



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102333867 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 14

(21) 申请号 200980157412. 3

(22) 申请日 2009. 12. 17

(30) 优先权数据

2008-327358 2008. 12. 24 JP

61/145, 912 2009. 01. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/006944 2009. 12. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/073551 EN 2010. 07. 01

(73) 专利权人 肿瘤疗法科学股份有限公司

地址 日本神奈川县

(72) 发明人 角田卓也 大泽龙司 吉村祥子

渡边朝久

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.

C12N 15/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1379041 A, 2002. 11. 13, 权利要求 1.

CN 1849395 A, 2006. 10. 18, 全文.

CN 101151280 A, 2008. 03. 26, 全文.

CN 101139392 A, 2008. 03. 12, 权利要求 1.

WO 9744667 A2, 1997. 11. 27, 权利要求 1、2.

WO 2008081581 A1, 2008. 07. 10, 权利要求 1.

Ross DT et al.. NCBI GDS1761. 《NCBI DATASET BROWSER》. 2004, 全文.

Mecham BH et al.. NCBI GDS823. 《NCBI DATASET BROWSER》. 2004, 全文.

Irigoyen M et al.. NCBI GDS2902. 《NCBI DATASET BROWSER》. 2007, 全文.

Strausberg, R. L. et al.. Chromosome 1 open reading frame 59 [Homo. 《Genbank》. 2006, 1-4.

审查员 汪未申

权利要求书1页 说明书31页

序列表12页 附图8页

(54) 发明名称

C10RF59 肽及包含它的疫苗

(57) 摘要

本发明提供了分离的具有氨基酸序列 SEQ ID NO :43 的肽或其免疫学活性片段, 其结合 HLA 抗原且具有细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 诱导能力。本发明进一步提供了对上述肽或片段包括 1、2、或几处氨基酸插入、替换或添加, 但仍具有细胞毒性 T 细胞诱导能力的肽。进一步提供了编码任何这些上述肽的核酸以及包括任何上述肽或核酸的药物制剂和药物组合物。本发明的肽、核酸、药物制剂和药物组合物可用于治疗癌症或肿瘤。

1. 下述 (a) 或 (b) 的分离的肽：
 - (a) 由 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成的分离的肽；
 - (b) 由 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成，其中替换 1 个或 2 个氨基酸的分离的肽，其中该肽结合 HLA-A02 并具有 CTL 诱导能力，其中所述替换选自：
 - (i) 自 N 端起的第二个氨基酸替换为甲硫氨酸或亮氨酸，和
 - (ii) C 端氨基酸替换为缬氨酸或亮氨酸。
2. 一种分离的多核苷酸，其编码权利要求 1 的肽。
3. 一种用于诱导 CTL 的作用剂，其中所述作用剂包含一种或多种权利要求 1 的肽或者一种或多种权利要求 2 的多核苷酸。
4. 一种用于治疗 / 或预防癌症和 / 或防止其手术后复发的药剂，其中该药剂包含一种或多种权利要求 1 的肽，或一种或多种权利要求 2 的多核苷酸。
5. 权利要求 4 的药剂，其配制为用于对 HLA 抗原为 HLA-A02 的受试者施用。
6. 权利要求 4 或 5 的药剂，其配制为用于治疗癌症。
7. 一种用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞 (APC) 的体外方法，其中该方法包括下面的两个步骤之一：
 - (a) 在体外使 APC 接触权利要求 1 的肽；和
 - (b) 将编码权利要求 1 的肽的多核苷酸导入 APC。
8. 一种用于诱导 CTL 的体外方法，其通过包括至少一个下述步骤的任何方法来进行：
 - (a) 将 CD8- 阳性 T 细胞与在其表面上呈递 HLA-A02 与权利要求 1 的肽的复合物的 APC 共培养；
 - (b) 将 CD8- 阳性 T 细胞与在其表面上呈递 HLA-A02 与权利要求 1 的肽的复合物的外来体共培养；和
 - (c) 将包含编码结合权利要求 1 的肽的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸的基因导入 T 细胞。
9. 一种分离的 APC，其在其表面上呈递 HLA-A02 与权利要求 1 的肽的复合物。
10. 权利要求 9 的 APC，其是通过权利要求 7 的方法诱导的。
11. 一种分离的 CTL，其靶向权利要求 1 的肽。
12. 权利要求 11 的 CTL，其是通过权利要求 8 的方法诱导的。
13. 权利要求 1 的肽或编码所述肽的多核苷酸在制备用于诱导针对癌症的免疫应答的药剂中的用途。
14. 权利要求 1 的肽在制备用于诱导抗原呈递细胞的药物组合物中的用途。
15. 权利要求 1 的肽在制备用于诱导 CTL 的药物组合物中的用途。

C10RF59 肽及包含它的疫苗

技术领域

[0001] 本申请要求 2008 年 12 月 24 日提交的日本专利申请 2008-327358 和 2009 年 1 月 20 日提交的美国临时申请 No. 61/145,912 的权益,通过述及将其全部内容收入本文。

[0002] 本发明涉及生物科学领域,更具体的说是癌症治疗领域。具体而言,本发明涉及新的肽(它们作为癌症疫苗极其有效)和用于治疗 and 预防肿瘤的药物。

背景技术

[0003] 已经证明,CD8 阳性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 可识别主要组织相容性复合物 (MHC) I 类分子上的肿瘤相关抗原 (TAA) 所衍生的表位肽,然后杀死肿瘤细胞。从 TAA 的第一个例子——黑素瘤抗原 (MAGE) 家族被发现起,人们主要通过免疫学手段 (NPL 1:Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2):177-80; NPL 2:Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3):725-9) 已经发现了许多其它 TAA。这些 TAA 中的一些目前正在作为免疫治疗靶标接受临床开发。

[0004] 能够诱导强力且特异性的抗肿瘤免疫应答的新 TAA 的鉴定保证了针对各种类型癌症的肽疫苗接种策略的临床应用的进一步开发 (NPL 3:Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20):1442-55; NPL 4:Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13):3134-42; NPL 5:Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21):5554-9; NPL 6:van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9):3308-14; NPL 7:Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20):4465-8; NPL 8:Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2):169-72; NPL 9:Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):459-66; NPL 10:Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):387-94)。迄今为止,已经有数项使用这些肿瘤相关抗原衍生的肽进行试验的临床报告 (NPL 11:Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20):4169-80; NPL 12:Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188:33-42; NPL 13:Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9):909-15)。

[0005] 哺乳动物基因收集项目 (MGC) 已经通过 cDNA 文库筛选鉴定了染色体 1 可读框 59 (C1orf59) (NPL 14:MGC Program Team, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24; 99(26):16899-903)。然而,尚未证实 C1orf59 是否可作为靶物用于针对肿瘤患者的癌症免疫疗法。

[0006] 引用表

[0007] 专利文献

[0008] [NPL 1]Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2):177-80

[0009] [NPL 2]Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3):725-9

[0010] [NPL 3]Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20):1442-55

[0011] [NPL 4]Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13):3134-42

[0012] [NPL 5]Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21):5554-9

[0013] [NPL 6]van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9):3308-14

- [0014] [NPL 7]Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20) :4465-8
- [0015] [NPL 8]Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2) :169-72
- [0016] [NPL 9]Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3) :459-66
- [0017] [NPL 10]Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3) :387-94
- [0018] [NPL 11]Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20) :4169-80
- [0019] [NPL 12]Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188 :33-42
- [0020] [NPL 13]Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9) :909-15
- [0021] [NPL 14]MGC Program Team, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24 ;99(26) : 16899-903

发明内容

[0022] 本发明部分地基于合适的免疫治疗靶标的发现。由于 TAA 一般被免疫系统察觉为“自身”并因此往往没有免疫原性，合适的靶标的发现是极为重要的。如上所述，Clorf59 (SEQ ID NO :43, 其由 GenBank 登录号 NM_144584 (SEQ ID NO :42) 编码) 已经被鉴定为在癌症诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和小细胞肺癌 (SCLC) 的组织中上调。因此，Clorf59 是免疫疗法的候选靶标。

[0023] 本发明至少部分基于 Clorf59 的拥有诱导对 Clorf59 特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的能力的特定表位肽的鉴定。如下文详细讨论的，使用自 Clorf59 衍生的 HLA-A*0201 或 A*2402 结合候选肽刺激从健康供体获得的外周血单个核细胞 (PBMC)。然后建立了具有针对经每一种候选肽刺激的 HLA-A02 或 A24 阳性靶细胞的特异性细胞毒性的 CTL 系。这些结果证明，这些肽是能诱导针对表达 Clorf59 的细胞的强力且特异性的免疫应答的 HLA-A02 或 A24 限制表位肽。这些结果指明，Clorf59 具有强免疫原性，而且它的表位是肿瘤免疫疗法的有效靶标。

[0024] 因此，本发明的一个目的是提供自 Clorf59 (SEQ ID NO :43) 衍生的分离的肽或其免疫学活性片段，其能结合 HLA 抗原。本发明肽预期具有 CTL 诱导能力。它们可用于离体诱导 CTL 或可施用于受试者以诱导针对癌症诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC 的免疫应答。优选地，所述肽是九肽或十肽，且典型地，由选自 SEQ ID NO :1、3、4、7、9、13、15、17、20、26、32、34、40 和 41 的氨基酸序列组成，显示强的 CTL 诱导能力。

[0025] 本发明涵盖经过修饰的肽，其具有 SEQ ID NO :1、3、4、7、9、13、15、17、20、26、32、34、40 和 41 的氨基酸序列，其中替换或添加了 1 个、2 个或更多个氨基酸，只要所述经修饰肽保留原始的 CTL 诱导能力。

[0026] 另外，本发明提供了分离的编码任何本发明肽的多核苷酸。这些多核苷酸可用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原表达细胞 (APC) 或可施用于受试者以诱导针对癌症以及本发明肽的免疫应答。

[0027] 当被施用于受试者时，本发明的肽被呈递于 APC 的表面上，然后诱导出靶向相应肽的 CTL。因此，本发明的一个方面是提供包括任何本发明肽或多核苷酸的作用剂，其用于诱导 CTL。另外，包括任何所述肽或多核苷酸的作用剂可用于治疗和 / 或预防癌症，诸如

膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC, 和 / 或防范它们的手术后复发。因此, 本发明的另一个目的是提供用于治疗 / 或预防癌症, 和 / 或用于防范它们的手术后复发的药剂, 其包括任何本发明肽或多核苷酸。作为本发明肽或多核苷酸的替换或除本发明的肽或多核苷酸之外, 本发明的作用剂或药剂可包括呈递任何本发明肽的 APC 或外来体作为活性组分。

[0028] 本发明的肽或多核苷酸可用于诱导在其表面上呈递 HLA 抗原与本发明肽的复合物的 APC, 例如通过使源自受试者的 APC 接触本发明肽或将编码本发明肽的多核苷酸导入 APC。此类 APC 具有针对靶肽的高 CTL 诱导能力且可用于癌症免疫疗法。因此, 本发明的另一个目的是提供用于诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 以及通过所述方法可获得的 APC 的方法。

[0029] 本发明的另一个目的是提供用于诱导 CTL 的方法, 其包括共培养 CD8⁺ 阳性 T 细胞与在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体的步骤或导入包括编码能够结合本发明肽的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位的多核苷酸的基因的步骤。可通过本发明方法获得的 CTL 也可用于治疗 / 或预防 C1orf59 过表达的癌症, 诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC。因此, 本发明的另一个目的是提供可通过本发明方法获得的 CTL。

[0030] 此外, 本发明的另一个目的是提供用于诱导针对癌症的免疫应答的方法, 该方法包括施用含有 C1orf59 或其免疫学活性片段、编码 C1orf59 或其片段的多核苷酸、或呈递 C1orf59 或其片段的外来体或 APC 的作用剂或组合物的步骤。

[0031] 本发明还可应用于任何涉及 C1orf59 过表达的疾病, 包括癌症, 诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC。

[0032] 应当理解前面的发明内容和下面的详细描述均为示例性的实施方案, 并不对本发明或本发明的其他可替换实施方案构成限制。

[0033] 附图简述

[0034] 本领域技术人员在考虑了下文的附图简要说明及对本发明及其优选实施方案的详细说明后将清楚地得知本发明的各个方面的应用:

[0035] 图 1 包括一系列照片, (a) 至 (j), 显示对用 C1orf59 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。用 C1orf59-A02-9-261 (SEQ ID NO:1) 刺激的 6 号孔 (a)、用 C1orf59-A02-9-152 (SEQ ID NO:3) 刺激的 2 号和 7 号孔 (b)、用 C1orf59-A02-9-121 (SEQ ID NO:4) 刺激的 4 号和 6 号孔 (c)、用 C1orf59-A02-9-122 (SEQ ID NO:7) 刺激的 3 号孔 (d)、用 C1orf59-A02-10-240 (SEQ ID NO:9) 刺激的 5 号孔 (e)、用 C1orf59-A02-10-90 (SEQ ID NO:13) 刺激的 4 号孔 (f)、用 C1orf59-A02-10-188 (SEQ ID NO:15) 刺激的 7 号孔 (g)、用 C1orf59-A02-10-122 (SEQ ID NO:17) 刺激的 4 号和 8 号孔 (h)、和用 C1orf59-A02-10-196 (SEQ ID NO:20) 刺激的 2 号孔 (i) 中的 CTL 分别显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。扩增用矩形框标示的孔中的细胞以建立 CTL 系。相反, 作为阴性数据的一种典型情况, 对用 C1orf59-A02-10-261 (SEQ ID NO:8) 刺激的 CTL 没有检测到特异性 IFN- γ 生成 (j)。在图中, “+” 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 “-” 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0036] 图 2 包括一系列线图, (a) 至 (e), 描绘用 IFN- γ ELISA 测定法得到的

用 Clorf59-A02-9-152 (SEQ ID NO :3) (a)、Clorf59-A02-9-121 (SEQ ID NO :4) (b)、Clorf59-A02-10-188 (SEQ ID NO :15) (c)、Clorf59-A02-10-122 (SEQ ID NO :17) (d)、和 Clorf59-A02-10-196 (SEQ ID NO :20) (e) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。通过用所有肽刺激而建立的 CTL 系均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0037] 图 3 描绘从经 Clorf59-A02-9-121 (SEQ ID NO :4) (a)、Clorf59-A02-10-188 (SEQ ID NO :15) (b) 和 Clorf59-A02-10-196 (SEQ ID NO :20) (c) 刺激的 CTL 系通过有限稀释建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。这里描绘的结果证明通过用每一种所述肽刺激而建立的 CTL 克隆与对照相比显示出强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对用适宜肽冲激过的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未用任何肽冲激过的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0038] 图 4 包括一系列线图, (a)-(c), 描绘针对外源表达 Clorf59 和 HLA-A*0201 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备用 HLA-A*0201 或用全长 Clorf59 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 Clorf59-A02-9-152 (SEQ ID NO :3) (a)、Clorf59-A02-9-121 (SEQ ID NO :4) (b) 和 Clorf59-A02-10-188 (SEQ ID NO :15) (c) 建立的 CTL 系显示针对用 Clorf59 和 HLA-A*0201 二者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性 (黑色菱形)。相反, 没有检测到显著的针对表达 HLA-A*0201 (三角形) 或 Clorf59 (圆形) 的靶细胞的特异性 CTL 活性。

[0039] 图 5 描绘的照片显示对用 Clorf59 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。用 Clorf59-A24-9-221 (SEQ ID NO :26) 刺激的 5 号孔 (a)、用 Clorf59-A24-9-66 (SEQ ID NO :32) 刺激的 3 号孔 (b)、用 Clorf59-A24-9-200 (SEQ ID NO :34) 刺激的 4 号孔 (c)、用 Clorf59-A24-10-124 (SEQ ID NO :40) 刺激的 5 号孔 (d) 和用 Clorf59-A24-10-363 (SEQ ID NO :41) 刺激的 7 号孔 (e) 中的 CTL 分别显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。这些图片的孔上的方框表示扩增来自相应孔的细胞以建立 CTL 系。在图中, " + " 指示该孔中的细胞经适宜肽冲激, 而 " - " 指示该细胞未经该肽冲激。

[0040] 图 6 描绘的线图显示用 ELISA 测定法得到的用 Clorf59-A24-9-221 (SEQ ID NO :26) (a)、Clorf59-A24-9-66 (SEQ ID NO :32) (b)、Clorf59-A24-9-200 (SEQ ID NO :34) (c)、Clorf59-A24-10-124 (SEQ ID NO :40) (d) 和 Clorf59-A24-10-363 (SEQ ID NO :41) (e) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。其证明通过用所有肽刺激而建立的 CTL 系均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示该细胞经适宜肽冲激, 而 " - " 指示该细胞未经任何肽冲激。

[0041] 图 7 显示从经 Clorf59-A24-9-221 (SEQ ID NO :26) (a 和 b)、Clorf59-A24-9-66 (SEQ ID NO :32) (c)、Clorf59-A24-9-200 (SEQ ID NO :34) (d)、Clorf59-A24-10-124 (SEQ ID NO :40) (e) 和 Clorf59-A24-10-363 (SEQ ID NO :41) (f) 刺激的 CTL 系通过有限稀释建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。其证明通过用这些肽建立的 CTL 克隆与对照相比显示出强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示该细胞用 SEQ ID NO :26 (a 和 b)、SEQ ID NO :32 (c)、SEQ ID NO :34 (d)、SEQ ID NO :40 (e) 和 SEQ ID NO :41 (f) 冲激过, 而 " - " 指示该细胞未用任何肽冲激过。

[0042] 图 8 描绘线图, 显示针对表达 Clorf59 和 HLA-A*2402 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备只用 HLA-A*2402 或只用全长 Clorf59 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 Clorf59-A24-9-221 (SEQ ID NO :26) 建立的 CTL 克隆显示针对用 Clorf59 和 HLA-A*2402 二

者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性（黑色菱形）。另一方面，没有检测到显著的针对表达 HLA-A*2402（三角形）或 Clorf59（圆形）的靶细胞的特异性 CTL 活性。

[0043] 实施方案的描述

[0044] 现在描述优选的方法、装置、和材料，不过在实施或检验本发明的实施方案时可使用与本文中描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料。然而，在描述本发明材料和方法之前，要理解本发明不限于特定大小、性状、尺度、材料、方法、方案等，因为它们可因循例行实验和优化而变化。还要理解，所述描述中使用的术语只是出于描述特定样式或实施方案的目的，而非意图限制本发明的范围，本发明的范围只会由所附权利要求来限制。

[0045] 通过提述明确地将本说明书中提到的每一篇出版物、专利或专利申请的公开文本完整收入本文。然而，本文中无一处可解释为承认本发明没有资格凭借发明在先而早于此类公开文本。

[0046] 如果有冲突，以本说明书（包括定义）为准。此外，材料、方法和实例仅为举例说明而不构成限制。

[0047] I. 定义

[0048] 如本文中使用的，词语“一个 / 种”、“该”、和“所述”意味着“至少一个 / 种”，除非另有明确说明。

[0049] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是经过修饰的残基或非天然存在型残基（诸如相应的天然存在型氨基酸的人工化学模拟物）的氨基酸聚合物，以及天然存在型氨基酸聚合物。

[0050] 如本文中使用的，术语“氨基酸”指天然存在型和合成型氨基酸，以及与天然存在型氨基酸相似地发挥功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。氨基酸可以是 L- 氨基酸或 D- 氨基酸任一。天然存在型氨基酸指由遗传密码编码的氨基酸，以及在细胞中在翻译后被修饰的氨基酸（例如羟脯氨酸、 γ - 羧基谷氨酸、和 O- 磷酸丝氨酸）。短语“氨基酸类似物”指与天然存在型氨基酸具有相同的基础化学结构（ α 碳与氢、羧基、氨基、和 R 基团结合）但具有经过修饰的 R 基团或经过修饰的主链的化合物（例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫）。短语“氨基酸模拟物”指与具有与一般氨基酸不同的结构但发挥与一般氨基酸相似的功能的化学化合物。

[0051] 氨基酸在本文中可以通过它们公知的三字母符号或 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。

[0052] 术语“基因”、“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用，而且除非另有明确说明与氨基酸类似地通过它们普遍接受的单字母代码来指称。

[0053] 除非另有定义，术语“癌症”指过表达 Clorf59 基因的癌症，它的实例包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和小细胞肺癌（SCLC）。

[0054] 除非另有定义，术语“细胞毒性 T 淋巴细胞”、“细胞毒性 T 细胞”和“CTL”在本文中可互换使用，而且除非另有明确说明，指能够识别非自身细胞（例如肿瘤细胞、病毒感染的细胞）并诱导此类细胞死亡的 T 淋巴细胞亚群。

[0055] 除非另有定义，术语“HLA-A02”指包含诸如 HLA-A0201 或 HLA-A0206 等亚型的

HLA-A2 类型。

[0056] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员的普遍理解相同的含义。

[0057] II. 肽

[0058] 为了证明衍生自 Clorf59 的肽发挥被 CTL 所识别的抗原的功能,对衍生自 Clorf59 (SEQ ID NO:43) 的肽进行了分析以确定它们是否为 HLA-A02 或 A24 限制性的抗原表位,HLA-A2 (A*0201) 是经常遇到的 HLA 等位基因 (Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101,1996;Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12,1995;Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24,1994)。基于它们对 HLA-A02 的结合亲和力,鉴定了衍生自 Clorf59 的 HLA-A02 结合肽的候选者。下述肽是候选肽:

[0059] Clorf59-A02-9-261 (SEQ ID NO:1),

[0060] Clorf59-A02-9-333 (SEQ ID NO:2),

[0061] Clorf59-A02-9-152 (SEQ ID NO:3),

[0062] Clorf59-A02-9-121 (SEQ ID NO:4),

[0063] Clorf59-A02-9-271 (SEQ ID NO:5),

[0064] Clorf59-A02-9-63 (SEQ ID NO:6),

[0065] Clorf59-A02-9-122 (SEQ ID NO:7),

[0066] Clorf59-A02-10-240 (SEQ ID NO:9),

[0067] Clorf59-A02-10-260 (SEQ ID NO:10),

[0068] Clorf59-A02-10-270 (SEQ ID NO:11),

[0069] Clorf59-A02-10-346 (SEQ ID NO:12),

[0070] Clorf59-A02-10-90 (SEQ ID NO:13),

[0071] Clorf59-A02-10-334 (SEQ ID NO:14),

[0072] Clorf59-A02-10-188 (SEQ ID NO:15),

[0073] Clorf59-A02-10-121 (SEQ ID NO:16),

[0074] Clorf59-A02-10-122 (SEQ ID NO:17),

[0075] Clorf59-A02-10-30 (SEQ ID NO:18),

[0076] Clorf59-A02-10-183 (SEQ ID NO:19),

[0077] Clorf59-A02-10-196 (SEQ ID NO:20),

[0078] Clorf59-A02-10-10 (SEQ ID NO:21),

[0079] Clorf59-A02-10-66 (SEQ ID NO:22),

[0080] Clorf59-A02-10-326 (SEQ ID NO:23),和

[0081] Clorf59-A02-10-252 (SEQ ID NO:24)。

[0082] 用加载了这些肽的树突细胞 (DC) 体外刺激 T 细胞后,使用下述每个肽,成功地建立了 CTL:

[0083] Clorf59-A02-9-261 (SEQ ID NO:1),

[0084] Clorf59-A02-9-152 (SEQ ID NO:3),

[0085] Clorf59-A02-9-121 (SEQ ID NO:4),

[0086] Clorf59-A02-9-122 (SEQ ID NO:7),

[0087] Clorf59-A02-10-240 (SEQ ID NO :9),

[0088] Clorf59-A02-10-90 (SEQ ID NO :13),

[0089] Clorf59-A02-10-188 (SEQ ID NO :15),

[0090] Clorf59-A02-10-122 (SEQ ID NO :17), 和

[0091] Clorf59-A02-10-196 (SEQ ID NO :20)。

[0092] 基于它们对 HLA-A24 的结合亲和力, 鉴定了衍生自 Clorf59 的 HLA-A24 结合肽的候选者。下述肽是候选肽:

[0093] Clorf59-A24-9-385-25 (SEQ ID NO :25),

[0094] Clorf59-A24-9-221-26 (SEQ ID NO :26),

[0095] Clorf59-A24-9-338-27 (SEQ ID NO :27),

[0096] Clorf59-A24-9-339-28 (SEQ ID NO :28),

[0097] Clorf59-A24-9-182-29 (SEQ ID NO :29),

[0098] Clorf59-A24-9-35-30 (SEQ ID NO :30),

[0099] Clorf59-A24-9-253-31 (SEQ ID NO :31),

[0100] Clorf59-A24-9-66-32 (SEQ ID NO :32),

[0101] Clorf59-A24-9-145-33 (SEQ ID NO :33),

[0102] Clorf59-A24-9-200-34 (SEQ ID NO :34),

[0103] Clorf59-A24-9-257-35 (SEQ ID NO :35),

[0104] Clorf59-A24-9-144-36 (SEQ ID NO :36),

[0105] Clorf59-A24-9-151-37 (SEQ ID NO :37),

[0106] Clorf59-A24-9-338-38 (SEQ ID NO :38),

[0107] Clorf59-A24-9-97-39 (SEQ ID NO :39),

[0108] Clorf59-A24-9-124-40 (SEQ ID NO :40), 和

[0109] Clorf59-A24-9-363-41 (SEQ ID NO :41)。

[0110] 用加载了这些肽的树突细胞 (DC) 体外刺激 T 细胞后, 使用每个下述肽, 成功地建立了 CTL:

[0111] Clorf59-A24-9-221-26 (SEQ ID NO :26),

[0112] Clorf59-A24-9-66-32 (SEQ ID NO :32),

[0113] Clorf59-A24-9-200-34 (SEQ ID NO :34),

[0114] Clorf59-A24-9-124-40 (SEQ ID NO :40), 和

[0115] Clorf59-A24-9-363-41 (SEQ ID NO :41)。

[0116] 这些建立的 CTL 针对经相应肽冲激的靶细胞显示强且特异性的 CTL 活性。本文中的这些结果证明 Clorf59 是被 CTL 识别的抗原, 且这些肽是 Clorf59 的受 HLA-A02 或 A24 限制的表位肽。

[0117] 由于 Clorf59 基因在诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC 的癌细胞中过表达且在大多数正常器官中不表达, 它是良好的免疫治疗靶标。因此, 本发明提供对应于 Clorf59 的被 CTL 识别的表位的九肽 (由九个氨基酸残基组成的肽) 和十肽 (由十个氨基酸残基组成的肽)。本发明的九肽和十肽的优选例子包括那些由选自 SEQ ID NO :1、3、4、7、9、13、15、17、20、26、32、34、40 和 41

的氨基酸序列组成的肽。

[0118] 一般而言,目前可以通过互联网访问的软件程序,如Parker KC et al.,J Immunol 1994 Jan 1,152(1):163-75 等中描述的那些,可以用来在计算机上计算不同肽与HLA抗原之间的结合亲和力。与HLA抗原的结合亲和力可以按照例如Parker KC et al.,J Immunol 1994Jan 1,152(1):163-75和Kuzushima K et al.,Blood 2001,98(6):1872-81中描述的那样进行测定。用于测定结合亲和力的方法在例如Journal of Immunological Methods, 1995,185:181-190.;Protein Science,2000,9:1838-1846中有描述。因此,可使用此类软件程序来选择与HLA抗原具有高结合亲和力的自Clorf59衍生的免疫学活性片段。因此,本发明涵盖由使用这些已知程序鉴定的可与HLA抗原结合的Clorf59衍生的任何免疫学活性片段组成的肽。本发明的肽可以是由全长Clorf59组成的肽。

[0119] 本发明的这些肽的侧翼可以具有额外的氨基酸残基,只要所得的肽保持其CTL诱导能力即可。本发明肽的侧翼的氨基酸序列可以由任何种类的氨基酸构成,只要它们不损害原来的肽的CTL诱导能力。因此,本发明涵盖包括自Clorf59衍生的肽且具有对HLA抗原的结合亲和力的肽。这样的肽典型地少于约40个氨基酸,经常少于约20个氨基酸,通常少于约15个氨基酸。

[0120] 一般而言,肽中一个、两个、或更多个氨基酸的修饰不会影响肽的功能,而且在有些情况下甚至会增强原始蛋白质的期望功能。事实上,已知有经过修饰的肽(即由与原始参照序列相比其中修饰(即替换、删除、添加或插入)一个、两个或数个氨基酸残基的氨基酸序列构成的肽)保留原始肽的生物学活性(Mark et al.,Proc Natl Acad Sci USA 1984,81:5662-6;Zoller and Smith,Nucleic Acids Res 1982,10:6487-500;Dalbadie-McFarland et al.,Proc Natl Acad Sci USA 1982,79:6409-13)。因此,在一个实施方案中,本发明的肽可既具有CTL诱导能力,又具有选自SEQ ID NO:1、3、4、7、9、13、15、17、20、26、32、34、40和41的氨基酸序列中添加、插入和/或替换一个、两个或甚至更多个氨基酸而得到的氨基酸序列。

[0121] 本领域技术人员认可,改变氨基酸序列中的单个氨基酸或少数百分比氨基酸的个别添加或替换往往会导致原始氨基酸序列的特性得以保留。因此,它们经常称作“保守替换”或“保守修饰”,其中对蛋白质的改变导致具有与原始蛋白质类似的功能的修饰蛋白质。提供功能上相似的氨基酸的保守替换表是本领域公知的。期望保留的氨基酸侧链特征的例子包括例如疏水性氨基酸(A,I,L,M,F,P,W,Y,V)、亲水性氨基酸(R,D,N,C,E,Q,G,H,K,S,T)、和具有下面的共同官能团或特征的侧链:脂肪族侧链(G,A,V,L,I,P);含羟基侧链(S,T,Y);含硫原子侧链(C,M);含羧酸和酰胺侧链(D,N,E,Q);含碱侧链(R,K,H);和含芳香族侧链(H,F,Y,W)。另外,下面的八组各自含有本领域公认互为保守替换的氨基酸:

[0122] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0123] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0124] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0125] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0126] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0127] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0128] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0129] 8) 半胱氨酸 (C), 甲硫氨酸 (M) (参见例如 Creighton, Proteins 1984)。

[0130] 此类保守修饰肽也被视为本发明的肽。然而, 本发明的肽不限于此, 可包括非保守修饰, 只要该修饰的肽保留原始肽的 CTL 诱导能力。另外, 经过修饰的肽不应排除 Clorf59 的多态变体、种间同源物、和等位基因中的可诱导 CTL 的肽。

[0131] 为了保持所需的 CTL 诱导能力, 可以修饰 (插入、删除、添加和 / 或替换) 少数 (例如, 1 个、2 个或数个) 或小百分比的氨基酸。这里, 术语“数个”意指 5 个或更少的氨基酸, 如 4 个、3 个或更少。要被修饰的氨基酸的百分比优选为 20% 以下, 更优选 15% 以下, 甚至更优选 10% 以下或 1-5%。

[0132] 此外, 可对本发明的肽插入、替换或添加氨基酸残基或者可删除氨基酸残基以实现更高的结合亲和力。当在免疫疗法的语境中使用, 本发明的肽应呈递在细胞或外来体的表面上, 优选作为与 HLA 抗原的复合物。除了天然被展示的肽之外, 由于已经知道通过结合 HLA 抗原而被展示的肽的序列规律 (J Immunol 1994, 152 :3913 ; Immunogenetics 1995, 41 :178 ; J Immunol 1994, 155 :4307), 可将基于此类规律的修饰引入本发明的免疫原性肽。例如, 可能希望进行替换, 将自 N 端起的第二个氨基酸替换为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸替换, 和 / 或将位于 C 端的氨基酸替换为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、或甲硫氨酸, 以提高 HLA-A24 结合。因此, 具有选自 SEQ ID NO :26、32、34、40 和 41 的氨基酸序列, 其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列中自 N 端起第二个氨基酸被替换为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸和肽, 和 / 或其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列中位于 C 端的氨基酸被替换为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、或甲硫氨酸的肽涵盖在本发明之内。另一方面, 拥有高 HLA-A02 结合亲和力的肽中自 N 端起的第二个氨基酸被替换为亮氨酸或甲硫氨酸, 且位于 C 端的氨基酸被替换为缬氨酸或亮氨酸。因此, 具有 SEQ ID NO :1、3、4、7、9、13、15、17 和 20 的氨基酸序列, 其中自 N 端起第二个氨基酸被替换为亮氨酸或甲硫氨酸和 / 或其中位于 C 端的氨基酸被替换为缬氨酸或亮氨酸的肽涵盖在本发明之内。不仅可以在肽的末端氨基酸处引入替换, 而且可以在潜在的 T 细胞受体 (TCR) 识别位置处引入替换。数项研究证明了具有氨基酸替换的肽可等同于或好于原来, 例如 CAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎、Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ 或 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1 ; 168 (3) :1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52 :199-206 及 S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

[0133] 本发明还考虑向所述肽的 N 和 / 或 C 端添加一个、两个或数个氨基酸。此类具有高 HLA 抗原结合亲和力且保留 CTL 诱导能力的修饰肽也包含在本发明之内。

[0134] 然而, 当肽序列与具有不同功能的内源或外源蛋白质的氨基酸序列的一部分相同时, 可能诱导副作用, 诸如自身免疫性病症和 / 或针对特定物质的变应性症状。因此, 优选的是, 首先利用可得的数据库实施同源性搜索, 以避免肽的序列与另一种蛋白质的氨基酸序列匹配的情况。当根据同源性搜索清楚了即使与目标肽相比差 1 个或 2 个氨基酸的肽亦不存在时, 可以修饰目标肽以提高其与 HLA 抗原的结合亲和力, 和 / 或提高其 CTL 诱导能力, 而没有任何发生此类副作用的危险。

[0135] 虽然预期如上所述的对 HLA 抗原具有高结合亲和力的肽是高度有效的, 但还是对根据高结合亲和力的存在为指标选出的候选肽检查了 CTL 诱导能力的存在。这里, 短语

“CTL 诱导能力”指肽被呈递到抗原呈递细胞 (APC) 上时诱导 CTL 的能力。另外,“CTL 诱导能力”包括肽诱导 CTL 活化、CTL 增殖、促进 CTL 溶解靶细胞、和提高 CTL IFN- γ 生成的能力。

[0136] CTL 诱导能力的确认如下来实现,诱导携带人 MHC 抗原的 APC (例如 B- 淋巴细胞、巨噬细胞、和树突细胞 (DC)), 或者更具体地说,衍生自人外周血单核白细胞的 DC, 并且在用肽诱导后,与 CD8 阳性细胞混合,然后测量由 CTL 针对靶细胞生成和释放的 IFN- γ 。作为反应系统,可使用已经制成的表达人 HLA 抗原的转基因动物 (例如 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8) : 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice :dependence on HLA class II restricted T(H) response 中描述的那些)。例如,可以用 ^{51}Cr 等放射性标记靶细胞,并且可以自靶细胞释放的放射性计算细胞毒性活性。或者,CTL 诱导能力可以如下评估:测量在携带固定化肽的 APC 存在下由 CTL 生成和释放的 IFN- γ , 并使用抗 IFN- γ 单克隆抗体显现培养基上的抑制区。

[0137] 作为如上所述检查肽的 CTL 诱导能力的结果,发现选自由 SEQ ID NO :1、3、4、7、9、13、15、17、20、26、32、34、40 和 41 所示的氨基酸序列组成的肽的九肽或十肽显示特别高的 CTL 诱导能力以及对 HLA 抗原的高亲和力。因此,例举这些肽为本发明优选的实施方案。

[0138] 另外,同源性分析的结果显示了那些肽与自任何其它已知人基因产物衍生的肽没有显著的同源性。这降低了用于免疫疗法时未知的或不想要的免疫应答的可能性。因此,也是根据这个方面,这些肽可用于在癌症患者中引发针对 Clorf59 的免疫力。因此,本发明的肽,优选由选自 SEQ ID NO :1、3、4、7、9、13、15、17、20、26、32、34、40 和 41 的氨基酸序列组成的肽。

[0139] 除上文讨论的对本发明肽的修饰之外,可将所述肽进一步连接至其它物质,只要它们保留原始肽的 CTL 诱导能力。例示性的物质包括:肽、脂质、糖和糖链、乙酰基、天然的和合成的聚合物等。本发明肽可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、和 / 或磷酸化,只要该修饰不破坏原始肽的生物学活性。这些种类的修饰可赋予额外的功能 (例如靶向功能和投递功能) 和 / 或使肽稳定。

[0140] 例如,为了提高多肽的体内稳定性,本领域已知引入 D- 氨基酸、氨基酸模拟物或非天然氨基酸;此构思也可适用于本发明多肽。可以以多种方式测定多肽的稳定性。例如,可使用肽酶和各种生物学介质 (诸如人血浆和血清) 来测试稳定性 (参见例如 Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11 :291-302)。

[0141] 本文中,本发明的肽也可以记为“Clorf59 肽”或“Clorf59 多肽”。

[0142] III. Clorf59 肽的制备

[0143] 本发明的肽可使用公知技术来制备。例如,肽可以通过合成、使用重组 DNA 技术或化学合成来制备。本发明的肽可个别地合成,或合成为由两个或更多个肽构成的较长多肽。然后可以分离,即纯化或分离所述肽,使其基本上不含其它天然存在的宿主细胞蛋白质及其片段或任何其它化学物质。

[0144] 可以根据选定的氨基酸序列,借助化学合成来获得本发明的肽。可适用于合成的常规肽合成法的例子包括但不限于:

- [0145] (i)Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ;
- [0146] (ii)The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976 ;
- [0147] (iii)Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co. , 1975 ;
- [0148] (iv)Basics and Experiment of Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co. , 1985 ;
- [0149] (v)Development of Pharmaceuticals(second volume)(in Japanese), Vol. 14(peptide synthesis), Hirokawa, 1991 ;
- [0150] (vi)W099/67288 ;和
- [0151] (vii)Barany G. & Merrifield R. B. , Peptides Vol. 2, " Solid Phase Peptide Synthesis" , Academic Press, New York, 1980, 100-118。

[0152] 或者,可应用任何已知的遗传工程肽生产方法来获得本发明的肽(例如 Morrison J, J Bacteriology 1977, 132 :349-51 ;Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(eds. Wu et al.) 1983, 101 :347-62)。例如,首先,制备包含处于可表达形式(例如处于相当于启动子序列的调节序列下游)的编码目标肽的多核苷酸的合适载体,并转移入合适宿主细胞。然后培养宿主细胞以生成感兴趣的肽。也可以适用体外翻译系统在体外生产肽。

[0153] IV. 多核苷酸

[0154] 本发明还提供编码任何上述本发明肽的多核苷酸。这些包括由天然存在型 Clorf59 基因 (GenBank Accession No. NM_144584 (SEQ ID NO :42)) 衍生的多核苷酸以及具有它们的经过保守修饰的核苷酸序列的多核苷酸。在本文中,短语“经过保守修饰的核苷酸序列”指编码相同或本质上相同的氨基酸序列的序列。由于遗传密码的简并性,对于任何给定蛋白质都有极其多种功能上相同的核酸来编码它。例如,密码子 GCA、GCC、GCG、和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在任何由密码子规定为丙氨酸的位置处,该密码子均可改变成任何相应的密码子,而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,是保守修饰变异的一种。本文中编码肽的每一种核酸序列也涵盖该核酸的每一种可能的沉默变异。本领域普通技术人员会认识到,可以修饰核酸中的每一个密码子 (AUG 和 TGG 除外, AUG 在正常情况下是甲硫氨酸的唯一密码子,而 TGG 在正常情况下是色氨酸的唯一密码子) 以产生功能上相同的分子。因而,每一种公开的序列均隐含涵盖了编码肽的核酸的每一种沉默变异。

[0155] 本发明的多核苷酸可以由 DNA、RNA、及其衍生物构成。DNA 由碱基诸如 A、T、C、和 G 合适地构成,而 T 在 RNA 中被 U 替换。

[0156] 本发明的多核苷酸可编码多个本发明肽,其中它们之间有或无居间氨基酸序列存在。例如,居间氨基酸序列可提供多核苷酸的或所翻译的肽的切割位点(例如酶识别序列)。另外,多核苷酸除编码本发明肽的编码序列以外还可包括任何额外的序列。例如,多核苷酸可以是包括表达肽所需要的调节序列的重组多核苷酸,或者可以是具有标志基因等等的表达载体(质粒)。一般而言,此类重组多核苷酸可通过常规重组技术操作多核苷酸来制备,例如通过使用聚合酶和内切核酸酶。

[0157] 重组和化学合成技术都可用来生成本发明的多核苷酸。例如,可以通过插入在转染入感受态细胞后能表达的适宜载体来生成多核苷酸。或者,可借助 PCR 技术或通过合适宿主中的表达来扩增多核苷酸(参见例如 Sambrook et al., Molecular Cloning :A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者,可使用固相技术来合成多核苷酸,如 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48 :2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3 :801-5 中记载的。

[0158] V. 外来体 (exosomes)

[0159] 本发明进一步提供了称作外来体的细胞内囊泡,这些外来体在它们的表面上呈递本发明肽与 HLA 抗原之间形成的复合物。外来体可以通过,例如在日本专利申请公报平 11-510507 和 W099/03499 中详细描述的方法来制备,并可以用从治疗和 / 或预防所针对的患者获得的 APC 制备。本发明的外来体可以作为疫苗以与本发明的肽相似的方式进行接种。

[0160] 复合物中包含的 HLA 抗原的类型必须与需要治疗和 / 或预防的受试者的类型匹配。例如,在日本人群中,HLA-A02 (特别是 A*0201 和还有 A*0206) 和 A24 (特别是 A*2402) 是普遍的且因此会适合于治疗日本人患者。使用在日本人和白种人中高表达的 A02 或 A24 型有利于获得有效的结果。典型的,在临床上,预先考察需要治疗的患者的 HLA 抗原类型,这样就能够合适地选择对特定抗原具有高水平的结合亲和力、或者具有藉由抗原呈递的 CTL 诱导能力的肽。此外,为了获得具有高结合亲和力和 CTL 诱导能力二者的肽,可以在天然存在的 Clorf59 部分肽的氨基酸序列的基础上进行 1 个、2 个或几个氨基酸的取代、插入和 / 或添加。

[0161] 当本发明的外来体使用 A02 型 HLA 抗原时,具有 SEQ ID NO :1、3、4、7、9、13、15、17 和 20 任一的序列的肽是有用的。或者,当本发明的外来体使用 A24 型 HLA 抗原时,具有 SEQ ID NO :26、32、34、40 和 41 任一的序列的肽是有用的。

[0162] VI. 抗原呈递细胞 (APC)

[0163] 本发明还提供在其表面上呈递在 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的分离的 APC。APC 可衍生自要进行治疗和 / 或预防的患者,而且可作为疫苗单独或与其它药物 (包括本发明的肽、外来体、或 CTL) 组合来施用。

[0164] APC 不限于特定种类的细胞,包括 DC、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞识别。由于 DC 是 APC 中具有最强 CTL 诱导作用的代表性 APC,DC 可以用作本发明的 APC。

[0165] 例如,可通过自外周血单核细胞诱导 DC,然后在体外、离体或在体内用本发明的肽接触 (刺激) 它们来获得本发明的 APC。当对受试者施用本发明的肽时,在受试者的身体中诱导出呈递本发明肽的 APC。因此,本发明的 APC 可通过将本发明的肽施用于受试者后自受试者收集 APC 来获得。或者,本发明的 APC 可通过使自受试者收集的 APC 接触本发明的肽来获得。

[0166] 本发明的 APC 可单独地或与其它药物 (包括本发明的肽、外来体或 CTL) 组合地施用于受试者以在受试者中诱导针对癌症的免疫应答。例如,离体施用可包括下述步骤:

[0167] a : 自第一受试者收集 APC ;

[0168] b : 使肽接触步骤 a 的 APC ; 并

[0169] c : 对第二受试者施用步骤 b 的 APC。

[0170] 第一受试者和第二受试者可以是同一个体,或者可以是不同个体。通过步骤 b 获得的 APC 可作为疫苗来施用,用于治疗和 / 或预防癌症,包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠

直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC。

[0171] 本发明还提供一种制备诱导 APC 的药物组合物的方法或工艺,其中所述方法包括将本发明的肽与药学可接受的载体混合或配制的步骤。

[0172] 依照本发明的一个方面,APC 具有高水平的 CTL 诱导能力。在术语“高水平的 CTL 诱导能力”中,高水平是相对于未与肽接触或与不能诱导 CTL 的肽接触的 APC 的该水平而言的。这样的具有高水平 CTL 诱导能力的 APC 可通过上文所述方法以及下述方法来制备,该方法包括在体外将编码本发明肽的多核苷酸转移至 APC 的步骤。所导入的基因可以是 DNA 或 RNA 的形式。用于进行导入的方法的例子包括但不限于本领域中常规实施的各种方法,诸如脂质体转染、电穿孔、和磷酸钙法。更具体的说,可以如 Cancer Res 1996, 56:5672-7;J Immunol 1998,161:5607-13;J Exp Med 1996,184:465-72;国际公开文本 No. 2000-509281 的已公开日文翻译中所述来实施。通过将基因转移入 APC,基因在细胞中经历转录、翻译、等等,然后得到的蛋白质被 MHC I 类或 II 类加工,并经由呈递途径呈递肽。

[0173] VII. 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)

[0174] 被诱导的针对任何本发明肽的 CTL 可在体内加强靶向癌细胞的免疫应答,并且因此可以以与肽本身相似的方式用作疫苗。因此,本发明还提供由任何本发明肽特异性诱导或活化的、分离的 CTL。

[0175] 此类 CTL 可通过下述步骤来获得:(1) 对受试者施用本发明的肽并从该受试者收集 CTL;(2) 在体外用本发明的肽接触(刺激)受试者衍生的 APC 和 CD8 阳性细胞、或外周血单个核白细胞,然后分离 CTL;(3) 在体外使 CD8-阳性细胞或外周血单个核白细胞接触在其表面上呈递 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的 APC 或外来体,然后分离 CTL;或(4) 将包括编码结合本发明的肽的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位的多核苷酸的基因导入 CTL。上述 APC 和外来体可通过上文记载的方法来制备,而且(4)之方法详述于下文“VIII. T 细胞受体 (TCR)”部分。

[0176] 可以从要进行治疗和/或预防的患者获取本发明的 CTL,而且可以将它们单独施用,或者与其它药物(包括本发明的肽或外来体)组合施用以实现调节效果的目的。所得到的 CTL 特异性针对呈递本发明的肽例如与用于诱导的肽相同的肽的靶细胞起作用。靶细胞可以是内源表达 Clorf59 的细胞,诸如癌细胞,或被 Clorf59 基因转染的细胞;而且因本发明的肽的刺激而在细胞表面上呈递该肽的细胞也可充当活化 CTL 攻击的靶标。

[0177] VIII. T 细胞受体 (TCR)

[0178] 本发明还提供包含编码能够形成 T 细胞受体 (TCR) 的亚单位的多肽的核酸的多核苷酸,及使用该组合物的方法。所述 TCR 亚单位具有形成赋予 T 细胞针对表达 Clorf59 的肿瘤细胞的特异性的 TCR 的能力。通过使用本领域已知的方法,可鉴定出编码用本发明的肽诱导的 CTL 携带的 TCR 亚基的 α 和 β 链的核酸序列 (WO2007/032255 及 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如,优选使用 PCR 方法来分析编码 TCR 亚单位的核酸序列。用于分析的 PCR 引物可以是但不限于例如作为 5' 侧引物的 5' -R 引物 (5' -gtctaccaggcattcgcttcac-3') (SEQ ID NO:44) 和作为 3' 侧引物的对 TCR α 链 C 区特异性的 3-TRa-C 引物 (5' -tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO:45)、对 TCR β 链 C1 区特异性的 3-TRb-C1 引物 (5' -tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO:46) 或对 TCR β 链 C2 区特异性的 3-TRbeta-C2 引物 (5' -ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ

ID NO:47)。衍生的 TCR 能以高亲合力结合展示 Clorf59 肽的靶细胞,且任选在体内和在体外介导有效率的对呈递 Clorf59 肽的靶细胞的杀伤。

[0179] 可以将编码 TCR 亚基的核酸掺入合适的载体,例如逆转录病毒载体。这些载体是本领域公知的。可使用本领域公知的方法将核酸或含有它们的载体转移入 T 细胞,例如来自患者的 T 细胞。有利的是,本发明提供一种即配即用型 (off-the-shelf) 组合物,其容许快速修饰患者自己的 T 细胞 (或其他哺乳动物的 T 细胞) 以快速且容易地生成具有卓越的癌细胞杀伤特性的修饰型 T 细胞。

[0180] 从用本发明的肽诱导的 CTL 分离的核酸编码的 TCR 能够特异性识别本发明肽与 HLA 分子之间形成的复合物,当 T 细胞的表面上携带该 TCR,可给予该 T 细胞针对靶细胞的特异性活性。此类特异性识别可通过任何已知方法来确认,而且优选的方法包括例如使用 HLA 分子和本发明肽进行的四聚物分析 (例如 Altman et al. Science. 274, 94-96 (1996); McMichael et al. J Exp Med. 187, 1367-1371 (1998)) 和 ELISPOT 测定法。通过实施 ELISPOT 测定法,能确认在细胞表面上表达 TCR 的 T 细胞通过 TCR 来识别细胞,并细胞内传递信号,然后自 T 细胞释放细胞因子,诸如 $\text{INF-}\gamma$ 。T 细胞针对靶细胞的细胞毒活性可使用本领域公知的方法来检查。一种优选的方法包括例如铬释放测定法,其使用表达 Clorf59 的 HLA 阳性细胞作为靶细胞。

[0181] 此外,本发明提供通过用编码在 HLA-A02 的背景下结合如 SEQ ID NO:1、3、4、7、9、13、15、17 和 20 的 Clorf59 肽及在 HLA-A24 的背景下结合 SEQ ID NO:26、32、34、40 和 41 的 Clorf59 肽的 TCR 亚单位多肽的核酸转导而制备的 CTL。经过转导的 CTL 在体内能够归巢 (homing) 到癌细胞,并且可以利用公知的体外培养方法扩增 (例如 Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。可以利用本发明的 CTL 来形成免疫原性组合物,所述组合物可以用来在需要治疗或保护的患者中治疗或预防癌症 (W02006/031221)。

[0182] IX. 药剂或药物组合物

[0183] 预防和防范包括降低来自疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,而二级和三级预防和防范水平涵盖旨在预防和防范疾病进展和症状出现以及降低已建立的疾病的负面影响的活动,这通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来实现。或者,预防和防范包括广泛的预防疗法,它们旨在减轻特定病症的严重性,例如降低肿瘤的增殖和转移、降低血管发生。

[0184] 治疗和 / 或预防癌症或肿瘤,和 / 或预防其手术后复发包括任何下述步骤,诸如手术清除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和遏制癌症发生、肿瘤消退、及降低或抑制转移。癌症的有效治疗和 / 或预防降低患癌个体的死亡率并改善其预后,降低血液中肿瘤标志物的水平,及减轻伴随癌症的可检测症状。例如,构成有效治疗和 / 或预防的症状减轻或改善包括 10%、20%、30% 或更多降低,或病情稳定。

[0185] 由于 Clorf59 表达在癌症 (包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC) 中与正常组织相比特异性升高,本发明的肽或编码此类肽的多核苷酸可用于治疗和 / 或预防癌症或肿瘤,和 / 或预防它们的手术后复发。因此,本发明提供用于治疗和 / 或预防癌症或肿瘤,和 / 或预防它们的手术后复发的药剂或药物组合物,其包括一种或多种本发明肽或编码所述肽的多核苷酸作为活性组分。或者,可以在任何上述外来体或细胞诸如 APC 的表面上表达本发明的肽,以用作药剂或

药物组合物。另外,上述靶向任何本发明的肽的 CTL 也可用作本发明药剂或药物组合物的活性组分。

[0186] 在另一个实施方案中,本发明还提供选自下组的活性组分在制备用于治疗癌症或肿瘤的药物组合物或药剂中的用途:

[0187] (a) 本发明的肽,

[0188] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸,

[0189] (c) 在其表面上呈递本发明肽的外来体或 APC, 和

[0190] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0191] 或者,本发明进一步提供用于治疗癌症或肿瘤的选自下组的活性组分:

[0192] (a) 本发明的肽,

[0193] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸,

[0194] (c) 在其表面上呈递本发明肽的外来体或 APC, 和

[0195] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0196] 或者,本发明进一步提供一种制备用于治疗癌症或肿瘤的药物组合物或药剂的方法或工艺,其中该方法或工艺包括配制药学或生理学可接受载体与作为活性组分的选自下组的活性组分的步骤:

[0197] (a) 本发明的肽,

[0198] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸,

[0199] (c) 在其表面上呈递本发明肽的外来体或 APC, 和

[0200] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0201] 在另一个实施方案中,本发明还提供一种制备用于治疗癌症或肿瘤的药物组合物或药剂的方法或工艺,其中该方法或工艺包括混合活性组分与药学或生理学可接受载体的步骤,其中所述活性组分选自下组:

[0202] (a) 本发明的肽,

[0203] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸,

[0204] (c) 在其表面上呈递本发明肽的外来体或 APC, 和

[0205] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0206] 或者,本发明的药物组合物或药剂可用于防范癌症或肿瘤和 / 或预防其手术后复发。

[0207] 本发明的药剂或药物组合物可用作疫苗。在本发明的语境中,短语“疫苗”(也称作“免疫原性组合物”)指具有在接种入动物后诱导抗肿瘤免疫力的功能的物质。

[0208] 本发明的药剂或药物组合物可用于在受试者或患者(包括人和任何其它哺乳动物,包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猫、犬、绵羊、山羊、猪、牛、马、猴、狒狒、和黑猩猩,特别是商业上重要的动物或驯养的动物)中治疗和 / 或预防癌症或肿瘤,和 / 或预防其手术后复发。

[0209] 依照本发明,已经发现具有 SEQ ID NO:1、3、4、7、9、13、15、17、20、26、32、34、40 和 41 任一的氨基酸序列的肽是 HLA-A02 或 A24 限制性表位肽或能诱导针对表达强且特异性的免疫应答的候选者。因此,包括任何这些具有 SEQ ID NO:1、3、4、7、9、13、15、17 和 20 的氨基酸序列的肽的本发明药剂或药物组合物特别适合于对其 HLA 抗原为 HLA-A02 的受试者施

用,而包括任何这些具有 SEQ ID NO:26、32、34、40 和 41 的氨基酸序列的肽的本发明药剂或药物组合物特别适合于对其 HLA 抗原为 HLA-A24 的受试者施用。对含有编码任何这些肽的多核苷酸(即本发明的多核苷酸)的药物制剂和药物组合物也是如此。

[0210] 要用本发明的药剂或药物组合物治疗的癌症或肿瘤不受限制,包括其中涉及 Clorf59 的所有种类的癌症或肿瘤,包括例如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC。

[0211] 除上述活性组分之外,本发明的药剂或药物组合物还可含有其它具有诱导针对癌性细胞的 CTL 的能力的肽、编码所述其它肽的其它多核苷酸、呈递所述其它肽的其它细胞等等。在本文中,其它具有诱导针对癌性细胞的 CTL 的能力的肽以癌症特异性抗原(例如已鉴定的 TAA)为例,但是不限于此。

[0212] 如果需要,本发明的药剂或药物组合物可任选包括其它治疗性物质作为活性组分,只要该物质不抑制活性组分例如任何本发明肽的抗肿瘤效果。例如,配制剂可包括抗炎剂、镇痛剂、化疗剂、诸如此类。除了在药物自身中包括其它治疗性物质之外,本发明的药物还可以与一种或多种其它药理学作用剂顺序或同时施用。药物和药理学作用剂的量取决于例如所使用的药理学作用剂的类型、所治疗的疾病、及施用的时序安排和路径。

[0213] 应当理解,除在本文中具体提及的组分之外,参考所讨论的配制剂的类型,本发明的药剂或药物组合物本领域常规的其它作用剂或组合物。

[0214] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药剂或药物组合物可包括在制品和试剂盒中,该制品和试剂盒含有可用于治疗要治疗的疾病(例如癌症)的病理状况的材料。制品可包括容纳任何本发明药剂或药物组合物的容器及标签。合适的容器包括瓶、管形瓶、和试管。容器可以用多种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器上的标签应指明该药剂用于治疗或预防一种或多种疾病状况。标签还可指明关于施用的指导等等。

[0215] 除上文描述的容器之外,包括本发明药剂或药物组合物的试剂盒还可任选进一步包括第二容器,其中装有药学可接受稀释剂。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头、注射器、和载有使用说明书的包装插页。

[0216] 如果期望的话,药剂或药物组合物可存在于药包或分配器装置中,该药包或分配器装置可装有一个或多个含有活性组分的单位剂型。例如,药包可包括金属或塑料箔,诸如泡罩包。药包或分配器装置可附有施用说明书。

[0217] (1) 含有肽作为活性组分的药剂或药物组合物

[0218] 本发明的肽可以作为药剂或药物组合物直接施用,或者如果必要,可以通过常规配制方法来配制。在后一种情况中,除本发明的肽之外,还可以视情况包括通常用于药物的载体、赋形剂等等,没有特别限制。此类载体的例子有灭菌水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养液、等等。另外,药剂或药物组合物视需要可含有稳定剂、悬浮液、防腐剂、表面活性剂等等。本发明的药剂或药物组合物可用于抗癌目的。

[0219] 本发明的肽可制备成由两种或更多种本发明肽构成的组合以在体内诱导 CTL。肽组合可采取鸡尾酒的形式,或者可使用标准技术彼此缀合。例如,可以将各个肽化学连接或表达成为单一融合多肽序列。组合中的各个肽可以是相同的或不同的。通过施用本发明的肽,肽被 HLA 抗原以高密度呈递在 APC 上,然后诱导出与所呈递的肽与 HLA 抗原之间形成的复合物特异性起反应的 CTL。或者,可以给受试者施用在其细胞表面上展示任何本发明的肽

的 APC (其可通过用本发明的肽刺激源自受试者的 APC (例如 DC) 而获得), 结果在受试者体内诱导出 CTL, 并且可提高针对癌细胞的攻击性。

[0220] 包括本发明的肽作为活性组分、用于治疗 and / 或预防癌症的药剂或药物组合物还可包括已知可有效诱导细胞免疫的佐剂。或者, 所述药剂或药物组合物可以与其它活性组分一起施用或通过配制成颗粒来施用。佐剂指在与具有免疫学活性的蛋白质一起 (或顺序) 施用增强针对该蛋白质的免疫应答的化合物。本文中涵盖的佐剂包括文献中记载的那些 (Clin Microbiol Rev 1994, 7 :277-89)。合适佐剂的例子包括磷酸铝、氢氧化铝、明矾、霍乱毒素、沙门氏菌毒素、诸如此类, 但不限于此。

[0221] 另外, 可方便地使用脂质体制制剂、其中肽结合于几微米直径的珠子的颗粒配制剂、和其中脂质结合于肽的配制剂。

[0222] 在本发明的另一个实施方案中, 本发明的肽也可以药学可接受盐的形式施用。盐的优选例子包括与碱金属成的盐、与金属成的盐、与有机碱成的盐、与有机酸成的盐和与无机酸成的盐。

[0223] 在一些实施方案中, 本发明的药剂或药物组合物可进一步包括引发 (prime) CTL 的成分。已经确认脂质是能够在体内引发针对病毒抗原的 CTL 的作用剂。例如, 可将棕榈酸残基连接至赖氨酸残基的 ϵ - 和 α - 氨基, 然后连接至本发明的肽。然后脂化肽可以在胶束或颗粒中直接施用, 掺入脂质体, 或在佐剂中乳化来施用。作为脂质引发 CTL 应答的另一个例子, 大肠杆菌 (E. coli) 脂蛋白, 诸如三棕榈酰基-S- 甘油基半胱氨酰丝氨酰- 丝氨酸 (P3CSS), 当与适宜的肽共价连接时, 可用来引发 CTL (参见例如 Deres et al., Nature 1989, 342 :561-4)。

[0224] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等, 及系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施, 或者通过多次施用来强化。本发明肽的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整, 通常是 0.001mg 至 1000mg, 例如 0.001mg 至 1000mg, 例如 0.1mg 至 10mg, 而且可以每少数天施用一次至每少数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0225] (2) 含有多核苷酸作为活性组分的药剂或药物组合物

[0226] 本发明的药剂或药物组合物也可含有处于可表达形式的编码本文中公开的肽的核酸。在本文中, 短语“处于可表达形式的”意味着多核苷酸在导入细胞时会在体内表达成诱导抗肿瘤免疫力的多肽。在一个例示性的实施方案中, 感兴趣的多核苷酸的核酸序列包括多核苷酸表达所必需的调节元件。多核苷酸可具有为实现稳定插入靶细胞的基因组所需的配置 (关于同源重组盒载体的描述参见例如 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51 :503-12)。参见例如 Wolff et al., Science 1990, 247 :1465-8; 美国专利 No. 5, 580, 859; 5, 589, 466; 5, 804, 566; 5, 739, 118; 5, 736, 524; 5, 679, 647; 及 WO 98/04720。基于 DNA 的投递技术的例子包括“裸 DNA”、易化 (布比卡因、聚合物、肽介导的) 投递、阳离子脂质复合物、和颗粒介导的 (“基因枪”) 或压力介导的投递 (参见例如美国专利 No. 5, 922, 687)。

[0227] 本发明的肽还可使用病毒或细菌载体来表达。表达载体的例子包括减毒病毒宿主, 诸如牛痘或禽痘。这种办法涉及使用例如牛痘病毒作为载体来表达编码肽的核苷酸序列。在导入宿主后, 重组牛痘病毒表达免疫原性肽, 并由此引起免疫应答。可用于免疫接种方案的牛痘载体和方法记载于例如美国专利 No. 4, 722, 848。另一种载体是卡介苗 (BCG, Bacille

Calmette Guerin)。BCG 载体记载于 Stover et al., Nature 1991, 351:456-60。有很多种可用于治疗性施用或免疫接种的其它载体是显而易见的,例如腺病毒和腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 载体、去毒炭疽毒素载体、诸如此类。参见例如 Shata et al., Mol Med Today 2000, 6:66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68:793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14:571-85。

[0228] 将多核苷酸投递入受试者可以是直接的,其中受试者直接暴露于携带多核苷酸的载体,或者是间接的,其中首先在体外用感兴趣的多核苷酸转化细胞,然后将细胞移植入受试者。这两种办法分别称作体内和离体基因疗法。

[0229] 关于基因疗法的方法的一般综述参见 Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3:87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33:573-96; Mulligan, Science 1993, 260:926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62:191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5):155-215。在 eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; 及 Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990 中描述的重组 DNA 技术领域的公知方法也可用于本发明。

[0230] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等,而且可使用系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。合适的载体或经编码本发明肽的多核苷酸转化的细胞中的多核苷酸的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当地加以调整,通常是 0.001mg 至 1000mg,例如 0.001mg 至 1000mg,例如 0.1mg 至 10mg,而且可以每数天施用一次至每数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0231] X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL 的方法

[0232] 本发明的肽和多核苷酸可用于诱导 APC 和 CTL。本发明的外来体和 APC 也可用于诱导 CTL。肽、多核苷酸、外来体和 APC 可以与任何其它化合物组合使用,只要该化合物不抑制它们的 CTL 诱导能力。因此,任何前文所述的本发明药剂或药物组合物均可用于诱导 CTL,而且除它们之外,那些包括肽和多核苷酸的也可用于诱导 APC,如下文讨论解释的。

[0233] (1) 诱导抗原呈递细胞 (APC) 的方法

[0234] 本发明提供了使用本发明的肽或多核苷酸来诱导具有高 CTL 诱导能力的 APC 的方法。

[0235] 本发明的方法包括在体外、离体或在体内使 APC 接触本发明肽的步骤。例如,离体使 APC 接触肽的方法可包括下述步骤:

[0236] a: 自受试者收集 APC; 并

[0237] b: 使步骤 a 的 APC 接触肽。

[0238] APC 不限于特定种类的细胞且包括 DC、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞和活化的 T 细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞所识别。由于 DC 在 APC 中具有最强的 CTL 诱导能力,可优选使用 DC。任何本发明肽均可以单独或其它本发明肽组合用作步骤 b 的肽。

[0239] 或者,可以将本发明的肽施用于受试者以在体内使肽接触 APC。因此,能在受试者的身体中诱导具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,本发明还涵盖将本发明的肽施用于受试者

以在体内诱导 APC 的方法。也有可能将编码本发明肽的多核苷酸以可表达形式施用于受试者,使得本发明的肽在体内表达并与 APC 接触,因此在受试者的身体中诱导具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,本发明还涵盖将本发明的多核苷酸施用于受试者以在体内诱导 APC 的方法。上文“IX. 药剂 (2) 含有多核苷酸作为活性组分的药剂”部分定义了短语“可表达形式”。

[0240] 另外,本发明包括将本发明的多核苷酸导入 APC 以诱导具有 CTL 诱导能力的 APC。例如,所述方法可包括下述步骤:

[0241] a:自受试者收集 APC;并

[0242] b:导入编码本发明肽的多核苷酸。

[0243] 步骤 b 可以如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分所述来实施。

[0244] (2) 诱导 CTL 的方法

[0245] 另外,本发明提供了使用本发明的肽、多核苷酸、或外来体或 APC 来诱导 CTL 的方法。

[0246] 本发明还提供了使用编码能形成 T 细胞受体 (TCR) 亚单位的多肽的多核苷酸来诱导 CTL 的方法,所述 TCR 亚单位识别本发明的肽与 HLA 抗原之间形成的复合物。优选地,所述诱导 CTL 的方法包括选自下组的至少一个步骤:

[0247] a) 使 CD8- 阳性 T 细胞与抗原呈递细胞和 / 或外来体接触,所述抗原呈递细胞和外来体在其表面上呈递 HLA 抗原与本发明的肽之间形成的复合物;和

[0248] b) 向 CD8- 阳性细胞中导入编码能够形成 TCR 亚单位的多肽的多核苷酸,所述 TCR 亚单位可识别本发明的肽与 HLA 抗原之间形成的复合物。

[0249] 当本发明的肽、多核苷酸、APC、或外来体被施用给受试者后,受试者的身体中诱导出 CTL,而且靶向癌细胞的免疫应答的强度增强。因此,本发明还涵盖一种方法,其包括将本发明的肽、多核苷酸、APC 或外来体施用于受试者以诱导 CTL 的步骤。

[0250] 或者,CTL 也可通过它们的离体使用来诱导。在此类情况下,在诱导 CTL 后,将活化的 CTL 返还给受试者。例如,本发明诱导 CTL 的方法可包括下述步骤:

[0251] a) 自受试者收集 APC;

[0252] b) 使步骤 a) 的 APC 接触肽;并

[0253] c) 共培养步骤 b) 的 APC 与 CD8- 阳性细胞。

[0254] 上文步骤 c 中要与 CD8- 阳性细胞共培养的 APC 也可通过将包括本发明多核苷酸的基因转移入 APC 来制备,如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分中详述的;但是不限于此,而且任何在其表面上有效呈递 HLA 抗原和本发明肽的 APC 均可用于本发明的方法。

[0255] 代替此类 APC,也可使用在其表面上呈递 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的外来体。也就是,本发明还涵盖一种方法,其中将在其表面上呈递 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的外来体与 CD8- 阳性细胞共培养。此类外来体可通过上文“V. 外来体”部分中记载的方法来制备。

[0256] 另外,可通过将包括编码 TCR 亚单位的多核苷酸的基因导入 CD8- 阳性细胞来诱导 CTL,所述 TCR 亚单位能结合本发明的肽。此类转导可以如上文“VIII. T 细胞受体 (TCR)”部分所述来实施。

[0257] 另外,本发明提供了一种制备用于诱导 CTL 的药剂或药物组合物的方法或工艺,

其中所述方法包括将本发明的肽与药学可接受的载体混合或配制的步骤。

[0258] (3) 诱导免疫应答的方法

[0259] 此外,本发明提供了用于诱导针对与 Clorf59 有关的疾病的免疫应答的方法。合适的疾病包括癌症,其例子包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、NSCLC、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和 SCLC。

[0260] 所述方法包括施用含有任何本发明肽或编码它们的多核苷酸的作用剂或组合物的步骤。本发明方法还涵盖施用呈递任何本发明肽的外来体或 APC。详情参见“IX. 药剂或药物组合物”部分,特别是描述本发明药物制剂和药物组合物作为疫苗使用的部分。另外,可用于本发明诱导免疫应答的方法的外来体和 APC 详细记载于上文“V. 外来体”、“VI. 抗原呈递细胞 (APC)”和“X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL 的方法”之 (1) 和 (2) 部分。

[0261] 本发明还提供了一种制备诱导免疫应答的药剂或药物组合物的方法或工艺,其中该方法包括将本发明的肽与药学可接受的载体混合或配制的步骤。

[0262] 或者,本发明的方法可包括施用疫苗或药物组合物的步骤,所述疫苗或药物组合物含有:

[0263] (a) 本发明的肽;

[0264] (b) 处于可表达形式的编码本文中公开的此类肽的核酸;

[0265] (c) 在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体;和

[0266] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0267] 在本发明中,可以用这些活性组分来治疗过表达 Clorf59 的癌症。所述癌症包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、和小细胞肺癌 (SCLC)。因而,在施用包含活性组分的疫苗或药物组合物之前,优选确认要治疗的癌细胞或组织中的 Clorf59 表达水平与同一器官的正常细胞相比是否提高。因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗(过)表达 Clorf59 的癌症的方法,该方法可包括下述步骤:

[0268] i) 测定 Clorf59 在自具有要治疗的癌症的受试者获得的癌细胞或组织中的表达水平;

[0269] ii) 将 Clorf59 表达水平与正常对照比较;并

[0270] iii) 将至少一种选自上文所述 (a) 至 (d) 的成分施用于具有与正常对照相比过表达 Clorf59 的癌症的受试者。

[0271] 或者,本发明还提供了一种包含至少一种选自上文所述 (a) 至 (d) 的成分的疫苗或药物组合物,其用于施用于具有过表达 Clorf59 的癌症的受试者。换言之,本发明进一步提供了一种用于鉴定要用本发明的 Clorf59 多肽来治疗的受试者的方法,该方法可包括测定 Clorf59 在受试者衍生癌细胞或组织中的表达水平的步骤,其中该水平与该基因的正常对照水平相比的升高指明该受试者具有可以用本发明的 Clorf59 多肽来治疗的癌症。

[0272] 根据本发明,测定在自受试者获得的癌细胞或组织中 Clorf59 的表达水平。表达水平可在转录产物(核酸)水平确定,使用本领域熟知的方法。举例而言,Clorf59 的 mRNA 可通过杂交方法(例如,Northern 杂交)使用探针定量。可在芯片或阵列上实施所述检测。对检测 Clorf59 的表达水平而言,优选使用阵列。本领域技术人员可利用 Clorf59 的序列信息制备上述探针。举例而言,Clorf59 的 cDNA 可用作探针。如果需要,可以用合适的标

记物,例如染料、荧光物质或同位素,来标记所述探针,而所述基因的表达水平可以作为发生了杂交的标签的强度来检测。

[0273] 进一步,Clorf59 的转录产物可通过基于扩增的检测技术(例如,RT-PCR)使用引物定量。上述引物可基于所述基因可用的序列信息制备。

[0274] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、温和条件或低严格条件下与 Clorf59 的 mRNA 杂交。如本文中所使用的,短语“严格(杂交)条件”是指这样的条件,在该条件下,探针或引物将与其靶序列杂交,但不与其它序列杂交。严格条件是依赖于序列的,在不同的环境下会不同。较长序列的与较短序列相比在更高的温度下观察到杂交。一般地,严格条件的温度应选择比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的热熔点(T_m)低大约 5°C 。 T_m 是(在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下)平衡状态下有 50% 的与其靶序列互补的探针与靶序列杂交的温度。因为靶序列一般过量存在,因此在 T_m 下,平衡时 50% 的探针被占据。典型地,严格条件是这样的:其中盐浓度小于大约 1.0M 钠离子,典型地大约 0.01-1.0M 钠离子(或其它盐),pH7.0-8.3,温度对于较短的探针或引物(例如 10-50 个核苷酸)是至少大约 30°C ,用于较长的探针或引物是至少大约 60°C 。严格条件也可以通过添加去稳定剂,例如甲酰胺,来实现。

[0275] 或者,可以检测翻译产物以测定 Clorf59 表达水平。例如,可以确定 Clorf59 蛋白的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括免疫测定法,此类方法使用特异识别所述蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰(例如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)均可用于检测,只要该片段或经修饰抗体保留对 Clorf59 蛋白的结合能力即可。制备这些类型的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的,并且在本发明中可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0276] 作为另一种基于 Clorf59 的基因翻译产物检测其表达水平的方法,可利用针对 Clorf59 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析观察其染色的强度。意即,在此测量中,强染色表明所述蛋白质的存在/水平增加,且同时表明 Clorf59 基因的高表达水平。

[0277] 如果 Clorf59 基因在癌细胞中的表达水平较之靶基因的对照水平增加了例如 10%,25%或 50%的话,或增加到超过 1.1 倍,超过 1.5 倍,超过 2.0 倍,超过 5.0 倍,超过 10 倍或者更多,则可认为该水平是增加的。

[0278] 对照水平可以与癌细胞同时确定,使用先前从疾病状态(癌性或非癌性)已知的受试者收集和保存的样品。另外,自具有要治疗的癌症的器官的非癌性区获得的正常细胞可用作正常对照。或者,对照水平可以借助统计方法,根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 Clorf59 基因表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以是衍生自先前测试过的细胞的表达模式数据库。

[0279] 而且,根据本发明的一个方面,可以将源自受试者的样品中 Clorf59 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用从来自与源自受试者的样品组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中 Clorf59 基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm 2\text{S.D.}$ 或平均值 $\pm 3\text{S.D.}$ 的范围可以用作标准值。

[0280] 在本发明的语境下,从已知非癌性的生物样品确定的对照水平称作“正常对照水平”。另一方面,如果对照水平是从癌性生物样品确定的,则称作“癌对照水平”。

[0281] 当 Clorf59 基因的表达水平相比正常对照水平有所提高或与癌性对照水平相似/等同,则优选本发明的疫苗或药物组合物来治疗受试者。

[0282] 更具体地,本发明提供了 (i) 诊断受试者是否具有要治疗的癌症,和 / 或 (ii) 为癌症治疗选择受试者的方法,该方法包括下述步骤:

[0283] a) 测定 Clorf59 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的癌细胞或组织中的表达水平;

[0284] b) 将 Clorf59 表达水平与正常对照水平比较;

[0285] c) 如果 Clorf59 表达水平与正常对照水平相比升高,则将受试者诊断为具有要治疗的癌症;和

[0286] d) 如果在步骤 c) 中将受试者诊断为具有要治疗的癌症的受试者,则选择该受试者进行癌症治疗。

[0287] 或者,此类方法包括下述步骤:

[0288] a) 测定 Clorf59 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的癌细胞或组织中的表达水平;

[0289] b) 将 Clorf59 表达水平与癌性对照水平比较;

[0290] c) 如果 Clorf59 表达水平与癌性对照水平相似或等同,则将受试者诊断为具有要治疗的癌症;并

[0291] d) 如果在步骤 c) 中将受试者诊断为具有要治疗的癌症,则选择该受试者进行癌症治疗。

[0292] 本发明还提供了用于确定罹患可用本发明的 Clorf59 多肽来治疗的癌症的受试者的试剂盒,其也可用于评估和 / 或监测癌症免疫疗法的功效。优选地,所述癌症包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、和小细胞肺癌 (SCLC)。更具体地,所述试剂盒优选包含至少一种在源自受试者的癌细胞中检测 Clorf59 基因表达的试剂,所述试剂可选自下组:

[0293] (a) 检测 Clorf59 基因的 mRNA 的试剂;

[0294] (b) 检测 Clorf59 的蛋白质的试剂;

[0295] (c) 检测 Clorf59 的蛋白质的生物活性的试剂。

[0296] 适于检测 Clorf59 基因 mRNA 的试剂包括特异性结合或识别 Clorf59mRNA 的核酸,例如具有与 Clorf59mRNA 的一部分互补的序列的寡核苷酸。这类寡核苷酸的例子有对 Clorf59mRNA 为特异性的引物与探针。可基于本领域众所周知的方法制备这类寡核苷酸。如果需要,检测 Clorf59mRNA 的试剂可固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种用于检测 Clorf59mRNA 的试剂。

[0297] 另一方面,适于检测 Clorf59 蛋白质的试剂包括针对 Clorf59 蛋白质的抗体。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步,任何所述抗体的片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等)均可用作检测试剂,只要所述片段或经修饰抗体保留与 Clorf59 蛋白的结合能力。为检测蛋白制备此类抗体的方法在本领域是众所周知的,且可在本发明中使用任何方法制备上述抗体及其等价物。进一步,所述抗体可用能产生信号的分子通过直接连接或间接标记技术进行标记。标记物与标记抗体以及检测抗体与其靶结合的方法在本领域是众所周知的,且本发明可使用任何标记物与方法。另外,在所述试剂盒中可

包括多于一种用于检测 Clorf59 蛋白质的试剂。

[0298] 所述试剂盒可包含多于一种前述的试剂。例如,自没有癌症或罹患癌症的受试者获取的组织样品可用作有用的对照试剂。本发明的试剂盒可进一步包括其它从商业或用户角度而言期望的材料,包括缓冲剂、稀释剂、滤纸、针头、注射器和带有使用说明书的装箱单(例如,书面、磁带、CD-ROM 等等)。这些试剂之类的可保留在带标签的容器中。合适的容器包括瓶、管状瓶(vials)和试管。所述容器可从多种材料制得,例如玻璃或塑料。

[0299] 在本发明的一个实施方案中,当所述试剂是针对 Clorf59 mRNA 的探针时,所述试剂可固定化于固体基质(例如多孔条)上,以形成至少一个检测位置。所述多孔条的测量或检测区域可包含多个位置,每个都包含核酸(探针)。测试条亦可包含阴性和/或阳性对照的位置。此外,对照位置可位于与测试条不同的条上。任选地,不同的检测位置可包含不同量的固定化核酸,即,在第一个检测位置上量较高而在接下来的位置上量较低。在加入测试样品之后,显示可检测信号的位置的数量提供了在样品中存在的 Clorf59 mRNA 量的定量指征。所述检测位置可具有任何合适可检测的形状,并通常是横跨测试条宽度的条状或点状。

[0300] 本发明所述试剂盒可进一步包括阳性对照样品或 Clorf59 标准样品。本发明的所述阳性对照样品可通过收集 Clorf59 阳性样品,随后测定其 Clorf59 水平来制备。或者,可将纯化的 Clorf59 蛋白或多核苷酸添加至不表达 Clorf59 的细胞以形成阳性样品或 Clorf59 标准样品。在本发明中,纯化的 Clorf59 可为重组蛋白。所述阳性对照样品中 Clorf59 的水平是例如高于截止值的。

[0301] 提供下面的实施例来例示本发明及帮助本领域普通技术人员来制备和使用本发明。实施例并非意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0302] 实施例 1

[0303] 材料和方法

[0304] 细胞系

[0305] T2(HLA-A2) 即人 B 淋巴母细胞样细胞系和 COS7 即非洲绿猴肾细胞系购自 ATCC。

[0306] 自 Clorf59 衍生的肽的候选物选择

[0307] 使用结合预测软件 "BIMAS" (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al., J Immunol 1994,152(1):163-75 及 Kuzushima et al., Blood 2001, 98(6):1872-81) 预测了 Clorf59 衍生的结合 HLA-A*0201 分子的 9 聚物和 10 聚物肽。由 Biosynthesis(Lewisville,Texas) 依照标准固相合成法合成了这些肽,并通过反相高效液相层析(HPLC)进行了纯化。分别通过分析性 HPLC 和质谱术分析测定了肽的纯度(>90%)和身份。将肽以 20mg/ml 在二甲亚砜(DMSO)中溶解,并保存于 -80℃。

[0308] 体外 CTL 诱导

[0309] 使用单核细胞衍生的树突细胞(DC)作为抗原呈递细胞(APC)来诱导针对人白细胞抗原(HLA)上呈递的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)应答。如别处所述(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15,63(14):4112-8)在体外生成 DC。具体而言,将用 Ficoll-Plaque(Pharmacia)溶液自正常志愿者(HLA-A*0201 阳性)分离的外周血单个核细

胞 (PBMC) 通过塑料组织培养皿 (Becton Dickinson) 粘附来加以分离, 以将它们作为单核细胞级分富集。将富集了单核细胞的群体在含有 2% 热灭活自体血清 (AS) 的 AIM-V 培养基 (Invitrogen) 中、于 1000U/ml 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) (R&D System) 和 1000U/ml 白介素 (IL)-4 (R&D System) 存在下培养。培养 7 天后, 将经细胞因子诱导的 DC 在 AIM-V 培养基中在 3 微克/ml β 2-微球蛋白存在下用 20 微克/ml 每一种合成肽于 37°C 冲激 3 小时。所生成的细胞表现出在它们的细胞表面上表达 DC 相关分子, 诸如 CD80、CD83、CD86 和 II 类 HLA (数据未显示)。然后将这些经肽冲激的 DC 通过 X-辐照 (20Gy) 来灭活, 并以 1 : 20 比例与自体 CD8+T 细胞混合; 自体 CD8+T 细胞是用 CD8 阳性分离试剂盒 (Dynal) 通过正选择获得的。在 48 孔板 (Corning) 中设立这些培养物; 每个孔在 0.5ml AIM-V/2% AS 培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的 DC、 3×10^5 个 CD8+T 细胞和 10ng/ml IL-7 (R&D System)。3 天后, 给这些培养物补充 IL-2 (CHIRON) 至终浓度 20IU/ml。在第 7 天和第 14 天, 将 T 细胞用经肽冲激的自体 DC 进一步刺激。每次的 DC 均通过与上文所述相同的方式来制备。在第 21 天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的 T2 细胞的 CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1) : 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8) : 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8) : 498-506)。

[0310] CTL 扩增程序

[0311] 使用与 Riddell 等人 (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16) : 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2) : 216-23) 记载的方法相似的方法在培养物中扩增 CTL。在 40ng/ml 抗 CD3 单克隆抗体 (Pharmingen) 存在下, 将总共 5×10^4 个 CTL 与两种经丝裂霉素 C 灭活的人 B-淋巴母细胞样细胞系一起悬浮在 25ml AIM-V/5% AS 培养基中。启动培养后一天, 向培养物添加 120IU/ml IL-2。在第 5 天、第 8 天和第 11 天给培养物补加新鲜的含有 30IU/ml IL-2 的 AIM-V/5% AS 培养基 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1) : 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8) : 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8) : 498-506)。

[0312] CTL 克隆的建立

[0313] 在 96 孔圆底微量滴定板 (Nalge Nunc International) 中进行稀释以获得 0.3、1、和 3 个 CTL/孔。在总共 150 μ l/孔含有 5% AS 的 AIM-V 培养基中将 CTL 与 1×10^4 个细胞/孔的两种人 B-淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml 的抗 CD3 抗体、和 125U/ml IL-2 一起温育。10 天后向培养基添加 50 μ l/孔 IL-2, 以达到终浓度 125U/ml IL-2。在第 14 天测试 CTL 活性, 并使用与上文所述相同的方法来扩增 CTL 克隆 (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8) : 498-506)。

[0314] 特异性 CTL 活性

[0315] 为了检查特异性 CTL 活性, 实施干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定和 IFN- γ 酶联免疫吸附测定 (ELISA)。具体而言, 制备经肽冲激的 T2 (1×10^4 /孔) 作为刺激细胞。使用 48 孔中培养的细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施 IFN- γ ELISPOT 测

定和 IFN- γ ELISA 测定。

[0316] 外源表达靶基因和 / 或 HLA-A02 的细胞的制备

[0317] 通过 PCR 来扩增编码靶基因或 HLA-A02 的可读框的 cDNA。将 PCR 扩增产物克隆入 pCAGGS 载体。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照制造商推荐的规程将质粒转染入 COS7, 一种无靶基因和 HLA-A02 的细胞系。自转染起 2 天后, 用 Versene (Invitrogen) 收获经过转染的细胞, 并用作 CTL 活性测定的靶细胞 (5×10^4 个细胞 / 孔)。

[0318] 结果

[0319] 癌症中增强的 Clorf59 表达

[0320] 使用 cDNA 微阵列自多种癌症获得的全局基因表达谱 (global gene expression profile) 数据揭示了 Clorf59 (GenBank 登录号 NM_144584 ; SEQ ID No : 42) 表达升高。Clorf59 表达在 33 例膀胱癌中的 31 例、70 例乳腺癌中的 34 例、12 例宫颈癌中的 11 例、8 例结肠直肠癌中的 8 例、57 例食道癌中的 25 例、10 例 NSCLC 中的 2 例、16 例骨肉瘤中的 8 例、1 例卵巢癌中的 1 例、6 例胰腺癌中的 3 例、41 例前列腺癌中的 20 例、13 例 SCLC 中的 7 例和 34 例软组织肿瘤中的 25 例中与相应的正常组织相比确实升高 (表 1)。

[0321] 表 1 : 观察到 Clorf59 在癌性组织中与正常相应组织相比上调的病例的比例

[0322]

癌症	比例
膀胱癌	31/33
乳腺癌	34/70
宫颈癌	11/12
结肠直肠癌	8/8
食道癌	25/57
NSCLC	2/10
骨肉瘤	8/16
卵巢癌	1/1
胰腺癌	3/6
前列腺癌	20/41
SCLC	7/13

[0323] 自 Clorf59 衍生的 HLA-A02 结合肽的预测

[0324] 表 2 依高结合亲和力的次序显示 Clorf59 的 HLA-A02 结合肽。选择并检查了总共 24 种具有潜在 HLA-A02 结合能力的肽以确定表位肽 (表 2)。

[0325] 表 2 : 自 Clorf59 衍生的 HLA-A02 结合 9 聚物和 10 聚物肽

[0326]

肽名称	等级	起始位置	氨基酸序列	BIMAS 得分	SEQ ID NO
C1orf59-9聚物	1	261	LQQERFFKL	166.362	1
	2	333	FCVGDKFFV	66.623	2
	3	152	YLSPSMIVI	45.255	3
	4	121	RLLGFDLIT	42.958	4
	5	271	LVNEVSQQV	42.418	5
	6	63	RLLKVNPCI	38.601	6
	7	122	LLGFDLITC	19.425	7
C1orf59-10聚物	1	261	LQQERFFKLV	354.871	8
	2	240	CLSEqHDQHV	285.163	9
	3	260	SLQQeRFFKL	235.414	10
	4	270	VLVNeVSQQV	118.238	11
	5	346	LLAYpKLNRL	83.527	12
	6	90	SLAPfLGDFL	57.572	13
	7	334	CVGDkFFVPL	55.332	14
	8	188	MEFQIWALYV	46.786	15
	9	121	RLLGfDLITC	42.278	16
	10	122	LLGFdLITCI	40.792	17
	11	30	PLYRqRYQFV	40.396	18
	12	183	FEWTrMEFQT	32.087	19
	13	196	YVANrYDYSV	27.995	20
	14	10	SVVDgNFEEV	23.23	21
	15	66	KVNPcIELLV	21.3	22
	16	326	IENSpTPFCV	13.335	23
	17	252	AVFTtSYPSL	10.374	24

[0327] 起始位置指自 C1orf59N 端起的氨基酸残基数。

[0328] 结合得分由“BIMAS”得出。

[0329] 预测的来自 C1orf59 的 HLA-A*0201 限制肽的 CTL 诱导

[0330] 依照“材料和方法”中描述的方案产生了针对那些自 C1orf59 衍生的肽的 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法来测定肽特异性 CTL 活性 (图 1(a)-(i))。其显示,用 C1orf59-A02-9-261 (SEQ ID NO:1) 刺激的 6 号孔 (a)、用 C1orf59-A02-9-152 (SEQ ID NO:3) 刺激的 2 号和 7 号孔 (b)、用 C1orf59-A02-9-121 (SEQ ID NO:4) 刺激的 4 号和 6 号孔 (c)、用 C1orf59-A02-9-122 (SEQ ID NO:7) 刺激的 3 号孔 (d)、用 C1orf59-A02-10-240 (SEQ ID NO:9) 刺激的 5 号孔 (e)、用 C1orf59-A02-10-90 (SEQ ID NO:13) 刺激的 4 号孔 (f)、用 C1orf59-A02-10-188 (SEQ ID NO:15) 刺激的 7 号孔 (g)、用 C1orf59-A02-10-122 (SEQ ID NO:17) 刺激的 4 号和 8 号孔 (h)、和用 C1orf59-A02-10-196 (SEQ ID NO:20) 刺激的 2 号孔 (i) 展现出与对照孔相比强的 IFN- γ 生成。另一方面,用表 1 所示其它肽刺激没有测定出特异性 CTL 活性,尽管那些肽可能具有对 HLA-A*0201 的结合活性。作为阴性数据的一种典型情况,对用 C1orf59-A02-10-261 (SEQ ID NO:8) 刺激的 CTL 没有检测出特异性 IFN- γ 生

成(图1(j))。结果是,自Clorf59衍生的9种肽被筛选为能诱导强CTL的肽。

[0331] 针对Clorf59特异性肽的CTL系和克隆的建立

[0332] 将用Clorf59-A02-9-152(SEQ ID NO:3)刺激的7号孔、用Clorf59-A02-9-121(SEQ ID NO:4)刺激的6号孔、用Clorf59-A02-10-188(SEQ ID NO:15)刺激的7号孔、用Clorf59-A02-10-122(SEQ ID NO:17)刺激的8号孔和用刺激的2号孔、用刺激的Clorf59-A02-10-196(SEQ ID NO:20)号孔中的通过IFN- γ ELISPOT测定法检测显示出肽特异性CTL活性的细胞扩增并建立为CTL系。通过IFN- γ ELISA测定法测定那些CTL系中的每一种CTL活性(图2(a)-(e))。其显示,与未经肽冲激的靶细胞相比,所有CTL系针对经相应肽冲激的靶细胞均展现出强的IFN- γ 生成。另外,如“材料和方法”中所述通过有限稀释自CTL系建立了CTL克隆,并通过IFN- γ ELISA测定法测定了CTL克隆针对经肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成(图3(a)-(c))。确定了经Clorf59-A02-9-121(SEQ ID NO:4)、Clorf59-A02-10-188(SEQ ID NO:15)和Clorf59-A02-10-196(SEQ ID NO:20)刺激的CTL克隆的强的IFN- γ 生成。

[0333] 针对外源表达Clorf59和HLA-A*0201的靶细胞的特异性CTL活性

[0334] 对针对这些肽产生的建成CTL系,检查它们识别内源表达Clorf59和HLA-A*0201分子的靶细胞的能力。使用用相应肽产生的CTL系作为效应细胞测试了针对用全长Clorf59和HLA-A*0201分子基因同时转染的COS7细胞(外源表达Clorf59和HLA-A*0201基因的靶细胞的一种特异性模型)的特异性CTL活性。制备了用全长Clorf59基因或HLA-A*0201转染的COS7细胞作为对照。在图4中,经Clorf59-A02-9-152(SEQ ID NO:3)(a)、Clorf59-A02-9-121(SEQ ID NO:4)(b)和Clorf59-A02-10-188(SEQ ID NO:15)(c)刺激的CTL针对表达Clorf59和HLA-A*0201二者的COS7细胞显示出强的CTL活性。另一方面,没有检测到显著的针对对照的特异性CTL活性。因此,这些数据清楚地证明Clorf59-A02-9-152(SEQ ID NO:3)、Clorf59-A02-9-121(SEQ ID NO:4)和Clorf59-A02-10-188(SEQ ID NO:15)与HLA-A*0201分子一起在靶细胞上天然表达,并被CTL识别。这些结果指示这种自Clorf59衍生的这些肽可应用于癌症疫苗,用于具有表达Clorf59的肿瘤的患者。

[0335] 对抗原肽的同源性分析

[0336] 经Clorf59-A02-9-261(SEQ ID NO:1)、Clorf59-A02-9-152(SEQ ID NO:3)、Clorf59-A02-9-121(SEQ ID NO:4)、Clorf59-A02-9-122(SEQ ID NO:7)、Clorf59-A02-10-240(SEQ ID NO:9)、Clorf59-A02-10-90(SEQ ID NO:13)、Clorf59-A02-10-188(SEQ ID NO:15)、Clorf59-A02-10-122(SEQ ID NO:17)和Clorf59-A02-10-196(SEQ ID NO:20)刺激的CTL显示出显著的且特异的CTL活性。这个结果可能是由于Clorf59-A02-9-261(SEQ ID NO:1)、Clorf59-A02-9-152(SEQ ID NO:3)、Clorf59-A02-9-121(SEQ ID NO:4)、Clorf59-A02-9-122(SEQ ID NO:7)、Clorf59-A02-10-240(SEQ ID NO:9)、Clorf59-A02-10-90(SEQ ID NO:13)、Clorf59-A02-10-188(SEQ ID NO:15)、Clorf59-A02-10-122(SEQ ID NO:17)和Clorf59-A02-10-196(SEQ ID NO:20)的序列与其它已知可使人免疫系统致敏的分子衍生的肽同源。为了排除这种可能性,使用BLAST算法(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有发现具有显著同源性的序

列。同源性分析的结果指示 Clorf59-A02-9-261 (SEQ ID NO :1)、Clorf59-A02-9-152 (SEQ ID NO :3)、Clorf59-A02-9-121 (SEQ ID NO :4)、Clorf59-A02-9-122 (SEQ ID NO :7)、Clorf59-A02-10-240 (SEQ ID NO :9)、Clorf59-A02-10-90 (SEQ ID NO :13)、Clorf59-A02-10-188 (SEQ ID NO :15)、Clorf59-A02-10-122 (SEQ ID NO :17) 和 Clorf59-A02-10-196 (SEQ ID NO :20) 的序列是独特的,因此,就我们所知,这些分子产生对一些无关分子的不期望的免疫学应答的可能性很小。

[0337] 总之,鉴定了自 Clorf59 衍生的新型 HLA-A02 表位肽,并证明它们适用于癌症免疫疗法。

[0338] 实施例 2

[0339] 材料和方法

[0340] 细胞系

[0341] 通过将 Epstein-Bar 病毒转化入 HLA-A24 阳性人 B 淋巴细胞,建立了 A24 淋巴瘤细胞样细胞系 (A24LCL) 细胞。COS7 即非洲绿猴肾细胞系购自 ATCC。

[0342] 自 Clorf59 衍生的肽的候选物选择

[0343] 使用结合预测软件 " BIMAS " (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al., J Immunol 1994,152(1):163-75 及 Kuzushima et al., Blood 2001, 98(6):1872-81) 预测了 Clorf59 衍生的结合 HLA-A*2402 分子的 9 聚物和 10 聚物肽。由 Sigma (Sapporo, Japan) 依照标准固相合成法合成了这些肽,并通过反相高效液相层析 (HPLC) 进行了纯化。分别通过分析性 HPLC 和质谱术分析测定了肽的纯度 (> 90%) 和身份。将肽以 20mg/ml 在二甲亚砜 (DMSO) 中溶解,并保存于 -80℃。

[0344] 体外 CTL 诱导

[0345] 使用单核细胞衍生树突细胞 (DC) 作为抗原呈递细胞 (APC) 来诱导针对人白细胞抗原 (HLA) 上呈递的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。如别处所述 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15,63(14):4112-8) 在体外生成 DC。具体而言,将用 Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液自正常志愿者 (HLA-A*2402 阳性) 分离的外周血单个核细胞 (PBMC) 通过塑料组织培养皿粘附 (Becton Dickinson) 来加以分离,以将它们作为单核细胞级分富集。将富集了单核细胞的群体在含有 2% 热灭活自体血清 (AS) 的 AIM-V 培养基 (Invitrogen) 中、于 1000U/ml 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) (R&D System) 和 1000U/ml 白介素 (IL)-4 (R&D System) 存在下培养。培养 7 天后,将经细胞因子诱导的 DC 在 AIM-V 培养基中在 3 微克/ml β 2-微球蛋白存在下用 20 微克/ml 每一种合成肽于 37℃ 冲激 3 小时。所生成的细胞表现出在它们的细胞表面上表达 DC 相关分子,诸如 CD80、CD83、CD86 和 II 类 HLA (数据未显示)。然后将这些经肽冲激的 DC 通过 X-辐照 (20Gy) 来灭活,并以 1:20 比例与自体 CD8+T 细胞混合;自体 CD8+T 细胞是用 CD8 阳性分离试剂盒 (Dynal) 通过正选择获得的。在 48 孔板 (Corning) 中设立这些培养物;每个孔在 0.5ml AIM-V/2% AS 培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的 DC、 3×10^5 个 CD8+T 细胞和 10ng/ml IL-7 (R&D System)。3 天后,给这些培养物补充 IL-2 (CHIRON) 至终浓度 20IU/ml。在第 7 天和第 14 天,将 T 细胞用经肽冲激的自体 DC 进一步刺激。每次的 DC 均通过与上文所述相同的方式来制备。在第 21 天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的 A24LCL 或 T2 细胞的 CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5,84(1):94-9;Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20,

84(8):1052-7;Uchida N et al.,Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86;Suda T et al.,Cancer Sci 2006 May,97(5):411-9;Watanabe T et al.,Cancer Sci 2005 Aug,96(8):498-506)。

[0346] CTL 扩增程序

[0347] 使用与 Riddell 等人 (Walter EA et al.,N Engl J Med 1995 Oct 19,333(16):1038-44;Riddell SR et al.,Nat Med 1996 Feb,2(2):216-23) 记载的方法相似的方法在培养物中扩增 CTL。在 40ng/ml 抗 CD3 单克隆抗体 (Pharmingen) 存在下,将总共 5×10^4 个 CTL 与两种经 MMC 灭活的人 B- 淋巴母细胞样细胞系一起悬浮在 25ml AIM-V/5% AS 培养基中。启动培养后一天,向培养物添加 120IU/ml IL-2。在第 5 天、第 8 天和第 11 天给培养物补加新鲜的含有 30IU/ml IL-2 的 AIM-V/5% AS 培养基 (Tanaka H et al.,Br J Cancer 2001 Jan 5,84(1):94-9;Umano Y et al.,Br J Cancer 2001 Apr 20,84(8):1052-7;Uchida N et al.,Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86;Suda T et al.,Cancer Sci 2006 May,97(5):411-9;Watanabe T et al.,Cancer Sci 2005 Aug,96(8):498-506)。

[0348] CTL 克隆的建立

[0349] 在 96 孔圆底微量滴定板 (Nalge Nunc International) 中进行稀释以获得 0.3、1、和 3 个 CTL/ 孔。在总共 150 μ l/ 孔含有 5% AS 的 AIM-V 培养基中将 CTL 与 1×10^4 个细胞/ 孔的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml 的抗 CD3 抗体、和 125U/ml IL-2 一起温育。10 天后向培养基添加 50 μ l/ 孔 IL-2,以达到终浓度 125U/ml IL-2。在第 14 天测试 CTL 活性,并使用与上文所述相同的方法来扩增 CTL 克隆 (Uchida N et al.,Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86;Suda T et al.,Cancer Sci 2006 May,97(5):411-9;Watanabe T et al.,Cancer Sci 2005Aug,96(8):498-506)。

[0350] 特异性 CTL 活性

[0351] 为了检查特异性 CTL 活性,实施干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定和 IFN- γ 酶联免疫吸附测定 (ELISA)。具体而言,制备经肽冲激的 A24LCL (1×10^4 / 孔) 作为刺激细胞。使用 48 孔中培养 of 细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施 IFN- γ ELISPOT 测定和 IFN- γ ELISA 测定。

[0352] 强迫表达靶基因和 / 或 HLA-A24 的细胞的建立

[0353] 通过 PCR 来扩增编码靶基因或 HLA-A24 的可读框的 cDNA。将 PCR 扩增产物克隆入 pCAGGS 载体。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照制造商推荐的规程将质粒转染入 COS7,一种无靶基因和 HLA-A24 的细胞系。自转染起 2 天后,用 Versene (Invitrogen) 收获经过转染的细胞,并用作 CTL 活性测定的靶细胞 (5×10^4 个细胞/ 孔)。

[0354] 结果

[0355] 自 Clorf59 衍生的 HLA-A24 结合肽的预测

[0356] 表 3 依高结合亲和力的次序显示 Clorf59 的 HLA-A24 结合肽。选择并检查了总共 17 种具有潜在 HLA-A24 结合能力的肽以确定表位肽 (表 3)。

[0357] 表 3:自 Clorf59 衍生的 HLA-A24 结合性 9 聚物和 10 聚物肽

[0358]

肽名称	等级	起始位置	氨基酸序列	结合得分	SEQ ID NO
C1orf59-A24-9聚物	1	385	NYFDEQFEF	132	25
	2	221	GYCTQIGIF	100	26
	3	338	KFFVPLQRL	48	27
	4	339	FFVPLQRLL	43.2	28
	5	182	KFEWTRMEF	33	29
	6	35	RYQFVKNLV	25.2	30
	7	253	VFTTSYPSL	20	31
	8	66	KVNPCIELL	14.4	32
	9	145	FPEVVFGYL	10.08	33
	10	200	RYDYSVEFT	10	34
C1orf59-A24-10聚物	1	257	SYPSLQQERF	150	35
	2	144	RFPEVVFGYL	120.96	36
	3	151	GYLFPSMIVI	75	37
	4	338	KFFVPLQRLL	48	38
	5	97	DFLKPRDLNL	30	39
	6	124	GFDLITCIEL	22	40
	7	363	RSVIADSIPL	12	41

[0359] 起始位置指自 C1orf59N 端起的氨基酸残基数。

[0360] 结合得分由“BIMAS”得出。

[0361] 预测的来自 C1orf59 的 HLA-A*2402 限制肽的 CTL 诱导和 C1orf59 衍生肽刺激的 CTL 系的建立

[0362] 依照“材料和方法”中描述的方案产生了针对那些自 C1orf59 衍生的肽的 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法来测定肽特异性 CTL 活性 (图 5a-e)。其显示,用 C1orf59-A24-9-221 (SEQ ID NO:26) 刺激的 5 号孔 (a)、用 C1orf59-A24-9-66 (SEQ ID NO:32) 刺激的 3 号孔 (b)、用 C1orf59-A24-9-200 (SEQ ID NO:34) 刺激的 4 号孔 (c)、用 C1orf59-A24-10-124 (SEQ ID NO:40) 刺激的 5 号孔 (d) 和用 C1orf59-A24-10-363 (SEQ ID NO:41) 刺激的 7 号孔 (e) 展现出与对照孔相比强的 IFN- γ 生成。另外,将所有阳性孔中的这些细胞扩增并建立 CTL 系。通过 IFN- γ ELISA 测定法测定那些 CTL 系的 CTL 活性 (图 6a-e)。其显示,与未经肽刺激的靶细胞相比,所有 CTL 系针对经相应肽刺激的靶细胞均展现出强的 IFN- γ 生成。另一方面,用其它表 3 所示肽刺激未能建立 CTL 系,尽管那些肽可能具有对 HLA-A*2402 的结合活性 (数据未显示)。结果表明 C1orf59 衍生的五种肽被筛选为能诱导强 CTL 系的肽。

[0363] 针对 C1orf59 特异性肽的 CTL 克隆的建立

[0364] 如“材料和方法”中所述通过有限稀释自 CTL 系建立了 CTL 克隆,并通过 IFN- γ ELISA 测定法测定了 CTL 克隆针对经肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。在图 7 中确定了经 C1orf59-A24-9-221 (SEQ ID NO:26)、C1orf59-A24-9-66 (SEQ ID NO:32)、C1orf59-A24-9-200 (SEQ ID NO:34)、C1orf59-A24-10-124 (SEQ ID NO:40) 和

Clorf59-A24-10-363(SEQ ID NO:41) 刺激的 CTL 克隆的强的 IFN- γ 生成。

[0365] 针对外源表达 Clorf59 和 HLA-A*2402 的靶细胞的特异性 CTL 活性

[0366] 对针对这些肽产生的建成 CTL 系,检查它们识别表达 Clorf59 和 HLA-A*2402 分子的靶细胞的能力。使用用相应肽产生的 CTL 系作为效应细胞测试了针对用全长 Clorf59 和 HLA-A*2402 分子基因同时转染的 COS7 细胞(表达 Clorf59 和 HLA-A*2402 基因的靶细胞的一种特异性模型)的特异性 CTL 活性。制备了用全长 Clorf59 基因或 HLA-A*2402 转染的 COS7 细胞作为对照。在图 8 中,经 SEQ ID NO:26 刺激的 CTL 针对表达 Clorf59 和 HLA-A*2402 二者的 COS7 细胞显示出强的 CTL 活性。另一方面,没有检测到显著的针对对照的特异性 CTL 活性。因此,这些数据清楚地证明 Clorf59-A24-9-221(SEQ ID NO:26) 被天然切割并与 HLA-A*2402 分子一起在靶细胞上表达,并且复合物被 CTL 识别。这些结果指示这种自 Clorf59 衍生的肽可应用于癌症疫苗,供用于具有表达 Clorf59 的肿瘤的患者。

[0367] 对抗原肽的同源性分析

[0368] 经 Clorf59-A24-9-221(SEQ ID NO:26)、Clorf59-A24-9-66(SEQ ID NO:32)、Clorf59-A24-9-200(SEQ ID NO:34)、Clorf59-A24-10-124(SEQ ID NO:40) 和 Clorf59-A24-10-363(SEQ ID NO:41) 刺激的 CTL 显示出显著的且特异的 CTL 活性。这个结果可能是由于 Clorf59-A24-9-221(SEQ ID NO:26)、Clorf59-A24-9-66(SEQ ID NO:32)、Clorf59-A24-9-200(SEQ ID NO:34)、Clorf59-A24-10-124(SEQ ID NO:40) 和 Clorf59-A24-10-363(SEQ ID NO:41) 的序列与其它已知可使人免疫系统致敏的分子衍生的肽同源。为了排除这种可能性,使用 BLAST 算法(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有发现具有显著同源性的序列。同源性分析的结果表明 Clorf59-A24-9-221(SEQ ID NO:26)、Clorf59-A24-9-66(SEQ ID NO:32)、Clorf59-A24-9-200(SEQ ID NO:34)、Clorf59-A24-10-124(SEQ ID NO:40) 和 Clorf59-A24-10-363(SEQ ID NO:41) 的序列是独特的,因此,就我们所知,这些分子产生对一些无关分子的不期望免疫学应答的可能性很小。

[0369] 总之,鉴定了自 Clorf59 衍生的新型 HLA-A24 表位肽。而且,证明了 Clorf59 的表位肽可用于癌症免疫疗法。

[0370] 工业应用性

[0371] 本发明描述了新的 TAA,尤其是源自 Clorf59 的新 TAA,它们能够诱导强而特异性的抗肿瘤免疫应答,并且可应用于广泛的癌症类型。这样的 TAA 可用作针对与 Clorf59 过表达相关的疾病的肽疫苗,这样的疾病例如癌症,更具体地说就是膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和小细胞肺癌(SCLC)。

[0372] 虽然本文中参照具体实施方案详细地描述了本发明,但是要理解,上面的描述本质上是例示性的和解释性的,而且意图例示本发明及其优选实施方案。经由常规实验,本领域技术人员会容易地认识到,可以对本发明进行各种变化和修饰,而不偏离本发明的精神和范围,本发明的边界和范围由所附权利要求来限定。

[0001]

序列表

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

<120> C10RF59 肽及包含它的疫苗

<130> ONC-A0832P

<150> JP 2008-327358

<151> 2008-12-24

<150> US 61/145,912

<151> 2009-01-20

<160> 47

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 1

Leu Gln Gln Glu Arg Phe Phe Lys Leu
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 2

Phe Cys Val Gly Asp Lys Phe Phe Val
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 3

Tyr Leu Ser Pro Ser Met Ile Val Ile
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 4

Arg Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile Thr
1 5

[0002]

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 5

Leu Val Asn Glu Val Ser Gln Gln Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 6

Arg Leu Leu Lys Val Asn Pro Cys Ile
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 7

Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile Thr Cys
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

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

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 9

Cys Leu Ser Glu Gln His Asp Gln His Val
1 5 10

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

[0003]

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 10

Ser Leu Gln Gln Glu Arg Phe Phe Lys Leu
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 11

Val Leu Val Asn Glu Val Ser Gln Gln Val
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 12

Leu Leu Ala Tyr Pro Lys Leu Asn Arg Leu
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 13

Ser Leu Ala Pro Phe Leu Gly Asp Phe Leu
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 14

Cys Val Gly Asp Lys Phe Phe Val Pro Leu
1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

[0004]

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 15

Met Glu Phe Gln Thr Trp Ala Leu Tyr Val
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 16

Arg Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile Thr Cys
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 17

Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile Thr Cys Ile
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 18

Pro Leu Tyr Arg Gln Arg Tyr Gln Phe Val
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 19

Phe Glu Trp Thr Arg Met Glu Phe Gln Thr
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

[0005]

<400> 20

Tyr Val Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 21

Ser Val Val Asp Gly Asn Phe Glu Glu Val
1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 22

Lys Val Asn Pro Cys Ile Glu Leu Leu Val
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 23

Ile Glu Asn Ser Pro Thr Pro Phe Cys Val
1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 24

Ala Val Phe Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 25

[0006]

Asn Tyr Phe Asp Glu Gln Phe Glu Phe
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 26

Gly Tyr Cys Thr Gln Ile Gly Ile Phe
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 27

Lys Phe Phe Val Pro Leu Gln Arg Leu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 28

Phe Phe Val Pro Leu Gln Arg Leu Leu
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 29

Lys Phe Glu Trp Thr Arg Met Glu Phe
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 30

Arg Tyr Gln Phe Val Lys Asn Leu Val

[0007]

1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 31

Val Phe Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Leu
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 32

Lys Val Asn Pro Cys Ile Glu Leu Leu
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 33

Phe Pro Glu Val Val Phe Gly Tyr Leu
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 34

Arg Tyr Asp Tyr Ser Val Glu Phe Thr
1 5

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 35

Ser Tyr Pro Ser Leu Gln Gln Glu Arg Phe
1 5 10

[0008]

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 36

Arg Phe Pro Glu Val Val Phe Gly Tyr Leu
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 37

Gly Tyr Leu Phe Pro Ser Met Ile Val Ile
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 38

Lys Phe Phe Val Pro Leu Gln Arg Leu Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 39

Asp Phe Leu Lys Pro Arg Asp Leu Asn Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 40

Gly Phe Asp Leu Ile Thr Cys Ile Glu Leu
1 5 10

<210> 41

[0009]

```

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 41
Arg Ser Val Ile Ala Asp Ser Ile Pro Leu
1             5             10

<210> 42
<211> 1890
<212> DNA
<213> 人

<400> 42
gttttttaggc ctttgccacg cctcgggagc gccacgaact caacagccgc ccaagccgcc 60
ttccggctcg cggctctcgg acgcgctcgg agttgggggc cttgccaac agctgccgta 120
ccgtgcccgcg tcgcagccgc acgctagcgg ggtcaacggc gcggcaggcg caggggtcct 180
cgccaagggt cggaaaggga ccttgaaaat ggcttctggg catgcgccac agcggccggt 240
acgagacgca aaaccgacgc cttggaactg agagcctaga gggacggagc tcggcgcacc 300
atgaggcttc cggggcccaa ggccgaccgt gagagcgcac gagctgagtc agtgcctgatt 360
ctctcaataa gagcttgaag gataaatctt catctttgtt tcaacaaac ttcgaaacaa 420
aatggaagaa aataatctac agtgcagtag tgtggttgac ggtaattttg aagaagttcc 480
cagggagacg gcaattcagt ttaaacctcc actatacaga cagcggtaac agtctgttaa 540
aaatttagtg gatcaacatg agcctaagaa ggttcagac ctaggatgtg gtgatacttc 600
actcttaagg ctgctaaag tcaatccatg cattgaattg ctgttggag tagataataa 660
tgaggataaa ttacgaigga gaggggattc gttagctcct ttcttggggg attttctgaa 720
acctcgggat ctgaatttga ccatcacatt gatacatggc tccgttggg agagagactc 780
tcgtttgctt ggatttgact tgataacgtg tattgaatta atagaacatt tggattcagg 840
tgatctggcc agatttcctg aagtggattt tgggtacctg tctccatcca tgattgtcat 900
cagcacacca aactctgaat tcaatccctt gtttccatca gtacacctaa gagattcaga 960
tcataaatat gagtggacca gaatggagtt tcagacctgg gctttatatg tggcaaatcg 1020
ctatgattac tctgtggagt ttactgggtt cggggaacca ccagctggag ctgagaaagt 1080
tggatactgt acccagatag gaatcttccg gaaaaatgga ggaaaggcaa cagaatcatg 1140
tcttcagag cagcatgac agcatgllt laaagctgtt tttaccacct cataccaag 1200
cttacagcag gaaaggttct ttaaacttgt gttggttaat gaggtgtccc aacaagtga 1260
aagcttaaga gtgagccacc tgccaaggcg gaaagaacag gctggggaac ggggtgataa 1320
gcccnaagac attggtggct caaaggcccc tctcccatgc ttggaccag tcttcacaga 1380
ggttgagaag gccaaagatag agaactctcc cacacccttc tgtgttgag ataaattttt 1440
cgtacctctg cagagactcc ttgcgtatcc caagttgaac cgttatgtg ctaatgaaga 1500
gatgatgaga tcagtcatg ctgactcaat tctctgagc agtgatgggt ctgcagtgggt 1560
ggctgacctg cgtaatatt ttgatgaaca gtttgagttt tgaaccaagt ttatttccctg 1620

```

[0010]

```

aaatttcagg gtctcagcga tagtttgct cacttagaat ttagttttt ttgigtaate 1680
ctaattcaag taatgtttt aaagtttcac tgcaaaagtc tatgttcaa gccattggac 1740
agacctgcit gagataatggc cagactgcag tgagccctga gaaagatatg agggittaaa 1800
acgggtgcit tcccttgatt ttggactttt ttgttttctc aagaataaag aagttggatg 1860
tggttaataig ttaattlga aaaaaaaaaa 1890

```

```

<210> 43
<211> 393
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 43

```

```

Met Glu Glu Asn Asn Leu Gln Cys Ser Ser Val Val Asp Gly Asn Phe
1          5          10          15

```

```

Glu Glu Val Pro Arg Glu Thr Ala Ile Gln Phe Lys Pro Pro Leu Tyr
20          25          30

```

```

Arg Gln Arg Tyr Gln Phe Val Lys Asn Leu Val Asp Gln His Glu Pro
35          40          45

```

```

Lys Lys Val Ala Asp Leu Gly Cys Gly Asp Thr Ser Leu Leu Arg Leu
50          55          60

```

```

Leu Lys Val Asn Pro Cys Ile Glu Leu Leu Val Gly Val Asp Ile Asn
65          70          75          80

```

```

Glu Asp Lys Leu Arg Trp Arg Gly Asp Ser Leu Ala Pro Phe Leu Gly
85          90          95

```

```

Asp Phe Leu Lys Pro Arg Asp Leu Asn Leu Thr Ile Thr Leu Tyr His
100         105         110

```

```

Gly Ser Val Val Glu Arg Asp Ser Arg Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile
115         120         125

```

```

Thr Cys Ile Glu Leu Ile Glu His Leu Asp Ser Gly Asp Leu Ala Arg
130         135         140

```

```

Phe Pro Glu Val Val Phe Gly Tyr Leu Ser Pro Ser Met Ile Val Ile
145         150         155         160

```

```

Ser Thr Pro Asn Ser Glu Phe Asn Pro Leu Phe Pro Ser Val Thr Leu
165         170         175

```

```

Arg Asp Ser Asp His Lys Phe Glu Trp Thr Arg Met Glu Phe Gln Thr
180         185         190

```

```

Trp Ala Leu Tyr Val Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Ser Val Glu Phe Thr
195         200         205

```

```

Gly Val Gly Glu Pro Pro Ala Gly Ala Glu Asn Val Gly Tyr Cys Thr

```

[0011]

210 215 220

Gln Ile Gly Ile Phe Arg Lys Asn Gly Gly Lys Ala Thr Glu Ser Cys
225 230 235 240

Leu Ser Glu Gln His Asp Gln His Val Tyr Lys Ala Val Phe Thr Thr
245 250 255

Ser Tyr Pro Ser Leu Gln Gln Glu Arg Phe Phe Lys Leu Val Leu Val
260 265 270

Asn Glu Val Ser Gln Gln Val Glu Ser Leu Arg Val Ser His Leu Pro
275 280 285

Arg Arg Lys Glu Gln Ala Gly Glu Arg Gly Asp Lys Pro Lys Asp Ile
290 295 300

Gly Gly Ser Lys Ala Pro Val Pro Cys Phe Gly Pro Val Phe Thr Glu
305 310 315 320

Val Glu Lys Ala Lys Ile Glu Asn Ser Pro Thr Pro Phe Cys Val Gly
325 330 335

Asp Lys Phe Phe Val Pro Leu Gln Arg Leu Leu Ala Tyr Pro Lys Leu
340 345 350

Asn Arg Leu Cys Ala Asn Glu Glu Met Met Arg Ser Val Ile Ala Asp
355 360 365

Ser Ile Pro Leu Ser Ser Asp Gly Ser Ala Val Val Ala Asp Leu Arg
370 375 380

Asn Tyr Phe Asp Glu Gln Phe Glu Phe
385 390

<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列

<400> 44
gtctaccagg cattcgcttc at

22

<210> 45
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列

<400> 45
tcagctggac cacagccgca gcgt

24

<210> 46

[0012]

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 3-TRbeta-C1

<400> 46
tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 47
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列

<400> 47
ctagcctctg gaatcctttc tctt 24

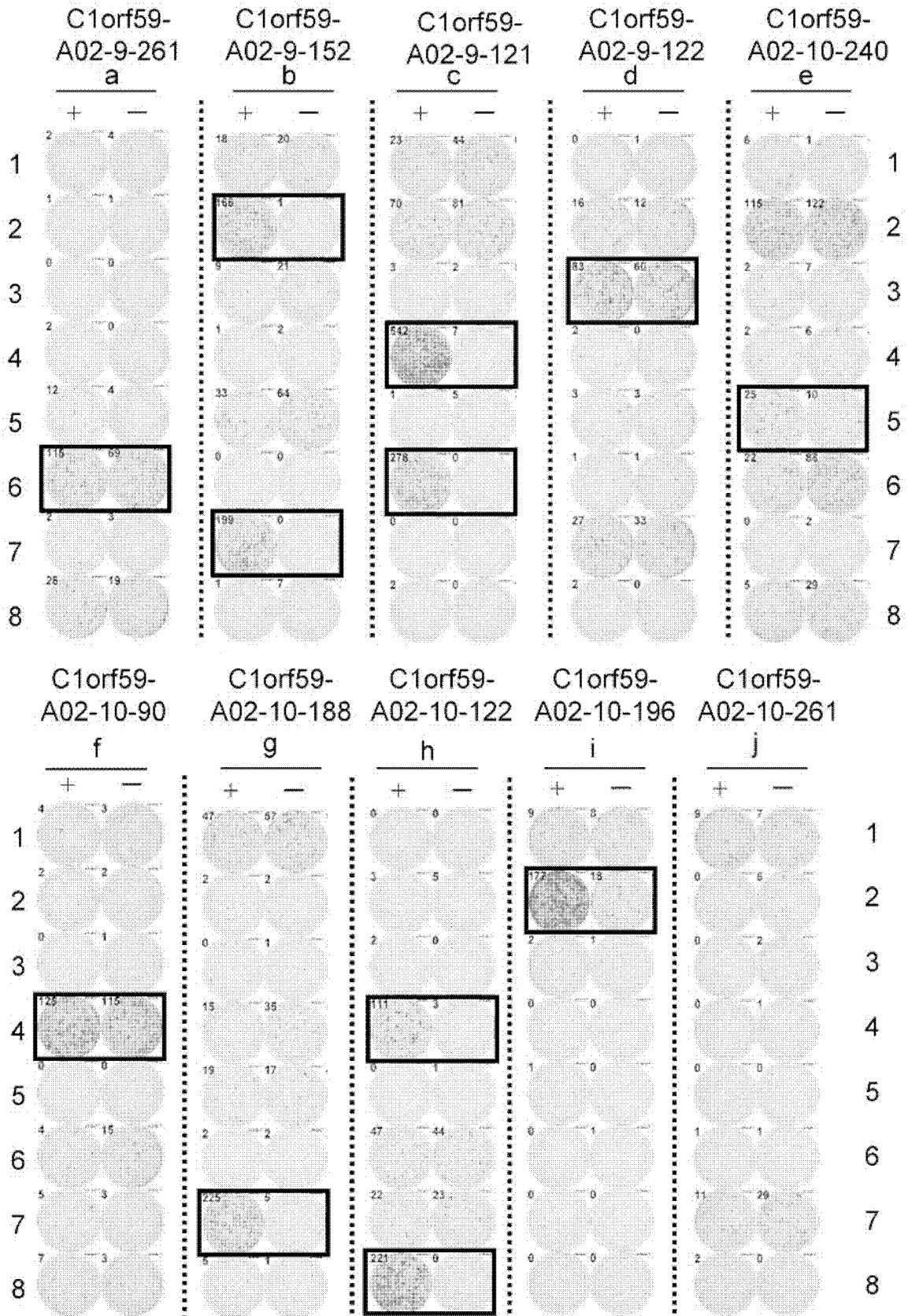


图 1

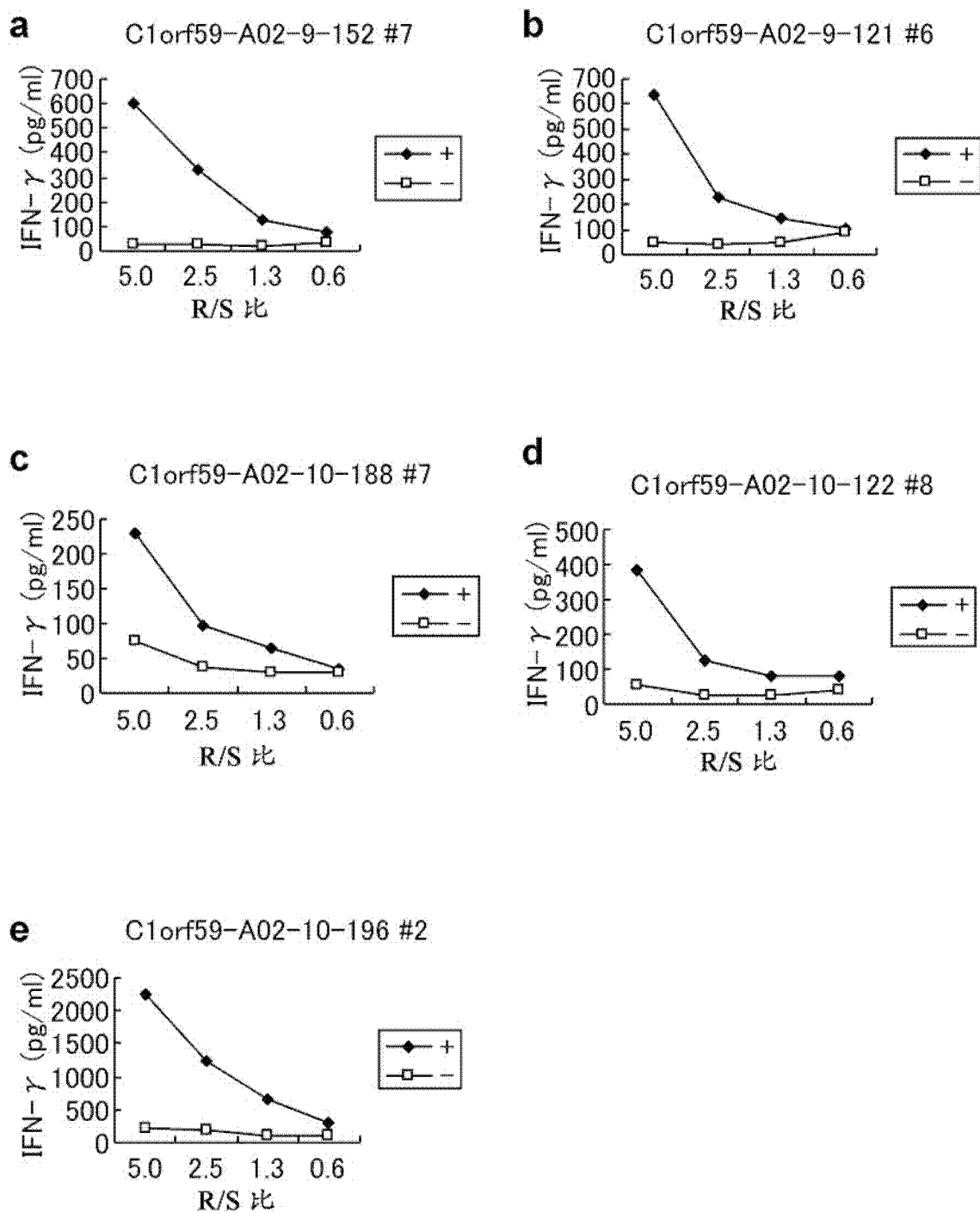


图 2

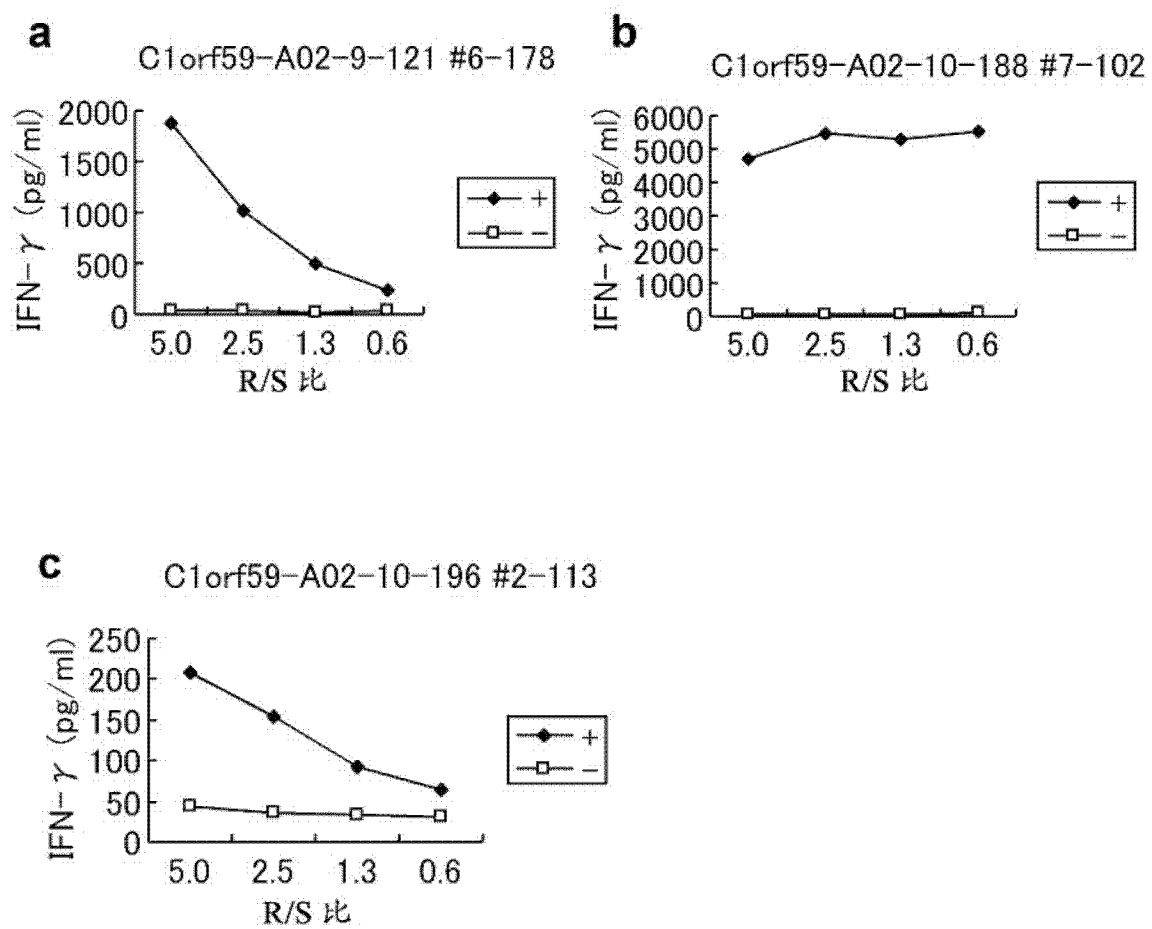


图 3

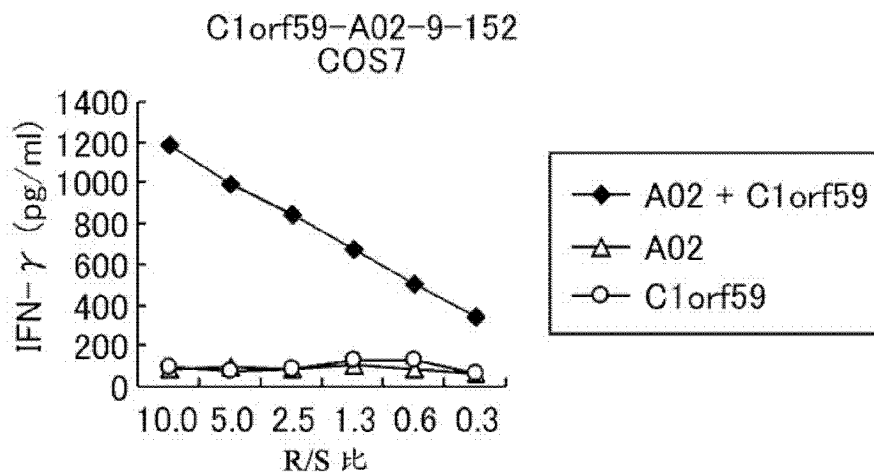
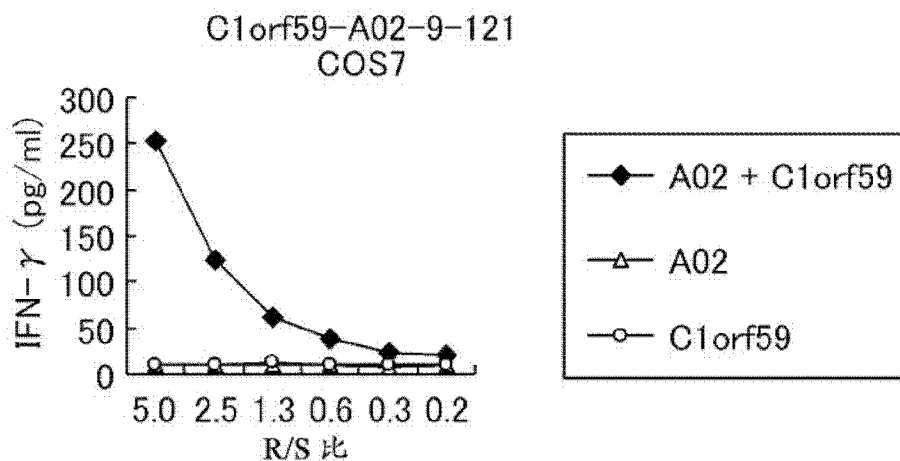
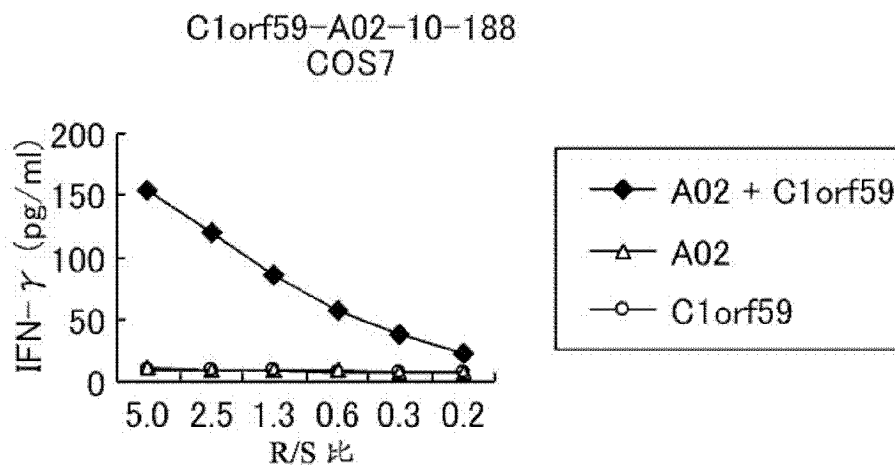
a**b****c**

图 4

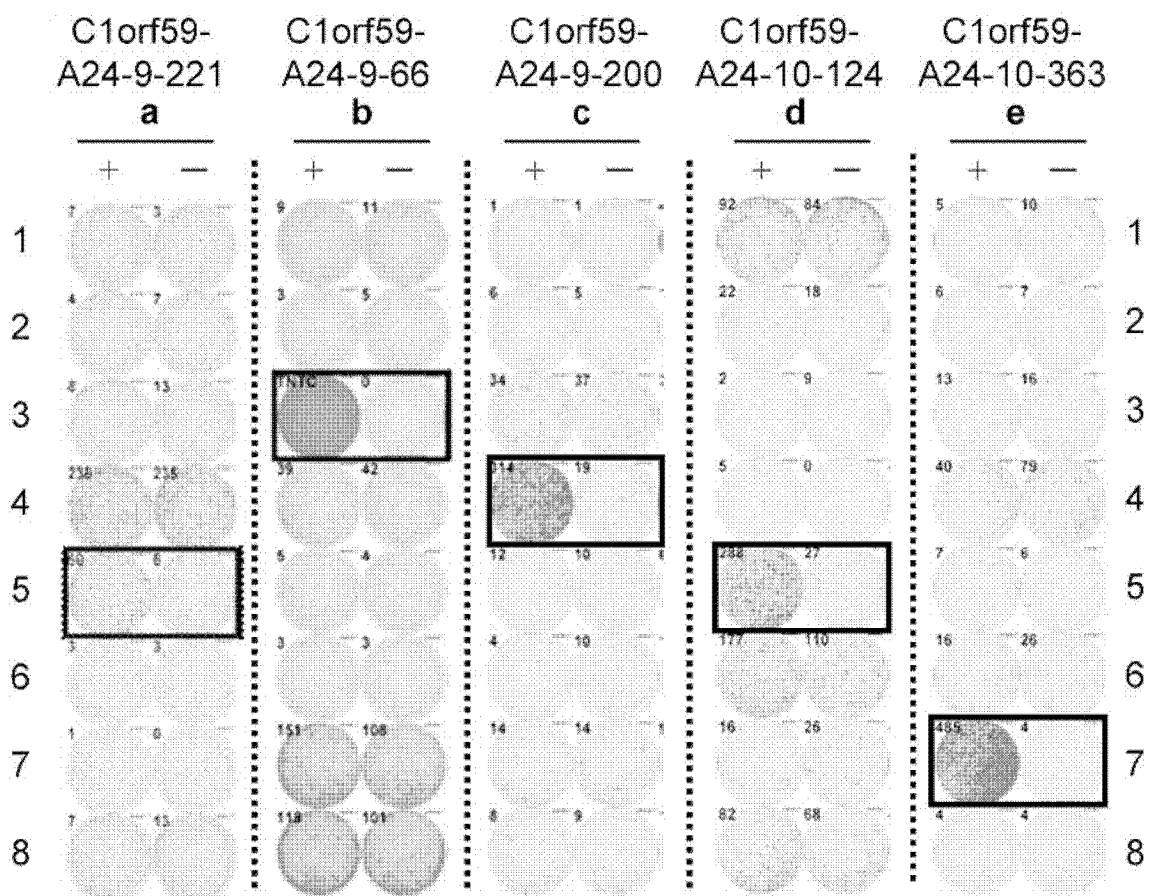


图 5

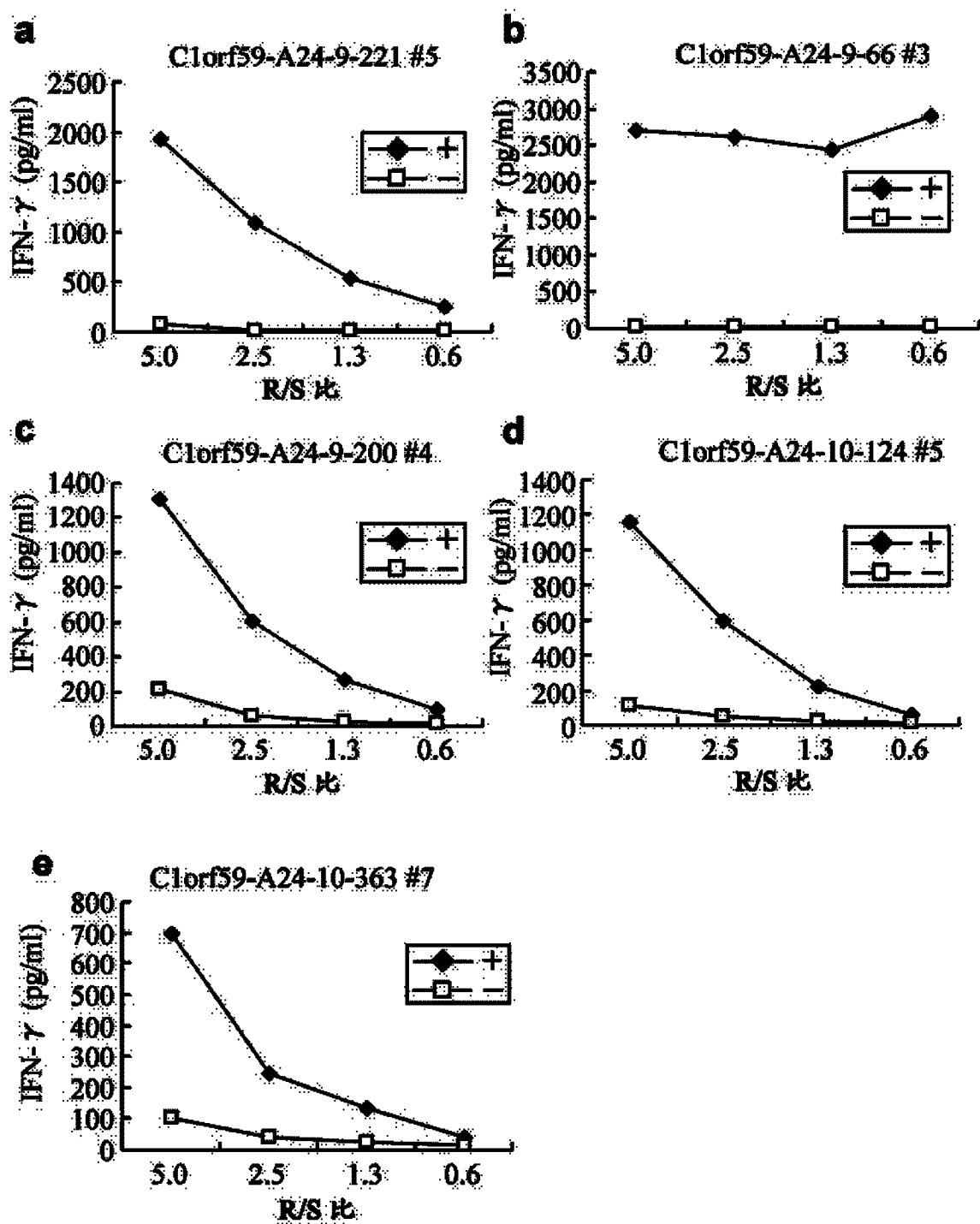


图 6

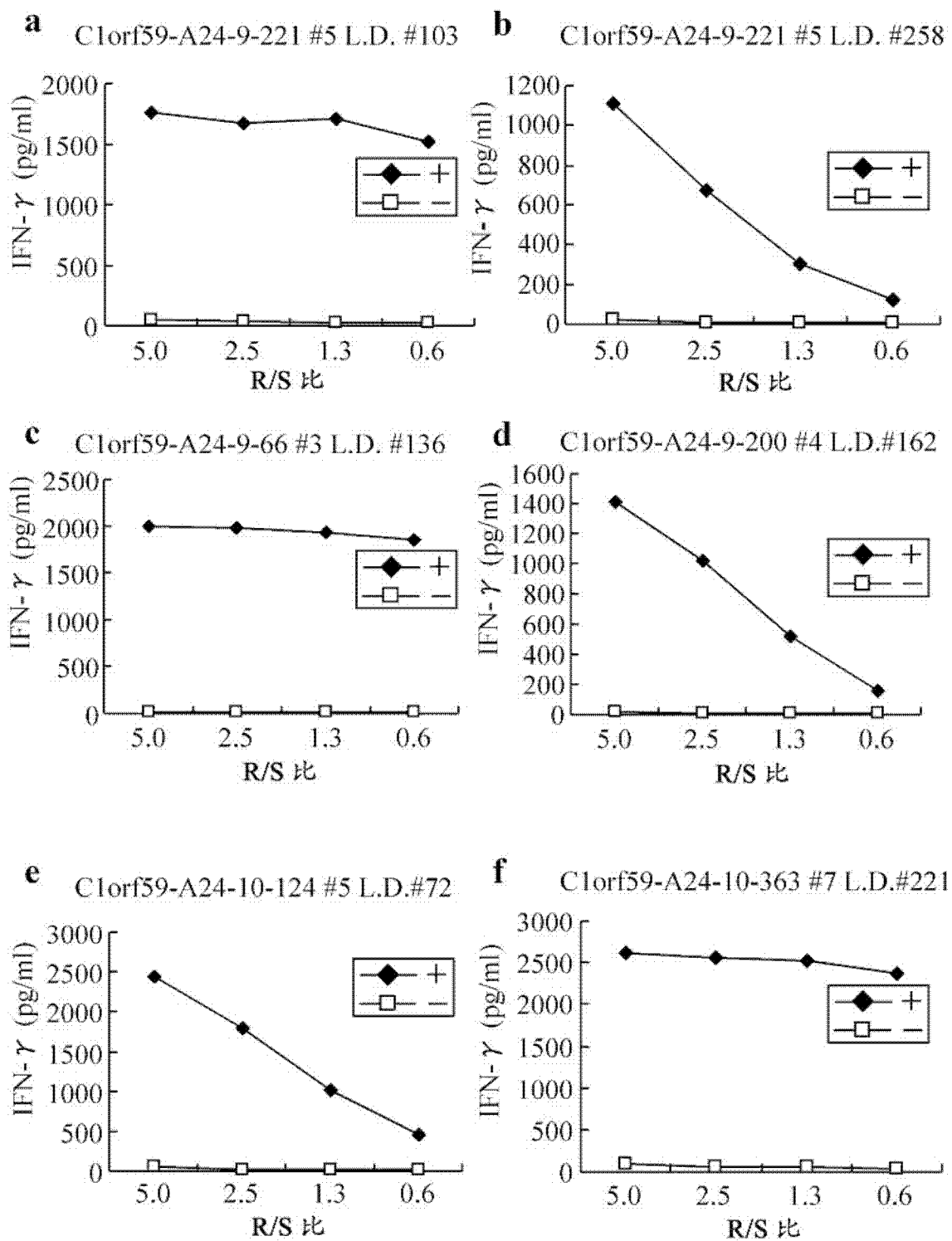


图 7

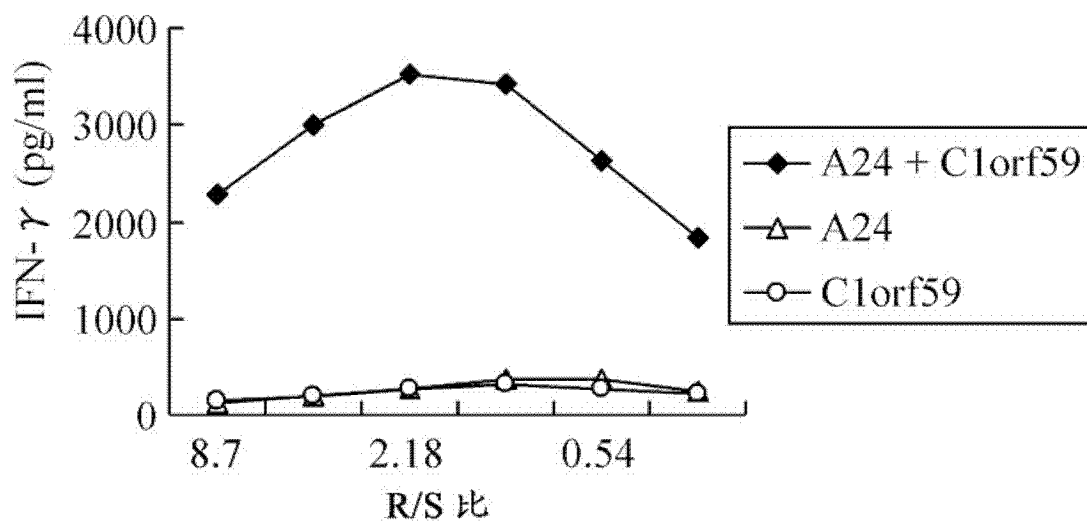
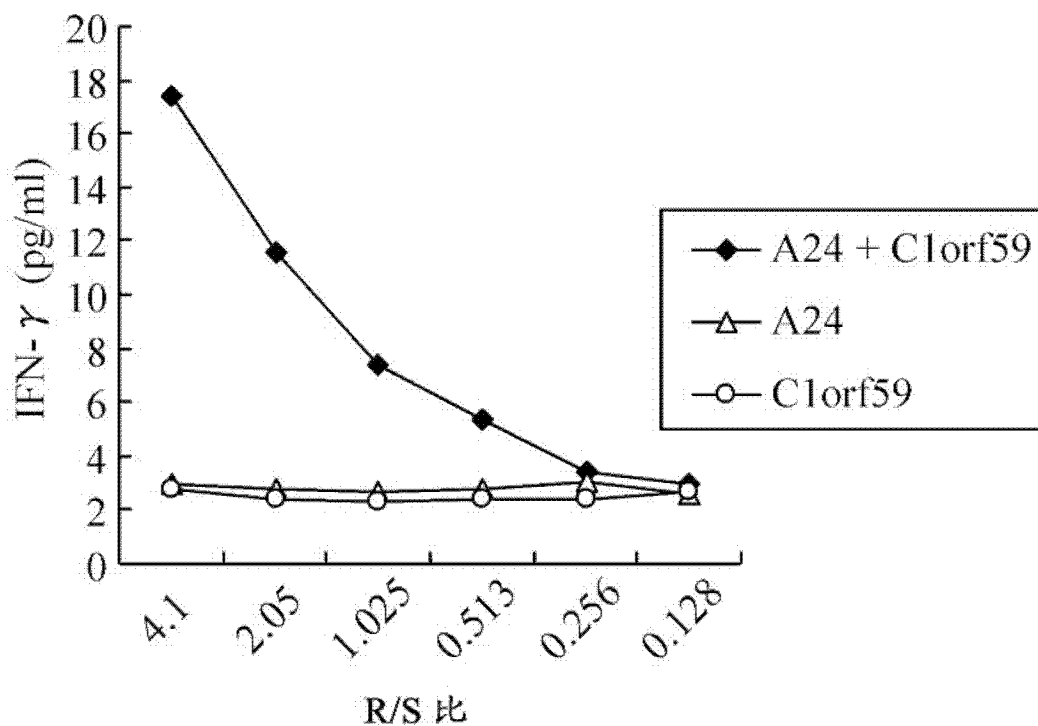
a C1orf59-A24-9-221 克隆 #5 L.D. #103 COS7**b** C1orf59-A24-9-221 克隆 #5 L.D. #248 COS7

图 8