



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109963585 B

(45) 授权公告日 2024.10.15

(21) 申请号 201780069631.0

(73) 专利权人 阿尔勒治疗公司

(22) 申请日 2017.09.21

地址 瑞士,日内瓦

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 M·德若尔滋 E·贝尔诺儿

申请公布号 CN 109963585 A

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(43) 申请公布日 2019.07.02

专利代理人 封新琴

(30) 优先权数据

(51) Int.CI.

PCT/EP2016/072475 2016.09.21 EP

A61K 39/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2019.05.10

CN 107428845 A, 2017.12.01

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2014041505 A1, 2014.03.20

PCT/EP2017/073954 2017.09.21

WO 2015073632 A1, 2015.05.21

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 沈晶晶

W02018/055060 EN 2018.03.29

权利要求书2页 说明书133页

序列表69页 附图70页

(54) 发明名称

包括细胞穿透肽、多表位和TLR肽激动剂的
用于治疗癌症的融合物

(57) 摘要

本发明提供了一种用于预防和/或治疗癌症的复合物,该复合物包括a)细胞穿透肽,b)至少一种抗原或抗原表位,和c)至少一种TLR肽激动剂,其中组分a) - c)共价地连接。具体地,提供了用于预防和/或治疗癌症的组合物,比如药物组合物和疫苗。

1. 一种复合物, 其自N端至C端包括:
 - a) 氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的细胞穿透肽;
 - b) 至少三种抗原表位; 和
 - c) 氨基酸序列如SEQ ID NO:15或71所示的至少一种TLR肽激动剂, 其中组分a) -c) 被共价连接, 并且其中所述至少三种抗原表位包括 (i) 如SEQ ID NO:95所示的存活蛋白片段, (ii) 如SEQ ID NO:96所示的CEA片段, 和 (iii) 如SEQ ID NO:97所示的ASCL2片段。
2. 根据权利要求1所述的复合物, 其中所述至少三种抗原表位如SEQ ID NO:98所示。
3. 根据权利要求1所述的复合物, 其中所述复合物是重组多肽或重组蛋白。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的复合物, 其中所述复合物包括或由氨基酸序列如SEQ ID NO:89所示的多肽。
5. 一种编码根据权利要求1-4任一项所述复合物的核酸。
6. 一种包括根据权利要求5所述核酸的载体。
7. 一种包括根据权利要求5所述核酸或根据权利要求6所述载体的宿主细胞。
8. 一种制备根据权利要求1-4任一项所述复合物的方法, 所述方法包括在培养基中培养根据权利要求7所述宿主细胞和从所述培养基分离所述复合物或在宿主细胞溶胞之后从宿主细胞溶胞产物分离所述复合物。
9. 一种负载有根据权利要求1-4任一项所述复合物的细胞。
10. 根据权利要求9所述的细胞, 其中所述细胞是抗原呈递细胞。
11. 根据权利要求10所述的细胞, 其中所述抗原呈递细胞是树突细胞。
12. 一种组合物, 其包括下列的至少一种:
 - (i) 根据权利要求1-4任一项所述复合物;
 - (ii) 根据权利要求5所述核酸;
 - (iii) 根据权利要求6所述载体;
 - (iv) 根据权利要求7所述宿主细胞; 或
 - (v) 根据权利要求9-11任一项所述细胞。
13. 一种疫苗, 其包括下列的至少一种:
 - (i) 根据权利要求1-4任一项所述复合物;
 - (ii) 根据权利要求5所述核酸;
 - (iii) 根据权利要求6所述载体;
 - (iv) 根据权利要求7所述宿主细胞; 或
 - (v) 根据权利要求9-11任一项所述细胞。
14. 一种药物组合物, 其包括至少一种根据权利要求1-4任一项所述复合物或至少一种根据权利要求9-11任一项所述细胞, 和药学上可接受的载体。
15. 下列在制备用于引发免疫应答或活化树突细胞的药物中的用途:
 - (i) 根据权利要求1-4任一项所述复合物;
 - (ii) 根据权利要求5所述核酸;
 - (iii) 根据权利要求6所述载体;
 - (iv) 根据权利要求7所述宿主细胞;

- (v) 根据权利要求9-11任一项所述细胞；
- (vi) 根据权利要求12所述组合物；
- (vii) 根据权利要求13所述疫苗；或
- (viii) 根据权利要求14所述药物组合物。

包括细胞穿透肽、多表位和TLR肽激动剂的用于治疗癌症的融合物

[0001] 本发明涉及接种疫苗的领域,具体地涉及用于预防和/或治疗结肠直肠癌(CRC)的疫苗。

[0002] 结直肠癌(CRC)在全球范围内,CRC是一种常见的和致命的疾病以及第三常见的诊断癌症,男性居第三位,女性居第二位,2012年新发病例超过136万,死亡人数约为694,000。发展CRC的风险受人类、环境和遗传因素的影响(Cancer, I.A.f.R.o.GLOBACAN 2012.2012 [2015年7月5日引用];可得自:http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx)。虽然CRC发病率在男性中比在女性中占更大比重,但受年龄和生活方式的影响更显著。事实上,超过90%被诊断患有CRC的患者为50岁或以上(Prevention,C.f.D.C.a.What Are the Risk Factors for Colorectal Cancer?2015[2015年7月5日引用]),同时2/3的病例发生在发达国家。有证据表明,一般食用肉类,特别是红肉或饮用导致一般型肥胖的酒精饮料大大增加了CRC的风险(Stewart,B.和C.Wild,World Cancer Report 2014,B.Stewart和C.Wild,Editors.2014,International Agency for Research on Cancer:Geneva)。另外两个因素正在显著影响结直肠癌的发病风险:遗传性和炎症性肠病。家族性腺瘤性息肉病(FAP)例如正显著增加不到50岁的人患CRC的风险(Burt,R.W.,J.A.DiSario,和L.Cannon-Albright,Genetics of colon cancer:impact of inheritance on colon cancer risk.Annu Rev Med,1995.46:p.371-9)。FAP,如MAP(MUTYH相关息肉病)(Sieber,O.M.等人,Multiple colorectal adenomas,classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH.N Engl J Med,2003.348(9):p.791-9)或林奇综合征(Lynch,H.T.等人,Genetics,natural history,tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer:an updated review.Gastroenterology,1993.104(5):p.1535-49)与使患者易于多发性结肠腺瘤的遗传的基因突变相关(Dennis J Ahnen, D.M.,FA.Colorectal cancer:Epidemiology,risk factors, and protective factors.2015[2015年7月9日引用];可得自:<http://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>)。溃疡性结肠炎或克罗恩病等疾病在发展CRC方面的影响已得到充分证明。例如,溃疡性结肠炎的影响与风险增加3至15倍有关(Ekbom,A.等人,Ulcerative colitis and colorectal cancer.A population-based study.N Engl J Med,1990.323(18):p.1228-33)。虽然关于克罗恩病的数据较少,但类似的相对风险与该疾病相关联。对于患有CRC、腺瘤性息肉病或炎症性肠病的家族史的患者,强烈建议进行早期筛查(Jemal,A.等人,Global cancer statistics.CA Cancer J Clin,2011.61(2):p.69-90)。

[0003] 与许多癌症一样,CRC患者的生存时间取决于疾病发展阶段。早期(0期、I期和II期)患者具有良好预后(超过75%)。III期具有更不均一的存活率(从90%降至50%),这取决于肿瘤侵入外周组织。最后,只有IV期对患者存活时间显示出快速且显著的影响:仅有约10%的患者在诊断后存活超过60个月。

[0004] 现有的治疗通常基于手术,随后有或没有完善的化学疗法、放射疗法和/或靶向疗

法(Moertel,C.G.,Chemotherapy for colorectal cancer.N Engl J Med,1994.330(16):p.1136-42;Meyerhardt,J.A.and R.J.Mayer,Systemic therapy for colorectal cancer.N Engl J Med,2005.352(5):p.476-87)。根据疾病进展阶段,现有治疗允许在诊断后两年存活率为30%至95%。所有早期CRC治疗策略均开始于手术,与其他方案组合或不组合。关于后续治疗方案的决定取决于初步筛查结果中确定的疾病进展阶段。对于晚期CRC,通常建议使用化学疗法或靶向疗法作为一线治疗。最常用的方案是FOLFOX、CapeOX或FOLFIRI。这些治疗可以与以下推荐的靶向VEGF(Genentech贝伐单抗(bevacizumab)/Avastin®或Regeneron-Sanofi阿柏西普(aflibercept)/Zaltrap®)或EGFR(Merck-Serono西妥昔单抗(cetuximab)/Erbitux®)的生物药物组合使用。可以提出其他靶向疗法作为独立的一线治疗。Amgen的EGFR单克隆抗体(帕尼单抗(panitumumab)/Vectibix®)以及最近的拜耳的小分子激酶抑制剂瑞戈非尼(Regorafenib)(Stivarga®)已经证明了它们能够增加整体CRC患者的存活时间。如果疾病已经重要地扩散到其他器官,可以使用来自Eli Lilly的VEGF单克隆抗体雷莫芦单抗(Ramucirumab)(Cyramza®)。对于IV期,可以使用放射来缓解疼痛等症状。

[0005] 虽然CRC化疗已经完善(Moertel,C.G.,Chemotherapy for colorectal cancer.N Engl J Med,1994.330(16):p.1136-42),但是针对更有效且更少受到二次效应策略的动力在过去几十年重要地发展,即针对IV期CRC(Gallagher,D.J.和N.Kemeny,Metastatic colorectal cancer:from improved survival to potential cure.Oncology,2010.78(3-4):p.237-48)。第一项试验涉及补充辅助疗法。然而,多年后,基于5-FU的术后疗法的价值仍然存在争议,特别是对于II期CRC患者(Meyerhardt,J.A.和R.J.Mayer,Systemic therapy for colorectal cancer.N Engl J Med,2005.352(5):p.476-87)。

[0006] 在该背景下,免疫疗法已经被认真地评估。免疫系统可以识别和在一定程度上消除肿瘤细胞,然而,该抗肿瘤应答通常具有低幅度并且是低效的。利用治疗性接种疫苗促进该弱的抗肿瘤应答已经是癌症疗法的长期追求目标。调节免疫系统以增强免疫应答因而已经成为肿瘤学中有希望的治疗方法,这是由于它可以与标准的护理治疗组合。

[0007] 临床试验中有希望的临床前数据和进展,包括最近FDA批准的Sipuleucel-T疫苗和抗CTLA-4抗体,显示主动免疫接种对于某些癌症类型是安全的和可行的治疗形式。已经使用不同的方法——其包括修饰的肿瘤细胞疫苗、肽疫苗、重组病毒载体、DNA、蛋白质、或树突细胞疫苗——报道了肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)介导的免疫应答的诱导。然而,由CTL介导的抗肿瘤免疫仅仅偶然地与肿瘤消退相关联并且仅仅少数项目已经到达III期临床阶段。

[0008] 总的来说,癌症疫苗迄今为止显示了非常有限的临床功效。事实上,在2011年末,在30,000项正在进行的癌症疫苗临床试验之中,仅仅报道了19项III期试验(全球数据,2012)。在它们之中,存在用于乳腺癌的肽疫苗NeuVax、用于非小细胞肺癌(NSCLC)和乳腺癌的基于脂质体的疫苗Stimuvax、用于NSCLC的基于牛痘的疫苗TG4010和用于NSCLC的含佐剂(adjuvanted)脂质体GSK1572932A。这四种癌症疫苗基于不同的技术并且具有如下共同之处:它们靶向一种单一抗原。

[0009] 治疗性癌症疫苗可以被划分为两种主要的类别:个性化(自体)和标准化疫苗,并

且取决于技术平台被进一步分类。当前的个性化疫苗包括肿瘤溶胞产物疫苗以及基于树突细胞的疫苗(下文称为基于细胞的)。对于后者,抗原负载可以在使用肿瘤溶胞产物的脉冲,或利用从肿瘤提取的RNA的转染的情况下发生。在该情况下,抗原是肿瘤特异的或相关的,但是没有明确限定。利用肽脉冲或使用蛋白质比如用于改造 Provenge® 疫苗的前列腺酸性磷酸酶(PAP),树突细胞也可以负载有限定的抗原。然而,这些基于细胞的疗法的制造过程是耗时的和劳动密集的,同时难以达到和维持质量标准。免疫监测产生进一步的复杂性。而且,与限定的和标准化的疫苗不同,大多数自体癌症疫苗不允许控制使用的抗原的特性或数量。

[0010] 与基于细胞的疗法(APC、T细胞、CAR、溶胞产物)形成对比,亚单位疫苗(蛋白质或肽)允许标准化疫苗发展出更容易的生产和显著更好的批次间重现性,其可以被施用给大范围的患者。另外,抗原被完全限定,其允许更好的免疫监测和降低疫苗组分的有害作用的风险。

[0011] 在临床前和临床研发中评价的不同方法包括短肽疫苗(Slingluff CL, Jr. The present and future of peptide vaccines for cancer:single or multiple, long or short, alone or in combination? Cancer journal 2011;17 (5) :343-50)、长肽疫苗(Melief CJ, van der Burg SH. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. Nature reviews Cancer 2008;8 (5) :351-60)和蛋白。与长肽和蛋白疫苗形成对比,短肽疫苗具有非常短的半衰期和可能对免疫应答具有消极后果。

[0012] 对于基于蛋白质的疫苗,在转移性黑素瘤(Kruit WH, Suciu S, Dreno B, Mortier L, Robert C, Chiariion-Silene V等人Selection of immunostimulant AS15 for active immunization with MAGE-A3 protein:results of a randomized phase II study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group in Metastatic Melanoma. Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology 2013;31 (19) :2413-20)和非小细胞肺癌(NSLC) (Vansteenkiste J, Zielinski M, Linder A, Dahabreh J, Gonzalez EE, Malinowski W等人Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology 2013;31 (19) :2396-403)中有希望的II期数据后,已经在满腔热情地等待利用基于重组融合蛋白的疫苗靶向MAGE-A3的结果。然而,在2013年,黑素瘤中的III期DERMA试验(NCT00796445)没有满足其第一个协同主要终点(co-primary endpoint),接着在2014年停止NSCL中的III期MAGRIT研究(NCT00480025)。不管这些非常令人失望的临床结果,基于蛋白质的疫苗不可否认地存在许多优点。

[0013] 同样在结直肠癌的背景下,肿瘤免疫学的科学进展导致通过细胞和体液途径更好地理解抗肿瘤免疫应答(Smith, C.L.等人, Immunotherapy of colorectal cancer. Br Med Bull, 2002.64:p.181-200; Koido, S.等人, Immunotherapy for colorectal cancer. World J Gastroenterol, 2013.19 (46) :p.8531-42)并帮助更好地鉴定肿瘤抗原。这一进展为CRC的免疫疗法开辟了新的视角。被动免疫疗法如抗体被证明是CRC治疗的首选靶向疗法。由于

它们能够通过表皮生长因子受体(EGFR)与肿瘤生长途径相互作用或抑制血管内皮生长因子(VEGF),西妥昔单抗、帕尼单抗和贝伐单抗等抗体分别在2004、2006和2009年获得FDA批准用于CRC治疗。

[0014] 到目前为止,CRC的过继性细胞转移(ACT)疗法临床试验不幸返回了不良结果。事实上,非工程化和工程化T细胞治疗的有限患者群体似乎是一个主要障碍。类似地,在用嵌合抗原受体(CAR)融合的T细胞治疗的患者中观察到的继发效应未能证明ACT是安全和有效的治疗(Koido,S.等人,Immunotherapy for colorectal cancer.World J Gastroenterol,2013.19(46):p.8531-42;Xiang,B.等人,Colorectal cancer immunotherapy.Discov Med,2013.15(84):p.301-8)。因此,在可行性和成本以及免疫应答记忆方面增加到通常的ACT缺点似乎暂时阻止了ACT选项。

[0015] 最近,患者对阿柏西普的存活率的阳性临床试验III期结果允许这种抗VEGF融合蛋白被FDA批准用于转移性结直肠癌(mCRC)(Clarke,J.M.和H.I.Hurwitz,Ziv-aflibercept:binding to more than VEGF-A--does more matter?Nat Rev Clin Oncol,2013.10(1):p.10-1)。这种靶向疗法批准为非抗体免疫疗法铺平了道路。到目前为止,尚未批准主动免疫疗法和免疫调节剂用于CRC。在结构上,对于CRC测试的绝大多数分子是小分子,通常是激酶抑制剂,或抗体(分别为52%和28%)。

[0016] 一般而言,治疗性癌症疫苗被施用给癌症患者以增强它们的免疫系统识别和杀伤肿瘤细胞的能力。治疗性癌症疫苗的主要目标是生成特异于肿瘤细胞的杀伤T细胞(还称为细胞毒性T淋巴细胞)。为了该目标和为了实现有效的免疫应答,疫苗必须包含称为抗原的分子,其也可以存在于肿瘤中并且需要被递送至抗原呈递细胞(APC),尤其是树突细胞(DC),以允许引发癌症免疫。DC将这些肿瘤抗原加工为在细胞表面表达的MHC I类或MHC II类分子上呈递至T细胞的小肽。然后由T细胞识别并且从而诱导它们的刺激的肽被称为表位。通过MHC I类或MHC II类分子的呈递允许活化两种类别的T细胞,分别是CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和CD4⁺辅助T(T_h)细胞。此外,为了成为完全活化的,除抗原识别之外,T细胞还需要第二信号——共刺激信号,其是抗原非特异性的并且由在APC和T细胞的表面上表达的共刺激分子之间的相互作用提供。因此,高效的治疗性癌症疫苗的两种主要的要求是肿瘤抗原的特异性和将它们高效地递送至DC的能力。

[0017] 总之,肿瘤特异性免疫应答的诱导因而需要三个主要的步骤:(i)抗原必须被递送至树突细胞,所述树突细胞将把抗原加工为表位,(ii)树突细胞应当接收合适的活化信号,和(iii)活化的负载肿瘤抗原的树突细胞必须在淋巴器官中生成T-细胞介导的免疫应答。

[0018] 由于肿瘤细胞可以通过下调个体抗原的表达逃避免疫系统(被动免疫逃避),多表位抗原递送提供了优势。事实上,基于蛋白质的疫苗允许多表位抗原递送至抗原呈递细胞(APC)比如树突细胞(DC),而没有限制于单一MHC等位基因的限制。另一个优势是最近在负载有蛋白质的树突细胞中描述的持久的表位呈递(van Montfoort N,Camps MG,Khan S,Filippov DV,Weterings JJ,Griffith JM等人Antigen storage compartments in mature dendritic cells facilitate prolonged cytotoxic T lymphocyte cross-priming capacity.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009;106(16):6730-5)。另外,蛋白质需要由DC摄取和加工以实现它们的组成表位(consituent epitope)的MHC限制的呈递。如在使用短肽——其不具

有这样严格的加工要求——接种疫苗后已经显示的,这减小诱导外周耐受的风险 (Toes RE,Offringa R,Blom RJ,Melief CJ,Kast WM.Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1996;93 (15):7855-60)。

[0019] 然而,大部分可溶性蛋白质通常在内溶酶体(endolysosome)中降解和在MHC I类分子上不良地交叉呈递,并且因此对CD8⁺T细胞应答具有差的免疫原性 (Rosalia RA,Quakkelaar ED,Redeker A,Khan S,Camps M,Drijfhout JW等人Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein,improving antigen presentation and T-cell activation.European journal of immunology 2013;43 (10):2554-65)。而且,虽然成熟的DC在引发和诱发T-细胞应答中比不成熟的DC更有效 (Apetoh L,Locher C,Ghiringhelli F,Kroemer G,Zitvogel L.Harnessing dendritic cells in cancer.Semin Immunol.2011;23:42-49),但是它们失去了高效地处理外源性抗原,具体地MHC II类限制的抗原的能力 (Banchereau J,Steinman RM.Dendritic cells and the control of immunity.Nature.1998;392:245-252)。结果,作为疫苗的肽-脉冲的DC具有多种限制。例如,肽降解、快速的MHC I类转换、和肽在DC/肽的制备和注射期间从MHC I类分子解离可能导致DC表面上MHC I类/肽复合物的短的半衰期,其导致弱的T-细胞应答。

[0020] 为了改进基于蛋白质的疫苗递送的功效,已经提出将细胞穿透肽用于把癌症肽(cancer peptide)细胞内递送入DC (Wang RF,Wang HYEnhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells.Nat Biotechnol.2002;20:149-156)。细胞穿透肽(CPP)是8至40个残基的肽,其具有穿过细胞膜并且进入大部分细胞类型的能力 (Copolovici DM,Langel K,Eriste E,Langel U.Cell-penetrating peptides:design,synthesis, and applications.ACS nano 2014;8 (3):1972-94,Millett F.Cell-penetrating peptides:classes,origin, and current landscape.Drug Discov Today 2012)。可选地,它们还称为蛋白质转导结构域(PTD),其反映如在天然蛋白质中出现的它们的起源。已经从蛋白质鉴定出几种有效的CPP,包括人免疫缺陷病毒的Tat蛋白、单纯疱疹病毒的VP22蛋白、和成纤维细胞生长因子 (Berry CC.Intracellular delivery of nanoparticles via the HIV-1tat peptide.Nanomedicine.2008;3:357-365;Deshayes S,Morris MC,Divita G,Heitz F.Cell-penetrating peptides:Tools for intracellular delivery of therapeutics.Cell Mol Life Sci.2005;62:1839-1849;Edenhofer F.Protein transduction revisited:Novel insights into the mechanism underlying intracellular delivery of proteins.Curr Pharm Des.2008;14:3628-3636;Gupta B,Levchenko TS,Torchilin VP.Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides.Adv Drug Deliv Rev.2005;57:637-651;Torchilin VP.Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting.Annu Rev Biomed Eng.2006;8:343-375)。发现由DC/TAT-TRP2诱发的T-细胞活性比由DC/TRP2诱导的高3至10倍 (Wang HY,Fu T,Wang G,Gang Z,Donna MPL,Yang JC,Restifo NP,Hwu P,Wang RF.Induction of CD4+T cell-

dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J Clin Invest.* 2002a;109:1463-1470)。

[0021] 而且,亚单位疫苗(肽或蛋白质)具有差的免疫原性。因此在治疗性癌症疫苗的背景下,有效的佐剂被强制性添加至疫苗,以便增加DC上共刺激分子的水平并且因此增大免疫系统对靶抗原的应答。佐剂通过模拟由免疫系统天然识别的保守微生物组分完成该任务。它们包括细菌细胞壁的组分脂多糖(LPS),和核酸比如双链RNA(dsRNA)、单链DNA(ssDNA)、和包含非甲基化的CpG二核苷酸的DNA。它们的存在连同疫苗可以极大地增加对抗原的先天免疫应答。另外,该佐剂应当促进使用CTL和极化的Th1类型(type polarized Th1)的适应性免疫应答,而不是导致抗体产生的体液免疫应答。已经评价了不同的佐剂,其中有限数目已经获得监管批准用于人用途。这些包括美国中的明矾、MPL(单磷酰脂质A)和AS0₄(明矾和MPL),和欧洲中的MF59(水包油乳剂)、AS0₄、脂质体(Lim, Y.T., *Vaccine adjuvant materials for cancer immunotherapy and control of infectious disease*. *Clin Exp Vaccine Res*, 2015.4(1):p.54-8)。

[0022] 最近,Toll样受体(TLR)配体正在成为有希望的佐剂类别(Baxevanis, C.N., I.F. Voutsas, and O.E. Tsitsilonis, *Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies*. *Immunotherapy*, 2013.5(5):p.497-511)。癌症疫苗研究的显著发展因而是对于疫苗制剂包括多种TLR激动剂,其包括TLR-3(聚肌苷酸胞苷酸)、TLR-4(单磷酰脂质A;MPL)、TLR-5(鞭毛蛋白)、TLR-7(咪喹莫特)和TLR-9(CpG) (Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. *Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines*. *Immunol Rev*. 2011;239:178-196)。在TLR刺激后,由免疫细胞产生的信号传导和细胞因子的类型控制CD4+T-细胞分化为Th1、Th2、Th17和Treg细胞。大部分基于TLR的佐剂对免疫细胞比如DC和T细胞的刺激产生促炎细胞因子并且促进Th1和CD8+T应答(Manicassamy S, Pulendran B. *Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors*. *Semin Immunol*. 2009;21:185-193)。

[0023] 将疫苗缀合至TLR配体是相对于非缀合的疫苗提供多种优势的引人注目的方法,所述优势包括(i)由表达TLR的免疫细胞优先摄取、(ii)更高的免疫应答和(iii)降低的诱导外周耐受的风险。事实上,负载有抗原的所有抗原呈递细胞将被同时活化。不同的组探究了该方法,其中多种TLR配体主要被化学连接至肽或蛋白疫苗(Zom GG, Khan S, Filippov DV, Ossendorp F. *TLR ligand-peptide conjugate vaccines: toward clinical application*. *Adv Immunol*. 2012;114:177-201)。由于与肽的化学连接容易进行,缀合疫苗的最积极研究的TLR配体是TLR2激动剂Pam2Cys和Pam3Cys(Fujita, Y. 和 H. Taguchi, *Overview and outlook of Toll-like receptor ligand-antigen conjugate vaccines*. *Ther Deliv*, 2012.3(6):p.749-60)。

[0024] 然而,迄今为止,大多数癌症疫苗试验已经显示了有限的功效。一种解释是缺少如下疗法:其可以同时(i)刺激多表位细胞毒性T细胞-介导的免疫,(ii)诱导T_h细胞和(iii)促进免疫记忆。这三个参数对生成有效的、持久的抗肿瘤免疫必不可少。事实上,特异于不同表位的CTL将允许异形肿瘤块内更多癌细胞的破坏,和避免抗原-丢失变体的向外生长(肿瘤免疫逃避)。T_h细胞涉及持久的细胞免疫的维持,并且通过T_h细胞的肿瘤浸润对CD8⁺

CTL的募集和功能也是必不可少的步骤。免疫记忆对防护肿瘤复发必不可少。

[0025] 鉴于上面,本发明的目标是克服上面概述的当前的癌症疫苗的缺点,并且提供用于结肠直肠癌免疫疗法应用的新型复合物,其代表具有用于预防和/或治疗结肠直肠癌的改进的抗肿瘤活性的更有效的疫苗。

[0026] 该目标借助在下面和所附权利要求中陈述的主题实现。

[0027] 虽然在下面详细描述了本发明,但是要理解本发明不限于本文描述的特定的方法、方案和试剂,因为这些可以改变。还要理解本文使用的术语不意图限制本发明的范围,其将仅仅由所附权利要求限制。除非另外限定,本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员一般理解的相同的含义。

[0028] 在下列中,将描述本发明的要素。这些要素在具体的实施方式的情况下被列出,然而,应当理解它们可以以任何方式和以任何数目组合以产生另外的实施方式。不同描述的实例和优选的实施方式不应当解释为将本发明限于仅仅明确描述的实施方式。本说明书应当理解为支持和涵盖将明确描述的实施方式与任何数目的公开的和/或优选的要素组合的实施方式。另外,除非上下文另外指出,本申请中所有描述的要素的任何排列和组合应当被认为被本申请的说明书公开。

[0029] 贯穿本说明书和所附的权利要求书,除非上下文另外需要,术语“包括(comprise)”和变型比如“包括(comprises)”和“包括(comprising)”将被理解暗示包括陈述的组成、整数或步骤但不排除任何其它未陈述的组成、整数或步骤。术语“由…组成(consist of)”是术语“包括”的特定的实施方式,其中排除任何其它未陈述的组成、整数或步骤。在本发明的上下文中,术语“包括”涵盖术语“由…组成”。术语“包括”因而涵盖“包含(including)”以及“由…组成(consisting)”,例如,“包括”X的组合物可以唯一地由X组成或可以包括额外的一些,例如,X+Y。

[0030] 除非本文另外指示或由上下文明确地否认,在描述本发明的上下文中(尤其是在权利要求的上下文中)使用的术语“一个(a)”和“一种(an)”和“该(所述,the)”和类似的指代物被解释为覆盖单数和复数二者。本文的值范围的叙述仅仅意欲充当分别提及落入该范围的每个独立值的速记方法。除非本文另外指示,每个单个值被并入说明书,如同其在本文被分别叙述一样。本说明书中的语言均不应当被解释为指示对实践本发明必不可少的任何未要求保护的要素。

[0031] 词语“基本上”不排除“完全地”,例如,“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时,词语“基本上”可以从本发明的限定省略。

[0032] 关于数值x的术语“大约”意思是 $x \pm 10\%$ 。

[0033] 根据本发明的复合物

[0034] 在第一方面,本发明提供了用于预防和/或治疗结肠直肠癌的复合物,其包括:

[0035] a) 细胞穿透肽;

[0036] b) 至少一种抗原或抗原表位;和

[0037] c) 至少一种TLR肽激动剂,

[0038] 其中组分a) - c),即细胞穿透肽、至少一种抗原或抗原表位和至少一种TLR肽激动剂被共价连接。

[0039] 根据本发明使用的这样的复合物提供了同时 (i) 刺激多表位细胞毒性T细胞-介导

的免疫, (ii) 诱导T_h细胞和(iii) 促进免疫记忆。从而, 根据本发明使用的复合物提供有效的疫苗, 具体地具有改进的抗肿瘤活性。

[0040] 优选地, 根据本发明使用的复合物是多肽或蛋白质, 具体地重组多肽或重组蛋白, 优选地重组融合蛋白或重组融合多肽。如本文使用的术语“重组”意思是它(在此:多肽或蛋白质)非天然存在。因此, 根据本发明使用的复合物——其是重组多肽或重组蛋白——通常包括组分a) 至c), 其中组分a) 至c) 具有不同的起源, 即不以该组合天然存在。

[0041] 在本发明的上下文中, 即贯穿本申请, 术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”和这些术语的变型分别指的是肽、寡肽、低聚物或包括融合蛋白的蛋白质, 其包括优选地通过正常的肽键或可选地通过修饰的肽键——比如例如在等排的肽(isosteric peptide)的情况下——彼此接合的至少两个氨基酸。肽、多肽或蛋白质可以由L-氨基酸和/或D-氨基酸组成。优选地, 肽、多肽或蛋白质由L-氨基酸(完全地)组成或由D-氨基酸(完全地)组成, 从而形成“逆反(retro-inverso)肽序列”。术语“逆反(肽)序列”指的是线性肽序列的异构体, 其中序列的方向被逆转并且每个氨基酸残基的手性被反转(参见例如Jameson等人, *Nature*, 368, 744-746 (1994); Brady等人, *Nature*, 368, 692-693 (1994))。具体地, 术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”还包括“模拟肽(peptidomimetics)”, 其被定义为包含非肽结构元件的肽类似物, 该肽能够模拟或拮抗天然亲本肽的生物学作用(一种或多种)。模拟肽缺乏经典的肽特性比如酶促地易剪切的肽键。具体地, 除这些氨基酸之外, 肽、多肽或蛋白质还可以包括由除遗传密码限定的20种氨基酸之外的氨基酸, 或其可以由除遗传密码限定的20种氨基酸之外的氨基酸组成。具体地, 本发明的上下文中的肽、多肽或蛋白质可以同样地由通过自然过程——比如翻译后的成熟过程——或通过化学过程修饰的氨基酸组成, 其对本领域技术人员是熟知的。这样的修饰在文献中被彻底地详细描述。这些修饰可以在多肽中的任何地方出现: 在肽骨架中、在氨基酸链中或甚至在羧基或氨基末端处。具体地, 肽或多肽可以在泛素化之后是分支的或可以在分支或不分支的情况下是环状的。该类型的修饰可以是本领域技术人员熟知的天然或合成翻译后加工的结果。具体地, 本发明的上下文中的术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”还包括修饰的肽、多肽和蛋白质。例如, 肽、多肽或蛋白质修饰可以包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、核苷酸或核苷酸衍生物的共价固定、脂质或脂质衍生物的共价固定、磷脂酰肌醇的共价固定、共价或非共价交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、包括聚乙二醇化的糖基化、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解过程、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、senoylation、硫酸化、氨基酸加成比如精氨酰化或泛素化。这样的修饰在文献中被彻底地详细描述(Proteins Structure and Molecular Properties (1993) 2nd Ed., T.E.Creighton, New York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B.C.Johnson, Ed., Academic Press, New York; Seifter等人 (1990) Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, *Meth. Enzymol.* 182:626-646以及Rattan等人, (1992) *Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging*, *Ann NY Acad Sci*, 663:48-62)。因此, 术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”优选地包括例如脂肽、脂蛋白、糖肽、糖蛋白等。

[0042] 然而, 在特别优选的实施方式中, 根据本发明使用的复合物是“经典的”肽、多肽或蛋白质, 由此“经典的”肽、多肽或蛋白质通常由选自遗传密码限定的20种氨基酸的氨基酸组成, 其彼此通过正常的肽键连接。

[0043] 如果根据本发明使用的复合物是多肽或蛋白质,优选的是它包括至少50、至少60、至少70,优选地至少80、至少90,更优选地至少100、至少110,甚至更优选地至少120、至少130,特别优选地至少140,或最优选地至少150个氨基酸残基。

[0044] 组分a) -细胞穿透肽

[0045] CPP允许高效地递送,即转运和负载,具体地至少一种抗原或抗原表位进入抗原呈递细胞(APC),具体地进入树突细胞(DC),并且因而至树突细胞的抗原加工机器。

[0046] 术语“细胞穿透肽”(“CPP”)通常被用于表示短肽,其能够转运不同类型的货物分子穿过质膜,并且因而促进多种分子货物(从纳米颗粒至小的化学分子和DNA的大片段)的细胞摄取。连接至细胞穿透肽的货物分子的“细胞内化”通常意思是转运货物分子穿过质膜,并且因而使货物分子进入细胞。取决于具体情况,货物分子可以然后在细胞质中被释放,定向于细胞内细胞器,或进一步在细胞表面处呈递。根据本发明的细胞穿透肽或包括所述细胞穿透肽的复合物的细胞穿透能力或内化可以通过本领域技术人员已知的标准方法检查,包括流式细胞术或活细胞和固定细胞的荧光显微镜检查、转导有所述肽或复合物的细胞的免疫组织化学、和蛋白质印迹。

[0047] 细胞穿透肽通常具有包含高相对丰度的带正电荷的氨基酸比如赖氨酸或精氨酸的氨基酸组合物或具有包含交替模式的极性/带电氨基酸和非极性疏水氨基酸的序列。这两种类型的结构分别被称为聚阳离子的或两亲的。细胞穿透肽具有不同的大小、氨基酸序列和电荷,但是所有CPP具有共同的特性,即易位质膜和促进将多种分子货物递送至细胞质或细胞的细胞器的能力。现在,CPP易位的理论区分三种主要的进入机制:在膜中直接渗透、内吞作用-介导的进入、和通过形成临时结构的易位。CPP转导是正在进行的研究区域。细胞穿透肽已经在医学中发现众多应用,作为药物递送剂——在包括癌症的不同疾病的治疗中——和病毒抑制剂,以及用于细胞标记和成像的造影剂。

[0048] 通常,细胞穿透肽(CPP)是8至50个残基的肽,其具有穿过细胞膜并且进入大部分细胞类型的能力。可选地,它们还称为蛋白质转导结构域(PTD),其反映如在天然蛋白质中存在的它们的起源。Frankel与Pabo和Green与Lowenstein同时描述了来自人免疫缺陷病毒1(HIV-TAT)的反式活化转录活化因子渗透入细胞的能力(Frankel,A.D.和C.O.Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988.55(6):p.1189-93)。在1991年,描述了将来自黑腹果蝇的触角足同源域(DNA-结合结构域)转导入神经细胞(Joliot,A.等人, *Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991.88(5):p.1864-8)。在1994年,命名为穿膜肽(Penetratin)的第一个16mer-肽CPP——其具有氨基酸序列RQIKIYFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:1)——表征自触角足的同源域的第三螺旋(Derossi,D.等人, *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes*. *J Biol Chem*, 1994.269(14):p.10444-50),接着在1998年,鉴定了蛋白质转导需要的TAT的最小结构域,其具有氨基酸序列YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:2)(Vives,E.,P.Brodin和B.Lebleu,A truncated HIV-1Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 1997.272(25):p.16010-7)。在过去二十年内,从不同的起源描述了数十种肽,其包括病毒蛋白,例如VP22(Elliott,G.和P.O'Hare, *Intercellular*

trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell, 1997. 88 (2) : p. 223-33) 和ZEBRA (Rothe, R. 等人, Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. J Biol Chem, 2010. 285 (26) : p. 20224-33) , 或来自毒液, 例如蜂毒肽 (Dempsey, C.E., The actions of melittin on membranes. Biochim Biophys Acta, 1990. 1031 (2) : p. 143-61) 、黄蜂毒素 (mastoporan) (Konno, K. 等人, Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF) , a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (Anterhynchium flavomarginatum micado) . Toxicon, 2000. 38 (11) : p. 1505-15) 、maurocalcin (Esteve, E. 等人, Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. J Biol Chem, 2005. 280 (13) : p. 12833-9) 、响尾蛇胺 (Nascimento, F.D. 等人, Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. J Biol Chem, 2007. 282 (29) : p. 21349-60) 或抗菌肽 (buforin) (Kobayashi, S. 等人, Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. Biochemistry, 2004. 43 (49) : p. 15610-6) 。合成CPP也被设计, 包括聚精氨酸 (R8、R9、R10和R12) (Futaki, S. 等人, Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. J Biol Chem, 2001. 276 (8) : p. 5836-40) 或转运素 (transportan) (Pooga, M. 等人, Cell penetration by transportan. FASEB J, 1998. 12 (1) : p. 67-77) 。任何上面描述的CPP可以在根据本发明使用的复合物中用作细胞穿透肽, 即组分a)。具体地, 根据本发明使用的复合物中的组分a), 即CPP, 可以包括TAT的最小结构, 其具有氨基酸序列YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2)。具体地, 根据本发明使用的复合物中的组分a), 即CPP, 可以包括穿膜肽, 其具有氨基酸序列RQIKIYFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:1)。

[0049] 还在综述: Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16) : 850-60, 2012中公开了多种CPP, 其可以在根据本发明使用的复合物中用作细胞穿透肽, 即组分a)。换句话说, 在Milletti, F., 2012, Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16) : 850-60中公开的CPP可以在根据本发明使用的复合物中用作细胞穿透肽, 即组分a)。具体地, 这包括阳离子CPP、两亲的CPP、和疏水性CPP以及衍生自类肝素-、RNA-和DNA-结合蛋白的CPP (参阅Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16) : 850-60, 2012的表1) 、衍生自信号肽的CPP (参阅Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16) : 850-60, 2012的表2) 、衍生自抗菌肽的CPP (参阅Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16) : 850-60, 2012的表3) 、衍生自病毒蛋白的CPP (参阅Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16) : 850-60, 2012的表4) 、衍生自多种天然蛋白质的CPP (参阅Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16) : 850-60, 2012的表5) 、和设计的CPP与衍生自肽

文库的CPP(参阅Millett,F.,Cell-penetrating peptides:classes,origin, and current landscape.Drug Discov Today17(15-16):850-60,2012的表6)。

[0050] 优选地,由根据本发明使用的复合物包括的细胞穿透肽,

[0051] i) 具有总计5至50个氨基酸,优选地总计10至45个氨基酸,更优选地总计15至45个氨基酸的所述肽的氨基酸序列的长度;和/或

[0052] ii) 具有包括ZEBRA的最小结构域的片段或这样的片段的序列变体的氨基酸序列,所述最小结构域从根据SEQ ID NO:3的ZEBRA氨基酸序列的残基170延伸至残基220,其中,任选地,1、2、3、4或5个氨基酸已经被置换、缺失、和/或添加而不丧失所述肽的细胞穿透能力。

[0053] 从而,优选的是由根据本发明使用的复合物包括的细胞穿透肽,

[0054] i) 具有总计5至50个氨基酸,优选地总计10至45个氨基酸,更优选地总计15至45个氨基酸的所述肽的氨基酸序列的长度;和

[0055] ii) 具有包括ZEBRA的最小结构域的片段或这样的片段的序列变体的氨基酸序列,所述最小结构域从根据SEQ ID NO:3的ZEBRA氨基酸序列的残基170延伸至残基220,其中,任选地,1、2、3、4或5个氨基酸已经被置换、缺失、和/或添加而不丧失所述肽的细胞穿透能力。

[0056] 这样优选的CPP在WO 2014/041505中被公开。

[0057] 术语“ZEBRA”(也称为Zta、Z、EB1或BZLF1)通常意思是爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)的碱性-亮氨酸拉链(bZIP)转录活化子。展示细胞穿透性质的ZEBRA的最小结构域已经被鉴定为横跨ZEBRA的残基170至残基220。ZEBRA的氨基酸序列在NCBI登录号YP_401673下被公开并且包括在SEQ ID NO:3中表示的245个氨基酸:

[0058] MMDPNSTSEDVKFTPDPYQVPFVQAFDQATRVYQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPEPLPQGQLTAYHVST
APTSWFSAPQPAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQNQQTNQAGGEAPQPGDNSTVQTAACVVFACPGANQGQLADI
GVPQPAPVAAPARRTRKPQQPESLEECDSELEIKRYKNRVASRKCRACKQLQHYREVAAKSENDRLRLLLKQ
MCPSLDVDSIIPRTPDVLHEDLLNF (SEQ ID NO:3-ZEBRA氨基酸序列(来自爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)的天然序列)(YP_401673))

[0059] 最近,源自病毒蛋白ZEBRA的CPP被描述通过如下二者转导蛋白质货物穿过生物膜:(i)直接易位和(ii)脂膜筏-介导的内吞作用(Rothe R,Liguori L,Villegas-Mendez A,Marques B,Grunwald D,Drouet E等人Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator.The Journal of biological chemistry2010;285(26):20224-33)。本发明人假设这两种进入机制应当促进MHC I和II类限制的货物抗原分别至CD8⁺和CD4⁺T细胞的呈递二者。因此,这样的CPP可以将多表位肽递送至树突细胞(DC),并且随后促进CTL与Th细胞活化和抗肿瘤功能。这样的CPP可以因而将根据本发明使用的复合物高效地递送至抗原呈递细胞(APC),并且导致多表位MHC I和II类限制的呈递。

[0060] 在本发明的上下文中,术语“MHC I类”表示两种主要类别的主要组织相容性复合体分子中的一种。MHC I类(也记为“MHC I”)分子在身体的每个有核细胞上被发现。MHC I类的功能是向细胞毒性细胞(CTL)展示表位。在人中,MHC I类分子由两条多肽链组成,α-和β2-微球蛋白(b2m)。仅仅α链是多态性的并且由HLA基因编码,而b2m亚基不是多态性的并且

由 β -2微球蛋白基因编码。在本发明的上下文中,术语“MHC II类”表示另一种主要类别的主要组织相容性复合体分子。MHC II类(也记为“MHC II”)分子仅仅在少数特定细胞类型上被发现,包括巨噬细胞、树突细胞和B细胞,其全部是专用的抗原呈递细胞(APC)。

[0061] 优选地,如上面描述的ZEBRA的最小结构域的片段的序列变体与如上面描述的ZEBRA的最小结构域的片段共享——具体地在整个长度内——至少70%,至少75%,优选地至少80%,更优选地至少85%,甚至更优选地至少90%,特别优选地至少95%,最优选地至少99%氨基酸序列同一性,而不丧失细胞穿透肽的细胞穿透能力。具体地,如上面描述的ZEBRA的最小结构域的“片段”优选地被理解为其截短的序列,即如下氨基酸序列:其与天然序列的氨基酸序列比较是N-端、C-端和/或序列内截短的。而且,这样的ZEBRA的最小结构域的“片段”具有优选地总计5至50个氨基酸,优选地总计10至45个氨基酸,更优选地总计15至45个氨基酸的长度。

[0062] 因此,如在本发明的上下文中使用的术语“序列变体”,即贯穿本申请,指的是参考序列中的任何改变。术语“序列变体”包括核苷酸序列变体和氨基酸序列变体。优选地,参考序列是任何在“序列和SEQ ID编号的表格”(序列表)中列出的序列,即SEQ ID N0:1至SEQ ID N0:94。优选地,序列变体与参考序列共享——具体地在序列的整个长度内——至少70%,至少75%,优选地至少80%,更优选地至少85%,甚至更优选地至少90%,特别优选地至少95%,最优选地至少99%序列同一性,由此,如下面所描述计算序列同一性。具体地,序列变体保留参考序列的特定功能。如下面所描述计算序列同一性。具体地,氨基酸序列变体具有改变的序列,其中参考序列中的一个或多个氨基酸被缺失或置换,或一个或多个氨基酸被插入参考氨基酸序列的序列。作为改变的结果,氨基酸序列变体具有与参考序列至少70%,至少75%,优选地至少80%,更优选地至少85%,甚至更优选地至少90%,特别优选地至少95%,最优选地至少99%同一的氨基酸序列。例如,至少90%同一的变体序列具有参考序列的每100个氨基酸不多于10个改变,即缺失、插入或置换的任意组合。

[0063] 在本发明的上下文中,与本发明的查询氨基酸序列“共享”至少例如95%的“序列同一性”的氨基酸序列意指主题氨基酸序列的序列与查询序列同一,除了主题氨基酸序列可以包括查询氨基酸序列的每100个氨基酸多至五个氨基酸改变。换句话说,为了获得与查询氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列的氨基酸序列,主题序列中多至5%(100个中的5个)的氨基酸残基可以被插入或置换为另一种氨基酸或被缺失,优选地在上面的变体或片段的限定内。当然,其也类似地适用于核酸序列。

[0064] 对于不准确对应的(氨基酸或核酸)序列,可以测定第一序列关于第二序列的“%同一性”。一般而言,待比较的这两个序列被比对以给出序列之间的最大相关性。这可以包括在一个或两个序列中插入“缺口”,以增强对齐程度。%同一性然后可以在比较的序列中的每个的全长内(所谓的全局比对)——其特别适合相同或相似长度的序列,或在较短的限定长度(所谓的局部比对)内——其更适合不相等长度的序列——进行测定。

[0065] 用于比较两个或更多个序列的同一性和同源性的方法是本领域熟知的。两个序列同一的百分数可以例如使用数学算法测定。可以使用的数学算法的优选的,但是非限制的实例是Karlin等人(1993),PNAS USA,90:5873-5877的算法。这样的算法被整合在BLAST家族的程序,例如BLAST或NBLAST程序(还参见Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215,403-410或Altschul等人(1997),Nucleic Acids Res,25:3389-3402)(可通过万维网站

ncbi.nlm.nih.gov处的NCBI的主页访问)和FASTA(Pearson(1990),Methods Enzymol.183,63-98;Pearson and Lipman(1988),Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 85,2444-2448.)中。可以通过这些程序鉴定以一定程度与其它序列同一的序列。另外,Wisconsin序列分析程序包,版本9.1(Devereux等人,1984,Nucleic Acids Res.,387-395)中可获得的程序,例如程序BESTFIT和GAP,可以被用于测定两个多核苷酸之间的%同一性和两个多肽序列之间的%同一性与%同源性或同一性。BESTFIT使用(Smith和Waterman(1981),J.Mol.Biol.147,195-197.)的“局部同源性”算法并且发现了两个序列之间相似性最好的单一区域。

[0066] 更优选地,在MHC I类和/或MHC II类分子的上下文中,如上面描述的根据本发明的细胞穿透肽的片段或其变体进一步保留所述肽的在细胞——比如抗原呈递细胞——的表面处呈递货物分子比如抗原或抗原表位的能力。在MHC I类和/或MHC II类分子的上下文中,细胞穿透肽或包括所述细胞穿透肽的复合物在细胞的表面处呈递货物分子比如抗原或抗原表位的能力可以通过本领域技术人员已知的标准方法检查,包括刺激增殖的能力和/或对这些表位具有特异性的MHC-限制的CD4⁺或CD8⁺T细胞的功能。

[0067] 优选的细胞穿透肽,其

[0068] i) 具有总计5至50个氨基酸,优选地总计10至45个氨基酸,更优选地总计15至45个氨基酸的所述肽的氨基酸序列的长度;和/或

[0069] ii) 具有包括ZEBRA的最小结构域的片段或这样的片段的变体的氨基酸序列,所述最小结构域从根据SEQ ID N0:3的ZEBRA氨基酸序列的残基170延伸至残基220,其中,任选地,1、2、3、4或5个氨基酸已经被置换、缺失、和/或添加而不丧失所述肽的细胞穿透能力

[0070] 优选地包括如下氨基酸序列,其具有至少一个与参考序列比较保守置换的氨基酸,意思是给定的氨基酸残基被替换为具有类似的生理化学特性的残基。

[0071] 通常,在参考氨基酸序列中存在的一一个或多个氨基酸的置换应当保守地完成。保守置换的实例包括将一种脂肪族残基置换为另一种,比如将Ile、Val、Leu或Ala置换为另一种,或将一种极性残基置换为另一种,比如Lys和Arg;Glu和Asp;或Gln和Asn之间。其它这样的保守置换,例如,具有类似的疏水性质的整个区域的置换是熟知的(Kyte and Doolittle,1982,J.Mol.Biol.157(1):105-132)。在本发明的上下文中,将一种或多种L-氨基酸置换为一种或多种D-氨基酸被认为是保守置换。示例性氨基酸置换被呈现在下面的表1中:

[0072]	原始残基	置换的实例
	Ala (A)	Val、Leu、Ile、Gly
	Arg (R)	His、Lys
	Asn (N)	Gln
	Asp (D)	Glu
	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
	Gly (G)	Pro、Ala
	His (H)	Lys、Arg
	Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe

Leu (L)	Ile、Val、Met、Ala、Phe
Lys (K)	Arg、His
Met (M)	Leu、Ile、Phe
Phe (F)	Leu、Val、Ile、Tyr、Trp、Met
Pro (P)	Ala、Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr、Phe
Tyr (Y)	Trp、Phe
原始残基	置换的实例
Val (V)	Ile、Met、Leu、Phe、Ala

[0073] (表1)

[0074] 特别优选地, 优选的细胞穿透肽, 其

[0075] i) 具有总计5至50个氨基酸, 优选地总计10至45个氨基酸, 更优选地总计15至45个氨基酸的所述肽的氨基酸序列的长度; 和/或

[0076] ii) 具有包括ZEBRA的最小结构域的片段或这样的片段的变体的氨基酸序列, 所述最小结构域从根据SEQ ID NO:3的ZEBRA氨基酸序列的残基170延伸至残基220, 其中, 任选地, 1、2、3、4或5个氨基酸已经被置换、缺失、和/或添加而不丧失所述肽的细胞穿透能力

[0077] 相对于SEQ ID NO:3的ZEBRA氨基酸序列, 在第189位的等价位置处, 包括Cys (C) 被置换为Ser (S)。

[0078] 从而, 优选的是这样优选的细胞穿透肽具有包括根据下列通式 (I) 的序列的氨基酸序列:

[0079] $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}SX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}$

[0080] 其中0、1、2、3、4或5个氨基酸被置换、缺失、和/或添加而不丧失所述肽的细胞穿透能力, 其中

[0081] X_1 是K、R或H, 优选地 X_1 是K或R;

[0082] X_2 是R、K或H, 优选地 X_2 是R或K;

[0083] X_3 是Y、W或F, 优选地 X_3 是Y、W或F;

[0084] X_4 是K、R或H, 优选地 X_4 是K或R;

[0085] X_5 是N或Q;

[0086] X_6 是R、K或H, 优选地 X_6 是R或K;

[0087] X_7 是V、I、M、L、F或A, 优选地 X_7 是V、I、M或L;

[0088] X_8 是A、V、L、I或G, 优选地 X_8 是A或G;

[0089] X_9 是S或T;

[0090] X_{10} 是R、K或H, 优选地 X_{10} 是R或K;

[0091] X_{11} 是K、R或H, 优选地 X_{11} 是K或R;

[0092] X_{13} 是R、K或H, 优选地 X_{13} 是R或K;

[0093] X_{14} 是A、V、L、I或G, 优选地 X_{14} 是A或G;

[0094] X_{15} 是K、R或H, 优选地 X_{15} 是K或R;

[0095] X_{16} 是F、L、V、I、Y、W或M,优选地 X_{16} 是F、Y或W;和

[0096] X_{17} 是K、R或H,优选地 X_{17} 是K或R。

[0097] 优选地,这样的肽、多肽或蛋白质由L-氨基酸(完全地)组成或由D-氨基酸(完全地)组成,从而形成“逆反肽序列”。术语“逆反(肽)序列”指的是线性肽序列的异构体,其中序列的方向被逆转并且每个氨基酸残基的手性被反转(参见例如Jameson等人,Nature,368,744-746(1994);Brady等人,Nature,368,692-693(1994))。

[0098] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_1 是K。

[0099] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_2 是R。

[0100] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_3 是Y。

[0101] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_4 是K。

[0102] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_5 是N。

[0103] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_6 是R。

[0104] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_7 是V。

[0105] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_8 是A。

[0106] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_9 是S。

[0107] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_{10} 是R。

[0108] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_{11} 是K。

[0109] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_{13} 是R。

[0110] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_{14} 是A。

[0111] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_{15} 是K。

[0112] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_{16} 是F。

[0113] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,其中 X_{17} 是K。

[0114] 在具体的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽通过通式(I)如上面一般地限定,

其中相对于通式 (I) 在与第12位等价的位置处的氨基酸是Ser (S)。

[0115] 还特别优选的是优选的细胞穿透肽,其

[0116] i) 具有总计5至50个氨基酸,优选地总计10至45个氨基酸,更优选地总计15至45个氨基酸的所述肽的氨基酸序列的长度;和/或

[0117] ii) 具有包括ZEBRA的最小结构域的片段或这样的片段的变体的氨基酸序列,所述最小结构域从根据SEQ ID NO:3的ZEBRA氨基酸序列的残基170延伸至残基220,其中,任选地,1、2、3、4或5个氨基酸已经被置换、缺失、和/或添加而不丧失所述肽的细胞穿透能力

[0118] 包括或由如下氨基酸序列或其序列变体组成而不丧失所述肽的细胞穿透能力,所述氨基酸序列选自根据SEQ ID NO:4-13的氨基酸序列,优选地序列变体具有0、1、2、3、4或5个被置换、缺失、和/或添加的氨基酸而不丧失所述肽的细胞穿透能力。

[0119] CPP1 (Z11) :

[0120] KRYKNRVASRKCR~~A~~FKQ~~L~~LQHYREVAAKSSENDRLRLLLKQMC

[0121] (SEQ ID NO:4)

[0122] CPP2 (Z12) :

[0123] KRYKNRVASRKCR~~A~~FKQ~~L~~LQHYREVAAKSSENDRLRLLLK

[0124] (SEQ ID NO:5)

[0125] CPP3 (Z13) :

[0126] KRYKNRVASRK~~S~~RAFKQ~~L~~LQHYREVAAKSSENDRLRLLLK

[0127] (SEQ ID NO:6)

[0128] CPP4 (Z14) :

[0129] KRYKNRVASRK~~S~~RAFKQ~~L~~LQHYREVAAAK

[0130] (SEQ ID NO:7)

[0131] CPP5 (Z15) :

[0132] KRYKNRVASRK~~S~~RAFK

[0133] (SEQ ID NO:8)

[0134] CPP6 (Z16) :

[0135] QHYREVAAKSSEND

[0136] (SEQ ID NO:9)

[0137] CPP7 (Z17) :

[0138] QLLQHYREVAAAK

[0139] (SEQ ID NO:10)

[0140] CPP8 (Z18) :

[0141] REVAAKSS END RLRLLLK

[0142] (SEQ ID NO:11)

[0143] CPP9 (Z19) :

[0144] KRYKNRVA

[0145] (SEQ ID NO:12)

[0146] CPP10 (Z20) :

[0147] VASRK~~S~~RAFK

[0148] (SEQ ID NO:13)

[0149] 从而,特别优选的是具有如下氨基酸序列或其序列变体而不丧失所述肽的细胞穿透能力的细胞穿透肽,所述氨基酸序列包括或由根据SEQ ID NO:6(CPP3/Z13)、SEQ ID NO:7(CPP4/Z14)、SEQ ID NO:8(CPP5/Z15)或SEQ ID NO:11(CPP8/Z18)的氨基酸序列组成,优选地序列变体具有0、1、2、3、4或5个被置换、缺失、和/或添加的氨基酸而不丧失所述肽的细胞穿透能力。而且,更优选的是具有如下氨基酸序列或其序列变体而不丧失所述肽的细胞穿透能力的细胞穿透肽,所述氨基酸序列包括或由根据SEQ ID NO:6(CPP3/Z13)或SEQ ID NO:7(CPP4/Z14)的氨基酸序列组成,优选地序列变体具有0、1、2、3、4或5个被置换、缺失、和/或添加的氨基酸而不丧失所述肽的细胞穿透能力。

[0150] 而且,最优选的是具有如下氨基酸序列或其序列变体而不丧失所述肽的细胞穿透能力的细胞穿透肽,所述氨基酸序列包括或由根据SEQ ID NO:6(CPP3/Z13)的氨基酸序列组成,优选地序列变体具有0、1、2、3、4或5个被置换、缺失、和/或添加的氨基酸而不丧失所述肽的细胞穿透能力。因此,最优选的是细胞穿透肽包括或由如下肽组成,所述肽具有根据SEQ ID NO:6(CPP3/Z13)的氨基酸序列或具有至少70%序列同一性、优选地至少75%序列同一性、更优选地至少80%序列同一性、甚至更优选地至少85%序列同一性、仍更优选地至少90%序列同一性、特别优选地至少95%序列同一性、最优选地至少99%序列同一性的其功能性序列变体。在该背景下,“功能性序列变体”是其中所述肽的细胞穿透能力被保持的序列变体。

[0151] 在一个优选的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽具有包括或由SEQ ID NO:6(CPP3/Z13)组成的氨基酸序列。

[0152] 在另一个优选的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽具有包括或由SEQ ID NO:7(CPP4/Z14)组成的氨基酸序列。

[0153] 在另一个优选的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽具有包括或由SEQ ID NO:8(CPP5/Z15)组成的氨基酸序列。

[0154] 在另一个优选的实施方式中,根据本发明的细胞穿透肽具有包括或由SEQ ID NO:11(CPP8/Z18)组成的氨基酸序列。

[0155] 本领域技术人员将理解本发明的细胞穿透肽的基本氨基酸序列可以进一步被翻译后修饰,比如通过糖基化或磷酸化,而不背离本发明。

[0156] 在进一步的实施方式中,除如上面描述的其氨基酸序列之外,根据本发明的细胞穿透肽任选地进一步包括如下的任一种或任意组合:

[0157] (i) 核定位信号(NLS)。这样的信号对技术人员是熟知的并且在Nair等人(2003, Nucleic Acids Res. 31(1):397-399)中被描述

[0158] (ii) 靶向肽,其包括肿瘤导向肽比如在Kapoor等人(2012, PLoS ONE 7(4): e35187)中描述的和在<http://crdd.osdd.net/raghava/tumorhope/general.php>中列出的那些

[0159] 优选地,根据本发明的细胞穿透肽连接至抗原或抗原表位并且促进所述抗原或抗原表位的细胞内化。

[0160] 根据本发明使用的复合物可以包括一种单一的细胞穿透肽或多于一种细胞穿透肽。优选地,根据本发明使用的复合物包括不多于五种细胞穿透肽,更优选地根据本发明使

用的复合物包括不多于四种细胞穿透肽,甚至更优选地根据本发明使用的复合物包括不多于三种细胞穿透肽,特别优选地根据本发明使用的复合物包括不多于两种细胞穿透肽和最优选地根据本发明使用的复合物包括一种单一的细胞穿透肽。

[0161] 组分b) -抗原/抗原表位

[0162] 根据本发明使用的复合物包括作为组分b)的至少一种抗原或抗原表位。

[0163] 如本文使用的,“抗原”是充当适应性免疫应答的受体的靶标——具体地作为抗体、T细胞受体、和/或B细胞受体的靶标——的任何结构物质。又称为“抗原决定簇”的“表位”是由免疫系统——具体地由抗体、T细胞受体、和/或B细胞受体——识别的抗原的部分(或片段)。因而,一种抗原具有至少一个表位,即单一抗原具有一个或多个表位。在本发明的上下文中,术语“表位”主要用于表示T细胞表位,其被呈递在抗原呈递细胞的表面上,在其中它们被结合至主要组织相容性复合体(MHC)。由MHC I类分子呈递的T细胞表位通常但不唯一地是长度为8和11个氨基酸之间的肽,而MHC II类分子呈现更长的肽,其长度通常但不唯一地在12和25个氨基酸之间。

[0164] 优选地,在根据本发明使用的复合物中,至少一种抗原或抗原表位选自:(i)肽、多肽或蛋白质,(ii)多糖,(iii)脂质,(iv)脂蛋白或脂肪,(v)糖脂,(vi)核酸,和(vii)小分子药物或毒素。因而,至少一种抗原或抗原表位可以是肽、蛋白质、多糖、脂质,包括脂蛋白和糖脂的其组合、核酸(例如DNA、siRNA、shRNA、反义寡核苷酸、陷阱DNA、质粒)、或小分子药物(例如环孢菌素A、紫杉醇、阿霉素、甲氨蝶呤、5-氨基乙酰丙酸)、或其任意组合,具体地如果多于一种抗原或抗原表位由本发明的复合物所包括。

[0165] 理解至少一种抗原或抗原表位可以包括例如至少一种,即一种或多种连接在一起的肽、多肽或蛋白质和/或至少一种,即一种或多种核酸,例如其中每一种编码一种肽或多肽。同样,至少一种抗原或抗原表位可以是包括脂蛋白和糖脂的蛋白质、脂质和/或多糖的组合。因而,具体地如果根据本发明使用的复合物包括多于一种抗原或抗原表位,它可以包括多于一种肽、多肽或蛋白质,多于一种多糖,多于一种脂质,多于一种脂蛋白,多于一种糖脂,多于一种核酸,多于一种小分子药物或毒素,或其组合。

[0166] 优选地,根据本发明使用的复合物包括至少一种抗原或抗原表位,其包括来自癌症/肿瘤相关抗原、癌症/肿瘤特异性抗原、和/或病原体的抗原蛋白——其包括病毒、细菌、真菌、原生动物和多细胞寄生虫抗原蛋白——的一种或多种表位。

[0167] 更优选地,至少一种抗原或抗原表位包括或由(i)至少一种病原体表位和/或(ii)至少一种癌症/肿瘤表位,具体地至少一种肿瘤表位组成。最优选地,至少一种抗原或抗原表位包括或由至少一种癌症/肿瘤表位,具体地至少一种肿瘤表位组成。

[0168] 特别优选的是,根据本发明使用的复合物包括仅仅这样的抗原(一种或多种)或抗原表位(一种或多种),其是癌症/肿瘤相关抗原(一种或多种)、癌症/肿瘤特异性抗原(一种或多种)和/或癌症/肿瘤表位(一种或多种);具体地,其是肿瘤相关抗原(一种或多种)、肿瘤特异性抗原(一种或多种)、和/或肿瘤表位(一种或多种)。

[0169] 如本文使用的,“癌症表位”意思是来自癌症相关抗原或来自癌症特异性抗原的表位。因此,“肿瘤表位”意思是来自肿瘤相关抗原或来自肿瘤特异性抗原的表位,这样的表位通常特异(或关联)于某一类型的癌症/肿瘤。具体地,癌症/肿瘤相关(同样癌症/肿瘤有关)抗原是由癌症/肿瘤细胞和正常细胞二者表达的抗原。因此,那些抗原通常从出生(或甚至

之前)就存在。因此,存在免疫系统发展出对那些抗原的自身耐受的可能。相比之下,癌症/肿瘤特异性抗原是由癌症/肿瘤细胞特异性表达的抗原,但是不由正常细胞表达。具体地,癌症/肿瘤特异性抗原包括新抗原。一般而言,新抗原是如下抗原:其在之前不存在并且因而对免疫系统是“新”的。新抗原通常是由于体细胞突变。在癌症/肿瘤的背景下,癌症/肿瘤特异性新抗原通常在发展出癌症/肿瘤前不存在,并且癌症/肿瘤特异性新抗原通常由癌性细胞/肿瘤细胞中的体细胞基因突变编码。由于新抗原对免疫系统是新的,那些抗原的自身耐受的风险与癌症/肿瘤相关抗原比较相当低。然而,每种癌症的一组肿瘤特异性突变似乎是独特的。因此,在本发明的上下文中,优选的是这样的癌症/肿瘤特异性抗原,具体地新抗原,通过技术人员已知的方法——例如,癌症基因组测序——在诊断患有结肠直肠癌的对象中被鉴定。在鉴定后,各自的癌症/肿瘤特异性新抗原和/或癌症/肿瘤特异性新抗原表位被用于根据本发明使用的复合物。

[0170] 优选地,根据本发明使用的复合物包括一种或多种癌症/肿瘤相关表位和/或一种或多种癌症/肿瘤相关抗原(但是优选地没有癌症/肿瘤特异性表位)。还优选的是根据本发明使用的复合物包括一种或多种癌症/肿瘤特异性表位和/或一种或多种癌症/肿瘤特异性抗原(但是优选地没有癌症/肿瘤相关表位)。根据本发明使用的复合物还可以优选地包括(i)一种或多种癌症/肿瘤相关表位和/或一种或多种癌症/肿瘤相关抗原和(ii)一种或多种癌症/肿瘤特异性表位和/或一种或多种癌症/肿瘤特异性抗原二者。

[0171] 具体地,抗原或抗原表位与其相关或抗原或抗原表位对其特异的癌症/肿瘤是如本文所述的结肠直肠癌。因此,抗原优选是CRC相关的或CRC特异性抗原,并且表位优选是CRC相关的或CRC特异性表位。

[0172] 合适的癌症/肿瘤表位可以例如从癌症/肿瘤表位数据库检索,例如从van der Bruggen P,Stroobant V,Vigneron N,Van den Eynde B.Peptide database:T cell-defined tumor antigens.Cancer Immun 2013;URL:<http://www.cancerimmunity.org/peptide/>,其中由CD4+或CD8+T细胞识别的人肿瘤抗原基于它们的表达图式被分类为四种主要组,或从数据库“Tantigen”(TANTIGEN版本1.0,2009年12月1日;由Dana-Farber癌症研究所癌症疫苗中心的生物信息核心实验室研发;URL:<http://cvc.dfcf.harvard.edu/tadb/>)。癌症/肿瘤表位的实例包括例如TRP2-来源的表位、糖蛋白100(gp100)黑素瘤抗原-来源的表位、糖蛋白70(gp70)抗原-来源的表位、存活蛋白表位、IEa表位、IL13 α 2、Epha2(A型肝配蛋白受体2)、其免疫原性片段、和这样的抗原和/或片段的融合物。另外,癌症/肿瘤表位的实例包括新抗原的表位,比如,例如,来自Yadav等人Nature.2014 Nov 27;515(7528):572-6描述的MC-38肿瘤细胞系的新抗原。如上面描述的,新抗原是正常人基因组中完全不存在的抗原。与未突变的自身抗原比较,新抗原具有与肿瘤对照的相关性,这是由于对于这些抗原可获得的T细胞池的质量不受中心T细胞耐受影响。具体地,新抗原可以基于个体肿瘤基因组。潜在的新抗原可以通过技术人员已知的方法预测,比如鉴定(癌症)基因组的蛋白编码部分内的突变的癌症基因组测序或深度测序技术。

[0173] 根据本发明使用的复合物中有用的癌症/肿瘤相关,具体地肿瘤有关,或组织特异性抗原的具体实例包括但不限于下列抗原:Her-2neu、SPAS-1、TRP-2、酪氨酸酶、Melan A/Mart-1、gp100、BAGE、GAGE、GM2神经节苷脂、驱动蛋白2、TATA元件调节因子1、肿瘤蛋白D52、MAGE D、ING2、HIP-55、TGF-1抗凋亡因子、HOM-Mel-40/SSX2、上皮抗原(LEA 135)、DF31MUC1

抗原(Apostolopoulos等人,1996Immunol.Cell.Biol.74:457-464;Pandey等人,1995,Cancer Res.55:4000-4003)、MAGE-1、HOM-Mel-40/SSX2、NY-ESO-1、EGFR、CEA、Epha2、Epha4、PCDGF、HAAH、间皮素;EPCAM;NY-ESO-1、糖蛋白MUC1和NIUC10粘蛋白p5(尤其是突变形式)、EGFR、癌症相关血清抗原(CASA)和癌症抗原125(CA 125)(Kierkegaard等人,1995,Gynecol.Oncol.59:251-254)、上皮糖蛋白40(EGP40)(Kievit等人,1997,Int.J.Cancer 71:237-245)、鳞状细胞癌抗原(SCC)(Lozza等人,1997Anticancer Res.17:525-529)、组织蛋白酶E(Mota等人,1997,Am.J Pathol.150:1223-1229)、黑素瘤中的酪氨酸酶(Fishman等人,1997Cancer 79:1461-1464)、脑海绵状血管瘤的细胞核抗原(PCNA)(Notelet等人,1997Surg.Neurology.47:364-370)、乳头状甲状腺癌中的35kD肿瘤相关自身抗原(Lucas等人,1996Anticancer Res.16:2493-2496)、CDC27(包括蛋白质的突变形式)、抗原丙糖磷酸异构酶、707-AP、A60分枝杆菌抗原(Macs等人,1996,J.Cancer Res.Clin.Oncol.122:296-300)、膜联蛋白II、AFP、ART-4、BAGE、 β -连环蛋白/m、BCL-2、bcr-abl、bcr-abl p190、bcr-abl p210、BRCA-1、BRCA-2、CA 19-9(Tolliver和O'Brien,1997,South Med.J.90:89-90;Tsuruta等人,1997Urol.Int.58:20-24)、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CDC27/m、CDK-4/m、CEA(Huang等人,Exper Rev.Vaccines (2002) 1:49-63)、CT9、CT10、Cyp-B、Dek-cain、DAM-6(MAGE-B2)、DAM-10(MAGE-B1)、EphA2(Zantek等人,Cell Growth Differ.(1999) 10:629-38;Carles-Kinch等人,Cancer Res.(2002) 62:2840-7)、EphA4(Cheng et al.,2002,Cytokine Growth Factor Rev.13:75-85)、肿瘤相关Thomsen-Friedenreich抗原(Dahlenborg等人,1997,Int.J.Cancer 70:63-71)、ELF2M、ETV6-AML1、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GnT-V、gp100(Zajac等人,1997,Int.J.Cancer 71:491-496)、HAGE、HER2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT、hTRT、iCE、凋亡抑制剂(例如,存活蛋白)、KH-1腺癌抗原(Deshpande和Danishefsky,1997,Nature 387:164-166)、KIAA0205、K-ras、LAGE、LAGE-1、LDLR/FUT、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE D、MART-1、MART-1/Melan-A(Kawakami和Rosenberg,1997,Int.Rev.Immunol.14:173-192)、MC1R、MDM-2、肌球蛋白/m、MUC1、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、新-polyA聚合酶、NA88-A、NY-ESO-1、NY-ESO-1a(CAG-3)、PAGE-4、PAP、蛋白酶3(Mollidrem等人,Blood (1996) 88:2450-7;Mollidrem等人,Blood (1997) 90:2529-34)、P15、p190、Pm1/RAR α 、PRAME、PSA、PSM、PSMA、RAGE、RAS、RCAS1、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-2、SART-3、SP17、SPAS-1、TEL/AML1、TPI/m、酪氨酸酶、TARP、TRP-1(gp75)、TRP-2、TRP-2/INT2、WT-1、和可选地源自NY-ESO-1与LAGE-1基因的翻译的NY-ESO-ORF2与CAMEL蛋白。而且,在根据本发明使用的复合物中有用的癌症/肿瘤相关,具体地肿瘤相关,或组织特异性抗原的另一个具体实例是抗原ASCL2(Achaete-scute同系物2)。众多其它癌症抗原是本领域熟知的。

[0174] 优选地,癌症/肿瘤抗原或癌症/肿瘤表位是重组癌症/肿瘤抗原或重组癌症/肿瘤表位。这样的重组癌症/肿瘤抗原或重组癌症/肿瘤表位可以通过在天然癌症/肿瘤抗原或天然癌症/肿瘤表位的总氨基酸序列中引入改变(添加、缺失或置换)特定氨基酸的突变来设计。突变的引入不过多地改变癌症/肿瘤抗原或癌症/肿瘤表位,使得其不能跨越哺乳动物对象,和优选地人或狗对象而普遍地适用,但是对它的改变足够使得所得的氨基酸序列打破耐受或被认为是外源抗原,以便产生免疫应答。另一种方式可以是产生共有的重组癌

症/肿瘤抗原或癌症/肿瘤表位,其与其对应的天然癌症/肿瘤抗原或天然癌症/肿瘤表位具有至少85%和高至99%氨基酸序列同一性;优选地至少90%和高至98%序列同一性;更优选地至少93%和高至98%序列同一性;或甚至更优选地至少95%和高至98%序列同一性。在一些情况下,重组癌症/肿瘤抗原或重组癌症/肿瘤表位与其对应的天然癌症/肿瘤抗原或癌症/肿瘤表位具有95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性。天然癌症/肿瘤抗原是通常与特定的癌症或癌症肿瘤相关联的抗原。取决于癌症/肿瘤抗原,癌症/肿瘤抗原的共有序列可以跨越哺乳动物物种或在物种的亚型内或跨越病毒株或血清型。一些癌症/肿瘤抗原不从癌症/肿瘤抗原的野生型氨基酸序列极大地改变。上述方法可以被组合,使得最终重组癌症/肿瘤抗原或癌症/肿瘤表位具有如上面讨论的与天然癌症抗原氨基酸序列的百分比相似性。然而,优选地,如本面描述的癌症/肿瘤抗原的表位的氨基酸序列不是突变的,并且因而与参考表位序列同一。

[0175] 如本文使用的“病原体表位”意思是来自病原体——其包括病毒、细菌、真菌、原生动物和多细胞寄生虫——的抗原蛋白、抗原多糖、抗原脂质、抗原脂蛋白或抗原糖脂的表位。来自病原体的抗原蛋白、多糖、脂质、脂蛋白或糖脂因此分别包括来自导致疾病——其可以是接种疫苗的靶标——的病原体的蛋白质、多糖、脂质、脂蛋白和糖脂,所述疾病包括,例如,阿米巴病、炭疽、布路里溃疡(溃疡分枝杆菌)、杯状病毒相关腹泻、弯曲杆菌腹泻、宫颈癌(人乳头瘤病毒)、沙眼衣原体相关生殖器疾病、霍乱、克里米亚-刚果出血热、登革热、白喉、埃博拉出血热、产肠毒素大肠杆菌(ETEC)腹泻、胃部癌(gastric cancer)(幽门螺杆菌)、淋病、A组链球菌相关疾病、B组链球菌相关疾病、B型流感嗜血杆菌肺炎和侵袭性疾病、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、戊型肝炎腹泻、2型单纯疱疹生殖器溃疡、HIV/AIDS、钩虫病、流感、日本脑炎、拉沙热、利什曼病、钩端螺旋体病(leptospirosi)、肝癌(乙型肝炎)、肝癌(丙型肝炎)、莱姆病、疟疾、马尔堡出血热、麻疹、腮腺炎、鼻咽癌(爱泼斯坦-巴尔病毒)、脑膜炎双球菌脑膜炎、副流感相关肺炎、百日咳、瘟疫、脊髓灰质炎、狂犬病、呼吸道合胞病毒(RSV)肺炎、裂谷热、轮状病毒腹泻、风疹、裂体吸虫病、严重急性呼吸综合征(SARS)、志贺氏菌病、天花、金黄色葡萄球菌相关疾病、胃癌(stomach cancer)(幽门螺杆菌)、肺炎链球菌和侵袭性疾病、破伤风、蜱源脑炎、沙眼、结核、土拉菌病、伤寒、西尼罗病毒相关疾病、黄热病。

[0176] 优选地,在MHC I类和/或MHC II类背景下和/或在CD1背景下,至少一种抗原或抗原表位将在细胞表面处呈递,而在MHC I类和/或MHC II类背景下,细胞表面处的呈递是优选的。短语“在MHC I类背景下的表位呈递”具体指的是位于细胞表面处的MHC I类分子的沟中的CD8⁺表位。短语“在MHC II类背景下的表位呈递”具体指的是位于细胞表面处的MHC II类分子的沟中的CD4⁺表位。短语“在CD1背景下的表位呈递”具体指的是位于细胞表面处的分化群(cluster of differentiation)1分子的沟中的脂质表位。

[0177] 有利地,根据本发明使用的复合物包括细胞穿透肽和至少一种抗原或抗原表位,并且允许在MHC I类和MHC II类背景下在抗原呈递细胞的细胞表面处转运和呈递所述表位,并且因而在接种疫苗和免疫疗法中是有用的。

[0178] 优选地,根据本发明使用的复合物包括至少一种抗原或抗原表位,其是至少一种CD4⁺表位和/或至少一种CD8⁺表位。

[0179] 如本文使用的,术语“CD4⁺表位”或“CD4⁺-限制的表位”表示由CD4⁺T细胞识别的表

位,所述表位具体地由位于MHC II类分子的沟中的抗原片段组成。在根据本发明使用的复合物中包括的单个CD4⁺表位优选地由大约12-25个氨基酸组成。它还可以由例如大约8-25个氨基酸或大约6-100个氨基酸组成。

[0180] 如本文使用的,术语“CD8⁺表位”或“CD8⁺-限制的表位”表示由CD8⁺T细胞识别的表位,所述表位具体地由位于MHC I类分子的沟中的抗原片段组成。在根据本发明使用的复合物中包括的单个CD8⁺表位优选地由大约8-11个氨基酸组成。它还可以由例如大约8-15个氨基酸或大约6-100个氨基酸组成。

[0181] 优选地,至少一种抗原可以包括或至少一种抗原表位可以由对应于癌症/肿瘤相关抗原、癌症/肿瘤特异性抗原、或病原体的抗原蛋白的抗原决定簇(一种或多种)的CD4⁺表位和/或CD8⁺表位组成。更优选地,至少一种抗原可以包括或至少一种抗原表位可以由对应于癌症/肿瘤相关抗原或癌症/肿瘤特异性抗原的抗原决定簇(一种或多种)的CD4⁺表位和/或CD8⁺表位组成。最优选地,至少一种抗原可以包括或至少一种抗原表位可以由对应于肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的抗原决定簇(一种或多种)的CD4⁺表位和/或CD8⁺表位组成。

[0182] 还优选的是根据本发明使用的复合物包括至少两种抗原或抗原表位,其中至少一种抗原或抗原表位包括或由CD4⁺表位组成并且至少一种抗原或抗原表位包括或由CD8⁺表位组成。现在确定了T_h细胞(CD4⁺)在DC许可(licensing)和在CTL(CD8⁺)在肿瘤位点处的募集与维持二者中的抗肿瘤免疫应答中发挥核心作用。因此,根据本发明使用的复合物——其包括至少两种抗原或抗原表位,其中至少一种抗原或抗原表位包括或由CD4⁺表位组成并且至少一种抗原或抗原表位包括或由CD8⁺表位组成——提供了综合免疫应答,其允许同时引发CTL和T_h细胞并且因而对针对仅仅一种CD8⁺表位或仅仅一种CD4⁺表位的免疫是优选的。例如,根据本发明使用的复合物可以优选地包括E α -CD4⁺表位和gp100-CD8⁺表位。

[0183] 优选地,根据本发明使用的复合物包括至少两种抗原或抗原表位,其中至少两种抗原或抗原表位包括或由至少两种,例如2、3、4、5、6、7、8、9或更多种CD4⁺表位和/或至少两种,例如2、3、4、5、6、7、8、9或更多种CD8⁺表位组成。从而,至少两种抗原或抗原表位优选地是不同的抗原或抗原表位,更优选地至少两种抗原或抗原表位彼此不同但是与相同种类的肿瘤相关。多抗原疫苗将(i)避免抗原-丢失变体的向外生长,(ii)靶向异形肿瘤块内不同的肿瘤细胞和(iii)规避患者间肿瘤可变性。因而,根据本发明使用的复合物特别优选地包括至少四种抗原或抗原表位,具体地具有至少两种CD8⁺表位和至少两种CD4⁺表位。这样的根据本发明使用的复合物诱导多表位CD8CTL和CD4T_h细胞协同地作用以抵抗肿瘤细胞和促进高效的抗肿瘤免疫。T_h细胞还涉及持久的细胞免疫的维持,其在接种疫苗后被监测。这样的根据本发明使用的复合物诱导多克隆、多表位免疫应答和多功能CD8⁺与CD4⁺T细胞,并且因而诱导有效的抗肿瘤活性。

[0184] 优选地,根据本发明使用的复合物包括至少两种抗原或抗原表位,更优选地根据本发明使用的复合物包括至少三种抗原或抗原表位,甚至更优选地根据本发明使用的复合物包括至少四种抗原或抗原表位,特别优选地根据本发明使用的复合物包括至少五种抗原或抗原表位并且最优选地根据本发明使用的复合物包括至少六种抗原或抗原表位。由根据本发明使用的复合物包括的抗原或抗原表位可以是相同或不同的,优选地由根据本发明使用的复合物包括的抗原或抗原表位彼此不同。优选地,根据本发明使用的复合物包括至少一种CD4⁺表位和至少一种CD8⁺表位。

[0185] 优选地,根据本发明使用的复合物包括多于一种CD4⁺表位,例如来自相同抗原或不同抗原的两种或更多种CD4⁺表位,并且优选地没有CD8⁺表位。还优选的是根据本发明使用的复合物包括多于一种CD8⁺表位,例如来自相同抗原或不同抗原的两种或更多种CD8⁺表位,并且优选地没有CD4⁺表位。然而,最优选地,根据本发明使用的复合物包括(i)至少一种CD4⁺表位,例如来自相同抗原或不同抗原的两种或更多种CD4⁺表位,和(ii)至少一种CD8⁺表位,例如来自相同抗原或不同抗原的两种或更多种CD8⁺表位。

[0186] 例如,根据本发明使用的复合物可以优选地包括gp100-CD8⁺表位、E α -CD4⁺表位,以及进一步的CD4⁺表位和进一步的CD8⁺表位。甚至更优选地,根据本发明使用的复合物可以包括包含gp100-CD8⁺表位和E α -CD4⁺表位的多肽和蛋白质。例如,由根据本发明使用的复合物包括的这样的多肽和蛋白质包括或由根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列或如上面限定的其序列变体组成:

[0187] ESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPRFAKF ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS

[0188] SEQ ID NO:14(包括OVA-CD4⁺、gp100-CD8⁺、E α -CD4⁺和OVA-CD8⁺表位的MAD5-货物)

[0189] 例如,根据本发明使用的复合物还可以包括gp70-CD8⁺表位和/或gp70-CD4⁺表位。具体地,根据本发明使用的复合物可以包括包含gp70-CD8⁺表位和/或gp70-CD4⁺表位的多肽或蛋白质。例如,由根据本发明使用的复合物包括的这样的多肽或蛋白质包括或由根据SEQ ID NO:43的氨基酸序列或如上面限定的其序列变体组成:

[0190] VTYHSPSYAYHQFERRAILNRLVQFIKDRI

[0191] SEQ ID NO:43(包括gp70-CD8⁺和gp70-CD4⁺表位的Mad8-货物)

[0192] 例如,根据本发明使用的复合物可以优选地包括至少一种存活蛋白表位,比如存活蛋白CD8⁺表位和/或存活蛋白CD4⁺表位。更优选地,根据本发明使用的复合物可以包括包含存活蛋白CD8⁺表位和/或存活蛋白CD4⁺表位的多肽或蛋白质。更优选地,根据本发明使用的复合物可以包括包含多于一种存活蛋白CD8⁺表位和/或多于一种存活蛋白CD4⁺表位——比如两种不同的存活蛋白CD8⁺表位——的多肽或蛋白质。例如,由根据本发明使用的复合物包括的这样的多肽或蛋白质包括或由根据SEQ ID NO:44的氨基酸序列或如上面限定的其序列变体组成:

[0193] NYRIATFKNWPFLEDCAMEELTVSEFLKLDRQR

[0194] SEQ ID NO:44(包括存活蛋白CD8⁺表位1和存活蛋白CD8⁺表位2的Mad11-货物)

[0195] 例如,根据本发明使用的复合物可以优选地包括来自新抗原的表位。甚至更优选地,根据本发明使用的复合物可以包括包含来自新抗原——比如由Yadav等人Nature.2014Nov 27;515(7528):572-6鉴定的来自MC-38肿瘤细胞系的新抗原——的表位的多肽或蛋白质。例如,由根据本发明使用的复合物包括的这样的多肽和蛋白质包括或由根据SEQ ID NO:42的氨基酸序列或如上面限定的其序列变体组成:

[0196] HLELASMTNMELMSSIV

[0197] SEQ ID NO:42(包括来自由Yadav等人Nature.2014Nov 27;515(7528):572-6描述的新抗原的Mad9-货物)。

[0198] 例如,根据本发明使用的复合物可以优选地包括多于一种,例如两种或三种,来自新抗原的表位。甚至更优选地,根据本发明使用的复合物可以包括包含多于一种例如两种

或三种来自新抗原——比如由Yadav等人Nature. 2014 Nov 27;515(7528):572-6鉴定的来自MC-38肿瘤细胞系的新抗原——的表位的多肽或蛋白质。例如,由根据本发明使用的复合物包括的这样的多肽和蛋白质包括或由根据SEQ ID NO:63的氨基酸序列或如上面限定的其序列变体组成:

[0199] LFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEG

[0200] SEQ ID NO:63(包括来自如由Yadav等人Nature. 2014 Nov 27;515(7528):572-6描述的新抗原的Mad12-货物)。

[0201] 优选地,由根据本发明使用的复合物包括的至少一种抗原或抗原表位是肽、多肽或蛋白质。在本发明中有用的肽、多肽或蛋白质性质的抗原或抗原表位的实例包括其癌症/肿瘤抗原或抗原表位;其变应性抗原或抗原表位;其自身免疫性自身抗原或抗原表位;其病原体抗原或抗原表位;和来自病毒的其抗原或抗原表位,所述病毒优选地来自巨细胞病毒(CMV)、天花病毒(*orthopox variola virus*)、类天花病毒(*orthopox alastrim virus*)、副痘病毒(*parapox ovis virus*)、传染性软疣痘病毒、1型单纯疱疹病毒、2型单纯疱疹病毒、乙型疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、伪狂犬病毒、人巨细胞病毒(*human cytomegaly virus*)、6型人疱疹病毒、7型人疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、8型人疱疹病毒、乙型肝炎病毒、基孔肯雅病毒、奥尼翁-尼翁病毒、风疹病毒、丙型肝炎病毒、C型GB病毒、西尼罗病毒、登革热病毒、黄热病病毒、跳跃病病毒、圣路易斯脑炎病毒、日本乙型脑炎病毒、波瓦生病毒、FSME病毒、SARS、SARS相关冠状病毒、人冠状病毒229E、人冠状病毒0c43、环曲病毒属(*Torovirus*)、人I型嗜T细胞病毒、人II型嗜T细胞病毒、HIV(AIDS)——即人1型免疫缺陷病毒或人2型免疫缺陷病毒、流感病毒、拉沙病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、塔卡里伯病毒、胡宁病毒、马秋博病毒、波尔那病病毒、布尼亞病毒、加利福尼亞腦炎病毒、裂谷热病毒、白蛉热病毒、托斯卡纳病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、哈扎拉病毒、喀山病毒、汉坦病毒、汉城病毒(*Seoul virus*)、希望山病毒(*Prospect Hill virus*)、普乌马拉病毒(*Puumala virus*)、多布拉伐病毒(*Dobrava Belgrade virus*)、图拉病毒(*Tula virus*)、辛诺柏病毒(*sin nombre virus*)、维多利亚湖马尔堡病毒(*Lake Victoria Marburg virus*)、埃博拉病毒扎伊尔株、埃博拉病毒苏丹株、埃博拉病毒科特迪瓦株、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、副流感病毒、疟原虫(镰状疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫、三日疟原虫、诺尔斯疟原虫)、马尔堡病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒(*human metapneumovirus*)、水泡性口膜炎印第安纳水泡病毒、狂犬病病毒、莫科拉病毒、杜文黑基病毒、1+2型欧洲蝙蝠狂犬病毒、澳大利亚蝙蝠狂犬病毒、腺病毒A-F、人乳头瘤病毒、6型尖锐湿疣病毒、11型尖锐湿疣病毒、多瘤病毒、2型腺病毒伴随病毒、轮状病毒、环状病毒、包括水痘-带状疱疹(*varizella zoster*)的水痘等;或来自利什曼虫、锥虫、阿米巴虫(*ameba*)、细菌等的抗原或抗原表位;或可以选自上面的抗原或抗原表位的表位或变体。优选地,如上面限定的抗原的表位以及变体展示与如上面显示或描述的抗原或抗原序列之一大约10%、具体地至少10%、大约20%、具体地至少20%、大约30%、具体地至少30%、大约40%、具体地至少40%、大约50%、具体地至少50%、大约60%、具体地至少60%、大约70%、具体地至少70%、大约80%、具体地至少80%、大约90%、具体地至少90%、至少95%或至少98%的序列同源性或同一性。在该上下文中,表位和变体的限定类似地如限定的适用。

[0202] 肽、多肽或蛋白质的分类中的抗原或抗原表位的实例包括多种胶质瘤表位的组

合,比如在Novellino等人(2005,Cancer Immunol Immunother,54(3):187-207)、Vigneron等人(2013,Cancer Immun.13:15)中描述的那些。然而,根据本发明使用的单一复合物还可以包括仅仅一个子集,即所有所述胶质瘤表位中的一种或多种。在这样的情况下,优选地,根据本发明的不同复合物包括所有所述胶质瘤表位的不同子集,使得例如包括根据本发明的这样的不同复合物的根据本发明的疫苗包括所有所述胶质瘤表位,但是其分布在不同的复合物中。

[0203] 而且,根据本发明使用的复合物还可以包括至少一种抗原或抗原表位,其中所述抗原或抗原表位是多糖、脂质、脂蛋白、和/或糖脂,具体地多糖、脂质、脂蛋白、和/或糖脂表位,其可以是,例如,如在此限定的病原体表位。

[0204] 具体地,根据本发明使用的复合物可以包括至少一种抗原或抗原表位,其中所述抗原或抗原表位是多糖、脂质、脂蛋白、和/或糖脂的,包括病毒、细菌、真菌、原生动物和多细胞寄生虫抗原或抗原表位。

[0205] 优选地,所述表位将在MHC I类和/或MHC II类背景下在细胞表面处呈递。

[0206] 优选地,所述脂质表位将在CD1(分化群1)背景下在细胞表面处呈递。

[0207] 根据本发明使用的复合物还可以包括至少一种抗原或抗原表位,其中所述抗原或抗原表位是小分子药物或毒素。

[0208] 在本发明中有用的小分子药物或毒素的分类中的货物分子的实例包括环孢菌素A、紫杉醇、阿霉素、甲氨蝶呤、5-氨基乙酰丙酸、白喉毒素、舒尼替尼和在De wit Amer(2010,Neuro Oncol,12(3):304-16)中综述的那些分子。

[0209] 根据本发明使用的复合物包括至少一种抗原或抗原表位,优选地根据本发明使用的复合物包括多于一种抗原或抗原表位,具体地2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原或抗原表位,更优选地根据本发明使用的复合物包括(至少)两种或三种抗原或抗原表位,甚至更优选地根据本发明使用的复合物包括(至少)四种或五种抗原或抗原表位。

[0210] 如果多于一种抗原或抗原表位由根据本发明使用的复合物包括,理解所述抗原或抗原表位也具体地在根据本发明使用的复合物中共价连接,例如至另一种抗原或抗原表位和/或至组分a),即细胞穿透肽,和/或至组分c),即TLR肽激动剂。

[0211] 由根据本发明使用的复合物包括的多种抗原或抗原表位可以相同或不同。优选地,由根据本发明使用的复合物包括的多种抗原或抗原表位彼此不同,因而提供了多抗原和/或多表位复合物。

[0212] 而且,优选的是多于一种抗原或抗原表位,具体地2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原或抗原表位,在根据本发明使用的复合物中被连续地定位。具体地,这意思是复合物包括的所有抗原和/或抗原表位以一段定位,其既不被组分a),即细胞穿透肽中断,也不被组分c),即TLR肽激动剂中断。而是,组分a)和组分c)在复合物中定位,例如在这样的一段所有抗原和/或抗原表位之前或之后。然而,以这样的方式连续定位的抗原和/或抗原表位可以彼此连接,例如通过如下面描述的间隔区或连接体,其既不是组分a),即细胞穿透肽,也不是组分c),即TLR肽激动剂。

[0213] 此外,还优选根据本发明使用的复合物包含抗原的一个或多个表位。因此,复合物优选包含一种或多种抗原的一个或多个表位。例如,复合物可包含第一抗原的一个或多个表位和第二抗原的一个或多个表位;或者复合物可以包含第一抗原的一个或多个表位,第

二抗原的一个或多个表位,和第三抗原的一个或多个表位;或者复合物可以包含第一抗原的一个或多个表位,第二抗原的一个或多个表位,第三抗原的一个或多个表位,和第四抗原的一个或多个表位;等等。在优选的实施方式中,复合物包含一种或多种抗原的一个以上表位;更优选地,相同抗原的抗原表位在根据本发明使用的复合物中连续(或重叠)定位。这尤其意味着复合物包含的相同抗原的所有抗原表位都位于一段中,该段既不被组分a),即细胞穿透肽,也不被组分c),即TLR肽激动剂,也不被任何其他抗原表位(即来自另一抗原的表位)中断。

[0214] 然而,可选地,多种抗原和/或抗原表位还可以以任何其它方式在根据本发明使用的复合物中定位,例如组分a)和/或组分c)在两种或更多种抗原和/或抗原表位之间定位,即一种或多种抗原和/或抗原表位在组分a)和组分c)之间定位(或反之亦然),和任选地,一种或多种抗原和/或抗原表位在组分a)和/或组分c)的各自另一端处定位。

[0215] 要理解与结肠直肠癌相关的大量不同的抗原或抗原表位可以有利地由根据本发明使用的单一复合物包括。可选地,与结肠直肠癌相关的大量不同的抗原或抗原表位可以分布至不同抗原或抗原表位的子集,具体地在结肠直肠癌的背景下彼此互补的子集,其由根据本发明的不同复合物包括,由此这样的包括不同子集的不同复合物可以有利地同时施用(例如在单一疫苗中)至需要其的对象。

[0216] 优选地,根据本发明使用的复合物包含至少一个肿瘤表位,其是选自EpCAM、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、CEA、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART和IL13R α 2的抗原的表位。更优选地,根据本发明使用的复合物包含至少一个肿瘤表位,其是选自ASCL2、EpCAM、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、CEA、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART和IL13R α 2的抗原的表位。那些抗原在结肠直肠癌的背景下特别有用。还优选根据本发明使用的复合物包含至少一种选自EpCAM、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、CEA、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART和IL13R α 2的肿瘤抗原,或其片段,或肿瘤抗原的序列变体或其片段的序列变体。还优选根据本发明使用的复合物包含至少一种选自ASCL2、EpCAM、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、CEA、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART和IL13R α 2的肿瘤抗原,或其片段,或肿瘤抗原的序列变体或其片段的序列变体。如本文使用的,抗原的“片段”包括抗原的至少10个连续的氨基酸,优选地抗原的至少15个连续的氨基酸,更优选地抗原的至少20个连续的氨基酸,甚至更优选地抗原的至少25个连续的氨基酸和最优选地抗原的至少30个连续的氨基酸。“序列变体”如上面限定,即序列变体具有与参考序列至少70%,优选地至少75%,更优选地至少80%,甚至优选地至少85%,仍更优选地至少90%,特别优选地至少95%,最优选地至少99%同一的(氨基酸)序列。“功能性”序列变体在抗原/抗原片段/表位的背景下意思是(例如由抗原(片段)包括的)表位(一种或多种)的功能不被损害或丧失。然而,优选地,(例如由本文描述的癌症/肿瘤抗原(片段)包括的)表位(一种或多种)的氨基酸序列不被突变并且因而与参考表位序列同一。

[0217] 如上面描述的,那些抗原的合适的癌症/肿瘤表位从文献中是已知的,或可以通过使用癌症/肿瘤表位数据库鉴定,例如从van der Bruggen P,Stroobant V,Vigneron N, Van den Eynde B.Peptide database:T cell-defined tumor antigen.Cancer Immun

2013;URL:<http://www.cancerimmunity.org/peptide/>,其中由CD4+或CD8+T细胞识别的人肿瘤抗原基于它们的表达图式被分类为四种主要组,或从数据库“T antigen”(TANTIGEN版本1.0,2009年12月1日;由Dana-Farber癌症研究所癌症疫苗中心的生物信息核心实验室研发;URL:<http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>)。

[0218] EpCAM

[0219] Ep-Cam是介导细胞粘附的糖蛋白。EpCAM的氨基酸序列在下列中显示:

[0220] MAPPQVLAFLGLLAATATFAAAQEEVCENYKLAVNCVNNNRQCQCTSVGAQNTVICKLAAKCLVM
KAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRDKDTEITCSERVRTYWIII
ELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVTIDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKG
SLFHSKKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVVLVISRKKRMAYEKA
EIKEMGEMHRELNA

[0221] [SEQ ID NO:47]

[0222] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:47的氨基酸序列或如本文描述的其片段或变体。

[0223] EpCAM的几种表位是技术人员已知的。优选地由根据本发明使用的复合物包括的优选的EpCAM表位包括下列表位(下列中显示的表位序列是上面的EpCAM序列的片段,并且因而在上面加下划线的EpCAM序列中显示;下列表位序列可以指的是一种表位或多于一种(重叠)表位):

[0224] GLKAGVIAV

[0225] [SEQ ID NO:48]

[0226] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:48的氨基酸序列或如本文描述的其片段或变体。

[0227] HER-2/neu

[0228] Her-2属于EGFR(表皮生长因子受体)家族。许多HLA-A表位是技术人员已知的。HER2的氨基酸序列在下列中显示:

[0229] MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLKLRPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNA
SLSFLQDIQEYQGYVLIHNQVRQVPLQRLRIVRGSQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTPVTGASPGLRELQLRSLT
EILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQLSLTRVCAGG
CARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACP
YNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDEGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFL
PESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLVDLQVNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLG
LRSRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCGPGPTQCVNC
SQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPGKVKPDL
SYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVLGVFGILIKRRQQKIRKY
TMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRLKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGWIWIPDGENVKIPVAIKVLRNTSPK
ANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLTQLMPYGCCLDHVRENRRGLGSQDNNWCMQIAKGMSYLEDV
RLVHRDLAARNVLVKSPNHWKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELM
TGFAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICIDVYIMIVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNED
LGPASPLDSTFYRSLLLEDDDMGDLVDAEYLVPPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGEPSEEEA

PRSPLAPSEGAGSDVFDGLMGAAKGLQLSPLHDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSHQPEYVNQPDVRP
QPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAGGAIVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYW
QDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

[0230] [SEQ ID NO:70]

[0231] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:70的氨基酸序列或如本文描述的其片段或变体。如上面描述的,Her-2的合适的癌症/肿瘤表位从文献中是已知的,或可以通过使用癌症/肿瘤表位数据库鉴定,例如从van der Bruggen P,Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B.Peptide database:T cell-defined tumor antigen.Cancer Immun 2013;URL:<http://www.cancerimmunity.org/peptide/>,其中由CD4+或CD8+T细胞识别的人肿瘤抗原基于它们的表达图式被分类为四种主要组,或从数据库“Tantigen”(TANTIGEN版本1.0,2009年12月1日;由Dana-Farber癌症研究所癌症疫苗中心的生物信息核心实验室研发;URL:<http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>)。

[0232] 粘蛋白-1(MUC-1)

[0233] MUC-1是作用于细胞粘附的人上皮粘蛋白。MUC-1的氨基酸序列在下列中显示：

[0235] [SEQ ID NO:49]

[0236] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:49的氨基酸序列或如本文描述的其片段或变体。

[0237] MUC-1的几种表位是技术人员已知的。优选地由根据本发明使用的复合物包括的优选的MUC-1表位包括下列表位(下列中显示的表位序列是上面的MUC-1序列的片段,并且因而在上面加下划线的MUC-1序列中显示;下列表位序列中的每个可以指的是一种表位或多于一种(重叠)表位):

[0238] GSTAPPVHN

[0239] [SEQ ID NO:50]

[0240] TAPPAHGVTS

[0241] [SEQ ID NO:51]

[0242] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:50的氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0243] TOMM34

[0244] TOMM34参与将前体蛋白输入线粒体。其许多表位是技术人员已知的。

[0245] RNF 43

[0246] RNF43是环指(RING)型E3泛素连接酶并且预测包含跨膜结构域、蛋白酶相关结构域、胞外域、和胞质环指结构域。RNF43被认为负调控Wnt信号传导,并且RNF43的表达导致卷曲受体(frizzled receptor)的泛素化的增加,它们的亚细胞分布的改变,导致这些受体的降低的表面水平。其许多表位是技术人员已知的。

[0247] KOC1

[0248] KOC1,也称为胰岛素样生长因子2mRNA-结合蛋白3(IGF2BP3),是mRNA结合蛋白。然而,不可获得表达数据。

[0249] 血管内皮生长因子(VEGF)/血管内皮生长因子受体(VEGFR)

[0250] 血管内皮生长因子(VEGF),最初称为血管通透因子(VPF),是刺激血管发生和血管新生的由细胞产生的信号蛋白。它是当血液循环不足时恢复给组织的供氧的系统的一部分。VEGF的正常功能是在胚胎发育期间产生新血管,在损伤后产生新血管,在锻炼之后产生肌肉,和产生新血管(侧支循环)以绕过阻塞的血管。存在VEGF的受体(VEGFR)的三种主要亚型,即VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3。

[0251] 人绒毛膜促性腺激素的β亚基(βhCG)

[0252] 人绒毛膜促性腺激素(hCG)是在植入之后由胚胎产生的激素。一些癌性肿瘤产生该激素;因此,当患者未怀孕时测量的升高的水平可以导致癌症诊断。hCG是异二聚体的,其具有与促黄体激素(LH)、促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)相同的α(阿尔法)亚基,和hCG独有的β(贝塔)亚基。hCG促性腺激素的β-亚基(β-hCG)包含145个氨基酸并且由六个高度同源基因编码。

[0253] 存活蛋白

[0254] 存活蛋白,还称为包含杆状病毒凋亡抑制因子重复的蛋白(baculoviral inhibitor of apoptosis repeat)5或BIRC5,是凋亡抑制因子(IAP)家族的成员。存活蛋白起作用以抑制胱天蛋白酶活化,从而导致凋亡或程序性细胞死亡的负调控。存活蛋白的氨基酸序列在下列中显示:

[0255] MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEGFIHCPTENEPDLAQCFCCFKELEGWEP
DDDPPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDRERAKNKIAKETNNKKFEETAKKVRRAIEQLAAMD

[0256] [SEQ ID NO:52]

[0257] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:52的氨基酸序列或如本文描述的其片段或变体。

[0258] 存活蛋白的几种表位是技术人员已知的。优选地由根据本发明使用的复合物包括的优选的存活蛋白表位包括下列表位(下列中显示的表位序列是上面的存活蛋白序列的片

段,并且因而在上面加下划线的存活蛋白序列中显示;下列表位序列可以指的是一种表位或多于一种(重叠)表位):

[0259] RISTFKNWPF

[0260] [SEQ ID NO:53]

[0261] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

[0262] 因此,优选的是根据本发明使用的复合物包含存活蛋白的表位。更优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:52的氨基酸序列的肽,或长度为至少10个氨基酸(优选至少15个氨基酸,更优选至少20个氨基酸,甚至更优选至少25个氨基酸,和最优选至少30个氨基酸)的其片段,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体。甚至更优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:53的氨基酸序列的肽。最优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:95的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%的序列同一性)的其功能性序列变体。

[0263] 癌胚抗原(CEA)

[0264] CEA是细胞内粘附糖蛋白。CEA在胎儿发育期间通常在胃肠组织中产生,但是产生在出生前停止。因此,在健康成人的血液中,CEA通常仅仅在非常低的水平下存在。CEA的氨基酸序列在下列中显示:

[0265] MESPSAPPHRCIPWQRLLL TASLLTFWNPPTAKLT IESTPFNVAEGKEVLLL VHNLPQHLFGYSWYK
GERVDGNRQI IGYVIGTQQATPGPAYSGREI IYPNASLLIQNII IQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPK
PSISSLNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTFNVTRNDTASYKCETQNPVSA
RRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNSCHAASNPPAQYSWFVNQTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQ
AHNSDTGLNRRTVTITVYAEPPKPFITSNNNSNPVEDEADAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRT
LTLLSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGN
IQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSLNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTT
YLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLVYGPDTPI ISPPDSSYLSG
ANLNLSCHSASNPSQY SWRINGIPQQHTQVLFI KITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSA
GATVGIMIGVLVGVVAL

[0266] [SEQ ID NO:54]

[0267] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:54的氨基酸序列或如本文描述的其片段或变体。

[0268] CEA的几种表位是技术人员已知的。优选地由根据本发明使用的复合物包括的优选的CEA表位包括下列表位(下列中显示的表位序列是上面的CEA序列的片段,并且因而在上面加下划线的CEA序列中显示;下列表位序列中的每个可以指的是一种表位或多于一种(重叠)表位):

[0269] YLSGANLNLS

[0270] [SEQ ID NO:55]

[0271] SWRINGIPQQ

[0272] [SEQ ID NO:56]

[0273] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:55的氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:56的氨基酸序列。

[0274] 因此,优选的是根据本发明使用的复合物包含CEA的表位。更优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:54的氨基酸序列的肽,或长度为至少10个氨基酸(优选至少15个氨基酸,更优选至少20个氨基酸,甚至更优选至少25个氨基酸,和最优选至少30个氨基酸)的其片段,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体。甚至更优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:55的氨基酸序列的肽和/或具有根据SEQ ID NO:56的氨基酸序列的肽。最优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:96的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%的序列同一性)的其功能性序列变体。

[0275] 转化生长因子β受体2(TGFβR2)

[0276] TGFβ受体是单向(single pass)丝氨酸/苏氨酸激酶受体。它们以若干不同同种型存在。TGFβR2是跨膜蛋白,其具有蛋白激酶结构域,与另一种受体蛋白形成异二聚体复合物,并且结合TGF-β。该受体/配体复合物使蛋白质磷酸化,其然后进入细胞核并且调控与细胞增殖相关的基因的子集的转录。

[0277] P53

[0278] P53是在防止基因组突变中发挥作用的肿瘤阻抑蛋白。P53具有许多抗癌功能的机制,并且在凋亡、基因组稳定和抑制血管发生中发挥作用。在其抗癌作用中,p53通过多种机制作用:当DNA已经遭受损伤时它可以活化DNA修复蛋白;在DNA损伤识别上,它可以通过将细胞周期保持在G1/S调控点来停滞生长;和它可以引发凋亡。

[0279] Kirsten Ras (KRas)

[0280] GTPase KRas还称为V-Ki-ras2Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物和KRAS,在正常组织信号传导中发挥关键功能,并且KRAS基因的突变在许多癌症的发展中是关键步骤。与ras亚家族的其它成员一样,KRAS蛋白是GTPase并且在许多信号传导途径中是早期参与者。KRAS通常被束缚至细胞膜,这是因为其C-端上异戊二烯基团的存在。KRas的氨基酸序列在下列中显示:

[0281] MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGYIPFIETSAKTRQRVEDAFYTLVREIRQYRLKKISKEEKTPGCVKIKKCIIM

[0282] [SEQ ID NO:57]

[0283] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列或如本文描述的其片段或变体。

[0284] Kirsten Ras的几种表位是技术人员已知的。优选地由根据本发明使用的复合物包括的优选的Kirsten Ras表位包括下列表位(下列中显示的表位序列是上面的Kirsten Ras序列的片段,并且因而在上面加下划线的Kirsten Ras序列中显示;下列表位序列可以指的是一种表位或多于一种(重叠)表位):

[0285] VVVGAGGVG

[0286] [SEQ ID NO:58]

[0287] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0288] 0-连接的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)转移酶(OGT)

[0289] OGT(0-连接的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)转移酶、0-GlcNAc转移酶、OGTase、0-连接的N-乙酰葡萄糖氨基转移酶、尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺:多肽 β -N-乙酰葡萄糖氨基转移酶、蛋白质0-连接的 β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶)是系统名为“UDP-N-乙酰-D-葡萄糖:蛋白质-0- β -N-乙酰-D-氨基葡萄糖转移酶”的酶。OGT催化将0-糖苷键中的单个N-乙酰葡萄糖胺添加至细胞内蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基。OGT是人体内众多生物学功能的一部分。OGT通过如下参与肌细胞和脂肪细胞中胰岛素的抗性:抑制AKT1的苏氨酸308磷酸化,增加IRS1磷酸化的速率(在丝氨酸307和丝氨酸632/635处),减少胰岛素信号传导,和使胰岛素信号的组分糖基化。另外,OGT在添加N-乙酰葡萄糖胺的情况下催化丝氨酸和苏氨酸残基的细胞内糖基化。研究显示OGT等位基因对胚胎发生是至关重要的,和OGT对细胞内糖基化和胚胎干细胞活力是必需的。OGT还催化修饰转录因子和RNA聚合酶II的翻译后修饰,然而该修饰的具体功能大部分是未知的。

[0290] 胱天蛋白酶5(CASP5)

[0291] 胱天蛋白酶5是蛋白水解地切割天冬氨酸残基处的其它蛋白质的酶,并且属于称为胱天蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶的家族。它是炎性胱天蛋白酶,连同胱天蛋白酶1、胱天蛋白酶4和鼠胱天蛋白酶4同系物胱天蛋白酶11,并且在免疫系统中发挥作用。

[0292] 结肠直肠肿瘤相关抗原-1(COA-1)

[0293] COA-1在2003年由Maccalli等(Maccalli, C.等人, Identification of a colorectal tumor-associated antigen (COA-1) recognized by CD4 (+) T lymphocytes. Cancer Res, 2003. 63 (20): p. 6735-43)鉴定为由结肠直肠和黑素瘤细胞强烈表达(不可获得数据)。它的突变可以干扰肿瘤和正常细胞的区分识别。

[0294] 黑素瘤相关抗原(MAGE)

[0295] 除雄性生殖细胞和——对于它们中的一些——胎盘之外,MAGE(黑素瘤相关抗原)基因家族的哺乳动物成员最初被描述为在正常成人组织中完全沉默。相比之下,这些基因在多种肿瘤中表达。因此,根据本发明使用的复合物优选地包括MAGE-家族的抗原(“MAGE”抗原)或其表位。在MAGE家族中,具体地MAGE-A3和MAGE-D4是优选的,并且MAGE-A3是特别优选的。MAGE-A3在健康细胞中的正常功能未知。MAGE-A3是肿瘤特异性蛋白,并且已经在许多肿瘤上被鉴定。MAGE-A3的氨基酸序列在下列中显示:

[0296] MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSTLVEVTLGEVPAAESPDPPQSPQGA
SSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEGPSTFPDLESEFQAALSRKVAELVHFLLKYRAREPVTKAEMLGSVGNWQ
YFFPVIFSKAFSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDNQIMPKAGLLIIVLAI IAREGDCAPEEK
IWEELSVLEVFEGREDSILGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVETSYVKVLHHMVKISGG
PHIS YPPLHEWVLREGE

[0297] [SEQ ID NO:59]

[0298] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0299] MAGE-A3的几种表位是技术人员已知的。优选地由根据本发明使用的复合物包括的优选的MAGE-A3表位包括下列表位(下列中显示的表位序列是上面的MAGE-A3序列的片

段,并且因而在上面加下划线的MAGE-A3序列中显示;下列表位序列可以指的是一种表位或多于一种(重叠)表位):

[0300] KVAELVHFL

[0301] [SEQ ID NO:60]

[0302] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0303] 由T-细胞识别的鳞状细胞癌抗原(SART)

[0304] 在SART家族内,SART-3是最优选的。因而,根据本发明使用的复合物优选地包括SART-家族的抗原(“SART”抗原)或其表位;根据本发明使用的复合物更优选地包括SART-3或其表位。由T-细胞识别的鳞状细胞癌抗原3具备能够诱导癌症患者中的HLA-A24-限制和肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞的肿瘤表位。SART-3被认为参与mRNA剪接的调控。

[0305] IL13R α 2

[0306] IL13R α 2以非常高的亲和力结合白介素13(IL-13)(并且因此可以将其隔绝)但是不允许IL-4结合。它充当IL-13和IL-4二者的负调节因子,然而该机制仍未确定。IL13R α 2的氨基酸序列在下列中显示:

[0307] MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYLQWQPPLSLDHFKECTVE
YELKYRNIGSETWKTIIITKNLHYKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPQGIPETKVQDMD
CVYYNQYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIKADGQNIICRFPYLEASDYKDFYICVNGSSEN
KPIRSSYFTFQLQNIKVPLPPVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCFDYEIEIREDDTLVTATVENETYTLK
TTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSDKQCWEGEDLSKTLRFWLPFGFILILVIFVTG
LLRKPNTPKMIPEFFCDT

[0308] [SEQ ID NO:61]

[0309] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:61的氨基酸序列或如本文描述的其片段或变体。

[0310] IL13R α 2的几种表位是技术人员已知的。优选地由根据本发明使用的复合物包括的优选的IL13R α 2表位包括下列表位(下列中显示的表位序列是上面的IL13R α 2序列的片段,并且因而在上面加下划线的IL13R α 2序列中显示;下列表位序列可以指的是一种表位或多于一种(重叠)表位):

[0311] LPFGFIL

[0312] [SEQ ID NO:62]

[0313] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0314] ASCL2(Achaete-scute同系物2)

[0315] ASCL2是一种基本的螺旋-环-螺旋转录因子,对胎盘发育过程中维持增殖滋养层至关重要。ASCL2被发现是在肠道肿瘤中过表达的增殖的推定调节因子。ASCL2的氨基酸序列如下所示:

[0316] MDGGTLPRSAPPAPPVGCAARRPASPELLRCSRRRPATAETGGGAAVARRNERERNRVKLVNLF
FQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTVAASPSRA
SSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAEREELLDFSSWLGGY

[0317] [SEQ ID NO:92]

[0318] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:92的氨基酸序列或如

本文描述的其片段或变体。

[0319] ASCL2的几种表位是技术人员已知的。优选地由根据本发明使用的复合物包括的优选的ASCL2表位包括下列表位(下列中显示的表位序列是上面的ASCL2序列的片段,并且因而在上面加下划线的ASCL2序列中显示;下列表位序列的每个可以指的是一种表位或多于一种(重叠)表位):

[0320] SAVEYIRALQ

[0321] [SEQ ID NO:93]

[0322] ERELLDFSSW

[0323] [SEQ ID NO:94]

[0324] 因此,根据本发明使用的优选的复合物包括根据SEQ ID NO:93的氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:94的氨基酸序列。

[0325] 因此,优选的是根据本发明使用的复合物包含ASCL2的表位。更优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:92的氨基酸序列的肽,或长度为至少10个氨基酸(优选至少15个氨基酸,更优选至少20个氨基酸,甚至更优选至少25个氨基酸,和最优选至少30个氨基酸)的其片段,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体。甚至更优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:93的氨基酸序列的肽和/或具有根据SEQ ID NO:94的氨基酸序列的肽。最优选地,该复合物包含具有根据SEQ ID NO:97的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%的序列同一性)的其功能性序列变体。

[0326] 优选地,根据本发明使用的复合物包含至少一种肿瘤表位,其是选自EpCAM、MUC-1、存活蛋白、CEA、KRas、MAGE-A3和IL13Ra2的抗原的表位,例如根据SEQ ID NO 48、50、51、53、55、56、58、60和62中任一个的表位;优选地,根据本发明使用的复合物包含至少一种肿瘤表位,其是选自EpCAM、MUC-1、存活蛋白、CEA、KRas、MAGE-A3、IL13Ra2和ASCL2的抗原的表位,例如根据SEQ ID NO 48、50、51、53、55、56、58、60、62、93和94中任一个的表位;更优选地,至少一个肿瘤表位是选自EpCAM、MUC-1、存活蛋白、CEA、KRas和MAGE-A3的抗原的表位,例如SEQ ID NO 48、50、51、53、55、56、58和60中任一个的表位;更优选地,至少一个肿瘤表位是选自EpCAM、MUC-1、存活蛋白、CEA、KRas、MAGE-A3和ASCL2的抗原的表位,例如根据SEQ ID NO 48、50、51、53、55、56、58、60、93和94中任一个的表位;甚至更优选地,至少一个肿瘤表位是选自EpCAM、MUC-1、存活蛋白和CEA的抗原的表位,例如根据SEQ ID NO 48、50、51、53、55和56中任一个的表位;甚至优选地,至少一个肿瘤表位是选自EpCAM、MUC-1、存活蛋白、CEA和ASCL2的抗原的表位,例如根据SEQ ID NO 48、50、51、53、55、56、93和94中任一个的表位;和最优选地,至少一个肿瘤表位是选自EpCAM、存活蛋白、CEA和ASCL2的抗原的表位,例如根据SEQ ID NO 48、53、55、56、93和94中任一个的表位。

[0327] 还优选的是根据本发明使用的复合物包括

[0328] i) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体;

[0329] ii) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:50的表位和/或根据SEQ ID

N0:51的表位)或其功能性序列变体;

[0330] iii) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:53的表位)或其功能性序列变体;

[0331] iv) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:55的表位和/或根据SEQ ID N0:56的表位)或其功能性序列变体;

[0332] v) KRas的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:58的表位)或其功能性序列变体;和/或

[0333] vi) MAGE-A3的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:60的表位)或其功能性序列变体。

[0334] 还优选的是根据本发明使用的复合物包括

[0335] vii) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:48的表位)或其功能性序列变体;

[0336] viii) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:50的表位和/或根据SEQ ID N0:51的表位)或其功能性序列变体;

[0337] ix) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:53的表位)或其功能性序列变体;

[0338] x) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:55的表位和/或根据SEQ ID N0:56)或其功能性序列变体;

[0339] xi) KRas的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:58的表位)或其功能性序列变体;

[0340] xii) MAGE-A3的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:60的表位)或其功能性序列变体;和/或

[0341] xiii) ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:93的表位和/或根据SEQ ID N0:94的表位)或其功能性序列变体。

[0342] 如上面描述的,那些抗原的进一步的表位(除示例的表位之外)可以从癌症/肿瘤表位数据库容易地检索到,例如从van der Bruggen P,Stroobant V,Vigneron N,Van den Eynde B.Peptide database:T cell-defined tumor antigen.Cancer Immun 2013;URL:<http://www.cancerimmunity.org/peptide/>,或从数据库“Tantigen”(TANTIGEN版本1.0,2009年12月1日;由Dana-Farber癌症研究所癌症疫苗中心的生物信息核心实验室研发;URL:<http://cvc.dfcf.harvard.edu/tadb/>)。

[0343] “序列变体”如上面限定,即序列变体具有与参考序列至少70%,至少75%,优选地至少80%,更优选地至少85%,甚至更优选地至少90%,特别优选地至少95%,最优选地至少99%同一的(氨基酸)序列。“功能性”序列变体在表位的背景下意思是作为表位的功能不被损害或丧失。然而,优选地,如本文描述的癌症/肿瘤抗原的表位的氨基酸序列不被突变并且因而与参考表位序列同一。

[0344] 还优选的是根据本发明使用的复合物包括

[0345] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的EpCAM的片段;

[0346] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的MUC-1的片段;

[0347] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的存活蛋白的片段;

- [0348] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的CEA的片段；
- [0349] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的KRas的片段；和/或
- [0350] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的MAGE-A3的片段。
- [0351] 还优选的是根据本发明使用的复合物包括
- [0352] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的EpCAM的片段；
- [0353] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的MUC-1的片段；
- [0354] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的存活蛋白的片段；
- [0355] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的CEA的片段；
- [0356] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的KRas的片段；
- [0357] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的MAGE-A3的片段；和/或
- [0358] -包括一种或多种表位或其功能性序列变体的ASCL2的片段。
- [0359] 如本文使用的，抗原的“片段”包括抗原的至少10个连续的氨基酸，优选地抗原的至少15个连续的氨基酸，更优选地抗原的至少20个连续的氨基酸，甚至更优选地抗原的至少25个连续的氨基酸和最优选地抗原的至少30个连续的氨基酸。因此，EpCAM的片段包括EpCAM (SEQ ID NO:47) 的至少10个连续的氨基酸，优选地EpCAM (SEQ ID NO:47) 的至少15个连续的氨基酸，更优选地EpCAM (SEQ ID NO:47) 的至少20个连续的氨基酸，甚至更优选地EpCAM (SEQ ID NO:47) 的至少25个连续的氨基酸和最优选地EpCAM (SEQ ID NO:47) 的至少30个连续的氨基酸；MUC-1的片段包括MUC-1 (SEQ ID NO:49) 的至少10个连续的氨基酸，优选地MUC-1 (SEQ ID NO:49) 的至少15个连续的氨基酸，更优选地MUC-1 (SEQ ID NO:49) 的至少20个连续的氨基酸，甚至更优选地MUC-1 (SEQ ID NO:49) 的至少25个连续的氨基酸和最优选地MUC-1 (SEQ ID NO:49) 的至少30个连续的氨基酸；存活蛋白的片段包括存活蛋白 (SEQ ID NO:52) 的至少10个连续的氨基酸，优选地存活蛋白 (SEQ ID NO:52) 的至少15个连续的氨基酸，更优选地存活蛋白 (SEQ ID NO:52) 的至少20个连续的氨基酸，甚至更优选地存活蛋白 (SEQ ID NO:52) 的至少25个连续的氨基酸和最优选地存活蛋白 (SEQ ID NO:52) 的至少30个连续的氨基酸；CEA的片段包括CEA (SEQ ID NO:54) 的至少10个连续的氨基酸，优选地CEA (SEQ ID NO:54) 的至少15个连续的氨基酸，更优选地CEA (SEQ ID NO:54) 的至少20个连续的氨基酸，甚至更优选地CEA (SEQ ID NO:54) 的至少25个连续的氨基酸和最优选地CEA (SEQ ID NO:54) 的至少30个连续的氨基酸；KRas的片段包括KRas (SEQ ID NO:57) 的至少10个连续的氨基酸，优选地KRas (SEQ ID NO:57) 的至少15个连续的氨基酸，更优选地KRas (SEQ ID NO:57) 的至少20个连续的氨基酸，甚至更优选地KRas (SEQ ID NO:57) 的至少25个连续的氨基酸和最优选地KRas (SEQ ID NO:57) 的至少30个连续的氨基酸；MAGE-A3的片段包括MAGE-A3 (SEQ ID NO:59) 的至少10个连续的氨基酸，优选地MAGE-A3 (SEQ ID NO:59) 的至少15个连续的氨基酸，更优选地MAGE-A3 (SEQ ID NO:59) 的至少20个连续的氨基酸，甚至更优选地MAGE-A3 (SEQ ID NO:59) 的至少25个连续的氨基酸和最优选地MAGE-A3 (SEQ ID NO:59) 的至少30个连续的氨基酸。而且，ASCL2的片段包括ASCL2 (SEQ ID NO:92) 的至少10个连续的氨基酸，优选地ASCL2 (SEQ ID NO:92) 的至少15个连续的氨基酸，更优选地ASCL2 (SEQ ID NO:92) 的至少20个连续的氨基酸，甚至更优选地ASCL2 (SEQ ID NO:92) 的至少25个连续的氨基酸和最优选地ASCL2 (SEQ ID NO:92) 的至少30个连续的氨基酸。
- [0360] 这样的片段的功能性序列变体具有与参考序列至少70%，至少75%，优选地至少

80%，更优选地至少85%，甚至更优选地至少90%，特别优选地至少95%，最优选地至少99%同一的(氨基酸)序列，并且由片段包括的至少一种(优选地所有)表位的表位功能被维持。

[0361] 优选地，这样的复合物包括

[0362] xiv) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体；

[0363] xv) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体；和

[0364] xvi) MAGE-A3的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:60的表位)或其功能性序列变体。

[0365] 这样的复合物优选地不包括HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、SART或IL13Ra2的任何表位。更优选地，这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0366] 还优选的是这样的复合物包括

[0367] xvii) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体；

[0368] xviii) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:50的表位和/或根据SEQ ID NO:51的表位)或其功能性序列变体；

[0369] xix) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体；和

[0370] xx) MAGE-A3的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:60的表位)或其功能性序列变体。

[0371] 这样的复合物优选地不包括HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、SART或IL13Ra2的任何表位。更优选地，这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0372] 还优选的是这样的复合物包括

[0373] xxi) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体；

[0374] xxii) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:50的表位和/或根据SEQ ID NO:51的表位)或其功能性序列变体；

[0375] xxiii) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体；和

[0376] xxiv) KRas的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:58的表位)或其功能性序列变体。

[0377] 这样的复合物优选地不包括HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。更优选地，这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、OGT、

CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0378] 还优选的是这样的复合物包括

[0379] xxv) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体;

[0380] xxvi) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:53的表位)或其功能性序列变体;

[0381] xxvii) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体;和

[0382] xxviii) MAGE-A3的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:60的表位)或其功能性序列变体。

[0383] 这样的复合物优选地不包括HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、SART或IL13R α 2的任何表位。更优选地,这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0384] 还优选的是这样的复合物包括

[0385] xxix) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:50的表位和/或根据SEQ ID NO:51的表位)或其功能性序列变体;

[0386] xxx) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:53的表位)或其功能性序列变体;和

[0387] xxxi) MAGE-A3的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:60的表位)或其功能性序列变体。

[0388] 这样的复合物优选地不包括EpCAM、HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、CEA、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、SART或IL13R α 2的任何表位。更优选地,这样的复合物不包括ASCL2、EpCAM、HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、CEA、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0389] 更优选地,这样的复合物包括

[0390] xxxii) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体;

[0391] xxxiii) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:50的表位和/或根据SEQ ID NO:51的表位)或其功能性序列变体;

[0392] xxxiv) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:53的表位)或其功能性序列变体;和/或

[0393] xxxv) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体。

[0394] 这样的复合物优选地不包括HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。更优选地,这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0395] 更优选地,这样的复合物包括

[0396] xxxvi) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:48的表位)或其功能性序列变体;

[0397] xxxvii) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:50的表位和/或根据SEQ ID N0:51的表位)或其功能性序列变体;

[0398] xxxviii) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:53的表位)或其功能性序列变体;

[0399] xxxix) ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:93的表位和/或根据SEQ ID N0:94的表位)或其功能性序列变体;和/或

[0400] x1) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:55的表位和/或根据SEQ ID N0:56的表位)或其功能性序列变体。

[0401] 这样的复合物优选地不包括HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0402] 更优选地,这样的复合物包括

[0403] x1i) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:48的表位)或其功能性序列变体;

[0404] x1ii) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:53的表位)或其功能性序列变体;

[0405] x1iii) ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:93的表位和/或根据SEQ ID N0:94的表位)或其功能性序列变体;和/或

[0406] x1iv) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:55的表位和/或根据SEQ ID N0:56的表位)或其功能性序列变体。

[0407] 这样的复合物优选地不包括HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0408] 特别优选地,这样的复合物包括

[0409] x1v) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:48的表位)或其功能性序列变体;

[0410] x1vi) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:50的表位和/或根据SEQ ID N0:51的表位)或其功能性序列变体;

[0411] x1vii) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:53的表位)或其功能性序列变体;和/或

[0412] x1viii) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:55的表位和/或根据SEQ ID N0:56的表位)或其功能性序列变体。

[0413] 这样的复合物优选地不包括HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。更优选地,这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0414] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0415] x1ix) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:55的表位和/或根据SEQ ID N0:56的表位)或其功能性序列变体;

[0416] 1) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:53的表位)或其功能性序列变体;

[0417] 1i) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体;和/或

[0418] 1ii) ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:93的表位和/或根据SEQ ID NO:94的表位)或其功能性序列变体。

[0419] 这样的复合物优选地不包括HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0420] 还特别优选地的是这样的复合物包括

[0421] 1iii) EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体;

[0422] 1iv) MUC-1的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:50的表位和/或根据SEQ ID NO:51的表位)或其功能性序列变体;和

[0423] 1v) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体。

[0424] 这样的复合物优选地不包括HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。更优选地,这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0425] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0426] 1vi) CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体;

[0427] 1vii) 存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:53的表位)或其功能性序列变体;和

[0428] 1viii) ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:93的表位和/或根据SEQ ID NO:94的表位)或其功能性序列变体。

[0429] 这样的复合物优选地不包括HER-2、EpCAM、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0430] 甚至更优选地,该复合物在N-至C-端方向上包括:

[0431] —CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体;

[0432] —存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:53的表位)或其功能性序列变体;和

[0433] —ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:93的表位和/或根据SEQ ID NO:94的表位)或其功能性序列变体。

[0434] 这样的复合物优选地不包括HER-2、EpCAM、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13Ra2的任何表位。

[0435] 甚至更优选地,该复合物在N-至C-端方向上包括:

[0436] i) 具有根据SEQ ID NO:54的氨基酸序列的肽,或长度为至少10个氨基酸(优选至

少15个氨基酸,更优选至少20个氨基酸,甚至更优选至少25个氨基酸,和最优选至少30个氨基酸)的其片段,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;

[0437] ii) 具有根据SEQ ID N0:52的氨基酸序列的肽,或长度为至少10个氨基酸(优选至少15个氨基酸,更优选至少20个氨基酸,甚至更优选至少25个氨基酸,和最优选至少30个氨基酸)的其片段,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;和

[0438] iii) 具有根据SEQ ID N0:92的氨基酸序列的肽,或长度为至少10个氨基酸(优选至少15个氨基酸,更优选至少20个氨基酸,甚至更优选至少25个氨基酸,和最优选至少30个氨基酸)的其片段,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体。

[0439] 这样的复合物优选地不包括除了CEA、存活蛋白和ASCL2之外的任何进一步的抗原或进一步的抗原的表位,更优选地,这样的复合物不包括任何其他(肿瘤)表位。

[0440] 优选地,在这样的复合物中, (i) 具有根据SEQ ID N0:54的氨基酸序列的肽或其片段或变体的C-端直接地连接至 (ii) 具有根据SEQ ID N0:52的氨基酸序列的肽或其片段或变体的N-端;和 (ii) 具有根据SEQ ID N0:52的氨基酸序列的肽或其片段或变体的C-端直接地连接至 (iii) 具有根据SEQ ID N0:92的氨基酸序列的肽或其片段或变体的N-端。

[0441] 仍更优选地,该复合物在N-至C-端方向上包括:

[0442] i) 具有根据SEQ ID N0:96的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;

[0443] ii) 具有根据SEQ ID N0:95的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;和

[0444] iii) 具有根据SEQ ID N0:97的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体。

[0445] 这样的复合物优选地不包括除了CEA、存活蛋白和ASCL2之外的任何进一步的抗原或进一步的抗原的表位,更优选地,这样的复合物不包括任何其他(肿瘤)表位。

[0446] 优选地,在这样的复合物中, (i) 具有根据SEQ ID N0:96的氨基酸序列的肽或其变体的C-端直接地连接至 (ii) 具有根据SEQ ID N0:95的氨基酸序列的肽或其变体的N-端;和 (ii) 具有根据SEQ ID N0:95的氨基酸序列的肽或其变体的C-端直接地连接至 (iii) 具有根据SEQ ID N0:97的氨基酸序列的肽或其变体的N-端。

[0447] 最优选地,复合物包括具有根据SEQ ID N0:98的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体。这样的复合物优选

地不包括除了CEA、存活蛋白和ASCL2之外的任何进一步的抗原或进一步的抗原的表位,更优选地,这样的复合物不包括任何其他(肿瘤)表位。

[0448] 还特别优选地的是这样的复合物包括

[0449] —EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体;和

[0450] —CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体。

[0451] 这样的复合物优选地不包括HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、0GT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。更优选地,这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、0GT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0452] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0453] —EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:48的表位)或其功能性序列变体;和

[0454] —ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:93的表位和/或根据SEQ ID NO:94的表位)或其功能性序列变体。

[0455] 这样的复合物优选地不包括HER-2、MUC-1、CEA、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、0GT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0456] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0457] —ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:93的表位和/或根据SEQ ID NO:94的表位)或其功能性序列变体;和

[0458] —CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体。

[0459] 这样的复合物优选地不包括HER-2、EpCAM、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、0GT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0460] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0461] —存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:53的表位)或其功能性序列变体;和

[0462] —ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:93的表位和/或根据SEQ ID NO:94的表位)或其功能性序列变体。

[0463] 这样的复合物优选地不包括HER-2、MUC-1、EpCAM、CEA、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、0GT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0464] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0465] —存活蛋白的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:53的表位)或其功能性序列变体;和

[0466] —CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID NO:55的表位和/或根据SEQ ID NO:56的表位)或其功能性序列变体。

[0467] 这样的复合物优选地不包括ASCL2、HER-2、EpCAM、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、TGF β R2、p53、KRas、0GT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0468] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0469] —EpCAM的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:48的表位)或其功能性序列变体。

[0470] 这样的复合物优选地不包括HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、CEA、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。更优选地,这样的复合物不包括ASCL2、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、CEA、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0471] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0472] —CEA的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:55的表位和/或根据SEQ ID N0:56的表位)或其功能性序列变体。

[0473] 这样的复合物优选地不包括EpCAM、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。更优选地,这样的复合物不包括ASCL2、EpCAM、HER-2、MUC-1、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0474] 还特别优选的是这样的复合物包括

[0475] —ASCL2的一种或多种表位(比如根据SEQ ID N0:93的表位和/或根据SEQ ID N0:94的表位)或其功能性序列变体。

[0476] 这样的复合物优选地不包括EpCAM、HER-2、MUC-1、CEA、TOMM34、RNF 43、KOC1、VEGFR、 β hCG、存活蛋白、TGF β R2、p53、KRas、OGT、CASP5、COA-1、MAGE、SART或IL13R α 2的任何表位。

[0477] 组分c) -TLR肽激动剂

[0478] 在根据本发明使用的复合物中,TLR肽激动剂允许疫苗对树突细胞的增加的靶向连同自身佐剂性(self-adjuvancy)。通过同时刺激内化、代谢和展示抗原(一种或多种)的抗原呈递细胞,具体地树突细胞,根据本发明使用的复合物中TLR肽激动剂与CPP和根据本发明的至少一种抗原或抗原表位的物理连接提供了增强的免疫应答。

[0479] 如在本发明的上下文中使用的,“TLR肽激动剂”是To11样受体(TLR)的激动剂,即它结合至TLR并且活化TLR,具体地产生生物应答。而且,TLR肽激动剂是如上面限定的肽、多肽或蛋白质。优选地,TLR肽激动剂包括10至150个氨基酸,更优选地15至130个氨基酸,甚至更优选地2至120个氨基酸,特别优选地25至110个氨基酸,和最优选地30至100个氨基酸。

[0480] To11样受体(TLR)是表征为细胞外、跨膜和胞质结构域的跨膜蛋白。包含富含亮氨酸的重复序列(LRR)——其具有马蹄样形状——的细胞外结构域参与识别源自不同微生物的常见分子模式。To11样受体包括TLR1-10。能够活化TLR受体和其修饰物与衍生物的化合物在本领域中良好地被记录。TLR1可以由细菌脂蛋白和其乙酰化形式活化,TLR2可以另外由革兰氏阳性菌糖脂、LPS、LP A、LTA、菌毛、外膜蛋白、来自细菌或来自宿主的热激蛋白、和分枝杆菌脂阿拉伯甘露聚糖(lipoarabinomannan)活化。TLR3可以由dsRNA——具体地病毒起源的——或由化学化合物聚(LC)活化。TLR4可以由革兰氏阴性LPS、LTA、来自宿主或来自细菌起源的热激蛋白、病毒外壳或包膜蛋白、紫杉酚或其衍生物、包含透明质酸的寡糖和纤连蛋白活化。TLR5可以使用细菌鞭毛或鞭毛蛋白活化。TLR6可以由分枝杆菌脂蛋白和B群链球菌热不稳定的可溶性因子(GBS-F)或葡萄球菌调控蛋白(modulin)活化。TLR7可以由咪唑

喹啉活化。TLR9可以由非甲基化的CpG DNA或染色质-IgG复合物活化。

[0481] 优选地,由根据本发明使用的复合物包括的TLR肽激动剂是TLR1、2、4、5、6和/或10的激动剂。TLR在细胞表面上(TLR1、2、4、5、6和10)或在细胞内细胞器比如内体的膜上(TLR3、4、7、8和9)表达。内体受体的天然配体结果是基于核酸的分子(除TLR4以外)。细胞表面表达的TLR1、2、4、5、6和10识别细胞外微生物的分子模式(Monie, T.P., Bryant, C.E. 等人 2009:Activating immunity:Lessons from the TLRs and NLRs.Trends Biochem. Sci. 34 (11), 553-561)。TLR在几种细胞类型上表达,但是几乎所有TLR在DC上表达,其使得这些特定细胞感测所有可能的病原体和危险信号。

[0482] 然而,TLR2、4和5在DC的表面处组成型地表达。因此,由根据本发明使用的复合物包括的TLR肽激动剂更优选地是TLR2、TLR4和/或TLR5的肽激动剂。甚至更优选地,TLR肽激动剂是TLR2肽激动剂和/或TLR4肽激动剂。特别优选地,TLR肽激动剂是TLR4肽激动剂。最优选地,TLR肽激动剂是一种TLR肽激动剂,其是TLR2和TLR4二者激动剂。TLR2可以检测各种源自细菌、病毒、寄生虫和真菌的配体。配体特异性通常通过TLR2与其它TLR比如TLR1、6或10,或非TLR分子比如树突状细胞相关性C型植物血凝素1(dectin-1)、CD14或CD36的相互作用测定。与TLR1的异二聚体的形成使得TLR2能够鉴定来自(分枝杆菌)细菌起源的三酰基脂蛋白或脂肽,比如Pam3CSK4和肽聚糖(PGA; Gay, N.J., and Gangloff, M. (2007) :Structure and function of Toll receptors and their ligands. Annu. Rev. Biochem. 76, 141-165; Spohn, R., Buwitt-Beckmann, U. 等人 (2004) :Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2—Structure-activity relationships. Vaccine 22 (19), 2494-2499)。TLR2和6的异二聚化使得能够检测二酰基脂肽和酵母聚糖。脂多糖(LPS)和其衍生物是TLR4的配体并且鞭毛蛋白是TLR5的配体(Bryant, C.E., Spring, D.R. 等人 (2010) . The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. Nat. Rev. Microbiol. 8 (1), 8-14)。

[0483] TLR2与大范围和在结构上多样范围的配体相互作用,所述配体包括由细菌和真菌表达的分子。已经鉴定了多种TLR2激动剂,包括天然和合成脂肽(例如发酵支原体巨噬细胞活化脂肽(MALP-2))、肽聚糖(PG比如来自金黄色葡萄球菌的那些)、来自多种细菌菌株的脂多糖(LPS)、多糖(例如酵母聚糖)、来自革兰氏阳性菌的糖基磷脂酰肌醇锚定的结构(例如来自分枝杆菌的脂磷壁酸(LTA)和脂阿拉伯甘露聚糖和来自结核分枝杆菌的脂甘露聚糖)。某些病毒决定簇也可以经由TLR2引发(Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. Nat Immunol. 2009;10(11):1200-7)。细菌脂肽是细胞壁的结构组分。它们由酰化的s-甘油酰半胱氨酸部分组成,肽可以经由半胱氨酸残基与其缀合。为细菌脂肽的TLR2激动剂的实例包括MALP-2和其合成类似物二-棕榈酰-S-甘油酰半胱氨酸(Pam₂Cys)或三-棕榈酰-S-甘油酰半胱氨酸(Pam₃Cys)。

[0484] 各种配体与TLR4相互作用,其包括来自明尼苏达沙门氏菌R595的单磷酰脂质A(MPLA)、脂多糖(LPS)、甘露聚糖(白色念珠菌)、糖肌醇磷脂(glycoinositolphospholipid)(锥虫)、病毒包膜蛋白(RSV和MMTV)和包括纤维蛋白原与热激蛋白的内源性抗原。TLR4的这样的激动剂例如在Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. Feb 24;2006;124(4):783-801或在Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like

receptor and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 30; 2009 388(4): 621-5中描述。在革兰氏阳性菌的外膜中发现的LPS是最广泛研究的TLR4配体。合适的LPS来源的TLR4激动剂肽例如在WO 2013/120073 (A1) 中描述。

[0485] TLR5通过由几乎所有能动菌表达的鞭毛蛋白分子的区域引发。因而,鞭毛蛋白、或衍生自鞭毛蛋白的肽或蛋白质和/或鞭毛蛋白的变体或片段也适合作为由根据本发明使用的复合物包括的TLR肽激动剂。

[0486] TLR肽激动剂的实例因而包括TLR2脂肽激动剂MALP-2、Pam₂Cys和Pam₃Cys或其修饰物,TLR4激动剂LPS的不同形式,例如脑膜炎双球菌野生型L3-LPS和突变体五-酰化的LpxL1-LPS,和TLR5激动剂鞭毛蛋白。

[0487] 然而,优选的是由根据本发明使用的复合物包括的TLR肽激动剂既不是脂肽也不是脂蛋白,既不是糖肽也不是糖蛋白,更优选地,由根据本发明使用的复合物包括的TLR肽激动剂是如本文限定的经典的肽、多肽或蛋白质。

[0488] 优选的TLR2肽激动剂是膜联蛋白II或其免疫调节片段,其在WO 2012/048190A1和美国专利申请13/0331546中详细地描述,具体地包括根据WO 2012/048190 A1的SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其片段或变体的TLR2肽激动剂是优选的。

[0489] 从而,包括或由根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列或如上面描述的其序列变体组成的TLR2肽激动剂作为由根据本发明使用的复合物包括的组分c)——即作为至少一种TLR肽激动剂——是特别优选的。

[0490] STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0491] SEQ ID NO:15 (TLR2肽激动剂Anaxa)

[0492] 根据SEQ ID NO:15的TLR肽激动剂的特别优选的功能性序列变体是根据SEQ ID NO:71的TLR肽激动剂:

[0493] STVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0494] SEQ ID NO:71

[0495] 因此,包括或由如上文描述的根据SEQ ID NO:71的氨基酸序列或其序列变体组成的TLR2肽激动剂具体地优选为组分c),即为由复合物包括的至少一种TLR肽激动剂。换句话说,复合物中的TLR肽激动剂优选地包括或由具有根据SEQ ID NO:71的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选至少75%,更优选至少80%,甚至优选至少85%,仍更优选至少90%,特别优选至少95%,最优选至少99%序列同一性)的其功能性序列变体组成。

[0496] 关于TLR4,TLR肽激动剂是特别优选的,其具体地相当于结合至TLR4的基序,具体地(i)模拟天然LPS配体的肽(RS01:Gln-Glu-Ile-Asn-Ser-Ser-Tyr和RS09:Ala-Pro-Pro-His-Ala-Leu-Ser)和(ii)纤连蛋白来源的肽。细胞糖蛋白纤连蛋白(FN)具有通过三个外显子的可变剪接从单基因生成的多种同种型。这些同种型中的一种是与TLR4相互作用的额外结构域A(EDA)。

[0497] 进一步合适的TLR肽激动剂包括纤连蛋白EDA结构域或其片段或变体。这样的合适的纤连蛋白EDA结构域或其片段或变体在EP 1 913 954B1、EP 2 476 440A1、US2009/0220532A1和WO 2011/101332A1中被公开。从而,包括或由根据SEQ ID NO:45的氨基酸序列或如上面描述的其序列变体组成的TLR4肽激动剂作为由根据本发明使用的复合物包括的组分c)——即作为至少一种TLR肽激动剂——是特别优选的。

[0498] NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLRPGSEYT
VSVVALHDDMESQPLIGIQST

[0499] SEQ ID NO:45 (TLR4肽激动剂EDA)

[0500] 此外,高迁移率族盒1蛋白 (high-mobility group box 1protein) (HMGB1) 和其肽片段被认为是TLR4激动剂。这样的HMGB1来源的肽例如在US 2011/0236406A1中被公开。

[0501] 而且,根据SEQ ID NO:15的TLR激动剂和根据SEQ ID NO:71的TLR激动剂也可以充当TLR4激动剂。因此,包括或由根据SEQ ID NO:15或71的氨基酸序列或其功能性序列变体组成的TLR4肽激动剂特别地优选为由复合物包括的组分c),即为至少一种TLR肽激动剂。

[0502] 根据本发明使用的复合物包括至少一种TLR肽激动剂,优选地根据本发明使用的复合物包括多于一种TLR肽激动剂,具体地2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种TLR肽激动剂,更优选地根据本发明使用的复合物包括(至少)两种或三种TLR肽激动剂,甚至更优选地根据本发明使用的复合物包括(至少)四种或五种TLR肽激动剂。如果根据本发明使用的复合物包括多于一种TLR肽激动剂,要理解所述TLR肽激动剂也具体地在根据本发明使用的复合物中共价连接,例如至另一种TLR肽激动剂和/或至组分a),即细胞穿透肽,和/或至组分b),即抗原或抗原表位。

[0503] 在特别优选的实施方式中,根据本发明使用的复合物包括一种单一TLR肽激动剂。特别地,在该特别优选的实施方式中,根据本发明使用的复合物包括一种单一TLR肽激动剂,并且不包括除所描述的一种单一TLR肽激动剂以外的具有TLR激动剂性质的进一步的组分。

[0504] 由根据本发明使用的复合物包括的多种TLR肽激动剂可以是相同或不同的。优选地,由根据本发明使用的复合物包括的多种TLR肽激动剂彼此不同。

[0505] 而且,优选的是多于一种抗原或抗原表位,具体地2、3、4、5、6、7、8、9、10种抗原或抗原表位,或更多的TLR肽激动剂,具体地2、3、4、5、6、7、8、9、10种TLR激动剂在根据本发明使用的复合物中被连续地定位。具体地,这意思是复合物包括的所有TLR肽激动剂以一段定位,其既不被组分a),即细胞穿透肽中断,也不被组分b),即至少一种抗原或抗原表位中断。而是,组分a)和组分b)在复合物中定位,例如在这样的一段所有TLR肽激动剂之前或之后。然而,以这样的方式连续定位的TLR肽激动剂可以彼此连接,例如通过如下面描述的间隔区或连接体,其既不是组分a),即细胞穿透肽,也不是组分b),即至少一种抗原或抗原表位。

[0506] 然而,可选地,多种TLR肽激动剂还可以以任何其它方式在根据本发明使用的复合物中定位,例如组分a)和/或组分b)在两种或更多种TLR肽激动剂之间定位,即一种或多种TLR肽激动剂在组分a)和组分b)之间定位(或反之亦然),和任选地,一种或多种TLR肽激动剂在组分a)和/或组分b)的各自另一端处定位。

[0507] 要理解活化相同或不同TLR受体的大量不同的TLR肽激动剂可以有利地由根据本发明使用的复合物包括。可选地,活化相同或不同TLR受体的大量不同的TLR肽激动剂可以分布至活化相同或不同TLR受体的不同TLR肽激动剂的子集,其由根据本发明的不同复合物包括,由此这样的包括不同子集的不同复合物可以有利地同时施用,例如在单一疫苗中,至需要其的对象。

[0508] 组分a)、b)和c)在根据本发明使用的复合物中的连接

[0509] 在根据本发明使用的复合物中,组分a)、b)和c)被共价连接,即根据本发明使用的复合物的三种组分a)、b)和c)中的两种之间的连接是共价连接。优选地,根据本发明使用的复合物的三种组分a)、b)和c)中的两种彼此共价连接(即“第一”和“第二”组分),并且三种组分a)、b)和c)中的第三组分被共价连接至三种组分a)、b)和c)中的第一组分或三种组分a)、b)和c)中的第二组分。从而,优选地形成线性分子。然而,还可以想得到的是三种组分a)、b)和c)中的每种被共价连接至三种组分a)、b)和c)中的两种其它组分。

[0510] 如在本发明的上下文中使用的,“共价连接”(也是共价键)指的是涉及共享原子之间的电子对的化学键。“共价连接”(也是共价键)具体地涉及当原子共享电子时它们之间的吸引力和排斥力的稳定平衡。对于许多分子,电子的共享允许每个原子达到等价的完整外壳(full outer shell),其相当于稳定的电子构型。共价键合包括许多种类的相互作用,包括例如 σ -键合、 π -键合、金属与金属键合、抓氢相互作用(agostic interaction)、和三中心两电子键。因此,根据本发明使用的复合物还可以被称为“化合物”,具体地它可以被称为“分子”。

[0511] 优选地,在根据本发明使用的复合物中,组分a)、b)和c)以本领域已知的任何合适的方式比如交联方法通过化学偶联被共价连接。然而,注意力被吸引到如下事实:许多已知的化学交联方法是非特异性的,即,它们不将偶联点引导至组分a)、b)和c)上的任何特定位点。因而,非特异性交联剂的使用可能攻击功能性位点或空间阻断活性位点,致使根据本发明使用的复合物的融合组分在生物学上失活。技术人员的知识提及通过使用适当的保护基团阻断潜在反应基团。可选地,可以采用强力的和通用的肟和腙接合技术的用途,其是可以应用于组分a)、b)和c)的交联的化学选择性实体。该连接技术例如由Rose et al. (1994), JACS 116, 30描述。

[0512] 偶联特异性可以通过直接化学合偶联至在组分a)、b)和/或c)中仅发现一次或数次的官能团而增加,该官能团将被交联至组分a)、b)和c)中的另一种。作为实例,如果仅一个半胱氨酸残基存在于根据本发明使用的复合物的某一组分a)、b)或c)中,可以使用半胱氨酸硫醇基。同样,例如,如果某一组分a)、b)或c)不包含赖氨酸残基,特异于伯胺的交联试剂对各自组分的氨基端将是选择性的。可选地,交联还可以经由安置在肽的N-端处的谷氨酸残基的侧链实施,以便酰胺键可以通过其侧链生成。因此,将谷氨酸残基连接至某一组分a)、b)或c)的N-端可以是有利的。然而,如果半胱氨酸残基将被引入某一组分a)、b)或c),在其N-或C-端处或附近引入是优选的。通过将一种或多种额外的氨基酸——例如尤其是半胱氨酸残基——添加至易位序列或通过置换被包括在各自的组分中的易位序列(一种或多种)的至少一种残基,基于某一组分a)、b)或c)的修饰,常规方法对这样的氨基酸序列改变是可用的。假如半胱氨酸侧链被用于偶联目的,某一组分a)、b)或c)优选地具有一个半胱氨酸残基。任何第二个半胱氨酸残基应当优选地被避免,并且当它们在由根据本发明使用的复合物包括的各自的组分中出现时可以任选地被替换。当半胱氨酸残基在某一组分a)、b)或c)的原始序列中被替换时,通常期望最小化在各自的组分的肽折叠中产生的变化。当替代物在化学上和空间上类似于半胱氨酸时,折叠的变化被最小化。因此,丝氨酸作为半胱氨酸的替代物是优选的。

[0513] 三种组分a)、b)和c)中的两种的偶联可以经由偶联剂或缀合剂(conjugating agent)完成,包括标准的肽合成偶联试剂比如HOBT、HBTU、DICl、TBTU。存在可以利用的几种

分子间交联剂,参见例如,Means和Feeney,Chemical Modification of Proteins,Holden-Day,1974,pp.39-43。在这些试剂之中,例如是,N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)或N,N'-(1,3-亚苯基)双马来酰亚胺;N,N'-乙烯-双-(碘乙酰胺)或具有6至11个碳的亚甲基桥的其它这样的试剂;和1,5-二氟-2,4-二硝基苯。对此目的有用的其它交联剂包括:p,p'-二氟-m,m'-二硝基二苯砜;二甲基己二酸二甲酯;苯酚-1,4-二磺酰氯;六亚甲基二异氰酸酯或二异硫氰酸酯、或苯偶氮基-对-二异氰酸酯;戊二醛和双重氨基联苯胺(disdiazobenzidine)。交联剂可以是同型双官能的,即,具有经历相同反应的两个官能团。优选的同型双官能交联剂是双马来酰亚胺基己烷(BMH)。BMH包含两个马来酰亚胺官能团,其与包含巯基的化合物在温和条件(pH 6.5-7.7)下特异性地反应。两个马来酰亚胺基团通过烃链相连。因此,BMH对包含半胱氨酸残基的蛋白质(或多肽)的不可逆的交联是有用的。交联剂也可以是异型双官能的。异型双官能交联剂具有两个不同的官能团,例如胺-反应基团和硫醇-反应基团,其将分别交联具有游离的胺和硫醇的两种蛋白质。异型双官能交联剂的实例是琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、和琥珀酰亚胺4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(SMPB)——MBS的链延长类似物。这些交联剂的琥珀酰亚胺基与伯胺反应,并且硫醇-反应性马来酰亚胺与半胱氨酸残基的硫醇形成共价键。因为交联剂通常在水中具有低溶解度,亲水部分,比如磺酸基团,可以被添加至交联剂以改进其水溶性。硫代-MBS和硫代-SMCC是出于水溶性被改性的交联剂的实例。许多交联剂产生在细胞条件下大体上不可切割的缀合物。因此,一些交联剂包含共价键,比如二硫键,其在细胞条件下是可切割的。例如,Traut试剂二硫双(丙酸琥珀酰亚胺酯)(DSP)、和N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)是熟知的可切割的交联剂。可切割的交联剂的使用允许由根据本发明使用的复合物包括的细胞穿透肽、至少一种抗原或抗原表位和至少一种TLR肽激动剂在被递送入靶细胞后彼此分离。出于此目的,直接的二硫连接也可以是有用的。化学交联还可以包括使用间隔臂。间隔臂提供了分子间灵活性或调节缀合部分之间的分子间距离并且从而可以帮助保留生物学活性。间隔臂可以是蛋白质(或多肽)部分——其包括间隔氨基酸,例如脯氨酸——的形式。可选地,间隔臂可以是交联剂的一部分,比如在“长链SPDP”中(Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 目录号21651H)。众多交联剂,包括上面讨论的交联剂,是商业上可获得的。它们的使用的详细说明容易从供应商获得。在由根据本发明使用的复合物包括的组分a)、b)和c)的连接的上下文中有用的关于蛋白质交联和缀合物制备的更详细的信息可以获得自:Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991)。

[0514] 用于肽或蛋白质交联的交联剂包括例如(i)胺对胺交联剂,例如同型双官能胺特异性蛋白质交联试剂,其基于用于伯胺的选择性缀合的NHS-酯和亚氨酸酯反应基团;在短的、长的、可切割的、不可逆的、可透过膜的、和细胞表面的种类中可获得;(ii)巯基对碳水化合物交联剂,例如基于用于缀合和形成共价交联的马来酰亚胺和酰肼反应基团的交联试剂;(iii)巯基对巯基交联剂,例如同型双官能巯基特异性交联试剂,其基于用于选择性共价缀合蛋白质和肽硫醇(还原的半胱氨酸)以形成稳定的硫醚键的马来酰亚胺或吡啶基二硫醇反应基团;(iv)光敏交联剂,例如芳基叠氮化物、二吖丙啶(diazirine)、和其它光敏(光活化的)化学异型双官能交联试剂,其经由两步活化缀合受体-配体相互作用复合物中涉及的蛋白质、核酸和其它分子结构;(v)胺对巯基交联剂,例如用于蛋白质和其它分子的

伯胺(赖氨酸)和巯基(半胱氨酸)基团之间的缀合的异型双官能蛋白质交联试剂;在不同长度和类型的间隔臂的情况下是可获得的;和(vi)胺对胺交联剂,例如羧基对胺交联剂,例如碳二亚胺交联试剂、DCC和EDC(EDAC)——其用于将羧基(谷氨酸、天冬氨酸,C-端)缀合至伯胺(赖氨酸,N-端),以及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)——其用于稳定活化用于胺缀合的羧化物。

[0515] 一般而言,可以在根据本发明使用的复合物中使用的交联剂的实例包括N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯、N-5-叠氮基-2-硝基苄氧基-琥珀酰亚胺、1,4-双-马来酰亚胺基丁烷、1,4-双-马来酰亚胺基(maleimimidyl)-2,3-二羟基-丁烷、双-马来酰亚胺基己烷、双-马来酰亚胺基乙烷、N-(β -马来酰亚胺基丙酸)酰肼*TFA、N-(β -马来酰亚胺基丙氧基)琥珀酰亚胺酯、1,8-双-马来酰亚胺基二乙二醇、1,11-双-马来酰亚胺基三乙二醇、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯、双(磺基琥珀酰亚胺基)戊二酸酯-d0、双(磺基琥珀酰亚胺基)2,2,4,4-戊二酸酯-d4、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯-d0、双(磺基琥珀酰亚胺基)2,2,7,7-辛二酸酯-d4、双(NHS)PEG5、双(NHS)PEG9、双(2-[琥珀酰亚胺基氧]乙基)砜、N,N-二环己基碳二亚胺、1-5-二氟-2,4-二硝基苯、二甲基己二酸二甲酯*2HCl、二甲基庚二亚氨酸酯*2HCl、二甲基辛二亚氨酸酯*2HCl、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯、二硫双(丙酸琥珀酰亚胺酯)(Lomant试剂)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯、二甲基3,3'-二硫双丙酰亚氨酸酯(propionimidate)*2HCl、二硫双-马来酰亚胺基乙烷、3,3'-二硫双(丙酸磺基琥珀酰亚胺酯)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、乙二醇双(琥珀酸琥珀酰亚胺酯)、N- ϵ -马来酰亚胺基己酸、N-(ϵ -马来酰亚胺基己酸)酰肼、N-(ϵ -马来酰亚胺基己酰基氧)琥珀酰亚胺酯、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰基氧)琥珀酰亚胺酯、N-(κ -马来酰亚胺基十一酸)酰肼、NHS-LC-二吖丙啶、琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)、琥珀酰亚胺基6-(3'-(2-吡啶基二硫)丙酰氨基)己酸酯、L-光反应(Photo)-亮氨酸、L-光反应-甲硫氨酸、间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酰肼*HCl、2-[N2-(4-叠氮基-2,3,5,6-四氟苯甲酰)-N6-(6-生物素酰氨基己酰基)-L-赖氨酰基]甲基硫代硫酸乙酯、2-[N2-[N6-(4-叠氮基-2,3,5,6-四氟苯甲酰)-N6-(6-生物素酰氨基己酰基)-L-赖氨酰基]]甲基硫代硫酸乙酯、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺酯乙烷叠氮化物、N-羟基琥珀酰亚胺酯四氧杂十五烷(tetraoxapentadecane)叠氮化物、N-羟基琥珀酰亚胺酯十二氧杂三十九烷叠氮化物、NHS-膦、3-(2-吡啶基二硫)丙酰基酰肼、2-吡啶基二硫醇-四氧杂十四烷-N-羟基琥珀酰亚胺、2-吡啶基二硫醇-四氧杂十四烷三十八烷-N-羟基琥珀酰亚胺、N-(对-马来酰亚胺基苯基)异氰酸酯、琥珀酰亚胺基(succinimidyl)3-(溴乙酰氨基)丙酸酯、NHS-二吖丙啶、NHS-SS-二吖丙啶、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯、琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-羧酸酯、NHS-PEG2-马来酰亚胺(maliemide)、NHS-PEG4-马来酰亚胺、NHS-PEG6-马来酰亚胺、NHS-PEG8-马来酰亚胺、NHS-PEG12-马来酰亚胺、NHS-PEG24-马来酰亚胺、琥珀酰亚胺基4-(对-马来酰亚胺基-苯基)丁酸酯、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酰氨基)己酸酯、4-琥珀酰亚胺基氧羰基-甲基- α -(2-吡啶基二硫)甲苯、琥珀酰亚胺基-(4-补骨脂素-8-基氧)丁酸酯、N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯、乙二醇双(磺基-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)、N-(ϵ -马来酰亚胺基己酰基氧)磺基琥珀酰亚胺酯、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰基氧)磺基琥珀酰亚胺酯、N-(κ -马来酰亚胺基十一酰基氧)

磺基琥珀酰亚胺酯、磺基-NHS-LC-二吖丙啶、磺基琥珀酰亚胺基6-(3'-[2-吡啶基二硫]丙酰氨基)己酸酯、间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、N-羟基琥珀酰亚胺、磺基-NHS-膦、磺基琥珀酰亚胺基6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯、磺基-NHS-(2-6-[生物素酰氨基]-2-(对-叠氮基苯甲酰氨基)(bezamido))、磺基-NHS-二吖丙啶、磺基-NHS-SS-二吖丙啶、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯、磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯、磺基琥珀酰亚胺基4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯、三-(2-马来酰亚胺基乙基)胺(三官能的)、和三-(琥珀酰亚胺基(succimidyl)氨基三乙酸酯(tricetate)) (三官能的)。

[0516] 根据本发明使用的复合物的三种组分a)、b)和c)中的两种之间的连接可以是直接的或间接的,即两种组分直接地接合或它们可以通过复合物的另外的组分连接,例如间隔区或连接体。

[0517] 如果待连接的组分具有反应性氨基或羧基,直接连接可以优选地通过酰胺桥实现。更具体地,如果待连接的组分是肽、多肽或蛋白质,肽键是优选的。这样的肽键可以使用涉及待连接的两种组分(一种组分的N-末端和另一种组分的C-末端)的化学合成形成,或可以经由两种组分的完整肽序列的蛋白质合成直接形成,其中两种(蛋白质或肽)组分优选地以一步合成。这样的蛋白质合成方法包括,例如,而不被限制于此,液相肽合成方法或固体肽合成方法,例如根据Merrifield的固体肽合成方法、t-Boc固相肽合成、Fmoc固相肽合成、基于BOP(苯并三唑-1-基-氧-三-(二甲基氨基)-磷鎓六氟磷酸盐)的固相肽合成等。可选地,酯或醚连接是优选的。

[0518] 而且,具体地,如果待连接的组分是肽、多肽或蛋白质,连接可以经由侧链发生,例如通过二硫桥。其它化学性质的进一步的组分,例如至少一种抗原或抗原表位——如果它不具有肽性质,可以被同样地附加至肽性质的组分,例如细胞穿透肽、至少一种TLR肽激动剂、和至少一种抗原或抗原表位——如果它具有肽性质。经由侧链的连接将优选地基于侧链氨基、硫醇基团或羟基,例如经由酰胺或酯或醚连接。另一种组分的肽主链与肽侧链的连接还可以经由异构肽键。异构肽键是不在蛋白质的主链上存在的酰胺键。键在一个肽或蛋白质的羧基端和另一个(靶)肽或蛋白质上赖氨酸残基的氨基之间形成。

[0519] 根据本发明使用的复合物可以任选地包括间隔区或连接体,其是非免疫学部分,其优选地是可切割的,并且其连接组分a)与b)和/或组分a)与c)、和/或组分b)与c),和/或连接连续的抗原或抗原表位,和/或连接连续的TLR肽激动剂,和/或连接连续的细胞穿透肽,和/或其可以被安置在组分b)和/或c)的C-端部分处。除连接组分之外,连接体或间隔区可以优选地提供进一步的功能,并且优选地是可切割的,更优选地在靶细胞内天然地可切割的,例如通过酶促切割。然而,具体地,这样的进一步的功能不包括任何免疫学功能。进一步的功能的实例,具体地关于融合蛋白中的连接体,可以在Chen X.等人,2013:Fusion Protein Linkers:Property,Design and Functionality.Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369中被发现,其中例如还公开了体内可切割的连接体。而且,Chen X.等人,2013:Fusion Protein Linkers:Property,Design and Functionality.Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369还公开了多种连接体,例如柔性连接体和刚性连接体,和连接体设计工具和数据库,其在根据本发明使用的复合物中可以是有用的或用于设计在根据本发明使用的复合物中使用的连接体。

[0520] 所述间隔区可以是肽的或非肽的,优选地间隔区是肽的。优选地,肽间隔区由大约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸,更优选地大约1、2、3、4或5个氨基酸组成。肽间隔区的氨基酸序列可以与组分a)、b)或c)中任一种的N-端或C-端侧翼区的氨基酸序列同一。可选地,肽间隔区可以由非天然氨基酸序列组成,比如由蛋白酶的已知切割位点的所述天然侧翼区或序列的保守氨基酸置换引起的氨基酸序列,所述蛋白酶的已知切割位点比如肠激酶靶位点(氨基酸序列:DDDK,SEQ ID NO:16)、因子Xa靶位点(氨基酸序列:IEDGR,SEQ ID NO:17)、凝血酶靶位点(氨基酸序列:LVPRGS,SEQ ID NO:18)、蛋白酶TEV靶位点(氨基酸序列:ENLYFQG,SEQ ID NO:19)、PreScission蛋白酶靶位点(氨基酸序列LEVLFQGP,SEQ ID NO:20)、聚阳离子氨基酸——例如聚K、弗林蛋白酶——靶位点(氨基酸序列RX (R/K)R,SEQ ID NO:21)。在具体的实施方式中,肽间隔区不包含任何Cys (C)残基。在优选的实施方式中,连接体序列包含至少20%,更优选地至少40%并且甚至更优选地至少50%Gly或β-丙氨酸残基,例如GlyGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO:22)、GlyGlyGlyGly (SEQ ID NO:23)、GlyGlyGly、CysGlyGly或GlyGlyCys等。适当的连接体序列可以容易地选择并且由本领域技术人员制备。它们可以由D和/或L氨基酸构成。肽间隔区的进一步的实例包括氨基酸序列EQLE (SEQ ID NO:24)或TEWT (SEQ ID NO:25)或其任何保守置换。

[0521] 非肽间隔区可以包括或可以是酯、硫酯和二硫化物。

[0522] 具体地,根据本发明使用的复合物可以包括间隔区或连接体,具体地肽间隔区,其被安置在组分a)与b)之间和/或组分a)与c)之间、和/或组分b)与c)之间。该肽间隔区可以由本领域技术人员选择,使得一旦包括细胞穿透肽和货物分子的复合物已经被内化,它可以被细胞机器切割。

[0523] 当复合物包括几种抗原或抗原表位时或当复合物包括几种TLR肽激动剂时,本领域技术人员将清楚本发明的复合物中包括的抗原或抗原表位中的每种和/或TLR肽激动剂中的每种可以彼此直接连接或经由间隔区或连接体——比如,例如,由几个氨基酸组成的肽间隔区——被连接。可选地,当根据本发明使用的复合物包括几种抗原或抗原表位时或当复合物包括几种TLR肽激动剂时,也可能的是由本发明的复合物包括的一些抗原或抗原表位和/或一些TLR肽激动剂彼此直接连接,并且一些其它抗原或抗原表位和/或一些其它TLR肽激动剂经由间隔区或连接体——比如由几个氨基酸组成的肽间隔区——被连接。

[0524] 例如,本发明的复合物中包括的两个连续的抗原或抗原表位或两个连续的TLR肽激动剂通过间隔区——其分别由所述抗原或抗原表位或所述TLR肽激动剂的天然侧翼区组成——彼此连接。例如,用于将第一抗原/抗原表位或第一TLR肽激动剂分别连接至第二抗原/抗原表位或第二TLR肽激动剂的间隔区可以由多至大约8个氨基酸组成,其对应于第一抗原/抗原表位或第一TLR肽激动剂的N-端或C-端侧翼区的多至大约4个氨基酸,接着是第二抗原/抗原表位或第二TLR肽激动剂的N-端或C-端侧翼区的多至大约4个氨基酸。在本发明的说明中,用于将第一抗原/抗原表位或第一TLR肽激动剂(“抗原/表位/TLR肽激动剂1”)连接至第二表位(“抗原/表位/TLR肽激动剂2”)的间隔区由大约8个氨基酸组成,其对应于如下范围内的任何可能的组合:抗原/表位/TLR肽激动剂1的0个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的8个侧翼氨基酸,至抗原/表位/TLR肽激动剂1的8个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的0个侧翼氨基酸,即包括抗原/表位/TLR肽激动剂1的1个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的7个侧翼氨基酸、抗原/表位/TLR肽激动剂1的2个侧翼氨基酸和

抗原/表位/TLR肽激动剂2的6个侧翼氨基酸、抗原/表位/TLR肽激动剂1的3个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的5个侧翼氨基酸、抗原/表位/TLR肽激动剂1的4个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的4个侧翼氨基酸、抗原/表位/TLR肽激动剂1的5个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的3个侧翼氨基酸、抗原/表位/TLR肽激动剂1的6个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的2个侧翼氨基酸、抗原/表位/TLR肽激动剂1的7个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的1个侧翼氨基酸、抗原/表位/TLR肽激动剂1的8个侧翼氨基酸和抗原/表位/TLR肽激动剂2的0个侧翼氨基酸。要理解总计8个氨基酸——其组成连接两个连续的抗原/表位/TLR肽激动剂的间隔区——不是绝对值并且间隔区还可以由总计例如3个氨基酸、4个氨基酸、5个氨基酸、6个氨基酸、7个氨基酸、9个氨基酸或10个氨基酸构成。类似地,在间隔区具有少于或多于8个氨基酸的情况下,如上面提及的等价组合也是本发明的说明。

[0525] 在本发明的另一个具体的说明中,用于将第一抗原/抗原表位或第一TLR肽激动剂(“抗原/表位/TLR肽激动剂1”)分别连接至第二抗原/抗原表位或第二TLR肽激动剂(“抗原/表位/TLR肽激动剂2”)的间隔区由例如1、2、3、4或5个氨基酸组成。更具体地,所述间隔区的氨基酸序列可以对应于抗原/表位/TLR肽激动剂1或抗原/表位/TLR肽激动剂2的N-端或C-端侧翼区的4个氨基酸。如上面描述的间隔区还可以被安置在根据本发明使用的复合物中包括的最后一个抗原/表位/TLR肽激动剂的C-端部分处。

[0526] 用于连接三种组分a)、b) 和c) 中的两种的技术在文献中良好地记录并且可以取决于至少一种抗原或抗原表位的性质。例如,三种组分a)、b) 和c) 中的两种之间的连接可以经由可切割的二硫化物连接通过总体逐步固相合成或液相或固相片段偶联,稳定的酰胺、噻唑烷、肟和肼连接,二硫化物连接,稳定的硫代马来酰亚胺连接,肽键(包括融合蛋白的氨基酸之间的肽键),或静电或疏水相互作用实现。

[0527] 优选地,由根据本发明使用的复合物包括的至少一种抗原或抗原表位以及由根据本发明使用的复合物包括的任何任选的间隔区或连接体具有肽性质。更优选地,根据本发明使用的复合物的所有组分,例如细胞穿透肽,至少一种抗原或抗原表位(其是肽、多肽或蛋白质),至少一种TLR肽激动剂和任何任选的肽连接体或间隔区在根据本发明使用的复合物中通过肽键被连接。最优选地,根据本发明使用的复合物因而是肽、多肽或蛋白质,比如融合蛋白,例如重组融合蛋白。

[0528] 在该背景下,包括或由根据SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87的氨基酸序列组成的复合物;或包括或由与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、

至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是优选的。而且,包括或由根据SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:91的氨基酸序列组成的复合物;或包括或由与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:91的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是优选的。而且,包括或由根据SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的复合物;或包括或由与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:69的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是优选的。包括或由根据SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的复合物或包括或由与SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是更优选的。包括或由根据SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的复合物或包括或由与SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是更优选的。包括或由根据SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的复合物或包括或由与SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是更优选的。而且,包括或由根据SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87的氨基酸序列组成的复合物或包括或由与SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:

NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是更优选的。而且,包括或由根据SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:91的氨基酸序列组成的复合物或包括或由与SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:91的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是更优选的。包括或由根据SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69组成的复合物或包括或由与SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是甚至更优选的。包括或由根据SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的复合物或包括或由与SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是甚至更优选的。包括或由根据SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的复合物或包括或由与SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:69共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成的复合物是特别优选的。最优先地,根据本发明使用的复合物包括或由根据SEQ ID NO:72的氨基酸序列或与SEQ ID NO:72共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成。最优先地,根据本发明使用的复合物包括或由根据SEQ ID NO:73的氨基酸序列或与SEQ ID NO:73共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成。最优先地,根据本发明使用的复合物包括或由根据SEQ ID NO:74的氨基酸序列或与SEQ ID NO:74共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成。最优先地,根据本发明使用的复合物包括或由根据SEQ ID NO:75的氨基酸序列或与SEQ ID NO:75共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成。最优先地,根据本发明使用的复合物包括或由根据SEQ ID NO:76的氨基酸序列或与SEQ ID NO:76共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列组成。最优先地,根据本

[0529] 特别优选的是根据本发明使用的复合物包括或由具有根据SEQ ID NO:89的氨基酸序列的多肽,或具有至少50%序列同一性(优选地至少60%、更优选地至少70%、更优选地至少75%、甚至更优选地至少80%、甚至更优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%和最优选地至少98%或99%序列同一性)的其功能性序列变体组成。

[0530] SEQ ID NO:26:

[0531] MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS RAKFKQLLQHY REVAAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS

[0532] SEQ ID NO:27:

[0533] MHHHHHHSTV HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD AEKRYKNRVA SRKSRAFKQ LLQHYREVAA AKSENDRLR LLLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVG V GALKVPRNQD WLGVPRFAKF ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS

[0534] SEQ ID NO:28:

[0535] MHHHHHHKRYKNRVA SRKSRAFKQ LLQHYREVAA AKSENDRLR LLLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVG V GALKVPRNQD WLGVPRFAKF ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGSS TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

[0536] SEQ ID NO:33:

[0537] MHHHHHHKRY KNRVASRKS RAKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVP RF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GSSTVHEILC KLSLEGDHST PPSAYGSVKP YTNAE

[0538] SEQ ID NO:34:

[0539] MHHHHHHREV AAAKSSENDR LRLLLKESLK ISQAVHAAH EINEAGREV VGVGALKVPRN QDWLGVP RF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GSSTVHEILCK LSLEGDHST PPSAYGSVKP TNFADAE

[0540] SEQ ID NO:37:

[0541] MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS RAKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVP RF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GS

[0542] SEQ ID NO:38:

[0543] MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTREV AAAKSSENDR LRLLLKESLK ISQAVHAAH EINEAGREV VGVGALKVPRN QDWLGVP RF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GS

[0544] SEQ ID NO:39:

[0545] KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKVTVHSPSYAYHQFERRAILNRLVQFI KDRISVVQALVLTSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN FDAE

[0546] SEQ ID NO:40:

- [0547] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKNYRIATFKNWPFL EDCAEELTVSEFL KLDQRQ RSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0548] SEQ ID NO:41:
- [0549] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKHLELASMTNMELMSSIVSTVHEILCKL SLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0550] SEQ ID NO:46:
- [0551] RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRRVKRKVPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVDKARVKRS IINFEKLRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0552] SEQ ID NO:69:
- [0553] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNM ELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0554] SEQ ID NO:72:
- [0555] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKAPPQVLAFGLLLAAATAYVDEKAPEFS MQGLKAGVIAVIVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0556] SEQ ID NO:73:
- [0557] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSAGATVGIMIGVLGVALILGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVA LSRKVAELVHFLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAPPQVLAFGLLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0558] SEQ ID NO:74:
- [0559] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSLGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLKYRA REPVTKAEMLGSVVAPPQVLAFGLLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0560] SEQ ID NO:75:
- [0561] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSLGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLKYRA REPVTKAEMLGSVVAPPQVLAFGLLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAP GSTAPPAHGVT SAPDRPALGSTAPPVHNVTSS TVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0562] SEQ ID NO:76:
- [0563] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSAPLPPAWQPFLKDHRI STFKNWPFL EGS AVKKQFEELTLGEFLKLD RERAPPQVLAFGLLLAAATA YVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDRPALGSTAPPVHNVTSS TVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE
- [0564] SEQ ID NO:77:

[0565] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSEYKLVVVGAVGVGKSALTAPPQVLAFGLLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAIVVAPGSTAPP AHGVTsapDTRPAPGSTAPPAHGVTsapDRPALGSTAPPVHNTSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE

[0566] SEQ ID NO:78:

[0567] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLFLEGSAVKKQFEELTLGEFLKLDRERAPPQVLAFGLLLAAATA YVDEKAPEFSMQGLKAGVIAIVVVLGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRK VAEVLHFLLLKYRAREPVTKAEMLSVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE

[0568] SEQ ID NO:79:

[0569] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSAPPQVLAFGLLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAIVVAPGSTAPPAHGVTsapDTRPAPGSTA PPAHGVTsapDRPALGSTAPPVHNTSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE

[0570] SEQ ID NO:80:

[0571] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSAPPQVLAFGLLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE

[0572] SEQ ID NO:81:

[0573] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKLGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSD PASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRKVAELVFLLLKYRAREPVTKAEMLSVVAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNW PFLEGSAVKKQFEELTLGEFLKLDRERAPGSTAPPAHGVTsapDTRPAPGSTAPPAHGVTsapDRPALGSTAPPVHN VTSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE

[0574] SEQ ID NO:82:

[0575] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSAN RSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE

[0576] SEQ ID NO:83:

[0577] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSAGATVGIMIGLVGVALIAPGSTAPPAHGVTsapDTRPAPGSTAPPAHGVTsapDRPALGST APPVHNTSAPPQVLAFGLLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF DAE

[0578] SEQ ID NO:84:

[0579] KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSSHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFSNLATGRNNSIV

KSITVSASGTSPGLSAAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLAF
GLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0580] SEQ ID NO:85:

[0581] KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLLKNRTLTLFNTRNDARAYVSGIQNSVSA
NRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSCSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIV
KSITVSASGTSPGLSAAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLAF
GLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0582] SEQ ID NO:86:

[0583] KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLLKNRTLTLFNTRNDARAYVSGIQNSVSA
NRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSCSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIV
KSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAVKKQFEETLGEGFLKLDRERAPGSTAPPAHG
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLAFGLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLK
AGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0584] SEQ ID NO:87:

[0585] KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLLKNRTLTLFNTRNDARAYVSGIQNSVSA
NRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSCSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIV
KSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAVKKQFEETLGEGFLKLDRERAPGSTAPPAHG
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLAFGLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLK
AGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0586] SEQ ID NO:88:

[0587] KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLLKNRTLTLFNTRNDARAYVSGIQNSVSA
NRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSCSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIV
KSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAVKKQFEETLGEGFLKLDRERAPPQVLAFGLL
LAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAVARRNERERNRVLVNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLR
SAVEYIRALQRLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAERELLDSSWLGGYSTVHEILCKLSLEGD
HSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0588] SEQ ID NO:89:

[0589] KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLLKNRTLTLFNTRNDARAYVSGIQNSVSA
NRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSCSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIV
KSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAVKKQFEETLGEGFLKLDRERAAVARRNERER
NRVVLVNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEG
LSPAERELLDSSWLGGYSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0590] SEQ ID NO:90:

[0591] KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLLKNRTLTLFNTRNDARAYVSGIQNSVSA
NRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSCSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIV
KSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAVKKQFEETLGEGFLKLDRERAKNKIAAVARR
NERERNRVLVNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG
PSEGALSPAERELLDSSWLGGYSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0592] SEQ ID NO:91:

[0593] KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVANRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLNLSCSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAVKKQFEELTLGEFLKLDRERAKNKIAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPHGGASKLSKVETLSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTTPVAASPSRASSSPRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGSEGALSPAERELLDFFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[0594] 最优选地,根据本发明使用的复合物包括下列组分(或由下列组分组成):

[0595] (i) 具有根据SEQ ID NO:6(CPP3/Z13)的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至更优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;

[0596] (ii) 具有根据SEQ ID NO:96的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;

[0597] (iii) 具有根据SEQ ID NO:95的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;

[0598] (iv) 具有根据SEQ ID NO:97的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;和

[0599] (v) 具有根据SEQ ID NO:71的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体。优选地,复合物在N-至C-端方向上包括组分(i) - (v)(如上面所描述的)。但是,组分也可以不同地排列,如将在下面描述的。

[0600] 在进一步方面,本发明还提供了包括下列的复合物:

[0601] 细胞穿透肽;

[0602] 至少三种抗原表位;和

[0603] 至少一种TLR肽激动剂,

[0604] 其中组分a) - c) 共价地连接,并且

[0605] 其中至少三种抗原表位包括(i)存活蛋白的一种或多种表位或(a)其功能性序列变体(一种或多种),(ii)CEA的一种或多种表位或(a)其功能性序列变体(一种或多种),和(iii)ASCL2的一种或多种表位或(a)其功能性序列变体(一种或多种)。

[0606] 根据本发明的这样的复合物的优选的实施方式对应于如上文描述的根据本发明使用的复合物的优选的实施方式。

[0607] 例如,根据本发明的复合物优选地包括具有根据SEQ ID NO:52的氨基酸序列的肽,或具有至少10个氨基酸长度的其片段,或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。更优选地,复合物包括具有根据SEQ ID NO:53的氨基酸序列的肽。甚至更优选地,复合物包括具有根据SEQ ID NO:95的氨基酸序列的肽或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。

[0608] 例如,根据本发明的复合物优选地包括具有根据SEQ ID NO:54的氨基酸序列的肽,或具有至少10个氨基酸长度的其片段,或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。更优选地,复合物包括具有根据SEQ ID NO:55的氨基酸序列的肽和/或具有根据SEQ ID NO:56的氨基酸序列的肽。甚至更优选地,复合物包括具有根据SEQ ID NO:96的氨基酸序列的肽或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。

[0609] 例如,根据本发明的复合物优选地包括具有根据SEQ ID NO:92的氨基酸序列的肽,或具有至少10个氨基酸长度的其片段,或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。更优选地,复合物包括具有根据SEQ ID NO:93的氨基酸序列的肽和/或具有根据SEQ ID NO:94的氨基酸序列的肽。甚至更优选地,复合物包括具有根据SEQ ID NO:97的氨基酸序列的肽或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。

[0610] 还优选的是复合物在N-至C-端方向上包括:

[0611] 如上面所描述的CEA的一种或多种表位或其功能性序列变体;

[0612] 如上面所描述的存活蛋白的一种或多种表位或其功能性序列变体;

[0613] 如上面所描述的ASCL2的一种或多种表位或其功能性序列变体。

[0614] 更优选地,复合物在N-至C-端方向上包括:

[0615] 一具有根据SEQ ID NO:54的氨基酸序列的肽,或如上面所描述的具有至少10个氨基酸长度的其片段,或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体;

[0616] 一具有根据SEQ ID NO:52的氨基酸序列的肽,或如上面所描述的具有至少10个氨基酸长度的其片段,或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体;和

[0617] 一具有根据SEQ ID NO:92的氨基酸序列的肽,或如上面所描述的具有至少10个氨基酸长度的其片段,或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。

[0618] 甚至更优选地, (i) 具有根据SEQ ID NO:54的氨基酸序列的肽或如上面所描述的其片段或变体的C-端直接地连接至 (ii) 具有根据SEQ ID NO:52的氨基酸序列的肽或如上面所描述的其片段或变体的N-端;和 (ii) 具有根据SEQ ID NO:52的氨基酸序列的肽或如上面所描述的其片段或变体的C-端直接地连接至 (iii) 具有根据SEQ ID NO:92的氨基酸序列的肽或如上面所描述的其片段或变体的N-端。

[0619] 还优选的是复合物包括具有根据SEQ ID NO:96的氨基酸序列的肽或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体;具有根据SEQ ID NO:95的氨基酸序列的肽或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体;具有根据SEQ ID NO:97的氨基酸序列的肽或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。

[0620] 最优选地,复合物包括具有根据SEQ ID NO:98的氨基酸序列的肽或如上面所描述的具有至少70%序列同一性的其功能性序列变体。

[0621] 优选地,复合物是如上面所描述的重组多肽或重组蛋白。

[0622] 而且,根据本发明的复合物的细胞穿透肽优选地对应于如上面描述的根据本发明使用的复合物的细胞穿透肽。这特别地适用于细胞穿透肽的优选实施方式。

[0623] 另外,根据本发明的复合物的TLR肽激动剂优选地对应于如上面所描述的根据本

发明使用的复合物的TLR肽激动剂。这特别地适用于TLR肽激动剂的优选实施方式。

[0624] 例如,根据本发明的复合物在N-至C-端方向上优选地包括如上面所描述的下列组分:

[0625] (i) 具有根据SEQ ID NO:6(CPP3/Z13)的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至更优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;

[0626] (ii) 具有根据SEQ ID NO:96的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;

[0627] (iii) 具有根据SEQ ID NO:95的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;

[0628] (iv) 具有根据SEQ ID NO:97的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体;和

[0629] (v) 具有根据SEQ ID NO:71的氨基酸序列的肽,或具有至少70%序列同一性(优选地至少75%、更优选地至少80%、甚至优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%、最优选地至少99%序列同一性)的其功能性序列变体,

[0630] 其中组分(i) - (v)任选地通过连接体或间隔区连接。

[0631] 最优选地,复合物包括或由具有根据SEQ ID NO:89的氨基酸序列的肽,或具有至少50%序列同一性(优选地至少60%、更优选地至少70%、更优选地至少75%、甚至更优选地至少80%、甚至更优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%和最优选地至少98%或99%序列同一性)的其功能性序列变体组成。

[0632] 优选地,根据本发明的复合物可以用于预防和/或治疗如本文所描述的结肠直肠癌。

[0633] 组分a)、b)和c)在根据本发明使用的复合物中的布置

[0634] 组分a)、b)和c)可以以任何方式布置在根据本发明使用的复合物中。

[0635] 具体地,如果多于一种细胞穿透肽和/或多于一种抗原或抗原表位和/或多于一种TLR肽激动剂由根据本发明使用的复合物包括,则多于一种细胞穿透肽可以以非连续方式定位,即至少一种抗原或抗原表位(组分b))和/或至少一种TLR肽激动剂(组分c))可以中断一段连续定位的细胞穿透肽和/或细胞穿透肽可以以交替方式与组分b)和/或与组分c)定位。类似地,多于一种抗原或抗原表位可以以非连续方式定位,即至少一种细胞穿透肽(组分a))和/或至少一种TLR肽激动剂(组分c))可以中断一段连续定位的抗原或抗原表位和/或抗原或抗原表位可以以交替方式与组分a)和/或与组分c)定位。类似地,多于一种TLR肽激动剂可以以非连续方式定位,即至少一种细胞穿透肽(组分a))和/或至少一种抗原或抗原表位(组分b))可以中断一段连续定位的TLR肽激动剂和/或TLR肽激动剂可以以交替方式与组分a)和/或与组分b)定位。

[0636] 然而,优选的是多于一种细胞穿透肽以连续方式在根据本发明使用的复合物中定位和/或多于一种抗原或抗原表位以连续方式在根据本发明使用的复合物中定位和/或多

于一种TLR肽激动剂以连续方式在根据本发明使用的复合物中定位。具体地,这意思是由复合物包括的某一组分的所有单个单元,即所有细胞穿透肽、所有抗原或抗原表位或所有TLR肽激动剂,以一段定位,其不被其它两种组分中的任一种中断。而是,其它两种组分在复合物中定位,例如在这样的一段所述某一组分的所有单个单元之前或之后。然而,以这样的方式连续定位的所述某一组分的单个单元可以彼此连接,例如通过如本文描述的间隔区或连接体,其不具有其它两种组分。

[0637] 特别优选的是组分a)、b) 和c) 中的每种以连续方式定位。

[0638] 在结构上,每种组分a)、b) 和c) 通常包括单个主链和至少一个侧链。如在本发明的上下文中使用的,术语“主链”(也是“骨架链”)指的是分子中共价键原子的主要的连续的链。例如,在肽、多肽和蛋白质中,主链(骨架)通常包括通过肽键连接的组成氨基酸的 α -碳原子和氮原子。骨架不包括侧链。如在本发明的上下文中使用的,术语“侧链”(也是“悬垂链(pendant chain)”)指的是附加至被称为“主链”或骨架的分子的核心部分的化学基团。例如,在肽、多肽和蛋白质中,侧链通常代表附加至骨架的 α -碳原子的组成氨基酸的(主要)部分。

[0639] 在根据使用本发明的复合物中,组分a)、b) 和c) 可以经由如本文描述的连接体或间隔区共价连接或它们可以被直接共价连接。独立于间隔区或连接体是否被用于共价连接,原则上存在三种组分中的两种如何在根据本发明使用的复合物中彼此连接的四个选项,即:

- [0640] (i) 经由主链/主链连接、
- [0641] (ii) 经由主链/侧链连接、
- [0642] (iii) 经由侧链/主链连接或
- [0643] (iv) 经由侧链/侧链连接。

[0644] 优选地,所有三种组分a)、b) 和c) 经由主链/主链连接被连接,因而具体地导致根据本发明使用的复合物的主链包括一种或多种细胞穿透肽的主链、一种或多种抗原或抗原表位的主链、和一种或多种TLR肽激动剂的主链。换句话说,一种或多种细胞穿透肽的主链、一种或多种抗原或抗原表位的主链、和一种或多种TLR肽激动剂的主链任选地连同进一步的组分,例如连接体(一个或多个)、间隔区(一个或多个)等组成根据本发明使用的复合物的主链。因此,组分a)、b) 和c) 的下列布置是优选的,具体地如果至少一种抗原或抗原表位是肽、多肽或蛋白质,由此所述优选的布置以复合物的主链的N-端 \rightarrow C-端方向在下面显示,并且其中所有三种组分a)、b) 和c) 经由主链/主链连接被连接,并且可以任选地通过连接体、间隔区或其它额外的组分连接:

[0645] (α) 组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -组分c) (至少一种TLR肽激动剂) ;

[0646] (β) 组分c) (至少一种TLR肽激动剂) -组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) ;

[0647] (γ) 组分a) (细胞穿透肽) -组分c) (至少一种TLR肽激动剂) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) ;

[0648] (δ) 组分c) (至少一种TLR肽激动剂) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -组分a) (细胞穿透肽) ;

[0649] (ε) 组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -组分a) (细胞穿透肽) -组分c) (至少一种TLR肽激动剂) ;或

[0650] (ζ) 组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -组分c) (至少一种TLR肽激动剂) -组分a) (细胞穿透肽) 。

[0651] 具体地,如果所有三种组分a)、b) 和c) 经由主链/主链连接被连接,优选的是至少一种抗原或抗原表位在细胞穿透肽的C-端定位,由此细胞穿透肽和至少一种抗原或抗原表位任选地通过进一步的组分——例如连接体、间隔区——或通过至少一种TLR肽激动剂连接。因此,这对应于来自上面显示的布置的布置(α)、(β) 和(γ),即从上面的布置,布置(α)、(β) 和(γ) 是更优选的。

[0652] 甚至更优选地,至少一种抗原或抗原表位在细胞穿透肽的C-端定位,由此细胞穿透肽和至少一种抗原或抗原表位任选地通过进一步的组分——例如连接体、间隔区——但是不通过至少一种TLR肽激动剂连接。因此,这对应于来自上面显示的布置的布置(α) 和(β),即从上面的布置,布置(α) 和(β) 是甚至更优选的。特别优选地,根据本发明使用的复合物是重组多肽或重组蛋白,并且组分a) 至c) 以如下顺序以所述复合物的主链的N-端→C-端方向定位:

[0653] (α) 组分a) -组分b) -组分c) ;或

[0654] (β) 组分c) -组分a) -组分b) ,

[0655] 其中组分可以通过进一步的组分连接,具体地通过连接体或间隔区。

[0656] 特别优选的是布置(α),其中至少一种TLR激动剂包括或由至少一种TLR2激动剂组成,例如:

[0657] (α1) 组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂;

[0658] (α2) 组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂,一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂和一种或多种TLR5肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR5肽激动剂;

[0659] (α3) 组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂和一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂;或

[0660] (α4) 组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂和一种或多种TLR5肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR5肽激动剂。

[0661] 可选地,在这样的包括TLR2肽激动剂的布置中,额外的TLR肽激动剂还可以被布置在复合物中的其它位置处,例如:

[0662] (α5) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂;

[0663] (α6) 一种或多种TLR5肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR5肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂;或

[0664] (α7) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂和一种或多种TLR5肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR5肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂。

[0665] 特别优选的是布置(β),其中至少一种TLR激动剂包括或由至少一种TLR4激动剂组成,例如:

[0666] (β1) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位);

[0667] (β2) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂,一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂和一种或多种TLR5肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR5肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位);

[0668] (β3) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂和一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位);或

[0669] (β4) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂和一种或多种TLR5肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR5肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位)。

[0670] 可选地,在这样的包括TLR4肽激动剂的布置中,额外的TLR肽激动剂还可以被布置在复合物中的其它位置处,例如:

[0671] (β5) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂;

[0672] (β6) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR5肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR5肽激动剂;或

[0673] (β7) 一种或多种TLR4肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR4肽激动剂-组分a) (细胞穿透肽) -组分b) (至少一种抗原或抗原表位) -一种或多种TLR2肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR2肽激动剂和一种或多种TLR5肽激动剂,例如1、2、3、4或5种TLR5肽激动剂。

[0674] 可选地,三种组分a)、b) 和c) 中的仅仅两种在根据本发明使用的复合物中经由主链/主链连接被连接。

[0675] 例如组分a) 和b) 经由主链/主链连接被连接,因而导致复合物中组分a) 和b) 的下列布置,其以复合物的主链的N-端→C-端方向显示,由此组分a) 和b) 可以任选地通过进一步的组分——例如连接体、间隔区等——连接:

[0676] (1) 细胞穿透肽(a) -抗原/抗原表位(b);或

[0677] (2) 抗原/抗原表位(b) -细胞穿透肽(a)。

[0678] 在这样的情况下,组分c),即至少一种TLR肽激动剂,可以然后经由主链/侧链连接,经由侧链/主链连接或经由侧链/侧链连接被布置至细胞穿透肽(a) 或抗原/抗原表位(b) 或——如果存在的话——另外的组分如间隔区或连接体,其可以例如在细胞穿透肽(a) 和抗原/抗原表位(b) 之间定位。这包括下列布置:

[0679] (i) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至组分

a),即至少一种TLR肽激动剂的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至细胞穿透肽的侧链;

[0680] (ii) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至组分a),即至少一种TLR肽激动剂的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至细胞穿透肽的主链;

[0681] (iii) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至组分a),即至少一种TLR肽激动剂的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至细胞穿透肽的侧链;

[0682] (iv) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至组分b),即至少一种TLR肽激动剂的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种抗原或抗原表位的侧链;

[0683] (v) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至组分b),即至少一种TLR肽激动剂的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种抗原或抗原表位的主链;

[0684] (vi) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至组分b),即至少一种TLR肽激动剂的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种抗原或抗原表位的侧链;

[0685] (vii) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至在组分a) 和组分b) 之间定位的连接体或间隔区,即至少一种TLR肽激动剂的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分a) 和组分b) 之间定位的连接体或间隔区的侧链;

[0686] (viii) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至在组分a) 和组分b) 之间定位的连接体或间隔区,即至少一种TLR肽激动剂的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分a) 和组分b) 之间定位的连接体或间隔区的主链;或

[0687] (ix) 组分c) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至在组分a) 和组分b) 之间定位的连接体或间隔区,即至少一种TLR肽激动剂的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分a) 和组分b) 之间定位的连接体或间隔区的侧链。

[0688] 例如组分b) 和c) 经由主链/主链连接被连接,因而导致复合物中组分b) 和c) 的下列布置,其以复合物的主链的N-端→C-端方向显示,由此组分b) 和c) 可以任选地通过进一步的组分——例如连接体、间隔区等——连接:

[0689] (3) 抗原/抗原表位(b)-TLR肽激动剂(c);或

[0690] (4) TLR肽激动剂(c)-抗原/抗原表位(b)。

[0691] 在这样的情况下,组分a),即细胞穿透肽,可以然后经由主链/侧链连接,经由侧链/主链连接或经由侧链/侧链连接被布置至抗原/抗原表位(b) 或TLR肽激动剂(c) 或——如果存在的话——另外的组分如间隔区或连接体,其可以例如在抗原/抗原表位(b) 和TLR肽激动剂(c) 之间定位。这包括下列布置:

[0692] (x) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至组分b),即细胞穿透肽的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种抗原或抗原表位的侧链;

[0693] (xi) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至组分

b),即细胞穿透肽的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种抗原或抗原表位的主链;

[0694] (xi) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至组分b),即细胞穿透肽的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种抗原或抗原表位的侧链;

[0695] (xii) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至组分c),即细胞穿透肽的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种TLR肽激动剂的侧链;

[0696] (xiii) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至组分c),即细胞穿透肽的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种TLR肽激动剂的主链;

[0697] (xiv) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至组分c),即细胞穿透肽的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种TLR肽激动剂的侧链;

[0698] (xv) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至在组分b) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区,即细胞穿透肽的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分b) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区的侧链;

[0699] (xvi) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至在组分b) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区,即细胞穿透肽的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分b) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区的主链;或

[0700] (xvii) 组分a) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至在组分b) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区,即细胞穿透肽的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分b) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区的侧链。

[0701] 例如组分a) 和c) 经由主链/主链连接被连接,因而导致复合物中组分a) 和b) 的下列布置,其以复合物的主链的N-端→C-端方向显示,由此组分a) 和c) 可以任选地通过进一步的组分——例如连接体、间隔区等——连接:

[0702] (5) 细胞穿透肽(a) - TLR肽激动剂(c);或

[0703] (6) TLR肽激动剂(c) - 细胞穿透肽(a)。

[0704] 在这样的情况下,组分b),即至少一种抗原或抗原表位,可以然后经由主链/侧链连接,经由侧链/主链连接或经由侧链/侧链连接被布置至细胞穿透肽(a) 或TLR肽激动剂(c) 或——如果存在的话——另外的组分如间隔区或连接体,其可以例如在细胞穿透肽(a) 和TLR肽激动剂(c) 之间定位。这包括下列布置:

[0705] (xix) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至组分a),即至少一种抗原或抗原表位的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至细胞穿透肽的侧链;

[0706] (xx) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至组分a),即至少一种抗原或抗原表位的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至细胞穿透肽的主链;

[0707] (xxi) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至组

分a),即至少一种抗原或抗原表位的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至细胞穿透肽的侧链;

[0708] (xxii) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至组分c),即至少一种抗原或抗原表位的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种TLR肽激动剂的侧链;

[0709] (xxiii) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至组分c),即至少一种抗原或抗原表位的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种TLR肽激动剂的主链;

[0710] (xxiv) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至组分c),即至少一种抗原或抗原表位的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至至少一种TLR肽激动剂的侧链;

[0711] (xxv) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由主链/侧链连接至在组分a) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区,即至少一种抗原或抗原表位的主链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分a) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区的侧链;

[0712] (xxvi) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/主链连接至在组分a) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区,即至少一种抗原或抗原表位的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分a) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区的主链;或

[0713] (xxvii) 组分b) 可以被连接-任选地经由间隔区或连接体-经由侧链/侧链连接至在组分a) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区,即至少一种抗原或抗原表位的侧链被共价连接-任选地经由间隔区或连接体-至在组分a) 和组分c) 之间定位的连接体或间隔区的侧链。

[0714] 可选地,可以想到的是在根据本发明使用的复合物中,所有三种组分a)、b) 和c) 经由主链/侧链连接,经由侧链/主链连接或经由侧链/侧链连接被布置,任选地通过额外的组分——例如间隔区或连接体——被连接。

[0715] 结肠直肠癌

[0716] 本发明提供了如上面所描述的用于预防和/或治疗结肠直肠癌的复合物。

[0717] 结肠直肠癌(CRC,也称为“肠癌”)是包含结肠癌和直肠癌(CC)的癌症。两种单独的癌症有许多共同的特征,除了癌症起点。根据Siegel, R., C. De Santis 和 A. Jemal, *Colorectal cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. 64(2):p.104-17, 在2006至2010年之间在美国,肿瘤部位的发病率在近侧结肠(结肠的第一和中间部分)中是稍微更重要的。在100,000个人中具有大约19例病例,其占病例的42%。然后是直肠癌,占病例的28%,以及远端结肠(结肠的底部部分),其在100,000个人中具有10例病例。

[0718] 在解剖学上,术语“结肠直肠癌”包括(i)结肠的癌症,例如盲肠(包括回盲瓣的癌症)、阑尾、升结肠、肝曲、横结肠、脾曲、降结肠、乙状结肠(包括乙状结肠(弯曲)的癌症)以及结肠重叠部位的癌症;(ii)直肠乙状结肠结合部的癌症,例如结肠和直肠的癌症以及直肠乙状结肠的癌症;和(iii)直肠的癌症,例如直肠壶腹的癌症。

[0719] 优选地,结肠直肠癌是结肠的癌症,例如盲肠的癌症(包括回盲瓣的癌症)、阑尾的癌症、升结肠的癌症、肝曲的癌症、横结肠的癌症、脾曲的癌症、降结肠的癌症、乙状结肠的

癌症(包括乙状结肠(弯曲)的癌症)或其组合。

[0720] 还优选的是结肠直肠癌是直肠乙状结肠结合部的癌症,比如(i)结肠和直肠的癌症或(ii)直肠乙状结肠的癌症。

[0721] 而且,还优选的是结肠直肠癌是直肠的癌症,比如直肠壶腹的癌症。

[0722] 关于细胞类型,结肠直肠癌包括结肠直肠腺癌、结肠直肠间质瘤、原发性结肠直肠淋巴瘤、结肠直肠平滑肌肉瘤、结肠直肠黑素瘤、结肠直肠鳞状细胞癌和结肠直肠类癌瘤,例如盲肠、阑尾、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和/或直肠的类癌瘤。因此,优选类型的结肠直肠癌包括结肠直肠腺癌、结肠直肠间质瘤、原发性结肠直肠淋巴瘤、结肠直肠平滑肌肉瘤、结肠直肠黑素瘤、结肠直肠鳞状细胞癌和结肠直肠类癌瘤,例如盲肠、阑尾、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和/或直肠的类癌瘤。更优选地,结肠直肠癌是结肠直肠腺癌或结肠直肠类癌瘤。甚至更优选地,结肠直肠癌是结肠直肠腺癌。

[0723] 超过95%的CRC是腺癌。结肠直肠腺癌通常从腺细胞开始,所述腺细胞使粘液润滑结肠或直肠。CRC通常从最内层开始,并且可以通过一些或所有其他层生长。在极少数情况下,CRC可能形成息肉,这有利于其生长到起始区域的壁。在晚期(III期和IV期),癌症通过血管传播到附近的淋巴结或身体的远端部位。

[0724] 例如,在结直肠癌中,TNM分期系统包括以下阶段的原发性肿瘤(“T”阶段):TX-原发性肿瘤无法评估,T0-没有原发肿瘤的证据,Ta-非侵袭性乳头状癌,Tis-原位癌:上皮内或浸润固有层,T1-肿瘤侵入粘膜下层,T2-肿瘤侵入固有肌层,T3-肿瘤通过固有肌层侵入结直肠周围组织,T4a-肿瘤穿透至内脏腹膜表面和T4b-肿瘤直接侵入或粘附于其他器官或结构;接下来的淋巴结阶段(“N”阶段):NX-区域淋巴结无法评估,N0-无区域淋巴结转移,N1-1-3个区域淋巴结中的转移,其中N1a-1个区域淋巴结中的转移,N1b-2-3个区域淋巴结中的转移和N1c-浆膜下层、肠系膜或非腹膜化的结肠周围或直肠周围组织中的肿瘤沉积(一种或多种),无区域淋巴结转移,N2-4个或更多淋巴结中的转移,其中N2a-4-6个区域淋巴结中的转移和N2b-7个或更多区域淋巴结中的转移;和以下阶段的远端转移(“M”阶段):M0-无远端转移和M1-远端转移,其中M1a-转移限于1个器官或部位(如肝、肺、卵巢、非区域节点)和M1b-转移超过1个器官/部位或腹膜。该阶段可以整合到以下结肠直肠癌的数值分期中:阶段0:Tis,N0,M0;阶段I:T1,N0,M0或T2,N0,M0;阶段IIA:T3,N0,M0;阶段IIB:T4a,N0,M0;阶段IIC:T4b,N0,M0;阶段IIIA:T1-T2,N1/N1c,M0或T1,N2a,M0;阶段IIIB:T3-T4a,N1/N1c,M0或T2-T3,N2a,M0或T1-T2,N2b,M0;阶段IIIC:T4a,N2a,M0或T3-T4a,N2b,M0或T4b,N1-N2,M0;阶段IVA:任何T,任何N,M1a和阶段IVB:任何T,任何N,M1b。简而言之,在第0阶段,癌症尚未生长超过结肠或直肠的内层;在第I阶段,癌症已从粘膜扩散到肌肉层;在第II阶段,癌症通过肌肉层扩散到附近器官的浆膜;在第III阶段,癌症已扩散到附近的淋巴结(一个或多个)或癌细胞已扩散到淋巴结附近的组织;在第IV阶段,癌症已经通过血液和淋巴结扩散到身体的其他部位。

[0725] 尽管术语“癌症”,结肠直肠癌包括如上所述的所有数值阶段,并且因此,结肠直肠癌的优选阶段可选自阶段0(Tis,N0,M0),阶段I(T1,N0,M0或T2,N0,M0),阶段IIA(T3,N0,M0),阶段IIB(T4a,N0,M0),阶段IIC(T4b,N0,M0),阶段IIIA(T1-T2,N1/N1c,M0或T1,N2a,M0),阶段IIIB(T3-T4a,N1/N1c,M0或T2-T3,N2a,M0或T1-T2,N2b,M0),阶段IIIC(T4a,N2a,M0或T3-T4a,N2b,M0或T4b,N1-N2,M0),阶段IVA(任何T,任何N,M1a)和阶段IVB(任何T,任何N,M1b)。

N, M1b)。更优选地,结肠直肠癌选自阶段I (T1, N0, M0或T2, N0, M0),阶段IIA (T3, N0, M0),阶段IIB (T4a, N0, M0),阶段IIC (T4b, N0, M0),阶段IIIA (T1-T2, N1/N1c, M0或T1, N2a, M0),阶段IIIB (T3-T4a, N1/N1c, M0或T2-T3, N2a, M0或T1-T2, N2b, M0),阶段IIIC (T4a, N2a, M0或T3-T4a, N2b, M0或T4b, N1-N2, M0),阶段IVA (任何T,任何N, M1a) 和阶段IVB (任何T,任何N, M1b)。甚至更优选地,结肠直肠癌选自阶段IIA (T3, N0, M0),阶段IIB (T4a, N0, M0),阶段IIC (T4b, N0, M0),阶段IIIA (T1-T2, N1/N1c, M0或T1, N2a, M0),阶段IIIB (T3-T4a, N1/N1c, M0或T2-T3, N2a, M0或T1-T2, N2b, M0),阶段IIIC (T4a, N2a, M0或T3-T4a, N2b, M0或T4b, N1-N2, M0),阶段IVA (任何T,任何N, M1a) 和阶段IVB (任何T,任何N, M1b)。最优选地,结肠直肠癌是(i)阶段III结肠直肠癌,例如阶段IIIA (T1-T2, N1/N1c, M0或T1, N2a, M0),阶段IIIB (T3-T4a, N1/N1c, M0或T2-T3, N2a, M0或T1-T2, N2b, M0) 或阶段IIIC (T4a, N2a, M0或T3-T4a, N2b, M0或T4b, N1-N2, M0),或(ii)阶段IV结肠直肠癌,例如阶段IVA (任何T,任何N, M1a) 和阶段IVB (任何T,任何N, M1b)。

[0726] 编码肽和蛋白质复合物的核酸

[0727] 在另一方面,本发明提供用于预防和/或治疗结肠直肠癌的核酸,具体地核酸分子,其编码如本文所描述的复合物,其中该复合物是多肽或蛋白质。具体地,本发明提供用于预防和/或治疗结肠直肠癌的多核苷酸,所述多核苷酸编码如上面所限定的复合物。换句话说,本发明具体地提供用于预防和/或治疗结肠直肠癌的核酸,具体地多核苷酸,其中该多核苷酸编码如本文所描述的复合物并且其中该复合物是多肽或蛋白质。

[0728] 本发明还提供核酸,具体地核酸分子,其编码如上面所描述的根据本发明的复合物,其中该复合物是多肽或蛋白质。具体地,本发明提供如上面所限定的编码复合物的多核苷酸。换句话说,本发明具体地提供核酸,具体地核酸分子,其包括多核苷酸,其中该多核苷酸编码如本文描述的根据本发明的复合物并且其中复合物是多肽或蛋白质。这种核酸可以用于预防和/或治疗结肠直肠癌。

[0729] 核酸优选包含单链、双链或部分双链核酸,优选选自基因组DNA、cDNA、RNA、siRNA、反义DNA、反义RNA、核酶、具有或不具有表达元件的互补RNA/DNA序列、小基因、基因片段、调节元件、启动子及其组合。核酸(分子)和/或多核苷酸的进一步优选的实例包括例如重组多核苷酸,载体,寡核苷酸, RNA分子如rRNA、mRNA、miRNA、siRNA或tRNA,或如上所述的DNA分子。因此,优选核酸(分子)是DNA分子或RNA分子;优选地选自基因组DNA; cDNA; siRNA; rRNA; mRNA; 反义DNA; 反义RNA; 核酶; 互补RNA和/或DNA序列; 具有或不具有表达元件、调节元件和/或启动子的RNA和/或DNA序列;载体;及其组合。

[0730] 优选地,本发明涉及根据本发明(使用)的核酸,所述核酸编码复合物,复合物具体地是多肽或蛋白质,所述复合物包括细胞穿透肽,至少一种抗原或抗原表位——其是多肽或蛋白质,和至少一种TLR肽激动剂,其中细胞穿透肽、至少一种抗原或抗原表位、和至少一种TLR肽激动剂被共价连接,任选地使用如本文描述的肽间隔区(一个或多个)或连接体(一个或多个)。如果多于一种抗原或抗原表位——其是多肽或蛋白质——由所述复合物包括,则多于一种抗原或抗原表位也被共价连接,任选地使用如本文描述的肽间隔区(一个或多个)或连接体(一个或多个)。类似地,如果多于一种TLR肽激动剂由所述复合物包括,则多于一种TLR肽激动剂也被共价连接,任选地使用如本文描述的肽间隔区(一个或多个)或连接体(一个或多个)。

[0731] 特别优选地,根据本发明(使用)的核酸编码为(重组)融合蛋白的复合物,其包括(a)如上面描述的细胞穿透肽,(b)至少一种、优选地至少两种、更优选地至少三种、甚至更优选地至少四种、特别优选地至少五种、最优选地至少六种如上面描述的抗原或抗原表位,其优选地以上面描述的连续方式布置,和(c)如上面描述的至少一种TLR激动剂。

[0732] 最优选地,核酸(分子)编码如本文所描述的示例性复合物或其功能性序列变体。因此,核酸(分子)最优选地包括编码根据SEQ ID NO:26-28、33-34、37-41、46、69或72-87的任一种的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26-28、33-34、37-41、46、69或72-87的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。具体地,核酸(分子)最优选地包括编码根据SEQ ID NO:26-28、33-34、37-41、46、69或72-91的任一种的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26-28、33-34、37-41、46、69或72-91的任一种共享至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。

[0733] 特别优选的是根据本发明的核酸(分子)包括编码根据SEQ ID NO:89的氨基酸序列的多肽,或具有至少50%序列同一性(优选地至少60%、更优选地至少70%、更优选地至少75%、甚至更优选地至少80%、甚至更优选地至少85%、仍更优选地至少90%、特别优选地至少95%和最优选地至少98%或99%序列同一性)的其功能性序列变体。

[0734] 复合物的产生和纯化

[0735] 根据进一步的方面,本发明提供了载体,优选地用于预防和/或治疗结肠直肠癌,具体地重组载体,其包括如上面描述的核酸。

[0736] 如在本发明的上下文中使用的,术语“载体”指的是核酸分子,优选地人工核酸分子,即不天然存在的核酸分子。在本发明的上下文中,载体适于并入或携带期望的核酸序列。这样的载体可以是储存载体、表达载体、克隆载体、转移载体等。储存载体是允许核酸分子的便利储存的载体。因而,载体可以包括例如对应于根据本发明的期望的复合物的序列。表达载体可以用于产生表达产物比如RNA,例如mRNA、或肽、多肽或蛋白质。例如,表达载体可以包括转录载体的序列段必需的序列,比如启动子序列。克隆载体通常是包含克隆位点——其可以用于将核酸序列并入载体——的载体。克隆载体可以是,例如,质粒载体或噬菌体载体。转移载体可以是适于将核酸分子转移入细胞或生物体的载体,例如,病毒载体。在本发明的上下文中,载体可以是,例如,RNA载体或DNA载体。优选地,载体是DNA分子。例如,本申请的意义上的载体包括克隆位点,选择标志物,比如抗生素抗性因子,和适于增殖载体的序列,比如复制起点。优选地,本申请的上下文中的载体是质粒载体。优选地,本申请的上下文中的载体是表达载体。

[0737] 转化有如上面描述的载体的细胞(优选地用于预防和/或治疗结肠直肠癌)也被包括在本发明的范围内。这样的细胞的实例包括但不限于细菌细胞,例如大肠杆菌,和真核细胞,例如,酵母细胞、动物细胞或植物细胞。在一个实施方式中,细胞是哺乳动物,例如,人、CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、黑素瘤或杂交瘤细胞。因此,本发明还涉及表达根据本发明(使用)的复合物;或包括根据本发明(使用)的载体的细胞。

[0738] 具体地,细胞可以转染有如上面描述的载体,优选地表达载体。术语“转染”指的是将核酸分子比如DNA或RNA(例如mRNA)分子引入细胞,优选地引入真核细胞。在本发明的上下文中,术语“转染”涵盖技术人员已知用于将核酸分子引入细胞的任何方法,优选地引入

真核细胞,比如引入哺乳动物细胞。这样的方法涵盖,例如,电穿孔,脂转染,例如基于阳离子脂质和/或脂质体,磷酸钙沉淀,基于纳米颗粒的转染,基于病毒的转染,或基于阳离子聚合物比如DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺的转染等。优选地,引入是非病毒性的。

[0739] 可以使用众多表达系统,其非限制性地包括染色体、附加体和衍生的病毒。更具体地,如上面描述的载体,具体地使用的重组载体,可以源自细菌质粒,转座子,酵母附加体,插入元件,酵母染色体元件,病毒比如杆状病毒、乳头瘤病毒比如SV40、牛痘病毒、腺病毒、狐狸痘病毒、伪狂犬病毒、逆转录病毒。

[0740] 例如,这样的载体,具体地重组载体,可以同样地是粘粒或噬粒衍生物。核苷酸序列,具体地根据本发明的核酸,可以通过本领域技术人员熟知的方法插入重组表达载体中,所述方法比如,例如,在MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Sambrook等人,4th Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2001中描述的那些。

[0741] 载体,具体地重组载体,还可以包括控制——具体地根据本发明(使用)的核酸的——表达调控的核苷酸序列,以及允许——具体地根据本发明(使用)的核酸的——表达、转录和翻译的核苷酸序列。通常,根据使用的宿主细胞选择这些序列。

[0742] 因而,例如,适当的分泌信号可以被整合在根据本发明(使用)的载体中,具体地重组载体中,使得由根据本发明(使用)的核酸编码的多肽或蛋白质将例如朝向内质网的腔,朝向壁膜间隙,在膜上或朝向细胞外环境被定向。适当的分泌信号的选择可以促进随后的蛋白质纯化。

[0743] 在又另一个方面,本发明提供了包括如本文描述的载体——具体地重组载体——的宿主细胞,其优选地用于预防和/或治疗结肠直肠癌。

[0744] 可以根据本领域技术人员熟知的方法实施将载体——具体地重组载体——引入宿主细胞,比如在BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Davis等人,2nd ed.,McGraw-Hill Professional Publishing,1995和MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL(同上)中描述的那些,例如,其包括如上面描述的转染,例如通过磷酸钙,通过DEAE葡聚糖,或通过阳离子脂质;显微注射、电穿孔、转导或感染。

[0745] 宿主细胞可以是,例如,细菌细胞比如大肠杆菌,真菌的细胞比如酵母细胞和曲霉、链霉的细胞,昆虫细胞,和/或任何细胞系,例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、C127小鼠细胞系、叙利亚仓鼠细胞的BHK细胞系、人胚胎肾293(HEK 293)细胞。优选地,根据本发明(使用)的宿主细胞是哺乳动物,例如,人、CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤或杂交瘤细胞。树突细胞和树突细胞系作为宿主细胞是特别优选的。通常,培养基的选择具体地取决于细胞类型和/或细胞系的选择,由此技术人员知道合适的培养基,其适于选择的细胞类型和/或细胞系。

[0746] 在如本文描述的载体和/或核酸的基础上,宿主细胞可以被例如用于表达多肽或蛋白质,具体地根据本发明(使用)的复合物。在通过标准方法纯化后,表达的多肽或蛋白质,具体地根据本发明(使用)的复合物,可以如本文描述的使用。

[0747] 因此,本发明还提供了用于制备如本文限定的复合物的方法,具体地,其中复合物是多肽或蛋白质。所述方法包括如下的步骤:

[0748] (i) 在培养基中培养如上面描述的宿主细胞;和

[0749] (ii) 从培养基分离如本文限定的复合物或在宿主细胞溶胞后从宿主细胞溶胞产物分离如本文限定的复合物。

[0750] 因而,通过根据本发明的这样的方法获得的复合物优选地是如本文描述的根据本发明(使用)的复合物。

[0751] 对于蛋白质提取,可以使用商购的试剂盒和/或试剂,例如来自Novagen的BugBusterTM。

[0752] 优选地,用于制备如本文限定的复合物的方法进一步包括下列步骤:

[0753] (iii) 溶解如本文限定的复合物,例如通过重悬在包含尿素或盐酸胍(GuHCl)的溶液中,

[0754] 其中步骤(iii)接着如上面描述的步骤(ii)。

[0755] 而且,优选的是用于制备如本文限定的复合物的方法进一步包括下列步骤:

[0756] (iv) 纯化如本文限定的复合物,优选地通过一步亲和色谱,

[0757] 其中步骤(iv)接着如上面描述的步骤(ii)或——如果存在的话——步骤(iii)。

[0758] 此外,如本文限定的复合物还可以通过合成化学方法例如通过固相肽合成制备。

[0759] 那些肽或蛋白质的纯化可以借助本领域已知用于蛋白质/肽纯化的任何技术实施。示例性技术包括离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法、和免疫亲和方法。

[0760] 因而,本发明还提供了用于制备如本文限定的复合物的方法,其包括如下的步骤:

[0761] (i) 化学地合成所述复合物;和

[0762] (ii) 纯化所述复合物。

[0763] 优选地,在用于制备如本文限定的复合物的方法中,在步骤(i)中化学合成的和在步骤(ii)中纯化的复合物包括细胞穿透肽的如本文描述的氨基酸序列,TLR肽激动剂的如本文描述的氨基酸序列,和任选地——如果至少一种抗原和/或抗原表位是肽或蛋白质——抗原或抗原表位的如本文描述的氨基酸序列。

[0764] 可选地,本发明还提供了用于制备如本文限定的复合物的方法,其中

[0765] (i) 细胞穿透肽、至少一种抗原或抗原片段和/或至少一种TLR肽激动剂被单独地合成;

[0766] (ii) 任选地,细胞穿透肽、至少一种抗原或抗原片段和/或至少一种TLR肽激动剂被纯化;和

[0767] (iii) 细胞穿透肽、至少一种抗原或抗原片段和/或至少一种TLR肽激动剂如上面描述被共价连接,任选地通过间隔区或连接体或通过如上面描述的交联剂。

[0768] 负载有根据本发明的复合物的细胞

[0769] 在又另一方面,本发明涉及负载有如本文限定的复合物的细胞,优选地用于预防和/或治疗结肠直肠癌。例如,负载有如本文限定的复合物的细胞是来自待治疗的对象的细胞,具体地来自待治疗的对象的分离的细胞,即从待治疗的对象分离的细胞。

[0770] 如在本发明的上下文中使用的,术语“对象”具体地指的是哺乳动物。例如,本发明预期的哺乳动物包括人、灵长类、家养动物比如牛、羊、猪、马、实验室啮齿动物等。更优选地,术语“对象”指的是人对象。

[0771] 如在本发明的上下文中使用的,“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”等一般意思是获得期望的药理学和生理学效果。效果在防止或部分地防止疾病、其症状或病况的

方面可以是预防性的和/或在部分或完全治愈疾病、归因于疾病的病况、症状或副作用的方面可以是治疗性的。如本文使用的术语“治疗”覆盖哺乳动物——具体地人——中的疾病的任何治疗并且包括：(a) 预防疾病在如下对象中发生：其可能易患该疾病但是该疾病的发作还没有发生和/或疾病在该对象中还没有被诊断，例如预防性早期无症状干预；(b) 抑制疾病，即，停滞或减慢其发展；或 (c) 减轻疾病，即，引起疾病和/或其症状或病况中的至少一种的至少部分消退比如改善或补救损害。具体地，根据本发明的方法、用途、制剂和组合物在治疗癌症或传染性疾病中和/或在预防癌症在患有早期癌症的对象中演化为晚期或转移阶段中是有用的，从而改善癌症的分期。当应用于癌症时，预防疾病或障碍包括预防癌症在个体——其被鉴定为在发展所述癌症的风险下，例如由于所述癌症在个体的亲属圈子中曾经发生——中的出现或发展，和预防促进肿瘤的病原体的感染，比如，例如，爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV)、人乳头瘤病毒 (HPV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、8型人疱疹病毒 (HHV8)、1型人T-细胞白血病病毒 (HTLV-1)、梅克尔细胞多瘤病毒 (MCV) 和幽门螺杆菌。术语“预防/治疗”癌症还覆盖了稳定或延迟个体中已经诊断的癌症。“稳定”的意思是在患有早期癌症的对象中防止癌症演化为晚期或转移阶段。

[0772] 优选地，负载有如本文限定的复合物的细胞是抗原呈递细胞 (APC)。优选地，抗原呈递细胞选自树突细胞 (DC)、巨噬细胞和B-细胞。树突细胞，具体地从待治疗的对象分离的树突细胞 (常规的和/或浆细胞样的)，是更优选的。

[0773] 从对象分离抗原呈递细胞——具体地树突细胞——的方法是技术人员已知的。它们包括从骨髓、脐带血或外周血采集单核细胞或造血干细胞。它们还包括使用胚胎干 (ES) 细胞和诱导多能干细胞 (iPS)。抗原呈递细胞，具体地树突细胞或它们的前体，可以通过如下方法被富集：其包括淘析和基于磁珠的分离，其可以涉及富集CD14⁺前体细胞。

[0774] 将如本文限定的复合物负载入细胞——优选地上面提及的抗原呈递细胞，更优选地树突细胞——并且在给对象施用前进一步制备这样的细胞的方法是本领域技术人员已知的。例如，制备树突细胞可以包括使用细胞因子——其可以包括例如GM-CSF和IL-4——的它们的培养或分化。树突细胞系还可以被采用。将本发明的复合物负载入细胞，优选地APC，更优选地树突细胞，可以包含在培养物中共培育本发明的复合物与细胞，其利用由如本文限定的复合物包括的细胞穿透肽的固有性质 (即其内化能力)。因而被负载以诱导高效成熟的细胞——例如树突细胞——的进一步的培养可以包括添加细胞因子，其包括IL-1 β ，IL-6，TNF α ，PGE2，IFN α ，和佐剂——其可以包括聚-IC、聚-ICLC (即羧甲基纤维素、聚肌苷酸-聚胞苷酸和聚-L-赖氨酸双链RNA的合成复合物)，和进一步的TLR激动剂和NLR (核苷酸-结合寡聚化结构域样受体) 激动剂。

[0775] 用于制备负载有如本文限定的复合物的细胞——具体地抗原呈递细胞——的方法可以包括如下的步骤：

[0776] (i) 使用本发明的复合物转导或转染所述细胞；

[0777] (ii) 在培养基中培养所述细胞；和

[0778] (iii) 从培养基分离所述细胞。

[0779] 优选地，细胞负载有如本文限定的复合物，其中复合物是多肽或蛋白质并且用于预防和/或治疗结肠直肠癌。

[0780] 优选地，在MHC I类背景和/或在MHC II类背景下，负载有如本文限定的和用于预

防和/或治疗结肠直肠癌的复合物(一种或多种)的细胞在细胞表面处呈递由所述复合物包括的至少一种抗原或抗原表位。

[0781] 根据本发明的组合物和试剂盒

[0782] 根据另一方面,本发明提供了组合物,其优选地用于预防和/或治疗结肠直肠癌,该组合物包括选自如下的至少一种组分:

[0783] (i) 如上面描述的复合物,

[0784] (ii) 如上面描述的核酸,

[0785] (iii) 如上面描述的载体,

[0786] (iv) 如上面描述的宿主细胞,和

[0787] (v) 如上面描述的负载有如本文限定的复合物的细胞。

[0788] 优选地,根据本发明的组合物包括如本文限定的复合物。

[0789] 根据本发明(使用)的组合物还可以包括多于一种上面的组分(i)至(v)。例如,根据本发明(使用)的组合物可以包括(i)下的至少两种不同的复合物,(ii)下的至少两种不同的核酸,(iii)下的至少两种不同的载体,(iv)下的至少两种不同的宿主细胞,和/或(v)下的至少两种不同的细胞;例如,根据本发明(使用)的组合物可以包括至少两种不同的复合物(i)和/或至少两种不同的核酸(ii)。

[0790] 例如,如上面描述的由组合物包括的不同的复合物(i)的不同之处可以在于组分a),即细胞穿透肽,在于组分b),即抗原或抗原表位或多于一种抗原或抗原表位的子集,或在于组分c),即TLR肽激动剂或多于一种TLR肽激动剂的子集;或如上面描述的由组合物包括的不同的复合物(i)的不同之处可以在于三种组分a)、b)和c)中的两种;或如上面描述的由组合物包括的不同的复合物(i)的不同之处可以在于复合物的所有三种组分a)、b)和c)。因此,如上面描述的由组合物包括的不同的核酸(ii)的不同之处可以在于它们编码这样不同的复合物;如上面描述的由组合物包括的不同的载体(iii)的不同之处可以在于它们包括这样不同的核酸;如上面描述的由组合物包括的不同的宿主细胞(iv)的不同之处可以在于它们包括这样不同的载体;并且如上面描述的由组合物包括的不同的负载有复合物的细胞(v)的不同之处可以在于它们负载有这样不同的复合物。

[0791] 本发明还提供了疫苗,其优选地用于预防和/或治疗结肠直肠癌,该疫苗包括选自下列的至少一种组分:

[0792] (i) 如上面描述的复合物,

[0793] (ii) 如上面描述的核酸,

[0794] (iii) 如上面描述的载体,

[0795] (iv) 如上面描述的宿主细胞,和

[0796] (v) 如上面描述的复合物负载有的细胞。

[0797] 优选地,根据本发明(使用)的疫苗包括如本文限定的复合物。

[0798] 从而,上面关于组分(i)至(v)的多于一种的根据本发明(使用)的组合物的详细描述也适用于根据本发明(使用)的疫苗。

[0799] 如在本发明的上下文中使用的,术语“疫苗”指的是生物制剂,其通常对特定的疾病——优选地癌症——提供先天性和/或适应性免疫。因而,疫苗具体地支持待治疗的对象的免疫系统的先天性和/或适应性免疫应答。例如,如本文限定的复合物的抗原或抗原表位

通常导致或支持待治疗的患者中的适应性免疫应答，并且如本文限定的复合物的TLR肽激动剂可以导致或支持先天性免疫应答。

[0800] 本发明的组合物，具体地本发明的疫苗，还可以包括药学上可接受的载体、佐剂、和/或媒介，如下面对本发明的药物组合物限定的。在本发明的组合物——具体地本发明的疫苗——的具体上下文中，药学上可接受的载体的选择原则上由本发明的组合物——具体地本发明的疫苗——的施用方式确定。本发明的组合物，具体地本发明的疫苗，可以例如被全身地或局部地施用。全身施用途径一般包括，例如，经皮，口服，肠胃外途径，其包括皮下、静脉内、肌肉内、动脉内、真皮内和腹腔内注射和/或鼻内施用途径。局部施用途径一般包括，例如，外用施用途径以及真皮内、经皮、皮下或肌肉内注射或病灶内、颅内、肺内、心内、结内和舌下注射。更优选地，本发明的组合物，具体地疫苗，可以通过真皮内、皮下、结内或肌肉内途径被施用。甚至更优选地，本发明的组合物，具体地疫苗，可以通过皮下、结内或肌肉内途径被施用。特别优选地，本发明的组合物，具体地疫苗，可以通过皮下或结内途径被施用。最优选地，本发明的组合物，具体地疫苗可以通过皮下途径被施用。本发明的组合物，具体地本发明的疫苗，因此优选地以液体(或有时以固体)形式配制。

[0801] 待施用的本发明的组合物——具体地本发明的疫苗——的合适的量可以使用动物模型通过常规实验确定。这样的模型不暗示任何限制地包括兔、羊、小鼠、大鼠、狗和非人灵长类模型。优选的用于注射的单位剂型包括无菌水溶液、生理盐水或其混合物。这样的溶液的pH应当被调节至大约7.4。合适的用于注射的载体包括水凝胶、用于控释或延迟释放的装置、聚乳酸和胶原基质。合适的用于外用施用的药学上可接受的载体包括适于在洗剂、霜剂、凝胶等中使用的那些。如果本发明的组合物，具体地本发明的疫苗，被口服施用，片剂、胶囊等是优选的单位剂型。用于制备单位剂型——其可以用于口服施用——的药学上可接受的载体是现有技术中熟知的。其选择将取决于次要考量比如味道、成本和可储存性，其对于本发明的目的不是决定性的，并且可以由本领域技术人员不困难地做出。

[0802] 本发明的组合物，具体地本发明的疫苗，可以额外地包含一种或多种辅助物质，以便进一步增加其免疫原性。如上面描述的本发明的复合物和辅助物质——其可以被任选地包含在如上面描述的本发明的疫苗中——的协同作用从而优选地被实现。取决于多种类型的辅助物质，在这方面可以开始考虑多种机制。例如，允许树突细胞(DC)的成熟的化合物，例如脂多糖、TNF- α 或CD40配体，形成第一类别的合适的辅助物质。一般而言，可能的是作为辅助物质使用以“危险信号”(LPS、GP96等)的方式影响免疫系统的任何试剂，或细胞因子比如GM-CSF，其使得由根据本发明的免疫刺激佐剂产生的免疫应答以靶向的方式被增强和/或影响。特别优选的辅助物质是细胞因子，比如单核因子、淋巴因子、白介素或趋化因子，其进一步促进先天性免疫应答，比如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、LT- β 或TNF- α ，生长因子，比如hGH。

[0803] 可以包括在本发明的疫苗中的进一步的添加剂是乳化剂，比如，例如，Tween[®]；湿润剂，比如，例如，月桂基硫酸钠；着色剂；味道赋予剂；药物载体；片剂成型剂；稳定剂；抗氧化剂；防腐剂。

[0804] 本发明的组合物，具体地本发明的疫苗，可以额外地包含任何进一步的化合物，其

已知由于它对人Toll样受体TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10的结合亲和力(作为配体),或由于它对鼠Toll样受体TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12或TLR13的结合亲和力(作为配体)是免疫刺激的。

[0805] 在该上下文中,可以被添加至本发明的组合物——具体地本发明的疫苗——的另一种类别的化合物可以是CpG核酸,具体地CpG-RNA或CpG-DNA。CpG-RNA或CpG-DNA可以是单链CpG-DNA(ss CpG-DNA)、双链CpG-DNA(dsDNA)、单链CpG-RNA(ss CpG-RNA)或双链CpG-RNA(ds CpG-RNA)。CpG核酸优选地是CpG-RNA的形式,更优选地单链CpG-RNA(ss CpG-RNA)的形式。CpG核酸优选地包含至少一种或多种(促有丝分裂的)胞嘧啶/鸟嘌呤二核苷酸序列(CpG基序(一种或多种))。根据第一优选的替代方案,包含在这些序列中的至少一种CpG基序,具体地CpG基序的C(胞嘧啶)和G(鸟嘌呤),是非甲基化的。任选地包含在这些序列中的所有进一步的胞嘧啶或鸟嘌呤可以是甲基化的或非甲基化的。然而,根据进一步优选的替代方案,CpG基序的C(胞嘧啶)和G(鸟嘌呤)也可以甲基化形式呈现。

[0806] 本发明还提供了药物组合物,优选地用于预防和/或治疗结肠直肠癌,具体地如上面描述的疫苗组合物,和用于治疗对象——优选地哺乳动物对象,和最优选地人对象——的方法,所述对象遭受结肠直肠癌。

[0807] 具体地,本发明提供了(用于)预防和/或治疗结肠直肠癌的药物组合物,其包括如本文限定的至少一种复合物或负载有如本文限定的复合物的至少一种细胞,和任选地药学上可接受的载体和/或媒介、或任何赋形剂、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员熟知的其它材料,具体地包括如本文限定的至少一种复合物或负载有如本文限定的复合物的至少一种细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0808] 作为进一步的成分,本发明的药物组合物可以具体地包括药学上可接受的载体和/或媒介。在本发明的上下文中,药学上可接受的载体通常包括液体或非液体基础的本发明的药物组合物。如果本发明的药物组合物以液体形式提供,载体将通常是无热原水;等渗盐水或缓冲(水)溶液,例如磷酸盐、柠檬酸盐等缓冲溶液。特别地对于注射本发明的药物组合物,可以使用水或优选地缓冲剂,更优选地水性缓冲剂,其包含钠盐,优选地至少30mM的钠盐,钙盐,优选地至少0.05mM的钙盐,和任选地钾盐,优选地至少1mM的钾盐。根据优选的实施方式,钠、钙和任选地钾盐可以以它们的卤化物的形式出现,例如氯化物、碘化物或溴化物,以它们的氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐或硫酸盐等的形式出现。不限于此,钠盐的实例包括例如NaCl、NaI、NaBr、Na₂CO₃、NaHCO₃、Na₂SO₄,任选的钾盐的实例包括例如KCl、KI、KBr、K₂CO₃、KHCO₃、K₂SO₄,并且钙盐的实例包括例如CaCl₂、CaI₂、CaBr₂、CaCO₃、CaSO₄、Ca(OH)₂。此外,上述阳离子的有机阴离子可以被包含在缓冲剂中。根据更优选的实施方式,适于如上面限定的注射目的缓冲剂可以包含选自氯化钠(NaCl)、氯化钙(CaCl₂)和任选地氯化钾(KCl)的盐,其中除氯化物之外可以存在进一步的阴离子。CaCl₂也可以被另一种盐如KCl替换。通常,注射缓冲剂中的盐以至少30mM氯化钠(NaCl)、至少1mM氯化钾(KCl)和至少0.05mM氯化钙(CaCl₂)的浓度存在。注射缓冲剂参照具体的参考介质可以是高渗的、等渗的或低渗的,即缓冲剂参考具体的参考介质可以具有更高的、相同的或更低的盐含量,其中优选地可以使用上述的盐的这样的浓度,其不由于渗透或其它浓度效应导致细胞的损害。参考介质是例如在“体内”方法中出现的液体,比如血液、淋巴液、胞质液,或其它体液,或例如在“体外”方法中可以被用作参考介质的液体,比如常见缓冲剂或液体。这样的常见缓冲剂或液体是

技术人员已知的。盐水(0.9%NaCl)和林格-乳酸溶液作为液体基础是特别优选的。

[0809] 优选地, (药物)组合物, 其包括如本文描述的复合物, 进一步包括精氨酸, 比如L-精氨酸。

[0810] 然而, 一种或多种相容性固体或液体填料或稀释剂或包封化合物也可以用于本发明的药物组合物, 其适于施用至待治疗的对象。如本文使用的术语“相容的”意思是本发明的药物组合物的这些组成能够以如下这样的方式与如上面限定的如本文限定的复合物混合: 在典型使用条件下不发生将实质上降低本发明的药物组合物的药物效力的相互作用。药学上可接受的载体、填料和稀释剂当然必须具有足够高的纯度和足够低的毒性以使得它们适于施用至待治疗的对象。可以被用作药学上可接受的载体、填料或其组成的化合物的一些实例是糖, 比如, 例如, 乳糖、葡萄糖和蔗糖; 淀粉, 比如, 例如, 玉米淀粉或马铃薯淀粉; 纤维素和其衍生物, 比如, 例如, 羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、醋酸纤维素; 粉末状黄蓍胶; 麦芽; 明胶; 牛脂; 固体助流剂, 比如, 例如, 硬脂酸、硬脂酸镁; 硫酸钙; 植物油, 比如, 例如, 花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和来自可可的油; 多元醇, 比如, 例如, 聚丙二醇、甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇; 海藻酸。

[0811] 本发明的药物组合物可以口服地、肠胃外地、通过吸入喷雾、外用地、直肠地、鼻部地、含服地、阴道地或经由植入的储器被施用。如本文使用的术语肠胃外包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内、颅内、经皮、真皮内、肺内、腹腔内、心内、动脉内、结内和舌下注射或输注技术。优选地, 本发明的药物组合物可以真皮内地、肌肉内地、结内地或皮下地被施用。更优选地, 本发明的药物组合物可以肌肉内地、结内地或皮下地被施用。甚至更优选地, 本发明的药物组合物可以结内地或皮下地被施用。最优选地, 本发明的药物组合物可以皮下地被施用。还特别优选的是本发明的药物组合物可以皮下地或真皮内地被施用。

[0812] 优选地, 本发明的药物组合物可以通过肠胃外注射被施用, 更优选地通过皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内、颅内、经皮、真皮内、肺内、腹腔内、心内、动脉内、结内和舌下注射或经由输注技术。本发明的药物组合物的无菌的可注射形式可以是水性或油性悬浮液。这些悬浮液可以使用合适的分散或湿润剂和悬浮剂根据本领域已知的技术配制。无菌的可注射制剂还可以是无毒性肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中无菌的可注射溶液或悬浮液, 例如1.3-丁烷二醇中的溶液。在可接受的媒介和溶剂之中, 可以采用的是水、林格溶液和等渗的氯化钠溶液。此外, 无菌的非挥发油常规地被采用为溶剂或悬浮介质。出于该目的, 可以采用任何无味的非挥发油, 包括合成的甘油一酯或甘油二酯。脂肪酸, 比如油酸和其甘油酯衍生物在可注射剂的制备中是有用的, 如是天然的药学上可接受的油, 比如橄榄油或蓖麻油, 尤其是其聚氧乙基化(polyoxyethylated)形式。这些油溶液或悬浮液还可以包含长链醇稀释剂或分散剂, 比如羧甲基纤维素或类似的分散剂, 其常用于配制药学上可接受的剂型, 包括乳液和悬浮液。其它常用的表面活性剂, 比如吐温、Span和其它乳化剂或生物利用度增强剂——其常用于制造药学上可接受的固体、液体或其它剂型——还可以被用于配制本发明的药物组合物的目的。

[0813] 对于静脉内、皮肤或皮下注射, 或病痛位点处的注射, 活性成分将优选地是肠胃外可接受的水溶液的形式, 其是无热原的并且具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如等渗媒介比如氯化钠注射剂、林格注射剂、乳酸林格注射剂制备合适

的溶液。可以根据需要包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。无论它是多肽、肽或核酸分子,待被给予个体的根据本发明的其它药学上有用的化合物的施用优选地以“预防有效量”或“治疗有效量”(视情况而定),这足以对个体显示益处。施用的实际量和施用速率与时间进程将取决于正治疗的疾病的性质和严重度。

[0814] 如上面限定的本发明的药物组合物还可以以任何口服可接受的剂型——其包括但不限于胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液——口服地被施用。在用于口服用途的片剂的情况下,常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。润滑剂比如硬脂酸镁也通常被添加。对于以胶囊形式口服施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当口服用途需要水性悬浮液时,活性成分,即如上面限定的本发明的转运蛋白货物缀合分子,与乳化剂和悬浮剂组合。如果期望的话,还可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0815] 本发明的药物组合物还可以外用地被施用,尤其是当治疗靶标包括通过外用施用容易接近的区域或器官时,例如包括皮肤或任何其它易接近的上皮组织的疾病。对于这些区域或器官中的每个,容易制备合适的外用制剂。对于外用施用,本发明的药物组合物可以以合适的药膏配制,其包含悬浮或溶解在一种或多种载体中的本发明的免疫刺激组合物,具体地如上面限定的其组分。用于外用施用的载体包括但不限于矿物油、液体矿脂、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可选地,本发明的药物组合物可以以合适的洗剂或霜剂配制。在本发明的上下文中,合适的载体包括但不限于矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚山梨酯60、鲸蜡酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基月桂醇、苄醇和水。

[0816] 在该上下文中,当使用上面的药物组合物时,治疗处方例如剂量等的决定通常在一般从业者和其它医生的职责内,并且通常考虑待治疗的障碍、个体患者的病况、递送位点、施用方法和从业者已知的其它因素。上面提及的技术和方案的实例可以在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980中被发现。

[0817] 因此,本发明的药物组合物通常包括“安全和有效量”的本发明的药物组合物——具体地如上面限定的如本文限定的复合物和/或负载有所述复合物的细胞——的组分。如本文使用的,“安全和有效量”意思是足以显著地诱导疾病或障碍的积极改变的如本文限定的复合物的量,即引发正在寻求的组织、系统、动物或人中的生物学或医学应答的如本文限定的复合物或负载有所述复合物的细胞的量。有效量可以是用于减轻被治疗的疾病或病症的症状的“治疗有效量”和/或用于预防被预防的疾病或病症的症状的“预防有效量”。术语还包括足以减少疾病的进展,显著地减少或抑制肿瘤生长或感染并且从而引发正在寻求的应答的活性复合物的量(即“抑制有效量”),具体地这样的应答可以是针对由复合物包括的抗原或抗原表位的免疫应答。然而,同时,“安全和有效量”是足够小以避免严重的副作用,也就是说,允许益处和风险之间合理的关系。这些界限的确定通常在合理的医学判断的范围内。本发明的药物组合物——具体地如上面限定的如本文限定的复合物——的组分的“安全和有效量”将另外改变,其与待治疗的具体病症并且也与如下有关:待治疗的患者的年龄和身体状况、体重、一般健康、性别、饮食、施用时间、排泄速率、药物组合、如上面限定的如本文限定的复合物的特定组分a)、b)和c)的活性、病症的严重度、治疗的持续时间、伴随疗法的性质、使用的具体的药学上可接受的载体的性质、和类似的因素,其在随行医生的知识和经验内。本发明的药物组合物一般作为药物组合物或作为疫苗可以用于人并且也可以用于兽医学目的,优选地用于人医学目的。

[0818] 根据本发明的药物组合物,具体地疫苗组合物,或制剂可以被施用为药物制剂,其可以以本文描述的任何形式包含如本文限定的复合物。

[0819] 如在本发明的上下文中使用的术语“药物制剂”和“药物组合物”具体地指的是如下这样的形式的制剂:其允许活性成分(一种或多种)的生物活性是明确有效的并且其不包含将对所述制剂将被施用的对象有毒性的额外的组分。

[0820] 在本发明的上下文中,治疗的“功效”可以基于响应于根据本发明的用途或方法的疾病过程的变化被测量。例如,癌症的治疗功效可以通过肿瘤体积的减小、和/或无进展存活时间的增加、和/或原发性癌症切除术后复发的降低的风险被测量。更具体地对于通过免疫疗法治疗的癌症,功效的评估可以通过免疫治疗剂通过新型免疫相关应答标准(irRC)——其改编自实体瘤应答评价标准(RECIST)和世界卫生组织(WHO)标准(J.Natl.Cancer Inst.2010,102(18):1388-1397)——的抗肿瘤应答的临床模式谱。传染性疾病的预防功效最终通过人群体中的流行病学研究被评估,其通常与血清中中和抗体的效价,和诱导多功能的病原体特异性T细胞应答相关联。临床前评估可以包括在使用传染性病原体攻击后对感染的抵抗。传染性疾病的治疗可以通过抑制病原体的生长或消灭病原体(并且因而,不存在检测到的病原体)被测量,其与病原体特异性抗体和/或T细胞免疫应答相关联。

[0821] 根据本发明的药物组合物,具体地疫苗组合物,或制剂还可以被施用为药物制剂,其可以以本文描述的任何形式包含负载有根据本发明的复合物的抗原呈递细胞。

[0822] 根据本发明(使用)的疫苗和/或组合物还可以被配制为药物组合物和其单位剂量,具体地连同如上面和下面描述的常规采用的佐剂、免疫调节材料、载体、稀释剂或赋形剂,并且是这样的形式,其可以被采用为固体,比如片剂或填充胶囊,或液体比如溶液、悬浮液、乳液、酏剂、或填充它们的胶囊,其所有均用于口服用途,或是无菌的可注射溶液的形式,其通过注射或连续输注用于肠胃外(包括皮下和真皮内)用途。

[0823] 在本发明的上下文中,具体地在根据本发明的药物组合物和疫苗的上下文中,可注射的组合物通常基于可注射的无菌盐水或磷酸盐缓冲盐水或本领域已知的其它可注射的载体。这样的药物组合物和其单位剂型可以包括常规比例的成分,具有或不具有额外的活性化合物或要素(principle),并且这样的单位剂型可以包含任何合适有效量的活性成分,其与待采用的预期每日剂量范围相当。

[0824] 在本发明的上下文中,合适的佐剂和/或免疫调节材料的实例包括MPL®(Corixa)、包括铝化合物的铝基矿物质(一般称为Alum)、AS01-4、MF59、磷酸钙、脂质体、Iscom、包括其稳定形式聚-ICLC(Hiltonol)的聚肌苷酸:聚胞苷酸(聚IC)、CpG寡脱氧核苷酸、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、脂多糖(LPS)、Montanide、聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLG)、鞭毛蛋白、皂树皮(Sap Bark tree)皂素(QS21)、氨基烷基葡萄糖酰胺化合物(例如RC529)、具有合成寡脱氧核苷酸的两组分抗菌肽(例如IC31)、咪喹莫特、瑞喹莫德、免疫刺激序列(ISS)、单磷酰脂质A(MPLA)、成纤维细胞刺激肽(FSL1)、和抗CD40抗体。

[0825] 根据本发明(使用)的组合物,具体地药物组合物和疫苗,可以是液体制剂,其包括但不限于水性或油性悬浮液、溶液、乳液、糖浆和酏剂。组合物还可以被配制为干燥产物,以便在使用前与水或其它合适的媒介进行重构。这样的液体制剂可以包含添加剂,其包括但不限于悬浮剂、乳化剂、非水性媒介和防腐剂。悬浮剂包括但不限于山梨醇糖浆、甲基纤维

素、葡萄糖/糖浆、明胶、羟基乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶、和氢化的食用脂肪。乳化剂包括但不限于卵磷脂、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯和阿拉伯树胶。防腐剂包括但不限于甲基或丙基对-羟基苯甲酸酯和山梨酸。分散或湿润剂包括但不限于聚(乙二醇)、甘油、牛血清白蛋白、Tween®、Span®。

[0826] 根据本发明(使用)的组合物,具体地药物组合物和疫苗,还可以被配制为贮存制剂,其可以通过植入或通过肌肉内注射被施用。

[0827] 根据本发明(使用)的组合物,具体地药物组合物和疫苗,还可以是固体组合物,其可以是以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。例如,用于口服施用的片剂和胶囊可以包含常规的赋形剂,其包括但不限于结合剂、填料、润滑剂、崩解剂和湿润剂。结合剂包括但不限于糖浆、阿拉伯树胶、明胶、山梨醇、黄蓍树、淀粉的粘液和聚乙烯吡咯烷酮。填料包括但不限于乳糖、糖、微晶纤维素、玉米淀粉、磷酸钙、和山梨醇。润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、聚乙二醇、和二氧化硅。崩解剂包括但不限于马铃薯淀粉和淀粉乙醇酸钠。湿润剂包括但不限于月桂基硫酸钠。片剂可以根据本领域熟知的方法被包衣。

[0828] 根据本发明(使用)的组合物,具体地药物组合物和疫苗,还可以以缓释形式或从缓释药物递送系统被施用。

[0829] 而且,根据本发明(使用)的组合物,具体地药物组合物和疫苗,可以被调整适于通过重复施用被递送。

[0830] 在根据本发明(使用)的组合物——具体地药物组合物和疫苗——的上下文中或在它们的制剂的上下文中有用的进一步的材料以及制剂加工技术等在“Part 5 of Remington’s “The Science and Practice of Pharmacy”, 22nd Edition, 2012, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins”中被陈述。

[0831] 在进一步的方面,本发明还涉及套装试剂盒(kit-of-parts),具体地用于预防和/或治疗结肠直肠癌,该套装试剂盒包括如下的至少一种:

[0832] (i) 如上面描述的复合物,

[0833] (ii) 如上面描述的核酸,

[0834] (iii) 如上面描述的载体,

[0835] (iv) 如上面描述的宿主细胞,和

[0836] (v) 负载有如上面描述的复合物的细胞。

[0837] 具体地,本发明的套装试剂盒可以包括多于一种组分(i)至(v)。例如,根据本发明的套装试剂盒可以包括(i)下的至少两种不同的复合物,(ii)下的至少两种不同的核酸,(iii)下的至少两种不同的载体,(iv)下的至少两种不同的宿主细胞,和/或(v)下的至少两种不同的细胞;例如,本发明的套装试剂盒可以包括至少两种不同的复合物(i)和/或至少两种不同的核酸(ii)。

[0838] 例如,如上面描述的由套装试剂盒包括的不同的复合物(i)的不同之处可以在于组分a),即细胞穿透肽,在于组分b),即抗原或抗原表位或多于一种抗原或抗原表位的子集,或在于组分c),即TLR肽激动剂或多于一种TLR肽激动剂的子集;或如上面描述的由套装试剂盒包括的不同的复合物(i)的不同之处可以在于三种组分a)、b)和c)中的两种;或如上面描述的由套装试剂盒包括的不同的复合物(i)的不同之处可以在于复合物的所有三种组分a)、b)和c)。因此,如上面描述的由套装试剂盒包括的不同的核酸(ii)的不同之处可以在

于它们编码这样不同的复合物;如上面描述的由套装试剂盒包括的不同的载体 (iii) 的不同之处可以在于它们包括这样不同的核酸;如上面描述的由套装试剂盒包括的不同的宿主细胞 (iv) 的不同之处可以在于它们包括这样不同的载体;并且如上面描述的由套装试剂盒包括的不同的负载有复合物的细胞 (v) 的不同之处可以在于它们负载有这样不同的复合物。

[0839] 套装试剂盒的多种组分可以被包装在一个或多个容器中。上面的组分可以以冻干或干燥形式提供或溶解在合适的缓冲剂中。试剂盒还可以包括额外的试剂,其包括例如防腐剂、生长介质、和/或用于储存和/或重构上面引用的组分的缓冲剂、清洗溶液等。此外,根据本发明的套装试剂盒可以任选地包含使用说明。

[0840] 而且,本发明还提供了用于治疗、预防和/或稳定结肠直肠癌的接种疫苗试剂盒,其包括如本文描述的药物组合物或如本文描述的疫苗和所述药物组合物或所述疫苗在预防和/或治疗结肠直肠癌中的使用说明。

[0841] 因而,本发明还提供了试剂盒:其包括如本文描述的复合物、如本文描述的细胞、如本文描述的组合物、如本文描述的疫苗、和/或如本文描述的药物组合物。

[0842] 优选地,这样的试剂盒进一步包括包装插页或指导散页,其具有通过使用如本文描述的根据本发明(使用)的复合物、如本文描述的细胞、如本文描述的组合物、如本文描述的疫苗、和/或如本文描述的药物组合物治疗结肠直肠癌的指导。

[0843] 还优选的是,除了如上面描述的组分 (i) - (v) 中任一种之外,试剂盒还包括化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂,比如免疫检查点调节剂,如在如本文描述使用的组合的背景下描述的。

[0844] 根据本发明的用途和方法

[0845] 在另一方面,本发明提供了如下任一种的用途: (i) 如本文描述的复合物,和/或 (ii) 负载有如本文描述的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞,(用于制备药物) 用于预防、治疗或稳定结肠直肠癌。因此,本发明提供了如下任一种: (i) 如本文描述的复合物,和/或 (ii) 负载有如本文描述的复合物的细胞比如抗原呈递细胞用于预防、治疗或稳定结肠直肠癌。

[0846] 本发明还提供了用于接种疫苗和/或免疫疗法的根据本发明使用的复合物,其允许在MHC I类和/或MHC II类背景下在抗原呈递细胞的细胞表面处转运和呈递由复合物包括的至少一种抗原或抗原表位。

[0847] 根据另一方面,本发明提供了预防、治疗或抑制结肠直肠癌的方法,其中所述方法包括给所述对象施用如下任一种: (i) 本发明的复合物, (ii) 本发明的负载有复合物的细胞,比如抗原呈递细胞,或 (iii) (i) 至 (ii) 的药物制剂。

[0848] 而且,本发明提供了用于在对象中引发或改进针对依赖于CD4⁺辅助T细胞和/或CD8⁺细胞毒性T细胞的一种或多种表位的免疫应答的方法,其中所述方法包括给所述对象施用如下的任一种: (i) 根据本发明使用的复合物,和/或 (ii) 负载有所述复合物的细胞,比如抗原呈递细胞,或 (iii) (i) 至 (ii) 的药物制剂。

[0849] 依赖于CD4⁺和/或CD8⁺应答的免疫应答可以通过评价炎性应答、促炎细胞因子应答测定,包括相对于施用本发明的化合物前的水平,IFN- γ 、TNF- α 和IL-2mRNA或蛋白质中的一种或多种的表达的增加。它还可以通过如下被测量:抗原特异性T细胞在施用本发明的化

合物后的频率或绝对数目的增加、HLA-肽多聚体染色、ELISPOT试验、和延迟型超敏性测试。它还可以通过依赖于抗原特异性T辅助细胞的抗原特异性血清抗体的增加被间接地测量。

[0850] 本发明还提供了用于在对象中引发或改进针对一种或多种抗原或抗原表位——其受限于多种MHC I类分子和/或多种MHC II类分子——的免疫应答的方法,其中所述方法包括给对象施用如下的任一种: (i) 根据本发明使用的复合物,和/或 (ii) 负载有所述复合物的细胞,比如抗原呈递细胞,或 (iii) (i) 至 (ii) 的药物制剂。

[0851] 用于在对象中引发或改进针对如本文描述的多种表位——其受限于多种MHC I类分子和/或多种MHC II类分子——的免疫应答的方法可以通过评价细胞因子应答测定,包括相对于施用本发明的化合物前、使用结合至抗原呈递细胞上离散的MHC I类和II类分子的个体肽体外刺激T细胞后的水平,IFN- γ 、TNF- α 和IL-2mRNA或蛋白质中的一种或多种的表达的增加。还可以通过使用表达不同MHC分子的抗原呈递细胞,或通过使用MHC封闭性抗体验证对不同的MHC分子的限制。它还可以通过如下被测量:抗原特异性T细胞在施用本发明的化合物后的频率或绝对数目的增加、HLA-肽多聚体染色,其使用用离散的MHC分子装配的多聚体。

[0852] 优选地,在根据本发明的用于引发或改进针对一种或多种抗原或抗原表位的免疫应答的方法中,免疫应答针对肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的一种或多种表位,例如,如本文描述的表位的组合。

[0853] 可选地或额外地,免疫应答可以针对来自病原体的抗原蛋白的多种表位。

[0854] 如本文描述的根据本发明的方法可以用于在对象中引发或改进针对一种或多种表位——其受限于MHC I类分子和/或MHC II类分子——的免疫应答。

[0855] 具体地,本发明因而提供了用于在需要其的对象中预防和/或治疗结肠直肠癌或起始、增强或延长抗肿瘤应答的方法,其包括给对象施用复合物,所述复合物包括:

[0856] 细胞穿透肽;

[0857] 至少一种抗原或抗原表位;和

[0858] 至少一种TLR肽激动剂,

[0859] 其中组分a) -c) 被共价连接。

[0860] 在这样的方法中,优选的是如本文描述的根据本发明(使用)的复合物、如本文描述的核酸、如本文描述的细胞、如本文描述的组合物、如本文描述的疫苗、和/或如本文描述的药物组合物被施用至对象。

[0861] 优选地,对象具有结肠直肠癌和/或被诊断有结肠直肠癌。在另一方面,本发明提供了如下的任一种在结肠直肠癌的(诊断)的背景下制备用于成像技术的成像组合物或制备用于诊断结肠直肠癌的诊断(diagnosis)组合物(“诊断(diagnostic)组合物”)的用途: (i) 如本文描述的复合物,和/或 (ii) 负载有如本文描述的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞。根据本发明的用于诊断结肠直肠癌的诊断组合物包括选自如下的至少一种组分:

[0862] (i) 如上面描述的复合物,

[0863] (ii) 如上面描述的核酸,

[0864] (iii) 如上面描述的载体,

[0865] (iv) 如上面描述的宿主细胞,和

[0866] (v) 负载有如上面描述的复合物的细胞。

[0867] 优选地,根据本发明的诊断组合物包括如上面描述的复合物。

[0868] 具体地,根据本发明(使用)的复合物、如本文描述的核酸、负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞比如抗原呈递细胞、本发明的组合物、本发明的药物组合物或本发明的疫苗、或最优选地本发明的诊断组合物可以作为诊断工具用于诊断中,例如在(体内或体外)试验中,例如在免疫试验中,检测、预测、诊断、或监测结肠直肠癌。

[0869] 作为实例,(体外)试验可以通过将根据本发明(使用)的复合物、负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞比如抗原呈递细胞、本发明的组合物、本发明的药物组合物或本发明的疫苗、或最优选地本发明的诊断组合物递送至靶细胞来进行,并且通过技术人员通常已知的生物物理学方法监测细胞应答,所述靶细胞通常选自例如培养的动物细胞、人细胞或微生物。其中通常使用的靶细胞可以是培养的细胞(体外),例如从人或动物体分离的细胞,比如从人或动物体分离的血细胞,或体内细胞,即组成活的动物或人的器官或组织的细胞,或在活的动物或人中发现的微生物。在该上下文中特别优选的是所谓的标志物或标记,其可以包含在根据本发明(使用)的复合物中,具体地,包含在根据本发明的诊断组合物中。

[0870] 根据进一步的方面,本发明提供了诊断对象中的结肠直肠癌的方法,其中所述方法包括给所述对象或给所述对象的离体样品施用如下的任一种: (i) 本发明的复合物, (ii) 负载有本发明的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞,或 (iii) (i) 至 (ii) 的药物制剂。

[0871] 优选地,根据本发明的用途和方法包括施用根据本发明(使用)的复合物。

[0872] 而且,根据本发明的用途和方法包括施用多于一种根据本发明的复合物、细胞或药物制剂。例如,在根据本发明的用途和方法中,至少两种不同的复合物被使用或施用,其中每种复合物包括至少一种抗原或抗原表位并且所述抗原或抗原表位或(如果多于一种抗原或抗原表位由所述复合物包括)所述抗原或抗原表位的子集在两种复合物之间是不同的。

[0873] 例如,如上面描述的由组合物包括的不同的复合物 (i) 的不同之处可以在于组分 a), 即细胞穿透肽, 在于组分 b), 即抗原或抗原表位或多于一种抗原或抗原表位的子集, 或在于组分 c), 即TLR肽激动剂或多于一种TLR肽激动剂的子集; 或如上面描述的由组合物包括的不同的复合物 (i) 的不同之处可以在于三种组分 a)、b) 和 c) 中的两种; 或如上面描述的由组合物包括的不同的复合物 (i) 的不同之处可以在于复合物的所有三种组分 a)、b) 和 c)。因此,如上面描述的由组合物包括的不同的核酸 (ii) 的不同之处可以在于它们编码这样不同的复合物; 如上面描述的由组合物包括的不同的载体 (iii) 的不同之处可以在于它们包括这样不同的核酸; 如上面描述的由组合物包括的不同的宿主细胞 (iv) 的不同之处可以在于它们包括这样不同的载体; 并且如上面描述的由组合物包括的不同的负载有复合物的细胞 (v) 的不同之处可以在于它们负载有这样不同的复合物。

[0874] 而且,在根据本发明的用途和方法中,根据本发明的细胞可以是抗原呈递细胞,具体地树突细胞,更优选地来自待治疗的对象的树突细胞。

[0875] 施用模式

[0876] 根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗可以以如上面描述的任何方式被施用,包括肠内地,比如口服地或直肠地,和肠胃外

地,比如静脉内地或其组合。肠胃外施用包括但不限于静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、真皮内和肌肉内。优选地,根据本发明使用的复合物;负载有根据本发明使用的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物和/或本发明的疫苗经由肠内施用途径,比如口服、舌下和直肠施用。根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗还可以优选地经由外用、瘤内、真皮内、皮下、肌肉内、鼻内、或结内途径被施用。根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗还可以以植入物的形式被施用,其允许缓慢释放组合物以及缓慢控制的i.v.输注。例如,根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗还可以被皮下地或真皮内地施用。

[0877] 根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗的施用可以需要多个连续的注射/施用。因而,施用可以被重复至少两次,例如一次作为初次免疫注射/施用和后者作为加强注射/施用。

[0878] 具体地,根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗可以被重复地或连续地施用。根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗可以被重复地或连续地施用持续至少1、2、3、或4周;2、3、4、5、6、8、10、或12个月;或2、3、4、或5年的时期。例如,根据本发明(使用)的复合物可以每天施用两次,每天一次,每两天一次,每三天一次,每周一次,每两周一次,每三周一次,每月一次或每两个月一次。优选地,根据本发明(使用)的复合物可以重复施用,例如每周一次或每两周(一次)。

[0879] 而且,组成根据本发明(使用)的复合物的细胞穿透肽,组分a)、b)和c),即至少一种抗原或抗原表位和至少一种TLR肽激动剂可以被包含在单独的组合物中,其就在施用前混合或其被同时施用至需要其的对象。

[0880] 根据一个方法,根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗可以使用如上面描述的施用途径被直接地施用至患者,具体地对于药物组合物描述的。可选地,根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗可以使用离体方法被施用至患者,例如通过将如上面限定的药物组合物、疫苗或本发明的转运蛋白货物缀合分子引入细胞,优选地自体细胞,即源自待治疗的患者的细胞,和将这些细胞移植入待治疗的患者的部位,任选地在治疗之前储存和/或培养这些细胞之后。

[0881] 作为单个或多个剂量被施用至个体的剂量将取决于各种因素改变,包括药代动力学性质、对象状况和特性(性别、年龄、体重、健康、大小)、症状的程度、同步治疗、治疗的频

率和期望的效果。

[0882] 通常,对于癌症治疗,根据本发明(使用)的复合物的治疗有效剂量是大约0.01mg至5mg/注射,具体地大约0.1mg至2mg/注射,或大约0.01nmol至1mmol/注射,具体地1nmol至1mmol/注射,优选地1 μ mol至1mmol/注射。

[0883] 通常,对于癌症治疗,负载有根据本发明(使用)的复合物的抗原呈递细胞的治疗有效剂量是大约200,000个细胞至2,000,000个细胞/注射。

[0884] 组合疗法

[0885] 根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗在根据本发明的方法和用途中的施用可以单独地或与助剂——其对治疗和/或稳定结肠直肠癌是有用的——组合地实施。

[0886] 例如,在治疗、预防或稳定结肠直肠癌的情况下,药物组合物在根据本发明的方法和用途中的施用可以与如下物质或任何其它分子组合地实施,所述物质在针对实体结肠直肠肿瘤的常规化学疗法中使用和用于控制转移的建立,所述分子通过引发程序性细胞死亡起作用,例如选自肿瘤坏死家族成员的助剂,其包括但不限于Fas配体和肿瘤坏死因子(TNF)相关凋亡诱导(TRAIL)配体。根据进一步的实施方式,根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗在根据本发明的方法和用途中的施用可以与放射疗法并行地实施。

[0887] 本发明涵盖根据本发明(使用)的复合物;根据本发明(使用)的核酸;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗的施用,其中在对治疗和/或稳定结肠直肠癌和/或防止结肠直肠癌复发(例如多种药物方案)有用的其它治疗方案或助剂之前、同时或之后,它以治疗有效量被施用至对象。与所述助剂同时施用的所述复合物、细胞、组合物、疫苗或药物组合物可以在相同或不同的组合物(一种或多种)中和通过相同或不同的施用途径(一种或多种)被施用。

[0888] 所述其它治疗方案或助剂可以选自放射疗法、化学疗法、外科手术、靶向疗法(包括小分子、肽和单克隆抗体)、和抗血管生成疗法。抗血管生成疗法在本文被定义为施用直接地或间接地靶向肿瘤相关脉管系统的药剂。

[0889] 因此,本发明还提供了如下的组合

[0890] (i) 如本文限定的复合物;和

[0891] (ii) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂,比如免疫检查点调节剂,

[0892] 其优选地用于预防和/或治疗结肠直肠癌。

[0893] 传统的化学治疗剂具有细胞毒性,即它们通过杀伤快速分裂的细胞起作用,这是大多数癌细胞的主要特性之一。用于与本文限定的复合物组合的优选化学治疗剂是本领域技术人员已知的用于治疗结肠直肠癌的这些化学治疗剂。用于组合的优选化学治疗剂包括5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨(Xeloda[®])、伊立替康(Camptosar[®])和奥沙利铂(Eloxatin[®])。还优选将本文限定的复合物与组合化学疗法组合,组合化学疗法优选选自(i)FOLFOX(5-FU、甲酰四氢叶酸和奥沙利铂);(ii)Cape0x(卡培他滨和奥沙利铂);(iii)5-FU和甲酰四氢叶酸;(iv)FOLFOXIRI(甲酰四氢叶酸、5-FU、奥沙利铂和伊立替康);和(v)FOLFIRI(5-FU、甲酰

四氢叶酸和伊立替康)。在非扩散癌症中,与(i)FOLFOX(5-FU、甲酰四氢叶酸和奥沙利铂);(ii)CapeOx(卡培他滨和奥沙利铂);或(iii)5-FU和甲酰四氢叶酸的组合是优选的。对于已经扩散的癌症,与(iv)FOLFOXIRI(甲酰四氢叶酸、5-FU、奥沙利铂和伊立替康);(i)FOLFOX(5-FU、甲酰四氢叶酸和奥沙利铂);或(v)FOLFIRI(5-FU、甲酰四氢叶酸和伊立替康)的组合是优选的。

[0894] 用于与本文限定的复合物组合用于治疗结肠直肠癌的靶向药物包括VEGF靶向药物和EGFR靶向药物。VEGF靶向药物的优选实例包括贝伐单抗(Avastin®)、雷莫芦单抗(ramucirumab)(Cyramza®)或阿柏西普(ziv-aflibercept)(Zaltrap®)。EGFR靶向药物的优选实例包括西妥昔单抗(Erbitux®)、帕尼单抗(Vectibix®)或瑞格非尼(Regorafenib)(Stivarga®)。

[0895] 与本文限定的复合物组合用于治疗结肠直肠癌的免疫治疗剂包括疫苗、嵌合抗原受体(CAR)、检查点调节剂和溶瘤病毒疗法。

[0896] 与本文限定的复合物组合用于治疗结肠直肠癌的优选疫苗包括TroVax、OncoVax、IMA910、ETBX-011、Mic0ryx、EP-2101、MKC1106-PP、CDX-1307、V934/V935、Me1CancerVac、Imprime PGG、FANG、Tecemotide、AlloStim、DCVax、GI-6301、AVX701、OCV-C02。

[0897] 人工T细胞受体(也称为嵌合T细胞受体、嵌合免疫受体、嵌合抗原受体(CAR))是工程化受体,其将任意特异性移植到免疫效应细胞上。人工T细胞受体(CAR)在过继细胞转移的背景下是优选的。为此,从患者中取出T细胞并进行修饰,使得它们表达对结肠直肠癌特异的受体。然后可以识别并杀伤癌细胞的T细胞被重新引入患者体内。

[0898] 如本文所用,术语“免疫检查点调节剂”(也称为“检查点调节剂”)是指分子或调节(例如,完全或部分减少、抑制、干扰、活化、刺激、增加、增强或支持)一个或多个检查点分子的功能的化合物。因此,免疫检查点调节剂可以是“免疫检查点抑制剂”(也称为“检查点抑制剂”或“抑制剂”)或“免疫检查点活化剂”(也称为“检查点活化剂”或“活化剂”)。“免疫检查点抑制剂”(也称为“检查点抑制剂”或“抑制剂”)完全或部分地减少、抑制、干扰或负调节一种或多种检查点分子的功能。“免疫检查点活化剂”(也称为“检查点活化剂”或“活化剂”)完全或部分活化、刺激、增加、增强、支持或正调节一种或多种检查点分子的功能。免疫检查点调节剂通常能够调节(i)自身耐受性和/或(ii)免疫应答的幅度和/或持续时间。优选地,根据本发明使用的免疫检查点调节剂调节一种或多种人检查点分子的功能,并且因此是“人检查点抑制剂”。

[0899] 检查点分子是分子,例如蛋白质,通常参与免疫途径,并且例如,调节T细胞活化、T细胞增殖和/或T细胞功能。因此,由检查点调节剂调节(例如,完全或部分减少、抑制、干扰、活化、刺激、增加、增强或支持)的检查点分子的功能通常是(调节)T细胞活化、T细胞增殖和/或T细胞功能。因此,免疫检查点分子调节和维持自身耐受性以及生理免疫应答的持续时间和幅度。许多免疫检查点分子属于B7:CD28家族或肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族,并且通过特异性配体的结合,活化募集至细胞质结构域的信号分子(参见Susumu Suzuki等人,2016:Current status of immunotherapy.Japanese Journal of Clinical Oncology,2016:doi:10.1093/jjco/hyv201[印刷之前电子公布];具体地表1)。

[0900] 优选地,与本文限定的复合物组合用于治疗结肠直肠癌的免疫检查点调节剂是一种或多种免疫检查点分子的活化剂或抑制剂,所述一种或多种免疫检查点分子选自CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CTLA-4、IDO、

KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、GITR、TNFR和/或FasR/DcR3；或其一种或多种配体的活化剂或抑制剂。

[0901] 更优选地，免疫检查点调节剂是(共)刺激检查点分子的活化剂或抑制性检查点分子的抑制剂或其组合。因此，免疫检查点调节剂更优选地是(i)CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR和/或ICOS的活化剂或(ii)A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PDL-1、PD-L2、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、TNFR和/或FasR/DcR3的抑制剂。

[0902] 甚至更优选地，免疫检查点调节剂是抑制性检查点分子的抑制剂(但优选不是刺激性检查点分子的抑制剂)。因此，免疫检查点调节剂甚至更优选地是A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PDL-1、PD-L2、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、TNFR和/或DcR3或其配体的抑制剂。

[0903] 还优选的是免疫检查点调节剂是刺激性或共刺激性检查点分子的活化剂(但优选不是抑制性检查点分子的活化剂)。因此，免疫检查点调节剂更优选地是CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR和/或ICOS或其配体的活化剂。

[0904] 甚至更优选免疫检查点调节剂是CD40途径、IDO途径、CTLA-4途径和/或PD-1途径的调节剂。特别地，免疫检查点调节剂优选是CD40、CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1和/或IDO的调节剂，更优选免疫检查点调节剂是CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1和/或IDO的抑制剂或CD40的活化剂，甚至更优选免疫检查点调节剂是CTLA-4、PD-L1、PD-1和/或IDO的抑制剂，和最优选免疫检查点调节剂是CTLA-4和/或PD-1的抑制剂。

[0905] 甚至更优选免疫检查点调节剂是CD40途径、IDO途径、LAG3途径、CTLA-4途径和/或PD-1途径的调节剂。特别地，免疫检查点调节剂优选是CD40、LAG3、CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1和/或IDO的调节剂，更优选免疫检查点调节剂是CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、LAG3和/或IDO的抑制剂或CD40的活化剂，甚至更优选免疫检查点调节剂是CTLA-4、PD-L1、PD-1、LAG3和/或IDO的抑制剂，甚至更优选免疫检查点调节剂是LAG3、CTLA-4和/或PD-1的抑制剂，和最优选免疫检查点调节剂是CTLA-4和/或PD-1的抑制剂。

[0906] 因此，用于与本文限定的复合物组合用于治疗结肠直肠癌的检查点调节剂可以选自CD40途径、CTLA-4途径或PD-1途径的已知调节剂。优选地，用于与本文限定的复合物组合用于治疗结肠直肠癌的检查点调节剂可以选自CD40途径、LAG3途径、CTLA-4途径或PD-1途径的已知调节剂。特别优选地，免疫检查点调节剂是PD-1抑制剂。CTLA-4途径和PD-1途径的优选抑制剂包括单克隆抗体 Yervoy[®] (伊匹单抗(Ipilimumab)；Bristol Myers Squibb) 和替西木单抗(Tremelimumab) (Pfizer/MedImmune) 以及 Opdivo[®] (纳武单抗(Nivolumab)；Bristol Myers Squibb)、Keytruda[®] (派姆单抗(Pembrolizumab)；Merck)、德瓦鲁单抗(Durvalumab) (MedImmune/AstraZeneca)、MEDI4736 (AstraZeneca；参见WO2011/066389A1)、MPDL3280A (Roche/Genentech；参见US 8,217,149B2)、Pidilizumab (CT-011；CureTech)、MEDI0680 (AMP-514；AstraZeneca)、MSB-0010718C (Merck)、MIH1 (Affymetrix) 和帕博利珠单抗(Lambrolizumab) (例如在WO2008/156712；Hamid等人，2013；N. Engl. J. Med. 369:134-144中公开为hPD109A及其人源化衍生物h409A11、h409A16和h409A17)。更优选的检查点抑制剂包括CTLA-4抑制剂 Yervoy[®] (伊匹单抗；Bristol Myers

Squibb) 和替西木单抗(Pfizer/MedImmune) 以及PD-1抑制剂Opdivo[®] (纳武单抗; Bristol Myers Squibb) 、Keytruda[®] (派姆单抗; Merck) 、Pidilizumab(CT-011; CureTech) 、MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca) 、AMP-224和帕博利珠单抗(例如在W02008/156712; Hamid O. 等人, 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144中公开为hPD109A及其人源化衍生物h409A11、h409A16和h409A17)。如上所述,LAG3抑制剂的优选实例是抗LAG3单克隆抗体BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb)。LAG3抑制剂的其他优选实例包括LAG525 (Novartis) 、IMP321 (Immutep) 和如W02009/044273A2和Brignon等人, 2009, Clin. Cancer Res. 15: 6225-6231中公开的LAG3-Ig, 以及阻断人LAG3的小鼠或人源化抗体(例如, WO 2008/132601 A1中描述的IMP701), 或阻断人LAG3的完全人抗体(例如EP 2320940 A2中公开的)。

[0907] 优选地,免疫检查点调节剂不是CD40的调节剂。特别地,优选免疫检查点调节剂不是CD40配体。还优选免疫检查点调节剂不是抗CD40抗体。

[0908] 还优选的是用于与本文限定的复合物组合用于治疗结肠直肠癌的复合物的免疫检查点调节剂选自派姆单抗、伊匹单抗、纳武单抗、MPDL3280A、MEDI4736、替西木单抗、阿维鲁单抗, (Avelumab) 、PDR001、LAG525、INCB24360、Varililumab、乌瑞鲁单抗(Urelumab) 、AMP-224和CM-24。

[0909] 通过在肿瘤中复制将溶瘤病毒工程化以引起细胞溶胞,从而活化抗肿瘤免疫应答。用于与本文限定的复合物组合用于治疗结肠直肠癌的溶瘤病毒疗法优选选自JX594(胸苷激酶失活的牛痘病毒)、ColoAd1(腺病毒)、NV1020(HSV衍生的)、ADXS11-001(减毒李斯特菌疫苗)、Reolysin[®] (人呼肠孤病毒的特殊制剂)、PANVAC(重组牛痘病毒CEA-MUC-1-TRICOM)、Ad5-hGCC-PADRE(重组腺病毒疫苗)和vvDD-CDSR(牛痘病毒)。

[0910] 优选地, (i) 复合物和(ii) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂,例如免疫检查点调节剂,大约同时施用。

[0911] “大约同时”,如本文所用,具体指同时施用或就在施用(i) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂,例如免疫检查点调节剂后,施用(ii) 复合物,或就在施用(i) 复合物之后,施用(ii) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂,例如免疫检查点调节剂。技术人员理解“就在……之后”包括准备第二次施用必需的时间-具体地暴露和消毒第二次施用的位置必需的时间以及“施用装置”(例如注射器,泵等)的适当准备。同时施用还包括如果(i) 复合物和(ii) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂(例如免疫检查点调节剂)的施用时期重叠或如果例如一种组分在更长的时间段内施用,例如30分钟、1小时、2小时或甚至更长,例如通过输注,并且在这样长的时期内的某个时间施用另一种成分。如果使用不同的施用途径和/或不同的施用部位,施用(i) 复合物和(ii) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂(例如免疫检查点调节剂)大约同时是特别优选的。

[0912] 还优选连续施用(i) 复合物和(ii) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂,例如免疫检查点调节剂。这意思是在(ii) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂(例如免疫检查点调节剂)之前或之后施用(i) 复合物。在连续施用中,施用第一组分和施用第二组分之间的时间优选不超过一周,更优选不超过3天,甚至更优选不超过2天,和最优选不超过24小时。特别优选的是, (i) 复合物和(ii) 化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂(例如免疫检查点调节剂)同时施用,其中在施用第一组分(复合物或检查点调节剂)和施用第二组分(检

查点调节剂和复合物中的另一种)之间的时间优选不超过6小时,更优选不超过3小时,甚至更优选不超过2小时,和最优选不超过1小时。

[0913] 优选地,(i)复合物和(ii)化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂(例如免疫检查点调节剂)通过相同的施用途径施用。还优选的是,(i)复合物和(ii)化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂(例如免疫检查点调节剂)通过不同的施用途径施用。

[0914] 此外,(i)复合物和(ii)化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂(例如免疫检查点调节剂)优选在不同的组合物中提供。可选地,(i)复合物和(ii)化学治疗剂、靶向药物和/或免疫治疗剂(例如免疫检查点调节剂)优选在相同的组合物中提供。

[0915] 因此,本发明提供了与至少一种助剂——其对治疗和/或稳定癌症和/或防止结肠直肠癌复发是有用的——组合的药物制剂,其包括根据本发明(使用)的复合物或根据本发明(使用)的细胞,具体地根据本发明(使用)的抗原呈递细胞,和至少一种药学上可接受的载体。

[0916] 而且,根据本发明(使用)的复合物;负载有根据本发明(使用)的复合物的细胞,比如抗原呈递细胞;本发明的组合物;本发明的药物组合物或本发明的疫苗可以在外科手术后——其中实体瘤已经被去除——作为抵抗复发和/或转移的预防剂被施用。

[0917] 而且,成像或诊断组合物在根据本发明的方法和用途中的施用可以单独地或与对成像和/或诊断结肠直肠癌有用的助剂组合地被实施。

[0918] 对象

[0919] 本发明可以被应用于遭受结肠直肠癌或处于发展结肠直肠癌的风险下的任何对象。具体地,所述复合物的治疗作用可以引起针对所述抗原或抗原表位的免疫应答,具体地依赖于CD4⁺辅助T细胞和/或CD8⁺细胞毒性T细胞和/或受限于MHC I类分子和/或MHC II类分子的应答。

[0920] 还优选的是根据本发明的对象已经经历肿瘤的外科手术切除。

[0921] 本发明在范围上不受限于本文描述的具体的实施方式。事实上,除本文描述的那些之外,本发明的多种修改将根据前面的描述和附图对本领域技术人员变得显而易见。这样的修改落入所附权利要求的范围内。

[0922] 本文引用的所有参考文献在此通过引用并入。

[0923] 除非另外定义,本文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一般理解的相同的含义。虽然与本文描述的那些类似或等价的方法和材料可以用于本发明的实践或测试,但是下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、和其它参考文献通过引用以其全部并入。在冲突的情况下,将以包括定义的本说明书为准。此外,材料、方法和实例仅仅是说明性的并且不意欲是限制性的。

附图说明

[0924] 在下列中将给出附图说明。附图意欲更详细地说明本发明。然而,它们不意欲以任何方式限制本发明的主题。

[0925] 图1:针对实施例1显示了通过来自一个单一棕黄层(buffy)的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物CD40的表达。DC在48h期间使用300nM的EDAZ13Mad5、Z13Mad5、Mad5或25ng/ml的LPS进行刺激。还进行每种条件的同种型染色(同种型不显示在

图1中) (一个实验)。

[0926] 图2:针对实施例1显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物CD86的表达。DC在48h期间使用300nM的EDAZ13Mad5、Z13Mad5、Mad5或25ng/ml的LPS进行刺激。还进行每种条件的同种型染色(同种型不显示在图2中) (一个实验)。

[0927] 图3:针对实施例1显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLADR的表达。DC在48h期间使用300nM的EDAZ13Mad5、Z13Mad5、Mad5或25ng/ml的LPS进行刺激。还进行每种条件的同种型染色(同种型不显示在图3中) (一个实验)。

[0928] 图4:针对实施例1显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物CD83的表达。DC在48h期间使用300nM的EDAZ13Mad5、Z13Mad5、Mad5或25ng/ml的LPS进行刺激。还进行每种条件的同种型染色(同种型不显示在图4中) (一个实验)。

[0929] 图5:针对实施例2显示了使用来自不同TCR转基因小鼠的骨髓来源的树突细胞(BMDC)和脾细胞的鼠体外系统中的功能性MHC I类限制的交叉呈递。为了该目的,BMDC过夜负载有300nM的EDAZ13Mad5、EDAMad5或Mad5。高效的MHC I类限制的OVACD8表位和gp100表位的呈递在4天后分别使用CFSE标记的OT1细胞和P-Mel细胞进行监测。高效的MHC II类限制的OVACD4表位的呈递在4天后使用CFSE标记的OT2细胞进行监测。作为对照,BMDC使用5μM肽脉冲1h(代表2个独立实验的一个实验)。

[0930] 图6:针对实施例3显示了2nmol组的结果。C57BL/6小鼠使用2nmol的EDAMad5或EDAZ13Mad5被接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。阳性对照组使用Mad5和MPLA(与EDA等摩尔)进行接种疫苗。小鼠在最后一次接种疫苗后7天被抽血并且进行五聚体染色(3-4只小鼠/组,一个实验)。

[0931] 图7:针对实施例3显示了10nmol组的结果。C57BL/6小鼠使用10nmol的EDAMad5或EDAZ13Mad5被接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。阳性对照组使用Mad5和MPLA(与EDA等摩尔)进行接种疫苗。小鼠在最后一次接种疫苗后7天被抽血并且进行五聚体染色(3-4只小鼠/组,一个实验)。

[0932] 图8:针对实施例3显示了测试的所有组的五聚体阳性CD8+T细胞的百分数。C57BL/6小鼠使用2nmol或10nmol的EDAMad5或EDAZ13Mad5被接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。阳性对照组使用Mad5和MPLA(与EDA等摩尔)进行接种疫苗。小鼠在最后一次接种疫苗后7天被抽血并且进行五聚体染色(一个实验,其中3-4只小鼠/组)。

[0933] 图9:针对实施例4显示了7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM);*,p<0.05EDAZ13Mad5对对照组(双向方差检验)。C57BL/6小鼠在左胁中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右胁中的皮下(s.c.)皮下注射10nmol的EDAZ13Mad5、EDAMad5、Mad5或MPLA(与EDA等摩尔)被接种疫苗两次(d5和d13)。使用卡尺测量肿瘤大小。

[0934] 图10:针对实施例4显示了个体肿瘤生长曲线(7只个体小鼠/组)。C57BL/6小鼠在左胁中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右胁中的皮下(s.c.)皮下注射10nmol的EDAZ13Mad5、EDAMad5、Mad5或MPLA(与EDA等摩尔)被接种疫苗两次(d5和

d13)。使用卡尺测量肿瘤大小。

[0935] 图11:针对实施例4显示了(A)7只小鼠/组的存活曲线;*,p<0.05EDAZ13Mad5对对照组(时序检验)和(B)7只小鼠/组的无肿瘤进展曲线(tumor-free progression curve);*,p<0.05EDAZ13Mad5对对照组(时序检验)。

[0936] 图12:针对实施例5显示了每个实验组的转移的数目。C57BL/6小鼠i.v.植入有 1×10^5 个B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞并且通过在右肋中的皮下(s.c.)皮下注射2nmol的EDAZ13Mad5、EDAMad5或Mad5或Z13Mad5+MPLA(与EDA等摩尔)或单独的MPLA被接种疫苗两次(d0和d9)。小鼠在第13天被处死并且回收肺。对每个肺进行转移灶数目的计数。**,p<0.01;****,p<0.0001(非配对T检验)。

[0937] 图13:针对实施例6显示了每个实验组的转移的数目。C57BL/6小鼠通过在右肋中的皮下(s.c.)皮下注射2nmol的EDAZ13Mad5、EDAMad5或Mad5或Z13Mad5+MPLA(与EDA等摩尔)被接种疫苗两次(d-21和d-7)。在第0天,小鼠i.v.植入有 1×10^5 个B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞。小鼠在第14天被处死并且回收肺。对每个肺进行转移灶数目的计数。*,p<0.05;***,p<0.0001(非配对T检验)。

[0938] 图14:显示了实施例8的结果。HEK-hTLR2细胞系在培养基中被接种在平的96-孔板中,其使用0.3μM、1μM或3μM的AnaxZ13Mad5或Z13Mad5Anaxa进行刺激并且在37℃下培育24h。阳性对照使用500ng/ml的Pam3CSK4进行。(A)二十微升的上清液被添加至QuantiBlue®检测培养基并且在OD读取(620nm)前在37℃下培育1h。(B)定量上清液中的IL-8分泌(通过ELISA)。

[0939] 图15:显示了实施例9的结果。C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa或axaZ13Mad5被接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。小鼠在最后一次接种疫苗后7天被抽血并且进行五聚体染色(一个实验)。

[0940] 图16:显示了实施例9的结果。C57BL/6小鼠使用2nmol Z13Mad5Anaxa或axaZ13Mad5被接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。小鼠在最后一次接种疫苗后7天被抽血并且进行五聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。*,p<0.05。

[0941] 图17:针对实施例10显示了7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM)。C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中皮下注射10nmol的AnaxZ13Mad5、Z13Mad5Anaxa或共注射Z13Mad5+Pam3CSK4(与Anaxa等摩尔)被接种疫苗两次(d5和d13)。使用卡尺测量肿瘤大小。*,p<0.05;***,p<0.001,****,p<0.0001。

[0942] 图18:针对实施例10显示了个体肿瘤生长曲线(7只个体小鼠/组)。C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中的皮下(s.c.)皮下注射10nmol的AnaxZ13Mad5、Z13Mad5Anaxa或共注射Z13Mad5+Pam3CSK4(与Anaxa等摩尔)被接种疫苗两次(d5和d13)。使用卡尺测量肿瘤大小。

[0943] 图19:针对实施例10显示了7只小鼠/组的存活曲线。C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中皮下注射10nmol的AnaxZ13Mad5、Z13Mad5Anaxa或共注射Z13Mad5+Pam3CSK4(与Anaxa等摩尔)被接种疫苗两次(d5和d13)。使用卡尺测量肿瘤大小。*,p<0.05,**,p<0.01,****,p<0.0001(时序检验)。

[0944] 图20:针对实施例11显示了7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM)。C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中皮下注射2nmol的

Hp91Z13Mad5、EDAZ13Mad5、Z13Mad5Anaxa、Z13Mad5EDA或Z13Mad5和MPLA(与EDA等摩尔)被接种疫苗两次(d5和d13)。*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001(在第23天, 双向方差检验)。

[0945] 图21:针对实施例11显示了个体肿瘤生长曲线(7只个体小鼠/组)。C57BL/6小鼠在左胁中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右胁中的皮下(s.c.)皮下注射2nmol的Hp91Z13Mad5、EDAZ13Mad5、Z13Mad5Anaxa、Z13Mad5EDA或Z13Mad5和MPLA(与EDA等摩尔)被接种疫苗两次(d5和d13)。

[0946] 图22:针对实施例11显示了所有7只小鼠/组的存活曲线。存活中位数被指示在图表上(m.s.)。*, p<0.05; **, p<0.01(时序检验)。

[0947] 图23:针对实施例12显示了7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM);****, p<0.0001(时序检验)。C57BL/6小鼠在左胁中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右胁中皮下注射0.5nmol、2nmol或10nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗两次(一次在d5并且一次在d13)。使用卡尺测量肿瘤大小。

[0948] 图24:针对实施例13显示了在C57BL/6小鼠的血液中检测到的SIINFEKL特异性CD8T细胞应答, 所述小鼠使用0.5nmol(A)或2nmol(B)的Z13Mad5Anaxa被s.c.、i.d.或i.m.接种疫苗三次(一次在Wk0, 一次在Wk2并且一次在Wk4)。血液在第二次和第三次接种疫苗后7天获得自小鼠并且进行多聚体染色(一个实验, 其中4只小鼠/组)。*, p<0.05。

[0949] 图25:针对实施例13显示了KLRG1表达(A)和PD-1表达(B), 其在多聚体-阳性CD8T细胞上进行分析(一个实验, 其中4只小鼠/组)。简略地, C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa被s.c.、i.d.或i.m.接种疫苗三次(一次在Wk0, 一次在Wk2并且一次在Wk4)。血液在第二次和第三次接种疫苗后7天获得自小鼠并且进行FACS染色。

[0950] 图26:针对实施例14显示了C57BL/6小鼠中的SIINFEKL特异性CD8T细胞应答, 所述小鼠使用0.5nmol的Z13Mad5Anaxa被结内地接种疫苗两次(一次在Wk0并且一次在Wk2)。血液在第二次接种疫苗后7天获得自小鼠并且进行多聚体染色(3只小鼠/组)。

[0951] 图27:针对实施例15显示了五聚体-阳性细胞在CD8T细胞之中的百分数(A和B;*, p<0.05)和五聚体-阳性CD8T细胞的KLRG1几何平均值(C和D)。简略地, C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa被s.c.接种疫苗3次(A和C:Wk0、Wk2和Wk4;B和D:Wk0、Wk2和Wk8)。小鼠在最后一次接种疫苗后7天被抽血并且进行五聚体染色(一个实验, 其中4只小鼠/组)。

[0952] 图28:针对实施例15显示了多聚体-阳性细胞在CD8T细胞之中的百分数(A和D);多聚体-阳性CD8T细胞的KLRG1几何平均值(B和E)和多聚体-阳性CD8T细胞的PD1几何平均值(C和F)。A-C, C57BL/6小鼠在第0天、第3天和第7天被接种疫苗3次并且在第7天和第14天被抽血。D-F, C57BL/6小鼠在第0天、第7天和第14天被接种疫苗3次并且在第14天和第21天被抽血。接种疫苗使用0.5nmol的Z13Mad5Anaxa被s.c.进行。多聚体染色在血液样品上进行(一个实验, 其中4只小鼠/组)。

[0953] 图29:针对实施例16显示了IL-6分泌, 其指示在使用如图中指示的多种构建体培育BMDC后的APC活化。简略地, BMDC在培养基中被接种在平的96-孔板中, 其使用1 μ M的Z13Mad5Anaxa、Mad5Anaxa、Z13Mad5、EDAZ13Mad5或EDAMad5进行刺激并且在37°C下培育24h。通过ELISA定量上清液中的IL-6分泌。2至3个独立实验的平均值±SEM。

[0954] 图30:针对实施例16显示了TNF- α 分泌, 其指示在使用如图中指示的多种构建体培

育Raw 264.7细胞后的APC活化。简略地,Raw 264.7细胞在培养基中被接种在平的96-孔板中,其使用1 μ M的Z13Mad5Anaxa、Mad5Anaxa或Z13Mad5进行刺激并且在37°C下培育24h。通过ELISA定量上清液中的TNF- α 分泌。2至3个独立实验的平均值 \pm SEM。

[0955] 图31:针对实施例17显示了IL-8分泌,其指示在使用如图中指示的多种构建体培育HEK-hTLR4细胞后的TLR4结合。简略地,HEK-hTLR4细胞在培养基中被接种在平的96-孔板中,其使用1 μ M的Z13Mad5Anaxa、Mad5Anaxa、Z13Mad5、EDAZ13Mad5或EDAMad5进行刺激并且在37°C下培育24h。通过ELISA定量上清液中的IL-8分泌。2至3个独立实验的平均值 \pm SEM。

[0956] 图32:针对实施例18显示了具有半治疗(semitherapeutic)设置的肺转移模型中转移的数目。简略地,C57BL/6小鼠i.v.植入有 1×10^5 个B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞并且通过在右肋中的皮下(s.c.)皮下注射2nmol的EDAZ13Mad5、Z13Mad5+MPLA(与EDA等摩尔)或单独的MPLA被接种疫苗两次(d0和d9)。小鼠在第13天被处死并且回收肺。对每个肺进行转移灶数目的计数。**,p<0.01(单向方差与Tukey多重比较检验)。

[0957] 图33:针对实施例19显示了具有半治疗设置的肺转移模型中转移的数目。简略地,C57BL/6小鼠i.v.植入有 1×10^5 个B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞并且通过在右肋中的皮下(s.c.)皮下注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa、Mad5Anaxa或Z13Mad5+Pam3CSK4(与Anaxa等摩尔)或单独的MPLA被接种疫苗两次(d0和d9)。小鼠在第21天被处死并且回收肺。对每个肺进行转移灶数目的计数。*,p<0.05;**,p<0.01(非配对t检验)。

[0958] 图34:针对实施例20显示了SIINFEKL特异性CD8T细胞在Quad-G1261成胶质细胞瘤模型中的定量。简略地,C57BL/6小鼠i.c.植入有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa被接种疫苗两次(d7和d21)。在第28天,SIINFEKL特异性CD8T细胞通过多聚体染色在血液中和在BIL中被定量(5-8只小鼠/组)。

[0959] 图35:针对实施例20显示了细胞因子分泌。简略地,C57BL/6小鼠i.c.植入有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa被接种疫苗两次(d7和d21)。BIL被分离并且在进行细胞因子的细胞内染色前在存在布雷菲尔德菌素A的情况下使用负载或未负载SIINFEKL肽的成熟的BMDC在6h期间进行培养。分泌细胞因子的CD8T细胞的%(5-8只小鼠/组)。

[0960] 图36:针对实施例21显示了Z13Mad5Anaxa对Quad-G1261成胶质细胞瘤模型中的存活的作用。简略地,C57BL/6小鼠i.c.植入有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗三次(d7、d21和d35)。小鼠每天称重并且当重量减少达到大于15%时被处死。

[0961] 图37:针对实施例22显示了Z13Mad5Anaxa对预防设置中的皮下EG7-OVA肿瘤模型中的肿瘤生长和存活的作用。简略地,C57BL/6小鼠通过在右肋中s.c.注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗两次(d-21和d-7),并且然后在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞。使用卡尺测量肿瘤大小。(A)7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值 \pm SEM);****,p<0.0001(在第30天,双向方差检验)。(B)7只小鼠/组的存活曲线。存活中位数被指示在图表上(m.s.);***,p<0.001(时序检验)。

[0962] 图38:针对实施例23显示了Z13Mad5Anaxa对确立的肿瘤上的治疗设置中的皮下B16-OVA肿瘤模型中的肿瘤生长和存活的作用。简略地,C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有1

$\times 10^5$ 个B16-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中s.c.注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗两次(d14和d21)。(A)7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM);*,p<0.05(在第32天,双向方差检验)。(B)7只小鼠/组的存活曲线。存活中位数被指示在图表上(m.s.)。

[0963] 图39:针对实施例24显示了Z13Mad5Anaxa中的CPP对皮下EG7-OVA肿瘤模型中的肿瘤生长和存活的作用。简略地,C57BL/6小鼠在第0天在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且然后通过在右肋中s.c.注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa或Mad5Anaxa被接种疫苗两次(d5和d13)。使用卡尺测量肿瘤大小。(A)7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM);****,p<0.0001。(B)7只小鼠/组的存活曲线。存活中位数被指示在图表上(m.s.);**,p<0.01;***,p<0.001。

[0964] 图40:针对实施例25显示了具有不同CPP的复合物对免疫应答的作用。C57BL/6小鼠使用2nmol(A)或0.5nmol(B)的Z13Mad5Anaxa、Z14Mad5Anaxa或Z18Mad5Anaxa被s.c.接种疫苗五次(Wk0、Wk2、Wk4、Wk6和Wk8)。小鼠在第2次、第3次、第4次和第5次接种疫苗后7天被抽血并且进行多聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。*,除在Z18Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的Vac2后之外,在每个时间点处的接种疫苗的小鼠对稚小鼠之间p<0.05。

[0965] 图41:针对实施例26显示了具有不同CPP的复合物对脾(A)、引流淋巴结(B)和骨髓(C)中的CD8T细胞的作用。C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa或Z14Mad5Anaxa被s.c.接种疫苗五次(Wk0、Wk2、Wk4、Wk6和Wk8)。在第5次接种疫苗后九天,小鼠被处死,回收器官并且进行多聚体染色。

[0966] 图42:针对实施例26显示了具有不同CPP的复合物对脾中的T细胞的作用(CD8T细胞应答(A)和CD4T细胞应答(B))。C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa或Z14Mad5Anaxa被s.c.接种疫苗五次(Wk0、Wk2、Wk4、Wk6和Wk8)。(A)在第5次接种疫苗后九天,对使用SIINFEKL OVACD8肽刺激的脾细胞进行酶联免疫斑点测定。(B)在第5次接种疫苗后九天,对使用OVACD4肽刺激的脾细胞进行酶联免疫斑点测定。

[0967] 图43:针对实施例26显示了具有不同CPP的复合物对CD8T细胞效应子功能的作用。C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa或Z14Mad5Anaxa被s.c.接种疫苗五次(Wk0、Wk2、Wk4、Wk6和Wk8)。在第5次接种疫苗后九天,对使用SIINFEKL OVACD8肽刺激的脾细胞进行细胞内染色。

[0968] 图44:针对实施例27显示了具有不同CPP的复合物对肿瘤生长(A)和存活率(B)的作用。C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中s.c.注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa或Z14Mad5Anaxa被接种疫苗两次(d5和d13)。(A)7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM);*,p<0.05;****,p<0.0001(在第28天,双向方差检验)。(B)7只小鼠/组的存活曲线。存活中位数被指示在图表上(m.s.);*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001(时序检验)。

[0969] 图45:针对实施例28显示了具有不同CPP的复合物对免疫应答的作用。C57BL/6小鼠使用2nmol(A)或0.5nmol(B)的EDAZ13Mad5、EDAZ14Mad5或EDAZ18Mad5被s.c.接种疫苗三次(Wk0、Wk2和Wk4)。小鼠在第3次接种疫苗后7天被抽血并且进行多聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。*,p<0.05。

[0970] 图46:针对实施例29显示了EDAZ14Mad5对肿瘤生长(A)和存活率(B)的作用。C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中s.c.注射

2nmol的EDAZ14Mad5被接种疫苗两次 (d5和d13)。左图:7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM);**,p<0.01(在第27天,双向方差检验)。右图:7只小鼠/组的存活曲线。存活中位数被指示在图表上(m.s.)。

[0971] 图47:针对实施例30显示了SIINFEKL特异性CD8T细胞在Quad-G1261成胶质细胞瘤模型中的定量。简略地,C57BL/6小鼠i.c.植入有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa被接种疫苗两次 (d7和d21)。在第28天,SIINFEKL特异性CD8T细胞通过多聚体染色在血液中和在BIL中被定量(7-16只小鼠/组)。

[0972] 图48:针对实施例30显示了细胞因子分泌。简略地,C57BL/6小鼠i.c.植入有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa被接种疫苗两次 (d7和d21)。BIL被分离并且在进行细胞因子的细胞内染色前在存在布雷菲德菌素A的情况下使用负载或未负载SIINFEKL肽的成熟的BMDC在6h期间进行培养。分泌细胞因子的CD8T细胞的% (7-16只小鼠/组)。

[0973] 图49:针对实施例31显示了Z13Mad8Anaxa对脾中的T细胞的作用(CD8T细胞应答(A)和CD4T细胞应答(B))。C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad8Anaxa被s.c.接种疫苗四次(Wk0、Wk2、Wk4和Wk6)。(A)在第4次接种疫苗后一周,对使用gp70CD8肽刺激的脾细胞进行酶联免疫斑点测定。(B)在第4次接种疫苗后一周,对使用gp70CD4肽刺激的脾细胞进行酶联免疫斑点测定。

[0974] 图50:针对实施例32显示了Z13Mad11Anaxa对B16肺转移模型中转移的数目(A)和对脾中的T细胞应答(B)的作用。C57BL/6小鼠使用1nmol的Z13Mad11Anaxa被s.c.接种疫苗两次(第0天、第10天)。

[0975] 图51:针对实施例33显示了Z13Mad9Anaxa对脾中的T细胞的作用(CD8T细胞应答)。C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad9Anaxa被s.c.接种疫苗四次(Wk0、Wk2、Wk4和Wk6)。在第4次接种疫苗后一周,对使用adpgk肽刺激的脾细胞进行酶联免疫斑点测定。

[0976] 图52:针对实施例34显示了具有不同CPP的复合物对免疫应答的作用。C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa或TatFMad5Anaxa被s.c.接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。小鼠在第2次接种疫苗后7天被抽血并且进行多聚体染色(一个实验,其中8只小鼠/组)。

[0977] 图53:针对实施例35显示了SIINFEKL特异性CD8T细胞在稚小鼠中的定量。简略地,C57BL/6小鼠通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa(“Z13Mad5Anaxa”组)或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa(“Z13Mad5+Anaxa”组)被接种疫苗一次(第0天)。SIINFEKL特异性CD8T细胞通过多聚体染色在血液中被定量(4-8只小鼠/组)。

[0978] 图54:针对实施例36显示了Z13Mad12Anaxa对血液中的T细胞的作用(CD8T细胞应答)。C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad12Anaxa被s.c.接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。在第2次接种疫苗后一周,在血细胞上进行新抗原reps1的多聚体染色。

[0979] 图55:针对实施例37显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86(从左至右)的表达。DC在48h期间使用300nM的Z13Mad5Anaxa(下图)或Z13Mad5(上图)进行刺激。还如显示的进行每种条件的同种型染色。

[0980] 图56:针对实施例38显示了在重复接种疫苗过程中多聚体-阳性细胞的百分比

(CD8T细胞的%)。简言之,利用2nmol的Z13Mad5Anaxa对C57BL/6小鼠皮下接种疫苗6次(第0、2、4、8、12、16周)。在每次接种疫苗之后或接种疫苗之前7天对小鼠进行采血,并进行五聚体染色(两组实验,每组4只小鼠)。时间轴下的箭头表示接种疫苗时间点。

[0981] 图57:针对实施例39显示了在MC-38肿瘤模型中用Z13Mad11Anaxa接种疫苗的小鼠和对照小鼠的肿瘤体积(A)和存活率(B)。简言之,C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 2×10^5 个MC38肿瘤细胞,并通过在右肋中s.c.注射2nmol的Z13Mad11Anaxa接种疫苗两次(肿瘤植入前-d21&-d7)。每组7只小鼠的(A)肿瘤生长和(B)存活曲线。存活中位数被指示在图表上(m.s.)。*,p<0.05;**,p<0.01(时序检验)。

[0982] 图58:针对实施例40显示了在施用根据本发明的复合物之后选择的细胞因子的释放。简言之,给C57BL/6小鼠i.v.注射10nmol的Z13Mad5Anaxa。施用后0.5、1和3h,采集血液样品以使用来自Luminex的多倍仪监测血清中的IL-6、TNF α 、IFN γ 、IL1- β 和IL12(n=4)。

[0983] 图59:针对实施例41显示了在对照(列(A))和Z13Mad12Anaxa-接种疫苗的小鼠(列(B))的肿瘤部位(肿瘤浸润细胞,TIL)处的新抗原adpgk特异性免疫应答。示出了TIL的FACS点图。每个点图指示了多聚体-阳性细胞的百分比(CD8T的百分比)。

[0984] 图60:针对实施例41显示了在对照(列(A))和Z13Mad12Anaxa-接种疫苗的小鼠(列(B))的肿瘤部位(肿瘤浸润细胞,TIL)处的新抗原reps1特异性免疫应答。示出了血细胞的FACS点图。每个点图指示了多聚体-阳性细胞的百分比(CD8T的百分比)。

[0985] 图61:针对实施例41显示了在对照和Z13Mad12Anaxa-接种疫苗的小鼠的肿瘤部位(肿瘤浸润细胞,TIL)处的新抗原特异性免疫应答。显示了每种表位(adpgk(A)和reps1(B))的多聚体-阳性细胞的百分比(CD8T的百分比)。

[0986] 图62:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP110刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0987] 图63:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP112刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0988] 图64:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP115刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0989] 图65:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP117刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0990] 图66:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP118刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0991] 图67:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP119刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0992] 图68:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突

细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP120刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0993] 图69:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP122刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0994] 图70:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用300nM的ATP123刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0995] 图71:针对实施例42显示了通过来自一个单一棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化标志物HLA-DR、CD83、CD80和CD86的表达。在过夜期间用600nM的ATP125刺激DC。还进行每种条件的同种型染色,如所示出的。

[0996] 图72针对实施例43显示了每组13至14只小鼠的肿瘤生长(A)和存活率(B)(平均值±SEM)。在背上给C57BL/6小鼠s.c.植入 2×10^5 个MC-38肿瘤细胞。通过在尾巴基部(base)皮下注射2nmol的Z13Mad12Anaxa对组“Z13Mad12Anaxa”和“Z13Mad12Anaxa+抗-PD1”的小鼠接种疫苗3次(d3、d10和d17)。在第6、10、13、17、20、24和27天的每个时将200 μ g的抗-PD1抗体i.p.施用至组“抗-PD1”和“Z13Mad12Anaxa+抗-PD1”的小鼠。利用卡尺测量肿瘤大小。每个肿瘤生长曲线指示每组的无肿瘤小鼠的数目。*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001。

[0997] 图73针对实施例43显示了每组13至14只小鼠的个体肿瘤生长曲线。在背上给C57BL/6小鼠s.c.植入 2×10^5 个MC-38肿瘤细胞。通过在尾巴基部(base)皮下注射2nmol的Z13Mad12Anaxa对组“Z13Mad12Anaxa”和“Z13Mad12Anaxa+抗-PD1”的小鼠接种疫苗3次(d3、d10和d17)。在第6、10、13、17、20、24和27天的每个时将200 μ g的抗-PD1抗体i.p.施用至组“抗-PD1”和“Z13Mad12Anaxa+抗-PD1”的小鼠。利用卡尺测量肿瘤大小。

[0998] 图74:示出了实施例44的结果。利用4nmol的ATP128对C57BL/6小鼠接种疫苗一次。7天后使小鼠流血并对利用负载有ATP128的树突细胞刺激的血细胞进行Elispot分析(一个实验)。

[0999] 图75:针对实施例45显示了来自十个不同棕黄层的人血单核细胞来源的树突细胞(DC)的活化指数。利用300nM的ATP128刺激DC过夜。通过分别利用缓冲剂和MPLA培育细胞进行阴性和阳性对照。

[1000] 图76:针对实施例46显示了在利用ATP128负载过夜后,被发现在来自两种不同供体(供体9(实线)和供体10(虚线))的人树突细胞表面处的MHC I类(A)和II类(B)上呈递的包含ATP128的肽的区域,和在MHC I类和II类(C)上呈递的肽的各自数目。加下划线的数字对应于前面在文献中描述为免疫原性肽的肽。

实施例

[1001] 在下列中,呈现了说明本发明的多种实施方式和方面的具体的实施例。然而,本发明在范围上不受限于本文描述的具体的实施方式。给出下列制剂和实施例以使得本领域技术人员能够更清楚地理解和实践本发明。然而,本发明在范围上不受限于示例性实施方式,其仅仅意欲作为本发明的单个方面的说明,并且功能上等价的方法在本发明的范围内。事

实上,除本文描述的那些之外,本发明的多种修改将根据前面的描述、附图和下面的实施例对本领域技术人员变得显而易见。所有这样的修改均落入所附权利要求的范围内。

[1002] 实施例1:体外人树突细胞成熟

[1003] 该研究的目标是调查根据本发明使用的复合物诱导树突细胞的成熟的能力。在本研究中,根据本发明使用的复合物是融合蛋白,其包括细胞穿透肽“Z13”,蛋白质“MAD5”——其由来自多种抗原的不同的CD8⁺和CD4⁺表位组成,和TLR4肽激动剂“EDA”。因此,设计了在N-端位置处具有EDA肽的融合蛋白和不具有Z13或EDA或二者的不同的对照缀合蛋白(control conjugated proteins)。

[1004] 即,下列构建体被设计,由此在氨基酸序列中,细胞穿透肽“Z13”加下划线地显示并且TLR肽激动剂“EDA”以斜体显示:

[1005] EDAZ13Mad5

[1006] 序列:

[1007] MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI
RELFPAPDPGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKSR AKFKQLLQHY
REVAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP
RFAKFASFEAQGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS

[1008] [SEQ ID NO:26]

[1009] 分子量:25' 057Da

[1010] 特性:

[1011] —Mad5货物包含OVACD4、gp100CD8、E α CD4和OVACD8表位

[1012] —包含EDA TLR激动剂(Lasarte, J. J. 等人, The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo. J Immunol, 2007.178(2):p.748-56)

[1013] —储存缓冲剂:50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10%甘油, 2mM DTT, 1M L-精氨酸, pH 8

[1014] —内毒素水平:<0.01EU/ μ g

[1015] Z13Mad5

[1016] 序列:

[1017] MHHHHHHKRY KNRVASRKSR AKFKQLLQHY REVAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA
AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE
WTGS

[1018] [SEQ ID NO:29]

[1019] 分子量:15' 196Da

[1020] 特性:

[1021] —Mad5货物包含OVACD4、gp100CD8、E α CD4和OVACD8表位

[1022] —储存缓冲剂:50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10%甘油, 2mM DTT, 1M L-精氨酸, pH 9

[1023] —内毒素水平:

[1024] o第1批:0.32EU/mg

- [1025] o第2批:0.44EU/mg
- [1026] Mad5
- [1027] 序列:
- [1028] MHHHHHE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS
- [1029] [SEQ ID NO:30]
- [1030] 分子量:10' 154.6Da
- [1031] 特性:
- [1032] —Mad5货物包含OVACD4、gp100CD8、E α CD4和OVACD8表位
- [1033] —储存缓冲剂:50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10%甘油, 2mM DTT, 0.5M L-精氨酸, pH 8
- [1034] —内毒素水平:0.069EU/mg
- [1035] 调查EDAZ13Mad5、Z13Mad5和Mad5蛋白诱导人树突细胞(DC)成熟的能力。在使用300nM的蛋白质在48h期间培育后,通过FACS在人DC上评估活化标志物表达(CD86、CD40、CD83和HLA-DR)(图1-4)。每种蛋白质的具体的缓冲剂被用作阴性对照。
- [1036] CD40的结果显示在图1中,CD86的结果显示在图2中,HLADR的结果显示在图3中,并且CD83的结果显示在图4中。EDAZ13Mad5诱导通过CD86、HLADR和CD83的上调显示的人DC的成熟,而Z13Mad5和Mad5蛋白不能够活化人DC。这些结果指示蛋白质的EDA部分负责人DC上活化标志物的上调。
- [1037] 实施例2:体外表位呈递(MHC I)
- [1038] 该研究的目标是使用来自不同TCR转基因小鼠的骨髓来源的树突细胞(BMDC)和脾细胞评估鼠体外系统中的功能性MHC I类限制的交叉呈递。为了该目的,使用构建体EDAZ13Mad5与Mad5(在上面的实施例1中描述的)和构建体EDAMad5:
- [1039] EDAMad5
- [1040] 序列
- [1041] MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTE SLKISQAVHAAHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS
- [1042] [SEQ ID NO:31]
- [1043] 分子量:20' 017Da
- [1044] 特性:
- [1045] —Mad5货物包含OVACD4、gp100CD8、E α CD4和OVACD8表位
- [1046] —包含EDA TLR激动剂
- [1047] —储存缓冲剂:50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10%甘油, 2mM DTT, 0.5M L-精氨酸, pH 8
- [1048] —内毒素水平:1.8EU/mg
- [1049] BMDC过夜负载有300nM的包含OVACD8、OVACD4和gp100表位的EDAMad5,EDAZ13Mad5和Mad5蛋白。这些MHC I限制的OVACD8和gp100表位的加工和呈递通过分别测量来自OT-1T细胞受体(TCR)转基因小鼠的稚OVA₂₅₇₋₂₆₄特异性CD8⁺T细胞和来自P-mel T细胞TCR转基因小

鼠的gp100特异性CD8⁺T细胞的体外增殖进行监测。因此,高效的MHC I类限制的OVACD8表位和gp100表位的呈递在4天后分别使用CFSE标记的OT1细胞和P-Mel细胞进行监测。MHC II限制的OVACD4表位的加工和呈递通过测量来自OT-2T细胞受体(TCR)转基因小鼠的稚OVA₃₂₃₋₃₃₉特异性CD4⁺T细胞的体外增殖进行监测。因此,高效的MHC II类限制的OVACD4表位的呈递在4天后使用CFSE标记的OT2细胞进行监测。作为对照,BMDC使用5μM肽脉冲1h(代表2个独立实验的一个实验)。

[1050] 结果显示在图5中。观察到所有评估的基于Mad5的蛋白质的类似的交叉呈递和加工能力。

[1051] 实施例3:CD8 T细胞免疫应答

[1052] 为了调查EDA缀合蛋白在诱导多克隆CD8⁺T细胞应答中的功效,C57BL/6小鼠通过皮下注射2nmol或10nmol的构建体EDAZ13Mad5或EDAMad5(在实施例1和2中描述的)被接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。阳性对照组使用Mad5和TLR4激动剂MPLA(与EDA等摩尔)被接种疫苗。两种剂量被评估:2nmol的构建体(图6)和10nmol的构建体(图7)。每组使用3-4只小鼠。

[1053] 在最后一次接种疫苗后七天,小鼠被抽血并且进行五聚体染色以监测血液中的OVA特异性免疫应答。在图8中,对于测试的所有组和两种剂量显示五聚体阳性CD8⁺T细胞的百分数。

[1054] 有趣地,这些数据显示了与2nmol比较,免疫应答在10nmol下更低。在两种剂量下,2nmol和10nmol,与EDAMad5组形成对比,在EDAZ13Mad5组中更一致地观察到疫苗介导的免疫应答。而且,当TLR4激动剂与疫苗缀合时,存在增加的免疫应答。

[1055] 实施例4:对基准EG.7-OVA肿瘤模型中肿瘤生长的疫苗功效

[1056] 为了评价EDA构建体蛋白对肿瘤生长控制的作用,选择EG.7-OVA胸腺瘤细胞的s.c.模型。C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞。在肿瘤植入后,小鼠在第5天和第13天使用10nmol的下列构建体(关于构建体描述参阅实施例1和2)之一在右肋中被s.c.接种疫苗:EDAZ13Mad5、EDAMad5、Mad5、或Mad5和MPLA(与EDA等摩尔)。使用卡尺测量肿瘤大小。

[1057] 图9显示了7只小鼠/组的肿瘤生长(平均值±SEM);*,p<0.05EDAZ13Mad5对对照组(双向方差检验)。图10显示了个体肿瘤生长曲线(7只个体小鼠/组)。图11A显示了7只小鼠/组的存活曲线;*,p<0.05EDAZ13Mad5对对照组(时序检验)。图11B显示了7只小鼠/组的无肿瘤进展曲线;*,p<0.05EDAZ13Mad5对对照组(时序检验)。

[1058] 结果显示了在治疗设置中,EDAZ13Mad5是与对照组比较显著地控制肿瘤生长的仅有的蛋白质疫苗,其具有显著更好的无肿瘤进展曲线和存活曲线。

[1059] 结果因此表明构建体蛋白EDAZ13Mad5是用于控制治疗设置中的肿瘤生长的高度有效的疫苗。

[1060] 实施例5:对黑素瘤转移模型中肿瘤生长的疫苗功效

[1061] 为了使用半治疗设置中的B16-OVA肿瘤细胞评估肺转移模型中的功效,使用不同的构建体蛋白:EDAMad5、EDAZ13Mad5、Z13Mad5+MPLA(关于构建体的设计参阅实施例1和2)、和单独的MPLA。C57BL/6小鼠i.v.植入有 1×10^5 个B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞,并且同时(d0)在右肋中通过皮下注射施用2nmol的疫苗(EDAMad5、EDAZ13Mad5、Z13Mad5+MPLA、单独的MPLA)。九天后,小鼠使用相同的剂量被第二次接种疫苗。进一步的对照组使用2nmol的

Z13Mad5和TLR4激动剂MPLA(与EDA等摩尔)或单独的MPLA被接种疫苗。小鼠在第13天被处死并且回收肺。对每个肺进行转移灶数目的计数。结果在图12中显示。

[1062] 结果显示了缀合物EDAZ13Mad5与Z13Mad5+MPLA一样有效地抑制肺中的肿瘤转移。另外,EDA-Mad5比EDAZ13Mad5更低效,其指示Z13在疫苗功效中的关键作用。

[1063] 实施例6:对黑素瘤转移模型-预防设置中肿瘤生长的疫苗功效

[1064] 另外,不同的构建体蛋白EDAMad5、EDAZ13Mad5、和Z13Mad5+MPLA(关于构建体的设计参阅实施例1和2)的功效在预防设置中的肺转移模型中被评估。在植入肿瘤细胞(d-21和d-7)前21和7天,C57BL/6小鼠通过在右肋中的皮下(s.c.)皮下注射2nmol的EDAZ13Mad5、EDAMad5或Z13Mad5+MPLA(与EDA等摩尔)被接种疫苗。在第0天,小鼠被i.v.植入有 1×10^5 个B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞。小鼠在第14天被处死并且回收肺小鼠。结果显示在图13中。

[1065] 实施例7:包括TLR2肽激动剂的进一步的构建体的设计

[1066] 在此,根据本发明使用的复合物又是融合蛋白,其包括细胞穿透肽“Z13”,蛋白质“MAD5”——其由来自多种抗原的不同的CD8⁺和CD4⁺表位组成,和TLR2肽激动剂“Anaxxa”。因此,设计了在C-端或N-端位置处具有Anaxxa肽的融合蛋白。

[1067] 即,下列构建体被设计,由此在氨基酸序列中,细胞穿透肽“Z13”加下划线地显示并且TLR肽激动剂“Anaxxa”以斜体显示:

[1068] AnaxxaZ13Mad5

[1069] 序列:

[1070] MHHHHHHSTV HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD AEKRYKNRVASRKSRAKFQ
LLQHYREVAA AKSSENDRLR LLLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPRFAKF
ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS

[1071] [SEQ ID NO:27]

[1072] 分子量:18973Da

[1073] 特性:

[1074] —Mad5货物包含OVACD4、gp100CD8、E α CD4和OVACD8表位

[1075] —包含膜联蛋白的35-mer肽

[1076] —储存缓冲剂:50mM Tris-HCl,150mM NaCl,10%甘油,2mM DTT,0.5M L-精氨酸,pH 8

[1077] —内毒素水平:5.17EU/mg

[1078] Z13Mad5Anaxxa

[1079] 序列:

[1080] MHHHHHHKRYKNRVA SRKSRAFKQ LLQHYREVAA AKSSENDRLR LLLKESLKIS
QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPRFAKF ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF
EKLTEWTGSS TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

[1081] [SEQ ID NO:28]

[1082] 分子量:18973Da

[1083] 特性:

[1084] —Mad5货物包含OVACD4、gp100CD8、E α CD4和OVACD8表位

[1085] —包含膜联蛋白的35-mer肽

[1086] 一储存缓冲剂:50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10%甘油, 2mM DTT, 0.5M L-精氨酸, pH 8

[1087] 一内毒素水平:3.1EU/mg

[1088] 实施例8:TLR2结合(HEK-hTLR2细胞系)

[1089] 该研究的目标是评估Z13Mad5Anaxa和AnaxaZ13Mad5构建体蛋白(关于这些构建体蛋白的设计参阅实施例7)是否能够结合作为激动剂的TLR2。HEK-BlueTMhTLR2在培养基中被接种在平的96-孔板中,其使用0.3μM、1μM或3μM的AnaxaZ13Mad5或Z13Mad5Anaxa进行刺激并且在37°C下培育24h。阳性对照使用500ng/ml的Pam3CSK4、TLR2激动剂进行。

[1090] 为了监测NF-κB/AP1的活化,二十微升的上清液被添加至QuantiBlue®检测培养基并且在OD读取(620nm)前在37°C下培育1h。结果显示在图14A中。

[1091] 通过ELISA定量上清液中IL-8的分泌。结果显示在图14B中。

[1092] 结果(图14A、B)显示了Z13Mad5Anaxa和AnaxaZ13Mad5能够类似地以剂量依赖方式结合至TLR2。

[1093] 实施例9:特异性CD8⁺T细胞的体内诱导

[1094] 为了调查实施例7的Anaxa缀合蛋白在诱导CD8⁺ T细胞应答中的功效,C57BL/6小鼠通过皮下注射2nmol的AnaxaZ13Mad5或2nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。在最后一次接种疫苗后七天,小鼠被抽血并且监测血液中的OVA特异性免疫应答,进行五聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。结果显示在图15和16中。

[1095] 这些数据指示Z13Mad5Anaxa疫苗和AnaxaZ13Mad5构建体二者均引发强烈的免疫应答。

[1096] 实施例10:对肿瘤生长的治疗作用

[1097] 为了评价在实施例7中设计的Anaxa缀合构建体蛋白对肿瘤生长控制的作用,使用基准肿瘤模型,即s.c.植入EG.7-OVA胸腺瘤细胞。

[1098] C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞。在肿瘤植入后,三组每组7只小鼠在第5天和第13天通过皮下注射10nmol的AnaxaZ13Mad5(第1组),Z13Mad5Anaxa(第2组)或Z13Mad5和Pam3CSK4(与Anaxa等摩尔;第3组)在右肋中被s.c.接种疫苗。为了比较与外部佐剂混合的蛋白质的作用,对照组使用Z13Mad5和Pam3CSK4(与Anaxa等摩尔)被接种疫苗。使用卡尺测量肿瘤大小。结果显示在图17-19中。

[1099] 在治疗方案中,Z13Mad5Anaxa和AnaxaZ13Mad5与对照组比较是用于控制肿瘤生长的更好的蛋白质疫苗,即Z13Mad5和Pam3CSK的共注射显示了显著更好的存活曲线。具体地,与和Pam3CSK4单独施用的Z13Mad5相比,Z13Mad5Anaxa和AnaxaZ13Mad5展现了显著更高的功效。结果因此表明构建体蛋白Z13Mad5Anaxa和AnaxaZ13Mad5是有希望的缀合疫苗,其用于控制治疗设置中的肿瘤生长。

[1100] 实施例11:对肿瘤生长的治疗作用——比较使用不同TLR激动剂的构建体

[1101] 该研究的目标是比较缀合至不同TLR激动剂的不同构建体蛋白疫苗——即实施例1和7的EDAZ13Mad5和Z13Mad5Anaxa——对肿瘤生长控制的功效。为了该目的,如先前在实施例10中描述中的,C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 EG.7-OVA胸腺瘤细胞。小鼠(7只个体小鼠/组)在第5天和第13天使用2nmol的EDAZ13Mad5、Z13Mad5Anaxa或共注射的Z13Mad5+MPLA(与EDAZ等摩尔)在右肋中被s.c.接种疫苗。

[1102] 结果显示在图20、21和22中。在该实验设置中,Z13Mad5Anaxa、EDAZ13Mad5和Z13Mad5+MPLA能够类似地显著控制肿瘤生长。而且,这些数据指示在该实验设置中,Z13Mad5Anaxa是显著控制肿瘤生长的最好的构建体并且EDAZ13Mad5轻微优于Z13Mad5+MPLA。

[1103] 实施例12:Z13Mad5Anaxa对肿瘤生长控制的剂量效应

[1104] 为了鉴定缀合疫苗的最佳剂量,评估三种不同剂量(0.5nmol、2nmol和10nmol)的Z13Mad5Anaxa(参阅实施例7)的控制肿瘤生长的能力。在如先前在实施例10中描述的EG.7-OVA胸腺瘤细胞的s.c.模型中评价Z13Mad5Anaxa构建体的剂量效应。在肿瘤植入后,小鼠在0.5、2或10nmol的Z13Mad5Anaxa下在治疗设置中被接种疫苗两次(在肿瘤植入后第5天和第13天)。

[1105] C57BL/6小鼠在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中皮下注射0.5nmol、2nmol或10nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗两次(d5和d13)。使用卡尺测量肿瘤大小。

[1106] 7只小鼠/组的肿瘤生长在图23中被描绘。那些数据显示0.5和2nmol的剂量至少与10nmol在用于控制肿瘤生长上一样有效。

[1107] 实施例13:Z13Mad5Anaxa的不同施用途径的作用

[1108] 该研究基于先前展现Z13Mad5Anaxa缀合疫苗的功效的实施例(参阅实施例7),如上面显示的,所述疫苗能够引发特异性免疫应答并且对控制皮下肿瘤模型EG7中的肿瘤生长是有效的。

[1109] 为了调查皮下、肌肉内和真皮内施用途径的作用,比较通过皮下、肌肉内和真皮内注射引发的免疫应答。使用来自Pantec Biosolutions的PLEASE[®]装置进行真皮内注射。

[1110] 小鼠使用0.5或2nmol的Z13Mad5Anaxa每两周被接种疫苗三次(Wk0、Wk2和Wk4)(参阅实施例7)。为了靶向几种淋巴结,第1次和第3次接种疫苗在右肋中进行而第2次在左肋中完成。在第2次和第3次接种疫苗后1周在血液中分析SIINFEKL特异性CD8+T细胞应答。图24显示了在每次接种疫苗后在C57BL/6小鼠——其使用0.5nmol(图24A)或2nmol(图24B)的Z13Mad5Anaxa被s.c.、i.d.或i.m.接种疫苗三次(Wk0、Wk2和Wk4)——的血液中检测到的SIINFEKL特异性CD8T细胞应答。血液在第2次和第3次接种疫苗后7天获得自小鼠并且进行多聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。

[1111] 结果指示在测试的两种剂量(0.5和2nmol)下,(i)测试的所有施用途径引发SIINFEKL特异性CD8免疫应答和(ii)皮下接种疫苗引发最强的SIINFEKL特异性CD8免疫应答。对于皮下施用,最大应答在第2次接种疫苗后达到并且在第3次接种疫苗后仍被维持。与皮下接种疫苗比较,通过真皮内和肌肉内接种疫苗引发的第2次接种疫苗后的SIINFEKL特异性CD8免疫应答更低并且在第3次接种疫苗后不增强。

[1112] 接着,分别通过分析KLRG 1(杀伤细胞凝集素样受体亚家族G成员1)和PD-1评价SIINFEKL特异性CD8T细胞的效应子功能和耗减状态。

[1113] 为了该目的,C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa(参阅实施例7)被s.c.、i.d.或i.m.接种疫苗三次(Wk0、Wk2和Wk4)。血液在第2次和第3次接种疫苗后7天获得自小鼠并且进行FACS染色。在多聚体-阳性CD8T细胞上分析KLRG1和PD-1表达(一个实验,其中4只小鼠/组)。结果显示在图25中。

[1114] 这些数据指示KLRG 1的表达在皮下接种疫苗后在SIINFEKL特异性CD8T细胞上强烈地增加。在i.d.或i.m.接种疫苗后,观察到的作用更低。KLRG 1-阳性细胞在SIINFEKL特异性CD8T细胞之中的百分数在s.c.接种疫苗后也被提高(数据未显示)。

[1115] 与KLRG 1形成对比,对于皮下和肌肉内接种疫苗途径,PD-1表达随着时间接种疫苗降低。这表明SIINFEKL特异性CD8T细胞没有被耗减。PD1-阳性细胞在SIINFEKL特异性CD8T细胞之中的百分数在s.c.和i.m.接种疫苗后也被减小(数据未显示)。值得注意的是当小鼠皮下地被接种疫苗时,PD-1表达在第2次接种疫苗后更高,其反映了特异性T细胞的早期活化状态(Keir, M.E.等人, PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26:p. 677-704)。

[1116] 还分析晚期耗减(late exhaustion)标志物Tim-3的表达。所有组均观察到非常低的表达。

[1117] 总之,结果指示皮下接种疫苗与肌肉内或真皮内注射比较引发最佳的特异性CD8免疫应答。

[1118] 实施例14:结内施用途径

[1119] 基于先前的实验(实施例13),另外调查结内施用途径。为了该目的,调查通过结内注射Z13Mad5Anaxxa(参阅实施例7)引发的免疫应答。

[1120] 出于该目的,小鼠首先皮下地注射伊文思蓝,以便使得容易地可视化用于注射的淋巴结,并且结内地注射而不需要侵入性外科手术,例如在Jewell, C.M., S.C. Lopez和D.J. Irvine, *In situ engineering of the lymph node microenvironment via intranodal injection of adjuvant-releasing polymer particles*. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2011. 108 (38): p. 15745-50中描述的。

[1121] C57BL/6小鼠使用0.5nmol的Z13Mad5Anaxxa(参阅实施例7)被每两周结内地接种疫苗两次(Wk0和Wk2)。第1次接种疫苗在右腹股沟淋巴结中进行,而第二次接种疫苗在左腹股沟淋巴结中完成。血液在第2次接种疫苗后7天获得自小鼠并且进行多聚体染色(3只小鼠/组)。换句话说,在第2次接种疫苗后一周分析血液中的SIINFEKL特异性CD8+T细胞应答。图26显示了SIINFEKL特异性CD8T细胞应答。那些数据指示结内注射也引发SIINFEKL特异性CD8T细胞。

[1122] 实施例15:接种疫苗方案

[1123] 接种疫苗方案评价工作起始于如下目标:鉴定使用如上面描述的相同的Z13Mad5Anaxxa构建体(参阅实施例7)的第三次接种疫苗的影响。考虑到先前的结果选择皮下途径。

[1124] 在实验中,前两次接种疫苗在Wk0和Wk2进行而且第3次接种疫苗在Wk4(图27A)或在Wk8(图27B)进行。因而,C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxxa被s.c.接种疫苗三次(图27A和C:Wk0、Wk2和Wk4并且图27B和D:Wk0、Wk2和Wk8)。血液在最后一次接种疫苗后7天获得自小鼠并且进行五聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。因此,在第2次和第3次接种疫苗后1周分析SIINFEKL特异性CD8+T细胞应答(图27A和B)。此外,通过分析KLRG 1在特异性CD8T细胞上的表达评价SIINFEKL特异性T细胞的效应子功能(图27C和D)。

[1125] 数据指示与对照比较,SIINFEKL特异性CD8T细胞的百分数在测试的所有时间点(Vac2和Vac3)以及在两种接种疫苗方案(图27A和B)中均显著增加。

[1126] 有趣地,在Wk4的第三次接种疫苗使得最突出地增加SIINFEKL特异性CD8T细胞的

百分数(图27A)。相同的细胞还通过较高的KLRG 1表达展现了改进的效应子功能(图27C)。相比之下,在Wk8进行的第三次接种疫苗的情况下,在SIINFEKL特异性免疫应答和在KLRG 1表达中不能观察到从第二次至第三次接种疫苗的改进。

[1127] 总之,这些结果指示CD8免疫应答可以通过缩短第二次和第三次接种疫苗之间的延迟增加。

[1128] 考虑到较早的第三次接种疫苗似乎增加免疫应答,在接下来的研究中调查接种疫苗的两种短的方案:

[1129] i) 第0天、第3天和第7天三次接种疫苗,和

[1130] ii) 第0天、第7天和第14天三次接种疫苗。

[1131] 再次,使用C57BL/6小鼠并且使用0.5nmol的Z13Mad5Anax (参阅实施例7) 进行s.c. 接种疫苗。在第2次和第3次接种疫苗后一周获得的血液样品上进行多聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。

[1132] 因而,在第2次和第3次接种疫苗后一周分析SIINFEKL特异性CD8+T细胞应答(图28A和D)。此外,通过分析KLRG 1在特异性CD8T细胞上的表达评价SIINFEKL特异性T细胞的效应子功能(图28B和28E),并且通过分析特异性T细胞的PD-1表达评价耗减状态(图28C和28F)。

[1133] 数据指示——类似于关于上面描述的接种疫苗方案的第一个研究——与对照比较,SIINFEKL特异性CD8T细胞的百分数在测试的所有时间点(Vac2和Vac3)以及在两种接种疫苗方案(图27A和B)中均增加(图28A和B)。

[1134] 然而,与方案wk0-wk2-wk4比较,在第0天、第3天和第7天使用接种疫苗的方案不引发这样高的SIINFEKL特异性CD8T细胞免疫应答。就在第0天、第7天和第14天使用接种疫苗的方案而言,引发的SIINFEKL特异性CD8T细胞免疫应答与先前的方案(d0-d3-d7)比较更好,但是在第3次接种疫苗后不被维持。

[1135] 总之,接种疫苗方案数据集指示Wk0-Wk2-Wk4接种疫苗方案是用于以高效应子功能诱导有效的OVA特异性CD8免疫应答的最好的接种疫苗方案。

[1136] 实施例16:TLR激动剂-CPP缀合构建体活化鼠抗原呈递细胞(APC)的能力

[1137] 为了调查CPP组分和TLR激动剂组分二者在根据本发明使用的复合物中的作用,再次使用如上面描述的融合蛋白(参阅实施例1、2和7)。

[1138] 此外,设计进一步的“对照肽”,其也是融合蛋白并且其包括蛋白质“MAD5”——其由来自多种抗原的不同的CD8⁺和CD4⁺表位组成,和TLR2肽激动剂“Anax”(即没有细胞穿透肽)。因此,下列对照构建体被另外地设计:

[1139] Mad5Anax

[1140] 序列:

[1141] MHHHHHHESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GSSTVHEILC KLSLEGDHST PPSAYGSVKP YTNFDAE

[1142] [SEQ ID NO:32]

[1143] 分子量:13933Da

[1144] 特性:

[1145] —Mad5货物包含OVACD4、gp100CD8、EαCD4和OVACD8表位

- [1146] —在C-端位置中包含膜联蛋白的35-mer肽
- [1147] —储存缓冲剂:50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10%甘油, 2mM DTT, 0.5M L-精氨酸, pH 8
- [1148] —内毒素水平:第1批-12.15EU/mg
- [1149] 该研究的目的是与缺少细胞穿透肽组分Z13 (Mad5Anax, 参阅上面; EDAMad5, 参阅实施例2) 或TLR激动剂 (Z13Mad5, 参阅实施例1) 的参考复合物比较, 评价根据本发明的两种示例性复合物——即EDAZ13Mad5 (参阅实施例1) 和Z13Mad5Anax (参阅实施例7) ——促进抗原呈递细胞活化的能力。
- [1150] 为了该目的, 在骨髓来源的树突细胞 (BMDC) ——其表达除TLR7以外的所有TLR——中评估上面提及的构建体促进抗原呈递细胞 (APC) 活化的能力。
- [1151] BMDC在培养基中被接种在平的96-孔板中, 其使用1μM的Z13Mad5Anax (参阅实施例7) 、Mad5Anax (参阅上面) 、Z13Mad5 (参阅实施例1) 、EDAZ13Mad5 (参阅实施例1) 或EDAMad5 (参阅实施例2) 进行刺激并且在37°C下培育24h。
- [1152] 通过监测IL-6在BMDC的培养物上清液中的分泌调查APC活化。通过ELISA定量上清液中的IL-6分泌。
- [1153] 结果显示在图29中。这些数据清楚地显示Z13Mad5Anax能够活化BMDC, 然而当细胞在存在Z13Mad5或Mad5Anax的情况下培养时没有观察到这样的活化。这表明不仅TLR激动剂 (Anax或EDA) 对巨噬细胞和树突细胞的活化至关重要, 而且CPP也是必需的。而且存在CPP但没有TLR激动剂是不充分的, 但是事实上, CPP和TLR激动剂二者对巨噬细胞和树突细胞的活化至关重要。
- [1154] 那些结果通过使用另一种细胞系被确认, 即在Raw 264.7小鼠巨噬细胞细胞系中, 其表达除TLR5以外的所有TLR (Applequist, S.E., R.P. Wallin, and H.G. Ljunggren, Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol*, 2002.14(9):p.1065-74)。
- [1155] Raw 264.7细胞在培养基中被接种在平的96-孔板中, 其使用1μM的Z13Mad5Anax (参阅实施例7) 、Mad5Anax (参阅上面) 或Z13Mad5 (参阅实施例1) 进行刺激并且在37°C下培育24h。
- [1156] 在Raw 264.7细胞中, 通过监测TNF-α在Raw 264.7的培养物上清液中的分泌调查APC活化。通过ELISA定量上清液中的TNF-α分泌。结果显示在图30中。
- [1157] 认为CPP可以促进分子进入细胞, 其允许细胞内TLR的更好的靶向。
- [1158] 总之, 数据揭示了CPP和TLR激动剂二者在缀合构建体内活化APC的关键作用。该作用可能由于帮助构建体进入细胞, 因此导致细胞内TLR的最佳靶向。
- [1159] 实施例17: 缀合构建体结合人TLR4的能力
- [1160] 最近显示Anax肽借助通过TLR2的信号传导拥有佐剂活性 (WO 2012/048190A1) , 然而EDA肽是TLR4的天然配体 (Okamura, Y. 等人, The extradomain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 2001.276(13):p.10229-33)。
- [1161] 而且, 如在上面的实施例8和图14中显示的, 根据本发明使用的复合物——其包括Anax肽作为TLR激动剂, 例如Z13Mad5Anax——能够结合至是人TLR2并且促进HEK-hTLR2细胞的IL-8分泌 (参阅实施例8, 图14)。

[1162] 在本研究中,评价根据本发明复合物——其包括Anaxa肽作为TLR激动剂或EDA肽作为TLR激动剂——结合至人TLR4的能力。为了该目的,转染有人TLR4(HEK-hTLR4)的HEK细胞在培养基中被接种在平的96-孔板中,其使用1μM的Z13Mad5Anaxa(参阅实施例7)、Mad5Anaxa(参阅上面)、Z13Mad5(参阅实施例1)、EDAZ13Mad5(参阅实施例1)或EDAMad5(参阅实施例2)进行刺激并且在37℃下培育24h。通过ELISA定量上清液中的IL-8分泌。

[1163] 结果显示在图31中。如预期的,使用EDAZ13Mad5培育HEK-hTLR4导致显著的IL-8分泌,其指示EDAZ13Mad5结合至TLR4。与在实施例16中获得的结果一致,EDAMad5(不具有CPP)的IL-8分泌与EDAZ13Mad5比较显著更低,其显示了存在CPP的作用。不包括TLR激动剂的Z13Mad5构建体显示没有IL-8分泌,其指示——如预期的——缺少结合至TLR4。

[1164] 有趣地,使用构建体Z13Mad5Anaxa培育HEK-hTLR4导致最明显的IL-8分泌,其指示Z13Mad5Anaxa结合至TLR4。这是令人吃惊的,因为Anaxa先前被猜测是TLR2激动剂。另外,不具有CPP的相同的构建体(Mad5Anaxa)导致显著更低的IL-8分泌,其确认了在实施例16中获得的结果。

[1165] 总之,这些数据(i)确认了在实施例16中获得的结果,(ii)确认了EDA的确是TLR4激动剂,并且(iii)令人吃惊地显示Anaxa肽也是TLR4激动剂(除是TLR2激动剂之外,参阅实施例8和图14)。

[1166] 实施例18:对肺转移模型-半治疗设置中肿瘤生长的疫苗功效:TLR激动剂EDA

[1167] 该研究基于实施例6,其显示了根据本发明使用的复合物——即EDAZ13Mad5——在预防设置中的黑素瘤肺转移模型中的功效(参阅图13)。

[1168] 在本研究中,使用相同的肺转移模型以及构建体蛋白EDAZ13Mad5和Z13Mad5+MPLA(关于构建体的设计参阅实施例1和2)。然而,在半治疗设置中,C57BL/6小鼠在植入肿瘤细胞的同时(d0)被接种疫苗,并且在植入后九天(d9)进行第二次接种疫苗。通过在右肋中的皮下(s.c.)皮下注射2nmol的EDAZ13Mad5、Z13Mad5+MPLA(与EDA等摩尔)或MPLA进行接种疫苗。在第0天,小鼠i.v.植入有 1×10^5 个B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞并且通过在右肋中皮下(s.c.)皮下注射2nmol的EDAZ13Mad5、Z13Mad5+MPLA(与EDA等摩尔)或单独的MPLA被接种疫苗两次(d0和d9)。小鼠在第13天被处死并且回收肺。结果显示在图32中。

[1169] 结果显示EDAZ13Mad5在抑制黑素瘤转移的生长方面比Z13Mad5+MPLA轻微地更有效。此外,在仅使用MPLA注射的小鼠中没有观察到佐剂作用。

[1170] 在预防和半治疗设置中,EDAZ13Mad5和Z13Mad5+MPLA二者显著地抑制黑素瘤转移在肺中的生长。

[1171] 实施例19:对肺转移模型-半治疗设置中肿瘤生长的疫苗功效:TLR激动剂Anaxa

[1172] 该研究基于具有相同模型(半治疗设置)和实验方案的实施例18。然而,调查了根据本发明复合物——其包括“Anaxa”肽作为TLR激动剂,而不是实施例18中的EDA TLR激动剂——的功效。

[1173] 为了该目的,C57BL/6小鼠i.v.植入有 1×10^5 个B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞并且通过在右肋中的皮下(s.c.)皮下注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa、Mad5Anaxa或Z13Mad5+Pam3CSK4(与Anaxa等摩尔)被接种疫苗两次(d0和d9)。小鼠在第21天被处死并且回收肺。对每个肺进行转移灶数目的计数。结果显示在图33中。

[1174] 结果显示Z13Mad5Anaxa在抑制黑素瘤转移的生长方面明显地比Z13Mad5+

Pam3CSK4更有效。相比之下, Mad5Anaxa不能够控制肺中的转移生长, 其再次强调CPP的重要性。

[1175] 总之, B16-OVA肺转移实验显示Z13Mad5Anaxa在抑制肺中的黑素瘤转移的生长中是高度有效的。

[1176] 实施例20:成胶质细胞瘤模型中的疫苗功效

[1177] 在该研究中, 使用了另一种癌症模型, 即成胶质细胞瘤模型。胶质瘤是成人中原发性脑肿瘤的最常见的形式, 其中多形性成胶质细胞瘤(GBM)是最致命的。该肿瘤因其高度侵袭性和攻击性性状而闻名。当前, 针对GBM的最佳治疗是包含外科手术、化学疗法和放射疗法的联合, 其具有仅仅14.6个月的中位数存活期。对改进胶质瘤患者的预后的新的治疗模态存在急迫的、未满足的医疗需要。T-细胞介导的免疫疗法是连同现有的模态用于胶质瘤的在概念上吸引人的治疗选项, 具体地高度侵袭性GBM。

[1178] G1261胶质瘤是致癌物诱导的小鼠胶质瘤模型。该模型代表在免疫活性动物中研发的极少数脑肿瘤模型之一, 其具有与人GBM类似的生长特性(Newcomb, E. 和 D. Zagzag, The murine GL261glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments, in CNS Cancer Models, Markers, Prognostic, Factors, Targets, and Therapeutic Approaches, E.G. Van Meir, Editor. 2009, Humana Press: Atlanta. p. 227-241; Jacobs, V.L. 等人, Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-tumour model. ASN Neuro, 2011. 3 (3) : p. e00063)。低数目的颅内移植的G1261细胞在C57BL/6小鼠中形成颅内肿瘤(Zhu, X. 等人, Poly-/CLC promotes the infiltration of effector T cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN- α and IFN- γ dependent manners. Cancer Immunol Immunother, 2010. 59 (9) : p. 1401-9; Zhu, X. 等人, Toll like receptor-3 ligand poly-/CLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumour models. J Transl Med, 2007. 5: p. 10)。细胞是中等免疫原性的:它们能够在肿瘤位点处引发肿瘤特异性免疫应答。然而, 肿瘤特异性免疫细胞不能够实现完全肿瘤清除。

[1179] 最近, M.011in通过使G1261细胞系转染有“Quad盒”——其表达由H-2b I类或II分子呈递的四种肽:人gp100₂₅₋₃₃、鸡OVA₂₅₇₋₂₆₄、鸡OVA₃₂₃₋₃₃₉和小鼠I-E α ₅₂₋₆₈——生成了新的G1261模型(Ohlfest, J.R. 等人, Vaccine injection site matters: qualitative and quantitative defects in CDB T cells primed as a function of proximity to the tumor in a murine glioma model. J Immunol, 2013. 190 (2) : p. 613-20)。Quad-G1261细胞系还稳定地表达萤光素酶, 其使得通过生物发光随访肿瘤生长。

[1180] 该研究的目标是评估根据本发明使用的复合物在Quad-G1261成胶质细胞瘤模型中的功效。

[1181] 在上面描述的成胶质细胞瘤模型中评价根据本发明使用的复合物——即Z13Mad5Anaxa(参阅实施例7)——的作用。因此在荷载G1261-Quad肿瘤的小鼠——其使用Z13Mad5Anaxa疫苗被接种疫苗两次(Wk1和Wk3)——中分析肿瘤位点处的T细胞归巢。使用单独施用的Z13Mad5和Anaxa(与Z13Mad5Anaxa等摩尔)接种疫苗的组被用作对照。简略地, C57BL/6小鼠i.c.植入(颅内地)有5×10⁵个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa(第1组)或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa(第2组)被接种疫苗两次(在植

入之后d7和d21)。在Wk4,分析血液和脑浸润淋巴细胞(BIL),由此在d28,SIINFEKL特异性CD8T细胞通过多聚体染色在血液中和在BIL中被定量(5-8只小鼠/组)。结果显示在图34中。

[1182] 一般而言,低频率的SIINFEKL特异性CD8T细胞在血液中被定量。然而,在Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的血液中观察到较高百分数的SIINFEKL特异性CD8T细胞。在所有组中,在BIL中存在明显较强的SIINFEKL特异性CD8T细胞的积聚。

[1183] 在使用Z13Mad5Anaxa两次接种疫苗后,SIINFEKL特异性细胞CD8+T细胞在BIL中的频率比使用Z13Mad5+Anaxa(12%)高2倍(24%)。

[1184] 接着,评估细胞因子分泌。为了该目的,C57BL/6小鼠i.c.植入有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa被接种疫苗两次(d7和d21)。BIL被分离并且在进行细胞因子细胞内染色前在存在布雷菲德菌素A的情况下使用负载或未负载SIINFEKL肽的成熟的BMDC在6h期间进行培养。结果显示在图35中。

[1185] 不管异质性,对于来自使用Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的脑浸润CD8T细胞观察到高水平的细胞因子分泌。这些结果展现了Z13Mad5Anaxa疫苗能够以有效的效应子功能在荷瘤小鼠的脑中引发较强的SIINFEKL特异性CD8T细胞免疫应答。

[1186] 获得的结果指示Z13Mad5Anaxa对引发高的脑浸润SIINFEKL特异性CD8免疫应答是有效的。Z13Mad5Anaxa能够促进脑中的抗原特异性CD8T细胞的细胞因子分泌。

[1187] 实施例21:对G1261-Quad成胶质细胞瘤模型中存活的疫苗功效

[1188] 在独立实验中,监测对照和Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的存活。治疗设置是在i.c.肿瘤植入之后在第7天、第21天和第35天使用2nmol的Z13Mad5Anaxa的三次连续的接种疫苗。

[1189] C57BL/6小鼠i.c.植入有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗三次(d7、d21和d35)。小鼠每天称重并且当重量减少达到大于15%时被处死。结果显示在图36中。

[1190] 结果显示Z13Mad5Anaxa治疗性接种疫苗比对照组更有效,其具有延长10天的中位数存活。

[1191] 实施例22:对皮下肿瘤模型-预防设置的疫苗功效

[1192] 该研究基于在实施例10——如在图17-19中显示的——中获得的结果。

[1193] 为了评价在实施例7中设计的Anaxa缀合构建体蛋白对肿瘤生长控制的作用,使用基准肿瘤模型,即s.c.植入EG.7-OVA胸腺瘤细胞。与实施例10形成对比,其中接种疫苗在第5天和第13天进行,在本研究中评价预防设置,其中小鼠在肿瘤植入前21和7天被接种疫苗。

[1194] C57BL/6小鼠通过在右肋中s.c.注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗两次(d-21和d-7),并且然后在第0天在左肋中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞。使用卡尺测量肿瘤大小。

[1195] 结果以肿瘤体积(图37A)和存活率(图37B)显示在图37中。数据显示使用Z13Mad5Anaxa的预防性接种疫苗对控制肿瘤生长和存活率是高度有效的。与对照小鼠比较,肿瘤的体积在使用Z13Mad5Anaxa处理的小鼠中高度显著减小。与对照小鼠比较,存活率在使用Z13Mad5Anaxa处理的小鼠中高度显著增加。

[1196] 实施例23:在具有确定的肿瘤的皮下肿瘤模型-治疗设置中的疫苗功效

[1197] 该研究基于在实施例10——如在图17-19中显示的——中和在图37中显示的实施例22中获得的结果。该研究的目标是评价Z13Mad5Anaxa (参阅实施例7) 对确定的肿瘤的作用。

[1198] 出于该目的, 使用B16-OVA黑素瘤细胞的s.c. 模型。在该模型中, 肿瘤细胞缓慢地扩散, 因此允许更大的接种疫苗时间窗口。

[1199] 一旦肿瘤被确定并且可视, 进行使用0.5nmol的低剂量的Z13Mad5Anaxa的第一次接种疫苗, 即在肿瘤细胞植入后第14天。第二次接种疫苗在第21天完成。

[1200] 因而, C57BL/6小鼠在左肋中s.c. 植入有 1×10^5 个B16-OVA肿瘤细胞并且通过在右肋中s.c. 注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa被接种疫苗两次 (d14和d21)。监测肿瘤生长和存活曲线。结果显示在图38中。

[1201] 结果指示Z13Mad5Anaxa有效地控制确定的和可视的肿瘤的生长。而且, 与对照比较, 确定的和可视的肿瘤存活率在使用Z13Mad5Anaxa治疗的小鼠中增加。

[1202] 实施例24: 皮下肿瘤模型-治疗设置中的疫苗功效: CPP的作用

[1203] 评价了对应于在实施例10中描述的研究的该研究的方案, 不同在于额外的组“Mad5Anaxa” (参阅实施例16)。

[1204] 简略地, 使用基准肿瘤模, 即s.c. 植入EG.7-OVA胸腺瘤细胞。C57BL/6小鼠在左肋中s.c. 植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞。在肿瘤植入后, 每个7只小鼠的组在第5天和第13天在右肋中通过皮下注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxa (第1组) 或Mad5Anaxa (第2组) 被s.c. 接种疫苗并且与对照组比较。使用卡尺测量肿瘤大小。结果显示在图39中。

[1205] 结果显示与对照小鼠和使用Mad5Anaxa——即没有CPP的构建体——处理的小鼠二者比较, 使用Z13Mad5Anaxa处理的小鼠显示了显著减小的肿瘤体积和显著增加的存活率。这些结果指示CPP的存在导致显著减小的肿瘤体积和显著增加的存活率, 即导致增加的接种疫苗效率。因此, 结果指示——连同在实施例10中获得的结果——CPP和TLR激动剂的存在对肿瘤生长和存活率发挥协同效应。

[1206] 实施例25: 比较使用具有不同细胞穿透肽的复合物的免疫应答的动力学

[1207] 为了调查不同的CPP在根据本发明使用的复合物中的作用, 使用如上面描述的融合蛋白Z13Mad5Anaxa (参阅实施例7)。

[1208] 此外, 设计了进一步的融合蛋白, 其包括不同于Z13的CPP——即Z14 (SEQ ID NO: 7) 或Z18 (SEQ ID NO: 11)。那些融合蛋白还包括蛋白质“MAD5”——其由来多种抗原的不同的CD8⁺和CD4⁺表位组成, 和TLR2肽激动剂“Anaxa”。因此, 下列构建体被另外地设计:

[1209] Z14Mad5Anaxa

[1210] 序列:

[1211] MHHHHHHKRY KNRVASRCSR AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GSSTVHEILC KLSLECDHST PPSAYGSVKP YTNFDAE

[1212] (SEQ ID NO:33)

[1213] Z18Mad5Anaxa

[1214] 序列:

[1215] MHHHHHHREV AAAKSSENDR LRLLLKESLK ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN

QDWLGVRFA KFASFEAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESI NFEKLTEWTG SSTVHEILCK LSLEGDHSTP
PSAYGSVKPY TNFDAE

[1216] (SEQ ID NO:34)

[1217] C57BL/6小鼠被分配为八个不同的组(4只小鼠/组):接受2nmol的Z13Mad5Anaxa、Z14Mad5Anaxa或Z18Mad5Anaxa的三组和各自的对照和接受0.5nmol的Z13Mad5Anaxa、Z14Mad5Anaxa或Z18Mad5Anaxa的三组和各自的对照。小鼠被s.c.接种疫苗五次(第0周、第2周、第4周、第6周和第8周)。小鼠在第2次、第3次、第4次和第5次接种疫苗后7天被抽血并且进行多聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。

[1218] 结果显示在图40中。与对照组比较,使用Z13Mad5Anaxa、Z14Mad5Anaxa或Z18Mad5Anaxa接种疫苗的所有组显示了多聚体-阳性细胞的增加的百分数(除Z18Mad5Anaxa的第二次接种疫苗以外)。这些结果指示具有不同细胞穿透肽的根据本发明的复合物能够在不同的剂量下引发免疫应答。

[1219] 实施例26:比较使用具有不同细胞穿透肽的复合物的T细胞免疫应答

[1220] 为了更详细地调查CD8T细胞免疫应答,C57BL/6小鼠被分配为三个不同的组(3-4只小鼠/组):幼稚的、Z13Mad5Anaxa或Z14Mad5Anaxa。

[1221] Z13Mad5Anaxa组和Z14Mad5Anaxa组的C57BL/6小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa(参阅实施例7)或Z14Mad5Anaxa(参阅实施例25)被s.c.接种疫苗五次(第0周、第2周、第4周、第6周和第8周)。在第5次接种疫苗后九天,小鼠被处死,回收器官,并且进行多聚体染色以鉴定SIINFEKL特异性CD8T细胞在脾、骨髓和引流淋巴结(腹股沟的和腋窝的)中的百分数。

[1222] 结果显示在图41中。使用Z13Mad5Anaxa或Z14Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠显示了多聚体-阳性细胞的类似的增加,具体地在脾和骨髓中,以及在引流淋巴结中的轻微增加。

[1223] 为了进一步调查在使用具有不同CPP的复合物的接种疫苗后的CD8T细胞效应子功能,在如上面描述的相同的小鼠的组中,在第5次接种疫苗后九天,在使用SIINFEKL OVACD8肽(SEQ ID NO:35)刺激的脾细胞上进行酶联免疫斑点测定,以便定量产生IFN- γ 的细胞。

[1224] 结果显示在图42A中。与稚小鼠比较,使用Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠显示了产生IFN- γ 的细胞的显著增加。与稚小鼠比较,使用Z14Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠也显示了产生IFN- γ 的细胞的增加,然而,增加不是显著的,其可能是由于低的小鼠数目(Z14Mad5Anaxa组中3只小鼠)。

[1225] 为了调查在使用具有不同CPP的复合物的接种疫苗后的CD4T细胞应答,在如上面描述的相同的小鼠的组中,在第5次接种疫苗后九天,在使用OVACD4肽(SEQ ID NO:36)刺激的脾细胞上进行酶联免疫斑点测定,以便定量产生IFN- γ 的细胞。

[1226] 结果显示在图42B中。与稚小鼠比较,使用Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠显示了产生IFN- γ 的细胞的高度显著增加。与稚小鼠比较,使用Z14Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠也显示了产生IFN- γ 的细胞的增加,然而,增加不是显著的,其可能是由于低的小鼠数目(Z14Mad5Anaxa组中3只小鼠)。

[1227] 此外,在上面描述的小鼠的组中,在使用SIINFEKL OVACD8肽(SEQ ID NO:35)刺激的脾细胞上进行细胞内染色以鉴定CD107a⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺细胞。结果显示在图43中。使用Z13Mad5Anaxa或Z14Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠显示了CD107a⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺细胞的类似的增加。

[1228] 实施例27:比较具有不同细胞穿透肽的复合物对EG.7-OVA s.c.模型中的肿瘤生长和存活的作用

[1229] 为了调查具有不同细胞穿透肽的复合物对肿瘤生长和存活的作用,使用EG.7-OVA s.c.模型。在d0,C57BL/6小鼠在左胁中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且被分配为三个不同的组(幼稚的、Z13Mad5Anaxax和Z14Mad5Anaxax)。小鼠在肿瘤植入后d5和d13通过在右胁中s.c.注射0.5nmol的Z13Mad5Anaxax或Z14Mad5Anaxax被接种疫苗两次。

[1230] 结果显示在图44中。使用Z13Mad5Anaxax或Z14Mad5Anaxax接种疫苗导致与对照小鼠(图44A)比较显著减小的肿瘤体积以及与对照小鼠(图44B)比较显著增加的存活率。那些结果指示两种复合物Z13Mad5Anaxax和Z14Mad5Anaxax能够显著地减小肿瘤生长和显著地延长存活。

[1231] 实施例28:比较在使用具有不同细胞穿透肽的复合物的接种疫苗后的免疫应答

[1232] 在该实验中,通过使用具有TLR激动剂“EDA”的复合物调查不同的CPP在根据本发明使用的复合物中的作用。因此,使用如上面描述的融合蛋白EDAZ13Mad5(参阅实施例1)。

[1233] 此外,设计了进一步的融合蛋白,其包括不同于Z13的CPP——即Z14(SEQ ID NO:7)或Z18(SEQ ID NO:11)。那些融合蛋白还包括蛋白质“MAD5”——其由来多种抗原的不同的CD8⁺和CD4⁺表位组成,和TLR4肽激动剂“EDA”。因此,下列构建体被另外地设计:

[1234] EDAZ14Mad5

[1235] 序列:

[1236] MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKSR AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPFR AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFELTEWT GS

[1237] (SEQ ID NO:37)

[1238] EDAZ18Mad5

[1239] 序列:

[1240] MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTREV AAAKSSENDR LRLLLKESLK ISQAVHAAHA EINEAGREVV VGVGALKVPRN QDWLGVPFRF KFASFEAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESII NFEKLTEWTG S

[1241] (SEQ ID NO:38)

[1242] C57BL/6小鼠被分配为八个不同的组(4只小鼠/组):接受2nmol的EDAZ13Mad5、EDAZ14Mad5或EDAZ18Mad5的三组和各自的对照和接受0.5nmol的EDAZ13Mad5、EDAZ14Mad5或EDAZ18Mad5的三组和各自的对照。小鼠被s.c.接种疫苗三次(第0周、第2周和第4周)。小鼠在第2次和第3次接种疫苗后7天被抽血并且进行多聚体染色(一个实验,其中4只小鼠/组)。

[1243] 结果显示在图45中。与对照组比较,使用EDAZ13Mad5,EDAZ14Mad5或EDAZ18Mad5接种疫苗的所有组显示了多聚体-阳性细胞的增加的百分数。这些结果指示具有不同细胞穿透肽的根据本发明的复合物能够在不同的剂量下引发免疫应答。

[1244] 实施例29:EDAZ14Mad5对EG.7-OVA s.c.模型中的肿瘤生长和存活的作用

[1245] 为了调查EDAZ14Mad5对肿瘤生长和存活的作用,使用EG.7-OVA s.c.模型(关于在相同模型中的作用参阅实施例4和图9-11)。

[1246] 在d0,C57BL/6小鼠在左胁中s.c.植入有 3×10^5 个EG7-OVA肿瘤细胞并且被分配为两个不同的组(幼稚的和EDAZ14Mad5)。小鼠在肿瘤植入后d5和d13通过在右胁中s.c.注射0.5nmol的EDAZ14Mad5被接种疫苗两次。

[1247] 结果显示在图46中。与EDAZ13Mad5类似(参阅实施例4,图9-11),使用EDAZ14Mad5接种疫苗导致与对照小鼠(图46A)比较显著减小的肿瘤体积以及与对照小鼠(图46B)比较显著增加的存活率。那些结果指示EDAZ14Mad5能够显著地减小肿瘤生长和显著地延长存活——其与EDAZ13Mad5类似(参阅实施例4,图9-11)。

[1248] 实施例30:Z13Mad5Anaxa融合构建体与Z13Mad5和Anaxa比较在成胶质细胞瘤模型中更优越的功效

[1249] 为了调查根据本发明的复合物的功效,选择成胶质细胞瘤模型(参阅实施例20)。即,Z13Mad5Anaxa(参阅实施例7;SEQ ID NO:28)被施用至一组小鼠,而Z13Mad5(SEQ ID NO:29)和Anaxa(SEQ ID NO:15)被施用(二者在一起)至另一组小鼠。

[1250] 在使用2nmol Z13Mad5Anaxa疫苗接种疫苗两次——即肿瘤植入(第0天)后第7天和第21天——的荷载G1261-Quad肿瘤的小鼠(7-16只小鼠/组)中分析肿瘤位点处的T细胞归巢。使用Z13Mad5和Anaxa(与Z13Mad5Anaxa等摩尔)二者接种疫苗的组被用作对照。简略地,C57BL/6小鼠i.c.植入(颅内地)有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa(第1组)或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa(第2组)被接种疫苗两次(在植入之后d7和d21)。在d28,分析血液和脑浸润淋巴细胞(BIL),由此SIINFEKL特异性CD8T细胞在d28通过多聚体染色在血液中和在BIL中被定量(7-16只小鼠/组)。

[1251] 结果显示在图47中。与使用Z13Mad5和Anaxa二者接种疫苗的小鼠比较,在Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的血液中观察到SIINFEKL特异性CD8T细胞的显著更高的百分数(图47A)。类似地,与使用Z13Mad5和Anaxa单独接种疫苗的小鼠比较,在Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的BIL中观察到SIINFEKL特异性CD8T细胞的更强的积聚(图47B,p=0.0539)。

[1252] 接着,评估细胞因子分泌。为了该目的,C57BL/6小鼠i.c.植入有 5×10^5 个G1261-Quad肿瘤细胞并且通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa被接种疫苗两次(d7和d21)。BIL被分离并且在进行细胞因子细胞内染色前在存在布雷菲德菌素A的情况下使用负载或未负载SIINFEKL肽(SEQ ID NO:35)的成熟的BMDC在6h期间进行培养。

[1253] 结果显示在图48中。一般而言,对于来自使用Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的脑浸润CD8 T细胞观察到高水平的细胞因子分泌。具体地,与使用Z13Mad5和Anaxa单独接种疫苗的小鼠比较,对于来自使用Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的脑浸润CD8 T细胞观察到总IFN- γ 和IFN- γ 与TNF- α 一起显著更高分分泌。

[1254] 总之,这些结果展现了Z13Mad5Anaxa疫苗(与单独施用的Z13Mad5和Anaxa比较)能够以有效的效应子功能在荷瘤小鼠的脑中引发更强的SIINFEKL特异性CD8 T细胞免疫应答。

[1255] 获得的结果指示Z13Mad5Anaxa对引发高的脑浸润SIINFEKL特异性CD8免疫应答是

有效的。Z13Mad5Anaxa能够促进脑中抗原特异性CD8 T细胞的细胞因子的分泌。

[1256] 实施例31:另一种抗原货物在根据本发明的复合物中的作用

[1257] 为了调查不同的抗原货物(“Mad8”)的作用,设计了包括细胞穿透肽、不同的抗原和TLR肽激动剂的另一种复合物(“Z13Mad8Anaxa”)。Z13Mad8Anaxa不同于抗原货物中的Z13Mad5Anaxa(在实施例7中描述的)。具体地,“Z13Mad8Anaxa”是包括细胞穿透肽“Z13”,抗原货物“MAD8”——其包括糖蛋白70的CD8和CD4表位,和TLR肽激动剂“Anaxa”的融合蛋白。在下列中,Z13Mad8Anaxa的氨基酸序列以加下划线地显示的细胞穿透肽“Z13”和以斜体显示的TLR肽激动剂“Anaxa”显示:

[1258] KRYKNRVASR KSRAKFKQLL QHYREVAAAK SSENDRLRLLKVTYHSPSYAY HQFERRAILN
RLVQFIKDRI SVVQALVLTS TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

[1259] (SEQ ID NO:39)

[1260] 稚Balb/c小鼠(4只小鼠/组)使用2nmol的Z13Mad8Anaxa被s.c.接种疫苗四次(第0周、第2周、第4周和第6周)。

[1261] 为了调查在接种疫苗后的CD4 T细胞应答,在第4次接种疫苗后一周,小鼠被死;回收器官并且在使用gp70CD4肽(SEQ ID NO:64)或gp70CD8肽(SEQ ID NO:65)刺激的脾细胞上进行离体酶联免疫斑点测定,以便定量产生IFN- γ 的表位特异性CD4和CD8 T细胞。

[1262] 结果显示在图49中。与稚小鼠比较,使用Z13Mad8Anaxa接种疫苗的小鼠显示了产生IFN- γ 的细胞的显著增加。这些数据显示Z13Mad8Anaxa疫苗能够引发有效的表位特异性CD8和CD4 T细胞免疫应答,并且因而根据本发明的复合物能够引发自身抗原免疫应答。

[1263] 实施例32:另一种抗原货物在根据本发明的复合物中的作用

[1264] 为了调查进一步的不同抗原货物(“Mad11”)的作用,设计了包括细胞穿透肽、不同的抗原和TLR肽激动剂的另一种复合物(“Z13Mad11Anaxa”)。Z13Mad11Anaxa不同于抗原货物中的Z13Mad5Anaxa(在实施例7中描述的)。具体地,“Z13Mad11Anaxa”是包括细胞穿透肽“Z13”,抗原货物“MAD11”——其包括如在Derouazi M, Wang Y, Marlu R等人Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: Application to TRP-2. Bioengineered Bugs. 2010;1 (1) :51-60. doi:10.4161/bbug.1.1.9482中描述的存活蛋白的两种CD8表位,和TLR肽激动剂“Anaxa”的融合蛋白。在下列中,示出了Z13Mad11Anaxa的氨基酸序列:

[1265] KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLKNYRIATFKNWPFLEDCAMEELTVSEFL
KLDRQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[1266] (SEQ ID NO:40)

[1267] 稚C57BL/6小鼠(5只小鼠/组)被i.v.植入有 1×10^5 个B16黑素瘤肿瘤细胞并且通过皮下注射1nmol的Z13Mad11Anaxa被接种疫苗两次(d0和d10)。

[1268] 在第18天,小鼠被处死,回收器官并且在使用存活蛋白肽存活蛋白20-28(SEQ ID NO:67)和存活蛋白97-104(SEQ ID NO:68)刺激的脾细胞上进行离体酶联免疫斑点测定,以便定量产生IFN- γ 的存活蛋白特异性T细胞。

[1269] 结果显示在图50中。与稚小鼠比较,使用Z13Mad11Anaxa接种疫苗的小鼠显示了更少的转移(图50A)。而且,在使用Z13Mad11Anaxa接种疫苗的小鼠的脾中观察到产生IFN- γ 的存活蛋白特异性T细胞的显著更高的数目(图49B)。

[1270] 获得的结果显示Z13Mad11Anaxa对减少转移的数目是有效的,并且Z13Mad11Anaxa能够促进脾中抗原特异性CD8T细胞的细胞因子的分泌。

[1271] 实施例33:另一种抗原货物在根据本发明的复合物中的作用

[1272] 为了调查进一步的不同抗原货物(“Mad9”)的作用,设计了包括细胞穿透肽、不同的抗原和TLR肽激动剂的另一种复合物(“Z13Mad9Anaxa”)。Z13Mad9Anaxa不同于抗原货物中的Z13Mad5Anaxa(在实施例7中描述的)。具体地,“Z13Mad9Anaxa”是包括细胞穿透肽“Z13”,抗原货物“Mad9”——其包括来自MC-38肿瘤细胞系的如由Yadav等人Nature.2014Nov 27;515(7528):572-6鉴定的新抗原,和TLR肽激动剂“Anaxa”的融合蛋白。在下列中,Z13Mad9Anaxa的氨基酸序列以加下划线地显示的细胞穿透肽“Z13”和以斜体显示的TLR肽激动剂“Anaxa”显示:

[1273] KRYKNRVASRKSRACKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKHLELASMTNMELMSSIVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[1274] (SEQ ID NO:41)

[1275] 稚C57BL/6小鼠(4只小鼠/组)使用2nmol的Z13Mad9Anaxa被s.c.接种疫苗四次(第0周、第2周、第4周和第6周)。为了调查在接种疫苗后的CD8T细胞应答,在第4次接种疫苗后一周,小鼠被处死,回收器官并且在使用adpgk肽(SEQ ID NO:66)刺激的7天体外再刺激后在脾细胞上进行酶联免疫斑点测定,以便定量产生IFN- γ 的表位特异性CD8T细胞。

[1276] 结果显示在图51中。与稚小鼠比较,使用Z13Mad9Anaxa接种疫苗的小鼠显示了效应物新抗原特异性CD8 T细胞的显著增加。

[1277] 实施例34:比较在使用具有不同细胞穿透肽的复合物的接种疫苗后的免疫应答

[1278] 在该实验中,通过使用具有TLR激动剂“Anaxa”的复合物调查不同的CPP在根据本发明的复合物中的作用。因此,使用如上面描述的融合蛋白Z13Mad5Anaxa(参阅实施例7,SEQ ID NO:28)。

[1279] 此外,设计了进一步的融合蛋白,其包括结合至如在Lu等人,Multiepitope trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses J.Immunol.,172(2004),pp.4575-4582中描述的融合连接体的TAT CPP。该融合蛋白还包括蛋白质“MAD5”——其由来多种抗原的不同的CD8⁺和CD4⁺表位组成,和TLR4肽激动剂“Anaxa”。因此,下列构建体被另外地设计:

[1280] TatFMad5Anaxa

[1281] 序列:

[1282] RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHEINEAGRRVKRKVPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVDKARVKRSIINFEKLRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[1283] (SEQ ID NO:46)

[1284] C57BL/6小鼠被分配为三个不同的组(8只小鼠/组):接受2nmol的Z13Mad5Anaxa的一组,接受2nmol的TatFMad5Anaxa的一组和各自的对照。小鼠使用2nmol的Z13Mad5Anaxa或2nmol的TatFMad5Anaxa被s.c.接种疫苗两次(第0周和第2周)。小鼠在第2次接种疫苗后7天被抽血并且进行多聚体染色(8只小鼠/组)。

[1285] 结果显示在图52中。与对照组比较,使用Z13Mad5Anaxa或TatFMad5Anaxa接种疫苗的小鼠显示了多聚体-阳性细胞的增加的百分数。这些结果指示具有不同细胞穿透肽的根

据本发明的复合物能够在不同的剂量下引发免疫应答。然而,源自ZEBRA (Z13) 的CPP优于TAT CPP。

[1286] 实施例35:Z13Mad5Anaxa融合构建体与Z13Mad5和Anaxa比较在稚小鼠中更优越的功效

[1287] 接着,在稚小鼠中调查根据本发明的复合物的功效。即,Z13Mad5Anaxa (参阅实施例7;SEQ ID NO:28) 被施用至一组小鼠,而Z13Mad5 (SEQ ID NO:29) 和Anaxa (SEQ ID NO:15) 被施用(二者在一起)至另一组小鼠。

[1288] Z13Mad5Anaxa组和Z13Mad5+Anaxa组的C57BL/6小鼠通过s.c.注射2nmol的Z13Mad5Anaxa (第1组) 或2nmol的Z13Mad5和2nmol的Anaxa (第2组) 被接种疫苗一次(第0周)。在第14天,分析血液,由此SIINFEKL特异性CD8T细胞通过多聚体染色在血液中被定量(4-8只小鼠/组)。

[1289] 结果显示在图53中。与使用Z13Mad5和Anaxa单独接种疫苗的小鼠比较,在Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠的血液中观察到SIINFEKL特异性CD8T细胞的显著更高的百分数(图53)。

[1290] 总之,这些结果展现了Z13Mad5Anaxa疫苗(与单独施用的Z13Mad5和Anaxa比较)能够在外周中引发更强的SIINFEKL特异性CD8T细胞免疫应答。

[1291] 实施例36:另一种抗原货物在根据本发明的复合物中的作用

[1292] 为了调查进一步的不同抗原货物(“Mad12”)的作用,设计了包括细胞穿透肽、不同的抗原和TLR肽激动剂的另一种复合物(“Z13Mad12Anaxa”)。Z13Mad12Anaxa不同于抗原货物中的Z13Mad5Anaxa(在实施例7中描述的)。具体地,“Z13Mad12Anaxa”是包括细胞穿透肽“Z13”,抗原货物“MAD12”——其包括来自MC-38肿瘤细胞系的如由Yadav等人Nature.2014 Nov 27;515(7528):572-6鉴定的三种新抗原,和TLR肽激动剂“Anaxa”的融合蛋白。在下列中显示了Z13Mad12Anaxa的氨基酸序列:

[1293] KRYKNRVASRKSRACKQQLQHYREVAAKSSENDRLRLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

[1294] (SEQ ID NO:69)

[1295] 稚C57BL/6小鼠(4只小鼠/组)使用2nmol的Z13Mad12Anaxa被s.c.接种疫苗两次(第0周、第2周)。为了调查在接种疫苗后的CD8T细胞应答,在第2次接种疫苗后一周,分析血液,由此新抗原reps1特异性CD8T细胞通过多聚体染色在血液中被定量(4只小鼠/组)。

[1296] 结果显示在图54中。与稚小鼠比较,使用Z13Mad12Anaxa接种疫苗的小鼠显示了效应物新抗原特异性CD8T细胞的显著增加。

[1297] 实施例37:体外人树突细胞成熟

[1298] 该研究的目标是调查与缺少TLR肽激动剂的复合物(“Z13Mad5”,SEQ ID NO:29,参阅实施例1)比较,根据本发明使用的复合物(“Z13Mad5Anaxa”,SEQ ID NO:28,参阅实施例7)诱导树突细胞的成熟的能力。

[1299] 调查Z13Mad5Anaxa多肽和Z13Mad5多肽诱导人树突细胞(DC)成熟的能力。在使用300nM的蛋白质过夜培育后,通过FACS在人DC上评估活化标志物表达(CD86、CD80、CD83和HLA-DR)(图55)。每种蛋白质的相同的缓冲剂体积被用作阴性对照。

[1300] 结果显示在图55中。Z13Mad5Anaxa诱导通过CD86、HLADR和CD83的上调显示的人DC

的成熟,而Z13Mad5不能够活化人DC。这些结果指示蛋白质的Anaxa部分负责人DC上活化标志物的上调。

[1301] 实施例38:在重复接种疫苗的过程内的CD8 T细胞免疫应答

[1302] 为了研究一批效应T细胞是否可以在几个月内维持,进行重复接种疫苗。即,用2nmol的构建体Z13Mad5Anaxa (SEQ ID N0:28) 对C57BL/6小鼠皮下接种疫苗6次(第0、2、4、8、12、16周)。在每次接种疫苗后(和一些接种疫苗前)7天,对小鼠放血并进行五聚体染色以监测血液中的OVA特异性免疫应答(两组实验,每组4只小鼠)。在图56中,显示了Z13Mad5Anaxa接种疫苗的小鼠和对照小鼠的五聚体阳性CD8+T细胞的百分比。

[1303] 这些数据显示一批效应T细胞可以在六次接种疫苗的情况下在四个月(17周)内维持。

[1304] 实施例39:在鼠MC38结肠直肠癌模型中评估根据本发明的复合物

[1305] 为了评估鼠结肠直肠癌模型中根据本发明的复合物的作用,选择鼠MC38结肠直肠癌模型。MC38是结肠癌细胞系。

[1306] 雉C57BL/6小鼠在左胁中s.c.植入有 2×10^5 个MC38肿瘤细胞,并通过在右胁中皮下注射2nmol的构建体Z13Mad11Anaxa (参阅实施例32,SEQ ID N0:40) 接种疫苗两次(肿瘤植入前-d21&-d7)。“Mad11”抗原货物包含由鼠MC38结肠直肠癌表达的两种存活蛋白表位。

[1307] 结果在图57中示出。与稚小鼠相比,用Z13Mad11Anaxa接种疫苗的小鼠显示出显著更小的肿瘤体积(图57A)。此外,用Z13Mad11Anaxa接种疫苗的小鼠显示出显著更高的存活率(图57B)。

[1308] 获得的结果显示,与对照相比,Z13Mad11Anaxa能够显著减少和延迟肿瘤生长。此外,用Z13Mad11Anaxa接种疫苗的小鼠的存活率增加。

[1309] 实施例40:小鼠中的初步毒性研究

[1310] 为了评估根据本发明的复合物在小鼠中的毒性,以2nmol s.c.和i.v.在稚C57BL/6小鼠中注射Z13Mad5Anaxa (SEQ ID N0:28)。在施用后0.5、1.5和3小时进行血液取样。使用商业多重试剂盒(Luminex)检测和定量血液中的细胞因子,并在每个时间点取样4只小鼠。然而不能检测到任何促炎细胞因子的表达。应注意,将多重试剂盒与具有类似结果的经典ELISA进行比较(数据未显示)。

[1311] 接下来,将Z13Mad5Anaxa (SEQ ID N0:28) 的剂量增加至10nmol。然而,在s.c.施用后,再次检测不到细胞因子。与s.c.施用相比,i.v.施用后1.5小时观察到IL-6和TNF α 的短暂增加。然而,这种轻微的增加在3小时后消失(图58)。在小鼠中皮下注射10nmol的Z13Mad5Anaxa在处理后多至6小时没有诱导任何细胞因子释放(数据未显示)。

[1312] 实施例41:包括细胞穿透肽、不同抗原和TLR肽激动剂的复合物对T细胞归巢至MC-38肿瘤部位的作用

[1313] 为了评估包含细胞穿透肽、不同抗原和TLR肽激动剂的复合物对T细胞归巢至肿瘤部位的作用,在MC-38肿瘤模型中用细胞穿透肽、不同抗原和TLR肽激动剂对小鼠接种疫苗。在第27天,对小鼠实施安乐死并进行FACS染色以监测TIL(肿瘤浸润淋巴细胞)中的新抗原特异性免疫应答。

[1314] 将C57BL/6小鼠(每组4只小鼠,雌性,7周龄)在左胁(第0天)s.c.植入 2×10^5 个MC-38肿瘤细胞。在肿瘤植入后,在第3天、第10天和第17天在尾巴基部用2nmol的

Z13Mad12Anaxa(参阅实施例36;SEQ ID NO:69)对组“Z13Mad12Anaxa”的小鼠接种疫苗。

[1315] 如图59、60和61所示,新抗原特异性T细胞在接种疫苗的小鼠的肿瘤部位积聚。在利用Z13Mad12Anaxa接种疫苗的小鼠中,多聚体阳性细胞的百分比显著增加。在对照小鼠中发现最低百分比的多聚体阳性细胞。

[1316] 实施例42:通过人构建体的人树突细胞活化

[1317] 该研究的目的是研究根据本发明的包含不同人抗原货物的不同复合物诱导人树突细胞的成熟的能力。为此,测试构建体ATP110(SEQ ID NO:72)、ATP112(SEQ ID NO:74)、ATP115(SEQ ID NO:77)、ATP117(SEQ ID NO:79)、ATP118(SEQ ID NO:80)、ATP119(SEQ ID NO:81)、ATP120(SEQ ID NO:82)、ATP122(SEQ ID NO:84)、ATP123(SEQ ID NO:85)和ATP125(SEQ ID NO:87)的每种。用于评估DC活化的生物指标是活化指数,其指示基于四种膜抗原:HLA-DR、CD80、CD83和CD86的表达强度的活化百分比。

[1318] 在利用300nM或600nM的上述构建体(ATP110(SEQ ID NO:72)、ATP112(SEQ ID NO:74)、ATP115(SEQ ID NO:77)、ATP117(SEQ ID NO:79)、ATP118(SEQ ID NO:80)、ATP119(SEQ ID NO:81)、ATP120(SEQ ID NO:82)、ATP122(SEQ ID NO:84)、ATP123(SEQ ID NO:85)和ATP125(SEQ ID NO:87))的每种过夜培育之后,通过FACS对人树突细胞评估活化标志物表达(CD86、CD80、CD83和HLA-DR)(图62-71)。相同缓冲剂体积的每种构建体被用作阴性对照。

[1319] 结果在图62-71中示出,其中所有测试的构建体显示了通过CD86、HLADR和CD83的上调显示的树突细胞成熟。

[1320] 实施例43:PD1抑制剂和包括细胞穿透肽、不同抗原和TLR肽激动剂的复合物的组合对结肠癌模型中肿瘤生长和存活率的作用

[1321] 为了评估PD1抑制剂和包括细胞穿透肽、不同抗原和TLR肽激动剂的复合物的组合在治疗结肠直肠癌中的作用,使用MC-38肿瘤模型。MC-38是结肠癌细胞系。

[1322] 为此,将C57BL/6小鼠(每组13至14只小鼠,雌性,7周龄)在左胁中(第0天)s.c.植入有 2×10^5 个MC38肿瘤细胞。在肿瘤植入后,在第3、10和17天用2nmol的Z13Mad12Anaxa(参阅实施例36;SEQ ID NO:69)在尾巴基部处对组“Z13Mad12Anaxa”和“Z13Mad12Anaxa+抗-PD1”的小鼠皮下接种疫苗。在第6、10、13、17、20、24和27天的每一个时,将200 μ g抗-PD1抗体RMP1-14(BioXcell,West Lebanon,NH,USA)i.p.施用至组“抗-PD1”和“Z13Mad12Anaxa+抗-PD1”的小鼠。在第10天和第17天,当施用Z13Mad12Anaxa和抗体二者时,就在s.c.施用Z13Mad12Anaxa之后i.p.施用抗体。用卡尺测量肿瘤大小。

[1323] 如图72和73所示,与对照组相比,单独用PD1抑制剂或单独用Z13Mad12Anaxa治疗导致肿瘤体积显著减少(图72A)和存活增加(图72B)。然而,PD1抑制剂和Z13Mad12Anaxa两者的组合导致最显著的改善,即肿瘤体积大大减少和存活率大大增加。值得注意的是,在“Z13Mad12Anaxa+aPD1”组中,只有三只小鼠发生肿瘤(而10只小鼠保持无肿瘤),而在“aPD1”组和“Z13Mad12Anaxa”组中,分别有8只和10只小鼠发生肿瘤。在对照组中,所有小鼠都发生肿瘤。这些数据表明,抗PD1疗法和Z13Mad12Anaxa接种疫苗二者的组合比单独的抗-PD1疗法或单独的Z13Mad12Anaxa接种疫苗更有效。

[1324] 如图73所示,“Z13Mad12Anaxa+aPD1”组中无肿瘤小鼠的数量(13只小鼠中的10只小鼠)大于“aPD1”组中无肿瘤小鼠数量(14只小鼠中的6只小鼠)和“Z13Mad12Anaxa”组中无肿瘤小鼠数量(13只小鼠中的3只小鼠)的总和。因此,这些结果表明抗-PD1疗法和Z13Mad12Anaxa

接种疫苗的协同效应。

[1325] 实施例44:在利用ATP128接种疫苗后在小鼠中引发的免疫应答

[1326] 设计了另一种人构建体ATP128 (SEQ ID NO:89) ,其包含细胞穿透肽、三种抗原(存活蛋白、CEA和ASCL2)的表位和TLR肽激动剂。具体地,“ATP128” (SEQ ID NO:89) 是包含细胞穿透肽“Z13” (SEQ ID NO:6) ,抗原存活蛋白、CEA和ASCL2的表位,以及TLR肽激动剂“Anax” (即,根据SEQ ID NO:71的TLR肽激动剂) 的序列变体的融合蛋白。在下文中,显示了ATP128的氨基酸序列:

[1327] KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVRNDARAYVSGIQNSVSA
NRSDPVTLVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIV
KSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAVKKQFEELTGEFLKLDRERA
NRVKLVNLGFQALRQHVPHGGASKLKVETLSAVEYIRALQRLLA
EHDARVNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAERELLD
FSSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF
DAE

[1328] (SEQ ID NO:89)

[1329] 通过皮下注射4nmol的ATP128 (SEQ ID NO:89) 对稚C57BL/6小鼠(每组5只小鼠,雌性,7周龄)接种疫苗。对照小鼠接受媒介(疫苗缓冲剂)。处理7天后,对小鼠放血,并对用负载有ATP128的小鼠树突细胞刺激的血细胞进行离体Elispot测定,以定量产生IFN- γ 的疫苗特异性T细胞。

[1330] 结果在图74中示出。与稚小鼠相比,利用ATP128接种疫苗的小鼠显示了更高的ATP128特异性免疫应答。

[1331] 获得的结果显示ATP128对于引发小鼠中的免疫应答是有效的。

[1332] 实施例45:通过ATP128构建体的人树突细胞活化

[1333] 该研究的目的是研究包含人抗原货物的ATP128 (SEQ ID NO:89) 诱导人树突细胞(人DC)的成熟的能力。为此,测试了ATP128 (SEQ ID NO:89)。用于评估DC活化的生物指标是活化指数(图75),其指示基于四种膜抗原:HLA-DR、CD80、CD83和CD86的表达强度的活化百分比。

[1334] 在用300nM的ATP128 (SEQ ID NO:89) 培育过夜后,通过FACS评估人树突细胞的活化标志物表达(CD86、CD80、CD83和HLA-DR)(图75)。相同的缓冲剂体积用作阴性对照,而MPLA用作阳性对照。

[1335] 结果在图75中示出。结果表明ATP128可以强力地活化人DC。

[1336] 实施例46:通过ATP128构建体的人树突细胞活化

[1337] 为了证实人细胞能够加工和呈递ATP128 (SEQ ID NO:89) 中包含的表位肽,将来自2个不同供体(称为供体“9”和“10”)的人树突细胞(人DC)过夜加载ATP128并加工用于HLA I类和II类/呈递的肽纯化,肽洗脱和通过质谱表征。简言之,通过使用HLA特异性抗体的免疫沉淀、酸处理和超滤获得来自休克冷冻的人DC样品的肽库。通过反相色谱法根据它们的疏水性分离HLA肽库,并在质谱仪(Thermo Fisher Scientific)中分析洗脱肽。然后通过分析未碎裂肽的质量信号以及含有肽序列信息的片段光谱来收集和自动处理数据。基于对由混洗(shuffled)目标数据库组成的诱饵数据库的处理通过Percolator算法确定假发现率(FDR) (KällL, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. Nat

Methods 4(11):923-925)。对于HLA I类,肽长度限制为8-12aa长度。对于HLA II类,肽被限制为12-25aa长度。HLA注释使用SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) 进行。

[1338] 数据显示负载有ATP128的人DC能够加工和呈递源自多抗原结构域的I类和II类表位肽二者(图76)。源自所有抗原的肽在I类库中鉴定。从疫苗的所有抗原部分鉴定出更高数量的II类结合肽。

[1339] 序列和SEQ ID编号的表格(序列表)：

[1340]

SEQ ID NO	序列	备注
SEQ ID NO:1	RQIKIYFQNRRMKWKK	CPP: 穿膜肽
SEQ ID NO:2	YGRKKRRQRRR	CPP : TAT 最小
SEQ ID NO:3	MMDPNSTEDVKFTPDPYQVPFVQAFDQATRVYQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPEPLPQGQLTA YHVSTAPTAGWFSAPQPAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQNQQTNQAGGEAPQPGDNSTVQTAA AVVFACPGANQGQQQLADIGVPQPAPVAAPARRTRKPQQPESLEECDSELEIKRYKNRVASRKCR AKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKQM CPSLDVDSIIPRTPDVLHEDLLNF	ZEBRA氨基酸序列(来自爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)的天然序列)(YP_401673)
SEQ ID NO:4	KRYKNRVASRKCRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKQMC	CPP1(Z11)
SEQ ID NO:5	KRYKNRVASRKCRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLK	CPP2(Z12)
SEQ ID NO:6	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLK	CPP3(Z13)
SEQ ID NO:7	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLK	CPP4(Z14)
SEQ ID NO:8	KRYKNRVASRKSRAFK	CPP5(Z15)
SEQ ID NO:9	QHYREVAAKSSENDRLRLLLK	CPP6(Z16)
SEQ ID NO:10	QLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLK	CPP7(Z17)
SEQ ID NO:11	REVAAKSSENDRLRLLLK	CPP8(Z18)
SEQ ID NO:12	KRYKNRVA	CPP9(Z19)
SEQ ID NO:13	VASRKSRACK	CPP10(Z20)
SEQ ID NO:14	ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVG ALKVPRNQDWLGVPRAFKFASFEAQG ALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTE	MAD5货物
SEQ ID NO:15	STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFD AE	TLR2肽激动剂Anaxxa
SEQ ID NO:16	DDDK	肠激酶靶位点
SEQ ID NO:17	IEDGR	因子Xa靶位点
SEQ ID NO:18	LVPRGS	凝血酶靶位点
SEQ ID NO:19	ENLYFQG	蛋白酶TEV靶位点
SEQ ID NO:20	LEVLFQGP	PreScission 蛋白酶靶位点
SEQ ID NO:21	RX(R/K)R	弗林蛋白酶靶位点
SEQ ID NO:22	GGGGG	肽连接体
SEQ ID NO:23	GGGG	肽连接体
SEQ ID NO:24	EQLE	肽连接体
SEQ ID NO:25	TEWT	肽连接体

[1341]

SEQ ID NO:26	MHHHHHHHNIDRPKGGLAFTDVVDVDSIKI AWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIRELFP APDGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVAL HDDMESQPLIGIQSTKRYKNRVAZRKSR AKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRL LKESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVG VGALKVPRNQDWLGVPRFAKFASFEAQ GALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTE WTGS	EDAZ13Mad5
SEQ ID NO:27	MHHHHHHSTVHEILCKLSLEGDHSTPPS AYGSVKPYTNFDAEKRYKNRVAZRKSR AKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRL LKESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVG GALKVPRNQDWLGVPRFAKFASFEAQ GALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTEW TGS	AnaxaZ13Mad5
SEQ ID NO:28	MHHHHHHKRYKNRVAZRKSRAFKQL LQHYREVAAKSSENDRLRLLLKESLKI SQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVP RNQDWLGVPRFAKFASFEAQGALANIA VDKANLDVEQLESIINFEKLTEWTGSST VHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN	Z13Mad5Anaxa
SEQ ID NO:29	MHHHHHHKRYKNRVAZRKSRAFKQL QHYREVAAKSSENDRLRLLLKESLKI SQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVP NQDWLGVPRFAKFASFEAQGALANIAVD KANLDVEQLESIINFEKLTEWTGS	Z13Mad5
SEQ ID NO:30	MHHHHHHESLKISQAVHAAHAEINEAGRE VVGVGALKVPRNQDWLGVPRFAKFASFEA QGALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTE WTGS	Mad5
SEQ ID NO:31	MHHHHHHHNIDRPKGGLAFTDVVDVDSIKI AWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIRELFP APDGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVAL HDDMESQPLIGIQSTESLKISQAVHAAH AEINEAGREVVGVGALKVPRNQDWLGV PRFAKFASFEAQGALANIAVDKANLDV EQLESIINFEKLTEWTGS	EdaMad5
SEQ ID NO: 32	MHHHHHHESLKISQAVHAAHAEINEAG REVVGVGALKVPRNQDWLGVPRFAKF ASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESII NFEKLTEWTGSSTVHEILCKLSLEGDHS TPPSAYGSVKPYTNFDAE	Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 33	MHHHHHHKRYKNRVAZRKSRAFKQL LQHYREVAAKESLKISQAVHAAHAEI NEAGREVVGVGALKVPRNQDWLGV PRFAKFASFEAQGALANIAVDKANLDVE QLESIINFEKLTEWTGSSTVHEILCKLSL EGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z14 Mad5Anaxa

[1342]

SEQ ID NO: 34	MHHHHHHREVAAKSSENDRLRLLLK ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVG ALKVPRNQDWLGVPRFAKFASFEAQGA LANIAVDKANLDVEQLESIINFEKTEW TGSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSV KPYTNFDAE	Z18 Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 35	SIINFEKL	SIINFEKL OVACD8
SEQ ID NO: 36	ISQAVHAAHAEINEAGR	OVACD4肽
SEQ ID NO: 37	MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKI AWESPQQVSRVYRVTYSSPEDGIRELFP APDGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVAL HDDMESQPLIGIQSTKRYKNRVAZRKS AKFKQLLQHYREVAAKESLKISQAVH AAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQD WLGVPRAKFASFEAQGALANIAVDKA NLDVEQLESIINFEKTEWTGS	EDAZ14Mad5
SEQ ID NO: 38	MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKI AWESPQQVSRVYRVTYSSPEDGIRELFP APDGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVAL HDDMESQPLIGIQSTREVAAKSSENDR LRLLLKESLKISQAVHAAHAEINEAGRE VVGVGALKVPRNQDWLGVPRFAKFAS FEAQGALANIAVDKANLDVEQLESIINF	EDAZ18Mad5
SEQ ID NO: 39	KRYKNRVAZRKSRAFKQLLQHYREVA AAKSSENDRLRLLLKVTYHSPSYAYHQ FERRAILNRLVQFIKDRISVVQALVLTST VHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYT	Z13Mad8Anaxa
SEQ ID NO: 40	KRYKNRVAZRKSRAFKQLLQHYREVA AAKSSENDRLRLLLKNYRIATFKNWPFL EDCAMEELTVSEFLKLDQRSTVHEILC KLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad11Anaxa
SEQ ID NO: 41	KRYKNRVAZRKSRAFKQLLQHYREVAAKS SENDRLRLLLKHLELASMTNMELMSSIVSTVH EILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad9Anaxa
SEQ ID NO: 42	HLELASMTNMELMSSIV	Mad9
SEQ ID NO: 43	VTYHSPSYAYHQFERRAILN	Mad8
SEQ ID NO: 44	NYRIATFKNWPFL	EDCAMEELTVSEFLK
SEQ ID NO: 45	NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQQVSRV RVTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLRPG SEYTVSVALHDDMESQPLIGIQST	EDAZ
SEQ ID NO: 46	RKKRRQRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRRV KRKVPRNQDWLRLVKRASFEAQGALANIAVDK ARVKRSIINFEKLRVKRSTVHEILCKLSLEGDH STPPSAYGSVKPYTNFDAE	TatFMad5Anaxa

SEQ ID NO: 47	MAPPQVLAFGLLAAATATFAAAQEECVCENY KLAVNCVNNNRQCQCTSVGAQNTVICKLA AKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNNDG LYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGV RRTDKDTEITCSERVERTYWIIIELKHKAREKPY DSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVI TIDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKG SLFHSKKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEK APEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVI SRKKRMAKYEKAIEKEMGEMHRELNA	EpCAM
SEQ ID NO: 48	GLKAGVIAV	EpCAM 表位
SEQ ID NO: 49	MTPGTQSPFFLLLLTVLTVTGSHASSTPGG EKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSVLSHSP GSGSSTTQGQDVTLAPATEPASGSAATWGQDV TSVPVTRPALGSTTPAHDVTSAPDNKPAPGST APPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA RPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAH VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGS TAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA TRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAH GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPG STAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA DTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRP APGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTA PPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTR PAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHG VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGS TAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA TRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAH GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPG STAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA DTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDNRPALGSTAPPV HNVTSASGSASGSASTLVHNGTSARATTPAS KSTPFSIPSHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSS VPPLTSSNHSTSPQLSTGVSSFFLSFHISNLQFN SSLEDPSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLG LSNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDVETQF NQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPPFSAQSGA GVPGWGIALLVLVCVLVALAIVYLIALAVCQC RRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRY VPPSSTDRLSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAAT SANL	MUC-1
SEQ ID NO: 50	GSTAPPVHN	MUC-1表位
SEQ ID NO: 51	TAPPAHGVT	MUC-1表位

[1343]

	SEQ ID NO: 52	MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCA CTPERMAEAGFIHCPTENEFDLAQCFCFKELE GWEPDDDPIEEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELT LGEFLKLDRERAKNKIAKETNNKKFEETAK KVRRAIEQLAAMD	存活蛋白
	SEQ ID NO: 53	RISTFKNWPF	存活蛋白表位
[1344]	SEQ ID NO: 54	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTLASLLTFWNPP AKLTIESPTFNVAEKGKEVLLLHVNL WYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGR EIIYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNE EATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAF TCEPETQDATYLWWVNNQLPVSPRLQLSNG NRTLTLFNVTRNDTASYK CETQNPVSARRSDS VILNVLYGPDADTISPLNTSYRSGENLNLSC ASNPPAQYSWFVN GSYTCQAHNSDTGLNRTT TSNNNSNPVEDEDAVALTCEPEI NQSLPVSPRLQLSNDNRTL ECGIQNKL TYYRPGVNL QHTQELFISNITE TVKTITV CEPEAQNT RTLTLFNVTR TLDVLYGP NPSPQY YACFVS GATVGIMI YLSGANLN SWRINGIP SEQ ID NO: 55	CEA
	SEQ ID NO: 55	YLSGANLNLS	CEA表位
	SEQ ID NO: 56	SWRINGIPQQ	CEA表位
	SEQ ID NO: 57	MTEYKLVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDE YDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILD SAMRDQYMTGEGFLCVFAINNTKS REQIKRVD QAQDLAR EIRQYRL VVVGAGGVG	Kirsten Ras
	SEQ ID NO: 58	MPLEQR TEEQE QGASSL FPDLE VTKA FGIEL MPKAG VFE PGSDP SEQ ID NO: 59	Kirsten Ras表位
	SEQ ID NO: 59	MPLEQR TEEQE QGASSL FPDLE VTKA FGIEL MPKAG VFE PGSDP YPLHEW KVAELV KVAELVHFL	MAGE-A3
	SEQ ID NO: 60		MAGE-A3表位

[1345]	SEQ ID NO: 61	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEIKVNP PQDFEIVDPGYLGYLYLQWQPPLSLDHFKECT VEYELKYRNIGSETWKTIITKNLHYKDGFDLN KGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWI SPQGIPETKVQDMDCVYYNWQYLLCSWKGPI GVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIKAD GQNIGCRFPYLEASDYKDFYICVNGSSENKPIR SSYFTFQLQNIVKPLPPVYLTFTRESSCEIKLK SIPLGPIPARCFDYIEIREDDTTLVTATVENETY TLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEW SDKQCWEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFV TGLLLRKPNTYPKMIPEFFCDT	IL13R α 2
	SEQ ID NO: 62	LPFGFIL	IL13R α 2表位
	SEQ ID NO: 63	LFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMS SIVVISASIVFNLLLEG	Mad12
	SEQ ID NO: 64	LVQFIKDRISVVQA	gp70CD4肽
	SEQ ID NO: 65	SPSYVYHQF	gp70CD8肽
	SEQ ID NO: 66	ASMTNMELM	adpgk肽
	SEQ ID NO: 67	ATKNWPFL	存活蛋白20-28
	SEQ ID NO: 68	TVSEFLKL	存活蛋白97-104
	SEQ ID NO: 69	KRYKNRVASRKSRACKQLQHYREVAAKS SENDRLRLLLKLFRRAAQLANDVVLQIMEHLEL ASMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLLEGSTVH EILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad12Anaxa

SEQ ID NO: 70 [1346]	MELAALCRWGLLALLPPGAASTQVCTGTD KLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVQGNLELT YLPTNASLSFLQDIQEVEQGYVIAHNQVRQVP LQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNNT PTVGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQ LCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLDTNRSRAC HPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRVCAGG CARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLA CLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEG RYTFCASCVTACPYNYLSTDVGSCALVCPLHN QEVTAEDEGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHL REVRAVTSANIQEAGCKKIFGSLAFLPESFDG DPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWP DSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLG ISWLGLRSLRELGSGLALIHNTLHFVHTVP WDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACH QLCARGHCWGPQPTQCVNCQFLRGQECVEE CRVLQGLPREYVNAHCLPCHPECQPQNGSVT CFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPGVKPD LSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCHSCVDLDD KGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGI LIKRRQQKIRKYTMRLLQETELVEPLTPSGA MPNQAQMRLKETELRKVKVLGSGAFGTVYK GIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANEILD EAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLTQLM PYGCLLDHVRENRRGRLGSQDLLNWCMQIAKG MSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITD FGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESIL RRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGI PAREIPDLLEKGERLPQPPICIDVYMIMVKCW MIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNE DLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEYLY VPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSG GGDLTLGLEPSEEAPRSP LAPSEGAGSDVFDG DLGMGAAKGLQSLPTHDPSPQRYSEDPTVPL PSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRQPPSPR EGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVF AFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAPFSPA NLYYWDQDPPERGAPPSTFKGPTAENPEYLG LDVPV	Her2/neu
SEQ ID NO: 71	STVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFD AE	TLR肽激动剂“Anaxax”序列变体
SEQ ID NO: 72	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAKS SENDRLRLLKAPPQVLAFLGLLAAATAYVDE KAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLE GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	ATP110

[1347]

SEQ ID NO: 73	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATV GIMIGVLGVVALIDGDPKLLTQHFVQENYLE YRQVPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVAL SRKVAELVHFLLKYRAREPVTKAEMLGSVV APPQVLAFLAATAYVDEKAPEFSMQGLK AGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYG SVKPYTNFDAE	ATP111
SEQ ID NO: 74	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSLGDPK KLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWG PRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLKYRA REPVTKAEMLGSVVAPPQVLAFLAATAY VDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCK LSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	ATP112
SEQ ID NO: 75	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSLGDPK KLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWG PRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLKYRA REPVTKAEMLGSVVAPPQVLAFLAATAY VDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAPPA HGVTsapdtrpapgstappaahgvtsapdrpal GSTAPPVHNVTSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPS AYGSVKPYTNFDAE	ATP113
SEQ ID NO: 76	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPTLPP AWQPFLKDRERAPPQVLAFLAATAYVD EKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAPPAHG VTSAPDTRPAPGSTAPPAAHGVTsapdrpalgs TAPPVHNVTSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAY GSVKPYTNFDAE	ATP114
SEQ ID NO: 77	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSEYKLV VVGAVGVGKSALTAPPQVLAFLAATAYV DEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAPPAH GVTsapdtrpapgstappaahgvtsapdrpalg STAPPVHNVTSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAE	ATP115

[1348]

SEQ ID NO: 78	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPTLPP AWQPFLKDHRISTFKNWPFLLEGSAVKKQFEEL TLGEFLKLDRERAPPQVLAFLGLAAATAYVD EKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVLGDPKKLLTQH FVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWGPRALVE TSYVKVALSRKVAELVHFLLKYRAREPVTK AEMLGSVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGS VKPYTNFdae	ATP116
SEQ ID NO: 79	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPPQV LAFLGLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIA VIVVAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTsapDRPALGSTAPPVHNVTSSTVHEILC KLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFdae	ATP117
SEQ ID NO: 80	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPPQV LAFLGLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIA VIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPY TNFdae	ATP118
SEQ ID NO: 81	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKLDGPKLLTQHFVQENYLEYR QVPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSR KVAELVHFLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAP TLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLLEGSAVKKQ FEELTLGEFLKLDRERAPGSTAPPAHGVTSAPD TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPALGSTAPPVH NVTSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPY TNFdae	ATP119
SEQ ID NO: 82	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ NSVSANRSDPVTPDSSYLSGANNLSSHSASP QYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSSTVHEI LCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFdae	ATP120
SEQ ID NO: 83	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSS HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNNSIVKSITVSASGTSPGLS AGATVGIMIGVLVGVVALIAPGSTAPPAHGVTS APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPALGSTAP PVHNVTSAPPQVLAFLGLAAATALIYYVDEK APEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEG DHSTPPSAYGSVKPYTNFdae	ATP121

SEQ ID NO: 84	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAKS SENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANLNLS HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS AAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHG VTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLAFL GLLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVI VVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN FDAE	ATP122
SEQ ID NO: 85	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAKS SENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANLNLS HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS AAPGSTAPPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAHG VTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLAFL GLLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVI VVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN FDAE	ATP123
SEQ ID NO: 86	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAKS SENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANLNLS HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS AAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGS AVKKQFEELTLGEFLKLDRERAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDRPALSTA PPVHNVTSAAPPQVLAFLGLLLAAATALIYYVDE KAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLE GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	ATP124
SEQ ID NO: 87	KRYKNRVASRKSRAFKQLLQHYREVAAKS SENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANLNLS HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS AAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGS AVKKQFEELTLGEFLKLDRERAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAAPDRPALSTA PPVHNVTSAAPPQVLAFLGLLLAAATALIYYVDE KAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILSKLSLE GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	ATP125

[1349]

[1350]

SEQ ID NO: 88	KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKNRTLTFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSC HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS AAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAV KKQFEELTLGEFLKLDRERAPPQVLAFLLLA AATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVA AVARRNERERNRVKLVLNLGFQALRQHVPHGG ASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVR NALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAEREL LDFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAY GSVKPYTNFDAE	ATP127
SEQ ID NO: 89	KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKNRTLTFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSC HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS AAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAV KKQFEELTLGEFLKLDRERAAVARRNERERNR VKLVLNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAERELLDFFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	ATP128
SEQ ID NO: 90	KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKNRTLTFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSC HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS AAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAV KKQFEELTLGEFLKLDRERAKNKIAAVARRNERERNRVKLVLNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAERELLDFFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	ATP129
SEQ ID NO: 91	KRYKNRVARSKSRAFKQLLQHYREVAAAKS SENDRLRLLLKNRTLTFNVTRNDARAYVSGI QNSVSANRSDPVTLVLPDSSYLSGANNLSC HSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNG TYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS AAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSAV KKQFEELTLGEFLKLDRERAKNKIAAVARRNERERNRVKLVLNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTPVAASPSRASSSPRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGSEGALSPAERELLDFFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	ATP130

[1351]

SEQ ID NO: 92	MDGGTLPRSAPPAPPVGCAARRPASPELL RCSRRRRPATAETGGAAAVARRNERERNRK LVNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSA VEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRP SAPRGPPGTTPVAASPSRASSSPRGGSSEPGSP RSAYSSDDSGCEGALSPAERELLDFFSSWLGGY	ASCL2
SEQ ID NO: 93	SAVEYIRALQ	ASCL2表位
SEQ ID NO: 94	ERELLDFFSSW	ASCL2表位
SEQ ID NO: 95	APTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSALK KQFEELTLGEFLKLDRER	存活蛋白片段
SEQ ID NO: 96	NRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSANRSDP VTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRI NGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLAT GRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSA	CEA片段
SEQ ID NO: 97	AAVARRNERERNRVKLVLGFQALRQHVPHG GASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAV RNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAERE LLDFSSWLGGY	ASCL2片段
SEQ ID NO: 98	NRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSANRSDP VTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRI NGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLAT GRNNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQP FLKDHRISTFKNWPFLEGSAVKKQFEELTLGEF LKLDRERAAVARRNERERNRVKLVLGFQAL RQHVPHGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRL LAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGAL SPAERELLDFFSSWLGGY	ATP128的抗原货物

- [0001] 序列表
[0002] <110> 阿尔勒治疗公司,瑞士,日内瓦
[0003] <120> 包括细胞穿透肽、多表位和TLR肽激动剂的用于治疗癌症的融合物
[0004] <130> AM05P013W0
[0005] <150> PCT/EP2016/072475
[0006] <151> 2016-09-21
[0007] <160> 98
[0008] <170> PatentIn版本3.5
[0009] <210> 1
[0010] <211> 16
[0011] <212> PRT
[0012] <213> 人工序列
[0013] <220>
[0014] <223> CPP: 穿膜肽
[0015] <400> 1
[0016] Arg Gln Ile Lys Ile Tyr Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
[0017] 1 5 10 15
[0018] <210> 2
[0019] <211> 11
[0020] <212> PRT
[0021] <213> 人工序列
[0022] <220>
[0023] <223> CPP: TAT 最小结构域
[0024] <400> 2
[0025] Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
[0026] 1 5 10
[0027] <210> 3
[0028] <211> 245
[0029] <212> PRT
[0030] <213> 人工序列
[0031] <220>
[0032] <223> ZEBRA氨基酸序列(来自爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)的天然序列) (YP_401673)
[0033] <400> 3
[0034] Met Met Asp Pro Asn Ser Thr Ser Glu Asp Val Lys Phe Thr Pro Asp
[0035] 1 5 10 15
[0036] Pro Tyr Gln Val Pro Phe Val Gln Ala Phe Asp Gln Ala Thr Arg Val
[0037] 20 25 30

[0038]	Tyr Gln Asp Leu Gly Gly Pro Ser Gln Ala Pro Leu Pro Cys Val Leu			
[0039]	35	40	45	
[0040]	Trp Pro Val Leu Pro Glu Pro Leu Pro Gln Gly Gln Leu Thr Ala Tyr			
[0041]	50	55	60	
[0042]	His Val Ser Thr Ala Pro Thr Gly Ser Trp Phe Ser Ala Pro Gln Pro			
[0043]	65	70	75	80
[0044]	Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Phe Pro			
[0045]	85	90	95	
[0046]	Val Ser Asp Ile Thr Gln Asn Gln Gln Thr Asn Gln Ala Gly Gly Glu			
[0047]	100	105	110	
[0048]	Ala Pro Gln Pro Gly Asp Asn Ser Thr Val Gln Thr Ala Ala Ala Val			
[0049]	115	120	125	
[0050]	Val Phe Ala Cys Pro Gly Ala Asn Gln Gly Gln Gln Leu Ala Asp Ile			
[0051]	130	135	140	
[0052]	Gly Val Pro Gln Pro Ala Pro Val Ala Ala Pro Ala Arg Arg Thr Arg			
[0053]	145	150	155	160
[0054]	Lys Pro Gln Gln Pro Glu Ser Leu Glu Glu Cys Asp Ser Glu Leu Glu			
[0055]	165	170	175	
[0056]	Ile Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Cys Arg Ala Lys			
[0057]	180	185	190	
[0058]	Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Lys Ser			
[0059]	195	200	205	
[0060]	Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Gln Met Cys Pro Ser			
[0061]	210	215	220	
[0062]	Leu Asp Val Asp Ser Ile Ile Pro Arg Thr Pro Asp Val Leu His Glu			
[0063]	225	230	235	240
[0064]	Asp Leu Leu Asn Phe			
[0065]	245			
[0066]	<210> 4			
[0067]	<211> 45			
[0068]	<212> PRT			
[0069]	<213> 人工序列			
[0070]	<220>			
[0071]	<223> CPP1 (Z11)			
[0072]	<400> 4			
[0073]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Cys Arg Ala Lys Phe			
[0074]	1	5	10	15
[0075]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Lys Ser Ser			
[0076]	20	25	30	

[0077]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Gln Met Cys			
[0078]	35	40	45	
[0079]	<210> 5			
[0080]	<211> 42			
[0081]	<212> PRT			
[0082]	<213> 人工序列			
[0083]	<220>			
[0084]	<223> CPP2 (Z12)			
[0085]	<400> 5			
[0086]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Cys Arg Ala Lys Phe			
[0087]	1 5 10 15			
[0088]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[0089]	20 25 30			
[0090]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys			
[0091]	35 40			
[0092]	<210> 6			
[0093]	<211> 42			
[0094]	<212> PRT			
[0095]	<213> 人工序列			
[0096]	<220>			
[0097]	<223> CPP3 (Z13)			
[0098]	<400> 6			
[0099]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[0100]	1 5 10 15			
[0101]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[0102]	20 25 30			
[0103]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys			
[0104]	35 40			
[0105]	<210> 7			
[0106]	<211> 30			
[0107]	<212> PRT			
[0108]	<213> 人工序列			
[0109]	<220>			
[0110]	<223> CPP4 (Z14)			
[0111]	<400> 7			
[0112]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[0113]	1 5 10 15			
[0114]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys			
[0115]	20 25 30			

- [0116] <210> 8
[0117] <211> 17
[0118] <212> PRT
[0119] <213> 人工序列
[0120] <220>
[0121] <223> CPP5 (Z15)
[0122] <400> 8
[0123] Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe
[0124] 1 5 10 15
[0125] Lys
[0126] <210> 9
[0127] <211> 15
[0128] <212> PRT
[0129] <213> 人工序列
[0130] <220>
[0131] <223> CPP6 (Z16)
[0132] <400> 9
[0133] Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp
[0134] 1 5 10 15
[0135] <210> 10
[0136] <211> 13
[0137] <212> PRT
[0138] <213> 人工序列
[0139] <220>
[0140] <223> CPP7 (Z17)
[0141] <400> 10
[0142] Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys
[0143] 1 5 10
[0144] <210> 11
[0145] <211> 19
[0146] <212> PRT
[0147] <213> 人工序列
[0148] <220>
[0149] <223> CPP8 (Z18)
[0150] <400> 11
[0151] Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu
[0152] 1 5 10 15
[0153] Leu Leu Lys
[0154] <210> 12

- [0155] <211> 8
[0156] <212> PRT
[0157] <213> 人工序列
[0158] <220>
[0159] <223> CPP9 (Z19)
[0160] <400> 12
[0161] Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala
[0162] 1 5
[0163] <210> 13
[0164] <211> 11
[0165] <212> PRT
[0166] <213> 人工序列
[0167] <220>
[0168] <223> CPP10 (Z20)
[0169] <400> 13
[0170] Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe Lys
[0171] 1 5 10
[0172] <210> 14
[0173] <211> 85
[0174] <212> PRT
[0175] <213> 人工序列
[0176] <220>
[0177] <223> MAD5货物
[0178] <400> 14
[0179] Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile
[0180] 1 5 10 15
[0181] Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Val Gly Ala Leu Lys Val Pro
[0182] 20 25 30
[0183] Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro Arg Phe Ala Lys Phe Ala Ser
[0184] 35 40 45
[0185] Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala Asn
[0186] 50 55 60
[0187] Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr
[0188] 65 70 75 80
[0189] Glu Trp Thr Gly Ser
[0190] 85
[0191] <210> 15
[0192] <211> 35
[0193] <212> PRT

- [0194] <213> 人工序列
- [0195] <220>
- [0196] <223> TLR2肽激动剂Anaxa
- [0197] <400> 15
- [0198] Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His
- [0199] 1 5 10 15
- [0200] Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe
- [0201] 20 25 30
- [0202] Asp Ala Glu
- [0203] 35
- [0204] <210> 16
- [0205] <211> 4
- [0206] <212> PRT
- [0207] <213> 人工序列
- [0208] <220>
- [0209] <223> 肠激酶位点
- [0210] <400> 16
- [0211] Asp Asp Asp Lys
- [0212] 1
- [0213] <210> 17
- [0214] <211> 5
- [0215] <212> PRT
- [0216] <213> 人工序列
- [0217] <220>
- [0218] <223> 因子Xa靶位点
- [0219] <400> 17
- [0220] Ile Glu Asp Gly Arg
- [0221] 1 5
- [0222] <210> 18
- [0223] <211> 6
- [0224] <212> PRT
- [0225] <213> 人工序列
- [0226] <220>
- [0227] <223> 凝血酶靶位点
- [0228] <400> 18
- [0229] Leu Val Pro Arg Gly Ser
- [0230] 1 5
- [0231] <210> 19
- [0232] <211> 7

- [0233] <212> PRT
[0234] <213> 人工序列
[0235] <220>
[0236] <223> 蛋白酶TEV靶位点
[0237] <400> 19
[0238] Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
[0239] 1 5
[0240] <210> 20
[0241] <211> 8
[0242] <212> PRT
[0243] <213> 人工序列
[0244] <220>
[0245] <223> PreScission 蛋白酶靶位点
[0246] <400> 20
[0247] Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
[0248] 1 5
[0249] <210> 21
[0250] <211> 4
[0251] <212> PRT
[0252] <213> 人工序列
[0253] <220>
[0254] <223> 弗林蛋白酶靶位点
[0255] <220>
[0256] <221> MISC_FEATURE
[0257] <222> (2) .. (2)
[0258] <223> X可以是任意氨基酸
[0259] <220>
[0260] <221> MISC_FEATURE
[0261] <222> (3) .. (3)
[0262] <223> X is R或K
[0263] <400> 21
[0264] Arg Xaa Xaa Arg
[0265] 1
[0266] <210> 22
[0267] <211> 5
[0268] <212> PRT
[0269] <213> 人工序列
[0270] <220>
[0271] <223> 肽连接体

[0272]	<400>	22												
[0273]	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly									
[0274]	1			5										
[0275]	<210>	23												
[0276]	<211>	4												
[0277]	<212>	PRT												
[0278]	<213>	人工序列												
[0279]	<220>													
[0280]	<223>	肽连接体												
[0281]	<400>	23												
[0282]	Gly	Gly	Gly	Gly										
[0283]	1													
[0284]	<210>	24												
[0285]	<211>	4												
[0286]	<212>	PRT												
[0287]	<213>	人工序列												
[0288]	<220>													
[0289]	<223>	肽连接体												
[0290]	<400>	24												
[0291]	Glu	Gln	Leu	Glu										
[0292]	1													
[0293]	<210>	25												
[0294]	<211>	4												
[0295]	<212>	PRT												
[0296]	<213>	人工序列												
[0297]	<220>													
[0298]	<223>	肽连接体												
[0299]	<400>	25												
[0300]	Thr	Glu	Trp	Thr										
[0301]	1													
[0302]	<210>	26												
[0303]	<211>	224												
[0304]	<212>	PRT												
[0305]	<213>	人工序列												
[0306]	<220>													
[0307]	<223>	EDAZ13Mad5												
[0308]	<400>	26												
[0309]	Met	His	His	His	His	Asn	Ile	Asp	Arg	Pro	Lys	Gly	Leu	Ala
[0310]	1			5					10					15

[0311]	Phe Thr Asp Val Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro			
[0312]	20	25	30	
[0313]	Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp			
[0314]	35	40	45	
[0315]	Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala			
[0316]	50	55	60	
[0317]	Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val			
[0318]	65	70	75	80
[0319]	Ala Leu His Asp Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser			
[0320]	85	90	95	
[0321]	Thr Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys			
[0322]	100	105	110	
[0323]	Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser			
[0324]	115	120	125	
[0325]	Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Lys Ile			
[0326]	130	135	140	
[0327]	Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg			
[0328]	145	150	155	160
[0329]	Glu Val Val Gly Val Gly Ala Leu Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp			
[0330]	165	170	175	
[0331]	Leu Gly Val Pro Arg Phe Ala Lys Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly			
[0332]	180	185	190	
[0333]	Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala Asn Leu Asp Val Glu Gln			
[0334]	195	200	205	
[0335]	Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Gly Ser			
[0336]	210	215	220	
[0337]	<210> 27			
[0338]	<211> 169			
[0339]	<212> PRT			
[0340]	<213> 人工序列			
[0341]	<220>			
[0342]	<223> AnaxaZ13Mad5			
[0343]	<400> 27			
[0344]	Met His His His His His Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys			
[0345]	1	5	10	15
[0346]	Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser			
[0347]	20	25	30	
[0348]	Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu Lys Arg Tyr Lys Asn Arg			
[0349]	35	40	45	

[0350] Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu Gln His
[0351] 50 55 60
[0352] Tyr Arg Glu Val Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg
[0353] 65 70 75 80
[0354] Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala
[0355] 85 90 95
[0356] His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Val Gly Ala
[0357] 100 105 110
[0358] Leu Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro Arg Phe Ala
[0359] 115 120 125
[0360] Lys Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val
[0361] 130 135 140
[0362] Asp Lys Ala Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe
[0363] 145 150 155 160
[0364] Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Gly Ser
[0365] 165
[0366] <210> 28
[0367] <211> 169
[0368] <212> PRT
[0369] <213> 人工序列
[0370] <220>
[0371] <223> Z13Mad5Anaxa
[0372] <400> 28
[0373] Met His His His His His Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser
[0374] 1 5 10 15
[0375] Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu
[0376] 20 25 30
[0377] Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu
[0378] 35 40 45
[0379] Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu
[0380] 50 55 60
[0381] Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Val Gly Ala Leu Lys Val
[0382] 65 70 75 80
[0383] Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro Arg Phe Ala Lys Phe Ala
[0384] 85 90 95
[0385] Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala
[0386] 100 105 110
[0387] Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
[0388] 115 120 125

[0389] Thr Glu Trp Thr Gly Ser Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu
 [0390] 130 135 140
 [0391] Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val
 [0392] 145 150 155 160
 [0393] Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu
 [0394] 165
 [0395] <210> 29
 [0396] <211> 134
 [0397] <212> PRT
 [0398] <213> 人工序列
 [0399] <220>
 [0400] <223> Z13Mad5
 [0401] <400> 29
 [0402] Met His His His His His Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser
 [0403] 1 5 10 15
 [0404] Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu
 [0405] 20 25 30
 [0406] Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu
 [0407] 35 40 45
 [0408] Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu
 [0409] 50 55 60
 [0410] Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Val Gly Ala Leu Lys Val
 [0411] 65 70 75 80
 [0412] Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro Arg Phe Ala Lys Phe Ala
 [0413] 85 90 95
 [0414] Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala
 [0415] 100 105 110
 [0416] Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 [0417] 115 120 125
 [0418] Thr Glu Trp Thr Gly Ser
 [0419] 130
 [0420] <210> 30
 [0421] <211> 92
 [0422] <212> PRT
 [0423] <213> 人工序列
 [0424] <220>
 [0425] <223> Mad5
 [0426] <400> 30
 [0427] Met His His His His His Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val

[0428]	1	5	10	15
[0429]	His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly			
[0430]		20	25	30
[0431]	Val Gly Ala Leu Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro			
[0432]		35	40	45
[0433]	Arg Phe Ala Lys Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn			
[0434]		50	55	60
[0435]	Ile Ala Val Asp Lys Ala Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile			
[0436]		65	70	75
[0437]	Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Gly Ser			80
[0438]		85	90	
[0439]	<210> 31			
[0440]	<211> 182			
[0441]	<212> PRT			
[0442]	<213> 人工序列			
[0443]	<220>			
[0444]	<223> EdaMad5			
[0445]	<400> 31			
[0446]	Met His His His His Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala			
[0447]		1	5	10
[0448]				15
[0449]	Phe Thr Asp Val Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro			
[0450]		20	25	30
[0451]	Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp			
[0452]		35	40	45
[0453]	Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala			
[0454]		50	55	60
[0455]				
[0456]	Phe Leu Gln Gly Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val			
[0457]		65	70	75
[0458]				80
[0459]	Ala Leu His Asp Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser			
[0460]		85	90	95
[0461]	Thr Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu			
[0462]		100	105	110
[0463]				
[0464]	Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Val Gly Ala Leu Lys Val			
[0465]		115	120	125
[0466]	Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro Arg Phe Ala Lys Phe Ala			
[0467]		130	135	140
[0468]	Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala			
[0469]		145	150	155
[0470]	Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu			160

[0467]	165	170	175
[0468]	Thr Glu Trp Thr Gly Ser		
[0469]	180		
[0470]	<210> 32		
[0471]	<211> 127		
[0472]	<212> PRT		
[0473]	<213> 人工序列		
[0474]	<220>		
[0475]	<223> Z14Mad5Anaxa		
[0476]	<400> 32		
[0477]	Met His His His His His Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val		
[0478]	1 5 10 15		
[0479]	His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly		
[0480]	20 25 30		
[0481]	Val Gly Ala Leu Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro		
[0482]	35 40 45		
[0483]	Arg Phe Ala Lys Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn		
[0484]	50 55 60		
[0485]	Ile Ala Val Asp Lys Ala Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile		
[0486]	65 70 75 80		
[0487]	Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Gly Ser Ser Thr Val His		
[0488]	85 90 95		
[0489]	Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro		
[0490]	100 105 110		
[0491]	Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[0492]	115 120 125		
[0493]	<210> 33		
[0494]	<211> 157		
[0495]	<212> PRT		
[0496]	<213> 人工序列		
[0497]	<220>		
[0498]	<223> Z14Mad5Anaxa		
[0499]	<400> 33		
[0500]	Met His His His His His Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser		
[0501]	1 5 10 15		
[0502]	Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu		
[0503]	20 25 30		
[0504]	Val Ala Ala Ala Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala		
[0505]	35 40 45		

[0506]	Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Val Gly			
[0507]	50	55	60	
[0508]	Ala Leu Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro Arg Phe			
[0509]	65	70	75	80
[0510]	Ala Lys Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala			
[0511]	85	90	95	
[0512]	Val Asp Lys Ala Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn			
[0513]	100	105	110	
[0514]	Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Gly Ser Ser Thr Val His Glu Ile			
[0515]	115	120	125	
[0516]	Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala			
[0517]	130	135	140	
[0518]	Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[0519]	145	150	155	
[0520]	<210> 34			
[0521]	<211> 146			
[0522]	<212> PRT			
[0523]	<213> 人工序列			
[0524]	<220>			
[0525]	<223> Z18Mad5Anaxa			
[0526]	<400> 34			
[0527]	Met His His His His His Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[0528]	1	5	10	15
[0529]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser			
[0530]	20	25	30	
[0531]	Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu			
[0532]	35	40	45	
[0533]	Val Val Gly Val Gly Ala Leu Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu			
[0534]	50	55	60	
[0535]	Gly Val Pro Arg Phe Ala Lys Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala			
[0536]	65	70	75	80
[0537]	Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu			
[0538]	85	90	95	
[0539]	Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Gly Ser Ser			
[0540]	100	105	110	
[0541]	Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser			
[0542]	115	120	125	
[0543]	Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp			
[0544]	130	135	140	

[0545] Ala Glu
 [0546] 145
 [0547] <210> 35
 [0548] <211> 8
 [0549] <212> PRT
 [0550] <213> 人工序列
 [0551] <220>
 [0552] <223> SIINFEKL OVACD8
 [0553] <400> 35
 [0554] Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 [0555] 1 5
 [0556] <210> 36
 [0557] <211> 17
 [0558] <212> PRT
 [0559] <213> 人工序列
 [0560] <220>
 [0561] <223> OVACD4肽
 [0562] <400> 36
 [0563] Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
 [0564] 1 5 10 15
 [0565] Arg
 [0566] <210> 37
 [0567] <211> 212
 [0568] <212> PRT
 [0569] <213> 人工序列
 [0570] <220>
 [0571] <223> EDAZ14Mad5
 [0572] <400> 37
 [0573] Met His His His His His Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala
 [0574] 1 5 10 15
 [0575] Phe Thr Asp Val Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro
 [0576] 20 25 30
 [0577] Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp
 [0578] 35 40 45
 [0579] Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala
 [0580] 50 55 60
 [0581] Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val
 [0582] 65 70 75 80
 [0583] Ala Leu His Asp Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser

[0584]	85	90	95
[0585]	Thr Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys		
[0586]	100	105	110
[0587]	Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Glu		
[0588]	115	120	125
[0589]	Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn		
[0590]	130	135	140
[0591]	Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Val Gly Ala Leu Lys Val Pro Arg		
[0592]	145	150	155
[0593]	Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro Arg Phe Ala Lys Phe Ala Ser Phe		
[0594]	165	170	175
[0595]	Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala Asn Leu		
[0596]	180	185	190
[0597]	Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu		
[0598]	195	200	205
[0599]	Trp Thr Gly Ser		
[0600]	210		
[0601]	<210> 38		
[0602]	<211> 201		
[0603]	<212> PRT		
[0604]	<213> 人工序列		
[0605]	<220>		
[0606]	<223> EDAZ18Mad5		
[0607]	<400> 38		
[0608]	Met His His His His His Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala		
[0609]	1 5 10 15		
[0610]	Phe Thr Asp Val Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro		
[0611]	20 25 30		
[0612]	Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp		
[0613]	35 40 45		
[0614]	Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala		
[0615]	50 55 60		
[0616]	Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val		
[0617]	65 70 75 80		
[0618]	Ala Leu His Asp Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser		
[0619]	85 90 95		
[0620]	Thr Arg Glu Val Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg		
[0621]	100 105 110		
[0622]	Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala		

[0623]	115	120	125
[0624]	His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Val Gly Ala		
[0625]	130	135	140
[0626]	Leu Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Pro Arg Phe Ala		
[0627]	145	150	155
[0628]	Lys Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val		
[0629]	165	170	175
[0630]	Asp Lys Ala Asn Leu Asp Val Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe		
[0631]	180	185	190
[0632]	Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Gly Ser		
[0633]	195	200	
[0634]	<210> 39		
[0635]	<211> 116		
[0636]	<212> PRT		
[0637]	<213> 人工序列		
[0638]	<220>		
[0639]	<223> Z13Mad8Anaxa		
[0640]	<400> 39		
[0641]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[0642]	1 5 10 15		
[0643]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[0644]	20 25 30		
[0645]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Val Thr Tyr His Ser Pro		
[0646]	35 40 45		
[0647]	Ser Tyr Ala Tyr His Gln Phe Glu Arg Arg Ala Ile Leu Asn Arg Leu		
[0648]	50 55 60		
[0649]	Val Gln Phe Ile Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu		
[0650]	65 70 75 80		
[0651]	Thr Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp		
[0652]	85 90 95		
[0653]	His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn		
[0654]	100 105 110		
[0655]	Phe Asp Ala Glu		
[0656]	115		
[0657]	<210> 40		
[0658]	<211> 110		
[0659]	<212> PRT		
[0660]	<213> 人工序列		
[0661]	<220>		

- [0662] <223> Z13Mad11Anaxa
- [0663] <400> 40
- [0664] Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe
- [0665] 1 5 10 15
- [0666] Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser
- [0667] 20 25 30
- [0668] Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Asn Tyr Arg Ile Ala Thr
- [0669] 35 40 45
- [0670] Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys Ala Met Glu Glu Leu Thr
- [0671] 50 55 60
- [0672] Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Gln Arg Ser Thr Val His Glu
- [0673] 65 70 75 80
- [0674] Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser
- [0675] 85 90 95
- [0676] Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu
- [0677] 100 105 110
- [0678] <210> 41
- [0679] <211> 94
- [0680] <212> PRT
- [0681] <213> 人工序列
- [0682] <220>
- [0683] <223> Z13Mad9Anaxa
- [0684] <400> 41
- [0685] Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe
- [0686] 1 5 10 15
- [0687] Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser
- [0688] 20 25 30
- [0689] Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys His Leu Glu Leu Ala Ser
- [0690] 35 40 45
- [0691] Met Thr Asn Met Glu Leu Met Ser Ser Ile Val Ser Thr Val His Glu
- [0692] 50 55 60
- [0693] Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser
- [0694] 65 70 75 80
- [0695] Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu
- [0696] 85 90
- [0697] <210> 42
- [0698] <211> 17
- [0699] <212> PRT
- [0700] <213> 人工序列

- [0701] <220>
- [0702] <223> Mad9
- [0703] <400> 42
- [0704] His Leu Glu Leu Ala Ser Met Thr Asn Met Glu Leu Met Ser Ser Ile
- [0705] 1 5 10 15
- [0706] Val
- [0707] <210> 43
- [0708] <211> 20
- [0709] <212> PRT
- [0710] <213> 人工序列
- [0711] <220>
- [0712] <223> Mad8
- [0713] <400> 43
- [0714] Val Thr Tyr His Ser Pro Ser Tyr Ala Tyr His Gln Phe Glu Arg Arg
- [0715] 1 5 10 15
- [0716] Ala Ile Leu Asn
- [0717] 20
- [0718] <210> 44
- [0719] <211> 33
- [0720] <212> PRT
- [0721] <213> 人工序列
- [0722] <220>
- [0723] <223> Mad11
- [0724] <400> 44
- [0725] Asn Tyr Arg Ile Ala Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys
- [0726] 1 5 10 15
- [0727] Ala Met Glu Glu Leu Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Gln
- [0728] 20 25 30
- [0729] Arg
- [0730] <210> 45
- [0731] <211> 90
- [0732] <212> PRT
- [0733] <213> 人工序列
- [0734] <220>
- [0735] <223> EDA
- [0736] <400> 45
- [0737] Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
- [0738] 1 5 10 15
- [0739] Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr

[0740]	20	25	30
[0741]	Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro		
[0742]	35	40	45
[0743]	Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro		
[0744]	50	55	60
[0745]	Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu		
[0746]	65	70	75
[0747]	Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr		80
[0748]		85	90
[0749]	<210> 46		
[0750]	<211> 115		
[0751]	<212> PRT		
[0752]	<213> 人工序列		
[0753]	<220>		
[0754]	<223> TatFMad5Anaxa		
[0755]	<400> 46		
[0756]	Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Val Lys Arg Ile Ser Gln		
[0757]	1	5	10
[0758]	Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Arg Val		15
[0759]		20	25
[0760]			30
[0761]	Lys Arg Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Arg Val Lys Arg Ala		
[0762]	35	40	45
[0763]	Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala		
[0764]	50	55	60
[0765]	Arg Val Lys Arg Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Arg Val Lys Arg		
[0766]	65	70	75
[0767]	Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His		80
[0768]	85	90	95
[0769]	Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe		
[0770]	100	105	110
[0771]	Asp Ala Glu		
[0772]	115		
[0773]	<210> 47		
[0774]	<211> 314		
[0775]	<212> PRT		
[0776]	<213> 人工序列		
[0777]	<220>		
[0778]	<223> EpCAM		
[0779]	<400> 47		

[0779]	Met Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Ala Ala Ala			
[0780]	1	5	10	15
[0781]	Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr			
[0782]	20	25	30	
[0783]	Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys			
[0784]	35	40	45	
[0785]	Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala			
[0786]	50	55	60	
[0787]	Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg			
[0788]	65	70	75	80
[0789]	Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp			
[0790]	85	90	95	
[0791]	Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly			
[0792]	100	105	110	
[0793]	Thr Ser Met Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp			
[0794]	115	120	125	
[0795]	Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile			
[0796]	130	135	140	
[0797]	Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys			
[0798]	145	150	155	160
[0799]	Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu			
[0800]	165	170	175	
[0801]	Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr			
[0802]	180	185	190	
[0803]	Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp			
[0804]	195	200	205	
[0805]	Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser			
[0806]	210	215	220	
[0807]	Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu			
[0808]	225	230	235	240
[0809]	Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala			
[0810]	245	250	255	
[0811]	Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val Ile			
[0812]	260	265	270	
[0813]	Val Val Val Val Ile Ala Val Val Ala Gly Ile Val Val Leu Val Ile			
[0814]	275	280	285	
[0815]	Ser Arg Lys Lys Arg Met Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Glu Ile Lys Glu			
[0816]	290	295	300	
[0817]	Met Gly Glu Met His Arg Glu Leu Asn Ala			

[0818]	305	310		
[0819]	<210>	48		
[0820]	<211>	9		
[0821]	<212>	PRT		
[0822]	<213>	人工序列		
[0823]	<220>			
[0824]	<223>	EpCAM表位		
[0825]	<400>	48		
[0826]	Gly Leu Lys Ala Ala Gly Val Ile Ala Val			
[0827]	1	5		
[0828]	<210>	49		
[0829]	<211>	1255		
[0830]	<212>	PRT		
[0831]	<213>	人工序列		
[0832]	<220>			
[0833]	<223>	MUC-1		
[0834]	<400>	49		
[0835]	Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr			
[0836]	1	5	10	15
[0837]	Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly			
[0838]	20	25	30	
[0839]	Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser			
[0840]	35	40	45	
[0841]	Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His			
[0842]	50	55	60	
[0843]	Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu			
[0844]	65	70	75	80
[0845]	Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln			
[0846]	85	90	95	
[0847]	Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr			
[0848]	100	105	110	
[0849]	Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro			
[0850]	115	120	125	
[0851]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr			
[0852]	130	135	140	
[0853]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser			
[0854]	145	150	155	160
[0855]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His			
[0856]	165	170	175	

[0857]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala			
[0858]	180	185	190	
[0859]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro			
[0860]	195	200	205	
[0861]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr			
[0862]	210	215	220	
[0863]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser			
[0864]	225	230	235	240
[0865]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His			
[0866]	245	250	255	
[0867]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala			
[0868]	260	265	270	
[0869]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro			
[0870]	275	280	285	
[0871]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr			
[0872]	290	295	300	
[0873]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser			
[0874]	305	310	315	320
[0875]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His			
[0876]	325	330	335	
[0877]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala			
[0878]	340	345	350	
[0879]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro			
[0880]	355	360	365	
[0881]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr			
[0882]	370	375	380	
[0883]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser			
[0884]	385	390	395	400
[0885]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His			
[0886]	405	410	415	
[0887]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala			
[0888]	420	425	430	
[0889]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro			
[0890]	435	440	445	
[0891]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr			
[0892]	450	455	460	
[0893]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser			
[0894]	465	470	475	480
[0895]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His			

[0896]	485	490	495
[0897]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala		
[0898]	500	505	510
[0899]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro		
[0900]	515	520	525
[0901]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr		
[0902]	530	535	540
[0903]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser		
[0904]	545	550	555
[0905]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His		
[0906]	565	570	575
[0907]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala		
[0908]	580	585	590
[0909]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro		
[0910]	595	600	605
[0911]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr		
[0912]	610	615	620
[0913]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser		
[0914]	625	630	635
[0915]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His		
[0916]	645	650	655
[0917]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala		
[0918]	660	665	670
[0919]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro		
[0920]	675	680	685
[0921]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr		
[0922]	690	695	700
[0923]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser		
[0924]	705	710	715
[0925]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His		
[0926]	725	730	735
[0927]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala		
[0928]	740	745	750
[0929]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro		
[0930]	755	760	765
[0931]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr		
[0932]	770	775	780
[0933]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser		
[0934]	785	790	795
			800

[0935]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His		
[0936]	805	810	815
[0937]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala		
[0938]	820	825	830
[0939]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro		
[0940]	835	840	845
[0941]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr		
[0942]	850	855	860
[0943]	Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser		
[0944]	865	870	875
[0945]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His		
[0946]	885	890	895
[0947]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala		
[0948]	900	905	910
[0949]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro		
[0950]	915	920	925
[0951]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn		
[0952]	930	935	940
[0953]	Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser		
[0954]	945	950	955
[0955]	Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly		
[0956]	965	970	975
[0957]	Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe		
[0958]	980	985	990
[0959]	Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His		
[0960]	995	1000	1005
[0961]	Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Ser Val Pro		
[0962]	1010	1015	1020
[0963]	Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr		
[0964]	1025	1030	1035
[0965]	Gly Val Ser Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln		
[0966]	1040	1045	1050
[0967]	Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu		
[0968]	1055	1060	1065
[0969]	Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln		
[0970]	1070	1075	1080
[0971]	Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser		
[0972]	1085	1090	1095
[0973]	Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn		

[0974]	1100	1105	1110
[0975]	Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala		
[0976]	1115	1120	1125
[0977]	Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp		
[0978]	1130	1135	1140
[0979]	Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly		
[0980]	1145	1150	1155
[0981]	Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu		
[0982]	1160	1165	1170
[0983]	Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg		
[0984]	1175	1180	1185
[0985]	Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr		
[0986]	1190	1195	1200
[0987]	His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr		
[0988]	1205	1210	1215
[0989]	Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser		
[0990]	1220	1225	1230
[0991]	Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val		
[0992]	1235	1240	1245
[0993]	Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu		
[0994]	1250	1255	
[0995]	<210> 50		
[0996]	<211> 9		
[0997]	<212> PRT		
[0998]	<213> 人工序列		
[0999]	<220>		
[1000]	<223> MUC-1表位		
[1001]	<400> 50		
[1002]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn		
[1003]	1	5	
[1004]	<210> 51		
[1005]	<211> 10		
[1006]	<212> PRT		
[1007]	<213> 人工序列		
[1008]	<220>		
[1009]	<223> MUC-1表位		
[1010]	<400> 51		
[1011]	Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser		
[1012]	1	5	10

- [1013] <210> 52
[1014] <211> 142
[1015] <212> PRT
[1016] <213> 人工序列
[1017] <220>
[1018] <223> 存活蛋白
[1019] <400> 52
- [1020] Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
[1021] 1 5 10 15
- [1022] His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
[1023] 20 25 30
- [1024] Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
[1025] 35 40 45
- [1026] Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
[1027] 50 55 60
- [1028] Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
[1029] 65 70 75 80
- [1030] Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
[1031] 85 90 95
- [1032] Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
[1033] 100 105 110
- [1034] Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
[1035] 115 120 125
- [1036] Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
[1037] 130 135 140
- [1038] <210> 53
[1039] <211> 10
[1040] <212> PRT
[1041] <213> 人工序列
[1042] <220>
[1043] <223> 存活蛋白表位
[1044] <400> 53
- [1045] Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe
[1046] 1 5 10
- [1047] <210> 54
[1048] <211> 701
[1049] <212> PRT
[1050] <213> 人工序列
[1051] <220>

[1052]	<223> CEA															
[1053]	<400> 54															
[1054]	Met	Glu	Ser	Pro	Ser	Ala	Pro	Pro	His	Arg	Trp	Cys	Ile	Pro	Trp	Gln
[1055]	1			5				10							15	
[1056]	Arg	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Phe	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr
[1057]				20				25							30	
[1058]	Thr	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile	Glu	Ser	Thr	Pro	Phe	Asn	Val	Ala	Glu	Gly
[1059]			35				40							45		
[1060]	Lys	Glu	Val	Leu	Leu	Leu	Val	His	Asn	Leu	Pro	Gln	His	Leu	Phe	Gly
[1061]		50					55							60		
[1062]	Tyr	Ser	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Arg	Val	Asp	Gly	Asn	Arg	Gln	Ile	Ile
[1063]	65			70				75						80		
[1064]	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Tyr	Ser
[1065]			85				90							95		
[1066]	Gly	Arg	Glu	Ile	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	Ile
[1067]			100				105							110		
[1068]	Ile	Gln	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	His	Val	Ile	Lys	Ser	Asp
[1069]		115				120								125		
[1070]	Leu	Val	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Arg	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu
[1071]		130				135								140		
[1072]	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Lys	Pro	Val	Glu	Asp	Lys
[1073]	145			150				155						160		
[1074]	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asp	Ala	Thr	Tyr
[1075]			165				170							175		
[1076]	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln
[1077]			180				185							190		
[1078]	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Arg	Asn
[1079]		195				200								205		
[1080]	Asp	Thr	Ala	Ser	Tyr	Lys	Cys	Glu	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Ala	Arg
[1081]		210				215								220		
[1082]	Arg	Ser	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro
[1083]	225			230				235						240		
[1084]	Thr	Ile	Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn
[1085]			245				250							255		
[1086]	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Phe
[1087]			260				265							270		
[1088]	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn
[1089]		275			280									285		
[1090]	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser

[1091]	290	295	300
[1092]	Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala		
[1093]	305	310	315
[1094]	Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu		
[1095]	325	330	335
[1096]	Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr		
[1097]	340	345	350
[1098]	Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg		
[1099]	355	360	365
[1100]	Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr		
[1101]	370	375	380
[1102]	Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser		
[1103]	385	390	395
[1104]	Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp		
[1105]	405	410	415
[1106]	Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn		
[1107]	420	425	430
[1108]	Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser		
[1109]	435	440	445
[1110]	Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile		
[1111]	450	455	460
[1112]	Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn		
[1113]	465	470	475
[1114]	Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val		
[1115]	485	490	495
[1116]	Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro		
[1117]	500	505	510
[1118]	Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln		
[1119]	515	520	525
[1120]	Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser		
[1121]	530	535	540
[1122]	Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn		
[1123]	545	550	555
[1124]	Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser		
[1125]	565	570	575
[1126]	Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly		
[1127]	580	585	590
[1128]	Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly		
[1129]	595	600	605

[1130]	Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln			
[1131]	610	615	620	
[1132]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu			
[1133]	625	630	635	640
[1134]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe			
[1135]	645	650	655	
[1136]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile			
[1137]	660	665	670	
[1138]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr			
[1139]	675	680	685	
[1140]	Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu			
[1141]	690	695	700	
[1142]	<210> 55			
[1143]	<211> 10			
[1144]	<212> PRT			
[1145]	<213> 人工序列			
[1146]	<220>			
[1147]	<223> CEA表位			
[1148]	<400> 55			
[1149]	Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser			
[1150]	1	5	10	
[1151]	<210> 56			
[1152]	<211> 10			
[1153]	<212> PRT			
[1154]	<213> 人工序列			
[1155]	<220>			
[1156]	<223> CEA表位			
[1157]	<400> 56			
[1158]	Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln			
[1159]	1	5	10	
[1160]	<210> 57			
[1161]	<211> 189			
[1162]	<212> PRT			
[1163]	<213> 人工序列			
[1164]	<220>			
[1165]	<223> Kirsten Ras			
[1166]	<400> 57			
[1167]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys			
[1168]	1	5	10	15

[1169] Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 [1170] 20 25 30
 [1171] Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 [1172] 35 40 45
 [1173] Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 [1174] 50 55 60
 [1175] Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 [1176] 65 70 75 80
 [1177] Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 [1178] 85 90 95
 [1179] Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 [1180] 100 105 110
 [1181] Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 [1182] 115 120 125
 [1183] Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 [1184] 130 135 140
 [1185] Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 [1186] 145 150 155 160
 [1187] Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys
 [1188] 165 170 175
 [1189] Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met
 [1190] 180 185
 [1191] <210> 58
 [1192] <211> 9
 [1193] <212> PRT
 [1194] <213> 人工序列
 [1195] <220>
 [1196] <223> Kirsten Ras表位
 [1197] <400> 58
 [1198] Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly
 [1199] 1 5
 [1200] <210> 59
 [1201] <211> 314
 [1202] <212> PRT
 [1203] <213> 人工序列
 [1204] <220>
 [1205] <223> MAGE-A3
 [1206] <400> 59
 [1207] Met Pro Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Leu

[1208]	1	5	10	15
[1209]	Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala			
[1210]		20	25	30
[1211]	Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val Glu Val			
[1212]		35	40	45
[1213]	Thr Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro Gln Ser			
[1214]		50	55	60
[1215]	Pro Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro Leu Trp			
[1216]		65	70	75
[1217]	Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Glu Gly Pro Ser			
[1218]		85	90	95
[1219]	Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser Arg Lys			
[1220]		100	105	110
[1221]	Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu			
[1222]		115	120	125
[1223]	Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn Trp Gln			
[1224]		130	135	140
[1225]	Tyr Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Phe Ser Ser Leu Gln Leu			
[1226]		145	150	155
[1227]	Val Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr			
[1228]		165	170	175
[1229]	Ile Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp			
[1230]		180	185	190
[1231]	Asn Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile			
[1232]		195	200	205
[1233]	Ile Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp Glu Glu			
[1234]		210	215	220
[1235]	Leu Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile Leu Gly			
[1236]		225	230	235
[1237]	Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu			
[1238]		245	250	255
[1239]	Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu			
[1240]		260	265	270
[1241]	Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His			
[1242]		275	280	285
[1243]	His Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu			
[1244]		290	295	300
[1245]	His Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu			
[1246]		305	310	

[1247]	<210> 60			
[1248]	<211> 9			
[1249]	<212> PRT			
[1250]	<213> 人工序列			
[1251]	<220>			
[1252]	<223> MAGE-A3表位			
[1253]	<400> 60			
[1254]	Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu			
[1255]	1	5		
[1256]	<210> 61			
[1257]	<211> 380			
[1258]	<212> PRT			
[1259]	<213> 人工序列			
[1260]	<220>			
[1261]	<223> IL13 α 2			
[1262]	<400> 61			
[1263]	Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile			
[1264]	1	5	10	15
[1265]	Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val			
[1266]	20	25	30	
[1267]	Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr			
[1268]	35	40	45	
[1269]	Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu			
[1270]	50	55	60	
[1271]	Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr			
[1272]	65	70	75	80
[1273]	Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp			
[1274]	85	90	95	
[1275]	Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln			
[1276]	100	105	110	
[1277]	Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr			
[1278]	115	120	125	
[1279]	Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp			
[1280]	130	135	140	
[1281]	Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly			
[1282]	145	150	155	160
[1283]	Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu			
[1284]	165	170	175	
[1285]	Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly			

[1286]	180	185	190
[1287]	Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys		
[1288]	195	200	205
[1289]	Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg		
[1290]	210	215	220
[1291]	Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro		
[1292]	225	230	235
[1293]	Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu		
[1294]	245	250	255
[1295]	Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr		
[1296]	260	265	270
[1297]	Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val		
[1298]	275	280	285
[1299]	Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu		
[1300]	290	295	300
[1301]	Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly		
[1302]	305	310	315
[1303]	Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu		
[1304]	325	330	335
[1305]	Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu		
[1306]	340	345	350
[1307]	Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr		
[1308]	355	360	365
[1309]	Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr		
[1310]	370	375	380
[1311]	<210> 62		
[1312]	<211> 7		
[1313]	<212> PRT		
[1314]	<213> 人工序列		
[1315]	<220>		
[1316]	<223> IL13Ra2表位		
[1317]	<400> 62		
[1318]	Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu		
[1319]	1	5	
[1320]	<210> 63		
[1321]	<211> 50		
[1322]	<212> PRT		
[1323]	<213> 人工序列		
[1324]	<220>		

- [1325] <223> Mad12
- [1326] <400> 63
- [1327] Leu Phe Arg Ala Ala Gln Leu Ala Asn Asp Val Val Leu Gln Ile Met
- [1328] 1 5 10 15
- [1329] Glu His Leu Glu Leu Ala Ser Met Thr Asn Met Glu Leu Met Ser Ser
- [1330] 20 25 30
- [1331] Ile Val Val Ile Ser Ala Ser Ile Ile Val Phe Asn Leu Leu Glu Leu
- [1332] 35 40 45
- [1333] Glu Gly
- [1334] 50
- [1335] <210> 64
- [1336] <211> 14
- [1337] <212> PRT
- [1338] <213> 人工序列
- [1339] <220>
- [1340] <223> gp70CD4肽
- [1341] <400> 64
- [1342] Leu Val Gln Phe Ile Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala
- [1343] 1 5 10
- [1344] <210> 65
- [1345] <211> 9
- [1346] <212> PRT
- [1347] <213> 人工序列
- [1348] <220>
- [1349] <223> gp70CD8肽
- [1350] <400> 65
- [1351] Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe
- [1352] 1 5
- [1353] <210> 66
- [1354] <211> 9
- [1355] <212> PRT
- [1356] <213> 人工序列
- [1357] <220>
- [1358] <223> adpgk肽
- [1359] <400> 66
- [1360] Ala Ser Met Thr Asn Met Glu Leu Met
- [1361] 1 5
- [1362] <210> 67
- [1363] <211> 8

[1364]	<212> PRT			
[1365]	<213> 人工序列			
[1366]	<220>			
[1367]	<223> 存活蛋白20-28			
[1368]	<400> 67			
[1369]	Ala Thr Lys Asn Trp Pro Phe Leu			
[1370]	1	5		
[1371]	<210> 68			
[1372]	<211> 8			
[1373]	<212> PRT			
[1374]	<213> 人工序列			
[1375]	<220>			
[1376]	<223> 存活蛋白97-104			
[1377]	<400> 68			
[1378]	Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu			
[1379]	1	5		
[1380]	<210> 69			
[1381]	<211> 127			
[1382]	<212> PRT			
[1383]	<213> 人工序列			
[1384]	<220>			
[1385]	<223> Z13Mad12Anaxa			
[1386]	<400> 69			
[1387]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[1388]	1	5	10	15
[1389]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[1390]	20	25	30	
[1391]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Leu Phe Arg Ala Ala Gln			
[1392]	35	40	45	
[1393]	Leu Ala Asn Asp Val Val Leu Gln Ile Met Glu His Leu Glu Leu Ala			
[1394]	50	55	60	
[1395]	Ser Met Thr Asn Met Glu Leu Met Ser Ser Ile Val Val Ile Ser Ala			
[1396]	65	70	75	80
[1397]	Ser Ile Ile Val Phe Asn Leu Leu Glu Leu Glu Gly Ser Thr Val His			
[1398]	85	90	95	
[1399]	Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro			
[1400]	100	105	110	
[1401]	Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[1402]	115	120	125	

[1403]	<210> 70		
[1404]	<211> 1255		
[1405]	<212> PRT		
[1406]	<213> 人工序列		
[1407]	<220>		
[1408]	<223> Her2/neu		
[1409]	<400> 70		
[1410]	Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu		
[1411]	1	5	10
[1412]	Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys		
[1413]	20	25	30
[1414]	Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His		
[1415]	35	40	45
[1416]	Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr		
[1417]	50	55	60
[1418]	Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val		
[1419]	65	70	75
[1420]	Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu		
[1421]	85	90	95
[1422]	Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr		
[1423]	100	105	110
[1424]	Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro		
[1425]	115	120	125
[1426]	Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser		
[1427]	130	135	140
[1428]	Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln		
[1429]	145	150	155
[1430]	160		
[1431]	Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn		
[1432]	165	170	175
[1433]	Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys		
[1434]	180	185	190
[1435]	His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser		
[1436]	195	200	205
[1437]	Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys		
[1438]	210	215	220
[1439]	Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys		
[1440]	225	230	235
[1441]	Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu		
	245	250	255

[1442]	His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val			
[1443]	260	265	270	
[1444]	Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg			
[1445]	275	280	285	
[1446]	Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu			
[1447]	290	295	300	
[1448]	Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln			
[1449]	305	310	315	320
[1450]	Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys			
[1451]	325	330	335	
[1452]	Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu			
[1453]	340	345	350	
[1454]	Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys			
[1455]	355	360	365	
[1456]	Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp			
[1457]	370	375	380	
[1458]	Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe			
[1459]	385	390	395	400
[1460]	Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro			
[1461]	405	410	415	
[1462]	Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg			
[1463]	420	425	430	
[1464]	Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu			
[1465]	435	440	445	
[1466]	Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly			
[1467]	450	455	460	
[1468]	Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val			
[1469]	465	470	475	480
[1470]	Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr			
[1471]	485	490	495	
[1472]	Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His			
[1473]	500	505	510	
[1474]	Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys			
[1475]	515	520	525	
[1476]	Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys			
[1477]	530	535	540	
[1478]	Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys			
[1479]	545	550	555	560
[1480]	Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys			

[1481]	565	570	575
[1482]	Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp		
[1483]	580	585	590
[1484]	Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu		
[1485]	595	600	605
[1486]	Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln		
[1487]	610	615	620
[1488]	Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys		
[1489]	625	630	635
[1490]	Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser		
[1491]	645	650	655
[1492]	Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly		
[1493]	660	665	670
[1494]	Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg		
[1495]	675	680	685
[1496]	Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly		
[1497]	690	695	700
[1498]	Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu		
[1499]	705	710	715
[1500]	Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys		
[1501]	725	730	735
[1502]	Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile		
[1503]	740	745	750
[1504]	Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu		
[1505]	755	760	765
[1506]	Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg		
[1507]	770	775	780
[1508]	Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu		
[1509]	785	790	795
[1510]	800		
[1511]	Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg		
[1512]	805	810	815
[1513]	Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly		
[1514]	820	825	830
[1515]	Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala		
[1516]	835	840	845
[1517]	Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe		
[1518]	850	855	860
[1519]	Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp		
[1519]	865	870	875
[1519]			880

[1520]	Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg		
[1521]		885	890
[1522]	Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val		895
[1523]		900	905
[1524]	Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala		910
[1525]		915	920
[1526]	Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro		925
[1527]		930	935
[1528]	Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro		940
[1529]		945	950
[1530]	Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met		955
[1531]		965	970
[1532]	Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met		975
[1533]		980	985
[1534]	Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu		990
[1535]		995	1000
[1536]	Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu		1005
[1537]		1010	1015
[1538]	Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr		1020
[1539]		1025	1030
[1540]	Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly		1035
[1541]		1040	1045
[1542]	Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg		1050
[1543]		1045	1055
[1544]	Ser Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu		1065
[1545]		1055	1060
[1546]	Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu		1080
[1547]		1085	1090
[1548]	Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu		1095
[1549]		1090	1095
[1550]	Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser		1110
[1551]		1100	1105
[1552]	Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser		1110
[1553]		1115	1120
[1554]	Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro		1125
[1555]		1130	1135
[1556]	Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro		1140
[1557]		1145	1150
[1558]	Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu		1155
[1559]		1160	1165
[1560]	Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu		1170
[1561]		1165	1170
[1562]	Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly		

[1559]	1175	1180	1185
[1560]	Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala		
[1561]	1190	1195	1200
[1562]	Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp		
[1563]	1205	1210	1215
[1564]	Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro		
[1565]	1220	1225	1230
[1566]	Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr		
[1567]	1235	1240	1245
[1568]	Leu Gly Leu Asp Val Pro Val		
[1569]	1250	1255	
[1570]	<210> 71		
[1571]	<211> 35		
[1572]	<212> PRT		
[1573]	<213> 人工序列		
[1574]	<220>		
[1575]	<223> TLR肽激动剂"Anaxxa"序列变体		
[1576]	<400> 71		
[1577]	Ser Thr Val His Glu Ile Leu Ser Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His		
[1578]	1 5 10 15		
[1579]	Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe		
[1580]	20 25 30		
[1581]	Asp Ala Glu		
[1582]	35		
[1583]	<210> 72		
[1584]	<211> 118		
[1585]	<212> PRT		
[1586]	<213> 人工序列		
[1587]	<220>		
[1588]	<223> ATP110		
[1589]	<400> 72		
[1590]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[1591]	1 5 10 15		
[1592]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[1593]	20 25 30		
[1594]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Ala Pro Pro Gln Val Leu		
[1595]	35 40 45		
[1596]	Ala Phe Gly Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Val Asp Glu Lys		
[1597]	50 55 60		

[1598]	Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val			
[1599]	65	70	75	80
[1600]	Ile Val Val Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu			
[1601]	85	90	95	
[1602]	Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr			
[1603]	100	105	110	
[1604]	Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[1605]	115			
[1606]	<210> 73			
[1607]	<211> 331			
[1608]	<212> PRT			
[1609]	<213> 人工序列			
[1610]	<220>			
[1611]	<223> ATP111			
[1612]	<400> 73			
[1613]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[1614]	1	5	10	15
[1615]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[1616]	20	25	30	
[1617]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Arg Thr Leu Thr Leu Phe			
[1618]	35	40	45	
[1619]	Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn			
[1620]	50	55	60	
[1621]	Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Pro Asp Ser Ser Tyr			
[1622]	65	70	75	80
[1623]	Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His Ser Ala Ser Pro Gln			
[1624]	85	90	95	
[1625]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu			
[1626]	100	105	110	
[1627]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe			
[1628]	115	120	125	
[1629]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile			
[1630]	130	135	140	
[1631]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr			
[1632]	145	150	155	160
[1633]	Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile Leu Gly			
[1634]	165	170	175	
[1635]	Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu			
[1636]	180	185	190	

[1637]	Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Ser Tyr Glu Phe Leu			
[1638]	195	200	205	
[1639]	Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Ala Leu			
[1640]	210	215	220	
[1641]	Ser Arg Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg			
[1642]	225	230	235	240
[1643]	Ala Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Ala			
[1644]	245	250	255	
[1645]	Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala			
[1646]	260	265	270	
[1647]	Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala			
[1648]	275	280	285	
[1649]	Gly Val Ile Ala Val Ile Val Val Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys			
[1650]	290	295	300	
[1651]	Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly			
[1652]	305	310	315	320
[1653]	Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[1654]	325	330		
[1655]	<210> 74			
[1656]	<211> 313			
[1657]	<212> PRT			
[1658]	<213> 人工序列			
[1659]	<220>			
[1660]	<223> ATP112			
[1661]	<400> 74			
[1662]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[1663]	1	5	10	15
[1664]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[1665]	20	25	30	
[1666]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Arg Thr Leu Thr Leu Phe			
[1667]	35	40	45	
[1668]	Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn			
[1669]	50	55	60	
[1670]	Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Pro Asp Ser Ser Tyr			
[1671]	65	70	75	80
[1672]	Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His Ser Ala Ser Pro Gln			
[1673]	85	90	95	
[1674]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu			
[1675]	100	105	110	

[1676]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe			
[1677]	115	120	125	
[1678]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile			
[1679]	130	135	140	
[1680]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Leu Gly Asp Pro			
[1681]	145	150	155	160
[1682]	Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu Tyr			
[1683]	165	170	175	
[1684]	Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Ser Tyr Glu Phe Leu Trp Gly			
[1685]	180	185	190	
[1686]	Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Ala Leu Ser Arg			
[1687]	195	200	205	
[1688]	Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg			
[1689]	210	215	220	
[1690]	Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Ala Pro Pro			
[1691]	225	230	235	240
[1692]	Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Val			
[1693]	245	250	255	
[1694]	Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val			
[1695]	260	265	270	
[1696]	Ile Ala Val Ile Val Val Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu			
[1697]	275	280	285	
[1698]	Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val			
[1699]	290	295	300	
[1700]	Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[1701]	305	310		
[1702]	<210> 75			
[1703]	<211> 366			
[1704]	<212> PRT			
[1705]	<213> 人工序列			
[1706]	<220>			
[1707]	<223> ATP113			
[1708]	<400> 75			
[1709]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[1710]	1	5	10	15
[1711]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[1712]	20	25	30	
[1713]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Arg Thr Leu Thr Leu Phe			
[1714]	35	40	45	

[1715]	Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn		
[1716]	50	55	60
[1717]	Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Pro Asp Ser Ser Tyr		
[1718]	65	70	75
[1719]	80		
[1720]	Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His Ser Ala Ser Pro Gln		
	85	90	95
[1721]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu		
[1722]	100	105	110
[1723]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe		
[1724]	115	120	125
[1725]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile		
[1726]	130	135	140
[1727]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Leu Gly Asp Pro		
[1728]	145	150	155
[1729]	160		
[1730]	Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu Tyr		
	165	170	175
[1731]	Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Ser Tyr Glu Phe Leu Trp Gly		
[1732]	180	185	190
[1733]	Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Ala Leu Ser Arg		
[1734]	195	200	205
[1735]	Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg		
[1736]	210	215	220
[1737]	Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Ala Pro Pro		
[1738]	225	230	235
[1739]	240		
[1740]	Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Val		
	245	250	255
[1741]	Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val		
[1742]	260	265	270
[1743]	Ile Ala Val Ile Val Val Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His		
[1744]	275	280	285
[1745]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala		
[1746]	290	295	300
[1747]	Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Arg Pro Ala Leu Gly		
[1748]	305	310	315
[1749]	320		
[1750]	Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ser Thr Val His Glu		
	325	330	335
[1751]	Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser		
[1752]	340	345	350
[1753]	Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		

[1754]	355	360	365
[1755]	<210> 76		
[1756]	<211> 335		
[1757]	<212> PRT		
[1758]	<213> 人工序列		
[1759]	<220>		
[1760]	<223> ATP114		
[1761]	<400> 76		
[1762]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[1763]	1 5 10 15		
[1764]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[1765]	20 25 30		
[1766]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Arg Thr Leu Thr Leu Phe		
[1767]	35 40 45		
[1768]	Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn		
[1769]	50 55 60		
[1770]	Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Pro Asp Ser Ser Tyr		
[1771]	65 70 75 80		
[1772]	Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His Ser Ala Ser Pro Gln		
[1773]	85 90 95		
[1774]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu		
[1775]	100 105 110		
[1776]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe		
[1777]	115 120 125		
[1778]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile		
[1779]	130 135 140		
[1780]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Pro Thr Leu		
[1781]	145 150 155 160		
[1782]	Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe		
[1783]	165 170 175		
[1784]	Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala Val Lys Lys Gln Phe Glu		
[1785]	180 185 190		
[1786]	Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Pro		
[1787]	195 200 205		
[1788]	Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Tyr		
[1789]	210 215 220		
[1790]	Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly		
[1791]	225 230 235 240		
[1792]	Val Ile Ala Val Ile Val Val Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala		

[1793]	245	250	255
[1794]	His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr		
[1795]	260	265	270
[1796]	Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Arg Pro Ala Leu		
[1797]	275	280	285
[1798]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ser Thr Val His		
[1799]	290	295	300
[1800]	Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro		
[1801]	305	310	315
[1802]	Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[1803]	325	330	335
[1804]	<210> 77		
[1805]	<211> 303		
[1806]	<212> PRT		
[1807]	<213> 人工序列		
[1808]	<220>		
[1809]	<223> ATP115		
[1810]	<400> 77		
[1811]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[1812]	1 5 10 15		
[1813]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[1814]	20 25 30		
[1815]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Arg Thr Leu Thr Leu Phe		
[1816]	35 40 45		
[1817]	Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn		
[1818]	50 55 60		
[1819]	Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Pro Asp Ser Ser Tyr		
[1820]	65 70 75 80		
[1821]	Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His Ser Ala Ser Pro Gln		
[1822]	85 90 95		
[1823]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu		
[1824]	100 105 110		
[1825]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe		
[1826]	115 120 125		
[1827]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile		
[1828]	130 135 140		
[1829]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Glu Tyr Lys Leu		
[1830]	145 150 155 160		
[1831]	Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ala Pro		

[1832]	165	170	175
[1833]	Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Tyr		
[1834]	180	185	190
[1835]	Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly		
[1836]	195	200	205
[1837]	Val Ile Ala Val Ile Val Val Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala		
[1838]	210	215	220
[1839]	His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr		
[1840]	225	230	235
[1841]	Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Arg Pro Ala Leu		
[1842]	245	250	255
[1843]	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ser Thr Val His		
[1844]	260	265	270
[1845]	Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro		
[1846]	275	280	285
[1847]	Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[1848]	290	295	300
[1849]	<210> 78		
[1850]	<211> 363		
[1851]	<212> PRT		
[1852]	<213> 人工序列		
[1853]	<220>		
[1854]	<223> ATP116		
[1855]	<400> 78		
[1856]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[1857]	1	5	10
[1858]	15		
[1859]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[1860]	20	25	30
[1861]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Arg Thr Leu Thr Leu Phe		
[1862]	35	40	45
[1863]	Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn		
[1864]	50	55	60
[1865]	Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Pro Asp Ser Ser Tyr		
[1866]	65	70	75
[1867]	80		
[1868]	Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His Ser Ala Ser Pro Gln		
[1869]	85	90	95
[1870]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu		
[1871]	100	105	110
[1872]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe		

[1871]	115	120	125
[1872]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile		
[1873]	130	135	140
[1874]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Pro Thr Leu		
[1875]	145	150	155
[1876]	Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe		
[1877]	165	170	175
[1878]	Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala Val Lys Lys Gln Phe Glu		
[1879]	180	185	190
[1880]	Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Pro		
[1881]	195	200	205
[1882]	Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Tyr		
[1883]	210	215	220
[1884]	Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly		
[1885]	225	230	235
[1886]	Val Ile Ala Val Ile Val Val Leu Gly Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr		
[1887]	245	250	255
[1888]	Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly		
[1889]	260	265	270
[1890]	Ser Asp Pro Ala Ser Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val		
[1891]	275	280	285
[1892]	Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Ala Leu Ser Arg Lys Val Ala Glu Leu		
[1893]	290	295	300
[1894]	Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val Thr Lys		
[1895]	305	310	315
[1896]	Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys		
[1897]	325	330	335
[1898]	Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly		
[1899]	340	345	350
[1900]	Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[1901]	355	360	
[1902]	<210> 79		
[1903]	<211> 285		
[1904]	<212> PRT		
[1905]	<213> 人工序列		
[1906]	<220>		
[1907]	<223> ATP117		
[1908]	<400> 79		
[1909]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		

[1910]	1	5	10	15
[1911]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[1912]		20	25	30
[1913]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Arg Thr Leu Thr Leu Phe			
[1914]		35	40	45
[1915]	Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn			
[1916]		50	55	60
[1917]	Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Pro Asp Ser Ser Tyr			
[1918]		65	70	75
[1919]	Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His Ser Ala Ser Pro Gln			
[1920]		85	90	95
[1921]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu			
[1922]		100	105	110
[1923]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe			
[1924]		115	120	125
[1925]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile			
[1926]		130	135	140
[1927]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Pro Pro Gln			
[1928]		145	150	155
[1929]	Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Val Asp			
[1930]		165	170	175
[1931]	Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile			
[1932]		180	185	190
[1933]	Ala Val Ile Val Val Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly			
[1934]		195	200	205
[1935]	Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro			
[1936]		210	215	220
[1937]	Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Arg Pro Ala Leu Gly Ser			
[1938]		225	230	235
[1939]	Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ser Thr Val His Glu Ile			
[1940]		245	250	255
[1941]	Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala			
[1942]		260	265	270
[1943]	Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[1944]		275	280	285
[1945]	<210> 80			
[1946]	<211> 232			
[1947]	<212> PRT			
[1948]	<213> 人工序列			

[1949]	<220>															
[1950]	<223> ATP118															
[1951]	<400> 80															
[1952]	Lys	Arg	Tyr	Lys	Asn	Arg	Val	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Phe			
[1953]	1			5			10					15				
[1954]	Lys	Gln	Leu	Leu	Gln	His	Tyr	Arg	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Ser	Ser
[1955]				20			25					30				
[1956]	Glu	Asn	Asp	Arg	Leu	Arg	Leu	Leu	Lys	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	
[1957]		35				40					45					
[1958]	Asn	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Ala	Arg	Ala	Tyr	Val	Ser	Gly	Ile	Gln	Asn
[1959]		50				55					60					
[1960]	Ser	Val	Ser	Ala	Asn	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Pro	Asp	Ser	Ser	Tyr
[1961]		65				70				75			80			
[1962]	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	His	Ser	Ala	Ser	Pro	Gln
[1963]				85				90					95			
[1964]	Tyr	Ser	Trp	Arg	Ile	Asn	Gly	Ile	Pro	Gln	Gln	His	Thr	Gln	Val	Leu
[1965]				100				105					110			
[1966]	Phe	Ile	Ala	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Asn	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ala	Cys	Phe
[1967]				115			120					125				
[1968]	Val	Ser	Asn	Leu	Ala	Thr	Gly	Arg	Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Lys	Ser	Ile
[1969]				130			135					140				
[1970]	Thr	Val	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Gln
[1971]		145				150					155			160		
[1972]	Val	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Tyr	Val	Asp
[1973]					165				170					175		
[1974]	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Phe	Ser	Met	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Val	Ile
[1975]					180				185					190		
[1976]	Ala	Val	Ile	Val	Val	Ser	Thr	Val	His	Glu	Ile	Leu	Cys	Lys	Leu	Ser
[1977]					195			200					205			
[1978]	Leu	Glu	Gly	Asp	His	Ser	Thr	Pro	Pro	Ser	Ala	Tyr	Gly	Ser	Val	Lys
[1979]				210			215					220				
[1980]	Pro	Tyr	Thr	Asn	Phe	Asp	Ala	Glu								
[1981]		225			230											
[1982]	<210> 81															
[1983]	<211> 261															
[1984]	<212> PRT															
[1985]	<213> 人工序列															
[1986]	<220>															
[1987]	<223> ATP119															

[1988]	<400> 81		
[1989]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[1990]	1	5	10 15
[1991]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[1992]	20	25	30
[1993]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Leu Gly Asp Pro Lys Lys		
[1994]	35	40	45
[1995]	Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln		
[1996]	50	55	60
[1997]	Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Ser Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg		
[1998]	65	70	75 80
[1999]	Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Ala Leu Ser Arg Lys Val		
[2000]	85	90	95
[2001]	Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro		
[2002]	100	105	110
[2003]	Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Ala Pro Thr Leu Pro		
[2004]	115	120	125
[2005]	Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys		
[2006]	130	135	140
[2007]	Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu		
[2008]	145	150	155 160
[2009]	Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Pro Gly		
[2010]	165	170	175
[2011]	Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg		
[2012]	180	185	190
[2013]	Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala		
[2014]	195	200	205
[2015]	Pro Asp Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val		
[2016]	210	215	220
[2017]	Thr Ser Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly		
[2018]	225	230	235 240
[2019]	Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr		
[2020]	245	250	255
[2021]	Asn Phe Asp Ala Glu		
[2022]	260		
[2023]	<210> 82		
[2024]	<211> 191		
[2025]	<212> PRT		
[2026]	<213> 人工序列		

[2027]	<220>		
[2028]	<223> ATP120		
[2029]	<400> 82		
[2030]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[2031]	1	5	10 15
[2032]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[2033]	20	25	30
[2034]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Arg Thr Leu Thr Leu Phe		
[2035]	35	40	45
[2036]	Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn		
[2037]	50	55	60
[2038]	Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Pro Asp Ser Ser Tyr		
[2039]	65	70	75 80
[2040]	Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His Ser Ala Ser Pro Gln		
[2041]	85	90	95
[2042]	Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu		
[2043]	100	105	110
[2044]	Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe		
[2045]	115	120	125
[2046]	Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile		
[2047]	130	135	140
[2048]	Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ser Thr Val His		
[2049]	145	150	155 160
[2050]	Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro		
[2051]	165	170	175
[2052]	Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[2053]	180	185	190
[2054]	<210> 83		
[2055]	<211> 311		
[2056]	<212> PRT		
[2057]	<213> 人工序列		
[2058]	<220>		
[2059]	<223> ATP121		
[2060]	<400> 83		
[2061]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[2062]	1	5	10 15
[2063]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[2064]	20	25	30
[2065]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Asn Arg Thr Leu Thr Leu		

[2066]	35	40	45
[2067]	Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln		
[2068]	50	55	60
[2069]	Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu		
[2070]	65	70	75
[2071]	Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Ser His		
[2072]	85	90	95
[2073]	Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln		
[2074]	100	105	110
[2075]	His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly		
[2076]	115	120	125
[2077]	Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser		
[2078]	130	135	140
[2079]	Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu		
[2080]	145	150	155
[2081]	Ser Ala Gly Ala Thr Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val		
[2082]	165	170	175
[2083]	Ala Leu Ile Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr		
[2084]	180	185	190
[2085]	Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala		
[2086]	195	200	205
[2087]	His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala		
[2088]	210	215	220
[2089]	Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe		
[2090]	225	230	235
[2091]	Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu		
[2092]	245	250	255
[2093]	Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala		
[2094]	260	265	270
[2095]	Val Ile Val Val Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu		
[2096]	275	280	285
[2097]	Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro		
[2098]	290	295	300
[2099]	Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[2100]	305	310	
[2101]	<210> 84		
[2102]	<211> 294		
[2103]	<212> PRT		
[2104]	<213> 人工序列		

[2105]	<220>															
[2106]	<223> ATP122															
[2107]	<400> 84															
[2108]	Lys	Arg	Tyr	Lys	Asn	Arg	Val	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Phe			
[2109]	1			5			10					15				
[2110]	Lys	Gln	Leu	Leu	Gln	His	Tyr	Arg	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Ser	Ser
[2111]				20			25					30				
[2112]	Glu	Asn	Asp	Arg	Leu	Arg	Leu	Leu	Lys	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	
[2113]				35			40				45					
[2114]	Phe	Asn	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Ala	Arg	Ala	Tyr	Val	Ser	Gly	Ile	Gln
[2115]				50			55				60					
[2116]	Asn	Ser	Val	Ser	Ala	Asn	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asp	Val	Leu
[2117]				65			70			75		80				
[2118]	Pro	Asp	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	His
[2119]				85			90				95					
[2120]	Ser	Ala	Ser	Pro	Gln	Tyr	Ser	Trp	Arg	Ile	Asn	Gly	Ile	Pro	Gln	Gln
[2121]				100			105				110					
[2122]	His	Thr	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Ala	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Asn	Asn	Gly
[2123]				115			120				125					
[2124]	Thr	Tyr	Ala	Cys	Phe	Val	Ser	Asn	Leu	Ala	Thr	Gly	Arg	Asn	Asn	Ser
[2125]				130			135				140					
[2126]	Ile	Val	Lys	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Gly	Leu
[2127]				145			150			155		160				
[2128]	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser
[2129]				165			170				175					
[2130]	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His
[2131]				180			185				190					
[2132]	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro
[2133]				195			200				205					
[2134]	Pro	Val	His	Asn	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Ala	Phe	Gly
[2135]				210			215				220					
[2136]	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys
[2137]				225			230			235		240				
[2138]	Ala	Pro	Glu	Phe	Ser	Met	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Val
[2139]				245			250				255					
[2140]	Ile	Val	Val	Ser	Thr	Val	His	Glu	Ile	Leu	Cys	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu
[2141]				260			265				270					
[2142]	Gly	Asp	His	Ser	Thr	Pro	Pro	Ser	Ala	Tyr	Gly	Ser	Val	Lys	Pro	Tyr
[2143]				275			280				285					

[2144]	Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[2145]	290			
[2146]	<210> 85			
[2147]	<211> 294			
[2148]	<212> PRT			
[2149]	<213> 人工序列			
[2150]	<220>			
[2151]	<223> ATP123			
[2152]	<400> 85			
[2153]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[2154]	1 5 10 15			
[2155]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[2156]	20 25 30			
[2157]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Asn Arg Thr Leu Thr Leu			
[2158]	35 40 45			
[2159]	Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln			
[2160]	50 55 60			
[2161]	Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu			
[2162]	65 70 75 80			
[2163]	Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His			
[2164]	85 90 95			
[2165]	Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln			
[2166]	100 105 110			
[2167]	His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly			
[2168]	115 120 125			
[2169]	Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser			
[2170]	130 135 140			
[2171]	Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu			
[2172]	145 150 155 160			
[2173]	Ser Ala Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser			
[2174]	165 170 175			
[2175]	Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His			
[2176]	180 185 190			
[2177]	Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro			
[2178]	195 200 205			
[2179]	Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly			
[2180]	210 215 220			
[2181]	Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys			
[2182]	225 230 235 240			

[2183]	Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val		
[2184]	245	250	255
[2185]	Ile Val Val Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu		
[2186]	260	265	270
[2187]	Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr		
[2188]	275	280	285
[2189]	Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[2190]	290		
[2191]	<210> 86		
[2192]	<211> 344		
[2193]	<212> PRT		
[2194]	<213> 人工序列		
[2195]	<220>		
[2196]	<223> ATP124		
[2197]	<400> 86		
[2198]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[2199]	1 5 10 15		
[2200]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[2201]	20 25 30		
[2202]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Asn Arg Thr Leu Thr Leu		
[2203]	35 40 45		
[2204]	Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln		
[2205]	50 55 60		
[2206]	Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu		
[2207]	65 70 75 80		
[2208]	Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His		
[2209]	85 90 95		
[2210]	Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln		
[2211]	100 105 110		
[2212]	His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly		
[2213]	115 120 125		
[2214]	Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser		
[2215]	130 135 140		
[2216]	Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu		
[2217]	145 150 155 160		
[2218]	Ser Ala Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp		
[2219]	165 170 175		
[2220]	His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala		
[2221]	180 185 190		

[2222]	Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu			
[2223]	195	200	205	
[2224]	Asp Arg Glu Arg Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val			
[2225]	210	215	220	
[2226]	Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro			
[2227]	225	230	235	240
[2228]	Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr			
[2229]	245	250	255	
[2230]	Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala			
[2231]	260	265	270	
[2232]	Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Leu Ile Tyr Tyr Val Asp			
[2233]	275	280	285	
[2234]	Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile			
[2235]	290	295	300	
[2236]	Ala Val Ile Val Val Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser			
[2237]	305	310	315	320
[2238]	Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys			
[2239]	325	330	335	
[2240]	Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[2241]	340			
[2242]	<210> 87			
[2243]	<211> 344			
[2244]	<212> PRT			
[2245]	<213> 人工序列			
[2246]	<220>			
[2247]	<223> ATP125			
[2248]	<400> 87			
[2249]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[2250]	1 5 10 15			
[2251]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[2252]	20 25 30			
[2253]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Asn Arg Thr Leu Thr Leu			
[2254]	35 40 45			
[2255]	Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln			
[2256]	50 55 60			
[2257]	Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu			
[2258]	65 70 75 80			
[2259]	Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His			
[2260]	85 90 95			

[2261]	Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln		
[2262]	100	105	110
[2263]	His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly		
[2264]	115	120	125
[2265]	Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser		
[2266]	130	135	140
[2267]	Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu		
[2268]	145	150	155
[2269]	Ser Ala Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp		
[2270]	165	170	175
[2271]	His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala		
[2272]	180	185	190
[2273]	Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu		
[2274]	195	200	205
[2275]	Asp Arg Glu Arg Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val		
[2276]	210	215	220
[2277]	Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro		
[2278]	225	230	235
[2279]	Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr		
[2280]	245	250	255
[2281]	Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala		
[2282]	260	265	270
[2283]	Phe Gly Leu Leu Ala Ala Thr Ala Leu Ile Tyr Tyr Val Asp		
[2284]	275	280	285
[2285]	Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile		
[2286]	290	295	300
[2287]	Ala Val Ile Val Val Ser Thr Val His Glu Ile Leu Ser Lys Leu Ser		
[2288]	305	310	315
[2289]	Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys		
[2290]	325	330	335
[2291]	Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[2292]	340		
[2293]	<210> 88		
[2294]	<211> 397		
[2295]	<212> PRT		
[2296]	<213> 人工序列		
[2297]	<220>		
[2298]	<223> ATP127		
[2299]	<400> 88		

[2300]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[2301]	1	5	10
[2302]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[2303]	20	25	30
[2304]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Asn Arg Thr Leu Thr Leu		
[2305]	35	40	45
[2306]	Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln		
[2307]	50	55	60
[2308]	Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu		
[2309]	65	70	75
[2310]	Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His		
[2311]	85	90	95
[2312]	Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln		
[2313]	100	105	110
[2314]	His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly		
[2315]	115	120	125
[2316]	Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser		
[2317]	130	135	140
[2318]	Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu		
[2319]	145	150	155
[2320]	Ser Ala Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp		
[2321]	165	170	175
[2322]	His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala		
[2323]	180	185	190
[2324]	Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu		
[2325]	195	200	205
[2326]	Asp Arg Glu Arg Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu		
[2327]	210	215	220
[2328]	Ala Ala Ala Thr Ala Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu		
[2329]	225	230	235
[2330]	Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val Ile Val Val		
[2331]	245	250	255
[2332]	Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu		
[2333]	260	265	270
[2334]	Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly		
[2335]	275	280	285
[2336]	Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu		
[2337]	290	295	300
[2338]	Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg		

[2339]	305	310	315	320
[2340]	Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala			
[2341]		325	330	335
[2342]	Pro Arg Gly Pro Ser Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu			
[2343]		340	345	350
[2344]	Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr Ser Thr Val His Glu Ile			
[2345]		355	360	365
[2346]	Leu Ser Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala			
[2347]		370	375	380
[2348]	Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[2349]		385	390	395
[2350]	<210> 89			
[2351]	<211> 353			
[2352]	<212> PRT			
[2353]	<213> 人工序列			
[2354]	<220>			
[2355]	<223> ATP128			
[2356]	<400> 89			
[2357]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe			
[2358]	1	5	10	15
[2359]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser			
[2360]		20	25	30
[2361]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Asn Arg Thr Leu Thr Leu			
[2362]		35	40	45
[2363]	Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln			
[2364]		50	55	60
[2365]	Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu			
[2366]		65	70	75
[2367]	80			
[2368]	Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His			
[2369]		85	90	95
[2370]	Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln			
[2371]		100	105	110
[2372]	His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly			
[2373]		115	120	125
[2374]	Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser			
[2375]		130	135	140
[2376]	Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu			
[2377]		145	150	155
[2378]	Ser Ala Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp			160

[2378]	165	170	175
[2379]	His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala		
[2380]	180	185	190
[2381]	Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu		
[2382]	195	200	205
[2383]	Asp Arg Glu Arg Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn		
[2384]	210	215	220
[2385]	Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val		
[2386]	225	230	235
[2387]	Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg		
[2388]	245	250	255
[2389]	Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His		
[2390]	260	265	270
[2391]	Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val		
[2392]	275	280	285
[2393]	Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Ser Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala		
[2394]	290	295	300
[2395]	Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr Ser Thr		
[2396]	305	310	315
[2397]	Val His Glu Ile Leu Ser Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr		
[2398]	325	330	335
[2399]	Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala		
[2400]	340	345	350
[2401]	Glu		
[2402]	<210> 90		
[2403]	<211> 358		
[2404]	<212> PRT		
[2405]	<213> 人工序列		
[2406]	<220>		
[2407]	<223> ATP129		
[2408]	<400> 90		
[2409]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[2410]	1	5	10
[2411]	15		
[2412]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[2413]	20	25	30
[2414]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Asn Arg Thr Leu Thr Leu		
[2415]	35	40	45
[2416]	Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln		
	50	55	60

[2417]	Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu			
[2418]	65	70	75	80
[2419]	Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His			
[2420]	85	90	95	
[2421]	Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln			
[2422]	100	105	110	
[2423]	His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly			
[2424]	115	120	125	
[2425]	Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser			
[2426]	130	135	140	
[2427]	Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu			
[2428]	145	150	155	160
[2429]	Ser Ala Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp			
[2430]	165	170	175	
[2431]	His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala			
[2432]	180	185	190	
[2433]	Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu			
[2434]	195	200	205	
[2435]	Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn			
[2436]	210	215	220	
[2437]	Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala			
[2438]	225	230	235	240
[2439]	Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys			
[2440]	245	250	255	
[2441]	Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg			
[2442]	260	265	270	
[2443]	Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu			
[2444]	275	280	285	
[2445]	Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Ser Glu Gly			
[2446]	290	295	300	
[2447]	Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu			
[2448]	305	310	315	320
[2449]	Gly Gly Tyr Ser Thr Val His Glu Ile Leu Ser Lys Leu Ser Leu Glu			
[2450]	325	330	335	
[2451]	Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Pro Tyr			
[2452]	340	345	350	
[2453]	Thr Asn Phe Asp Ala Glu			
[2454]	355			
[2455]	<210> 91			

[2456]	<211> 396		
[2457]	<212> PRT		
[2458]	<213> 人工序列		
[2459]	<220>		
[2460]	<223> ATP130		
[2461]	<400> 91		
[2462]	Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe		
[2463]	1	5	10
[2464]	Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser		
[2465]	20	25	30
[2466]	Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Asn Arg Thr Leu Thr Leu		
[2467]	35	40	45
[2468]	Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Ser Gly Ile Gln		
[2469]	50	55	60
[2470]	Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu		
[2471]	65	70	75
[2472]	Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His		
[2473]	85	90	95
[2474]	Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln		
[2475]	100	105	110
[2476]	His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly		
[2477]	115	120	125
[2478]	Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser		
[2479]	130	135	140
[2480]	Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu		
[2481]	145	150	155
[2482]	Ser Ala Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp		
[2483]	165	170	175
[2484]	His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala		
[2485]	180	185	190
[2486]	Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu		
[2487]	195	200	205
[2488]	Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn		
[2489]	210	215	220
[2490]	Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala		
[2491]	225	230	235
[2492]	Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys		
[2493]	245	250	255
[2494]	Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg		

[2495]	260	265	270
[2496]	Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu		
[2497]	275	280	285
[2498]	Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr		
[2499]	290	295	300
[2500]	Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg		
[2501]	305	310	315
[2502]	Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp		
[2503]	325	330	335
[2504]	Asp Ser Gly Ser Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu		
[2505]	340	345	350
[2506]	Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr Ser Thr Val His Glu Ile Leu		
[2507]	355	360	365
[2508]	Ser Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr		
[2509]	370	375	380
[2510]	Gly Ser Val Lys Pro Tyr Thr Asn Phe Asp Ala Glu		
[2511]	385	390	395
[2512]	<210> 92		
[2513]	<211> 193		
[2514]	<212> PRT		
[2515]	<213> 人工序列		
[2516]	<220>		
[2517]	<223> ASCL2		
[2518]	<400> 92		
[2519]	Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val		
[2520]	1	5	10
[2521]	15		
[2522]	Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu		
[2523]	20	25	30
[2524]	Arg Cys Ser Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly		
[2525]	35	40	45
[2526]	Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys		
[2527]	50	55	60
[2528]	Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly		
[2529]	65	70	75
[2530]	80		
[2531]	Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val		
[2532]	85	90	95
[2533]	Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val		
[2534]	100	105	110
[2535]	Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser		

[2534]	115	120	125
[2535]	Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser		
[2536]	130	135	140
[2537]	Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser		
[2538]	145	150	155
[2539]	Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu		
[2540]	165	170	175
[2541]	Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly		
[2542]	180	185	190
[2543]	Tyr		
[2544]	<210> 93		
[2545]	<211> 10		
[2546]	<212> PRT		
[2547]	<213> 人工序列		
[2548]	<220>		
[2549]	<223> ASCL2表位		
[2550]	<400> 93		
[2551]	Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln		
[2552]	1	5	10
[2553]	<210> 94		
[2554]	<211> 10		
[2555]	<212> PRT		
[2556]	<213> 人工序列		
[2557]	<220>		
[2558]	<223> ASCL2表位		
[2559]	<400> 94		
[2560]	Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp		
[2561]	1	5	10
[2562]	<210> 95		
[2563]	<211> 50		
[2564]	<212> PRT		
[2565]	<213> 人工序列		
[2566]	<220>		
[2567]	<223> 存活蛋白片段		
[2568]	<400> 95		
[2569]	Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg		
[2570]	1	5	10
[2571]	Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ser Ala Val Lys		
[2572]	20	25	30

[2573]	Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg			
[2574]	35	40	45	
[2575]	Glu Arg			
[2576]	50			
[2577]	<210> 96			
[2578]	<211> 120			
[2579]	<212> PRT			
[2580]	<213> 人工序列			
[2581]	<220>			
[2582]	<223> CEA片段			
[2583]	<400> 96			
[2584]	Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala			
[2585]	1	5	10	15
[2586]	Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro			
[2587]	20	25	30	
[2588]	Val Thr Leu Asp Val Leu Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn			
[2589]	35	40	45	
[2590]	Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile			
[2591]	50	55	60	
[2592]	Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile			
[2593]	65	70	75	80
[2594]	Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala			
[2595]	85	90	95	
[2596]	Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser			
[2597]	100	105	110	
[2598]	Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala			
[2599]	115	120		
[2600]	<210> 97			
[2601]	<211> 106			
[2602]	<212> PRT			
[2603]	<213> 人工序列			
[2604]	<220>			
[2605]	<223> ASCL2片段			
[2606]	<400> 97			
[2607]	Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu			
[2608]	1	5	10	15
[2609]	Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly			
[2610]	20	25	30	
[2611]	Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu			

[2612]	35	40	45
[2613]	Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg		
[2614]	50	55	60
[2615]	Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala		
[2616]	65	70	75
[2617]	Pro Arg Gly Pro Ser Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu		80
[2618]	85	90	95
[2619]	Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr		
[2620]	100	105	
[2621]	<210> 98		
[2622]	<211> 276		
[2623]	<212> PRT		
[2624]	<213> 人工序列		
[2625]	<220>		
[2626]	<223> ATP128的抗原货物		
[2627]	<400> 98		
[2628]	Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala		
[2629]	1	5	10
[2630]	15		
[2631]	Tyr Val Ser Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro		
[2632]	20	25	30
[2633]	Val Thr Leu Asp Val Leu Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn		
[2634]	35	40	45
[2635]	Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile		
[2636]	50	55	60
[2637]	Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile		
[2638]	65	70	75
[2639]	80		
[2640]	Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala		
[2641]	85	90	95
[2642]	Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser		
[2643]	100	105	110
[2644]	Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp		
[2645]	115	120	125
[2646]	Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro		
[2647]	130	135	140
[2648]	Phe Leu Glu Gly Ser Ala Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu		
[2649]	145	150	155
[2650]	Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Ala Val Ala Arg Arg		160
[2649]	165	170	175
[2650]	Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln		

[2651]	180	185	190
[2652]	Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser		
[2653]	195	200	205
[2654]	Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln		
[2655]	210	215	220
[2656]	Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly		
[2657]	225	230	235
[2658]	Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Ser Glu		
[2659]	245	250	255
[2660]	Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp		
[2661]	260	265	270
[2662]	Leu Gly Gly Tyr		
[2663]	275		

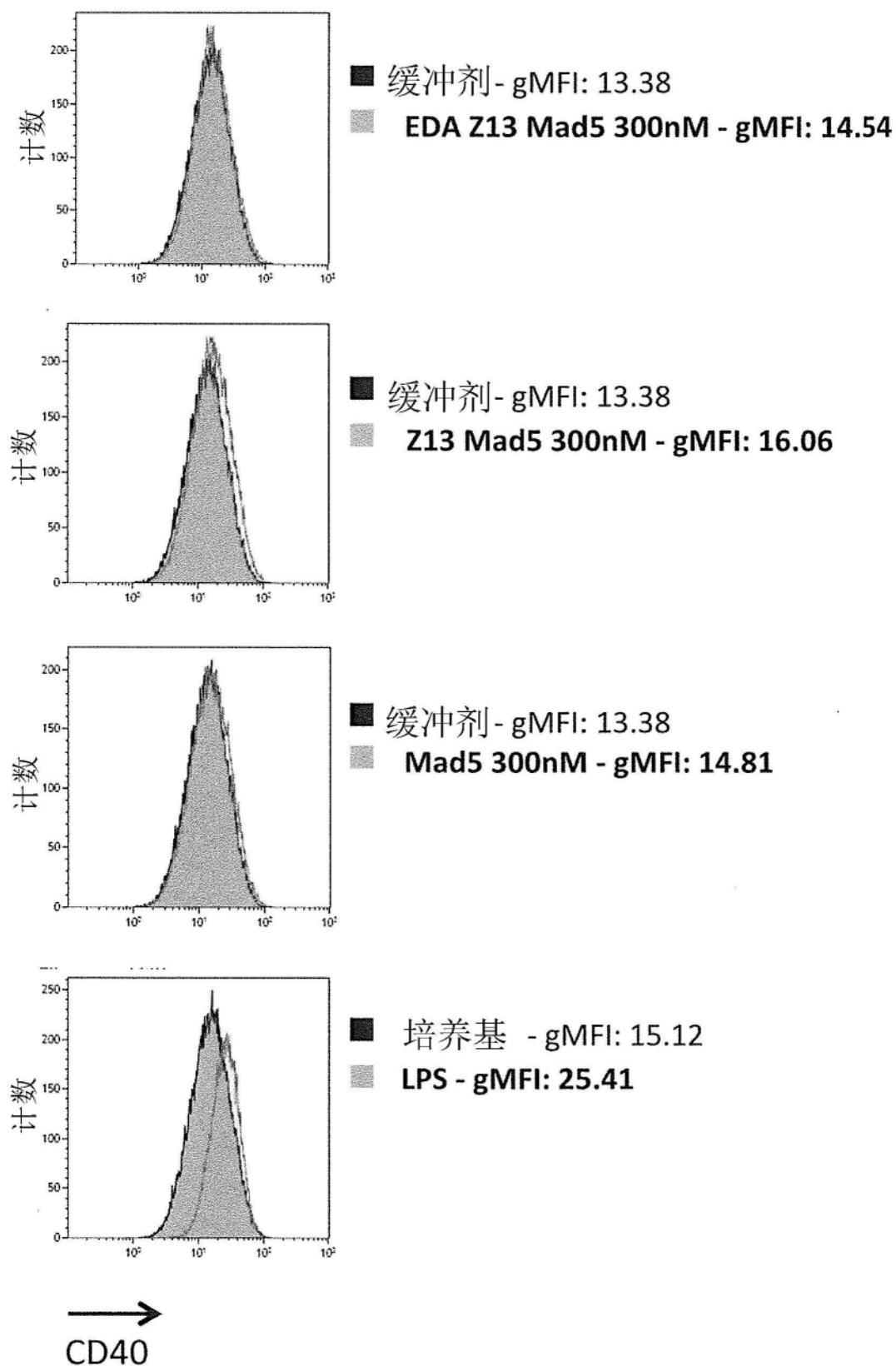


图1

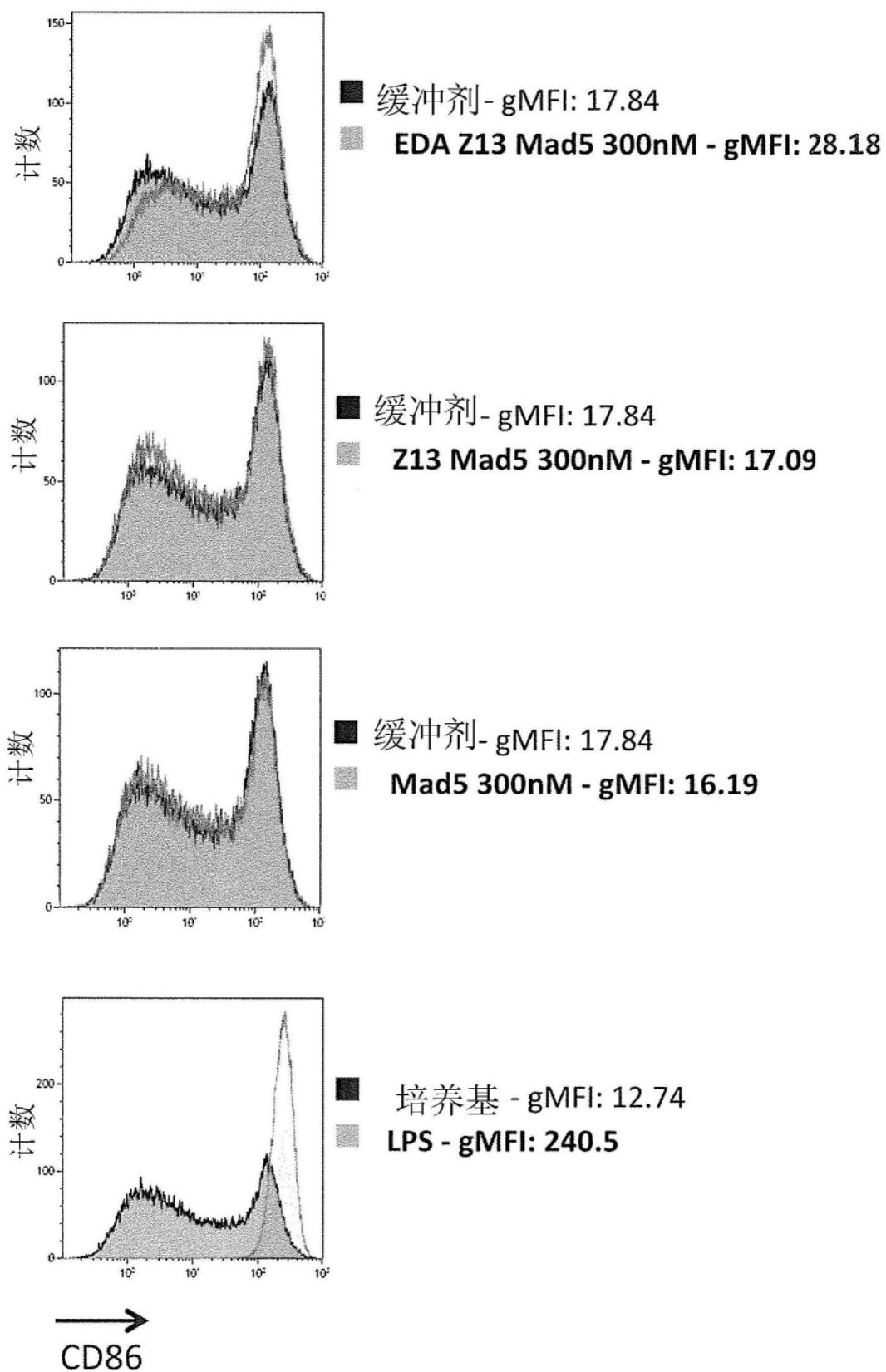


图2

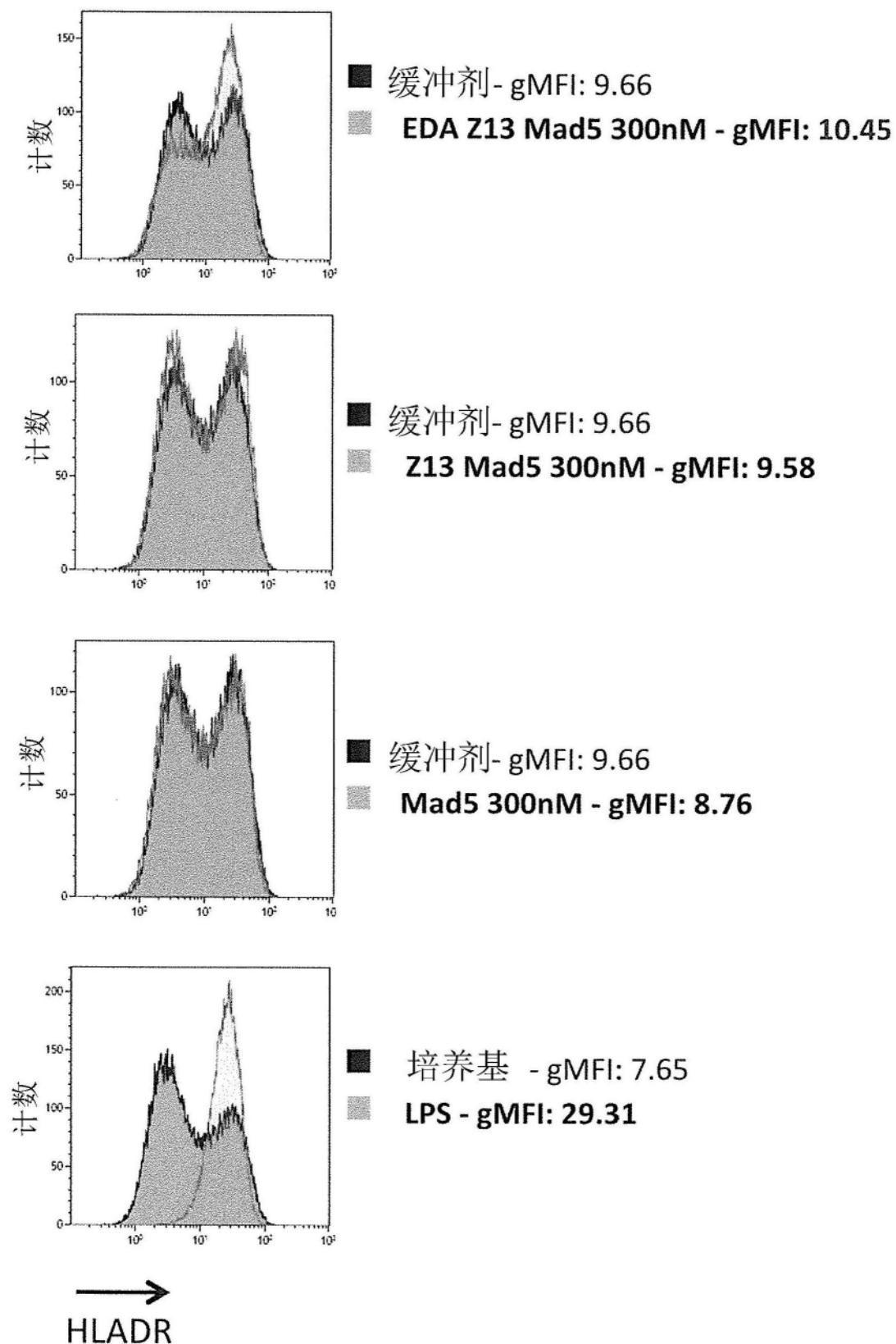


图3

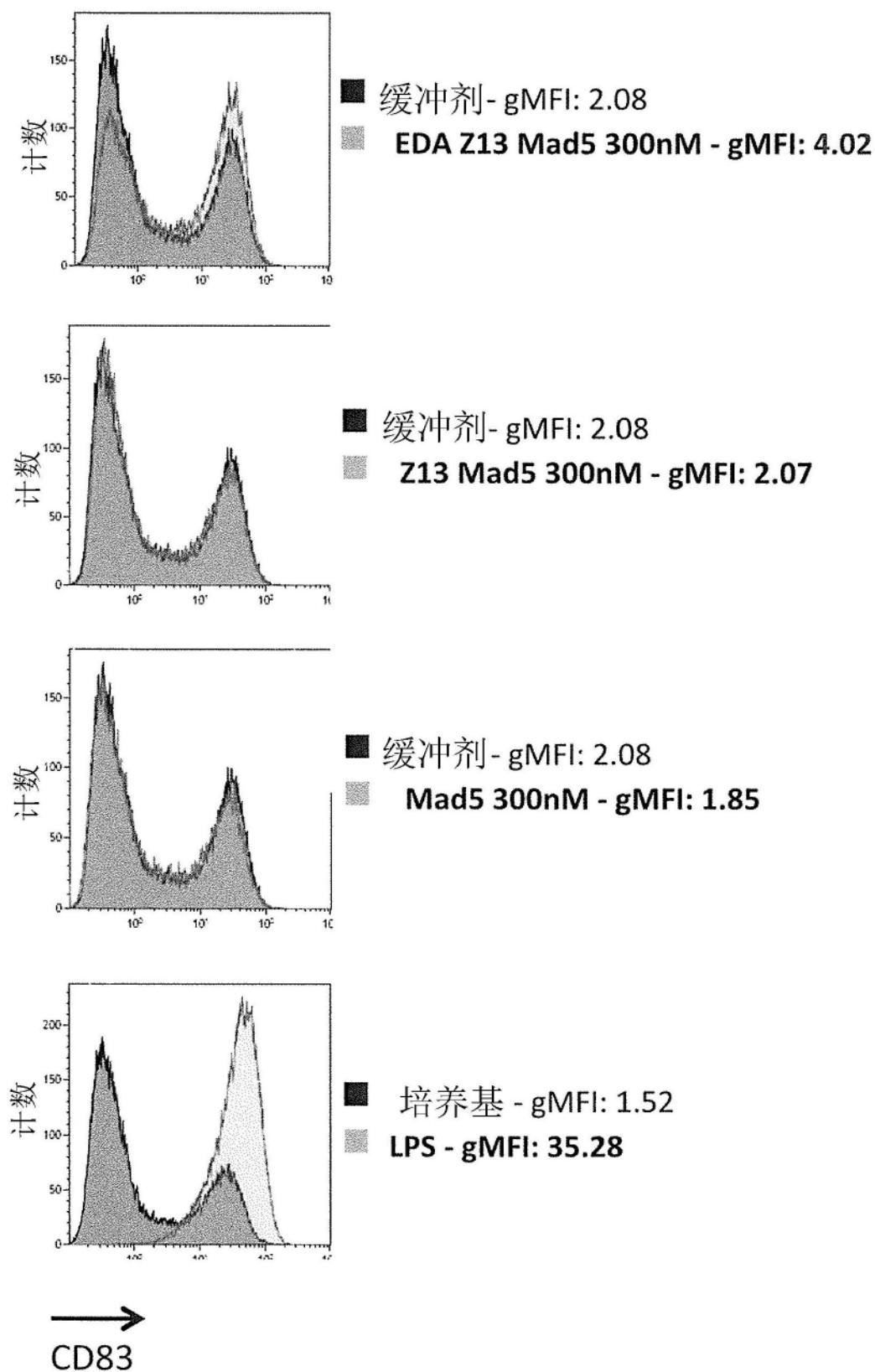


图4

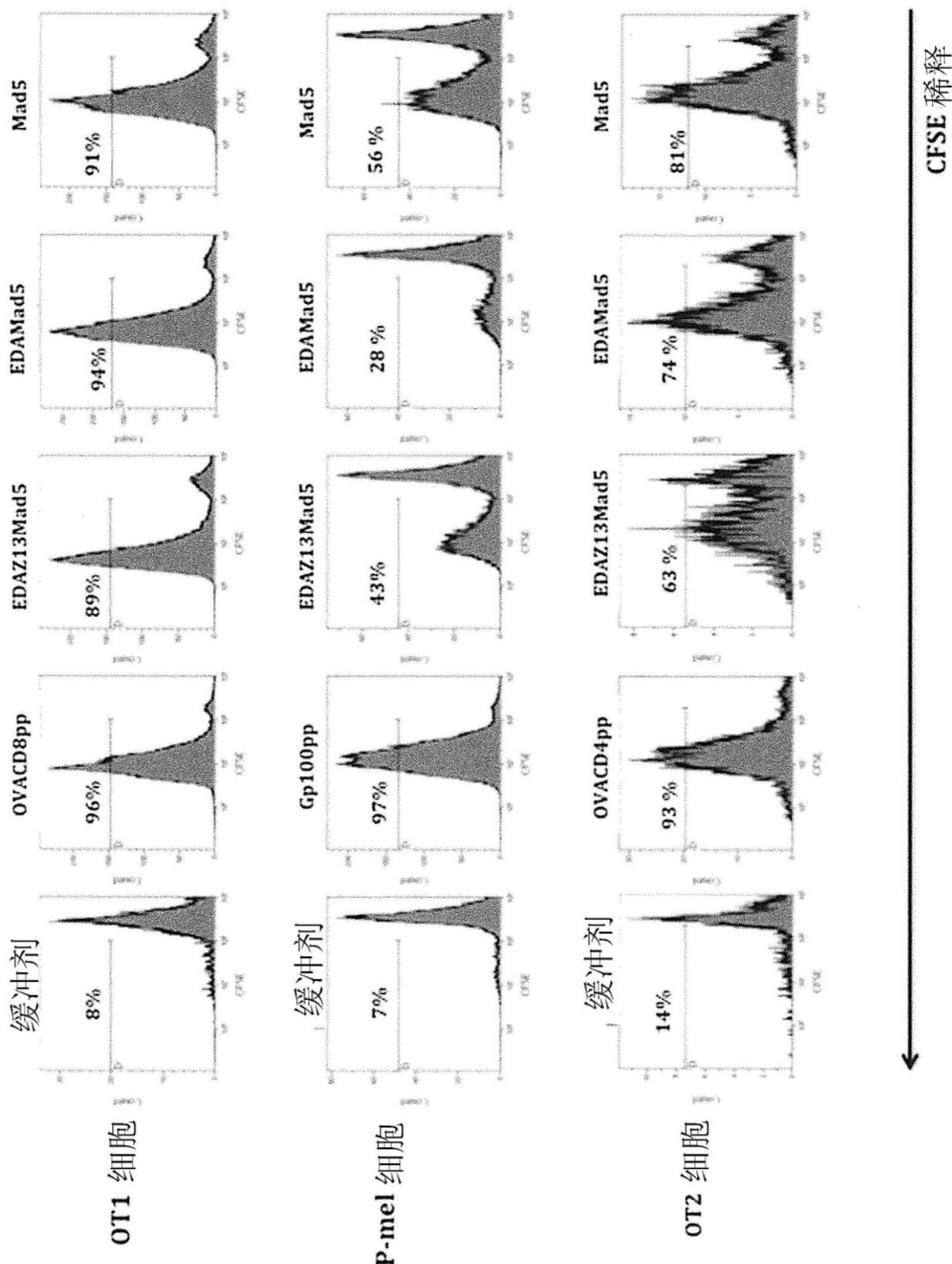
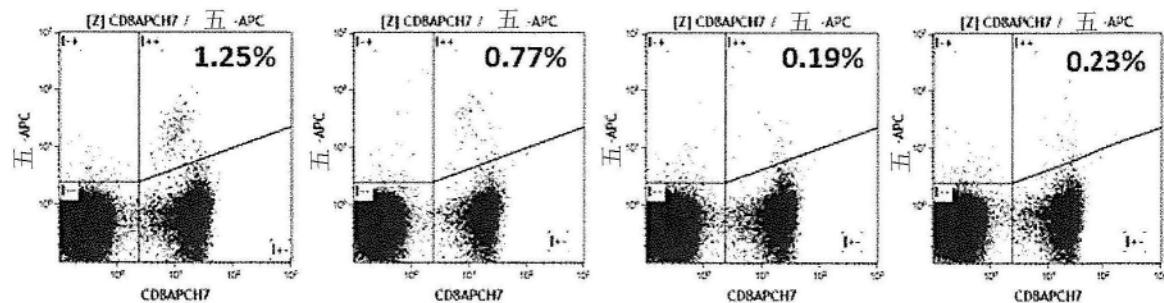


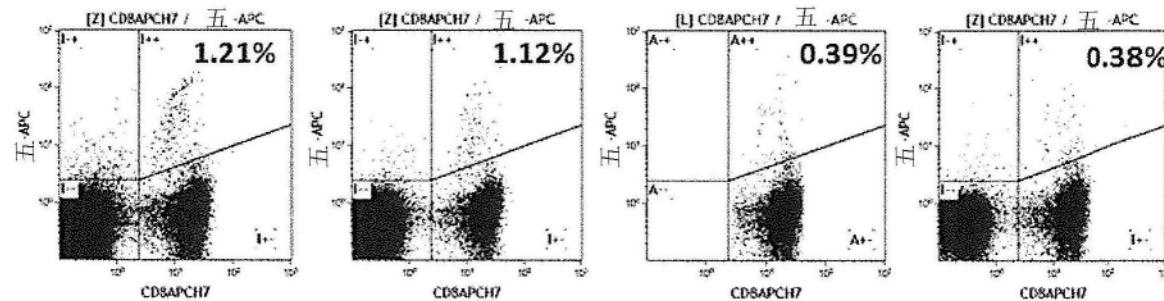
图5

注射的2 nmol蛋白质

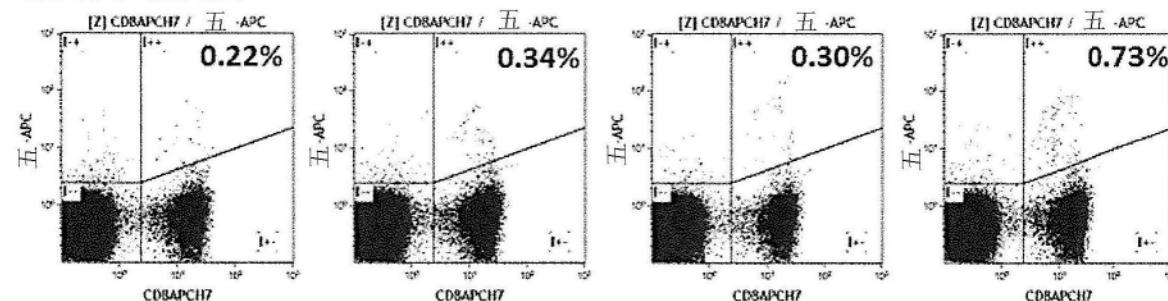
EDA-MAD5



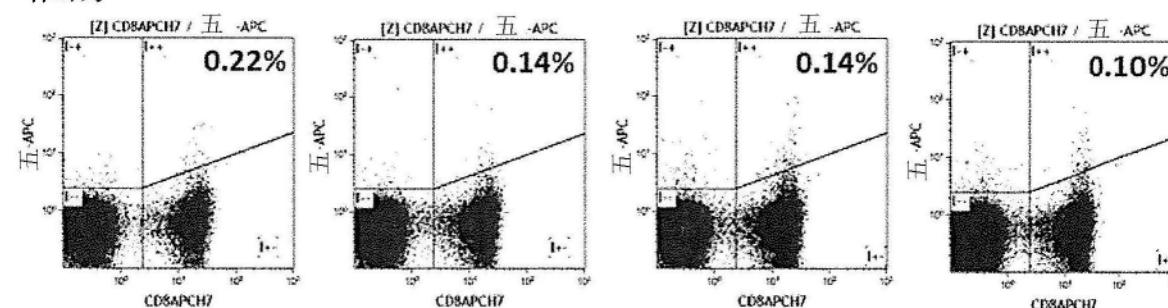
EDA-Z13-MAD5



MAD5+MPLA



稚的

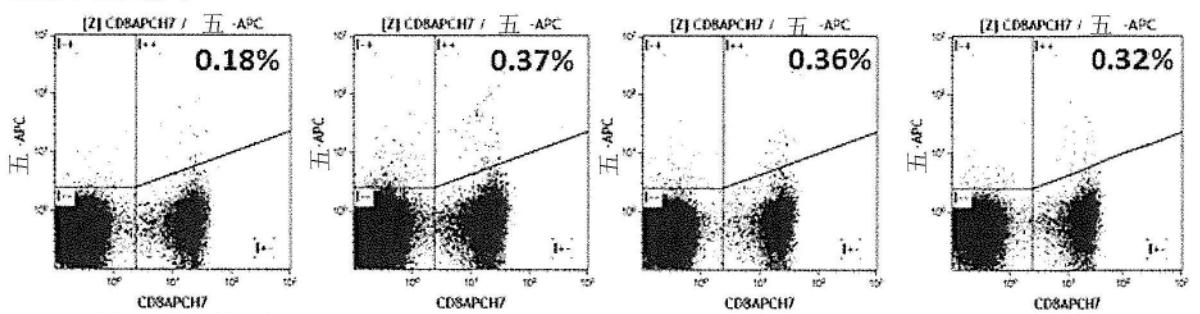


五聚体
CD8

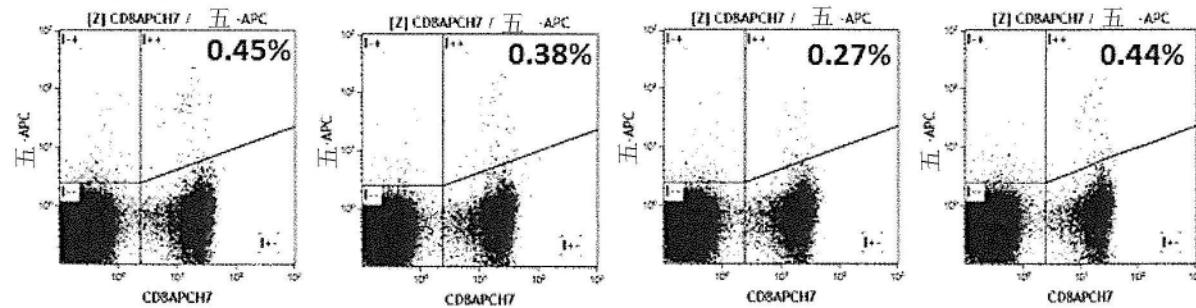
图6

注射的10 nmol蛋白质

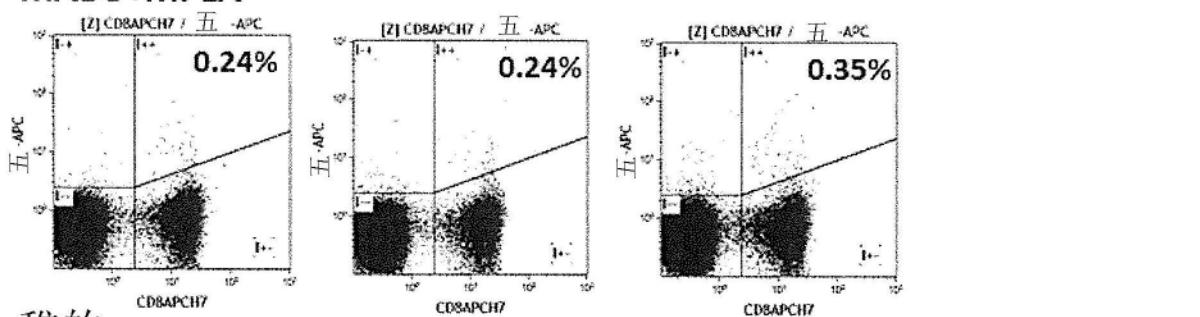
EDA-MAD5



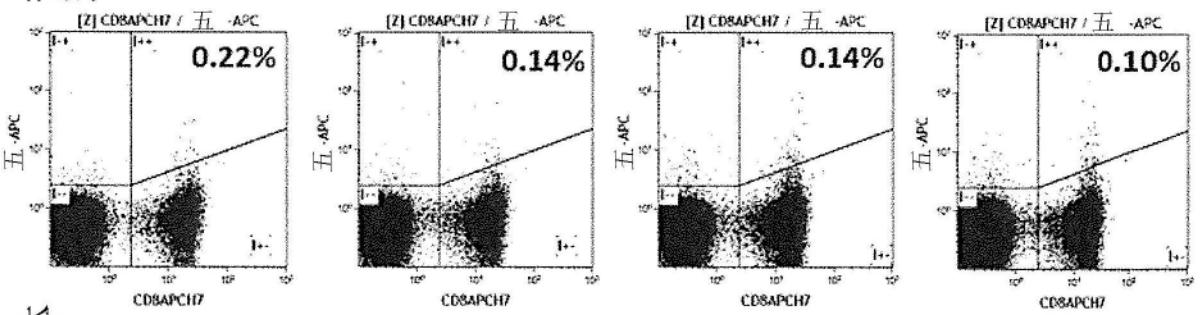
EDA-Z13-MAD5



MAD5+MPLA



稚的



五聚体
CD8

图7

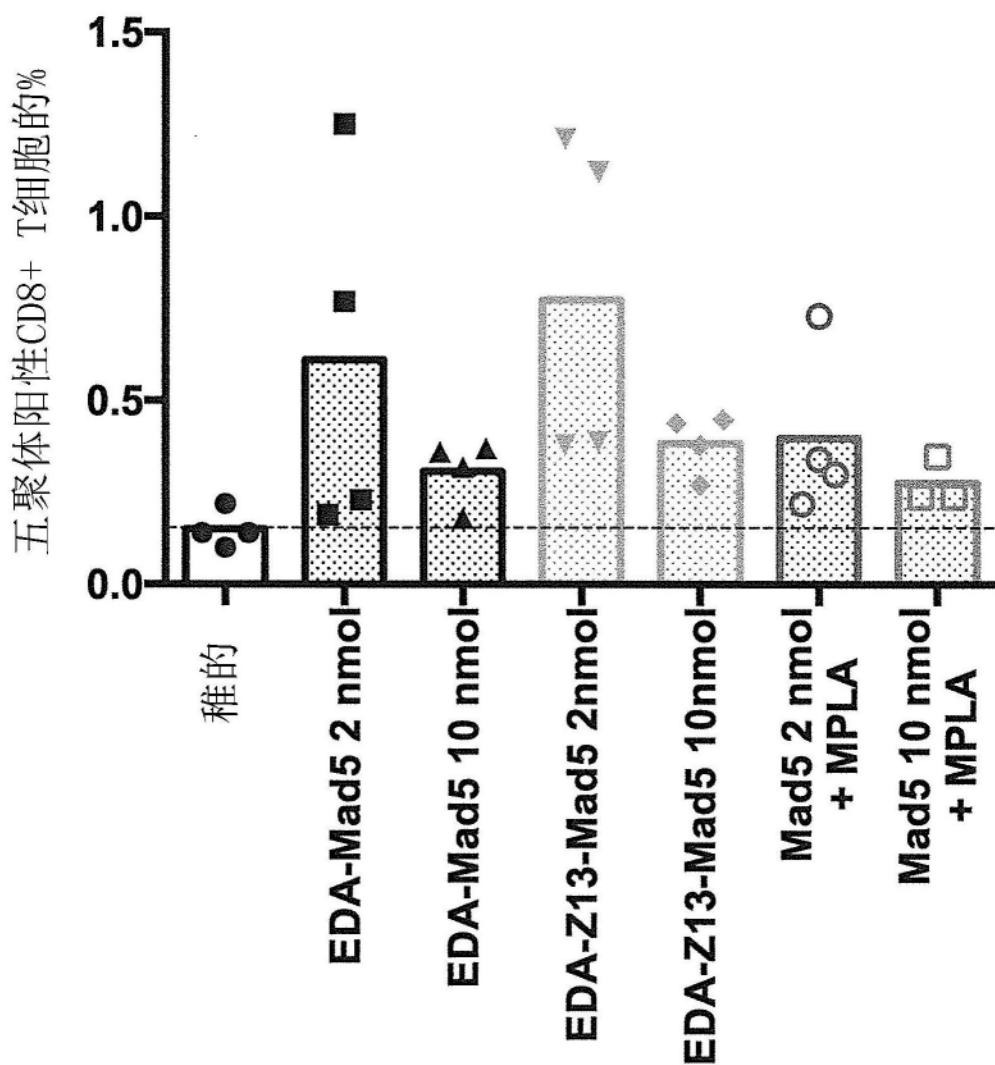
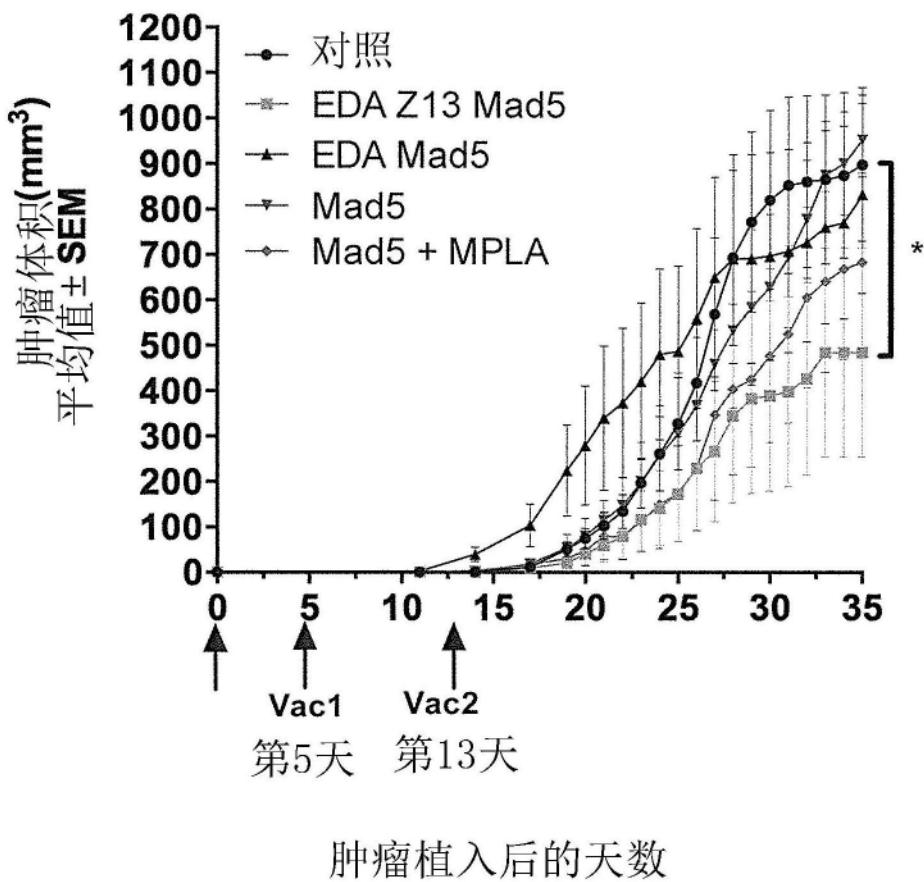


图8



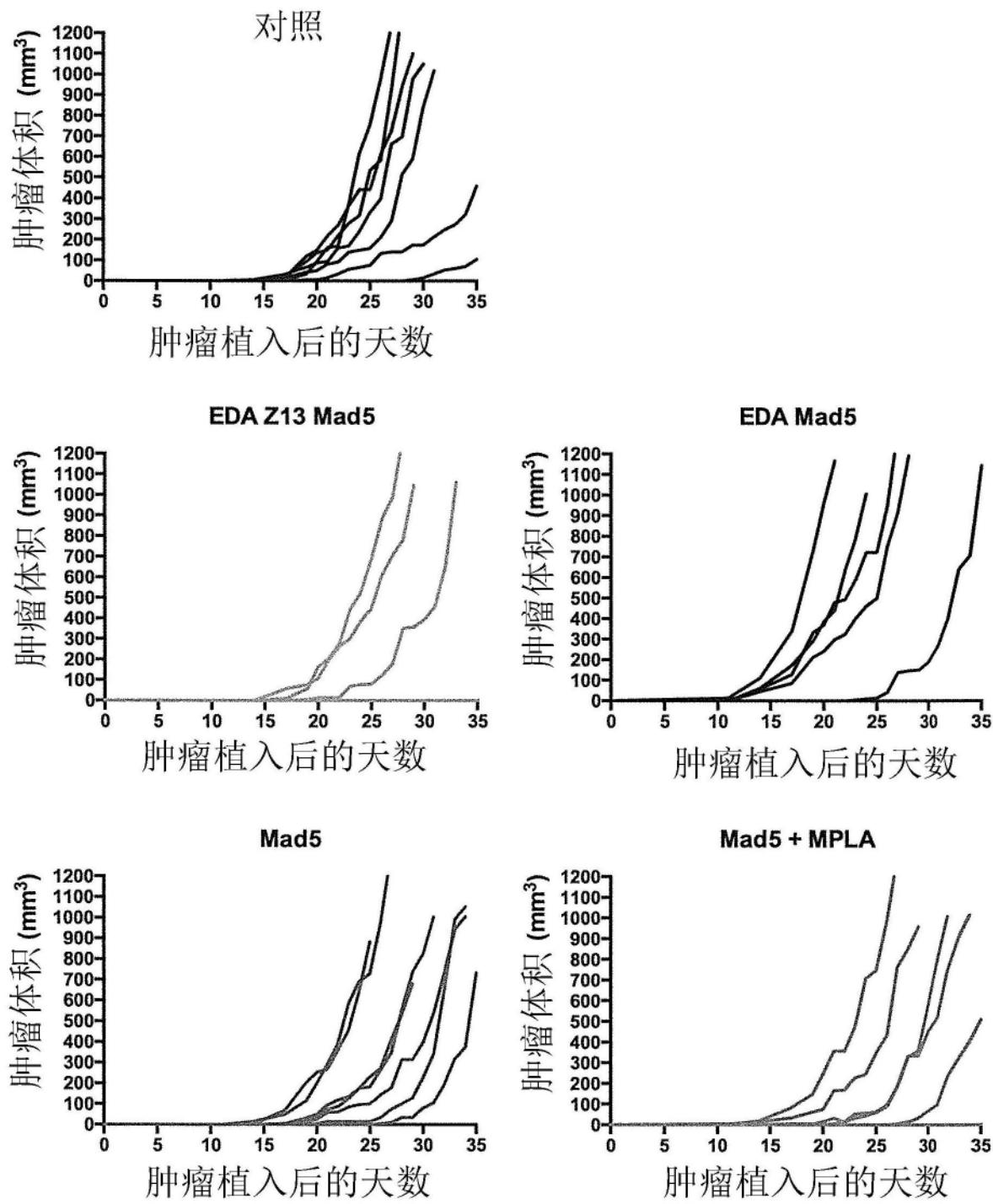
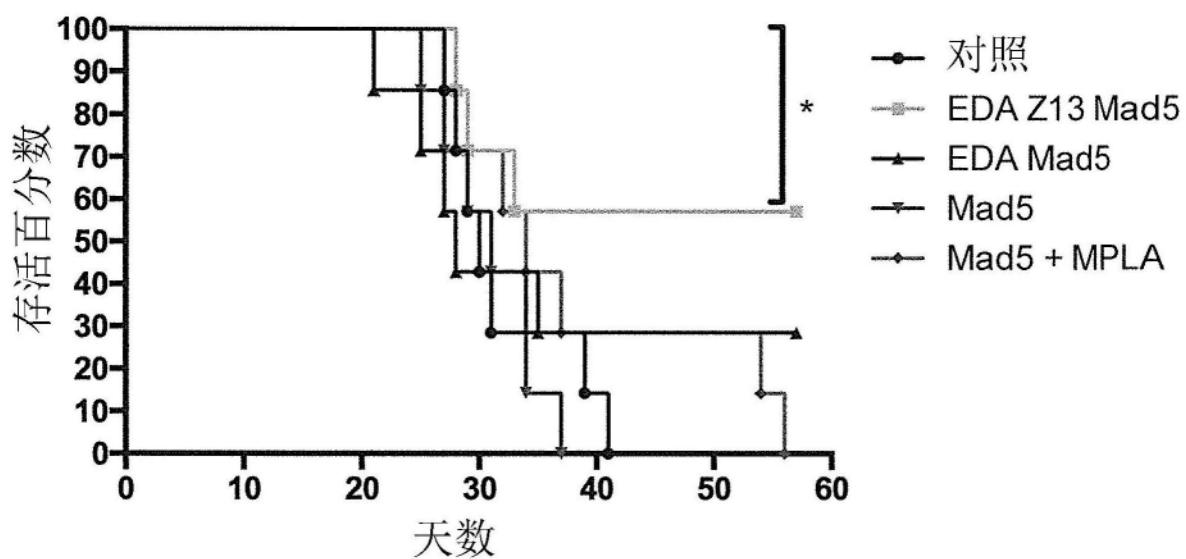


图10

A



B

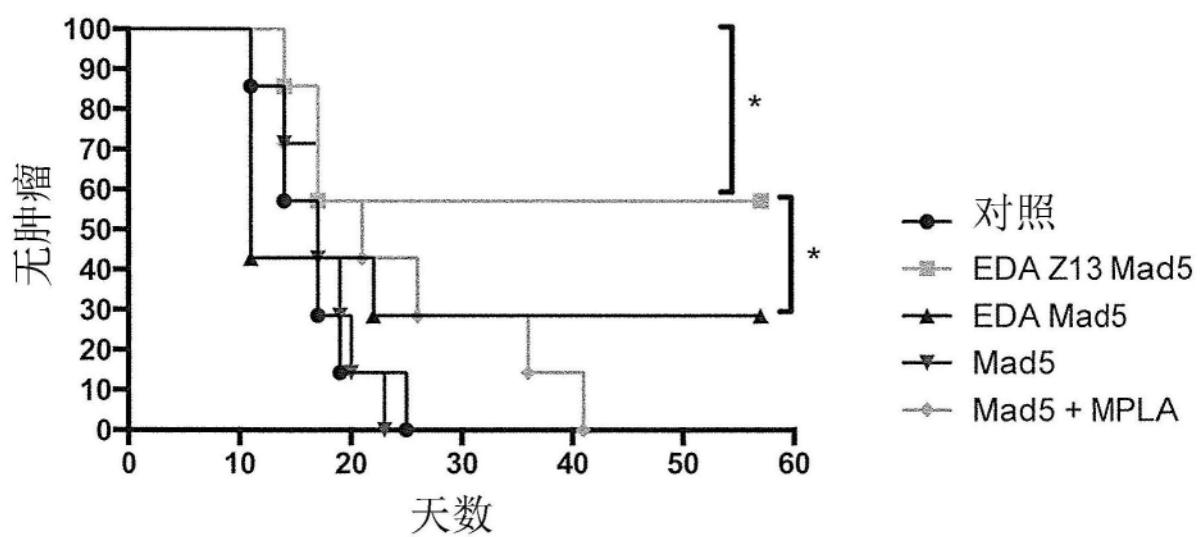


图11

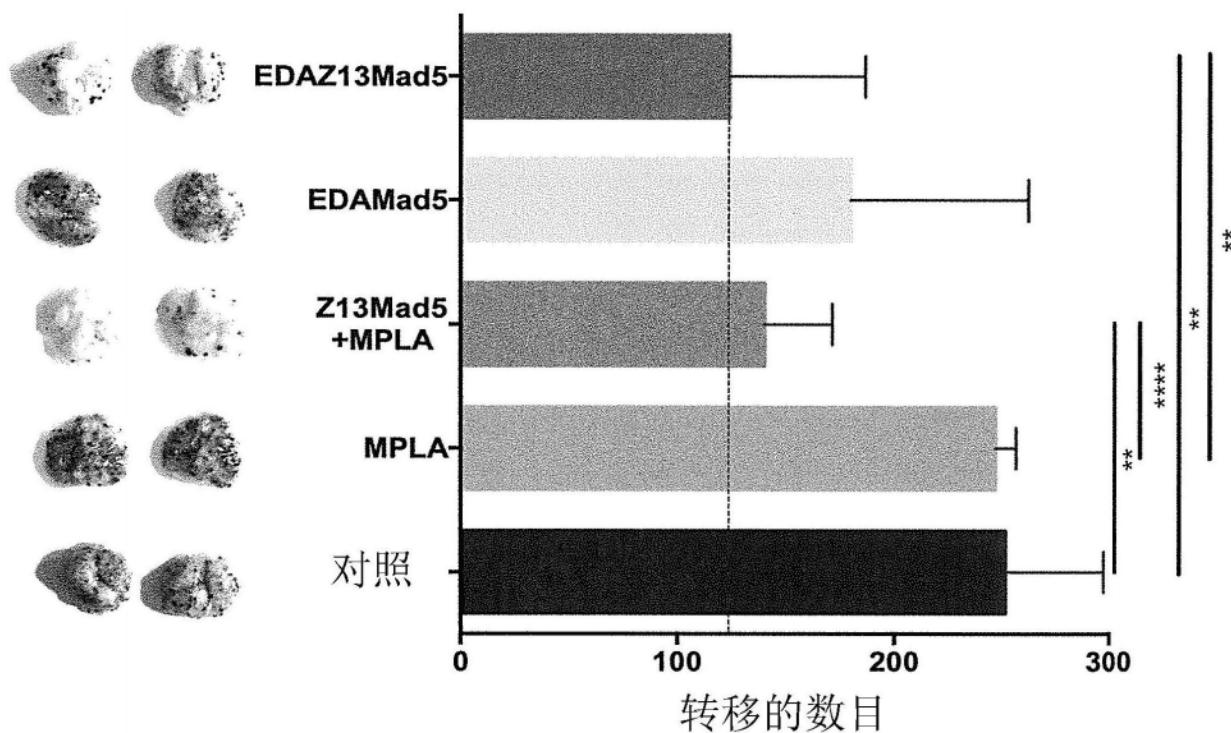


图12

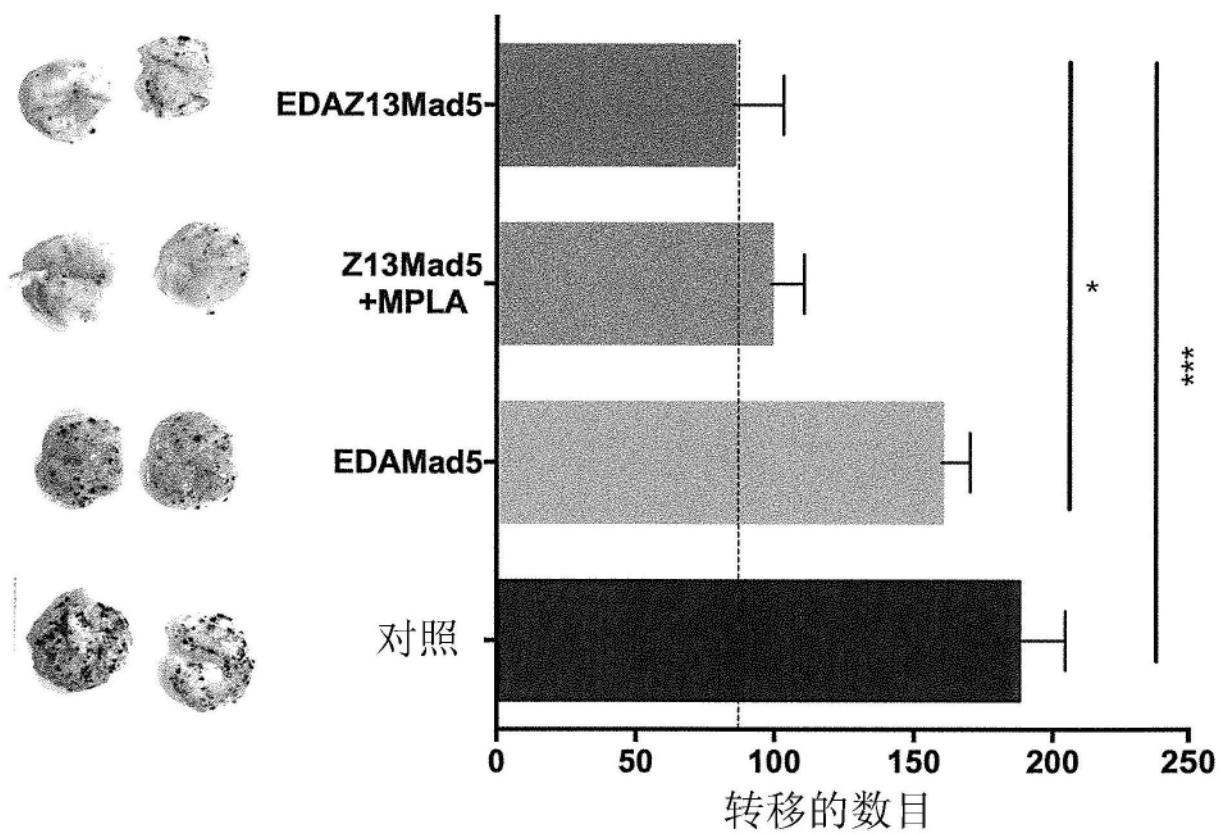
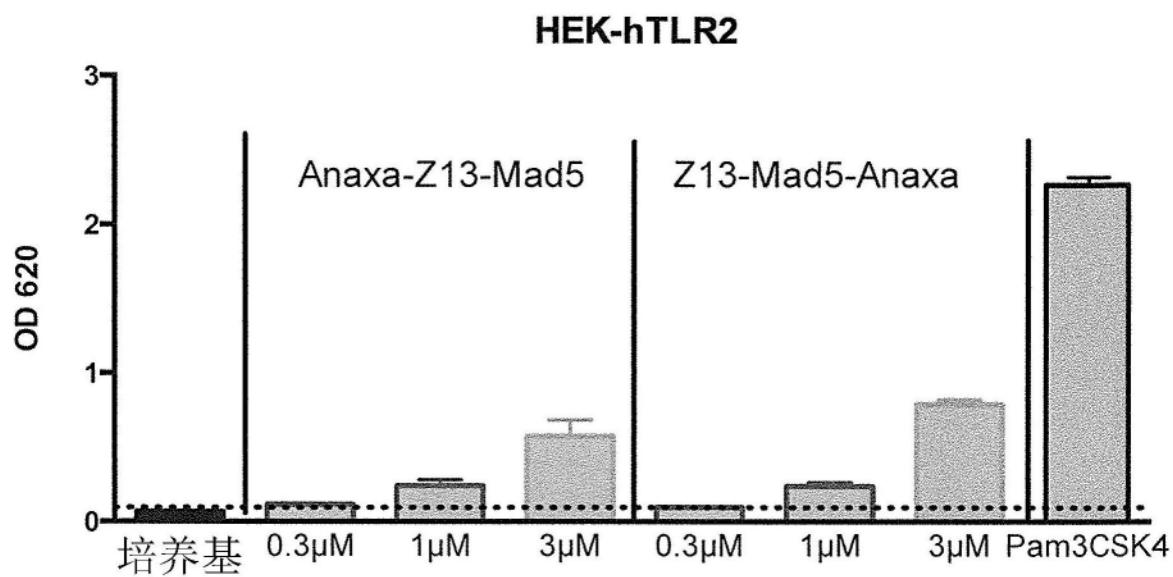


图13

A



B

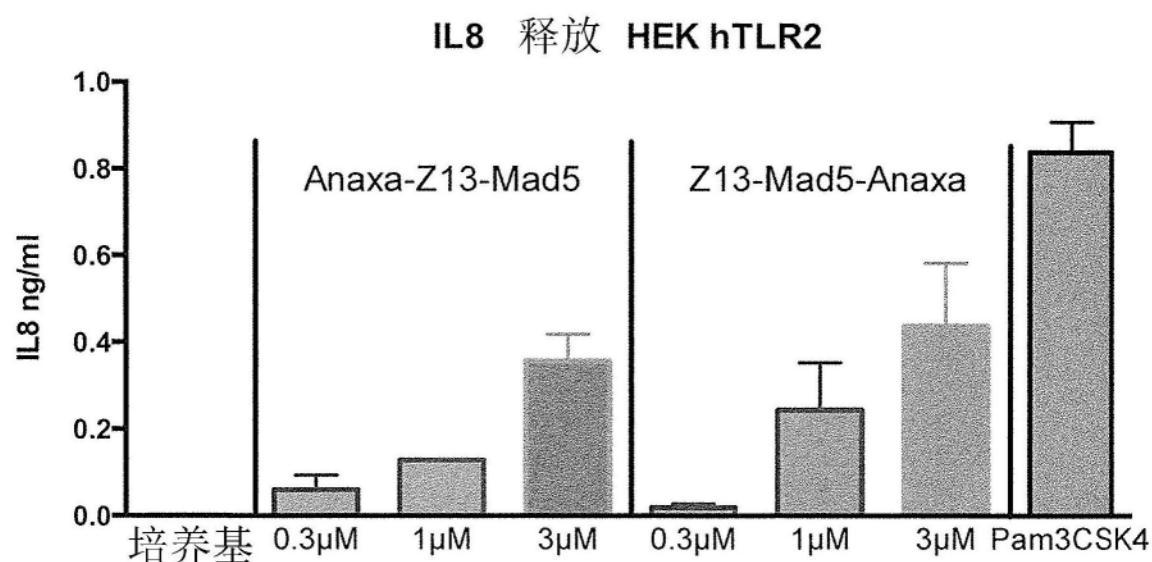


图14

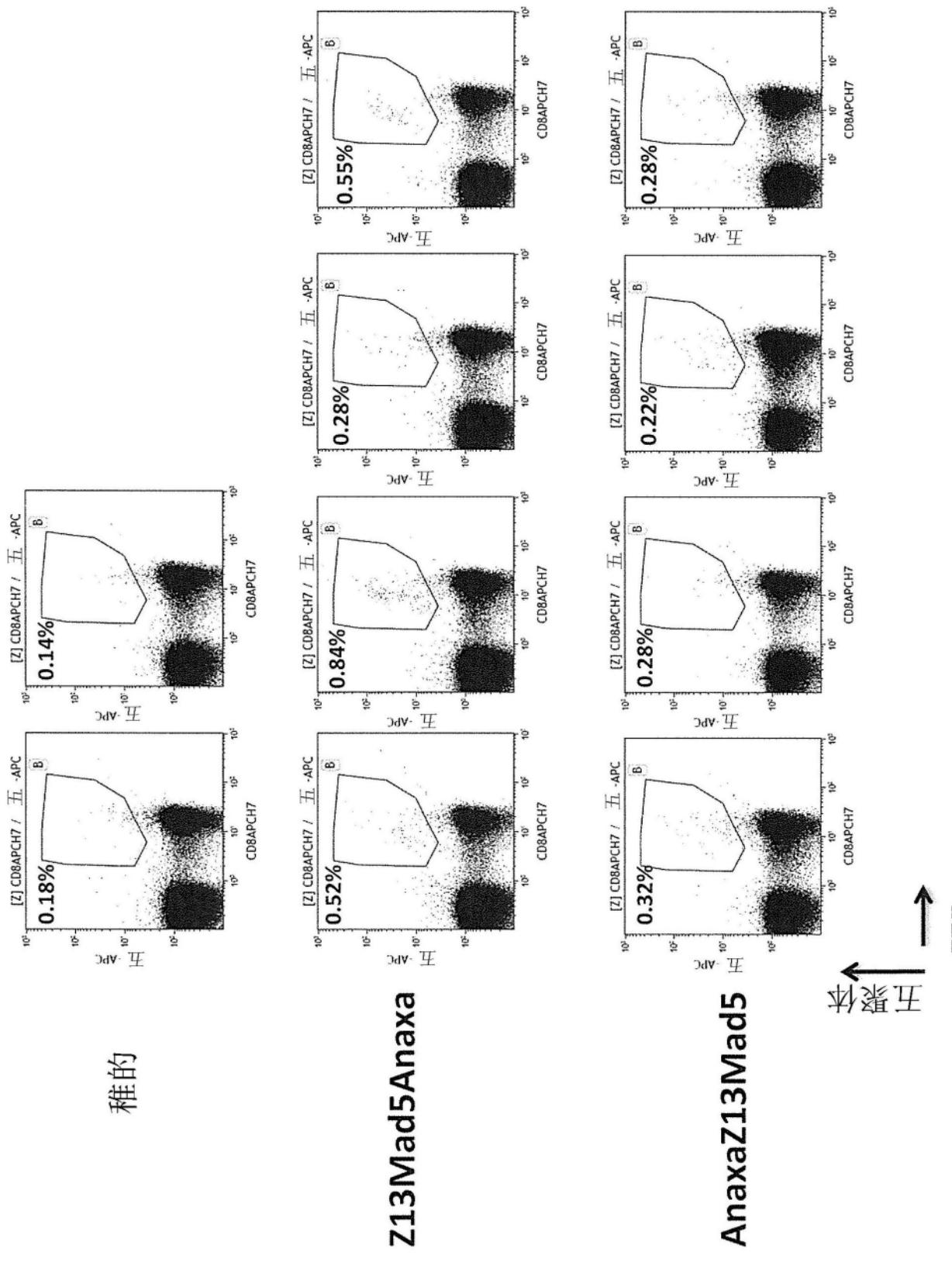


图15

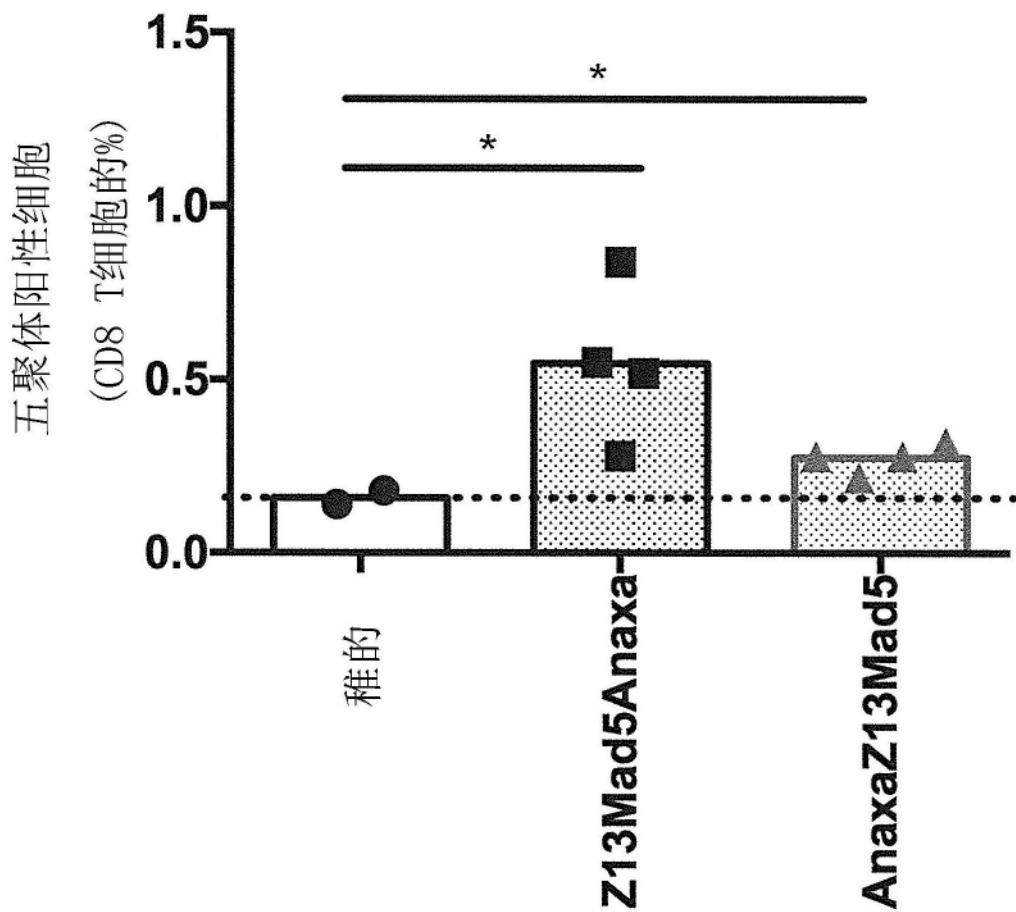


图16

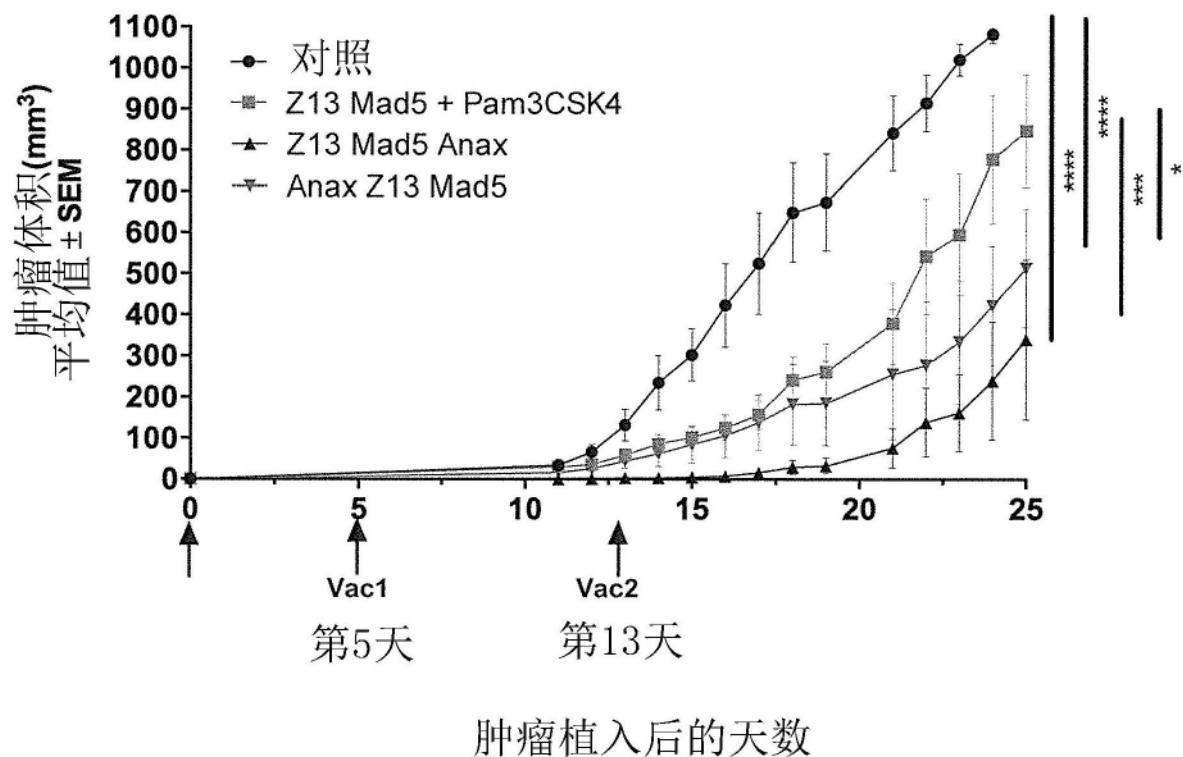


图17

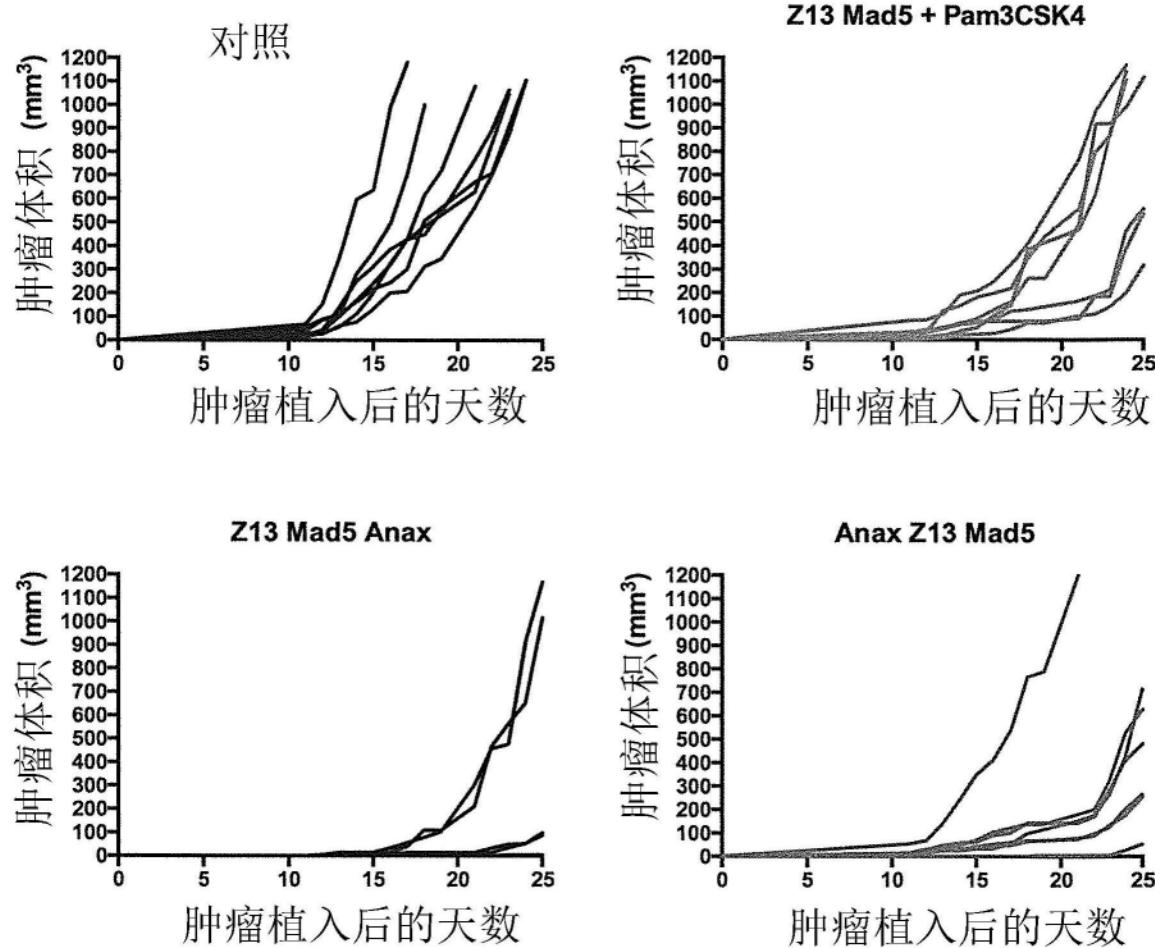


图18

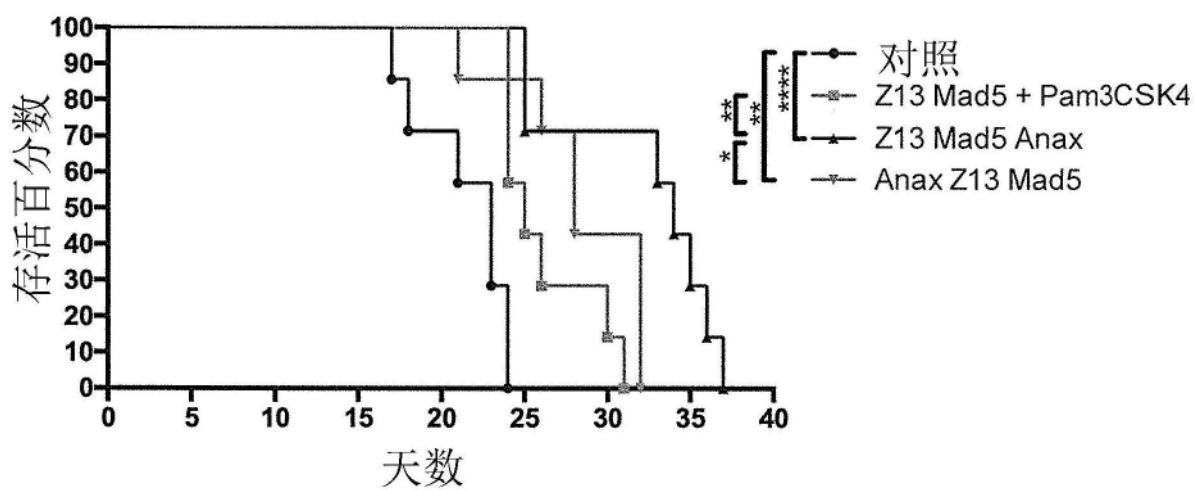


图19

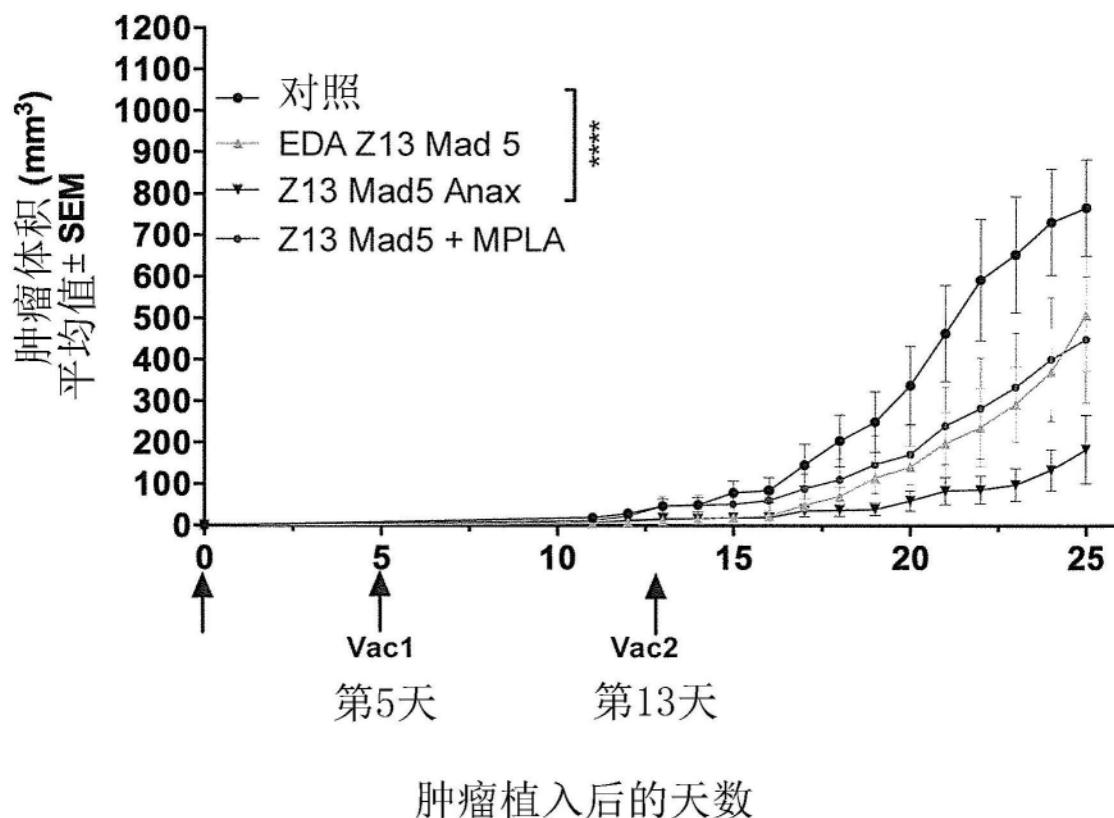


图20

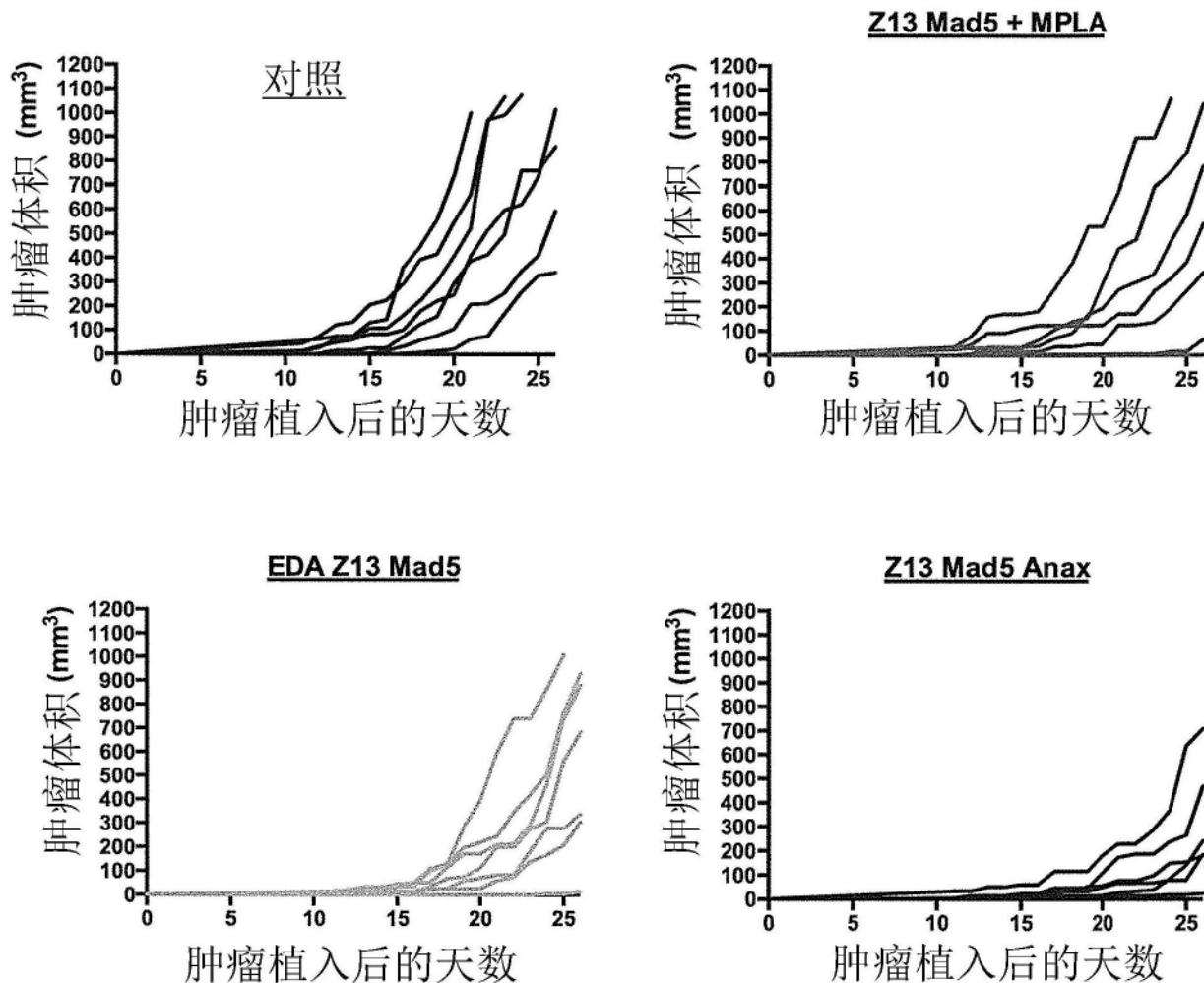


图21

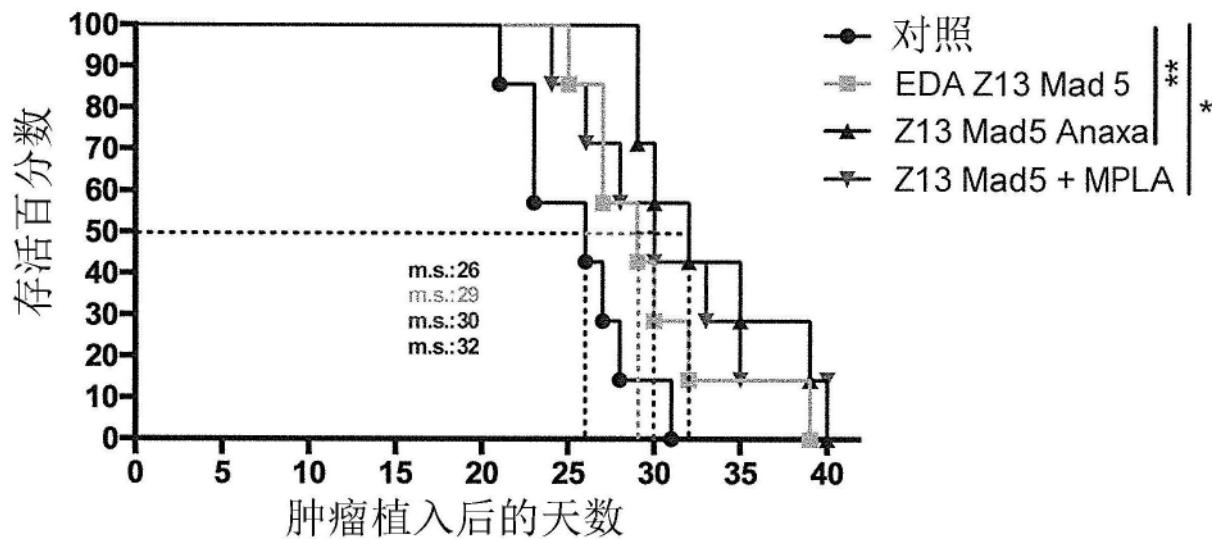


图22

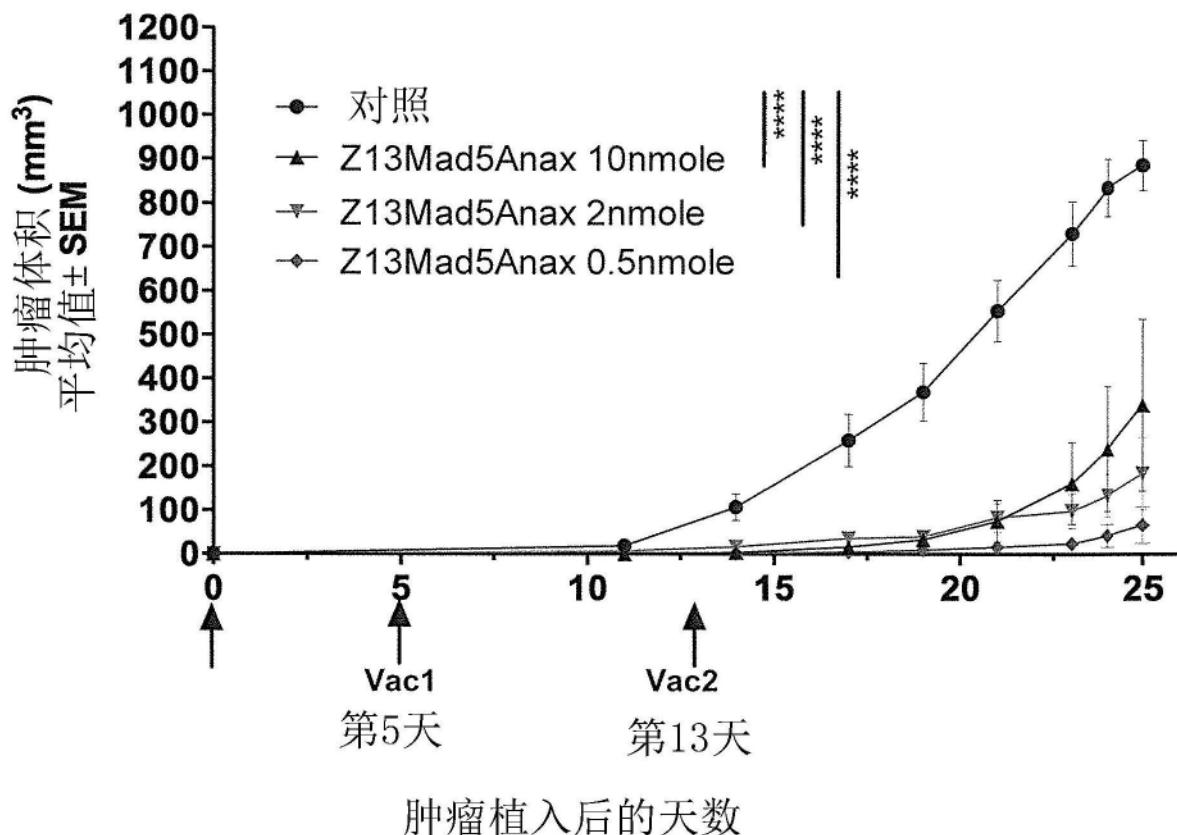
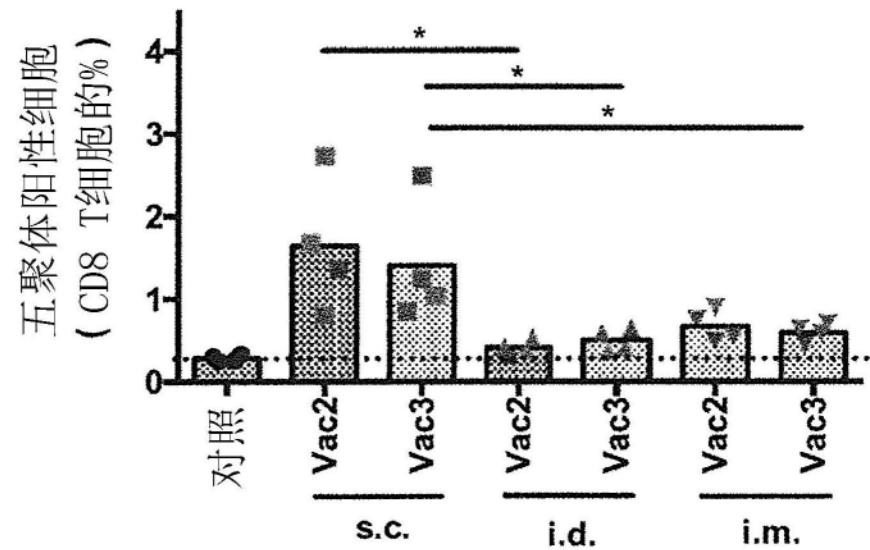


图23

A

0.5nmole



B

2nmole

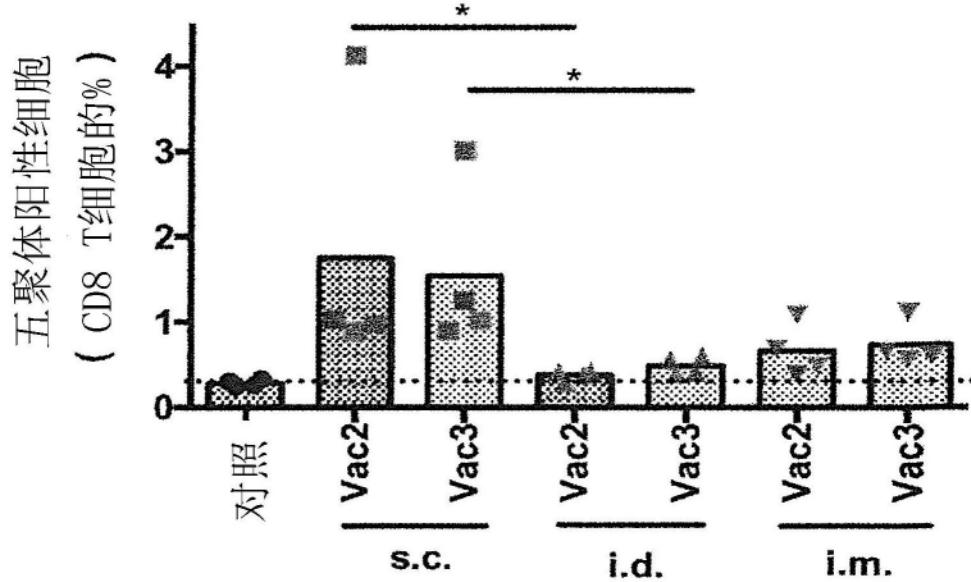
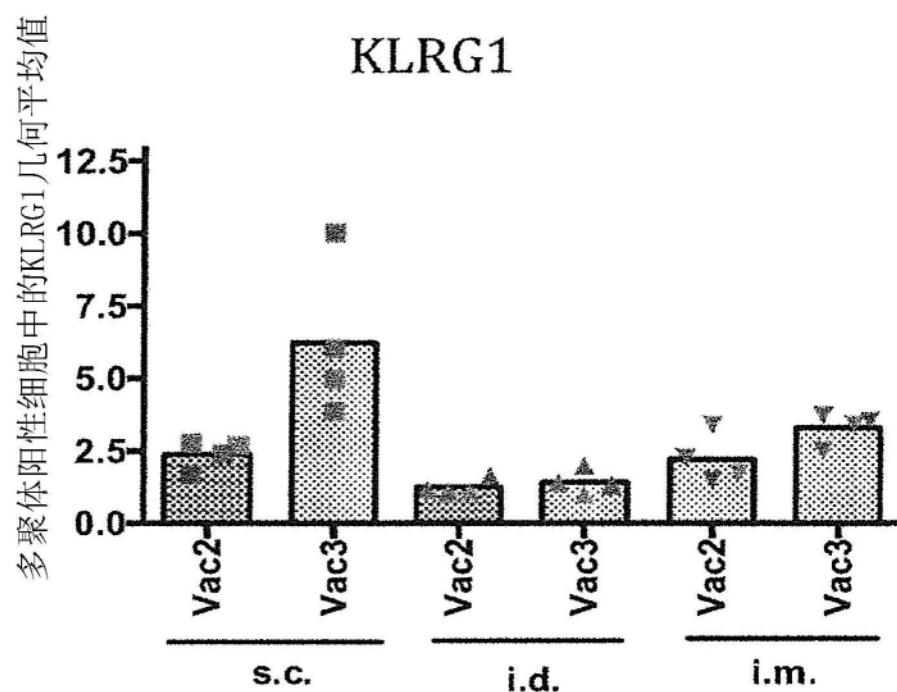


图24

A

KLRG1



B

PD-1

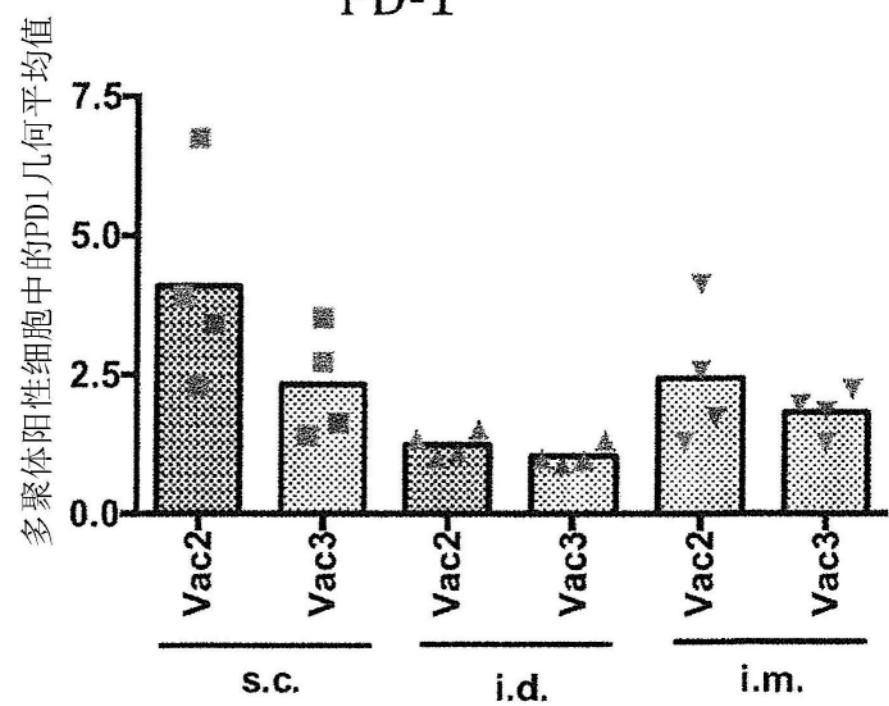


图25

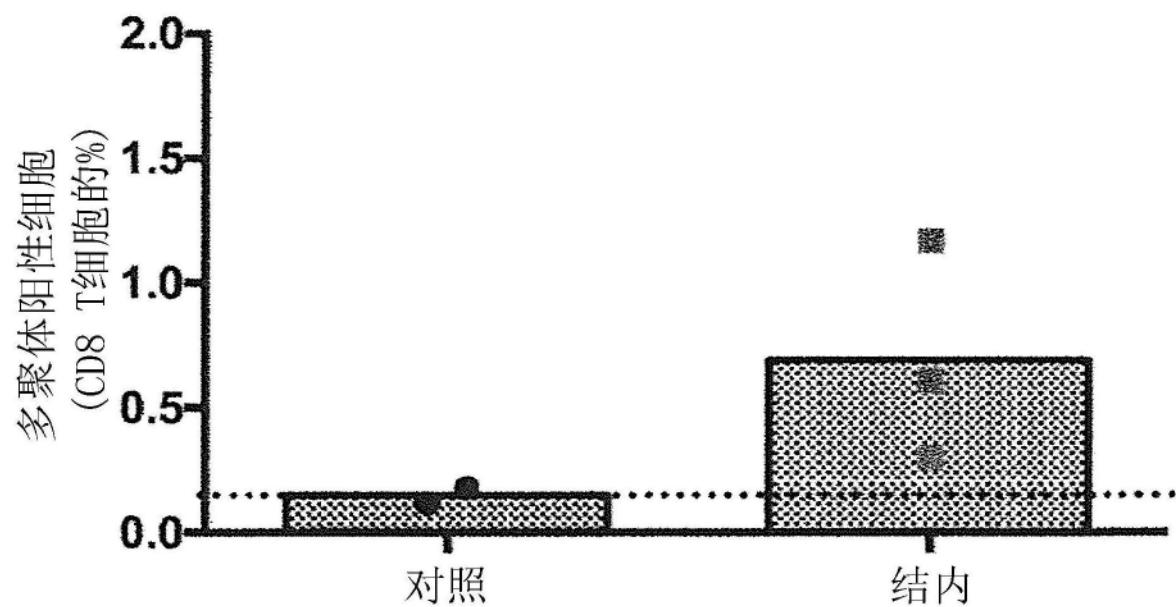


图26

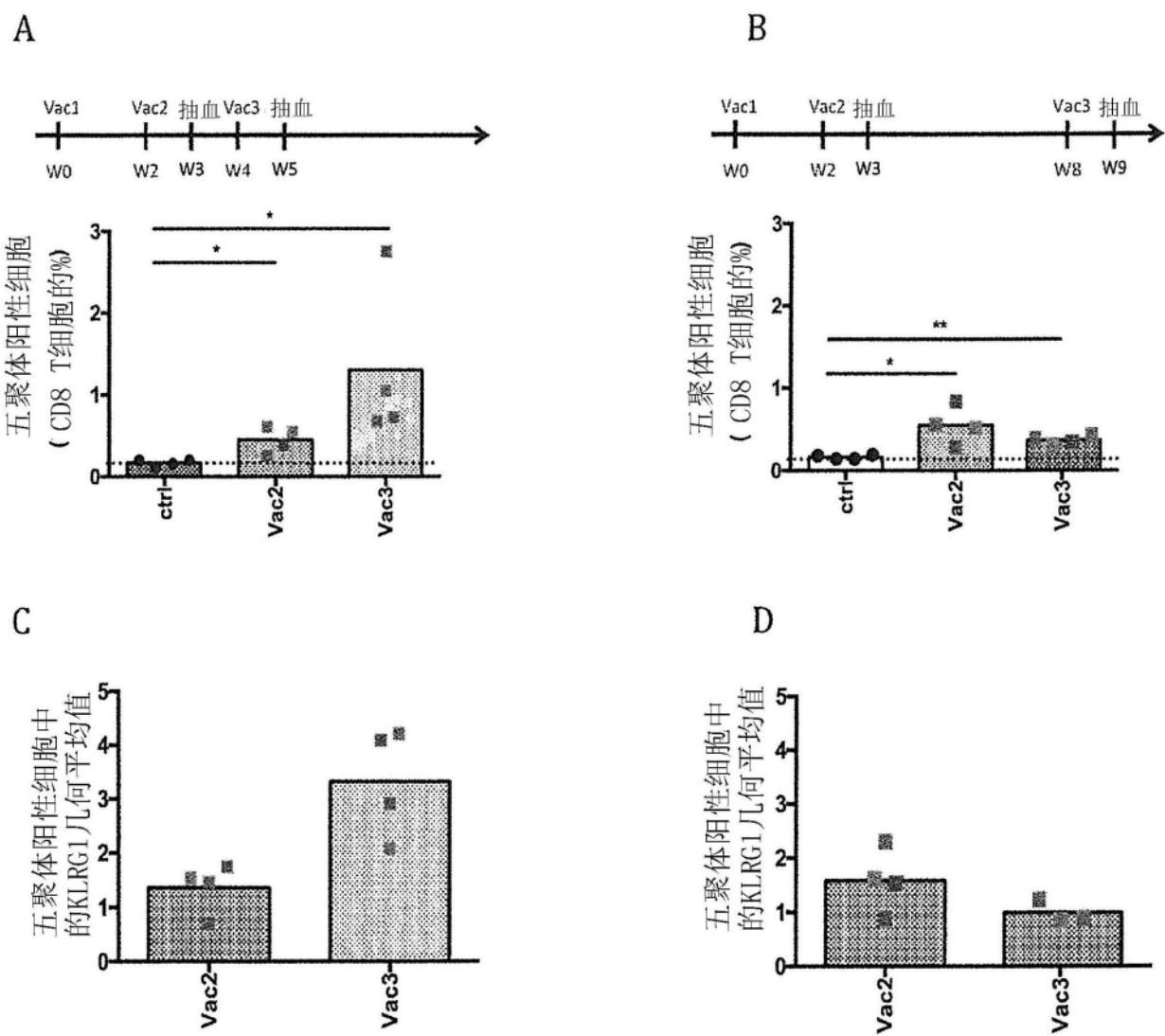


图27

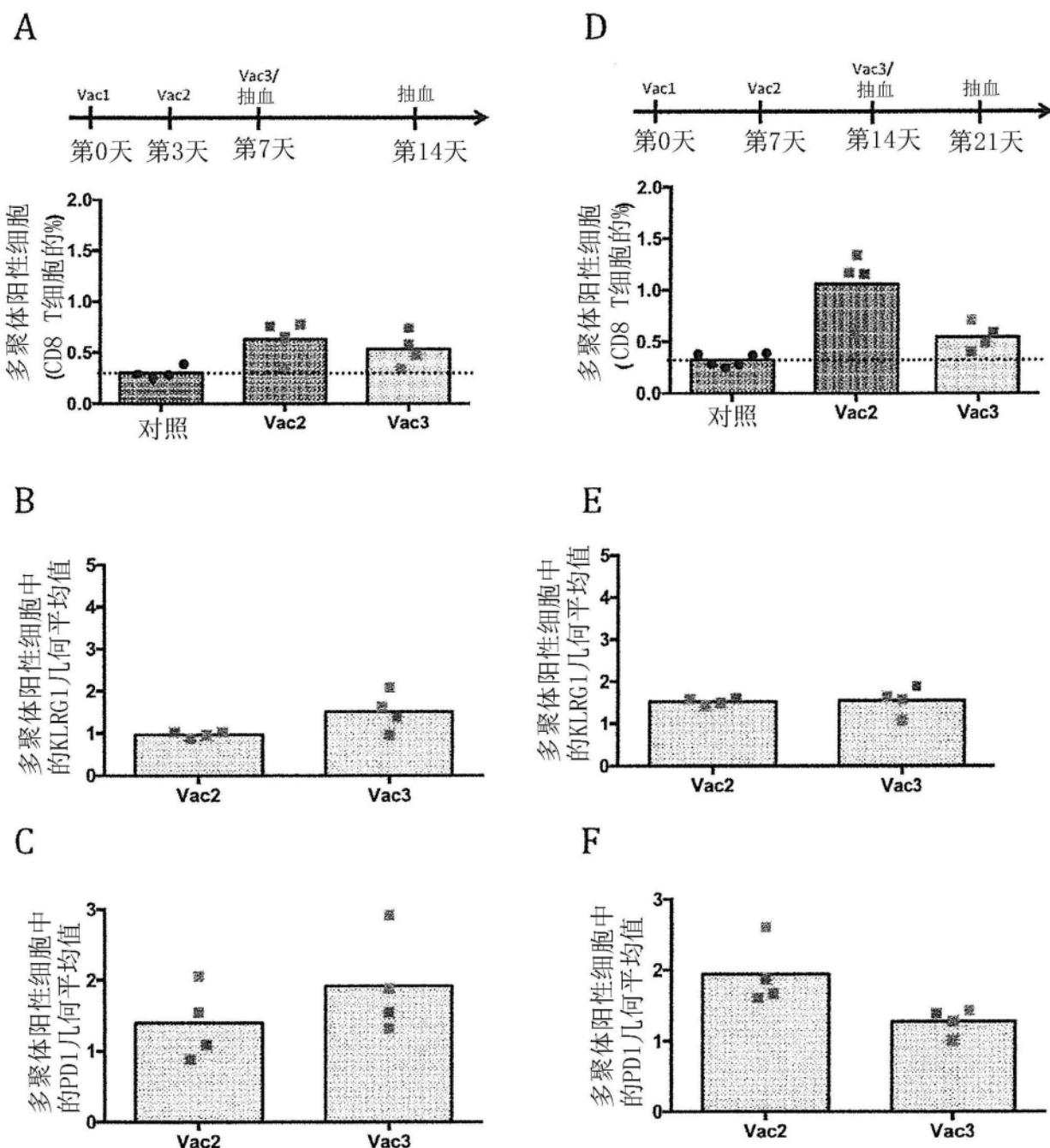


图28

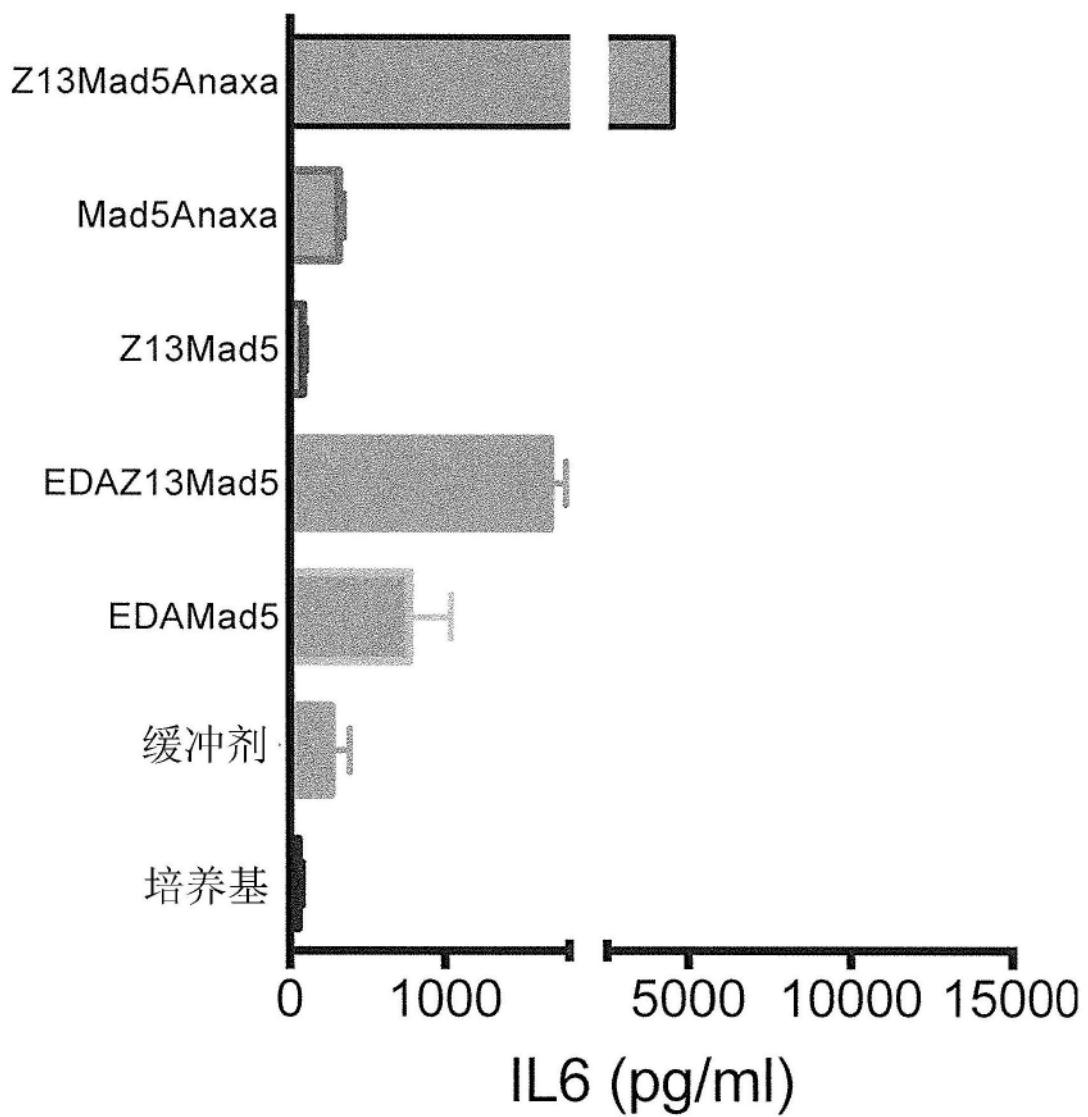


图29

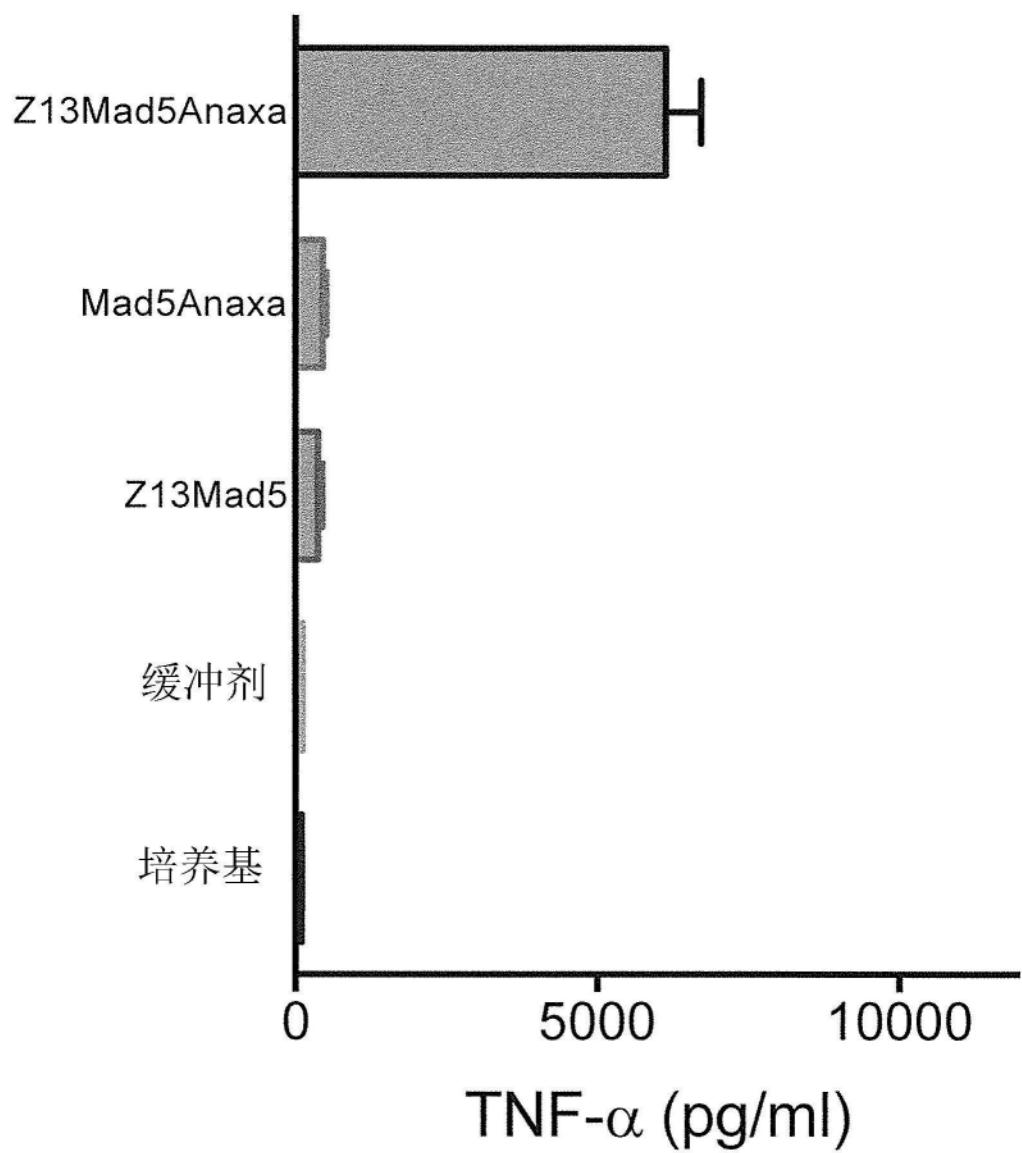


图30

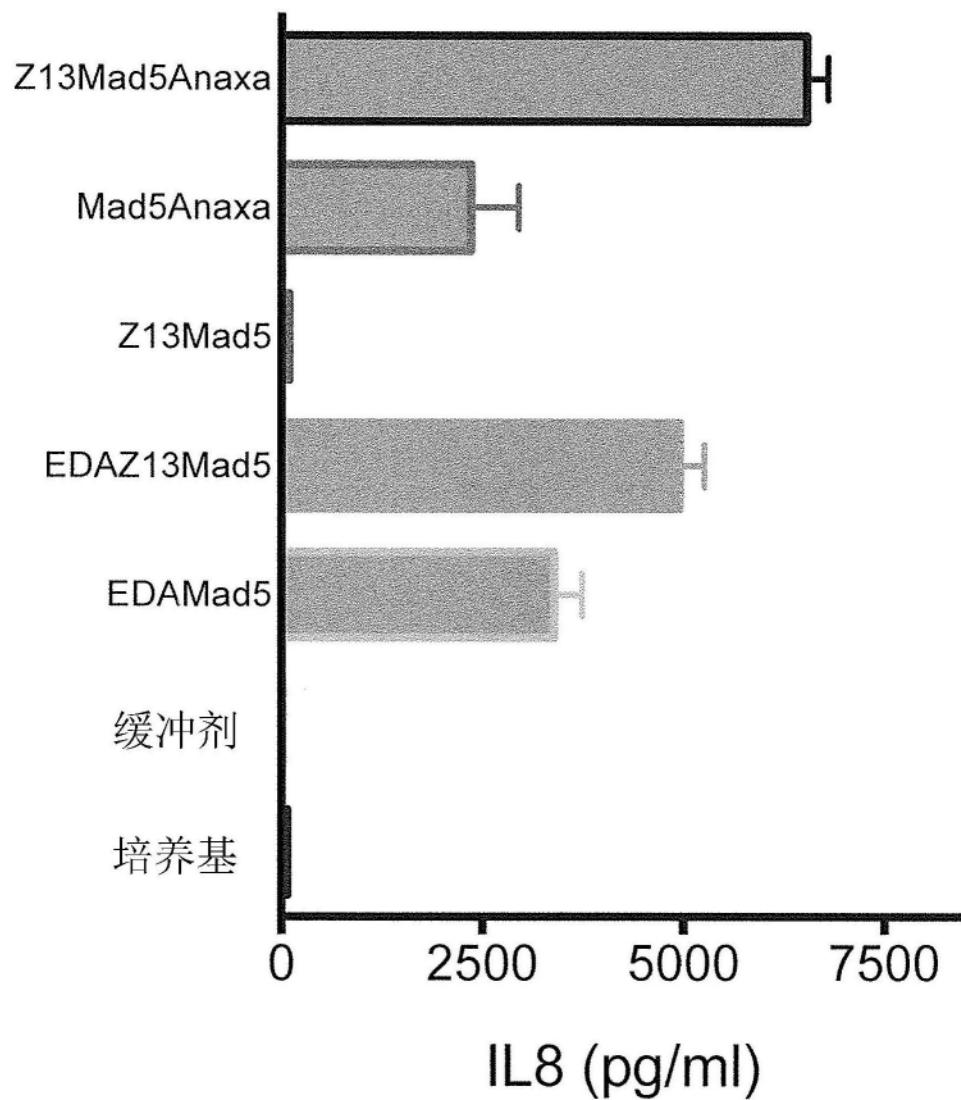


图31

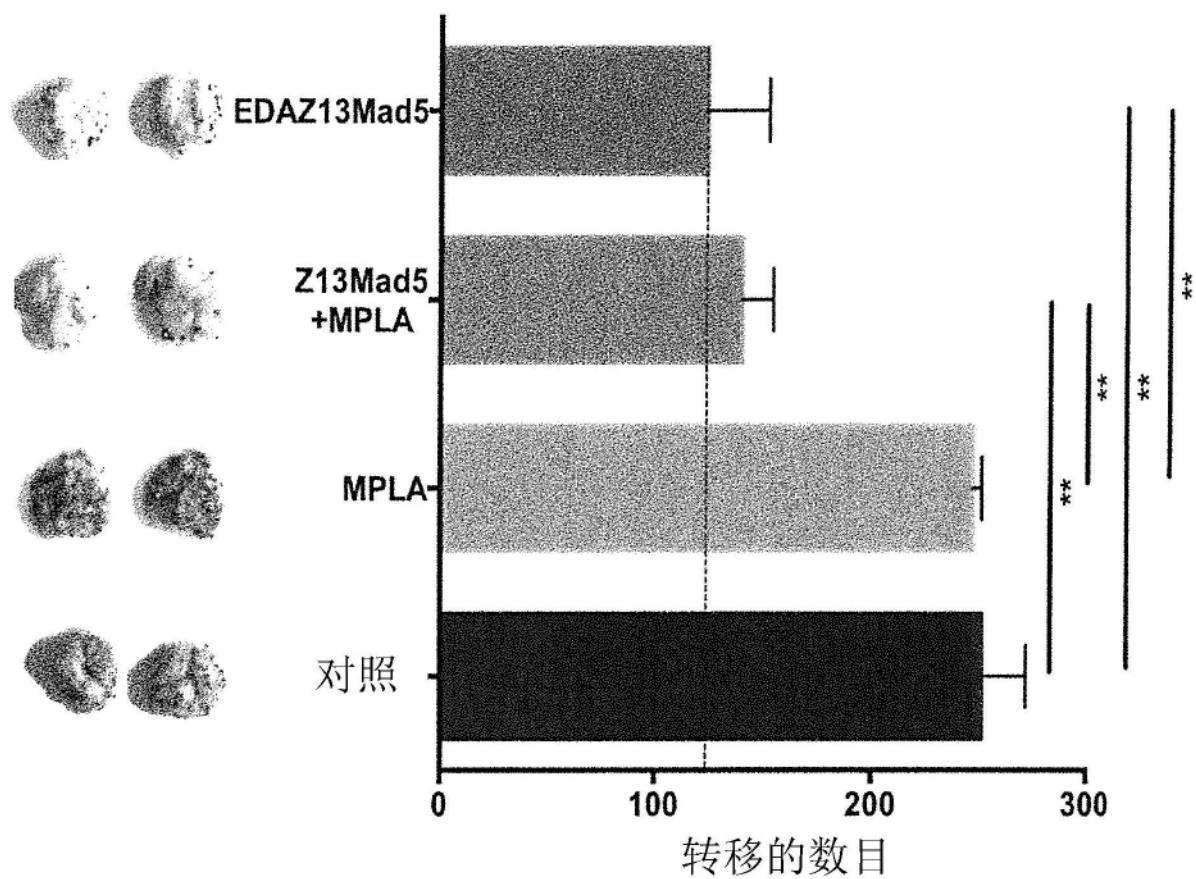


图32

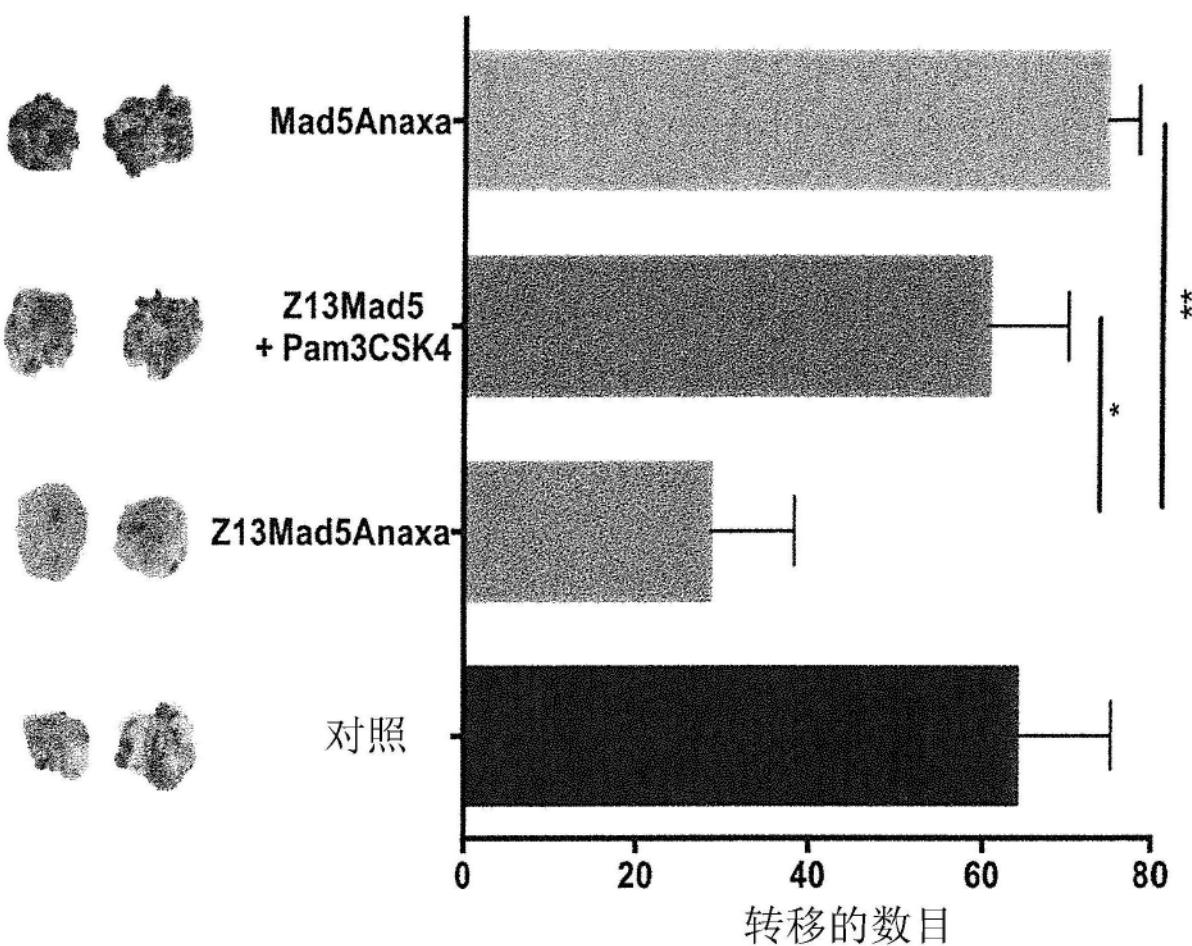


图33

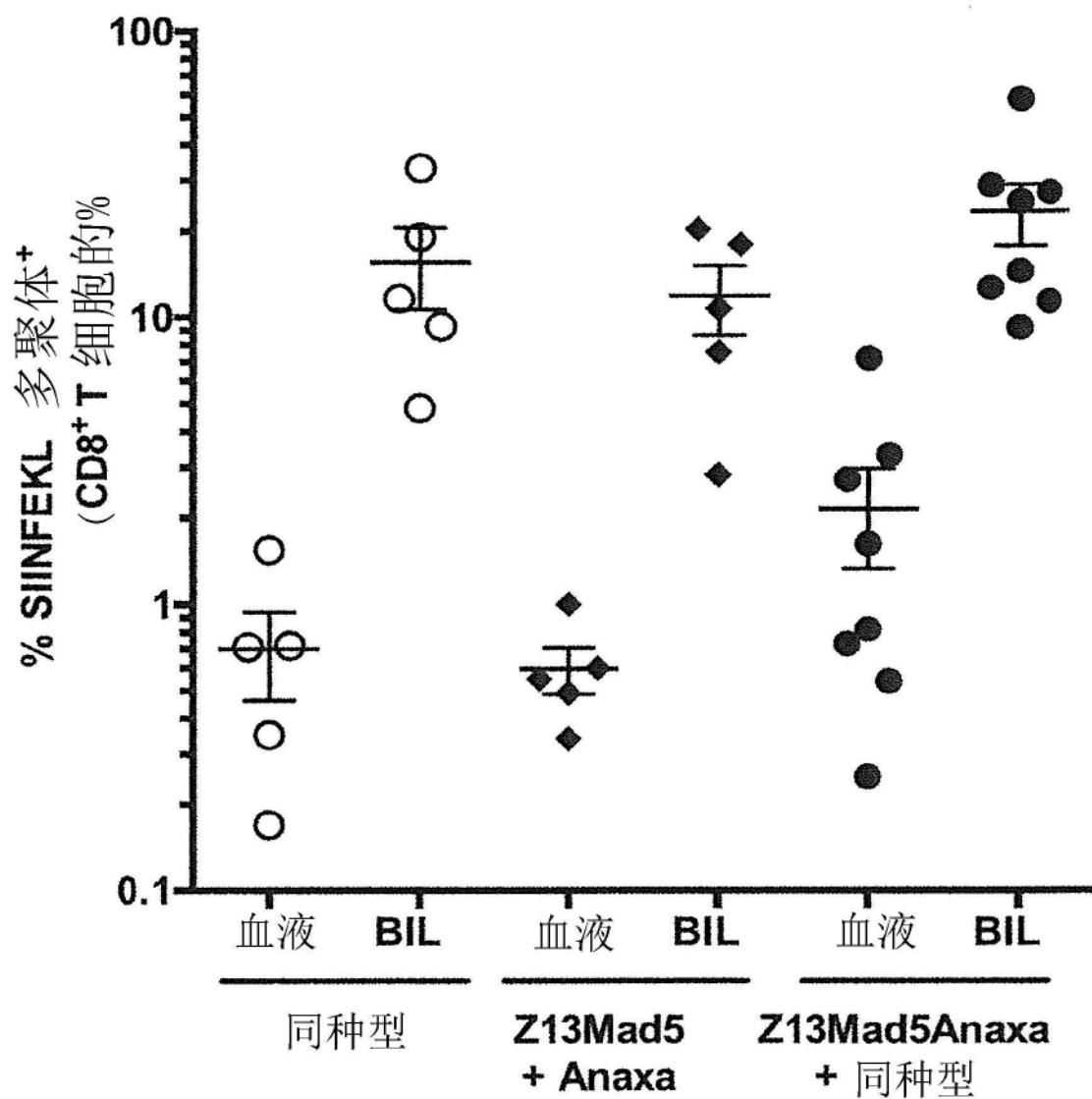


图34

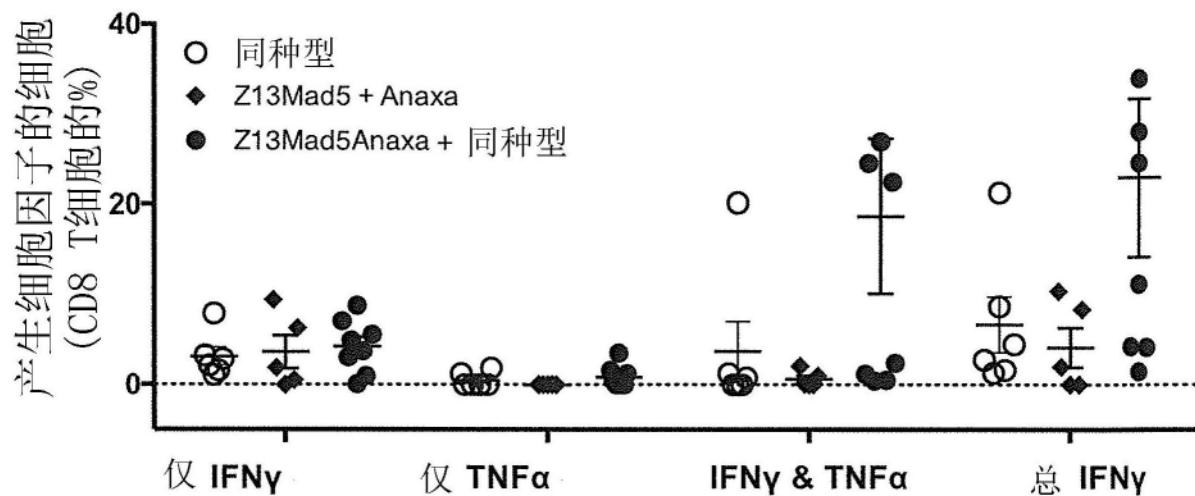


图35

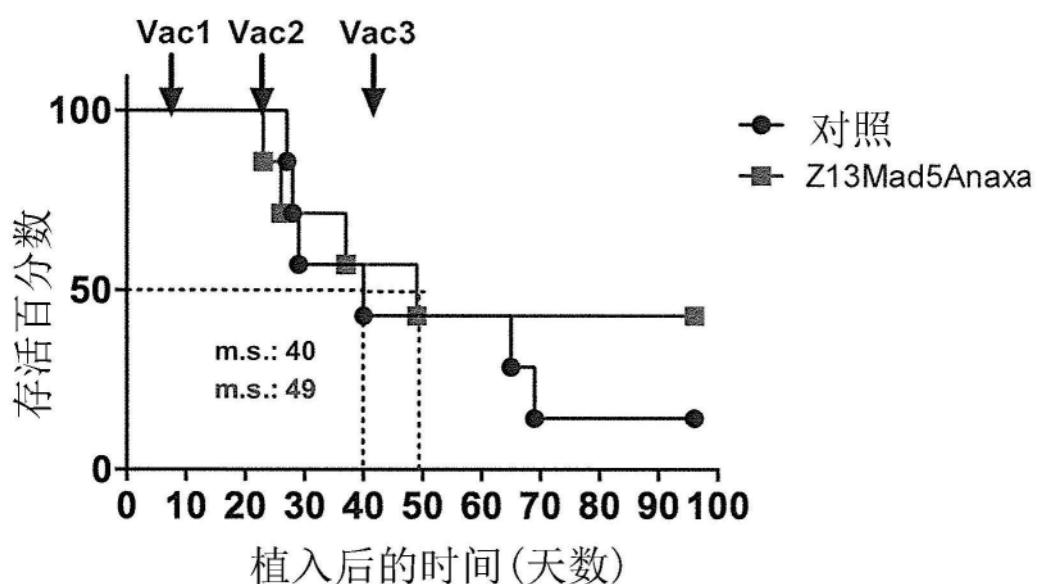
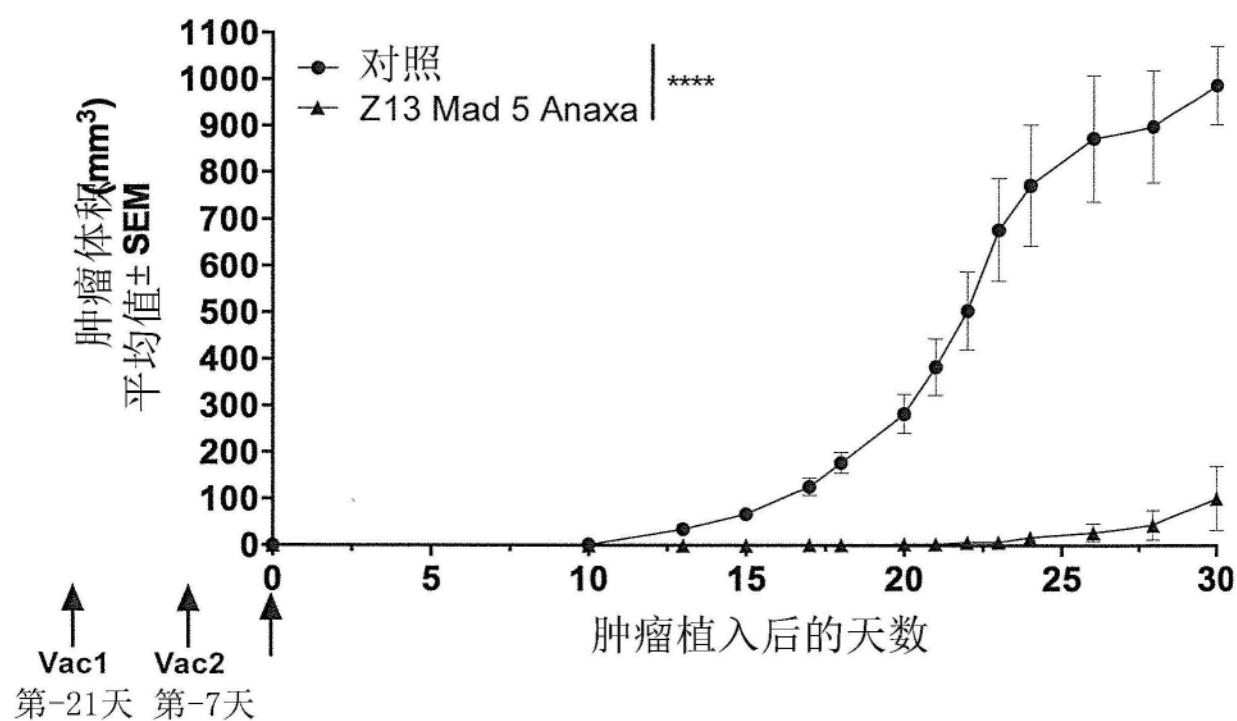


图36

A



B

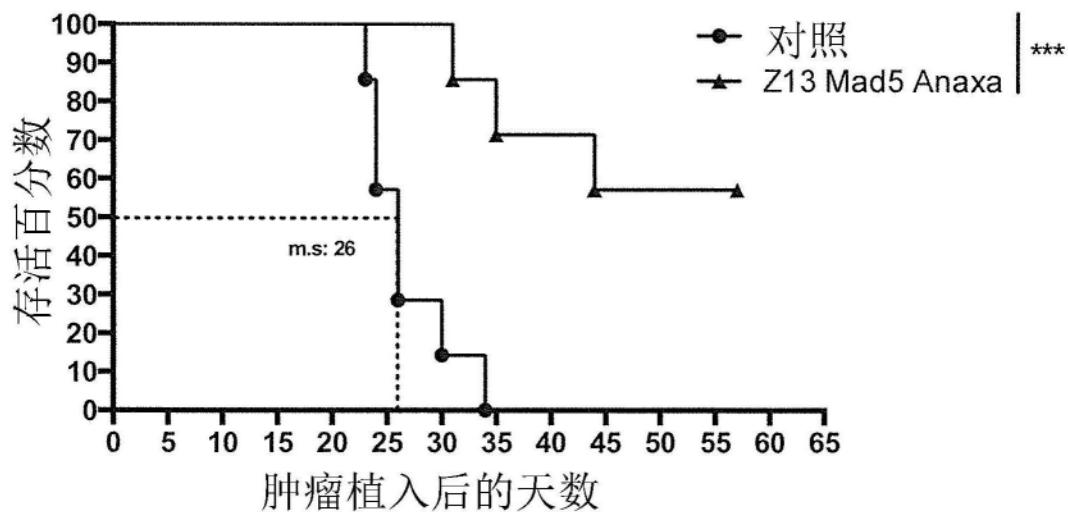
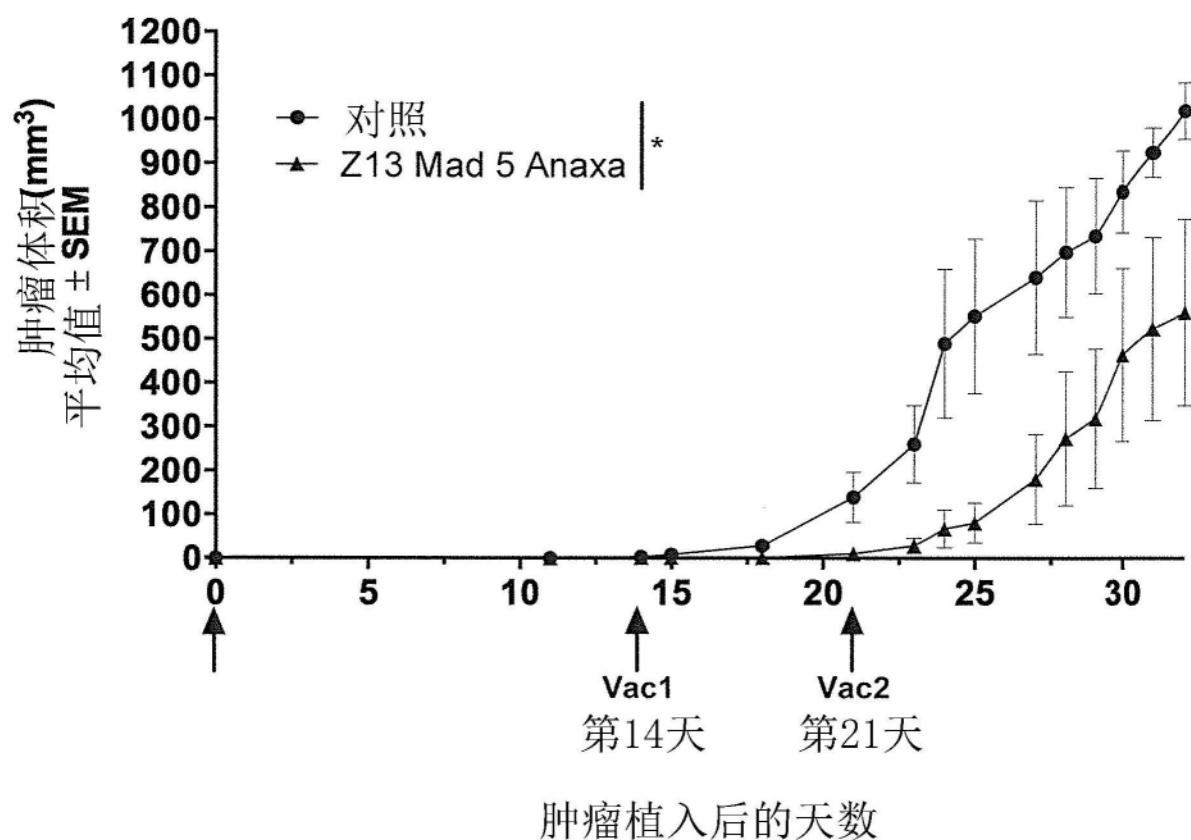


图37

A



B

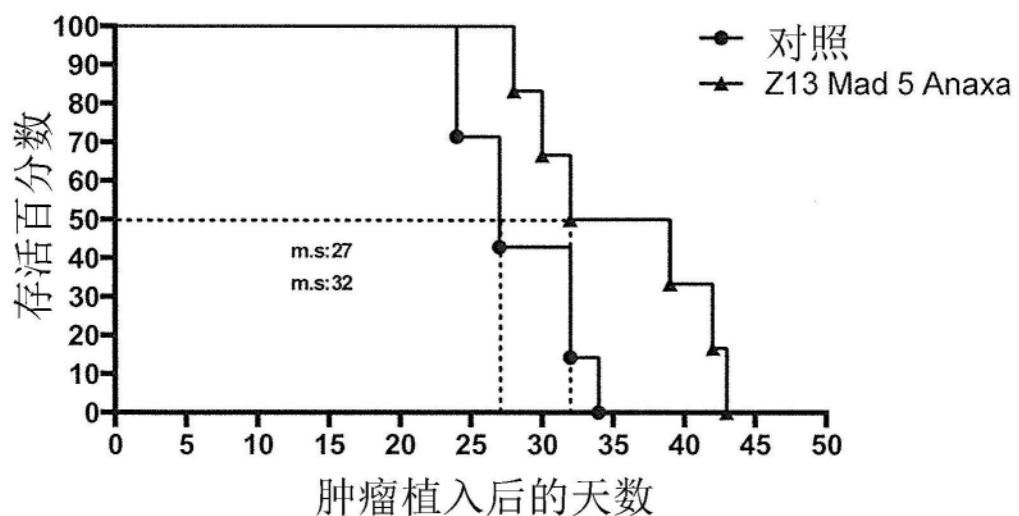
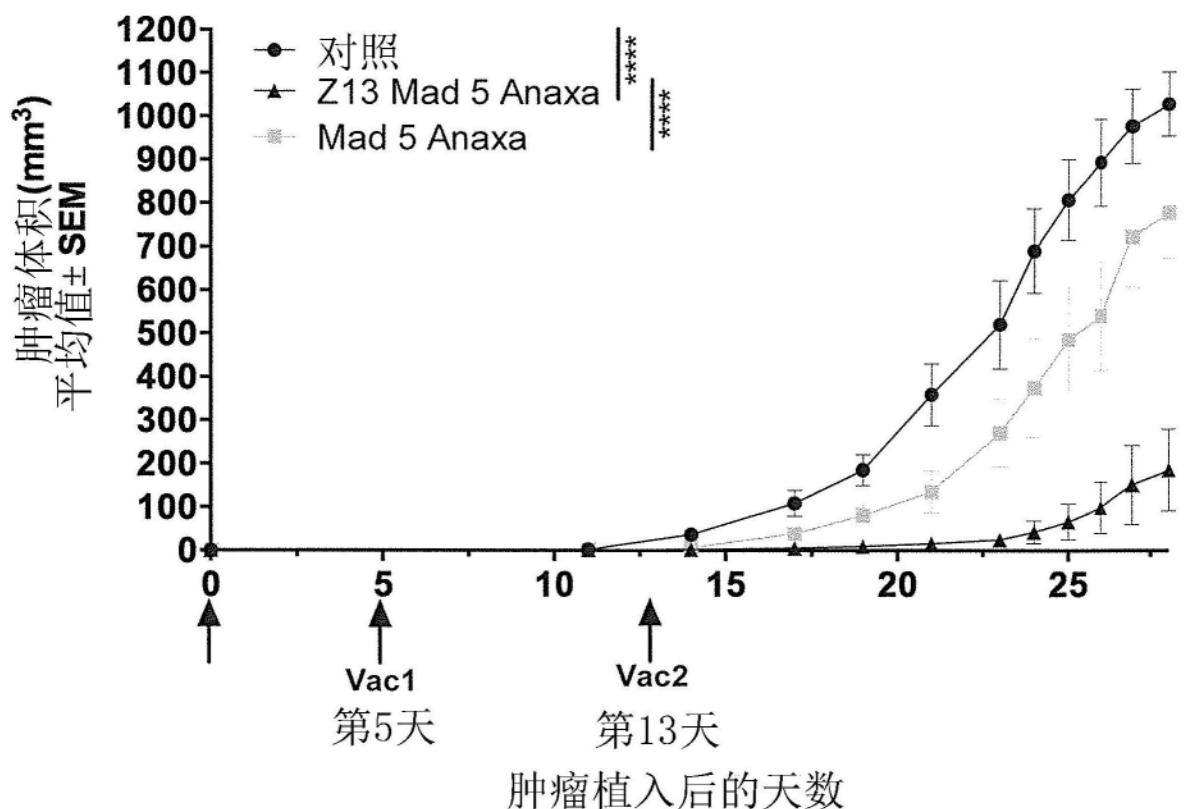


图38

A



B

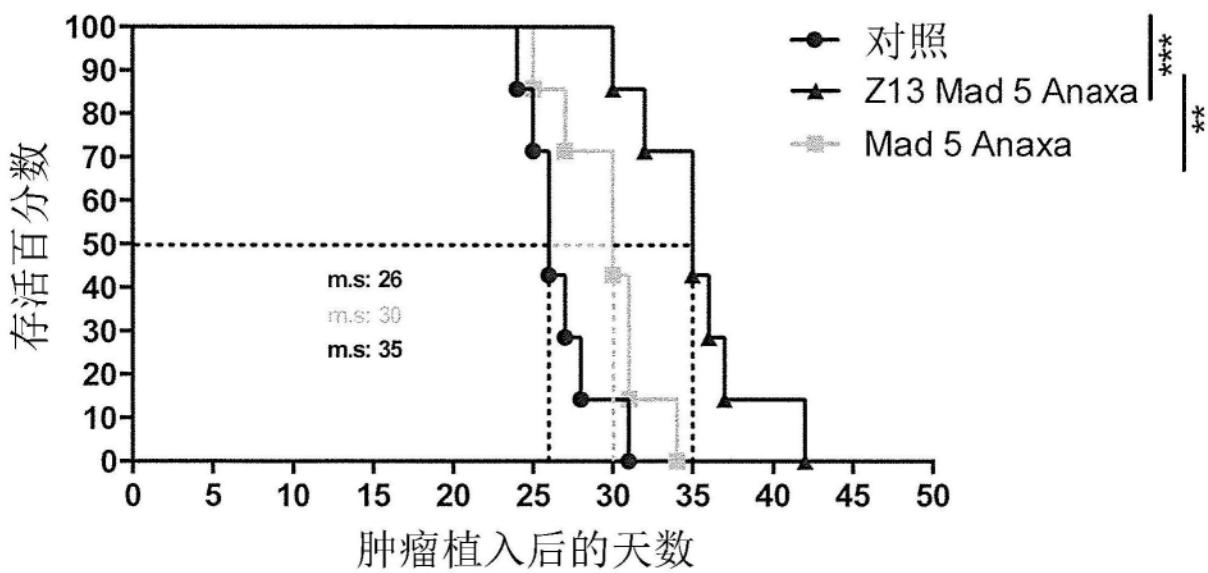
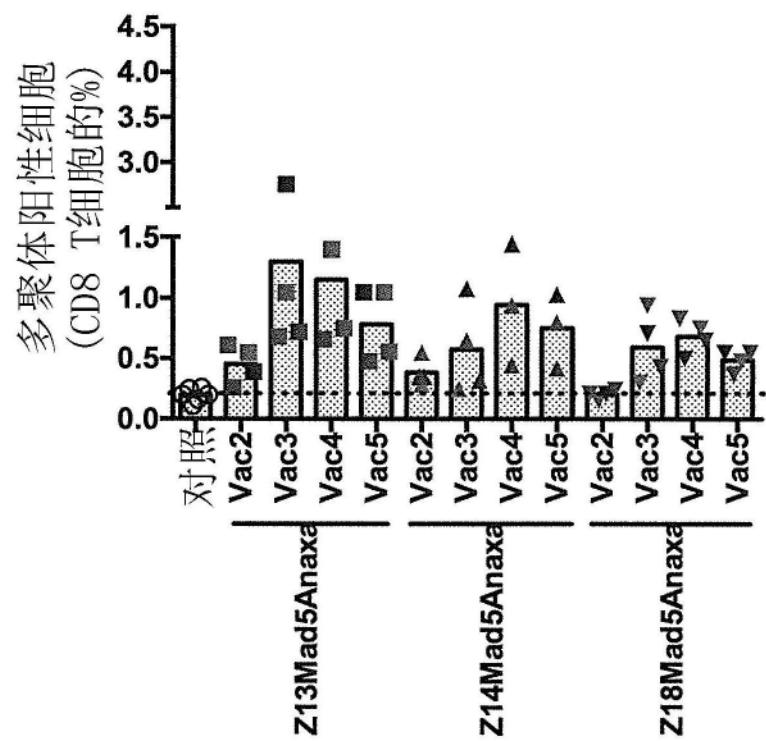


图39

A

2 nmol



B

0.5 nmol

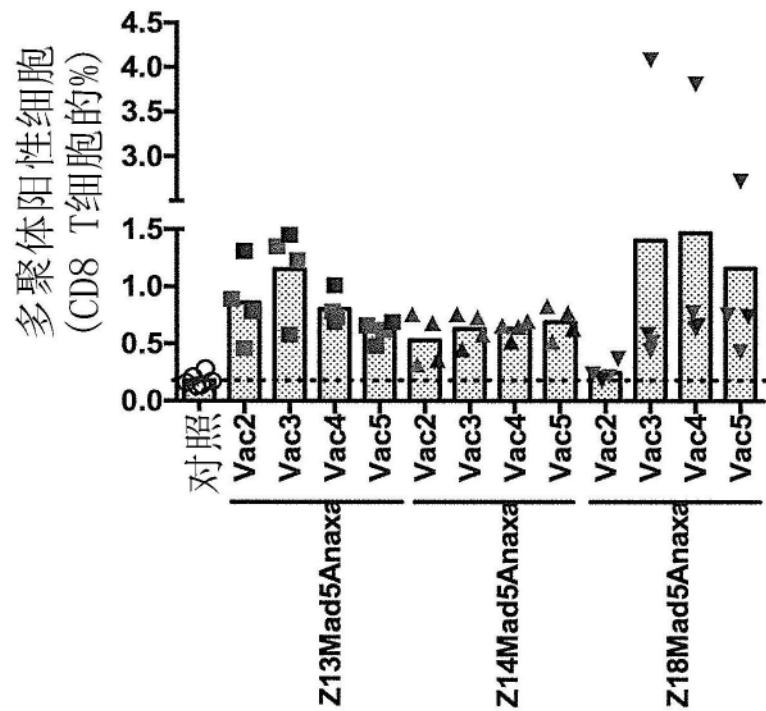


图40

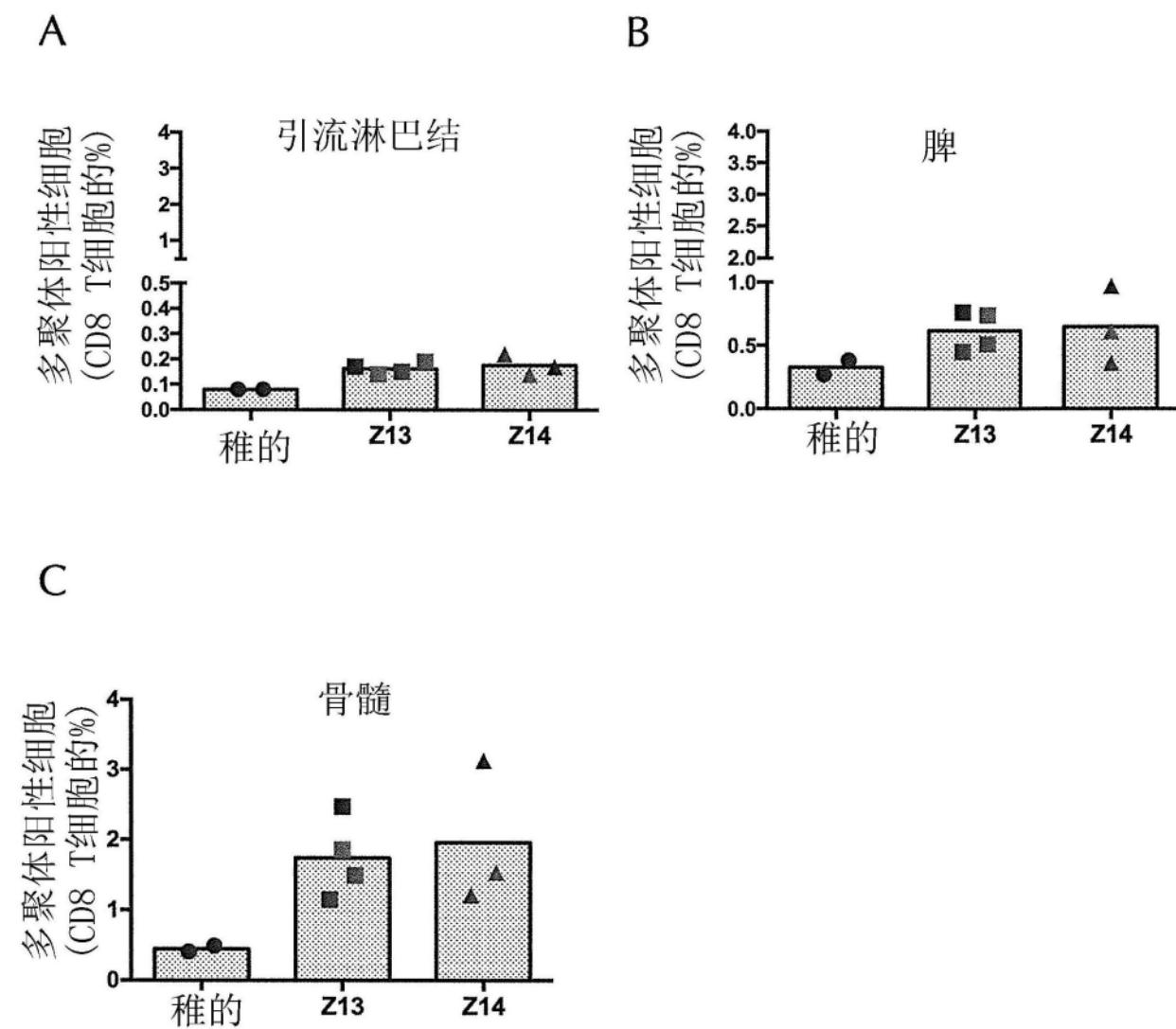
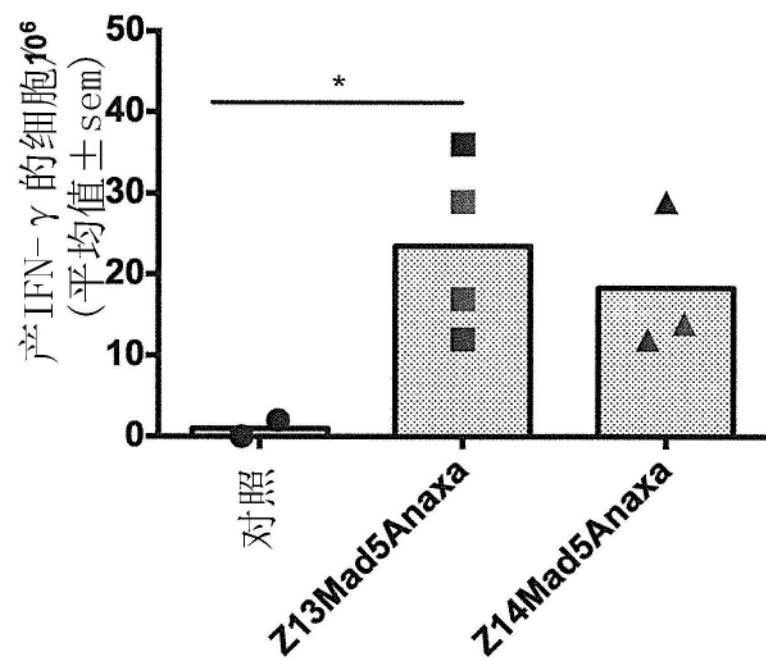


图41

A



B

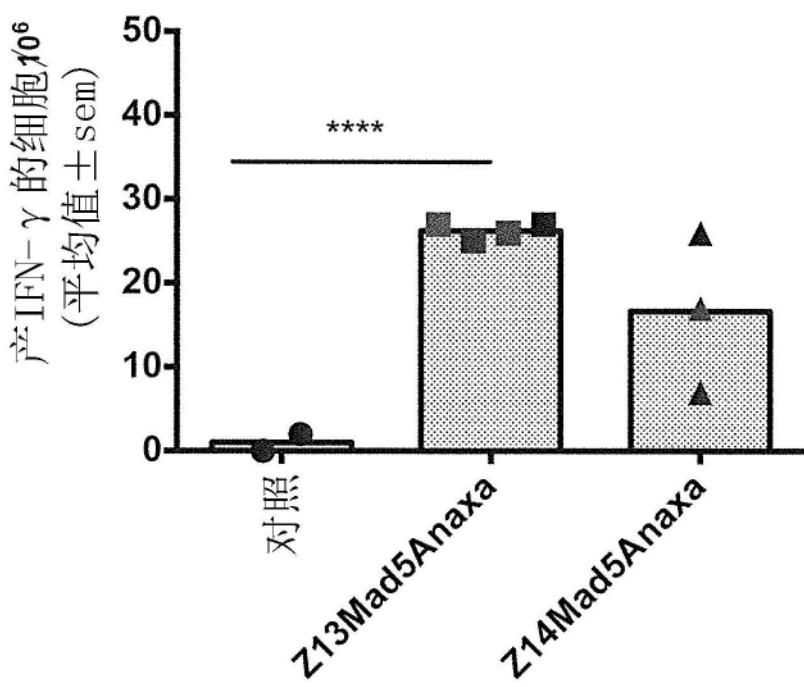


图42

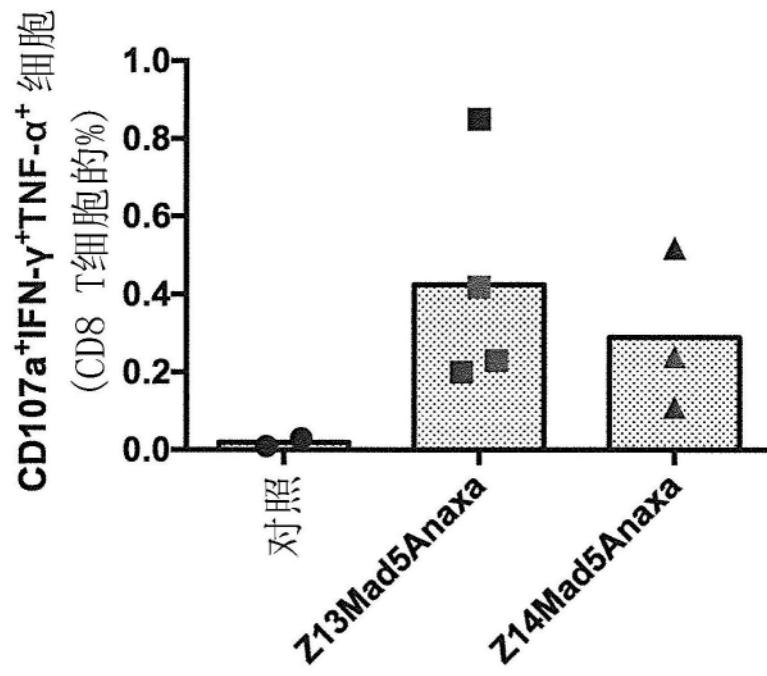
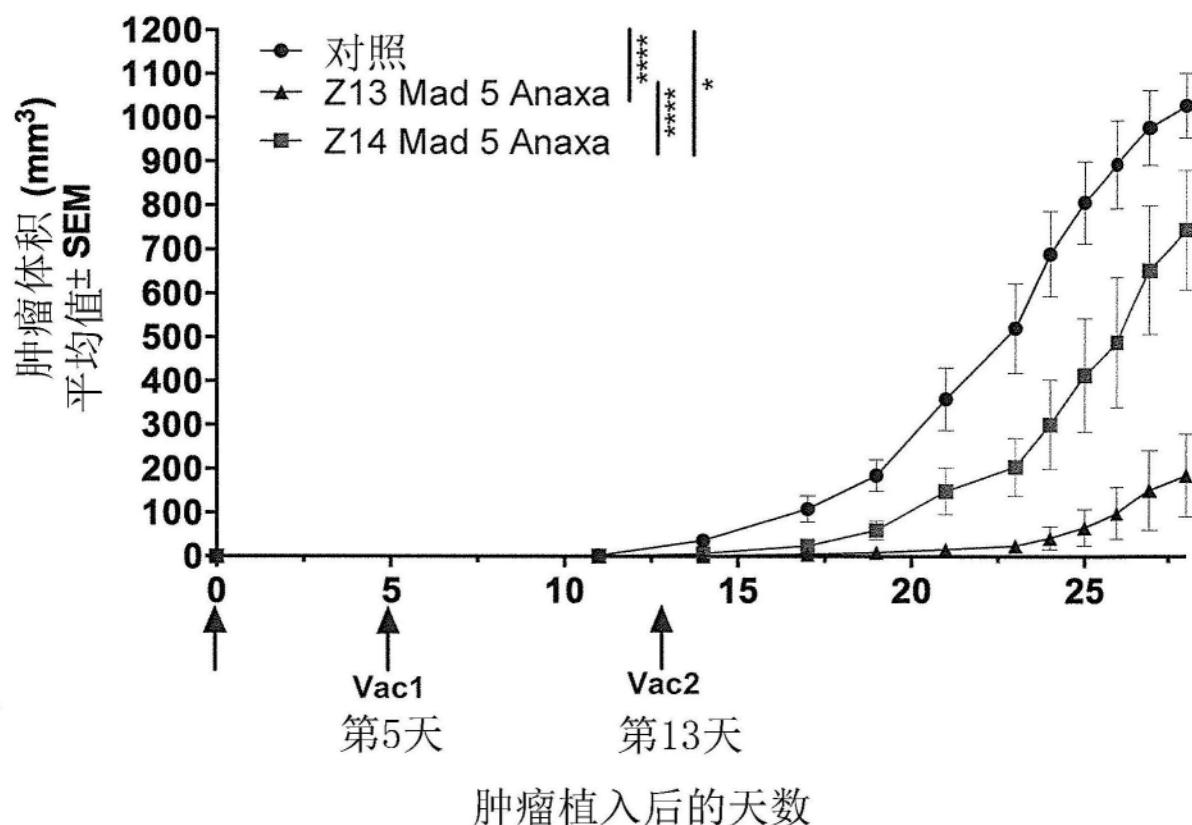


图43

A



B

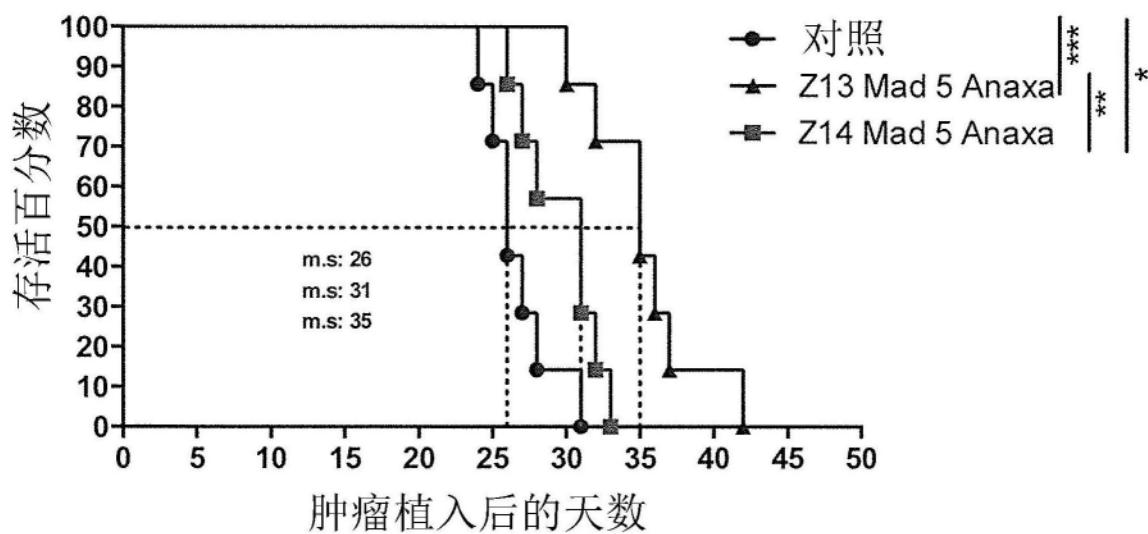
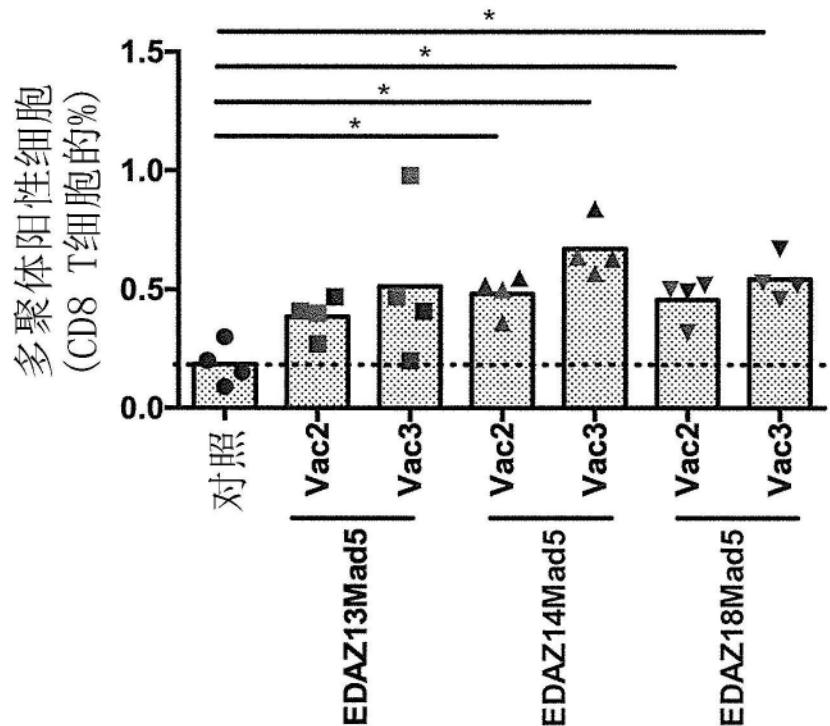


图44

A

2 nmol

B

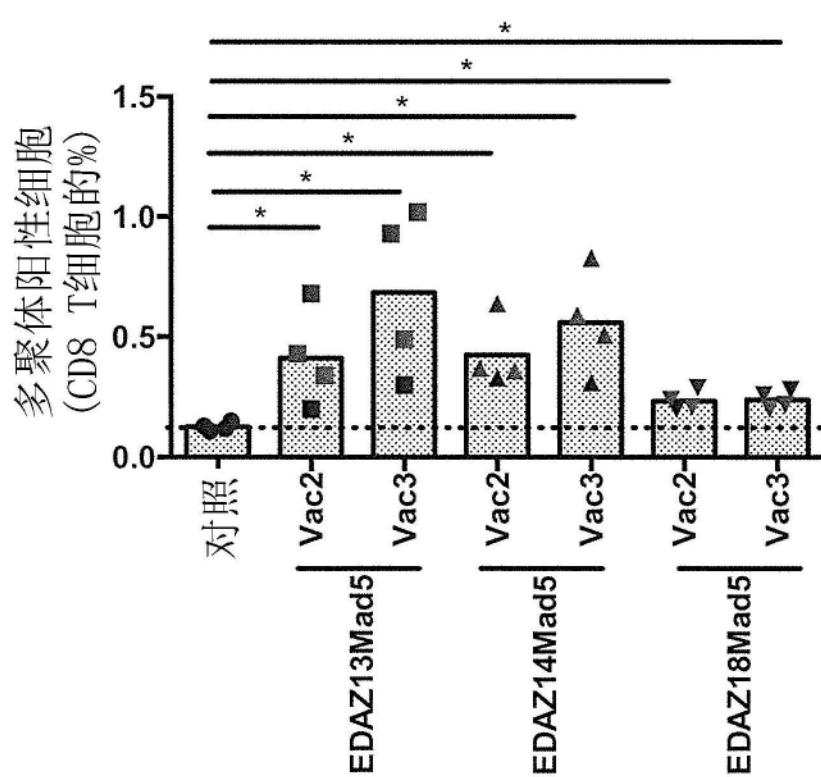
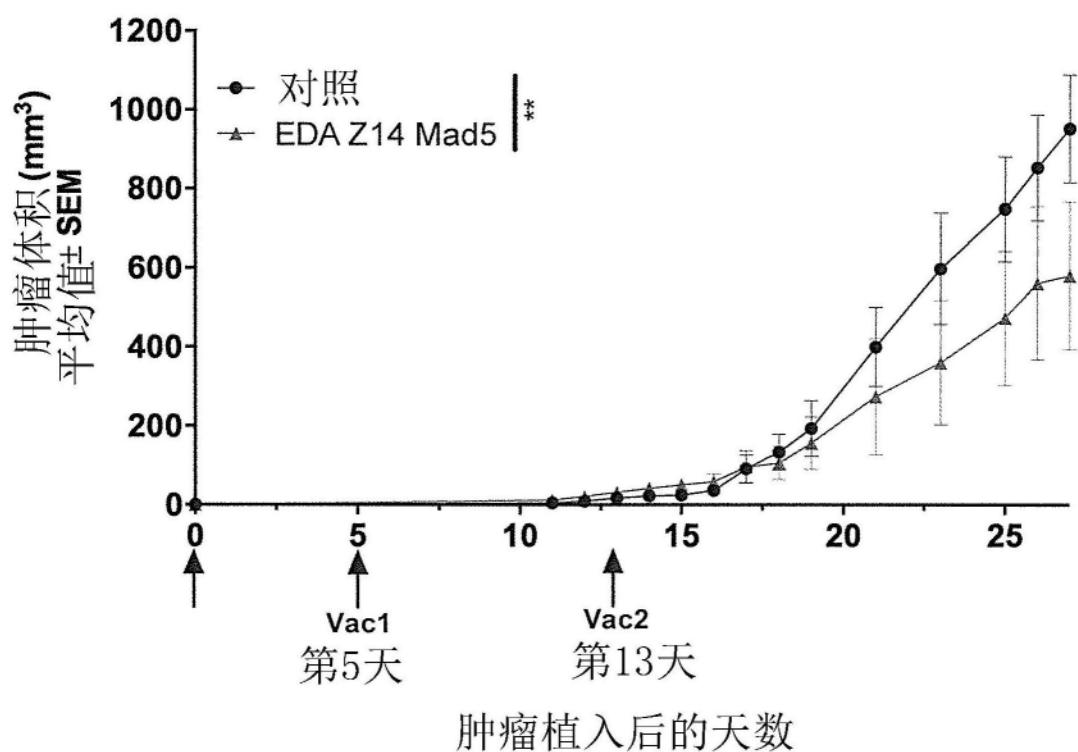
0.5 nmol

图45

A



B

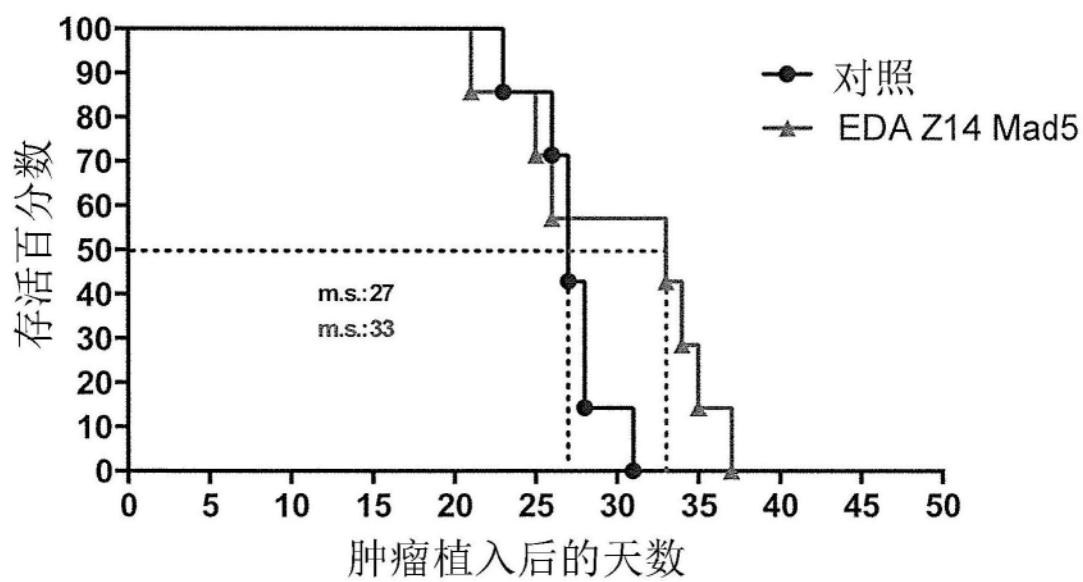
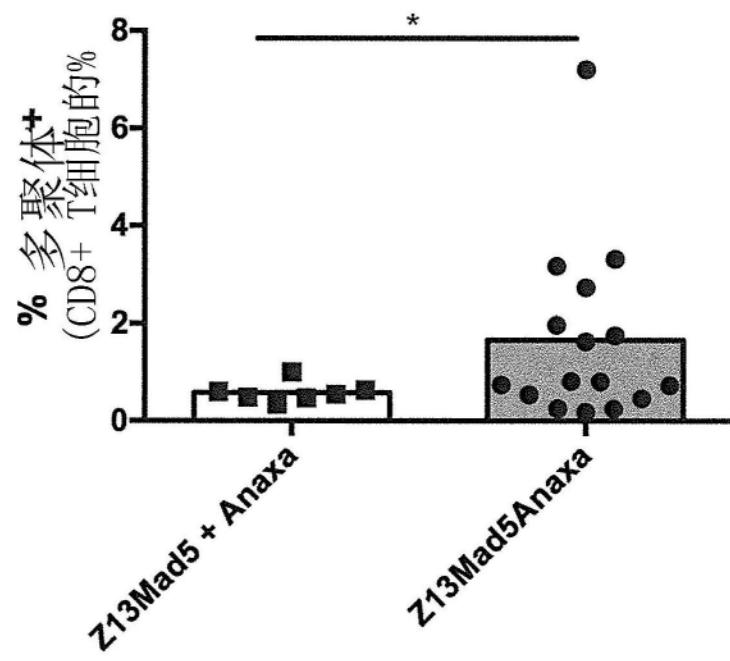


图46

A



B

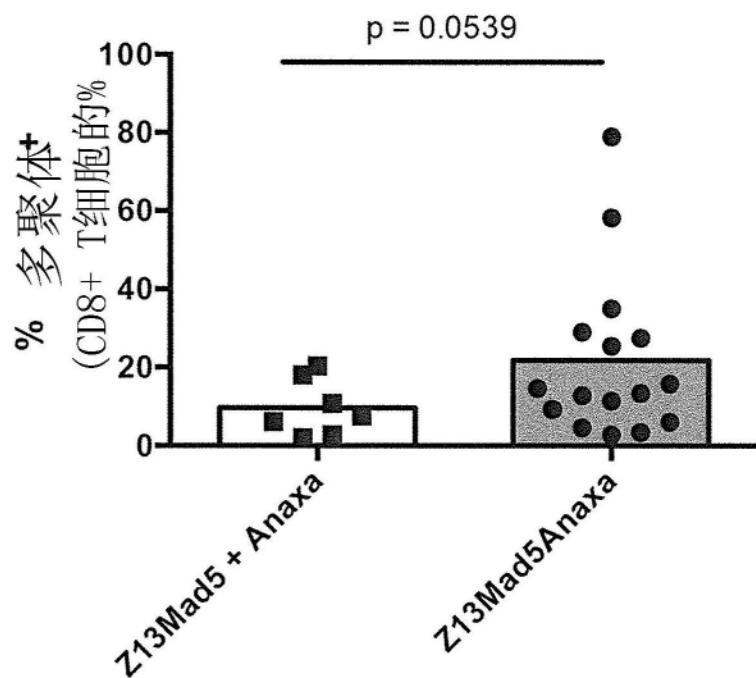


图47

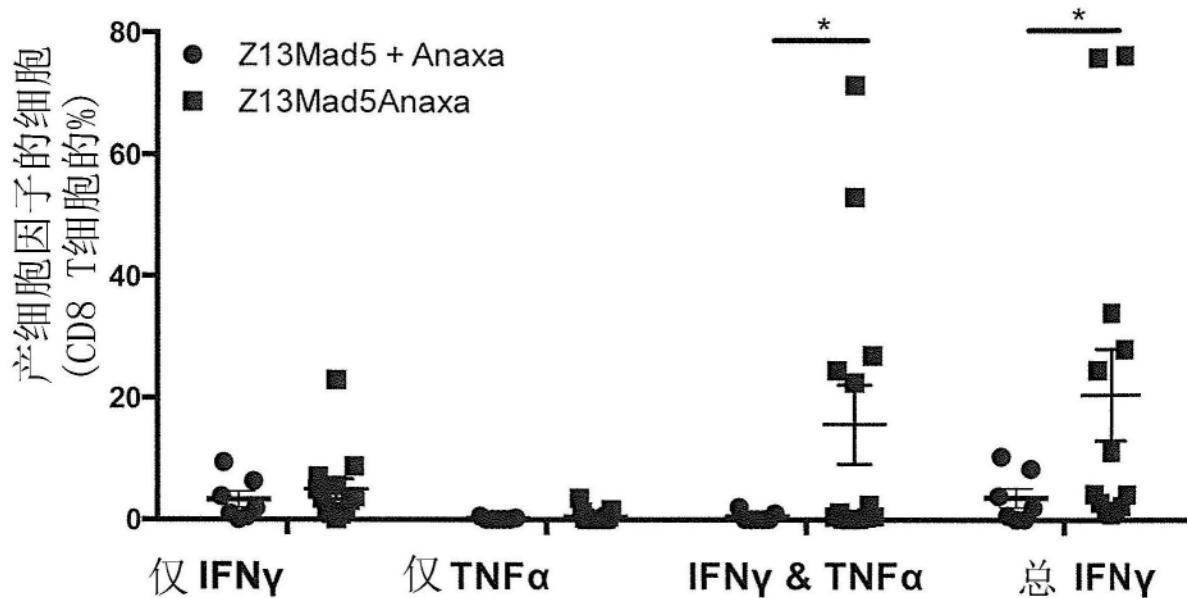
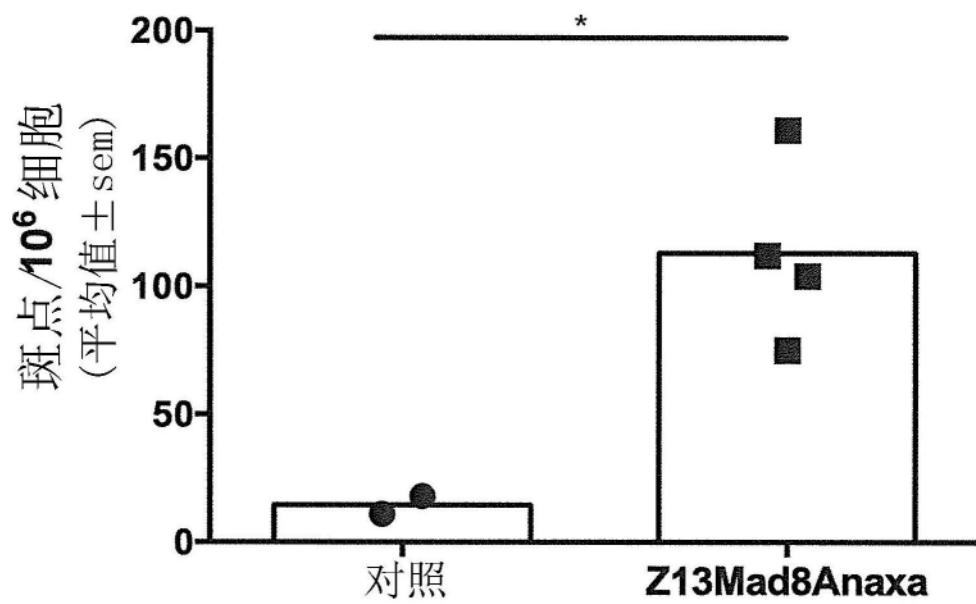


图48

A



B

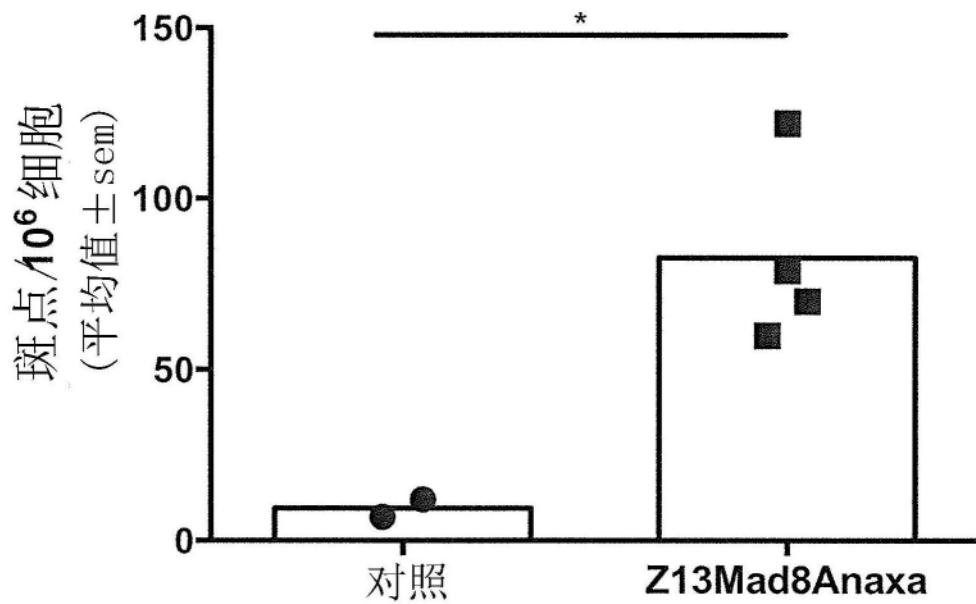
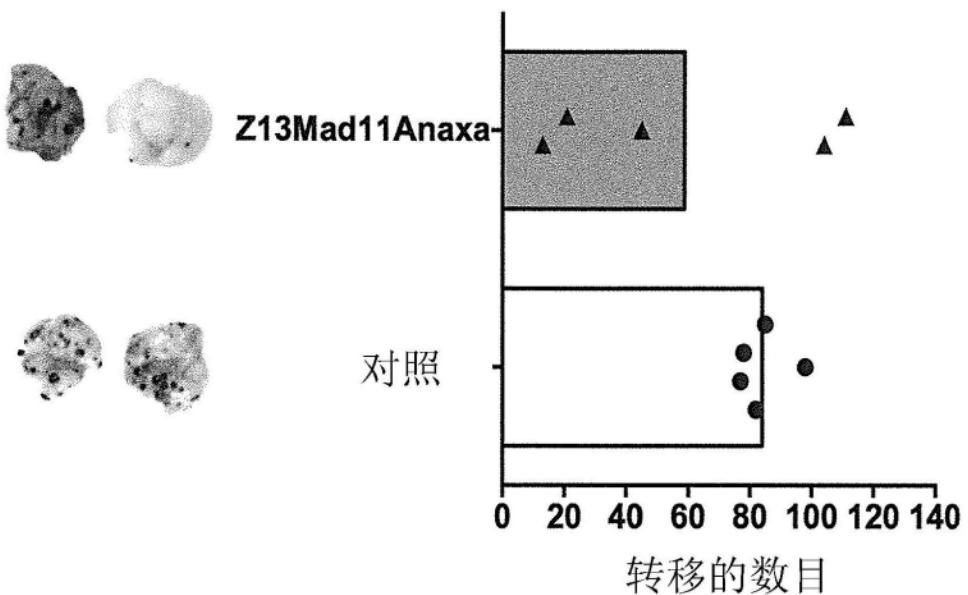


图49

A



B

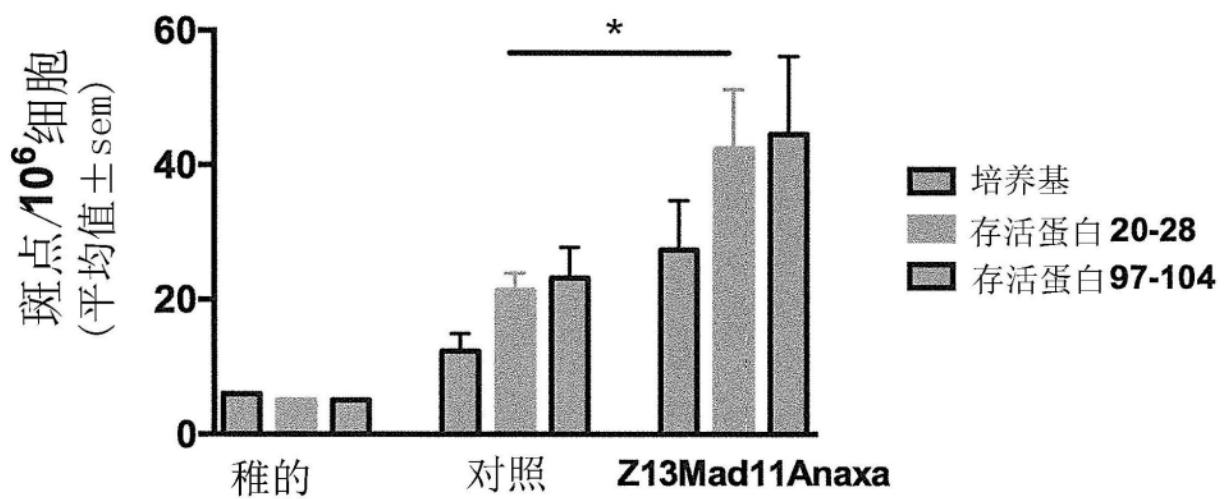


图50

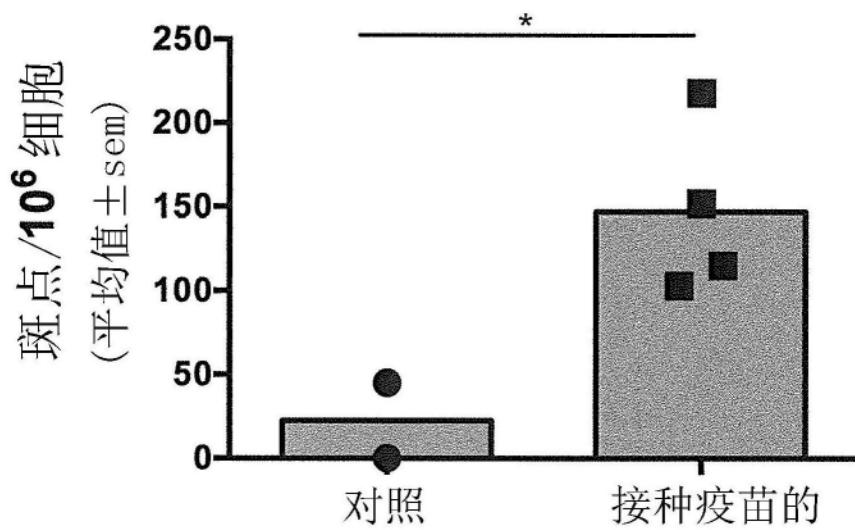


图51

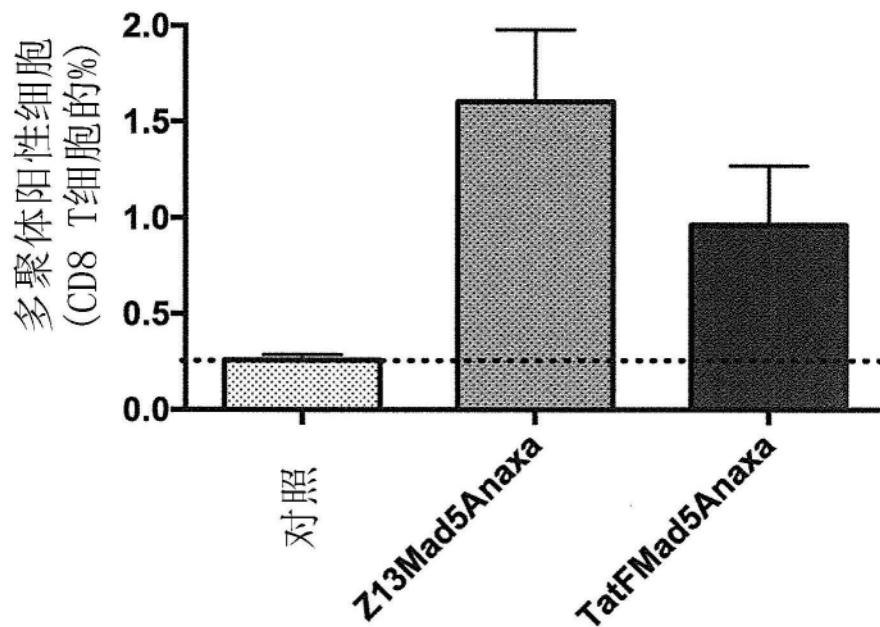


图52

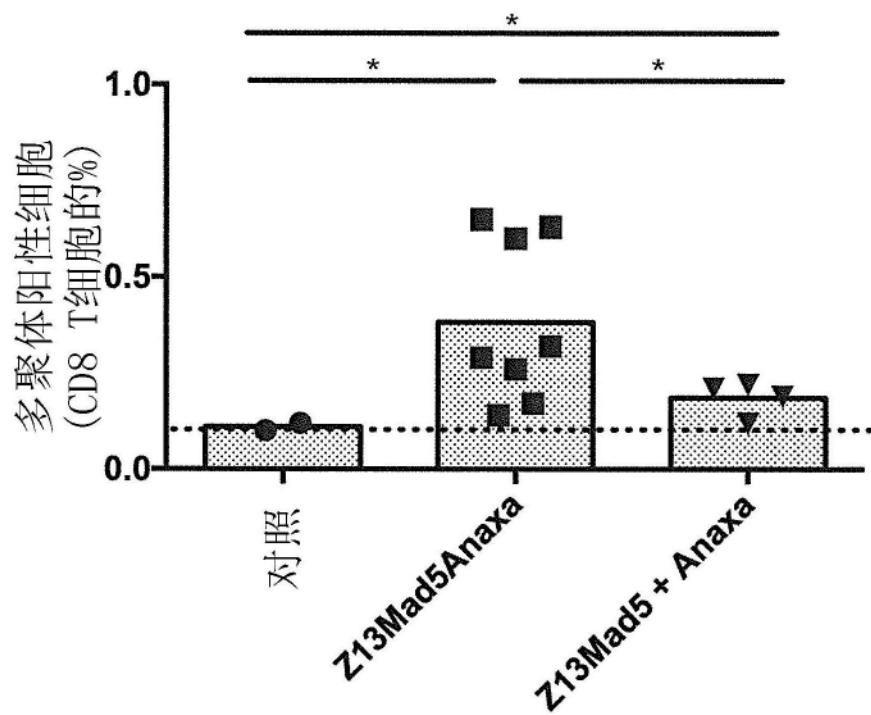


图53

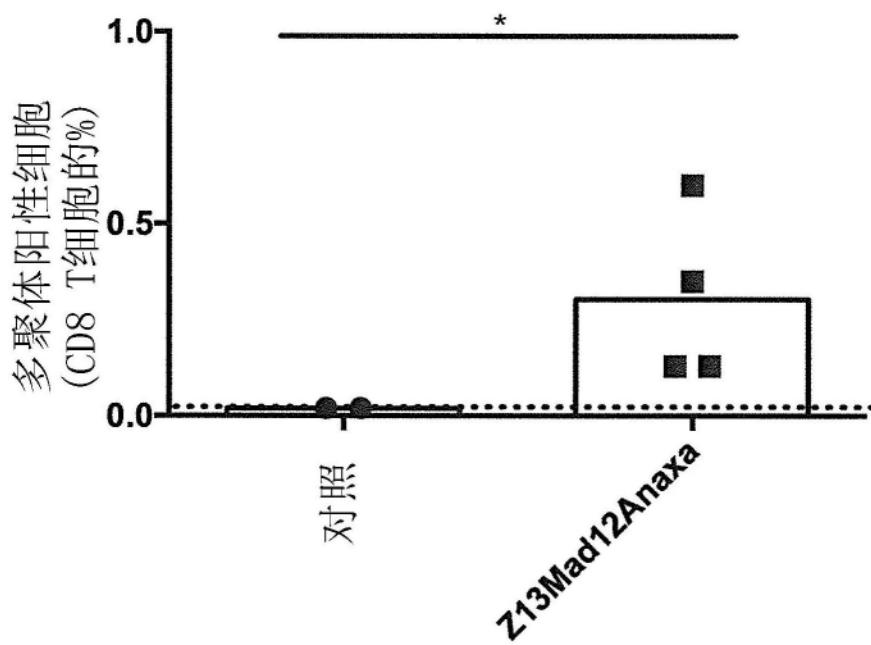


图54

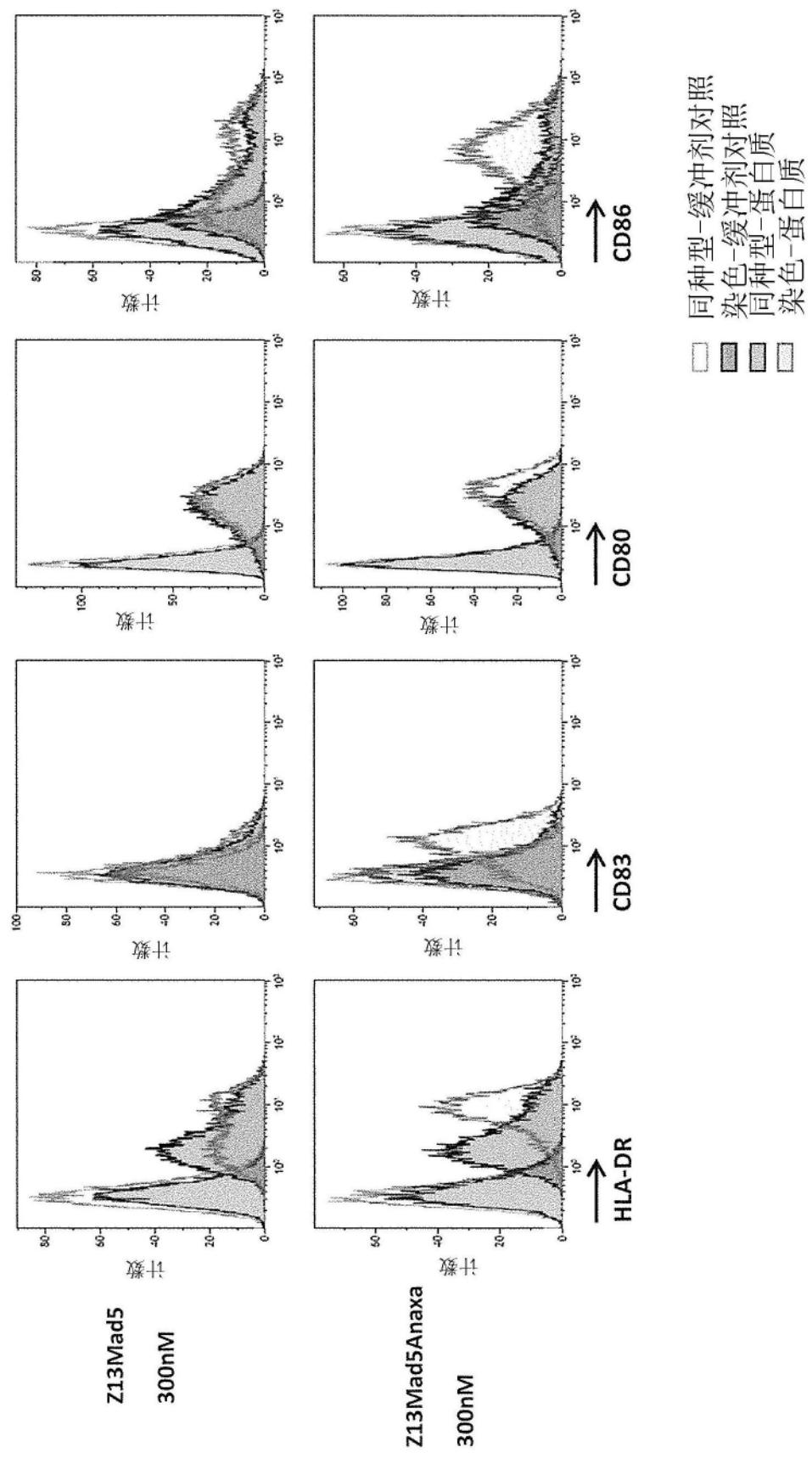


图55

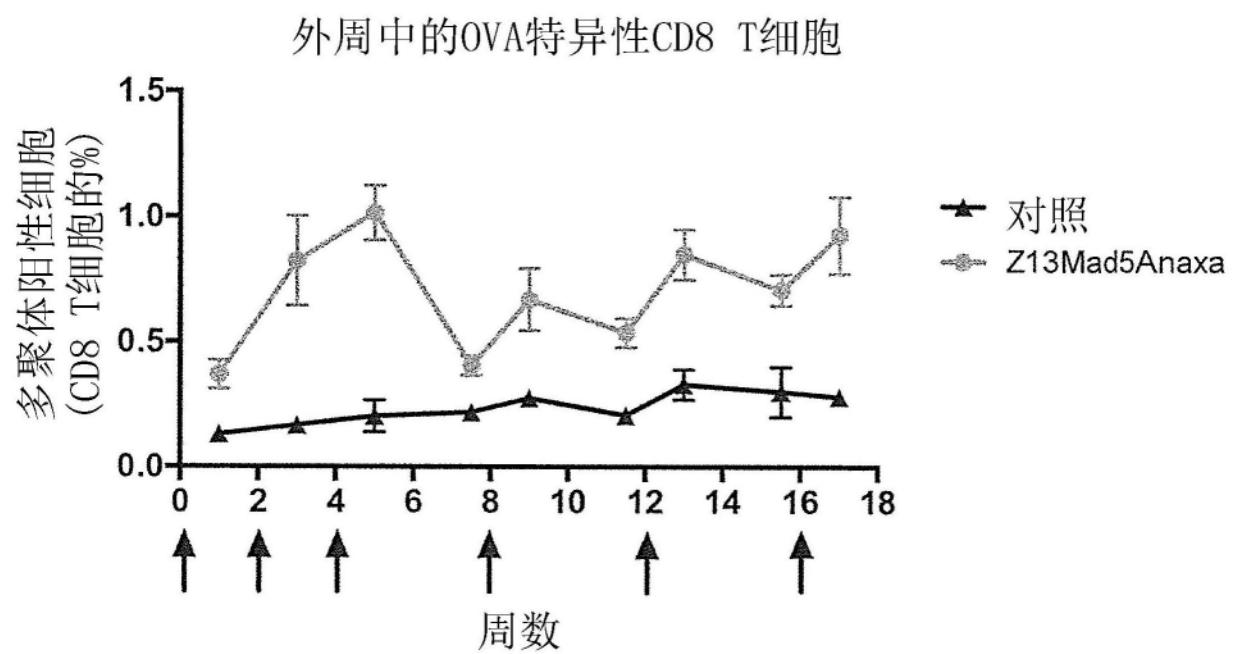
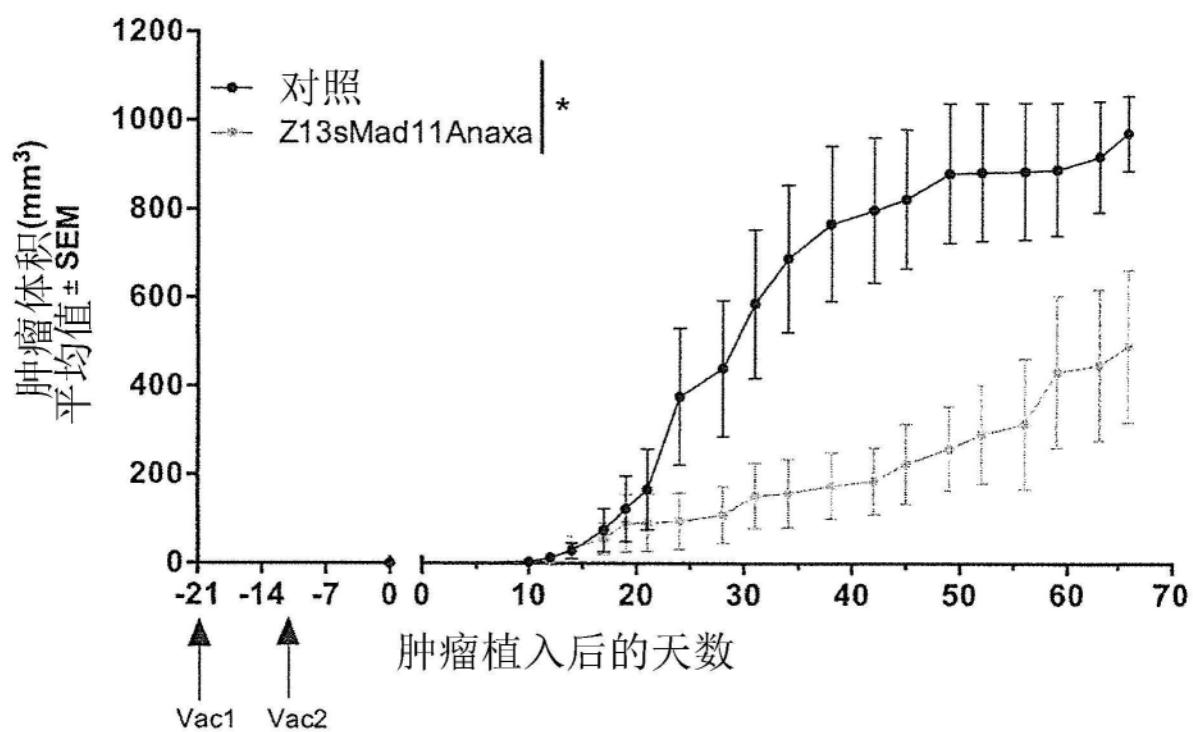


图56

A



B

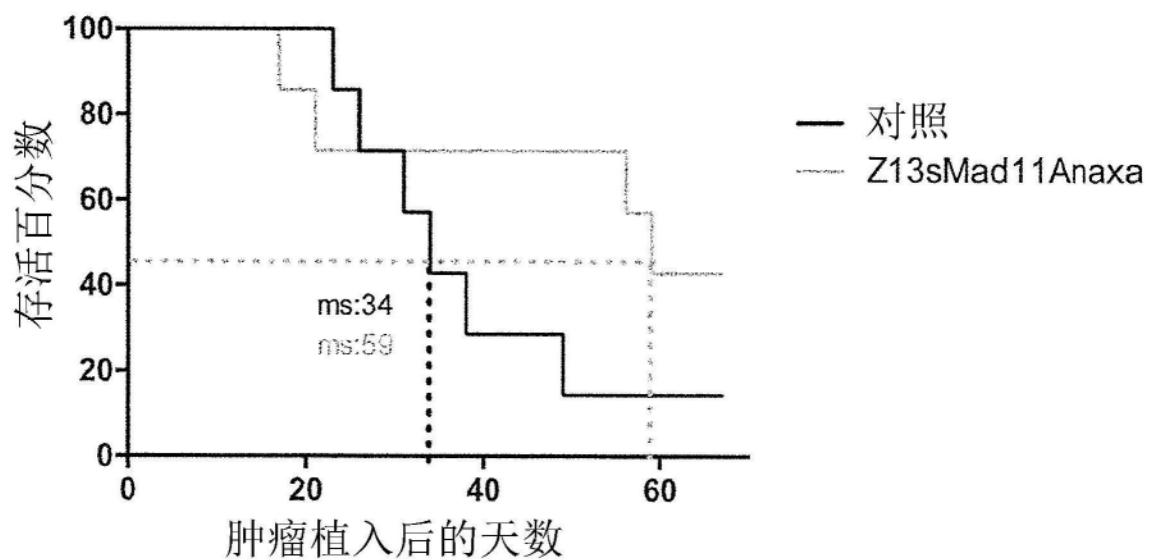


图57

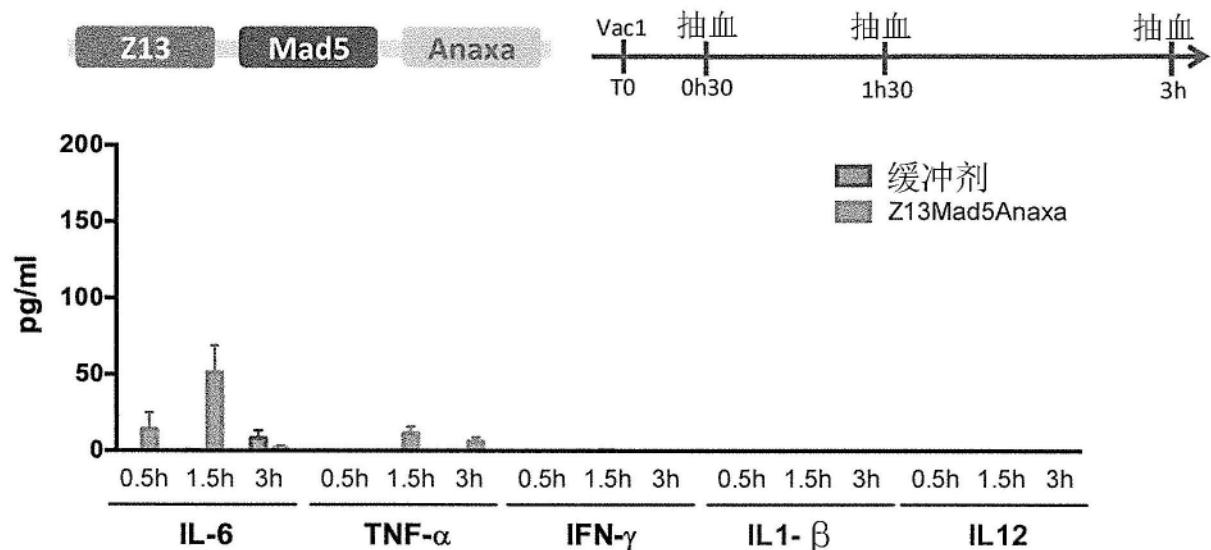


图58

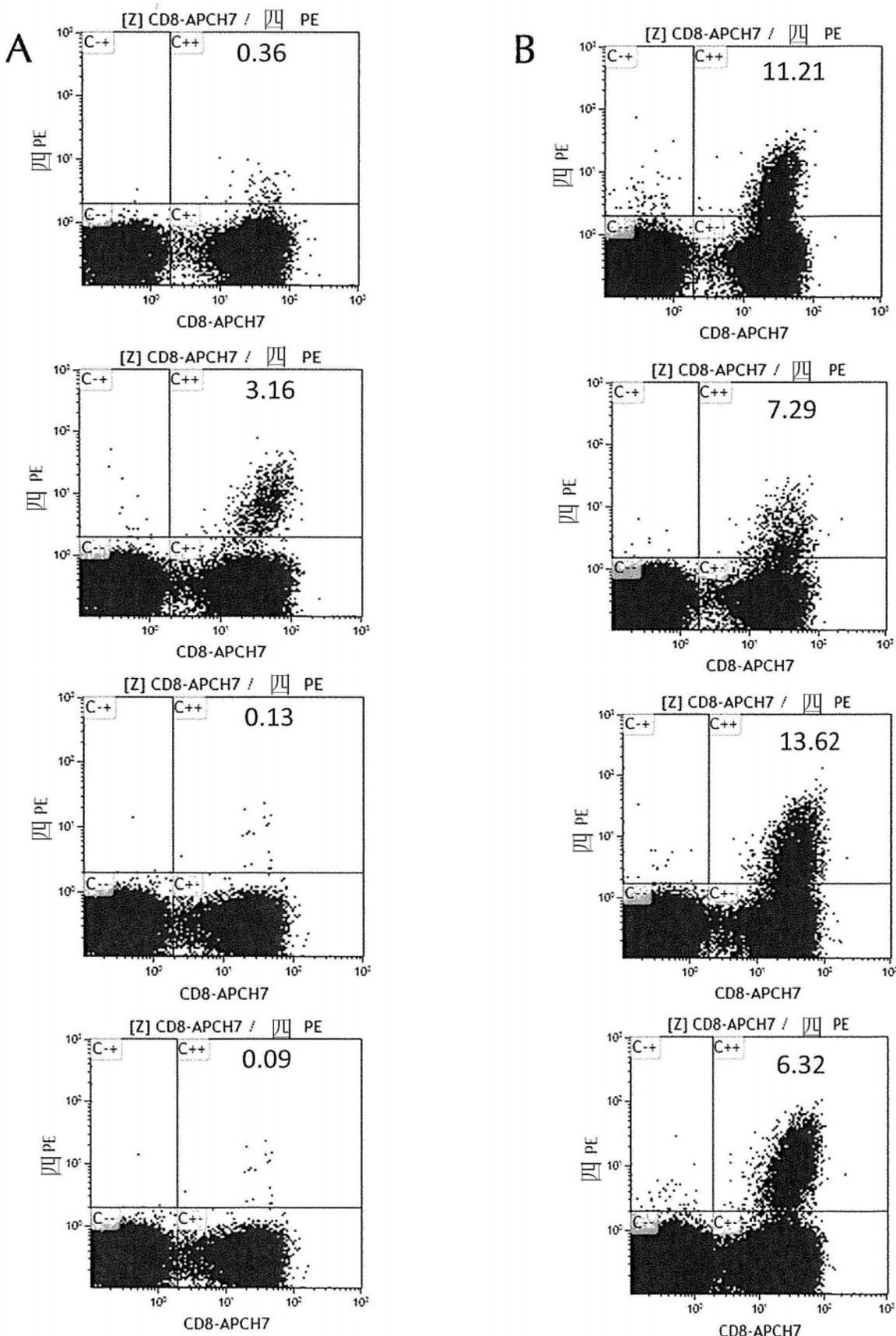


图59

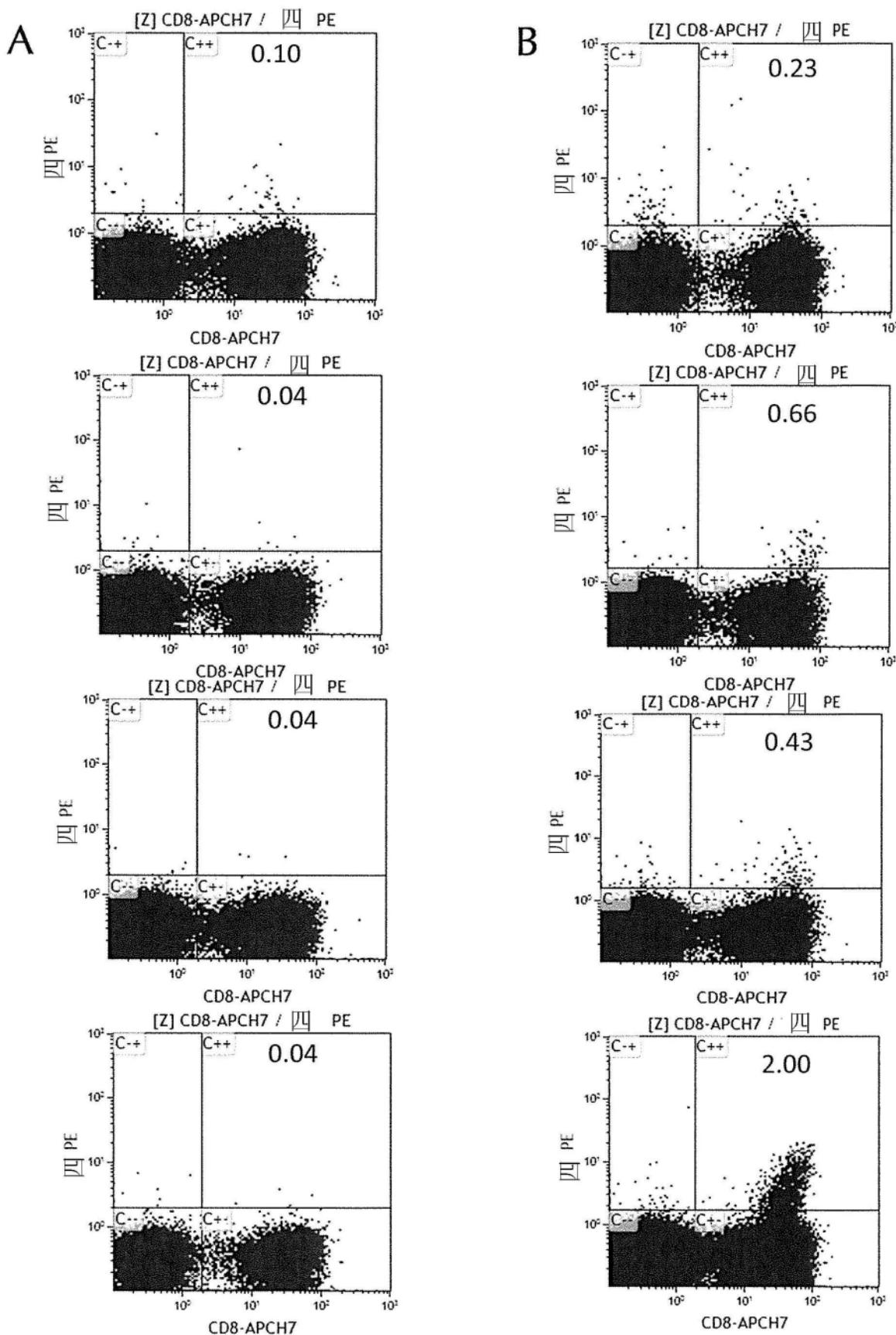
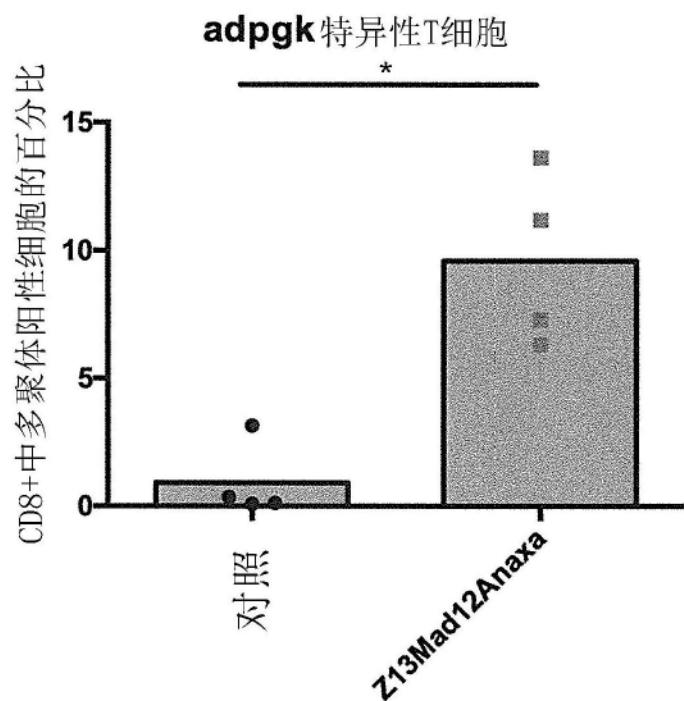


图60

A



B

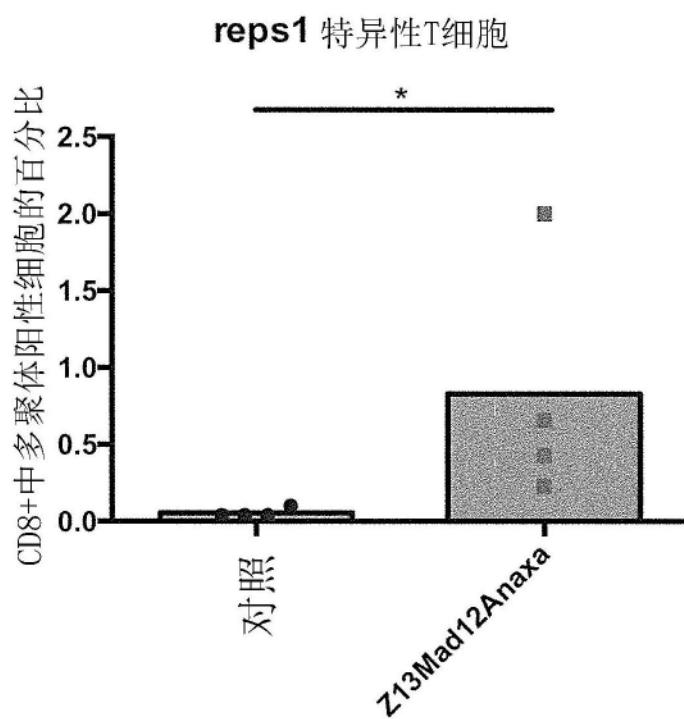


图61

ATP110

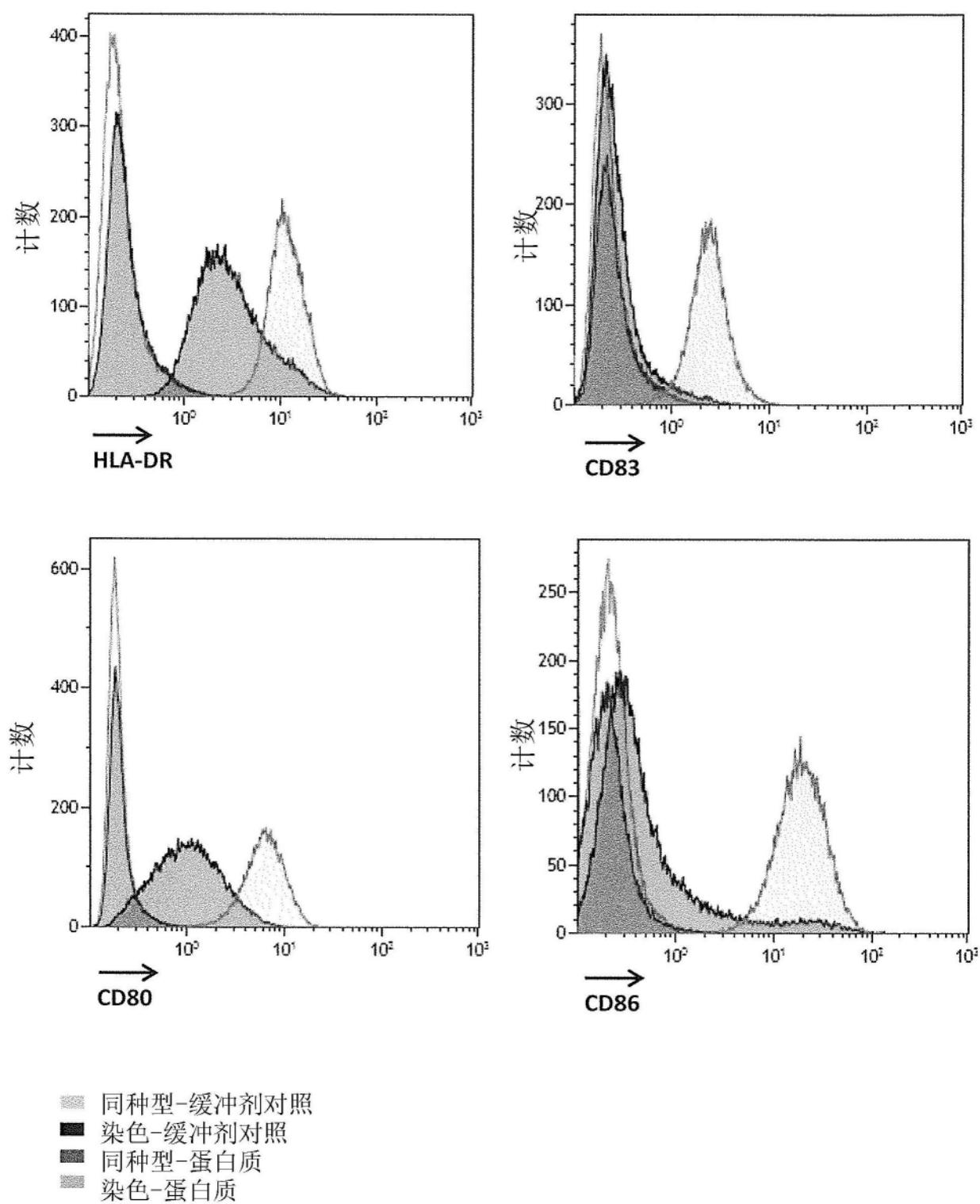


图62

ATP112

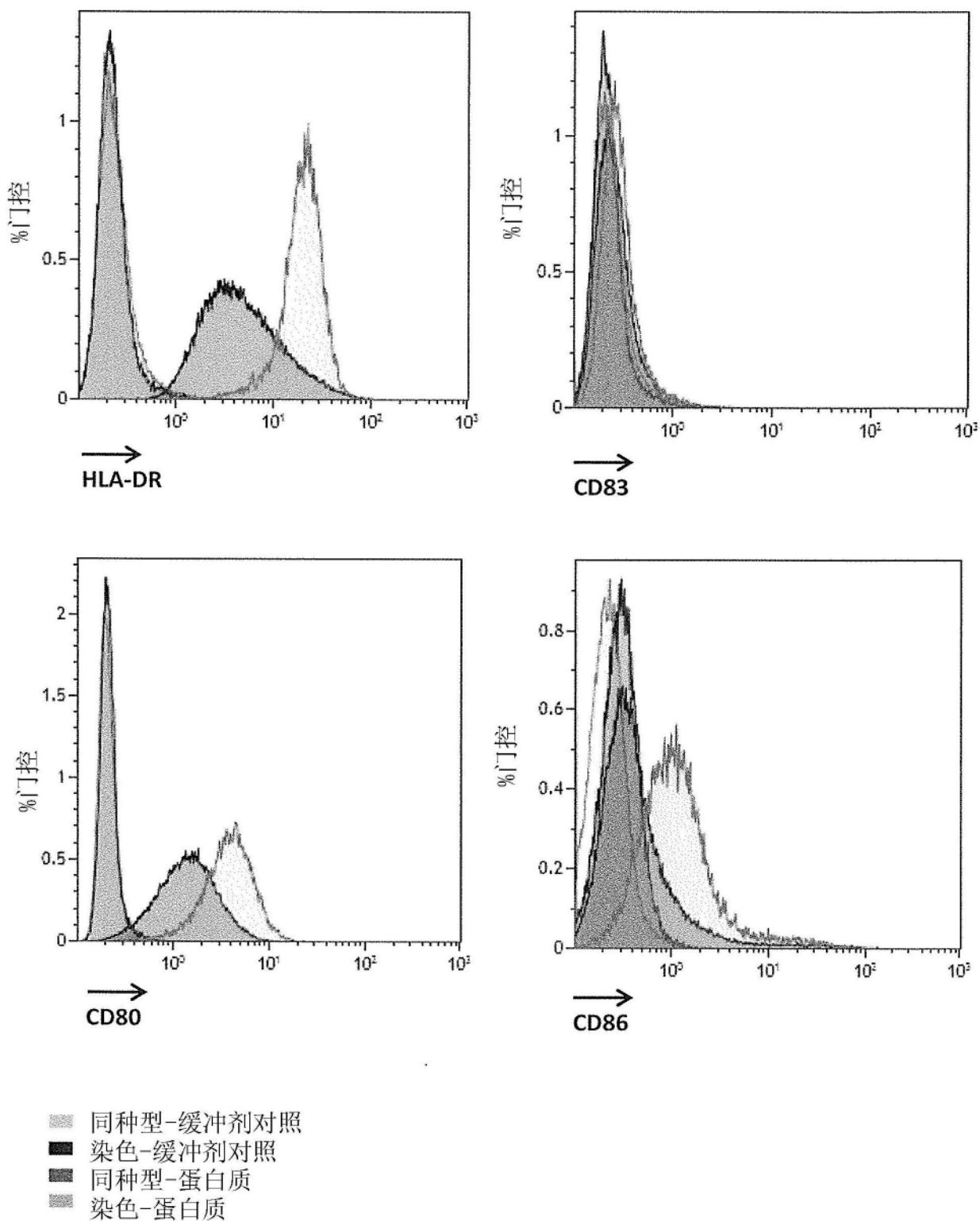


图63

ATP115

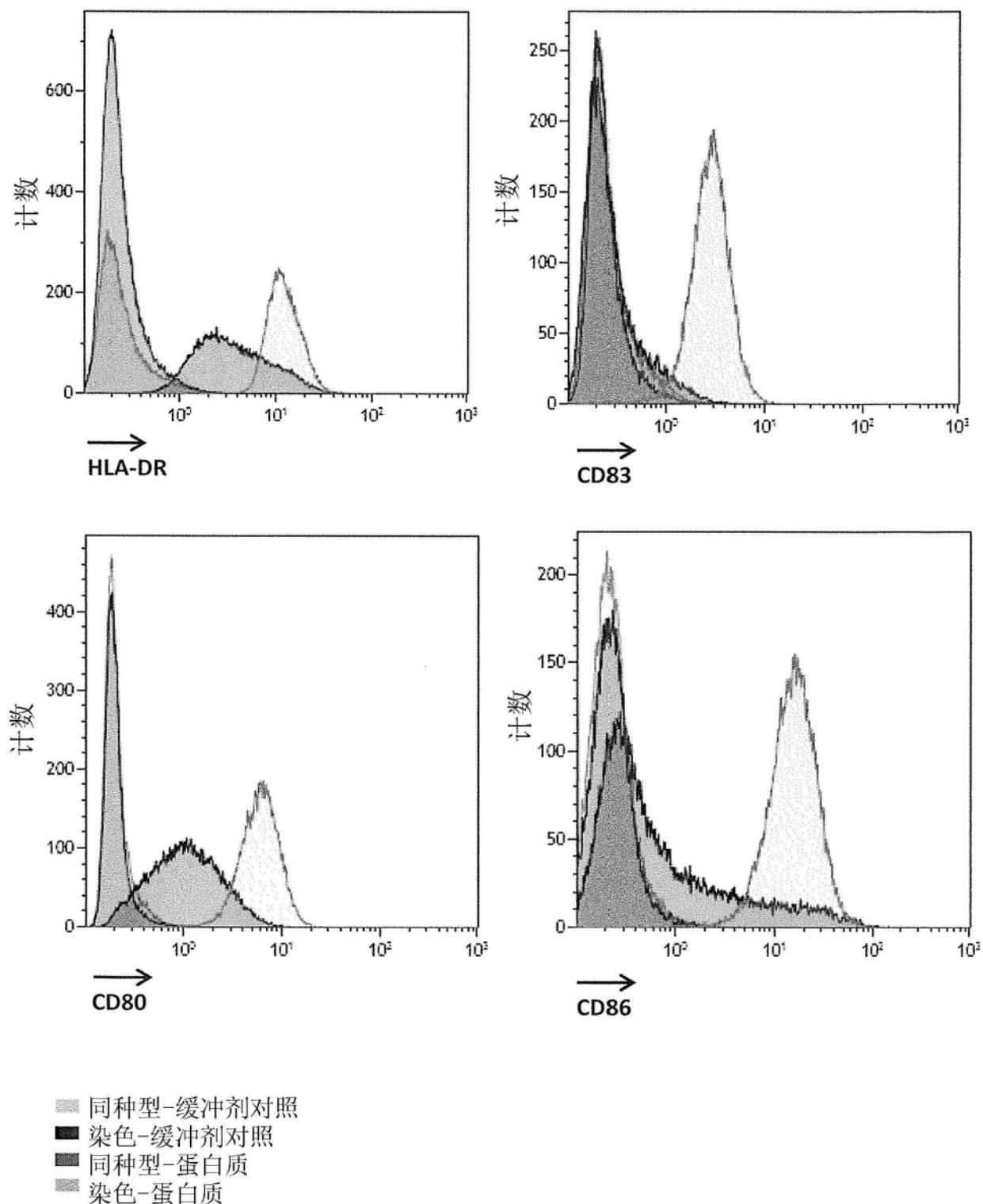


图64

ATP117

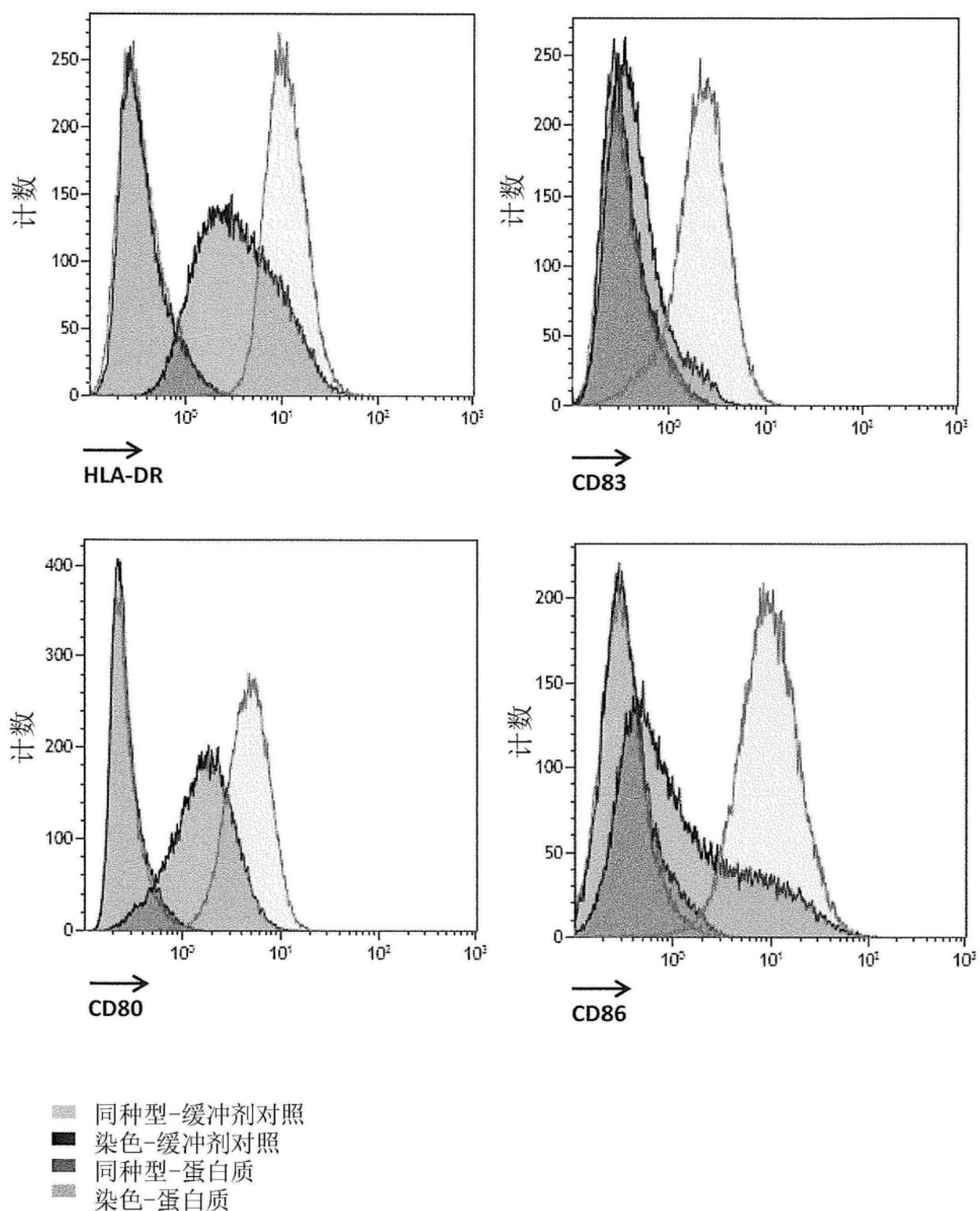


图65

ATP118

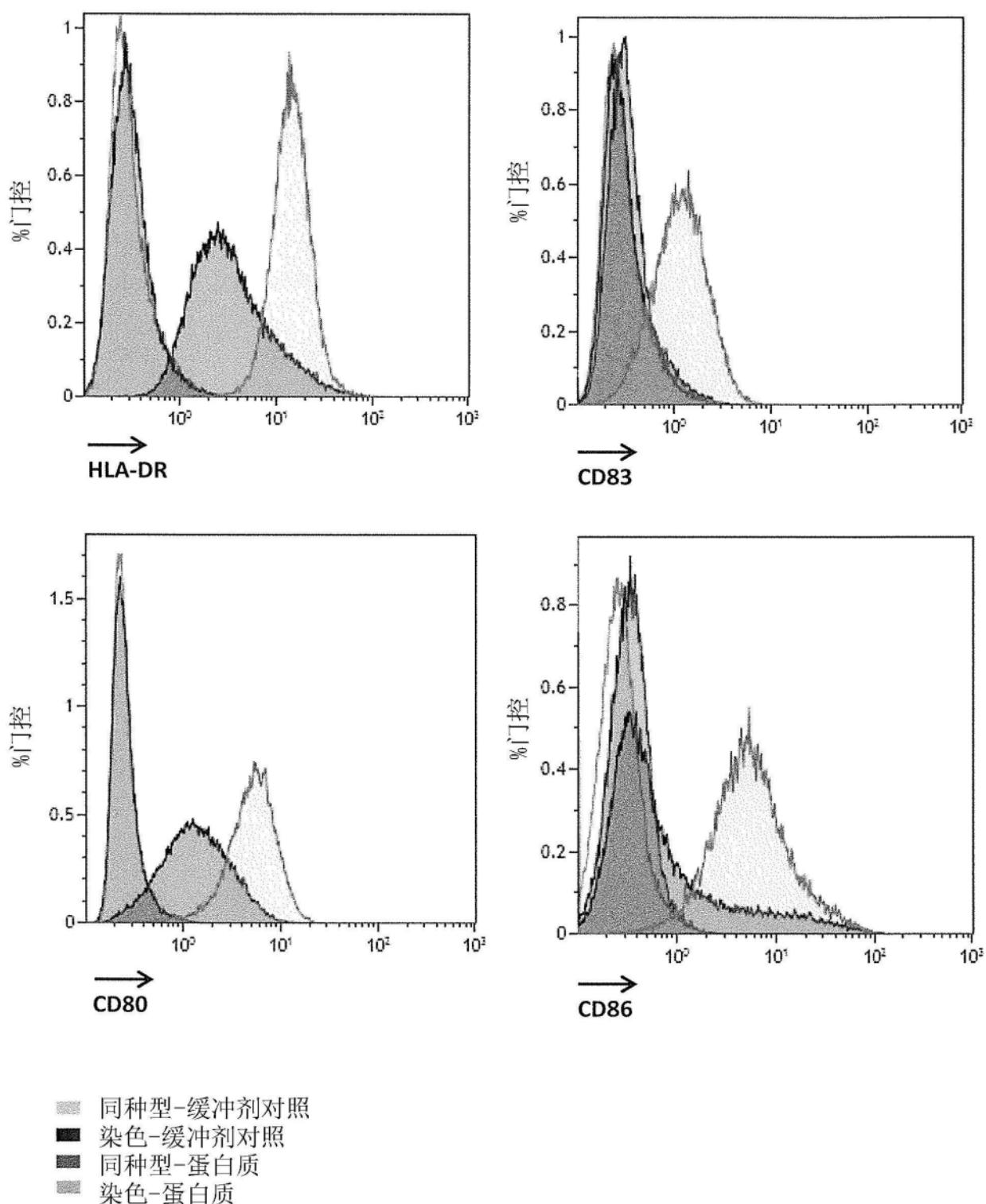


图66

ATP119

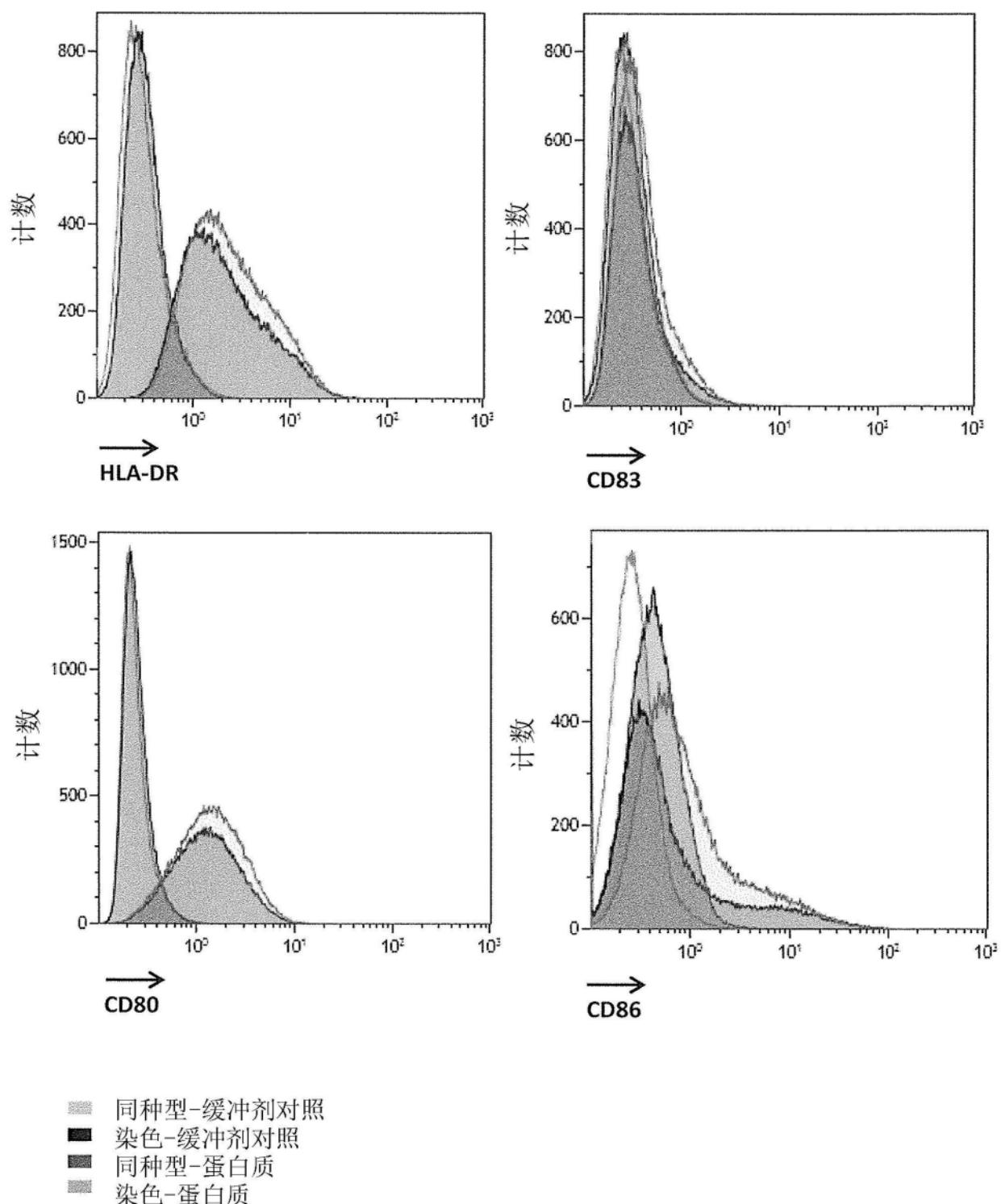


图67

ATP120

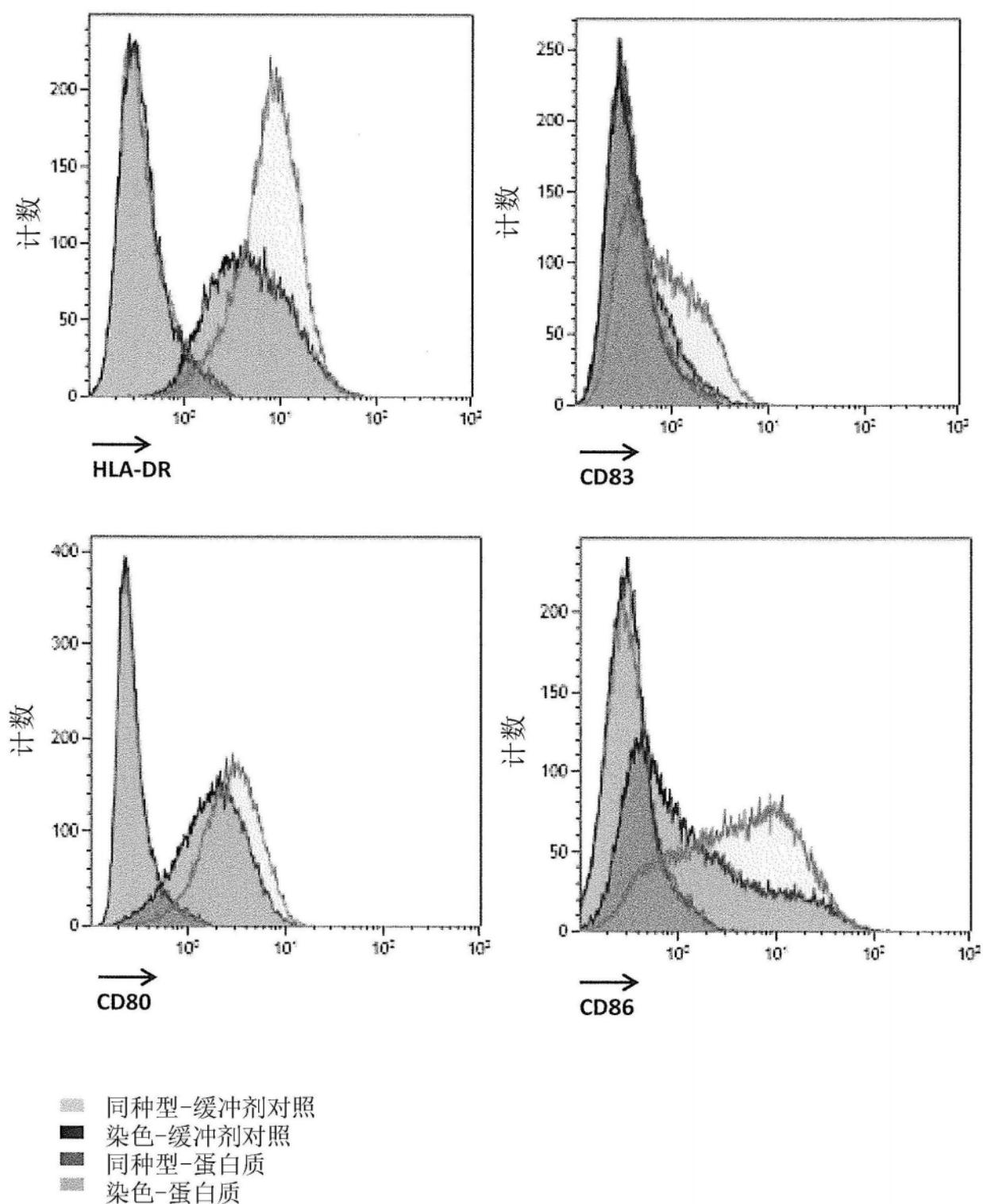


图68

ATP122

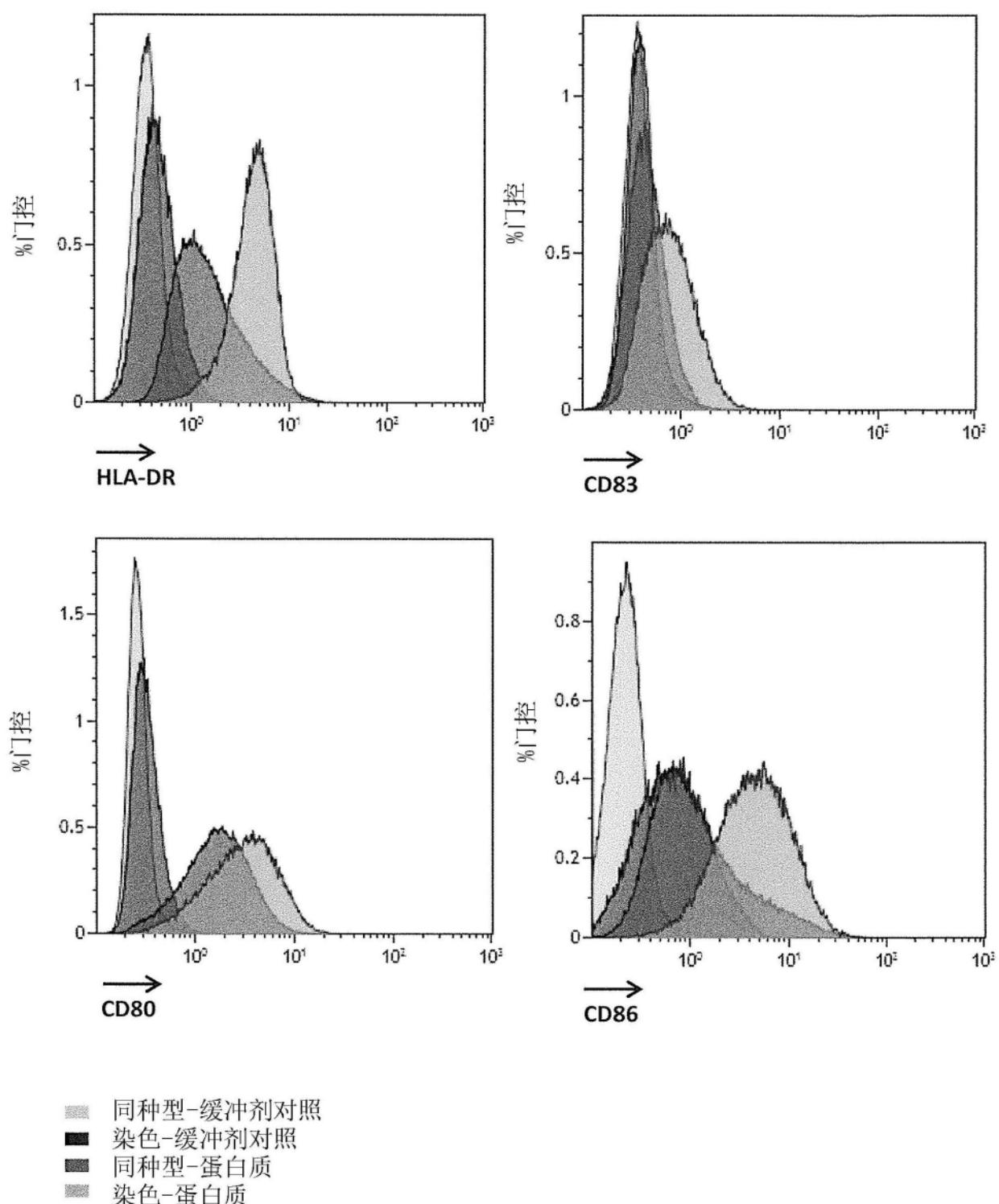


图69

ATP123

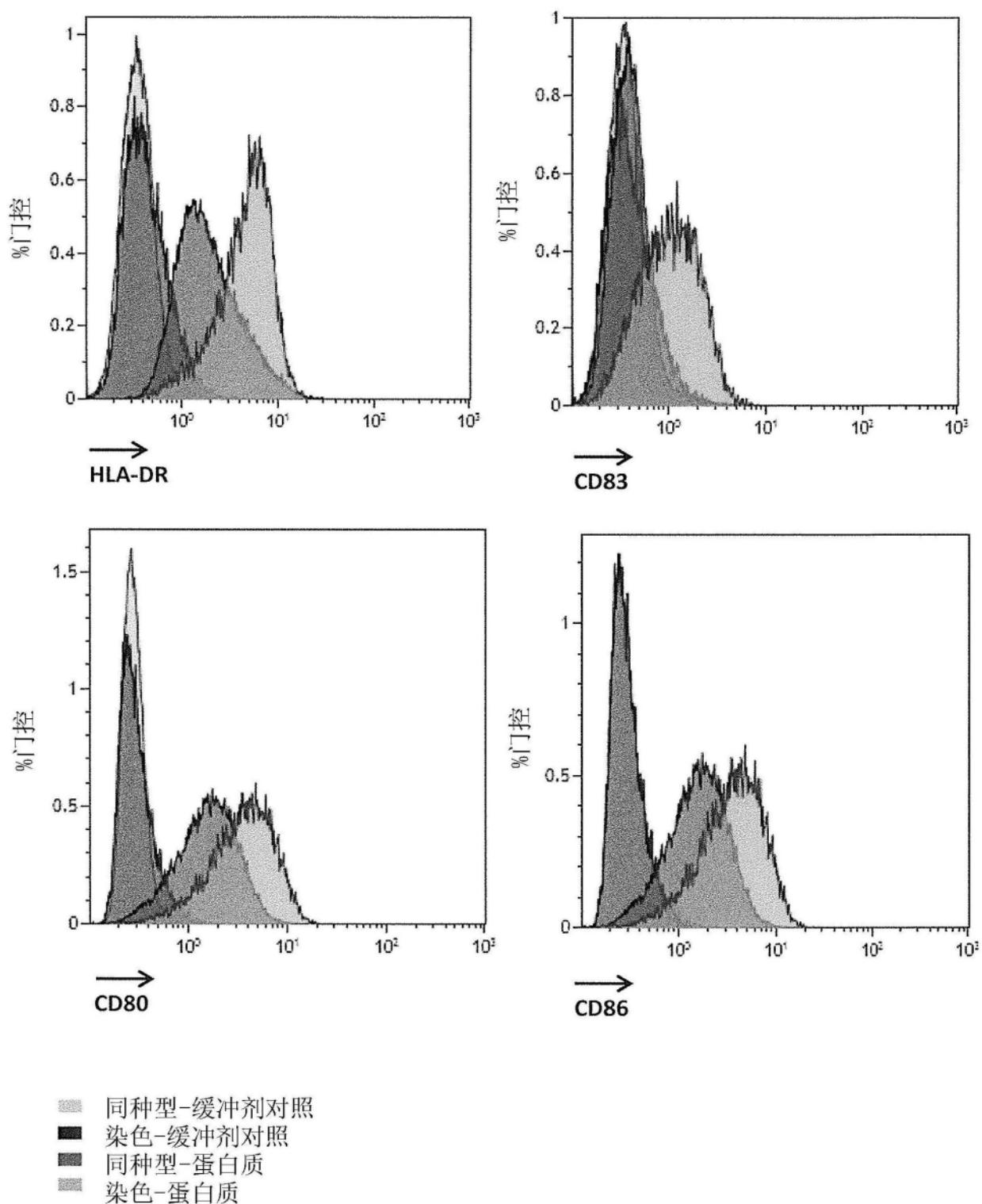


图70

ATP125

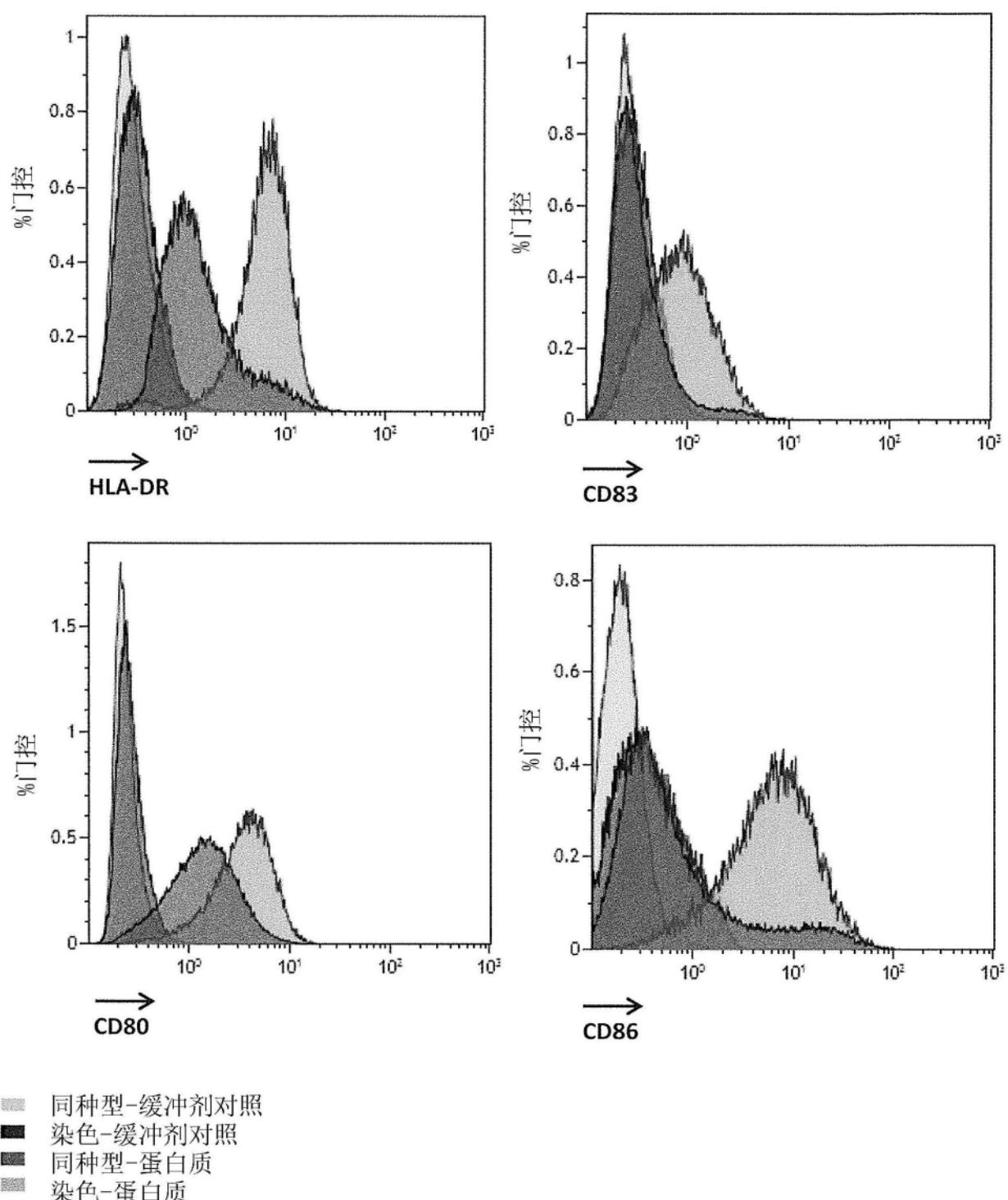
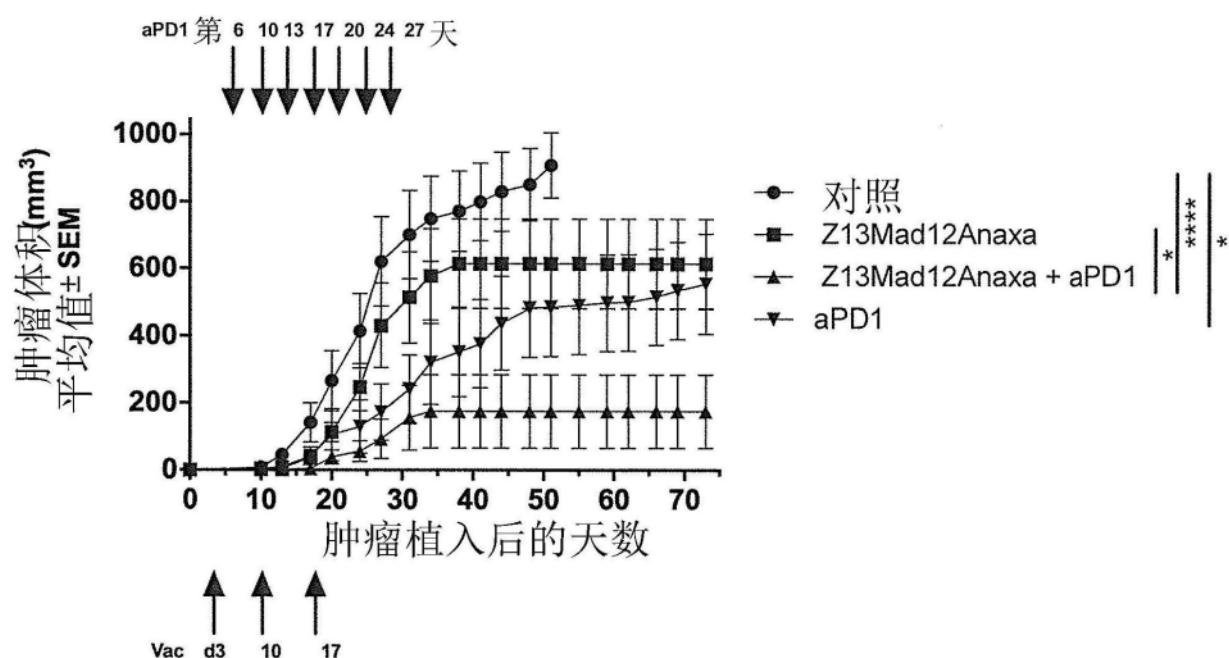


图71

A



B

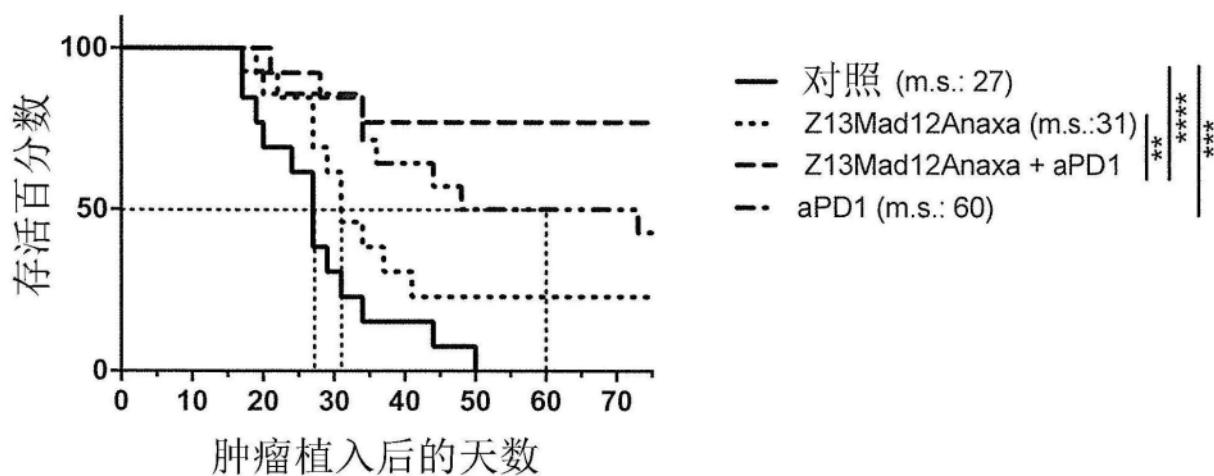


图72

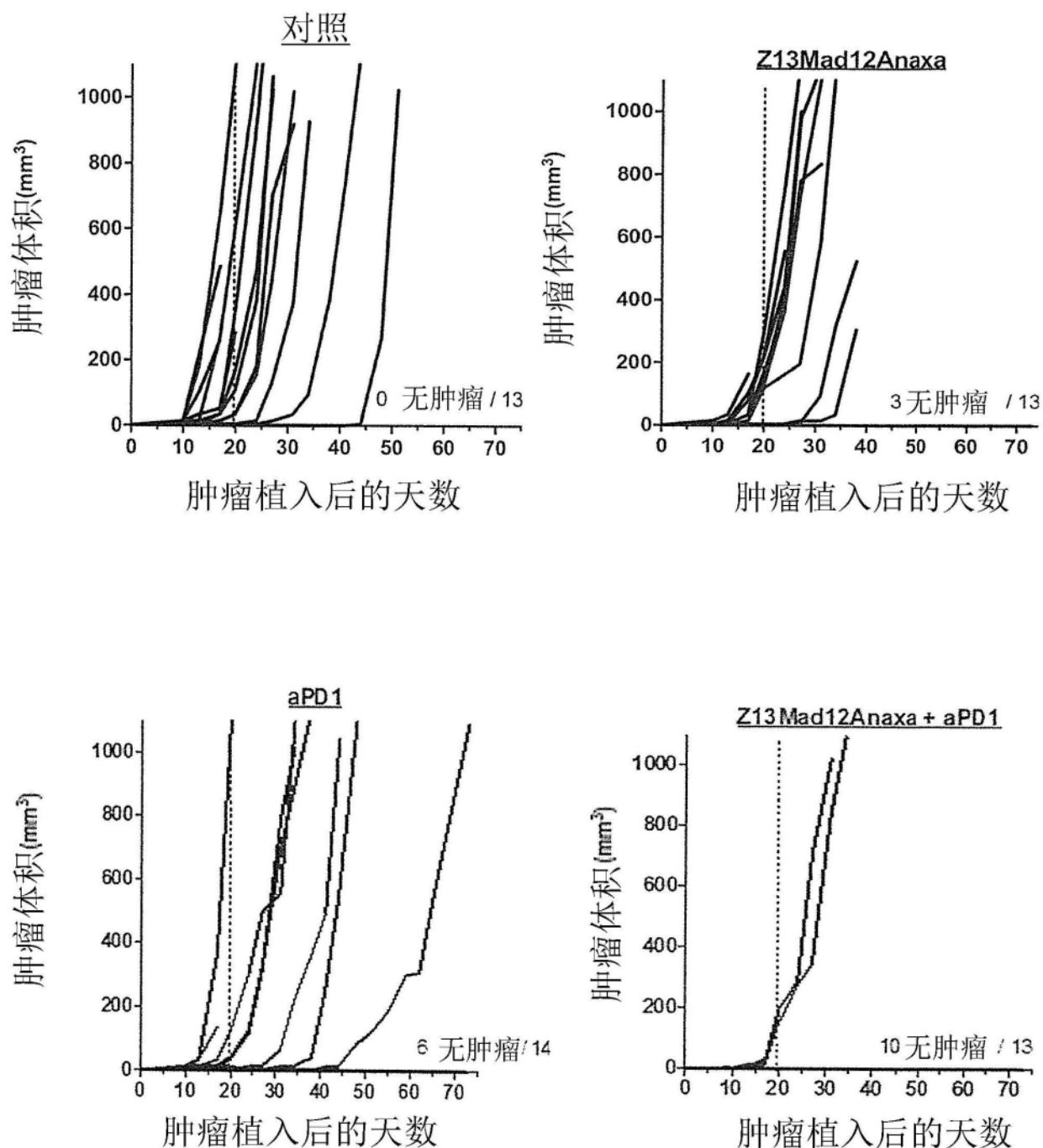


图73

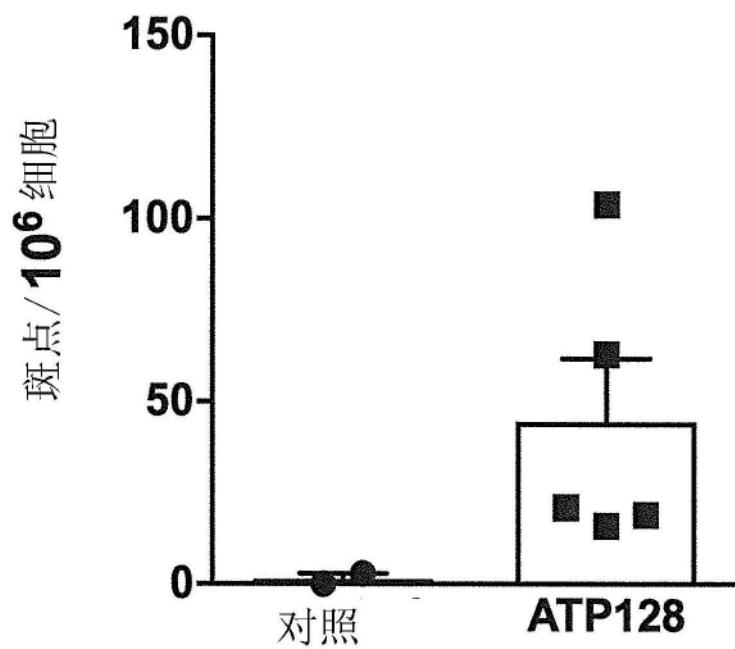


图74

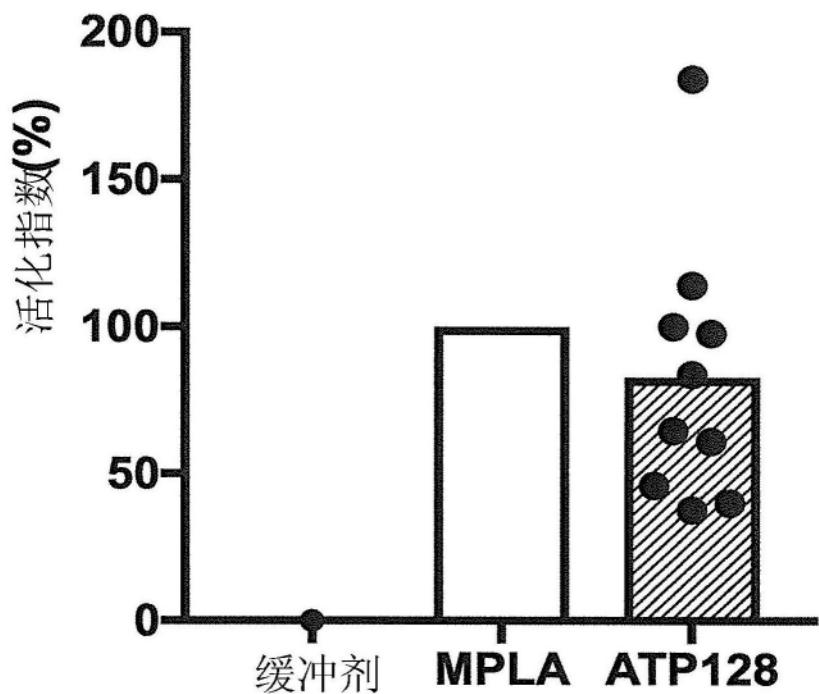
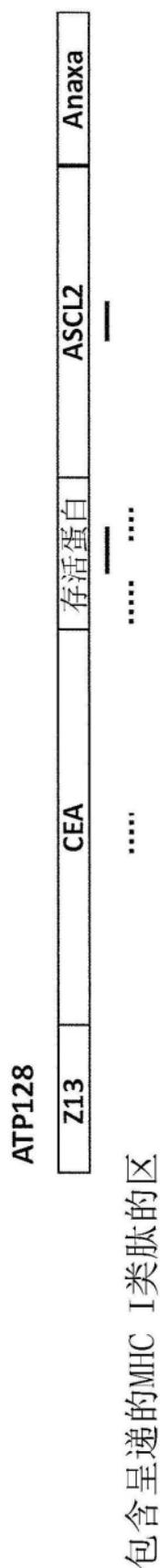


图75

A



B

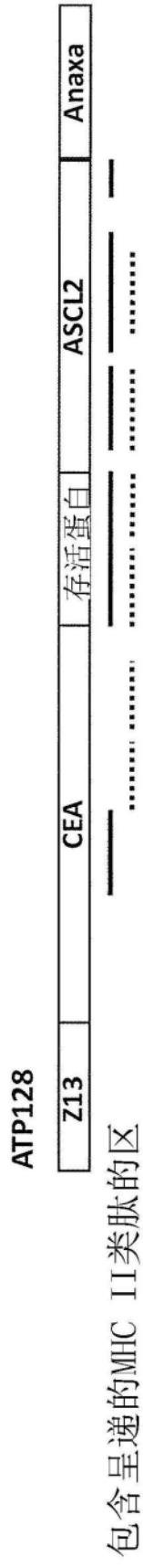


图76

C

供体	HLA I类单体型	CEA	存活蛋白	ASCL2
9	A*02:01, A*29:02 B*07:02, B*55:01	0	1	2
10	A*02:01, A*31:01 B*35, B*40:05	1	1	0

供体	HLA II类单体型	CEA	存活蛋白	ASCL2
9	DRB1*14, DRB1*15 DQB1*05:03, DQB1*06:03	6	40	66
10	DRB1*08:02, DRB1*14:02 DQB1*03:01, DQB1*03:01	2	8	27

图76续