



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104619833 B

(45)授权公告日 2018.01.02

(21)申请号 201380047407.3

(22)申请日 2013.09.09

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104619833 A

(43)申请公布日 2015.05.13

(30)优先权数据

61/699,550 2012.09.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.03.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/005321 2013.09.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/041784 EN 2014.03.20

(73)专利权人 肿瘤疗法科学股份有限公司

地址 日本神奈川县

(72)发明人 角田卓也 大泽龙司 吉村祥子

渡边朝久

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

C12N 9/00(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C07K 16/40(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

G01N 33/15(2006.01)

(56)对比文件

CN 102215870 A,2011.10.12,

CN 101796184 A,2010.08.04,

CN 1333830 A,2002.01.30,

CN 1315998 A,2001.10.03,

CN 1323217 A,2001.11.21,

Tomomi Ueki et al..Ubiquitination and Downregulation of BRCA1 by Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2T Overexpression in Human Breast Cancer Cells.《Cancer Research》.2009,第69卷(第22期),8752-8760.

Hao J et al..Elevated expression of UBE2T in lung cancer tumors and cell lines.《Tumour Biol.》.2008,第29卷(第3期),195-203.

Hao J et al..Elevated expression of UBE2T in lung cancer tumors and cell lines.《Tumour Biol.》.2008,第29卷(第3期),195-203.

顾星.人类泛素结合酶UBE2T_UBE2W和UBE2Z的功能研究.《中国博士学位论文全文数据库·基础科学辑》.2009,

审查员 黄磊

权利要求书2页 说明书47页

序列表15页 附图9页

(54)发明名称

UBE2T肽及包含它们的疫苗

(57)摘要

本文中描述了针对癌症的肽疫苗。具体地,提供了引发CTL的衍生自UBE2T的表位肽。还提供了靶向此类肽的具有CTL诱导能力的分离的抗原呈递细胞和CTL,及用于诱导抗原呈递细胞或CTL的方法。本发明进一步提供了含有衍生自UBE2T

的此类表位肽或编码该多肽的多核苷酸作为活性成分的药物组合物。此外,本发明提供了用于治疗/或防范(即预防)癌症(肿瘤),和/或预防其术后复发的方法,及用于诱导CTL的方法,用于诱导抗肿瘤免疫的方法,其使用本发明的衍生自UBE2T的表位肽,编码肽的多核苷酸,或呈递肽的抗原呈递细胞,或药物组合物进行。

1. 具有细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 诱导能力的分离的肽, 其中所述肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。

2. 具有细胞毒性T淋巴细胞诱导能力的分离的肽, 其中所述肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成, 其中1或2个氨基酸被取代, 其中所述取代选自由下述 (a) 和 (b) 组成的组:

(a) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的自N端起的第二个氨基酸被取代为苯丙氨酸、甲硫氨酸或色氨酸; 和

(b) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的C端氨基酸被取代为苯丙氨酸、亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸。

3. 分离的多核苷酸, 其编码权利要求1或2的肽。

4. 用于诱导CTL的组合物, 其中所述组合物包含至少一种选自下组的活性成分:

(a) 权利要求1或2的肽;

(b) 权利要求3的多核苷酸;

(c) 抗原呈递细胞 (APC), 该抗原呈递细胞在其表面上呈递权利要求1或2的肽; 和

(d) 外来体, 该外来体在其表面上呈递权利要求1或2的肽。

5. 一种用于治疗 and/或预防癌症, 和/或预防其手术后复发的药物组合物, 其中所述组合物包含至少一种选自下组的活性成分:

(a) 权利要求1或2的肽;

(b) 权利要求3的多核苷酸;

(c) APC, 该APC在其表面上呈递权利要求1或2的肽; 和

(d) 外来体, 该外来体在其表面上呈递权利要求1或2的肽; 和

(e) CTL, 其可以识别呈递权利要求1或2的肽的细胞。

6. 权利要求5的药物组合物, 其中所述药物组合物配制用于对其HLA抗原为HLA-A24的受试者施用。

7. 一种用于诱导具有CTL诱导能力的APC的体外方法, 其中该方法包括选自下组的步骤:

(a) 使APC与权利要求1或2的肽接触, 和

(b) 将编码权利要求1或2的肽的多核苷酸导入APC。

8. 一种用于诱导CTL的体外方法, 其中该方法包括选自下组的步骤:

(a) 将CD8阳性T细胞与在表面上呈递HLA抗原与权利要求1或2的肽的复合物的APC共培养;

(b) 将CD8阳性T细胞与在表面上呈递HLA抗原与权利要求1或2的肽的复合物的外来体共培养; 和

(c) 将1个编码两种T细胞受体 (TCR) 亚单位的多核苷酸或多个编码每种TCR亚基的多核苷酸导入CD8阳性T细胞中, 其中由所述亚单位形成的TCR能结合细胞表面上权利要求1或2的肽和HLA抗原的复合物。

9. 一种分离的APC, 该APC在其表面上呈递HLA抗原与权利要求1或2的肽的复合物。

10. 权利要求9的APC, 其是通过权利要求7的方法诱导的。

11. 一种分离的CTL, 其靶向权利要求1或2的肽。

12. 权利要求11的CTL, 其是通过权利要求8的方法诱导的。

13. 权利要求1或2的肽,或编码所述肽的多核苷酸,在制造用于在受试者中诱导针对癌症的免疫应答的组合物中的用途。

14. 一种载体,其包含编码权利要求1或2的肽的核苷酸序列。

15. 一种组合物在制造用于治疗 and/或预防癌症,和/或阻止其术后复发的药物中的用途,其中所述组合物包含至少一种选自下组的活性成分:

(a) 权利要求1或2的肽;

(b) 权利要求3的多核苷酸;

(c) APC,该APC在其表面上呈递权利要求1或2的肽;

(d) 外来体,该外来体在其表面上呈递权利要求1或2的肽;和

(e) CTL,其可以识别呈递权利要求1或2的肽的细胞。

16. 权利要求15的用途,其中所述癌症选自膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食道癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

UBE2T肽及包含它们的疫苗

技术领域

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

[0002] 优先权

[0003] 本申请要求2012年9月11日提交的美国临时申请61/699,550的权益,通过述及将其全部内容收入本文用于所有目的。

背景技术

[0004] 已经显示CD8阳性细胞毒性T细胞细胞(CTL)可识别主要组织相容性复合物(MHC) I类分子上找到的肿瘤相关抗原(TAA)所衍生的表位肽,然后杀死肿瘤细胞。从TAA的第一个例子——黑素瘤抗原(MAGE)家族被发现起,主要通过免疫学手段(NPL 1-2)已经发现了许多其它TAA。这些TAA中的一些目前正在作为免疫治疗靶标进行临床开发。

[0005] 有利的TAA对于癌细胞的扩增和存活而言是不可或缺的。使用这样的TAA作为免疫治疗的靶标,可以最大程度的减小人们熟知的癌细胞免疫逃逸的风险。癌细胞免疫逃逸可归因于治疗驱动的免疫选择(therapeutically driven immune selection)而导致的TAA删除、突变或下调。因此,能够诱导强力且特异性的抗肿瘤免疫应答的新TAA的鉴定保证了进一步开发并且由此利用针对各种类型癌症的肽疫苗接种策略的临床考察正在进行中(NPL 3-10)。迄今为止,已经有数项使用这些肿瘤相关抗原衍生的肽进行临床试验的报告。不幸的是,在这些癌症疫苗试验中只观察到较低的客观应答率(NPL 11-13)。因此,仍然对作为免疫治疗靶的新TAA存在需求。

[0006] UBE2T(泛素缀合酶E2;在SEQ ID NO:65中所示的典型氨基酸序列;在SEQ ID NO:64(GenBank登录号NM_014176)中所示的典型核苷酸序列)是泛素缀合酶(E2)之一。报告了UBE2T是其表达在用血清刺激的人成纤维细胞中上调的基因之一(NPL 14)。在范可尼贫血(Fanconi anemia)途径中,UBE2T结合FANCL,并且是DNA损伤诱导的FANCD2单泛素化必需的(NPL 15-16)。在最近的研究中,发现了UBE2T在乳腺癌中通常上调,并且与BRCA1/BRCA1关联的RING域蛋白(BARD1)复合物相互作用并共定位(PTL 1,NPL 17)。那些研究中的Northern印迹分析揭示了UBE2T转录物在乳腺癌细胞系中以非常高的水平检出,但是在重要的器官中几乎检测不到。此外,在癌细胞系中通过siRNA敲低内源UBE2T已经显示了显著抑制那些细胞系的生长(PTL 1-2,NPL 17)。

[0007] 引用表

[0008] 专利文献

[0009] [PTL 1]W02005/029067

[0010] [PTL 2]W02009/001562

[0011] 非专利文献

[0012] [NPL 1]Boon T,Int J Cancer 1993,54(2):177-80

[0013] [NPL 2]Boon T & van der Bruggen P,J Exp Med 1996,183(3):725-9

- [0014] [NPL 3]Harris CC,J Natl Cancer Inst 1996,88 (20):1442-55
- [0015] [NPL 4]Butterfield LH et al.,Cancer Res 1999,59 (13):3134-42
- [0016] [NPL 5]Vissers JL et al.,Cancer Res 1999,59 (21):5554-9
- [0017] [NPL 6]van der Burg SH et al.,J Immunol 1996,156 (9):3308-14
- [0018] [NPL 7]Tanaka F et al.,Cancer Res 1997,57 (20):4465-8
- [0019] [NPL 8]Fujie T et al.,Int J Cancer 1999,80 (2):169-72
- [0020] [NPL 9]Kikuchi M et al.,Int J Cancer 1999,81 (3):459-66
- [0021] [NPL 10]Oiso M et al.,Int J Cancer 1999,81 (3):387-94
- [0022] [NPL 11]Bellli F et al.,J Clin Oncol 2002,20 (20):4169-80
- [0023] [NPL 12]Coulie PG et al.,Immunol Rev 2002,188:33-42
- [0024] [NPL 13]Rosenberg SA et al.,Nat Med 2004,10 (9):909-15
- [0025] [NPL 14]Iyer VR et al.,Science 1999,283:83-7
- [0026] [NPL 15]Machida YJ et al.,Mol Cell 2006,23:589-96
- [0027] [NPL 16]Alpi A et al.,Mol Cell Biol 2007,27:8421-30
- [0028] [NPL 17]Ueki T et.al.,Cancer Res.2009,69:8752-60

[0029] 发明概述

[0030] 本发明至少部分基于可以充当免疫疗法的合适靶物的新肽的发现。由于TAA一般被免疫系统察觉为“自身的”，因此经常没有先天性免疫原性，合适的靶物的发现仍然是有意义的。为此，本发明至少部分涉及在衍生自UBE2T的肽中拥有诱导对UBE2T特异性的CTL的能力的特定表位肽的鉴定。

[0031] 本文中公开的结果证明了鉴定的肽是HLA-A24或HLA-A2限制性表位肽，其可以诱导针对表达UBE2T的细胞的有力且特异性的免疫应答。

[0032] 因而，本发明的目的是提供UBE2T衍生的肽，其可以用于在体外、离体或在体内诱导CTL，或者对受试者施用以诱导针对癌症的免疫应答，所述癌症的例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食道癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。优选的肽是九肽和十肽，更优选具有选自下组的氨基酸序列的九肽和十肽：SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58。这些中，特别优选具有选自下组的氨基酸序列的肽：SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58。

[0033] 本发明还涵盖具有选自下组的氨基酸序列的经修饰的肽：SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58，其中取代、缺失、插入和/或添加了1、2或更多个氨基酸，只要所得的经修饰的肽保留初始的未修饰的肽的必需的CTL诱导能力。在一个实施方案中，在初始肽是9聚体（SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、29、30、32、36、38、和41）时，经修饰的肽的大小优选在9至40个氨基酸的范围中，诸如在9至20个氨基酸的范围中，例如在范围9至15个氨基酸中。同样地，在初始肽是10聚体（SEQ ID NO:17、19、20、21、22、23、24、25、27、48、49、51、52、53、55、56和58）时，经修饰的肽的大小优选在10至40个氨基酸的范围中，诸如在10至20个氨基酸的范围中，例如在范围10至15个氨基酸中。

[0034] 本发明还涵盖编码任何一种本发明的肽的分离的多核苷酸。这些多核苷酸可以用来诱导或者制备具有CTL诱导能力的APC。像本发明的肽一样,这样的APC可以施用给受试者以诱导针对癌症的免疫应答。

[0035] 当施用给受试者时,本发明的肽可以被呈递在抗原呈递细胞的表面上,以诱导靶向相应肽的CTL。因此,本发明的一个目的是提供作用剂或组合物,此类作用剂或组合物包含一种或多种本发明的肽,或一种或多种编码此类肽的多核苷酸。作用剂或组合物可以用于诱导CTL。这样的作用剂或组合物可以用来治疗和/或预防癌症,和/或预防转移或其手术后复发。本发明考虑到的癌症的例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食道癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0036] 本发明还涵盖包含一种或多种本发明的肽或者本发明的多核苷酸的药物组合物或药物作用剂。药物组合物优选配制为用于治疗 and/或预防癌症,和/或预防其转移或手术后复发。作为本发明的肽或多核苷酸的替代或者补充,本发明的药剂或组合物可包括呈递有任何本发明的肽的APC或外来体作为活性成分。

[0037] 本发明的肽或多核苷酸可以用来诱导在表面上呈递人白细胞抗原 (HLA) 与本发明的肽的复合物的APC,例如通过使衍生自受试者的APC与本发明的肽接触,或者通过将编码本发明的肽的多核苷酸导入到APC中。这样的APC具有诱导特异性识别在表面上呈现靶肽的细胞的CTL的能力,并且可用于癌症免疫疗法。因此,本发明涵盖用于诱导具有CTL诱导能力的APC的方法和通过所述方法获得的APC。

[0038] 另外,本发明还涵盖用于诱导具有CTL诱导性的APC的作用剂或组合物,所述作用剂或组合物包括本发明的任何肽或多核苷酸。

[0039] 本发明的另一个目的是提供用于诱导CTL的方法,所述方法包括将CD8阳性T细胞与在其表面上呈递有HLA抗原与本发明的肽的复合物的APC共培养的步骤,将CD8阳性T细胞与在其表面上呈递有HLA抗原与本发明的肽的复合物的外来体共培养的步骤,或者导入包括编码两种T细胞受体 (TCR) 亚单位的多核苷酸或编码每种TCR亚基的多个多核苷酸的步骤,其中TCR能够结合细胞表面上呈递的本发明的肽和HLA抗原的复合物。通过此类方法获得的CTL能够用于癌症的治疗和/或预防,所述癌症的例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤、和睾丸肿瘤。因此,本发明还涵盖通过上述方法获得的CTL。

[0040] 本发明的另一个目的是提供分离的APC,其在表面上呈递有HLA抗原与本发明的肽的复合物。本发明还提供靶向本发明的肽的分离的CTL。此类CTL也可以定义为能够识别(或结合)细胞表面上的本发明的肽和HLA抗原的复合物的CTL。这些APC和CTL可以用于癌症免疫治疗。

[0041] 本发明的还有一个目的是提供在有此需要的受试者体内诱导针对癌症的免疫应答的方法,这样的方法包括对受试者施用包含选自下组的至少一种组分的作用剂或组合物的步骤:本发明的肽、或编码所述肽的多核苷酸、呈递有所述肽的外来体或APC以及能够识别在表面上呈递本发明的肽的细胞的CTL。

[0042] 本发明的一个方面涉及本发明的肽或包含本发明的肽的组合物,其用作药物。本

发明的应用可延及多种涉及或者源于UBE2T过表达的疾病中的任何一种,例如癌症,其例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0043] 更具体地,本发明提供了以下内容:

[0044] [1]一种具有细胞毒性T淋巴细胞(CTL)诱导能力的分离的肽,其中所述肽包含下述的氨基酸序列(a)或(b):

[0045] (a) UBE2T的免疫学活性片段的氨基酸序列;

[0046] (b) UBE2T的免疫学活性片段的氨基酸序列中取代、缺失、插入和/或添加了1、2或数个氨基酸的氨基酸序列,

[0047] 其中由所述肽诱导的CTL具有针对呈递衍生自UBE2T的片段的细胞的细胞毒性活性;

[0048] [2] [1]的肽,其中所述肽包含下述的氨基酸序列(a)或(b):

[0049] (a) 选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58;

[0050] (b) 选自下组的氨基酸序列中取代、缺失、插入和/或添加了1、2或数个氨基酸的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58;经修饰的肽的大小优选在9至40个氨基酸的范围中,诸如在9至20个氨基酸的范围中,例如在范围9至15个氨基酸中;

[0051] [3] [2]的肽,其中所述肽是以下的寡肽(i)或(ii):

[0052] (i) 具有下述特征之一或二者的肽:

[0053] (a) 选自SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25或27的氨基酸序列的自N端起的第二个氨基酸被取代为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸;和

[0054] (b) SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25或27的氨基酸序列的C端氨基酸被取代为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸;

[0055] (ii) 具有下述特征之一或二者的肽:

[0056] (a) 选自SEQ ID NO:29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56或58的氨基酸序列的自N端起的第二个氨基酸被取代为亮氨酸或甲硫氨酸;和

[0057] (b) SEQ ID NO:29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56或58的氨基酸序列的C端氨基酸被取代为缬氨酸或亮氨酸。

[0058] [4] [1]至[3]中任一项的肽,其中所述肽是九肽或十肽。

[0059] [5] [4]的肽,其中所述肽由选自下组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58。

[0060] [6]一种分离的多核苷酸,其编码[1]至[5]中任一项的肽。

[0061] [7]一种用于诱导CTL的组合物,其中所述组合物包含至少一种选自下组的活性成分:

[0062] (a) [1]至[5]中任一项的肽;

[0063] (b) [6]的多核苷酸;

[0064] (c) APC,该APC在其表面上呈递[1]至[5]中任一项的肽;和

[0065] (d) 外来体,该外来体在其表面上呈递[1]至[5]中任一项的肽。

[0066] [8]一种用于治疗 and/或预防癌症, and/或预防其手术后复发的药物组合物,其中所述组合物包含至少一种选自下组的活性成分:

[0067] (a) [1]至[5]中任一项的肽;

[0068] (b) [6]的多核苷酸;

[0069] (c) APC,该APC在其表面上呈递[1]至[5]中任一项的肽;和

[0070] (d) 外来体,该外来体在其表面上呈递[1]至[5]中任一项的肽;和

[0071] (e) CTL,其可以识别呈递[1]至[5]中任一项的肽的细胞。

[0072] [9][8]的药物组合物,其中所述药物组合物配制用于对其HLA抗原为HLA-A24或HLA-A2的受试者施用。

[0073] [10]一种用于诱导具有CTL诱导能力的APC的方法,其中该方法包括选自下组的步骤:

[0074] (a) 使APC与[1]-[5]中任一项的肽接触,和

[0075] (b) 将编码[1]-[5]中任一项的肽的多核苷酸导入APC。

[0076] [11]一种用于诱导CTL的方法,其中该方法包括选自下组的步骤:

[0077] (a) 将CD8阳性T细胞与在表面上呈递HLA抗原与[1]-[5]中任一项的肽的复合物的APC共培养;

[0078] (b) 将CD8阳性T细胞与在表面上呈递HLA抗原与[1]-[5]中任一项的肽的复合物的外来体共培养;和

[0079] (c) 将1个编码两种TCR亚单位的多核苷酸或多个编码每种TCR亚基的多核苷酸导入CD8阳性T细胞中,其中由所述亚单位形成的TCR能结合细胞表面上的[1]至[5]中任一项的肽和HLA抗原的复合物。

[0080] [12]一种分离的APC,该APC在其表面上呈递HLA抗原与[1]-[5]中任一项的肽的复合物。

[0081] [13][12]的APC,,其是通过[10]的方法诱导的。

[0082] [14]一种分离的CTL,其靶向[1]-[5]中任一项的肽。

[0083] [15][14]的CTL,其是通过[11]的方法诱导的。

[0084] [16]一种在受试者中诱导针对癌症的免疫应答的方法,其中所述方法包括对受试者施用包含[1]-[5]中任一项的肽、或编码所述肽的多核苷酸的组合物的步骤。

[0085] [17]针对[1]-[5]中任一项的肽的抗体或其免疫学活性片段。

[0086] [18]一种载体,其包含编码[1]-[5]中任一项的肽的核苷酸序列;优选地,载体适合于所述肽的表达(称为表达载体),例如将编码核苷酸序列在载体中在启动子序列下游插入,并且与所述启动子序列可操作连接。术语“可操作连接”意图指核苷酸序列与启动子序列(调节序列)连接,从而它容许在体外或接受载体导入的宿主细胞中表达核苷酸序列;

[0087] [19]用[18]的表达载体或本文中描述的表达载体转化或转染过的宿主细胞。

[0088] [20]一种诊断试剂盒,其包含[1]-[5]中任一项的肽、[6]的多核苷酸或[17]的抗体或免疫学活性片段;和

[0089] [21].一种用于筛选具有诱导CTL的能力的肽的方法,所述CTL具有针对呈递有衍生自UBE2T的片段的细胞的特异性细胞毒活性,其中所述方法包括如下步骤:

[0090] (i) 提供由对原始氨基酸序列通过取代、缺失、插入和/或添加一个、两个或数个氨基酸残基而修饰得到的氨基酸序列组成的候选序列,其中所述原始氨基酸序列选自SEQ ID

NOs:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58,

[0091] (ii) 选择与衍生自除UBE2T之外的任何已知人基因产物的肽均无显著实质同源性(或序列同一性)的候选序列;

[0092] (iii) 使由步骤(ii)中选择的候选序列组成的肽与抗原呈递细胞接触;

[0093] (iv) 使步骤(iii)的抗原呈递细胞与CD8阳性T细胞接触;和

[0094] (v) 鉴定其CTL诱导能力相同于或高于由原始氨基酸序列组成的肽的肽。

[0095] [22] 一种药物组合物,其包含[1]至[5]中任一项的肽。

[0096] [23] [1]至[5]中任一项的肽,其用作药物。

[0097] [24] [6]的多核苷酸或[18]的载体,其用作药物。

[0098] 在上文外,在联系附图和实施例阅读下面的详细说明时,本发明的这些和其它目的和特征将变得更加显而易见。然而,应当理解,前面的发明概要和后面的详细说明都仅仅提出了示例性的实施方案,并不对本发明或本发明的其它可替代实施方案构成限制。

[0099] 尤其是,虽然在本文中就若干具体的实施方案对本发明进行了说明,应当理解这些描述对本发明而言是示例说明性的,不解释成对本发明的限制。在不背离如随附的权利要求所描述的本发明的精神和范围的前提下本领域技术人员将容易地想到本发明的多种修改和应用。类似地,本发明的其它目的、特征、好处和优势是从此处的概要和下文描述的特定实施方案可以容易地想到的,并且是本领域技术人员可以显见的。根据上文的内容并结合随附的实施例、数据、附图以及从中能够合理推断的内容,或者进一步考虑本文中引用的参考文献,这样的目的、特征、好处和优势是容易想到的。

[0100] 附图简述

[0101] 本领域技术人员在考虑了下文的附图简要说明及对本发明及其优选实施方案的详细说明后将清楚地得知本发明的各个方面的应用。

[0102] [图1a-1]

[0103] 图1a-1由一系列照片(a)至(l)组成,其显示了用衍生自UBE2T的肽诱导的CTL上的干扰素(IFN)- γ 酶联免疫点(ELISPOT)测定法的结果。用UBE2T-A24-9-60(SEQ ID NO:1)(a)刺激的8号孔,用UBE2T-A24-9-45(SEQ ID NO:2)(b)刺激的1号孔,用UBE2T-A24-9-133(SEQ ID NO:4)(c)刺激的6号孔,用UBE2T-A24-9-138(SEQ ID NO:6)(d)刺激的6号孔,用UBE2T-A24-9-43(SEQ ID NO:11)(e)刺激的4号孔,用UBE2T-A24-9-106(SEQ ID NO:12)(f)刺激的2号孔,用UBE2T-A24-9-3(SEQ ID NO:13)(g)刺激的6号孔,用UBE2T-A24-9-105(SEQ ID NO:15)(h)刺激的3号孔,用UBE2T-A24-10-130(SEQ ID NO:17)(i)刺激的2号孔,用UBE2T-A24-10-131(SEQ ID NO:19)(j)刺激的1号孔,用UBE2T-A24-10-133(SEQ ID NO:20)(k)刺激的3号孔,和用UBE2T-A24-10-99(SEQ ID NO:21)(l)刺激的6号孔中的CTL与对照相比分别显示强的IFN- γ 生成。这些图片的孔上的方框表示来自相应孔中的细胞被扩增以建立CTL系。对比地,作为阴性数据的典型情况,没有显示来自用UBE2T-A24-9-124(SEQ ID NO:3)(r)刺激的CTL的特异性IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成。

[0104] [图1m-r]

[0105] 图1m-r由一系列照片(m)至(r)组成,其显示了用衍生自UBE2T的肽诱导的CTL上的

干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫点 (ELISPOT) 测定法的结果。用UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO: 22) (m) 刺激的7号孔, 用UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO: 23) (n) 刺激的8号孔, 用UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO: 24) (o) 刺激的1号孔, 用UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO: 25) (p) 刺激的4号孔和用UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27) (q) 刺激的7号孔中的CTL与对照相比分别显示强的IFN- γ 生成。这些图片的孔上的方框表示来自相应孔中的细胞被扩增以建立CTL系。对比地, 作为阴性数据的典型情况, 没有显示来自用UBE2T-A24-9-124 (SEQ ID NO: 3) (r) 刺激的CTL的特异性IFN- γ 生成。在图中, “+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成, 而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成。

[0106] [图2a-1]

[0107] 图2a-1由一系列照片(a)至(l)组成, 其显示了用衍生自UBE2T的肽诱导的CTL上的ELISPOT测定法的结果。用UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29) (a) 刺激的4号孔, 用UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO: 30) (b) 刺激的5号孔, 用UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO: 32) (c) 刺激的7号孔, 用UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO: 36) (d) 刺激的5号孔, 用UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38) (e) 刺激的3号孔, 用UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO: 41) (f) 刺激的4号孔, 用UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) (g) 刺激的6号孔, 用UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO: 49) (h) 刺激的7号孔, 用UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO: 51) (i) 刺激的8号孔, 用UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52) (j) 刺激的2号孔, 用UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO: 53) (k) 刺激的1号孔, 和用UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55) (l) 刺激的8号孔中的CTL与对照相比分别显示强的IFN- γ 生成。这些图片上孔上的方框表示来自相应孔中的细胞被扩增以建立CTL系。对比地, 作为阴性数据的典型情况, 没有显示来自用UBE2T-A02-9-161 (SEQ ID NO: 28) (o) 刺激的CTL的特异性IFN- γ 生成。在图中, “+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成, 而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成。

[0108] [图2m-o]

[0109] 图2m-o由一系列线图(m)-(o)组成, 显示对用衍生自UBE2T的肽诱导的CTL进行的ELISPOT测定的结果。用UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO: 56) (m) 刺激的5号孔和用UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO: 58) (n) 刺激的3号孔中的CTL分别与对照相比显示了强的IFN- γ 生成。这些图片上孔上的方框表示来自相应孔中的细胞被扩增以建立CTL系。对比地, 作为阴性数据的典型情况, 没有显示来自用UBE2T-A02-9-161 (SEQ ID NO: 28) (o) 刺激的CTL的特异性IFN- γ 生成。在图中, “+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成, 而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成。

[0110] [图3]

[0111] 图3由一系列线图(a)-(d)组成, 显示从用UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) (a), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2) (b), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13) (c) 和UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27) (d) 刺激的CTL系的IFN- γ 生成。CTL产生的IFN- γ 的量用IFN- γ 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的CTL克隆与对照相比均显示了强的IFN- γ 生成。在图中, “+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成, 而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的IFN- γ 生成。R/S比表示应答细胞 (CTL系) 与刺激细胞的比。

[0112] [图4]

[0113] 图4由一系列线图(a)-(c)组成,显示了用UBE2T-A24-9-60(SEQ ID NO:1)(a), UBE2T-A24-9-45(SEQ ID NO:2)(b)和UBE2T-A24-9-3(SEQ ID NO:13)(c)刺激的CTL系通过有限稀释而建立的CTL克隆的IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的CTL克隆显示与对照相比强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经合适的肽刺激的靶细胞的IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的IFN- γ 生成。R/S比表示应答细胞(CTL克隆)与刺激细胞的比。

[0114] [图5]

[0115] 图5-1由一系列线图(a)-(e)组成,描绘了用UBE2T-A02-9-107(SEQ ID NO:29)(a), UBE2T-A02-9-13(SEQ ID NO:38)(b), UBE2T-A02-10-70(SEQ ID NO:48)(c), UBE2T-A02-10-102(SEQ ID NO:52)(d)和UBE2T-A02-10-101(SEQ ID NO:55)(e)刺激的CTL系的IFN- γ 生成。CTL产生的IFN- γ 的量用IFN- γ ELISA测量。结果显示用每种肽刺激而建立的CTL系与对照相比显示了强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的IFN- γ 生成。R/S比表示应答细胞(CTL系)与刺激细胞的比。

[0116] [图6]

[0117] 图6由一系列线图(a)至(e)组成,显示了用UBE2T-A02-9-107(SEQ ID NO:29)(a), UBE2T-A02-9-13(SEQ ID NO:38)(b), UBE2T-A02-10-70(SEQ ID NO:48)(c), UBE2T-A02-10-102(SEQ ID NO:52)(d)和UBE2T-A02-10-101(SEQ ID NO:55)(e)刺激的CTL系通过有限稀释而建立的CTL克隆的IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的CTL克隆显示与对照相比强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经合适的肽刺激的靶细胞的IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的IFN- γ 生成。R/S比表示应答细胞(CTL克隆)与刺激细胞的比。

[0118] [图7]

[0119] 图7是一幅线图,显示了针对表达UBE2T和HLA-A*2402的靶细胞的特异性CTL活性。制备用HLA-A*2402或用全长UBE2T基因转染的COS7细胞作为对照。用UBE2T-A24-9-60(SEQ ID NO:1)建立的CTL克隆显示了针对用UBE2T和HLA-A*2402二者转染的COS7细胞的特异性CTL活性(黑色菱形)。另一方面,没有检测到显著的针对表达HLA-A*2402(三角形)或UBE2T(圆形)的靶细胞的特异性CTL活性。

[0120] [图8]

[0121] 图8是一幅线图,显示了针对表达UBE2T和HLA-A*0201的靶细胞的特异性CTL活性。制备用HLA-A*0201或用全长UBE2T基因转染的COS7细胞作为对照。用UBE2T-A02-10-70(SEQ ID NO:48)建立的CTL系显示了针对用UBE2T和HLA-A*0201二者转染的COS7细胞的特异性CTL活性(黑色菱形)。另一方面,没有检测到显著的针对表达HLA-A*0201(三角形)或UBE2T(圆形)的靶细胞的特异性CTL活性。

[0122] 发明详述

[0123] 现在描述优选的方法、装置和材料,不过在实施或检验本发明的实施方案时可使用与本文中描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料。然而,在描述本发明材料和方法之前,应理解这些描述都是说明性的,并不意图限制,还要理解的是本发明不限于特定大小、性状、尺度、材料、方法学、方案等,因为它们可因循例行实验和优化而变化。此外,所

述描述中使用的术语只是出于描述特定样式或实施方案的目的,而非意图限制本发明的范围,本发明的范围只会由所附权利要求来限制。通过提述明确地将本说明书中提到的每一篇出版物、专利或专利申请的公开文本完整收入本文。然而,本文中无一处可解释为承认本发明没有资格凭借发明在先而早于此类公开文本。

[0124] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语均具有本发明相关领域的技术人员通常知晓的意义。如果有冲突,以本说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实例仅为举例说明而不构成限制。

[0125] I. 定义

[0126] 如本文中使用的,词语“一个/种”、“该”、和“所述”意味着“至少一个/种”,除非另有明确说明。

[0127] 术语“分离的”和“纯化的”与物质(例如多肽、抗体、多核苷酸等)相关联使用时,指该物质基本上不含至少一种原本会包括在天然来源中的物质。因此,分离的或纯化的抗体指基本上不含细胞材料(例如来自所述蛋白质(抗体)的细胞或组织来源的碳水化合物、脂质或其它污染性蛋白质)或者在化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品的抗体。术语“基本上不含细胞材料”包括多肽的制备物,其中所述多肽与分离出该多肽的或重组产生该多肽的细胞的细胞组分是分离的。如此,基本上不含细胞材料的多肽包括多肽制备物,其具有小于约30%、20%、10%或5%(以干重计)的异源蛋白质(在本文中也称为“污染蛋白质”)。在多肽以重组方式生成时,在一些实施方案中,它也基本上不含培养基,包括多肽的其中培养基小于蛋白质制备物体积的约20%、10%或5%的制备物。当多肽系通过化学合成生成时,它优选基本上不含化学前体或其它化学品,包括多肽的这样的制备物,其中多肽合成涉及的化学前体或其它化学品小于多肽制备物体积的约30%、20%、10%、5%(以干重计)。特定蛋白质制备物含有经分离或纯化的多肽的事实可以例如通过在蛋白质制备物的十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳和对凝胶进行考马斯亮蓝染色等处理后出现单一条带来示明。在一个优选实施方案中,本发明的肽和多核苷酸是分离的或纯化的。

[0128] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基可以是一个或多个修饰残基或非天然存在型残基(诸如相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物)的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。

[0129] 术语“寡肽”在本文中使用时指由20个氨基酸残基或更少,通常15个氨基酸残基或更少组成的肽。如本文中使用,术语“九肽”指由9个氨基酸残基组成的肽,而术语“十肽”指由10个氨基酸残基组成的肽。

[0130] 如本文中使用的,术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸,以及具有与天然存在的氨基酸相似的功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。氨基酸可以是L-氨基酸或D-氨基酸。天然存在的氨基酸指由遗传密码编码的氨基酸,以及在细胞中在翻译后被修饰的氨基酸(例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、和O-磷酸丝氨酸)。短语“氨基酸类似物”指与天然存在型氨基酸具有相同的基础化学结构(α 碳与氢、羧基、氨基、和R基团结合)但具有经过修饰的R基团或经过修饰的主链的化合物(例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷)。短语“氨基酸模拟物”指与具有与一般氨基酸不同的结构但发挥与一般氨基酸相似的功能的化学化合物。氨基酸在本文中可以通过它们公知的三字母符号或IUPAC-IUB生物

化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。

[0131] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”在本文中除非另有明确说明可互换使用，并用它们普遍接受的单字母代码来指称它们。

[0132] 术语“(作用)剂”和“组合物”和在本文中可以互换使用，指包含规定量的规定成分的产品，以及通过所述规定量的规定成分的组合直接或间接地得到的任何产品。这些术语当与修饰语“药物”(如“药物作用剂”和“药物组合物”)关联使用时，意在涵盖：包括活性成分以及组成担载体的惰性成分的产品，以及通过所述任何两种或更多种成分的组合、复合或聚集，或通过一种或多种组分的解离，或通过一种或多种成分的其他类型的反应或相互作用而直接或间接地得到的产品。相应地，在本发明的语境中，术语“药物作用剂”和“药物组合物”指任何涵盖任何通过混合本发明的分子或化合物与药学或生理学上可接受的担载体而制成的产品。

[0133] 术语“活性成分”在本文中意指作用剂或组合物中具有生物学活性或生理学活性的物质。尤其是，在药剂或药物组合物的语境中，术语“活性成分”是指显示客观的药理学效果的物质。例如，在用于治疗或预防癌症的药剂或药物组合物的场合，作用剂或组合物中的活性成分可直接或间接地导致对于癌细胞和/或组织的至少一种生物学或生理学作用。优选地，这样的作用可包括减少或抑制癌细胞生长、破坏或杀死癌细胞和/或癌组织，等等。典型地，活性成分的间接效果是诱导识别或杀死癌细胞的CTL。在配制之前，“活性成分”又可称“原料药”(bulk)、“药物物质”(drug substance)或“技术产品”(technical product)。

[0134] 本文中所用的短语“药学上可接受的担载体”或“生理学上可接受的担载体”意思是药学上或生理学上可接受的材料、组合物、物质或媒介，包括但不限于液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂和包埋材料。

[0135] 在一些实施方案中，本发明的某些药剂或药物组合物特别可以用作疫苗。在本发明的语境中，术语“疫苗”(又称“免疫原性组合物”)是指在接种到动物体内后具有改善、增强和/或诱导抗肿瘤免疫功能的作用剂或组合物。

[0136] 除非另有定义，术语“癌症”指过表达UBE2T基因的癌症或肿瘤，其实例包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0137] 除非另有定义，术语“细胞毒性T淋巴细胞”、“细胞毒性T细胞”和“CTL”在本文中可互换使用，而且除非另有明确说明，指能够识别非自身细胞(例如肿瘤/癌细胞、病毒感染的细胞)并诱导此类细胞死亡的T淋巴细胞亚群。

[0138] 除非另有定义，本文中使用的术语“HLA-A24”代表性指亚型，亚型的例子包括但不限于HLA-A*2401, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2404, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2420, HLA-A*2425和HLA-A*2488。

[0139] 除非另有定义，本文中使用的术语“HLA-A2”代表性地指亚型，其例子包括但不限于HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228和HLA-A*0250。

[0140] 除非另有定义，如本文中所用的术语“试剂盒”是指试剂及其他材料的组合。考虑术语“试剂盒”可包括微阵列、芯片、标记物、等等。术语“试剂盒”不意图限于某种特定的试

剂和/或材料组合。

[0141] 如本文中使用的,在受试者或者患者的语境中,短语“受试者的(或患者的)HLA抗原为HLA A24或HLA-A2”是指受试者或患者纯合地或者杂合地拥有HLA-A24或HLA-A2抗原基因,并且HLA-A24或HLA-A2抗原在受试者或患者的细胞中作为HLA抗原表达。

[0142] 以本发明的材料和方法在“治疗”癌症的语境中为限,如果治疗导致临床上的收益,例如受试者体内癌症的尺寸、普遍性(prevalence)或转移潜力的降低,延长生存时间,抑制术后复发,等等,则认为治疗是“有效的”。当预防性地进行治疗时,“有效的”意思是其阻碍或阻止癌症的形成,或者阻止或减轻癌症的临床症状。“有效性”结合用于诊断或治疗特定肿瘤类型的任何已知方法来确定。

[0143] 以本发明的方法和组合物可用于“预防”和“防范”的语境为限,此类术语在本文中可互换使用,指降低缘于疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,而二级和三级预防和防范水平涵盖旨在预防和防范疾病的进展与症状的出现、以及通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来降低已建立的疾病的负面影响的的活动。或者,预防和防范可包括旨在减轻特定病症的严重性(例如降低肿瘤的增殖和转移等)的多种多样的预防性疗法。

[0144] 在本发明的语境中,治疗和/或预防癌症和/或预防其手术后复发包括任何导致下述事件的活性,诸如手术去除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和阻抑癌症发生、及降低或抑制转移,抑制癌症的术后复发,及延长存活时间。癌症的有效治疗和/或预防可降低患癌个体死亡率及改善其预后,降低其血液中肿瘤标志物的水平,及减轻其伴随癌症的可检测症状。例如,症状的减轻或改善构成有效治疗和/或预防,包括10%、20%、30%或更多降低,或实现病情稳定。

[0145] 在本发明的语境中,术语“抗体”指可以与指定的蛋白或其肽具有特异性反应性的免疫球蛋白及其片段。抗体可以包括人抗体、灵长源化(primatized)抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、人源化抗体、与其它蛋白或放射性标记物融合的抗体、和抗体片段。另外,在本文中,抗体以最广义使用,具体涵盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们展现期望的生物学活性。“抗体”指示所有类别(例如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)。

[0146] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语的意义均与本发明所属技术领域普通技术人员通常理解的含义相同。

[0147] II. 肽

[0148] 下面详细描述的本发明的肽可称为“UBE2T肽”或“UBE2T多肽”。

[0149] 为了证明衍生自UBE2T的肽发挥被CTL所识别的抗原的功能,对衍生自UBE2T(SEQ ID NO:65)的肽进行了分析以确定它们是否为HLA-A24或HLA-A2限制性的抗原表位,HLA-A24或A2是经常遇到的HLA等位基因(Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994)。

[0150] 基于它们对HLA-A24的结合亲和力鉴定衍生自UBE2T的HLA-A24结合肽的候选者。鉴定以下候选肽:SEQ ID NO:1、2和4至27。此外,在通过用这些肽冲激(加载)的树突细胞(DC)在体外刺激T细胞后,使用下列每种肽成功建立CTL:

[0151] UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO:2), UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO:4), UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO:6), UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO:11), UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO:12), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO:13), UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO:15), UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO:17), UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO:19), UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO:20), UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO:21), UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO:22), UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO:23), UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO:24), UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO:25) 和 UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO:27)。

[0152] 基于它们对HLA-A2的结合亲和力鉴定衍生自UBE2T的HLA-A2结合肽的候选者。鉴定以下的肽:SEQ ID NOs:29至63。此外,在通过用这些肽冲激(加载)的树突细胞(DC)在体外刺激T细胞后,使用下列每种肽成功建立CTL:

[0153] UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO:29), UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO:30), UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO:32), UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO:36), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO:38), UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO:41), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48), UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO:49), UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO:51), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO:52), UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO:53), UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO:55), UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO:56) 和 UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO:58)。

[0154] 这些建立的CTL针对用相应肽冲激过的靶细胞显示了强的特异性CTL活性。这些结果显示UBE2T是被CTL识别的抗原,且被测试的肽是UBE2T的受HLA-A24或HLA-A2限制的表位肽。

[0155] 因而,在优选的实施方案中,具有SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、或27的氨基酸序列的肽可以用于在诱导前已经鉴定为具有HLA-A24的受试者中诱导CTL。同样地,具有SEQ ID NO:SEQ ID NO:29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56或58的氨基酸序列的肽可以用于在诱导前已经鉴定为具有HLA-A2的受试者中诱导CTL。

[0156] 由于UBE2T基因在癌细胞和组织,包括例如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤的细胞和组织中过表达,而在大多数正常器官中不表达,它代表了一种良好的免疫治疗靶标。因此,本发明提供与来自UBE2T的被CTL识别的表位对应的九肽(由九个氨基酸残基组成的肽)和十肽(由十个氨基酸残基组成的肽)。本发明的九肽和十肽的尤其优选的例子包括具有选自SEQ ID NO:2-40和42-84的氨基酸序列的肽。或者,本发明提供了能诱导CTL的分离的肽,其中所述肽由UBE2T的免疫学活性片段组成。在一些实施方案中,本发明提供了包含选自下组的氨基酸序列的肽:SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58。在优选的实施方案中,本发明的肽是包含选自下组的氨基酸序列的九肽或十肽:SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58。本发明的肽的优选例子包括由选自下组的氨基酸序列组成的肽:SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56和58。

[0157] 本发明的肽,尤其是本发明的九肽和十肽,在其侧翼可以具有额外的氨基酸残基,

只要所得的肽保持其CTL诱导能力即可。具体的额外氨基酸残基可以由任何种类的氨基酸构成,只要其不损害原来的肽的CTL诱导能力。因此,本发明涵盖具有CTL诱导能力的肽,尤其是衍生自UBE2T的肽(例如,包含SEQ ID NO:1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56或58的氨基酸序列的肽)。这样的肽为例如少于约40个氨基酸,经常少于约20个氨基酸,且通常少于约15个氨基酸。更具体地,此类肽的大小优选在10至40个氨基酸的范围中,诸如在10至20个氨基酸的范围中,例如在范围10至15个氨基酸中。

[0158] 一般而言,已知肽中一个、两个或几个氨基酸的修饰不会影响肽的功能,而且在有些情况下甚至会增强原蛋白质的期望功能。事实上,已知有经过修饰的肽(即由与原始参照序列相比已有一个、两个或数个氨基酸残基修饰(即取代、添加、缺失和/或插入)的氨基酸序列构成的肽)保留原始肽的生物学活性(Mark et al.,Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:5662-6;Zoller and Smith,Nucleic Acids Res 1982,10:6487-500;Dalbadie-McFarland et al.,Proc Natl Acad Sci USA 1982,79:6409-13)。因此,在一个实施方案中,本发明的肽既具有CTL诱导能力,又具有选自SEQ ID NOs:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列,其中所述序列添加、缺失、插入和/或取代了一个、两个或甚至几个氨基酸。本发明的肽既具有CTL诱导能力,又具有选自SEQ ID NOs:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列中添加、缺失、插入和/或取代了一个、两个或数个氨基酸而得到的氨基酸序列。

[0159] 本领域技术人员认可,对氨基酸序列进行改变全部氨基酸序列中的单个氨基酸或少数百分比氨基酸的个别修饰(例如缺失、插入、添加和/或取代)倾向于导致原始氨基酸侧链的特性的保留;因此其通常被称作“保守替代”或“保守修饰”,其中对蛋白质的改变导致具有与原始蛋白质类似的功能的蛋白质。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域公知的。期望保留的氨基酸侧链特征的例子包括例如疏水性氨基酸(A,I,L,M,F,P,W,Y,V)、亲水性氨基酸(R,D,N,C,E,Q,G,H,K,S,T)、和具有下面的共同官能团或特征的侧链:脂肪族侧链(G,A,V,L,I,P);含羟基侧链(S,T,Y);含硫原子侧链(C,M);含羧酸和酰胺侧链(D,N,E,Q);含碱侧链(R,K,H);和含芳香侧链(H,F,Y,W)。另外,下面的八组各自含有本领域认可互为保守替代的氨基酸:

[0160] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0161] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0162] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0163] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0164] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0165] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0166] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0167] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(参见例如Creighton,Proteins 1984)。

[0168] 此类保守修饰肽也被视为本发明的肽。然而,本发明的肽不限于此,可包括非保守修饰,只要该肽保留原始未修饰肽的必需d的CTL诱导能力。另外,经过修饰的肽不应排除衍生自UBE2T的多态变体、种间同源物、和等位基因的可诱导CTL的肽。

[0169] 可以对本发明的肽插入、取代或添加氨基酸残基,或者,可以从本发明的肽缺失氨基酸残基,以实现更高的结合亲和力。为了保持所需的CTL诱导能力,本领域技术人员优选修饰(即缺失、插入、添加和/或取代)少数(例如,1个、2个或数个)或小百分比的氨基酸。这里,术语“数个”意指5个以下的氨基酸,如4个或3个以下。要被修饰的氨基酸的百分比可以是例如30%以下,优选20%以下,更优选15%以下,进一步更优选10%以下,例如1-5%。

[0170] 当在癌症免疫疗法的语境中使用,本发明的肽可以呈递在细胞或外来体的表面上,作为与HLA抗原的复合物。因此,优选选择不仅诱导CTL而且具有对HLA抗原的高结合亲和力的肽。为此目的,可以对肽通过取代、插入、缺失和/或添加氨基酸残基来加以修饰以产生具有更好的对HLA抗原的结合亲和力的修饰肽。除了天然被展示的肽之外,由于通过结合HLA抗原而被展示的肽的序列规律是已知的(Kubo RT等,J Immunol 1994,152:3913;-24; Rammensee HG等,Immunogenetics 1995,41:178;-228;Kondo等,J Immunol 1994,155:4307-12;Falk K等,Nature.1991May 23;351(6324):290-6.),可将基于此类规律的修饰引入本发明的免疫原性肽。

[0171] 例如,具有高的HLA-A24结合亲和力的肽的自N端起的第二个氨基酸倾向于被取代为酪氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸。类似地,C端氨基酸被取代为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸的肽往往具有高的HLA-A24结合亲和力。由此,可能期望将自N端起的第二个氨基酸取代为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸,和/或将C端氨基酸取代为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸,以增加HLA-A24结合亲和力。因此,具有选自SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27的氨基酸序列,其中所述SEQ ID NO的氨基酸序列的自N端起的第二个氨基酸被取代为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸,和/或其中所述SEQ ID NO的氨基酸序列的C端被取代为亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸的肽涵盖在本发明之内。此外,本发明涵盖这样的肽,其包含在SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27中取代、缺失、插入、和/或一个、两个或数个氨基酸而得到的氨基酸序列,这样的肽具有下述特征之一或二者:(a)自N端起的第二个氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸;和(b)C末端氨基酸是苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸。在优选的实施方案中,本发明的肽包括在SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27的氨基酸序列中自N端起的第二个氨基酸被取代为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸,和/或C末端氨基酸被取代为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸而得到的氨基酸序列。

[0172] 类似地,具有高的HLA-A2结合亲和力的肽的自N端起的第二个氨基酸倾向于被取代为亮氨酸或甲硫氨酸和/或C端氨基酸被取代为缬氨酸或亮氨酸。由此,可能期望将自N端起的第二个氨基酸取代为亮氨酸或甲硫氨酸,和/或将C端氨基酸取代为缬氨酸或亮氨酸,以增加HLA-A2结合亲和力。因此,具有选自SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列,其中所述SEQ ID NO的氨基酸序列的自N端起的第二个氨基酸被取代为亮氨酸或甲硫氨酸,和/或其中所述SEQ ID NO的氨基酸序列的C端被取代为缬氨酸或亮氨酸的肽涵盖在本发明之内。此外,本发明涵盖这样的肽,其包含在SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58中取代、缺失、插入、和/或一个、两个或数个氨基酸而得到的氨基酸序列,这样的肽具有下述特征之一或二者:(a)自N端起的第二个氨基酸是亮氨酸或甲硫氨酸;和(b)C末端氨基酸是缬氨酸或亮氨酸。在优选的实施方案中,本

发明的肽包括在SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列中自N端起的第二个氨基酸被取代为亮氨酸或甲硫氨酸,和/或C末端氨基酸被取代为缬氨酸或亮氨酸而得到的氨基酸序列。

[0173] 不仅可以在肽的末端氨基酸处引入取代,而且可以在肽的潜在T细胞受体(TCR)识别位置处引入取代。数项研究已证明了具有氨基酸取代的肽可等同于或好于原来功能的功能,例如CAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎、Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎或gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎(Zaremba et al.Cancer Res.57,4570-4577,1997,Hoffmann TK et al.J Immunol.(2002);168(3):1338-47., Dionne SO et al.Cancer Immunol immunother.(2003)52:199-206及Dionne SO et al.Cancer Immunology,Immunotherapy(2004)53,307-314)。

[0174] 本发明还考虑也可以向本发明的肽的N和/或C端添加1个、2个或数个氨基酸。此类具有高HLA抗原结合亲和力且保留CTL诱导能力的修饰肽也包含在本发明之内。

[0175] 例如,本发明提供长度少于15、14、13、12、11或10个氨基酸的分离的肽,其具有CTL诱导能力并且包含选自下组的氨基酸序列:

[0176] (i) 在选自1,2,4,6,11,12,13和15的氨基酸序列中修饰了1、2或数个氨基酸,和

[0177] (ii) (i)的氨基酸序列,其中该氨基酸序列具有所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者:

[0178] (a) 所述SEQ ID NO的自N末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸和色氨酸的氨基酸;和

[0179] (b) 所述SEQ ID NO的C末端氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸和甲硫氨酸的氨基酸;和

[0180] (iii) 选自下组的氨基酸序列中修饰了1、2或更多个氨基酸的氨基酸序列:SEQ ID NOs:,29,30,32,36,38和41;

[0181] (iv) (iii)的氨基酸序列,其中该氨基酸序列具有所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者:

[0182] (a) 所述SEQ ID NO的自N末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自亮氨酸和甲硫氨酸的氨基酸;和

[0183] (b) 所述SEQ ID NO的C末端氨基酸为或被修饰为选自缬氨酸和亮氨酸的氨基酸。

[0184] 此外,本发明还提供长度少于15、14、13、12、11或10个氨基酸的分离的肽,其具有CTL诱导能力并且包含选自下组的氨基酸序列:

[0185] (i') 在选自SEQ ID NO:17,19,20,21,22,23,24,25和27的氨基酸序列中修饰了1、2或几个氨基酸,其中所述肽具有诱导细胞毒性T淋巴细胞的能力,和

[0186] (ii') (i')的氨基酸序列,其中该氨基酸序列具有所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者:

[0187] (a') 所述SEQ ID NO的自N末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸和色氨酸的氨基酸;和

[0188] (b') 所述SEQ ID NO的C末端氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸和甲硫氨酸的氨基酸。

[0189] (iii') 选自下组的氨基酸序列中修饰了1、2或更多个氨基酸的氨基酸序列:SEQ ID NO:48,49,51,52,53,55,56和58,

[0190] (iv') (iii')的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者:

[0191] (a) 所述SEQ ID NO的自N末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自亮氨酸和甲硫氨酸的氨基酸;和

[0192] (b) 所述SEQ ID NO的C末端氨基酸为或被修饰为选自缬氨酸和亮氨酸的氨基酸。

[0193] 这些肽在APC中被加工以在这些肽与APC接触或在APC中引入时在其上呈递选自下组的肽:(i)至(iv)和(i')至(iv')。

[0194] 然而,当肽序列与具有不同功能的内源或外源蛋白质的氨基酸序列的一部分相同时,可能诱导副作用,诸如自身免疫性病症和/或针对特定物质的变应性症状。因此,优选的是首先利用可用的数据库实施同源性搜索,以避免肽的序列与另一种蛋白质的氨基酸序列匹配的情况。当根据同源性搜索清楚了甚至不存在与目标肽有1个或2个氨基酸差异的肽时,可以修饰目标肽以提高其与HLA抗原的结合亲和力,和/或提高其CTL诱导能力,而没有任何发生此类副作用的危险。

[0195] 虽然对HLA抗原具有高结合亲和力的肽预期是有效的,但还是对根据高结合亲和力的存在为指标选出的候选肽检查了CTL诱导能力的存在。这里,短语“CTL诱导能力”指肽被呈递到抗原呈递细胞(APC)上时诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的能力。另外,“CTL诱导能力”包括肽诱导CTL活化、CTL增殖、促进CTL溶解靶细胞、和提高CTL的IFN- γ 生成的能力。

[0196] CTL诱导能力的确认如下来实现,诱导携带人MHC抗原的APC(例如B-淋巴细胞、巨噬细胞、和树突细胞(DC)),或者更具体地说,衍生自人外周血单核白细胞的DC,并且在用测试肽刺激APC后,将APC与CD8阳性T细胞混合以诱导CTL,然后测量由CTL针对靶细胞生成和释放的IFN- γ 。作为反应系统,可使用已经制成的表达人HLA抗原的转基因动物(例如BenMohamed L等,Hum Immunol 2000,61(8):764-79 Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice:dependence on HLA class II restricted T(H) response中描述的那些)。或者,可以用⁵¹Cr等放射性标记靶细胞,并且可以自靶细胞释放的放射性计算CTL的细胞毒性活性。或者,CTL诱导能力可以如下评估:测量在携带固定化肽的细胞存在下由CTL生成和释放的IFN- γ ,并使用抗IFN- γ 单克隆抗体显现培养基上的抑制区。

[0197] 除上述的修饰之外,还可将本发明的肽连接至其它肽,只要所得的连接肽保留原始肽所需的CTL诱导能力,并且,优选地,还保留所需的HLA结合能力。合适的“其他”肽的例子包括:从其他TAA衍生的能诱导CTL的肽。本发明的肽可以通过接头直接或间接地连接于“另一个”肽。肽间的接头是本领域公知的,且包括例如AAY (Daftarian PM, et al., J Trans Med 2007,5:26), AAA, NKRK (Sutmoller RP, et al., J Immunol. 2000, 165:7308-7315) or K (Ota S, et al., Can Res. 62, 1471-1476, Kawamura KS, et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715)。

[0198] 上文所述的连接的肽在本文中被称为“多表位”(polytope),即两个或更多个潜在免疫原性或免疫应答刺激性肽构成的组,这些肽可以以各种排列方式(例如串联、交叠)连接在一起。该多表位(或编码该多表位的核酸)可以依照标准免疫方案来施用,例如施用于动物,以测试该多表位刺激、增强和/或引起免疫应答的有效性。

[0199] 肽可直接地或经使用侧翼序列连接在一起以形成多表位,而且多表位作为疫苗的用途是本领域公知的(参见例如Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-

5849,1995;Gilbert et al.,Nature Biotechnol.15(12):1280-1284,1997;Thomson et al.,J Immunol.157(2):822-826,1996;Tarn et al.,J Exp.Med.171(1):299-306,1990)。可制备含有不同数目和组合的表位的多表位并测试它们被CTL识别的情况及提高免疫应答的功效。

[0200] 本发明的肽还可连接至其它物质,只要所得的连接肽保留原始肽的所需的CTL诱导能力。合适的物质的例子包括例如:肽、脂质、糖和糖链、乙酰基、天然的和合成的聚合物等。肽还可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化等等,条件是该修饰不破坏如原始肽的生物学活性。可进行这些类型的修饰可赋予额外的功能(例如靶向功能和投递功能)或使肽稳定。

[0201] 例如,为了提高肽的体内稳定性,本领域已知引入D-氨基酸、氨基酸模拟物或非天然氨基酸;此构思也可适用于此处的肽。肽的稳定性可以以多种方式测定。例如,可使用肽酶和各种生物学介质(诸如人血浆和血清)来测试稳定性(参见例如Verhoef et al.,Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986,11:291-302)。

[0202] 此外,如上文所述,在上述取代、缺失、插入和/或添加了1个、2个或数个氨基酸残基的修饰肽中,可以筛选或选择与原始肽相比活性相同或更高者。因此,本发明还提供由于筛选或选择与原始肽相比活性相同或更高的修饰肽的方法。一种示例的方法包括下述步骤:

[0203] a:对本发明的肽取代、缺失、插入和/或添加至少一个氨基酸残基,

[0204] b:测定步骤a中修饰的肽的活性,

[0205] c:选择具有与原始肽相比相同或更高活性的肽。

[0206] 优选地,要测定的肽的活性是CTL诱导能力。

[0207] 在优选的实施方案中,本发明提供一种用于筛选具有诱导CTL的能力的肽的方法,所述CTL具有针对呈递有衍生自UBE2T的片段的细胞的特异性细胞毒活性,其中所述方法包括如下步骤:

[0208] (i) 提供由对原始氨基酸序列通过取代、缺失、插入和/或添加一个、两个或数个氨基酸残基而修饰得到的氨基酸序列组成的候选序列,其中所述原始氨基酸序列选自SEQ ID NOs:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58,

[0209] (ii) 选择与衍生自除UBE2T之外的任何已知人基因产物的肽均无实质显著同源性(或序列同源性)的候选序列;

[0210] (iii) 使由步骤(ii)中选择的候选序列组成的肽与抗原呈递细胞接触;

[0211] (iv) 使步骤(iii)的抗原呈递细胞与CD8阳性细胞接触;和

[0212] (v) 鉴定其CTL诱导能力相同于或高于与由原始氨基酸序列组成的肽的肽。

[0213] III.UBE2T肽的制备

[0214] 本发明的肽可使用公知技术来制备。例如,肽可以通过合成、使用重组DNA技术或化学合成来制备。本发明的肽可个别地合成,或合成为包括两个或更多个肽的较长多肽。然后可以分离,即纯化或分离所述肽,以使其基本上没有其它天然存在的宿主细胞蛋白质及其片段或任何其它化学物质。

[0215] 本发明的肽可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化等,前提是该修饰不破

坏原始肽的生物学活性。其他示例性的修饰包括掺入一种或多种D-氨基酸或其他可用的氨基酸模拟物,以便例如增加肽的血清半寿期。

[0216] 可以根据选定的氨基酸序列,借助化学合成来获得本发明的肽。例如,可适用于合成的常规肽合成法包括:

[0217] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

[0218] (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

[0219] (iii) Peptide Synthesis (日文), Maruzen Co., 1975;

[0220] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (日文), Maruzen Co., 1985;

[0221] (v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (日文), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

[0222] (vi) W099/67288; 和

[0223] (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118。

[0224] 或者,可适用任何已知的遗传工程肽生产方法来获得本发明的肽(例如Morrison J., J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101:347-62)。例如,首先,制备包含处于可表达形式(例如处于相当于启动子序列的调节序列下游)的编码目标肽的多核苷酸的合适载体,并转化入合适的宿主细胞。本发明还提供了此类载体和宿主细胞。然后培养宿主细胞以生成感兴趣的肽。也可以采用体外翻译系统在体外生产肽。

[0225] IV. 多核苷酸

[0226] 本发明还提供编码任何上述本发明肽的多核苷酸。这些包括衍生自天然存在型UBE2T基因(例如GenBank Accession No. NM_014176 (SEQ ID NO:64))的多核苷酸,以及具有它们的经过保守修饰的核苷酸序列的多核苷酸。在本文中,短语“经过保守修饰的核苷酸序列”指编码相同或本质上相同的氨基酸序列的序列。由于遗传密码的简并性,对于任何给定蛋白质都有极其多种功能上相同的核酸来编码它。例如,密码子GCA、GCC、GCG、和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子规定为丙氨酸的任何位置处,该密码子可改变成任何相应所述密码子,而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,是保守修饰变异的一种。本文中编码肽的每一种核酸序列也描述该核酸的每一种可能的沉默变异。本领域普通技术人员会认识到,核酸中的每一个密码子(AUG和TGG除外,AUG在正常情况下是甲硫氨酸的唯一密码子,而TGG在正常情况下是色氨酸的唯一密码子)都可以被修饰以产生功能上相同的分子。因而,每一种所公开的序列隐含涵盖了编码肽的核酸的每一种沉默变异。

[0227] 本发明的多核苷酸可以由DNA、RNA、及其衍生物构成。如本领域公知的,DNA由碱基诸如A、T、C、和G合适地构成,而T在RNA中被U取代。本领域技术人员会认识到非天然存在的碱基也包括在多核苷酸中。

[0228] 本发明的多核苷酸可编码多个本发明肽,其中有或无居间氨基酸序列。例如,居间氨基酸序列可提供多核苷酸的或所翻译的肽的切割位点(例如酶识别序列)。另外,本发明的多核苷酸除编码本发明肽的编码序列以外还可包括任何额外的序列。例如,本发明的多核苷酸可以是包括表达肽所需要的调节序列的重组多核苷酸,或者可以是具有标志基因等

等的表达载体(质粒)。一般而言,此类重组多核苷酸可通过常规重组技术操作多核苷酸来制备,例如通过使用聚合酶和内切核酸酶。

[0229] 重组和化学合成技术都可用来生成本发明的多核苷酸。例如,可以通过插入在转染入感受态细胞后能表达的适宜载体来生成本发明的多核苷酸。或者,可借助PCR技术或通过合适宿主中的表达来扩增本发明的多核苷酸(参见例如Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1989)。或者,可使用固相技术来合成多核苷酸,如Beaucage SL & Iyer RP,Tetrahedron 1992,48:2223-311;Matthes et al.,EMBO J 1984,3:801-5中记载的。

[0230] V. 外来体(exosomes)

[0231] 本发明进一步提供了称作外来体的细胞内囊泡,这些外来体在它们的表面上呈递本发明肽与HLA抗原之间形成的复合物。外来体可以通过,例如在日本专利申请公开文本H11-510507和W099/03499中详细描述的方法来制备,并可以用从作为治疗和/或预防对象的患者获得的APC制备。本发明的外来体可以作为疫苗以与本发明的肽相似的方式进行接种。

[0232] 复合物中包含的HLA抗原的类型必须与需要治疗和/或预防的受试者的类型匹配。例如,在日本人群中,HLA-A24和HLA-A2(尤其是HLA-A*2402和HLA-A*0201和HLA-A*0206)是普遍存在的,因此对于日本人患者的治疗可能是适合的。使用在日本人和白种人中高度表达的HLA-A24或HLA-A2型对于获得有效的结果是有利的,而且也可以使用HLA-A2402、HLA-A*0201和HLA-A*0206等亚型。典型地,在临床上,预先考察需要治疗的患者的HLA抗原类型,这样就能够合适地选择对该特定抗原具有高水平的结合亲和力、或者具有藉由抗原呈递的CTL诱导能力的肽。此外,为了获得同时具有高结合亲和力和CTL诱导能力的肽,可以在天然存在的UBE2T部分肽的氨基酸序列的基础上进行1个、2个或数个氨基酸的取代、插入、缺失和/或添加。

[0233] 当对本发明的外来体使用HLA抗原的HLA-A24型时,具有选自SEQ ID NOs:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27的氨基酸序列的肽是特别有用的。

[0234] 或者,当对本发明的外来体使用HLA抗原的HLA-A2型时,包含选自SEQ ID NOs:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列的肽是特别有用的。

[0235] 在一些实施方案中,本发明的外来体在它们的表面上呈递本发明的肽与HLA-A24或HLA-A2抗原的复合物。在典型的实施方案中,本发明的外来体在其表面上呈递具有SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25或27的氨基酸序列的肽(或其经修饰的肽)和HLA-A24的复合物。在其他实施方案中,本发明的外来体在其表面上呈递具有SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56或58的氨基酸序列的肽(或其经修饰的肽)和HLA-A2的复合物。

[0236] VI. 抗原呈递细胞(APC)

[0237] 本发明还提供在其表面上呈递在HLA抗原与本发明肽之间形成的复合物的分离的抗原呈递细胞(APC)。所述APC可衍生自作为治疗和/或预防对象的患者,而且可作为疫苗单独地或与其它药物(包括本发明的肽、外来体、或CTL)组合来施用。

[0238] APC不限于特定种类的细胞,并且包括树突细胞(DC)、Langerhans细胞、巨噬细胞、B细胞、和活化的T细胞,已知这些细胞可在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,以供

淋巴细胞识别。由于DC是APC中具有最强CTL诱导活性的代表性APC,DC适合于本发明的APC。

[0239] 例如,可通过自外周血单核细胞诱导DC,然后在体外、离体或在体内用本发明的肽接触(刺激)它们来获得APC。当对受试者施用本发明的肽时,在受试者的身体中诱导出呈递本发明肽的APC。因此,可以通过对受试者施用本发明的肽,然后从受试者收集APC,来获得本发明的APC。或者,可以通过使从受试者收集而来的APC与本发明的肽接触来获得本发明的APC。

[0240] 本发明的APC可以单独或者与其他药物,包括本发明的肽、外来体或CTL组合施用给受试者,以在受试者体内诱导针对癌症的免疫应答。例如,离体施用可包括下述步骤:

[0241] a:自第一受试者收集APC;

[0242] b:使步骤a的APC接触本发明的肽;并

[0243] c:对第二受试者施用步骤b的APC。

[0244] 第一受试者和第二受试者可以是同一个体,或者可以是不同个体。通过步骤b获得的APC可以作为治疗和/或预防癌症用的疫苗配制和施用,所述癌症例如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食道癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤,但不限于这些。

[0245] 在本发明的语境中,可以利用本发明的肽来制造能够诱导抗原呈递细胞的药物组合物。本发明还提供了用于制备诱导抗原呈递细胞用的药物组合物的方法或工艺,其中所述方法包括混合或本发明的肽与可药用载体的步骤。本发明还提供本发明的肽用于诱导抗原呈递细胞的用途。

[0246] 根据本发明的一个方面,本发明的APC具有CTL诱导能力。在APC的语境下,短语“CTL诱导能力”指APC与CD8阳性细胞接触时诱导CTL的能力。此外,“CTL诱导能力”包括APC肽诱导CTL活化、CTL增殖、促进CTL溶解靶细胞、和提高CTL的IFN- γ 生成的能力。尤其是,本发明的APC具有诱导对UBE2T特异性的CTL的能力。这样的具有CTL诱导能力的APC除了用上文描述的方法外,还包括在体外将含有编码本发明肽的多核苷酸的基因转移至APC的步骤的方法来制备。所导入的基因可以是DNA或RNA的形式。用于进行导入的方法的例子包括但不限于本领域中常规实施的各种方法,例如可使用脂质体转染、电穿孔、或磷酸钙法。更具体的说,可以如Reeves ME et al.,Cancer Res 1996,56:5672-7;Butterfield LH et al.,J Immunol 1998,161:5607-13;Boczowski D et al.,J Exp Med 1996,184:465-72;日本专利公开文本No.JP2000-509281中所述来实施。通过将编码本发明肽的基因转移入APC,基因在细胞中经历转录、翻译、等等,然后得到的蛋白质被MHC I类或II类加工,并经由呈递途径呈递给部分肽。

[0247] 在一些实施方案中,本发明的APC在它们的表面上呈递HLA-A24或HLA-A2抗原与本发明的肽的复合物。在典型的实施方案中,本发明的APC在其表面上呈递着具有氨基酸序列1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25或27的肽(或其修饰肽)与HLA-A24的复合物。在其他的实施方案中,本发明的APC其表面上呈递着具有氨基酸序列SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56或58的肽(或其修饰肽)与HLA-A2的复合物。

[0248] VII.细胞毒性T细胞(CTL)

[0249] 诱导出的针对任何一种本发明肽的CTL可在体内加强靶向癌细胞的免疫应答,并且因此可以以与肽本身相似地用作疫苗。因此,本发明提供由任何一种本发明肽特异性诱

导或活化的、分离的CTL。

[0250] 此类CTL可通过下述步骤来获得：(1) 对受试者施用本发明的肽；(2) 在体外用本发明的肽接触（刺激）衍生自受试者的APC，以及CD8阳性T细胞或外周血单核白细胞；(3) 在体外使CD8阳性T细胞或外周血单核白细胞接触在其表面上呈递HLA抗原与肽之间形成的复合物的APC或外来体；或(4) 将编码两种T细胞受体（TCR）亚单位的多核苷酸或编码每个TCR亚基的多个多核苷酸导入CD8阳性T细胞中，其中由此类亚单位形成的TCR能结合细胞表面上的本发明肽和HLA抗原的复合物。此类APC或外来体可通过上文记载的方法来制备。(4) 的方法的详情记载于下文“VIII.T细胞受体（TCR）”部分。

[0251] 本发明的CTL可以从要进行治疗和/或预防的患者获取，而且可以将它们单独施用，或者与其它药物（包括本发明的肽、APC或外来体）组合施用以产生调节效果。所得到的CTL特异性针对呈递本发明的肽（例如与用于诱导的肽相同的肽）的靶细胞起作用。靶细胞可以是内源表达UBE2T的细胞，例如癌细胞，或者或被UBE2T基因转染的细胞；而且因本发明肽的刺激而在细胞表面上呈递本发明肽的细胞也可充当活化CTL攻击的靶标。

[0252] 在一些实施方案中，本发明的CTL是这样的CTL，其识别呈递HLA-A24或HLA-A2抗原与本发明的肽的复合物的细胞。在CTL的语境中，短语“识别细胞”是指通过其TCR结合HLA-A24或HLA-A2抗原与本发明的肽的复合物并显示针对该细胞的特异性细胞毒活性。这里，“特异性细胞毒活性”是指针对呈递HLA-A24或HLA-A2抗原与本发明的肽的复合物的细胞，但不针对其他细胞显示细胞毒活性。相应地，显示针对呈递有本发明的肽的细胞的特异性细胞毒活性的CTL包含在本发明中。

[0253] 在典型的实施方案中，本发明的CTL能够识别通过HLA-A24呈递具有氨基酸序列SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25或27的肽（或其修饰肽）的细胞。在优选的实施方案中，本发明的此类CTL能够识别表达UBE2T和HLA-A24的细胞（例如HLA-A24阳性癌细胞），并且显示针对此类细胞的细胞毒性活性。

[0254] 在其他实施方案中，本发明的CTL能够识别通过HLA-A2呈递具有氨基酸序列SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56或58的肽（或其修饰肽）的细胞。在优选的实施方案中，本发明的此类CTL能够识别表达UBE2T和HLA-A2的细胞（例如HLA-A2阳性癌细胞），并且显示针对此类细胞的细胞毒性活性。

[0255] VIII.T细胞受体（TCR）

[0256] 本发明还提供包含组合物及使用该组合物的方法，所述组合物包含一个编码两种TCR亚单位的多核苷酸或编码每种TCR亚单位的多个多核苷酸，其中由此类亚单位形成的TCR能结合细胞表面上的HLA抗原和本发明肽的复合物。这样的TCR亚基能够形成TCR，后者赋予T细胞以针对呈递UBE2T的肿瘤细胞的特异性。通过使用本领域已知的方法，可鉴定出在用本发明的一种或多种肽诱导的CTL中分别编码TCR亚基的 α 和 β 链的多核苷酸（WO2007/032255及Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)）。例如，优选用PCR方法分析TCR。用于分析的PCR引物可以是，例如，作为5'侧引物的5'-R引物（5'-gtctaccaggcattcgcttcatt-3'）（SEQ ID NO:66），以及作为3'侧引物的对TCR α 链C区特异的3-TR α -C引物（5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3'）（SEQ ID NO:67），对TCR β 链C1区特异的3-TR β -C1引物（5'-tcagaaatcctttctcttgac-3'）（SEQ ID NO:68），或对TCR β 链C2区特异的3-TR β -C2引物（5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3'）（SEQ ID NO:69），但不限于此。衍生的TCR能够以高亲

合力结合呈递本发明的肽的靶细胞,并任选地在体内和体外介导针对呈递本发明的肽的靶细胞的高效杀伤。

[0257] 可以将编码两种TCR亚单位的多核苷酸掺入合适的载体,例如逆转录病毒载体中。这些载体是本领域公知的。可以将所述多核苷酸或者包含它们的载体有用地转入T细胞(例如CD8阳性T细胞),例如来自患者的T细胞中。有利的是,本发明提供一种即配即用型组合物,其容许快速修饰患者自己的T细胞(或其他哺乳动物的T细胞)以快速且容易地生成具有卓越的癌细胞杀伤特性的修饰型T细胞。

[0258] 针对本发明的肽的特异性的TCR是能够特异性地识别本发明的肽与HLA分子的复合物的受体,当TCR呈递于T细胞的表面上时给予T细胞针对靶细胞的特异性。上述复合物的特异性识别可以通过任何已知方法来确认,所述方法的优选例子包括使用HLA分子和本发明的肽的多聚体染色体,和ELISPOT测定法。通过实施ELISPOT测定法,可以确认在细胞表面上表达TCR的T细胞通过TCR识别细胞,并且信号在胞内传播。还可以通过已知的方法确认上文提及的TCR可以在T细胞表面上存在TCR时给出T细胞细胞毒性活性的。优选的方法包括例如测定针对靶细胞的细胞毒性活性,诸如铬释放测定法。

[0259] 还有,本发明提供了CTL,其通过用编码两种TCR亚单位的多个多核苷酸或编码每个TCR亚单位的多个多核苷酸转导来制备,其中由此类TCR亚单位形成的TCR可以结合UBE2T肽,例如具有SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25或27的氨基酸序列的肽(在HLA-A24的背景中),以及还有具有SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56或58的氨基酸序列的肽(在HLA-A2的背景中)。

[0260] 经过转导的CTL在体内能够归巢(homing)到癌细胞,并且可以利用公知的培养方法体外扩增(例如Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。可以利用本发明的T细胞来形成免疫原性组合物,所述组合物可以用来在需要治疗和/或保护的患者中治疗或预防癌症(参见WO2006/031221,通过提述并入其全部内容)。

[0261] IX. 药物作用剂或药物组合物:

[0262] 本发明还提供了包含选自下组的至少一种活性成分的药物作用剂或组合物:

[0263] (a) 本发明的肽;

[0264] (b) 可表达形式的编码本发明的此类肽的多核苷酸;

[0265] (c) 本发明的APC;

[0266] (d) 本发明的外来体;和

[0267] (e) 本发明的CTL。

[0268] 由于UBE2T表达在癌症(其例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤)中上调,本发明的肽或多核苷酸可用于治疗和/或预防癌症,和/或用于预防癌症的术后复发。因此,本发明提供配制为用于治疗 and/或预防癌症,和/或预防它们的手术后复发的药物组合物或药物作用剂,此组合物或作用剂包括至少一种本发明的肽或多核苷酸作为活性成分。或者,可以在任何上述外来体或细胞诸如APC的表面上表达本发明的肽,以用作药物组合物或药物作用剂。另外,上述靶向任何一种本发明的肽的CTL也可用作本发明的药物组合物或药物作用剂的活性成分。

[0269] 相应地,本发明提供包含选自下组的至少一种活性成分的作用剂或组合物:

- [0270] (a) 本发明的肽，
- [0271] (b) 处于可表达形式的编码本发明的肽的多核苷酸，
- [0272] (c) 本发明的APC，
- [0273] (d) 本发明的外来体，和
- [0274] (e) 本发明的CTL。
- [0275] 在药物作用剂或组合物中，此类活性成分以治疗或药学有效量存在。
- [0276] 本发明药物组合物或药物作用剂也可以用作疫苗。在本发明的语境中，短语“疫苗”（又称“免疫原性组合物”）是指在接种到动物体内后具有改善、增强和/或诱导抗肿瘤免疫功能的作用剂或组合物。换言之，本发明提供了作用剂或组合物用于在受试者中诱导针对癌症的免疫应答。在此类药剂或组合物中的肽量可以为在显著增强或刺激携带表达UBE2T的癌症的受试者中的免疫应答中有效的量。
- [0277] 本发明的药物组合物或作用剂可用于在受试者或患者中治疗和/或预防癌症，和/或预防其手术后复发，所述受试者或患者包括人和任何其它哺乳动物，包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猫、犬、绵羊、山羊、猪、牛、马、猴、狒狒、和黑猩猩，特别是商业上重要的动物或驯养的动物。在一些实施方案中，本发明的药物作用剂或组合物可以配制为供施用给抗原为HLA-A24或HLA-A2的受试者。
- [0278] 在另一实施方案中，本发明还提供活性成分在制备用于治疗 and/或预防癌症或肿瘤，和/或防止其手术后复发的药物组合物或药物作用剂中的用途，所述活性成分选自：
- [0279] (a) 本发明的肽；
- [0280] (b) 处于可表达形式的编码此类本发明的肽的多核苷酸；
- [0281] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC，
- [0282] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体；和
- [0283] (e) 本发明的CTL。
- [0284] 或者，本发明进一步提供用于治疗 and/或预防癌症或肿瘤，和/或防止其手术后复发的活性成分，所述活性成分选自下组：
- [0285] (a) 本发明的肽；
- [0286] (b) 处于可表达形式的编码此类本发明的肽的多核苷酸；
- [0287] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC；
- [0288] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体；和
- [0289] (e) 本发明的CTL。
- [0290] 或者，本发明进一步提供一种制备用于治疗或预防癌症或肿瘤，和/或防止其手术后复发的药物组合物或药物作用剂的方法或工艺，其中该方法或工艺包括配制药学或生理学上可接受的担载体与选自下组的活性成分的步骤：
- [0291] (a) 本发明的肽；
- [0292] (b) 处于可表达形式的编码此类本发明的肽的多核苷酸；
- [0293] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC；
- [0294] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体；和
- [0295] (e) 本发明的CTL。
- [0296] 在另一个实施方案中，本发明还提供一种制备用于治疗或预防癌症或肿瘤、和/或

防止其手术后复发的药物组合物或药物作用剂的方法或工艺,其中该方法或工艺包括混合活性成分与药学或生理学可接受的担载体的步骤,其中所述活性成分选自下组:

[0297] (a) 本发明的肽;

[0298] (b) 处于可表达形式的编码此类本发明的肽的多核苷酸;

[0299] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC;

[0300] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体;和

[0301] (e) 本发明的CTL T细胞。

[0302] 在另一个实施方案中,本发明还提供用于治疗或预防癌症或肿瘤、和/或防止其手术后复发的方法,其中所述方法包括对受试者施用选自下列的至少一种活性成分的步骤:

[0303] (a) 本发明的肽;

[0304] (b) 处于可表达形式的编码此类本发明的肽的多核苷酸;

[0305] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC;

[0306] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体;和

[0307] (e) 本发明的CTL。

[0308] 依照本发明,已经发现了具有选自SEQ ID NOs:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27中的氨基酸序列的肽是能够在受试者中诱导针对表达HLA-A24和UBE2T的癌症的强且特异性的免疫应答的HLA-A24限制性表位肽。还已经发现了具有选自SEQ ID NOs:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58中的氨基酸序列的肽是能够在受试者中诱导针对表达HLA-A24和UBE2T的癌症的强且特异性的免疫应答的HLA-A2限制性表位肽。因此,包含任何具有选自1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27的氨基酸序列的这些肽的药物组合物或药物作用剂特别适合于对HLA抗原为HLA-A24的受试者施用。在另一个方面,包含任何具有选自SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列的这些肽的药物组合物或药物作用剂特别适合于对HLA抗原为HLA-A2的受试者施用。对于包含编码这些肽中的任一个的多核苷酸(即本发明的多核苷酸)的药物组合物和药剂也是如此。

[0309] 要用本发明的药物组合物或药物作用剂治疗和/预防的癌症或肿瘤没有限定,并且包括其中涉及(例如过表达)UBE2T的任何癌症,其例子包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0310] 本发明的药物组合物或药物作用剂除上述活性成分之外还可含有其它具有诱导针对癌性细胞的CTL的能力的肽、编码所述其它肽的其它多核苷酸、呈递所述其它肽的其它细胞,等等。此类“其它”具有诱导针对癌性细胞的CTL的能力的肽的实例包括但不限于衍生自癌症特异性抗原(例如已鉴定的TAA)的肽。

[0311] 如果需要,本发明的药物组合物或药物作用剂可任选包括其它治疗性物质作为活性成分,只要该物质不抑制本发明的活性成分(例如任何本发明的肽、多核苷酸、外来体、APC、CTL)的抗肿瘤效果。例如,配制剂可包括抗炎物质、镇痛剂、化疗剂、诸如此类。除了在药物自身中包括其它治疗性物质之外,本发明的药物还可以与一种或多种其它药理学组合物顺序或同时施用。药物和药理学组合物的量取决于例如所使用的药理学组合物的类型、所治疗的疾病、及施用的时序安排和路径。

[0312] 应当理解,除在本文中具体提及的组分之外,本发明的药物组合物或药物作用剂可包括与所讨论的配制剂类型相关的本领域常规的其它物质。

[0313] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药物组合物或药物作用剂可包装在制品和试剂盒中,该制品和试剂盒含有可用于治疗要治疗的疾病(例如癌症)的病理状况的材料。制品可包括任何本发明药物组合物或药物作用剂的容器及标签。合适的容器包括瓶、管形瓶、和试管。容器可以用多种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器上的标签应指明该组合物或剂用于治疗或预防疾病的一种或多种状况。标签还可指明关于施用的指导等等。

[0314] 除上文描述的容器之外,包括本发明药物组合物或药物作用剂的试剂盒还可任选进一步包括第二容器,其中装有药学可接受的稀释剂。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头、注射器、和载有使用说明书的包装插页。

[0315] 如果期望的话,本发明的药物组合物或药物作用剂可呈现在药包或分配器装置中提供,该药包或分配器装置可装有一个或多个含有活性成分的单位剂型。例如,药包可包括金属或塑料箔,诸如泡罩包。药包或分配器装置可附有施用说明书。

[0316] (1) 含有肽作为活性成分的药物组合物

[0317] 本发明的肽可以作为药物组合物或药物作用剂直接施用,或者如果必要,通过常规配制方法来配制。在后一种情况中,除本发明的肽之外,还可以视情况包括通常用于药物的担载体、赋形剂、等等,没有特别限制。此类担载体的例子是灭菌水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养液、等等。另外,本发明的药物组合物或药物作用剂可在必要时含有稳定剂、悬浮液、防腐剂、表面活性剂等等。本发明的药物组合物或药物作用剂可用于抗癌目的。

[0318] 本发明的肽可制备成组合,其包含两种或更多种本发明的肽,以在体内诱导CTL。肽可以采取鸡尾酒的形式,或者可使用标准技术彼此缀合。例如,可以将各个肽化学连接或表达成为单一融合多肽。组合中的各个肽可以是相同的或不同的。通过施用本发明的肽,肽被HLA抗原以高密度展示在APC上,然后诱导出与所展示的肽与HLA抗原之间形成的复合物特异性起反应的CTL。或者,可以从受试者分离APC(例如DC),然后用本发明的肽刺激它们,来获得在其细胞表面上展示任何所述本发明肽的APC,可以将这些APC重新施用给受试者而在受试者体内诱导出CTL,结果,可提高针对肿瘤相关内皮的攻击性。

[0319] 任何本发明的肽作为活性成分的用于治疗 and/或预防癌症的药物组合物或药物作用剂还可包括佐剂,从而可有效地建立细胞免疫。或者,本发明的药物组合物或药物作用剂可以与其它活性成分一起施用,或者可以通过配制成颗粒来施用。佐剂指在与具有免疫学活性的蛋白质一起(或顺序)施用增强针对该蛋白质的免疫应答的任何化合物、物质或组合物。此处考虑到的佐剂包括文献中记载的那些(Johnson AG, Clin Microbiol Rev 1994, 7:277-89)。合适佐剂的例子包括但不限于磷酸铝、氢氧化铝、明矾、霍乱毒素、沙门氏菌毒素、IFA(不完全弗氏佐剂)、CFA(完全弗氏佐剂)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG, O/W乳液等等。另外,可方便地使用脂质体制剂、其中肽结合至几微米直径的珠子的颗粒制剂、和其中脂质结合至肽的配制剂。

[0320] 在另一个实施方案中,本发明的肽还可以作为可药用盐的形式施用。优选的盐的实例包括但不限于与碱金属的盐、与金属的盐、与有机碱的盐、与胺的盐、与有机酸(乙酸、甲酸、丙酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸等等)的

盐、和与无机酸(盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸、硝酸等等)的盐。本文中所用的短语“可药用盐”是指保留所述化合物的生物学有效性和性质,通过与无机酸或有机酸或碱(如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等)反应所得到的盐。

[0321] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物或药物作用剂还可进一步包括引发(prime)CTL的成分。已经确认脂质是能够在体内引发针对病毒抗原的CTL的组分。例如,可将棕榈酸残基连接至赖氨酸残基的 ϵ -和 α -氨基,然后连接至本发明的肽。然后脂化肽可以在胶束或颗粒中直接施用,掺入脂质体,或在佐剂中乳化。作为脂质的其他例子,大肠杆菌(*E.coli*)脂蛋白,诸如三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酰丝氨酰-丝氨酸(P3CSS),当与适宜的肽共价连接时,可用来引发CTL(参见例如Deres et al.,*Nature* 1989,342:561-4)。

[0322] 合适的施用方法的例子包括,但不一定限于,口服、和皮内、皮下、肌肉内、骨内、腹膜内和静脉内注射等等,及系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。可以对需要治疗表达UBE2T的癌症的受试者施用治疗或药理学有效量的本发明的肽。或者,可以对携带表达UBE2T的癌症的受试者施用足以增强或刺激用CTL介导的免疫应答,和/或足以诱导针对表达UBE2T的癌症或肿瘤的CTL的本发明的肽量。本发明肽的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整,通常是0.001mg至1000mg,例如0.01mg至100mg,例如0.1mg至30mg,例如0.1mg至10mg,例如0.5mg至5mg,而且可以每少数天施用一次至每少数月施用一次,例如一周一次。本领域技术人员能容易地选择合适的剂量。

[0323] (2) 含有多核苷酸作为活性成分的药物组合物

[0324] 本发明的药物组合物或药物作用剂也可含有处于可表达形式的编码本发明的肽的核酸。在本文中,短语“处于可表达形式的”意味着多核苷酸在导入细胞时会在体内表达成诱导抗肿瘤免疫力的多肽。在一个例示性的实施方案中,感兴趣的多核苷酸的核酸序列包括多核苷酸表达所必需的调节元件。多核苷酸可具有为实现稳定插入靶细胞的基因组所需的配置(关于同源重组盒载体的描述参见例如Thomas KR & Capecchi MR,*Cell* 1987,51:503-12)。参见例如Wolff et al.,*Science* 1990,247:1465-8;美国专利No.5,580,859;5,589,466;5,804,566;5,739,118;5,736,524;5,679,647;及WO 98/04720。基于DNA的投递技术的例子包括“裸DNA”、易化(布比卡因、聚合物、肽介导的)投递、阳离子脂质复合物、和颗粒介导的(“基因枪”)或压力介导的投递(参见例如美国专利No.5,922,687)。

[0325] 本发明的肽还可用于病毒或细菌载体来表达。表达载体的例子包括减毒病毒宿主,诸如牛痘或禽痘。这种办法涉及使用例如牛痘病毒作为载体来表达编码肽的核苷酸序列。在导入宿主后,重组牛痘病毒表达表达免疫原性肽,并由此引发免疫应答。可用于免疫接种方案的牛痘载体和方法记载于例如美国专利No.4,722,848。另一种载体是卡介苗(BCG, *Bacille Calmette Guerin*)。BCG载体记载于Stover et al.,*Nature* 1991,351:456-60。有很多种可用于治疗性施用或免疫接种的其它载体是容易想到的,例如腺病毒和腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)载体、去毒炭疽毒素载体、诸如此类。参见例如Shata et al.,*Mol Med Today* 2000,6:66-71;Shedlock et al.,*J Leukoc Biol* 2000,68:793-806;Hipp et al.,*In Vivo* 2000,14:571-85。

[0326] 将多核苷酸投递入患者可以是直接的,其中使患者直接暴露于携带多核苷酸的载体,或者是间接的,其中首先在体外用感兴趣的多核苷酸转化细胞,然后将细胞移植入患

者。这两种办法分别称作体内和离体基因疗法。

[0327] 关于基因疗法的方法的一般综述参见Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12:488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3:87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33:573-96; Mulligan RC, *Science* 1993, 260:926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62:191-217; *Trends in Biotechnology* 1993, 11 (5): 155-215。在eds. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, NY, 1993); 及Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990中描述了可应用于本发明的重组DNA技术领域的公知方法。

[0328] 施用可以通过口服、或皮内、皮下、静脉内、肌肉内、骨内、或腹膜内注射等等,而且可使用系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。可以对需要治疗表达UBE2T的癌症的受试者施用治疗或药理学有效量的多核苷酸。或者,可以对携带表达UBE2T的癌症的受试者施用足以增强或刺激用CTL介导的免疫应答,和/或足以诱导针对表达UBE2T的癌症或肿瘤的CTL的本发明的多核苷酸量。合适的担载体或经编码本发明肽的多核苷酸转化的细胞中的多核苷酸的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整,通常是0.001mg至1000mg,例如0.01mg至100mg,例如0.1mg至30mg,例如0.1mg至10mg,例如0.5mg至5mg,而且可以每数天施用一次至每数月施用一次,例如一周一次。本领域技术人员能适宜地选择合适的剂量。

[0329] X. 使用肽、外来体、APC和CTL的方法

[0330] 本发明的肽和编码此类肽的多核苷酸可用于制备或诱导APC和CTL。本发明的外来体和APC也可用于制备或诱导CTL。肽、多核苷酸、外来体和APC可以与任何其它化合物组合使用,只要该其他的化合物不抑制其CTL诱导能力。因此,任何前文所述的本发明的药物组合物或药物作用剂均可用于诱导CTL。除它们之外,包括肽和多核苷酸者也可用于诱导APC,如下文解释的。

[0331] (1) 诱导抗原呈递细胞 (APC) 的方法

[0332] 本发明提供了使用本发明的肽或多核苷酸来诱导具有CTL诱导能力的APC的方法。

[0333] 本发明的方法包括在体外、离体或体内使APC与本发明的肽接触的步骤。例如,离体诱导APC的方法可包括下述步骤:

[0334] a: 从受试者收集APC; 和

[0335] b: 使步骤a的APC与本发明的肽接触。

[0336] APC不限于特定种类的细胞,并且包括DC、Langerhans细胞、巨噬细胞、B细胞、和活化的T细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞识别。优选地可使用DC,因为它们在APC中具有最强的CTL诱导能力。任何一种本发明肽均可以单独或与一种或多种其它本发明的肽和/或一种或多种衍生自UBE2T之外的TAA的CTL可诱导肽组合使用。

[0337] 另一方面,当将本发明的肽施用给受试者时,APC在体内接触到所述肽,结果,在受试者的身体中诱导出具有CTL诱导能力的APC。因此,本发明的方法可包括将本发明的肽施用于受试者以在该受试者的身体中诱导具有CTL诱导能力的APC。类似地,当将处于可表达形式的本发明的多核苷酸施用于受试者时,本发明的肽在体内表达并与APC接触,结果,在

受试者的身体中诱导出具有高CTL诱导能力的APC。因此,本发明还可包括将本发明的多核苷酸施用于受试者以在该受试者的身体中诱导具有CTL诱导能力的APC。短语“可表达的形式”描述于上文“IX. 药物作用剂或药物组合物(2)含有多核苷酸作为活性组分的药物作用剂或药物组合物”部分。

[0338] 此外,本发明的方法可包括将本发明的多核苷酸导入APC以诱导具有CTL诱导能力的APC。例如,该方法可包括下述步骤:

[0339] a:自受试者收集APC;并

[0340] b:向步骤a中收集的APC中导入编码本发明肽的多核苷酸。

[0341] 步骤b可如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分中所述来实施。

[0342] 或者,本发明提供了制备能够特异性诱导针对UBE2T的CTL活性的抗原呈递细胞(APC)的方法,其中所述方法可以包括下列步骤之一:

[0343] (a)在体外、离体或体内使APC与本发明的肽接触;和

[0344] (b)将编码本发明的肽的多核苷酸导入APC中。

[0345] 或者,本发明提供了用于诱导具有CTL诱导能力的APC的方法,其中所述方法包括选自下组的步骤:

[0346] (a)使APC与本发明的肽接触;并

[0347] (b)将编码本发明的肽的多核苷酸导入APC中。

[0348] 在优选的实施方案中,本发明提供用于诱导或制备具有CTL诱导能力的APC的方法,所述方法包括下述步骤之一:

[0349] (a)在体外、离体或体内使表达HLA-A24的APC接触具有选自SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27的肽或其修饰肽;和

[0350] (b)向表达HLA-A24的APC中导入编码具有选自SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27的氨基酸序列的肽或其修饰肽的多核苷酸。

[0351] 通过上述方法诱导的APC通过HLA-A24将此类肽呈递在其表面上,并且能够诱导具有针对表达HLA-A24和UBE2T的细胞的特异性细胞毒活性的CTL。

[0352] 在另一个实施方案中,本发明提供用于诱导或制备具有CTL诱导能力的APC的方法,所述方法包括下述步骤之一:

[0353] (a)在体外、离体或体内使表达HLA-A2的APC接触具有选自SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58)的肽或其修饰肽;和

[0354] (b)向表达HLA-A2的APC中导入编码具有选自SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58)的氨基酸序列的肽或其修饰肽的多核苷酸。

[0355] 通过上述方法诱导的APC通过HLA-A2将此类肽呈递在其表面上,并且能够诱导具有针对表达HLA-A2和UBE2T的细胞的特异性细胞毒活性的CTL。

[0356] 本发明的方法可以在体外、离体或体内实施。优选地,本发明的方法可以在体外或离体实施。用于诱导具有CTL诱导能力的APC的APC可以优选地是表达HLA-A24或HLA-A2抗原的APC。这样的APC可以通过本领域公知的方法从获自HLA抗原为HLA-A24或HLA-A2的受试者的外周血单核细胞(PBMC)制备。通过本发明的方法诱导的APC可以是在其表面中呈递本发明的肽与HLA抗原(HLA-A24或HLA-A2抗原)的复合物的APC。当将通过本发明的方法诱导的APC施用给受试者以在该受试者中诱导针对癌症的免疫应答时,该受试者优选是APC所来源

的同一受试者。不过,受试者可以不同于APC供体,只要该受试者具有与APC供体相同的HLA类型即可。

[0357] 在另一个实施方案中,本发明提供用于在诱导具有CTL诱导能力的APC中使用的作用剂或组合物,此类作用剂或组合物包括一种或多种本发明的肽或多核苷酸。

[0358] 在另一个实施方案中,本发明提供本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸在制备配制为用于诱导APC的作用剂或组合物中的用途。

[0359] 或者,本发明还提供本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸用于在诱导具有CTL诱导能力的APC中使用。

[0360] (2) 诱导CTL的方法

[0361] 本发明还提供了使用本发明的肽、多核苷酸、或外来体或APC来诱导CTL的方法。

[0362] 本发明还提供了使用一个编码两个TCR亚基的多核苷酸或编码每个TCR亚基的多个多核苷酸来诱导CTL的方法,其中由此类亚基形成的TCR能识别(结合)细胞表面上的本发明的肽与HLA抗原的复合物。优选地,所述诱导CTL的方法可以包括选自下组的至少一个步骤:

[0363] a) 使CD8阳性T细胞与抗原呈递细胞接触,所述抗原呈递细胞在其表面上呈递有HLA抗原与本发明的肽之间形成的复合物;

[0364] b) 使CD8阳性T细胞与外来体接触,所述外来体在其表面上呈递有HLA抗原与本发明的肽之间形成的复合物;

[0365] c) 向CD8阳性T细胞中导入一个编码两个TCR亚基的多核苷酸或编码每个TCR亚基的多个多核苷酸,其中由此类亚基形成的TCR能识别(结合)细胞表面上的本发明的肽与HLA抗原的复合物。

[0366] 当本发明的肽、多核苷酸、APC或外来体被施用给受试者后,受试者的身体中诱导出CTL,而且靶向表达UBE2T的癌细胞的免疫应答的强度增强。因此,本发明的方法可包括将本发明的肽、多核苷酸、APC或外来体施用于受试者的步骤。

[0367] 或者,也可通过离体或体外使用它们来诱导CTL,并且在诱导CTL后,可以将活化的CTL返还给受试者。例如,所述方法可包括下述步骤:

[0368] a: 自受试者收集APC;

[0369] b: 用本发明的肽接触步骤a的APC;并

[0370] c: 将步骤b的APC与CD8阳性T细胞共培养。

[0371] 上文步骤c中要与CD8阳性T细胞共培养的APC也可通过将包括本发明多核苷酸的基因转移入APC来制备,如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分所述,但是本发明不限于此,而且涵盖任何在其表面上有效呈递HLA抗原和本发明肽形成的复合物的APC。

[0372] 作为上述APC的替代,可任选地使用在其表面上呈递HLA抗原和本发明肽形成的复合物的外来体。即,本发明还可包括将在其表面上呈递HLA抗原和本发明肽形成的复合物的外来体与CD8阳性细胞共培养的步骤。此类外来体可通过上文“V. 外来体”部分中描述的方法来制备。适用于本发明的方法的APC和外来体在其表面上呈递有本发明的肽与HLA-A24或HLA-A2的复合物。

[0373] 例如,呈递有HLA-A24与具有选自SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25和27的氨基酸序列的肽(或其修饰肽)的APC或外来体可优选地用于诱导具

有针对表达HLA-A24和UBE2T的细胞的特异性细胞毒活性的CTL。同样地,呈递有HLA-A2与具有选自SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列的肽(或其修饰肽)的APC或外来体可优选地用于诱导具有针对表达HLA-A2和UBE2T的细胞的特异性细胞毒活性的CTL。

[0374] 另外,可通过将一个编码两个TCR亚基的多核苷酸或编码每个TCR亚基的多个多核苷酸导入CD8阳性T细胞来诱导本发明的CTL,其中由此类亚基形成的TCR能结合本发明的肽与细胞表面上的HLA抗原的复合物。此类转导可如上文“VIII.T细胞受体(TCR)”部分中所述来实施。

[0375] 本发明的方法可以在体外、离体或体内实施。优选地,本发明的方法可以在体外或离体实施。用于诱导CTL的CD8阳性T细胞可以通过本领域公知的方法从获自的受试者的PBMC制备。在优选的实施方案中,CD8阳性T细胞的供体可以是其HLA抗原为HLA-A24或HLA-A2抗原的受试者。通过本发明的方法诱导的CTL可以是识别在其表面上呈递本发明的肽与HLA抗原的复合物的细胞的CTL。这样的CTL显示针对在其表面上呈递有本发明的肽的细胞的特异性细胞毒活性,因此,能够显示针对表达UBE2T的细胞(例如癌细胞)的特异性细胞毒活性。当将通过本发明的方法诱导的CTL施用给受试者以在该受试者中诱导针对癌症的免疫应答时,该受试者优选是CD8阳性T细胞所来源的同一受试者。不过,受试者可以不同于CD8阳性T细胞供体,只要该受试者具有与CD8阳性T细胞供体相同的HLA类型即可。

[0376] 另外,本发明提供了一种制造用于诱导CTL的药物组合物或药物作用剂的方法或工艺,其中该方法包括混合或配制本发明的肽与药学可接受的担载体的步骤。

[0377] 在另一个实施方案中,本发明提供用于诱导CTL的作用剂或组合物,其中所述作用剂或组合物包括本发明的一种或多种肽、一种或多种多核苷酸、一种或多种APC和/或外来体。

[0378] 在另一个实施方案中,本发明提供本发明的肽、多核苷酸、APC或外来体在制备配制为用于诱导CTL的作用剂或组合物中的用途。

[0379] 或者,本发明还提供本发明的肽、多核苷酸、APC或外来体用于在诱导CTL中使用。

[0380] XI. 诱导免疫应答的方法

[0381] 此外,本发明提供了诱导针对涉及UBE2T的疾病的免疫应答的方法。合适的疾病包括癌症,其例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0382] 本发明的方法可包括施用含有任何本发明肽或编码它们的多核苷酸的作用剂或组合物的步骤。本发明还涵盖施用呈递任何本发明肽的外来体或APC的步骤。关于详情参见“IX. 药物作用剂或药物组合物”项,特别是描述本发明的药物组合物作为疫苗的用途的部分。另外,可用于本发明诱导免疫应答的方法的外来体和APC详细描述于上文“V. 外来体”、“VI. 抗原呈递细胞(APC)”和“X. 使用肽、外来体、APC和CTL的方法”的(1)和(2)部分。

[0383] 本发明还提供了一种制造用于诱导针对癌症的免疫应答的药物组合物或药物作用剂的方法或工艺,其中该方法可包括混合或配制本发明的肽与药学可接受的载体的步骤。

[0384] 或者,本发明的方法可包括施用本发明的疫苗或药物组合物或药物物质的步骤,

所述疫苗或药物组合物或药物作用剂包含：

- [0385] (a) 本发明的肽；
- [0386] (b) 处于可表达的形式编码如本发明的此类肽的核酸；
- [0387] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC；
- [0388] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体；或
- [0389] (e) 本发明的CTL。

[0390] 在本发明的语境中，过表达UBE2T的癌症可用这些活性组分来治疗。所述癌症的例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。因而，在施用包括任何上述的活性组分的疫苗或药物组合物或药物作用剂之前，优选确认自要治疗的受试者收集的癌性细胞或组织中的UBE2T表达水平与自同一受试者收集的正常细胞或组织比较是否提高了。因此，在一个实施方案中，本发明提供了用于在有需要的患者中治疗(过)表达UBE2T的癌症的方法，该方法包括下述步骤：

- [0391] i) 测定自具有要治疗的癌症的受试者获得的生物学样品中的UBE2T表达水平；
- [0392] ii) 将UBE2T表达水平与正常对照比较；并
- [0393] iii) 对具有与正常对照相比过表达UBE2T的癌症的受试者施用至少一种选自上文所述(a)至(d)的成分。

[0394] 或者，本发明提供包括至少一种选自上文所述(a)至(e)的成分的疫苗或药物组合物，用于对具有过表达UBE2T的癌症的受试者施用。换言之，本发明进一步提供了用于鉴定要用本发明肽来治疗的受试者的方法，所述方法包括测定衍生自受试者的生物学样品中的UBE2T表达水平的步骤，其中该表达水平与该基因的正常对照水平相比的升高指示该受试者可能具有可用本发明肽来治疗的癌症。

[0395] 此外，在优选的实施方案中，受试者的HLA型可以在施用本发明的肽前鉴定。例如优选对鉴定为HLA-A24的受试者施用具有具有SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25或27的氨基酸序列的肽。或者，优选对鉴定为HLA-A2的受试者施用具有具有SEQ ID NO:29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56或58的氨基酸序列的肽。

[0396] 任何衍生自受试者的细胞或组织均可用于测定UBE2T表达水平，只要其可以包括UBE2T转录或翻译产物。合适样品的例子包括但不限于身体组织与体液，例如血液、痰与尿液。优选地，衍生自受试者的细胞或组织样品含有这样的细胞群体，该群体包括上皮细胞，更优选癌性上皮细胞或衍生自癌性组织的上皮细胞。进一步，如果必要，可从所得的身体组织与体液中纯化所述细胞，然后将其用作衍生自受试者的样品。

[0397] 根据本发明，可以测定在自受试者获得的生物学样品中UBE2T的表达水平。UBE2T的表达水平可在转录(核酸)产物水平确定，使用本领域已知方法。举例而言，UBE2T的mRNA可通过杂交方法(例如，Northern杂交)使用探针定量。检测可在芯片或阵列上实施。对检测UBE2T的表达水平而言，可优选使用阵列。本领域技术人员可利用UBE2T的序列信息制备上述探针。举例而言，UBE2T的cDNA可用作探针。如需要，所述探针可用合适的标记物来标记，例如染料、荧光物质和同位素，且UBE2T的表达水平可以作为所杂交的标记物的强度检测。

[0398] 此外，UBE2T的转录产物还可通过基于扩增的检测方法(例如，RT-PCR)使用引物定量。此类引物也可基于UBE2T的可得序列信息制备。

[0399] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、中等严格条件或低严格条件下与UBE2T的mRNA杂交。如本文中所使用的,短语“严格(杂交)条件”是指这样的条件,在该条件下,探针或引物将与其靶序列杂交,但不与其它序列杂交。严格条件是依赖于序列的,而且在不同的环境下会不同。较长序列的特异杂交与较短序列相比在较高温度下观察到。一般地,严格条件的温度选择比特定序列在限定的离子强度和pH下的热熔点(T_m)低大约5摄氏度。 T_m 是(在限定的离子强度、pH和核酸浓度下)平衡状态下有50%的与其靶序列互补的探针与靶序列杂交的温度。因为靶序列一般过量存在,因此在 T_m ,平衡时50%的探针被占据。典型地,严格条件会是这样的:其中盐浓度小于大约1.0M钠离子,典型地大约0.01-1.0M钠离子(或其它盐),pH7.0-8.3,温度对于较短的探针或引物(例如10-50个核苷酸)是至少大约30摄氏度,用于较长的探针或引物是至少大约60摄氏度。严格条件也可以通过添加去稳定物质,例如甲酰胺,来实现。

[0400] 本发明的探针或引物典型地是基本上纯化的寡核苷酸。寡核苷酸典型地包括这样的核苷酸序列区域,其在严格条件下与包括UBE2T序列的核酸的至少大约2000,1000,500,400,350,300,250,200,150,100,50,或25个连续有义链核苷酸序列,或者包括UBE2T序列的核酸的反义链核苷酸序列,或者些序列的天然存在的突变体杂交。尤其是,例如,在优选的实施方案中,可以使用长度为5-50的寡核苷酸作为引物来扩增要检测的基因。更优选地,可以用特定大小,一般是长度15-30个碱基的寡核苷酸探针或引物来检测UBE2T基因的mRNA或cDNA。大小范围可以是至少10个核苷酸,至少12个核苷酸,至少15个核苷酸,至少20个核苷酸,至少25个核苷酸,至少30个核苷酸,且探针和引物的大小范围可为5-10个核苷酸,10-15个核苷酸,15-20个核苷酸,20-25个核苷酸,和25-30个核苷酸。在优选的实施方案中,寡核苷酸探针或引物的长度可以从15-25个核苷酸中选择。使用此类寡核苷酸探针或引物检测基因的测定程序、装置或试剂是公知的(例如寡核苷酸微阵列或PCR)。在这些测定中,探针或引物也可以包括标签或接头序列。此外,可以使用可检测的标记物或待捕捉的亲亲和配体来修饰探针或引物。或者,在基于杂交的检测程序中,也可以使用长度为数百个(例如约100-200个)碱基至数千个(例如约1000-2000个)碱基的多核苷酸用于探针(例如Northern印迹测定或cDNA微阵列分析)。

[0401] 或者,可以检测UBE2T的翻译产物以鉴定要通过本发明的方法治疗的受试者。例如,可以确定UBE2T蛋白(SEQ ID NO:65)的量。测定作为翻译产物的UBE2T蛋白量的方法的例子包括免疫测定法,此类方法使用特异识别所述UBE2T蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰(例如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv等)均可用于检测,只要该片段或经修饰抗体保留对UBE2T蛋白的结合能力即可。制备这些类型的抗体的方法是本领域众所周知的,并且可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0402] 作为另一种基于TOPK的翻译产物检测UBE2T的表达水平的方法,可利用针对UBE2T蛋白的抗体通过免疫组织化学分析测量其染色的强度。意即,在这种测量中,强染色表明所述UBE2T蛋白质存在/水平增加,且同时表明UBE2T的高表达水平。

[0403] 对于受试者衍生的样品中的UBE2T基因,如果表达水平较之UBE2T的对照水平(例如正常细胞中的表达水平)增加了例如10%,25%或50%的话,或增加到超过1.1倍,超过1.5倍,超过2.0倍,超过5.0倍,超过10倍或者更多,则可以认为其在癌细胞中的表达水平增加了。

[0404] 对照水平可以与癌细胞同时确定,使用先前从健康受试者/受试者们收集和保存的样品。另外,自具有要治疗的癌症的器官的非癌性区获得的正常细胞可用作正常对照。或者,对照水平可以借助统计方法,根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的UBE2T表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以是来自先前测试过的细胞的表达模式数据库。而且,根据本发明的一个方面,可以将生物样品中UBE2T的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用从来自与衍生自受试者的样品的组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中UBE2T基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm$ 2S.D.或平均值 $\pm$ 3S.D.的范围可以用作标准值。

[0405] 样品表达水平与对照水平间的差异可以相对已知表达水平不会随着细胞的癌或非癌状态改变的对照核酸(例如管家基因)的表达水平加以标准化。示例的对照基因包括,但不仅限于, β -肌动蛋白、甘油醛-3磷酸脱氢酶和核糖体蛋白P1。

[0406] 当UBE2T的表达水平相比正常表达水平有所提高,则受试者可鉴定为具有要通过施用本发明的药物组合物或作用剂治疗的癌症的受试者。

[0407] 本发明还提供了一种使用本发明的前述药物组合物或作用剂选择受试者进行癌症治疗的方法,该方法包括下述步骤:

[0408] a) 测定UBE2T在自患有癌症的受试者获得的生物学样品中的表达水平;

[0409] b) 将步骤a)中测定的UBE2T的表达水平与正常对照水平比较;并

[0410] c) 若UBE2T的表达水平与正常对照水平相比升高的话,选择受试者进行通过本发明的药物组合物的作用剂的癌症治疗。

[0411] 在一些实施方案中,此类方法可以进一步包括以下步骤,即在上文限定的步骤a)-c)之后或之间鉴定具有选自下组的HLA的受试者:HLA-A24和HLA-A2。根据本发明的癌症疗法对于患有过表达UBE2T的癌症且具有HLA-A24或HLA-A2的受试者是优选的。用HLA分型的方法是本领域中公知的。例如,基于PCR的用于对HLA等位基因分型的方法是公知的。对每种HLA分子特异性的抗体也是适合于鉴定受试者的HLA类型的工具。

[0412] 在一个实施方案中,本发明进一步提供了诊断试剂盒,其包含本发明的一种或多种肽。

[0413] 可以通过使用本发明的肽检测受试者衍生的样品(例如血液)中针对本发明的肽的抗体诊断癌症。若受试者衍生的样品(例如血液样品)含有针对本发明肽的抗体并且抗体的量测定为大于截留值(与对照水平相比)的话,则该受试者怀疑患有癌症。

[0414] 在另一个实施方案中,本发明的诊断试剂盒可包括本发明的肽及与它结合的HLA分子。使用抗原性肽和HLA分子检测抗原特异性CTL的合适方法早已确立(例如Altman JD et al., Science. 1996, 274 (5284): 94-6)。因此,本发明肽和HLA分子形成的复合物可用于检测方法检测肿瘤抗原特异性CTL,由此能够较早检测癌症的复发和/或转移。进一步,它可用于选择适合包含本发明肽作为活性组分的药物组合物或作用剂的受试者或评估该药物组合物或作用剂的治疗效果。

[0415] 特别地,依照已知方法(参见例如Altman JD et al., Science. 1996, 274 (5284): 94-6),可制备放射性标记的HLA分子和本发明肽的寡聚物复合物,诸如四聚体。使用该复合物,可通过例如来对衍生自怀疑患有癌症的受试者的外周血淋巴细胞中的抗原-肽特异性

CTL定量来进行诊断。

[0416] 本发明进一步提供了使用本发明的肽来评估受试者的免疫学应答的方法和诊断剂。在本发明的一个实施方案中,使用本发明的肽作为试剂来评估或预测受试者的免疫应答。要评估的免疫应答是通过在体外或在体内使免疫原(即本发明的肽)接触免疫活性细胞来诱导的。在优选的实施方案中,用于评估免疫应答的免疫活性细胞可以选自外周血、外周血淋巴细胞(PBL)、和外周血单个核细胞(PBMC)。用于此类分析的测定系统包括相对较新的技术发展,诸如四聚体染色测定、胞内淋巴因子染色和干扰素释放测定法、或ELISPOT测定法。在一个优选的实施方案中,要与肽试剂接触的免疫活性细胞可以是抗原呈递细胞,包括树突细胞。

[0417] 例如,本发明的肽可用于四聚体染色测定法,评估外周血单个核细胞在暴露于肿瘤细胞抗原或免疫原后抗原特异性CTL的存在。HLA四聚体复合物可用于直接显现抗原特异性CTL(参见例如Ogg et al., Science 279:2103-2106, 1998; 和Altman et al., Science 174:94-96, 1996) 和测定抗原特异性CTL群体在外周血单个核细胞样品中的频率。使用本发明肽的四聚体试剂可如下所述来生成。

[0418] 与HLA分子结合的肽在相应HLA重链和 β 2-微球蛋白存在下重折叠以生成三分子复合物。在该复合物中,重链的羧基末端在先前工程化到蛋白质中的位点处被生物素化。然后,将链霉亲和素添加至复合物以形成由三分子复合物和链霉亲和素组成的四聚体。借助荧光标记的链霉亲和素,四聚体能用于对抗原特异性细胞染色。然后可鉴定细胞,例如通过流式细胞术。此类分析可用于诊断或预后目的。通过该规程鉴定的细胞也可用于治疗目的。

[0419] 本发明的肽还可用于制备抗体,使用本领域公知技术(参见例如CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; 和Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 其可作为试剂用于诊断或监测癌症。此类抗体可包括识别HLA分子背景中的肽的抗体,即结合肽-MHC复合物的抗体。

[0420] 本发明的肽和组合物还具有多种其他应用,本文中描述了其中一些。例如,本发明提供了一种用于诊断或检测以UBE2T多肽表达或呈递为特征的病症的方法。

[0421] 例如,诊断可使用容许通过对荧光素标记的HLA多聚体复合物染色而直接定量抗原特异性T细胞的方法来进行(例如Altman, J.D. et al., 1996, Science 274:94; Altman, J.D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330)。还提供了对胞内淋巴因子的染色和干扰素- γ 释放测定法或ELISPOT测定法。四聚体染色、胞内淋巴因子染色和ELISPOT测定法都表现出比更常规的测定法灵敏至少10倍(Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8:177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186:859; Dunbar, P.R. et al., 1998, Curr. Biol. 8:413;)。也可使用五聚体(例如US 2004-209295A)、Dextramers(例如WO 02/072631)、和Streptamers(例如Nature medicine 6.631-637 (2002))。

[0422] 例如,在一些实施方案中,本发明提供一种用于诊断或评价被施用了至少一种本发明的UBE2T肽的受试者的免疫应答的方法,所述方法包括下述步骤:

[0423] (a) 在适合诱导对免疫原特异性的CTL的条件下使免疫原与具免疫活性细胞接触;

[0424] (b) 检测或测定步骤(a)中诱导的CTL的诱导水平; 和

[0425] (c) 将所述受试者的免疫应答与所述CTL诱导水平相关联。

[0426] 在本发明中,免疫原是下述中至少一种:具有SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56或58的氨基酸序列的UBE2T肽,和具有所述氨基酸序列中已经过1个、2个或更多个氨基酸取代而修饰的氨基酸序列的肽。同时,适合诱导免疫原特异性CTL的条件是本领域公知的。例如,可以在体外在免疫原存在下培养具免疫活性细胞来诱导免疫原特异性CTL。为了诱导免疫原特异性CTL,可以将任何刺激因子添加至细胞培养物。例如,IL-2是用于CTL诱导的优选的刺激因子。

[0427] 在一些实施方案中,对要用肽癌症疗法治疗的受试者的免疫应答的监测或评价步骤可以在治疗之前、之中和/或之后进行。一般而言,在癌症治疗规程中,反复地对要治疗的受试者施用免疫原性肽。例如,可以每周施用免疫原性肽3-10周。相应地,可以在整个癌症治疗程序中评价或监测受试者的免疫应答。或者,评价或监测免疫应答的步骤可以在治疗程序完成时进行。

[0428] 根据本发明,免疫原特异性CTL的诱导相对于对照增强,表明要评价或诊断的受试者对已施用的免疫原免疫应答。用于评价免疫应答的合适的对照可包括,例如,具免疫活性细胞未接触肽时的CTL诱导水平,或者与具有UBE2T肽之外的氨基酸序列(例如随机氨基酸序列)的对照肽接触时的CTL诱导水平。

[0429] XII. 抗体

[0430] 本发明进一步提供了与本发明的肽结合的抗体。优选的抗体特异性结合本发明的肽且不会结合(或会微弱结合)除本发明外的那些肽。

[0431] 针对本发明肽的抗体可用于癌症诊断和预后测定法。类似地,此类抗体可用于癌症的治疗、诊断、和/或预后,只要癌症中也表达或过表达UBE2T。此外,胞内表达的抗体(例如单链抗体)在治疗上可用于治疗涉及UBE2T表达的癌症,这样的癌症的例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0432] 本发明还提供了多种免疫学测定法,用于检测和/或定量UBE2T蛋白(SEQ ID NO:65)或其片段,包括由选自SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列组成的肽。在本发明的语境中,与UBE2T多肽结合的抗体优选识别由选自SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列组成的肽。抗体的结合特异性可用抑制测试来确认。即,当要分析的抗体与全长UBE2T多肽之间的结合在任何由选自SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56或58的氨基酸序列组成的片段存在下受到抑制时,显示了该抗体特异性结合该片段。在本发明的语境中,此类免疫学测定法以本领域公知的各种免疫学测定形式实施,包括但不限于各种类型的放射免疫测定法、免疫层析技术、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、酶联免疫荧光测定法(ELIFA)、等等。

[0433] 本发明的相关免疫学的但非抗体的测定法也包括T细胞免疫原性测定法(抑制性的或刺激性的)以及MHC结合测定法。另外,本发明考虑能够检测表达UBE2T的癌症的免疫学成像方法,其例子包括但不限于使用经标记的本发明抗体的放射闪烁成像方法。此类测定法在临床上可用于表达TOPK的癌症的检测、监测、和预后,表达UBE2T的癌症的例子包括但

不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0434] 本发明的抗体可以以任何形式使用,例如单克隆或多克隆抗体,而且还可包括通过用本发明的肽免疫动物(诸如家兔)而获得的抗血清、所有种类的多克隆和单克隆抗体、及通过遗传重组生成的人抗体和人源化抗体。

[0435] 本发明的抗体可识别具有选自SEQ ID NO:1,2,4,6,11,12,13,15,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,30,32,36,38,41,48,49,51,52,53,55,56和58的氨基酸序列的肽。用于合成寡肽的方法是本领域公知的。合成后,可任选在作为免疫原使用之前纯化肽。在本发明的语境中,寡肽(例如9或10聚物)可与载体缀合或连接以增强免疫原性。匙孔虫戚血蓝蛋白(KLH)作为担载体是公知的。用于缀合KLH和肽的方法也是本领域公知的。

[0436] 或者,可以将编码本发明肽的基因插入已知的表达载体,然后用该载体转化本文所述宿主细胞。可以通过任何标准方法从宿主细胞外部或内部回收所需肽,然后可将其用作抗原。或者,表达肽的完整细胞或其溶胞物或者化学合成的肽也可用作抗原。

[0437] 可以用抗原免疫任何哺乳动物,但优选考虑与用于细胞融合的亲本细胞的相容性。通常,可使用啮齿目(Rodentia)、兔形目(Lagomorpha)或灵长目(Primate)的动物。啮齿科动物包括例如小鼠、大鼠和仓鼠。兔形科动物包括例如家兔。灵长科动物包括例如狭鼻猿(Catarrhini)(东半球猴(old world monkey))诸如食蟹猴(Macaca fascicularis)、恒河猴(rhesus monkey)、狒狒(sacred baboon)和黑猩猩(chimpanzee)。

[0438] 用抗原免疫动物的方法是本领域已知的。腹膜内注射或皮下注射抗原是免疫哺乳动物的标准方法。更具体的说,可以在适量的磷酸盐缓冲盐水(PBS)、生理盐水等中稀释和悬浮抗原。如果需要,可将抗原悬浮液与适量的标准佐剂诸如弗氏(Freund)完全佐剂混合,制成乳状液,然后施用于哺乳动物。优选的是,其后每4-21天施用数次与适量弗氏不完全佐剂混合的抗原。还可使用适宜的担载体进行免疫。如上所述进行免疫后,可通过标准方法检验血清中所需抗体的量的增加。

[0439] 可以如下制备针对本发明肽的多克隆抗体:从经过免疫的哺乳动物(该哺乳动物经检验其血清中所需抗体增加)收集血液,并通过任何常规方法从血液中分离血清。多克隆抗体可包括含有多克隆抗体的血清,以及可以从所述血清中分离的、含有该多克隆抗体的级分。可以使用例如偶联有本发明肽的亲合柱从仅识别本发明肽的级分中制备免疫球蛋白G或M,并进一步使用蛋白A或蛋白G柱纯化该级分。

[0440] 为了制备单克隆抗体,从经过抗原免疫并如上所述检查出血清中所需抗体水平升高的哺乳动物收集免疫细胞,并进行细胞融合。用于细胞融合的免疫细胞可优选获自脾。其它要与上述免疫细胞融合的优选亲本细胞包括例如哺乳动物的骨髓瘤细胞,更优选具有为了用药物选择融合细胞而获得的特性的骨髓瘤细胞。

[0441] 可根据已知的方法,例如Milstein等(Galfre和Milstein,Methods Enzymol73:3-46(1981))的方法,将上述免疫细胞与骨髓瘤细胞进行融合。

[0442] 对于由细胞融合得到的杂交瘤,可在标准选择培养基诸如HAT培养基(含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基)中培养以进行选择。通常,细胞培养在HAT培养基中连续进行数天至数周,培养的时间足以使除了所需杂交瘤之外的所有其它细胞(非融合的细胞)死亡。然后,可进行标准有限稀释(standard limiting dilution)来筛选和克隆生成所需抗

体的杂交瘤细胞。

[0443] 除了上述用抗原免疫非人动物来制备杂交瘤的方法外,还可以在体外用肽、表达肽的细胞或其溶胞物免疫人淋巴细胞,诸如那些感染了EB病毒的人淋巴细胞。然后,使经过免疫的淋巴细胞与能够无限分裂的衍生自人的骨髓瘤细胞诸如U266融合,以产生期望的生成能够与所述肽结合的人抗体的杂交瘤(已公开但未审查的日本专利申请No.S 63-17688)。

[0444] 随后将所得杂交瘤移植入小鼠腹腔,并抽取腹水。所得的单克隆抗体可通过例如硫酸铵沉淀、蛋白A或蛋白G柱、DEAE离子交换层析或偶联有本发明肽的亲合柱进行纯化。本发明的抗体不仅可用于纯化和检测本发明的肽,还可以用作本发明肽的激动剂和拮抗剂的候选物。

[0445] 获得的单克隆抗体也可以使用遗传工程技术来重组制备(参见例如Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, 由MacMillan Publishers LTD在英国出版(1990))。例如,可以从生成抗体的免疫细胞诸如杂交瘤或经免疫淋巴细胞克隆编码抗体的DNA,将该DNA插入合适的载体,并导入宿主细胞以制备重组抗体。本发明还提供如上所述制备的重组抗体。

[0446] 此外,本发明的抗体可以是抗体片段或经过修饰的抗体,只要它结合本发明的肽。例如,抗体片段可以是Fab、F(ab')₂、Fv或将来自H链和L链的Fv片段通过合适的接头连接而成的单链Fv(scFv) (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-83(1988))。更具体的说,可以通过用酶诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体来生成抗体片段。或者,可以构建编码抗体片段的基因,将其插入表达载体,并在合适的宿主细胞中表达(参见例如Co et al., *J Immunol* 152:2968-76(1994); Better and Horwitz, *Methods Enzymol* 178:476-96(1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol* 178:497-515(1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121:652-63(1986); Rousseaux et al., *Methods Enzymol* 121:663-9(1986); Bird and Walker, *Trends Biotechnol* 9:132-7(1991))。

[0447] 抗体可以通过与多种分子诸如聚乙二醇(PEG)缀合来修饰。本发明提供了经过这样修饰的抗体。可通过化学修饰抗体来获得经过修饰的抗体。这些修饰方法是本领域常规的。

[0448] 或者,可以以衍生自非人抗体的可变区与衍生自人抗体的恒定区之间的嵌合抗体或者包含衍生自非人抗体的互补决定区(CDR)、衍生自人抗体的框架区(FR)及恒定区的人源化抗体的形式来获得本发明的抗体。此类抗体可依照已知技术来制备。人源化可通过用啮齿类的CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列来进行(参见例如Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536(1988))。因而,此类人源化抗体是嵌合抗体,其中人可变域的一小部分已被来自非人物种的相应序列所取代。

[0449] 也可以使用完全的人抗体,这样的抗体除了人框架区和恒定区外还包含人可变区。此类抗体可使用本领域已知的多种技术来制备。例如,体外方法包括使用展示在噬菌体上的人抗体片段的重组文库(例如Hoogenboom & Winter, *J.Mol.Biol.* 227:381(1991))。类似的,可通过将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物,例如内源免疫球蛋白基因部分或完全灭活的小鼠,来生成人抗体。该方法记载于例如美国专利Nos.6,150,584;5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016。

[0450] 可以将如上获得的抗体纯化至同质。例如,可依照用于一般蛋白质的分离和纯化方法进行抗体的分离和纯化。例如,可以通过适当选择和组合使用柱层析诸如亲和层析、过滤、超滤、盐析、透析、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦来分出和分离抗体(Antibodies: A Laboratory Manual,Ed Harlow和David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory (1988)),但并不局限于此。蛋白A柱和蛋白G柱可以用作亲和柱。例示性的可使用的蛋白A柱包括例如Hyper D、POROS和Sephacrose F.F. (Pharmacia)。

[0451] 除亲和力外的例示性层析包括例如离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤、反相层析、吸附层析、等等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual,Ed Daniel R.Marshak et al.,Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。可以通过液相层析来进行层析规程,诸如HPLC和FPLC。

[0452] 例如,可使用吸光度测量、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、酶免疫测定法(EIA)、放射免疫测定法(RIA)和/或免疫荧光来测量本发明抗体的抗原结合活性。在ELISA中,将本发明的抗体固定化在板上,将本发明的肽施加到该板上,再施加含有所需抗体的样品,诸如生成抗体的细胞的培养物上清液或纯化的抗体。然后施加用酶(诸如碱性磷酸酶)标记的、识别第一抗体的第二抗体,并将板温育。接着,在洗涤后,向板中加入酶底物,诸如磷酸对硝基苯酯,并测量吸光度以评估样品的抗原结合活性。可以使用BIAcore (Pharmacia) 来评估本发明抗体的活性。

[0453] XII. 载体和宿主细胞

[0454] 本发明还提供了导入有编码本发明肽的多核苷酸的载体和宿主细胞。本发明的载体可用于在宿主细胞中保持本发明的多核苷酸、尤其是DNA,用于表达本发明的肽,或者用于施用本发明的多核苷酸以用于基因疗法。

[0455] 当大肠杆菌是宿主细胞且在大肠杆菌(例如JM109、DH5 α 、HB101或XL1Blue)中大量扩增和生成载体时,载体应具有在大肠杆菌中扩增的“(复制)起点”和用于选择经过转化的大肠杆菌的标志基因(例如通过药物诸如氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素等进行选择的药物抗性基因)。例如,可以使用M13系列载体、pUC系列载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script等。另外,与上述载体一样,pGEM-T、pDIRECT和pT7也可以用于亚克隆和提取cDNA。当使用载体来生成本发明的肽时,表达载体是有用的。例如,要在大肠杆菌中表达的表达载体应具备上述在大肠杆菌中扩增的特征。当使用大肠杆菌诸如JM109、DH5 α 、HB101或XL1Blue作为宿主细胞时,载体应具有能在大肠杆菌中高效表达所需基因的启动子,例如lacZ启动子(Ward et al.,Nature 341:544-6 (1989);FASEB J 6:2422-7 (1992))、araB启动子(Better et al.,Science 240:1041-3 (1988))、T7启动子等。在这方面,可以使用例如pGEX-5X-1 (Pharmacia)、“QIAexpress系统”(Qiagen)、pEGFP和pET(在这种情况下,宿主优选为表达T7RNA聚合酶的BL21)来取代上述载体。另外,载体还可以包含用于肽分泌的信号序列。指导肽分泌至大肠杆菌周质的例示性信号序列有pelB信号序列(Lei et al.,J Bacteriol 169:4379 (1987))。用于将载体导入靶宿主细胞的手段包括例如氯化钙法和电穿孔法。

[0456] 除了大肠杆菌外,还可以使用例如衍生自哺乳动物的表达载体(例如pcDNA3 (Invitrogen)和pEGF-BOS (Mizushima S等,Nucleic Acids Res 18(17):5322 (1990))、pEF、pCDM8)、衍生自昆虫细胞的表达载体(例如“Bac-to-BAC杆状病毒表达系统”(GIBCO

BRL)、pBacPAK8)、衍生自植物的表达载体(例如pMH1、pMH2)、衍生自动物病毒的表达载体(例如pHSV、pMV、pAdexLcw)、衍生自逆转录病毒的表达载体(例如pZIpneo)、衍生自酵母的表达载体(例如“毕赤酵母表达试剂盒”(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)及衍生自枯草芽孢杆菌的表达载体(例如pPL608、pKTH50)来生成本发明的肽。

[0457] 为了在动物细胞诸如CHO、COS或NIH3T3细胞中表达载体,载体应具有在所述细胞中进行表达所必需的启动子,例如SV40启动子(Mulligan et al., Nature 277:108 (1979))、MMLV-LTR启动子、EF1 α 启动子(Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18:5322 (1990))、CMV启动子、等等,及优选用于选择转化子的标志基因(例如通过药物(例如新霉素、G418)进行选择的药物抗性基因)。具有这些特征的已知载体的例子包括例如pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV和pOP13。

[0458] 虽然与本文中描述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明的实施或测试,但是描述了合适的方法和材料。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过提及完整收入。在冲突的情况中,应当以本说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法和例子仅仅是例示性的而并不意图为限制性的。

实施例

[0459] 材料和方法

[0460] 细胞系

[0461] HLA-A*2402阳性B-淋巴母细胞样细胞系TISI购自IHWG细胞和基因库(Seattle WA)。HLA-A*0201阳性B-淋巴母细胞样细胞系T2和非洲绿猴肾细胞系COS7购自ATCC。

[0462] 衍生自UBE2T的肽的候选者选择

[0463] 使用“NetMHC3.2”结合预测服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>)(Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62 (5):378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003 May, 12 (5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12; 20 (9):1388-97)和“BIMAS”(http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)(Parker et al., J Immunol 1994, 152 (1):163-75, Kuzushima et al., Blood 2001, 98 (6):1872-81)预测了衍生自UBE2T的结合HLA-A*2402分子或HLA-A*0201分子的9聚体和10聚体肽。这些肽由Biosynthesis (Lewisville, Texas)根据标准固相合成法合成,并通过反相高效液相色谱(HPLC)纯化。分别通过分析型HPLC和质谱分析来确定肽的纯度(>90%)和身份。将肽以20mg/ml溶解在二甲基亚砜中并保存于-80℃。

[0464] 体外CTL诱导

[0465] 使用单核细胞衍生的树突细胞(DC)作为抗原呈递细胞来诱导针对呈递在人白细胞抗原(HLA)上的肽的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答。如他处所述(Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63 (14):4112-8)体外制备DC。具体地说,对于用Ficoll-Plaque (Pharmacia)溶液从正常志愿者(HLA-A*2402或HLA-A*0201阳性)分离的外周血单个核细胞,通过粘附塑料组织培养盘(Becton Dickinson)加以分离,以将它们作为单核细胞级分加以富集。将富集了单核细胞的群体在含2%热灭活的自体血清(AS)的AIM-V培养基(Invitrogen)中,在1000U/ml的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(R&D System)和1000U/ml白介素(IL)-4(R&D System)的存在下培养。培养7天后,将经细胞因子诱导的DC在AIM-V培

培养基中在3微克/ml β 2-微球蛋白存在下用20微克/ml每一种合成肽于37℃冲激3小时。所生成的细胞表现上在它们的细胞表面上表达DC相关分子,诸如CD80、CD83、CD86和HLA II类(数据未显示)。然后将这些经肽冲激的DC用X辐照(20Gy)灭活,并以1:20比例与用CD8阳性分离试剂盒(Dyna1)通过正选择获得的自体CD8⁺T细胞混合。在48孔板(Corning)中设立这些培养物;每个孔在0.5ml AIM-V/2%AS培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的DC、 3×10^5 个CD8⁺T细胞和10ng/ml IL-7(R&D System)。3天后,给这些培养物补充IL-2(CHIRON)至终浓度20IU/ml。在第7天和第14天,将这些T细胞用经肽冲激的自体DC进一步刺激。DC每次通过与上文所述相同的方式来制备。在第21天在第三轮肽刺激后针对经肽冲激的TISI或肽脉冲的TS细胞测试CTL(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001,84(1):94-9;Umano Y et al., Br J Cancer 2001,84(8):1052-7;Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004,10(24):8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006,97(5):411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005,96(8):498-506)。

[0466] CTL扩增规程

[0467] 使用与Riddell等人(Walter EA et al., N Engl J Med 1995,333(16):1038-44;Riddell SR et al., Nat Med 1996,2(2):216-23)记载的方法相似的方法在培养中扩增CTL。在40ng/ml抗CD3单克隆抗体(Pharmingen)存在下,将总共 5×10^4 个CTL在具有经丝裂霉素C灭活的两种人B-淋巴母细胞样细胞系的25ml AIM-V/5%AS培养基中悬浮。启动培养后一天,向培养物添加120IU/ml IL-2。在第5天、第8天和第11天给培养物补加新鲜的含有30IU/ml IL-2的AIM-V/5%AS培养基(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001,84(1):94-9;Umano Y et al., Br J Cancer 2001,84(8):1052-7;Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004,10(24):8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006,97(5):411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005,96(8):498-506)。

[0468] CTL克隆的建立

[0469] 在96圆底微量滴定板(Nalge Nunc International)中进行稀释以获得0.3、1和3个CTL/孔。在总共150微升/孔的含5%AS的AIM-V培养基中,将CTL与 1×10^4 个细胞/孔的两种人B-淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml的抗CD3抗体,和125U/ml的IL-2一起培养。10天后向培养基中加入50微升/孔的IL-2以达到终浓度125U/ml的IL-2。在第14天测试CTL活性,并使用如上所述的相同方法扩增CTL克隆(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004,10(24):8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006,97(5):411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005,96(8):498-506)。

[0470] 特异性CTL活性

[0471] 为了检查特异性CTL活性,实施了干扰素(IFN)- γ 酶联免疫斑点(ELISPOT)测定法和IFN- γ 酶联免疫吸附测定法(ELISA)。具体地,制备经肽脉冲的TISI或经肽脉冲的T2细胞(1×10^4 /孔)作为刺激细胞。使用48孔中培养的小区作为应答细胞。依照制造商的规程实施IFN- γ ELISPOT测定法和IFN- γ ELISA测定法。

[0472] 强迫表达靶基因和/或HLA-A24或HLA-A2的细胞的建立

[0473] 通过PCR来扩增编码UBE2T可读框或HLA-A*2402或HLA-A*0201的cDNA。将PCR扩增产物克隆入表达载体。使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)依照制造商推荐的规程将载体转染入COS7细胞(其是UBE2T无义、HLA-A*2402无义和HLA-A*0201无义细胞系)。自转染起

2天后,用Versene (Invitrogen) 收获经转染的细胞,并用作CTL活性测定法的靶细胞 (5X 10⁴个细胞/孔)。

[0474] 结果

[0475] 癌症中升高的UBE2T表达

[0476] 利用cDNA微阵列从不同癌症中获得了广泛的基因表达谱数据,显示UBE2T (GenBank Accession No.NM_014176 (SEQ ID No:64)) 表达升高。与相应的正常组织相比,UBE2T表达在24例膀胱癌中的24例,50例乳腺癌中的44例,15例宫颈癌中的14例,12例胆管细胞癌中的12例,16例CML中的9例,9例结直肠癌中的9例,47例食管癌中的31例,8例胃癌中的5例,2例弥漫型胃癌中的2例,27例NSCLC中的23例,3例淋巴瘤中的3例,16例骨肉瘤中的9例,7例卵巢癌中的3例,3例胰腺癌中的3例,23例前列腺癌中的21例,12例SCLC中的12例,26软组织肿瘤中的11例和9例睾丸肿瘤中的7例中有效升高(表1)。

[0477] [表1]

[0478] 与正常相应组织相比在癌性组织中观察到的UBE2T上调的病例的比例

癌症/肿瘤	比率
膀胱癌	24/24
乳腺癌	44/50
宫颈癌	14/15
胆管细胞癌	12/12
CML	9/16
结直肠癌	9/9
食管癌	31/47
胃癌	5/8
弥漫型胃癌	2/2
NSCLC	23/27
淋巴瘤	3/3
骨肉瘤	9/16
卵巢癌	3/7
胰腺癌	3/3
前列腺癌	21/23
SCLC	12/12
软组织肿瘤	11/26
睾丸肿瘤	7/9

[0480] 衍生自UBE2T的HLA-A24结合肽的预测

[0481] 表2a和2b以高结合亲和力的顺序显示了UBE2T的HLA-A24结合性9聚体和10聚体肽。选择并检查了总共27种具有潜在HLA-A24结合能力的肽,以确定表位肽。

[0482] [表2a]

[0483] 衍生自UBE2T的HLA-A24结合9聚体肽

[0484]

SEQ ID NO	起始位置	氨基酸位置	Kd (nM)
1	60	RYPFEPPQI	25
2	45	PYEKGVFKL	752
3	124	LMADISSEF	1463
4	133	KYNKPAFLK	2283
5	55	VIIPERYPF	3082
6	138	AFLKNARQW	3317
7	6	RLKRELHML	3711
8	71	LTPIYHPNI	4077
9	131	EFKYNKPAF	4692
10	62	PFEPPQIRF	7647
11	43	NTPYEKGVF	9498
12	106	TVLTSIQLL	9831
SEQ ID NO	起始位置	氨基酸位置	结合得分
13	3	RASRLKREL	10.56
14	84	RICLDVLKL	8.8
15	105	ATVLTISIQL	6
16	74	IYHPNIDSA	6

[0485] [表2b]

[0486] 衍生自UBE2T的HLA-A24结合10聚体肽

[0487]

SEQ ID NO	起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)
17	130	SEFKYNKPAF	776
18	123	PLMADISSEF	5392
19	131	EFKYNKPAFL	7050
SEQ ID NO	起始位置	氨基酸序列	结合得分
20	133	KYNKPAFLKN	19.8
21	99	RPSLNIA TVL	11.2
22	154	KQKADEE EML	8
23	105	ATVLTISIQLL	7.2
24	115	MSEPNPDDPL	7.2
25	177	STQKRKASQL	6
26	30	QMDDLRAQIL	5.76
27	44	TPYEKGVFKL	5.28

[0488] 起始位置指示从UBE2T的N端起氨基酸残基的数字。

[0489] 结合得分和解离常数[Kd (nM)]分别从“BIMAS”和“NetMHC3.2”得到。

[0490] 衍生自UBE2T的HLA-A02结合肽的预测

[0491] 表3a和3b以高结合亲和力的顺序显示了UBE2T的HLA-A02结合性9聚体和10聚体

肽。选择并检查了总共36种具有潜在HLA-A02结合能力的肽,以确定表位肽。

[0492] [表3a]

[0493] 衍生自UBE2T的HLA-A02结合9聚体肽

[0494]

SEQ ID NO	起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)
28	161	EMLDNLPEA	76
29	107	VLTSIOLLM	385
30	30	QMDDLRAQT	473
31	103	NIATVLTST	668
32	106	TVLTSIQLL	1048
33	124	LMADISSEF	1595
34	6	RLKRELHML	1653
35	101	SLNIATVLT	3347
36	49	GVFKLEVII	5114
37	70	FLTPIYHPN	5950
38	13	MLATEPPPG	6039
39	84	RICLDVLKL	6284
40	66	PQIRFLTPI	6587
41	132	FKYNKPAFL	6642
42	96	GAWRPSLNI	8188
43	81	SAGRICLDV	8938
44	14	LATEPPPGI	9511
45	105	ATVLTSIQL	9872
SEQ ID NO	起始位置	氨基酸序列	结合得分
46	139	FLKNARQWT	6.599

[0495] [Table 3b]

[0496] 衍生自UBE2T的HLA-A02结合10聚体肽

[0497]

SEQ ID NO	起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)
47	13	MLATEPPPGI	43
48	70	FLTPIYHPNI	49
49	6	RLKRELHMLA	1415
50	165	NLPEAGDSRV	1902
51	106	TVLTSIQLLM	2648
52	102	LNIA TVLTSTI	3011
53	30	QMDDLRAQIL	4035
54	12	HMLATEPPPG	4153
55	101	SLNIATVLTST	4622
56	29	DQMDDLRAQI	5029

57	105	ATVLTSIQLL	5128
58	38	ILGGANTPYE	6464
59	107	VLTSIQLLMS	7911
60	161	EMLDNLPEAG	9002
61	113	LLMSEPNPDD	9132
62	104	IATVLTSIQL	9157
SEQ ID NO	起始位置	氨基酸序列	结合得分
63	44	TPYEKGVFKL	24.406

[0498] 起始位置指示从UBE2T的N端起氨基酸残基的数字。

[0499] 结合得分和解离常数[Kd(nM)]分别从“BIMAS”和“NetMHC3.2”得到。

[0500] 使用预测的来自UBE2T的HLA-A*2402限制型肽诱导CTL

[0501] 使用“材料和方法”中描述的规程制备了针对衍生自UBE2T的肽的CTL。通过IFN- γ ELISPOT测定法测定了肽特异性CTL活性(图1)。显示了用UBE2T-A24-9-60(SEQ ID NO:1)(a)刺激的8号孔,用UBE2T-A24-9-45(SEQ ID NO:2)(b)刺激的1号孔,用UBE2T-A24-9-133(SEQ ID NO:4)(c)刺激的6号孔,用UBE2T-A24-9-138(SEQ ID NO:6)(d)刺激的6号孔,用UBE2T-A24-9-43(SEQ ID NO:11)(e)刺激的4号孔,用UBE2T-A24-9-106(SEQ ID NO:12)(f)刺激的2号孔,用UBE2T-A24-9-3(SEQ ID NO:13)(g)刺激的6号孔,用UBE2T-A24-9-105(SEQ ID NO:15)(h)刺激的3号孔,用UBE2T-A24-10-130(SEQ ID NO:17)(i)刺激的2号孔,用UBE2T-A24-10-131(SEQ ID NO:19)(j)刺激的1号孔,用UBE2T-A24-10-133(SEQ ID NO:20)(k)刺激的3号孔,用UBE2T-A24-10-99(SEQ ID NO:21)(l)刺激的6号孔,用UBE2T-A24-10-154(SEQ ID NO:22)(m)刺激的7号孔,用UBE2T-A24-10-105(SEQ ID NO:23)(n)刺激的8号孔,用UBE2T-A24-10-115(SEQ ID NO:24)(o)刺激的1号孔,用UBE2T-A24-10-177(SEQ ID NO:25)(p)刺激的4号孔和用UBE2T-A24-10-44(SEQ ID NO:27)(q)刺激的7号孔与对照孔相比显示了强的IFN- γ 生成。另一方面,用表2a和2b所示的其他肽刺激没有检测到特异性CTL活性,尽管那些肽具有可能的HLA-A*2402结合活性。作为典型的阴性数据的例子,没有显示从用UBE2T-A24-9-124(SEQ ID NO:3)(r)刺激的CTL的特异性IFN- γ 生成。因此,其指示了选择17种衍生自UBE2T的肽作为能诱导强CTL的肽。

[0502] 使用预测的来自UBE2T的HLA-A*0201限制型肽诱导CTL

[0503] 根据如“材料和方法”中描述的方案生成衍生自UBE2T的那些肽的CTL。通过IFN- γ ELISPOT测定法检测肽特异性CTL活性(图2)。显示了用UBE2T-A02-9-107(SEQ ID NO:29)(a)刺激的4号孔,用UBE2T-A02-9-30(SEQ ID NO:30)(b)刺激的5号孔,用UBE2T-A02-9-106(SEQ ID NO:32)(c)刺激的7号孔,用UBE2T-A02-9-49(SEQ ID NO:36)(d)刺激的5号孔,用UBE2T-A02-9-13(SEQ ID NO:38)(e)刺激的3号孔,用UBE2T-A02-9-132(SEQ ID NO:41)(f)刺激的4号孔,用UBE2T-A02-10-70(SEQ ID NO:48)(g)刺激的6号孔,用UBE2T-A02-10-6(SEQ ID NO:49)(h)刺激的7号孔,用UBE2T-A02-10-106(SEQ ID NO:51)(i)刺激的8号孔,用UBE2T-A02-10-102(SEQ ID NO:52)(j)刺激的2号孔,用UBE2T-A02-10-30(SEQ ID NO:53)(k)刺激的1号孔,用UBE2T-A02-10-101(SEQ ID NO:55)(l)刺激的8号孔,用UBE2T-A02-10-29(SEQ ID NO:56)(m)刺激的5号孔和用UBE2T-A02-10-38(SEQ ID NO:58)(n)刺激的3号孔与对照孔相比显示了强的IFN- γ 生成。另一方面,用表3a和3b所示的其他肽刺激没有

检测到特异性CTL活性,尽管那些肽具有可能的HLA-A*0201结合活性。作为典型的阴性数据的例子,没有显示从用UBE2T-A02-9-161 (SEQ ID NO:28) (o) 刺激的CTL的特异性IFN- γ 生成。因此,其指示选择14种衍生自UBE2T的肽作为能诱导强CTL的肽。

[0504] 针对衍生自UBE2T的肽的特异性CTL系和克隆的建立

[0505] 对于用UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1) (a) 刺激的8号孔,用UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO:2) (b) 刺激的1号孔,用UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO:13) (c) 刺激的6号孔,用UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO:27) 刺激的7号孔中通过IFN- γ ELISPOT测定法检测显示出肽特异性CTL活性的细胞进行扩增并建立CTL系。通过IFN- γ ELISA测定法测定这些CTL系的CTL活性(图3)。与未经肽脉冲的靶细胞相比,显示CTL系针对经相应肽脉冲的靶细胞均展现出强的IFN- γ 生成。此外,如“材料和方法”中所述从CTL系通过有限稀释建立CTL克隆,并通过IFN- γ ELISA测定这些CTL克隆针对用相应肽脉冲的T1SI细胞的IFN- γ 生成。从用UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1) (a), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO:2) (b) 和UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO:13) (c) 刺激的CTL克隆测得了强的IFN- γ 生成(图4)。

[0506] 用UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO:29) (a) 刺激的4号孔,用UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO:38) (b) 刺激的3号孔,用UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48) (c) 刺激的6号孔,用UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO:52) (d) 刺激的2号孔,用UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO:55) (e) 刺激的8号孔中通过IFN- γ ELISPOT测定法检测显示出肽特异性CTL活性的细胞进行扩增并建立CTL系。通过IFN- γ ELISA测定法测定这些CTL系的CTL活性(图5)。与未经肽脉冲的靶细胞相比,显示CTL系针对经相应肽脉冲的靶细胞均展现出强的IFN- γ 生成。此外,如“材料和方法”中所述从CTL系通过有限稀释建立CTL克隆,并通过IFN- γ ELISA测定法测定这些CTL克隆针对用相应肽脉冲的T2细胞的IFN- γ 生成。从用UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO:29) (a), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO:38) (b), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48) (c), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO:52) (d) 和UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO:55) (e) 刺激的CTL克隆测得了强的IFN- γ 生成(图6)。

[0507] 针对表达UBE2T和HLA-A*2402或HLA-A*0201的靶细胞的特异性CTL活性

[0508] 针对对UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1) 肽产生的建成CTL克隆,检查其识别表达UBE2T和HLA-A*2402分子的靶细胞的能力。制备用全长UBE2T和HLA-A*2402基因两者转染的COS7细胞(表达TOPK和HLA-A*2402基因的靶细胞的特异性模型)作为刺激细胞,以及用全长UBE2T或HLA-A*2402转染的COS7细胞作为对照。在图7中,经UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1) 刺激的CTL克隆针对表达UBE2T和HLA-A*2402二者的COS7细胞显示出强的CTL活性。另一方面,没有检测到显著的针对对照的特异性CTL活性。因此,这些数据清楚地证明UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1) 肽被内源地加工并与HLA-A*2402分子一起被呈递在靶细胞上,并被CTL识别。这些结果指示衍生自UBE2T的此肽可以用于对具有表达UBE2T的肿瘤的患者应用癌症疫苗。

[0509] 针对对UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48) 肽产生的建成CTL克隆,检查其识别表达UBE2T和HLA-A*0201分子的靶细胞的能力。制备用全长UBE2T和HLA-A*0201基因两者转染的COS7细胞(表达UBE2T和HLA-A*0201基因的靶细胞的特异性模型)作为刺激细胞,以及用全长UBE2T或HLA-A*0201转染的COS7细胞作为对照。在图8中,经UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48) 刺激的CTL系针对表达UBE2T和HLA-A*0201二者的COS7细胞显示出强的CTL活性。另

一方面,没有检测到显著的针对对照的特异性CTL活性。因此,这些数据清楚地证明UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48) 肽被内源地加工并与HLA-A*0201分子一起被呈递在靶细胞上,并被CTL识别。这些结果表明这种从UBE2T衍生的肽可适合作为癌症疫苗用于治疗具有表达UBE2T的肿瘤的患者。

[0510] 对抗原肽的同源性分析

[0511] 经UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO:2), UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO:4), UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO:6), UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO:11), UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO:12), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO:13), UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO:15), UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO:17), UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO:19), UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO:20), UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO:21), UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO:22), UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO:23), UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO:24), UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO:25), UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO:27), UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO:29), UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO:30), UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO:32), UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO:36), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO:38), UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO:41), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48), UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO:49), UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO:51), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO:52), UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO:53), UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO:55), UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO:56) 和 UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO:58) 刺激的CTL显示出显著的且特异的CTL活性。这个结果可能是由于序列UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO:2), UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO:4), UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO:6), UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO:11), UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO:12), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO:13), UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO:15), UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO:17), UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO:19), UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO:20), UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO:21), UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO:22), UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO:23), UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO:24), UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO:25), UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO:27), UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO:29), UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO:30), UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO:32), UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO:36), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO:38), UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO:41), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48), UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO:49), UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO:51), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO:52), UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO:53), UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO:55), UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO:56) 和 UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO:58) 与其它已知可使人免疫系统致敏的分子衍生的肽同源。为了排除这种可能性,使用BLAST算法 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) 使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有发现具有显著同源性的序列。同源性分析的结果指示UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO:1), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO:2), UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO:4), UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO:6), UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO:11), UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO:12), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO:13), UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO:15), UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO:17), UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO:19), UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO:20), UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO:21), UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO:22), UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO:23), UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO:24),

UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO:25), UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO:27), UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO:29), UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO:30), UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO:32), UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO:36), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO:38), UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO:41), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO:48), UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO:49), UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO:51), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO:52), UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO:53), UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO:55), UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO:56) 和 UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO:58) 的序列是独特的, 因此, 就我们所知, 这些分子产生对一些无关分子的不期望的免疫学应答的可能性很小。总之, 鉴定了新的衍生自UBE2T的HLA-A*2402或HLA-A*0201表位肽。此外, 证明了UBE2T的表位肽可以适用于癌症免疫治疗。

[0512] 工业应用性

[0513] 本发明提供了新的衍生自UBE2T的表位肽, 它们可诱导强而特异性的抗肿瘤免疫应答, 并且可应用于广泛的癌症类型。这样的肽可作为肽疫苗用于UBE2T相关疾病, 例如癌症, 更具体地膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、CML、结直肠癌、食道癌、胃癌、弥漫型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、SCLC、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0514] 虽然本文中参照其具体实施方案详细地描述了本发明, 但是要理解, 上面的描述本质上是例示性的和解释性的, 而且意图例示本发明及其优选实施方案。经由常规实验, 本领域技术人员会容易地认识到, 可以对本发明进行各种变化和修饰, 而不偏离本发明的精神和范围, 本发明的边界和范围由所附权利要求来限定。

<110> 肿瘤疗法科学股份有限公司

<120> UBE2T 肽及包含它们的疫苗

<130> ONC-A1213P

<150> US 61/699,550

<151> 2012-09-11

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 1

Arg Tyr Pro Phe Glu Pro Pro Gln Ile
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

[0001]

<400> 2

Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 3

Leu Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 4

Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu Lys
1 5

<210> 5

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 5

Val Ile Ile Pro Glu Arg Tyr Pro Phe
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 6

Ala Phe Leu Lys Asn Ala Arg Gln Trp
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

[0002]

<400> 7

Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 8

Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 9

Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 10

Pro Phe Glu Pro Pro Gln Ile Arg Phe
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 11

Asn Thr Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 12

[0003]

Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 13

Arg Ala Ser Arg Leu Lys Arg Glu Leu
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 14

Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 15
Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 16
Ile Tyr His Pro Asn Ile Asp Ser Ala
1 5

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 17
Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe
1 5 10

[0004]

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 18
Pro Leu Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 19
Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 20

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

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 21

Arg Pro Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu
1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 22

Lys Gln Lys Ala Asp Glu Glu Glu Met Leu
1 5 10

[0005]

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 23

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

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 24

Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp Pro Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 25

Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 26

Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 27

Thr Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 28

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 29

Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 30

Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile

[0006]

[0007]

1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 31
Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 32
Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 33
Leu Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 34
Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 35
Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr
1 5

[0008]

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 36

Gly Val Phe Lys Leu Glu Val Ile Ile
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 37

Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 38

Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 39

Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 40

Pro Gln Ile Arg Phe Leu Thr Pro Ile
1 5

<210> 41

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 41

Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 42

Gly Ala Trp Arg Pro Ser Leu Asn Ile
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

[0009]

<400> 43

Ser Ala Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 44

Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly Ile
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 45

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 46

Phe Leu Lys Asn Ala Arg Gln Trp Thr
1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 47

Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly Ile
1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 48

[0010]

Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile
1 5 10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 49

Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu Ala
1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 50

Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser Arg Val
1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 51
Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 52
Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 53
Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu
1 5 10

[0011]

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 54
His Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly
1 5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 55
Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 56

Asp Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile
1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 57

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

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 58

Ile Leu Gly Gly Ala Asn Thr Pro Tyr Glu
1 5 10

[0012]

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 59

Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met Ser
1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 60

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly
1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 61

[0013]

Leu Leu Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp
1 5 10

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 62

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

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 UBE2T 的肽

<400> 63

Thr Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu
1 5 10

<210> 64
<211> 935
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (137).. (730)

<400> 64
agtcagaggt cgcgcaggcg ctggtacccc gtgggtccgc ggggtgcgc gtgigaggg 60

gtgicagctc agigcacc cc aggcagctct tagtgtggag cagigaactg tgtgtggtc 120

cttctacttg gggatc atg cag aga gct tca cgt ctg aag aga gag ctg cac 172
Met Gln Arg Ala Ser Arg Leu Lys Arg Glu Leu His
1 5 10

atg tta gcc aca gag cca ccc cca ggc atc aca tgt tgg caa gat aaa 220
Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly Ile Thr Cys Trp Gln Asp Lys
15 20 25

gac caa atg gat gac ctg cga gct caa ata tta ggt gga gcc aac aca 268
Asp Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu Gly Gly Ala Asn Thr
30 35 40

cct tat gag aaa ggt gtt ttt aag cta gaa gtt atc att cct gag agg 316
Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu Glu Val Ile Ile Pro Glu Arg
45 50 55 60

tac cca ttt gaa cct cct cag atc cga ttt ctg act cca att tat cat 364
Tyr Pro Phe Glu Pro Pro Gln Ile Arg Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His
65 70 75

cca aac att gat tct gct gga agg att tgt ctg gat gtt ctg aaa ttt 412
Pro Asn Ile Asp Ser Ala Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu
80 85 90

	cca cca aaa ggt gct tgg aga cca tcc ctc aac atc gca act gtg ttg Pro Pro Lys Gly Ala Trp Arg Pro Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu 95 100 105	460
	acc tct att cag ctg ctc atg tca gaa ccc aac cct gat gac cag ctc Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp Pro Leu 110 115 120	508
	atg gct gac ata tcc tca gaa ttt aaa tat aat aag cca gcc ttc ctc Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu 125 130 135 140	556
	aag aat gcc aga cag tgg aca gag aag cat gca aga cag aaa caa aag Lys Asn Ala Arg Gln Trp Thr Glu Lys His Ala Arg Gln Lys Gln Lys 145 150 155	604
	gct gat gag gaa gag atg ctt gat aat cta cca gag gct ggt gac tcc Ala Asp Glu Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser 160 165 170	652
	aga gta cac aac tca aca cag aaa agg aag gcc agt cag cta gta ggc Arg Val His Asn Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu Val Gly 175 180 185	700
	ata gaa aag aaa ttt cat cct gat gtt tag gggacttgct ctgggtcctc Ile Glu Lys Lys Phe His Pro Asp Val 190 195	750
	ttagttaatg tgtcttttgc caaggigatc taagtigccct accttgaatt tttttttaa 810	
	tatatattgat gacataaatt ttgtgtagtt tatattatctt gtacataatgt attttgaaat 870	
	cttttaaacc tgaanaataa atagicaltt aaigtigaan aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 930	
[0014]	aaaaa	935
	<210> 65 <211> 197 <212> PRT <213> 人	
	<400> 65	
	Met Gln Arg Ala Ser Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu Ala Thr 1 5 10 15	
	Glu Pro Pro Pro Gly Ile Thr Cys Trp Gln Asp Lys Asp Gln Met Asp 20 25 30	
	Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu Gly Gly Ala Asn Thr Pro Tyr Glu Lys 35 40 45	
	Gly Val Phe Lys Leu Glu Val Ile Ile Pro Glu Arg Tyr Pro Phe Glu 50 55 60	
	Pro Pro Gln Ile Arg Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile Asp 65 70 75 80	
	Ser Ala Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu Pro Pro Lys Gly 85 90 95	
	Ala Trp Arg Pro Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln 100 105 110	

Leu Leu Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp Pro Leu Met Ala Asp Ile
115 120 125

Ser Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu Lys Asn Ala Arg
130 135 140

Gln Trp Thr Glu Lys His Ala Arg Gln Lys Gln Lys Ala Asp Glu Glu
145 150 155 160

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser Arg Val His Asn
165 170 175

Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu Val Gly Ile Glu Lys Lys
180 185 190

Phe His Pro Asp Val
195

<210> 66
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于 TCR 分析的 PCR 引物

<400> 66
gtctaccagg cattcgcttc at 22

[0015]

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于 TCR 分析的 PCR 引物

<400> 67
tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

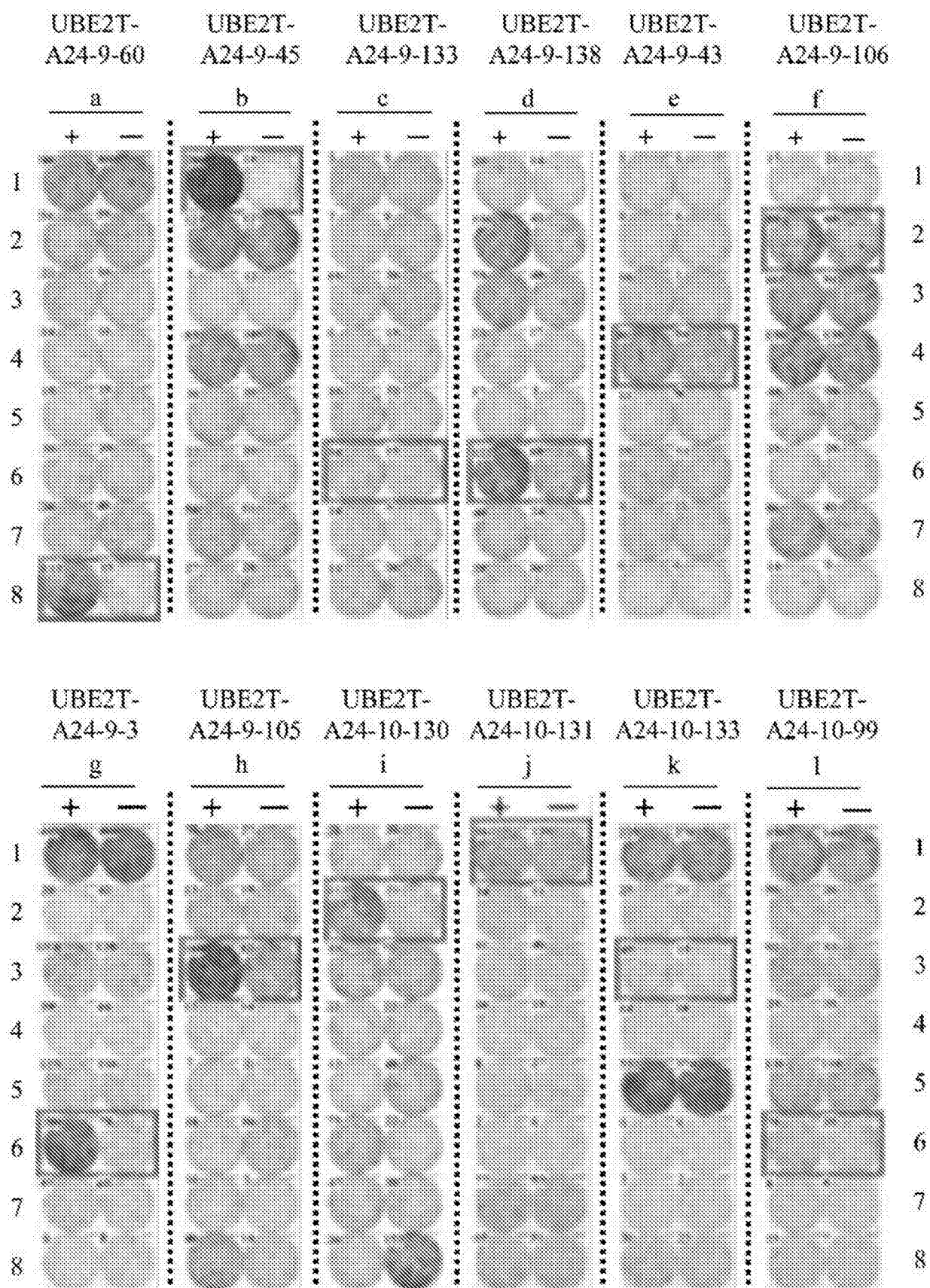
<220>
<223> 用于 TCR 分析的 PCR 引物

<400> 68
tcagaaatcc ttctctctga c 21

<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于 TCR 分析的 PCR 引物

<400> 69
ctagcctctg gaatccttc tctt 24



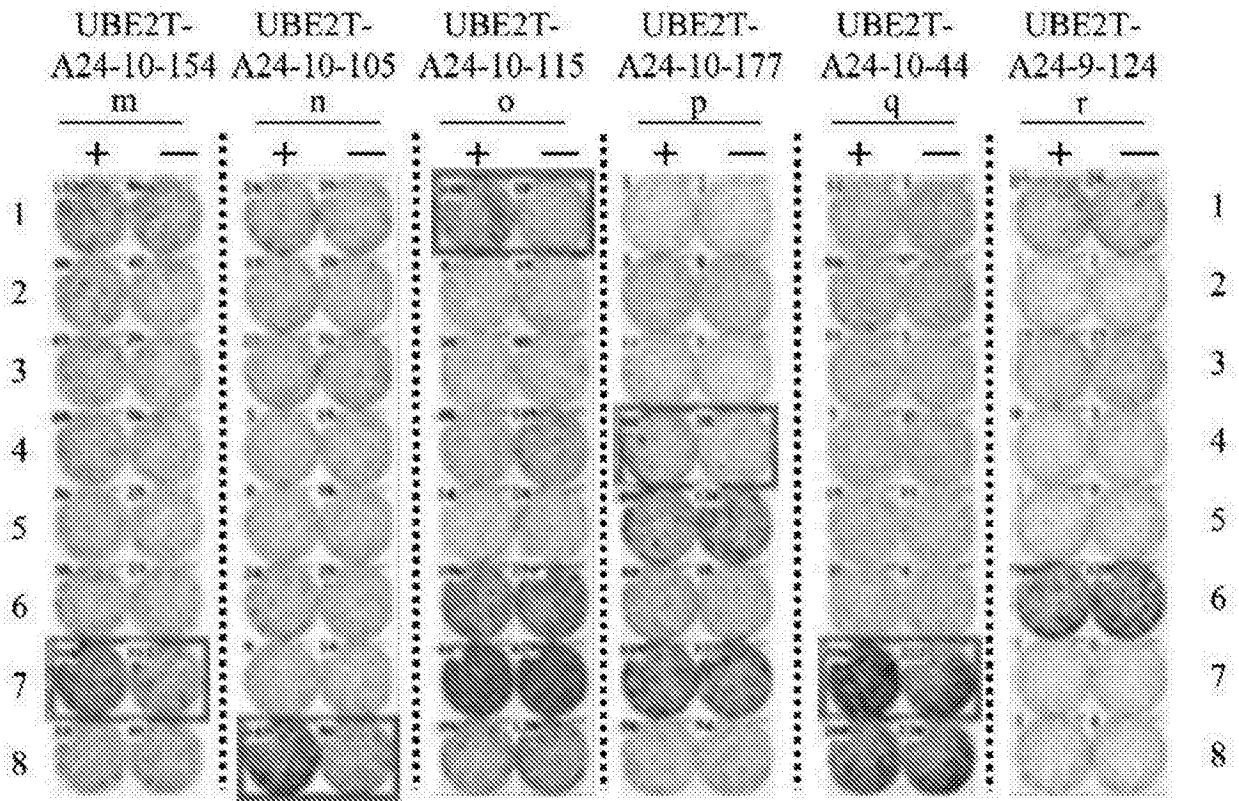
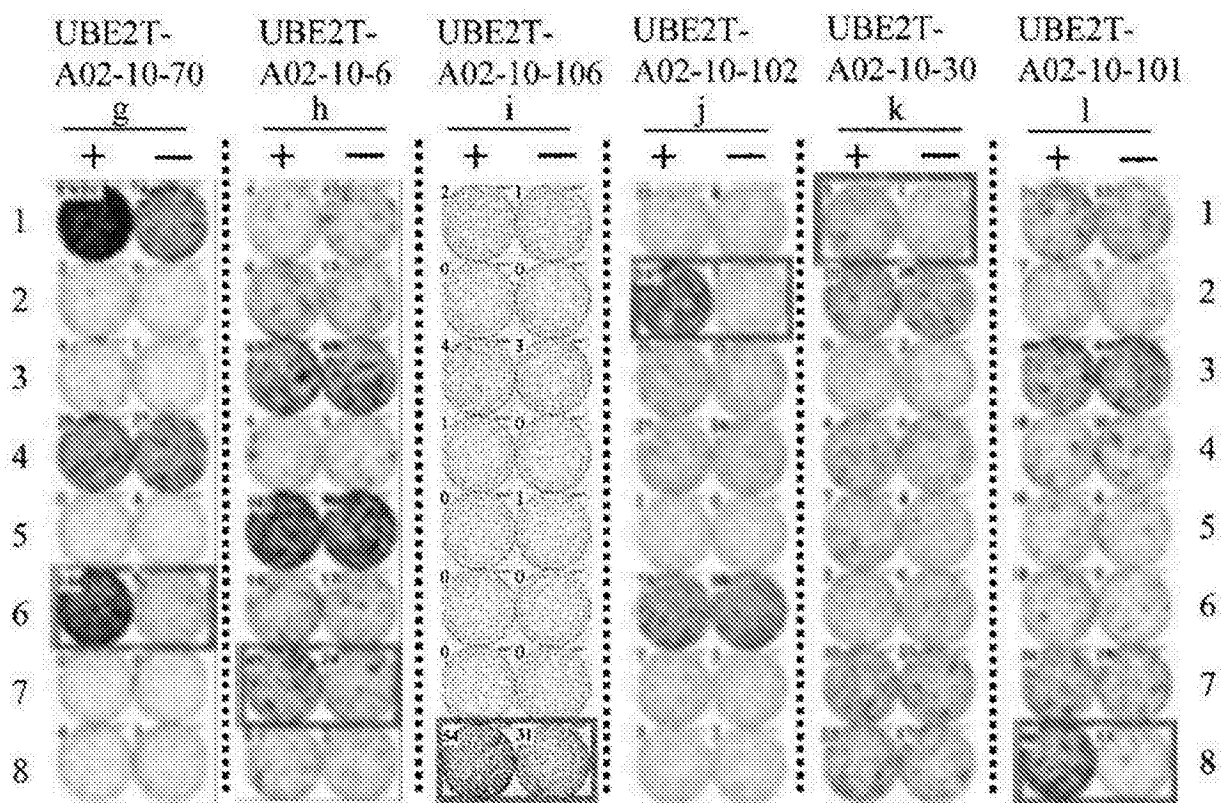
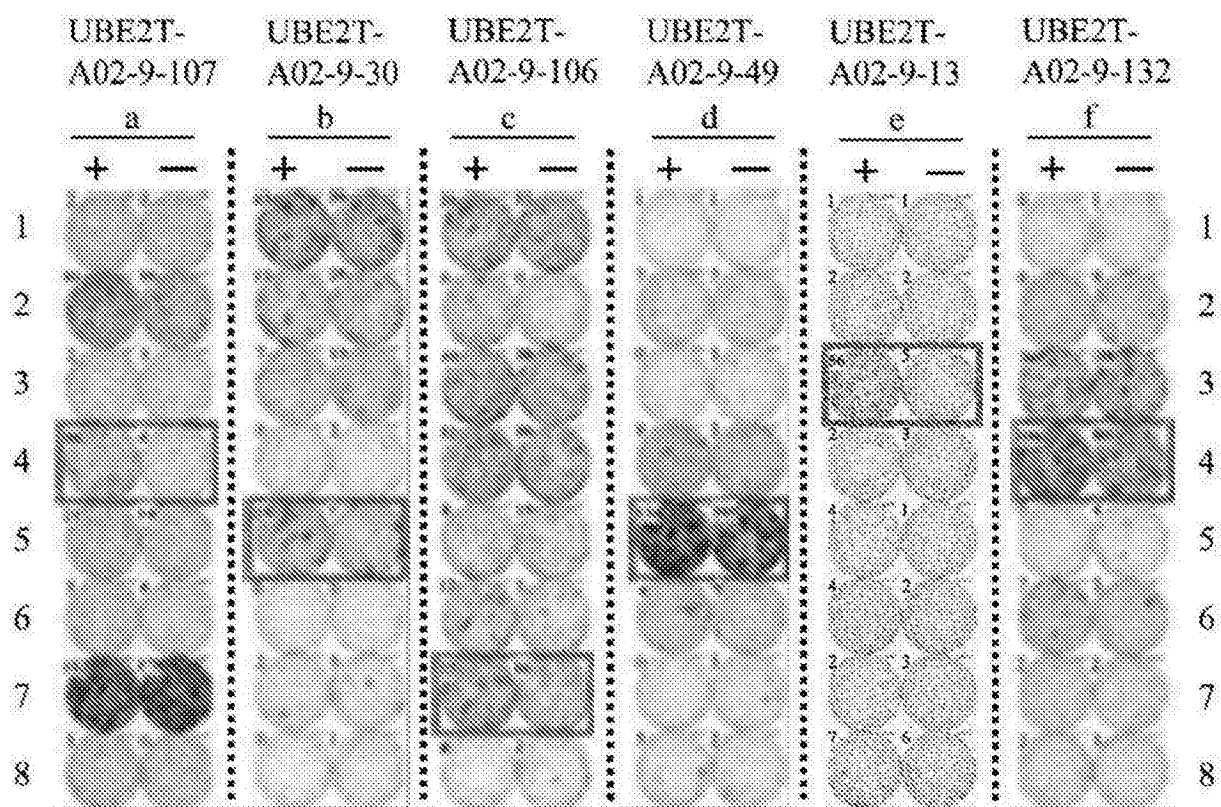


图1



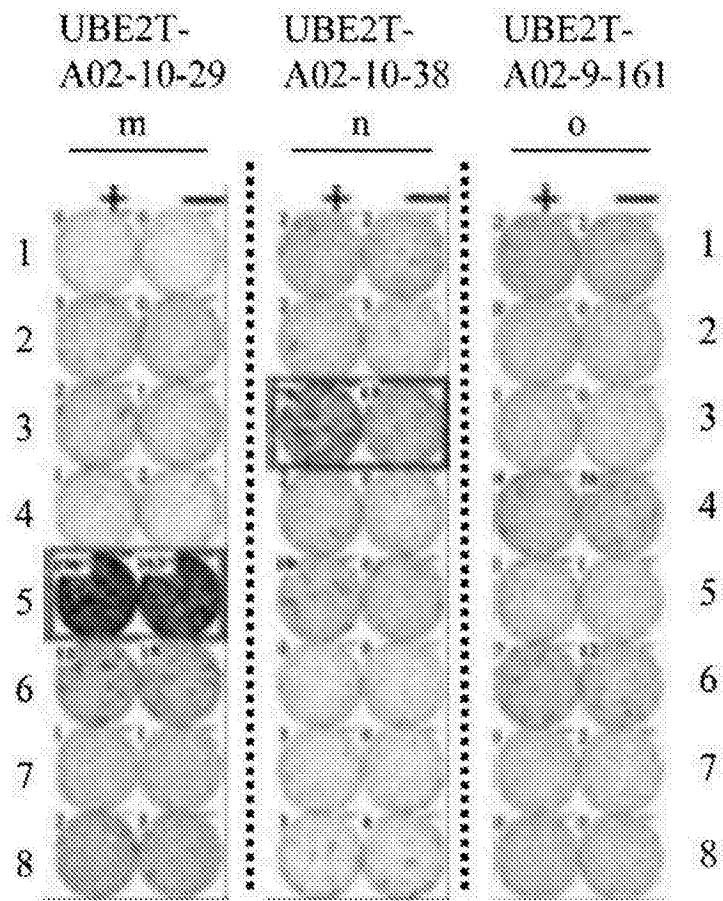


图2

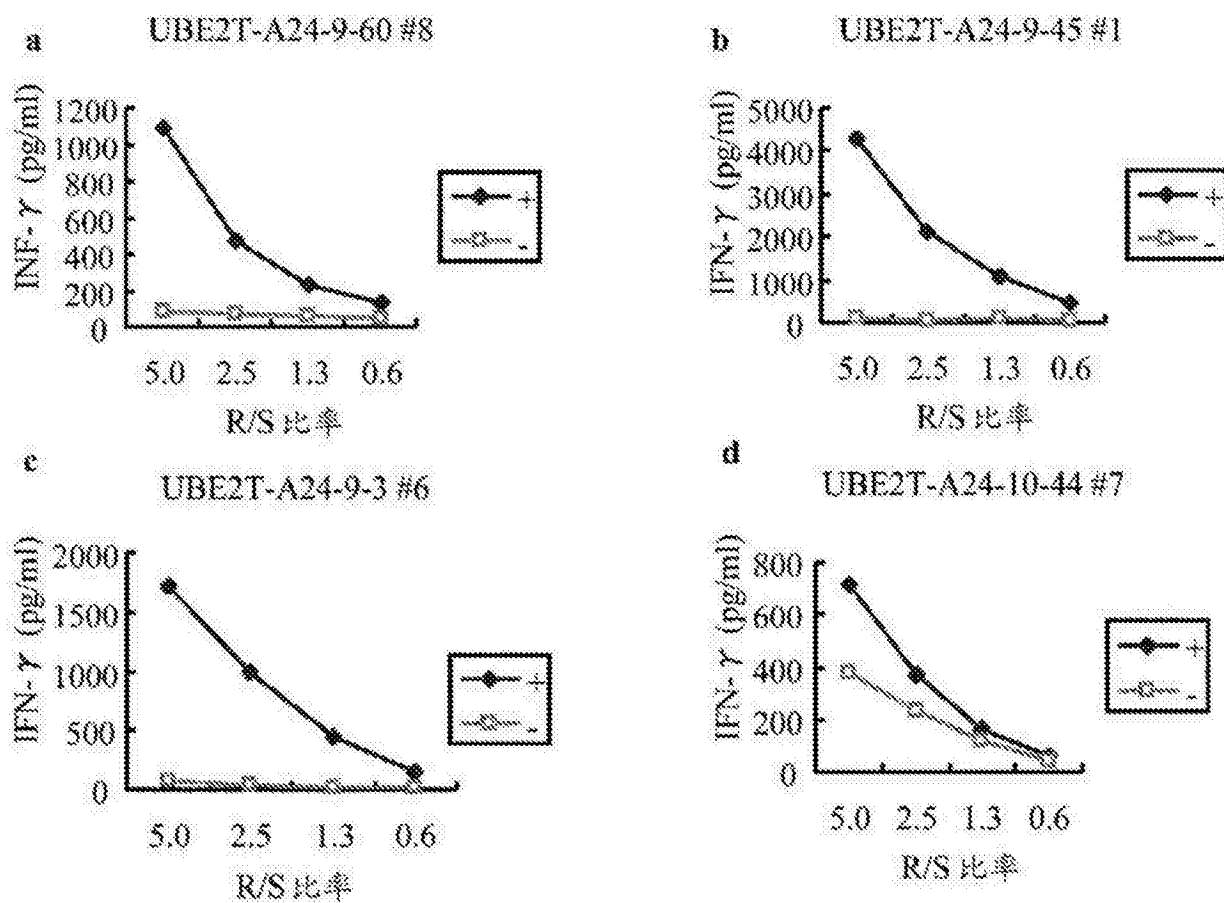


图3

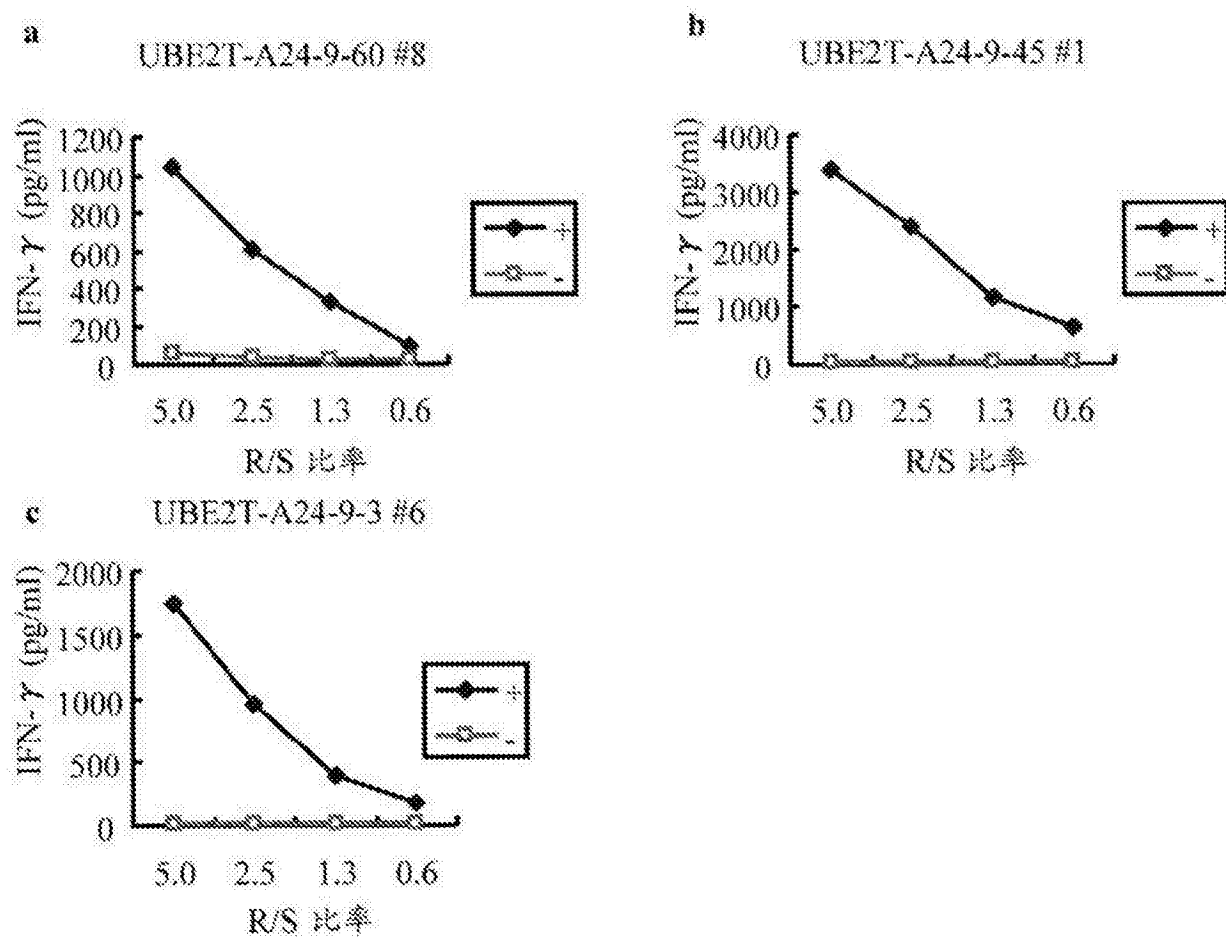


图4

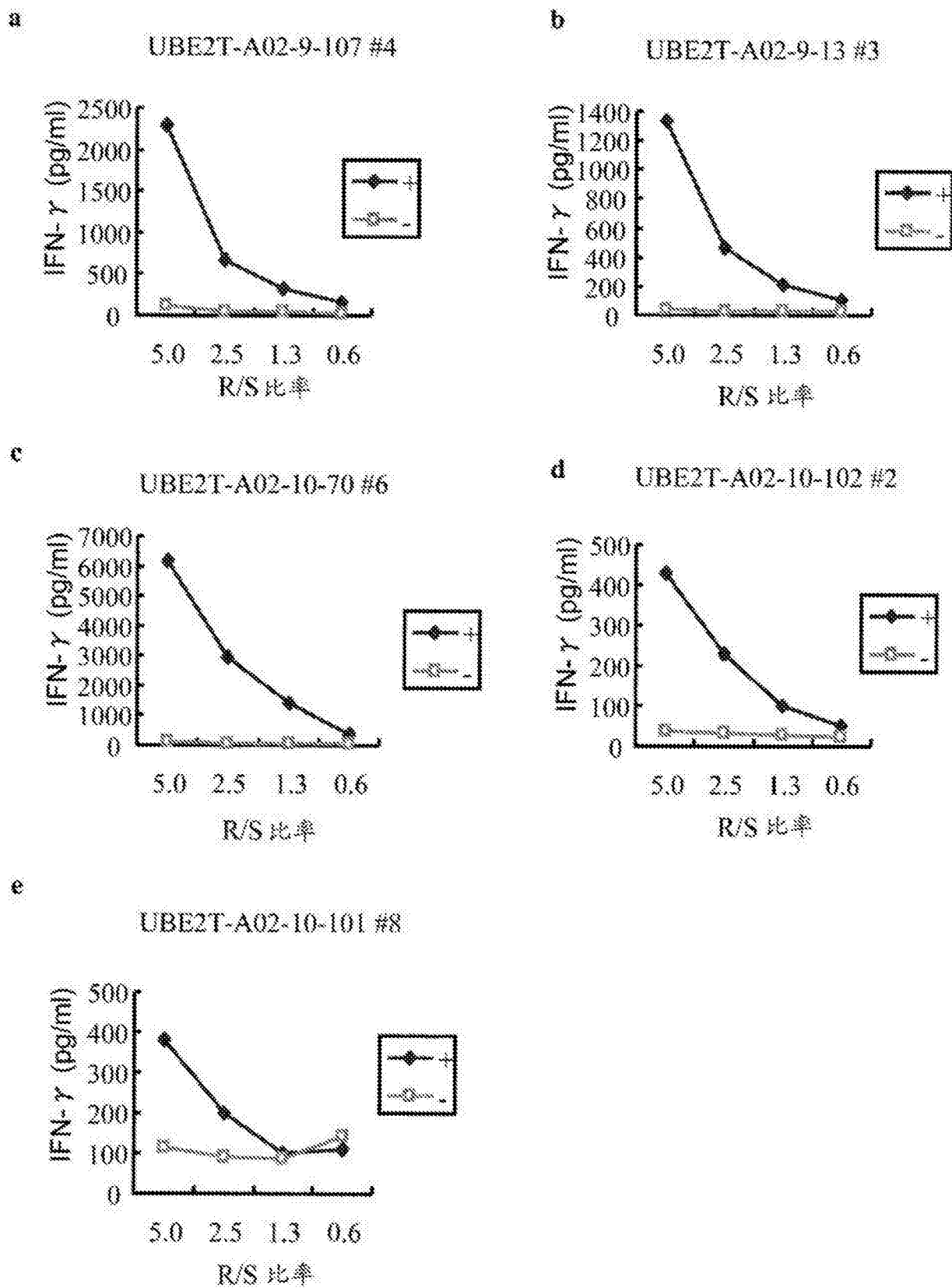


图5

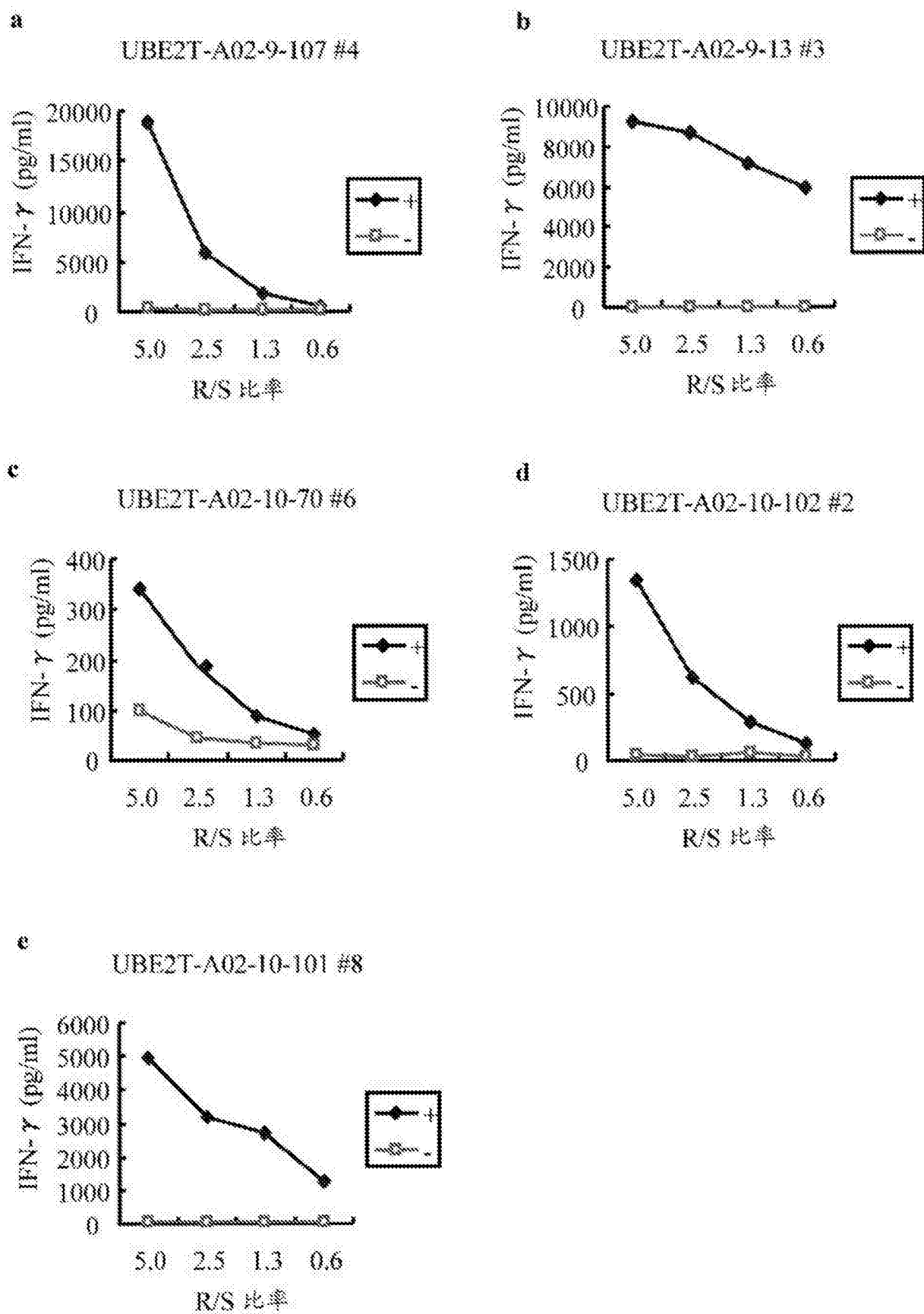


图6

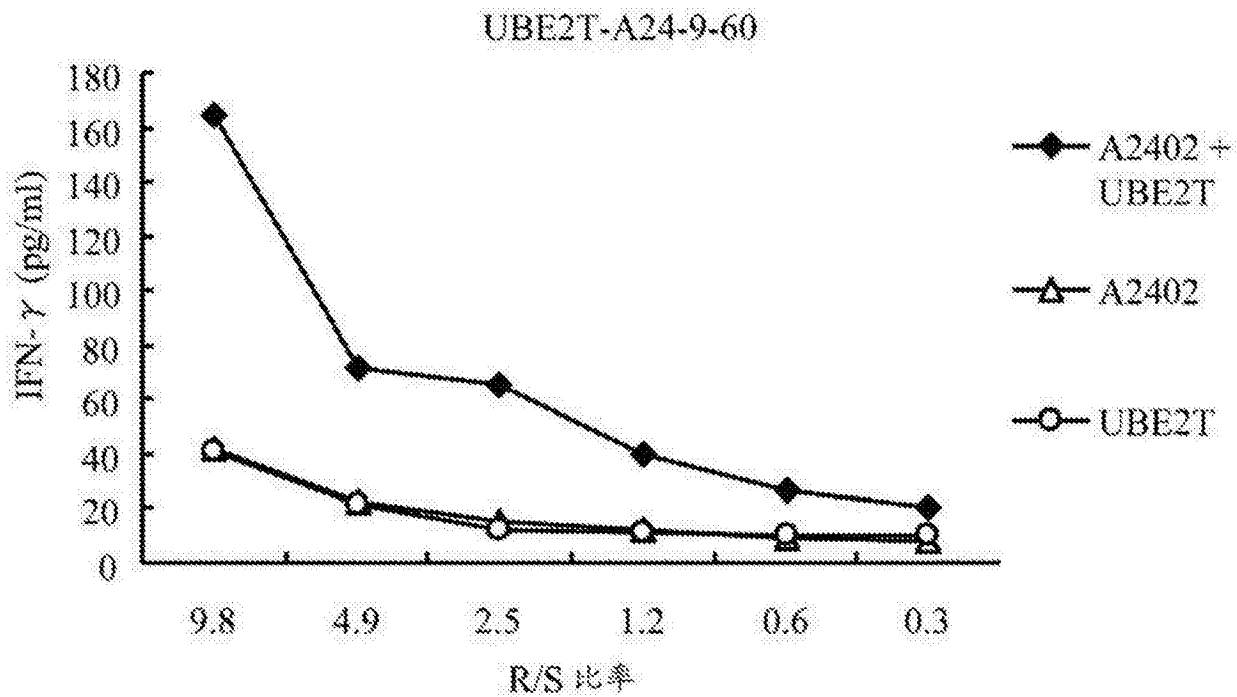


图7

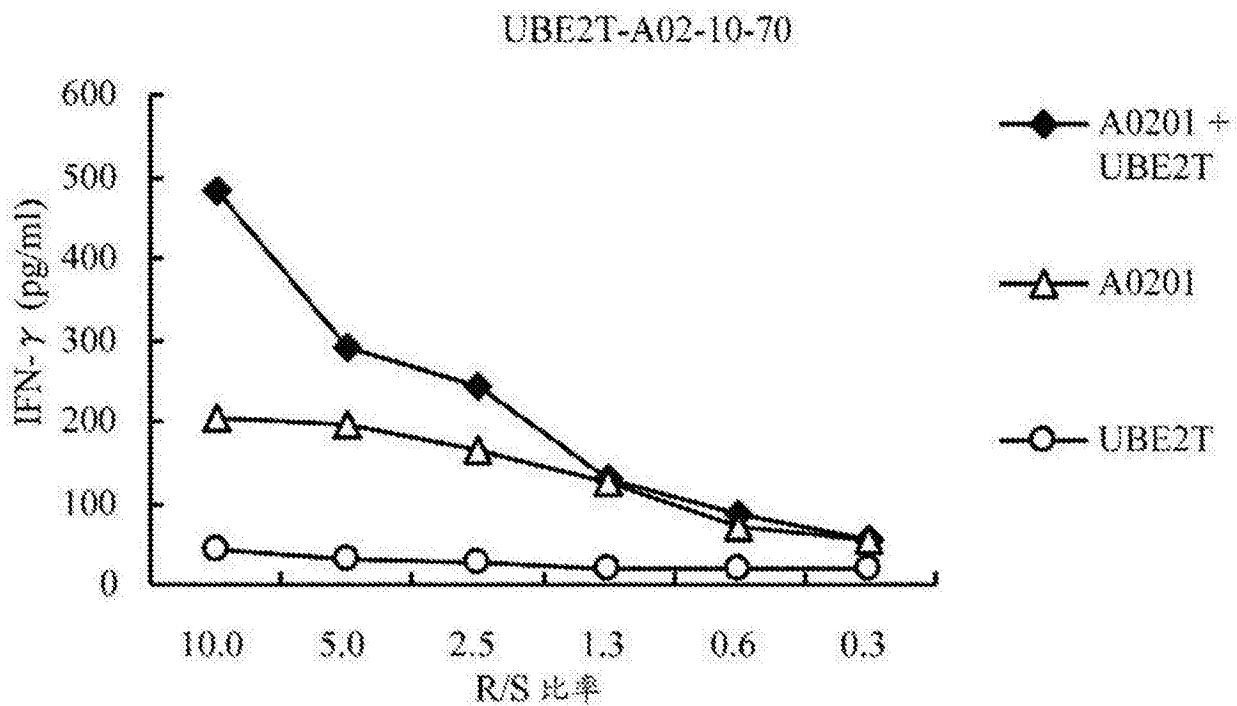


图8