



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105164256 B

(45)授权公告日 2018.10.19

(21)申请号 201480022294.6

(22)申请日 2014.03.11

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105164256 A

(43)申请公布日 2015.12.16

(30)优先权数据

61/777,334 2013.03.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.10.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/001350 2014.03.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/141683 EN 2014.09.18

(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 15/00(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

C12N 5/0783(2006.01)

C12N 5/0784(2006.01)

(56)对比文件

W0 2007013480 A2,2007.02.01,

CN 102863514 A,2013.01.09,

Hawkins et al..Identification of

Breast Cancer Peptide Epitopes Presented by HLA-A*0201.《J.Proteome Res.》.2008,摘要,第1448页右栏第2段,第1453页表1.

审查员 王婷

权利要求书2页 说明书43页

序列表22页 附图4页

(54)发明名称

KNTC2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,提供了衍生自KNTC2基因的分离的表位肽,其引发CTL,并且如此适合于在癌症免疫的背景中使用。创造性的肽涵盖KNTC2衍生的肽和其经修饰的型式(其中取代、缺失、插入或添加了1、2或几个氨基酸)两者,只要此类经修饰的型式保留初始序列的必需的CTL诱导能力。进一步提供了编码此类肽的多核苷酸及包含任何此类肽或多核苷酸作为活性剂的药物组合物。还提供了靶向此类肽的抗原呈递细胞和分离的CTL,及用于诱导抗原呈递细胞或CTL的方法。此外,本发明提供了用于治疗 and/or 防范(即预防)癌症(肿瘤),和/or 预防其转移性或术后复发的方法,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KNTC2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. 一种具有细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 诱导能力的分离的肽, 其中所述肽由SEQ ID NO: 7的氨基酸序列组成。
2. 一种分离的多核苷酸, 其编码权利要求1的肽。
3. 一种组合物, 其包含至少一种选自下组的活性成分:
 - (a) 权利要求1的肽;
 - (b) 编码权利要求1的肽的多核苷酸;
 - (c) 抗原呈递细胞 (APC), 该抗原呈递细胞在其表面上呈递HLA抗原和权利要求1的肽的复合物;
 - (d) 外来体, 该外来体在其表面上呈递HLA抗原和权利要求1的肽的复合物; 和
 - (e) CTL, 该CTL靶向HLA抗原和权利要求1的肽的复合物。
4. 一种用于治疗表达KNTC2的癌症的药物组合物, 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的肽;
 - (b) 编码权利要求1的肽的多核苷酸;
 - (c) APC, 该APC在其表面上呈递HLA抗原和权利要求1的肽的复合物;
 - (d) 外来体, 该外来体在其表面上呈递HLA抗原和权利要求1的肽的复合物; 和
 - (e) CTL, 其能识别呈递HLA抗原和权利要求1的肽的复合物的细胞。
5. 权利要求4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-A2的受试者施用。
6. 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的肽接触, 和
 - (b) 将编码权利要求1的肽的多核苷酸导入APC。
7. 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) 亚基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, 其中由所述亚基形成的TCR能结合细胞表面上权利要求1的肽和HLA抗原的复合物。
8. 一种分离的APC, 该APC在其表面上呈递HLA抗原与权利要求1的肽的复合物。
9. 权利要求8的APC, 其是通过包括选自下组的步骤的方法诱导的:
 - (a) 使APC与权利要求1的肽接触, 和
 - (b) 将编码权利要求1的肽的多核苷酸导入APC。
10. 一种分离的CTL, 其靶向HLA抗原和权利要求1的肽的复合物。
11. 权利要求10的CTL, 其是通过包括选自下组的步骤的方法诱导的:
 - (a) 将CD8阳性T细胞与在表面上呈递HLA抗原与权利要求1的肽的复合物的APC共培养;
 - (b) 将CD8阳性T细胞与在表面上呈递HLA抗原与权利要求1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) 亚基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,其中由所述亚基形成的TCR能结合细胞表面上权利要求1的肽和HLA抗原的复合物。

12. 权利要求1的肽或编码所述肽的多核苷酸在制造用于诱导针对表达KNTC2的癌症的免疫应答的组合物中的用途。

13. 一种载体,其包含编码权利要求1的肽的核苷酸序列。

14. 用权利要求13的载体转化或转染过的宿主细胞。

KNTC2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2013年3月12日提交的美国临时申请61/777,334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。如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TAA衍生的肽进行临床试验的报告。不幸的是,这些癌症疫苗试验至今仅产生较低的客观应答率(NPL 11-13)。因此,仍然对作为免疫治疗靶的新TAA存在需求。

[0006] KNTC2(又称为“动粒(kinetchore)关联2”、HEC1或NDC 80)是Ndc80复合物的成员,该Ndc80复合物由Ndc80(KNTC2)-Nuf2(CDCA1)和Spc24-Spc25(NPL 14)的两种亚复合物构成。动粒外板内的CDCA1-KNTC2复合物的附着位点产生染色体移动的微管依赖性力,并且调节在动粒上的纺锤体检查点蛋白装配(NPL 15)。

[0007] 在通过使用含有27,648种基因的cDNA微阵列的全基因组表达概况分析阐明非小细胞肺癌(NSCLC)中的分子机制的过程中,发现KNTC2在NSCLC中频繁过表达(NPL 16,17,18,19,20)。Northern印迹分析揭示了此基因转录物在肺癌组织中高度表达,但是在除了睾丸外的正常组织中不表达。此外,显示了随后用siRNA敲低KNTC2表达显著抑制NSCLC细胞的生长(NPL 21,PTL 1)。

[0008] 还已经报告了KNTC2在癌症组织中上调,诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食道癌、非细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤(PTL 2)。

[0009] 另外,本发明人已经鉴定出KNTC2肽,其可以结合HLA-A24并诱导CTL,并且可用于靶向HLA-A24阳性患者的免疫疗法(PTL 2)。然而,尽管这些肽可以适合于表达HLA-A24亚型的患者,但是仍然需要在表达其它类型的HLA抗原的患者中诱导CTL的肽。

[0010] 引用表

[0011] 专利文献

[0012] [PTL 1]W02007/013480

[0013] [PTL 2]W02008/102557

[0014] 非专利文献

[0015] [NPL 1]Boon T,Int J Cancer 1993,54(2):177-80

[0016] [NPL 2]Boon T&van der Bruggen P,J Exp Med 1996,183(3):725-9

[0017] [NPL 3]Harris CC,J Natl Cancer Inst 1996,88(20):1442-55

[0018] [NPL 4]Butterfield LH et al.,Cancer Res 1999,59(13):3134-42

[0019] [NPL 5]Vissers JL et al.,Cancer Res 1999,59(21):5554-9

[0020] [NPL 6]van der Burg SH et al.,J Immunol 1996,156(9):3308-14

[0021] [NPL 7]Tanaka F et al.,Cancer Res 1997,57(20):4465-8

[0022] [NPL 8]Fujie T et al.,Int J Cancer 1999,80(2):169-72

[0023] [NPL 9]Kikuchi M et al.,Int J Cancer 1999,81(3):459-66

[0024] [NPL 10]Oiso M et al.,Int J Cancer 1999,81(3):387-94

[0025] [NPL 11]Bellli F et al.,J Clin Oncol 2002,20(20):4169-80

[0026] [NPL 12]Coulie PG et al.,Immunol Rev 2002,188:33-42

[0027] [NPL 13]Rosenberg SA et al.,Nat Med 2004,10(9):909-15

[0028] [NPL 14]Ciferri C,et al.J Biol Chem 2005;280:29088-95

[0029] [NPL 15]Wigge P.A,et al.J Cell Biol.2001;152:349-60

[0030] [NPL 16]Kikuchi T,et al.,Oncogene.2003;22:2192-205

[0031] [NPL 17]Suzuki C,et al.,Cancer Res.2003;63:7038-41

[0032] [NPL 18]Kakiuchi S,et al.,Mol Cancer Res.2003;1:485-99

[0033] [NPL 19]Zembutsu H,et al.,Int J.Oncol.2003;23:29-39

[0034] [NPL 20]Kakiuchi S,et al.,Hum Mol Genet.2004;13:3029-43

[0035] [NPL 21]Hayama S,et al.Cancer Res.2006Nov 1;66(21):10339-48

[0036] 发明概述

[0037] 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。在本发明的过程中，证明了KNTC2(一种在SEQ ID NO:79中所示的典型氨基酸序列；一种在SEQ ID NO:77(GenBank登录号NM_006101)或SEQ ID NO 78(GenBank登录号AF017790)中所示的典型核苷酸序列)在癌症中特异性过表达，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、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤。如此，本发明聚焦于KNTC2作为癌症/肿瘤免疫疗法的候选靶物。

[0038] 为了那个目的，本发明至少部分涉及在衍生自KNTC2的肽中拥有诱导对KNTC2特异性的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的能力的特定表位肽的鉴定。

[0039] 本文中公开的结果证明了鉴定的肽是HLA-A2限制性表位肽，其可以诱导针对表达KNTC2的细胞的有力且特异性的免疫应答。

[0040] 因而，本发明的目的是提供KNTC2衍生的肽，其可以用于在体外、离体或在体内以

HLA-A2限制性方式诱导CTL,或者直接对受试者施用以诱导针对癌症的体内免疫应答,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、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤。

[0041] 本发明的肽的长度一般小于15、14、13、12、11或10个氨基酸。优选的肽是九肽和十肽。特别优选的九肽和十肽具有选自下组的氨基酸序列:更优选具有选自下组的氨基酸序列的九肽和十肽:SEQ ID NO:2、3、7、17、41、53和68。

[0042] 本发明还涵盖具有对选自SEQ ID NO:2、3、7、17、41、53和68的氨基酸序列取代、缺失、插入和/或添加了1、2或更多个氨基酸的氨基酸序列的经修饰的肽,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。

[0043] 在一个实施方案中,在初始肽是9聚体(例如SEQ ID NO:2、3、7、和17之一)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(例如SEQ ID NO:41、53和68之一)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10至15个氨基酸的范围中。

[0044] 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。

[0045] 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。本发明的组合物可以用于诱导CTL,如此在治疗和/或预防癌症,和/或预防转移或其手术后复发中得到应用。本发明考虑到的靶定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、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤。

[0046] 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。药物组合物优选配制为用于治疗 and/或预防癌症(更具体是原发性癌症),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,本发明的药物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。

[0047] 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,并且如此在癌症免疫疗法的背景中是有用的。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。

[0048] 另外,本发明还涵盖用于诱导具有CTL诱导性的APC的组合物,所述组合物包括本发明的任何肽或多核苷酸。

[0049] 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、慢性髓样白血病 (CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌 (SCLC) 和软组织肿瘤。因此,本发明涵盖用于诱导CTL的方法和通过此类方法获得的CTL两者。

[0050] 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在癌症免疫治疗的背景中得到应用。

[0051] 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组合物的步骤:(a) 本发明的肽、或编码所述肽的多核苷酸,(b) 呈递有所述肽(a)的外来体或APC以及(c)能够识别在其表面上呈递本发明的肽的细胞的CTL。

[0052] 本发明的一个方面涉及本发明的肽或包含此类肽的作用剂或组合物,其用作药物。

[0053] 本发明的应用可延及多种涉及或者源于KNTC2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、慢性髓样白血病 (CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌 (SCLC) 和软组织肿瘤。

[0054] 更具体地,本发明提供了以下内容:

[0055] [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):

[0056] (a) KNTC2的免疫学活性片段的氨基酸序列;

[0057] (b) 在KNTC2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,

[0058] 其中由所述肽诱导的CTL具有针对呈递衍生自KNTC2的片段的细胞的特异性细胞毒性活性;

[0059] [2][1]的肽,其中所述肽包含下述的氨基酸序列(a)或(b):

[0060] (a) 选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、3、7、17、41、53和68;

[0061] (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:2、3、7、17、41、53和68;

[0062] [3].[2]的肽,其中所述肽具有下述特征之一或二者:

[0063] (a) 从N末端起的第二个氨基酸是亮氨酸或甲硫氨酸;和

[0064] (b) C末端氨基酸是缬氨酸或亮氨酸;

[0065] [4].[1]至[3]中任一项的肽,其中所述肽是九肽或十肽;

[0066] [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:2、3、7、17、41、53和68;

[0067] [6].一种分离的多核苷酸,其编码[1]至[5]中任一项的肽;

- [0068] [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:
- [0069] (a) [1]至[5]中任一项的肽;
- [0070] (b) [6]的多核苷酸;
- [0071] (c) 抗原呈递细胞 (APC), 该抗原呈递细胞在其表面上呈递[1]至[5]中任一项的肽;和
- [0072] (d) 外来体,该外来体在其表面上呈递[1]至[5]中任一项的肽;
- [0073] [8]. 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:
- [0074] (a) [1]至[5]中任一项的肽;
- [0075] (b) [6]的多核苷酸;
- [0076] (c) APC,该APC在其表面上呈递[1]至[5]中任一项的肽;和
- [0077] (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
- [0078] (e) CTL,其可以识别呈递[1]至[5]中任一项的肽的细胞;
- [0079] [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-A2的受试者施用;
- [0080] [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:
- [0081] (a) 使APC与[1]-[5]中任一项的肽接触,和
- [0082] (b) 将编码[1]-[5]中任一项的肽的多核苷酸导入APC;
- [0083] [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:
- [0084] (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;
- [0085] (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
- [0086] (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[1]至[5]中任一项的肽和HLA抗原的复合物;
- [0087] [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;
- [0088] [13]. [12]的APC,,其是通过[10]的方法诱导的;
- [0089] [14]. 一种分离的CTL,其靶向[1]-[5]中任一项的肽;
- [0090] [15]. [14]的CTL,其是通过[11]的方法诱导的;
- [0091] [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;
- [0092] [17]. 针对[1]-[5]中任一项的肽的抗体或其免疫学活性片段;
- [0093] [18]. 一种载体,其包含编码[1]-[5]中任一项的肽的核苷酸序列;
- [0094] [19]. 用[18]的表达载体转化或转染过的宿主细胞;
- [0095] [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;及

[0096] [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KNTC2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:

[0097] (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 NO:2、3、7、17、41、53和68,

[0098] (ii) 选择与衍生自除KNTC2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;

[0099] (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;

[0100] (iv) 使步骤(iii)的抗原呈递细胞与CD8阳性T细胞接触;和

[0101] (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;

[0102] [22]一种药物组合物,其包含[1]至[5]中任一项的肽;

[0103] [23][1]至[5]中任一项的肽,其用作药物;和

[0104] [24][6]的多核苷酸或[18]的载体,其用作药物。

[0105] 或者,本发明还提供了以下实施方案:

[0106] [1].一种具有细胞毒性T淋巴细胞(CTL)诱导能力的分离的肽,其中由所述肽诱导的CTL具有针对呈递衍生自KNTC2的片段的细胞的特异性细胞毒性活性,进一步其中所述肽包含下述的氨基酸序列(a)或(b):

[0107] (a) KNTC2的免疫学活性片段的氨基酸序列;

[0108] (b) 在KNTC2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;

[0109] [2][1]的肽,其中所述肽具有下述的氨基酸序列(a)或(b):

[0110] (a) 选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、3、7、17、41、53和68;

[0111] (b) 对选自下组的氨基酸序列取代、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:2、3、7、17、41、53和68;

[0112] [3].[2]的肽,其中所述肽具有下述特征之一或二者:

[0113] (a) 从N末端起的第二个氨基酸是亮氨酸或甲硫氨酸;和

[0114] (b) C末端氨基酸是缬氨酸或亮氨酸;

[0115] [4].[1]至[3]中任一项的肽,其中所述肽是九肽或十肽;

[0116] [5].一种分离的多核苷酸,其编码[1]至[4]中任一项的肽;

[0117] [6].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:

[0118] (a) [1]至[4]中任一项的肽;

[0119] (b) [5]的多核苷酸;

[0120] (c) 抗原呈递细胞(APC),该抗原呈递细胞在其表面上呈递[1]至[4]中任一项的肽;和

[0121] (d) 外来体,该外来体在其表面上呈递[1]至[4]中任一项的肽;

[0122] [7].一种用于治疗 and/或预防原发性癌症,和/或预防其转移或手术后复发,或诱导针对所述癌症的免疫应答的药物组合物,其中所述组合物包含至少一种选自下组的活性

成分：

- [0123] (a) [1]至[4]中任一项的肽；
- [0124] (b) [5]的多核苷酸；
- [0125] (c) APC,该APC在其表面上呈递[1]至[4]中任一项的肽；和
- [0126] (d) 外来体,该外来体在其表面上呈递[1]至[4]中任一项的肽；和
- [0127] (e) CTL,其可以识别呈递[1]至[4]中任一项的肽的细胞；
- [0128] [8].[7]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-A2的受试者施用；
- [0129] [9].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：
 - [0130] (a) 使APC与[1]-[4]中任一项的肽接触,和
 - [0131] (b) 将编码[1]-[4]中任一项的肽的多核苷酸导入APC；
- [0132] [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：
 - [0133] (a) 将CD8阳性T细胞与在表面上呈递HLA抗原与[1]-[4]中任一项的肽的复合物的APC共培养；
 - [0134] (b) 将CD8阳性T细胞与在表面上呈递HLA抗原与[1]-[4]中任一项的肽的复合物的外来体共培养；和
 - [0135] (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[1]至[4]中任一项的肽和HLA抗原的复合物；
- [0136] [11].一种分离的APC,该APC在其表面上呈递HLA抗原与[1]-[4]中任一项的肽的复合物；
- [0137] [12].[11]的APC,其是通过[9]的方法诱导的；
- [0138] [13].一种分离的CTL,其靶向[1]-[4]中任一项的肽；
- [0139] [14].[13]的CTL,其是通过[10]的方法诱导的；
- [0140] [15].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]-[4]中任一项的肽、或编码所述肽的多核苷酸的组合物的步骤；
- [0141] [16].针对[1]-[5]中任一项的肽的抗体或其免疫学活性片段；
- [0142] [17].一种载体,其包含编码[1]-[4]中任一项的肽的核苷酸序列；
- [0143] [18].用[17]的表达载体转化或转染过的宿主细胞；
- [0144] [19].一种诊断试剂盒,其包含[1]-[4]中任一项的肽、[5]的多核苷酸或[16]的抗体或免疫学活性片段；及
- [0145] [20].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KNTC2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：
 - [0146] (i) 提供具有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的候选序列,其中所述原始氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、3、7、17、41、53和68,
 - [0147] (ii) 选择与衍生自除KNTC2之外的任何已知人基因产物的肽均无显著实质同源性的候选序列；

[0148] (iii) 使具有步骤(ii)中选择的候选序列的肽与抗原呈递细胞接触;

[0149] (iv) 使步骤(iii)的抗原呈递细胞与CD8阳性T细胞接触;和

[0150] (v) 鉴定其CTL诱导能力相同于或高于具有原始氨基酸序列的肽的肽;

[0151] [21] 一种药物组合物,其包含[1]至[4]中任一项的肽;

[0152] [22] [1]至[4]中任一项的肽,其用作药物;和

[0153] [23] [5]的多核苷酸或[17]的载体,其用作药物。

[0154] 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。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。

[0155] 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。

[0156] 附图简述

[0157] 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。

[0158] [图1]

[0159] 图1由一系列照片(a)至(h)组成,描绘了干扰素(IFN)-gamma酶联免疫点(ELISPOT)测定法对用衍生自KNTC2的肽诱导的CTL的结果。与对照相比,用KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO:2)诱导的孔号#8中(a),用KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3)诱导的孔号#4(b),用KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)诱导的#7中(c),用KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO:17)诱导的#5中(d),用KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO:41)诱导的#3中(e),用KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO:53)诱导的#2中(f)和用KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO:68)诱导的#6中(g)的CTL分别显示强的IFN-gamma生成。这些照片的孔上的正方形标示扩充来自相应孔的细胞以建立CTL系。比较而言,作为阴性数据的典型,从用KNTC2-A02-9-330 (SEQ ID NO:1)刺激的CTL(h)没有观察到特异性IFN-gamma生成。在图中,“+”标示针对用合适的肽冲击的靶细胞的IFN-gamma生成,并且“-”标示针对没有用任何肽冲击的靶细胞的IFN-gamma生成。

[0160] [图2]

[0161] 图2由一系列线图(a)至(c)组成,描绘了用KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO:2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3) (b)和KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) (c)刺激的CTL系的IFN-gamma生成。通过IFN-gamma酶联免疫吸附测定法(ELISA)测量CTL生成的IFN-gamma的数量。结果表明与对照相比,通过用每种肽刺激建立的CTL系显示强的IFN-gamma生成。在图中,“+”标示针对用合适的肽冲击的靶细胞的IFN-gamma生成,并且“-”标示针对没有用任何肽冲击的靶细胞的IFN-gamma生成。R/S比率指示响应细胞(CTL系)和刺激细胞的数目的比率。

[0162] [图3]

[0163] 图3显示了通过限制稀释从用KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO:2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3) (b) 和KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) (c) 刺激的CTL系建立的CTL克隆的IFN- γ 生成。结果表明与对照相比,通过用每种肽刺激建立的CTL系显示强的IFN- γ 生成。在图中,“+”标示针对用合适的肽冲击的靶细胞的IFN- γ 生成,并且“-”标示针对没有用任何肽冲击的靶细胞的IFN- γ 生成。R/S比率指示响应细胞 (CTL系) 和刺激细胞的数目的比率。

[0164] [图4]

[0165] 图4是线图,其描绘了针对表达KNTC2和HLA-A*0201的靶细胞的CTL克隆的特异性CTL活性。制备用HLA-A*0201或全长KNTC2基因转染的COS7细胞作为对照。用KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) 建立的CTL系显示针对用KNTC2和HLA-A*0201两者 (黑色菱形) 转染的COS7细胞的特异性CTL活性。另一方面,针对表达HLA-A*0201 (三角形) 或KNTC2 (圆圈) 的靶细胞没有检出显著的特异性CTL活性。

[0166] 发明详述

[0167] 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。

[0168] 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。

[0169] 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。

[0170] I. 定义

[0171] 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。

[0172] 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。

[0173] 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。

[0174] 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。如本文中使用时,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。

[0175] 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。

[0176] 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。

[0177] 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。

[0178] 术语“(作用)剂”和“组合物”和在本文中可互换使用,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。

[0179] 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组成物质。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)。

[0180] 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。

[0181] 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。

[0182] 除非另有定义,术语“癌症”指过表达KNTC2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、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤。

[0183] 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。

[0184] 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。

[0185] 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。

[0186] 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-A2”是指受试者或患者纯合地或者杂合地拥有HLA-A2抗原基因,并且HLA-A2抗原在受试者或患者的细胞中作为HLA抗原表达。

[0187] 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,抑制转移性或术后复发,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。

[0188] 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。

[0189] 在本发明的语境中,治疗和/或预防癌症和/或预防其转移性或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、诱导癌症减退和抑制癌症发生、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。

[0190] 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)。

[0191] 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。

[0192] II. 肽

[0193] 下面详细描述的本发明的肽可称为“KNTC2肽”或“KNTC2多肽”。

[0194] 为了证明衍生自KNTC2的肽发挥被CTL所识别的抗原的功能,对衍生自KNTC2(SEQ ID NO:79)的肽进行了分析以确定它们是否为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)。

[0195] 衍生自KNTC2的HLA-A2结合肽的候选物基于其对HLA-A2的结合亲和力鉴定。鉴定下述肽:SEQ ID NO:2至76。

[0196] 上述之中,下述肽导致成功的CTL建立,在通过用这些肽冲击(加载)的树突细胞(DC)体外刺激T细胞后,使用每种下述肽成功建立CTL:

[0197] KNTC2-HLA-A02-9-131(SEQ ID NO:2), KNTC2-HLA-A02-9-181(SEQ ID NO:3), KNTC2-HLA-A02-9-184(SEQ ID NO:7), KNTC2-HLA-A02-9-127(SEQ ID NO:17), KNTC2-HLA-A02-10-127(SEQ ID NO:41), KNTC2-HLA-A02-10-322(SEQ ID NO:53)和KNTC2-HLA-A02-10-185(SEQ ID NO:68)。

[0198] 上述所述的建立的CTL显示针对用相应的肽冲击的靶细胞的强的特异性CTL活性。这些结果表明KNTC2是由CTL识别的抗原,并且上述肽是受HLA-A2限制的KNTC2的表位肽;因此,此类肽可以经由对HLA-A2阳性患者诱导CTL的细胞毒性而有效进行癌症免疫疗法。

[0199] 由于KNTC2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、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织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KNTC2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KNTC2的免疫学活性片段组成。在一些实施方案中,本发明提供了具有选自下组的氨基酸序列的肽:SEQ ID NO:2、3、7、17、41、53和68。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:2、3、7、17、41、53和68。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:2、3、7、17、41、53和68。

[0200] 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KNTC2的肽。这样的肽例如少于约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。

[0201] 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 NO:2,3,7,17,41,53和68的氨基酸序列,其中添加和/或取代了一个、两个或甚至更多个氨基酸。换言之,本发明的肽既具有CTL诱导能力,又具有选自SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68的氨基酸序列中取代、缺失、插入和/或添加了一个、两个或数个氨基酸而得到的氨基酸序列,只要经修饰的肽保留初始参照肽的CTL诱导能力。

[0202] 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:

[0203] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0204] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0205] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0206] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0207] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0208] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0209] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0210] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(参见例如Creighton,Proteins 1984)。

[0211] 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KNTC2的多态变体、种间同源物、和等位基因的可诱导CTL的肽。

[0212] 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%。

[0213] 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。

[0214] 例如,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:2,3,7,17,41,53和68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,其包含在选自SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68的氨基酸序列中取代、缺失、插入、和/或添加一个、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,本发明的肽包括在选自SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68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。

[0215] 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,T.K.Hoffmann et al.J Immunol.(2002);168(3):1338-47., S.O.Dionne et al.Cancer Immunol immunother.(2003)52:199-206及S.O.Dionne et al.Cancer Immunology,Immunotherapy(2004)53,307-314)。

[0216] 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。

[0217] 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诱导能力和选自下组的氨基酸序列:

[0218] (i)在选自SEQ ID NO:2,3,7,和17的氨基酸序列中修饰了1、2或数个氨基酸,和

[0219] (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:

[0220] (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

[0221] (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。

[0222] 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诱导能力和选自下组的氨基酸序列:

[0223] (i')在选自SEQ ID NO:41,53和68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

[0224] (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:

[0225] (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

[0226] (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。

[0227] 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(ii)和(i')至(ii')。

[0228] 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,可能诱导负面的副作用,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,抗体期望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自然界中不存在与目标肽相比相同至仅有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。

[0229] 虽然对HLA抗原具有高结合亲和力的肽预期是高度有效的,但还是对根据高结合亲和力的存在为指标选出的候选肽检查了CTL诱导能力的存在。这里,短语“CTL诱导能力”指肽被呈递到抗原呈递细胞(APC)上时诱导细胞毒性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。

[0230] 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):764-79Related Articles,Books,Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1transgenic 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。

[0231] 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结合活性。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一个或多个“其他”肽。肽间的接头是本领域公知的,且包括例如AAY(P.M.Daftarian et al.,J Trans Med 2007,5:26),AAA,NKRK(SEQ ID NO:84)(R.P.M.Sutmuller et al.,J Immunol.2000,165:7308-7315)或K(S.Ota et al.,Can Res.62,1471-1476,K.S.Kawamura et al.,J Immunol.2002,168:5709-5715)。

[0232] 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。

[0233] 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。

[0234] 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。

[0235] 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)。

[0236] 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:

[0237] a:对本发明的肽修饰(即取代、缺失、插入和/或添加)至少一个氨基酸残基,

[0238] b:测定步骤a中修饰的肽的活性,

[0239] c:选择具有与原始肽相比相同或更高活性的肽。

[0240] 在本文中,要测定的活性可以包括MHC结合活性、APC或CTL诱导能力和细胞毒性活性。优选地,要测定的肽的活性是CTL诱导能力。

[0241] 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KNTC2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:

[0242] (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:2,3,7,17,41,53和68,

[0243] (ii) 选择与衍生自除KNTC2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;

[0244] (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;

[0245] (iv) 使步骤(iii)的抗原呈递细胞与CD8阳性细胞接触;和

[0246] (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。

[0247] 在本发明的肽包含半胱氨酸残基(例如SEQ ID NO:7)时,肽趋于经由半胱氨酸残基的SH基团之间的二硫键而形成二聚体。因此,本发明扩展到具有诱导CTL的能力的肽二聚体。可以经由单体中存在的或对单体添加的半胱氨酸残基之间的二硫键通过结合两个KNTC2肽单体形成本发明的肽二聚体。在每个肽的氨基酸序列含有半胱氨酸残基(Cys)时,

可以在此类半胱氨酸残基之间形成二硫键以形成本发明的寡聚体肽。或者,若氨基酸序列自身没有半胱氨酸,则可以在对此类氨基酸序列添加的半胱氨酸残基间形成二硫键。例如,可以将半胱氨酸残基在肽的C端和/或N端导入每种肽中以形成二硫键。此外,也可以在每种肽的氨基酸序列内插入一个或多个半胱氨酸残基。

[0248] III.KNTC2肽的制备

[0249] 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。

[0250] 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。

[0251] 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:

[0252] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

[0253] (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

[0254] (iii) Peptide Synthesis (日文), Maruzen Co., 1975;

[0255] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (日文), Maruzen Co., 1985;

[0256] (v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (日文), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

[0257] (vi) W099/67288; 和

[0258] (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118。

[0259] 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。

[0260] 在本发明的肽是肽二聚体时,可以使用本领域中已知的方法制备此类二聚体。例如,若肽单体包含一对半胱氨酸残基,则可以例如通过除去所有保护基(包括半胱氨酸侧链上的保护基),然后将所得的单体溶液在碱性条件下进行空气氧化,或者在碱性或酸性条件下添加氧化剂以形成二硫键来制备肽二聚体。氧化剂的例子包括碘、二甲亚砜(DMSO)和铁氰化钾。

[0261] 包含两个或更多个半胱氨酸残基的肽单体也可以通过如上文描述的方法制备。在此情况中,获得具有不同类型的二硫键的异构体。在另一个方面,可以通过为半胱氨酸侧链选择保护基的组合制备特定半胱氨酸残基之间形成二硫键的肽二聚体。保护基的组合的例子包括MeBzl(甲基苄基)基团和Acm(乙酰胺甲基)基团、Trt(三苯甲基)基团和Acm基团、

Npys (3-硝基-2-吡啶基巯基) 基团和Acm基团、及S-Bu-t (S-叔-丁基) 基团和Acm基团的组合。例如,在MeBzl基团和Acm基团的组合的情况下,可以通过除去除了在半胱氨酸侧链上外的MeBzl基团和保护基,将所得的单体溶液进行空气氧化以形成脱保护的半胱氨酸残基之间的二硫键,然后脱保护并使用碘氧化以形成先前通过Acm保护的半胱氨酸残基之间的二硫键实施肽二聚体制备。

[0262] IV. 多核苷酸

[0263] 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KNTC2基因(例如GenBank登录号NM_006101 (SEQ ID NO:77) 或AF017790 (SEQ ID NO:78)) 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。

[0264] 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。

[0265] 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。

[0266] 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技术或通过在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。

[0267] V. 外来体(exosomes)

[0268] 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体。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。

[0269] 复合体中包含的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-A2 (尤其是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群中频繁表达的HLA-A2型对于获得有效的结果是有利的,而且也可以使用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KNTC2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。

[0270] 当对本发明的外来体使用HLA抗原的HLA-A2型时,具有选自SEQ ID NOs:2,3,7,17,41,53和68的氨基酸序列的肽是特别有用的。

[0271] 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-A2抗原的复合物。

[0272] VI. 抗原呈递细胞 (APC)

[0273] 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。

[0274] 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。

[0275] 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。

[0276] 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:

[0277] a: 自第一受试者收集APC;

[0278] b: 使步骤a的APC接触本发明的肽;并

[0279] c: 对第二受试者步骤b的APC。

[0280] 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、慢性髓样白血病 (CML)、结直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌 (SCLC) 和软组织肿瘤,但不限于这些。

[0281] 在本发明的语境中,可以利用本发明的肽来制造能够诱导APC的药物组合物。本发明还提供了用于制备诱导APC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APC的用途。

[0282] 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KNTC2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具体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; Boczkowski D et al., J Exp Med 1996, 184:465-72; 日本专利公开文本No. 2000-509281中所述来实施。通过将编码本发明的肽的基因转移入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。或者,本发明的APC可以通过包括仅使APC与本发明的肽接触的步骤的方法制备。在一些实施方案中,本发明的APC在它们的表面上呈递HLA-A2抗原与本发明的肽的复合物。

[0283] VII. 细胞毒性T细胞 (CTL)

[0284] 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。

[0285] 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。

[0286] 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KNTC2的细胞,例如癌细胞,或者或被KNTC2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。

[0287] 在一些实施方案中,本发明的CTL识别呈递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-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-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。具体地,本发明的CTL能够识别表达KNTC2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特异性细胞毒性活性。

[0288] VIII. T细胞受体(TCR)

[0289] 本发明还提供组合物,所述组合物包含一个或多个编码两种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。还涵盖使用所述组合物的方法。这样的TCR亚基能够形成

TCR,后者赋予T细胞以针对呈递KNTC2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'-gtctaccaggcattcgcttcat-3')(SEQ ID NO:80),以及作为3'侧引物的对TCR α 链C区特异的3-TRa-C引物(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3')(SEQ ID NO:81),对TCR β 链C1区特异的3-TRb-C1引物(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3')(SEQ ID NO:82),或对TCR β 链C2区特异的3-TRb-C2引物(5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3')(SEQ ID NO:83),但不限于此。衍生的TCR能够以高亲和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。

[0290] 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。

[0291] 针对本发明的肽的特异性的TCR应当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HLA阳性靶细胞的细胞毒性活性,诸如铬释放测定法。

[0292] 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可以在HLA-A2的背景中结合KNTC2肽,例如SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68。

[0293] 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)。

[0294] IX. 药物组合物:

[0295] 由于与正常组织相比,KNTC2表达在癌症(其例子包括但不必限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤)中上调,本发明的肽或多核苷酸可用于诱导针对癌症或肿瘤细胞的免疫应答,并且如此用来治疗和/或预防癌症,和/或用于预防癌症的转移性或术后复发。因此,本发明提供配制为用于治疗 and/或预防癌症,和/或预防它们的转移性或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。

[0296] 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:

[0297] (a) 本发明的肽,

[0298] (b) 处于可表达形式的编码本发明的肽的多核苷酸,

[0299] (c) 本发明的APC,

[0300] (d) 本发明的外来体,和

[0301] (e) 本发明的CTL。

[0302] 在药物组合物或作用剂中,此类肽、多核苷酸、APC和CTL以治疗或药学有效量存在。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。

[0303] 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/或预防其转移性或手术后复发,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、猪、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-A2的受试者。

[0304] 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/或预防癌性或肿瘤性状况,和/或防止其转移性或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:

[0305] (a) 本发明的肽;

[0306] (b) 处于可表达形式的编码本发明的肽的多核苷酸;

[0307] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC,

[0308] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体;和

[0309] (e) 本发明的CTL。

[0310] 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:

[0311] (a) 本发明的肽;

[0312] (b) 处于可表达形式的编码此类本发明的肽的多核苷酸;

[0313] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC;

[0314] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体;和

[0315] (e) 本发明的CTL。

[0316] 或者,本发明进一步提供一种制备用于治疗或预防癌性或肿瘤性状况,和/或防止其转移性或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:

[0317] (a) 本发明的肽;

[0318] (b) 处于可表达形式的编码本发明的肽的多核苷酸;

[0319] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC;

[0320] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体;和

[0321] (e) 本发明的CTL。

[0322] 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性或肿瘤性状况、和/或防止其转移性或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:

[0323] (a) 本发明的肽;

[0324] (b) 处于可表达形式的编码本发明的肽的多核苷酸;

[0325] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC;

[0326] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体;和

[0327] (e) 本发明的CTL。

[0328] 在另一个实施方案中,本发明还提供用于治疗或预防癌性或肿瘤性状况、和/或防止其转移性或手术后复发的方法,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:

[0329] (a) 本发明的肽;

[0330] (b) 处于可表达形式的编码此类本发明的肽的多核苷酸;

[0331] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC;

[0332] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体;和

[0333] (e) 本发明的CTL。

[0334] 依照本发明,已经显示了具有选自SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68中的氨基酸序列的肽是HLA-A2限制性表位肽,并且如此充当能够在受试者中诱导针对表达HLA-A2和KNTC2的癌症的强且特异性的免疫应答的候选物。因此,包含任何具有选自SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68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。此类作用剂或组合物中的肽量可以是在携带表达KNTC2和HLA-A2的癌症的受试者中显著诱导强的且特异性的免疫应答上有效的量。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。

[0335] 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、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤。优选地,癌症表达HLA-A2(即HLA-A2阳性癌症)。

[0336] 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、编码所述肽的多核苷酸、呈递所述肽的细胞,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。

[0337] 如果必要,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别的活性成分,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。

[0338] 本领域技术人员应当认可,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。

[0339] 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。

[0340] 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或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、和载有使用说明的包装插页。

[0341] 如果期望的话,本发明的药物组合物或药物作用剂可包装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。

[0342] (1) 含有肽的药物组合物

[0343] 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。此类担载体的例子包括但不限于灭菌水、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。

[0344] 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。

[0345] 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(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。

[0346] 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配制剂、和其中脂质结合至肽的配制剂。

[0347] 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(例如乙酸、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(例如盐酸、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。

[0348] 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)。

[0349] 合适的施用方法的例子包括,但不一定限于,口服、皮内、皮下、肌肉内、骨内、腹膜内和静脉内注射等等。施用可以是系统施用或局部施用至靶位点附近(即直接注射)。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KNTC2的癌症或肿瘤的受试者施用治疗或药学有效量的本发明的肽。或者,可以对具有表达KNTC2的癌症的受试者施用足以诱导针对表达KNTC2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确定合适的且最佳的剂量。

[0350] (2) 含有多核苷酸的药物组合物

[0351] 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文中公开的肽的核酸。在本文中,短语“处于可表达形式的”意味着多核苷酸在导入细胞时会在体内表达成诱导抗肿瘤免疫力的多肽。在一个例示性的实施方案中,感兴趣的多核苷酸的核酸序列包括多核苷酸表达所必需的调节元件。多核苷酸可具有为实现稳定插入靶细胞的基因组所需的配置(关于同源重组盒载体的描述参见例如Thomas KR&Capecchi MR,*Cell* 1987,51:503-12)。参见例如Wolff et al.,*Science* 1990,247:1465-8;美国专利No.5,580,859;5,589,466;5,804,566;5,739,118;5,736,524;5,679,647;及W098/04720。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)。

[0352] 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。

[0353] 将多核苷酸投递入患者体内可以是直接的,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。

[0354] 关于基因疗法的方法的一般综述参见Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12:488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3:87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33:573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260:926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62:191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11 (5): 155-215。在eds. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, NY, 1993); 及Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990中描述了可应用于本发明的重组DNA技术领域的公知方法。

[0355] 与肽的施用一样,多核苷酸的施用可以通过口服、皮内、皮下、静脉内、肌肉内、骨内、或腹膜内注射等等进行。施用可以是系统施用或局部施用(直接注射)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KNTC2的癌症或肿瘤的受试者施用治疗或药学有效量的本发明的多核苷酸。或者,可以对具有表达KNTC2的癌症的受试者施用足以诱导针对表达KNTC2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0.1mg至30mg,例如0.01mg至100mg,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。本领域技术人员能容易地确定合适的且最佳的剂量。

[0356] X. 使用肽、外来体、APC和CTL的方法

[0357] 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。

[0358] (1) 诱导抗原呈递细胞(APC)的方法

[0359] 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。

[0360] 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:

[0361] a: 从受试者收集APC; 和

[0362] b: 使步骤a的APC与本发明的肽接触。

[0363] 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KNTC2之外的TAA的CTL可诱导肽组合使用。

[0364] 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如下的步骤: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,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,本发明的方法还可包括如下的步骤: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. 药物组合物 (2) 含有多核苷酸的药物组合物”部分。

[0365] 本发明的方法还可包括如下的步骤: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:

[0366] a: 自受试者收集APC; 并

[0367] b: 向步骤a中收集的APC中导入编码本发明肽的多核苷酸。

[0368] 步骤b可如上文“VI. 抗原呈递细胞 (APC)”部分中所述来实施。

[0369] 或者,本发明的方法可以包括如下的步骤:经由下述步骤之一制备能够特异性诱导针对KNTC2的CTL活性的APC:

[0370] (a) 在体外、离体或体内使APC与本发明的肽接触; 和

[0371] (b) 将编码本发明的肽的多核苷酸导入APC中。

[0372] 或者,本发明的方法可以包括经由下述步骤之一诱导具有CTL诱导能力的APC的步骤:

[0373] (a) 使APC与本发明的肽接触; 并

[0374] (b) 将编码本发明的肽的多核苷酸导入APC中。

[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。用于诱导具有CTL诱导能力的APC的APC可以优选地是表达HLA-A2抗原的APC(即HLA-A2阳性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-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-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HLA类型相同的HLA类型即可。

[0376] 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。

[0377] 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的组合物中的用途。

[0378] 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。

[0379] (2) 诱导CTL的方法

[0380] 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。

[0381] 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(即结合)本发明的肽与HLA抗原的细胞表面复合物。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:

[0382] 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;

[0383] 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;

[0384] 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。

[0385] 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KNTC2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。

[0386] 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:

[0387] a: 自受试者收集APC;

[0388] b: 用本发明的肽接触步骤a的APC;并

[0389] c: 将步骤b的APC与CD8阳性T细胞共培养。

[0390] 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(APC)”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。

[0391] 作为上述APC的替代,可任选地使用在表面上呈递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和外来体在表面上呈递有本发明的肽与HLA-A2的复合物。

[0392] 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。

[0393] 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-A2抗原的受试者。通过本发明的方法诱导的CTL可以识别在其表面上呈递本发明的肽与HLA抗原(例如HLA-A2)的复合物的细胞。这样的CTL显示针对在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KNTC2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HLA类型相同的HLA类型即可。

[0394] 另外,本发明提供了一种制造用于诱导CTL的药物组合物的方法或工艺,其中该方法包括混合或配制本发明的肽与药学可接受的承载体的步骤。

[0395] 在另一个实施方案中,本发明提供用于诱导CTL的组合物,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。

[0396] 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。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。

[0397] XI. 诱导免疫应答的方法

[0398] 此外,本发明提供了诱导针对涉及KNTC2的疾病的免疫应答的方法。涵盖的疾病包括癌症,其例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤。优选地,癌症表达HLA-A2(即HLA-A2阳性癌症)。

[0399] 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。

[0400] 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,其中该方法或工艺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。

[0401] 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:

[0402] (a) 本发明的肽;

[0403] (b) 处于可表达的形式的编码本发明的此类肽的核酸;

[0404] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的APC;

[0405] (d) 在其表面上呈递本发明的肽的外来体;或

[0406] (e) 本发明的CTL。

[0407] 在本发明的语境中,过表达KNTC2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、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤。

[0408] 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KNTC2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KNTC2的癌症的方法,该方法包括下述步骤:

[0409] 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KNTC2表达水平;

[0410] ii) 将KNTC2表达水平与正常对照比较;并

[0411] iii) 对具有与正常对照相比过表达KNTC2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。

[0412] 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KNTC2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

KNTC2表达水平的步骤,其中该表达水平与KNTC2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。

[0413] 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。优选地,可以选择HLA-A2阳性受试者以施用本发明的疫苗或药物组合物。

[0414] 任何衍生自受试者的细胞或组织均可用于测定KNTC2表达水平,只要其可以包括KNTC2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。

[0415] 根据本发明,可以测定在自受试者获得的生物学样品中KNTC2的表达水平。KNTC2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,KNTC2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KNTC2的表达水平而言,可优选使用阵列。本领域技术人员可利用KNTC2的序列信息制备上述探针。举例而言,KNTC2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KNTC2的表达水平可以作为所杂交的标记物的强度检测。

[0416] 此外,KNTC2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KNTC2的可得序列信息制备。

[0417] 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KNTC2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。

[0418] 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KNTC2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KNTC2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KNTC2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体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)。

[0419] 或者,可以检测KNTC2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KNTC2蛋白(例如SEQ ID NO:79)的量。测定作为翻译产物的KNTC2蛋白量的方法的例子包括但不限于免疫测定法,此类方法使用特异识别所述KNTC2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KNTC2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。

[0420] 作为另一种基于其翻译产物检测KNTC2的表达水平的方法,可利用针对KNTC2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KNTC2蛋白质存在/水平增加,且同时表明KNTC2的高表达水平。

[0421] 对于,如果表达水平较之KNTC2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,则可以认为受试者衍生的样品中的KNTC2基因的表达水平增加了。

[0422] 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KNTC2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KNTC2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KNTC2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。

[0423] 在本发明的背景中,自己知为非癌性的生物样品测定的对照水平称为“正常对照水平”。在另一个方面,若从癌性生物学样品测定对照水平,则它称为“癌性对照水平”。

[0424] 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。

[0425] 当KNTC2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。

[0426] 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:

[0427] a) 测定KNTC2在自具有癌症的受试者获得的生物学样品中的表达水平;

[0428] b) 将步骤a)中测定的KNTC2的表达水平与正常对照水平比较;并

[0429] c) 若KNTC2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。

[0430] 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HLA-A2的受试者(即HLA-A2阳性受试者)。用HLA分型的方法是本领域中公知的。例如,可以使用基于PCR的用于对HLA等位基因分型的方法。针对HLA-A2的抗体也是适合于鉴定受试者的HLA类型的工具。

[0431] 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。

[0432] 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,组织)中针对本发明的一种或多种肽的抗体诊断癌症。

[0433] 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。

[0434] 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来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的受试者或评估该药物组合物的治疗效果。

[0435] 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。

[0436] 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诊断剂和方法。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)。用于收集或分离此类免疫活性细胞的方法是本领域中公知的。在一些实施方案中,可以采用可导致抗原特异性CTL的产生的任何作用剂作为试剂,所述抗原特异性CTL识别并结合肽表位。不需要使用肽试剂作为免疫原。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。

[0437] 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。

[0438] 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。

[0439] 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。

[0440] 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KNTC2多肽表达或呈递为特征的病症的方法。

[0441] 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,Science274:94;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))。

[0442] 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KNTC2肽的受试者的免疫应答的方法,所述方法包括下述步骤:

[0443] (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;

[0444] (b) 检测或测定步骤(a)中诱导的CTL的诱导水平;和

[0445] (c) 将所述受试者的免疫应答与所述CTL诱导水平相关联。

[0446] 在本发明的背景中,优选地,免疫原是下述中至少一种:具有SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53或68的氨基酸序列的KNTC2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。

[0447] 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。

[0448] 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KNTC2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。

[0449] XII. 抗体

[0450] 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)其他肽。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。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KNTC2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。

[0451] 本发明还提供了多种免疫学测定法,用于检测和/或定量KNTC2蛋白(SEQ ID NO: 79)或其片段,包括具有选自SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68的氨基酸序列的肽。在本发明的语境中,与KNTC2多肽结合的抗KNTC2抗体优选识别具有选自SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68的氨基酸序列的肽。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KNTC2多肽之间的结合在任何具有选自SEQ ID NO:2,3,7,17,41,53和68的氨基酸序列的片段多肽存在下受到抑制时,此类抗体视为特异性结合该片段。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。

[0452] 相关免疫学的但非抗体的测定法也可以包括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KNTC2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KNTC2的癌症的检测、监测、和预后,表达KNTC2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、慢性髓样白血病(CML)、结直肠癌、食管癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌(SCLC)和软组织肿瘤。

[0453] 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。

[0454] 本发明的抗体可识别具有选自SEQ ID NOs:2,3,7,17,41,53和68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。

[0455] 或者,可以将编码本发明肽或其片段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其所需肽,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。

[0456] 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)。

[0457] 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。

[0458] 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。

[0459] 为了制备在本发明的背景中使用的单克隆抗体，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。

[0460] 可根据已知的方法，例如Milstein等（Galfre和Milstein, Methods Enzymol 173:3-46 (1981)）的方法，将上述免疫细胞与骨髓瘤细胞进行融合。

[0461] 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。

[0462] 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，可以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JPS 63-17688）。

[0463] 随后，然后可以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/或拮抗剂候选物。

[0464] 如此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。

[0465] 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))。

[0466] 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。

[0467] 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。

[0468] 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。

[0469] 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 Sepharose F.F. (Pharmacia)。

[0470] 除亲和层析外的合适的层析技术的例子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。

[0471] 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。

[0472] XII. 载体和宿主细胞

[0473] 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。本发明的载体可用作在宿主细胞中的本发明的多核苷酸 (尤其是 DNA) 的载体,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。

[0474] 当选择大肠杆菌作为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,载体应具有适合于在大肠杆菌中扩增的“ori”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。

[0475] 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 (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。

[0476] 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。

[0477] 在下文中,参照实施例更为详细地描述本发明。然而,虽然下述材料、方法和实施例可以用来帮助普通技术人员进行和使用本发明的某些实施方案,但是这些仅意图例示本发明的各方面,如此绝不限本发明的范围。如本领域普通技术人员会容易认可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。

实施例

[0478] 材料和方法

[0479] 细胞系

[0480] C1R, HLA-A, B负突变体成淋巴细胞样细胞系,和COS7,非洲绿猴肾细胞购自ATCC。

[0481] 稳定表达HLA-A*0201的刺激细胞的生成

[0482] 使用表达HLA-A*0201的C1R稳定细胞系(C1R-A02)作为刺激细胞。为了生成稳定的细胞系,通过Neon转染系统(Invitrogen)以1350V, 20ms脉冲和3次实施电穿孔。用携带新霉

素抗性基因的pcDNA3.1载体 (Invitrogen) 转染HLA-A*0201构建体。为了选择稳定转染的细胞,在转染后第2天开始G418 (Invitrogen) 选择。培养后2周,将细胞在含有补充有G418的培养基得到96孔板上分配。分配后30天,通过FACS (BD Biosciences) 分析增殖细胞的HLA-A*0201表达。

[0483] 衍生自KNTC2的肽的候选者选择

[0484] 使用“NetMHC3.2”结合预测服务器 (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) 预测了衍生自KNTC2的结合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℃。

[0485] 体外CTL诱导

[0486] 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 Jul 15, 63 (14) : 4112-8) 体外制备DC。具体地说,对于用Ficoll-Paque Plus (Pharmacia) 溶液从正常志愿者 (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1000IU/ml的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (R&D System) 和1000IU/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培养基中在3微克/mlβ2-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。所生成的细胞表观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射线放射 (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测试针对经肽冲激的C1R-A02细胞的CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84 (1) : 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84 (8) : 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10 (24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97 (5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96 (8) : 498-506)。

[0487] CTL扩增规程

[0488] 使用与Riddell等人 (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333 (16) : 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2 (2) : 216-23) 记载的方法相似的方法在培养中扩增CTL。将总共 5×10^4 个CTL在25ml AIM-V/5%AS培养基中悬浮,其中有在40ng/ml抗CD3单克隆抗体 (Pharmingen) 存在下经丝裂霉素C灭活的两种人B-淋巴母细胞样细胞系。启动培养后一天,向培养物添加120IU/ml IL-2。在第5天、第8天和第11天给培养物补加新

鲜的含有30IU/ml IL-2的AIM-V/5%AS培养基 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

[0489] CTL克隆的建立

[0490] 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125IU/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125IU/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 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

[0491] 特异性CTL活性

[0492] 为了检查特异性CTL活性, 实施了IFN- γ ELISPOT测定法和IFN- γ ELISA。制备经肽冲激的C1R-A02细胞 (1×10^4 /孔) 作为刺激细胞。使用48孔中培养的细胞、CTL细胞系和CTL克隆作为应答细胞。在制造商的规程下实施IFN- γ ELISPOT测定法和IFN- γ ELISA。

[0493] 强迫表达靶基因和/或HLA-A*0201的细胞的建立

[0494] 通过PCR来扩增编码靶基因或HLA-A*0201的可读框的cDNA。将PCR扩增产物克隆入表达载体。使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照制造商的规程将质粒转染入COS7 (其是靶基因和HLA-A*0201阴性的细胞系)。自转染起2天后, 用Versene (Invitrogen) 收获经转染的细胞, 并用作CTL活性测定法的刺激细胞 (5×10^4 个细胞/孔)。

[0495] 结果

[0496] 衍生自KNTC2的HLA-A*0201结合肽的预测

[0497] 表1a和1b以高结合亲和力的次序显示了KNTC2的HLA-A02结合9聚体和10聚体肽。选择并检查总共76种具有潜在的HLA-A02结合能力的肽以测定表位肽。

[0498] [表1a]

[0499] 衍生自KNTC2的HLA-A*0201结合9聚体肽

[0500]

起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)	SEQ ID NO
330	GLNEEIARV	14	1
131	FLYGFLCPS	19	2
181	IYAALVWLI	21	3
274	ALNEQIARL	25	4
549	GLSEAMNEL	30	5
327	KLNLNNEEI	59	6
184	ALVWLIDCI	98	7
588	MVATHVGSV	124	8
464	LLNETEEEI	126	9
599	HLEEQIAKV	127	10

323	ILDQKLNGL	162	11
581	NLQRLEMV	182	12
355	IIDNQKYSV	289	13
91	FIQQCIRQL	325	14
449	CLVKYRAQV	356	15
176	HTWPHIVAA	451	16
127	KIFTFLYGF	454	17
481	GLEDITLEQL	458	18
180	HIVAALVWL	478	19
417	KLARKLCLI	550	20
218	GIMHNKLFL	831	21
163	ALSKSSMYT	1032	22
585	LLEMVATHV	1060	23
72	GIFSSSEKI	1498	24
411	QLAEYHKLA	1592	25
129	FTFLYGFLC	1659	26
410	TQLAEYHKL	1725	27
560	VQREYQLVV	1938	28
564	YQLVVQTTT	2253	29
492	MITESKRVS	3246	30
502	TLKEEVQKL	3280	31
534	SLEKHKHLL	3460	32
485	TLEQLNAMI	3546	33
316	NLESHSAIL	4545	34
361	YSVADIERI	4545	35

[0501] [表1b]

[0502] 衍生自KNTC2的HLA-A*0201结合10聚体肽

[0503]

起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)	SEQ ID NO
584	RLLEMVATHV	24	36
131	FLYGFLCPSY	37	37
313	YMSNLESHA	51	38
393	KLWNEELKYA	55	39
163	ALSKSSMYTV	56	40
127	KIFTFLYGFL	135	41
125	FLKIFTFLYG	164	42
354	NIIDNQKYSV	245	43
113	SMKSLQAPSV	305	44
491	AMITESKRVS	410	45

463	ELNETEEEEI	532	46
180	HIVAALVWLI	564	47
187	WLIDCIKIHT	586	48
162	FALSKSSMYT	668	49
614	CMSEDLSENI	879	50
256	DLFNVDFAKL	1047	51
509	KLDDLYQQKI	1133	52
322	AILDQKLNGL	1184	53
15	SMQELRSQDV	1270	54
183	AALVWLIDCI	1330	55
541	LLESTVNQGL	1339	56
133	YGFLCPSYEL	1489	57
223	KLFLDYTIKC	1616	58
273	RALNEQIARL	1618	59
225	FLDYTIKCYE	1778	60
587	EMVATHVGSV	1815	61
135	FLCPSYELPD	1826	62
228	YTIKCYESFM	2153	63
253	KLKDLFNVDA	2196	64
129	FTFLYGF LCP	2494	65
581	NLQR LLEMVA	2681	66
168	SMYTVGAPHT	2717	67
185	LVWLIDCIKI	2778	68
176	HTWPHIVAAL	3257	69
155	FKDLGYPFAL	3439	70
259	NVDAFKLES L	3792	71
236	FMSGADSFDE	4152	72
219	IMHNKLFLDY	4307	73
327	KLNGLNEEIA	4308	74
298	KLKASLQGDV	4873	75
580	NNLQR LLEMV	4935	76

[0504] 起始位置指示从KNTC2的N端起的氨基酸残基的数目,解离常数[Kd (nM)]从“NetMHC3.2”推导。

[0505] 用以HLA-A*0201限制的来自KNTC2的预测肽的CTL诱导

[0506] 依照如“材料和方法”中描述的方案生成衍生自KNTC2的那些肽的CTL。通过IFN- γ ELISPOT测定法检测肽特异性CTL活性(图1)。与对照孔相比,用KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO:2)的孔号#8(a),用KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3)的#4(b),用KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)的#7(c),用KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO:17)的#5(d),用KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO:41)的#3(e),用KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO:53)的#2(f)和用KNTC2-

A02-10-185 (SEQ ID NO:68) 的#6 (g) 表明强的IFN- γ 生成。在另一个方面,通过用表1a和b中显示的其他肽刺激没有检出特异性CTL活性,尽管事实上此类肽拥有在HLA-A*0201的情况下的结合活性的潜力。作为阴性数据的典型,从用KNTC-A02-9-330 (SEQ ID NO:1) 刺激的CTL (h) 没有观察到特异性IFN- γ 生成。总之,这些结果提示了7种衍生自KNTC2的选择的肽可以诱导强的CTL。

[0507] 针对KNTC2衍生肽的CTL系和克隆的建立

[0508] 扩充显示在用KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO:2) 的孔号#8 (a), 用KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3) 的#4 (b) 和用KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) 的#7 (c) 中通过IFN- γ ELISPOT测定法检出的肽特异性CTL活性的细胞,并建立CTL系。通过IFN- γ ELISA测量这些CTL系的CTL活性(图2)。与没有肽冲击的靶细胞相比,那些CTL系表明针对用相应肽冲击的靶细胞的强的IFN- γ 生成。此外,通过从如“材料和方法”中描述的CTL系的限制稀释建立CTL克隆,并通过IFN- γ ELISA测量针对用相应肽冲击的C1R-A02细胞的来自CTL克隆的IFN- γ 生成。从用KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO:2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3) (b) 和KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) (c) 刺激的CTL克隆观察到强的IFN- γ 生成(图3)。

[0509] 针对表达KNTC2和HLA-A*0201的靶细胞的特异性CTL活性

[0510] 对针对KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) 肽生成的建立的CTL系检查识别表达KNTC2和HLA-A*0201分子的靶细胞的能力。制备用全长的KNTC2和HLA-A*0201基因两者转染的COS7细胞(表达KNTC2和HLA-A*0201基因的靶细胞的特定模型)作为刺激细胞,并使用用全长的KNTC2或HLA-A*0201转染的COS7细胞作为对照。在图4中,用KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) 刺激的CTL系显示针对表达KNTC2和HLA-A*0201两者的COS7细胞的强的CTL活性。在另一个方面,针对对照没有检出显著的特异性CTL活性。如此,此数据清楚证明KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) 肽在具有HLA-A*0201分子的靶细胞上内源加工并表达,并且被CTL识别。这些结果指示衍生自KNTC2的此肽可以用于对具有KNTC2表达癌症的患者应用癌症疫苗。

[0511] 抗原肽的同源性分析

[0512] 用KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO:2), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3), KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7), KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO:17), KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO:41), KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO:53) 和KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO:68) 刺激的CTL与衍生自己知敏化人免疫系统的其它分子的肽同源。为了排除此可能性,使用BLAST算法(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)作为询问对这些肽序列进行同源性分析,这揭示了没有具有显著同源性的序列。同源性分析的结果指示KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO:2), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3), KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7), KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO:17), KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO:41), KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO:53) 和KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO:68) 的序列是独特的,因此据我们所知,此分子引起对一些无关分子的不想要的免疫应答的可能性很小。

[0513] 总之,本文中鉴定的衍生自KNTC2的新的HLA-A*0201表位肽可以在癌症免疫疗法领域中得到应用。

[0514] 工业应用性

[0515] 本发明提供了新的衍生自KNTC2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KNTC2相关疾病，例如癌症，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、慢性髓样白血病 (CML)、结直肠癌、食道癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌 (SCLC) 和软组织肿瘤。

[0516] 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。

序列表

<110> 肿瘤疗法科学股份有限公司
<120> KNTC2 肽及包含它们的疫苗
<130> ONC-A1304P
<150> US 61/777,334
<151> 2013-03-12
<160> 84
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 1
Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
[0001] <223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 2
Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 3
Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 4
Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu
1 5

<210> 5

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 5
Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 6
Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

[0002] <400> 7
Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 8
Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 9
Leu Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile
1 5

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

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 10

His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 11

Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 12

[0003] Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 13

Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 14

Phe Ile Gln Gln Cys Ile Arg Gln Leu
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 15
Cys Leu Val Lys Tyr Arg Ala Gln Val
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 16
His Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 17
Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe
1 5

[0004]

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 18
Gly Leu Glu Asp Thr Leu Glu Gln Leu
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 19
His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 20

Lys Leu Ala Arg Lys Leu Lys Leu Ile
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 21

Gly Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 22

Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr
1 5

[0005]

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 23

Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 24

Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 25

Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu Ala
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 26

Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 27

Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 28

Val Gln Arg Glu Tyr Gln Leu Val Val
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 29

Tyr Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 30

Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val

1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 31
Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 32
Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu
1 5

[0007] <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 33
Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 34
Asn Leu Glu Ser His Ser Ala Ile Leu
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 35
Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg Ile
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 36
Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 37
Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
[0008]
<400> 38
Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His Ser Ala
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 39
Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys Tyr Ala
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 40
Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val
1 5 10

<210> 41

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 41

Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu
1 5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 42

Phe Leu Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

[0009]

<400> 43

Asn Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 44

Ser Met Lys Ser Leu Gln Ala Pro Ser Val
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 45

Ala Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 46

Glu Leu Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile
1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 47

His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile
1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 48

[0010] Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile His Thr
1 5 10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 49

Phe Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 50

Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile
1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 51
Asp Leu Phe Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 52

Lys Leu Asp Asp Leu Tyr Gln Gln Lys Ile
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 53

Ala Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu
1 5 10

[0011]

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 54

Ser Met Gln Glu Leu Arg Ser Gln Asp Val
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽
<400> 55

Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 56

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

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 57

Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu
1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 58

Lys Leu Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys
1 5 10

[0012]

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 59

Arg Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu
1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 60

Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu
1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 61

Glu Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 62

Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 63

Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met
1 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 64

Lys Leu Lys Asp Leu Phe Asn Val Asp Ala
1 5 10

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 65

Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro
1 5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 66

Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala

[0013]

[0014]

1 5 10

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 67

Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His Thr
1 5 10

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 68

Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 69

His Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala Leu
1 5 10

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 70

Phe Lys Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Ala Leu
1 5 10

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 71

Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu
1 5 10

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 72

Phe Met Ser Gly Ala Asp Ser Phe Asp Glu
1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 73

Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 74

Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 75

Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln Gly Asp Val
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 的肽

<400> 76

Asn Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val
1 5 10

<210> 77

[0015]

<211> 2209
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 77

actgcgcgcg tcgtgcgtaa tgacgtcagc gccggcggag aatttcaaat tgaacggct	60
tiggcgggcc gaggaaggac ctggigtiti gatgaccgct gtctgtctta gcagatactt	120
gcacggitta cagaaattcg gtccctgggt cggttcagga aacfggaaaa aaggtaataa	180
gcattgaagcg cagttcagtt tccagcgggt gtgtcggccg cctctccatg caggagttaa	240
gatcccagga tgaataaaaa caaggccctc alacccctca aaccaaagag aaaccaacct	300
tiggaaagtt gagtataaac aaaccgacat ctgaagaaa agtctcgtta ttggcaaaa	360
gaactagtgg acatggatcc cggatagtc aacttggat atttccagt tctgagaaaa	420
tcaaggaccg gagaccactt aatgacaaag ctttcattca gcagtgtatt cgacaacct	480
gtgagtttct tacagaaaat ggtaatgcac ataattgttc catgaaatct ctacaagctc	540
cctctgttaa agacttccgt aagatcttca ctttcttta tggcttctg tgccctcat	600
acgaacttcc tgacacaaag ttgaagaag aggttccaag aatctttaa gaccttgggt	660
atccttttgc acatctcaaa agctccatgt acacagtggt ggcctctcat acatggctc	720
acattgtggc agccttagtt tggctaatag actgcatca gatacatact gccatgaaag	780
aaagctcacc ttattttgat gatgggcagc ctgggggaga agaaactgaa gatggaatta	840
tgcataataa gttgtttttg gactacacca taaaatgcta tgagagtttt atgagtggtg	900
ccgacagcti tgatgagatg aatgcagagc tgcagtcaaa actgaaggat ttattttaatg	960
tggtatgttt taagciggaa tcattagaag caaaaaacag agcatigaat gaacagattg	1020
caagatttga acaagaaga gaaaaagaac cgaatcgtct agagtcgtg agaaaactga	1080
aggttctctt acaaggagat gtcaaaaagt atcaggcata catgagcaat ttggagtctc	1140
attcagecat tctgaccag aaattaaatg gtctcaatga ggaatttct agagtagaac	1200
tagaatgtga acaataaaaa caggagaaca ctgcactaca gaatacatt gacaaccaga	1260
agtactcagt tgcagacatt gagegaataa atcatgaag aaatgaattg cagcagacia	1320
ttaataaati aaccaaggac ctggaagctg aacaacagaa gttgtggaat gaggagttaa	1380
aatatgccag aggcaaagaa gcgattgaaa cacaattagc agagtatcac aaatttgcta	1440
gaaaattaaa acttattcct aaagggtctg agaattccaa aggttatgac ttigaaatta	1500
agtttaatcc cgaggctgtt gccaaactgc ttgtcaata cagggtctca gtttatgtac	1560
ctcttaagga actccigaat gaaactgaag aagaatttaa taaagcccta aataaaaaaa	1620
tgggtttgga ggatacttta gaacaattga atgcaatgat aacagaaagc aagagaagtg	1680
tgagaactct gaaagaagaa gtcaaaaagc tggatgact ttaccaacaa aaaattaagg	1740
aagcagagga agaggatgaa aaatgtgccg gtgagcttga gtcttggag aaacacaagc	1800
acctgttaga aagtactgtt aaccaggggc tcagigaagc tatgaatgaa ttagtgtctg	1860
ttcagcggga ataccaacta gttgtgcaaa ccacagctga agaaagacga aaagtgggaa	1920
ataacttgca acgtctgtta gagaaggtg ctacacatgt tgggtctgta gagaaacatc	1980
ttagggagca gattgtctaa gtgatagag aataagaaga atgcatgtca gaagatctct	2040

[0016]

cggaatat taaagagatt agagataagt atgagaagaa agctactcta attaatgttt 2100
 ctgaagaatg aagataaaat gttagcatg tatatatatc catagtgaat aaaattgtct 2160
 cagttaaagtg taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2209

<210> 78
 <211> 2150
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (105).. (2033)

<400> 78
 ctgagccac gaaggcccg ctgtccctgc tagcagatac ttgcaagggt tacagaaatt 60
 cggccctgg gtctgtctcag gaaactggaa aaaaggtcat aagc atg aag cgc agt 116
 Met Lys Arg Ser
 1

tca gtt tcc agc ggt ggt gct ggc cgc ctc tcc atg cag gag tta aga 164
 Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Ser Met Gln Glu Leu Arg
 5 10 15 20

tcc cag gat gta aat aaa caa ggc ctc tat acc cct caa acc aaa gag 212
 Ser Gln Asp Val Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Thr Pro Gln Thr Lys Glu
 25 30 35

aaa cca acc ttt gga aag ttg agt ata aac aaa ccg aca tct gaa aga 260
 Lys Pro Thr Phe Gly Lys Leu Ser Ile Asn Lys Pro Thr Ser Glu Arg
 40 45 50

[0017]

aaa gtc tgc cta ttt ggc aaa aga act agt gga cat gga tcc cgg aat 308
 Lys Val Ser Leu Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gly His Gly Ser Arg Asn
 55 60 65

agt caa ctt ggt ata ttt tcc agt tct gag aaa atc aag gac ccg aga 356
 Ser Gln Leu Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile Lys Asp Pro Arg
 70 75 80

cca ctt aat gac aaa gca ttc att cag cag igt att cga caa ctc tgt 404
 Pro Leu Asn Asp Lys Ala Phe Ile Gln Gln Cys Ile Arg Gln Leu Cys
 85 90 95 100

gag ttt ctt aca gaa aat ggt tat gca cat aat gtg tcc atg aaa tct 452
 Glu Phe Leu Thr Glu Asn Gly Tyr Ala His Asn Val Ser Met Lys Ser
 105 110 115

cta caa gct ccc tct gtt aaa gac ttc ctg aag atc ttc aca ttt ctt 500
 Leu Gln Ala Pro Ser Val Lys Asp Phe Leu Lys Ile Phe Thr Phe Leu
 120 125 130

tat ggc ttc ctg tgc ccc tca tac gaa ctt cct gac aca aag ttt gaa 548
 Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Thr Lys Phe Glu
 135 140 145

gaa gag gtt cca aga atc ttt aaa gac ctt ggg tat cct ttt gca cta 596
 Glu Glu Val Pro Arg Ile Phe Lys Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Ala Leu
 150 155 160

tcc aaa agc tcc atg tac aca gtg ggg gct cct cat aca tgg cct cac 644
 Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His Thr Trp Pro His
 165 170 175 180

att gtg gca gcc tta gtt tgg cta ata gac tgc atc aag ata cat act 692
 Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile His Thr
 185 190 195

[0018]	gcc atg aaa gaa agc tca cct tta ttt gat gat ggg cag cct tgg gga Ala Met Lys Glu Ser Ser Pro Leu Phe Asp Asp Gly Gln Pro Trp Gly 200 205 210	740
	gaa gaa act gaa gat gga att atg cat aat aag ttg ttt ttg gac tac Glu Glu Thr Glu Asp Gly Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu Asp Tyr 215 220 225	788
	acc ata aaa tgc tat gag agt ttt atg agt ggt gcc gac agc ttt gat Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met Ser Gly Ala Asp Ser Phe Asp 230 235 240	836
	gag atg aat gca gag ctg cag tca aaa ctg aag gat tta ttt aat gtg Glu Met Asn Ala Glu Leu Gln Ser Lys Leu Lys Asp Leu Phe Asn Val 245 250 255 260	884
	gat gct ttt aag ctg gaa tca tta gaa gca aaa aac aga gca ttg aat Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Asn Arg Ala Leu Asn 265 270 275	932
	gaa cag att gca aga ttg gaa caa gaa aga gaa aaa gaa ccg aat cgt Glu Gln Ile Ala Arg Leu Glu Gln Glu Arg Glu Lys Glu Pro Asn Arg 280 285 290	980
	cta gag tcg ttg aga aaa ctg aag gct tcc tta caa gga gat gtt caa Leu Glu Ser Leu Arg Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln Gly Asp Val Gln 295 300 305	1028
	aag tat cag gca tac atg agc aat ttg gag tct cat tca gcc att ctt Lys Tyr Gln Ala Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His Ser Ala Ile Leu 310 315 320	1076
	gac cag aaa tta aat ggt ctc aat gag gaa att gct aga gta gaa cta Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val Glu Leu 325 330 335 340	1124
	gaa tgt gaa aca ata aaa cag gag aac act cga cta cag aat atc att Glu Cys Glu Thr Ile Lys Gln Glu Asn Thr Arg Leu Gln Asn Ile Ile 345 350 355	1172
	gac aac cag aag tac tca gtt gca gac att gag cga ata aat cat gaa Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg Ile Asn His Glu 360 365 370	1220
	aga aat gaa ttg cag cag act att aat aaa tta acc aag gac ctg gaa Arg Asn Glu Leu Gln Gln Thr Ile Asn Lys Leu Thr Lys Asp Leu Glu 375 380 385	1268
	gct gaa caa cag aag ttg tgg aat gag gag tta aaa tat gcc aga ggc Ala Glu Gln Gln Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys Tyr Ala Arg Gly 390 395 400	1316
	aaa gaa gcg att gaa aca caa tta gca gag tat cac aaa ttg gct aga Lys Glu Ala Ile Glu Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu Ala Arg 405 410 415 420	1364
	aaa tta aaa ctt att cct aaa ggt gct gag aat tcc aaa ggt tat gac Lys Leu Lys Leu Ile Pro Lys Gly Ala Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Asp 425 430 435	1412
	ttt gaa att aag ttt aat ccc gag gct ggt gcc aac tgc ctt gtc aaa Phe Glu Ile Lys Phe Asn Pro Glu Ala Gly Ala Asn Cys Leu Val Lys 440 445 450	1460
	tac agg gct caa gtt tat gta cct ctt aag gaa ctc ctg aat gaa act Tyr Arg Ala Gln Val Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu Leu Asn Glu Thr 455 460 465	1508
	gaa gaa gaa att aat aaa gcc cta aat aaa aaa atg ggt ttg gag gat Glu Glu Glu Ile Asn Lys Ala Leu Asn Lys Lys Met Gly Leu Glu Asp 470 475 480	1556

	act tta gaa caa ttg aat gca atg ata aca gaa agc aag aga agt gtg Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val 485 490 495 500	1604
	aga act ctg aaa gaa gaa gtt caa aag ctg gat gat ctt tac caa caa Arg Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Asp Asp Leu Tyr Gln Gln 505 510 515	1652
	aaa att aag gaa gca gag gaa gag gat gaa aaa tgt gcc agt gag ctt Lys Ile Lys Glu Ala Glu Glu Glu Asp Glu Lys Cys Ala Ser Glu Leu 520 525 530	1700
	gag tcc ttg gag aaa cac aag cac ctg cta gaa agt act gtt aac cag Glu Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu Glu Ser Thr Val Asn Gln 535 540 545	1748
	ggg ctc agt gaa gct atg aat gaa tta gat gct gtt cag cgg gaa tac Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu Asp Ala Val Gln Arg Glu Tyr 550 555 560	1796
	caa cta gtt glg caa acc acg act gaa gaa aga cga aaa gtg gga aat Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr Glu Glu Arg Arg Lys Val Gly Asn 565 570 575 580	1844
	aac ttg caa cgt ctg tta gag atg gtt gct aca cat gtt ggg tct gta Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val 585 590 595	1892
	gag aaa cat ctt gag gag cag att gct aaa gtt gat aga gaa tat gaa Glu Lys His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val Asp Arg Glu Tyr Glu 600 605 610	1940
	gaa tgc atg tca gaa gat ctc tcg gaa aat att aaa gag att aga gat Glu Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile Lys Glu Ile Arg Asp 615 620 625	1988
[0019]	aag tat gag aag aaa gct act cta att aag tct tct gaa gaa tga Lys Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Leu Ile Lys Ser Ser Glu Glu 630 635 640	2033
	agataaaatg ttgaicattgt atatatatcc atagtgaata aaatgtcttc agtaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	2093 2150
	<210> 79 <211> 642 <212> PRT <213> 人	
	<400> 79	
	Met Lys Arg Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Ser Met 1 5 10 15	
	Gln Glu Leu Arg Ser Gln Asp Val Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Thr Pro 20 25 30	
	Gln Thr Lys Glu Lys Pro Thr Phe Gly Lys Leu Ser Ile Asn Lys Pro 35 40 45	
	Thr Ser Glu Arg Lys Val Ser Leu Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gly His 50 55 60	
	Gly Ser Arg Asn Ser Gln Leu Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile 65 70 75 80	

Lys Asp Pro Arg Pro Leu Asn Asp Lys Ala Phe Ile Gln Gln Cys Ile
 85 90 95
 Arg Gln Leu Cys Glu Phe Leu Thr Glu Asn Gly Tyr Ala His Asn Val
 100 105 110
 Ser Met Lys Ser Leu Gln Ala Pro Ser Val Lys Asp Phe Leu Lys Ile
 115 120 125
 Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp
 130 135 140
 Thr Lys Phe Glu Glu Glu Val Pro Arg Ile Phe Lys Asp Leu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Phe Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His
 165 170 175
 Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
 180 185 190
 Lys Ile His Thr Ala Met Lys Glu Ser Ser Pro Leu Phe Asp Asp Gly
 195 200 205
 Gln Pro Trp Gly Glu Glu Thr Glu Asp Gly Ile Met His Asn Lys Leu
 210 215 220
 Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met Ser Gly Ala
 225 230 235 240
 Asp Ser Phe Asp Glu Met Asn Ala Glu Leu Gln Ser Lys Leu Lys Asp
 245 250 255
 Leu Phe Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Asn
 260 265 270
 Arg Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu Glu Gln Glu Arg Glu Lys
 275 280 285
 Glu Pro Asn Arg Leu Glu Ser Leu Arg Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln
 290 295 300
 Gly Asp Val Gln Lys Tyr Gln Ala Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His
 305 310 315 320
 Ser Ala Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala
 325 330 335
 Arg Val Glu Leu Glu Cys Glu Thr Ile Lys Gln Glu Asn Thr Arg Leu
 340 345 350
 Gln Asn Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg
 355 360 365

[0020]

Ile Asn His Glu Arg Asn Glu Leu Gln Gln Thr Ile Asn Lys Leu Thr
 370 375 380
 Lys Asp Leu Glu Ala Glu Gln Gln Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys
 385 390 395 400
 Tyr Ala Arg Gly Lys Glu Ala Ile Glu Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His
 405 410 415
 Lys Leu Ala Arg Lys Leu Lys Leu Ile Pro Lys Gly Ala Glu Asn Ser
 420 425 430
 Lys Gly Tyr Asp Phe Glu Ile Lys Phe Asn Pro Glu Ala Gly Ala Asn
 435 440 445
 Cys Leu Val Lys Tyr Arg Ala Gln Val Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu
 450 455 460
 Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile Asn Lys Ala Leu Asn Lys Lys Met
 465 470 475 480
 Gly Leu Glu Asp Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile Thr Glu Ser
 485 490 495
 Lys Arg Ser Val Arg Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Asp Asp
 500 505 510
 Leu Tyr Gln Gln Lys Ile Lys Glu Ala Glu Glu Glu Asp Glu Lys Cys
 515 520 525
 Ala Ser Glu Leu Glu Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu Glu Ser
 530 535 540
 Thr Val Asn Gln Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu Asp Ala Val
 545 550 555 560
 Gln Arg Glu Tyr Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr Glu Glu Arg Arg
 565 570 575
 Lys Val Gly Asn Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His
 580 585 590
 Val Gly Ser Val Glu Lys His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val Asp
 595 600 605
 Arg Glu Tyr Glu Glu Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile Lys
 610 615 620
 Glu Ile Arg Asp Lys Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Leu Ile Lys Ser Ser
 625 630 635 640
 Glu Glu

[0021]

	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 TCR 分析的 PCR 引物	
	<400> 80	
	gtctaccagg cattcgcttc at	22
	<210> 81	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 TCR 分析的 PCR 引物	
	<400> 81	
	tcagctggac cacagccgca gcgt	24
	<210> 82	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0022]	<220>	
	<223> 用于 TCR 分析的 PCR 引物	
	<400> 82	
	tcagaaatcc tttctcttga c	21
	<210> 83	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 TCR 分析的 PCR 引物	
	<400> 83	
	ctagcctctg gaatccttc tctt	24
	<210> 84	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的肽序列	
	<400> 84	
	Asn Lys Arg Lys	
	1	

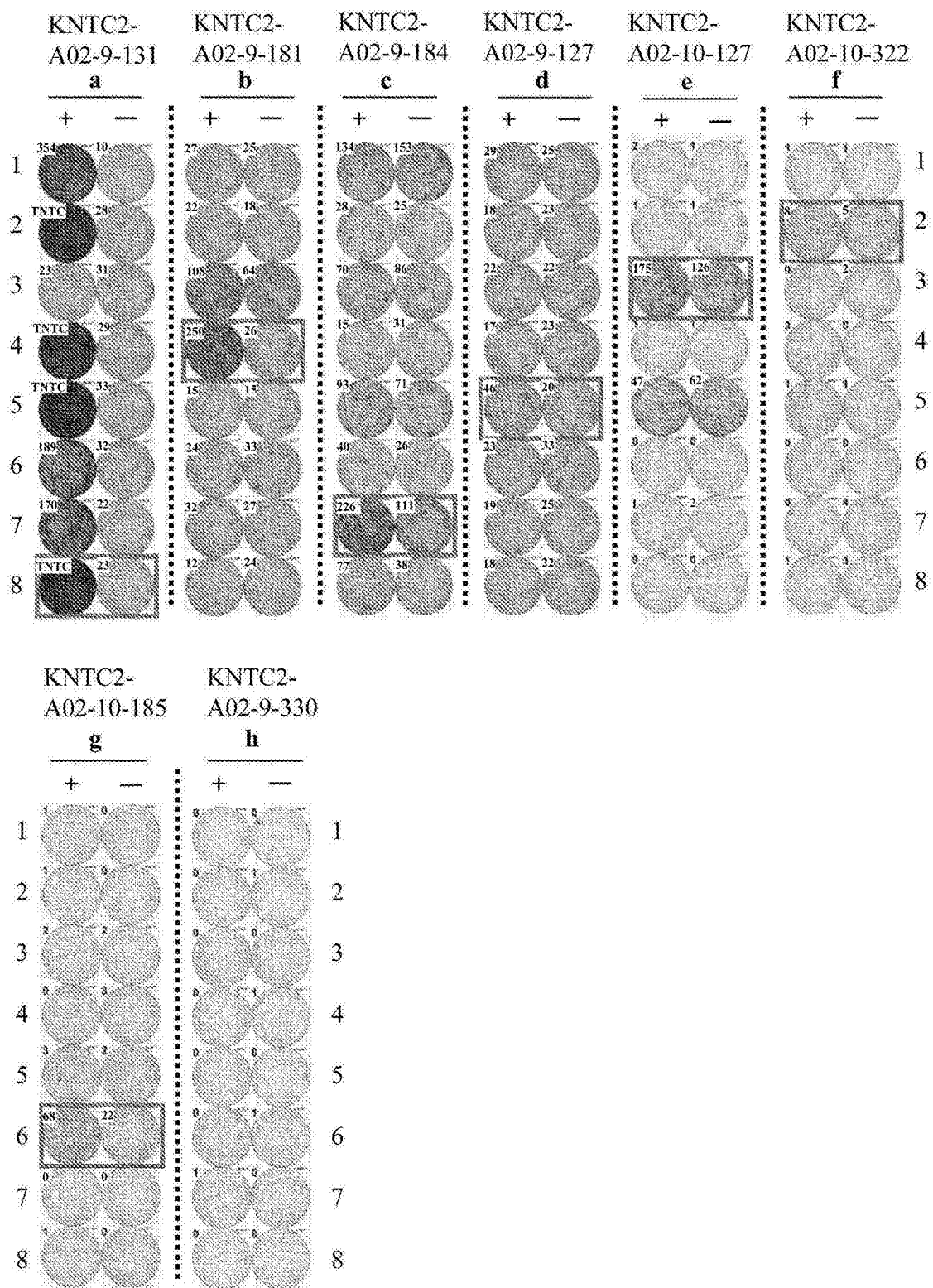


图1

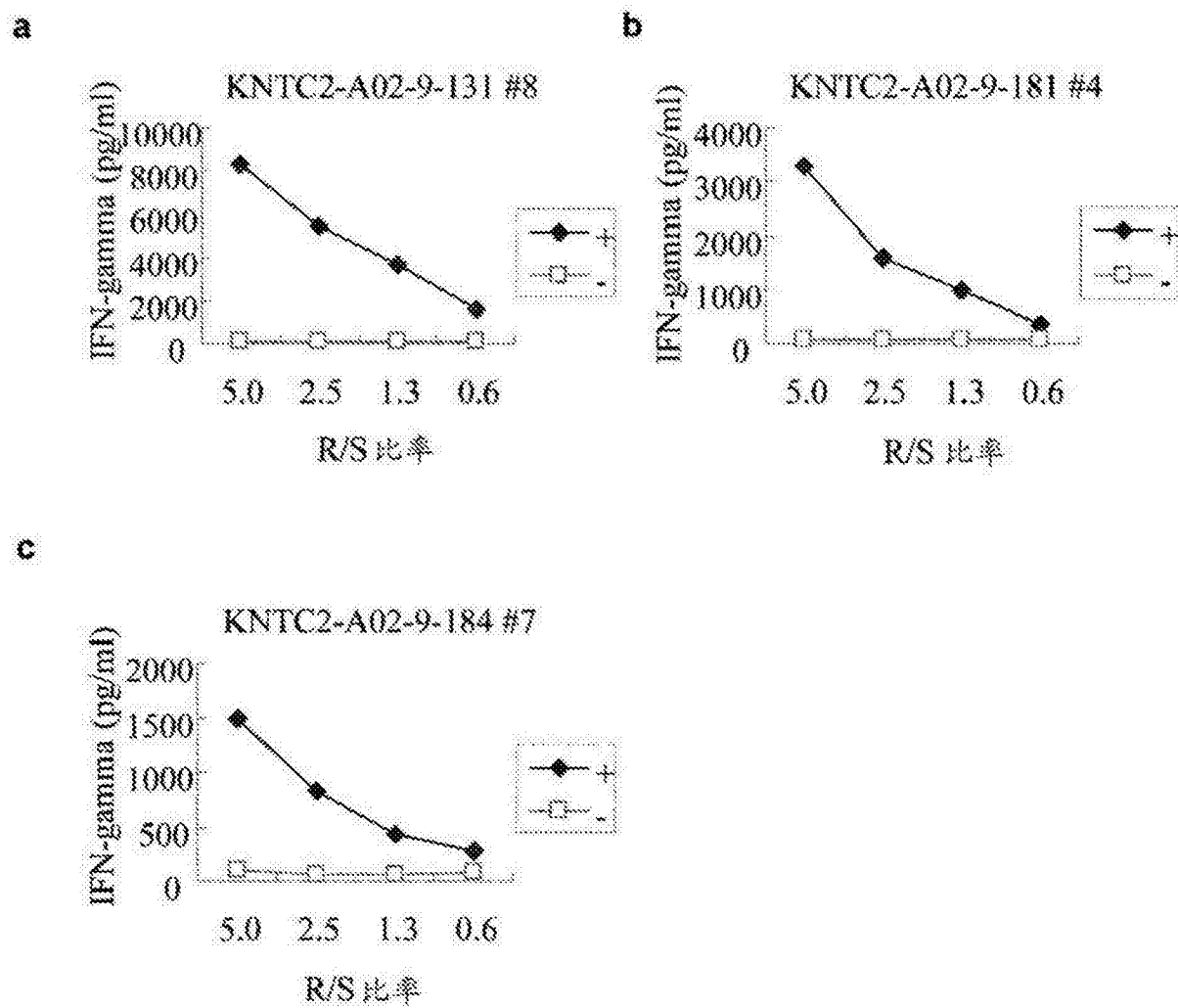


图2

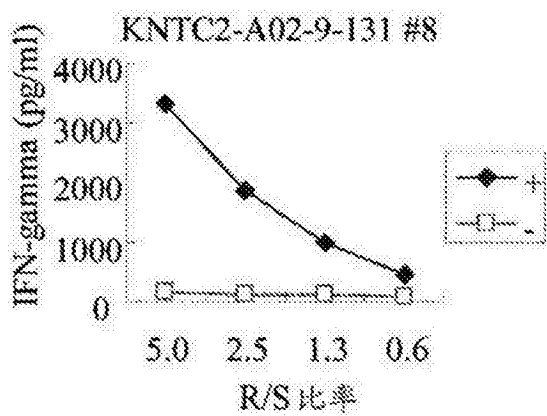
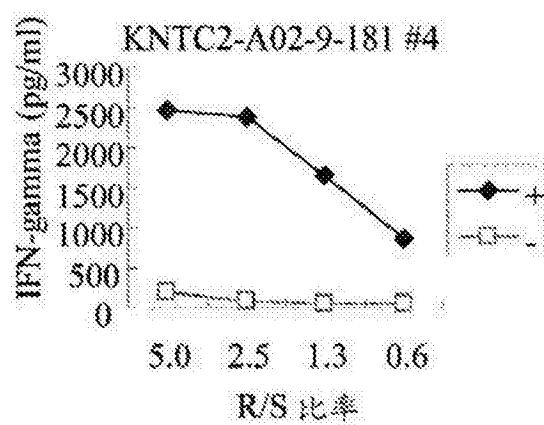
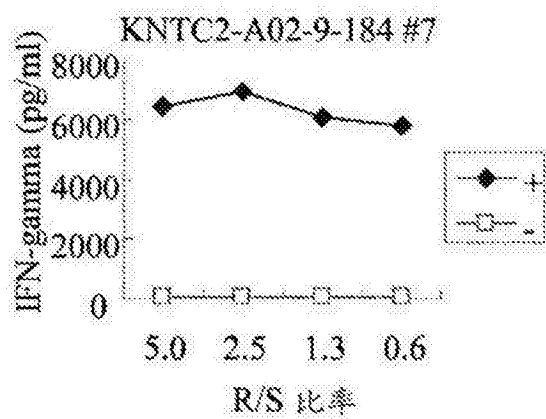
a**b****c**

图3

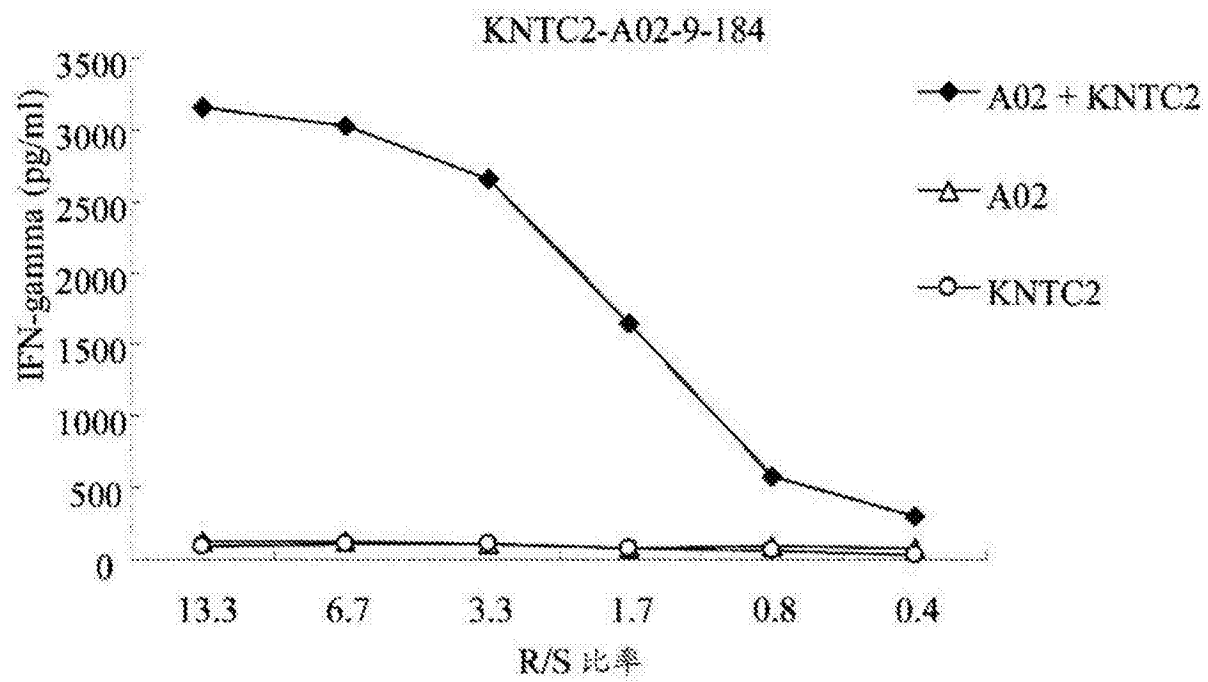


图4