



(10) 授权公告号 CN 109641936 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 28

(21) 申请号 201780045782.2

(22) 申请日 2017.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109641936 A

(43) 申请公布日 2019.04.16

(30) 优先权数据  
16175397.5 2016.06.21 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.01.23

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2017/065122 2017.06.20

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/220602 EN 2017.12.28

(73) 专利权人 IO生物技术公司  
地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 M·H·安德森

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

专利代理师 陈玉平 姜建成

(51) Int.Cl.  
C07K 7/08 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 103917243 A, 2014.07.09  
WO 2001034768 A2, 2001.05.17  
周莹等. 鼠抗人PD-L1功能性单克隆抗体的  
研制及其生物学特性的鉴定.《细胞与分子免疫  
学杂志》.2011,第27卷(第11期),  
Shamaila Munir, et al.. HLA-Restricted  
CTL That Are Specific for the Immune  
Checkpoint Ligand PD-L1 Occur with High  
Frequency in Cancer Patients.《Cancer  
Res》.2013,第73卷(第6期),

审查员 高赞

权利要求书2页 说明书29页  
序列表30页 附图20页

(54) 发明名称  
用于癌症疫苗中的PDL1肽

(57) 摘要  
本发明涉及适用于癌症疗法的PD-L1肽片  
段,以及PD-L1肽片段,当其与其他癌症疗法同时  
或依序给予时用于治疗或预防癌症的方法中。

1. PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐，  
其中所述肽片段选自以下肽片段或其药学上可接受的盐：  
NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-OH (SEQ ID NO:77)、  
NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:77)、  
RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-OH (SEQ ID NO:52)、  
RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)。
2. 权利要求1的肽片段，其选自：  
NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-OH (SEQ ID NO:77)、  
RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-OH (SEQ ID NO:52)、  
RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)。
3. 一种组合物，其包括权利要求1或2的PD-L1肽片段，任选地以及药学上可接受的添加剂和/或防腐剂。
4. 一种免疫治疗组合物，其包括：
  - a) 权利要求1或2的PD-L1肽片段；和
  - b) 佐剂；  
其用作药物。
5. 权利要求4的免疫治疗组合物，其用于治疗或预防疾病、病症或病况的方法中，所述疾病、病症或病况选自癌症；感染；自身免疫疾病。
6. 权利要求5的免疫治疗组合物，其中所述癌症为形成肿瘤的癌症疾病。
7. 权利要求5的免疫治疗组合物，其中所述感染为感染性疾病。
8. 权利要求7的免疫治疗组合物，其中所述感染性疾病为胞内感染或病毒感染。
9. 权利要求8的免疫治疗组合物，其中所述胞内感染为选自单核细胞增多性李斯特氏菌 (*L.monocytogenes*) 和疟原虫的病原体的胞内感染。
10. 权利要求8的免疫治疗组合物，其中所述病毒感染为选自HIV和肝炎病毒的病毒的感染。
11. 权利要求5的免疫治疗组合物，其中所述自身免疫疾病为糖尿病、SLE或硬化症。
12. 权利要求4的免疫治疗组合物，其中所述佐剂选自基于细菌DNA的佐剂、基于油/表面活性剂的佐剂、基于病毒dsRNA的佐剂、咪唑喹啉 (imidazoquinoline)、Montanide ISA佐剂。
13. 一种试剂盒，其包括：
  - a) 权利要求3的组合物或权利要求4-12中任一项的免疫治疗组合物，和
  - b) 包括至少一种第二活性成分的组合物，所述第二活性成分选自免疫刺激化合物；抗癌剂。
14. 权利要求13的试剂盒，其中所述免疫刺激化合物为白细胞介素。
15. 权利要求14的试剂盒，其中所述白细胞介素为IL-2或IL-21。
16. 权利要求13的试剂盒，其中所述抗癌剂为化疗剂。
17. 权利要求16的试剂盒，其中所述化疗剂为Actimide、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊立

替康、来那度胺、亚叶酸、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、nivolumab、奥沙利铂、紫杉醇、pembrolizumab、培美曲塞、雷利度胺、替莫唑胺、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春地辛或长春瑞滨。

18. 权利要求13的试剂盒,其中所提供的组合物同时给予或依序给予。

19. 权利要求1或2的肽片段、权利要求3的组合物或权利要求4-12中任一项的免疫治疗组合物或权利要求13-18中任一项的试剂盒在制备治疗以表达PD-L1为特征的临床病况的药物中的用途。

20. 权利要求1或2的肽片段用于制备药物的用途,所述药物用于治疗或预防以表达PD-L1为特征的临床病况。

21. 权利要求20的用途,其中所述药物为免疫治疗组合物或疫苗。

22. 权利要求19或20的用途,其中所述待治疗的临床病况是表达PD-L1的癌症疾病。

23. 权利要求19或20的用途,其中所述临床病况选自感染性疾病和自身免疫疾病。

24. 权利要求1或2的肽片段或其药学上可接受的盐,当与其他癌症疗法同时或依序给予时,其用于治疗或预防癌症的方法中。

25. 权利要求24的肽片段,其中所述其他癌症疗法为细胞因子疗法、T细胞疗法、NK疗法、免疫系统检查点抑制剂、化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质、基因疗法、抗体或树突细胞。

26. 权利要求24的肽片段,其中所述其他癌症疗法选自免疫系统检查点抑制剂,并且抑制剂为检查点阻断抗体,所述检查点阻断抗体选自Actimide、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊立替康、来那度胺、亚叶酸、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、Nivolumab、奥沙利铂、紫杉醇、Pembrolizumab、培美曲塞、雷利度胺、替莫唑胺、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

## 用于癌症疫苗中的PDL1肽

### 技术领域

[0001] 本发明涉及新的PD-L1肽片段,以及包含这些肽片段的组合物、用途和试剂盒。此外,本发明涉及PD-L1肽片段,当与其他的癌症疗法同时或依序给予时,其用于治疗或预防癌症的方法中。

### 背景技术

[0002] 免疫系统能够识别并破坏肿瘤细胞;然而,尽管实际上致癌性转化与免疫原性抗原的表达相关,但免疫系统通常无法有效地应答这些抗原。免疫系统变得耐受这些抗原。当这种情况发生时,肿瘤细胞不受控制地增殖,导致形成恶性癌症,被侵袭的个体具有不良预后。必须克服所述获得的耐受性状态,癌症免疫疗法才会成功。若干证据表明,T细胞是针对癌细胞的免疫应答中的主要效应因子。免疫调节蛋白,如吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)和程序性细胞死亡1配体1(PD-L1),在抗癌免疫应答的免疫抑制和耐受性诱导中发挥重要作用。CTLA-4是T细胞应答的关键负调节因子,其能够限制抗肿瘤免疫应答。最近,抗CTLA-4抗体ipilimumab在临床III期研究中显示出效果之后得到FDA和EMA的批准,用于治疗黑色素瘤。另一种对抗肿瘤特异性免疫并阻碍有效的抗癌免疫疗法的核心机理需要特定的环境,在该环境中致耐受性的树突细胞(DC)发挥了使免疫应答偏离有效免疫的至关重要的作用。

[0003] 程序性死亡-1(PD1)是调节性表面分子,其递送对维持针对它们的同源抗原的T细胞功能性沉默而言重要的抑制信号。它的配体,已知为PD-L1和PD-L2或B7-H1和B7-H2,存在于炎症微环境中的APC、肿瘤细胞、胎盘细胞和非造血细胞上表达。PD-1或其配体PD-L1的干扰增强了抗肿瘤免疫。PD-L1的上调似乎是癌症可用来逃避宿主免疫系统的机理。PD-L1在肿瘤上的表达与许多癌症的不良临床结果相关,所述癌症包括胰腺癌、肾细胞癌、卵巢癌、头颈癌和黑色素瘤(Hamanishi et al.,2007,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.104:3360-3365;Nomi et al.,2007,Clin.Cancer Res.13:2151-2157;Hino et al.,2010,Cancer.116:1757-1766)。因此,对来自肾细胞癌患者的196个肿瘤样本的分析发现,PD-L1的高肿瘤表达与以下有关:肿瘤侵占性提高和死亡风险增大4.5倍(Thompson et al.,2004,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101:17174-17179)。具有较高的PD-L1表达的卵巢癌患者比那些具有较低的PD-L1表达的患者具有显著更差的预后。观察到PD-L1表达和上皮内CD8+T淋巴细胞计数之间的负相关,表明肿瘤细胞上的PD-L1可抑制抗肿瘤CD8+T细胞(Hamanishi et al.,2007,见上文)。

[0004] 树突细胞(DC)是最有效的抗原呈递细胞,它们已显示出有效刺激特异性免疫应答。<sup>1</sup>DC疫苗通常由成熟成为DC的外周血单核细胞组成,并且在被注射前用体外抗原致敏。在过去的十年中,基于DC的癌症疫苗受到许多关注。然而,尽管已经进行了许多DC疫苗接种试验,但临床效益对于大多数患者而言是有限的。对于目前的疫苗接种策略,被诱导的T细胞频率不显著,并且需要额外的步骤来辅助增加T细胞应答。因此,需要进一步的研究来优化DC的产生和表型,以增强它们诱导“完全防御的”T细胞的能力,来确定最佳给药途径,以

及来鉴定与其他疗法的理想结合。

[0005] 程序性死亡1 (PD-1) 是在T细胞表面上表达的抑制性分子。PD-1配体PD-L1 (也称为CD274或B7-H1) 在淋巴细胞 (例如单核细胞、DC和T细胞) 上组成型表达, 并且它还存在于非造血细胞 (例如内皮细胞和上皮细胞) 上。<sup>2,3</sup>PD-L1可通过IFN调节因子-1 (IRF-1), 以似乎是JAK/STAT依赖性的方式, 由I型和II型干扰素 (IFN) 上调。<sup>4</sup>通常, 在正常免疫应答过程中, T细胞上的PD-1和PD-L1之间的相互作用控制周围细胞耐受性的诱导和维持。<sup>5</sup>在自身免疫疾病的诱导期和效应期, PD-L1是自我反应性T细胞的关键负调节因子, 并且它以多种方式发挥其抑制功能。除了作为PD-1的配体, PD-L1结合B7-1 (CD80), 阻止B7-1共刺激。IL-10在结合PD-L1时产生, 并且可能增强活化的T细胞的凋亡。<sup>6</sup>

[0006] 免疫系统持续寻找外来病原体和不规则细胞, 例如癌细胞。因此, 癌症为了持续生长, 它必须躲避免疫系统以避免被破坏。PD-1及其配体在维持外周耐受性和阻止自身免疫中发挥核心作用, 癌细胞能够利用该系统来产生抑制性微环境, 因此保护其自身免于免疫介导的灭杀。实际上, 已在多种癌症中发现PD-L1的高表达,<sup>7,8</sup>并且在肾细胞癌中PD-L1表达最初被描述为肿瘤侵占性的指标。<sup>9</sup>此外, 已表明肿瘤细胞上的PD-L1表达作为许多实体癌症 (包括卵巢癌和胰腺癌) 中的预后因素。<sup>10,11</sup>

[0007] 通过单克隆抗体阻断PD-1或PD-L1已经产生显著的临床应答,<sup>12,13</sup>抗PD1抗体pembrolizumab和nivolumab最近被美国食品与药品管理局 (FDA) 批准用于治疗转移性黑色素瘤 (分别于2014年9月和12月)。PD-L1特异性T细胞的近期发现表明, 免疫系统自身具有抵抗PD-1及其配体的作用的机理。<sup>14,15</sup>实际上, 与健康捐赠者相比, 癌症患者的外周血中的PD-L1特异性T细胞应答显示出以更高频率发生。<sup>14,15</sup>随后, 发现这些PD-L1特异性T细胞裂解表达PD-L1的细胞, 包括黑色素瘤细胞和非恶性DC。<sup>14,16</sup>此外, PD-L1特异性T细胞的激活促进针对病毒抗原的免疫应答。<sup>17</sup>这些发现表明PD-L1特异性T细胞在免疫稳态中的自我反应性功能。此外, 表明使用PD-L1衍生的肽进行刺激能够通过推动微环境中的免疫平衡朝向更少免疫抑制来促进之前存在的免疫应答或疫苗产生的免疫应答。

[0008] 我们最近在IV期恶性黑色素瘤患者中进行了疫苗研究 (Borch et al., 准备中)。在所述研究中, 患者接种用mRNA转染的DC, 所述mRNA编码肿瘤相关抗原p53、存活素 (survivin) 和端粒酶 (疫苗在本文中称为“DCvacc”)。然而, 临床效益有限, 并且患者的免疫监测表明他们的外周血单核细胞 (PBMC) 仅具有针对DCvacc的有限反应性。

## 发明内容

[0009] 本发明人已经鉴定了新的人PD-L1片段 (SEQ ID NO:1), 所述片段具有良好的溶解度、不聚集、不易于形成 $\beta$ -折叠, 因此适于例如含有佐剂的疫苗。SEQ ID NO.91的PD-L1肽片段 (其为W02013056716中描述的PDlong2, W02013056716以引用的方式纳入本文) 非常疏水, 并且非常易于形成 $\beta$ -折叠, 因此溶解度低。此外, 该肽含有游离的SH, 必须在低pH下进行处理以防止形成二聚体。

[0010] 此外, 已表明 (见下文) PD-L1肽片段SEQ ID NO.91和89 (在W02013056716和本文中分别称为PDlong2和PDlong1) 共刺激增加了基于树突细胞的癌症疫苗的免疫原性。因此, PD-L1特异性T细胞被这两种PD-L1肽片段的任一种激活可直接调节DC疫苗的免疫原性。因此, 加入PD-L1表位可以是增强癌症疫苗和其他免疫治疗剂的效力的一种易于应用且具有

吸引力的选择。因此,预期由SEQ ID NO.91组成的PD-L1肽片段或由SEQ ID NO.89组成的PD-L1肽片段以及包含这些的更长序列将具有如本文所示的效果。

[0011] 一方面,本发明涉及PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐,其具有下式:

[0012]  $X^1\text{VILGAILLCLGVALTFIX}^2$  (SEQ ID NO:78)

[0013] 其中

[0014] N端 $X^1$ 选自L、HL、THL、RTHL (SEQ ID NO:79)、ERTHL (SEQ ID NO:80)、NERTHL (SEQ ID NO:81)或不存在,

[0015] C端 $X^2$ 选自F、FR、FRL、FRLR (SEQ ID NO:82)、FRLRK (SEQ ID NO:83)、FRLRKG (SEQ ID NO:84)、FRLRKGR (SEQ ID NO:85)、FRLRKGRM (SEQ ID NO:86)、FRLRKGRMM (SEQ ID NO:87)、FRLRKGRMMD (SEQ ID NO:88)或不存在,

[0016] 条件是如果 $X^1$ 不存在,则 $X^2$ 不是FRLRKG (SEQ ID NO:84),

[0017] 其中C端氨基酸还包括酰胺。换言之,C端氨基酸可被其对应的酰胺替换。 $X^1$ 和 $X^2$ 可各自独立地选自可获得的选择。

[0018] 当存在C端残基的氨基酸形式时,这在本文中可通过符号X-OH表示,而如果存在酰胺形式,这可通过符号X-NH<sub>2</sub>表示。如果两个符号均没有使用,应理解为涵盖了C端残基的氨基酸形式和酰胺形式两者。因此,本发明的肽或其药学上可接受的盐可包含表A中所示的任一种氨基酸序列或由表A中所示的任一种氨基酸序列组成,任选地其中C端氨基酸被对应的酰胺形式替换。

[0019] 表A

| 肽名称 | SEQ ID No | 序列                           | 起始位置 | 终止位置 |
|-----|-----------|------------------------------|------|------|
|     | 2         | VILGAILLCLGVALTFI            | 242  | 258  |
|     | 3         | VILGAILLCLGVALTFIF           | 242  | 259  |
|     | 4         | VILGAILLCLGVALTFIFR          | 242  | 260  |
|     | 5         | VILGAILLCLGVALTFIFRL         | 242  | 261  |
|     | 6         | VILGAILLCLGVALTFIFRLR        | 242  | 262  |
|     | 7         | VILGAILLCLGVALTFIFRLRK       | 242  | 263  |
|     | 8         | VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR     | 242  | 265  |
|     | 9         | VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRM    | 242  | 266  |
|     | 10        | VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM   | 242  | 267  |
|     | 11        | VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD  | 242  | 268  |
|     | 12        | LVILGAILLCLGVALTFI           | 241  | 258  |
|     | 13        | LVILGAILLCLGVALTFIF          | 241  | 259  |
|     | 14        | LVILGAILLCLGVALTFIFR         | 241  | 260  |
|     | 15        | LVILGAILLCLGVALTFIFRL        | 241  | 261  |
|     | 16        | LVILGAILLCLGVALTFIFRLR       | 241  | 262  |
|     | 17        | LVILGAILLCLGVALTFIFRLRK      | 241  | 263  |
|     | 18        | LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG     | 241  | 264  |
|     | 19        | LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR    | 241  | 265  |
|     | 20        | LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRM   | 241  | 266  |
|     | 21        | LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM  | 241  | 267  |
|     | 22        | LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD | 241  | 268  |
|     | 23        | HLVILGAILLCLGVALTFI          | 240  | 258  |
|     | 24        | HLVILGAILLCLGVALTFIF         | 240  | 259  |
|     | 25        | HLVILGAILLCLGVALTFIFR        | 240  | 260  |
|     | 26        | HLVILGAILLCLGVALTFIFRL       | 240  | 261  |

[0020]

[0021]

|         |    |                                   |     |     |
|---------|----|-----------------------------------|-----|-----|
|         | 27 | HLVILGAILLCLGVALTFIFRLR           | 240 | 262 |
|         | 28 | HLVILGAILLCLGVALTFIFRLRK          | 240 | 263 |
|         | 29 | HLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG         | 240 | 264 |
|         | 30 | HLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR        | 240 | 265 |
|         | 31 | HLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRM       | 240 | 266 |
|         | 32 | HLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM      | 240 | 267 |
|         | 33 | HLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD     | 240 | 268 |
|         | 34 | THLVILGAILLCLGVALTFI              | 239 | 258 |
|         | 35 | THLVILGAILLCLGVALTFIF             | 239 | 259 |
|         | 36 | THLVILGAILLCLGVALTFIFR            | 239 | 260 |
|         | 37 | THLVILGAILLCLGVALTFIFRL           | 239 | 261 |
|         | 38 | THLVILGAILLCLGVALTFIFRLR          | 239 | 262 |
|         | 39 | THLVILGAILLCLGVALTFIFRLRK         | 239 | 263 |
|         | 40 | THLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG        | 239 | 264 |
|         | 41 | THLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR       | 239 | 265 |
|         | 42 | THLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRM      | 239 | 266 |
|         | 43 | THLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM     | 239 | 267 |
|         | 44 | THLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD    | 239 | 268 |
|         | 45 | RTHLVILGAILLCLGVALTFI             | 238 | 258 |
|         | 46 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIF            | 238 | 259 |
|         | 47 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFR           | 238 | 260 |
|         | 48 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRL          | 238 | 261 |
|         | 49 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLR         | 238 | 262 |
|         | 50 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRK        | 238 | 263 |
|         | 51 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG       | 238 | 264 |
| IO104.1 | 52 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR      | 238 | 265 |
|         | 53 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRM     | 238 | 266 |
|         | 54 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM    | 238 | 267 |
|         | 55 | RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD   | 238 | 268 |
|         | 56 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFI            | 237 | 258 |
|         | 57 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIF           | 237 | 259 |
|         | 58 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFR          | 237 | 260 |
|         | 59 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRL         | 237 | 261 |
|         | 60 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLR        | 237 | 262 |
|         | 61 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRK       | 237 | 263 |
|         | 62 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG      | 237 | 264 |
|         | 63 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR     | 237 | 265 |
|         | 64 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRM    | 237 | 266 |
|         | 65 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM   | 237 | 267 |
|         | 66 | ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD  | 237 | 268 |
|         | 67 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFI           | 236 | 258 |
|         | 68 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIF          | 236 | 259 |
|         | 69 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFR         | 236 | 260 |
|         | 70 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRL        | 236 | 261 |
|         | 71 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLR       | 236 | 262 |
|         | 72 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRK      | 236 | 263 |
|         | 73 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG     | 236 | 264 |
|         | 74 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR    | 236 | 265 |
|         | 75 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRM   | 236 | 266 |
|         | 76 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM  | 236 | 267 |
|         | 77 | NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD | 236 | 268 |

[0022] “起始位置”栏和“终止位置”栏表示SEQ ID NO:1序列内各肽的起始位置和终止位置。从表中可理解,本发明的肽包含SEQ ID NO:1的PD-L1序列的17至33个连续氨基酸或由



SEQ ID NO:1的PD-L1序列的17至33个连续氨基酸组成。如本文所述,可在N端和/或C端添加额外的残基以提高稳定性。SEQ ID NO:1的连续氨基酸优选包括至少对应于SEQ ID NO:1的第242-258位的氨基酸,在C端具有最多达10个对应于SEQ ID NO:1的第259-268位的额外氨基酸;和/或在N端具有最多达6个对应于SEQ ID NO:1的第236-241位的额外氨基酸。特别优选的是包含氨基酸序列RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR (SEQ ID NO:52)或由该序列组成的肽,所述序列对应于SEQ ID NO:1的第238-265位。该肽在本文中可称为I0104.1。该序列的C端残基可被对应的酰胺形式替换并且同样优选。具有C端氨基酸的片段可称为I0104.1-OH。具有C端酰胺的片段在本文中可称为I0104.1-NH<sub>2</sub>。表A中的任一种序列可进行一个、两个、三个、四个或五个保守置换,并且所得序列仍被认为是本发明的肽,尽管所述肽优选能够被对名为PDL111的HLA-A2表位(作为SEQ NO:92而提供的序列)具有特异性的T细胞识别。最优选地,所述保守置换不改变对应于SEQ ID NO:1的第250-258位的氨基酸,SEQ ID NO:1的第250-258位的氨基酸为PDL111表位的氨基酸序列。

[0023] 在一个实施方案中,本发明的肽片段选自以下肽片段或其药学上可接受的盐:

[0024] NERHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD (SEQ ID NO:77)、

[0025] NERHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:77)、

[0026] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR (SEQ ID NO:52)、

[0027] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)、

[0028] NERHLVILGAILLCLGVALTFI (SEQ ID NO:67)、

[0029] NERHLVILGAILLCLGVALTFI-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:67)、

[0030] VILGAILLCLGVALTFI (SEQ ID NO:2)、

[0031] VILGAILLCLGVALTFI-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:2)。通常,所述肽片段选自:

[0032] NERHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD (SEQ ID NO:77)、

[0033] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR (SEQ ID NO:52),和

[0034] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)。

[0035] 另一方面,本发明涉及一种组合物,其包括本发明的PD-L1肽片段;任选地与药学上可接受的添加剂一起。

[0036] 另一方面,本发明涉及一种用作药物的免疫治疗组合物,例如疫苗,包括:

[0037] a) 本发明的PD-L1肽片段;和

[0038] b) 佐剂。

[0039] 在一个实施方案中,本发明的免疫治疗组合物用于治疗或预防疾病、病症或病况的方法中,所述疾病、病症或病况选自癌症,例如形成肿瘤的癌症疾病;感染,例如感染性疾病,例如胞内感染,例如选自单核细胞增多性李斯特氏菌(*L.monocytogenes*)和疟原虫的病原体的胞内感染,病毒感染,例如选自HIV和肝炎病毒的病毒;自身免疫疾病,例如糖尿病、SLE和硬化症。

[0040] 在另一个实施方案中,所述佐剂选自基于细菌DNA的佐剂、基于油/表面活性剂的佐剂、基于病毒dsRNA的佐剂、imidazochiniline、Montanide ISA佐剂。

[0041] 另一方面,本发明涉及试剂盒,其包括:

[0042] a) 本发明的免疫治疗组合物,和

[0043] b) 包括至少一种第二活性成分的组合物,所述第二活性成分选自免疫刺激化合



物,例如白细胞介素,例如IL-2和/或IL-21;抗癌剂,例如化疗剂,例如Actimide、阿扎胞苷(Azacitidine)、硫唑嘌呤(Azathioprine)、博来霉素(Bleomycin)、卡铂(Carboplatin)、卡培他滨(Capecitabine)、顺铂(Cisplatin)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、阿糖胞苷(Cytarabine)、柔红霉素(Daunorubicin)、多西他赛(Docetaxel)、去氧氟尿苷(Doxifluridine)、多柔比星(Doxorubicin)、表柔比星(Epirubicin)、依托泊苷(Etoposide)、氟达拉滨(Fludarabine)、氟尿嘧啶(Fluorouracil)、吉西他滨(Gemcitabine)、羟基脲(Hydroxyurea)、伊达比星(Idarubicin)、伊立替康(Irinotecan)、来那度胺(Lenalidomide)、亚叶酸(Leucovorin)、氮芥(Mechlorethamine)、美法仑(Melphalan)、巯基嘌呤(Mercaptopurine)、甲氨蝶呤(Methotrexate)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、nivolumab、奥沙利铂(Oxaliplatin)、紫杉醇(Paclitaxel)、pembrolizumab、培美曲塞(Pemetrexed)、雷利度胺(Revlimid)、替莫唑胺(Temozolomide)、替尼泊苷(Teniposide)、硫鸟嘌呤(Thioguanine)、戊柔比星(Valrubicin)、长春碱(Vinblastine)、长春新碱(Vincristine)、长春地辛(Vindesine)和长春瑞滨(Vinorelbine)。在一个实施方案中,所提供的组合物同时给予或依序给予。

[0044] 另一方面,本发明涉及一种治疗以表达PD-L1为特征的临床病况的方法,所述方法包括给予患有所述临床病况的个体有效量的本发明的肽片段、本发明的组合物或本发明的试剂盒。

[0045] 另一方面,本发明涉及本发明的肽片段用于制备药物(例如免疫治疗组合物或疫苗)的用途,所述药物用于治疗或预防以表达PD-L1为特征的临床病况。在一个实施方案中,待治疗的临床病况是表达PD-L1的癌症疾病。在另一个实施方案中,所述临床病况选自感染性疾病和自身免疫疾病。

[0046] 另一方面,本发明涉及具有下式的PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐:

[0047]  $X^1\text{VILGAILLCLGVALTFIX}^2$

[0048] 其中

[0049] N端 $X^1$ 选自L、HL、THL、RTHL (SEQ ID NO:79)、ERTHL (SEQ ID NO:80)、NERTHL (SEQ ID NO:81),或不存在,

[0050] C端 $X^2$ 选自F、FR、FRL、FRLR (SEQ ID NO:82)、FRLRK (SEQ ID NO:83)、FRLRKG (SEQ ID NO:84)、FRLRKGR (SEQ ID NO:85)、FRLRKGRM (SEQ ID NO:86)、FRLRKGRMM (SEQ ID NO:87)、FRLRKGRMMD (SEQ ID NO:88),或不存在,

[0051] 条件是如果 $X^1$ 不存在,则 $X^2$ 不是FRLRKG (SEQ ID NO:84),

[0052] 其中C端氨基酸还包含酰胺;

[0053] 当与其他癌症疗法同时或依序给予时,其用于治疗或预防癌症的方法中,所述其他癌症疗法例如细胞因子疗法、T细胞疗法、NK疗法、免疫系统检查点抑制剂、化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质、基因疗法、抗体和树突细胞。PD-L1肽片段可选自表A中公开的那些中的任一种,或其药学上可接受的盐,任选地其中C端氨基酸被对应的酰胺形式替换。在一个实施方案中,PD-L1肽片段选自以下肽片段或其药学上可接受的盐:

[0054] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD (SEQ ID NO:77)、

[0055] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:77)、

[0056] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR (SEQ ID NO:52)、

- [0057] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)、
- [0058] NERTHLVILGAILLCLGVALTFI (SEQ ID NO:67)、
- [0059] NERTHLVILGAILLCLGVALTFI-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ IDNO:67)、
- [0060] VILGAILLCLGVALTFI (SEQ ID NO:2)、
- [0061] VILGAILLCLGVALTFI-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:2)。通常,所述肽片段选自:
- [0062] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD (SEQ ID NO:77)、
- [0063] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR (SEQ ID NO:52), 和
- [0064] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)。
- [0065] 另一方面,本发明涉及包含下式的PD-L1肽片段:
- [0066] FMTYWHLNNAFTVTVPKDL (SEQ ID NO:89), 其中C端氨基酸还包含酰胺,或其药学上可接受的盐;
- [0067] 当与其他癌症疗法同时或依序给予时,其用于治疗或预防癌症的方法中,所述其他癌症疗法例如细胞因子疗法、T细胞疗法、NK疗法、免疫系统检查点抑制剂、化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质、基因疗法、抗体和树突细胞。在一个实施方案中,PD-L1肽片段选自具有下式的PD-L1片段:FMTYWHLNNAFTVTVPKDL (SEQ ID NO:89), 其中C端氨基酸还包含酰胺。在另一个实施方案中,所述其他癌症疗法选自免疫系统检查点抑制剂,其中所述抑制剂为选自以下的检查点阻断抗体:Actimide、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊立替康、来那度胺、亚叶酸、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、Nivolumab、奥沙利铂、紫杉醇、Pembrolizumab、培美曲塞、雷利度胺、替莫唑胺、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

## 附图说明

- [0068] 图1. 使用PD-L1衍生的表位的共刺激增强对树突细胞疫苗具有反应性的T细胞的频率。(A) 将来自患者的PBMC ( $5 \times 10^6$ ) 在体外用DC疫苗 (DCvacc) 刺激两次。第二天,将培养物用一种或两种长PD-L1表位共刺激,或用不相关的HIV对照肽孵育。肽刺激后第二天,将所有的培养物用IL2刺激。16-20天之后,通过细胞内TNF $\alpha$ /INF  $\gamma$  染色检查培养物中的DCvacc反应性T细胞。(B-E) 来自三个黑色素瘤患者的PBMC培养物的实例,其中PD-L1特异性T细胞的共激活显著提高了针对DCvacc的T细胞免疫,如通过细胞内TNF $\alpha$ /INF  $\gamma$  染色所测量的。(B) 应答DCvacc, CD4<sup>+</sup>T细胞仅释放TNF $\alpha$ 。(C) 应答DCvacc, PD-L1肽共刺激诱导TNF $\alpha$ /INF  $\gamma$  双阳性CD4<sup>+</sup>T细胞。(D, E) 使用PD-L1表位的共刺激增加了对DCvacc产生反应的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>两种细胞的数量。
- [0069] 图2. 使用PDLong1加树突细胞疫苗的PBMC共刺激。在第16-20天,在使用DCvacc的两次刺激和使用不相关的对照肽或PDLong1肽的两次刺激之后,通过流式细胞术来确定应答DCvacc而释放TNF $\alpha$ /INF  $\gamma$  的细胞的百分数。在疫苗接种之前(基线)和四次疫苗接种之后取自8名黑色素瘤患者的PBMC培养物中的DCvacc反应性CD4<sup>+</sup>T细胞的百分数(A) 和CD8<sup>+</sup>T细胞的百分数(B)。
- [0070] 图3. 对PDLong1和PDLong2的天然T细胞应答。(A) INF  $\gamma$  ELISPOT用于测量来自黑

色素瘤患者的肿瘤浸润淋巴细胞中针对PDLong1和PDLong2的T细胞应答。在来自12名黑色素瘤患者的 $5 \times 10^4$ 细胞中,测量应答PDLong1或PDLong2而释放IFN $\alpha$ 的细胞的平均数量。(B)在不使用或使用PDLong1或PDLong2肽的情况下,使用来自两名黑色素瘤患者的TIL进行的ELISPOT孔的实例。(C)在不使用或使用PDLong1或PDLong2的情况下,培养肿瘤浸润淋巴细胞5小时,然后进行细胞内INF  $\gamma$  /TNF $\alpha$ 染色分析。(D) 应答不使用肽或使用PDLong1或PDLong2的情况,来自黑色素瘤患者的肿瘤浸润淋巴细胞的INF  $\gamma$  /TNF $\alpha$ 染色的实例。

[0071] 图4.使用PDLong1加PDLong2以及DC疫苗对患者PBMC的刺激。在第16-20天,在使用DCvacc的两次刺激和使用不相关的对照肽或PDLong1加PDLong2肽的两次刺激之后,通过流式细胞术来确定应答DCvacc而释放TNF $\alpha$ /INF  $\gamma$  的细胞的百分数。在疫苗接种之前(基线)和四次疫苗接种之后取自8名黑色素瘤患者的PBMC培养物中DCvacc反应性CD4<sup>+</sup>T细胞的百分数(A)和CD8<sup>+</sup>T细胞的百分数(B)。

[0072] 图5.来自四名患者的细胞培养物上清液中细胞因子分泌的比较。在分析DCvacc反应性T细胞的当天,收集用不相关的对照肽或用PDLong1加PDLong2共刺激的培养物的上清液,从而可测量INF  $\gamma$  (A)、IL-6 (B) 或TFG $\beta$  (C) 的存在。(D) 此外,在使用HIV或PDLong1加PDLong2表位进行第二次刺激之后,对细胞总数进行计数。

[0073] 图6.与不相关的对照肽相比,应答I0104.1-OH和I0104.1-NH<sub>2</sub>的黑色素瘤患者的肿瘤浸润淋巴细胞中释放INF  $\gamma$  的细胞的测量。

[0074] 图7.对PDLong2、I0104.1-OH、I0104.1-NH<sub>2</sub>、PDL111和不相关的对照肽应答的PDL111特异性CD8-T细胞的ELISPOT比较。

[0075] 图8.鼠PDL1特异性T细胞天然存在于小鼠中。A)表示实施例3中描述的实验的时间线;B)离体使用5种肽备选物之一刺激的脾细胞的Elispot结果;C)用最有效的肽(mLong1)刺激的脾细胞的代表性Elispot孔和结果。 $n=5-10$ 只小鼠/组。

[0076] 图9.由变应原2,4-二硝基氟苯(DNFB)引起的局部炎症在小鼠中引发了PD-L1特异性T细胞应答。A)表示实施例4中描述的实验的时间线;B)离体使用mPD-L1long1或mPD-L1short刺激来自脾脏和dLN的细胞的Elispot结果;C)与对照相比,具有最高应答的DNFB处理的小鼠之一的代表性Elispot孔。 $n=12$ 只小鼠/组。

[0077] 图10.使用mPD-L1long1的疫苗接种扩大了小鼠中PD-L1-特异性T细胞群。A)表示实施例5中描述的实验的时间线;B)离体使用mPD-L1long1或mPD-L1short刺激的脾细胞的Elispot结果;C)各组的代表性小鼠的Elispot孔。 $n=3-4$ 只小鼠/组。

[0078] 图11.使用mPD-L1long1的疫苗接种在小鼠中显示出抗肿瘤作用。A)表示实施例6中描述的实验的时间线;B)对于每只小鼠,肿瘤体积随时间的变化(M1-M3仅用Montanide接种;M4-M5用mPD-L1long1加Montanide接种);C)Kaplan-Meier存活曲线;D)对于各组而言,平均肿瘤体积随时间的变化。 $n=3$ 只小鼠/组。

[0079] 序列描述

[0080] SEQ ID NO:1是人(h)PD-L1的全长氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO:2-77是本发明的示例性肽的氨基酸序列,其全部为hPD-L1的片段。

[0082] SEQ ID NO:78是代表对应于本发明的肽的通式的氨基酸序列。

[0083] SEQ ID NO:79-81是多个N端氨基酸序列,其可被添加到式SEQ ID NO:78中。

[0084] SEQ ID NO:82-88是多个C端氨基酸序列,其可被添加到式SEQ ID NO:78中。

- [0085] SEQ ID NO:89是本发明的另一示例性肽,其为hPD-L1的片段。
- [0086] SEQ ID NO:90是SEQ ID NO:89内包含的T细胞表位序列。
- [0087] SEQ ID NO:91是本文中公开的hPDL1片段的氨基酸序列。
- [0088] SEQ ID NO:92是称为PDL111的HLA-A2表位的氨基酸序列(对应于hPDL1的第250-258位)。
- [0089] SEQ ID NO:93和94是在实施例中被用作对照的某些肽的氨基酸序列。
- [0090] SEQ ID NO:95是鼠(m)PD-L1的全长氨基酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:96-100是衍生自mPD-L1的肽的氨基酸序列,所述肽在实施例中所描述的小鼠模型实验中被用作本发明的肽的类似物。
- [0092] SEQ ID NO:101是SEQ ID NO:96内包含的T细胞表位序列。

### 具体实施方式

[0093] 癌症免疫抑制的问题在W02013056716中得到解决,其中人PD-L1全长(SEQ ID NO.1)的PD-L1片段基于发明人出乎意料的发现——癌症患者中针对表达PD-L1的细胞的自发性细胞毒性免疫应答。这些发现开启了通常适用于控制癌症疾病的新的治疗和诊断方法。有趣的是,这些发现不局限于癌症,还适用于其他以存在不期望的表达PD-L1的细胞为特征的临床病况。

[0094] W02013056716中公开的发明通过直接杀死表达PD-L1的癌细胞和通过杀死表达PD-L1的调节细胞来靶向癌症疾病。这通过使T细胞能够识别表达PD-L1的细胞来完成。同样,当临床病况是感染时,使T细胞能够杀死表达PD-L1的APC/DC。因此,免疫抑制酶PD-L1在癌细胞和APC中的表达与本发明的方法——其靶向这些表达PD-L1的细胞——的应用相结合是积极的。这种方法,尤其是其需要杀死APC/DC,与本领域中的普遍观点相悖,本领域普遍观点认为,通常尝试抑制PD-L1以在保留这些细胞的同时除去APC/DC周围的耐受环境,这些细胞被认为是启动有效的免疫应答所需要的。此外,针对表达PD-L1的细胞的自发性细胞毒性免疫应答的发现是特别出乎意料的,因为表达PD-L1的细胞拮抗其他免疫治疗方法所需的效果。因此,PD-L1-和肿瘤靶向免疫疗法的结合是高度协同的。体内PD-L1特异性T细胞应答的存在证明了癌症患者能够响应PD-L1肽的存在而在体内产生对PD-L1的T细胞应答。因此,出现了两种产生T细胞应答的状况:T细胞存在于癌症患者中并且它们能够扩增,这在提交的申请中表明了。这符合免疫学领域的一般常识,即提供额外的PD-L1蛋白或PD-L1肽将导致产生PD-L1特异性T细胞应答。与B细胞上的膜结合抗体(其能够单独识别抗原)不同的是,T细胞识别复杂配体,包括结合至称为主要组织相容性复合体(MHC)的蛋白的抗原肽。在人中,该分子被称为人白细胞抗原(HLA)。I类HLA分子从细胞内的蛋白降解中采集肽样品并将这些样品在细胞表面呈递给T细胞。因此,这使得T细胞能够监测细胞改变。当T细胞在HLA分子的环境中遇见抗原时,它经过克隆扩增并分化为记忆T细胞和多种效应T细胞。因此,自发性免疫应答的鉴定证明了抗原是T细胞靶标。它证明了特异性T细胞已被激活并且已经在体内扩增。

[0095] SEQ ID NO.91的PD-L1肽片段(其为W02013056716中描述的PDlong2)非常疏水,并且非常易于形成 $\beta$ -折叠,因此溶解度低。此外,该肽包含游离的SH,必须在低pH下经过处理以防止形成二聚体。因此,需要更易溶解且易于处理的PD-L1肽片段,其包含SEQ ID NO.91

的氨基酸序列或至少该序列的一部分,该序列的这一部分在C端缺少最多达6个氨基酸。

[0096] 在一个广泛的方面,本发明涉及具有下式的PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐:

[0097]  $X^1\text{VILGAILLCLGVALTFIX}^2$

[0098] 其中

[0099] N端 $X^1$ 选自L、HL、THL、RTHL (SEQ ID NO:79)、ERTHL (SEQ ID NO:80)、NERTHL (SEQ ID NO:81),或不存在,

[0100] C端 $X^2$ 选自F、FR、FRL、FRLR (SEQ ID NO:82)、FRLRK (SEQ ID NO:83)、FRLRKG (SEQ ID NO:84)、FRLRKGR (SEQ ID NO:85)、FRLRKGRM (SEQ ID NO:86)、FRLRKGRMM (SEQ ID NO:87)、FRLRKGRMMD (SEQ ID NO:88),或不存在,

[0101] 条件是如果 $X^1$ 不存在,则 $X^2$ 不是FRLRKG (SEQ ID NO:84),

[0102] 其中C端氨基酸还包含酰胺。PD-L1肽片段可选自表A中公开的那些PD-L1肽片段中的任一种,或其药学上可接受的盐,任选地其中C端氨基酸被对应的酰胺形式替换。如本文所使用,所示任何氨基酸序列可在C端氨基酸处被修饰为酰胺形式(-CONH<sub>2</sub>)或被修饰为酸形式(-COOH),因此这些的任一种是优选的实施方案,并且意指任何C端氨基酸(例如I、F、R、L、K、G、M、D)包含酰胺形式和酸形式,除非通过-NH<sub>2</sub>或-OH具体说明。

[0103] 在另一个实施方案中, $X^1$ 选自RTHL (SEQ ID NO:79)和NERTHL (SEQ ID NO:81)。

[0104] 在另一个实施方案中, $X^2$ 选自FRLRKGR-OH (SEQ ID NO:85)、FRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:85)和FRLRKGRMMD-OH (SEQ ID NO:88)。

[0105] 在一个实施方案中,本发明的肽片段选自以下肽片段或其药学上可接受的盐:

[0106] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-OH (SEQ ID NO:77)、

[0107] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:77)、

[0108] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-OH (SEQ ID NO:52)、

[0109] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)、

[0110] NERTHLVILGAILLCLGVALTFI-OH (SEQ ID NO:67)、

[0111] NERTHLVILGAILLCLGVALTFI-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:67)、

[0112] VILGAILLCLGVALTFI-OH (SEQ ID NO:2)、

[0113] VILGAILLCLGVALTFI-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:2)。通常,所述肽片段选自:

[0114] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-OH (SEQ ID NO:77)、

[0115] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-OH (SEQ ID NO:52) 和

[0116] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)。

[0117] 另一方面,本发明涉及一种组合物,其包括本发明的PD-L1肽片段以及任选的药学上可接受的添加剂。在进一步的实施方案中,本发明的PD-L1肽片段选自上述广泛方面中的任一种。通常,存在药学上可接受的添加剂。在一个实施方案中,所述组合物是疫苗组合物。在进一步实施方案中,所述添加剂选自载体、赋形剂、稀释剂和佐剂,通常选自佐剂。这类佐剂可选自基于细菌DNA的佐剂、基于油/表面活性剂的佐剂、基于病毒dsRNA的佐剂、imidazochinilines、Montanide ISA佐剂。

[0118] 另一方面,本发明涉及免疫治疗组合物,其包括:

[0119] a) 本发明的PD-L1肽片段;和

[0120] b) 佐剂;

[0121] 所述组合物被用作药物。在进一步的实施方案中,本发明的PD-L1肽片段选自涉及上述广泛方面中的任一种。在进一步的实施方案中,所述佐剂选自基于细菌DNA的佐剂、基于油/表面活性剂的佐剂、基于病毒dsRNA的佐剂、imidazochinilines、Montanide ISA佐剂。这些佐剂的每一种或佐剂组构成单独的实施方案。

[0122] 在一个实施方案中,本发明的免疫治疗组合物用于治疗或预防疾病、病症或病况的方法中,所述疾病、病症或病况选自癌症,例如形成肿瘤的癌症疾病;感染,例如感染性疾病,例如胞内感染,例如选自单核细胞增多性李斯特氏菌和疟原虫的病原体的胞内感染,病毒感染,例如选自HIV和肝炎病毒的病毒;自身免疫疾病,例如糖尿病、SLE和硬化症。所述疾病、病症或病况的每一种或疾病、病症或病况组构成单独的实施方案。

[0123] 另一方面,本发明涉及试剂盒,其包括:

[0124] a) 本发明的免疫治疗组合物,和

[0125] b) 包括至少一种第二活性成分的组合,所述第二活性成分选自免疫刺激化合物,例如白细胞介素(例如IL-2和/或IL-21);抗癌剂,例如化疗试剂,例如Actimide、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊立替康、来那度胺、亚叶酸、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、Nivolumab、奥沙利铂、紫杉醇、Pembrolizumab、培美曲塞、雷利度胺、替莫唑胺、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。在一个实施方案中,将所提供的组合物同时给予。在另一个实施方案中,将所提供的组合物依序给予。关于a)项下的免疫治疗组合物,本发明的PD-1肽片段的进一步的实施方案选自涉及上述广泛方面中的任一种。在进一步的实施方案中,所述佐剂可选自基于细菌DNA的佐剂、基于油/表面活性剂的佐剂、基于病毒dsRNA的佐剂、imidazochinilines、Montanide ISA佐剂。这些佐剂的每一种或佐剂组构成单独的实施方案。关于b)项下的第二活性成分,所述第二活性成分的进一步的实施方案选自上述构成单独实施方案中的任一种。

[0126] 另一方面,本发明涉及一种试剂盒,其包括:

[0127] a) 本发明的免疫治疗组合物,和

[0128] b) 阻断或抑制免疫系统检查点的免疫调节剂,所述检查点可与(a)的组合中所包括的组分检查点相同或不同。换言之,其可与包括PD1和PDL1之间的相互作用的检查点相同或不同。

[0129] 在一个实施方案中,所述检查点选自以下选项:

[0130] a) IDO1及其底物之间的相互作用;

[0131] b) PD1和PDL1之间和/或PD1和PDL2之间的相互作用;

[0132] c) CTLA4和CD86之间和/或CTLA4和CD80之间的相互作用;

[0133] d) B7-H3和/或B7-H4和它们各自的配体之间的相互作用;

[0134] e) HVEM和BTLA之间的相互作用;

[0135] f) GAL9和TIM3之间的相互作用;

[0136] g) MHC I类或II类和LAG3之间的相互作用;以及

[0137] h) MHC I类或II类和KIR之间的相互作用。

[0138] 在进一步的实施方案中,所述免疫调节剂是结合至所述免疫系统检查点的组分的

抗体或小分子抑制剂(SMI)。

[0139] 在进一步的实施方案中,所述试剂是ID01的小分子抑制剂,任选地其中所述抑制剂是Epacadostat (INCB24360)、Indoximod、GDC-0919 (NLG919) 或F001287,或其中所述试剂是结合至CTLA4或PD1的抗体,任选地其中所述结合至CTLA4的抗体是ipilimumab,所述结合至PD1的抗体是pembrolizumab。

[0140] 在另一方面,本发明涉及一种治疗以表达PD-L1为特征的临床病况的方法,所述方法包括给予患有所述临床病况的个体有效量的本发明的肽片段、本发明的组合物或本发明的试剂盒。

[0141] 在另一方面,本发明涉及一种治疗以表达PD-L1为特征的临床病况的方法,所述方法包括给予患有所述临床病况的个体有效量的具有下式的PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐:

[0142]  $X^1\text{VILGAILLCLGVALTFIX}^2$

[0143] 其中

[0144] N端 $X^1$ 选自L、HL、THL、RTHL (SEQ ID NO:79)、ERTHL (SEQ ID NO:80)、NERTHL (SEQ ID NO:81),或不存在,

[0145] C端 $X^2$ 选自F、FR、FRL、FRLR (SEQ ID NO:82)、FRLRK (SEQ ID NO:83)、FRLRKG (SEQ ID NO:84)、FRLRKGR (SEQ ID NO:85)、FRLRKGRM (SEQ ID NO:86)、FRLRKGRMM (SEQ ID NO:87)、FRLRKGRMMD (SEQ ID NO:88),或不存在,

[0146] 条件是如果 $X^1$ 不存在,则 $X^2$ 不是FRLRKG (SEQ ID NO:84),其中C端氨基酸还包含酰胺。PD-L1肽片段可选自表A中公开的那些PD-L1肽片段的任一种,或其药学上可接受的盐,任选地其中C端氨基酸被对应的酰胺形式替换。

[0147] 另一方面,本发明涉及本发明的PD-L1肽片段用于制备药物(例如免疫治疗组合物或疫苗)的用途,所述要去用于治疗或预防以表达PD-L1为特征的临床病况。在本发明的肽片段的用途的一个实施方案中,所述药物是免疫治疗组合物。在本发明的肽片段的用途的另一个实施方案中,所述药物是疫苗。在一个实施方案中,待治疗的临床病况是表达PD-L1的癌症疾病。在另一个实施方案中,所述临床病况选自感染性疾病和自身免疫性疾病。在进一步的实施方案中,PD-L1肽片段为下式的PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐:

[0148]  $X^1\text{VILGAILLCLGVALTFIX}^2$

[0149] 其中

[0150] N端 $X^1$ 选自L、HL、THL、RTHL (SEQ ID NO:79)、ERTHL (SEQ ID NO:80)、NERTHL (SEQ ID NO:81),或不存在,

[0151] C端 $X^2$ 选自F、FR、FRL、FRLR (SEQ ID NO:82)、FRLRK (SEQ ID NO:83)、FRLRKG (SEQ ID NO:84)、FRLRKGR (SEQ ID NO:85)、FRLRKGRM (SEQ ID NO:86)、FRLRKGRMM (SEQ ID NO:87)、FRLRKGRMMD (SEQ ID NO:88),或不存在,

[0152] 条件是如果 $X^1$ 不存在,则 $X^2$ 不是FRLRKG (SEQ ID NO:84),其中C端氨基酸还包含酰胺。PD-L1肽片段可选自表A中公开的那些PD-L1肽片段的任一种,或其药学上可接受的盐,任选地其中C端氨基酸被对应的酰胺形式替换。

[0153] 在另一方面,本发明涉及具有下式的PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐:

[0154]  $X^1\text{VILGAILLCLGVALTFIX}^2$



[0155] 其中

[0156] N端 $X^1$ 选自L、HL、THL、RTHL (SEQ ID NO:79)、ERTHL (SEQ ID NO:80)、NERTHL (SEQ ID NO:81),或不存在,

[0157] C端 $X^2$ 选自F、FR、FRL、FRLR (SEQ ID NO:82)、FRLRK (SEQ ID NO:83)、FRLRKG (SEQ ID NO:84)、FRLRKGR (SEQ ID NO:85)、FRLRKGRM (SEQ ID NO:86)、FRLRKGRMM (SEQ ID NO:87)、FRLRKGRMMD (SEQ ID NO:88),或不存在,

[0158] 条件是如果 $X^1$ 不存在,则 $X^2$ 不是FRLRKG (SEQ ID NO:84),

[0159] 其中C端氨基酸还包含酰胺;

[0160] 当与其他癌症疗法同时或依序给予时,其用于治疗或预防癌症的方法中。所述PD-L1肽片段可选自表A中公开的那些的任一种,或其药学上可接受的盐,任选地其中C端氨基酸被对应的酰胺形式替换。其他癌症疗法可以是细胞因子疗法、T细胞疗法、NK疗法、免疫系统检查点抑制剂、化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质、基因疗法、抗体和树突细胞。每一种其他癌症疗法——其为细胞因子疗法、T细胞疗法、NK疗法、免疫系统检查点抑制剂、化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质、基因疗法、抗体和树突细胞——构成单独的实施方案。例如,在进一步的实施方案中,其他癌症疗法选自免疫系统检查点抑制剂,其中所述抑制剂是选自以下的检查点阻断抗体:Actimide、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊立替康、来那度胺、亚叶酸、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、Nivolumab、奥沙利铂、紫杉醇、Pembrolizumab、培美曲塞、雷利度胺、替莫唑胺、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。在一个实施方案中,PD-L1肽片段选自以下PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐:

[0161] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD (SEQ ID NO:77)、

[0162] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:77)、

[0163] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR (SEQ ID NO:52)、

[0164] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)、

[0165] NERTHLVILGAILLCLGVALTFI (SEQ ID NO:67)、

[0166] NERTHLVILGAILLCLGVALTFI-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:67)、

[0167] VILGAILLCLGVALTFI (SEQ ID NO:2)、

[0168] VILGAILLCLGVALTFI-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:2)。通常,所述肽片段选自:

[0169] NERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD (SEQ ID NO:77)、

[0170] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR (SEQ ID NO:52) 和

[0171] RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGR-NH<sub>2</sub> (具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)。

[0172] 另一方面,本发明涉及包含下式的PD-L1肽片段或其药学上可接受的盐:

[0173] FMTYWHLNFTVTVPKDL (SEQ ID NO:89),其中C端氨基酸还包含酰胺;

[0174] 当与其他癌症疗法同时或依序给予时,其用于治疗或预防癌症的方法中,所述其他癌症疗法例如细胞因子疗法、T细胞疗法、NK疗法、免疫系统检查点抑制剂、化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质、基因疗法、抗体和树突细胞。在一个实施方案中,PD-L1肽片段由SEQ ID NO.1序列的最多达35个连续氨基酸(例如30或25个连续氨基酸)组成并且包含具有下式

的PD-L1片段:FMTYWHLNAFTVTVPKDL (SEQ ID NO:89)。在一个实施方案中,PD-L1肽片段选自具有下式的PD-L1片段:FMTYWHLNAFTVTVPKDL (SEQ ID NO:89),其中C端氨基酸还包含酰胺。在进一步的实施方案中,其他癌症疗法选自免疫系统检查点抑制剂,其中所述抑制剂为选自以下的检查点阻断抗体:Actimide、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊立替康、来那度胺、亚叶酸、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、Nivolumab、奥沙利铂、紫杉醇、Pembrolizumab、培美曲塞、雷利度胺、替莫唑胺、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0175] 本文公开的PD-L1肽片段通过标准肽合成(例如固相肽合成(SPPS))来制备。SPPS是实验室中合成肽的标准方法。SPPS允许合成难以在细菌中表达的天然肽、非天然氨基酸的掺入、肽/蛋白质骨架修饰以及由D-氨基酸组成的D-蛋白质。用功能单位(“接头”)处理小的多孔珠,可在该功能单位上构造肽链。肽将保持与珠的共价连接,直至通过试剂(例如无水氢氟酸或三氟乙酸)从珠上切割。因此,所述肽“固定”在固相上并且可在过滤过程中被保留,而液相试剂和合成副产物被冲走。SPPS的一般原理是脱保护-冲洗-偶联-冲洗的重复循环之一。固相连接肽的游离N端酰胺偶联至单个N-保护的氨基酸单位。之后该单位被脱保护,暴露出新的N端酰胺,其可与另一个氨基酸连接。该技术的优势部分在于能够在每次反应后进行冲洗循环,除去过量试剂,而全部生长中的目标肽保持与不溶性树脂的共价连接。SPPS有两种主要使用形式——Fmoc和Boc。不同于核糖体蛋白合成,固相肽合成以C端至N端的方式进行。氨基酸单体的N端被这两组中的任一组保护并被添加到脱保护的氨基酸链上。两种技术皆可使用自动合成仪,尽管许多研究团队继续手动进行SPPS。此外,本领域技术人员应理解,在上文和下文所述的方法中,中间化合物的功能基团可能需要被保护基团保护。

[0176] 当本文公开的化合物和药物组合物用于上述治疗时,将治疗有效量的至少一种化合物给予至需要所述治疗的哺乳动物。

[0177] 如本文所使用,为了方便起见,通过本领域技术人员已知的单字母或三字母代码来识别氨基酸,如下表所示:

[0178] 氨基酸、单字母和三字母代码

[0179]

| 氨基酸       | 三字母代码 | 单字母代码 |
|-----------|-------|-------|
| 丙氨酸       | ala   | A     |
| 精氨酸       | arg   | R     |
| 天冬酰胺      | asn   | N     |
| 天冬氨酸      | asp   | D     |
| 天冬酰胺或天冬氨酸 | asx   | B     |
| 半胱氨酸      | cys   | C     |
| 谷氨酸       | glu   | E     |
| 谷氨酰胺      | gln   | Q     |
| 谷氨酰胺或谷氨酸  | glx   | Z     |
| 甘氨酸       | gly   | G     |

[0180]

|      |     |   |
|------|-----|---|
| 组氨酸  | his | H |
| 异亮氨酸 | ile | I |
| 亮氨酸  | leu | L |
| 赖氨酸  | lys | K |
| 甲硫氨酸 | met | M |
| 苯丙氨酸 | phe | F |
| 脯氨酸  | pro | P |
| 丝氨酸  | ser | S |
| 苏氨酸  | thr | T |
| 色氨酸  | trp | W |
| 酪氨酸  | tyr | Y |
| 缬氨酸  | val | V |

[0181] 本文使用的术语“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”意指为了抵抗病况(例如疾病或病症)的目的而管理和护理患者。该术语意欲包括针对患者所患的给定病况的全部范围的治疗,例如给予活性化合物以减轻症状或并发症,以延迟疾病、病症或病况的发

展,以减轻或缓解症状和并发症,和/或治愈或消除疾病、病症或病况以及预防病况,其中预防应理解为为了抵抗病况(例如疾病或病症)的目的而管理和护理患者,包括给予活性化合物以预防症状或并发症的发病。治疗可以急性方式或慢性方式进行。待治疗的患者优选为哺乳动物,特别是人类,但也可包括动物,例如狗、猫、牛、羊和猪。

[0182] 如本文所使用,术语“治疗有效量”的本发明的PD-L1肽片段或如本文公开的肽片段意指足以治愈、减轻或部分抑制给定疾病及其并发症的临床表现的量。足以实现该目的的量被定义为“治疗有效量”。各目的的有效量将取决于疾病或损伤的严重性以及受试者的体重和总体状态。应理解,确定适合的剂量可使用常规实验,通过构建数值矩阵并测试矩阵中不同的点来实现,这些全部在受训的医师或兽医的常规技能范围内。

[0183] 另一方面,本发明涉及药物组合物,其包括本发明的PD-L1肽和任选的药学上可接受的添加剂(例如载体或赋形剂)。

[0184] 本文使用的“药学上可接受的添加剂”意欲包括但不限于载体、赋形剂、稀释剂、佐剂、着色剂、芳香剂、防腐剂等,技术人员在配制本发明的化合物时会考虑所述添加剂以制备药物组合物。

[0185] 可用于本发明的组合物的佐剂、稀释剂、赋形剂和/或载体在以下方面必须是药学上可接受的:与式(1)的化合物和药物组合物的其他成分相容并且对其赋形剂无害。优选所述组合物不应含有任何可引起有害反应(例如过敏反应)的物质。可用于本发明的药物组合物的佐剂、稀释剂、赋形剂和载体是本领域技术人员公知的。

[0186] 佐剂为其与所述组合物的混合提高或者改进由所述组合物引起的免疫应答的任何物质。广义的佐剂为促进免疫应答的物质。佐剂还可优选具有储库(depot)作用,即它们还使得从给药位点缓慢且持续释放活性药剂。佐剂的一般讨论提供于Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (第二版, 1986), 第61-63页。

[0187] 佐剂可选自:  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$ , 二氧化硅, 明矾,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 高岭土, 碳, 氢氧化铝, 胞壁酰二肽, N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP), N-乙酰-去甲胞壁酰(nornuramyl)-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(CGP 11687, 还称为nor-MDP), N-乙酰胞壁酰(acetylmuramyl)-L-丙氨酸-D-异谷氨酸-L-丙氨酸-2-(1'2'-二棕榈酰-sn-丙三氧基-3-羟基磷酸基氧基)-乙胺(CGP 19835 A, 还称为MTP-PE), 于2% 鲨烯/Tween-80.RTM. 乳剂中的RIBI (MPL+TDM+CWS), 脂多糖及其多种衍生物(包括脂质A), 弗氏完全佐剂(FCA), 弗氏不完全佐剂, Merck佐剂65, 多核苷酸(例如聚IC和聚AU酸类), 来自结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的蜡D, 短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)和布鲁氏菌属(*Brucella*)成员中发现的物质, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN(参见US 58767和5,554,372), 脂质A衍生物, 霍乱毒素衍生物, HSP衍生物, LPS衍生物, 合成肽基质或GMDP, 白细胞介素1, 白细胞介素2, Montanide ISA-51和QS-21。还表明多种皂苷提取物适用于作为免疫原组合物中的佐剂。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)也可用作佐剂。

[0188] 本发明使用的优选佐剂包括基于油/表面活性剂的佐剂, 例如Montanide佐剂(可获自比利时的Seppic), 优选Montanide ISA-51。其他优选佐剂为基于细菌DNA的佐剂, 例如包含CpG寡核苷酸序列的佐剂。其他优选佐剂为基于病毒dsRNA的佐剂, 例如聚I:C。GM-CSF和Imidazochiniline也是优选的佐剂的实例。

[0189] 所述佐剂最优选Montanide ISA佐剂。所述Montanide ISA佐剂优选Montanide ISA 51或Montanide ISA 720。

[0190] 在Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (第二版, 1986), 61-63页中还指出, 当目的抗原的分子量低或免疫原性差时, 推荐偶联至免疫原性载体。本发明的免疫治疗组合物的多肽或片段可偶联至载体。载体可以独立于佐剂而存在。载体的功能可以为, 例如, 增加多肽片段的分子量以提高活性或免疫原性, 以赋予稳定性, 以提高生物活性, 或以增长血清半衰期。此外, 载体可有助于将多肽或其片段呈递于T细胞。因此, 在免疫原性组合物中, 所述多肽或其片段可以与载体(例如以下所示的那些)结合。

[0191] 所述载体可以是本领域技术人员已知的任何适合的载体, 例如蛋白质或抗原呈递细胞, 例如树突细胞(DC)。载体蛋白包括钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin), 血清蛋白如转铁蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白或卵白蛋白, 免疫球蛋白, 或激素如胰岛素或棕榈酸。或者, 载体蛋白可以是破伤风类毒素或白喉类毒素。或者, 载体可以是右旋糖苷, 例如琼脂糖。载体必须是人生理上可接受的和安全的。

[0192] 所述免疫治疗组合物可任选地包括药学上可接受的赋形剂。所述赋形剂在以下方面必须是“可接受的”, 即与组合物的其他成分相容并且对其受体无害。辅助物质, 例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等, 可存在于赋形剂中。这些赋形剂和辅助物质通常是在接受所述组合物的个体中不诱导免疫应答并且给予后不产生过度毒性的药物试剂。药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体, 例如水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、丙三醇和乙醇。其中还可包含药学上可接受的盐, 例如无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等; 有机酸的盐, 如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。药学上可接受的赋形剂、载体和辅助物质的充分讨论可获自Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., NJ, 1991)。

[0193] 免疫治疗组合物可以以适于药丸给药或适于连续给药的形式来制备、包装或售卖。可注射组合物可以以单位剂型——例如以含有防腐剂的安瓿——或多剂量容器来制备、包装或售卖。组合物包括但不限于悬浮剂、溶液剂、油性溶媒或水性溶媒中的乳剂和可植入缓释制剂或生物可降解制剂。在组合物的一个实施方案中, 活性成分以干燥形式(例如粉末或颗粒)提供, 用适当的溶媒(例如无菌、无热原的水)来复原, 之后给予经复原的组合物。所述组合物可以以无菌可注射水性或油性悬浮剂或溶液剂的形式来制备、包装或售卖。该悬浮剂或溶液剂可根据已知的技术来配制, 并且除活性成分外还可包含其他成分, 如本文所述的佐剂、赋形剂和辅助物质。这类无菌可注射制剂可以使用无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂(例如水或1,3-丁二醇)来制备。其他可接受的稀释剂和溶剂包括但不限于, Ringer's溶液、等渗氯化钠溶液以及不挥发的油类如合成的甘油单酯或甘油二酯。

[0194] 其他有用的组合物包括那些组合物, 即其包含以微晶形式、以脂质体制剂或作为生物可降解的聚合物体系的组分的活性成分。用于持续释放或植入的组合物可包含药学上可接受的聚合材料或疏水材料, 例如乳剂、离子交换树脂、微溶性聚合物或微溶性盐。或者, 所述组合物的活性成分可被微粒载体包封、吸附至微粒载体或与微粒载体结合。适合的微粒载体包括衍生自聚甲基丙烯酸甲酯聚合物的那些, 以及衍生自聚丙交酯(poly(lactides))和聚乙丙交酯(poly(lactide-co-glycolides))的PLG微粒。参见例如Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10:362-368。还可使用其他微粒体系和聚合物, 例如聚合物如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、精胺、亚精胺, 以及这些分子的缀合物。

[0195] 如上文提及的,本文所公开的组合物、特别是免疫治疗组合物除包括本文所公开的化合物以外还可包括至少一种药学上可接受的佐剂、稀释剂、赋形剂和/或载体。在一些实施方案中,所述药物组合物包括1至99重量%的所述至少一种药学上可接受佐剂、稀释剂、赋形剂和/或载体以及1至99重量%的本文所公开的化合物。活性成分和药学上可接受的佐剂、稀释剂、赋形剂和/或载体的总量不会超过所述组合物(特别是药物组合物)重量的100%。本文所述的任意组合物、疫苗或试剂盒可额外包含防腐剂,其在贮存于溶液中或作为冻干物贮存时可提高本发明的组分肽片段的稳定性。适合的防腐剂是本领域公知的并优选为药学上可接受的。在一些情况下,可通过在N端、在C端或在两端掺入另外的末端残基来提高肽片段的稳定性。这类残基通常为亲水氨基酸残基或对应的酰胺。通常,肽片段在N端和/或C端可包含另外的1、2或3个这类残基。

[0196] 在一些实施方案中,仅一种本文所公开的化合物用于以上讨论的目的。

[0197] 在一些实施方案中,两种或更多种本文所公开的化合物组合用于以上讨论的目的。

[0198] 包含本文所述化合物的组合物,特别是免疫治疗组合物,可适于口服、静脉内、局部、腹膜内、经鼻、口腔、舌下或皮下给药,或适于以例如气溶胶或气悬细粉的形式经呼吸道给药。因此,所述药物组合物可以是例如以下形式:片剂、胶囊剂、粉末、纳米颗粒、晶体、无定型物质、溶液剂、透皮贴剂或栓剂。

[0199] 所述方法的进一步实施方案在本文的实验部分描述,并且每种单独的方法以及每种起始材料构成实施方案,其可形成实施方案的一部分。

[0200] 上述实施方案应被视为是指本文所述的任一方面(例如“治疗方法”、“免疫治疗组合物”、“用作药物的化合物”或“用于方法的化合物”)以及本文所述的任一实施方案,除非具体指明实施方案涉及本发明的某一方面或某些方面。

[0201] 本文所引用的全部参考文献,包括出版物、专利申请和专利,以引用的方式纳入本文,引用的程度如同单独且具体地指明各参考文献以引用的方式纳入并且在本文中全文阐述一样。

[0202] 如本文所用,所有标题和副标题仅为方便起见,不应当理解为以任何方式限制本发明。

[0203] 本发明涵盖了上述要素的所有可能的变化形式的任意组合,除非本文中另外指明或与上下文明显矛盾。

[0204] 本发明描述的上下文中使用的术语“一”和“一个”和“所述”和类似的指代物将被理解为涉及单数和复数,除非本文中另外指明或与上下文明显矛盾。

[0205] 本文中记载的数值范围仅意欲作为单独提及落入该范围的各独立数值的速记方法,除非本文另有说明,各独立数值纳入本说明书中,如同它在本文中被单独记载一样。除非另外说明,本文提供的全部准确数值代表相应的近似数值(例如就特定因子或测量所提供的准确的所有准确的示例性数值可被认为还提供了相应的近似测量,在适当的情况以“约”来修饰)。

[0206] 本文所述的所有方法可以以任何适当的次序进行,除非本文中另外指明或与上下文明显矛盾。

[0207] 本文所提供的任何和所有实施例或示例性表述(例如“例如”)的使用仅意欲更好

地阐述本发明,其不对本发明的范围进行限制,除非另外说明。说明书中的表述不应被解释为表明任何要素对本发明的实践而言是必需的,除非明确地这样说明。

[0208] 本文对专利文件的引用和纳入仅为方便起见,不反映任何这类专利文件的合法性、可专利性和/或可实施性的观点。

[0209] 在本文中,对本发明的任何方面或实施方案的描述中,使用术语例如“包括(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”或“包含(containing)”来提及一个要素或多个要素意欲为“由……组成”、“基本上由……组成”或“基本上包括”该特定要素或多个要素的本发明的类似方面或实施方案提供支持,除非另外说明或与上下文明显矛盾(例如,本文所描述的包括特定要素的组合物应当理解为还描述了由该要素组成的组合物,除非另外说明或与上下文明显矛盾)。

[0210] 本发明包括适用法律允许的最大范围内的本文所示方面或权利要求中记载的主题的所有修改和等价物。

[0211] 本发明还通过以下实施例来详细说明,然而,这些实施例不应当解释为限制保护的。上文描述和以下实施例中公开的特征可以单独地和以其任意组合的方式、以其多种形式作为实现本发明的材料。

[0212] 实施例

[0213] 实施例1

[0214] 材料和方法

[0215] 患者和捐赠者

[0216] 将26名IV期黑色素瘤患者招募到开放标记的非随机I/II期研究(EudraCT编号2009-010194-20;临床试验政府识别编号:NCT00978913)中。方案得到丹麦首都地区科学伦理委员会(H-A-2009-013)、丹麦医药局(2612-4030)、丹麦数据保护局的批准并根据赫尔辛基宣言(Declaration of Helsinki)的规定进行。在研究开始前获得来自患者的书面知情同意书。临床和免疫结果将另外报道(Borch等人,准备中)。简言之,对患者皮内注射自体DC疫苗,两周注射六次,随后每四周一次直至进展。同时,两周一次地用节拍式环磷酸胺方案(每天两次50mg)治疗患者。

[0217] 出于免疫监控目的,接种前收集患者的外周血单核细胞(PBMC),之后用树突细胞疫苗(DCvacc)进行4次和6次接种。使用Lymphoprep分离法分离PBMC,制备成HLA型并冷冻于含有10%DMSO的FCS中。如之前所述<sup>24</sup>产生DC疫苗并根据丹麦医药局批准的生产质量管理规范(GMP)进行所有步骤。简言之,通过白细胞去除术分离自体PBMC,进一步分离单核细胞并培养8天。在第6天,使用IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6和PGE2来进行DC的成熟化。使用自动低温保存来冷冻1 $\times 10^7$ DC的等分溶液。将成熟的DC用编码肿瘤相关抗原p53、存活素和hTERT的mRNA转染以产生DCvacc。

[0218] 肽

[0219] 合成来自PD-L1的19个氨基酸长肽(丹麦,哥本哈根,TAG Copenhagen):PDLong1:PDL1<sub>9-28</sub>,FMTYWHLNNAFTVPKDL——SEQ ID NO:89。PDLong1包含9mer HLA-A2限制肽(此处称为“PD-L101”)的序列PDL1<sub>15-23</sub>;使用互联网上可获得的表位预测数据库“SYFPEITHI”<sup>25</sup>来鉴定和分析(LLNNAFTVTV-SEQ ID NO:90)。通过SYFPEITHI算法,PD-L101得分30并且最终为最佳候选表位。



[0220] 此外,合成来自PD-L1的23个氨基酸长肽(丹麦,哥本哈根,TAG Copenhagen): PDLong2:PDL1<sub>242-264</sub>,VILGAILLCLGVALTFIFRLRKG (SEQ ID NO:91)。该长肽含有许多可能的15' mer HLA II类限制表位以及最小的I类限制表位,如通过www.syfpeithi.de<sup>25</sup>上可获得的Rammensee等人开发的算法所预测的。特别地,它含有命名为PDL111的HLA-A2表位(PDL1<sub>250-58</sub>,CLGVALTFI-SEQ ID NO:92)。将20-mer长肽(此处命名为“不相关对照”)GARVERVDFGNFVFNISVLW-SEQ ID NO:93用作对照肽,并将HLA-A2高亲和力结合表位HIV-1pol<sub>476-484</sub>(ILKEPVHGV-SEQ ID NO:94)用作不相关对照。

#### [0221] 共刺激测定

[0222] 将来自恶性黑色素瘤患者的PBMC用自体DCvacc刺激,比例为DCvacc:PBMC 1:10。刺激后第二天,分开培养物并用含有25μg/mL PDLong1:PDL19-28,[FMTYWHLNFTVTVPKDL-SEQ ID NO:89]或PDLong2:PDL1242-264,[VILGAILLCLGVALTFIFRLRKG-SEQ ID NO:91]的肽或不相关长肽[GARVERVDFGNFVFNISVLW-SEQ ID NO:93](作为对照共刺激)共刺激。在第7天用DCvacc进行第二次刺激,然后在第8天进行肽共刺激。每种肽共刺激之后的第二天添加IL-2(120U/mL)。第二次肽共刺激之后一周,使用细胞内细胞因子染色来分析培养物的DCvacc应答。

#### [0223] 髓内细胞因子染色(ICS)

[0224] 为了检测产生细胞因子(IFN-γ和TNF-α)的细胞亚群,将用DCvacc刺激并用肽共刺激两周的PBMC在37℃下于5%CO<sub>2</sub>中用DCvacc(比例DCvacc:PBMC 1:10)刺激5小时。在孵育第一小时后,以1:200的稀释率添加GolgiPlug(BD)。在另外4小时之后,将细胞用PBS冲洗两次,用针对表面标志物的荧光色素缀合的抗体(CD3-Amcyan、CD4-PerCP和CD8-Pacific Blue,全部来自BD)进行染色。将细胞再冲洗一次,之后用固定/透化和透化缓冲剂(eBioscience)根据制造商的说明进行固定和透化。随后使用针对细胞内细胞因子的荧光色素缀合的抗体对细胞进行染色。使用以下组合:IFN-γ-PE-CY7(BD)、TNF-α-APC(eBioscience)。使用相关的同种型对照来实现正确的互补并确认抗体特异性。使用BD FACSCanto II流式细胞仪来分析染色细胞并使用BD FACS Diva软件进行进一步分析。

[0225] 为了测定PD-L1应答,将培养物用PDLong1或PDLong2(0.2mmol/L)或不相关肽刺激5小时。随后将细胞用表面和胞内抗体染色并在BD FACSCanto II上进一步分析。

#### [0226] ELISPOT

[0227] 在本研究中,根据CIP提供的指南([http://cimt.eu/cimt/files/dl/cip\\_guidelines.pdf](http://cimt.eu/cimt/files/dl/cip_guidelines.pdf))进行ELISPOT。简言之,用相关抗体过夜包被硝酸纤维素铺底的96孔板。冲洗孔,通过X-vivo培养基阻断并添加细胞,如果可能则在不同细胞浓度下进行平行的三份或两份,含有或不含有肽。将板孵育4小时。接下来,弃掉培养基并冲洗孔,之后添加相关的生物素化的第二抗体(Ab)(Mabtech),之后添加抗生物素蛋白-酶缀合物(AP-抗生物素蛋白;Calbiochem/Invitrogen Life Technologies),最后添加酶底物NBT/BCIP(Invitrogen Life Technologies)。使用ImmunoSpot Series 2.0分析仪(CTL分析仪)对斑点进行计数。

#### [0228] CBA

[0229] 为了测定经DCvacc刺激的和肽共刺激的(PDLong1和PDLong2或HIV肽)培养物中细胞因子分泌的变化,使用BD™流式细胞术微球阵列法(CBA) Flex Set来分析细胞培养物上清液中的IFN-γ、TGF-β1、TNF-α、IL-6、IL-10和IL-17A。将针对IFN-γ、TNF-α、IL-6和IL-10的

Flex Set组合,而单独分析IL-17A和TGF- $\beta$ 1。根据制造商的推荐进行分析。在FACSCANTO II (BD Biosciences)上获得样品并使用FCAP Array<sup>TM</sup>软件v 3.0.1 (BD Biosciences)分析数据。

[0230] 结果

[0231] 使用长PD-L1肽的共刺激提高了针对DCvacc的T细胞反应性

[0232] 通常,接种疫苗前和接种疫苗后在患者中都观察到了针对DCvacc的低免疫性。在本研究中,我们开始检查PD-L1特异性T细胞对DCvacc特异性T细胞应答的支持作用。因此,在接种疫苗前(基线处)以及接种DCvacc四次(对于一些患者而言,六次)之后,从患有黑色素瘤的患者中分离PBMC。将PBMC用DCvacc结合对照HIV表位或PD-L1肽刺激两次,如图1A所示。总体上,我们发现DCvacc主要刺激CD4<sup>+</sup>T细胞。首先,我们检查了之前描述的来自PD-L1的长T细胞表位(“PDLong1” [PDL1<sub>9-27</sub>, FMTYWHLLNAFTVTVPKDL] SEQ ID NO:89)的效果。<sup>18</sup>PDL1<sub>9-27</sub>包含HLA-A2限制性、PD-L1衍生的CD8<sup>+</sup>T细胞表位(PDL1<sub>15-23</sub>, LLNAFTVTV-SEQ ID NO:90)。我们观察到PBMC数量增加,这表明与对照HIV表位相比,当PBMC与PDLong1共培养时显示出针对DCvacc的反应性。图1B-E表示来自三名捐赠者的培养物结果,其中PD-L1特异性T细胞的共激活显著提高针对DCvacc的T细胞免疫力。在没有共刺激的情况下,CD4<sup>+</sup>T细胞应答DCvacc而仅释放TNF $\alpha$ (图1B)。在有PD-L1肽共刺激的情况下,DCvacc诱导了TNF $\alpha$ /INF  $\gamma$  双阳性CD4<sup>+</sup>T细胞(图1C)。在有PD-L1肽共刺激的情况下,反应性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞数目均应答DCvacc而增加(图1D和E)。

[0233] 在接种疫苗前的PBMC培养物中,使用PDLong1的共刺激在8名捐赠者中的6名中提高了针对DCvacc的CD4<sup>+</sup>T细胞反应性(P=0.312),在8名捐赠者中的7名中提高了CD8<sup>+</sup>T细胞反应性(P=0.039)(分别为图2A和B)。四次疫苗接种后,所有捐赠者中的CD4<sup>+</sup>T细胞反应性提高(P=0.016)(图2A),而在8名捐赠者中仅5名中CD8<sup>+</sup>T细胞反应性提高(P=0.313)(图2B)。与用对照肽共刺激的培养物相比,在用PDLong1肽共刺激的培养物中,CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞针对DCvacc的反应程度显著更高(分别为P=0.02和P=0.05)。

[0234] 针对新的长PD-L1表位的自发性免疫应答

[0235] 为了进一步研究针对PD-L1的免疫应答是否可被共刺激增强,我们使用IFN  $\gamma$  ELISPOT测定来检查来自12名黑色素瘤患者的肿瘤浸润淋巴细胞针对其他PD-L1衍生表位(PDLong2[PDL1<sub>242-264</sub>, VILGAILLCLGVALTFIFRLRKG(SEQ ID NO:91)])的T细胞反应性。IFN  $\gamma$  ELISPOT测定表明,用PDLong2培养的肿瘤浸润淋巴细胞中T细胞应答增加(图3A和B)。该增加的应答通过胞内细胞因子染色来确定(图3C和D)。

[0236] 使用两种长PD-L1肽的共刺激增强了针对DCvacc的T细胞反应性

[0237] 接下来,我们检查了来自8名接种了疫苗的黑色素瘤患者的PBMC以测定使用PDLong1和PDLong2共刺激的效果(图4A和B)。我们观察到,与使用对照肽共刺激的那些培养物相比,已使用两种PDLong表位共刺激的培养物中针对DCvacc反应的CD4<sup>+</sup>T细胞的数目显著增加(在基线处P=0.008,第四次疫苗接种之后P=0.008)。因此,在两个时间点,所有捐赠者中CD4<sup>+</sup>T细胞反应性均增加。在所有捐赠者(除一名捐赠者以外)中基线处(P=0.008)和第四次疫苗接种(P=0.055)之后CD8<sup>+</sup>T细胞反应性同样显著增加。

[0238] Mann-Whitney检验表明,当我们将用一种或两种PD-L1表位刺激的所有培养物与用对照肽孵育的培养物进行比较时,PD-L1共刺激对T细胞应答具有显著效果。CD4<sup>+</sup>T细胞应

答:基线处 $P=0.012$ ,第四次疫苗接种后 $P=0.002$ ,第六次疫苗接种后 $P=0.095$ 。 $CD8^+$ T细胞应答:基线处 $P=0.01$ ,第四次疫苗接种后 $P=0.076$ ,第六次疫苗接种后 $P=0.31$ 。

[0239] 使用PD-L1表位的共刺激诱导IL-6产生

[0240] 为了检查细胞因子调控环境方面的变化,我们使用BDTM流式细胞术微球阵列法(CBA)Flex Set测定来比较来自四名捐赠者的PBMC培养物的上清液中的细胞因子分泌。与对照培养物相比,使用PDLong表位共刺激的PBMC培养物显示出更高浓度的促炎症细胞因子INF  $\gamma$  和IL6。在基线处及第四次疫苗接种之后,在来自四名患者中的三名的培养物中观察到比对照培养物更高的INF  $\gamma$  水平(图5A)。此外,在两个时间点,与用对照肽孵育相比,用两种PDLong肽(Long 1+2)共刺激之后在全部四名患者中观察到IL-6水平大幅提高(图5B)。我们还观察到,与对照相比,用两种PDLong肽共刺激的培养物中调节细胞因子TGF $\beta$ 的水平更低(图5C)。在来自四名患者中的两名的PBMC培养物中在基线处观察到这些更低水平的TGF $\beta$ ,并且在第四次疫苗接种/共刺激之后在全部四名患者的PBMC培养物中观察到这些更低水平的TGF $\beta$ 。测量了其他细胞因子,例如TNF $\alpha$ 、IL10和IL17,但是未在任何所检查的上清液中检测到它们(数据未示出)。除了细胞因子概况方面的变化,与对照培养物相比,用PD-L1表位共刺激的大多数培养物中细胞数目更高(图5D)。在来自四名患者中的三名的培养物中在基线处观察到细胞数目增加,并且在第四次刺激之后在全部四名患者的培养物中观察到细胞数目增加。

[0241] 讨论

[0242] 目前正在研究以癌症中的免疫抑制为目的的若干可能的治疗策略,例如使用单克隆抗体来阻断抑制性途径。<sup>19</sup>我们已采用的替代性策略是利用特异性T细胞来靶向免疫抑制。<sup>20</sup>在本研究中,当我们检查基于DC的疫苗与衍生自PD-L1的长肽表位的共刺激对免疫原性的影响时,我们发现针对疫苗的T细胞反应性显著增强。 $CD4^+$ T细胞的反应性增加得最多,但是 $CD8^+$ T细胞反应性在共刺激后也显著增强。

[0243] 总体而言,我们在患者的离体PBMC中未观察到或仅观察到非常有限的针对DCvacc的反应性(Borch等人,准备中)。因此,在接种DCvacc的患者体内仅存在有限的T细胞诱导频率。这可能是由于存在不同的免疫抑制机制,这些免疫抑制机制甚至可被DC增强的。调节反馈机制(例如PD-L1的上调)对于限制免疫应答的强度和范围是必需的,否则免疫应答可能引起对宿主的伤害。然而,这种免疫逃避在癌症免疫疗法的情况中是有害的。因此,在免疫抑制机制可能抑制治疗效果的情况下,靶向一种或更多种免疫抑制途径与抗癌免疫疗法相结合可能是有用的。

[0244] 本研究的结果表明,向癌症疫苗中加入PD-L1表位能够增强体内针对疫苗的免疫应答。这些措施能够通过促炎症PD-L1特异性T细胞的共激活来增强效应T细胞,所述促炎症PD-L1特异性T细胞由于PD-L1的局部表达而被吸引到肿瘤微环境中。之前的研究已报道了,调节T细胞(Treg)暴露于IL-6和其他促炎症细胞因子诱导成熟Treg的重编程程序以获得类似于促炎症Th17细胞的表型。<sup>21-23</sup>在本研究中,在已用PD-L1表位共刺激的培养物中,IL-6水平显著更高。因此,PD-L1特异性T细胞可以通过直接和间接释放促炎症细胞因子,以及通过直接除去表达PD-L1的调节免疫细胞——其抑制PD-1阳性T细胞,有效地延长免疫应答的效应期。除直接抑制PD-L1的免疫调节作用外,PD-L1特异性T细胞可抑制由它们的同源靶细胞介导的其他免疫抑制途径。

[0245] 阻断PD-1途径的早期成功导致制药公司之间研发靶向PD-1或PD-L1的单克隆抗体的商业利益和竞争。PD-1途径阻断与疫苗接种的组合是一种有前景的替代方法,因为已表明疫苗使免疫效应细胞聚集到肿瘤微环境中。通过诱导PD-L1特异性T细胞来靶向免疫调节是增强免疫治疗剂的免疫原性的颇具吸引力的选择,因为增强PD-L1特异性T细胞可直接调整免疫调节并改变耐受性。疫苗接种与PD-1途径阻断的组合应当是易于实现的并且是协同的,因为通过抗体的PD-L1阻断将使表达PD-L1的靶细胞成为疫苗诱导的T细胞更易攻击的目标。需要进行进一步研究以确认包括采用PD-L1衍生表位对PD-L1特异性T细胞进行共刺激的方案的安全性、耐受性和有效性。

#### [0246] 实施例2

[0247] 人患者中针对IO104.1的自发性免疫应答

[0248] 我们首先分析了来自黑色素瘤患者的肿瘤浸润T细胞中针对两个版本的IO104.1的免疫应答。接着我们分析了PDL111特异性T细胞是否能够识别IO104.1。

[0249] 材料和方法

[0250] 肽

[0251] PDL111=CLGVALTFI(最小表位-SEQ ID NO:92)

[0252] IO104(PDLong2)=VILGAILLCLGVALTFIFRLRKG(SEQ ID NO:92)

[0253] IO 104.1-OH=

[0254] Arg-Thr-His-Leu-Val-Ile-Leu-Gly-Ala-Ile-Leu-Leu-Cys-Leu-Gly-Val-Ala-Leu-Thr-Phe-Ile-Phe-Arg-Leu-Arg-Lys-Gly-Arg-OH(C端酸)(SEQ ID NO:52)

[0255] IO 104.1-NH<sub>2</sub>=

[0256] Arg-Thr-His-Leu-Val-Ile-Leu-Gly-Ala-Ile-Leu-Leu-Cys-Leu-Gly-Val-Ala-Leu-Thr-Phe-Ile-Phe-Arg-Leu-Arg-Lys-Gly-Arg-NH<sub>2</sub>(C端酰胺)(具有C端酰胺的SEQ ID NO:52)

[0257] ELISPOT测定

[0258] ELISPOT技术使得能够筛选用于T细胞识别的大量肽抗原,尽管可利用的T细胞相对较少。我们使用ELISPOT测定来定量测量分泌IFN- $\gamma$ 的肽特异性效应细胞,如实施例1中所述。我们根据由癌症免疫疗法免疫指导项目提供的指南(CIP;[http://cimt.eu/cimt/files/dl/cip\\_guidelines.pdf](http://cimt.eu/cimt/files/dl/cip_guidelines.pdf))进行该测定。为了测量T细胞反应性,使用相关抗体过夜包被硝酸纤维素铺底的96孔板(MultiScreen MSIPN4W;Millipore)。冲洗孔并用X-vivo培养基阻断2小时。将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)以不同的细胞浓度添加到平行三份的孔中,加入PD-L1肽或加入对照肽,并过夜孵育。第二天,冲洗孔,并加入相关的生物素化的第二抗体(Mabtech),然后加入抗生物素蛋白-酶缀合物(AP-抗生物素蛋白;Calbiochem/Invitrogen Life Technologies);最后,我们加入酶底物NBT/BCIP(Invitrogen Life Technologies)用于显影。在配有Immunospot软件v5.1的CTL ImmunoSpot S6Ultimate-V分析仪上分析显影后的ELISPOT板上的斑点。

[0259] 结果

[0260] 我们使用IFN $\gamma$  ELISPOT测定以检查来自7名黑色素瘤患者的肿瘤浸润淋巴细胞针对IO101.4肽的T细胞反应性。IFN $\gamma$  ELISPOT测定表明了来自三名患者的用IO101.4肽培养的肿瘤浸润淋巴细胞中的T细胞应答。参见图6。

[0261] 接下来,我们通过ELISPOT检查对最小表位C L G V A L T F I (PDL111-SEQ ID NO:92,其位于I0104.1内)具有特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞是否能够识别两个版本的I0104.1。我们分析了针对PDL111、PDL1<sub>242-264</sub> (VILGAILLCLGVALTFIFRLRKG-PDLong2,SEQ ID NO:91)、I0104.1 (-OH) 和I0104.1 (NH) 的反应性。T细胞能够针对两个版本的I0101.4产生反应。参见图7。

[0262] 结论

[0263] I0104.1特异性T细胞天然存在于人黑色素瘤患者的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 中。I0101.4肽还能被对已知的PD-L1表位具有特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞识别,所述已知的PD-L1表位包含在I0101.4序列内。

[0264] 实施例3——PDL1特异性T细胞天然存在于小鼠中

[0265] 我们假定如果PD-L1特异性T细胞天然存在,那么它们应当应答炎症而活化和扩张。

[0266] 材料和方法

[0267] 间隔两天(第0+2天)对C56BL/6小鼠经腹膜内(i.p.)注射于200μl PBS中的1μg IFN $\gamma$  (或者对对照而言,不注射)以刺激炎症。第5天处死小鼠,制备摘除的脾脏的单细胞溶液,用于通过IFN $\gamma$ -Elispot的进一步分析。

[0268] 在Elispot板中用5μg/ml来自鼠(m)PDL1的肽离体刺激 $9 \times 10^5$ 脾细胞/孔18-20小时。经肽刺激的孔的斑点计数扣除背景(没有肽刺激的孔的斑点计数)。

[0269] 根据以下推理选择来自PDL1的肽。

[0270] mPD-L1的序列为:

[0271] **MRIFAGIIIFT** **ACCHLLRAFT** **ITAPKDL**YVV EYGSNVTME CRFPVERELD LLALVVYWE  
KEDEQVIQFV AGEEDLKPOH SNFRGRASLP KDQLLKGNA ALQITDVKLQ DAGVYCCII  
SYGGADYKRI TLKVNAPYRK INQRISVDPA TSEHELICQ AEGYPEAEVI WTNSDHQPV  
SGKRSVTTSR TEGMLLNVTSLRVNATAND VFYCTFWRS QPGQNHTAEL IIPELPATH  
PPQNRTHWVL LGSILLEFLIV VSTVLLFLRK QVRMLDVEK CGVEDTSSKN RNDTQFEET

[0272] (SEQ ID NO:95-N端/信号序列以粗体表示,C端/跨膜区以下划线表示)

[0273] 该序列明显不同于人(h)PDL1的序列,因此不可能在小鼠中试验使用与在人中试验时相同的肽。然而,我们有意从mPDL1中大约对应于hPDL1中那些获得PDlong1和PDlong2序列的区域的区域中选择肽(参见实施例1和2)。即,从mPDL1的N端/信号序列和C端/跨膜区中选择肽。

[0274] 选择了以下的肽:

[0275] MRIFAGIIIFTACCHLLRA (mLong1;SEQ ID NO:96)

[0276] FTACCHLLRAFT ITAPKDL (mLong2;SEQ ID NO:97)

[0277] WVLLGS ILLFLIVSTVLLFLRKQV (mLong3;SEQ ID NO:98)

[0278] TVLLFLRKQVRMLDVEKCGV (mLong4;SEQ ID NO:99)

[0279] MLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET (mLong5;SEQ ID NO:100)

[0280] mLong1和2是来自上文中以粗体表示的mPDL1区域的重叠序列;mLong3、4和5是来自上文中以下划线表示的mPDL1区域的重叠序列。mLong1被认为是最接近于人PDlong1肽的小鼠等价物。mLong3被认为是最接近于人PDlong2肽的小鼠等价物。

[0281] 结果和结论

[0282] Elispot的结果示于图8中。先前用IFN $\gamma$ 刺激之后,全部5种鼠肽被T细胞识别,因此表明针对这些序列内的表位的特异性T细胞天然地存在于小鼠中,即使在没有接种疫苗的情况下也如此。使用mLong1和mLong3获得了最为阳性的结果。在随后的鼠实验中,为简化起见,仅使用mLong1,但是预期使用至少mLong3将获得类似结果。

[0283] 实施例4——小鼠中天然存在的PDL1特异性T细胞的进一步支持

[0284] 考虑到实施例3中的结果,我们假定PD-L1特异性T细胞还应当应答局部刺激(例如应答过敏原的炎症)而活化并扩张。

[0285] 材料和方法

[0286] 连续三天(第0-2天),将0.15%2,4-二硝基氟苯(DNFB;过敏原)于1:4橄榄油/丙酮(00A)中的溶液(或仅00A作为对照)涂在C56BL/6小鼠的双耳后。第5天处死小鼠并制备经摘除的脾脏和引流淋巴结(dLN)的单细胞溶液,用于通过IFN $\gamma$ -Elispot的进一步分析。

[0287] 在Elispot板中用5 $\mu$ g/ml mPD-L1long1(来自实施例3的mLong1)或mPD-L1short(mLong1肽的一部分,序列为GIIFTACCHL(SEQ ID NO:101))离体刺激8-9 $\times 10^5$ 细胞/孔18-20小时。经肽刺激的孔的斑点计数扣除背景(没有肽刺激的孔的斑点计数)。

[0288] 结果和结论

[0289] Elispot的结果示于图9中。在用DNFB处理的小鼠中脾细胞和dLN识别长肽和短肽两者,但是使用对照则无法识别,证明天然存在的PDL1特异性T细胞确实应答局部过敏原刺激而活化和扩张。对长肽和短肽两者的应答表明该应答很可能归因于CD8 $^+$ 和CD4 $^+$ T细胞。短肽应当仅由MHC I类结合并呈递,因此仅能够刺激CD8 $^+$ T细胞。长肽(在处理后将可能由MHC I类和II类结合并呈递,因此刺激CD8 $^+$ 和CD4 $^+$ T细胞。

[0290] 实施例5——使用PDL1肽的疫苗接种提高了小鼠中的PDL1特异性应答

[0291] 材料和方法

[0292] 在第0天,将C56BL/6小鼠在下背部经皮下(s.c)接种100 $\mu$ g mPD-L1long1(来自实施例3的mLong1),含有或不含有作为佐剂的Montanide(仅Montanide作为对照)。在第7天处死小鼠并制备经摘除的脾脏的单细胞溶液,用于通过IFN $\gamma$ -Elispot进行进一步分析。

[0293] 在Elispot板中用5 $\mu$ g/ml mPD-L1long1或mPD-L1short离体刺激9 $\times 10^5$ 细胞/孔18-20小时。经肽刺激的孔的斑点计数扣除背景(没有肽刺激的孔的斑点计数)。

[0294] 结果和讨论

[0295] Elispot的结果示于图10中。与使用单独的佐剂接种的小鼠相比,在接种所述肽的小鼠的脾脏和引流淋巴结(DLN)中观察到强的PD-L1特异性T细胞应答。通过IFN $\gamma$  Elispot观察到在接种mPD-L1long的小鼠中使用mPD-L1long和较短版本mPD-L1short两者的离体刺激显示出增加的PD-L1特异性应答。

[0296] 实施例6——在小鼠中接种mPD-L1long1显示出抗肿瘤效果

[0297] 材料和方法

[0298] 将C56BL/6小鼠在下背部的一侧经皮下(s.c)接种2 $\times 10^5$ 个B16F10肿瘤细胞(第0天)。接种前将肿瘤细胞在体外用IFN $\gamma$ 预刺激24小时。在第0天和第7天,将小鼠在下背部的另一侧经皮下(s.c)接种100 $\mu$ g含Montanide作为佐剂的mPD-L1long1(仅有Montanide作为对照)。每周测量三次肿瘤大小,当肿瘤长的过大时处死小鼠。

[0299] 结果和结论

[0300] 结果如图11所示。与仅接种montanide的小鼠相比,接种肽+montanide的小鼠显示出减少的肿瘤生长和更好的存活。因此,通过接种而扩张和活化的抗PDL1 T细胞具有抗肿瘤效果。

[0301] 实施例3至7的总体结论(体内试验)

[0302] 我们描述了IFN $\gamma$ 注射(实施例3)和过敏原的局部刺激(实施例4)引起PD-L1特异性T细胞扩张,这表明PD-L1特异性T细胞已经存在并且在炎症反应位点接收到来自它们同源靶标(即专门的抗原呈递细胞)的强活化信号后被激活并增殖。我们证明PD-L1特异性T细胞易于通过疫苗接种而扩张,并产生抗肿瘤效果。因此,PD-L1特异性T细胞是免疫系统的以下能力的一个特别有趣的实例:免疫系统能够通过直接针对癌细胞所采用的免疫抑制机制发生反应来影响适应性免疫应答。已表明使用PDL1肽的疫苗接种具有直接的体内益处。

[0303] Elispot方法的一般细节

[0304] • 处死小鼠之后,摘除脾脏(和引流淋巴结(dLN))。

[0305] • 将脾脏和dLN经70 $\mu$ M细胞过滤器粉碎,进入含有培养基(RPMI+10%FCS+1%青霉素/链霉素)的50ml管中,在300G下冲洗5分钟,对于dLN重复该操作。用RBC裂解液裂解脾细胞1分钟并在培养基中冲洗两次。

[0306] • 对细胞进行计数并将其转移至IFN $\gamma$  Ab包被的Elispot板中,细胞数目为 $9 \times 10^5$ 细胞/孔。包被抗体:抗小鼠IFN-g mAb AN18(Mabtech目录编号:3321-3-1000)。

[0307] • 以5 $\mu$ g/ml的浓度将刺激肽添加到指定孔中。对照孔不用肽刺激。

[0308] • 18-20小时之后对Elispot板进行显影。

[0309] • 检测抗体抗小鼠IFN-g mAb R4-6A2-生物素(Mabtech目录编号:3321-6-1000)。抗生物素蛋白-酶缀合物(AP-抗生物素蛋白;Calbiochem/Invitrogen Life Technologies)和酶底物NBT/BCIP(Invitrogen Life Technologies)用于显影。

[0310] • 经肽刺激的孔的斑点计数总是扣除相应的未用肽刺激的孔(背景)。

[0311] • 负值设定为零。

[0312] 人PD-L1的全长序列(SEQ ID NO.1)

[0313]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Ile | Phe | Ala | Val | Phe | Ile | Phe | Met | Thr | Tyr | Trp | His | Leu | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asn | Ala | Phe | Thr | Val | Thr | Val | Pro | Lys | Asp | Leu | Tyr | Val | Val | Glu | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Ser | Asn | Met | Thr | Ile | Glu | Cys | Lys | Phe | Pro | Val | Glu | Lys | Gln | Leu |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Asp | Leu | Ala | Ala | Leu | Ile | Val | Tyr | Trp | Glu | Met | Glu | Asp | Lys | Asn | Ile |
| 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Ile | Gln | Phe | Val | His | Gly | Glu | Glu | Asp | Leu | Lys | Val | Gln | His | Ser | Ser |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Tyr | Arg | Gln | Arg | Ala | Arg | Leu | Leu | Lys | Asp | Gln | Leu | Ser | Leu | Gly | Asn |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Ala | Ala | Leu | Gln | Ile | Thr | Asp | Val | Lys | Leu | Gln | Asp | Ala | Gly | Val | Tyr |
|     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| Arg | Cys | Met | Ile | Ser | Tyr | Gly | Gly | Ala | Asp | Tyr | Lys | Arg | Ile | Thr | Val |
|     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| Lys | Val | Asn | Ala | Pro | Tyr | Asn | Lys | Ile | Asn | Gln | Arg | Ile | Leu | Val | Val |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |



Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser  
 165 170 175  
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn  
 180 185 190  
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr  
 195 200 205  
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu  
 210 215 220  
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His  
 225 230 235 240  
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
 245 250 255  
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys  
 260 265 270  
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu  
 275 280 285  
 Glu Thr  
 290

[0315] 参考文献

[0316] 1.Hansen M, Met O, Svane IM, Andersen MH. Cellular based cancer vaccines: type 1 polarization of dendritic cells. Curr Med Chem 2012;19:4239-4246.

[0317] 2. Tamura H, Dong H, Zhu G, Sica GL, Flies DB, Tamada K et al. B7-H1 co-stimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. Blood 2001;97:1809-1816.

[0318] 3. Tewalt EF, Cohen JN, Rouhani SJ, Guidi CJ, Qiao H, Fahl SP et al. Lymphatic endothelial cells induce tolerance via PD-L1 and lack of co-stimulation leading to high-level PD-1 expression on CD8T cells. Blood 2012;120:4772-4782.

[0319] 4. Seo SK, Seo DI, Park WS, Jung WK, Lee DS, Park SG et al. Attenuation of IFN-gamma-induced B7-H1 expression by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 via downregulation of the Jak/STAT/IRF-1 signaling pathway. Life Sci 2014;112:82-89.

[0320] 5. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med 1999;5:1365-1369.

[0321] 6. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 2012;12:252-264.

[0322] 7. Andersen MH. The targeting of immunosuppressive mechanisms in hematological malignancies. Leukemia 2014;28:1784-1792.

[0323] 8. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y et al. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. Leukemia 2009;23:375-382.

[0324] 9. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS et

al.Co-stimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients:Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target.Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:17174-17179.

[0325] 10.Hamanishi J,Mandai M,Iwasaki M,Okazaki T,Tanaka Y,Yamaguchi K et al.Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer.Proc Natl

[0326] Acad Sci U S A 2007;104:3360-3365.

[0327] 11.Nomi T,Sho M,Akahori T,Hamada K,Kubo A,Kanehiro H et al.Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer.Clin Cancer Res 2007; 13:2151-2157.

[0328] 12.Brahmer JR,Tykodi SS,Chow LQ,Hwu WJ,Topalian SL,Hwu P et al.Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer.N Engl J Med 2012;366:2455-2465.

[0329] 13.Topalian SL,Hodi FS,Brahmer JR,Gettinger SN,Smith DC,McDermott DF et al.Safety,Activity,and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer.N Engl J Med 2012;366:2443-2453.

[0330] 14.Munir S,Andersen GH,Met O,Donia M,Frosig TM,Larsen SK et al.HLA-restricted cytotoxic T cells that are specific for the immune checkpoint ligand PD-L1 occur with high frequency in cancer patients.

[0331] Cancer

[0332] Research 2013;73:1674-1776.

[0333] 15.Munir S,Andersen GH,Woetmann A,Odum N,Becker JC,Andersen MH.Cutaneous T cell lymphoma cells are targets for immune checkpoint ligand PD-L1-specific,cytotoxic T cells.Leukemia 2013;27:2251-2253.

[0334] 16.Andersen MH,Sorensen RB,Brimnes MK,Svane IM,Becker JC,thor Straten P.Identification of heme oxygenase-1-specific regulatory CD8+T cells in cancer patients.J Clin Invest 2009;119:2245-2256.

[0335] 17.Ahmad SM,Larsen SK,Svane IM,Andersen MH.Harnessing PD-L1-specific cytotoxic T cells for anti-leukemia immunotherapy to defeat mechanisms of immune escape mediated by the PD-1 pathway.Leukemia 2014;28:236-238.

[0336] 18.Munir S,Andersen GH,Svane IM,Andersen MH.The immune checkpoint regulator PD-L1 is a specific target for naturally occurring CD4+T cells.Oncoimmunology 2013;2:e23991.

[0337] 19.Borch TH,Donia M,Andersen MH,Svane IM.Reorienting the immune system in the treatment of cancer by using anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies Drug Discov Today 2015;20:1127-1134.

[0338] 20.Andersen MH.Immune Regulation by Self-Recognition:Novel Possibilities for Anticancer Immunotherapy.J Natl Cancer Inst 2015;107:154.

- [0339] 21. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008;29:44-56.
- [0340] 22. Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 2008;41:87-102.
- [0341] 23. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010;10:248-256.
- [0342] 24. Berntsen A, Trepikak R, Wenandy L, Geertsen PF, Thor SP, Andersen MH et al. Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial. *J Immunother* 2008;31:771-780.
- [0343] 25. Rammensee HG, Falk K, Roetzschke O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Biol* 1995;5:35-44.

## 序列表

&lt;110&gt; Herlev医院

&lt;120&gt; 用于癌症疫苗中的PDL1肽

&lt;130&gt; N410216W0

&lt;150&gt; EP16175397.5

&lt;151&gt; 2016-06-21

&lt;160&gt; 101

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 290

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人 (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu  
1 5 10 15

[0001] Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr  
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu  
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile  
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser  
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn  
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr  
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val  
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val  
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr  
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser  
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn  
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr  
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu  
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His  
225 230 235 240

[0002] Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys  
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu  
275 280 285

Glu Thr  
290

<210> 2  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile

<210> 3  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe

<210> 4  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

[0003] Ile Phe Arg

<210> 5  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe Arg Leu  
20

<210> 6  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe Arg Leu Arg  
20

<210> 7  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe Arg Leu Arg Lys  
20

<210> 8  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

[0004] Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg  
20

<210> 9  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met  
20 25

<210> 10  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met  
20 25

<210> 11  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 11

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp  
20 25

<210> 12  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

[0005]

<400> 12

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile

<210> 13  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 13

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe

<210> 14  
<211> 20



<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg  
20

<210> 15  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu  
20

[0006]

<210> 16  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 16

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg  
20

<210> 17  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys  
20

<210> 18  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 18

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly  
20

<210> 19  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 19

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

[0007] Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg  
20 25

<210> 20  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 20

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met  
20 25

<210> 21  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met  
20 25

<210> 22  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 22

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp  
20 25

<210> 23  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 23

[0008] His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile

<210> 24  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 24

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe  
20

<210> 25  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 25

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg  
20

<210> 26

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 26

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg Leu  
20

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

[0009] <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 27

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg  
20

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 28

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys  
20

<210> 29

<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)  
  
<400> 29

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly  
20 25

<210> 30  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)  
  
<400> 30

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg  
20 25

[0010]

<210> 31  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)  
  
<400> 31

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met  
20 25

<210> 32  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)  
  
<400> 32

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met

20

25

<210> 33  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 33

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp  
20 25

<210> 34  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 34

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

[0011]

Leu Thr Phe Ile  
20

<210> 35  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 35

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe  
20

<210> 36  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 36

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala

1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg  
20

<210> 37  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 37

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu  
20

<210> 38  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

[0012] <400> 38

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg  
20

<210> 39  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 39

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys  
20 25

<210> 40  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 40

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly  
20 25

<210> 41

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 41

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg  
20 25

[0013]

<210> 42

<211> 28

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 42

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met  
20 25

<210> 43

<211> 29

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 43

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met  
20 25



<210> 44  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 44

Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp  
20 25 30

<210> 45  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 45

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

[0014] Ala Leu Thr Phe Ile  
20

<210> 46  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 46

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe  
20

<210> 47  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 47

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg  
20

<210> 48  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)  
  
<400> 48

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu  
20

<210> 49  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)  
  
<400> 49

[0015] Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg  
20 25

<210> 50  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)  
  
<400> 50

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys  
20 25

<210> 51  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)  
  
<400> 51

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly  
20 25

<210> 52  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 52

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg  
20 25

<210> 53  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

[0016]

<400> 53

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met  
20 25

<210> 54  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 54

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met  
20 25 30

<210> 55  
<211> 31  
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 55

Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp  
20 25 30

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 56

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile  
20

[0017]

<210> 57

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 57

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe  
20

<210> 58

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 58

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg  
20

<210> 59  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 59

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu  
20 25

<210> 60  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 60

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

[0018] Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg  
20 25

<210> 61  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 61

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys  
20 25

<210> 62  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 62

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly  
20 25

<210> 63  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 63

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg  
20 25

<210> 64  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 64

[0019] Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met  
20 25 30

<210> 65  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 65

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met  
20 25 30

<210> 66  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 66

Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly  
1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp  
20 25 30

<210> 67  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 67

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile  
20

<210> 68  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

[0020]

<400> 68

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe  
20

<210> 69  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 69

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg  
20 25

<210> 70  
<211> 26

<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 70

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu  
20 25

<210> 71  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 71

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg  
20 25

[0021]

<210> 72  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 72

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys  
20 25

<210> 73  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 73

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly  
20 25



<210> 74  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 74

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg  
20 25 30

<210> 75  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 75

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

[0022] Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met  
20 25 30

<210> 76  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 76

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met  
20 25 30

<210> 77  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 77

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met  
20 25 30

Asp

|                       |                            |
|-----------------------|----------------------------|
| $\langle 210 \rangle$ | 78                         |
| $\langle 211 \rangle$ | 19                         |
| $\langle 212 \rangle$ | PRT                        |
| $\langle 213 \rangle$ | 人工序列 (Artificial Sequence) |

<220>  
<223> 对应于本发明的肽的通式

|       |              |
|-------|--------------|
| <220> |              |
| <221> | 变体 (VARIANT) |
| <222> | (1).. (1)    |
| <223> | Xaa是任意氨基酸    |

<220>  
<221> 变体 (VARIANT)  
<222> (19).. (19)  
<223> Xaa是任意氨基酸

[0023]           <400>   78

Xaa Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Xaa

|       |                            |
|-------|----------------------------|
| <210> | 79                         |
| <211> | 4                          |
| <212> | PRT                        |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的N端氨基酸序列

&lt;400&gt; 79

Arg Thr His Leu  
1

|                       |                            |
|-----------------------|----------------------------|
| $\langle 210 \rangle$ | 80                         |
| $\langle 211 \rangle$ | 5                          |
| $\langle 212 \rangle$ | PRT                        |
| $\langle 213 \rangle$ | 人工序列 (Artificial Sequence) |

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的N端氨基酸序列

<400> 80

Glu Arg Thr His Leu  
1 5

<210> 81  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的N端氨基酸序列

<400> 81

Asn Glu Arg Thr His Leu  
1 5

<210> 82  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0024]

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的C端氨基酸序列

<400> 82

Phe Arg Leu Arg  
1

<210> 83  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的C端氨基酸序列

<400> 83

Phe Arg Leu Arg Lys  
1 5

<210> 84  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的C端氨基酸序列  
  
<400> 84

Phe Arg Leu Arg Lys Gly  
1 5

<210> 85  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的C端氨基酸序列  
  
<400> 85

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg  
1 5

<210> 86  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0025]

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的C端氨基酸序列  
  
<400> 86

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met  
1 5

<210> 87  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的C端氨基酸序列  
  
<400> 87

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met  
1 5

<210> 88  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 可添加至式SEQ ID NO:78的C端氨基酸序列  
<400> 88

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp  
1 5 10

<210> 89  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 89

Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro  
1 5 10 15

Lys Asp Leu

[0026] <210> 90  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 90

Leu Leu Asn Ala Phe Thr Val Thr Val  
1 5

<210> 91  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 91

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly  
20

<210> 92  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 92

Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile  
1 5

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实施例中对用的对照肽

<400> 93

Gly Ala Arg Val Glu Arg Val Asp Phe Gly Asn Phe Val Phe Asn Ile  
1 5 10 15

Ser Val Leu Trp  
20

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

[0027] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实施例中对用的对照肽

<400> 94

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val  
1 5

<210> 95

<211> 290

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 95

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu  
1 5 10 15

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

Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu  
35 40 45

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val  
50 55 60

Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn  
65 70 75 80

Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn  
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr  
100 105 110

Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu  
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp  
130 135 140

Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro  
145 150 155 160

[0028]

Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly  
165 170 175

Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val  
180 185 190

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

Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile  
210 215 220

Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp  
225 230 235 240

Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val  
245 250 255

Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys  
260 265 270

Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu  
275 280 285

Glu Thr  
290

<210> 96  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 96

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu  
1 5 10 15

Arg Ala

<210> 97  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

[0029]

<400> 97

Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro  
1 5 10 15

Lys Asp Leu

<210> 98  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 98

Trp Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr  
1 5 10 15

Val Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val  
20 25

<210> 99  
<211> 20



<212> PRT  
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 99

Thr Val Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu  
 1 5 10 15

Lys Cys Gly Val  
 20

<210> 100  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

[0030] <400> 100

Met Leu Asp Val Glu Lys Cys Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn  
 1 5 10 15

Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu Glu Thr  
 20 25

<210> 101  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 101

Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu  
 1 5 10

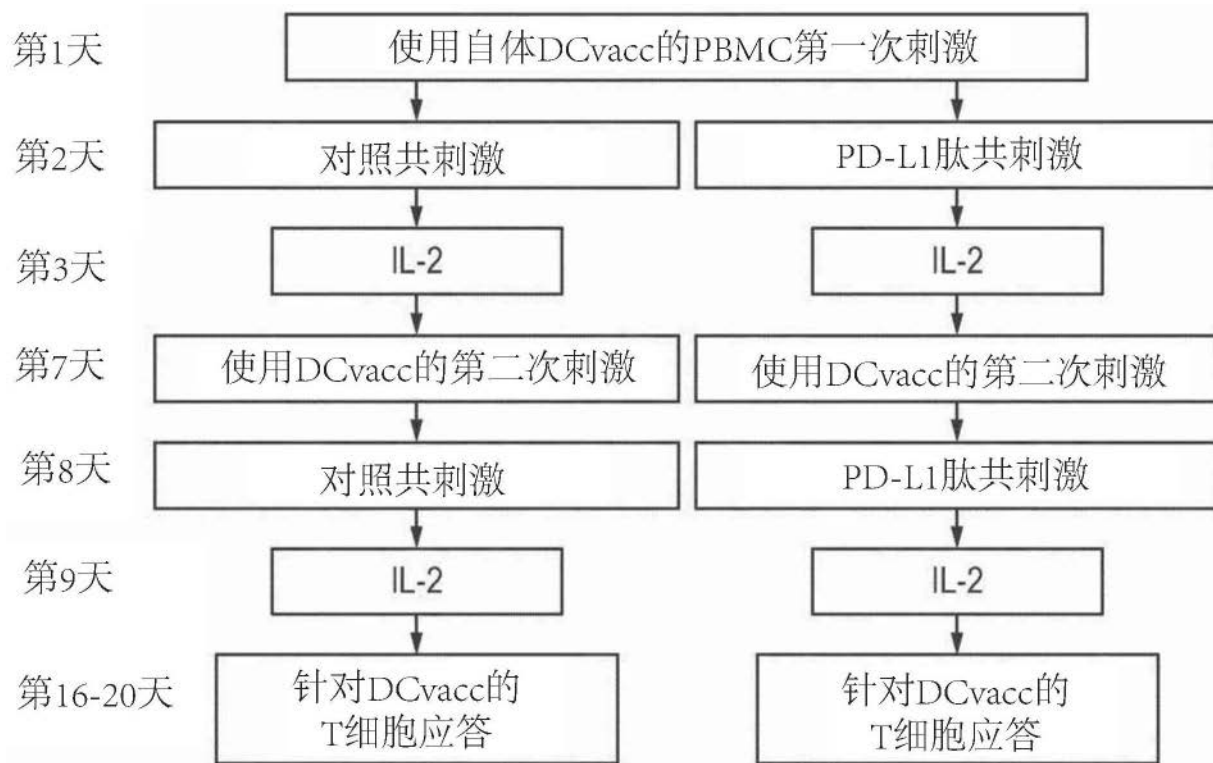


图1A

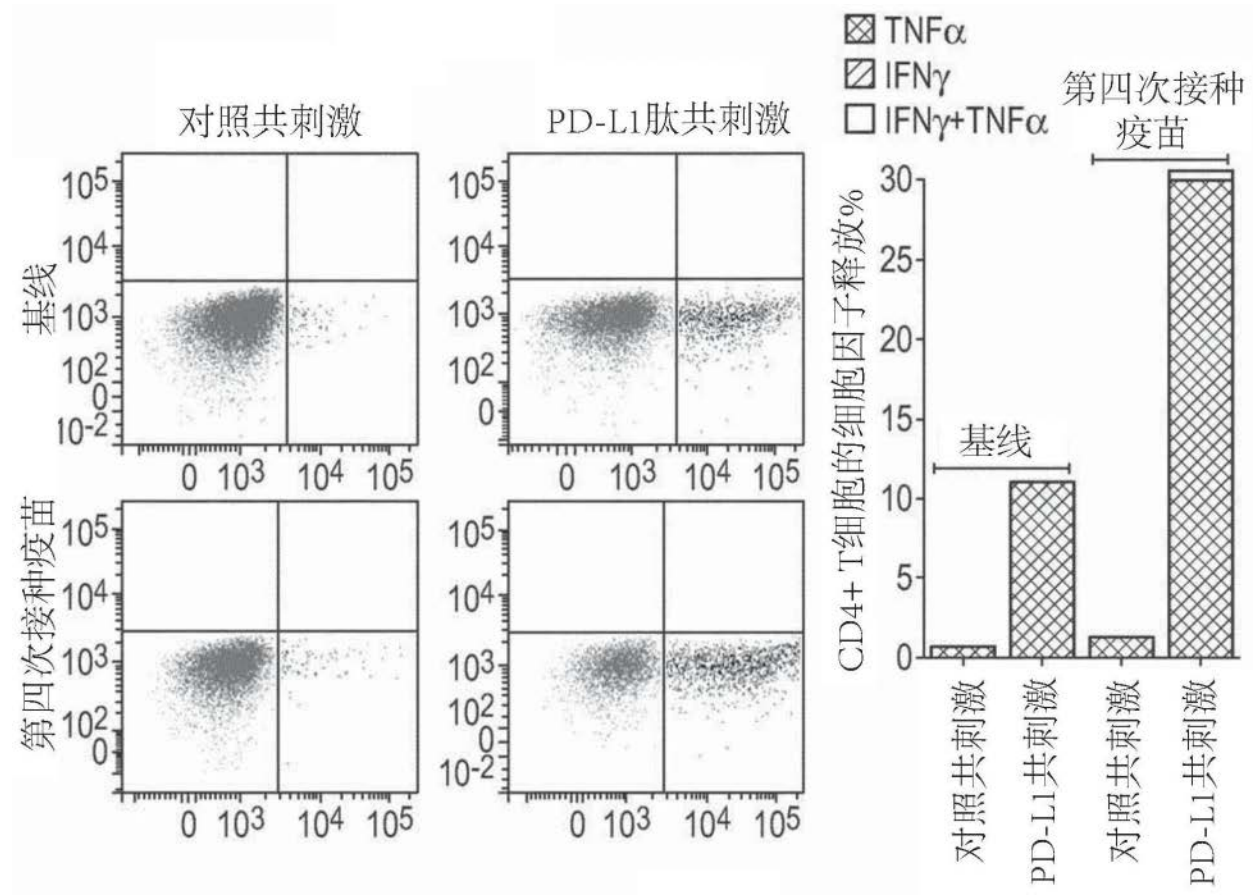


图1B

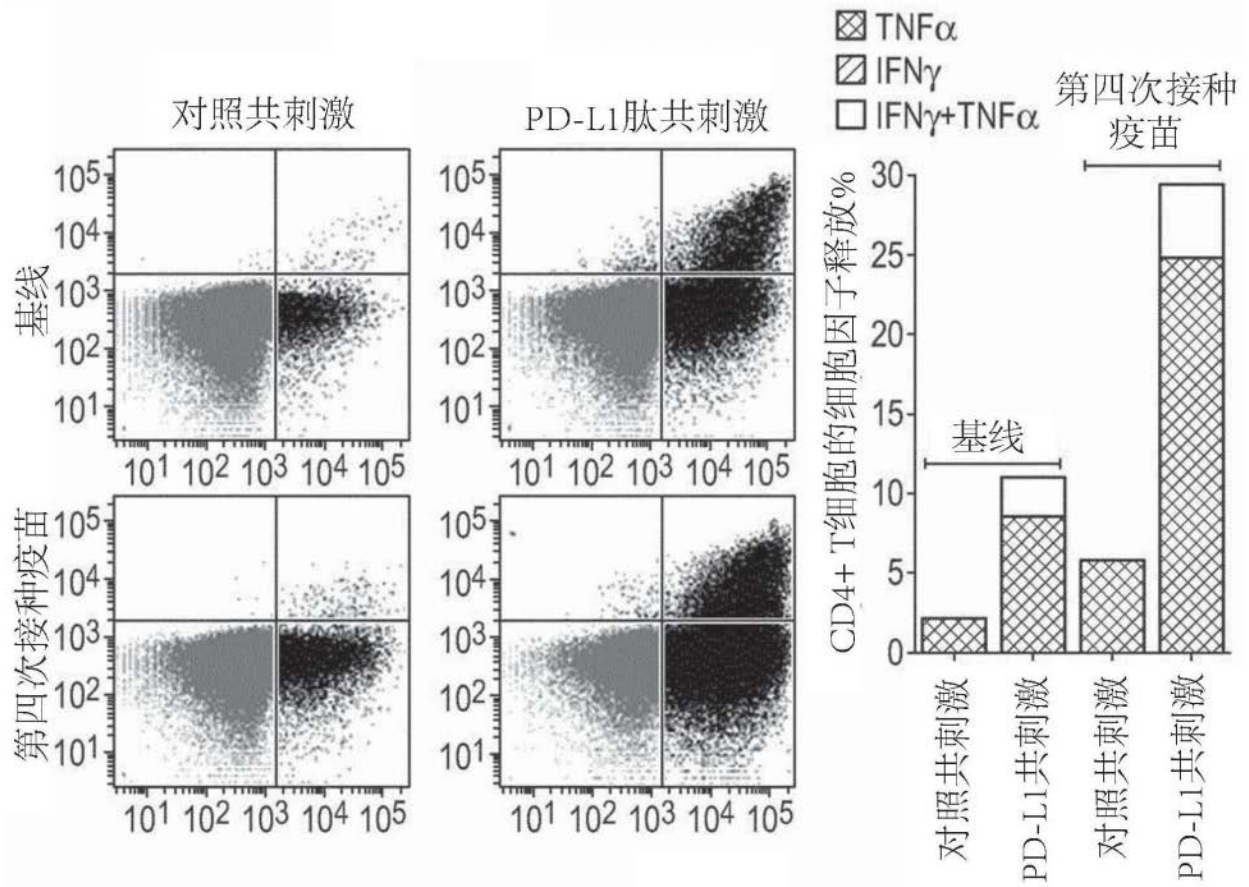


图1C

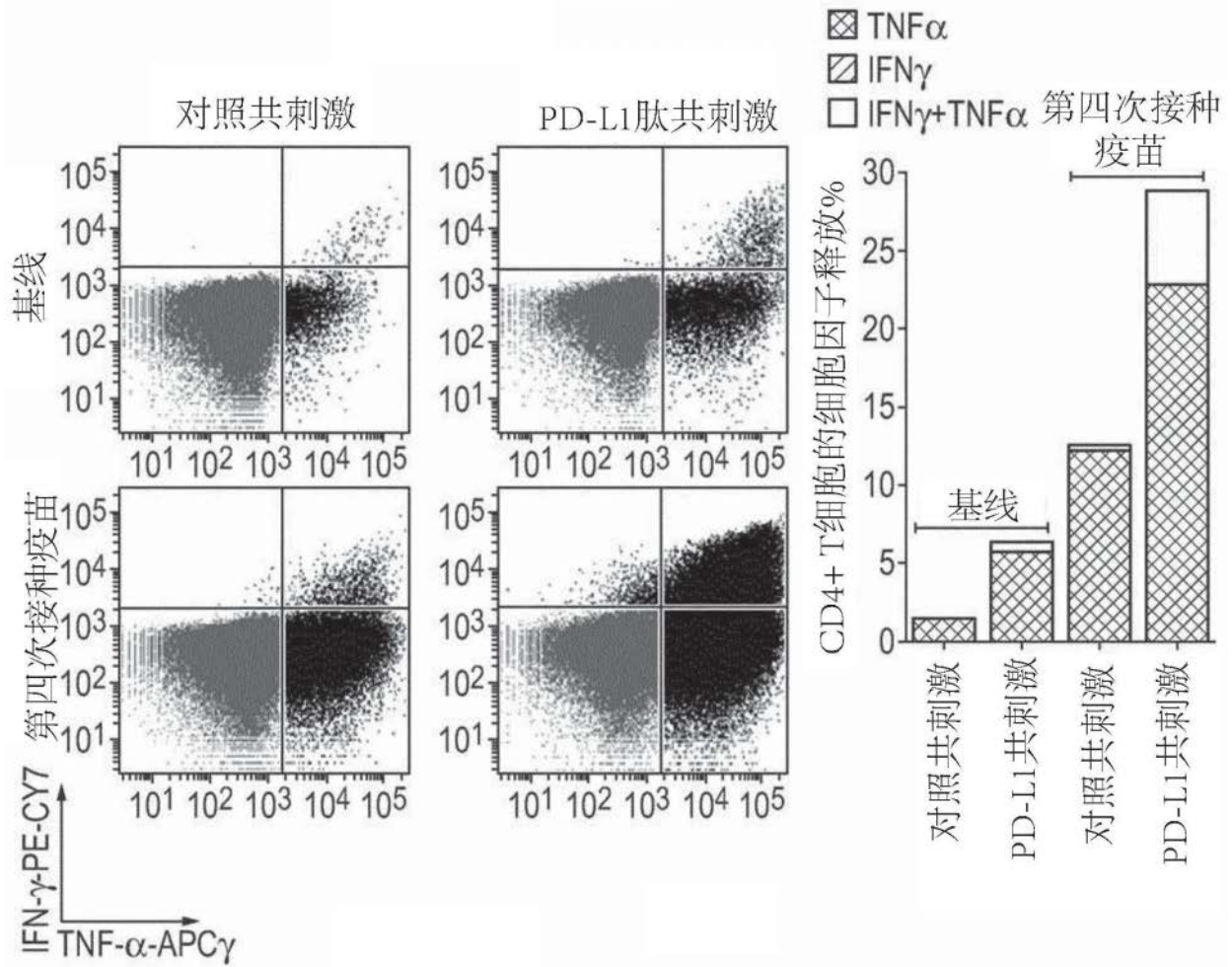


图1D

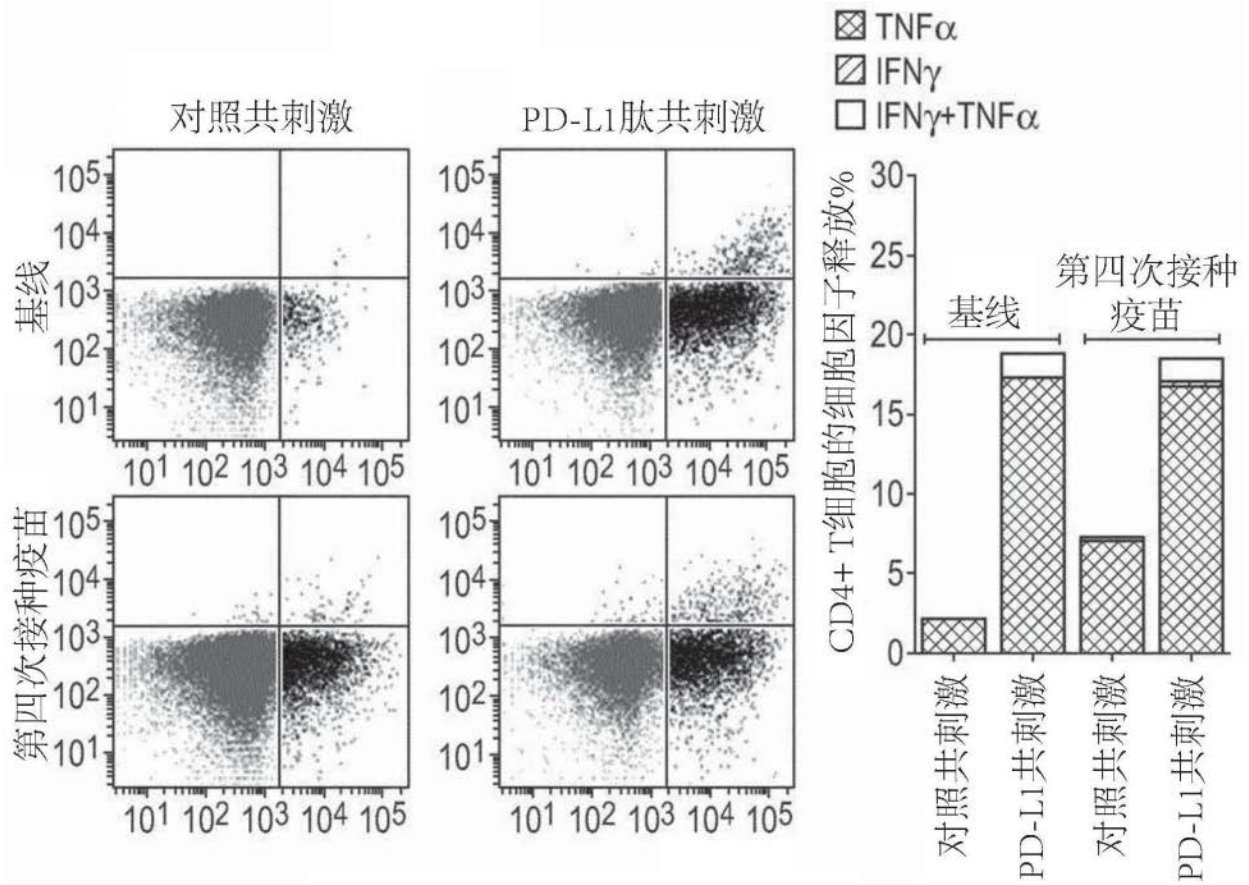


图1E



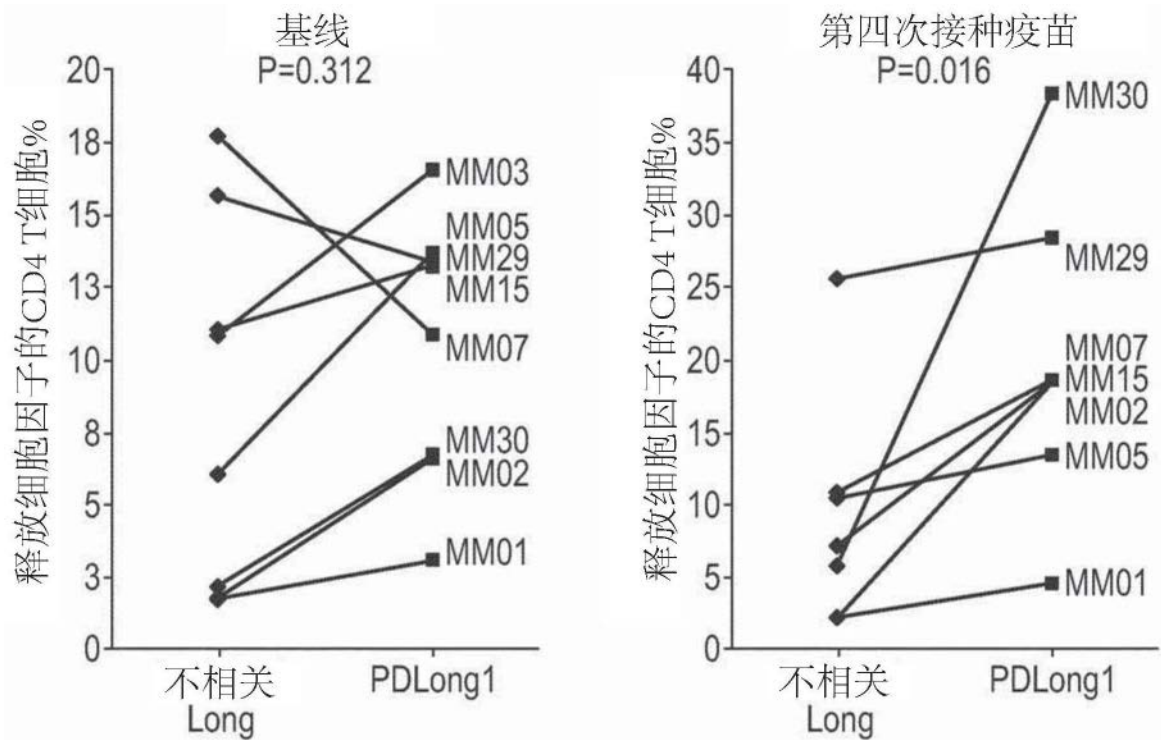


图2A

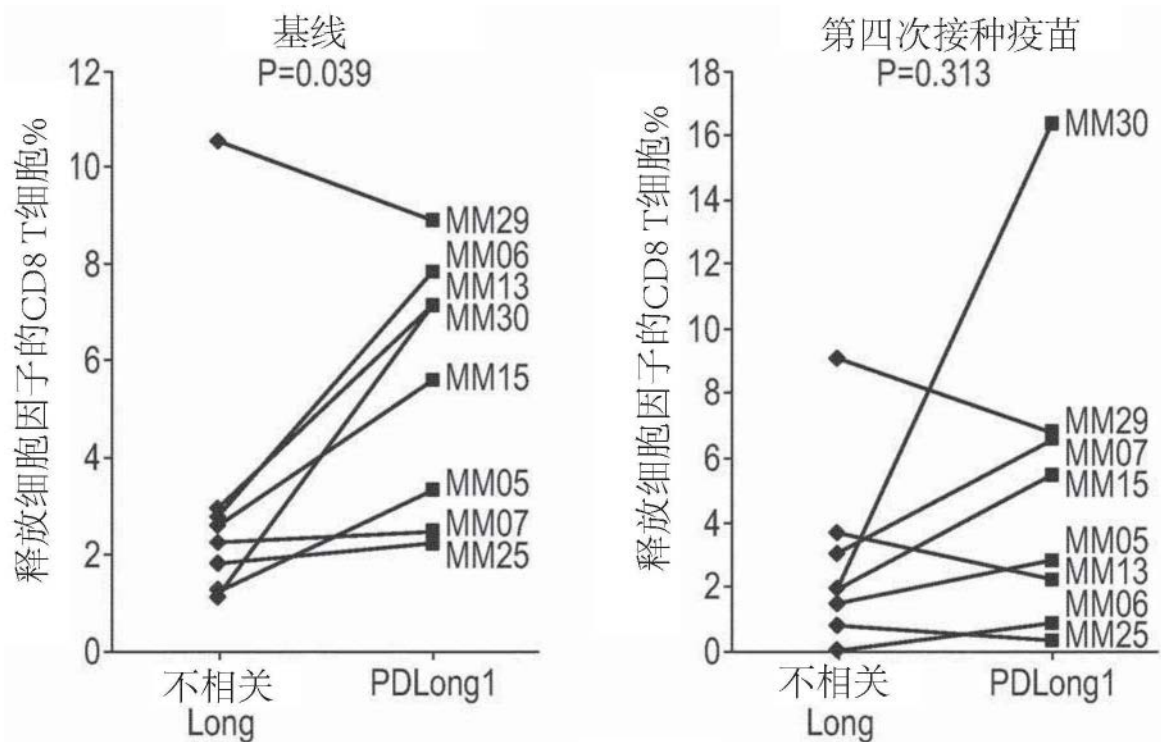


图2B

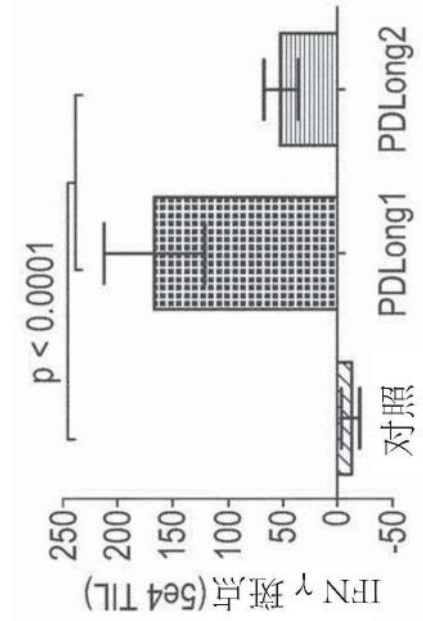


图3A

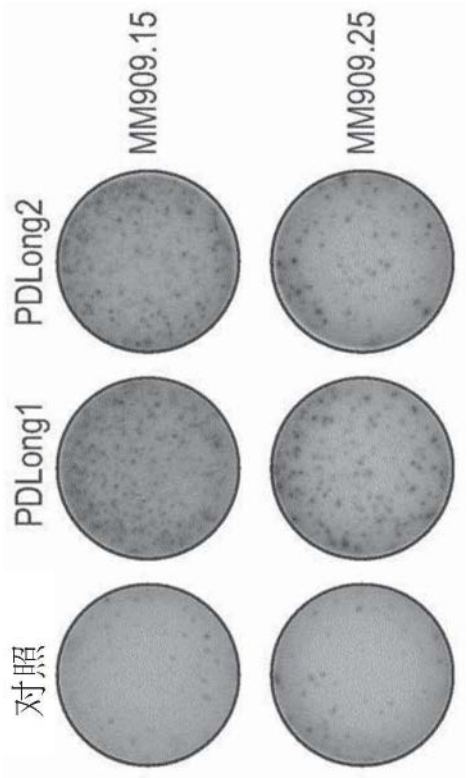


图3B



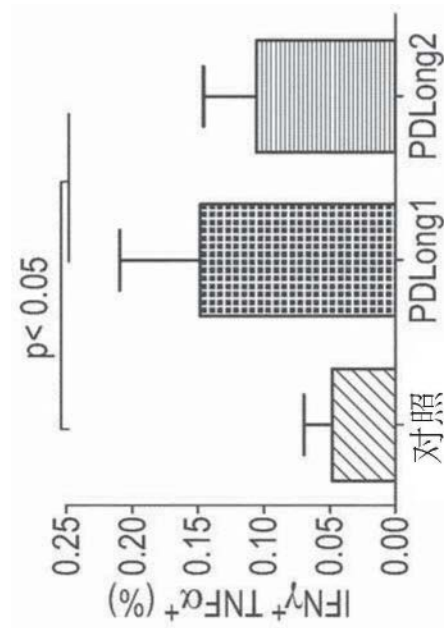


图3C

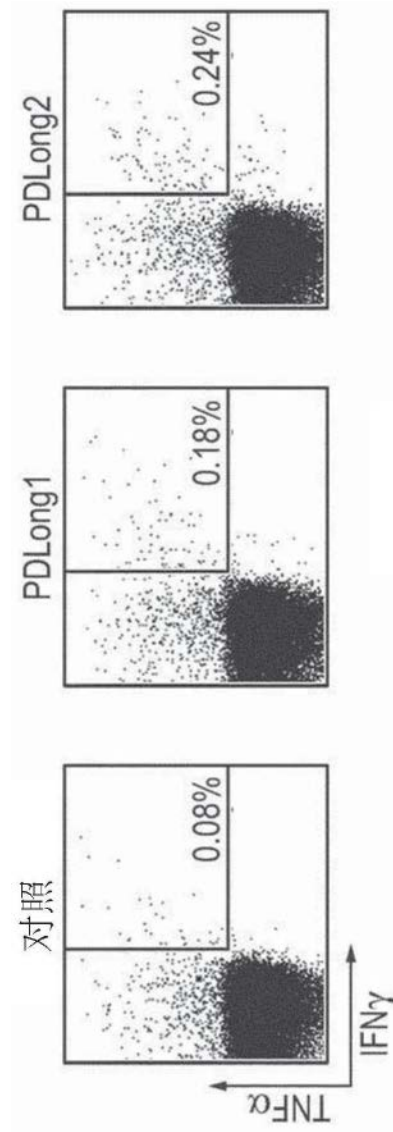


图3D

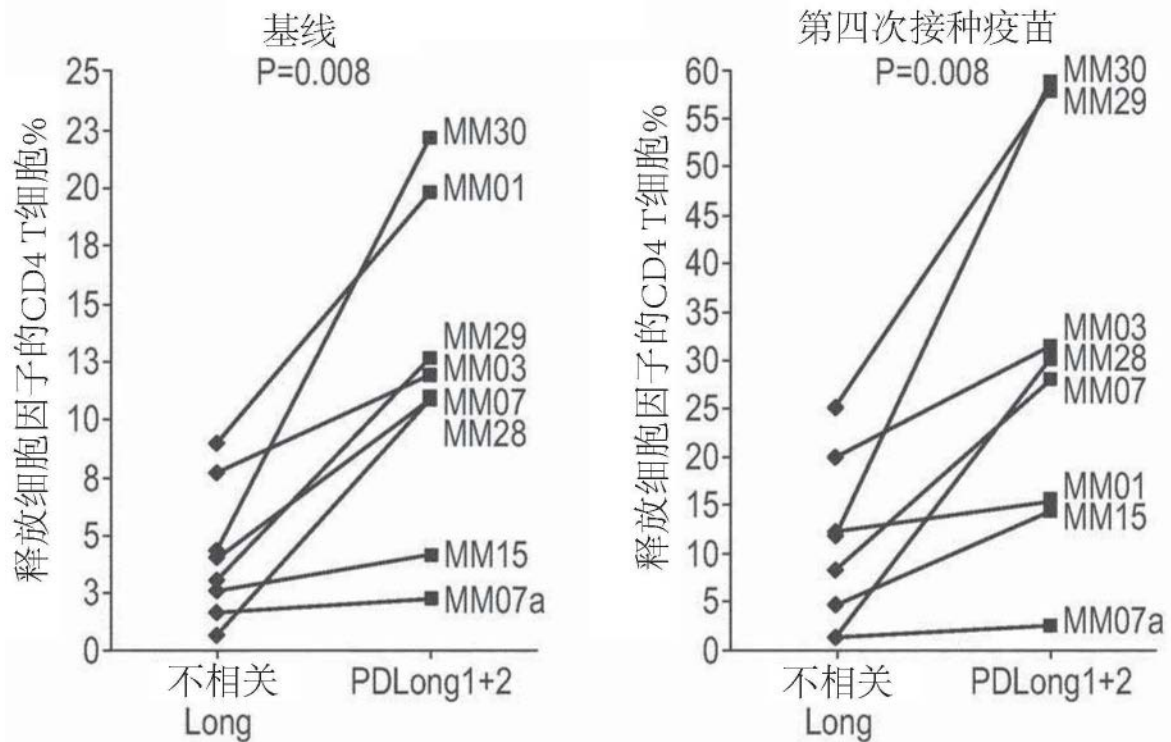


图4A

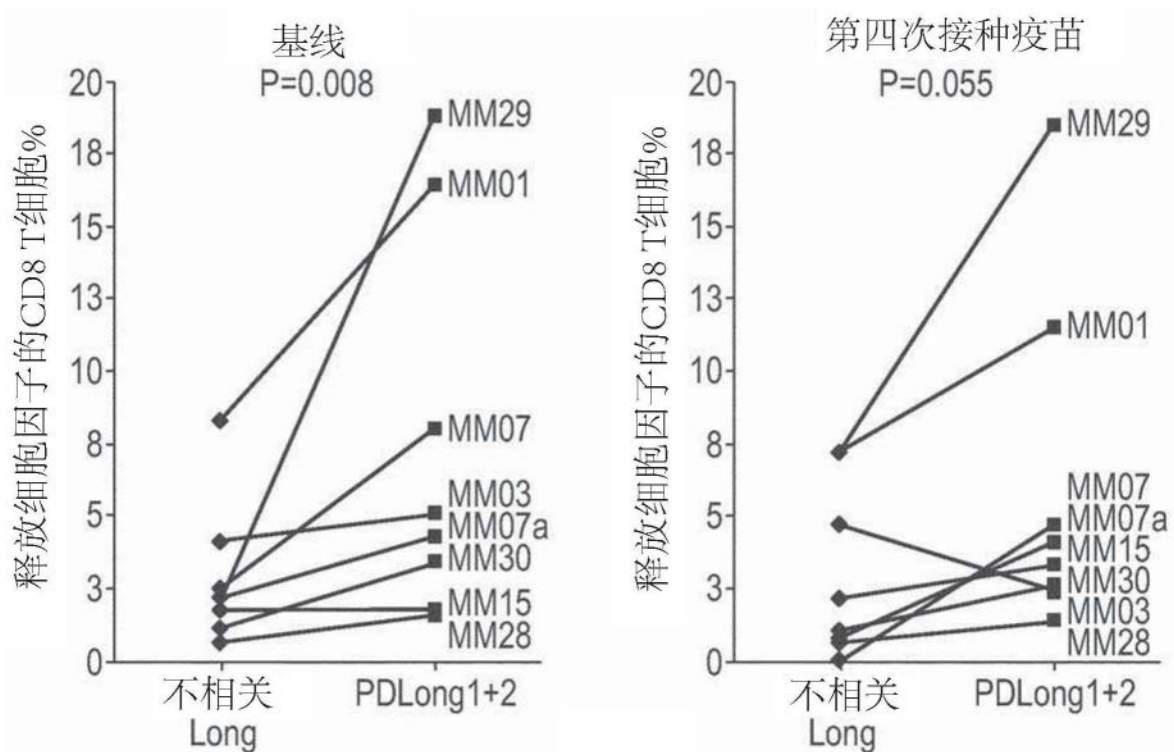


图4B

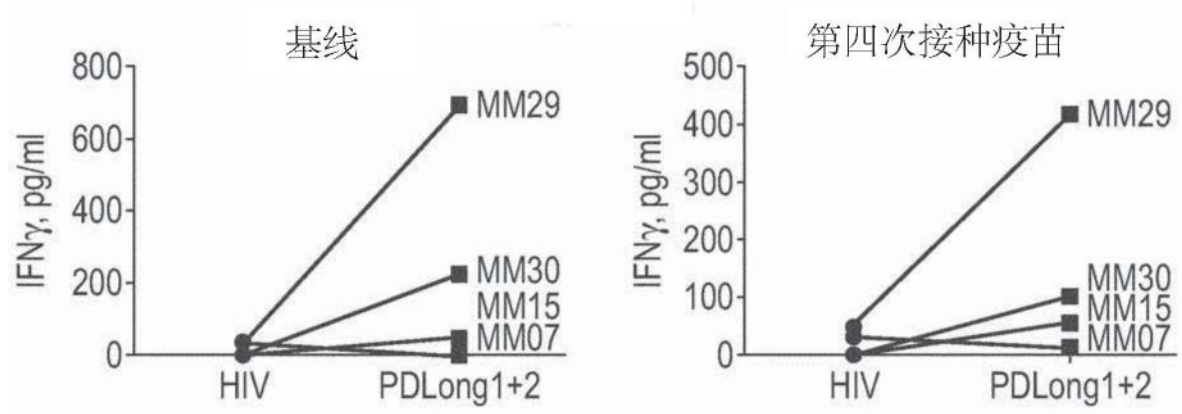


图5A

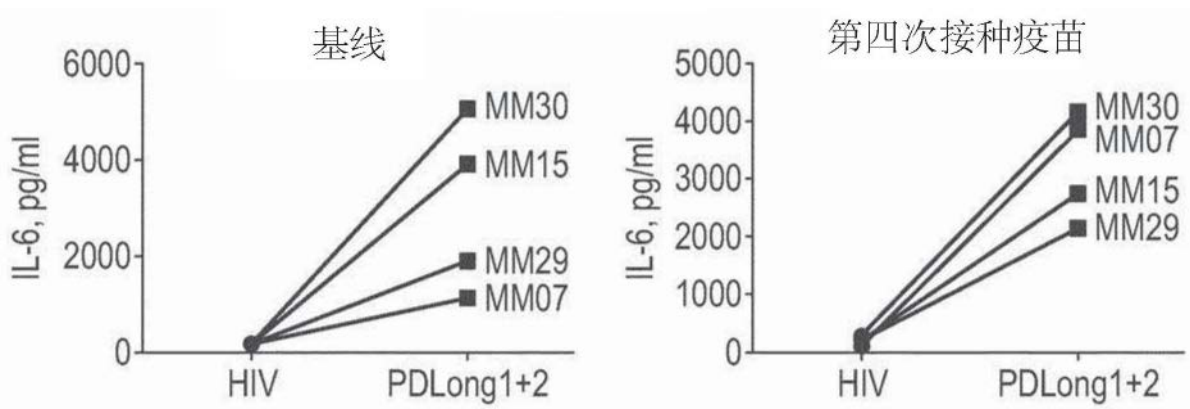


图5B

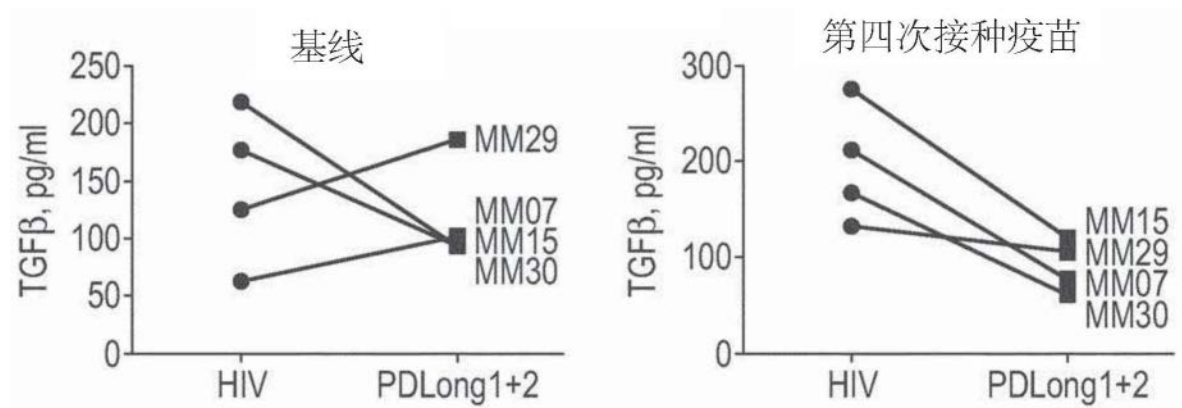


图5C

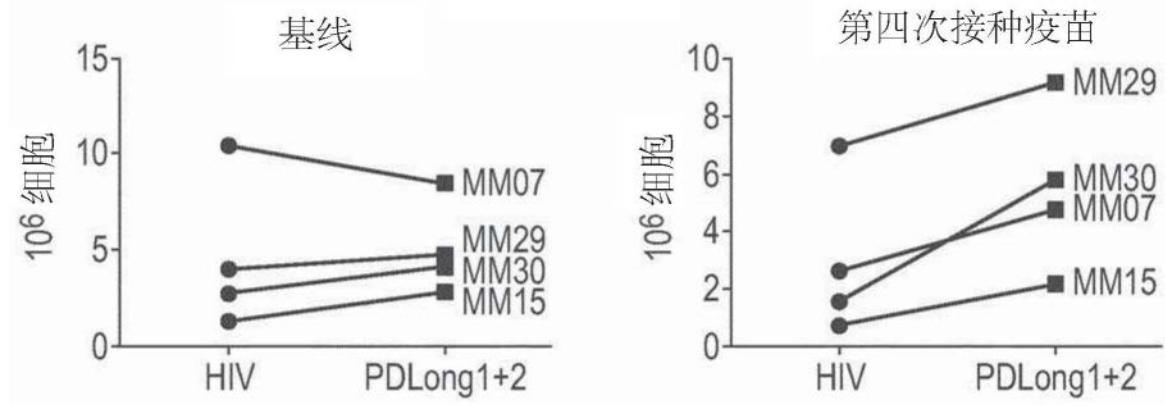


图5D

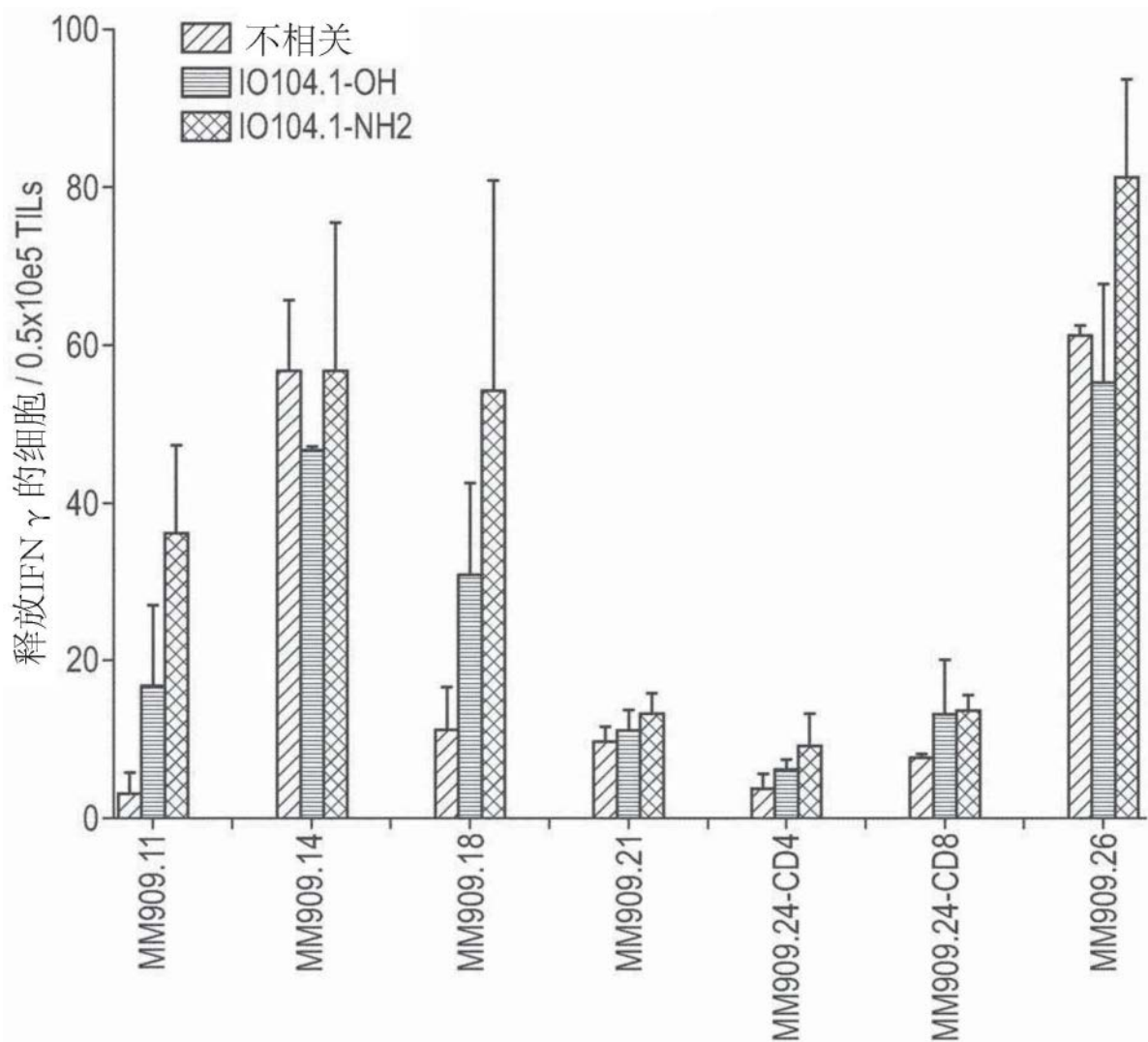


图6

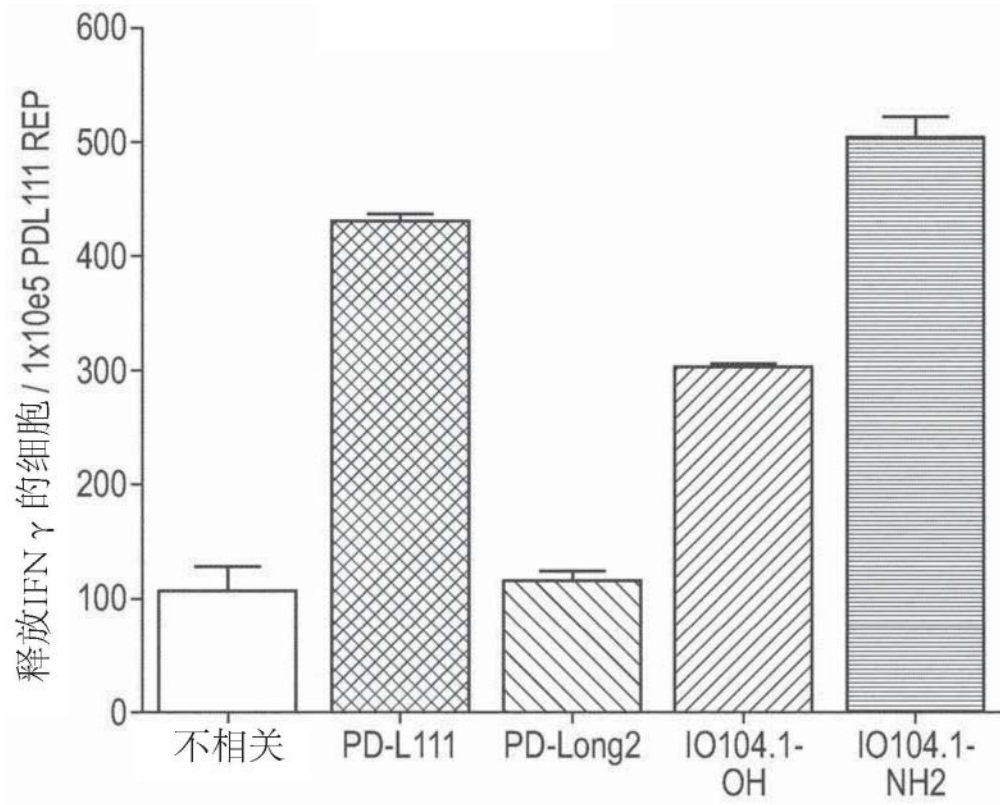


图7

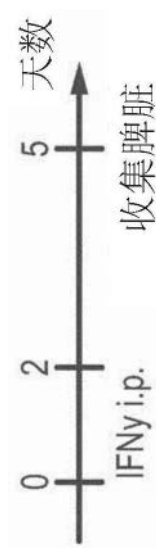


图8A

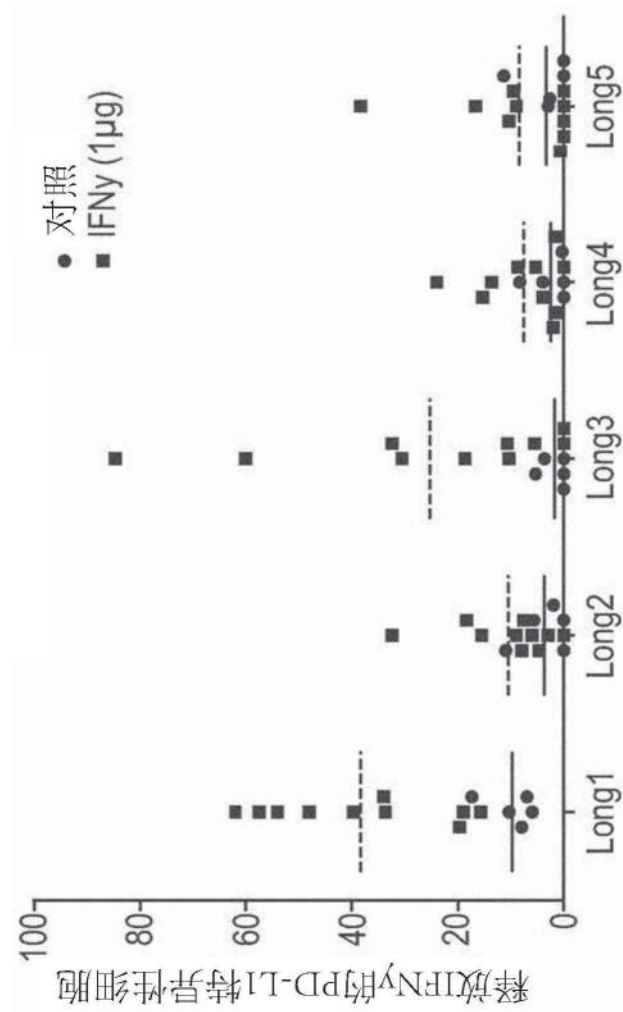


图8B

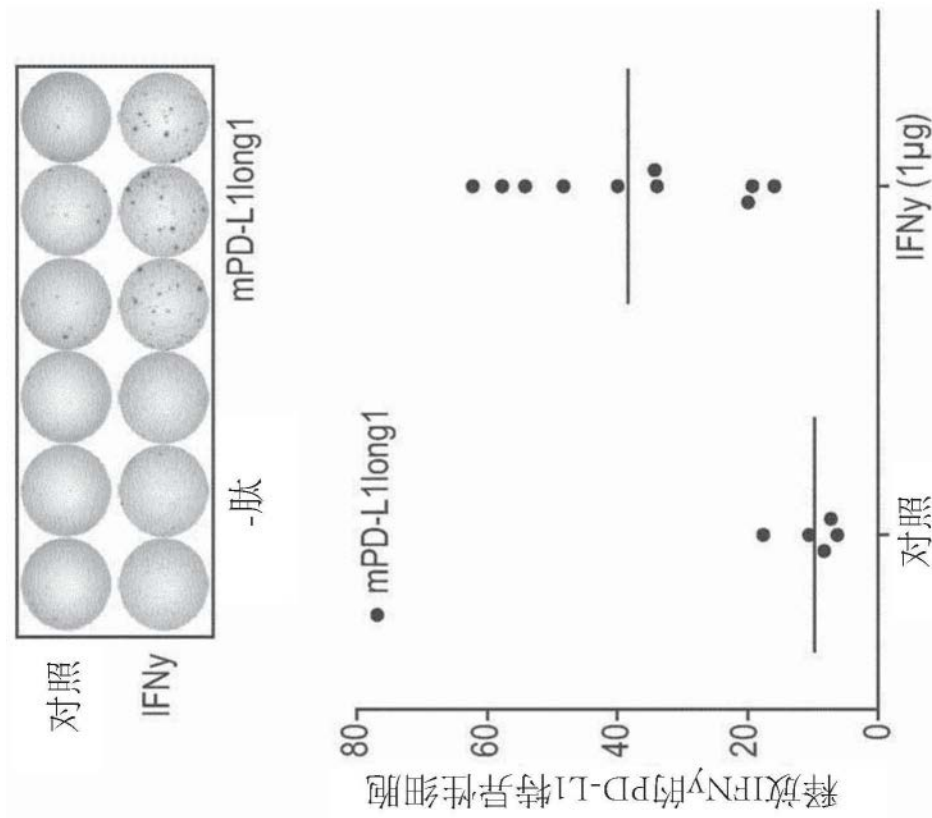


图8C



图9A



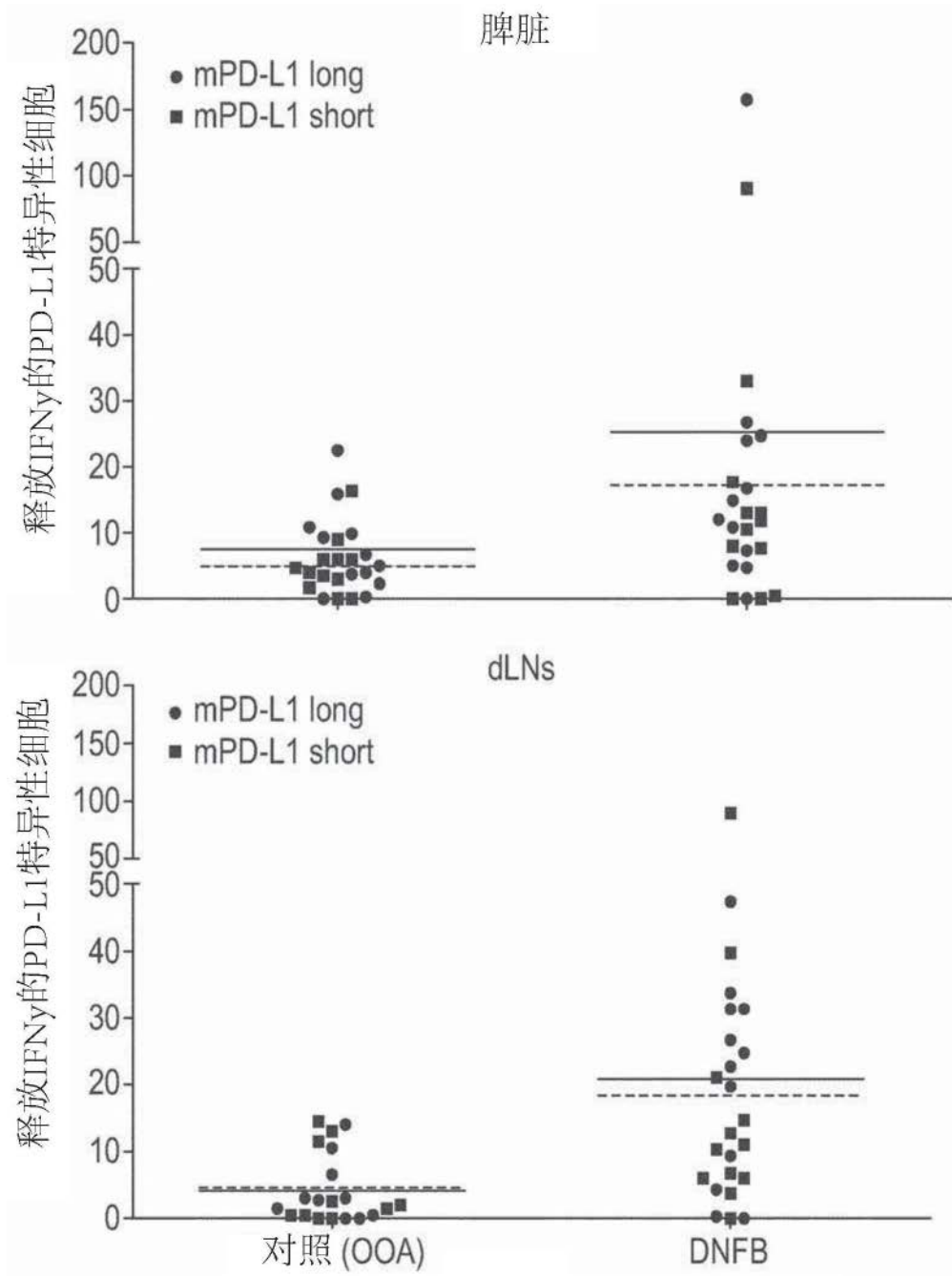


图9B

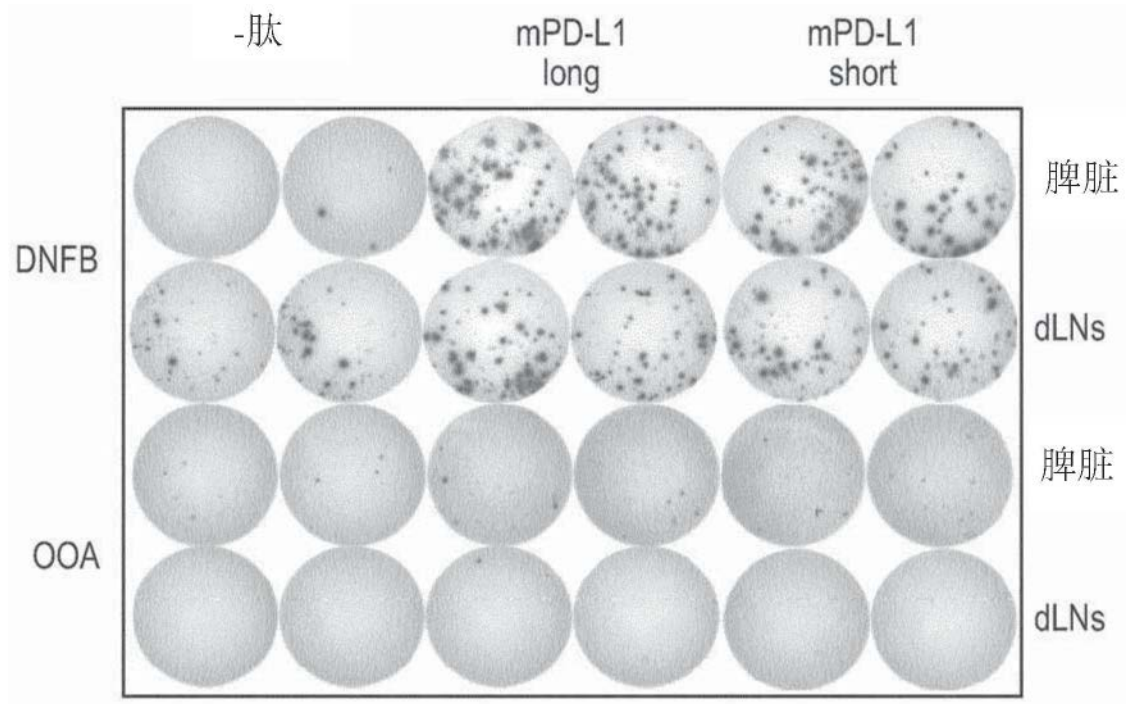


图9C



图10A

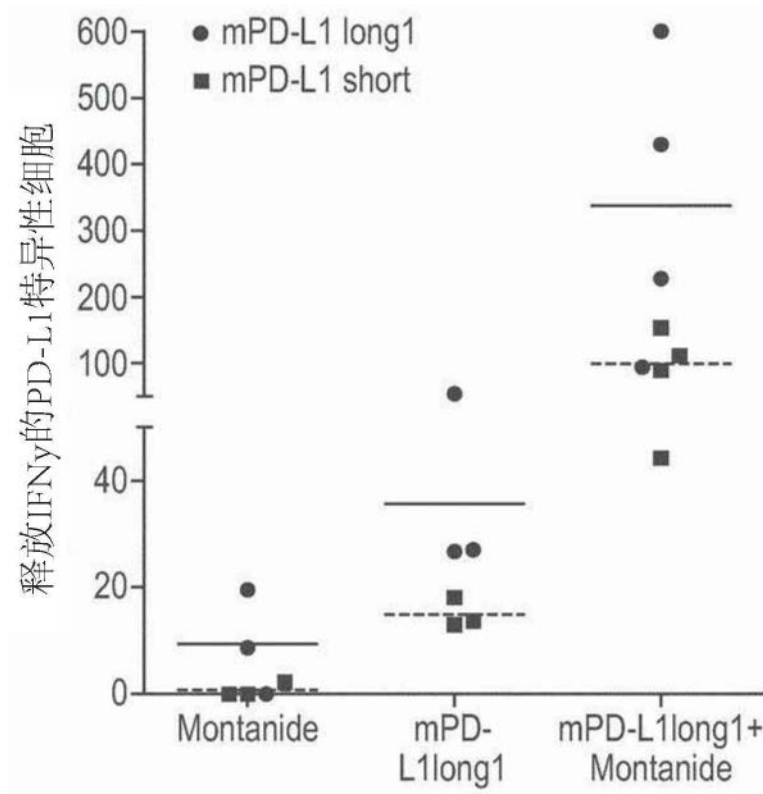


图10B

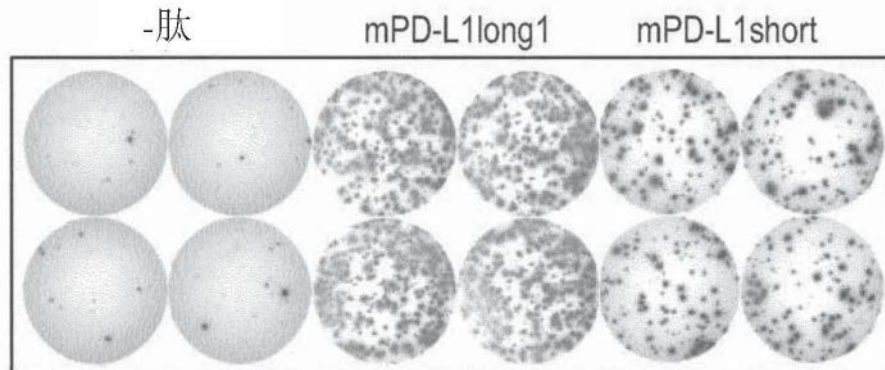


图10C



图11A

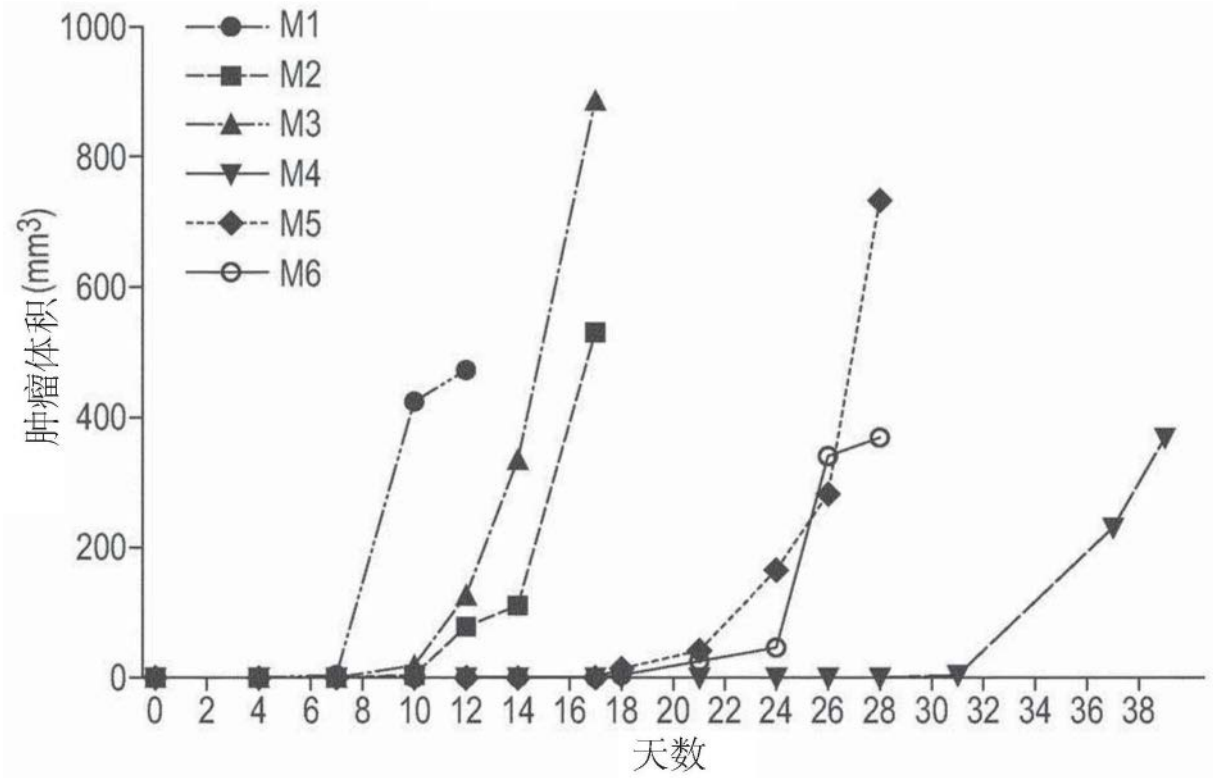


图11B

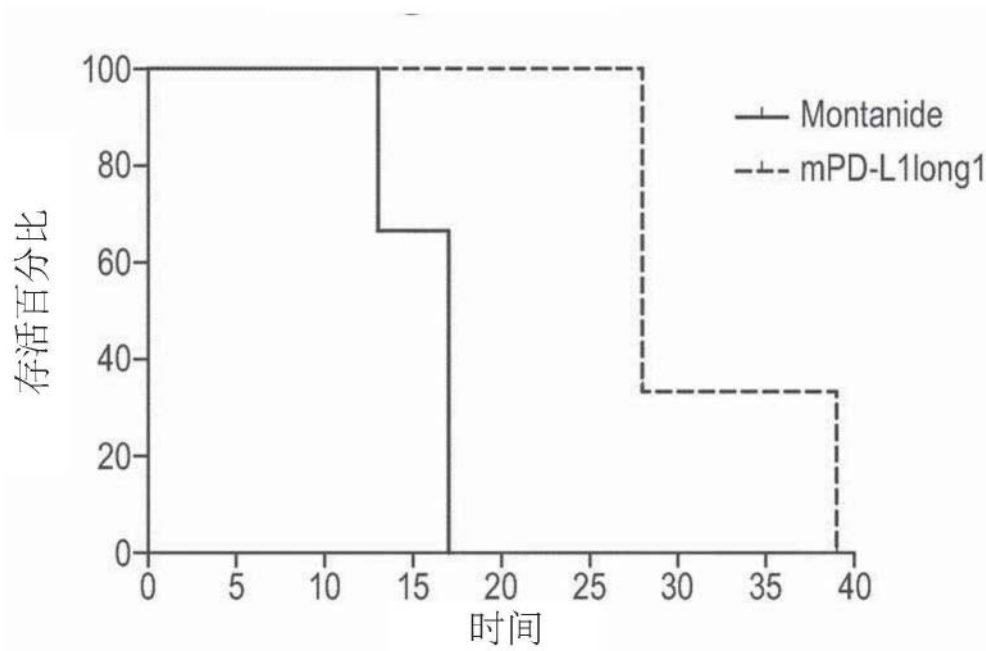


图11C

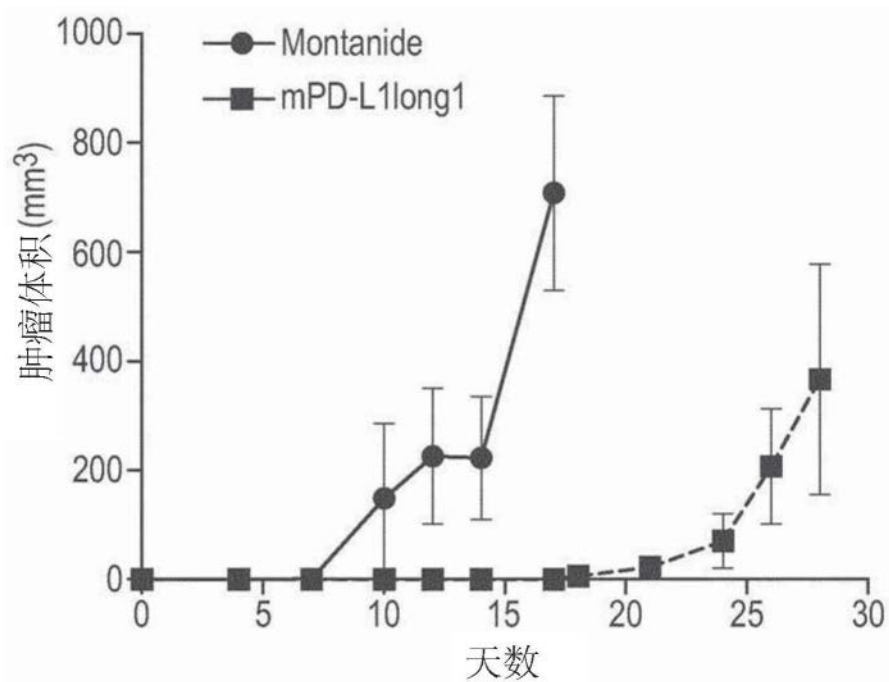


图11D