



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107810193 B

(45) 授权公告日 2022. 03. 22

(21) 申请号 201680025708.X

哈普瑞特·辛格 奥利弗·施尔

(22) 申请日 2016.05.04

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 封新琴

申请公布号 CN 107810193 A

(51) Int.Cl.

(43) 申请公布日 2018.03.16

C07K 14/74 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 14/725 (2006.01)

1507719.1 2015.05.06 GB

C07K 16/28 (2006.01)

62/157,684 2015.05.06 US

C12N 15/12 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 5/0783 (2010.01)

2017.11.03

A61K 35/17 (2015.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 39/00 (2006.01)

PCT/EP2016/060007 2016.05.04

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02016/177784 EN 2016.11.10

WO 2015018805 A1,2015.02.12

(73) 专利权人 伊玛提克斯生物技术有限公司

CN 101168566 A,2008.04.30

地址 德国蒂宾根

CN 101765610 A,2010.06.30

(72) 发明人 安德烈·马尔 托尼·温斯切尼克

审查员 刘俊

安妮塔·维贝 延斯·弗里切

权利要求书2页 说明书98页

序列表49页 附图20页

(54) 发明名称

用于结直肠癌(CRC)和其他癌症免疫治疗的
新型肽和肽组合物及其支架

(57) 摘要

本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白、
核酸和细胞。特别是,本发明涉及癌症的免疫疗
法。本发明还涉及单独使用或与其他肿瘤相关肽
(能够例如作为刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激
T细胞并转入患者的疫苗组合物的活性药物成分)
联合使用的肿瘤相关T细胞(CTL)肽表位。与
主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽或与
此同类的肽也可以是抗体、可溶性T细胞受体和
其他结合分子的靶标。

1. 一种肽或其药学可接受的盐,所述肽由氨基酸序列SEQ ID NO: 142组成。
2. 根据权利要求1所述的肽或其盐,其中所述肽具有与主要组织相容性复合体(MHC) -I或-II类分子结合的能力,其中所述肽与所述MHC结合时能够被CD4和/或CD8T细胞识别。
3. 根据权利要求1所述的肽或其盐,其中所述肽被修饰和/或包含非肽键。
4. 一种融合蛋白,其包含根据权利要求1至3中任一项所述的肽,所述肽融合至HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸。
5. 一种可溶的或膜结合的抗体或其片段,其特异性地识别根据权利要求1或2所述的肽或与MHC分子结合时权利要求1或2所述的肽。
6. 根据权利要求5所述的抗体,其为单克隆抗体、双特异性抗体和/或嵌合抗体。
7. 根据权利要求5或6所述的抗体,其中所述抗体具有其他的效应子功能,所述效应子功能包括免疫刺激结构域或毒素。
8. 一种可溶性或膜结合的T细胞受体(TCR)或其片段,其与和MHC分子结合时的HLA配体反应,其中所述配体是根据权利要求1或2所述的肽。
9. 根据权利要求8所述的TCR,其中所述TCR以可溶性分子提供并具有其他效应子功能,所述其他效应子功能包括免疫刺激结构域或毒素。
10. 一种核酸,其编码权利要求1或2所述的肽,或权利要求8或9所述的TCR。
11. 根据权利要求10所述的核酸,其与异源启动子序列连接。
12. 一种表达载体,其包含权利要求10或11所述的核酸。
13. 一种重组宿主细胞,其包含根据权利要求1至3中任一项所述的肽、根据权利要求10或11所述的核酸、编码根据权利要求5至7中任一项所述的抗体的核酸、或根据权利要求12所述的表达载体。
14. 根据权利要求13所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞为抗原提呈细胞,所述抗原提呈细胞包括树突状细胞。
15. 根据权利要求13所述的重组宿主细胞,其包括根据权利要求10或11所述的编码权利要求8或9的TCR的核酸、或编码根据权利要求5至7中任一项所述的抗体的核酸、或根据权利要求12所述的包含所述核酸的表达载体,其中所述宿主细胞为T细胞或NK细胞。
16. 一种制备权利要求1或2所述的肽或权利要求8或9所述的TCR的方法,该方法包括培养权利要求13所述的宿主细胞,以及从该宿主细胞或其培养基中分离出所述肽或TCR,其中该宿主细胞提呈权利要求1或2所述的肽、或表达权利要求10或11所述的编码权利要求1或2所述的肽或权利要求8或9所述的TCR的核酸、或载有权利要求12所述的包含所述核酸的表达载体。
17. 一种体外制备激活的T淋巴细胞的方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人I或II类MHC分子进行体外接触一段时间,该时间足以以抗原特异性的方式激活T细胞,其中人I或II类MHC分子在合适的抗原提呈细胞或模拟抗原提呈细胞的人工构建体表面上表达,其中所述抗原为权利要求1或2所述的肽。
18. 一种激活的T淋巴细胞,其由权利要求17所述的方法制成,其有选择性地识别一种细胞,该细胞提呈含有权利要求1或2给出的氨基酸序列的多肽。
19. 根据权利要求1至3中任一项所述的肽、根据权利要求5至7中任一项所述的抗体、根据权利要求8或9所述的TCR、根据权利要求10或11所述的核酸、根据权利要求12所述的表达

载体、根据权利要求13至15中任一项所述的重组宿主细胞、或根据权利要求18所述的激活的T淋巴细胞在制造抗癌药物中的用途。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述癌症选自肺癌、脑癌、肝癌、肾癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌。

21. 一种试剂盒,包括:(a) 容器,其包含药物组合物,该药物组合物含有权利要求1至3中任一项所述的肽或其盐、权利要求10或11所述的核酸、权利要求12所述的表达载体、权利要求13或14所述的重组宿主细胞、权利要求18所述的激活的T淋巴细胞、权利要求8或9所述的TCR、或权利要求5至7中任一项所述的抗体,以溶液或冻干的形式;和 (b) 第二个容器,其含有冻干剂型的稀释液或重构液。

22. 根据权利要求21所述的试剂盒,其还包含:(c) 至少一种选自由SEQ ID No: 2至191中任一个组成的组的另外的肽,以及/或 (d) (i) 使用溶液或(ii) 重构和/或使用冻干剂型的说明书。

23. 根据权利要求21或22所述的试剂盒,还包括以下中的一个或多个:(iii) 缓冲剂、(iv) 稀释剂、(v) 过滤器、(vi) 针、或(vii) 注射器。

24. 一种药物组合物,其包括至少一种选自以下的活性成分:a) 权利要求1至3中任一项所述的肽或其盐;b) 与a) 中的肽和/或肽-MHC复合体反应的T细胞受体;c) 融合蛋白,其包含与HLA-DR抗原相关不变链(Ii) 的第1至80N-端氨基酸融合的a) 中的肽;d) 编码a) 至c) 中任一项的核酸或包含该核酸的表达载体;e) 包括d) 中表达载体的宿主细胞,f) 一种激活的T淋巴细胞,其通过包括将T细胞与a) 中的肽进行体外接触一段时间的方法而获得,其中接触的一段时间足以以抗原特异性的方式激活该T细胞且该肽在合适的抗原提呈细胞表面表达;g) 抗体或可溶性T细胞受体,其与a) 中的肽和/或肽-MHC复合体、和/或提呈a) 中的肽的细胞反应,并有可能通过与免疫激活结构域或毒素融合而被修饰;和 h) 根据a) 至g) 中任一项的缀合或标记的肽或支架、以及药学可接受的载体。

25. 根据权利要求24所述的药物组合物,其还包括药学可接受的赋形剂或佐剂。

用于结直肠癌 (CRC) 和其他癌症免疫治疗的新型肽和肽组合 物及其支架

[0001] 本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白、核酸和细胞。特别是,本发明涉及癌症的免疫疗法。本发明还涉及单独使用或与其他肿瘤相关肽(能够例如作为刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激T细胞并转入患者的疫苗组合物的活性药物成分)联合使用的肿瘤相关T细胞(CTL)肽表位。与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽或与此同类的肽也可以是抗体、可溶性T细胞受体和其他结合分子的靶标。

[0002] 本发明涉及数种新型肽序列及其变体,它们源自人肿瘤细胞的HLA-I类分子,可用于在引发抗肿瘤免疫反应的疫苗组合物中或作为开发药物/免疫活性化合物和细胞的靶标。

背景技术

[0003] 结直肠癌(CRC)是男性中第三常见的癌症,是女性中第二常见的癌症。全球范围内,CRC占有所有新诊断癌症病例约10%。2012年,新诊断CRC病例为136万,其中男性74.6万,女性61.4万,男女比例为1.2:1(World Cancer Report,2014)。CRC是一种老年人疾病。确诊时平均年龄为68岁(SEER Stat facts,2014)。

[0004] 发病率因地域有约十倍差异,男性和女性发病率相似。两性发病率最高均在澳大利亚/新西兰(年龄标化率(ASR)男性=45/10万,女性ASR=32/10万)。欧洲发病率显示较小的区域性差异,男性ASR=38/10万,女性ASR=25/10万。世界上发病率最低在西非,男性为4.5/10万,女性为3.8/10万(World Cancer Report,2014)。

[0005] CRC总体5年生存率为65%左右。但是,生存率取决于确诊时间点的疾病分期。局限性CRC的5年生存率为89.8%、区域和远程CRC的生存率分别为70.5%和12.9%。CRC是癌症死亡的第四大原因(694000死亡病例;8.5%)(SEER Stat facts,2014;World Cancer Report,2014)。

[0006] CRC通常使用TNM系统进行分期,该系统融入了原发性肿瘤(T)大小、淋巴结受累(N)和远处转移(M)发生的信息。UICC(国际抗癌联盟)分期系统基于TNM分期系统,包括预后预测的统计学数据(Stintzing,2014)。

[0007] CRC发生的危险因素包括生活方式因素、遗传性倾向和炎症性疾病。过量饮酒、吸烟和肥胖与CRC发生的风险上升有关。遗传危险因素为CRC的家族性发生、家族性腺瘤性息肉病(FAP)、轻型FAP(AFAP)/轻型腺瘤性结肠息肉病(AAPC)、遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)和错构瘤性息肉综合征。与CRC风险增加相关的炎症病症包括炎症肠道疾病(IBD),例如溃疡性结肠炎和克罗恩病(Baena and Salinas,2015;Stintzing,2014;Vasen et al.,2015)。

[0008] 从组织学上来看,超过90%的结直肠癌为腺癌。罕见的CRC类型包括神经内分泌、鳞状细胞、腺鳞、梭形细胞和未分化癌(Fleming et al.,2012)。大部分结直肠腺癌来自于腺瘤或非典型增生癌前病变。根据病变/癌症的类型,不同的分子机制促进肿瘤发生。染色体不稳定性(CIN)途径(“抑制”途径)的特征在于APC、KRAS或p53基因的突变。其他突变发现于LKB1/STK11、SMAD4、BMPR1A或MYH基因中。该微卫星不稳定性(MSI)途径(“突变”途径)包

括DNA错配修复(MMR)基因MLH1、MSH2、MSH6和PMS2,MMR基因甲基化或BRAF突变。表观遗传不稳定,包括DNA甲基化、组蛋白改变和染色质重塑为CIMP(CpG岛甲基剂表型)肿瘤的特性(Fleming et al.,2012)。

[0009] 根据所述CRC期别,有不同的标准疗法可用于结肠癌和直肠癌。标准方法包括外科手术、放射治疗、化学治疗和靶向治疗CRC(Berman et al.,2015a;Berman et al.,2015b)。

[0010] 肿瘤切除对CRC治疗至关重要。因为直肠位于骨盆内,因此,直肠癌的解剖学环境与其他CRC不同,可能难以介入肿瘤。高分化小直肠肿瘤(T1期)需要切除,但无需作进一步的化疗治疗。较高T分期的直肠肿瘤患者在全直肠系膜切除术(TME)和辅助化疗前接受氟尿嘧啶新辅助放化疗。对于化学治疗,使用药物卡培他滨或5-氟尿嘧啶(5-FU)。对于联合化疗,推荐含5-FU、亚叶酸和奥沙利铂的鸡尾酒疗法(FOLFOX)(Stintzing,2014;Berman et al.,2015b)。

[0011] 结肠癌的治疗包括根治性结肠切除术和淋巴结切除术。早期(UICC I期)无需额外治疗。UICC II期肿瘤患者接受5-FU或卡培他滨。UICC III期患者的治疗包括药物联合方案FOLFOX和XELOX(卡培他滨+奥沙利铂)(Berman et al.,2015a;Stintzing,2014)。

[0012] 转移性不可切除的CRC可用鸡尾酒化疗如FOLFIRI(5-FU、亚叶酸、依立替康)、FOLFOX、FOLFOXIRI(5-FU、伊立替康、奥沙利铂)、FOLFOX/卡培他滨、FOLFOX/奥沙利铂、FOLFIRI/卡培他滨和伊立替康或UFT(5-FU、替加氟-尿嘧啶)(Stintzing,2014)治疗。

[0013] 除了化疗药物外,靶向作用于表皮生长因子受体(EGFR、西妥昔单抗、帕尼单抗)或血管内皮生长因子-A(VEGF-A、贝伐单抗)的若干单克隆抗体施用给疾病期别高的患者。对于二线治疗和之后的治疗,可使用VEGF抑制剂阿柏西普、酪氨酸激酶抑制剂瑞戈非尼、胸苷酸合成酶抑制剂TAS-102和脱氧尿苷三磷酸酶抑制剂TAS-114(Stintzing,2014;Wilson et al.,2014)。

[0014] 最新临床试验分析了主动免疫疗法作为CRC的一种治疗选择。这些治疗策略包括用肿瘤相关抗原(TAA)的肽、全肿瘤细胞、树突状细胞(DC)疫苗和病毒载体进行疫苗接种(Koido et al.,2013)。

[0015] 迄今为止的肽疫苗针对癌胚抗原(CEA)、黏蛋白1、EGFR、T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3(SART3)、 β -人绒毛膜促性腺激素(β -hCG)、肾母细胞瘤抗原1(WT1)、生存素-2B、MAGE3、p53、环指蛋白43和线粒体外膜移位酶34(TOMM34)或突变KRAS。在几项一期和二期临床试验中,患者表现为抗原特异性CTL反应或产生抗体。与免疫反应相反,许多患者没有从肽疫苗中获得临床水平上的利益(Koido et al.,2013;Miyagi et al.,2001;Moulton et al.,2002;Okuno et al.,2011)。

[0016] 树突细胞疫苗包括用TAA衍生肽、肿瘤细胞裂解物、凋亡肿瘤细胞脉冲处理的DC或肿瘤RNA或DC肿瘤细胞融合产物。虽然I/II期试验的许多患者表现出特异性免疫反应,但只有少数人获得临床益处(Koido et al.,2013)。

[0017] 全肿瘤细胞疫苗由自体肿瘤细胞组成,被修饰以分泌GM-CSF,通过辐射或病毒感染、照射细胞被修饰。多数患者在几项II/III期临床试验中没有表现获得临床利益(Koido et al.,2013)。

[0018] 编码CEA以及B7.1、ICAM-1和LFA-3的牛痘病毒或复制缺陷型禽痘病毒已经在I期临床试验的病毒载体疫苗中被用作赋形剂。不同的研究使用了编码CEA和B7.1的非复制

型金丝雀痘病毒。除了诱导CEA特异性T细胞应答外,40%的患者表现出客观临床反应(Horig et al.,2000;Kaufman et al.,2008)。

[0019] 考虑到治疗癌症相关的严重副作用和费用,通常有必要确定可用于治疗癌症的因子,尤其是CRC。通常也有必要确定代表癌症生物标志物的因子,尤其是CRC,从而更好地诊断癌症、评估预后和预测治疗成功性。

[0020] 癌症免疫治疗代表了癌症细胞特异性靶向作用的一个选项,同时最大限度地减少副作用。癌症免疫疗法利用存在的肿瘤相关抗原。

[0021] 肿瘤相关抗原(TAA)的目前分类主要包括以下几组:

[0022] a) 癌-睾丸抗原:T细胞能够识别的最先确认的TAA属于这一类抗原,由于其成员表达于组织学相异的人肿瘤中、正常组织中、仅在睾丸的精母细胞/精原细胞中、偶尔在胎盘中,因此,它最初被称为癌-睾丸(CT)抗原。由于睾丸细胞不表达HLA I类和II类分子,所以,在正常组织中,这些抗原不能被T细胞识别,因此在免疫学上可考虑为具有肿瘤特异性。CT抗原大家熟知的例子是MAGE家族成员和NY-ESO-1。

[0023] b) 分化抗原:肿瘤和正常组织(肿瘤源自该组织)都含有TAA。大多数已知的分化抗原发现于黑色素瘤和正常黑色素细胞中。许多此类黑色素细胞谱系相关蛋白参与黑色素的生物合成,因此这些蛋白不具有肿瘤特异性,但是仍然被广泛用于癌症的免疫治疗。例子包括,但不仅限于,黑色素瘤的酪氨酸酶和Melan-A/MART-1或前列腺癌的PSA。

[0024] c) 过表达的TAA:在组织学相异的肿瘤中以及许多正常组织中都检测到了基因编码被广泛表达的TAA,一般表达水平较低。有可能许多由正常组织加工和潜在提呈的表位低于T细胞识别的阈值水平,而它们在肿瘤细胞中的过表达能够通过打破先前确立的耐受性而引发抗癌反应。这类TAA的典型例子为Her-2/neu、生存素、端粒酶或WT1。

[0025] d) 肿瘤特异性抗原:这些独特的TAA产生于正常基因(如 β -catenin、CDK4等)的突变。这些分子变化中有一些与致癌性转化和/或进展相关。肿瘤特异性抗原一般可在不对正常组织带来自体免疫反应风险的情况下诱导很强的免疫反应。另一方面,这些TAA在多数情况下只与其上确认了有TAA的确切肿瘤相关,并且通常在许多个体肿瘤之间并不都共享TAA。在含有肿瘤特定(相关)同种型蛋白的情况下,如果肽源自肿瘤(相关)外显子也可能出现肽肿瘤特异性(或相关性)。

[0026] e) 由异常翻译后修饰产生的TAA:此类TAA可能由肿瘤中既不具有特异性也不过表达的蛋白产生,但其仍然具有肿瘤相关性(该相关性由主要对肿瘤具有活性的翻译后加工所致)。此类TAA产生于变糖基化模式的改变,导致肿瘤产生针对MUC1的新型表位或在降解过程中导致诸如蛋白拼接的事件,这可能具有也可能不具有肿瘤特异性。

[0027] f) 肿瘤病毒蛋白:这些TTA是病毒蛋白,可在致癌过程中发挥关键作用,并且由于它们是外源蛋白(非人源蛋白),所以能够激发T细胞反应。这类蛋白的例子有人乳头状瘤16型病毒蛋白、E6和E7,它们在宫颈癌中表达。

[0028] 基于T细胞的免疫治疗靶向作用于主要组织相容性复合体(MHC)分子提呈的来源于肿瘤相关蛋白或肿瘤特异性蛋白的肽表位。肿瘤特异性T淋巴细胞所识别的抗原,即其表位,可以是源自所有蛋白类型的分子,如酶、受体、转录因子等,它们在相应肿瘤的细胞中被表达,并且与同源未变的细胞相比,其表达通常上调。

[0029] MHC分子有两类:MHC I类和MHC II类。MHC I类分子由一条 α 重链和 β -2-微球蛋白,

MHC II类分子由一条 α 和一条 β 链组成。其三位构造形成一个结合槽,用于与肽进行非共价相互作用。

[0030] 大部分有核细胞上都可发现MHC-I类分子。他们提呈主要为内源性的蛋白、缺陷核糖体产物(DRIP)和较大肽裂解生成的肽。然而,源自内体结构或外源性来源的肽也经常在MHC-I类分子上发现。这种I-类分子非经典提呈方式在文献中被称为交叉提呈(Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990)。MHC II类分子主要发现于专业抗原提呈细胞(APC)上,并且主要提呈,例如,在内吞作用过程中由APC占据并且随后被加工的外源性或跨膜蛋白的肽。

[0031] 肽和MHC I类的复合体由负载相应T细胞受体(TCR)的CD8阳性T细胞进行识别,而肽和MHC II类分子的复合体由负载相应TCR的CD4阳性辅助T细胞进行识别。因此,TCR、肽和MHC按照1:1:1的化学计量呈现,这一点已是共识。

[0032] CD4阳性辅助T细胞在诱导和维持CD8阳性细胞毒性T细胞的有效反应中发挥重要作用。肿瘤相关抗原(TAA)衍生的CD4阳性T细胞表位的识别对开发能引发抗肿瘤免疫反应的药物产品可能非常重要(Gnjatic et al., 2003)。在肿瘤部位,T辅助细胞维持着对细胞毒性T细胞(CTL)友好的细胞因子环境(Mortara et al., 2006)并吸引效应细胞,如CTL、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和粒细胞(Hwang et al., 2007)。

[0033] 在没有炎症的情况下,MHC II类分子的表达主要局限于免疫系统细胞,尤其是专业抗原提呈细胞(APC),例如,单核细胞、单核细胞源性细胞、巨噬细胞、树突状细胞。在癌症患者的肿瘤细胞中发现有MHC II类分子的表达(Dengjel et al., 2006)。

[0034] 本发明的拉长(较长)肽可作为MHC-II类活性表位。

[0035] MHC-II类表位活化的辅助T细胞在编排抗肿瘤免疫的CTL效应子功能中发挥着重要作用。触发 T_{H1} 细胞反应的辅助T细胞表位支援CD8阳性杀伤T细胞的效应子功能,其中包括直接作用于肿瘤细胞的细胞毒性功能(该类肿瘤细胞表面显示有肿瘤相关肽/MHC复合体)。这样,肿瘤相关T辅助细胞表位单独使用或与其他肿瘤相关肽结合使用可作为刺激抗肿瘤免疫反应的疫苗化合物的活性药物成分。

[0036] 哺乳动物(如小鼠)模型显示,即使没有CD8阳性T淋巴细胞,CD4阳性T细胞也能通过分泌干扰素- γ (IFN γ)抑制血管生成而足以抑制肿瘤的表现(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999)。没有CD4T细胞作为直接抗肿瘤效应因子的证据(Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014)。

[0037] 由于HLA II类分子的组成性表达通常仅限于免疫细胞,因此,直接从原发肿瘤中分离II类肽之前被认为是不可能的事。然而,Dengjel等人成功地在肿瘤中直接识别了多个MHCII类表位(WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1)。

[0038] 由于CD8依赖型和CD4依赖型这两种反应共同并协同地促进抗肿瘤作用,因此,确定和表征由CD8+T细胞(配体:MHC I类分子+肽表位)或CD4阳性T辅助细胞(配体:MHC II类分子)识别的肿瘤相关抗原对开发肿瘤疫苗非常重要。

[0039] 对于MHC I类肽触发(引发)细胞免疫反应的肽,它也必须与MHC分子结合。这一过程依赖于MHC分子的等位基因以及肽氨基酸序列的特异性多态性。MHC-I类-结合肽的长度通常为8-12个氨基酸残基,并且在其与MHC分子相应结合沟槽相互作用的序列中通常包含两个保守残基(“锚”)。这样,每个MHC的等位基因都有“结合基序”,从而确定哪些肽能与结

合沟槽特异性结合。

[0040] 在MHC-I类依赖性免疫反应中,肽不仅能与肿瘤细胞表达的某些MHC-I类分子结合,而且它们之后还必须能被T细胞负载的特异性T细胞受体(TCR)识别。

[0041] 对于被T淋巴细胞识别为肿瘤特异性抗原或相关性抗原以及用于治疗蛋白,必须具备特殊的条件。该抗原应主要由肿瘤细胞表达,而不由正常健康组织表达,或表达数量相对较少。在一个优选的实施方案中,与正常健康组织相比,所述肽应在肿瘤细胞中过度提呈。更为适宜的情况是,该相应抗原不仅出现于一种肿瘤中,而且浓度(即每个细胞的相应肽拷贝数目)高。肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原往往是源自直接参与因细胞周期控制或凋亡抑制中的其功能而发生的正常细胞向肿瘤细胞转化的蛋白。另外,这些直接导致转化事件的蛋白的下游靶标可能会被上调,因此可能与肿瘤间接相关。这些间接肿瘤相关抗原也可能是预防接种方法的靶标(Singh-Jasuja et al., 2004)。至关重要的是,表位存在于抗原氨基酸序列中,以确保这种来自肿瘤相关抗原的肽(“免疫原性肽”)可导致体外或体内T细胞反应。

[0042] 基本上,任何能与MHC分子结合的肽都可能充当一个T细胞表位。诱导体外或体内T细胞反应的前提是存在具有相应TCR的T细胞并且不存在对该特定表位的免疫耐受性。

[0043] 因此,TAA是基于T细胞疗法(包括但不限于肿瘤疫苗)研发的起点。识别和表征TAA的方法通常基于对患者或健康受试者T细胞的使用情况,或基于肿瘤与正常组织肽之间差别转录特性或差别表达模式的产生。然而,对肿瘤组织或人肿瘤细胞株中过表达或选择性表达的基因的识别并不提供在免疫疗法中使用这些基因所转录抗原的准确信息。这是因为,有着相应TCR的T细胞必须要存在而且对这个特定表位的免疫耐受性必须不存在或为最低水平,因此,这些抗原的表位只有一部分适合这种应用。因此,在本发明的一非常优选的实施例中,只选择那些针对可发现功能性和/或增殖性T细胞情况的过量提呈或选择性提呈肽,这一点非常重要。这种功能性T细胞被定义为在以特异性抗原刺激后能够克隆地扩展并能够执行效应子功能(“效应子T细胞”)的T细胞。

[0044] 在通过根据本发明的特定TCR(例如可溶性TCR)和抗体或其他结合分子(支架)靶向作用于肽-MHC的情况下,潜在肽的免疫原性是次要的。在这些情况下,提呈是决定因素。

发明内容

[0045] 在本发明的第一方面,本发明涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191的氨基酸序列、或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191具有至少77%,优选至少88%同源(优选至少77%或至少88%相同)的变体序列,其中所述变体与MHC结合和/或诱导T细胞与所述肽发生交叉反应,或其药学可接受的盐,其中所述肽不是潜在全长多肽。

[0046] 本发明进一步涉及本发明的一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191的序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191具有至少77%、优选至少88%同源性(优选为至少77%或至少88%相同)的变体,其中所述肽或其变体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸。

[0047] 下表显示了根据本发明的肽、它们各自的SEQ ID NO、以及这些肽的可能来源(潜在)基因。表1和表2中的所有肽均与HLA-A*02结合。表2中的肽之前在大型列表中披露,作为高通量筛查结果,错误率高,或使用算法计算出,但之前与癌症毫无关联。表3中的肽是可与

本发明其他肽组合使用的其他肽。表4A和B中的肽还可用于诊断和/或治疗各种其他恶性疾病,这些疾病涉及过表达或过提呈各潜在多肽。

[0048] 表1:本发明中的肽

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
1	ALIKQLFEA	168417, 441234, 89958	ZNF679, ZNF716, SAPCD2
2	ALLPRYFFL	23120	ATP10B
3	RLIPDTLYSV	1303	COL12A1
4	RLAELTVDEFL	26155, 401010	NOC2L, LOC401010
[0049] 5	WLFDDGGLTL	6557, 6558, 6559	SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3
6	FLAELPGSLSL	5326	PLAGL2
7	YLTRHLAVL	4583	MUC2
8	ALMLQGVDLL	3329	HSPD1
9	ILDDHLSRV	8313	AXIN2
10	RMYNKIFAI	80201	HKDC1

[0050]

11	YLFECTFNM	90161	HS6ST2
12	ALVQGILERV	4843	NOS2
13	FLLAEDTKV	10592	SMC2
14	FLDKPEDVLL	2036	EPB41L1
15	LQLDKEFQL	24140	FTSJ1
16	VLVDQSWVL	5655	KLK10
17	ALAAARVEL	6558	SLC12A2
18	FLSSLKGGLL	83608	C18orf21
19	RLYTKLLNEA	4651	MYO10
20	YLKDGDVML	11180	WDR6
21	VLIDHRWVL	43849	KLK12
22	GLIDEVMVL	54905	CYP2W1
23	FLDANGHFV	54905	CYP2W1
24	VLDGVLMEI	4190	MDH1
25	SLADRLIGV	57535	KIAA1324
26	GLASKENFSNVSL	6840	SVIL
27	LLADEDSSYL	51510	CHMP5
28	ALTEIQEFI	5591	PRKDC
29	QMLDVAIRV	8943	AP3D1
30	GLSSAYGGL	10787, 3856, 728638	NCKAP1, KRT8, KRT8P3
31	LLYGKYVSV	84065	TMEM222
32	KLNTETFGV	149986	LSM14B
33	ALWEKNTHL	11190	CEP250
34	ILLEKSVSV	80728	ARHGAP39
35	KLLDLTVRI	10562	OLFM4
36	GLLESPSIFNFTA	23185	LARP4B
37	GLFAGLGGAGA	10916	MAGED2
38	SLAPTPVSA	8870	IER3
39	GLNGGSPAAA	1045	CDX2
40	ALSNVIHKV	5268	SERPINB5
41	ILDDSFKLL	9843	HEPH
42	SILDDSFKL	9843	HEPH
43	TLDAAQPRV	6649	SOD3

[0051]

44	SLESKLTSV	9289	GPR56
45	ALAELLHGA	26470	SEZ6L2
46	GLDDRYSLV	11187	PKP3
47	KLYERCEVV	2065	ERBB3
48	FLDASDPAL	65266	WNK4
49	SGMGGITAV	3856	KRT8
50	TLMAEMHVV	2186	BPTF
51	QVWEIQHTV	26290	GALNT8
52	ALDSSNSMQTI	3875	KRT18
53	FLLGSEIKL	54885	TBC1D8B
54	ALLNGEYLLAA	57418	WDR18
55	QIITSVVS	5378	PMS1
56	VLFTDEGVPKFL	4731	NDUFV3
57	NLLEKENYL	5318	PKP2
58	AMADKMDMSL	10189	ALYREF
59	LLTDNVVKL	79810	PTCD2
60	VLDEDEPRFL	23287	AGTPBP1
61	KLLKLFQGV	26058	GIGYF2
62	YLAPENGYL	6625	SNRNP70
63	KLFSILSTV	54919	HEATR2
64	KTLGKLWRL	30812, 6662, 6663	SOX8, SOX9, SOX10
65	FGAPGHSA	5725	PTBP1
66	GLDDGPDFL	58533	SNX6
67	SLNDLEKDVMLL	6597	SMARCA4
68	SILQFVHMV	5800	PTPRO
69	GMLNEAEGKAIKL	4629	MYH11
70	MISELEVRL	4629	MYH11
71	RLWTEIPTAI	3710	ITPR3
72	YLLDYPNNLL	26057	ANKRD17
73	YLFDAVSM	51074	APIP
74	YLMGFLHAV	23779, 553158, 55615	ARHGAP8, PRR5-ARHGAP8, PRR5
75	EMIENIQSV	1080	CFTR

[0052]

76	YLIGEKQHLY	7429	VIL1
77	SLLKRDFGA	1655	DDX5
78	ALDPELLLL	57805	KIAA1967
79	SLAADQLLKL	9295	SRSF11
80	QVDEVVDIMRV	3604, 6844, 9341	TNFRSF9, VAMP2, VAMP3
81	ALLSQQTHL	7050	TGIF1
82	QLYEEPDTKL	10270	AKAP8
83	LTIEDGIFEV	3306, 3312, 100287551	HSPA2, HSPA8, HSPA8P8
84	SMVEDITGLRL	1832	DSP
85	ILHDINSDGVL	4924	NUCB1
86	KVFPGKISV	56667	MUC13
87	LLFDAPDLRL	55561	CDC42BPG
88	KLDIKVETV	55243	KIRREL
89	SLIEYEFRV	3655	ITGA6
90	GLLKPGLNVVL	10969	EBNA1BP2
91	TVDVATPSV	8924	HERC2
92	WIDDTSAFV	5073	PARN
93	SLQELRLLL	55502	HES6
94	KSMDIVLTV	4586, 727897	MUC5AC, MUC5B
95	AILDAHIEV	26290	GALNT8
96	KLYSRLVYV	387496	RASL11A
97	ALWWGVVTV	3784	KCNQ1
98	AMNGKSFSV	79572	ATP13A3
99	KLLEVDLDTV	4648	MYO7B
100	SLDDFLATA	55341	LSG1
101	GLSEGHTFQV	2318	FLNC
102	KILVSLIEV	10422	UBAC1
103	FLFGYPKRL	64110	MAGEF1
104	ILLTIKDDTIYL	4583	MUC2
105	YALDLSTFL	8870	IER3
106	SLISEKILL	26504	CNNM4
107	ALLGGGPYML	80004	ESRP2
108	SLAELVPGVGGI	9742	IFT140

[0053]

109	ALDGDQMEL	3192	HNRNPU
110	LLGELPRLLLL	1604	CD55
111	HMDDGGYSM	27316, 494115	RBMX, RBMXL1
112	KLQGVLIYL	51809	GALNT7
113	ILYDLQQNL	3783	KCNN4
114	TAVGHALVL	1293	COL6A3
115	SLFDVSHML	275	AMT
116	LVYQFVHPI	25803	SPDEF
117	TLQPVDNSTISL	1266	CNN3
118	LLADLKTMTV	5141, 5142, 5143, 5144	PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D
119	ILYQTVTGL	83732	RIOK1
120	VLYEGVDEV	93432	MGAM2
121	SLAPNIISQL	25824	PRDX5
122	SLMGMVLKL	11169	WDHD1

[0054] 表2:本发明中的其他肽,之前不知是否与癌症有关联-J=磷酸丝氨酸

[0055]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
123	KTLESYLL	6240	RRM1
124	RVLPPSALQSV	9212	AURKB
125	KLGDFFGLLVEL	9088	PKMYT1
126	TLAKYLMEL	891, 9133	CCNB1, CCNB2
127	RLAELTVDEFLA	26155	NOC2L
128	MLDDRAYLV	23511	NUP188
129	VLIDVLKEL	23019	CNOT1
130	GLGGSQIDTHL	23215	PRRC2C
131	KLLDVVHPA	10574	CCT7
132	ALLNAILHSA	25926	NOL11
133	RTFEKIEEV	3978	LIG1
134	GVAGGSILKGV	1968, 255308	EIF2S3, LOC255308
135	KLQEEIPVL	1062	CENPE
136	KLFDIFSQQV	55737	VPS35
137	QLTEIKPLL	57446	NDRG3
138	KQFEGTVEI	675	BRCA2
139	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
140	LLNEILEQV	64151	NCAPG
141	AVIEHLERL	283459	GATC

[0056]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
142	SLVQRVETI	1894	ECT2
143	KLSDVWKEL	197259	MLKL
144	LLNDRIWLA	90204	ZSWIM1
145	LLLEVVKQV	65065	NBEAL1
146	ALSDETWGL	2886	GRB7
147	TLTELRAFL	8242	KDM5C
148	RLENMTEVV	23042	PDXDC1
149	YQFDKVGILTL	8563	THOC5
150	RLADLEALKV	10535	RNASEH2A
151	SAQGS DVSLTACKV	100507703, 3105	LOC100507703, HLA-A
152	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
153	ILFSEDSTKLFV	84916	CIRH1A
154	KLPSETIFVGC	50628	GEMIN4
155	RLLGEEVVRV	9894	TELO2
156	SLMMTIINL	7153	TOP2A
157	SLIERDLKL	9875	URB1
158	GLLDPSVFHV	79050	NOC4L
159	VLVDDDGIKVV	79022	TMEM106C
160	KLLEFDQLQL	8871	SYNJ2
161	FLKNELDNV	10293	TRAIP
162	KLMDYIDEL	85444	LRRCC1
163	RLLHEVQEL	10540	DCTN2
164	KMLDEILLQL	5425	POLD2
165	RLLDFPEAMVL	23113	CUL9
166	GLLEARGILGL	990	CDC6
167	SVIDHIHLISV	10755	GIPC1
168	GLIRFPLMTI	55643	BTBD2
169	YLAHFIEGL	64328	XPO4
170	ALAGGITMV	790	CAD
171	RLQETEGMVAV	10042	HMGXB4
172	LLDVTVMQV	22820	COPG1
173	KLGDLMVLL	57647	DHX37
174	ILLDDNMQIRL	5261	PHKG2
175	TLLGGKEAQALGV	94059	LENG9
176	RTLDKVLEV	9933	KIAA0020
177	ALLQGAIESV	25894	PLEKHG4
178	YLFREPATI	4728	NDUFS8
179	RLLJPLSSA	125950	RAVER1
180	NLLEIAPHL	2820	GPD2
181	NLFDLGGQYLRV	22827	PUF60

[0057]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
182	SLNKWIFTV	339665	SLC35E4
183	TLQEVVTGV	55750	AGK
184	SLLDENNVSSYL	5591	PRKDC
185	VLYTGVRV	64682	ANAPC1
186	KMSEKILL	5690	PSMB2
187	GLHNVVYGI	23019	CNOT1
188	FLVDGPRVQL	90204	ZSWIM1
189	AISEVIGKITA	9183	ZW10
190	AMAEMVLQV	9918	NCAPD2
191	QLFSEIHN	55755	CDK5RAP2

[0058]

表3:用于例如个性化癌症疗法的其他肽-J=磷酸丝氨酸

[0059]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
192	KIQEMQHFL	4321	MMP12
193	KLSPTVVGL	8313	AXIN2
194	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
195	LLGERVAL	23475	QPRT
196	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
197	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
198	VLYGPDVPTI	4680	CEACAM6
199	FLLEREQLL	165055	CCDC138
200	SAVDFIRTL	9263	STK17A
201	GJFNGALAAV	39	ACAT2
202	GLAALAVHL	2175	FANCA
203	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1
204	KLLDLETERILL	2803	GOLGA4
205	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
206	RIAGIRGIQGV	23167	EFR3A
207	KLCEGFNEV	51142, 646630	CHCHD2, CHCHD2P8
208	RLIDRIKTV	60560	NAA35
209	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
210	KLAVALLAA	3576	IL8
211	SLFGKKYIL	2274	FHL2
212	FLLDGSANV	1293	COL6A3
213	LLWAPTAQA	389812	LCN15
214	SVLEKEIYSI	127602	DNAH14
215	KLQEKIQEL	1062	CENPE
216	YLWDLDHGFAGV	832	CAPZB
217	KLLDTMVDFTL	100527963, 11243	PMF1-BGLAP, PMF1

[0060]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
218	KLSWDLIYL	51148	CERCAM
219	FLDEKGRCV	4583	MUC2
220	KMDPVAYRV	5859	QARS
221	ILNVDGLIGV	47	ACLY
222	GVIAEILRGV	10528	NOP56
223	VLMQDSRLYL	983	CDK1
224	QLQEGKNVIGL	8407	TAGLN2
225	YLYGQTTTYL	7153	TOP2A
226	FLVDGSWSV	1303	COL12A1
227	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
228	SMSGYDQVL	3187, 3188	HNRNPH1, HNRNPH2
229	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11, DDX12P, LOC642846
230	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
231	RLFADILNDV	64755	C16orf58
232	RLLDSVSRL	3918	LAMC2
233	RLDDLKMTV	3918	LAMC2
234	KMFESFIESV	5576	PRKAR2A
235	LLHEENFSV	6942	TCF20
236	KMSELQTYV	1063	CENPF
237	KLVEFDLGA	10460	TACC3
238	NMLEAVHTI	7272	TTK
239	QLIEKNWLL	56992	KIF15
240	VLAPRVLRA	5954	RCN1
241	ILIDWLQV	891	CCNB1
242	RLEEDDGDVAM	10482	NXF1
243	TLMDMRLSQV	24148	PRPF6
244	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
245	QLIDYERQL	11072	DUSP14
246	GLTDNIHLV	25878	MXRA5
247	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y
248	ALYGDIDAV	5743	PTGS2
249	ALYGRLEV	23294	ANKS1A
250	ALCEENMRGV	1938	EEF2
251	SLLQATDFMSL	7070	THY1
252	YVYQNNIYL	2191	FAP
253	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
254	VLFQEALWHV	2194	FASN
255	ALALWIPSL	200634	KRTCAP3
256	GLLEELVTV	642475	MROH6

[0061]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
257	SLADFMQEV	23019	CNOT1
258	LLYEGKLT	440107	PLEKHG7
259	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
260	ALLAEGITWV	54499	TMCO1
261	YLYDSETKNA	4316	MMP7
262	VLAKPGVISV	1293	COL6A3
263	LLAGQTYHV	1293	COL6A3
264	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
265	LLDKKIGV	10576	CCT2

[0062] 本发明还一般涉及本发明的肽用于治疗增殖性疾病,例如,肺癌、脑癌、胃癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌(MCC)、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌。

[0063] 特别优选的是本发明的肽(单独或组合),其选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191。更优选的是所述肽(单独或组合)选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:68(见表1),并且其用于CRC、肺癌、脑癌、胃癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌、优选为CRC的免疫治疗。

[0064] 最优选的是所述单独或组合的肽-选自SEQ ID NO:1、3、6、11、13、16、18、19、23、24、26、31、32、34、37、40、44、45、59、67、71、82、87、88、100、103、105、113、123、124、126、129、131、132、133、135、137、140、142、150、152、153和SEQ IDNO:166以及它们在CRC、肺癌、脑癌、胃癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞、黑素瘤、卵巢癌和食道癌免疫治疗中的用途,优选为CRC。

[0065] 如示下面的表4A和B所示,其中本发明的许多肽也发现于其他肿瘤中,因此也可用于其他适应症的免疫治疗。另请参阅图1D和实例1。

[0066] 表4A:本发明的肽及其在其他增殖性疾病(特别是其他癌性疾病)中的特定用途。该表显示在其他肿瘤类型上发现的选定肽,它们或是过量提呈于多于5%的测定肿瘤样本,或提呈于多于5%的测定肿瘤样本上且肿瘤与正常组织的几何学平均值比值大于3。过度提呈定义为与最高提呈的正常样本相比,肿瘤样本中的提呈更高。

[0067]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
1	ALIKQLFEA	肺、脑、卵巢、食管
3	RLIPDTLYSV	肺、胰腺、乳腺、卵巢、食管
4	RLAELTVDEFL	肺、卵巢
6	FLAELPGSLSL	肺、肝、白细胞、黑色素瘤、卵巢
8	ALMLQGVDLL	胰腺、白细胞
10	RMYNKIFAI	肝脏
11	YLFKTFNM	肺、脑、食管
13	FLLAEDTKV	黑色素瘤
15	LQLDKEFQL	肺、食管
16	VLVDQSWVL	卵巢
18	FLSSLKGGLL	卵巢
19	RLYTKLLNEA	脑、食管
25	SLADRLIGV	前列腺、卵巢
26	GLASKENFSNVSL	肺、肝、食管
29	QMLDVAIRV	白细胞
31	LLYGKYVSV	肺、肾、脑、肝、白细胞、卵巢、食管
33	ALWEKNTHL	肝、MCC
34	ILLEKSVSV	卵巢
37	GLFAGLGGAGA	食管
38	SLAPTPVSA	胰腺
40	ALSNVIHKV	肺、胰腺、食管
44	SLESKLTSV	脑、胰腺、卵巢
45	ALAELLHGA	肺、肾、脑、肝、前列腺、乳腺、卵巢
46	GLDDRYSLV	食管
47	KLYERCEVV	肝脏
48	FLDASDPAL	肾脏、前列腺
53	FLLGSEIKL	肾脏、胰腺
54	ALLNGEYLLAA	肝脏、卵巢、食管
55	QIITSVSV	胰腺
56	VLFTDEGVPKFL	肺、肾脏、肝脏
57	NLLEKENYL	卵巢
58	AMADKMDMSL	脑、白细胞、黑色素瘤
59	LLTDNVVKL	肺、肝、食管
61	KLLKLFQGV	肾脏
62	YLAPENGYL	肺、肝脏、黑色素瘤、食管
63	KLFSILSTV	脑、肝脏、前列腺、卵巢、食管

[0068]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
65	FGAPGIISA	胃、食管
67	SLNDLEKDVMLL	白细胞、黑色素瘤
69	GMLNEAEGKAIK L	前列腺
70	MISELEVRL	肾脏、胃、前列腺、食管
71	RLWTEIPTAI	肝脏
72	YLLDYPNNLL	肺、肾、脑、肝、白细胞、乳腺、卵巢、 食管
74	YLMGFLHAV	卵巢
76	YLIGEKQHLY	肝脏
77	SLLKRDFGA	肺、乳腺
79	SLAADQLLKL	肺、肝脏
80	QVDEVVDIMRV	白细胞
81	ALLSQQTHL	食管
82	QLYEEDPTKL	白细胞、食管
83	LTIEDGIFEV	肾、白细胞、MCC、黑色素瘤、食管
84	SMVEDITGLRL	肺、肝、食管
87	LLFDAPDLRL	肺、卵巢
88	KLDIKVETV	肺、肾、肝、黑色素瘤、卵巢、食管
89	SLIEYEFVRV	肝脏、食管
90	GLLKPGLNVVL	肺、食管
91	TVDVATPSV	乳腺、卵巢
92	WIDDTSAFV	黑色素瘤
98	AMNGKSFSV	肝脏、食管
101	GLSEGHTFQV	前列腺
102	KILVSLIEV	肺、肾、卵巢、食管
103	FLFGYPKRL	脑、肝脏、前列腺
105	YALDLSTFL	肾、肝
107	ALLGGGPYML	肺
108	SLAELVPGVGGI	肾、脑、肝、卵巢
110	LLGELPRLLLL	肺、胰腺、白细胞
116	LVYQFVHPI	胰腺、前列腺、乳腺、卵巢
117	TLQPVDNSTISL	肺、肾脏、肝脏、胰腺、食管
118	LLADLKTMTV	脑、白细胞、黑色素瘤
119	ILYQTVTGL	食管
121	SLAPNIISQL	肝脏、白细胞
123	KTLEERSYLL	肺、肾、肝、MCC、卵巢、食管
124	RVLPPSALQSV	肺、肝、MCC、黑色素瘤、卵巢、食管
125	KLGDFFGLLVEL	肺、脑、黑色素瘤、卵巢、食管

[0069]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
126	TLAKYLMEL	肺、脑、肝脏、卵巢、食管
127	RLAELTVDEFLA	卵巢
128	MLDDRAYLV	肺、脑、乳房、MCC、卵巢、食管
129	VLIDVLKEL	肾、白细胞
131	KLLDVVHPA	肺、脑、肝脏、前列腺、卵巢
132	ALLNAILHSA	肺、脑、肝脏、卵巢、食管
133	RTFEKIEEV	肺、肾、脑、胃、肝、乳腺、MCC、卵巢、食管
134	GVAGGSILKGV	肺、肝脏、黑色素瘤、卵巢、食管
135	KLQEEIPVL	肺
136	KLFDIFSQQV	肝脏
137	QLTEIKPLL	脑、卵巢
138	KQFEGTVEI	食管
139	VLLNEILEQV	肺、肝脏、黑色素瘤、卵巢、食管
140	LLNEILEQV	肺、黑色素瘤、卵巢
141	AVIEHLERL	肺、肾脏、食管
142	SLVQRVETI	肺、肾、肝、黑色素瘤、卵巢、食管
143	KLSDVWKEL	肺
144	LLNDRIWLA	食管
145	LLLEVVKQV	黑色素瘤
146	ALSDETWGL	肾脏、胃、胰腺、乳腺、卵巢
147	TLTELRAFL	肾脏
148	RLLNMTEVV	肝脏
149	YQFDKVGILTL	白细胞、黑色素瘤
151	SAQGS DVSLTAC KV	肺
152	KLLAVIHEL	肺、肾、胰腺、卵巢、食管
153	ILFSEDSTKLFV	肺、肝、白细胞、黑色素瘤、卵巢、食管
154	KLPSETIFVGC	肺、肝脏、白细胞、卵巢、食管
155	RLLGEEVVRV	食管
156	SLMMTIINL	肺、肝脏、黑色素瘤
157	SLIERDLKL	肺、肾、脑、肝、食管
158	GLLDPSVFHV	肾、脑、肝、食管
159	VLVDDDDGIKVV	肝、黑色素瘤、卵巢
160	KLLEFDQLQL	肺、肾、白细胞、卵巢
161	FLKNELDNV	肺、肝、白细胞、乳腺、黑色素瘤、卵巢
162	KLMDYIDEL	脑、食管
163	RLLHEVQEL	脑
164	KMLDEILLQL	脑

[0070]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
165	RLLDFPEAMVL	肺、卵巢
166	GLLEARGILGL	肝脏
167	SVIDHIHLISV	肺、黑色素瘤、卵巢
168	GLIRFPLMTI	肺、肾脏、肝脏
169	YLAHFIEGL	脑、肝、白细胞、食管
170	ALAGGITMV	肺、肾脏、肝脏、胰腺、黑色素瘤、食管
171	RLQETEGMVAV	肝脏、白细胞、MCC
172	LLD TVTMQV	肾脏、黑色素瘤、卵巢
173	KLGDLMVLL	白细胞
174	ILLDDNMQIRL	肝、黑色素瘤、卵巢
175	TLLGGKEAQALG V	卵巢
177	ALLQGAIESV	黑色素瘤、卵巢、食管
178	YLFREPATI	肺、脑、肝脏、前列腺、黑色素瘤、卵巢、食管
180	NLLEIAPHL	脑、白细胞、乳腺
181	NLFDLGGQYLRV	脑、肝脏、卵巢
183	TLQEVVTGV	前列腺、乳腺
184	SLLDENNVSSYL	肺、肾脏、肝脏、胰腺、前列腺、MCC、黑色素瘤、卵巢、食管
185	VLYTG VVRV	白细胞、黑色素瘤、卵巢
186	KMSEKILL	食管
187	GLHNVVYGI	前列腺
188	FLVDGPRVQL	乳腺、黑色素瘤
189	AISEVIGKITA	卵巢
190	AMAEMVLQV	肺
191	QLFSEIHNL	脑、肝脏
192	KIQEMQHFL	肺、食管
193	KLSPTVVGL	肝、卵巢
194	SLYKGLLSV	肺、肾、脑、肝、卵巢、食管
195	LLLGERVAL	肝、卵巢
197	SLFGQDVKAV	MCC、食管
198	VLYGPDVPTI	胰腺
199	FLLEREQLL	肾、白细胞、黑色素瘤
200	SAVDFIRTL	乳腺、食管
201	GJFNGALAAV	脑、胰腺
202	GLAALAVHL	黑色素瘤、卵巢、食管
203	KLIDLSQVMYL	肺、肾、胰腺、卵巢
204	KLLDLETERILL	肺、肝脏、前列腺、卵巢

[0071]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
205	RLHDENILL	肺、肾、脑、肝、胰腺、前列腺、卵巢、食管
206	RIAGIRGIQGV	肺、肾、肝脏、前列腺、卵巢
207	KLCEGFNEV	脑、肝脏
208	RLIDRIKTV	肺、脑、肝、卵巢
209	KLQDGLLHI	肾、脑、肝、胰腺
210	KLAVALLAA	肺、肾、脑、肝、食管
211	SLFGKKYIL	肾脏
212	FLLDGSAHV	肺、胰腺、食管
214	SVLEKEIYSI	肺、肝脏、前列腺、乳腺、卵巢、食管
215	KLQEKIQEL	肺、卵巢、食管
216	YLWDLDHGFAGV	肺、脑、肝脏、前列腺、黑色素瘤、卵巢、食管
217	KLLDTMVDFTL	肺、肾、脑、肝、卵巢、食管
218	KLSWDLIYL	肺、肾脏
220	KMDPVAYRV	肝、前列腺
221	ILNVDGLIGV	肾、脑、肝、前列腺、白细胞
222	GVIAEILRGV	肺、肾脏、脑、肝脏
223	VLMQDSRLYL	肺
224	QLQEGKNVIGL	胰腺
225	YLYGQTTTYL	肺、肾、胃、肝、黑色素瘤、卵巢、食管
226	FLVDGSWSV	肺、胃、胰腺、乳腺、卵巢、食管
227	LTAPPEALLMV	肺、肾、脑、肝、胰腺、白细胞、卵巢、食管
228	SMSGYDQVL	肺、白细胞
229	YLLEKFVAV	肺、肝脏、卵巢
230	AMSSKFFLV	肺、脑、胃、肝、胰腺、前列腺、乳腺、卵巢、食管
231	RLFADILNDV	肺、脑、肝脏、前列腺、MCC、卵巢
232	RLLDSVSRL	肺、肾脏、肝脏、胰腺、乳腺、卵巢、食管
233	RLDDLKMTV	肺、肾脏、胰腺、乳腺、卵巢、食管
234	KMFESFIESV	肺、肾、脑、肝、前列腺、卵巢、食管
235	LLHEENFSV	肺、肾、肝脏、卵巢、食管
236	KMSELQTYV	肺、胰腺、黑色素瘤、卵巢、食管
237	KLVEFDLGA	肺、脑、胃、肝脏、MCC、卵巢、食管
238	NMLEAVHTI	肺、肝脏、黑色素瘤、卵巢、食管
239	QLIEKNWLL	肺、肝脏、白细胞、卵巢、食管
240	VLAPRVLRA	肺、肾、脑、肝、胰腺、卵巢

[0072]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
241	ILIDWLVQV	肺、肾、脑、肝、胰腺、卵巢、食管
242	RLEEDDGDVAM	肺、肾、脑、肝、胰腺、白细胞、乳腺、黑色素瘤
243	TLMDMRLSQV	肺、肾、脑、肝、前列腺、卵巢
244	SLHFLILYV	肺、肾、脑、肝、黑色素瘤
245	QLIDYERQL	肺、肾脏、肝脏、胰腺、乳腺、食管
246	GLTDNIHLV	肺、肾脏、胰腺、乳腺、卵巢、食管
247	SLDTLMTYV	肺、肾、脑、胰腺、前列腺、白细胞、食管
248	ALYGDIDAV	肺、脑、胰腺、食管
249	ALYGRLEV	MCC、卵巢、食管
250	ALCEENMRGV	肺、肾、脑、肝、MCC、食管
251	SLLQATDFMSL	肾脏、胰腺、食管
252	YVYQNNIYL	肺、胃、肝、胰腺、乳腺、黑色素瘤、卵巢、食管
253	KLLDEVTYLEA	肝脏
254	VLQFEALWHV	肝脏
255	ALALWIPSL	肺、胰腺、卵巢、食管
256	GLLEELVT	肺、胃、胰腺、卵巢
257	SLADFMQEV	肺、前列腺、MCC、卵巢
258	LLYEGKLT	乳腺、卵巢
259	ALADKELLPSV	肺、肾脏、肝脏、胰腺、前列腺、黑色素瘤、卵巢、食管
260	ALLAEGITWV	肝脏
261	YLYDSETKNA	肾、肝、胰腺、卵巢、食管
262	VLAKPGVISV	肺、胰腺
264	RLLDVLAPLV	肾、肝
265	LLDKKIGV	肾脏、卵巢、食管

[0073] 表4B: 本发明的肽及其在其他增殖性疾病(特别是其他癌性疾病)中的特定用途(表4A修订版)。该表(如表4A)显示,对于其他肿瘤类型的选定肽,发现他们过量提呈(特定提呈)于多于5%的测定肿瘤样本,或提呈于多于5%的测定肿瘤样本且肿瘤与正常组织的几何学平均值比值大于3。过度提呈定义为与最高提呈的正常样本相比,肿瘤样本中的提呈更高。经过度提呈的正常组织有:脂肪组织、肾上腺、血细胞、血管、骨髓、脑、食道、眼、胆囊、心脏、肾、大肠、肝、肺、淋巴结、神经、胰腺、甲状旁腺、腹膜、垂体、胸膜、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、甲状腺、气管、输尿管、膀胱。

[0074]

序列号	序列	其他实体
1	ALIKQLFEA	SCLC、GC、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
2	ALLPRYFFL	子宫癌
3	RLIPDTLYSV	黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
4	RLAELTVDEFL	CLL、黑色素瘤、膀胱癌、AML
6	FLAELPGSLSL	SCLC、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
8	ALMLQGVDLL	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、AML
11	YLFEKTFNM	SCLC、膀胱癌
13	FLLAEDTKV	膀胱癌、AML、NHL、OC
15	LQLDKEFQL	CLL、BRCA、膀胱癌、子宫癌、PC
16	VLVDQSWVL	食管癌、膀胱癌
18	FLSSLKGGLL	黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、AML
19	RLYTKLLNEA	黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
22	GLIDEVMVL	胆囊癌、胆管癌
23	FLDANGHFV	GC、食道癌、胆囊癌、胆管癌
25	SLADRLIGV	SCLC、BRCA、子宫癌
26	GLASKENFSNVS SL	膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
28	ALTEIQEFI	NSCLC、脑癌、HCC、BRCA、黑色素瘤、食道癌、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
29	QMLDVAIRV	BRCA
31	LLYGKYVSV	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌
32	KLNTETFGV	GC、BRCA、食管癌、AML
33	ALWEKNTHL	膀胱癌
34	ILLEKSVSV	BRCA、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌
35	KLLDLTVRI	胆囊癌、胆管癌
36	GLLESPSIFNFT A	BRCA
37	GLFAGLGGAGA	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
38	SLAPTPVSA	子宫癌
40	ALSNVIHKV	膀胱癌
42	SILDDSFKL	胆囊癌、胆管癌
43	TLDAAQPRV	PrC、食管癌
44	SLESKLTSV	黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌
45	ALAELLHGA	黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
46	GLDDRYSLV	膀胱癌
47	KLYERCEVV	黑色素瘤

[0075]

序列号	序列	其他实体
53	FLLGSEIKL	HCC、黑色素瘤、膀胱癌、AML
54	ALLNGEYLLAA	NSCLC、脑癌、GC、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
55	QIITSVVS	CLL、膀胱癌、子宫癌、AML
56	VLFTDEGVPKFL	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、OC
58	AMADKMDMSL	NSCLC、SCLC、BRCA、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
59	LLTDNVVKL	黑色素瘤、AML、NHL
61	KLLKLFQGV	黑色素瘤、AML
62	YLAPENGYL	SCLC、CLL、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
63	KLFSILSTV	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
64	KTLGKLWRL	黑色素瘤
66	GLDDGPDFL	黑色素瘤
67	SLNDLEKDVMLL	SCLC、膀胱癌、子宫癌、AML、NHL
71	RLWTEIPTAI	NSCLC、SCLC、黑色素瘤、食道癌、膀胱癌
72	YLLDYPNNLL	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、NHL、PC
74	YLMGFLHAV	BRCA、膀胱癌
75	EMIENIQSV	胆囊癌、胆管癌
77	SLLKRDFGA	SCLC、黑色素瘤、食道癌、膀胱癌、子宫癌、NHL
78	ALDPELLLL	AML
79	SLAADQLLKL	子宫癌
80	QVDEVVDIMRV	AML
81	ALLSQQTHL	膀胱癌、AML
82	QLYEEDPTKL	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
83	LTIEDGIFEV	NHL
84	SMVEDITGLRL	SCLC、OC、膀胱癌、子宫癌、NHL
87	LLFDAPDLRL	SCLC、BRCA、膀胱癌、子宫癌
88	KLDIKVETV	BRCA、膀胱癌
90	GLLKPGLNVVL	膀胱癌、AML
91	TVDVATPSV	CLL
93	SLQELRLLL	SCLC
97	ALWWGVVTV	CLL
98	AMNGKSFSV	NSCLC、SCLC、BRCA、黑色素瘤、OC、膀胱癌、胆

[0076]

序列号	序列	其他实体
		囊癌、胆管癌
99	KLLEVDLDTV	胆囊癌、胆管癌、AML
100	SLDDFLATA	PC、CLL、BRCA、黑色素瘤、食道癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
102	KILVSLIEV	NHL
103	FLFGYPKRL	NSCLC、SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、AML
105	YALDLSTFL	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、PC
107	ALLGGGPYML	膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
108	SLAELVPGVGGI	BRCA
109	ALDGDQMEL	AML
110	LLGELPRLLLL	黑色素瘤、食管癌、膀胱癌
113	ILYDLQQNL	SCLC、CLL、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
114	TAVGHALVL	BRCA、黑色素瘤、胆囊癌、胆管癌
116	LVYQFVHPI	膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
117	TLQPDNSTISL	子宫癌、胆囊癌、胆管癌
118	LLADLKTMTV	NHL
119	ILYQTVTGL	CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、白血病、NHL
120	VLYEGVDEV	SCLC、BRCA、胆囊癌、胆管癌
121	SLAPNIISQL	AML
123	KTLEERSYLL	SCLC、BRCA、膀胱癌、子宫癌、白血病、NHL、PC
124	RVLPPSALQSV	SCLC、BRCA、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL、PC
125	KLGDFFGLLVEL	SCLC、膀胱癌、AML、PC
126	TLAKYLMEL	SCLC、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
127	RLAELTVDEFL A	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、AML
128	MLDDRAYLV	PC
129	VLIDVLKEL	黑色素瘤、NHL
130	GLGGSQIDTHL	食管癌、子宫癌
131	KLLDVVHPA	CLL、BRCA、膀胱癌、子宫癌、AML、NHL
132	ALLNAILHSA	SCLC、CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、NHL、PC
133	RTFEKIEEV	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、AML、NHL
134	GVAGGSILKGV	CLL、BRCA、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
135	KLQEEIPVL	BRCA、黑色素瘤、NHL
136	KLFDIFSQQV	膀胱癌、子宫癌、NHL
137	QLTEIKPLL	CLL、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL

[0077]

序列号	序列	其他实体
138	KQFEGTVEI	CLL、NHL
139	VLLNEILEQV	SCLC、CLL、膀胱癌、子宫癌、白血病、NHL、PC
140	LLNEILEQV	SCLC、CLL、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
142	SLVQRVETI	SCLC、PC、BRCA、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
143	KLSDVWKEL	胆囊癌、胆管癌
144	LLNDRIWLA	BRCA、黑色素瘤、子宫癌
145	LLLEVVKQV	胆囊癌、胆管癌、NHL
146	ALSDETWGL	SCLC、CLL、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
147	TLTELRAFL	CLL、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
148	RLLNMTEVV	CLL、OC、膀胱癌、子宫癌、NHL
149	YQFDKVGILTL	SCLC、RCC、脑癌
150	RLADLEALKV	膀胱癌、NHL
152	KLLAVIHEL	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
153	ILFSEDSTKLFV	膀胱癌、NHL
154	KLPSETIFVGC	黑色素瘤、子宫癌、AML
155	RLLGEEVVRV	黑色素瘤
156	SLMMTIINL	SCLC、GC、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL、OC
158	GLLDPSVFHV	黑色素瘤、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
159	VLVDDDDGIKVV	SCLC、BRCA、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
160	KLLEFDQLQL	SCLC
161	FLKNELDNV	食管癌、膀胱癌、子宫癌、AML、NHL
162	KLMDYIDEL	NSCLC、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
163	RLLHEVQEL	RCC、AML、NHL
164	KMLDEILLQL	SCLC、RCC、CLL、黑色素瘤、OC、膀胱癌、AML、NHL
165	RLLDFPEAMVL	SCLC、CLL、膀胱癌、子宫癌
166	GLLEARGILGL	膀胱癌、AML、NHL
167	SVIDHIHLISV	SCLC、BRCA
168	GLIRFPLMTI	CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、AML
169	YLAHFIEGL	膀胱癌、OC
170	ALAGGITMV	CLL、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
171	RLQETEGMVAV	黑色素瘤、OC

序列号	序列	其他实体
172	LLLDTVTMQV	膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML
173	KLGDLMVLL	黑色素瘤、AML、NHL
174	ILLDDNMQIRL	SCLC、CLL、膀胱癌、AML
177	ALLQGAIESV	SCLC、GC、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
178	YLFREPATI	BRCA、膀胱癌、子宫癌、PC
179	RLLJPLSSA	AML、BRCA、PC、胆囊癌、HCC、黑色素瘤、NHL、OC、食管癌、脑癌、NSCLC、SCLC、子宫癌
180	NLLEIAPHL	NSCLC、黑色素瘤、OC、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML
181	NLFDLGGQYLR V	CLL、黑色素瘤、膀胱癌
[0078] 182	SLNKWIFTV	黑色素瘤
183	TLQEVVTGV	CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、NHL
184	SLLDENNVSSY L	SCLC、CLL、BRCA、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL、OC
185	VLYTGVRV	SCLC、BRCA、食管癌、AML、NHL
186	KMSEKILL	黑色素瘤
187	GLHNVVYGI	CLL、黑色素瘤、膀胱癌、NHL
188	FLVDGPRVQL	CLL、子宫癌
189	AISEVIGKITA	胆囊癌、胆管癌、PC
190	AMAEMVLQV	SCLC、CLL、BRCA、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
191	QLFSEIHNL	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL、PC

[0079] NSCLC=非小细胞肺癌、SCLC=小细胞肺癌、RCC=肾癌、CRC=结肠或直肠癌、GC=胃癌、HCC=肝癌、PC=胰腺癌、PrC=前列腺癌、BRCA=乳腺癌、MCC=梅克尔细胞癌、OC=卵巢癌、NHL=非霍奇金淋巴瘤、AML=急性骨髓性白血病、CLL=慢性淋巴细胞白血病。

[0080] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID No.1、3、4、6、11、15、26、31、40、45、56、59、62、72、77、79、84、87、88、90、102、107、110、117、123、124、125、126、128、131、132、133、134、135、139、140、141、142、143、151、152、153、154、156、157、160、161、165、167、168、170、178、184、190、192、194、203、204、205、206、208、210、212、214、215、216、217、218、222、223、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、250、252、255、256、257、259和262中任一项的本发明的至少一种肽在肺癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在肺癌的联合治疗中的用途。

[0081] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID No.1、11、19、31、44、45、58、63、72、103、108、118、125、126、128、131、132、133、137、157、158、162、163、164、169、178、180、181、191、194、201、205、207、208、209、210、216、217、221、222、227、230、231、234、237、240、241、242、243、244、247、248和250中任一项所述的本发明的至少一种肽在脑癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在脑癌的联合治疗中的用途。

[0082] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID No.65、70、133、146、225、226、230、237、252和256中任一项所述的本发明的至少一种肽在胃癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在胃癌的联合治疗中的用途。

[0083] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号31、45、48、53、56、61、70、72、83、88、102、105、108、117、123、129、133、141、142、146、147、152、157、158、160、168、170、172、184、194、199、203、205、206、209、210、211、217、218、221、222、225、227、232、233、234、235、240、241、242、243、244、245、246、247、250、251、259、261、264和265中任一项所述的本发明的至少一种肽在肾癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在肾癌的联合治疗中的用途。

[0084] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号6、10、26、31、33、45、47、54、56、59、62、63、71、72、76、79、84、88、89、98、103、105、108、117、121、123、124、126、131、132、133、134、136、139、142、148、153、154、156、157、158、159、161、166、168、169、170、171、174、178、181、184、191、193、194、195、204、205、206、207、208、209、210、214、216、217、220、221、222、225、227、229、230、231、232、234、235、237、238、239、240、241、242、243、244、245、250、252、253、254、259、260、261和264中任一项所述的本发明的至少一种肽在肝癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在肝癌的联合治疗中的用途。

[0085] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号3、8、38、40、44、53、55、110、116、117、146、152、170、184、198、201、203、205、209、212、224、226、227、230、232、233、236、240、241、242、245、246、247、248、251、252、255、256、259、261和262中任一项所述的本发明的至少一种肽在胰腺癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在胰腺癌的联合治疗中的用途。

[0086] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号25、45、48、63、69、70、101、103、116、131、178、183、184、187、204、205、206、214、216、220、221、230、231、234、243、247、257和259中任一项所述的本发明的至少一种肽在前列腺癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在前列腺癌的联合治疗中的用途。

[0087] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号6、8、29、31、58、67、72、80、82、83、110、118、121、129、149、153、154、160、161、169、171、173、180、185、199、221、227、228、239、242和247中任一项所述的本发明的至少一种肽在白血病治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在白血病的联合治疗中的用途。

[0088] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号3、45、72、77、91、116、128、133、146、161、180、183、188、200、214、226、230、232、233、242、245、246、252和258中任一项所述的本发明的至少一种肽在乳腺癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在乳腺癌的联合治疗中的用途。

[0089] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号33、83、123、124、128、139、143、153、27、37、41、43、53、59、61、67、72、76、78、80、82、133、171、184、197、231、237、249、250和257中任一项所述的本发明的至少一种肽在梅克尔细胞癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在梅克尔细胞癌的联合治疗中的用途。

[0090] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号6、13、58、62、67、83、88、92、118、124、125、134、139、140、142、145、149、153、156、159、161、167、170、172、174、177、178、184、185、188、199、202、216、225、236、238、242、244、252和259中任一项所述的本发明的至少一种肽在黑色素瘤治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在黑色素瘤的联合治疗中的用途。

[0091] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号1、3、4、6、16、18、25、31、34、44、45、54、57、63、72、74、87、88、91、102、108、116、123、124、125、126、127、128、131、132、133、134、137、139、140、142、146、152、153、154、159、160、161、165、167、172、174、175、177、178、181、184、185、189、193、194、195、202、203、204、205、206、208、214、215、216、217、225、226、227、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、243、246、249、252、255、256、257、258、259、261和265中任一项所述的本发明的至少一种肽在卵巢癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在卵巢癌的联合治疗中的用途。

[0092] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号1、3、11、15、19、26、31、37、40、46、54、59、62、63、65、70、72、81、82、83、84、88、89、90、98、102、117、119、123、124、125、126、128、132、133、134、138、139、141、142、144、152、153、154、155、157、158、162、169、170、177、178、184、186、192、194、197、200、202、205、210、212、214、215、216、217、225、226、227、230、232、233、234、235、236、237、238、239、241、245、246、247、248、249、250、251、252、255、259、261和265中任一项所述的本发明的至少一种肽在食管癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在食管癌的联合治疗中的用途。

[0093] 因此,本发明的另一个方面涉及本发明中肽在治疗选自CRC、肺癌、脑癌、胃癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌组中的增殖性疾病的用途,优选为这些肽在上述疾病的联合治疗中的用途。

[0094] 本发明还涉及本发明的肽,其具有与主要组织相容性复合体(MHC) I或以拉长形式存在的例如长度变化的-MHC-II类分子结合的能力。

[0095] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中所述肽(每种肽)系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191的氨基酸序列组成。

[0096] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽被修饰有和/或包含非肽键。

[0097] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽为融合蛋白的一部分,特别是与HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸融合,或与抗体(例如,树突状细胞特定抗体)或抗体的序列融合。

[0098] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明的肽。本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。

[0099] 本发明进一步涉及一种能表达和/或表达本发明核酸的表达载体。

[0100] 本发明进一步涉及本发明的肽、本发明的核酸或本发明的表达载体在疾病治疗或药物,特别是癌症治疗中的用途。

[0101] 本发明进一步涉及本发明中的肽或本发明中的肽复合体(含有MHC)的特异性抗体以及制造这些抗体的方法。

[0102] 本发明进一步涉及本发明的T细胞受体(TCR),特别是基因构建到自体或异体T细胞中的可溶性TCR(sTCRs)和克隆TCR,以及制造这些TCR的方法和载有所述TCR或所述TCR交叉反应的NK细胞。

[0103] 抗体和TCR是根据本发明的肽的免疫治疗用途的其他实施方案。

[0104] 本发明进一步涉及含本发明核酸或前述表达载体的宿主细胞。本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其为抗原提呈细胞,优选为树突细胞。

[0105] 本发明进一步涉及生产本发明一种肽的一种方法,所述方法包括培养本发明的宿

主细胞和从所述宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0106] 本发明进一步涉及本发明中的方法,其中通过使抗原与足够量的抗原提呈细胞接触,抗原被装载到表达于合适的抗原提呈细胞或人工抗原呈递细胞表面的I或II类MHC分子。

[0107] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中抗原提呈细胞包括能表达SEQ ID NO.1至SEQ ID NO.191、优选为含SEQ ID No.1至SEQ ID No.68或其变体氨基酸序列,或能表达含有SEQ ID NO.1至SEQ ID NO.191、优选为含SEQ ID No.1至SEQ ID No.68或其变体氨基酸序列的肽的表达载体。

[0108] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的激活的T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞表达含本发明氨基酸序列的多肽。

[0109] 本发明进一步涉及一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明任何氨基酸序列的多肽,该方法包括对患者施用按本发明方法制造的有效量T细胞。

[0110] 本发明进一步涉及任何所述的肽、本发明的核酸、本发明的表达载体、本发明的细胞、本发明的激活T淋巴细胞、T细胞受体或抗体或其他肽-和/或肽-MHC结合分子的作为药剂或在制造药剂中的用途。所述药剂优选为具有抗癌活性。

[0111] 优选情况为,所述药剂为基于可溶性TCR或抗体的细胞治疗药物、疫苗或蛋白。

[0112] 本发明还涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为CRC、肺癌、脑癌、胃癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌(MCC)、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌细胞,优选为CRC细胞。

[0113] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的生物标志物,在此称为“靶标”,其可用于诊断癌症,优选为CRC。所述标志物可以肽本身过度提呈或相应基因过表达。标志物也可以用于预测治疗成功的可能性,优选为免疫疗法,最优选为靶向作用于该生物标志物识别的相同靶目标免疫疗法。例如,抗体或可溶性TCR可用于染色肿瘤切片以检测是否存在相关肽与MHC复合。

[0114] 或者,抗体具有进一步的效应子功能,如免疫刺激域或毒素。

[0115] 本发明还涉及这些癌症治疗中新靶点的用途。

[0116] 针对其他癌症疾病的治疗和诊断用途在以下对于本发明肽的基础表达产物(多肽)的更详细描述中进行披露。

[0117] AKAP8(也称为AKAP95)编码A激酶锚定蛋白家族的一员,其包括包含用于蛋白激酶A(PKA)RI/RII亚基的结合结构域以及招募PKA和其他信号分子至特定亚细胞位置的支架蛋白。AKAP8结合至PKA的RII α 亚基,可能透过将PKA和凝集素复合体作用于染色质而在有丝分裂期在染色体凝集中发挥作用(RefSeq,2002)。AKAP8蛋白表达在直肠癌和肺癌中显著上调,并与细胞分化和组织病理学类型相关,这表明在肿瘤发生和发展中起重要作用。AKAP8的表达与细胞周期蛋白E和细胞周期蛋白D的表达相关(Chen et al.,2012;Hu et al.,2013;Qi et al.,2015)。

[0118] ARHGAP39(也称为Vilse或CrGAP)编码参与Roundabout(Robo)受体介导的排斥力轴突导向和调节RAC依赖性细胞骨架变化的Rho GTP酶激活蛋白(Hu et al.,2005)。

[0119] ARHGAP39常在膀胱癌细胞系中上调(Matsuda et al.,2011)。ARHGAP39参与内皮细胞的定向迁移(Kaur et al.,2008)。

[0120] AURKB (也称为AIM-1) 编码极光激酶B——丝氨酸/苏氨酸激酶的极光激酶亚族的一员。AURKB与其他蛋白一起透过与微管关联在有丝分裂和减数分裂过程中调节染色体的分离(RefSeq,2002)。AURKB表达在不同的癌症类型,包括肺、结直肠和乳腺癌以及白血病中上调,因而与预后不良相关。因此,AURKB抑制剂临床治疗的开发是一令人感兴趣的领域(Hayama et al.,2007;Pohl et al.,2011;Hegyi et al.,2012;Goldenson and Crispino,2015)。AURKB过表达导致组蛋白H3的磷酸化和染色体的不稳定,这是癌变的关键因素(Ota et al.,2002;Tatsuka et al.,1998)。AURKB活性增强了致癌Ras介导的细胞转化(Kanda et al.,2005)。

[0121] C18orf21 (也称为XTP13) 编码HIV感染抑制相关的异常血红蛋白 β 链肽(Liu et al.,2011a;Aschauer et al.,1983)。

[0122] CCNB1编码细胞周期蛋白B1,这是参与有丝分裂的一种调节蛋白。它有两个替代转录物,一个成型表达,一个主要在G2/M期表达(RefSeq,2002)。CCNB1编码细胞周期蛋白B1,这是参与有丝分裂的一种调节蛋白(RefSeq,2002)。CCNB1是一种经过充分描述的肿瘤抗原,在乳腺癌、头颈癌、前列腺癌、结直肠癌、肺癌和肝癌中过表达(Egloff et al.,2006)。CCNB1被证明在多种癌症实体(包括结直肠癌、乳腺癌、肺癌和肾癌)中上调。CCNB1的下调导致G2/M期细胞周期阻滞以及增殖和迁移的抑制(Chang et al.,2013;Sakurai et al.,2014;Fang et al.,2014;Ding et al.,2014)。CCNB1基因遗传多态性与中国汉族女性的乳腺癌易感性、进展和生存相关(Li et al.,2013)。

[0123] CCNB2编码细胞周期蛋白B2,这是在细胞周期调控中起作用的细胞周期蛋白家族中的一员(RefSeq,2002)。CCNB2在结直肠癌中上调(Park et al.,2007)。CCNB2在各种人肿瘤中过表达。CCNB2在肿瘤细胞中的强表达与肺腺癌和浸润性乳腺癌的不良预后相关(Takashima et al.,2014;Albulescu,2013)。

[0124] CCT7编码含有TCP1复合体(CCT)亚基7(ETA)的伴侣蛋白,它参与多种蛋白(包括肌动蛋白和微管蛋白)的ATP依赖性折迭。CCT7被发现是一种蛋白子网的一部分,该网络可明显判别晚期人结直肠癌(Nibbe et al.,2009)。

[0125] CDC42BPG (也称为MRCK γ) 编码CDC42结合蛋白激酶 γ (DMPK样),其为所述肌强直性营养不良激酶相关CDC42结合激酶家族的一员(Ng et al.,2004)。

[0126] CDC6编码DNA复制激活所需的蛋白(RefSeq,2002)。CDC6表达在不同癌症类型(包括胆囊、宫颈和前列腺癌)中失调(Wu et al.,2009;Wang et al.,2009c;Robles et al.,2002;Shu et al.,2012)。CDC6与c-Myc一起促进遗传不稳定性、肿瘤样转化和凋亡衰减(Chen et al.,2014a)。缺氧诱导的ATR促进CDC6的降解。DNA复制的激活由p53基因透过Cdc6蛋白稳定性调节(Duursma and Agami,2005;Martin et al.,2012)。

[0127] CENPE编码丝粒蛋白E,312kDa,即在细胞周期G2期中累积的一种驱动蛋白样动力蛋白。CENPE被认为是负责哺乳动物染色体运动和/或主轴伸长动力蛋白中一个(RefSeq,2002)。CENPE表达与胶质瘤级别显著相关,可能为神经胶质瘤患者预测生存时间补充其他参数(Bie et al.,2011)。与化疗敏感肿瘤相比,CENPE在化疗耐药的卵巢上皮性肿瘤中上调(Ju et al.,2009)。CENPE在浸润性和侵袭-浸润性垂体泌乳素瘤中上调(Wierinckx et al.,2007)。

[0128] CIRH1A (也称为Cirhin) 编码肝硬化常染色体隐性1A,这是一种位于核仁的含蛋白

的WD40重复蛋白。它会导致北美印第安人儿童肝硬化(NAIC) (RefSeq,2002)。CIRH1A可上调典型NF- κ B元素,可能参与在含NF- κ B元素的其他基因调控。这表明,CIRH1A可影响癌症相关NF- κ B通路(Yu et al.,2009)。

[0129] CNOT1编码CCR4-NOT去腺苷化酶复合体的酶相关亚基,它是翻译和mRNA稳定性的重要调节剂(Ito et al.,2011;Boland et al.,2013)。CNOT1基因中的单核苷酸多态性(SNP)在骨肉瘤和急性淋巴细胞白血病(ALL)中检测到(Gutierrez-Camino et al.,2014; Bilbao-Aldaiturriaga et al.,2015)。CNOT1耗竭诱导mRNA的稳定性和ER应激介导细胞凋亡的激活(Ito et al.,2011)。

[0130] COL12A1编码XII型胶原蛋白的 α 链,而XII型胶原蛋白是FACIT(三螺旋区不连续的纤维相关性胶原蛋白)胶原蛋白家族的一员,因而是细胞外基质(ECM)的一部分(RefSeq,2002)。COL12A1在卵巢癌细胞系的耐药变体中过表达(Januchowski et al.,2014)。在结直肠癌中,COL12A1在癌相关成纤维细胞周围促结缔组织增生基质中以及侵袭面内衬癌细胞中过表达(Karagiannis et al.,2012)。

[0131] CYP2W1编码酶是细胞色素P450超家族的一员,这些酶是单加氧酶,催化涉及药物代谢和胆固醇、类固醇和其他脂质合成的许多反应(RefSeq,2002)。CYP2W1在多种人类癌症(包括肝细胞癌、结直肠癌和胃癌)中过表达。CYP2W1过表达与肿瘤进展和不良预后相关(Aung et al.,2006;Gomez et al.,2010;Zhang et al.,2014e)。由于肿瘤特异性表达,CYP2W1是癌症治疗中的一个令人关注的药物靶标或前体药物酶激活剂(Karlgren and Ingelman-Sundberg,2007;Nishida et al.,2010)。

[0132] ECT2编码上皮细胞转化蛋白2,这是一种与Rho-特定交换因子和细胞周期调节剂相关的鸟嘌呤核苷酸交换因子和转化蛋白(RefSeq,2002)。ECT2过表达是各种人类肿瘤(包括肺癌、卵巢癌、胃癌和胰腺癌)的肿瘤特异性基因扩增的结果。ECT2对于细胞增殖、迁移、侵袭和致瘤性非常重要(Fields and Justilien,2010;Jin et al.,2014)。在卵巢癌中,蛋白激酶C ι 和ECT2透过MEK/ERK信令激活肿瘤起始细胞表型(Wang et al.,2013)。核ECT2优先结合至Rho GTP酶Rac1并透过Rac1活化导致细胞转化,而细胞质ECT2结合至RhoGTP酶RhoA并透过RhoA活化导致胞质裂沟的形成(Su et al.,2011;Huff et al.,2013)。

[0133] GPR56编码黏附G蛋白偶联受体G1 (ADGRG1),其调节大脑皮质形成。GPR56特异性结合至转谷氨酰胺酶2,一种肿瘤进展的抑制剂(RefSeq,2002)。在黑色素瘤和前列腺癌中,GPR56透过抑制肿瘤生长和转移从而抑制肿瘤发生。在其他癌症类型中的作用似乎很复杂,可能是由于GPR56不同剪接变体活化转录因子样蛋白以进行c-myc和p53反应的能力不同(Kim et al.,2010b;Xu et al.,2010;Yang and Xu,2012)。GPR56抑制VEGF从黑色素瘤细胞中产生,并透过涉及蛋白激酶C α 的信号传导途径阻碍它们的血管生成和生长(Yang et al.,2011a)。

[0134] HS6ST2编码硫酸肝素(HS)磺基转移酶基因家族的一员。HS6ST2催化硫酸盐转移至HS(RefSeq,2002)。HS6ST2在不同的癌症类型(包括甲状腺癌、结直肠癌和卵巢癌)中过表达,并与迁移、侵袭和不良预后相关(Backen et al.,2007;Hatabe et al.,2013;Di et al.,2014)。TGF- β 透过刺激产生HS6ST2和IL-11而促进癌转移(Pollari et al.,2012)。HS6ST2是血管生成以回应于EGF、FGF2和VEGF信号途径的调节剂(Ferreras et al.,2012; Cole et al.,2014)。

[0135] IER3 (也称为IEX-1) 编码即刻早期应答基因3, 其具有保护细胞免受Fas-或肿瘤坏死因子 α -诱导的细胞凋亡的功能 (RefSeq, 2002)。卵巢癌、胰腺癌、血癌、乳腺癌和结肠癌、淋巴瘤和骨髓瘤中IER3表达去调节与较差或较好的预后相关, 这取决于肿瘤的类型和进展阶段, 并且使得该蛋白 (单独或与其他基因一起) 成为一种有价值的生物标志物 (Wu et al., 2013)。IER3基因表达透过一正或负的方式在调节细胞凋亡和细胞生长中起重要作用。IER3过表达使某些细胞对凋亡敏感并加速细胞周期进展, 但降低其他细胞的增殖, 而IER3表达的破坏与细胞凋亡和细胞周期进展的减少相关 (Zhang et al., 2011a)。IER3干扰某些信号通路, 尤其是NF- κ B、MAPK/ERK和PI3K/Akt。小鼠模型还显示在免疫功能中涉及IER3表达 (Arlt and Schafer, 2011; Wu, 2003)。

[0136] ITPR3编码含有一个C-末端钙通道和一个N-末端配体结合位点的肌醇1,4,5-三磷酸的受体。ITPR3在引起能量代谢和生长的外分泌中起作用 (RefSeq, 2002)。ITPR3在几种癌症类型 (包括结直肠癌、胃癌、乳腺癌) 中过表达, 与癌症进展和肿瘤侵袭性直接相关 (Shibao et al., 2010; Mound et al., 2013; Sakakura et al., 2003)。Akt可透过减少内质网的Ca²⁺释放而以ITPR3依赖性方式保护细胞不发生凋亡 (Marchi et al., 2012)。

[0137] KCNN4 (也称为KCa3.1或hIKCa1) 编码被细胞内钙激活的异四聚体电压无关钾信道的一部分。该通道激活后是促进钙流入的膜超极化 (RefSeq, 2002)。KCNN4在若干癌症 (包括乳腺癌、肺癌和前列腺癌) 中上调, 与细胞增殖和肿瘤生长有关 (Chou et al., 2008; Lallet-Daher et al., 2009; Haren et al., 2010; Bulk et al., 2015)。KCNN4的抑制调节活性氧 (ROS) 水平和促进p53活化, 其抑制细胞生长和迁移并导致细胞凋亡 (Liu et al., 2015b)。KIRREL (也称为NEPH1) 编码肾病蛋白样蛋白家族的一员, 这些成员与足蛋白的胞质域相互作用 (RefSeq, 2002)。

[0138] KLK10 (也称为NES1) 编码丝氨酸蛋白酶激肽释放酶亚家族的一员, 其在肿瘤中发挥作用并且是潜在的生物标志物 (RefSeq, 2002)。KLK10在结肠癌、卵巢癌和胃癌中上调, 但在乳腺癌、肺癌和前列腺癌中下调 (Yousef et al., 2005; Feng et al., 2006; Zhang et al., 2010; Li et al., 2001)。KLK10的表现遗传沉寂由TGF β /Smad蛋白信令维持, 而KLK10上调被激活的Ras/MEK/ERK和PI3K/Akt信号传导促进 (Paliouras and Diamandis, 2008; Papageorgis et al., 2010)。

[0139] LIG1是参与核苷酸切除修复 (NER) 和碱基切除修复 (BER) 途径的DNA修复基因。LIG1单核苷酸多态性与肺癌、子宫内膜癌和神经胶质瘤的风险相关 (Doherty et al., 2011; Lee et al., 2008b; Liu et al., 2009)。

[0140] LSG1编码大60S亚基核xxport GTP酶1。该蛋白是细胞生存力所必需的, 可位于内质网、细胞核和细胞质 (RefSeq, 2002)。

[0141] LSM14B (也称为RAP55B) 编码LSM (如Sm) 结构域家族的一员, 其参与RNA代谢、有丝分裂G2/M期调节、翻译抑制、掺入MRNP颗粒、P体形成和应力颗粒定位 (Marnef et al., 2009; Albrecht and Lengauer, 2004)。

[0142] MAGED2编码黑色素瘤抗原家族D, 2, 是Xp11.2 (X连锁智力低下的热点) 中一个新定义的MAGE-D集群成员。MAGED2在特定脑区和在睾丸间质普遍呈高水平表达。

[0143] MAGED2是野生型p53活性的电位负调节剂 (Langnaese et al., 2001; Papageorgio et al., 2007)。MAGED2过表达与黑色素瘤、乳腺癌和结肠癌有关 (Li et al., 2004;

Strekalova et al.,2015)。

[0144] MAGEF1编码包含微卫星重复蛋白并广泛表达的黑色素瘤抗原(MAGE)超家族的成员,表明在正常细胞生理学中发挥作用(Stone et al.,2001)。夫拉平度诱导人肿瘤细胞增殖的抑制以及在不同人类肿瘤细胞系中MAGEF1的下调(Lu et al.,2004)。MAGEF1是在结直肠癌组织中过表达(Chung et al.,2010)。

[0145] MDH1编码苹果酸脱氢酶,这种酶在柠檬酸循环中利用NAD/NADH辅助因子系统催化苹果酸盐的可逆氧化至草酰乙酸。MDH1定位于细胞质,可能在苹果酸-天冬氨酸穿梭中起着举足轻重的作用,这作用于细胞溶质和线粒体之间的代谢协调(RefSeq,2002)。在胶质母细胞瘤中,MDH1是几种去调节微小RNA的靶标,其表达受到抑制。再加上已知的肿瘤抑制剂或致癌基因,MDH1可有助于区分低级别与高级别胶质瘤(Lages et al.,2011;Kounelakis et al.,2013)。MDH1在空细胞垂体腺瘤和甲状腺嗜酸细胞瘤中过表达(Hu et al.,2007;Baris et al.,2004)。

[0146] MYO10编码表示非传统肌球蛋白的肌球蛋白超家族的一员。它用作基于肌动蛋白的分子马达并在减数分裂期间起着F-肌动蛋白和微管细胞骨架的整合作用(RefSeq,2002)。MYO10在几种癌症实体(包括乳腺癌和肺癌)中过表达,并与转移、细胞迁移和侵袭性表型相关(Cao et al.,2014;Sun et al.,2015b;Courson and Cheney,2015)。变型p53促进NCAPG编码非SMC缩合I复合体亚基G,其负责有丝分裂和减数分裂期间染色体的缩合和稳定(RefSeq,2002)。NCAPG在多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病患者中以及来自血液的白血病细胞或骨髓瘤细胞中下调(Cohen et al.,2014)。NCAPG可能是结直肠癌的多重抗药性基因(Li et al.,2012)。NCAPG在嫌色亚型人类细胞癌中高度上调,但在常规人类肾细胞癌中不是这样(Kim et al.,2010a)。NCAPG上调与黑色素瘤进展相关(Ryu et al.,2007)。NCAPG与葡萄膜黑色素瘤相关(Van Ginkel et al.,1998)。NCAPG在不同肿瘤细胞中表现出不同表达(Jager et al.,2000)。

[0147] NDRG3编码N-myc下游调控基因的一员,其在睾丸、前列腺和卵巢中高度表达,并可能在精子形成中发挥作用(Zhao et al.,2001)。NDRG3可在不同癌症类型(包括膀胱癌)中作为肿瘤抑制基因(Yang et al.,2013;Tsui et al.,2015)。NDRG3充当前列腺癌的肿瘤激活子,其中上调表达导致生长速率加快、迁移率更高和诱导血管生成趋化因子。NDRG3上调与在肝癌细胞中的恶性表型相关(Wang et al.,2009b;Fan et al.,2011)。

[0148] NOL11编码核仁蛋白11,其是核糖体合成最优rDNA转录所需的(Freed et al.,2012;Griffin et al.,2015)。Nol11是乳房和卵巢肿瘤抑制BRCA1的交互作用基因(Hill et al.,2014)。

[0149] PLAGL2编码多形性腺瘤基因(PLAG)家族的一员,是识别DNA和/或RNA的一种锌指蛋白(Kas et al.,1998)。PLAGL2用作各种癌症(包括白血病、神经胶质瘤、结直肠癌和肺癌腺癌)的原癌基因。也有证据证明,PLAGL2可透过激活细胞周期阻滞和凋亡充当肿瘤抑制因子(Yang et al.,2011b;Hanks and Gauss,2012;Liu et al.,2014a)。PLAGL2阻止E3泛素连接酶PIRH2(调节p53稳定性)的蛋白酶体降解。PLAGL2表达也增加p73水平和上调p73靶基因,如p21和Bax(Zheng et al.,2007;Hanks and Gauss,2012;Landrette et al.,2005)。

[0150] PTC2D编码可能涉及加工RNA转录(包括源自线粒体DNA的细胞色素b)的三角状五肽重复结构域蛋白2。这种蛋白的功能障碍在心脏衰竭病因中起着可能的作用(Xu et al.,

2008)。

[0151] RAD54编码属于DEAD样解旋酶家族的一种蛋白。酿酒酵母RAD54和RDH54具有相似性,两者均参与DNA同源重组和修复。该蛋白结合至双链DNA,并在存在DNA时显示ATP酶活性。该基因在睾丸和脾脏中高度表达,这表明在减数分裂和有丝分裂重组中具有活性作用(RefSeq,2002)。在原发性淋巴瘤和结肠癌观察到了RAD54B的纯合突变(Hiramoto et al.,1999)。RAD54B抵消了人类肿瘤细胞中RAD51直接结合至dsDNA的基因组不稳定影响(Mason et al.,2015)。

[0152] RNASEH2A编码异源三聚体II型核糖核酸酶H酶的成分,且是其活性的主要来源。

[0153] RNASEH2A是一种核酸内切酶,预期可在滞后链DNA合成期间去除冈崎片段RNA引物(RefSeq,2002)。RNASEH2A在转化间质干细胞中上调,在许多癌细胞(包括侵袭性前列腺癌)中过表达。RNASEH2A敲减抑制了锚定非依赖性生长,但没有改变癌细胞的增殖(Flanagan et al.,2009;Williams et al.,2014)。

[0154] RRM1编码核苷酸还原酶M1,是在分裂细胞S期中DNA合成之前产生脱氧核糖核苷酸必需的酶。它是位于11p15.5印迹基因域(一个重要的肿瘤抑制基因区)的几个基因之一(RefSeq,2002)。RRM1参与细胞增殖、细胞迁移、肿瘤发生和转移进展的调节。针对不同类型癌症(如肺癌、胰腺癌、乳腺癌和胃癌)的大量研究确定了RRM1的预后或预测值(Carvalho et al.,2009;Jordheim et al.,2011;Wang et al.,2013d)。核苷类似物吉西他滨(癌症治疗中一种常见的化疗药物)靶向作用于RRM1(Jordheim and Dumontet,2013)。

[0155] SERPINB5(也称为乳腺丝抑蛋白)编码根据其促进细胞凋亡和抑制细胞侵袭和血管生成的能力表征为II类肿瘤抑制因子的丝氨酸蛋白酶抑制剂分化体B成员5(Bailey et al.,2006)。SERPINB5是很多癌症类型(包括乳腺癌、肺癌、头颈癌、口腔癌和前列腺癌)诊断一个有价值的分子标志物和预后的预测因子(Marioni et al.,2009;Lonardo et al.,2010;Sager et al.,1996;Sheng,2004)。SERPINB5充当HDAC1活性的内源性调节剂,并与p53肿瘤抑制途径相互作用(Maass et al.,2000;Kaplun et al.,2012)。

[0156] SEZ6L2编码定位于细胞表面并在胰腺β细胞中富集的癫痫发作相关蛋白(RefSeq,2002;Stutzer et al.,2013)。SEZ6L2的表达在肺癌中上调,较高的表达水平与较短的生存期相关(Ishikawa et al.,2006)。

[0157] SMARCA4(也称为BRG1)编码解旋酶和含有SWI/SNF家族(大ATP依赖性染色质重塑复合体SWI/SNF的一部分)蛋白的ATP酶的一员。该复合体是染色质正常抑制基因转录激活所需要的(RefSeq,2002)。SMARCA4充当一种肿瘤抑制剂,并透过突变在不同癌症实体(包括乳腺癌、肺癌和结肠癌)中下调。低SMARCA4水平与肿瘤进展(如突变和侵袭)有关(Medina and Sanchez-Cespedes,2008;Bai et al.,2013b;Reisman et al.,2003;Wang et al.,2016)。SMARCA4涉及到集中肿瘤抑制因子和重要的肿瘤相关蛋白,如p53、p16INK4a、hTERT和Akt(Medina and Sanchez-Cespedes,2008;Becker et al.,2009;Naidu et al.,2009;Liu et al.,2014b;Wu et al.,2014a)。

[0158] SMC2(也称为CAP-E或SMC2L1)编码结构维持染色体家族的一员,对于有丝分裂染色体浓缩和DNA修复很关键(RefSeq,2002)。SMC2基因被胃癌和结直肠癌中移码突变和表达缺失以及微卫星不稳定性改变,表明SMC2可能参与肿瘤的发病过程(Je et al.,2014)。SMC2基因改变可能在基因组不稳定性中发挥作用,从而加速其他改变在脓胸相关淋巴瘤中

积聚 (Ham et al., 2007)。

[0159] SVIL编码黏着斑蛋白,这是一种具有鲜明的氨基和羧基末端结构域的偶蛋白,其似乎在细胞扩散和黏着斑分解过程中协助肌凝蛋白II的装配 (RefSeq, 2002)。SVIL主要透过激活子甲基化在前列腺癌组织中显著下调 (Vanaja et al., 2006)。SVIL透过p53水平的控制调节细胞的存活。SVIL表达是生存信号传导和细胞运动途径之间的串扰所必需的 (Fang and Luna, 2013)。

[0160] TMEM222编码位于染色体1p36.11的跨膜蛋白222 (RefSeq, 2002)。

[0161] ZNF679编码含有一种含KRAB (Krüppel相关盒) 结构域的锌指蛋白,其充当为转录因子。ZNF679的激活子区由辅抑制物KAP1和H3me3K9 (赖氨酸的组蛋白3三甲基化9) 结合 (O' Geen et al., 2007)。

具体实施方式

[0162] 是否能刺激免疫反应取决于是否存在被宿主免疫系统视为异物的抗原。发现肿瘤相关抗原的存在增加了运用宿主免疫系统干预肿瘤生长的可能性。目前,针对癌症免疫治疗,正在探索利用免疫系统的体液和细胞进行免疫的各种机制。

[0163] 细胞免疫反应的特定元素能特异性地识别和破坏肿瘤细胞。从肿瘤浸润细胞群或外周血中分离出的T-细胞表明,这些细胞在癌症的天然免疫防御中发挥了重要作用。特别是CD8阳性T细胞在这种反应中发挥重要作用,TCD8⁺能识别通常8至10个源自蛋白或位于细胞质的缺损核糖体产物 (DRIP) 的氨基酸残基的主要组织相容性复合体 (MHC) 所载的肽中所含的I类分子。人MHC分子也称为人白细胞-抗原 (HLA)。

[0164] 除非另有说明,否则本文使用的所有术语定义如下。

[0165] 术语“T细胞反应”是指由一种肽在体外或体内诱导的效应子功能的特异性扩散和激活。对于MHC I类限制性细胞毒性T细胞,效应子功能可能为溶解肽脉冲的、肽前体脉冲的或天然肽提呈的靶细胞、分泌细胞因子,优选为肽诱导的干扰素- γ , TNF- α 或IL-2,分泌效应分子,优选为肽诱导的颗粒酶或穿孔素,或脱颗粒。

[0166] 本文所用“肽”这一术语,系指一系列氨基酸残基,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羧基之间的肽键来连接。这些肽的长度优选为9个氨基酸,但至短可为8个氨基酸长度,至长可为10、11、12、13或14个氨基酸长度或更长,如果为MHC-II类肽时 (本发明肽的拉长变体),至长可为15、16、17、18、19或20个氨基酸长度或更长。

[0167] 因此,“肽”这一术语应包括一系列氨基酸残基的盐,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羧基之间的肽键来连接。优选的情况是,盐为肽的药学可接受的盐,例如:氯化物或乙酸 (三氟乙酸) 盐。必须注意的是,本发明肽的盐与其体内状态的肽基本上不同,因为该不是体内的盐。

[0168] 术语“肽”应也包括“寡肽”。本文使用的术语“寡肽”是指一系列氨基酸残基,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羧基之间的肽键来连接。寡肽的长度对于本发明来说并不十分关键,只要在寡肽中保持正确的表位即可。通常,寡肽长度约小于30个氨基酸残基,约长于15个氨基酸。

[0169] “多肽”这一术语是指一系列氨基酸残基,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羧基之间的肽键来连接。多肽的长度对于本发明来说并不十分关键,只要保持正确的表位即可。与

术语肽或寡肽相对,“多肽”这一术语是指包含多于约30个氨基酸残基的分子。

[0170] 一种肽、寡肽、蛋白或编码该分子的核苷酸如果能诱导免疫反应,则具有“免疫原性”(因此是本发明中的一种“免疫原”)。在本发明的情况下,免疫原性的更具体定义是诱导T细胞反应的能力。因此,“免疫原”是一种能够诱导免疫反应的分子,并且在本发明的情况下,是一种能诱导T细胞反应的分子。在另一方面,所述免疫原可以是肽,肽与MHC的复合体、和/或用于提高特异性抗体或TCR抗性的蛋白。

[0171] I类T细胞“表位”要求的是一种结合至MHC I类受体上的短肽,从而形成一种三元复合体(MHC I类 α 链、 β -2-微球蛋白和肽),其可以通过T细胞负载匹配T细胞受体与具有适当亲和力的MHC/肽复合物结合来识别。结合至MHC I类分子的肽的典型长度为8-14个氨基酸,最典型为9个氨基酸长度。

[0172] 在人类中,有三种编码MHC I类分子的不同基因位点(人MHC分子也是指定的人白细胞抗原(HLA)):HLA-A、HLA-B和HLA-C。HLA-A*01、HLA-A*02和HLA-B*07是可从这些基因位点表达的不同MHC I类等位基因的实例。

[0173] 表5:HLA-A*02和HLA-A*24和最常见HLA-DR血清类型的表达频率F。频率根据Mori等人(Mori et al.,1997)使用的Hardy-Weinberg公式 $F=1-(1-Gf)^2$ 改编,从美国人群范围内的单体型频率中推导出。由于连锁不平衡,某些HLA-DR等位基因内的A*02或A*24组合与其预期单一频率相比,可能是浓缩的或频率较低。有关详细信息,请参阅Chanock等人的文献(Chanock et al.,2004)。

[0174]

等 位 基 因	人 群	根据等位基因频率算得的显 型
A*02	高加索人（北美）	49.1%
A*02	非裔美国人（北美）	34.1%
A*02	亚裔美国人（北美）	43.2%
A*02	拉丁美洲（北美）	48.3%
DR1	高加索人（北美）	19.4%
DR2	高加索人（北美）	28.2%
DR3	高加索人（北美）	20.6%
DR4	高加索人（北美）	30.7%
DR5	高加索人（北美）	23.3%
DR6	高加索人（北美）	26.7%
DR7	高加索人（北美）	24.8%
DR8	高加索人（北美）	5.7%
DR9	高加索人（北美）	2.1%
DR1	非裔（北）美人	13.20%
DR2	非裔（北）美人	29.80%
DR3	非裔（北）美人	24.80%
DR4	非裔（北）美人	11.10%
DR5	非裔（北）美人	31.10%
DR6	非裔（北）美人	33.70%
DR7	非裔（北）美人	19.20%
DR8	非裔（北）美人	12.10%
DR9	非裔（北）美人	5.80%
DR1	亚裔（北）美人	6.80%

[0175]

等 位 基 因	人 群	根据等位基因频率算得的显 型
DR2	亚裔（北）美人	33.80%
DR3	亚裔（北）美人	9.20%
DR4	亚裔（北）美人	28.60%
DR5	亚裔（北）美人	30.00%
DR6	亚裔（北）美人	25.10%
DR7	亚裔（北）美人	13.40%
DR8	亚裔（北）美人	12.70%
DR9	亚裔（北）美人	18.60%
DR1	拉丁裔（北）美人	15.30%
DR2	拉丁裔（北）美人	21.20%
DR3	拉丁裔（北）美人	15.20%
DR4	拉丁裔（北）美人	36.80%
DR5	拉丁裔（北）美人	20.00%
DR6	拉丁裔（北）美人	31.10%
DR7	拉丁裔（北）美人	20.20%
DR8	拉丁裔（北）美人	18.60%
DR9	拉丁裔（北）美人	2.10%
A*24	菲律宾	65%
A*24	俄罗斯涅涅茨人	61%
A*24:02	日本	59%
A*24	马来西亚	58%
A*24:02	菲律宾	54%
A*24	印度	47%
A*24	韩国	40%
A*24	斯里兰卡人	37%

[0176]	等位基因	人群	根据等位基因频率算得的显型
	A*24	中国	32%
	A*24:02	印度	29%
	A*24	澳大利亚西部人	22%
	A*24	美国	22%
	A*24	俄罗斯萨马拉人	20%
	A*24	南美	20%
	A*24	欧洲	18%

[0177] 本发明的肽,优选当如本文描述纳入本发明的疫苗时与A*02。疫苗还可能包括泛结合MHC II类肽。因此,本发明的疫苗可用于治疗A*02阳性患者中的癌症,但不因为这些肽的广泛结核性而必须选择II类MHC同种异型。

[0178] 如果本发明的A*02肽与结合至另一等位基因例如A*24的肽组合,与单独的MHC I类等位基因相比,可治疗更高比例的患者群体。虽然在大多数人群中,低于50%的患者可由单独的等位基因来解决问题,但是本发明中一种含HLA-A*24和HLA-A*02表位的疫苗可以治疗任何相关人群中至少60%的患者。具体来说,各区域中,以下比例的患者这些等位基因中的至少一个有肯定效果:美国61%、西欧62%、中国75%、韩国77%、日本86%(根据www.allele frequencies.net计算)。

[0179] 在一项优选的实施方案中,术语“核苷酸序列”系指脱氧核苷酸的杂聚物。

[0180] 编码特定肽、寡肽或多肽的核苷酸序列可为天然核苷酸序列,也可合成核苷酸序列。一般来说,编码肽、多肽以及本发明蛋白的DNA片段由cDNA片段和短寡核苷酸衔接物,或一系列寡核苷酸组成,以提供一种合成基因,该基因能够在包含源自微生物或病毒操纵子的调节元素的重组转录单元中被表达。

[0181] 如本文所用的术语“肽的核苷酸编码”系指对肽进行核苷酸序列编码,其中该肽包括与将由用于产生TCR的树突细胞或另一细胞系统所表达该序列的生物系统兼容的人工(人造)激活和停止密码子。

[0182] 本文提到的核酸序列既包括单链核酸也包括双链核酸。因此,除非本文另有所指,否则,例如对于DNA,具体的序列是该序列的单链DNA、该序列与其互补序列的双工(双链DNA)以及该序列的互补序列。

[0183] “编码区”这一术语是指在基因的天然基因组环境中天然或正常编码该基因的表达产物的那部分基因,即,体内编码该基因的天然表达产物的区域。

[0184] 编码区可来自非突变(“正常”)基因、突变基因或异常基因,甚至还可以来自DNA序列,完全可在实验室中使用本领域熟知的DNA合成方法合成。

[0185] “表达产物”这一术语是指多肽或蛋白,它是基因和遗传码退化并因而编码同样的氨基酸所造成的任何核酸序列编码同等物的翻译产物。

[0186] “片段”这一术语,当指的是一种编码序列时,表示包含非完整编码区的DNA的一部分,其表达产物与完整编码区表达产物基本上具有相同的生物学功能或活性。

[0187] “DNA片段”这一术语是指一种DNA聚合物,以单独的片段形式或一种较大DNA结构的组分形式存在,它们从至少分离过一次的DNA中以基本纯净的形式获得,即不含污染性内源性材料,并且获得的数量或浓度能够使用标准生化方法,例如使用克隆载体,进行识别、操纵和回收该片段及其组分核苷酸序列。此类片段以开放阅读框架(未被内部未翻译序列打断)或内含子(通常提呈于真核基因中)的形式存在。未翻译DNA序列可能存在于开放阅读框架的下游,在那里其不会干预编码区的操纵或表达。

[0188] “引物”这一术语应当表示一种短核酸序列,其可与一个DNA链配对,并在DNA聚合酶开始合成脱氧核糖核酸链之处提供一个游离的3'-OH末端。

[0189] “激活子”这一术语应当表示参与RNA聚合酶的结合从而激活转录的DNA区域。

[0190] 术语“分离”应当表示一种物质从其原来的环境(例如,如果是天然发生的则是天然环境)中被移走。例如,活体动物中的天然核苷酸或多肽不是分离的,但是,从天然系统中一些或所有共存物质中分离出来的核苷酸或多肽是分离的。此类多核苷酸可能是载体的一部分和/或此类多核苷酸和多肽可能是一种组合物的一部分,并且由于该载体或组合物不是其天然环境的一部分,因此它仍然是分离的。

[0191] 本发明中披露的多核苷酸和重组或免疫原性多肽也可能以“纯化”的形式存在。术语“纯化”并非要求绝对的纯度;它只是一个相对的定义,可以包括高度纯化或部分纯化的制剂,相关领域技术人员能理解这些术语。例如,各个从已用传统方法纯化为具有电泳同构型的cDNA库中分离出的各种克隆物。明确考虑到将起始材料或天然物质纯化至少一个数量级,优选为两或三个数量级,更优选为四或五个数量级。此外,明确涵盖所述多肽的纯度优选为99.999%,或至少为99.99%或99.9%;甚而适宜为以重量计99%或更高。

[0192] 根据本发明公开的核酸和多肽表达产物,以及包含此类核酸和/或多肽的表达载体可能以“浓缩的形式”存在。本文使用的术语“浓缩”是指材料的浓度至少是其自然浓度的大约2、5、10、100或1000倍,有优势的是,按重量计为0.01%,优选为至少0.1%。也明确考虑到,按重量计约为0.5%、1%、5%、10%和20%的浓缩制剂。序列、构型、载体、克隆物以及包含本发明的其他材料可有优势地以浓缩或分离的形式存在。“活性片段”这一术语是指产生免疫反应的片段(即具有免疫原性活性),通常是一种肽、多肽或核酸序列的片段,不论是单独或可选地与合适的佐剂一起或在载体中给予一种动物,比如哺乳动物,例如兔子或小鼠,也包括人;这种免疫反应采用的形式是在接受动物(如:人)体内刺激T细胞反应。或者,“活性片段”也可用于诱导体外T细胞反应。

[0193] 本文使用的“部分”(portion)、“节段”(segment)、“片段”(fragment)这几个术语,当与多肽相关地使用时是指残基的连续序列,比如氨基酸残基,其序列形成一个较大序列的子集。例如,如果一个多肽以任一种肽链内切肽酶(如胰蛋白酶或糜蛋白酶)进行处理,则该处理获得的寡肽会代表起始多肽的部分、节段或片段。当与多核苷酸相关地使用时,这些术语系指用任何核酸内切酶处理所述多核苷酸产生的产物。

[0194] 根据本发明,术语“等同度百分比”或“等同百分比”,如果指的是序列,则表示在待对比序列(“被对比序列”)与所述序列或权利要求的序列(“参考序列”)对准之后将被对比序列与所述序列或权利要求的序列进行比较。然后根据下列公式计算等同度百分比:等同度百分比=100[1-(C/R)]

[0195] 其中C是参考序列与被对比序列之间对准长度上参考序列与被对比序列之间的差

异数量,其中

[0196] (i) 参考序列中每个碱基或氨基酸序列在被对比序列中没有对应的对准碱基或氨基酸;

[0197] (ii) 参考序列中每个空隙,以及

[0198] (iii) 参考序列中每个对准碱基或氨基酸与被对比序列中对准碱基或氨基酸不同,即构成一个差异以及

[0199] (iiii) 必须在对准序列的第1位置开始对准;

[0200] 并且R是参考序列与被对比序列对准长度上在参考序列中产生任何空隙也计算为一个碱基或氨基酸的参考序列中的碱基或氨基酸数目。

[0201] 如果“被对比序列”和“参考序列”之间存在的一个对准按上述计算的等同度百分比大致等于或大于指定的最低等同度百分比,则被对比序列与参考序列具有指定的最低等同度百分比,虽然可能存在按本文上述计算的等同度百分比低于指定等同度百分比的对准。

[0202] 因此,如上所述,本发明提出了一种肽,其包括选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191群组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191具有88%同源性的其变体、或诱导与该肽发生T细胞交叉反应的一个变体。本发明所述的肽具有与主要组织相容性复合体(MHC) I或所述肽拉长版本的II类分子结合的能力。

[0203] 在本发明中,“同源性”一词系指两个氨基酸序列之间的同一度(参见上文的等同度百分比,如肽或多肽序列。前文所述的“同源”是通过将理想条件下调整的两个序列与待比较序列进行比对后确定的。此类序列同源性可通过使用ClustalW等算法创建一个排列而进行计算。也可用使用一般序列分析软件,更具体地说,是VectorNTI、GENETYX或由公共数据库提供的其他工具。

[0204] 本领域技术人员能评估特定肽变体诱导的T细胞是否可与该肽本身发生交叉反应(Appay et al.,2006;Colombetti et al.,2006;Fong et al.,2001;Zaremba et al.,1997)。

[0205] 发明人用给定氨基酸序列的“变体”表示,一个或两个氨基酸残基等的侧链通过被另一个天然氨基酸残基的侧链或其他侧链取代而发生改变,这样,这种肽仍然能够以含有给定氨基酸序列(由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191组成)的肽大致同样的方式与HLA分子结合。例如,一种肽可能被修饰以便至少维持(如没有提高)其能与HLA-A*02或-DR等合适MHC分子的结合槽相互作用和结合,以及至少维持(如没有提高)其与激活T细胞的TCR结合的能力。

[0206] 随后,这些T细胞可与细胞和杀伤细胞发生交叉反应,这些细胞表达多肽(其中包含本发明中定义的同源肽的天然氨基酸序列)。正如科学文献和数据库(Rammensee et al.,1999;Godkin et al.,1997)中所述,HLA-A结合肽的某些位点通常为锚定残基,可形成一种与HLA结合槽的结合模式相称的核心序列,其定义由构成结合槽的多肽链的极性、电物理、疏水性和空间特性确定。因此,本领域技术人员能够通过保持已知的锚残基来修饰SEQ ID No:1至SEQ ID NO:191列出的氨基酸序列,并且能确定这些变体是否保持与MHC I或II类分子结合的能力。本发明的变体保持与激活T细胞的TCR结合的能力,随后,这些T细胞可与表达一种包含本发明定义的同源肽的天然氨基酸序列的多肽的细胞发生交叉反应并杀

死该等细胞。

[0207] 如果无另有说明,那么本文公开的原始(未修饰)肽可以通过在肽链内的不同(可能为选择性)位点上取代一个或多个残基而被修饰。优选情况是,这些取代位于氨基酸链的末端。此取代可能是保守性的,例如,其中一个氨基酸被具有类似结构和特点的另一个氨基酸所取代,比如其中一个疏水性氨基酸被另一个疏水性氨基酸取代。更保守的取代是具有相同或类似的大小和化学性质的氨基酸间的取代,例如,亮氨酸被异亮氨酸取代。在天然同源蛋白家族序列变异的研究中,某些氨基酸的取代往往比其他氨基酸更具有耐受性,这些氨基酸往往表现出与原氨基酸的大小、电荷、极性和疏水性之间的相似性相关,这是确定“保守取代”的基础。

[0208] 在本文中,保守取代定义为在以下五种基团之一的内部进行交换:基团1—小脂肪族、非极性或略具极性的残基(Ala,Ser,Thr,Pro,Gly);基团2—极性、带负电荷的残基及其酰胺(Asp,Asn,Glu,Gln);基团3—极性、带正电荷的残基(His,Arg,Lys);基团4—大脂肪族非极性残基(Met,Leu,Ile,Val,Cys)以及基团5—大芳香残基(Phe,Tyr,Trp)。

[0209] 较不保守的取代可能涉及一个氨基酸被另一个具有类似特点但在大小上有所不同的氨基酸所取代,如:丙氨酸被异亮氨酸残基取代。高度不保守的取代可能涉及一个酸性氨基酸被另一个具有极性甚至具有碱性性质的氨基酸所取代。然而,这种“激进”取代不能认为是无效的而不予考虑,因为化学作用是不完全可预测的,激进的取代可能会带来其简单化学原理中无法预见的偶然效果。

[0210] 当然,这种取代可能涉及普通L-氨基酸之外的其他结构。因此,D-氨基酸可能被本发明的抗原肽中常见的L-氨基酸取代,也仍在本公开的范围之内。此外,非标准氨基酸(即,除了常见的天然蛋白原氨基酸)也可以用于取代之目的,以生产根据本发明的免疫原和免疫原性多肽。

[0211] 如果在一个以上位置上的取代发现导致肽的抗原活性基本上等于或大于以下定义值,则对这些取代的组合进行测试,以确定组合的取代是否产生对肽抗原性的迭加或协同效应。肽内被同时取代的位置最多不能超过4个。

[0212] 基本上由本文所指氨基酸序列组成的一种肽可能有一个或两个非锚定氨基酸(见下面锚基序相关内容)被交换,而不存在这种情况,即相比于未修饰的肽,与人类主要组织相容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。在另一实施方案中,在基本上由本文所述氨基酸序列组成的肽中,一个或两个氨基酸可与其保守交换伙伴交换(见下文),而不存在这种情况,即相比于未修饰的肽,与人类主要组织相容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。

[0213] 这些基本不与T细胞受体互动的氨基酸残基可通过取代其他几乎不影响T细胞反应并不妨碍与相关MHC结合的氨基酸而得到修饰。因此,除了特定限制性条件外,本发明的肽可能为任何包括给定氨基酸序列或部分或其变体的肽(发明人所用的这个术语包括寡肽或多肽)。

[0214] 表6:根据SEQ ID NO:7、9、31、192、212和142的肽的优选变体和基序

[0215]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 7	Y	L	T	R	H	L	A	V	L
变体									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I

[0216]

		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 9	I	L	D	D	H	L	S	R	V
变体									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 31	L	L	Y	G	K	Y	V	S	V
变体									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L

[0217]

	M							A
	A							
	A							I
	A							L
	A							A
	V							
	V							I
	V							L
	V							A
	T							
	T							I
	T							L
	T							A
	Q							
	Q							I
	Q							L
	Q							A

[0218]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 192	K	I	Q	E	M	Q	H	F	L
变体		L							V
		L							I
		L							
		L							A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A

[0219]

		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 212	F	L	L	D	G	S	A	N	V
变体									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 142	S	L	V	Q	R	V	E	T	I
变体									V
									L
									A
		M							V

[0220]

	M							
	M							L
	M							A
	A							V
	A							
	A							L
	A							A
	V							V
	V							
	V							L
	V							A
	T							V
	T							
	T							L
	T							A
	Q							V
	Q							
	Q							L
	Q							A

[0221] 较长(拉长)的肽也可能适合。MHC I类表位(通常为8至11个氨基酸)可能由肽从较长的肽或包含实际表位的蛋白中加工而产生。两侧有实际表位的残基优选为在加工过程中几乎不影响暴露实际表位所需蛋白裂解的残基。

[0222] 本发明的肽可被拉长多达四个氨基酸,即1、2、3或4个氨基酸,可按照4:0与0:4之间的任何组合添加至任意一端。本发明的拉长组合可见表7。

[0223] 表7:本发明肽的拉长组合

[0224]

C-端	N-端
4	0
3	0 或 1
2	0 或 1 或 2
1	0 或 1 或 2 或 3
0	0 或 1 或 2 或 3 或 4

[0225]	C-端	N-端
	N-端	C-端
	4	0
	3	0 或 1
	2	0 或 1 或 2
	1	0 或 1 或 2 或 3
	0	0 或 1 或 2 或 3 或 4

[0226] 拉伸/延长的氨基酸可以是所述蛋白或任何其他氨基酸的原序列肽。拉长可用于增强所述肽的稳定性或溶解性。

[0227] 因此,本发明所述的表位可能与天然肿瘤相关表位或肿瘤特异性表位相同,也可能包括来自参考肽的不超过四个残基的不同肽,只要它们有基本相同的抗原活性即可。

[0228] 在一项替代实施方案中,肽的一边或双边被拉长4个以上的氨基酸,优选最多30个氨基酸的总长度。这可形成MHC-II类结合肽。结合至MHC II类肽可通过本领域中已知的方法进行测试。

[0229] 因此,本发明提出了MHC I类表位的肽和变体,其中所述肽或抗体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸长度(即10、11、12、13、14个氨基酸,如果为拉长II类结合肽时,长度也可15、16、17、18、19、20、21或22个氨基酸)。

[0230] 当然,本发明的肽或变体能与人类主要组织相容性复合体(MHC) I或II类分子结合。肽或变体与MHC复合物的结合可用本领域内的已知方法进行测试。

[0231] 优选情况是,当本发明的肽特异性T细胞相比于取代肽受到检测时,如果取代肽在相对于背景肽溶解度增加达到最大值的一半,则该肽浓度不超过约1mM,优选为不超过约1μM,更优选为不超过约1nM,再优选为不超过约100pM,最优选为不超过约10pM。也优选为,取代肽被一个以上的T细胞识别,最少为2个,更优选为3个。

[0232] 在本发明的一个特别优选实施方案中,肽系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191所选的氨基酸序列组成。

[0233] 基本由“...组成”系指本发明的肽,除了根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191中的任一序列或其变体组成外,还含有位于其他N和/或C端延伸处的氨基酸,而它们不一定能形成作为MHC分子表位的肽。

[0234] 但这些延伸区域对有效将本发明中的肽引进细胞具有重要作用。在本发明的一实施例中,该肽为融合蛋白的一部分,含来自NCBI、GenBank登录号X00497的HLA-DR抗原相关不变链(p33,以下称为“Ii”)的80个N-端氨基酸等。在其他的融合中,本发明的肽可以被融合到本文所述的抗体、或其功能性部分,特别是融合入抗体的序列,以便所述抗体进行特异性靶向作用,或者,例如进入本文所述的树突状细胞特异性抗体。

[0235] 此外,该肽或变体可进一步修饰以提高稳定性和/或与MHC分子结合,从而引发更强的免疫反应。肽序列的该类优化方法是本领域内所熟知的,包括,例如,反式肽键和非肽键的引入。

[0236] 在反式肽键氨基酸中,肽(-CO-NH-)并未连接其残基,但是其肽键是反向的。这种

逆向反向模拟肽 (retro-inverso peptidomimetics) 可通过本领域已知的方法制备, 例如: Meziere 等人在 (Meziere et al., 1997) 中所述的方法, 以引用的方式并入本文。这种方法涉及制备包含骨架 (而并非侧链) 改变的模拟肽。Meziere 等人 (Meziere et al., 1997) 的研究显示, 这些模拟肽有利于 MHC 的结合和辅助性 T 细胞的反应。以 NH-CO 键替代 CO-NH 肽键的逆向反向肽大大地提高了抗水解性能。

[0237] 非肽键为 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 等。美国 4897445 号专利提出了多肽链中非肽键 ($-\text{CH}_2-\text{NH}$) 的非固相合成法, 该方法涉及按标准程序合成的多肽以及通过氨基醛和一种含 NaCNBH_3 的氨基酸相互作用而合成的非肽键。

[0238] 含上述序列的肽可与其氨基和/或羧基末端的其他化学基团进行合成, 从而提高肽的稳定性、生物利用度、和/或亲和力等。例如, 苄氧羰基、丹酰基等疏水基团或叔丁氧羰基团可加入肽的氨基末端。同样, 乙酰基或 9-芴甲氧羰基可能位于肽的氨基末端。此外, 疏水基团、叔丁氧羰基团或氨基团都可能被加入肽的羧基末端。

[0239] 另外, 本发明中的所有肽都可能经合成而改变其空间构型。例如, 可能使用这些肽的一个或多个氨基酸残基的右旋体, 通常不是其左旋体。更进一步地, 本发明中肽的至少一个氨基酸残基可被熟知的一个非天然氨基酸残基取代。诸如此类的改变可能有助于增加本发明肽的稳定性、生物利用度和/或结合作用。

[0240] 同样, 本发明中的肽或变体可在合成肽之前或之后通过特异氨基酸的反应而进行化学修饰。此类修饰的实施例为本领域所熟知, 例如, 在 R. Lundblad 所著的《Chemical Reagents for Protein Modification》(3rd ed. CRC Press, 2004) (Lundblad, 2004) 中有概述, 以参考文献的方式并入本文。虽然氨基酸的化学修饰方法无限制, 但其包括 (但不限于) 通过以下方法修饰: 酰基化、胺基化、赖氨酸吡哆基化、还原烷基化、以 2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 三硝基苯基化氨基团、通过将半胱氨酸过甲酸氧化为磺基丙氨酸而对羧基团和巯基进行氨基修饰、形成易变衍生物、与其他巯基化合物形成混合二硫化合物、与马来酰亚胺反应, 与碘乙酸或碘乙酰胺羧甲基化、在碱性 pH 值下与氰酸盐甲氨酰化。在这方面, 技术人员参考了《Current Protocols In Protein Science》(Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000)) (Coligan et al., 1995) 中第 15 章所述的在蛋白化学修饰相关的广泛方法。

[0241] 简言之, 修饰蛋白的精氨酸残基等往往基于邻二羰基化合物 (如苯甲酰甲醛、2, 3-丁二酮以及 1, 2-烯丙二酮) 的反应而形成加合物。另一个实施例是丙酮醛与精氨酸残基的反应。半胱氨酸可在赖氨酸和组氨酸等亲核位点不作随同修饰的情况下就得到修饰。因此, 有大量试剂可进行半胱氨酸的修饰。Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) 等公司的网站含有具体试剂的信息。

[0242] 蛋白中二硫键的选择性还原也很普遍。二硫键可在生物制药热处理中形成和氧化。伍德沃德氏试剂 K 可用于修饰特定的谷氨酸残基。N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基-碳二亚胺可用于形成赖氨酸残基和谷氨酸残基的分子内交联。例如: 焦碳酸二乙酯是修饰蛋白组氨酸残基的试剂。组氨酸也可使用 4-羟基-2-壬烯醛进行修饰。赖氨酸残基与其他 α -氨基团的反应, 例如, 有利于肽结合到蛋白/肽的表面或交联处。赖氨酸聚是多(乙烯)乙二醇的附着点, 也是蛋白糖基化的主要修饰位点。蛋白的蛋氨酸残基可通过碘乙酰胺、溴乙胺、氯

胺T等被修饰。

[0243] 四硝基甲烷和N-乙酰基咪唑可用于酪氨酸残基的修饰。经二酪氨酸形成的交联可通过过氧化氢/铜离子完成。

[0244] 对色氨酸修饰的最近研究中使用了N-溴代琥珀酰亚胺、2-羟基-5-硝基苄溴或3-溴-3-甲基-2-(2-硝基苄基)-3H-吡啶(BPNS-粪臭素)。

[0245] 当蛋白与戊二醛、聚乙二醇二丙烯酸酯和甲醛的交联用于配制水凝胶时,治疗性蛋白和含聚乙二醇的肽的成功修饰往往可延长循环半衰期。针对免疫治疗的变态反应原化学修饰往往通过氰酸钾的氨基甲酰化实现。

[0246] 一种肽或变体,其中肽被修饰或含非肽键,优选为本发明的实施例。一般来说,肽和变体(至少含氨基酸残基之间的肽联接)可使用Lukas等人(Lukas et al.,1981)以及此处引用的参考文献所披露的固相肽合成Fmoc-聚酰胺模式进行合成。芴甲氧羰基(Fmoc)团对N-氨基提供临时保护。使用N,N-二甲基甲酰胺中的20%二甲基吡啶中对这种碱高度敏感的保护基团进行重复分裂。由于它们的丁基醚(在丝氨酸苏氨酸和酪氨酸的情况下)、丁基酯(在谷氨酸和天门冬氨酸的情况下)、叔丁氧羰基衍生物(在赖氨酸和组氨酸的情况下)、三苯甲基衍生物(在半胱氨酸的情况下)及4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基衍生物(在精氨酸的情况下),侧链功能可能会受到保护。只要谷氨酰胺和天冬酰胺为C-末端残基,侧链氨基功能保护所使用的是由4,4'-二甲氧基二苯基团。固相支撑基于聚二甲基丙烯酸酰胺聚合物,其由三个单体二甲基丙烯酸酰胺(骨架单体)、双丙烯酸乙烯二胺(交联剂)和N-丙烯酰胺肌胺酸甲酯(功能剂)构成。使用的肽-树脂联剂为酸敏感的4-羟甲基苯氧乙酸衍生物。所有的氨基酸衍生物均作为其预制对称酸酐衍生物加入,但是天冬酰胺和谷氨酰胺除外,它们使用被逆转的N,N'-二环己基碳二亚胺/1-羟基苯并三唑介导的耦合程序而加入。所有的耦合和脱保护反应用茚三酮、硝基苯磺酸或isotin测试程序监测。合成完成后,用浓度为95%含50%清道夫混合物的三氟醋酸,从伴随去除侧链保护基团的树脂支承物中裂解肽。常用的清道夫混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水,准确的选择依据合成肽的氨基酸组成。此外,固相和液相方法结合使用对肽进行合成是可能的(例如,请参阅(Bruckdorfer et al.,2004)以及本文引用的参考文献)

[0247] 三氟乙酸用真空中蒸发、随后用承载粗肽的二乙基乙醚滴定进行去除。用简单萃取程序(水相冻干后,该程序制得不含清道夫混合物的肽)清除任何存在的清道夫混合物。肽合成试剂一般可从Calbiochem-Novabiochem(英国诺丁汉)获得。

[0248] 纯化可通过以下技术的任何一种或组合方法进行,如:再结晶法、体积排阻色谱法、离子交换色谱法、疏水作用色谱法以及(通常)反相高效液相色谱法(如使用乙腈/水梯度分离)。

[0249] 可以使用薄层色谱法、电泳特别是毛细管电泳、固相萃取(CSPE)、反相高效液相色谱法、酸解后的氨基酸分析、快原子轰击(FAB)质谱分析以及MALDI和ESI-Q-TOF质谱分析进行肽分析。

[0250] 为了选择过度提呈的肽,计算了提呈图,其显示样本中位提呈量以及复制变化。该特点使相关肿瘤实体的样本与正常组织样本的基线值并列。可通过计算调节线性混合效应模型(Pinheiro et al.,2015)的p值将以上每个特点并入过度提呈分数中,从而通过假发现率(Benjamini and Hochberg,1995)调整多项检验。

[0251] 对于通过质谱法对HLA配体的识别和相对定量,对来自冲击冷冻组织样本的HLA分子进行纯化并对HLA相关肽进行分离。分离的肽分开,并在线通过纳米-电喷雾-电离(nanoESI)液相色谱-质谱(LC-MS)实验进行鉴定。由此产生的肽序列的验证方法是,将CRC样本(N=24个A*02阳性样本)中记录的天然TUMAP的片段模式与相同序列相应合成参考肽的片段模式进行比较。由于这些肽被直接鉴定为原发性肿瘤HLA分子的配体,因此这些结果为获得自24名CRC患者的原发性癌症组织上确定肽的天然加工和提呈提供了直接证据。

[0252] 发现管道XPRESIDENT® v2.1(例如,参见US 2013-0096016,并在此通过引用将其整体并入本文)考虑到识别和选择相关过量提呈的候选肽疫苗,这基于与几种不同的非癌组织和器官相比癌症或其他受感染组织的HLA限制肽水平直接相对定量结果。这通过以下方法实现:使用专有数据分析管道处理的LC-MS采集数据、结合序列识别算法、谱聚类、计算离子、保留时间调整、充电状态卷积以及正态化而开发无标记差异化定量方法。

[0253] 为每种肽和样本确立了提呈水平,包括误差估计值。肿瘤组织大量提呈的肽以及肿瘤与非肿瘤组织和器官中过量提呈的肽已经得到确定。

[0254] 对来自CRC组织样本的HLA肽复合物进行纯化,并且对HLA相关肽使用LC-MS进行分离和分析(见实施例)。本申请中包含的所有TUMAP使用原发性CRC样本的方法进行鉴定,确认其在原发性CRC上的提呈。

[0255] 在多个CRC和正常组织上确定的TUMAP用无标记LC-MS数据的离子计数方法进行量化。该方法假定肽的LC-MS信号区域与样本中其丰度相关。各种LC-MS实验中肽的所有量化信号在集中趋势基础上进行正常化,根据每个样品进行平均,并合并入柱状图(被称为提呈图)。提呈图整合了不同分析方法,如:蛋白数据库检索、谱聚类、充电状态卷积(除电)和保留时间校准和正态化。

[0256] 此外,发现管道XPRESIDENT® v2.x可对癌症或其他感染组织上的MHC-肽,优选为HLA限制性肽进行直接的绝对定量。简言之,总细胞计数根据被分析的组织样本的总DNA含量来计算。组织样本中TUMAP的总肽量用nanoLC-MS/MS测定为天然TUMAP的比率以及TUMAP同位素标记版本的已知量,称为内部标准。TUMAP分离效率确定方法:把肽:所有选定TUMAP的MHC在TUMAP分离程序尽早的时间点加入组织裂解液,并在肽分离完成后通过nanoLC-MS/MS检测。总细胞计数和总肽量根据每份组织样本三次测量值来计算。所述肽特异性分离效率计算为三次重复测量10次加标实验的平均值(见实施例6和表12)。

[0257] 本发明提出了有利于治疗癌肿/肿瘤,优选为治疗过量提呈或只提呈本发明肽的CRC。这些肽由质谱分析法直接显示出,而由HLA分子自然提呈于人原发性人CRC样本中。

[0258] 与正常组织相比,癌症中高度过表达肽来源的许多源基因/蛋白(也指定为“全长蛋白”或“潜在蛋白”) - 本发明相关的“正常组织”是来自大肠(结肠或直肠)健康肺细胞或其他正常组织细胞,这表明肿瘤与这些源基因的高度关联性(见实施例2)。此外,这些肽本身也在肿瘤组织中过度提呈(本发明相关的“肿瘤组织”是指来自CRC患者的样本),但不在正常组织中过度提呈(见实施例1)。

[0259] HLA结合肽能够被免疫系统识别,特别是T淋巴细胞。T细胞可破坏提呈被识别HLA/肽复合体的细胞(如:提呈衍生肽的CRC细胞)。

[0260] 本发明的所有肽已被证明具有刺激T细胞反应的能力,并过量提呈,因而可用于制备本发明的抗体和/或TCR,例如可溶性TCR(参见实施例3和实施例4)。此外,肽与相应的MHC

组合时,也可用于制备本发明的抗体和/或TCR,特别是sTCR。各个方法均为技术人员所熟知,并在各个文献中可找到。因此,本发明的肽可用于在患者中产生免疫反应,从而能够毁灭肿瘤细胞。患者的免疫反应能够通过直接给予患者所述肽或前体物质(如,加长肽、蛋白或编码这些肽的核酸),较理想是与加强免疫原性的制剂相结合,而进行诱导。源自该治疗性疫苗的免疫反应预期能够高度特异性地对抗肿瘤细胞,因为本发明的目标肽在正常组织上提呈的复制数目较少,防止患者发生对抗正常细胞的不良自体免疫反应的风险。

[0261] 本说明书还涉及包含一个 α 链和一个 β 链(“ α/β TCR”)的T细胞受体(TCR)。还提供了由MHC分子提呈时可与TCR和抗体结合的肽。本说明书还涉及核酸、载体和用于表达TCR的宿主细胞和本说明书的肽;以及使用它们的方法。

[0262] 术语“T细胞受体”(缩写TCR)是指一种异二聚体分子,其包含一个 α 多肽链(α 链)和一个 β 多肽链(β 链),其中所述异二聚体受体能够结合由HLA分子提呈的肽抗原。

[0263] 该术语还包括所谓的 γ/δ TCR。

[0264] 在一个实施方案中,本说明书提供了如本文中所描述的产生TCR的方法,该方法包括在适于促进TCR表达的条件下培养能够表达TCR的宿主细胞。

[0265] 另一个方面,本说明书涉及一种根据本说明书的方法,其中所述抗原透过与足够量的含抗原提成细胞的抗原结合被载入表达于合适抗原提呈细胞或人工抗原呈递细胞表面的I或II类MHC分子,或该抗原透过四聚化被加载I或II类MHC四聚体/I或II类MHC复合单体。

[0266] α/β TCR的 α 和 β 链和 γ/δ TCR的 γ 和 δ 链通常被视为各自有两个“结构域”,即可变和恒定结构域。可变结构域由可变区(V)和连接区(J)的组合。可变结构域还可能包括一个前导区(L)。 β 和 δ 链还可能包括一个多样区(D)。 α 和 β 恒定结构域还可能包括锚定 α 和 β 链至细胞膜的C末端跨膜(TM)结构域。

[0267] 相对于 γ/δ 的TCR,如本文所用的术语“TCR γ 可变域”是指无前导区(L)的TCR γ V(TRGV)区与TCR γ (TRGJ)区的组合,术语TCR γ 恒定结构域是指细胞外TRGC区域,或C-末端截短TRGC序列。同样地,“TCR δ 可变域”是指无前导区(L)的TCR δ V(TRDV)区与TCR δ D/J(TRDD/TRDJ)区的组合,术语“TCR δ 恒定结构域”是指细胞外TRDC区域,或C-末端截短TRDC序列。

[0268] 本说明书的TCR优选结合至肽HLA分子复合体,其具有约100 μ M或更小、约50 μ M或更小、约25 μ M或更小或约10 μ M或更小的结合亲和力(KD)。更为优选的情况是具有约1 μ M或更小、约100nM或更小、约50nM或更小或约25nM或更小结合亲和力的高亲和力TCR。本发明TCR优选结合亲和力范围的非限制性示例包括约1nM至约10nM;约10nM至约20nM;约20nM至约30nM;约30nM至约40nM;约40nM至约50nM;约50nM至约60nM;约60nM至约70nM;约70nM至约80nM;约80nM至约90nM;以及约90nM至约100nM。

[0269] 与本说明书TCR相关,本文使用的“特异性结合”及其语法变体用于表示对100 μ M或更小的肽-HLA分子复合体有结合亲和力(KD)的TCR。

[0270] 本说明书的 α/β 异二聚体TCR可能具有其恒定结构域之间的引入二硫键。这种类型的优选TCR包括那些具有一个TRAC恒定域序列和TRBC1或TRBC2恒定域序列的TCR,除非TRAC的苏氨酸48和TRBC1或TRBC2的丝氨酸57被半胱氨酸残基取代,所述半胱氨酸形成TRAC恒定域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定区序列之间的二硫键。不论具有或不具有上述的引入链间键,本说明书的 α/β 杂二聚体TCR可能具有一个TRAC恒定域序列和一个TRBC1或TRBC2恒定

结构域序列,并且TRAC恒定结构域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定结构域序列可能透过TRAC外显子2的Cys4和TRBC1或TRBC2外显子2的Cys4之间的天然二硫键相连。

[0271] 本说明书的TCR可能包括选自由放射性核素、荧光团和生物素组成组中的可检测标记。本说明书的TCR可能共轭至治疗活性剂,如放射性核素、化学治疗剂或毒素。

[0272] 在一个实施方案中,具有在 α 链中至少一个突变和/或具有在 β 链中至少一个突变的TCR与未突变的TCR相比,已经修改了糖基化。

[0273] 在一个实施方案中,在TCR α 链和/或TCR β 链中包括至少一个突变的TCR对肽HLA分子复合体有结合亲和力和/或结合半衰期,其是包含未突变TCR α 链和/或未突变TCR β 链的TCR的结合亲和力的至少两倍。肿瘤特异性TCR亲和力增强及其开发依赖于存在最佳TCR亲和力的窗口。这样窗口的存在是根据观察结果:HLA-A2限制性病原体特异性TCR与HLA-A2限制性肿瘤相关自身抗原特异性TCR相比,KD值通常大约低10倍。现已知,尽管肿瘤抗原可能具有免疫原性,但是因为肿瘤来自个体自身的细胞,因此仅突变蛋白或翻译加工改变的蛋白将被免疫系统视为外来物质。上调或过表达(所谓的自体抗原)的抗原不一定诱导针对肿瘤的功能免疫应答:表达对这些抗原具有高度反应性的TCR的T细胞会在一种称为中枢耐受的过程中在胸腺内被不利选择,也就是说只有对自身抗原具有低亲和力TCR的细胞才仍然存在。因此,本说明书的TCR或变体对根据本发明肽的亲和力可透过本领域熟知的方法来增强。

[0274] 本说明书还涉及一种识别和分离本发明TCR的一种方法,所述方法包括:用A2/肽单体从HLA-A*02阴性健康供体孵育PBMC,用四聚体-藻红蛋白(PE)孵育PBMC并透过荧光激活细胞分选(FACS)-Calibur方法分析分离高亲和力T细胞。

[0275] 本说明书还涉及一种识别和分离本发明TCR的一种方法,所述方法包括:获得含整个人体TCR $\alpha\beta$ 基因位点(1.1and 0.7Mb)的转基因小鼠(其T细胞表达多样化人类TCR,用于补偿小鼠TCR缺乏),用相关肽对小鼠进行免疫处理,用四聚体-藻红蛋白(PE)孵育从转基因小鼠中获得的PBMC,并透过荧光激活细胞分选(FACS)-Calibur方法分析分离高亲和力T细胞。

[0276] 一方面,为了获得表达本说明书TCR的T细胞,编码本说明书TCR- α 和/或TCR- β 链的核酸被克隆入表达载体,诸如 γ 反转录病毒或慢病毒。重组病毒产生,然后测试功能,如抗原专一性和功能性亲合力。然后,最终产品的等分试样被用于转导靶T细胞群体(一般纯化自患者的PBMC),在输入患者前展开。另一方面,为了获得表达本说明书TCR的T细胞,TCRRNA透过本领域中已知的技术(例如,体外转录系统)合成。然后,体外合成的TCRRNA透过电穿孔来重新表达肿瘤特异性TCR- α 和/或TCR- β 链被引入获得自健康供体的初级CD8⁺T细胞。

[0277] 为了增加表达,编码本说明书TCR的核酸在操作上可连接到强激活子,例如逆转录病毒长末端重复序列(LTR)、巨细胞病毒(CMV)、鼠干细胞病毒(MSCV)U3、磷酸甘油酸激酶(PGK)、 β 肌动蛋白、泛素蛋白和猿猴病毒40(SV40)/CD43复合激活子、延伸因子(EF)-1a和脾脏病灶形成病毒(SFFV)激活子。在一优选实施方案中,激活子与被表达的核酸异源。除了强激活子外,本说明书的TCR表达盒可能含有附加的元素,可提高转基因表达,包括中枢多聚嘌呤区(CPPT),其促进了慢病毒构建体的核易位(Follenzi et al.,2000),和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元素(WPRE),其透过提高RNA稳定性增加转基因表达水平(Zufferey et al.,1999)。

[0278] 本发明TCR的 α 和 β 链可由位于分开的载体核酸进行编码,或者可透过位于同一载

体的多核苷酸编码。

[0279] 实现高水平的TCR表面表达需要引入TCR的TCR- α 和TCR- β 链高水平转录。为了实现它,本说明书的TCR- α 和TCR- β 链可在单一的载体中被克隆入双顺反子构建体,其已被证明能够克服这一障碍。使用TCR- α 和TCR- β 链在之间的病毒核糖体间进入位点(IRES)导致两链的协同表达,因为TCR- α 和TCR- β 链均由在翻译过程中分成两个蛋白的单一转录物产生,从而确保了产生TCR- α 和TCR- β 链的相等摩尔比。(Schmitt et al.2009)。编码本说明书TCR的核酸可以是被优化以从宿主细胞增加表达的密码子。遗传密码冗余让一些氨基酸被一个以上的密码子编码,但某些密码子没有其他密码子“优化”,因为匹配tRNA以及其他因子的相对可用性(Gustafsson et al.,2004)。修改TCR- α 和TCR- β 基因序列使得每个氨基酸被用于哺乳动物基因表达的最佳密码子编码,以及消除mRNA不稳定性基序或隐蔽剪接位点,已显示可显著提高TCR- α 和TCR- β 基因表达(Scholten et al.,2006)。

[0280] 此外,引入的和内源性TCR链之间的错配可能会导致获得特异性,其构成自身免疫的显著风险。例如,混合TCR二聚体的形成可能会减少可用以形成正确配对TCR复合体的CD3分子数目,因此,可以显著降低表达所引入TCR的细胞的功能性亲合力(Kuball et al.,2007)。

[0281] 为了减少错配,本说明书引入的TCR链的C-末端结构域可以进行修改以促进链间亲和力,同时降低引入链与内源TCR配对的能力。这些策略可能包括用鼠配对物取代人类TCR- α 和TCR- β C端结构域(鼠化C端结构域);透过引入第二个半胱氨酸残基到引入TCR的TCR- α 和TCR- β 链产生C末端结构域的第二链间二硫键(半胱氨酸修饰);交换TCR- α 和TCR- β 链C端结构域的相互作用残基(“杵臼结构”);直接融合TCR- α 和TCR- β 链可变结构域至CD3 ζ (CD3 ζ 融合)(Schmitt et al.2009)。

[0282] 在一实施方案中,宿主细胞被改变结构以表达本说明书的TCR。在一优选实施方案中,宿主细胞为人T细胞或T细胞祖细胞。在一些实施方案中,T细胞或T细胞祖细胞从癌症患者中获得。在另一些实施方案中,T细胞或T细胞祖细胞从健康供体中获得。本说明书的宿主细胞相对于待治疗的患者可以为同种异体或自体的。在一实施方案中,宿主是被转化以表达 α/β TCR的 γ/δ T细胞。

[0283] “药物组合物”是指适合在医疗机构用于人体的组合物。优选地,药物组合物为无菌状态,并根据GMP指南生产。

[0284] 药物组合物包括游离形式或以一种药学可接受的盐形式存在的肽(也参见上文)。此处使用的“药学可接受的盐”系指所公开的肽的一种衍生物,其中该肽由制酸或药剂的碱盐进行改性。例如,用与适合的酸反应的游离碱(通常其中的中性药物有一个中性-NH₂基团)制备酸式盐。适合制备酸盐的酸包括有机酸,如:乙酸、丙酸、羧基酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、甲磺酸、苯磺酸、水杨酸等等、以及无机酸,如:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸等。相反,可在一种肽上提呈的酸性基团的碱盐制剂使用药学可接受的碱基进行制备,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等等。

[0285] 在特别优选的实施方案中,药物组合物包括乙酸(醋酸盐),三氟乙酸盐或盐酸(氯化物)形式的肽。

[0286] 本发明中所述的药剂优选为一种免疫治疗药剂,例如,一种疫苗。该疫苗可直接给

到患者的受影响器官,也可i.d.、i.m.、s.c.、i.p.和i.v.注射方式全身给药,或体外应用到来自患者或其细胞株的细胞(随后再将这些细胞注入到患者中),或体外用于从来自患者的免疫细胞的一个细胞亚群(然后再将细胞重新给予患者)。如果核酸体外注入细胞,可能有益于细胞转染,以共同表达免疫刺激细胞因子(如白细胞介素-2)。肽可完全单独给药,也可与免疫刺激佐剂相结合(见下文)、或与免疫刺激细胞因子联合使用、或以适当的输送系统给药(例如脂质体)。该肽也可共轭形成一种合适的载体(如钥孔虫血蓝蛋白(KLH)或甘露)到合适的载体(参阅W0 95/18145及(Longenecker et al.,1993))。肽也可能被标记,可能是融合蛋白,或可能是杂交分子。在本发明中给出序列的肽预计能刺激CD4或CD8T细胞。然而,在有CD4T-辅助细胞的帮助时,CD8T细胞刺激更加有效。因此,对于刺激CD8T细胞的MHC-I类表位,一种杂合分子的融合伙伴或片段提供了刺激CD4阳性T细胞的适当表位。CD4-和CD8刺激表位为本领域所熟知、并包括本发明中确定的表位。

[0287] 一方面,疫苗包括至少含有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191中列出的一种肽以及至少另外一种肽,优选为2至50个、更优选为2至25个、再优选为2至20个、最优选为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个肽。肽可能从一个或多个特定TAA中衍生,并且可能与MHC I类分子结合。

[0288] 另一方面,本发明提出了一种编码本发明中肽或肽变体的核酸(如多聚核苷酸)。多聚核苷酸可能为,例如,DNA、cDNA、PNA、RNA或其组合物,它们可为单链和/或双链、或多聚核苷酸的原生或稳定形式(如:具有硫代磷酸骨架的多聚核苷酸),并且只要它编码肽,就可能包含也可能不包含内含子。当然,多聚核苷酸只能编码加入天然肽键并含有天然氨基酸残基的肽。另一个方面,本发明提出了一种可根据本发明表达多肽的表达载体。对于连接多核苷酸,已经开发出多种方法,尤其是针对DNA,可通过向载体补充可连接性末端等方法进行连接。例如,可向DNA片段加入补充性均聚物轨道,之后DNA片段被插入到载体DNA。然后,通过补充性均聚物尾巴的氢键结合,将载体和DNA片段结合,从而形成重组DNA分子。

[0289] 含有一个或多个酶切位点的合成接头为DNA片段与载体连接提供了另一种方法。含各种限制性核酸内切酶的合成接头可通过多种管道购得,其中包括从国际生物技术公司(International Biotechnologies Inc,New Haven,CN,美国)购得。

[0290] 编码本发明多肽的DNA理想修饰方法是使用Saiki等人(Saiki et al.,1988)所采用的聚合酶链反应方法。此方法可用于将DNA引入合适的载体(例如,通过设计合适的酶切位点),也可用于本领域已知的其他有用方法修饰DNA。如果使用病毒载体,痘病毒载体或腺病毒载体为优选。

[0291] 之后,DNA(或在逆转录病毒载体情况下,RNA)可能表达于合适的宿主,从而制成含本发明肽或变体的多肽。因此,可根据已知技术使用编码本发明肽或变体的DNA,用本文所述方法适当修饰后,构建表达载体,然后表达载体用于转化合适宿主细胞,从而表达和产生本发明中的多肽。此类技术包括那些公开于,例如,美国专利4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075和4,810,648。

[0292] 编码含本发明化合物多肽的DNA(或在逆转录病毒载体情况下,RNA)可能被加入到其他多种DNA序列,从而引入到合适的宿主中。同伴DNA将取决于宿主的性质、DNA引入宿主的方式、以及是否需要保持为游离体还是要相互结合。

[0293] 一般来说,DNA可以适当的方向和正确的表达阅读框架附着到一种表达载体(如质

粒)中。如有必要,该DNA可能与所需宿主所识别的相应转录和翻译调节控制核苷酸序列连接,尽管表达载体中一般存在此类控制功能。然后,该载体通过标准方法被引入宿主。一般来说,并不是所有的宿主都会被载体转化。因此,有必要选择转化过的宿主细胞。选择方法包括用任何必要的控制元素向表达载体插入一个DNA序列,该序列对转化细胞中的可选择性属性(如抗生素耐药性)进行编码。

[0294] 另外,有这种选择属性的基因可在另外一个载体上,该载体用来协同转化所需的宿主细胞。

[0295] 然后,本发明中的重组DNA所转化的宿主细胞在本文中所述本领域技术人员熟悉的合适条件下培养足够长的时间,从而表达之后可回收的肽。

[0296] 有许多已知的表达系统,包括细菌(如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母(如酵母菌)、丝状真菌(如曲霉菌)、植物细胞、动物细胞及昆虫细胞。该系统可优选为哺乳动物细胞,如来自ATCC细胞生物学库(Cell Biology Collection)中的CHO细胞。

[0297] 典型的哺乳动物细胞组成型表达载体质粒包括CMV或含一个合适的多聚A尾巴的SV40激活子以及抗性标志物(如新霉素)。一个实例为从Pharmacia公司(Piscataway,新泽西,美国)获得的pSVL。一种可诱导型哺乳动物表达载体的例子是pMSG,也可以从Pharmacia公司获得。有用的酵母质粒载体是pRS403-406和pRS413-416,一般可从Stratagene Cloning Systems公司(La Jolla,CA 92037,美国)获得。质粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406是酵母整合型质粒(YIp),并插入了酵母可选择性标记物HIS3、TRP1、LEU2和URA3。pRS413-416质粒为酵母着丝粒质粒(Ycp)。基于CMV激活子的载体(如,来自于Sigma-Aldrich公司)提供了瞬时或稳定的表达、胞浆表达或分泌,以及FLAG、3xFLAG、c-myc或MATN不同组合物中的N-端或C-端标记。这些融合蛋白可用于检测、纯化及分析重组蛋白。双标融合为检测提供了灵活性。

[0298] 强劲的人巨细胞病毒(CMV)激活子调控区使得COS细胞中的组成蛋白表达水平高达1mg/L。对于较弱的细胞株,蛋白水平一般低于0.1mg/L。SV40复制原点的出现将导致DNA在SV40复制容纳性COS细胞中高水平复制。例如,CMV载体可包含细菌细胞中的pMB1(pBR322的衍生物)复制原点、细菌中进行氨苄青霉素抗性选育的钙-内酰胺酶基因、hGH polyA和f1的原点。含前胰岛素原引导(PPT)序列的载体可使用抗FLAG抗体、树脂和板引导FLAG融合蛋白分泌到进行纯化的培养基中。其他与各种宿主细胞一起应用的载体和表达系统是本领域熟知众所周知的。

[0299] 在另一个实施方案中,对本发明的两个或更多的肽或肽变体进行编码,因此,以一个连续顺序(类似于“一串珠子”的构建体)表达。在达到目标,所述肽或肽变体可能通过连接氨基酸的延伸处(例如LLLLLL)连接或融合一起,也可能他们之间没有任何附加的肽而被连接。这些构建体也可用于癌症治疗,可诱导涉及MHC I和MHC II类分子的免疫应答。

[0300] 本发明还涉及一种宿主细胞,其以本发明的多核苷酸载体构建转化而来。宿主细胞可为原核细胞,也可为真核细胞。在有些情况下,细菌细胞为优选原核宿主细胞,典型为大肠杆菌株,例如,大肠杆菌菌株DH5(从Bethesda Research Laboratories公司(Bethesda,MD,美国)获得)和RR1(从美国菌种保藏中心(ATCC,Rockville,MD,美国),ATCC编号31343获得)。首选的真核宿主细胞包括酵母、昆虫和哺乳动物细胞,优选为脊椎动物细胞,如:小鼠、大鼠、猴子或人成纤维细胞和结肠癌细胞株中的细胞。酵母宿主细胞包括

YPH499、YPH500和YPH501,一般可从Stratagene Cloning Systems公司(La Jolla, CA92037, 美国)获得。首选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞为ATCC中的CCL61细胞、NIH瑞士小鼠胚胎细胞NIH/3T3为ATCC中的CRL 1658细胞、猴肾源性COS-1细胞为ATCC中的CRL 1650细胞以及人胚胎肾细胞的293号细胞。首选昆虫细胞为Sf9细胞,可用杆状病毒表达载体转染。有关针对表达选择合适宿主细胞的概要,可从教科书(Paulina Balbás and Argelia Lorence《Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols》Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9)和本领域技术人员知道的其他文献中查到。

[0301] 含本发明DNA结构的适当宿主细胞的转化可使用大家熟知的方法完成,通常取决于使用载体的类型。关于原核宿主细胞的转化,请参见,例如,Cohen等人的文献(Cohen et al., 1972)和(Green and Sambrook, 2012)。酵母细胞的转化在Sherman等人的文章(Sherman et al., 1986)中进行了描述。Beggs (Beggs, 1978)中所述的方法也很有用。对于脊椎动物细胞,转染这些细胞的试剂等,例如,磷酸钙和DEAE-葡聚糖或脂质体配方,可从Stratagene Cloning Systems公司或Life Technologies公司(Gaithersburg, MD 20877, 美国)获得。电穿孔也可用于转化和/或转染细胞,是本领域用于转化酵母细胞、细菌细胞、昆虫细胞和脊椎动物细胞大家熟知的方法。

[0302] 被成功转化的细胞(即含本发明DNA结构的细胞)可用大家熟知的方法(如PCR)进行识别。另外,上清液存在的蛋白可使用抗体进行检测。

[0303] 应了解,本发明中的某些宿主细胞用于制备本发明中的肽,例如细菌细胞、酵母细胞和昆虫细胞。但是,其他宿主细胞可能对某些治疗方法有用。例如,抗原提呈细胞(如树突状细胞)可用于表达本发明中的肽,使他们可以加载相应的MHC分子中。因此,本发明提出了含本发明中核酸或表达载体的一种宿主细胞。

[0304] 在一个优选实施方案中,宿主细胞为抗原提呈细胞,尤其是树突状细胞或抗原提呈细胞。2010年4月29日,美国食品和药物管理局(FDA)批准载有含前列腺酸性磷酸酶(PAP)的重组融合蛋白可用于治疗无症状或症状轻微的转移性HRPC(Rini et al., 2006; Small et al., 2006)。

[0305] 另一方面,本发明提出了一种配制一种肽及其变体的方法,该方法包括培养宿主细胞和从宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0306] 在另一个实施方案中,本发明中的肽、核酸或表达载体用于药物中。例如,肽或其变体可制备为静脉(i.v.)注射剂、皮下(s.c.)注射剂、皮内(i.d.)注射剂、腹膜内(i.p.)注射剂、肌肉(i.m.)注射剂。肽注射的优选方法包括s.c.、i.d.、i.p.、i.m.和i.v.注射。DNA注射的优选方法为i.d.、i.m.、s.c.、i.p.和i.v.注射。例如,给予50 μ g至1.5mg,优选为125 μ g至500 μ g的肽或DNA,这取决于具体的肽或DNA。上述剂量范围在以前的试验中成功使用(Walter et al., 2012)。

[0307] 用于主动免疫接种的多聚核苷酸可为基本纯化形式,也可包被于载体或输送系统。核酸可能为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。这种核酸的设计和引入方法为本领域所熟知。例如,文献中有其概述(Teufel et al., 2005)。多核苷酸疫苗很容易制备,但这些载体诱导免疫反应的作用模式尚未完全了解。合适的载体和输送系统包括病毒DNA和/或RNA,如基于腺病毒、牛痘病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、腺相关病毒或含一种以上病毒元素

的混合病毒的系统。非病毒输送系统包括阳离子脂质体和阳离子聚合物,是DNA输送所属领域内熟知的系统。也可使用物理输送系统,如通过“基因枪”。肽或核酸编码的肽可以是一种融合蛋白,例如,含刺激T细胞进行上述CDR的表位。

[0308] 本发明的药剂也可能包括一种或多种佐剂。佐剂是那些非特异性地增强或加强免疫反应的物质(例如,通过CD8-阳性T细胞和辅助T(T_H)细胞介导的对一种抗原的免疫应答,因此被视为对本发明的药剂有用。适合的佐剂包括(但不限于)1018ISS、铝盐、AMPLIVAX[®]、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、鞭毛蛋白或鞭毛蛋白衍生的TLR5配体、FLT3配体、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(ALDARA[®])、resiquimod、ImuFact IMP321、白细胞介素IL-2、IL-13、IL-21、干扰素 α 或 β ,或其聚乙二醇衍生物、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、JuvImmune[®]、LipoVac、MALP2、MF59、单磷脂A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、水包油和油包水乳状液、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、PepTel[®]载体系统、基于聚丙交酯复合乙交酯[PLG]和右旋糖苷微粒、重组人乳铁传递蛋白SRL172、病毒颗粒和其他病毒样颗粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys、源自皂角苷、分支杆菌提取物和细菌细胞壁合成模拟物的Aquila公司的QS21刺激子,以及其他专有佐剂,如:Ribi's Detox、Quil或Superfos。优选佐剂如:弗氏佐剂或GM-CSF。前人对一些树突状细胞特异性免疫佐剂(如MF59)及其制备方法进行了描述(Allison and Krummel,1995)。也可能使用细胞因子。一些细胞因子直接影响树突状细胞向淋巴组织迁移(如,TNF-),加速树突状细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原提呈细胞(如,GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国5849589号专利,特别以其完整引用形式并入本文),并充当免疫佐剂(如IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN- α 、IFN- β)(Gabrilovich et al., 1996)。

[0309] 据报告,CpG免疫刺激寡核苷酸可提高佐剂在疫苗中的作用。如果没有理论的约束,CpG寡核苷酸可通过Toll样受体(TLR)(主要为TLR9)激活先天(非适应性)免疫系统从而起作用。CpG引发的TLR9活化作用提高了对各种抗原的抗原特异性体液和细胞反应,这些抗原包括肽或蛋白抗原、活病毒或被杀死的病毒、树突状细胞疫苗、自体细胞疫苗以及预防性和治疗性疫苗中的多糖结合物。更重要的是,它会增强树突状细胞的成熟和分化,导致 T_H 细胞的活化增强以及细胞毒性T淋巴细胞(CTL)生成加强,甚至CD4T细胞说明的缺失。甚至有疫苗佐剂的存在也能维持TLR9活化作用诱发的 T_H 偏移,这些佐剂如:正常促进 T_H 偏移的明矾或弗氏不完全佐剂(IFA)。CpG寡核苷酸与以下其他佐剂或配方一起制备或联合给药时,表现出更强的佐剂活性,如微粒、纳米粒子、脂肪乳或类似制剂,当抗原相对较弱时,这些对诱发强反应尤为必要。他们还能加速免疫反应,使抗原剂量减少约两个数量级,在有些实验中,对不含CpG的全剂量疫苗也能产生类似的抗体反应(Krieg,2006)。美国6406705B1号专利对CpG寡核苷酸、非核酸佐剂和抗原结合使用促使抗原特异性免疫反应进行了描述。一种CpG TLR9拮抗剂为Mologen公司(德国柏林)的dSLIM(双干环免疫调节剂),这是本发明药物组合物的优选成分。也可使用其他如TLR结合分子,如:RNA结合TLR7、TLR8和/或TLR9。

[0310] 其他有用的佐剂例子包括(但不限于)化学修饰性CpG(如CpR、Idera)、dsRNA模拟物,如,Poly(I:C)及其衍生物(如:AmpliGen、Hiltonol、多聚-(ICLC)、多聚(IC-R)、多聚(I:C12U))、非CpG细菌性DNA或RNA以及免疫活性小分子和抗体,如:环磷酰胺、舒尼替单抗、贝伐单抗[®]、西乐葆、NCX-4016、西地那非、他达拉非、伐地那非、索拉非尼、替莫唑胺、

temsirolimus、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗-CTLA4、免疫系统的其他抗体靶向性主要结构(如:抗-CD40、抗-TGF β 、抗-TNF α 受体)和SC58175,这些药物都可能有治疗作用和/或充当佐剂。技术人员无需过度进行不当实验就很容易确定本发明中有用的佐剂和添加剂的数量和浓度。

[0311] 首选佐剂是抗-CD40、咪喹莫特、瑞喹莫德、GM-CSF、环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐单抗、干扰素 α 、CpG寡核苷酸及衍生物、多聚(I:C)及衍生物、RNA、西地那非和PLG或病毒颗粒的微粒制剂。

[0312] 本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂从含集落刺激因子制剂中选择,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特、resiquimod和干扰素- α 。

[0313] 本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂从含集落刺激因子制剂中选择,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特和resiquimod。在本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂为环磷酰胺、咪喹莫特或resiquimod。更优选的佐剂是Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、聚-ICLC(Hiltonol®)和抗CD40mAB或其组合物。

[0314] 此组合药物为非肠道注射使用,如皮下、皮内、肌肉注射,也可口服。为此,肽和其他选择性分子在药学可接受的载体中分解或悬浮,优选为水载体。此外,组合物可包含辅料,如:缓冲剂、结合剂、冲击剂、稀释剂、香料、润滑剂等。这些肽也可与免疫刺激物质合用,如:细胞因子。可用于此类组合物的更多辅料可在从A.Kibbe所著的Handbook of Pharmaceutical Excipients(Kibbe,2000)等书中获知。此组合药物可用于阻止、预防和/或治疗腺瘤或癌性疾病。例如,EP2112253中有示例制剂。

[0315] 重要的是要认识到,通过本发明的疫苗引发的免疫应答在不同的细胞阶段和开发的不同阶段攻击癌症。而且不同的癌症相关信号通路被攻击。这相对于其他疫苗的优势,这些疫苗只针对一个或几个靶标,这可能会导致肿瘤很容易适应于攻击(肿瘤逃逸)。此外,并非所有的个体肿瘤都表达相同模式的抗原。因此,几个肿瘤相关肽的组合确保了每个肿瘤都承担至少一些靶标。该组合物以这样的方式设计,预期每个肿瘤可表达几种抗原并覆盖肿瘤生长和维持所需要的几种独立的途径。因此,疫苗可易于“现成的”用于较大患者群体。这意味着,预选择接受疫苗治疗的患者可限制为HLA分型,无需抗原表达的任何额外的生物标志物评估,但仍然确保多个靶标同时被诱导的免疫应答攻击,这对于疗效很重要(Banchereau et al.,2001;Walter et al.,2012)。

[0316] 本文所用的“支架”一词是指与(如抗原)决定因子特异性结合的分子。在一项实施方案中,支架是能够引导其所连接的实体(例如,(第二)抗原结合部分)至目标靶点,例如,至特定类型的肿瘤细胞或承载抗原决定簇的肿瘤基质(如根据目前申请中肽和MHC的复合体)。在另一项实施例中,支架能够通过其靶抗原(例如T细胞受体复合体抗原)激活信号通路。支架包括但不限于抗体及其片段,抗体的抗原结合区,其包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区,结合的蛋白包括至少一个锚蛋白重复序列基元和单域抗原结合(SDAB)分子、适体、(可溶)TCR和(经修饰的)细胞,例如同种异体或自体T细胞。为了评估某个分子是否是结合至靶点的支架,可进行结合测定。

[0317] “特定”结合系指,与其他天然肽-MHC复合体相比,该支架与感兴趣的肽-MHC复合

体更好地结合,结合程度为,拥有能够杀死承载特定靶点细胞的活性分子的支架不能够杀死无特定靶点但提呈一个或多个其他肽-MHC复合体的另一细胞。如果交叉反应性肽-MHC的肽并不是天然的,即,并非来自人HLA-多肽组,则结合至其他肽-MHC复合体是无关紧要的。评估靶细胞杀伤的测试在本领域中是公知的。它们应该含有未改变的肽-MHC提呈的靶细胞(原发细胞或细胞系)或载有肽的细胞进行,以便达到天然肽-MHC的水平。

[0318] 各支架可包括一个标记,其通过确定是否存在或不存卷标所提供的信号可检测到结合支架。例如,该支架可用荧光染料或任何其他适用的细胞标记分子进行标记。此类标记分子是本领域中公知的。例如,通过荧光染料进行的荧光标记可通过荧光或激光扫描显微术或流式细胞术提供结合适体的可视化。

[0319] 各支架可与第二个活性分子(例如IL-21、抗CD3、抗CD28)共轭。

[0320] 关于多肽支架的进一步信息,可参阅,例如,在WO 2014/071978A1背景技术部分,并作为参考文献引用。

[0321] 本发明还涉及适体。适体(例如,参见WO 2014/191359及其中引用的文献)是短的单链核酸分子,其可以折迭为所定义的三维结构并识别特定的靶标结构。它们似乎是开发靶向治疗的合适替代方法。适体已显示可选择性与具有高亲和力和特异性的复合靶标相结合。

[0322] 识别细胞表面分子的适体在过去十年内已经确定,并为开发诊断和治疗方法提供了手段。由于适体已显示几乎无毒性和免疫原性,因此,它们是生物医学应用中有前景的候选物质。事实上适体,例如前列腺特异性膜抗原识别适体,已被成功地用于靶向治疗并在体内模型的异种移植物中显示出功能。此外,认识到特定肿瘤细胞系的适体也已确定。

[0323] 可选择DNA适体来揭示各种癌细胞的广谱标识属性,特别是那些来自于实体瘤的细胞,而非致瘤和主要健康细胞不被识别。如果所识别的适体不仅识别肿瘤特异性子类型,而且与一系列肿瘤相互作用,这使适体适用于作为所谓的广谱诊断和治疗手段。

[0324] 此外,用流式细胞仪对细胞结合行为的研究显示,适体在纳摩尔范围内显示出很好的亲和力。

[0325] 适体用于诊断和治疗目的。此外,也可能显示,一些适体被肿瘤细胞吸取,因而可作为抗癌剂靶向递送的分子赋形剂,例如siRNA进入肿瘤细胞。

[0326] 可选择适体针对复合体的靶标,如细胞和组织以及包含、优选包括根据任何SEQ ID NO 1至SEQ ID NO 191的一个序列、根据当前发明的肽复合体与MHC分子,使用细胞SELEX(通过指数富集的配体系统进化)技术。

[0327] 本发明中的肽可用于生成和开发出针对MHC/肽复合物的特定抗体。这些抗体可用于治疗,将毒素或放射性物质靶向病变组织。这些抗体的另一用途是为了成像之目的(如PET)将放射性核素靶向病变组织。这可有助于检测小转移灶或确定病变组织的大小和准确位置。

[0328] 因此,本发明的另一方面是提出产生特异性结合至与HLA限制性抗原络合的I或II类人主要组织相容性复合体(MHC)的一种重组抗体的方法,该方法包括:用可溶形式的与HLA限制性抗原络合的(MHC) I或II类分子对包含表达所述主要组织相容性说复合体(MHC) I或II类的基因工程非人哺乳动物进行免疫;将mRNA分子与产生所述非人哺乳动物细胞的抗体分离;产生一个噬菌体显示库,显示由所述mRNA分子编码的蛋白分子;以及将至少一个噬

菌体与所述噬菌体显示库分离,所述的至少一个噬菌体显示所述抗体特异性地结合至与HLA限制性抗原络合的所述人主要组织相容性说复合体(MHC) I或II类。

[0329] 本发明的另一方面提出一种抗体,其特异性结合至与一种HLA限制性抗原络合的I或II类人主要组织相容性说复合体(MHC),其中该抗体优选为多克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体和/或嵌合抗体。

[0330] 产生这种抗体和单链I类主要组织相容性复合物的相应方法,以及产生这些抗体的其他工具在WO 03/068201、WO 2004/084798、WO 01/72768、WO 03/070752以及出版物(Cohen et al.,2003a;Cohen et al.,2003b;Denkberg et al.,2003)中进行了披露,为了本发明之目的,所有参考文献通过引用被完整地并入本文。

[0331] 优选地,该抗体与复合体的结合亲和力低于20纳摩尔,优选为低于10纳摩尔,这在本发明情况下也被视为具有“特异性”。

[0332] 本发明涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191的序列或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191具有88%同源性(优选为相同)的变体,或诱导与所述变异肽发生T细胞交叉反应的变体,其中,所述肽不是基本的全长多肽。

[0333] 本发明进一步涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191的序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191具有至少88%同源性(优选为相同)的变体,其中所述肽或变体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸。

[0334] 本发明进一步涉及本发明的肽,其具有与主要组织相容性复合体(MHC) I或II类分子结合的能力。

[0335] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中肽由或基本由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191的氨基酸序列组成。

[0336] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽(在化学上)被修饰有和/或包含非肽键。

[0337] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽为融合蛋白的一部分,特别包括HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸,或其中该肽与一种抗体(例如,树突状细胞特定抗体)融合。

[0338] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明的肽,前提是肽并非完整(完全)的人蛋白。本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。

[0339] 本发明进一步涉及一种能表达本发明核酸的表达载体。

[0340] 本发明进一步涉及本发明的肽、本发明的核酸或本发明的药学可接受的表达载体,特别是用于治疗CRC。

[0341] 本发明进一步涉及含本发明核酸或本发明表达载体的宿主细胞。

[0342] 本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其为抗原提呈细胞,优选为树突细胞。

[0343] 本发明进一步涉及生产本发明的肽的方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞和从所述宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0344] 本发明进一步涉及本发明中的方法,其中通过使抗原与足够量的抗原提呈细胞接触,抗原被载入表达于合适抗原提呈细胞表面的I或II类MHC分子。

[0345] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中该抗原提呈细胞包括表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191或变体氨基酸序列的肽。

[0346] 本发明进一步涉及以本发明方法生产的激活T细胞,其中所述T细胞有选择性地识

别一种细胞,该细胞异常表达含本发明氨基酸序列的多肽。

[0347] 本发明进一步涉及一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明任何氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者本发明的有效量T细胞。

[0348] 本发明进一步涉及任何所述肽、本发明的核酸、本发明的表达载体、本发明的细胞、本发明的激活细胞毒性T淋巴细胞在作为药剂或制造药剂中的用途。本发明进一步涉及本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0349] 本发明进一步涉及本发明的用途,其中该药剂为疫苗。本发明进一步涉及本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0350] 本发明还涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为CRC细胞或其他实体或血液肿瘤细胞,如:肺癌、脑癌、胃癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌。

[0351] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的特定标志物蛋白和生物标志物,在此称为“靶标”,其可用于诊断和/或判断CRC的预后。本发明还涉及这些供癌症治疗使用的新靶点。

[0352] 本文中术语“抗体”为广义上的定义,既包括多克隆也包括单克隆抗体。除了完整或“全部”的免疫球蛋白分子,“抗体”这一术语还包括这些免疫球蛋白分子和人源化免疫球蛋白分子的片段(如,CDR、Fv、Fab和Fc片段)或聚合物,只要它们表现出本发明的任何期望属性(例如,CRC标志物(多)肽的特异性结合、将毒素传递给癌症标志物基因表达水平增加时的CRC细胞和/或抑制CRC标志物多肽的活性)。

[0353] 只要有可能,本发明的抗体可从商业来源购买。本发明的抗体也可能使用已知的方法制得。技术人员会了解全长CRC标志物多肽或其片段可用于制备本发明的抗体。用于产生本发明抗体的多肽可部分或全部地由天然源经纯化而得,也可利用重组DNA技术生产。

[0354] 例如,本发明的编码肽的cDNA,例如,该肽为根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191多肽的肽,或其中一个变体或片段,可在原核细胞中(如:细菌)或真核细胞(如:酵母、昆虫或哺乳动物细胞)中表达,之后,可纯化重组蛋白,并用于产生一种特异性结合用于产生本发明抗体的CRC标志物多肽的单克隆或多克隆抗体制剂。

[0355] 本领域的技术人员会认识到,两种或两种以上不同集合的单克隆抗体或多克隆抗体能最大限度地增加获得一种含预期用途所需的特异性和亲和力(例如,ELISA法、免疫组织化学、体内成像、免疫毒素疗法)的抗体的可能性。根据抗体的用途,用已知的方法对其期望活性进行测试(例如,ELISA法、免疫组织化学、免疫治疗等;要获取产生和测试抗体的进一步指导,请参阅,例如,Greenfield,2014(Greenfield,2014))。例如,该抗体可用ELISA法或免疫印迹法、免疫组织化学染色福尔马林固定的癌组织或冰冻的组织切片进行检测。在初次体外表征后,用于治疗或体内诊断用途的抗体根据已知的临床测试方法进行检测。

[0356] 此处使用的术语“单克隆抗体”系指从大量同质抗体中获得的一种抗体,即,由相同的抗体组成的抗体群,但可能少量提呈的自然突变除外。此处所述的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中一部分重链和/或轻链与从特定物种中获得的抗体或属于特定抗体类型和分类型抗体的相应序列相同(同质),同时,剩余链与从其他物种中获得的抗体或属于特定抗体类型和子类型抗体的相应序列以及这些抗体的片段相同(同质),只要他们表现出预期的拮抗活性(美国4816567号专利,其在此以其整体并入)。

[0357] 本发明的单克隆抗体可能使用杂交瘤方法制得。在杂交瘤方法中,老鼠或其他适

当的宿主动物,通常用免疫制剂以引发产生或能产生将特异性结合至免疫制剂的抗体。或者,淋巴细胞可在体外进行免疫。

[0358] 单克隆抗体也可由DNA重组方法制得,如:美国4816567号专利所述。编码本发明单克隆抗体的DNA可很容易地使用传统程序进行分离和测序(例如:通过使用能与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0359] 体外方法也适用于制备单价抗体。抗体消化以产生抗体的片段,尤其是Fab片段,可以通过使用本领域已知的常规技术完成。例如,可以通过使用木瓜蛋白酶完成消化。木瓜蛋白酶消化的实施例在WO 94/29348和美国4342566号专利中有描述。抗体的木瓜蛋白酶消化通常产生两种相同的抗原结合性片段,称为Fab片段(每个片段都有一个抗原结合点)和残余Fc片段。胃蛋白酶处理产生aF(ab')₂片段和pFc'片段。

[0360] 抗体片段,不论其是否附着于其他序列,均可包括特定区域或特定氨基酸残基的插入、删除、替换、或其他选择性修饰,但前提是,片段的活性与非修饰的抗体或抗体片段相比没有显著的改变或损害。这些修饰可提供一些额外的属性,如:删除/添加可与二硫键结合的氨基酸,以增加其生物寿命、改变其分泌特性等。在任何情况下,抗体片段必须拥有生物活性的特性,如:结合活性、调节结合域的结合力等。抗体的功能性或活性区域可通过蛋白特定区域的基因突变、随后表达和测试所表达的多肽进行确定。这些方法为本行业技术人员所熟知,可包括编码抗体片段的核酸的特定位置基因突变。

[0361] 本发明的抗体可进一步包括人源化抗体或人抗体。非人(如:鼠)抗体的人源化形式为嵌合抗体免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如:Fv、Fab、Fab'或抗体的其他抗原结合序列),其中包含从非人免疫球蛋白中获得的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)(如具有与其特异性、亲和力和能力的小鼠、大鼠或兔子)CDR的残基取代。在某些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架(FR)残基被相应的非人残基取代。人源化抗体可能还包括既非受体抗体、也非输入CDR或框架序列中发现的残基。一般来说,人源化抗体将包括几乎所有的至少一个、通常为二个可变域,其中,全部或几乎全部的CDR区域均对应于非人免疫球蛋白的区域并且全部或几乎全部的FR区域均为非人免疫球蛋白相同序列的区域。理想情况是,人源化抗体还将包括至少免疫球蛋白恒定区(Fc)的一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的一部分。

[0362] 人源化非人抗体的方法为本行业所熟知。一般来说,人源化抗体具有一个或多个从非人源头引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基往往被称为“输入”残基,通常从“输入”可变域中获得。人源化基本上可以通过将啮齿动物CDR或CDR序列取代为相应的人抗体序列而完成。因此,这种“人源化”抗体为嵌合抗体(美国4816567号专利),其中大大少于完整的人可变域被来自于非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常为人抗体,其中有些CDR残基以及可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0363] 可使用免疫后在内源性免疫球蛋白产生缺失时能产生完整人抗体的转基因动物(如:小鼠)。例如,它被描述为,嵌合和种系突变小鼠中的抗体重链连接区域基因的纯合性缺失导致内源性抗体生成的完全抑制。在此种系变种小鼠中人种系免疫球蛋白基因数目的转移在抗原挑战后将导致人抗体的生成。人抗体也可在噬菌体展示库中产生。

[0364] 本发明的抗体优选为通过药学可接受的载体的形式给予受试者。通常,在制剂中使用适量的药学可接受的盐,以使制剂等渗。药学可接受的载体的例子包括生理盐水、林格

氏液和葡萄糖溶液。溶液的pH值优选为约5至8,更优选为约7至7.5。此外,载体还包括缓释制剂,如:含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,其中基质为有形物品形式,如:薄膜、脂质体或微粒。本行业的技术人员熟知,某些载体可能为更优选,取决于例如,抗体的给药途径和浓度。

[0365] 该抗体可通过注射(如:静脉内、腹腔内、皮下、肌肉内)或通过输注等其他方法给予受试者、患者或细胞,确保其以有效的形式传输到血液中。这些抗体也可以通过瘤内或瘤周途径给予,从而发挥局部和全身的治疗作用。局部或静脉注射为优选。

[0366] 抗体给药的有效剂量和时间表可根据经验确定,并且作出此类决定属本行业的技术范围内。本行业的技术人员会明白,必须给予的抗体剂量根据以下因素会有所不同,例如:接受抗体的受试者、给药途径、使用的抗体以及其他正在使用的药物的特定类型。单独使用的抗体的通常日剂量可能为约1 μ g/kg至最多100mg/kg体重或更多,这取决于上述因素。给予抗体,优选为治疗癌症后,治疗抗体的疗效可通过技术人员熟知的不同方法评估。例如:接受治疗的受试者癌症的大小、数量和/或分布可使用标准肿瘤成像技术进行监测。因治疗而给予的抗体与不给予抗体时的病程相比,可阻止肿瘤生长、导致肿瘤缩小、和/或阻止新肿瘤的发展,这样的抗体是一种有效治疗癌症的抗体。

[0367] 本发明的另一方面提出了制备识别特异性肽-MHC复合物的可溶性T细胞受体(sTCR)的一种方法。这种可溶性T细胞受体可从特异性T细胞克隆中产生,并且它们的亲和力可以通过互补决定区靶向诱变而增加。为了T细胞受体选择之目的,可以使用噬菌体展示(美国2010/0113300, (Liddy et al., 2012))。为了在噬菌体展示期间以及实际使用为药物时稳定T细胞受体之目的,可通过非天然二硫键、其他共价键(单链T细胞受体)或通过二聚化结构域连接 α 和 β 链(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T细胞受体可以连接到毒素、药物、细胞因子(参见US 2013/0115191)、域招募效应细胞,如抗CD3域等,以便对靶细胞执行特定的功能。此外,它可能表达于用于过继转移的T细胞。进一步的信息可在WO 2004/033685A1和WO 2004/074322A1中找到。sTCR的组合在WO 2012/056407A1中进行了描述。WO 2013/057586A1中公开了制备的进一步的方法。

[0368] 此外,可用本发明的肽和/或TCR或抗体或其他结合分子在活检样本的基础上验证病理师对癌症的诊断。

[0369] 该抗体或TCR也可用于体内诊断实验。一般来说,抗体用放射性核素标记(如: ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S),从而可免疫闪烁扫描法使肿瘤局限化。在一实施方案中,其中的抗体或片段与两个或两个以上选自包括上述蛋白的组的蛋白靶目标细胞外域结合,并且亲和力值(Kd)低于 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 。

[0370] 诊断用抗体可通过各种影像学方法使用适合检测的探针进行标记。探针检测方法包括但不限于,荧光、光、共聚焦和电镜方法;磁共振成像和光谱学技术;透视、计算机断层扫描和正电子发射断层扫描。合适的探针包括但不限于,荧光素、罗丹明、曙红及其它荧光团、放射性同位素、黄金、钆和其他稀土、顺磁铁、氟-18和其他正电子发射放射性核素。此外,探针可能是双功能或多功能的,并且用一种以上的上述方法可进行检测。这些抗体可用所述的探针直接或间接进行标记。抗体探针的连接,包括探针的共价连接、将探针融合入抗体、以及螯合化合物的共价连接从而结合探针、以及其他本行业熟知的方法。对于免疫组织化学方法,疾病组织样本可能是新鲜或冷冻或可能包埋于石蜡中以及用福尔马林等防腐剂

固定。固定或包埋的切片包括与标记一抗和二抗接触的样本,其中该抗体用于检测原位蛋白的表达。

[0371] 本发明的另一方面包括一种体外制备激活的T细胞的方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人MHC分子进行体外连接,这些分子在合适的抗原提呈细胞表面表达足够的一段时间从而以抗原特异性方式激活T细胞,其中所述抗原为根据本发明所述的一种肽。优选情况是足够量的抗原与抗原提呈细胞一同使用。

[0372] 优选情况是,哺乳动物细胞的TAP肽转载体缺乏或水平下降或功能降低。缺乏TAP肽转运载体的适合细胞包括T2、RMA-S和果蝇细胞。TAP是与抗原加工相关的转运载体。人体肽载入的缺陷细胞株T2从属美国菌种保藏中心(ATCC,12301Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852,美国)目录号CRL1992;果蝇细胞株Schneider 2号株从属ATCC目录CRL 19863;小鼠RMA-S细胞株Ljunggren等人描述过(Ljunggren and Karre,1985)。

[0373] 优选情况是,宿主细胞在转染前基本上不表达MHC I类分子。刺激因子细胞还优选为表达对T细胞共刺激信号起到重要作用的分子,如,B7.1、B7.2、ICAM-1和LFA 3中的任一种分子。大量MHC I类分子和共刺激分子的核酸序列可从GenBank和EMBL数据库中公开获得。

[0374] 当MHC I类表位用作一种抗原时,T细胞为CD8阳性T细胞。

[0375] 如果抗原提呈细胞受到转染而表达这种表位,则优选的细胞包括一个表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:191的肽或变体氨基酸序列。

[0376] 可使用其他一些方法来体外生成T细胞。例如,自体肿瘤浸润性淋巴细胞可用于生成CTL。Plebanski等人在(Plebanski et al.,1995)使用自体外周血淋巴细胞(PLB)制得T细胞。另外,也可能用肽或多肽脉冲处理树突状细胞或通过重组病毒感染而制成自体T细胞。此外,B细胞可用于制备自体T细胞。此外,用肽或多肽脉冲处理或用重组病毒感染的巨噬细胞可用于配制自体T细胞。S.Walter等人在(Walter et al.,2003)中描述了通过使用人工抗原提呈细胞(aAPC)体外激活T细胞,这也是生成作用于所选肽的T细胞的一种合适方法。在本发明中,根据生物素:链霉素生物化学方法通过将预制的MHC:肽复合物耦合到聚苯乙烯颗粒(微球)而生成aAPC。该系统实现了对aAPC上的MHC密度进行精确调节,这使得可以在血液样本中选择地引发高或低亲合力的高效抗原特异性T细胞反应。除了MHC:肽复合物外,aAPC还应携运含共刺激活性的其他蛋白,如耦合至表面的抗-CD28抗体。此外,此类基于aAPC的系统往往需要加入适当的可溶性因子,例如,诸如白细胞介素12的细胞因子。

[0377] 也可用同种异体细胞制得T细胞,在WO 97/26328中详细描述了一种方法,以参考文献方式并入本文。例如,除了果蝇细胞和T2细胞,也可用其他细胞来提呈肽,如CHO细胞、杆状病毒感染的昆虫细胞、细菌、酵母、牛痘感染的靶细胞。此外,也可使用植物病毒(例如,参阅Porta等人在(Porta et al.,1994)中描述了将豇豆花叶病毒开发为一种提呈外来肽的高产系统。

[0378] 被激活的T细胞直接针对本发明中的肽,有助于治疗。因此,本发明的另一方面提出了用本发明前述方法制得的激活T细胞。

[0379] 按上述方法制成的激活T细胞将会有选择性地识别异常表达含SEQ ID NO:1至SEQ IDNO 191氨基酸序列的多肽。

[0380] 优选情况是,T细胞通过与其含HLA/肽复合物的TCR相互作用(如,结合)而识别该

细胞。T细胞是杀伤患者靶细胞方法中有用的细胞,其靶细胞异常表达含本发明中氨基酸序列的多肽。此类患者给予有效量的激活T细胞。给予患者的T细胞可能源自该患者,并按上述方法激活(即,它们为自体T细胞)。或者,T细胞不是源自该患者,而是来自另一个人。当然,优选情况是该供体为健康人。发明人使用“健康个人”系指一个人一般状况良好,优选为免疫系统合格,更优选为无任何可很容易测试或检测到的疾病。

[0381] 根据本发明,CD8-阳性T细胞的体内靶细胞可为肿瘤细胞(有时表达MHC-II类抗原)和/或肿瘤周围的基质细胞(肿瘤细胞)(有时也表达MHC-II类抗原;(Dengjel et al., 2006))。

[0382] 本发明所述的T细胞可用作治疗性组合物中的活性成分。因此,本发明也提出了一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明中氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者上述有效量的T细胞。

[0383] 发明人所用的“异常表达”的意思还包括,与正常表达水平相比,多肽过表达,或该基因在源自肿瘤的组织中未表达,但是在该肿瘤中却表达。“过表达”系指多肽水平至少为正常组织中的1.2倍;优选为至少为正常组织中的2倍,更优选为至少5或10倍。

[0384] T细胞可用本领域已知的方法制得(如,上述方法)。

[0385] T细胞继转移方案为本领域所熟知的方案。综述可发现于:Gattioni et al.和Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006)。

[0386] 本发明的另一个方面包括使用与MHC复合的肽,以生成T细胞受体,其核酸被克隆并被引入至宿主细胞,优选为T细胞。然后,该通过基因工程改变的T细胞可转给患者用于癌症治疗。

[0387] 本发明的任一分子(即肽、核酸、抗体、表达载体、细胞,激活T细胞、T细胞受体或其编码核酸)都有益于治疗疾病,其特点在于细胞逃避免疫反应的打击。因此,本发明的任一分子都可用作药剂或用于制造药剂。这种分子可单独使用也可与本发明中的其他分子或已知分子联合使用。

[0388] 本发明还涉及一种试剂盒,其包括:

[0389] (a) 一个容器,包含上述溶液或冻干形式的药物组合物;

[0390] (b) 可选的第二个容器,其含有冻干剂型的稀释剂或重组溶液;和

[0391] (c) 可选的(i) 使用溶液或(ii) 重构和/或使用冻干剂型的说明书。

[0392] 该试剂盒还步包括一个或多个(iii) 缓冲剂, (iv) 稀释剂, (v) 过滤液, (vi) 针, 或(v) 注射器。容器最好是瓶子、小瓶、注射器或试管,可以为多用途容器。药物组合物最好是冻干的。

[0393] 本发明中的试剂盒优选包含一种置于合适容器中的冻干制剂以及重构和/或使用的说明。适当的容器包括,例如瓶子、西林瓶(如双室瓶)、注射器(如双室注射器)和试管。该容器可能由多种材料制成,如玻璃或塑料。试剂盒和/或容器最好有容器或关于容器的说明书,指明重组和/或使用的方向。例如,标签可能表明冻干剂型将重组为上述肽浓度。该标签可进一步表明制剂用于皮下注射。

[0394] 存放制剂的容器可使用多用途西林瓶,使得可重复给予(例如,2-6次)重组剂型。该试剂盒可进一步包括装有合适稀释剂(如碳酸氢钠溶液)的第二个容器。

[0395] 稀释液和冻干制剂混合后,重组制剂中的肽终浓度优选为至少0.15mg/mL/肽(=

75 μ g), 不超过3mg/mL/肽(=1500 μ g)。该试剂盒还可包括商业和用户角度来说可取的其他材料, 包括其他缓冲剂、稀释剂, 过滤液、针头、注射器和带有使用说明书的包装插页。

[0396] 本发明中的试剂盒可能有一个单独的容器, 其中包含本发明所述的药物组合物制剂, 该制剂可有其他成分(例如, 其他化合物或及其药物组合物), 也可无其他成分, 或者每种成分都有其不同容器。

[0397] 优选情况是, 本发明的试剂盒包括与本发明的一种制剂, 包装后与第二种化合物(如佐剂(例如GM-CSF)、化疗药物、天然产品、激素或拮抗剂、抗血管生成剂或抑制剂、凋亡诱导剂或螯合剂)或其药物组合物联合使用。该试剂盒的成分可进行预络合或每种成分在给予患者之前可放置于单独的不同容器。该试剂盒的成分可以是一种或多种溶液, 优选为水溶液, 更优选为无菌水溶液。该试剂盒的成分也可作为固体形式, 加入合适的溶剂后转换为液体, 最好放置于另一个不同的容器中。

[0398] 治疗试剂盒的容器可能为西林瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器、或任何其他盛装固体或液体的工具。通常, 当成分不只一种时, 试剂盒将包含第二个西林瓶或其他容器, 使之可以单独定量。该试剂盒还可能包含另一个装载药学可接受的液体的容器。优选情况是, 治疗试剂盒将包含一个设备(如, 一个或多个针头、注射器、滴眼器、吸液管等), 使得可注射本发明的药物(本试剂盒的组合物)。

[0399] 本发明的药物配方适合以任何可接受的途径进行肽给药, 如口服(肠道)、鼻内、眼内、皮下、皮内、肌内, 静脉或经皮给药。优选为皮下给药, 最优选为皮内给药, 也可通过输液泵给药。

[0400] 由于本发明的肽从CRC中分离而得, 因此, 本发明的药剂优选用于治疗CRC。

[0401] 本发明进一步涉及为个体患者制备个体化药物的一种方法, 其中包括: 制造含选自预筛选TUMAP库至少一种肽的药物组合物, 其中药物组合物中所用的至少一种肽选择为适合于个体患者。在一项实施方案中, 药物组合物为一种疫苗。该方法也可以改动以产生下游应用的T细胞克隆物, 如: TCR隔离物或可溶性抗体和其他治疗选择。

[0402] “个体化药物”系指专门针对个体患者的治疗, 将仅用于该等个体患者, 包括个体化活性癌症疫苗以及使用自体组织的过继细胞疗法。

[0403] 如本文所述, “库”应指已经接受免疫原性预筛查和/或在特定肿瘤类型中过量提呈的一组或一系列肽。“库”一词并不暗示, 疫苗中包括的特定肽已预先制造并储存于物理设备中, 虽然预期有这种可能性。明确预期所述肽可以用于新制造每种个体化疫苗, 也可能被预先制造和储存。库(例如, 数据库形式)由肿瘤相关肽组成, 其在各种HLA-A HLA-B和HLA-C等位基因CRC患者的肿瘤组织中高度过表达。其可能含有包括MHC I类和MHC II类肽或拉长的MHC I类肽。除了从几种CRC组织中采集的肿瘤相关肽外, 库还可能包含HLA-A*02和HLA-A*24标记肽。这些肽可对TUMAP诱导的T细胞免疫进行量化比较, 从而可得出疫苗抗肿瘤反应能力的重要结论。其次, 在没有观察到来自患者“自身”抗原TUMAP的任何疫苗诱导的T细胞反应时, 它们可作为来自“非自身”抗原的重要阳性对照肽。第三, 它还可对患者的免疫功能状态得出结论。

[0404] 库的TUMAP通过使用一种功能基因组学方法进行鉴定, 该方法结合了基因表达分析、质谱法和T细胞免疫学(XPresident®)。该方法确保了只选择真实存在于高百分比肿瘤但在正常组织中不表达或仅很少量表达的TUMAP用于进一步分析。对于初始肽的选择, 患者的

CRC样本和健康供体的血液以循序渐进的方法进行分析：

[0405] 1. 恶性材料的HLA配体用质谱法确定

[0406] 2. 使用全基因组信使核糖核酸 (mRNA) 表达分析法用于确定恶性肿瘤组织 (CRC) 与一系列正常器官和组织相比过表达的基因。

[0407] 3. 确定的HLA配体与基因表达数据进行比较。肿瘤组织上过度提呈或选择性提呈的肽, 优选为第2步中检测到的选择性表达或过表达基因所编码的考虑为多肽疫苗的合适候选TUMAP。

[0408] 4. 文献检索以确定更多证据以支持确认为TUMAP的肽的相关性

[0409] 5. 过表达在mRNA水平的相关性由肿瘤组织第3步选定的TUMAP重新检测而确定, 并且在健康组织上缺乏 (或不经常) 检测。

[0410] 6. 为了评估通过选定的肽诱导体内T细胞反应是否可行, 使用健康供体以及CRC患者的人T细胞进行体外免疫原性测定。

[0411] 一方面, 在将所述肽加入库之前, 对其进行筛查以了解免疫原性。举例来说 (但不限于此), 纳入库的肽的免疫原性的确定方法包括体外T细胞激活, 具体为: 用装载肽/MHC复合物和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞反复刺激来自健康供体的CD8⁺T细胞。

[0412] 这种方法优选用于罕见癌症以及有罕见表达谱的患者。与含目前开发为固定组分的多肽鸡尾酒相反的是, 库可将肿瘤中抗原的实际表达于疫苗进行更高层次的匹配。在多目标方法中, 每名患者将使用几种“现成”肽的选定单一肽或组合。理论上来说, 基于从50抗原肽库中选择例如5种不同抗原肽的一种方法可提供大约170万种可能的药物产品 (DP) 组分。

[0413] 在一方面, 选择所述肽用于疫苗, 其基于个体患者的适合性, 并使用本发明此处或后文所述的方法。

[0414] HLA表型、转录和肽组学资料从患者的肿瘤材料和血液样本中收集, 以确定最合适每名患者且含有“库”和患者独特 (即突变) TUMAP的肽。将选择的那些肽选择性地或过表达于患者肿瘤中, 并且可能的情况下, 如果用患者个体PBMC进行检测, 则表现出很强的体外免疫原性。

[0415] 优选的情况是, 疫苗所包括的肽的一种确定方法包括: (a) 识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽 (TUMAP); (b) 将 (a) 中鉴定的肽与上述肽的库 (数据库) 进行比对; 且 (c) 从与患者中确定的肿瘤相关肽相关的库 (数据库) 中选择至少一种肽。例如, 肿瘤样本提呈的TUMAP的鉴定方法有: (a1) 将来自肿瘤样本的表达数据与所述肿瘤样本组织类型相对应的正常组织样本的表达数据相比对, 以识别肿瘤组织中过表达或异常表达的蛋白; 以及 (a2) 将表达数据与结合到肿瘤样本中I类MHC和/或II类分子的MHC配体序列相关联, 以确定来源于肿瘤过表达或异常表达的蛋白的MHC配体。优选情况是, MHC配体的序列的确定方法是: 洗脱来自肿瘤样本分离的MHC分子结合肽, 并测序洗脱配体。优选情况是, 肿瘤样本和正常组织从同一患者获得。

[0416] 除了使用库 (数据库) 模型选择肽以外, 或作为一种替代方法, TUMAP可能在新患者中进行鉴定, 然后列入疫苗中。作为一种实施例, 患者中的候选TUMAP可通过以下方法进行鉴定: (a1) 将来自肿瘤样本的表达数据与所述肿瘤样本组织类型相对应的正常组织样本的表达数据相比对, 以识别肿瘤组织中过表达或异常表达的蛋白; 以及 (a2) 将表达数据与结

合到肿瘤样本中I类MHC和/或II类分子的MHC配体序列相关联,以确定来源于肿瘤过表达或异常表达的蛋白的MHC配体。作为另一实施例,蛋白的鉴定方法为可包含突变,其对于肿瘤样本相对于个体患者的相应正常组织是独特的,并且TUMAP可通过特异性靶向作用于变异来鉴定。例如,肿瘤以及相应正常组织的基因组可通过全基因组测序方法进行测序:为了发现基因蛋白编码区域的非同义突变,从肿瘤组织中萃取基因组DNA和RNA,从外周血单核细胞(PBMC)中提取正常非突变基因组种系DNA。运用的NGS方法只限于蛋白编码区的重测序(外显子组重测序)。为了这一目的,使用供货商提供的靶序列富集试剂盒来捕获来自人样本的外显子DNA,随后使用HiSeq2000(Illumina公司)进行测序。此外,对肿瘤的mRNA进行测序,以直接定量基因表达,并确认突变基因在患者肿瘤中表达。得到的数以百万计的序列读数通过软件算法处理。输出列表中包含突变和基因表达。肿瘤特异性体突变通过与PBMC衍生的种系变化比较来确定,并进行优化。然后,为了库可能测试新确定的肽了解如上所述的免疫原性,并且选择具有合适免疫原性的候选TUMAP用于疫苗。

[0417] 在一个示范实施方案中,疫苗中所含肽通过以下方法确定:(a)用上述方法识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);(b)将(a)中鉴定的肽与已经针对免疫原性和在肿瘤中(与相应的正常组织相比)过量提呈进行预筛查肽的库进行比对;(c)选择库中的与患者中确定的肿瘤相关肽相关的至少一种肽;及(d)可选地在(a)中选择至少一种新确定的肽,确认其免疫原性。

[0418] 在一个示范实施方案中,疫苗中所含肽通过以下方法确定:(a)识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);以及(b)在(a)中选择至少一种新确定的肽,并确认其免疫原性。

[0419] 一旦选定了用于个体化肽疫苗的肽时,则生产疫苗。该疫苗优选为一种液体制剂,包括溶解于20-40% DMSO之间,优选为约30-35% DMSO,例如,约33% DMSO中的个体肽。

[0420] 列入产品的每种肽都溶于DMSO中。单个肽溶液浓度的选择取决于要列入产品中的肽的数量。单肽-DMSO溶液均等混合,以实现一种溶液中包含所有的肽,且浓度为每肽~2.5mg/ml。然后该混合溶液按照1:3比例用注射用水进行稀释,以达到在33% DMSO中每肽0.826mg/ml的浓度。稀释的溶液通过0.22 μ m无菌筛检程序进行过滤。从而获得最终本体溶液。

[0421] 最终本体溶液填充到小瓶中,在使用前储存于-20 $^{\circ}$ C下。一个小瓶包含700 μ L溶液,其中每种肽含有0.578mg。其中的500 μ L(每种肽约400 μ g)将用于皮内注射。

[0422] 本发明的肽除了用于治疗癌症,也可用于诊断。由于肽由CRC细胞产生,并且已确定这些肽在正常组织中不存在或水平较低,因此这些肽可用于诊断癌症是否存在。

[0423] 血液样本中组织活检物含权利要求的肽,可有助于病理师诊断癌症。用抗体、质谱或其他本领域内已知的方法检测某些肽可使病理师判断该组织样本为恶性的还是炎症或一般病变,也可用作CRC的生物标志物。肽基团的提呈使得能对病变组织进行分类或进一步分成子类。

[0424] 对病变标本中肽的检测使得能对免疫系统治疗方法的利益进行判断,特别是如果T-淋巴细胞已知或预计与作用机制有关。MHC表达的缺失是一种机制,充分说明了哪些受感染的恶性细胞逃避了免疫监视。因此,肽的提呈表明,分析过的细胞并没有利用这种机制。

[0425] 本发明的肽可用于分析淋巴细胞对肽的反应(如T细胞反应),或抗体对肽或MHC分

子络合的肽发生的反应。这些淋巴细胞反应可以作为预后指标,决定是否采取进一步的治疗。这些反应也可以用作免疫疗法中的替代反应指标,旨在以不同方式诱导淋巴细胞反应,如接种蛋白疫苗、核酸、自体材料、淋巴细胞过继转移。基因治疗中,淋巴细胞对肽发生的反应可以在副作用的评估中考虑。淋巴细胞反应监测也可能成为移植疗法随访检查中的一种有价值的工具,如,用于检测移植抗宿主和宿主抗移植疾病。

[0426] 下列描述优选方案的实施例将对本发明进行说明,并参照随附图表(但是不仅限于此)。考虑到本发明的目的,文中引用的所有参考文献通过引用的方式并入在本文中。

附图说明

[0427] 图1A至M显示了正常组织(白色柱)和CRC(黑色柱)中各种肽的过量提呈。图1A:基因符号:ZNF679、ZNF716、SAPCD2,肽:ALIKQLFEA (SEQ ID NO.:1),从左至右的组织:1脂肪组织、3肾上腺、6动脉、3骨髓、7大脑、3乳腺、1神经、1卵巢、8食管、2胆囊、5心脏、16肾脏、21肝脏、46肺、3淋巴结、4白细胞样本、3卵巢、7胰腺、4外周神经、1腹膜、1脑垂体、2胎盘、3胸膜、1前列腺、2唾液腺、4骨骼肌、4皮肤、2小肠、4脾、7胃、4睾丸、2胸腺、3甲状腺、1气管、1输尿管、3膀胱、2子宫、2静脉、13结肠、6直肌、24CRC。该肽还在9/99肺癌、2/28脑癌、4/20卵巢癌、1/45胃癌、1/33前列腺癌和2/15的食道癌中检测出(未列出)。图1B:基因符号:BRCA2,肽:KQFEGTVEI (SEQ ID NO.:138),从左至右的组织:1脂肪组织、3肾上腺、6动脉、3骨髓、7大脑、3乳腺、1神经、1卵巢、8食管、2胆囊、5心脏、16肾脏、21肝脏、46肺、3淋巴结、4白细胞样本、3卵巢、7胰腺、4外周神经、1腹膜、1脑垂体、2胎盘、3胸膜、1前列腺、2唾液腺、4骨骼肌、4皮肤、2小肠、4脾、7胃、4睾丸、2胸腺、3甲状腺、1气管、1输尿管、3膀胱、2子宫、2静脉、13结肠、6直肌、24CRC。该肽还在1/15食道癌、1/28脑癌、1/45胃癌症和3/91的肺癌中检测出(未列出)。图1C:基因符号:IL8,肽:KLAVALLAA (SEQ ID NO.:210),从左至右的组织:1脂肪组织、3肾上腺、6动脉、3骨髓、7大脑、3乳腺、1神经、1卵巢、8食管、2胆囊、5心脏、16肾脏、21肝脏、46肺、3淋巴结、4白细胞样本、3卵巢、7胰腺、4外周神经、1腹膜、1脑垂体、2胎盘、3胸膜、1前列腺、2唾液腺、4骨骼肌、4皮肤、2小肠、4脾、7胃、4睾丸、2胸腺、3甲状腺、1气管、1输尿管、3膀胱、2子宫、2静脉、13结肠、6直肌、24CRC。该肽还在14/99肺癌、1/18肾癌、2/28脑癌、2/16肝癌、1/20卵巢癌、1/45胃癌症和3/15的食道癌中检测出(未列出)。图1D)基因符号:TMEM222,肽:LLYGKYVSV (SEQ ID NO.:31),从左至右的组织:3胰腺细胞系、3皮肤细胞系、1白细胞细胞系、0正常组织、28癌组织(2脑癌、1乳腺癌、1结肠癌、1食道癌、2肾癌、1白血病、5肝癌、7肺癌、5卵巢癌、1前列腺癌、2直肠癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1D和表4之间的肿瘤类型相关的差异可能是由于表4采用更严格的选择标准所致(详情请参照表4)。图1D显示了可检测提呈肽Y的所有样本,无论过度提呈参数和技术样本质量检查如何。图1E:基因符号:ZNF679、ZNF716、SAPCD2,肽:ALIKQLFEA (SEQ ID NO.:1),从左至右的组织:7癌细胞系、1原发性癌症细胞培养物、58癌组织(5脑癌、1乳腺癌、9结肠癌、1结直肠癌、3食道癌、1胆囊癌、2白细胞白血病、15肺癌、2淋巴结癌、1骨髓细胞癌、5卵巢癌、1前列腺癌、4直肠癌、1皮肤癌、2胃癌、2膀胱癌、3子宫癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1F:F)基因符号:PLAGL2,肽:FLAELPGSLSL (SEQ ID NO.:6),从左至右的组织:8癌细胞系、1原发性癌症细胞培养物、2正常组织(1淋巴结、1脾)、57癌组织(1骨髓癌、1乳腺癌、1盲肠癌、5结肠癌、2食道癌、1胆囊癌、3白细胞白血病、2肝癌、13肺癌、8淋巴结癌、1骨髓细胞癌、9卵巢癌、2直肠癌、1

皮肤癌、1胃癌、4膀胱癌、2子宫癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1G:基因符号:CYP2W1,肽:FLDANGHFV (SEQ ID NO.:23),从左至右的组织:1原发性癌症细胞培养物、3正常组织(3胎盘)、12癌组织(5结肠癌、1食道癌、1胆囊癌、2直肠癌、3胃癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1H:基因符号:CYP2W1,肽:GLIDEVMVL (SEQ ID NO.:22),从左至右的组织:1正常组织(1胃)、6癌组织(3结肠癌、1胆囊癌、2直肠癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1I:基因符号:AXIN2,肽:ILDDHLSRV (SEQ ID NO.:9),从左至右的组织:5癌组织(1盲肠癌、1结肠癌、1肺癌、2直肠癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1J:基因符号:RAD54B,肽:KLLAVIHEL (SEQ ID NO.:152),从左至右的组织:3细胞系、2正常组织(1淋巴结、1脾)、34癌组织(1乳腺癌、7结肠癌、1食道癌、1胆囊癌、1肾癌、8肺癌、4淋巴结癌、1骨髓细胞癌、4卵巢癌、1胰腺癌、1直肠癌、3皮肤癌、1膀胱癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1K:基因符号:ECT2,肽:SLVQRVETI (SEQ ID NO.:142),从左至右的组织:5细胞系、1原代培养物、47癌组织(2胆管癌、2乳腺癌、1盲肠癌、7结肠癌、3食道癌、3胆囊癌、1肾癌、2肝癌、10肺癌、2淋巴结癌、4卵巢癌、1胰腺癌、2直肠癌、2皮肤癌、1胃癌、2膀胱癌、2子宫癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1L:基因符号:MMP12,肽:KIQEMQHFL (SEQ ID NO.:192),从左至右的组织:1原代培养物、44癌组织(5结肠癌、1食道癌、1胆囊癌、1头颈部癌、30肺癌、1淋巴结癌、1直肠癌、1胃癌、1睾丸癌、1膀胱癌、1子宫癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。图1M:基因符号:COL6A3,肽:FLLDGSANV (SEQ ID NO.:212),从左至右的组织:3细胞系、2正常组织(1胎盘、1脾)、146癌组织(4胆管癌、13乳腺癌、1盲肠癌、8结肠癌、1结直肠癌、6食道癌、5胆囊癌、5头颈部癌、2肾癌、1肝癌、62肺癌、2淋巴结癌、9卵巢癌、7胰腺癌、3直肠癌、4皮肤癌、5胃癌、5膀胱癌、3子宫癌)。测试的正常组织系列与图1A-C中相同。

[0428] 图2A至C显示了本发明的源基因的代表性表达特征(与正常结肠和直肠相比的相对表达),这些基因在一系列正常组织(白色柱)CRC中以及10份CRC样本(黑色柱)中高度过表达或专门表达。从左到右的组织:肾上腺、动脉、骨髓、脑(全部)、乳腺、结肠、食管、心脏、肾(三份)、白细胞、肝、肺、淋巴结、卵巢、胰腺、胎盘、前列腺、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、膀胱、宫颈、子宫、静脉、3个正常结肠样本、10个CRC样本。图2A,CCNB1;图2B,CDK1;图2C,CHMP5。图2D显示了本发明的源基因的代表性表达特征(与正常结肠和直肠相比的相对表达),这些基因在一系列正常组织(白色柱)CRC中以及20份CRC样本(黑色柱)中高度过表达或专门表达。从左到右的组织:6动脉、2血细胞、2大脑、1心脏、2肝、3肺、2静脉、1脂肪组织、1肾上腺、5骨髓、1软骨、1结肠、1食道、2眼睛、2胆囊、2唾液腺、1肾脏、6淋巴结、4胰腺、2外周神经、2脑下垂体、1直肠、2骨骼肌、1皮肤、1小肠、1脾脏、1胃、1甲状腺、7气管、1膀胱、1乳腺癌、5卵巢、5胎盘、1前列腺、1睾丸、1胸腺、1子宫、20个CRC样本。图2D:ECT2。

[0429] 图3显示了示例性的免疫原性数据:肽特定多聚体染色后的流式细胞仪结果。

[0430] 图4A至C显示了健康HLA-A*02+供体的肽特异性CD8+T细胞体外反应的示例性结果。CD8+T细胞制备的方法为:使用抗CD28mAb和HLA-A*02涂层的人工APC分别用SeqID No 22肽(A,左图)、SeqID No 9肽(B,左图)或SeqID No 142肽(C,左图)致敏。经过3个周期的刺激后,用A*02/SeqID No 22(A)、A*02/SeqID No 9(B)或A*02/SeqID No 142(C)的2D多聚体染色法对肽反应性细胞进行检测。右图(A、B和C)显示用不相关A*02/肽复合体刺激的细胞对照染色。存活的单细胞针对CD8+淋巴细胞进行门控。Boolean门控帮助排除用不同肽特定

的多聚体检测的假阳性事件。提示了CD8+淋巴细胞中特异性多聚体+细胞的频率。

[0431] 实施例

[0432] 实施例1

[0433] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的识别和定量

[0434] 组织样本

[0435] 患者的肿瘤组织获得自蒂宾根大学医院。

[0436] 正常组织获得自Asterand, Detroid, USA和Royston, Herts, UK、Bio-Options Inc., CA, USA、BioServe, Beltsville, MD, USA、Capital BioScience Inc., Rockville, MD, USA、Geneticist Inc., Glendale, CA, USA、Tissue Solutions Ltd, Glasgow, Scotland, UK、日内瓦大学医院、海德堡大学医院、京都府立医科大学 (KPUM)、慕尼黑大学医院、ProteoGenex Inc., Culver City, CA, USA、蒂宾根大学医院。

[0437] 所有患者在手术或尸检前都获得了书面知情同意。切除后组织立即进行冷休克处理, 在分离TUMAP前储存于-70℃或以下。

[0438] 从组织样本中分离HLA肽

[0439] 根据方案 (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) 略加修改, 使用HLA-A*02特异性抗体BB7.2、HLA-A、HLA-B、HLAC特异性抗体W6/32、CNBr活化的琼脂糖凝胶、酸处理和超滤方法以固体组织的免疫沉淀法获得了冷休克组织样本的HLA肽库。

[0440] 质谱分析

[0441] 获得的HLA肽库根据其疏水性用反相色谱 (nanoAcquity UPLC system, Waters) 分离, 洗脱肽用装有电喷雾源的LTQ-velos融合杂交质谱 (ThermoElectron) 进行了分析。肽库被直接加载填充有1.7μm C18反相材料 (Waters) 的分析用熔炼石英微毛细管柱 (75μm内径 x 250mm), 应用流速为400nL每分钟。随后, 使用来自流速为300nL每分钟、浓度为10%至33%溶剂B中的两步180分钟二元梯度法对肽进行分离。梯度由溶剂A (含0.1%甲酸的水) 和溶剂B (含0.1%甲酸的乙腈)。金镀膜玻璃毛细管 (PicoTip, New Objective) 用于引入到纳升电喷雾源。使用前5 (TOP5) 策略在数据依赖模式下操作LTQ-Orbitrap质谱仪。简言之, 首先以高精度质量完全扫描在orbitrap开始一个扫描周期 (R=30000), 之后用先前选定离子的动态排除技术在orbitrap中对5种含量最为丰富的前体离子进行MS/MS扫描 (R=7500)。串联质谱以SEQUEST和另一种手动控制器进行解读。生成的自然肽破碎模式与合成序列相同参考肽的破碎模式进行比较后, 确保了被识别的肽序列。

[0442] 无标记的相对LC-MS定量通过离子计数 (即通过LC-MS功能提取和分析) 来进行 (Mueller et al., 2007)。该方法假定肽的LC-MS信号区域与样本中其丰度相关。提取的特征通过充电状态去卷积和保留时间校准进行进一步处理 (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008)。最后, 所有的LC-MS特征与序列鉴定结果交叉引用, 以将不同样本和组织的定量数据与肽呈递特征结合。定量数据根据集中数据以两层方式进行正态化处理, 以说明技术和生物学复制变异。因此, 每个被识别的肽均可与定量资料相关, 从而可得出样本和组织之间的相对定量。此外, 对候选肽获得的所有定量数据进行手动检查, 以确保数据的一致性, 并验证自动化分析的准确度。对于每种肽, 计算了提呈图, 其显示样本平均提呈量以及复制变化。这些特征使CRC样本与正常组织样本的基线值并列。示范性过度提呈肽的提呈谱示于图1中。示范性肽的提呈分数见表8。

[0443] 表8:提呈分数。该表列出了与一系列正常组织相比在肿瘤上非常高度过量提呈(++++)、与一系列正常组织相比在肿瘤上高度过量提呈(+++)或与一系列正常组织相比在肿瘤上过量提呈(++)的肽。

[0444]

序列 ID 号	序列	肽提呈
1	ALIKQLFEA	++++
2	ALLPRYFFL	++++
3	RLIPDTLYSV	++++
4	RLAELTVDEFL	++++
5	WLFDDGGLTL	++++
6	FLAELPGSLSL	++
7	YLTRHLAVL	++++
8	ALMLQGVDLL	++++
9	ILDDHLSRV	++++
10	RMYNKIFAI	++++
11	YLFKTFNM	++++
12	ALVQGILERV	++++
13	FLLAEDTKV	++++
15	LQLDKEFQL	++
16	VLVDQSWVL	++++

[0445]

序列 ID 号	序列	肽提呈
17	ALAAARVEL	+++
18	FLSSLKGGLL	+++
19	RLYTKLLNEA	+++
21	VLIDHRWVL	+++
22	GLIDEVMVL	+++
23	FLDANGHFV	+
25	SLADRLIGV	+++
26	GLASKENFSNVSL	+++
27	LLADEDSSYL	+++
30	GLSSAYGGL	+++
31	LLYGKYVSV	+++
32	KLNTETFGV	+++
33	ALWEKNTHL	+++
34	ILLEKSVSV	+++
35	KLLDLTVRI	+++
36	GLLESPSIFNFTA	+++
37	GLFAGLGGAGA	+++
38	SLAPTPVSA	+++
39	GLNGGSPAAA	+++
40	ALSNVIHKV	+++
41	ILDDSFKLL	++
42	SILDDSFKL	+++
43	TLDAAQPRV	++
44	SLESKLTSV	+++
45	ALAEELLHGA	+++
46	GLDDRYSLV	+
47	KLYERCEVV	++
48	FLDASDPAL	+++
51	QVWEIQHTV	++
53	FLLGSEIKL	++
54	ALLNGEYLLAA	+
56	VLFTDEGVPKFL	+
57	NLLEKENYL	++
58	AMADKMDMSL	+
59	LLTDNVVKL	+
60	VLDEDEPRFL	+
61	KLLKLFQGV	+++
62	YLAPENGYL	++
63	KLFSILSTV	+
64	KTLGKLWRL	+++

[0446]

序列 ID 号	序列	肽提呈
65	FGAPGIISA	+++
66	GLDDGPDFL	+
67	SLNDLEKDVMLL	+
68	SILQFVH MV	++
69	GMLNEAEGKAIKL	+
70	MISELEURL	+
71	RLWTEIPTAI	++
72	YLLDYPNNLL	++
73	YLFDAVSM	++
74	YLMGFLHAV	++
75	EMIENIQSV	+
77	SLLKRDFGA	+
78	ALDPELLLL	+
80	QVDEVVDIMRV	++
81	ALLSQQTHL	++
82	QLYEEDTKL	++
83	LTIEDGIFEV	+
88	KLDIKVETV	+
89	SLIEYFRV	++
90	GLLKPGLNVVL	+
92	WIDDTSAFV	+++
93	SLQELRLLL	+
95	AILDAHIEV	+
96	KLYSRLVYV	++
97	ALWWGVVTV	++
100	SLDDFLATA	+
102	KILVSLIEV	+++
103	FLFGYPKRL	+
110	LLGELPRLLLL	+
111	HMDDGGYSM	+
112	KLGGVLIYL	+++
113	ILYDLQQNL	+
123	KTLEERSYLL	+++
124	RVLPPSALQSV	++
125	KLGGDFLLVEL	+++
126	TLAKYLMEL	+++
127	RLAELTVDEFLA	+++
128	MLDDRAYLV	++
129	VLIDVLKEL	+++
130	GLGGSQIDTHL	+++

[0447]

序列 ID 号	序列	肽提呈
131	KLLDVVHPA	+++
132	ALLNAILHSA	+++
133	RTFEKIEEV	+++
134	GVAGGSILKGV	+++
135	KLQEEIPVL	+++
136	KLFDIFSQQV	+++
137	QLTEIKPLL	+++
138	KQFEGTVEI	+++
139	VLLNEILEQV	+
141	AVIEHLERL	+++
142	SLVQRVETI	+++
143	KLSDVWKEL	+++
144	LLNDRIWLA	+
145	LLLEVVKQV	+++
146	ALSDETWGL	+
148	RLENMTEVV	++
150	RLADLEALKV	+++
152	KLLAVIHEL	+
153	ILFSEDSTKLFV	+
154	KLPSETIFVGC	+
155	RLLGEEVVRV	++
156	SLMMTIINL	++
157	SLIERDLKL	++
158	GLLDPSVFHV	+++
159	VLVDDDGIKVV	+++
160	KLLEFDQLQL	++
161	FLKNELDNV	++
162	KLMDYIDEL	++
163	RLLHEVQEL	++
164	KMLDEILLQL	++
165	RLLDFPEAMVL	+++
166	GLLEARGILGL	+
168	GLIRFPLMTI	++
170	ALAGGITMV	++
171	RLQETEGMVAV	+
172	LLLDTVMTMQV	+
173	KLGDLMVLL	+
177	ALLQGAIESV	+
178	YLFREPATI	+
179	RLLJPLSSA	+

[0448]

序列 ID 号	序列	肽提呈
180	NLLEIAPHL	++
183	TLQEVVTGV	+
185	VLYTGVRV	+
186	KMSEKILL	+
187	GLHNVVYGI	++
188	FLVDGPRVQL	+
192	KIQEMQHFL	+++
193	KLSPTVVGL	+++
194	SLYKGLLSV	+++
195	LLGERVAL	+++
198	VLYGPDVPTI	++
199	FLLEREQLL	+++
201	GJFNGALAAV	+++
202	GLAALAVHL	+++
203	KLIDLSQVMYL	+
204	KLLDLETERILL	++
205	RLHDENILL	+++
206	RIAGIRGIQGV	++
207	KLCEGFNEV	+++
208	RLIDRIKTV	+++
209	KLQDGLLHI	+++
210	KLAVALLAA	+++
211	SLFGKKYIL	+++
213	LLWAPTAQA	+++
214	SVLEKEIYSI	+++
215	KLQEKIQEL	+++
216	YLWDLHDHGFAGV	+++
217	KLLDTMVDFTL	++
218	KLSWDLIYL	+
220	KMDPVAYRV	+
221	ILNVDGLIGV	+
223	VLMQDSRLYL	+++
224	QLQEGKNVIGL	+++
225	YLYGQTTTYL	+
226	FLVDGSWSV	+
227	LTAPPEALLMV	++
228	SMSGYDQVL	+
229	YLLEKFVAV	++
230	AMSSKFFLV	++
231	RLFADILNDV	+++

序列 ID 号	序列	肽提呈
232	RLLDSVSRL	+
233	RLDDLKMTV	++
234	KMFESFIESV	++
235	LLHEENFSV	++
236	KMSELQTYV	+
237	KLVEFDLGA	++
238	NMLEAVHTI	++
239	QLIEKNWLL	+++
240	VLAPRVLRA	++
241	ILIDWLQV	+
[0449] 242	RLEEDDGDVAM	++
243	TLMDMRLSQV	+
244	SLHFLILYV	+
245	QLIDYERQL	+
246	GLTDNIHLV	+
247	SLDTLMTYV	+
249	ALYGRLEV	+
250	ALCEENMRGV	+
252	YVYQNNIYL	+
254	VLVFEALWHV	++
257	SLADFMQEV	++
259	ALADKELLPSV	+
261	YLYDSETKNA	+

[0450] 实施例2

[0451] 编码本发明肽的基因的表达谱

[0452] 与正常细胞相比,一种肽在肿瘤细胞上的过度提呈或特定提呈足以使其用在免疫治疗中,且一些肽为肿瘤特异性的,尽管其源蛋白也存在于正常组织中。而且,mRNA表达谱增加了免疫治疗目标肽选择中的额外的安全级别。特别是对于具有高安全性风险的治疗选择,诸如亲和力成熟的TCR,理想的目标肽将来源于该肿瘤独有的且不出现于正常组织中的蛋白。

[0453] RNA来源与制备

[0454] 手术切除组织标本按如上所述(参见实施例1)在获得每名患者的书面知情同意后提供。手术后立即速冻肿瘤组织标本,之后在液态氮中用杵臼匀浆。使用TRI试剂(Ambion公司,Darmstadt,德国)之后,用RNeasy(QIAGEN公司,Hilden,德国)清理,从而从这些样本中制备总RNA;这两种方法都根据制造商的方案进行。

[0455] 健康人体组织中的总RNA从商业途径获得(Ambion公司,Huntingdon,英国;Clontech公司,海德堡,德国;Stratagene公司,阿姆斯特丹,荷兰;BioChain公司,Hayward,CA,美国)。混合数个人(2至123个人)的RNA,使每个人的RNA的重量相同。

[0456] 所有RNA样本的质量和数量都在Agilent 2100Bioanalyzer分析仪(Agilent公司,Waldbronn,德国)上使用RNA 6000Pico LabChip Kit试剂盒(Agilent公司)进行评估。

[0457] 微阵列实验

[0458] 所有肿瘤和正常组织的RNA样本都使用Affymetrix Human Genome (HG) U133A或HG-U133Plus 2.0Affymetrix寡核苷酸芯片(Affymetrix公司,Santa Clara,CA,美国)进行基因表达分析。所有步骤都根据Affymetrix手册进行。简言之,如手册中所述,使用SuperScript RTII (Invitrogen公司)以及oligo-dT-T7引物(MWG Biotech公司,Ebersberg,德国)从5-8 μ g RNA中合成双链cDNA。用BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics公司,Farmingdale,NY,美国)进行U133A测定或用GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix公司)进行U133Plus 2.0测定,之后用链霉亲和素-藻红蛋白和生物素化抗链霉素蛋白抗体(Molecular Probes公司,Leiden,荷兰)进行破碎、杂交和染色,这样完成体外转录。用Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A)或Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133Plus 2.0)对图像进行扫描,用GCOS软件(Affymetrix公司)在所有参数默认设置情况下对数据进行分析。为了实现标准化,使用了Affymetrix公司提供的100种管家基因(housekeeping gene)。相对表达值用软件给定的signal log ratio进行计算,正常肾组织样本的值任意设置为1.0。本发明的代表性源基因在CRC中高度过表达的表达谱如图2所示。进一步代表性基因的表达分数见表9。

[0459] 表9:表达分数。该表列出了与一系列正常组织相比在肿瘤上非常高度过表达(+++)、与一系列正常组织相比在肿瘤上高度过表达(++)或与一系列正常组织相比在肿瘤上过表达(+)的基因的肽。

[0460]

序列 ID 号	基因名称	序列	基因表达
2	ATP10B	ALLPRYFFL	+++
5	SLC12A1,SLC12A2,SLC12A3	WLFDDGGLTL	+++
6	PLAGL2	FLAELPGSLSL	+++
7	MUC2	YLTRHLAVL	+
8	HSPD1	ALMLQGVDLL	+
13	SMC2	FLLAEDTKV	+++
16	KLK10	VLVDQSWVL	+
17	SLC12A2	ALAAARVEL	+++
19	MYO10	RLYTKLLNEA	+++
27	CHMP5	LLADEDSSYL	++
29	AP3D1	QMLDVAIRV	+
35	OLFM4	KLLDLTVRI	+
36	LARP4B	GLLESPSIFNFTA	+
39	CDX2	GLNGGSPAAA	++
40	SERPINB5	ALSNVIHKV	+
41	HEPH	ILDDSFKLL	++
42	HEPH	SILDDSFKL	++
46	PKP3	GLDDRYSLV	+
47	ERBB3	KLYERCEVV	+
53	TBC1D8B	FLLGSEIKL	+
55	PMS1	QIITSVVSV	++
57	PKP2	NLLEKENYL	++
60	AGTPBP1	VLDEDEPRFL	+
63	HEATR2	KLFSILSTV	++
64	SOX8,SOX9,SOX10	KTLGKLWRL	++
67	SMARCA4	SLNDLEKDVML	++

[0461]

		L	
68	PTPRO	SILQFVH MV	+
73	APIP	YLF DIAVSM	+
74	ARHGAP8, PRR5- ARHGAP8, PRR5	YLMGFLHAV	+
75	CFTR	EMIENIQSV	+++
77	DDX5	SLLKRDFGA	+
79	SRSF11	SLAADQLLKL	++
81	TGIF1	ALLSQQTHL	+
84	DSP	SMVEDITGLRL	+
86	MUC13	KVFP GKISV	+++
89	ITGA6	SLIEYEF RV	++
90	EBNA1BP2	GLLKPGLNVVL	++
92	PARN	WIDDTSAFV	+
98	ATP13A3	AMNGKSFSV	+++
104	MUC2	ILLTIKDDTIYL	+
112	GALNT7	KLQGVLIYL	++
113	KCNN4	ILYDLQQNL	+
123	RRM1	KT LERSYLL	+++
124	AURKB	RVLPPSALQSV	++
126	CCNB1, CCNB2	TLAKYLMEL	+++
129	CNOT1	VLIDVLKEL	+
130	PRRC2C	GLGGSQ LIDTHL	++
132	NOL11	ALLNAILHSA	++
134	EIF2S3, LOC255308	GVAGGSILKGV	+
135	CENPE	KLQEEIPVL	+
138	BRCA2	KQFEGTVEI	++
139	NCAPG	VLLNEILEQV	+++
140	NCAPG	LLNEILEQV	+++
142	ECT2	SLVQRVETI	++
144	ZSWIM1	LLNDRIWLA	++
147	KDM5C	TLTELRAFL	+
148	PDXDC1	RLL ENMTEVV	+

[0462]

152	RAD54B	KLLAVIHEL	+
156	TOP2A	SLMMTIINL	+++
157	URB1	SLIERDLKL	+
160	SYNJ2	KLLEFDQLQL	+
161	TRAIP	FLKNELDNV	+
166	CDC6	GLLEARGILGL	+
171	HMGXB4	RLQETEGMVAV	+
172	COPG1	LLDVTVMQV	+
180	GPD2	NLLEIAPHL	+
183	AGK	TLQEVVTGV	++
184	PRKDC	SLLDENNVSSYL	+
187	CNOT1	GLHNVVYGI	+
188	ZSWIM1	FLVDGPRVQL	++
190	NCAPD2	AMAEMVLQV	+
191	CDK5RAP2	QLFSEIHNL	+
192	MMP12	KIQEMQHFL	++
194	RAD54B	SLYKGLLSV	+
197	ZNF451	SLFGQDVKAV	+
198	CEACAM6	VLYGPDVPTI	++
202	FANCA	GLAALAVHL	++
204	GOLGA4	KLLDLETERILL	+
205	RPGRIP1L	RLHDENILL	+
206	EFR3A	RIAGIRGIQGV	+
208	NAA35	RLIDRIKTV	+
215	CENPE	KLQEKIQEL	+
219	MUC2	FLDEKGRCV	+
223	CDK1	VLMQDSRLYL	+++
225	TOP2A	YLYGQTTTYL	+++
228	HNRNPH1,HNRNPH2	SMSGYDQVL	+++
229	DDX11,DDX12P,LOC642846	YLLEKFVAV	+
230	WNT5A	AMSSKFFLV	+
232	LAMC2	RLLDSVSRL	++
233	LAMC2	RLDDLKMTV	++

[0463]	235	TCF20	LLHEENFSV	+
	236	CENPF	KMSELQTYV	++
	239	KIF15	QLIEKNWLL	+++
	240	RCN1	VLAPRVLRA	++
	241	CCNB1	ILIDWLVQV	+++
	250	EEF2	ALCEENMRGV	+
	257	CNOT1	SLADFMQEV	+

[0464] 实施例3

[0465] MHC-I类提呈肽的体外免疫原性

[0466] 为了获得关于本发明TUMAP的免疫原性信息,发明人使用体外T细胞致敏分析方法进行了研究,其中该分析方法基于装载有肽/MHC复合物的人工抗原提呈细胞(aAPC)和CD28抗体对CD8⁺T细胞的反复刺激。如此,发明人可以显示出,本发明目前为止22种HLA-A*0201限制TUMAP具有免疫原性,这表明这些肽为对抗人CD8⁺前体T细胞的T细胞表位(表10)。

[0467] CD8⁺T细胞体外激活

[0468] 为了用载有肽-MHC复合物(pMHC)的人工抗原提呈细胞和抗CD28抗体进行体外刺激,发明人首先从University clinics Mannheim,Germany中获取健康供体CD8微珠(Miltenyi Biotec,Bergisch-Gladbach,Germany)通过积极选择白细胞清除术后新鲜HLA-A*02产物而分离出CD8⁺T细胞。

[0469] PBMC和分离出的CD8⁺淋巴细胞使用前在T细胞培养基(TCM)中培养,培养基包括RPMI-Glutamax(Invitrogen公司,Karlsruhe,德国)并补充10%热灭活人AB血清(PAN-Biotech公司,Aidenbach,德国)、100U/ml青霉素/100μg/ml链霉素(Cambrex公司,Cologne,德国)、1mM丙酮酸钠(CC Pro公司,Oberdorla,德国)和20μg/ml庆大霉素(Cambrex公司)。在此步骤,2.5ng/ml的IL-7(PromoCell公司,Heidelberg,德国)和10U/ml的IL-2(Novartis Pharma公司,Nürnberg,德国)也加入TCM。

[0470] 对于pMHC/抗-CD28涂层珠的生成、T细胞的刺激和读出,使用每刺激条件四个不同pMHC分子以及每个读出条件8个不同的pMHC分子在高度限定的体外系统中进行。

[0471] 纯化的共刺激小鼠IgG2a抗人CD28抗体9.3(Jung et al.,1987)使用制造商(Perbio公司,波恩,德国)推荐的N-羟基琥珀酰亚胺生物素进行化学生物素化处理。所用珠为5.6μm的链霉抗生物素蛋白包裹的多聚苯乙烯颗粒(Bangs Laboratories,伊利诺伊州,美国)。用于阳性和阴性对照刺激物的pMHC分别为A*0201/MLA-001(从Melan-A/MART-1中修饰制得的肽ELAGIGILTV(SEQ ID NO.266))和A*0201/DDX5-001(从DDX5中获得的YLLPAIVHI(SEQ ID NO.267))。

[0472] 800.000珠/200μl包裹于含有4x 12.5ng不同生物素-pMHC的96孔板、进行洗涤,随后加入体积为200μl的600ng生物素抗-CD28。在37℃下,在含5ng/ml IL-12(PromoCell)的200μl TCM中共培养1x10⁶CD8⁺T细胞与2x10⁵的清洗涂层珠3天,从而激活刺激。之后,一半培养基与补充80U/ml IL-2的新鲜TCM进行交换,并且培养在37℃下持续4天。这种刺激性周期总共进行3次。对于使用每条件8种不同pMHC分子的pMHC多聚体读出,二维组合编码方法如前述使用(Andersen et al.,2012),稍作修饰,涵盖耦合至5种不同的荧光染料。最后,用

Live/dead near IR染料 (Invitrogen公司, Karlsruhe, 德国)、CD8-FITC抗体克隆SK1 (BD公司, Heidelberg, 德国) 和荧光pMHC多聚体而执行多聚体分析。对于分析, 使用了配有合适激光仪和筛检程序的BD LSRII SORP细胞仪。肽特异性细胞以占总CD8+细胞的百分比形式进行计算。多聚体分析结果使用FlowJo软件 (Tree Star公司, Oregon, 美国) 进行评估。特定多聚体+CD8+淋巴细胞的体外填充用与阴性对照刺激组比较而进行检测。如果健康供体中的至少一个可评价的体外刺激孔在体外刺激后发现含有特异性CD8+T细胞株 (即该孔包含至少1%特定多聚体+CD8+T细胞, 并且特定多聚体+的百分比至少为阴性对照刺激中位数的10倍), 则检测给定抗原的免疫原性。

[0473] CRC肽体外免疫原性

[0474] 对于所测试的HLA-I类肽, 可通过肽特异性T细胞株的生成证明其体外免疫原性。TUMAP特异性多聚体针对本发明的1种肽染色后进行的示例性流式细胞仪检测结果如图3所示, 同时也示出相应的阴性对照信息。本发明2种肽的结果汇总于表10A。

[0475] 表10A: 本发明中HLA I类肽的体外免疫原性。

[0476] 申请人对本发明的肽所做的体外免疫原性实验的示例性结果。<20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; ≥70% = ++++

[0477]

序列ID号	肽代码	孔	供体
219	MUC2-001	++	+++
220	QAR-001	+++	++++

[0478] 表10B: 本发明中HLA I类肽体外免疫原性的额外数据。

[0479] 申请人对本发明的HLA-A*02限制肽所做的体外免疫原性实验的示例性结果。提示了体外免疫原性实验的结果。阳性孔和供体 (其他可评价) 的百分比概括为<20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; ≥70% = ++++

[0480]

序列ID号	序列	阳性孔[%]
1	ALIKQLFEA	"+"
2	ALLPRYFFL	"++++"
3	RLIPDTLYSV	"++++"
5	WLFDDGGLTL	"++"
7	YLTRHLAVL	"+"
9	ILDDHLSRV	"+"
10	RMYNKIFAI	"++++"
11	YLFKTFNM	"+"
12	ALVQGILERV	"++++"
13	FLLAEDTKV	"++"
17	ALAAARVEL	"++"
18	FLSSLKGGLL	"+"
19	RLYTKLLNEA	"++++"

[0481]	21	VLIDHRWVL	"+"
	22	GLIDEVMVL	"++"
	31	LLYGKYVSV	"++"
	32	KLNTETFGV	"++"
	37	GLFAGLGGAGA	"+"
	38	SLAPTPVSA	"+"
	42	SILDDSFKL	"+"
	47	KLYERCEVV	"+"
	59	LLTDNVVKL	"+"
	64	KTLGKLWRL	"++++"
	123	KTLETSYLL	"+"
	124	RVLPPSALQSV	"+"
	127	RLAELTVDEFLA	"+"
	132	ALLNAILHSA	"+"
	133	RTFEKIEEV	"+"
	136	KLFDIFSQQV	"++"
	141	AVIEHLERL	"+"
	142	SLVQRVETI	"+"
	150	RLADLEALKV	"++"

[0482] 实施例4

[0483] 肽的合成

[0484] 所有的肽通过使用Fmoc策略以标准、广为接受的固相肽合成法合成。每个肽的身份和纯度已使用质谱和RP-HPLC分析法确定。用冻干法(三氟乙酸盐)获得白色至类白色的肽,纯度为>50%。所有的TUMAP优选作为三氟乙酸盐或乙酸盐进行给药,其他药学可接受的盐形式也可以。

[0485] 实施例5

[0486] MHC结合测定

[0487] 用于T细胞疗法的本发明候选肽进一步测试其MHC结合能力(亲和性)。单个肽-MHC复合物通过UV-配体交换产生,其中,紫外线敏感肽经紫外线照射后裂解,与分析的相关肽交换。只有能够有效地结合并稳定肽接受MHC分子的候选肽才能阻止MHC复合物的解离。为了确定交换反应的产率,将基于稳定MHC复合物轻链($\beta 2m$)的检测结果进行ELISA测定。检测总体上按照Rodenko等人在(Rodenko et al., 2006)中描述的方法进行。

[0488] 96孔Maxisorp板(NUNC)在室温下在PBS中以2ug/ml链霉包被过夜,用4倍洗涤并在37℃下在含封闭缓冲液的2%BSA中封闭1小时。折迭的HLA-A*02:01/MLA-001单体作为标准品,涵盖15-500ng/ml的范围。紫外线交换反应的肽-MHC单体在封闭缓冲液中稀释100倍。样本在37℃下孵育1小时,洗涤四次,在37℃下以2ug/ml HRP缀合抗- $\beta 2m$ 温育1小时,再次洗涤,并以 NH_2SO_4 封堵的TMB溶液进行检测。在450nm处测量吸收。在生成和产生抗体或其片段

时和/或T细胞受体或其片段时,通常优选显示为高交换产率(优选为高于50%,最优选为高于75%)的候选肽,这是因为它们对MHC分子表现出足够的亲合力,并能防止MHC复合物的解离。

[0489] 表11:MHC-I类结合分数。HLA-I类限制肽与HLA-A*02:01的结合根据肽交换产量分类: $\geq 10\% = +$; $\geq 20\% = ++$; $\geq 50\% = +++$; $\geq 75\% = ++++$; J=磷酸丝氨酸

[0490]

序列 ID	肽代码	肽交换
1	ALIKQLFEA	"+++"
2	ALLPRYFFL	"++"
3	RLIPDTLYSV	"++++"
4	RLAELTVDEFL	"++++"
5	WLFDDGGLTL	"++++"
6	FLAELPGSLSL	"+++"
7	YLTRHLAVL	"++"
8	ALMLQGVDLL	"++++"
9	ILDDHLSRV	"++"
10	RMYNKIFAI	"++++"
11	YLFKETFNM	"++++"
12	ALVQGILERV	"++++"
13	FLLAEDTKV	"++++"
14	FLDKPEDVLL	"++"

[0491]

15	LQLDKEFQL	"+++"
16	VLVDQSWVL	"+++"
17	ALAAARVEL	"+++"
18	FLSSLKGGLL	"+++"
19	RLYTKLLNEA	"+++"
20	YBKDGDVML	"+++"
21	VLIDHRWVL	"+++"
22	GLIDEVMVL	"+++"
23	FLDANGHFV	"+++"
24	VLDGVLMEI	"+++"
25	SLADRLIGV	"++++"
26	GLASKENFSNVSL	"++"
27	LLADEDSSYL	"++"
28	ALTEIQEFI	"++++"
29	QMLDVAIRV	"+++"
30	GLSSAYGGL	"+"
31	LLYGKYVSV	"+++"
32	KLNTETFGV	"++"
33	ALWEKNTHL	"+++"
34	ILLEKSVSV	"+++"
35	KLLDLTVRI	"+++"
36	GLLESPSIFNFTA	"+++"
37	GLFAGLGGAGA	"+++"
38	SLAPTPVSA	"++"
40	ALSNVIHKV	"++"
41	ILDDSFKLL	"++"
42	SILDDSFKL	"++++"
43	TLDAAQPRV	"++"
44	SLESKLTSV	"+++"
45	ALAEILLHGA	"+++"
46	GLDDRYSLV	"+++"
47	KLYERCEVV	"++"
48	FLDASDPAL	"++"

[0492]

50	TLMAEMHVV	"+++"
51	QVWEIQHTV	"++"
52	ALDSSNSMQTI	"++"
53	FLLGSEIKL	"+++"
54	ALLNGEYLLAA	"+++"
56	VLFTDEGVPKFL	"++"
57	NLLEKENYL	"+++"
58	AMADKMDMSL	"++"
59	LLTDNVVKL	"+++"
60	VLDEDEPRFL	"++"
61	KLLKLFQGV	"+++"
62	YLAPENGYL	"++"
63	KLFSILSTV	"++"
64	KTLGKLWRL	"++"
66	GLDDGPDFL	"++"
67	SLNDLEKDVMLL	"+++"
68	SILQFVH MV	"+++"
69	GMLNEAEGKAIKL	"++"
70	MISELEVRL	"+++"
71	RLWTEIPTAI	"+++"
72	YLLDYPNNLL	"+++"
73	YLFDAVSM	"+++"
74	YLMGFLHAV	"+++"
75	EMIENIQSV	"++"
76	YLIGEKQH YL	"+++"
77	SLLKRDFGA	"++"
78	ALDPELLLL	"++"
79	SLAADQLLKL	"++"
80	QVDEVVDIMRV	"++"
81	ALLSQQTHL	"+++"
82	QLYEEPDTKL	"++"
83	LTIEDGIFEV	"+++"
84	SMVEDITGLRL	"+++"

[0493]

85	ILHDINSDGVL	"++"
86	KVFPGKISV	"++"
87	LLFDAPDLRL	"+++"
88	KLDIKVETV	"++++"
89	SLIEYEFrv	"++++"
90	GLLKPGLNvVL	"++++"
91	TVDVATPSV	"++++"
92	WIDDTSAFV	"++++"
93	SLQELRLLL	"++++"
94	KSMDIVLTV	"++++"
95	AILDAHIEV	"++++"
96	KLYSRLVYV	"++"
97	ALWWGVVTV	"++"
98	AMNGKSFSV	"++"
99	KLLEVLDLTV	"++++"
100	SLDDFLATA	"++++"
101	GLSEGHTFQV	"++++"
102	KILVSLIEV	"++++"
103	FLFGYPKRL	"++"
104	ILLTIKDDTIYL	"++++"
105	YALDLSTFL	"++++"
106	SLISEKILL	"++++"
107	ALLGGGPYML	"++++"
108	SLAELVPGVGGI	"++++"
109	ALDGDQMEL	"++"
110	LLGELPRLLLL	"++++"
112	KLQVLIYL	"++"
113	ILYDLQQNL	"++"
114	TAVGHALVL	"+"
115	SLFDVSHML	"++++"
116	LVYQFVHPI	"++"
117	TLQPVNSTISL	"++"
118	LLADLKTmv	"++++"

[0494]

119	ILYQTVTGL	"++"
120	VLYEGVDEV	"++"
121	SLAPNIISQL	"+++"
122	SLMGMVLKL	"+++"
123	KTLEERSYLL	"++"
124	RVLPPSALQSV	"+++"
125	KLGDFGLLVEL	"++++"
126	TLAKYLMEL	"+++"
127	RLAELTVDEFLA	"+++"
128	MLDDRAYLV	"++"
129	VLIDVLKEL	"+++"
130	GLGGSQLIDTHL	"++"
131	KLLDVVHPA	"++"
132	ALLNAILHSA	"+++"
133	RTFEKIEEV	"++"
134	GVAGGSILKGV	"++++"
135	KLQEEIPVL	"++"
136	KLFDIFSQQV	"+++"
137	QLTEIKPLL	"+++"
138	KQFEGTVEI	"+++"
139	VLLNEILEQV	"+++"
140	LLNEILEQV	"+++"
141	AVIEHLERL	"++++"
142	SLVQRVETI	"+++"
143	KLSDVWKEL	"+++"
144	LLNDRIWLA	"+++"
145	LLLEVVKQV	"+++"
146	ALSDETWGL	"++"
147	TLTELRAFL	"++++"
148	RLLNMTEVV	"+++"
149	YQFDKVGILTL	"+++"
150	RLADLEALKV	"+++"
151	SAQGSDVSLTACK	"+++"

[0495]

	V	
152	KLLAVIHEL	"++"
153	ILFSEDSTKLFV	"+++"
154	KLPSETIFVGC	"+++"
155	RLLGEEVVRV	"+++"
156	SLMMTIINL	"++++"
157	SLIERDLKL	"+++"
158	GLLDPSVFHV	"+++"
159	VLVDDDDGIKVV	"++"
160	KLLEFDQLQL	"+++"
161	FLKNELDNV	"+++"
162	KLMDYIDEL	"+++"
163	RLLHEVQEL	"+++"
164	KMLDEILLQL	"++++"
165	RLLDFPEAMVL	"++++"
166	GLLEARGILGL	"+++"
167	SVIDHIHLISV	"+++"
168	GLIRFPLMTI	"+++"
169	YLAHFIEGL	"+++"
170	ALAGGITMV	"+++"
171	RLQETEGMVAV	"++"
172	LLDVTVMQV	"+++"
173	KLGDLMVLL	"+++"
174	ILLDDNMQIRL	"++++"
175	TLLGGKEAQALGV	"+++"
176	RTLDKVLEV	"++"
177	ALLQGAIESV	"+++"
178	YLFREPATI	"++"
179	RLLJPLSSA	"+++"
181	NLFDLGGQYLRV	"+++"
182	SLNKWIFTV	"++++"
183	TLQEVVTGV	"+++"
184	SLLDENNVSSYL	"+++"

[0496]

185	VLYTGVVRV	"+++"
186	KMSEKILL	"+++"
187	GLHNVVYGI	"+++"
188	FLVDGPRVQL	"+++"
189	AISEVIGKITA	"+++"
190	AMAEMVLQV	"+++"
191	QLFSEIHNL	"++++"

[0497] 实施例6

[0498] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的绝对定量

[0499] 黏合剂例如抗体和/或TCR的产生是一个费力的过程,其可以仅针对一些选定靶标进行。在肿瘤相关和特异性肽的情况下,选择标准包括但不限于提呈于细胞表面上的肽的提呈独占性和浓度。除了如实施例1中所述肽的分离和相对定量,发明人也分析了每个细胞的绝对肽拷贝数,如专利x中所述。实体肿瘤样本中每个细胞的TUMAP拷贝数定量需要分离TUMAP的绝对定量、TUMAP分离效率和分析的组织样本细胞计数。图4中提供了我们实验方法的概览。实验步骤如下所述。

[0500] Nano LC-MS/MS肽定量

[0501] 对于通过质谱法对肽的准确定量,使用内标法生成每种肽的校准曲线。内标是每种肽的双同位素标记的变体,即,TUMAP合成中纳入2个同位素标记的氨基酸。它与肿瘤相关肽仅在质量上不同,但在其他的物理化学性质方面无差异(Anderson et al.,2012)。内标被掺入到每个MS样本,所有MS信号均标准化为内标MS信号,以平衡MS实验之间潜在的技术差异。

[0502] 校准曲线用至少三种不同的矩阵绘制,即,来自于类似于常规MS样本的天然样本的HLA肽洗脱液,并且每个制备品以重复MS运行进行测量。对于评价,MS信号被标准化为内标信号,校准曲线通过logistic回归计算。

[0503] 对于来自组织样本的肿瘤相关肽的定量,各样本也掺有内标;MS信号标准化为内标并使用该肽校正曲线进行定量。

[0504] 肽/MHC分离的效率

[0505] 对于任何蛋白纯化过程,来自组织样本蛋白的分离与相关蛋白的一定损失相关联。为了确定TUMAP分离的效率,针对选定为绝对定量的所有TUMAP产生了肽/MHC复合物。为了能够区别天然肽/MHC复合物与加样物,使用了单同位素标记版本的TUMAP,即TUMAP合成期间纳入1个同位素标记的氨基酸。这些复合物被掺入新制备的组织裂解物中,例如,在TUMAP分离过程中最早可能时间点,然后在之后的亲和纯化中像天然肽/MHC复合物被获取。因此,测量单标记TUMAP的恢复可得到个体TUMAP分离效率相关的结论。分离效率使用少量样本进行分析,且这些组织样本可比较。与此相反,个体肽之间的分离效率不同。这表明,分离效率虽然只在有限数量的样本中进行测定,但可外推至任何其他组织制备品中。但是,由于分离效率不能从一种肽外推至其他肽,因此,有必要单独分析每个TUMAP。

[0506] 固体、冷冻组织中细胞计数的测定

[0507] 为了确定经过绝对肽定量的组织样本的细胞数,发明人采用了DNA含量分析。此方

法适用于不同来源的广泛样本,最重要的是,冷冻样本 (Forsey and Chaudhuri,2009; Alcoser et al.,2011;Silva et al.,2013)。在肽分离方案期间,组织样本被加工为均匀的裂解物,从中取一小等份裂解物。样本等分为三份,从中分离DNA (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen,Hilden,德国)。每次DNA分离的总DNA含量至少重复两次使用基于荧光的DNA定量测定法 (Qubit dsDNA HS AssayKit,Life Technologies,Darmstadt,德国) 进行定量。

[0508] 为了计算细胞数,生成来自单个健康血细胞等分试样的DNA标准曲线,使用一系列指定的细胞数。标准曲线用于计算每次DNA分离的总DNA含量的总细胞含量。用于肽分离的组织样本的平均总细胞计数,在考虑裂解物等份的已知体积和总裂解物体积的情况下进行推算。

[0509] 每细胞的肽拷贝数

[0510] 使用前述实验的数据,发明人以总肽量除以样本总细胞计数计算得出每个细胞的TUMAP拷贝数,随后除以分离效率。选定肽的细胞拷贝数如表12所示。

[0511] 表12:绝对拷贝数。该表列出了NSCLC肿瘤样本中绝对肽定量的结果。针对每种肽,每个细胞的中位拷贝数表示:<100=+;>=100=++;>=1,000+++;>=10,000=++++。提示样本数量,其中提供评估的高质量MS数据。

序列ID号	肽代码	每细胞拷贝数 (中位数)	样本数量
1	ZNF-002	+	19
142	ECT2-001	+	18
22	CYP2W1-001	++	23
152	RAD54B-002	+++	6

[0512] 参考文献列表

[0514] Allison,J.P.et al.,Science 270 (1995):932-933

[0515] Andersen,R.S.et al.,Nat.Protoc.7 (2012):891-902

[0516] Appay,V.et al.,Eur.J Immunol.36 (2006):1805-1814

[0517] Banchereau,J.et al.,Cell 106 (2001):271-274

[0518] Beatty,G.et al.,J Immunol 166 (2001):2276-2282

[0519] Beggs,J.D.,Nature 275 (1978):104-109

[0520] Benjamini,Y.et al.,Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological),Vol.57 (1995):289-300

[0521] Boulter,J.M.et al.,Protein Eng 16 (2003):707-711

[0522] Braumuller,H.et al.,Nature (2013)

[0523] Brossart,P.et al.,Blood 90 (1997):1594-1599

[0524] Bruckdorfer,T.et al.,Curr.Pharm.Biotechnol.5 (2004):29-43

[0525] Card,K.F.et al.,Cancer Immunol Immunother.53 (2004):345-357

[0526] Chanock,S.J.et al.,Hum.Immunol.65 (2004):1211-1223

[0527] Cohen,C.J.et al.,J Mol Recognit.16 (2003a):324-332

[0528] Cohen,C.J.et al.,J Immunol 170 (2003b):4349-4361

[0529] Cohen,S.N.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69 (1972):2110-2114

[0530] Coligan JE et al., (1995)

- [0531] Colombetti,S.et al.,J Immunol.176(2006):2730-2738
- [0532] Dengjel,J.et al.,Clin Cancer Res 12(2006):4163-4170
- [0533] Denkberg,G.et al.,J Immunol 171(2003):2197-2207
- [0534] Falk,K.et al.,Nature 351(1991):290-296
- [0535] Fong,L.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98(2001):8809-8814
- [0536] Gabrilovich,D.I.et al.,Nat Med.2(1996):1096-1103
- [0537] Gattinoni,L.et al.,Nat Rev.Immunol 6(2006):383-393
- [0538] Gnjatic,S.et al.,Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100(2003):8862-8867
- [0539] Godkin,A.et al.,Int.Immunol 9(1997):905-911
- [0540] Green MR et al.,4th, (2012)
- [0541] Greenfield EA,2nd, (2014)
- [0542] Hwang,M.L.et al.,J Immunol.179(2007):5829-5838
- [0543] Jung,G.et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 84(1987):4611-4615
- [0544] Kibbe AH,rd, (2000)
- [0545] Krieg,A.M.,Nat Rev.Drug Discov.5(2006):471-484
- [0546] Liddy,N.et al.,Nat Med.18(2012):980-987
- [0547] Ljunggren,H.G.et al.,J Exp.Med.162(1985):1745-1759
- [0548] Longenecker,B.M.et al.,Ann N.Y.Acad.Sci.690(1993):276-291
- [0549] Lukas,T.J.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78(1981):2791-2795
- [0550] Lundblad RL,3rd, (2004)
- [0551] Meziere,C.et al.,J Immunol 159(1997):3230-3237
- [0552] Morgan,R.A.et al.,Science 314(2006):126-129
- [0553] Mori,M.et al.,Transplantation 64(1997):1017-1027
- [0554] Mortara,L.et al.,Clin Cancer Res.12(2006):3435-3443
- [0555] Mueller,L.N.et al.,J Proteome.Res 7(2008):51-61
- [0556] Mueller,L.N.et al.,Proteomics.7(2007):3470-3480
- [0557] Mumberg,D.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96(1999):8633-8638
- [0558] Pinheiro J et al., (2015)
- [0559] Plebanski,M.et al.,Eur.J Immunol 25(1995):1783-1787
- [0560] Porta,C.et al.,Virology 202(1994):949-955
- [0561] Rammensee,H.G.et al.,Immunogenetics 50(1999):213-219
- [0562] Rini,B.I.et al.,Cancer 107(2006):67-74
- [0563] Rock,K.L.et al.,Science 249(1990):918-921
- [0564] Rodenko,B.et al.,Nat Protoc.1(2006):1120-1132
- [0565] Saiki,R.K.et al.,Science 239(1988):487-491
- [0566] Seeger,F.H.et al.,Immunogenetics 49(1999):571-576
- [0567] Sherman F et al., (1986)
- [0568] Singh-Jasuja,H.et al.,Cancer Immunol.Immunother.53(2004):187-195
- [0569] Small,E.J.et al.,J Clin Oncol.24(2006):3089-3094

- [0570] Sturm,M.et al.,BMC.Bioinformatics.9(2008):163
- [0571] Teufel,R.et al.,Cell Mol Life Sci.62(2005):1755-1762
- [0572] Tran,E.et al.,Science 344(2014):641-645
- [0573] Walter,S.et al.,J Immunol 171(2003):4974-4978
- [0574] Walter,S.et al.,Nat Med.18(2012):1254-1261
- [0575] Willcox,B.E.et al.,Protein Sci.8(1999):2418-2423
- [0576] Zaremba,S.et al.,Cancer Res.57(1997):4570-4577
- [0577] Albrecht,M.et al.,FEBS Lett.569(2004):18-26
- [0578] Albulescu,R.,Biomark.Med.7(2013):203
- [0579] Aschauer,H.et al.,Wien.Klin.Wochenschr.95(1983):785-788
- [0580] Aung,P.P.et al.,Oncogene 25(2006):2546-2557
- [0581] Backen,A.C.et al.,Br.J Cancer 96(2007):1544-1548
- [0582] Bai,J.et al.,PLoS.One.8(2013b):e59772
- [0583] Bailey,C.M.et al.,J Cell Physiol 209(2006):617-624
- [0584] Baris,O.et al.,J Clin Endocrinol.Metab 89(2004):994-1005
- [0585] Becker,T.M.et al.,Mol.Cancer 8(2009):4
- [0586] Bie,L.et al.,PLoS.One.6(2011):e25631
- [0587] Bilbao-Aldaiturriaga,N.et al.,Pediatr.Blood Cancer 62(2015):766-769
- [0588] Boland,A.et al.,Nat Struct.Mol.Biol 20(2013):1289-1297
- [0589] Bulk,E.et al.,Int.J Cancer 137(2015):1306-1317
- [0590] Cao,R.et al.,Br.J Cancer 111(2014):539-550
- [0591] Carvalho,L.et al.,Rev Port.Pneumol.15(2009):683-696
- [0592] Chang,H.Y.et al.,PLoS.One.8(2013):e54117
- [0593] Chen,C.H.et al.,Oncotarget.5(2014a):6300-6311
- [0594] Chen,Y.D.et al.,Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi.30(2012):725-729
- [0595] Chou,C.C.et al.,Expert.Rev Mol.Diagn.8(2008):179-187
- [0596] Chung,F.Y.et al.,J Surg.Oncol 102(2010):148-153
- [0597] Cohen,Y.et al.,Hematology.19(2014):286-292
- [0598] Cole,C.L.et al.,J Biol Chem 289(2014):10488-10501
- [0599] Courson,D.S.et al.,Exp.Cell Res 334(2015):10-15
- [0600] Di,Maro G.et al.,J Clin Endocrinol.Metab 99(2014):E1617-E1626
- [0601] Ding,K.et al.,Med.Hypotheses 83(2014):359-364
- [0602] Doherty,J.A.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.20(2011):1873-1882
- [0603] Duursma,A.et al.,Mol.Cell Biol 25(2005):6937-6947
- [0604] Egloff,A.M.et al.,Cancer Res 66(2006):6-9
- [0605] Fan,C.G.et al.,Oncol Rep.26(2011):1281-1286
- [0606] Fang,Y.et al.,Cancer Biol Ther.15(2014):1268-1279

- [0607] Fang,Z.et al.,J Biol Chem 288(2013):7918-7929
- [0608] Fang,Z.Q.et al.,Genet.Mol Res 12(2013):1479-1489
- [0609] Feng,B.et al.,J Gastroenterol.Hepatol.21(2006):1596-1603
- [0610] Ferreras,C.et al.,J Biol Chem 287(2012):36132-36146
- [0611] Fields,A.P.et al.,Adv.Enzyme Regul.50(2010):190-200
- [0612] Flanagan,J.M.et al.,Mol.Cancer Ther.8(2009):249-260
- [0613] Freed,E.F.et al.,PLoS.Genet.8(2012):e1002892
- [0614] Goldenson,B.et al.,Oncogene 34(2015):537-545
- [0615] Gomez,A.et al.,Mol.Pharmacol.78(2010):1004-1011
- [0616] Griffin,J.N.et al.,PLoS.Genet.11(2015):e1005018
- [0617] Gutierrez-Camino,A.et al.,Pediatr.Res 75(2014):767-773
- [0618] Ham,M.F.et al.,Cancer Sci.98(2007):1041-1047
- [0619] Hanks,T.S.et al.,Apoptosis.17(2012):236-247
- [0620] Haren,N.et al.,Histol.Histopathol.25(2010):1247-1255
- [0621] Hatabe,S.et al.,Mol.Clin Oncol 1(2013):845-850
- [0622] Hayama,S.et al.,Cancer Res 67(2007):4113-4122
- [0623] Hegyi,K.et al.,Pathobiology 79(2012):314-322
- [0624] Hill,S.J.et al.,Genes Dev.28(2014):1957-1975
- [0625] Hiramoto,T.et al.,Oncogene 18(1999):3422-3426
- [0626] Hu,J.et al.,Pituitary.10(2007):47-52
- [0627] Hu,S.X.et al.,Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi.31(2013):890-894
- [0628] Huff,L.P.et al.,Genes Cancer 4(2013):460-475
- [0629] Ishikawa,N.et al.,Cancer Sci.97(2006):737-745
- [0630] Ito,K.et al.,Protein Cell 2(2011):755-763
- [0631] Jager,D.et al.,Cancer Res 60(2000):3584-3591
- [0632] Januchowski,R.et al.,Biomed.Res Int 2014(2014):365867
- [0633] Jin,Y.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014):8724-8731
- [0634] Jordheim,L.P.et al.,Biomark.Med.7(2013):663-671
- [0635] Jordheim,L.P.et al.,Lancet Oncol 12(2011):693-702
- [0636] Ju,W.et al.,Oncol.Res.18(2009):47-56
- [0637] Kanda,A.et al.,Oncogene 24(2005):7266-7272
- [0638] Kaplun,A.et al.,Crit Rev Eukaryot.Gene Expr.22(2012):249-258
- [0639] Karlgren,M.et al.,Expert.Opin.Ther.Targets.11(2007):61-67
- [0640] Kas,K.et al.,J Biol Chem 273(1998):23026-23032
- [0641] Kaur,S.et al.,BMC.Cell Biol 9(2008):61
- [0642] Kim,D.H.,Yonsei Med.J 48(2007):694-700
- [0643] Kim,D.S.et al.,J Proteome.Res 9(2010a):3710-3719
- [0644] Kim,J.E.et al.,J Cancer Res Clin Oncol 136(2010b):47-53

- [0645] Kounelakis,M.G.et al.,IEEE J Biomed.Health Inform.17(2013):128-135
- [0646] Lages,E.et al.,PLoS.One.6(2011):e20600
- [0647] Lallet-Daher,H.et al.,Oncogene 28(2009):1792-1806
- [0648] Landrette,S.F.et al.,Blood 105(2005):2900-2907
- [0649] Langnaese,K.et al.,Cytogenet.Cell Genet.94(2001):233-240
- [0650] Lee,Y.C.et al.,Int.J Cancer 122(2008b):1630-1638
- [0651] Li,B.et al.,Cancer Res 61(2001):8014-8021
- [0652] Li,G.H.et al.,Bioinformatics.30(2014):748-752
- [0653] Li,J.F.et al.,Zhonghua Wei Chang Wai Ke.Za Zhi.15(2012):388-391
- [0654] Li,Y.et al.,PLoS.One.8(2013):e84489
- [0655] Liu,B.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014a):3089-3100
- [0656] Liu,L.et al.,Retrovirology.8(2011a):94
- [0657] Liu,X.et al.,Eur.J Cancer 50(2014b):2251-2262
- [0658] Liu,Y.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.18(2009):204-214
- [0659] Liu,Y.et al.,J Cancer 6(2015b):643-651
- [0660] Lonardo,F.et al.,Curr.Pharm.Des 16(2010):1877-1881
- [0661] Lu,X.et al.,Mol.Cancer Ther.3(2004):861-872
- [0662] Maass,N.et al.,Acta Oncol 39(2000):931-934
- [0663] Marchi,S.et al.,Cell Death.Dis.3(2012):e304
- [0664] Marioni,G.et al.,Acta Otolaryngol.129(2009):476-480
- [0665] Marnef,A.et al.,Int.J Biochem.Cell Biol 41(2009):977-981
- [0666] Martin,L.et al.,Oncogene 31(2012):4076-4084
- [0667] Mason,J.M.et al.,Nucleic Acids Res.43(2015):3180-3196
- [0668] Matsuda,R.et al.,Br.J Cancer 104(2011):376-386
- [0669] Medina,P.P.et al.,Epigenetics.3(2008):64-68
- [0670] Mound,A.et al.,Eur.J Cancer 49(2013):3738-3751
- [0671] Naidu,S.R.et al.,Oncogene 28(2009):2492-2501
- [0672] Ng,Y.et al.,J Biol Chem 279(2004):34156-34164
- [0673] Nibbe,R.K.et al.,Mol Cell Proteomics.8(2009):827-845
- [0674] Nishida,C.R.et al.,Mol.Pharmacol.78(2010):497-502
- [0675] O'Geen,H.et al.,PLoS.Genet.3(2007):e89
- [0676] Ota,T.et al.,Cancer Res 62(2002):5168-5177
- [0677] Paliouras,M.et al.,Tumour.Biol 29(2008):63-75
- [0678] Papageorgio,C.et al.,Int.J Oncol.31(2007):1205-1211
- [0679] Papageorgis,P.et al.,Cancer Res 70(2010):968-978
- [0680] Pohl,A.et al.,Pharmacogenomics.J 11(2011):93-99
- [0681] Pollari,S.et al.,Mol.Cancer Res 10(2012):597-604
- [0682] Qi,F.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.8(2015):1666-1673
- [0683] RefSeq,The NCBI handbook[Internet],Chapter 18,(2002),<http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/

- [0684] Reisman,D.N.et al.,Cancer Res 63(2003):560-566
- [0685] Robles,L.D.et al.,J Biol Chem 277(2002):25431-25438
- [0686] Ryu,B.et al.,PLoS.One.2(2007):e594
- [0687] Sager,R.et al.,Curr.Top.Microbiol.Immunol.213(Pt 1)(1996):51-64
- [0688] Sakakura,C.et al.,Anticancer Res 23(2003):3691-3697
- [0689] Sakurai,Y.et al.,Mol.Pharm.11(2014):2713-2719
- [0690] Sakurikar,N.et al.,J Biol Chem 287(2012):39193-39204
- [0691] Sheng,S.,Front Biosci.9(2004):2733-2745
- [0692] Shibao,K.et al.,Cell Calcium 48(2010):315-323
- [0693] Shu,G.S.et al.,Cancer Biomark.11(2012):107-114
- [0694] Stone,B.et al.,Gene 267(2001):173-182
- [0695] Strekalova,E.et al.,Clin.Cancer Res.(2015)
- [0696] Stutzer,I.et al.,J Biol Chem 288(2013):10536-10547
- [0697] Su,K.C.et al.,Dev.Cell 21(2011):1104-1115
- [0698] Sun,Y.et al.,Oncotarget.6(2015b):8244-8254
- [0699] Takashima,S.et al.,Tumour.Biol.35(2014):4257-4265
- [0700] Tatsuka,M.et al.,Cancer Res 58(1998):4811-4816
- [0701] Tsui,K.H.et al.,Sci.Rep.5(2015):12870
- [0702] Van Ginkel,P.R.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1448(1998):290-297
- [0703] Vanaja,D.K.et al.,Clin Cancer Res 12(2006):1128-1136
- [0704] Wang,G.et al.,Oncogene 35(2016):651-661
- [0705] Wang,G.et al.,Tumour.Biol 36(2015a):1055-1065
- [0706] Wang,Q.et al.,PLoS.One.8(2013d):e70191
- [0707] Wang,W.et al.,Int.J Cancer 124(2009b):521-530
- [0708] Wang,W.X.et al.,Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.40(2009c):857-860
- [0709] Wierinckx,A.et al.,Endocr.Relat Cancer 14(2007):887-900
- [0710] Williams,K.A.et al.,PLoS.Genet.10(2014):e1004809
- [0711] Wu,M.X.,Apoptosis.8(2003):11-18
- [0712] Wu,M.X.et al.,Expert.Opin.Ther.Targets.17(2013):593-606
- [0713] Wu,S.et al.,Cell Cycle 13(2014a):2869-2878
- [0714] Wu,Z.et al.,Neoplasia.11(2009):66-76
- [0715] Xu,F.et al.,Biochem.J 416(2008):15-26
- [0716] Yang,J.et al.,Surg.Oncol 22(2013):e53-e57
- [0717] Yang,L.et al.,Cancer Res 71(2011a):5558-5568
- [0718] Yang,L.et al.,Future.Oncol 8(2012):431-440
- [0719] Yang,X.et al.,Biomed.Pharmacother.67(2013):681-684
- [0720] Yang,Y.S.et al.,Lung Cancer 74(2011 b):12-24
- [0721] Yousef,G.M.et al.,Tumour.Biol 26(2005):227-235

- [0722] Yu,B.et al.,Exp.Cell Res 315 (2009) :3086-3098
- [0723] Zhang,F.et al.,J Viral Hepat.21 (2014a) :241-250
- [0724] Zhang,K.et al.,Tumour.Biol 35 (2014e) :7669-7673
- [0725] Zhang,M.et al.,Zhong.Nan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.36 (2011a) :274-276
- [0726] Zhang,Y.et al.,Cancer Sci.101 (2010) :934-940
- [0727] Zheng,G.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.364 (2007) :344-350
- [0728] Follenzi A,et al.Nat Genet.2000 Jun;25 (2) :217-22.
- [0729] Zufferey R,et al.J Virol.1999 Apr;73 (4) :2886-92.
- [0730] Scholten KB,et al.Clin Immunol.2006 May;119 (2) :135-45.
- [0731] Gustafsson C,et al.Trends Biotechnol.2004 Jul;22 (7) :346-53.Review.
- [0732] Kuball,J.,et al. (2007) .Blood 109,2331-2338.
- [0733] Schmitt,T.M.,et al. (2009) .Hum.Gene Ther.20,1240-1248

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 伊玛提克斯生物技术有限公司
- [0003] <120> 用于结直肠癌(CRC)和其他癌症免疫治疗的新型肽和肽组合物及其支架
- [0004] <130> I32811W0
- [0005] <150> GB 1507719.1
- [0006] <151> 2015-05-06
- [0007] <150> US 62/157,684
- [0008] <151> 2015-05-06
- [0009] <160> 267
- [0010] <170> PatentIn版本3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 9
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0015] <400> 1
- [0016] Ala Leu Ile Lys Gln Leu Phe Glu Ala
- [0017] 1 5
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 9
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 智人
- [0022] <400> 2
- [0023] Ala Leu Leu Pro Arg Tyr Phe Phe Leu
- [0024] 1 5
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 10
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 智人
- [0029] <400> 3
- [0030] Arg Leu Ile Pro Asp Thr Leu Tyr Ser Val
- [0031] 1 5 10
- [0032] <210> 4
- [0033] <211> 11
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 智人
- [0036] <400> 4
- [0037] Arg Leu Ala Glu Leu Thr Val Asp Glu Phe Leu
- [0038] 1 5 10

[0039]	<210>	5	
[0040]	<211>	10	
[0041]	<212>	PRT	
[0042]	<213>	智人	
[0043]	<400>	5	
[0044]	Trp Leu Phe Asp Asp Gly Gly Leu Thr Leu		
[0045]	1	5	10
[0046]	<210>	6	
[0047]	<211>	11	
[0048]	<212>	PRT	
[0049]	<213>	智人	
[0050]	<400>	6	
[0051]	Phe Leu Ala Glu Leu Pro Gly Ser Leu Ser Leu		
[0052]	1	5	10
[0053]	<210>	7	
[0054]	<211>	9	
[0055]	<212>	PRT	
[0056]	<213>	智人	
[0057]	<400>	7	
[0058]	Tyr Leu Thr Arg His Leu Ala Val Leu		
[0059]	1	5	
[0060]	<210>	8	
[0061]	<211>	10	
[0062]	<212>	PRT	
[0063]	<213>	智人	
[0064]	<400>	8	
[0065]	Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu Leu		
[0066]	1	5	10
[0067]	<210>	9	
[0068]	<211>	9	
[0069]	<212>	PRT	
[0070]	<213>	智人	
[0071]	<400>	9	
[0072]	Ile Leu Asp Asp His Leu Ser Arg Val		
[0073]	1	5	
[0074]	<210>	10	
[0075]	<211>	9	
[0076]	<212>	PRT	
[0077]	<213>	智人	

[0078] <400> 10
[0079] Arg Met Tyr Asn Lys Ile Phe Ala Ile
[0080] 1 5
[0081] <210> 11
[0082] <211> 9
[0083] <212> PRT
[0084] <213> 智人
[0085] <400> 11
[0086] Tyr Leu Phe Glu Lys Thr Phe Asn Met
[0087] 1 5
[0088] <210> 12
[0089] <211> 10
[0090] <212> PRT
[0091] <213> 智人
[0092] <400> 12
[0093] Ala Leu Val Gln Gly Ile Leu Glu Arg Val
[0094] 1 5 10
[0095] <210> 13
[0096] <211> 9
[0097] <212> PRT
[0098] <213> 智人
[0099] <400> 13
[0100] Phe Leu Leu Ala Glu Asp Thr Lys Val
[0101] 1 5
[0102] <210> 14
[0103] <211> 10
[0104] <212> PRT
[0105] <213> 智人
[0106] <400> 14
[0107] Phe Leu Asp Lys Pro Glu Asp Val Leu Leu
[0108] 1 5 10
[0109] <210> 15
[0110] <211> 9
[0111] <212> PRT
[0112] <213> 智人
[0113] <400> 15
[0114] Leu Gln Leu Asp Lys Glu Phe Gln Leu
[0115] 1 5
[0116] <210> 16

[0117] <211> 9
[0118] <212> PRT
[0119] <213> 智人
[0120] <400> 16
[0121] Val Leu Val Asp Gln Ser Trp Val Leu
[0122] 1 5
[0123] <210> 17
[0124] <211> 9
[0125] <212> PRT
[0126] <213> 智人
[0127] <400> 17
[0128] Ala Leu Ala Ala Ala Arg Val Glu Leu
[0129] 1 5
[0130] <210> 18
[0131] <211> 10
[0132] <212> PRT
[0133] <213> 智人
[0134] <400> 18
[0135] Phe Leu Ser Ser Leu Lys Gly Gly Leu Leu
[0136] 1 5 10
[0137] <210> 19
[0138] <211> 10
[0139] <212> PRT
[0140] <213> 智人
[0141] <400> 19
[0142] Arg Leu Tyr Thr Lys Leu Leu Asn Glu Ala
[0143] 1 5 10
[0144] <210> 20
[0145] <211> 9
[0146] <212> PRT
[0147] <213> 智人
[0148] <400> 20
[0149] Tyr Leu Lys Asp Gly Asp Val Met Leu
[0150] 1 5
[0151] <210> 21
[0152] <211> 9
[0153] <212> PRT
[0154] <213> 智人
[0155] <400> 21

[0156] Val Leu Ile Asp His Arg Trp Val Leu
[0157] 1 5
[0158] <210> 22
[0159] <211> 9
[0160] <212> PRT
[0161] <213> 智人
[0162] <400> 22
[0163] Gly Leu Ile Asp Glu Val Met Val Leu
[0164] 1 5
[0165] <210> 23
[0166] <211> 9
[0167] <212> PRT
[0168] <213> 智人
[0169] <400> 23
[0170] Phe Leu Asp Ala Asn Gly His Phe Val
[0171] 1 5
[0172] <210> 24
[0173] <211> 9
[0174] <212> PRT
[0175] <213> 智人
[0176] <400> 24
[0177] Val Leu Asp Gly Val Leu Met Glu Leu
[0178] 1 5
[0179] <210> 25
[0180] <211> 9
[0181] <212> PRT
[0182] <213> 智人
[0183] <400> 25
[0184] Ser Leu Ala Asp Arg Leu Ile Gly Val
[0185] 1 5
[0186] <210> 26
[0187] <211> 13
[0188] <212> PRT
[0189] <213> 智人
[0190] <400> 26
[0191] Gly Leu Ala Ser Lys Glu Asn Phe Ser Asn Val Ser Leu
[0192] 1 5 10
[0193] <210> 27
[0194] <211> 10

[0195] <212> PRT
[0196] <213> 智人
[0197] <400> 27
[0198] Leu Leu Ala Asp Glu Asp Ser Ser Tyr Leu
[0199] 1 5 10
[0200] <210> 28
[0201] <211> 9
[0202] <212> PRT
[0203] <213> 智人
[0204] <400> 28
[0205] Ala Leu Thr Glu Ile Gln Glu Phe Ile
[0206] 1 5
[0207] <210> 29
[0208] <211> 9
[0209] <212> PRT
[0210] <213> 智人
[0211] <400> 29
[0212] Gln Met Leu Asp Val Ala Ile Arg Val
[0213] 1 5
[0214] <210> 30
[0215] <211> 9
[0216] <212> PRT
[0217] <213> 智人
[0218] <400> 30
[0219] Gly Leu Ser Ser Ala Tyr Gly Gly Leu
[0220] 1 5
[0221] <210> 31
[0222] <211> 9
[0223] <212> PRT
[0224] <213> 智人
[0225] <400> 31
[0226] Leu Leu Tyr Gly Lys Tyr Val Ser Val
[0227] 1 5
[0228] <210> 32
[0229] <211> 9
[0230] <212> PRT
[0231] <213> 智人
[0232] <400> 32
[0233] Lys Leu Asn Thr Glu Thr Phe Gly Val

[0234]	1	5	
[0235]	<210>	33	
[0236]	<211>	9	
[0237]	<212>	PRT	
[0238]	<213>	智人	
[0239]	<400>	33	
[0240]	Ala Leu Trp Glu Lys Asn Thr His Leu		
[0241]	1	5	
[0242]	<210>	34	
[0243]	<211>	9	
[0244]	<212>	PRT	
[0245]	<213>	智人	
[0246]	<400>	34	
[0247]	Ile Leu Leu Glu Lys Ser Val Ser Val		
[0248]	1	5	
[0249]	<210>	35	
[0250]	<211>	9	
[0251]	<212>	PRT	
[0252]	<213>	智人	
[0253]	<400>	35	
[0254]	Lys Leu Leu Asp Leu Thr Val Arg Ile		
[0255]	1	5	
[0256]	<210>	36	
[0257]	<211>	13	
[0258]	<212>	PRT	
[0259]	<213>	智人	
[0260]	<400>	36	
[0261]	Gly Leu Leu Glu Ser Pro Ser Ile Phe Asn Phe Thr Ala		
[0262]	1	5	10
[0263]	<210>	37	
[0264]	<211>	11	
[0265]	<212>	PRT	
[0266]	<213>	智人	
[0267]	<400>	37	
[0268]	Gly Leu Phe Ala Gly Leu Gly Gly Ala Gly Ala		
[0269]	1	5	10
[0270]	<210>	38	
[0271]	<211>	9	
[0272]	<212>	PRT	

[0273] <213> 智人
[0274] <400> 38
[0275] Ser Leu Ala Pro Thr Pro Val Ser Ala
[0276] 1 5
[0277] <210> 39
[0278] <211> 10
[0279] <212> PRT
[0280] <213> 智人
[0281] <400> 39
[0282] Gly Leu Asn Gly Gly Ser Pro Ala Ala Ala
[0283] 1 5 10
[0284] <210> 40
[0285] <211> 9
[0286] <212> PRT
[0287] <213> 智人
[0288] <400> 40
[0289] Ala Leu Ser Asn Val Ile His Lys Val
[0290] 1 5
[0291] <210> 41
[0292] <211> 9
[0293] <212> PRT
[0294] <213> 智人
[0295] <400> 41
[0296] Ile Leu Asp Asp Ser Phe Lys Leu Leu
[0297] 1 5
[0298] <210> 42
[0299] <211> 9
[0300] <212> PRT
[0301] <213> 智人
[0302] <400> 42
[0303] Ser Ile Leu Asp Asp Ser Phe Lys Leu
[0304] 1 5
[0305] <210> 43
[0306] <211> 9
[0307] <212> PRT
[0308] <213> 智人
[0309] <400> 43
[0310] Thr Leu Asp Ala Ala Gln Pro Arg Val
[0311] 1 5

[0312] <210> 44
[0313] <211> 9
[0314] <212> PRT
[0315] <213> 智人
[0316] <400> 44
[0317] Ser Leu Glu Ser Lys Leu Thr Ser Val
[0318] 1 5
[0319] <210> 45
[0320] <211> 9
[0321] <212> PRT
[0322] <213> 智人
[0323] <400> 45
[0324] Ala Leu Ala Glu Leu Leu His Gly Ala
[0325] 1 5
[0326] <210> 46
[0327] <211> 9
[0328] <212> PRT
[0329] <213> 智人
[0330] <400> 46
[0331] Gly Leu Asp Asp Arg Tyr Ser Leu Val
[0332] 1 5
[0333] <210> 47
[0334] <211> 9
[0335] <212> PRT
[0336] <213> 智人
[0337] <400> 47
[0338] Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val
[0339] 1 5
[0340] <210> 48
[0341] <211> 9
[0342] <212> PRT
[0343] <213> 智人
[0344] <400> 48
[0345] Phe Leu Asp Ala Ser Asp Pro Ala Leu
[0346] 1 5
[0347] <210> 49
[0348] <211> 9
[0349] <212> PRT
[0350] <213> 智人

[0351] <400> 49
[0352] Ser Gly Met Gly Gly Ile Thr Ala Val
[0353] 1 5
[0354] <210> 50
[0355] <211> 9
[0356] <212> PRT
[0357] <213> 智人
[0358] <400> 50
[0359] Thr Leu Met Ala Glu Met His Val Val
[0360] 1 5
[0361] <210> 51
[0362] <211> 9
[0363] <212> PRT
[0364] <213> 智人
[0365] <400> 51
[0366] Gln Val Trp Glu Ile Gln His Thr Val
[0367] 1 5
[0368] <210> 52
[0369] <211> 11
[0370] <212> PRT
[0371] <213> 智人
[0372] <400> 52
[0373] Ala Leu Asp Ser Ser Asn Ser Met Gln Thr Ile
[0374] 1 5 10
[0375] <210> 53
[0376] <211> 9
[0377] <212> PRT
[0378] <213> 智人
[0379] <400> 53
[0380] Phe Leu Leu Gly Ser Glu Ile Lys Leu
[0381] 1 5
[0382] <210> 54
[0383] <211> 11
[0384] <212> PRT
[0385] <213> 智人
[0386] <400> 54
[0387] Ala Leu Leu Asn Gly Glu Tyr Leu Leu Ala Ala
[0388] 1 5 10
[0389] <210> 55

[0390] <211> 9
[0391] <212> PRT
[0392] <213> 智人
[0393] <400> 55
[0394] Gln Ile Ile Thr Ser Val Val Ser Val
[0395] 1 5
[0396] <210> 56
[0397] <211> 12
[0398] <212> PRT
[0399] <213> 智人
[0400] <400> 56
[0401] Val Leu Phe Thr Asp Glu Gly Val Pro Lys Phe Leu
[0402] 1 5 10
[0403] <210> 57
[0404] <211> 9
[0405] <212> PRT
[0406] <213> 智人
[0407] <400> 57
[0408] Asn Leu Leu Glu Lys Glu Asn Tyr Leu
[0409] 1 5
[0410] <210> 58
[0411] <211> 10
[0412] <212> PRT
[0413] <213> 智人
[0414] <400> 58
[0415] Ala Met Ala Asp Lys Met Asp Met Ser Leu
[0416] 1 5 10
[0417] <210> 59
[0418] <211> 9
[0419] <212> PRT
[0420] <213> 智人
[0421] <400> 59
[0422] Leu Leu Thr Asp Asn Val Val Lys Leu
[0423] 1 5
[0424] <210> 60
[0425] <211> 10
[0426] <212> PRT
[0427] <213> 智人
[0428] <400> 60

[0429] Val Leu Asp Glu Asp Glu Pro Arg Phe Leu
[0430] 1 5 10
[0431] <210> 61
[0432] <211> 9
[0433] <212> PRT
[0434] <213> 智人
[0435] <400> 61
[0436] Lys Leu Leu Lys Leu Phe Gln Gly Val
[0437] 1 5
[0438] <210> 62
[0439] <211> 9
[0440] <212> PRT
[0441] <213> 智人
[0442] <400> 62
[0443] Tyr Leu Ala Pro Glu Asn Gly Tyr Leu
[0444] 1 5
[0445] <210> 63
[0446] <211> 9
[0447] <212> PRT
[0448] <213> 智人
[0449] <400> 63
[0450] Lys Leu Phe Ser Ile Leu Ser Thr Val
[0451] 1 5
[0452] <210> 64
[0453] <211> 9
[0454] <212> PRT
[0455] <213> 智人
[0456] <400> 64
[0457] Lys Thr Leu Gly Lys Leu Trp Arg Leu
[0458] 1 5
[0459] <210> 65
[0460] <211> 9
[0461] <212> PRT
[0462] <213> 智人
[0463] <400> 65
[0464] Phe Gly Ala Pro Gly Ile Ile Ser Ala
[0465] 1 5
[0466] <210> 66
[0467] <211> 9

[0468] <212> PRT
[0469] <213> 智人
[0470] <400> 66
[0471] Gly Leu Asp Asp Gly Pro Asp Phe Leu
[0472] 1 5
[0473] <210> 67
[0474] <211> 12
[0475] <212> PRT
[0476] <213> 智人
[0477] <400> 67
[0478] Ser Leu Asn Asp Leu Glu Lys Asp Val Met Leu Leu
[0479] 1 5 10
[0480] <210> 68
[0481] <211> 9
[0482] <212> PRT
[0483] <213> 智人
[0484] <400> 68
[0485] Ser Ile Leu Gln Phe Val His Met Val
[0486] 1 5
[0487] <210> 69
[0488] <211> 13
[0489] <212> PRT
[0490] <213> 智人
[0491] <400> 69
[0492] Gly Met Leu Asn Glu Ala Glu Gly Lys Ala Ile Lys Leu
[0493] 1 5 10
[0494] <210> 70
[0495] <211> 9
[0496] <212> PRT
[0497] <213> 智人
[0498] <400> 70
[0499] Met Ile Ser Glu Leu Glu Val Arg Leu
[0500] 1 5
[0501] <210> 71
[0502] <211> 10
[0503] <212> PRT
[0504] <213> 智人
[0505] <400> 71
[0506] Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile

[0507]	1	5	10
[0508]	<210> 72		
[0509]	<211> 10		
[0510]	<212> PRT		
[0511]	<213> 智人		
[0512]	<400> 72		
[0513]	Tyr Leu Leu Asp Tyr Pro Asn Asn Leu Leu		
[0514]	1	5	10
[0515]	<210> 73		
[0516]	<211> 9		
[0517]	<212> PRT		
[0518]	<213> 智人		
[0519]	<400> 73		
[0520]	Tyr Leu Phe Asp Ile Ala Val Ser Met		
[0521]	1	5	
[0522]	<210> 74		
[0523]	<211> 9		
[0524]	<212> PRT		
[0525]	<213> 智人		
[0526]	<400> 74		
[0527]	Tyr Leu Met Gly Phe Leu His Ala Val		
[0528]	1	5	
[0529]	<210> 75		
[0530]	<211> 9		
[0531]	<212> PRT		
[0532]	<213> 智人		
[0533]	<400> 75		
[0534]	Glu Met Ile Glu Asn Ile Gln Ser Val		
[0535]	1	5	
[0536]	<210> 76		
[0537]	<211> 10		
[0538]	<212> PRT		
[0539]	<213> 智人		
[0540]	<400> 76		
[0541]	Tyr Leu Ile Gly Glu Lys Gln His Tyr Leu		
[0542]	1	5	10
[0543]	<210> 77		
[0544]	<211> 9		
[0545]	<212> PRT		

[0546] <213> 智人
[0547] <400> 77
[0548] Ser Leu Leu Lys Arg Asp Phe Gly Ala
[0549] 1 5
[0550] <210> 78
[0551] <211> 9
[0552] <212> PRT
[0553] <213> 智人
[0554] <400> 78
[0555] Ala Leu Asp Pro Glu Leu Leu Leu Leu
[0556] 1 5
[0557] <210> 79
[0558] <211> 10
[0559] <212> PRT
[0560] <213> 智人
[0561] <400> 79
[0562] Ser Leu Ala Ala Asp Gln Leu Leu Lys Leu
[0563] 1 5 10
[0564] <210> 80
[0565] <211> 11
[0566] <212> PRT
[0567] <213> 智人
[0568] <400> 80
[0569] Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
[0570] 1 5 10
[0571] <210> 81
[0572] <211> 9
[0573] <212> PRT
[0574] <213> 智人
[0575] <400> 81
[0576] Ala Leu Leu Ser Gln Gln Thr His Leu
[0577] 1 5
[0578] <210> 82
[0579] <211> 10
[0580] <212> PRT
[0581] <213> 智人
[0582] <400> 82
[0583] Gln Leu Tyr Glu Glu Pro Asp Thr Lys Leu
[0584] 1 5 10

[0585] <210> 83
[0586] <211> 10
[0587] <212> PRT
[0588] <213> 智人
[0589] <400> 83
[0590] Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val
[0591] 1 5 10
[0592] <210> 84
[0593] <211> 11
[0594] <212> PRT
[0595] <213> 智人
[0596] <400> 84
[0597] Ser Met Val Glu Asp Ile Thr Gly Leu Arg Leu
[0598] 1 5 10
[0599] <210> 85
[0600] <211> 11
[0601] <212> PRT
[0602] <213> 智人
[0603] <400> 85
[0604] Ile Leu His Asp Ile Asn Ser Asp Gly Val Leu
[0605] 1 5 10
[0606] <210> 86
[0607] <211> 9
[0608] <212> PRT
[0609] <213> 智人
[0610] <400> 86
[0611] Lys Val Phe Pro Gly Lys Ile Ser Val
[0612] 1 5
[0613] <210> 87
[0614] <211> 10
[0615] <212> PRT
[0616] <213> 智人
[0617] <400> 87
[0618] Leu Leu Phe Asp Ala Pro Asp Leu Arg Leu
[0619] 1 5 10
[0620] <210> 88
[0621] <211> 9
[0622] <212> PRT
[0623] <213> 智人

[0624] <400> 88
[0625] Lys Leu Asp Ile Lys Val Glu Thr Val
[0626] 1 5
[0627] <210> 89
[0628] <211> 9
[0629] <212> PRT
[0630] <213> 智人
[0631] <400> 89
[0632] Ser Leu Ile Glu Tyr Glu Phe Arg Val
[0633] 1 5
[0634] <210> 90
[0635] <211> 11
[0636] <212> PRT
[0637] <213> 智人
[0638] <400> 90
[0639] Gly Leu Leu Lys Pro Gly Leu Asn Val Val Leu
[0640] 1 5 10
[0641] <210> 91
[0642] <211> 9
[0643] <212> PRT
[0644] <213> 智人
[0645] <400> 91
[0646] Thr Val Asp Val Ala Thr Pro Ser Val
[0647] 1 5
[0648] <210> 92
[0649] <211> 9
[0650] <212> PRT
[0651] <213> 智人
[0652] <400> 92
[0653] Trp Ile Asp Asp Thr Ser Ala Phe Val
[0654] 1 5
[0655] <210> 93
[0656] <211> 9
[0657] <212> PRT
[0658] <213> 智人
[0659] <400> 93
[0660] Ser Leu Gln Glu Leu Arg Leu Leu Leu
[0661] 1 5
[0662] <210> 94

[0663] <211> 9
[0664] <212> PRT
[0665] <213> 智人
[0666] <400> 94
[0667] Lys Ser Met Asp Ile Val Leu Thr Val
[0668] 1 5
[0669] <210> 95
[0670] <211> 9
[0671] <212> PRT
[0672] <213> 智人
[0673] <400> 95
[0674] Ala Ile Leu Asp Ala His Ile Glu Val
[0675] 1 5
[0676] <210> 96
[0677] <211> 9
[0678] <212> PRT
[0679] <213> 智人
[0680] <400> 96
[0681] Lys Leu Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Val
[0682] 1 5
[0683] <210> 97
[0684] <211> 9
[0685] <212> PRT
[0686] <213> 智人
[0687] <400> 97
[0688] Ala Leu Trp Trp Gly Val Val Thr Val
[0689] 1 5
[0690] <210> 98
[0691] <211> 9
[0692] <212> PRT
[0693] <213> 智人
[0694] <400> 98
[0695] Ala Met Asn Gly Lys Ser Phe Ser Val
[0696] 1 5
[0697] <210> 99
[0698] <211> 10
[0699] <212> PRT
[0700] <213> 智人
[0701] <400> 99

[0702]	Lys Leu Leu Glu Val Asp Leu Asp Thr Val
[0703]	1 5 10
[0704]	<210> 100
[0705]	<211> 9
[0706]	<212> PRT
[0707]	<213> 智人
[0708]	<400> 100
[0709]	Ser Leu Asp Asp Phe Leu Ala Thr Ala
[0710]	1 5
[0711]	<210> 101
[0712]	<211> 10
[0713]	<212> PRT
[0714]	<213> 智人
[0715]	<400> 101
[0716]	Gly Leu Ser Glu Gly His Thr Phe Gln Val
[0717]	1 5 10
[0718]	<210> 102
[0719]	<211> 9
[0720]	<212> PRT
[0721]	<213> 智人
[0722]	<400> 102
[0723]	Lys Ile Leu Val Ser Leu Ile Glu Val
[0724]	1 5
[0725]	<210> 103
[0726]	<211> 9
[0727]	<212> PRT
[0728]	<213> 智人
[0729]	<400> 103
[0730]	Phe Leu Phe Gly Tyr Pro Lys Arg Leu
[0731]	1 5
[0732]	<210> 104
[0733]	<211> 12
[0734]	<212> PRT
[0735]	<213> 智人
[0736]	<400> 104
[0737]	Ile Leu Leu Thr Ile Lys Asp Asp Thr Ile Tyr Leu
[0738]	1 5 10
[0739]	<210> 105
[0740]	<211> 9

[0741] <212> PRT
[0742] <213> 智人
[0743] <400> 105
[0744] Tyr Ala Leu Asp Leu Ser Thr Phe Leu
[0745] 1 5
[0746] <210> 106
[0747] <211> 9
[0748] <212> PRT
[0749] <213> 智人
[0750] <400> 106
[0751] Ser Leu Ile Ser Glu Lys Ile Leu Leu
[0752] 1 5
[0753] <210> 107
[0754] <211> 10
[0755] <212> PRT
[0756] <213> 智人
[0757] <400> 107
[0758] Ala Leu Leu Gly Gly Gly Pro Tyr Met Leu
[0759] 1 5 10
[0760] <210> 108
[0761] <211> 12
[0762] <212> PRT
[0763] <213> 智人
[0764] <400> 108
[0765] Ser Leu Ala Glu Leu Val Pro Gly Val Gly Gly Ile
[0766] 1 5 10
[0767] <210> 109
[0768] <211> 9
[0769] <212> PRT
[0770] <213> 智人
[0771] <400> 109
[0772] Ala Leu Asp Gly Asp Gln Met Glu Leu
[0773] 1 5
[0774] <210> 110
[0775] <211> 11
[0776] <212> PRT
[0777] <213> 智人
[0778] <400> 110
[0779] Leu Leu Gly Glu Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu

[0780]	1	5	10
[0781]	<210>	111	
[0782]	<211>	9	
[0783]	<212>	PRT	
[0784]	<213>	智人	
[0785]	<400>	111	
[0786]	His Met Asp Asp Gly Gly Tyr Ser Met		
[0787]	1	5	
[0788]	<210>	112	
[0789]	<211>	9	
[0790]	<212>	PRT	
[0791]	<213>	智人	
[0792]	<400>	112	
[0793]	Lys Leu Gly Gln Val Leu Ile Tyr Leu		
[0794]	1	5	
[0795]	<210>	113	
[0796]	<211>	9	
[0797]	<212>	PRT	
[0798]	<213>	智人	
[0799]	<400>	113	
[0800]	Ile Leu Tyr Asp Leu Gln Gln Asn Leu		
[0801]	1	5	
[0802]	<210>	114	
[0803]	<211>	9	
[0804]	<212>	PRT	
[0805]	<213>	智人	
[0806]	<400>	114	
[0807]	Thr Ala Val Gly His Ala Leu Val Leu		
[0808]	1	5	
[0809]	<210>	115	
[0810]	<211>	9	
[0811]	<212>	PRT	
[0812]	<213>	智人	
[0813]	<400>	115	
[0814]	Ser Leu Phe Asp Val Ser His Met Leu		
[0815]	1	5	
[0816]	<210>	116	
[0817]	<211>	9	
[0818]	<212>	PRT	

[0819] <213> 智人
[0820] <400> 116
[0821] Leu Val Tyr Gln Phe Val His Pro Ile
[0822] 1 5
[0823] <210> 117
[0824] <211> 12
[0825] <212> PRT
[0826] <213> 智人
[0827] <400> 117
[0828] Thr Leu Gln Pro Val Asp Asn Ser Thr Ile Ser Leu
[0829] 1 5 10
[0830] <210> 118
[0831] <211> 9
[0832] <212> PRT
[0833] <213> 智人
[0834] <400> 118
[0835] Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val
[0836] 1 5
[0837] <210> 119
[0838] <211> 9
[0839] <212> PRT
[0840] <213> 智人
[0841] <400> 119
[0842] Ile Leu Tyr Gln Thr Val Thr Gly Leu
[0843] 1 5
[0844] <210> 120
[0845] <211> 9
[0846] <212> PRT
[0847] <213> 智人
[0848] <400> 120
[0849] Val Leu Tyr Glu Gly Val Asp Glu Val
[0850] 1 5
[0851] <210> 121
[0852] <211> 10
[0853] <212> PRT
[0854] <213> 智人
[0855] <400> 121
[0856] Ser Leu Ala Pro Asn Ile Ile Ser Gln Leu
[0857] 1 5 10

[0858] <210> 122
[0859] <211> 9
[0860] <212> PRT
[0861] <213> 智人
[0862] <400> 122
[0863] Ser Leu Met Gly Met Val Leu Lys Leu
[0864] 1 5
[0865] <210> 123
[0866] <211> 9
[0867] <212> PRT
[0868] <213> 智人
[0869] <400> 123
[0870] Lys Thr Leu Glu Arg Ser Tyr Leu Leu
[0871] 1 5
[0872] <210> 124
[0873] <211> 11
[0874] <212> PRT
[0875] <213> 智人
[0876] <400> 124
[0877] Arg Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Gln Ser Val
[0878] 1 5 10
[0879] <210> 125
[0880] <211> 11
[0881] <212> PRT
[0882] <213> 智人
[0883] <400> 125
[0884] Lys Leu Gly Asp Phe Gly Leu Leu Val Glu Leu
[0885] 1 5 10
[0886] <210> 126
[0887] <211> 9
[0888] <212> PRT
[0889] <213> 智人
[0890] <400> 126
[0891] Thr Leu Ala Lys Tyr Leu Met Glu Leu
[0892] 1 5
[0893] <210> 127
[0894] <211> 12
[0895] <212> PRT
[0896] <213> 智人

[0897] <400> 127
[0898] Arg Leu Ala Glu Leu Thr Val Asp Glu Phe Leu Ala
[0899] 1 5 10
[0900] <210> 128
[0901] <211> 9
[0902] <212> PRT
[0903] <213> 智人
[0904] <400> 128
[0905] Met Leu Asp Asp Arg Ala Tyr Leu Val
[0906] 1 5
[0907] <210> 129
[0908] <211> 9
[0909] <212> PRT
[0910] <213> 智人
[0911] <400> 129
[0912] Val Leu Ile Asp Val Leu Lys Glu Leu
[0913] 1 5
[0914] <210> 130
[0915] <211> 12
[0916] <212> PRT
[0917] <213> 智人
[0918] <400> 130
[0919] Gly Leu Gly Gly Ser Gln Leu Ile Asp Thr His Leu
[0920] 1 5 10
[0921] <210> 131
[0922] <211> 9
[0923] <212> PRT
[0924] <213> 智人
[0925] <400> 131
[0926] Lys Leu Leu Asp Val Val His Pro Ala
[0927] 1 5
[0928] <210> 132
[0929] <211> 10
[0930] <212> PRT
[0931] <213> 智人
[0932] <400> 132
[0933] Ala Leu Leu Asn Ala Ile Leu His Ser Ala
[0934] 1 5 10
[0935] <210> 133

[0936] <211> 9
[0937] <212> PRT
[0938] <213> 智人
[0939] <400> 133
[0940] Arg Thr Phe Glu Lys Ile Glu Glu Val
[0941] 1 5
[0942] <210> 134
[0943] <211> 11
[0944] <212> PRT
[0945] <213> 智人
[0946] <400> 134
[0947] Gly Val Ala Gly Gly Ser Ile Leu Lys Gly Val
[0948] 1 5 10
[0949] <210> 135
[0950] <211> 9
[0951] <212> PRT
[0952] <213> 智人
[0953] <400> 135
[0954] Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu
[0955] 1 5
[0956] <210> 136
[0957] <211> 10
[0958] <212> PRT
[0959] <213> 智人
[0960] <400> 136
[0961] Lys Leu Phe Asp Ile Phe Ser Gln Gln Val
[0962] 1 5 10
[0963] <210> 137
[0964] <211> 9
[0965] <212> PRT
[0966] <213> 智人
[0967] <400> 137
[0968] Gln Leu Thr Glu Ile Lys Pro Leu Leu
[0969] 1 5
[0970] <210> 138
[0971] <211> 9
[0972] <212> PRT
[0973] <213> 智人
[0974] <400> 138

[0975] Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile
[0976] 1 5
[0977] <210> 139
[0978] <211> 10
[0979] <212> PRT
[0980] <213> 智人
[0981] <400> 139
[0982] Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val
[0983] 1 5 10
[0984] <210> 140
[0985] <211> 9
[0986] <212> PRT
[0987] <213> 智人
[0988] <400> 140
[0989] Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val
[0990] 1 5
[0991] <210> 141
[0992] <211> 9
[0993] <212> PRT
[0994] <213> 智人
[0995] <400> 141
[0996] Ala Val Ile Glu His Leu Glu Arg Leu
[0997] 1 5
[0998] <210> 142
[0999] <211> 9
[1000] <212> PRT
[1001] <213> 智人
[1002] <400> 142
[1003] Ser Leu Val Gln Arg Val Glu Thr Ile
[1004] 1 5
[1005] <210> 143
[1006] <211> 9
[1007] <212> PRT
[1008] <213> 智人
[1009] <400> 143
[1010] Lys Leu Ser Asp Val Trp Lys Glu Leu
[1011] 1 5
[1012] <210> 144
[1013] <211> 9

[1014]	<212>	PRT
[1015]	<213>	智人
[1016]	<400>	144
[1017]	Leu Leu Asn Asp Arg Ile Trp Leu Ala	
[1018]	1	5
[1019]	<210>	145
[1020]	<211>	9
[1021]	<212>	PRT
[1022]	<213>	智人
[1023]	<400>	145
[1024]	Leu Leu Leu Glu Val Val Lys Gln Val	
[1025]	1	5
[1026]	<210>	146
[1027]	<211>	9
[1028]	<212>	PRT
[1029]	<213>	智人
[1030]	<400>	146
[1031]	Ala Leu Ser Asp Glu Thr Trp Gly Leu	
[1032]	1	5
[1033]	<210>	147
[1034]	<211>	9
[1035]	<212>	PRT
[1036]	<213>	智人
[1037]	<400>	147
[1038]	Thr Leu Thr Glu Leu Arg Ala Phe Leu	
[1039]	1	5
[1040]	<210>	148
[1041]	<211>	10
[1042]	<212>	PRT
[1043]	<213>	智人
[1044]	<400>	148
[1045]	Arg Leu Leu Glu Asn Met Thr Glu Val Val	
[1046]	1	5 10
[1047]	<210>	149
[1048]	<211>	11
[1049]	<212>	PRT
[1050]	<213>	智人
[1051]	<400>	149
[1052]	Tyr Gln Phe Asp Lys Val Gly Ile Leu Thr Leu	

[1053]	1	5	10
[1054]	<210> 150		
[1055]	<211> 10		
[1056]	<212> PRT		
[1057]	<213> 智人		
[1058]	<400> 150		
[1059]	Arg Leu Ala Asp Leu Glu Ala Leu Lys Val		
[1060]	1	5	10
[1061]	<210> 151		
[1062]	<211> 14		
[1063]	<212> PRT		
[1064]	<213> 智人		
[1065]	<400> 151		
[1066]	Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val		
[1067]	1	5	10
[1068]	<210> 152		
[1069]	<211> 9		
[1070]	<212> PRT		
[1071]	<213> 智人		
[1072]	<400> 152		
[1073]	Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu		
[1074]	1	5	
[1075]	<210> 153		
[1076]	<211> 12		
[1077]	<212> PRT		
[1078]	<213> 智人		
[1079]	<400> 153		
[1080]	Ile Leu Phe Ser Glu Asp Ser Thr Lys Leu Phe Val		
[1081]	1	5	10
[1082]	<210> 154		
[1083]	<211> 11		
[1084]	<212> PRT		
[1085]	<213> 智人		
[1086]	<400> 154		
[1087]	Lys Leu Pro Ser Glu Thr Ile Phe Val Gly Cys		
[1088]	1	5	10
[1089]	<210> 155		
[1090]	<211> 10		
[1091]	<212> PRT		

[1092]	<213>	智人	
[1093]	<400>	155	
[1094]	Arg Leu Leu Gly Glu Glu Val Val Arg Val		
[1095]	1	5	10
[1096]	<210>	156	
[1097]	<211>	9	
[1098]	<212>	PRT	
[1099]	<213>	智人	
[1100]	<400>	156	
[1101]	Ser Leu Met Met Thr Ile Ile Asn Leu		
[1102]	1	5	
[1103]	<210>	157	
[1104]	<211>	9	
[1105]	<212>	PRT	
[1106]	<213>	智人	
[1107]	<400>	157	
[1108]	Ser Leu Ile Glu Arg Asp Leu Lys Leu		
[1109]	1	5	
[1110]	<210>	158	
[1111]	<211>	10	
[1112]	<212>	PRT	
[1113]	<213>	智人	
[1114]	<400>	158	
[1115]	Gly Leu Leu Asp Pro Ser Val Phe His Val		
[1116]	1	5	10
[1117]	<210>	159	
[1118]	<211>	11	
[1119]	<212>	PRT	
[1120]	<213>	智人	
[1121]	<400>	159	
[1122]	Val Leu Val Asp Asp Asp Gly Ile Lys Val Val		
[1123]	1	5	10
[1124]	<210>	160	
[1125]	<211>	10	
[1126]	<212>	PRT	
[1127]	<213>	智人	
[1128]	<400>	160	
[1129]	Lys Leu Leu Glu Phe Asp Gln Leu Gln Leu		
[1130]	1	5	10

[1131]	<210>	161	
[1132]	<211>	9	
[1133]	<212>	PRT	
[1134]	<213>	智人	
[1135]	<400>	161	
[1136]	Phe Leu Lys Asn Glu Leu Asp Asn Val		
[1137]	1	5	
[1138]	<210>	162	
[1139]	<211>	9	
[1140]	<212>	PRT	
[1141]	<213>	智人	
[1142]	<400>	162	
[1143]	Lys Leu Met Asp Tyr Ile Asp Glu Leu		
[1144]	1	5	
[1145]	<210>	163	
[1146]	<211>	9	
[1147]	<212>	PRT	
[1148]	<213>	智人	
[1149]	<400>	163	
[1150]	Arg Leu Leu His Glu Val Gln Glu Leu		
[1151]	1	5	
[1152]	<210>	164	
[1153]	<211>	10	
[1154]	<212>	PRT	
[1155]	<213>	智人	
[1156]	<400>	164	
[1157]	Lys Met Leu Asp Glu Ile Leu Leu Gln Leu		
[1158]	1	5	10
[1159]	<210>	165	
[1160]	<211>	11	
[1161]	<212>	PRT	
[1162]	<213>	智人	
[1163]	<400>	165	
[1164]	Arg Leu Leu Asp Phe Pro Glu Ala Met Val Leu		
[1165]	1	5	10
[1166]	<210>	166	
[1167]	<211>	11	
[1168]	<212>	PRT	
[1169]	<213>	智人	

[1170] <400> 166
[1171] Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gly Ile Leu Gly Leu
[1172] 1 5 10
[1173] <210> 167
[1174] <211> 11
[1175] <212> PRT
[1176] <213> 智人
[1177] <400> 167
[1178] Ser Val Ile Asp His Ile His Leu Ile Ser Val
[1179] 1 5 10
[1180] <210> 168
[1181] <211> 10
[1182] <212> PRT
[1183] <213> 智人
[1184] <400> 168
[1185] Gly Leu Ile Arg Phe Pro Leu Met Thr Ile
[1186] 1 5 10
[1187] <210> 169
[1188] <211> 9
[1189] <212> PRT
[1190] <213> 智人
[1191] <400> 169
[1192] Tyr Leu Ala His Phe Ile Glu Gly Leu
[1193] 1 5
[1194] <210> 170
[1195] <211> 9
[1196] <212> PRT
[1197] <213> 智人
[1198] <400> 170
[1199] Ala Leu Ala Gly Gly Ile Thr Met Val
[1200] 1 5
[1201] <210> 171
[1202] <211> 11
[1203] <212> PRT
[1204] <213> 智人
[1205] <400> 171
[1206] Arg Leu Gln Glu Thr Glu Gly Met Val Ala Val
[1207] 1 5 10
[1208] <210> 172

[1209]	<211> 10
[1210]	<212> PRT
[1211]	<213> 智人
[1212]	<400> 172
[1213]	Leu Leu Leu Asp Thr Val Thr Met Gln Val
[1214]	1 5 10
[1215]	<210> 173
[1216]	<211> 9
[1217]	<212> PRT
[1218]	<213> 智人
[1219]	<400> 173
[1220]	Lys Leu Gly Asp Leu Met Val Leu Leu
[1221]	1 5
[1222]	<210> 174
[1223]	<211> 11
[1224]	<212> PRT
[1225]	<213> 智人
[1226]	<400> 174
[1227]	Ile Leu Leu Asp Asp Asn Met Gln Ile Arg Leu
[1228]	1 5 10
[1229]	<210> 175
[1230]	<211> 13
[1231]	<212> PRT
[1232]	<213> 智人
[1233]	<400> 175
[1234]	Thr Leu Leu Gly Gly Lys Glu Ala Gln Ala Leu Gly Val
[1235]	1 5 10
[1236]	<210> 176
[1237]	<211> 9
[1238]	<212> PRT
[1239]	<213> 智人
[1240]	<400> 176
[1241]	Arg Thr Leu Asp Lys Val Leu Glu Val
[1242]	1 5
[1243]	<210> 177
[1244]	<211> 10
[1245]	<212> PRT
[1246]	<213> 智人
[1247]	<400> 177

[1248]	Ala Leu Leu Gln Gly Ala Ile Glu Ser Val
[1249]	1 5 10
[1250]	<210> 178
[1251]	<211> 9
[1252]	<212> PRT
[1253]	<213> 智人
[1254]	<400> 178
[1255]	Tyr Leu Phe Arg Glu Pro Ala Thr Ile
[1256]	1 5
[1257]	<210> 179
[1258]	<211> 9
[1259]	<212> PRT
[1260]	<213> 智人
[1261]	<400> 179
[1262]	Arg Leu Leu Ser Pro Leu Ser Ser Ala
[1263]	1 5
[1264]	<210> 180
[1265]	<211> 9
[1266]	<212> PRT
[1267]	<213> 智人
[1268]	<400> 180
[1269]	Asn Leu Leu Glu Ile Ala Pro His Leu
[1270]	1 5
[1271]	<210> 181
[1272]	<211> 12
[1273]	<212> PRT
[1274]	<213> 智人
[1275]	<400> 181
[1276]	Asn Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val
[1277]	1 5 10
[1278]	<210> 182
[1279]	<211> 9
[1280]	<212> PRT
[1281]	<213> 智人
[1282]	<400> 182
[1283]	Ser Leu Asn Lys Trp Ile Phe Thr Val
[1284]	1 5
[1285]	<210> 183
[1286]	<211> 9

[1287] <212> PRT
[1288] <213> 智人
[1289] <400> 183
[1290] Thr Leu Gln Glu Val Val Thr Gly Val
[1291] 1 5
[1292] <210> 184
[1293] <211> 12
[1294] <212> PRT
[1295] <213> 智人
[1296] <400> 184
[1297] Ser Leu Leu Asp Glu Asn Asn Val Ser Ser Tyr Leu
[1298] 1 5 10
[1299] <210> 185
[1300] <211> 9
[1301] <212> PRT
[1302] <213> 智人
[1303] <400> 185
[1304] Val Leu Tyr Thr Gly Val Val Arg Val
[1305] 1 5
[1306] <210> 186
[1307] <211> 9
[1308] <212> PRT
[1309] <213> 智人
[1310] <400> 186
[1311] Lys Met Ser Glu Lys Ile Leu Leu Leu
[1312] 1 5
[1313] <210> 187
[1314] <211> 9
[1315] <212> PRT
[1316] <213> 智人
[1317] <400> 187
[1318] Gly Leu His Asn Val Val Tyr Gly Ile
[1319] 1 5
[1320] <210> 188
[1321] <211> 10
[1322] <212> PRT
[1323] <213> 智人
[1324] <400> 188
[1325] Phe Leu Val Asp Gly Pro Arg Val Gln Leu

[1326]	1	5	10
[1327]	<210> 189		
[1328]	<211> 11		
[1329]	<212> PRT		
[1330]	<213> 智人		
[1331]	<400> 189		
[1332]	Ala Ile Ser Glu Val Ile Gly Lys Ile Thr Ala		
[1333]	1	5	10
[1334]	<210> 190		
[1335]	<211> 9		
[1336]	<212> PRT		
[1337]	<213> 智人		
[1338]	<400> 190		
[1339]	Ala Met Ala Glu Met Val Leu Gln Val		
[1340]	1	5	
[1341]	<210> 191		
[1342]	<211> 9		
[1343]	<212> PRT		
[1344]	<213> 智人		
[1345]	<400> 191		
[1346]	Gln Leu Phe Ser Glu Ile His Asn Leu		
[1347]	1	5	
[1348]	<210> 192		
[1349]	<211> 9		
[1350]	<212> PRT		
[1351]	<213> 智人		
[1352]	<400> 192		
[1353]	Lys Ile Gln Glu Met Gln His Phe Leu		
[1354]	1	5	
[1355]	<210> 193		
[1356]	<211> 9		
[1357]	<212> PRT		
[1358]	<213> 智人		
[1359]	<400> 193		
[1360]	Lys Leu Ser Pro Thr Val Val Gly Leu		
[1361]	1	5	
[1362]	<210> 194		
[1363]	<211> 9		
[1364]	<212> PRT		

[1365]	<213>	智人	
[1366]	<400>	194	
[1367]	Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val		
[1368]	1	5	
[1369]	<210>	195	
[1370]	<211>	9	
[1371]	<212>	PRT	
[1372]	<213>	智人	
[1373]	<400>	195	
[1374]	Leu Leu Leu Gly Glu Arg Val Ala Leu		
[1375]	1	5	
[1376]	<210>	196	
[1377]	<211>	9	
[1378]	<212>	PRT	
[1379]	<213>	智人	
[1380]	<400>	196	
[1381]	Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val		
[1382]	1	5	
[1383]	<210>	197	
[1384]	<211>	10	
[1385]	<212>	PRT	
[1386]	<213>	智人	
[1387]	<400>	197	
[1388]	Ser Leu Phe Gly Gln Asp Val Lys Ala Val		
[1389]	1	5	10
[1390]	<210>	198	
[1391]	<211>	10	
[1392]	<212>	PRT	
[1393]	<213>	智人	
[1394]	<400>	198	
[1395]	Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile		
[1396]	1	5	10
[1397]	<210>	199	
[1398]	<211>	9	
[1399]	<212>	PRT	
[1400]	<213>	智人	
[1401]	<400>	199	
[1402]	Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu		
[1403]	1	5	

[1404]	<210>	200	
[1405]	<211>	9	
[1406]	<212>	PRT	
[1407]	<213>	智人	
[1408]	<400>	200	
[1409]	Ser Ala Val Asp Phe Ile Arg Thr Leu		
[1410]	1	5	
[1411]	<210>	201	
[1412]	<211>	10	
[1413]	<212>	PRT	
[1414]	<213>	智人	
[1415]	<400>	201	
[1416]	Gly Ser Phe Asn Gly Ala Leu Ala Ala Val		
[1417]	1	5	10
[1418]	<210>	202	
[1419]	<211>	9	
[1420]	<212>	PRT	
[1421]	<213>	智人	
[1422]	<400>	202	
[1423]	Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu		
[1424]	1	5	
[1425]	<210>	203	
[1426]	<211>	11	
[1427]	<212>	PRT	
[1428]	<213>	智人	
[1429]	<400>	203	
[1430]	Lys Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu		
[1431]	1	5	10
[1432]	<210>	204	
[1433]	<211>	12	
[1434]	<212>	PRT	
[1435]	<213>	智人	
[1436]	<400>	204	
[1437]	Lys Leu Leu Asp Leu Glu Thr Glu Arg Ile Leu Leu		
[1438]	1	5	10
[1439]	<210>	205	
[1440]	<211>	9	
[1441]	<212>	PRT	
[1442]	<213>	智人	

[1443] <400> 205
[1444] Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu
[1445] 1 5
[1446] <210> 206
[1447] <211> 11
[1448] <212> PRT
[1449] <213> 智人
[1450] <400> 206
[1451] Arg Ile Ala Gly Ile Arg Gly Ile Gln Gly Val
[1452] 1 5 10
[1453] <210> 207
[1454] <211> 9
[1455] <212> PRT
[1456] <213> 智人
[1457] <400> 207
[1458] Lys Leu Cys Glu Gly Phe Asn Glu Val
[1459] 1 5
[1460] <210> 208
[1461] <211> 9
[1462] <212> PRT
[1463] <213> 智人
[1464] <400> 208
[1465] Arg Leu Ile Asp Arg Ile Lys Thr Val
[1466] 1 5
[1467] <210> 209
[1468] <211> 9
[1469] <212> PRT
[1470] <213> 智人
[1471] <400> 209
[1472] Lys Leu Gln Asp Gly Leu Leu His Ile
[1473] 1 5
[1474] <210> 210
[1475] <211> 9
[1476] <212> PRT
[1477] <213> 智人
[1478] <400> 210
[1479] Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala
[1480] 1 5
[1481] <210> 211

[1482] <211> 9
[1483] <212> PRT
[1484] <213> 智人
[1485] <400> 211
[1486] Ser Leu Phe Gly Lys Lys Tyr Ile Leu
[1487] 1 5
[1488] <210> 212
[1489] <211> 9
[1490] <212> PRT
[1491] <213> 智人
[1492] <400> 212
[1493] Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
[1494] 1 5
[1495] <210> 213
[1496] <211> 9
[1497] <212> PRT
[1498] <213> 智人
[1499] <400> 213
[1500] Leu Leu Trp Ala Pro Thr Ala Gln Ala
[1501] 1 5
[1502] <210> 214
[1503] <211> 10
[1504] <212> PRT
[1505] <213> 智人
[1506] <400> 214
[1507] Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile
[1508] 1 5 10
[1509] <210> 215
[1510] <211> 9
[1511] <212> PRT
[1512] <213> 智人
[1513] <400> 215
[1514] Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu
[1515] 1 5
[1516] <210> 216
[1517] <211> 12
[1518] <212> PRT
[1519] <213> 智人
[1520] <400> 216

[1521]	Tyr Leu Trp Asp Leu Asp His Gly Phe Ala Gly Val
[1522]	1 5 10
[1523]	<210> 217
[1524]	<211> 11
[1525]	<212> PRT
[1526]	<213> 智人
[1527]	<400> 217
[1528]	Lys Leu Leu Asp Thr Met Val Asp Thr Phe Leu
[1529]	1 5 10
[1530]	<210> 218
[1531]	<211> 9
[1532]	<212> PRT
[1533]	<213> 智人
[1534]	<400> 218
[1535]	Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ile Tyr Leu
[1536]	1 5
[1537]	<210> 219
[1538]	<211> 9
[1539]	<212> PRT
[1540]	<213> 智人
[1541]	<400> 219
[1542]	Phe Leu Asp Glu Lys Gly Arg Cys Val
[1543]	1 5
[1544]	<210> 220
[1545]	<211> 9
[1546]	<212> PRT
[1547]	<213> 智人
[1548]	<400> 220
[1549]	Lys Met Asp Pro Val Ala Tyr Arg Val
[1550]	1 5
[1551]	<210> 221
[1552]	<211> 10
[1553]	<212> PRT
[1554]	<213> 智人
[1555]	<400> 221
[1556]	Ile Leu Asn Val Asp Gly Leu Ile Gly Val
[1557]	1 5 10
[1558]	<210> 222
[1559]	<211> 10

[1560] <212> PRT
[1561] <213> 智人
[1562] <400> 222
[1563] Gly Val Ile Ala Glu Ile Leu Arg Gly Val
[1564] 1 5 10
[1565] <210> 223
[1566] <211> 10
[1567] <212> PRT
[1568] <213> 智人
[1569] <400> 223
[1570] Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu
[1571] 1 5 10
[1572] <210> 224
[1573] <211> 11
[1574] <212> PRT
[1575] <213> 智人
[1576] <400> 224
[1577] Gln Leu Gln Glu Gly Lys Asn Val Ile Gly Leu
[1578] 1 5 10
[1579] <210> 225
[1580] <211> 10
[1581] <212> PRT
[1582] <213> 智人
[1583] <400> 225
[1584] Tyr Leu Tyr Gly Gln Thr Thr Thr Tyr Leu
[1585] 1 5 10
[1586] <210> 226
[1587] <211> 9
[1588] <212> PRT
[1589] <213> 智人
[1590] <400> 226
[1591] Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val
[1592] 1 5
[1593] <210> 227
[1594] <211> 11
[1595] <212> PRT
[1596] <213> 智人
[1597] <400> 227
[1598] Leu Thr Ala Pro Pro Glu Ala Leu Leu Met Val

[1599]	1	5	10
[1600]	<210> 228		
[1601]	<211> 9		
[1602]	<212> PRT		
[1603]	<213> 智人		
[1604]	<400> 228		
[1605]	Ser Met Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu		
[1606]	1	5	
[1607]	<210> 229		
[1608]	<211> 9		
[1609]	<212> PRT		
[1610]	<213> 智人		
[1611]	<400> 229		
[1612]	Tyr Leu Leu Glu Lys Phe Val Ala Val		
[1613]	1	5	
[1614]	<210> 230		
[1615]	<211> 9		
[1616]	<212> PRT		
[1617]	<213> 智人		
[1618]	<400> 230		
[1619]	Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val		
[1620]	1	5	
[1621]	<210> 231		
[1622]	<211> 10		
[1623]	<212> PRT		
[1624]	<213> 智人		
[1625]	<400> 231		
[1626]	Arg Leu Phe Ala Asp Ile Leu Asn Asp Val		
[1627]	1	5	10
[1628]	<210> 232		
[1629]	<211> 9		
[1630]	<212> PRT		
[1631]	<213> 智人		
[1632]	<400> 232		
[1633]	Arg Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu		
[1634]	1	5	
[1635]	<210> 233		
[1636]	<211> 9		
[1637]	<212> PRT		

[1638]	<213>	智人	
[1639]	<400>	233	
[1640]	Arg Leu Asp Asp Leu Lys Met Thr Val		
[1641]	1	5	
[1642]	<210>	234	
[1643]	<211>	10	
[1644]	<212>	PRT	
[1645]	<213>	智人	
[1646]	<400>	234	
[1647]	Lys Met Phe Glu Ser Phe Ile Glu Ser Val		
[1648]	1	5	10
[1649]	<210>	235	
[1650]	<211>	9	
[1651]	<212>	PRT	
[1652]	<213>	智人	
[1653]	<400>	235	
[1654]	Leu Leu His Glu Glu Asn Phe Ser Val		
[1655]	1	5	
[1656]	<210>	236	
[1657]	<211>	9	
[1658]	<212>	PRT	
[1659]	<213>	智人	
[1660]	<400>	236	
[1661]	Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val		
[1662]	1	5	
[1663]	<210>	237	
[1664]	<211>	10	
[1665]	<212>	PRT	
[1666]	<213>	智人	
[1667]	<400>	237	
[1668]	Lys Leu Val Glu Phe Asp Phe Leu Gly Ala		
[1669]	1	5	10
[1670]	<210>	238	
[1671]	<211>	9	
[1672]	<212>	PRT	
[1673]	<213>	智人	
[1674]	<400>	238	
[1675]	Asn Met Leu Glu Ala Val His Thr Ile		
[1676]	1	5	

[1677]	<210>	239	
[1678]	<211>	9	
[1679]	<212>	PRT	
[1680]	<213>	智人	
[1681]	<400>	239	
[1682]	Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu		
[1683]	1	5	
[1684]	<210>	240	
[1685]	<211>	9	
[1686]	<212>	PRT	
[1687]	<213>	智人	
[1688]	<400>	240	
[1689]	Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala		
[1690]	1	5	
[1691]	<210>	241	
[1692]	<211>	9	
[1693]	<212>	PRT	
[1694]	<213>	智人	
[1695]	<400>	241	
[1696]	Ile Leu Ile Asp Trp Leu Val Gln Val		
[1697]	1	5	
[1698]	<210>	242	
[1699]	<211>	11	
[1700]	<212>	PRT	
[1701]	<213>	智人	
[1702]	<400>	242	
[1703]	Arg Leu Glu Glu Asp Asp Gly Asp Val Ala Met		
[1704]	1	5	10
[1705]	<210>	243	
[1706]	<211>	10	
[1707]	<212>	PRT	
[1708]	<213>	智人	
[1709]	<400>	243	
[1710]	Thr Leu Met Asp Met Arg Leu Ser Gln Val		
[1711]	1	5	10
[1712]	<210>	244	
[1713]	<211>	9	
[1714]	<212>	PRT	
[1715]	<213>	智人	

[1716] <400> 244
[1717] Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val
[1718] 1 5
[1719] <210> 245
[1720] <211> 9
[1721] <212> PRT
[1722] <213> 智人
[1723] <400> 245
[1724] Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu
[1725] 1 5
[1726] <210> 246
[1727] <211> 9
[1728] <212> PRT
[1729] <213> 智人
[1730] <400> 246
[1731] Gly Leu Thr Asp Asn Ile His Leu Val
[1732] 1 5
[1733] <210> 247
[1734] <211> 9
[1735] <212> PRT
[1736] <213> 智人
[1737] <400> 247
[1738] Ser Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val
[1739] 1 5
[1740] <210> 248
[1741] <211> 9
[1742] <212> PRT
[1743] <213> 智人
[1744] <400> 248
[1745] Ala Leu Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Val
[1746] 1 5
[1747] <210> 249
[1748] <211> 9
[1749] <212> PRT
[1750] <213> 智人
[1751] <400> 249
[1752] Ala Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Val Val
[1753] 1 5
[1754] <210> 250

[1755]	<211>	10	
[1756]	<212>	PRT	
[1757]	<213>	智人	
[1758]	<400>	250	
[1759]	Ala Leu Cys Glu Glu Asn Met Arg Gly Val		
[1760]	1	5	10
[1761]	<210>	251	
[1762]	<211>	11	
[1763]	<212>	PRT	
[1764]	<213>	智人	
[1765]	<400>	251	
[1766]	Ser Leu Leu Gln Ala Thr Asp Phe Met Ser Leu		
[1767]	1	5	10
[1768]	<210>	252	
[1769]	<211>	9	
[1770]	<212>	PRT	
[1771]	<213>	智人	
[1772]	<400>	252	
[1773]	Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu		
[1774]	1	5	
[1775]	<210>	253	
[1776]	<211>	11	
[1777]	<212>	PRT	
[1778]	<213>	智人	
[1779]	<400>	253	
[1780]	Lys Leu Leu Asp Glu Val Thr Tyr Leu Glu Ala		
[1781]	1	5	10
[1782]	<210>	254	
[1783]	<211>	10	
[1784]	<212>	PRT	
[1785]	<213>	智人	
[1786]	<400>	254	
[1787]	Val Leu Phe Gln Glu Ala Leu Trp His Val		
[1788]	1	5	10
[1789]	<210>	255	
[1790]	<211>	9	
[1791]	<212>	PRT	
[1792]	<213>	智人	
[1793]	<400>	255	

[1794] Ala Leu Ala Leu Trp Ile Pro Ser Leu
[1795] 1 5
[1796] <210> 256
[1797] <211> 9
[1798] <212> PRT
[1799] <213> 智人
[1800] <400> 256
[1801] Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val
[1802] 1 5
[1803] <210> 257
[1804] <211> 9
[1805] <212> PRT
[1806] <213> 智人
[1807] <400> 257
[1808] Ser Leu Ala Asp Phe Met Gln Glu Val
[1809] 1 5
[1810] <210> 258
[1811] <211> 9
[1812] <212> PRT
[1813] <213> 智人
[1814] <400> 258
[1815] Leu Leu Tyr Glu Gly Lys Leu Thr Leu
[1816] 1 5
[1817] <210> 259
[1818] <211> 11
[1819] <212> PRT
[1820] <213> 智人
[1821] <400> 259
[1822] Ala Leu Ala Asp Lys Glu Leu Leu Pro Ser Val
[1823] 1 5 10
[1824] <210> 260
[1825] <211> 10
[1826] <212> PRT
[1827] <213> 智人
[1828] <400> 260
[1829] Ala Leu Leu Ala Glu Gly Ile Thr Trp Val
[1830] 1 5 10
[1831] <210> 261
[1832] <211> 10

[1833] <212> PRT
[1834] <213> 智人
[1835] <400> 261
[1836] Tyr Leu Tyr Asp Ser Glu Thr Lys Asn Ala
[1837] 1 5 10
[1838] <210> 262
[1839] <211> 10
[1840] <212> PRT
[1841] <213> 智人
[1842] <400> 262
[1843] Val Leu Ala Lys Pro Gly Val Ile Ser Val
[1844] 1 5 10
[1845] <210> 263
[1846] <211> 9
[1847] <212> PRT
[1848] <213> 智人
[1849] <400> 263
[1850] Leu Leu Ala Gly Gln Thr Tyr His Val
[1851] 1 5
[1852] <210> 264
[1853] <211> 10
[1854] <212> PRT
[1855] <213> 智人
[1856] <400> 264
[1857] Arg Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val
[1858] 1 5 10
[1859] <210> 265
[1860] <211> 8
[1861] <212> PRT
[1862] <213> 智人
[1863] <400> 265
[1864] Leu Leu Asp Lys Lys Ile Gly Val
[1865] 1 5
[1866] <210> 266
[1867] <211> 10
[1868] <212> PRT
[1869] <213> 智人
[1870] <400> 266
[1871] Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

[1872]	1	5	10
[1873]	<210>	267	
[1874]	<211>	9	
[1875]	<212>	PRT	
[1876]	<213>	智人	
[1877]	<400>	267	
[1878]	Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile		
[1879]	1	5	

肽: ALIKQLFEA (A*02) SEQ ID NO: 1

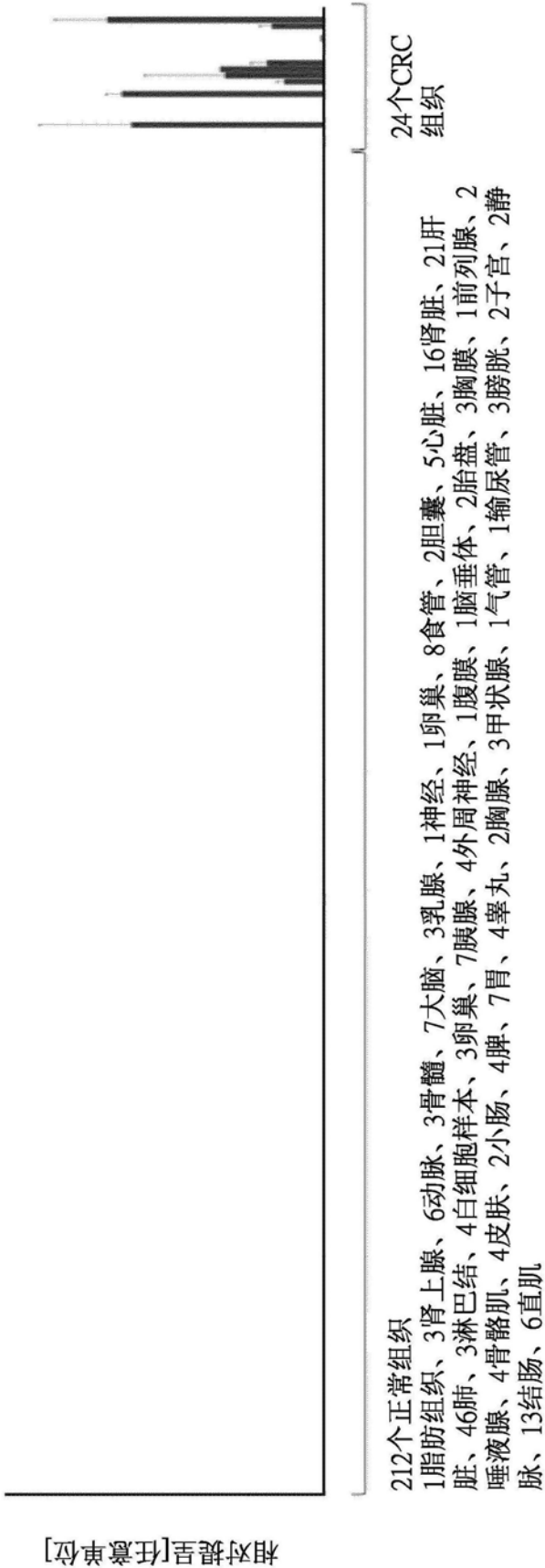


图1A

肽：KQFEGTVEI (A*02) – SEQ ID NO: 138

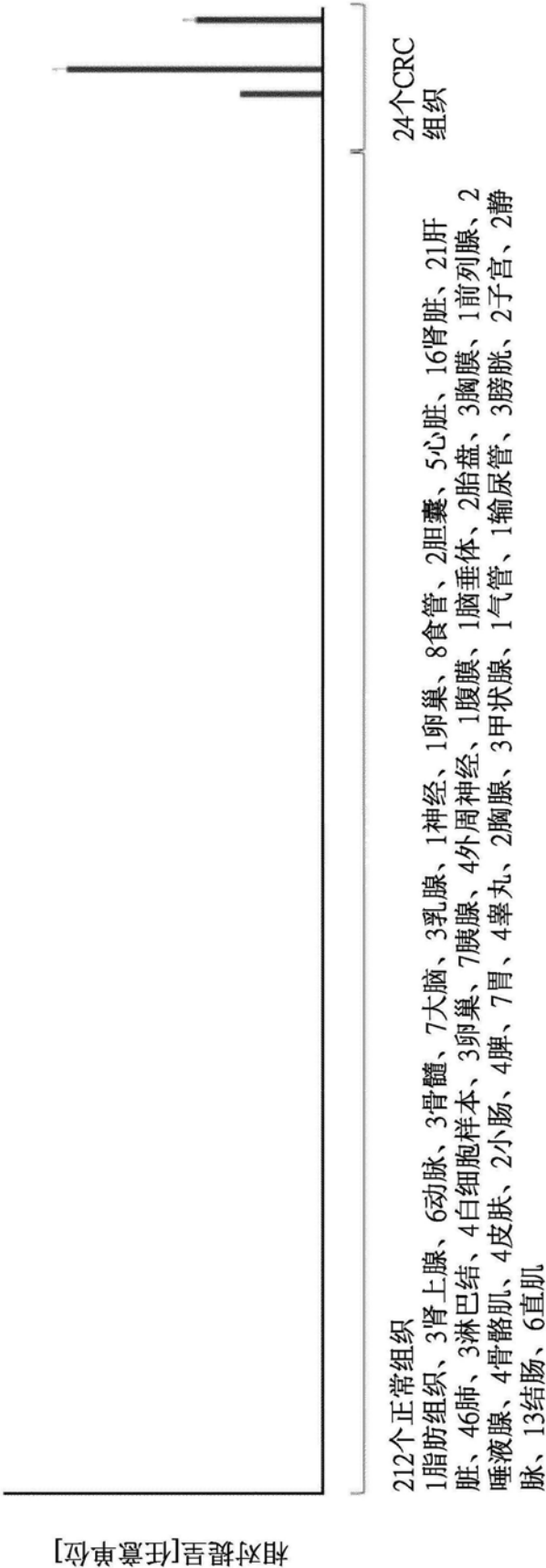


图1B

肽: KLAVALLA (A*02) – SEQ ID NO: 210

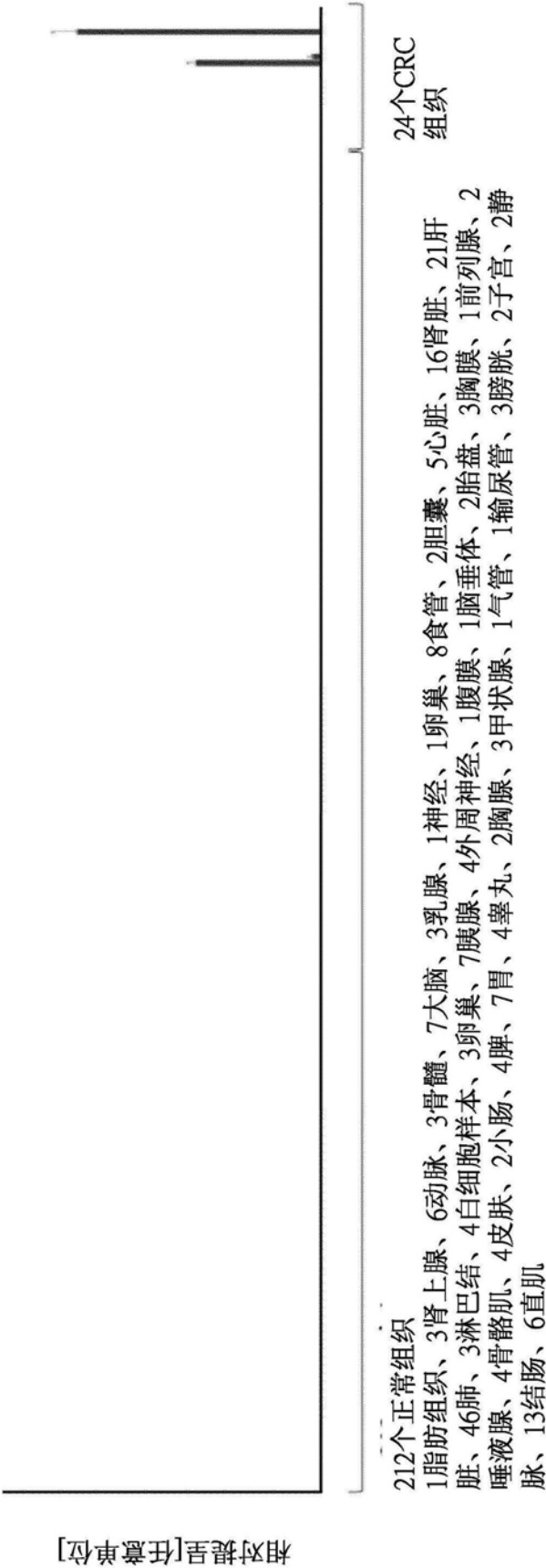
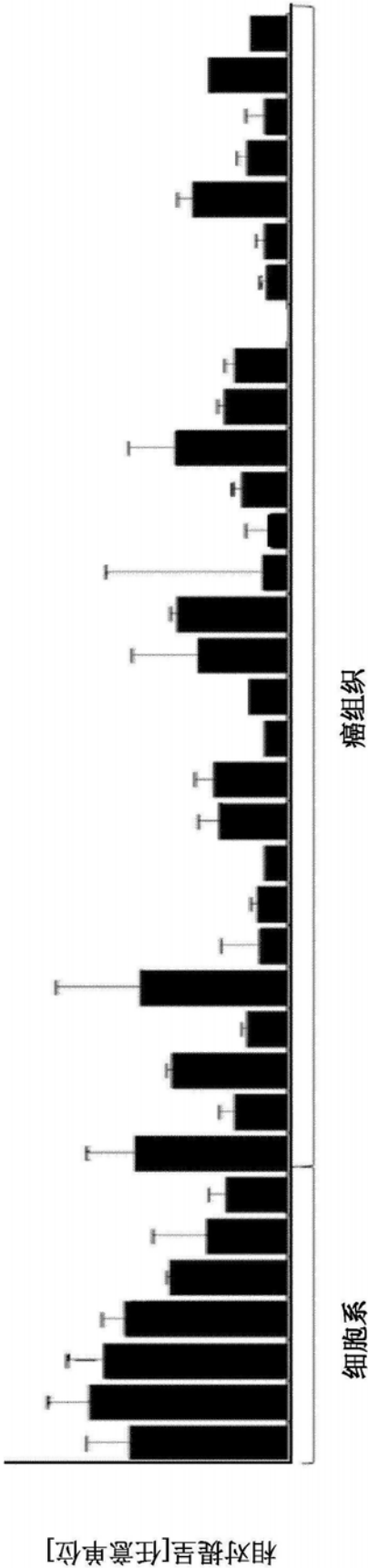


图1C

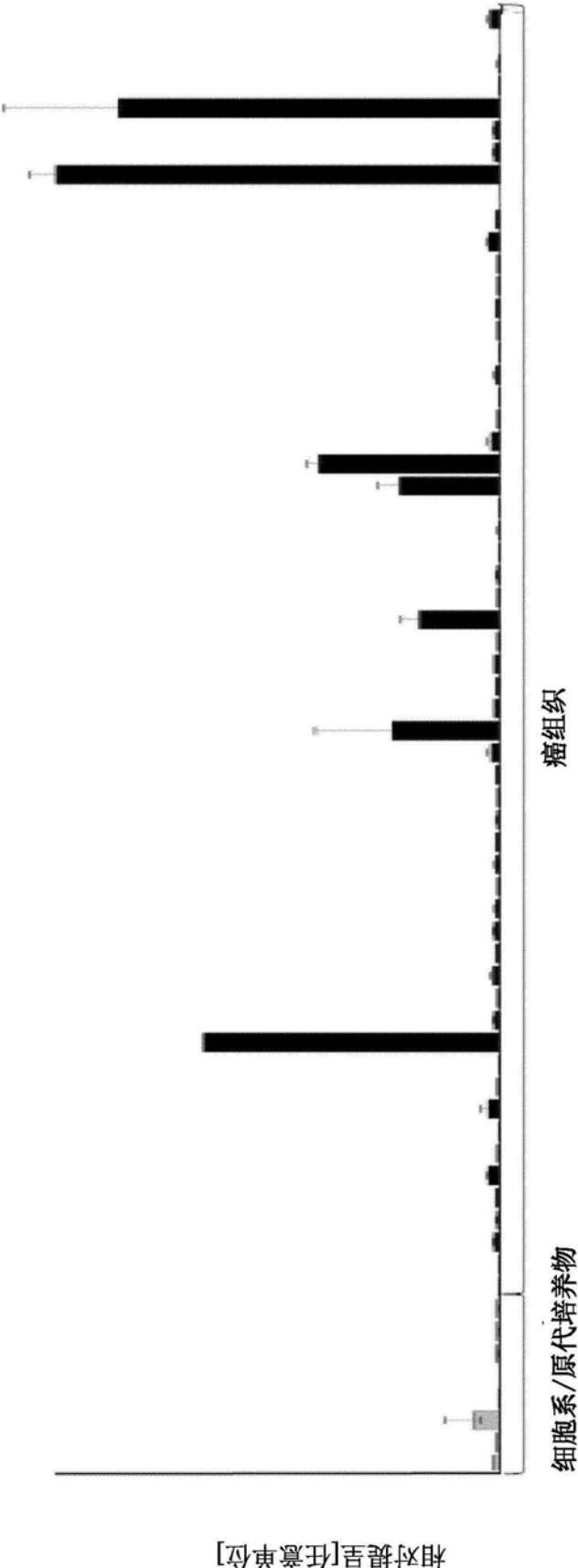
肽：LLYGKYVSV (A*02) – SEQ ID NO: 31



肽检测到在
3胰腺细胞系、3皮肤细胞系、1白细胞细胞系、0正常组织、28癌组织（2脑癌、1乳腺癌、1结肠癌、1食道癌、2肾癌、1白血病、5
肝癌、7肺癌、5卵巢癌、1前列腺癌、2直肠癌）（从左到右）

图1D

肽：ALIKQLFEA (A*02)
SEQ ID NO: 1



肽检测到在
7癌细胞系、1原发性癌症细胞培养物、58癌组织（5脑癌、1乳腺癌、9结肠癌、1结肠癌、3食道癌、1胆囊癌、2白细胞白血病、15肺癌、2淋巴瘤、1骨髓细胞癌、5卵巢癌、1前列腺癌、4直肠癌、1皮肤癌、2膀胱癌、3子宫癌）（从左到右）

图1E

肽：FLAELPGSLSL (A*02)
SEQ ID NO: 6

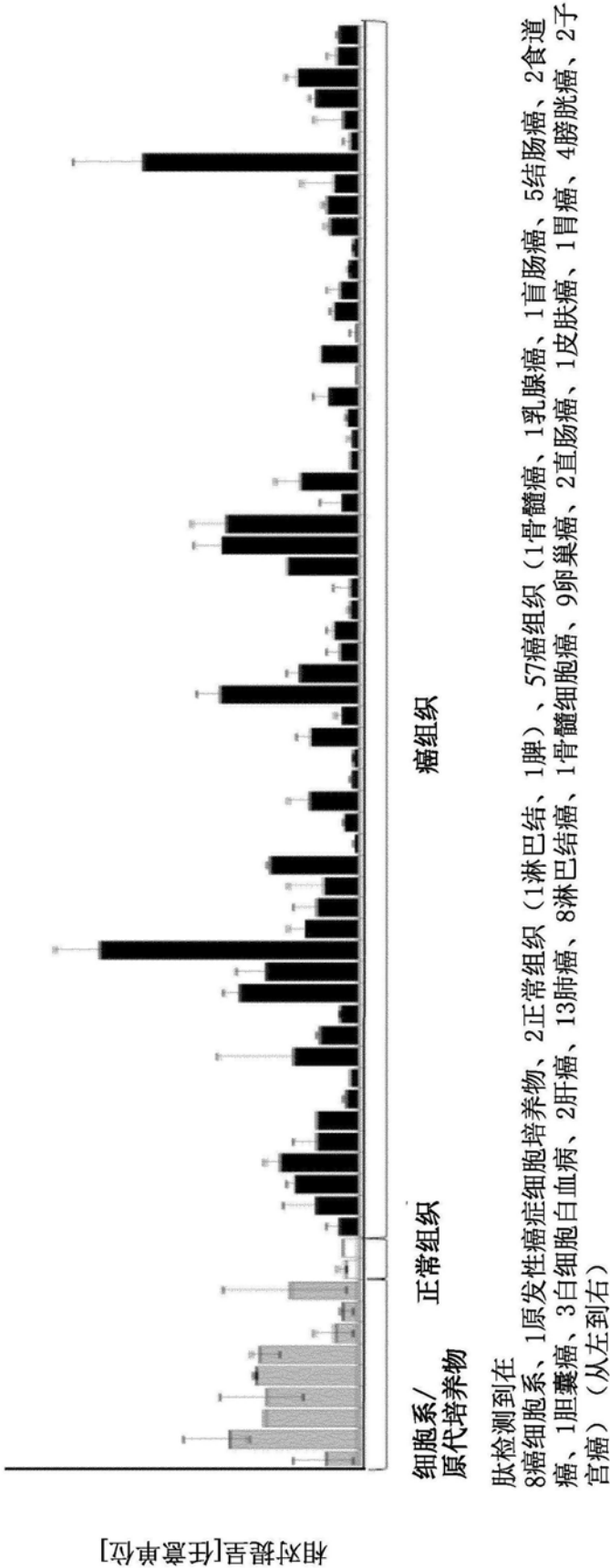


图1F

肽: FLDANGHFV (A*02)
SEQ ID NO: 23

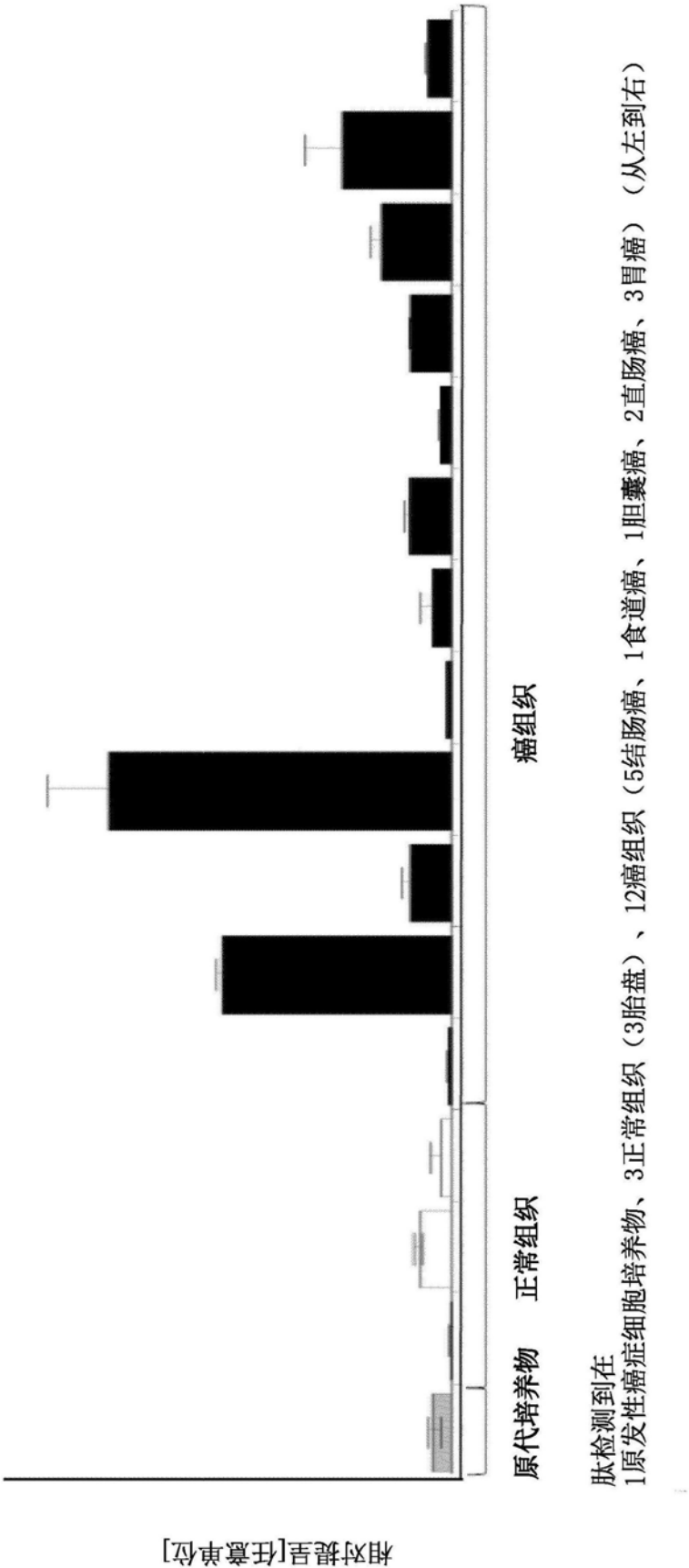
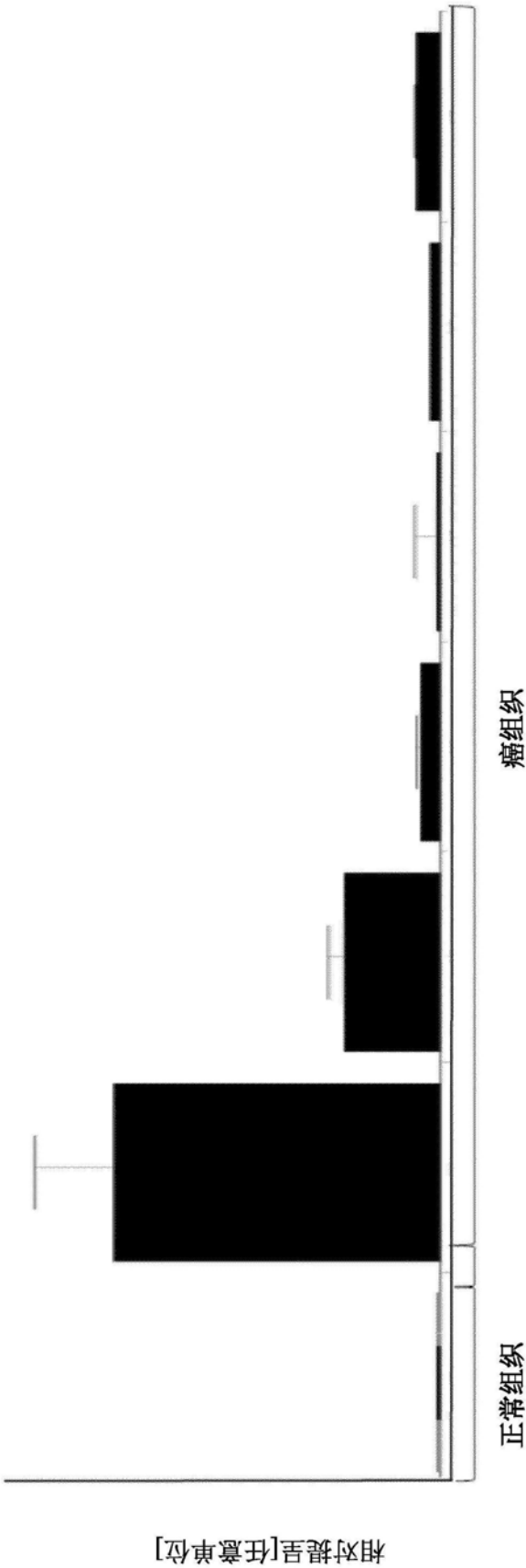


图1G

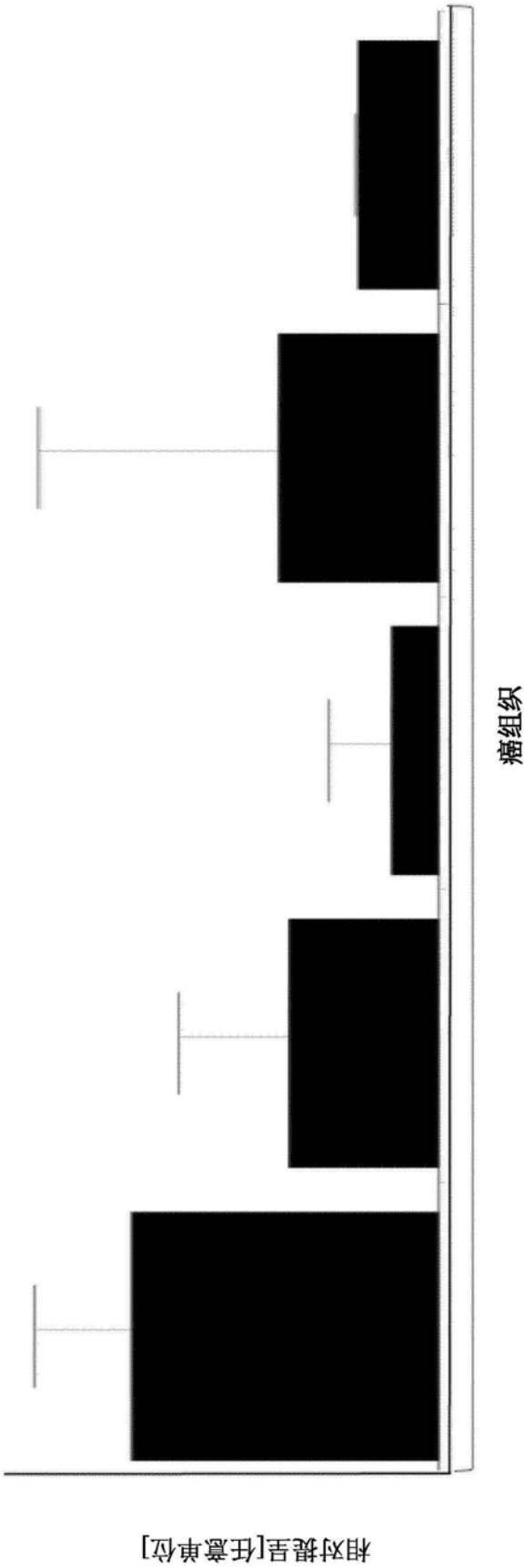
肽: GLIDEVMVL (A*02)
SEQ ID NO: 22



肽检测到在
1 正常组织 (1胃)、6 癌组织 (3 结肠癌、1 胆囊癌、2 直肠癌) (从左到右)

图1H

肽: ILDDHLSRV (A*02)
SEQ ID NO: 9



肽检测到在
5癌组织 (1盲肠癌、1结肠癌、1肺癌、2直肠癌) (从左到右)

图1I

肽: KLLAVIHEL (A*02)
SEQ ID NO: 152

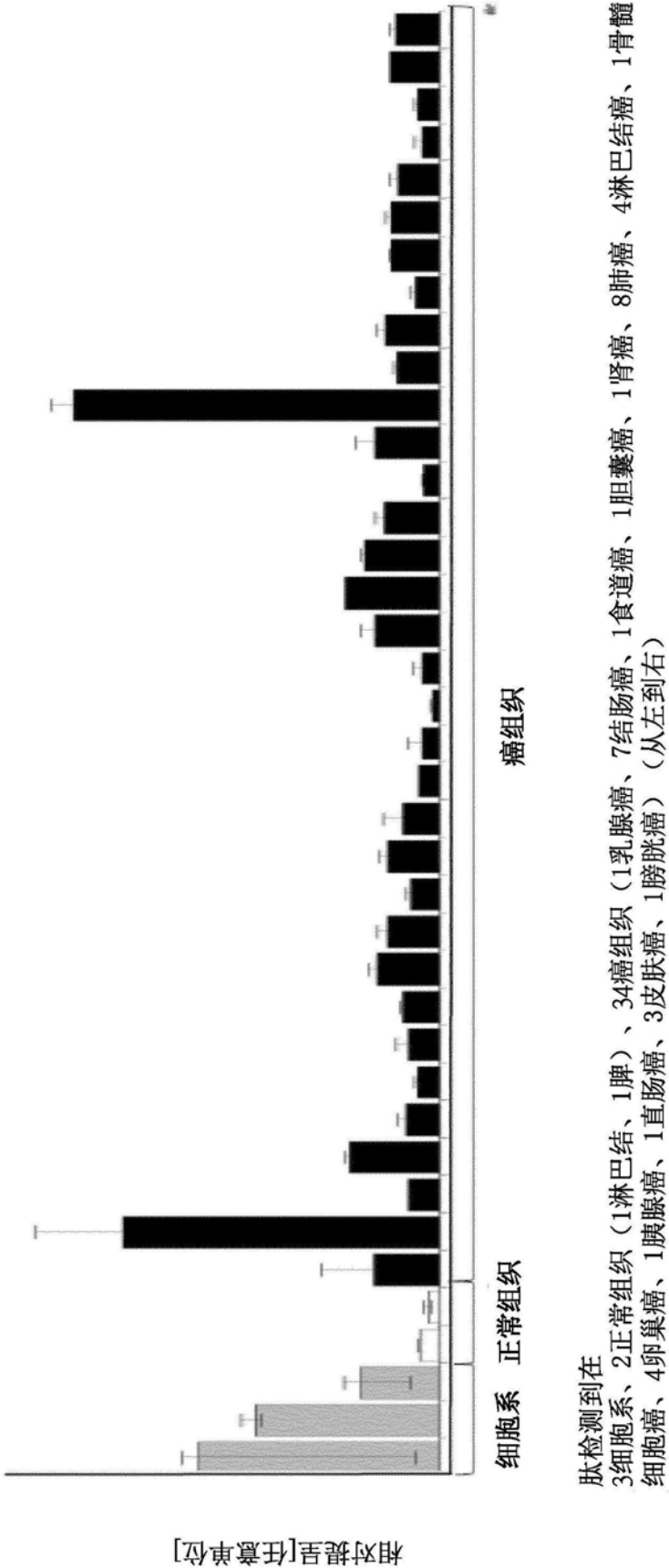


图1J

肽 : SLVQRVETI (A*02)
SEQ ID NO: 142

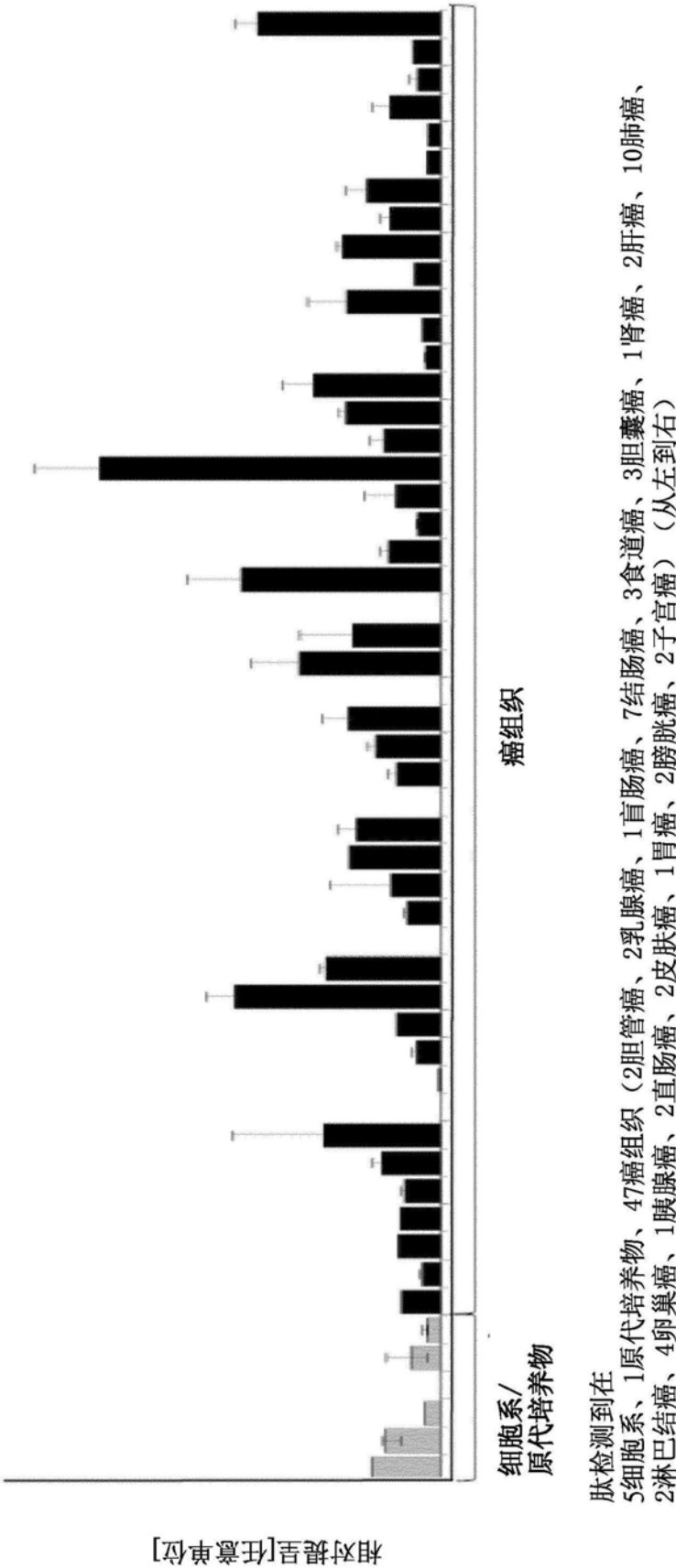


图1K

肽 : KIQEMQHFL (A*02)
SEQ ID NO: 192

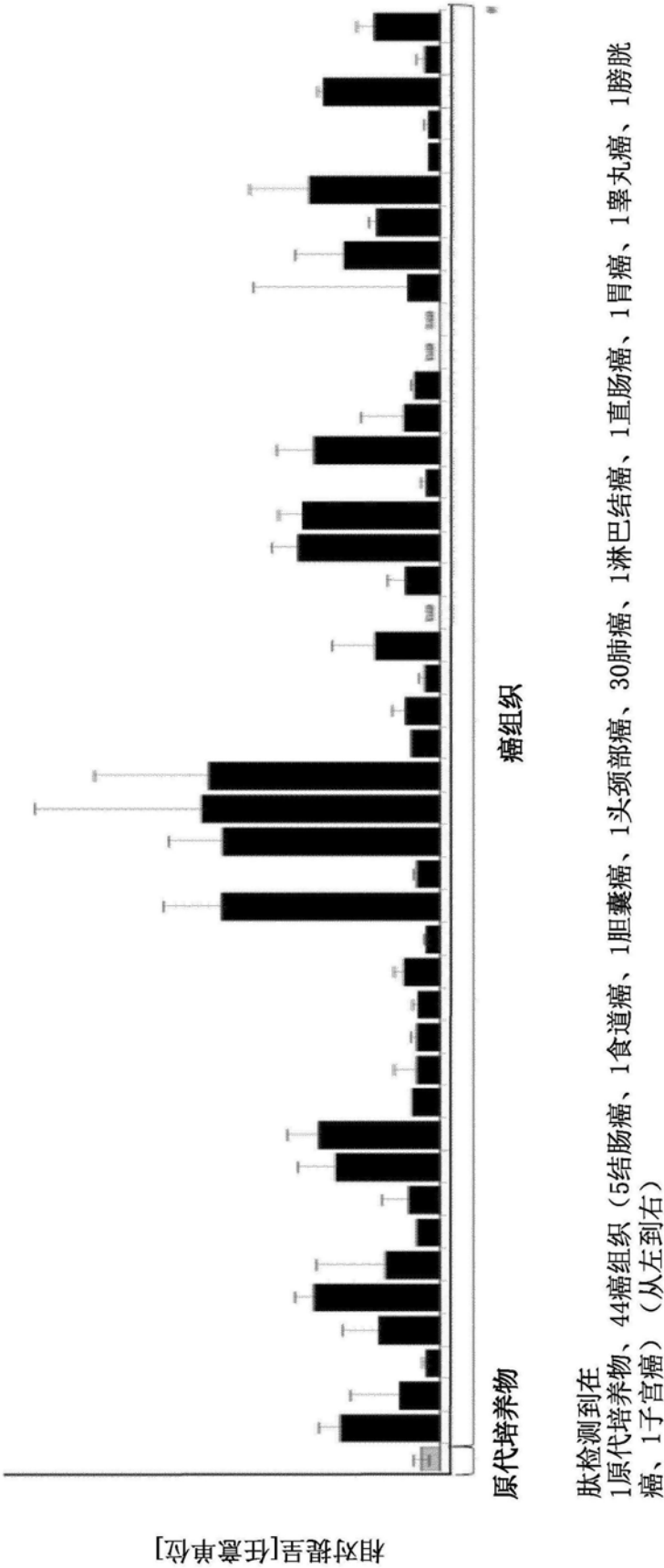


图1L

肽: FLLDGSANV (A*02)

SEQ ID NO: 212

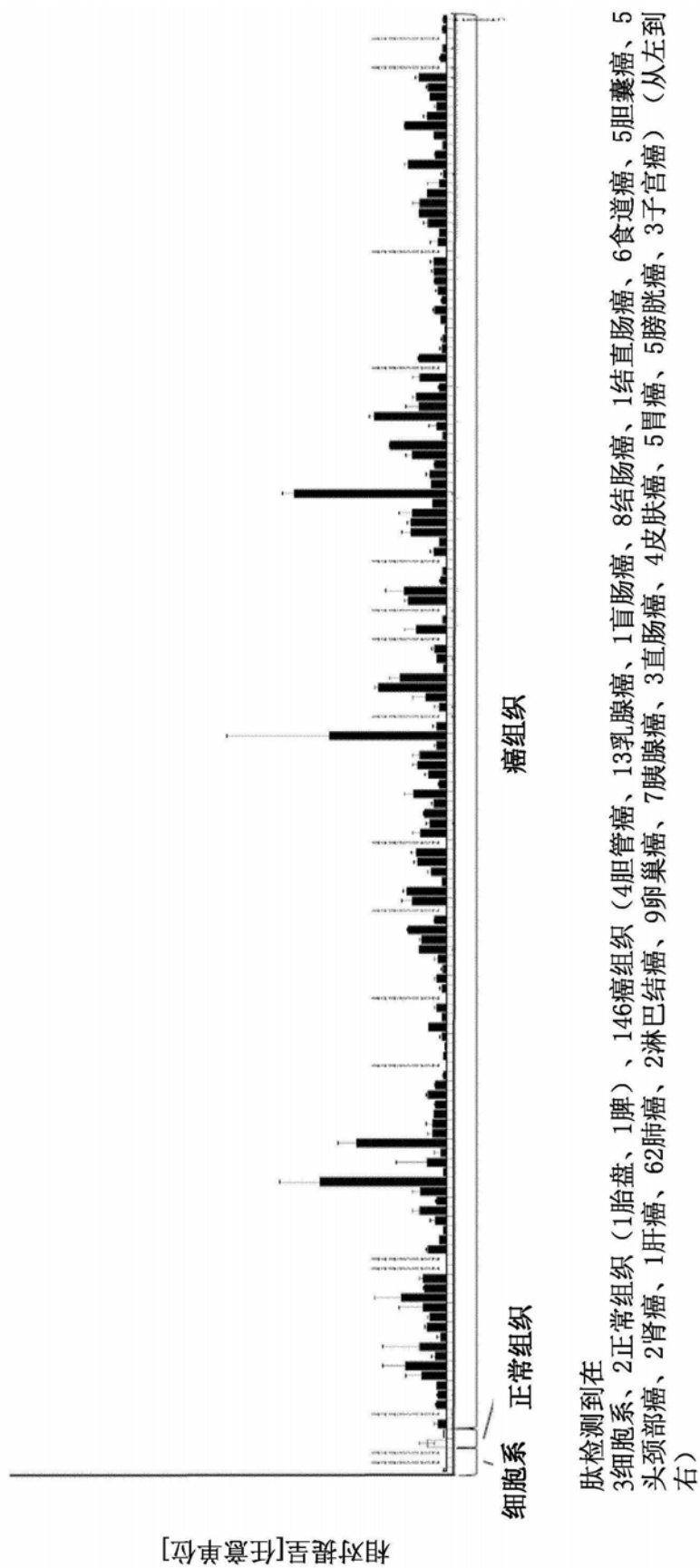


图 1M

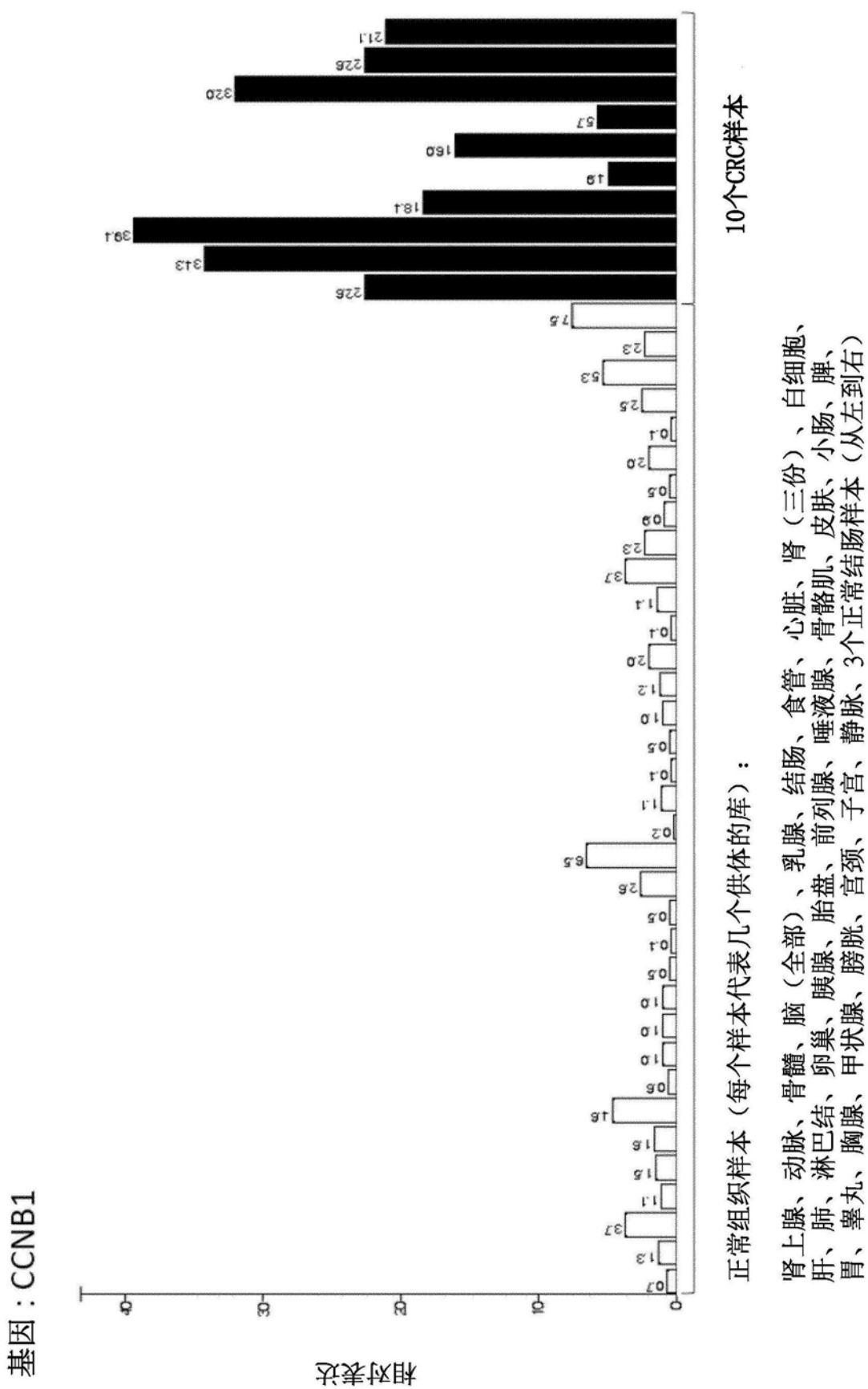


图2A

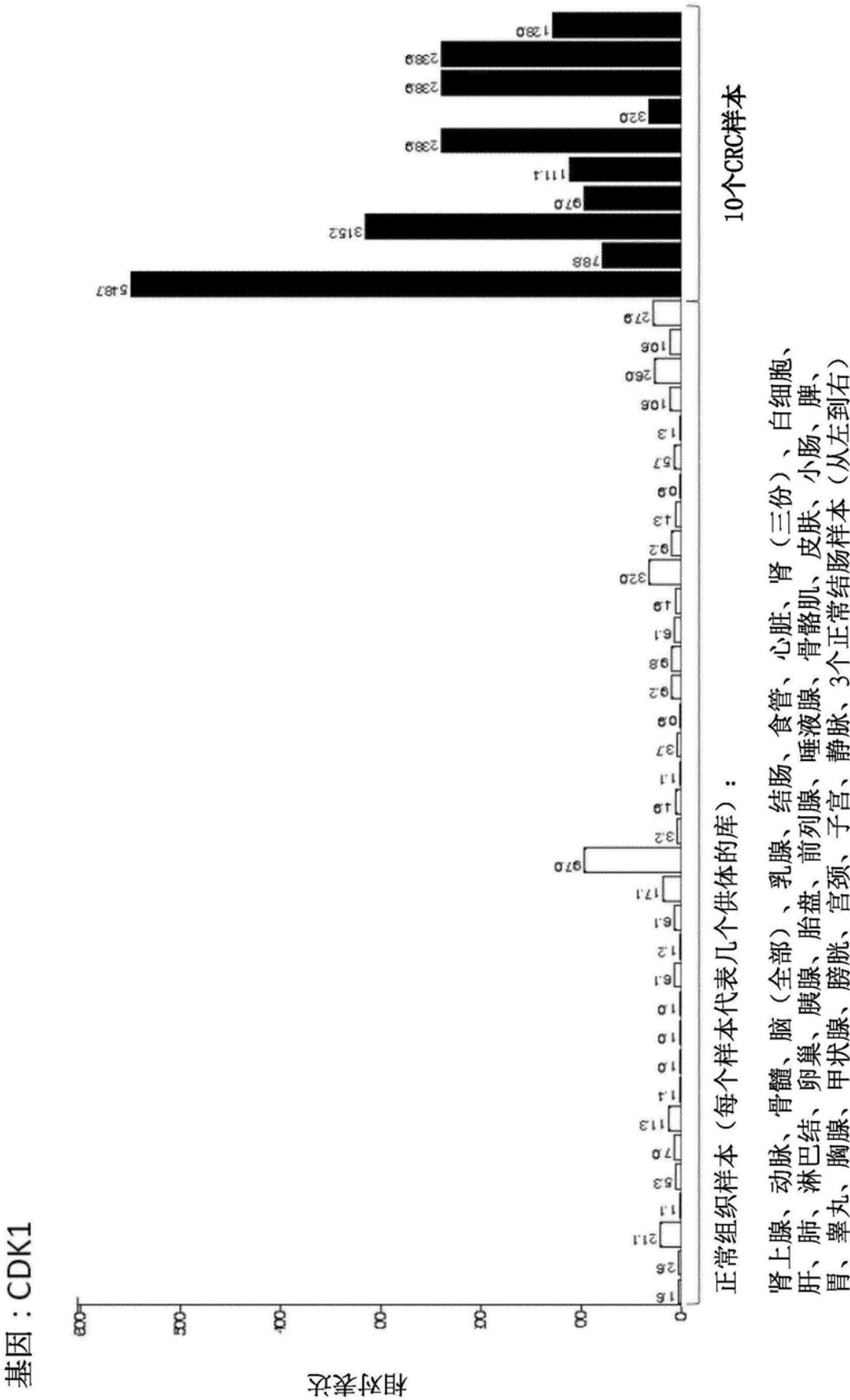


图2B

基因：CHMP5

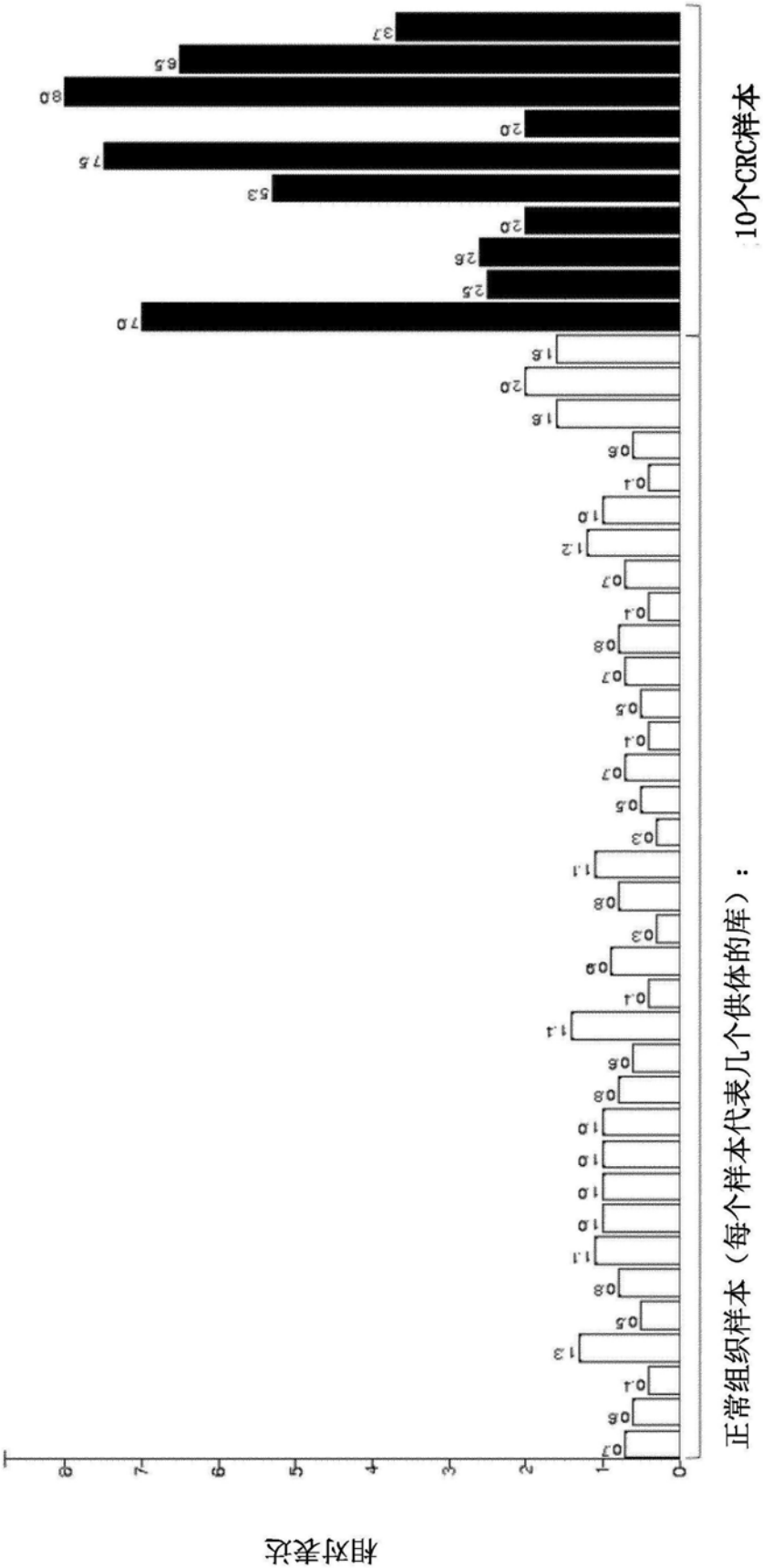


图2C

基因：ECT2
(肽：SLVQRVETI, SEQ ID: 142)

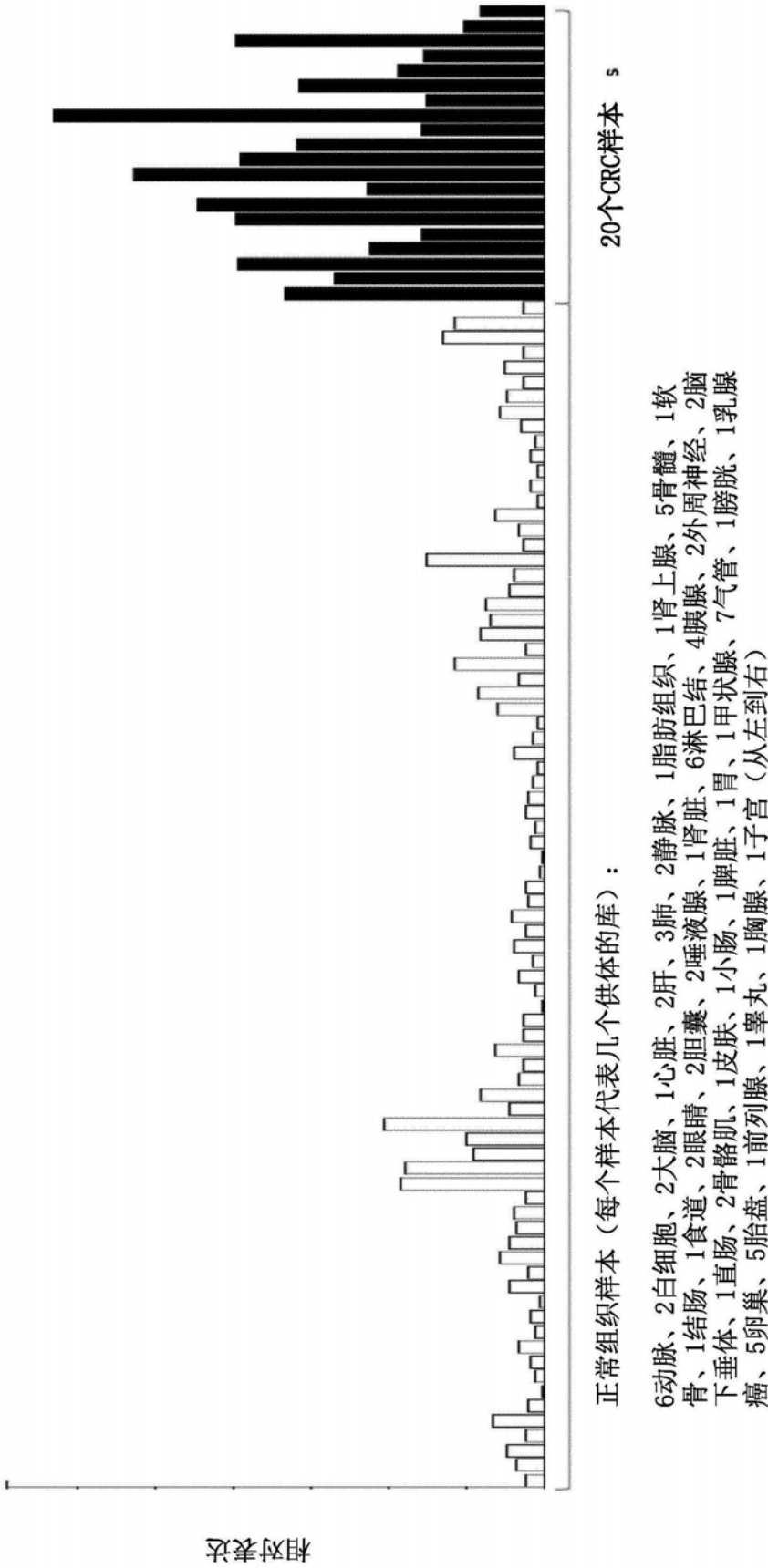


图2D

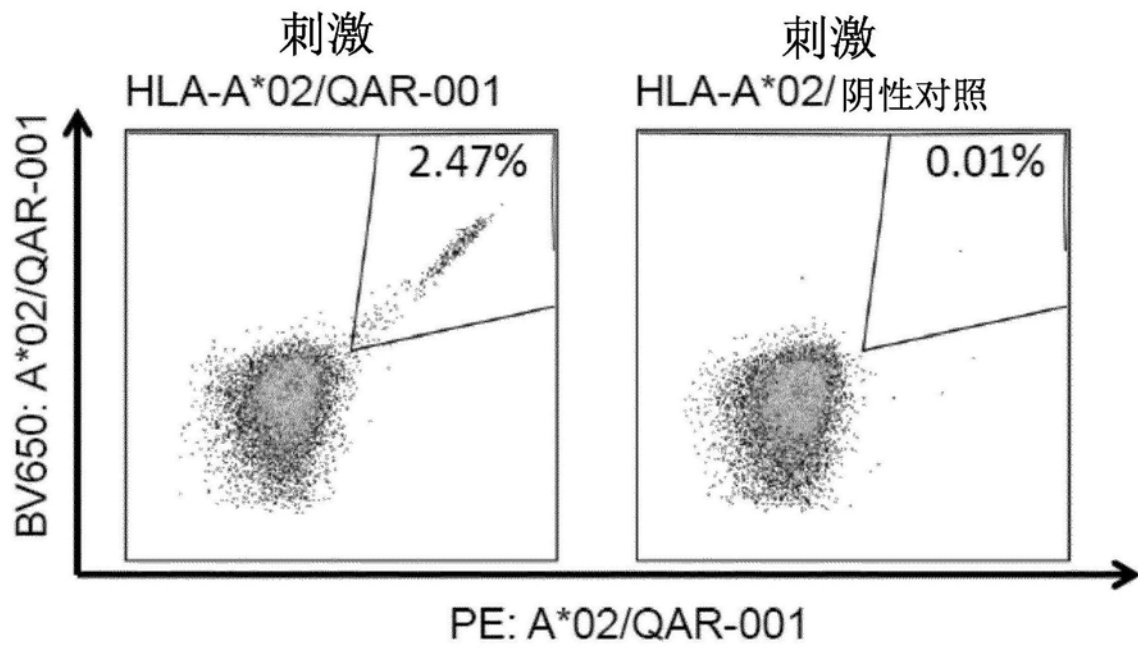


图3

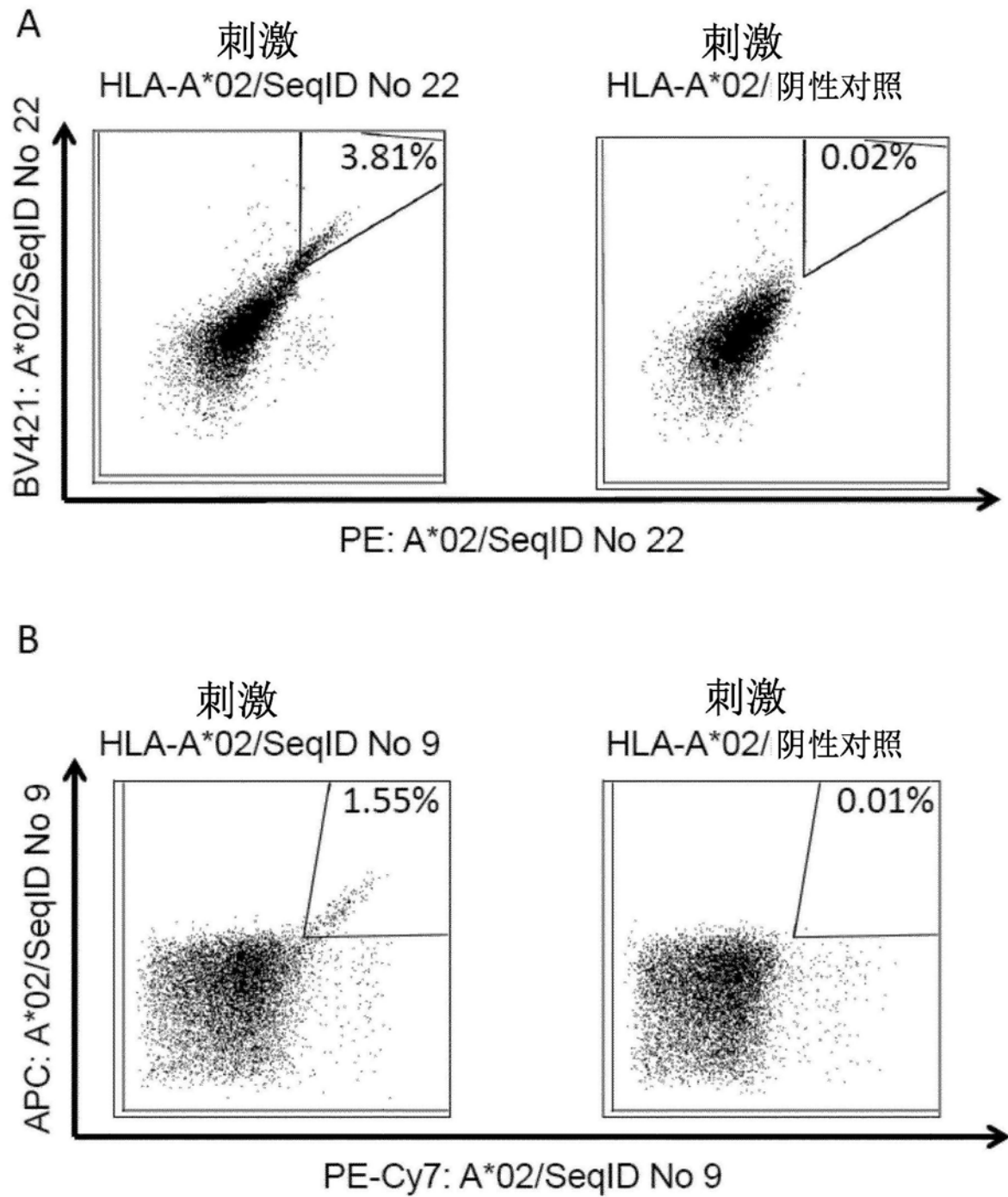


图4

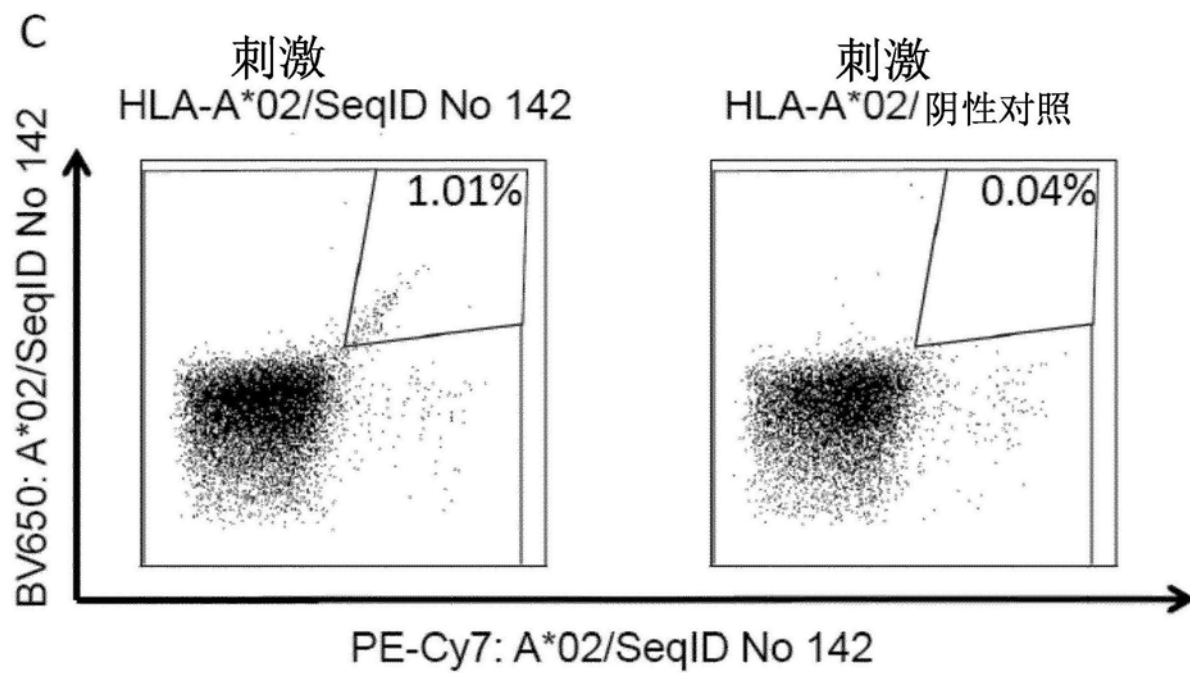


图4(续)