



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107438619 B

(45) 授权公告日 2021.12.14

(21) 申请号 201680020165.2

(22) 申请日 2016.03.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107438619 A

(43) 申请公布日 2017.12.05

(30) 优先权数据
1505585.8 2015.03.31 GB
62/140,767 2015.03.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/056601 2016.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/156230 EN 2016.10.06

(73) 专利权人 伊玛提克斯生物技术有限公司
地址 德国蒂宾根

(72) 发明人 安德里亚·马尔
托尼·温斯切尼克 奥利弗·施尔
延斯·弗里切 哈普瑞特·辛格
科莱特·宋

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 14/74 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004048599 A2,2004.06.10

WO 2004085461 A2,2004.10.07

WO 2009015842 A2,2009.02.05

US 2010029573 A1,2010.02.04

Weinschenk T等.Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines.《Cancer Research》.2002,第62卷(第20期), 张克勤等.肾细胞癌相关抗原及其免疫疗法的研究进展.《现代医药卫生》.2004,(第9期),

审查员 刘芳

权利要求书2页 说明书91页

序列表28页 附图21页

(54) 发明名称

用于肾细胞癌(RCC)免疫治疗的新型肽和肽组合物和支架

(57) 摘要

本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白质、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(刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激T细胞和转入患者的疫苗复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能是抗体、可溶性T细胞受体和其他结合分子

的靶标。

1. 一种肽,所述肽由氨基酸序列SEQ ID NO: 12组成;及其药用盐。
2. 一种核酸,其编码根据权利要求1中所述的肽。
3. 根据权利要求2所述的核酸,其中所述核酸连接到异源启动子序列。
4. 一种表达载体,其能够表达根据权利要求2或3所述的核酸。
5. 一种重组宿主细胞,其包含根据权利要求1所述的肽、根据权利要求2或3所述的核酸、或根据权利要求4中所述的表达载体。
6. 根据权利要求5所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞为抗原提呈细胞。
7. 根据权利要求6所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞是树突状细胞。
8. 一种制备根据权利要求1所述的肽的方法,该方法包括:培养根据权利要求5-7中任一项所述的重组宿主细胞,所述宿主细胞提呈根据权利要求1所述的肽、或表达根据权利要求2或3所述的核酸、或载有根据权利要求4所述的表达载体;以及从该宿主细胞或其培养基中分离出所述肽。
9. 一种体外制备启动的T淋巴细胞的方法,该方法包括将T细胞与在合适的抗原提呈细胞表面或模拟抗原提呈细胞的人工结构的表面上表达的载有抗原的人I或II类MHC分子进行体外接触足够的一段时间从而以抗原特异性方式启动所述T细胞,其中所述抗原为权利要求1中所述的肽。
10. 根据权利要求9中所述的方法制成的启动的T淋巴细胞,其有选择性地识别提呈包含权利要求1中给出的氨基酸序列的多肽的细胞。
11. 根据权利要求1所述的肽、根据权利要求2或3所述的核酸、根据权利要求4中所述的表达载体、根据权利要求5-7中任一项所述的重组宿主细胞、或根据权利要求10所述的启动的T淋巴细胞在制备抗癌药剂中的用途,其中所述癌症选自过表达肽SEQ ID No.12所衍生自的蛋白质的肝癌、肺癌、脑癌、卵巢癌和肾细胞癌。
12. 一种套件,其包括:
 - (a) 容器,所述容器包含溶液或冻干形式的药物组合物,所述药物组合物含有根据权利要求1所述的肽、根据权利要求2或3所述的核酸、根据权利要求4所述的表达载体、根据权利要求5-7中任一项所述的重组宿主细胞、根据权利要求10中所述的启动的T淋巴细胞。
13. 根据权利要求12所述的套件,其中所述套件还包括(b) 第二容器,所述第二容器含有稀释剂或用于冻干剂型的重组溶液。
14. 根据权利要求12或13所述的套件,其中所述套件还包括(c) 至少一种另外的肽,其选自由SEQ ID No.1至SEQ ID No.11和SEQ ID No.13至SEQ ID No.151组成的组。
15. 根据权利要求12或13所述的套件,其中所述套件还包括(d) (i) 使用所述溶液或(ii) 重组和/或使用所述冻干剂型的说明书。
16. 根据权利要求14所述的套件,其中所述套件还包括(d) (i) 使用所述溶液或(ii) 重组和/或使用所述冻干剂型的说明书。
17. 根据权利要求12或13所述的套件,其进一步包括以下中的一个或多个:(iii) 缓冲剂、(iv) 稀释剂、(v) 过滤器、(vi) 针头或(v) 注射器。
18. 一种用于生产个性化抗癌疫苗的方法,所述方法包括:
 - a) 识别个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);
 - b) 将a) 中识别的肽与已经接受过免疫原性预筛查和/或与正常组织相比在肿瘤中过度

提呈的由权利要求1所述的肽组成的存储库进行比较；

- c) 选择与所述患者中识别的TUMAP匹配的来自所述存储库中的至少一种肽；和
- d) 基于步骤c) 配制个性化疫苗，

其中所述癌症选自过表达肽SEQ ID No.12所衍生自的蛋白质的肝癌、肺癌、脑癌、卵巢癌和肾细胞癌。

19. 根据权利要求18中所述的方法，其中所述TUMAP通过以下方法识别：

a1) 将肿瘤样本的表达数据与肿瘤样本组织类型相应的正常组织样本的表达数据进行比较，以识别在肿瘤样本中过度表达或异常表达的蛋白；和

a2) 将表达数据与肿瘤样本中MHC I类和/或II类分子结合的MHC配体序列相关联，以识别从肿瘤过度表达或异常表达的蛋白质衍生的MHC配体。

20. 根据权利要求19所述的方法，其中MHC配体的序列的识别方法是：将结合的肽从肿瘤样本分离的MHC分子上洗脱下来，并对洗脱的配体进行测序。

21. 根据权利要求19所述的方法，其中所述与肿瘤样本组织类型相应的正常组织获得自同一患者。

22. 根据权利要求18或19所述的方法，其进一步包括以下步骤：识别与该个体患者相应正常组织相比对所述肿瘤样本具有唯一性的至少一种突变，以及选择与所述突变相关的肽用包含于疫苗中或用于产生细胞疗法，其中所述突变相关的肽由氨基酸序列SEQ ID NO: 12组成。

23. 根据权利要求22中所述的方法，其中所述至少一种突变通过全基因组测序鉴定。

24. 一种药物组合物，其包括至少一种活性成分，该成分选自以下项组成的组

- a) 由SEQ ID No.12组成的肽；
- b) 编码a) 的肽的核酸或包含所述核酸的表达载体；
- c) 包含b) 的表达载体的宿主细胞，以及

d) 通过以下方法获得的启动的T淋巴细胞，该方法包括将T细胞与在合适的抗原提呈细胞表面表达的a) 的肽进行体外接触足够的一段时间从而以抗原特异性方式启动所述T细胞。

25. 根据权利要求24所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含药用赋形剂和/或稳定剂。

用于肾细胞癌 (RCC) 免疫治疗的新型肽和肽组合物和支架

[0001] 本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白质、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(刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激T细胞和转入患者的疫苗复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能是抗体、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,可用于引发抗肿瘤免疫反应的疫苗组合中或作为开发药物/免疫活性化合物和细胞的目标。

[0003] 发明背景

[0004] 肾癌在男性中比在女性中更为常见,2012年,在全球范围内,是男性(214000例)第9大常见癌症,是女性(124000例)第14大常见癌症。70%的新发病例发生于人类发展水平较高和很高的国家,34%的估计新发病例在欧洲和19%在北美。2012年估计有143000人死于肾癌(男性91000人,女性52000);在全球范围,肾癌是癌症死亡的第16大最常见原因。

[0005] 捷克共和国发病率最高。北欧、东欧、北美和澳大利亚发病率也较高。非洲和东亚大部分地区预计发病率低。病死率在高度发达的国家(总死亡率与发病率之比为0.4)低于人类发展水平较低或中等的国家(0.5)。只有3.1%的确诊病例在非洲,但5.7%的死亡病例发生在该地区。发病率和死亡率在人类发展水平不同的许多国家一直在增加(World Cancer Report,2014)。

[0006] 大多数肾癌为肾细胞癌(RCC),这是肾实质内不同细胞类型产生的异构级肿瘤。大部分是透明细胞肾癌(约占肾癌症病例的70%),其次为乳头状(10-15%)、嫌色(约5%)和集合管(<1%)肾细胞癌。每个肾细胞瘤亚型都具有明显的遗传特征(Moch,2013;World Health Organization Classification of Tumours,2004)。

[0007] 肾细胞癌(RCC)的特征在于无早期体征、临床表现不同以及耐放射和化疗。RCC患者中共有2530%的患者在开始时出现明显的转移(Hofmann et al.,2005)。约三分之一的RCC患者会随着时间推移而患转移性疾病。因此,在所有RCC患者中,有将近50-60%的患者最终会出现转移性疾病(Bleumer et al.,2003;Hofmann et al.,2005)。在转移性疾病患者中,约75%的患者有肺转移瘤,36%的患者有淋巴结和/或软组织受累,20%的患者有骨骼受累,18%的患者有肝脏受累(Sachdeva et al.,2010)。

[0008] 接受基于细胞因子一线全身治疗的转移性疾病的RCC患者可分为基于5个预后因素预测生存的风险人群(Motzer et al.,2004)。与较短生存期相关的预治疗特点是低Karnofsky功能状态(<80%)、高血清乳酸脱氢酶(>1.5ULN)、低血红蛋白(<LLN)、高校正血清钙(>10mg/dL)和诊断至治疗的时间<1年。基于这些风险因素,患者被分为三个风险群体。18%的患者为零危险因素(有利风险),其至死亡的中位时间为30个月。62%的患者有一个或两个危险因素(中等风险),这个组的中位生存时间为14个月。有3个或更多危险因素(差风险)的患者占20%,其中位生存时间为5个月。这种MSKCC风险组分类方法在临床实践中广泛应用于晚期RCC。风险分类可用于规划和解释临床试验结果和指导治疗。

[0009] RCC的风险因素是吸烟和肥胖。不同的荟萃分析证实,曾经吸烟与从不吸烟相比,

可增加肾癌的风险(Cho et al.,2011;Hunt et al.,2005)。对于与每天吸烟数量相关的风险,也存在剂量依赖性增加。风险在戒烟后5年期间下降。超重尤其是肥胖是对女性和男性的肾癌危险因素(Ljungberg et al.,2011)。可归因于超重和肥胖的肾癌所有病例比例估计在美国约40%,在欧洲国家最高40%(Renehan et al.,2008;Renehan et al.,2010)。肥胖影响肾致癌作用的机制尚不清楚。性类固醇激素可能会透过内分泌受体介导的直接影响肾细胞增殖。肥胖与内分泌失调(如性荷尔蒙结合球蛋白和孕激素水平下降、胰岛素抗性)以及生长因子水平(例如胰岛素样生长因子1(IGF-1))下降均可能会导致肾癌。最近,一项病例对照研究报告了透明细胞癌与肥胖存在着更强的关联(World Cancer Report,2014)。

[0010] 初始治疗最常见是部分或完全切除患病肾脏,仍然是主要的有效治疗方法(Rini et al.,2008)。对于预后得分较差患者的一线治疗,数个癌症组织和协会制定的指南推荐受体酪氨酸激酶抑制剂(TKI)舒尼替尼(Sutent®)和帕唑帕尼(Votrient®)、单克隆抗体贝伐单抗(阿瓦斯丁®)与干扰素 α (IFN- α)和mTOR抑制剂temsirolimus(Torisel®)组合。根据美国NCCN以及欧洲EAU和ESMO详细说明书的指导,TKI索拉非尼、帕唑帕尼或最近的阿西替尼被推荐作为之前细胞因子(IFN- α 、IL-2)治疗失败的RCC患者的二线治疗。NCCN指导还建议舒尼替尼用于此情况(根据NCCN分类I的高水平证据)。

[0011] 依维莫司和阿西替尼被推荐作为根据现有指导未从TKI的VEGF靶向疗法获益的患者的二线治疗。

[0012] RCC的已知免疫原性代表了支持在晚期RCC中使用免疫治疗和癌症疫苗的基础。

[0013] 淋巴细胞PD-1表达和RCC晚期分期、分级和预后以及RCC肿瘤细胞选择性PD-L1表达之间的有趣相关性以及其与较差临床结果的潜在关联性导致新的抗PD-1/PD-L1制剂的开发,单独使用或与抗血管生成药物或其他免疫治疗方法联合使用治疗RCC(Massari et al.,2015)。

[0014] 在晚期RCC中,一项名为TRIST研究的III期癌症疫苗试验评估了TroVax(使用肿瘤相关抗原5T4的疫苗,和痘病毒载体)加入到一线标准治疗后是否延长局部晚期或mRCC患者的生存期。两组均未达到中位生存期,399名患者(54%)继续参加研究,但是资料分析证实了之前的临床效果,这表明TroVax具有免疫活性,5T4-特异性抗体反应强度与生存期改善存在相关性。另外,有几项研究使用RCC中过度表达的表位寻找肽疫苗。

[0015] 肿瘤疫苗的各种方法已在研究中。采用全肿瘤方法(包括肿瘤细胞裂解物,与肿瘤细胞的树突状细胞融合体或整个肿瘤RNA)的研究在RCC患者中完成,在一些试验中报告了肿瘤病灶的缓解(Avigan et al.,2004;Holtl et al.,2002;Marten et al.,2002;Su et al.,2003;Wittig et al.,2001)。

[0016] 在过去几年中,在RCC中表达并由抗原特异性CTL识别的几种人TAA已使用表达克隆、反向免疫学方法或透过应用DNA微数组技术进行了定义和描述(Dannenmann et al.,2013;Michael and Pandha,2003;Minami et al.,2014;Renkvist et al.,2001;Wierecky et al.,2006)。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RCC。通常也有必要确定代表癌症生物标志物的因子,尤其是RCC,从而更好地诊断癌症、评估预后和预测治疗成功性。

[0017] 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。

[0018] 肿瘤相关抗原 (TAA) 的目前分类主要包括以下几组:

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] c) 过量表达的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量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。

[0022] 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瘤性转化和/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)。

[0023] 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过表达表达的蛋白产生, 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] 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)。

[0030] 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)。

[0031] 本发明的拉长(较长)肽可作为MHC-II类活性表位。

[0032] 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。

[0033] 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)。

[0034] 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MHC II类表位 (WO 2007/028574,EP 1 760088 B1)。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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质,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法中,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。

[0039]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。

[0040]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量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。

[0041]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。

[0042]发明简介

[0043]在本发明的第一方面,本发明涉及一种肽,包含选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114的组的一个氨基酸序列、或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114具有至少77%,优选至少88%同源(优选至少77%或至少88%相同)的一种变体序列(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),或其药用盐(其中所述肽不是潜在全长多肽)。

[0044]本发明进一步涉及本发明的一种肽,包含选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:162优选为SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114的组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114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)的一种变体,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。

[0045]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,这些疾病涉及过量表达或过度提呈各潜在多肽。

[0046]表1:本发明中的肽

[0047]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
1	ALIVSLPYL	10786	SLC17A3
2	ILWREVVTI	3299	HSF4
3	RLLGEVQAL	3299	HSF4
4	FLSQDIITV	5972	REN
5	YLYPNLTRL	6540	SLC6A13
6	VLFELSKTV	23250	ATP11A
7	FLLSLIDRL	112399	EGLN3
8	GLASFKSFL	8490	RGS5
9	ILLQKPDSV	8490	RGS5
10	KLLQNNYGL	8490	RGS5
11	FIQTEAPKEV	8490	RGS5
12	ALDPSGNQLI	54437	SEMA5B
13	KIMAQILTV	120892	LRRK2
14	ALLTETIFL	120892	LRRK2
15	ILIKHLVKV	143872	ARHGAP42
16	FMPEELPQL	55258	THNSL2
17	ILAQQVHAL	113220	KIF12
18	YVLDLAAKV	47	ACLY
19	LLDPGSLQL	646658	SYNDIG1L
20	AVANTTFTV	80270	HSD3B7
21	RLIQGDQILSV	10207	INADL
22	FLSPPLPSV	593, 641649	BCKDHA, TMEM91
23	YIQEVVQYI	23236	PLCB1
24	FTLGTTVFL	4717	NDUFC1

[0048]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
25	LLVPAHLVAA	11082	ESM1
26	SLMEILYTL	91949	COG7
27	SLSDLLVSL	23596	OPN3
28	FIADLVVGL	2023, 2026, 2027	ENO1, ENO2, ENO3
29	ILLDLEQAL	9820	CUL7
30	QLFYTKIFL	5351	PLOD1
31	VLFGLDPAVIKV	259217	HSPA12A
32	FLAGGIRGSGA	113730	KLHDC7B
33	FIADVVEKI	5654, 94031	HTRA1, HTRA3
34	ELNNQNFYL	11113	CIT
35	VLHSLQTQL	51129	ANGPTL4
36	SLFGKKYIL	2274	FHL2
37	VLAPVILML	8714	ABCC3
38	VLLDTILQL	11077	HSF2BP
39	YLLNLNHLGL	23471	TRAM1
40	YIQEHLLQI	10625	IVNS1ABP
41	GLLKTQLKL	25932	CLIC4
42	VILDTGTIQL	9027	NAT8
43	YLKDELDEL	23255	SOGA2
44	ALFSFVTAL	80727	TTYH3
45	ALLGIPLTL	3777, 60598	KCNK3, KCNK15
46	GLSEVLVQI	57553	MICAL3
47	TLAEVRAVQEI	56950	SMYD2
48	VVASNIMEV	5209	PFKFB3
49	VLIVEVPGV	111	ADCY5
50	SLSDHIVLL	3675	ITGA3
51	NLWPMILTL	3675	ITGA3
52	SILDAVQRV	137902	PXDNL
53	FLLEIRQTL	23161	SNX13
54	ALVAKGLVQA	10327	AKR1A1
55	YLALILPVL	9122	SLC16A4
56	ILMDFSNSM	3691	ITGB4
57	SLQKEILYL	55102	ATG2B
58	FLVDFEQSHL	1573	CYP2J2
59	SLKNNVSV	7045	TGFBI
60	ILWKDIEYV	143425	SYT9
61	SLMGILLRI	22900	CARD8
62	VLAGPAFLVQL	55244	SLC47A1

[0049]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
63	GLIEDHFDVTV	51752	ERAP1
64	LLAASVALA	4885	NPTX2
65	IYGGSVTGA	7167, 729708	TPI1, TPI1P1
66	TLLKTIHKV	57545	CC2D2A
67	LLDVLAPLV	80781	COL18A1
68	YVLTQPPSV	28796, 28815, 28831, 3537, 3538	IGLV3-21, IGLV2-14, IGLJ3, IGLC1, IGLC2
69	ILADLLPSL	25979	DHRS7B
70	SLTALRLLL	9920	KBTBD11
71	ALDGHLYAV	9920	KBTBD11
72	YSLEKVFGI	10916	MAGED2
73	GLDGIPFTV	7205	TRIP6
74	GLFHKQVTV	23037	PDZD2
75	FLIKSINLV	143879	KBTBD3
76	VLADDHLIEV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2, PDZK1, PDZK1P1
77	SLIKHKIML	523	ATP6V1A
78	ALLDTVVQA	8911, 8912	CACNA1I, CACNA1H
79	ALADIVWRA	84182	FAM188B
80	KLASMLETL	112464	PRKCDBP
81	SLLPALPKL	4036	LRP2
82	SLLQATDFMSL	7070	THY1
83	IQWSIVPEV	23151	GRAMD4
84	YLMDEGAHL	7358	UGDH
85	FVMSEIRTV	114991	ZNF618
86	GLLQGKLALL	4835	NQO2
87	LADGVQKV	8542	APOL1
88	TLAELHISL	84166	NLRC5
89	SLLLAVTEV	3714	JAG2
90	FTLEKNFVI	1292	COL6A2
91	MLLSSLVSL	79001	VKORC1
92	FLFRDILEL	29102	DROSHA

[0050] 表2: 本发明中的其他肽, 之前与癌症无已知的关联

[0051]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
93	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
94	ILHHKVYDL	1528	CYB5A

[0052]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
95	KLTDVGIATL	115701	ALPK2
96	TLAETLVNL	283372, 283373	ANKRD52
97	TLISELVQA	9820	CUL7
98	KIPPVSPSI	57561	ARRDC3
99	GLAPHLEQI	79711	IPO4
100	KLNVAPLAV	653784, 80097	MZT2A, MZT2B
101	HIYDKAFITV	2321	FLT1
102	LLFDVHTTL	65250	C5orf42
103	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
104	ALFEGVVRQI	6236	RRAD
105	ALADLDELLIRA	3339	HSPG2
106	VLMDLKALL	51428	DDX41
107	VLMDLKALLL	51428	DDX41
108	VLISVLQAI	26999	CYFIP2
109	YLWSRVEKL	120892	LRRK2
110	LLDLHSYLL	10299	MARCH6
111	TLLETEMLL	80817	CEP44
112	LLFDHLEPIEL	25780	RASGRP3
113	SLFDWNVKL	134111	UBE2QL1
114	ALAVNISAA	908	CCT6A

[0053] 表3:用于例如个性化癌症疗法的其他肽

[0054]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
115	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
116	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
117	VLFGELPAL	8701	DNAH11
118	FLNAIETAL	8701	DNAH11
119	RLHDENILL	23322	RPGRIPI1L
120	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
121	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
122	SLDPSSPQV	9514	GAL3ST1
123	YVDPVITSI	4233	MET
124	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
125	KLDPTKTTL	10397	NDRG1
126	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
127	VLAPLFVYL	2535, 8321, 8324	FZD2, FZD1, FZD7
128	YLEEDVYQL	23255	SOGA2

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
129	VLAPRVLRA	5954	RCN1
130	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
131	VMAGDIYSV	123	PLIN2
132	SVASTITGV	123	PLIN2
133	QLIDYERQL	11072	DUSP14
134	VADKIHSV	11072	DUSP14
135	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
136	YQDPHSTAV	1956	EGFR
137	TLVAIVVGV	60681	FKBP10
138	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y
139	ILNVDGLIGV	47	ACLY
[0055] 140	SLANNVTSV	131566	DCBLD2
141	LLVDDSFLHTV	253982	ASPHD1
142	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
143	ALFVRLALA	7045	TGFBI
144	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
145	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
146	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1
147	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
148	KLLTEVHAA	101	ADAM8
149	SILTIEDGIFEV	100287551, 3306, 3312	HSPA8P8, HSPA2, HSPA8
150	TLMPNINKL	5169	ENPP3
151	YMYEGPAPRI	5169	ENPP3

[0056] 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、结肠癌或直肠癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌。

[0057] 特别优选的是本发明的肽(单独或组合),其选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114的组。更优选的是所述肽(单独或组合)选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:63(见表1)的组,并且其用于RCC、肺癌、脑癌、胃癌、结肠癌或直肠癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌、优选为RCC的免疫治疗。

[0058] 如示下面的表4A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1E和实例1。

[0059] 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,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5%以上测定的肿瘤样本,或提呈于5%以上测定的肿瘤样本且几何学平均值肿瘤与正常组织的比值大于3。

[0060]

SEQ ID 号	序列	其他相关器官/疾病
1	ALIVSLPYL	肝脏
2	ILWREVVTL	卵巢
5	YLYPNLTRL	肝脏
8	GLASFKSFL	胰腺
12	ALDPSGNQLI	卵巢
14	ALLTETIFL	白细胞
15	ILIKHLVKV	肝脏
16	FMPEELPQL	胰腺、乳腺、卵巢
21	RLIQGDQILSV	肺、结肠、直肠、肝、卵巢
23	YIQEVVQYI	肝脏
24	FTLGTTVFL	肝、前列腺、白细胞、食管
26	SLMEILYTL	结肠、直肠、胰腺、前列腺、卵巢
27	SLSDLLVSL	肺、肝、胰腺、白细胞
28	FIADLVVGL	黑色素瘤
29	ILLDLEQAL	肺、胰腺、前列腺、乳腺、卵巢
30	QLFYTKIFL	肺、结肠、直肠、卵巢
31	VLFGLDPAVIKV	脑、卵巢
32	FLAGGIRGSGA	胃
33	FIADVVEKI	肺、白细胞、卵巢
34	ELNNQNFYL	黑色素瘤、食管

[0061]

SEQ ID 号	序列	其他相关器官/疾病
36	SLFGKKYIL	结肠、直肠
37	VLAPVILML	肺、结肠、直肠、胰腺、卵巢
38	VLLDTILQL	脑、肝、胰腺、黑色素瘤、卵巢
39	YLLNLNHLGL	肺、肝脏、白细胞
44	ALFSFVTAL	肺、黑色素瘤、卵巢
45	ALLGIPLTL	前列腺、卵巢、食管
46	GLSEVLVQI	结肠、直肠
47	TLAEVRAVQEI	肝脏、黑色素瘤
49	VLIVEVPGV	卵巢
50	SLSDHIVLL	肺
51	NLWPMILTL	肺、胰腺、食管
52	SILDAVQRV	肺、脑、胰腺、卵巢
54	ALVAKGLVQA	黑色素瘤、卵巢
55	YLALILPVL	黑色素瘤
56	ILMDFSNSM	胰腺
59	SLKNNVSV	胰腺、卵巢、食管
61	SLMGILLRI	白细胞
63	GLIEDHFDVTV	肺、结肠、直肠、前列腺、白细胞、黑色素瘤、卵巢
65	IYGGSVTGA	乳腺
66	TLLKTIHKV	脑
67	LLDVLAPLV	肺、胃、肝、胰腺、乳腺、食管
68	YVLTQPPSV	肺、胰腺、白细胞、食管
69	ILADLLPSL	肺、脑、胰腺、乳腺、卵巢
72	YSLEKVFGI	肝脏

[0062]

SEQ ID 号	序列	其他相关器官/疾病
73	GLDGIPFTV	脑、胰腺、乳腺、黑色素瘤
78	ALLDTVVQA	肝、前列腺
79	ALADIVWRA	肺、脑、结肠、直肠、肝、胰腺、前列腺、卵巢、食管
82	SLLQATDFMSL	结肠、直肠、胰腺、食管
84	YLMDEGAHL	肝脏
85	FVMSEIRTV	肝脏
86	GLLQGKLALL	肝脏、黑色素瘤
87	LADGVQKV	乳腺、黑色素瘤
88	TLAELHISL	卵巢
90	FTLEKNFVI	前列腺
91	MLLSSLVSL	肺、肝脏
93	GVMAGDIYSV	肺、结肠、直肠、肝脏、食管
94	ILHHKVYDL	肝脏
96	TLAETLVNL	肺、胃、结肠、直肠、胰腺、前列腺、乳腺、卵巢、食管
97	TLISELVQA	肺、结肠、直肠、胰腺、前列腺、乳腺、黑色素瘤、卵巢、食管
98	KIPPVPSI	肺、肝脏、乳腺
99	GLAPHLEQI	肝、卵巢
100	KLNVAPLAV	肺、脑、结肠、直肠、肝、胰腺、黑色素瘤、卵巢
101	HIYDKAFITV	肝、卵巢
102	LLFDVHTTL	肺、脑
103	KLQDGLLHI	脑、结肠、直肠、肝
104	ALFEGVVRQI	肝脏、黑色素瘤、食管

[0063]

SEQ ID 号	序列	其他相关器官/疾病
105	ALADLDELLIRA	胰腺、黑色素瘤
107	VLMDLKALLL	前列腺、白细胞、卵巢
108	VLISVLQAI	白细胞
109	YLWSRVEKL	胰腺、卵巢
110	LLDLHSYLL	胃、白细胞
111	TLLETEMLL	胰腺、乳腺
112	LLFDHLEPIEL	白细胞
113	SLFDWNVKL	肝、前列腺
114	ALAVNISAA	肺、脑、肝脏、胰腺、食管
115	LLDPKTIFL	结肠、直肠、肝脏
116	GLVDIMVHL	卵巢
117	VLFGELPAL	肺、胰腺、乳腺、卵巢
119	RLHDENILL	肺、脑、结肠、直肠、肝、胰腺、前列腺、卵巢、食管
121	ALLRTVVSV	肺、肝、胰腺、乳腺、卵巢
122	SLDPSSPQV	肝脏
123	YVDPVITSI	肺
124	ILSPLSVAL	肝脏、胰腺
125	KLDPTKTTL	前列腺
126	KIQEILTQV	肺、脑、胃、结肠、直肠、肝脏、胰腺、白细胞、卵巢、食管
127	VLAPLFVYL	肺、胰腺、乳腺、黑色素瘤
128	YLEEDVYQL	肺、胰腺
129	VLAPRVLRA	肺、脑、结肠、直肠、肝、胰腺、卵巢
130	ALPTVLVGV	肺、脑、胃、结肠、直肠、肝脏、黑色素瘤、食管

[0064]

SEQ ID 号	序列	其他相关器官/疾病
131	VMAGDIYSV	肺、肝、胰腺、食管
132	SVASTITGV	肝脏、乳腺
133	QLIDYERQL	肺、结肠、直肠、肝脏、胰腺、食管
134	VADKIHSV	胃、胰腺、食管
135	VVDEGPTGV	肺、脑、胃、肝、胰腺、白细胞、乳腺、卵巢、食管
136	YQDPHSTAV	脑、肝脏
137	TLVAIVVGV	肺、脑、胃、结肠、直肠、肝脏、胰腺、前列腺、乳腺、卵巢
138	SLDTLMTYV	肺、脑、结肠、直肠、胰腺、前列腺、白细胞、食管
139	ILNVDGLIGV	脑、结肠、直肠、肝、前列腺
140	SLANNVTSV	肺、脑、胰腺、黑色素瘤、卵巢、食管
141	LLVDDSFLHTV	脑、肝、胰腺、黑色素瘤、卵巢、食管
142	SVDVSPPKV	肺、胰腺、黑色素瘤、食管
143	ALFVRLALA	肺、脑、胃、结肠、直肠、肝脏、黑色素瘤、食管
144	RLLDVLAFLV	肝脏
145	SLHFLILYV	肺、脑、结肠、直肠、肝脏、黑色素瘤、卵巢
146	KLIDLSQVMYL	肺、结肠、直肠、胰腺、卵巢
147	ALADKELLPSV	肺、结肠、直肠、肝脏、胰腺、黑色素瘤、卵巢
148	KLLTEVHAA	肺、胃、结肠、直肠、肝、胰腺、乳腺、卵巢、食管
149	SILTIEDGIFEV	肺、脑、结肠、直肠、肝、胰腺、前列腺、白细胞、乳腺、黑色素瘤、卵巢

[0065]

SEQ ID 号	序列	其他相关器官/疾病
150	TLMPNINKL	肝脏

[0066] 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。该表(如表4A)显示,对于其他肿瘤类型的选定肽,发现它们过量提呈(特定提呈)于5%以上测定的肿瘤样本,或提呈于5%以上测定的肿瘤样本且几何平均值肿瘤与正常组织的比值大于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。经测试过度

提呈的正常组织有：脂肪组织、肾上腺、血细胞、血管、骨髓、脑、软骨、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、胸腺、甲状腺、气管、输尿管、膀胱。

[0067]

SEQ ID 号	序列	其他实体
2	ILWREVVTL	黑色素瘤、NHL
4	FLSQDIITV	子宫癌
6	VLFELSKTV	AML
8	GLASFKSFL	黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
10	KLLQNNYGL	BRCA、胆囊癌、胆管癌
12	ALDPSGNQLI	脑癌
13	KIMAQILTV	CLL、NHL
14	ALLTETIFL	NHL
15	ILIKHLVKV	子宫癌、NHL
17	ILAQQVHAL	子宫癌
18	YVLDLAAKV	SCLC、CLL、BRCA、黑色素瘤、子宫癌、NHL
20	AVANTTFTV	食管癌、膀胱癌、子宫癌
21	RLIQGDQILSV	SCLC、BRCA、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、OC
24	FTLGTTVFL	黑色素瘤、子宫癌、NHL
26	SLMEILYTL	黑色素瘤、胆囊癌、胆管癌、AML、OC、SCLC

[0068]

27	SLSDLLVSL	CRC、黑色素瘤、子宫癌、AML、NHL
28	FIADLVVGL	SCLC、CLL、AML、NHL
29	ILLDLEQAL	黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL、OC
30	QLFYTKIFL	黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
33	FIADVVEKI	SCLC、BRCA、食管癌
34	ELNNQNFYL	CRC、膀胱癌、AML、NHL
36	SLFGKKYIL	膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
38	VLLDTILQL	NSCLC、SCLC、CLL、BRCA、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL、OC
39	YLLNLNHLGL	NHL
40	YIQEHLQI	黑色素瘤
43	YLKDELDEL	食道癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
45	ALLGIPLTL	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、OC
46	GLSEVLVQI	SCLC、HCC、黑色素瘤、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
48	VVASNIMEV	BRCA、黑色素瘤
49	VLIVEVPGV	胆囊癌、胆管癌、OC
50	SLSDHIVLL	PC、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
51	NLWPMILTL	黑色素瘤、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、食管癌
52	SILDAVQRV	SCLC、BRCA、黑色素瘤、子宫癌
54	ALVAKGLVQA	NHL
55	YLALILPVL	CLL
56	ILMDFSNSM	膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
57	SLQKEILYL	黑色素瘤
59	SLKNNVSV	黑色素瘤、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
61	SLMGILLRI	BRCA

[0069]

62	VLAGPAFLVQL	子宫癌
63	GLIEDHFDVTV	SCLC
64	LLAASVALA	脑癌、AML
65	IYGGSVTGA	CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌
66	TLLKTIHKV	黑素瘤、膀胱癌
67	LLDVLAPLV	CRC、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
68	YVLTQPPSV	BRCA
69	ILADLLPSL	SCLC、黑色素瘤、食管癌、子宫癌、AML、NHL
72	YSLEKVFGI	脑癌、GC、CRC、PrC、BRCA、黑色素瘤、OC、膀胱癌、AML、PC
73	GLDGIPFTV	GC、膀胱癌、子宫癌、AML
75	FLIKSINLV	CLL、黑色素瘤、AML
76	VLADDHLIEV	HCC、胆囊癌、胆管癌
77	SLIKHKIML	CRC、黑色素瘤、子宫癌
78	ALLDTVVQA	BRCA
79	ALADIVWRA	SCLC、BRCA、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、食管癌、OC
80	KLASMLETL	黑色素瘤
81	SLLPALPKL	BRCA
82	SLLQATDFMSL	NSCLC、脑癌、BRCA、黑色素瘤、子宫癌、NHL、PC
83	IQWSIVPEV	CLL、黑色素瘤、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
84	YLMDEGAHL	胆囊癌、胆管癌
85	FVMSEIRTV	子宫癌、胆囊癌、胆管癌
86	GLLQGKLALL	子宫癌、NHL
88	TLAELHISL	CLL、食管癌
89	SLLLAVTEV	SCLC、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌
90	FTLEKNFVI	CRC、BRCA、PC

[0070]

91	MLLSSLVSL	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
92	FLFRDILEL	黑色素瘤、AML
93	GVMAGDIYSV	胆囊癌、胆管癌、PC
95	KLTDVGIATL	黑色素瘤、NHL
96	TLAETLVNL	SCLC、HCC、CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
97	TLISELVQA	SCLC、GC、HCC、CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
98	KIPPVSPSI	子宫癌、NHL
99	GLAPHLEQI	BRCA、黑色素瘤、AML、NHL
100	KLNVAPLAV	CLL、BRCA、子宫癌、AML、NHL、OC
101	HIYDKAFITV	SCLC、BRCA
102	LLFDVHTTL	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、AML
103	KLQDGLLHI	SCLC、PC、黑色素瘤、OC、NHL
104	ALFEGVVRQI	膀胱癌
105	ALADLDELLIR A	BRCA
106	VLMDLKALL	AML
107	VLMDLKALLL	AML
108	VLISVLQAI	BRCA、AML、NHL
109	YLWSRVEKL	CLL、NHL
110	LLDLHSYLL	子宫癌
111	TLLETEMLL	膀胱癌
112	LLFDHLEPIEL	BRCA、NHL
113	SLFDWNVKL	SCLC、BRCA、食管癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
114	ALAVNISAA	GC、CRC、CLL、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL、PC

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。

[0071] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号21、27、29、30、33、37、39、44、50、51、52、63、67、68、69、79、91、93、96、97、98、100、102、114、117、119、121、123、126、127、128、129、130、131、165、137、138、140、142、143、145、146、147、148和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗肺癌。

[0072] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号31、38、52、66、69、73、79、100、102、103、114、119、126、129、130、135、136、137、138、139、140、141、143、145和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗脑癌。

[0073] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号32、67、96、110、126、130、134、135、137、143和148中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗胃癌。

[0074] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号21、26、30、36、37、46、63、79、82、93、96、97、100、103、115、119、126、129、130、133、137、138、139、143、145、146、147、148和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗结直肠癌。

[0075] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号1、5、15、21、23、24、27、38、39、47、67、72、78、79、84、85、86、91、93、94、98、99、100、101、103、104、113、114、115、119、121、122、124、126、129、130、131、132、133、135、136、137、139、141、143、144、145、147、148、149和150中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗肝癌。

[0076] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号8、16、26、27、29、37、38、51、52、56、59、67、68、69、73、79、82、96、97、100、105、109、111、114、117、119、121、124、126、127、128、129、131、133、134、135、137、138、140、141、142、146、147、148和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗胰腺癌。

[0077] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号24、26、29、45、63、78、79、90、96、97、107、113、119、125、137、138、139和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗前列腺癌。

[0078] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号14、24、27、33、39、61、63、68、107、108、110、112、126、135、138和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案中的肽联合用于治疗白血病。

[0079] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号16、29、65、67、69、73、87、96、97、98、111、117、121、127、132、135、137、148和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗乳腺癌。

[0080] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号28、34、38、44、47、54、55、63、73、86、87、97、100、104、105、127、130、140、141、142、143、145、147和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗黑色素瘤。

[0081] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号2、12、16、21、26、29、30、31、33、37、38、44、45、49、52、54、59、63、69、79、88、96、97、99、100、101、107、109、116、117、119、121、126、129、135、137、140、141、145、146、147、148和149中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗卵巢癌。

[0082] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID号24、34、45、51、59、67、68、79、82、93、96、97、104、114、119、126、130、131、133、134、135、138、140、141、142、143和148中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗食管癌。

[0083] 因此,本发明的另一个方面涉及本发明中肽的用途-优选联合用于治疗选自RCC、肺癌、脑癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌、优选为RCC组中的增殖性疾病。

[0084] 优选情况是,本发明涉根据SEQ ID NO:1和/或15的本发明中肽的用途-优选联合用于治疗选自RCC、肺癌、脑癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食管癌组的增殖性疾病,优选为RCC。

[0085] 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。

[0086] 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:114的一个氨基酸序列组成。

[0087] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽被修饰和/或包含非肽键。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 本发明进一步涉及本发明的一种肽、本发明的一种核酸或本发明的一种治疗疾病的药用表达载体,特别是用于治疗癌症。

[0092] 本发明进一步涉及本发明中肽或本发明中所述肽复合体(含有MHC)的特定抗体以及制造这些抗体的方法。

[0093] 本发明进一步涉及本发明的T细胞受体(TCR),特别是可溶性TCR(sTCRs)和加工为自体或异体T细胞的克隆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细胞的制造方法。

[0094] 抗体和TCR是根据本发明SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:151的肽现有免疫治疗用途的另外实施方案。

[0095] 本发明进一步涉及含本发明核酸或前述表达载体的一种宿主细胞。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。

[0096] 本发明进一步涉及配制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。

[0097] 本发明进一步涉及本发明中的所述方法,其中抗原通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。

[0098] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中抗原提呈细胞由能表达含SEQ ID NO.1至SEQ ID NO.114、优选为含SEQ ID No.1至SEQ ID No.63所述肽的一个表达载体、或一个变体氨基酸序列组成。

[0099] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的启动T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞表达含一种本发明氨基酸序列的多肽。

[0100] 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按本发明方法制造的有效量T细胞。

[0101] 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、本发明的作为药剂或制造药剂的启动T淋巴细胞、T细胞受体或抗体或其他肽.和/或肽-

MHC结合分子的用途。所述药剂优选为具有抗癌活性。

[0102] 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、疫苗或蛋白质。

[0103] 本发明还一般涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为RCC、肺癌、脑癌、胃癌、结肠或直肠癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食管癌组的增殖性疾病,优选为RCC细胞。

[0104] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的生物标志物,在此成为“靶标”,其可用于诊断癌症,优选为RCC。所述标志物可以肽本身过度提呈或相应基因过度表达。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。

[0105] 或者,抗体具有进一步的效应子功能,如免疫刺激域或毒素。

[0106] 本发明还涉及这些癌症治疗中新靶点的用途。

[0107] ABCC3与肝细胞癌、卵巢癌、直肠癌、骨肉瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤和胰腺导管腺癌相关 (Mohelnikova-Duchonova et al.,2013;Molina-Pinelo et al.,2014;Goode et al.,2014;Liu et al.,2014c;Yu et al.,2014;Sedlakova et al.,2015;Zuniga-Garcia et al.,2015;Wang et al.,2014c)。

[0108] ACLY在各种肿瘤(如乳腺癌、肝癌、结肠癌、肺癌和前列腺癌)中异常表达,与肿瘤分期和分化负相关(Zu et al.,2012)。

[0109] 胰腺癌中ADAM8过度表达与胰腺导管腺癌细胞的迁移和侵袭性增加相关(Schlomann et al.,2015)。ADAM8参与肺癌、肾细胞癌和脑癌中肿瘤细胞的迁移和侵袭(Mochizuki and Okada,2007)。

[0110] ADCY5基因超甲基化和mRNA表达减少发生于急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和肺腺癌(Kuang et al.,2008;Tong et al.,2010;Sato et al.,2013a)。

[0111] AHNAK2是参与肿瘤生长和侵袭的成纤维细胞生长因子1(FGF1)非经典分泌途径的重要元素(Kirov et al.,2015)。

[0112] 研究表明AIFM2的表达在大多数人类肿瘤中被下调(Wu et al.,2004;Mei et al.,2006)。AIFM2被确定为与卵巢癌细胞系致瘤性的功能抑制相关的9个基因之一(Notaridou et al.,2011)。

[0113] AKR1A1被证明在乳腺癌中上调,与肺癌和喉癌相关(Pennmg,2014;Hlavac et al.,2014;Kim et al.,2012)。

[0114] ALPK2表达在结直肠腺瘤中下调,在正常结肠隐窝转向腺瘤过程中可能发挥作用(Yoshida et al.,2012)。ALPK2显示胃癌中拷贝数损失和表达不足之间有很强的关联(Junnila et al.,2010)。

[0115] ANGPTL4显示在乳腺癌、浆液性卵巢癌中上调,且与成胶质细胞瘤、肝细胞癌、口腔鳞状细胞癌和肺癌相关(Ferguson et al.,2013;Tanaka et al.,2015;Ng et al.,2014;Garner et al.,2015;Schumann et al.,2015;Johnson et al.,2015)。

[0116] APOL1表达在肾细胞癌组织和细胞系中下调(Hu et al.,2012)。

[0117] ARRDC3与乳腺癌和前列腺癌有关(Wang et al.,2014a;Huang et al.,2012a)。

[0118] ATG2B移码突变在高微卫星不稳定性的胃癌和结肠癌中普遍存在(Kang et al.,

2009)。

[0119] ATP11A显示在结直肠癌中上调,与淋巴细胞白血病相关,且被认为是结直肠癌转移的生物标志物(Miyoshi et al.,2010;Zhang et al.,2005)。

[0120] ATP2A1被证明在癌症恶病质中上调(Fontes-Oliveira et al.,2013)。

[0121] ATP2A2与皮肤癌、结肠癌和肺癌有关(Korosec et al.,2006;Hovnanian,2007)。

[0122] CACNA1H与醛固酮分泌腺瘤、前列腺癌和乳腺癌有关(Felizola et al.,2014;Asaga et al.,2006;Gackiere et al.,2013)。

[0123] CACNA1I与结肠癌、乳腺癌和前列腺癌有关(Basson et al.,2015)。

[0124] CARD8在几个癌症细胞系(包括卵巢癌、乳腺癌和肺癌)以及从结直肠癌、胃癌或乳腺癌患者中获得的组织中高表达(Pathan et al.,2001;Yamamoto et al.,2005)。

[0125] CCT6A与睾丸生殖细胞肿瘤和恶性黑色素瘤有关(Tanic et al.,2006;Alagaratnam et al.,2011)。

[0126] 与邻近非肿瘤组织相比,CIT经常在肝细胞癌(HCC)中上调。RNAi敲减CIT抑制体内HCC的致瘤性(Fu et al.,2011)。

[0127] CLIC4在肿瘤细胞中下调和肿瘤基质中上调对于许多人类癌症(包括肾癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌和皮肤癌)很常见,标志着恶性进展(Suh et al.,2007a;Okudela et al.,2014;Suh et al.,2007b)。

[0128] 据报告,膀胱癌、横纹肌样肿瘤及卵巢癌和基因内的特定多态性的COL18A1差异表达被证明能增加散发性乳房癌的风险(Fang et al.,2013;Gadd et al.,2010;Lourenco et al.,2006;Peters et al.,2005)。

[0129] COL6A2与子宫颈癌、高级别浆液性卵巢癌整体存活差、B-前体急性淋巴细胞白血病、肝细胞癌、原发性和转移性脑肿瘤、肺鳞状上皮细胞癌、头颈部鳞状细胞癌相关,且被描述为子宫颈癌的潜在DNA甲基化(Cheon et al.,2014;Chen et al.,2014c;Vachani et al.,2007;Liu et al.,2010b;Seong et al.,2012;Hogan et al.,2011)。

[0130] CUL7与胰腺癌和肝细胞癌有关(Wang et al.,2014b;Paradis et al.,2013)。

[0131] CYB5A表达在肝细胞癌下调(Khan et al.,2013a)。CYB5A是胰腺导管腺癌的预后因子,透过自噬诱导和TRAF6调制发挥其肿瘤抑制功能(Giovannetti et al.,2014)。CYB5A编码一种解毒致癌分子的酶,是胰腺癌的一个预后因素(Blanke et al.,2014;Giovannetti et al.,2014)。

[0132] CYFIP2表达在乳腺癌新形成淋巴结中增加(Gantsev et al.,2013)。

[0133] 与对照组织相比,CYFIP2表达在人胃肿瘤样本中降低(Cheng et al.,2013)。CYFIP2是慢性淋巴细胞性白血病甲基化的几种凋亡相关基因之一(Halldorsdottir et al.,2012)。

[0134] CYP2J2是一种酶,其被证明在多种人类癌症中过量表达,包括食道癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌和结肠癌。CYP2J2透过促进EGFR磷酸化和启动PI3K和MAPK信号传导增加增殖并且抑制癌细胞凋亡,并进一步代谢酪氨酸激酶抑制剂,从而产生对抗癌剂的抗性(Jiang et al.,2005;Narjoz et al.,2014)。

[0135] DCBLD2在胶质母细胞瘤和头颈部癌症(HNCS)中上调,是EGFR刺激肿瘤发生所需要的(Feng et al.,2014)。此外,DCBLD2在高度转移性肺癌亚系和组织样本中上调

(Koshikawa et al.,2002)。与此相反,在胃癌中,DCBLD2的表达透过其启动子的甲基化而沉寂(Kim et al.,2008)。

[0136] DDX41与急性骨髓性白血病相关(Antony-Debre and Steidl,2015)。

[0137] DRISHA是微小RNA生物合成中的两个关键酶之一,在许多癌症中过量表达,包括胃肠道肿瘤、乳腺癌和宫颈癌,并且似乎增强增殖、集落形成和肿瘤细胞迁移(Avery-Kiejda et al.,2014;Havens et al.,2014;Zhou et al.,2013)。

[0138] DUSP14基因中的单核苷酸多态性与黑素瘤改变风险相关(Yang et al.,2014a;Liu et al.,2013)。

[0139] EGFR被证明在乳腺癌和唾液腺腺样癌中上调,与非小细胞肺癌、肝细胞癌和结直肠癌相关(Dienstmann et al.,2015;Wang et al.,2015b;Steinway et al.,2015;Xiao et al.,2015;Inoue et al.,2015)。

[0140] EGLN3表达被证明在非小细胞肺癌和肾细胞癌中上调。此外,EGLN3与透明细胞肾细胞癌和结直肠癌相关(Tanaka et al.,2014;Yang et al.,2014d;Toth et al.,2014;Chu et al.,2014)。

[0141] ENO1表达被证明在非小细胞肺癌中上调。此外,ENO1与子宫内膜癌、胰腺导管腺癌、恶性胶质瘤和鼻咽癌相关(Yang et al.,2014b;Naryzhnyi et al.,2014;Principe et al.,2015;Fu et al.,2015;Zhao et al.,2015a)。

[0142] ENO2与肺癌、实体神经内分泌癌、颗粒细胞瘤和胰腺癌相关(Sigari et al.,2014;Zizi-Sermpetzoglou et al.,2014;Liu et al.,2014a;Bedir et al.,2015;Wang et al.,2013b)。

[0143] ENO3与B细胞淋巴瘤、肺泡软组织肉瘤、横纹肌肉瘤和神经母细胞瘤相关(Oka et al.,1989;Mukai et al.,1986;Royds et al.,1985;Ishiguro et al.,1984)。

[0144] ENPP3与神经母细胞瘤、II期结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌、急性嗜碱细胞白血病和胆管细胞癌相关(Agesen et al.,2012;Staal-Viliare et al.,2007;Gomez-Villafuertes et al.,2014;Yano et al.,2004;Thiel et al.,2011)。

[0145] ERAP1与宫颈癌、肾细胞癌、食管鳞状细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌和神经母细胞瘤相关(Mehta et al.,2015;Forloni et al.,2010;Liu et al.,2010a;Kamphausen et al.,2010;Ayshangul et al.,2011;Stoehr et al.,2013)。

[0146] ESM1表达被证明在胃癌中升高,与肝母细胞瘤、鼻咽癌和卵巢癌相关,并且可能是胃癌的潜在生物标志物(Yu et al.,2013;Dong et al.,2014;Lv et al.,2014;ElBehery et al.,2013)。

[0147] FHL2被证明在急性髓细胞白血病、卵巢癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌、胰腺导管腺癌和人类恶性黑色素瘤中上调,在前列腺癌和横纹肌肉瘤中下调(Kleiber et al.,2007;Westphal et al.,2015;Qian et al.,2010;Zienert et al.,2015)。

[0148] FKBP10被确定为在白血病细胞中参与获取和维护阿霉素耐药表型的一种新型基因(Sun et al.,2014b)。FKBP10已透过其上调与结直肠癌有关(Olesen et al.,2005)。与此相反,FKBP10表达不足是上皮性卵巢癌的特征(Quinn et al.,2013)。

[0149] FLT1与结肠癌、前列腺癌、非小细胞肺癌和胰腺癌相关(Awasthi et al.,2015;Heist et al.,2015;Tsourlakakis et al.,2015;Zhang et al.,2015)。

[0150] FZD1与食管癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、前列腺癌、胆囊鳞状细胞/腺鳞癌和腺癌、结肠癌和乳腺癌相关(Goksel et al.,2014;Hung et al.,2014;Davidov et al.,2014;Su et al.,2015;Zhang et al.,2012a;Planutis et al.,2013;Devaney et al.,2013;Li et al.,2014a)。

[0151] FZD2被证明在食管癌中上调,与胃肠道间质肿瘤、涎腺腺样囊性癌和结直肠癌相关(Wang and Zheng,2014;Ding et al.,2015;Prakash et al.,2005;Liu et al.,2014b)。

[0152] FZD7被证明在卵巢癌中上调,与子宫颈癌、肝细胞癌、结直肠癌、黑素瘤、乳腺癌、胃癌和中枢神经细胞瘤相关(Anastas et al.,2014;Li et al.,2014c;Gonzalez et al.,2014;Song et al.,2014;Deng et al.,2015;Asad et al.,2014;Vasiljevic et al.,2013;Rocken and Warneke,2012;Dey et al.,2013)。

[0153] GAL3ST1活性在肾细胞癌(RCC)组织和RCC细胞系SMKT-R3中增加(Honke et al.,1996)。与正常卵巢间质组织和正常卵巢表面上皮细胞相比,GAL3ST1表达在卵巢上皮癌细胞中上调(Liu et al.,2010c)。

[0154] GALNT2(N-乙酰半乳糖氨基转移酶2)显示可透过增加胃癌细胞中的MMP-2和TGF-SS1以及透过抑制肝细胞癌中的EGF受体活性(经常下调)而发挥抗增殖和抗转移活性。相反,据报告,在鳞状细胞癌中,GALNT2过量表达可透过修改O-糖基化和EGFR的活性来增强肿瘤细胞的侵袭能力(Hua et al.,2012;Lin et al.,2014;Wu et al.,2011)。

[0155] GRAMD4在肝细胞癌(HCC)细胞系和肝癌组织中上调,表达增加与HCC的临床病理特征相关(Zhang et al.,2013)。

[0156] HAVCR1被描述为与卵巢透明细胞癌和肾细胞癌相关的新候选生物标志物(Bonventre,2014;Kobayashi et al.,2015)。HAVCR1被证明可启动透明细胞肾细胞癌来源细胞系中的IL-6/STAT-3/HIF-1A信号通路,并确定肿瘤进展和患者结果(Cuadros et al.,2014)。HAVCR1在肾脏中组成型表达被描述为透明细胞肾细胞癌发生的一个潜在的敏感性特征(Cuadros et al.,2013)。HAVCR1被描述为在肾癌、卵巢透明细胞癌和结直肠癌中上调(Wang et al.,2013c)。HAVCR1上调被描述为结直肠癌的一个潜在诊断生物标志物,是手术后较长无病间隔(可能也涉及结直肠癌转移级联)的预后标记(Wang et al.,2013c)。HAVCR1被证明与T细胞大颗粒淋巴细胞白血病有关(Wlodarski et al.,2008)。

[0157] HSF2BP编码与HSF2相关的HSF2结合蛋白,可能参与调节HSF2活化(RefSeq,2002)。

[0158] HSF4编码热休克转录因子4,其启动热或其他应力条件下的热休克反应基因(RefSeq,2002)。HSF4被证明在胶质母细胞瘤中下调(Mustafa et al.,2010)。

[0159] 不同的研究表明,HSPA2在宫颈癌、肾细胞癌和膀胱癌的疾病进展中起着重要作用。基因内多态性与胃癌的发生有关(Ferrer-Ferrer et al.,2013;Garg et al.,2010a;Garg et al.,2010b;Singh and Suri,2014)。

[0160] HSPA8被证明在食管癌细胞中过度表达,HSPA8在体外食管鳞状癌细胞中高水平表达抵消这些细胞的氧化应激诱导的细胞凋亡。此外,HSPA8在多发性骨髓瘤和结肠癌中过量表达,HSPA8的BCR-ABL1-诱导表达促进慢性髓性白血病细胞的存活(Chatterjee et al.,2013;Dadkhah et al.,2013;Jose-Eneriz et al.,2008;Kubota et al.,2010;Wang et al.,2013a)。

[0161] HSPG2与黑色素瘤、口腔鳞状细胞癌、肾透明细胞癌和前列腺肿瘤相关,其显示在肝细胞癌和结肠癌中下调(Nikitovic et al.,2014;Warren et al.,2014;Gbormittah et al.,2014;Zaghloul et al.,2015;Kawahara et al.,2014;Suhovskih et al.,2015;2015;Elewa et al.,2015;Lai et al.,2011)。

[0162] HTRA1与肝细胞癌、脾边缘区淋巴瘤、鳞状细胞癌和神经母细胞瘤相关,并显示在胃癌、乳腺癌、胆囊癌和肺腺癌中下调(Xu et al.,2014;D'Angelo et al.,2014;Fujinaga et al.,2014;Sahasrabudde et al.,2014;Franco et al.,2015;Arribas et al.,2015;Zhao et al.,2015b;Bao et al.,2015)。

[0163] HTRA3显示在口腔鳞状细胞癌和甲状腺癌中上调,在卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌和肺癌中下调,并与结直肠癌相关,可能是口腔癌的一个潜在预后生物标志物(Karagiannis et al.,2014;Zhao et al.,2014;Moriya et al.,2015;Narkiewicz et al.,2009;Beleford et al.,2010;Zurawa-Janicka et al.,2012;Yin et al.,2013)。

[0164] IGF2BP3编码胰岛素样生长因子II mRNA结合蛋白3,这是一种癌胚蛋白,其抑制胰岛素样生长因子II的翻译(RefSeq,2002)。体外研究表明,IGF2BP3促进肿瘤细胞的增殖、黏附和侵袭。此外,IGF2BP3已经显示与侵袭性和晚期癌症相关(Bell et al.,2013;Gong et al.,2014)。IGF2BP3过度表达在许多肿瘤类型中进行了说明,并与预后较差、肿瘤期别高和转移相关,例如在神经母细胞瘤、结直肠癌、肝内胆管癌、肝细胞癌、前列腺癌和肾细胞癌中过度表达(Bell et al.,2013;Findeis-Hosey and Xu,2012;Hu et al.,2014;Szarvas et al.,2014;Jeng et al.,2009;Chen et al.,2011;Chen et al.,2013;Hoffmann et al.,2008;Lin et al.,2013;Yuan et al.,2009)。

[0165] IGLC1新获得的和复发性缺失在45名患者中3名中检测到,表明在慢性粒细胞白血病(CML)中存在酪氨酸激酶抑制剂(TKI)抗性(Nowak et al.,2010)。

[0166] 杂合性的IGLC2损失已在50%的翔实的颅内脑膜瘤病例中得到证明(Kim et al.,1993)。

[0167] IGLJ3是普遍用于多毛细胞白血病中优选轻链IGA组合物的连接基因(Forconi et al.,2008)。与来自正常、自身反应性和肿瘤细胞相比,IGLV2-14是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)中第三常见的IGLV基因(Stamatopoulos et al.,2005)。

[0168] 与来自正常、自身反应性和肿瘤细胞相比,IGLV3-21是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)中最常见的IGLV基因(Stamatopoulos et al.,2005)。

[0169] INADL在对顺铂-吉西他滨联合化疗有反应的非小细胞肺癌中下调(Ma et al.,2015)。

[0170] ITGA3被证明在结直肠癌中上调,与前列腺癌、表皮样癌、早期胃癌和骨肉瘤相关(Yang et al.,2014c;Chong et al.,2014;Lustosa et al.,2014;Ren et al.,2014;Bauer et al.,2014;Mertens-Walker et al.,2015)。

[0171] ITGB4与前列腺癌、胃癌、乳腺癌、口腔鳞状细胞癌和卵巢癌相关,并且被证明在胰腺导管腺癌中上调(Chen et al.,2014b;Xin et al.,2014;Zubor et al.,2015;Masugi et al.,2015;Gao et al.,2015b;Kawakami et al.,2015)。ITGB4(也称为CD104)往往与 $\alpha 6$ 亚基关联,并可能在几种浸润性癌症的生物学中发挥重要作用,如食管鳞状细胞癌、膀胱癌和卵巢癌(Kwon et al.,2013;Pereira et al.,2014;Chen et al.,2014b)。ITGB4单核苷

酸多态性似乎影响肿瘤的侵袭性和存活,并可能对乳腺癌患者具有预后价值 (Brendle et al.,2008)。

[0172] IVNS1ABP与BCL1/JH阳性多发性骨髓瘤相关,并且可能是多发性骨髓瘤的一个潜在预后标志物(Ni et al.,2012)。

[0173] JAG2被证明在胰腺导管腺癌、肝细胞癌和视网膜母细胞瘤中上调,与多发性骨髓瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、骨肉瘤、头颈癌和膀胱尿路上皮癌相关 (Sun et al.,2014a;Li et al.,2014b;Carvalho et al.,2014;Xiao et al.,2014;Zhang et al.,2014a;Sasnauskiene et al.,2014;Lu et al.,2014;Hu et al.,2015;Li et al.,2013)。

[0174] KCNK15基因超甲基化发现于几个细胞系,包括结肠癌、白血病和膀胱癌 (Shu et al.,2006)。

[0175] KIF12被证明在乳腺癌中过度表达,并与肾肿瘤、子宫癌和胰腺癌相关 (Katoh and Katoh,2005;Tan et al.,2012)。

[0176] KLHDC7B与宫颈鳞状细胞癌相关,是宫颈鳞状细胞癌的一个潜在生物标志物 (Guo et al.,2015)。

[0177] LRP2与肝细胞癌、胰腺癌、恶性黑色素瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤和肾透明细胞癌相关 (Fernandez-Banet et al.,2014;Andersen et al.,2015;Pedersen et al.,2010;Schuetz et al.,2005;Anderson et al.,2013)。

[0178] LRRK2与激素相关癌、乳腺癌和帕金森氏病患者的伴随非皮肤癌相关,并且可能与帕金森氏病患者的血液癌症相关 (Ruiz-Martinez et al.,2014;Agalliu et al.,2015;Inzelberg et al.,2012)。

[0179] MACC1在许多癌症实体中,包括胃癌、结直肠癌、肺癌和乳腺癌中过度表达,并与癌症的进展、转移和患者生存期差有关 (Huang et al.,2013;Ma et al.,2013;Stein,2013;Wang et al.,2015a;Wang et al.,2015c;Ilm et al.,2015)。MACC1透过靶向作用于 β -连环蛋白和PI3K/AKT信号通路促进致癌作用,从而导致增加c-Met和 β -连环蛋白和其下游靶基因包括c-Myc、细胞周期蛋白D1、胱天蛋白酶9、BAD和MMP9 (Zhen et al.,2014;Yao et al.,2015)。

[0180] MAGED2过度表达与黑素瘤、乳腺癌和结肠癌有关 (Li et al.,2004;Strekalova et al.,2015)。MET被证明在去分化脂肪肉瘤中上调,并且与黑素细胞瘤、肝细胞癌、非小细胞肺癌、遗传性乳头状肾癌和胃腺癌相关 (Petrini,2015;Finocchiaro et al.,2015;Steinway et al.,2015;Bill et al.,2015;Yeh et al.,2015)。

[0181] NAT8与淋巴细胞白血病有关 (Mak et al.,2014)。

[0182] NDRG1是诸如胰腺癌等癌症中的转移抑制剂,并且显示在前列腺癌和结肠癌中下调,但被证明在肝细胞癌和宫颈腺癌中上调 (Nishio et al.,2008;Cheng et al.,2011;Bae et al.,2013;Richardson et al.,2013)。

[0183] NLRC5显示在淋巴衍生的肿瘤细胞系中下调 (Staehli et al.,2012)。

[0184] NPTX2被胰腺癌、尤因肉瘤和成胶质细胞瘤中的启动子超甲基化下调 (Zhang et al.,2012b;Alholle et al.,2013;Shukla et al.,2013)。

[0185] NQO2与子宫内膜癌、乳头状甲状腺微小癌和食管癌相关 (Hevir-Kene and Rizner,2015;Malik et al.,2012;Lee et al.,2013)。

- [0186] 与5-氟尿嘧啶敏感性Be17402和HepG2细胞相比,OPN3表达在耐5-氟尿嘧啶肝细胞癌细胞株Be17402和HepG2中减少(Jiao et al.,2012)。
- [0187] PDZD2与小肠神经内分泌肿瘤和前列腺癌有关(Tam et al.,2006;Rehfeld et al.,2014)。
- [0188] PDZK1过度表达可能在多发性骨髓瘤的药物抗性中发挥作用(RefSeq,2002)。
- [0189] PFKFB3被证明在胃癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌中上调,并与胰腺癌、前列腺癌和成胶质细胞瘤相关(Minchenko et al.,2014;Fleischer et al.,2011;Ragnum et al.,2013)。
- [0190] PLCB1与原发性头颈部鳞状细胞癌、髓性白血病和胶质母细胞瘤相关(Guerrero-Preston et al.,2014;Waugh,2014;Ramazzotti et al.,2011)。
- [0191] PLIN2参与脂质存储,是用于检测早期结直肠癌的血浆生物标志物(Matsubara et al.,2011)。与对照组相比,PLIN2在透明细胞和乳头状肾细胞癌患者中显著升高。PLIN2术前尿浓度反映肿瘤大小和分期(Morrissey et al.,2014)。PLIN2在乳腺癌标本中的表达显著高于正常组织和肺鳞状细胞癌(Zhang et al.,2014b)。
- [0192] PLOD1表达与人类乳腺癌进展相关(Gilkes et al.,2013)。
- [0193] PRKCDP显示在乳腺癌脑转移癌和原发性乳腺癌中下调。此外,PRKCDP与乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肺癌和胃癌有关(Bai et al.,2012;Moutinho et al.,2014;Li et al.,2015;Tong et al.,2012;Wikman et al.,2012)。
- [0194] RASGRP3被证明在胶质母细胞瘤、乳腺癌和人黑素瘤中上调,与前列腺癌、肝癌和口腔癌相关(Nagy et al.,2014;Sowalsky et al.,2015;Lee et al.,2015;Yang et al.,2011;Bhatnagar et al.,2012;Martinez-Lopez et al.,2012)。
- [0195] RCN1定位于人内皮细胞和前列腺癌细胞系中的质膜(RefSeq,2002)。RCN1在乳腺癌中过度表达(Amatschek et al.,2004)。
- [0196] REN与肾细胞癌、胰腺癌、促结缔组织增生的小圆细胞瘤和肾素瘤相关(Elouazzani et al.,2014;Lee et al.,2014;Nakai et al.,2015;Araujo et al.,2015)。
- [0197] RGS5显示在肺癌中下调,在透明细胞肾细胞癌、肝癌、几个淋巴瘤亚型和甲状旁腺瘤中上调,并与结直肠癌、神经母细胞瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌和胃癌相关(Volz et al.,2015;Xu et al.,2015;Wang et al.,2010a;Dannenmann et al.,2013;Koh et al.,2011;Huang et al.,2012b;Altman et al.,2012;Kumps et al.,2013;Sethakorn and Dulin,2013;Hu et al.,2013)。
- [0198] RPGRIP1L部分透过有丝分裂步骤蛋白Mad2抑制锚定非依赖性生长,并且是人肝癌的候选肿瘤抑制基因(Linet et al.,2009)。
- [0199] RRAD被证明在肺癌、卵巢癌和鼻咽癌中下调,与多形性胶质母细胞瘤、食管鳞状细胞瘤和肝癌相关(Wang et al.,2014d;Yeometal.,2014;Liu et al.,2015;Mo et al.,2012;Lin and Chuang,2012;Jin et al.,2013)。
- [0200] SEMA5B在肾细胞癌中上调,但到目前为止,其表达尚未在其他癌症类型或正常组织中发现(Hirota et al.,2006)。
- [0201] 纤溶酶- α 2-纤溶酶抑制剂复合物的血浆水平被证明是非小细胞肺癌生存的预测因子,在前列腺癌患者的血液中观察到 α 2-抗纤溶酶活性低(Taguchi et al.,1996;Zietek

et al.,1996)。

[0202] SLC16A3表达与肝细胞癌患者较差预后有关,在细胞系实验中,可增加细胞增殖、迁移和侵袭(Gao et al.,2015a)。在胰腺癌亚组中,SLC16A3显示在肿瘤发生中有功能性参与(Baek et al.,2014)。

[0203] SLC16A4被证明在非小细胞肺癌、腺样癌、胰腺导管癌、口腔鳞状细胞癌和胃癌中上调,并与乳腺癌和肝细胞癌相关(Baek et al.,2014;Gao et al.,2015a;Yan et al.,2014;Jensen et al.,2014;Koo and Yoon,2015;Granja et al.,2015;Baenke et al.,2015)。

[0204] 有机阴离子转运子2和有机阳离子转运子2的高表达是转移性结直肠癌接受基于FOLFOX化疗患者的独立预测因子(Tashiro et al.,2014)。与非肿瘤胰腺组织相比,SLC22A2、SLC22A11、SLC28A1、SLC28A3和SLC29A1的mRNA表达在胰腺肿瘤中下调(Mohelnikova-Duchonova et al.,2013a)。SLC22A2(也称为OCT2)调节近端小管中顺铂的摄取,OCT2的抑制可防止顺铂诱导的严重肾毒性发生(Sprowl et al.,2013)。

[0205] SLC47A1与前列腺癌有关(Joerger et al.,2015)。

[0206] SLC6A13表达被证明在结肠癌中上调(Tran et al.,2014b)。

[0207] SMYD2被证明在食管鳞状原发性癌、乳腺癌、肝癌、胃癌和急性淋巴细胞性白血病中上调(Sakamoto et al.,2014;Komatsu et al.,2015;Nguyen et al.,2015)。

[0208] SYT9与宫颈癌和前列腺癌相关,并且可能为宫颈癌的潜在生物标志物(Chen et al.,2014c;Bao et al.,2011)。

[0209] TGFBI表达被证明在胆管癌、肝癌、胃癌、食管癌和肾透明细胞癌中升高。此外,TGFBI被证明与结直肠癌有关(Lebdai et al.,2015;Ozawa et al.,2014;Zhu et al.,2015;Han et al.,2015)。

[0210] THY1是鼻咽癌抗侵袭活性的候选抑癌基因(Lung et al.,2010)。

[0211] TIMP1蛋白表达与转移性肝病、儿童急性淋巴细胞白血病和乳腺癌预后不良相关(Bunatova et al.,2012;Scrideli et al.,2010;Siewerts et al.,2007)。TIMP1是检测胰腺癌的潜在血清标志物(Slater et al.,2013)。TIMP1是一个众所周知的甲状腺癌标志物(Griffith et al.,2006)。

[0212] TPI1显示在骨肉瘤中下调,与乳腺癌、食管鳞状细胞癌、胶质母细胞瘤、子宫内膜癌和卵巢癌相关(Zamani-Ahmadmamdiet al.,2014;Chen et al.,2014a;Yoshida et al.,2013;Khan et al.,2013b;Gao et al.,2014)。

[0213] TRIP6被证明在尤因氏肉瘤、鼻咽癌和胶质母细胞瘤中上调,与乳腺癌相关(Pavlikova et al.,2015;Lai et al.,2010;Fei et al.,2013;Grunewald et al.,2013)。

[0214] UBE2QL1转录显示在肾细胞癌中下调(Wake et al.,2013)。

[0215] UGDH与结直肠癌、前列腺癌、卵巢浆液性腺癌、乳腺癌和肝细胞癌相关(Lapointe and Labrie,1999;Konno,2001;Fan et al.,2009;Wei et al.,2009;Wang et al.,2010b)。

[0216] VKORC1基因多态性可能与罹患前列腺癌的风险相关(Nimptsch et al.,2009)。VKORC1影响PIVKAI(维生素K缺乏诱导蛋白)浓度,这用来筛选肝细胞癌筛查(Wang et

a1., 2010c)。

[0217] 发明的详细说明

[0218] 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。

[0219] 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)。

[0220] 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启动。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。

[0221] 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 -氨基和羰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或12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13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸长度或更长。

[0222] 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 -氨基和羰基之间的肽键来连接。优选的情况是, 盐为肽的药用盐, 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。

[0223] 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 -氨基和羰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。

[0224] “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 -氨基和羰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。

[0225] 一种肽、寡肽、蛋白质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。

[0226] 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。

[0227] 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。

[0228] 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)。

[0229]

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%

[0230]

等位基 因	人群	根据等位基因频率算得的显 型
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%
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%

等位基因	人群	根据等位基因频率算得的显型
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%
[0231] A*24	印度	47%
A*24	韩国	40%
A*24	斯里兰卡人	37%
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%

[0232] 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结合。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。

[0233] 如果本发明的A*02肽与结合至另一等位基因的肽(如A*24)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.allelefrequencies.net计算)。

[0234] 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。

[0235] 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,也可为合成核苷酸序列。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。

[0236] 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)启动和停止密码子。

[0237] 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。

[0238] “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。

[0239] 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。

[0240] “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。

[0241] “片断”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。

[0242] “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。

[0243] “引物”这一术语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。

[0244] “启动子”这一术语表示参与RNA聚合酶的结合从而启动转录的DNA区域。

[0245] 术语“分离”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。

[0246] 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。

[0247] 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。

[0248] 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。

[0249] 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)]

[0250] 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

[0251] (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;

[0252] (ii) 参考序列中每个空隙,以及

[0253] (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

[0254] (iiii) 必须在对准序列的第1位置开始对准;

[0255] 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。

[0256] 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。

[0257] 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:114群组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114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。

[0258] 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Vector NTI、GENETYX或由公共数据库提供的其他工具。

[0259] 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)。

[0260] 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:114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)其与启动T细胞的TCR结合的能力。

[0261] 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结合槽的结合模序相称的核心序列,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:114提出的氨基酸序列,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启动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。

[0262] 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。在天然同源蛋白质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。

[0263] 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)。

[0264] 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或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。

[0265] 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。

[0266] 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。

[0267] 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,与人类主要组织兼容性复合体(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,与人类主要组织兼容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。

[0268] 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)。

[0269] 表6:根据SEQ ID NO:1、4和5的HLA-A*02肽的优选变体和基序

[0270]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 1	A	L	I	V	S	L	P	Y	L
变体									V

[0271]

									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
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 4	F	L	S	Q	D	I	I	T	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							

[0272]

		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: 5	Y	L	Y	P	N	L	T	R	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
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

[0273] 较长(拉长)的肽也可能适合。MHC I类表位(通常长度为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。

[0274] 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。

[0275] 表7:本发明肽的拉长组合

[0276]

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
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

[0277] 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。

[0278] 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。

[0279] 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。

[0280] 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,长度也可为15、16、17、18、19、20、21或22个氨基酸)。

[0281] 当然,本发明的肽或变体能与人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。

[0282] 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1 μ M,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。

[0283] 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:114所选的氨基酸序列组成。

[0284] 基本由“...组成”系指本发明的肽,除了根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114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。

[0285] 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。

[0286] 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。

[0287] 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。

[0288] 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。

[0289] 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。

[0290] 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。

[0291] 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、脒基化、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章所述的在蛋白质化学修饰相关的广泛方法。

[0292] 简言之,修饰蛋白质的精氨酸残基等往往基于于邻二羰基化合物(如苯甲酰甲醛、2,3丁二酮以及1,2-烯巴二酮)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。

[0293] 蛋白质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质组氨酸残基的试剂。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,也是蛋白质糖基化的主要修饰位点。蛋白质的蛋氨酸残基可通过碘乙酰胺、溴乙胺、氯胺T等被修饰。

[0294] 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。

[0295] 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硝苯巯基)-3H-吡啶(BPNS-粪臭素)。

[0296] 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。

[0297] 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%二甲基胍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)、双丙烯酸酰乙二胺(交联剂)和N-丙烯酰胺肌酸甲酯(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)

[0298] 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。

[0299] 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)。

[0300] 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。

[0301] 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。

[0302] 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,并通过在线纳米-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RCC样本(N=18个*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18名RCC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。

[0303] 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。

[0304] 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。

[0305] 对来自RCC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RCC样本的方法进行鉴定,确认其在原发性RCC上的提呈。

[0306] 在多个RCC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。

[0307] 此外,发现管道 XPRESIDENT® v2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,并在肽分离成后完成后通过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)。

[0308] 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肺癌。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RCC样本中。

[0309] 与正常组织相比,癌症中高度过量表达肽来源的许多源基因/蛋白质(也指定为“全长蛋白质”或“潜在蛋白”) - 本发明相关的“正常组织”是健康肾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RCC患者的样本),但不在正常组织中过度提呈(见实施例1)。

[0310] 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RCC细胞)。

[0311] 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,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。

[0312] 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。

[0313] 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。该术语还包括所谓的 γ/δ TCR。

[0314] 在一个实施方案中,该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。

[0315] 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呈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。

[0316] 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。

[0317] 相对于 γ/δ 的TCR,如本文所用的术语“TCR γ 可变结构域”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 可变结构域是指无前导区(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。

[0318] 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。

[0319] 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。

[0320] 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恒定结构域序列和TRBC1或TRBC2恒定结构域序列的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恒定结构域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定结构域序列之间的二硫键。

[0321] 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恒定结构域序列和一个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。

[0322] 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。

[0323] 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。

[0324] 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。此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,因此仅突变蛋白质或翻译加工改变的蛋白将将被免疫系统视为外来物质。上调或过度表达(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程序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。

[0325] 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并透过荧光启动细胞分选(FACS)方法-Calibur分析分离高亲和力T细胞。

[0326] 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,并透过荧光启动细胞分选(FACS)方法-Calibur分析分离高亲和力T细胞。

[0327] 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,TCR RNA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TCR RNA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。

[0328] 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启动子,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复合启动子、延伸因子(EF)-1a和脾脏病灶形成病毒(SFFV)启动子。在一优选实施方案中,启动子与被表达的核酸异源。除了强启动子外,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)。

[0329] 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。

[0330] 实现高水平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人双顺反子构建体,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质的单一转录物产生,从而确保了产生TCR- α 和TCR- β 链的相等摩尔比。(Schmitt et al.2009)。

[0331] 编码本说明书TCR的核酸可以是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)。

[0332] 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,这些特异性对自身免疫构成显著风险。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的细胞的功能性亲和力(Kuball et al.,2007)。

[0333] 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,而降低引入链与内源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末端结构域的第二二硫键(半胱氨酸修饰);交换TCR- α

[0334] 和TCR- β 链C端结构域的相互作用残基(“柞白结构”);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)。

[0335] 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。

[0336] “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。

[0337] 药物组合物包括游离形式或以一种药用盐形式存在的肽(也参见上文)。此处使用的“药用盐”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用碱基进行制备,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等等。

[0338] 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。

[0339] 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(如钥孔虫凝血蛋白(KLH)或甘露)到合适的载体(参阅WO 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。

[0340] 一方面,疫苗包括至少含有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114中提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。

[0341] 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。

[0342] 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。

[0343] 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。

[0344] 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。

[0345] 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。

[0346] 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。

[0347] 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。

[0348] 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。

[0349] 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。

[0350] 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。

[0351] 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启动子以及抗性标志物(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启动子的载体(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。

[0352] 强劲的人巨细胞病毒(CMV)启动子调控区使得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。

[0353] 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符氨基酸的延伸处(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。

[0354] 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, CA 92037, 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。

[0355] 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。

[0356] 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。

[0357] 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。

[0358] 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)。

[0359] 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。

[0360] 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)。

[0361] 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。

[0362] 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(但不仅限于)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、单磷酸脂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)。

[0363] 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)启动先天(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_{H1} 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_{H1} 偏移,这些佐剂如:正常促进 T_{H2} 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6406705 B1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。

[0364] 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-TGFβ、抗-TNFα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。

[0365] 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。

[0366] 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。

[0367] 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。

[0368] 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用载体中分解或悬浮,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。

[0369] 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)。

[0370] 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)启动信号通路。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。

[0371] “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。

[0372] 各支架可包括一个标记,其通过确定是否存在或不存在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。

[0373] 各支架可与第二个活性分子(例如IL-21、抗CD3、抗CD28)共轭。

[0374] 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。

[0375] 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。

[0376] 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瘤中显示出功能。此外,认识到特定肿瘤细胞系的适体也已确定。

[0377] 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。

[0378] 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。

[0379] 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。

[0380] 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 114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。

[0381] 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。

[0382] 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。

[0383] 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。

[0384] 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。

[0385] 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”。

[0386] 本发明涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114的组的一个序列或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114具有88%同源性 (优选为相同) 的一种变体,或诱导与所述变异肽发生T细胞交叉反应的一种变体,其中,所述肽不是基本的全长多肽。

[0387] 本发明进一步涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114的组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114具有至少88%同源性 (优选为相同) 的一种变体,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。

[0388] 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。

[0389] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中肽系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114的一个氨基酸序列组成。

[0390] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽 (在化学上) 被修饰和/或包含非肽键。

[0391] 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。

[0392] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明所述肽,前提是该肽并非完整 (完全) 的人蛋白。

[0393] 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。

[0394] 本发明进一步涉及一种能表达本发明核酸的表达载体。

[0395] 本发明进一步涉及本发明的一种肽、本发明的一种核酸或本发明的一种药用表达载体,特别是用于治疗RCC。

[0396] 本发明进一步涉及含本发明核酸或本发明表达载体的一种宿主细胞。

[0397] 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。

[0398] 本发明进一步涉及配制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。

[0399] 本发明进一步涉及本发明中的方法,其中抗原通过与足够量的含抗原提呈细胞的抗原结合被载入表达于合适抗原提呈细胞表面的I或II类MHC分子。

[0400] 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一个表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114的肽或所述变体氨基酸序列。

[0401] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的启动T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞异常表达含一种本发明氨基酸序列的多肽。

[0402] 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。

[0403] 本发明进一步涉及任何所述肽、本发明的一种核酸、本发明的一种表达载体、本发明的一种细胞、本发明一种作为药剂或制造药剂的启动细胞毒性T淋巴细胞的用途。本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0404] 本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中该药剂为一种疫苗。本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0405] 本发明还一般涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为RCC细胞或其他实体或血液肿瘤细胞,如:肺癌、脑癌、胃癌、结肠或直肠癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食管癌。

[0406] 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,在此成为“靶标”,其可用于诊断和/或判断RCC的预后。本发明还涉及这些供癌症治疗使用的新靶点。

[0407] 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,RCC标志物(多)肽的特异性结合、将毒素传递给癌细胞标志物基因表达水平增加时的RCC细胞和/或抑制RCC标志物多肽的活性)。

[0408] 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RCC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。

[0409] 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:114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RCC标志物多肽的单克隆或多克隆抗体制剂。

[0410] 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。

[0411] 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)。

[0412] 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。

[0413] 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)。

[0414] 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。

[0415] 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。

[0416] 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。

[0417] 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。

[0418] 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组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。

[0419] 本发明的抗体优选为通过药用载体的形式给予受试者。通常,在制剂中使用适量的药用盐,以使制剂等渗。药用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。

[0420] 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。

[0421] 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RCC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。

[0422] 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中公开了制备的其它方法。

[0423] 本发明的另一方面提出了一种TCR,例如,识别本文披露的特异性肽-MHC复合体的可溶性T细胞受体(sTCR)。

[0424] 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。

[0425] 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质靶目标细胞外域结合,并且亲和力值(Kd)低于 $1 \times 10\mu\text{M}$ 。

[0426] 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、钷和其他稀土、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。

[0427] 本发明的另一方面包括一种体外制备启动的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启动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。

[0428] 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载体。

[0429] 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目录号CRL 19863;小鼠RMA-S细胞株Ljunggren等人描述过(Ljunggren and Karre, 1985)。

[0430] 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。

[0431] 当MHC I类表位用作一种抗原时,T细胞为CD8阳性T细胞。

[0432] 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:114和/或SEQ ID NO:115至SEQ ID NO:151的肽或变体氨基酸序列。

[0433] 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(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与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(Walter et al.,2003)中描述了通过使用人工抗原提呈细胞(aAPC)体外启动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和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。

[0434] 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。

[0435] 被启动的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启动T细胞。

[0436] 按上述方法制成的启动T细胞将会有选择性地识别异常表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO 114氨基酸序列的多肽。

[0437] 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启动T细胞。给予患者的T细胞可能源自该患者,并按上述方法启动(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。

[0438] 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))。

[0439] 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。

[0440] 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,多肽过量表达,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。“过量表达”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。

[0441] T细胞可用本领域已知的方法制得(如,上述方法)。T细胞继转移方案也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)。

[0442] 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。

[0443] 本发明的任一分子(即肽、核酸、抗体、表达载体、细胞,启动T细胞、T细胞受体或编码核酸)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。

[0444] 本发明还涉及一种套件,其包括:

[0445] (a) 一个容器,包含上述溶液或冻干粉形式的药物组合物;

[0446] (b) 可选的第二个容器,其含有冻干粉剂型的稀释剂或重组溶液;和

[0447] (c) 可选的(i) 溶液使用或(ii) 重组和/或冻干制剂使用的说明。

[0448] 该套件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。

[0449] 本发明中的套件优选包含一种置于合适容器中的冻干制剂以及重组和/或使用说明。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。

[0450] 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。该套件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。

[0451] 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)。该套件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。

[0452] 本发明中的套件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。

[0453] 优选情况是,本发明的套件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。该套件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。该套件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。该套件的成分也可为固体形式,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。

[0454] 治疗套件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,套件将包含第二个西林瓶或其他容器,使之可以单独定量。该套件还可能包含另一个装载药用液体的容器。优选情况是,治疗套件将包含一个设备(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(本套件的组合物)。

[0455] 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。

[0456] 由于本发明的肽从RCC中分离而得,因此,本发明的药剂优选用于治疗RCC。

[0457] 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存储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。

[0458] “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。

[0459] 如本文所述,“存储库”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。“存储库”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。存储库(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RCC患者的肿瘤组织中高度过度表达。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RCC组织中采集的肿瘤相关肽外,存储库还可能包含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。

[0460] 存储库的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RCC样本和健康供体的血液以循序渐进的方法进行分析:

[0461] 1. 恶性材料的HLA配体用质谱法确定

[0462] 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(RCC)与一系列正常器官和组织相比过度表达的基因。

[0463] 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量表达基因所编码的考虑为多肽疫苗的合适候选TUMAP。

[0464] 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

[0465] 5. 过度表达在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。

[0466] 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RCC患者的人T细胞进行体外免疫原性测定。

[0467] 一方面,在将所述肽加入存储库之前,对其进行筛查以了解免疫原性。举例来说(但不限于此),纳入存储库的肽的免疫原性的确定方法包括体外T细胞启动,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。

[0468] 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,存储库可将肿瘤中抗原的实际表达于疫苗进行更高程度的匹配。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。

[0469] 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。

[0470] 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“存储库”和患者独特(即突变)TUMAP的肽。将选择的那些肽选择性地或过度表达于患者肿瘤中,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。

[0471] 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存储库(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存储库(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对比,以识别肿瘤组织中过量表达或异常表

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配体序列想关联,以确定来源于肿瘤过量表达或异常表达的蛋白质的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。

[0472] 除了使用存储库(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量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配体序列想关联,以确定来源于肿瘤过量表达或异常表达的蛋白质的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:为了发现基因蛋白质编码区的非同义突变,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,为了存储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。

[0473] 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)中鉴定的肽与进行肿瘤(与相应的正常组织相比)免疫原性和过量提呈预筛查肽的存储库进行比对;(c)从与患者中确定的肿瘤相关肽相关的存储库中选择至少一种肽;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。

[0474] 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。

[0475] 一旦选定了用于个体化肽疫苗的肽时,则产生疫苗。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。

[0476] 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。

[0477] 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。

[0478] 本发明的肽除了用于治疗癌症,也可用于诊断。由于肽由RCC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。

[0479] 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RCC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。

[0480] 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。

[0481] 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,用于检测移植物抗宿主和宿主抗移植物疾病。

[0482] 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。

[0483] 图表

[0484] 图A至N显示了正常组织和RCC中各种肽的过量提呈。图1A) 基因:SLC17A3,肽:ALIVSLPYL (SEQ ID NO.:1) -从左至右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,2动脉,3骨髓,7脑,3乳房,13结肠,1卵巢,1十二指肠4食管,2胆囊,3心脏,4白细胞样本,19肝,43肺,1淋巴结,1卵巢,6胰腺癌,2周围神经,1腹膜,1脑垂体,3胸膜,1前列腺,6直肌,3骨骼肌,3皮肤,2小肠,4脾脏,5胃,1睾丸,2胸腺,3甲状腺,2子宫,2静脉,12肾,18RCC。该肽也在肝癌中发现(未列出)。图1B) 基因:SOGA2,肽:YLEEDVYQL (SEQ ID NO.:128) -从左至右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,2动脉,3骨髓,7脑,3乳房,13结肠,1卵巢,1十二指肠4食管,2胆囊,3心脏,4白细胞样本,19肝,43肺,1淋巴结,1卵巢,6胰腺癌,2周围神经,1腹膜,1脑垂体,3胸膜,1前列腺,6直肌,3骨骼肌,3皮肤,2小肠,4脾脏,5胃,1睾丸,2胸腺,3甲状腺,2子宫,2静脉,12肾,18RCC。该肽也在胰腺癌、卵巢癌、胃癌和肺癌中发现(未列出)。图1C) 基因:SEMA5B,肽:ALDPSGNQLI (SEQ ID NO.:12) -从左至右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,2动脉,3骨髓,7脑,3乳房,13结肠,1卵巢,1十二指肠4食管,2胆囊,3心脏,4白细胞样本,19肝,43肺,1淋巴结,1卵巢,6胰腺癌,2周围神经,1腹膜,1脑垂体,3胸膜,1前列腺,6直肌,3骨骼肌,3皮肤,2小肠,4脾脏,5胃,1睾丸,2胸腺,3甲状腺,2子宫,2静脉,12肾,18RCC。该肽也在卵巢癌、脑癌和肺癌中发现(未列出)。图1D) 基因:RGS5,肽:GLASFKSFL (SEQ ID NO.:8) -从左至右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,2动脉,3骨髓,7脑,3乳房,13结肠,1卵巢,1十二指肠4食管,2胆囊,3心脏,4白细胞样本,19肝,43肺,1淋巴结,1卵巢,6胰腺癌,2周围神经,1腹膜,1脑垂体,3胸膜,1前列腺,6直肌,3骨骼肌,3皮肤,2小肠,4脾脏,5胃,1睾丸,2胸腺,3甲状腺,2子宫,2静脉,12肾,18RCC。该肽也在前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、黑色素瘤、卵巢癌、食管癌、胰腺癌、脑癌、胃癌中发现到(未列出)。图1E) 基因:SLC16A3,肽:VVDEGPTGV (SEQ ID NO.:135) -从左至右的组织:1白细胞细胞系,5正常组织(3肺,1淋巴结,1脾),77癌组织(2脑癌,1乳腺癌,1结肠癌,1食管癌,10肾癌,1白血病,1肝癌,35肺癌,12卵巢癌,8胰腺癌,5胃癌)。没有肽提呈的样本没有列出。测试的正常(健康)组织系列与图1A-D中相同。图1F) 基因:ESM1,肽:LLVPAHLVAA (SEQ ID

No.:25) -从左至右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,2动脉,3骨髓,7脑,3乳房,13结肠,1十二指肠,4食管,2胆囊,3心脏,4白细胞,19肝,43肺,1淋巴结,1卵巢,6胰腺癌,2周围神经,1腹膜,1脑垂体,3胸膜,1前列腺,6直肠,3骨骼肌,3皮肤,2小肠,4脾脏,5胃,1睾丸,2胸腺,3甲状腺,2子宫,2静脉,12肾,18RCC。该肽也在胰腺癌、食管癌、脑癌、肺癌和子宫癌中发现(未列出)。图1G) 基因:ARHGAP42,肽:ILIKHLVKV (SEQ ID NO.:15) -从左至右的组织:1细胞系(1黑色素瘤),17癌组织(1结肠癌,5肾癌,1肝癌,3肺癌,4淋巴结癌,1睾丸癌,2子宫癌)。图1H) 基因:HTR,肽:FIADVVEKI (SEQ ID NO.:33) -从左至右的组织:16癌组织(1脑癌,1乳腺癌,1食管癌,3肾癌,1白细胞白血病癌,5肺癌,1淋巴结癌,2卵巢癌,1胰腺癌)。图1I) 基因:HSF2B,肽:VLLDTILQL (SEQ ID NO.:38) -从左至右的组织:1良性(肾癌),3细胞系(1胰腺,1胸膜,1前列腺),1其他疾病(1皮肤),9正常组织(1肺,1淋巴结,2胎盘,1小肠,3脾脏,1甲状腺),67癌组织(1胆管癌,5脑癌,2乳腺癌,2食管癌,2胆囊癌,4肾癌,7白细胞白血病癌症,3肝癌,16肺癌,5淋巴结癌,1骨髓细胞癌,9卵巢癌,1胰腺癌,1直肠癌,5皮肤癌,2膀胱癌,1子宫癌)。图1J) 基因:TRAM1,肽:YLLNLNHLGL (SEQ ID NO.:39) -从左至右的组织:2细胞系(1肾,1胰),1正常组织(1肺),19癌症组织(1乳腺癌,2肾癌,3白细胞白血病癌,2肝癌,7肺癌,1淋巴结癌,1卵巢癌,1直肠癌,1膀胱癌)。图1K) 基因:PXDNL,肽:SILDAVQRV (SEQ ID NO.:52) -从左至右的组织:23癌组织(3脑癌,4乳腺癌,3肾癌,8肺癌,2卵巢癌,1胰腺癌,1皮肤癌,1子宫癌)。图1L) 基因:THY1,肽:SLLQATDFMSL (SEQ ID NO.:82) -从左至右的组织:11细胞系(11胰腺细胞系),4正常组织(1肾脏,1淋巴结,1胎盘,1气管),36癌症组织(1胆管癌,5脑癌,3乳腺癌,4结肠癌,1食管癌,3肾癌,1肝癌,9肺癌,1淋巴结癌,1卵巢癌,2胰腺癌,1直肠癌,2皮肤癌,1膀胱癌,1子宫癌)。图1M) 基因:ARRDC3,肽:KIPPVSPSI (SEQ ID NO.:98) -从左至右的组织:2细胞系(2肾脏),4正常组织(1肾上腺,1肺,1淋巴结,1胎盘),47癌症组织(4脑癌,1乳腺癌,1食管癌,1胆囊癌,5肾癌,1白细胞白血病癌,5肝癌,12肺癌,2淋巴结癌,4卵巢癌,3前列腺癌症,2皮肤癌,6子宫癌)。图1N) 基因:TIMP1,肽:KLQDGLLHI (SEQ ID NO.:103) -从左至右的组织:1细胞系(1血细胞),29癌症组织(2脑癌,5结肠癌,3肾癌,1肝癌,4肺癌,2淋巴结癌,3卵巢癌,1胰腺癌,1直肠癌,6皮肤癌,1睾丸癌)。

[0485] 图2A)至D)显示了本发明的源基因的代表性表达特征(与正常肾脏相比的相对表达),这些基因在一系列正常组织中以及35份RCC样本中高度过度表达或专门表达。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、23个正常肾脏样本、35个RCC样本。图2A) GAL3ST1;图2B) EGLN3;图2C) APOL1;和图2D) MET。

[0486] 图3A-F显示了示例性的免疫原性资料:肽特异性多聚体染色后的流式细胞仪结果,作为健康HLA-A*02+供体的肽特异性体外CD8+T细胞应答的结果。CD8+T细胞制备的方法为:使用抗CD28mAb和HLA-A*02涂层的人工APC分别与SeqID No 20肽(C,左图、Seq ID No 34(D,左图)、SeqID No 1肽(E,左图)或SeqID No 15肽(F,左图)合成。经过3个周期的刺激后,用A*02/SeqID No 20(C)、A*02/SeqID No 34(D)、A*02/SeqID No 1(E)或A*02/SeqID No 15(F)的2D多聚体染色法对肽反应性细胞进行检测。右图(C、D、E和F)显示用不相关A*02/肽复合体刺激的细胞对照染色。活单细胞在CD8+淋巴细胞上得到门控。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。提示了特异性多聚体+细胞和CD8+淋巴

细胞的频率。

实施例

[0487] 实施例1

[0488] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的识别和定量

[0489] 组织样本

[0490] 患者的肿瘤组织获得自BioServe (Beltsville, MD, USA)、慕尼黑大学医院、京都府立医科大学 (KPUM)、蒂宾根大学医院。

[0491] 正常(健康)组织获得自Bio-Options Inc., CA, USA、BioServe, Beltsville, MD, USA、Capital BioScience Inc., Rockville, MD, USA、Geneticist Inc., Glendale, CA, USA、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。

[0492] 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°C或以下。

[0493] 从组织样本中分离HLA肽

[0494] 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。

[0495] 质谱分析

[0496] 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1.7 μ m C18反相材料(Waters)的分析用熔炼石英微毛细管柱(75 μ m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。

[0497] 无标记相对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RCC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。

[0498] 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HLA-A*02肽。

[0499]

序列 ID 号	序列	肽提呈
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTI	+++
3	RLLGEVQAL	+++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	+++
6	VLFEISKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	+++
9	ILLQKPDSV	+++
10	KLLQNNYGL	+
11	FIQTEAPKEV	+++
12	ALDPSGNQLI	+++
13	KIMAQILTV	+
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	+++
16	FMPEELPQL	+++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	+
20	AVANTTFTV	+++
21	RLIQGDQILSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	++
26	SLMEILYTL	+++
27	SLSDLLVSL	++

[0500]

28	FIADLVVGL	++
29	ILLDLEQAL	+
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+
32	FLAGGIRGSGA	+++
33	FIADVVEKI	+++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	+++
36	SLFGKKYIL	+++
37	VLAPVILML	+++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLOI	++
41	GLLKTLOKL	+
42	VILDTGTIQL	+++
43	YKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+
45	ALLGIPLTL	++
47	TLAEVRAVQEI	+
48	VVASNIMEV	+++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	+
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	+++
55	YLALILPVL	+++
56	ILMDFSNSM	+
57	SLQKEILYL	+++
58	FLVDFEQSHL	++
60	ILWKDIEYV	+++

[0501]

61	SLMGILLRI	+++
62	VLAGPAFLVQL	+++
66	TLLKTIKV	++
67	LLDVLAPLV	+
68	YVLTQPPSV	+++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	+
72	YSLEKVFGI	+
73	GLDGIPFTV	++
74	GLFHKQVTV	+
75	FLIKSINLV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	+
79	ALADIVWRA	+
80	KLASMLETL	+
83	IQWSIVPEV	++
86	GLLQGKLALL	+
88	TLAELHISL	+
89	SLLAVTEV	+
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	+
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++
94	ILHHKVYDL	+
96	TLAETLVNL	+
97	TLISELVQA	+
98	KIPPVSPSI	+++
99	GLAPHLEQI	+
100	KLNVAPLAV	+

[0502]

101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+
103	KLQDGLLHI	+++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	++
106	VLMDLKALL	+
107	VLMDLKALLL	++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	+
110	LLDLHSYLL	+
111	TLLETETMLL	+++
112	LLFDHLEPIEL	+
113	SLFDWNVKL	++
114	ALAVNISAA	++
115	LLDPKTIFL	+++
116	GLVDIMVHL	+++
117	VLFGELPAL	+++
118	FLNAIETAL	+++
119	RLHDENILL	+++
120	GLAGDNIYL	+++
121	ALLRTVVSV	++
122	SLDPSSPQV	++
123	YVDPVITSI	++
124	ILSPLSVAL	+
125	KLDPTKTTL	+++
126	KIQEILTQV	+++
127	VLAPLHVYL	++
128	YLEEDVYQL	+++
129	VLAPRVLRA	++

[0503]	130	ALPTVLVGV	++
	131	VMAGDIYSV	++
	132	SVASTITGV	++
	133	QLIDYERQL	++
	134	VADKIHSV	+++
	135	VVDEGPTGV	+++
	136	YQDPHSTAV	++
	137	TLVAIVVGV	++
	138	SLDTLMTYV	++
	139	ILNVDGLIGV	++
	140	SLANNVTSV	++
	141	LLVDDSFLHTV	+++
	143	ALFVRLALA	++
	145	SLHFLILYV	+
	150	TLMPNINKL	+++
	151	YMYEGPAPRI	+++

[0504] 实施例2

[0505] 编码本发明肽的基因的表达谱

[0506] 与正常细胞相比在肿瘤细胞上一种肽过度提呈或特定提呈足够其在免疫治疗中有效使用,一些肽为肿瘤特异性的,尽管存在其源蛋白也存在于正常组织中。但是,mRNA表达谱增加了免疫治疗目标肽选择中其他级别的安全性。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对该肿瘤独一无二且不出现于正常组织中的蛋白。

[0507] RNA来源与制备

[0508] 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。

[0509] 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,从而使每个人的RNA得到等加权。

[0510] 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。

[0511] 微数组实验

[0512] 所有肿瘤和正常组织的RNA样本都使用Affymetrix Human Genome (HG) U133A或

HG-U133Plus 2.0 Affymetrix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RCC中高度过量表达的表达谱如图2所示。进一步代表性基因的表达分数见表9。

[0513] 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量表达(++)、与一系列正常组织相比在肿瘤上高度过量表达(++)或与一系列正常组织相比在肿瘤上过量表达(+)的基因的肽。

[0514]

序列 ID 号	基因名称	序列	基因表达
1	SLC17A3	ALIVSLPYL	++
2	HSF4	ILWREVVTL	++
3	HSF4	RLLGEVQAL	++
6	ATP11A	VLFELSKTV	+
7	EGLN3	FLLSLIDRL	++
18	ACLY	YVLDLAAKV	+
28	ENO1,ENO2,ENO3	FIADLVVGL	+
35	ANGPTL4	VLHSLQTQL	++
37	ABCC3	VLAPVILML	+
40	IVNS1ABP	YIQEHL LQI	+
50	ITGA3	SLSDHIVLL	+
51	ITGA3	NLWPMILTL	+
55	SLC16A4	YLALILPVL	+
59	TGFBI	SLKNNVVS	+
62	SLC47A1	VLAGPAFLVQL	+
63	ERAP1	GLIEDHFDVTV	+
65	TPI1,TPI1P1	IYGGSVTGA	+
76	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1	VLADDHLIEV	++
81	LRP2	SLLPALPKL	+
87	APOL1	LADGVQKV	++
93	PLIN2	GVMAGDIYSV	+
94	CYB5A	ILHHKVYDL	+
101	FLT1	HIYDKAFITV	++

	105	HSPG2	ALADLDELLIRA	+
	115	HAVCR1	LLDPKTIFL	+
	120	SLC22A2	GLAGDNIYL	+
	122	GAL3ST1	SLDPSSPQV	+++
	123	MET	YVDPVITSI	++
	125	NDRG1	KLDPTKTTL	+
[0515]	127	FZD2,FZD1,FZD7	VLAPLFVYL	+
	131	PLIN2	VMAGDIYSV	+
	132	PLIN2	SVASTITGV	+
	137	FKBP10	TLVAIVVGV	+
	139	ACLY	ILNVDGLIGV	+
	143	TGFBI	ALFVRLALA	+

[0516] 实施例3

[0517] MHC-I类提呈肽的体外免疫原性

[0518] 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细胞扩增分析方法进行了研究,其中该分析方法基于使用装载肽/MHC复合物和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞(aAPC)进行反复刺激。用这种方法,发明人可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)。

[0519] CD8+T细胞体外启动

[0520] 为了用载有肽-MHC复合物(pMHC)和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞进行体外刺激,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。

[0521] 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,Oberrdorf,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。

[0522] 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。

[0523] 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)。

[0524] 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.152)) 和A*0201/DDX5-001 (从DDX5中获得的YLLPAIVHI (SEQ ID NO.153))。

[0525] 800.000珠/200 μ l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200 μ l的600ng生物素抗-CD28。在37 $^{\circ}$ C下,在含5ng/ml IL-12 (PromoCell)的200 μ l TCM中共培养 1×10^6 CD8+T细胞与 2×10^5 的清洗涂层珠3天,从而启动刺激。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 $^{\circ}$ C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SKi (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。

[0526] RCC肽体外免疫原性

[0527] 对于受到测试的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特异性多聚体对本发明的2种肽染色后流式细胞仪检测的典型结果如图3所示, 同时也含有相应的阴性对照信息。本发明3种肽的结果汇总于表10A) 和B)。

[0528] 表10A: 本发明中HLA I类肽的体外免疫原性

[0529] 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% = ++++

[0530]

序列ID号	肽代码	孔	供体
123	YVDPVITSI	+	++++
127	VLAPLFVYL	++	++++
143	ALFVRL LALA	+	+++

[0531] 表10B: 本发明中HLA I类肽的体外免疫原性

[0532] 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。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% = ++++

[0533]

序列ID号	序列	阳性孔 [%]
1	ALIVSLPYL	+
2	ILWREVVTL	+
3	RLLGEVQAL	+

[0534]	6	VLFEISKTV	+
	7	FLLSLIDRL	+
	9	ILLQKPDSV	+
	15	ILIKHLVKV	+
	16	FMPEELPQL	+
	18	YVLDLAAKV	++
	20	AVANTTFTV	+
	22	FLSPPLPSV	++
	29	ILLDLEQAL	+
	34	ELNNQNFYL	++
	36	SLFGKKYIL	++
	94	ILHHKVYDL	++
	95	KLTDVGIATL	++++
	98	KIPPVPSI	++++

[0535] 实施例4

[0536] 肽的合成

[0537] 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,其他盐形式也可以。

[0538] 实施例5

[0539] MHC结合测定

[0540] 本发明基于T细胞疗法的候选肽进一步测试其MHC结合能力(亲和性)。单个肽-MHC复合体通过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。

[0541] 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°C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°C下孵育1小时,洗涤四次,在37°C下以2ug/ml HRP缀合抗- $\beta 2m$ 温育1小时,再次洗

涤,并以NH₂SO₄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。

[0542] 表11:MHC-I类结合分数

[0543] HLA-I类限制肽与HLA-A*02:01的结合根据肽交换产量分类:≥10%=+;≥20%=++;≥50%=+++;≥75%=++++

[0544]

序列 ID	肽代码	肽交换
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	++
6	VLFEFSKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	++
9	ILLQKPDSV	++

[0545]

10	KLLQNNYGL	++
11	FIQTEAPKEV	++
12	ALDPSGNQLI	++
13	KIMAQILTV	+++
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	++
16	FMPEELPQL	++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	++
20	AVANTTFTV	++
21	RLIQGDQILSV	++
22	FLSPPLPSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	+++
25	LLVPAHLVAA	++
27	SLSDLLVSL	+++
28	FIADLVVGL	++
29	ILLDLEQAL	+++
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+++
33	FIADVVEKI	++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	++
36	SLFGKKYIL	++
37	VLAPVILML	++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLOI	+++

[0546]

41	GLLKTQLQKL	++
42	VILDTGTIQL	++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+++
45	ALLGIPLTL	+++
46	GLSEVLVQI	+++
47	TLAEVRAVQEI	+++
48	VVASNIMEV	++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	++
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	++
53	FLLEIRQTL	++
54	ALVAKGLVQA	++
55	YLALILPVL	++
56	ILMDFSNSM	+++
57	SLQKEILYL	++
58	FLVDFEQSHL	++++
59	SLKNNVSV	+++
60	ILWKDIEYV	+++
61	SLMGILLRI	++
62	VLAGPAFLVQL	+++
63	GLIEDHFDVTV	++
64	LLAASVALA	++
65	IYGGSVTGA	++
66	TLLKTIKV	++
67	LLDVLAPLV	++
68	YVLTQPPSV	++
69	ILADLLPSL	++

[0547]

70	SLTALRLLL	++
71	ALDGHLYAV	+++
72	YSLEKVFGI	++
73	GLDGIPFTV	+++
74	GLFHKQVTV	+++
75	FLIKSINLV	+++
76	VLADDHLIEV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	++
79	ALADIVWRA	+++
80	KLASMLETL	+++
81	SLLPALPKL	++
82	SLLQATDFMSL	+++
83	IQWSIVPEV	+++
84	YLMDEGAHL	++
85	FVMSEIRTV	+++
86	GLLQGKLALL	++
88	TLAELHISL	++
89	SLLAVTEV	++
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	++
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++++
94	ILHHKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++
96	TLAETLVNL	+++
97	TLISELVQA	++
98	KIPPVSPSI	++
99	GLAPHLEQI	++

	100	KLNVAPLAV	++
	101	HIYDKAFITV	++
	102	LLFDVHTTL	+++
	103	KLQDGLLHI	++
	104	ALFEGVVRQI	+++
	105	ALADLDELLIRA	+++
	106	VLMDLKALL	+++
[0548]	107	VLMDLKALLL	+++
	108	VLISVLQAI	++
	109	YLWSRVEKL	++++
	110	LLDLHSYLL	++
	111	TLLETMLL	++
	112	LLFDHLEPIEL	+++
	113	SLFDWNVKL	+++
	114	ALAVNISAA	+++

[0549] 实施例6

[0550] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的绝对定量

[0551] 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排除提呈于细胞表面上肽的提呈和浓度。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。实验步骤如下所述。

[0552] Nano LC-MS/MS肽定量

[0553] 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。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。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。

[0554] 肽/MHC分离的效率

[0555] 对于任何蛋白质纯化过程,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。

[0556] 固体、冷冻组织中细胞计数的测定

[0557] 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 Assay Kit,Life Technologies,Darmstadt,德国) 进行定量。

[0558] 为了计算细胞数,生成了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。

[0559] 每细胞的肽拷贝数

[0560] 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。

[0561] 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	SLC17A3-001	++	18

[0563] 参考文献列表

[0564] PLoS.One.10 (2015) :e0119247

[0565] Agalliu,l.et al.,JAMA Neurol.72 (2015) :58-65

[0566] Agesen,T.H.et al.,Gut 61 (2012) :1560-1567

[0567] Alagaratnam,S.et al.,Int.J Androl 34 (2011) :e133-e150

[0568] Alcoser,S.Y.et al.,BMC.Biotechnol.11 (2011) :124

[0569] Alholle,A.et al.,Epigenetics.8 (2013) :1198-1204

[0570] Allison,J.P.et al.,Science 270 (1995) :932-933

[0571] Altman,M.K.et al.,Biochem.Res.Int.2012 (2012) :518437

[0572] Amatschek,S.et al.,Cancer Res 64 (2004) :844-856

[0573] Anastas,J.N.et al.,J Clin Invest 124 (2014) :2877-2890

[0574] Andersen,R.K.et al.,Pigment Cell Melanoma Res.28 (2015) :267-280

- [0575] Andersen,R.S.et al.,Nat.Protoc.7 (2012) :891-902
- [0576] Anderson,L.N.et al.,PLoS.One.8 (2013) :e66768
- [0577] Anderson,N.L.et al.,J Proteome.Res 11 (2012) :1868-1878
- [0578] Antony-Debre,I.et al.,Cancer Cell 27 (2015) :609-611
- [0579] Appay,V.et al.,Eur.J Immunol.36 (2006) :1805-1814
- [0580] Araujo,W.F.et al.,Urol.Oncol (2015)
- [0581] Arribas,A.J.et al.,Blood 125 (2015) :1922-1931
- [0582] Asad,M.et al.,Cell Death.Dis.5 (2014) :e1346
- [0583] Asaga,S.et al.,Anticancer Res.26 (2006) :35-42
- [0584] Avery-Kiejda,K.A.et al.,BMC.Cancer 14 (2014) :253
- [0585] Avigan,D.et al.,Clin Cancer Res.10 (2004) :4699-4708
- [0586] Awasthi,N.et al.,Cancer Lett.358 (2015) :59-66
- [0587] Ayshamgul,H.et al.,Chin Med.J (Engl.) 124 (2011) :341-346
- [0588] Bae,D.H.et al.,J Clin Pathol.66 (2013) :911-917
- [0589] Baek,G.et al.,Cell Rep.9 (2014) :2233-2249
- [0590] Baenke,F.et al.,J Pathol. (2015)
- [0591] Bai,L.et al.,J Cell Biochem.113 (2012) :322-328
- [0592] Banchereau,J.et al.,Cell 106 (2001) :271-274
- [0593] Bao,B.Y.et al.,Clin Cancer Res.17 (2011) :928-936
- [0594] Bao,W.et al.,Biomed.Pharmacother.70 (2015) :97-102
- [0595] Basson,M.D.et al.,Mol.Oncol 9 (2015) :513-526
- [0596] Bauer,K.M.et al.,J Proteome.Res.13 (2014) :4910-4918
- [0597] Beatty,G.et al.,J Immunol 166 (2001) :2276-2282
- [0598] Bedir,R.et al.,Iran J Otorhinolaryngol.27 (2015) :69-74
- [0599] Beggs,J.D.,Nature 275 (1978) :104-109
- [0600] Beleford,D.et al.,Clin Cancer Res.16 (2010) :398-409
- [0601] Bell,J.L.et al.,Cell Mol Life Sci.70 (2013) :2657-2675
- [0602] Benjamini,Y.et al.,Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological) ,Vol.57 (1995) :289-300
- [0603] Bhatnagar,R.et al.,Oral Oncol 48 (2012) :831-835
- [0604] Bill,K.L.et al.,Lab Invest (2015)
- [0605] Blanke,K.L.et al.,Cancer Causes Control 25 (2014) :1513-1521
- [0606] Bleumer,I.et al.,Eur.Urol.44 (2003) :65-75
- [0607] Bonventre,J.V.,Trans.Am.Clin Climatol.Assoc.125 (2014) :293-299
- [0608] Boulter,J.M.et al.,Protein Eng 16 (2003) :707-711
- [0609] Braumuller,H.et al.,Nature (2013)
- [0610] Brendle,A.et al.,Carcinogenesis 29 (2008) :1394-1399
- [0611] Brossart,P.et al.,Blood 90 (1997) :1594-1599
- [0612] Bruckdorfer,T.et al.,Curr.Pharm.Biotechnol.5 (2004) :29-43

- [0613] Bunatova,K.et al.,Anticancer Res.32(2012):4601-4606
- [0614] Card,K.F.et al.,Cancer Immunol Immunother.53(2004):345-357
- [0615] Carvalho,F.L.et al.,Prostate 74(2014):933-945
- [0616] Chanock,S.J.et al.,Hum.Immunol.65(2004):1211-1223
- [0617] Chatterjee,M.et al.,Haematologica 98(2013):1132-1141
- [0618] Chen,K.et al.,J Cancer Res.Clin Oncol 140(2014a):1715-1721
- [0619] Chen,Q.et al.,PLoS.One.9(2014b):e88386
- [0620] Chen,S.T.et al.,Cancer Sci.102(2011):2191-2198
- [0621] Chen,Y.C.et al.,Int.J Cancer 135(2014c):117-127
- [0622] Chen,Y.L.et al.,Int J Surg.11(2013):85-91
- [0623] Cheng,A.S.et al.,Gastroenterology 144(2013):122-133
- [0624] Cheng,J.et al.,Cancer Lett.310(2011):35-45
- [0625] Cheon,D.J.et al.,Clin Cancer Res 20(2014):711-723
- [0626] Cho,E.et al.,Hematol.Oncol.Clin.North Am.25(2011):651-665
- [0627] Chong,Y.et al.,Oncol Rep.31(2014):2535-2544
- [0628] Chu,X.et al.,Asian Pac.J Cancer Prev.15(2014):5819-5823
- [0629] Cohen,C.J.et al.,J Mol Recognit.16(2003a):324-332
- [0630] Cohen,C.J.et al.,J Immunol 170(2003b):4349-4361
- [0631] Cohen,S.N.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69(1972):2110-2114
- [0632] Coligan,J.E.et al.,Current Protocols in Protein Science(1995)
- [0633] Colombetti,S.et al.,J Immunol.176(2006):2730-2738
- [0634] Cuadros,T.et al.,Cancer Res 74(2014):1416-1428
- [0635] Cuadros,T.et al.,Eur.J Cancer 49(2013):2034-2047
- [0636] D'Angelo,V.et al.,J Neurooncol.117(2014):287-294
- [0637] Dadkhah,E.et al.,Arch.Iran Med.16(2013):463-470
- [0638] Dannenmann,S.R.et al.,Cancer Immunol.Res.1(2013):288-295
- [0639] Davidov,T.et al.,J Surg.Res.190(2014):565-574
- [0640] Deng,B.et al.,Tumour.Biol.(2015)
- [0641] Dengjel,J.et al.,Clin Cancer Res 12(2006):4163-4170
- [0642] Denkberg,G.et al.,J Immunol 171(2003):2197-2207
- [0643] Devaney,J.M.et al.,Prostate Cancer Prostatic.Dis.16(2013):292-300
- [0644] Dey,N.et al.,PLoS.One.8(2013):e77425
- [0645] Dienstmann,R.et al.,Am.Soc.Clin Oncol Educ.Book.35(2015):e149-e156
- [0646] Ding,L.C.et al.,Oncol Rep.(2015)
- [0647] Dong,R.et al.,PLoS.One.9(2014):e85599
- [0648] El Behery,M.M.et al.,Arch.Gynecol.Obstet.288(2013):1371-1376
- [0649] Elewa,M.A.et al.,Clin Exp.Metastasis(2015)
- [0650] Elouazzani,H.et al.,J Clin Imaging Sci.4(2014):33
- [0651] Falk,K.et al.,Nature 351(1991):290-296

- [0652] Fan,H.Z.et al.,J Cancer Res.Clin Oncol 135(2009):591-602
- [0653] Fang,Z.Q.et al.,Genet.Mol Res 12(2013):1479-1489
- [0654] Fei,J.et al.,Tumour.Biol.34(2013):2329-2335
- [0655] Felizola,S.J.et al.,J Steroid Biochem.Mol.Biol.144 Pt B(2014):410-416
- [0656] Feng,H.et al.,J Clin Invest 124(2014):3741-3756
- [0657] Ferguson,B.W.et al.,BMC.Cancer 13(2013):593
- [0658] Fernandez-Banet,J.et al.,Genomics 103(2014):189-203
- [0659] Ferrer-Ferrer,M.et al.,Arch.Med.Res 44(2013):467-474
- [0660] Findeis-Hosey,J.J.et al.,Biotech.Histochem.87(2012):24-29
- [0661] Finocchiaro,G.et al.,Ann.Transl.Med.3(2015):83
- [0662] Fleischer,M.et al.,Genes Chromosomes.Cancer 50(2011):1010-1020
- [0663] Fong,L.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98(2001):8809-8814
- [0664] Fontes-Oliveira,C.C.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1830(2013):2770-2778
- [0665] Forconi,F.et al.,Haematologica 93(2008):697-705
- [0666] Forloni,M.et al.,Cancer Res.70(2010):916-924
- [0667] Forsey,R.W.et al.,Biotechnol.Lett.31(2009):819-823
- [0668] Franco,R.et al.,Histol.Histopathol.30(2015):707-714
- [0669] Fu,Q.F.et al.,J Hematol.Oncol 8(2015):22
- [0670] Fu,Y.et al.,Mol.Biol.Rep.38(2011):693-702
- [0671] Fujinaga,T.et al.,Int.J Oncol 44(2014):1614-1624
- [0672] Gabrilovich,D.I.et al.,Nat Med.2(1996):1096-1103
- [0673] Gackiere,F.et al.,Biol.Open.2(2013):941-951
- [0674] Gadd,S.et al.,Lab Invest 90(2010):724-738
- [0675] Gantsev,S.K.et al.,Biomed.Pharmacother.67(2013):363-366
- [0676] Gao,H.et al.,Cancer Lett.344(2014):54-61
- [0677] Gao,H.J.et al.,J Cancer Res.Clin Oncol 141(2015a):1151-1162
- [0678] Gao,W.et al.,BMC.Cancer 15(2015b):367
- [0679] Garg,M.et al.,Cancer 116(2010a):3785-3796
- [0680] Garg,M.et al.,Eur.J Cancer 46(2010b):207-215
- [0681] Garner,J.M.et al.,PLoS.One.10(2015):e0125838
- [0682] Gattinoni,L.et al.,Nat Rev.Immunol 6(2006):383-393
- [0683] Gbormittah,F.O.et al.,J Proteome.Res.13(2014):4889-4900
- [0684] Gilkes,D.M.et al.,Mol Cancer Res 11(2013):456-466
- [0685] Giovannetti,E.et al.,J Natl.Cancer Inst.106(2014):djt346
- [0686] Gnjjatic,S.et al.,Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100(2003):8862-8867
- [0687] Godkin,A.et al.,Int.Immunol 9(1997):905-911
- [0688] Goksel,G.et al.,J BUON.19(2014):207-214
- [0689] Gomez-Villafuertes,R.et al.,J Neurochem.131(2014):290-302
- [0690] Gong,Y.et al.,Adv.Anat.Pathol.21(2014):191-200

- [0691] Gonzalez,J.E.et al.,J Am.Acad.Audiol.25(2014):253-260
- [0692] Goode,G.et al.,PLoS.One.9(2014):e100103
- [0693] Granja,S.et al.,Oncotarget.6(2015):6708-6721
- [0694] Green,M.R.et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual 4th(2012)
- [0695] Greenfield,E.A.,Antibodies:A Laboratory Manual 2nd(2014)
- [0696] Griffith,O.L.et al.,J Clin.Oncol.24(2006):5043-5051
- [0697] Grunewald,T.G.et al.,Biol.Cell 105(2013):535-547
- [0698] Guerrero-Preston,R.et al.,Epigenetics.9(2014):1031-1046
- [0699] Guo,P.et al.,Onco.Targets.Ther.8(2015):73-79
- [0700] Halldorsdottir,A.M.et al.,Am.J Hematol.87(2012):361-367
- [0701] Han,B.et al.,Mol.Cancer 14(2015):64
- [0702] Havens,M.A.et al.,PLoS.Genet.10(2014):e1004312
- [0703] Heist,R.S.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 112(2015):1547-1552
- [0704] Hevir-Kene,N.et al.,Chem Biol.Interact.234(2015):309-319
- [0705] Hirota,E.et al.,Int.J Oncol.29(2006):799-827
- [0706] Hlavac,V.et al.,Medicine (Baltimore) 93(2014):e255
- [0707] Hoffmann,N.E.et al.,Cancer 112(2008):1471-1479
- [0708] Hofmann,H.S.et al.,Eur.Urol.48(2005):77-81
- [0709] Hogan,L.E.et al.,Blood 118(2011):5218-5226
- [0710] Holtl,L.et al.,Clin.Cancer Res.8(2002):3369-3376
- [0711] Honke,K.et al.,J Biochem.119(1996):421-427
- [0712] Hovnanian,A.,Subcell.Biochem.45(2007):337-363
- [0713] Hu,C.A.et al.,FEBS Lett.586(2012):947-955
- [0714] Hu,M.et al.,J Surg.Oncol 108(2013):192-196
- [0715] Hu,S.et al.,J Cancer Res Clin Oncol 140(2014):883-893
- [0716] Hu,Y.et al.,Mol.Cancer Ther.14(2015):289-297
- [0717] Hua,D.et al.,Int.J Mol Med.30(2012):1267-1274
- [0718] Huang,C.N.et al.,Ann.Oncol 23(2012a):707-713
- [0719] Huang,G.et al.,J Surg.Oncol 105(2012b):420-424
- [0720] Huang,Y.et al.,Cell Biosci.3(2013):16
- [0721] Hung,T.H.et al.,Int.J Biochem.Cell Biol.53(2014):55-65
- [0722] Hunt,J.D.et al.,Int.J Cancer 114(2005):101-108
- [0723] Hwang,M.L.et al.,J Immunol.179(2007):5829-5838
- [0724] Ilm,K.et al.,Mol.Cancer 14(2015):38
- [0725] Inoue,Y.et al.,Cancer Chemother.Pharmacol.(2015)
- [0726] Inzelberg,R.et al.,Neurology 78(2012):781-786
- [0727] Ishiguro,Y.et al.,Gan 75(1984):53-60
- [0728] Jeng,Y.M.et al.,Br.J Surg.96(2009):66-73
- [0729] Jensen,D.H.et al.,J Oral Pathol.Med.(2014)

- [0730] Jiang,J.G.et al.,Cancer Res 65(2005):4707-4715
- [0731] Jiao,J.et al.,Cancer Lett.320(2012):96-103
- [0732] Jin,Z.et al.,Anticancer Res.33(2013):5199-5203
- [0733] Joerger,M.et al.,Prostate Cancer Prostatic.Dis.18(2015):167-172
- [0734] Johnson,R.H.et al.,Oncotarget.(2015)
- [0735] Jose-Eneriz,E.S.et al.,Br.J Haematol.142(2008):571-582
- [0736] Jung,G.et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 84(1987):4611-4615
- [0737] Junnila,S.et al.,BMC.Cancer 10(2010):73
- [0738] Kamphausen,E.et al.,Cancer Immunol.Immunother.59(2010):1273-1284
- [0739] Kang,M.R.et al.,J Pathol.217(2009):702-706
- [0740] Karagiannis,G.S.et al.,Mol.Oncol 8(2014):1240-1252
- [0741] Katoh,M.et al.,Oncol Rep.13(2005):367-370
- [0742] Kawahara,R.et al.,PLoS.One.9(2014):e115004
- [0743] Kawakami,K.et al.,Int.J Oncol(2015)
- [0744] Khan,R.et al.,Clin.Proteomics.10(2013a):6
- [0745] Khan,Z.et al.,Cancer Invest 31(2013b):404-411
- [0746] Kibbe,A.H.,Handbook of Pharmaceutical Excipients rd(2000)
- [0747] Kim,J.H.et al.,J Korean Med.Sci.8(1993):68-72
- [0748] Kim,J.S.et al.,Cancer Biol.Ther.13(2012):638-646
- [0749] Kim,M.et al.,Mol Cancer Res 6(2008):222-230
- [0750] Kirov,A.et al.,J Cell Biochem.(2015)
- [0751] Kleiber,K.et al.,Anticancer Res.27(2007):55-61
- [0752] Kobayashi,H.et al.,Oncol Lett.10(2015):612-618
- [0753] Koh,J.et al.,Mol.Endocrinol.25(2011):867-876
- [0754] Komatsu,S.et al.,Br.J Cancer 112(2015):357-364
- [0755] Konno,R.,Hum.Cell 14(2001):261-266
- [0756] Koo,J.S.et al.,Am.J Clin Pathol.143(2015):584-592
- [0757] Korosec,B.et al.,Cancer Genet.Cytogenet.171(2006):105-111
- [0758] Koshikawa,K.et al.,Oncogene 21(2002):2822-2828
- [0759] Krieg,A.M.,Nat Rev.Drug Discov.5(2006):471-484
- [0760] Kuang,S.Q.et al.,Leukemia 22(2008):1529-1538
- [0761] Kubota,H.et al.,Cell Stress.Chaperones.15(2010):1003-1011
- [0762] Kumps,C.et al.,PLoS.One.8(2013):e52321
- [0763] Kwon,J.et al.,Int J Oncol 43(2013):1523-1530
- [0764] Lai,K.K.et al.,PLoS.Genet.7(2011):e1002147
- [0765] Lai,Y.J.et al.,Mol.Cell Biol.30(2010):5582-5596
- [0766] Lapointe,J.et al.,Endocrinology 140(1999):4486-4493
- [0767] Lebdaï,S.et al.,Urol.Oncol 33(2015):69-8
- [0768] Lee,H.J.et al.,Oncol Lett.8(2014):1986-1992

- [0769] Lee,H.K.et al.,Oncotarget.6(2015):1850-1864
- [0770] Lee,J.et al.,Yonsei Med.J 54(2013):1158-1167
- [0771] Li,J.et al.,J Mol.Histol.45(2014a):47-57
- [0772] Li,M.et al.,Int.J Oncol.24(2004):305-312
- [0773] Li,R.et al.,Curr.Cancer Drug Targets.14(2014b):274-285
- [0774] Li,W.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.6(2013):2430-2440
- [0775] Li,X.X.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014c):2729-2736
- [0776] Li,Y.et al.,BMC.Cancer 15(2015):417
- [0777] Liddy,N.et al.,Nat Med.18(2012):980-987
- [0778] Lin,L.et al.,Oncol Lett.6(2013):740-744
- [0779] Lin,M.C.et al.,Oral Oncol 50(2014):478-484
- [0780] Lin,Y.W.et al.,Eur.J Cancer 45(2009):2041-2049
- [0781] Lin,Z.Y.et al.,Biomed.Pharmacother.66(2012):454-458
- [0782] Liu,B.et al.,Zhonghua Fu Chan Ke.Za Zhi.45(2010a):41-44
- [0783] Liu,F.et al.,World J Surg.Oncol 12(2014a):333
- [0784] Liu,H.et al.,Carcinogenesis 34(2013):885-892
- [0785] Liu,J.et al.,Oncotarget.(2015)
- [0786] Liu,K.et al.,Tumour.Biol.35(2014b):995-1002
- [0787] Liu,S.et al.,Tumour.Biol.35(2014c):9897-9904
- [0788] Liu,Y.et al.,J Neurooncol.99(2010b):13-24
- [0789] Liu,Y.et al.,Mol.Cancer 9(2010c):186
- [0790] Ljungberg,B.et al.,Eur.Urol.60(2011):615-621
- [0791] Ljunggren,H.G.et al.,J Exp.Med.162(1985):1745-1759
- [0792] Longenecker,B.M.et al.,Ann N.Y.Acad.Sci.690(1993):276-291
- [0793] Lourenco,G.J.et al.,Breast Cancer Res Treat.100(2006):335-338
- [0794] Lu,Y.Y.et al.,Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi.22(2014):1336-1340
- [0795] Lukas,T.J.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78(1981):2791-2795
- [0796] Lundblad,R.L.,Chemical Reagents for Protein Modification 3rd(2004)
- [0797] Lung,H.L.et al.,Int.J Cancer 127(2010):304-312
- [0798] Lustosa,S.A.et al.,ScientificWorldJournal.2014(2014):102541
- [0799] Lv,Z.et al.,Tumour.Biol.35(2014):10497-10502
- [0800] Ma,G.F.et al.,Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci.19(2015):578-585
- [0801] Ma,J.et al.,Pathol.Oncol Res 19(2013):821-832
- [0802] Mak,A.B.et al.,J Mol.Biol.426(2014):2175-2182
- [0803] Malik,M.A.et al.,Mol.Biol.Rep.39(2012):9095-9104
- [0804] Marten,A.et al.,Cancer Immunol.Immunother.51(2002):637-644
- [0805] Martinez-Lopez,N.et al.,Gastroenterology 143(2012):787-798
- [0806] Massari,F.et al.,Cancer Treat.Rev.41(2015):114-121
- [0807] Masugi,Y.et al.,Lab Invest 95(2015):308-319

- [0808] Matsubara,J.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.20 (2011) :2195-2203
- [0809] Mehta,A.M.et al.,Immunogenetics 67 (2015) :267-275
- [0810] Mei,J.et al.,Oncogene 25 (2006) :849-856
- [0811] Mertens-Walker,I.et al.,BMC.Cancer 15 (2015) :164
- [0812] Meziere,C.et al.,J Immunol 159 (1997) :3230-3237
- [0813] Michael,A.et al.,Lancet Oncol.4 (2003) :215-223
- [0814] Minami,T.et al.,Int.Immunopharmacol.20 (2014) :59-65
- [0815] Minchenko,O.H.et al.,World J Gastroenterol.20 (2014) :13705-13717
- [0816] Miyoshi,N.et al.,Oncol Rep.23 (2010) :505-510
- [0817] Mo,Y.et al.,Cancer Lett.323 (2012) :147-154
- [0818] Moch,H.,Semin.Cancer Biol.23 (2013) :3-9
- [0819] Mochizuki,S.et al.,Cancer Sci.98 (2007) :621-628
- [0820] Mohelnikova-Duchonova,B.et al.,Cancer Chemother.Pharmacol.72 (2013a) :669-682
- [0821] Mohelnikova-Duchonova,B.et al.,Pancreas 42 (2013b) :707-716
- [0822] Molina-Pinelo,S.et al.,PLoS.One.9 (2014) :e90524
- [0823] Morgan,R.A.et al.,Science 314 (2006) :126-129
- [0824] Mori,M.et al.,Transplantation 64 (1997) :1017-1027
- [0825] Moriya,Y.et al.,Oral Oncol 51 (2015) :84-89
- [0826] Morrissey,J.J.et al.,Urology 83 (2014) :256-14
- [0827] Mortara,L.et al.,Clin Cancer Res.12 (2006) :3435-3443
- [0828] Motzer,R.J.et al.,Clin.Cancer Res.10 (2004) :6302S-6303S
- [0829] Moutinho,C.et al.,J Natl.Cancer Inst.106 (2014) :djt322
- [0830] Mueller,L.N.et al.,J Proteome.Res 7 (2008) :51-61
- [0831] Mueller,L.N.et al.,Proteomics.7 (2007) :3470-3480
- [0832] Mukai,M.et al.,Am.J Surg.Pathol.10 (1986) :212-218
- [0833] Mumberg,D.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 (1999) :8633-8638
- [0834] Mustafa,D.A.et al.,Gene Regul.Syst.Bio 4 (2010) :103-107
- [0835] Nagy,Z.et al.,Mol.Cancer 13 (2014) :96
- [0836] Nakai,Y.et al.,J Cancer Res.Clin Oncol 141 (2015) :933-939
- [0837] Narjoz,C.et al.,PLoS.One.9 (2014) :e95532
- [0838] Narkiewicz,J.et al.,Oncol Rep.21 (2009) :1529-1537
- [0839] Naryzhnyi,S.N.et al.,Biomed.Khim.60 (2014) :308-321
- [0840] Ng,K.T.et al.,Mol.Cancer 13 (2014) :196
- [0841] Nguyen,H.et al.,J Biol.Chem 290 (2015) :13641-13653
- [0842] Ni,I.B.et al.,Hematol.Rep.4 (2012) :e19
- [0843] Nikitovic,D.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1840 (2014) :2471-2481
- [0844] Nimptsch,K.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.18 (2009) :49-56

- [0845] Nishio,S.et al.,Cancer Lett.264(2008):36-43
- [0846] Notaridou,M.et al.,Int.J Cancer 128(2011):2063-2074
- [0847] Nowak,D.et al.,Blood 115(2010):1049-1053
- [0848] Oka,K.et al.,Lab Invest 60(1989):38-44
- [0849] Okudela,K.et al.,PLoS.One.9(2014):e87193
- [0850] Olesen,S.H.et al.,Mol Cell Proteomics.4(2005):534-544
- [0851] Ozawa,D.et al.,Ann.Surg.Oncol(2014)
- [0852] Paradis,V.et al.,Gut 62(2013):911-919
- [0853] Pathan,N.et al.,J Biol.Chem 276(2001):32220-32229
- [0854] Pavlikova,N.et al.,Exp.Cell Res.333(2015):1-10
- [0855] Pedersen,M.O.et al.,Leuk.Lymphoma 51(2010):314-328
- [0856] Penning,T.M.,Chem Res.Toxicol.27(2014):1901-1917
- [0857] Pereira,P.M.et al.,Org.Biomol.Chem.12(2014):1804-1811
- [0858] Peters,D.G.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.14(2005):1717-1723
- [0859] Petrini,I.,Ann.Transl.Med.3(2015):82
- [0860] Pinheiro,J.et al.,nlme:Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- [0861] Planutis,K.et al.,J Transl.Med.11(2013):50
- [0862] Plebanski,M.et al.,Eur.J Immunol 25(1995):1783-1787
- [0863] Porta,C.et al.,Virology 202(1994):949-955
- [0864] Prakash,S.et al.,J Pediatr.Hematol.Oncol 27(2005):179-187
- [0865] Principe,M.et al.,Oncotarget.6(2015):11098-11113
- [0866] Qian,Z.et al.,Chem Biol.Interact.184(2010):50-57
- [0867] Quinn,M.C.et al.,Int J Oncol 42(2013):912-920
- [0868] Ragnum,H.B.et al.,Int.J Radiat.Oncol Biol.Phys.87(2013):753-760
- [0869] Ramazzotti,G.et al.,Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.21(2011):291-301
- [0870] Rammensee,H.G.et al.,Immunogenetics 50(1999):213-219
- [0871] RefSeq,The NCBI handbook[Internet],Chapter 18,(2002),<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- [0872] Rehfeld,A.et al.,Front Endocrinol. (Lausanne) 5(2014):46
- [0873] Ren,Y.et al.,Mol.Cell Proteomics.13(2014):3126-3137
- [0874] Renehan,A.G.et al.,Int.J Cancer 126(2010):692-702
- [0875] Renehan,A.G.et al.,Lancet 371(2008):569-578
- [0876] Renkvist,N.et al.,Cancer Immunol.Immunother.50(2001):3-15
- [0877] Richardson,A.et al.,Crit Rev.Oncog.18(2013):409-434
- [0878] Rini,B.I.et al.,Curr.Opin.Oncol.20(2008):300-306
- [0879] Rini,B.I.et al.,Cancer 107(2006):67-74
- [0880] Rock,K.L.et al.,Science 249(1990):918-921
- [0881] Rocken,C.et al.,Pathologe 33 Suppl 2(2012):235-240

- [0882] Rodenko,B.et al.,Nat Protoc.1 (2006) :1120-1132
- [0883] Royds,J.A.et al.,J Clin Pathol.38 (1985) :1258-1260
- [0884] Ruiz-Martinez,J.et al.,Mov Disord.29 (2014) :750-755
- [0885] Sachdeva K et al.,<http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview> (2010)
- [0886] Sahasrabuddhe,N.A.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.446 (2014) :863-869
- [0887] Saiki,R.K.et al.,Science 239 (1988) :487-491
- [0888] Sakamoto,L.H.et al.,Leuk.Res.38 (2014) :496-502
- [0889] Sasnauskiene,A.et al.,Medicina (Kaunas.) 50 (2014) :14-18
- [0890] Sato,T.et al.,PLoS.One.8 (2013) :e59444
- [0891] Schlomann,U.et al.,Nat Commun.6 (2015) :6175
- [0892] Schuetz,A.N.et al.,J Mol.Diagn.7 (2005) :206-218
- [0893] Schumann,T.et al.,Oncotarget. (2015)
- [0894] Scrideli,C.A.et al.,Leuk.Res.34 (2010) :32-37
- [0895] Sedlakova,I.et al.,Int.J Gynecol.Cancer 25 (2015) :236-243
- [0896] Seeger,F.H.et al.,Immunogenetics 49 (1999) :571-576
- [0897] Seong,J.et al.,Mol.Biol.Rep.39 (2012) :3597-3601
- [0898] Sethakorn,N.et al.,J Recept.Signal.Transduct.Res.33 (2013) :166-171
- [0899] Sherman,F.et al.,Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- [0900] Shu,J.et al.,Cancer Res.66 (2006) :5077-5084
- [0901] Shukla,S.et al.,Cancer Res.73 (2013) :6563-6573
- [0902] Sieuwerts,A.M.et al.,Clin.Chem 53 (2007) :1280-1288
- [0903] Sigari,N.et al.,Clin Lab 60 (2014) :23-27
- [0904] Silva,L.P.et al.,Anal.Chem.85 (2013) :9536-9542
- [0905] Singh,S.et al.,Tumour.Biol. (2014)
- [0906] Singh-Jasuja,H.et al.,Cancer Immunol.Immunother.53 (2004) :187-195
- [0907] Slater,E.P.et al.,Transl.Oncol.6 (2013) :99-103
- [0908] Small,E.J.et al.,J Clin Oncol.24 (2006) :3089-3094
- [0909] Song,J.et al.,PLoS.One.9 (2014) :e110074
- [0910] Sowalsky,A.G.et al.,Mol.Cancer Res.13 (2015) :98-106
- [0911] Sprowl,J.A.et al.,Clin Pharmacol.Ther.94 (2013) :585-592
- [0912] Staal-Viliare,A.et al.,Leuk.Lymphoma 48 (2007) :439-441
- [0913] Staehli,F.et al.,J Immunol.188 (2012) :3820-3828
- [0914] Stamatopoulos,K.et al.,Blood 106 (2005) :3575-3583
- [0915] Stein,U.,Expert.Opin.Ther.Targets.17 (2013) :1039-1052
- [0916] Steinway,S.N.et al.,PLoS.One.10 (2015) :e0128159
- [0917] Stoehr,C.G.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.6 (2013) :998-1008
- [0918] Strekalova,E.et al.,Clin.Cancer Res. (2015)

- [0919] Sturm,M.et al.,BMC.Bioinformatics.9(2008):163
- [0920] Su,H.et al.,J Transl.Med.13(2015):104
- [0921] Su,Z.et al.,Cancer Res.63(2003):2127-2133
- [0922] Suh,K.S.et al.,Clin.Cancer Res.13(2007a):121-131
- [0923] Suh,K.S.et al.,Mol.Carcinog.46(2007b):599-604
- [0924] Suhovskih,A.V.et al.,Cell Tissue Res.(2015)
- [0925] Sun,W.et al.,Cancer Res.74(2014a):1091-1104
- [0926] Sun,Z.et al.,J Proteome.Res 13(2014b):1593-1601
- [0927] Szarvas,T.et al.,Int J Cancer 135(2014):1596-1604
- [0928] Taguchi,O.et al.,Clin Chim.Acta 244(1996):69-81
- [0929] Tam,C.W.et al.,Endocrinology 147(2006):5023-5033
- [0930] Tan,M.H.et al.,Breast Cancer Res.Treat.131(2012):849-858
- [0931] Tanaka,J.et al.,J Oral Pathol.Med.44(2015):126-133
- [0932] Tanaka,T.et al.,J Cancer Res.Clin Oncol 140(2014):503-513
- [0933] Tanic,N.et al.,Anticancer Res.26(2006):2137-2142
- [0934] Tashiro,A.et al.,Am.J Cancer Res.4(2014):528-536
- [0935] Teufel,R.et al.,Cell Mol Life Sci.62(2005):1755-1762
- [0936] Thiel,A.et al.,Oncol Rep.26(2011):615-620
- [0937] Tong,S.Y.et al.,Cancer Invest 30(2012):642-645
- [0938] Tong,W.G.et al.,Epigenetics.5(2010):499-508
- [0939] Toth,K.et al.,Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.22(2014):642-647
- [0940] Tran,E.et al.,Science 344(2014a):641-645
- [0941] Tran,T.T.et al.,Photochem.Photobiol.90(2014b):1136-1143
- [0942] Tsourlakis,M.C.et al.,Int.J Mol.Sci.16(2015):8591-8606
- [0943] Vachani,A.et al.,Clin Cancer Res.13(2007):2905-2915
- [0944] Vasiljevic,A.et al.,Neuropathology.33(2013):149-161
- [0945] Volz,N.B.et al.,Pharmacogenomics.J 15(2015):69-76
- [0946] Wake,N.C.et al.,Hum.Mutat.34(2013):1650-1661
- [0947] Walter,S.et al.,J Immunol 171(2003):4974-4978
- [0948] Walter,S.et al.,Nat Med.18(2012):1254-1261
- [0949] Wang,B.S.et al.,Cell Stress.Chaperones.18(2013a):359-366
- [0950] Wang,D.et al.,Mol.Cell Biochem.396(2014a):67-77
- [0951] Wang,G.et al.,Tumour.Biol 36(2015a):1055-1065
- [0952] Wang,H.et al.,J Biol.Chem 289(2014b):4009-4017
- [0953] Wang,J.H.et al.,World J Gastroenterol.16(2010a):5642-5646
- [0954] Wang,L.H.et al.,Tumour.Biol.35(2014c):1157-1168
- [0955] Wang,R.et al.,Biomed.Res.Int.2013(2013b):195692
- [0956] Wang,T.P.et al.,Exp.Cell Res.316(2010b):2893-2902
- [0957] Wang,W.M.et al.,Mol.Med.Rep.(2015b)

- [0958] Wang,Y.et al.,J Biol.Chem 289(2014d):14225-14238
- [0959] Wang,Y.et al.,Clin.Chem Lab Med.48(2010c):1475-1479
- [0960] Wang,Y.et al.,Anticancer Res 33(2013c):207-214
- [0961] Wang,Y.et al.,Pathol.Oncol Res.20(2014):611-618
- [0962] Wang,Z.et al.,J Cancer Res Clin Oncol 141(2015c):1353-1361
- [0963] Warren,C.R.et al.,J Cell Biochem.115(2014):1322-1333
- [0964] Waugh,M.G.,Mol.Neurobiol.(2014)
- [0965] Wei,Q.et al.,Cancer Res.69(2009):2332-2339
- [0966] Westphal,P.et al.,Am.J Clin Pathol.143(2015):248-256
- [0967] Wierecky,J.et al.,Cancer Res.66(2006):5910-5918
- [0968] Wikman,H.et al.,PLoS.One.7(2012):e47537
- [0969] Willcox,B.E.et al.,Protein Sci.8(1999):2418-2423
- [0970] Wittig,B.et al.,Hum.Gene Ther.12(2001):267-278
- [0971] Wlodarski,M.W.et al.,J Leukoc.Biol 83(2008):589-601
- [0972] World Cancer Report,(2014)
- [0973] World Health Organization Classification of Tumours,(2004)
- [0974] Wu,M.et al.,Oncogene 23(2004):6815-6819
- [0975] Wu,Y.M.et al.,Cancer Res 71(2011):7270-7279
- [0976] Xiao,L.et al.,Biochim.Biophys.Acta(2015)
- [0977] Xiao,W.et al.,Mol.Med.Rep.10(2014):453-458
- [0978] Xin,Z.et al.,Virchows Arch.465(2014):35-47
- [0979] Xu,Y.et al.,J Cell Biochem.115(2014):1112-1121
- [0980] Xu,Z.et al.,Oncol Rep.33(2015):2899-2907
- [0981] Yamamoto,M.et al.,Cancer Res.65(2005):8706-8714
- [0982] Yan,P.et al.,Asian Pac.J Cancer Prev.15(2014):8923-8929
- [0983] Yang,C.Y.et al.,J Immunol 192(2014a):1547-1557
- [0984] Yang,D.et al.,Oncogene 30(2011):4590-4600
- [0985] Yang,J.et al.,J Proteomics.109(2014b):162-175
- [0986] Yang,W.et al.,Med.Oncol 31(2014c):826
- [0987] Yang,W.et al.,Tumour.Biol.35(2014d):8267-8279
- [0988] Yano,Y.et al.,Cancer Lett.207(2004):139-147
- [0989] Yao,Y.et al.,Cell Physiol Biochem.35(2015):983-996
- [0990] Yeh,I.et al.,Nat.Commun.6(2015):7174
- [0991] Yeom,S.Y.et al.,Mol.Cancer Ther.13(2014):3049-3061
- [0992] Yin,Y.et al.,Tumour.Biol.34(2013):3611-3617
- [0993] Yoshida,A.et al.,Hum.Cell 26(2013):56-66
- [0994] Yoshida,Y.et al.,Anticancer Res.32(2012):2301-2308
- [0995] Yu,P.H.et al.,PLoS.One.8(2013):e82254
- [0996] Yu,Z.et al.,Cancer Lett.353(2014):182-193

- [0997] Yuan,R.H.et al.,Ann Surg.Oncol 16(2009):1711-1719
- [0998] Zaghoul,R.A.et al.,Eur.J Pharmacol.746(2015):353-362
- [0999] Zamani-Ahmadmhamudi,M.et al.,Electrophoresis 35(2014):901-910
- [1000] Zaremba,S.et al.,Cancer Res.57(1997):4570-4577
- [1001] Zhang,B.et al.,Blood 106(2005):1355-1361
- [1002] Zhang,H.et al.,Cancer Lett.323(2012a):106-113
- [1003] Zhang,J.et al.,Mol.Med.Rep.10(2014a):749-754
- [1004] Zhang,J.et al.,Xi.Bao.Yu Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za Zhi.29(2013):190-193
- [1005] Zhang,L.et al.,Dig.Dis.Sci.57(2012b):2608-2614
- [1006] Zhang,S.D.et al.,Onco.Targets.Ther.8(2015):835-843
- [1007] Zhang,X.D.et al.,Int.J Clin Exp.Med.7(2014b):1190-1196
- [1008] Zhao,M.et al.,Cancer Invest 32(2014):464-469
- [1009] Zhao,M.et al.,Oncotarget.(2015a)
- [1010] Zhao,Z.et al.,Med.Oncol 32(2015b):112
- [1011] Zhen,T.et al.,Oncotarget.5(2014):3756-3769
- [1012] Zhou,J.et al.,Oncol Rep.30(2013):2229-2237
- [1013] Zhu,J.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.8(2015):702-710
- [1014] Zienert,E.et al.,Cancer Lett.364(2015):17-24
- [1015] Zietek,Z.et al.,Pol.Tyg.Lek.51(1996):86-88
- [1016] Zizi-Sermpetzoglou,A.et al.,Eur.J Gynaecol.Oncol 35(2014):325-327
- [1017] Zu,X.Y.et al.,Recent Pat Anticancer Drug Discov.7(2012):154-167
- [1018] Zubor,P.et al.,Mol.Biol.Rep.42(2015):977-988
- [1019] Zuniga-Garcia,V.et al.,Dig.Dis.Sci.(2015)
- [1020] Zurawa-Janicka,D.et al.,Oncol Rep.28(2012):1838-1844
- [1021] Follenzi A,et al.Nat Genet.2000 Jun;25(2):217-22.
- [1022] Zufferey R,et al.J Virol.1999 Apr;73(4):2886-92.
- [1023] Scholten KB,et al.Clin Immunol.2006 May;119(2):135-45.
- [1024] Gustafsson C,et al.Trends Biotechnol.2004 Jul;22(7):346-53.Review.
- [1025] Kuball,J.,et al.(2007).Blood 109,2331-2338.
- [1026] 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> 用于肾细胞癌 (RCC) 免疫治疗的新型肽和肽组合物和支架
- [0004] <130> I32806W0
- [0005] <150> GB 1505585.8
- [0006] <151> 2015-03-31
- [0007] <150> US 62/140,767
- [0008] <151> 2015-03-31
- [0009] <160> 153
- [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 Val Ser Leu Pro Tyr Leu
- [0017] 1 5
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 9
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 智人
- [0022] <400> 2
- [0023] Ile Leu Trp Arg Glu Val Val Thr Leu
- [0024] 1 5
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 9
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 智人
- [0029] <400> 3
- [0030] Arg Leu Leu Gly Glu Val Gln Ala Leu
- [0031] 1 5
- [0032] <210> 4
- [0033] <211> 9
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 智人
- [0036] <400> 4
- [0037] Phe Leu Ser Gln Asp Ile Ile Thr Val
- [0038] 1 5

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

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

[0117] <211> 9
[0118] <212> PRT
[0119] <213> 智人
[0120] <400> 16
[0121] Phe Met Pro Glu Glu Leu Pro Gln Leu
[0122] 1 5
[0123] <210> 17
[0124] <211> 9
[0125] <212> PRT
[0126] <213> 智人
[0127] <400> 17
[0128] Ile Leu Ala Gln Gln Val His Ala Leu
[0129] 1 5
[0130] <210> 18
[0131] <211> 9
[0132] <212> PRT
[0133] <213> 智人
[0134] <400> 18
[0135] Tyr Val Leu Asp Leu Ala Ala Lys Val
[0136] 1 5
[0137] <210> 19
[0138] <211> 9
[0139] <212> PRT
[0140] <213> 智人
[0141] <400> 19
[0142] Leu Leu Asp Pro Gly Ser Leu Gln Leu
[0143] 1 5
[0144] <210> 20
[0145] <211> 9
[0146] <212> PRT
[0147] <213> 智人
[0148] <400> 20
[0149] Ala Val Ala Asn Thr Thr Phe Thr Val
[0150] 1 5
[0151] <210> 21
[0152] <211> 11
[0153] <212> PRT
[0154] <213> 智人
[0155] <400> 21

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

[0195] <212> PRT
[0196] <213> 智人
[0197] <400> 27
[0198] Ser Leu Ser Asp Leu Leu Val Ser Leu
[0199] 1 5
[0200] <210> 28
[0201] <211> 9
[0202] <212> PRT
[0203] <213> 智人
[0204] <400> 28
[0205] Phe Ile Ala Asp Leu Val Val Gly Leu
[0206] 1 5
[0207] <210> 29
[0208] <211> 9
[0209] <212> PRT
[0210] <213> 智人
[0211] <400> 29
[0212] Ile Leu Leu Asp Leu Glu Gln Ala Leu
[0213] 1 5
[0214] <210> 30
[0215] <211> 9
[0216] <212> PRT
[0217] <213> 智人
[0218] <400> 30
[0219] Gln Leu Phe Tyr Thr Lys Ile Phe Leu
[0220] 1 5
[0221] <210> 31
[0222] <211> 12
[0223] <212> PRT
[0224] <213> 智人
[0225] <400> 31
[0226] Val Leu Phe Gly Leu Asp Pro Ala Val Ile Lys Val
[0227] 1 5 10
[0228] <210> 32
[0229] <211> 11
[0230] <212> PRT
[0231] <213> 智人
[0232] <400> 32
[0233] Phe Leu Ala Gly Gly Ile Arg Gly Ser Gly Ala

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

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

- [0312] <210> 44
[0313] <211> 9
[0314] <212> PRT
[0315] <213> 智人
[0316] <400> 44
[0317] Ala Leu Phe Ser Phe Val Thr Ala Leu
[0318] 1 5
[0319] <210> 45
[0320] <211> 9
[0321] <212> PRT
[0322] <213> 智人
[0323] <400> 45
[0324] Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Thr Leu
[0325] 1 5
[0326] <210> 46
[0327] <211> 9
[0328] <212> PRT
[0329] <213> 智人
[0330] <400> 46
[0331] Gly Leu Ser Glu Val Leu Val Gln Ile
[0332] 1 5
[0333] <210> 47
[0334] <211> 11
[0335] <212> PRT
[0336] <213> 智人
[0337] <400> 47
[0338] Thr Leu Ala Glu Val Arg Ala Val Gln Glu Ile
[0339] 1 5 10
[0340] <210> 48
[0341] <211> 9
[0342] <212> PRT
[0343] <213> 智人
[0344] <400> 48
[0345] Val Val Ala Ser Asn Ile Met Glu Val
[0346] 1 5
[0347] <210> 49
[0348] <211> 9
[0349] <212> PRT
[0350] <213> 智人

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

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

[0429] Ile Leu Trp Lys Asp Ile Glu Tyr Val
 [0430] 1 5
 [0431] <210> 61
 [0432] <211> 9
 [0433] <212> PRT
 [0434] <213> 智人
 [0435] <400> 61
 [0436] Ser Leu Met Gly Ile Leu Leu Arg Ile
 [0437] 1 5
 [0438] <210> 62
 [0439] <211> 11
 [0440] <212> PRT
 [0441] <213> 智人
 [0442] <400> 62
 [0443] Val Leu Ala Gly Pro Ala Phe Leu Val Gln Leu
 [0444] 1 5 10
 [0445] <210> 63
 [0446] <211> 11
 [0447] <212> PRT
 [0448] <213> 智人
 [0449] <400> 63
 [0450] Gly Leu Ile Glu Asp His Phe Asp Val Thr Val
 [0451] 1 5 10
 [0452] <210> 64
 [0453] <211> 9
 [0454] <212> PRT
 [0455] <213> 智人
 [0456] <400> 64
 [0457] Leu Leu Ala Ala Ser Val Ala Leu Ala
 [0458] 1 5
 [0459] <210> 65
 [0460] <211> 10
 [0461] <212> PRT
 [0462] <213> 智人
 [0463] <400> 65
 [0464] Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Val Thr Gly Ala
 [0465] 1 5 10
 [0466] <210> 66
 [0467] <211> 9

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

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

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

[0585] <210> 83
[0586] <211> 9
[0587] <212> PRT
[0588] <213> 智人
[0589] <400> 83
[0590] Ile Gln Trp Ser Ile Val Pro Glu Val
[0591] 1 5
[0592] <210> 84
[0593] <211> 9
[0594] <212> PRT
[0595] <213> 智人
[0596] <400> 84
[0597] Tyr Leu Met Asp Glu Gly Ala His Leu
[0598] 1 5
[0599] <210> 85
[0600] <211> 9
[0601] <212> PRT
[0602] <213> 智人
[0603] <400> 85
[0604] Phe Val Met Ser Glu Ile Arg Thr Val
[0605] 1 5
[0606] <210> 86
[0607] <211> 10
[0608] <212> PRT
[0609] <213> 智人
[0610] <400> 86
[0611] Gly Leu Leu Gln Gly Lys Leu Ala Leu Leu
[0612] 1 5 10
[0613] <210> 87
[0614] <211> 8
[0615] <212> PRT
[0616] <213> 智人
[0617] <400> 87
[0618] Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val
[0619] 1 5
[0620] <210> 88
[0621] <211> 9
[0622] <212> PRT
[0623] <213> 智人

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

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

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

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

[0780] 1 5
[0781] <210> 111
[0782] <211> 9
[0783] <212> PRT
[0784] <213> 智人
[0785] <400> 111
[0786] Thr Leu Leu Glu Thr Glu Met Leu Leu
[0787] 1 5
[0788] <210> 112
[0789] <211> 11
[0790] <212> PRT
[0791] <213> 智人
[0792] <400> 112
[0793] Leu Leu Phe Asp His Leu Glu Pro Ile Glu Leu
[0794] 1 5 10
[0795] <210> 113
[0796] <211> 9
[0797] <212> PRT
[0798] <213> 智人
[0799] <400> 113
[0800] Ser Leu Phe Asp Trp Asn Val Lys Leu
[0801] 1 5
[0802] <210> 114
[0803] <211> 9
[0804] <212> PRT
[0805] <213> 智人
[0806] <400> 114
[0807] Ala Leu Ala Val Asn Ile Ser Ala Ala
[0808] 1 5
[0809] <210> 115
[0810] <211> 9
[0811] <212> PRT
[0812] <213> 智人
[0813] <400> 115
[0814] Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
[0815] 1 5
[0816] <210> 116
[0817] <211> 9
[0818] <212> PRT

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

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

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

[0936] <211> 9
[0937] <212> PRT
[0938] <213> 智人
[0939] <400> 133
[0940] Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu
[0941] 1 5
[0942] <210> 134
[0943] <211> 8
[0944] <212> PRT
[0945] <213> 智人
[0946] <400> 134
[0947] Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val
[0948] 1 5
[0949] <210> 135
[0950] <211> 9
[0951] <212> PRT
[0952] <213> 智人
[0953] <400> 135
[0954] Val Val Asp Glu Gly Pro Thr Gly Val
[0955] 1 5
[0956] <210> 136
[0957] <211> 9
[0958] <212> PRT
[0959] <213> 智人
[0960] <400> 136
[0961] Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val
[0962] 1 5
[0963] <210> 137
[0964] <211> 9
[0965] <212> PRT
[0966] <213> 智人
[0967] <400> 137
[0968] Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val
[0969] 1 5
[0970] <210> 138
[0971] <211> 9
[0972] <212> PRT
[0973] <213> 智人
[0974] <400> 138

[0975] Ser Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val
 [0976] 1 5
 [0977] <210> 139
 [0978] <211> 10
 [0979] <212> PRT
 [0980] <213> 智人
 [0981] <400> 139
 [0982] Ile Leu Asn Val Asp Gly Leu Ile Gly Val
 [0983] 1 5 10
 [0984] <210> 140
 [0985] <211> 9
 [0986] <212> PRT
 [0987] <213> 智人
 [0988] <400> 140
 [0989] Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser Val
 [0990] 1 5
 [0991] <210> 141
 [0992] <211> 11
 [0993] <212> PRT
 [0994] <213> 智人
 [0995] <400> 141
 [0996] Leu Leu Val Asp Asp Ser Phe Leu His Thr Val
 [0997] 1 5 10
 [0998] <210> 142
 [0999] <211> 9
 [1000] <212> PRT
 [1001] <213> 智人
 [1002] <400> 142
 [1003] Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val
 [1004] 1 5
 [1005] <210> 143
 [1006] <211> 10
 [1007] <212> PRT
 [1008] <213> 智人
 [1009] <400> 143
 [1010] Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala
 [1011] 1 5 10
 [1012] <210> 144
 [1013] <211> 10

[1014] <212> PRT
[1015] <213> 智人
[1016] <400> 144
[1017] Arg Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val
[1018] 1 5 10
[1019] <210> 145
[1020] <211> 9
[1021] <212> PRT
[1022] <213> 智人
[1023] <400> 145
[1024] Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val
[1025] 1 5
[1026] <210> 146
[1027] <211> 11
[1028] <212> PRT
[1029] <213> 智人
[1030] <400> 146
[1031] Lys Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu
[1032] 1 5 10
[1033] <210> 147
[1034] <211> 11
[1035] <212> PRT
[1036] <213> 智人
[1037] <400> 147
[1038] Ala Leu Ala Asp Lys Glu Leu Leu Pro Ser Val
[1039] 1 5 10
[1040] <210> 148
[1041] <211> 9
[1042] <212> PRT
[1043] <213> 智人
[1044] <400> 148
[1045] Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
[1046] 1 5
[1047] <210> 149
[1048] <211> 12
[1049] <212> PRT
[1050] <213> 智人
[1051] <400> 149
[1052] Ser Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val

[1053]	1	5	10
[1054]	<210> 150		
[1055]	<211> 9		
[1056]	<212> PRT		
[1057]	<213> 智人		
[1058]	<400> 150		
[1059]	Thr Leu Met Pro Asn Ile Asn Lys Leu		
[1060]	1	5	
[1061]	<210> 151		
[1062]	<211> 10		
[1063]	<212> PRT		
[1064]	<213> 智人		
[1065]	<400> 151		
[1066]	Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Arg Ile		
[1067]	1	5	10
[1068]	<210> 152		
[1069]	<211> 10		
[1070]	<212> PRT		
[1071]	<213> 智人		
[1072]	<400> 152		
[1073]	Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val		
[1074]	1	5	10
[1075]	<210> 153		
[1076]	<211> 9		
[1077]	<212> PRT		
[1078]	<213> 智人		
[1079]	<400> 153		
[1080]	Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile		
[1081]	1	5	



图1A



图1B

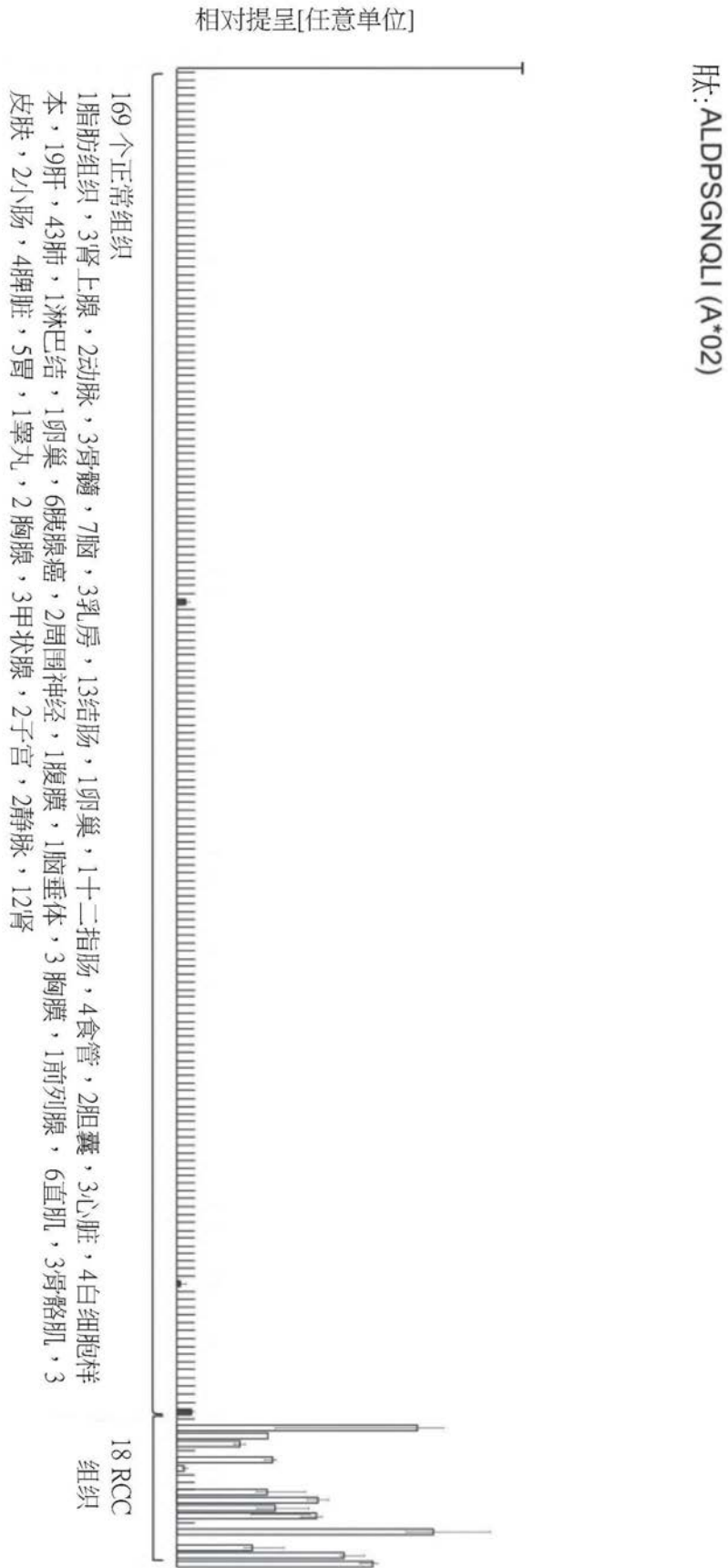


图1C



图1D

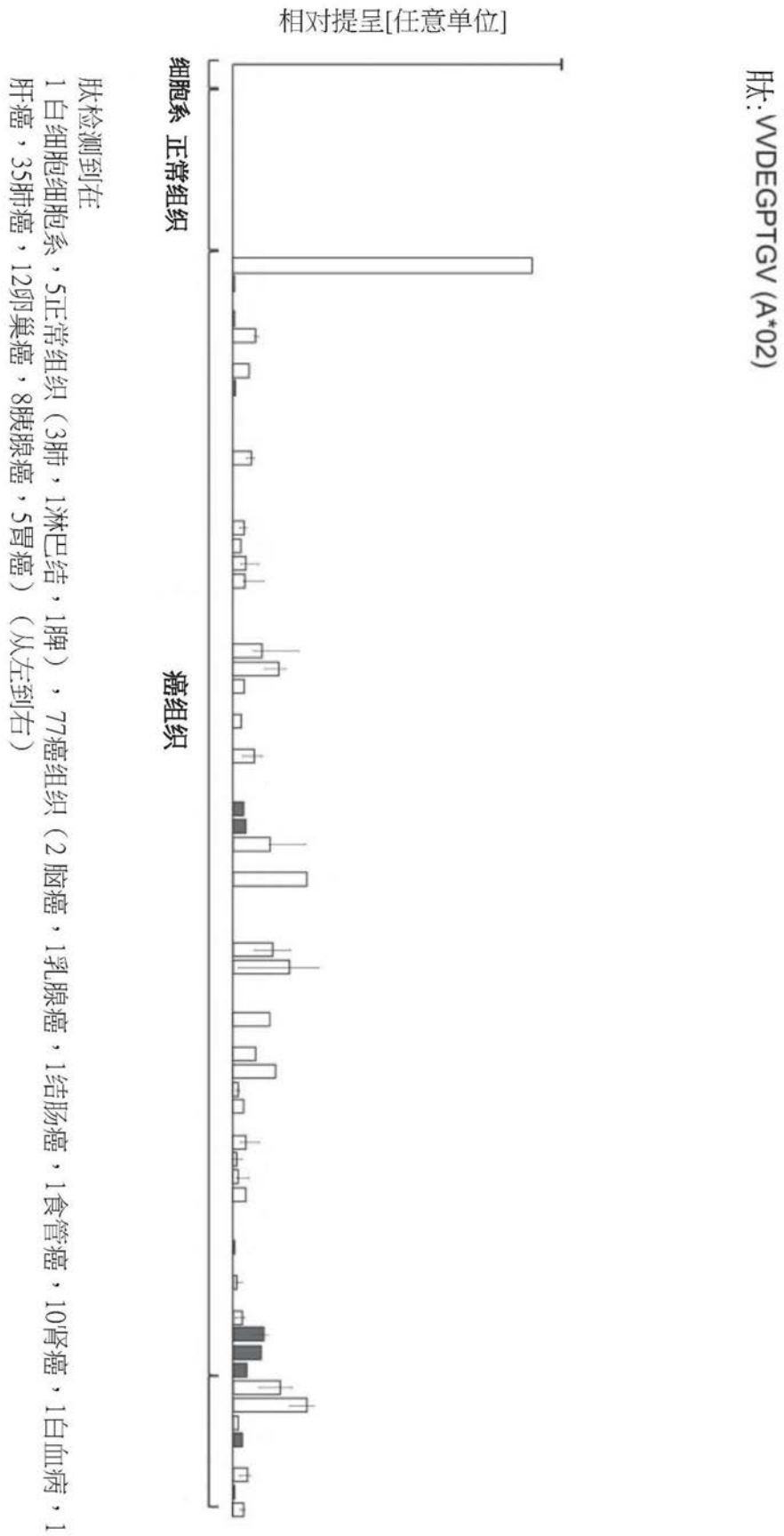


图1E

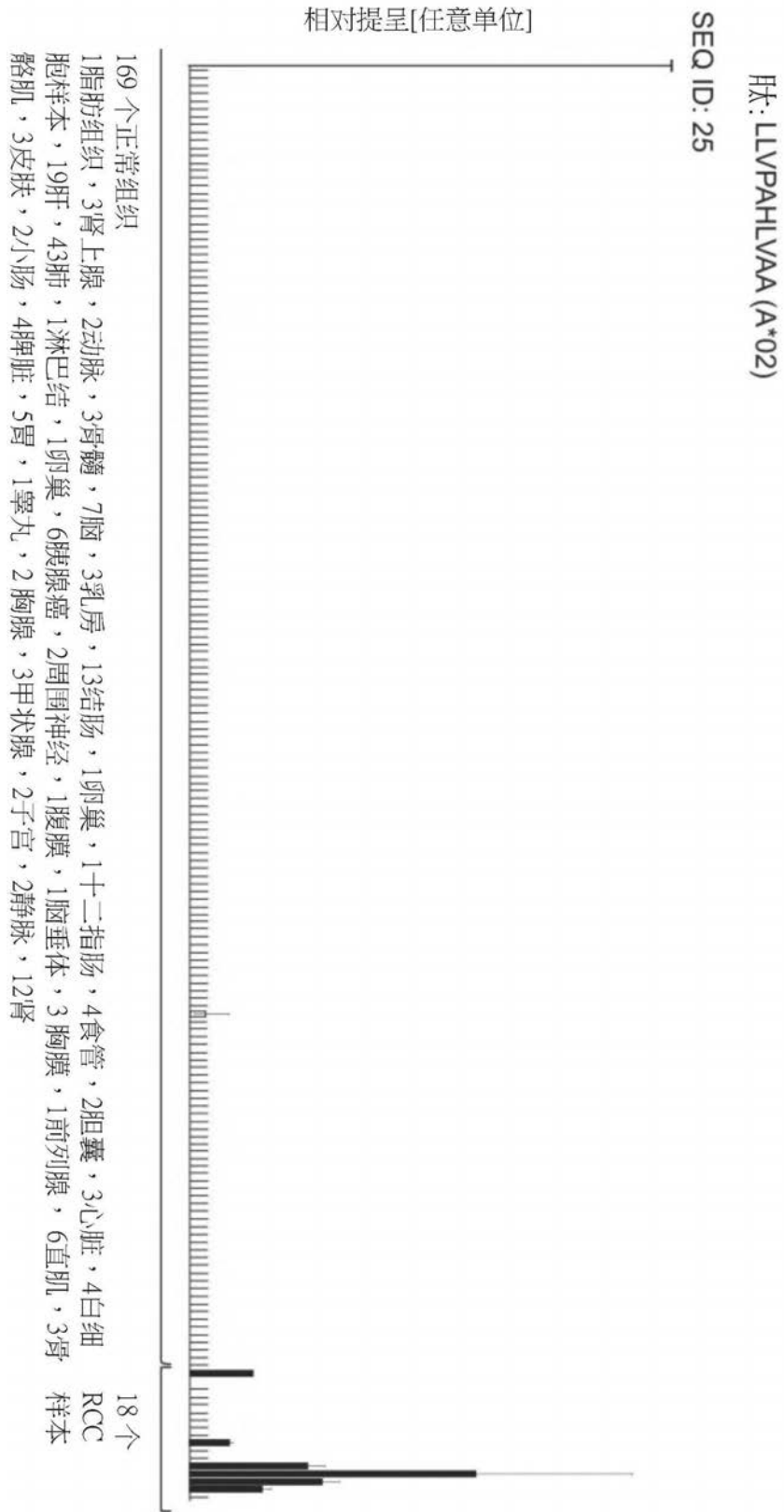


图1F

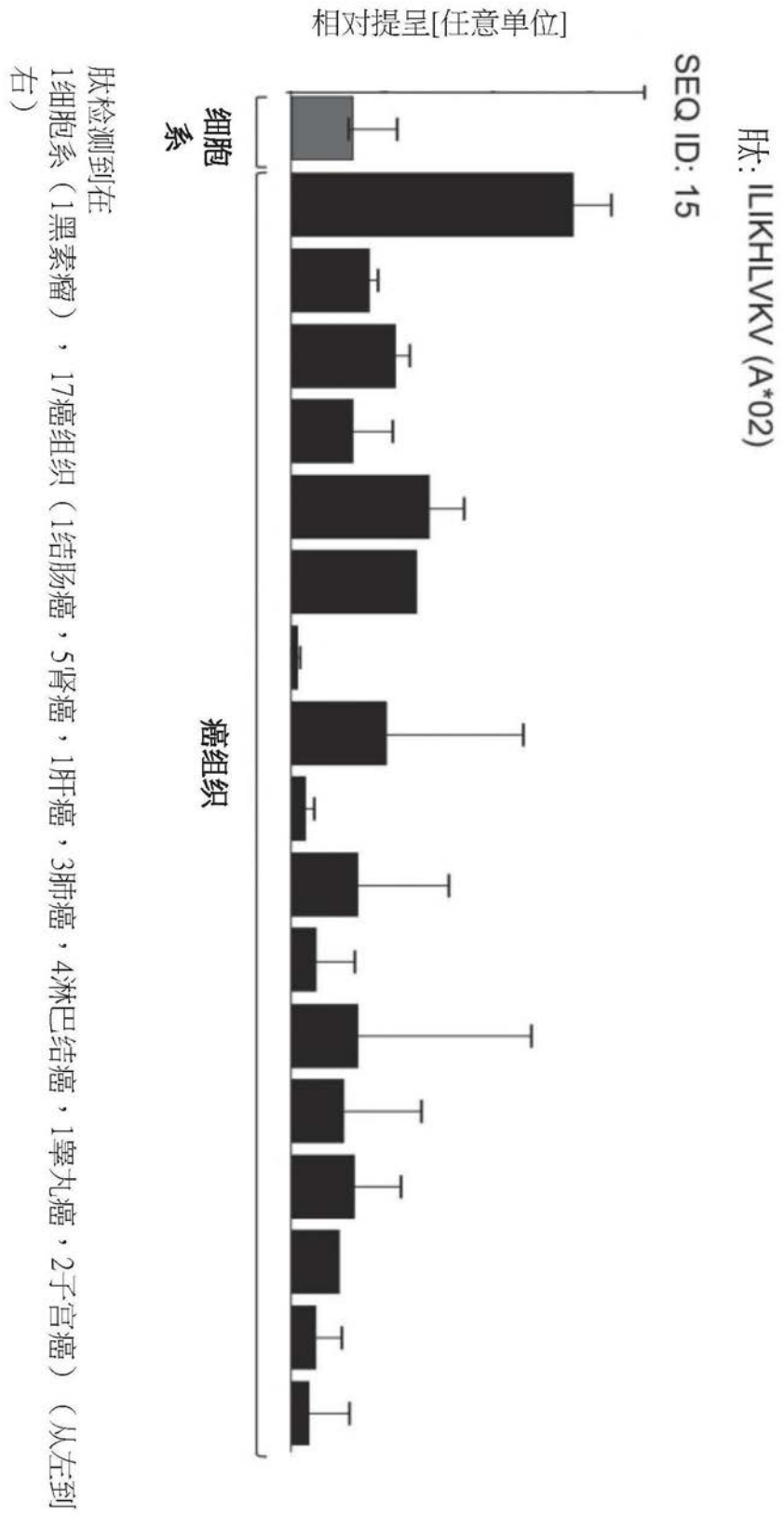


图1G

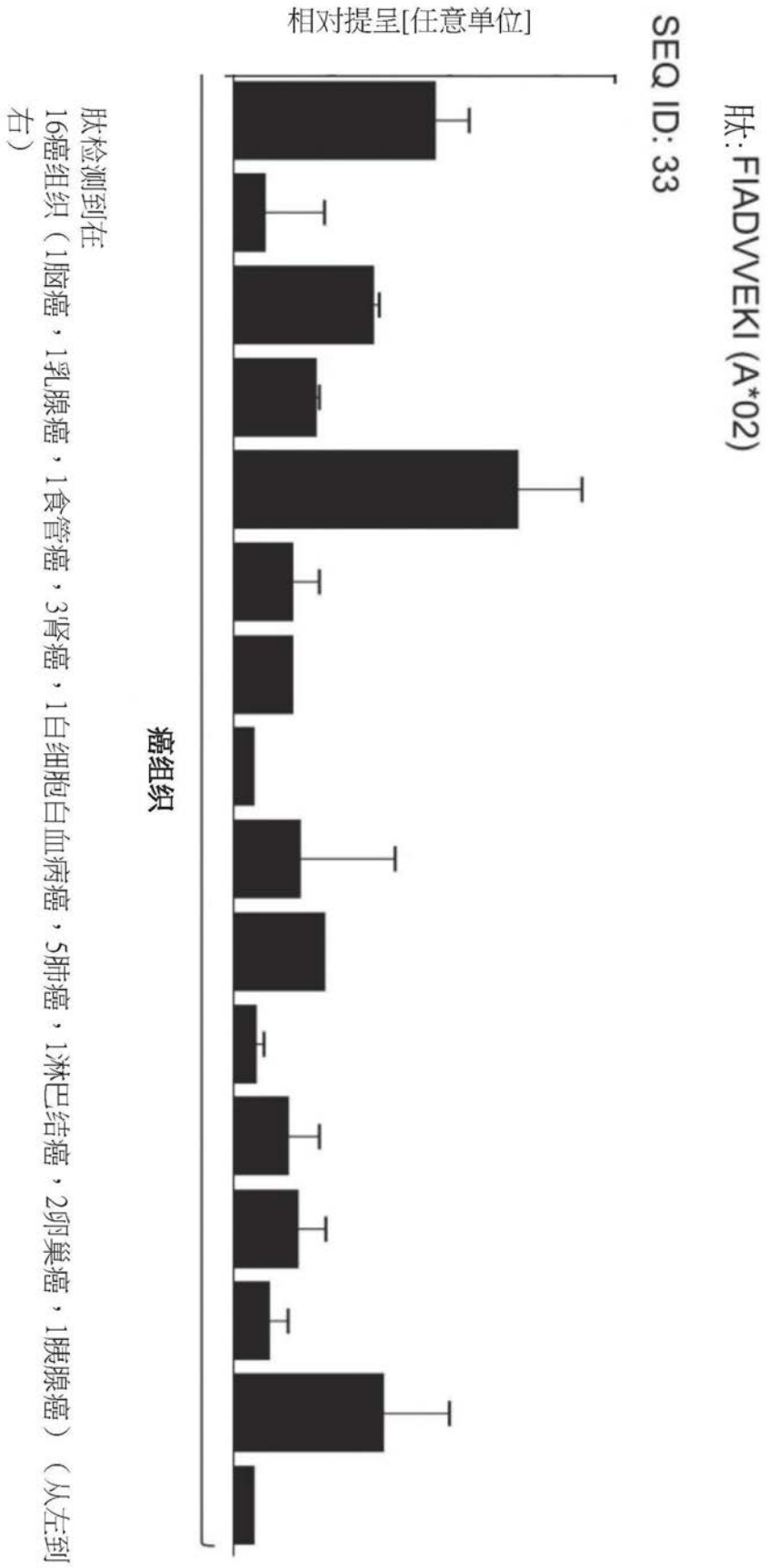


图1H

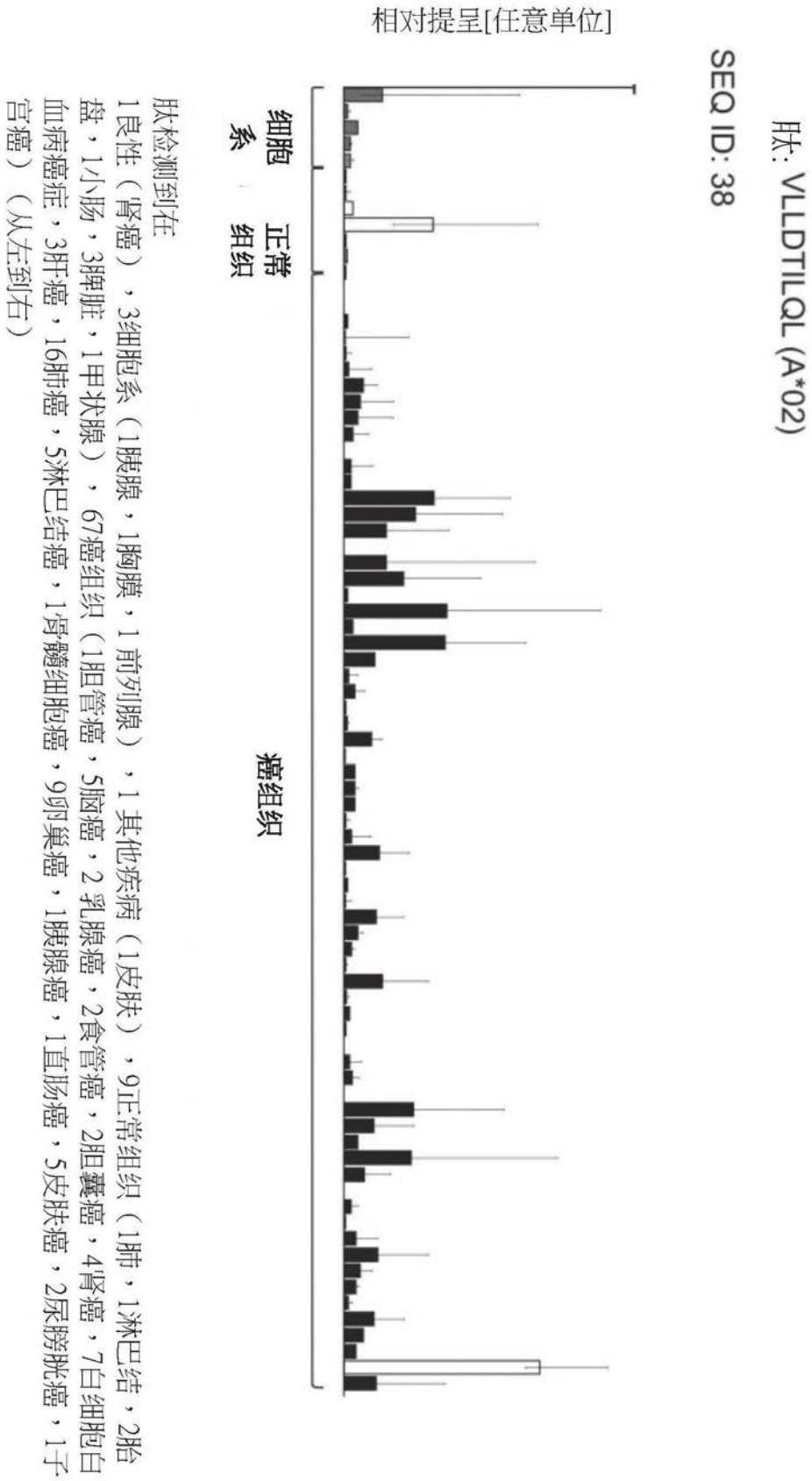


图11

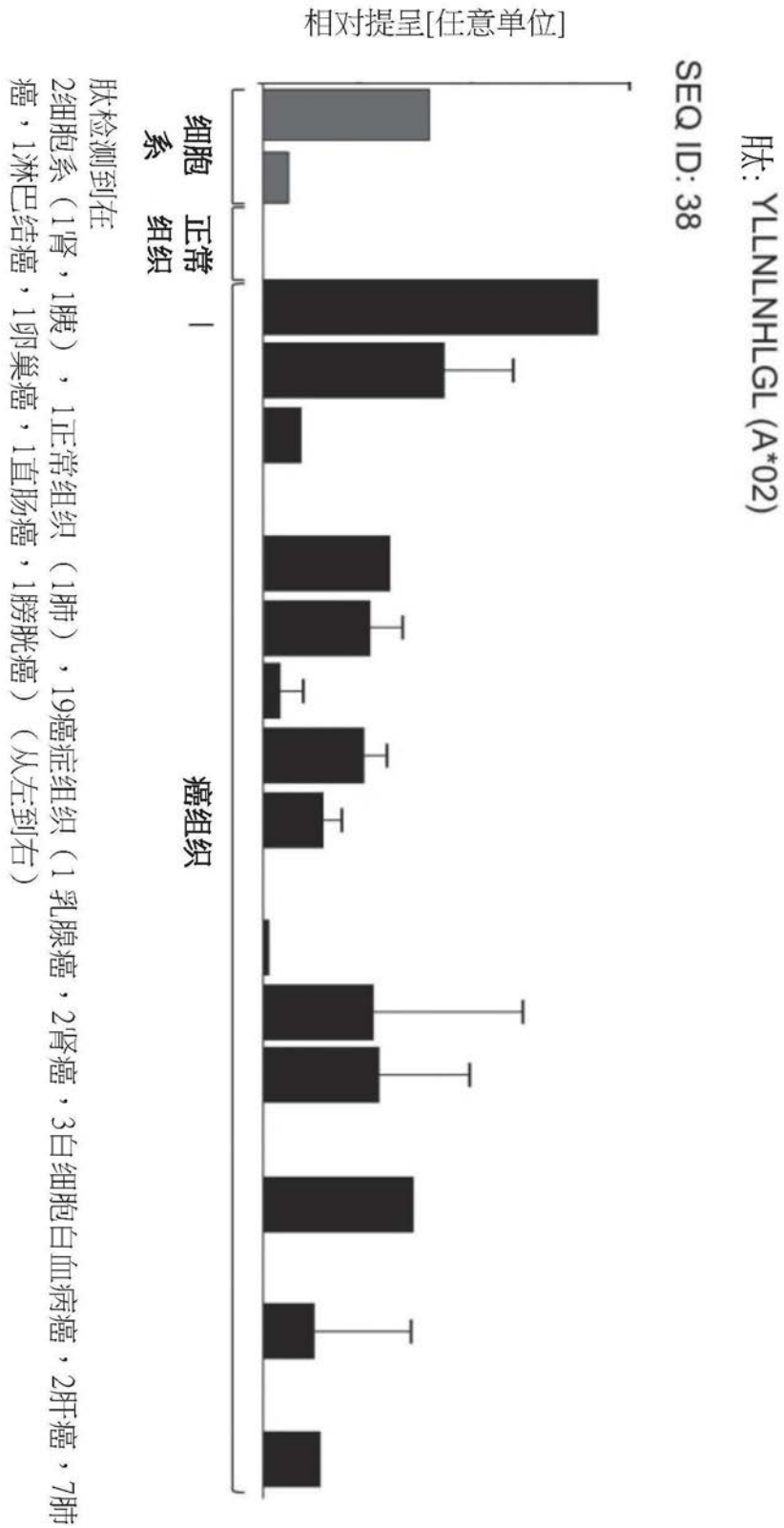


图1J

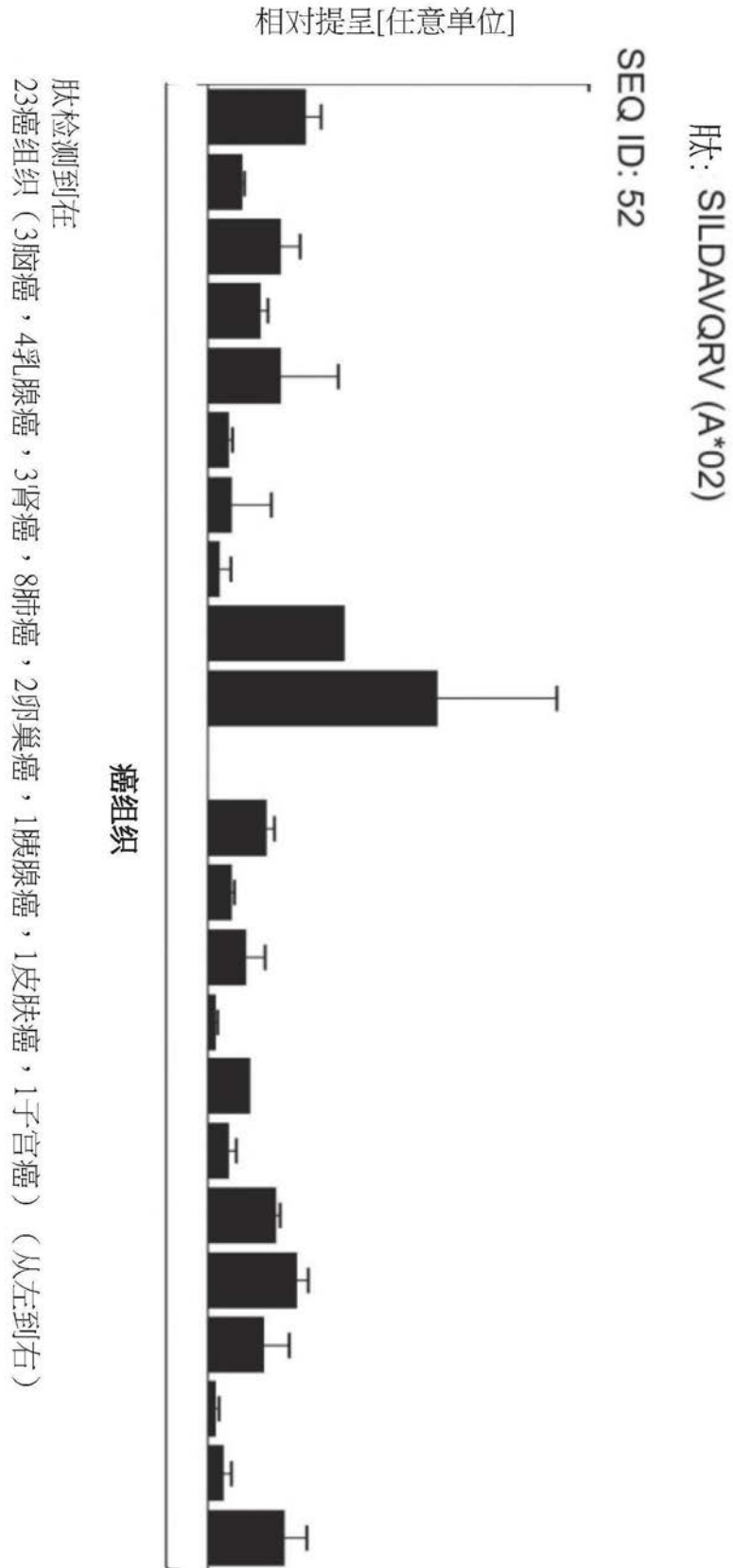


图1K

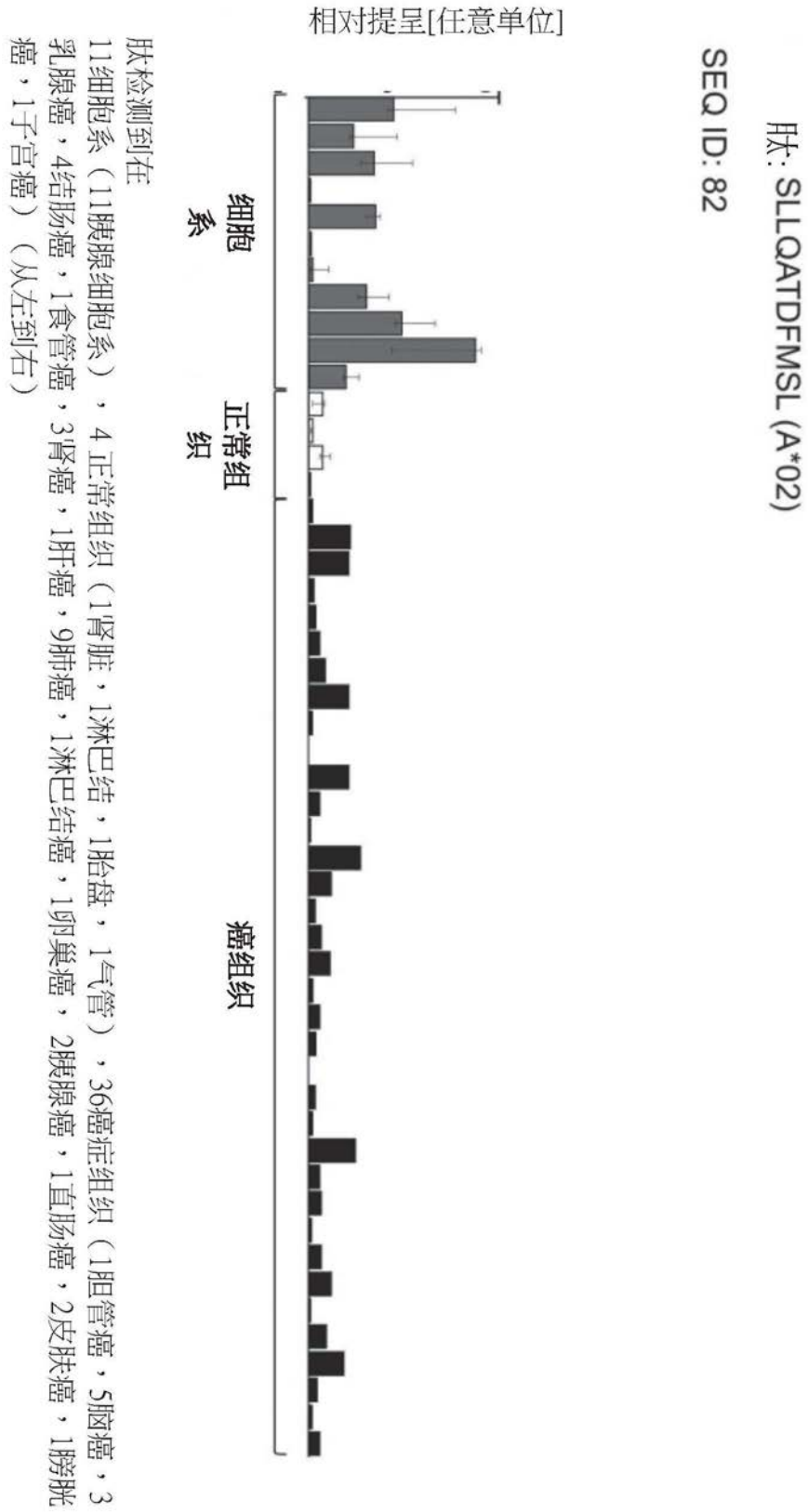


图1L

肽: KIPPVSPSI (A*02)

SEQ ID: 98

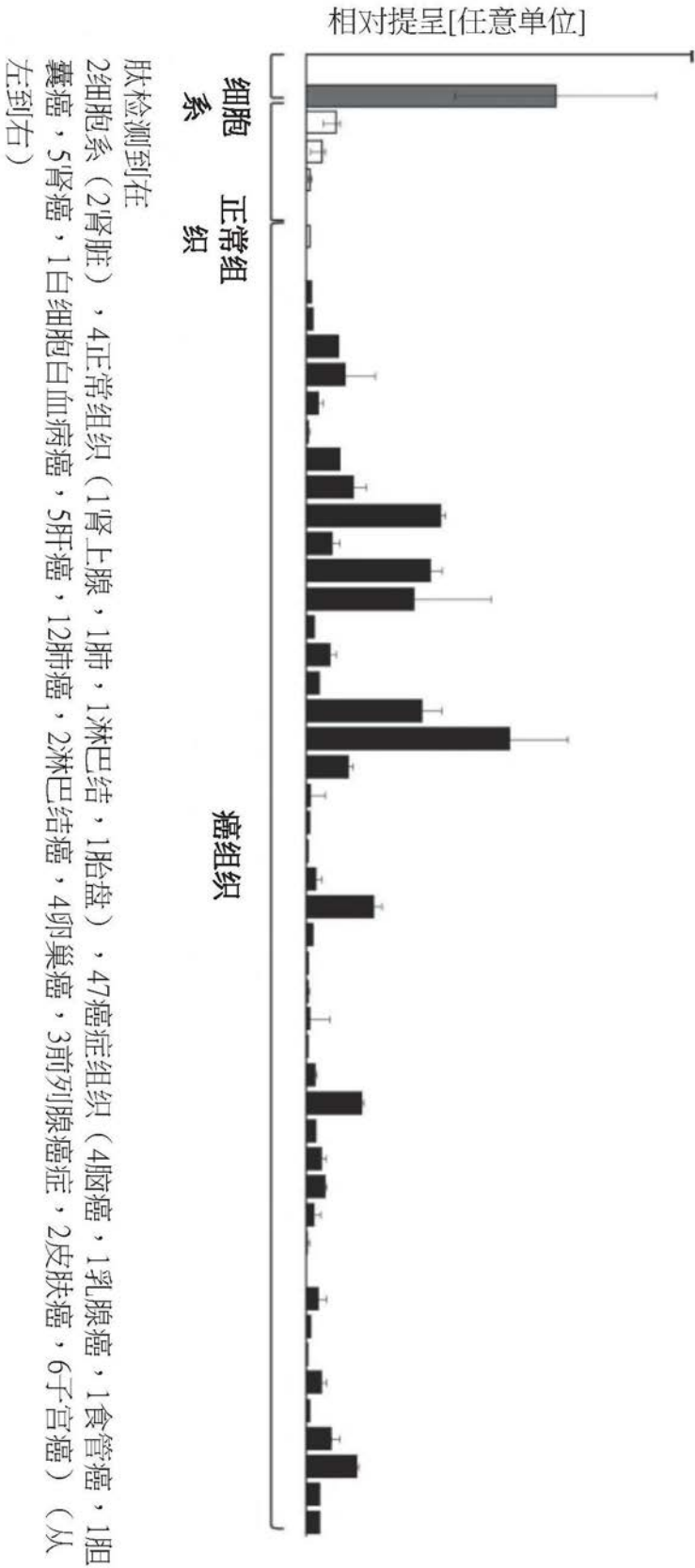


图1M

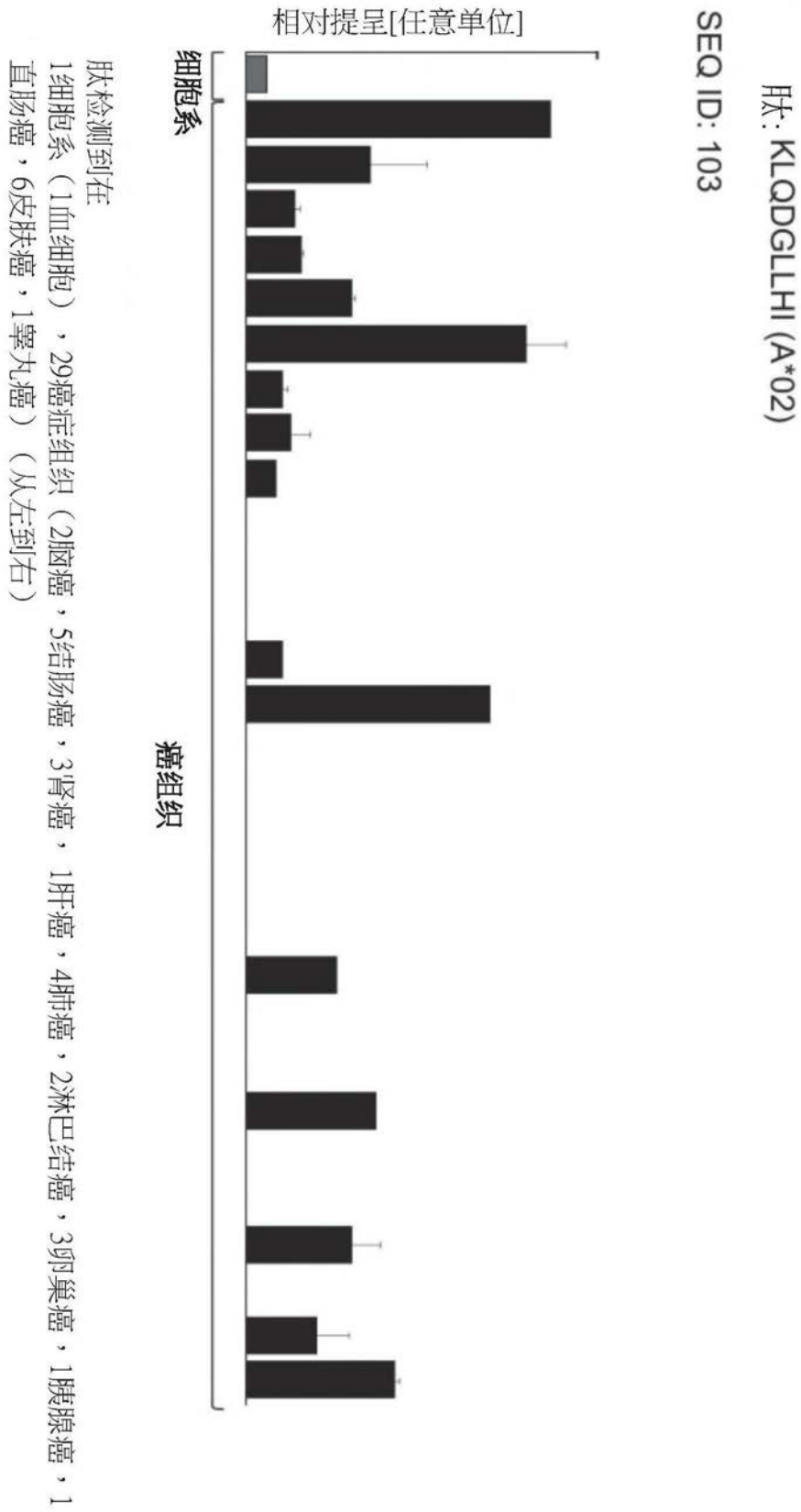


图1N

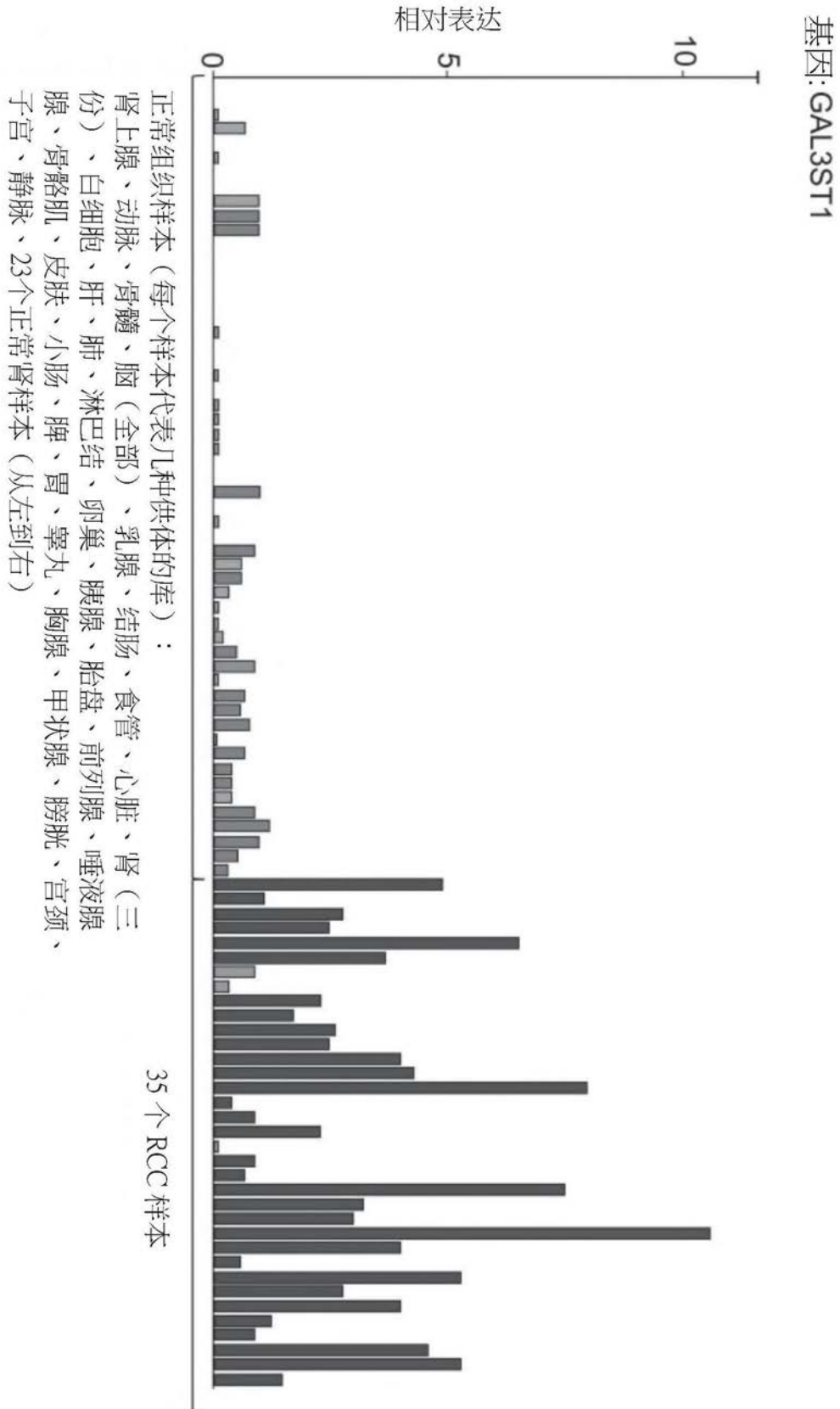


图2A

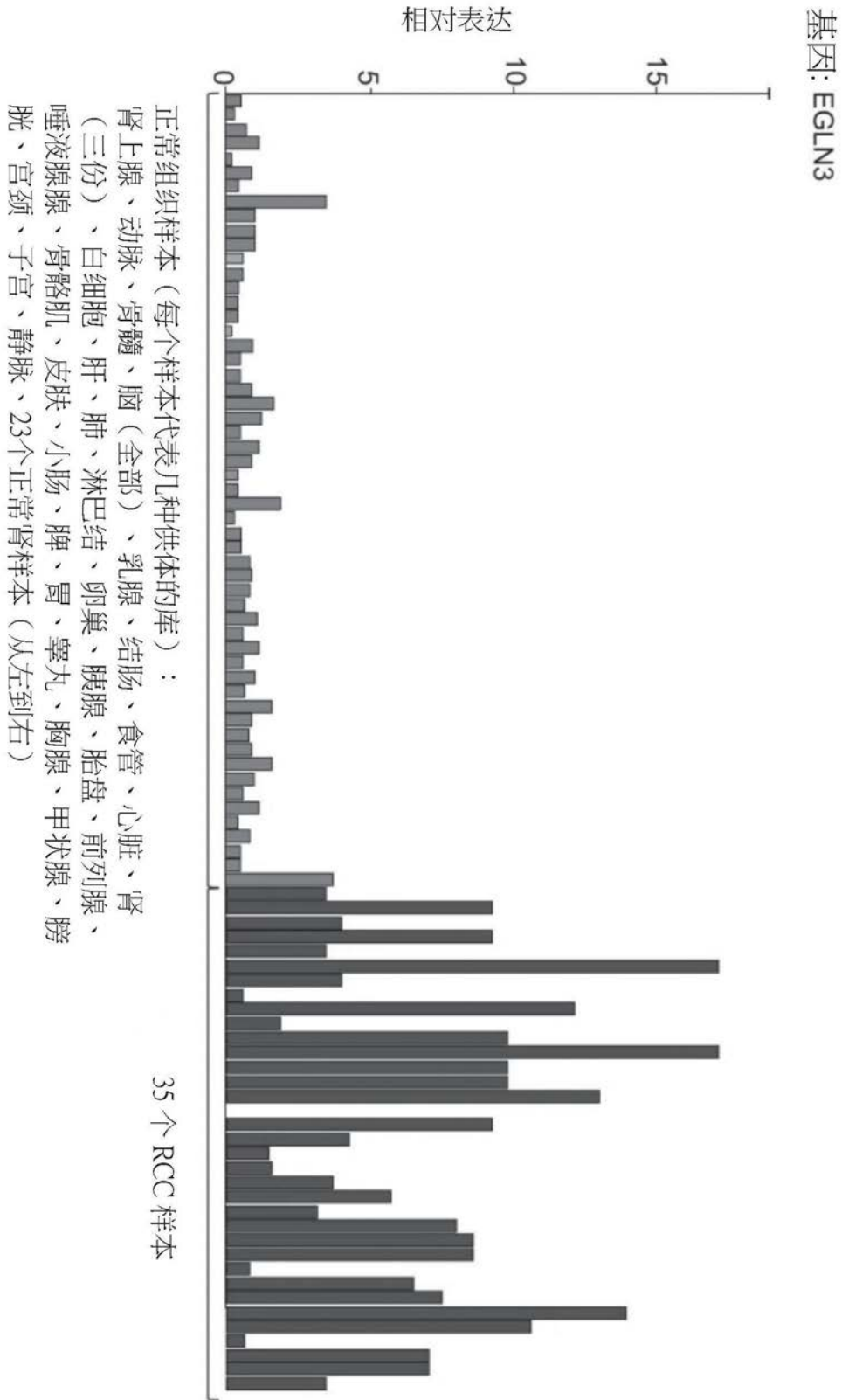


图2B

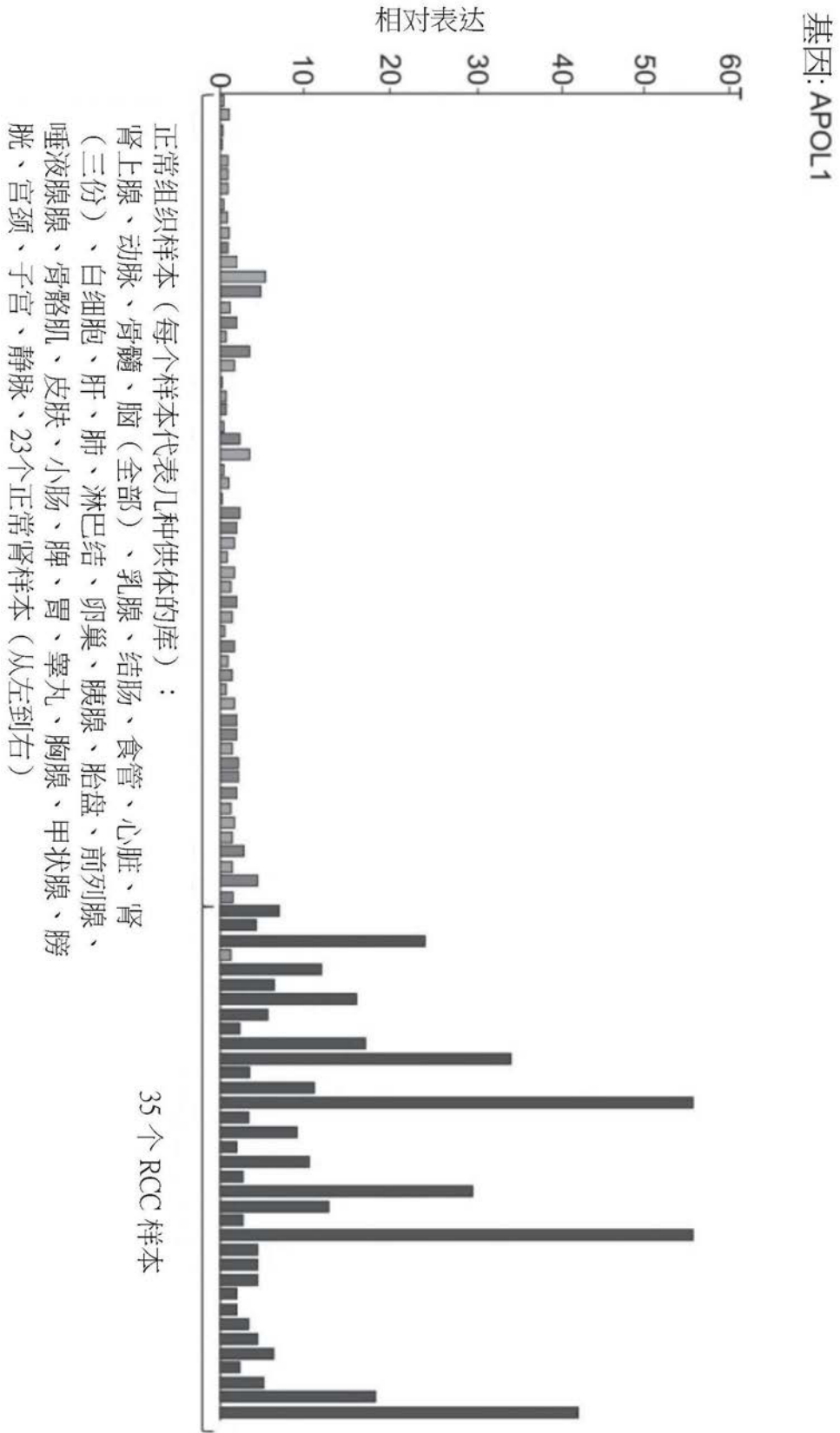


图2C

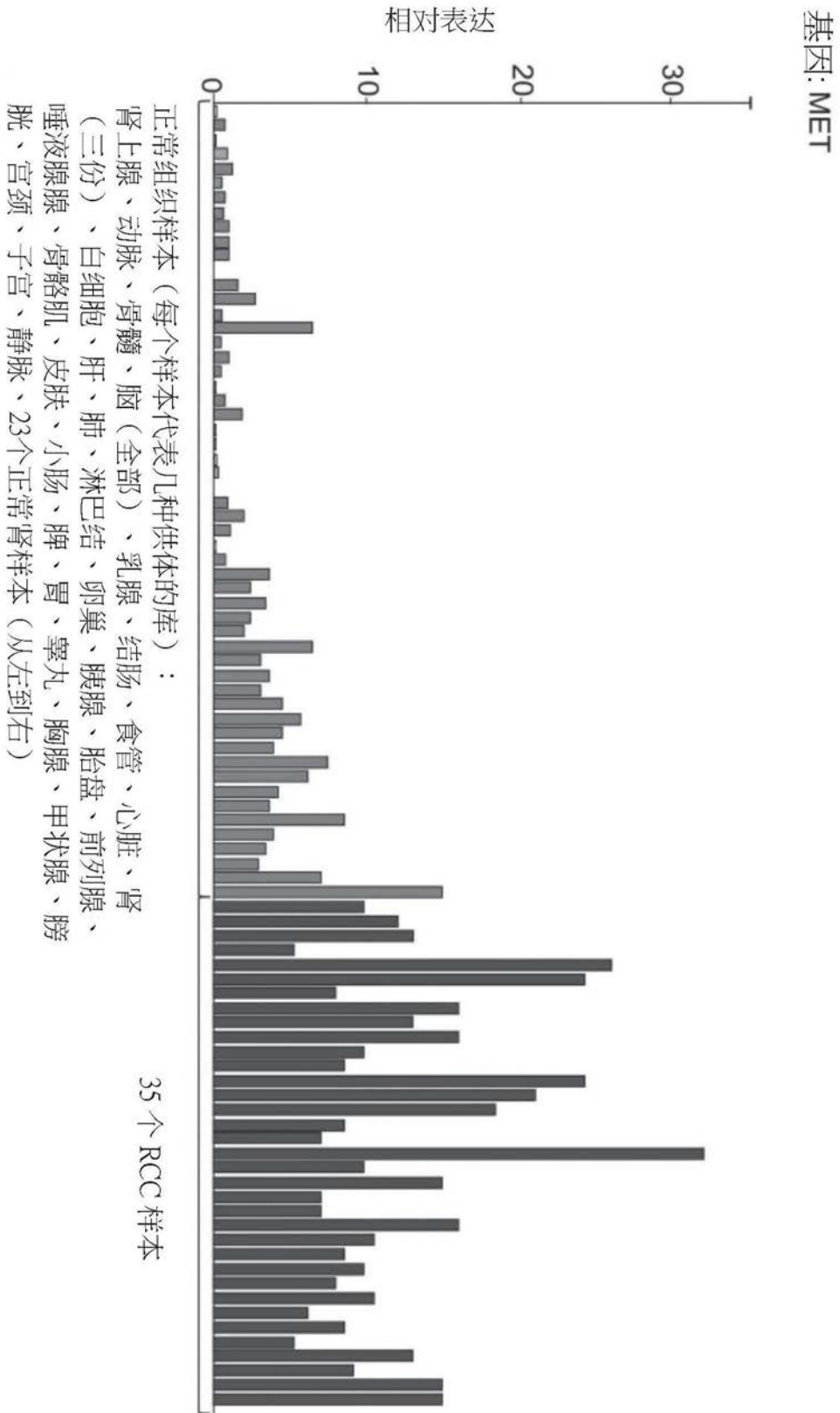


图2D

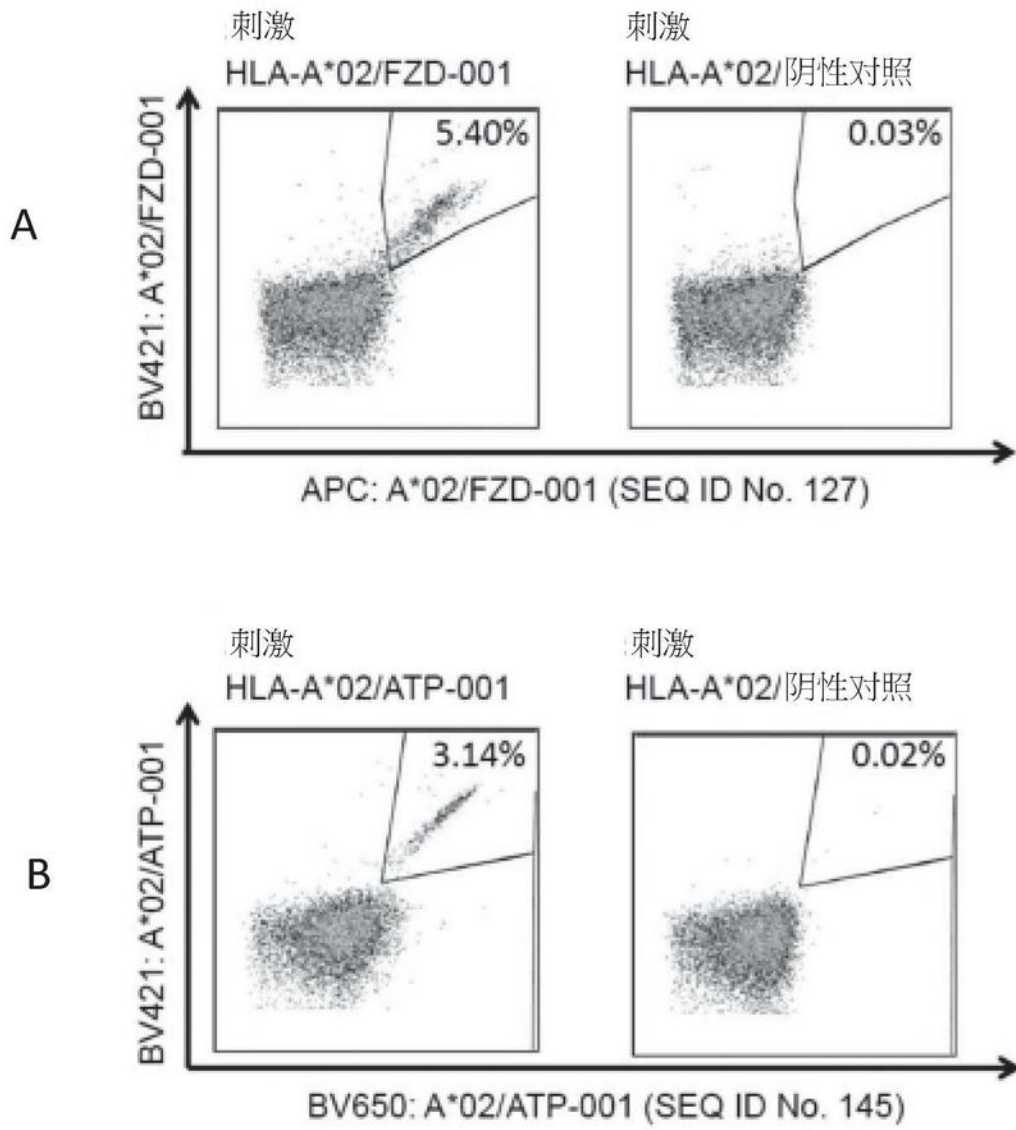


图3

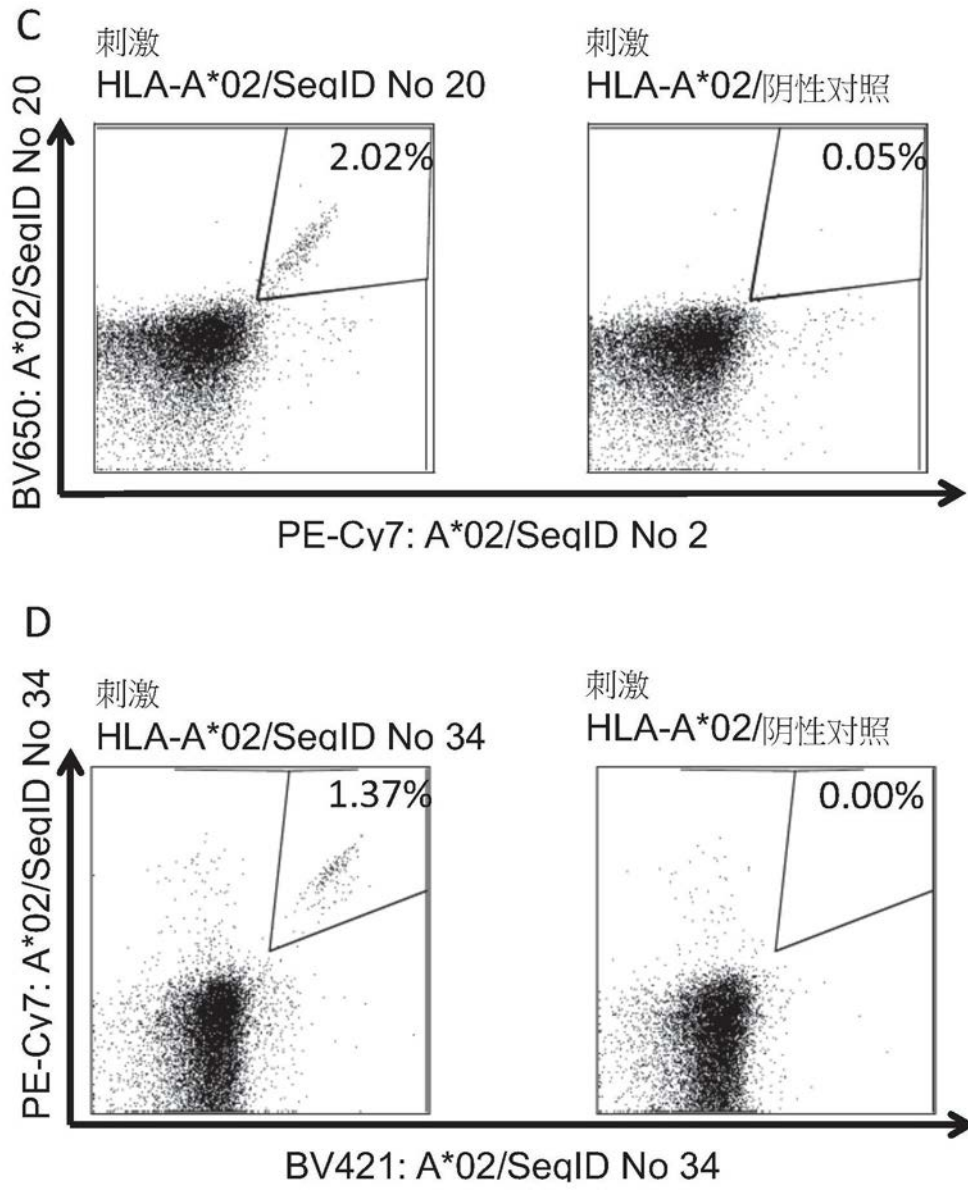


图3(续)

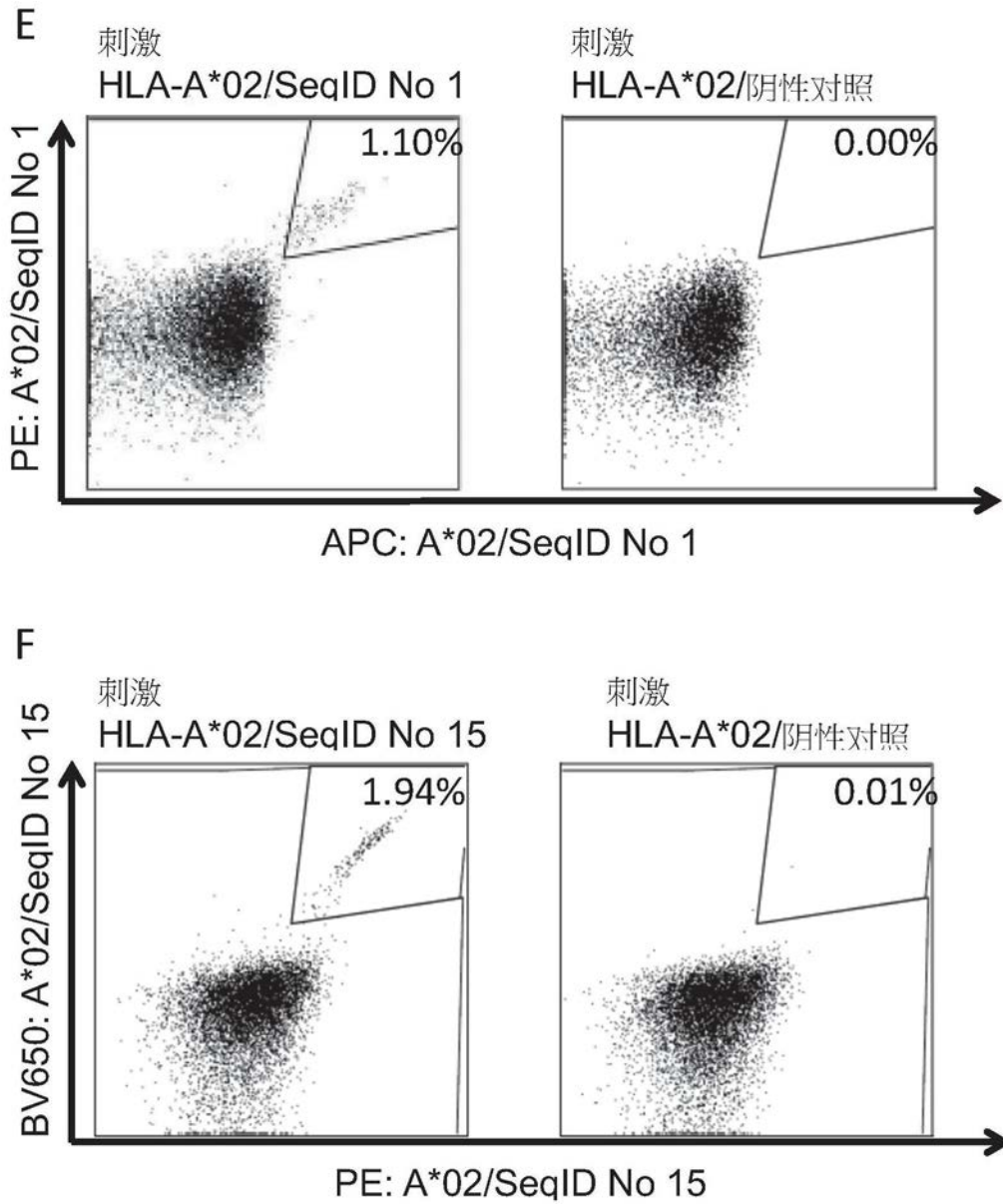


图3(续)