



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102112147 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 21

(21) 申请号 200980130349. 4

(22) 申请日 2009. 06. 01

(30) 优先权数据

61/058, 180 2008. 06. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 01. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/045866 2009. 06. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/149021 EN 2009. 12. 10

(73) 专利权人 达纳 - 法伯癌症研究所股份有限

公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 尼基尔 . C. 穆恩希

肯尼斯 . C. 安德森 裴洙恩

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101048509 A, 2007. 10. 03,

李若溪 . MHC I 类分子及其结合抗原肽的研究进展 . 《重庆师范大学学报 (自然科学版)》. 1996, 第 13 卷 (第 2 期), 43-50.

Kenneth C. Parker et al. scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. 《Journal of Immunology》. 1994, 第 152 卷 (第 1 期), 163-175.

审查员 雷锋林

权利要求书1页 说明书43页
序列表6页 附图23页

(54) 发明名称

XPB1、CD138、和 CS1 肽

(57) 摘要

本文公开了多个特征,包括免疫原性 XPB1-、CD138-、和 CS1- 衍生肽 (及其药物组合物) 等。所述肽可以在多种方法中使用,诸如用于诱导免疫应答的方法、用于生成抗体的方法、及用于治疗癌症 (例如浆细胞病症,诸如多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症) 的方法。所述肽还可以包括在 MHC 分子多聚体组合物中,而且还可以在例如用于在一群细胞中检测 T 细胞的方法中使用。

1. 一种药物组合物,其包含至少两种如下述的肽:
 - (I) 由 SEQ ID NO:1-10 任一的氨基酸序列组成的肽,
 - (II) 由 SEQ ID NO:11-14 任一的氨基酸序列组成的肽,
 - (III) 由 SEQ ID NO:15-18 任一的氨基酸序列组成的肽。
2. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述肽之一由 SEQ ID NO:1-10 任一的氨基酸序列组成。
3. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述肽之一由 SEQ ID NO:11-14 任一的氨基酸序列组成。
4. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述肽之一由 SEQ ID NO:15-18 任一的氨基酸序列组成。
5. 权利要求 1 的药物组合物,其包含至少三种所述肽。
6. 权利要求 1 的药物组合物,其包含至少四种所述肽。
7. 权利要求 1-6 任一的药物组合物,其中两或多种肽由以下组成:
SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 ;和
SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。
8. 权利要求 1-6 任一的药物组合物,其中所述肽之一由 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列组成。
9. 权利要求 1-6 任一的药物组合物,其中所述肽之一由 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列组成。
10. 权利要求 7 的药物组合物,还包含由 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列组成的肽。
11. 权利要求 7 的药物组合物,还包含由 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列组成的肽。
12. 权利要求 7 的药物组合物,还包含由 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列组成的肽、以及由 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列组成的肽。
13. 权利要求 1-12 任一的药物组合物,还包含药学可接受的载体。
14. 权利要求 1-12 任一的药物组合物,还包含一或多种治疗剂,诊断剂,预防剂,和免疫刺激剂。
15. 权利要求 1-12 任一的药物组合物,其中所述组合物是用于治疗或预防受试者中的癌症的组合物。
16. 权利要求 15 的药物组合物,其中所述癌症是浆细胞癌。
17. 权利要求 16 的药物组合物,其中所述浆细胞癌是多发性骨髓瘤。
18. 权利要求 15 的药物组合物,其中所述受试者患有或疑似患有癌症,或者有发生或复发癌症的风险,所述受试者有发生活动性多发性骨髓瘤的风险,和 / 或所述受试者患有意义不明的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS)。
19. 试剂盒,包含权利要求 1-12 任一的药物组合物,或至少两种根据权利要求 1-12 任一的肽,还包含对受试者施用所述组合物的用法说明。

XBP1、CD138、和 CS1 肽

[0001] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0002] 本申请中描述的研究得到了资金 No. P50-100707、P01-78378、和 R01-50947 的支持,每项均来自(美国)国立卫生研究院。因此,政府对本发明具有某些权利。

[0003] 发明背景

[0004] 多发性骨髓瘤和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom' smacroglobulinemia)是两种血液学癌症,每年在美国分别影响大约 45,000 和 1,500 人。虽然这两种病症都常常使用例如单独的或与骨髓移植组合的化疗来治疗,但是罹患这些病症之一的患者的预后通常较差。因此,迫切需要有效的治疗和/或预防方案。

[0005] 发明概述

[0006] 本公开内容涉及免疫原性 X- 框蛋白 1(XBP1)、CD138、和 CD2 子集 1(CS1) 衍生肽及使用所述肽的方法。发现所述肽具有多种特性,包括例如升高的对 HLA-A2 分子的亲和力、升高的在 HLA-A2 的肽结合沟内的稳定性、及在 MHC 分子的环境中在细胞(例如癌细胞)的表面上表达时诱导 T 细胞活化和增殖的能力。

[0007] 根据上述描述会显然的是,所述肽(及其药物组合物)可用于多种应用,诸如用于诱导免疫应答的方法、用于活化 T 细胞的方法、用于生成抗体的方法、及用于治疗例如癌症(例如浆细胞癌症,诸如多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症)的方法。此外,所述肽可以包括在 MHC 分子多聚体组合物中,其可用于例如在一群细胞中检测肽特异性 T 细胞。

[0008] 一方面,本公开内容的特征为一种分离的肽,其由与 SEQ ID NO:1-18 任一至少 66(例如至少 66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,或 99)% 相同的氨基酸序列组成,其中所述肽结合主要组织相容性复合物(MHC)分子。所述肽可以结合主要组织相容性复合物(MHC)分子,诸如 MHC I 类或 II 类分子。

[0009] 另一方面,本公开内容的特征为一种分离的肽,其由与 SEQ ID NO:1-18 任一至少 66(例如至少 66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,或 99)% 相同的氨基酸序列组成。所述肽可以在与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合时受到 T 细胞上抗原特异性 T 细胞受体识别。

[0010] 另一方面,本公开内容的特征为一种分离的肽,其包含:由与 SEQ IDNO:1-18 任一至少 66(例如至少 66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,或 99)% 相同的肽组成的第一氨基酸序列;和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。

[0011] 另一方面,本公开内容的特征为一种分离的肽,其由 SEQ ID NO:1-18 任一的氨基酸序列组成,但是具有不超过四处替代。所述不超过四处替代可以是保守的或非保守的。

[0012] 又一方面,本公开内容的特征为一种分离的肽,其包含:由 SEQ IDNO:1-18 任一组成但是具有不超过四处替代的第一氨基酸序列;和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序

列。所述不超过四处替代可以是保守的或非保守的。

[0013] 在一些实施方案中,本文中描述的任何分离的肽可以结合主要组织相容性复合物(MHC)分子(例如MHC I类或II类分子)。所述MHC分子可以是例如HLA-A2分子。所述MHC分子可以是例如人MHC分子。

[0014] 在一些实施方案中,本文中描述的任何分离的肽可以在与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合时受到T细胞上抗原特异性T细胞受体识别。

[0015] 在本文中描述的任何分离的肽的一些实施方案中,所述第二氨基酸序列可以包含或者是靶向多肽、免疫刺激性分子、免疫球蛋白或其抗原结合片段、免疫球蛋白分子的Fc受体结合区、或载体多肽。所述靶向多肽可以是例如将上述分离的肽靶向抗原呈递细胞(例如树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、或B细胞)的靶向多肽。所述免疫刺激性分子可以是例如细胞因子或T辅助者表位(T helper epitope)。所述免疫球蛋白可以是例如单链Fv免疫球蛋白片段或整个免疫球蛋白分子。所述载体肽可以包含或者是KLH(匙孔藻血蓝蛋白)多肽。

[0016] 在一些实施方案中,本文中描述的任何分离的肽可以含有接头序列。所述接头序列抗原连接第一氨基酸序列与第二氨基酸序列。所述接头序列可以包含至少一个(例如1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或10个或更多个)蛋白酶切割位点或者由其组成。

[0017] 在本文中描述的任何分离的肽的一些实施方案中,所述第二氨基酸序列可以在所述第一氨基酸序列的氨基端或羧基端。

[0018] 在一些实施方案中,本文中描述的任何分离的肽可以带有可检测的标记。

[0019] 又一方面,本公开内容的特征为:(i)一种分离的核酸,其本文中描述的任何分离的肽;(ii)一种载体,其包含(i)的分离的核酸;或(iii)一种培养细胞,其包含(ii)的载体。所述载体可以可操作连接至表达控制序列。所述培养细胞可以是原核细胞或真核细胞。所述培养细胞可以是例如真菌细胞、植物细胞、或动物细胞(例如线虫细胞、昆虫细胞、鸟细胞、鱼细胞、或哺乳动物细胞(例如人细胞))。所述培养细胞可以是免疫细胞诸如本文中描述的任何免疫细胞。

[0020] 另一方面,本公开内容的特征为一种生产肽的方法。所述方法包括在允许所述肽表达的条件下培养本文中描述的任何培养细胞的步骤。所述方法还可以包括自所述细胞或自培养所述细胞的培养液分离所述肽的步骤。

[0021] 另一方面,本公开内容的特征为一种药物组合物,其包含一种或多种本文中描述的任何分离的肽和药学可接受载体。所述组合物还可以包括例如一种或多种治疗剂、诊断剂、或预防剂、或免疫刺激剂。免疫刺激剂包括但不限于例如T辅助者表位、改变的肽配体、佐剂、或本文中描述的任何其它免疫刺激剂。所述T辅助者表位可以是例如PADRE序列或通用破伤风类毒素T辅助(TT Th)表位。所述佐剂可以选自下组:弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、明矾、To11受体的配体、QS21、RIBI、霍乱毒素(CT)、大肠杆菌热不稳定毒素(LT)、突变体CT(MCT)、和突变体大肠杆菌热不稳定毒素(MLT)。

[0022] 又一方面,本公开内容的特征为一种试剂盒,其包含:(i)一种或多种本文中描述的任何分离的肽;和关于对受试者施用所述肽的用法说明;和/或(ii)一种或多种编码所述分离的肽的分离的核酸、一种或多种含有所述分离的核酸的载体、或一种或多种含有所述载体的培养细胞,和关于生成所述分离的肽的用法说明。

[0023] 在一些实施方案中,所述试剂盒还可以包括例如一种或多种药学可接受载体、一种或多种免疫刺激剂、或一种或多种治疗剂、诊断剂、或预防剂。所述一种或多种免疫刺激剂可以选自下组:T 辅助者表位、改变的肽配体、和佐剂。

[0024] 另一方面,本公开内容的特征为一种制品,其包含:容器;和装在所述容器内的组合物,其中所述组合物包含用于在哺乳动物中诱导免疫应答的活性组分,其中所述活性组分包含一种或多种本文中描述的任何分离的肽。所述容器可以有标签指明所述组合物用于在哺乳动物中诱导免疫应答。所述标签可以进一步指明所述组合物要施用于具有、怀疑具有、或有风险发生多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的哺乳动物。所述制品还可以包括关于对所述哺乳动物施用所述组合物的用法说明。所述组合物可以是例如在溶液中、为干燥的、或冻干的。

[0025] 又一方面,本公开内容的特征为一种用于在受试者中诱导免疫应答的方法,该方法包括对受试者投递一种或多种(例如 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,或 18 种)本文中描述的任何分离的肽的步骤。所述方法还可以包括在对所述受试者投递所述一种或多种肽后确定所述受试者中是否发生免疫应答的步骤。可以将所述一种或多种肽作为药物组合物对所述受试者投递。所述受试者可以是例如哺乳动物(例如人)或本文中描述的任何其它受试者。所述受试者可以具有、怀疑具有、有风险发生多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、或处于多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症好转期(remission)。

[0026] 在一些实施方案中,所述方法可以包括确定所述受试者的多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的一个或多个浆细胞是否表达 XBP1、CD138、或 CS1。

[0027] 在一些实施方案中,所述方法可以包括对所述受试者施用一种或多种化疗剂、一种或多种形式的电离辐射、或一种或多种免疫治疗剂。所述一种或多种形式的电离辐射可以是例如伽马辐照、X 辐照、或贝塔辐照。所述一种或多种化疗剂可以选自下组:顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、丙卡巴肼(procarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、喜树碱(camptothecin)、阿霉素(adriamycin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、美法仑(melphalan)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、白消安(bisulfan)、亚硝基脲(nitrosurea)、放线菌素 D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、verampil、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、泰素(taxol)、反铂(transplatinum)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、长春新碱(vincristin)、长春碱(vinblastin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、和上述任一的类似物。所述方法还可以包括对所述受试者施用一种或多种免疫刺激剂。

[0028] 在一些实施方案中,所述投递包括对所述受试者施用所述一种或多种肽。在一些实施方案中,所述投递包括对所述受试者施用一种或多种核酸,其每一种包含编码所述一种或多种肽的核苷酸序列,所述核苷酸序列可操作连接至表达控制序列。所述核酸可以在经所述核酸转染且表达所述一种或多种肽的重组细胞中。所述重组细胞可以通过转染自所述受试者获得的细胞得到的经转染细胞或其后代。所述重组细胞可以是抗原呈递细胞,诸如但不限于树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、或 B 细胞。

[0029] 在上文描述的任何方法的一些实施方案中,所述投递包括:使所述一种或多种肽接触细胞;并在使所述一种或多种肽接触所述细胞后,对所述受试者投递所述细胞。所述细胞可以是例如抗原呈递细胞,诸如本文中描述的任何抗原呈递细胞。所述细胞可以是例如自所述受试者获得的细胞或其后代。在一些实施方案中,所述细胞可以是自与所述受试者同一物种的另一受试者获得的细胞或其后代。所述另一受试者可以表达至少一种与所述受试者共同的 MHC 分子。所述至少一种 MHC 分子可以是例如 MHC I 类分子,诸如 HLA-A2 分子。

[0030] 在一些实施方案中,所述方法还可以包括在对所述受试者施用所述一种或多种肽前,自所述受试者获得包含一个或多个造血干细胞的一群细胞。

[0031] 另一方面,本公开内容的特征为一种用于治疗多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的方法。所述方法包括对受试者施用一种或多种(例如 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,或 18 种)本文中描述的任何肽的步骤,其中所述受试者具有或有风险发生多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症。

[0032] 另一方面,本公开内容的特征为一种用于为需要治疗的哺乳动物选择疗法的方法。所述方法包括下述步骤:确定哺乳动物中的癌症的一个或多个癌细胞是否表达 XBP1,其中所述癌症是多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症;并若一个或多个癌细胞表达 XBP1,则选择一种或多种选自下组的肽作为所述哺乳动物的治疗剂:(a) 一种分离的肽,其由与 SEQ ID NO:1-10 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成;(b) 一种分离的肽,其由 SEQ ID NO:1-10 任一氨基酸序列组成,具有不超过四处替代;(c) 一种分离的肽,其包含:(i) 由 SEQ ID NO:1-10 任一组成,具有不超过四处替代的第一氨基酸序列;和(ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列;和(d) 一种分离的肽,其包含:(i) 由与 SEQ ID NO:1-10 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成的第一氨基酸序列;和(ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。所述方法还可以包括在确定所述癌症的一个或多个细胞表达 XBP1 后,对所述受试者投递所述选定的一种或多种肽的步骤。

[0033] 又一方面,本公开内容的特征为一种用于为具有癌症的哺乳动物选择疗法的方法。所述方法包括下述步骤:确定哺乳动物中的癌症的一个或多个癌细胞是否表达 CD138,其中所述癌症是多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症;并若一个或多个癌细胞表达 CD138,则选择一种或多种选自下组的肽作为所述哺乳动物的治疗剂:(a) 一种分离的肽,其由与 SEQ ID NO:11-14 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成;(b) 一种分离的肽,其由 SEQ ID NO:11-14 任一氨基酸序列组成,具有不超过四处替代;和(c) 一种分离的肽,其包含:(i) 由 SEQ ID NO:11-14 任一组成,具有不超过四处替代的第一氨基酸序列;和(ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列;和(d) 一种分离的肽,其包含:(i) 由与 SEQ ID NO:11-14 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成的第一氨基酸序列;和(ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。所述方法还可以包括在确定所述癌症的一个或多个细胞表达 CD138 后,对所述受试者投递所述一种或多种肽的步骤。

[0034] 另一方面,本公开内容的特征为一种用于为需要治疗的哺乳动物选择疗法的方法。所述方法包括确定哺乳动物中的癌症的一个或多个癌细胞是否表达 CS1,其中所述癌症是多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症;并若一个或多个癌细胞表达 CS1,则选择一种或多种选自下组的肽作为所述哺乳动物的治疗剂:(a) 一种分离的肽,其由与 SEQ

ID NO:15-18 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成 ;(b) 一种分离的肽,其由 SEQ ID NO:15-18 任一的氨基酸序列组成,具有不超过四处替代 ;(c) 一种分离的肽,其包含 :(i) 由 SEQ ID NO:15-18 任一组成,具有不超过四处替代的第一氨基酸序列 ;和 (ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列 ;和 (d) 一种分离的肽,其包含 :(i) 由与 SEQ ID NO:15-18 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成的第一氨基酸序列 ;和 (ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。所述方法还可以包括在确定所述癌症的一个或多个细胞表达 CS1 后,对所述受试者投递所述选定的一种或多种肽的步骤。

[0035] 又一方面,本公开内容的特征为一种用于为具有多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的哺乳动物选择治疗剂的方法。所述方法包括下述步骤,若哺乳动物的多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的一个或多个癌细胞表达 XBP1,则选择一种或多种选自下组的肽作为所述哺乳动物的治疗剂 :(a) 一种分离的肽,其由与 SEQ ID NO:1-10 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成 ;(b) 一种分离的肽,其由 SEQ ID NO:1-10 任一的氨基酸序列组成,具有不超过四处替代 ;和 (c) 一种分离的肽,其包含 :(i) 由 SEQ ID NO:1-10 任一组成,具有不超过四处替代的第一氨基酸序列 ;和 (ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列 ;和 (d) 一种分离的肽,其包含 :(i) 由与 SEQ ID NO:1-10 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成的第一氨基酸序列 ;和 (ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。

[0036] 又一方面,本公开内容的特征为一种用于为具有多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的哺乳动物选择治疗剂的方法,该方法包括下述步骤,若哺乳动物的多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的一个或多个癌细胞表达 CD138,则选择一种或多种选自下组的肽作为所述哺乳动物的治疗剂 :(a) 一种分离的肽,其由与 SEQ ID NO:11-14 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成 ;(b) 一种分离的肽,其由 SEQ ID NO:11-14 任一的氨基酸序列组成,具有不超过四处替代 ;和 (c) 一种分离的肽,其包含 :(i) 由 SEQ ID NO:11-14 任一组成,具有不超过四处替代的第一氨基酸序列 ;和 (ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列 ;和 (d) 一种分离的肽,其包含 :(i) 由与 SEQ ID NO:11-14 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成的第一氨基酸序列 ;和 (ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。

[0037] 另一方面,本公开内容的特征为一种用于为具有多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的哺乳动物选择治疗剂的方法,该方法包括下述步骤,若哺乳动物的多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的一个或多个癌细胞表达 CS1,则选择一种或多种选自下组的肽作为所述哺乳动物的治疗剂 :(a) 一种分离的肽,其由与 SEQ ID NO:15-18 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成 ;(b) 一种分离的肽,其由 SEQ ID NO:15-18 任一的氨基酸序列组成,具有不超过四处替代 ;和 (c) 一种分离的肽,其包含 :(i) 由 SEQ ID NO:15-18 任一组成,具有不超过四处替代的第一氨基酸序列 ;和 (ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列 ;和 (d) 一种分离的肽,其包含 :(i) 由与 SEQ ID NO:15-18 任一至少 66% 相同的氨基酸序列组成的第一氨基酸序列 ;和 (ii) 与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。

[0038] 在上文任何方法的一些实施方案中,所述受试者或哺乳动物可以是接受过针对多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的疗法,而且对所述疗法没有响应的受试者或哺乳动物。

[0039] 另一方面,本公开内容的特征为一种用于在哺乳动物中诱导免疫应答的方法。所

述方法包括对受试者施用经一种或多种（例如 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,或 18 种）本文中描述的任何肽接触的免疫细胞或其后代的步骤。所述方法可以包括使所述免疫细胞接触所述一种或多种肽。所述免疫细胞可以是例如 T 细胞。所述 T 细胞可以在抗原呈递细胞存在下经所述一种或多种肽接触。

[0040] 在一些实施方案中,所述方法还可以包括在接触前获得所述免疫细胞的步骤。所述免疫细胞可以是自所述受试者或自所述受试者同一物种的另一受试者获得的。

[0041] 在一些实施方案中（例如在所述细胞是自另一受试者获得的实施方案中）,所述免疫细胞表达至少一种与所述受试者共同的 MHC 分子。所述至少一种 MHC 分子可以是例如 MHC I 类分子,诸如 HLA-A2 分子。

[0042] 又一方面,本公开内容的特征为一种组合物,其包含:(i) 一种或多种本文中描述的任何肽和(ii) 主要组织相容性复合物(MHC) 分子多聚体,其中所述多聚体包含两个或更多个（例如 2,3,4,5,6,7,8,9,或 10 或更多个）MHC 分子之肽结合区。在一些实施方案中,每一个肽结合区有(i) 结合它。在一些实施方案中,每一个肽结合区有(i) 非共价或共价结合它。所述 MHC 分子多聚体可以包含两个或更多个（例如 2,3,4,5,6,7,8,9,或 10 或更多个）整个 MHC 分子。所述 MHC 分子多聚体可以包含人 MHC 分子。所述 MHC 分子多聚体可以包含 MHC I 类分子,诸如 HLA-A2 分子。

[0043] 在一些实施方案中,所述组合物可以包含至少两种或更多种（例如 2,3,4,5,6,7,8,9,或 10 或更多种）所述肽。

[0044] 在一些实施方案中,所述两个或更多个肽结合区可以来自相同 MHC 分子。在一些实施方案中,所述两个或更多个肽结合区来自不同 MHC 分子 MHC 分子。在一些实施方案中,所述两个或更多个肽结合区可以是至少两个（例如 2,3,4,5,6,7,8,9,或 10 更多个）来自相同 MHC 分子的区和至少一个（例如 1,2,3,4,5,6,7,8,9,或 10 或更多个）来自不同 MHC 分子的区的混合物。

[0045] 在一些实施方案中,所述 MHC 分子多聚体能够结合所述一种或多种肽中的至少一种。

[0046] 在一些实施方案中,所述组合物可以带有可检测的标记。例如,一种或多种所述肽和 / 或一种或多种所述肽结合区可以带有可检测的标记。在一些实施方案中,所述一种或多种 MHC 分子多聚体中至少一种或所述一种或多种肽中至少一种是可操作标记的。

[0047] 又一方面,本公开内容的特征为一种试剂盒,其包含一种组合物,该组合物包含:一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) 分子多聚体,其中每个多聚体包含 MHC 分子的两个或更多个肽结合区;和一种或多种本文中描述的任何肽。所述试剂盒还可以包括:关于使所述组合物接触细胞的用法说明、关于可检测标记所述一种或多种 MHC 分子多聚体之一或所述一种或多种肽之一的用法说明;一种或多种可检测标记物;和 / 或关于检测所述一种或多种可检测标记物中至少一种的用法说明。所述一种或多种可检测标记物可以选自下组:发光标记物、荧光标记物、放射性标记物、和酶标记物。

[0048] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员普通理解相同的含义。若有冲突,以本文件（包括定义）为准。下文描述了优选的方法和材料,尽管与本文中描述的方法和材料相似或等同的方法和材料也可以用于实施或检验本发明。通过述及完整收录本文中提到的所有出版物、专利申请和其它参考文献。本

文中公开的材料、方法、和实施例只是例示性的,而非意图限制。

[0049] 根据上述描述、根据附图及根据权利要求,本发明的其它特征和优点(例如用于在受试者中诱导免疫应答的方法)会是显而易见的。

[0050] 附图简述

[0051] 图1是一幅柱状图,描绘荧光团标记的 XBP1 肽对人 T2 细胞表面上 HLA-A2 分子的亲和力。Y 轴代表均值荧光强度,而 X 轴代表测定法中筛选的各种肽: XBP1₁₁₇₋₁₂₅(LLREKTHGL(SEQ ID NO:1);XBP1#1 肽), XBP1₁₈₄₋₁₉₂(NISPWILAV(SEQ ID NO:2); XBP1#2 肽), XBP1₁₈₉₋₁₉₇(ILAVLTLQI(SEQ ID NO:3);XBP1#3 肽), XBP1₁₉₂₋₂₀₀(ILAVLTLQI(SEQ ID NO:4);XBP1#4 肽), XBP1₁₁₀₋₁₁₈(KLLENQLL(SEQ ID NO:5);XBP1#5 肽), 和 XBP1₉₃₋₁₀₁(RMSELEQQV(SEQ ID NO:27);XBP1#6 肽)。还评估了流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆(GILGFVFTL(SEQ ID NO:24))作为对照。

[0052] 图2是一幅柱状图,其描绘荧光团标记的 XBP1 肽(XBP1₁₈₄₋₁₉₂(NISPWILAV(XBP12N; SEQ ID NO:2)) 和 YISPWILAV(XBP12M;SEQ ID NO:6)) 在人 T2 细胞表面上 HLA-A2 分子沟内的稳定性。还评估了流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆(GILGFVFTL(SEQ ID NO:24))作为对照。Y 轴代表均值荧光强度,而 X 轴代表测量肽稳定性的时间间隔。

[0053] 图3是一幅柱状图,其描绘荧光团标记的 XBP1 肽对人 T2 细胞表面上 HLA-A2 分子的亲和力。Y 轴代表均值荧光强度,而 X 轴代表测定法中筛选的各种肽:天然 XBP1₁₉₆₋₂₀₄(GILDNLDPV(SEQ ID NO:7);XBP1SP#1p) 和 XBP1₃₆₇₋₃₇₅(ELFPQLISV(SEQ ID NO:9);XBP1SP#3p)。还评估了流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆(GILGFVFTL(SEQ ID NO:24);“Inf. v. p.”)作为对照。

[0054] 图4是一幅柱状图,其描绘荧光团标记的 XBP1 肽(XBP1 SP 1N(GILDNLDPV;SEQ ID NO:7);XBP1SP 3N(ELFPQLISV;SEQ ID NO:9) 和 XBP1SP 3M(ELFPQLISV;SEQ ID NO:10)) 在人 T2 细胞表面上 HLA-A2 分子沟内的稳定性。Y 轴代表均值荧光强度,而 X 轴代表测量肽稳定性的时间间隔。

[0055] 图5是一系列一维荧光流式细胞术(FFC)柱状图,其描绘一群混合的人淋巴细胞中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的百分比。细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)群或是不刺激(unstim),或是用 XBP12M(XBP12M-CTL) 或 XBP1-1S3M(上文)之一刺激。还评估了流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆(GILGFVFTL(SEQ ID NO:24);“Inf. v. p.”)作为对照。每幅柱状图的 Y 轴指示细胞数,而 X 轴代表结合细胞表面 CD4 抗原(左栏)或 CD8 抗原(右栏)的荧光团标记的特异性抗体的荧光强度。标示了门内细胞的所示百分比。

[0056] 图6是一系列二维 FFC 柱状图,其描绘一群淋巴细胞中用 XBP1 肽:XBP12M 或 XBP13M 刺激后 CD69⁺/CD45RO⁺ 或 CD45RA⁺/CCR7⁺ 细胞的百分比。每幅点图的 Y 轴指示结合细胞表面 CD69 抗原(左栏)或 CD45RA 抗原(右栏)的荧光团标记的特异性抗体的荧光强度,而每幅点图的 X 轴指示结合细胞表面 CD45RO 抗原(左栏)或 CCR7 抗原(右栏)的荧光团标记的特异性抗体的荧光强度。标示了点图右上象限中的细胞的所示百分比。

[0057] 图7是一幅柱状图,其描绘来自与多发性骨髓瘤(MM)McCAR 细胞和 MM1S 细胞和急性髓性白血病(AML)ML-2 细胞一起共培养的 XBP1-CTL(XBP12M-CTL 和 XBP1SP 3M-CTL)的 IFN- γ (干扰素- γ)释放。Y 轴代表以 pg/mL 为单位的自含 CTL 的细胞释放的 IFN- γ 量。

[0058] 图8是一系列二维 FFC 柱状图,其描绘与 MM 或 AML 细胞一起共培养后

XBP1-CTL (XBP12M-CTL 和 XBP1-SP 3M CTL) 的增殖。Y 轴代表群体中每种细胞的数目,而 X 轴代表细胞中羧基荧光素琥珀酰亚氨基酯 (CFSE) 的量。

[0059] 图 9 和 10 是一对线图,其描绘通过钙荧光素 (calcein) 释放测定法测定的 XBP1-CTL 依赖性癌细胞裂解。将 XBP1-2M 特异性 CTL (图 9) 或 XBP1-SP-3M-CTL (图 10) 与 U266 癌细胞、McCaR 癌细胞、ML-2 癌细胞、或 MM1S 癌细胞中每一种一起共培养,并作为自癌细胞释放的钙荧光素量的函数来计算 CTL 的癌细胞裂解量。Y 轴代表靶细胞的百分比特异性裂解,而 X 轴代表 CTL 对癌细胞的比 (效应细胞对靶细胞比) (1 : 1, 10 : 1, 20 : 1, 或 60 : 1)。

[0060] 图 11 是一幅柱状图,其描绘荧光团标记的 CD138 肽对人 T2 细胞表面上 HLA-A2 分子的亲和力。Y 轴代表均值荧光强度,而 X 轴指示测定法中筛选的各种肽: CD138256-264 (VIAGGLVGL; CD138#1p (SEQ ID NO:11)); CD138260-268 (GLVGLIFAV; CD138#2p (SEQ ID NO:12)); CD1385-13 (ALWLWLCAL; CD138#3p (SEQ ID NO:13)); 和 CD1387-15 (WLWLCALAL; CD138#3p (SEQ ID NO:14))。还评估了流感病毒蛋白基质肽 58-66 (GILGFVFTL (SEQ ID NO:24); “Inf. v. p.”) 作为对照。

[0061] 图 12 是一幅柱状图,其描绘荧光团标记的 CD138#2 肽在人 T2 细胞表面上 HLA-A2 分子沟内的稳定性 (与流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL (SEQ ID NO:24); “Inf. v. p.”) 比较)。Y 轴代表均值荧光强度,而 X 轴代表其中测量肽稳定性的时间间隔。

[0062] 图 13 是一系列一维 FFC 柱状图,其描绘群体中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的百分比。CTL 群或是不刺激 (unstim),或是用 CD138#2 肽刺激 (CD138-CTL)。每幅柱状图的 Y 轴代表细胞数,而 X 轴代表结合细胞表面 CD40 抗原 (左栏) 或 CD8 抗原 (右栏) 的荧光团标记的特异性抗体的荧光强度。

[0063] 图 14 是一系列二维 FFC 柱状图,其描绘一群淋巴细胞中用 CD138#2 肽刺激后 CD69⁺/CD45RO⁺ 或 CD45RA⁺/CCR7⁺ 细胞的百分比。CTL 群或是不刺激 (unstim),或是用 CD138#2 肽刺激 (CD138-CTL)。每幅点图的 X 轴 (FL-1) 代表结合细胞表面 CD69 抗原 (左栏) 或 CD45RA 抗原 (右栏) 的荧光团标记的特异性抗体的荧光强度,而每幅点图的 Y 轴 (FL-2) 描绘结合细胞表面 CD45RO 抗原 (左栏) 或 CCR7 抗原 (右栏) 的荧光团标记的特异性抗体的荧光强度。标示了点图右上象限中的细胞的所示百分比。

[0064] 图 15 是一幅柱状图,其描绘与多发性骨髓瘤 (MM) McCaR 细胞 (CD138⁺/HLA-A2⁺)、MM1S 细胞 (CD138⁺/HLA-A2⁻)、或急性髓性白血病 (AML) ML-2 细胞 (CD138⁻/HLA-A2⁻) 一起共培养的 CD138-CTL 的 IFN- γ 释放。Y 轴代表以 pg/mL 为单位的自 CTL 释放的 IFN- γ 量,而 X 轴指示用作刺激细胞的癌细胞。通过测量用肿瘤细胞系刺激过夜后对 IFN- γ 分泌的诱导来确定 CD138-CTL 的抗原特异性和 HLA-A2 限制。

[0065] 图 16 是一系列一维 FFC 柱状图,其描绘与 McCaR、ML-2、或 MM1S 癌细胞一起共培养后 CD138-CTL (CD138#2p-CTL) 的增殖。Y 轴代表群体中每种细胞的数目,而 X 轴代表细胞中羧基荧光素琥珀酰亚氨基酯 (CFSE) 的量。标示了点图右上象限中细胞的所示百分比。

[0066] 图 17 是一幅线图,其描绘通过钙荧光素释放测定法测定的 CD138-CTL 依赖性癌细胞裂解。将 CD138#2p 特异性 CTL 与癌细胞 U266、ML-2、或 MM1S 细胞中每一种一起共培养,并作为自癌细胞释放的钙荧光素量的函数来计算 CTL 的癌细胞裂解量。Y 轴代表靶细胞的百分比特异性裂解,而 X 代表 CTL 对癌细胞的比 (效:靶比) (1 : 1, 10 : 1, 20 : 1, 或

60 : 1)。

[0067] 图 18A 和 18B 是一系列二维 FFC 柱状图,其描绘通过 CD107 测定法测定的 CD138-CTL 依赖性癌细胞裂解。每幅点图的 X 轴代表 FITC 偶联的特异性结合 CD107a 和 CD107b 的抗体的荧光强度,而 Y 轴代表 PE 偶联的特异性结合 CD8 的抗体的荧光强度。图 18A 显示以不同比(效:靶比)(5 : 1,1 : 1,或 1 : 5)CTL 对经 CD138 肽脉冲的 T2 细胞或经无关 MAGE3 肽脉冲的 T2 细胞的裂解。图 18B 展示以 CTL 对 McCAR 细胞比(效应:靶)(1 : 1)CTL 对经 CD138 肽脉冲的 McCAR 细胞或经无关 MAGE3 肽脉冲的 McCAR(CD138⁺/HLA-A2⁺)细胞的裂解。标了点图右上象限中的细胞的所示百分比。

[0068] 图 19 是一幅柱状图,其描绘多份多发性骨髓瘤癌细胞样品中每一份的 CS1mRNA 相对表达(Y 轴)。每份样品是自具有多发性骨髓瘤的不同人患者获得的。

[0069] 图 20 是一幅柱状图,其描绘荧光团标记的 CS1 肽对人 T2 细胞上 HLA-A2 分子的亲和力。X 轴代表均值荧光强度,而 Y 轴指示测定法中筛选的各种肽:CS1-P1:CS1236-245(LLLSLFVLGL(SEQ ID NO:15));CS1-P2:CS1239-247(SLFVLGLFL(SEQ ID NO:16));CS1-P3:CS1232-240(LLVPLLLSL(SEQ ID NO:17));和 CS1-P4:CS19-17(TLIYILWQL(SEQ ID NO:18))。还评估了流感病毒蛋白基质肽 58-66(GILGFVFTL(SEQ ID NO:24);“流感基质 58-66”)作为对照。

[0070] 图 21 是一幅线图,其描绘通过胸苷掺入测定法测定的与呈递 CS1-P2 肽的人 T2 细胞接触的 CS1-P2-CTL 的增殖(“P2-T2”)。Y 轴代表掺入正在分裂的细胞的 ³H-胸苷每分钟计数(CPM),而 X 轴代表含 CTL 的细胞与 T2 细胞一起培养的小时数。

[0071] 图 22 是一幅柱状图,其描绘来自分别与呈递 CS1-P1、CS1-P2、CS1-P3、或 CS1-P4 肽的 T2 细胞一起共培养的 CS1-CTL 的 IFN- γ 释放(P1-CTL、P2-CTL、P3-CTL、和 P4-CTL)。Y 轴代表以 pg/mL 为单位的自 CTL 释放的 IFN- γ 量。

[0072] 图 23 是一幅柱状图,其描绘通过钙荧光素释放测定法测定的 CS1-CTL 依赖性癌细胞裂解。将 P2-CTL 与癌细胞 U266、McCAR、ML-2、或 MM1S 细胞中每一种一起共培养,并作为自癌细胞释放的钙荧光素量的函数来计算由 CS1-CTL 诱导的癌细胞裂解量。Y 轴代表百分比细胞毒性。

[0073] 发明详述

[0074] 本公开内容的特征为免疫原性 XBP1、CD138、和 CS1 衍生肽(及其药物组合物),其可用于例如在受试者中诱导免疫应答(例如刺激 CTL 应答)或刺激抗体生成。所述肽可用于多种应用,诸如用于诱导免疫应答的方法、用于生成抗体的方法、及用于治疗癌症(例如浆细胞病症,诸如多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症)的方法。所述肽还可以包括在 MHC 分子多聚体组合物中及在例如用于在一群细胞中检测 T 细胞的方法中使用。

[0075] 下文给出了所述肽以及用于制备和使用所述肽的例示方法的详细描述。

[0076] 肽

[0077] 本公开内容的特征为分离的肽,其由与表 1 中所示 SEQ ID NO:1-18 任一至少 66%(例如 66%,67%,68%,69%,70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,或 90%或更多)相同的氨基酸序列组成,或基本上由其组成。

[0078] 表 1.

[0079]

<u>初始蛋白质</u>	<u>氨基酸位置</u>	<u>氨基酸序列</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
XBP1, 未剪接	117-125	LLREKTHGL	1
XBP1, 未剪接	184-192	NISPWILAV	2
XBP1, 未剪接	189-197	ILAVLTLQI	3
XBP1, 未剪接	192-200	VLTLLQIQL	4
XBP1, 未剪接	110-118	KLLLENQLL	5
XBP1, 未剪接	184-192	YISPWILAV	6
XBP1, 经剪接	196-204	GILDNLDPV	7
XBP1, 经剪接	193-201	ILLGILDNL	8
XBP1, 经剪接	367-375	ELFPQLISV	9
XBP1, 经剪接	367-375	YLFPLISV	10
CD138	256-264	VIAGGLVGL	11
CD138	260-268	GLVGLIFAV	12
CD138	5-13	ALWLWLCAL	13
CD138	7-15	WLWLCALAL	14
CS1	236-245	LLSLFVLGL	15
CS1	239-247	SLFVLGLFL	16
CS1	232-240	LLVPLLLSL	17
CS1	9-17	TLIYILWQL	18

[0080] 粗体残基指示相对于相应野生型氨基酸序列的氨基酸变化。

[0081] 表 1 中描绘且以氨基酸位置提及的“XBP1, 未剪接”肽指其末端与未剪接形式的人 XBP1 蛋白中有关氨基酸位置对应的 XBP1 片段, 未剪接形式的人 XBP1 蛋白具有 261 个氨基酸和下述序列:

[0082] M V V V A A A P N P A D G T P K V L L L S G Q P A S A A G A P A G Q A L P L M V P A Q R G A S P E A A S G G L P Q A R K R Q R L T H L S P E E K A L R R K L K N R V A A Q T A R D R K K A R M S E L E Q Q V D L E E E N Q K L L L E N Q L L R E K T H G L V V E N Q E L R Q R L G M D A L V A E E E A E A K G N E V R P V A G S A E S A A L R L R A P L Q Q V Q A Q L S P L Q N I S P W I L A V L T L Q I Q S L I S C W A F W T T W T Q S C S S N A L P Q S L P A W R S S Q R S T Q K D P V P Y Q P P F L C Q W G R H Q P S W K P L M N (SEQ ID NO :19 ;Genbank 登录号 NP_005071)。

[0083] 表 1 中描绘且以氨基酸位置提及的“XBP1, 经剪接”肽指其末端与经剪接形式的人 XBP1 蛋白中有关氨基酸位置对应的 XBP1 片段, 经剪接形式的人 XBP1 蛋白具有 376 个氨基酸和下述序列:

[0084] M V V V A A A P N P A D G T P K V L L L S G Q P A S A A G A P A G Q A L P L M V P A Q R G A S P E A A S G G L P Q A R K R Q R L T H L S P E E K A L R R K L K N R V A A Q T A R D R K K A R M S E L E Q Q V D L E E E N Q K L L L E N Q L L R E K T H G L V V E N Q E L R Q R L G M D A L V A E E E A E A K G N E V R P V A G S A E S A A G A G P V V T P P E H L P M D S G G I D S S D E S D I L L G I L D N L D P V M F F K C P S P E P A S L E E L P E V Y P E G P S S L P A S L S L V G T S S A K L E A I N E L I R F D H I Y T K P L V L E I P S E T E S Q A N V V V K I E E A P L S P S E N D H P E F I V S V K E E P V E D D L V P E L G I S N L L S S S H C P K P S S C L L D A Y S D C G Y G G S L S P F S D M S S L L G V N H S W E D T F A N E L F P Q L I S V (SEQ ID NO :20 ;Genbank 登录号 NP_001073007)。

[0085] 表 1 中描绘且以氨基酸位置提及的“CD138”肽指其末端与人 CD138 蛋白中有关氨基酸位置对应的 CD138 片段, 人 CD138 蛋白具有 310 个氨基酸和下述序列:

[0086] MRRAALWLWLCALALSLQPALPQIVATNLPPEDQDGSDDSDNFSGSGAGALQDITLSQQTPSTWKDTQLLTAIPTSPPEPTGLEATAASTSTLPAGEGPKGEAVVLPEVEPGLTAREQEATPRPRETTQLPTTHQASTTTATT AQEPATSHPHRDMQPGHHETSTPAGPSQADLHTPHTEDGGPSATERAAEDGASSQLPAAEGSGEQDFTFETSGEN TAVVAVEPDRRNQSPVDQGATGASQGLLDRKEVLGGVIAGGLVGLIFAVCLVGFMLYRMKKKDEGSYSLEEPKQA NGGAYQKPTKQEEFYA (SEQ ID NO :21 ;Genbank 登录号 NP_002988)。

[0087] 表 1 中描绘且以氨基酸位置提及的“CS1”肽指其末端与人 CS1 蛋白中有关氨基酸位置对应的 CS1 片段,人 CS1 蛋白具有 335 个氨基酸和下述序列:

[0088] MAGSPTCLTLIYLWQLTGSAASGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPLVTIQPEGGT IIVTQNRNRERVDFPDGGYSLKLSKLKKNDSGIYYVGIYSSSLQQPSTQEYVLHVYEHLSPKPKVTMGLQSNKNGTCV TNLTCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESDMTFICVARNPVSRNFSSPILARKLCEGAADDPD SSMVLLCLLLVPLLLSLFVLGLFLWFLKRERQEEYIEKKRVDICRETPNICPHSGENTYDTIPHTNRTILKEDPA NTVYSTVEIPKKMENPHSLLTMPDTPRLFAYENVI (SEQ ID NO :22 ;Genbank 登录号 NP_067004)。

[0089] 本文中描述的肽在本文中常常使用有关序列存在于具有 SEQ ID NO :19-22 的野生型、全长、成熟人蛋白质中时肽的 N 和 C 末端氨基酸的残基编号来提及(例如 XBP1₁₁₇₋₁₂₅)。这些肽通常会具有与具有 SEQ ID NO :19-22 的野生型、全长、成熟蛋白质的相应区段相同的序列。然后,本领域技术人员理解,术语“XBP1,未剪接肽”(例如具有下述氨基酸位置的 XBP1,未剪接肽:117-125,184-192,189-197,192-200,或 110-118)、“XBP1,经剪接肽”(例如具有下述氨基酸位置的 XBP1,经剪接肽:196-204,193-201,或 367-375)、“CD138 肽”(例如具有下述氨基酸位置的 CD138 肽:256-264,260-268,5-13,或 7-15)、和 CS1 肽(例如具有下述氨基酸位置的 CS1 肽:236-245,239-247,232-240,或 9-17)可以分别是人以外的物种的 XBP1 未剪接肽、XBP1 经剪接肽、CD138、或 CS1 多肽的肽片段。正如本领域技术人员会领会的,此类非人多肽的肽片段的 N 和 C 末端氨基酸的编号并非必然与人多肽的相应肽片段的 N 和 C 末端氨基酸的编号相同。此外,非人多肽的肽片段的长度和/或氨基酸(序列)并非必然会与人多肽的相应肽片段的长度和/或氨基酸(序列)相同。本领域技术人员会知道如何确立自非人 XBP1 未剪接、XBP1 经剪接、CD138、和 CS1 多肽衍生的肽的 N 和 C 末端氨基酸、长度、和氨基酸序列。用于实现这一点的一种有用方法是序列比对,特别是最大同源性序列比对。

[0090] 两种肽序列(例如 SEQ ID NO :1-18 的一种肽和可以与所述肽至少 66% 相同的另一种氨基酸序列)之间的百分比同一性可以使用多种算法和计算机程序来确定,包括但不限于 Clustal W(The European Bioinformatics Institute(EMBL-EBI)、BLAST-Protein(National Center for Biotechnology Information(NCBI), United States National Institutes of Health)、和 PSAlign(University of Texas A&M ;Sze et al. (2006) Journal of Computational Biology 13 :309-319)。

[0091] 本文中公开了上文描述的人和非人肽的变体。本文中描述的人和非人肽的变体包括各种形式具有下述各项的肽:(i) 不超过 4(例如 3,2,或 1)处氨基酸替代(例如保守或非保守替代);(ii) 末端或内部删除;或(iii) 末端或内部添加,均在下文中详细阐述。

[0092] 本公开内容的特征还有如下的肽,其由 SEQ ID NO :1-18(如表 1 中描绘的)的氨基酸序列组成或基本上由其组成,但是具有不超过四处(例如不超过三处、不超过两处、或不超过一处)替代。所述替代可以是例如保守的或非保守的(如上文描述的)。

[0093] 保守替代包括下述各组内的替代：缬氨酸、丙氨酸和甘氨酸；亮氨酸、缬氨酸、和异亮氨酸；天冬氨酸和谷氨酸；天冬酰胺和谷氨酰胺；丝氨酸、半胱氨酸、和苏氨酸；赖氨酸和精氨酸；及苯丙氨酸和酪氨酸。非极性疏水性氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷的（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、和组氨酸。带负电荷的（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。上文所述极性、碱性或酸性组的一个成员被相同组的另一个成员替代的任何替代可认为是保守替代。相反，非保守替代指一种氨基酸替代具有相异特征的另一种氨基酸。

[0094] 在一些实施方案中，任何肽的位置 3、4、5、6、7、和 8 中的一个或多个例如一个、两个、三个、四个、或所有五个）未被替代。在一些实施方案中，任何肽的位置 3、4、5、6、7、和 8 中的一个或多个与表 1 中的肽的氨基酸相同。

[0095] 特征还有如下的肽，其包含：基本上由表 1 中描绘的 SEQ ID NO:1-18 任一组成或由其组成的第一氨基酸序列；和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。所述第一氨基酸序列可以具有例如不超过四处替代（保守或非保守替代），或者可以与表 1 中描绘的 SEQ ID NO:1-18 任一至少约 66%（例如 66%，67%，68%，69%，70%，71%，72%，73%，74%，75%，76%，77%，78%，79%，80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，或 90% 或更多）相同。

[0096] 所述肽的所述第二异源氨基酸序列一般不会（且选择成不会）不利影响细胞中 SEQ ID NO:1-18 的免疫原性肽的生成。预期细胞机制除去肽中任何另外的序列以产生 SEQ ID NO:1-18 的免疫原性肽，所述肽由 I 类或 II 类 MHC 分子呈递以刺激针对表达 XBP1、CD138、或 CS1 的癌细胞的免疫应答。

[0097] 与第一氨基酸序列“异源”的氨基酸序列或术语“异源氨基酸序列”指第一氨基酸序列天然存在时侧翼氨基酸序列以外的任何氨基酸序列。例如，人 XBP1 中 LLREKTHGL (SEQ ID NO:1) 刚好侧翼的两个或更多个（例如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 或 20 或更多个）和 / 或不到 20 个（例如 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 或 1 个）羧基和 / 或氨基端氨基酸不认为是与 SEQ ID NO:1 异源的。本领域技术人员理解，含有如下的第一氨基酸序列的肽可以在自然界中根本不存在，所述第一氨基酸序列与 SEQ ID NO:1-18 的氨基酸序列不到 100% 相同，或在 SEQ ID NO:1-18 的氨基酸序列中含有一处至四处保守替代。

[0098] 在一些实施方案中，第二氨基酸序列可以是单一氨基酸。本领域技术人员理解，与第一氨基酸序列“异源”的氨基酸或术语“异源氨基酸”指第一氨基酸序列天然存在时侧翼氨基酸以外的任何氨基酸。例如，紧接人 XBP1 中 LLREKTHGL (SEQ ID NO:1) 侧翼的两个氨基酸不认为是与 SEQ ID NO:1 异源的。

[0099] 异源序列可以是例如用于纯化重组蛋白的序列（例如 FLAG、多组氨酸（例如六组氨酸）、血凝素 (HA)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、或麦芽糖结合蛋白 (MBP)）。异源序列还可以是作为诊断或可检测标志物有用的蛋白质，例如萤光素酶、绿色荧光蛋白 (GFP)、或氯霉素乙酰基转移酶 (CAT)。在一些实施方案中，所述肽可以含有来自另一种蛋白质的信号序列，诸如 KDEL (SEQ ID NO:23) 序列或本文中描述的任何其它的。在一些实施方案中，所述肽可以含有整个或部分免疫球蛋白分子（例如整个或部分免疫球蛋白重链恒定区；见下文）。

在一些实施方案中,所述肽可以含有治疗性或免疫刺激性多肽(例如 T 辅助者表位(例如 PADRE 表位或破伤风类毒素通用 T 辅助细胞表位)或整个或部分细胞因子或趋化因子)和/或载体(例如 KLH),其例如在引发免疫应答(例如用于抗体生产)中 useful。在一些实施方案中,所述肽可以含有一种或多种接头肽序列(见下文)。所述肽还可以含有靶向多肽。异源序列可以是不同长度的,而且在有些情况中可以是比异源氨基酸序列所附着的第一氨基酸序列要长的序列。本领域技术人员理解,含有第一氨基酸序列和与第一异源的第二氨基酸序列的肽没有序列上对应的天然存在蛋白质。

[0100] 如本文中使用的,靶向多肽指将它们所附着的实体(例如第一氨基酸序列)靶定特定组织(例如淋巴结)或细胞(例如抗原呈递细胞或其它免疫细胞)或者(在体外的情况中)特定分离的附着或分子复合物的多肽。靶定多肽可以是例如抗体(免疫球蛋白)或其抗原结合片段或者细胞表面受体的配体。抗体(或其抗原结合片段)可以是例如单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、完全人的抗体、单链抗体、嵌合抗体、或者抗体的 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fab' 片段、Fv 片段、或 scFv 片段。包括或就是 Fc 区(有或无抗原结合区)的抗体片段也可以用于将试剂靶向靶定 Fc 受体的细胞(例如抗原呈递细胞,诸如指交错(interdigitating)树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、或 B 细胞)。细胞表面受体的配体可以是例如趋化因子、细胞因子(例如白介素 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,或 16)、或死亡受体配体(例如 FasL 或 TNF α)。

[0101] 在一些实施方案中,所述异源序列可以是例如“转运序列”,其帮助将所述肽投递至细胞或特定细胞隔室(例如内质网或高尔基体)。转运序列可以包括例如膜移位序列、transportan 序列、触角(antennapedia)序列、环状整联蛋白结合肽、和 Tat 介导的肽,或其经修饰型式。

[0102] 接头序列可以连接第一氨基酸序列与一个或多个异源氨基酸序列。例如,接头序列可以连接第一氨基酸序列与第二氨基酸序列。所述接头肽可以是或者含有例如其中至少四个至六个氨基酸是甘氨酸的氨基酸串。(参见例如 Mancebo et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10 :2492-2502)。接头也可以是或者含有六个或更多个(例如 7,8,9,10,11,或 12 或更多个)组氨酸残基。所述接头肽可以含有或者就是至少一个(例如 1,2,3,4,5,6,7,或 8 或更多个)蛋白酶切割位点。所述蛋白酶位点可以是例如胰蛋白酶、糜蛋白酶、或因子 Xa 切割位点。此类蛋白酶位点例如对于将第一氨基酸序列与异源序列分开可以是有用的。例如,在表达和纯化含有第一氨基酸序列通过胰蛋白酶蛋白酶切割位点连接多组氨酸序列(在这种情况下用于纯化)的肽后,可以通过用胰蛋白酶接触肽来自第一氨基酸序列除去多组氨酸序列。

[0103] 所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列可以以多种方式彼此结合。如本文中使用的,两个或更多个原子或分子单元之间的相互作用语境中的“结合”包括两个或更多原子或分子实体(例如第一氨基酸序列和第二氨基酸序列)的任何共价或非共价键合或物理混合。共价键的化学本质(两个原子共享一对或多对价电子)是本领域已知的,而且包括例如二硫键或肽键。非共价键指不涉及共享价电子对的原子或分子之间的化学键。例如,非共价相互作用包括例如疏水相互作用、氢键相互作用、离子键、范德华碱、或偶极-偶极相互作用。此类非共价相互作用的例子包括抗体-抗原复合或结合对相互作用(结合对的第一与第二成员的相互作用,诸如链霉亲和素与生物素之间的相互作用)。本领域技术人员

理解,术语“结合”(例如在第一氨基酸序列和第二氨基酸序列的语境中)因此与术语“包含”涉及相同范围(coextensive)。

[0104] 在一些实施方案中,含有第一氨基酸序列和第二氨基酸序列的肽可以是融合蛋白。例如,所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列可以由单一核酸序列编码(并作为融合蛋白来表达)。在有些情况中,所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列可以由两种或更多种(例如三种、四种、五种、或六种或更多种)不同核酸序列编码。例如,所述第一氨基酸序列可以由第一核酸序列编码,而所述第二氨基酸序列可以由第二核酸序列编码(见下文“用于生成肽的核酸和方法”)。

[0105] 当分开表达或生成时,第一氨基酸序列和第二氨基酸序列可以使用多种已知的化学交联剂任一交联在一起。此类化学交联剂的例子是那些经由包括“受阻”二硫键在内的联接来连接两个氨基酸残基的。在这些联接中,交联单元内的二硫键受到保护(通过二硫键任一侧的阻碍基团)免于被例如还原型谷胱甘肽或酶二硫化物还原酶的作用所还原。一种合适的化学交联剂,4-琥珀酰亚氨基氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫)甲苯(SMPT),在两个氨基酸序列之间形成此类联接,其利用一种氨基酸序列上的末端赖氨酸和另一种氨基酸序列上的末端半胱氨酸。异双功能试剂通过每个氨基酸序列上的不同偶联模块(coupling moiety)来交联。这样,所得“二聚体”会是异二聚体(含有第一和第二氨基酸序列的肽),而非同二聚体(例如两个第一氨基酸序列或两个第二氨基酸序列)或同二聚体与异二聚体的混合物。如此,一种氨基酸序列上的偶联模块可以是半胱氨酸残基,而另一种上是赖氨酸残基。其它有用的交联剂包括但不限于连接两个氨基(例如N-5-叠氮-2-硝基苯甲酰基氧琥珀酰亚胺)、两个硫氢基(例如1,4-二-马来酰亚氨基丁烷)、一个氨基与一个硫氢基(例如m-马来酰亚氨基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、一个氨基与一个羧基(例如4-[p-叠氮水杨酸基氨基]丁胺)、及一个氨基与一个胍基(存在于精氨酸的侧链中)(例如p-叠氮苯基乙二醛单水合物)的化学药品。

[0106] 偶联模块会优选位于每个氨基酸序列的末端(C或N)。如上文指示的,它们可以是每个氨基酸序列上的半胱氨酸残基,或一个上的半胱氨酸与另一个上的赖氨酸。在它们是两个半胱氨酸残基的情况中,交联可以通过例如将氨基酸序列暴露于氧化性条件来实现。

[0107] 肽可以含有第一氨基酸序列和第二氨基酸序列,或者肽可以含有超过一个(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、或八个或更多个)别的异源氨基酸序列。所述别的异源氨基酸序列可以在第一氨基酸序列氨基端和/或羧基端的侧翼,或者连接至第一氨基酸序列氨基端和/或羧基端。

[0108] 在连接超过两个氨基酸序列的情况中,至少一个氨基酸可以具有超过一个交联模块。例如,第一氨基酸序列可以具有氨基末端和羧基末端处的交联模块。此类多聚体可以“序贯”构建。如此,将每个氨基酸序列连接至下一个,使得链中的末端氨基酸序列只具有一个涉及域间(或试剂间)键的残基,而“内部”氨基酸序列各具有两个涉及域间键的模块。或者,可以将一个氨基酸序列(诸如第一氨基酸序列)连接至多个(例如2,3,4,或5个)其它氨基酸序列。

[0109] 特征还有如下的肽组合物,其包含:第一成分和第二成分,其中所述第一成分由表1中描述的SEQ ID NO:1-18的氨基酸序列组成或基本上由其组成。所述第二成分可以是例如异源氨基酸序列(如上文描述的)、任何其它抗原性肽(例如本文中描述的以外的

XBP-1、CD138、或 CS1 肽),可检测标记物(见下文),治疗剂、诊断剂、或预防剂(见下文)。例如,肽组合物可以含有由 SEQ ID NO:1-18 任一组成或基本上由其组成的氨基酸序列和可检测标记物诸如放射性核素。

[0110] 本领域技术人员理解,在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-18 任一的肽可以在氨基末端和/或羧基末端具有多至 200 个(例如 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190,或 200 个)异源的或在天然蛋白质中存在的氨基酸。

[0111] 本文中描述的肽可以结合主要组织相容性复合物(MHC)分子(例如 MHC I 类分子或 MHC II 类分子)。“主要组织相容性复合物”或“MHC”指在控制负责生理性免疫应答的细胞相互作用中发挥作用的一簇基因。在人类中,MHC 称作 HLA 复合物(参见例如 Paul et al.,FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY,3rd Edition,Raven Press,New York,(1993) 及 Stites,et al.,IMMUNOLOGY,8th Edition,Lange Publishing,Los Altos,Calif.(1994))。

[0112] 如本文中使用的,“HLA 超型或家族”指基于共享的肽结合特异性分组的 HLA 分子集。将对携带某些氨基酸基序的肽共享有点相似结合亲和力的 HLA I 类分子分组入 HLA 超型。术语 HLA 超型、HLA 超型家族、HLA 家族、和 HLA xx 样分子(其中 xx 表示特定 HLA 型)是同义的。HLA I 类分子的类型包括例如 HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A24、HLA-B7、HLA-B27、HLA-B44、HLA-B58、或 HLA-B62。此类 HLA 分子详细记载于美国专利 No. 7,026,443,通过述及完整收录其整个公开内容。

[0113] 肽可以以高亲和力或中等亲和力结合 MHC 分子。如本文中使用的,肽对 HLA I 类分子的“高亲和力”结合定义为解离常数(K_D)小于 50(例如 45,40,35,30,25,20,15,10,5,1,0.5,0.1,或小于 0.05)nM 的结合。“中等结合”指肽以介于约 50nM 与约 500nM 之间(例如 55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,110,115,120,130,140,150,160,170,180,190,200,210,220,230,240,250,260,270,280,290,300,310,320,330,340,350,360,370,380,390,400,410,420,430,440,450,460,470,480,490,或 500nM)的 K_D 结合 HLA I 类分子。肽对 HLA II 类分子的“高亲和力”结合定义为 K_D 小于 100(例如 95,90,85,80,75,70,65,60,55,50,45,40,35,30,25,20,15,10,5,1,0.5,0.1,或小于 0.05)nM 的结合。肽对 HLA II 类分子的“中等亲和力”指 K_D 介于约 100 与约 1000nM 之间(例如 100,110,115,120,130,140,150,160,170,180,190,200,210,220,230,240,250,260,270,280,290,300,310,320,330,340,350,360,370,380,390,400,410,420,430,440,450,460,470,480,490,500,510,520,530,540,550,560,570,580,590,600,610,620,630,640,650,660,670,680,690,700,710,720,730,740,750,760,770,780,790,800,810,820,830,840,850,860,870,880,890,900,910,920,930,940,950,960,970,980,990,或 1000nM)的结合。用于测定肽与 MHC 分子的结合亲和力的方法是本领域已知的,而且在所附实施例中给出。合适的方法还记载于例如美国专利 No. 7,026,443。

[0114] 本文中描述的肽也可以在与 MHC 分子结合时受到 T 细胞上抗原特异性 T 细胞受体识别。多种合适的方法可用于确定肽在与 MHC 分子结合时是否受到 T 细胞上 T 细胞受体识别。例如,可以将来自正常受试者的外周血淋巴细胞(PBL)与测试肽一起在抗原呈递细胞存在下在体外培养数周的一段时间。对所述肽特异性的 T 细胞在此期间变成活化的,

而且可以使用例如增殖测定法（羧基荧光素琥珀酰亚胺酯（CFSE）测定法或³H-胸苷测定法）、有限稀释测定法、细胞毒性测定法（例如钙荧光素释放测定法）、或细胞因子（例如 IFN γ ）、淋巴因子、或⁵¹Cr 释放测定法来检测（参见例如 Wentworth, P. A. et al., Mol. Immunol. 32 :603, 1995 ; Celis, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :2105, 1994 ; Tsai, V et al., J. Immunol. 158 :1796, 1997 ; Kawashima, I. et al., Human Immunol. 59 :1, 1998, 通过述及完整收录每一篇的公开内容）。一种合适的体内方法涉及免疫 HLA 转基因小鼠，其中将肽在佐剂中皮下施用于 HLA 转基因小鼠，并在免疫接种后数周取出脾细胞，在测试肽存在下在体外培养大约一周，使用例如⁵¹Cr 释放测定法来检测肽特异性 T 细胞（参见例如 Wentworth, P. A. et al., J. Immunol. 26 :97, 1996 ; Wentworth, P. A. et al., Int. Immunol. 8 :651, 1996 ; Alexander, J. et al., J. Immunol. 159 :4753, 1997, 通过述及完整收录每一篇的公开内容）。合适的方法还在所附实施例中给出。例如，可以通过 CD107 毒性测定法或钙荧光素释放测定法（见例如实施例 13 和 14）来测定肽（在 MHC 分子的环境中）对 T 细胞的活化。

[0115] 另外，抗原特异性 T 细胞的直接定量可以通过用可检测标记的 MHC 复合物诸如本文中描述的任何 MHC 分子多聚体组合物（见下文）或 HLA-I 四聚体（例如记载于 Altman, J. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :10330, 1993 及 Altman, J. D. et al., Science 274 :94, 1996, 通过述及完整收录每一篇的公开内容）对 T 细胞染色来实施。

[0116] 在一些实施方案中，可以修饰肽（例如可以替代肽的氨基酸）以调控（例如提高或降低）肽的一种或多种特性。例如，可以替代表 1 中描绘的肽之一的一个或多个（例如两个、三个、或四个）氨基酸以提高所述肽对 MHC 分子的亲和力。在一些实施方案中，可以修饰本文中描述的肽之一的氨基酸（例如所述肽与 T 细胞受体接触的氨基酸残基）以增强 T 细胞受体与所述肽（在 MHC 分子的环境中）之间的结合相互作用。此类经修饰肽常常称作“改变的肽配体”。（参见例如 Kalergis et al. (2000) J Immunol. 165(1) :280 ; Conlon et al. (2002) Science 1801 ; 及国际公开号 W002070003, 通过述及完整收录每一篇的公开内容）。

[0117] 用于修饰肽以及确定修饰的效果的合适方法在所附实施例中给出，而且记载于例如 Collins et al. (Immunological Reviews(1998) 163 :151-160, 通过述及完整收录其公开内容）。

[0118] 用于生成肽的核酸和方法

[0119] 本公开内容的特征还有编码一种或多种（例如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 或 14 种）上文描述的任何肽的核酸序列（以及含有核酸序列的核酸载体），及用于生成一种或多种（例如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 或 14 种）上文描述的任何肽的方法。此类方法可以包括下述步骤：任选提供包含如下的核酸载体的细胞（或细胞群），所述核酸载体含有编码一种或多种本文中描述的任何肽的核酸序列，所述核酸序列可操作连接表达控制序列，并在允许所述肽表达的条件下培养所述细胞。所述方法还可以包括自所述细胞或培养所述细胞的培养液分离所述一种或多种肽的步骤。

[0120] 用于为重表达一种或多种本文中描述的肽构建核酸序列和载体（例如表达载体）的合适方法是本领域技术人员公知的，而且记载于例如 Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual Second Edition vol. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor

Laboratory Press :Cold Spring Harbor, New York, USA, Nov. 1989, 通过述及完整收录其公开内容。所述核酸和载体可用于例如在多种宿主细胞中表达所述肽, 包括例如细菌、酵母、或哺乳动物细胞。所述核酸和载体还可以在例如下文描述的体内和体外方法中使用。

[0121] 肽编码序列可以可操作连接启动子和 / 或增强子元件, 其指导由所述核酸编码的肽表达。增强子在时间、位置、和水平方面提供表达特异性。与启动子不同, 增强子可以在位于距转录起始位点不同距离处时发挥功能, 只要启动子存在。增强子也可以位于有关基因的转录起始位点的下游或外显子中。为了使编码序列在启动子控制下, 必须使肽的翻译读码框的翻译起始位点位于启动子下游 (3') 1 个与约 50 个核苷酸之间。感兴趣的启动子包括但不限于巨细胞病毒 hCMV 立即早期基因、SV40 腺病毒的早期或晚期启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 系统、TRC 系统、噬菌体 A 的主要操纵基因和启动子区、fd 外壳蛋白的控制区、3 磷酸甘油酸激酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子、和酵母 α 交配因子的启动子、腺病毒 E1b 最小启动子、或胸苷激酶最小启动子。

[0122] 肽编码序列或含有肽编码序列的载体可以含有编码信号肽的前导序列。前导序列可以位于编码一种或多种本文中描述的肽的序列的 5' 端。信号肽可以刚好在给定的 N 端, 或者可以与它隔开一个或多个 (例如 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15 或 20 个) 氨基酸, 只要前导序列与编码肽的核酸序列符合读码框。一般在分泌前自肽切除 (当然除非信号肽指导跨膜蛋白的插入) 的信号肽在翻译期间指导它所附着的肽进入宿主细胞内质网 (ER) 的内腔, 并然后经分泌小泡将肽分泌入宿主细胞的环境。有用的信号肽包括例如细胞因子或生长因子的天然前导序列、KDEL (SEQ ID NO :23)、或例如美国专利 No. 5, 827, 516 中记载的任何信号序列, 通过述及完整收录其公开内容。

[0123] 在一些实施方案中, 肽编码序列的 5' 端可以包括非天然 ATG “起始序列”。就是说, 例如, 可以对编码肽的核酸序列添加 ATG 序列以确保肽正确转录和翻译。虽然前导序列一般包括 ATG 起始序列, 但是在它不包括的 ATG 起始序列的实施方案中, 可以在编码前导序列的核酸的 5' 端添加 ATG 序列。

[0124] 用于构建肽编码序列和表达载体的合适方法是本领域技术人员公知的, 而且记载于例如 Sambrook et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual Second Edition vol. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press :Cold Spring Harbor, New York, USA, Nov. 1989 ; 通过述及完整收录其公开内容。

[0125] 可以使用多种方法将重组载体导入细胞, 所述方法可以至少部分取决于核酸要导入的细胞的类型。例如, 细菌细胞可以使用诸如电穿孔或热休克等方法来转化。用于转染酵母细胞的方法包括例如原生质球技术或全细胞氯化锂酵母转化法 (参见例如美国专利 No. 4, 929, 555 ; Hinnen et al. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 :1929 ; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153 :163 ; 美国专利 No. 4, 879, 231 ; 及 Sreekrishna et al. (1987) Gene 59 :115, 通过述及将每一篇的公开内容完整收入本文)。动物细胞的转染的特征可以为例如使用磷酸钙、电穿孔、热休克、脂质体、或转染试剂诸如 FUGENE ® 或 LIPOFECTAMINE ®、或通过在溶液中使裸核酸载体接触细胞 (参见例如 Sambrook et al., supra) 将载体导入细胞。

[0126] 可用于本文中描述的肽的小或大规模生产的表达系统包括但不限于微生物诸如经重组噬菌体 DNA、质粒 DNA、或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌 (例如大肠杆菌和枯草杆

菌);经重组酵母表达载体转化的真菌(例如酵母(例如糖酵母属(*Saccharomyces*)和毕赤氏酵母属(*Pichia*));经重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;经重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒(CaMV)和烟草花叶病毒(TMV))感染或经转化重组质粒表达载体(例如Ti质粒)的植物细胞系统;或包含重组表达构建物的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、VERO、HeLa、MDCK、WI38、和NIH 3T3细胞),所述重组表达构建物含有自哺乳动物细胞基因组(例如金属硫蛋白启动子)或自哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子、CMV启动子、SV40启动子、或牛痘病毒7.5K启动子)衍生的启动子。作为宿主细胞有用的还有直接自哺乳动物获得的、经质粒载体转染或经病毒载体(例如病毒载体,诸如疱疹病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、减毒的牛痘病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒和腺伴随病毒等)感染的原代或继代细胞。

[0127] 如上文描述的,在本文中描述的任何肽表达后,可以使用标准技术(参见Sambrook et al., supra)自培养细胞或自培养细胞的培养液分离肽。分离蛋白质的方法是本领域已知的,而且包括例如液相层析(例如HPLC)、亲和层析(例如金属螯合或免疫亲和层析)、离子交换层析、疏水相互作用层析、沉淀、或差异溶解。

[0128] 较小的肽(例如具有少于200(例如少于175、少于150、少于125、少于100、少于90、少于80、少于70、或少于60)个氨基酸的肽)可以通过标准化学手段诸如Fmoc固相合成(见实施例1)来化学合成。

[0129] 本文中描述的肽可以但非必须是分离的。术语“分离的”在应用于本文中描述的任何肽时指已经与天然伴随它的成分(例如蛋白质或其它天然存在生物学或有机分子)分开或自天然伴随它的成分(例如蛋白质或其它天然存在生物学或有机分子)纯化的肽、其片段(或组合物、高分子复合物)。本领域技术人员理解,重组分子(例如重组肽)始终会是“分离的”。通常,当肽(或片段或高分子复合物)占制备物中相同类型的总分子的至少60%(以重量计),例如样品中相同类型的总分子的60%时,它就是分离的。例如,当本文中描述的肽占制备物或样品中总蛋白质的至少60%(以重量计)时,就认为它是分离的。在一些实施方案中,制备物中的某分子占制备物中相同类型的总分子的至少75%、至少90%、或至少99%(以重量计)。

[0130] 类似地,本文中描述的肽编码序列或含有肽编码序列的载体也可以是分离的。术语“分离的”在应用于本文中描述的任何肽编码序列或载体时指已经与天然伴随它的成分(例如蛋白质或其它天然存在生物学或有机分子)分开或自天然伴随它的成分(例如核酸、蛋白质、或其它天然存在生物学或有机分子)纯化的肽编码序列或载体、其片段。本领域技术人员理解,重组分子(例如重组载体或肽编码序列)始终会是“分离的”。通常,当肽编码序列或载体(或其片段)占制备物中相同类型的总分子的至少60%(以重量计),例如样品中相同类型的总分子的60%时,它就是分离的。例如,当本文中描述的肽编码序列或载体占制备物或样品中总核酸的至少60%(以重量计)时,就认为它是分离的。在一些实施方案中,制备物中的某分子占制备物中相同类型的总分子的至少75%、至少90%、或至少99%(以重量计)。

[0131] 在一些实施方案中,分离的肽、肽编码序列、或载体可以是冷冻的、冻干的、或固定化的,而且在适宜条件下保存,这容许分子保留活性(例如肽结合MHC分子诸如MHC I类分子的能力或载体支持肽在细胞中表达的能力)。

[0132] 对所述肽的附加处理

[0133] 本文中描述的任何肽表达或合成后,可以进一步加工肽。进一步加工可以包括对肽的化学或酶促修饰,或者在肽经过修饰修饰的情况中,加工可以包括对已有修饰的酶促或化学改变,或二者皆有。别的对肽的加工可以包括添加(共价或非连接接合)异源氨基酸序列诸如但不限于上文描述的任何异源氨基酸序列。酶促处理可以涉及在容许肽被修饰的条件下使肽接触例如一种或多种蛋白酶、磷酸酶、或激酶。酶促处理可以涉及使肽接触一种或多种能够糖基化肽或修饰肽的糖基化的酶(例如寡糖基转移酶或甘露糖苷酶)。

[0134] 加工可以包括添加例如给肽可检测标记物。例如,可以用酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶)、荧光材料(例如伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺、荧光素、丹酰氯、别藻蓝蛋白(APC)、或藻红蛋白)、发光材料(例如镧系元素或其螯合物)、生物发光材料(例如萤光素酶、萤光素、或水母发光蛋白)、或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{125}I 、或 ^{35}S)可检测标记肽。

[0135] 加工也可以涉及将肽偶联至聚合物(聚烷撑二醇模块诸如聚乙二醇模块)。在一些实施方案中,在肽上N端的位点处将聚合物偶联至多肽。在一些实施方案中,肽可以含有一个或多个内部氨基酸插入,其提供内部聚合物缀合位点,聚合物可以缀合于此。

[0136] 药物组合物

[0137] 可以将本文中描述的任何肽和编码肽的核酸掺入药物组合物。此类组合物通常包括一种或多种肽(和/或编码肽的核酸)和药学可接受载体。如本文中使用的,语言“药学可接受载体”包括与药物施用相容的溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂、诸如此类。可以将一种或多种肽配制成糖浆剂、酏剂、悬浮液、粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、锭剂、含锭、水溶液、乳膏、软膏剂、洗剂、凝胶剂、乳剂、等形式的药物组合物。还可以将补充活性化合物(例如一种或多种化疗剂)掺入组合物。

[0138] 一般将药物组合物配制成与其预定施用路径相容。施用路径的例子包括口服、直肠、和胃肠外,例如静脉内、肌肉内、皮内、皮下、吸入、经皮、或经粘膜。用于胃肠外应用的溶液或悬浮液可以包括下面的成分:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、聚丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;及用于调节张力的药剂诸如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱诸如氢氯酸或氢氧化钠调节pH。可以将组合物封装在玻璃或塑料制成的安瓿、一次性使用的注射器或多剂管形瓶中。

[0139] 适合于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况中)或悬浮液和用于临场制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉剂。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N. J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况中,药物组合物必须是无菌的,而且流动性程度应当易于注射。它在制造和贮存的条件应当是稳定的,而且必须针对任何微生物诸如细菌和真菌的污染进行防护。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇、诸如此类)、及其合适混合物的溶剂或分散介质。可以例如通过使用涂层诸如卵磷脂、通过维持所需粒度(在分散体的情况中)和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂来实现对微生物污染的防护,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳贡、诸如

此类。在许多情况中,会想要在组合物中包括等张剂,例如糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇、氯化钠。可以通过在组合物中包括延迟吸收的药剂来实现可注射组合物的吸收的延长,例如单硬脂酸铝和明胶。

[0140] 可以如下制备无菌可注射溶液,即在根据需要具有一种或一组上文列举的组分的适宜溶剂中以所需量掺入一种或多种肽(或一种或多种编码肽的核酸),接着过滤除菌。一般而言,如下制备分散体,即将肽(或编码肽的核酸)掺入含有来自上文列举的基本分散介质和所需其它组分的无菌媒介。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况中,制备方法可以包括真空干燥或冷冻干燥,这自其先前无菌过滤的溶液产生活性组分加任何别的期望组分的粉末。

[0141] 口服组合物一般包括惰性稀释剂或可食用载体。出于口服治疗性施用的目的,可以与赋形剂一起掺入一种或多种肽,并以片剂、含锭、或胶囊剂的形式使用,例如媒介胶囊剂。还可以使用流体载体来制备口服组合物,作为漱口剂使用。可以包括药学相容结合剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、含锭等等可以含有任何下面的组分或具有相似性质的化合物:粘合剂诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂诸如淀粉或乳糖;崩解剂诸如褐藻酸、Primogel、或玉米淀粉;润滑剂诸如硬脂酸镁或 Sterotes;助流剂诸如胶体二氧化硅;甜味剂诸如蔗糖或糖精;或芳香剂诸如薄荷、水杨酸甲酯、或桔味剂。

[0142] 粉剂和片剂可以含有 1% 至 95% (w/w) 的一种肽或者两种或更多种肽的混合物。在某些实施方案中,肽的范围可以是约 5% 至 70% (w/w)。合适的载体是碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂、诸如此类。术语“制备”意图包括将肽(或核酸)与封装材料像提供胶囊(其中有或无其它载体,肽被载体包围,因而与它联合)的载体一起配制。类似地,包括扁囊剂和锭剂。片剂、粉剂、胶囊剂、丸剂、扁囊剂、和锭剂可以用作适合于口服施用的固体剂量形式。

[0143] 适合于口服使用的水溶液可以如下制备,即在水中溶解活性成分并根据需要添加合适的着色剂、香料、稳定剂、和增稠剂。适合于口服使用的水悬浮液可以如下制备,即在具有粘性材料的水中分散微细活性成分,所述粘性材料诸如天然的或合成的胶质、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、和其它公知的助悬剂。

[0144] 对于通过吸入来施用,可以从含有合适推进剂(例如气体诸如二氧化碳)的加压容器或分配器,或喷雾器以气溶胶喷射形式投递肽或核酸。

[0145] 系统施用也可以是通过经粘膜或经皮手段。对于经粘膜或经皮施用,在配制剂中施用对于要渗透的屏障适宜的渗透剂。此类渗透剂是本领域普遍知道的,而且包括例如用于经粘膜施用的去污剂、胆盐、和梭链孢酸衍生物。经粘膜施用可以经由使用鼻喷雾或栓剂来实现。对于经皮施用,可以将肽或核酸配制成软膏剂、油膏剂、凝胶剂、或乳膏,如本领域普遍知道的。

[0146] 肽或核酸也可以制备成栓剂(例如用常规的栓剂基质诸如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂形式供直肠投递用。

[0147] 在一个实施方案中,可以与会保护肽免于从身体中快速清除的载体一起来制备肽或核酸,诸如受控释放配制剂,包括植入物和微囊化投递系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯-乙酸乙烯、聚(酸)酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯

(polyorthoester)、和聚乳酸。用于制备此类配制剂的方法对于本领域技术人员会是显而易见的。所述材料也可以购自 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc。脂质体悬浮液（包括用针对 APC 特异性抗原的单克隆抗体靶向例如 APC 的脂质体）也可以用作药学可接受载体。这些可以依照本领域技术人员已知的方法来制备，例如如美国专利 No. 4, 522, 811 中记载的。

[0148] 为了容易施用和剂量的一致性，以剂量单位形式配制口服或胃肠外组合物可以是有利的。如本文中使用的，剂量单位形式指适合作为单一剂量用于要处理的受试者的物理离散单元；每个单位含有与所需药学载体联合的预定数量的肽（或核酸），根据计算，该数量产生期望的治疗效果。剂量单位还可以伴有用法说明。

[0149] 可以将编码肽的核酸分子插入载体，并用作基因疗法载体（如上文描述的）。可以通过例如静脉内注射、局部施用（参见例如美国专利 No. 5, 328, 470）或通过定向注射（参见例如 Chen, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :3054-3057）将基因疗法载体投递给受试者。基因疗法载体的药物制备物可以包括可接受稀释剂中的基因疗法载体，或者可以包含埋藏有基因投递媒介的缓慢释放基质。或者，在可以自重细胞完整生成完整基因投递载体的情况中，例如逆转录病毒载体，药物制备物可以包括一个或多个生成基因投递系统的细胞（见下文“离体方法 (Ex Vivo method)”）。

[0150] 基因投递媒介的别的例子包括但不限于脂质体；生物相容聚合物，包括天然聚合物和合成聚合物；脂蛋白；多肽；多糖；脂多糖；人工病毒包膜；金属颗粒；细菌；病毒诸如杆状病毒、腺病毒、和逆转录病毒；噬菌体；粘粒；质粒；真菌载体和本领域通常使用的其它重组媒介，已经记载了将它们用于多种真核和原核宿主中的表达，而且像简单的蛋白质表达一样，可用于基因疗法。

[0151] 病毒载体的例子包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、甲病毒载体等等。包含靶向模块诸如抗体或其片段的脂质体也可以用于制备用于给受试者投递的核酸药物组合物。

[0152] 本文中描述的任何药物组合物可以与关于施用的用法说明（如下文描述的）一起包括在容器、药包、或分配器中。

[0153] MHC 分子多聚体组合物和使用该组合物的方法

[0154] 本公开内容的特征还有包含下述各项的组合物：(i) 一种或多种上文描述的任何肽和 (ii) 主要组织相容性复合物 (MHC) 分子多聚体。多聚体含有两个或更多个（例如 3、4、5、6、7、8、9、或 10 或更多个）整个 MHC 分子或 MHC 分子之肽结合区。一种或多种肽可以结合（例如共价或非共价结合）MHC 分子多聚体。

[0155] 多聚体的 MHC 分子可以是 MHC I 类分子（例如 HLA-A2 分子）或 MHC II 类分子。MHC 分子可以是哺乳动物（例如啮齿类动物、非人灵长类动物、人、或本文中描述的任何其它哺乳动物）MHC 分子。

[0156] 多聚体中的两个或更多个 MHC 分子（或 MHC 分子之肽结合区）可以来自相同的 MHC 分子或来自不同的 MHC 分子。例如，MHC 分子多聚体可以含有五个 MHC 分子，其中三个是相同的 MHC 分子，且另两个与前三个不同。又例如，多聚体的每个 MHC 分子是不同的。至少一个 MHC 分子可以结合至少一种肽。

[0157] 在一些实施方案中，上文组合物可以含有至少两种（例如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 或 15 或更多种) 本文中描述的任何肽。

[0158] 组合物还可以结合可检测标记物。例如, 多聚体的一个或多个 MHC 分子可以共价或非共价结合可检测标记物。合适的可检测标记物(例如酶、荧光材料、发光材料、生物发光材料、或放射性核素)以及用于将可检测标记物连接肽或 MHC 分子的方法上文有描述。

[0159] MHC 多聚体组合物可以使用上文描述的肽如下生成: 在相应 HLA 重链和 β_2 -微球蛋白存在下使结合 HLA 分子的肽再折叠以生成三分子复合物。然后将复合物在重链的羧基末端处在先前改造入重链的位点处生物素化。然后通过添加链霉亲和素来诱导多聚体形成。

[0160] 由于 T 细胞受体能够在极其多种其它肽-MHC 复合物中识别靶细胞上的特定肽-MHC 复合物, 因此本文中描述的 MHC 多聚体组合物可用于例如在一群无关 T 细胞中检测抗原特异性 T 细胞(见下文)。对于此类测定法, 多聚体一般会可检测标记(见上文)。

[0161] 例如, 多聚体 MHC 分子/肽复合物可以在测定法中用于在暴露于免疫原后对外周血单个核细胞评估抗原特异性 CTL 的存在。MHC 多聚体复合物可用于直接显现抗原特异性 CTL(参见例如 Ogg et al., Science 279:2103-2106, 1998; 及 Altman et al., Science 174:94-96, 1996) 及测定外周血单个核细胞的样品中抗原特异性 CTL 群的频率。在一个例子中, 用于使 MHC 多聚体多聚化的可检测标记的链霉亲和素可用于标记结合多聚体之 MHC 分子/肽复合物的 T 细胞。为此, 将经多聚体处理的细胞暴露于例如标记物(例如偶联有生物素的荧光团)。然后可以容易地分离或检测细胞, 例如使用流式细胞术。

[0162] 应用

[0163] 本文中描述的肽(及其药物组合物)、含有 MHC 多聚体的组合物、试剂盒、和制品可以在多种方法中使用。例如, 肽可用于: (i) 在受试者(例如具有癌症的受试者)中诱导免疫应答; (ii) 活化培养中的 T 细胞; 和/或 (iii) 治疗或甚至预防癌症, 诸如多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症。如上文描述的, 含有 MHC 多聚体的组合物可用于例如在一群无关 T 细胞中检测抗原特异性 T 细胞。

[0164] 虽然肽(或其药物组合物)、含有 MHC 多聚体的组合物、试剂盒、或制品的效用绝不限于本文中描述的任何特定实施方案, 但是下文提供了可以使用这些试剂的例示性方法。

[0165] 用于诱导免疫应答的方法

[0166] 本公开内容的特征还有多种用于在受试者中诱导免疫应答的方法。用于在受试者中诱导免疫应答的方法可以包括给受试者施用一种或多种本文中描述的肽(或含有编码肽的核酸序列的表达载体)(或任何含有一种或多种本文中描述的肽(或载体)的药物组合物)的步骤。通过使用编码一种或多种本文中描述的肽的核酸表达系统, 本文中描述的任何肽可用于刺激免疫应答。就是说, 用于在受试者中诱导免疫应答的方法可以包括给受试者施用含有编码一种或多种本文中描述的肽的核酸的表达载体(或含有表达载体的药物组合物)的步骤免疫应答可以是 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)、T_H1 应答、T_H2 应答、或这两种类型的应答的组合。

[0167] 任何上文方法还可以是例如用于在受试者治疗或预防(防范)癌症(例如浆细胞病症, 诸如多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、或任何表达 XBP1、CD138、或 CS1 的其它癌症)的方法。当术语“预防”在本文中针对给定状况的给定处理联合使用时, 它们意味着所处理的受试者或是根本没有发生临床上可观察水平的状况(例如受试者没有

展现状况的一种或多种症状,在癌症的情况中,受试者没有发生可检测水平的癌症),或是与不处理的情况相比受试者中状况发生得更缓慢和/或程度更低(例如受试者中症状更少或癌细胞数目更少)。这些术语不仅仅限于受试者没有经历状况的无论什么方面的情形。例如,若例如在预期会产生给定状况表现(晚期癌症)的癌症的早期诊断(例如在来自受试者的样品中检测到少数癌细胞)期间给予处理,并导致受试者经历比不处理所预期的更少和/或更轻的状况症状,则会说该处理“预防”了状况。当受试者只展示轻度慢性的癌症症状时,就说处理可以“预防”癌症(例如浆细胞病症,诸如多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症)。“预防”并不暗示如此处理的受试者甚至必须没有发生单个癌细胞。

[0168] 一般而言,投递给受试者的肽会在药学可接受载体(例如生理盐水)中悬浮并口服、直肠、或胃肠外施用,例如注射至静脉内、皮下、肌肉内、鞘内、腹膜内、直肠内、阴道内、鼻内、胃内、气管内、或肺内(见下文)。

[0169] 施用可以通过药物组合物推注的周期性注射,或者可以是不间断的或连续的,其通过静脉内或腹膜内施用进行,来自储库,储库是外部的(例如 IV 袋)或内部的(例如生物蚀解植入物、生物人工器官、或植入式试剂生成细胞集落)。参见例如美国专利 No. 4, 407, 957, 5, 798, 113 及 5, 800, 828, 通过述及将每一篇完整收入本文。

[0170] 施用治疗性核酸的常规且药学可接受路径包括但不必限于肌肉内、皮下、皮内、经皮、静脉内、直肠(例如灌肠剂、栓剂)、口服、胃内、鼻内、和有效吸入路径的其它路径、及其它胃肠外施用路径。如果想要,可以根据核酸分子和/或对免疫应答的期望效果而组合或调整施用路径。用于给受试者施用核酸的方法可以包括多种公知技术,诸如载体介导的基因转移(例如病毒感染/转染,或各种其它基于蛋白质或基于脂质的基因投递复合物)以及便于投递“裸”多核苷酸的技术(诸如电穿孔、“基因枪”投递、和用于将多核苷酸导入受试者或受试者之细胞的各种其它技术)。

[0171] 一般而言,所需要的肽或核酸剂量取决于施用路径的选择;配制剂的性质;受试者的疾病的性质或严重程度;受试者的免疫状态;受试者的体型、体重、表面积、年龄、和性别;其它正在施用的药物;及主治医学专业人员的判断。

[0172] 肽用于诱导免疫应答的合适剂量在 0.000001 至 10mg 试剂或抗原性/免疫原性组合物每 kg 受试者的范围中。鉴于试剂的多样性和各种施用路径的不同效率,预期所需要的剂量差异较大。例如,鼻或直肠施用可要求比通过静脉内注射进行的施用要高的剂量。可以使用用于优化的标准经验常规来调整这些剂量水平的差异,正如本领域中普遍理解的。施用可以是单次或多次(例如 2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150, 或更多次)。例如,可以作为初始免疫接种来施用肽,然后作为强化免疫接种来随后施用一次或多次。

[0173] 在本文中描述的方法的语境中,给受试者施用的核酸的剂量应当足以随时间在受试者中实现有益治疗响应或缓解症状。虽然所施用的剂量会随例如受试者或要实现的临床目标而变化(见下文),但是合适的剂量范围为在单个剂量里提供多至约 1 μ g、至约 1,000 μ g、至约 5,000 μ g、至约 10,000 μ g、至约 25,000 μ g 或约 50,000 μ g 核酸每 ml 载体的范围。

[0174] 为了优化治疗功效(例如一种或多种肽或编码肽的核酸在受试者中诱导免疫应答的功效),可以首先以不同的给药方案来施用含有肽或核酸的组合物。单位剂量和方案取决于多种因素,包括例如哺乳动物的物种、它的免疫状态、哺乳动物的体重。

[0175] 药物组合物（例如含有一种或多种本文中描述的肽或编码一种或多种肽的一种或多种核酸序列的药物组合物）的给药频率在医学从业人员（例如医生或护士）的技术和临床判断内。通常，通过临床试验来确立施用方案，临床试验可确立最佳的施用参数。然而，从业人员可以根据受试者的年龄、健康、重量、性别和医学状态来改变此类施用方案。

[0176] 在一些实施方案中，药物组合物可以给受试者施用至少 2（例如 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 或 20 或更多）次。例如，可以给受试者施用药物组合物每月一次，持续三个月；每周一次，持续一个月；每年一次，持续三年；每年一次，持续五年；每五年一次；每十年一次；或每三年一次，持续终生。

[0177] 在一些实施方案中，试剂可以与免疫调节剂诸如 Toll 受体配体或佐剂一起施用（见下文）。

[0178] 如本文中定义的，“治疗有效量”的肽或编码肽的核酸指肽或核酸能够在所处理的受试者中产生免疫应答的量。治疗有效量的肽（即有效剂量）包括毫克、微克、纳克、或皮克量的试剂每千克受试者或样品重量（例如约 1 纳克每千克至约 500 微克每千克、约 1 微克每千克至约 500 毫克每千克、约 100 微克每千克至约 5 毫克每千克、或约 1 微克每千克至约 50 微克每千克）。治疗有效量的核酸也包括微克、纳克、或皮克量的试剂每千克受试者或样品重量（例如约 1 纳克每千克至约 500 微克每千克、约 1 微克每千克至约 500 微克每千克、约 100 微克每千克至约 500 微克每千克、或约 1 微克每千克至约 50 微克每千克）。

[0179] 如本文中定义的，“预防有效量”的肽或编码肽的核酸指肽或核酸能够在所处理受试者中产生针对癌细胞（例如多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症细胞）的免疫应答的量，该免疫应答能够预防受试者中发生癌症或能够实质性降低受试者发生或继续发生癌症的机会（见上文）。预防有效量的肽（即有效剂量）包括毫克、微克、纳克、或皮克量的试剂每千克受试者或样品重量（例如约 1 纳克每千克至约 500 微克每千克、约 1 微克每千克至约 500 毫克每千克、约 100 微克每千克至约 5 毫克每千克、或约 1 微克每千克至约 50 微克每千克）。预防有效量的核酸也包括微克、纳克、或皮克量的试剂每千克受试者或样品重量（例如约 1 纳克每千克至约 500 微克每千克、约 1 微克每千克至约 500 微克每千克、约 100 微克每千克至约 500 微克每千克、或约 1 微克每千克至约 50 微克每千克）。

[0180] 受试者可以是任何能够对可以产生免疫应答的动物，诸如但不限于哺乳动物，例如人（例如人患者）或非人灵长类动物（例如黑猩猩、狒狒、或猴）、小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、马、家畜（例如牛、猪、绵羊、或山羊）、犬、猫、或鲸。受试者可以是具有、怀疑具有、或有风险发生癌症，诸如多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、或任何其它类型的表达 XBP1、CD138、或 CS1 的癌症。受试者可以是处于多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症好转期的受试者。

[0181] 方法还可以包括在给受试者施用一种或多种肽（或核酸）前确定受试者的癌症（例如浆细胞病症，诸如多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症）的一个或多个癌细胞是否表达 XBP1、CD138、或 CS1 的步骤。这些蛋白质的表达包括 mRNA 和蛋白质表达二者。用于检测细胞中蛋白质和 mRNA 表达的方法是本领域已知的，而且包括例如用于检测蛋白质的酶联免疫吸附测定法（ELISA）、Western 和点印迹技术、或免疫组织化学技术及用于检测 mRNA 的逆转录 - 聚合酶链式反应（RT-PCR）或 Northern 印迹技术。（参见 Sambrook et al., supra）。

[0182] 方法还可以包括给受试者施用一种或多种化疗剂、一种或多种形式的电离辐射、或一种或多种免疫调节剂的步骤。一种或多种形式的电离辐射可以是伽马辐照、X 辐照、或贝塔辐照。一种或多种化疗剂可以选自下组：顺铂、卡铂、丙卡巴肼、双氯乙基甲胺、环磷酰胺、喜树碱、阿霉素、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷、verampil、鬼臼毒素、他莫昔芬、泰素、沙利度胺、lenalidomide、蛋白体抑制剂（例如 bortezomib）、hsp90 抑制剂（例如 tenespinmycin）、反铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春碱、甲氨蝶呤、或上述任一类似物。免疫调节剂包括例如多种趋化因子和细胞因子，诸如白介素 2 (IL-2)、粒细胞 / 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、和白介素 12 (IL-12)。

[0183] 受试者可以具有、怀疑具有、或有风险发生癌症，诸如多发性骨髓瘤或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症。“怀疑具有癌症的”受试者指具有癌症的一种或多种症状的受试者。癌症的症状是本领域技术人员公知的，而且一般包括但不限于疼痛、体重减轻、虚弱、过度疲劳、进食困难、食欲不振、久咳、气急恶化、咳血、血尿、血便、恶心、呕吐、腹胀、胃气胀、腹膜腔积液、阴道出血、便秘、腹胀、结肠穿孔、急性腹膜炎（感染、发热、疼痛）、疼痛、吐血、大量出汗、发热、高血压、贫血、腹泻、黄疸、头晕、寒战、肌肉痉挛、吞咽困难、诸如此类。多发性骨髓瘤的症状具体包括例如骨痛（例如背部或肋骨）、血液中高水平的钙、过度口渴或排尿、便秘、恶心、食欲不振、意识错乱、腿虚弱或麻木、体重减轻、或重复感染。指示瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的症状包括例如虚弱、淋巴结肿大、严重疲劳、鼻出血、体重减轻、神经学问题。

[0184] 如本文中使用的，“有风险发生癌症的”受试者指具有发生癌症的素因即发生癌症的遗传素因诸如肿瘤抑制基因中的突变（例如 BRCA1、p53、RB、或 APC 中的突变）的受试者，已经暴露于能导致癌症的条件条件的受试者，或当前受到能导致癌症的条件影响的受试者。如此，当受试者已经暴露于诱变或致癌水平的某些化合物（例如香烟烟雾中的致癌化合物诸如丙烯醛、4-氨基联苯、芳族胺、苯、苯并 {a} 蒽、苯并 {a} 芘、甲醛、肼、钋-210（氡）、聚氨酯、或氯化乙烯）时，受试者也可以是“有风险发生癌症的”。当受试者已经暴露于例如大剂量的紫外光或 X 辐照，或暴露于（例如感染）引起肿瘤的 / 肿瘤相关的病毒诸如乳头瘤病毒、Epstein-Barr 病毒、乙肝病毒、或人 T 细胞白血病 - 淋巴瘤病毒时，受试者可以是“有风险发生癌症的”。另外，当受试者患有炎症（例如慢性炎症）时，受试者可以是“有风险发生癌症的”。若例如受试者具有意义不明的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS)，则受试者可以是有风险发生多发性骨髓瘤的。

[0185] 根据上文，会清楚的是“怀疑具有癌症”或“有风险发生癌症”的受试者并非感兴趣物种内的所有受试者。

[0186] 在一些实施方案中，方法还可以包括确定对受试者施用肽或核酸后受试者中是否发生免疫应答。用于确定受试者中是否发生免疫应答的合适方法包括使用免疫测定法来检测例如来自受试者的生物学样品中对肽特异性的抗体的存在。例如，在对受试者施用肽后，可以自受试者获得生物学样品（例如血液样品），并测试对肽特异性的抗体的存在。免疫应答还可以通过测定样品中活化的 T 细胞的存在或量来检测。此类测定法包括例如增殖测定法、有限稀释测定法、细胞毒性测定法（例如淋巴因子或 ⁵¹Cr 释放测定法）（如上文描述的）。

[0187] 在一些实施方案中,所述方法还可以包括确定受试者是否具有癌症的步骤。用于此类确定的合适方法取决于受试者中要检测的癌症的类型,但是是本领域已知的。此类方法可以是定性的或定量的。例如,当受试者展现多发性骨髓瘤的两种或更多种(例如三种、四种、五种、或六种或更多种)症状,诸如本文中描述的任何症状,医学从业人员可以诊断受试者具有多发性骨髓瘤。也可以通过测量血钙水平、白血球或红血球计数、或受试者尿液中蛋白质的量来确定受试者具有多发性骨髓瘤。

[0188] 离体方法。一种用于在受试者中诱导免疫应答的离体策略可以涉及使自受试者获得的合适 APC(例如树突细胞、单核细胞、或巨噬细胞)接触本文中描述的任何肽。或者,可以用编码一种或多种肽的核酸(例如表达载体)转染细胞,并任选在允许肽表达的条件下培养一段时间。转染方法会取决于细胞和转染入细胞的核酸的类型。(见上文“用于生成肽的核酸和方法”部分及还有 Sambrook et al., supra)。接触或转染后,然后将细胞返还受试者。

[0189] 细胞可以是表达 MHC I 类或 II 分子的极其多种类型之任一。例如,细胞可以包括骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、T 细胞(例如 T 辅助细胞、CD4⁺ 细胞、CD8⁺ 细胞、或细胞毒性 T 细胞)、或 B 细胞。

[0190] 用于刺激免疫应答的离体方法可以包括在体外使 T 细胞(例如在一群自受试者获得的淋巴细胞中的 T 细胞)接触表达结合有本文中描述的肽之一的 MHC 分子的抗原呈递细胞,接触的时间(和条件)足以活化 T 细胞。接触后,将活化的 T 细胞再导入获得该细胞的受试者。用于生成表达结合有本文中描述的肽之一的 MHC 分子的 APC 的方法在这部分的上文给出。

[0191] 在任何离体方法的一些实施方案中,可以使自相同物种的不同受试者获得的(同种异体的)细胞接触试剂(或免疫原性/抗原性组合物)并施用给受试者。

[0192] 用于在受试者中生成抗体的方法

[0193] 用于生成对免疫原(例如一种或多种本文中描述的任何肽)特异性的抗体的方法是本领域已知的,而且下文有详述。例如,对本文中描述的肽特异性的抗体或抗体片段可以通过免疫接种来生成,例如使用动物,或通过体外方法来生成,诸如噬菌体展示。可以使用本文中描述的肽的整个或部分来生成抗体或抗体片段。

[0194] 可以使用肽来制备抗体,即用肽免疫接种合适的受试者(例如家兔、山羊、小鼠、或其它哺乳动物,诸如人)。适宜的免疫原性制备物可以含有例如本文中描述的任何试剂。制备物可以进一步包括佐剂,诸如弗氏完全或不完全佐剂、明矾、RIBI、或类似的免疫刺激剂。佐剂还包括例如霍乱毒素(CT)、大肠杆菌热不稳定毒素(LT)、突变体 CT(MCT)(Yamamoto et al. (1997) J. Exp. Med. 185 :1203-1210) 和突变体大肠杆菌热不稳定毒素(MLT)(Di Tommaso et al. (1996) Infect. Immunity 64 :974-979)。MCT 和 MLT 含有相对于亲本分子基本上消除毒性且基本上不损害佐剂活性的点突变。用免疫原性肽制备物(例如本文中描述的任何试剂)免疫接种合适的受试者诱导多克隆抗肽抗体应答。

[0195] 如本文中使用的,术语抗体指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分(即含有特异性结合肽(例如本文中描述的肽)的抗原结合位点的分子)。特异性结合本文中描述的肽的抗体指结合所述肽但基本上不结合样品中的其它分子的抗体。免疫球蛋白分子的免疫学活性部分的例子包括例如 F(ab) 片段、F(ab')₂ 片段、或本文中描述的任

何其它抗体片段（见下文）。

[0196] 抗肽抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体制备物。如本文中使用的，术语单克隆抗体指只含有一类能够与肽起免疫反应的抗原结合位点的抗体分子群。单克隆抗体组合物因此提出展示对与其起免疫反应的特定肽的单一结合亲和力。

[0197] 多克隆抗肽抗体可以如上文所述来制备，即用肽免疫原免疫接种合适的受试者。可以通过标准技术诸如使用固定化肽用酶联免疫吸附测定法（ELISA）随时间监测经免疫受试者中的抗肽抗体滴度。如果想要，可以自哺乳动物（例如自血液）分离针对肽的抗体分子，并通过诸如蛋白 A 层析等技术进一步纯化以获得 IgG 级分。在免疫接种后的适宜时间，例如当抗肽抗体滴度最高时，可以自受试者获得抗体生成细胞，并用于通过标准技术来制备单克隆抗体，诸如最初由 Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256 :495497 记载的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术 (Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4 :72)、或 EBV 杂交瘤技术 (Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 7796)。出于生成抗肽单克隆抗体的目的，可以应用于融合淋巴细胞和永生化细胞系的多种公开方案任一（参见例如 *Current Protocols in Immunology*, supra; Galfre et al. (1977) *Nature* 266 :55052; R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies : A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); 及 Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54 :387402, 通过述及完整收录每一篇的公开内容）。

[0198] 作为制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的备选方案，可以通过用本文中描述的肽筛选重组的组蛋白文库（例如抗体噬菌体展示文库）以分离结合该肽的免疫球蛋白文库成员来鉴定和分离单克隆抗肽抗体。

[0199] 抗肽抗体（例如单克隆抗体）可用于通过诸如亲和层析或免疫沉淀等技术来分离肽。此外，抗肽抗体可用于在本文中描述的筛选测定法中检测肽。可以任选将抗体偶联至可检测标记物诸如本文中描述的任何可检测标记物或者结合对的第一或第二成员（例如链霉亲和素 / 生物素或亲和素 / 生物素），可以将其第二成员偶联至可检测标记物。

[0200] 针对靶肽（例如本文中描述的肽）的非人抗体也可以在非人宿主（例如啮齿类动物）中生成，然后人源化，例如如美国专利 No. 6, 602, 503, EP 239400, 美国专利 No. 5, 693, 761, 及美国专利 No. 6, 407, 213 中记载的，通过述及完整收录每一篇的公开内容。

[0201] EP 239400 (Winter et al.) 记载了通过将一种物种中的 CDR 用来自另一物种的 CDR 替代（给定可变区内的）来改变抗体。与真正的嵌合抗体相比，CDR 替代抗体可以更不可能在人中引发免疫应答，因为 CDR 替代抗体含有相当少的非人成分。参见 Riechmann et al. (1988) *Nature* 332, 323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239, 1534-1536, 通过述及完整收录每一篇的公开内容。通常，将鼠抗体的 CDR 替代入人抗体的相应区，这通过使用重组核酸技术以生成编码期望替代抗体的序列来进行。可以添加期望同种型（例如 CH 的伽马 1 和 CL 的卡帕）的人恒定区基因区段，而且可以在哺乳动物细胞中共表达人源化重链和轻链基因以生成可溶性人源化抗体。

[0202] WO 90/07861 记载了一种方法，其包括通过计算机分析来选择人 V 框架区以实现与初始鼠抗体 V 区框架的最佳蛋白质序列同源性，并对鼠 V 区的三级结构建模以显现有可能与鼠 CDR 起相互作用的框架氨基酸残基。然后将这些鼠氨基酸残基叠加到同源人框架

上。还可参见美国专利 No. 5,693,762 ;5,693,761 ;5,585,089 ;及 5,530,101。作为标准, Tempest et al. (1991) *Biotechnology* 9,266-271 使用分别自 NEWM 和 REI 重链和轻链衍生的 V 区框架, for CDR 嫁接, 没有根本性地引入小鼠残基。使用 Tempest 等人的办法来构建基于 NEWM 和 REI 的人源化抗体的一项优点在于 NEWM 和 REI 可变区的三维结构是根据 x 射线结晶学而已知的, 且因此可以对 CDR 与 V 区框架残基之间的特定相互作用建模。

[0203] 可以修饰非人抗体以包括插入人免疫球蛋白序列的替代, 例如特定位置处的共有人氨基酸残基, 例如一个或多个 (例如至少 5 个、10 个、12 个、或所有) 下面的位置: (在轻链可变域框架中) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L, 和 / 或 (在重链可变域框架中) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H, 和 / 或 103H (依照 Kabat 编号方式)。参见例如美国专利 No. 6,407,213, 通过述及将其公开内容完整收入本文。

[0204] 结合靶肽的完全人的单克隆抗体可以例如使用体外引发的人脾细胞来生成, 如 Boemer et al. (1991) *J. Immunol.*, 147, 86-95 记载的。它们可以通过全集克隆来制备, 如 Persson et al., 1991, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88 :2432-2436 或 Huang and Stollar (1991) *J. Immunol. Methods* 141, 227-236 ;还有美国专利 No. 5,798,230 记载的, 通过述及将每一篇的公开内容完整收入本文。使用标准噬菌体技术, 大型未免疫人噬菌体展示文库也可以用于分离高亲和力抗体, 其可以开发成人治疗剂 (参见例如 Vaughan et al., 1996 ;Hoogenboom et al. (1998) *Immunotechnology* 4 :1-20 ;及 Hoogenboom et al. (2000) *Immunol Today* 2 :371-8 ;美国专利申请公开文本 No. 2003-0232333, 通过述及完整收录每一篇的公开内容)。

[0205] 如本文中使用的, “免疫球蛋白可变域序列” 指可以形成免疫球蛋白可变域结构的氨基酸序列。例如, 序列可以包括天然存在可变域的氨基酸序列的整个或部分。例如, 序列可以省略一个、两个或更多个 N 或 C 端氨基酸、内部氨基酸, 可以包括一处或多处替代或添加的末端氨基酸, 或者可以包括其它改变。在一个实施方案中, 包括免疫球蛋白可变域序列的肽可以结合另一免疫球蛋白可变域序列以形成靶物结合结构 (或 “抗原结合位点”), 例如与靶肽起相互作用的结构。

[0206] 抗体的 VH 或 VL 链可以进一步包括重链或轻链恒定区的整个或部分, 以由此分别形成重链或轻链免疫球蛋白链。在一个实施方案中, 抗体是两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的四聚体。免疫球蛋白重链和轻链可以通过二硫键相连接。重链恒定区通常包括三个恒定域 (即 CH1、CH2 和 CH3) 和一个铰链区。轻链恒定区通常包括一个 CL 域。重链和轻链的可变区含有与抗原起相互作用的结合域。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织或因子的结合, 包括免疫细胞的各种细胞 (例如效应细胞) 和经典补体系统第一成分 (C1q)。

[0207] 抗体的一个或多个区可以是人的、有效人化的、或人源化的。例如, 一个或多个可变区可以是人的或有效人化的。例如, 一个或多个 CDR (例如重链 (HC) CDR1、HC CDR2、HC CDR3、轻链 (LC) CDR1、LC CDR2、和 LC CDR3) 可以是人的。每个轻链 CDR 可以是人的。HC CDR3 可以是人的。一个或多个框架区 (FR) 可以是人的, 例如 HC 或 LC 的 FR1、FR2、FR3、和 FR4。在一些实施方案中, 所有框架区是人的, 例如衍生自人体细胞, 例如生成免疫球蛋白的

造血细胞或非造血细胞。在一个实施方案中,人序列是种系序列,例如由种系核酸编码的。一个或多个恒定区可以是人的、有效人化的、或人源化的。在另一个实施方案中,至少 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 或 98% 的框架区(例如 FR1、FR2、和 FR3 合计,或 FR1、FR2、FR3、和 FR4 合计)或整个抗体可以是人的、有效人化的、或人源化的。例如,FR1、FR2、和 FR3 合计可以与由人种系区段编码的人序列至少 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98, 或 99% 相同。在一些实施方案中,为了人源化鼠抗体,可以将小鼠 Ig 基因座的一个或多个区用相应人 Ig 基因座替换(参见例如 Zou et al. (1996) The FASEB Journal Vol 10, 1227-1232; Popov et al. (1999) J. Exp. Med. 189(10) 1611-1619; 及 Nicholson et al. (1999) J. Immunol. 163(12) 6898-6906; 通过述及完整收录每一篇的公开内容)。

[0208] “有效人化的”免疫球蛋白可变区指包括足够数目的人框架氨基酸位置使得免疫球蛋白恒定区在正常人中不引发免疫原性应答的免疫球蛋白可变区。“有效人化的”抗体指包括足够数目的人氨基酸位置使得抗体在正常人中不引发免疫原性应答的抗体。

[0209] “人源化的”免疫球蛋白可变区指经过修饰使得经修饰形式在人中引发比未修饰形式少的免疫应答的免疫球蛋白可变区,例如修饰成包括足够数目的人框架氨基酸位置,使得免疫球蛋白可变区在正常人中不引发免疫原性应答。关于“人源化的”免疫球蛋白的描述包括例如美国专利 No. 6, 407, 213 及美国专利 No. 5, 693, 762, 通过述及将每一篇的公开内容完整收入本文。在一些情况中,人源化免疫球蛋白可以在一个或多个框架氨基酸位置包括非人氨基酸。

[0210] 抗体整个或部分可以由免疫球蛋白基因或其区段编码。例示性的人免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA1 和 IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(约 25kDa 或 214 个氨基酸)由 NH₂ 端的可变区基因(约 110 个氨基酸)和 COOH 端的 κ 或 λ 恒定区基因编码。全长免疫球蛋白“重链”(约 50kDa 或 446 个氨基酸)类似地由可变区基因(约 116 个氨基酸)和其它上述恒定区基因之一例如 γ (编码约 330 个氨基酸)编码。

[0211] 全长抗体的术语“抗原结合片段”指全长抗体保留特异性结合感兴趣靶物的能力的片段。全长抗体的术语“抗原结合片段”内涵盖的结合片段的例子包括:(i) Fab 片段,即一种单价片段,其由 VL、VH、CL 和 CH1 域组成;(ii) F(ab')₂ 片段,即一种二价片段,其包括通过铰链区处的二硫桥相连接的两个 Fab 片段;(iii) Fd 片段,其由 VH 和 CH1 域组成;(iv) Fv 片段,其由抗体一条臂的 VL 和 VH 域组成;(v) dAb 片段 (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546),其由 VH 域组成;和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR),其保留功能性。另外,虽然 Fv 片段的两个域,即 VL 和 VH,是由分开的基因编码的,但是可以使用重组方法通过合成接头来连接它们,使得它们能够作为单一蛋白质链生成,其中 VL 和 VH 区配对以形成称作单链 Fv (scFv) 的单价分子。(参见例如 Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 及 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 通过述及将每一篇的公开内容完整收入本文)。

[0212] 抗体

[0213] 通过本文中描述的方法生成的分离的抗体或其抗原结合片段可以选择性结合 SEQ ID NO:1-18 任一氨基酸序列内的或与 SEQ ID NO:1-18 任一氨基酸序列交叠的表位。抗体还可以是交叉阻断结合 SEQ ID NO:1-18 任一氨基酸序列内的或与 SEQ ID NO:1-18 任一氨

氨基酸序列交叠的表位的抗体结合的抗体。通常,当抗体以小于 10^{-6} M 的 K_D 结合时,认为抗体对表位的结合是选择性的。如果必要,可以通过改变结合条件来降低非特异性结合而基本上不影响选择性结合。“交叉阻断”的抗体或“交叉阻断性抗体”指如下的第一抗体,其在结合表位(例如 SEQ ID NO:1-18 任一内的或与 SEQ ID NO:1-18 任一交叠的表位)时降低或消除第二抗体结合肽的能力(相对于在第一抗体缺失下发生的第二抗体对肽的结合)。

[0214] 本领域技术人员理解,通过本文中描述的方法生成的抗体(例如对一种或多种本文中描述的肽特异性的抗体)可用于例如检测表达 XBP1、CD138、或 CS1 的癌细胞,且因此可用于本文中描述的许多例示性方法。

[0215] 选择治疗法的方法

[0216] 用于为具有癌症(例如浆细胞病症,诸如多发性骨髓瘤和/或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症或任何表达 XBP1、CD138、或 CS1 的癌症)的受试者选择疗法的方法包括下述步骤:任选确定受试者的癌症的一个或多个细胞(例如浆细胞)是否表达 XBP1;并若一个或多个细胞表达 XBP1,则选择含有至少一种如下的肽的组合物作为所述受试者的疗法,所述肽包含 SEQ ID NO:1-10 任一的氨基酸序列。如上文描述的,所述氨基酸序列可以是与 SEQ ID NO:1-10 任一的氨基酸序列至少 66% 相同,或者含有 SEQ ID NO:1-10 任一的氨基酸序列的不超过 4 处替代,前提是所述氨基酸序列能够:(i) 在受试者诱导免疫应答;(ii) 结合 MHC 分子;和 (iii) 在 MHC 分子的环境中受到 T 细胞上 T 细胞受体识别。所述肽还可以是包含下述各项的肽:基本上由表 1 中描绘的 SEQ ID NO:1-10 任一组成或由其组成的第一氨基酸序列;和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。

[0217] 用于为具有癌症的受试者选择疗法的方法可以包括下述步骤:任选确定受试者的癌症的一个或多个细胞(例如浆细胞)是否表达 CD138;并若一个或多个细胞表达 CD138,则选择含有至少一种如下的肽的组合物作为所述受试者的疗法,所述肽包含 SEQ ID NO:11-14 任一的氨基酸序列。如上文描述的,所述氨基酸序列可以是与 SEQ ID NO:11-14 任一的氨基酸序列至少 66% 相同,或者含有 SEQ ID NO:11-14 任一的氨基酸序列的不超过 4 处替代,前提是所述氨基酸序列能够:(i) 在受试者中诱导免疫应答;(ii) 结合 MHC 分子;和 (iii) 在 MHC 分子的环境中受到 T 细胞上 T 细胞受体识别。所述肽还可以是包含下述各项的肽:基本上由表 1 中描绘的 SEQ ID NO:11-14 任一组成或由其组成的第一氨基酸序列;和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。

[0218] 用于为具有癌症的受试者选择疗法的方法可以包括下述步骤:任选确定受试者的癌症的一个或多个细胞(例如浆细胞)是否表达 CS1;并若一个或多个细胞表达 CS1,则选择含有至少一种如下的肽的组合物作为所述受试者的疗法,所述肽包含 SEQ ID NO:15-18 任一的氨基酸序列。如上文描述的,所述氨基酸序列可以是与 SEQ ID NO:15-18 任一的氨基酸序列至少 66% 相同,或者含有 SEQ ID NO:11-14 任一的氨基酸序列的不超过 4 处替代,前提是所述氨基酸序列能够:(i) 在受试者中诱导免疫应答;(ii) 结合 MHC 分子;和 (iii) 在 MHC 分子的环境中受到 T 细胞上 T 细胞受体识别。所述肽还可以是包含下述各项的肽:基本上由表 1 中描绘的 SEQ ID NO:15-18 任一组成或由其组成的第一氨基酸序列;和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列。

[0219] 本领域技术人员理解,在受试者的癌症的一个或多个细胞(例如浆细胞)表达 XBP1、CD138、和 CS1 中两种或更多种的情况中,可以给受试者投递一组合适的肽。例如,在

受试者的癌症的一个或多个细胞（例如浆细胞）测定为表达 XBP1 和 CD138 的情况中，用于选择疗法的方法可以包括选择下述各项作为所述受试者的疗法：(a) 含有至少一种包含 SEQ ID NO:1-10 任一氨基酸序列肽的组合物和含有至少一种包含 SEQ ID NO:11-14 任一氨基酸序列的肽的组合物的组合；或 (ii) 包含至少一种包含 SEQ ID NO:1-10 任一氨基酸序列的肽和至少一种包含 SEQ ID NO:11-14 任一氨基酸序列的肽的组合物。

[0220] 用于确定一个或多个细胞是否表达 XBP1、CD138、或 CS1 的方法是本领域已知的，而且上文有描述。例如，可以使用通过本文中描述的方法制备的 XBP1、CD138、或 CS1 特异性抗体来测试自受试者获得的生物学样品（例如血液样品或淋巴结组织样品）以检测由细胞（或细胞溶胞物）表达的 XBP1、CD138、或 CS1 多肽的存在或量。（参见例如工作实施例和 Sambrook et al., supra）。用于对生物学样品测定多肽的存在或量的方法包括例如 ELISA、免疫组织化学、流式细胞术、Western 印迹、或点印迹测定法。

[0221] 在一些实施方案中，本文中描述的任何方法还可以包括提供来自受试者的生物学样品和 / 或获得来自受试者的生物学样品的步骤。用于本文中描述的方法的合适生物学样品包括任何生物学流体、细胞、组织、或其级分，其包括感兴趣的分析物蛋白质（例如 XBP1、CD138、或 CS1 蛋白质）。生物学样品可以是例如自受试者（例如哺乳动物，诸如人）获得的标本，或者可以衍生自此类受试者。例如，样品可以通过活检获得的组织切片或放置在组织培养中或适应组织培养的细胞。生物学样品还可以是含有细胞的生物学流体，诸如尿液、血液、血浆、血清、唾液、精液、痰、脑脊髓液、泪液、粘液或抽吸物（例如肺或乳头抽吸物），或者吸收到纸或聚合物基片上的样品。生物学样品可以进一步进一步分级，如果想要，分级成含有特定细胞类型的级分。例如，血液样品可以分级成血清，或者分级成含有特定类型血细胞（诸如红血球或白血球（白细胞））的级分。如果想要，样品可以是来自受试者的多种样品类型的组合，诸如组织与生物学流体的组合。

[0222] 生物学样品可以得自受试者，例如具有、怀疑具有、或有风险发生癌症（例如多发性骨髓瘤和 / 或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症）的受试者。可以采用用于获得生物学样品的任何合适方法，尽管例示性的方法包括例如放血、拭样（例如口腔拭样）、穿刺、或细针穿刺活检规程。容许细针穿刺的组织非限制性例子包括淋巴结、肺、甲状腺、乳房、和肝。也可以例如通过显微切割（例如激光捕捉显微切割 (LCM) 或激光显微切割 (LMD)）、膀胱清洗、涂片 (PAP 涂片)、或导管灌洗来收集样品。

[0223] 例如使用上文描述的方法在受试者中检测到癌症（例如多发性骨髓瘤和 / 或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症）后，医学从业人员（例如医生）可以通过例如下述各项为受试者选择适宜的治疗模态（例如包含一种或多种本文中描述的肽的疗法）：(i) 书写药物处方；(ii) 将药物给予（但是不必施用）受试者（例如当患者在内科医师的办公室时将处方药物的样品交给患者）；(iii) 给患者通讯（口头的、书面的（处方以外的）、或电子的（电子信函、到可靠地点的电子邮件））建议的或推荐的治疗模态（例如包含一种或多种本文中描述的肽的疗法）；或 (iv) 为受试者鉴定合适的治疗模态并将信息散布给其它医学人员，例如经由患者记录。后面的 (iv) 在如下的情况中可以有用的，其中例如要由不同医学从业人员给患者施用超过一种疗法或治疗剂。

[0224] （使用上文任何方法）检测受试者中 XBP1、CD138、或 CS1 的存在或量；和 / 或为受试者选择疗法后，医学从业人员（例如医生）可以给受试者施用适宜治疗模态。用于施用

包含一种或多种本文中描述的肽的疗法的方法上文有详述。

[0225] 另外,医学从业人员还可以选择、开处方和/或施用一种或多种用于治疗癌症的别的治疗剂或一种或多种用于治疗抗癌剂的副作用的药物。用于治疗多发性骨髓瘤和/或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的合适化疗剂包括例如美法仑(melphalan)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、长春新碱(vincristine)、多柔比星(doxorubicin)、泼尼松(prednisone)、地塞米松(dexamethasone)、蛋白体抑制剂(例如bortezomib)、沙利度胺(thalidomide)、或lenalidomide。

[0226] 抗癌剂的副作用包括例如贫血、胃肠症状(例如恶心、呕吐、腹泻)、白细胞减少(白血球数目减少,这可引起感染)、暂时掉发、或血小板减少(血小板数目减少,这可引起出血)。如此,医生可以连同抗贫血药物诸如Epoetinalpha(例如Procrit®或Epogen®)一起给受试者开处方或施用化疗剂诸如长春新碱。

[0227] 试剂盒和制品

[0228] 本公开内容的特征还有多种试剂盒。试剂盒可以包括例如一种或多种(例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10或更多种)本文中描述的任何肽(或含有编码一种或多种肽的核酸序列的表达载体);和关于给受试者施用肽的用法说明。试剂盒可以包括一种或多种药学可接受载体和/或一种或多种免疫刺激剂。免疫刺激剂可以是例如T辅助者表位、改变的肽配体、或佐剂。

[0229] 试剂盒还可以含有一种或多种治疗剂、诊断剂、或预防剂。一种或多种治疗剂、诊断剂、或预防剂包括但不限于:(i) 调控炎症应答的药剂(例如阿司匹林(aspirin)、吲哚美辛(indomethacin)、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、类固醇(steroids)、色甘酸钠(cromolyn sodium)、或茶碱(theophylline));(ii) 影响肾和/或心血管功能的药剂(例如呋塞米(furosemide)、噻嗪(thiazide)、阿米洛利(amiloride)、螺内酯(spironolactone)、卡托普利(captopril)、依那普利(enalapril)、赖诺普利(lisinopril)、地尔硫卓(diltiazem)、硝苯地平(nifedipine)、维拉帕米(verapamil)、地高辛(digoxin)、硝酸异山梨酯(isordil)、多巴酚丁胺(dobutamine)、利多卡因(lidocaine)、奎尼丁(quinidine)、腺苷(adenosine)、洋地黄(digitalis)、美伐他汀(mevastatin)、洛伐他汀片(lovastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、或甲羟戊酸(mevalonate));(iii) 影响胃肠功能的药物(例如奥美拉唑(omeprazole)或硫糖铝(sucralfate));(iv) 抗生素(例如四环素(tetracycline)、克林霉素(clindamycin)、两性霉素B(amphotericin B)、奎宁(quinine)、甲氧西林(methicillin)、万古霉素(vancomycin)、青霉素G(penicillin G)、阿莫西林(amoxicillin)、庆大霉素(gentamicin)、红霉素(erythromycin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、多西环素(doxycycline)、链霉素(streptomycin)、庆大霉素(gentamicin)、妥布霉素(tobramycin)、氯霉素(chloramphenicol)、异烟肼(isoniazid)、氟康唑(fluconazole)、或金刚烷胺(amantadine));(v) 抗癌剂(例如环磷酰胺(cyclophosphamide)、甲氨蝶呤(methotrexate)、氟尿嘧啶(flourouracil)、阿糖胞苷(cytarabine)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、多柔比星(doxorubicin)、博来霉素(bleomycin)、丝裂霉素C(mitomycin C)、羟基脲(hydroxyurea)、泼尼松(prednisone)、他莫昔芬(tamoxifen)、顺铂(cisplatin)、或达卡

巴嗪 (decarbazine)) ;(vi) 免疫调节剂 (例如白介素、干扰素例如干扰素伽马 (IFN- γ)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、肿瘤坏死因子阿尔法 (TNF α)、肿瘤坏死因子贝塔 (TNF β)、环孢霉素 (cyclosporine)、FK506、硫唑嘌呤 (azathioprine)、类固醇) ;(ix) 作用于血液和 / 或血液形成器官的药物 (例如白介素、G-CSF、GM-CSF、红细胞生成素、肝素、华法林 (warfarin)、或香豆素 (coumarin)) ;或 (vii) 激素 (例如生长激素 (GH)、促乳素、黄体化激素、TSH、ACTH、胰岛素、FSH、CG、生长抑素、雌激素、雄激素、孕酮、促性腺激素释放激素 (GnRH)、甲状腺素、三碘甲腺原氨酸) ;激素拮抗剂 ;影响钙化和骨周转的药剂 (例如钙、磷酸盐、甲状旁腺素 (PTH)、维生素 D、二磷酸盐、降钙素、氟化物)。

[0230] 在一些实施方案中,试剂盒可以含有一种或多种 (例如一种、两种、或三种或更多种) 本文中描述的任何 XBP1、CD138、和 / 或 CS1 抗体。在一些实施方案中,试剂盒可以包括两种抗体,每种对不同的蛋白质是特异性的。例如,试剂盒可以含有一种 XBP1 特异性抗体 (本文中描述的) 和一种 CS1 特异性抗体 (本文中描述的)。在一些实施方案中,试剂盒可以包括三种抗体,每种对不同的蛋白质是特异性的。试剂盒可以任选包括关于对生物学样品测定一种或多种 XBP1、CD138、和 / 或 CS1 蛋白的存在或量的用法说明。

[0231] 特征还有制品,其包括 :容器 ;和装在容器中的组合物,其中组合物包含用于在哺乳动物 (例如人) 中降低免疫应答的活性组分,其中活性组分包含一种或多种 (例如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10 或更多种) 本文中描述的任何肽,且其中容器有标签指明组合物用于在哺乳动物 (例如本文中描述的任何哺乳动物) 中降低免疫应答。标签可以进一步指明组合物要施用于具有、怀疑具有、或有风险发生多发性骨髓瘤和 / 或瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症的哺乳动物。制品中的组合物可以是干燥的或冻干的,而且可以包括例如一种或多种用于溶解干燥或冻干组合物的溶液 (和 / 或关于溶解干燥或冻干组合物的用法说明)。

[0232] 制品还可以包括关于给哺乳动物施用组合物 (例如如上所述) 的用法说明。

[0233] 下面的实施示意图而非限制本发明。

实施例

[0234] 实施例 1 :材料和方法

[0235] 细胞系。人多发性骨髓瘤细胞系 :McCAR、MM1S 和 U226 得自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC ;Manassas, VA)。人急性髓样白血病 (AML) 细胞系 ML-2 由 Dr. Y Matsuo (Fujisaki Cell Center, Okayama, Japan) 馈赠。T2 细胞系,其是表达 HLA-A2.1 分子的人 B 和 T 细胞杂合物 (Zweerink et al., (1993) J Immunol. 150 (5) :1763-71), 由 Dr. J. Mouldrem (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX) 提供,而且用作抗原呈递细胞 (APC) 的来源。所有细胞系在补充有 10% 胎牛血清 (FCS ;BioWhittaker, Walkersville, MD)、100 IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素 (Gibco-Life Technologies) 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco-Life Technologies, Rockville, MD) 中培养。

[0236] 试剂。偶联有藻红蛋白 (PE) 小鼠抗人 CD80 或 CD83 单克隆抗体 (单抗) 购自 Immunotech (Hialegha, FL)。偶联有异硫氰酸荧光素 (FITC)、PE 或 PerCP 的 CD3、CD4、CD8、CD14、CD40、CD45RA、CD45RO、CD69、CD80、CD83、CD86、CCR7、HLA-A2 和 HLA-DR 特异性单抗购自 Becton Dickinson/Pharmingen (San Diego, CA)。

[0237] 合成的肽。流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆(GIL GFVFTL;SEQ ID NO:25)和 MAGE-3 肽(FLWGPRLV;SEQ ID NO:26)用作对照 HLA-A2 结合肽。六种天然的未剪接 XBP1 肽:XBP1₁₁₇₋₁₂₅(LLREKTHGL;SEQ ID NO:1);XBP1₁₈₄₋₁₉₂(NISPWILAV(SEQ ID NO:2));XBP1₁₈₉₋₁₉₇(ILAVLTLQI(SEQ ID NO:3));XBP1₁₉₂₋₂₀₀(ILAVLTLQI(SEQ ID NO:4));XBP1₁₁₀₋₁₁₈(KLLLENQLL(SEQ ID NO:5));XBP1₉₃₋₁₀₁(RMSELEQQV(SEQ ID NO:27));三种天然的经剪接 XBP1 肽,包括 SP XBP1₁₉₆₋₂₀₄(GILDNLDPV(SEQ ID NO:7));SP XBP1₁₉₃₋₂₀₁(ILLGILDNL(SEQ ID NO:8));SP XBP1₃₆₇₋₃₇₅(ELFPQLISV(SEQ ID NO:9));不规则的 XBP1(YISPWILAV(SEQ ID NO:6));和不规则的经剪接的 XBP1(YILDNLDPV(SEQ ID NO:27));和 YLFPQLISV(SEQ ID NO:10)肽作为潜在 HLA-A2 结合肽而设计并检验。如本文中使用的,“不规则”(例如不规则肽)指一种形式的肽,其中一个或多个氨基酸相对于野生型或初始序列进行了修饰以产生免疫原性比相应的野生型肽要高的肽。例如,在上文刚刚描述的例示性不规则肽中,粗体的氨基酸指示相对于 XBP1 的野生型序列进行了修饰的氨基酸。

[0238] 四种天然 CD138 肽:CD138₂₅₆₋₂₆₄(VIAGGLVGL(SEQ ID NO:11));CD138₂₆₀₋₂₆₈(GLVGLIFAV(SEQ ID NO:12));CD138₅₋₁₃(ALWLWLCAL(SEQ ID NO:13));和 CD138₇₋₁₅(WLWLCALAL(SEQ ID NO:14))作为潜在 HLA-A2 结合肽而设计并检验。

[0239] 四种天然 CS1 肽:CS1-P1:CS1₂₃₆₋₂₄₅(LLLSLFLVGL(SEQ ID NO:15));CS1-P2:CS1₂₃₉₋₂₄₇(SLFVLGLFL(SEQ ID NO:16));CS1-P3:CS1₂₃₂₋₂₄₀(LLVPLLLSL(SEQ ID NO:17));和 CS1-P4:CS1₉₋₁₇(TLIYILWQL(SEQ ID NO:18))作为潜在 HLA-A2 结合肽而设计(使用三个不同的数据库 RANKPEP、BIMAS 和 NetMHC)并检验。(参见例如 Reche et al. (2002) Human Immunology 63:710-709)。

[0240] XBP-1 和 CD138 肽通过标准 FMOC(9-苄基甲基-氧羰基)化学来合成(Biosynthesis, Lewisville, TX),使用反相层析纯化至>85%,并通过质谱术来验证分子量。CS1 肽由 New England Peptides LLC 合成,纯度大于 95%。将冻干的肽在二甲亚砜(DMSO)(Sigma, St. Louis, MO)中溶解,在 AIM-V 培养基(Gibco-Life Technologies)中稀释,并保存于-140°C。

[0241] 肽结合测定法。在 T2 细胞上评估 XBP1、CD138、或 CS1 肽的 HLA-A2 结合。在该测定法中,清洗 T2 细胞,在无血清 AIM-V 培养基中重悬浮至终浓度 1×10^6 细胞/ml,并转移入 24 孔组织培养板。将细胞与 50 μ g/ml 各 XBP1、CD138、或 CS1 肽或 30 μ g/ml 流感病毒蛋白基质肽加 3 μ g 人 β_2 微球蛋白(Sigma)一起温育,于 37°C,5% CO₂ 在增湿空气中温育。过夜温育后,清洗细胞,然后于 4°C 接触 FITC 偶联的(或在测定 CS1 肽对 HLA-A2 的结合的情况下,PE 偶联的)小鼠抗人 HLA-A2 单克隆抗体 15 分钟。再次清洗细胞,然后使用 FACS Sort™ 流式细胞仪及 CellQuest™ v2.1 软件(Becton Dickinson, San Jose, CA)通过荧光流式细胞术(FFC)来分析。肽结合 HLA-A2 的能力通过用 FFC 分析测量 T2 细胞上由肽结合 HLA-A2 引起的 HLA-A2 分子上调来测定,其反映为均值荧光强度(MFI)。

[0242] 肽稳定性测定法。使用人 T2 细胞系检查 XBP1 或 CD138 肽在 HLA-A2 分子的结合沟中的稳定性。如上所述将 T2 细胞与各种肽一起温育。过夜温育后,清洗细胞以除去未结合的肽,然后与 10 μ g/ml 布雷菲德菌素 A(Sigma)一起于 37°C 温育 1 小时以阻断新合成的 HLA-A2.1 分子的细胞表面表达。在布雷菲德菌素(Brefeldin)A 处理后 0、2、4、6 和 18 小时时测量肽/HLA-A2 结合稳定性。温育期后,收获细胞,清洗,用 FITC 偶联的小鼠抗人

HLA-A2 单克隆抗体染色, 并使用 FACSTM Sort 流式细胞仪及 CellQuestTM v2.1 软件 (Becton Dickinson) 通过 FFC 来分析。

[0243] 单核细胞衍生的成熟树突细胞的生成。使用 Ficoll-PaqueTM Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden) 上的标准密度梯度离心自取自正常人供体的白细胞血袋分离外周血单个核细胞 (PBMC)。如下自作为贴壁细胞级分获得的单核细胞生成树突细胞 (DC)。为了生成不成熟 DC (immDC), 将单核细胞在补充有 10% 胎牛血清 (FCS; BioWhittaker, Walkersville, MD) 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco-Life Technologies, Rockville, MD) 中在 1,000U/ml GM-CSF (粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子) 和 1,000U/ml IL-4 (白介素-4) 存在下培养 7 天。隔天给培养物添加新鲜培养基加 GM-CSF 和 IL-4。在第 7 天通过将 immDC 在 1,000U/ml IFN- α (干扰素阿尔法) 加 10ng/ml TNF- α (肿瘤坏死因子阿尔法) 及新鲜的含 GM-CSF 和 IL-4 的 10% FCS-RPMI 中培养 3 天来获得成熟 DC (mDC)。收获 immDC 和 mDC, 并使用 CD14、CD40、CD80、CD83、CD86、和 HLA-DR 特异性抗体和 FFC 分析检查它们的表达表型。

[0244] CD3⁺T 细胞的分离。使用泛 T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 自 PBMC 的不贴壁细胞级分 (单核细胞贴壁后) 获得正常供体的 T 细胞。简言之, 如下实现 T 细胞富集, 即通过用半抗原偶联的 CD11b、CD16、CD19、CD36 和 CD56 抗体的混合物标记和含有偶联有抗半抗原单克隆抗体的 MAC 微珠的柱来消减 B 细胞、NK 细胞、早期红细胞样细胞、血小板和嗜碱性细胞。自柱收集流出液 (阴性细胞级分), 作为经过富集的 CD3⁺T 细胞。通过流式细胞术检查自初始获得的 T 细胞富集的 CD3⁺T 细胞的纯度 (均值 $\pm$ 标准偏差), 发现是 $94 \pm 2\%$ 。

[0245] 对肽特异性 CTL 的诱导。通过用经 XBP1、CD138、或 CS1 肽脉冲的抗原呈递细胞 (APC) (或是 T2 细胞或是 mDC) 重复刺激自正常 HLA-A2⁺ 供体获得的 CD3⁺T 淋巴细胞来离体生成肽特异性 CTL (即 XBP1、CD138、或 CS1 肽特异性 CTL)。简言之, 清洗 T2 细胞, 并在无血清 AIM-V 培养基 (Gibco BRL) 中重悬浮, 并于 37°C 用 50 μ g/ml 适宜 XBP1 或 CD138 肽脉冲过夜。清洗经肽脉冲的 APC, 计数, 以 10Gy 辐照, 并在补充有 10% 人 AB 血清 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 的 AIM-V 培养基中以 1 : 40 T2/肽 (刺激物) 对 CD3⁺T 细胞 (响应物) 比用于引发 CD3⁺T 细胞。每七天用经辐照的 APC/肽再刺激 T 细胞培养物, 总共 4 个循环, 以生成 XBP1 肽特异性 CTL (XBP1-CTL)、CD138 肽特异性 CTL (CD138-CTL)、或 CS1 肽特异性 CTL (CS1-CTL)。根据上文清楚的是, 本文中提到的“XBP1-CTL”、“CD138-CTL”、和“CS1-CTL”不是克隆 (或同质) 群。更正确地说, XBP1-CTL、CD138-CTL、和 CS1-CTL 细胞是自正常供体获得的含有 XBP1 肽、CD138 肽、或 CS1 肽特异性 CTL 及非特异性 CTL、APC、和其它淋巴细胞的异质淋巴细胞群。第二次刺激后 2 天将 50U/ml 白介素-2 (IL-2) 添加至培养物。在含有 50U/ml IL-2 补充有 10% 人 AB 血清的 AIM-V 培养基中维持对照 T 细胞培养物 (未用肽刺激)。

[0246] XBP1-CTL、CD138-CTL、或靶细胞的表型分析。为了测定 XBP1-CTL 的表型, 使用抗 CD4-PE 或抗 CD8-FITC 小鼠抗人单抗来检测细胞的 CD4 或 CD8 表达。另外, 使用 FITC 偶联的抗 CD69/PE 偶联的抗 CD45RO 或 FITC 偶联的抗 CD45RA-FITC/PE 偶联的抗 CCR7 小鼠抗人单抗任一的组合来检测细胞上的多种其它表达标志物。或者, 使用 FITC 偶联的抗 HLA-A2 抗人单抗来测定 U266、McCAR、ML-2 和 MM1S 细胞的 HLA-A2 表达。于 4°C 使细胞接触抗体 15 分

钟后,清洗细胞,并使用 FACSsort™ 流式细胞仪及 CellQuest v2.1 软件 (Becton Dickinson) 来分析。

[0247] Western 印迹。将大约 100 μ g 来自每种细胞系 (U266、McCAR、ML-2、和 MM1S) 的蛋白质溶物在 Laemmli 氏样品缓冲液 (0.1M Tris-HCl 缓冲液 pH6.8, 含有 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.05% β -巯基乙醇、10% 甘油和 0.001% 溴酚蓝) 中悬浮,煮沸 2 分钟,并以 80V 进行 8-16% 梯度十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 2 小时 (Xcell Surelock Mini Cell, Invitrogen, Carlsbad, CA)。蛋白质梯形物 (分子量已知的蛋白质的混合物) 用作凝胶中的大小标志以测定肽的分子量 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。在 Tris-甘氨酸缓冲液中以 40V 2 小时将凝胶电印迹到硝酸纤维素膜 (Trans-Blot, 0.2 微米转移膜, Bio-Rad Laboratories, CA) 上。通过 Ponceau S 染色来确认蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。膜与小鼠抗人 XBP1 抗体或抗人 CD138 抗体一起的温育在含有 1% BSA 的磷酸盐缓冲液盐水和 Tween 20 (PBST) 中实施 1 小时,不停摇动。将膜用 PBST 清洗三次,并在含有 3% 脱脂奶粉的 PBST 中在抗小鼠 IgG-辣根过氧化物酶偶联物中温育 1 小时。清洗后,依照产品手册 (Amersham Life Sciences Inc., Arlington Heights, IL) 中提供的用法说明,使用增强型化学发光来检测特定蛋白质。

[0248] IFN- γ ELISA。使用人 IFN- γ ELISA 试剂盒 (BD Biosciences, San Diego, CA) 测量 XBP1-CTL、CD138-CTL、或 CS1-CTL 与多发性骨髓瘤 (MM) 细胞 (McCAR、MM1S)、急性髓性白血病 (AML) 细胞 (ML-2)、或 T2 细胞 (上文) 一起共培养后的 IFN- γ 释放。简言之,将作为标准品的经纯化的 IFN- γ 的稀释液或 CTL 上清液转移入经单克隆抗人 IFN- γ 捕捉抗体预包被的 96 孔板的孔,并于室温温育 2 小时。数次清洗后,将含有检测抗体和亲合素-辣根过氧化物酶偶联物的缓冲液添加至每个孔,并于室温温育 1 小时。清洗孔,然后给每个孔添加辣根过氧化物酶底物溶液,并于室温温育 30 分钟。将终止溶液添加至每个孔,并用 PerkinElmer Wallac Victor2 计数器 (PerkinElmer, Wellesley, MA) 测定 450nm 处的吸光度。根据 IFN- γ 标准曲线来计算 CTL 培养物上清液中存在的细胞因子的量。

[0249] 通过羧基荧光素琥珀酰亚氨基酯 (CFSE) 示踪的细胞增殖。将 XBP1-CTL 或 CD138-CTL 在 PBS (Gibco-BRL) 中清洗两次,并以浓度 1×10^6 细胞 /ml 在 RPMI-1640 培养基中重悬浮。将 DMSO 中 5mM 储备溶液形式的 CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) 添加至 CTL 以给出终浓度 5 μ M,并在 CO₂ 温箱中于 37°C 避光温育 10 分钟。温育后,将体积相当于 CTL 细胞体积 5 倍的冰冷的 PBS (含有 2% FCS) 添加至细胞以淬灭反应。将细胞在冰上温育 5 分钟,离心,并在总共三次清洗后在新鲜的 PBS (含有 2% FCS) 中重悬浮。将 CFSE 标记的 T 细胞用 RPMI 培养液调整至浓度为 2×10^6 细胞 /ml,用 2×10^5 细胞 /ml McCAR 细胞、ML-2 细胞、MM1S 细胞、或无细胞刺激。在第 4 天通过 FFC 分析来检查经刺激的 CFSE 标记的细胞。

[0250] 细胞毒性测定法。如例如 Roden et al. (1999) J. Immunol Methods 226:29-41 所述,通过钙荧光素释放测定法来测量 XBP1-CTL、CD138-CTL、或 CS1-CTL 的细胞毒性活性。简言之,将靶细胞 (3×10^5 个细胞) (包括 T2、U266 细胞、McCAR 细胞、ML-2 细胞、和 MM1S 细胞) 在含有 10mM 钙荧光素-AM (Molecular Probes) 的无血清培养基中于 37°C 温育 30 分钟,在冷的含 5% FCS 的 PBS 中清洗三次,并在 96 孔 U 底微量滴定板中 (重复三个孔 / 样品) 以各种效应细胞:靶细胞比与效应细胞 (5×10^3 细胞 / 孔) 一起温育。将板于 37°C 和 5%

CO₂ 温育 3 小时。温育后,通过以 1,000rpm 离心 5 分钟来沉淀细胞,并将 100 μl 上清液转移至 96 孔平底微量滴定板 (Nunc) 的孔,并作为自细胞释放的荧光的量来测量钙荧光素释放 (使用 VICTOR2-1420 多标记物计数器 (PerkinElmer, Boston, MA))。从去污剂释放的靶细胞计数和无效应细胞时从靶细胞自发释放的计数获得最大钙荧光素释放。如下计算细胞的细胞毒性: %特异性裂解 = [(实验释放 - 自发释放) ÷ (最大释放 - 自发释放)] × 100。

[0251] CD107 细胞毒性测定法。CD107 细胞毒性测定法如 Betts 等人 (2003) 和 Mittendorf 等人 (2005) 所述实施,只是有下文详述的微小更改。于 37°C 使在无血清培养基中及在组织培养板的孔中培养的 T2 或 McCAR 细胞接触 CD138 肽或 MAGE 肽大约 12 小时。然后清洗细胞以除去未结合的肽。然后以各种效应 (细胞): 靶 (细胞) 比将 CD138-CTL 与上文处理的 T2 cells 或 McCAR 细胞 (每一种呈递肽抗原) 一起共培养。在添加 CD138-CTL 的同时将 CD107a 和 CD107b (都偶联有可检测标记物 FITC) 每一种的 10 μl 等分试样添加至每个孔。将含有细胞的孔以 1000rpm 离心 5 分钟,并于 37°C 温育 1 小时。温育后,将 0.02 μg 布雷菲德菌素 A 添加至每个孔,并将细胞于 37°C 再温育 4 小时。收集细胞,用 Pharmingen 染色缓冲液 (Pharmingen-BD Biosciences, San Jose, CA) 清洗,并接触 PE 偶联的小鼠抗人 CD8 抗体 30 分钟以检测 CD8 表达。清洗细胞,并通过流式细胞术来分析。

[0252] 实施例 2: XBP1₁₈₄₋₁₉₂ (NISPWILAV) 和经剪接 XBP1₃₆₇₋₁₄₅ (ELFPQLISV) 肽展示对 HLA-A2 结合的高亲和力 / 稳定性

[0253] 使用搜索软件 SYFPEITHI (MHC 配体和肽基序的数据库, Institute for Cell Biology, Department of Immunology, Heidelberg) 分析了未剪接或经剪接 XBP1 蛋白的全长序列 (见上文) 以预测对 HLA-A2 特异性的肽,接着是 BIMAS 程序以选择具有延长的一半时间 (half-time) 解离速率的肽。自未剪接 XBP1 蛋白选择了总共六种潜在的 HLA-A2 结合型天然肽,如下面的: XBP1₁₁₇₋₁₂₅ (LLREKTHGL (SEQ ID NO:1); XBP1#1 肽), XBP1₁₈₄₋₁₉₂ (NISPWILAV (SEQ ID NO:2); XBP1#2 肽), XBP1₁₈₉₋₁₉₇ (ILAVLTLQI (SEQ ID NO:3); XBP1#3 肽), XBP1₁₉₂₋₂₀₀ (ILAVLTLQI (SEQ ID NO:4); XBP1#4 肽), XBP1₁₁₀₋₁₁₈ (KLLLENQLL (SEQ ID NO:5); XBP1#5 肽), 和 XBP1₉₃₋₁₀₁ (RMSELEQQV (SEQ ID NO:27); XBP1#6 肽)。另外,自经剪接 XBP1 蛋白选择了三种潜在的 HLA-A2 结合型天然肽供评估用: SP XBP1₁₉₆₋₂₀₄ (GILDNLDPV (SEQ ID NO:7); SP XBP1#1 肽), SP XBP1₁₉₃₋₂₀₁ (ILLGILDNL (SEQ ID NO:8); SP XBP1#2 肽) 和 SP XBP1₃₆₇₋₃₇₅ (ELFPQLISV (SEQ ID NO:9); SP XBP1#3 肽)。使用 T2 肽结合测定法评估了这些天然 XBP1 肽和流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL (SEQ ID NO:24)) (已知其是 HLA-A2 结合肽) 的 HLA-A2 亲和力。肽的特异性亲和力以 HLA-A2 均值荧光强度 (MFI) 来评估,其是肽结合 HLA-A2 后 T2 细胞上 HLA-A2 上调的函数。在所测试的自未剪接 XBP1 蛋白衍生的肽中, XBP1₁₈₄₋₁₉₂ (NISPWILAV (SEQ ID NO:2); 称作 XBP1#2p) 测定为具有最高的对 HLA-A2 的亲和力 (MFI = 720 ± 140), 而且拥有甚至比流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL (SEQ ID NO:16)) (MFI = 604 ± 10) 更高的亲和力。剩余的肽, XBP1₁₁₇₋₁₂₅ (LLREKTHGL (SEQ ID NO:1)), XBP1₁₈₉₋₁₉₇ (ILAVLTLQI (SEQ ID NO:3)), XBP1₁₉₂₋₂₀₀ (ILAVLTLQI (SEQ ID NO:4)), XBP1₁₁₀₋₁₁₈ (KLLLENQLL (SEQ ID NO:5)) 和 XBP1₉₃₋₁₀₁ (RMSELEQQV (SEQ ID NO:27)) 也具有显著的对 HLA-A2 的亲和力, 尽管小于 XBP1₁₈₄₋₁₉₂ (NISPWILAV (SEQ ID NO:2)) 肽的亲和力 (图 1)。

[0254] 还在布雷菲德菌素 A 处理后 0、2、4、6 和 18 小时评估了每种肽的 HLA-A2 结合稳

定性。初步研究证明了未剪接 XBP1#2p 肽具有与流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL (SEQ ID NO :24)) 相比显著更低水平的 HLA-A2 结合稳定性。为了改善 XBP1#2p 在 HLA-A2 沟内的稳定性,根据天然 XBP1₁₈₄₋₁₉₂ (NISPWILAV (SEQ ID NO :2)) 设计了一种不规则肽,其中精氨酸 184 用酪氨酸替换 (不规则 YISPWILAV (SEQ ID NO :6) 肽;在本文中称作 XBP12M;粗体氨基酸指示相对于野生型序列修饰的氨基酸)。图 2 描绘测试 XBP12M 的 HLA-A2 结合稳定性的实验的结果。如图 2 中显示的,与天然肽对应物相比,对不规则肽观察到显著更长时期的 T2 细胞上 HLA-A2 上调 (作为肽的结合稳定性的函数)。这些结果证明了对肽的修饰导致更高的 HLA-A2 结合稳定性。

[0255] 在所测试的经剪接 XBP1 肽中,天然 SP XBP1₁₉₆₋₂₀₄ (GILDNLDPV (SEQ ID NO :7); SP XBP1#1p) 和 SP XBP1₃₆₇₋₃₇₅ (ELFPQLISV (SEQ ID NO :9); SPXBP1#3p) 均拥有对 HLA-A2 的高亲和力,分别反映为 MFI 得分 762 ± 167 和 785 ± 84 。此亲和力与具有 $\text{MFI} = 807 \pm 113$ 的流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL (SEQ ID NO :24)) 亲和力相当 (图 3)。如上所述修饰肽序列 SPXBP1#1p 和 SP XBP1#3p 以增强它们的 HLA-A2 结合稳定性。就是说,每种肽的第一个氨基酸用酪氨酸替换。图 4 描绘用不规则肽 YLFPQLISV (SEQ ID NO :10;在本文中称作 SP XBP1#3M) 诱导的 T2 细胞上 HLA-A2 上调与其天然对应物相比的升高。通过自含有细胞的孔除去过量的未结合的肽后,将不规则肽在布雷菲德菌素 A 中培养 6 小时,此更高水平的 HLA-A2 上调得到维持。与 XBP1#3M 的功效相反,自天然肽 XBP1#1p 衍生的不规则肽 YILDNLDPV (SEQ ID NO :28) 没有展现出与其天然对应物相比显著的 HLA-A2 稳定性升高。

[0256] 如此,选择不规则肽 YLFPQLISV (SEQ ID NO :10) 和 YISPWILAV (SEQ ID NO :6) 用于进一步评估它们活化 XBP1 抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (XBP1-CTL) 的能力。

[0257] 实施例 3 :XBP1-CTL 展示与未刺激的 T 细胞不同的表型

[0258] 通过独特细胞表面抗原 (例如 CD8) 的表达在表型上定义细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。细胞表面抗原还可用于进一步将 CTL 定义为幼稚的或活化的记忆细胞。例如,幼稚的人 CTL 可以通过 $\text{CD45RA}^+/\text{CCR7}^+$ 的存在来定义,而活化的人记忆细胞可以作为 $\text{CD69}^+/\text{CD45RO}^+$ 来鉴定。对经不规则肽刺激的人 T 细胞群实施了流式细胞术以测定 CTL 中幼稚的或活化的记忆细胞的百分比。图 5 显示用 XBP1 不规则肽刺激的 CTL 诱导与未刺激的 T 细胞培养物 (33%) 相比显著更高百分比的 CD8^+ T 细胞 (未剪接肽刺激 :81%;经剪接肽刺激 :75%),及与未刺激的 T 细胞培养物 (64%) 相比更低百分比的 CD4^+ T 细胞 (未剪接肽刺激 :14%;经剪接肽刺激 :18%)。对未刺激的对照 T 细胞或 CD138-CTL 进一步检查幼稚的 ($\text{CD45RA}^+/\text{CCR7}^+$) 或活化的记忆 ($\text{CD69}^+/\text{CD45RO}^+$) 细胞状态。在对照 T 细胞培养物含有 24% 的 $\text{CD45RA}^+/\text{CCR7}^+$ 幼稚细胞的情况下,只有 1% 或 2% 的 XBP1-CTL 展现出这种表型。另外,与对照 T 细胞 (4%) 相比,XBP1-CTL (未剪接肽刺激 :62%;经剪接肽刺激 :64%) 中表达 $\text{CD69}^+/\text{CD45RO}^+$ (活化的记忆) 表型的细胞群显著更高 (图 6)。这些结果证明了 XBP1 不规则肽将 T 细胞的表型变成活化的 CTL 的表型。

[0259] 实施例 4 :McCAR 和 U266 表达 HLA-A2 和 XBP1 抗原

[0260] 使用流式细胞术和 Western 印迹测定了数种多发性骨髓瘤细胞系中 HLA-A2 和 XBP1 抗原的表达。使 U266、McCAR、ML-2、和 MM1S 细胞中每一种接触可检测标记的抗 HLA-A2 抗体,并进行流式细胞术分析。在 U266、McCAR 和 ML-2 细胞系上检测到高 HLA-A2 表面表达,但是 MM1S 细胞系不然。通过 Western 印迹测定了多种细胞系中每一种中 XBP1 的细胞

内表达。自每种细胞系制备溶胞物,并进行 SDS-PAGE。这些分析显示了经剪接的 XBP1 蛋白在 U266、McCAR 和 MM1S 中表达,但是 ML-2 细胞系不然。相反,在所有测试的细胞系中都观察到未剪接的 XBP1。

[0261] 实施例 5 :XBP1-CTL 的抗原特异性、且 HLA-A2 限制性 IFN- γ 分泌

[0262] 通过测量用上文提到的多发性骨髓瘤细胞系刺激后对 IFN- γ 分泌的诱导,测定了上文生成的 XBP1-CTL 的抗原特异性和 HLA-A2.1 限制性。XBP1-CTL 在与 McCAR 细胞一起培养时展现出显著的 IFN- γ 分泌升高 (* $p < 0.05$)。相反,在与 ML-2 或 MM1S 细胞一起培养时观察到很少的来自 XBP1-CTL 的 IFN- γ 分泌(图 7)。发现只有 McCAR 细胞表达 HLA-A2 和 XBP1 二者。这些结果提示 XBP1-CTL 能够抗原特异性地和 HLA-A2 限制性地响应多发性骨髓瘤细胞上呈递的 XBP1 肽。

[0263] 实施例 6 :XBP1-CTL 的抗原特异性、且 HLA-A2 限制性细胞增殖

[0264] 将 XBP1-CTL 暴露于羧基荧光素琥珀酰亚氨基酯 (CFSE),如上文描述的。通过测量细胞中 CFSE 的量测定了 XBP1-CTL 响应用各种肿瘤系刺激而发生的增殖。CFSE 是一种膜渗透性染料,其被细胞摄取。在细胞分裂时,一半的 CFSE 被分配给子细胞。继而,当每个子细胞分裂时,总共四分之一的初始 CFSE 浓度被分配给第三代细胞。如此,可以以群体中每个细胞中的染料浓度的倒数来确定细胞分裂的次数。

[0265] 将 XBP1-CTL 与膜渗透性染料 CFSE 一起温育 10 分钟,清洗,然后接触上文提到的多发性骨髓瘤细胞。使用流式细胞术测定 CFSE 的量。当细胞与 50U/ml IL-2 一起温育时,没有观察到显著的 CTL 增殖。然而,当 XBP1-CTL 细胞与 McCAR 细胞一起培养时,观察到显著更高的 CTL 增殖(M1 门选 ;XBP1-2M :55%,XBP1SP-3M :42%)(图 8)。这些结果证明了 CTL 细胞的增殖是 XBP1 特异性的且 HLA-A2 限制性的,而且与 IFN- γ 分泌数据一致。

[0266] 实施例 7 :XBP1-CTL 的抗原特异性、且 HLA-A2 限制性细胞毒性活性

[0267] 测定了不规则 XBP1 肽特异性 CTL 特异性靶向并裂解多发性骨髓瘤细胞的能力。对用 YISPWILAV (SEQ ID NO :6 ;XBP1SP 2M) 或 YLFPQLISV (SEQ ID NO :10 ;XBP1SP 3M) 肽任一诱导的 XBP1-CTL 检查了它们裂解多发性骨髓瘤细胞的能力,如通过钙荧光素释放测定法测定的。将每种 CTL 群与 MM 或 AML 细胞一起共培养,并通过测量自裂解的细胞释放的钙荧光素的量来测定裂解的量。如图 9 和 10 中显示的,XBP12M 特异性 CTL (图 9) 以及 XBP1SP3M 特异性 CTL (图 10) 能够裂解 HLA-A2⁺/XBP1⁺ 恶性 MM 细胞,McCAR (XBP12M-CTL 裂解 9-50%,而 XBP1SP 3M-CTL 裂解 15-69%) 和 U266 (XBP12M-CTL 裂解 16-74%,而 XBP1SP 3M-CTL 裂解 18-83%)。然而,CTL 没有显著诱导 HLA-A2⁺AML 细胞 (ML-2) 或 HLA-A2⁺MM 细胞 (MM1S) 裂解,证明这种细胞的细胞毒性是抗原特异性的且 HLA-A2 限制性的。另外,CTL 没有杀死天然杀伤细胞 (NK) 敏感性细胞系 K562,确认针对多发性骨髓瘤细胞观察到的细胞毒性并不归因于 XBP1-CTL 中的污染性 NK 细胞。

[0268] 实施例 8 :CD138 肽对 HLA-A2 结合的亲和力

[0269] 使用搜索软件 SYFPEITHI (MHC 配体和肽基序的数据库, Institute for Cell Biology, Department of Immunology, Heidelberg) 分析了 CD 138 的全长序列 (见上文) 以预测对 HLA-A2 特异性的肽,接着是 BIMAS 程序以选择具有延长的一半时间解离速率的肽。选择了总共四种潜在 HLA-A2 结合天然肽 :CD138₂₅₆₋₂₆₄ (VIAGGLVGL ;CD138#1p (SEQ ID NO :11)) ;CD138₂₆₀₋₂₆₈ (GLVGLIFAV ;CD138#2p (SEQ ID NO :12)) ;CD138₅₋₁₃ (ALWLWLCAL ;

CD138#3p(SEQ ID NO:13)) ;和 CD138₇₋₁₅(WLWLCALAL ;CD138#4p(SEQ ID NO:14))。使用 T2 肽结合测定法评估了这些天然 CD138 肽和流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆(GILGFVFTL(SEQ ID NO:24)) 的 HLA-A2 结合亲和力。以 HLA-A2 均值荧光强度 (MFI) 来评估肽的亲和力,HLA-A2 在 T2 细胞上经由 HLA-A2 特异性结合而上调。

[0270] 在所测试的自 CD138 衍生的肽中,CD138#2p 测定为具有最特异性的 HLA-A2 结合 (MFI = 690±65),这接近 HLA-A2 特异性对照流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆ 的亲和力 (MFI = 705±80)。剩余的肽,CD138#1p、CD138#3p、和 CD138#4p 展现出显著比 CD138#2p 肽要低的 HLA-A2 结合亲和力 (图 11)。

[0271] 还在布雷菲德菌素 A 处理后 0、2、4、6 和 18 小时评估了 CD138#2p 的 HLA-A2 结合稳定性。图 12 描绘测试 CD138#2p 的 HLA-A2 结合稳定性的实验的结果。如图 12 中显示的,CD138#2p 在其随时间 (肽脉冲后 0 小时、2 小时、4 小时、6 小时、或过夜) 诱导 T2 上 HLA-A2 上调的能力方面几乎等同于流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆(GILGFVFTL(SEQ ID NO:24))。这证明了 CD138#2p 结合 HLA-A2 分子的高水平稳定性。

[0272] 如此,选择 CD138#2p 用于进一步评估其活化 CD138 抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CD138-CTL) 的能力。

[0273] 实施例 9 :CD138-CTL 展示与未刺激的 T 细胞不同的表型

[0274] 对经异二聚体肽刺激的 T 细胞群实施了 FFC 以测定 CTL 中幼稚的或活化的记忆细胞的百分比。图 13 显示用 CD138#2p 肽刺激的 CTL 展现出与未刺激的 T 细胞培养物 (33%) 相比显著更高百分比的 CD8⁺T 细胞 (肽刺激:82%),及与未刺激的 T 细胞培养物 (64%) 相比更低百分比的 CD4⁺T 细胞 (肽刺激:15%)。对未刺激的对照 T 细胞或 CD138-CTL 进一步检查幼稚的 (CD45RA⁺/CCR7⁺) 或活化的记忆 (CD69⁺/CD45RO⁺) 细胞状态。在对照 T 细胞培养物含有 24% 的 CD45RA⁺CCR7⁺ 幼稚细胞的情况下,只有 1% 的 CD138-CTL 展现出这种表型。另外,与对照 T 细胞 (4%) 相比,CD138-CTL (67%) 中表达 CD69⁺/CD45RO⁺ (活化的记忆) 表型的细胞的比例显著更高 (图 14)。这些结果证明了 CD138#2p 肽将 T 细胞的表型变成活化的 CTL 的表型。

[0275] 实施例 10 :McCAR 和 U266 表达 HLA-A2 和 CD138 抗原

[0276] 使用 FFC 测定了数种多发性骨髓瘤细胞系中 HLA-A2 和 CD138 抗原的表达。在 U266、McCAR 和 ML-2 细胞系上检测到高 HLA-A2 表面表达,但是 MM1S 细胞系不然。在 U266、McCAR 和 MM1S 细胞系中观察到 CD138 的细胞内表达,但是 ML-2 细胞系不然。

[0277] 实施例 11 :CD138-CTL 的抗原特异性、且 HLA-A2 限制性 IFN- γ 分泌

[0278] CD138-CTL 的抗原特异性和 HLA-A2 限制性通过用各种肿瘤细胞系刺激过夜后诱导 IFN- γ 分泌来进一步确认。与用多发性骨髓瘤 MM1S 细胞 (CD138⁺/HLA-A2⁻) 或急性髓性白血病 ML-2 细胞 (CD138⁻/HLA-A2⁻) 刺激相比,CD138-CTL 在用 McCAR 细胞 (CD138⁺/HLA-A2⁺) 刺激后显示出显著的 IFN- γ 分泌升高 (*p < 0.05)。这些结果提供了 CD138-CTL 的抗原特异性、且 HLA-A2 限制性应答的进一步证据。

[0279] 实施例 12 :CD138-CTL 的抗原特异性、且 HLA-A2 限制性细胞增殖

[0280] 通过测量细胞中 CFSE 的量测定了 CD138-CTL 响应各种肿瘤系刺激而发生的增殖。将 CD138-CTL 与膜渗透性染料 CFSE 一起温育 10 分钟,清洗,然后接触上文提到的多发性骨髓瘤细胞。使用 FFC 测定 CFSE 的量。当细胞与 50U/ml IL-2 一起温育时没有观察到显著

的细胞增殖。然而,当 CD138-CTL 细胞与 McCAR 细胞一起培养时观察到显著更高的 CTL 增殖 (M1 门选 ;50%) (图 16)。这些结果证明了 CTL 细胞的增殖是 CD138 特异性的且 HLA-A2 限制性的,而且与 IFN- γ 释放数据一致。

[0281] 实施例 13 :CD138-CTL 在钙荧光素 - 细胞毒性测定法中

[0282] 测定了 CD138-CTL 特异性靶向并裂解多发性骨髓瘤细胞的能力。对用 CD138#2p 肽诱导的 CD138-CTL 检查了它们裂解多发性骨髓瘤细胞的能力,如通过钙荧光素释放细胞毒性测定法测定的。如图 17 中显示的,CD138-CTL 能够裂解 HLA-A2⁺/CD138-1⁺ 恶性多发性骨髓瘤细胞, U266。然而,CTL 没有显著裂解 HLA-A2⁺AML 细胞 (ML-2) 或 HLA-A2⁻MM 细胞 (MM1S),证明这种细胞的细胞毒性是抗原特异性的且 HLA-A2 限制性的。另外,CTL 没有杀死天然杀伤细胞 (NK) 敏感细胞系 K562,确认针对多发性骨髓瘤细胞观察到的细胞毒性并非归因于 CD138-CTL 中的污染性 NK 细胞。

[0283] 实施例 14 :CD138-CTL 在 CD107 细胞毒性测定法中

[0284] CD107 测定法容许使用只在脱粒 (即靶细胞裂解期间发生的初始事件) 期间表达的标志物在表型和功能上表征有响应的 CD8⁺T 细胞。使用这种测定法,通过以流式细胞术分析来分析 CD138-CTL 的细胞表面上 CD107a 和 CD107b 的上调水平,测量了 CD138-CTL 的细胞毒性水平。结果表明,在不同的效靶比 (5 : 1, 1 : 1, 或 1 : 5) 时,CD138-CTL 经历生理变化以诱导呈递相应 CD138 肽的 T2 细胞裂解,但是经无关 MAGE3 肽脉冲的 T2 细胞不然 (图 18A)。另外,CD138-CTL 诱导呈递相应 CD138 肽的 McCAR 细胞 (CD138⁺/HLA-A2⁺) 细胞裂解,但是呈递无关 MAGE3 肽的细胞不然 (在 CTL :刺激细胞比为 1 : 1 时) (图 18B)。

[0285] 实施例 15 :多发性骨髓瘤细胞系和原代多发性骨髓瘤细胞的 CS1 多肽表达

[0286] 使用 FFC 微阵列分析测定了数种多发性骨髓瘤细胞系中的 HLA-A2 和 CS1 抗原的表达。使 U266、McCAR、ML-2、和 MM1S 细胞中每一种接触带有可检测标记的抗 HLA-A2 抗体和带有可检测标记的抗 CS1 抗体,并进行流式细胞术分析。类似地,自六名 MM 患者中每一名获得原代 MM 细胞,并接触带有可检测标记的抗 HLA-A2 抗体和带有可检测标记的抗 CS1 抗体,并进行流式细胞术分析。在 U266、McCAR、和 ML-2 细胞系的表面上检测到水平升高的 HLA-A2 和 CS1 蛋白表面表达,但是在 MM1S 细胞系上不然。

[0287] 为了测试 CS1 是否在自人患者获得的原代 MM 细胞中表达,对自多名患者获得的原代 MM 样品实施了微阵列分析。自每名 MM 患者的 CD138 纯化的肿瘤细胞分离总 RNA,并使用 Affymetrix U133Plus 2.0 阵列 (Affymetrix, California) 进行微阵列分析。与来自没有 MM 的患者的细胞中的表达相比,在大多数 MM 细胞中观察到 MM 细胞中升高的 CS1mRNA 表达 (图 19)。

[0288] 总之,这些结果证明了 CS1 蛋白在原代的和培养的 MM 细胞中都表达。

[0289] 实施例 16 :CS1 肽对 HLA-A2 结合的亲和力

[0290] 使用搜索软件 RANKPEP、BIMAS、和 NetMHC 分析了 CS1 蛋白的全长序列 (见上文) 以预测对 HLA-A2 特异性的肽。选择了总共四种潜在 HLA-A2 结合天然肽 :CS1-P1 : CS1₂₃₆₋₂₄₅ (LLLSLFVLGL (SEQ ID NO :15)) ;CS1-P2 :CS1₂₃₉₋₂₄₇ (SLFVLGLFL (SEQ ID NO :16)) ; CS1-P3 :CS1₂₃₂₋₂₄₀ (LLVPLLLSL (SEQ ID NO :17)) ; 和 CS1-P4 :CS1₉₋₁₇ (TLIYILWQL (SEQ ID NO :18))。使用 T2 肽结合测定法评估了这些天然 CS1 肽和流感病毒蛋白基质肽₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL (SEQ ID NO :24)) 的 HLA-A2 结合亲和力。作为 HLA-A2 均值荧光强度 (MFI)

来评估肽的亲合力,HLA-A2 在 T2 细胞上经由 HLA-A2 特异性结合而上调。使用 T2 细胞系测量了结合 HLA-A*0201 分子的肽。将 T2 细胞 (1×10^6 细胞 /mL) 与 $3 \mu\text{g}$ 人 β_2 -微球蛋白和 / 或 $50 \mu\text{g/mL}$ CS1 肽一起温育。流感病毒蛋白基质肽用作阳性对照。过夜温育后,清洗细胞,用 PE 标记的小鼠抗人 HLA-A2 单抗染色,并通过流式细胞术来分析。计算荧光指数 (FI = 经肽加 β_2 -微球蛋白脉冲的 T2 细胞的均值通道荧光 / 仅仅经 β_2 -微球蛋白脉冲的 T2 细胞的均值通道荧光) 以确定 T2 细胞上由 HLA-A2.1 特异性肽结合引起的 HLA-A2.1 分子上调。

[0291] 在所测试的自 CS1 衍生的肽中,三种 (P2、P3、和 P4) 具有比流感基质肽要高的对 HLA-A2 的亲合力。剩余的肽, P1 (CS1₂₃₆₋₂₄₅ (LLLSLFVLGL (SEQ IDNO :15))) 仅仅展现出比流感基质肽要略低的 HLA-A2 结合亲合力 (图 20)。

[0292] 实施例 17 :P2 肽特异性 CS1-CTL 的表达

[0293] 自人外周血单个核细胞 (PBMC) 分离 CD8⁺T 细胞,并与呈递 P2 (CS1₂₃₉₋₂₄₇ (SLFVLGLFL (SEQ ID NO :16))) 肽的自体树突细胞一起培养。每 7 天通过添加呈递肽的树突细胞来再刺激 CD8⁺ 细胞。第四次再刺激后,通过用 PE 偶联的 HLA-A*0201P2 四聚体检测模块和 FITC 偶联的抗 CD8 单克隆抗体染色的流式分析来评估培养物中对 CS1239-247 特异性的 CTL 的存在。群体中大约 4.1% 的细胞受到 HLA-A*0201P2 四聚体和抗 CD8 抗体二者的结合,指示大约 4.1% 的细胞是 CS1-CTL。

[0294] 实施例 18 :CS1-CTL 的 CS1P2 肽特异性细胞活化

[0295] 通过含氚胸苷 (³H-胸苷) 掺入测定法评估了 CS1-CTL 的增殖活性。将 CS1-CTL (5×10^4 / 孔) 与经辐照的呈递 (或不呈递) CS1P2 肽的 T2 细胞 (5×10^3 / 孔) 一起分别培养 24、48、和 72 小时。给孔添加 ³H-胸苷 ($0.5 \mu\text{Ci}$), 12 小时后收获细胞。与接触不呈递 CS1P2 肽的 T2 细胞的 CS1-CTL 相比,与呈递 CS1P2 的 T2 细胞一起培养的 CS1-CTL 展现出显著的增殖升高 (图 21)。诱导 48 小时时通过使用单克隆抗 CD25-PC5 抗体以流式细胞术测量表面 PC5 表达的上调来测定 CS1-CTL 的活化。正在增殖的 CS1-CTL 在与呈递 CS1P2 的 T2 细胞一起培养时展现出 PC5 表达升高的发现提示 CS1-CTL 也被活化。

[0296] 实施例 19 :CS1-CTL 的抗原特异性、且 HLA-A2 限制性 IFN- γ 分泌

[0297] 四种不同 CS1-CTL 群 (CS1-P1-CTL、CS1-P2-CTL、CS1-P3-CTL、和 CS1-P4-CTL) 中每一种用于表面 HLA-A2 环境中呈递各 CS1 肽的 T2 细胞刺激过夜后诱导 IFN- γ 分泌,以此进一步确认 CS1-CTL 的抗原特异性和 HLA-A2 限制性。虽然每种 CS1-CTL 群展现出 IFN- γ 分泌的一些升高,但是 CS1-P2-CTL 在与呈递 P2 肽的 T2 细胞接触后展现出最大程度的 IFN- γ 分泌 (图 22)。这些结果提供了 CS1-CTL 群的抗原特异性、且 HLA-A2 限制性应答的进一步证据。

[0298] 实施例 20 :CS1-CTL 在钙荧光素 - 细胞毒性测定法中

[0299] 测定了 CS1-CTL 特异性靶向和裂解多发性骨髓瘤细胞的能力。将 CS1-CTL 用 CS1-P2 肽活化两次 (在第 1 天和第 7 天),并检查它们裂解多发性骨髓瘤细胞的能力,如通过钙荧光素释放细胞毒性测定法所测定的。将 MM 细胞系 (MM.1S、U266 和 MCCAR) 用钙荧光素-AM ($5 \mu\text{g/mL}$) 标记,并以 5,000 细胞 / 孔用作靶细胞。效应细胞对靶细胞的比为 20 : 1。如图 23 中显示的,CS1-P2-CTL 有效杀死 (30% 细胞毒性) 靶 MM 细胞系 MCCAR (HLA-A2⁺/CS1⁺),而对 MM.1S (HLA-A2⁻/CS1⁺) 和 U266 (HLA-A2⁺/CS1⁻) 靶细胞没有观察到显著的细胞毒

性。此外，CS1-CTL 展示出对经 P2 肽接触的 MCCAR 细胞的高细胞毒性，由此确认了肽特异性、且 HLA-A2 限制性的细胞毒效应。

[0300] 其它实施方案

[0301] 虽然已经结合其详细描述描述了本发明，但是上述描述意图例示而非限制本发明的范围，本发明的范围由所附权利要求的范围来限定。其它方面、优点、和更改在所附权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> 达纳-法伯癌症研究所股份有限公司 (Dana-Farber Cancer Institute, Inc.)

<120> XBP1、CD138、和 CS1 肽

<130> 00530-0154W01

<140> PCT/US2009/045866

<141> 2009-06-01

<150> US 61/058,180

<151> 2008-06-02

<160> 28

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Lcu Lcu Arg Glu Lys Thr His Gly Lcu
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

Asn Ile Ser Pro Trp Ile Leu Ala Val
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 3

Ile Leu Ala Val Leu Thr Leu Gln Ile
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 4

Ile Leu Ala Val Leu Thr Leu Gln Ile
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 5

Lys Leu Leu Leu Glu Asn Gln Leu Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 6

Tyr Ile Ser Pro Trp Ile Lcu Ala Val

[0002]

1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 7
Gly Ile Leu Asp Asn Leu Asp Pro Val
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 8
Ile Leu Leu Gly Ile Leu Asp Asn Leu
1 5

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

<400> 9
Glu Leu Phe Pro Gln Leu Ile Ser Val
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10
Tyr Leu Phe Pro Gln Leu Ile Ser Val
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 11
Val Ile Ala Gly Gly Leu Val Gly Leu
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 12
Gly Leu Val Gly Leu Ile Phe Ala Val
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 13
Ala Leu Trp Leu Trp Leu Cys Ala Leu
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT

[0003]

```

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 14
Trp Leu Trp Leu Cys Ala Leu Ala Leu
1          5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 15
Leu Leu Leu Ser Leu Phe Val Leu Gly Leu
1          5          10

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 16
Ser Leu Phe Val Leu Gly Leu Phe Leu
1          5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 17
Leu Leu Val Pro Leu Leu Leu Ser Leu
1          5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 18
Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln Leu
1          5

<210> 19
<211> 261
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 19
Met Val Val Val Ala Ala Ala Pro Asn Pro Ala Asp Gly Thr Pro Lys
1          5          10          15
Val Leu Leu Leu Ser Gly Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Ala
20          25          30
Gly Gln Ala Leu Pro Leu Met Val Pro Ala Gln Arg Gly Ala Ser Pro
35          40          45
Glu Ala Ala Ser Gly Gly Leu Pro Gln Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu
50          55          60
Thr His Leu Ser Pro Glu Glu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Asn
65          70          75          80
Arg Val Ala Ala Gln Thr Ala Arg Asp Arg Lys Lys Ala Arg Met Scr
85          90          95
Glu Leu Glu Gln Gln Val Val Asp Leu Glu Glu Glu Asn Gln Lys Leu
100          105          110
Leu Leu Glu Asn Gln Leu Leu Arg Glu Lys Thr His Gly Leu Val Val
115          120          125
Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Arg Leu Gly Met Asp Ala Leu Val Ala
130          135          140
Glu Glu Glu Ala Glu Ala Lys Gly Asn Glu Val Arg Pro Val Ala Gly
145          150          155          160
Ser Ala Glu Ser Ala Ala Leu Arg Leu Arg Ala Pro Leu Gln Gln Val
165          170          175
Gln Ala Gln Leu Ser Pro Leu Gln Asn Ile Ser Pro Trp Ile Leu Ala

```

[0004]

```

          180          185          190
Val Leu Thr Leu Gln Ile Gln Ser Leu Ile Ser Cys Trp Ala Phe Trp
          195          200          205
Thr Thr Trp Thr Gln Ser Cys Ser Ser Asn Ala Leu Pro Gln Ser Leu
          210          215          220
Pro Ala Trp Arg Ser Ser Gln Arg Ser Thr Gln Lys Asp Pro Val Pro
          225          230          235          240
Tyr Gln Pro Pro Phe Leu Cys Gln Trp Gly Arg His Gln Pro Ser Trp
          245          250          255
Lys Pro Leu Met Asn
          260

```

```

<210> 20
<211> 376
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

```

```

<400> 20
Met Val Val Val Ala Ala Ala Pro Asn Pro Ala Asp Gly Thr Pro Lys
  1          5          10          15
Val Leu Leu Leu Ser Gly Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Ala
  20          25          30
Gly Gln Ala Leu Pro Leu Met Val Pro Ala Gln Arg Gly Ala Ser Pro
  35          40          45
Glu Ala Ala Ser Gly Gly Leu Pro Gln Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu
  50          55          60
Thr His Leu Ser Pro Glu Glu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Asn
  65          70          75          80
Arg Val Ala Ala Gln Thr Ala Arg Asp Arg Lys Lys Ala Arg Met Ser
  85          90          95
Glu Leu Glu Gln Gln Val Val Asp Leu Glu Glu Glu Asn Gln Lys Leu
  100          105          110
Leu Leu Glu Asn Gln Leu Leu Arg Glu Lys Thr His Gly Leu Val Val
  115          120          125
Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Arg Leu Gly Met Asp Ala Leu Val Ala
  130          135          140
Glu Glu Glu Ala Glu Ala Lys Gly Asn Glu Val Arg Pro Val Ala Gly
  145          150          155          160
Ser Ala Glu Ser Ala Ala Gly Ala Gly Pro Val Val Thr Pro Pro Glu
  165          170          175
His Leu Pro Met Asp Ser Gly Gly Ile Asp Ser Ser Asp Ser Glu Ser
  180          185          190
Asp Ile Leu Leu Gly Ile Leu Asp Asn Leu Asp Pro Val Met Phe Phe
  195          200          205
Lys Cys Pro Ser Pro Glu Pro Ala Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Val
  210          215          220
Tyr Pro Glu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Val
  225          230          235          240
Gly Thr Ser Ser Ala Lys Leu Glu Ala Ile Asn Glu Leu Ile Arg Phe
  245          250          255
Asp His Ile Tyr Thr Lys Pro Leu Val Leu Glu Ile Pro Ser Glu Thr
  260          265          270
Glu Ser Gln Ala Asn Val Val Val Lys Ile Glu Glu Ala Pro Leu Ser
  275          280          285
Pro Ser Glu Asn Asp His Pro Glu Phe Ile Val Ser Val Lys Glu Glu
  290          295          300
Pro Val Glu Asp Asp Leu Val Pro Glu Leu Gly Ile Ser Asn Leu Leu
  305          310          315          320
Ser Ser Ser His Cys Pro Lys Pro Ser Ser Cys Leu Leu Asp Ala Tyr
  325          330          335
Ser Asp Cys Gly Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Pro Phe Ser Asp Met Ser
  340          345          350
Ser Leu Leu Gly Val Asn His Ser Trp Glu Asp Thr Phe Ala Asn Glu
  355          360          365
Leu Phe Pro Gln Leu Ile Ser Val
  370          375

```

```

<210> 21
<211> 310
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

```

```

<400> 21
Met Arg Arg Ala Ala Leu Trp Leu Trp Leu Cys Ala Leu Ala Leu Ser

```

[0005]

```

1      5      10      15
Leu Gln Pro Ala Leu Pro Gln Ile Val Ala Thr Asn Leu Pro Pro Glu
20      25      30
Asp Gln Asp Gly Ser Gly Asp Asp Ser Asp Asn Phe Ser Gly Ser Gly
35      40      45
Ala Gly Ala Leu Gln Asp Ile Thr Leu Ser Gln Gln Thr Pro Ser Thr
50      55      60
Trp Lys Asp Thr Gln Leu Leu Thr Ala Ile Pro Thr Ser Pro Glu Pro
65      70      75      80
Thr Gly Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ser Thr Ser Thr Leu Pro Ala Gly
85      90      95
Glu Gly Pro Lys Glu Gly Glu Ala Val Val Leu Pro Glu Val Glu Pro
100     105     110
Gly Leu Thr Ala Arg Glu Gln Glu Ala Thr Pro Arg Pro Arg Glu Thr
115     120     125
Thr Gln Leu Pro Thr Thr His Gln Ala Ser Thr Thr Thr Ala Thr Thr
130     135     140
Ala Gln Glu Pro Ala Thr Ser His Pro His Arg Asp Met Gln Pro Gly
145     150     155     160
His His Glu Thr Ser Thr Pro Ala Gly Pro Ser Gln Ala Asp Leu His
165     170     175
Thr Pro His Thr Glu Asp Gly Gly Pro Ser Ala Thr Glu Arg Ala Ala
180     185     190
Glu Asp Gly Ala Ser Ser Gln Leu Pro Ala Ala Glu Gly Ser Gly Glu
195     200     205
Gln Asp Phe Thr Phe Glu Thr Ser Gly Glu Asn Thr Ala Val Val Ala
210     215     220
Val Glu Pro Asp Arg Arg Asn Gln Ser Pro Val Asp Gln Gly Ala Thr
225     230     235     240
Gly Ala Ser Gln Gly Leu Leu Asp Arg Lys Glu Val Leu Gly Gly Val
245     250     255
Ile Ala Gly Gly Leu Val Gly Leu Ile Phe Ala Val Cys Leu Val Gly
260     265     270
Phe Met Leu Tyr Arg Met Lys Lys Lys Asp Glu Gly Ser Tyr Ser Leu
275     280     285
Glu Glu Pro Lys Gln Ala Asn Gly Gly Ala Tyr Gln Lys Pro Thr Lys
290     295     300
Gln Glu Glu Phe Tyr Ala
305     310

```

<210> 22
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

```

<400> 22
Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
1      5      10      15
Leu Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Pro Val Lys Glu Leu Val Gly Ser
20      25      30
Val Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val
35      40      45
Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Pro Leu Val Thr Ile Gln
50      55      60
Pro Glu Gly Gly Thr Ile Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Arg Glu Arg
65      70      75      80
Val Asp Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
85      90      95
Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Val Gly Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
100     105     110
Gln Gln Pro Ser Thr Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu
115     120     125
Ser Lys Pro Lys Val Thr Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr
130     135     140
Cys Val Thr Asn Leu Thr Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val
145     150     155     160
Ile Tyr Thr Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn
165     170     175
Gly Ser Ile Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr
180     185     190
Phe Ile Cys Val Ala Arg Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro
195     200     205
Ile Leu Ala Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Pro Asp Ser
210     215     220
Ser Met Val Leu Leu Cys Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Leu Ser Leu

```

[0006]

```

225          230          235          240
Phe Val Leu Gly Leu Phe Leu Trp Phe Leu Lys Arg Glu Arg Gln Glu
          245          250          255
Glu Tyr Ile Glu Lys Lys Arg Val Asp Ile Cys Arg Glu Thr Pro
          260          265          270
Asn Ile Cys Pro His Ser Gly Glu Asn Thr Glu Tyr Asp Thr Ile Pro
          275          280          285
His Thr Asn Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asp Pro Ala Asn Thr Val Tyr
          290          295          300
Ser Thr Val Glu Ile Pro Lys Lys Met Glu Asn Pro His Ser Leu Leu
305          310          315          320
Thr Met Pro Asp Thr Pro Arg Leu Phe Ala Tyr Glu Asn Val Ile
          325          330          335

```

```

<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

```

```

<400> 23
Lys Asp Glu Leu
1

```

```

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 流感病毒(Influenza virus)

```

```

<400> 24
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1          5

```

```

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 流感病毒(Influenza virus)

```

```

<400> 25
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1          5

```

```

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

```

```

<400> 26
Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1          5

```

```

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

```

```

<400> 27
Arg Met Ser Glu Leu Glu Gln Gln Val
1          5

```

```

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 流感病毒(Influenza virus)

```

```

<400> 28
Tyr Ile Leu Asp Asn Leu Asp Pro Val
1          5

```

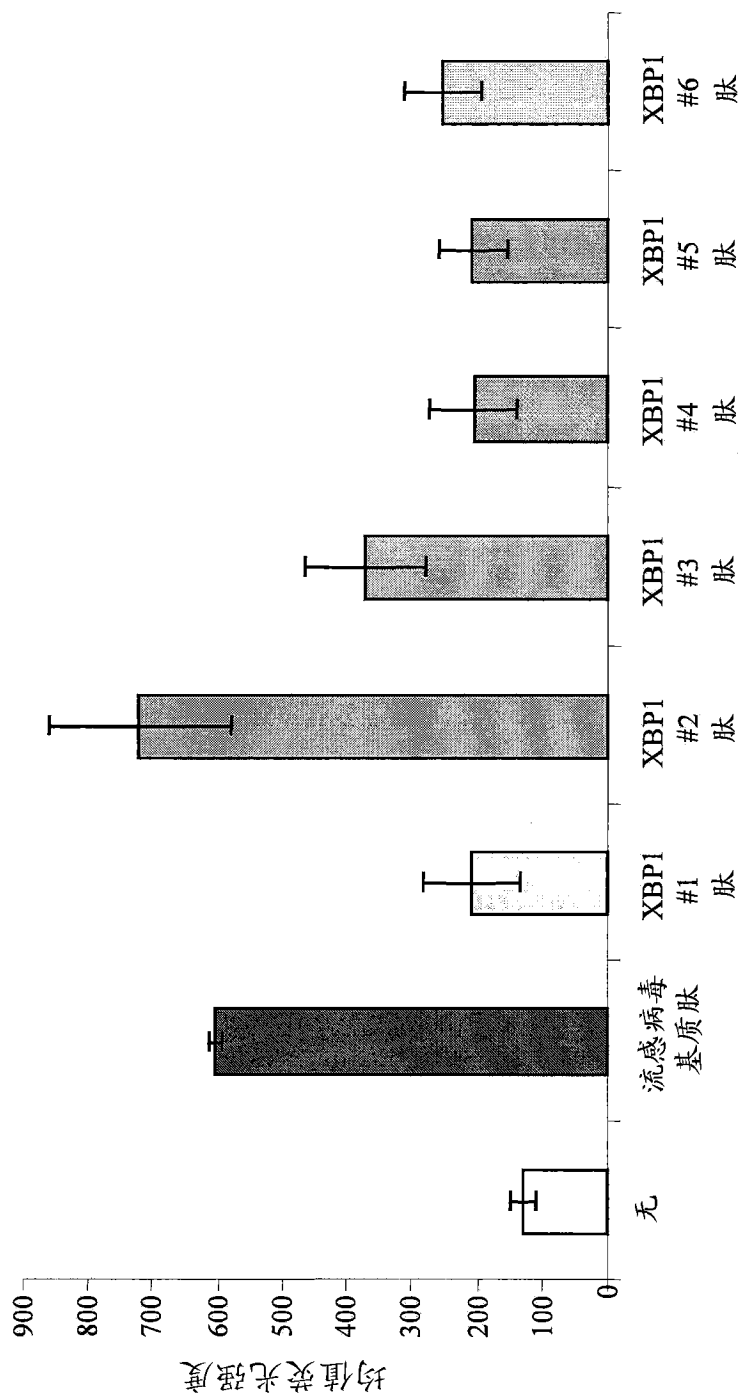


图 1

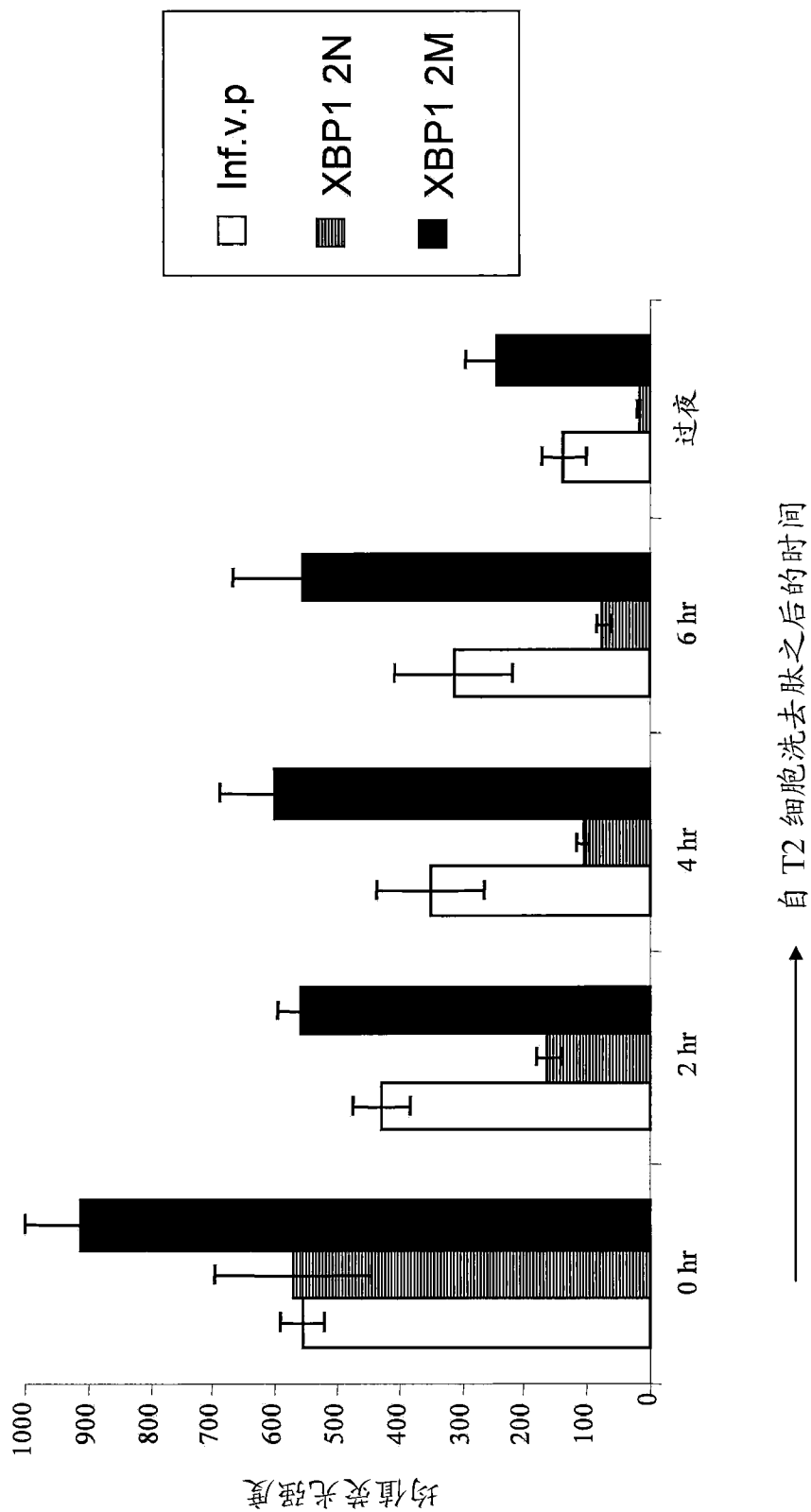


图 2

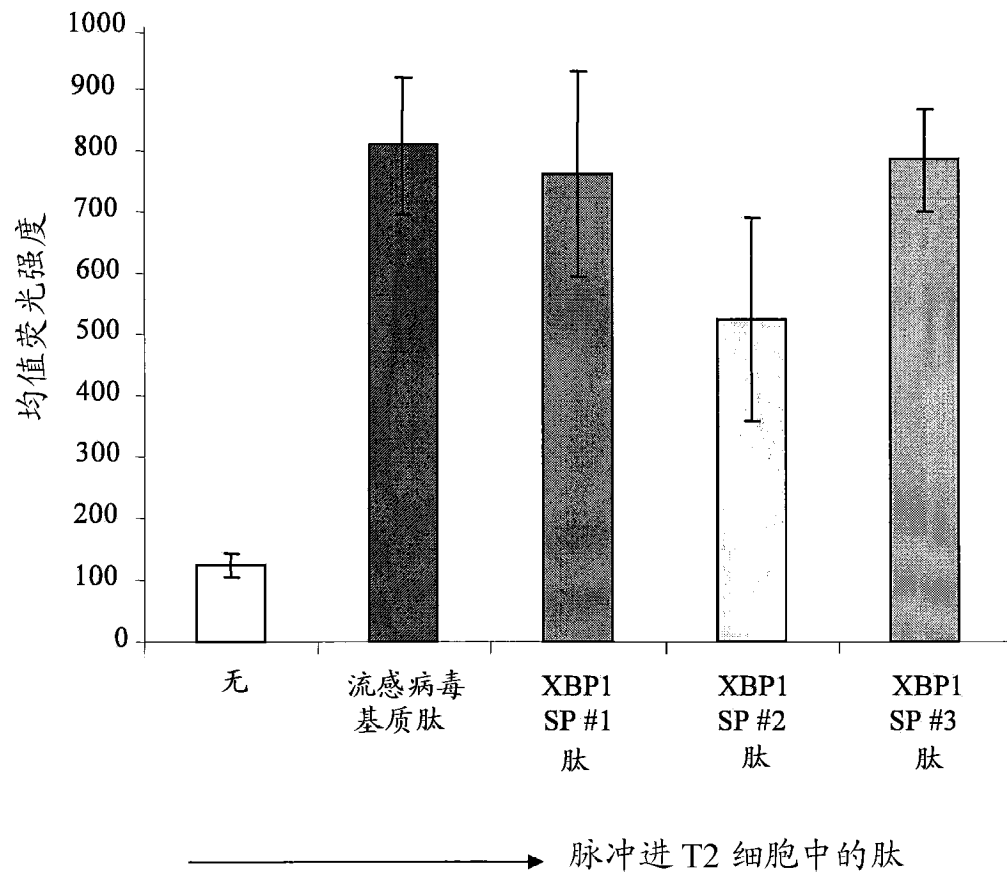


图 3

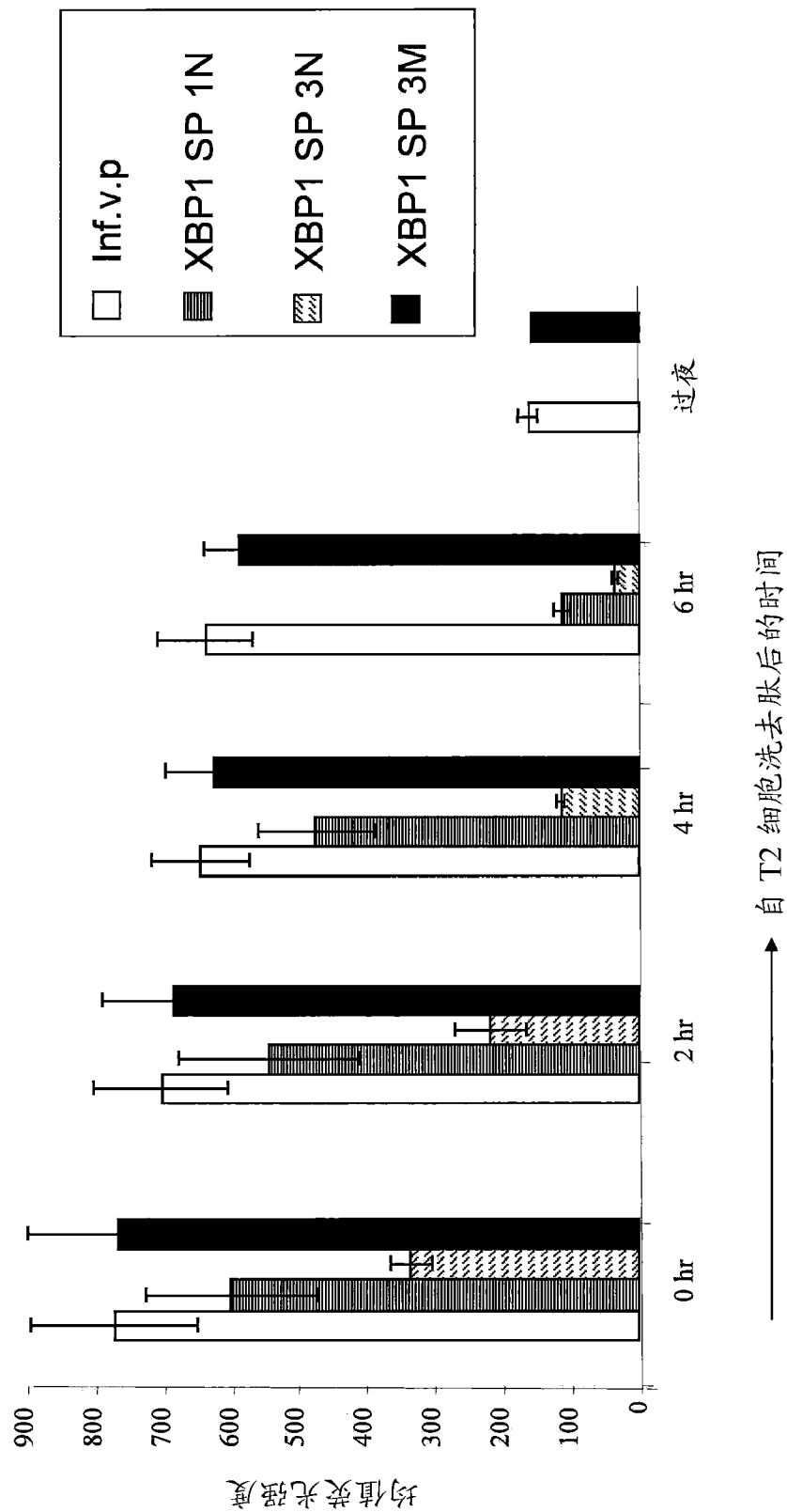


图 4

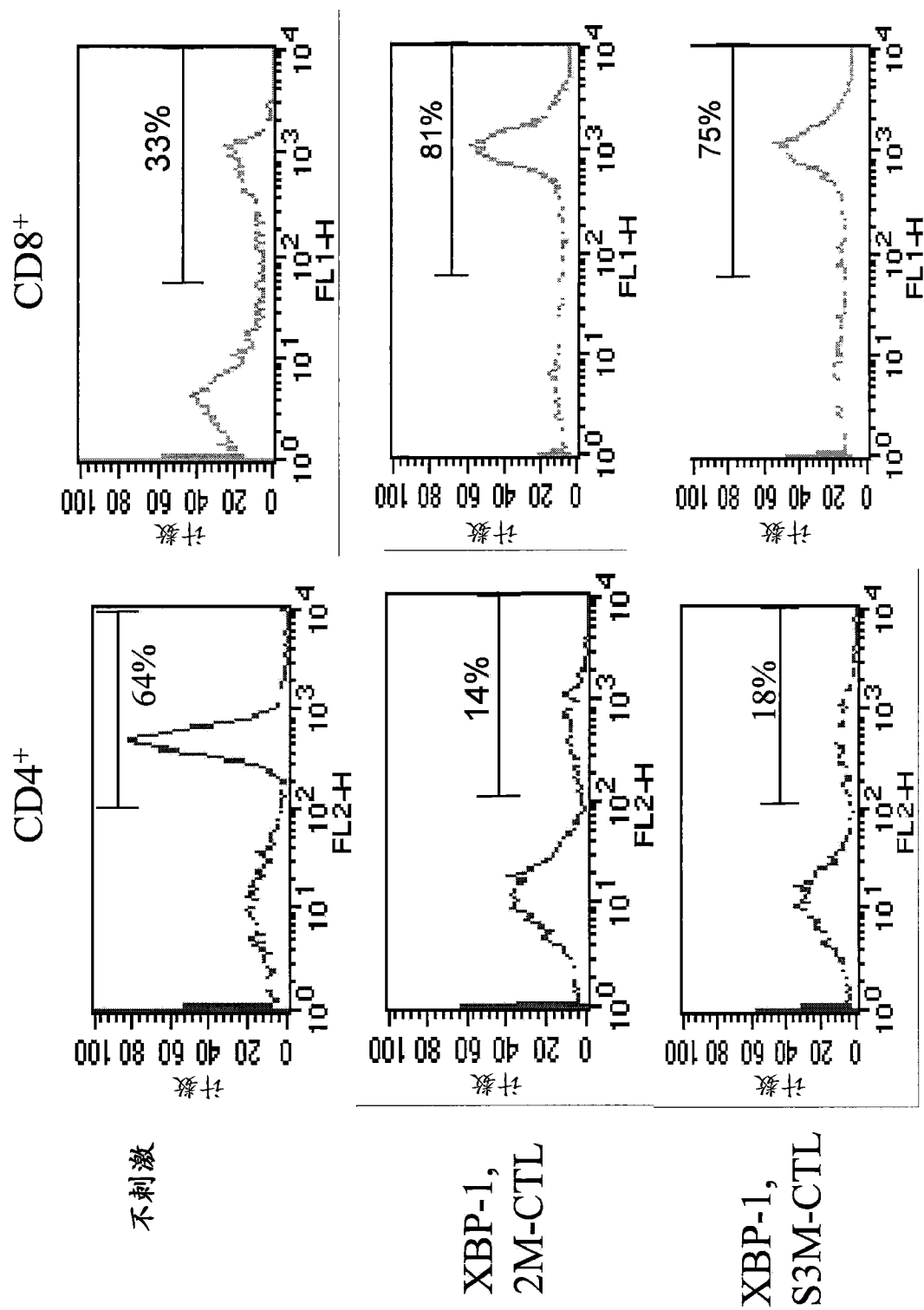


图 5

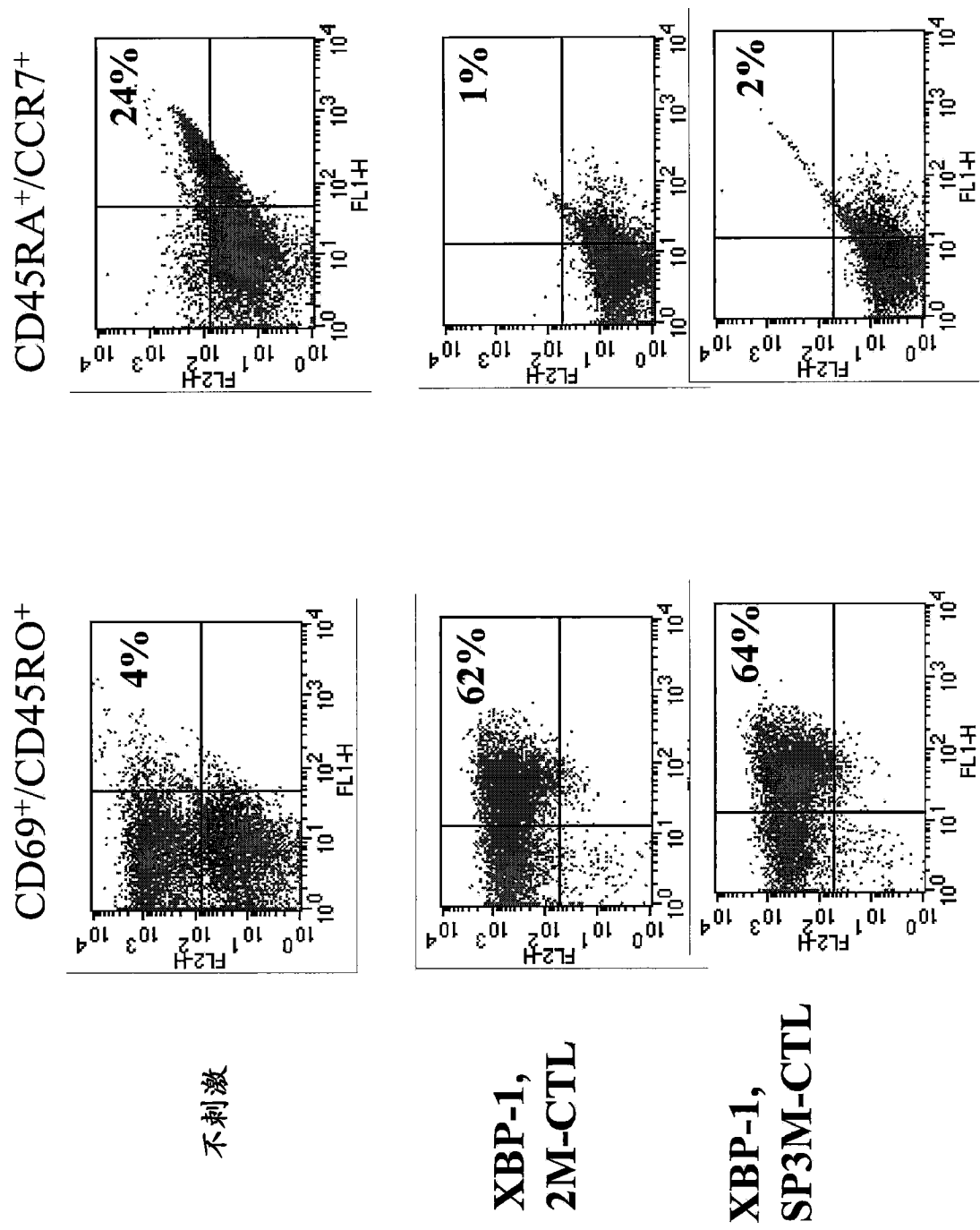


图 6

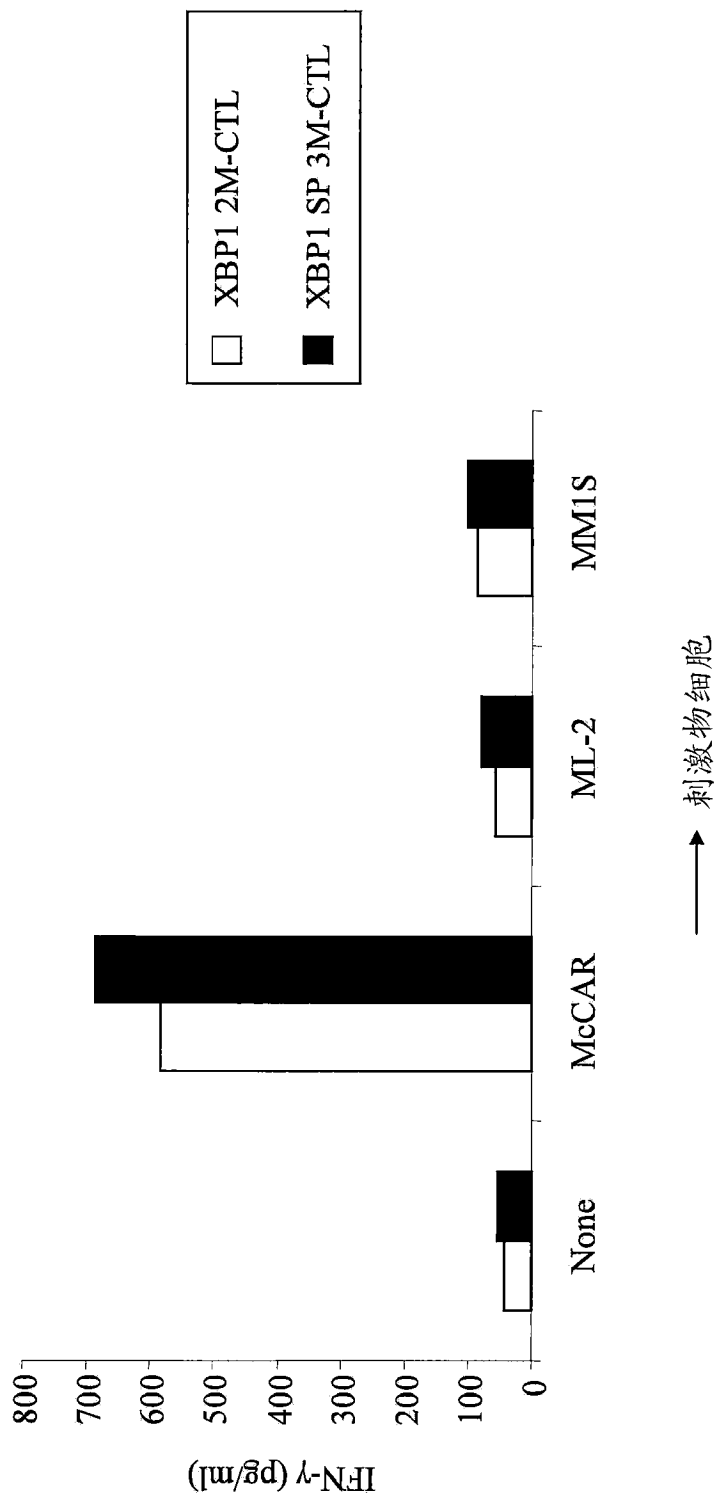


图 7

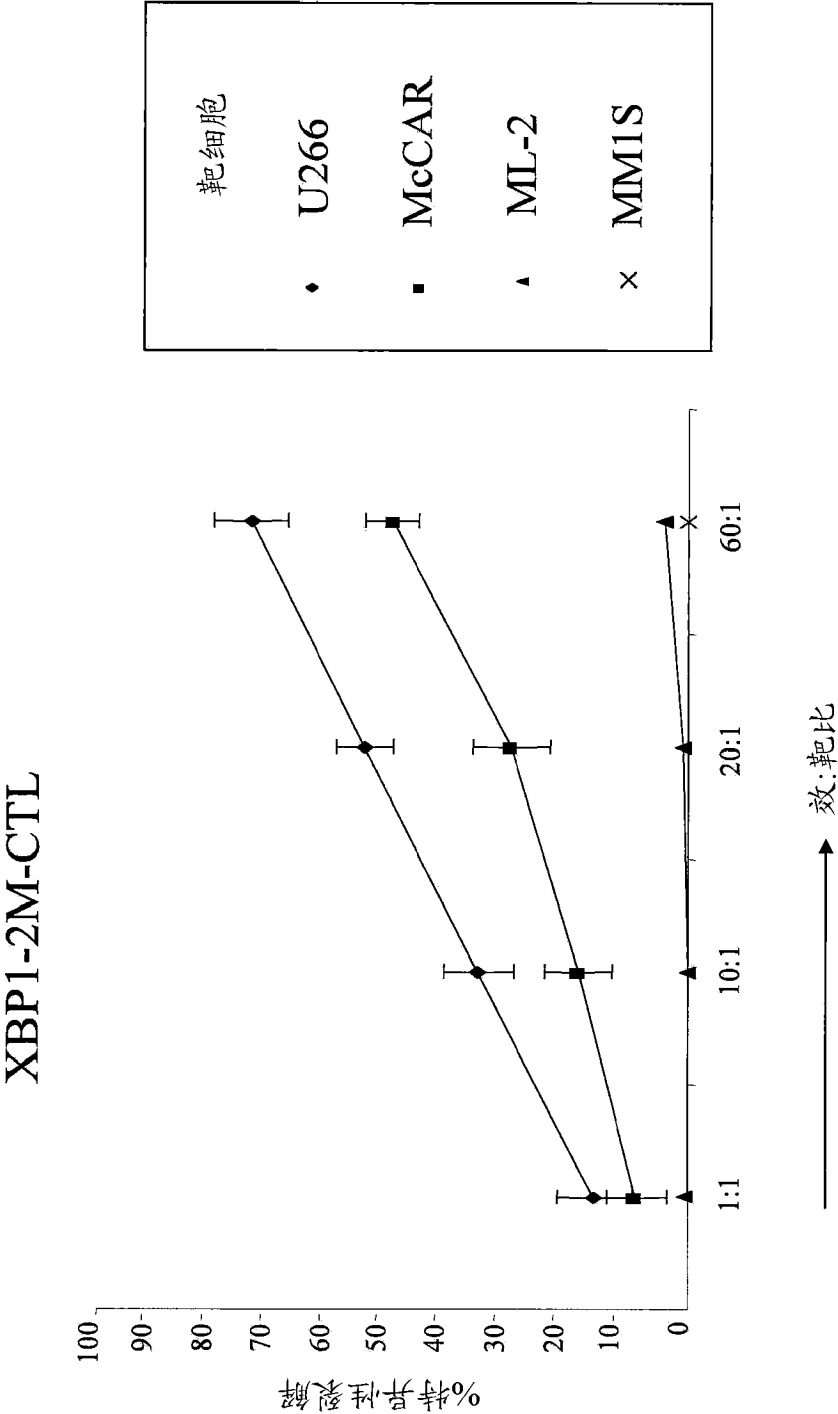


图 9

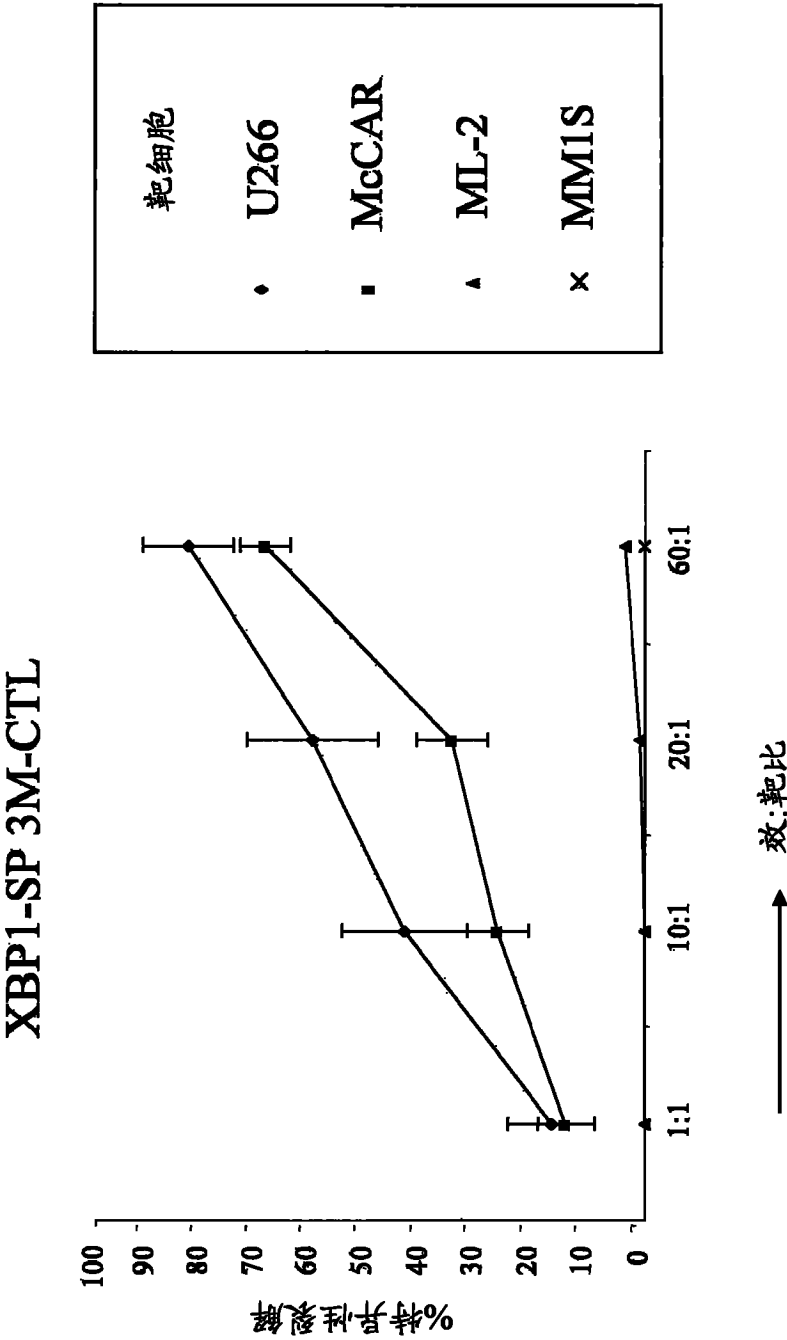


图 10

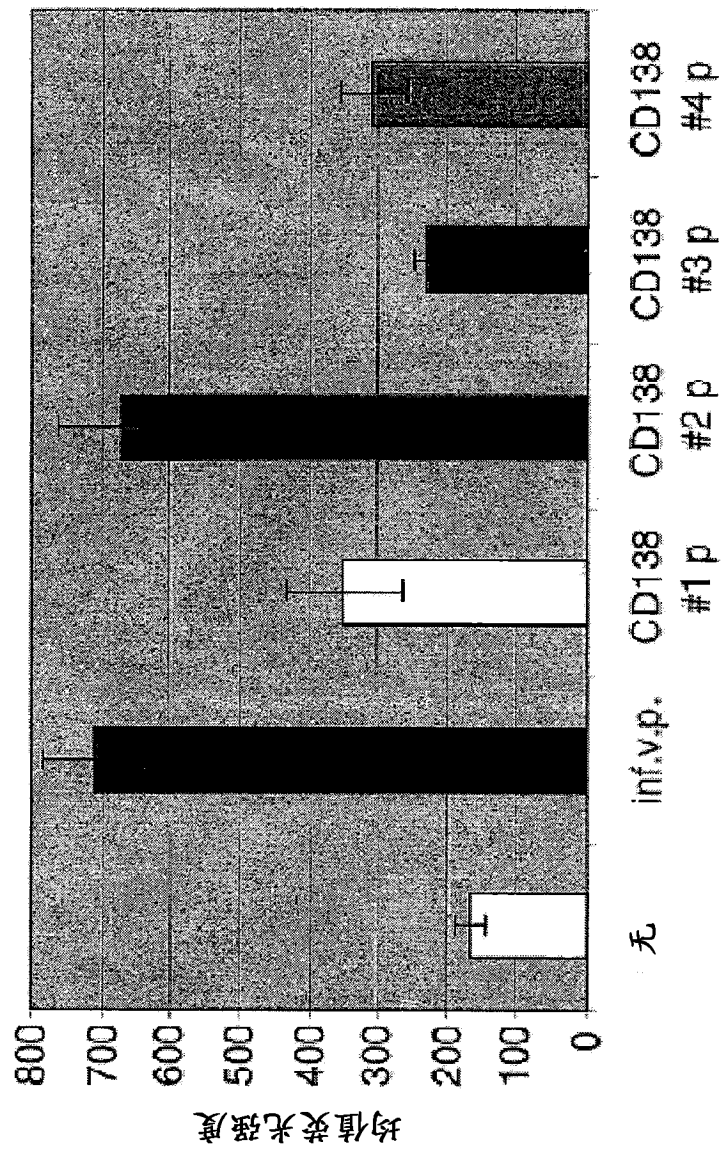


图 11

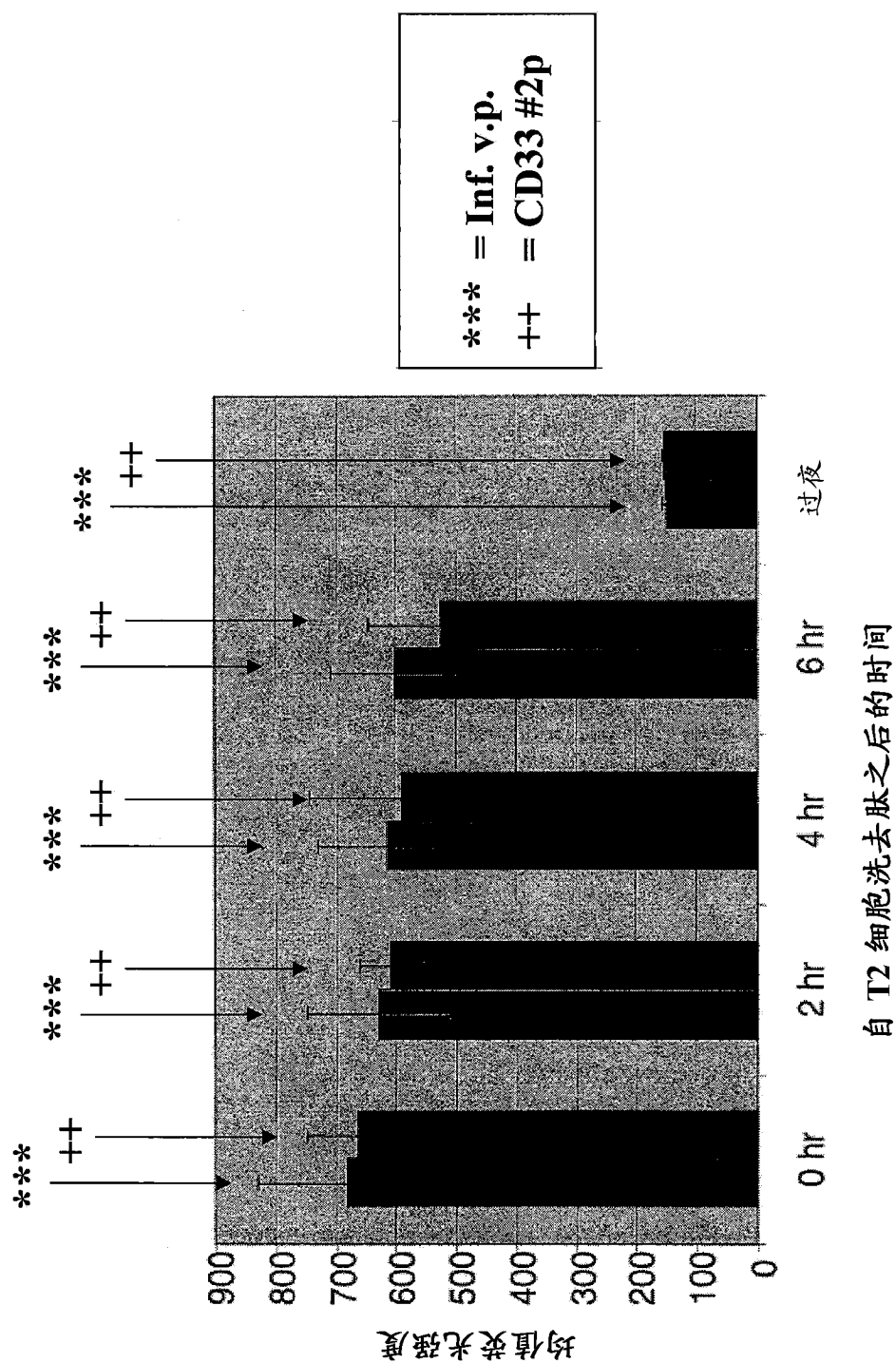


图 12

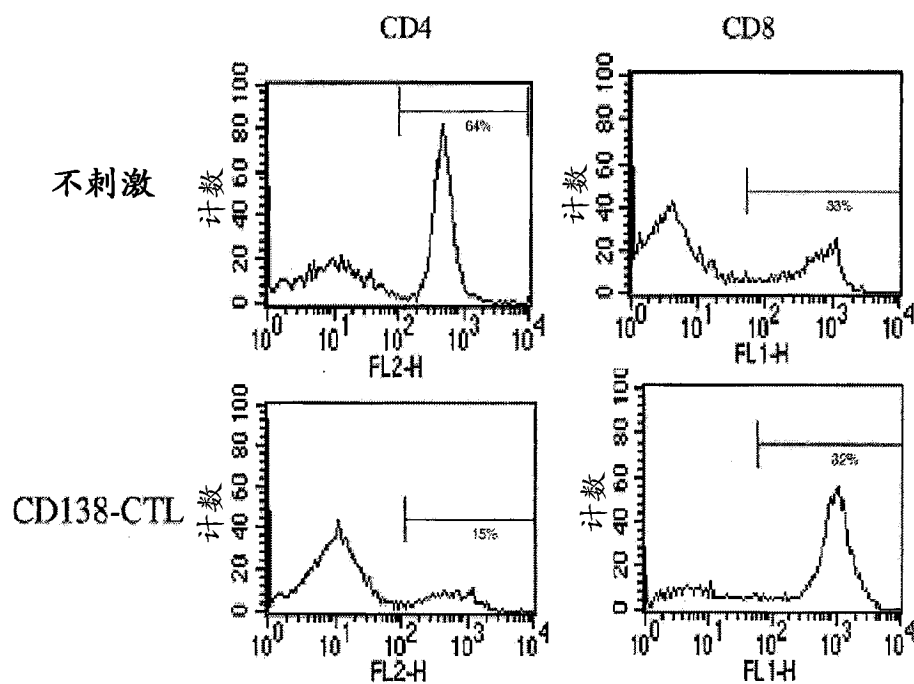


图 13

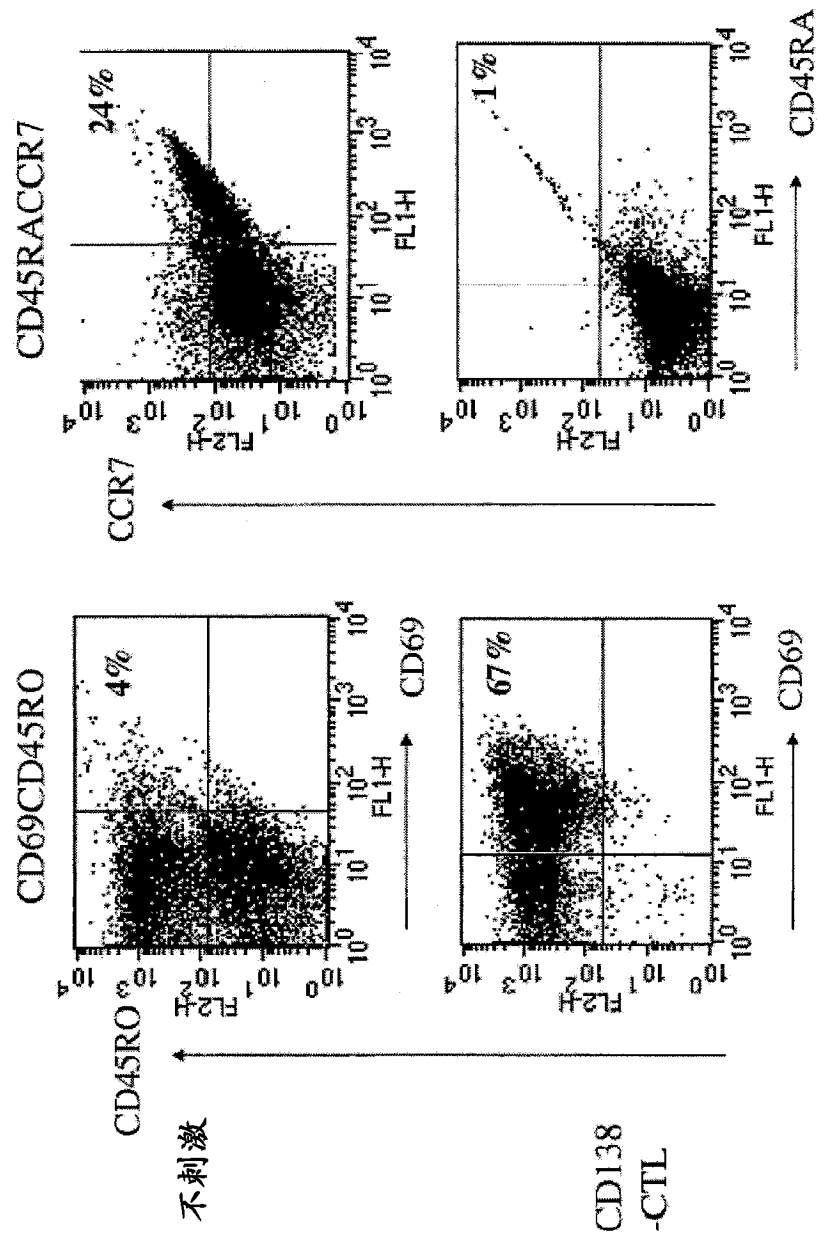


图 14

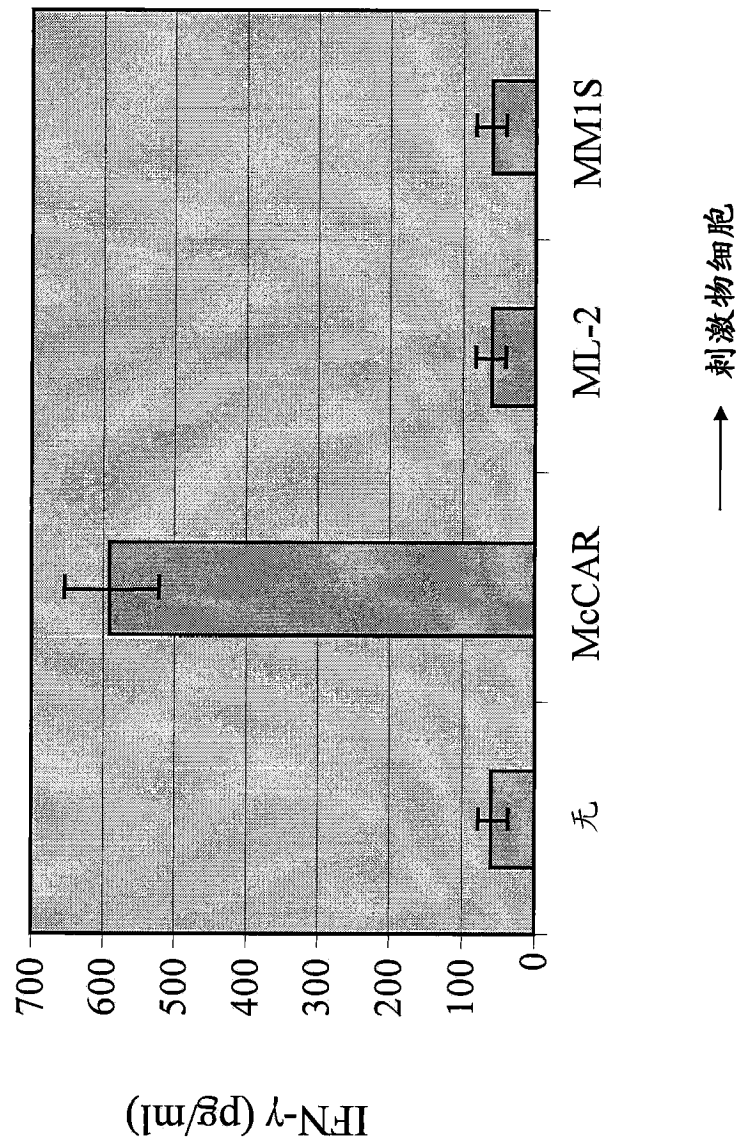


图 15

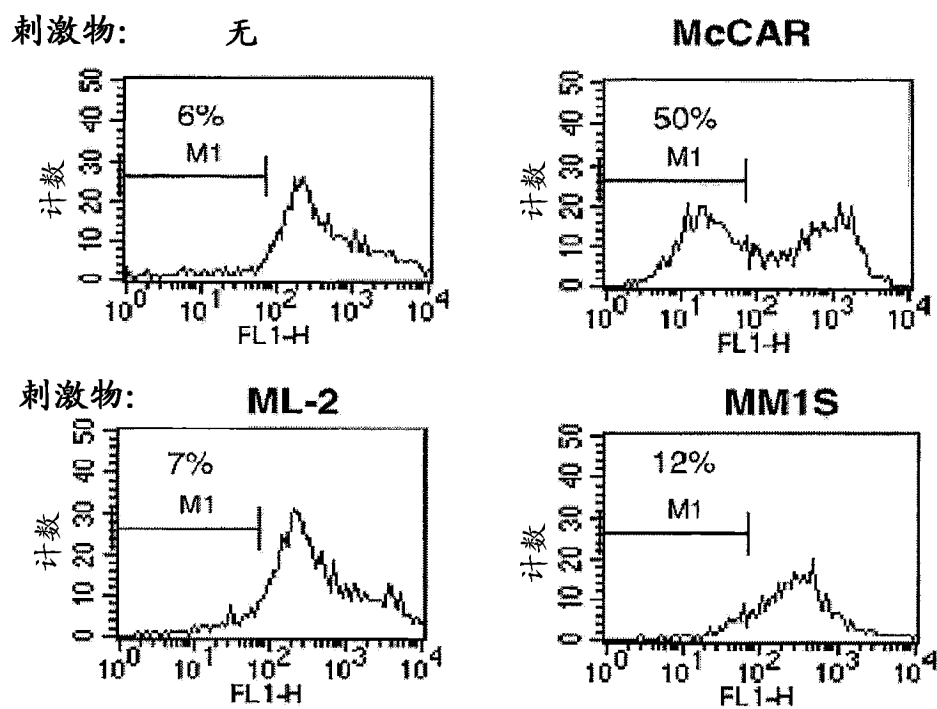


图 16

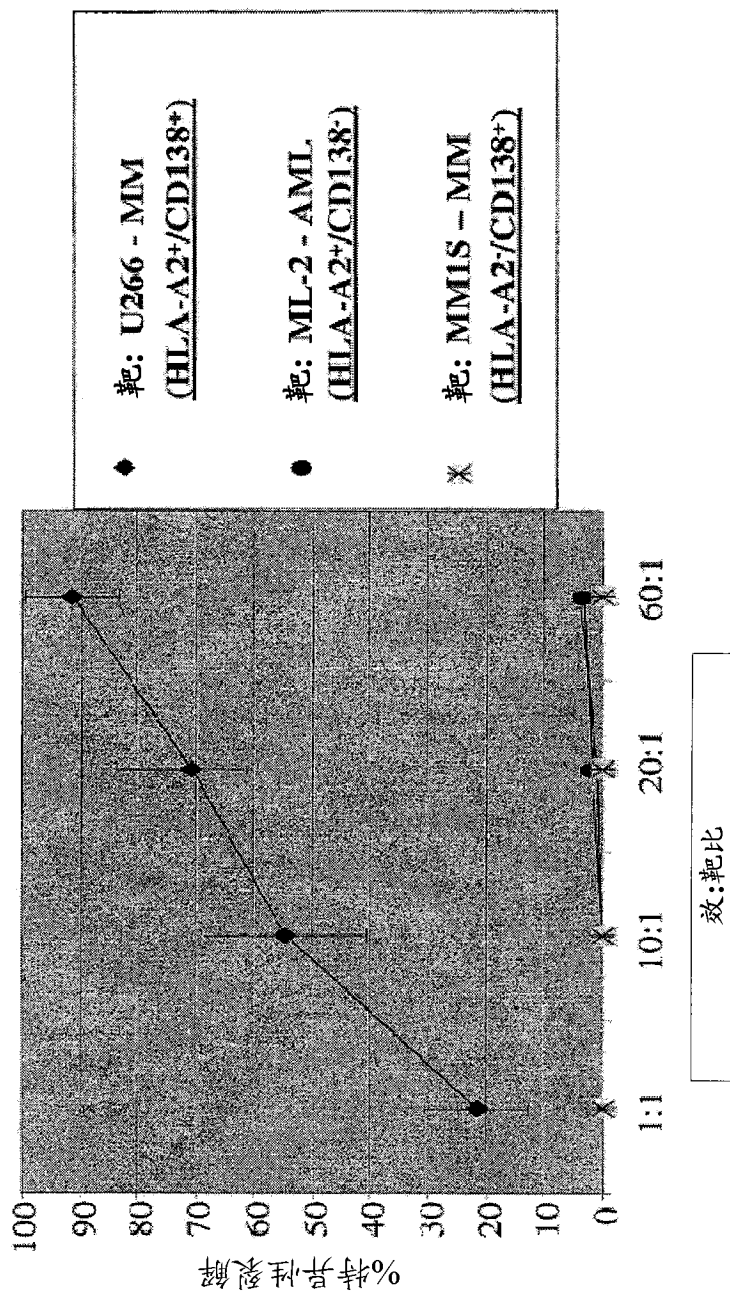


图 17

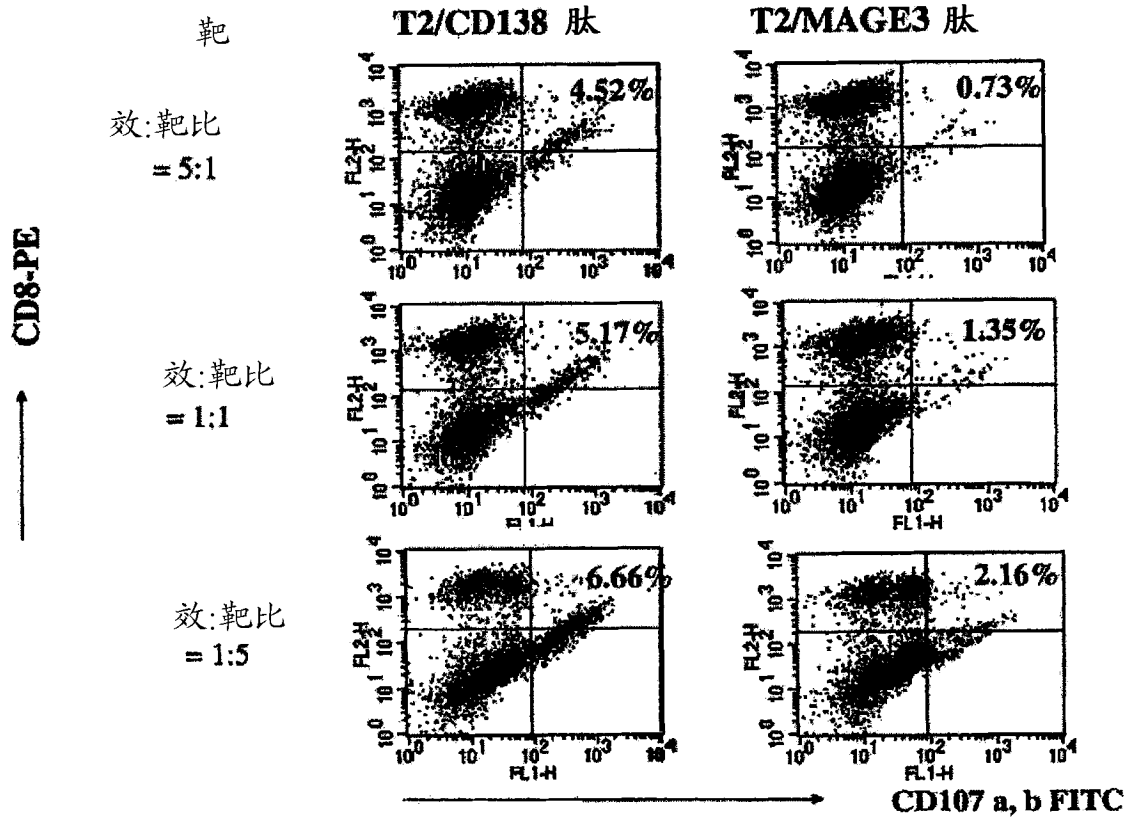


图 18A

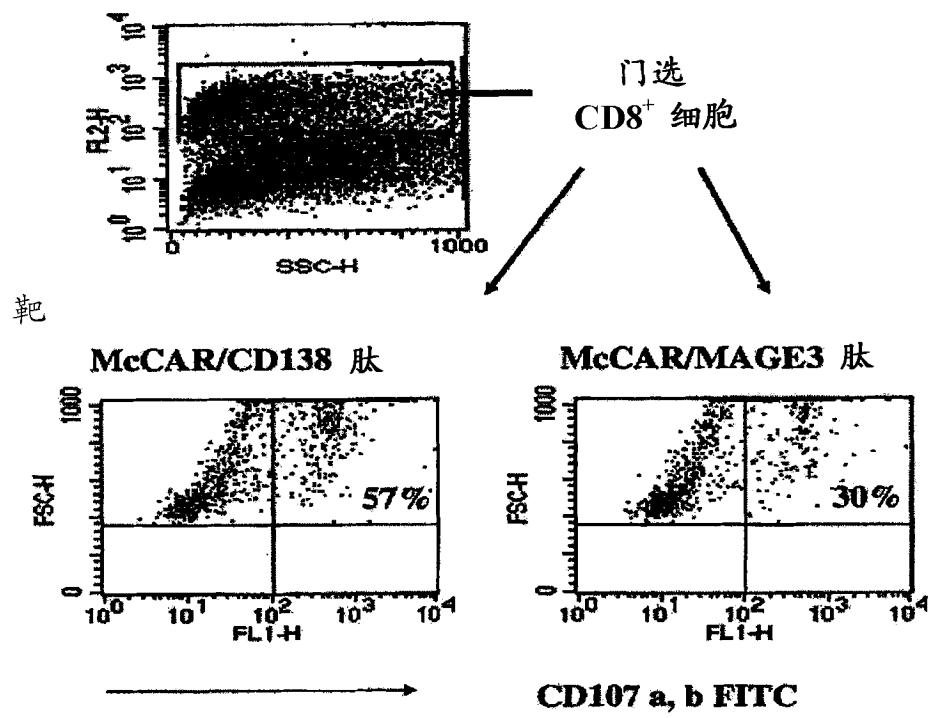


图 18B

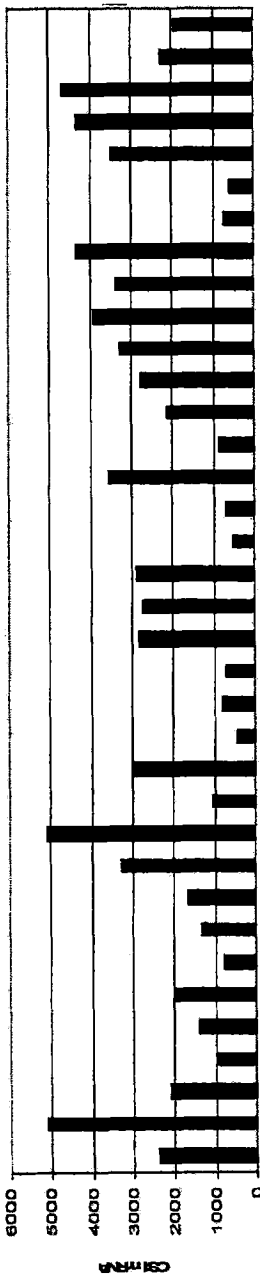


图 19

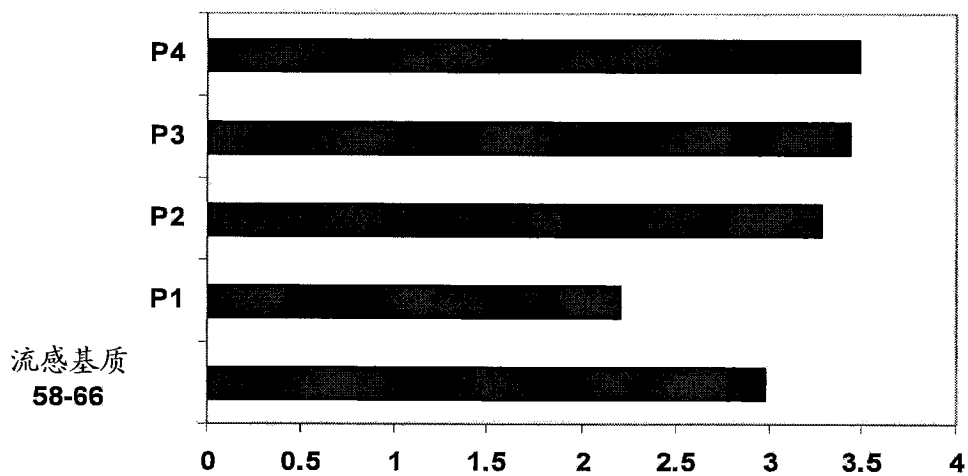


图 20

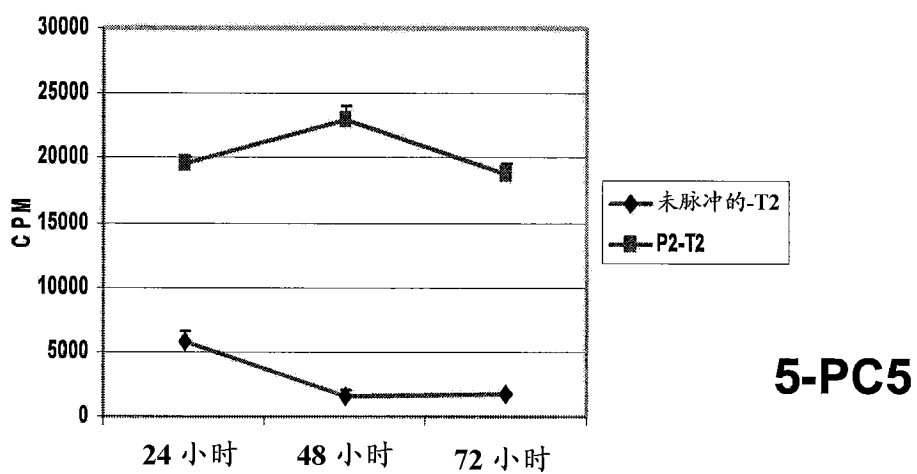
**5-PC5**

图 21

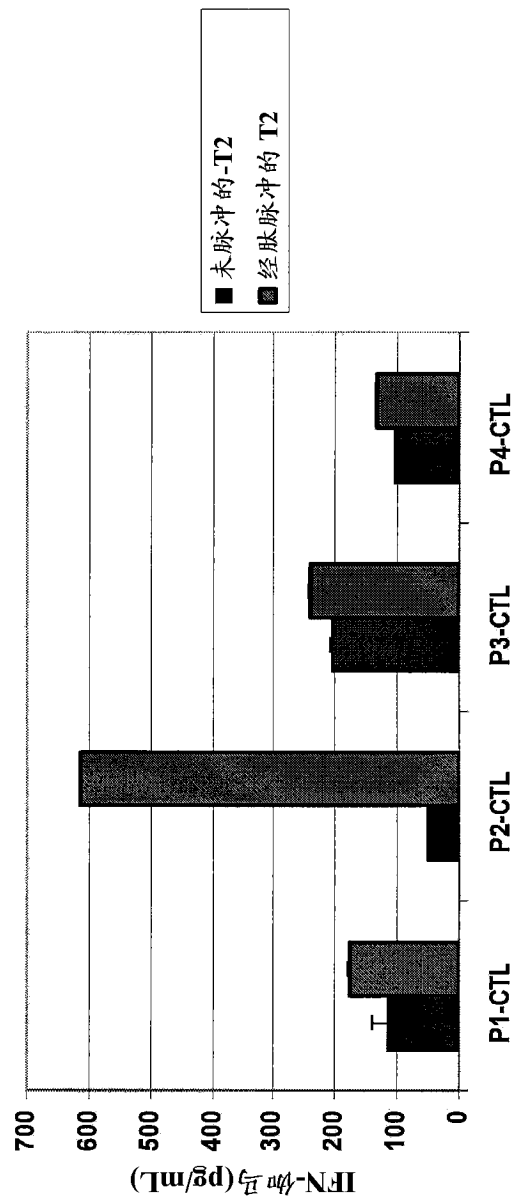


图 22

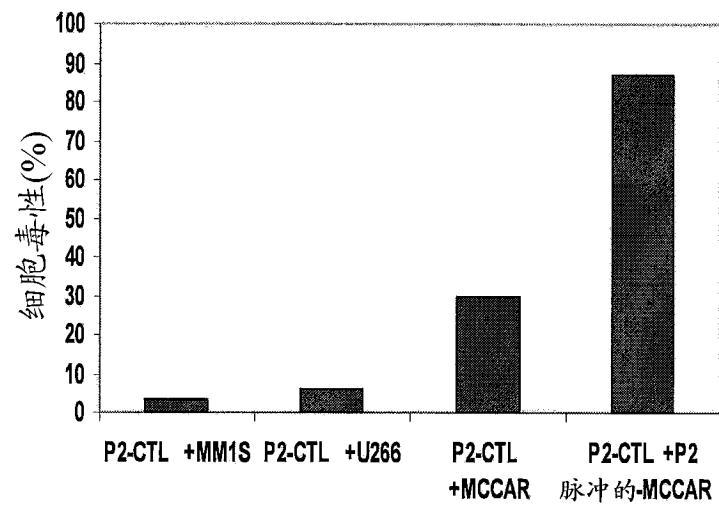


图 23