



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103180730 B

(45) 授权公告日 2016.03.02

(21) 申请号 201180034398.5  
 (22) 申请日 2011.05.16  
 (30) 优先权数据  
 61/334866 2010.05.14 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2013.01.11  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2011/036665 2011.05.16  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02011/143656 EN 2011.11.17  
 (73) 专利权人 综合医院公司  
 地址 美国马萨诸塞州  
 专利权人 达纳-法伯癌症研究所公司  
 (72) 发明人 N. 哈科亨 C. 吴  
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001  
 代理人 杜艳玲 梁谋  
 (51) Int. Cl.  
 G01N 33/53(2006.01)  
 G01N 33/68(2006.01)  
 (56) 对比文件  
 WO 2007/101227 A2, 2007.09.07,  
 WO 2010/033949 A1, 2010.03.25,  
 Volker Lennerz. the response of  
 autologous T cells to a human melanoma  
 is dominated by mutated neoantigens.

《PNAS》.2005, 第 102 卷(第 44 期), 第 16013-16018 页.  
 Jianping Huang et al.T Cells Associated with Tumor Regression Recognize Frameshifted Products of the CDKN2A umor Suppressor Gene Locus and a Mutated HLA Class I Gene Product. 《The Journal of Immunology》.2004, 第 172 卷第 6057-6064 页.  
 Gisella Volpe, et al.Alternative BCR/ABL Splice Variantsin Philadelphia Chromosome - Positive Leukemias Resultin Novel Tumor-Specific Fusion Proteins that May Represent Potential Targets for Immunotherapy Approaches. 《Cancer Research》.2007, 第 67 卷  
 Ingvil S&aelig terdal, et al.Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. 《PNAS》.2001, 第 98 卷(第 23 期), 第 13255-13260 页.  
 Boris Linard.A ras-Mutated Peptide Targeted by CTL In filtrating a Human Melanoma Lesion. 《The Journal of Immunology》.2002, 第 168 卷第 4802-4808 页.  
 (续)

审查员 刘迎鸣

权利要求书4页 说明书41页  
序列表32页 附图18页

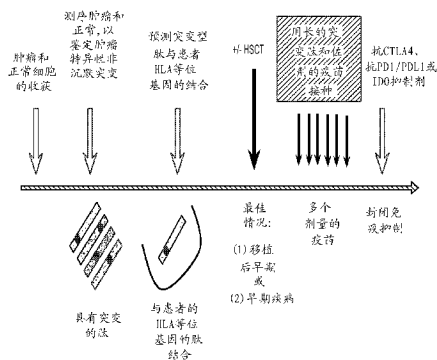
(54) 发明名称

鉴定肿瘤特异性新抗原的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫治疗肽及其在免疫疗法特别是癌症的免疫疗法中的用途。具体地,本发明提供了鉴定肿瘤特异性新抗原的方法,其单独或与其他肿瘤相关肽组合充当疫苗组合物的药物成分,所述疫苗组合物刺激抗肿瘤应答。

个人化的新抗原疫苗接种策略



CN 103180730 B

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/68*(2006.01)

*A61K 39/395*(2006.01)

*A61P 35/00*(2006.01)

(56) 对比文件

Luisa Novellino. A listing of human tumor antigens recognized by Tcells: March 2004 update. 《Cancer Immunol Immunother》. 2005, 第 54 卷第 187-207 页 .

Hans-Georg Rammensee. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. 《Immunological

Reviews》. 2002, 第 188 卷第 164-176 页 .

Marialuisa Sensi, et al. Unique Tumor Antigens: Evidence for Immune Control of Genome Integrity and Immunogenic Targets for T Cell-Mediated Patient-Specific Immunotherapy. 《clinical Cancer Research》. 2006, 第 12 卷第 5023-5032 页 .

John H. Sampson, et al. An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme. 《Molecular Cancer Therapeutics 》. 2009, 第 8 卷第 2773-2779 页 .

1. 一种制备受试者特异性的免疫原性组合物的方法,所述免疫原性组合物施用后将受试者特异性肽呈递至受试者的免疫系统,其中所述受试者患有肿瘤,和所述受试者特异性肽对所述受试者和受试者肿瘤有特异性,所述方法包括:

(i) 鉴定,包括通过

受试者肿瘤样品的全基因组或全外显子组核酸测序,和

受试者非肿瘤样品的全基因组或全外显子组核酸测序,

4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种肿瘤特异性非沉默突变不存在于所述非肿瘤样品;和

(ii) 从鉴定的非沉默突变中选择 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种受试者特异性肽,每个具有与鉴定的多个肿瘤特异性突变不同的肿瘤新表位,其是对受试者肿瘤有特异性的表位;

其中,每个新表位是不存在于非肿瘤样品的肿瘤特异性非沉默突变的表达产物,每个新表位能够引发肿瘤特异性 T 细胞应答,每个新表位与受试者的 I 类 HLA 蛋白连接,以及选择包括

确定受试者特异性肽与 I 类 HLA 蛋白的结合,

和

(iii) 配制用于施用至受试者的受试者特异性免疫原性组合物,从而施用后将 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种受试者特异性肽呈递给受试者的免疫系统,

其中所述选择或配制包括以下至少之一:

在受试者特异性免疫原性组合物中包含受试者特异性肽,所述受试者特异性肽包括鉴定的新 ORF 的表达产物,其中新 ORF 是在非肿瘤样品中不存在的肿瘤特异性非沉默突变,其创造新的开放阅读框,和

在受试者特异性免疫原性组合物中包含受试者特异性肽,所述受试者特异性包括鉴定的点突变的表达产物,并与受试者 I 类 HLA 蛋白具有 IC<sub>50</sub> 少于 500nM 的确定的结合,

由此,鉴定出 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种受试者特异性肽,和制备出受试者特异性的免疫原性组合物,其施用后将 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种受试者特异性肽呈递给受试者的免疫系统,其中所述受试者特异性肽对受试者和受试者的肿瘤具有特异性。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含 8 至 50 个氨基酸长度的受试者特异性肽。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含多于 15 个氨基酸长度的受试者特异性肽。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含 24 至 40 个氨基酸长度的受试者特异性肽。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含激活抗肿瘤 CD8 T 细胞的受试者特异性肽。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含以少于 250 nM 的 IC<sub>50</sub> 与受试者的 HLA 蛋白结合的受试者特异性肽。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含以少于 100 nM 的 IC50 与受试者的 HLA 蛋白结合的受试者特异性肽。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含以少于 50 nM 的 IC50 与受试者的 HLA 蛋白结合的受试者特异性肽。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种助剂一起施用的组合物。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种助剂一起施用的组合物,其中所述助剂分开施用。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种助剂一起施用的组合物,其中所述配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含助剂。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种载体一起施用的组合物,其中所述配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含载体。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备与另一种抗癌治疗剂一起施用的组合物。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备与抗-免疫抑制剂/免疫刺激剂一起施用的组合物。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备与提供 CTLA PD-1 或 PD-L1 阻断的抗-免疫抑制剂/免疫刺激剂一起施用的组合物。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备与包含抗-CTLA 抗体或抗-PD-L1 抗体的抗-免疫抑制剂/免疫刺激剂一起施用的组合物。

17. 权利要求 14-16 中任一项的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种助剂一起施用的组合物。

18. 权利要求 14-16 中任一项的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种助剂一起施用的组合物,其中所述助剂分开施用。

19. 权利要求 14-16 中任一项的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种助剂一起施用的组合物,其中所述配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含助剂。

20. 权利要求 17 的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种载体一起施用的组合物,其中所述配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含载体。

21. 权利要求 18 的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种载体一起施用的组合物,其中所述配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含载体。

22. 权利要求 19 的方法,其中所述选择或配制包括制备与至少一种载体一起施用的组合物,其中所述配制包括在受试者特异性免疫原性组合物中包含载体。

23. 权利要求 14-16 中任一项的方法,其中所述选择或配制包括制备与另一种抗癌治疗剂一起施用的组合物。

24. 权利要求 17 的方法,其中所述选择或配制包括制备与另一种抗癌治疗剂一起施用的组合物。

25. 权利要求 18 的方法,其中所述选择或配制包括制备与另一种抗癌治疗剂一起施用的组合物。

26. 权利要求 19 的方法,其中所述选择或配制包括制备与另一种抗癌治疗剂一起施用

的组合物。

27. 权利要求 20 的方法,其中所述选择或配制包括制备与另一种抗癌治疗剂一起施用的组合物。

28. 权利要求 21 的方法,其中所述选择或配制包括制备与另一种抗癌治疗剂一起施用的组合物。

29. 权利要求 22 的方法,其中所述选择或配制包括制备与另一种抗癌治疗剂一起施用的组合物。

30. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括确定在受试者癌组织中的至少一种受试者特异性肽的水平,其中所述受试者特异性肽是受试者亲本肽的突变,其在受试者的非癌正常组织中表达,和确定在受试者的非癌正常组织中亲本肽的表达水平,和当亲本肽以相当高的量在受试者非癌正常组织中表达时,在受试者特异性组合物中以少量包含或不包含受试者特异性肽。

31. 权利要求 1 的方法,其中所述确定受试者特异性肽与 HLA 蛋白的结合包括体外测定肽结合 HLA 蛋白。

32. 权利要求 1 的方法,其中所述确定受试者特异性肽与 HLA 蛋白的结合包括计算预测。

33. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括确定在受试者的肿瘤组织中至少一种受试者特异性肽的表达水平,和当受试者特异性肽以相当高的量在受试者的肿瘤组织中表达时,在受试者特异性组合物中包含受试者特异性肽。

34. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括确定在受试者的癌组织中至少一种受试者特异性肽的表达水平,和当受试者特异性肽以相当高的量在受试者癌组织中表达时,在受试者特异性组合物中包含受试者特异性肽。

35. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备将受试者特异性肽通过其表达经载体体内呈递给受试者免疫系统的组合物。

36. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备将受试者特异性肽通过其表达经核酸分子载体体内呈递给受试者免疫系统的组合物。

37. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备将受试者特异性肽通过其表达经病毒载体体内呈递给受试者免疫系统的组合物。

38. 权利要求 1 的方法,其中所述选择或配制包括制备将受试者特异性肽通过其施用经包含所述受试者特异性肽的免疫原性组合物呈递给受试者免疫系统的组合物。

39. 权利要求 1 的方法,其中所述呈递给受试者免疫系统的 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种受试者特异性肽包括引发 T 细胞的受试者特异性肽。

40. 权利要求 39 的方法,还包括从受试者分离所述 T 细胞。

41. 权利要求 40 的方法,还包括扩增所述分离的 T 细胞。

42. 权利要求 1 的方法,其中所述肿瘤是实体瘤。

43. 权利要求 1 的方法,其中所述肿瘤是血液肿瘤。

44. 权利要求 1 的方法,其中所述肿瘤是乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、睾丸癌、头与颈癌、胰腺癌、脑癌、黑素瘤、淋巴瘤或白血病。

45. 权利要求 1 的方法,其中所述肿瘤是黑素瘤。

46. 权利要求 1 的方法,其中所述肿瘤是白血病。

## 鉴定肿瘤特异性新抗原的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2010 年 5 月 14 日提交的美国临时申请号 61/334,866 的利益,所述申请整体引入本文作为参考。

### 发明领域

[0003] 本发明一般涉及肿瘤特异性新抗原的鉴定和这些新抗原生产癌症疫苗的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 肿瘤疫苗一般由肿瘤抗原和免疫刺激分子(例如细胞因子或 TLR 配体)组成,其一起工作以诱导识别且裂解肿瘤细胞的抗原特异性细胞毒性 T 细胞(CTLs)。在这时,几乎所有疫苗都含有共享的肿瘤抗原或全肿瘤细胞制剂(Gilboa, 1999)。共享的肿瘤抗原是跨越许多个体在肿瘤中具有选择性表达的免疫原性蛋白质,并且通常作为合成肽或重组蛋白质递送给患者(Boon 等人, 2006)。相比之下,全肿瘤细胞制剂作为自体被照射细胞、细胞裂解产物、细胞融合物、热休克蛋白质制剂或总 mRNA 递送给患者(Parmiani 等人, 2007)。因为全肿瘤细胞从自体患者中分离,所以细胞表达患者特异性肿瘤抗原以及共享的肿瘤抗原。最后,存在第三类肿瘤抗原,由于鉴定其的技术困难,其已罕见地用于疫苗中(Sensi 等人 2006)。这个种类由具有肿瘤特异性突变的蛋白质组成,所述肿瘤特异性突变导致改变的氨基酸序列。此类突变的蛋白质具有下述潜力:(a) 独特地标记肿瘤(相对于非肿瘤细胞)用于由免疫系统识别且破坏(Lennerz 等人, 2005);(b) 避免中枢和有时外周 T 细胞耐受,并且因此由更有效的高亲和力 T 细胞受体识别(Gotter 等人, 2004)。

[0006] 因此,存在鉴定作为肿瘤疫苗有用的新表位的方法的需要。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明部分涉及鉴定能够引发肿瘤特异性 T 细胞应答的肽的方法。

[0009] 在一个方面,本发明提供了通过鉴定具有癌症的受试者的表达基因中的肿瘤特异性突变来鉴定新抗原的方法。在一些方面,当突变是点突变时,该方法进一步包括鉴定具有该突变的突变型肽。优选地,突变型肽以大于野生型肽的亲和力结合 I 类 HLA 蛋白质,并且具有小于 500 nm 的 IC50;在其他方面,当突变是剪接位点、移码、连读或基因融合突变时,该方法进一步包括鉴定由该突变编码的突变型多肽。优选地,突变型多肽结合 I 类 HLA 蛋白质。

[0010] 任选地,该方法进一步包括选择激活抗肿瘤 CD8 T 细胞的肽或多肽。

[0011] 突变型肽或多肽优选以大于野生型肽的亲和力结合 I 类 HLA 蛋白质,并且具有小于 500 nm 的 IC50。优选地,该肽或多肽具有小于 250 nm 的 IC50。更优选地,该肽或多肽具有小于 100 nm 的 IC50。最优选地,该肽或多肽具有小于 50 nm 的 IC50。

[0012] 突变型肽长度为约 8-10 个氨基酸。在另一个方面,长度为约 8-50 个氨基酸。例如,突变型肽长度大于 10 个氨基酸、长度大于 15 个氨基酸、长度大于 20 个氨基酸、长度大于 30 个氨基酸。优选地,突变型肽长度为约 24-40 个氨基酸。

[0013] 在进一步方面,本发明提供了通过施用根据本发明的方法鉴定的一种或多种肽或

多肽和佐剂,在受试者中诱导肿瘤特异性免疫应答的方法。佐剂是例如基于 TLR 的佐剂或基于矿物油的佐剂。在一些方面,该肽或多肽和基于 TLR 的佐剂由基于矿物油的佐剂乳化。任选地,该方法进一步包括施用抗免疫抑制剂例如抗 CTLA-4 抗体、抗 PD1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CD25 抗体或 IDO 的抑制剂。

[0014] 在另外一个方面,本发明提供了通过给受试者施用自体树突细胞或抗原呈递细胞(其已用根据本发明的方法鉴定的一种或多种肽或多肽脉冲),在受试者中诱导肿瘤特异性免疫应答的方法。任选地,该方法进一步包括施用佐剂,例如基于 TLR 的佐剂或基于矿物油的佐剂。在一些方面,该肽或多肽和基于 TLR 的佐剂由基于矿物油的佐剂乳化。在一些实施方案中,该方法进一步包括施用抗免疫抑制剂。抗免疫抑制剂包括例如抗 CTLA-4 抗体、抗 PD1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CD25 抗体或 IDO 的抑制剂。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了通过鉴定受试者的表达基因中的多个肿瘤特异性突变就癌症免疫接种或治疗受试者的方法,鉴定具有所鉴定的肿瘤特异性突变的突变型肽或多肽,选择一种或多种鉴定的突变型肽或多肽,其以大于野生型肽的亲合力结合 I 类 HLA 蛋白质,并且能够激活抗肿瘤 CD8<sup>+</sup> T 细胞,并且给受试者施用一种或多种选择的肽、多肽或用一种或多种鉴定的肽或多肽脉冲的自体树突细胞或抗原呈递细胞。突变型肽长度为约 8-10 个氨基酸。在另一个方面,长度为约 8-50 个氨基酸。例如,突变型肽长度大于 10 个氨基酸、长度大于 15 个氨基酸、长度大于 20 个氨基酸、长度大于 30 个氨基酸。优选地,突变型肽长度为约 24-40 个氨基酸。

[0016] 任选地,该方法进一步包括施用佐剂,例如基于 TLR 的佐剂或基于矿物油的佐剂。在一些方面,该肽或多肽和基于 TLR 的佐剂由基于矿物油的佐剂乳化。在一些实施方案中,该方法进一步包括施用抗免疫抑制剂。抗免疫抑制剂包括例如抗 CTLA-4 抗体、抗 PD1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CD25 抗体或 IDO 的抑制剂。

[0017] 权利要求 22 的方法,其中所述受试者已接受造血干细胞移植。

[0018] 受试者是人、犬、猫或马。癌症是乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、睾丸癌、头与颈癌、胰腺癌、脑癌、黑色素瘤、淋巴瘤例如 B 细胞淋巴瘤或白血病,例如急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病或 T 细胞淋巴细胞白血病。

[0019] 本发明中还包括的是含有根据本发明的方法鉴定的肽或多肽和药学可接受的载体的药物组合物。

[0020] 例如,本发明提供了含有至少两种不同的 SF3B1 肽的组合物,其中每种肽长度等于或小于 50 个氨基酸且含有

[0021] 在氨基酸位置 625 处的亮氨酸;

[0022] 在氨基酸位置 626 处的组氨酸;

[0023] 在氨基酸位置 700 处的谷氨酸;

[0024] 在氨基酸位置 742 处的天冬氨酸;或

[0025] 在氨基酸位置 903 处的精氨酸,当依照野生型 SF3B1 编号时。

[0026] 本发明还提供了含有至少两种不同的 MYD88 肽的组合物,其中每种肽长度等于或小于 50 个氨基酸且含有

[0027] 在氨基酸位置 232 处的苏氨酸;在氨基酸位置 258 处的亮氨酸;或

[0028] 在氨基酸位置 265 处的脯氨酸,当依照野生型 MYD88 编号时。

[0029] 本发明进一步提供了含有至少两种不同的 TP53 肽的组合物,其中每种肽长度等于或小于 50 个氨基酸且含有在氨基酸位置 111 处的精氨酸;在氨基酸位置 215 处的精氨酸;在氨基酸位置 238 处的丝氨酸;在氨基酸位置 248 处的谷氨酰胺;在氨基酸位置 255 处的苯丙氨酸;在氨基酸位置 273 处的半胱氨酸或在氨基酸位置 281 处的天冬酰胺,当依照野生型 TP53 编号时。

[0030] 本发明进一步提供了含有至少两种不同的 ATM 肽的组合物,其中每种肽长度等于或小于 50 个氨基酸且含有

[0031] 在氨基酸位置 1252 处的苯丙氨酸;在氨基酸位置 2038 处的精氨酸;在氨基酸位置 2522 处的组氨酸;或在氨基酸位置 2954 处的半胱氨酸,当依照野生型 ATM 编号时。

[0032] 组合物包含至少两种不同的 Abl 肽,其中每种肽长度等于或小于 50 个氨基酸且含有在氨基酸位置 244 处的缬氨酸;

[0033] 在氨基酸位置 248 处的缬氨酸;

[0034] 在氨基酸位置 250 处的谷氨酸;在氨基酸位置 250 处的丙氨酸;在氨基酸位置 252 处的组氨酸;在氨基酸位置 252 处的精氨酸;在氨基酸位置 253 处的苯丙氨酸;在氨基酸位置 253 处的组氨酸;在氨基酸位置 255 处的赖氨酸;在氨基酸位置 255 处的缬氨酸;在氨基酸位置 276 处的甘氨酸;在氨基酸位置 315 处的异亮氨酸;在氨基酸位置 315 处的天冬酰胺;在氨基酸位置 317 处的亮氨酸;在氨基酸位置 343 处的苏氨酸;在氨基酸位置 351 处的苏氨酸;在氨基酸位置 355 处的甘氨酸;在氨基酸位置 359 处的缬氨酸;在氨基酸位置 359 处的丙氨酸;在氨基酸位置 379 处的异亮氨酸;在氨基酸位置 382 处的亮氨酸;在氨基酸位置 387 处的甲硫氨酸;在氨基酸位置 396 处的脯氨酸;在氨基酸位置 396 处的精氨酸;在氨基酸位置 417 处的酪氨酸;或在氨基酸位置 486 处的丝氨酸,当依照野生型 ABL 编号时。

[0035] 在本发明中进一步包括的是含有至少两种不同的 FBXW7 肽的组合物,其中每种肽长度等于或小于 50 个氨基酸且含有在氨基酸位置 280 处的亮氨酸;在氨基酸位置 465 处的组氨酸;在氨基酸位置 505 处的半胱氨酸;或在氨基酸位置 597 处的谷氨酸,当依照野生型 FBXW7 编号时。

[0036] 在进一步方面,本发明提供了含有至少两种不同的 MAPK1 肽的组合物,其中每种肽长度等于或小于 50 个氨基酸且含有在氨基酸位置 162 处的天冬酰胺;在氨基酸位置 291 处的甘氨酸;或

[0037] 在氨基酸位置 316 处的苯丙氨酸,当依照野生型 MAPK1 编号时。

[0038] 本发明还提供了含有至少两种不同的 GNB1 肽的组合物,其中每种肽长度等于或小于 50 个氨基酸且含有在氨基酸位置 180 处的苏氨酸,当依照野生型 GNB1 编号时。

[0039] 还由本发明提供的是用长度等于或小于 50 个氨基酸的 Bcr-abl 肽的组合物治疗具有伊马替尼抗性肿瘤的受试者或 HLA-A3 阳性受试者的方法,所述 Bcr-abl 肽含有在氨基酸位置 255 处的赖氨酸,当依照野生型 bcr-abl 编号时。

[0040] 由本发明进一步提供的是治疗具有伊马替尼抗性肿瘤的受试者的方法,其包括给受试者施用含有 bcr-abl 突变的一种或多种肽,其中所述肽等于或小于 50 个氨基酸,并且以小于 500 nm 的 IC50 结合 I 类 HLA 蛋白质。

[0041] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有由本发明所属领域普通技术人员通常理解相同的含义。尽管与本文描述那些相似或等价的方法和材料可以用于本发明

的实践中,但下文描述了合适的方法和材料。所有出版物、专利申请、专利和本文提及的其他参考文献特别整体引入作为参考。在冲突的情况下,以本说明书包括定义为准。此外,本文描述的材料、方法和实施例仅是举例说明性的且不预期是限制性的。

[0042] 本发明的其他特点和优点通过下述详述和权利要求将是显而易见的且由其包含。

[0043] 附图简述

[0044] 图 1 显示了使用 3 类抗原用于肿瘤疫苗的特异性和自身免疫毒性的平衡。全肿瘤细胞可能是对于肿瘤疫苗最少特异性的抗原制剂,因为在肿瘤细胞中表达的全套蛋白质抗原包括也存在于机体的其他细胞中的数千种蛋白质。过表达的肿瘤抗原是略微更特异性的,因为它们已就与机体的其他细胞相比较在肿瘤中高得多和更多选择性表达进行选择。然而,就这些抗原的表达测试在机体中的每一种细胞是不可能,并且存在其他细胞表达其的基本危险。最后,突变的蛋白质生成仅存在于肿瘤细胞中且提供最大水平的特异性的新表位。

[0045] 图 2 是用于个人化新抗原疫苗接种策略的方案,其可以应用于任何癌症的治疗。我们还突出显示了在两种独特情况下应用这种策略的可能性。在第一种情况下,患者在造血干细胞移植(HSCT)(例如对于 CLL、CML 和其他白血病完成的)后的早期接种疫苗。HSCT 后的早期是独特的治疗背景,因为免疫系统由于用 HSCT 重构而是感受态的,从而克服肿瘤或治疗诱导的宿主免疫缺陷。此外,在淋巴细胞减少的环境中稳态细胞因子的丰度,例如在早期 HSCT 后的背景中,可以促成 T 细胞的快速扩增。在第二种情况下,患者在疾病过程早期接种疫苗,当免疫能力在疾病的早期中可以变得更完整时,在通过暴露于化学疗法(例如用于实体或造血系统肿瘤)的损伤前。因为免疫系统在这两种特异性情况下可能是最活性的,所以我们建议这些是用于应用肿瘤疫苗接种策略的理想情况。

[0046] 图 3 显示了以 3 步描述的用于鉴定肿瘤新表位的策略:(1)使用测序技术,检测存在于肿瘤中但不存在于单个患者的种系 DNA 中的基因突变;(2)使用预测算法,预测突变的肽是否具有结合个人 HLA 等位基因的潜力;这些预测的肽可以任选对于结合合适的 HLA 蛋白质在实验上测试。此外,这些基因还必须在肿瘤细胞中表达。(3)离体生成 T 细胞且测试它们是否能够识别表达突变蛋白质的细胞;可替代地,质谱法可以用于检测从肿瘤细胞表面 HLA 蛋白质中洗脱的肽。对于慢性淋巴细胞白血病,我们迄今为止的研究证实存在平均 23 个蛋白质改变突变/患者,46 种预测的结合突变型肽和 15-25 种验证的结合突变型肽。在这些中,我们预期~7-12 种肽在肿瘤细胞中表达且加工(尽管这跨越肿瘤和患者可以不同)。

[0047] 图 4 显示了五类突变生成潜在的肿瘤新表位。新的肿瘤特异性表位可以由于错义、剪接位点、移码或连读点突变(红色星号)而出现,或由两种基因的融合(或在相同基因内)而出现。特别地,剪接位点、移码、连读突变和基因融合可以各自生成新的氨基酸段(以品红色),其通常是不翻译的,但目前由于突变而表达且翻译。错义突变导致具有单个氨基酸变化的肽。

[0048] 图 5 显示了在 CLL 患者中的突变频率/种类。我们将下一代测序应用于 7 个 CLL 肿瘤系列的研究揭示 CLL 细胞具有许多突变,其提供可能的突变肽的丰富来源。我们观察到在 CLL 中的非沉默基因改变的总数目范围为 17-155/个体,其中大多数是体细胞改变的点突变(错义)。4 个患者的肿瘤还具有剪接位点突变;对于 3 个患者,通过 RNA 测序鉴定新

基因融合。

[0049] 图 6 显示了针对患者的 6 个 HLA (MHC I 类) 等位基因中的每一个来自肽结合(对于具有特异性错义突变的肽)的自动化预测(图 3 中的策略的步骤 2A)的数据。品红色 = 强结合剂;绿色 = 中等结合剂。

[0050] 图 7 显示了用于证实突变基因的 RNA 表达(图 3 中的策略的步骤 2B)的方法。A. 对于 CLL 患者 7,我们发现具有预测的 HLA 结合肽的超过一半的突变基因在 RNA 水平上表达。B. 我们还已使用 RNA 焦磷酸测序,以检测具有在 DNA 中发现的特异性突变的表达的 RNAs。C. 我们可以使用断裂点区(描述的是对于患者 2 发现的融合)的 PCR-TOPO 克隆,验证通过 DNA 测序可见的新基因融合。

[0051] 图 8 显示了用于 HLA 肽结合的实验验证(图 3 中的策略的步骤 2C)的方法和数据。A. 关于与特异性 HLA 等位基因的肽结合的实验验证的方案。B. 在患者 1 和 2 中鉴定的候选突变肽的概括。加阴影的室指示分析在进行中。C. 关于对于患者 2 由基因改变(错义突变或基因融合)生成的肽预测与实验验证的结合亲和力比较的数据。 $IC_{50} < 120nM$  的预测截断(在左侧的垂直实线)导致所有肽显示与 I 类 HLA 的实验结合。

[0052] 图 9 显示了突变与种系(即,也称为亲本、野生型或正常)肽比较与 HLA 等位基因的预测差异结合。患者 2 的 25 种预测的 HLA 结合突变肽中的 12 种具有比亲本肽 >2 倍大的结合(截断 = 红色虚线)。这进一步增加突变肽的特异性。突变肽由于两个原因是特异性的:首先,识别突变肽的许多 T 细胞受体不可能检测野生型亲本肽;其次,一些突变肽可以以比亲本肽更高的亲和力结合 HLA。因为第一种性质不能计算预测,所以我们集中于预测第二种性质,且仅选择那些肽用于包括在疫苗中,所述肽相对于野生型肽关于突变显示与 HLA 的更高结合。

[0053] 图 10 显示了针对候选的个人 CLL 新表位的 T 细胞反应性(图 3 中的策略的步骤 3)。我们观察到在治疗后从患者 1 中分离的 T 细胞可以检测特异性突变的 TLK2 肽(肽 #7)(使用 Elispot 测定)。

[0054] 图 11 显示了 BCR-ABL 突变生成预期为结合 HLA-A 和 HLA-B 等位基因的许多肽。通过应用 NetMHC 预测算法(Nielsen 等人 PLoS One. 2007, 2(8):e796),我们预测由 BCR-ABL 突变生成的肽具有结合 8 种常见 HLA-A 和 -B 等位基因的潜力。最常见的 BCR-ABL 突变以递减频率排序(从左到右),且描述了多种 I 类 MHC 结合肽的预测  $IC_{50}$ 。总之,我们预测了 84 种肽以良好亲和力结合跨越广泛范围的 HLA 等位基因,所述良好亲和力定义为小于 1000 的  $IC_{50}$ 。在所有预测的肽中,84 种中的 24 种(29%)预测为具有  $IC_{50} < 50$  的强结合剂。42 种肽(50%)是中等结合剂,定义为在 50 和 500 之间的  $IC_{50}$ 。18 种肽(21%)是定义为  $IC_{50}$  在 500 和 1000 之间的弱结合剂。

[0055] 图 12 显示了具有 E255K 突变的 BCR-ABL 肽结合 HLA 蛋白质,且与存在于 CML 患者中的特异性、多功能 T 细胞结合。A. E255K-B(和亲本肽)与 HLA A3 和超型成员的实验衍生的结合得分。B. 在 HSCT 后由 HLAA3+ E255K+ 患者扩增的 CD8+ T 细胞中,我们检测到针对 E255K-B (MUT) 肽的  $IFN\gamma$  分泌和表达 E255K 小基因(MG)的表达 A3+ 的 APCs。这个应答在 I 类封闭抗体(w6/32)的存在下是取消的。C.  $IFN\gamma$  分泌细胞对于突变肽也是四聚体+,并且是(D)多功能的,分泌 IP10、TNF  $\alpha$  和 GM-CSF(基于 Luminex 测定)。

[0056] 图 13 显示了患者衍生的 T 细胞克隆可以识别肿瘤特异性表位且杀死呈现这些表

位的细胞。A. 与 CML66 (肽 66-72C) 的 CD8+ T 细胞表位的反应性受 HLA B-4403 限制。B. CML66 mRNA 可以有效核转染到 CD40L 扩增的 B 细胞内。C. CML66 特异性 CD8+ T 细胞对于通过 RNA 核转染或通过肽脉冲表达 CML66 的 CD40L B 细胞而不是对照靶是细胞毒性的。

[0057] 图 14 显示了在 CLL 中显著突变的基因。A. 在 64 个 CLL 样品中 9 种最显著突变的基因。N - 跨越 64 个测序的样品在碱基对中覆盖的总领域。通过比较察看观察到的突变丛(constellation)的概率与跨越数据集计算的本底突变率来计算 p 和 q 值。红色条 - 先前未知在 CLL 中是突变的基因;灰色条 - 其中在 CLL 中的突变先前已报道的基因。B. 在 64 个 CLLs 中(在 CLLs 样品中的位置和突变显示在基因上)发现的在 *ATM*、*SF3B1*、*TP53*、*MYD88*、*FBXW7*、*DDX3X*、*MAPK1* 和 *GNAI1* 中的突变类型(错义、剪接位点、无义)和定位,与文献或 COSMIC 数据库中先前报道的突变相比较(线显示在基因下的突变位置)。

[0058] 图 15 显示了 SF3B1 在 CLL 样品中表达(曲线图中的第 7 个柱)且具有比许多对照细胞更高的表达,包括:PBMC, M:单核细胞、CC:癌细胞系(包括 K562、Jurkat、IM9、MCF-7、Hela、Ovcar、RPMI、OTM、MCF-CAR、KM12BM 和 MM1S)。

[0059] 图 16 显示了 SF3B1 突变生成预期为结合患者特异性 HLA 等位基因的肽。例如,包括常见 SF3B1 K700E 突变的一种肽预测为强烈结合 HLA。

[0060] 发明详述

[0061] 开发治愈和肿瘤特异性免疫疗法的关键障碍之一是高度限制的肿瘤抗原的鉴定和选择,以避免自身免疫。由于在恶性细胞内的遗传改变出现的肿瘤新抗原代表最肿瘤特异性种类的抗原。由于鉴定其的技术困难,新抗原已罕见地用于疫苗中。我们鉴定肿瘤特异性新表位的方法涉及三个步骤。(1) 使用肿瘤的全基因组或全外显子组(即,仅捕获的外显子)或 RNA 测序与来自每个患者的匹配种系样品比较鉴定 DNA 突变;(2)应用验证的肽-MHC 结合预测算法,以生成可以结合患者 HLA 等位基因且基于肿瘤中存在的非沉默突变的一组候选 T 细胞表位;和(3) 任选证实针对突变肽的抗原特异性 T 细胞或证实候选肽结合肿瘤表面上的 HLA 蛋白质。

[0062] 相应地,本发明涉及用于鉴定和/或检测抗原的 T 细胞表位的方法。具体地,本发明提供了鉴定和/或检测肿瘤特异性新抗原的方法,所述肿瘤特异性新抗原用于诱导受试者中的肿瘤特异性免疫应答。

[0063] 特别地,本发明提供了通过鉴定受试者的基因组中的多个肿瘤特异性突变来免疫接种或治疗受试者的方法。选择具有鉴定的突变且结合 I 类 HLA 蛋白质的突变型肽和多肽。任选地,这些肽和多肽以大于野生型肽的亲和力结合 I 类 HLA 蛋白质,和/或能够激活抗肿瘤 CD8 T 细胞。将这些肽施用于受试者。可替代地,施用已用该肽脉冲的自体抗原呈递细胞。

[0064] 在肿瘤的免疫控制中突变抗原或新抗原的重要性已在基本(seminal)研究中得到理解,所述基本研究显示:(a)小鼠和人通常发动针对突变抗原的 T 细胞应答(Parmiani 等人,2007;Sensi 和 Anichini,2006);(b)小鼠可以通过用肿瘤中存在的单一突变肽免疫接种保护不受肿瘤(Mandelboim 等人,1995);(c)自发或疫苗介导的长期黑素瘤幸存者发动针对突变抗原的强记忆细胞毒性 T 细胞(CTL)应答(Huang 等人,2004;Lennerz 等人,2005;Zhou 等人,2005a);(d)最后,当用存在于自体肿瘤细胞中的患者特异性的突变免疫球蛋白蛋白质免疫接种时,滤泡型淋巴瘤患者显示分子缓解。(Baskar 等人,2004)。此外,在这些

患者中的 CTL 应答直接针对突变而不是共享的免疫球蛋白蛋白质区。另外,此类突变肽具有下述潜力:(a)独特地标记肿瘤用于由免疫系统识别且破坏,从而减少关于自身免疫的危险;和(b)避免中枢和外周 T 细胞耐受,允许抗原由更有效的高亲和力 T 细胞受体识别。(图 1)。

[0065] 在任何特定基因中的同一突变很少跨越肿瘤发现(且甚至对于最常见的驱动突变以低频率)。因此,本发明的方法将包括鉴定患者特异性肿瘤突变。使用高度平行的测序技术、HLA 肽结合预测工具和生物化学测定,本发明的方法将允许:(1)综合鉴定表达且结合患者的肿瘤中存在的 HLA 蛋白质的突变肽;(2)监控癌症患者针对这些鉴定的新表位的天然免疫应答;(3)测定在患者 HLA 蛋白质的背景中识别这些肽的细胞毒性 T 细胞是否可以离体选择性裂解自体肿瘤细胞。这个策略解决涉及癌症患者的免疫系统如何与肿瘤新表位相互作用的几个基本问题。这些包括:肿瘤新表位的哪个和何种部分由 T 细胞检测,多少 T 细胞前体能够响应新表位,新表位特异性记忆和效应 T 细胞在循环和肿瘤中有多频繁,T 细胞对于这些表位具有多少亲和力,新表位特异性 T 细胞是有功能的吗?这些问题的答案提供关于在人疫苗中使用肿瘤新表位的理由和策略。

[0066] 人的免疫系统可以分类成两个功能子系统,即先天性和获得性免疫系统。先天性免疫系统是针对感染的第一线防御,并且大多数潜在病原体在它们可以引起例如显著感染之前快速中和。获得性免疫系统与侵入生物的称为抗原的分子结构反应。存在两类获得性免疫反应,即体液免疫反应和细胞介导的免疫反应。在体液免疫反应中,由 B 细胞分泌到体液内的抗体结合病原体衍生的抗原,导致通过多种机制的病原体消除,例如补体介导的裂解。在细胞介导的免疫反应中,激活能够破坏其他细胞的 T 细胞。如果例如与疾病有关的蛋白质存在于细胞中,那么它们在细胞内蛋白酶解断裂为肽。特异性细胞蛋白质随后将其自身附着至以这种方式形成的抗原或肽,并且将其转运至细胞的表面,在其中它们呈递给机体的分子防御机制,特别是 T 细胞。细胞毒性 T 细胞识别这些抗原且杀死具有该抗原的细胞。

[0067] 转运且在细胞表面上呈递肽的分子称为主要组织相容性复合物(MHC)的蛋白质。MHC 蛋白质分类成 I 类和 II 类 MHC 蛋白质。两个 MHC 种类的蛋白质结构非常相似;然而,它们在其功能中相当大地不同。MHC I 类的蛋白质存在于机体的几乎所有细胞包括大多数肿瘤细胞的表面上。MHC I 类的蛋白质装载有抗原,所述抗原通常源于内源性蛋白质或细胞内存在的病原体,并且随后呈递给细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)。II 类的 MHC 蛋白质仅存在于树突细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞和其他抗原呈递细胞上。它们主要将由体外抗原来源即细胞外加工的肽呈递给 T 辅助(Th)细胞。由 I 类 MHC 蛋白质结合的大多数肽源于在健康宿主生物自身中产生的细胞质蛋白质,且通常不刺激免疫反应。相应地,识别此类自身肽呈递的 I 类 MHC 分子的细胞毒性 T 淋巴细胞在胸腺中缺失,或在其从胸腺中释放后,被缺失或灭活,即耐受。MHC 分子仅在它们将肽呈递给非耐受的细胞毒性 T 淋巴细胞时,才能刺激免疫反应。细胞毒性 T 淋巴细胞在其表面上具有 T 细胞受体(TCR)和 CD8 分子。T 细胞受体能够识别且结合由 MHC I 类分子复合的肽。每个细胞毒性 T 淋巴细胞表达独特的 T 细胞受体,其能够结合特异性 MHC/肽复合物。

[0068] 肽通过在内质网内的竞争亲和力结合将其自身附着至 MHC I 类分子,在它们呈递在细胞表面上之前。此处,个别肽的亲和力直接连接至其氨基酸序列和在氨基酸序列内的

限定位置中特异性结合基序的存在。如果此类肽的序列是已知的,那么例如使用例如肽疫苗可以操纵免疫系统针对患病细胞。

[0069] 使用计算机算法,可以预测潜在的 T 细胞表位,即肽序列,其由以肽呈递的复合物形式的 I 类或 II 类 MHC 分子结合,且随后以这种形式,由 T 淋巴细胞的 T 细胞受体识别。目前,特别使用两种程序,即 SYFPEITHI (Rammensee 等人, *Immunogenetics*, 50 (1999), 213-219) 和 HLA\_BIND (Parker 等人, *J. Immunol.*, 152 (1994), 163-175)。潜在地可以结合 I 类 MHC 分子的以这种方式测定的肽序列随后已在体外检查其实际结合能力。

[0070] 本发明的技术目的是提供用于鉴定且筛选肿瘤细胞中存在的潜在 T 细胞表位的改良方法,所述方法允许就其结合特异性 MHC 分子的能力同时和快速检查大量肽序列。

[0071] 在本发明中,它基于其的技术目的通过提供用于鉴定和 / 或检测突变抗原的方法实现,所述突变抗原存在于肿瘤中但不存在于正常组织中。该方法使用癌症患者基因组的整个编码部分的大量平行基因组测序,以鉴定肿瘤中的特异性突变基因。为了缩小突变型肽至具有比野生型肽更强烈地结合 HLA 的潜力并且因此赋予肿瘤特异性的那些,充分建立的算法将用于预测结合每个患者的 6 个独特的 I 类 HLA 等位基因中的任何的肽,并且将计算对于具有肿瘤特异性突变残基的所有 9 或 10 聚体肽与具有种系残基的那些比较的预测 IC50。一般地,具有预测的 IC50<50nM 的肽一般视为中等至高亲和力结合肽,且将选择用于以经验为主地使用 HLA 结合的生物化学测定测试其亲和力。最后,将测定人免疫系统是否可以发动针对这些突变的肿瘤抗原的有效免疫应答且因此有效杀死肿瘤而不是正常细胞。

[0072] 定义

[0073] “T 细胞表位”应理解为意指这样的肽序列,其可以由以肽呈递的 MHC 分子或 MHC 复合物形式的 I 或 II 类 MHC 分子结合,并且随后以这种形式分别由细胞毒性 T 淋巴细胞或 T 辅助细胞识别且结合。

[0074] “受体”应理解为意指能够结合配体的生物学分子或分子分组。受体可以作用于传输细胞、细胞形成或生物中的信息。受体包含至少一个受体单位且优选两个受体单位,其中每个受体单位可以由蛋白质分子特别是糖蛋白分子组成。受体具有补充配体那种的结构且可以将配体复合为结合配偶体。信息特别通过在细胞表面上的配体复合后受体的构象变化传输。根据本发明,受体应理解为特别意指能够与配体形成受体 / 配体复合物的 MHC I 和 II 类蛋白质,特别是合适长度的肽或肽片段。

[0075] “配体”应理解为意指具有补充受体那种的结构且能够与这种受体形成复合物的分子。根据本发明,配体应理解为特别意指在其氨基酸序列中具有合适长度和合适结合基序的肽或肽片段,从而使得肽或肽片段能够与 MHC I 类或 MHC II 类的蛋白质形成复合物。

[0076] “受体 / 配体复合物”也应理解为意指“受体 / 肽复合物”或“受体 / 肽片段复合物”,特别是呈递 I 类或 II 类 MHC 分子的肽或肽片段。

[0077] “主要组织相容性复合物(MHC)的蛋白质或分子”、“MHC 分子”、“MHC 蛋白质”或“HLA 蛋白质”应理解为特别意指这样的蛋白质,其能够结合起因于蛋白质抗原的蛋白酶切割且代表潜在的 T 细胞表位的肽,将其转运至细胞表面且将其在那里呈递给特异性细胞,特别是细胞毒性 T 淋巴细胞或 T 辅助细胞。基因组中的主要组织相容性复合物包含遗传区,其在细胞表面上表达的基因产物对于结合且呈递内源和 / 或外源抗原且从而对于调节免疫过程是重要的。主要组织相容性复合物分类成编码不同蛋白质的两组基因,即 MHC

I 类分子和 MHC II 类分子。两个 MHC 种类的分子对于不同抗原来源是专门的。MHC I 类分子呈递内源合成的抗原,例如病毒蛋白质和肿瘤抗原。MHC II 类分子呈递源于外部来源的蛋白质抗原,例如细菌产物。两个 MHC 种类的细胞生物学和表达模式适合于这些不同作用。

[0078] I 类 MHC 分子由重链和轻链组成,并且能够结合约 8 - 11 个氨基酸,但通常 9 或 10 个氨基酸的肽,如果这种肽具有合适的结合基序,并且将其呈递给细胞毒性 T 淋巴细胞。由 I 类 MHC 分子结合的肽源于内源蛋白质抗原。I 类 MHC 分子的重链优选是 HLA-A、HLA-B 或 HLA-C 单体,并且轻链是  $\beta$ -2- 微球蛋白。

[0079] II 类 MHC 分子由  $\alpha$  链和  $\beta$  组成且能够结合约 15 - 24 个氨基酸的肽,如果这种肽具有合适的结合基序,且将其呈递给 T 辅助细胞。由 II 类 MHC 分子结合的肽通常源于细胞外的外源蛋白质抗原。 $\alpha$  链和  $\beta$  链特别是 HLA-DR、HLA-DQ 和 HLA-DP 单体。

[0080] “疫苗”应理解为意指用于生成用于疾病预防和 / 或治疗的免疫性的组合物。相应地,疫苗是包含抗原的药物,且预期通过疫苗接种在人或动物中用于生成特异性防御和保护物质。

[0081] “分离的”意指多核苷酸或多肽或其片段、变体或衍生物,其已基本上去除与之天然结合的其他生物学材料,或基本上不含例如衍生自重组宿主细胞的其他生物学材料,所述重组宿主细胞已遗传改造为表达本发明的多肽。

[0082] “新抗原”意指起于表达蛋白质的肿瘤特异性突变的一类肿瘤抗原。

[0083] “纯化的”意指多核苷酸或多肽或其片段、变体或衍生物,其基本上不含与之天然结合的其他生物学材料,或不含例如衍生自重组宿主细胞的其他生物学材料,所述重组宿主细胞已遗传改造为表达本发明的多肽。即,例如本发明的纯化多肽是至少约 70-100% 纯的多肽,即多肽存在于组合物中,其中多肽构成按总组合物的重量计约 70-100%。在一些实施方案中,本发明的纯化多肽是按重量计约 75%-99% 纯、按重量计约 80%-99% 纯、按重量计约 90%-99% 纯、或按重量计约 95% - 99% 纯。

[0084] 肿瘤特异性突变的鉴定

[0085] 本发明基于特定突变(例如存在于癌细胞中的变体或等位基因)的鉴定。特别地,这些突变存在于具有癌症的受试者的癌细胞的基因组中但不存在于来自受试者的正常组织中。

[0086] 肿瘤中的遗传突变会视为对于肿瘤的免疫学靶向有用,如果它们导致在肿瘤中专一的蛋白质的氨基酸序列中的变化。有用的突变包括:(1) 导致蛋白质中的不同氨基酸的非同义突变;(2) 其中终止密码子被修饰或缺失的连读突变,导致在 C 末端具有新肿瘤特异性序列的更长蛋白质的翻译;(3) 导致成熟 mRNA 中包括内含子和因此独特的肿瘤特异性蛋白质序列的剪接位点突变;(4) 引起在 2 个蛋白质的连接处(即基因融合)具有肿瘤特异性序列嵌合蛋白质的染色体重排;(5) 导致具有新的肿瘤特异性蛋白质序列的新开放读码框的移码突变或缺失。

[0087] 起于肿瘤细胞中的例如剪接位点、移码、连读或基因融合突变的具有突变的肽或突变多肽可以通过在肿瘤与正常细胞中比较测序 DNA、RNA 或蛋白质进行鉴定。

[0088] 还在本发明的范围内的是包括先前鉴定的肿瘤特异性突变的肽。已知肿瘤突变可以在 <http://www.sanger.ac.uk/cosmic> 处找到。

[0089] 多种方法可用于检测个体的 DNA 或 RNA 中特定突变或等位基因的存在。在这个领

域中的进展已提供准确、容易和价廉的大规模 SNP 基因分型。最近以来,例如,已描述了几个新技术,包括动态等位基因特异性杂交(DASH)、微板阵列对角线凝胶电泳(MADGE)、焦磷酸测序、寡核苷酸特异性连接、TaqMan 系统以及多种 DNA“芯片”技术,例如 Affymetrix SNP 芯片。这些方法要求一般通过 PCR 扩增靶遗传区。基于通过侵袭切割随后为质谱法或固定挂锁探针和滚环扩增的小信号分子生成的另外其他新开发方法,可能最后消除关于 PCR 的需要。本领域已知的用于检测特异性单核苷酸多态性的几种方法在下文概括。本发明的方法应理解为包括所有可获得的方法。

[0090] 基于 PCR 的检测方法可以包括多个标记同时的多路扩增。例如,本领域众所周知的是选择 PCR 引物以生成 PCR 产物,其在大小中不重叠且可以同时分析。可替代地,可以用引物扩增不同标记,所述引物差异标记且从而可以各自差异检测。当然,基于杂交的检测方法允许样品中的多个 PCR 产物的差异检测。其他技术是本领域已知的,以允许多个标记的多路分析。

[0091] 几种方法已得到开发,以促进基因组 DNA 或细胞 RNA 中的单核苷酸多态性的分析。在一个实施方案中,单碱基多态性可以通过使用专门的外切核酸酶抗性核苷酸进行,如例如 Mundy, C. R. (美国专利号 4,656,127) 中公开的。根据该方法,与多态位点 3' 紧邻的等位基因序列互补的引物允许与得自特定动物或人的靶分子杂交。如果在靶分子上的多态位点含有与存在的特定外切核酸酶抗性核苷酸衍生物互补的核苷酸,那么那种衍生物将掺入杂交引物的末端上。此类掺入致使引物对外切核酸酶有抗性,并且从而允许其检测。因为样品的外切核酸酶抗性衍生物的身份是已知的,所以引物已变得对外切核酸酶抗性的发现揭示存在于靶分子的多态位点中的核苷酸与反应中使用的核苷酸衍生物的那种互补。这种方法具有它不要求测定大量外部序列数据的优点。

[0092] 在本发明的另一个实施方案中,基于溶液的方法用于测定多态位点的核苷酸的身份。Cohen, D. 等人(法国专利 2,650,840 ;PCT 申请号 W091/02087)。如在美国专利号 4,656,127 的 Mundy 方法中,采用与多态位点 3' 紧邻的等位基因序列互补的引物。该方法使用标记的双脱氧核苷酸衍生物测定那个位点的核苷酸的身份,如果与多态位点的核苷酸互补,那么所述核苷酸将变得掺入引物的末端上。

[0093] 称为遗传位点分析(Genetic Bit Analysis)或 GBA® 的可替代方法由 Goelet, P. 等人(PCT 申请号 92/15712) 描述。Goelet, P. 等人的方法使用标记的终止子和与多态位点 3' 的序列互补的引物的混合物。掺入的标记的终止子因此通过待评估的靶分子的多态位点中存在的核苷酸测定且与之互补。与 Cohen 等人(法国专利 2,650,840 ;PCT 申请号 W091/02087) 的方法形成对比,Goelet, P. 等人的方法优选是非均相测定,其中引物或靶分子固定至固相。

[0094] 近来,用于测定 DNA 中的多态位点的几个引物引导的核苷酸掺入程序已得到描述(Komher, J. S. 等人, Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990); Syvanen, A.-C., 等人, Genomics 8:684-692 (1990); Kuppaswamy, M. N. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 88:1143-1147 (1991); Prezant, T. R. 等人, Hum. Mutat. 1:159-164 (1992); Ugozzoli, L. 等人, GATA 9:107-112 (1992); Nyren, P. 等人, Anal. Biochem. 208:171-175 (1993))。这些方法不同于 GBA®, 因为它们都依赖于标记的脱氧核苷酸的掺入,以区分在多态位点上的碱基。在此类形式中,因为

信号与掺入的脱氧核苷酸数目成比例,所以在相同核苷酸运行中出现的多态性可以导致与运行长度成比例的信号(Syvanen, A.-C., 等人, Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59(1993))。

[0095] 许多主观努力目前正在进行中,以平行获得直接来自数百万个别 DNA 或 RNA 分子的序列信息。实时单分子边合成边测序技术取决于荧光核苷酸的检测,因为它们掺入与待测序的模板互补的 DNA 的新生链。在一种方法中,长度 30-50 个碱基的寡核苷酸在 5' 末端共价锚定至玻璃盖玻片。这些锚定的链执行两种功能。首先,如果模板配置与表面结合的寡核苷酸互补的捕获尾部,那么它们充当关于靶模板链的捕获位点。它们还充当用于模板指导的引物延伸的引物,其形成序列阅读的基础。捕获引物充当用于序列测定的固定位置位点,使用染料-接头的合成、检测和化学切割的多个循环,以去除染料。每个循环由加入聚合酶/标记的核苷酸混合物、清洗、成像和染料切割组成。在可替代方法中,聚合酶用荧光供体分子修饰且固定在载玻片上,而每个核苷酸用附着至  $\gamma$  磷酸盐的受体荧光部分颜色编码。当核苷酸变得掺入从新链内时,该系统检测在荧光标记的聚合酶和荧光修饰的核苷酸之间的相互作用。还存在其他边合成边测序技术。

[0096] 优选地,任何合适的边合成边测序平台可以用于鉴定突变。如上所述,四个主要的边合成边测序平台是目前可获得的:来自 Roche/454 Life Sciences 的 Genome Sequencers、来自 Illumina/Solexa 的 1G Analyzer、来自 Applied BioSystems 的 SOLiD 系统、和来自 Helicos Biosciences 的 Heliscope 系统。边合成边测序平台也已由 Pacific BioSciences 和 VisiGen Biotechnologies 描述。这些平台各自可以用于本发明的方法中。在一些实施方案中,待测序的多个核酸分子与载体(例如固体载体)结合。为了将核酸固定在载体上,捕获序列/通用引发位点可以加入模板的 3' 末端和/或 5' 末端上。核酸可以通过使捕获序列与共价附着至载体的互补序列杂交与载体结合。捕获序列(也称为通用捕获序列)是与附着至载体的序列互补的核酸序列,其可以双重充当通用引物。

[0097] 作为捕获序列的可替代物,偶联对的成员(如例如美国专利申请号 2006/0252077 中所述的例如抗体/抗原、受体/配体、或抗生物素蛋白-生物素对)可以连接至在表面上待捕获的每个片段,所述表面由那个偶联对的各自第二个成员包被。

[0098] 在捕获后,序列可以例如通过单分子检测/测序进行分析,例如如实施例和美国专利号 7,283,337 中所述的,包括模板依赖性边合成边测序。在边合成边测序中,在聚合酶的存在下使表面结合的分子暴露于多个标记的三磷酸核苷酸。模板的序列通过掺入成长链的 3' 末端内的标记核苷酸的次序进行测定。这可以实时完成或可以以分步重复的方式完成。对于实时分析,可以掺入对于每个核苷酸的不同光学标记,并且多个激光器可以用于刺激掺入的核苷酸。

[0099] 任何细胞类型或组织可以用于获得用于在本文描述的诊断中使用的核酸样品。在优选实施方案中, DNA 或 RNA 样品得自肿瘤或通过已知技术(例如静脉穿刺)获得的体液例如血液或唾液。可替代地,核酸测试可以对干样品(例如毛发或皮肤)执行。

[0100] 可替代地,蛋白质质谱法可以用于鉴定或验证与肿瘤细胞上的 MHC 蛋白质结合的突变肽的存在。肽可以从肿瘤细胞或由肿瘤免疫沉淀的 HLA 分子中酸洗脱,且随后使用质谱法鉴定。

[0101] 新抗原肽

[0102] 本发明进一步包括包含通过本发明的方法鉴定的肿瘤特异性突变的分离肽,包含

已知肿瘤特异性突变的肽,和通过本发明的方法鉴定的突变型多肽或其片段。这些肽和多肽在本文中称为“新抗原肽”或“新抗原多肽”。术语“肽”在本说明书中与“突变型肽”和“新抗原肽”可互换使用,以指定一般通过在相邻氨基酸的 $\alpha$ -氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列残基,一般为L-氨基酸。类似地,术语“多肽”在本说明书中与“突变型多肽”和“新抗原多肽”可互换使用,以指定一般通过在相邻氨基酸的 $\alpha$ -氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列残基,一般为L-氨基酸。多肽或肽可以是多个长度,以其天然(不带电)形式或以其为盐的形式,且不含修饰例如糖基化、侧链氧化、或磷酸化或含有这些修饰,实施该修饰不破坏如本文描述的多肽的生物学活性的条件。

[0103] 在特定实施方案中,至少一个新抗原肽分子的大小可以包含但不限于约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47、约48、约49、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120个或更多氨基酸分子残基,和其中衍生的任何范围。在具体实施方案中,新抗原肽分子等于或小于50个氨基酸。

[0104] 在一些实施方案中,本发明的特定新抗原肽和多肽是:对于MHC I类,长度13个残基或更少,且通常由约8 - 约11个残基组成,特别是9或10个残基;对于MHC II类,15-24个残基。

[0105] 更长的肽可以以几种方法设计。在一种情况下,当HLA结合肽是预测或已知的时,更长的肽可以由下述组成:(1)具有针对每个相应基因产物的N和C末端的2-5个氨基酸的延长的个别结合肽;(2)对于各自具有延长序列的一些或所有结合肽的串联(concatenation)。在另一种情况下,当测序揭示肿瘤中存在的长(>10个残基)新表位序列(例如由于导致新肽序列的移码、连读或内含子包含)时,更长的肽将由下述组成:(3)新肿瘤特异性氨基酸的整个段 - 从而回避关于与HLA蛋白质结合的肽的计算预测或体外测试的需要。在两种情况下,更长肽的使用允许通过患者细胞的内源加工,且可以导致更有效的抗原呈递和T细胞应答的诱导。

[0106] 新抗原肽和多肽结合HLA蛋白质。在一些方面,新抗原肽和多肽以大于野生型肽的亲和力结合HLA蛋白质。新抗原肽或多肽具有至少小于5000 nM、至少小于500 nM、至少小于250 nM、至少小于200 nM、至少小于150 nM、至少小于100 nM、至少小于50 nM或更少的IC<sub>50</sub>。

[0107] 当施用于受试者时,新抗原肽和多肽不诱导自身免疫应答和/或引起免疫耐受。

[0108] 本发明还提供了包含至少两种或更多种新抗原肽的组合物。在一些实施方案中,组合物含有至少两种不同的肽。优选地,至少两种不同的肽衍生自相同多肽。不同多肽意指该肽通过长度、氨基酸序列或两者改变。肽衍生自已知含有肿瘤特异性突变或已通过本发明的方法发现含有肿瘤特异性突变的任何多肽。新抗原肽可以由其衍生的合适多肽可以例如在COSMIC数据库(<http://www.sanger.ac.uk/cosmic>)关于人癌症中的体细胞突变的COSMIC curates 综合信息发现。肽含有肿瘤特异性突变。在一些方面,肿瘤特异性突变是关于特定癌症类型的驱动突变。在一些方面,肽衍生自SF3B1多肽、MYD88多肽,TP53多肽、ATM多肽、Ab1多肽、FBXW7多肽、DDX3X多肽、GNB1多肽的MAPK1多肽。

[0109] SF3B1肽意指该肽含有SF3B1多肽的部分。优选地,SF3B1肽包括在氨基酸位置

625 处的亮氨酸 ;在氨基酸位置 626 处的组氨酸 ;在氨基酸位置 700 处的谷氨酸 ;在氨基酸位置 742 处的天冬氨酸 ;或在氨基酸位置 903 处的精氨酸,当依照野生型 SF3B1 编号时。野生型 SF3B1 显示于表 A (SEQ ID NO:1)。

[0110]

表A: 野生型SF3B1 (SEQ ID NO:1)
makiakthediaeqireiqgkkaaldeagqvgldstggyydgqeiyyggsdr
fagyvtsiaateledddddysstslilgqkkpgyhavallndipqsteg
ydpfaehrpkiadredeykkhrrtmilisperldpfadggktpdpkmnar
tymdvrmreqhltkeereirgqlaekakagelkvvnngaaasqppskrkrw
dqtadqtpgatpkklsawdqaetpghtpslrwdetpgrakgsetpgatpg
skiwdtpshtpagaatpgrgdtppghatpghggatssarknrwdetpkte
rdtpghgsegwaetprttdrggdsigetptpgaskrkrwdetpasqmggst
pvltpgktpigtpammatptpghimsmtpeqlqawrwereidernrpls
deeldamfpegykvlpppagyvpirtparkltatptplggmtgfhmqted
rtaksvndqpegnlpflkpdidiqyfdkllvdvdestlspeegkerkimkl
llkikngtppmrkaalrqitdkarefgagplfnqilpllmsptledgerh
llvkvidrilykiddlvrpyvhkilvviellidedyyarvegriianl
akaaglatmismrpdidnmdeyvrnttarafavvasalgipsllpflka
vckskkswqarhtgikivqgiailmgcailphlrslveiiehgldvdeqqk
virtisalaiaaalaeeatpygiesfdsvlkplwkgirghrgkglaaflkai
gyliplmdaeyanyytrevmlilirefqspsdeemkkivlkvykqccgtdg
veanyikteilppffkhfwqhrmaldtrnyrqldvttvelankvgaaefi
srivddlkdeaeyrkvmmetiekimgnlgaadidhkleeqlidgilyaf
qegttedevmlngfgtvvnalgrvkpylpqicgtvlwrlnnksakvrqq
aadlisrtavvmktcqeeklmghlgvviyeylgeeypevlqsilqalkai
vnvigmhkmtppekdliprltpilknrhekvgencidlvgridrgeayv
sarewmricfellellkakkairratvntfgyiakaigpbdivlatllnn
lkvgerqnrvttaiaivaetcsptvlpalmneyrvpelnvqngvks
lsflfeyigemgkdyiyavtplledalmdrdlvhrqtasavvqhmslgvy
gfqcedslnhllnyvwpvfetsphviquavmgaleglrvaigpcrmlqyc
lqglfhparkvrdivywkinyysiyyiqsdalishypriynddkntyiryel
dyil

[0111] MYD88 肽意指该肽含有 MYD88 多肽的部分。优选地,MYD88 肽包括在氨基酸位置 232 处的苏氨酸 ;在氨基酸位置 258 处的亮氨酸 ;或在氨基酸位置 265 处的脯氨酸,当依照野生型 MYD88 编号时,当依照野生型 MYD88 编号时。野生型 MYD88 显示于表 B (SEQ ID NO:2) 中。

[0112]

表B: 野生型MYD88 (SEQ ID NO:2)
mrpdraeapggppamaaggggagsaapvstssiplaaalnrvrrrlsifl
nvrtqvaadwtalaeemdfeyleirqltqadptgrllidawqgrpgasvg
rlllelltkigrddvlllelqpsieedcqkyilkqqgeaaekplqvaavdss
vprrtaelagittlddplghmperfdaficycpsdiqfygemirqltqny
riklcvsdrdvlpgtcevswiaseliekrcrrmvvvsddylqskecdfqt
kfalslspgahqkrlipikykamkkefpsilrfitvcdytnpctkswfw
rlakalslp

[0113] TP53 肽意指该肽含有 TP53 多肽的部分。优选地, TP53 肽包括在氨基酸位置 111

处的精氨酸 ;在氨基酸位置 215 处的精氨酸 ;在氨基酸位置 238 处的丝氨酸 ;在氨基酸位置 248 处的谷氨酰胺 ;在氨基酸位置 255 处的苯丙氨酸 ;在氨基酸位置 273 处的半胱氨酸或在氨基酸位置 281 处的天冬酰胺,当依照野生型 TP53 编号时。野生型 TP53 显示于表 C (SEQ ID NO:3) 中。

[0114]

表C: 野生型TP53 (SEQ ID NO:3)
meepqsdpsvepplsqetfsdlwkllepennvlsplpsqamddimlspddi eqwftedpgpdeaprppeaappvapapapaaptaapapapapswplsssvpsq ktyqgsygfrlgflhsgtaksvtctyvspalnkmfcqlaktcpvqlwvdst pppgtrvramaiykqsqhmt evvrrcpbherc sdsdglappqhlirvegn lrveylddrntfrhsvvpyeppevgsdcttithynymcnsecm ggmnrp iltiit ledssgnllgrnsfevrvcacpgrdrtrteeenlrkkgephhelp pgstkralpantssspqpkkkpldgeyftlqirgrerfemfreinealel kdaqagkepggserahsshkkskkqgsterhkkimfktegpdsd

[0115] ATM 肽意指该肽含有 SF3B1 多肽的部分。优选地, ATM 肽包括在氨基酸位置 1252 处的苯丙氨酸 ;在氨基酸位置 2038 处的精氨酸 ;在氨基酸位置 2522 处的组氨酸 ;或在氨基酸位置 2954 处的半胱氨酸,当依照野生型 ATM 编号时。

[0116] 野生型 ATM 显示于表 D (SEQ ID NO:4) 中。

[0117]

表D: 野生型ATM (SEQ ID NO:4)
mslvndllliccrglehdraterkkevekfkrlirp petikhldrnsdsk qgkylndavfrflqkyiqketeclriakpnsastqasrqkkmqeissi vkyfikcanrraprlikogellnyimdtvkdsengaiygadcsnilkdil svrkywceisqqgwlelfsvyfrlykpsqdvhrvlvariihavtkgccs qtdglnskfldffskaiqcargeksssglnhilaaltifkktlavnfrir vcelgdeilptllyiwtqhr lndsikeviielfqlqiyihhpkgaktqek gayestkwr silynlydllvneishigsrgkyssqfrniavkenlielma

[0118]

```

dichqvfnedtrsleisqsytttqressdysvpckrkkiekgwevikdhl
qksqndfdlvpwliqiatqliskypaslpnceisplimilsqllpqqrhge
rtpyvlrcltevalcqdkrnslessqksdllklwnkiwcitfrgisseqi
qaenfgllgailqgslvevdrefwklftgsacrpscpavcciltlalttsi
vpgtvkmgieqnmcevnrfsfsikesimkwllfyqlegdlenstevppilh
snfphlylekilveltmknckaamnffqsvpecehbqkckeelsfsevee
lflqttfdkmdffitivrecgiekbgqesigfsvhqnikesldrcllgiseq
llnnyseitnsetlvrcsrllvgvlgcycymgviaeeeykselqfakak
slmqcagesitlfnkntneefrigslrnmqletrelsnctkkspnkias
gfflrlltsklmndiadicksiasfikkpfdrgevesmeddtngnlmeve
dqssmnlfnndypdssvsdanepgesqstligainplaeeylskqdlifldm
lkflclcvttaqtntvsfraadirrklmlidsatleptksahlhmylml
lkelpggeeyplpmedvlellkplsnvcslyrrdqdvcktilnhvihvkn
lggsnmdsentrdaggqfltvigafwhltkerkyifsvrmaalvnciktll
eadpyskwailnvmgkdfpvnevftqfladnhhqvrmlaaesinrifqdt
kgdsarlikalpklqqtafenaylkagegmremshsaenpetldeiyvr
ksvlltliavvlscopicekqalfalckevkenglephlvkvlkvset
fgyrredfmashldyivlewlnlqdtteynlsefpfillnytniedfys
cykvliphlvirshfdevksianqigedwksiltcdfpkilvnilpyfay
egtrdsqmagqretatkvydmiksenllgkqidhlfisnlpelvveillmt
lhepanssasqstdlclcdfsgdlpdpapnpphfpshvikatfayienchktk
lksileilkskpsdyqkillsaiceqaetnnyvkkhrilkiyhlfvslll
kdiksglggawafvlrdviytlilyingrpscimdvslrfsllccdlisq
vcqtavtyckdalenhihvivgtlilplvyeqvevqkqvldilkylvidnk
dnenlyitiklldpfpdhvfkdlritqqkikyargpfsllleeinhflsv
svydalpitrlegikdirrqllelkkdqmvdimraeqdnpqdgimvklvvn
llqlskmainhtgekeveleavgeclgevpidfstiaiqbskdasytkal
klfedkelqwtfimltylnntivedcvkvrseaavtclknlatktghsfw
eiymttddpmlaylqppfrtsrkkflevprfdkenpfeglddinlwipse
nhdiwiktltcafldsggkceilqlkpmcevktdfcqtvlpylihdil
lqdtneeswrnllsthvqgffteclrhfsqtersttpanldsesehffroc
ldkksqrtmlavvdymrrqkrpsqstifndafwldlnylevakvaqscaa
hftallyaelyadkksmddqekrelafeegsqsttisalsekskeetgis
lqdlilleiyrSIGEPDSlygcgggkmlqpitrlrtyeheaawgkalvtyd
letaipastrqagiigalqnlglchilevykglidenkdwcpelaelhy
qaawrnmqwdhctsvskevegtstyheslynalqslrdrefstfyeklya
rvkeveemckrelsvslyptlrlrqaigelesigelfersvthrqlse
vykwqkhsqllkdsdfsfqepimalrtvileilmekemdnsqrecikdi
ltkhlvelsilartfkntqlperalifqikqynsvsogvsewqleaaqvw
akkeqslalsilkqmikkldascaannpaliktyteclrvcgwlaetcl
enpavimqstylekavevagnydgeessdelrngkmaflslarfesdtqyqr
ienymksssefenkqallkrakeevglirehkiqtnrytvkvqreleldel
alralkedrkrflickavenyincillsgeehdmwvfricalwlensgvsev
ngmmkrdgmkiptykfiplmayqlaarmgtkmmgglgfhevlannlrisim
dhphtlfiilalananrdefltkpevarrrsrirknvpkqssqldedrte
aanriictirsrrpqrsvsvealodayiilanldatqwktrkqginipad
qpitkklknedvvvptmeikvdhtgeygnlytiqsfkaefrlaggvnlpk
iidcvgadgkerrqlykgrddirgdavmqgvfgmentllqentetrkrki

```

[0119]

```

tictykyvplsgrrsgvlewctgtvpigeflvnnedgahkryrpndfsafq
cqkkmnevqkksafeekyevfndvvcqnfqpvfryfcmekfldpaiwfekrl
aytrsvatssivgyilglgdrhvqnilineqsaelvhdldgvafeggkil
ptpetvpfrlrrdivdgmgitgvegvfrceektmevmrnsgetiltive
vlllydplfdwtmnpkalyllqqrpedetelhptlnaddqeckrnisdidq
sfnkvaervlmlrleqeklkqveegtvlsvgggvnlliqgaidpknlsrlfp
qwkawv

```

[0120] Ab1 肽意指该肽含有 Ab1 多肽的部分。优选地, Bcr-ab1 肽包括在氨基酸位置 244 处的缬氨酸 ;在氨基酸位置 248 处的缬氨酸 ;在氨基酸位置 250 处的谷氨酸 ;在氨基酸位置 250 处的丙氨酸 ;在氨基酸位置 252 处的组氨酸 ;在氨基酸位置 252 处的精氨酸 ;在氨基酸位置 253 处的苯丙氨酸 ;在氨基酸位置 253 处的组氨酸 ;在氨基酸位置 255 处的赖氨酸 ;在氨基酸位置 255 处的缬氨酸 ;在氨基酸位置 276 处的甘氨酸 ;在氨基酸位置 315 处的异亮氨酸 ;在氨基酸位置 315 处的天冬酰胺 ;在氨基酸位置 317 处的亮氨酸 ;在氨基酸位置 343 处的苏氨酸 ;在氨基酸位置 351 处的苏氨酸 ;在氨基酸位置 355 处的甘氨酸 ;在氨基酸位置 359 处的缬氨酸 ;在氨基酸位置 359 处的丙氨酸 ;在氨基酸位置 379 处的异亮氨酸 ;在氨基酸位置 382 处的亮氨酸 ;在氨基酸位置 387 处的甲硫氨酸 ;在氨基酸位置 396 处的脯氨酸 ;在氨基酸位置 396 处的精氨酸 ;在氨基酸位置 417 处的酪氨酸 ;或在氨基酸位置 486 处的丝氨酸, 当依照野生型 Ab1 编号时。野生型 Ab1 显示于表 E (SEQ ID NO:5) 中。

[0121]

表E: 野生型Ab1 (SEQ ID NO:5)

```

MLEICLNLVGCKSRKGLSSSSCYLEALQPPVASDFEPQGLSEARWNSKENLLAGPSENDPNLFLVALY
DFVASGDNTLSITTEGKLRVLGYNHNGEWCEAQIKNGQGVFQSNYITPVNSLEKHSWYHGVVSRNAEYL
LSSGTINGQFLVRESESSPGQPEISLRYEGRVYHYRINTASDCKLYVSSKSRFNTLAEVLVHHHSTVADGLI
ITLHYPAFKRNEKPTVYGVSPNYKXEMERTDIIMKHKLGGQYGEVYEGVWRKYSLTVAVKTLKEDTNEV
EEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITFPTYGNLLDYLRECNRQEVNAVLLYMATQISSA
MEYLEKGNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFFIKWTAPESLAYNRFSDIKS
DVRANFVLLMETATYGMSPYFGIDLSQVYELLEKDYRNEBPEGCPKXVYELMRACKQKMPSDRPPFAEIR
QAFTHFQESSLSDEVENELGKQGVAVSTLLQAPLPTKTYTSSRAAENRDTTDPKMPNCKGQGESD
PLDHEFAVSFLLPRKENGPPPEGGLNEDERLLPDKFTNLFSALIKKKKTAPTPPKSSSFREMUGQPER
RGAGEEGRUISNGALAFPLDTADPAKSPKPSNGAGVFNGLRESGGGFPSPHLWKKSSLTSSRLAI
GEEEGGGSSCKRFLRSCASCVFNGARDTEWRVYTLPRDLQSTIGQFDSSTFGGKSEKPALPKRAGEN
RSDQVTRGTVTPPPRLVKKNEEADEVFNDIMESSPGSPFNLTPKFLRQVTVAPASGLPHKEEAGKGS
ALGTPAAAEFVYTPSKAGSGAPGQTSKQFAEESVYRNNKHSSESPGRDKGKLSRLKPAFFFFPAAAGAKA
GGPFGQSPQEAAGEAVLCAKTKATSLVDVAVNSDAAKPSQPGEGLYKPVLPATPKPQSAKPSGTPISPAP
VESTLPCASSALAGDQPSSTAFIPLISTRVSLRKTROPFERIASGAIITKGVYLDSTEALCLAI SPNSEQM
ASRSVAVLEAGKRLYTFQVSYVDSIQQMRNFFAFREAINKLENNLRELQICPATAGSGPAAATQDFSKLLSS
VKEISDIVQR

```

[0122] FBXW7 肽意指该肽含有 FBXW7 多肽的部分。优选地, FBXW7 肽包括在氨基酸位置 280 处的亮氨酸 ;在氨基酸位置 465 处的组氨酸 ;在氨基酸位置 505 处的半胱氨酸 ;或在氨基酸位置 597 处的谷氨酸, 当依照野生型 FBXW7 编号时。野生型 FBXW7 显示于表 F (SEQ ID NO:6) 中。

[0123]

**表F: 野生型FBXW7 (SEQ ID NO:6)**

```

mqgellsvsgskrrrrtggslrgnpsessqvdeeqmnrsvveeeqqqqlrqqee
ehtarngevvvgveprpfgggndsgqqggleennnrflsvdedssgnqeesqee
deehageqgleeeteeeeemdgessddfdqsddssredethhtnsvtntasslv
dlpvhqlsspfykttkmkrklhdhgsevrfsfsgkpkckvseytsttglv
pcsatpttfgdlraangggqrrrritvqpptglqewlkmfqswsgpekl
laldelidsceptqvkhammqviepqfgrdfisllpkelalyvlsflepkd
llgaaqtcrywri laednllwrekckeegideplhikrrkvikpgfihsp
wksayirqhrldtnwrrgelkspkvkghddhvitolqfognrivsgedd
ntlkvwsavtqkclrtlvghtggvswssqmrndnliiegstdrtlkvwnaet
gecihtlyghtstvr cmlihekrvvsgrdatlrvwdietggclhvlmgh
vaavrvcvqydgrrvvsegaydfmvkvw dpetetclhtlqghtnrsvslqfd
gihvvsqsl dtekrvwdvetgncihtltghqsltsgmelkdnilvsgnad
stvkilwdiktggclqtlqgpnkhqsavtclqfnkrfvitesddgtvklwd
lktgefirnltvlesggsggvvwrirasntklvcavgsr ngteetklvl
dfdvdmk

```

[0124] DDX3X 肽意指该肽含有 DDX3X 多肽的部分。DDX3X 肽是其为下述结果的肽 :在氨基酸位置 24 处的错义突变 ;在氨基酸位置 342 处剪接位点或在氨基酸位置 410 处的移码,当依照野生型 DDX3X 编号时。野生型 FBXW7 显示于表 G (SEQ ID NO:7) 中。

[0125]

**表F: 野生型DDX3X (SEQ ID NO:7)**

```

mshvavenalgldqqfagldlnssdnqsggstaskgryipphlrnreatk
gfydkdssgwsstkdkdayssfgersdorgkssffsdrgegergrfddrg
rsdydgigsrgdrsgfgkferggnsrwc dksdeddws kplppserleqel
fsggntginfkyddipveatgnncpphiesfsdvemgeiimgnieltry
trtpvgkhaipiikekrdlmacaqtgsgktaafllpilsqiysdgpgea
lramkengrygrrkqypiselvlaptrelavqiyeearkfsyrarvrpcvv
yggadigqqirdlergchllvatpgrlvdmmergkigldfckylvldead
rmlmgfepqirriveqdtmppkgvrhtmmfsatfpkeiqmlardfldey
iflavgrvgstsenitqkvvwveesdkrsfllldlinatgkds ltlvfv et
kkgadsledflyhegyactsihgdrsqrdreealhqfrsgkspilvatav
aargldisnvhvinfdlpsdieeyvhrigrtgrvgnlglatsffn erni
nitkdllldllveakqevpswlenmayehhykgsertgrakserrfsggfgar
dyrqesgassssfsrassersggggghgssrgfggggyggfynsdgyeg
nynsqgvdwwgn

```

[0126] MAPK1 肽意指该肽含有 MAPK1 多肽的部分。优选地, MAPK1 肽包括在氨基酸位置 162 处的天冬酰胺 ;在氨基酸位置 291 处的甘氨酸 ;或在氨基酸位置 316 处的苯丙氨酸,当依照野生型 MAPK1 编号时。野生型 MAPK1 显示于表 H (SEQ ID NO:8) 中。

[0127]

表F: 野生型MAPK1 (SEQ ID NO:8)
<pre> maaaaaagagapemvrgqvfdvgrpnytnleyigegaygmvcsaydvnkvkr vaikkispfehgtycqrtlreikillrfrbeniigindiiraptieqmkd vyivqdlmetdlykllktqhlndhicyflyqilrgikyihsanvlhrdl kpsnllnttcdkicdfglarvadpdhdhtgflteyvatrwyrapeiml nskgytksidiwsvgcilaemlnrpfpgkhyldqlnhilgilgspsqe dlnclinkarnyllelphknkvpwnrlfpnadskaldlldkmltfnpkh rievqalahpylegyydpsepiaaeapfkfdmelledlpkekklkelifee tarfqpgyrs </pre>

[0128] GNB1 肽意指该肽含有 GNB1 多肽的部分。优选地, GNB1 肽包括在氨基酸位置 180 处的苏氨酸, 当依照野生型 GNB1 编号时。野生型 GNB1 显示于表 I (SEQ ID NO:9) 中。

[0129]

表I: 野生型GNB1 (SEQ ID NO:9)
<pre> mseldqirgeaeglkngirdarkacadatlsqitnndpvgriqmrtrrt lrghlakaiyambwgtderllvsasqdgklliwdeytnkvhaiplrsswv mtcayapsngnyvacggldnicisiyniktregnvrvsrelaghtgylsccr flddnqivtssqdttcaldietgqqt tftghtgdvmslslapdtrlfv sgacdasaklwdvregmcrqtftghesdinaicffpognafatgsddatc rifdlradqelmtyshdnlicgitsvafsksgrrlllagyddfnrcnvwal kadragvlaghdnrvsclgvtdddgmavatgswdsfikiwn </pre>

[0130] 具有所需活性的新抗原肽和多肽可以根据需要进行修饰, 以提供特定所需属性, 例如改善的药理学特征, 同时增加或至少保留未修饰肽结合所需 MHC 分子且激活合适 T 细胞的基本上所有生物学活性。例如, 可以对新抗原肽和多肽实施多种改变, 例如保守或非保守置换, 其中此类改变可能提供在其使用中的特定优点, 例如改善的 MHC 结合。保守置换意指将氨基酸残基替换为生物学和 / 或化学相似的另一个, 例如一个疏水性残基替换为另一个, 或一个极性残基替换另一个。置换包括组合例如 Gly, Ala ; Val, Ile, Leu, Met ; Asp, Glu ; Asn, Gln ; Ser, Thr ; Lys, Arg ; 和 Phe, Tyr。单个氨基酸置换的效应也可以使用 D- 氨基酸进行探测。此类修饰可以使用众所周知的肽合成程序进行制备, 如例如 Merrifield, Science 232:341-347 (1986), Barany & Merrifield, The Peptides, Gross & Meienhofer, 编辑 (N. Y., Academic Press), 第 1-284 页 (1979); 和 Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (Rockford, Ill., Pierce), 第 2 版 (1984) 中所述。

[0131] 新抗原肽和多肽还可以通过延长或减少化合物的氨基酸序列进行修饰, 例如通过氨基酸的添加或缺失。肽、多肽或类似物还可以通过改变特定残基的次序或组成进行修饰, 容易理解一般不改变对于生物学活性所需的特定氨基酸残基, 例如在关键接触位点处的那些或保守残基, 而对生物学活性没有不良作用。非关键氨基酸无需限制于蛋白质中天然存在的那些, 例如 L- $\alpha$ -氨基酸或其 D- 同分异构体, 但同样可以包括非天然氨基酸, 例如  $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -氨基酸、以及 L- $\alpha$ -氨基酸的许多衍生物。

[0132] 一般地, 具有单个氨基酸置换的一系列肽用于测定静电电荷、疏水性等对结合的作用。例如, 沿着肽的长度制备一系列带正电 (例如 Lys 或 Arg) 或带负电 (例如 Glu) 的氨基酸置换, 揭示针对多个 MHC 分子和 T 细胞受体的不同敏感性模式。此外, 可以采用使用小的相对中性部分例如 Ala, Gly, Pro 或相似残基的多个置换。置换可以是同寡聚体或异寡聚

体。置换或加入的残基数目和类型取决于在必需接触点之间所需的间隔和寻求的特定功能属性(例如疏水性与亲水性相比较)。对于 MHC 分子或 T 细胞受体增加的结合亲和力也可以通过此类置换来实现,与亲本肽的亲和力相比较。在任何情况下,此类置换应采用选择的氨基酸残基或其他分子片段,以避免例如可能破坏结合的空间和电荷干扰。

[0133] 氨基酸置换一般具有单个残基。置换、缺失、插入或其任何组合可以组合,以取得最终肽。置换变体是其中肽的至少一个残基已去除且不同残基掺入其位置中的那些。当希望精细调整肽的特征时,一般依照下表制备此类置换。

[0134]

原始残基	示例性置换
Ala	Ser
Arg	Lys, His
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Lys; Arg
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; His
Met	Leu; Ile
Phe	Tyr; Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr; Phe
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu
Pro	Gly

[0135] 在功能中的大量变化(例如对于 MHC 分子或 T 细胞受体的亲和力)通过选择比在上表中的那些更不保守的置换制备,即选择在其对维持下述的作用中更显著不同的残基:(a) 在置换区域中的肽主链的结构,例如作为片层或螺旋构象,(b) 在靶位点上分子的电荷或疏水性或(c) 侧链的容积。一般而言预期产生肽性质中的最大变化的置换将是这样的,其中(a) 亲水残基例如丝氨酰置换(或由其置换)疏水残基,例如亮氨酰、异亮氨酰、苯丙氨酰、缬氨酰或丙氨酰;(b) 具有正电性侧链的残基,例如赖氨酰、精氨酰或组氨酰置换(或由其置换)负电性残基,例如谷氨酰或天冬氨酰;或(c) 具有庞大侧链的残基例如苯丙氨酸置换(或由其置换)不具有侧链的那种,例如甘氨酸。

[0136] 肽和多肽还可以包含新抗原肽或多肽的两个或更多个残基的电子等排体。如此处定义电子等排体是两个或更多个残基的序列,其可以置换第二个序列,因为第一个序列的空间构象符合对于第二个序列特异性的结合位点。该术语具体包括本领域技术人员众所

周知的肽主链修饰。此类修饰包括酰胺氮的修饰,  $\alpha$ -碳、酰胺羰基、酰胺键的完全替换、延长、缺失或主链交联。一般参见 Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, 第 VII 卷(Weinstein 编辑, 1983)。

[0137] 具有多个氨基酸模拟物或非天然氨基酸的肽和多肽的修饰在增加肽和多肽在体内的稳定性中是特别有用的。稳定性可以以许多方式进行测定。例如, 肽酶和多种生物培养基例如人血浆和血清已用于测试稳定性。参见例如, Verhoef 等人, Eur. J. Drug Metab Pharmacokin. 11:291-302 (1986)。本发明的肽的半衰期使用 25% 人血清(v/v)测定方便地测定。该方案一般如下。将合并的人血清(AB 型, 非热灭活的)在使用前通过离心脱脂质。血清随后用 RPMI 组织培养基稀释至 25% 且用于测试肽稳定性。在预定时间间隔时, 取出小量反应溶液, 并且加入 6% 含水三氟乙酸或乙醇中。将混浊的反应样品冷却(4°C)15 分钟且随后旋转以使沉淀的血清蛋白质形成团块。肽的存在随后通过反相 HPLC 使用稳定性特异性层析条件进行测定。

[0138] 肽和多肽可以进行修饰, 以提供除改善的血清半衰期外的所需属性。例如, 肽诱导 CTL 活性的能力可以通过连接至序列得到增强, 所述序列含有能够诱导 T 辅助细胞应答的至少一个表位。特别优选的免疫原性肽 / T 辅助缀合物通过间隔物分子连接。间隔物一般包含相对小的中性分子, 例如氨基酸或氨基酸模拟物, 其在生理条件下是基本上不带电的。间隔物一般选自例如 Ala、Gly、或非极性氨基酸或中性极性氨基酸的其他中性间隔物。应当理解任选存在的间隔物无需包含相同残基且从而可以是异或同寡聚体。当存在时, 间隔物通常是至少一个或两个残基, 更通常三至六个残基。可替代地, 肽可以连接至 T 辅助肽而无需间隔物。

[0139] 新抗原肽可以直接或经由在肽的氨基或羧基末端上的间隔物连接至 T 辅助肽。新抗原肽或 T 辅助肽的氨基末端可以是酰化的。示例性 T 辅助肽包括破伤风类毒素 830-843、流感 307-319、疟疾环孢子(circumsporozoite) 382-398 和 378-389。

[0140] 蛋白质或肽可以通过本领域技术人员已知的任何技术进行制备, 包括通过标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽、从天然来源中分离蛋白质或肽、或蛋白质或肽的化学合成。对应于多种基因的核苷酸和蛋白质、多肽和肽序列先前已公开, 并且可以在本领域普通技术人员已知的电脑化数据库发现。一个此类数据库是美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的 Genbank 和位于美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)网站的 GenPept 数据库。关于已知基因的编码区可以使用本文公开的技术或如本领域普通技术人员已知的技术进行扩增和 / 或表达。可替代地, 蛋白质、多肽和肽的多种商业制剂是本领域技术人员已知的。

[0141] 在本发明的进一步方面, 提供了编码本发明的新抗原肽的核酸(例如多核苷酸)。多核苷酸可以是例如单链和 / 或双链的 DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA, 或天然或稳定形式的多核苷酸, 例如具有硫代磷酸酯(phosphorothiate)主链的多核苷酸, 或其组合, 并且它可以含有或不含有内含子, 只要它编码肽。当然, 仅含有通过天然存在的肽键连接的天然存在的氨基酸残基的肽可由多核苷酸编码。本发明的再进一步方面提供了能够表达根据本发明的多肽的表达载体。用于不同细胞类型的表达载体是本领域众所周知的, 并且可以无需过度实验而选择。一般地, 将 DNA 以合适方向和正确读码框插入表达载体例如质粒内用于表达。需要时, DNA 可以连接至由所需宿主识别的合适转录和翻译调节控制核苷酸序列, 尽管

此类控制是表达载体中一般可获得的。载体随后通过标准技术引入宿主内。指导可以例如在 Sambrook 等人(1989)Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y 中找到。

#### [0142] 疫苗组合物

[0143] 本发明涉及能够引起特异性 T 细胞应答的免疫原性组合物,例如疫苗组合物。疫苗组合物包含对应于通过本文描述的方法鉴定的肿瘤特异性新抗原的突变型肽和突变型多肽。

[0144] 本领域技术人员能够选择优选的肽、多肽或其组合,通过测试例如在体外的 T 细胞生成以及其效率和总体存在,对于特定肽的特定 T 细胞的增殖、亲和力和扩增,和 T 细胞的功能性,例如通过分析 IFN- $\gamma$  生产或通过 T 细胞的肿瘤杀死。通常,随后将最有效的肽合并为疫苗。

[0145] 合适的疫苗将优选含有 1 - 20 种肽,更优选 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种不同的肽,进一步优选 6、7、8、9、10 11、12、13 或 14 种不同的肽,且最优选 12、13 或 14 种不同的肽。

[0146] 在本发明的一个实施方案中,这样选择不同的肽和 / 或多肽,从而使得一种疫苗组合物包含能够与不同 MHC 分子例如不同 MHC I 类分子结合的肽和 / 或多肽。优选地,一种疫苗组合物包含能够与最频繁出现的 MHC I 类分子结合的肽和 / 或多肽。因此,根据本发明的疫苗组合物包含能够与至少 2 个优选的、更优选至少 3 个优选的、甚至更优选至少 4 个优选的 MHC I 类分子结合的不同片段。

[0147] 疫苗组合物能够产生特异性细胞毒性 T 细胞应答和 / 或特异性辅助 T 细胞应答。

[0148] 疫苗组合物可以进一步包含佐剂和 / 或载体。有用的佐剂和载体的例子在本文下文给出。组合物中的肽和 / 或多肽可以与载体结合,例如蛋白质或抗原呈递细胞,例如能够将肽呈递给 T 细胞的树突细胞(DC)。

[0149] 佐剂可以是其混合到疫苗组合物内增加或以其他方式修饰针对突变型肽的免疫应答的任何物质。载体是新抗原肽能够与之结合的支架结构,例如多肽或多糖。任选地,佐剂与本发明的肽或多肽共价或非共价缀合。

[0150] 佐剂增加针对抗原的免疫应答的能力一般通过免疫介导的反应中的显著增加或疾病症状中的减少体现。例如,体液免疫中的增加一般通过针对抗原产生的抗体滴度中的显著增加体现,并且 T 细胞活性中的增加一般以增加的细胞增殖或细胞毒性或细胞因子分泌体现。佐剂还可以改变免疫应答,例如通过将主要的体液或 Th 应答改变成主要的细胞或 Th 应答。

[0151] 合适的佐剂包括但不限于 1018 ISS、铝盐、Amplivax、AS15、BCG、CP-870, 893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、Imiquimod、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、单磷脂质 A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel. RTM. 载体系统、PLG 微粒、瑞喹莫德、SRL172、病毒体及其他病毒样颗粒、YF-17D、VEGF 拮、R848、 $\beta$ -葡聚糖、Pam3Cys、衍生自皂苷的 Aquila's QS21 刺激子(Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA)、分枝杆菌提取物和合成细菌细胞壁模拟物、和其他有专利权的佐剂例如 Ribit's Detox. Quil 或 Superfos。佐剂例如不完全弗氏或 GM-CSF 是

优选的。对于树突细胞及其制剂特异性的几种免疫学佐剂(例如 MF59) 先前已得到描述 (Dupuis M, 等人, Cell Immunol. 1998 ;186 (1) :18-27 ;Allison A C ;Dev Biol Stand. 1998 ;92:3-11)。还可以使用细胞因子。几种细胞因子已直接连接至影响树突细胞迁移至淋巴样组织(例如 TNF- $\alpha$ ), 加速树突细胞成熟为有效的抗原呈递细胞用于 T 淋巴细胞(例如 GM-CSF、IL-1 和 IL-4) (美国专利号 5, 849, 589, 特别整体引入本文作为参考) 且充当免疫佐剂(例如 IL-12) (Gabrilovich D I, 等人, J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6) :414-418)。

[0152] CpG 免疫刺激寡核苷酸也已报道为增强佐剂在疫苗背景中的作用。不受理论束缚, CpG 寡核苷酸通过经由 Toll 样受体 (TLR) 主要是 TLR9 激活先天性 (非适应性) 免疫系统起作用。CpG 触发的 TLR9 激活增强针对广泛多样的抗原的抗原特异性体液和细胞应答, 所述抗原包括肽或蛋白质抗原、活的或杀死的病毒、树突细胞疫苗、自体细胞疫苗和在预防和治疗疫苗中的多糖缀合物。更重要的是, 它增强树突细胞成熟和分化, 导致即使在不存在 CD4 T 细胞辅助的情况下, 也增强的 TH1 细胞激活和强细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 生成。由 TLR9 刺激诱导的 TH1 偏差即使在疫苗佐剂例如铝或不完全弗氏佐剂 (IFA) 的存在下也得到维持, 所述佐剂通常促进 TH2 偏差。当与其他佐剂或在制剂例如微粒、纳米颗粒、脂质乳剂或相似制剂一起配制或共施用, CpG 寡核苷酸显示甚至更大的佐剂活性, 当抗原相对弱时, 这尤其是对于诱导强应答所需的。它们还加速免疫应答且使得抗原剂量减少约两个数量级, 在一些实验中具有针对不含 CpG 的全剂量疫苗的可比较抗体应答 (Arthur M. Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, Jun. 2006, 471-484)。美国专利号 6, 406, 705 B1 描述了 CpG 寡核苷酸、非核酸佐剂和抗原的组合使用, 以诱导抗原特异性免疫应答。商购可得 CpG TLR9 拮抗剂是 Mologen (Berlin, GERMANY) 的 dSLIM (双重茎环免疫调节剂), 其是本发明的药物组合物的优选组分。还可以使用其他 TLR 结合分子, 例如结合 TLR 7、TLR 8 和 / 或 TLR 9 的 RNA。

[0153] 有用的佐剂的其他例子包括但不限于化学修饰的 CpGs (例如 CpR, Idera)、聚 (I:C) (例如聚 i:CI2U)、非 CpG 细菌 DNA 或 RNA 以及免疫活性小分子和抗体, 例如环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐珠单抗、西乐葆、NCX-4016、西地那非、他达拉非、伐地那非、索拉非尼 (sorafenib)、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、ZD2171、AZD2171、伊匹单抗、曲美木单抗和 SC58175, 其可以在治疗上起作用和 / 或充当佐剂。在本发明的背景中使用的佐剂和添加剂的量和浓度可以容易地通过技术人员进行测定, 而无需过度实验。另外的佐剂包括集落刺激因子, 例如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF, 沙格司亭)。

[0154] 根据本发明的疫苗组合物可以包含超过一种不同的佐剂。此外, 本发明包括包含任何佐剂物质的治疗组合物, 所述佐剂物质包括上文的任何或其组合。还考虑肽或多肽和佐剂可以以任何合适顺序分开施用。

[0155] 载体可以不依赖于佐剂而存在。载体的功能可以例如是增加特别是突变体的分子量, 以便增加其活性或免疫原性, 赋予稳定性, 增加生物学活性, 或增加血清半衰期。此外, 载体可以帮助将肽呈递给 T 细胞。载体可以是本领域技术人员已知的任何合适载体, 例如蛋白质或抗原呈递细胞。载体蛋白质可以是但不限于钥孔血蓝蛋白、血清蛋白质例如转铁蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白或卵白蛋白、免疫球蛋白或激素, 例如胰岛素或棕榈酸。对于人的免疫接种, 载体必须是对人可接受的生理学可接受的载体和安

全的。然而,破伤风类毒素和 / 或白喉类毒素是本发明的一个实施方案中的合适载体。可替代地,载体可以是葡聚糖例如琼脂糖。

[0156] 细胞毒性 T 细胞(CTLs) 识别以与 MHC 分子结合的肽形式的抗原而不是完整外源抗原自身。MHC 分子自身位于抗原呈递细胞的细胞表面上。因此, CTLs 的激活仅在存在肽抗原、MHC 分子和 APC 的三聚复合物的情况下才是可能的。相应地,它可以增强免疫应答,如果不仅将肽用于 CTLs 的激活,而且另外加入具有各自 MHC 分子的 APCs。因此,在一些实施方案中,根据本发明的疫苗组合物另外含有至少一种抗原呈递细胞。

[0157] 抗原呈递细胞(或刺激细胞)一般在其表面上具有 MHC I 或 II 类分子,并且在一个实施方案中,基本上不能自身装载具有所选抗原的 MHC I 或 II 类分子。如下文更详细地描述的, MHC I 或 II 类分子可以容易地在体外装载有所选抗原。

[0158] 优选地,抗原呈递细胞是树突细胞。适当地,树突细胞是用新抗原肽脉冲的自体树突细胞。肽可以是任何合适的肽,其引起合适的 T 细胞应答。使用由来自肿瘤相关抗原的肽脉冲的自体树突细胞的 T 细胞治疗公开于 Murphy 等人(1996)The Prostate 29, 371-380 和 Tjua 等人(1997)The Prostate 32, 272-278 中。

[0159] 因此,在本发明的一个实施方案中,含有至少一种抗原呈递细胞的疫苗组合物用本发明的一种或多种肽脉冲或装载有本发明的一种或多种肽。可替代地,从患者中分离的外周血单核细胞(PBMCs) 可以离体装载有肽且注射回患者内。

[0160] 作为可替代方案,抗原呈递细胞包含编码本发明的肽的表达构建体。多核苷酸可以是任何合适的多核苷酸并且优选它能够转导树突细胞,从而导致肽的呈递和免疫的诱导。

#### [0161] 治疗方法

[0162] 本发明进一步提供了通过给受试者施用本发明的新抗原肽或疫苗组合物,在受试者中诱导肿瘤特异性免疫应答,针对肿瘤接种疫苗,治疗或减轻受试者中的癌症症状的方法。

[0163] 受试者已诊断有癌症或处于发展癌症的危险中。受试者具有伊马替尼抗性肿瘤。受试者是人、犬、猫、马或其中需要肿瘤特异性免疫应答的任何动物。肿瘤是任何实体瘤例如乳腺、卵巢、前列腺、肺、肾、胃、结肠、睾丸、头与颈、胰腺、脑、黑素瘤及其他组织器官的肿瘤和血液学肿瘤,例如淋巴瘤和白血病,包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、T 细胞淋巴细胞白血病和 B 细胞淋巴瘤。

[0164] 本发明的肽或组合物以足以诱导 CTL 应答的量施用。

[0165] 在具体实施方案中,本发明提供了通过给受试者施用含有 bcr-abl 突变的一种或多种新抗原肽来治疗伊马替尼抗性肿瘤的方法。在一些实施方案中,受试者是 HLA-A3。Bcr-abl 突变包括例如 T315I、E255K、M351T、Y253H、Q252H、F317L、F359V、G250E、Y253F、E355G、E255V、M244V、L248V、G250A、Q252R、D276G、T315N、M343T、F359A、V379I、F382L、L387M、H396P、H396R、S417Y、F486S。

[0166] 本发明的新抗原肽、多肽或疫苗组合物可以单独或与其他治疗剂组合施用。治疗剂是例如化学治疗剂、辐射或免疫疗法。可以施用用于特定癌症的任何合适的治疗处理。化学治疗剂的例子包括但不限于阿地白介素、六甲蜜胺、氨磷汀、天冬酰胺酶、博来霉素、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、克拉屈滨、西沙必利、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴

嗪(DTIC)、更生霉素、多西他赛、多柔比星、屈大麻酚、红细胞生成素  $\alpha$ 、依托泊苷、非格司亭、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、格拉司琼、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、干扰素  $\alpha$ 、伊立替康、兰索拉唑、左旋咪唑、甲酰四氢叶酸、甲地孕酮、美司钠、氨甲蝶呤、甲氧氯普胺、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、奥美拉唑、昂丹司琼、紫杉醇(Taxol®)、匹鲁卡品、丙氯拉嗪(prochloroperazine)、利妥昔单抗、它莫西芬、泰素、托泊替康盐酸盐、曲妥珠单抗、长春碱、长春新碱和长春瑞滨酒石酸盐。对于前列腺癌治疗,抗 CTLA-4 可以与之组合的优选的化学治疗剂是紫杉醇(Taxol®)。

[0167] 另外,受试者可以进一步施用抗免疫抑制/免疫刺激剂。例如,受试者进一步施用抗 CTLA 抗体或抗 PD-1 或抗 PD-L1。通过抗体封闭 CTLA-4 或 PD-L1 可以增强针对患者中的癌细胞的免疫应答。特别地,当遵循疫苗接种方案时,CTLA-4 封闭已显示有效。

[0168] 待包括在疫苗组合物中的每种肽的最佳量和最佳给药方案可以通过本领域技术人员进行测定,而无需过度实验。例如,肽或其变体可以制备用于静脉内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、真皮内(i.d.)注射、腹膜内(i.p.)注射、肌内(i.m.)注射。优选的肽注射方法包括 s.c.、i.d.、i.p.、i.m. 和 i.v.。优选的 DNA 注射方法包括 i.d.、i.m.、s.c.、i.p. 和 i.v.。例如,可以给予 1 - 500 mg 50  $\mu$ g - 1.5 mg,、优选 125  $\mu$ g - 500  $\mu$ g 肽或 DNA 的剂量,并且取决于各自的肽或 DNA。这个范围的剂量成功地用于先前试验中(Brunsvig P F, 等人,Cancer Immunol Immunother. 2006 ;55 (12):1553-1564 ;M. Staehler, 等人,ASCO 会议 2007 ;摘要号 3017)。疫苗组合物的其他施用方法是本领域技术人员已知的。

[0169] 本发明的药物组合物可以这样汇集,从而使得组合物中存在的肽的选择、数目和/或量是组织、癌症和/或患者特异性的。例如,肽的确切选择可以通过亲本蛋白质在给定组织中的表达模式进行指导,以避免副作用。选择可以取决于癌症的具体类型、疾病的状态、早期治疗方案、患者的免疫状态以及当然患者的 HLA 单倍型。此外,根据本发明的疫苗可以含有根据特定患者的个人需要的个体化组分。例子包括根据特定患者中的有关新抗原的表达、由于个人变态反应或其他治疗的不需要的副作用、和第一轮治疗或治疗方案后关于次级处理的调整改变肽的量。

[0170] 对于待作用于癌症的疫苗的组合物,其内源亲本蛋白质在正常组织中以大量表达的肽将被避免或以低量存在于本发明的组合物中。另一方面,如果已知患者的肿瘤表达大量特定蛋白质,那么用于治疗这种癌症的各自药物组合物可以以大量存在和/或可以包括对于这种特定蛋白质或这种蛋白质的途径特异性的超过一种肽。

[0171] 包含本发明的肽的药物组合物可以施用于已患有癌症的个体。在治疗应用中,组合物以这样的量施用于患者,所述量足以引起针对肿瘤抗原的有效 CTL 应答,且治愈或至少部分停止症状和/或并发症。足以实现这点的量定义为“治疗有效剂量”。对于这个用途有效的量取决于例如肽组成、施用方式、待治疗疾病的阶段和严重性、患者的重量和一般健康状况、和开处方医生的判断,但一般对于初次免疫接种(即对于治疗或预防施用)范围为对于 70 kg 患者约 1.0  $\mu$ g - 约 50,000  $\mu$ g 肽,随后为加强剂量或经过数周到数月依照加强方案约 1.0  $\mu$ g - 约 10,000  $\mu$ g 肽,取决于通过测量患者的血液中的特异性 CTL 活性的患者应答和状况。必须紧记本发明的肽和组合物一般可以在重病状态下采用,即危及生命或潜在危及生命的情况,尤其当癌症已转移时。在此类情况下,考虑到外部物质的最小化和肽的相对无毒性质,可以且可能由治疗医生感觉希望施用基本过量的这些肽组合物。

[0172] 对于治疗用途,施用应在肿瘤检测或手术摘除时开始。这随后为加强剂量,直至至少症状基本上取消和对于其后的时期。

[0173] 用于治疗处理的药物组合物(例如疫苗组合物)预期用于肠胃外、局部、鼻、口或局部施用。优选地,药物组合物肠胃外施用,例如静脉内、皮下、皮内或肌内。组合物可以在手术切除部位施用,以诱导针对肿瘤的局部免疫应答。本发明提供了用于肠胃外施用的组合物,其包含肽和疫苗组合物溶解或悬浮于可接受的载体、优选含水载体中的溶液。可以使用多种含水载体,例如水、缓冲水、0.9% 盐水、0.3% 甘氨酸、透明质酸等。这些组合物可以通过常规的众所周知的灭菌技术进行灭菌,或可以是无菌过滤的。所得到的水溶液可以包装用于像这样使用,或冻干,冻干的制剂在施用前与无菌溶液组合。组合物可以含有接近生理条件所需的药学可接受的辅助物质,例如 pH 调整和缓冲试剂、张力调整剂、湿润剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。

[0174] 本发明的肽在药物制剂中的浓度可以广泛不同,即从按重量计小于约 0.1%,通常为或至少约 2% 到多达 20% - 50% 或更多,并且将依照选择的具体施用方式,主要通过流体体积、粘度等进行选择。

[0175] 本发明的肽还可以经由脂质体施用,其将肽靶向特定细胞组织,例如淋巴样组织。脂质体在增加肽的半衰期中也是有用的。脂质体包括乳状液、泡沫、胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散体、薄层等。在这些制剂中,待递送的肽作为脂质体的部分单独或与分子结合掺入,所述分子结合例如在淋巴样细胞中普遍的受体,例如结合 CD45 抗原的单克隆抗体,或其他治疗或免疫原性组合物。因此,充满本发明的所需肽的脂质体可以导向淋巴样细胞的部位,在其中脂质体随后递送所选治疗 / 免疫原性肽组合物。用于在本发明中使用的脂质体由标准囊泡形成脂质形成,其一般包括中性和带负电的磷脂和固醇例如胆固醇。脂质的选择一般通过考虑例如脂质体大小、酸不稳定性和脂质体在血流中的稳定性加以指导。多种方法可用于制备脂质体,如例如 Szoka 等人, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9 ;467 (1980), 美国专利号 4,235,871、4,501,728、4,837,028 和 5,019,369 中所述。

[0176] 对于靶向免疫细胞,待掺入脂质体内的配体可以包括例如,对于所需免疫系统细胞的细胞表面决定簇特异性的抗体或其片段。含有肽的脂质体悬液可以以这样的剂量静脉内、局部、外部等施用,所述剂量尤其根据施用方式、待递送的肽和待治疗的疾病阶段而改变。

[0177] 对于固体组合物,可以使用常规或纳米颗粒无毒固体载体,其包括例如药学级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。对于经口施用,药学可接受的无毒组合物通过掺入通常采用的赋形剂中的任何例如先前列出的那些载体形成,且一般为 10-95% 活性成分,即本发明的一种或多种肽,和更优选以 25%-75% 的浓度。

[0178] 对于气溶胶施用,免疫原性肽优选以精细分开形式连同表面活性剂和抛射剂一起供应。一般的肽百分比是按重量计 0.01 %-20%,优选 1%-10%。表面活性剂当然必须是无毒的,并且优选在抛射剂中是可溶的。此类试剂的代表是含有 6 - 22 个碳原子的脂肪酸的酯或偏酯,例如具有脂肪族多元醇或其环酐的己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、硬脂油酸(olestERIC)和油酸。可以采用混合酯例如混合或天然甘油酯。表面活性剂可以构成按重量计 0.1%-20% 的组合物,优选 0.25-5%。组合物的余量是普通抛射剂。载

体还可以根据需要进行例如卵磷脂一起包括用于鼻内递送。

[0179] 对于治疗或免疫接种目的,编码本发明的肽和任选的本文描述的一种或多种肽的核酸也可以施用于患者。许多方法方便地用于将核酸递送给患者。例如,核酸可以直接作为“裸露 DNA”递送。这种方法例如在 Wolff 等人, *Science* 247:1465-1468 (1990) 以及美国专利号 5,580,859 和 5,589,466 中描述。核酸还可以如例如美国专利号 5,204,253 中所述的使用弹道递送施用。可以施用仅包含 DNA 的颗粒。可替代地, DNA 可以附着至颗粒,例如金颗粒。

[0180] 核酸还可以与阳离子化合物例如阳离子脂质复合递送。脂质介导的基因递送方法例如在 9618372WOAWO 96/18372 ;9324640WOAWO 93/24640 ;Mannino & Gould-Fogerite , *BioTechniques* 6 (7):682-691 (1988) ;5279833USARose 美国专利号 5,279,833 ;9106309WOAWO 91/06309 ;和 Felgner 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7414 (1987) 中描述。

[0181] 本发明的肽和多肽也可以通过减弱的病毒宿主例如牛痘或禽痘表达。这种方法涉及使用痘苗病毒作为载体,以表达编码本发明的肽的核苷酸序列。在引入急性或慢性感染的宿主内或未感染的宿主内之后,重组痘苗病毒表达免疫原性肽,并且从而引发宿主 CTL 应答。在免疫接种方案中有用的牛痘载体和方法例如在美国专利号 4,722,848 中描述。另一种载体是 BCG (卡介苗)。BCG 载体在 Stover 等人 (*Nature* 351:456-460 (1991)) 中描述。对于本发明的肽的治疗施用或免疫接种有用的广泛多样的其他载体例如伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 载体等,根据本文说明书对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0182] 施用编码本发明的肽的核酸的优选方法使用编码多个表位的小基因构建体。为了制备编码所选 CTL 表位(小基因)的 DNA 序列用于在人细胞中表达,将表位的氨基酸序列反向翻译。人密码子使用表用于指导关于每个氨基酸的密码子选择。这些表位编码 DNA 序列是直接邻接的,产生连续多肽序列。为了最佳化表达和 / 或免疫原性,另外的元件可以掺入小基因设计内。可以反向翻译且包括在小基因序列中的氨基酸序列的例子包括:辅助 T 淋巴细胞、表位、前导(信号)序列和内质网保留信号。此外,CTL 表位的 MHC 呈递可以通过包括合成(例如聚丙氨酸)或与 CTL 表位相邻的天然存在的侧翼序列得到改善。

[0183] 通过装配寡核苷酸将小基因序列转换为 DNA,所述寡核苷酸编码小基因的正和负链。使用众所周知的技术在合适条件下,将重叠寡核苷酸(长 30-100 个碱基)合成、磷酸化、纯化且退火。寡核苷酸的末端使用 T4 DNA 连接酶进行连接。编码 CTL 表位多肽的这种合成的小基因随后可以克隆到所需表达载体内。

[0184] 本领域技术人员众所周知的标准调节序列包括在载体中,以确保在靶细胞中的表达。需要几个载体元件:具有用于小基因插入的下游编码位点的启动子;用于有效转录终止的多腺苷酸化信号;大肠杆菌 (*E. coli*) 复制起点;和大肠杆菌可选标记(例如氨苄青霉素或卡那霉素抗性)。众多启动子可以用于这个目的,例如人巨细胞病毒(hCMV)启动子。关于其他合适的启动子序列,参见美国专利号 5,580,859 和 5,589,466。

[0185] 可能需要另外的载体修饰,以最佳化小基因表达和免疫原性。在一些情况下,需要内含子用于有效基因表达,并且一种或多种合成或天然存在的内含子可以掺入小基因的转录区内。还可以考虑 mRNA 稳定序列的包括用于增加小基因表达。近来已提出免疫刺激序列 (ISSs 或 CpGs) 在 DNA 疫苗的免疫原性中起作用。如果发现增强免疫原性,那么这些序

列可以包括在载体中,在小基因编码序列外。

[0186] 在一些实施方案中,可以使用双顺反子表达载体,以允许产生小基因编码表位和包括第二种蛋白质,以增强或减少免疫原性。如果共表达可以有利地增强免疫应答的蛋白质或多肽的例子包括细胞因子(例如 IL2、IL12、GM-CSF)、细胞因子诱导分子(例如 LeIF)或共刺激分子。辅助(HTL)表位可以连接至细胞内靶向信号且与 CTL 表位分开表达。这将允许 HTL 表位导向与 CTL 表位不同的细胞区室。如果需要的话,这可以促进 HTL 表位更有效进入 MHC II 类途径内,从而改善 CTL 诱导。与 CTL 诱导形成对比,通过免疫抑制分子(例如 TGF- $\beta$ )的共表达特别减少免疫应答在特定疾病中可以有利的。

[0187] 一旦选择表达载体,就将小基因克隆到启动子下游的多接头区。将这种质粒转化到合适的大肠杆菌菌株内,并且使用标准技术制备 DNA。使用限制性作图和 DNA 序列分析证实小基因的定向和 DNA 序列以及包括在载体中的其他元件。具有正确质粒的细菌细胞可以贮存作为原始细胞库和工作细胞库。

[0188] 纯化的质粒 DNA 可以制备用于使用多种制剂注射。这些中最简单的是冻干 DNA 在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的重构。多种方法已得到描述,并且新技术可以变得可用。如上所述,核酸用阳离子脂质方便地配制。此外,统称为保护、相互作用、非冷凝(PINC)的糖脂、促融脂质体(fusogenic liposome)、肽和化合物也可以与纯化的质粒 DNA 复合,以影响变量例如稳定性、肌内分散或运输至特定器官或细胞类型。

[0189] 靶细胞致敏可以用作功能测定用于小基因编码的 CTL 表位的表达和 MHC I 类呈递。将质粒 DNA 引入哺乳动物细胞系内,其适合于作为用于标准 CTL 铬释放测定的靶。使用的转染方法将取决于最终制剂。电穿孔可以用于“裸露”DNA,而阳离子脂质允许直接体外转染。可以共转染表达绿色荧光蛋白(GFP)的质粒,以允许使用荧光激活细胞分选(FACS)富集转染细胞。这些细胞随后进行铬-51 标记且用作靶细胞用于表位特异性 CTL 系。通过 51 Cr 释放检测的细胞溶解指示小基因编码的 CTL 表位的 MHC 呈递的产生。

[0190] 体内免疫原性是用于小基因 DNA 制剂的功能测试的第二种方法。表达合适的人 MHC 分子的转基因小鼠用 DNA 产物免疫接种。施用剂量和途径是制剂依赖性的(例如 IM 用于溶于 PBS 中的 DNA, IP 用于脂质复合的 DNA)。在免疫接种后二十一天,收获脾细胞且在编码待测试的每个表位的肽的存在下再刺激 1 周。使用标准技术,就装载肽的、铬-51 标记的靶细胞的细胞裂解测定这些效应细胞(CTLs)。通过对应于小基因编码表位的肽的 MHC 装载致敏的靶细胞的裂解证实用于 CTLs 的体内诱导的 DNA 疫苗功能。

[0191] 肽同样可以用于离体引发 CTL。所得到的 CTL 可以用于治疗患者中的慢性肿瘤,所述患者不响应其他常规治疗形式,或不响应肽疫苗治疗方法。通过在组织培养中温育患者的 CTL 前体细胞(CTLp)连同抗原呈递细胞(APC)和合适肽的来源,诱导针对特定肿瘤抗原的离体 CTL 应答。在合适的温育时间(一般为 1-4 周)后,其中 CTLp 是激活的且成熟和扩增为效应 CTL,将细胞输回到患者内,在其中它们将破坏其特异性靶细胞(即肿瘤细胞)。为了最佳化用于生成特异性细胞毒性 T 细胞的体外条件,将刺激细胞的培养物维持在合适的无血清培养基中。

[0192] 在刺激细胞与待激活的细胞例如前体 CD8<sup>+</sup> 细胞一起温育前,将抗原肽的量加入具有足够数量的刺激细胞培养物中,以变得装载到要在刺激细胞的表面上表达的人 I 类分子内。在本发明中,足够量的肽是允许约 200 且优选 200 或更多的人 I 类 MHC 分子装载有

待在每个刺激细胞的表面上表达的肽的量。优选地,刺激细胞与  $>2\mu\text{g/ml}$  肽一起温育。例如,刺激细胞与  $> 3, 4, 5, 10, 15$  或更多  $\mu\text{g/ml}$  肽一起温育。

[0193] 静止或前体 CD8<sup>+</sup> 细胞随后在具有合适的刺激细胞的培养物中温育足以激活 CD8<sup>+</sup> 细胞的时间段。优选地, CD8<sup>+</sup> 细胞以抗原特异性方式激活。静止或前体 CD8<sup>+</sup> (效应) 细胞与刺激细胞的比可以从个体到个体不同, 并且可以进一步取决于变量, 例如个体的淋巴细胞对于培养培养的顺应性, 以及疾病状况的性质和严重性或对于其使用所述治疗模式的其他状况。然而, 优选地, 淋巴细胞: 刺激细胞比在约 30:1 至 300:1 的范围中。效应 / 刺激培养可以维持刺激治疗上有用或有效数目的 CD8<sup>+</sup> 细胞所需的时间。

[0194] 在体外的 CTL 诱导要求肽的特异性识别, 所述肽结合在 APC 上的等位基因特异性 MHC I 类分子。特异性 MHC / 肽复合物 / APC 的数目对于 CTL 的刺激是关键, 特别在初次免疫应答中。虽然小量肽 / MHC 复合物 / 细胞足以致使细胞对于通过 CTL 的裂解敏感, 或刺激次级 CTL 应答, 但 CTL 前体 (pCTL) 在初次应答过程中的成功激活要求显著更高数目的 MHC / 肽复合物。空的主要组织相容性复合物分子在细胞上的肽装载允许初次细胞毒性 T 淋巴细胞应答的诱导。空的主要组织相容性复合物分子在细胞上的肽装载致使初次细胞毒性 T 淋巴细胞应答的诱导成为可能。

[0195] 因为突变细胞系对于每一个人 MHC 等位基因不存在, 所以使用技术从 APC 的表面去除内源 MHC 结合肽, 随后用目的免疫原性肽装载所得到的空 MHC 分子是有利的。非转化 (非致瘤)、未感染细胞和优选患者的自体细胞作为 APC 的使用对于设计针对开发离体 CTL 治疗的 CTL 诱导方案是希望的。本申请公开用于从 APC 的表面剥离内源 MHC 结合肽随后装载所需肽的方法。

[0196] 稳定的 MHC I 类分子是由下述元件形成的三聚复合物: 1) 通常 8 - 10 个残基的肽, 2) 跨膜重聚合蛋白质链, 其具有在其  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  结构域的肽结合位点, 和 3) 非共价结合的非多态轻链、 $\beta 2$  微球蛋白 (microglobulin)。从复合物中去除结合的肽和 / 或解离  $\beta 2$  微球蛋白致使 MHC I 类分子无功能和不稳定, 导致快速降解。从 PBMCs 中分离的所有 MHC I 类分子具有与其结合的内源肽。因此, 第一个步骤是在内源肽可以加入其中之前, 去除与 APC 上的 MHC I 类分子结合的所有内源肽, 而不引起其降解。

[0197] 释放结合肽的 MHC I 类分子的两种可能方法包括使培养温度从  $37^{\circ}\text{C}$  降到  $26^{\circ}\text{C}$  过夜, 以使  $\beta 2$  微球蛋白失稳且使用弱酸处理从细胞中剥离内源肽。该方法将先前结合的肽释放到细胞外环境中, 允许新的内源肽结合空的 I 类分子。冷温温育方法致使内源肽与 MHC 复合物有效结合, 但要求在  $26^{\circ}\text{C}$  的过夜温育, 其可以减慢细胞的代谢速率。还可能不主动合成 MHC 分子的细胞 (例如静止 PBMC) 不通过冷温程序产生大量空的表面 MHC 分子。

[0198] 苛性酸剥离涉及用三氟乙酸, pH 2 的肽提取, 或免疫亲和性纯化的 I 类肽复合物的酸变性。这些方法对于 CTL 诱导是不可行的, 因为去除内源肽同时保存对于抗原呈递关键的 APC 活力和最佳代谢速率是重要的。pH 3 的弱酸溶液例如甘氨酸或柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液已用于鉴定内源肽, 且鉴定肿瘤相关 T 细胞表位。该处理是特别有效的, 因为仅 MHC I 类分子是失稳的 (并且释放结合的肽), 而其他表面抗原保持完整, 包括 MHC II 类分子。最重要的是, 用弱酸溶液处理细胞不影响细胞的活力或代谢状态。弱酸处理是快速的, 因为内源肽的剥离在  $4^{\circ}\text{C}$  两分钟内发生, 并且在装载合适的肽后 APC 准备执行其功能。该技术在本文中用于制备肽特异性 APCs 用于生成初次抗原特异性 CTL。所得到的 APC 在诱导肽特异性

CD8<sup>+</sup> CTL 中是有效的。

[0199] 激活的 CD8<sup>+</sup> 细胞可以使用多种已知方法之一与刺激细胞有效分开。例如,对于刺激细胞、装载到刺激细胞上的肽、或 CD8<sup>+</sup> 细胞(或其区段)特异性的单克隆抗体可以用于结合其合适的互补配体。随后可以经由合适方法例如经由众所周知的免疫沉淀或免疫测定方法,从刺激-效应细胞混合物中提取抗体标记的分子。

[0200] 有效的细胞毒性量的激活 CD8<sup>+</sup> 细胞可以在体外和体内用途之间改变,以及随着这些杀伤细胞的最终靶的细胞量和类型改变。该量还将取决于患者的状况而改变且应经由通过从业者考虑的所有合适因子进行测定。然而,优选约  $1 \times 10^6$  - 约  $1 \times 10^{12}$ 、更优选约  $1 \times 10^8$  - 约  $1 \times 10^{11}$ 、且甚至更优选约  $1 \times 10^9$  - 约  $1 \times 10^{10}$  激活的 CD8<sup>+</sup> 细胞用于成人,与在小鼠中使用的约  $5 \times 10^6$  -  $5 \times 10^7$  细胞相比较。

[0201] 优选地,如上所述,在将 CD8<sup>+</sup> 细胞施用于待治疗的个体之前,从细胞培养中收获激活的 CD8<sup>+</sup> 细胞。然而,必须指出与其他目前和提出的治疗模式不同,本方法使用并非致瘤的细胞培养系统。因此,如果未达到刺激细胞和激活 CD8<sup>+</sup> 细胞的完全分离,那么不存在已知与施用小数目刺激细胞相关的固有危险,而哺乳动物肿瘤促进细胞的施用可能是极端危险的。

[0202] 再引入细胞组分的方法是本领域已知的,并且包括程序例如给予 Honsik, 等人的美国专利号 4,844,893 和给予 Rosenberg 的美国专利号 4,690,915 中例示的那些。例如,经由静脉内输注施用激活的 CD8<sup>+</sup> 细胞是合适的。

[0203] 本发明将在下述实施例中进一步描述,所述实施例不限制在权利要求中描述的本发明的范围。

## 实施例

[0204] 实施例 1: 鉴定用于疫苗接种的新表位的策略

[0205] 我们鉴定肿瘤特异性新表位的方法涉及 3 个步骤。(1) 使用肿瘤的全基因组或全外显子组(即,仅捕获的外显子)测序与来自每个患者的匹配种系样品比较鉴定 DNA 突变。我们的初步研究证实 CLL 细胞含有许多不同的遗传改变,其改变氨基酸序列且可以生成潜在的新 T 细胞表位。(2) 应用高度验证的肽-MHC 结合预测算法,以生成基于肿瘤中存在的非沉默突变的一组候选 T 细胞表位。我们将证实突变基因作为 RNA 在 CLL 样品中的表达,并且随后使用实验方法证实肽-HLA 结合预测,以定量候选肽与 HLA 等位基因的结合。(3) 针对突变肽的抗原特异性 T 细胞的生成。

[0206] 实施例 2: 用于鉴定具有慢性淋巴细胞白血病的患者的肿瘤中的突变基因的肿瘤和正常基因组测序(步骤 1)

[0207] 为了检测肿瘤特异性突变(其不存在于正常组织中),从每个患者的肿瘤和正常组织中收集样品。对于白血病,使用磁珠分离或使用对于肿瘤细胞特异性的抗体的荧光激活细胞分选纯化肿瘤,所述肿瘤细胞例如具有表达 CD5 和 CD19 表面标记的慢性淋巴细胞白血病(CLL)的患者的肿瘤细胞。皮肤成纤维细胞用作正常组织对照。从分离的肿瘤或正常组织细胞中纯化用于测序的 DNA 或 RNA。对于黑素瘤、卵巢和其他实体瘤(其中存在由非肿瘤细胞的污染),从相对均质的肿瘤细胞短期培养物或激光捕获肿瘤中分离 DNA 和 RNA。PBMCs 用作正常对照细胞。对于所有样品,将 PBMCs 冷冻保存直至需要扩增突变肽特异性的 T 细

胞时。最后,还将肿瘤细胞的短期培养物冷冻保存,用于以后用作扩增 T 细胞的靶。在测序前,分离的基因组 DNA 或 RNA 就核酸完整性和纯度进行测试。

[0208] 对于每个 DNA 样品,将全基因组 DNA 剪切且测序,或通过互补寡核苷酸使用杂交体选择来捕获编码外显子且随后测序(Gnirke 等人,Nat Biotechnol. 2009,27 (2):182-9)。使用 Illumina 下一代测序仪器生成且测序 DNA 和 RNA 文库。

[0209] 具有慢性淋巴细胞白血病(CLL)的 64 个患者的测序获得 23 个非沉默突变的平均值,其相对于种系 DNA 序列改变在肿瘤中的蛋白质氨基酸序列(图 3)。这些非沉默突变分成具有生成新表位的潜力的 5 个不同种类:错义、剪接位点、移码(插入缺失(indel)、插入和缺失)、连读和基因融合(图 4)。这些突变的频率跨越个体患者不同(图 5)。所有这些突变提供用于免疫接种的潜在新表位,其中移码、连读和剪接位点(例如具有保留的内含子)突变生成更长段的新肽,错义突变导致具有单个氨基酸改变的短肽,并且最后融合基因生成具有新连接序列的杂交肽。

[0210] 实施例 3:衍生自具有肿瘤特异性突变的表达蛋白质的 HLA 结合肽的鉴定(步骤 2)。

[0211] 下一个问题是突变基因是否可以生成可以由患者 MHC/HLA 蛋白质呈递的肽。首先,几种算法用于预测具有 IC<sub>50</sub> 得分 < 500 nM 的 30 和 137 种 HLA 结合肽,其来自患者 1 的 10 个错义突变,和来自患者 2 的 53 个错义、1 个插入缺失和 2 个基因融合。显示了关于具有 6 个特异性 HLA 等位基因的患者中的一个错义突变的例子,在 9 聚体肽和 HLA 等位基因的 54 个组合中具有 2 个预测的结合肽(图 6)。为了证实这些基因在肿瘤中表达,我们测量关于突变基因的 RNA 水平(使用取决于突变种类的几种方法,图 7),且发现具有 HLA 结合肽的 98% 突变基因表达。

[0212] 随后通过用测试肽与已知结合 HLA 等位基因的参考肽比较执行竞争性结合测定,实验上验证通过 RNA 表达验证的所有预测肽的 HLA 结合容量。(Sidney 等人 Curr Protoc Immunol. 2001,第 18 章:单元 18.3)(图 8A)。在我们提交用于实验证实 HLA 结合的子集中,来自患者 1 中的错义突变的 17 种预测肽中的 8 种(47%)证实对于 HLA 等位基因具有高结合亲和力(IC<sub>50</sub> <500)(图 8B)。对于患者 2,49 种预测肽中的 25 种在实验上证实为 HLA 结合(图 8B)。这些结果暗示具有预测的 IC<sub>50</sub><150nM 的所有肽在实验上显示 HLA 结合,而 <500 nM 的截断 40-50% 的时间生成真结合肽(图 8C)。值得注意的是,患者 2 的 25 种证实的突变肽中的 12 种具有比种系肽 > 2 倍好的结合亲和力(图 9)。虽然此类肽对于掺入肿瘤疫苗中是优选的,以减少与种系肽交叉反应的 T 细胞的机会,但由于通过 T 细胞受体突变型与种系肽比较的差异识别,未显示差异结合的肽仍可以提供肿瘤特异性应答。

[0213] 实施例 4:针对通过测序 CLL 患者样品鉴定的突变肽的 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答(步骤 3)

[0214] 基于预测或实验上验证的 HLA 结合的突变肽,我们现在可以测定是否可以生成识别这些肿瘤特异性突变肽的 T 细胞。我们因此合成具有小于 1000 nM 的结合得分的肽,其衍生自在肿瘤细胞中具有验证表达的基因。为了生成具有所需特异性的 T 细胞,我们在 IL-2 和 IL-7 的存在下,在每周基础上,用肽脉冲(使用个别肽或肽库)的自体 APCs (树突细胞和 CD40L 扩增的自体 B 细胞)刺激测序患者的 T 细胞。在 3-4 轮刺激后,扩增的 D8<sup>+</sup> 细胞在 ELISpot 上测试针对肽的反应性的证据,其基于 IFN  $\gamma$  分泌。在患者 1 的 17 种候选肽中(图 10),我们已检测到针对用来自 TLK2 基因的突变肽脉冲的自体 DCs 的 T 细胞中的 IFN  $\gamma$  分

泌。

[0215] 实施例 5:突变的 BCR-ABL 基因结合患者 MHC/HLA 蛋白质且可以引发突变型肽特异性 CD8+ T 细胞

[0216] 我们在具有另一个类型的白血病,慢性髓样白血病(CML)的患者中执行针对肿瘤特异性突变型肽的 T 细胞应答的更全面研究。CML 通过肿瘤特异性易位(*BCR-ABL*基因融合的产物)的表达定义。*BCR-ABL*中的突变在 CML 患者中发展,所述 CML 患者发展针对用靶向 *BCR-ABL*的甲磺酸伊马替尼的前线药理学治疗的药物抗性。潜在地,当结合 MHC 蛋白质时,这些突变可以生成来自宿主的 T 细胞或植入的正常供体可以识别的新表位;这些 T 细胞可能是最低限度耐受的。

[0217] 我们考虑了涉及对于伊马替尼具有抗性的患者的 20 种最常见突变,且预测在每个突变周围倾斜(tiled)的 9 和 10 聚体肽的结合。使用 NetMHC (Nielsen 等人 PLoS One. 2007,2 (8):e796)或 IEDB (Vita R 等人 Nucleic Acids Res. 2010,38:D854-62) 预测算法,我们预测来自 20 种常见突变的 84 种肽与一个或多个 8 种常见 HLA 等位基因的结合( $IC_{50}<1000$ ),其中许多肽衍生自三个最常见突变。84 种肽中的 24 种预测为强结合剂( $IC_{50}<50$ ) (图 14),42 种肽为中间结合剂( $50<IC_{50}<500$ ),并且 18 种肽为弱结合剂( $500<IC_{50}<1000$ )。

[0218] 我们将注意力集中在由 E255K (E255K-B<sub>255-263</sub>)突变(KVYEGVWKK) (SEQ ID NO:10) 生成的突变型肽,所述突变预测为以高亲和力结合 HLA-A3。( $IC_{50}=33.1$ )。使用竞争性 MHC 结合测定(图 8A),我们在实验上证实 E255K - B 对于 HLA-A3 的高结合亲和力( $IC_{50}=17nM$ ),与亲本(野生型)肽相比较,突变型肽具有强~10 倍的 HLA 结合(图 15A)。E255K - B 也在实验上验证结合其他 A3 亚型家族成员 HLA-A\*1101 和 HLA - A\*68。我们接下来生成针对来自正常 HLA-A3+ 供体和 2 个 E255K+/HLA-A3+ CML 患者的 E255K-B 的 T 细胞系,其各自证实针对突变大于亲本肽的特异性(图 15B,C)。E255K-B 看起来内源加工且呈递,因为对于 E255K-B 反应性的 T 细胞也响应用小基因转染的 HLA-A3+ APCs,所述小基因包含围绕 E255K 突变的 227 个碱基对。最后,在一个患者中的 E255K 反应性仅在治愈的别 - HSCT 后发展(图 15D)。这些研究证实白血病衍生的遗传改变可以提供新的免疫原性肿瘤特异性抗原靶,其与体内临床应答结合。我们鉴定突变 BCR-ABL 的免疫原性 T 细胞表位的方法从而举例说明关于应用生物信息学工具的有效策略,以发现来自突变基因的 T 细胞表位。

[0219] 实施例 6:识别肿瘤表位的患者 T 细胞克隆可以选择性杀死呈递突变表位的细胞

[0220] T 细胞的靶特异性的证实通过个别 T 细胞克隆的表征最佳解决。我们因此一般通过反应性 T 细胞系的有限稀释分离突变肽特异性 T 细胞克隆,且随后使用标准铬释放测定筛选 T 细胞克隆,其证实突变与种系肽脉冲的自体 APCs 比较的差异杀死。使用关于每种肽的标准稀释系列,我们测量对于 50% 杀死所需的肽浓度。如果对于 50% 杀死所需的野生型与突变型肽的比是大于 10 倍,那么我们得出结论存在这些肽通过 T 细胞的差异识别,如先前对于突变肿瘤抗原可见的。我们已对于 CML 肿瘤抗原 CML66 执行这个程序。为了测定 CML66 肽特异性 T 细胞是否识别加工且呈递的表位,将 CML66 肽反应性 T 细胞与自体 APCs 转导一起温育,以表达整个 CML66 蛋白质。我们通过质粒 DNA 或体外转录的 RNA 的核转染表达 CML66 (在 DCs、CD40L 扩增的 B 细胞、或具有改造的 HLA 分子的 K562 细胞中)。如图 12A 中所示,刺激的 T 细胞对于 HLA-B4403 结合的 CML66 衍生的肽表位(肽 66-72C)是特异

性的。因为当 CD40L 扩增的 B 细胞用 CML66 mRNA 核转染时,整个 CML66 蛋白质是有效表达的(图 12B),所以我们能够在标准铬释放测定中使用这些细胞(或肽脉冲的细胞)作为靶,且发现 T 细胞有效裂解这些靶(图 12C)。对于由每个癌症患者生成的突变肽特异性 T 细胞系各自执行可比较测定,包括患者匹配的肿瘤细胞的裂解(例如使用实施例 6 和 7 中所述的 T 细胞系)。

[0221] 实施例 7 :作为潜在肿瘤抗原的突变肿瘤驱动物

[0222] 在跨越 64 个患者的 1188 个非沉默突变中,我们鉴定 8 个频发突变,包括 SF3B1 (16% 的 CLL 患者)、TP53 (12.5%)、MYD88 (9%)、ATM (9%)、FBXW7 (6%)、MAPK1 (5%)、GNB1 (3%) 和 M6PR (3%) (图 11)。这些突变(尤其是最频繁的那些 :SF3B1、TP53、MYD88 和 ATM)预测为驱动突变,其对于肿瘤发展或进展是必需的。这些驱动基因代表用于包括在疫苗中的有希望的肿瘤特异性抗原。

[0223] SF3B1 是 CLL 中最频繁突变的基因,在保守位点上突变,在 CLL 患者中高度表达(图 12),并且先前未得到描述。最常见的 SF3B1 突变是 K700E (40% 的 SF3B1 突变);另外 89 个独立 CLL 患者的基因分型揭开具有这个突变的 6 个更多的患者肿瘤。通过将肽-HLA 结合算法应用于 SF3B1 突变,我们预测突变肽与最常见的 HLA-A2 等位基因的结合(图 13)。如果具有 CLL 中的最常见突变(SF3B1 K700E)的肽结合最常见的 I 类 HLA 等位基因(HLA-A2),那么这种肽是用于包括在用于许多 CLL 患者的 CLL 疫苗中的极佳候选物。

[0224] 参考文献

[0225]

- Albert, T. J., Molla, M. N., Muzny, D. M., Nazareth, L., Wheeler, D., Song, X., Richmond, T. A., Middle, C. M., Rodesch, M. J., Packard, C. J., 等人 (2007). Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nat Methods* 4, 903-905.
- Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Canning, C., Neuberg, D., Schlossman, R., Pickett, C., Collins, H., Wang, Y., Anderson, K. C., and Ritz, J. (1998). Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood* 91, 3671-3680.
- Amunziata, C. M., Davis, R. E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., 等人 (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 115-130.
- Attia, P., Phan, G. Q., Maker, A. V., Robinson, M. R., Quezado, M. M., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., 等人 (2005). Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23, 6043-6053.
- Austen, B., Powell, J. E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A. M., Fegan, C., Moss, P., and Stankovic, T. (2005). Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 106, 3175-3182.
- Balakrishnan, A., Bleeker, F. E., Lamba, S., Rodolfo, M., Daniotti, M., Scarpa, A., van Tilborg, A. A., Leenstra, S., Zanon, C., and Bardelli, A. (2007). Novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 67, 3545-3550.
- Baskar, S., Kobrin, C. B., and Kwak, L. W. (2004). Autologous lymphoma vaccines induce human T cell responses against multiple, unique epitopes. *J Clin Invest* 113, 1498-1510.

[0226]

- Baurain, J. F., Coliau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T., and Coulie, P. G. (2000). High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J Immunol* 164, 6057-6066.
- Beck, K. E., Blansfield, J. A., Tran, K. Q., Feldman, A. L., Hughes, M. S., Royal, R. E., Kammula, U. S., Topalian, S. L., Sherry, R. M., Kleiner, D., 等人 (2006). Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 24, 2283-2289.
- Bellucci, R., Wu, C. J., Chiaretti, S., Weller, E., Davies, F. E., Alyea, E. P., Dranoff, G., Anderson, K. C., Munshi, N. C., and Ritz, J. (2004). Complete response to donor lymphocyte infusion in multiple myeloma is associated with antibody responses to highly expressed antigens. *Blood* 103, 656-663.
- Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24, 175-208.
- Brandle, D., Brasseur, F., Weynants, P., Boon, T., and Van den Eynde, B. (1996). A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 183, 2501-2508.
- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., 等人 (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448, 439-444.
- Chiari, R., Foury, F., De Plaen, E., Baurain, J. F., Thonnard, J., and Coulie, P. G. (1999). Two antigens recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a melanoma result from a single point mutation in an essential housekeeping gene. *Cancer Res* 59, 5785-5792.
- De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J. P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T. (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2274-2278.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., 等人 (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.

[0227]

- Estep, A. L., Palmer, C., McCormick, F., and Rauen, K. A. (2007). Mutation Analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 Ovarian Cancer Cell Lines: Implications for Therapy. *PLoS ONE* 2, e1279.
- Garcia-Marco, J. A., Caldas, C., Price, C. M., Wiedemann, L. M., Ashworth, A., and Catovsky, D. (1996). Frequent somatic deletion of the 13q12.3 locus encompassing BRCA2 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 88, 1568-1575.
- Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 11, 263-270.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgleish, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., 等人 (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-158.
- Gueguen, M., Patard, J. J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renaud, J. C., Van Cangh, P. J., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (1998). An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *J Immunol* 160, 6188-6194.
- Herman, J., Jongeneel, V., Kuznetsov, D., and Coulic, P. G. (1999). Differences in the recognition by CTL of peptides presented by the HLA-B\*4402 and the HLA-B\*4403 molecules which differ by a single amino acid. *Tissue Antigens* 53, 111-121.
- Hocker, T., and Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* 28, 578-588.
- Hodi, F. S., Butler, M., Oble, D. A., Seiden, M. V., Haluska, F. G., Kruse, A., Macrae, S., Nelson, M., Canning, C., Lowy, L., 等人 (2008). Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3005-3010.
- Hodi, F. S., Mihm, M. C., Soiffer, R. J., Haluska, F. G., Butler, M., Seiden, M. V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., 等人 (2003). Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4712-4717.
- Huang, J., El-Gamil, M., Dudley, M. E., Li, Y. F., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F. (2004). T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. *J Immunol* 172, 6057-6064.
- Jocham, D., Richter, A., Hoffmann, L., Iwig, K., Fahlenkamp, D., Zakrzewski, G., Schmitt, E., Dannenberg, T., Lehmacher, W., von Wietersheim, J., and Doehn, C. (2004). Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell

[0228]

- carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 363, 594-599.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., and Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 13, 552-559.
- Keats, J. J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W. J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C. X., Sebag, M., 等人 (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 131-144.
- Ladetto, M., Ormede, P., Sametti, S., Donovan, J. W., Astolfi, M., Drandi, D., Volpato, F., Giaccone, L., Giaretta, F., Palumbo, A., 等人 (2002). Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. *Exp Hematol* 30, 529-536.
- Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R. A., Lilke, A., Ferel, D., Wolfel, C., Huber, C., and Wolfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16013-16018.
- Lin, H. H., Ray, S., Tongchusak, S., Reinherz, E., and Brusic, V. (2008). Evaluation of MHC class I peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics* (in press).
- Maker, A. V., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., Hughes, M., Yellin, M. J., Haworth, L. R., Levy, C., 等人 (2006). Inpatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* (1997) 29, 455-463.
- Mandelboim, O., Vadai, E., Fridkin, M., Katz-Hillel, A., Feldman, M., Berke, G., and Eisenbach, L. (1995). Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. *Nat Med* 1, 1179-1183.
- Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., and van der Bruggen, P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 186, 785-793.
- Marijt, W. A., Heemskerk, M. H., Kloosterboer, F. M., Goulmy, E., Kester, M. G., van der Hoorn, M. A., van Luxemburg-Heys, S. A., Hoogeboom, M., Mutis, T., Drijfhout, J. W., 等人 (2003). Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2742-2747.

[0229]

- Marina O, Hainz U, Biernacki MA, 等人 (2010) Serologic markers of effective tumor immunity against chronic lymphocytic leukemia include nonmutated B-cell antigens. *Cancer Res* 70, 1344-1355.
- Mullally, A., and Ritz, J. (2007). Beyond HLA: the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 109, 1355-1362.
- Ofran, Y., Brusic, V., Soiffer, R., Antin, J. H., and Ritz, J. (2008). Identification of human minor histocompatibility antigens (mHa) by combining bioinformatic prediction of peptide epitopes with validation of T cell reactivity in patient blood samples after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Bone Marrow Transplant* 14, 1.
- Parmiani, G., De Filippo, A., Novellino, L., and Castelli, C. (2007). Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol* 178, 1975-1979.
- Pasmant, E., Laurendeau, L., Heron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., and Bieche, I. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family; identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res* 67, 3963-3969.
- Peters, B., Sidney, J., Bourne, P., Bui, H. H., Baus, S., Doh, G., Fleri, W., Kronenberg, M., Kube, R., Lund, O., 等人 (2005). The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. *PLoS Biol* 3, e91.
- Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., 等人 (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8372-8377.
- Provan, D., Bartlett-Pandite, L., Zwicky, C., Neuberger, D., Maddocks, A., Corradini, P., Soiffer, R., Ritz, J., Nadler, L. M., and Gribben, J. G. (1996). Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood* 88, 2228-2235.
- Reifenberger, J., Knobbe, C. B., Sterzinger, A. A., Blaschke, B., Schulte, K. W., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2004). Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int J Cancer* 109, 377-384.
- Ribas, A., Camacho, L. H., Lopez-Berestein, G., Pavlov, D., Bulanhagui, C. A., Millham, R., Comin-Anduix, B., Reuben, J. M., Seja, E., Parker, C. A., 等人 (2005). Antitumor activity in

[0230]

- melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol* 23, 8968-8977.
- Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Lofus, D., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183, 1185-1192.
- Rondon, G., Giralt, S., Huh, Y., Khouri, I., Andersson, B., Andreeff, M., and Champlin, R. (1996). Graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 18, 669-672.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., and Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10, 909-915.
- Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275, 1790-1792.
- Sanderson, K., Scotland, R., Lee, P., Liu, D., Groshen, S., Snively, J., Sian, S., Nichol, G., Davis, T., Keler, T., 等人 (2005). Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol* 23, 741-750.
- Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., 等人 (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18538-18543.
- Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G. A., Dohner, H., and Lichter, P. (1999). Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 748-753.
- Segal, N. H., Parsons, D. W., Peggs, K. S., Velculescu, V., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Allison, J. P. (2008). Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* 68, 889-892.
- Sensí, M., and Anichini, A. (2006). Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy. *Clin Cancer Res* 12, 5023-5032.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., 等人 (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-274.

[0231]

- Soiffer, R., Hodi, F. S., Haluska, F., Jung, K., Gillessen, S., Singer, S., Tanabe, K., Duda, R., Mentzer, S., Jaklitsch, M., 等人 (2003). Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 21, 3343-3350.
- Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., 等人 (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13141-13146.
- Srivastava, P. K. (2006). Therapeutic cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 18, 201-205.
- Stankovic, T., Hubank, M., Cronin, D., Stewart, G. S., Fletcher, D., Bignell, C. R., Alvi, A. J., Austen, B., Weston, V. J., Fegan, C., 等人 (2004). Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood* 103, 291-300.
- Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 63, 2127-2133.
- Thomas, R. K., Baker, A. C., Debiasi, R. M., Winckler, W., Laframboise, T., Lin, W. M., Wang, M., Feng, W., Zander, T., MacConaill, L., 等人 (2007). High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 39, 347-351.
- Thompson, A. A., Talley, J. A., Do, H. N., Kagan, H. L., Kunkel, L., Berenson, J., Cooper, M. D., Saxon, A., and Wall, R. (1997). Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 90, 1387-1394.
- Thornton, P. D., Gruszka-Westwood, A. M., Hamoudi, R. A., Atkinson, S., Kaczmarek, P., Morilla, R. M., Hilditch, B. L., A'Hern, R., Matutes, E., and Catovsky, D. (2004). Characterisation of TP53 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J* 5, 47-54.
- Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C. B., Okada, C. Y., 等人 (2002). Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517-1526.

[0232]

- Toze, C. L., Galal, A., Barnett, M. J., Shepherd, J. D., Conneally, E. A., Hogge, D. E., Nantel, S. H., Nevill, T. J., Sutherland, H. J., Connors, J. M., 等人 (2005). Myeloablative allografting for chronic lymphocytic leukemia: evidence for a potent graft-versus-leukemia effect associated with graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 36, 825-830.
- Ueda, M., Toji, E., and Noda, S. (2007). Germ line and somatic mutations of BRAF V599E in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 17, 794-797.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Van Pel, A., Georlette, M., and Boon, T. (1979). Tumor cell variants obtained by mutagenesis of a Lewis lung carcinoma cell line: immune rejection by syngeneic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5282-5285.
- Van Trappen, P. O., Cullup, T., Troke, R., Swann, D., Shepherd, J. H., Jacobs, I. J., Gayther, S. A., and Mein, C. A. (2007). Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 104, 129-133.
- Willmore-Payne, C., Holden, J. A., Tripp, S., and Layfield, L. J. (2005). Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 36, 486-493.
- Woffel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Woffel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284.
- Wu, C. J., Biernacki, M., Kutok, J. L., Rogers, S., Chen, L., Yang, X. F., Soiffer, R. J., and Ritz, J. (2005). Graft-versus-leukemia target antigens in chronic myelogenous leukemia are expressed on myeloid progenitor cells. *Clin Cancer Res* 11, 4504-4511.
- Wu, C. J., Chillemi, A., Alyea, E. P., Orsini, E., Neuberg, D., Soiffer, R. J., and Ritz, J. (2000a). Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood* 95, 352-359.
- Wu, C. J., and Ritz, J. (2006). Induction of tumor immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Adv Immunol* 90, 133-173.
- Wu, C. J., Yang, X. F., McLaughlin, S., Neuberg, D., Canning, C., Stein, B., Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Dranoff, G., and Ritz, J. (2000b). Detection of a potent humoral response

[0233]

associated with immune-induced remission of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 106, 705-714.

Wu, R., Hendrix-Lucas, N., Kuick, R., Zhai, Y., Schwartz, D. R., Akyol, A., Hanash, S., Misek, D. E., Katabuchi, H., Williams, B. O., 等人 (2007). Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell* 11, 321-333.

Yang, X. F., Wu, C. J., McLaughlin, S., Chillemi, A., Wang, K. S., Canning, C., Alyea, E. P., Kantoff, P., Soiffer, R. J., Dranoff, G., and Ritz, J. (2001). CML66, a broadly immunogenic tumor antigen, elicits a humoral immune response associated with remission of chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7492-7497.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., 等人 (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 203-213.

Zhang W, Choi J, Zeng W, 等人 (2010) Graft-versus-Leukemia Antigen CML66 Elicits Coordinated B-Cell and T-Cell Immunity after Donor Lymphocyte Infusion. *Clin Cancer Res*. 16, 2729-2739.

Zhou, J., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F. (2005a). Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy. *J Immunother* (1997) 28, 53-62.

Zhou, X., Jun, D. Y., Thomas, A. M., Huang, X., Huang, L. Q., Mautner, J., Mo, W., Robbins, P. F., Pardoll, D. M., and Jaffee, E. M. (2005b). Diverse CD8+ T-cell responses to renal cell carcinoma antigens in patients treated with an autologous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transduced renal tumor cell vaccine. *Cancer Res* 65, 1079-1088.

## 序列表

- <110> The General Hospital Corporation  
 Dana-Farber Cancer Institute, Inc.  
 <120> 鉴定肿瘤特异性新抗原的组合物和方法  
 <130> 39564-502001W0  
 <140> PCT/US2011/036665  
 <141> 2011-05-16  
 <150> 61/334866  
 <151> 2010-05-14  
 <160> 23  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1304  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 1

```

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

Lys Ala Gly Glu Leu Lys Val Val Asn Gly Ala Ala Ala Ser Gln Pro  
 180 185 190  
 Pro Ser Lys Arg Lys Arg Arg Trp Asp Gln Thr Ala Asp Gln Thr Pro  
 195 200 205  
 Gly Ala Thr Pro Lys Lys Leu Ser Ser Trp Asp Gln Ala Glu Thr Pro  
 210 215 220  
 Gly His Thr Pro Ser Leu Arg Trp Asp Glu Thr Pro Gly Arg Ala Lys  
 225 230 235 240  
 Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ala Thr Pro Gly Ser Lys Ile Trp Asp Pro  
 245 250 255  
 Thr Pro Ser His Thr Pro Ala Gly Ala Ala Thr Pro Gly Arg Gly Asp  
 260 265 270  
 Thr Pro Gly His Ala Thr Pro Gly His Gly Gly Ala Thr Ser Ser Ala  
 275 280 285  
 Arg Lys Asn Arg Trp Asp Glu Thr Pro Lys Thr Glu Arg Asp Thr Pro  
 290 295 300  
 Gly His Gly Ser Gly Trp Ala Glu Thr Pro Arg Thr Asp Arg Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Asp Ser Ile Gly Glu Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Lys Arg Lys Ser  
 325 330 335  
 Arg Trp Asp Glu Thr Pro Ala Ser Gln Met Gly Gly Ser Thr Pro Val  
 340 345 350  
 Leu Thr Pro Gly Lys Thr Pro Ile Gly Thr Pro Ala Met Asn Met Ala  
 355 360 365  
 Thr Pro Thr Pro Gly His Ile Met Ser Met Thr Pro Glu Gln Leu Gln  
 370 375 380  
 Ala Trp Arg Trp Glu Arg Glu Ile Asp Glu Arg Asn Arg Pro Leu Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Glu Glu Leu Asp Ala Met Phe Pro Glu Gly Tyr Lys Val Leu Pro  
 405 410 415  
 Pro Pro Ala Gly Tyr Val Pro Ile Arg Thr Pro Ala Arg Lys Leu Thr  
 420 425 430  
 Ala Thr Pro Thr Pro Leu Gly Gly Met Thr Gly Phe His Met Gln Thr  
 435 440 445  
 Glu Asp Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Asp Gln Pro Ser Gly Asn Leu  
 450 455 460  
 Pro Phe Leu Lys Pro Asp Asp Ile Gln Tyr Phe Asp Lys Leu Leu Val  
 465 470 475 480  
 Asp Val Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys

	485	490	495
Ile Met Lys Leu Leu Leu Lys Ile Lys Asn Gly Thr Pro Pro Met Arg			
	500	505	510
Lys Ala Ala Leu Arg Gln Ile Thr Asp Lys Ala Arg Glu Phe Gly Ala			
	515	520	525
Gly Pro Leu Phe Asn Gln Ile Leu Pro Leu Leu Met Ser Pro Thr Leu			
	530	535	540
Glu Asp Gln Glu Arg His Leu Leu Val Lys Val Ile Asp Arg Ile Leu			
545	550	555	560
Tyr Lys Leu Asp Asp Leu Val Arg Pro Tyr Val His Lys Ile Leu Val			
	565	570	575
Val Ile Glu Pro Leu Leu Ile Asp Glu Asp Tyr Tyr Ala Arg Val Glu			
	580	585	590
Gly Arg Glu Ile Ile Ser Asn Leu Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr			
	595	600	605
Met Ile Ser Thr Met Arg Pro Asp Ile Asp Asn Met Asp Glu Tyr Val			
	610	615	620
Arg Asn Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Val Val Ala Ser Ala Leu Gly			
625	630	635	640
Ile Pro Ser Leu Leu Pro Phe Leu Lys Ala Val Cys Lys Ser Lys Lys			
	645	650	655
Ser Trp Gln Ala Arg His Thr Gly Ile Lys Ile Val Gln Gln Ile Ala			
	660	665	670
Ile Leu Met Gly Cys Ala Ile Leu Pro His Leu Arg Ser Leu Val Glu			
	675	680	685
Ile Ile Glu His Gly Leu Val Asp Glu Gln Gln Lys Val Arg Thr Ile			
	690	695	700
Ser Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Ala Glu Ala Ala Thr Pro Tyr Gly			
705	710	715	720
Ile Glu Ser Phe Asp Ser Val Leu Lys Pro Leu Trp Lys Gly Ile Arg			
	725	730	735
Gln His Arg Gly Lys Gly Leu Ala Ala Phe Leu Lys Ala Ile Gly Tyr			
	740	745	750
Leu Ile Pro Leu Met Asp Ala Glu Tyr Ala Asn Tyr Tyr Thr Arg Glu			
	755	760	765
Val Met Leu Ile Leu Ile Arg Glu Phe Gln Ser Pro Asp Glu Glu Met			
	770	775	780
Lys Lys Ile Val Leu Lys Val Val Lys Gln Cys Cys Gly Thr Asp Gly			
785	790	795	800



1100	1105	1110
Val Ala Ile Ala Ile Val	Ala Glu Thr Cys Ser Pro	Phe Thr Val
1115	1120	1125
Leu Pro Ala Leu Met Asn Glu	Tyr Arg Val Pro Glu	Leu Asn Val
1130	1135	1140
Gln Asn Gly Val Leu Lys Ser	Leu Ser Phe Leu Phe	Glu Tyr Ile
1145	1150	1155
Gly Glu Met Gly Lys Asp Tyr	Ile Tyr Ala Val Thr	Pro Leu Leu
1160	1165	1170
Glu Asp Ala Leu Met Asp Arg	Asp Leu Val His Arg	Gln Thr Ala
1175	1180	1185
Ser Ala Val Val Gln His Met	Ser Leu Gly Val Tyr	Gly Phe Gly
1190	1195	1200
Cys Glu Asp Ser Leu Asn His	Leu Leu Asn Tyr Val	Trp Pro Asn
1205	1210	1215
Val Phe Glu Thr Ser Pro His	Val Ile Gln Ala Val	Met Gly Ala
1220	1225	1230
Leu Glu Gly Leu Arg Val Ala	Ile Gly Pro Cys Arg	Met Leu Gln
1235	1240	1245
Tyr Cys Leu Gln Gly Leu Phe	His Pro Ala Arg Lys	Val Arg Asp
1250	1255	1260
Val Tyr Trp Lys Ile Tyr Asn	Ser Ile Tyr Ile Gly	Ser Gln Asp
1265	1270	1275
Ala Leu Ile Ala His Tyr Pro	Arg Ile Tyr Asn Asp	Asp Lys Asn
1280	1285	1290
Thr Tyr Ile Arg Tyr Glu Leu	Asp Tyr Ile Leu	
1295	1300	
<210>	2	
<211>	309	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	2	
Met Arg Pro Asp Arg Ala Glu Ala Pro Gly Pro Pro Ala Met Ala Ala		
1	5	10
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser Thr Ser Ser		
	20	25
Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg Leu Ser Leu		
	35	40
Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr Ala Leu Ala		
		45



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

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu  
 325 330 335  
 Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp  
 340 345 350  
 Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His  
 355 360 365  
 Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met  
 370 375 380  
 Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp  
 385 390  
 <210> 4  
 <211> 3056  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 4  
 Met Ser Leu Val Leu Asn Asp Leu Leu Ile Cys Cys Arg Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
 His Asp Arg Ala Thr Glu Arg Lys Lys Glu Val Glu Lys Phe Lys Arg  
 20 25 30  
 Leu Ile Arg Asp Pro Glu Thr Ile Lys His Leu Asp Arg His Ser Asp  
 35 40 45  
 Ser Lys Gln Gly Lys Tyr Leu Asn Trp Asp Ala Val Phe Arg Phe Leu  
 50 55 60  
 Gln Lys Tyr Ile Gln Lys Glu Thr Glu Cys Leu Arg Ile Ala Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Asn Val Ser Ala Ser Thr Gln Ala Ser Arg Gln Lys Lys Met Gln Glu  
 85 90 95  
 Ile Ser Ser Leu Val Lys Tyr Phe Ile Lys Cys Ala Asn Arg Arg Ala  
 100 105 110  
 Pro Arg Leu Lys Cys Gln Glu Leu Leu Asn Tyr Ile Met Asp Thr Val  
 115 120 125  
 Lys Asp Ser Ser Asn Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Asp Cys Ser Asn Ile  
 130 135 140  
 Leu Leu Lys Asp Ile Leu Ser Val Arg Lys Tyr Trp Cys Glu Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Gln Gln Gln Trp Leu Glu Leu Phe Ser Val Tyr Phe Arg Leu Tyr Leu  
 165 170 175  
 Lys Pro Ser Gln Asp Val His Arg Val Leu Val Ala Arg Ile Ile His  
 180 185 190

Ala Val Thr Lys Gly Cys Cys Ser Gln Thr Asp Gly Leu Asn Ser Lys  
195 200 205

Phe Leu Asp Phe Phe Ser Lys Ala Ile Gln Cys Ala Arg Gln Glu Lys  
210 215 220

Ser Ser Ser Gly Leu Asn His Ile Leu Ala Ala Leu Thr Ile Phe Leu  
225 230 235 240

Lys Thr Leu Ala Val Asn Phe Arg Ile Arg Val Cys Glu Leu Gly Asp  
245 250 255

Glu Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Ile Trp Thr Gln His Arg Leu Asn  
260 265 270

Asp Ser Leu Lys Glu Val Ile Ile Glu Leu Phe Gln Leu Gln Ile Tyr  
275 280 285

Ile His His Pro Lys Gly Ala Lys Thr Gln Glu Lys Gly Ala Tyr Glu  
290 295 300

Ser Thr Lys Trp Arg Ser Ile Leu Tyr Asn Leu Tyr Asp Leu Leu Val  
305 310 315 320

Asn Glu Ile Ser His Ile Gly Ser Arg Gly Lys Tyr Ser Ser Gly Phe  
325 330 335

Arg Asn Ile Ala Val Lys Glu Asn Leu Ile Glu Leu Met Ala Asp Ile  
340 345 350

Cys His Gln Val Phe Asn Glu Asp Thr Arg Ser Leu Glu Ile Ser Gln  
355 360 365

Ser Tyr Thr Thr Thr Gln Arg Glu Ser Ser Asp Tyr Ser Val Pro Cys  
370 375 380

Lys Arg Lys Lys Ile Glu Leu Gly Trp Glu Val Ile Lys Asp His Leu  
385 390 395 400

Gln Lys Ser Gln Asn Asp Phe Asp Leu Val Pro Trp Leu Gln Ile Ala  
405 410 415

Thr Gln Leu Ile Ser Lys Tyr Pro Ala Ser Leu Pro Asn Cys Glu Leu  
420 425 430

Ser Pro Leu Leu Met Ile Leu Ser Gln Leu Leu Pro Gln Gln Arg His  
435 440 445

Gly Glu Arg Thr Pro Tyr Val Leu Arg Cys Leu Thr Glu Val Ala Leu  
450 455 460

Cys Gln Asp Lys Arg Ser Asn Leu Glu Ser Ser Gln Lys Ser Asp Leu  
465 470 475 480

Leu Lys Leu Trp Asn Lys Ile Trp Cys Ile Thr Phe Arg Gly Ile Ser  
485 490 495

Ser Glu Gln Ile Gln Ala Glu Asn Phe Gly Leu Leu Gly Ala Ile Ile

500	505	510
Gln Gly Ser Leu Val Glu Val Asp Arg Glu Phe Trp Lys Leu Phe Thr		
515	520	525
Gly Ser Ala Cys Arg Pro Ser Cys Pro Ala Val Cys Cys Leu Thr Leu		
530	535	540
Ala Leu Thr Thr Ser Ile Val Pro Gly Thr Val Lys Met Gly Ile Glu		
545	550	555
Gln Asn Met Cys Glu Val Asn Arg Ser Phe Ser Leu Lys Glu Ser Ile		
565	570	575
Met Lys Trp Leu Leu Phe Tyr Gln Leu Glu Gly Asp Leu Glu Asn Ser		
580	585	590
Thr Glu Val Pro Pro Ile Leu His Ser Asn Phe Pro His Leu Val Leu		
595	600	605
Glu Lys Ile Leu Val Ser Leu Thr Met Lys Asn Cys Lys Ala Ala Met		
610	615	620
Asn Phe Phe Gln Ser Val Pro Glu Cys Glu His His Gln Lys Asp Lys		
625	630	635
Glu Glu Leu Ser Phe Ser Glu Val Glu Glu Leu Phe Leu Gln Thr Thr		
645	650	655
Phe Asp Lys Met Asp Phe Leu Thr Ile Val Arg Glu Cys Gly Ile Glu		
660	665	670
Lys His Gln Ser Ser Ile Gly Phe Ser Val His Gln Asn Leu Lys Glu		
675	680	685
Ser Leu Asp Arg Cys Leu Leu Gly Leu Ser Glu Gln Leu Leu Asn Asn		
690	695	700
Tyr Ser Ser Glu Ile Thr Asn Ser Glu Thr Leu Val Arg Cys Ser Arg		
705	710	715
Leu Leu Val Gly Val Leu Gly Cys Tyr Cys Tyr Met Gly Val Ile Ala		
725	730	735
Glu Glu Glu Ala Tyr Lys Ser Glu Leu Phe Gln Lys Ala Lys Ser Leu		
740	745	750
Met Gln Cys Ala Gly Glu Ser Ile Thr Leu Phe Lys Asn Lys Thr Asn		
755	760	765
Glu Glu Phe Arg Ile Gly Ser Leu Arg Asn Met Met Gln Leu Cys Thr		
770	775	780
Arg Cys Leu Ser Asn Cys Thr Lys Lys Ser Pro Asn Lys Ile Ala Ser		
785	790	795
Gly Phe Phe Leu Arg Leu Leu Thr Ser Lys Leu Met Asn Asp Ile Ala		
805	810	815

Asp Ile Cys Lys Ser Leu Ala Ser Phe Ile Lys Lys Pro Phe Asp Arg  
 820 825 830  
 Gly Glu Val Glu Ser Met Glu Asp Asp Thr Asn Gly Asn Leu Met Glu  
 835 840 845  
 Val Glu Asp Gln Ser Ser Met Asn Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Asp Ser  
 850 855 860  
 Ser Val Ser Asp Ala Asn Glu Pro Gly Glu Ser Gln Ser Thr Ile Gly  
 865 870 875 880  
 Ala Ile Asn Pro Leu Ala Glu Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Asp Leu Leu  
 885 890 895  
 Phe Leu Asp Met Leu Lys Phe Leu Cys Leu Cys Val Thr Thr Ala Gln  
 900 905 910  
 Thr Asn Thr Val Ser Phe Arg Ala Ala Asp Ile Arg Arg Lys Leu Leu  
 915 920 925  
 Met Leu Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu Pro Thr Lys Ser Leu His Leu  
 930 935 940  
 His Met Tyr Leu Met Leu Leu Lys Glu Leu Pro Gly Glu Glu Tyr Pro  
 945 950 955 960  
 Leu Pro Met Glu Asp Val Leu Glu Leu Leu Lys Pro Leu Ser Asn Val  
 965 970 975  
 Cys Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Gln Asp Val Cys Lys Thr Ile Leu Asn  
 980 985 990  
 His Val Leu His Val Val Lys Asn Leu Gly Gln Ser Asn Met Asp Ser  
 995 1000 1005  
 Glu Asn Thr Arg Asp Ala Gln Gly Gln Phe Leu Thr Val Ile Gly  
 1010 1015 1020  
 Ala Phe Trp His Leu Thr Lys Glu Arg Lys Tyr Ile Phe Ser Val  
 1025 1030 1035  
 Arg Met Ala Leu Val Asn Cys Leu Lys Thr Leu Leu Glu Ala Asp  
 1040 1045 1050  
 Pro Tyr Ser Lys Trp Ala Ile Leu Asn Val Met Gly Lys Asp Phe  
 1055 1060 1065  
 Pro Val Asn Glu Val Phe Thr Gln Phe Leu Ala Asp Asn His His  
 1070 1075 1080  
 Gln Val Arg Met Leu Ala Ala Glu Ser Ile Asn Arg Leu Phe Gln  
 1085 1090 1095  
 Asp Thr Lys Gly Asp Ser Ser Arg Leu Leu Lys Ala Leu Pro Leu  
 1100 1105 1110  
 Lys Leu Gln Gln Thr Ala Phe Glu Asn Ala Tyr Leu Lys Ala Gln

1115	1120	1125
Glu Gly Met Arg Glu Met Ser His Ser Ala Glu Asn Pro Glu Thr		
1130	1135	1140
Leu Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Lys Ser Val Leu Leu Thr Leu Ile		
1145	1150	1155
Ala Val Val Leu Ser Cys Ser Pro Ile Cys Glu Lys Gln Ala Leu		
1160	1165	1170
Phe Ala Leu Cys Lys Ser Val Lys Glu Asn Gly Leu Glu Pro His		
1175	1180	1185
Leu Val Lys Lys Val Leu Glu Lys Val Ser Glu Thr Phe Gly Tyr		
1190	1195	1200
Arg Arg Leu Glu Asp Phe Met Ala Ser His Leu Asp Tyr Leu Val		
1205	1210	1215
Leu Glu Trp Leu Asn Leu Gln Asp Thr Glu Tyr Asn Leu Ser Ser		
1220	1225	1230
Phe Pro Phe Ile Leu Leu Asn Tyr Thr Asn Ile Glu Asp Phe Tyr		
1235	1240	1245
Arg Ser Cys Tyr Lys Val Leu Ile Pro His Leu Val Ile Arg Ser		
1250	1255	1260
His Phe Asp Glu Val Lys Ser Ile Ala Asn Gln Ile Gln Glu Asp		
1265	1270	1275
Trp Lys Ser Leu Leu Thr Asp Cys Phe Pro Lys Ile Leu Val Asn		
1280	1285	1290
Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Tyr Glu Gly Thr Arg Asp Ser Gly Met		
1295	1300	1305
Ala Gln Gln Arg Glu Thr Ala Thr Lys Val Tyr Asp Met Leu Lys		
1310	1315	1320
Ser Glu Asn Leu Leu Gly Lys Gln Ile Asp His Leu Phe Ile Ser		
1325	1330	1335
Asn Leu Pro Glu Ile Val Val Glu Leu Leu Met Thr Leu His Glu		
1340	1345	1350
Pro Ala Asn Ser Ser Ala Ser Gln Ser Thr Asp Leu Cys Asp Phe		
1355	1360	1365
Ser Gly Asp Leu Asp Pro Ala Pro Asn Pro Pro His Phe Pro Ser		
1370	1375	1380
His Val Ile Lys Ala Thr Phe Ala Tyr Ile Ser Asn Cys His Lys		
1385	1390	1395
Thr Lys Leu Lys Ser Ile Leu Glu Ile Leu Ser Lys Ser Pro Asp		
1400	1405	1410

Ser Tyr	Gln Lys Ile Leu Leu	Ala Ile Cys Glu Gln	Ala Ala Glu
1415	1420	1425	
Thr Asn	Asn Val Tyr Lys Lys	His Arg Ile Leu Lys	Ile Tyr His
1430	1435	1440	
Leu Phe	Val Ser Leu Leu Leu	Lys Asp Ile Lys Ser	Gly Leu Gly
1445	1450	1455	
Gly Ala	Trp Ala Phe Val Leu	Arg Asp Val Ile Tyr	Thr Leu Ile
1460	1465	1470	
His Tyr	Ile Asn Gln Arg Pro	Ser Cys Ile Met Asp	Val Ser Leu
1475	1480	1485	
Arg Ser	Phe Ser Leu Cys Cys	Asp Leu Leu Ser Gln	Val Cys Gln
1490	1495	1500	
Thr Ala	Val Thr Tyr Cys Lys	Asp Ala Leu Glu Asn	His Leu His
1505	1510	1515	
Val Ile	Val Gly Thr Leu Ile	Pro Leu Val Tyr Glu	Gln Val Glu
1520	1525	1530	
Val Gln	Lys Gln Val Leu Asp	Leu Leu Lys Tyr Leu	Val Ile Asp
1535	1540	1545	
Asn Lys	Asp Asn Glu Asn Leu	Tyr Ile Thr Ile Lys	Leu Leu Asp
1550	1555	1560	
Pro Phe	Pro Asp His Val Val	Phe Lys Asp Leu Arg	Ile Thr Gln
1565	1570	1575	
Gln Lys	Ile Lys Tyr Ser Arg	Gly Pro Phe Ser Leu	Leu Glu Glu
1580	1585	1590	
Ile Asn	His Phe Leu Ser Val	Ser Val Tyr Asp Ala	Leu Pro Leu
1595	1600	1605	
Thr Arg	Leu Glu Gly Leu Lys	Asp Leu Arg Arg Gln	Leu Glu Leu
1610	1615	1620	
His Lys	Asp Gln Met Val Asp	Ile Met Arg Ala Ser	Gln Asp Asn
1625	1630	1635	
Pro Gln	Asp Gly Ile Met Val	Lys Leu Val Val Asn	Leu Leu Gln
1640	1645	1650	
Leu Ser	Lys Met Ala Ile Asn	His Thr Gly Glu Lys	Glu Val Leu
1655	1660	1665	
Glu Ala	Val Gly Ser Cys Leu	Gly Glu Val Gly Pro	Ile Asp Phe
1670	1675	1680	
Ser Thr	Ile Ala Ile Gln His	Ser Lys Asp Ala Ser	Tyr Thr Lys
1685	1690	1695	
Ala Leu	Lys Leu Phe Glu Asp	Lys Glu Leu Gln Trp	Thr Phe Ile

1700	1705	1710
Met Leu Thr Tyr Leu Asn Asn Thr Leu Val Glu Asp Cys Val Lys		
1715	1720	1725
Val Arg Ser Ala Ala Val Thr Cys Leu Lys Asn Ile Leu Ala Thr		
1730	1735	1740
Lys Thr Gly His Ser Phe Trp Glu Ile Tyr Lys Met Thr Thr Asp		
1745	1750	1755
Pro Met Leu Ala Tyr Leu Gln Pro Phe Arg Thr Ser Arg Lys Lys		
1760	1765	1770
Phe Leu Glu Val Pro Arg Phe Asp Lys Glu Asn Pro Phe Glu Gly		
1775	1780	1785
Leu Asp Asp Ile Asn Leu Trp Ile Pro Leu Ser Glu Asn His Asp		
1790	1795	1800
Ile Trp Ile Lys Thr Leu Thr Cys Ala Phe Leu Asp Ser Gly Gly		
1805	1810	1815
Thr Lys Cys Glu Ile Leu Gln Leu Leu Lys Pro Met Cys Glu Val		
1820	1825	1830
Lys Thr Asp Phe Cys Gln Thr Val Leu Pro Tyr Leu Ile His Asp		
1835	1840	1845
Ile Leu Leu Gln Asp Thr Asn Glu Ser Trp Arg Asn Leu Leu Ser		
1850	1855	1860
Thr His Val Gln Gly Phe Phe Thr Ser Cys Leu Arg His Phe Ser		
1865	1870	1875
Gln Thr Ser Arg Ser Thr Thr Pro Ala Asn Leu Asp Ser Glu Ser		
1880	1885	1890
Glu His Phe Phe Arg Cys Cys Leu Asp Lys Lys Ser Gln Arg Thr		
1895	1900	1905
Met Leu Ala Val Val Asp Tyr Met Arg Arg Gln Lys Arg Pro Ser		
1910	1915	1920
Ser Gly Thr Ile Phe Asn Asp Ala Phe Trp Leu Asp Leu Asn Tyr		
1925	1930	1935
Leu Glu Val Ala Lys Val Ala Gln Ser Cys Ala Ala His Phe Thr		
1940	1945	1950
Ala Leu Leu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Lys Ser Met Asp		
1955	1960	1965
Asp Gln Glu Lys Arg Ser Leu Ala Phe Glu Glu Gly Ser Gln Ser		
1970	1975	1980
Thr Thr Ile Ser Ser Leu Ser Glu Lys Ser Lys Glu Glu Thr Gly		
1985	1990	1995

Ile Ser	Leu Gln Asp Leu Leu	Leu Glu Ile Tyr Arg	Ser Ile Gly
2000	2005	2010	
Glu Pro	Asp Ser Leu Tyr Gly	Cys Gly Gly Gly Lys	Met Leu Gln
2015	2020	2025	
Pro Ile	Thr Arg Leu Arg Thr	Tyr Glu His Glu Ala	Met Trp Gly
2030	2035	2040	
Lys Ala	Leu Val Thr Tyr Asp	Leu Glu Thr Ala Ile	Pro Ser Ser
2045	2050	2055	
Thr Arg	Gln Ala Gly Ile Ile	Gln Ala Leu Gln Asn	Leu Gly Leu
2060	2065	2070	
Cys His	Ile Leu Ser Val Tyr	Leu Lys Gly Leu Asp	Tyr Glu Asn
2075	2080	2085	
Lys Asp	Trp Cys Pro Glu Leu	Glu Glu Leu His Tyr	Gln Ala Ala
2090	2095	2100	
Trp Arg	Asn Met Gln Trp Asp	His Cys Thr Ser Val	Ser Lys Glu
2105	2110	2115	
Val Glu	Gly Thr Ser Tyr His	Glu Ser Leu Tyr Asn	Ala Leu Gln
2120	2125	2130	
Ser Leu	Arg Asp Arg Glu Phe	Ser Thr Phe Tyr Glu	Ser Leu Lys
2135	2140	2145	
Tyr Ala	Arg Val Lys Glu Val	Glu Glu Met Cys Lys	Arg Ser Leu
2150	2155	2160	
Glu Ser	Val Tyr Ser Leu Tyr	Pro Thr Leu Ser Arg	Leu Gln Ala
2165	2170	2175	
Ile Gly	Glu Leu Glu Ser Ile	Gly Glu Leu Phe Ser	Arg Ser Val
2180	2185	2190	
Thr His	Arg Gln Leu Ser Glu	Val Tyr Ile Lys Trp	Gln Lys His
2195	2200	2205	
Ser Gln	Leu Leu Lys Asp Ser	Asp Phe Ser Phe Gln	Glu Pro Ile
2210	2215	2220	
Met Ala	Leu Arg Thr Val Ile	Leu Glu Ile Leu Met	Glu Lys Glu
2225	2230	2235	
Met Asp	Asn Ser Gln Arg Glu	Cys Ile Lys Asp Ile	Leu Thr Lys
2240	2245	2250	
His Leu	Val Glu Leu Ser Ile	Leu Ala Arg Thr Phe	Lys Asn Thr
2255	2260	2265	
Gln Leu	Pro Glu Arg Ala Ile	Phe Gln Ile Lys Gln	Tyr Asn Ser
2270	2275	2280	
Val Ser	Cys Gly Val Ser Glu	Trp Gln Leu Glu Glu	Ala Gln Val

2285	2290	2295
Phe Trp Ala Lys Lys Glu Gln Ser Leu Ala Leu Ser Ile Leu Lys		
2300	2305	2310
Gln Met Ile Lys Lys Leu Asp Ala Ser Cys Ala Ala Asn Asn Pro		
2315	2320	2325
Ser Leu Lys Leu Thr Tyr Thr Glu Cys Leu Arg Val Cys Gly Asn		
2330	2335	2340
Trp Leu Ala Glu Thr Cys Leu Glu Asn Pro Ala Val Ile Met Gln		
2345	2350	2355
Thr Tyr Leu Glu Lys Ala Val Glu Val Ala Gly Asn Tyr Asp Gly		
2360	2365	2370
Glu Ser Ser Asp Glu Leu Arg Asn Gly Lys Met Lys Ala Phe Leu		
2375	2380	2385
Ser Leu Ala Arg Phe Ser Asp Thr Gln Tyr Gln Arg Ile Glu Asn		
2390	2395	2400
Tyr Met Lys Ser Ser Glu Phe Glu Asn Lys Gln Ala Leu Leu Lys		
2405	2410	2415
Arg Ala Lys Glu Glu Val Gly Leu Leu Arg Glu His Lys Ile Gln		
2420	2425	2430
Thr Asn Arg Tyr Thr Val Lys Val Gln Arg Glu Leu Glu Leu Asp		
2435	2440	2445
Glu Leu Ala Leu Arg Ala Leu Lys Glu Asp Arg Lys Arg Phe Leu		
2450	2455	2460
Cys Lys Ala Val Glu Asn Tyr Ile Asn Cys Leu Leu Ser Gly Glu		
2465	2470	2475
Glu His Asp Met Trp Val Phe Arg Leu Cys Ser Leu Trp Leu Glu		
2480	2485	2490
Asn Ser Gly Val Ser Glu Val Asn Gly Met Met Lys Arg Asp Gly		
2495	2500	2505
Met Lys Ile Pro Thr Tyr Lys Phe Leu Pro Leu Met Tyr Gln Leu		
2510	2515	2520
Ala Ala Arg Met Gly Thr Lys Met Met Gly Gly Leu Gly Phe His		
2525	2530	2535
Glu Val Leu Asn Asn Leu Ile Ser Arg Ile Ser Met Asp His Pro		
2540	2545	2550
His His Thr Leu Phe Ile Ile Leu Ala Leu Ala Asn Ala Asn Arg		
2555	2560	2565
Asp Glu Phe Leu Thr Lys Pro Glu Val Ala Arg Arg Ser Arg Ile		
2570	2575	2580

Thr Lys	Asn Val	Pro Lys	Gln Ser	Ser Ser	Gln Leu	Asp Glu	Asp Arg	2585	2590	2595
Thr Glu	Ala Ala	Asn Arg	Ile Ile	Cys Thr	Ile Arg	Ser Arg	Arg Arg	2600	2605	2610
Pro Gln	Met Val	Arg Ser	Val Glu	Ala Leu	Cys Asp	Ala Tyr	Ile Ile	2615	2620	2625
Ile Leu	Ala Asn	Leu Asp	Ala Thr	Gln Trp	Lys Thr	Gln Arg	Lys Ile	2630	2635	2640
Gly Ile	Asn Ile	Pro Ala	Asp Gln	Pro Ile	Thr Lys	Leu Lys	Asn Ile	2645	2650	2655
Leu Glu	Asp Val	Val Val	Pro Thr	Met Glu	Ile Lys	Val Asp	His Ile	2660	2665	2670
Thr Gly	Glu Tyr	Gly Asn	Leu Val	Thr Ile	Gln Ser	Phe Lys	Ala Ile	2675	2680	2685
Glu Phe	Arg Leu	Ala Gly	Gly Val	Asn Leu	Pro Lys	Ile Ile	Asp Ile	2690	2695	2700
Cys Val	Gly Ser	Asp Gly	Lys Glu	Arg Arg	Gln Leu	Val Lys	Gly Ile	2705	2710	2715
Arg Asp	Asp Leu	Arg Gln	Asp Ala	Val Met	Gln Gln	Val Phe	Gln Ile	2720	2725	2730
Met Cys	Asn Thr	Leu Leu	Gln Arg	Asn Thr	Glu Thr	Arg Lys	Arg Ile	2735	2740	2745
Lys Leu	Thr Ile	Cys Thr	Tyr Lys	Val Val	Pro Leu	Ser Gln	Arg Ile	2750	2755	2760
Ser Gly	Val Leu	Glu Trp	Cys Thr	Gly Thr	Val Pro	Ile Gly	Glu Ile	2765	2770	2775
Phe Leu	Val Asn	Asn Glu	Asp Gly	Ala His	Lys Arg	Tyr Arg	Pro Ile	2780	2785	2790
Asn Asp	Phe Ser	Ala Phe	Gln Cys	Gln Lys	Lys Met	Met Glu	Val Ile	2795	2800	2805
Gln Lys	Lys Ser	Phe Glu	Glu Lys	Tyr Glu	Val Phe	Met Asp	Val Ile	2810	2815	2820
Cys Gln	Asn Phe	Gln Pro	Val Phe	Arg Tyr	Phe Cys	Met Glu	Lys Ile	2825	2830	2835
Phe Leu	Asp Pro	Ala Ile	Trp Phe	Glu Lys	Arg Leu	Ala Tyr	Thr Ile	2840	2845	2850
Arg Ser	Val Ala	Thr Ser	Ser Ile	Val Gly	Tyr Ile	Leu Gly	Leu Ile	2855	2860	2865
Gly Asp	Arg His	Val Gln	Asn Ile	Leu Ile	Asn Glu	Gln Ser	Ala Ile			

2870	2875	2880
Glu Leu Val His Ile Asp Leu Gly Val Ala Phe Glu Gln Gly Lys		
2885	2890	2895
Ile Leu Pro Thr Pro Glu Thr Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Asp		
2900	2905	2910
Ile Val Asp Gly Met Gly Ile Thr Gly Val Glu Gly Val Phe Arg		
2915	2920	2925
Arg Cys Cys Glu Lys Thr Met Glu Val Met Arg Asn Ser Gln Glu		
2930	2935	2940
Thr Leu Leu Thr Ile Val Glu Val Leu Leu Tyr Asp Pro Leu Phe		
2945	2950	2955
Asp Trp Thr Met Asn Pro Leu Lys Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Arg		
2960	2965	2970
Pro Glu Asp Glu Thr Glu Leu His Pro Thr Leu Asn Ala Asp Asp		
2975	2980	2985
Gln Glu Cys Lys Arg Asn Leu Ser Asp Ile Asp Gln Ser Phe Asn		
2990	2995	3000
Lys Val Ala Glu Arg Val Leu Met Arg Leu Gln Glu Lys Leu Lys		
3005	3010	3015
Gly Val Glu Glu Gly Thr Val Leu Ser Val Gly Gly Gln Val Asn		
3020	3025	3030
Leu Leu Ile Gln Gln Ala Ile Asp Pro Lys Asn Leu Ser Arg Leu		
3035	3040	3045
Phe Pro Gly Trp Lys Ala Trp Val		
3050	3055	
<210> 5		
<211> 1130		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 5		
Met Leu Glu Ile Cys Leu Lys Leu Val Gly Cys Lys Ser Lys Lys Gly		
1	5	10
Leu Ser Ser Ser Ser Ser Cys Tyr Leu Glu Glu Ala Leu Gln Arg Pro		
	20	30
Val Ala Ser Asp Phe Glu Pro Gln Gly Leu Ser Glu Ala Ala Arg Trp		
	35	45
Asn Ser Lys Glu Asn Leu Leu Ala Gly Pro Ser Glu Asn Asp Pro Asn		
	50	60
Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Phe Val Ala Ser Gly Asp Asn Thr Leu		

65	70	75	80
Ser Ile Thr Lys Gly Glu Lys Leu Arg Val Leu Gly Tyr Asn His Asn			
	85	90	95
Gly Glu Trp Cys Glu Ala Gln Thr Lys Asn Gly Gln Gly Trp Val Pro			
	100	105	110
Ser Asn Tyr Ile Thr Pro Val Asn Ser Leu Glu Lys His Ser Trp Tyr			
	115	120	125
His Gly Pro Val Ser Arg Asn Ala Ala Glu Tyr Leu Leu Ser Ser Gly			
	130	135	140
Ile Asn Gly Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Glu Ser Ser Pro Gly Gln			
145	150	155	160
Arg Ser Ile Ser Leu Arg Tyr Glu Gly Arg Val Tyr His Tyr Arg Ile			
	165	170	175
Asn Thr Ala Ser Asp Gly Lys Leu Tyr Val Ser Ser Glu Ser Arg Phe			
	180	185	190
Asn Thr Leu Ala Glu Leu Val His His His Ser Thr Val Ala Asp Gly			
	195	200	205
Leu Ile Thr Thr Leu His Tyr Pro Ala Pro Lys Arg Asn Lys Pro Thr			
	210	215	220
Val Tyr Gly Val Ser Pro Asn Tyr Asp Lys Trp Glu Met Glu Arg Thr			
225	230	235	240
Asp Ile Thr Met Lys His Lys Leu Gly Gly Gly Gln Tyr Gly Glu Val			
	245	250	255
Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys Tyr Ser Leu Thr Val Ala Val Lys Thr			
	260	265	270
Leu Lys Glu Asp Thr Met Glu Val Glu Glu Phe Leu Lys Glu Ala Ala			
	275	280	285
Val Met Lys Glu Ile Lys His Pro Asn Leu Val Gln Leu Leu Gly Val			
	290	295	300
Cys Thr Arg Glu Pro Pro Phe Tyr Ile Ile Thr Glu Phe Met Thr Tyr			
305	310	315	320
Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu Arg Glu Cys Asn Arg Gln Glu Val Asn			
	325	330	335
Ala Val Val Leu Leu Tyr Met Ala Thr Gln Ile Ser Ser Ala Met Glu			
	340	345	350
Tyr Leu Glu Lys Lys Asn Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn			
	355	360	365
Cys Leu Val Gly Glu Asn His Leu Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu			
	370	375	380

Ser Arg Leu Met Thr Gly Asp Thr Tyr Thr Ala His Ala Gly Ala Lys  
 385 390 395 400  
 Phe Pro Ile Lys Trp Thr Ala Pro Glu Ser Leu Ala Tyr Asn Lys Phe  
 405 410 415  
 Ser Ile Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile  
 420 425 430  
 Ala Thr Tyr Gly Met Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Asp Leu Ser Gln Val  
 435 440 445  
 Tyr Glu Leu Leu Glu Lys Asp Tyr Arg Met Glu Arg Pro Glu Gly Cys  
 450 455 460  
 Pro Glu Lys Val Tyr Glu Leu Met Arg Ala Cys Trp Gln Trp Asn Pro  
 465 470 475 480  
 Ser Asp Arg Pro Ser Phe Ala Glu Ile His Gln Ala Phe Glu Thr Met  
 485 490 495  
 Phe Gln Glu Ser Ser Ile Ser Asp Glu Val Glu Lys Glu Leu Gly Lys  
 500 505 510  
 Gln Gly Val Arg Gly Ala Val Ser Thr Leu Leu Gln Ala Pro Glu Leu  
 515 520 525  
 Pro Thr Lys Thr Arg Thr Ser Arg Arg Ala Ala Glu His Arg Asp Thr  
 530 535 540  
 Thr Asp Val Pro Glu Met Pro His Ser Lys Gly Gln Gly Glu Ser Asp  
 545 550 555 560  
 Pro Leu Asp His Glu Pro Ala Val Ser Pro Leu Leu Pro Arg Lys Glu  
 565 570 575  
 Arg Gly Pro Pro Glu Gly Gly Leu Asn Glu Asp Glu Arg Leu Leu Pro  
 580 585 590  
 Lys Asp Lys Lys Thr Asn Leu Phe Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys  
 595 600 605  
 Lys Thr Ala Pro Thr Pro Pro Lys Arg Ser Ser Ser Phe Arg Glu Met  
 610 615 620  
 Asp Gly Gln Pro Glu Arg Arg Gly Ala Gly Glu Glu Glu Gly Arg Asp  
 625 630 635 640  
 Ile Ser Asn Gly Ala Leu Ala Phe Thr Pro Leu Asp Thr Ala Asp Pro  
 645 650 655  
 Ala Lys Ser Pro Lys Pro Ser Asn Gly Ala Gly Val Pro Asn Gly Ala  
 660 665 670  
 Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ser Gly Phe Arg Ser Pro His Leu Trp Lys  
 675 680 685  
 Lys Ser Ser Thr Leu Thr Ser Ser Arg Leu Ala Thr Gly Glu Glu Glu

690	695	700
Gly Gly Gly Ser Ser Ser Lys Arg Phe Leu Arg Ser Cys Ser Ala Ser		
705	710	715
Cys Val Pro His Gly Ala Lys Asp Thr Glu Trp Arg Ser Val Thr Leu		
	725	730
Pro Arg Asp Leu Gln Ser Thr Gly Arg Gln Phe Asp Ser Ser Thr Phe		
	740	745
Gly Gly His Lys Ser Glu Lys Pro Ala Leu Pro Arg Lys Arg Ala Gly		
	755	760
Glu Asn Arg Ser Asp Gln Val Thr Arg Gly Thr Val Thr Pro Pro Pro		
	770	780
Arg Leu Val Lys Lys Asn Glu Glu Ala Ala Asp Glu Val Phe Lys Asp		
785	790	795
Ile Met Glu Ser Ser Pro Gly Ser Ser Pro Pro Asn Leu Thr Pro Lys		
	805	810
Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ala Pro Ala Ser Gly Leu Pro His		
	820	825
Lys Glu Glu Ala Gly Lys Gly Ser Ala Leu Gly Thr Pro Ala Ala Ala		
	835	840
Glu Pro Val Thr Pro Thr Ser Lys Ala Gly Ser Gly Ala Pro Gly Gly		
	850	855
Thr Ser Lys Gly Pro Ala Glu Glu Ser Arg Val Arg Arg His Lys His		
865	870	875
Ser Ser Glu Ser Pro Gly Arg Asp Lys Gly Lys Leu Ser Arg Leu Lys		
	885	890
Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ser Ala Gly Lys Ala Gly Gly		
	900	905
Lys Pro Ser Gln Ser Pro Ser Gln Glu Ala Ala Gly Glu Ala Val Leu		
	915	920
Gly Ala Lys Thr Lys Ala Thr Ser Leu Val Asp Ala Val Asn Ser Asp		
	930	935
Ala Ala Lys Pro Ser Gln Pro Gly Glu Gly Leu Lys Lys Pro Val Leu		
945	950	955
Pro Ala Thr Pro Lys Pro Gln Ser Ala Lys Pro Ser Gly Thr Pro Ile		
	965	970
Ser Pro Ala Pro Val Pro Ser Thr Leu Pro Ser Ala Ser Ser Ala Leu		
	980	985
Ala Gly Asp Gln Pro Ser Ser Thr Ala Phe Ile Pro Leu Ile Ser Thr		
	995	1000
		1005

Arg Val Ser Leu Arg Lys Thr Arg Gln Pro Pro Glu Arg Ile Ala  
 1010 1015 1020  
 Ser Gly Ala Ile Thr Lys Gly Val Val Leu Asp Ser Thr Glu Ala  
 1025 1030 1035  
 Leu Cys Leu Ala Ile Ser Arg Asn Ser Glu Gln Met Ala Ser His  
 1040 1045 1050  
 Ser Ala Val Leu Glu Ala Gly Lys Asn Leu Tyr Thr Phe Cys Val  
 1055 1060 1065  
 Ser Tyr Val Asp Ser Ile Gln Gln Met Arg Asn Lys Phe Ala Phe  
 1070 1075 1080  
 Arg Glu Ala Ile Asn Lys Leu Glu Asn Asn Leu Arg Glu Leu Gln  
 1085 1090 1095  
 Ile Cys Pro Ala Thr Ala Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Gln Asp  
 1100 1105 1110  
 Phe Ser Lys Leu Leu Ser Ser Val Lys Glu Ile Ser Asp Ile Val  
 1115 1120 1125  
 Gln Arg  
 1130  
 <210> 6  
 <211> 707  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 6  
 Met Asn Gln Glu Leu Leu Ser Val Gly Ser Lys Arg Arg Arg Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Gly Asn Pro Ser Ser Ser Gln Val Asp Glu Glu Gln  
 20 25 30  
 Met Asn Arg Val Val Glu Glu Glu Gln Gln Gln Gln Leu Arg Gln Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Glu His Thr Ala Arg Asn Gly Glu Val Val Gly Val Glu Pro  
 50 55 60  
 Arg Pro Gly Gly Gln Asn Asp Ser Gln Gln Gly Gln Leu Glu Glu Asn  
 65 70 75 80  
 Asn Asn Arg Phe Ile Ser Val Asp Glu Asp Ser Ser Gly Asn Gln Glu  
 85 90 95  
 Glu Gln Glu Glu Asp Glu Glu His Ala Gly Glu Gln Asp Glu Glu Asp  
 100 105 110  
 Glu Glu Glu Glu Glu Met Asp Gln Glu Ser Asp Asp Phe Asp Gln Ser  
 115 120 125

Asp Asp Ser Ser Arg Glu Asp Glu His Thr His Thr Asn Ser Val Thr  
 130 135 140  
 Asn Ser Ser Ser Ile Val Asp Leu Pro Val His Gln Leu Ser Ser Pro  
 145 150 155 160  
 Phe Tyr Thr Lys Thr Thr Lys Met Lys Arg Lys Leu Asp His Gly Ser  
 165 170 175  
 Glu Val Arg Ser Phe Ser Leu Gly Lys Lys Pro Cys Lys Val Ser Glu  
 180 185 190  
 Tyr Thr Ser Thr Thr Gly Leu Val Pro Cys Ser Ala Thr Pro Thr Thr  
 195 200 205  
 Phe Gly Asp Leu Arg Ala Ala Asn Gly Gln Gly Gln Gln Arg Arg Arg  
 210 215 220  
 Ile Thr Ser Val Gln Pro Pro Thr Gly Leu Gln Glu Trp Leu Lys Met  
 225 230 235 240  
 Phe Gln Ser Trp Ser Gly Pro Glu Lys Leu Leu Ala Leu Asp Glu Leu  
 245 250 255  
 Ile Asp Ser Cys Glu Pro Thr Gln Val Lys His Met Met Gln Val Ile  
 260 265 270  
 Glu Pro Gln Phe Gln Arg Asp Phe Ile Ser Leu Leu Pro Lys Glu Leu  
 275 280 285  
 Ala Leu Tyr Val Leu Ser Phe Leu Glu Pro Lys Asp Leu Leu Gln Ala  
 290 295 300  
 Ala Gln Thr Cys Arg Tyr Trp Arg Ile Leu Ala Glu Asp Asn Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Trp Arg Glu Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ile Asp Glu Pro Leu His Ile  
 325 330 335  
 Lys Arg Arg Lys Val Ile Lys Pro Gly Phe Ile His Ser Pro Trp Lys  
 340 345 350  
 Ser Ala Tyr Ile Arg Gln His Arg Ile Asp Thr Asn Trp Arg Arg Gly  
 355 360 365  
 Glu Leu Lys Ser Pro Lys Val Leu Lys Gly His Asp Asp His Val Ile  
 370 375 380  
 Thr Cys Leu Gln Phe Cys Gly Asn Arg Ile Val Ser Gly Ser Asp Asp  
 385 390 395 400  
 Asn Thr Leu Lys Val Trp Ser Ala Val Thr Gly Lys Cys Leu Arg Thr  
 405 410 415  
 Leu Val Gly His Thr Gly Gly Val Trp Ser Ser Gln Met Arg Asp Asn  
 420 425 430  
 Ile Ile Ile Ser Gly Ser Thr Asp Arg Thr Leu Lys Val Trp Asn Ala

435	440	445
Glu Thr Gly Glu Cys Ile His Thr Leu Tyr Gly His Thr Ser Thr Val		
450	455	460
Arg Cys Met His Leu His Glu Lys Arg Val Val Ser Gly Ser Arg Asp		
465	470	475
Ala Thr Leu Arg Val Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Cys Leu His Val		
485	490	495
Leu Met Gly His Val Ala Ala Val Arg Cys Val Gln Tyr Asp Gly Arg		
500	505	510
Arg Val Val Ser Gly Ala Tyr Asp Phe Met Val Lys Val Trp Asp Pro		
515	520	525
Glu Thr Glu Thr Cys Leu His Thr Leu Gln Gly His Thr Asn Arg Val		
530	535	540
Tyr Ser Leu Gln Phe Asp Gly Ile His Val Val Ser Gly Ser Leu Asp		
545	550	555
Thr Ser Ile Arg Val Trp Asp Val Glu Thr Gly Asn Cys Ile His Thr		
565	570	575
Leu Thr Gly His Gln Ser Leu Thr Ser Gly Met Glu Leu Lys Asp Asn		
580	585	590
Ile Leu Val Ser Gly Asn Ala Asp Ser Thr Val Lys Ile Trp Asp Ile		
595	600	605
Lys Thr Gly Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln Gly Pro Asn Lys His Gln		
610	615	620
Ser Ala Val Thr Cys Leu Gln Phe Asn Lys Asn Phe Val Ile Thr Ser		
625	630	635
Ser Asp Asp Gly Thr Val Lys Leu Trp Asp Leu Lys Thr Gly Glu Phe		
645	650	655
Ile Arg Asn Leu Val Thr Leu Glu Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Val		
660	665	670
Trp Arg Ile Arg Ala Ser Asn Thr Lys Leu Val Cys Ala Val Gly Ser		
675	680	685
Arg Asn Gly Thr Glu Glu Thr Lys Leu Leu Val Leu Asp Phe Asp Val		
690	695	700
Asp Met Lys		
705		
<210> 7		
<211> 662		
<212> PRT		
<213> 智人		

&lt;400&gt; 7

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

Asp Ile Gly Gln Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Cys His Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Val Ala Thr Pro Gly Arg Leu Val Asp Met Met Glu Arg Gly Lys Ile  
 325 330 335  
 Gly Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met  
 340 345 350  
 Leu Asp Met Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Arg Ile Val Glu Gln Asp  
 355 360 365  
 Thr Met Pro Pro Lys Gly Val Arg His Thr Met Met Phe Ser Ala Thr  
 370 375 380  
 Phe Pro Lys Glu Ile Gln Met Leu Ala Arg Asp Phe Leu Asp Glu Tyr  
 385 390 395 400  
 Ile Phe Leu Ala Val Gly Arg Val Gly Ser Thr Ser Glu Asn Ile Thr  
 405 410 415  
 Gln Lys Val Val Trp Val Glu Glu Ser Asp Lys Arg Ser Phe Leu Leu  
 420 425 430  
 Asp Leu Leu Asn Ala Thr Gly Lys Asp Ser Leu Thr Leu Val Phe Val  
 435 440 445  
 Glu Thr Lys Lys Gly Ala Asp Ser Leu Glu Asp Phe Leu Tyr His Glu  
 450 455 460  
 Gly Tyr Ala Cys Thr Ser Ile His Gly Asp Arg Ser Gln Arg Asp Arg  
 465 470 475 480  
 Glu Glu Ala Leu His Gln Phe Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ile Leu Val  
 485 490 495  
 Ala Thr Ala Val Ala Ala Arg Gly Leu Asp Ile Ser Asn Val Lys His  
 500 505 510  
 Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Ser Asp Ile Glu Glu Tyr Val His Arg  
 515 520 525  
 Ile Gly Arg Thr Gly Arg Val Gly Asn Leu Gly Leu Ala Thr Ser Phe  
 530 535 540  
 Phe Asn Glu Arg Asn Ile Asn Ile Thr Lys Asp Leu Leu Asp Leu Leu  
 545 550 555 560  
 Val Glu Ala Lys Gln Glu Val Pro Ser Trp Leu Glu Asn Met Ala Tyr  
 565 570 575  
 Glu His His Tyr Lys Gly Ser Ser Arg Gly Arg Ser Lys Ser Ser Arg  
 580 585 590  
 Phe Ser Gly Gly Phe Gly Ala Arg Asp Tyr Arg Gln Ser Ser Gly Ala  
 595 600 605  
 Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Ser Arg Ala Ser Ser Ser Arg Ser Gly



210	215	220
Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His Ile		
225	230	235
Leu Gly Ile Leu Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile Ile		
	245	250
Asn Leu Lys Ala Arg Asn Tyr Leu Leu Ser Leu Pro His Lys Asn Lys		
	260	265
Val Pro Trp Asn Arg Leu Phe Pro Asn Ala Asp Ser Lys Ala Leu Asp		
	275	280
Leu Leu Asp Lys Met Leu Thr Phe Asn Pro His Lys Arg Ile Glu Val		
	290	295
Glu Gln Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro Ser		
305	310	315
Asp Glu Pro Ile Ala Glu Ala Pro Phe Lys Phe Asp Met Glu Leu Asp		
	325	330
Asp Leu Pro Lys Glu Lys Leu Lys Glu Leu Ile Phe Glu Glu Thr Ala		
	340	345
Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser		
	355	360
<210> 9		
<211> 340		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 9		
Met Ser Glu Leu Asp Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Asn		
1	5	10
Gln Ile Arg Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Ala Thr Leu Ser Gln		
	20	25
Ile Thr Asn Asn Ile Asp Pro Val Gly Arg Ile Gln Met Arg Thr Arg		
	35	40
Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Gly		
	50	55
Thr Asp Ser Arg Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile		
65	70	75
Ile Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg		
	85	90
Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val		
	100	105
Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr		

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

Lys Ile Trp Asn

340

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 10

Lys Val Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys

1 5

<210> 11

- <211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 亲本肽  
<400> 11  
Leu Met Pro Lys His Phe Ile Arg  
1 5  
<210> 12  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 错义突变型肽  
<400> 12  
Leu Met Pro Lys Leu Phe Ile Arg  
1 5  
<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 化学合成的肽  
<400> 13  
Ala Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Ile  
1 5  
<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 化学合成的肽  
<400> 14  
Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Thr Ser  
1 5  
<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 15

Ile Leu Leu Met Thr Val Thr Ser Ile

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 16

Leu Leu Met Thr Val Thr Ser Ile Asp

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 17

Leu Met Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 18

Met Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 19

Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 20

Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ala

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 21

Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ala Val

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 22

Ala Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Thr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

<400> 23

Glu Val Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys

1 5

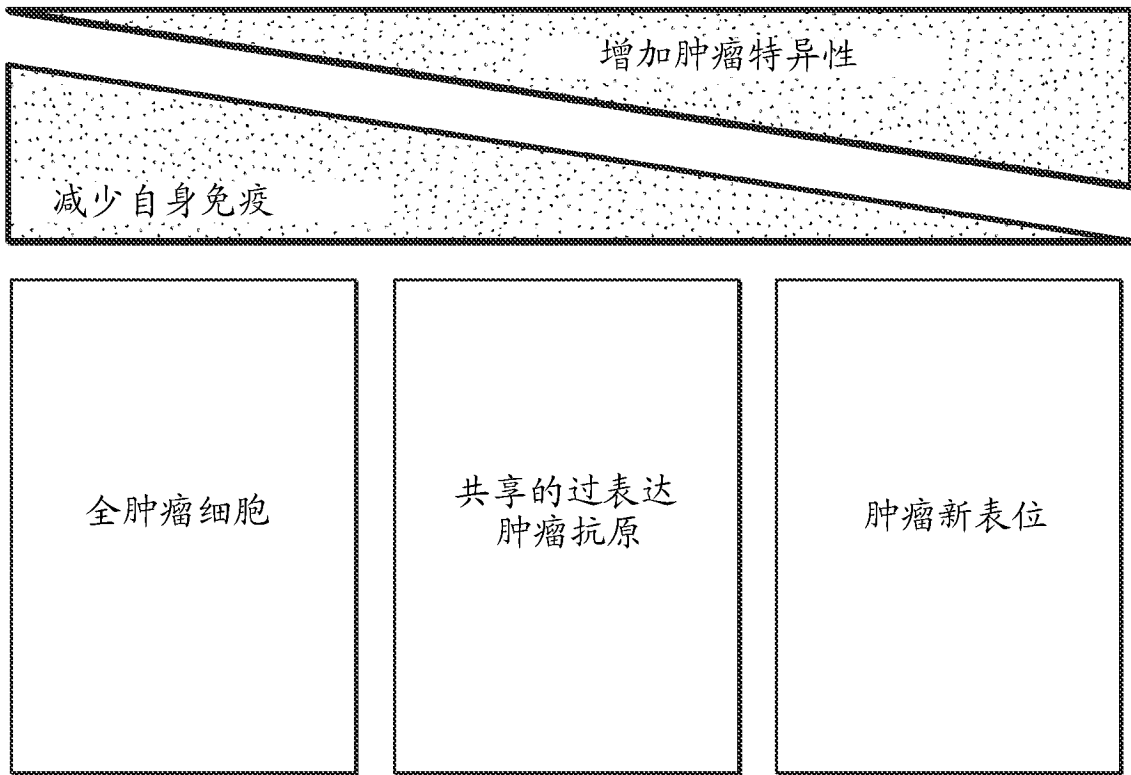


图 1

个人化的新抗原疫苗接种策略

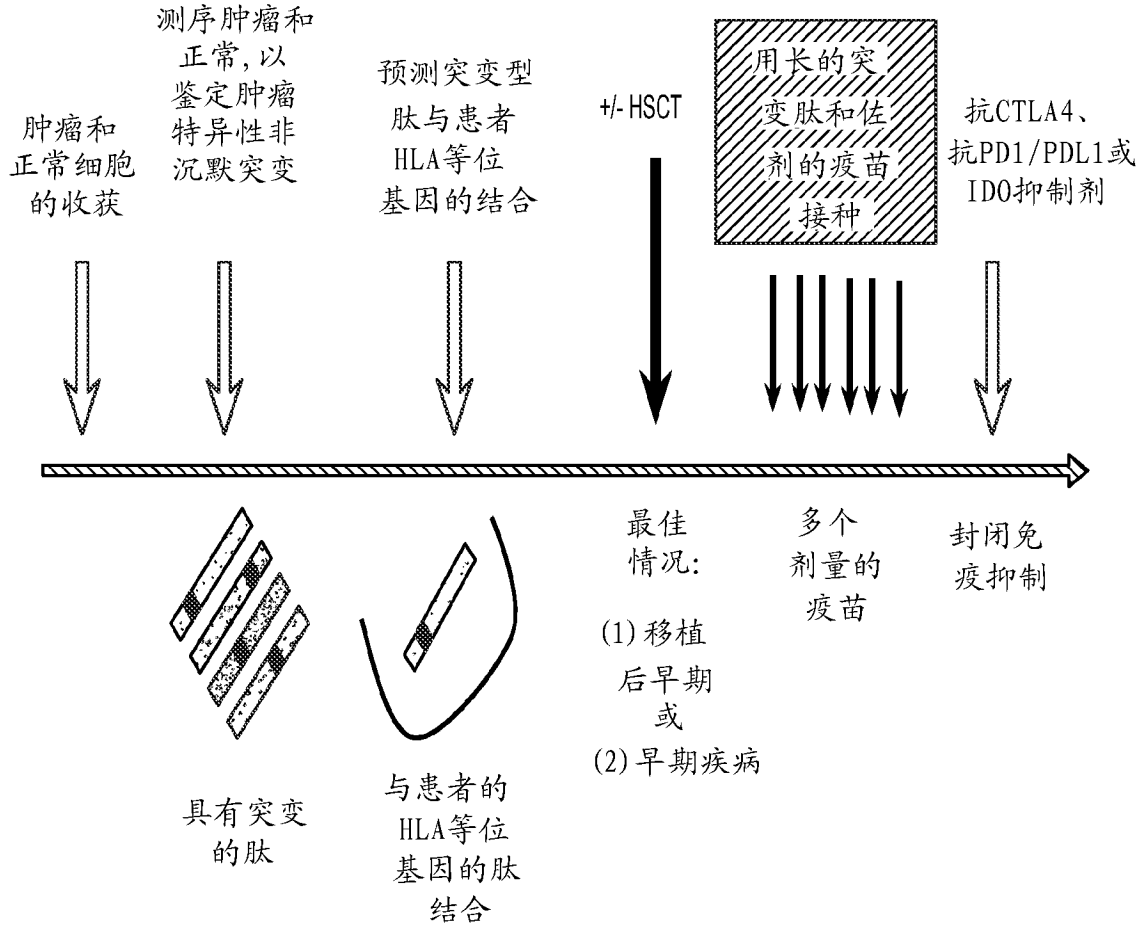


图 2

用于鉴定肿瘤新表位的策略

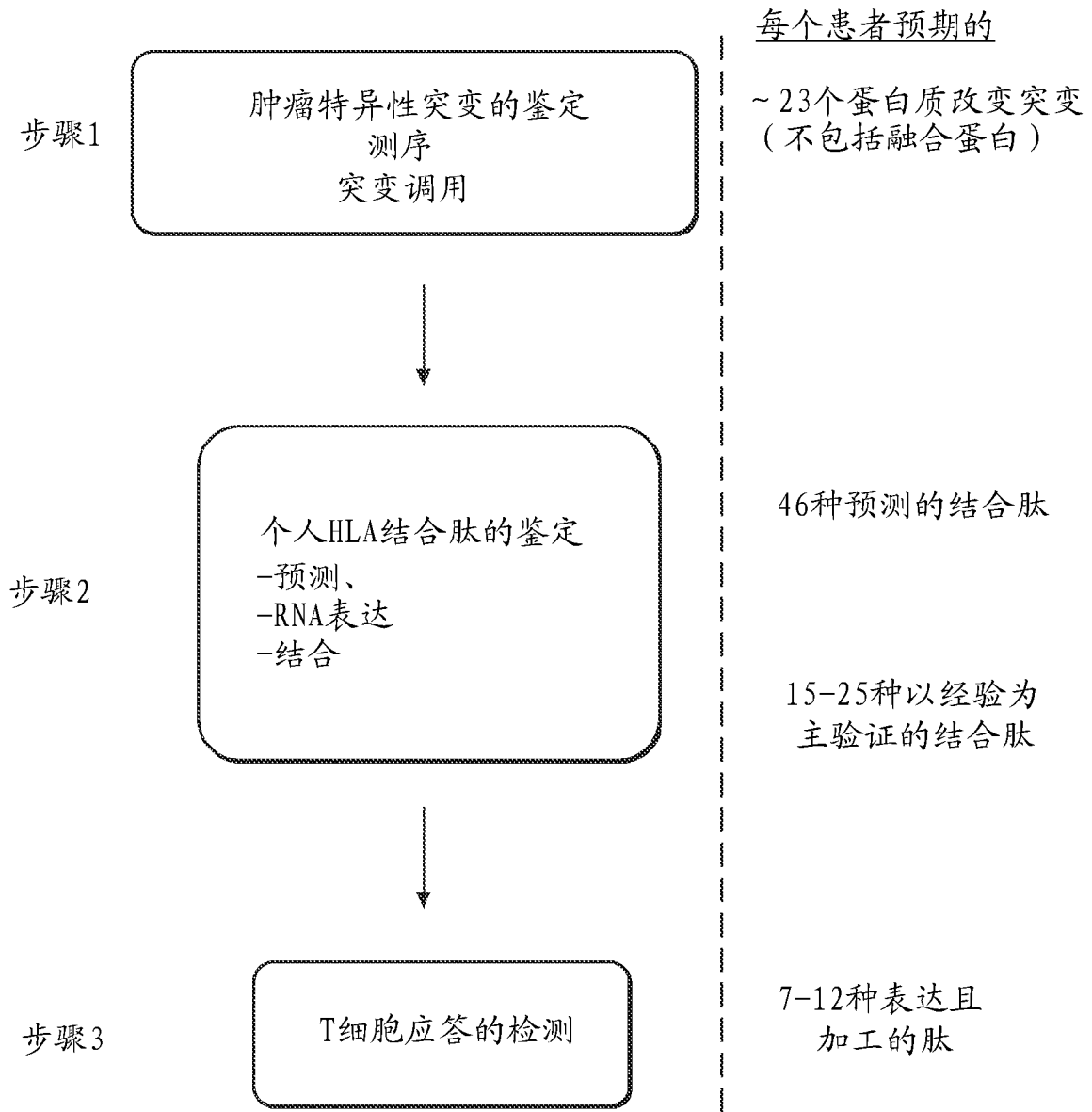


图 3

步骤1: 鉴定5类突变生成潜在的肿瘤新表位

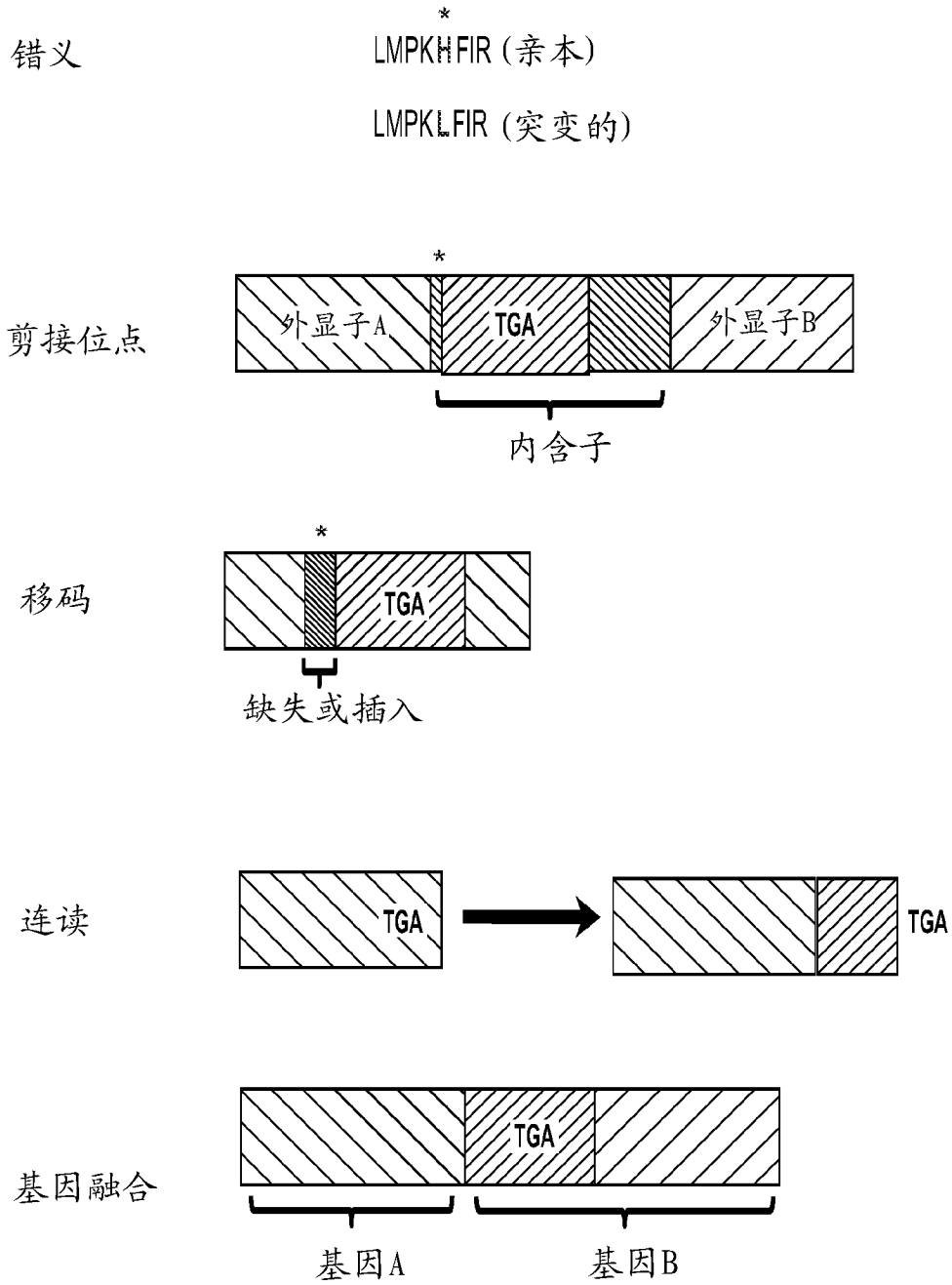


图 4

在CLL患者中每个种类的突变频率

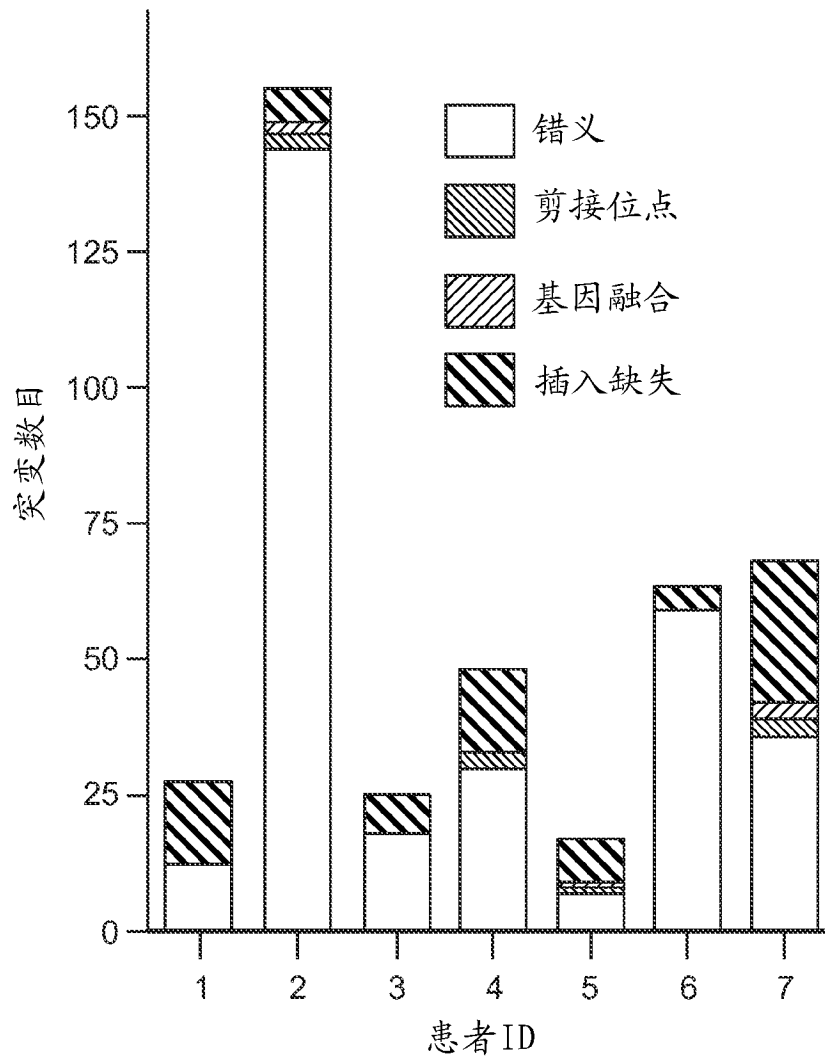


图 5

步骤2A: 针对患者HLA等位基因各自的  
自动化肽预测

非突变的	ASILLMTVI	强结合亲和力 IC <sub>50</sub> < 50nm	中等结合 IC <sub>50</sub> < 500nm
突变的	ASILLMTVT		
突变的	ASILLMTVT		
位置	F2R/NM_001992 T@196		
188-196	ASILLMTVT	23671.85 19359.42 29705.82 33914.47 30813.86 29921.85	
189-197	SILLMTVTS	33864.61 8502.78 32065.73 14437.61 35076.88 31257.98	
190-198	ILLMTVTSI	28921.10 [41.91] 11185.03 921.87 18346.73 13844.36	
191-199	LLMTVTSID	32446.28 6105.16 31413.94 19157.37 42419.53 41446.55	
192-200	LMTVTSIDR	30402.31 33262.16 41747.34 39837.33 37470.89 35512.98	
193-201	MTVTSIDRF	5066.20 17874.71 16830.38 27827.56 7827.33 6665.52	
194-202	TVTSIDRFL	25673.87 10165.34 17459.35 29667.50 19864.06 20854.32	
195-203	VTSIDRFLA	4397.21 7438.75 27799.40 34937.23 34058.25 28879.51	
196-204	TSIDRFLAV	5703.43 527.45 9124.17 [245.43] 11255.57 9553.74	

图 6

步骤2B: 突变基因的RNA表达的证实

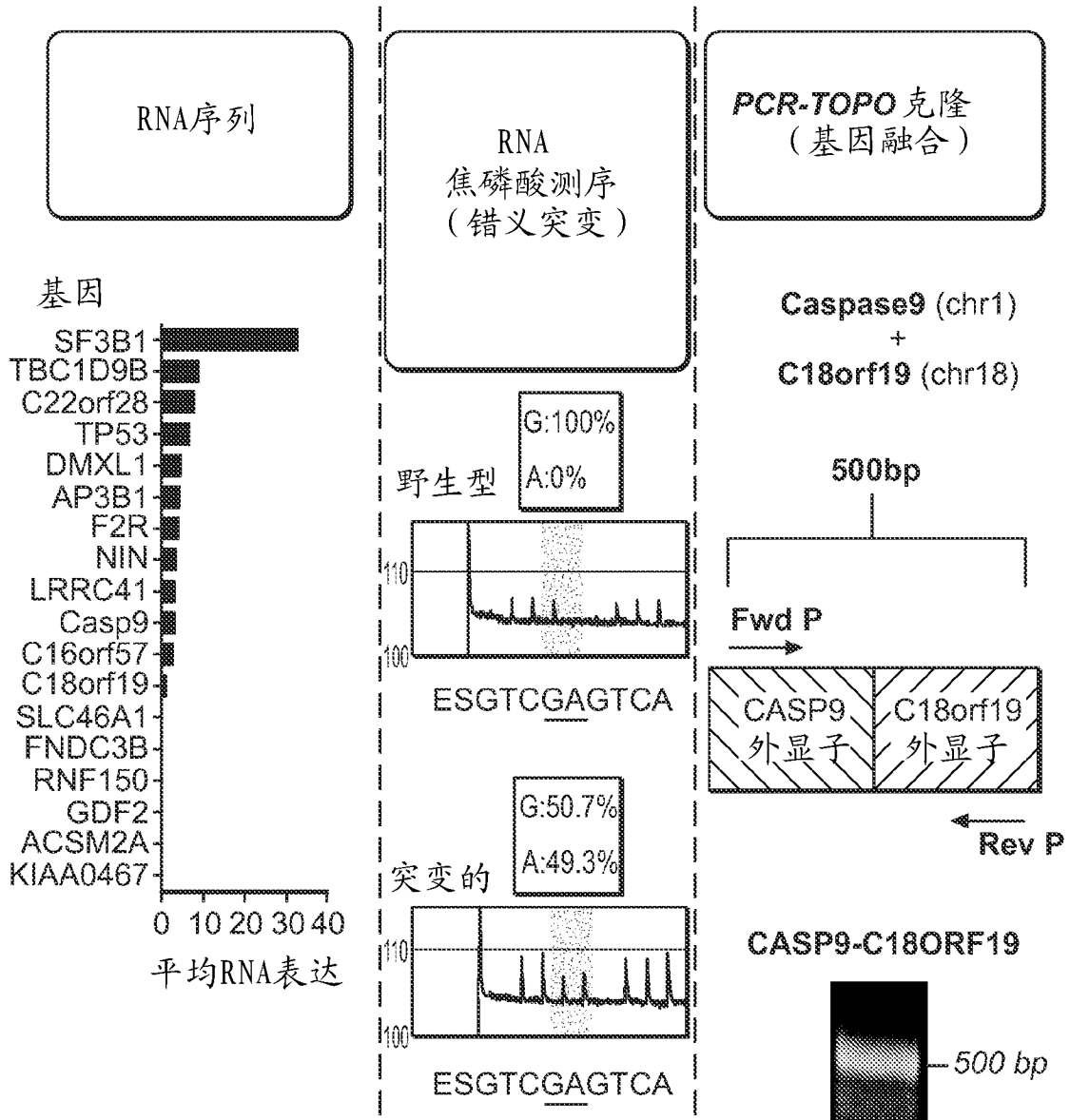


图 7

步骤2C: HLA肽结合的实验验证

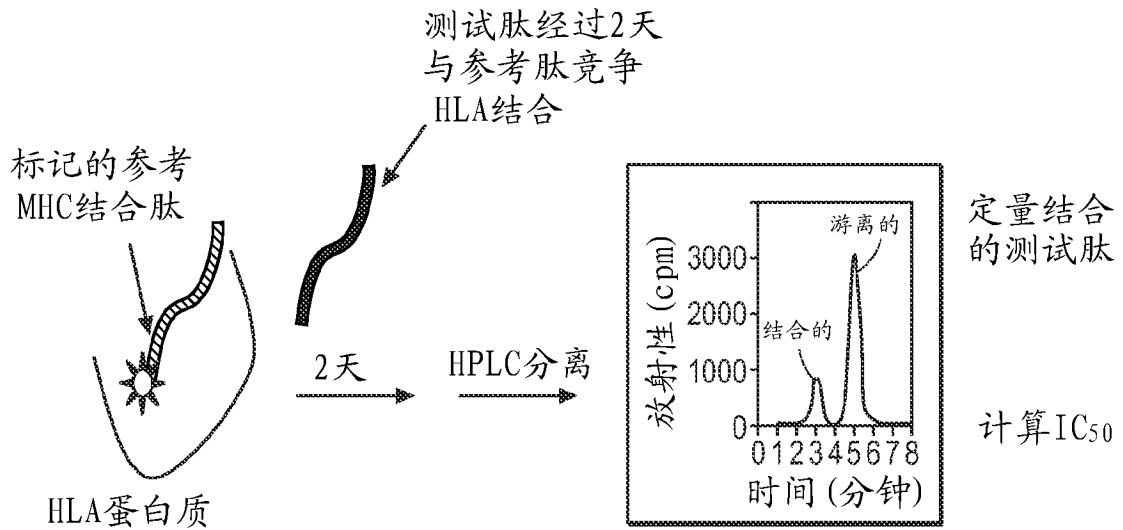


图 8A

患者	遗传改变的种类	突变基因 #	预测为生成HLA结合肽的突变基因 #	预测的肽 #	实验上证实的肽/总共测试的
1	错义	12	10	30	8/17 (47%)
	剪接位点	0	0	0	0
	插入缺失	16	0	0	0
	基因融合				
2	错义	144	53	116	18/29 (46%)
	剪接位点	3	0	0	0
	插入缺失	6	1	11	
	基因融合	2	2	10	7/10 (70%)

图 8B

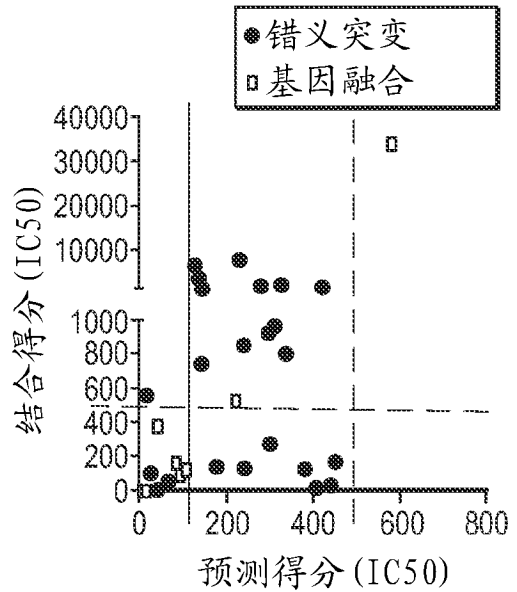


图 8C

突变与种系肽比较与HLA等位基因的预测的差异结合

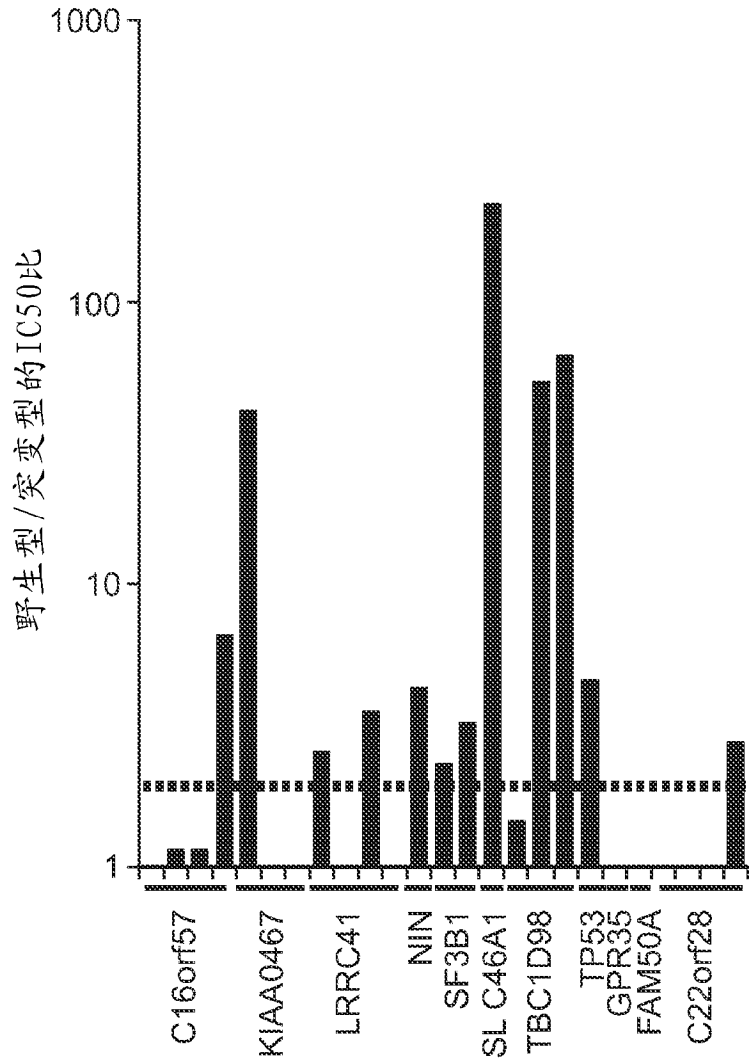


图 9

步骤3: 针对候选个人CLL新表位的T细胞反应性

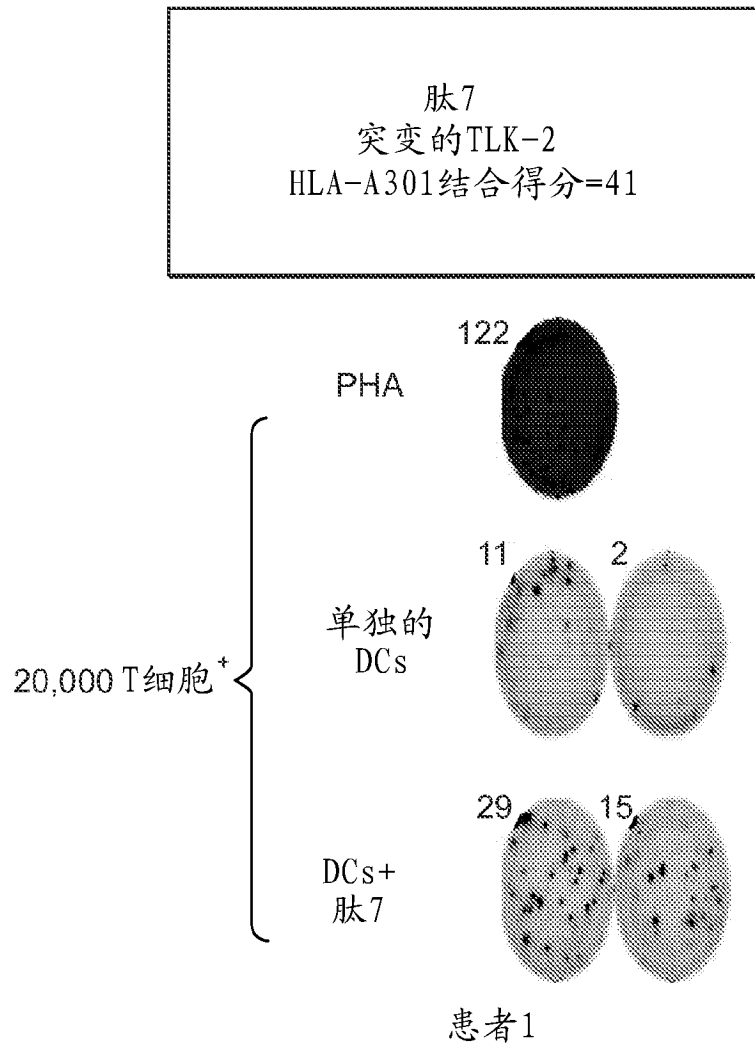


图 10

BCR-ABL突变生成预测为结合HLA-A和HLA-B等位基因的许多肽

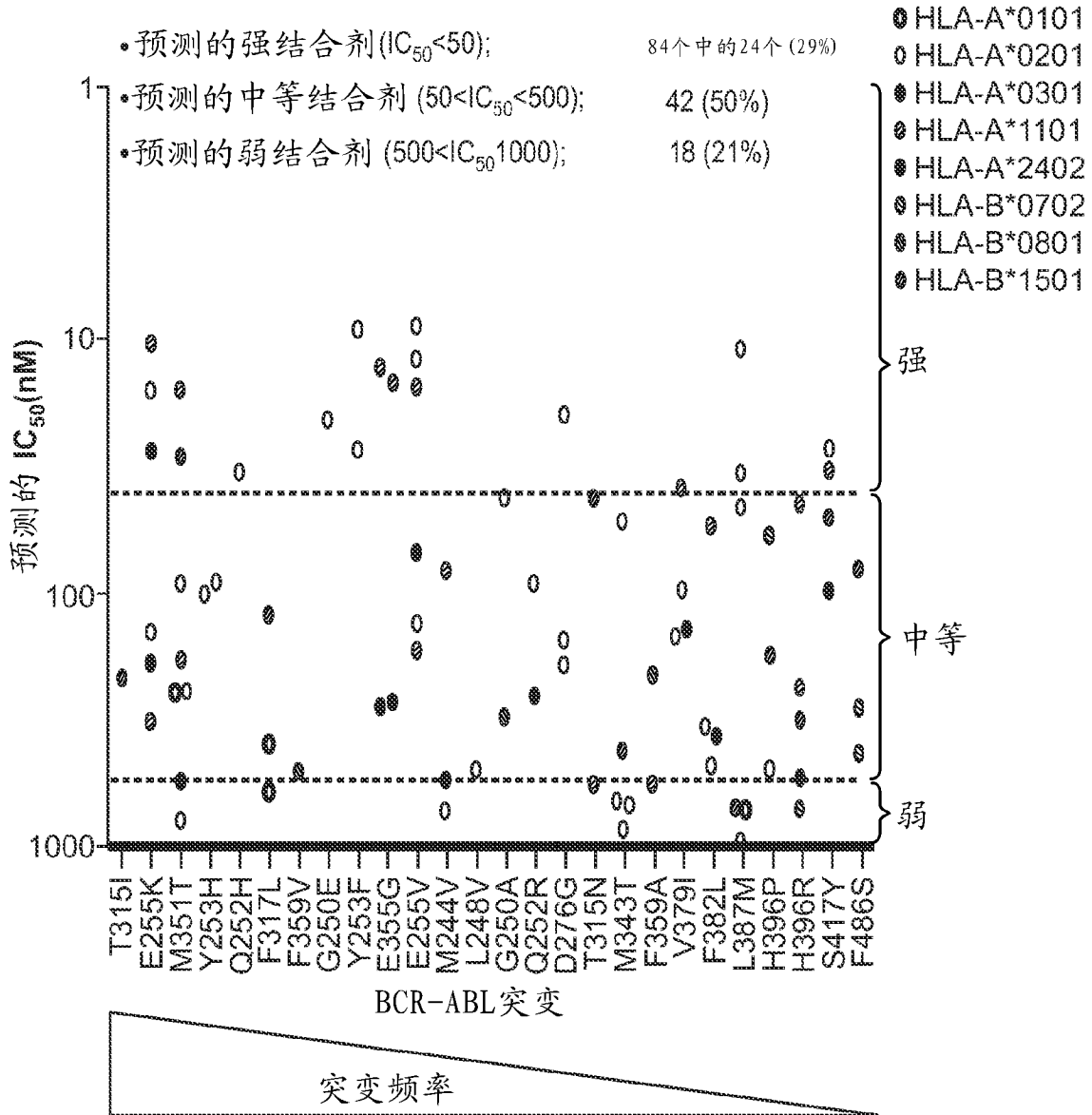


图 11

肽	序列	HLA A03亚型结合容量 (IC50 nM)					
		A*0301	A*1101	A*3001	A*3101	A*3301	A*6801
E255K-亲本的	EVYEGVWKK	1074	63	.	.	60	10
E255K-B	KVYEGVWKK	17	39	603	202	42860	45

图 12A

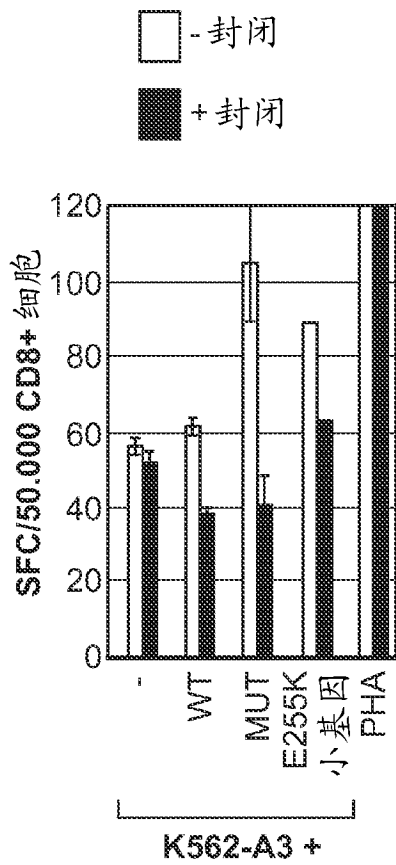


图 12B

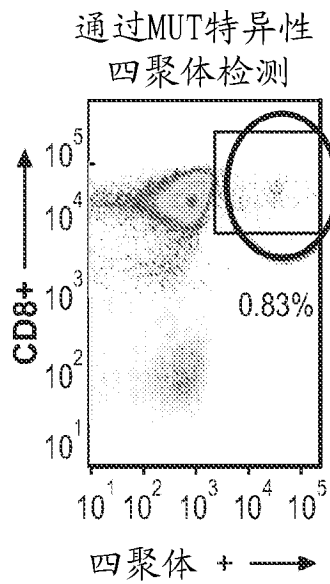


图 12C

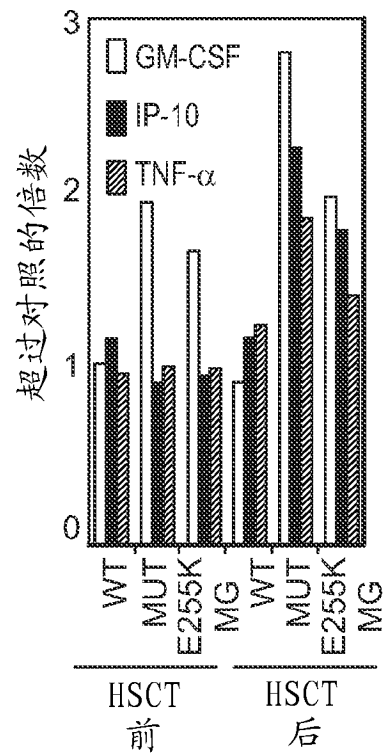


图 12D

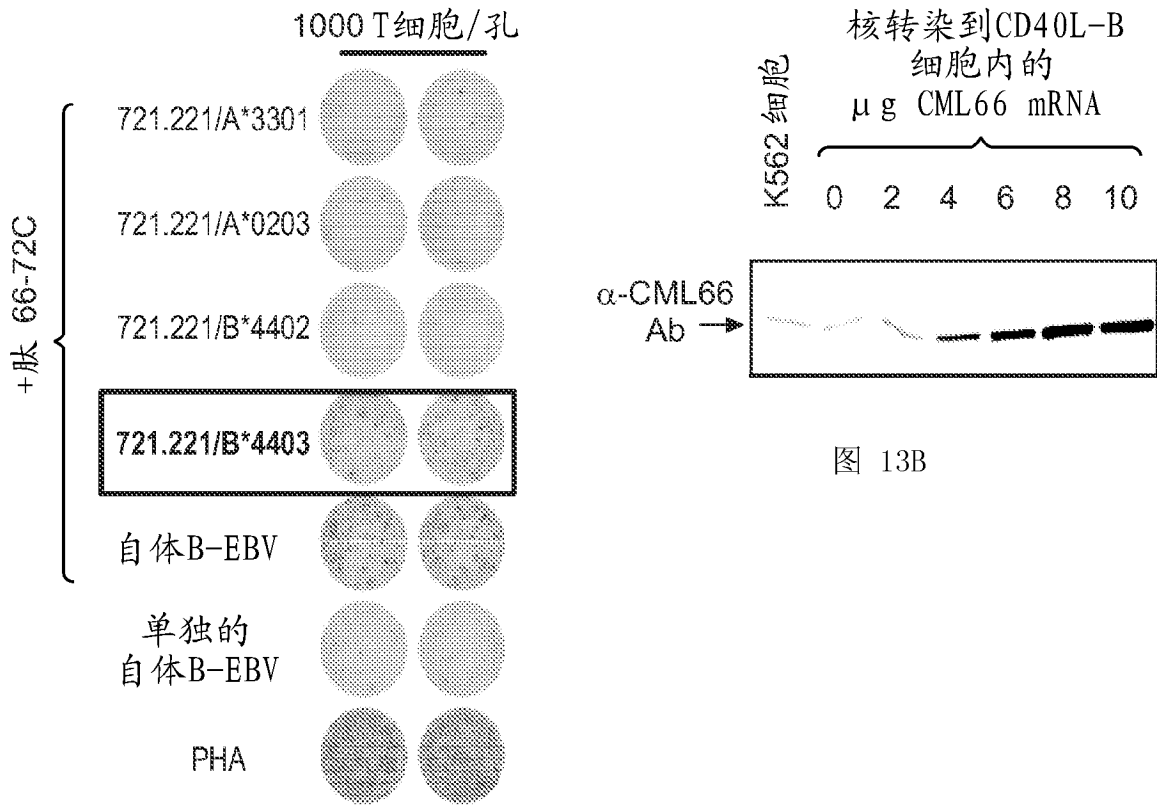


图 13B

图 13A

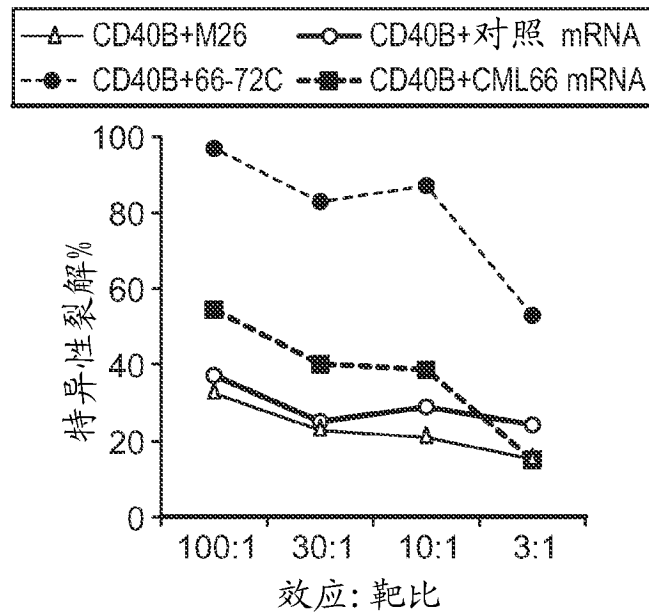


图 13C

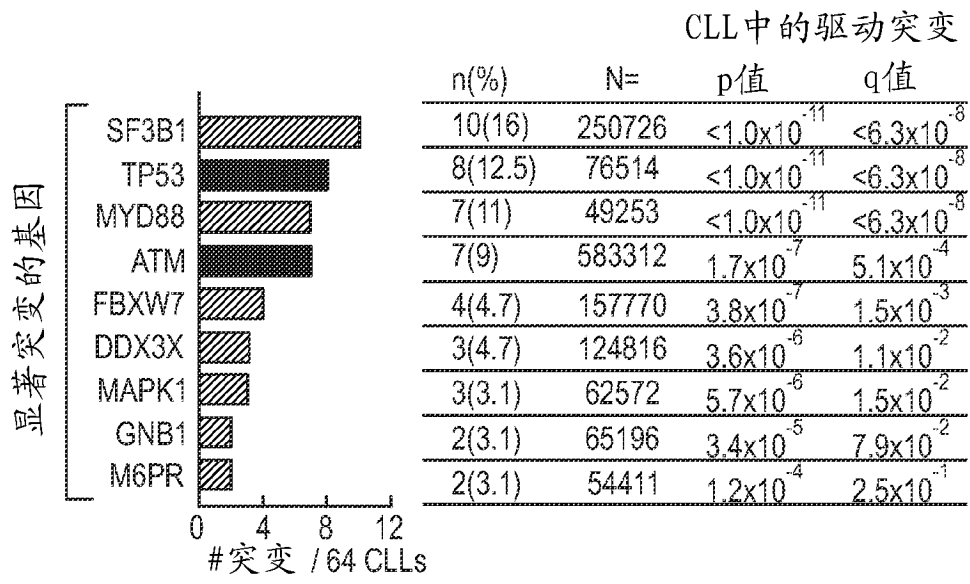


图 14A

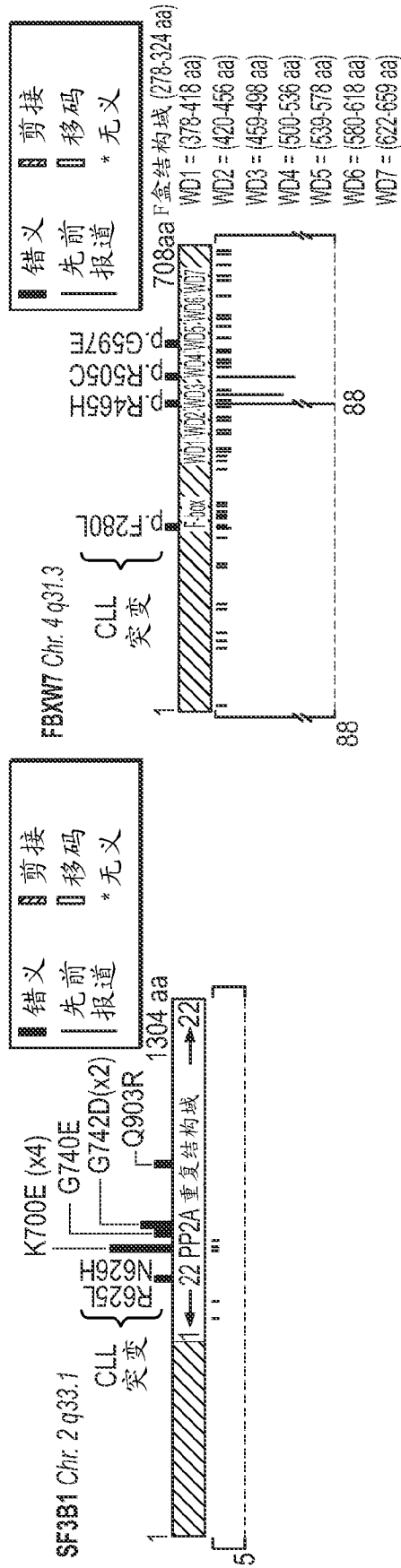


图 14B



SF3B1表达在CLL细胞中高

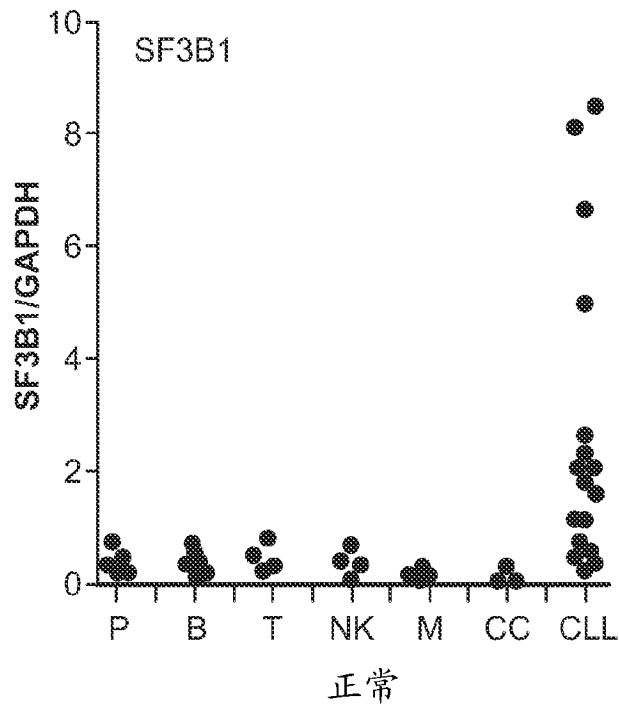


图 15

SF3B1突变生成与测序的CLL患者的  
HLA等位基因结合的预测肽

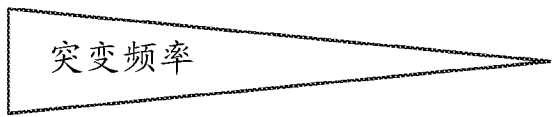
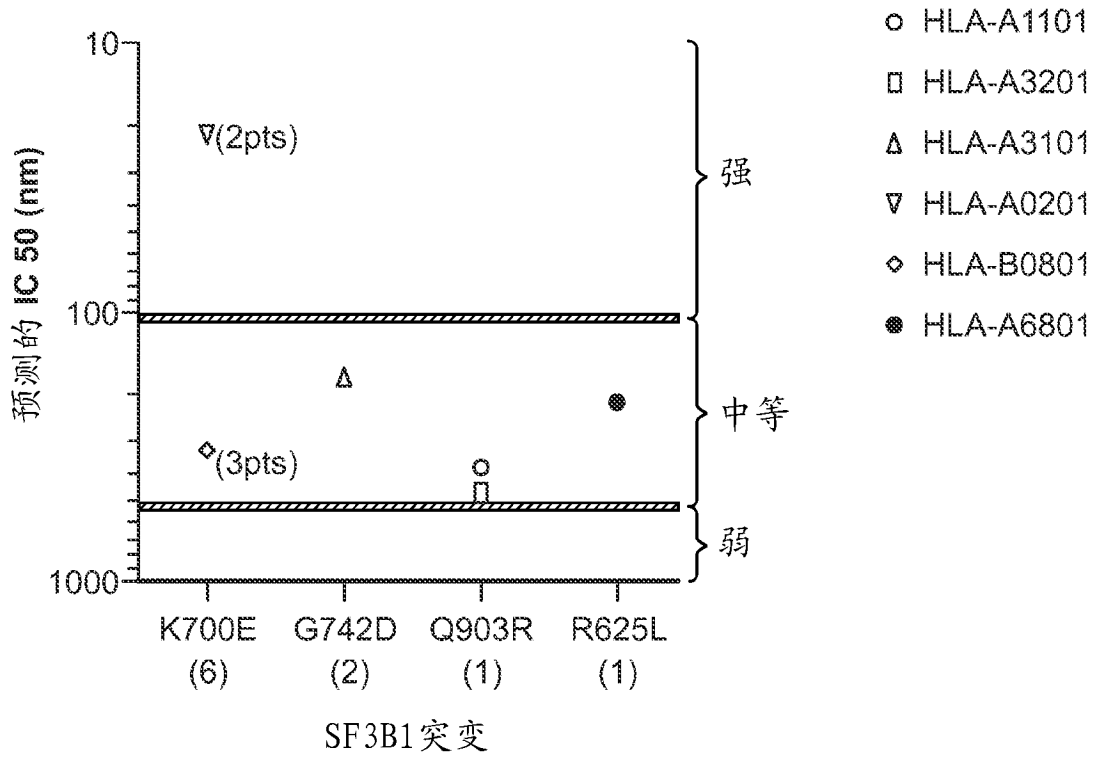


图 16

专利名称(译)	鉴定肿瘤特异性新抗原的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103180730B</a>	公开(公告)日	2016-03-02
申请号	CN201180034398.5	申请日	2011-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	综合医院公司		
当前申请(专利权)人(译)	综合医院公司		
[标]发明人	N 哈科亨 C 吴		
发明人	N.哈科亨 C.吴		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 C12Q1/68 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	A61K39/00 C12Q1/6886 C12Q2600/156 G01N33/574 G01N33/6878 G01N2333/47 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 A61P43/00 C12Q2600/136 G01N33/5011 A61K39/39558 G01N33/5308 G01N33/6854 A61K39/0011 A61K45/06 A61K2039/505 A61K2039/53 A61K2039/55511 A61K2039/57 A61K2039/572 G01N33/57492 G01N2333/70539 G16B15/00		
代理人(译)	杜艳玲 梁谋		
优先权	61/334866 2010-05-14 US		
其他公开文献	CN103180730A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及免疫治疗肽及其在免疫疗法特别是癌症的免疫疗法中的用途。具体地，本发明提供了鉴定肿瘤特异性新抗原的方法，其单独与其他肿瘤相关肽组合充当疫苗组合物的药物成分，所述疫苗组合物刺激抗肿瘤应答。

个人化的新抗原疫苗接种策略

