



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112679604 A

(43) 申请公布日 2021.04.20

(21) 申请号 202011636463.9

(22) 申请日 2016.04.22

(30) 优先权数据

1507030.3 2015.04.24 GB

62/152,258 2015.04.24 US

(62) 分案原申请数据

201680023017.6 2016.04.22

(71) 申请人 伊玛提克斯生物技术有限公司

地址 德国图宾根市

(72) 发明人 安德里亚·马尔

托尼·温斯切尼克 奥利弗·施尔

延斯·弗里切 哈普瑞特·辛格

克劳迪娅·瓦格纳

朱莉娅·莱博尔德 科莱特·宋

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 14/74 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书128页

序列表33页 附图17页

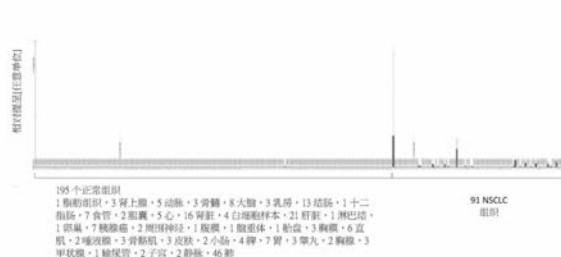
(54) 发明名称

用于肺癌(包括非小细胞肺癌和其他癌症)免疫治疗的新型肽和肽组合物

(57) 摘要

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

肽: FLIPYAIML (A*02) SEQ ID NO: 2



1. 一种肽,其包括选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.110组成群组的一个氨基酸序列、以及与SEQ ID No.1至SEQ ID No.110具有至少88%同源性的其变体序列、其中所述变体与主要组织相容性复合体(MHC)结合和/或诱导与该变体肽发生T细胞交叉反应,其中所述肽不是一种全长多肽。
2. 根据权利要求1中所述的肽,其中所述肽有能力与MHC-I或-II类分子结合,其中所述肽与MHC结合时能够被CD4和/或CD8T细胞识别。
3. 根据权利要求1或2中所述的肽或其变体,其中氨基酸序列包括SEQ ID No.1至SEQ ID No.110任何一个序列中的一个连续的氨基酸延伸区。
4. 根据权利要求1至3任一项中所述的肽或其变体,其中所述肽或其变体的总长度为8至100个氨基酸、优选为8至30个氨基酸、更优选为8至16个氨基酸、最优选为该肽该肽系由或基本系由根据SEQ ID No.1至SEQ ID No.110任何的氨基酸序列组成。
5. 根据权利要求1至4任一项中所述的肽或其变体,其中所述肽被修饰和/或包含非肽键。
6. 根据权利要求1至5任一项所述的肽或其变体,其中所述肽为融合蛋白的一部分,尤其包含HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸。
7. 根据权利要求1至6任一项中所述的一种编码肽或其变体的核酸,任选连接到一个异源启动子序列。
8. 根据权利要求7中所述的一种表达核酸的表达载体。
9. 一种重组宿主细胞,其包括根据权利要求1至6中所述的肽、根据权利要求7中所述的核酸、根据权利要求8中所述的表达载体,其中所述宿主细胞优选为抗原提成细胞,例如树突状细胞。
10. 根据权利要求1至6任一项中所述的肽或其变体、根据权利要求7中所述的核酸、根据权利要求8中所述或根据权利要求9中所述的药用表达载体。

用于肺癌(包括非小细胞肺癌和其他癌症)免疫治疗的新型肽和肽组合物

[0001] 本申请是申请日为2016年4月22日、申请号为201680023017.6、发明名称为“用于肺癌(包括非小细胞肺癌和其他癌症)免疫治疗的新型肽和肽组合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白质、核酸和细胞。特别是,本发明涉及癌症的免疫疗法。本发明还涉及单独使用或与其他肿瘤相关肽(刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激T细胞和转入患者的疫苗复合物的活性药物成分)联合使用的肿瘤相关T细胞(CTL)肽表位。与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽或与此同类的肽也可能是抗体、可溶性T细胞受体和其他结合分子的靶标。

[0003] 本发明涉及数种新型肽序列及其变体,它们源自人肿瘤细胞的HLA-I类和HLA-II类分子,可用于引发抗肿瘤免疫反应的疫苗组合物中或作为开发药物/免疫活性化合物和细胞的目标。

[0004] 发明背景

[0005] 在男性和女性中,癌症相关死亡的大多数均为肺癌。在世界范围内,就发生率和死亡率而言,肺癌都是最常见的癌症。2012年,有超过180万的新发病例(占癌症总发病人数的13%),160万人死于肺癌(占癌症总死亡人数的20%)。肺癌是87个国家中男性、26个国家中女性癌症死亡的首要原因。超过三分之一的新诊断病例在中国。发生率最高的地区为北美、欧洲和东亚(World Cancer Report,2014)。

[0006] 自1987年以来,每年死于肺癌的女性超过了死于乳腺癌。从1991年至2003年,男性的死亡率持续下降,每年约下降1.9%。女性肺癌死亡率在连续增长几十年后正趋于平稳。肺癌死亡率的这些趋势反映了过去30年吸烟率的下降。

[0007] 根据美国国立癌症研究所(NCI)的资料,预计2013年美国有23万新发病例,16万死于肺癌。

[0008] 根据之前的经验,小细胞肺癌与非小细胞肺癌(NSCLC)区分,后者包括组织学类型的腺癌、鳞状细胞癌和大细胞癌。然而,在过去的十年中,由于遗传学的主要差异以及对特定治疗的反应,腺癌和鳞状细胞癌的区别已被越来越多地认识。因此,依据驱动和保持肺肿瘤发生的特定遗传改变,根据分子学亚型,肺癌被进一步分类(Travis et al.,2013)。

[0009] 预后一般较差。在所有肺癌患者中,10%-15%的患者在确诊后存活五年。肺癌患者生存期差是因为(至少部分因为)80%的患者在确诊时就有转移,一半以上的患者有远距离转移(SEER Stat facts,2014)。在发病时,30-40%的NSCLC病例处于四期,60%的SCLC病例处于四期。

[0010] 肺癌的1年相对存活率在1975-1979年期间为35%,至2010年,略上升至44%,这主要是由于手术技术的改进和组合疗法的使用。然而,所有阶段的肺癌组合在一起,5年存活率仅为17%。对于疾病在检出时仍为局部性的病例,存活率为54%;但是仅有16%的肺癌在此早期得到确诊(SEER Stat facts,2014)。

[0011] 治疗选择根据癌症的类型(小细胞和非小细胞肺癌)和阶段进行确定,包括手术、

放疗、化疗、靶向生物治疗,如贝伐单抗®和埃罗替尼®对于局部癌,通常选择外科手术治疗。最近的研究表明,手术后化疗可提高早期非小细胞肺癌的存活率。由于该疾病在发现时通常已经扩散,因此,常常使用放射和化疗,有时与手术联合使用。单一化疗或放化疗结合是治疗小细胞肺癌的通常选择;采用这一方案,有很大比例的患者获得缓解,在一些接受手术的病例中,缓解为持久缓解(S3-Leitlinie Lungenkarzinom,2011)。

[0012] 晚期肺癌也对传统的化疗产生耐药。然而,最近的研究进展依赖于组织学和遗传学在治疗方法上取得令人兴奋的进步。审查水平为:旨在区分KRAS的密码子12和13突变以及密码子12特定突变确定的不同氨基酸取代的辅助化疗试验(Shepherd et al.,2013)。

[0013] 为了扩大NSCLC的治疗方案,已经研究了或正在研究不同的免疫治疗方法。虽然用L-BLP25或MAGEA3进行疫苗接种未能证明在NSCLC患者中疫苗介导的生存优势,但是同种异体细胞源性疫苗在临床研究中表现出有希望的结果。此外,针对神经节苷脂、表皮生长因子受体和其他几个抗原的进一步接种试验目前正在进行中。增强患者抗肿瘤T细胞反应的另一策略包括使用特异性抗体阻断抑制性T细胞受体或其配体。目前,正在临床试验中评估上述几种抗体(包括ipilimumab、nivolumab、pembrolizumab、MPDL3280A和MEDI-4736)在NSCLC中的治疗潜力(Reinmuth et al.,2015)。

[0014] 考虑到治疗癌症相关的严重副作用和费用,通常有必要确定可用于治疗癌症的因子,尤其是肺癌,包括NSCLC。通常也有必要确定代表癌症生物标志物的因子,尤其是肺癌,从而更好地诊断癌症、评估预后和预测治疗成功性。

[0015] 癌症免疫治疗代表了癌症细胞特异性靶向作用的一个选项,同时最大限度地减少副作用。癌症免疫疗法利用存在的肿瘤相关抗原。

[0016] 肿瘤相关抗原(TAA)的目前分类主要包括以下几组:

[0017] a) 癌-睾丸抗原:T细胞能够识别的最先确认的TAA属于这一类抗原,由于其成员表达于组织学相异的人肿瘤中、正常组织中、仅在睾丸的精母细胞/精原细胞中、偶尔在胎盘中,因此,它最初被称为癌-睾丸(CT)抗原。由于睾丸细胞不表达HLA I类和II类分子,所以在正常组织中,这些抗原不能被T细胞识别,因此在免疫学上可考虑为具有肿瘤特异性。CT抗原大家熟知的例子是MAGE家族成员和NY-ESO-1。

[0018] b) 分化抗原:肿瘤和正常组织(肿瘤源自该组织)都含有TAA。大多数已知的分化抗原发现于黑色素瘤和正常黑色素细胞中。许多此类黑色素细胞谱系相关蛋白参与黑色素的生物合成,因此这些蛋白不具有肿瘤特异性,但是仍然被广泛用于癌症的免疫治疗。例子包括,但不仅限于,黑色素瘤的酪氨酸酶和Melan-A/MART-1或前列腺癌的PSA。

[0019] c) 过量表达的TAA:在组织学相异的肿瘤中以及许多正常组织中都检测到了基因编码被广泛表达的TAA,一般表达水平较低。有可能许多由正常组织加工和潜在提呈的表位低于T细胞识别的阈值水平,而它们在肿瘤细胞中的过量表达能够通过打破先前确立的耐受性而引发抗癌反应。这类TAA的典型例子为Her-2/neu、生存素、端粒酶或WT1。

[0020] d) 肿瘤特异性抗原:这些独特的TAA产生于正常基因(如 β -catenin、CDK4等)的突变。这些分子变化中有一些与致瘤性转化和/或进展相关。肿瘤特异性抗原一般可在不对正常组织带来自体免疫反应风险的情况下诱导很强的免疫反应。另一方面,这些TAA在多数情况下只与其上确认了有TAA的确切肿瘤相关,并且通常在许多个体肿瘤之间并不都共享TAA。在含有肿瘤特定(相关)同种型蛋白的情况下,如果肽源自肿瘤(相关)外显子也可能出

现肽肿瘤特异性(或相关性)。

[0021] e) 由异常翻译后修饰产生的TAA:此类TAA可能由肿瘤中既不具有特异性也不过量表达的蛋白产生,但其仍然具有肿瘤相关性(该相关性由主要对肿瘤具有活性的翻译后加工所致)。此类TAA产生于变糖基化模式的改变,导致肿瘤产生针对MUC1的新型表位或在降解过程中导致诸如蛋白拼接的事件,这可能具有也可能不具有肿瘤特异性。

[0022] f) 肿瘤病毒蛋白:这些TTA是病毒蛋白,可在致癌过程中发挥关键作用,并且由于它们是外源蛋白(非人源蛋白),所以能够激发T细胞反应。这类蛋白的例子有人乳头状瘤16型病毒蛋白、E6和E7,它们在宫颈癌中表达。

[0023] 基于T细胞的免疫治疗靶向作用于主要组织相容性复合体(MHC)分子提呈的来源于肿瘤相关蛋白或肿瘤特异性蛋白的肽表位。肿瘤特异性T淋巴细胞所识别的抗原,即其表位,可以是源自所有蛋白类型的分子,如酶、受体、转录因子等,它们在相应肿瘤的细胞中被表达,并且与同源未变的细胞相比,其表达通常上调。

[0024] MHC分子有两类:MHC I类和MHC II类。MHC I类分子由一条 α 重链和 β -2-微球蛋白,MHC II类分子由一条 α 和一条 β 链组成。其三位构造形成一个结合槽,用于与肽进行非共价相互作用。

[0025] 大部分有核细胞上都可发现MHC-I类分子。他们提呈主要为内源性的蛋白、缺陷核糖体产物(DRIP)和较大肽裂解生成的肽。然而,源自内体结构或外源性来源的肽也经常发现于MHC-I类分子上。这种I-类分子非经典提呈方式在文献中被称为交叉提呈(Brossart and Bevan,1997;Rock et al.,1990)。MHC II类分子主要发现于专业抗原提呈细胞(APC)上,并且主要提呈,例如,在内吞作用过程中由APC占据并且随后被加工的外源性或跨膜蛋白的肽。

[0026] 肽和MHC I类的复合体由负载相应T细胞受体(TCR)的CD8阳性T细胞进行识别,而肽和MHC II类分子的复合体由负载相应TCR的CD4阳性辅助T细胞进行识别。因此,TCR、肽和MHC按照1:1:1的化学计量呈现,这一点已是共识。

[0027] CD4阳性辅助T细胞在诱导和维持CD8阳性细胞毒性T细胞的有效反应中发挥重要作用。肿瘤相关抗原(TAA)衍生的CD4阳性T细胞表位的识别对开发能引发抗肿瘤免疫反应的药物产品可能非常重要(Gnjatic et al.,2003)。在肿瘤部位,T辅助细胞维持着对细胞毒性T细胞(CTL)友好的细胞因子环境(Mortara et al.,2006)并吸引效应细胞,如CTL、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和粒细胞(Hwang et al.,2007)。

[0028] 在没有炎症的情况下,MHC II类分子的表达主要局限于免疫系统细胞,尤其是专业抗原提呈细胞(APC),例如,单核细胞、单核细胞源性细胞、巨噬细胞、树突状细胞。在癌症患者的肿瘤细胞中发现有MHC II类分子的表达(Dengjel et al.,2006)。

[0029] 本发明的拉长(较长)肽可作为MHC-II类活性表位。

[0030] MHC-II类表位活化的辅助T细胞在编排抗肿瘤免疫的CTL效应子功能中发挥着重要作用。触发TH1细胞反应的辅助T细胞表位支援CD8阳性杀伤T细胞的效应子功能,其中包括直接作用于肿瘤细胞的细胞毒性功能(该类肿瘤细胞表面显示有肿瘤相关肽/MHC复合体)。这样,肿瘤相关T辅助细胞表位单独使用或与其他肿瘤相关肽结合使用可作为刺激抗肿瘤免疫反应的疫苗化合物的活性药物成分。

[0031] 哺乳动物(如小鼠)模型显示,即使没有CD8阳性T淋巴细胞,CD4阳性T细胞也能通

过分泌干扰素- γ (IFN γ) 抑制血管生成而足以抑制肿瘤的表现 (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999)。没有CD4T细胞作为直接抗肿瘤效应因子的证据 (Braumulleret al., 2013; Tran et al., 2014)。

[0032] 由于HLA II类分子的组成性表达通常仅限于免疫细胞,因此,直接从原发肿瘤中分离II类肽之前被认为是不可能的事。然而,Dengjel等人成功地在肿瘤中直接识别了多个MHC II类表位(WO 2007/028574,EP 1 760 088B1)。

[0033] 由于CD8依赖型和CD4依赖型这两种反应共同并协同地促进抗肿瘤作用,因此,确定和表征由CD8+T细胞(配体:MHC I类分子+肽表位)或CD4阳性T辅助细胞(配体:MHC II类分子)识别的肿瘤相关抗原对开发肿瘤疫苗非常重要。

[0034] 对于MHC I类肽触发(引发)细胞免疫反应的肽,它也必须与MHC分子结合。这一过程依赖于MHC分子的等位基因以及肽氨基酸序列的特异性多态性。MHC-I类-结合肽的长度通常为8-12个氨基酸残基,并且在其与MHC分子相应结合沟槽相互作用的序列中通常包含两个保守残基(“锚”)。这样,每个MHC的等位基因都有“结合基序”,从而确定哪些肽能与结合沟槽特异性结合。

[0035] 在MHC-I类依赖性免疫反应中,肽不仅能与肿瘤细胞表达的某些MHC-I类分子结合,而且它们之后还必须能被T细胞负载的特异性T细胞受体(TCR)识别。

[0036] 对于被T淋巴细胞识别为肿瘤特异性抗原或相关性抗原以及用于治疗蛋白质,必须具备特殊的条件。该抗原应主要由肿瘤细胞表达,而不由正常健康组织表达,或表达数量相对较少。在一个优选的实施方案中,与正常健康组织相比,所述肽应在肿瘤细胞中过度提呈。更为适宜的情况是,该相应抗原不仅出现于一种肿瘤中,而且浓度(即每个细胞的相应肽拷贝数目)高。肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原往往是源自直接参与因细胞周期控制或凋亡抑制中的其功能而发生的正常细胞向肿瘤细胞转化的蛋白。另外,这些直接导致转化事件的蛋白的下游靶标可能会被上调,因此可能与肿瘤间接相关。这些间接肿瘤相关抗原也可能是预防接种方法的靶标(Singh-Jasuja et al., 2004)。至关重要的是,表位存在于抗原氨基酸序列中,以确保这种来自肿瘤相关抗原的肽(“免疫原性肽”)可导致体外或体内T细胞反应。

[0037] 基本上,任何能与MHC分子结合的肽都可能充当一个T细胞表位。诱导体外或体内T细胞反应的前提是存在具有相应TCR的T细胞并且不存在对该特定表位的免疫耐受性。

[0038] 因此,TAA是基于T细胞疗法(包括但不限于肿瘤疫苗)研发的起点。识别和表征TAA的方法通常基于对患者或健康受试者T细胞的使用情况,或基于肿瘤与正常组织肽之间差别转录特性或差别表达模式的产生。然而,对肿瘤组织或人肿瘤细胞株中过量表达或选择性表达的基因的识别并不提供在免疫疗法中使用这些基因所转录抗原的准确信息。这是因为,有着相应TCR的T细胞必须要存在而且对这个特定表位的免疫耐受性必须不存在或为最低水平,因此,这些抗原的表位只有一部分适合这种应用。因此,在本发明的一非常优选的实施例,只选择那些针对可发现功能性和/或增殖性T细胞情况的过量提呈或选择性提呈肽,这一点非常重要。这种功能性T细胞被定义为在以特异性抗原刺激后能够克隆地扩展并能够执行效应子功能(“效应子T细胞”)的T细胞。

[0039] 在通过根据本发明的特定TCR(例如可溶性TCR)和抗体或其他结合分子(支架)靶向作用于肽-MHC的情况下,潜在肽的免疫原性是次要的。在这些情况下,提呈是决定因素。

[0040] 发明简介

[0041] 在本发明的第一方面,本发明涉及一种肽,包含选自包括SEQ ID NO:1至SEQ IDNO:110的组的一个氨基酸序列、或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110具有至少77%,优选至少88%同源(优选至少77%或至少88%相同)的一种变体序列(其中所述变体与MHC结合和/或诱导T细胞与所述肽发生交叉反应),或其药用盐(其中所述肽不是潜在全长多肽)。

[0042] 本发明进一步涉及本发明的一种肽,包含选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:162优选为SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110的组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110具有至少77%、优选至少88%同源性(优选为至少77%或至少88%相同)的一种变体,其中所述肽或其变体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至20个氨基酸。

[0043] 下表显示了根据本发明的肽、它们各自的SEQ ID NO、以及这些肽的可能源(潜在)基因。表1和表4中的所有肽均与HLA-A*02结合。表2中的所有肽均与HLA-A*24结合。表3和表5中的所有肽均与HLA-DR结合。表4和表5中的肽之前在大型列表中披露,作为高通量筛查结果,错误率高,或使用算法计算出,但之前与癌症毫无关联。表6、表7和表8中的肽是可与本发明其他肽组合使用的其他肽。表9和10中的肽还可用于诊断和/或治疗各种其他恶性疾病,这些疾病涉及过量表达或过度提呈各潜在多肽。

[0044] 表1:本发明中的肽

[0045]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
1	KLLPYIVGV	1293	COL6A3
2	FLIPYAIML	11254	SLC6A14
3	FLYDVVKSL	1293	COL6A3
4	FVFSFPVSV	1846	DUSP4
5	ALTSTLISV	10457	GPNMB
6	SLQGSIMTV	653509, 729238	SFTPA1, SFTPA2
7	NLLQVLEKV	144501	KRT80
8	ALLNILSEV	55236	UBA6
9	ALSGTLSGV	4174	MCM5
10	KMAGIGIREA	3866	KRT15
11	YLVNQVKEL	10051	SMC4
12	IVDRITTVV	6509	SLC1A4
13	FLFDGSANL	1293	COL6A3
14	LIQDRVAEV	3914	LAMB3
15	ELDRTPEV	23450	SF3B3
序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
16	LIFDLGGGTFDV	3303, 3304, 3305, 3306, 3310, 3311, 3312	HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA6, HSPA7, HSPA8
17	TLLQEQGTKTV	286887, 3852, 3853, 3854	KRT6C, KRT5, KRT6A, KRT6B
18	ILLTEQINL	10745, 57157	PHTF1, PHTF2
19	VLTSDSPAL	10457	GPNMB
20	LMTKEISSV	5591	PRKDC
21	VLSSGLTAA	1459	CSNK2A2
22	NLINQEIML	5783	PTPN13

[0046] 表2:本发明中的其他肽

[0047]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
23	VYTSWQIPQKF	101060271, 6362	CCL18
24	NYPKSIHSF	4321	MMP12
25	RFMDGHITF	27074	LAMP3
26	RYLEKFYGL	4321	MMP12
27	RYPPPREF	1293	COL6A3
28	RYLDSLKAIVF	55839	CENPN
29	YYTKGFALLNF	5352	PLOD2
30	KYLEKYYNL	4312	MMP1
31	SYLDKVRAL	3858, 3859, 3860, 3861, 3866, 3868, 3872, 3880	KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT19
32	EYQPEMLEKF	1293	COL6A3
33	TYSEKTTLF	94025	MUC16
34	VFMKDGFFYF	4312	MMP1
35	TYNPEIYVI	3673	ITGA2
36	YYGNTLVEF	25903	OLFML2B
37	RYLEYFEKI	79573	TTC13

[0048]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
38	VFLNRAKAVFF	10457	GPNMB
39	KFLEHTNFEF	1794	DOCK2
40	IYNPSMGVSVL	5818	PVRL1
41	TYIGQGYII	60681	FKBP10
42	VYVTIDENNIL	4363	ABCC1
43	RYTLHINTL	247	ALOX15B
44	IYNQIAELW	27293	SMPDL3B
45	KFLESKGYEF	9945	GFPT2
46	NYTNGSFGSNF	1655	DDX5
47	RYISPDQLADL	2023	ENO1
48	YYYGNILVEF	25903	OLFML2B
49	QYLFPSFETF	3824	KLRD1
50	LYIGWDKHYGF	5685	PSMA4
51	NYLLESPHRF	9842	PLEKHM1
52	SYMEVPTYLNF	7805	LAPTM5
53	IYAGQWPDF	81035	COLEC12
54	AYKDKDISFF	58486	ZBED5
55	IYPVKYTQTF	64065	PERP
56	RYFPTQALNF	291, 292, 293, 83447	SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC25A31
57	SYSIGIANF	1303	COL12A1
58	VYFKPSLTPSGEF	9972	NUP153
59	HYFNTPFQL	160760	PPTC7
60	SYPAKLSFI	4029	L1RE1
61	RYGSPINTF	647024	C6orf132
62	AYKPGALTF	84883	AIFM2
63	LYINKANIW	55632	G2E3
64	VYPLALYGF	9213	XPR1

[0049]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
65	IYQRWKDLL	219285	SAMD9L
66	DYIPQLAKF	2744	GLS
67	IFLDYEAGHLSF	81559	TRIM11
68	RYLFVVDRL	55686	MREG
69	TYAALNSKATF	8826	IQGAP1
70	VYHSYLTIF	7226	TRPM2
71	TYLTNHLRL	90874	ZNF697
72	YYVDKLFNTI	5922	RASA2
73	RYLHVEGGNF	3516	RBPJ
74	EYLPEFLHTF	154664	ABCA13
75	AYPDLNEIYRSF	11262	SP140
76	VYTZIQSRF	8445, 8798	DYRK2, DYRK4
77	RYLEAGAAGLRW	23640	HSPBP1
78	IYTRVTYYL	64499, 7177	TPSB2, TPSAB1
79	RYGGSAEL	23135	KDM6B
80	AYLKEVEQL	8087	FXR1
81	KYIEAIQWI	81501	DCSTAMP
82	FYQGIVQQF	10426	TUBGCP3
83	EYSDVLAKLAF	27245	AHDC1
84	TFDVAPSRLDF	23420, 283820, 408050	NOMO1, NOMO2, NOMO3
85	PFLQASPHF	84985	FAM83A

[0050] 表3:本发明中的HLA-DR肽

[0051]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
86	LSADDIRGIQSLYGDPK	4321	MMP12
87	EGDIQQFLITGDPKAAAYDY	1301	COL11A1
88	NPVSQVEILKNKPLSVG	3694	ITGB6

[0052]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
89	KLYIGNLSENAAPS	10643	IGF2BP3
90	DAVQMVITEAQKVDTR	3918	LAMC2
91	VARLPIIDLAPVDVGGTD	1290	COL5A2
92	NKPSRPLFLDIAPLDIGGAD	1278	COL1A2
93	SRPQAPITGYRIVYSPSV	2335	FNI

[0053] 表4:本发明中的其他肽,之前与癌症无已知的关联

[0054]

序列ID号	序列	基因ID	正式基因符号
94	ILVDWLQV	9133	CCNB2
95	KIIGIMEEV	2956	MSH6
96	AMGIAPPKV	9129	PRPF3
97	TLFPVRLLV	79888	LPCAT1
98	VLYPHEPTAV	29980,5523	DONSON,PPP2R3A
99	ALFQRPPLI	1736	DKC1
100	KIVDFSYSV	701	BUB1B
101	LLLEILHEI	30001	ERO1L
102	SLLSELQHA	115362	GBP5
103	KLLSDPNYGV	79188	TMEM43
104	SLVAVELEKV	25839	COG4
105	IVAESLQQV	6772	STAT1
106	SILEHQIQV	4173	MCM4
107	ALSERAVAV	10213	PSMD14
108	TLLDFINAV	55236	UBA6
109	NLIEVNEEV	221960,51622	CCZ1B,CCZ1

[0055] 表5:本发明中的其他HLA-DR肽,之前与癌症无已知的关联

序列ID号	序列	基因ID	正式基因符号
110	IQLIVQDKESVFSPR	27074	LAMP3

[0056] 表6:用于个性化癌症疗法的其他肽

[0058]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
111	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
112	VLAPLFVYL	2535, 8321, 8324	FZD2, FZD1, FZD7
113	FLLDGSANV	1293	COL6A3
114	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
115	YVYQNNIYL	2191	FAP
116	KIQEMQHFL	4321	MMP12
117	ILIDWLQV	891	CCNB1
118	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
119	IVDDITYNV	2335	FN1
120	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
121	RLLDSVSRL	3918	LAMC2
122	KLSWDLIYL	51148	CERCAM
123	GLTDNIHLV	25878	MXRA5
124	NLLDLDYEL	1293	COL6A3
125	RLDDLKMTV	3918	LAMC2
126	KLLTEVHAA	101	ADAM8
127	ILFPDIARA	64110	MAGEF1
128	TLSSIKVEV	25878	MXRA5
129	GLIEIISNA	23020	SNRNP200
130	KILEDVGV	22974	TPX2
131	ALVQDLAKA	891	CCNB1
132	ALFVRLALA	7045	TGFBI

[0059]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
133	RLASYLDKV	3857, 3858, 3859, 3860, 3861, 3866, 3868, 3872, 3880	KRT9, KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT19
134	TLWYRAPEV	1019,1021	CDK4,CDK6
135	AIDGNNHEV	9945	GFPT2
136	ALVDHTPYL	1462	VCAN
137	FLVDGSWSV	1303	COL12A1
138	ALNEEAGRLLL	27338	UBE2S
139	SLIEDLILL	64754	SMYD3
140	TLYPHTSQV	1462	VCAN
141	NLIEKSIYL	667	DST
142	VLLPVEVATHYL	10568	SLC34A2
143	AIVDKVPSV	22820	COPG1
144	KIFDEILVNA	7153, 7155	TOP2A, TOP2B
145	AMTQLLAGV	3371	TNC
146	FQYDHEAFL	57333, 5954	RCN3, RCN1
147	VLFPNLKTV	646	BNC1
148	ALFGALFLA	5360	PLTP
149	KLVEFDLGA	10460	TACC3
150	GVLENIFGV	399909	PCNXL3
151	AVVEFLTSV	29102	DROSHA
152	ILQDRLNQV	990	CDC6
153	ALYDSVILL	1734	DIO2
154	ILFEINPKL	154664	ABCA13
155	ALDENLHQL	154664	ABCA13
156	TVAEVIQSV	55083	KIF26B
157	KLFGKTYL	6317	SERPINB3
158	KLDETNNIL	667	DST

[0060] 表7:用于例如个性化癌症疗法的其他肽

[0061]

序列ID号	序列	基因ID	正式基因符号
159	TYKYVDINTF	4321	MMP12
160	SYLQAANAL	1293	COL6A3
161	LYQILQGIVF	983	CDK1

[0062]

[0063]

表8:用于例如个性化癌症疗法的HLA-DR肽

[0064]	序列ID号	序列	基因ID	正式基因符号
	162	TNGVIHVVDKLLYPADT	10631	POSTN

[0065] 本发明还一般涉及本发明的肽用于治疗增殖性疾病,例如,脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、肾癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、白血病(AML、CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、食道癌包括胃食管交界处癌(OSCAR)、胆囊癌和胆管癌(GBC_CCC)、膀胱癌(UBC)、子宫癌(UEC)。

[0066] 特别优选的是本发明的肽(单独或组合),其选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110的组。更优选的是所述肽(单独或组合)选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:14(见表1)和SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:47(见表2)的组,并且其用于肺癌(包括NSCLC)、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、肾癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、白血病(AML、CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、食道癌包括胃食管交界处癌(OSCAR)、胆囊癌和胆管癌(GBC_CCC)、膀胱癌(UBC)、子宫癌(UEC)、优选为肺癌包括NSCLC的免疫治疗。

[0067] 如示下面的表9、9-2和表10、10-2所示,其中本发明的许多肽也发现于其他肿瘤中,因此也可用于其他适应症的免疫治疗。另请参阅图1和实例1。

[0068] 表9:本发明的HLA-A*02肽及其在其他增殖性疾病(特别是其他癌性疾病)中的特定用途。该表显示,对于其他肿瘤类型的选定肽,发现他们过量提呈(特定提呈)于5%以上测定的肿瘤样本,或提呈于5%以上测定的肿瘤样本且几何学平均值肿瘤与正常组织的比值大于3。

[0069]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
1	KLLPYIVGV	胰腺、乳腺
2	FLIPYAIML	胃、结肠、直肠、胰腺
3	FLYDVVKSL	胰腺、乳腺
4	FVFSFPVSV	胃、胰腺、乳腺、黑色素瘤、卵巢
5	ALTSTLISV	乳腺、黑色素瘤、食管
7	NLLQVLEKV	肾脏、结肠、直肠、肝脏、乳腺
8	ALLNILSEV	脑、肝脏、前列腺、卵巢
9	ALSGTLSGV	脑、肝、白细胞、黑色素瘤、卵巢、食管
10	KMAGIGIREA	前列腺、卵巢
11	YLNQVKEL	结肠、直肠、肝脏
13	FLFDGSANL	结肠、直肠、胰腺、乳腺、食管
14	LIQDRVAEV	肾脏
15	ELDRTPEV	肾、脑、肝、白细胞
16	LIFDLGGGTFD V	脑、肝、前列腺、乳腺、黑色素瘤、卵巢
18	ILLTEQINL	肾、胃、肝、胰腺、前列腺、乳腺、卵巢、食管
19	VLTSDSPAL	肝脏、黑色素瘤、食管
20	LMTKEISSV	脑、肝脏、黑色素瘤
21	VLSSGLTAA	肝脏、食管
94	ILVDWLVQV	肾脏、脑、胃、结肠、直肠、肝脏、黑色素瘤、卵巢
95	KIIGIMEEV	肾、MCC、食管
96	AMGIAPPKV	结肠、直肠、肝、胰腺、白细胞
97	TLFPVRLLV	肾、白细胞

[0070]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
98	VLYPHEPTAV	肾、脑、结肠、直肠、肝、MCC、黑色素瘤、卵巢
99	ALFQRPLI	结肠、直肠、肝脏、卵巢
100	KIVDFSYSV	脑、结肠、直肠、MCC、卵巢
101	LLLEILHEI	肾脏、肝脏、胰腺、乳腺、卵巢
102	SLLELQHA	肾脏、乳腺、卵巢、食管
103	KLLSDPNYGV	脑、胰腺
104	SLVAVELEKV	脑、肝、胰腺、MCC、卵巢、食管
105	IVAESLQQV	肾、胃、胰腺、乳腺、卵巢、食管
106	SILEHQIQV	肾脏
111	SLYKGLLSV	肾脏、脑、结肠、直肠、肝脏、卵巢
112	VLAPLFVYL	肾脏、胰腺、乳腺、黑色素瘤
113	FLLDGSANV	胃、结肠、直肠、肝、胰腺、乳腺、卵巢、食管
114	AMSSKFFLV	脑、胃、结肠、直肠、肝、胰腺、前列腺、卵巢、食管
115	YVYQNNIYL	胃、结肠、直肠、肝、胰腺、乳腺、黑色素瘤、卵巢、食管
116	KIQEMQHFL	结肠、直肠
117	ILIDWLQVQ	肾脏、脑、胃、结肠、直肠、肝脏、胰腺、黑色素瘤、卵巢
118	SLHFLILYV	肾脏、脑、结肠、直肠、肝脏、黑色素瘤、卵巢
119	IVDDITYNV	肝脏、胰腺、乳腺、食管
120	KIQEILTQV	肾脏、脑、胃、结肠、直肠、肝脏、胰腺、白细胞、卵巢、食管
121	RLLDSVSRL	肾、结肠、直肠、肝、胰腺、卵巢
122	KLSWDLIYL	肾脏、结肠、直肠
123	GLTDNIHLV	肾、结肠、直肠、胰腺、卵巢、食管
124	NLLDLDYEL	胃、结肠、直肠、胰腺、乳腺、卵巢、食管
125	RLDDLKMTV	结肠、直肠、胰腺、卵巢、食管
126	KLLTEVHAA	肾、胃、结肠、直肠、肝、胰腺、乳腺、卵巢
127	ILFPDIIARA	肾、脑、白细胞、食管
128	TLSSIKVEV	肾、胃、结肠、直肠、胰腺、前列腺、乳腺、黑色素瘤、卵巢

[0071]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
129	GLIEIISNA	脑、结肠、直肠、肝脏、卵巢、食管
130	KILEDVVG	肾、胃、结肠、直肠、黑色素瘤、卵巢、食管
131	ALVQDLAKA	肾、胃、结肠、直肠、肝脏、胰腺、卵巢
132	ALFVRLALA	肾、脑、胃、结肠、直肠、肝、胰腺、黑色素瘤、卵巢、食管
133	RLASYLDKV	胰腺、乳腺、食管
134	TLWYRAPEV	胃、黑色素瘤、卵巢
135	AIDGNNHEV	脑、肝、胰腺
136	ALVDHTPYL	肾脏、肝脏、胰腺
137	FLVDGSWSV	胃、结肠、直肠、胰腺、卵巢、食管
138	ALNEEAGRLL L	肾、脑、胃、结肠、直肠、肝、胰腺、MCC、黑色素瘤、卵巢、食管
139	SLIEDLILL	肾、脑、结肠、直肠、肝、胰腺、前列腺、黑色素瘤、卵巢、食管
141	NLIEKSIYL	食管
142	VLLPVEVATH YL	卵巢
143	AIVDKVPSV	肾、肝、胰腺、前列腺、卵巢、食管
144	KIFDEILVNA	胃、结肠、直肠、黑色素瘤、卵巢、食管
145	AMTQLLAGV	脑、结肠、直肠、乳腺、食管
146	FQYDHEAFL	肾、胃、结肠、直肠、胰腺、黑色素瘤、食管
147	VLFPNLKTV	肾脏
148	ALFGALFLA	黑色素瘤、卵巢
149	KLVEFDLGA	脑、胃、结肠、直肠、肝、MCC、卵巢、食管
150	GVLENIFGV	肾、脑、肝、卵巢、食管
151	AVVEFLTSV	脑、MCC、食管
152	ILQDRLNQV	结肠、直肠、肝脏、卵巢
153	ALYDSVILL	胃、前列腺、食管
155	ALDENLHQL	食管

[0072]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
156	TVAEVIQSV	胰腺、乳腺、食管
157	KLFGKTYL	食管

[0073] 表9-2:本发明的HLA-A*02肽及其在其他增殖性疾病(特别是其他癌性疾病)中的特定用途(表9修订版)。该表(如表9)显示,对于其他肿瘤类型的选定肽,发现他们过量提呈

(特定提呈)于5%以上测定的肿瘤样本,或提呈于5%以上测定的肿瘤样本且几何学平均值肿瘤与正常组织的比值大于3。过度提呈定义为与最高提呈的正常样本相比,肿瘤样本中的提呈更高。经过度提呈的正常组织有:脂肪组织、肾上腺、血细胞、血管、骨髓、脑、软骨、食道、眼、胆囊、心脏、肾、大肠、肝、肺、淋巴结、神经、胰腺、甲状旁腺、腹膜、垂体、胸膜、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、胸腺、甲状腺、气管、输尿管、膀胱。

[0074]

序列 ID 号	序列	其他实体
1	KLLPYIVGV	SCLC、CRC、黑色素瘤、食管癌、胆囊癌、胆管癌
2	FLIPYAIML	SCLC、PC、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
3	FLYDVVKSL	SCLC、CRC、胆囊癌、胆管癌
4	FVFSFPVSV	SCLC、食管癌、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
7	NLLQVLEKV	SCLC、OC、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
8	ALLNILSEV	SCLC、BRCA、食管癌、膀胱癌、子宫癌
9	ALSGTLSGV	CLL、BRCA、膀胱癌、子宫癌、白血病、NHL
10	KMAGIGIREA	膀胱癌
11	YLVNQVKEL	SCLC、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML
13	FLFDGSANL	SCLC、GC、黑色素瘤、OC、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
14	LIQDRVAEV	食管癌、膀胱癌

[0075]

序列 ID 号	序列	其他实体
15	ELDRTPEEV	SCLC、PC、CLL、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
17	TLLQEQGTKTV	SCLC、食管癌、膀胱癌
18	ILLTEQINL	SCLC、黑色素瘤、胆囊癌、胆管癌
20	LMTKEISSV	OC、食管癌、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
21	VLSSGLTAA	CRC、BRCA、膀胱癌、子宫癌
22	NLINQEIML	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌
94	ILVDWLQVQV	SCLC、BRCA、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL
95	KIIGIMEEV	SCLC、脑癌、GC、CRC、黑色素瘤、白血病、NHL
96	AMGIAPPKV	SCLC、BRCA、黑色素瘤、NHL
98	VLYPHEPTAV	SCLC、BRCA、食管癌、膀胱癌、NHL
99	ALFQRPLI	SCLC、CLL、食管癌、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
100	KIVDFSYSV	SCLC、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌
101	LLLEILHEI	SCLC、CLL、膀胱癌
102	SLLSELQHA	SCLC、黑色素瘤、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、NHL
103	KLLSDPNYGV	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
105	IVAESLQQV	SCLC、黑色素瘤、NHL
106	SILEHQIQV	CRC、BRCA、食管癌、膀胱癌、子宫癌、白血病、NHL
107	ALSERAVAV	食管癌、子宫癌
108	TLLDFINAV	NHL
109	NLIEVNEEV	CLL、AML

[0076] SCLC=小细胞肺癌,RCC=肾癌,CRC=结肠或直肠癌,GC=胃癌,HCC=肝癌,PC=胰腺癌,PrC=前列腺癌,BRCA=乳腺癌,MCC=梅克尔细胞癌,OC=卵巢癌,NHL=非霍奇金淋巴瘤,AML=急性骨髓性白血病,CLL=慢性淋巴细胞白血病。

[0077] 表10:本发明的HLA-A*24肽及其在其他增殖性疾病(特别是其他癌性疾病)中的特定用途。该表显示,对于其他肿瘤类型的选定肽,发现它们过量提呈(特定提呈)于5%以上测定的肿瘤样本,或提呈于5%以上测定的肿瘤样本且几何学平均值肿瘤与正常组织的比值大于3。

[0078]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
26	RYLEKIFYGL	胃、肝
27	RYPVPREF	肝、前列腺
28	RYLDSLKAIVF	肾、肝
29	YYTKGFALLNF	肾、脑、肝
31	SYLDKVRAL	胃
33	TYSEKTLF	胃
36	YYGNTLVEF	脑、胃
37	RYLEYFEKI	脑、肝脏、前列腺
38	VFLNRAKAVFF	肝脏
39	KFLEHTNFEF	肝脏
41	TYIGQGYII	脑、胃、肝脏、前列腺
42	VYVTIDENNIL	肾、胃
43	RYTLHINTL	前列腺
44	IYNQIAELW	胃、肝
45	KFLESKGYEF	脑
46	NYTNGSFGSNF	肝脏
47	RYISPDQLADL	肾脏
49	QYLFPSFETF	胃
50	LYIGWDKHYGF	肾、胃、肝脏
51	NYLLESPHRF	肝脏
52	SYMEVPTYLNF	肝脏
53	IYAGQWDF	前列腺

[0079]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
54	AYKDKDISFF	肾脏、脑
56	RYFPTQALNF	肾、胃、肝脏
58	VYFKPSLTPSGEF	胃、肝
59	HYFNTPFQL	肾、脑、肝、前列腺
60	SYPAKLSFI	肝脏
61	RYGSPINTF	肝、前列腺
62	AYKPGALTF	肝脏
63	LYINKANIW	胃、肝
66	DYIPQLAKF	肾、肝
67	IFLDYEAGHLSF	肾、胃、肝脏、前列腺
69	TYAALNSKATF	肝脏
70	VYHSYLTIF	脑、肝脏
71	TYLTNHLRL	肝脏
72	YYVDKLFNTI	肝、前列腺
73	RYLHVEGGNF	脑、肝脏
75	AYPDLNEIYRSF	肝脏
76	VYTZIQSRF	肝、前列腺
77	RYLEAGAAGLRW	胃、肝
78	IYTRVTYYL	胃、前列腺
79	RYGGSFAEL	脑、肝脏
80	AYLKEVEQL	脑、前列腺
81	KYIEAIQWI	肝脏
82	FYQGIVQQF	脑、肝脏、前列腺
84	TFDVAPSRLDF	肝、前列腺
85	PFLQASPHF	胃
159	TYKYVDINTF	胃
160	SYLQAANAL	胃

[0080]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
161	LYQILQGIVF	肾、胃、肝脏

[0081] 表10-2:本发明的HLA-A*24肽及其在其他增殖性疾病(特别是其他癌性疾病)中的特定用途(表10修订版)。该表(如表10)显示,对于其他肿瘤类型的选定肽,发现他们过量提呈(特定提呈)于5%以上测定的肿瘤样本,或提呈于5%以上测定的肿瘤样本且几何学平均

值肿瘤与正常组织的比值大于3。过度提呈定义为与最高提呈的正常样本相比,肿瘤样本中的提呈更高。经过度提呈的正常组织有:肾上腺、动脉、脑、心脏、肾、大肠、肝、肺、胰腺、垂体、皮肤、脾、胃、胸腺。

序列 ID 号	序列	其他实体
27	RYPVPVREF	脑癌
32	EYQPEMLEKF	脑癌
40	IYNPSMGVSVL	脑癌
46	NYTNGSFGSNF	脑癌
[0082] 47	RYISPDQLADL	HCC
48	YYYGNTLVEF	脑癌
57	SYSIGIANF	脑癌
61	RYGSPINTF	GC
67	IFLDYEAGHLSF	脑癌
72	YYVDKLFNTI	脑癌
76	VYTZIQSRF	脑癌

[0083] GC=胃癌,HCC=肝癌。

[0084] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号7、14、15、18、94、95、97、98、101、102、105、106、111、112、117、118、120、121、122、123、126、127、128、130、131、132、136、138、139、143、146、147、150、28、29、42、47、50、54、56、59、66、67和161中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗肾癌。

[0085] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号8、9、15、16、20、94、98、100、103、104、111、114、117、118、120、127、129、132、135、138、139、145、149、150、151、29、36、37、41、45、54、59、70、73、79、80和82中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗脑癌。

[0086] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号2、4、18、94、105、113、114、115、117、120、124、126、128、130、131、132、134、137、138、144、146、149、153、26、31、33、36、41、42、44、49、50、56、58、63、67、77、78、85、159、160和161中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗胃癌。

[0087] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号2、7、11、13、94、96、98、99、100、

111、113、114、115、116、117、118、120、121、122、123、124、125、126、128、129、130、131、132、137、138、139、144、145、146、149和152中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗结直肠癌。

[0088] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号7、8、9、11、15、16、18、19、20、21、94、96、98、99、101、104、111、113、114、115、117、118、119、120、121、126、129、131、132、135、136、138、139、143、149、150、152、26、27、28、29、37、38、39、41、44、46、50、51、52、56、58、59、60、61、62、63、66、67、69、70、71、72、73、75、76、77、79、81、82、84和161中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗肝癌。

[0089] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号1、2、3、4、13、18、96、101、103、104、105、112、113、114、115、117、119、120、121、123、124、125、126、128、131、132、133、135、136、137、138、139、143、146和156中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗胰腺癌。

[0090] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号8、10、16、18、114、128、139、143、153、27、37、41、43、53、59、61、67、72、76、78、80、82和84中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗前列腺癌。

[0091] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号9、15、96、97、120和127中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案中的肽联合用于治疗白血病(AML、CLL)。

[0092] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号1、3、4、5、7、13、16、18、101、102、105、112、113、115、119、124、126、128、133、145和156中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗乳腺癌。

[0093] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号95、98、100、104、138、149和151中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案中的肽联合用于治疗梅克尔细胞癌。

[0094] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号4、5、9、16、19、20、94、98、112、115、117、118、128、130、132、134、138、139、144、146和148中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗黑色素瘤。

[0095] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号4、8、9、10、16、18、94、98、99、100、101、102、104、105、111、113、114、115、117、118、120、121、123、124、125、126、128、129、130、131、132、134、137、138、139、142、143、144、148、149、150和152中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗卵巢癌。

[0096] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号5、9、13、18、19、21、95、102、104、105、113、114、115、119、120、123、124、125、127、129、130、132、133、137、138、139、141、143、144、145、146、149、150、151、153、155、156和157中任一项所述的本发明的至少一种肽与一种优选实施方案的肽联合用于治疗食管癌。

[0097] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号13、25、113、114、115、120、121、128、159和161中任一项所述的本发明的至少一种肽,优选为联合用于治疗乳肺癌(包括NSCLC)。

[0098] 因此,本发明的另一个方面涉及本发明中肽的用途-优选联合用于治疗选自肺癌(包括NSCLC)、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、肾癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃

癌、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、白血病 (AML、CLL) 组中的增殖性疾病。

[0099] 本发明还涉及本发明的肽,其具有与主要组织相容性复合体 (MHC) I或以拉长形式存在的例如长度变化的-MHC-II类分子结合的能力。

[0100] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中所述肽(每种肽)系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:162,优选为SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110的一个氨基酸序列组成。

[0101] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽被修饰和/或包含非肽键。

[0102] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽为融合蛋白的一部分,特别是与HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸融合,或与抗体(例如,树突状细胞特定抗体)或抗体的序列融合。

[0103] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明的肽。本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。

[0104] 本发明进一步涉及一种能表达和/或表达本发明核酸的表达载体。

[0105] 本发明进一步涉及本发明的一种肽、本发明的一种核酸或本发明的一种治疗疾病的药用表达载体,特别是用于治疗癌症。

[0106] 本发明进一步涉及本发明中肽或本发明中所述肽复合体(含有MHC)的特定抗体以及制造这些抗体的方法。

[0107] 本发明进一步涉及本发明的T细胞受体(TCR),特别是可溶性TCR(sTCRs)和加工为自体或异体T细胞的克隆TCR,以及制造这些TCR的方法和载有所述TCR或所述TCR交叉反应的NK细胞的制造方法。

[0108] 抗体和TCR是根据本发明的肽现有免疫治疗用途的另外实施方案。

[0109] 本发明进一步涉及含本发明核酸或前述表达载体的一种宿主细胞。本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其为抗原提呈细胞,优选为树突细胞。

[0110] 本发明进一步涉及配制本发明一种肽的一种方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞和从所述宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0111] 本发明进一步涉及本发明中的所述方法,其中抗原通过与足够量的合抗原提成细胞的抗原结合被载体表达于合适抗原提呈细胞或人工抗原呈递细胞表面的I或II类MHC分子。

[0112] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中抗原提呈细胞由能表达含SEQ ID NO.1至SEQ ID NO.110、优选为含SEQ ID No.1至SEQ ID No.14、以及SEQ ID No.23至SEQ ID No.:47所述肽的一个表达载体、或一个变体氨基酸序列组成。

[0113] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的启动T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞表达含一种本发明氨基酸序列的多肽。

[0114] 本发明进一步涉及一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明任何氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者按本发明方法制造的有效量T细胞。

[0115] 本发明进一步涉及任何所述肽、本发明的核酸、本发明的表达载体、本发明的细胞、本发明的作为药剂或制造药剂的启动T淋巴细胞、T细胞受体或抗体或其他肽-和/或肽-MHC结合分子的用途。所述药剂优选为具有抗癌活性。

[0116] 优选情况为,所述药剂为基于可溶性TCR或抗体的细胞治疗药物、疫苗或蛋白质。

优选情况为,所述药剂为获得自可溶性TCR或抗体(例如,包含抗CD3抗体或一部分的sTCR)的细胞治疗药物、疫苗或蛋白质。

[0117] 本发明还一般涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为肺癌(包括NSCLC)脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、肾癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、白血病(AML、CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、食管癌包括胃食管交界处癌(OSCAR)、胆囊癌和胆管癌(GBC、CCC)、膀胱癌(UBC)、子宫癌(UEC)细胞,优选为肺癌细胞。

[0118] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的生物标志物,在此成为“靶标”,其可用于诊断癌症,优选为肺癌(包括NSCLC)。所述标志物可以肽本身过度提呈或相应基因过度表达。标志物也可以用于预测治疗成功的可能性,优选为免疫疗法,最优选为靶向作用于该生物标志物识别的相同靶目标免疫疗法。例如,抗体或可溶性TCR可用于染色肿瘤切片以检测是否存在相关肽与MHC复合。

[0119] 或者,抗体具有进一步的效应子功能,如免疫刺激域或毒素。

[0120] 本发明还涉及这些癌症治疗中新靶点的用途。

[0121] 胶原 α -3(VI)链蛋白(COL6A3)-COL6A3编码 α -3链,这是VI型胶原蛋白的3个 α 链之一。该蛋白结构域已被证明与细胞外基质蛋白相结合,这是一种相互作用,可说明此胶原在组织基质成分中的重要性。通过在卵巢癌细胞中表达促进顺铂耐药的VI型胶原而重组细胞外基质。胶原VI是否存在与肿瘤分级相关,它是卵巢癌的一种预后因子(Sherman-Baust et al.,2003)。COL6A3在结直肠肿瘤(Smith et al.,2009a)、唾液腺癌(Leivo et al.,2005)过量表达,在胃癌中差异表达(Yang et al.,2007)。COL6A3已被确定为含肿瘤特异性剪接变体的七种基因之一。经验证的肿瘤特异性剪接变化高度一致,从而能够使正常和癌症样本明显区分,甚至可明确区分肿瘤不同分期(Thorsen et al.,2008)。

[0122] 溶质载体家族6(氨基酸转运)成员14(SLC6A14)-SLC6A14编码溶质载体家族6成员14(SLC6A14)。SLC6A14是一种氨基酸转运体,是溶质载体家族6的一员。该家族的成员为钠和氯依赖性氨基酸/神经递质转运体。SLC6A14转运中性和阳离子氨基酸。转运体在正常组织中低水平表达(Sloan and Mager,1999)。SLC6A14被证明在宫颈癌(Gupta et al.,2006)、结直肠(Gupta et al.,2005)和雌激素受体(ER)阳性乳腺癌(Karunakaran et al.,2011)组织和细胞系以及肝细胞瘤细胞(Fuchs et al.,2004)中上调。虽然SLC6A14在相应的正常组织/细胞中表达很低,但是癌细胞上调SLC6A14以满足他们对这些氨基酸的需求增加。 α -甲基-DL-色氨酸(α -MT)——SLC6A14的选择性阻断剂,诱导氨基酸剥夺,并导致ER阳性乳腺癌细胞系中的凋亡(Karunakaran et al.,2011)。

[0123] 双重特异性磷酸酶4(DUSP4)-由DUSP4基因编码的蛋白质是双重特异性蛋白磷酸酶亚家族的一员。DUSP4灭活ERK1、ERK2和JNK,在各种组织中表达,并且位于细胞核中。根据报告,与非恶性乳腺癌样本中相比,DUSP4(别名MKP2)在恶性样本中过度表达(Wang et al.,2003)。在结肠癌症患者微数组数据集中,发现DUSP4表达为差异表达,在BRAF突变肿瘤中表达最高。此外,高DUSP4与较差的整体存活率相关(De,V et al.,2013)。

[0124] 糖蛋白(跨膜)nmb(GPNMB)-基因GPNMB编码I型跨膜糖蛋白。GPNMB已经显示在大部分不同癌症类型中表达,并通过促进肿瘤细胞迁移、侵袭和转移形成主要增加肿瘤侵袭性。在分子水平上,已表明GPNMB可增加MMP-2、3和9的表达,且本身受p53调节(Metz et al.,2005;Metz et al.,2007;Rose et al.,2007;Fiorentini et al.,2014)。高水平的GPNMB

与SCLC、GBM和ccRCC的总生存期下降进一步相关(Qin et al.,2014;Li et al.,2014;Kuanet al.,2006)。

[0125] 角蛋白,II型细胞骨架80(KRT80)-KRT80编码角蛋白80(KRT80)。KRT80在几乎所有类型的上皮细胞中被发现,与晚期组织或细胞分化相关。含中间丝的KRT80位于靠近桥粒斑的细胞边缘,并且只在进入终末分化的细胞内,KRT80呈细胞质分布(Langbein et al.,2010)。

[0126] 染色体结构维持蛋白4(SMC4)-SMC4蛋白是凝聚蛋白的核心组成部分,在染色质凝聚中发挥作用,还与细胞核仁分离、DNA修复和染色质支架的维持相关(Cervantes et al.,2006)。

[0127] 溶质载体家族1(谷氨酸/中性氨基酸转运体)成员4(SLC1A4)-SLC1A4是一种氨基酸转运体,介导小中性氨基酸钠的依赖性交换(综述(Kanai et al.,2013))。与鳞状细胞癌相比,SLC1A4被描述为被显著更多的食管腺癌表达(Younes et al.,2000)。SLC1A4在前列腺癌细胞中的表达显示增加,以响应于雄激素治疗(Wang et al.,2013a)。

[0128] 角蛋白5(KRT5)、角蛋白6A(KRT6A)、角蛋白6B(KRT6B)、角蛋白6C(KRT6C)-KRT5、KRT6A、KRT6B和KRT6C为同源角蛋白的蛋白质,他们是中间丝蛋白。角蛋白被广泛地用作肿瘤诊断的标记蛋白,因为他们的表达模式涉及恶性肿瘤的起源组织(综述(Karantza,2011))。在正常情况下,KRT6A和KRT6B似乎通过隔离从而抑制亲迁徙Src激酶的活性来抑制细胞迁移。该机制是否也适用于癌细胞仍未进行研究(Rotty and Coulombe,2012)。KRT5/6染色作为几种标记物之一被提出,在NSCLC中区分低分化腺癌和鳞状细胞癌(Zhao et al.,2014b;Xu et al.,2014)。肺神经内分泌肿瘤的KRT5/6也呈阴性(Zhang et al.,2014)。

[0129] 趋化因子(C-C基序)配体18(肺和启动调节)(CCL18)-这种抗菌基因是聚集在17号染色体上的几种半胱氨酸-半胱氨酸(CC)细胞因子基因之一。该基因编码的细胞因子显示了对于幼稚T细胞、CD4⁺和CD8⁺T细胞和未活化淋巴细胞的趋化活性,但对于单核细胞或粒细胞没有趋化活性。肿瘤组织和血液中CCL18水平上调已在癌症中进行了描述,CCL18血清水平已被作为几种肿瘤类型的生物标志物提出。在多种情况下,显示晚期肿瘤类型与预后不良相关(例如胃癌(Wu et al.,2013a)、乳腺癌(Chen et al.,2011;Narita et al.,2011)、前列腺癌(Chen et al.,2014)、膀胱癌(Urquidi et al.,2012))。CCL18的血清水平相比健康对照而言在NSCLC患者中增加。另外,血清水平增加预测腺癌患者的生存时间下降(Plones et al.,2012)。CCL18是12-蛋白血清生物标志物的一部分,可确定NSCLC(Ostroff et al.,2010)。

[0130] 基质金属蛋白酶12(巨噬细胞弹性蛋白酶)(MMP12)-MMP12,也称为人类金属蛋白酶(HME)或巨噬细胞金属蛋白酶(MME),是其降解弹性蛋白能力被识别的一种锌内肽酶。除此之外,它具有广泛范围的底物,延伸到其它基质蛋白(如胶原、纤连蛋白、层粘连蛋白、蛋白多糖)和非基质蛋白质(如 α -1-抗胰蛋白酶)。哮喘、肺气肿和慢性阻塞性肺疾病(COPD)时,MMP12可能有助于肺泡破坏和气道重塑(Cataldo et al.,2003;Wallace et al.,2008)。MMP12牵涉巨噬细胞迁移,并且因为它可从纤溶酶原中产生血管抑素,因而有助于抑制血管生成(Chakraborti et al.,2003;Chandler et al.,1996;Sang,1998)。像其他金属蛋白酶一样,MMP12参与生理过程,如:胚胎发生、伤口愈合和月经周期(Chakraborti et al.,2003;Labied et al.,2009),而且参与组织破坏的病理过程。虽然数据是基于一些情况下

少数患者,但文献中有充分的证据表明MMP12往往在癌症中过度表达(Denys et al.,2004;Hagemann et al.,2001;Ma et al.,2009;Vazquez-Ortiz et al.,2005;Ye et al.,2008)。但是,关于MMP12对临床参数和预后影响的数据是有争议的。虽然它可能参与基质溶解从而参与转移,但也可以通过产生血管抑素抑制肿瘤生长,这负面影响血管生成(Gorrin-Rivas et al.,2000;Gorrin Rivas et al.,1998;Kim et al.,2004)。对于肺癌,MMP12表达的后果是有争议的。根据报告,在炎症引发的肺重塑中,上皮细胞中过度表达MMP12。MMP12上调可能在肺气肿到肺癌过渡中发挥作用(Qu et al.,2009)。动物研究表明,基质或巨噬细胞表达MMP12抑制肺肿瘤的生长(Acuff et al.,2006;Houghton et al.,2006)。但是,也有报告表明,肺肿瘤MMP12过度表达与切除后复发、转移性疾病和较短的无复发生存期有关(Cho et al.,2004;Hofmann et al.,2005)。

[0131] 溶酶体相关膜蛋白3(LAMP3)-LAMP3是一种发现于溶酶体区室的I型跨膜蛋白,具有一个小胞质结构域和一个高度糖基化管腔域(Wilke et al.,2012)。数种癌症均报告了LAMP3上调,但是,肿瘤细胞本身表达LAMP3还没有被证实。LAMP3(+)DC特别在含有增殖T淋巴细胞的侵袭性肿瘤边缘形成簇中检测到,因而被提出可反映局部抗肿瘤免疫应答,例如,对于肾细胞癌(Middel et al.,2010)、食管鳞状细胞癌(Liu et al.,2010)、结直肠癌(Yuan et al.,2008;Sandel et al.,2005)和黑素瘤(Ladanyi et al.,2007)。转录资料的荟萃分析表明,低肺癌LAMP3表达水平可能与较短的总生存期相关(Lindskog et al.,2014)。

[0132] 着丝粒蛋白N(CENPN)-CENPN基因编码的蛋白质形成核小体相关复合体的一部分,并且对于动粒装配很重要。CENPN识别一种着丝粒特异性组蛋白变体(CENP-A),因而需要确定很多其他着丝粒蛋白的募集位点(Carroll et al.,2009)。CENPN和核小体相关复合体(NAC)的耗竭不损害双极纺锤体形成,但会导致染色体板集合缺陷(McClelland et al.,2007)。CENPN与其他的NAC蛋白一起被募集到DNA双链断裂处,因此,此复合体被提出在DNA修复中发挥作用(Zeitlin et al.,2009)。

[0133] 原胶原赖氨酸,2-酮戊二酸5-双加氧酶2(PLOD2)-由该基因编码的蛋白质是定位于粗面内质网潴泡的膜结合二聚体酶。该基因的编码区突变与布鲁克征候群相关。根据描述,PLOD2在结直肠癌(Nicastri et al.,2014)、多发性骨髓瘤(Slany et al.,2014)和子宫颈癌(Rajkumar et al.,2011)中上调,并于与骨转移形成相关(Blanco et al.,2012)。研究显示,胶质母细胞瘤(Dong et al.,2005)以及乳腺癌(Gilkes et al.,2013)和肝细胞癌中,PLOD2表达升高与不良预后有关,其中在肝细胞癌中,它也与肿瘤大小增加并形成肝内转移相关(Noda et al.,2012)。

[0134] 基质金属蛋白酶1(MMP1)-MMP1是基质金属蛋白酶(MMP)家族的一员。一般情况下,MMP在血管功能调节、重塑和血管生成中起重要作用。通过ECM和其他细胞外分子的降解,它们促进内皮细胞和血管平滑肌细胞的迁移和侵袭,并影响血管细胞增殖和凋亡(Chen et al.,2013)。MMP1过度表达已在几个癌症类型中进行了描述,并与血管生成、侵袭和不良预后相关。例如,MMP1水平升高已经被描述为结肠癌存活率的一个独立因素(Langenskiold et al.,2013),肿瘤和基质中MMP1表达与乳腺癌的肿瘤进展和较差预后相关(Bostrom et al.,2011)。MMP1水平已被证明在肺癌患者的血浆和肿瘤组织中升高,并与较晚期别和存活率下降相关(Li et al.,2010b)。一项荟萃分析证实,MMP1-16071G/2G多态性与罹患肺癌风

险增加相关(Xiao et al.,2012)。

[0135] 角蛋白10(KRT10)、角蛋白12(KRT12)、角蛋白13(KRT13)、角蛋白14(KRT14)、角蛋白15(KRT15)、角蛋白16(KRT16)、角蛋白17(KRT17)、角蛋白19(KRT19)-同源角蛋白KRT10、KRT12、KRT13、KRT14、KRT15、KRT16、KRT17和KRT19是中间丝蛋白。一些角蛋白与干细胞特性相关,例如KRT14被认为是癌干细胞标志物(Hatina and Schulz,2012;Schalken and van,2003)。KRT15用作识别和定位表皮干细胞的标志物(Adhikary et al.,2013;Troy et al.,2011),KRT17在毛发凸起基底层的干细胞中表达(Bragulla and Homberger,2009)。针对不同癌症类型对不同角蛋白的表达模式进行了分析,上调和下调均有报告。例如,高水平KRT17与较差预后(Wang et al.,2013b;Escobar-Hoyos et al.,2014)和较晚期别(Kim et al.,2012)相关。对于KRT13,多数研究表明在癌性组织中下调(Hourihan et al.,2003;Ida-Yonemochi et al.,2012),KRT13的表达在鳞状细胞转化过程中似乎被KRT17的表达替代(Mikami et al.,2011)。对于KRT10和KRT15,在癌症中上调和下调均被不同的研究证实。KRT19常在许多癌症类型中过度表达,并与转移和不良生存期相关(Zong et al.,2012;Lee et al.,2012)。KRT12在角膜上皮细胞中表达。角膜显示角蛋白12(被认为是分化标志物)下调(Zhang et al.,2010b)。

[0136] 黏蛋白16,细胞表面(MUC16)-MUC16在几个膜结合黏蛋白中最大。MUC16是单次跨膜蛋白,具有高度糖基化胞外结构域。MUC16是一种肿瘤相关抗原,裂解自卵巢癌细胞表面,脱落到血液中并用作监测卵巢癌的生长的成熟生物标志物(Bafna et al.,2010)。MUC16表达水平增加已在肺鳞状细胞癌中被证实(Wang et al.,2014)。此外,高MUC16血清水平与NSCLC患者生存期缩短相关(Yu et al.,2013;Cedres et al.,2011)。与其他生物标记物组合,MUC16可能是肺癌亚型基因表达标志的一部分(Li et al.,2012)。

[0137] 整合素 α -2(CD49B,VLA-2受体的 α 2亚基)(ITGA2)-ITGA2编码胶原和相关蛋白的跨膜受体的 α 亚基。少量研究报告,ITGA2在癌症中失调,其中含有水平升高和下降的证据:在胰腺导管腺癌中,ITGA2被低甲基化和过度表达,表达升高与不良预后相关(Nones et al.,2014)。与此相反,前列腺癌中ITGA2下调已得到证明(Shaikhibrahim et al.,2011)。乳腺癌和前列腺癌中,ITGA2表达下降与转移形成和较差生存率有关(Ramirez et al.,2011)。

[0138] 嗅素样2B(OLFML2B)-OLFML2B属于嗅素蛋白家族,其为细胞外糖蛋白,主要参与化学感受纤毛分化、早期神经形成、神经管背部化、神经肌肉信令、突触小泡胞吐作用和青光眼的发病。OLFML2B转录物可在小鼠的不同组织中检测到,包括肺、胃和前列腺,但在肝脏中没有检测到(Furutani et al.,2005)。OLFML2B基因定位于染色体1q23.3,这在关联研究中被证明是精神分裂症的易感性基因位点(Puri et al.,2007)。

[0139] 三十四肽重复结构域13(TTC13)-TTC13属于三十四肽重复(TPR)结构域蛋白质家族。TPR结构域似乎对于伴侣功能、细胞周期、转录和蛋白转运很重要,含有TPR基序的蛋白通常与多蛋白复合体相关(Blatch and Lassel,1999)。TCC13基因定位于染色体1q42.2。染色体1q42.2-43在一项相关分析研究中被描述为前列腺癌的一种假定易感基因位点(Berthon et al.,1998),但这无法在进一步的研究中针对更大患者人群得到证实(Singh,2000;Gibbs et al.,1999)。

[0140] 胞质分裂作用因子2(DOCK2)-由DOCK2基因编码的蛋白质属于CDM蛋白家族。DOCK2已知是淋巴细胞迁移和趋化的重要因子。外显子组和全基因组测序研究确认,在结直肠癌、

食管腺癌和胰腺导管内乳头状粘液性肿瘤中有DOCK2基因内突变(Yu et al.,2014; Dulaket al.,2013;Furukawa et al.,2011)。此外,DOCK2被证明在儿童星形细胞瘤样本中差异表达,因此可能代表这种疾病的一个相关治疗靶点(Zhao et al.,2014a)。

[0141] 脊髓灰质炎病毒受体相关1(疱疹病毒进入介体C)(PVRL1)-PVRL1编码黏附蛋白,其在上皮细胞和内皮细胞黏附连接和紧密连接的组织中发挥作用。PVRL1基因定位到染色体11q23,这是被发现在腺样囊性癌中扩增的区域(Zhang et al.,2013)。由于细胞黏附的重要功能,PVRL1与细胞侵袭和迁移特性调节以及上皮-间质转化相关,这些是肿瘤发生的重要进程。PVRL1被确定为子宫颈癌鳞状细胞癌亚型的标志特性的一部分(Imadome et al.,2010)。相对于正常甲状腺组织,PVRL1表达被发现在甲状腺肿瘤中增加,并在乳头状甲状腺癌进一步增加(Jensen et al.,2010)。PVRL1/2的表达与急性骨髓性白血病的更好的预后相关(Graf et al.,2005)。

[0142] FK506结合蛋白10,65kDa(FKBP10)-FK506-结合蛋白10(FKBP10)属于FKBP类肽基脯氨酰顺/反异构酶家族。它位于内质网,并充当分子伴侣(Ishikawa et al.,2008; Patterson et al.,2000)。它是在肺发育中高度表达,并且在肺损伤后可以以协调的方式被细胞外基质蛋白重新启动(Patterson et al.,2005)。

[0143] ATP结合盒,亚族C(CFTR/MRP),成员1(ABCC1)-由ABCC1基因编码的蛋白是ATP结合盒(ABC)转运体超家族中的一员。ABC蛋白质跨越细胞内外膜运输各种分子。ABCC1在正常和肿瘤细胞中起着重要的药物外排泵角色(Chen and Tiwari,2011)。几项研究描述了不同肿瘤类型中ABCC1的过度表达,在许多情况下,发现ABCC1表达水平与肿瘤分期、转移和较差预后相关(例如在乳腺癌、前列腺癌和肺癌中)(Deeley et al.,2006)。针对中国患者的一项研究确定了ABCC1基因的SNP可增加NSCLC的易感性(Yin et al.,2011)。另一项研究报告,ABCC1 SNP和NSCLC患者的无进展生存期之间相关(Lamba et al.,2014)。

[0144] 花生四烯酸15-脂氧化酶B型(ALOX15B)-ALOX15B编码参与脂肪酸氢过氧化物产生的结构相关非血红素铁双加氧酶的脂氧合酶家族的一员。ALOX15B(更常称为15LOX-2)及其酶促产物15-S-羟酸(15S-HETE)在肿瘤发展中的作用已经在前列腺癌中进行最深入的研究。几项研究已经证明,与正常组织或细胞系相比,ALOX15B的表达水平以及15S-HETE的产生水平都在前列腺癌中下降(Hu et al.,2013;Shappell et al.,2001)。在正常的肺中,ALOX15B表达仅限于II型肺细胞。表达在NSCLC升高,ALOX15B水平与肿瘤分级以及肿瘤细胞增殖指数之间被描述为呈逆相关(Gonzalez et al.,2004)。

[0145] 鞘磷脂磷酸二酯酶,酸样3B(SMPDL3B)-SMPDL3B是在足细胞中表达的鞘磷脂磷酸二酯酶,其表达与糖尿病肾病和局灶性节段性肾小球硬化有关。肾脏疾病中SMPDL3B表达下降与细胞骨架重构和细胞凋亡相关(Merscher and Fornoni,2014)。SMPDL3B基因映射到染色体1p35.3。

[0146] 谷氨酰胺-果糖-6-磷酸转氨酶2(GFPT2)-GFPT2参与神经突向外生长、早期神经元细胞发育、神经肽信令/合成和神经受体(Tondreau et al.,2008)。GFPT2遗传变异与II型糖尿病和糖尿病肾病有关(Zhang et al.,2004)。此外,GFPT2SNP的关联性表明参与氧化途径调制的基因可能是糖尿病慢性肾功能不全的主要原因(Prasad et al.,2010)。GFPT2基因的DNA甲基化在主要急性淋巴细胞白血病(ALL)样本中进行了验证。多CpG岛甲基化的患者总生存率较差(Kuang et al.,2008)。GFPT2在谷氨酰胺代谢中发挥作用,观察到在间充

质细胞系中更高度表达。谷氨酰胺代谢可能在肿瘤进展中发挥重要作用,细胞代谢途径的抑制剂可以是一种表观遗传疗法(Simpson et al.,2012)。

[0147] DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 框解旋酶5 (DDX5) -DDX5 (P68) 是一种ATP依赖性RNA解旋酶,在剪接、rRNA加工和核糖体生物发生、miRNA加工以及转录调控中发挥作用。DDX5是多种因子的转录共启动因子,这些因子在癌症发展中发挥作用,如雄激素受体、p53和Runx2。DDX5已被证明在许多不同的癌症类型中过度表达,例如结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、神经胶质瘤、肝细胞癌和白血病(Dai et al.,2014;Fuller-Pace,2013)。

[0148] 烯醇酶1, (α) (ENO1) -ENO1基因编码烯醇化酶 α (ENO α),这是三种烯醇酶蛋白之一,其他分别为烯醇酶- β 和烯醇酶- γ 。ENO1/ENO α 过度表达在许多癌症类型中被证明(Capello et al.,2011)。ENO α 是一种金属酶,其在磷酸烯醇丙酮酸盐合成糖酵解中起作用。

[0149] ENO α 水平升高与NSCLC患者较差的生存期相关(Chang et al.,2006)。同样,另一项研究证实ENO1在一组预后差的肺腺癌患者中表达上调(Pernemalm et al.,2013)。ENO α 已被证明为肿瘤相关抗原,抗ENO α 抗体以及特异性ENO α T细胞已在胰腺癌患者被检测到(Cappello et al.,2009)。ENO α 自身抗体也在NSCLC患者中检测到,ENO α 表达已被证明在NSCLC组织中增加(He et al.,2007;Li et al.,2006)。

[0150] 杀伤细胞凝集素样受体亚家族D,成员1 (KLRD1) -KLRD1,更常称为CD94,与NKG2分子相关,以形成在自然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)上表达的异二聚体。抑制受体KLRD1 (CD94):NKG2A被证明在肿瘤浸润淋巴细胞中过度表达,例如肾细胞癌和子宫颈癌,这可能导致抗肿瘤免疫应答受损(Schleypen et al.,2003;Sheu et al.,2005)。同样,HLA-E——KLRD1 (CD94):NKG2A配体在肿瘤细胞上过度表达可能还有助于肿瘤免疫逃逸(Bossard et al.,2012;Gooden et al.,2011)。

[0151] 胶原蛋白,XII型, $\alpha 1$ (COL12A1) -COL12A1基因编码XII型胶原蛋白的 α 链,而XII型胶原蛋白是FACIT(三螺旋区不连续的纤维相关性胶原蛋白)胶原蛋白的家族成员。XII型胶原蛋白是I型胶原蛋白中存在的一种同源三聚体,被认为可修饰胶原蛋白I纤维与周围基质之间的相互作用(Oh et al.,1992)。COL12A1可能参与基底膜调节,为原纤维和其他基质组分之间提供特异性分子桥(Thierry et al.,2004)。COL12A1在心脏、胎盘、肺、骨骼肌和胰腺(Dharmavaram et al.,1998)以及多种结缔组织包括关节和软骨(Gregory et al.,2001;Walchli et al.,1994;Watt et al.,1992)中表达。与较低或无微卫星不稳定性的稳定组相比,COL12A1在高微卫星不稳定性的肿瘤中下调(Ortega et al.,2010)。

[0152] ATP结合盒,亚族A (ABC1),成员13 (ABCA13) -在人类中,跨膜转运体的ATP结合盒(ABC)家族至少有48个基因和7个基因亚族。所预测的ABCA13蛋白由5058个氨基酸残基组成,因此该蛋白是迄今为止所描述的最大ABC蛋白(Prades et al.,2002)。Knight等人确定ABCA13蛋白在小鼠和人海马和皮层中表达,这两个区域均与精神分裂症和双相性精神障碍相关(Knight et al.,2009)。ABCA13基因映射到染色体7p12.3,该区域包含影响胰腺的遗传性疾病(Shwachman-Diamond征候群)以及参与T细胞肿瘤侵袭和转移(INM7)的位点,因此,该基因是这些疾病的定位候选基因(Prades et al.,2002)。

[0153] 细胞周期蛋白B2 (CCNB2) -CCNB2是与主要的细胞周期调控激酶CDK1 (CDC2) 相关联的几个细胞周期蛋白之一。细胞周期蛋白水平在细胞周期期间转录调节,提供CDK1不同水平的活性和特异性,从而控制细胞周期进程。细胞周期蛋白B2的表达由肿瘤抑制基因p53和

BRCA1调节,这两个基因通过抑制细胞周期蛋白B2转录而起作用(Quaas et al.,2012;Deet al.,2011)。CCNB2上调在几个肿瘤类型中进行了描述,如宫颈癌(Espinosa et al.,2013;Rajkumar et al.,2011)、膀胱癌(Lu et al.,2010)、结直肠癌(Park et al.,2007)、星形细胞瘤(Liu et al.,2013)和胶质母细胞瘤(Hodgson et al.,2009)。CCNB2表达水平与乳腺癌预后差相关,并被确定为生存的独立预后标志物(Shubbar et al.,2013)。CCNB2在NSCLC中过度表达(Hofmann et al.,2004),被确定为肺腺癌患者预后不良的独立预测因子,但不是鳞状细胞癌的预测因子(Takashima et al.,2014)。

[0154] MutS同源物6(MSH6)-MSH6编码DNA错配修复MutS家族的一员。MSH蛋白,包括MSH6,在复制过程中识别基因组序列的错误,以防止损坏链的复制并修复单链断裂(Conde-Perezprina et al.,2012)。在几种癌症中,MSH6突变和错误的DNA错配修复机制(MMR)进行了描述(例如结直肠癌(Sameer et al.,2014;Vilar and Gruber,2010;Silva et al.,2009;Kastrinos and Syngal,2007;Davidson,2007)、胰腺癌(Solomon et al.,2012)、卵巢癌(Xiao et al.,2014)、乳腺癌(Mahdi et al.,2013))。

[0155] PRP3前mRNA加工因子3同源物(酿酒酵母)(PRPF3)-PRPF3编码前mRNA加工因子3。PRPF3介导针对剪接体的核RNA衰变机制的募集(Nag and Steitz,2012)。PRPF3通过转录因子HNF4 α 的胎儿/癌症特异性剪接变体在肝细胞癌中上调(Niehof and Borlak,2008)。

[0156] 溶血卵磷脂酰基转移酶1(LPCAT1)-LPCAT1催化溶血磷脂酰胆碱(LPC)转化至磷脂酰胆碱。此外,LPCAT1能够把溶血PAF(烷基化LPC)转换成血小板活化因子(PAF)。LPCAT1过度表达在结直肠癌(Mansilla et al.,2009)、肝细胞癌(Morita et al.,2013)、乳腺癌(Abdelzاهر and Mostafa,2015)、前列腺癌(Xu et al.,2013;Grupp et al.,2013;Zhou et al.,2012)和肺癌(Wu et al.,2013b)中进行过描述。LPCAT1过度表达促进体外细胞增殖、迁移和侵袭(Morita et al.,2013)。

[0157] SON的下游邻居(DONSON)DONSON编码SON的下游邻居(DONSON)。DONSON是一种中心体蛋白,其水平在细胞周期期间被调节,在S期达到峰值。DONSON是形成适当的有丝分裂纺锤体所需的,似乎在DNA损伤应答中起作用(Fuchs et al.,2010)。目前无癌症相关的文献。

[0158] 苯并咪唑出芽抑制解除同源物1 β (酵母)(BUB1B)-BUB1B编码BUB1丝分裂步骤的丝氨酸/苏氨酸激酶B,这是一种丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶。它的功能是作为一种有丝分裂调节剂,通过其在有丝分裂步骤中的作用并建立适当的微管着丝粒黏附,从而确保染色体精确分离。据报告,BUB1B在各种肿瘤中表达既有上调也有下调。总体上,更多文献报告BUB1B在癌症中过度表达,肿瘤进展和预后不良的关联性也进行了描述,例如鼻咽癌(Huang et al.,2012a)、扁桃体癌(Hannisdal et al.,2010)、乳腺癌(Maciejczyk et al.,2013)、卵巢上皮癌(Lee et al.,2009)和胰胆型腺癌(Gladhaug et al.,2010)。同样,BUB1B蛋白减少与前列腺癌更长的存活期有关(Cirak et al.,2013)。

[0159] 寡聚高尔基复合体4(COG4)-COG4是寡聚蛋白复合体的组分,涉及高尔基体的结构和功能。相互作用的研究表明,COG4作为该复合体的核心组分,在复合体的装配/功能中持有重要作用(Loh and Hong,2004)。COG亚基COG4、6和8可与定义的高尔基SNARE相互作用,并参与高尔基体内囊泡分拣特异性的定义(Willett et al.,2013)。此外,COG复合体已显示可调节高尔基糖基化机制的维护(Pokrovskaya et al.,2011)。

[0160] 蛋白酶体(前体、巨蛋白因子)26S亚基,非ATP酶,14(PSMD14)-PSMD14是26S蛋白酶

体——通过泛素途径降解靶向破坏蛋白质的多蛋白复合体的组分。19S复合体内PSMD14蛋白复合体(19S cap;PA700)负责蛋白酶体降解期间的基质去泛素化(Spataro et al., 1997)。蛋白酶体亚基的异常表达和功能障碍参与恶性转化以及对各种细胞毒性药物的细胞抗性。PSMD14在哺乳动物细胞的过度表达影响细胞增殖和对细胞毒性药物(如长春碱、顺铂和多柔比星)的反应(Spataro et al., 2002)。siRNA转染的PSMD14下调对细胞活力有相当大的影响,引起G0-G1期细胞阻滞,最终导致衰老(Byrne et al., 2010)。

[0161] RAD54同源物B(酿酒酵母)(RAD54B)-DNA修复和重组蛋白RAD54B是在人类由RAD54B基因编码的一种蛋白质。RAD54结合至双链DNA,并在存在DNA时显示ATP酶活性。人类RAD54B蛋白是RAD54蛋白质的旁系,在同源重组中起着重要的作用。同源重组(HR)对于DNA双链断裂(DSB)的准确修复很重要(Sarai et al., 2008)。已知在癌症中体细胞突变基因RAD54B的敲减导致哺乳动物细胞中染色体不稳定(CIN)(McManus et al., 2009)。RAD54B升高的基因表达与GBM患者中较短的至疾病进展时间和不良OS有关(Grunda et al., 2010)。

[0162] 卷曲家族受体1(FZD1)、卷曲家族受体2(FZD2)、卷曲家族受体7(FZD7)-基因FZD2、FZD1和FZD7均来自“卷曲”基因家族;该基因家族的成员编码7-跨膜结构域蛋白,他们是Wnt信号传导蛋白的受体。FZD2基因的表达似乎受发育调节,在胎儿肾脏、肺脏以及成人结肠和卵巢中呈高水平表达(Sagara et al., 1998;Zhao et al., 1995)。FZD1蛋白包含信号肽、N-末端胞外区域富含半胱氨酸的结构域、7个跨膜结构域以及一个C端PDZ结构域结合基序。FZD1转录物在各种组织中表达,包括肺、心脏、肾脏、胰腺、前列腺和卵巢(Sagara et al., 1998)。结果发现卷曲1和2受体的表达在乳腺癌中上调(Milovanovic et al., 2004)。FZD7蛋白含有N末端信号序列、10个半胱氨酸残基(典型的Fz家族成员的富含半胱氨酸胞外结构域)、7个跨膜结构域以及有一个PDZ结构域结合基序的细胞内C-端尾部。在低分化人食管癌中,FZD7基因表达可能下调APC功能,增强 β -连环蛋白介导的信号(Sagara et al., 1998; Tanaka et al., 1998)。

[0163] 无翅型MMTV整合位点家族,成员5A(WNT5A)-通常情况下,Wnt5a调节多种细胞功能,如增殖、分化、迁移、黏附和极性(Kikuchi et al., 2012)。它是在未分化的人胚胎干细胞中表达(Kato, 2008)。WNT5A被列为非转化WNT家族成员,其在肿瘤发生中的作用仍不明确。它在某些癌症(甲状腺、脑、乳腺和结直肠癌)中显示出肿瘤抑制活性,但是在肺、胃和前列腺癌中异常上调(Li et al., 2010a)。致癌WNT5A在癌症干细胞中启动经典WNT信令以进行自我更新,在肿瘤间质接口的启动非经典WNT信令以进行侵袭和转移(Kaohand Kaoh, 2007)。WNT5A的表达在各种肿瘤实体中进行了描述。例如,在28%的前列腺癌病例中观察到了Wnt5a的异常蛋白表达,其促进肿瘤侵袭性(Yamamoto et al., 2010)。此外,WNT5A过度表达被描述为与卵巢癌(Badiglian et al., 2009)、黑色素瘤(Da Forno et al., 2008; Weeraratna et al., 2002)、GBM(Yu et al., 2007)、肺癌(Huang et al., 2005)和胰腺癌(Ripka et al., 2007)的较差预后和/或肿瘤分级增加相关。在HCC中,似乎经典Wnt信号通路有助于肿瘤启动和非典型信号传导至肿瘤进展(Yuzugullu et al., 2009)。

[0164] 成纤维细胞活化蛋白 α (FAP)-成纤维细胞活化蛋白(FAP)是一种属于丝氨酸蛋白酶家族的II型整合膜糖蛋白。FAP α 的推定丝氨酸蛋白酶活性和其体内诱导模式可能提示,该分子在发育、组织修复和上皮癌发生的过程中所起的作用为控制成纤维细胞生长或上皮-间充质相互作用(Scanlan et al., 1994)。大多数正常成人组织和良性上皮性肿瘤显示

很少或没有可检测到的FAP表达。但是，FAP表达在恶性乳房、结直肠、肺、皮肤和胰腺肿瘤90%以上的基质，伤口愈合纤维细胞、软组织肉瘤和一些胎儿间充质细胞中被检测到。FAP通过细胞黏附和迁移过程以及ECM成分的快速降解在癌细胞生长和转移中发挥潜在作用。因此，它存在于侵入ECM的肿瘤细胞和参与血管生成的内皮细胞，但在相同类型的非活动细胞中不表达(Dolznic et al.,2005;Kennedy et al.,2009;Rettia et al.,1993;Rettig et al.,1994;Scanlan et al.,1994;Zhang et al.,2010a)。

[0165] 细胞周期蛋白B1 (CCNB1) -CCNB1编码周期细胞蛋白B1,是与CDK1/CDC2相关以促进有丝分裂进展的几个有丝分裂细胞周期蛋白之一。CNB1过度表达在许多癌症类型中进行了描述,并且与肿瘤进展和预后不良相关,例如结直肠癌(Li et al.,2003)、乳腺癌(Aaltonen et al.,2009;Agarwal et al.,2009)、NSCLC(Cooper et al.,2009)和食管鳞状细胞癌(Huang et al.,2014)。此外,在胃癌中,CCNB1表达与区域淋巴结转移和较差临床预后相关(Begnami et al.,2010;Fujita et al.,2012)。针对CCNB1的抗体在肺癌或前列腺癌患者中检测到,并被提议作为肺癌早期检测的生物标志物(Egloff et al.,2005;Zhang et al.,2003)。

[0166] ATP酶、Ca⁺⁺转运、心肌、快速收缩1(ATP2A1),ATP酶、Ca⁺⁺转运、心肌、快速收缩2(ATP2A2) -这两个基因(ATP2A1和ATP2A2)均编码SERCA Ca(2+) -ATP酶。肌浆网(SR)1/ER钙ATP酶(SERCA)是钙泵,在整个SR/ER膜结合ATP水解和钙转运体(MacLennan et al.,1997)。SERCA由三个同源基因编码:SERCA1(ATP2A1)、SERCA2(ATP2A2)和SERCA3(Wu et al.,1995)。出现的一些证据表明,SERCA也可能对细胞凋亡、分化和细胞增殖的过程有直接的影响(Chami et al.,2000;Ma et al.,1999;Sakuntabhai et al.,1999)。编码SERCA1的ATP2A1的突变导致一些常染色体隐性形式的布罗迪氏病,其特征在于运动期间肌肉松弛性受损加重(Odermatt et al.,1996)。ATP2A2是与毛囊角化病相关的ATP酶,这是一种罕见的常染色体显性遗传性皮肤病,其特征在于异常角质化和棘层松解(Huo et al.,2010)。ATP2A2的种系改变可能导致易患肺癌和结肠癌,ATP2A2基因受损可能参与癌变(Korosec et al.,2006)。在小细胞肺癌(H1339)和腺癌肺癌(HCC)细胞系中,ER Ca²⁺-含量与正常人支气管上皮相比下降。Ca²⁺-含量下降与把钙泵送至ER内的SERCA 2表达降低有关(Bergner et al.,2009)。ATP2A2可能是结直肠癌(CRC)患者的潜在预后标志物。它在循环肿瘤细胞(CTC)中被检测,术后复发与基因过度表达显著相关(Huang et al.,2012b)。

[0167] 纤连蛋白1(FN1) -FN1编码纤连蛋白,这是一种糖蛋白,以可溶二聚体形式存在于血浆、以二聚体或多聚体形式存在于细胞表面并存在于细胞外基质。据报告,在大多数肿瘤中,FN1主要由癌相关成纤维细胞(CAF)和内皮细胞表达,而不是肿瘤细胞表达(Berndt et al.,2010)。FN1水平升高已经在一些癌症类型中进行了报告,且与预后不良或癌症进展有关,例如胆囊癌(Cao et al.,2015)、前列腺癌(von et al.,2013)和肾细胞癌(Steffens et al.,2012;Waalkes et al.,2010)。FN1也牵涉肺癌发病的刺激,包括细胞生长、化学耐药和凋亡抑制(综述见(Ritzenthaler et al.,2008))。

[0168] 胰岛素样生长因子2mRNA结合蛋白3(IGF2BP3) -IGF2BP3是胰岛素样生长因子-II mRNA结合蛋白家族中的一员,涉及mRNA定位、转换及翻译控制。该蛋白包含数个KH(钾同源)结构域,这些结构域在RNA结合中起着重要作用,并已知参与RNA合成和代谢。表达主要在胚胎发育期间发生,并在一些肿瘤中有描述。因此,IGF2BP3被认为是一种癌胚蛋白(Liao

et al.,2005)。IGF2BP3可能通过增强IGF-II蛋白合成以及通过稳定CD44mRNA诱导细胞黏附和侵袭从而促进肿瘤细胞增殖(Findeis-Hosey and Xu,2012)。此外,IGF2BP3表达在许多人类肿瘤中进行了研究,越来越多的证据表明,它介导迁移、浸润、细胞存活和肿瘤转移(Jenget al.,2009;Kabbarah et al.,2010;Li et al.,2011;Liao et al.,2011;Lu et al.,2011;Hwang et al.,2012;Samanta et al.,2012),也可能参与血管生成(Suvasini et al.,2011;Chen et al.,2012)。在肺腺癌中,在中度或低分化腺癌中可检测到较高频率的IGF2BP3表达,这可能与侵袭性生物学行为相关(Findeis-Hosey et al.,2010;Beljan et al.,2012;Findeis-Hosey and Xu,2012)。

[0169] 层粘连蛋白, γ 2 (LAMC2) -层粘连蛋白(细胞外基质糖蛋白家族)是基底膜的主要非胶原成分。它们牵涉多种生物学过程,包括细胞黏附、分化、迁移、信令、神经突向外生长和转移。LAMC2基因编码层粘连蛋白-5 γ 2链(层粘连蛋白-5的一部分),这是基底膜区的主要成分之一。LAMC2在胃癌中经常由启动子去甲基化上调(Kwon et al.,2011)。LAMC2被发现在异向性黑素瘤区域与缺血性黑色素瘤区域过度表达(Lugassy et al.,2009)。LAMC2是膀胱癌转移的生物标志物,其表达水平与肿瘤分级相关(Smith et al.,2009b)。LAMB3和LAMC2基因在32个NSCLC细胞系21个中共表达(66%),但在13个SCLC细胞系仅在1个中共表达(8%)。LAMB3和LAMC2基因的共表达也在检测的所有4个原发性NSCLC细胞中观察到,但在相应的非癌肺细胞中没有观察到(Manda et al.,2000)。

[0170] 脑内皮细胞黏附分子(CERCAM) -CERCAM定位于内皮细胞的表面(Starzyk et al.,2000),被映射到染色体9q34.11上,这是9q上的一个备选区域,确定为与家族性特发性脊柱侧凸相关(Miller et al.,2012)。CEECAM1基因在神经系统和在几个分泌组织(如唾液腺、胰腺、肝脏和胎盘)中广泛转录(Schegg et al.,2009)。CERCAM蛋白在结构上类似于ColGalT酶GLT25D1和GLT25D2。但是,虽然它的功能仍然未知,但是似乎在功能上与相关GLT25D1蛋白不同,而该蛋白没有诸如GLT25D1和GLT25D2蛋白质的糖基转移酶的功能(Perrin-Tricaud et al.,2011)。

[0171] 基质重塑相关蛋白5 (MXRA5) -MXRA5,也称为adlican,编码黏附蛋白聚糖,属于一组参与细胞外基质重塑和细胞-细胞黏附的基因(Rodningen et al.,2008)。虽然MXRA5在癌症中的作用未知,但是MXRA5体细胞突变已经在来自各种组织(如皮肤、脑、肺和卵巢)的肿瘤中确认。在adlican (MXRA5) 上进行的RT-PCR证实了相比正常结肠组织在结肠癌中过度表达的微数组结果(13个结直肠肿瘤和13个正常组织)(Zou et al.,2002)。在最近的一项研究中,基质重塑有关蛋白5是NSCLC中第二大最常见的突变基因(第一大为TP53)(Xionget al.,2012)。

[0172] ADAM金属肽酶域8 (ADAM8) -ADAM8是ADAM(解联蛋白和金属蛋白酶域)家族的一员。许多ADAM种类(包括ADAM8)在人恶性肿瘤中表达,它们参与生长因子活性和整合功能的调节,导致促进细胞生长和侵袭(Mochizuki and Okada,2007)。ADAM8的表达与EGFR呈正相关。两者均主要表达于细胞质内和细胞膜上(Wu et al.,2008)。ADAM8在检测的绝大多数肺癌中大量表达。ADAM8的外源性表达增加哺乳动物细胞的迁移活性,这表明ADAM8可能在肺癌的发展中起着明显作用(Ishikawa et al.,2004)。ADAM8与肺癌的预后不良相关(Hernandez et al.,2010)。ADAM8过度表达与较短的患者生存期有关,这是RCC远程转移的良好预测因子(Roemer et al.,2004b;Roemer et al.,2004a)。此外,ADAM8的表达水平和

蛋白酶活性与神经胶质瘤细胞侵袭活性相关,这表明ADAM8可能在脑癌肿瘤侵袭中发挥显著作用(Wildeboer et al.,2006)。

[0173] 黑色素瘤抗原家族F,1 (MAGEF1) -MAGE(黑素瘤相关抗原)超家族的大部分已知成员在肿瘤、睾丸和胎儿组织中表达,这被描述为癌症/睾丸表达模式(MAGE亚组I)。MAGE亚组I的肽已被成功地用于肽和DC疫苗接种(Nestle et al.,1998;Marchand et al.,1999;Marchand et al.,1999;Marchand et al.,1995;Thurner et al.,1999)。与此相反,一些MAGE基因(MAGE亚组II),如MAGEF1,在所测试的所有成年和胎儿组织中普遍表达,也在许多肿瘤类型,包括卵巢癌、乳腺癌、子宫颈癌、黑素瘤和白血病中表达(Nestle et al.,1998;Marchand et al.,1999;Marchand et al.,1999;Marchand et al.,1995;Thurner et al.,1999)。尽管如此,MAGEF1的过度表达可在NSCLC(Tsai et al.,2007)以及79%台湾结直肠癌症患者队列中检测到(Chung et al.,2010)。

[0174] 小核糖核蛋白200kDa (U5) (SNRNP200) -mRNA前剪接是由剪接体催化,剪接体是专门RNA和蛋白质亚基组成的复合体,可以消除转录mRNA前段的内含子。剪接体由小核RNA蛋白质(snRNP)U1、U2、U4、U5和U6以及大约80个保守蛋白质一起组成。SNRNP200是U4/U6双工解旋所需的基因,解旋是剪接体催化活化所必需的基因(Maeder et al.,2009)。在心脏、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾、胰腺中检测到了SNRNP200的表达(Zhao et al.,2009a)。SNRNP200突变最近被发现与常染色体显性色素性视网膜炎(adRP)相关(Benaglio et al.,2011;Liu et al.,2012)。

[0175] TPX2,微管相关,同源物(非洲爪蟾)(TPX2) -TPX2是一个纺锤体装配因子。它是有丝分裂纺锤体和凋亡期间微管正常装配所需的。TPX2是染色质和/或着丝点相关微管成核所需的(Bird and Hyman,2008;Moss et al.,2009)。新合成TPX2是几乎所有Aurora A活化和对卵母细胞成熟过程中体内p53充分合成和磷酸化所需的(Pascreau et al.,2009)。TPX2是一种细胞周期相关蛋白,在多种肿瘤类型中过度表达,如脑膜瘤(Stuart et al.,2010)、喉鳞状细胞癌(SCCL)(Cordes et al.,2010)、口腔鳞状细胞癌(SCC)(Shigeishi et al.,2009)、肝细胞癌(HCC)(Satow et al.,2010)、胰腺肿瘤(Warner et al.,2009)、卵巢癌(Ramakrishna et al.,2010)、肺鳞状细胞癌(Lin et al.,2006;Ma et al.,2006)。它是经常与Aurora-A共同过表达,形成具有致癌性质的新功能单元(Asteritiet et al.,2010)。TPX2表达是肺癌的预后指标(Kadara et al.,2009)。

[0176] β 诱导的转化生长因子,68kDa (TGFBI) -TGFBI最先被认定为人肺腺癌细胞株的TGF- β 诱导基因。它能编码分泌出的细胞外基质蛋白,该蛋白被认为作用于细胞黏附物和细胞外基质成分。正常情况下,TGFBI的表达主要存在于成纤维细胞、角质形成细胞和肌肉细胞(Bae et al.,2002)。TGFBI在几个实体肿瘤中过度表达,如结肠癌(Kitahara et al.,2001)、胰腺癌(Schneider et al.,2002)和肾癌(Ivanov et al.,2008)。TGFBI在肺癌中下调(Zhao et al.,2004;Shao et al.,2006),减少了肺肿瘤细胞的转移可能性,当过度表达时促进凋亡细胞死亡(Zhao et al.,2006)。在NSCLC样本中,观察到了TGFBI表达升高与对化疗反应之间有很强的相关性(Irigoyen et al.,2010)。

[0177] 细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)/细胞周期蛋白依赖性激酶6(CDK6) -CDK4是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的一员。它是蛋白激酶复合体的催化亚基,对于细胞周期G1期的进展很重要。这种激酶的活性局限于细胞周期期间G1至S期过渡期,其表达主要控制在转录

水平上(Xiao et al.,2007)。CDK4和CDK6酶及其调节剂(例如,细胞周期蛋白)在胚胎发育、体内平衡和癌症发生中起着关键作用(Graf et al.,2010)。在肺癌组织中,CDK4蛋白的表达水平相对于正常组织显著升高($P < 0.001$)。CDK4表达较高的患者总生存时间明显短于CDK4表达低的患者。多因素分析表明,CDK4表达水平是肺癌患者生存期的独立预后指标($P < 0.001$)。另外,抑制CDK4表达也显著升高细胞周期调节因子p21基因的表达(Wu et al.,2011)。在表达内源性K-ras癌基因的肺细胞中,消融CDK4而不是Cdk2或CDK6诱导立即的衰老反应。这样的反应不会发生于表达单个等位基因Cdk4的肺部,也不会发生于其他K-ras基因表达组织中。计算机断层扫描可检测的晚期肿瘤靶向Cdk4等位基因也诱导衰老并阻止肿瘤进展(Puyol et al.,2010)。

[0178] 多能聚糖(VCAN)-VCAN基因是聚集蛋白聚糖/多能聚糖蛋白聚糖家族的一员。VCAN已知与细胞外基质中的一些分子相关,包括透明质酸、腱生蛋白、纤蛋白-1、纤连蛋白、CD44和L-选择蛋白、原纤维蛋白、整联蛋白和链结蛋白(Zheng et al.,2004)。VCAN在多种组织中表达。它在组织发育的早期阶段高度表达,并且在组织成熟后其表达降低。其表达也在伤口修复和肿瘤生长期间升高(Ghosh et al.,2010)。RNA干扰敲减VCAN的人肺腺癌(A549)细胞在体内显著抑制肿瘤生长,但在体外不抑制(Creighton et al.,2005)。VCAN是p53基因的直接靶标。VCAN高表达也在早期前列腺癌和乳腺癌的肿瘤周围基质组织中发现,并与侵袭性肿瘤行为相关(Yoon et al.,2002)。

[0179] 泛素结合酶E2S(UBE2S)-UBE2S是促进有丝分裂退出的APC辅助因子。它的消耗延长药物诱导的有丝分裂阻滞并抑制有丝分裂滑脱(Garnett et al.,2009)。UBE2S在常见的人类癌症中过度表达。在食管癌中,UBE2S与肿瘤负荷程度显著相关。其阳性与新辅助治疗反应不佳和较差的生存期有关联(Chen et al.,2009)。在UBE2S启动子中,确定了早期生长反应-1(EGFR-1)和血清应答因子(SRF)结合位点。这些因子的过度表达增加了癌细胞增殖所需的UBE2S表达增加(Lim et al.,2008)。

[0180] 含SET和MYND结构域蛋白3(SMYD3)-据报告,SMYD3(组蛋白H3赖氨酸4特异性甲基转移酶)上调在结直肠癌(CRC)和肝细胞癌(HCC)的增殖中发挥关键作用。另一项研究表明SMYD3表达在绝大多数乳腺癌组织中也升高。与CRC和HCC一样,小干扰RNA对该基因的SMYD3压制导致乳腺癌细胞生长抑制,这表明SMYD3表达增加也是乳腺癌细胞增殖所必需的(Hamamoto et al.,2006)。通过RNA干扰敲减SMYD3下调了c-Met的表达,并抑制HGF诱导的细胞迁移和侵袭(Zou et al.,2009)。SMYD3在HeLa细胞增殖和迁移/侵袭中起着关键作用,并且它可能是人类宫颈癌一个有用的治疗靶标(Wang et al.,2008)。

[0181] 肌张力异常蛋白(DST)-DST(BPAG1-e)编码黏附连接斑块蛋白质的血小板溶素蛋白家族的一员。BPAG1-E在上皮组织中表达,锚固含角蛋白中间丝至半桥粒(HDS)。HD是促进分层和复杂上皮细胞中上皮基质黏附的多蛋白黏附复合体。其功能的调节在各种生物过程中至关重要,例如,伤口愈合期间角化细胞的分化和迁移以及肿瘤侵袭,在此过程中细胞从基质分离并获得一个能动表型(Litjens et al.,2006)。恶性黑色素瘤是侵袭性最强的肿瘤类型之一。BPAG1在人黑色素瘤细胞系(A375和G361)和正常人类黑素细胞中表达。黑色素瘤患者血清中抗BPAG1自身抗体的水平比健康志愿者血清中的水平显著提高($p < 0.01$)。抗BPAG1自身抗体可能黑色素瘤诊断的一个有前途的标志物(Shimbo et al.,2010)。DST与乳腺癌侵袭有关(Schuetz et al.,2006)。BPAG1基因可能参与鼻咽癌(NPC)的增殖、凋亡、侵

袭和转移 (Fang et al., 2005)。

[0182] 溶质载体家族34 (磷酸钠), 成员2 (SLC34A2) - SLC34A2是pH敏感型钠依赖性磷酸转运体。高分化肿瘤中SLC34A2基因表达上调可能反映卵巢致癌期间细胞分化过程, 可作为卵巢癌诊断和预后的潜在标志物 (Shyian et al., 2011)。RT-PCR证实在乳头状甲状腺癌中SLC34A2表达增加 (Kim et al., 2010b)。与正常组织相比, 乳腺癌组织中SLC34A2的基因表达也显著增加 (Chen et al., 2010)。

[0183] 细胞黏合素C (键生蛋白) (TNC) - 细胞黏合素C (TNC) 是一种细胞外基质蛋白, 在与迁移活性升高密切相关的过程中高度上调, 这些过程如: 胚胎发展 (Bartsch et al., 1992)、伤口愈合 (Mackie et al., 1988) 及肿瘤进程 (Chiquet-Ehrismann, 1993; Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003)。另外, TNC在具有高增殖指数的肿瘤血管中多量表达, 这表明, TNC参与瘤血管生成 (Kim et al., 2000)。TNC过度表达已在以下癌症中进行了进一步的报告: 结肠癌 (De et al., 2013); 腺样囊性癌, 它与最差的预后有关 (Siu et al., 2012); 鼻咽纤维血管瘤, 它可能促进血管生成 (Renkonen et al., 2012); 晚期黑色素瘤 (Fukunaga-Kalabis et al., 2010); 胰腺癌, 它发挥着增殖、迁移和转移作用 (Paron et al., 2011)。

[0184] 内质网钙结合蛋白1、EF-手型钙结合结构域 (RCN1), 内质网钙结合蛋白3、EF-手型钙结合结构域 (RCN3) - 内质网钙结合蛋白1是一种位于ER内腔中的钙结合蛋白。免疫组化检查证实RCN在胎儿和成人的各种器官中广泛分布, 主要分布于内分泌和外分泌器官。RCN过度表达可能在肿瘤发生、肿瘤侵袭和耐药性方面发挥作用 (Fukuda et al., 2007)。内质网钙结合蛋白1 (RCN1) 是内皮 (EC) 和前列腺癌 (PCa) 细胞系中的细胞表面相关蛋白。细胞表面上的RCN1表达被肿瘤坏死因数 α 治疗骨髓内皮细胞上调 (Cooper et al., 2008)。RCN1在结直肠癌 (CRC) 中上调, 局限于癌细胞或癌细胞附近的基质细胞。它可能是新的备选CRC标志物 (Watanabe et al., 2008)。RCN3是定位于分泌途径的多种EF手型钙结合蛋白CREC (Cab45/内质网钙结合蛋白/ERC45/钙腔蛋白) 家族的一员 (Tsuji et al., 2006)。在少突胶质细胞瘤中, RCN3表明是一种潜在的重要候选基因。虽然关于RCN3的功能知之甚少 (Drucker et al., 2009)。

[0185] 碱性核蛋白1 (BNC1) - 碱性核蛋白是一种具有高度限制组织分布的锌指蛋白 (Tseng, 1998)。迄今为止, 碱性核蛋白主要在分层扁平上皮基底角质形成细胞 (皮肤、口腔上皮、食管、阴道和角膜) 以及睾丸和卵巢配子细胞中检测到 (Tseng and Green, 1994; Weiner and Green, 1998)。现在有相当多的证据表明, 碱性核蛋白是rRNA基因 (rDNA) 的细胞类型特异性转录因子。碱性核蛋白的锌指在rDNA启动子内与三个进化上保守的位点相互作用 (Iuchi and Green, 1999; Tseng et al., 1999)。经CpG甲基化的表观遗传调控在肿瘤发生以及癌症治疗反应中起重要作用。BNC1在抗辐射H1299人非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系中低甲基化。H1299细胞中BNC1 mRNA表达的抑制也降低了这些细胞对电离辐射的抗性 (Kim et al., 2010a)。在慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 样本中也检测到BNC1的异常DNA甲基化 (Tonget al., 2010)。在肾细胞癌 (RCC) 中, BNC1的甲基化与预后较差有关, 与肿瘤大小、期别或分级无关 (Morris et al., 2010)。

[0186] 转化, 含酸性卷曲螺旋蛋白3 (TACC3) - TACC3存在于CH-TOG (结肠和肝肿瘤过度表达基因) 和内涵蛋白的复合体, 它们是在着丝粒纤维中交联的微管。TACC3在某些增殖性组织中表达, 包括睾丸、肺、脾、骨髓、胸腺和外周血白细胞。TACC3表达在某些人类肿瘤类型中

改变。在细胞中,TACC3位于中心体和纺锤体微管,而不是星体微管(Hood and Royle, 2011)。TACC3表达与p53表达有关,肿瘤中TACC3与p53高表达的患者具有比肿瘤中两种免疫染色法检测表达水平都低的患者预后明显较差($P=0.006$)。这表明,TACC3上升可能有利于NSCLC增殖并有助于肿瘤进展,同时TACC3表达是NSCLC临床结局的一个强有力的预后指标(Jung et al.,2006)。Tacc3可能是Notch信号传导途径的负调控因子(Bargo et al., 2010)。

[0187] 山核桃素样3(果蝇)(PCNXL3)-山核桃素样蛋白3(PCNXL3)是一种多通膜蛋白;它属于山核桃素家族。PCNXL3基因被映射至染色体11q12.1-q13区域。三种新的人类肿瘤相关易位断点均位于标志物D11S4933和D11S546之间的染色体11q13区域。因而,PCNXL3可能是一种11q13相关疾病基因(van et al.,2000)。

[0188] Drosha酶,核糖核酸酶III型(DROSHA)-Drosha酶是一种负责发起微RNA(miRNA)加工的2类核糖核酸酶III型酶,miRNA由细胞天然表达的短小RNA分子,通过与RNA诱导的沉默复合体(RISC)相互作用来诱导作为RNAi途径一部分的互补信使RNA(mRNA)的分裂而调节多种其他基因。微小RNA分子被合成为长RNA初级转录物(称作pri-miRNA),其通过Drosha裂解以产生约70个碱基对长的特征性茎-环结构(称为pre-miRNA)(Lee et al.,2003)。Drosha作为一种被称为微处理复合体的蛋白复合体的一部分存在,其中还包含双链RNA结合蛋白Pasha(也称为DGCR8)(Denli et al.,2004),这对于Drosha活性是必需的,并且能够结合正确加工所需要的pri-miRNA的单链片段(Han et al.,2006)。人类Drosha酶于2000年克隆出来,那时它被定为参与核糖体RNA前体加工的核dsRNA核糖核酸酶(Wu et al.,2000)。Drosha酶是首个被发现和克隆的人类核糖核酸酶III型酶。参与miRNA加工和活性的其他两个人类酶为Dicer酶和Argonaute蛋白。Drosha和Pasha均位于细胞核,在那里pri-miRNA加工为pre-miRNA。然后,后者进一步通过核糖核酸酶Dicer酶加工进入细胞质的成熟miRNA(Lee et al.,2003)。Drosha酶和其他miRNA加工酶可能是癌症预后的重要酶(Slack and Weidhaas,2008)。

[0189] 细胞分裂周期6同源物(酿酒酵母)(CDC6)-CDC6蛋白在DNA复制早期步骤中充当调控器。它在细胞周期G1期期间位于细胞核,但在S期开始转运至细胞质中。另外,CDC6在高等真核细胞中通过与ATR相互作用来调节复制步骤活化(Yoshida et al.,2010)。CDC6对DNA复制非常关键,其失调参与肿瘤发生。研究发现,通过RNA干扰(RNAi)的CDC6下调阻止细胞增殖,促进细胞凋亡(Lau et al.,2006)。CDC6被发现在数种癌症中过度表达。过度表达CDC6的癌症类型为胃癌(Tsukamoto et al.,2008)、脑肿瘤(Ohta et al.,2001)、口腔鳞状细胞癌(Feng et al.,2008)、子宫颈癌(Wang et al.,2009)和恶性间皮瘤(Romagnoli et al.,2009)。

[0190] 脱碘酶,碘化甲腺氨酸,II型(DI02)-由DI02基因编码的蛋白质属于碘化甲腺氨酸脱碘酶家族。它在甲状腺中高表达,并可能显著导致格雷夫斯病和甲状腺腺瘤患者甲状腺T3产生的相对增加(Meyer et al.,2008);(de Souza Meyer et al.,2005)。基因表达模式在向上和向下进展类型的鼻咽癌(NPC)之间显著不同。DI02基因的表达在向下进展型癌症(向下=远程转移)中高于向上进展型癌症(颅底局部生长和侵袭),这可能与NPC的转移可能性密切相关(Liang et al.,2008a)。DI02mRNA以及DI02活性在脑肿瘤中表达(Murakami et al.,2000)。肺中D2活性存在于并类似于外周肺和肺癌组织(Wawrzynska

etal.,2003)。

[0191] 驱动蛋白家族成员26B (KIF26B) -驱动蛋白是属于存在于真核细胞中一类动力蛋白的蛋白质。驱动蛋白沿微管丝移动,并且通过ATP水解获得力量(因此驱动蛋白为ATP酶)。Kif26b,一种驱动蛋白家族基因,是Sa111的下游靶标(Nishinakamura et al.,2011)。Kif26b对肾发育至关重要,因为其调节与输尿管芽接触的间充质细胞的黏附。Kif26b体外过度表达通过与非肌肉肌球蛋白的相互作用导致细胞黏附增加(Terabayashi et al.,2012;Uchiyama et al.,2010)。

[0192] 丝氨酸蛋白酶抑制剂,分化体B(卵清蛋白),成员3 (SERPINB3) -鳞状细胞癌抗原(SCCA),也称为SERPINB3,是丝氨酸蛋白酶抑制剂(serp) 高分子量家族的一员(Suminamiet al.,1991)。在头颈部组织癌症和其他上皮癌中报告有高水平表达(Torre,1998)。根据报告,与肿瘤周围组织相比,SCCA在肿瘤组织中过度表达,这表明其作为HCC组织学检测潜在标志物的作用(Pontisso et al.,2004)。丝氨酸蛋白酶抑制剂B3/B4,特别是丝氨酸蛋白酶抑制剂B4,似乎在异常上皮细胞增殖中发挥着重要作用。丝氨酸蛋白酶抑制剂B3/B4的评估可能在预测疾病进展中有预后价值,特别是对于肺癌易感性增加的患者(Calabrese et al.,2012)。一方面,SCCA1 (SERPINB3) 抑制溶酶体损伤诱导的细胞死亡,另一方面,它通过启动独立于死亡受体凋亡途径的胱天蛋白酶-8而使细胞对ER应激敏感(Ullman et al.,2011)。一些研究表明,SERPINB3在表皮屏障破坏的引导中起重要作用。SERPINB3可能是表皮屏障功能的关键决定因素(Katagiri et al.,2010)。

[0193] 细胞周期蛋白依赖性激酶1 (CDK1) -CDC2(细胞分裂周期2),也称为p34cdc2或Cdk1(细胞周期蛋白依赖性激酶1),属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族Cdk,在细胞周期调控中发挥着关键作用(Vermeulen et al.,2003)。在多种癌症中发现有CDC2过量表达,虽然根据(Vermeulen et al.,2003)的数据其他细胞周期蛋白(如,细胞周期蛋白)的表达失调更加频繁。针对NSCLC的CDC2过度表达进行了描述(Xu et al.,2011;Zhang et al.,2011)。Perumal等人(2012)报告CDC2过度表达与预后不良相关(Perumal et al.,2012)。此外,一项研究表明,临床上可使用CDC2作为早期非小细胞肺癌复发的预测因子(Kubo et al.,2014)。

[0194] 胶原蛋白,XI型, α 1 (COL11A1) -COL11A1编码XI型胶原蛋白(较小的纤维状胶原蛋白)两个 α 链之一。根据报告,COL11A1在几种癌症中,例如结直肠癌(Freire et al.,2014)、乳腺癌(Ellsworth et al.,2009)、胃癌(Zhao et al.,2009b)、膀胱肿瘤(Ewald et al.,2013)中上调。卵巢癌中COL11A1的表达与癌症复发和生存期较差有关。COL11A1的敲减减少了小鼠体外细胞迁移、侵袭和肿瘤进展(Cheon et al.,2014;Wu et al.,2014b)。根据微数组分析结果,与健康对照组相比,COL11A1被发现在不吸烟女性肺癌患者的肺组织中差异表达(Lv and Wang,2015)。

[0195] 胶原蛋白,I型, α 2 (COL1A2) -COL1A2编码I型胶原蛋白的亲 α 2链,三螺旋结构包括两个 α 1链和一个 α 2链。在胃癌样本中,COL1A2被发现相比正常组织上调(Yan et al.,2014;Yang et al.,2007),并与较晚的分期相关(Yasui et al.,2004)。据报告,COL1A2在骨肉瘤(Wu et al.,2014a)、晚期膀胱癌(Fang et al.,2013)、头颈部/口腔鳞状细胞癌(HNOSCC)(Yeet al.,2008)和髓母细胞瘤(儿童中最常见的恶性脑肿瘤)中上调(Liang et al.,2008b)。

[0196] 骨膜素,成骨细胞特异性因子(POSTN)-POSTN,该基因编码与成束蛋白家族具有相似性的蛋白,参与细胞存活和血管生成,已成为各种类型人类癌症肿瘤进展的一种很有前途的标志物(Ruan et al.,2009)。骨膜素蛋白质或mRNA高表达在大多数实体瘤中检测到,包括乳腺癌(Zhang et al.,2010c)、结肠癌(Kikuchi et al.,2008)、头颈癌(Kudo et al.,2006)、胰腺癌(Kanno et al.,2008)、乳头状甲状腺癌(Puppini et al.,2008)、前列腺癌(Tischler et al.,2010)、卵巢癌(Choi et al.,2010)、肺癌(Takanami et al.,2008)、肝癌(Utispian et al.,2010)以及食管鳞状细胞癌(Kwon et al.,2009)。骨膜素在肺癌中异常高表达,与血管生成、侵袭和转移有关(Takanami et al.,2008)。A549非小细胞肺癌(NSCLC)细胞骨膜素的沉默抑制肿瘤细胞生长和减少细胞侵袭(Wu et al.,2013c)。

[0197] 含AT钩,DNA结合基序1(AHDC1)-该基因编码含有两个AT-钩(可能在DNA结合中起作用)的蛋白质。这种基因的突变与脑视觉缺陷相关(Bosch et al.,2015)。采用全基因组测序法,AHDC1新发截断突变在征候群表现的语言发育迟缓、肌张力低下和睡眠呼吸暂停的患者中确定。突变最有可能导致这种遗传性征候群(Xia et al.,2014)。

[0198] 凋亡诱导因子,线粒体相关,2(AIFM2)-该基因编码结合单链DNA的黄素蛋白氧化还原酶,且被认为在出现细菌和病毒DNA时可促进凋亡。AIFM2没有充分表征,但是有限的证据表明,它可能充当肿瘤抑制因子。AIFM2表达由肿瘤抑制基因p53活化,p53的异位表达已被证明可诱导细胞凋亡。此外,AIFM2表达显示在一系列人类肿瘤(包括肾、胃、结直肠以及其他癌症样本)中下调(Ohiro et al.,2002;Wu et al.,2004)。但是,在基因敲除的小鼠模型中,AIFM2不是p53依赖性肿瘤抑制所需要的(Mei et al.,2006)。在细胞培养中,AIFM2参与介导腺苷诱导的细胞凋亡(Yang et al.,2011)。

[0199] 6号染色体开放阅读框132(C6orf132)-C6orf132编码6号染色体开放阅读框132。基因C6orf132位于染色体6p21.1上(Mungall et al.,2003)。这种基因的功能尚不清楚。

[0200] CCZ1液泡蛋白运输和生物合成相关同源基因(酿酒酵母)(CCZ1),CCZ1液泡蛋白运输和生物合成相关同源基因B(酿酒酵母)(CCZ1B)-CCZ1编码CCZ1液泡蛋白质运输和生物合成相关基因同源基因(酿酒酵母)。CCZ1B编码CCZ1液泡蛋白质运输和生物合成相关基因同源基因B(酿酒酵母)。CCZ1和CCZ1B被确定为(通过比较蛋白质组学)在秀丽隐杆线虫中进化上保守的人基因(Lai et al.,2000)。基因CCZ1和CCZ1B位于染色体7p22.1上(Hillier et al.,2003)。CCZ1似乎通过在吞噬小体中募集GTP酶RAB7A7在溶酶体生物发生和吞噬小体成熟中起作用(Nieto et al.,2010)。CCZ1B基因是一个未表征的基因。

[0201] 胶原蛋白,V型, $\alpha 2$ (COL5A2)-该基因编码低丰度纤维胶原蛋白之一的 α 链。根据报告,与邻近的非癌组织相比,COL5A2在结直肠癌组织样本中上调(Fischer et al.,2001)。导管原位癌(DCIS)、浸润性导管癌(IDC)和乳腺癌患者基质的对应样本显示,COL5A2在IDC中表达升高(Vargas et al.,2012)。骨肉瘤中,COL5A2被报告为上调,在肿瘤发生中起重要作用(Wu et al.,2014)。

[0202] 聚集亚家族成员12(COLEC12)-该基因编码C-凝集素家族的一员,该家族具有胶原蛋白样序列和糖识别结构域。COLEC12蛋白是一种清道夫受体,这是一种显示与宿主防御相关的多个功能的细胞表面糖蛋白。COLEC12基因表明是未分化甲状腺癌可能的候选生物标志物(Espinal-Enriquez et al.,2015)。COLEC12在HER2阳性乳腺癌细胞系BT474中差异表达,可能促进曲妥单抗的效率(von der Heyde et al.,2015)。

[0203] 套体素蛋白复合体,亚基 $\gamma 1$ (COPG1) -COPG1编码套体素复合体1 (COPI) 的蛋白质亚基。COPI膜泡介导逆行运输(从高尔基体返回至ER) 和高尔基体内运输。COPI套体的胞浆前体是七聚体套体素复合体,可被认为由两个亚复合体组成。第一由 β -、 γ -、 δ -和 ξ -COP亚基组成,它们与AP网格蛋白接头亚基远亲同源 (Watson et al.,2004)。EGFR的EGF依赖性核运输通过从高尔基体到ER的逆行运输调节,其涉及EGFR与 γ -COP (COPI套体素的亚基之一) 的关联性 (Wang et al.,2010b)。通过免疫组化方法,COPG1被证实在肺癌衍生内皮细胞和癌性肺细胞中大量表达 (Park et al.,2008)。

[0204] CSNK2A2-酪蛋白激酶II亚基 α -启动因子是在人体中由CSNK2A2基因编码的酶。一项回顾性研究表明,CSNK2A1可能是NSCLC患者完全切除后独立于淋巴结转移状态的有用预后标志物 (Wang et al.,2010c)。CSNK2A2与晚期人类结直肠癌的肿瘤进展相关 (Nibbe et al.,2009)。

[0205] 表达树突细胞七通跨膜蛋白 (DCSTAMP) -该基因编码主要在树突细胞中表达的七通跨膜蛋白。所编码的蛋白参与树突状细胞的一系列免疫功能。DCSTAMP已被确定为在乳头状甲状腺癌中差异表达的基因 (Lee et al.,2009),随后被证实在这类样本中表达水平升高 (Kim et al.,2010)。

[0206] 先天性角化不良1,dyskerin (DKC1) -DKC1基因在两个不同复合体中发挥作用。Dyskerin介导核糖体和小核RNA上尿苷的修饰以及端粒酶RNA组分 (TERC) 的稳定化。在人类肿瘤中,dyskerin表达被发现与rRNA修饰和TERC水平均相关 (Penzo et al.,2015)。此外,dyskerin过度表达与各种肿瘤类型 (例如HCC) 的预后不良相关 (Liu et al.,2012)。

[0207] 双特异性酪氨酸(Y)-磷酸化调节激酶2 (DYRK2) /双特异性酪氨酸(Y)-磷酸化调节激酶4) (DYRK4) -DYRK2和DYRK4属于Dyrk蛋白激酶家族 (有5个成员的哺乳动物家族),其参与细胞分化、增殖和存活的调节 (Papadopoulos et al.,2011)。DYRK2通过降解Snail控制乳腺癌的上皮-间充质转换 (Mimoto et al.,2013)。DYRK2调控p53以诱导细胞凋亡并增强对DNA损伤的回应:在暴露于基因毒性应激后,DYRK2易位到细胞核并通过磷酸化启动p53 (Meulmeester and Jochemsen,2008;Taira et al.,2007)。DYRK4基因映射到染色体12p13.32,其被描述为CRC的一个易感基因,因为CCND2基因受到了影响 (Jia et al.,2013; Peters et al.,2013)。一些研究强调了DYRK4在神经元分化中的作用 (Leypoldt et al.,2001;Slepek et al.,2012)。

[0208] ER01样(酿酒酵母) ER01L-ER01样蛋白 α 是在人类中由ER01L基因编码的蛋白质。ER01- α 是存在于内质网和缺氧条件下被诱导的氧化酶。ER01- α 在多种肿瘤类型中呈过度表达。此外,癌症相关ER01- α 通过氧化折迭调节MHC I类分子的表达 (Kukita et al.,2015)。研究表明,hER01- α 在癌症细胞中的表达与预后较差相关联,因此可能是乳腺癌患者的预后因子 (Kutomi et al.,2013)。在自然人类肿瘤中,ER01L mRNA在与VEGF表达上调一致的缺氧微环境中被专门诱导。研究表明,通过siRNA对ER01L产生减少导致VEGF分泌的显著抑制,使增殖能力受损并增强细胞凋亡 (May et al.,2005)。

[0209] 序列相似性家族83,成员A (FAM83A) -FAM83A被确定在几个不同癌组织类型中升高 (Cipriano et al.,2014)。但是,FAM83A的功能尚不清楚 (Boyer et al.,2013)。FAM83A在肺癌中被预测为一种肿瘤特异性基因,其在肺癌样本中表达已被实验证实。在腺癌中表达特别高 (Li et al.,2005)。其他人报告了与肺癌疾病进展相关 (Liu et al.,2008)。

[0210] 脆性X智力低下,常染色体同源物1 (FXR1) -由FXR1基因编码的蛋白是一种RNA结合蛋白,与功能上相似的蛋白质FMR1和FXR2相互作用。FXR1在多种人类疾病(包括癌症)中表达失调。FXR1充当癌基因,这可能会增加癌细胞的增殖、迁移和侵袭(Jin et al.,2015)。FXR1是NSCLC一种新的癌基因,FXR1其调节功能的方式是在肺癌细胞两个相同的扩增子内与两种其他癌基因——蛋白激酶C, ι (PRKCI) 和上皮细胞转化2 (ECT2) 形成一种新的复合体(Qian et al.,2015b)。据报告,NSCLC中FXR1表达增加是预测存活差的候选生物标志物,可能代表一种新的治疗靶标。此外,FXR1表达在多种人类癌症中与临床结果差有关,这表明该RNA结合蛋白较广泛地牵涉癌症进展(Qian et al.,2015a)。

[0211] G2/M期特异性E3泛素蛋白连接酶 (G2E3) -G2/M期特异性E3泛素-蛋白连接酶是在人体中被G2E3基因编码的酶。G2E3在细胞质和细胞核之间穿梭,集中在核仁并重新定位至核质,以回应DNA损伤。G2E3是一个双功能泛素连接酶,是早期胚胎形成过程中预防细胞凋亡所需的(Brooks et al.,2008)。一些研究结果表明,G2E3是DNA损伤应答和细胞存活分子决定因素,并且其损耗使肿瘤细胞对DNA损伤治疗敏感(Schmidt et al.,2015b)。此外,G2E3丢失触发凋亡并减少癌细胞增殖。因此,G2E3充当一种存活因子(Schmidt et al.,2015a)。

[0212] 鸟苷酸结合蛋白5 (GBP5) -人鸟苷酸结合蛋白5 (hGBP5) 属于干扰素- γ 诱导大GTP酶家族,因促炎性细胞因子导致的高感应而被熟知(Wehner and Herrmann,2010)。hGBP5存在于三种剪接变体中,形成两种不同的蛋白质,其中所述的肿瘤特异性蛋白的C端被截短97个氨基酸(Fellenberg et al.,2004)。

[0213] 谷氨酰胺酶 (GLS) GLS基因编码K型线粒体谷氨酰胺酶。谷氨酰胺酶 (GLS) 将谷氨酰胺转换为谷氨酸,在癌细胞代谢、生长和增殖中起着关键作用。一些研究表明,GLS是肿瘤发生和支持小分子所需要的,且GLS基因抑制作为GLS肿瘤细胞自主依赖性靶向作用的可能方法以用于癌症治疗(Xiang et al.,2015)。GLS剪接变体的瞬时敲减表明,GAC损失对NSCLC肿瘤细胞生长产生最不利的影响(van den Heuvel et al.,2012)。在结肠癌(Huang et al.,2014a)、肝细胞癌(Yu et al.,2015)和胰腺导管腺癌(PDA)(Chakrabarti et al.,2015)中,GLS1的表达被上调并与临床病理因素相关。

[0214] 热休克70kDa蛋白2 (HSPA2) -HSPA2已被确定为在一亚组人类癌症中以正常水平表达的潜在促癌蛋白,如乳腺癌(Mestiri et al.,2001)、子宫颈癌(Garg et al.,2010a)、膀胱上皮癌(Garg et al.,2010c)、鼻咽癌(Jalbout et al.,2003)和恶性肿瘤(Chouchane et al.,1997)。在来自几种人类癌症细胞系中也观察到了一定程度的HSPA2基因活性(Scioglinska et al.,2008),而癌症细胞中HSPA2基因的沉寂导致生长停滞和致瘤性降低(Rohde et al.,2005;Xia et al.,2008)。此外,HSPA2基因多态性与罹患肺癌风险增加相关(Wang et al.,2010a)。HSPA2的过度表达与乳腺癌、宫颈癌和膀胱尿路上皮癌的细胞增殖增加、分化差、淋巴结转移相关(Garg et al.,2010a;Garg et al.,2010c;Mestiri et al.,2001)。

[0215] 热休克70kDa蛋白8 (HSPA8) -HSPA8基因编码热休克蛋白70家族Hsc70的一员,该家族包含热诱导和组成性表达的成员。HSPA8与新生多肽结合以促进正确的蛋白质折迭(Beckmann et al.,1990)。HSC70作为分子伴侣,辅助蛋白质合成、折迭、装配、细胞室之间转运以及降解(Bukau and Horwich,1998;Hartl and Hayer-Hartl,2002)。HSC70在非恶性

乳腺细胞以及乳腺癌细胞中表达 (Kao et al., 2003; Vargas-Roig et al., 1998), HSP/HSC70在化疗耐药癌细胞中过度表达 (Ciocca et al., 1992; Lazaris et al., 1997) 存进了对这些蛋白可能的临床指标进行研究 (Ciocca and Calderwood, 2005)。这一分泌的hsc70伴侣在细胞增殖中发挥潜在作用, 可能导致过度表达组织蛋白酶D癌症细胞的更高比例的肿瘤生长 (Nirde et al., 2010)。此外Ruisin等人报告了该基因多态性与肺癌风险之间有关 (Rusin et al., 2004)。

[0216] 热休克70kDa蛋白1A (HSPA1A) -HSPA1A, 也称为HSP72, 被证明在癌症中强烈上调, 并通过抑制p53依赖性和p53非依赖性衰老途径而在肿瘤细胞生长中发挥关键作用 (Sherman, 2010)。在RCC (Atkins et al., 2005) 和胃肠癌 (Wang et al., 2013a) 中过度表达, 其中后者显示与淋巴结和远程转移的进展、浸润和存在有显著相关性。

[0217] 热休克70kDa蛋白1B (HSPA1B) -HSPA1B, 也称为HSP70-2, 编码睾丸特异性热休克蛋白70-2, 对于精母细胞和癌细胞的生长是必不可少的 (Hafield and Lovas, 2012)。不同的研究表明, HSP70-2在宫颈癌 (Garg et al., 2010b)、肾细胞癌 (Singh and Suri, 2014) 和膀胱癌的疾病进展中起着重要作用, 基因内多态性与胃癌发展相关 (Ferrer-Ferrer et al., 2013)。有些功能性HSPA1B变体与肺癌风险和生存相关。这些Hsp 70基因变体可能会为预测肺癌风险和预后提供有用的生物标志物 (Szondy et al., 2012; Guo et al., 2011)。

[0218] 热休克70kDa蛋白1样 (HSPA1L) -热休克70kDa蛋白1L是在人体中由染色体6上的HSPA1L基因编码的蛋白。虽然它与HSPA1A和HSPA1B具有很近的同源性, 但是调节不同且不是可热诱导的 (Ito et al., 1998)。基因内多态性与前列腺癌的易感性和预后 (Sfar et al., 2010) 以及肝细胞癌易感性 (Medhi et al., 2013) 有关。

[0219] 热休克70kDa蛋白6 (HSP70B') (HSPA6) -热休克蛋白 (Hsp) 70B' 是严格可诱导的人Hsp70伴侣蛋白, 在大多数细胞中很少有或没有基础表达水平 (Noonan et al., 2007)。HSPA6, 也被称为热休克蛋白70B', 显示在胶质母细胞瘤细胞 (Huang et al., 2014b) 中通过Y15处理和头颈部癌细胞 (Narita et al., 2002) 热休克而上调。HSPA6水平高可能与HCC的早期复发相关 (Yang et al., 2015)。

[0220] 热休克蛋白70kDa 7 (HSP70B) (HSPA7) -HSPA7是一种假基因。

[0221] HSPA (热休克70kDa) 结合蛋白, 细胞质辅助伴侣分子1 (HSPBP1) -热休克结合蛋白HspBP1是Hsp70辅伴侣分子家族的一员。HspBP1是一种辅助伴侣分子, 结合并调节伴侣分子Hsp70。HspBP1和Hsp70水平在乳腺癌患者的血清中均显著高于健康个体血清中的水平 (Souza et al., 2009)。HSPBP1在白血病患者中过度表达 (Sedlackova et al., 2011)。HspBP1在人HCV-HCC中上调, 这种增加与Hsp70水平增加相关 (Yokoyama et al., 2008)。

[0222] 含GTP酶启动蛋白IQ基序1 (IQGAP1) -IQGAP1, 也被称为p195, 是在人体中由IQGAP1基因编码的普遍表达的蛋白质。IQGAP1是几个不同细胞过程, 特别是细胞骨架重排的关键介体。最近的研究表明IQGAP1在癌症中的潜在作用, 这由在一系列肿瘤中观察到的IQGAP1过度表达和不同的膜定位而得到证明 (Johnson et al., 2009)。IQGAP1过度表达可能在胰腺癌发生和进展中发挥重要作用 (Wang et al., 2013c)。抑制IQGAP1表达减少了食管鳞状细胞癌 (ESCC) 中的肿瘤细胞生长、迁移和侵袭。 (Wang et al., 2014c)。此外, 卵巢癌干细胞样细胞 (CSC-LCS) 分化期间IQGAP1表达增加参与侵略性细胞行为, 这可能导致卵巢癌转移 (Huang et al., 2015a)。

[0223] 整联蛋白,β6 (ITGB6) -ITGB6是整联蛋白的子类型,只在上皮细胞表面表达,并且是细胞外基质蛋白的受体(Weinacker et al.,1994)。一项研究发现,相对于正常组织,ITGB6在所研究的10种肿瘤类型中表达增加。据报告,子宫、皮肤、食管、头颈部鳞状细胞癌的ITGB6表达频率最高。值得注意的是,ITGB6抗体介导的阻断抑制体内肿瘤进展(VanArsen et al.,2008)。ITGB6已被开发为肿瘤特异性药物递送的靶标,并增强结肠癌的治疗疗效(Liang et al.,2015;Zhao-Yang et al.,2008)。在乳腺癌中,无论是mRNA或蛋白质的ITGB6高表达均与很差的生存和远处转移增加有关。ITGB6靶向抗体抑制乳腺癌小鼠模型的肿瘤生长(Allen et al.,2014)。

[0224] 赖氨酸(K) -特异性脱甲基酶6B(KDM6B) -KDM6B,也称为JMJD3,是在人体中由KDM6B基因编码的组蛋白脱甲基酶。KDM6B通过组蛋白3赖氨酸27残基的去甲基化而影响转录调控。KDM6B表达低是手术切除结肠癌患者预后差的独立预测因子($P=0.042$) (Yokoyama et al.,2008)。此外,KDM6B过度表达通过启动线粒体依赖性凋亡并通过减弱NSCLC细胞侵袭转移级联而抑制细胞生长(Ma et al.,2015)。另一方面,KDM6B在肾透明细胞癌(ccRCC)呈高水平表达,并与ccRCC预后差呈正相关。KDM6B敲减能在体外抑制ccRCC肿瘤形成(Li et al.,2015)。此外,KDM6B的失调可能有助于通过抑制p53途径形成神经胶质瘤,导致终端分化阻滞(Ene et al.,2012)。

[0225] 角蛋白9,I型(KRT9) -角蛋白9是一种I型角蛋白,在人体中由KRT9基因编码。它仅发现于手掌和脚底的终末分化表皮中。编码本蛋白的突变导致表皮掌跖角化病(Reis et al.,1994)。KRT9在HCC中上调。这种过度表达可能在HCC转移中起着至关重要的作用,并且可以作为预测HCC转移的一个潜在血清标志物(Fu et al.,2009)。

[0226] LINE1反转录转座元素1(L1RE1) -L1RE1基因,也被称为LRE1,编码“LINE”(长散布核元素)反转录转座元素(LRE),这是一种含有自主转座子活性的移动DNA序列。根据报告,LINE1反转录转座子家族在许多癌症中低甲基化,反映了基因组的普遍甲基化状态(Ostertag and Kazazian,Jr.,2001)。一个长散布核元素重复区域LRE1位于22q11-q12,是普遍甲基化状态不变的指标(Chalitchagorn et al.,2004;Ostertag and Kazazian,Jr.,2001)。一些数据表明,LRE1相对甲基化是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的一个独立后生物标志物(Hsiung et al.,2007)。

[0227] 层粘连蛋白,β3(LAMB3) -LAMB3编码层粘连蛋白的β3亚基,其与α和γ亚基一起形成层粘连蛋白5。在甲状腺乳头状癌(PTC)(Barros-Fillho et al.,2015)、宫颈鳞状细胞癌(宫颈SCC)(Yamamoto et al.,2013)和口腔鳞状细胞癌(OSCC)(Tanis et al.,2014)中LAMB3上调。基因数组和生物信息学分析提示LAMB3是参与肺癌的关键基因。该基因的敲减抑制人肺癌细胞体外和体内侵袭和转移。LAMB3在肺癌患者中过度表达,其表达与淋巴结转移相关(Wang et al.,2013b)。

[0228] 溶酶体蛋白跨膜5(LAPTM5) -LAPTM5基因编码与溶酶体相关的细胞内小泡膜蛋白。LAPTM5在肺癌中异常甲基化,甲基化与肿瘤分化状态相关(Cortese et al.,2008)。LAPTM5阳性囊泡与神经母细胞瘤的自发消退过程中发生的程序性细胞死亡密切相关(Inoue et al.,2009)。CD1e蛋白参与树突状细胞中脂质抗原的提呈。LAPTM5控制CD1e泛素化或可溶性溶酶体CD1e蛋白的产生(Angenieux et al.,2012)。

[0229] 微小染色体维持复合体成分4(MCM4) -由MCM4基因编码的蛋白质是启动真核基因

组复制所必需的高度保守的微小染色体维持蛋白(MCM)中的一个。MCM4在膀胱癌(Zekri et al.,2015)下调,与正常肺组织相比,在肺腺癌中差异表达(Zhang et al.,2014)。MCM4过度表达与乳腺癌患者较短生存相关(Kwok et al.,2015)。

[0230] 微小染色体维持复合体成分5(MCM5)-MCM5涉及DNA复制和细胞周期调控。MCM5高表达水平被证明与口腔鳞状细胞癌(Yu et al.,2014)、子宫颈癌(Das et al.,2013)、胃癌(Giaginis et al.,2011)和结肠癌(Burger,2009)的进展和较差预后相关。

[0231] 黑素曲菌素(MREG)MREG通过逆行微管依赖性黑素体运输的调节在细胞内黑素体分布中起作用(Wu et al.,2012)(Ohbayashi et al.,2012)。此外,MREG还在色素掺入到黑素调节中发挥作用(Rachel et al.,2012)。雌激素受体阳性的乳腺癌细胞中,MREG显示通过其3'非编码区的miRNA-26靶向作用。但是,MREG直接参与miRNA-26介导的细胞增殖不能得到证实(Tan et al.,2014)。

[0232] NODAL调节剂1(NOM01)/NODAL调节剂2(NOM02)/NODAL调节剂3(NOM03)-NOM01、NOM02和NOM03基因是位于染色体16臂p上复制区域的三个高度相似的基因。这些基因编码可能具有相同功能的密切相关蛋白质。NOM01被确认为在皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)细胞系HuT78中的过度表达基因(Lange et al.,2009)。NOM01是Nodal信号传导的拮抗剂。Nodal是转化生长因子- β (TGF- β)超家族的信号传导因子,在脊椎发育中起着关键作用(Haffner et al.,2004)。

[0233] 核孔蛋白153kDa(NUP153)-核孔蛋白153(Nup153),是核孔复合体(NPC)的一个组成部分,涉及NPC与核纤层的相互作用。Nup153耗竭诱导戏剧性细胞骨架重排,其损害人乳腺癌细胞的迁移(Zhou and Pante,2010)。NUP153核孔蛋白调节细胞核与细胞质之间的特异性蛋白分布,有趣的是,包括TGF β 信号传导的转导因子SMAD2(Xu et al.,2002)。最近,一些分析显示了胰腺癌核孔蛋白NUP153可能的新颖致癌功能(表面上通过调制TGF β 信令)(Shain et al.,2013)。

[0234] PERP、TP53凋亡效应子(PERP)-PERP是编码桥粒蛋白的p53/p63调节基因,该蛋白在细胞-细胞黏附和肿瘤抑制中起着关键作用。PERP表达的丧失与过渡至鳞状细胞癌(SCC)以及口腔SCC患者局部复发增加相关(Kong et al.,2013)。PERP表达在许多人类乳腺癌细胞系中降低(Dusek et al.,2012)。一些研究表明,Perp缺乏通过增强细胞存活、桥粒损失和炎症促进癌症发生(Beaudry et al.,2010)。PERP是p53基因的细胞凋亡相关靶标,单独活化足以诱导细胞凋亡途径,导致细胞死亡(Chen et al.,2011)。

[0235] 推定同源结构域转录因子1(PHTF1)/推定同源结构域转录因子2(PHTF2)-PHTF1(推定同源域转录因子)是位于人类基因组1p11-P13的推定同源基因。这种基因是进化上保守的,并主要表达于睾丸(Manuel et al.,2000)。作为一种转录因子,PHTF1基因主要参与如DNA依赖性转录的生物过程并调节生物过程。PHTF1过度表达负责调节T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)细胞系的细胞增殖和凋亡。PHTF1可以是肿瘤抑制样基因,用于触发PHTF1-FEM1b-Apaf-1细胞凋亡途径的治疗靶标(Huang et al.,2015b)。

[0236] 推定同源结构域转录因子2是在人体中由PHTF2基因编码的蛋白质。PHTF2主要在肌肉中表达,位于人类基因组7q11.23-q21(Manuel et al.,2000)。

[0237] 包含普列克底物蛋白同源结构域,家族M(有RUN结构域)成员1(PLEKHM1)-由PLEKM1基因编码的蛋白质是骨吸收必不可少的,并且在破骨细胞囊泡运输中可能发挥重要

作用。这种基因的突变与常染色体隐性遗传骨硬化型6 (OPTB6) 相关 (van et al., 2004)。研究表明PLEKHM1为上皮性卵巢癌的候选易感基因 (Permeth-Wey et al., 2013)。

[0238] 磷脂转移蛋白 (PLTP) - 磷脂转移蛋白 (PLTP) 在炎症调节中起重要作用。一些数据表明, PLTP在巨噬细胞中具有抗炎能力 (Vuletic et al., 2011)。此外, PLTP在调节三酰基脂质A与脂蛋白的关联性中必不可少, 从而导致其残留时间延长和其促炎和抗癌特性放大 (Gautier et al., 2010)。PLTP在乳腺癌患者中差异表达, 可能与化疗反应相关 (Chen et al., 2012)。

[0239] 蛋白磷酸酶2, 调节亚基B", α (PPP2R3A) - 该基因编码蛋白磷酸酶2的其中一种调节亚基。蛋白磷酸酶2 (以前命名2A类型) 是四种主要丝氨酸/苏氨酸磷酸酶之一, 牵涉细胞生长和分裂的负控制 (Ruediger et al., 2001)。PPP2R3A在儿童急性淋巴细胞白血病 (ALL) 中频繁甲基化 (Dunwell et al., 2009)。

[0240] PTC7蛋白磷酸酶同源物 (酿酒酵母) (PPTC7) - PPTC7编码PTC7蛋白磷酸酶同源物, 位于染色体12q24.11。PPTC7最近被确定为回应于环境毒素的新易感基因 (Zhu et al., 2015)。

[0241] 蛋白激酶, DNA活化的催化多肽 (PRKDC) PRKDC编码DNA依赖性蛋白激酶 (DNA-PK) 的催化亚基, DNA-PK是PI3/PI4激酶家族的一员。研究表明, PRKDC可经Akt/GSK3通路稳定c-Myc癌蛋白 (An et al., 2008)。PRKDC的启动与HCC增殖、基因组不稳定性及微血管密度正相关, 与细胞凋亡和患者生存负相关 (Evert et al., 2013)。

[0242] 蛋白酶体 (前体、巨蛋白因子) 亚基, α -型, 4 (PSMA4) - PSMA4编码蛋白酶亚基 α 4, 其在非溶酶体途径中以ATP/泛素依赖的过程裂解肽。PSMA4基因的单核苷酸多态性与中国汉族人群肺癌风险相关 (Wang et al., 2015)。另一方面, 根据报告, PSMA4基因的单核苷酸多态性不是非小细胞肺癌易感性的主要促成因素 (Yongjun Zhang et al., 2013)。此外, 与正常肺组织相比, 观察到PSMA4在肺肿瘤中过度表达。PSMA4表达的下调降低蛋白酶活性并诱导细胞凋亡 (Liu et al., 2009)。

[0243] 蛋白酪氨酸磷酸酶, 非受体型13 (PTPN13) - 该基因编码蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 家族的一员。PTP是信号传导分子, 调节多种细胞过程, 包括细胞生长、分化、有丝分裂周期和致癌性转化。PTPN13被发现与Fas受体相互作用, 因此可能在Fas介导的程序性细胞死亡中起作用。此外, PTPN13与GTP酶启动蛋白相互作用, 因此可作为Rho信号传导途径的调节因子。在血液恶性肿瘤中, PTPN13具有矛盾的作用, 分别抑制或促进淋巴瘤和骨髓性白血病的肿瘤生长 (Wang et al., 2014b)。这可通过PTPN13抵消致癌酪氨酸激酶活性的能力及其抑制与Fas死亡受体相互作用来解释 (Freiss and Chalbos, 2011)。在乳腺癌中, PTPN13被视为乳腺肿瘤回应于抗雌激素的独特标志物, 并且是启动肿瘤细胞凋亡刺激物的潜在治疗靶标 (Freiss et al., 2004)。Fas/PTPN13结合的抑制可能为开发抗癌药物提供良好的靶标 (Takahashi and Kataoka, 1997)。

[0244] RAS p21蛋白活化剂2 (RASA2) - RAS p21蛋白活化剂2编码GTP酶启动蛋白GAP1家族的一员。作为RAS功能的抑制剂, RASA2增强RAS蛋白的弱内在GTP酶活性, 导致RAS的非活性GDP结合形式, 从而控制细胞增殖和分化。取决于精确遗传改变、其基因内的位置以及它对蛋白质功能施加的影响, RASA2在理论上可用作任一个癌基因或作为肿瘤抑制基因 (Friedman, 1995)。轻度应急条件下, RASA2由胱天蛋白酶-3裂解, 这形成片段, 称为N片段刺

激抗死亡信令。当胱天蛋白酶-3活性进一步增加时,这会产生一个片段,称为N2,它不再保护细胞。另一方面,全长RASA2通过避免受失活磷酸酶影响而促成Akt活性(Cailliau et al., 2015)。在乳腺癌中,应启动化的胱天蛋白酶-3可能通过片段N2的产生有助于抑制转移(Barras et al., 2014)。RASA2被确认为在5%黑色素瘤中突变的肿瘤抑制基因(Arafah et al., 2015)。

[0245] 免疫球蛋白k J区重组信号结合蛋白(RBPJ)-免疫球蛋白k J区重组信号结合蛋白编码对于Notch信号传导途径重要的转录调控因子。当不与Notch蛋白结合时,RBPJ充当抑制剂,当与Notch蛋白结合时,RBPJ充当活化剂。它被认为通过募集含有组蛋白去乙酰或组蛋白乙酰化酶蛋白的染色质重塑复合体至Notch信号通路而发挥作用。异种移植小鼠模型显示,RBPJ敲减抑制致瘤性并降低肿瘤体积,表明组织缺氧可通过上调RBPJ促进Smoothened转录以诱导胰腺癌细胞的增殖、侵袭性和肿瘤发生(Onishi et al., 2016)。RBPJ敲减导致细胞生长显著下降的作用也在前列腺癌和肺癌细胞中发现,这表明RBPJ表达可能是治疗人类癌症一个有前途的治疗方式(Xue et al., 2015;Lv et al., 2015)。此外,RBPJ过度表达促进横纹肌肉瘤细胞的锚定依赖性生长(Nagao et al., 2012)。RBPJ介导的Notch信号传导对树突细胞依赖性抗肿瘤免疫应答也是至关重要的(Feng et al., 2010)。

[0246] 含9样的无菌 α 基序结构域(SAMD9L)-SAMD9L编码含有9样无菌 α 基序结构域并位于染色体7q21.2。SAMD9和SAMD9L基因具有共同的基因结构,并以60%的氨基酸同一性编码蛋白质,表明有抑制炎症通路的作用。SAMD9L定位于早期内涵体,充当核内体融合促进者。SAMD9L基因的单倍不足有助于骨髓转化,SAMD9L被确定为候选髓肿瘤抑制基因(Nagamachi et al., 2013)。SAMD9L敲减显著促进细胞增殖和肝细胞癌细胞系的集落形成,这是因为SAMD9L的沉寂使细胞周期进程的G1-S期过渡并导致Wnt/ β -连环蛋白通路的活性升高。最近发现强调了体细胞突变导致SAMD9L失活的肿瘤抑制作用,并在人类癌症中表达降低(Wanget al., 2014a)。与健康对照人群相比,SAMD9L在转移性黑素瘤患者的T和B细胞群中表现出表达显著降低(Critchley-Thorne et al., 2007)。

[0247] 剪接因子3b,亚基3,130kDa(SF3B3)-SF3B3编码剪接因子3b蛋白复合体的亚基3。SF3B3过度表达与雌激素受体阳性乳腺癌中整体存活和内分泌性显著相关(Gokmen-Polaret al., 2015)。

[0248] 表面活性蛋白A1(SFTPA1)/表面活性蛋白A2(SFTPA2)-这些基因编码肺表面活性蛋白,这些蛋白是称为胶原凝集素的C型凝集素亚家族的一员。SFTPA结合于脂质和微生物表面上发现的特定碳水化合物部分,并在表面活性剂稳态和呼吸道病原体的防御中发挥至关重要的作用。这些基因的突变与特发性肺纤维化有关。肺癌特异性基因标志,含有SFTPA1和SFTPA2基因,从其他癌症样本中准确分辨肺癌(Peng et al., 2015)。EGFR突变在有SFTPA表达的肺腺癌中比那些没有SFTPA表达的肺腺癌中明显更常见(Jie et al., 2014)。SFTPA通过调节肿瘤相关巨噬细胞的极化而抑制肺癌进展(Mitsuhashi et al., 2013)。肺上皮细胞突变SFTPA2的表达导致潜在TGF- β 1和TGF- β 1介导的EMT分泌(Maitra et al., 2012)。此外,前列腺癌的发展可能与SFTPA水平降低有关(Kankavi et al., 2014)。

[0249] 溶质载体家族25(线粒体载体;腺嘌呤核苷酸转位分子)成员31(SLC25A31)/溶质载体家族25(线粒体载体;腺嘌呤核苷酸转位分子)成员4(SLC25A4)/溶质载体家族25(线粒体载体;腺嘌呤核苷酸转位分子)成员5(SLC25A5)/溶质载体家族25(线粒体载体;腺嘌呤核

昔酸转位分子)成员6 (SLC25A6) -溶质载体家族25的蛋白质为ADP/ATP载体,在线粒体中针对基质ATP交换胞质ADP。它们用作易位ADP/ATP的门控孔,并形成嵌于内线粒体膜的同型二聚体。过度表达该基因家族的细胞已被证明可显示抗凋亡表型。此基因家族的抑制表达显示可诱导凋亡,抑制肿瘤生长。虽然SLC25A4优先存在于分化组织中,并且专门针对肌肉和大脑存在,但是SLC25A5在增生组织(如肿瘤)中表达。SLC25A6是普遍表达,SLC25A31存在于肝细胞和生殖细胞中(Dolce et al.,2005)。特别是SLC25A5有助于癌变。由于SLC25A5表达与肿瘤线粒体生物能密切相关,所以,这是癌症个体化治疗和抗癌策略开发的有前途的靶标(Chevrollier et al.,2011)。此外,SLC25A31稳定的过度表达保护癌症细胞免受氯尼达明和星形孢菌素细胞凋亡影响,与Bcl-2表达无关。因此,在人SLC25同种型子家族中发现二分现象,SLC25A4和SLC25A6异构体有促凋亡功能,而SLC25A5和SLC25A31异构体使细胞死亡诱导刺激物不敏感(Gallerne et al.,2010)。

[0250] SP140核体蛋白(SP140) -SP140编码SP140核体蛋白,位于染色体2q37.1上。SP140被证明在喉鳞状细胞癌中上调(Zhou et al.,2007)。SP140与慢性淋巴细胞性白血病(Lan et al.,2010)、多发性骨髓瘤(Kortum et al.,2015)和急性早幼粒细胞性白血病(Bloch et al.,1996)有关。

[0251] 信号转导器和转录活化剂1,91kDa (STAT1) -STAT1被酪氨酸磷酸化活化以应答所有干扰素(Decker et al.,2002),并有助于Th1细胞分化(Schulz et al.,2009)。在分子水平上,STAT1通过其能力增加细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p21Cip1的表达或降低c-myc的表达来抑制接受IFN- γ 治疗的小鼠和人肿瘤细胞的增殖(Ramana et al.,2000)。STAT1的抗肿瘤活性通过其抑制小鼠模型中的血管生成和肿瘤转移的能力进一步得到支持(Huang et al.,2002)。STAT1 mRNA水平增加被证明是分子信号的一部分,与激素受体阴性和三阴性乳腺癌患者的转移结果预后较好有关(Yau et al.,2010)。

[0252] 跨膜蛋白43 (TMEM43) -该基因编码跨膜蛋白43。该基因的缺陷是家族性致心律失常性右心室发育不良型5 (ARVD5)的原因,该疾病也称为致心律失常性右室心肌病型5 (ARVC5)。ARVD是一种遗传疾病,其特征为室性心动过速、心力衰竭、心源性猝死和纤维脂肪替代心肌细胞(Siragam et al.,2014)。TMEM43可能在内核膜通过组织蛋白质复合体保持核膜结构中具有重要作用(Bengtsson and Otto,2008)。

[0253] 拓扑异构酶(DNA) II α 170kDa (TOP2A) /拓扑异构酶(DNA) II β 180kDa (TOP2B) -TOP2A和TOP2B编码一种DNA拓扑异构酶的高度同源亚型,这种酶能够控制和改变转录过程中DNA的拓扑状态。这种核酶参与诸如染色体凝集、染色单体分离以及减轻DNA转录和复制过程中产生的扭转应力等过程。TOP2A是细胞增殖所必需的,并在快速生长细胞中高表达,而TOP2B不是生长所必需的并且最近显示涉及治疗相关的继发恶性肿瘤(Toyoda et al.,2008)。TOP2A被发现在若干癌症类型中过度表达(例如,恶性胸膜间皮瘤(Roe et al.,2010)、恶性神经鞘瘤(Kresse et al.,2008)、肺腺癌细胞(Kobayashi et al.,2004)、膀胱癌(Simonet et al.,2003)、胶质母细胞瘤(van den Boom et al.,2003))。TOP2B参与DNA转录、复制、重组和有丝分裂,除了TOP1外,它代表属于该拓扑异构酶基因家族的第二个NUP98融合伴侣基因(Nebral et al.,2005)。

[0254] 类胰蛋白酶 α / β 1 (TPSAB1) /类胰蛋白酶 β 2 (TPSB2) -类胰蛋白酶 α / β 1 (TPSAB1) 和类胰蛋白酶 β 2 (TPSB2) 与其他两种胰蛋白酶同种型一起,由肥大细胞表达。类胰蛋白酶已被显

示是涉及哮喘和其他过敏性和炎症疾病的发病机理的介质。通过肥大细胞分泌的类胰蛋白酶具有促血管发生功能,并有助于肿瘤血管形成。类胰蛋白酶通过蛋白酶活化受体-2 (PAR-2) 的活化而起作用,另外有助于细胞外基质降解,从而也促进血管生长。另外,肿瘤组织中出现类胰蛋白酶阳性的肥大细胞与几个癌症类型的血管发生相关 (Ammendola et al., 2014)。据报告,类胰蛋白酶阳性肥大细胞水平在前列腺癌中升高,与微血管密度、肿瘤分期和较短的生存期相关 (Nonomura et al., 2007; Stawerski et al., 2013)。同样地,类胰蛋白酶阳性的肥大细胞也与胃癌 (Zhao et al., 2012; Ribatti et al., 2010) 以及肺腺癌 (Imada et al., 2000; Takanami et al., 2000) 的肿瘤阶段和血管生成相关。

[0255] 含三重基序11 (TRIM11) - 含三重基序蛋白11是一种在人体中被TRIM11基因编码的蛋白质。TRIM11已知参与中枢神经系统的发育和破坏人体肽 (阿尔茨海默状神经元损伤抑制剂) 的稳定性 (Niikura et al., 2003)。TRIM11在高分级胶质瘤中过度表达,促进细胞增殖、侵袭、转移和神经胶质肿瘤生长 (Di et al., 2013)。

[0256] 瞬时受体电位阳离子通道,亚家族M,成员2 (TRPM2) - 由该基因编码的蛋白质是受细胞内游离ADP-核糖调节的钙可渗透阳离子通道。TRPM2可能参与在一定条件下介导细胞凋亡 (Ishii et al., 2007; Cao et al., 2015)。但是,其对细胞生长增殖的作用较不明确,并且可能依赖于细胞培养条件和可变剪接同种型的表达 (Chen et al., 2014)。在黑色素瘤和前列腺癌中,肿瘤富集TRPM2反义转录物已得到确认,其与细胞凋亡和临床结果相关 (Orfanelli et al., 2015)。

[0257] 微管蛋白 γ 复合体相关蛋白3 (TUBGCP3) - 微管蛋白 γ 复合体相关蛋白3是多亚基 γ 微管蛋白复合体的一部分,对于真核细胞中的微管成核至关重要 (Lynch et al., 2014)。细胞质 γ 微管蛋白复合体通过一组所谓的 γ 微管蛋白复合体结合蛋白针对中心体或其他微管组织中心 (Schiebel, 2000)。研究发现,胶质母细胞瘤细胞中与正常人星形细胞相比,TUBGCP3转录物表达显著上升,TUBGCP3免疫反应性比在正常大脑中显著上升。TUBGCP3也与微血管增殖和信号传导途径相互作用有关,导致恶性表型 (Draberova et al., 2015)。此外,TUBGCP3被发现在近四倍体比在二倍体套细胞淋巴瘤样本中表达显著更高 (Neben et al., 2007)。

[0258] 泛素样调节剂启动酶6 (UBA6) - 泛素样调节剂启动酶6是在人体中由UBA6基因编码的蛋白质。UBA6是在睾丸中表达量最大的泛素启动酶。此外,它是对DNA损伤的细胞应答所必需的 (Moudry et al., 2012)。

[0259] 异嗜性和多变逆转录病毒受体1 (XPR1) - XPR1是包含180个残基长的氨基末端SPX结构域的一个多通路膜分子 (命名为SYG1、PHO81和XPR1)。据报告,XPR1可介导磷酸盐输出 (Giovannini et al., 2013)。破骨细胞分化后发现XPR1 mRNA转录增加 (Sharma et al., 2010)。最初,XPR1被描述为反转录病毒受体,被异嗜性和多变MLV (X-MLV和P-MLV) 二个 γ 逆转录病毒使用,可以感染人类细胞以及各种其他物种,例如小鼠和鸟类 (Kozak, 2010; Martin et al., 2013)。

[0260] 含锌指BED型5 (ZBED5) - 含锌指BED型5的特征在于编码主要来自查理样DNA转座子的序列,但是,它好像不是一个活跃的DNA转座子,因为它两侧没有终端反向重复序列。ZBED5与Buster DNA转座子相关,在系统发育上与其他ZBED分开。ZBED基因在脊椎组织中广泛表达,他们一起调节显著多样性的功能 (Hayward et al., 2013)。

[0261] 锌指蛋白697 (ZNF697) - ZNF697基因编码锌指蛋白697,其位于染色体1p12上并可能在DNA结合中起作用(Yu et al.,2011)。

[0262] 是否能刺激免疫反应取决于是否存在被宿主免疫系统视为异物的抗原。发现肿瘤相关抗原的存在增加了运用宿主免疫系统干预肿瘤生长的可能性。目前,针对癌症免疫治疗,正在探索利用免疫系统的体液和细胞进行免疫的各种机制。

[0263] 细胞免疫反应的特定元素能特异性地识别和破坏肿瘤细胞。从肿瘤浸润细胞群或外周血中分离出的T-细胞表明,这些细胞在癌症的天然免疫防御中发挥了重要作用。特别是CD8阳性T细胞在这种反应中发挥重要作用,TCD8+能识别通常8至10个源自蛋白或位于细胞质的缺损核糖体产物(DRIP)的氨基酸残基的主要组织相容性复合体(MHC)所载的肽中所含的I类分子。人MHC分子也称为人白细胞-抗原(HLA)。

[0264] 除非另有说明,否则本文使用的所有术语定义如下。

[0265] 术语“T细胞反应”是指由一种肽在体外或体内诱导的效应子功能的特异性扩散和启动。对于MHC I类限制性细胞毒性T细胞,效应子功能可能为溶解肽脉冲的、肽前体脉冲的或天然肽提呈的靶细胞、分泌细胞因子,优选为肽诱导的干扰素- γ ,TNF- α 或IL-2,分泌效应分子,优选为肽诱导的颗粒酶或穿孔素,或脱颗粒。

[0266] 本文所用“肽”这一术语,系指一系列氨基酸残基,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。这些肽的长度优选为9个氨基酸,但至短可为8个氨基酸长度,至长可为10、11、12或13个氨基酸长度或更长,如果为MHC-II类肽时(本发明肽的拉长变体),至长可为14、15、16、17、18、19或20个氨基酸长度或更长。

[0267] 因此,“肽”这一术语应包括一系列氨基酸残基的盐,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。优选的情况是,盐为肽的药用盐,例如:氯化物或乙酸(三氟乙酸)盐。必须注意的是,本发明肽的盐与其体内状态的肽基本上不同,因为该不是体内的盐。

[0268] 术语“肽”应也包括“寡肽”。本文使用的术语“寡肽”是指一系列氨基酸残基,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。寡肽的长度对于本发明来说并不十分关键,只要在寡肽中保持正确的表位即可。通常,寡肽长度约小于30个氨基酸残基,约长于15个氨基酸。

[0269] “多肽”这一术语是指一系列氨基酸残基,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。多肽的长度对于本发明来说并不十分关键,只要保持正确的表位即可。与术语肽或寡肽相对,“多肽”这一术语是指包含多于约30个氨基酸残基的分子。

[0270] 一种肽、寡肽、蛋白质或编码该分子的核苷酸如果能诱导免疫反应,则具有“免疫原性”(因此是本发明中的一种“免疫原”)。在本发明的情况下,免疫原性的更具体定义是诱导T细胞反应的能力。因此,“免疫原”是一种能够诱导免疫反应的分子,并且在本发明的情况下,是一种能诱导T细胞反应的分子。在另一方面,所述免疫原可以是肽,肽与MHC的复合体、和/或用于提高特异性抗体或TCR抗性的蛋白。

[0271] I类T细胞“表位”要求的是一种结合至MHC I类受体上的短肽,从而形成一种三元复合体(MHC I类 α 链、 β -2-微球蛋白和肽),其可以通过T细胞负载匹配T细胞受体与具有适当亲和力的MHC/肽复合物结合来识别。结合至MHC I类分子的肽的典型长度为8-14个氨基酸,最典型为9个氨基酸长度。

[0272] 在人类中,有三种编码MHC I类分子的不同基因位点(人MHC分子也是指定的人白

细胞抗原 (HLA) : HLA-A、HLA-B和HLA-C。HLA-A*01、HLA-A*02和HLA-B*07是从这些基因位点表达的不同MHC I类等位基因的实例。

[0273] 表11: HLA-A*02和HLA-A*24和最常见HLA-DR血清类型的表达频率F。频率根据Mori等人 (Mori et al., 1997) 使用的Hardy-Weinberg公式 $F=1(1-Gf)^2$ 改编, 从美国人群范围内的单体型频率中推导出。由于连锁不平衡, 某些HLA-DR等位基因内的A*02或A*24组合与其预期单一频率相比, 可能是浓缩的或频率较低。有关详细信息, 请参阅Chanock等人的文献 (Chanock et al., 2004)。

[0274]

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

[0275]

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

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

[0277] 本发明的肽,优选当如本文描述纳入本发明的疫苗时与HLA-A*02和HLA-A*24结合。本发明的MHC II类肽与几种不同的HLA II类分子结合,并被称为混杂结合剂(泛结合肽)。疫苗还可能包括泛结合MHC II类肽。因此,本发明的疫苗可用于治疗A*02或A*24阳性患者中的癌症,但不因为这些肽的广泛结核性而必须选择II类MHC同种异型。

[0278] 如果本发明的A*02肽与本发明的A*24肽组合,与单独的MHC I类等位基因相比,可治疗更高比例的患者群体。虽然在大多数人群中,低于50%的患者可由单独的等位基因来解决问题,但是本发明中一种含HLA-A*24和HLA-A*02表位的疫苗可以治疗任何相关人群中至少60%的患者。具体来说,各区域中,以下比例的患者这些等位基因中的至少一个有肯定效果:美国61%、西欧62%、中国75%、韩国77%、日本86%(根据www.allelefrequencies.net计算)。

[0279] 在一项优选的实施方案中,术语“核苷酸序列”系指脱氧核苷酸的杂聚物。

[0280] 编码特定肽、寡肽或多肽的核苷酸序列可为天然核苷酸序列,也可为合成核苷酸序列。一般来说,编码肽、多肽以及本发明蛋白的DNA片段由cDNA片段和短寡核苷酸衔接物,或一系列寡核苷酸组成,以提供一种合成基因,该基因能够在包含源自微生物或病毒操纵子的调节元素的重组转录单元中被表达。

[0281] 如本文所用的术语“肽的核苷酸编码”系指对肽进行核苷酸序列编码,其中该肽包括与将由用于产生TCR的树突细胞或另一细胞系统所表达该序列的生物系统兼容的人工(人造)启动和停止密码子。

[0282] 本文提到的核酸序列既包括单链核酸也包括双链核酸。因此,除非本文另有所指,否则,例如对于DNA,具体的序列是该序列的单链DNA、该序列与其互补序列的双工(双链DNA)以及该序列的互补序列。

[0283] “编码区”这一术语是指在基因的天然基因组环境中天然或正常编码该基因的表达产物的那部分基因,即,体内编码该基因的天然表达产物的区域。

[0284] 编码区可来自非突变(“正常”)基因、突变基因或异常基因,甚至还可以来自DNA序列,完全可在实验室中使用本领域熟知的DNA合成方法合成。

[0285] “表达产物”这一术语是指多肽或蛋白,它是基因和遗传码退化并因而编码同样的氨基酸所造成的任何核酸序列编码同等物的翻译产物。

[0286] “片断”这一术语,当指的是一种编码序列时,表示包含非完整编码区的DNA的一部

分,其表达产物与完整编码区表达产物基本上具有相同的生物学功能或活性。

[0287] “DNA片段”这一术语是指一种DNA聚合物,以单独的片段形式或一种较大DNA结构的组分形式存在,它们从至少分离过一次的DNA中以基本纯净的形式获得,即不含污染性内源性材料,并且获得的数量或浓度能够使用标准生化方法,例如使用克隆载体,进行识别、操纵和回收该片段及其组分核苷酸序列。此类片段以开放阅读框架(未被内部未翻译序列打断)或内含子(通常提呈于真核基因中)的形式存在。未翻译DNA序列可能存在于开放阅读框架的下游,在那里其不会干预编码区的操纵或表达。

[0288] “引物”这一术语表示一种短核酸序列,其可与一个DNA链配对,并在DNA聚合酶开始合成脱氧核糖核酸链之处提供一个游离的3'-OH末端。

[0289] “启动子”这一术语表示参与RNA聚合酶的结合从而启动转录的DNA区域。

[0290] 术语“分离”表示一种物质从其原来的环境(例如,如果是天然发生的则是天然环境)中被移走。例如,活体动物中的天然核苷酸或多肽不是分离的,但是,从天然系统中一些或所有共存物质中分离出来的核苷酸或多肽是分离的。此类多核苷酸可能是载体的一部分和/或此类多核苷酸和多肽可能是一种组合物的一部分,并且由于该载体或组合物不是其天然环境的一部分,因此它仍然是分离的。

[0291] 本发明中披露的多核苷酸和重组或免疫原性多肽也可能以“纯化”的形式存在。术语“纯化”并非要求绝对的纯度;它只是一个相对的定义,可以包括高度纯化或部分纯化的制剂,相关领域技术人员能理解这些术语。例如,各个从已用传统方法纯化为具有电泳同构型的cDNA库中分离出的各种克隆物。明确考虑到将起始材料或天然物质纯化至少一个数量级,优选为两或三个数量级,更优选为四或五个数量级。此外,明确涵盖所述多肽的纯度优选为99.999%,或至少为99.99%或99.9%;甚而适宜为以重量计99%或更高。

[0292] 根据本发明公开的核酸和多肽表达产物,以及包含此类核酸和/或多肽的表达载体可能以“浓缩的形式”存在。本文使用的术语“浓缩”是指材料的浓度至少是其自然浓度的大约2、5、10、100或1000倍,有优势的是,按重量计为0.01%,优选为至少0.1%。也明确考虑到,按重量计约为0.5%、1%、5%、10%和20%的浓缩制剂。序列、构型、载体、克隆物以及包含本发明的其他材料可有优势地以浓缩或分离的形式存在。“活性片段”这一术语是指产生免疫反应的片段(即具有免疫原性活性),通常是一种肽、多肽或核酸序列的片段,不论是单独或可选地与合适的佐剂一起或在载体中给予一种动物,比如哺乳动物,例如兔子或小鼠,也包括人;这种免疫反应采用的形式是在接受动物(如:人)体内刺激T细胞反应。或者,“活性片段”也可用于诱导体外T细胞反应。

[0293] 本文使用的“部分”(portion)、“节段”(segment)、“片段”(fragment)这几个术语,当与多肽相关地使用时是指残基的连续序列,比如氨基酸残基,其序列形成一个较大序列的子集。例如,如果一个多肽以任一种肽链内切肽酶(如胰蛋白酶或糜蛋白酶)进行处理,则该处理获得的寡肽会代表起始多肽的部分、节段或片段。当与多核苷酸相关地使用时,这些术语系指用任何核酸内切酶处理所述多核苷酸产生的产物。

[0294] 根据本发明,术语“等同度百分比”或“等同百分比”,如果指的是序列,则表示在待对比序列(“被对比序列”)与所述序列或权利要求的序列(“参考序列”)对准之后将被对比序列与所述序列或权利要求的序列进行比较。然后根据下列公式计算等同度百分比:等同度百分比=100[1-(C/R)]

[0295] 其中C是参考序列与被对比序列之间对准长度上参考序列与被对比序列之间的差异数量,其中

[0296] (i) 参考序列中每个碱基或氨基酸序列在被对比序列中没有对应的对准碱基或氨基酸;

[0297] (ii) 参考序列中每个空隙,以及

[0298] (iii) 参考序列中每个对准碱基或氨基酸与被对比序列中对准碱基或氨基酸不同,即构成一个差异以及

[0299] (iiii) 必须在对准序列的第1位置开始对准;

[0300] 并且R是参考序列与被对比序列对准长度上在参考序列中产生任何空隙也计算为一个碱基或氨基酸的参考序列中的碱基或氨基酸数目。

[0301] 如果“被对比序列”和“参考序列”之间存在的一个对准按上述计算的等同度百分比大致等于或大于指定的最低等同度百分比,则被对比序列与参考序列具有指定的最低等同度百分比,虽然可能存在按本文上述计算的等同度百分比低于指定等同度百分比的对准。

[0302] 因此,如上所述,本发明提出了一种肽,其包括选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110群组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110具有88%同源性的其变体、或诱导与该肽发生T细胞交叉反应的一个变体。本发明所述的肽具有与主要组织相容性复合体(MHC) I或所述肽拉长版本的II类分子结合的能力。

[0303] 在本发明中,“同源性”一词系指两个氨基酸序列之间的同一度(参见上文的等同度百分比,如肽或多肽序列。前文所述的“同源”是通过将理想条件下调整的两个序列与待比较序列进行比对后确定的。此类序列同源性可通过使用ClustalW等算法创建一个排列而进行计算。也可用使用一般序列分析软件,更具体地说,是Vector NTI、GENETYX或由公共数据库提供的其他工具。

[0304] 本领域技术人员能评估特定肽变体诱导的T细胞是否可与该肽本身发生交叉反应(Appay et al.,2006;Colombetti et al.,2006;Fong et al.,2001;Zaremba et al.,1997)。

[0305] 发明人用给定氨基酸序列的“变体”表示,一个或两个氨基酸残基等的侧链通过被另一个天然氨基酸残基的侧链或其他侧链取代而发生改变,这样,这种肽仍然能够以含有给定氨基酸序列(由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110组成)的肽大致同样的方式与HLA分子结合。例如,一种肽可能被修饰以便至少维持(如没有提高)其能与HLA-A*02或-DR等合适MHC分子的结合槽相互作用和结合,以及至少维持(如没有提高)其与启动T细胞的TCR结合的能力。

[0306] 随后,这些T细胞可与细胞和杀伤细胞发生交叉反应,这些细胞表达多肽(其中包含本发明中定义的同源肽的天然氨基酸序列)。正如科学文献和数据库(Rammensee et al.,1999;Godkin et al.,1997)中所述,HLA-A结合肽的某些位点通常为锚定残基,可形成一种与HLA结合槽的结合模序相称的核心序列,其定义由构成结合槽的多肽链的极性、电物理、疏水性和空间特性确定。因此,本领域技术人员能够通过保持已知的锚残基来修饰SEQ ID No:1至SEQ ID NO:110提出的氨基酸序列,并且能确定这些变体是否保持与MHC I或II类分子结合的能力。本发明的变体保持与启动T细胞的TCR结合的能力,随后,这些T细胞可与表

达一种包含本发明定义的同源肽的天然氨基酸序列的多肽的细胞发生交叉反应并杀死该等细胞。

[0307] 如果无另有说明,那么本文公开的原始(未修饰)肽可以通过在肽链内的不同(可能为选择性)位点上取代一个或多个残基而被修饰。优选情况是,这些取代位于氨基酸链的末端。此取代可能是保守性的,例如,其中一个氨基酸被具有类似结构和特点的另一个氨基酸所取代,比如其中一个疏水性氨基酸被另一个疏水性氨基酸取代。更保守的取代是具有相同或类似的大小和化学性质的氨基酸间的取代,例如,亮氨酸被异亮氨酸取代。在天然同源蛋白质家族序列变异的研究中,某些氨基酸的取代往往比其他氨基酸更具有耐受性,这些氨基酸往往表现出与原氨基酸的大小、电荷、极性和疏水性之间的相似性相关,这是确定“保守取代”的基础。

[0308] 在本文中,保守取代定义为在以下五种基团之一的内部进行交换:基团1-小脂肪族、非极性或略具极性的残基(Ala,Ser,Thr,Pro,Gly);基团2-极性、带负电荷的残基及其酰胺(Asp,Asn,Glu,Gln);基团3-极性、带正电荷的残基(His,Arg,Lys);基团4-大脂肪族非极性残基(Met,Leu,Ile,Val,Cys)以及基团5-大芳香残基(Phe,Tyr,Trp)。

[0309] 较不保守的取代可能涉及一个氨基酸被另一个具有类似特点但在大小上有所不同的氨基酸所取代,如:丙氨酸被异亮氨酸残基取代。高度不保守的取代可能涉及一个酸性氨基酸被另一个具有极性或甚至具有碱性性质的氨基酸所取代。然而,这种“激进”取代不能认为是无效的而不予考虑,因为化学作用是不完全可预测的,激进的取代可能会带来其简单化学原理中无法预见的偶然效果。

[0310] 当然,这种取代可能涉及普通L-氨基酸之外的其他结构。因此,D-氨基酸可能被本发明的抗原肽中常见的L-氨基酸取代,也仍在本公开的范围之内。此外,非标准氨基酸(即,除了常见的天然蛋白原氨基酸)也可以用于取代之目的,以生产根据本发明的免疫原和免疫原性多肽。

[0311] 如果在一个以上位置上的取代发现导致肽的抗原活性基本上等于或大于以下定义值,则对这些取代的组合进行测试,以确定组合的取代是否产生对肽抗原性的迭加或协同效应。肽内被同时取代的位置最多不能超过4个。

[0312] 基本上由本文所指氨基酸序列组成的一种肽可能有一个或两个非锚定氨基酸(见下面锚基序相关内容)被交换,而不存在这种情况,即相比于未修饰的肽,与人类主要组织相容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。在另一实施方案中,在基本上由本文所述氨基酸序列组成的肽中,一个或两个氨基酸可与其保守交换伙伴交换(见下文),而不存在这种情况,即相比于未修饰的肽,与人类主要组织相容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。

[0313] 这些基本不与T细胞受体互动的氨基酸残基可通过取代其他几乎不影响T细胞反应并不妨碍与相关MHC结合的氨基酸而得到修饰。因此,除了特定限制性条件外,本发明的肽可能为任何包括给定氨基酸序列或部分或其变体的肽(发明人所用的这个术语包括寡肽或多肽)。

[0314] 表12:根据SEQ ID NO:1、2和4的HLA-A*02肽的优选变体和基序

[0315]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID 1	K	L	L	P	Y	I	V	G	V
变体									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I

[0316]

		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID 2	F	L	I	P	Y	A	I	M	L
变体									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I

[0317]

		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID 4	F	V	F	S	F	P	V	S	V
变体		L							
		L							I
		L							L
		L							A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
									I
									L
									A
		T							
		T							I

[0318]

	T							L
	T							A
	Q							
	Q							I
	Q							L
	Q							A

[0319] 表12B:根据SEQ ID NO:13的HLA-A*02肽的优选变体和基序

[0320]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID 13	F	L	F	D	G	S	A	N	L
变体									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

[0321] 表13:根据SEQ ID NO:23、24和25的HLA-A*24肽的优选变体和基序

[0322]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID 23	V	Y	T	S	W	Q	I	P	Q	K	F
变体											I
											L
		F									I
		F									L
		F									
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID 24	N	Y	P	K	S	I	H	S	F		
变体									I		
									L		
		F							I		
		F							L		
		F									
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID 25	R	F	M	D	G	H	I	T	F		
变体		Y							I		
		Y							L		
		Y									
									I		
									L		

[0323] 较长(拉长)的肽也可能适合。MHC I类表位(通常长度为8至11个氨基酸)可能由肽从较长的肽或包含实际表位的蛋白中加工而产生。两侧有实际表位的残基优选为在加工过程中几乎不影响暴露实际表位所需蛋白裂解的残基。

[0324] 本发明的肽可被拉长多达四个氨基酸,即1、2、3或4个氨基酸,可按照4:0与0:4之间的任何组合添加至任意一端。本发明的拉长组合可见表14。

[0325] 表14:本发明肽的拉长组合

[0326]	C-端	N-端
	4	0
	3	0或1
	2	0或1或2
	1	0或1或2或3
	0	0或1或2或3或4
[0326]	N-端	C-端
	4	0
	3	0或1
	2	0或1或2
	1	0或1或2或3
	0	0或1或2或3或4

[0327] 拉伸/延长的氨基酸可以是所述蛋白或任何其他氨基酸的原序列肽。拉长可用于增强所述肽的稳定性或溶解性。

[0328] 因此,本发明所述的表位可能与天然肿瘤相关表位或肿瘤特异性表位相同,也可能包括来自参考肽的不超过四个残基的不同肽,只要它们有基本相同的抗原活性即可。

[0329] 在一项替代实施方案中,肽的一边或双边被拉长4个以上的氨基酸,优选最多30个氨基酸的总长度。这可形成MHC-II类结合肽。结合至MHC-II类肽可通过本领域中已知的方法进行测试。

[0330] 因此,本发明提出了MHC-I类表位的肽和变体,其中所述肽或抗体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸长度(即10、11、12、13、14个氨基酸,如果为拉长II类结合肽时,长度也可为15、16、17、18、19、20、21或22个氨基酸)。

[0331] 当然,本发明的肽或变体能与人主要组织相容性复合体(MHC)I或II类分子结合。肽或变体与MHC复合物的结合可用本领域内的已知方法进行测试。

[0332] 优选情况是,当本发明的肽特异性T细胞相比于取代肽受到检测时,如果取代肽在相对于背景肽溶解度增加达到最大值的一半,则该肽浓度不超过约1mM,优选为不超过约1 μ M,更优选为不超过约1nM,再优选为不超过约100pM,最优选为不超过约10pM。也优选为,取代肽被一个以上的T细胞识别,最少为2个,更优选为3个。

[0333] 在本发明的一个特别优选实施方案中,肽系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110所选的氨基酸序列组成。

[0334] 基本由“...组成”系指本发明的肽,除了根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110中的任一序列或其变体组成外,还含有位于其他N和/或C端延伸处的氨基酸,而它们不一定能形成作为MHC分子表位的肽。

[0335] 但这些延伸区域对有效将本发明中的肽引进细胞具有重要作用。在本发明的一实施例中,该肽为融合蛋白的一部分,含来自NCBI、GenBank登录号X00497的HLA-DR抗原相关不变链(p33,以下称为“Ii”)的80个N-端氨基酸等。在其他的融合中,本发明的肽可以被融合到本文所述的抗体、或其功能性部分,特别是融合人抗体的序列,以便所述抗体进行特异性靶向作用,或者,例如进入本文所述的树突状细胞特异性抗体。

[0336] 此外,该肽或变体可进一步修饰以提高稳定性和/或与MHC分子结合,从而引发更强的免疫反应。肽序列的该类优化方法是本领域内所熟知的,包括,例如,反式肽键和非肽

键的引入。

[0337] 在反式肽键氨基酸中,肽(-CO-NH-)并未连接其残基,但是其肽键是反向的。这种逆向反向模拟肽(retro-inverso peptidomimetics)可通过本领域已知的方法制备,例如:Meziere等人在(Meziere et al.,1997)中所述的方法,以引用的方式并入本文。这种方法涉及制备包含骨架(而非侧链)改变的模拟肽。Meziere等人(Meziere et al.,1997)的研究显示,这些模拟肽有利于MHC的结合和辅助性T细胞的反应。以NH-CO键替代CO-NH肽键的逆向反向肽大大地提高了抗水解性能。

[0338] 非肽键为-CH₂-NH、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-和-CH₂SO-等。美国4897445号专利提出了多肽链中非肽键(-CH₂-NH)的非固相合成法,该方法涉及按标准程序合成的多肽以及通过氨基醛和一种含NaCNBH₃的氨基酸相互作用而合成的非肽键。

[0339] 含上述序列的肽可与其氨基和/或羧基末端的其他化学基团进行合成,从而提高肽的稳定性、生物利用度、和/或亲和力等。例如,苄氧羰基、丹酰基等疏水基团或叔丁氧羰基团可加入肽的氨基末端。同样,乙酰基或9-芴甲氧羰基可能位于肽的氨基末端。此外,疏水基团、叔丁氧羰基团或氨基团都可能被加入肽的羧基末端。

[0340] 另外,本发明中的所有肽都可能经合成而改变其空间构型。例如,可能使用这些肽的一个或多个氨基酸残基的右旋体,通常不是其左旋体。更进一步地,本发明中肽的至少一个氨基酸残基可被熟知的一个非天然氨基酸残基取代。诸如此类的改变可能有助于增加本发明肽的稳定性、生物利用度和/或结合作用。

[0341] 同样,本发明中的肽或变体可在合成肽之前或之后通过特异氨基酸的反应而进行化学修饰。此类修饰的实施例为本领域所熟知,例如,在R.Lundblad所著的《Chemical Reagents for Protein Modification》(3rd ed.CRC Press,2004)(Lundblad,2004)中有概述,以参考文献的方式并入本文。虽然氨基酸的化学修饰方法无限制,但其包括(但不限于)通过以下方法修饰:酰基化、脒基化、赖氨酸吡哆基化、还原烷基化、以2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)三硝基苯基化氨基团、通过将半胱氨酸过甲酸氧化为磺基丙氨酸而对羧基团和巯基进行氨基修饰、形成易变衍生物、与其他巯基化合物形成混合二硫化合物、与马来酰亚胺反应,与碘乙酸或碘乙酰胺羧甲基化、在碱性pH值下与氰酸盐甲酰化。在这方面,技术人员参考了《Current Protocols In Protein Science》(Eds.Coligan et al.(JohnWiley and Sons NY 1995-2000))(Coligan et al.,1995)中第15章所述的在蛋白质化学修饰相关的广泛方法。

[0342] 简言之,修饰蛋白质的精氨酸残基等往往基于于邻二羰基化合物(如苯甲酰甲醛、2,3丁二酮以及1,2-烯己二酮)的反应而形成加合物。另一个实施例是丙酮醛与精氨酸残基的反应。半胱氨酸可在赖氨酸和组氨酸等亲核位点不作随同修饰的情况下就得到修饰。因此,有大量试剂可进行半胱氨酸的修饰。Sigma-Aldrich(<http://www.sigma-aldrich.com>)等公司的网站含有具体试剂的信息。

[0343] 蛋白质中二硫键的选择性还原也很普遍。二硫键可在生物制药热处理中形成和氧化。伍德沃德氏试剂K可用于修饰特定的谷氨酸残基。N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基-碳二亚胺可用于形成赖氨酸残基和谷氨酸残基的分子内交联。例如:焦碳酸二乙酯是修饰蛋白质组氨酸残基的试剂。组氨酸也可使用4-羟基-2-壬烯醛进行修饰。赖氨酸残基与其他α-氨基

团的反应,例如,有利于肽结合到蛋白/肽的表面或交联处。赖氨酸聚是多(乙烯)乙二醇的附着点,也是蛋白质糖基化的主要修饰位点。蛋白质的蛋氨酸残基可通过碘乙酰胺、溴乙胺、氯胺T等被修饰。

[0344] 四硝基甲烷和N-乙酰基咪唑可用于酪氨酸残基的修饰。经二酪氨酸形成的交联可通过过氧化氢/铜离子完成。

[0345] 对色氨酸修饰的最近研究中使用了N-溴代琥珀酰亚胺、2-羟基-5-硝基苄溴或3-溴-3-甲基-2-(2-硝基苄基)-3H-吡啶(BPNS-粪臭素)。

[0346] 当蛋白与戊二醛、聚乙二醇二丙烯酸酯和甲醛的交联用于配制水凝胶时,治疗性蛋白和含聚乙二醇的肽的成功修饰往往可延长循环半衰期。针对免疫治疗的变态反应原化学修饰往往通过氰酸钾的氨基甲酰化实现。

[0347] 一种肽或变体,其中肽被修饰或含非肽键,优选为本发明的实施例。一般来说,肽和变体(至少含氨基酸残基之间的肽联接)可使用Lukas等人(Lukas et al.,1981)以及此处引用的参考文献所披露的固相肽合成Fmoc-聚酰胺模式进行合成。芴甲氧羰基(Fmoc)团对N-氨基提供临时保护。使用N,N-二甲基甲酰胺中的20%二甲基胍啶中对这种碱高度敏感的保护基团进行重复分裂。由于它们的丁基醚(在丝氨酸苏氨酸和酪氨酸的情况下)、丁基酯(在谷氨酸和天门冬氨酸的情况下)、叔丁氧羰基衍生物(在赖氨酸和组氨酸的情况下)、三苯甲基衍生物(在半胱氨酸的情况下)及4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基衍生物(在精氨酸的情况下),侧链功能可能会受到保护。只要谷氨酰胺和天冬酰胺为C-末端残基,侧链氨基功能保护所使用的是由4,4'-二甲氧基二苯基团。固相支撑基于聚二甲基丙烯酸酯聚合物,其由三个单体二甲基丙烯酸酯(骨架单体)、双丙烯酸酯乙烯二胺(交联剂)和N-丙烯酰胺肌胺酸甲酯(功能剂)构成。使用的肽-树脂联剂为酸敏感的4-羟甲基苯氧乙酸衍生物。所有的氨基酸衍生物均作为其预制对称酸酐衍生物加入,但是天冬酰胺和谷氨酰胺除外,它们使用被逆转的N,N-二环己基碳二亚胺/1-羟基苯并三唑介导的耦合程序而加入。所有的耦合和脱保护反应用茚三酮、硝基苯磺酸或isotin测试程序监测。合成完成后,用浓度为95%含50%清道夫混合物的三氟醋酸,从伴随去除侧链保护基团的树脂支承物中裂解肽。常用的清道夫混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水,准确的选择依据合成肽的氨基酸组成。此外,固相和液相方法结合使用对肽进行合成是可能的(例如,请参阅(Bruckdorfer et al.,2004)以及本文引用的参考文献)。

[0348] 三氟乙酸用真空中蒸发、随后用承载粗肽的二乙基乙醚滴定进行去除。用简单萃取程序(水相冻干后,该程序制得不含清道夫混合物的肽)清除任何存在的清道夫混合物。肽合成试剂一般可从Calbiochem-Novabiochem(英国诺丁汉)获得。

[0349] 纯化可通过以下技术的任何一种或组合方法进行,如:再结晶法、体积排阻色谱法、离子交换色谱法、疏水作用色谱法以及(通常)反相高效液相色谱法(如使用乙腈/水梯度分离)。

[0350] 可以使用薄层色谱法、电泳特别是毛细管电泳、固相萃取(CSPE)、反相高效液相色谱法、酸解后的氨基酸分析、快原子轰击(FAB)质谱分析以及MALDI和ESI-Q-TOF质谱分析进行肽分析。

[0351] 为了选择过度提呈的肽,计算了提呈图,其显示样本中位提呈量以及复制变化。该特点使相关肿瘤实体的样本与正常组织样本的基线值并列。可通过计算调节线性混合效应

模型 (Pinheiro et al., 2015) 的p值将以上每个特点并入过度提呈分数中, 从而通过假发现率 (Benjamini and Hochberg, 1995) 调整多项检验。

[0352] 对于通过质谱法对HLA配体的识别和相对定量, 对来自冲击冷冻组织样本的HLA分子进行纯化并对HLA相关肽进行分离。分离的肽分开, 并通过在线纳米-电喷雾-电离 (nanoESI) 液相色谱-谱 (LC-MS) 实验进行鉴定。由此产生的肽序列的验证方法是, 将肺癌 (NSCLC) 样本 (N=91个A*02阳性样本, N=80个A*24阳性样本) 中记录的天然TUMAP的片段模式与相同序列相应合成参考肽的片段模式进行比较。由于这些肽被直接鉴定为原发性肿瘤HLA分子的配体, 因此这些结果为获得自155名肺癌 (NSCLC) 患者的原发性癌症组织上确定肽的天然加工和提呈提供了直接证据。

[0353] 发现管道XPRESIDENT®v2.1 (例如, 参见US 2013-0096016, 并在此通过引用将其整体并入本文) 考虑到识别和选择相关过量提呈的候选肽疫苗, 这基于与几种不同的非癌组织和器官相比癌症或其他受感染组织的HLA限制肽水平直接相对定量结果。这通过以下方法实现: 使用专有数据分析管道处理的LC-MS采集数据、结合序列识别算法、谱聚类、计算离子、保留时间调整、充电状态卷积以及正态化而开发无标记差异化定量方法。

[0354] 为每种肽和样本确立了提呈水平, 包括误差估计值。肿瘤组织大量提呈的肽以及肿瘤与非肿瘤组织和器官中过量提呈的肽已经得到确定。

[0355] 对来自肺癌 (NSCLC) 组织样本的HLA肽复合物进行纯化, 并且对HLA相关肽使用LC-MS进行分离和分析 (见实施例)。本申请中包含的所有TUMAP使用原发性肺癌 (NSCLC) 样本的方法进行鉴定, 确认其在原发性肺癌 (NSCLC) 上的提呈。

[0356] 在多个肺癌 (NSCLC) 和正常组织上确定的TUMAP用无标记LC-MS数据的离子计数方法进行量化。该方法假定肽的LC-MS信号区域与样本中其丰度相关。各种LC-MS实验中肽的所有量化信号在集中趋势基础上进行正常化, 根据每个样品进行平均, 并合并人柱状图 (被称为提呈图)。提呈图整合了不同分析方法, 如: 蛋白数据库检索、谱聚类、充电状态卷积 (除电) 和保留时间校准和正态化。

[0357] 此外, 发现管道XPRESIDENT®v2.x可对癌症或其他感染组织上的MHC-肽, 优选为HLA限制性肽进行直接的绝对定量。简言之, 总细胞计数根据被分析的组织样本的总DNA含量来计算。组织样本中TUMAP的总肽量用nanoLC-MS/MS测定为天然TUMAP的比率以及TUMAP同位素标记版本的已知量, 称为内部标准。TUMAP分离效率确定方法: 把肽: 所有选定TUMAP的MHC在TUMAP分离程序尽早的时间点加入组织裂解液, 并在肽分离成后完成后通过nanoLC-MS/MS检测。总细胞计数和总肽量根据每份组织样本三次测量值来计算。所述肽特异性分离效率计算为三次重复测量10次加标实验的平均值 (见实施例和表22)。

[0358] 本发明提出了有利于治疗癌肿/肿瘤, 优选为治疗过量提呈或只提呈本发明肽的肺癌。这些肽由质谱分析法直接显示出, 而由HLA分子自然提呈于人原发性人肺癌 (NSCLC) 样本中。

[0359] 与正常组织相比, 癌症中高度过量表达肽来源的许多源基因/蛋白质 (也指定为“全长蛋白”或“潜在蛋白”) - 本发明相关的“正常组织”是健康肺细胞或其他正常组织细胞, 这表明肿瘤与这些源基因的高度关联性 (见实施例2)。此外, 这些肽本身也在肿瘤组织中过度提呈 (本发明相关的“肿瘤组织”是指来自肺癌 (NSCLC) 患者的样本), 但不在正常组织中过度提呈 (见实施例1)。

[0360] HLA结合肽能够被免疫系统识别,特别是T淋巴细胞。T细胞可破坏提呈被识别HLA/肽复合体的细胞(如:提呈衍生肽的肺癌细胞)。

[0361] 本发明的所有肽已被证明具有刺激T细胞反应的能力,并过量提呈,因而可用于制备本发明的抗体和/或TCR,例如可溶性TCR(参见实施例3和实施例4)。此外,肽与相应的MHC组合时,也可用于制备本发明的抗体、其特异性结合片段、抗体样黏合剂和/或TCR,特别是sTCR。各个方法均为技术人员所熟知,并在各个文献中可找到。因此,本发明的肽可用于在患者中产生免疫反应,从而能够毁灭肿瘤细胞。患者的免疫反应能够通过直接给予患者所述肽或前体物质(如,加长肽、蛋白或编码这些肽的核酸),较理想是与加强免疫原性的制剂相结合,而进行诱导。源自该治疗性疫苗的免疫反应预期能够高度特异性地对抗肿瘤细胞,因为本发明的目标肽在正常组织上提呈的复制数目较少,防止患者发生对抗正常细胞的不良自体免疫反应的风险。

[0362] 本发明的另一方面提出了制备识别特异性肽-MHC复合物的可溶性T细胞受体(sTCR)的一种方法。这种可溶性T细胞受体可从特异性T细胞克隆中产生,并且它们的亲和力可以通过互补决定区靶向诱变而增加。为了T细胞受体选择之目的,可以使用噬菌体展示(美国2010/0113300, (Liddy et al., 2012))。为了在噬菌体展示期间以及实际使用为药物时稳定T细胞受体之目的,可通过非天然二硫键、其他共价键(单链T细胞受体)或通过二聚化结构域连接 α 和 β 链(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T细胞受体可以连接到毒素、药物、细胞因子(参见US 2013/0115191)、结构域招募效应细胞,如抗CD3域等,以便对靶细胞执行特定的功能。此外,它可能表达于用于过继转移的T细胞。进一步的信息可在WO 2004/033685A1和WO 2004/074322A1中找到。sTCR的组合在WO2012/056407A1中进行了描述。WO 2013/057586A1中公开了制备的其他方法。

[0363] “药物组合物”是指适合在医疗机构用于人体的组合物。优选地,药物组合物为无菌状态,并根据GMP指南生产。

[0364] 药物组合物包括游离形式或以一种药用盐形式存在的肽(也参见上文)。此处使用的“药用盐”系指所公开的肽的一种衍生物,其中该肽由制酸或药剂的碱盐进行改性。例如,用与适合的酸反应的游离碱(通常其中的中性药物有一个中性-NH₂基团)制备酸式盐。适合制备酸盐的酸包括有机酸,如:乙酸、丙酸、羧基酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、甲磺酸、苯磺酸、水杨酸等等、以及无机酸,如:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸等。相反,可在一种肽上提呈的酸性基团的碱盐制剂使用药用碱基进行制备,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等等。

[0365] 在特别优选的实施方案中,药物组合物包括乙酸(醋酸盐),三氟乙酸盐或盐酸(氯化物)形式的肽。

[0366] 本发明中所述的药剂优选为一种免疫治疗药剂,例如,一种疫苗。该疫苗可直接给到患者的受影响器官,也可i.d.、i.m.、s.c.i.p.和i.v注射方式全身给药,或体外应用到来自患者或其细胞株的细胞(随后再将这些细胞注入到患者中),或体外用于从来自患者的免疫细胞的一个细胞亚群(然后再将细胞重新给予患者)。如果核酸体外注入细胞,可能有益于细胞转染,以共同表达免疫刺激细胞因子(如白细胞介素-2)。肽可完全单独给药,也可与免疫刺激佐剂相结合(见下文)、或与免疫刺激细胞因子联合使用、或以适当的输送系统给

药(例如脂质体)。该肽也可共轭形成一种合适的载体(如钥孔虫凝集素蛋白(KLH)或甘露)到合适的载体(参阅WO 95/18145及(Longenecker et al.,1993))。肽也可能被标记,可能是融合蛋白,或可能是杂交分子。在本发明中给出序列的肽预计能刺激CD4或CD8T细胞。然而,在有CD4T-辅助细胞的帮助时,CD8T细胞刺激更加有效。因此,对于刺激CD8T细胞的MHC-I类表位,一种杂合分子的融合伙伴或片段提供了刺激CD4阳性T细胞的适当表位。CD4-和CD8刺激表位为本领域所熟知、并包括本发明中确定的表位。

[0367] 一方面,疫苗包括至少含有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110中提出的一种肽以及至少另外一种肽,优选为2至50个、更优选为2至25个、再优选为2至20个、最优选为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个肽。肽可能从一个或多个特定TAA中衍生,并且可能与MHC I类分子结合

[0368] 另一方面,本发明提出了一种编码本发明中肽或肽变体的核酸(如多聚核苷酸)。多聚核苷酸可能为,例如,DNA、cDNA、PNA、RNA或其组合物,它们可为单链和/或双链、或多聚核苷酸的原生或稳定形式(如:具有硫代磷酸骨架的多聚核苷酸),并且只要它编码肽,就可能包含也可能不包含内含子。当然,多聚核苷酸只能编码加入天然肽键并含有天然氨基酸残基的肽。另一个方面,本发明提出了一种可根据本发明表达多肽的表达载体。

[0369] 对于连接多核苷酸,已经开发出多种方法,尤其是针对DNA,可通过向载体补充可连接性末端等方法进行连接。例如,可向DNA片段加入补充性均聚物轨道,之后DNA片段被插入到载体DNA。然后,通过补充性均聚物尾巴的氢键结合,将载体和DNA片段结合,从而形成重组DNA分子。

[0370] 含有一个或多个酶切位点的合成接头为DNA片段与载体连接提供了另一种方法。含各种限制性核酸内切酶的合成接头可通过多种管道购得,其中包括从国际生物技术公司(International Biotechnologies Inc,New Haven,CN,美国)购得。

[0371] 编码本发明多肽的DNA理想修饰方法是使用Saiki等人(Saiki et al.,1988)所采用的聚合酶链反应方法。此方法可用于将DNA引入合适的载体(例如,通过设计合适的酶切位点),也可用于本领域已知的其他有用方法修饰DNA。如果使用病毒载体,痘病毒载体或腺病毒载体为优选。

[0372] 之后,DNA(或在逆转录病毒载体情况下,RNA)可能表达于合适的宿主,从而制成含本发明肽或变体的多肽。因此,可根据已知技术使用编码本发明肽或变体的DNA,用本文所述方法适当修饰后,构建表达载体,然后表达载体用于转化合适宿主细胞,从而表达和产生本发明中的多肽。此类技术包括那些公开于,例如,美国专利4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075和4,810,648。

[0373] 编码含本发明化合物多肽的DNA(或在逆转录病毒载体情况下,RNA)可能被加入到其他多种DNA序列,从而引入到合适的宿主中。同伴DNA将取决于宿主的性质、DNA引入宿主的方式、以及是否需要保持为游离体还是要相互结合。

[0374] 一般来说,DNA可以适当的方向和正确的表达阅读框架附着到一种表达载体(如质粒)中。如有必要,该DNA可能与所需宿主所识别的相应转录和翻译调节控制核苷酸序列连接,尽管表达载体中一般存在此类控制功能。然后,该载体通过标准方法被引入宿主。一般来说,并不是所有的宿主都会被载体转化。因此,有必要选择转化过的宿主细胞。选择方法包括用任何必要的控制元素向表达载体插入一个DNA序列,该序列对转化细胞中的可选择

性属性(如抗生素耐药性)进行编码。

[0375] 另外,有这种选择属性的基因可在另外一个载体上,该载体用来协同转化所需的宿主细胞。然后,本发明中的重组DNA所转化的宿主细胞在本文中所述本领域技术人员熟悉的合适条件下培养足够长的时间,从而表达之后可回收的肽。

[0376] 有许多已知的表达系统,包括细菌(如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母(如酵母菌)、丝状真菌(如曲霉菌)、植物细胞、动物细胞及昆虫细胞。该系统可优选为哺乳动物细胞,如来自ATCC细胞生物学库(Cell Biology Collection)中的CHO细胞。

[0377] 典型的哺乳动物细胞组成型表达载体质粒包括CMV或含一个合适的多聚A尾巴的SV40启动子以及抗性标志物(如新霉素)。一个实例为从Pharmacia公司(Piscataway,新泽西,美国)获得的pSVL。一种可诱导型哺乳动物表达载体的例子是pMSG,也可以从Pharmacia公司获得。有用的酵母质粒载体是pRS403-406和pRS413-416,一般可从Stratagene Cloning Systems公司(La Jolla,CA 92037,美国)获得。质粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406是酵母整合型质粒(YIp),并插入了酵母可选择性标记物HIS3、TRP1、LEU2和URA3。pRS413-416质粒为酵母着丝粒质粒(Ycp)。基于CMV启动子的载体(如,来自于Sigma-Aldrich公司)提供了瞬时或稳定的表达、胞浆表达或分泌,以及FLAG、3xFLAG、c-myc或MATN不同组合物中的N-端或C-端标记。这些融合蛋白可用于检测、纯化及分析重组蛋白。双标融合为检测提供了灵活性。

[0378] 强劲的人巨细胞病毒(CMV)启动子调控区使得COS细胞中的组成蛋白表达水平高达1mg/L。对于较弱的细胞株,蛋白水平一般低于0.1mg/L。SV40复制原点的出现将导致DNA在SV40复制容纳性COS细胞中高水平复制。例如,CMV载体可包含细菌细胞中的pMB1(pBR322的衍生物)复制原点、细菌中进行氨苄青霉素抗性选育的钙-内酰胺酶基因、hGH polyA和f1的原点。含前胰岛素原引导(PPT)序列的载体可使用抗FLAG抗体、树脂和板引导FLAG融合蛋白分泌到进行纯化的培养基中。其他与各种宿主细胞一起应用的载体和表达系统是本领域熟知众所周知的。

[0379] 在另一个实施方案中,对本发明的两个或更多的肽或肽变体进行编码,因此,以一个连续顺序(类似于“一串珠子”的构建体)表达。在达到目标,所述肽或肽变体可能通过连接符氨基酸的延伸处(例如LLLLLL)连接或融合一起,也可能他们之间没有任何附加的肽而被连接。这些构建体也可用于癌症治疗,可诱导涉及MHC I和MHC II类分子的免疫应答。

[0380] 本发明还涉及一种宿主细胞,其以本发明的多核苷酸载体构建转化而来。宿主细胞可为原核细胞,也可为真核细胞。在有些情况下,细菌细胞为优选原核宿主细胞,典型为大肠杆菌株,例如,大肠杆菌菌株DH5(从Bethesda Research Laboratories公司(Bethesda,MD,美国)获得)和RR1(从美国菌种保藏中心(ATCC,Rockville,MD,美国),ATCC编号31343获得)。首选的真核宿主细胞包括酵母、昆虫和哺乳动物细胞,优选为脊椎动物细胞,如:小鼠、大鼠、猴子或人成纤维细胞和结肠癌细胞株中的细胞。酵母宿主细胞包括YPH499、YPH500和YPH501,一般可从Stratagene Cloning Systems公司(La Jolla,CA92037,美国)获得。首选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞为ATCC中的CCL61细胞、NIH瑞士小鼠胚胎细胞NIH/3T3为ATCC中的CRL 1658细胞、猴肾源性COS-1细胞为ATCC中的CRL 1650细胞以及人胚胎肾细胞的293号细胞。首选昆虫细胞为Sf9细胞,可用杆状病毒表达载体转染。有关针对表达选择合适宿主细胞的概要,可从教科书(Paulina

Balbás and Argelia Lorence《Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols》Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9) 和本领域技术人员知道的其他文献中查到。

[0381] 含本发明DNA结构的适当宿主细胞的转化可使用大家熟知的方法完成,通常取决于使用载体的类型。关于原核宿主细胞的转化,请参见,例如,Cohen等人的文献(Cohen et al., 1972) 和(Green and Sambrook, 2012)。酵母细胞的转化在Sherman等人的文章(Sherman et al., 1986) 中进行了描述。Beggs (Beggs, 1978) 中所述的方法也很有用。对于脊椎动物细胞,转染这些细胞的试剂等,例如,磷酸钙和DEAE-葡聚糖或脂质体配方,可从Stratagene Cloning Systems公司或Life Technologies公司(Gaithersburg, MD 20877, 美国) 获得。电穿孔也可用于转化和/或转染细胞,是本领域用于转化酵母细胞、细菌细胞、昆虫细胞和脊椎动物细胞大家熟知的方法。

[0382] 被成功转化的细胞(即含本发明DNA结构的细胞)可用大家熟知的方法(如PCR) 进行识别。另外,上清液存在的蛋白可使用抗体进行检测。

[0383] 应了解,本发明中的某些宿主细胞用于制备本发明中的肽,例如细菌细胞、酵母细胞和昆虫细胞。但是,其他宿主细胞可能对某些治疗方法有用。例如,抗原提呈细胞(如树突状细胞)可用于表达本发明中的肽,使他们可以加载相应的MHC分子中。因此,本发明提出了含本发明中核酸或表达载体的一种宿主细胞。

[0384] 在一个优选实施方案中,宿主细胞为抗原提呈细胞,尤其是树突状细胞或抗原提呈细胞。2010年4月29日,美国食品和药物管理局(FDA) 批准载有含前列腺酸性磷酸酶(PAP) 的重组融合蛋白可用于治疗无症状或症状轻微的转移性HRPC(Rini et al., 2006; Small et al., 2006)。

[0385] 另一方面,本发明提出了一种配制一种肽及其变体的方法,该方法包括培养宿主细胞和从宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0386] 在另一个实施方案中,本发明中的肽、核酸或表达载体用于药物中。例如,肽或其变体可制备为静脉(i.v.) 注射剂、皮下(s.c.) 注射剂、皮内(i.d.) 注射剂、腹膜内(i.p.) 注射剂、肌肉(i.m.) 注射剂。肽注射的优选方法包括s.c.、i.d.、i.p.、i.m. 和i.v. 注射。DNA注射的优选方法为i.d.、i.m.、s.c.、i.p. 和i.v. 注射。例如,给予50 μ g至1.5mg,优选为125 μ g至500 μ g的肽或DNA,这取决于具体的肽或DNA。上述剂量范围在以前的试验中成功使用(Walter et al., 2012)。

[0387] 用于主动免疫接种的多聚核苷酸可为基本纯化形式,也可包被于载体或输送系统。核酸可能为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。这种核酸的设计和引入方法为本领域所熟知。例如,文献中有其概述(Teufel et al., 2005)。多核苷酸疫苗很容易制备,但這些载体诱导免疫反应的作用模式尚未完全了解。合适的载体和输送系统包括病毒DNA和/或RNA,如基于腺病毒、牛痘病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、腺相关病毒或含一种以上病毒元素的混合病毒的系统。非病毒输送系统包括阳离子脂质体和阳离子聚合物,是DNA输送所属领域内熟知的系统。也可使用物理输送系统,如通过“基因枪”。肽或核酸编码的肽可以是一种融合蛋白,例如,含刺激T细胞进行上述CDR的表位。

[0388] 本发明的药剂也可能包括一种或多种佐剂。佐剂是那些非特异性地增强或加强免疫反应的物质(例如,通过CD8-阳性T细胞和辅助T (TH) 细胞介导的对一种抗原的免疫应答,

因此被视为对本发明的药剂有用。适合的佐剂包括(但不限于)1018ISS、铝盐、**AMPLIVAX®**、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、鞭毛蛋白或鞭毛蛋白衍生的TLR5配体、FLT3配体、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(**ALDARA®**)、resiquimod、ImuFactIMP321、白细胞介素IL-2、IL-13、IL-21、干扰素 α 或 β 、或其聚乙二醇衍生物、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、**JuvImmune®**、LipoVac、MALP2、MF59、单磷酰脂A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、水包油和油包水乳状液、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、**PepTel®**载体系统、基于聚丙交酯复合乙交酯[PLG]和右旋糖苷微粒、重组人乳铁传递蛋白SRL172、病毒颗粒和其他病毒样颗粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys、源自皂角苷、分支杆菌提取物和细菌细胞壁合成模拟物的Aquila公司的QS21刺激子,以及其他专有佐剂,如:Ribi's Detox、Quil或Superfos。优选佐剂如:弗氏佐剂或GM-CSF。前人对一些树突状细胞特异性免疫佐剂(如MF59)及其制备方法进行了描述(Allison and Krummel,1995)。也可能使用细胞因子。一些细胞因子直接影响树突状细胞向淋巴组织迁移(如,TNF-),加速树突状细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原提呈细胞(如,GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国5849589号专利,特别以其完整引用形式并入本文),并充当免疫佐剂(如IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN- α 、IFN- β)(Gabrilovich et al.,1996)。

[0389] 据报告,CpG免疫刺激寡核苷酸可提高佐剂在疫苗中的作用。如果没有理论的约束,CpG寡核苷酸可通过Toll样受体(TLR)(主要为TLR9)启动先天(非适应性)免疫系统从而起作用。CpG引发的TLR9活化作用提高了对各种抗原的抗原特异性体液和细胞反应,这些抗原包括肽或蛋白抗原、活病毒或被杀死的病毒、树突状细胞疫苗、自体细胞疫苗以及预防性和治疗性疫苗中的多糖结合物。更重要的是,它会增强树突状细胞的成熟和分化,导致TH1细胞的活化增强以及细胞毒性T淋巴细胞(CTL)生成加强,甚至CD4T细胞说明的缺失。甚至有疫苗佐剂的存在也能维持TLR9活化作用诱发的TH1偏移,这些佐剂如:正常促进TH2偏移的明矾或弗氏不完全佐剂(IFA)。CpG寡核苷酸与以下其他佐剂或配方一起制备或联合给药时,表现出更强的佐剂活性,如微粒、纳米粒子、脂肪乳或类似制剂,当抗原相对较弱时,这些对诱发强反应尤为必要。他们还能加速免疫反应,使抗原剂量减少约两个数量级,在有些实验中,对不含CpG的全剂量疫苗也能产生类似的抗体反应(Krieg,2006)。美国6406705B1号专利对CpG寡核苷酸、非核酸佐剂和抗原结合使用促使抗原特异性免疫反应进行了描述。一种CpG TLR9拮抗剂为Mologen公司(德国柏林)的dSLIM(双干环免疫调节剂),这是本发明药物组合物的优选成分。也可使用其他如TLR结合分子,如:RNA结合TLR7、TLR8和/或TLR9。

[0390] 其他有用的佐剂例子包括(但不限于)化学修饰性CpG(如CpR、Idera)、dsRNA模拟物,如,Poly(I:C)及其衍生物(如:AmpliGen、Hiltonol、多聚-(ICLC)、多聚(IC-R)、多聚(I:C12U))、非CpG细菌性DNA或RNA以及免疫活性小分子和抗体,如:环磷酰胺、舒尼替单抗、**贝伐单抗®**、西乐葆、NCX-4016、西地那非、他达拉非、伐地那非、索拉非尼、替莫唑胺、temsirolimus、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗-CTLA4、免疫系统的其他抗体靶向性主要结构(如:抗-CD40、抗-TGF β 、抗-TNF α 受体)和SC58175,这些药物都可能具有治疗作用和/或充当佐剂。技术人员无需过度进行不当实验就很容易确定本发明中有用的佐剂和添加剂的数量和浓度。

[0391] 首选佐剂是抗-CD40、咪喹莫特、瑞喹莫德、GM-CSF、环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐单抗、干扰素 α 、CpG寡核苷酸及衍生物、多聚(I:C)及衍生物、RNA、西地那非和PLG或病毒颗粒的微粒制剂。

[0392] 本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂从含集落刺激因子制剂中选择,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特、resiquimod和干扰素- α 。

[0393] 本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂从含集落刺激因子制剂中选择,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特和resiquimod。在本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂为环磷酰胺、咪喹莫特或resiquimod。更优选的佐剂是Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA50V、Montanide ISA-51、聚-ICLC(Hiltonol®)和抗CD40mAB或其组合物。

[0394] 此组合药物为非肠道注射使用,如皮下、皮内、肌肉注射,也可口服。为此,肽和其他选择性分子在药用载体中分解或悬浮,优选为水载体。此外,组合物可包含辅料,如:缓冲剂、结合剂、冲击剂、稀释剂、香料、润滑剂等。这些肽也可与免疫刺激物质合用,如:细胞因子。可用于此类组合物的更多辅料可在从A.Kibbe所著的Handbook of Pharmaceutical Excipients(Kibbe,2000)等书中获知。此组合药物可用于阻止、预防和/或治疗腺瘤或癌性疾病。例如,EP2112253中有示例制剂。

[0395] 重要的是要认识到,通过本发明的疫苗引发的免疫应答在不同的细胞阶段和开发的不同阶段攻击癌症。而且不同的癌症相关信号通路被攻击。这相对于其他疫苗的优势,这些疫苗只针对一个或几个靶标,这可能会导致肿瘤很容易适应于攻击(肿瘤逃逸)。此外,并非所有的个体肿瘤都表达相同模式的抗原。因此,几个肿瘤相关肽的组合确保了每个肿瘤都承担至少一些靶标。该组合物以这样的方式设计,预期每个肿瘤可表达几种抗原并覆盖肿瘤生长和维持所需要的几种独立的途径。因此,疫苗可易于“现成的”用于较大患者群体。这意味着,预选择接受疫苗治疗的患者可限制为HLA分型,无需抗原表达的任何额外的生物标志物评估,但仍然确保多个靶标同时被诱导的免疫应答攻击,这对于疗效很重要(Banchereau et al.,2001;Walter et al.,2012)。

[0396] 本文所用的“支架”一词是指与(如抗原)决定因子特异性结合的分子。在一项实施方案中,支架是能够引导其所连接的实体(例如,(第二)抗原结合部分)至目标靶点,例如,至特定类型的肿瘤细胞或承载抗原决定簇的肿瘤基质(如根据目前申请中肽和MHC的复合物)。在另一项实施例中,支架能够通过其靶抗原(例如T细胞受体复合物抗原)启动信号通路。支架包括但不限于抗体及其片段,抗体的抗原结合区,其包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区,结合的蛋白包括至少一个锚蛋白重复序列基元和单域抗原结合(SDAB)分子、适体、(可溶)TCR和(经修饰的)细胞,例如同种异体或自体T细胞。为了评估某个分子是否是结合至靶点的支架,可进行结合测定。

[0397] “特定”结合系指,与其他天然肽-MHC复合物相比,该支架与感兴趣的肽-MHC复合物更好地结合,结合程度为,拥有能够杀死承载特定靶点细胞的活性分子的支架不能够杀死无特定靶点但提呈一个或多个其他肽-MHC复合物的另一细胞。如果交叉反应性肽-MHC的肽并不是天然的,即,并非来自人HLA-多肽组,则结合至其他肽-MHC复合物是无关紧要的。评估靶细胞杀伤的测试在本领域中是公知的。它们应该含有未改变的肽-MHC提呈的靶细胞

(原发细胞或细胞系)或载有肽的细胞进行,以便达到天然肽-MHC的水平。

[0398] 各支架可包括一个标记,其通过确定是否存在或不存卷标所提供的信号可检测到结合支架。例如,该支架可用荧光染料或任何其他适用的细胞标记分子进行标记。此类标记分子是本领域中公知的。例如,通过荧光染料进行的荧光标记可通过荧光或激光扫描显微术或流式细胞术提供结合合适体的可视化。

[0399] 各支架可与第二个活性分子(例如IL-21、抗CD3、抗CD28)共轭。

[0400] 关于多肽支架的进一步信息,可参阅,例如,在WO 2014/071978A1背景技术部分,并作为参考文献引用。

[0401] 本发明还涉及适体。适体(例如,参见WO2014/191359及其中引用的文献)是短的单链核酸分子,其可以折迭为所定义的三维结构并识别特定的靶标结构。它们似乎是开发靶向治疗的合适替代方法。适体已显示可选择性与具有高亲和力和特异性的复合体靶标相结合。

[0402] 识别细胞表面分子的适体在过去十年内已经确定,并为开发诊断和治疗方法提供了手段。由于适体已显示几乎无毒性和免疫原性,因此,它们是生物医学应用中有前景的候选物质。事实上适体,例如前列腺特异性膜抗原识别适体,已被成功地用于靶向治疗并在体内模型的异种移植物中显示出功能。此外,认识到特定肿瘤细胞系的适体也已确定。

[0403] 可选择DNA适体来揭示各种癌细胞的广谱标识属性,特别是那些来自于实体瘤的细胞,而非致瘤和主要健康细胞不被识别。如果所识别的适体不仅识别肿瘤特异性子类型,而且与一系列肿瘤相互作用,这使适体适用于作为所谓的广谱诊断和治疗手段。

[0404] 此外,用流式细胞仪对细胞结合行为的研究显示,适体在纳摩尔范围内显示出很好的亲和力。

[0405] 适体用于诊断和治疗目的。此外,也可能显示,一些适体被肿瘤细胞吸取,因而可作为抗癌剂靶向递送的分子赋形剂,例如siRNA进入肿瘤细胞。

[0406] 可选择适体针对复合体的靶标,如细胞和组织以及包含、优选包括根据任何SEQ ID NO 1至SEQ ID NO 110的一个序列、根据当前发明的肽复合体与MHC分子,使用细胞SELEX(通过指数富集的配体系统进化)技术。

[0407] 本发明中的肽可用于生成和开发出针对MHC/肽复合物的特定抗体。这些抗体可用于治疗,将毒素或放射性物质靶向病变组织。这些抗体的另一用途是为了成像之目的(如PET)将放射性核素靶向病变组织。这可有助于检测小转移灶或确定病变组织的大小和准确位置。

[0408] 因此,本发明的另一方面是提出产生特异性结合至与HLA限制性抗原络合的I或II类人主要组织相容性复合体(MHC)的一种重组抗体的方法,该方法包括:用可溶形式的与HLA限制性抗原络合的(MHC) I或II类分子对包含表达所述主要组织相容性说复合体(MHC) I或II类的基因工程非人哺乳动物进行免疫;将mRNA分子与产生所述非人哺乳动物细胞的抗体分离;产生一个噬菌体显示库,显示由所述mRNA分子编码的蛋白分子;以及将至少一个噬菌体与所述噬菌体显示库分离,所述的至少一个噬菌体显示所述抗体特异性地结合至与HLA限制性抗原络合的所述人主要组织相容性说复合体(MHC) I或II类。

[0409] 本发明的另一方面提出一种抗体,其特异性结合至与一种HLA限制性抗原络合的I或II类人主要组织相容性说复合体(MHC),其中该抗体优选为多克隆抗体、单克隆抗体、双

特异性抗体和/或嵌合抗体。

[0410] 产生这种抗体和单链I类主要组织相容性复合物的相应方法,以及产生这些抗体的其他工具在WO 03/068201、WO 2004/084798、WO 01/72768、WO 03/070752以及出版物(Cohen et al.,2003a;Cohen et al.,2003b;Denkberg et al.,2003)中进行了披露,为了本发明之目的,所有参考文献通过引用被完整地并入本文。

[0411] 优选地,该抗体与复合体的结合亲和力低于20纳摩尔,优选为低于10纳摩尔,这在本发明情况下也被视为具有“特异性”。

[0412] 本发明涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110的组的一个序列或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110具有88%同源性(优选为相同)的一种变体,或诱导与所述变异肽发生T细胞交叉反应的一种变体,其中,所述肽不是基本的全长多肽。

[0413] 本发明进一步涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110的组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110具有至少88%同源性(优选为相同)的一种变体,其中所述肽或变体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸。

[0414] 本发明进一步涉及本发明的肽,其具有与主要组织相容性复合体(MHC)I或II类分子结合的能力。

[0415] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中肽系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110的一个氨基酸序列组成。

[0416] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽(在化学上)被修饰和/或包含非肽键。

[0417] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽为融合蛋白的一部分,特别包括HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸,或其中该肽与一种抗体(例如,树突状细胞特定抗体)融合。

[0418] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明所述肽,前提是该肽并非完整(完全)的人蛋白。

[0419] 本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。

[0420] 本发明进一步涉及一种能表达本发明核酸的表达载体。

[0421] 本发明进一步涉及本发明的一种肽、本发明的一种核酸或本发明的一种药用表达载体,特别是用于治疗肺癌。

[0422] 本发明进一步涉及含本发明核酸或本发明表达载体的一种宿主细胞。

[0423] 本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其为抗原提呈细胞,优选为树突细胞。

[0424] 本发明进一步涉及配制本发明一种肽的一种方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞和从所述宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0425] 本发明进一步涉及本发明中的方法,其中抗原通过与足够量的含抗原提呈细胞的抗原结合被载体表达于合适抗原提呈细胞表面的I或II类MHC分子。

[0426] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中该抗原提呈细胞包括一个表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110的肽或所述变体氨基酸序列。

[0427] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的启动T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞异常表达合一种本发明氨基酸序列的多肽。

[0428] 本发明进一步涉及一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明任何氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者本发明的有效量T细胞。

[0429] 本发明进一步涉及任何所述肽、本发明的一种核酸、本发明的一种表达载体、本发明的一种细胞、本发明一种作为药剂或制造药剂的启动细胞毒性T淋巴细胞的用途。本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0430] 本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中该药剂为一种疫苗。本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0431] 本发明还一般涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为肺癌细胞或其他实体或血液肿瘤细胞,如:脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、肾癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、白血病(AML、CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、食管癌包括胃食管交界处癌(OSCAR)、胆囊癌和胆管癌(GBC、CCC)、膀胱癌(UBC)和子宫癌(UEC)细胞。

[0432] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的特定标志物蛋白和生物标志物,在此成为“靶标”,其可用于诊断和/或判断肺癌的预后。本发明还涉及这些供癌症治疗使用的新靶点。

[0433] 本文中术语“抗体”为广义上的定义,既包括多克隆也包括单克隆抗体。除了完整或“全部”的免疫球蛋白分子,“抗体”这一术语还包括这些免疫球蛋白分子和人源化免疫球蛋白分子的片段(如,CDR、Fv、Fab和Fc片段)或聚合物,只要它们表现出本发明的任何期望属性(例如,肺癌标志物(多)肽的特异性结合、将毒素传递给肺癌细胞标志物基因表达水平增加时的肺癌细胞和/或抑制肺癌标志物多肽的活性)。

[0434] 只要有可能,本发明的抗体可从商业来源购买。本发明的抗体也可能使用已知的方法制得。技术人员会了解全长肺癌标志物多肽或其片段可用于制备本发明的抗体。用于产生本发明抗体的多肽可部分或全部地由天然源经纯化而得,也可利用重组DNA技术生产。

[0435] 例如,本发明的编码肽的cDNA,例如,该肽为根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110多肽的肽,或其中一个变体或片段,可在原核细胞中(如:细菌)或真核细胞(如:酵母、昆虫或哺乳动物细胞)中表达,之后,可纯化重组蛋白,并用于产生一种特异性结合用于产生本发明抗体的肺癌标志物多肽的单克隆或多克隆抗体制剂。

[0436] 本领域的技术人员会认识到,两种或两种以上不同集合的单克隆抗体或多克隆抗体能最大限度地增加获得一种合预期用途所需的特异性和亲和力(例如,ELISA法、免疫组织化学、体内成像、免疫毒素疗法)的抗体的可能性。根据抗体的用途,用已知的方法对其期望活性进行测试(例如,ELISA法、免疫组织化学、免疫治疗等;要获取产生和测试抗体的进一步指导,请参阅,例如,Greenfield,2014(Greenfield,2014)。例如,该抗体可用ELISA法或免疫印迹法、免疫组织化学染色福尔马林固定的肺癌组织或冰冻的组织切片进行检测。在初次体外表征后,用于治疗或体内诊断用途的抗体根据已知的临床测试方法进行检测。

[0437] 此处使用的术语“单克隆抗体”系指从大量同质抗体中获得的一种抗体,即,由相同的抗体组成的抗体群,但可能少量提呈的自然突变除外。此处所述的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中一部分重链和/或轻链与从特定物种中获得的抗体或属于特定抗体类型和分类型抗体的相应序列相同(同质),同时,剩余链与从其他物种中获得的抗体或属于特定抗体类型和子类型抗体的相应序列以及这些抗体的片段相同(同质),只要他们表现出预期的拮抗活性(美国4816567号专利,其在此以其整体并入)。

[0438] 本发明的单克隆抗体可能使用杂交瘤方法制得。在杂交瘤方法中,老鼠或其他适当的宿主动物,通常用免疫制剂以引发产生或能产生将特异性结合至免疫制剂的抗体。或

者,淋巴细胞可在体外进行免疫。

[0439] 单克隆抗体也可由DNA重组方法制得,如:美国4816567号专利所述。编码本发明单克隆抗体的DNA可很容易地使用传统程序进行分离和测序(例如:通过使用能与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0440] 体外方法也适用于制备单价抗体。抗体消化以产生抗体的片段,尤其是Fab片段,可以通过使用本领域已知的常规技术完成。例如,可以通过使用木瓜蛋白酶完成消化。木瓜蛋白酶消化的实施例在WO 94/29348和美国4342566号专利中有描述。抗体的木瓜蛋白酶消化通常产生两种相同的抗原结合性片段,称为Fab片段(每个片段都有一个抗原结合点)和残余Fc片段。胃蛋白酶处理产生aF(ab')₂片段和pFc'片段。

[0441] 抗体片段,不论其是否附着于其他序列,均可包括特定区域或特定氨基酸残基的插入、删除、替换、或其他选择性修饰,但前提是,片段的活性与非修饰的抗体或抗体片段相比没有显著的改变或损害。这些修饰可提供一些额外的属性,如:删除/添加可与二硫键结合的氨基酸,以增加其生物寿命、改变其分泌特性等。在任何情况下,抗体片段必须拥有生物活性的特性,如:结合活性、调节结合域的结合力等。抗体的功能性或活性区域可通过蛋白特定区域的基因突变、随后表达和测试所表达的多肽进行确定。这些方法为本行业技术人员所熟知,可包括编码抗体片段的核酸的特定位置基因突变。

[0442] 本发明的抗体可进一步包括人源化抗体或人抗体。非人(如:鼠)抗体的人源化形式为嵌合抗体免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如:Fv、Fab、Fab'或抗体的其他抗原结合序列),其中包含从非人免疫球蛋白中获得的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)(如具有与其特异性、亲和力和能力的小鼠、大鼠或兔子)CDR的残基取代。在某些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架(FR)残基被相应的非人残基取代。人源化抗体可能还包括既非受体抗体、也非输入CDR或框架序列中发现的残基。一般来说,人源化抗体将包括几乎所有的至少一个、通常为二个可变域,其中,全部或几乎全部的CDR区域均对应于非人免疫球蛋白的区域并且全部或几乎全部的FR区域均为人免疫球蛋白相同序列的区域。理想情况是,人源化抗体还将包括至少免疫球蛋白恒定区(Fc)的一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的一部分。

[0443] 人源化非人抗体的方法为本行业所熟知。一般来说,人源化抗体具有一个或多个从非人源头引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基往往被称为“输入”残基,通常从“输入”可变域中获得。人源化基本上可以通过将啮齿动物CDR或CDR序列取代为相应的人抗体序列而完成。因此,这种“人源化”抗体为嵌合抗体(美国4816567号专利),其中大大少于完整的人可变域被来自于非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常为人抗体,其中有些CDR残基以及可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0444] 可使用免疫后在内源性免疫球蛋白产生缺失时能产生完整人抗体的转基因动物(如:小鼠)。例如,它被描述为,嵌合和种系突变小鼠中的抗体重链连接区域基因的纯合性缺失导致内源性抗体生成的完全抑制。在此种系变种小鼠中人种系免疫球蛋白基因数组的转移在抗原挑战后将导致人抗体的生成。人抗体也可在噬菌体展示库中产生。

[0445] 本发明的抗体优选为通过药用载体的形式给予受试者。通常,在制剂中使用适量的药用盐,以使制剂等渗。药用载体的例子包括生理盐水、林格氏液和葡萄糖溶液。溶液的pH值优选为约5至8,更优选为约7至7.5。此外,载体还包括缓释制剂,如:含有抗体的固体疏

水性聚合物半透性基质,其中基质为有形物品形式,如:薄膜、脂质体或微粒。本行业的技术人员熟知,某些载体可能为更优选,取决于例如,抗体的给药途径和浓度。

[0446] 该抗体可通过注射(如:静脉内、腹腔内、皮下、肌肉内)或通过输注等其他方法给予受试者、患者或细胞,确保其以有效的形式传输到血液中。这些抗体也可以通过瘤内或瘤周途径给予,从而发挥局部和全身的治疗作用。局部或静脉注射为优选。

[0447] 抗体给药的有效剂量和时间表可根据经验确定,并且作出此类决定属本行业的技术范围内。本行业的技术人员会明白,必须给予的抗体剂量根据以下因素会有所不同,例如:接受抗体的受试者、给药途径、使用的抗体以及其他正在使用的药物的特定类型。单独使用的抗体的通常日剂量可能为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至最多 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重或更多,这取决于上述因素。给予抗体,优选为治疗肺癌后,治疗抗体的疗效可通过技术人员熟知的不同方法评估。例如:接受治疗的受试者肺癌的大小、数量和/或分布可使用标准肿瘤成像技术进行监测。因治疗而给予的抗体与不给予抗体时的病程相比,可阻止肿瘤生长、导致肿瘤缩小、和/或阻止新肿瘤的发展,这样的抗体是一种有效治疗肺癌的抗体。

[0448] 本发明的另一方面提出了制备识别特异性肽-MHC复合物的可溶性T细胞受体(sTCR)的一种方法。这种可溶性T细胞受体可从特异性T细胞克隆中产生,并且它们的亲和力可以通过互补决定区靶向诱变而增加。为了T细胞受体选择之目的,可以使用噬菌体展示(美国2010/0113300, (Liddy et al., 2012))。为了在噬菌体展示期间以及实际使用为药物时稳定T细胞受体之目的,可通过非天然二硫键、其他共价键(单链T细胞受体)或通过二聚化结构域连接 α 和 β 链(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T细胞受体可以连接到毒素、药物、细胞因子(参见US 2013/0115191)、域招募效应细胞,如抗CD3域等,以便对靶细胞执行特定的功能。此外,它可能表达于用于过继转移的T细胞。进一步的信息可在WO 2004/033685A1和WO 2004/074322A1中找到。sTCR的组合在WO 2012/056407A1中进行了描述。WO 2013/057586A1中公开了制备的进一步的方法。

[0449] 此外,可用本发明的肽和/或TCR或抗体或其他结合分子在活检样本的基础上验证病理师对癌症的诊断。

[0450] 该抗体或TCR也可用于体内诊断实验。一般来说,抗体用放射性核素标记(如: ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S),从而可免疫闪烁扫描法使肿瘤局限化。在一实施方案中,其中的抗体或片段与两个或两个以上选自包括上述蛋白的组的蛋白质靶目标细胞外域结合,并且亲和力值(Kd)低于 $1 \times 10\mu\text{M}$ 。

[0451] 诊断用抗体可通过各种影像学方法使用适合检测的探针进行标记。探针检测方法包括但不限于,荧光、光、共聚焦和电镜方法;磁共振成像和光谱学技术;透视、计算机断层扫描和正电子发射断层扫描。合适的探针包括但不限于,荧光素、罗丹明、曙红及其它荧光团、放射性同位素、黄金、钷和其他稀土、顺磁铁、氟-18和其他正电子发射放射性核素。此外,探针可能是双功能或多功能的,并且用一种以上的上述方法可进行检测。这些抗体可用所述的探针直接或间接进行标记。抗体探针的连接,包括探针的共价连接、将探针融合入抗体、以及螯合化合物的共价连接从而结合探针、以及其他本行业熟知的方法。对于免疫组织化学方法,疾病组织样本可能是新鲜或冷冻或可能包埋于石蜡中以及用福尔马林等防腐剂固定。固定或包埋的切片包括与标记一抗和二抗接触的样本,其中该抗体用于检测原位蛋白的表达。

[0452] 本发明的另一方面包括一种体外制备启动的T细胞的方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人MHC分子进行体外连接,这些分子在合适的抗原提呈细胞表面表达足够的一段时间从而以抗原特异性方式启动T细胞,其中所述抗原为根据本发明所述的一种肽。优选情况是足够量的抗原与抗原提呈细胞一同使用。

[0453] 优选情况是,哺乳动物细胞的TAP肽转载体缺乏或水平下降或功能降低。缺乏TAP肽转运载体的适合细胞包括T2、RMA-S和果蝇细胞。TAP是与抗原加工相关的转载体。

[0454] 人体肽载人的缺陷细胞株T2从属美国菌种保藏中心(ATCC,12301ParklawnDrive, Rockville, Maryland 20852,美国)目录号CRL1992;果蝇细胞株Schneider 2号株从属ATCC目录号CRL 19863;小鼠RMA-S细胞株Ljunggren等人描述过(Ljunggren and Karre,1985)。

[0455] 优选情况是,宿主细胞在转染前基本上不表达MHC I类分子。刺激因子细胞还优选为表达对T细胞共刺激信号起到重要作用的分子,如,B7.1、B7.2、ICAM-1和LFA 3中的一种分子。大量MHC I类分子和共刺激分子的核酸序列可从GenBank和EMBL数据库中公开获得。

[0456] 当MHC I类表位用作一种抗原时,T细胞为CD8阳性T细胞。

[0457] 如果抗原提呈细胞受到转染而表达这种表位,则优选的细胞包括一个表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:110的肽或变体氨基酸序列。

[0458] 可使用其他一些方法来体外生成T细胞。例如,自体肿瘤浸润性淋巴细胞可用于生成CTL。Plebanski等人在(Plebanski et al.,1995)使用自体外周血淋巴细胞(PLB)制得T细胞。另外,也可能用肽或多肽脉冲处理树突状细胞或通过重组病毒感染而制成自体T细胞。此外,B细胞可用于制备自体T细胞。此外,用肽或多肽脉冲处理或用重组病毒感染的巨噬细胞可用于配制自体T细胞。S.Walter等人在(Walter et al.,2003)中描述了通过使用人工抗原提呈细胞(aAPC)体外启动T细胞,这也是生成作用于所选肽的T细胞的一种合适方法。在本发明中,根据生物素:链霉素生物化学方法通过将预制的MHC:肽复合物耦合到聚苯乙烯颗粒(微球)而生成aAPC。该系统实现了对aAPC上的MHC密度进行精确调节,这使得可以在血液样本中选择地引发高或低亲和力的高效抗原特异性T细胞反应。除了MHC:肽复合物外,aAPC还应携运含共刺激活性的其他蛋白,如耦合至表面的抗-CD28抗体。此外,此类基于aAPC的系统往往需要加入适当的可溶性因子,例如,诸如白细胞介素-12的细胞因子。

[0459] 也可用同种异体细胞制得T细胞,在WO 97/26328中详细描述了一种方法,以参考文献方式并入本文。例如,除了果蝇细胞和T2细胞,也可用其他细胞来提呈肽,如CHO细胞、杆状病毒感染的昆虫细胞、细菌、酵母、牛痘感染的靶细胞。此外,也可使用植物病毒(例如,参阅Porta等人在(Porta et al.,1994)中描述了将豇豆花叶病毒开发为一种提呈外来肽的高产系统。

[0460] 被启动的T细胞直接针对本发明中的肽,有助于治疗。因此,本发明的另一方面提出了用本发明前述方法制得的启动T细胞。

[0461] 按上述方法制成的启动T细胞将会有选择性地识别异常表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO 110氨基酸序列的多肽。

[0462] 优选情况是,T细胞通过与其含HLA/肽复合物的TCR相互作用(如,结合)而识别该细胞。T细胞是杀伤患者靶细胞方法中有用的细胞,其靶细胞异常表达含本发明中氨基酸序列的多肽。此类患者给予有效量的启动T细胞。给予患者的T细胞可能源自该患者,并按上述

方法启动(即,它们为自体T细胞)。或者,T细胞不是源自该患者,而是来自另一个人。当然,优选情况是该供体为健康人。发明人使用“健康个人”系指一个人一般状况良好,优选为免疫系统合格,更优选为无任何可很容易测试或检测到的疾病。

[0463] 根据本发明,CD8-阳性T细胞的体内靶细胞可为肿瘤细胞(有时表达MHC-II类抗原)和/或肿瘤周围的基质细胞(肿瘤细胞)(有时也表达MHC-II类抗原;(Dengjel et al., 2006))。

[0464] 本发明所述的T细胞可用作治疗性组合物中的活性成分。因此,本发明也提出了一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明中氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者上述有效量的T细胞。

[0465] 发明人所用的“异常表达”的意思还包括,与正常表达水平相比,多肽过量表达,或该基因在源自肿瘤的组织中未表达,但是在该肿瘤中却表达。“过量表达”系指多肽水平至少为正常组织中的1.2倍;优选为至少为正常组织中的2倍,更优选为至少5或10倍。

[0466] T细胞可用本领域已知的方法制得(如,上述方法)。

[0467] T细胞继转移方案为本领域所熟知的方案。综述可发现于:Gattioni et al.和Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006;Morgan et al., 2006)。

[0468] 本发明的另一个方面包括使用与MHC复合的肽,以生成T细胞受体,其核酸被克隆并被引入至宿主细胞,优选为T细胞。然后,该通过基因工程改变的T细胞可转给患者用于癌症治疗。

[0469] 本发明的任一分子(即肽、核酸、抗体、表达载体、细胞,启动T细胞、T细胞受体或编码核酸)都有益于治疗疾病,其特点在于细胞逃避免疫反应的打击。因此,本发明的任一分子都可用作药剂或用于制造药剂。这种分子可单独使用也可与本发明中的其他分子或已知分子联合使用。

[0470] 本发明还涉及一种套件,其包括:

[0471] (a) 一个容器,包含上述溶液或冻干粉形式的药物组合物;

[0472] (b) 可选的第二个容器,其含有冻干粉剂型的稀释剂或重组溶液;和

[0473] (c) 可选的(i) 溶液使用或(ii) 重组和/或冻干制剂使用的说明。

[0474] 该套件还步包括一个或多个(iii) 缓冲剂,(iv) 稀释剂,(v) 过滤液,(vi) 针,或(v) 注射器。容器最好是瓶子、小瓶、注射器或试管,可以为多用途容器。药物组合物最好是冻干的。

[0475] 本发明中的套件优选包含一种置于合适容器中的冻干制剂以及重组和/或使用说明。适当的容器包括,例如瓶子、西林瓶(如双室瓶)、注射器(如双室注射器)和试管。该容器可能由多种材料制成,如玻璃或塑料。试剂盒和/或容器最好有容器或关于容器的说明书,指明重组和/或使用的方向。例如,标签可能表明冻干剂型将重组为上述肽浓度。该标签可进一步表明制剂用于皮下注射。

[0476] 存放制剂的容器可使用多用途西林瓶,使得可重复给予(例如,2-6次)重组剂型。该套件可进一步包括装有合适稀释剂(如碳酸氢钠溶液)的第二个容器。

[0477] 稀释液和冻干制剂混合后,重组制剂中的肽终浓度优选为至少0.15mg/mL/肽(=75 μ g),不超过3mg/mL/肽(=1500 μ g)。该套件还可包括商业和用户角度来说可取的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂,过滤液、针头、注射器和带有使用说明书的包装插页。

[0478] 本发明中的套件可能有一个单独的容器,其中包含本发明所述的药物组合物制剂,该制剂可有其他成分(例如,其他化合物或其药物组合物),也可无其他成分,或者每种成分都有其不同容器。

[0479] 优选情况是,本发明的套件包括与本发明的一种制剂,包装后与第二种化合物(如佐剂(例如GM-CSF)、化疗药物、天然产品、激素或拮抗剂、抗血管生成剂或抑制剂、凋亡诱导剂或螯合剂)或其药物组合物联合使用。该套件的成分可进行预络合或每种成分在给予患者之前可放置于单独的不同容器。该套件的成分可以是一种或多种溶液,优选为水溶液,更优选为无菌水溶液。该套件的成分也可为固体形式,加入合适的溶剂后转换为液体,最好放置于另一个不同的容器中。

[0480] 治疗套件的容器可能为西林瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器、或任何其他盛装固体或液体的工具。通常,当成分不只一种时,套件将包含第二个西林瓶或其他容器,使之可以单独定量。该套件还可能包含另一个装载药用液体的容器。优选情况是,治疗套件将包含一个设备(如,一个或多个针头、注射器、滴眼器、吸液管等),使得可注射本发明的药物(本套件的组合物)。

[0481] 本发明的药物配方适合以任何可接受的途径进行肽给药,如口服(肠道)、鼻内、眼内、皮下、皮内、肌内,静脉或经皮给药。优选为皮下给药,最优选为皮内给药,也可通过输液泵给药。

[0482] 由于本发明的肽从肺癌中分离而得,因此,本发明的药剂优选用于治疗肺癌。

[0483] 本发明进一步涉及为个体患者制备个体化药物的一种方法,其中包括:制造含选自预筛选TUMAP存储库至少一种肽的药物组合物,其中药物组合物中所用的至少一种肽选择为适合于个体患者。在一项实施方案中,药物组合物为一种疫苗。该方法也可以改动以产生下游应用的T细胞克隆物,如:TCR隔离物或可溶性抗体和其他治疗选择。

[0484] “个体化药物”系指专门针对个体患者的治疗,将仅用于该等个体患者,包括个体化活性癌症疫苗以及使用自体组织的过继细胞疗法。

[0485] 如本文所述,“存储库”应指已经接受免疫原性预筛查和/或在特定肿瘤类型中过量提呈的一组或一系列肽。“存储库”一词并不暗示,疫苗中包括的特定肽已预先制造并储存于物理设备中,虽然预期有这种可能性。明确预期所述肽可以用于新制造每种个体化疫苗,也可能被预先制造和储存。存储库(例如,数据库形式)由肿瘤相关肽组成,其在各种HLA-A HLA-B和HLA-C等位基因肺癌患者的肿瘤组织中高度过度表达。其可能含有包括MHC I类和MHC II类肽或拉长的MHC I类肽。除了从几种肺癌组织中采集的肿瘤相关肽外,存储库还可能包含HLA-A*02和HLA-A*24标记肽。这些肽可对TUMAP诱导的T细胞免疫进行量化比较,从而可得出疫苗抗肿瘤反应能力的重要结论。其次,在没有观察到来自患者“自身”抗原TUMAP的任何疫苗诱导的T细胞反应时,它们可作为来自“非自身”抗原的重要阳性对照肽。第三,它还可对患者的免疫功能状态得出结论。

[0486] 存储库的TUMAP通过使用一种功能基因组学方法进行鉴定,该方法结合了基因表达分析、质谱法和T细胞免疫学(XPresident®)。该方法确保了只选择真实存在于高百分比肿瘤但在正常组织中不表达或仅很少量表达的TUMAP用于进一步分析。对于初始肽的选择,患者的肺癌样本和健康供体的血液以循序渐进的方法进行分析:

[0487] 1. 恶性材料的HLA配体用质谱法确定

[0488] 2. 使用全基因组信使核糖核酸(mRNA)表达分析法用于确定恶性肿瘤组织(肺癌)与一系列正常器官和组织相比过度表达的基因。

[0489] 3. 确定的HLA配体与基因表达数据进行比较。肿瘤组织上过度提呈或选择性提呈的肽,优选为第2步中检测到的选择性表达或过量表达基因所编码的考虑为多肽疫苗的合适候选TUMAP。

[0490] 4. 文献检索以确定更多证据以支持确认为TUMAP的肽的相关性

[0491] 5. 过度表达在mRNA水平的相关性由肿瘤组织第3步选定的TUMAP重新检测而确定,并且在健康组织上缺乏(或不经常)检测。

[0492] 6. 为了评估通过选定的肽诱导体内T细胞反应是否可行,使用健康供体以及肺癌患者的人T细胞进行体外免疫原性测定。

[0493] 一方面,在将所述肽加入存储库之前,对其进行筛查以了解免疫原性。举例来说(但不限于此),纳入存储库的肽的免疫原性的确定方法包括体外T细胞启动,具体为:用装载肽/MHC复合物和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞反复刺激来自健康供体的CD8⁺T细胞。

[0494] 这种方法优选用于罕见癌症以及有罕见表达谱的患者。与含目前开发为固定组分的多肽鸡尾酒相反的是,存储库可将肿瘤中抗原的实际表达于疫苗进行更高层次的匹配。在多目标方法中,每名患者将使用几种“现成”肽的选定单一肽或组合。理论上来说,基于从50抗原肽库中选择例如5种不同抗原肽的一种方法可提供大约170万种可能的药物产品(DP)组分。

[0495] 在一方面,选择所述肽用于疫苗,其基于个体患者的适合性,并使用本发明此处或后文所述的方法。

[0496] HLA表型、转录和肽组学资料从患者的肿瘤材料和血液样本中收集,以确定最合适每名患者且含有“存储库”和患者独特(即突变)TUMAP的肽。将选择的那些肽选择性地或过度表达于患者肿瘤中,并且可能的情况下,如果用患者个体PBMC进行检测,则表现出很强的体外免疫原性。

[0497] 优选的情况是,疫苗所包括的肽的一种确定方法包括:(a)识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);(b)将(a)中鉴定的肽与上述肽的存储库(数据库)进行比对;且(c)从与患者中确定的肿瘤相关肽相关的存储库(数据库)中选择至少一种肽。例如,肿瘤样本提呈的TUMAP的鉴定方法有:(a1)将来自肿瘤样本的表达数据与所述肿瘤样本组织类型相对应的正常组织样本的表达数据相比对,以识别肿瘤组织中过量表达或异常表达的蛋白;以及(a2)将表达数据与结合到肿瘤样本中I类MHC和/或II类分子的MHC配体序列想关联,以确定来源于肿瘤过量表达或异常表达的蛋白质的MHC配体。优选情况是,MHC配体的序列的确定方法是:洗脱来自肿瘤样本分离的MHC分子结合肽,并测序洗脱配体。优选情况是,肿瘤样本和正常组织从同一患者获得。

[0498] 除了使用存储库(数据库)模型选择肽以外,或作为一种替代方法,TUMAP可能在新患者中进行鉴定,然后列入疫苗中。作为一种实施例,患者中的候选TUMAP可通过以下方法进行鉴定:(a1)将来自肿瘤样本的表达数据与所述肿瘤样本组织类型相对应的正常组织样本的表达数据相比对,以识别肿瘤组织中过量表达或异常表达的蛋白;以及(a2)将表达数据与结合到肿瘤样本中I类MHC和/或II类分子的MHC配体序列想关联,以确定来源于肿瘤过量表达或异常表达的蛋白质的MHC配体。作为另一实施例,蛋白的鉴定方法为可包含突变,

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

[0499] 在一个示范实施方案中,疫苗中所含肽通过以下方法确定:(a)用上述方法识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);(b)将(a)中鉴定的肽与进行肿瘤(与相应的正常组织相比)免疫原性和过量提呈预筛查肽的存储库进行比对;(c)从与患者中确定的肿瘤相关肽相关的存储库中选择至少一种肽;及(d)可选地在(a)中选择至少一种新确定的肽,确认其免疫原性。

[0500] 在一个示范实施方案中,疫苗中所含肽通过以下方法确定:(a)识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);以及(b)在(a)中选择至少一种新确定的肽,并确认其免疫原性。

[0501] 一旦选定了用于个体化肽疫苗的肽时,则产生疫苗。该疫苗优选为一种液体制剂,包括溶解于20-40%DMSO之间,优选为约30-35%DMSO,例如,约33%DMSO中的个体肽。

[0502] 列入产品的每种肽都溶于DMSO中。单个肽溶液浓度的选择取决于要列入产品中的肽的数量。单肽-DMSO溶液均等混合,以实现一种溶液中包含所有的肽,且浓度为每肽~2.5mg/ml。然后该混合溶液按照1:3比例用注射用水进行稀释,以达到在33%DMSO中每肽0.826mg/ml的浓度。稀释的溶液通过0.22 μ m无菌筛检程序进行过滤。从而获得最终本体溶液。

[0503] 最终本体溶液填充到小瓶中,在使用前储存于-20 $^{\circ}$ C下。一个小瓶包含700 μ L溶液,其中每种肽含有0.578mg。其中的500 μ L(每种肽约400 μ g)将用于皮内注射。

[0504] 本发明的肽除了用于治疗癌症,也可用于诊断。由于肽由肺癌细胞产生,并且已确定这些肽在正常组织中不存在或水平较低,因此这些肽可用于诊断癌症是否存在。

[0505] 血液样本中组织活检物合权利要求的肽,可有助于病理师诊断癌症。用抗体、质谱或其他本领域内已知的方法检测某些肽可使病理师判断该组织样本为恶性的还是炎症或一般病变,也可用作肺癌的生物标志物。肽基团的提呈使得能对病变组织进行分类或进一步分成子类。

[0506] 对病变标本中肽的检测使得能对免疫系统治疗方法的利益进行判断,特别是如果T-淋巴细胞已知或预计与作用机制有关。MHC表达的缺失是一种机制,充分说明了哪些受感染的恶性细胞逃避了免疫监视。因此,肽的提呈表明,分析过的细胞并没有利用这种机制。

[0507] 本发明的肽可用于分析淋巴细胞对肽的反应(如T细胞反应),或抗体对肽或MHC分子络合的肽发生的反应。这些淋巴细胞反应可以作为预后指标,决定是否采取进一步的治疗。这些反应也可以用作免疫疗法中的替代反应指标,旨在以不同方式诱导淋巴细胞反应,

如接种蛋白疫苗、核酸、自体材料、淋巴细胞过继转移。基因治疗中,淋巴细胞对肽发生的反应可以在副作用的评估中考虑。淋巴细胞反应监测也可能成为移植疗法随访检查中的一种有价值的工具,如,用于检测移植物抗宿主和宿主抗移植物疾病。

[0508] 下列描述优选方案的实施例将对本发明进行说明,并参照随附图表(但是不仅限于此)。考虑到本发明的目的,文中引用的所有参考文献通过引用的方式并入在本文中。

[0509] 在图中,

[0510] 图1A-D显示了正常组织和NSCLC样本中各种肽的过量提呈。图1E-F显示了所有的细胞系、正常组织和癌症组织,其中检测出了典型肽(FVFSFPVSV,SEQ ID NO:4(A*02)和YYTKGFALLNF,SEQ ID NO:29(A*24))。图1A-基因:SLC6A14,肽:FLIPYAIML(A*02;SEQ ID NO.:2)-从左至右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,5动脉,3骨髓,8大脑,3乳房,13结肠,1十二指肠,7食管,2胆囊,5心,16肾脏,4白细胞样本,21肝脏,1淋巴结,1卵巢,7胰腺癌,2周围神经,1腹膜,1脑垂体,1胎盘,3胸膜,6直肌,2唾液腺,3骨骼肌,3皮肤,2小肠,4脾,7胃,3睾丸,2胸腺,3甲状腺,1输尿管,2子宫,2静脉,46肺,91NSCLC。该肽也在胰腺癌、胃癌、结直肠癌、食管癌中找到(未显示)。图1B-基因:COL6A3,肽:FLFDGSANL(A*02;SEQ ID NO.:13)-从左至右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,5动脉,3骨髓,8大脑,3乳房,13结肠,1十二指肠,7食管,2胆囊,5心,16肾脏,4白细胞样本,21肝脏,1淋巴结,1卵巢,7胰腺癌,2周围神经,1腹膜,1脑垂体,1胎盘,3胸膜,6直肌,2唾液腺,3骨骼肌,3皮肤,2小肠,4脾,7胃,3睾丸,2胸腺,3甲状腺,1输尿管,2子宫,2静脉,46肺,91NSCLC。该肽也在前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌、肝癌、黑色素瘤、卵巢癌、食管癌、胰腺癌、胃癌中找到(未显示)。图1C-基因:CCL18,肽:VYTSWQIPQKF(A*24;SEQ ID NO.:23)-从左至右的组织:2肾上腺,1动脉,4脑,1乳腺,5结肠,1心脏,13肾脏,9肝脏,3胰腺,1脑垂体,2直肌,3皮肤,1脾,12胃,1胸腺,2子宫,9肺,80NSCLC。该肽也在前列腺癌、胃癌中找到(未显示出)。图1D-基因:CENPN,肽:RYLDSLKAIIVF(A*24;SEQ ID NO.:28)-从左至右的组织:2肾上腺,1动脉,4脑,1乳腺,5结肠,1心脏,13肾脏,9肝脏,3胰腺,1脑垂体,2直肌,3皮肤,1脾,12胃,1胸腺,2子宫,9肺,80NSCLC。该肽也在肝癌、胃癌、RCC中找到(未显示)。图1E-基因:DUSP4,肽:FVFSFPVSV(A*02;SEQ ID NO.:4)-从左至右的组织:5胰腺细胞系,3皮肤,15正常组织(2食管,7肺,3脾,3胃),126癌组织(1脑癌,2乳腺癌,5结肠癌,5食管癌,2胆囊癌,8肾癌,5肝癌,58肺癌,11卵巢癌,9胰腺癌,2前列腺癌,1直肠癌,4皮肤癌,12胃癌,1睾丸癌)。该组正常组织与A-B相同,但没有检测的组织未显示。图1F-基因:PLOD2,肽:YYTKGFALLNF(A*24;SEQ ID NO.:29)-从左至右的组织:30癌组织(1脑癌,3肾癌,2肝癌,22肺癌,2胃癌)。该组正常组织与C-D相同,但没有检测的组织未显示。图1G显示了正常组织和NSCLC样本中A*24肽的过量提呈。基因:LAMP3,肽:RFMDGHITF(A*24;SEQ ID NO.:25)-从左至右的组织:2肾上腺,1动脉,4脑,1乳腺,5结肠,1心脏,13肾脏,9肝脏,3胰腺,1脑垂体,2直肌,3皮肤,1脾,12胃,1胸腺,2子宫,9肺,80NSCLC。该肽也在前列腺癌、胃癌中找到(未显示)。

[0511] 图2显示了本发明的源基因的代表性表达特征(与正常肾脏相比的相对表达),这些基因在一系列正常组织胰腺癌中以及38份肺癌样本中高度过度表达或专门表达。从左至右的组织:肾上腺、动脉、骨髓、脑(全部)、乳腺、结肠、食管、心脏、肾(三份)、白细胞、肝、肺、淋巴结、卵巢、胰腺、胎盘、前列腺、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、膀胱、宫颈、子宫、静脉、1个正常(健康)肺样品、38个NSCLC样本。A) SMC4, B) LAMB3; C)

MMP12, 和D) LAMP3。

[0512] 图3显示了示例性的免疫原性资料:肽特定多聚体染色后流式细胞仪结果。A) SLC1A4-001 (SEQ ID No.12), B) IGF2BP3-001 (SEQ ID No.120), C) LAMC2-001 (SEQ ID No.121), D) COL6A3-008 (SEQ ID No.13), 和E) LAMP3-001 (SEQ ID No.25)。

[0513] 图4显示了抗原刺激CD4+T细胞增殖的结果:该图显示了每个肽的阳性供体的数目。

[0514] 图5显示了在II级ICS测定中针对CEA-006的示例性疫苗诱导CD4T细胞应答。体外致敏后,对患者36-031的PBMC进行了分析以了解CD4T细胞对CEA-006的应答(上图)并在V8/EOS库时间点模拟(下图)。细胞用相应的肽刺激并分别采用活力、抗CD3、抗CD8、抗CD4和效应标志物染色(从右到左:CD154、TNF- α 、干扰素- γ 、IL-2、IL-10)。对活CD4T细胞进行了分析,以了解一种或多种效应分子阳性细胞的比例。

[0515] 图6显示了控制II类肽的免疫原性:本图显示了采用ICS在16例患者中针对IMA950肽、在71名患者中针对IMA910肽检测了5个II类肽的免疫应答率。

实施例

[0516] 实施例1

[0517] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的识别和定量

[0518] 组织样本

[0519] 患者的肿瘤组织获得自海德堡大学医院和慕尼黑大学医院。正常(健康)组织获得自Bio-Options Inc., CA, USA、BioServe, Beltsville, MD, USA、Capital BioScience Inc., Rockville, MD, USA、Geneticist Inc., Glendale, CA, USA、日内瓦大学医院、海德堡大学医院、京都府立医科大学(KPUM)、大阪市立大学(OCU)、慕尼黑大学医院、ProteoGenex Inc., Culver City, CA, USA、蒂宾根大学医院。

[0520] 所有患者在手术或尸检前都获得了书面知情同意。切除后组织立即进行冷休克处理,在分离TUMAP前储存于-70°C或以下。

[0521] 从组织样本中分离HLA肽

[0522] 根据方案(Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999)略加修改,使用HLA-A*02特异性抗体BB7.2、HLA-A、HLA-B、HLAC特异性抗体W6/32、CNBr活化的琼脂糖凝胶、酸处理和超滤方法以固体组织的免疫沉淀法获得了冷休克组织样本的HLA肽库。

[0523] 质谱分析

[0524] 获得的HLA肽库根据其疏水性用反相色谱(nanoAcquity UPLC system, Waters)分离,洗脱肽用装有电喷雾源的LTQ-velos融合杂交质谱(ThermoElectron)进行了分析。肽库被直接加载填充有1.7 μ m C18反相材料(Waters)的分析用熔炼石英微毛细管柱(75 μ m内径x250mm),应用流速为400nL每分钟。随后,使用来自流速为300nL每分钟、浓度为10%至33%溶剂B中的两步180分钟二元梯度法对肽进行分离。梯度由溶剂A(含0.1%甲酸的水)和溶剂B(含0.1%甲酸的乙腈)。金镀膜玻璃毛细管(PicoTip, New Objective)用于引入到纳升电喷雾源。使用前5(TOP5)策略在数据依赖模式下操作LTQ-Orbitrap质谱仪。简言之,首先以高精度质量完全扫描在orbitrap开始一个扫描周期(R=30000),之后用先前选定离子的动态排除技术在orbitrap中对5种含量最为丰富的前体离子进行MS/MS扫描(R=7500)。串联

质谱以SEQUEST和另一种手动控制器进行解读。生成的自然肽破碎模式与合成序列相同参考肽的破碎模式进行比较后,确保了被识别的肽序列。

[0525] 无标记相对LC-MS定量通过离子计数(即通过LC-MS功能提取和分析)来进行(Mueller et al.,2007)。该方法假定肽的LC-MS信号区域与样本中其丰度相关。提取的特征通过充电状态去卷积和保留时间校准进行进一步处理(Mueller et al.,2008;Sturm et al.,2008)。最后,所有的LC-MS特征与序列鉴定结果交叉引用,以将不同样本和组织的定量数据与肽呈递特征结合。定量数据根据集中数据以两层方式进行正态化处理,以说明技术和生物学复制变异。因此,每个被识别的肽均可与定量资料相关,从而可得出样本和组织之间的相对定量。此外,对候选肽获得的所有定量数据进行手动检查,以确保数据的一致性,并验证自动化分析的准确度。对于每种肽,计算了提呈图,其显示样本平均提呈量以及复制变化。这些特征使肺癌样本与正常组织样本的基线值并列。

[0526] 示范性过度提呈肽的提呈谱示于图1中。示范性肽的提呈分数见表15和表16。

[0527] 表15:提呈分数。该表列出了与一系列正常组织相比在肿瘤上非常高度过量提呈(+++)、与一系列正常(健康)组织相比在肿瘤上高度过量提呈(++)或与一系列正常组织相比在肿瘤上过量提呈(+)的HLA-A*02肽。

[0528]

序列 ID 号	序列	肽代码	肽提呈
1	KLLPYIVGV	COL6A3-010	+++

[0529]

2	FLIPYAIML	SLC6A14-001	+++
3	FLYDVVKSL	COL6A3-007	++
4	FVFSFPVSV	DUSP4-001	+
5	ALTSTLISV	GPNM-002	++
9	ALSGTLSGV	MCM5-001	++
13	FLFDGSANL	COL6A3-008	+++
14	LIQDRVAEV	LAMB3-001	+
15	ELDRTPEEV	SF3B3-001	+
16	LIFDLGGGTFDV	HSP-003	+
17	TLLQEQGTKTV	KRT-006	+
18	ILLTEQINL	PHT-001	+
20	LMTKEISSV	PRKDC-001	+
21	VLSSGLTAA	CSNK2A2-001	+
94	ILVDWLQVQ	CCNB2-001	+++
96	AMGIAPPKV	PRPF3-001	+
97	TLFPVRLLV	LPCAT1-001	+
98	VLYPHEPTAV	DONSON-001	++
99	ALFQRPLI	DKC-001	+
101	LLLEILHEI	ERO-001	+
102	SLLSELQHA	GBP5-001	++
103	KLLSDPNYGV	TMEM43-001	+
105	IVAESLQQV	STA-002	+
111	SLYKGLLSV	RAD54B-001	+++
112	VLAPLFVYL	FZD-001	++
113	FLLDGSANV	COL6A3-002	+++
114	AMSSKFFLV	WNT5A-001	++
115	YVYQNNIYL	FAP-003	+
116	KIQEMQHFL	MMP12-003	+++
117	ILIDWLQVQ	CCNB1-002	++

[0530]

118	SLHFLILYV	ATP-001	+
119	IVDDITYNV	FN1-001	++
120	KIQEILTQV	IGF2BP3-001	+++
121	RLLDSVSRL	LAMC2-001	+
122	KLSWDLIYL	CERC-001	+
123	GLTDNIHLV	MXRA5-002	++
124	NLLDLDYEL	COL6A3-003	+++
125	RLDDLKMTV	LAMC2-002	++
126	KLLTEVHAA	ADAM8-001	++
127	ILFPDIARA	MAGEF1-001	+
128	TLSSIKVEV	MXRA5-001	+++
129	GLIEIISNA	SNRNP20-001	+
130	KILEDVVGCV	TPX2-001	+
131	ALVQDLAKA	CCNB1-001	+
132	ALFVRL LALA	TGFBI-001	++
133	RLASYLDKV	KRT-007	+
134	TLWYRAPEV	CDK4-001	+
136	ALVDHTPYL	VCAN-002	+
137	FLVDGSWSV	COL12A1-002	++
138	ALNEEAGRLLL	UBE2S-001	++
139	SLIEDLILL	SMYD3-001	++
142	VLLPVEVATHYL	SLC34A2-001	+
143	AIVDKVPSV	COPG1-001	+
144	KIFDEILVNA	TOP-001	+
145	AMTQLLAGV	TNC-001	+
146	FQYDHEAFL	RCN1-001	++
148	ALFGALFLA	PLT-001	+
149	KLVEFDLGA	TACC3-001	+
150	GVLENIFGV	PCNXL3-001	+
152	ILQDRLNQV	CDC6-001	+
153	ALYDSVILL	DIO2-001	++
156	TVAEVIQSV	KIF26B-001	+

[0531] 表16: 提呈分数。该表列出了与一系列正常组织相比在肿瘤上非常高度过量提呈(+++)、与一系列正常组织相比在肿瘤上高度过量提呈(++)或与一系列正常组织相比在肿

瘤上过量提呈(+)的HLA-A*24肽。

[0532]

序列 ID 号	序列	肽代码	肽提呈
23	VYTSWQIPQKF	CCL18-001	+++
24	NYPKSIHSF	MMP12-005	+++
25	RFMDGHITF	LAMP3-001	+++
26	RYLEKIFYGL	MMP12-006	+++
27	RYPPPVREF	COL6A3-012	+++
28	RYLDSLKAIVF	CENPN-001	+++
29	YYTKGFALLNF	PLOD2-002	+++
30	KYLEKYYNL	MMP1-001	+++
31	SYLDKVRAL	KRT-008	+++
32	EYQPEMLEKF	COL6A3-013	+++
33	TYSEKTTLF	MUC16-001	+++
34	VFMKDGFFYF	MMP1-002	+++
35	TYNPEIYVI	ITGA2-002	+++
36	YYGNTLVEF	OLFML2B-001	+++
37	RYLEYFEKI	TTC13-001	+++
38	VFLNRAKAVFF	GPNM-003	+++
39	KFLEHTNFEF	DOCK2-001	+++
40	IYNPSMGVSVL	PVRL1-001	+++
41	TYIGQGYII	FKBP10-002	+++
42	VYVTIDENNIL	ABCC1-001	+++
43	RYTLHINTL	ALOX15B-001	+++

[0533]

44	IYNQIAELW	SMPDL3B-001	+++
45	KFLESKGYEF	GFPT2-002	+++
46	NYTNGSFGSNF	DDX5-007	+++
47	RYISPDQLADL	ENO1-001	+++
48	YYYGNTLVEF	OLFML2B-002	+++
49	QYLFPSFETF	KLRD-001	+++
50	LYIGWDKHYGF	PSMA4-001	+++
51	NYLLESPHRF	PLE-001	+++
52	SYMEVPTYLNF	LAPTM5-001	+++
53	IYAGQWPDF	COLEC12-001	+++
54	AYKDKDISFF	ZBED5-001	+++
55	IYPVKYTQTF	PERP-001	+++
56	RYFPTQALNF	SLC-003	+++
57	SYSIGIANF	COL12A1-003	+++
58	VYFKPSLTPSGEF	NUP153-001	+++
59	HYFNTPFQL	PPTC-001	+++
60	SYPAKLSFI	FLJ44796-001	+++
61	RYGSPINTF	C6orf132-001	+++
62	AYKPGALTF	AIFM2-001	+++
63	LYINKANIW	G2E-002	+++
64	VYPLALYGF	XPR-001	+++
65	IYQRWKDLL	SAMD9L-001	+++
66	DYIPQLAKF	GLS-001	+++
67	IFLDYEAGHLSF	TRIM11-001	+++
68	RYLFFVVDRL	MREG-001	+++
69	TYAALNSKATF	IQGAP1-001	+++
70	VYHSYLTIF	TRPM2-001	+++
71	TYLTNHLRL	ZNF697-001	+++
72	YYVDKLFNTI	RASA2-001	+++

	73	RYLHVEGGNF	RBPJ-001	+++
	74	EYLPEFLHTF	ABCA13-003	+++
	75	AYPDLNEIYRSF	SP14-001	+++
	76	VYTZIQSRF	DYR-001	+++
	77	RYLEAGAAGLRW	HSPBP-001	+++
	78	IYTRVTYYL	TPS-001	+++
	79	RYGGSFAEL	KDM6B-001	++
[0534]	81	KYIEAIQWI	DCSTA-001	+++
	82	FYQGIVQQF	TUBGCP3-001	+++
	83	EYSDVLAKLAF	AHD-001	+++
	84	TFDVAPSRLDF	NOM-001	+++
	85	PFLQASPHF	FAM83A-001	+++
	159	TYKYVDINTF	MMP12-004	+++
	160	SYLQAANAL	COL6A3-001	+++
	161	LYQILQGIVF	CDC2-001	+++

[0535] 实施例2

[0536] 编码本发明肽的基因的表达谱

[0537] 与正常细胞相比在肿瘤细胞上一种肽过度提呈或特定提呈足够其在免疫治疗中有效使用,一些肽为肿瘤特异性的,尽管存在其源蛋白也存在于正常组织中。但是,mRNA表达谱增加了免疫治疗目标肽选择中其他级别的安全性。特别是对于具有高安全性风险的治疗选择,诸如亲和力成熟的TCR,理想的目标肽将来源于对该肿瘤独一无二且不出现于正常组织中的蛋白。

[0538] RNA来源与制备

[0539] 手术切除组织标本按如上所述(参见实施例1)在获得每名患者的书面知情同意后提供。手术后立即速冻肿瘤组织标本,之后在液态氮中用杵臼匀浆。使用TRI试剂(Ambion公司,Darmstadt,德国)之后用RNeasy(QIAGEN公司,Hilden,德国)清理从这些样本中制备总RNA;这两种方法都根据制造商的方案进行。

[0540] 健康人体组织中的总RNA从商业途径获得(Ambion公司,Huntingdon,英国;Clontech公司,海德堡,德国;Stratagene公司,阿姆斯特丹,荷兰;BioChain公司,Hayward,CA,美国)。混合数个人(2至123个人)的RNA,从而使每个人的RNA得到等加权。

[0541] 所有RNA样本的质量和数量都在Agilent 2100Bioanalyzer分析仪(Agilent公司,Waldbronn,德国)上使用RNA 6000Pico LabChip Kit试剂盒(Agilent公司)进行评估。

[0542] 微数组实验

[0543] 所有肿瘤和正常组织的RNA样本都使用Affymetrix Human Genome (HG) U133A或HG-U133Plus 2.0Affymetrix寡核苷酸芯片(Affymetrix公司,Santa Clara,CA,美国)进行基因表达分析。所有步骤都根据Affymetrix手册进行。简言之,如手册中所述,使用

SuperScript RTII (Invitrogen公司) 以及oligo-dT-T7引物 (MWG Biotech公司, Ebersberg, 德国) 从5-8 μ g RNA中合成双链cDNA。用BioArray High Yield RNA TranscriptLabelling Kit (ENZO Diagnostics公司, Farmingdale, NY, 美国) 进行U133A测定或用GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix公司) 进行U133Plus 2.0测定, 之后用链霉亲和素-藻红蛋白和生物素化抗链霉素蛋白抗体 (Molecular Probes公司, Leiden, 荷兰) 进行破碎、杂交和染色, 这样完成体外转录。用Agilent2500A GeneArray Scanner (U133A) 或Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133Plus 2.0) 对图像进行扫描, 用GCOS软件 (Affymetrix公司) 在所有参数默认设置情况下对数据进行分析。为了实现标准化, 使用了Affymetrix公司提供的100种管家基因 (housekeeping gene)。相对表达值用软件给定的 signal log ratio进行计算, 正常肾组织样本的值任意设置为1.0。本发明的代表性源基因在肺癌中高度过量表达的表达谱如图2所示。进一步代表性基因的表达分数见表17和表18。

[0544] 表17: 表达分数。该表列出了与一系列正常组织相比在肿瘤上非常高度过量表达(+++)、与一系列正常组织相比在肿瘤上高度过量表达(++) 或与一系列正常组织相比在肿瘤上过量表达(+) 的基因的HLA-A*02肽。

[0545]

序列 ID 号	序列	肽代码	基因表达
2	FLIPYAIML	SLC6A14-001	++
5	ALTSTLISV	GPNM-002	+
6	SLQGSIMTV	SFT-001	++
8	ALLNILSEV	UBA6-002	++
11	YLVNVQVKEL	SMC4-002	++
12	IVDRITTVV	SLC1A4-001	+
14	LIQDRVAEV	LAMB3-001	++
16	LIFDLGGGTFDV	HSP-003	+
18	ILLTEQINL	PHT-001	+
19	VLTSDSPAL	GPNM-001	+
95	KIIGIMEEV	MSH6-001	++
97	TLFPVRLLV	LPCAT1-001	+
105	IVAESLQQV	STA-002	++
106	SILEHQIQV	MCM4-001	++
108	TLLDFINAV	UBA6-001	++
115	YVYQNNIYL	FAP-003	+
116	KIQEMQHFL	MMP12-003	+++
117	ILIDWLQVQV	CCNB1-002	+
119	IVDDITYNV	FNI-001	+
120	KIQEILTQV	IGF2BP3-001	++
121	RLLDSVSRL	LAMC2-001	++
125	RLDDLKMTV	LAMC2-002	++
130	KILEDVVGCV	TPX2-001	+
131	ALVQDLAKA	CCNB1-001	+
133	RLASYLDKV	KRT-007	+
136	ALVDHTPYL	VCAN-002	+
140	TLYPHTSQV	VCAN-001	+
141	NLIEKSIYL	DST-001	+

[0546]	142	VLLPVEVATHYL	SLC34A2-001	++
	143	AIVDKVPSV	COPG1-001	+
	144	KIFDEILVNA	TOP-001	++
	152	ILQDRLNQV	CDC6-001	+
	158	KLDETNNTL	DST-002	+

[0547] 表18:表达分数。该表列出了与一系列正常组织相比在肿瘤上非常高度过量表达(+++)、与一系列正常组织相比在肿瘤上高度过量表达(++)或与一系列正常组织相比在肿瘤上过量表达(+)的基因的HLA-A*24肽。

[0548]	序列ID号	序列	肽代码	基因表达
	23	VYTSWQIPQKF	CCL18-001	+++
	24	NYPKSIHSF	MMP12-005	+++
	25	RFMDGHITF	LAMP3-001	+++
	26	RYLEKFYGL	MMP12-006	+++
	28	RYLDSLKAIVF	CENPN-001	++
	29	YYTKGFALLNF	PLOD2-002	+
	30	KYLEKYNNL	MMP1-001	+
	31	SYLDKVRAL	KRT-008	+
	34	VFMKI) GFFYF	MMP1-002	+
	35	TYNPEIYVI	ITGA2-002	+
	38	VFLNRAKAVFF	GPNM-003	+
	39	KFLEHTNFEF	DOCK2-001	+
	43	RYTLHINTL	ALOX15B-001	+
	47	RYISPDQLADL	EN01-001	+
	159	TYKYVDINTF	MMP12-004	+++
	161	LYQILQGIVF	CDC2-001	+

[0549] 实施例3

[0550] MHC-I类提呈肽的体外免疫原性

[0551] 为了获得关于本发明TUMAP的免疫原性信息,发明人使用体外T细胞扩增分析方法进行了研究,其中该分析方法基于使用装载肽/MHC复合物和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞(aAPC)进行反复刺激。用这种方法,发明人可显示出本发明目前为止84种HLA-A*02限制TUMAP具有免疫原性,这表明这些肽为对抗人CD8+前体T细胞的T细胞表位(表19)。

[0552] CD8+T细胞体外启动

[0553] 为了用载有肽-MHC复合物(pMHC)和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞进行体外刺激,发明人首先从University clinics Mannheim,Germany中获取健康供体CD8微珠(Miltenyi Biotec,Bergisch-Gladbach,Germany)通过积极选择白细胞清除术后新鲜HLA-A*02产物而分离出CD8+T细胞。

[0554] PBMC和分离出的CD8+淋巴细胞使用前在T细胞培养基(TCM)中培养,培养基包括

RPMI-Glutamax (Invitrogen公司, Karlsruhe, 德国) 并补充10%热灭活人AB血清 (PAN-Biotech公司, Aidenbach, 德国)、100U/ml青霉素/100 μ g/ml链霉素 (Cambrex公司, Cologne, 德国), 1mM丙酮酸钠 (CC Pro公司, Oberdorla, 德国) 和20 μ g/ml庆大霉素 (Cambrex公司)。在此步骤, 2.5ng/ml的IL-7 (PromoCell公司, Heidelberg, 德国) 和10U/ml的IL-2 (NovartisPharma公司, Nürnberg, 德国) 也加入TCM。

[0555] 对于pMHC/抗-CD28涂层珠的生成、T细胞的刺激和读出, 使用每刺激条件四个不同pMHC分子以及每个读出条件8个不同的pMHC分子在高度限定的体外系统中进行。

[0556] 纯化的共刺激小鼠IgG2a抗人CD28抗体9.3 (Jung et al., 1987) 使用制造商 (Perbio公司, 波恩, 德国) 推荐的N-羟基琥珀酰亚胺生物素进行化学生物素化处理。所用珠为5.6 μ m的链霉抗生物素蛋白包裹的多聚苯乙烯颗粒 (Bangs Laboratories, 伊利诺伊州, 美国)。用于阳性和阴性对照刺激物的pMHC分别为A*0201/MLA-001 (从Melan-A/MART-1中修饰制得的肽ELAGIGILTV (SEQ ID NO.163)) 和A*0201/DDX5-001 (从DDX5中获得的YLLPAIVHI (SEQ ID NO.164))。

[0557] 800.000珠/200 μ l包裹于含有4x 12.5ng不同生物素-pMHC的96孔板、进行洗涤, 随后加入体积为200 μ l的600ng生物素抗-CD28。在37 $^{\circ}$ C下, 在含5ng/ml IL-12 (PromoCell) 的200 μ l TCM中共培养 1×10^6 CD8+T细胞与 2×10^5 的清洗涂层珠3天, 从而启动刺激。之后, 一半培养基与补充80U/ml IL-2的新鲜TCM进行交换, 并且培养在37 $^{\circ}$ C下持续4天。这种刺激性周期总共进行3次。对于使用每条件8种不同pMHC分子的pMHC多聚体读出, 二维组合编码方法如前述使用 (Andersen et al., 2012), 稍作修饰, 涵盖耦合至5种不同的荧光染料。最后, 用Live/dead near IR染料 (Invitrogen公司, Karlsruhe, 德国)、CD8-FITC抗体克隆SK1 (BD公司, Heidelberg, 德国) 和荧光pMHC多聚体而执行多聚体分析。对于分析, 使用了配有合适激光仪和筛检程序的BD LSRII SORP细胞仪。肽特异性细胞以占总CD8+细胞的百分比形式进行计算。多聚体分析结果使用FlowJo软件 (Tree Star公司, Oregon, 美国) 进行评估。特定多聚体+CD8+淋巴细胞的体外填充用与阴性对照刺激组比较而进行检测。如果健康供体中的至少一个可评价的体外刺激孔在体外刺激后发现含有特异性CD8+T细胞株 (即该孔包含至少1%特定多聚体+CD8+T细胞, 并且特定多聚体+的百分比至少为阴性对照刺激中位数的10倍), 则检测给定抗原的免疫原性。

[0558] 肺癌肽体外免疫原性

[0559] 对于受到测试的HLA-I类肽, 可通过肽特异性T细胞株的生成证明其体外免疫原性。TUMAP特异性多聚体对本发明的3种肽染色后流式细胞仪检测的典型结果如图3所示, 同时也含有相应的阴性对照信息。本发明84种肽的结果汇总于表19。

[0560] 表19: 本发明中HLA-A*02肽的体外免疫原性。

[0561] 申请人对本发明的肽所做的体外免疫原性实验的示例性结果。<20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70% = ++++

[0562]

序列 ID 号	肽代码	孔	供体
1	COL6A3-010	++	++++
2	SLC6A14-001	+	++++
3	COL6A3-007	+	++++
4	DUSP4-001	++	++++
5	GPNM-002	+	++++
6	SFT-001	++	++++
7	KRT80-001	+	++
8	UBA6-002	++	++++
9	MCM5-001	+	++++
10	KRT15-001	++++	++++
11	SMC4-002	+	++++
12	SLC1A4-001	++++	++++
13	COL6A3-008	+	++
14	LAMB3-001	+	++++
15	SF3B3-001	++	++++
16	HSP-003	+	+++
17	KRT-006	+	++
18	PHT-001	+	++
19	GPNM-001	+	++++
21	CSNK2A2-001	+	+
22	PTPN13-001	+	+
94	CCNB2-001	++	++++
95	MSH6-001	++++	++++
96	PRPF3-001	++++	++++
97	LPCAT1-001	+++	++++
98	DONSON-001	+	++++
99	DKC-001	++	++++
100	BUB1B-001	++	++++

[0563]

序列 ID 号	肽代码	孔	供体
101	ERO-001	+	+++
102	GBP5-001	+	++
103	TMEM43-001	+	++++
104	COG4-001	+	++++
105	STA-002	+	+
106	MCM4-001	+	+
107	PSMD14-002	+	+++
108	UBA6-001	+	+++
109	CCZ-001	+	+++
111	RAD54B-001	++	++++
112	FZD-001	+++	++++
113	COL6A3-002	++	++++
114	WNT5A-001	++	++++
115	FAP-003	+	++++
116	MMP12-003	+	++++
117	CCNB1-002	++	++++
118	ATP-001	++++	++++
119	FN1-001	++	++++
120	IGF2BP3-001	+	++++
121	LAMC2-001	++	++++
122	CERC-001	+++	++++
123	MXRA5-002	+	++++
124	COL6A3-003	+	++++
125	LAMC2-002	+	++++
126	ADAM8-001	+	++++
127	MAGEF1-001	+++	++++
128	MXRA5-001	+	++++
129	SNRNP20-001	++	++++

[0564]

序列 ID 号	肽代码	孔	供体
130	TPX2-001	++	++++
131	CCNB1-001	++	++++
132	TGFBI-001	++	++++
133	KRT-007	++	++++
134	CDK4-001	++++	++++
135	GFPT2-001	+++	++++
136	VCAN-002	+	++++
137	COL12A1-002	+	++
138	UBE2S-001	+	++++
139	SMYD3-001	+	++
140	VCAN-001	++	++++
141	DST-001	+	++++
142	SLC34A2-001	+	++
143	COPG1-001	+	+++
144	TOP-001	+	++
145	TNC-001	+	++
147	BNC1-001	+	++++
148	PLT-001	+	++
149	TACC3-001	+	+++
150	PCNXL3-001	+	+++
151	DROSHA-001	+	++++
152	CDC6-001	+	+++
153	DIO2-001	+	+
154	ABCA13-001	+	++++
155	ABCA13-002	+	+++
156	KIF26B-001	+	+
157	SERPINB3-001	+	+++
158	DST-002	+	++

[0565] 表20:本发明中HLA-A*24肽的体外免疫原性。

[0566] 申请人对本发明的肽所做的体外免疫原性实验的示例性结果。<20%=+;20%-

49% = ++; 50% - 69% = +++; > = 70% = ++++

序列 ID 号	肽代码	孔	供体
23	CCL18-001	+	+
25	LAMP3-001	+	++
26	MMP12-006	+	++++
27	COL6A3-012	++	++++
28	CENPN-001	+	++++
29	PLOD2-002	+	+++
30	MMP1-001	++	++++
32	COL6A3-013	+	+
33	MUC16-001	+	++
34	MMP1-002	+	++
35	ITGA2-002	++	++++
36	OLFML2B-001	++	++++
37	TTC13-001	+++	++++
39	DOCK2-001	+	++
40	PVRL1-001	+	++
41	FKBP10-002	+	++++
42	ABCC1-001	+	++
43	ALOX15B-001	+	++
44	SMPDL3B-001	++	++++
46	DDX5-007	+	+
47	ENO1-001	+	+++
48	OLFML2B-002	+	++
49	KLRD-001	+	++++
50	PSMA4-001	+	++++

[0567]

[0568]

序列 ID 号	肽代码	孔	供体
52	LAPTM5-001	+	++
53	COLEC12-001	+	+++
54	ZBED5-001	+	++++
56	SLC-003	+	+
57	COL12A1-003	+	++++
58	NUP153-001	+	+
59	PPTC-001	++	++++
61	C6orf132-001	+	+++
62	AIFM2-001	+	++
63	G2E-002	+	++
64	XPR-001	++	++++
65	SAMD9L-001	+	+++
66	GLS-001	+	++++
67	TRIM11-001	+	+
68	MREG-001	++++	++++
69	IQGAP1-001	+	+
70	TRPM2-001	++	++++
71	ZNF697-001	++	++++
72	RASA2-001	+	++
73	RBPI-001	+	++
74	ABCA13-003	+	++
75	SP14-001	+	+
76	DYR-001	+	++
77	HSPBP-001	+	+
78	TPS-001	++	++++
79	KDM6B-001	+	++
81	DCSTA-001	++	++++
82	TUBGCP3-001	+	++

[0569]

序列ID号	肽代码	孔	供体
83	AHD-001	+	+++
85	FAM83A-001	++	++++
159	MMP12-004	+	+++
160	COL6A3-001	+	++
161	CDC2-001	+	++++

[0570] 实施例4

[0571] 肽的合成

[0572] 所有的肽通过使用Fmoc策略以标准、广为接受的固相肽合成法合成。每个肽的身份和纯度已使用质谱和RP-HPLC分析法确定。用冻干法(三氟乙酸盐)获得白色至类白色的肽,纯度为>85%。所有的TUMAP优选作为三氟乙酸盐或乙酸盐进行给药,其他药用盐形式也可以。

[0573] 实施例5

[0574] MHC结合测定

[0575] 本发明基于T细胞疗法的候选肽进一步测试其MHC结合能力(亲和性)。单个肽-MHC复合体通过UV-配体交换产生,其中,紫外线敏感肽经紫外线照射后裂解,与分析的相关肽交换。只有能够有效地结合并稳定肽接受MHC分子的候选肽才能阻止MHC复合物的解离。为了确定交换反应的产率,将基于稳定MHC复合物轻链($\beta 2m$)的检测结果进行ELISA测定。检测总体上按照Rodenko等人在(Rodenko et al., 2006)中描述的方法进行。

[0576] 96孔Maxisorp板(NUNC)在室温下在PBS中以2ug/ml链霉包被过夜,用4倍洗涤并在37°C下在含封闭缓冲液的2%BSA中封闭1小时。折迭的HLA-A*02:01/MLA-001单体作为标准品,涵盖15-500ng/ml的范围。紫外线交换反应的肽-MHC单体在封闭缓冲液中稀释100倍。样本在37°C下孵育1小时,洗涤四次,在37°C下以2ug/ml HRP缀合抗- $\beta 2m$ 温育1小时,再次洗涤,并以NH₂S0₄封堵的TMB溶液进行检测。在450nm处测量吸收。在生成和产生抗体或其片段时和/或T细胞受体或其片段时,通常优选显示为高交换产率(优选为高于50%,最优选为高于75%)的候选肽,这是因为它们对MHC分子表现出足够的亲合力,并能防止MHC复合物的解离。

[0577] 表21:MHC-I类结合分数

[0578] <20%=+;20%-49%=++;50%-75%=+++;>=75%=++++

[0579]

序列ID	肽代码	肽交换
31	KRT-008	+++
45	GFPT2-002	+++
51	PLE-001	+++
55	PERP-001	+++
60	FLJ44796-001	+++
80	FXR1-001	+++

[0580] 实施例6

[0581] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的绝对定量

[0582] 黏合剂例如抗体和/或TCR的产生是一个费力的过程,其可以仅针对一些选定靶标进行。在肿瘤相关和特异性肽的情况下,选择标准包括但不限于排除提呈于细胞表面上肽的提呈和浓度。除了如实施例1中所述肽的分离和相对定量,发明人也分析了每个细胞的绝对肽拷贝数。实体肿瘤样本中每个细胞的TUMAP拷贝数定量需要分离TUMAP的绝对定量、TUMAP分离效率和分析的组织样本细胞计数。实验步骤如下所述。

[0583] Nano LC-MS/MS肽定量

[0584] 对于通过质谱法对肽的准确定量,使用内标法生成每种肽的校准曲线。内标是每种肽的双同位素标记的变体,即,TUMAP合成中纳入2个同位素标记的氨基酸。它与肿瘤相关肽仅在质量上不同,但在其他的物理化学性质方面无差异(Anderson et al.,2012)。内标被掺入到每个MS样本,所有MS信号均标准化为内标MS信号,以平衡MS实验之间潜在的技术差异。校准曲线用至少三种不同的矩阵绘制,即,来自于类似于常规MS样本的天然样本的HLA肽洗脱液,并且每个制备品以重复MS运行进行测量。对于评价,MS信号被标准化为内标信号,校准曲线通过logistic回归计算。对于来自组织样本的肿瘤相关肽的定量,各样本也掺有内标,MS信号标准化为内标并使用该肽校正曲线进行定量。

[0585] 肽/MHC分离的效率

[0586] 对于任何蛋白质纯化过程,来自组织样本蛋白的分离与相关蛋白的一定损失相关联。为了确定TUMAP分离的效率,针对选定为绝对定量的所有TUMAP产生了肽/MHC复合物。为了能够区别天然肽/MHC复合物与加样物,使用了单同位素标记版本的TUMAP,即TUMAP合成期间纳入1个同位素标记的氨基酸。这些复合物被掺入新制备的组织裂解物中,例如,在TUMAP分离过程中最早可能时间点,然后在之后的亲和纯化中像天然肽/MHC复合物被获取。因此,测量单标记TUMAP的恢复可得到个体TUMAP分离效率相关的结论。分离效率使用少量样本进行分析,且这些组织样本可比较。与此相反,个体肽之间的分离效率不同。这表明,分离效率虽然只在有限数量的样本中进行测定,但可外推至任何其他组织制备品中。但是,由于分离效率不能从一种肽外推至其他肽,因此,有必要单独分析每个TUMAP。

[0587] 固体、冷冻组织中细胞计数的测定

[0588] 为了确定经过绝对肽定量的组织样本的细胞数,发明人采用了DNA含量分析。此方法适用于不同来源的广泛样本,最重要的是,冷冻样本(Forsey and Chaudhuri,2009;Alcoser et al.,2011;Silva et al.,2013)。在肽分离方案期间,组织样本被加工为均匀的裂解物,从中取一小等份裂解物。样本等分为三份,从中分离DNA(QiaAmp DNA Mini Kit,Qiagen,Hilden,德国)。每次DNA分离的总DNA含量至少重复两次使用基于荧光的DNA定量测定法(Qubit dsDNA HS Assay Kit,Life Technologies,Darmstadt,德国)进行定量。为了计算细胞数,生成来自单个健康血细胞等分试样的DNA标准曲线,使用一系列指定的细胞数。标准曲线用于计算每次DNA分离的总DNA含量的总细胞含量。用于肽分离的组织样本的平均总细胞计数,在考虑裂解物等份的已知体积和总裂解物体积的情况下进行推算。

[0589] 每细胞的肽拷贝数

[0590] 使用前述实验的数据,发明人以总肽量除以样本总细胞计数计算得出每个细胞的TUMAP拷贝数,随后除以分离效率。选定肽的细胞拷贝数如表22所示。

[0591] 表22:绝对拷贝数。该表列出了NSCLC肿瘤样本中绝对肽定量的结果。针对每种肽,每个细胞的中位拷贝数表示:<100=+;>=100=++;>=1,000+++;>=10,000=++++。提示样本数量,其中提供评估的高质量MS数据。

序列 ID 号	肽代码	每细胞拷贝数 (中位数)	样本数量
13	COL6A3-008	+++	18
23	CCL18-001	+++	19
24	MMP12-005	+++	11
25	LAMP3-001	++++	7
26	MMP12-006	+++	17
27	COL6A3-012	+++	12
29	PLOD2-002	++	22
30	MMP1-001	+++	11
[0592] 32	COL6A3-013	++	20
33	MUC16-001	++	22
35	ITGA2-002	++	19
36	OLFML2B-001	+++	22
37	TTC13-001	+++	13
38	GPNM-003	+++	5
41	FKBP10-002	++	19
98	DONSON-001	+	18
100	BUB1B-001	+	11
111	RAD54B-001	+	16
113	COL6A3-002	++	19
114	WNT5A-001	++	17

[0593]	115	FAP-003	++	17
	120	IGF2BP3-001	++	14
	121	LAMC2-001	++	10
	123	MXRA5-002	+	17
	124	COL6A3-003	+++	18
	126	ADAM8-001	+	15
	128	MXRA5-001	++	19
	137	COL12A1-002	++	12
	140	VCAN-001	+	19
	141	DST-001	++	12
	147	BNC1-001	+	10
	158	DST-002	++	7
	159	MMP12-004	++	22
	160	COL6A3-001	++++	23
	161	CDC2-001	+++	18

[0594] 实施例6

[0595] HLA II类T细胞增殖检测

[0596] 以下实验总结了选定MHC II类TUMAP的T细胞增殖测定结果。测试的10个肽抗原中的9个呈阳性免疫原性。21个可评估T细胞样本中的11个对至少一种肽表现出阳性反应。个体肽抗原在最多6个供体中刺激CD4+T细胞增殖。这些数字与同一检测中测试的五个参考肽结果具有可比性,且在临床疫苗试验环境下证实了大多数患者的免疫原性。因此,可以得出结论,新测试肽也很有可能在疫苗试验中诱导T细胞反应。

[0597] 为了总结选定肽的可能性尤其是作为备选疫苗的可能性,使用ProImmune公司的商业T细胞增殖测定法分析T细胞增殖来确定其体外免疫原性。

[0598] 健康供体CD8耗竭血细胞样本用选定的肽进行了测试。诱导CD4+T细胞增殖的肽可能导致出现辅助T细胞免疫应答,因此,这些肽被认为具有免疫原性。使用羧基琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记对CD4+T细胞的增殖进行确定。在增殖细胞中,CFSE均匀地分布到分裂细胞。因此,在分析的细胞中增殖可测定为CFSE荧光减少。

[0599] 表23选定HLA II类肽。

序列ID号:	肽编号	序列	来源	
86	MMP12-007	LSADDIRGIQSLYGDPK	本专利申请	
87	COL11A1-001	EGDIQQFLITGDPKAAAYDY	本专利申请	
92	COL1A2-001	NKPSRLPFLDIAPLDIGGAD	本专利申请	
91	COL5A2-001	VARLPIIDLAPVDVGGTD	本专利申请	
93	FN1-002	SRPQAPITGYRIVYSPSV	本专利申请	
[0600]	88	ITGB6-001	NPVSQVEILKNKPLSVG	本专利申请
	90	LAMC2-003	DAVQMVITEAQKVDTR	本专利申请
	110	LAMP3-002	IQLIVQDKESVFSR	本专利申请
	89	IGF2BP3-002	KLYIGNLSENAAPS	本专利申请
	162	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	本专利申请
	165	BIR-002	TLGEFLKLDREKAKN	阳性对照
	166	MET-005	TFSYVDPVITSISPKEYG	阳性对照
	167	MMP-001	SQDDIKGIQKLYGKRS	阳性对照
	168	CEA-006	SPQYSWRINGIPQQHT	阳性对照
	169	TGFBI-004	TPPIDAHRNLLRNH	阳性对照

[0601] 测试原理

[0602] 来自健康人供体的外周血单核细胞 (PBMC) 样本基于HLA-DRB1等位基因表达选自ProImmune细胞库。CD8⁺T细胞在使用前从供体血液样本耗尽以避免假阳性反应。剩余的CD4⁺T细胞用CFSE标记,随后用5 μ M每个所选肽进行孵育。每个肽在六个复制孔中进行测试。背景在每板上六个未刺激的对照孔中进行测量。

[0603] 经过7天孵育后,细胞用抗CD4抗体共染色,并通过流式细胞术分析。增殖程度通过测量CFSE强度下降程度来确定。

[0604] 流式细胞仪数据使用FlowJo软件(Tree Star公司)进行评估。流式细胞仪分析结果以CD4⁺不显著人群与总CD4⁺人群之比表示。增殖程度表示为高于背景的刺激百分比,即抗原刺激CD4⁺CFSE dim细胞的比例减去未刺激对照孔CD4⁺CFSE dim细胞的比例。对于每个样本,计算每次重复的平均值以及相应的平均值标准误差(SEM)。

[0605] 供体的选择

[0606] 供体按HLA-DRB1等位基因表达选择。另外两种HLA II类位点(DQ和DP)没有被纳入分析。相关DRB1等位基因根据预测肽结合频率基于SYFPEITHI算法选择(Rammensee et al., 1999)。对于HLA-DR,结合通过等于或大于18的SYFPEITHI结合预测分数来定义。此结合阈值分数基于对公布的已知混杂HLA-DR配体的结合分数分析而被定义(表24)。

[0607] 表24:经实验证明与几种HLA-DR等位基因结合的肽HLA-DR结合的SYFPEITHI预测分数。如果实验证明与所示DR等位基因结合,则只显示预测分数。如果DR等位基因的高分辨率信息缺失,则标记为*。如果实验证明一个等位基因结合了,23/26(89%)的SYFPEITHI分数 \geq 18。

肽	DRB1* 等位基因					
	0101	0301	0401	0701	1101	1501
SSX2 ₄₅₋₅₉ KIFYVYMKRKYEAMT SEQ ID NO:170	-	-	-	18	24	-
MAGE A3 ₁₁₁₋₁₂₅ RKVAELVHFLLLKYR SEQ ID NO:171	24*	-	26*	-	23*	-
MAGE A3 ₁₄₆₋₁₆₀ FFPVIFSKASSSLQL SEQ ID NO:172	31*	-	28*	24*	24*	-
MAGE A3 ₁₉₁₋₂₀₅ GDNQIMPKAGLLIIV SEQ ID NO:173	24*	-	20*	-	14*	-
MAGE A3 ₂₈₁₋₃₉₅ TSYVKVLHMHMVKISG SEQ ID NO:174	27*	-	28*	-	28*	-
NY-ESO-1 ₁₂₁₋₁₃₈ VLLKEFTVSGNILTIRLT SEQ ID NO:175	22	-	-	24	14	-
HER2/neu ₈₈₃₋₈₉₉ KVPIKWMALESILRRRF SEQ ID NO:176	25	-	22	-	-	-
PADRE [D-Ala]K[L-cyclohexyl-Ala] VAAWTLKAA[D-Ala] SEQ ID NO:177	26	11	28	28	17	24

[0609] 所有选择肽中结合频率超过20%的所有DRB1基因均被要求纳入ProImmune的供体组。额外要求4个其他少见的DRB1等位基因 (DRB1*10:01、DRB1*16:01、DRB1*08:01和DRB1*13:03)。组合供体组如表26所示。

[0610] 表25选定肽与含已知结合基序的各种HLA-DRB1等位基因的结合能力:SYFPEITHI得分超过17,则以1算作一个结合事件。最后一列显示的是所有选定肽的结合事件百分比。

[0611]

MHC	MMP12-007	COL11A1-001	COL1A2-001	COL5A2-001	FN1-002	ITGB6-001	LAMC2-003	LAMP3-002	IGF2BP3-002	POSTN-002	BIR-002	MET-005	MMP-001	CEA-006	TGFBI-004	肽结合剂百分比
DRB1*0401	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
DRB1*0404	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
DRB1*0101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	93%
DRB1*0301	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	93%
DRB1*1104	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	93%
DRB1*0405	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	93%
DRB1*0402	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	87%
DRB1*0701	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	80%
DRB1*1501	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	73%
DRB1*1301	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	67%
DRB1*1502	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	67%
DRB1*1101	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	53%
DRB1*0901	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	40%
DRB1*1302	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	20%
DRB1*0802	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	20%
DRB1*0803	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	13%

[0612] 表26供体组。21个选定供体的HLA-DRB1等位基因分布

[0613]

供体 ID	DRB1_1	DRB1_2
D778	*04:04	*10:01
D780	*01:01	*04:01
D789	*13:01	*16:01
D799	*03:01	*09:01
D800	*15:02	*16:01
D801	*11:01	*15:01
D813	*07:01	*15:01
D816	*01:01	*04:05

[0614]

D817	*10:01	*13:01
D820	*01:01	*07:01
D822	*04:04	*08:01
D829	*07:01	*11:01
D836	*13:01	*13:03
D845	*03:01	*11:04
D857	*03:01	*04:05
D906	*15:01	*15:02
D940	*04:01	*15:01
D946	*11:01	*14:01
D951	*03:01	*04:04
D962	*03:01	*09:01
D973	*03:01	*11:04

[0615] 体外免疫原性结果

[0616] CD4+T细胞的抗原刺激增殖被认为是体外免疫原性的指标,并使用来自Prolimmune的市售T细胞增殖测定法进行了研究。抗原刺激CD4+T细胞增殖的程度以高于背景的刺激百分比表示。刺激超过背景0.02%以上的反应,SEM=2(即,两个标准误差值大于背景)被视为阳性。

[0617] 10个选定肽抗原中的9个测试呈阳性(FN1-002除外)。21个可评估T细胞样本中的11个对至少一种肽表现出阳性反应(图4)。个体肽抗原在最多6个供体中刺激CD4+T细胞增殖。

[0618] 体内与体外免疫原性的比较

[0619] T细胞增殖分析包括5个肽,以已知体内免疫原性作为阳性对照。对于这些肽的体内免疫原性,采用CD4T细胞的细胞内细胞因子染色(ICS)法在临床试验中使用接种过这些肽的患者的血样进行测定。

[0620] 原则上,ICS测定法分析效应子功能有关的特异性T细胞的质量。因此,外周单核细胞(PBMC)在体外用相关肽、参考肽和阴性对照(此处为模拟)进行再刺激。在再刺激细胞进行染色检查IFN- γ 、TNF- α 、IL-2和IL-10产生以及共刺激分子CD154的表达后,在流式细胞仪上对染色细胞进行计数(图5)。

[0621] 免疫原性分析显示,在16名患者中接种IMA950肽(BIR-002和MET-005)的免疫应答为100%(研究IMA950-101),在71名患者中接种IMA910肽(CEA-006、TGFBI-004和MMP-001)的免疫应答为44%至86%(研究IMA910-101)(图6)。

[0622] 体内免疫原性已知的肽的体外免疫原性结果与选定肽进行了比较(表27)。分析表明,在21个接受研究的供体样本中的7个,阳性对照肽刺激CD4+T细胞增殖。在每个肽的最多4个供体样本中,平均刺激反应的强度范围高于背景0.09至0.31%。例如,对于BIR-002的刺

激强度为0.24%。BIR-002被认为在不同的临床试验中具有高度免疫原性。在针对表达不同HLA-DR等位基因的19名可评估患者进行的一项临床试验中,BIR-002作为前列腺癌特异性肽疫苗的组分进行了测试(Feyerabend et al.,2009)。16名(84%)患者有针对BIR-002的CD4+T细胞应答(Widenmeyer et al.,2008),表明其高免疫原性潜力。在IMA950试验中,100%(N=16)的患者显示了对BIR-002的免疫应答。

[0623] 通过比较,除了FN1-002外,当前分析中所选肽刺激总共11个受研究供体样本中的CD4+T细胞增殖。因而,在每个肽的最多6个供体中,平均刺激反应的强度范围高于背景0.19至0.48%。这些值类似于高度免疫原性肽BIR-002刺激反应的强度。有趣的是,对于所有阳性对照肽,体外免疫原性测定阳性供体样本的分数(范围:4-19%)大大低于临床试验中对这些肽有免疫应答患者的分数(范围:44-100%)。这一观察表明,当前在体外免疫原性测定设置相当保守,并很可能低估了临床环境中肽的免疫原性。因此,可以预料,被研究的10个肽中有9个很可能在临床试验中诱发大多数患者的体内免疫应答。

[0624] 表27. 选定肽和具有已知体内免疫原性的阳性对照肽的T细胞增殖测定结果。

序列 ID 号	肽编号	阳性供体的数量	反应强度：高于背景的平均值 (%)
86	MMP12-007	2	0.28
87	COL11A1-001	5	0.19
92	COL1A2-001	2	0.48
91	COL5A2-001	2	0.21
88	ITGB6-001	6	0.23
90	LAMC2-003	3	0.27
[0625] 110	LAMP3-002	5	0.25
89	IGF2BP3-002	3	0.40
162	POSTN-002	2	0.39
165	BIR-002	3	0.24
166	MET-005	4	0.31
167	MMP-001	2	0.09
168	CEA-006	1	0.20
169	TGFBI-004	2	0.19

[0626] 参考文献列表

[0627] Aaltonen,K.et al.,Br.J Cancer 100(2009):1055-1060

[0628] Abdelzaher,E.et al.,Tumour.Biol.(2015)

[0629] Acuff,H.B.et al.,Cancer Research 66(2006):7968-7975

[0630] Adhikary,G.et al.,PLoS.ONE.8(2013):e84324

- [0631] Agarwal,R.et al.,Clinical Cancer Research 15(2009):3654-3662
- [0632] Alcoser,S.Y.et al.,BMC.Biotechnol.11(2011):124
- [0633] Allison,J.P.et al.,Science 270(1995):932-933
- [0634] Andersen,R.S.et al.,Nat.Protoc.7(2012):891-902
- [0635] Anderson,N.L.et al.,J Proteome.Res 11(2012):1868-1878
- [0636] Appay,V.et al.,Eur.J Immunol.36(2006):1805-1814
- [0637] Asteriti,I.A.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1806(2010):230-239
- [0638] Badiglian,Filho L.et al.,Oncol Rep.21(2009):313-320
- [0639] Bae,J.S.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.294(2002):940-948
- [0640] Bafna,S.et al.,Oncogene 29(2010):2893-2904
- [0641] Banchereau,J.et al.,Cancer Res.61(2001):6451-6458
- [0642] Bargo,S.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.400(2010):606-612
- [0643] Bartsch,S.et al.,J Neurosci.12(1992):736-749
- [0644] Beatty,G.et al.,J Immunol 166(2001):2276-2282
- [0645] Beggs,J.D.,Nature 275(1978):104-109
- [0646] Begnami,M.D.et al.,Hum.Pathol.41(2010):1120-1127
- [0647] Beljan,Perak R.et al.,Diagn.Pathol.7(2012):165
- [0648] Benaglio,P.et al.,Hum.Mutat.32(2011):E2246-E2258
- [0649] Benjamini,Y.et al.,Journal of the Royal Statistical Society.Series
- [0650] B(Methodological),Vol.57(1995):289-300
- [0651] Bergner,A.et al.,J Exp.Clin Cancer Res.28(2009):25
- [0652] Berndt,A.et al.,Histochem.Cell Biol.133(2010):467-475
- [0653] Berthon,P.et al.,Am.J Hum.Genet.62(1998):1416-1424
- [0654] Bird,A.W.et al.,J Cell Biol.182(2008):289-300
- [0655] Blanco,M.A.et al.,Cell Res 22(2012):1339-1355
- [0656] Blatch,G.L.et al.,BioEssays 21(1999):932-939
- [0657] Bossard,C.et al.,Int.J Cancer 131(2012):855-863
- [0658] Bostrom,P.et al.,BMC.Cancer 11(2011):348
- [0659] Boulter,J.M.et al.,Protein Eng 16(2003):707-711
- [0660] Bragulla,H.H.et al.,J Anat.214(2009):516-559
- [0661] Braumuller,H.et al.,Nature(2013)
- [0662] Brossart,P.et al.,Blood 90(1997):1594-1599
- [0663] Bruckdorfer,T.et al.,Curr.Pharm.Biotechnol.5(2004):29-43
- [0664] Byrne,A.et al.,Exp.Cell Res 316(2010):258-271
- [0665] Calabrese,F.et al.,Pathology 44(2012):192-198
- [0666] Cao,Y.et al.,Cancer Lett.(2015)
- [0667] Capello,M.et al.,FEBS J 278(2011):1064-1074
- [0668] Cappello,P.et al.,Int J Cancer 125(2009):639-648
- [0669] Card,K.F.et al.,Cancer Immunol.Immunother.53(2004):345-357

- [0670] Carroll,C.W.et al.,*Nat Cell Biol.*11 (2009) :896-902
- [0671] Cataldo,D.D.et al.,*Cell Mol.Biol. (Noisy.-le-grand)* 49 (2003) :875-884
- [0672] Cedres,S.et al.,*Clin Lung Cancer* 12 (2011) :172-179
- [0673] Cervantes,M.D.et al.,*Mol.Cell Biol.*26 (2006) :4690-4700
- [0674] Chakraborti,S.et al.,*Mol.Cell Biochem.*253 (2003) :269-285
- [0675] Chami,M.et al.,*Oncogene* 19 (2000) :2877-2886
- [0676] Chandler,S.et al.,*Biochem.Biophys.Res Commun.*228 (1996) :421-429
- [0677] Chang,G.C.et al.,*Clinical Cancer Research* 12 (2006) :5746-5754
- [0678] Chanock,S.J.et al.,*Hum.Immunol.*65 (2004) :1211-1223
- [0679] Chen,D.R.et al.,*Anticancer Res.*30 (2010) :4135-4140
- [0680] Chen,G.et al.,*Biomed.Res Int.*2014 (2014) :230183
- [0681] Chen,J.et al.,*Cancer Cell* 19 (2011) :541-555
- [0682] Chen,M.F.et al.,*J Mol.Med* 87 (2009) :307-320
- [0683] Chen,P.et al.,*J Mol.Histol.*43 (2012) :63-70
- [0684] Chen,Q.et al.,*Mediators.Inflamm.*2013 (2013) :928315
- [0685] Chen,Z.S.et al.,*FEBS J* 278 (2011) :3226-3245
- [0686] Cheon,D.J.et al.,*Clin.Cancer Res.*20 (2014) :711-723
- [0687] Chiquet-Ehrismann,R.,*Semin.Cancer Biol.*4 (1993) :301-310
- [0688] Chiquet-Ehrismann,R.et al.,*J Pathol.*200 (2003) :488-499
- [0689] Cho,N.H.et al.,*Oncogene* 23 (2004) :845-851
- [0690] Choi,K.U.et al.,*Int J Cancer* (2010)
- [0691] Chung,F.Y.et al.,*J Surg.Oncol* 102 (2010) :148-153
- [0692] Cirak,Y.et al.,*Med.Oncol* 30 (2013) :526
- [0693] Cohen,C.J.et al.,*J Mol.Recognit.*16 (2003a) :324-332
- [0694] Cohen,C.J.et al.,*J Immunol.*170 (2003b) :4349-4361
- [0695] Cohen,S.N.et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69 (1972) :2110-2114
- [0696] Coligan,J.E.et al.,*Current Protocols in Protein Science* (1995)
- [0697] Colombetti,S.et al.,*J Immunol.*176 (2006) :2730-2738
- [0698] Conde-Perezprina,J.C.et al.,*Oxid.Med.Cell Longev.*2012 (2012) :728430
- [0699] Cooper,C.R.et al.,*J Cell Biochem.*104 (2008) :2298-2309
- [0700] Cooper,W.A.et al.,*Histopathology* 55 (2009) :28-36
- [0701] Cordes,C.et al.,*Anticancer Res* 30 (2010) :3541-3547
- [0702] Creighton,C.J.et al.,*Mol.Cancer Res* 3 (2005) :119-129
- [0703] Da Forno,P.D.et al.,*Clinical Cancer Research* 14 (2008) :5825-5832
- [0704] Dai,T.Y.et al.,*J Exp.Clin Cancer Res* 33 (2014) :64
- [0705] Davidson,N.O.,*Keio J Med.*56 (2007) :14-20
- [0706] de Souza Meyer,E.L.et al.,*Clin Endocrinol. (Oxf)* 62 (2005) :672-678
- [0707] De,Boeck A.et al.,*Proteomics.*13 (2013) :379-388
- [0708] De,Luca P.et al.,*Mol Cancer Res* 9 (2011) :1078-1090

- [0709] De,Vriendt,V et al.,Biomarkers 18(2013):516-524
- [0710] Deeley,R.G.et al.,Physiol Rev.86(2006):849-899
- [0711] Dengjel,J.et al.,Clin Cancer Res.12(2006):4163-4170
- [0712] Denkberg,G.et al.,J Immunol.171(2003):2197-2207
- [0713] Denli,A.M.et al.,Nature 432(2004):231-235
- [0714] Denys,H.et al.,Br.J Cancer 90(2004):1443-1449
- [0715] Dharmavaram,R.M.et al.,Matrix Biol.16(1998):343-348
- [0716] Dolznig,H.et al.,Cancer Immun.5(2005):10
- [0717] Dong,S.et al.,J Neuropathol.Exp.Neurol.64(2005):948-955
- [0718] Drucker,K.L.et al.,Genes Chromosomes.Cancer 48(2009):854-864
- [0719] Dulak,A.M.et al.,Nat Genet.45(2013):478-486
- [0720] Egloff,A.M.et al.,Ann N.Y.Acad.Sci.1062(2005):29-40
- [0721] Ellsworth,R.E.et al.,Clin.Exp.Metastasis 26(2009):205-213
- [0722] Escobar-Hoyos,L.F.et al.,Mod.Pathol.27(2014):621-630
- [0723] Espinosa,A.M.et al.,PLoS.ONE.8(2013):e55975
- [0724] Ewald,J.A.et al.,PLoS.ONE.8(2013):e55414
- [0725] Falk,K.et al.,Nature 351(1991):290-296
- [0726] Fang,W.Y.et al.,Acta Biochim.Biophys.Sin. (Shanghai) 37(2005):541-546
- [0727] Fang,Z.Q.et al.,Genet.Mol.Res.12(2013):1479-1489
- [0728] Feng,C.J.et al.,Anticancer Res 28(2008):3763-3769
- [0729] Findeis-Hosey,J.J.et al.,Biotech.Histochem.87(2012):24-29
- [0730] Findeis-Hosey,J.J.et al.,Hum.Pathol.41(2010):477-484
- [0731] Fiorentini,C.et al.,Exp.Cell Res 323(2014):100-111
- [0732] Fong,L.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98(2001):8809-8814
- [0733] Forsey,R.W.et al.,Biotechnol.Lett.31(2009):819-823
- [0734] Freire,J.et al.,Pathol.Res.Pract.210(2014):879-884
- [0735] Fuchs,B.C.et al.,Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol 286(2004):G467-G478
- [0736] Fuchs,F.et al.,Mol Syst.Biol.6(2010):370
- [0737] Fujita,A.et al.,Virchows Arch.460(2012):163-169
- [0738] Fukuda,T.et al.,J Histochem.Cytochem.55(2007):335-345
- [0739] Fukunaga-Kalabis,M.et al.,Oncogene 29(2010):6115-6124
- [0740] Fuller-Pace,F.V.,RNA.Biol.10(2013):121-132
- [0741] Furukawa,T.et al.,Sci.Rep.1(2011):161
- [0742] Furutani,Y.et al.,Biochem.J 389(2005):675-684
- [0743] Gabrilovich,D.I.et al.,Nat.Med 2(1996):1096-1103
- [0744] Garnett,M.J.et al.,Nat.Cell Biol.11(2009):1363-1369
- [0745] Gattinoni,L.et al.,Nat.Rev.Immunol.6(2006):383-393
- [0746] Ghosh,S.et al.,Gynecol.Oncol 119(2010):114-120

- [0747] Gibbs,M.et al.,Am.J Hum.Genet.64(1999):1087-1095
- [0748] Gilkes,D.M.et al.,Mol Cancer Res 11(2013):456-466
- [0749] Gladhaug,I.P.et al.,Histopathology 56(2010):345-355
- [0750] Gnjatic,S.et al.,Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100(2003):8862-8867
- [0751] Godkin,A.et al.,Int.Immunol 9(1997):905-911
- [0752] Gonzalez,A.L.et al.,Hum.Pathol.35(2004):840-849
- [0753] Gooden,M.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 108(2011):10656-10661
- [0754] Gorrin Rivas,M.J.et al.,Hepatology 28(1998):986-993
- [0755] Gorrin-Rivas,M.J.et al.,Ann Surg 231(2000):67-73
- [0756] Graf,F.et al.,Mini.Rev.Med.Chem.10(2010):527-539
- [0757] Graf,M.et al.,Eur.J Haematol.75(2005):477-484
- [0758] Green,M.R.et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual 4th(2012)
- [0759] Greenfield,E.A.,Antibodies:A Laboratory Manual 2nd(2014)
- [0760] Gregory,K.E.et al.,J Bone Miner.Res.16(2001):2005-2016
- [0761] Grunda,J.M.et al.,Clin Cancer Res.16(2010):2890-2898
- [0762] Grupp,K.et al.,Mol Oncol 7(2013):1001-1011
- [0763] Gupta,N.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1741(2005):215-223
- [0764] Gupta,N.et al.,Gynecol.Oncol 100(2006):8-13
- [0765] Hagemann,T.et al.,Eur.J Cancer 37(2001):1839-1846
- [0766] Hamamoto,R.et al.,Cancer Sci.97(2006):113-118
- [0767] Han,J.et al.,Cell 125(2006):887-901
- [0768] Hannisdal,K.et al.,Head Neck 32(2010):1354-1362
- [0769] Hatina,J.et al.,Neoplasma 59(2012):728-736
- [0770] He,P.et al.,Cancer Sci.98(2007):1234-1240
- [0771] Hernandez,I.et al.,Oncogene 29(2010):3758-3769
- [0772] Hodgson,J.G.et al.,Neuro Oncol 11(2009):477-487
- [0773] Hofmann,H.S.et al.,Am.J Respir.Crit Care Med.170(2004):516-519
- [0774] Hofmann,H.S.et al.,Clinical Cancer Research 11(2005):1086-1092
- [0775] Hood,F.E.et al.,Bioarchitecture.1(2011):105-109
- [0776] Houghton,A.M.et al.,Cancer Research 66(2006):6149-6155
- [0777] Hourihan,R.N.et al.,Anticancer Res 23(2003):161-165
- [0778] Hu,Y.et al.,Carcinogenesis 34(2013):176-182
- [0779] Huang,C.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.21(2012a):166-175
- [0780] Huang,C.L.et al.,J Clin Oncol 23(2005):8765-8773
- [0781] Huang,M.Y.et al.,DNA Cell Biol.31(2012b):625-635
- [0782] Huang,T.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014):1544-1552
- [0783] Huo,J.et al.,Arch.Dermatol.Res.302(2010):769-772
- [0784] Hwang,M.L.et al.,J Immunol.179(2007):5829-5838
- [0785] Hwang,Y.S.et al.,Head Neck 34(2012):1329-1339

- [0786] Ida-Yonemochi,H.et al.,Mod.Pathol.25(2012):784-794
- [0787] Imadome,K.et al.,Cancer Biol.Ther 10(2010):1019-1026
- [0788] Irigoyen,M.et al.,Mol.Cancer 9(2010):130
- [0789] Ishikawa,N.et al.,Clin Cancer Res.10(2004):8363-8370
- [0790] Ishikawa,Y.et al.,J Biol.Chem.283(2008):31584-31590
- [0791] Iuchi,S.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96(1999):9628-9632
- [0792] Ivanov,S.V.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.370(2008):536-540
- [0793] Jeng,Y.M.et al.,Br.J Surg 96(2009):66-73
- [0794] Jensen,K.et al.,J Pathol.221(2010):193-200
- [0795] Jung,C.K.et al.,Pathol.Int 56(2006):503-509
- [0796] Jung,G.et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 84(1987):4611-4615
- [0797] Kabbarah,O.et al.,PLoS.ONE.5(2010):e10770
- [0798] Kadara,H.et al.,Cancer Prev.Res (Phila) 2(2009):702-711
- [0799] Kanai,Y.et al.,Mol Aspects Med.34(2013):108-120
- [0800] Kanno,A.et al.,Int J Cancer 122(2008):2707-2718
- [0801] Karantza,V.,Oncogene 30(2011):127-138
- [0802] Karunakaran,S.et al.,J Biol.Chem.286(2011):31830-31838
- [0803] Kastrinos,F.et al.,Semin.Oncol 34(2007):418-424
- [0804] Katagiri,C.et al.,J Dermatol.Sci.57(2010):95-101
- [0805] Katoh,M.,Curr.Drug Targets.9(2008):565-570
- [0806] Katoh,M.et al.,Int J Mol.Med 19(2007):273-278
- [0807] Kennedy,A.et al.,Int J Cancer 124(2009):27-35
- [0808] Kibbe,A.H.,Handbook of Pharmaceutical Excipients rd(2000)
- [0809] Kikuchi,A.et al.,Acta Physiol (Oxf) 204(2012):17-33
- [0810] Kikuchi,Y.et al.,J Histochem.Cytochem.56(2008):753-764
- [0811] Kim,C.H.et al.,Surg Neurol.54(2000):235-240
- [0812] Kim,C.Y.et al.,Oncol.Rep.27(2012):608-620
- [0813] Kim,E.H.et al.,Oncogene 29(2010a):4725-4731
- [0814] Kim,H.S.et al.,Korean J Intern.Med.25(2010b):399-407
- [0815] Kim,S.et al.,Korean J Hepatol.10(2004):62-72
- [0816] Kitahara,O.et al.,Cancer Res.61(2001):3544-3549
- [0817] Knight,H.M.et al.,Am J Hum.Genet.85(2009):833-846
- [0818] Korosec,B.et al.,Cancer Genet.Cytogenet.171(2006):105-111
- [0819] Krieg,A.M.,Nat.Rev.Drug Discov.5(2006):471-484
- [0820] Kuan,C.T.et al.,Clinical Cancer Research 12(2006):1970-1982
- [0821] Kuang,S.Q.et al.,Leukemia 22(2008):1529-1538
- [0822] Kubo,H.et al.,BMC.Cancer 14(2014):755
- [0823] Kudo,Y.et al.,Cancer Research 66(2006):6928-6935
- [0824] Kwon,O.H.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.406(2011):539-545

- [0825] Kwon,Y.J.et al.,Oncol Res 18(2009):141-151
- [0826] Labied,S.et al.,Hum.Reprod.24(2009):113-121
- [0827] Ladanyi,A.et al.,Cancer Immunol.Immunother.56(2007):1459-1469
- [0828] Lamba,J.K.et al.,Pharmacogenomics.15(2014):1565-1574
- [0829] Langbein,L.et al.,J Biol.Chem.285(2010):36909-36921
- [0830] Langenskiold,M.et al.,Scand.J Gastroenterol.48(2013):563-569
- [0831] Lau,E.et al.,EMBO Rep.7(2006):425-430
- [0832] Lee,J.I.et al.,World J Gastroenterol.18(2012):4751-4757
- [0833] Lee,Y.et al.,Nature 425(2003):415-419
- [0834] Lee,Y.K.et al.,Br.J Cancer 101(2009):504-510
- [0835] Leivo,I.et al.,Cancer Genet.Cytogenet.156(2005):104-113
- [0836] Li,C.et al.,Proteomics.6(2006):547-558
- [0837] Li,H.G.et al.,J Craniofac.Surg.22(2011):2022-2025
- [0838] Li,J.et al.,Cancer Biol.Ther.10(2010a):617-624
- [0839] Li,J.Q.et al.,Int.J Oncol 22(2003):1101-1110
- [0840] Li,M.et al.,Lung Cancer 69(2010b):341-347
- [0841] Li,X.et al.,Neoplasma 59(2012):500-507
- [0842] Li,Y.N.et al.,APMIS 122(2014):140-146
- [0843] Liang,W.J.et al.,Ai.Zheng.27(2008a):460-465
- [0844] Liang,Y.et al.,J Neurooncol.86(2008b):133-141
- [0845] Liao,B.et al.,J Biol.Chem.286(2011):31145-31152
- [0846] Liao,B.et al.,J Biol.Chem.280(2005):18517-18524
- [0847] Liddy,N.et al.,Nat.Med.18(2012):980-987
- [0848] Lim,J.H.et al.,J Cell Biochem.105(2008):1117-1127
- [0849] Lin,D.M.et al.,Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi.35(2006):540-544
- [0850] Lindskog,C.et al.,FASEB J(2014)
- [0851] Litjens,S.H.et al.,Trends Cell Biol.16(2006):376-383
- [0852] Liu,J.et al.,Pathol.Res Pract.206(2010):602-606
- [0853] Liu,T.et al.,PLoS.ONE.7(2012):e45464
- [0854] Liu,Z.et al.,Mol Neurobiol.47(2013):325-336
- [0855] Ljunggren,H.G.et al.,J Exp.Med 162(1985):1745-1759
- [0856] Loh,E.et al.,J Biol.Chem.279(2004):24640-24648
- [0857] Longenecker,B.M.et al.,Ann N.Y.Acad.Sci.690(1993):276-291
- [0858] Lu,D.et al.,Am.J Surg.Pathol.35(2011):1638-1645
- [0859] Lu,Y.et al.,Am.J Transl.Res 3(2010):8-27
- [0860] Lugassy,C.et al.,J Cutan.Pathol.36(2009):1237-1243
- [0861] Lukas,T.J.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78(1981):2791-2795
- [0862] Lundblad,R.L.,Chemical Reagents for Protein Modification 3rd(2004)
- [0863] Lv,M.et al.,Exp.Lung Res.41(2015):74-83

- [0864] Ma,L.J.et al.,Arch.Med Res 40(2009):114-123
- [0865] Ma,T.S.et al.,Cell Calcium 26(1999):25-36
- [0866] Ma,Y.et al.,Clinical Cancer Research 12(2006):1121-1127
- [0867] Maciejczyk,A.et al.,J Histochem.Cytochem.61(2013):330-339
- [0868] Mackie,E.J.et al.,J Cell Biol.107(1988):2757-2767
- [0869] MacLennan,D.H.et al.,J Biol.Chem.272(1997):28815-28818
- [0870] Maeder,C.et al.,Nat Struct.Mol.Biol.16(2009):42-48
- [0871] Mahdi,K.M.et al.,Asian Pac.J Cancer Prev.14(2013):3403-3409
- [0872] Manda,R.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.275(2000):440-445
- [0873] Mansilla,F.et al.,J Mol Med.(Berl)87(2009):85-97
- [0874] Marchand,M.et al.,Int.J.Cancer 80(1999):219-230
- [0875] Marchand,M.et al.,Int.J Cancer 63(1995):883-885
- [0876] McClelland,S.E.et al.,EMBO J 26(2007):5033-5047
- [0877] McManus,K.J.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 106(2009):3276-3281
- [0878] Merscher,S.et al.,Front Endocrinol.(Lausanne)5(2014):127
- [0879] Metz,R.L.et al.,Breast Cancer Res 9(2007):R58
- [0880] Metz,R.L.et al.,Cell Cycle 4(2005):315-322
- [0881] Meyer,E.L.et al.,Mol.Cell Endocrinol.289(2008):16-22
- [0882] Meziere,C.et al.,J Immunol 159(1997):3230-3237
- [0883] Middel,P.et al.,BMC.Cancer 10(2010):578
- [0884] Mikami,T.et al.,Oral Oncol.47(2011):497-503
- [0885] Miller,N.H.et al.,Hum.Hered.74(2012):36-44
- [0886] Milovanovic,T.et al.,Int.J Oncol 25(2004):1337-1342
- [0887] Mochizuki,S.et al.,Cancer Sci.98(2007):621-628
- [0888] Morgan,R.A.et al.,Science(2006)
- [0889] Mori,M.et al.,Transplantation 64(1997):1017-1027
- [0890] Morita,Y.et al.,J Hepatol.59(2013):292-299
- [0891] Morris,M.R.et al.,Oncogene 29(2010):2104-2117
- [0892] Mortara,L.et al.,Clin Cancer Res.12(2006):3435-3443
- [0893] Moss,D.K.et al.,J Cell Sci.122(2009):644-655
- [0894] Mueller,L.N.et al.,J Proteome.Res.7(2008):51-61
- [0895] Mueller,L.N.et al.,Proteomics.7(2007):3470-3480
- [0896] Mumberg,D.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96(1999):8633-8638
- [0897] Murakami,M.et al.,J Clin Endocrinol.Metab 85(2000):4403-4406
- [0898] Nag,A.et al.,RNA.Biol.9(2012):334-342
- [0899] Narita,D.et al.,Rom.J Morphol.Embryol.52(2011):1261-1267
- [0900] Nestle,F.O.et al.,Nat Med.4(1998):328-332
- [0901] Nicastrì,A.et al.,J Proteome.Res(2014)
- [0902] Niehof,M.et al.,Gastroenterology 134(2008):1191-1202

- [0903] Nishinakamura,R.et al.,Pediatr.Nephrol.26(2011):1463-1467
- [0904] Noda,T.et al.,Liver Int.32(2012):110-118
- [0905] Nones,K.et al.,Int.J Cancer 135(2014):1110-1118
- [0906] Odermatt,A.et al.,Nat Genet.14(1996):191-194
- [0907] Oh,S.P.et al.,Genomics 14(1992):225-231
- [0908] Ohta,S.et al.,Oncol Rep.8(2001):1063-1066
- [0909] Ortega,P.et al.,Int.J Oncol 36(2010):1209-1215
- [0910] Ostroff,R.M.et al.,PLoS.ONE.5(2010):e15003
- [0911] Park,S.H.et al.,Clinical Cancer Research 13(2007):858-867
- [0912] Paron,I.et al.,PLoS.ONE.6(2011):e21684
- [0913] Pascreau,G.et al.,J Biol.Chem.284(2009):5497-5505
- [0914] Patterson,C.E.et al.,Cell Stress.Chaperones.10(2005):285-295
- [0915] Patterson,C.E.et al.,Mol.Biol.Cell 11(2000):3925-3935
- [0916] Pernemalm,M.et al.,J Proteome.Res 12(2013):3934-3943
- [0917] Perrin-Tricaud,C.et al.,PLoS.ONE.6(2011):e29390
- [0918] Perumal,D.et al.,PLoS.ONE.7(2012):e43589
- [0919] Pinheiro,J.et al.,nlme:Linear and Nonlinear Mixed Effects
- [0920] Models(<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- [0921] Plebanski,M.et al.,Eur.J Immunol 25(1995):1783-1787
- [0922] Plones,T.et al.,PLoS.ONE.7(2012):e41746
- [0923] Pokrovskaya,I.D.et al.,Glycobiology 21(2011):1554-1569
- [0924] Pontisso,P.et al.,Br.J Cancer 90(2004):833-837
- [0925] Porta,C.et al.,Virology 202(1994):949-955
- [0926] Prades,C.et al.,Cytogenet.Genome Res 98(2002):160-168
- [0927] Prasad,P.et al.,BMC.Med.Genet.11(2010):52
- [0928] Puppin,C.et al.,J Endocrinol.197(2008):401-408
- [0929] Puri,V.et al.,Biol.Psychiatry 61(2007):873-879
- [0930] Puyol,M.et al.,Cancer Cell 18(2010):63-73
- [0931] Qin,C.et al.,Mol Med.Rep.9(2014):851-856
- [0932] Qu,P.et al.,Cancer Research 69(2009):7252-7261
- [0933] Quaas,M.et al.,Cell Cycle 11(2012):4661-4672
- [0934] Rajkumar,T.et al.,BMC.Cancer 11(2011):80
- [0935] Ramakrishna,M.et al.,PLoS.ONE.5(2010):e9983
- [0936] Ramirez,N.E.et al.,J Clin Invest 121(2011):226-237
- [0937] Rammensee,H.G.et al.,Immunogenetics 50(1999):213-219
- [0938] Reinmuth,N.et al.,Dtsch.Med.Wochenschr.140(2015):329-333
- [0939] Renkonen,S.et al.,Head Neck(2012)
- [0940] Rettig,W.J.et al.,Cancer Research 53(1993):3327-3335
- [0941] Rettig,W.J.et al.,Int J Cancer 58(1994):385-392

- [0942] Rini,B.I.et al.,Cancer 107(2006):67-74
- [0943] Ripka,S.et al.,Carcinogenesis 28(2007):1178-1187
- [0944] Ritzenthaler,J.D.et al.,Mol Biosyst.4(2008):1160-1169
- [0945] Rock,K.L.et al.,Science 249(1990):918-921
- [0946] Rodenko,B.et al.,Nat.Protoc.1(2006):1120-1132
- [0947] Rodningen,O.K.et al.,Radiother.Oncol 86(2008):314-320
- [0948] Roemer,A.et al.,Oncol Rep.11(2004a):529-536
- [0949] Roemer,A.et al.,J Urol.172(2004b):2162-2166
- [0950] Romagnoli,S.et al.,Am J Pathol.174(2009):762-770
- [0951] Rose,A.A.et al.,Mol Cancer Res 5(2007):1001-1014
- [0952] Rotty,J.D.et al.,J Cell Biol.197(2012):381-389
- [0953] Ruan,K.et al.,Cell Mol.Life Sci.66(2009):2219-2230
- [0954] S3-Leitlinie Lungenkarzinom,020/007,(2011)
- [0955] Sagara,N.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.252(1998):117-122
- [0956] Saiki,R.K.et al.,Science 239(1988):487-491
- [0957] Sakuntabhai,A.et al.,Nat Genet.21(1999):271-277
- [0958] Samanta,S.et al.,Oncogene 31(2012):4689-4697
- [0959] Sameer,A.S.et al.,Eur.J Cancer Prev.23(2014):246-257
- [0960] Sandel,M.H.et al.,Clinical Cancer Research 11(2005):2576-2582
- [0961] Sang,Q.X.,Cell Res 8(1998):171-177
- [0962] Sarai,N.et al.,Nucleic Acids Res.36(2008):5441-5450
- [0963] Satow,R.et al.,Clinical Cancer Research 16(2010):2518-2528
- [0964] Scanlan,M.J.et al.,Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 91(1994):5657-5661
- [0965] Schalken,J.A.et al.,Urology 62(2003):11-20
- [0966] Schegg,B.et al.,Mol.Cell Biol.29(2009):943-952
- [0967] Schleypen,J.S.et al.,Int.J Cancer 106(2003):905-912
- [0968] Schneider,D.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1588(2002):1-6
- [0969] Schuetz,C.S.et al.,Cancer Research 66(2006):5278-5286
- [0970] Seeger,F.H.et al.,Immunogenetics 49(1999):571-576
- [0971] SEER Stat facts,(2014),<http://seer.cancer.gov/>
- [0972] Shaikhibrahim,Z.et al.,Int.J Mol Med.28(2011):605-611
- [0973] Shao,G.et al.,Cancer Res.66(2006):4566-4573
- [0974] Shappell,S.B.et al.,Neoplasia.3(2001):287-303
- [0975] Shepherd,F.A.et al.,J Clin.Oncol.31(2013):2173-2181
- [0976] Sherman,F.et al.,Laboratory Course Manual for Methods in YeastGenetics(1986)
- [0977] Sherman-Baust,C.A.et al.,Cancer Cell 3(2003):377-386
- [0978] Sheu,B.C.et al.,Cancer Res.65(2005):2921-2929
- [0979] Shigeishi,H.et al.,Int J Oncol 34(2009):1565-1571

- [0980] Shimbo,T.et al.,PLoS.ONE.5 (2010) :e10566
- [0981] Shubbar,E.et al.,BMC.Cancer 13 (2013) :1
- [0982] Shyian,M.et al.,Exp.Oncol 33 (2011) :94-98
- [0983] Silva,F.C.et al.,Sao Paulo Med.J 127 (2009) :46-51
- [0984] Silva,L.P.et al.,Anal.Chem.85 (2013) :9536-9542
- [0985] Simpson,N.E.et al.,Breast Cancer Res.Treat.133 (2012) :959-968
- [0986] Singh,R.,Br.J Cancer 83 (2000) :1654-1658
- [0987] Singh-Jasuja,H.et al.,Cancer Immunol.Immunother.53 (2004) :187-195
- [0988] Siu,A.et al.,Anticancer Res.32 (2012) :3683-3688
- [0989] Slack,F.J.et al.,N.Engl.J Med.359 (2008) :2720-2722
- [0990] Slany,A.et al.,J Proteome.Res 13 (2014) :844-854
- [0991] Sloan,J.L.et al.,J Biol.Chem.274 (1999) :23740-23745
- [0992] Small,E.J.et al.,J Clin Oncol.24 (2006) :3089-3094
- [0993] Smith,M.J.et al.,Br.J Cancer 100 (2009a) :1452-1464
- [0994] Smith,S.C.et al.,Am J Pathol.174 (2009b) :371-379
- [0995] Solomon,S.et al.,Cancer J 18 (2012) :485-491
- [0996] Spataro,V.et al.,Anticancer Res 22 (2002) :3905-3909
- [0997] Spataro,V.et al.,J Biol.Chem.272 (1997) :30470-30475
- [0998] Starzyk,R.M.et al.,J Infect.Dis.181 (2000) :181-187
- [0999] Steffens,S.et al.,Oncol Lett.3 (2012) :787-790
- [1000] Stuart,J.E.et al.,J Neuropathol.Exp.Neurol. (2010)
- [1001] Sturm,M.et al.,BMC.Bioinformatics.9 (2008) :163
- [1002] Suminami,Y.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.181 (1991) :51-58
- [1003] Suvasini,R.et al.,J Biol.Chem.286 (2011) :25882-25890
- [1004] Takanami,I.et al.,Int J Biol.Markers 23 (2008) :182-186
- [1005] Takashima,S.et al.,Tumour.Biol.35 (2014) :4257-4265
- [1006] Tanaka,S.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95 (1998) :10164-10169
- [1007] Terabayashi,T.et al.,PLoS.ONE.7 (2012) :e39714
- [1008] Teufel,R.et al.,Cell Mol.Life Sci.62 (2005) :1755-1762
- [1009] Thierry,L.et al.,J Mol.Histol.35 (2004) :803-810
- [1010] Thorsen,K.et al.,Mol.Cell Proteomics.7 (2008) :1214-1224
- [1011] Thurner,B.et al.,J Exp.Med 190 (1999) :1669-1678
- [1012] Tischler,V.et al.,BMC.Cancer 10 (2010) :273
- [1013] Tondreau,T.et al.,BMC.Genomics 9 (2008) :166
- [1014] Tong,W.G.et al.,Epigenetics.5 (2010) :499-508
- [1015] Torre,G.C.,Tumour.Biol.19 (1998) :517-526
- [1016] Tran,E.et al.,Science 344 (2014) :641-645
- [1017] Travis,W.D.et al.,J Clin.Oncol.31 (2013) :992-1001
- [1018] Troy,T.C.et al.,Stem Cell Rev.7 (2011) :927-934

- [1019] Tsai,J.R.et al.,Lung Cancer 56(2007):185-192
- [1020] Tseng,H.,Front Biosci.3(1998):D985-D988
- [1021] Tseng,H.et al.,J Cell Sci.112 Pt 18(1999):3039-3047
- [1022] Tseng,H.et al.,J Cell Biol.126(1994):495-506
- [1023] Tsuji,A.et al.,Biochem.J 396(2006):51-59
- [1024] Tsukamoto,Y.et al.,J Pathol.216(2008):471-482
- [1025] Uchiyama,Y.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 107(2010):9240-9245
- [1026] Ullman,E.et al.,Mol.Cell Biol.31(2011):2902-2919
- [1027] Urquidi,V.et al.,PLoS.ONE.7(2012):e37797
- [1028] Utispan,K.et al.,Mol.Cancer 9(2010):13
- [1029] van,Asseldonk M.et al.,Genomics 66(2000):35-42
- [1030] Vazquez-Ortiz,G.et al.,BMC.Cancer 5(2005):68
- [1031] Vermeulen,K.et al.,Cell Prolif.36(2003):131-149
- [1032] Vilar,E.et al.,Nat Rev.Clin Oncol 7(2010):153-162
- [1033] von,Au A.et al.,Neoplasia.15(2013):925-938
- [1034] Waalkes,S.et al.,BMC.Cancer 10(2010):503
- [1035] Walchli,C.et al.,J Cell Sci.107(Pt 2)(1994):669-681
- [1036] Wallace,A.M.et al.,COPD.5(2008):13-23
- [1037] Walter,S.et al.,J.Immunol.171(2003):4974-4978
- [1038] Walter S et al.,J Immunother(SITC Annual Meeting 2011)35,(2012)
- [1039] Wang,H.Y.et al.,Cancer Lett.191(2003):229-237
- [1040] Wang,L.et al.,J Thorac.Dis.6(2014):1380-1387
- [1041] Wang,Q.et al.,J Natl.Cancer Inst.105(2013a):1463-1473
- [1042] Wang,S.Z.et al.,BMB.Rep.41(2008):294-299
- [1043] Wang,W.X.et al.,Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.40(2009):857-860
- [1044] Wang,Y.F.et al.,Tumour.Biol.34(2013b):1685-1689
- [1045] Warner,S.L.et al.,Clinical Cancer Research 15(2009):6519-6528
- [1046] Watanabe,M.et al.,Proteomics.Clin Appl.2(2008):925-935
- [1047] Watt,S.L.et al.,J Biol.Chem.267(1992):20093-20099
- [1048] Wawrzynska,L.et al.,Monaldi Arch.Chest Dis.59(2003):140-145
- [1049] Weeraratna,A.T.et al.,Cancer Cell 1(2002):279-288
- [1050] Weiner,L.et al.,Differentiation 63(1998):263-272
- [1051] Wen,G.et al.,Cancer Lett.308(2011):23-32
- [1052] Wildeboer,D.et al.,J Neuropathol.Exp.Neurol.65(2006):516-527
- [1053] Wilke,S.et al.,BMC.Biol.10(2012):62
- [1054] Willcox,B.E.et al.,Protein Sci.8(1999):2418-2423
- [1055] Willett,R.et al.,Nat Commun.4(2013):1553
- [1056] World Cancer Report,(2014)
- [1057] Wu,A.et al.,J Transl.Med.9(2011):38

- [1058] Wu,D.et al.,Mol.Med.Rep.10(2014a):2415-2420
- [1059] Wu,G.C.et al.,Ai.Zheng.27(2008):874-878
- [1060] Wu,H.et al.,J Biol.Chem.275(2000):36957-36965
- [1061] Wu,J.et al.,BMC.Clin Pathol.13(2013a):15
- [1062] Wu,K.D.et al.,Am.J Physiol 269(1995):C775-C784
- [1063] Wu,M.et al.,BMC.Cancer 13(2013b):44
- [1064] Wu,S.Q.et al.,Mol.Med.Rep.7(2013c):875-880
- [1065] Wu,Y.H.et al.,Oncogene 33(2014b):3432-3440
- [1066] Xiao,L.et al.,Biochem.J 403(2007):573-581
- [1067] Xiao,X.et al.,Gynecol.Oncol 132(2014):506-512
- [1068] Xiao,X.Y.et al.,Tumour.Biol.33(2012):2385-2392
- [1069] Xiong,D.et al.,Carcinogenesis 33(2012):1797-1805
- [1070] Xu,B.et al.,Br.J Cancer 109(2013):1279-1286
- [1071] Xu,X.Y.et al.,Pathol.Res Pract. (2014)
- [1072] Xu,Y.et al.,PLoS.ONE.6(2011):e21119
- [1073] Yamamoto,H.et al.,Oncogene 29(2010):2036-2046
- [1074] Yan,Z.et al.,Biomark.Insights.9(2014):67-76
- [1075] Yang,S.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1772(2007):1033-1040
- [1076] Yasui,W.et al.,Cancer Sci.95(2004):385-392
- [1077] Ye,H.et al.,BMC.Genomics 9(2008):69
- [1078] Yin,J.Y.et al.,Clin Exp.Pharmacol.Physiol 38(2011):632-637
- [1079] Yoon,H.et al.,Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 99(2002):15632-15637
- [1080] Yoshida,K.et al.,J Cell Sci.123(2010):225-235
- [1081] Younes,M.et al.,Anticancer Res 20(2000):3775-3779
- [1082] Yu,D.et al.,Int.J Mol Sci.14(2013):11145-11156
- [1083] Yu,J.et al.,Gut(2014)
- [1084] Yu,J.M.et al.,Cancer Lett.257(2007):172-181
- [1085] Yuan,A.et al.,APMIS 116(2008):445-456
- [1086] Yuzugullu,H.et al.,Mol.Cancer 8(2009):90
- [1087] Zaremba,S.et al.,Cancer Res.57(1997):4570-4577
- [1088] Zeitlin,S.G.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 106(2009):15762-15767
- [1089] Zhang,C.et al.,PLoS.ONE.6(2011):e23849
- [1090] Zhang,C.et al.,Am.J Clin Pathol.142(2014):320-324
- [1091] Zhang,H.et al.,J Clin Endocrinol.Metab 89(2004):748-755
- [1092] Zhang,J.et al.,Front Biosci. (Elite.Ed) 2(2010a):1154-1163
- [1093] Zhang,J.Y.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.12(2003):136-143
- [1094] Zhang,L.et al.,Am.J Pathol.182(2013):2048-2057
- [1095] Zhang,Y.et al.,J Cell Sci.123(2010b):1285-1294
- [1096] Zhang,Y.et al.,J Surg Res 160(2010c):102-106

- [1097] Zhao,C.et al.,Am.J Hum.Genet.85(2009a):617-627
- [1098] Zhao,H.et al.,Cancer Gene Ther 21(2014a):448-455
- [1099] Zhao,W.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014b):4247-4253
- [1100] Zhao,Y.et al.,Mol.Carcinog.45(2006):84-92
- [1101] Zhao,Y.et al.,Radiat.Res.162(2004):655-659
- [1102] Zhao,Y.et al.,Anat.Rec.(Hoboken.) 292(2009b):692-700
- [1103] Zhao,Z.et al.,Genomics 27(1995):370-373
- [1104] Zheng,P.S.et al.,FASEB J 18(2004):754-756
- [1105] Zhou,X.et al.,Exp.Mol Pathol.92(2012):105-110
- [1106] Zong,J.et al.,Clin.Transl.Oncol.14(2012):21-30
- [1107] Zou,J.N.et al.,Cancer Lett.280(2009):78-85
- [1108] Zou,T.T.et al.,Oncogene 21(2002):4855-4862
- [1109] Allen,M.D.et al.,Clin Cancer Res.20(2014):344-357
- [1110] Ammendola,M.et al.,Biomed.Res.Int.2014(2014):154702
- [1111] An,J.et al.,Mol Cancer 7(2008):32
- [1112] Angenieux,C.et al.,PLoS.ONE.7(2012):e42634
- [1113] Arafeh,R.et al.,Nat Genet.47(2015):1408-1410
- [1114] Atkins,D.et al.,Contrib.Nephrol.148(2005):35-56
- [1115] Barras,D.et al.,Int.J Cancer 135(2014):242-247
- [1116] Barros-Filho,M.C.et al.,J Clin Endocrinol.Metab 100(2015):E890-E899
- [1117] Beaudry,V.G.et al.,PLoS.Genet.6(2010):e1001168
- [1118] Beckmann,R.P.et al.,Science 248(1990):850-854
- [1119] Bengtsson,L.et al.,J Cell Sci.121(2008):536-548
- [1120] Bloch,D.B.et al.,J Biol Chem 271(1996):29198-29204
- [1121] Bosch,D.G.et al.,Eur.J Hum.Genet.(2015)
- [1122] Boyer,A.P.et al.,Mol.Cell Proteomics.12(2013):180-193
- [1123] Brooks,W.S.et al.,J Biol Chem 283(2008):22304-22315
- [1124] Bukau,B.et al.,Cell 92(1998):351-366
- [1125] Burger,M.,Dig.Dis.Sci.54(2009):197-198
- [1126] Cailliau,K.et al.,J Biol Chem 290(2015):19653-19665
- [1127] Cao,Q.F.et al.,Cancer Biother.Radiopharm.30(2015):87-93
- [1128] Chakrabarti,G.et al.,Cancer Metab 3(2015):12
- [1129] Chalitchagorn,K.et al.,Oncogene 23(2004):8841-8846
- [1130] Chen,K.et al.,Cancer Biol Ther.12(2011):1114-1119
- [1131] Chen,S.J.et al.,J Biol.Chem 289(2014):36284-36302
- [1132] Chen,Y.Z.et al.,Cancer Chemother.Pharmacol.70(2012):637-644
- [1133] Chevrollier,A.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1807(2011):562-567
- [1134] Chouchane,L.et al.,Cancer 80(1997):1489-1496
- [1135] Ciocca,D.R.et al.,Cell Stress.Chaperones.10(2005):86-103

- [1136] Ciocca,D.R.et al.,Cancer Res.52(1992):3648-3654
- [1137] Cipriano,R.et al.,Mol.Cancer Res.12(2014):1156-1165
- [1138] Cortese,R.et al.,Int.J Biochem.Cell Biol 40(2008):1494-1508
- [1139] Critchley-Thorne,R.J.et al.,PLoS.Med.4(2007):e176
- [1140] Das,M.et al.,PLoS.ONE.8(2013):e69607
- [1141] Decker,T.et al.,J Clin Invest 109(2002):1271-1277
- [1142] Di,K.et al.,Oncogene 32(2013):5038-5047
- [1143] Dolce,V.et al.,FEBS Lett.579(2005):633-637
- [1144] Draberova,E.et al.,J Neuropathol.Exp.Neurol.74(2015):723-742
- [1145] Dunwell,T.L.et al.,Epigenetics.4(2009):185-193
- [1146] Dusek,R.L.et al.,Breast Cancer Res 14(2012):R65
- [1147] Ene,C.I.et al.,PLoS.ONE.7(2012):e51407
- [1148] Espinal-Enriquez,J.et al.,BMC.Genomics 16(2015):207
- [1149] Evert,M.et al.,Br.J Cancer 109(2013):2654-2664
- [1150] Fellenberg,F.et al.,J Invest Dermatol.122(2004):1510-1517
- [1151] Feng,F.et al.,Mol.Cancer 9(2010):90
- [1152] Ferrer-Ferrer,M.et al.,Arch.Med.Res 44(2013):467-474
- [1153] Fischer,H.et al.,Carcinogenesis 22(2001):875-878
- [1154] Freiss,G.et al.,Bull.Cancer 91(2004):325-332
- [1155] Freiss,G.et al.,Anticancer Agents Med.Chem 11(2011):78-88
- [1156] Friedman,E.,Pathobiology 63(1995):348-350
- [1157] Fu,B.S.et al.,Nan.Fang Yi.Ke.Da.Xue.Xue.Bao.29(2009):1775-1778
- [1158] Gallerne,C.et al.,Int.J Biochem.Cell Biol 42(2010):623-629
- [1159] Garg,M.et al.,Cancer 116(2010a):3785-3796
- [1160] Garg,M.et al.,Cancer 116(2010b):3785-3796
- [1161] Garg,M.et al.,Eur.J Cancer 46(2010c):207-215
- [1162] Gautier,T.et al.,FASEB J 24(2010):3544-3554
- [1163] Giaginis,C.et al.,Dig.Dis.Sci.56(2011):777-785
- [1164] Giovannini,D.et al.,Cell Rep.3(2013):1866-1873
- [1165] Gokmen-Polar,Y.et al.,Mod.Pathol.28(2015):677-685
- [1166] Guo,H.et al.,Cancer Research 71(2011):7576-7586
- [1167] Haffner,C.et al.,EMBO J 23(2004):3041-3050
- [1168] Hartl,F.U.et al.,Science 295(2002):1852-1858
- [1169] Hatfield,M.P.et al.,Protein Pept.Lett.19(2012):616-624
- [1170] Hayward,A.et al.,PLoS.ONE.8(2013):e59940
- [1171] Hillier,L.W.et al.,Nature 424(2003):157-164
- [1172] Hsiung,D.T.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.16(2007):108-114
- [1173] Huang,F.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014a):1093-1100
- [1174] Huang,G.et al.,Anticancer Agents Med.Chem 14(2014b):9-17

- [1175] Huang,L.et al.,Int.J Gynecol.Cancer 25 (2015a) :559-565
- [1176] Huang,S.et al.,Oncogene 21 (2002) :2504-2512
- [1177] Huang,X.et al.,Cancer Cell Int.15 (2015b) :93
- [1178] Imada,A.et al.,Eur.Respir.J 15 (2000) :1087-1093
- [1179] Inoue,J.et al.,PLoS.ONE.4 (2009) :e7099
- [1180] Ishii,M.et al.,Anticancer Res.27 (2007) :3987-3992
- [1181] Ito,Y.et al.,J Biochem.124 (1998) :347-353
- [1182] Jalbout,M.et al.,Cancer Lett.193 (2003) :75-81
- [1183] Jia,W.H.et al.,Nat.Genet.45 (2013) :191-196
- [1184] Jie,Liu et al.,Pathol.Res Pract.210 (2014) :176-181
- [1185] Jin,X.et al.,Tumour.Biol (2015)
- [1186] Johnson,M.et al.,Cell Signal.21 (2009) :1471-1478
- [1187] Kankavi,O.et al.,Ren Fail.36 (2014) :258-265
- [1188] Kao,R.H.et al.,Int.J Exp.Pathol.84 (2003) :207-212
- [1189] Kim,H.S.et al.,Korean J Intern.Med.25 (2010) :399-407
- [1190] Kobayashi,K.et al.,Oncogene 23 (2004) :3089-3096
- [1191] Kong,C.S.et al.,Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.115 (2013) :
95-103
- [1192] Kortum,K.M.et al.,Ann.Hematol.94 (2015) :1205-1211
- [1193] Kozak,C.A.,Retrovirology.7 (2010) :101
- [1194] Kresse,S.H.et al.,Mol.Cancer 7 (2008) :48
- [1195] Kukita,K.et al.,J Immunol.194 (2015) :4988-4996
- [1196] Kutomi,G.et al.,Cancer Sci.104 (2013) :1091-1096
- [1197] Kwok,H.F.et al.,Am.J Cancer Res 5 (2015) :52-71
- [1198] Lai,C.H.et al.,Genome Res 10 (2000) :703-713
- [1199] Lan,Q.et al.,Eur.J Haematol.85 (2010) :492-495
- [1200] Lange,A.et al.,Exp.Dermatol.18 (2009) :527-535
- [1201] Lazaris,A.C.et al.,Breast Cancer Res.Treat.43 (1997) :43-51
- [1202] Lee,K.Y.et al.,Yonsei Med.J 50 (2009) :60-67
- [1203] Leypoldt,F.et al.,J Neurochem.76 (2001) :806-814
- [1204] Li,Q.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.8 (2015) :6334-6344
- [1205] Li,Y.et al.,Neoplasia.7 (2005) :1073-1080
- [1206] Liang,B.et al.,Clin Cancer Res.21 (2015) :1183-1195
- [1207] Liu,B.et al.,PLoS.ONE.7 (2012) :e43147
- [1208] Liu,L.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.372 (2008) :756-760
- [1209] Liu,Y.et al.,Cancer Research 69 (2009) :7844-7850
- [1210] Lv,Q.et al.,Tumour.Biol 36 (2015) :3751-3756
- [1211] Lynch,E.M.et al.,Curr.Biol 24 (2014) :896-903
- [1212] Ma,J.et al.,Cell Physiol Biochem.37 (2015) :201-213

- [1213] Maitra,M.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 109(2012):21064-21069
- [1214] Manuel,A.et al.,Genomics 64(2000):216-220
- [1215] Martin,C.et al.,J Virol.87(2013):10094-10104
- [1216] May,D.et al.,Oncogene 24(2005):1011-1020
- [1217] Medhi,S.et al.,J Viral Hepat.20(2013):e141-e147
- [1218] Mei,J.et al.,Oncogene 25(2006):849-856
- [1219] Mestiri,S.et al.,Cancer 91(2001):672-678
- [1220] Meulmeester,E.et al.,Curr.Cancer Drug Targets.8(2008):87-97
- [1221] Mimoto,R.et al.,Cancer Lett.339(2013):214-225
- [1222] Mitsuhashi,A.et al.,Am.J Pathol.182(2013):1843-1853
- [1223] Moudry,P.et al.,Cell Cycle 11(2012):1573-1582
- [1224] Mungall,A.J.et al.,Nature 425(2003):805-811
- [1225] Nagamachi,A.et al.,Cancer Cell 24(2013):305-317
- [1226] Nagao,H.et al.,PLoS.ONE.7(2012):e39268
- [1227] Narita,N.et al.,Int.J Radiat.Oncol Biol Phys.53(2002):190-196
- [1228] Neben,K.et al.,Int.J Cancer 120(2007):1669-1677
- [1229] Nebral,K.et al.,Clinical Cancer Research 11(2005):6489-6494
- [1230] Nibbe,R.K.et al.,Mol.Cell Proteomics.8(2009):827-845
- [1231] Nieto,C.et al.,J Cell Sci.123(2010):2001-2007
- [1232] Niikura,T.et al.,Eur.J Neurosci.17(2003):1150-1158
- [1233] Nirde,P.et al.,Oncogene 29(2010):117-127
- [1234] Nonomura,N.et al.,Br.J Cancer 97(2007):952-956
- [1235] Noonan,E.J.et al.,Cell Stress.Chaperones.12(2007):219-229
- [1236] Ohbayashi,N.et al.,J Cell Sci.125(2012):1508-1518
- [1237] Ohiro,Y.et al.,FEBS Lett.524(2002):163-171
- [1238] Onishi,H.et al.,Cancer Lett.371(2016):143-150
- [1239] Orfanelli,U.et al.,Oncogene 34(2015):2094-2102
- [1240] Ostertag,E.M.et al.,Annu.Rev Genet.35(2001):501-538
- [1241] Papadopoulos,C.et al.,J Biol.Chem 286(2011):5494-5505
- [1242] Park,H.J.et al.,J Proteome.Res 7(2008):1138-1150
- [1243] Peng,L.et al.,Sci.Rep.5(2015):13413
- [1244] Penzo,M.et al.,Oncotarget.6(2015):21755-21760
- [1245] Permeth-Wey,J.et al.,Nat Commun.4(2013):1627
- [1246] Peters,U.et al.,Gastroenterology 144(2013):799-807
- [1247] Qian,J.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 112(2015a):3469-3474
- [1248] Qian,J.et al.,Genom.Data 5(2015b):272-274
- [1249] Rachel,R.A.et al.,PLoS.ONE.7(2012):e42446
- [1250] Ramana,C.V.et al.,EMBO J 19(2000):263-272
- [1251] Reis,A.et al.,Nat Genet.6(1994):174-179

- [1252] Ribatti,D.et al.,Int.J Exp.Pathol.91(2010):350-356
- [1253] Roe,O.D.et al.,Lung Cancer 67(2010):57-68
- [1254] Rohde,M.et al.,Genes Dev.19(2005):570-582
- [1255] Ruediger,R.et al.,Oncogene 20(2001):1892-1899
- [1256] Rusin,M.et al.,Mol.Carcinog.39(2004):155-163
- [1257] Schiebel,E.,Curr.Opin.Cell Biol 12(2000):113-118
- [1258] Schmidt,F.et al.,Aging (Albany.NY) 7(2015a):527-528
- [1259] Schmidt,F.et al.,Oncotarget.6(2015b):617-632
- [1260] Schulz,E.G.et al.,Immunity.30(2009):673-683
- [1261] Scieglinska,D.et al.,J Cell Biochem.104(2008):2193-2206
- [1262] Sedlackova,L.et al.,Tumour.Biol 32(2011):33-44
- [1263] Sfar,S.et al.,Hum.Immunol.71(2010):377-382
- [1264] Shain,A.H.et al.,BMC.Genomics 14(2013):624
- [1265] Sharma,P.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.399(2010):129-132
- [1266] Sherman,M.,Ann.N.Y.Acad.Sci.1197(2010):152-157
- [1267] Simon,R.et al.,Int J Cancer 107(2003):764-772
- [1268] Singh,S.et al.,Tumour.Biol 35(2014):12695-12706
- [1269] Siragam,V.et al.,PLoS.ONE.9(2014):e109128
- [1270] Slepak,T.I.et al.,Cytoskeleton(Hoboken.) 69(2012):514-527
- [1271] Souza,A.P.et al.,Cell Stress.Chaperones.14(2009):301-310
- [1272] Stawerski,P.et al.,Contemp.Oncol (Pozn.) 17(2013):378-382
- [1273] Szondy,K.et al.,Cancer Invest 30(2012):317-322
- [1274] Taira,N.et al.,Mol.Cell 25(2007):725-738
- [1275] Takahashi,M.et al.,Gan To Kagaku Ryoho 24(1997):222-228
- [1276] Takanami,I.et al.,Cancer 88(2000):2686-2692
- [1277] Tan,S.et al.,Breast Cancer Res 16(2014):R40
- [1278] Tanis,T.et al.,Arch.Oral Biol 59(2014):1155-1163
- [1279] Toyoda,E.et al.,J Biol.Chem.283(2008):23711-23720
- [1280] Van Aarsen,L.A.et al.,Cancer Res.68(2008):561-570
- [1281] van den Boom,J.et al.,Am.J Pathol.163(2003):1033-1043
- [1282] van den Heuvel,A.P.et al.,Cancer Biol Ther.13(2012):1185-1194
- [1283] van,Wesenbeeck L.et al.,J Bone Miner.Res 19(2004):183-189
- [1284] Vargas,A.C.et al.,Breast Cancer Res.Treat.135(2012):153-165
- [1285] Vargas-Roig,L.M.et al.,Int.J Cancer 79(1998):468-475
- [1286] von der,Heyde S.et al.,PLoS.ONE.10(2015):e0117818
- [1287] Vuletic,S.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1813(2011):1917-1924
- [1288] Wang,Q.et al.,Int.J Biol Sci.10(2014a):807-816
- [1289] Wang,T.et al.,Clin Transl.Oncol 17(2015):564-569
- [1290] Wang,W.M.et al.,Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi.22(2014b):1744-

1747

- [1291] Wang,X.et al.,Clin Chim.Acta 417(2013a):73-79
- [1292] Wang,X.M.et al.,PLoS.ONE.8(2013b):e55714
- [1293] Wang,X.X.et al.,Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.12(2013c):540-545
- [1294] Wang,X.X.et al.,PLoS.ONE.9(2014c):e96501
- [1295] Wang,Y.et al.,Clin Chem.Lab Med.48(2010a):1657-1663
- [1296] Wang,Y.N.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.399(2010b):498-504
- [1297] Wang,Z.et al.,Med.Sci.Monit.16(2010c):CR357-CR364
- [1298] Watson,P.J.et al.,Traffic.5(2004):79-88
- [1299] Wehner,M.et al.,FEBS J 277(2010):1597-1605
- [1300] Weinacker,A.et al.,J Biol.Chem 269(1994):6940-6948
- [1301] Wu,D.et al.,Mol.Med.Rep.10(2014):2415-2420
- [1302] Wu,M.et al.,Oncogene 23(2004):6815-6819
- [1303] Wu,X.S.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 109(2012):E2101-E2109
- [1304] Xia,F.et al.,Am.J Hum.Genet.94(2014):784-789
- [1305] Xia,L.M.et al.,Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.16(2008):678-682
- [1306] Xiang,Y.et al.,J Clin Invest 125(2015):2293-2306
- [1307] Xu,L.et al.,Mol.Cell 10(2002):271-282
- [1308] Xue,L.et al.,Cell Physiol Biochem.36(2015):1982-1990
- [1309] Yamamoto,N.et al.,Int.J Oncol 42(2013):1523-1532
- [1310] Yang,D.et al.,Cell Physiol Biochem.27(2011):37-44
- [1311] Yang,Z.et al.,Int.J Med.Sci.12(2015):256-263
- [1312] Yau,C.et al.,Breast Cancer Res 12(2010):R85
- [1313] Yokoyama,Y.et al.,Mol.Med.Rep.1(2008):197-201
- [1314] Yongjun Zhang,M.M.et al.,J Cancer Res Ther.9(2013):660-663
- [1315] Yu,D.et al.,Oncotarget.6(2015):7619-7631
- [1316] Yu,H.et al.,Nat Methods 8(2011):478-480
- [1317] Yu,S.Y.et al.,J Oral Pathol.Med.43(2014):344-349
- [1318] Zekri,A.R.et al.,Asian Pac.J Cancer Prev.16(2015):3543-3549
- [1319] Zhang,W.et al.,Tumori 100(2014):338-345
- [1320] Zhao,Y.et al.,Oncol Lett.4(2012):755-758
- [1321] Zhao-Yang,Z.et al.,Cancer Lett.266(2008):209-215
- [1322] Zhou,J.R.et al.,Zhonghua Er.Bi Yan.Hou Tou.Jing.Wai Ke.Za Zhi.42(2007):934-938
- [1324] Zhou,L.et al.,FEBS Lett.584(2010):3013-3020
- [1325] Zhu,J.et al.,J Pharmacol.Toxicol.Methods 76(2015):76-82
- [1326] 更具体地,本申请提供下列各项:
- [1327] 1.一种肽,其包括选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.110组成群组的一个氨基酸序列、以及与SEQ ID No.1至SEQ ID No.110具有至少88%同源性的其变体序列、其中所述变

体与主要组织相容性复合体 (MHC) 结合和/或诱导与该变体肽发生T细胞交叉反应,其中所述肽不是一种全长多肽。

[1328] 2. 根据项1中所述的肽,其中所述肽有能力与MHC-I或-II类分子结合,其中所述肽与MHC结合时能够被CD4和/或CD8T细胞识别。

[1329] 3. 根据项1或2中所述的肽或其变体,其中氨基酸序列包括SEQ ID No.1至SEQ ID No.110任何一个序列中的一个连续的氨基酸延伸区。

[1330] 4. 根据项1至3任一项中所述的肽或其变体,其中所述肽或其变体的总长度为8至100个氨基酸、优选为8至30个氨基酸、更优选为8至16个氨基酸、最优选为该肽该肽系由或基本系由根据SEQ ID No.1至SEQ ID No.110任何的氨基酸序列组成。

[1331] 5. 根据项1至4任一项中所述的肽或其变体,其中所述肽被修饰和/或包含非肽键。

[1332] 6. 根据项1至5任一项所述的肽或其变体,其中所述肽为融合蛋白的一部分,尤其包含HLA-DR抗原相关不变链 (Ii) 的N-端氨基酸。

[1333] 7. 根据项1至6任一项中所述的一种编码肽或其变体的核酸,任选连接到一个异源启动子序列。

[1334] 8. 根据项7中所述的一种表达核酸的表达载体。

[1335] 9. 一种重组宿主细胞,其包括根据项1至6中所述的肽、根据项7中所述的核酸、根据项8中所述的表达载体,其中所述宿主细胞优选为抗原提成细胞,例如树突状细胞。

[1336] 10. 根据项1至6任一项中所述的肽或其变体、根据项7中所述的核酸、根据项8中所述或根据项9中所述的药用表达载体。

[1337] 11. 一种制备根据项1至6任一项所述的肽或其变体的方法,该方法包括培养根据项9所述的宿主细胞、其提呈根据项1至6所述的肽或表达根据项7所述的核酸或载有根据项8所述的表达载体,以及从该宿主细胞或其培养基中分离出肽或其变体。

[1338] 12. 一种体外制备启动的T淋巴细胞的方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人I或II类MHC分子进行体外连接,这些分子在合适的抗原提呈细胞表面或人工模拟的抗原提呈细胞结构表面上表达足够的一段时间从而以抗原特异性方式启动T细胞,其中所述抗原为项1至4任一项中所述的肽。

[1339] 13. 根据项12中所述的方法制成的启动T淋巴细胞,其有选择性地识别一种细胞,该细胞提呈含项1至4任一项中给定氨基酸序列的多肽。

[1340] 14. 一种杀灭患者中靶向细胞的方法,其中靶向细胞提呈一种多肽,该多肽含项1至4任一项中给定的氨基酸序列;一种给药方法,其中包括给予患者项13中定义的有效量T细胞。

[1341] 15. 一种抗体,特别是可溶性或膜结合性抗体,其特异性地识别根据项1至5中的肽或其变体,与MHC分子结合时优选为根据项1至5中任一项所述的肽或变体。

[1342] 16. 根据项1至6任一项中所述的一种肽、根据项7中所述的核酸、根据项8中所述的一种表达载体、根据项9中所述的细胞或根据项13中所述的启动毒性T淋巴细胞或根据项15中所述的抗体在治疗癌症或制造抗癌药剂中的用途。

[1343] 17. 根据项16所述的用途,其中所述癌症为选自肺癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、肾癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、白血病 (AML、CLL) 和其他肿瘤,这些肿瘤过度表达来自根据任意SEQ ID No.1至SEQ ID No.110的肽所衍

生的蛋白。

[1344] 18. 一种药盒, 包括:

[1345] (a) 一个容器包含一种药物组合物, 其含有根据项1至6任一项所述的肽或变体、根据项7所述的核酸、根据项8所述的表达载体、根据项10所述的细胞、根据项13所述的启动T淋巴细胞或根据项15所述的溶液或冻干形式的抗体;

[1346] (b) 可选地, 第二个容器, 其含有冻干粉剂型的稀释剂或重组溶液;

[1347] (c) 可选地, 至少一种以上肽, 选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.162基团, 以及

[1348] (d) 可选地, (i) 使用溶液或(ii) 重组和/或使用冻干粉剂型的说明书。

[1349] 19. 根据项18所述的套件, 进一步包括一个或多个(iii) 缓冲剂, (iv) 稀释剂, (v) 过滤液, (vi) 针, 或(v) 注射器。

[1350] 20. 根据项18或19所述的套件, 其中所述肽系选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.110组成的基团。

[1351] 21. 一种用于生产个性化抗癌疫苗, 所述方法包括:

[1352] a) 识别所述个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);

[1353] b) 将a) 中确定的肽与已经接受过免疫原性预筛查和/或与正常组织相比在肿瘤中过度提呈的存储库的肽进行比较。

[1354] c) 选择与患者中识别的TUMAP匹配的存储库中的至少一种肽; 和

[1355] d) 基于步骤c) 构想个性化疫苗。

[1356] 22. 根据项21中所述的方法, 其中所述TUMAP通过以下方法识别:

[1357] a1) 将肿瘤样本的表达数据与肿瘤样本组织类型相应的正常组织样本的表达数据进行比较, 以识别在肿瘤样本中过度表达或异常表达的蛋白; 和

[1358] a2) 将表达数据与肿瘤样本中MHC I类和/或II类分子结合的MHC配体序列相关联, 以识别肿瘤过度表达或异常的蛋白质衍生的MHC配体。

[1359] 23. 根据项21或22所述的方法, 其中MHC配体的序列的确定方法是: 洗脱来自肿瘤样本分离的MHC分子结合肽, 并测序洗脱配体。

[1360] 24. 根据项21至23任一项所述的方法, 其中该类型肿瘤样本相应的正常组织样本获得自同一患者。

[1361] 25. 根据项21至24任一项中所述的方法, 其中存储库包含的肽用基于以下步骤进行识别:

[1362] aa. 通过高度并行的方法, 例如微数组或基于测序的表达谱, 进行全基因组信使核糖核酸(mRNA) 表达分析, 其包括识别相较于正常组织在恶性组织中过度表达的基因;

[1363] ab. 选择步骤aa检测到的特异性表达或过量表达的基因所编码的肽, 以及

[1364] ac. 通过选定的肽确定诱导体内T细胞反应, 包括使用健康供体或所述患者的人类T细胞的体外免疫原性测定; 或

[1365] ba. 用质谱法识别来自所述肿瘤样本的HLA配体;

[1366] bb. 通过高度并行的方法, 例如微数组或基于测序的表达谱, 进行全基因组信使核糖核酸(mRNA) 表达分析, 其包括识别相较于正常组织在恶性组织中过度表达的基因;

[1367] bc. 比较识别的HLA配体与所述基因表达资料;

[1368] bd. 选择步骤bc检测到的特异性表达或过量表达的基因所编码的肽;

- [1369] be. 重新检测肿瘤组织上来自步骤bd的选定TUMAP、其在健康组织上缺乏或不经常检测,并确定在mRNA水平上过度表达的相关性;以及
- [1370] bf. 通过选定的肽确定诱导体内T细胞反应,包括使用健康供体或所述患者的人类T细胞的体外免疫原性测定。
- [1371] 26. 根据项21至25任一项所述的方法,其中存储库是否包括肽免疫原性由含有体外免疫原性实验、个体HLA结合性患者免疫监测、MHC多聚体染色、ELISPOT分析和/或细胞内细胞因子染色的一种方法确定。
- [1372] 27. 根据项21至26任一项所述的方法,其中所述存储库包括选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.162组成的基团的多个肽。
- [1373] 28. 根据项21至27任一项所述的方法,其进一步包括以下步骤:识别与该个体患者相应正常组织相比对所述肿瘤样本具有唯一性的至少一种突变,以及选择与突变相关并包含于疫苗或用于产生细胞疗法的一种肽。
- [1374] 29. 根据项28中所述的方法,其中所述至少一种突变通过全基因组测序鉴定。
- [1375] 30. 一种T细胞受体,优选为与HLA配体反应的可溶性或膜结合T细胞受体,其中所述配体由与选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.110组成的组的氨基酸序列至少75%同源性。
- [1376] 31. 根据项30所述的T细胞受体,其中所述氨基酸序列与SEQ ID No.1至SEQ ID No.110至少88%同源。
- [1377] 32. 根据项30或31所述的T细胞受体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID No.1至SEQ ID No.110中的任何一个。
- [1378] 33. 根据项30至32中任何一项所述的T细胞受体,其中所述T细胞受体作为可溶性分子提供并任选具有进一步的效应子功能,如免疫刺激域或毒素。
- [1379] 34. 根据项30至33任一项中所述的一种编码TCR的核酸,任选连接到一个异源启动子序列。
- [1380] 35. 根据项34中所述的一种能表达核酸的表达载体。
- [1381] 36. 一种宿主细胞,其包括根据项34中所述的核酸或编码根据项15中所述的一种抗体或根据项35所述的表达载体,其中所述宿主细胞优选为T细胞或NK细胞。
- [1382] 37. 根据项30至33任一项中所述的一种制备T细胞受体的方法,所述方法包括根据项36中所述的培养宿主细胞,以及从宿主细胞和/或其培养基中分离出所述T细胞受体。
- [1383] 38. 一种药物组合物,其包括至少一种活性成分,该成分选自以下项组成的组
- [1384] a) 选自由SEQ ID No.1至SEQ ID No.110组成的基团的一种肽;
- [1385] b) 与根据a)中的肽和/或肽MHC复合体产生反应的一种T细胞受体;
- [1386] c) 由根据a)中所述的肽以及HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的第1至80N-端氨基酸组成的融合蛋白;
- [1387] d) 编码a)至c)任一项的一种核酸或一种包含所述核酸的表达载体。
- [1388] e) 包括d中表达载体的宿主细胞,
- [1389] f) 一种启动的T淋巴细胞,通过一种方法获得,该方法包括将T细胞与a)中所述肽进行体外连接,该肽在合适的抗原提呈细胞表面表达足够的一段时间从而以抗原特异性方式启动所述T细胞;以及将这些活化的T细胞转入自体或其他患者的方法;
- [1390] g) 与a)中一种肽和/或肽-MHC复合体反应的一种抗体或可溶性T细胞受体和/或提

供根据a)所述的并有可能通过与免疫启动域或毒素融合而修饰的一种肽，

[1391] h) 一种适体，其识别选自包含SEQ ID No.1至SEQ ID No.110的组的一种肽和/或选自包含SEQ ID No.1至SEQ ID No.162的组一种肽与MHC分子的一种复合体，

[1392] i) 根据a)至h)任一项的一种共轭或标记肽或支架以及药用载体，或药用赋形剂和/或稳定剂。

[1393] 39. 一种适体，其特异性地识别根据项1至4中的肽或其变体，优选为根据项1至4中任一项所述的、与MHC分子结合的肽或变体。

序列表

<110> 伊玛提克斯生物技术有限公司

<120> 用于肺癌(包括非小细胞肺癌和其他癌症)免疫治疗的新型肽和肽组合物

<130> I32809W0

<150> US 62/152,258

<151> 2015-04-24

<150> GB 1507030.3

<151> 2015-04-24

<160> 177

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Lys Leu Leu Pro Tyr Ile Val Gly Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Phe Leu Ile Pro Tyr Ala Ile Met Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Phe Leu Tyr Asp Val Val Lys Ser Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Phe Val Phe Ser Phe Pro Val Ser Val

1 5

<400> 10
Lys Met Ala Gly Ile Gly Ile Arg Glu Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 11
Tyr Leu Asn Val Gln Val Lys Glu Leu
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 12
Ile Val Asp Arg Thr Thr Thr Val Val
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 13
Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 14
Leu Ile Gln Asp Arg Val Ala Glu Val
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 15
Glu Leu Asp Arg Thr Pro Pro Glu Val
1 5

<210> 16

<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 16
Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 17
Thr Leu Leu Gln Glu Gln Gly Thr Lys Thr Val
1 5 10
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 18
Ile Leu Leu Thr Glu Gln Ile Asn Leu
1 5
<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 19
Val Leu Thr Ser Asp Ser Pro Ala Leu
1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 20
Leu Met Thr Lys Glu Ile Ser Ser Val
1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 21

Val Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ala Ala

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Asn Leu Ile Asn Gln Glu Ile Met Leu

1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Val Tyr Thr Ser Trp Gln Ile Pro Gln Lys Phe

1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Asn Tyr Pro Lys Ser Ile His Ser Phe

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

Arg Phe Met Asp Gly His Ile Thr Phe

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 26

Arg Tyr Leu Glu Lys Phe Tyr Gly Leu

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT
<213> 智人
<400> 27
Arg Tyr Pro Pro Pro Val Arg Glu Phe
1 5
<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 28
Arg Tyr Leu Asp Ser Leu Lys Ala Ile Val Phe
1 5 10
<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 29
Tyr Tyr Thr Lys Gly Phe Ala Leu Leu Asn Phe
1 5 10
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 30
Lys Tyr Leu Glu Lys Tyr Tyr Asn Leu
1 5
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 31
Ser Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu
1 5
<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 32
Glu Tyr Gln Pro Glu Met Leu Glu Lys Phe

<213> 智人
 <400> 38
 Val Phe Leu Asn Arg Ala Lys Ala Val Phe Phe
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 39
 Lys Phe Leu Glu His Thr Asn Phe Glu Phe
 1 5 10
 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 40
 Ile Tyr Asn Pro Ser Met Gly Val Ser Val Leu
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 41
 Thr Tyr Ile Gly Gln Gly Tyr Ile Ile
 1 5
 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 42
 Val Tyr Val Thr Ile Asp Glu Asn Asn Ile Leu
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 43
 Arg Tyr Thr Leu His Ile Asn Thr Leu
 1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 44
Ile Tyr Asn Gln Ile Ala Glu Leu Trp
1 5
<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 45
Lys Phe Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Glu Phe
1 5 10
<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 46
Asn Tyr Thr Asn Gly Ser Phe Gly Ser Asn Phe
1 5 10
<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 47
Arg Tyr Ile Ser Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu
1 5 10
<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 48
Tyr Tyr Tyr Gly Asn Thr Leu Val Glu Phe
1 5 10
<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

Ser Tyr Pro Ala Lys Leu Ser Phe Ile

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Arg Tyr Gly Ser Pro Ile Asn Thr Phe

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Ala Tyr Lys Pro Gly Ala Leu Thr Phe

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Leu Tyr Ile Asn Lys Ala Asn Ile Trp

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Val Tyr Pro Leu Ala Leu Tyr Gly Phe

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

Ile Tyr Gln Arg Trp Lys Asp Leu Leu

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT
 <213> 智人
 <400> 66
 Asp Tyr Ile Pro Gln Leu Ala Lys Phe
 1 5
 <210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 67
 Ile Phe Leu Asp Tyr Glu Ala Gly His Leu Ser Phe
 1 5 10
 <210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 68
 Arg Tyr Leu Phe Val Val Asp Arg Leu
 1 5
 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 69
 Thr Tyr Ala Ala Leu Asn Ser Lys Ala Thr Phe
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 70
 Val Tyr His Ser Tyr Leu Thr Ile Phe
 1 5
 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 71
 Thr Tyr Leu Thr Asn His Leu Arg Leu

<213> 智人
<400> 77
Arg Tyr Leu Glu Ala Gly Ala Ala Gly Leu Arg Trp
1 5 10
<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 78
Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu
1 5
<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 79
Arg Tyr Gly Gly Ser Phe Ala Glu Leu
1 5
<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 80
Ala Tyr Leu Lys Glu Val Glu Gln Leu
1 5
<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 81
Lys Tyr Ile Glu Ala Ile Gln Trp Ile
1 5
<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 82
Phe Tyr Gln Gly Ile Val Gln Gln Phe
1 5

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

Glu Tyr Ser Asp Val Leu Ala Lys Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 84

Thr Phe Asp Val Ala Pro Ser Arg Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 85

Pro Phe Leu Gln Ala Ser Pro His Phe

1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 86

Leu Ser Ala Asp Asp Ile Arg Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Asp Pro

1 5 10 15

Lys

<210> 87

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 87

Glu Gly Asp Ile Gln Gln Phe Leu Ile Thr Gly Asp Pro Lys Ala Ala

1 5 10 15

Tyr Asp Tyr

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 88

Asn Pro Val Ser Gln Val Glu Ile Leu Lys Asn Lys Pro Leu Ser Val
1 5 10 15

Gly

<210> 89

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 89

Lys Leu Tyr Ile Gly Asn Leu Ser Glu Asn Ala Ala Pro Ser
1 5 10

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 90

Asp Ala Val Gln Met Val Ile Thr Glu Ala Gln Lys Val Asp Thr Arg
1 5 10 15

<210> 91

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 91

Val Ala Arg Leu Pro Ile Ile Asp Leu Ala Pro Val Asp Val Gly Gly
1 5 10 15

Thr Asp

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 92

Asn Lys Pro Ser Arg Leu Pro Phe Leu Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ile
1 5 10 15

Gly Gly Ala Asp
 20

<210> 93

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 93

Ser Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Val Tyr Ser Pro

1 5 10 15

Ser Val

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 94

Ile Leu Val Asp Trp Leu Val Gln Val

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 95

Lys Ile Ile Gly Ile Met Glu Glu Val

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 96

Ala Met Gly Ile Ala Pro Pro Lys Val

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 97

Thr Leu Phe Pro Val Arg Leu Leu Val

1 5

<210> 98

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 98

Val Leu Tyr Pro His Glu Pro Thr Ala Val

1 5 10

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 99

Ala Leu Phe Gln Arg Pro Pro Leu Ile

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 100

Lys Ile Val Asp Phe Ser Tyr Ser Val

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 101

Leu Leu Leu Glu Ile Leu His Glu Ile

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 102

Ser Leu Leu Ser Glu Leu Gln His Ala

1 5

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 103

Lys Leu Leu Ser Asp Pro Asn Tyr Gly Val

1 5 10

<210> 104

<211> 10

<212> PRT
<213> 智人
<400> 104
Ser Leu Val Ala Val Glu Leu Glu Lys Val
1 5 10
<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 105
Ile Val Ala Glu Ser Leu Gln Gln Val
1 5
<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 106
Ser Ile Leu Glu His Gln Ile Gln Val
1 5
<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 107
Ala Leu Ser Glu Arg Ala Val Ala Val
1 5
<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 108
Thr Leu Leu Asp Phe Ile Asn Ala Val
1 5
<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 109
Asn Leu Ile Glu Val Asn Glu Glu Val

<213> 智人
<400> 115
Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu
1 5
<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 116
Lys Ile Gln Glu Met Gln His Phe Leu
1 5
<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 117
Ile Leu Ile Asp Trp Leu Val Gln Val
1 5
<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 118
Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val
1 5
<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 119
Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val
1 5
<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 120
Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 121
Arg Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu
1 5
<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 122
Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ile Tyr Leu
1 5
<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 123
Gly Leu Thr Asp Asn Ile His Leu Val
1 5
<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 124
Asn Leu Leu Asp Leu Asp Tyr Glu Leu
1 5
<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 125
Arg Leu Asp Asp Leu Lys Met Thr Val
1 5
<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 126
Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
1 5

<210> 127
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 127
Ile Leu Phe Pro Asp Ile Ile Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 128
Thr Leu Ser Ser Ile Lys Val Glu Val
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 129
Gly Leu Ile Glu Ile Ile Ser Asn Ala
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 130
Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 131
Ala Leu Val Gln Asp Leu Ala Lys Ala
1 5

<210> 132

Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val

1 5

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 138

Ala Leu Asn Glu Glu Ala Gly Arg Leu Leu Leu

1 5 10

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 139

Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 140

Thr Leu Tyr Pro His Thr Ser Gln Val

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 141

Asn Leu Ile Glu Lys Ser Ile Tyr Leu

1 5

<210> 142

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 142

Val Leu Leu Pro Val Glu Val Ala Thr His Tyr Leu

1 5 10

<210> 143

<211> 9

<212> PRT
<213> 智人
<400> 143
Ala Ile Val Asp Lys Val Pro Ser Val
1 5
<210> 144
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 144
Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala
1 5 10
<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 145
Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val
1 5
<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 146
Phe Gln Tyr Asp His Glu Ala Phe Leu
1 5
<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 147
Val Leu Phe Pro Asn Leu Lys Thr Val
1 5
<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 148
Ala Leu Phe Gly Ala Leu Phe Leu Ala

<213> 智人
<400> 154
Ile Leu Phe Glu Ile Asn Pro Lys Leu
1 5
<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 155
Ala Leu Asp Glu Asn Leu His Gln Leu
1 5
<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 156
Thr Val Ala Glu Val Ile Gln Ser Val
1 5
<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 157
Lys Leu Phe Gly Glu Lys Thr Tyr Leu
1 5
<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 158
Lys Leu Asp Glu Thr Asn Asn Thr Leu
1 5
<210> 159
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 159
Thr Tyr Lys Tyr Val Asp Ile Asn Thr Phe
1 5 10

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 160

Ser Tyr Leu Gln Ala Ala Asn Ala Leu

1 5

<210> 161

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 161

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe

1 5 10

<210> 162

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 162

Thr Asn Gly Val Ile His Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp

1 5 10 15

Thr

<210> 163

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 163

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 164

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1 5

<210> 165

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 165

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn
1 5 10 15

<210> 166

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 166

Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr
1 5 10 15

Gly

<210> 167

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 167

Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Lys Leu Tyr Gly Lys Arg Ser
1 5 10 15

<210> 168

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 168

Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr
1 5 10 15

<210> 169

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 169

Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg Asn His
1 5 10 15

<210> 170

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 170

Lys Ile Phe Tyr Val Tyr Met Lys Arg Lys Tyr Glu Ala Met Thr

1	5	10	15
<210> 171			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 171			
Arg Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg			
1	5	10	15
<210> 172			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 172			
Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu Gln Leu			
1	5	10	15
<210> 173			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 173			
Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val			
1	5	10	15
<210> 174			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 174			
Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His His Met Val Lys Ile Ser Gly			
1	5	10	15
<210> 175			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 175			
Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg			
1	5	10	15
Leu Thr			
<210> 176			
<211> 17			

<212> PRT

<213> 智人

<400> 176

Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg

1 5 10 15

Phe

<210> 177

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 177

Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala

1 5 10

肽: FLIPYAIML (A*02) SEQ ID NO: 2



图1A

肽: FLFDGSANL (A*02) SEQ ID NO: 13

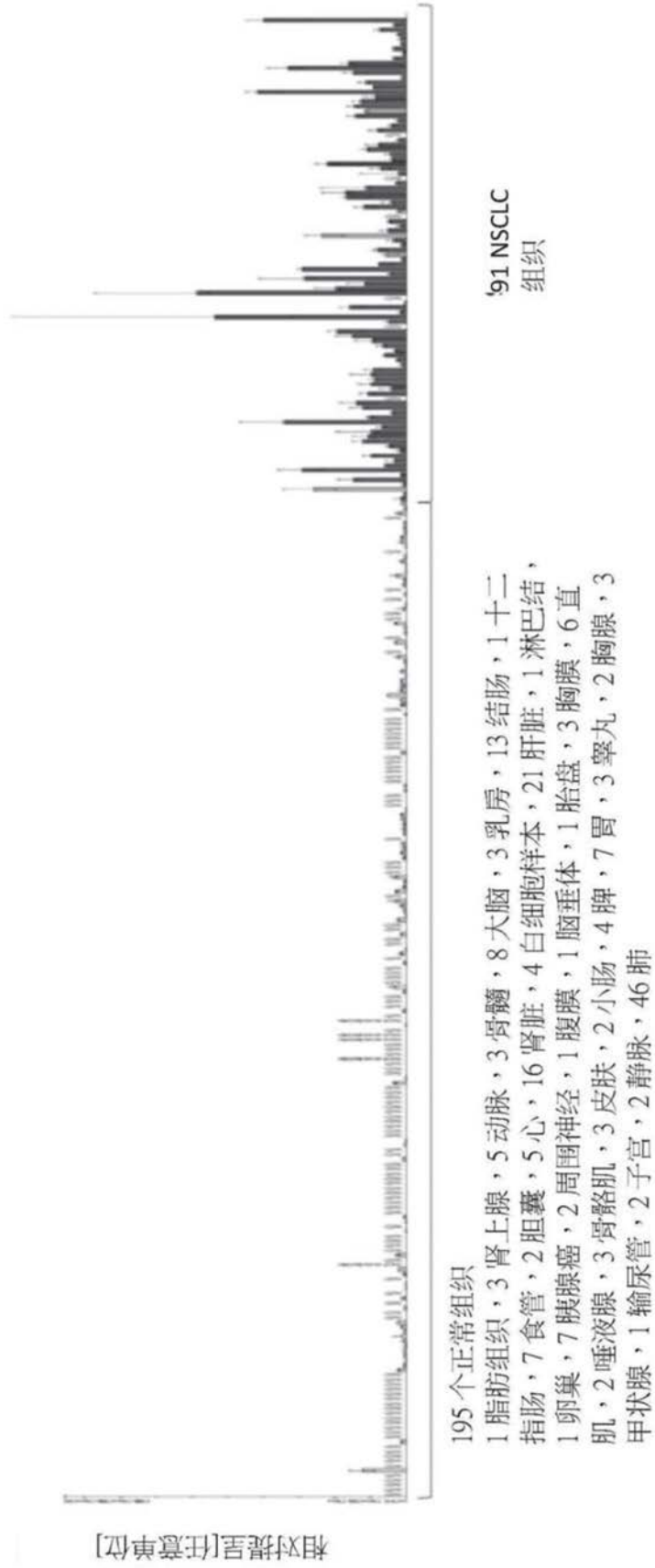


图1B

肽: VYTSWQIPQKF (A*24) SEQ ID NO: 23

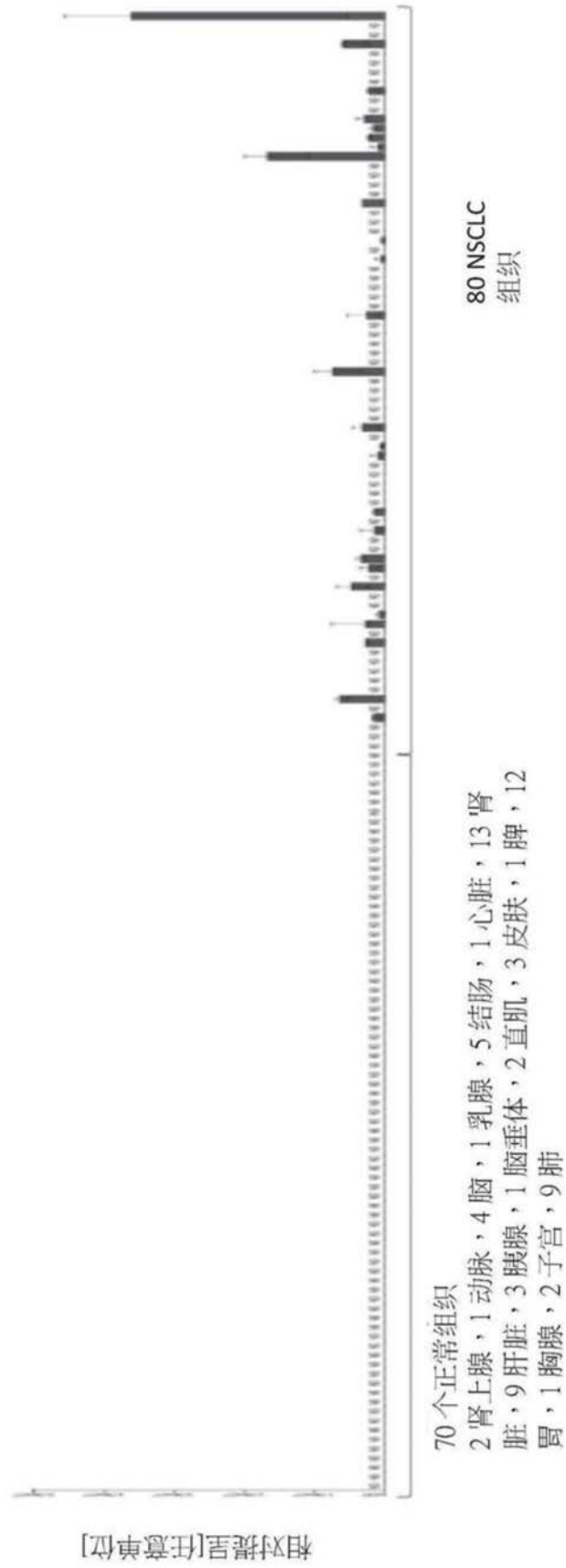


图1C

肽: RYLDLKAIVF (A*24) SEQ ID NO: 28

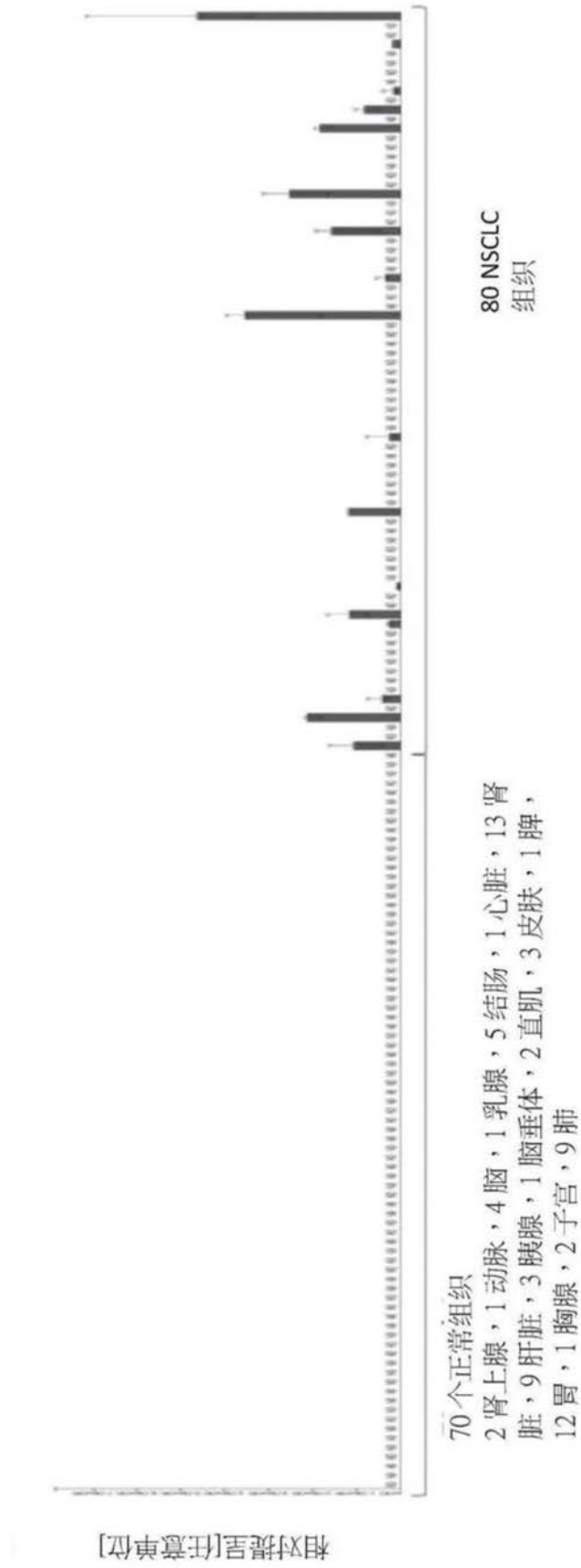
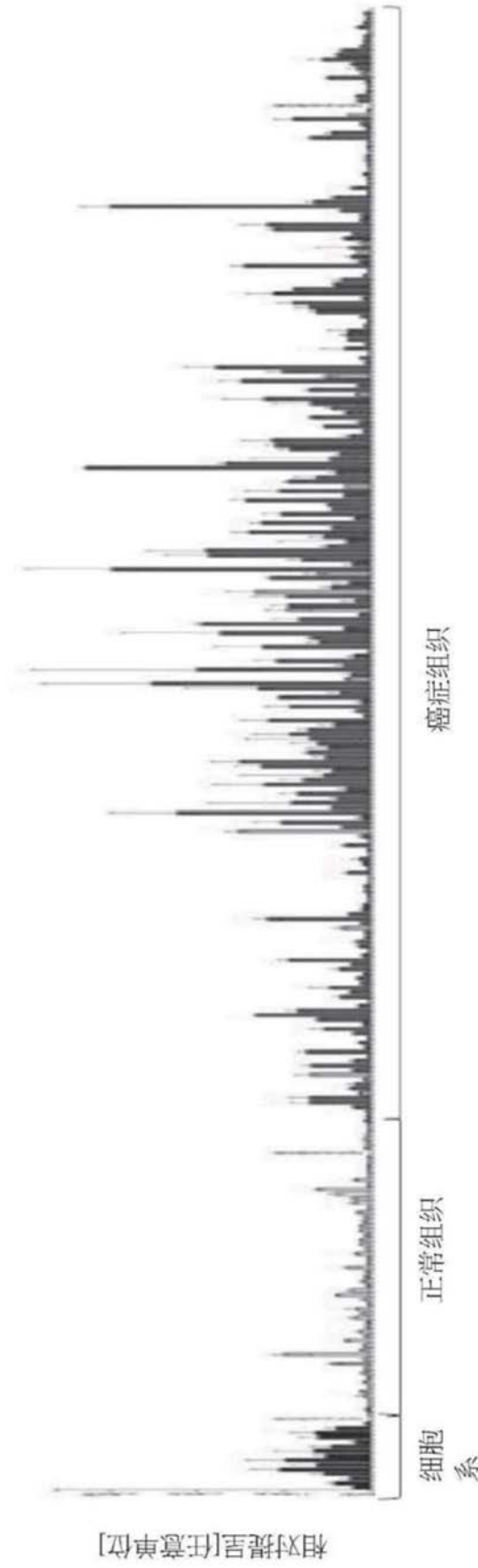


图1D

肽: FVFSFPVSV (A*02) SEQ ID NO: 4

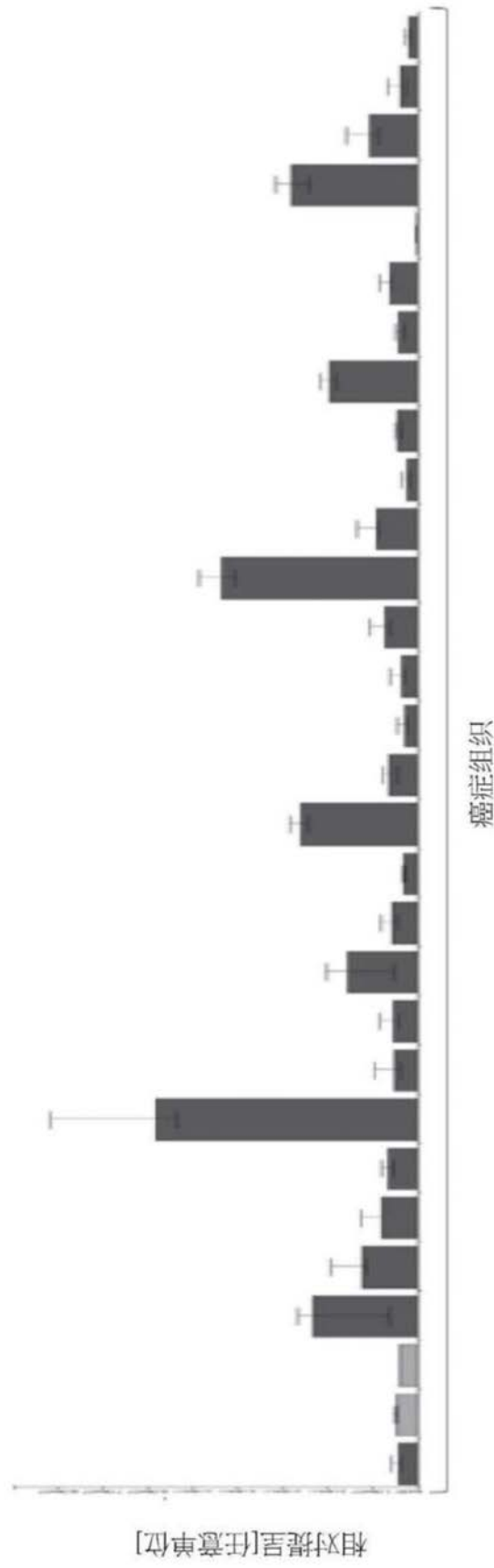


肽检测到在

5 胰腺细胞系, 3 皮肤, 15 正常组织 (2 食管, 7 肺, 3 脾, 3 胃), 126 癌组织 (1 脑癌, 2 乳腺癌, 5 结肠癌, 5 食管癌, 2 胆
 囊癌, 8 肾癌, 5 肝癌, 58 肺癌, 11 卵巢癌, 9 胰腺癌, 2 前列腺癌, 1 直肠癌, 4 皮肤癌, 12 胃癌, 1 睾丸癌) (从左到右)

图1E

肽: YYTKGFALLNF (A*24) SEQ ID NO: 29



肽检测到在
30 癌症组织 (1 脑癌, 3 肾癌, 2 肝癌, 22 肺癌, 2 胃癌) (从左到右)

图1F

肽: RFMDGHITF (A*24) SEQ ID NO: 25

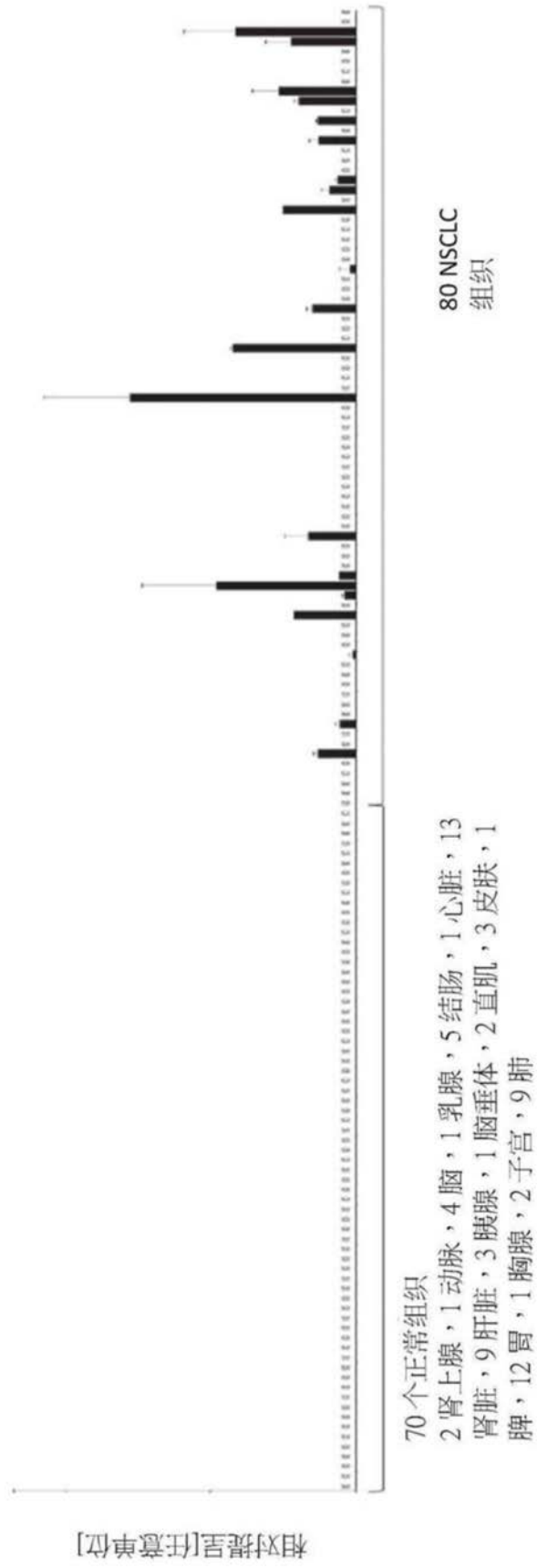


图1G

基因: SMC4

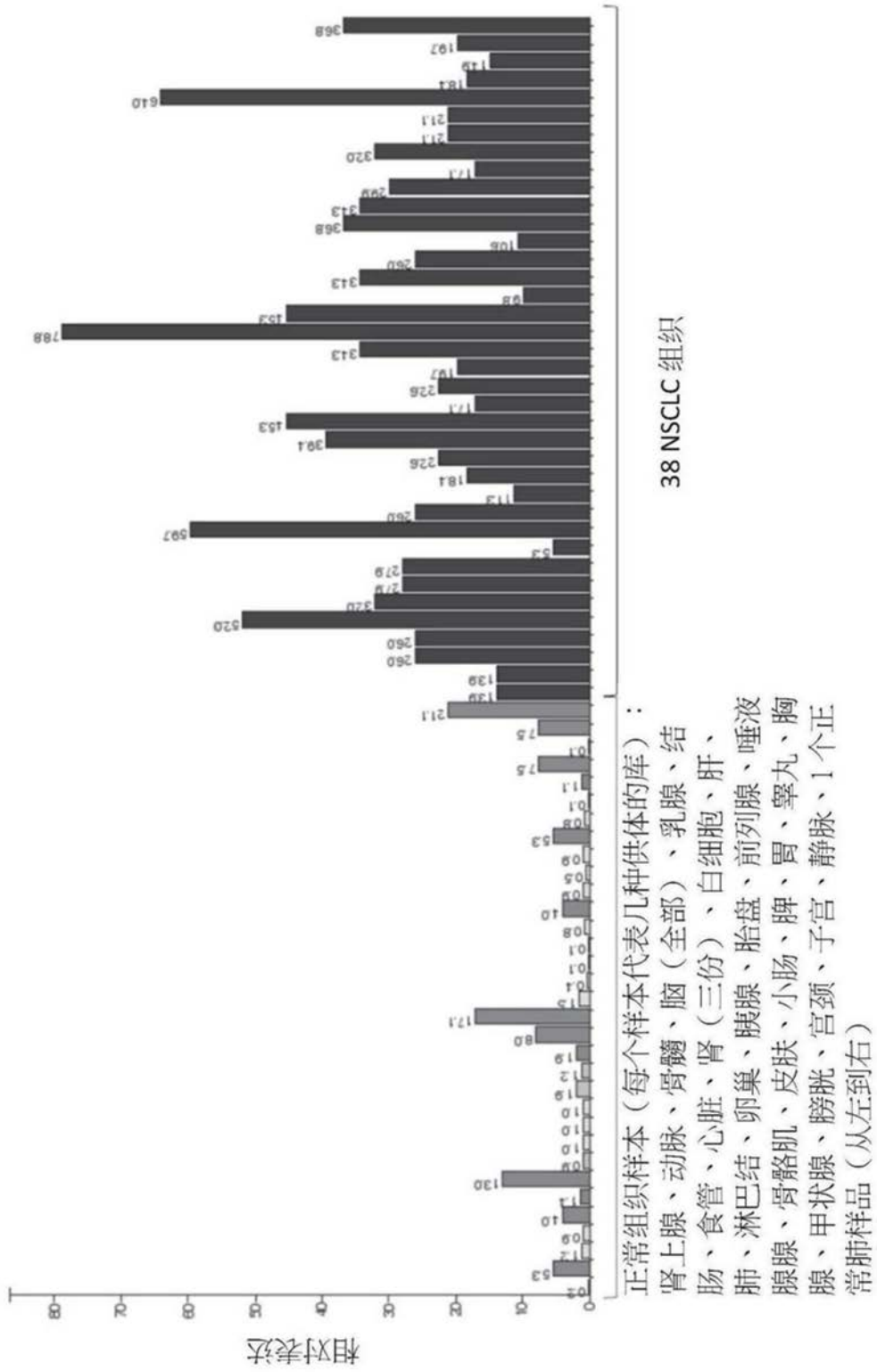


图2A

基因: LAMB3

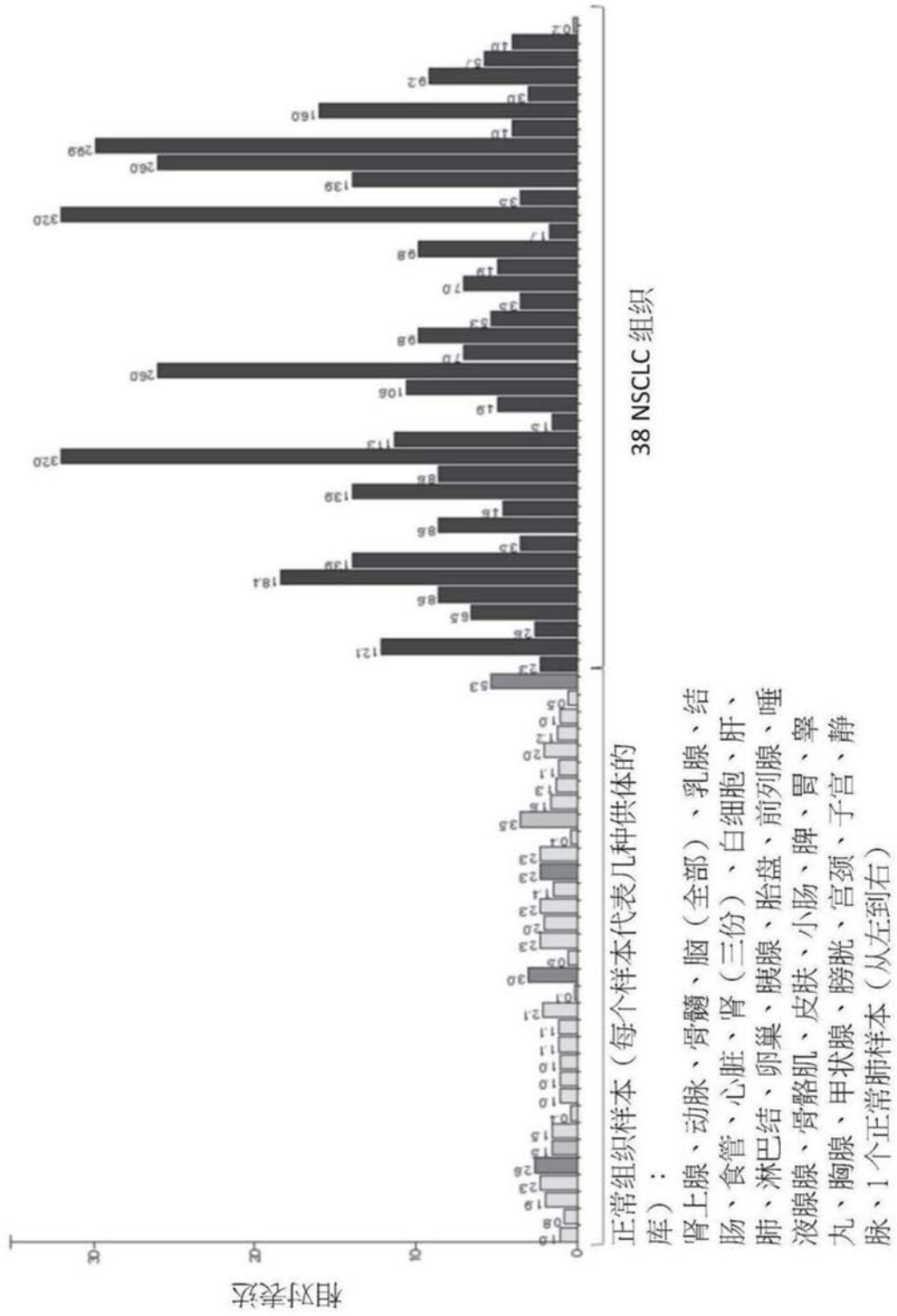


图2B

基因: MMP12

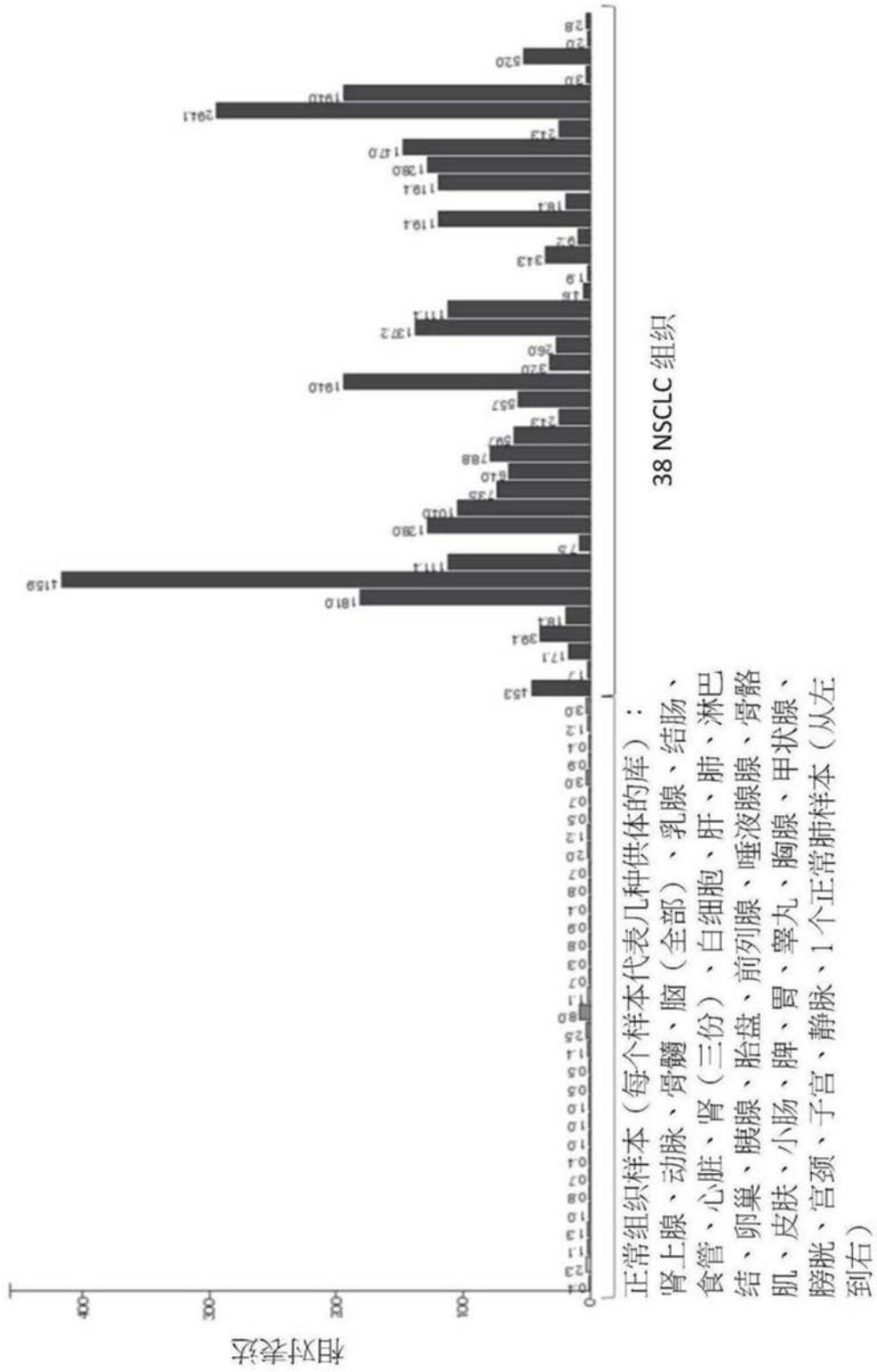


图2C

基因: CENPN

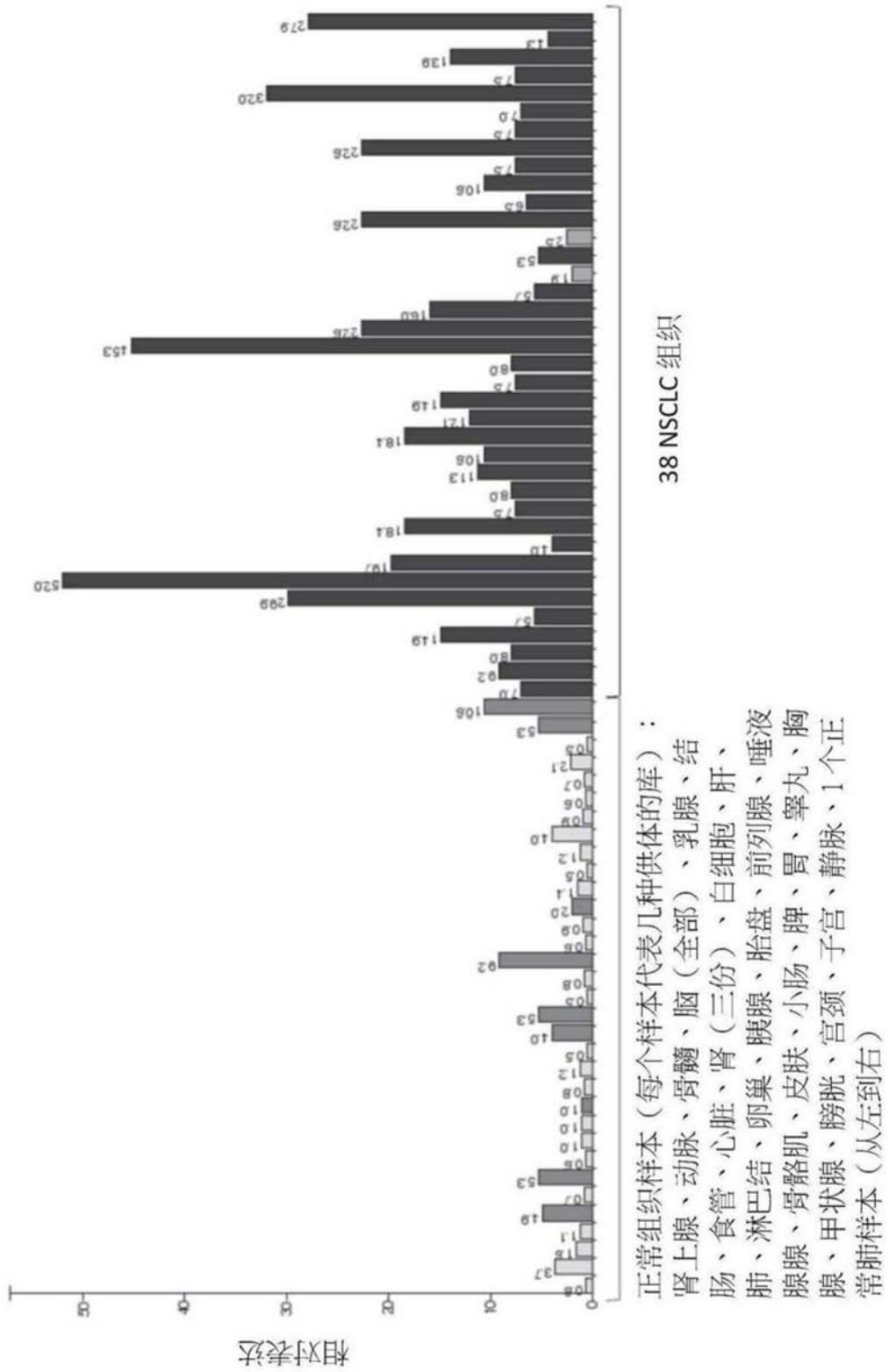


图2D

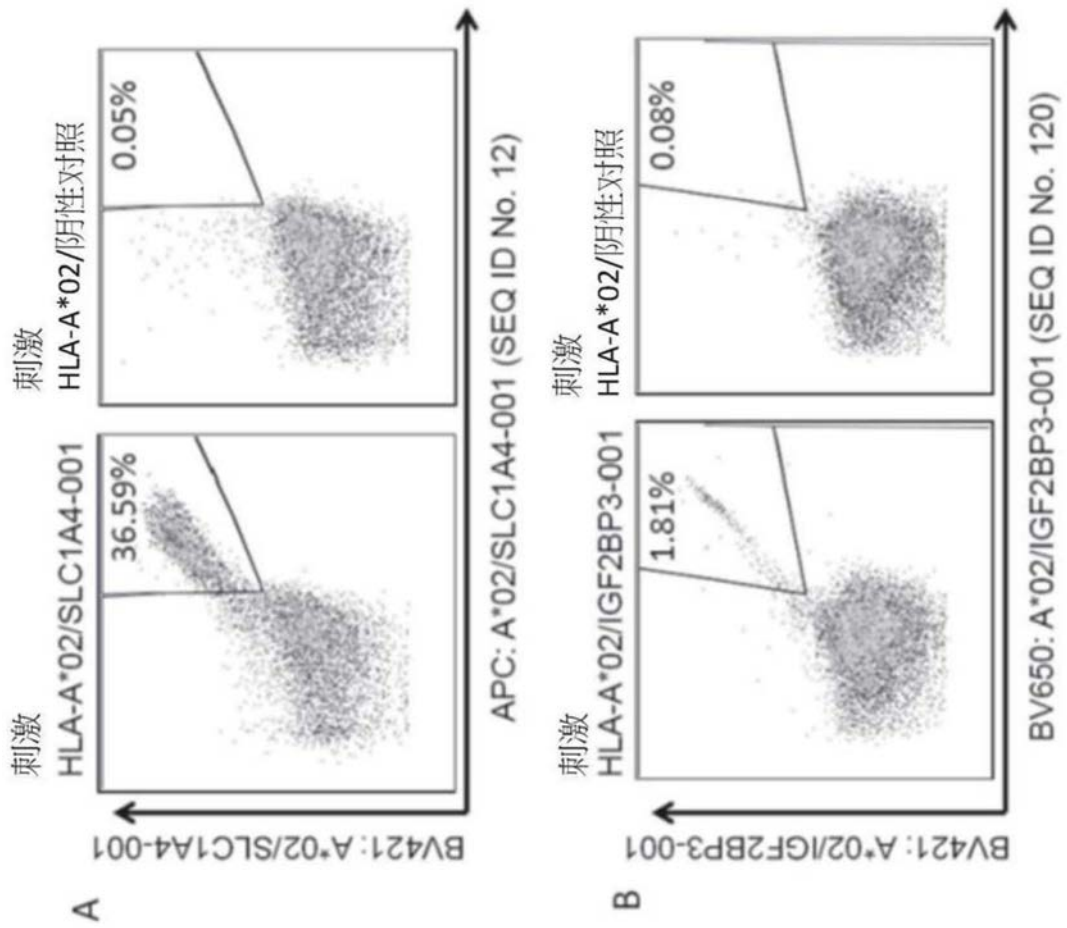


图3

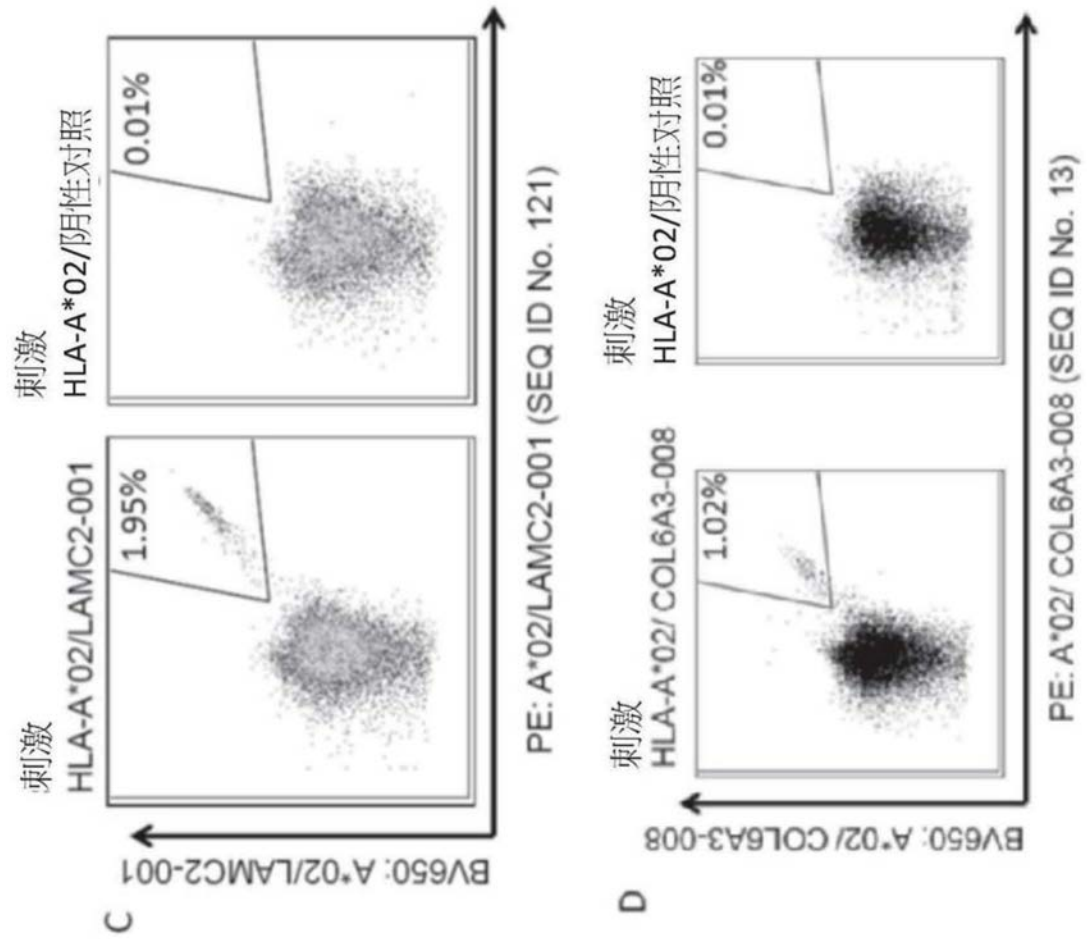


图3(续)

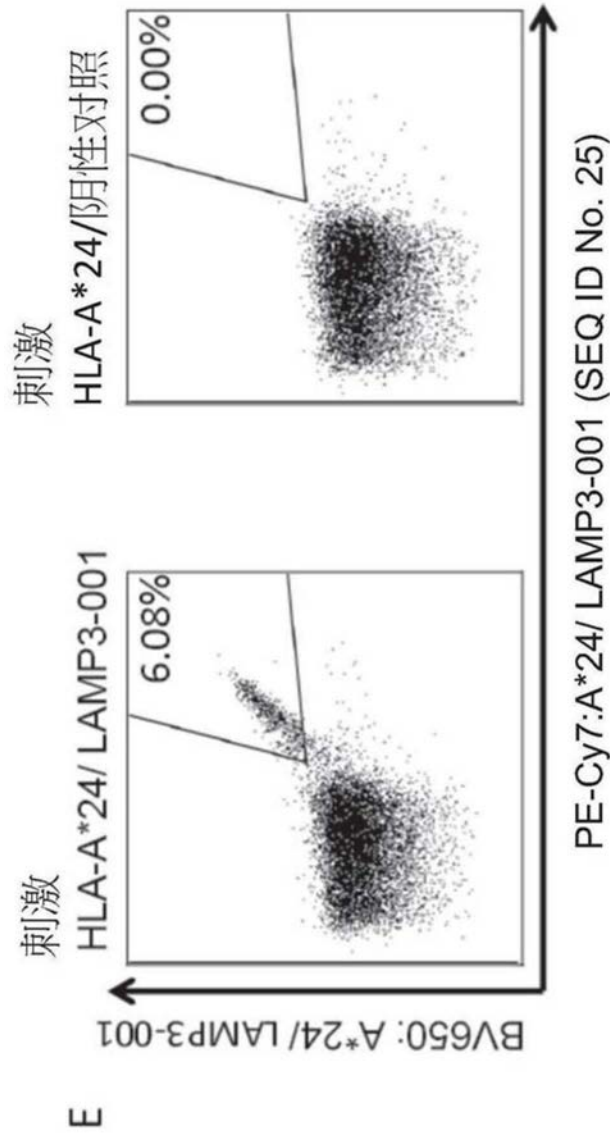


图3(续)

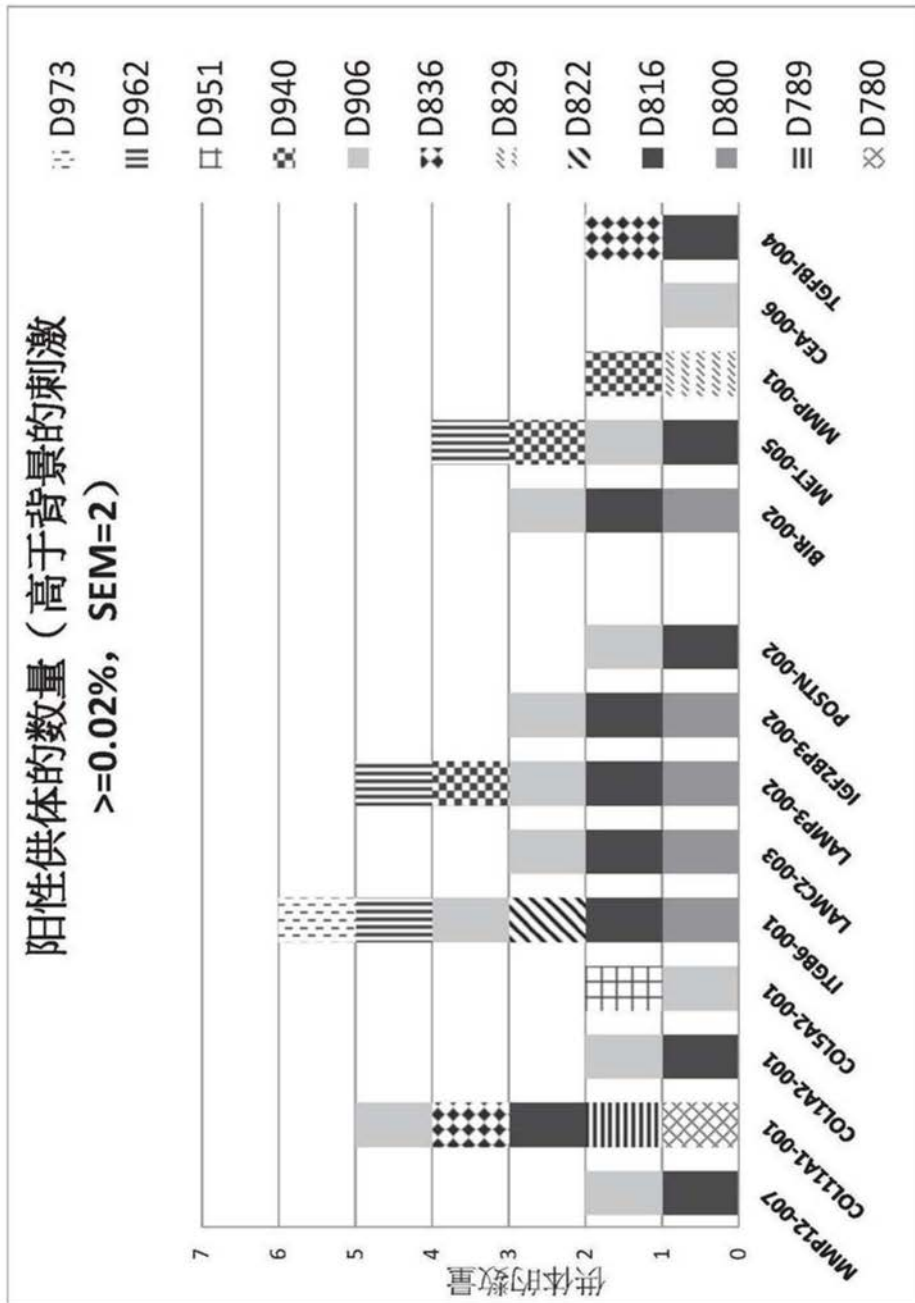


图4

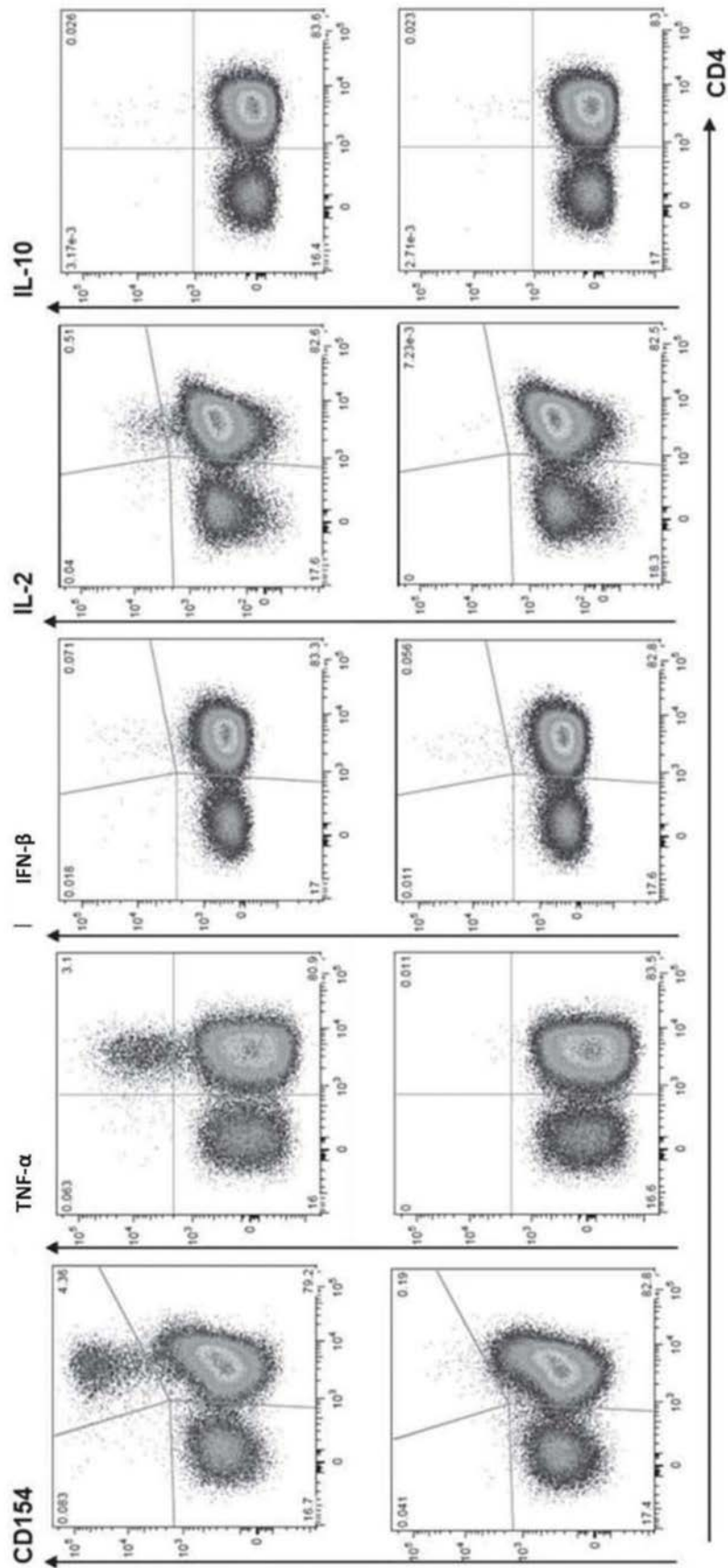


图5

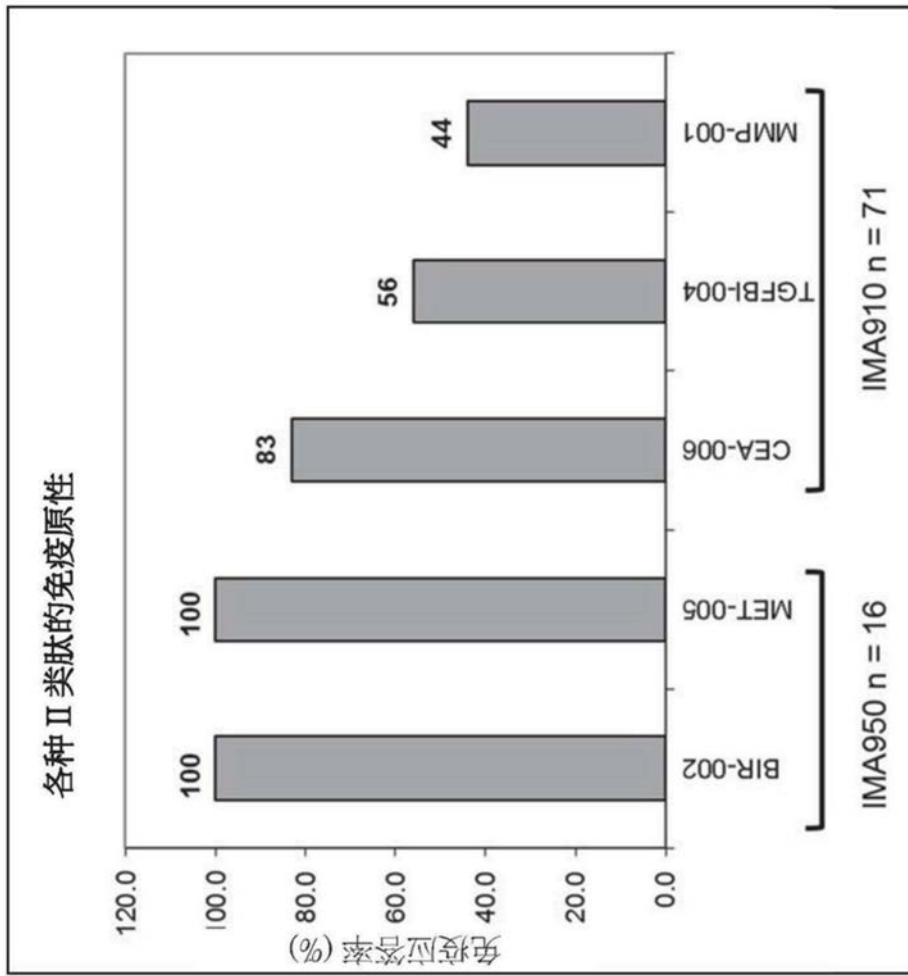


图6