



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104684577 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 03

(21) 申请号 201380014022. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 01. 14

A61K 39/00(2006. 01)

A61K 38/08(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/586, 177 2012. 01. 13 US

61/647, 207 2012. 05. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/021448 2013. 01. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/106834 EN 2013. 07. 18

(71) 申请人 纪念斯隆凯特林癌症中心

地址 美国纽约

(72) 发明人 R·J·奥赖利 E·道布罗维纳

A·塞尔瓦库马尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健

权利要求书2页 说明书70页

序列表36页 附图11页

(54) 发明名称

免疫原性 WT-1 肽及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供肽、免疫原性组合物和疫苗, 以及治疗表达 WT-1 的癌症、降低表达 WT-1 的癌症的发病率和诱导针对表达 WT-1 的癌症的免疫应答的方法, 包括来源于 WT-1 蛋白的肽。

1. 一种分离的 WT-1 肽, 其由选自以下的氨基酸序列组成: AILDFFFFLQ (SEQ ID NO:147), RQRPHPGAL (SEQ ID NO:142), GALRNPTAC (SEQ ID NO:143), THSPTHPPR (SEQ ID NO:146), ASGSEPPQM (SEQ ID NO:151), WNQMNLGATLK (SEQ ID NO:173), PGCLQQPEQQG (SEQ ID NO:149) 和 LDFAPPGASAY (SEQ ID NO:156)。

2. 一种分离的 WT-1 肽, 其由选自以下的氨基酸序列组成: PLPHFPPSL (SEQ ID NO:144), HFPPSLPPT (SEQ ID NO:145), PGCLQQPEQ (SEQ ID NO:148), KLGAAEASA (SEQ ID NO:150), LLAAILDFFL (SEQ ID NO:184), CLQQPEQQGV (SEQ ID NO:185) 和 ALRNPTACPL (SEQ ID NO:191)。

3. 一种分离的 WT-1 肽, 其由选自以下的氨基酸序列组成: RDLNALLPAV (SEQ ID NO:152), GGCALPVSQA (SEQ ID NO:153), GAAQWAPVL (SEQ ID NO:154), LDFAPPGAS (SEQ ID NO:155), SAYGSLGGP (SEQ ID NO:157), PAPPPIPPP (SEQ ID NO:158), ACRYGPFPG (SEQ ID NO:159), SGQARMFPN (SEQ ID NO:160), PSCLESQPA (SEQ ID NO:162), NQGYSTVTF (SEQ ID NO:163), HHAAQFPNH (SEQ ID NO:164), HSFKHEDPM (SEQ ID NO:165), CHTPTDSCT (SEQ ID NO:166), CTGSQALLL (SEQ ID NO:167), TDSCTGSQA (SEQ ID NO:168), RTPYSSDNL (SEQ ID NO:169), NLYQMTSQLE (SEQ ID NO:170), WNQMNLGAT (SEQ ID NO:171), WNQMNLGATLK (SEQ ID NO:173), CMTWNQMNLGATLKG (SEQ ID NO:174), NLGATLKG (SEQ ID NO:175), LGATLKGVA (SEQ ID NO:176), TLGVAAGS (SEQ ID NO:177), GYESDNHTT (SEQ ID NO:178), FMCAYPGCNK (SEQ ID NO:179), KRPFMCAYPGC (SEQ ID NO:180), RKFSRSDHL (SEQ ID NO:181), LKTHTRTHT (SEQ ID NO:182), NMHQRNHTKL (SEQ ID NO:183), QARMFPNAPY (SEQ ID NO:190), ALRNPTACPL (SEQ ID NO:191) 和 APVLDFAAPPASAYG (SEQ ID NO:193)。

4. 一种分离的 WT-1 肽, 其由选自 SEQ ID NO:1-141 的氨基酸序列组成。

5. 一种分离的 WT-1 肽, 其由包括选自 SEQ ID NO:142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、184 和 185 的氨基酸序列的 8-30 个氨基酸组成。

6. 一种分离的 WT-1 肽, 其由包括选自 SEQ ID NO:1-141 的氨基酸序列的 16-30 个氨基酸组成。

7. 权利要求 1-6 中任一项的分离的 WT-1 肽, 其中所述分离的 WT-1 肽结合 HLA I 类分子、HLA II 类分子、或其组合。

8. 一种药物组合物, 其包括权利要求 1-6 中任一项的肽和药学上可接受的载体、媒介物或赋形剂。

9. 一种疫苗, 其包括 (a) 一或多种权利要求 1-6 的分离的 WT-1 肽和 (b) 佐剂或载体。

10. 权利要求 9 的疫苗, 其中所述佐剂是 QS21, 弗氏不完全佐剂, 磷酸铝, 氢氧化铝, BCG, 明矾, 生长因子, 细胞因子, 趋化因子, 白介素, Montanide 或 GM-CSF。

11. 一种治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象或降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发的方法, 所述方法包括给所述对象施用权利要求 9 的疫苗, 从而治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象, 降低对象中表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述表达 WT-1 的癌症是白血病, 促结缔组织增生的小圆细胞瘤, 胃癌, 结肠癌, 肺癌, 乳腺癌, 生殖细胞瘤, 卵巢癌, 子宫癌, 甲状腺癌, 肝癌, 肾癌, 卡波西氏肉瘤, 肉瘤, 肝细胞癌, 维尔姆斯氏瘤, 急性髓性白血病 (AML), 骨髓发育不良综合征 (MDS), 或非小细胞肺癌 (NSCLC)。

13. 一种用于诱导对表达 WT-1 的癌症的细胞特异的 CTL 的形成和增殖的方法, 所述方法包括给所述对象施用权利要求 9 的疫苗, 从而诱导对表达 WT-1 的癌症的细胞特异的 CTL 的形成和增殖。

14. 权利要求 13 的方法, 其中所述表达 WT-1 的癌症是白血病, 促结缔组织增生的小圆细胞瘤, 胃癌, 结肠癌, 肺癌, 乳腺癌, 生殖细胞瘤, 卵巢癌, 子宫癌, 甲状腺癌, 肝癌, 肾癌, 卡波西氏肉瘤, 肉瘤, 肝细胞癌, 维尔姆斯氏瘤, 急性髓性白血病 (AML), 脊髓发育不良综合征 (MDS), 或非小细胞肺癌 (NSCLC)。

15. 一种组合物, 其包括 (a) 抗原呈递细胞和 (b) 权利要求 1-6 中任一项的肽。

16. 权利要求 11-14 中任一项的方法, 其中所述癌症是间皮瘤。

免疫原性 WT-1 肽及其使用方法

[0001] 政府支持

[0002] 本工作得到国立卫生研究院基金 CA23766, CA59350 和 CA08748 的支持。美国政府享有本发明的某些权利。

发明领域

[0003] 本发明提供肽,包括所述肽的组合物和疫苗,以及治疗表达 WT-1 的癌症、降低表达 WT-1 的癌症的发病率和诱导针对表达 WT-1 的癌症的免疫应答的方法,包括施用所述肽、组合物或疫苗。

[0004] 发明背景

[0005] 维尔姆斯瘤 (WT),在新生儿中以 1/10000 频率发生的小儿肾母细胞瘤,数年来已成为大量临床和基础研究的内容。该肿瘤是胚胎来源的;其通常在 5 岁之前的儿童中检测到,可以在单侧或双侧发生。当发育中肾的致密后肾间充质细胞不能正确分化时,WT 出现。维尔姆斯瘤 1(WT-1) 肿瘤抑制基因在 WT 病因学中的参与显示遗传变异可以对发育和肿瘤发生均产生影响。

[0006] 维尔姆斯瘤蛋白 I(WT-1) 是在正常个体发育期间在诸如胎儿肾、睾丸和卵巢中表达的锌指转录因子。在成人中,WT-1 限于造血干细胞、肌上皮祖细胞、肾足细胞以及睾丸和卵巢中的一些细胞中的低水平表达。最近证实了 WT-1 在数种白血病类型中过表达,表明 WT-1 将成为各种癌症免疫疗法的有吸引力的靶标。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供肽、组合物和免疫原性组合物诸如包括免疫原性肽的疫苗,以及治疗表达 WT-1 的癌症、降低表达 WT-1 的癌症的发病率,和诱导针对表达 WT-1 的癌症的免疫应答的方法,包括施用免疫原性肽。

[0009] 在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 WT-1 肽,其具有由序列 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中任一项组成的氨基酸 (AA) 序列。在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 HLA I 类结合 WT-1 肽,其具有由序列 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,190,191 和 193 中任一项组成的氨基酸 (AA) 序列。在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 HLA II 类结合 WT-1 肽,其具有由序列 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180 中任一项组成的氨基酸 (AA) 序列。

[0010] 在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 WT-1 肽,其具有由序列 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 任一项组成的氨基酸 (AA) 序列,或上述任一项的片段。在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 HLA I 类结合 WT-1 肽,其具有由序列 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,190,191 和 193 中任一项组成的氨基酸 (AA) 序列。在一个实施方案

中,本发明提供一种分离的HLA II类结合WT-1肽,其具有由序列SEQ ID NO:149,156,173,174和180中任一项组成的氨基酸(AA)序列。

[0011] 在另一个实施方案中,本发明提供一种包括(a)抗原呈递细胞和(b)选自SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191和193的肽的组合物。在另一个实施方案中,本发明提供一种包括(a)抗原呈递细胞和(b)HLA I类结合肽的组合物,所述HLA I类结合肽选自SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182和183。在另一个实施方案中,本发明提供一种包括(a)抗原呈递细胞和(b)HLA II类结合肽的组合物,所述HLA II类结合肽选自SEQ ID NO:149,156,173,174和180。

[0012] 在另一个实施方案中,本发明提供一种疫苗,其包括SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191和193中的一或多种肽。在另一个实施方案中,本发明提供一种疫苗,其包括选自SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182和183的一或多种HLA I类结合肽。在另一个实施方案中,本发明提供一种疫苗,其包括选自SEQ ID NO:149,156,173,174和180的一或多种HLA II类结合肽。在另一个实施方案中,本发明提供一种疫苗,其包括选自SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182和183的一或多种HLA I类结合肽,和选自SEQ ID NO:149,156,173,174和180的一或多种HLA II类结合肽。

[0013] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有表达WT-1的癌症的对象的方法,所述方法包括给对象施用本发明的WT-1肽或疫苗,从而治疗患有表达WT-1的癌症的对象。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明提供一种在对象中降低表达WT-1的癌症的发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用本发明的WT-1肽或疫苗,从而在对象中降低表达WT-1的癌症的发病率或其复发。

[0015] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导WT-1蛋白特异性CTL的形成和增殖的方法,所述方法包括将淋巴细胞群与本发明的肽或组合物接触,从而诱导WT-1蛋白特异性CTL的形成和增殖。该方法可以在体外、离体或体内进行。当在体外或离体进行时,这些CTL继而可以被输注入患者以达到治疗效果。

[0016] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导(a)WT-1蛋白特异性CD8⁺淋巴细胞;或(b)对WT-1蛋白特异的CD4⁺淋巴细胞、或其组合的形成和增殖的方法,所述方法包括将淋巴细胞群与本发明的肽或组合物接触,从而诱导(a)WT-1蛋白特异性CD8⁺淋巴细胞;或(b)对WT-1蛋白特异的CD4⁺淋巴细胞、或其组合的形成和增殖。该方法可以在体外、离体或体内进行。当在体外或离体进行时,这些CTL继而可以被输注入患者以达到治疗效果。

[0017] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导对象的抗癌免疫应答的方法,所述方法包括将对象与免疫原性组合物接触的步骤,所述免疫原性组合物包括(a)WT-1蛋白;(b)WT蛋白的片段;(c)编码WT-1蛋白的核苷酸分子;或(d)编码WT-1蛋白片段的核苷酸分子,从而诱导对象的抗间皮瘤免疫应答。在一个实施方案中,WT-1蛋白的片段由来自SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191和193的肽组成或包括来自SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191和193的肽。在另一个实施方案中,所述片段由以下肽组成或包括以下肽,所述肽来

自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183,或 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180。

[0018] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a) WT-1 蛋白;(b) WT 蛋白的片段;(c) 编码 WT-1 蛋白的核苷酸分子;或 (d) 编码 WT-1 蛋白片段的核苷酸分子,从而治疗患有间皮瘤的对象。在一个实施方案中,WT-1 蛋白的片段是来自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的肽。在另一个实施方案中,所述片段由以下肽组成或包括以下肽,所述肽来自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183,或 SEQ ID NO:156,173,174 和 180。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低对象的癌症发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a) WT-1 蛋白;(b) WT 蛋白的片段;(c) 编码 WT-1 蛋白的核苷酸分子;或 (d) 编码 WT-1 蛋白片段的核苷酸分子,从而降低对象的间皮瘤发病率或其复发。在一个实施方案中,WT-1 蛋白的片段是来自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的肽。在另一个实施方案中,所述片段由以下肽组成或包括以下肽,所述肽来自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183,或 SEQ IDNO:149,156,173,174 和 180。

[0020] 在另一个实施方案中,癌症是表达 WT-1 的癌症。在一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是急性髓性白血病 (AML)。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症与脊髓发育不良综合征 (MDS) 有关。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是 MDS。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是非小细胞肺癌 (NSCLC)。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是维尔姆斯氏瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是白血病。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是血液癌症。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是淋巴瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是促结缔组织增生的小圆细胞瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是间皮瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是恶性间皮瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是胃癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是结肠癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肺癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是乳腺癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是生殖细胞瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是卵巢癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是子宫癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是甲状腺癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肝细胞癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是甲状腺癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肝癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肾癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是卡波西氏肉瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肉瘤。在另一个实施方案,表达 WT-1 的癌症是任意其他癌或肉瘤。

[0021] 在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是实体瘤。在另一个实施方案中,实体瘤与表达 WT-1 的癌症有关。在另一个实施方案中,实体瘤与脊髓发育不良综合征 (MDS) 有关。

在另一个实施方案中,实体瘤与非小细胞肺癌 (NSCLC) 有关。在另一个实施方案中,实体瘤与肺癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与乳腺癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与结肠直肠癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与前列腺癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与卵巢癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与肾癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与胰腺癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与脑癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与胃肠癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与皮肤癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与黑色素瘤有关。

[0022] 在另一个实施方案中,本发明提供一种包括本发明分离的肽以及至少 1 种其他 WT-1 肽的组合物。在一些实施方案中,提供包括至少 2 种不同的本发明分离的肽的组合物。在一些实施方案中,提供包括至少 3 种或至少 4 种不同的本发明分离的肽的组合物。每种可能性代表本发明单独的实施方案。在一些实施方案中,本发明的组合物是疫苗。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象的方法,所述方法包括给对象施用本发明的肽或组合物,从而治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象。

[0024] 在另一个实施方案中,本发明提供一种在对象中降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用本发明的肽或组合物,从而在对象中降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发。

[0025] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导 WT-1 蛋白特异性 CTL 的形成和增殖的方法,所述方法包括将淋巴细胞群与本发明的肽或组合物接触,从而诱导 WT-1 蛋白特异性 CTL 的形成和增殖。

[0026] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导 (a) WT-1 蛋白特异性 CD8⁺淋巴细胞;或 (b) 对 WT-1 蛋白特异的 CD4⁺淋巴细胞、或其组合的形成和增殖的方法,所述方法包括将淋巴细胞群与本发明的肽或组合物接触,从而诱导 (a) WT-1 蛋白特异性 CD8⁺淋巴细胞;或 (b) 对 WT-1 蛋白特异的 CD4⁺淋巴细胞、或其组合的形成和增殖。

[0027] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种具有至少一个氨基酸变化的本发明肽,所述氨基酸变化增加所述肽结合 HLA 分子的亲和力。

[0028] 本申请要求 2012 年 1 月 13 日提交的系列号为 61/586,177 和 2012 年 5 月 15 日提交的系列号为 61/647,207 的美国临时申请的优先权;这两者均以全文引入本文作为参考。

[0029] 附图简述

[0030] 为使本发明的上述特征、优点和目的以及其他将明显,可以被实现以及可以更详细地被了解,简要概括了本发明的更具体的描述。上述细节可以参考其某些实施方案,其在附图中显示。这些附图构成说明书的一部分。但是应当注意,附图显示本发明优选的实施方案,因此不应被认为限制它们的范围。

[0031] 图 1A-D 显示通过用加载 WT-1 来源的十五肽总库的自体 APC 刺激,从正常供体 (n = 56) 的 PBMC 产生的 CTL 的 WT-1 特异性应答;

[0032] 图 2A-E 描述用于产生跨越 WT-1 蛋白全序列的重叠十五肽的总库和表位定位的策略;

[0033] 图 3A-D 显示在与加载于自体 CAM 上的重叠 15-聚体的 WT-1 总库共培养 40 天后,WT-1 CTL 中针对来源于 WT-1 蛋白的相同免疫优势肽 (immunodominant peptide) 序列的组合 HLA I 类和 II 类限制性 WT-1 特异性 T 细胞应答;

[0034] 图 4A-F 显示 WT-1 的图式;和

[0035] 图 5 描述在 8 个正常 A0201+ 供体中使用加载于 A0201-AAPC 上的混合 A0201 表位的结果。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明提供免疫原性肽,和包括免疫原性肽的组合物和疫苗,以及治疗表达 WT-1 的癌症、降低表达 WT-1 的癌症的发病率和诱导针对表达 WT-1 的癌症的免疫应答的方法,包括施用一或多种免疫原性肽。

[0038] 本发明提供 WT-1 肽,以及治疗表达 WT-1 的癌症、降低表达 WT-1 的癌症的发病率和诱导针对表达 WT-1 的癌症的免疫应答的方法,包括免疫原性肽。

[0039] 在另一个实施方案中,作为本发明肽来源的 WT-1 分子具有以下序列:

[0040] 1 SRQRPHPGAL RNPTACPLPH FPPSLPPTH S PTHPPRAGTA AQAPGPRRL

[0041] 51 AAILDFLLQ DPASTCVPEP ASQHTLRSGP GCLQQPEQQG VRDPGGIWAK

[0042] 101 LGAAEASAER LQRRSRGAS GSEPQQMGSD VRDLNALLPA VPSLGGGGG

[0043] 151 ALPVSAAQW APVLDFAAPP ASAYGSLGGP APPPAPPPPP PPPHFSFIKQ

[0044] 201 EPSWGAEPH EEQCLSAFTV HFSGQFTGTA GACRYGPFPG PPPSQASSGQ

[0045] 251 ARMFPNAPYL PSCLESQPAI RNQGYSTVTF DGTPSYGHTP SHHAAQFPNH

[0046] 301 SFKHEDPMGQ QGSLGEQQYS VPPVYGCHT PTDSCTGSQA LLLRTPYSSD

[0047] 351 NLYQMTSQLE CMTWNQMN LGATLKGVAAGS SSSVKWTEGQ SNHSTGYESD

[0048] 401 NHTTPILCGA QYRIHTHGVF RGIQDVRVP GVAPTLVRS SETSEKRPFM

[0049] 451 CAYPGCNKRY FKLSHLQMS RKHTGEKPYQ CDFKDCERRF SRSDQLKRHQ

[0050] 501 RRHTGVKPFQ CKTCQRKFSR SDHLKTHTRT HTGKTSEKPF SCRWPSCQKK

[0051] 551 FARSDLV RH HNMHQRNMTK LQLAL (SEQ ID NO:194)

[0052] WT-1 蛋白的上述序列是由 Gessler 等人 (37) 公开的那些,其包括 575 个氨基酸,并包括在 WT-116 的 (外显子 5+, KTS+) 同种型中缺失的 N 端前 126 个氨基酸。

[0053] 在另一个实施方案中,WT-1 序列是:

[0054] MGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGALPVSAAQWAPVLDFAAPPASAYGSLGGPAPPAPP

[0055] PPHHFSFIKQEPSWGAEPHEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPPSQASSGQA

[0056] RMFPNAPYLPSCLESQPAIRNQGYSTVTFDGTPSYGHTPSHHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGS

[0057] LGEQQYSVPPVYGCHTPTDSCTGSQALLLRTPYSSDNLYQMTSQLECMWNQMN LGATLKG

[0058] VAAAGSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHTHGVFRG IQDVRVPGVAPTL

[0059] VRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMSRKHTGEKPYQCDFKDCERRFSRSDQLK

[0060] RHQRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTHTGKTSEKPFSCRWPSCQKKFARSDLV

[0061] HNMHQRNMTKLQLAL (GenBank 登录号 AY245105 ;SEQ ID NO:195)。

[0061] 在另一个实施方案中,WT-1 分子具有序列:

[0062] AAESAERLQRRSRGASGSEPQQMGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGALPVSAAQWAP

[0063] VLDFAAPPASAYGSLGGPAPPAPPAPPAPPAPPAPPAPPAPPAPPAPPAPPAPPAPPAPP

[0064] TGTAGACRYGPFPPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSCLESQPAIRNQGYSTVTFDGTPSYGHT

[0065] PSHHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPVYGCHTPTDSCTGSQALLLRTPYSSDN

[0066] LYQMTSQLECMWNQMN LGATLKGHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHTHGVFRG IQDVRVP

[0067] PGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRF
[0068] SRSDQLKRHRRRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTHTGEKPFSCRWPSCQKKFARS
DELVRHHNMHQ RNMTKLQLAL (GenBank 登录号 NM_000378 ;SEQ ID NO:196)。

[0069] 在另一个实施方案中,WT-1 分子具有序列:

[0070] MQDPASTCVPEPASQHTLRSGPGCLQQPEQQGVRDPGGIWAKLGAAEASAERLQGRRSRGA
[0071] SGSEPQQMGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGCALPVSGAAQWAPVLDFAFPPGASAYGSLGGP
[0072] APPPAPPPPPPPPHSFYKQEPSWGAEPHEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPPPSQ
[0073] ASSGQARMFPNAPYLPSCLSQPAIRNQGYSTVTFDGTSPSYGHTPSHHAQFPNHSFKHEDP
[0074] MGQQGSLGEQQYSVPPPVYGCHTPTDSTGSAQLLLRTPYSSDONLYQMTSQAECMTWNQM
[0075] NLGATLKGVAAGSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNTTPILCGAQYRIHTHGVRFGIQDVRV
[0076] PGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRF
[0077] SRSDQLKRHRRRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTHTGEKPFSCRWPSCQKKFARS
DELVRHHNMHQ RNMTKLQLAL (GenBank 登录号 NP_077742 ;SEQ ID NO:197)。

[0078] 在另一个实施方案中,WT-1 蛋白具有 GenBank 登录号 NM_024426 所示的序列。在其他实施方案中,WT-1 蛋白具有或包括下列序列条目之一所示的一条序列:NM_024425, NM_024424, NM_000378, S95530, D13624, D12496, D 12497, 或 X77549。在另一个实施方案中,WT-1 蛋白具有本领域已知的任意其他 WT-1 序列。本发明提供肽、组合物和免疫原性组合物诸如包括免疫原性肽的疫苗,以及治疗表达 WT-1 的癌症、降低表达 WT-1 的癌症的发病率和诱导针对表达 WT-1 的癌症的免疫应答的方法,包括施用免疫原性肽。

[0079] 在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 WT-1 肽,其具有由序列 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中任一项组成的氨基酸 (AA) 序列。在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 HLA I 类结合 WT-1 肽,其具有由序列 SEQ ID NO:142,143,144,145, 146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165, 166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183 中任一项组成的氨基酸 (AA) 序列。在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 HLA II 类结合 WT-1 肽,其具有由序列 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180 中任一项组成的氨基酸 (AA) 序列。在另一个实施方案中,HLA I 类肽由 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151 组成或包括 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151,以及 HLA II 类肽由 SEQ ID NO :149 组成或包括 SEQ ID NO :149。

[0080] 在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 WT-1 肽或其片段,所述分离的 WT-1 肽具有包括序列 SEQ ID NO:1-53 或 43-XXX 中任一项的氨基酸 (AA) 序列。在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 HLA I 类结合 WT-1 肽,其具有包括序列 SEQ ID NO:142,143, 144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163, 164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183 中任一项的氨基酸 (AA) 序列。在一个实施方案中,本发明提供一种分离的 HLA II 类结合 WT-1 肽,其具有包括序列 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180 中任一项的氨基酸 (AA) 序列。在另一个实施方案中,HLA I 类肽由 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151 组成或包括 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151,以及 HLA II 类肽由 SEQ ID NO :149 组成或包括 SEQ ID NO :149。

[0081] 在另一个实施方案中,本发明提供一种包括 (a) 抗原呈递细胞和 (b) 选自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 的肽的组合物。在另一个实施方案中,本发明提供一种包括 (a) 抗原呈递细胞和 (b)HLA I 类结合肽的组合物,所述 HLA I 类结合肽选自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183。在另一个实施方案中,本发明提供一种包括 (a) 抗原呈递细胞和 (b)HLA II 类结合肽的组合物,所述 HLA II 类结合肽选自 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180。在另一个实施方案中,HLA I 类肽由 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151 组成或包括 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151,以及 HLA II 类肽由 SEQ ID NO :149 组成或包括 SEQ ID NO :149。

[0082] 在另一个实施方案中,本发明提供一种疫苗,其包括 SEQ ID NO :1-160,162-185,190,191 和 193 中的一或多种肽。在另一个实施方案中,本发明提供一种疫苗,其包括选自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183 的一或多种 HLA I 类结合肽。在另一个实施方案中,本发明提供一种疫苗,其包括选自 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180 的一或多种 HLA II 类结合肽。在另一个实施方案中,本发明提供一种疫苗,其包括选自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183 的一或多种 HLA I 类结合肽,和选自 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180 的一或多种 HLA II 类结合肽。在另一个实施方案中,HLA I 类肽由 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151 组成或包括 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151,以及 HLA II 类肽由 SEQ ID NO :149 组成或包括 SEQ ID NO :149。

[0083] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 肽或疫苗,从而治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象。

[0084] 在另一个实施方案中,本发明提供一种在对象中降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 肽或疫苗,从而在对象中降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发。

[0085] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导对象的抗癌免疫应答的方法,所述方法包括将对象与免疫原性组合物接触的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a)WT-1 蛋白;(b) WT 蛋白的片段;(c) 编码 WT-1 蛋白的核苷酸分子;或 (d) 编码 WT-1 蛋白片段的核苷酸分子,从而诱导对象的抗间皮瘤免疫应答。在一个实施方案中,WT-1 蛋白的片段由来自 SEQ ID NO :1-160,162-185,190,191 和 193 的肽组成或包括来自 SEQ ID NO :1-160,162-185,190,191 和 193 的肽。在另一个实施方案中,所述片段由以下肽组成或包括以下肽,所述肽来自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183,或 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180。

[0086] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a)WT-1 蛋白;(b)WT 蛋白

的片段 ;(c) 编码 WT-1 蛋白的核苷酸分子 ;或 (d) 编码 WT-1 蛋白片段的核苷酸分子,从而治疗患有间皮瘤的对象。在一个实施方案中,WT-1 蛋白的片段是来自 SEQ ID NO :1-160, 162-185,190,191 和 193 的肽。在另一个实施方案中,所述片段由以下肽组成或包括以下肽,所述肽来自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154, 155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175, 176,177,178,179,180,181,182 和 183,或 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180。在另一个实施方案中,HLA I 类肽由 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151 组成或包括 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151,以及 HLA II 类肽由 SEQ ID NO :149 组成或包括 SEQ ID NO :149。

[0087] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低对象的癌症发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a)WT-1 蛋白 ;(b)WT 蛋白的片段 ;(c) 编码 WT-1 蛋白的核苷酸分子 ;或 (d) 编码 WT-1 蛋白片段的核苷酸分子,从而降低对象的间皮瘤发病率或其复发。在一个实施方案中,WT-1 蛋白的片段是来自 SEQ ID NO :1-160,162-185,190,191 或 193 的肽。在另一个实施方案中,所述片段由以下肽组成或包括以下肽,所述肽来自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150, 151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170, 171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183,或 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180。在另一个实施方案中,HLA I 类肽由 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148, 150 或 151 组成或包括 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151,HLA II 类肽由 SEQ ID NO :149 组成或包括 SEQ ID NO :149。

[0088] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 肽或疫苗,从而治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象。

[0089] 在另一个实施方案中,本发明提供一种在对象中降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 肽或疫苗,从而在对象中降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发。

[0090] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导对象的抗癌免疫应答的方法,所述方法包括将对象与免疫原性组合物接触的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a)WT-1 蛋白 ;(b) WT 蛋白的片段 ;(c) 编码 WT-1 蛋白的核苷酸分子 ;或 (d) 编码 WT-1 蛋白片段的核苷酸分子,从而诱导对象的抗间皮瘤免疫应答。在一个实施方案中,WT-1 蛋白的片段是来自 SEQ ID NO :1-160,162-185,190,191 或 193 的肽。在另一个实施方案中,所述片段由以下肽组成或包括以下肽,所述肽来自 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152, 153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173, 174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183,或 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180。在另一个实施方案中,HLA I 类肽由 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151 组成或包括 SEQ ID NO :142,143,144,145,146,147,148,150 或 151,HLA II 类肽由 SEQ ID NO :149 组成或包括 SEQ ID NO :149。

[0091] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a)WT-1 蛋白 ;(b)WT 蛋白的片段 ;(c) 编码 WT-1 蛋白的核苷酸分子 ;或 (d) 编码 WT-1 蛋白片段的核苷酸分子,从而

治疗患有间皮瘤的对象。在一个实施方案中, WT-1 蛋白的片段是来自 SEQ ID NO :1-160, 162-185, 190, 191 或 193 的肽。

[0092] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种降低对象的癌症发病率或其复发的方法, 所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤, 所述免疫原性组合物包括 (a) WT-1 蛋白; (b) WT 蛋白的片段; (c) 编码 WT-1 蛋白的核苷酸分子; 或 (d) 编码 WT-1 蛋白片段的核苷酸分子, 从而降低对象的间皮瘤发病率或其复发。在一个实施方案中, WT-1 蛋白的片段是来自 SEQ ID NO :1-160, 162-185, 190, 191 或 193 的肽。

[0093] 在另一个实施方案中, 癌症是表达 WT-1 的癌症。在一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是急性髓性白血病 (AML)。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症与脊髓发育不良综合征 (MDS) 有关。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是 MDS。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是非小细胞肺癌 (NSCLC)。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是维尔姆斯氏瘤。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是白血病。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是血液癌症。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是淋巴瘤。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是促结缔组织增生的小圆细胞瘤。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是间皮瘤。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是恶性间皮瘤。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是胃癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是结肠癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是肺癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是乳腺癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是生殖细胞瘤。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是卵巢癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是子宫癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是甲状腺癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是肝细胞癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是甲状腺癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是肝癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是肾癌。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是卡波西氏肉瘤。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是肉瘤。在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是任意其他癌症或肉瘤。

[0094] 在另一个实施方案中, 表达 WT-1 的癌症是实体瘤。在另一个实施方案中, 实体瘤与表达 WT-1 的癌症有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与脊髓发育不良综合征 (MDS) 有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与非小细胞肺癌 (NSCLC) 有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与肺癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与乳腺癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与结肠直肠癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与前列腺癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与卵巢癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与肾癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与胰腺癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与脑癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与胃肠癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与皮肤癌有关。在另一个实施方案中, 实体瘤与黑色素瘤有关。

[0095] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种包括本发明分离的肽以及至少 1 种其他 WT-1 肽的组合物。在一些实施方案中, 提供包括至少 2 种不同的本发明分离的肽的组合物。在一些实施方案中, 提供包括至少 3 种或至少 4 种不同的本发明分离的肽的组合物。每种可能性代表本发明单独的实施方案。在一些实施方案中, 本发明的组合物是疫苗。

[0096] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象的方法, 所述方法包括给对象施用本发明的肽或组合物, 从而治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象。

[0097] 在另一个实施方案中,本发明提供一种在对象中降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用本发明的肽或组合物,从而在对象中降低表达 WT-1 的癌症的发病率或其复发。

[0098] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导 WT-1 蛋白特异性 CTL 的形成和增殖的方法,所述方法包括将淋巴细胞群与本发明的肽或组合物接触,从而诱导 WT-1 蛋白特异性 CTL 的形成和增殖。

[0099] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导 (a)WT-1 蛋白特异性 CD8⁺淋巴细胞;或 (b) 对 WT-1 蛋白特异的 CD4⁺淋巴细胞,或其组合的形成和增殖的方法,所述方法包括将淋巴细胞群与本发明的肽或组合物接触,从而诱导 (a)WT-1 蛋白特异性 CD8⁺淋巴细胞;或 (b) 对 WT-1 蛋白特异的 CD4⁺淋巴细胞,或其组合的形成和增殖。

[0100] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种具有至少一个氨基酸变化的本发明肽,所述氨基酸变化增加所述肽结合 HLA 分子的亲和力。

[0101] 在本发明方法和组合物的另一个实施方案中,“肽”是指通过肽键连接的亚单位氨基酸的化合物。在另一个实施方案中,肽包括氨基酸类似物。在另一个实施方案中,肽包括模拟肽。将在下文列举可以包括在本发明方法和组合物的肽中的不同氨基酸类似物和模拟肽。在另一个实施方案中,亚单位通过肽键连接。在另一个实施方案中,亚单位通过另一类型的键(例如酯键,醚键,等等)连接。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0102] 本发明未改变的肽(如上下文所述)在本文中被统称为“WT-1 肽”。下文中针对“WT-1 肽”列举的每一实施方案适用于本发明未改变的 WT-1 肽和 HLA I 类和 II 类变态(heteroclitic)肽。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0103] 在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合 HLA I 类分子或 II 类分子。在另一个实施方案中,所述肽与 I 类和 II 类分子均结合。在另一个实施方案中,HLA II 类分子是 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,HLA II 类分子是 HLA-DRA 分子。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA-DQA1 分子。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA-DQB1 分子。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA-DPA1 分子。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA-DPB1 分子。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA-DMA 分子。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA-DMB 分子。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA-DOA 分子。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA-DOB 分子。在另一个实施方案,HLA 分子是本领域已知的任意其他 HLA II 类分子。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0104] 在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-A 分子,其结合模体(motif)包含于或包括本发明的肽。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-B 分子。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-C 分子。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-A0201 分子。在另一个实施方案,分子是 HLA A1。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA A2。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA A2.1。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA A3。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA A3.2。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA A11。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA A24。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA B7。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA B27。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA B8。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0105] 在另一个实施方案中,本发明方法和组合物的 HLA I 类分子-结合 WT-1 肽与 HLA

I 类分子的超家族结合。在另一个实施方案中,所述超家族是 A2 超家族。在另一个实施方案中,所述超家族是 A3 超家族。在另一个实施方案中,所述超家族是 A24 超家族。在另一个实施方案中,所述超家族是 B7 超家族。在另一个实施方案中,所述超家族是 B27 超家族。在另一个实施方案中,所述超家族是 B44 超家族。在另一个实施方案中,所述超家族是 C1 超家族。在另一个实施方案中,所述超家族是 C4 超家族。在另一个实施方案中,所述超家族是本领域已知的任意其他超家族。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0106] 在另一个实施方案中,HLA 分子是 A0101, A0201, A0203, A2402, A6901, B0702, A3101, B3501, B3503, B3508, B3802, B3801, B3901, B4001, B4402, B4701, B5701, C0401, C1701, DRB₁0101, DRB₁0402, DRB₁0402, DRB₁0401 或 DRB₁1104 分子。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182 和 183,以及 SEQ ID NO:149,156,173,174 和 180 的肽,与表 1 或 2 中针对每种肽描述的 HLA I 类或 II 类分子结合。在另一个实施方案中,HLA I 类肽由 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,150 或 151 组成或包括 SEQ ID NO:142,143,144,145,146,147,148,150 或 151,HLA II 类肽由 SEQ ID NO:149 组成或包括 SEQ ID NO:149,并且与表 1 或表 2 中针对每种肽的相应一或多种 HLA 分子结合。在一个实施方案中,某些肽可以结合一种以上的 HLA 等位基因。

[0107] 在另一个实施方案中,提供本发明肽的修饰。在一个实施方案中,所述修饰包括至少一个变态氨基酸变化,也称为突变或突变的,或锚定残基突变(见下文)。相对于肽的未突变对应物,本发明修饰肽的 HLA I 类分子结合模体显示对 HLA I 类分子的亲和力增加。在另一个实施方案中,点突变增加分离的突变 WT-1 肽对 HLA I 类分子的亲和力。在另一个实施方案中,亲和力增加是相对于分离的未突变 WT-1 肽的亲和力(针对相同 HLA I 类分子),所述分离的突变 WT-1 肽来自所述分离的未突变 WT-1 肽。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0108] 在另一个实施方案中,将本发明方法和组合物的 WT-1 肽设计为显示针对 HLA 分子的亲和力。在另一个实施方案中,亲和力是如本文描述的高亲和力。

[0109] HLA 分子,在另一个实施方案中已知作为主要组织相容性复合体(MHC)分子,与肽结合并将它们呈递给免疫细胞。因此,在另一个实施方案中,肽的免疫原性是由其针对 HLA 分子的亲和力部分决定的。HLA I 类分子与 CD8 分子相互作用,所述 CD8 分子通常存在于细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)上。HLA II 类分子与 CD4 分子相互作用,所述 CD4 分子通常存在于辅助 T 淋巴细胞上。

[0110] 在另一个实施方案中,本发明的肽是免疫原性的。在另一个实施方案中,“免疫原性”是指刺激、引发或参与免疫应答的能力。在另一个实施方案中,引发的免疫应答是细胞介导的免疫应答。在另一个实施方案中,免疫应答是细胞介导应答和体液应答的组合。

[0111] 在另一个实施方案中,与 MHC 分子-肽复合物结合的 T 细胞被活化和诱导以增殖并裂解表达包括所述肽的蛋白的细胞。通常最初 T 细胞被“专业的”抗原呈递细胞(“APC”;例如树突状细胞,单核细胞,和巨噬细胞)活化,所述抗原呈递细胞呈递共刺激分子,它们促使 T 细胞活化而不是无反应或凋亡。在另一个实施方案中,如本文所述,应答是变态的,这样的话 CTL 裂解肿瘤细胞,所述肿瘤细胞表达与本发明肽具有 AA 序列同源性的蛋白或与

最初刺激 T 细胞的肽不同的肽。

[0112] 在另一个实施方案中,本发明的肽与 T 细胞接触诱导其分化为效应和 / 或记忆 T 细胞。效应或记忆 T 细胞与相同肽的后续接触,或,在另一个实施方案中,与本发明相关肽的接触,导致更快和更强烈的免疫应答。在另一个实施方案中,通过测量暴露于肽的 T 细胞群体的增殖程度来测量这种应答。在另一个实施方案中,通过下文列举的任意方法来测量这种应答。

[0113] 在另一个实施方案中,本发明方法和组合物的肽以高亲和力与 HLA II 类分子结合。在其他实施方案中,HLA II 类分子是本文列举的任意 HLA II 类分子。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0114] 在另一个实施方案中,本发明方法和组合物的肽的衍生物以高亲和力与 HLA I 类分子结合。在其他实施方案中,MHC I 类分子是本文列举的任意 MHC I 类分子。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0115] 在另一个实施方案中,本发明方法和组合物的肽以显著亲和力与 HLA II 类分子结合,而来源于原始肽的肽以显著亲和力与 HLA I 类分子结合。

[0116] 在另一个实施方案中,“亲和力”是指将标准肽与指定 MHC 分子的结合抑制 50% 所需的肽浓度。在另一个实施方案中,“高亲和力”是指如下亲和力,其使得标准肽结合的 50% 抑制需要约 500 纳摩 (nM) 或更低浓度的肽。在另一个实施方案中,需要约 400nM 或更低浓度的肽。在另一个实施方案中,结合亲和力是 300nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 200nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 150nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 100nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 80nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 60nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 40nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 30nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 20nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 15nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 10nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 8nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 6nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 4nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 3nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 2nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 1.5nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 1nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 0.8nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 0.6nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 0.5nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 0.4nM。在另一个实施方案中,结合亲和力是 0.3nM。在另一个实施方案中,结合亲和力低于 0.3nM。

[0117] 在另一个实施方案中,“亲和力”是指与 MHC 分子的结合强度的测量。在另一个实施方案中,使用本领域已知的测量竞争性结合亲和力的方法来测量亲和力。在另一个实施方案中,使用本领域已知的测量相对结合亲和力的方法来测量亲和力。在另一个实施方案中,所述方法是竞争性结合测定法。在另一个实施方案中,所述方法是放射免疫测定法或 RIA。在另一个实施方案中,所述方法是 BiaCore 分析。在另一个实施方案中,所述方法是本领域已知的任意其他方法。在另一个实施方案中,所述方法产生相对于已知亲和力的参考肽的 IC₅₀ 的 IC₅₀。

[0118] 每种类型的亲和力和测量亲和力的方法代表本发明单独的实施方案。

[0119] 在另一个实施方案中,“高亲和力”是指 0.5-500nM 的 IC₅₀。在另一个实施方案中,IC₅₀ 是 1-300nM。在另一个实施方案中,IC₅₀ 是 1.5-200nM。在另一个实施方案中,IC₅₀ 是

2-100nM。在另一个实施方案中, IC50 是 3-100nM。在另一个实施方案中, IC50 是 4-100nM。在另一个实施方案中, IC50 是 6-100nM。在另一个实施方案中, IC50 是 10-100nM。在另一个实施方案中, IC50 是 30-100nM。在另一个实施方案中, IC50 是 3-80nM。在另一个实施方案中, IC50 是 4-60nM。在另一个实施方案中, IC50 是 5-50nM。在另一个实施方案中, IC50 是 6-50nM。在另一个实施方案中, IC50 是 8-50nM。在另一个实施方案中, IC50 是 10-50nM。在另一个实施方案中, IC50 是 20-50nM。在另一个实施方案中, IC50 是 6-40nM。在另一个实施方案中, IC50 是 8-30nM。在另一个实施方案中, IC50 是 10-25nM。在另一个实施方案中, IC50 是 15-25nM。每种亲和力及亲和力范围代表本发明单独的实施方案。

[0120] 在另一个实施方案中, 本发明方法和组合物的肽结合 HLA 分子的超家族。HLA 分子的超家族具有非常类似或相同的结合模体。在另一个实施方案中, 所述超家族是 HLA I 类超家族。在另一个实施方案中, 所述超家族是 HLA II 类超家族。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0121] 在另一个实施方案中, 术语“HLA 结合肽”, “HLA I 类分子结合肽”和“HLA II 类分子结合肽”是指以可检测的亲和力结合 HLA 分子的肽。在另一个实施方案中, 该术语是指以高亲和力结合 HLA 分子的肽。在另一个实施方案中, 该术语是指以足以活化 T 细胞前体的亲和力结合 HLA 分子的肽。在另一个实施方案中, 该术语是指以足以介导 T 细胞识别的亲和力结合 HLA 分子的肽。在其他实施方案中, HLA 分子是本文列举的任意 HLA 分子。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0122] 在另一个实施方案中, “变态”是指产生识别原始肽的免疫应答的肽, 所述原始肽是变态肽的来源 (例如不包含锚定残基突变的肽)。在另一个实施方案中, “原始肽”是指本发明的肽。在另一个实施方案中, “变态”是指产生识别原始肽的免疫应答的肽, 所述原始肽是变态肽的来源, 其中通过变态肽的免疫产生的免疫应答大于通过原始肽的免疫产生的免疫应答。在另一个实施方案中, “变态”免疫应答是识别原始肽的免疫应答, 所述原始肽是改善肽的来源 (例如不包含锚定残基突变的肽)。在另一个实施方案中, “变态”免疫应答是指识别原始肽的免疫应答, 所述原始肽是变态肽的来源, 其中通过变态肽的免疫产生的免疫应答程度大于通过原始肽的免疫产生的免疫应答。在另一个实施方案中, 通过变态肽的免疫产生的免疫应答程度大于实质上相当于响应原始肽免疫的免疫应答。在另一个实施方案中, 通过变态肽的免疫产生的免疫应答程度大于比响应原始肽免疫低的免疫应答。在另一个实施方案中, 本发明的变态肽是 HLA I 类变态肽。用于鉴定 HLA I 类和 II 类残基以及通过突变残基提高 HLA 结合的方法是本领域公知的, 如下所述。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0123] 在另一个实施方案中, 本发明的变态肽诱导相对于作为变态肽来源的 WT-1 肽 (“天然肽”) 增加至少 2 倍的免疫应答。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 3 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 5 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 7 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 10 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 15 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 20 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 30 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 50 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 100 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 150 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 200 倍。在另一个实施方案中, 相对于天然肽增加 300 倍。在另一

个实施方案中,相对于天然肽增加 500 倍。在另一个实施方案中,相对于天然肽增加 1000 倍。在另一个实施方案中,相对于天然肽增加超过 1000 倍。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0124] 在另一个实施方案中,本发明提供一种来源于本发明分离的 WT-1 肽的 HLA II 类变态肽。在另一个实施方案中,衍生过程包括引入增强肽与 HLA II 类分子结合的突变。在另一个实施方案中,衍生过程由引入增强肽与 HLA I 类分子结合的突变组成。在另一个实施方案中,突变位于 HLA II 类锚定残基上。在另一个实施方案中,如本文举例说明的,按照与 HLA I 类变态肽的鉴定和检验类似的方式鉴定和检验本发明的变态 II 类肽。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0125] 在另一个实施方案中,通过 HLA II 类模体锚定残基的突变,可以在本发明的肽中产生或改进 HLA II 类结合位点。在另一个实施方案中,修饰的锚定残基位于 P1 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P2 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P6 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P9 位置。在另一个实施方案中,锚定残基选自 P1, P2, P6, 和 P9 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P3 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P4 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P5 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P6 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P8 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P10 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P11 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P12 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P13 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于本领域已知的 HLA II 类分子的任意其他锚定残基处。在另一个实施方案中,除了 P1, P2, P6 和 P9 之外的残基作为次级锚定残基 (secondary anchor residue); 因此,将它们突变可以改进 HLA II 类结合。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0126] 在另一个实施方案中,通过引入产生锚定模体的突变来产生变态肽。在另一个实施方案中,“锚定模体”或“锚定残基”是指在 HLA 结合序列的特定位置的 1 个或 1 组优选的残基。

[0127] HLA 结合序列是 HLA II 类结合序列。在另一个实施方案中,HLA 结合序列是 HLA I 类结合序列。在另一个实施方案中,对应于锚定模体的位置是在结合 HLA 分子中起重要作用的那些位置。在另一个实施方案中,锚定残基是初级锚定模体 (primary anchor motif)。在另一个实施方案中,锚定残基是次级锚定模体。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0128] 用于预测 MHC II 类表位的方法是本领域公知的。在另一个实施方案中,利用 TEPITOPE (Meister GE, Roberts CG 等人, Vaccine 199513:581-91) 预测 MHC II 类表位。在另一个实施方案中,利用 EpiMatrix (De Groot AS, Jesdale BM 等人, AIDS Res Hum Retroviruses 199713:529-31) 预测 MHC II 类表位。在另一个实施方案中,利用 Predict Method (Yu K, Petrovsky N 等人, Mol Med. 20028:137-48) 预测 MHC II 类表位。在另一个实施方案中,利用 SYFPEITHI 表位预测算法 (实施例) 预测 MHC II 类表位。在另一个实施方案中,利用 Rankpep 预测 MHC II 类表位。在另一个实施方案中,利用本领域已知的任意其他方法预测 MHC II 类表位。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0129] 在另一个实施方案中,就 HLA II 类结合肽 (例如 HLA-DR- 结合肽) 而言,修饰的锚定残基位于 P1 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P2 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P6 位置。在另一个实施方案中,锚定残基位于 P9 位置。在其他实施方案

中,锚定残基是 P3, P4, P5, P6, P8, P10, P11, P12 或 P13 位置。在另一个实施方案中,锚定残基是本领域已知的 HLA II 类分子的任意其他锚定残基。在另一个实施方案中,除了 P1, P2, P6 和 P9 之外的残基作为次级锚定残基;因此,将它们突变可以改进 HLA II 类结合。在另一个实施方案中,将上述残基的任意组合进行突变。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0130] 在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合 2 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合 3 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合 4 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合 5 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合 6 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合超过 6 种不同的 HLA II 类分子。

[0131] 在另一个实施方案中,被本发明 WT-1 肽结合的 HLA II 类分子由指定 HLA II 类基因座的两个或更多个不同的等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA II 类分子由基因座的 3 个不同等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA II 类分子由基因座的 4 个不同等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA II 类分子由基因座的 5 个不同等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA II 类分子由基因座的 6 个不同等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA II 类分子由基因座的超过 6 个不同等位基因编码。

[0132] 在另一个实施方案中,被 WT-1 肽结合的 HLA II 类分子由 2 个不同基因座的 HLA II 类基因编码。在另一个实施方案中,结合的 HLA 分子由 2 个或更多个不同基因座的 HLA II 类基因编码。在另一个实施方案中,结合的 HLA 分子由 3 个不同基因座的 HLA II 类基因编码。在另一个实施方案中,结合的 HLA 分子由 3 个或更多个不同基因座的 HLA II 类基因编码。在另一个实施方案中,结合的 HLA 分子由 4 个不同基因座的 HLA II 类基因编码。在另一个实施方案中,结合的 HLA 分子由 4 个或更多个不同基因座的 HLA II 类基因编码。在另一个实施方案中,结合的 HLA 分子由超过 4 个不同基因座的 HLA II 类基因编码。在其他实施方案中,基因座选自 HLA-DRB 基因座。在另一个实施方案中,HLA II 类结合肽是 HLA-DRA 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽是 HLA-DQA1 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽是 HLA-DQB1 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽是 HLA-DPA1 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽是 HLA-DPB1 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽是 HLA-DMA 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽是 HLA-DMB 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽是 HLA-DOA 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽是 HLA-DOB 结合肽。在另一个实施方案中,所述肽结合本领域已知的任意其他 HLA II 类分子。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0133] 在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合 2 种不同的 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,所述肽结合 3 种不同的 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,所述肽结合 4 种不同的 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,所述肽结合 5 种不同的 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,所述肽结合 6 种不同的 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,所述肽结合超过 6 种不同的 HLA-DRB 分子。

[0134] 在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合由 2 个不同 HLA-DRB 等位基因编码的 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,HLA-DRB 分子由 3 个不同的 HLA-DRB 等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA-DRB 分子由 4 个不同的 HLA-DRB 等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA-DRB 分子由 5 个不同的 HLA-DRB 等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA-DRB

分子由 6 个不同的 HLA-DRB 等位基因编码。在另一个实施方案中,HLA-DRB 分子由超过 6 个不同的 HLA-DRB 等位基因编码。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0135] 在另一个实施方案中,本发明的 WT-1 肽结合由 2 个不同 HLA-DRB 等位基因编码的 HLA-DRB 分子,所述 HLA-DRB 等位基因选自 DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101, 和 DRB 1501。在另一个实施方案中,WT-1 肽结合由 3 个不同 HLA-DRB 等位基因编码的 HLA-DRB 分子,所述 HLA-DRB 等位基因选自 DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101, 和 DRB 1501。在另一个实施方案中,WT-1 肽结合由 4 个不同 HLA-DRB 等位基因编码的 HLA-DRB 分子,所述 HLA-DRB 等位基因选自 DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101, 和 DRB 1501。在另一个实施方案中,WT-1 肽结合由 5 个不同 HLA-DRB 等位基因编码的 HLA-DRB 分子,所述 HLA-DRB 等位基因选自 DRB 101, DRB 301, DRB401, DRB 701, DRB 1101, DRB 1101 和 DRB 1501。在另一个实施方案中,WT-1 肽结合由由下列 HLA-DRB 等位基因的每一种编码的 HLA-DRB 分子 :DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101, 和 DRB 1501。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0136] 在另一个实施方案中,本发明提供一种包括本发明 2 种不同 WT-1 肽的组合物。在另一个实施方案中,所述 2 种不同的 WT-1 肽都未被改变。在另一个实施方案中,所述 WT-1 肽的 1 种是未改变的,而另一种是变态的。在另一个实施方案中,所述两种 WT-1 肽均是变态的。

[0137] 在另一个实施方案中,组合物包括本发明 3 种不同的 WT-1 肽。在另一个实施方案中,组合物包括本发明 4 种不同的 WT-1 肽。在另一个实施方案中,组合物包括本发明 5 种不同的 WT-1 肽。在另一个实施方案中,组合物包括超过 5 种本发明不同的分离 WT-1 肽。

[0138] 在另一个实施方案中,所述组合物中的 2 种 WT-1 肽是未改变的。在另一个实施方案中,所述组合物中的 2 种 WT-1 肽是变态的。在另一个实施方案中,所述组合物中的 2 种 WT-1 肽是未改变的,并且 2 种是变态的。在另一个实施方案中,所述组合物中超过 2 种 WT-1 肽是未改变的。在另一个实施方案中,所述组合物中超过 2 种 WT-1 肽是变态的。在另一个实施方案中,所述组合物中超过 2 种 WT-1 肽是未改变的,并且超过 2 种是变态的。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0139] 在另一个实施方案中,本发明组合物中 1 种额外的 WT-1 肽具有选自如下所示的序列 :SEQ ID NO:1-160, 162-185, 190, 191 或 193。在另一个实施方案中,本发明组合物中 2 种额外的 WT-1 肽具有选自如下所示的序列 :SEQ ID NO:1-160, 162-185, 190, 191 或 193。在另一个实施方案中,本发明组合物中 3 种额外的 WT-1 肽具有选自如下所示的序列 :SEQ ID NO:1-160, 162-185, 190, 191 或 193。

[0140] 在另一个实施方案中,使用本领域已知的任意其他免疫原性 WT-1 肽作为额外的 WT-1 肽。在另一个实施方案中,使用本领域已知的免疫原性 WT-1 肽的任意组合。其他 WT 肽的非限制性来源包括 W02005053618, W02007047764 和 W02007120673。

[0141] 每种额外的 WT-1 肽,及其每种组合,代表本发明单独的实施方案。

[0142] 在另一个实施方案中,本发明的组合物包含 2 种 HLA II 类变态肽,其均来源于本发明相同的分离 WT-1 肽。在另一个实施方案中,所述 2 种 HLAI I 类变态肽包含在不同 HLA II 类分子锚定残基上的突变。在另一个实施方案中,所述 2 种 HLA II 类变态肽包含在相同锚定残基上的不同突变。在另一个实施方案中,所述 2 种 HLA II 类变态肽来源于本发明不

同的分离 WT-1 肽。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0143] 在另一个实施方案中,本发明的 2 种 WT-1 肽,或对应于本发明 2 种 HLA II 类变态肽的 WT-1 肽,彼此重叠。在另一个实施方案中,所述肽之间的重叠是至少 7 个氨基酸 (AA)。在另一个实施方案中,重叠是至少 8AA。在另一个实施方案中,重叠是至少 9AA。在另一个实施方案中,重叠是 7AA。在另一个实施方案中,重叠是 8AA。在另一个实施方案中,重叠是 9AA。在另一个实施方案中,重叠是 10AA。在另一个实施方案中,重叠是 11AA。在另一个实施方案中,重叠是 12AA。在另一个实施方案中,重叠是 13AA。在另一个实施方案中,重叠是 14AA。在另一个实施方案中,重叠是 15AA。在另一个实施方案中,重叠是 16AA。在另一个实施方案中,重叠超过 16AA。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0144] 在另一个实施方案中,本发明组合物的肽结合 2 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述肽结合 3 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述肽结合 4 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述肽结合 5 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述肽结合超过 5 种不同的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述组合物的肽结合相同的 HLA II 类分子。

[0145] 在另一个实施方案中,本发明组合物的每种 WT-1 肽结合一组 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,每种 WT-1 肽结合不同组的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述组合物的 WT-1 肽结合相同组的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,2 种 WT-1 肽结合不同但重叠组的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,2 种或更多种的 WT-1 肽结合相同组的 HLA II 类分子,而另一 WT-1 肽结合不同的组。在另一个实施方案中,2 种或更多种的 WT-1 肽结合一种重叠组的 HLA II 类分子,而另一 WT-1 肽结合不同的组。

[0146] 在另一个实施方案中,本发明组合物的 2 种或更多种 WT-1 肽各结合超过 1 种 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,所述组合物的肽结合的 4 种或更多种 HLA-DRB 分子彼此不同。在另一个实施方案中,HLA-DRB 分子由不同的 HLA-DRB 等位基因编码。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0147] 在另一个实施方案中,本发明组合物的 WT-1 肽结合的 2 种或更多种 HLA II 类分子是 HLA-DRB 分子。在另一个实施方案中,结合的 3 种或更多种 HLA II 类分子是 HLA-DRB 分子。在其他实施方案中,结合的 HLA II 类分子可以是本文列举的任意 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,结合的 HLA II 类分子由指定基因座的 2 个或更多个不同 HLA II 类等位基因编码。在另一个实施方案中,结合的 HLA II 类分子由 2 个或更多个不同基因座的 HLA II 类基因编码。

[0148] 每种上述组合物代表本发明单独的实施方案。

[0149] 在另一个实施方案中,“HLA II 类分子组”是指由特定基因座的不同等位基因编码的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述术语是指具有特定结合特异性的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述术语是指具有特定肽共有序列的 HLA II 类分子。在另一个实施方案中,所述术语是指 HLA II 类分子的超家族。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0150] 在另一个实施方案中,本发明提供一种组合物,其包括未改变的本发明 HLA II 类分子-结合 WT-1 肽,和第二 HLA I 类分子-结合 WT-1 肽。在另一个实施方案中,所述组合物包括除了 HLA I 类分子-结合 WT-1 肽以外的超过 1 种本发明 HLA II 类分子-结合 WT-1

肽。在另一个实施方案中,所述组合物包括除了 HLA II 类分子 - 结合 WT-1 肽以外的超过 1 种本发明 HLA I 类分子 - 结合 WT-1 肽。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0151] 在另一个实施方案中,HLA I 类分子 - 结合 WT-1 肽的 AA 序列包括选自 SEQ ID NO : 1-160,162-185,190,191 或 193 的序列。在另一个实施方案中,HLA I 类分子 - 结合 WT-1 肽的 AA 序列选自 SEQ ID NO :1-160,162-185,190,191 或 193 所示的序列。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0152] 在另一个实施方案中,HLA I 类分子 - 结合 WT-1 肽是 HLA I 类变态肽。在另一个实施方案中,如本文进一步所述,HLA I 类分子 - 结合 WT-1 肽包含其 HLA I 类分子锚定残基的突变。如本文提供的,对 WT-1 来源的肽在 HLA 锚定残基上进行修饰,以产生具有对 HLA-A0201 和 HLA-A0301 增加的预测结合的变态肽。具有增加的预测结合的肽还显示增强的结合 HLA I 类分子的能力和增加的免疫原性。

[0153] 在另一个实施方案中,增强 MHC 结合的突变位于 HLA I 类变态肽位置 1 的残基上。在另一个实施方案中,所述残基被变为酪氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为甘氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为苏氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为苯丙氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为本领域已知的任意其他残基。在另一个实施方案中,位置 1 的取代(例如变为酪氨酸)稳定位置 2 锚定残基的结合。

[0154] 在另一个实施方案中,突变位于 HLA I 类变态肽的位置 2。在另一个实施方案中,所述残基被变为亮氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为缬氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为异亮氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为甲硫氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为本领域已知的任意其他残基。

[0155] 在另一个实施方案中,突变位于 HLA I 类变态肽的位置 6。在另一个实施方案中,所述残基被变为缬氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为半胱氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为谷氨酰胺。在另一个实施方案中,所述残基被变为组氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为本领域已知的任意其他残基。

[0156] 在另一个实施方案中,突变位于 HLA I 类变态肽的位置 9。在另一个实施方案中,所述突变改变其 C 端位置的残基。在另一个实施方案中,所述残基被变为缬氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为苏氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为异亮氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为亮氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为丙氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为半胱氨酸。在另一个实施方案中,所述残基被变为本领域已知的任意其他残基。

[0157] 在另一个实施方案中,点突变位于初级锚定残基。在另一个实施方案中,HLA I 类初级锚定残基是位置 2 和 9。在另一个实施方案中,点突变位于次级锚定残基。在另一个实施方案中,HLA I 类次级锚定残基是位置 1 和 8。在另一个实施方案中,HLA I 类次级锚定残基是位置 1,3,6,7 和 8。在另一个实施方案中,所述点突变位于选自位置 4,5 和 8 的位置。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0158] 在另一个实施方案中,点突变位于选自 HLA I 类结合模体的位置 1,2,8 和 9 的位置的 1 个或更多个残基。在另一个实施方案中,点突变位于选自 HLA I 类结合模体的位置 1,3,6 和 9 的位置的 1 个或更多个残基。在另一个实施方案中,点突变位于选自 HLA I 类结合模体的位置 1,2,6 和 9 的位置的 1 个或更多个残基。在另一个实施方案中,点突变位

于选自 HLA I 类结合模体的位置 1,6 和 9 的位置的 1 个或多个残基。在另一个实施方案中,点突变位于选自位置 1,2 和 9 的位置的 1 个或多个残基。在另一个实施方案中,点突变位于选自位置 1,3 和 9 的位置的 1 个或多个残基。在另一个实施方案中,点突变位于选自位置 2 和 9 的位置的 1 个或多个残基。在另一个实施方案中,点突变位于选自位置 6 和 9 的位置的 1 个或多个残基。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0159] 每种上述锚定残基和取代代表本发明单独的实施方案。

[0160] 在另一个实施方案中,HLA I 类分子-结合 WT 肽的长度为 9AA。在另一个实施方案中,肽的长度为 10AA。如本文提供的,9-10AA 的天然和变态肽显示与 HLA I 类分子的实质结合,以及引发细胞因子分泌和 CTL 的细胞溶解的能力。

[0161] 在另一个实施方案中,被 HLA I 类分子-结合 WT-1 肽结合的 HLA I 类分子是 HLA-A 分子。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-A2 分子。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-A3 分子。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-A1 分子。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-B8 分子。在另一个实施方案中,HLA I 类分子是 HLA-0201 分子。在另一个实施方案,HLA I 类分子与本领域已知的任意其他 HLA I 类分子结合。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0162] 在另一个实施方案中,本发明方法和组合物的 WT-1 肽具有 8-30 个氨基酸的长度。在另一个实施方案中,肽的长度为 9-11AA。在另一个实施方案中,肽的长度大小范围是 7-25AA,或在另一个实施方案中,或在另一个实施方案中,8-11,或在另一个实施方案中,8-15,或在另一个实施方案中,9-20,或在另一个实施方案中,9-18,或在另一个实施方案中,9-15,或在另一个实施方案中,8-12,或在另一个实施方案中,9-11AA。在另一个实施方案中,肽长度为 8AA,或在另一个实施方案中,9AA 或在另一个实施方案中,10AA 或在另一个实施方案中,12AA 或在另一个实施方案中,长度为 25AA,或在另一个实施方案中,它们之间的任意长度。在另一个实施方案中,肽具有更长的长度,例如 50,或 100,或更多。在这种实施方案中,细胞将肽加工为 7-25AA 的长度。在这种实施方案中,细胞将肽加工为 9-11AA 的长度。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0163] 在另一个实施方案中,肽的长度为 15-23AA。在另一个实施方案中,长度为 15-24AA。在另一个实施方案中,长度为 15-25AA。在另一个实施方案中,长度为 15-26AA。在另一个实施方案中,长度为 15-27AA。在另一个实施方案中,长度为 15-28AA。在另一个实施方案中,长度为 14-30AA。在另一个实施方案中,长度为 14-29AA。在另一个实施方案中,长度为 14-28AA。在另一个实施方案中,长度为 14-26AA。在另一个实施方案中,长度为 14-24AA。在另一个实施方案中,长度为 14-22AA。在另一个实施方案中,长度为 14-20AA。在另一个实施方案中,长度为 16-30AA。在另一个实施方案中,长度为 16-28AA。在另一个实施方案中,长度为 16-26AA。在另一个实施方案中,长度为 16-24AA。在另一个实施方案中,长度为 16-22AA。在另一个实施方案中,长度为 18-30AA。在另一个实施方案中,长度为 18-28AA。在另一个实施方案中,长度为 18-26AA。在另一个实施方案中,长度为 18-24AA。在另一个实施方案中,长度为 18-22AA。在另一个实施方案中,长度为 18-20AA。在另一个实施方案中,长度为 20-30AA。在另一个实施方案中,长度为 20-28AA。在另一个实施方案中,长度为 20-26AA。在另一个实施方案中,长度为 20-24AA。在另一个实施方案中,长度为 22-30AA。在另一个实施方案中,长度为 22-28AA。在另一个实施方案中,长度为 22-26AA。

在另一个实施方案中,长度为 24-30AA。在另一个实施方案中,长度为 24-28AA。在另一个实施方案中,长度为 24-26AA。

[0164] 每种上述肽、肽长度和肽类型代表本发明单独的实施方案。

[0165] 在另一个实施方案中,利用本领域公知的原理,对本发明的肽进行微小修饰(minor modification),但不降低它们对 HLA 分子的亲和力或改变它们的 TCR 特异性。在另一个实施方案中,就 HLA I 类结合肽而言,“微小修饰”涉及例如包括一个氨基酸在内的插入、缺失或取代,或 2-9 个残基之外的包括 1-3 个氨基酸在内的缺失或添加。尽管本文描述的计算机算法可用于预测肽的 MHC I 类结合能力,但它们只有 60-80% 的预测准确性;因此,在最终确定 MHC I 类结合亲和力之前,对肽应进行经验鉴定。因此,本发明的肽不限于通过显示强 MHC I 类结合亲和力的算法预测得到的肽。可以进行的修饰类型在下文列出。每种修饰代表本发明单独的实施方案。

[0166] 在另一个实施方案中,通过将锚定残基突变为 MHC I 类优选的锚定残基(在其他实施方案中,其可以是本文列举的任意锚定残基),对本发明实施例列举的肽进行进一步修饰。在另一个实施方案中,通过将锚定残基突变为针对该位置的不同 MHC I 类优选残基,对包含 MHC I 类优选锚定残基的本发明肽进行进一步修饰。在其他实施方案中,不同的优选残基可以是本文列举的任意优选残基。

[0167] 在另一个实施方案中,被进一步修饰的锚定残基位于位置 1。在另一个实施方案中,锚定残基位于位置 2。在另一个实施方案中,锚定残基位于位置 3。在另一个实施方案中,锚定残基位于位置 4。在另一个实施方案中,锚定残基位于位置 5。在另一个实施方案中,锚定残基位于位置 6。在另一个实施方案中,锚定残基位于位置 7。在另一个实施方案中,锚定残基位于位置 8。在另一个实施方案中,锚定残基位于位置 9。就 HLA I 类结合肽而言,除了 2 和 9 以外的残基可以作为次级锚定残基;因此,将它们突变可以改善 MHC I 类结合。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0168] 在另一个实施方案中,本发明方法和组合物的肽是实施例所列举肽的长度变体。在另一个实施方案中,所述长度变体比实施例的肽短 1 个氨基酸(AA)。在另一个实施方案中,所述长度变体比实施例的肽短 2AA。在另一个实施方案中,所述长度变体比实施例的肽短超过 2AA。在另一个实施方案中,更短的肽是在 N 末端截短。在另一个实施方案中,更短的肽是在 C 末端截短。在另一个实施方案中,截短的肽是在 N 末端和 C 末端均截短。在另一个实施方案中,将肽截短但不改变对 HLA 分子的亲和力,这是本领域公知的。

[0169] 每种上述截短肽代表本发明单独的实施方案。

[0170] 在另一个实施方案中,长度变体比本发明实施例列举的肽更长。在另一个实施方案中,更长的肽是根据周围的 WT-1 序列在 N 末端延伸。在另一个实施方案中,将肽在 N 末端延伸但不改变对 HLA 分子的亲和力,这是本领域公知的。这类肽因此是实施例所列举肽的等同物。在另一个实施方案中,N 端延伸肽延伸一个残基。在另一个实施方案中,N 端延伸肽延伸两个残基。在另一个实施方案中,N 端延伸肽延伸三个残基。在另一个实施方案中,N 端延伸肽延伸超过三个残基。

[0171] 在另一个实施方案中,更长的肽是根据周围的 WT-1 序列在 C 末端延伸。在另一个实施方案中,将肽在 C 末端延伸但不改变对 HLA 分子的亲和力,这是本领域公知的。这类肽因此是本发明实施例所列举肽的等同物。在另一个实施方案中,C 端延伸肽延伸一个残基。

在另一个实施方案中，C 端延伸肽延伸两个残基。在另一个实施方案中，C 端延伸肽延伸三个残基。在另一个实施方案中，C 端延伸肽延伸超过三个残基。

[0172] 在另一个实施方案中，延伸肽是根据周围的 WT-1 序列在 N 末端和 C 末端均延伸。

[0173] 每种上述延伸肽代表本发明单独的实施方案。

[0174] 在另一个实施方案中，本发明的截短肽保留第二残基和 C 端残基上的 HLA 锚定残基（例如 HLA I 类锚定残基），比本发明实施例列举的肽具有更小数目的插入残基数（例如 5）。在另一个实施方案中，将肽进行这种突变但不改变对 HLA 分子的亲和力。

[0175] 在另一个实施方案中，通过去除上述序列之一的一个插入残基，设计出这类截短肽。在另一个实施方案中，保留第二和第八残基上的 HLA 锚定残基。在另一个实施方案中，保留第一和第八残基上的 HLA 锚定残基。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0176] 在另一个实施方案中，本发明的延伸肽保留第二残基和 C 端残基上的 HLA 锚定残基（例如 HLA I 类锚定残基），比本发明实施例列举的肽具有更大数目的插入残基数（例如 7 或 8）。在另一个实施方案中，通过在上述序列之一的两个插入残基之间添加一个或更多个残基，设计出这类延伸肽。本领域公知的是，可以在 HLA 结合肽的插入序列之间去除或添加残基，而不改变对 HLA 的亲和力。这类肽因此是本发明实施例所列举肽的等同物。在另一个实施方案中，保留第二和第九残基上的 HLA 锚定残基。在另一个实施方案中，保留第一和第八残基上的 HLA 锚定残基。在另一个实施方案中，保留被 6 个插入残基分离的两个残基上的 HLA 锚定残基。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0177] 在另一个实施方案中，“片段”是指长度为 11 或更多 AA 的肽。在另一个实施方案中，本发明的肽片段长 16 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段长 12 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段是 13 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段是 14 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段是 15 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段是 17 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段是 18 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段是 19 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段是 22 或更多 AA。在另一个实施方案中，片段是 8-12AA。在另一个实施方案中，片段是约 8-12AA。在另一个实施方案中，片段是 16-19AA。在另一个实施方案中，片段是约 16-19AA。在另一个实施方案中，片段是 10-25AA。在另一个实施方案中，片段是约 10-25AA。在另一个实施方案中，片段具有任意其他长度。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0178] 在另一个实施方案中，“WT-1 蛋白的片段”是指本文所述“片段”的任意定义。每种定义代表本发明单独的实施方案。

[0179] 在另一个实施方案中，本发明的肽与实施例列举的肽同源。在另一个实施方案中，当涉及任意蛋白或肽时，术语“同源性”、“同源”等等是指在序列比对和引入空位（必要时）以实现最大百分比同源性后（并且不将任意保守取代作为序列同一性的一部分），候选序列中与相应天然多肽的残基相同的氨基酸残基百分比。用于比对的方法和计算机程序是本领域公知的。

[0180] 在另一个实施方案中，当涉及任意核酸序列时，术语“同源性”类似地表示候选序列中与相应天然核酸序列的核苷酸相同的核苷酸百分比。

[0181] 在另一个实施方案中，通过本领域详细描述的方法，通过用于序列比对的计算机算法来确定同源性。在其他实施方案中，核酸序列同源性的计算机算法分析包括使用

任意数目的可用软件包,诸如,例如, BLAST, DOMAIN, BEAUTY (BLAST Enhanced Alignment Utility), GENPEPT 和 TREMBL 包。

[0182] 在另一个实施方案中,“同源性”是指与选自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的序列的同一性大于 70%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与选自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的序列的同一性大于 72%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 75%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与选自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的序列的同一性大于 78%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 80%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 82%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与选自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的序列的同一性大于 83%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 85%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 87%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与选自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的序列的同一性大于 88%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 90%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 92%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与选自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的序列的同一性大于 93%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 95%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与选自 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 或 193 的序列的同一性大于 96%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 97%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 98%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性大于 99%。在另一个实施方案中,“同源性”是指与 SEQ ID NO:1-160,162-185,190,191 和 193 中之一的同一性为 100%。每种可能性代表本发明单独的实施方案。在另一个实施方案中,通过候选序列杂交的检测来确定同源性,该方法在本领域有详尽描述(参见,例如,“Nucleic Acid Hybridization”Hames, B. D., 和 Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook 等人, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y.; 和 Ausubel 等人, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y) 在另一个实施方案中,在中等到严格条件下,针对编码天然半胱天冬酶肽的 DNA 的互补序列实施杂交方法。杂交条件是,例如,在如下溶液中 42°C 温育过夜,所述溶液包括:10-20% 甲酰胺,5X SSC (150mM NaCl, 15mM 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH 7.6), 5X Denhardt's 溶液, 10% 硫酸葡聚糖, 和 20 μ g/ml 变性剪切的鲑鱼精子 DNA。

[0183] 在实施例中所列举肽的每种上述同源物和变体代表本发明单独的实施方案。

[0184] 在另一个实施方案中,本发明提供一种包括本发明肽的组合物。在另一个实施方案中,组合物还包括药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,组合物还包括佐剂。在另一个实施方案中,组合物包括 2 种或更多种本发明的肽。在另一个实施方案中,组合物还包

括下文所述的任意添加剂、化合物或赋形剂。在另一个实施方案中,佐剂是 KLH、QS21、弗氏完全或不完全佐剂、磷酸铝、氢氧化铝、BCG 或明矾。在其他实施方案中,载体是本文列举的任意载体。在其他实施方案中,佐剂是本文列举的任意佐剂。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0185] 在另一个实施方案中,本发明提供包括本发明肽的疫苗。在另一个实施方案中,本发明提供包括抗原呈递细胞 (APC) 和本发明肽的疫苗。在另一个实施方案中,疫苗还包括载体。在另一个实施方案中,疫苗还包括佐剂。在另一个实施方案中,疫苗还包括 APC。在另一个实施方案中,疫苗还包括抗原、载体和 / 或 APC 中超过 1 种的组合。在另一个实施方案中,疫苗是基于细胞的组合物。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0186] 在另一个实施方案中,术语“疫苗”是指以下材料或组合物,当将其引入对象时,提供该对象针对特定疾病、病症或症状的预防性或治疗性应答。在另一个实施方案中,本发明包括基于肽的疫苗,其中所述肽包括本文所列的任意实施方案,包括免疫调节化合物诸如细胞因子、佐剂,等等。

[0187] 在另一个实施方案中,本发明方法和组合物的疫苗还包括佐剂。在另一个实施方案中,佐剂是 Montanide。在另一个实施方案中,佐剂是 Montanide ISA 51。Montanide ISA 51 包含天然可代谢的油和精炼乳化剂。在另一个实施方案中,佐剂是 GM-CSF。在另一个实施方案中,重组 GM-CSF 是在酵母 (啤酒酵母) 载体中表达的人蛋白。GM-CSF 促进造血祖细胞、APC 以及树突状细胞和 T 细胞的克隆扩增和分化。

[0188] 在另一个实施方案中,佐剂是细胞因子。在另一个实施方案中,佐剂是生长因子。在另一个实施方案中,佐剂是细胞群。在另一个实施方案中,佐剂是 QS21。在另一个实施方案中,佐剂是弗氏不完全佐剂。在另一个实施方案中,佐剂是磷酸铝。在另一个实施方案中,佐剂是氢氧化铝。在另一个实施方案中,佐剂是 BCG。在另一个实施方案中,佐剂是明矾。

[0189] 在另一个实施方案中,佐剂是白介素。在另一个实施方案中,佐剂是趋化因子。在另一个实施方案中,佐剂是本领域已知的任意其他类型的佐剂。在另一个实施方案中,WT-1 疫苗包括两种上述佐剂。在另一个实施方案中,WT-1 疫苗包括超过两种上述佐剂。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0190] 在其他实施方案中,本发明的疫苗或组合物可以包括本发明 WT-1 肽及其组合的任意实施方案。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0191] 应理解本文描述的有关本发明肽、疫苗和组合物的任意实施方案均可在本发明的任意方法中使用。肽、疫苗或组合物与方法的每种组合代表其实施方案。

[0192] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 疫苗,从而治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象。

[0193] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有 MDS 的对象的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 疫苗,从而治疗患有 MDS 的对象。

[0194] 在另一个实施方案中,本发明提供一种抑制或终止对象的表达 WT-1 的癌症的进展的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 疫苗,从而抑制或终止表达 WT-1 的癌症的进展。

[0195] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低对象的表达 WT-1 的癌症的发病率的

方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 疫苗,从而降低对象的表达 WT-1 的癌症的发病率。

[0196] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低对象的 AML 的发病率的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 疫苗,从而降低 AML 的发病率。

[0197] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低对象的表达 WT-1 的癌症的复发率的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 疫苗,从而降低对象的表达 WT-1 的癌症的复发率。

[0198] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低对象的 AML 的复发率的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 疫苗,从而降低对象的 AML 的复发率。

[0199] 在另一个实施方案中,本发明提供一种打破对象对表达 WT-1 的癌症的 T 细胞耐受性的方法,所述方法包括给对象施用本发明的 WT-1 疫苗,从而打破对表达 WT-1 的癌症的 T 细胞耐受性。

[0200] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象的方法,包括 (a) 通过本发明的方法在供体中诱导人细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的形成和增殖,所述 CTL 识别癌症的恶性细胞;和 (b) 将人 CTL 输注入对象,从而治疗患有癌症的对象。

[0201] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有表达 WT-1 的癌症的对象的方法,包括 (a) 通过本发明的方法离体诱导人 CTL 的形成和增殖,所述 CTL 识别癌症的恶性细胞,其中人免疫细胞获自供体;和 (b) 将人 CTL 输注入对象,从而治疗患有癌症的对象。

[0202] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导 (a) WT-1 蛋白特异性 CD8⁺淋巴细胞;或 (b) 对 WT-1 蛋白特异的 CD4⁺淋巴细胞,或其组合的形成和增殖的方法,所述方法包括将淋巴细胞群与本发明的肽或组合物接触,从而诱导 (a) WT-1 蛋白特异性 CD8⁺淋巴细胞;或 (b) 对 WT-1 蛋白特异的 CD4⁺淋巴细胞,或其组合的形成和增殖。该方法可以在体外、离体或体内进行。当在体外或离体进行时,这些 CTL 继而可以被输注入患者以达到治疗效果。

[0203] 用于离体免疫治疗的方法是本领域公知的,描述于,例如,美国专利申请系列 2006/0057130, 2005/0221481, 2005/0214268, 2003/0175272, 2002/0127718, 和美国专利 5, 229, 115, 这些引入本文作为参考。其他方法是本领域公知的,描述于例如, Davis ID 等人 (Blood dendritic cells generated with Flt3 ligand and CD40 ligand prime CD8⁺ T cells efficiently in cancer patients. *J Immunother.* 2006 年 9 月 -10 月; 29(5):499-511) 和 Mitchell MS 等人 (The cytotoxic T cell response to peptide analogs of the HLA-A*0201-restricted MUC1 signal sequence epitope, *Ml. 2. Cancer Immunol Immunother.* 2006 年 7 月 28 日)。每种方法代表本发明单独的实施方案。

[0204] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导对表达 WT-1 的癌症的细胞特异的 CTL 的形成和增殖的方法,所述方法包括将淋巴细胞群体与本发明的疫苗接触。在另一个实施方案中,所述疫苗是与本发明的肽结合的 APC。在另一个实施方案中,所述疫苗是与本发明的肽混合物结合的 APC。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0205] 在另一个实施方案中,本发明提供一种在对象中产生变态免疫应答的方法,其中所述变态免疫应答是针对表达 WT-1 的癌症,所述方法包括给对象施用本发明的疫苗,从而产生变态免疫应答。

[0206] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导对象的抗间皮瘤免疫应答的方法,所

述方法包括将对象与免疫原性组合物接触的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a)WT-1 蛋白 ;或 (b)WT 蛋白的片段,从而诱导对象的抗间皮瘤免疫应答。在另一个实施方案中,间皮瘤是恶性间皮瘤。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0207] 在另一个实施方案中,本发明提供一种诱导对象的抗间皮瘤免疫应答的方法,所述方法包括将对象与免疫原性组合物接触的步骤,所述免疫原性组合物包括编码 (a)WT-1 蛋白 ;或 (b)WT-1 蛋白的片段的核苷酸分子,从而诱导对象的抗间皮瘤免疫应答。在另一个实施方案中,间皮瘤是恶性间皮瘤。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0208] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有间皮瘤的对象的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a)WT-1 蛋白 ;或 (b)WT 蛋白的片段,从而治疗患有间皮瘤的对象。在另一个实施方案中,间皮瘤是恶性间皮瘤。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0209] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗患有间皮瘤的对象的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括编码 (a)WT-1 蛋白 ;或 (b)WT-1 蛋白的片段的核苷酸分子,从而治疗患有间皮瘤的对象。在另一个实施方案中,间皮瘤是恶性间皮瘤。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0210] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低对象的间皮瘤发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括 (a)WT-1 蛋白 ;或 (b)WT 蛋白的片段,从而降低对象的间皮瘤发病率或其复发。在另一个实施方案中,间皮瘤是恶性间皮瘤。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0211] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低对象的间皮瘤发病率或其复发的方法,所述方法包括给对象施用免疫原性组合物的步骤,所述免疫原性组合物包括编码 (a)WT-1 蛋白 ;或 (b)WT-1 蛋白的片段的核苷酸分子,从而降低对象的间皮瘤发病率或其复发。在另一个实施方案中,间皮瘤是恶性间皮瘤。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0212] 在另一个实施方案中,用本发明方法引发的免疫应答的靶细胞在 HLA 分子上呈递本发明的 WT-1 肽,或相应 WT-1 片段。在另一个实施方案中,HLA 分子是 HLA I 类分子。在其他实施方案中,HLA 分子是本领域已知的任意 HLA I 类同种型或 HLA I 类分子。在另一个实施方案中,针对 WT-1 肽或片段的免疫应答是变态免疫应答。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0213] 在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是急性髓性白血病 (AML)。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症与脊髓发育不良综合征 (MDS) 有关。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是 MDS。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是非小细胞肺癌 (NSCLC)。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是维尔姆斯氏瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是白血病。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是血液癌症。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是淋巴瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是促结缔组织增生的小圆细胞瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是间皮瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是恶性间皮瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是胃癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是结肠癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肺癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是乳腺癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是生殖细胞瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是卵巢癌。在另一个实施方案中,

表达 WT-1 的癌症是子宫癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是甲状腺癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肝细胞癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是甲状腺癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肝癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肾癌。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是卡波西氏肉瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是肉瘤。在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是任意其他癌症或肉瘤。

[0214] 在另一个实施方案中,表达 WT-1 的癌症是实体瘤。在另一个实施方案中,实体瘤与表达 WT-1 的癌症有关。在另一个实施方案中,实体瘤与脊髓发育不良综合征 (MDS) 有关。在另一个实施方案中,实体瘤与非小细胞肺癌 (NSCLC) 有关。在另一个实施方案中,实体瘤与肺癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与乳腺癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与结肠直肠癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与前列腺癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与卵巢癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与肾癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与胰腺癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与脑癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与胃肠癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与皮肤癌有关。在另一个实施方案中,实体瘤与黑色素瘤有关。

[0215] 在另一个实施方案中,通过本发明方法治疗的癌症或肿瘤被怀疑表达 WT-1。在另一个实施方案中,还没有通过检测真正的肿瘤样本来验证 WT-1 表达。在另一个实施方案中,在许多情况下所述癌症或肿瘤是已知表达 WT-1 的类型。在另一个实施方案中,在大多数情况下所述类型表达 WT-1。

[0216] 每种类型的表达 WT-1 的癌症或肿瘤,以及被怀疑表达 WT-1 的癌症或肿瘤,代表本发明单独的实施方案。

[0217] 本文列举的有关本发明肽、疫苗和组合物的任意实施方案均可在本发明的任意方法中使用,并且每个都代表其实施方案。

[0218] 在另一个实施方案中,在本发明的方法中使用本发明的多种肽来刺激免疫应答。

[0219] 本领域技术人员将能够理解本文公开的方法将能够设计其他 WT-1 来源的肽。所述方法还能够设计与其他 HLA 分子结合的肽。所述方法还能够设计组合本发明的 WT-1 来源肽的疫苗。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0220] 在另一个实施方案中,本发明的疫苗具有以下优点:活化或引发包含各种不同的 HLA II 类分子等位基因的 WT-1 特异性 CD4⁺T 细胞。在另一个实施方案中,所述疫苗具有以下优点:在相当比例的群体中(例如在不同的实施方案中,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,或大于 95%)活化或引发 WT-1 特异性的 CD4⁺T 细胞。在另一个实施方案中,所述疫苗在相当比例的特定种群中(例如美洲白种人)活化或引发 WT-1 特异性的 CD4⁺T 细胞。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0221] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供免疫应答的改善,所述免疫应答已经在对象中建立。在另一个实施方案中,本发明的方法包括施用肽、组合物或疫苗 2 次或更多次。在另一个实施方案中,所述肽在其组成、浓度或其组合方面不同。在另一个实施方案中,所述肽在对象中启动针对感兴趣的抗原的免疫应答,所述对象还没有启动针对所述抗原的免疫应答。在另一个实施方案中,响应 APC 或癌细胞上肽的呈递而诱导 CTL 增殖。在其他实施方案中,免疫应答的调节涉及免疫系统的体液和细胞介导的臂 (arm) 中的任一或

两个,其分别伴有 Th2 和 Th1 T 辅助细胞的存在,或在另一个实施方案中,分别涉及每一个臂。

[0222] 在其他实施方案中,影响肿瘤生长的方法导致 (1) 肿瘤细胞分裂的直接抑制,或 (2) 免疫细胞介导的肿瘤细胞裂解,或以上两者,这导致肿瘤细胞净扩增的抑制。

[0223] 本领域普通技术人员基于大量公知方法,可以容易的测定由这两种机制任一种产生的肿瘤生长抑制。在另一个实施方案中,通过测量一段时间内的实际肿瘤大小,可以测定肿瘤抑制。在另一个实施方案中,利用本领域技术人员公知的方法,通过估计(一段时间内的)肿瘤大小可以测定肿瘤抑制。更具体来说,可以使用各种放射成像方法(例如,单光子和正电子发射计算机断层检查;一般参见 "Nuclear Medicine in Clinical Oncology," Winkler, C. (ed.) Springer-Verlag, New York, 1986) 来估算肿瘤大小。这种方法还可以利用各种显影剂,包括例如,常规显影剂(例如,镓-67 柠檬酸盐),以及用于代谢产物成像、受体成像或免疫学成像(例如,放射性标记的单克隆抗体特异性肿瘤标记物)的专用试剂。此外,还可以使用非放射性方法诸如超声(参见, "Ultrasonic Differential Diagnosis of Tumors", Kossoff and Fukuda, (eds.), Igaku-Shoin, New York, 1984) 来估算肿瘤大小。

[0224] 除了上文讨论的用于测定肿瘤抑制的体内方法之外,还可以使用各种体外方法以便预测体内肿瘤抑制。代表性的实例包括通过以下方式测定的淋巴细胞介导的抗肿瘤溶胞活性,例如通过 ^{51}Cr 释放测定法(实施例),肿瘤依赖性淋巴细胞增殖 (Ioannides, 等人, J. Immunol. 146 (5):1700-1707, 1991), 肿瘤特异性抗体的体外产生 (Herlyn, 等人, J. Immunol. Meth. 73:157-167, 1984), 细胞(例如,CTL, 辅助 T 细胞)或体液(例如,抗体)介导的体外细胞生长抑制 (Gazit, 等人, Cancer Immunol Immunother 35:135-144, 1992), 以及,用于测定细胞前体频率的任意这些测定法 (Vose, Int. J. Cancer 30:135-142 (1982), 等等。

[0225] 在另一个实施方案中,抑制肿瘤生长的方法表示,与不接触或不暴露于本发明肽的生长相比,减弱的生长状态。肿瘤细胞生长可以通过本领域已知的任意方法进行评价,包括但不限于,测量肿瘤大小,使用 ^3H - 胸苷掺入测定法来确定肿瘤细胞是否增殖,或对肿瘤细胞计数。在其他实施方案中,“抑制”肿瘤细胞生长表示减缓、延迟或停止肿瘤生长,或导致肿瘤消退。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0226] 在本发明的方法和组合物的另一个实施方案中,测量 WT-1 表达。在另一个实施方案中,测量 WT-1 转录物表达。在另一个实施方案中,测量肿瘤的 WT-1 蛋白水平。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0227] 用于测定免疫应答的存在和大小的方法是本领域公知的。在另一个实施方案中,淋巴细胞增殖测定法,其中放射性物质(例如 ^3H - 胸苷)的 T 细胞摄取作为细胞增殖的函数被测定。在其他实施方案中,通过测量以下的增加来检测 T 细胞增殖:白介素-2 (IL-2) 产生, Ca^{2+} 流出,或染料摄入,诸如 3-(4, 5- 二甲基噻唑-2-基)-2, 5- 联苯-四唑。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0228] 在另一个实施方案中,通过本领域已知的方法(包括细胞增殖、细胞因子产生等等的检测)来测定 CTL 刺激。通过对 T 细胞接触配体-脉冲刺激的 (ligand-pulsed) 靶标时分泌的细胞因子类型和数量的分析可以作为功能活性的测量。可以通过 ELISA 或 ELISPOT

测定法来测量细胞因子以确定细胞因子产生的速率和总量 (Fujihashi K. 等人 (1993) J. Immunol. Meth. 160:181; Tanguay S. and Killion J. J. (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13:259)。

[0229] 在另一个实施方案中,通过⁵¹Cr-释放裂解测定法来测定CTL活性。将抗原特异性T细胞对肽脉冲刺激的⁵¹Cr标记的靶标的裂解与用对照肽脉冲刺激的靶细胞进行比较。在另一个实施方案中,用本发明的肽刺激T细胞,并测定MHC背景下表达天然肽的靶细胞的裂解。在另一个实施方案中,使用固定时间点(例如,4小时)的裂解以及全部靶标裂解的动力学,以鉴定配体表现 (Ware C.F. 等人 (1983) J Immunol 131:1312)。

[0230] 用于测定肽对HLA分子亲和力的方法是本领域公知的。在另一个实施方案中,通过TAP稳定测定法来测定亲和力。

[0231] 在另一个实施方案中,通过竞争性放射免疫测定法来测定亲和力。在另一个实施方案中,使用下列方案:用含1%牛血清白蛋白(BSA; Fisher Chemicals, Fairlawn, NJ)的PBS将靶细胞洗涤两次。将细胞按 10^7 /ml在冰上重悬,并在存在3mg/ml beta₂微球蛋白的条件下使用柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液在0°C将天然细胞表面结合肽剥离2分钟。在存在3mg/ml beta₂微球蛋白和30mg/ml脱氧核糖核酸酶的条件下,将沉淀按照 5×10^6 细胞/ml重悬于PBS/1% BSA,并在存在或缺失HLA特异性肽的条件下将200ml等分试样在20°C温育10分钟,然后与¹²⁵I标记的肽在20°C温育30分钟。在用PBS/2% BSA洗涤两次和用PBS洗涤1次后测定总的结合¹²⁵I。通过将递增浓度的测试肽与已知的结合肽进行比较,测定相对亲和力。

[0232] 在另一个实施方案中,对肽与活细胞(例如SKLY-16细胞)表面HLA的结合进行特异性分析以证实结合是针对合适的HLA分子的,并表征其限制性。在另一个实施方案中,这包括与过量的未标记肽(已知结合相同或不同的HLA分子)的竞争以及靶细胞(其表达相同或不同的HLA型)的使用。在另一个实施方案中,在活的新鲜或0.25%多聚甲醛固定的人PBMC、白血病细胞系和特定HLA型的EBV转化T细胞系中进行这种测定。肽(其被发现结合特定细胞上的MHC分子)的相对亲和力通过如上所述的竞争测定法来测定,所述竞争测定法针对具有对相关HLA分子(例如,酪氨酸酶或HBV肽序列)高亲和力的¹²⁵I标记的肽。在另一个实施方案中,本发明的方法和组合物的HLA II类结合肽比结合HLA II类分子的最小长度要长,在另一个实施方案中所述最小长度是约12AA。在另一个实施方案中,增加HLA II类结合肽的长度能够结合超过一个HLA II类分子。在另一个实施方案中,增加长度能够结合其结合模体未知的HLA II类分子。在另一个实施方案中,增加长度能够结合HLA I类分子。在另一个的实施方案中,HLA I类分子的结合模体是已知的。在另一个的实施方案中,HLA I类分子的结合模体是未知的。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0233] 在另一个实施方案中,在本发明方法和组合物中使用的肽包括非典型氨基酸诸如:1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸酯(Kazmierski 等人 (1991) J. Am Chem. Soc. 113:2275-2283); (2S, 3S)-甲基-苯丙氨酸, (2S, 3R)-甲基-苯丙氨酸, (2R, 3S)-甲基-苯丙氨酸和 (2R, 3R)-甲基-苯丙氨酸(Kazmierski and Hruby (1991) Tetrahedron Lett. 32(41):5769-5772); 2-氨基四氢化萘-2-羧酸(Landis (1989) Ph. D. Thesis, University of Arizona); 羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸酯(Miyake 等人 (1984) J. Takeda Res. Labs. 43:53-76), 组氨酸异喹啉羧酸(Zechel 等人 (1991)

Int. J. Pep. Protein Res. 38(2):131-138); 和 HIC(组氨酸环脲), (Dharanipragada 等人 (1993) Int. J. Pep. Protein Res. 42(1):68-77) 和 ((1992) Acta. Crst., Crystal Struct. Comm. 48(IV):1239-124)。

[0234] 在另一个实施方案中,本发明的肽包括氨基酸类似物或模拟肽,在其他实施方案中诱导或有利于特定的二级结构。在其他实施方案中,这类肽包括下列: LL-Acp(LL-3-氨基-2-propenidone-6-羧酸), β -转角诱导二肽类似物(Kemp 等人 (1985) J. Org. Chem. 50:5834-5838); β -片层诱导类似物(Kemp 等人 (1988) Tetrahedron Lett. 29:5081-5082); β -转角诱导类似物(Kemp 等人 (1988) Tetrahedron Lett. 29:5057-5060); α -螺旋诱导类似物(Kemp 等人 (1988) Tetrahedron Lett. 29:4935-4938); γ -转角诱导类似物(Kemp 等人 (1989) J. Org. Chem. 54:109:115); 下列参考文献提供的类似物:Nagai 和 Sato(1985) Tetrahedron Lett. 26:647-650; 和 DiMaio 等人 (1989) J. Chem. Soc. Perkin Trans, p. 1687; Gly-Ala 转角类似物(Kahn 等人 (1989) Tetrahedron Lett. 30:2317); 酰胺键电子等排体(Jones 等人 (1988) Tetrahedron Lett. 29(31):3853-3856); tretrazol(Zabrocki 等人 (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:5875-5880); DTC(Samanen 等人 (1990) Int. J. ProteinPep. Res. 35:501:509); 以及以下教导的类似物:Olson 等人 (1990) J. Am. Chem. Sci. 112:323-333 和 Garvey 等人 (1990) J. Org. Chem. 55(3):936-940。 β 转角和 β 凸起的构象限制性模拟物,以及包含它们的肽,描述于 1995 年 8 月 8 日授权给 Kahn 的美国专利 5,440,013。

[0235] 在其他实施方案中,如下文所述,将本发明的肽与一种不同的其他分子缀合,其可以通过共价或非共价连接(复合的),在另一个实施方案中,其性质根据具体目的而改变。在另一个实施方案中,肽被共价或非共价复合到大分子载体(例如免疫原性载体),包括但不限于,天然和合成的多聚体、蛋白、多糖、多肽(氨基酸)、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮和脂。在另一个实施方案中,将本发明的肽与基质连接。在另一个实施方案中,将肽与脂肪酸缀合以导入脂质体(美国专利 5,837,249)。在另一个实施方案中,将本发明的肽与固相支持物共价或非共价复合,各种固相支持物是本领域已知的。在另一个实施方案中,肽与载体、基质、脂肪酸或固相支持物的连接用于增加引发的免疫应答。

[0236] 在其他实施方案中,载体是甲状腺球蛋白、白蛋白(例如人血清白蛋白)、破伤风类毒素、聚氨基酸诸如聚(赖氨酸:谷氨酸)、流感蛋白、乙肝病毒核心蛋白、钥孔虫戚血兰素、白蛋白,或另一种载体蛋白或载体肽、乙肝病毒重组疫苗或 APC。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0237] 在另一个实施方案中,术语“氨基酸”(AA)是指天然的或,在另一个实施方案中,非天然或合成的 AA,并且在其他实施方案中,可以包括,甘氨酸、D- 或 L- 旋光异构体、AA 类似物、模拟肽,或其组合。

[0238] 在另一个实施方案中,术语“癌症”、“赘生物(neoplasm)”、“赘生的(neoplastic)”或“肿瘤(tumor)”可以互换使用,是指经历恶性转化(使它们对于宿主生物体来说是病理性的)的细胞。通过非常成熟的技术(尤其是组织学检查)可以轻易的区分原发癌细胞(即,从邻近恶性转化部位获得的细胞)和非癌细胞。如本文使用的癌细胞的定义不仅包括原发癌细胞,而且包括来源于癌细胞祖先的任意细胞。这包括转移的癌细胞,以及来源于癌细胞的体外培养物和细胞系。在另一个实施方案中,肿瘤可基于肿瘤块来检测;例如,通过

诸如 CAT 扫描、磁共振成像 (MRI)、X 光、超声或触诊这类方法,和在另一个实施方案中,通过生化或免疫学发现来鉴定,后者在其他实施方案中也被用于鉴定癌细胞。

[0239] 用于合成肽的方法是本领域公知的。在另一个实施方案中,本发明的肽利用合适的固态合成方法来合成(参见例如, Steward and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Freemantle, San Francisco, Calif. (1968); Merrifield (1967) Recent Progress in Hormone Res 23:451)。在其他实施方案中,使用本文描述的测定法来检测这些肽的活性。

[0240] 在另一个实施方案中,通过标准方法纯化本发明的肽,所述标准方法包括层析(例如,离子交换、亲和力和大小分级柱层析法)、离心、差异溶解度,或通过用于蛋白纯化的任意其他标准技术。在另一个实施方案中,使用免疫亲和层析,通过将其结合到包括抗体(其针对该肽或本发明的相关肽而产生,并粘附到固定的支持物上)的亲和柱来分离表位。

[0241] 在另一个实施方案中,亲和标签诸如 6-His (Invitrogen)、麦芽糖结合域 (New England Biolabs)、流感包膜序列 (Kolodziej 等人 (1991) Meth. Enzymol. 194:508-509)、谷胱甘肽-S-转移酶或其他亲和标签连接到本发明的肽以便于经通过合适的亲和柱而纯化。在其他实施方案中,还可以使用诸如蛋白水解、核磁共振和 X 射线晶体分析法的技術,对分离的肽进行物理表征。

[0242] 在另一个实施方案中,利用已知的技术通过体外翻译产生本发明的肽,这对本领域技术人员将是显而易见的。在另一个实施方案中,肽在翻译期间或翻译后进行差别修饰,例如,通过磷酸化、糖基化、交联、酰化、蛋白水解切割、连接到抗体分子、膜分子或其他配体 (Ferguson 等人 (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:285-320)。

[0243] 在另一个实施方案中,本发明的肽还包括可检测的标记,其在另一个实施方案中是荧光的,或在另一个实施方案中是发光的,或在另一个实施方案中是放射性的,或在另一个实施方案中是电子致密。在其他实施方案中,可检测的标记包括,例如,绿色荧光蛋白 (GFP)、DS-Red (红色荧光蛋白)、分泌的碱性磷酸酶 (SEAP)、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{14}C 、荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹酰和伞形酮、荧光素或大量本领域技术人员已知的其他这类标记。使用的具体标记物将取决于使用的免疫测定类型。

[0244] 在另一个实施方案中,本发明的肽与基质连接,所述基质在另一个实施方案中用作载体。在另一个实施方案中,肽与基质的连接用于增加引发的免疫应答。

[0245] 在另一个实施方案中,使用常规交联剂诸如碳二亚胺,按照本文所述将本发明的肽与其他分子连接。碳二亚胺的实例是 1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基)碳二亚胺 (CMC), 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) 和 1-乙基-3-(4-氮翁-44-二甲基戊基)碳二亚胺。

[0246] 在其他实施方案中,交联剂包括溴化氰、戊二醛和琥珀酸酐。通常,可以使用大量同型双功能试剂中的任一种,包括同型双功能醛、同型双功能环氧化物、同型双功能亚氨酸酯、同型双功能 N-羟基琥珀酰亚胺酯、同型双功能马来酰亚胺、同型双功能卤代烷、同型双功能吡啶二硫化物、同型双功能芳基卤、同型双功能酰肼、同型双功能重氮衍生物和同型双功能光反应化合物。在其他实施方案中,还可以预见的是异型双功能化合物,例如,具有胺反应基和硫氢反应基的化合物,具有胺反应基和光反应基的化合物,以及具有羰基反应基和硫氢反应基的化合物。

[0247] 在其他实施方案中,同型双功能交联剂分别包括双功能 N- 羟基琥珀酰亚胺酯二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯),二琥珀酰亚胺辛二酸酯,和二琥珀酰亚胺酒石酸酯;双功能亚氨基己二亚氨基二甲酯,庚二酰亚氨基二甲酯,和辛二亚氨基二甲酯;双功能硫氢反应性交联剂 1,4-双-[3'-(2'-二硫吡啶)丙酰胺基]丁烷,二马来酰亚胺基己烷,和双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷;双功能芳基卤 1,5-二氟-2,4-二硝基苯和 4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯砜;双功能光反应试剂诸如双-[b-(4-叠氮基水杨基氨基)乙基]二硫醚;双功能醛甲醛,丙二醛,丁二醛,戊二醛,和己二醛;双功能环氧化物诸如 1,4-丁二醇二环氧甘油醚;双功能酰肼己二酸二酰肼,卡巴肼,和琥珀酸二酰肼;双功能重氮 o-联甲苯胺,重氮化和双偶氮联苯胺;双功能卤代烷 N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺),N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺),N,N'-十一亚甲基-双(碘乙酰胺),以及苄卤和 halomustards,诸如 a,a'-二碘-p-二甲苯磺酸和三(2-氯乙烷)胺。

[0248] 在其他实施方案中,如本文描述的用于将肽连接到其他分子的异型双功能交联剂包括,但不限于,SMCC(琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯),MBS(m-马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯),SIAB(N-琥珀酰亚胺(4-碘代乙酰基)氨基苯甲酸酯),SMPB(琥珀酰亚胺-4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸酯),GMBS(N-(.gamma.-马来酰亚胺基丁酸)琥珀酰亚胺酯),MPBH(4-(4-N-马来酰亚胺苯基)丁酸酰肼),M2C2H(4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基-酰肼),SMPT(琥珀酰亚胺基氧化羰基-a-甲基-a-(2-二硫吡啶)甲苯),和 SPDP(N-琥珀酰亚胺 3-(2-二硫吡啶)丙酸酯)。

[0249] 在另一个实施方案中,将本发明的肽配制为通过离子、吸附或生物特异性相互作用的单体非共价连接。在另一个实施方案中,通过低离子强度环境(诸如在去离子水中)下盐桥的形成,实现肽与带正电或带负电的分子的复合。在另一个实施方案中,使用带电的多聚体诸如聚-(L-谷氨酸)或聚-(L-赖氨酸)(其分别包含许多的负电荷和正电荷)可以产生大的复合物。在另一个实施方案中,将肽吸附到表面诸如微粒胶乳珠子或其他疏水多聚体,形成非共价结合的肽-超级抗原复合物,在其他实施方案中有效模拟交联的或化学聚合的蛋白。在另一个实施方案中,通过使用其他分子间的生物特异性相互作用,将肽非共价连接。例如,生物素对蛋白诸如亲和素或链霉亲和素或它们衍生物的强亲和力可用于形成肽复合物。根据这个方面,和在另一个实施方案中,使用常见的生物素化试剂诸如 D-生物素的 N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS-生物素)(其与可用的胺基反应),可以将肽修饰为具有生物素基团。

[0250] 在另一个实施方案中,将本发明的肽与载体连接。在另一个实施方式中,载体是 KLH。在其他实施方案中,载体是本领域已知的任意其他载体,包括,例如,甲状腺球蛋白、白蛋白诸如人血清白蛋白、破伤风类毒素、聚氨基酸诸如聚(赖氨酸:谷氨酸)、流感、乙肝病毒核心蛋白、乙肝病毒重组疫苗等等。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0251] 在另一个实施方案中,将本发明的肽与脂(诸如 P3 CSS)缀合。在另一个实施方案中,将本发明的肽与珠子缀合。

[0252] 在另一个实施方案中,本发明的组合物还包括免疫调节化合物。在其他实施方案中,免疫调节化合物是细胞因子、趋化因子,或增强免疫系统辅助或粘附分子的表达的补体组分,它们的受体,或其组合。在一些实施方案中,免疫调节化合物包括白介素,例如白介素 1 到 15,干扰素 α 、 β 或 γ ,肿瘤坏死因子,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),

巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF), 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF), 趋化因子诸如中性粒细胞活化蛋白 (NAP), 巨噬细胞化学引诱物和活化因子 (MCAF), RANTES, 巨噬细胞炎性肽 MIP-1a 和 MIP-1b, 补体组分, 或其组合。在其他实施方案中, 免疫调节化合物刺激或增强以下物质的表达: OX40, OX40L (gp34), 淋巴细胞趋化因子 (lymphotactin), CD40, CD40L, B7. 1, B7. 2, TRAP, ICAM-1、2 或 3, 细胞因子受体, 或其组合。

[0253] 在另一个实施方案中, 免疫调节化合物诱导或增强参与免疫应答的共刺激分子的表达, 在一些实施方案中, 所述共刺激分子包括 CD40 或其配体、CD28、CTLA-4 或 B7 分子。在另一个实施方案中, 免疫调节化合物诱导或增强以下物质的表达: 热稳定抗原 (HSA) (Liu Y. 等人 (1992) J. Exp. Med. 175:437-445)、硫酸软骨素修饰的 MHC 恒定链 (Ii-CS) (Naujokas M. F. 等人 (1993) Cell 74:257-268) 或胞内粘附分子 1 (ICAM-1) (Van R. H. (1992) Cell 71:1065-1068), 在另一个实施方案中, 这通过与它们在 T 细胞上的同源配体相互作用促进共刺激。

[0254] 在另一个实施方案中, 组合物包含溶剂, 所述溶剂包括水、分散介质、细胞培养基、等渗剂等等。在另一个实施方案中, 溶剂是 pH 为大约 7.0 的水性等渗缓冲液。在另一个实施方案中, 组合物包括稀释剂诸如水、磷酸缓冲盐溶液或生理盐水。在另一个实施方案中, 组合物包括溶剂, 其是非水的, 诸如丙基乙二醇、聚乙二醇和植物油。

[0255] 在另一个实施方案中, 将组合物配制为通过本领域技术人员已知的众多技术之一进行施用。例如, 本发明提供药物组合物的以下施用方式: 肠胃外、静脉内、皮下、皮内、粘膜内、局部地、口服或通过吸入。

[0256] 在另一个实施方案中, 包括本发明肽的疫苗还包括细胞群, 在另一个实施方案中, 其包括淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、内皮细胞、干细胞或其组合, 在另一个实施方案中其相对于彼此是自体的 (autologous)、同基因的 (syngeneic) 或异基因的 (allogeneic)。在另一个实施方案中, 细胞群包括本发明的肽。在另一个实施方案中, 细胞群摄取所述肽。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0257] 在另一个实施方案中, 本发明的细胞群获自体内来源, 诸如, 例如, 外周血、白细胞分离 (leukopheresis) 血液制品、分离 (apheresis) 血液制品、外周淋巴结、肠相关淋巴组织、脾、胸腺、脐带血、肠系膜淋巴结、肝、免疫病变部位例如滑液、胰、脑脊液、肿瘤样本、肉芽肿组织, 或其中可以获得这类细胞的任意其他来源。在另一个实施方案中, 细胞群获自人类来源, 在其他实施方案中, 其来自人类胎儿、新生儿、儿童或成人来源。在另一个实施方案中, 本发明的细胞群获自动物来源, 诸如, 例如, 猪的或猴的, 或任意其他感兴趣的动物。在另一个实施方案中, 本发明的细胞群获自对象, 所述对象是正常的, 或在另一个实施方案中, 是患病的, 或在另一个实施方案中, 易患感兴趣的疾病。

[0258] 在另一个实施方案中, 通过基于亲和力的分离方法来分离本发明的细胞群。在其他实施方案中, 用于亲和分离的技术包括磁性分离、使用抗体包被的磁珠、亲和层析、与单克隆抗体连接或与单克隆抗体联用的细胞毒剂, 例如补体和细胞毒素, 以及利用粘附到固体基质 (诸如板) 的抗体进行“淘选”, 或任意其他便利的技术。在其他实施方案中, 分离技术包括使用荧光活化细胞分选器, 其可以具有不同程度的复杂度, 诸如多通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道, 等等。在其他实施方案中, 可以使用能够分离本发明细胞群的任意技术, 这被认为是本发明的一部分。

[0259] 在另一个实施方案中,树突状细胞来自在各种淋巴和非淋巴组织中发现的形态类似细胞类型的各种群体,并如此鉴定(Steinman(1991)Ann. Rev. Immunol. 9:271-296)。在另一个实施方案中,用于本发明的树突状细胞分离自骨髓,或在另一个实施方案中,来源于骨髓祖细胞,或,在另一个实施方案中,分离自/来源于外周血,或在另一个实施方案中,来源于细胞系,或是细胞系。

[0260] 在另一个实施方案中,本文描述的细胞群分离自哺乳动物(诸如鼠、猿或人)的白细胞组分(参见,例如,WO 96/23060)。在另一个实施方案中,白细胞组分可以从哺乳动物的外周血分离。

[0261] 用于分离树突状细胞的方法是本领域公知的。在另一个实施方案中,DC 通过包括下列步骤的方法进行分离:(a) 通过本领域已知的方法诸如白细胞分离法,提供从哺乳动物来源获得的白细胞组分;(b) 通过逆流离心洗脱,将步骤(a)的白细胞组分分离为4个或更多个亚组分;(c) 通过将细胞与钙离子载体、GM-CSF 和 IL-13 或 GM-CSF 和 IL-4 接触,将来自步骤(b)的一个或更多个组分中的单核细胞刺激转化为树突状细胞;(d) 鉴定来自步骤(c)的树突状细胞富集组分;和(e) 收集步骤(d)的富集组分,优选的在大约4°C。

[0262] 在另一个实施方案中,树突状细胞富集组分通过荧光激活细胞分类术进行鉴定,其鉴定下列标记物中的至少一种:HLA-DR、HLA-DQ 或 B7. 2,并且鉴定下列标记物的同时缺失:CD3、CD14、CD16、56、57 和 CD 19、20。

[0263] 在另一个实施方案中,细胞群包括淋巴细胞,在另一个实施方案中,其是 T 细胞,或在另一个实施方案中,是 B 细胞。在其他实施方案中,T 细胞被表征为 NK 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)、TBL、天然 T 细胞,或其组合。应理解作为原代或细胞系、克隆等等的 T 细胞被认为是本发明的一部分。在另一个实施方案中,T 细胞是 CTL,或 CTL 系,CTL 克隆,或从肿瘤、炎性或其他浸润液分离的 CTLs。

[0264] 在另一个实施方案中,造血干细胞或早期祖细胞包括用于本发明的细胞群。在另一个实施方案中,所述群是通过白细胞分离法分离或衍生的。在另一个实施方案中,在细胞因子施用之后,从骨髓、外周血(PB)或新生脐带血进行白细胞分离。在另一个实施方案中,干细胞或祖细胞的特征在于已知为 CD34⁺的表面抗原标记物的表面表达,和表面谱系抗原标记物的表达排除, Lin⁻。

[0265] 在另一个实施方案中,连同骨髓细胞,给对象施用本发明的肽、组合物或疫苗。在另一个实施方案中,与骨髓细胞一起施用的实施方案在之前对象的放射之后进行,作为疗程的一部分,以便遏制、抑制或治疗对象的癌症。

[0266] 在另一个实施方案中,短语“接触细胞”或“接触群”是指暴露的方法,其在该其他实施方案中可以是直接或间接的。在另一个实施方案中,这种接触包括通过本领域公知的任意方式直接注射细胞,诸如显微注射。在另一个实施方案中,还可以预见,提供给细胞是间接的,诸如通过在细胞周围的培养基中提供,或通过本领域公知的任意途径并如本文所述给对象施用。

[0267] 在另一个实施方案中,本发明方法的 CTL 产生在体内实现,并受到向对象引入抗原呈递细胞(体外与本发明的肽接触)的影响(参见例如 Paglia 等人(1996)J. Exp. Med. 183:317-322)。

[0268] 在另一个实施方案中,将本发明方法和组合物的肽递送给 APC。在另一个实施方案

中,将肽刺激的 APC 给对象施用以引发免疫应答,或治疗或抑制肿瘤的生长或复发。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0269] 在另一个实施方案中,以编码肽的 cDNA 形式将肽递送给 APC。在另一个实施方案中,术语“抗原呈递细胞 (APC)”是指树突状细胞 (DC)、单核细胞 / 巨噬细胞、B 淋巴细胞或表达必需 MHC/ 共刺激分子的其他细胞类型,它们有效的允许呈递肽的 T 细胞识别。在另一个实施方案中,APC 是癌细胞。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0270] 在另一个实施方案中,CTL 与 2 种或更多种 APC 群接触。在另一个实施方案中,2 种或更多种 APC 群呈递不同的肽。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0271] 在另一个实施方案中,使用在 APC (例如 DC) 的胞浆中引起抗原表达的技术将肽递送到 APC。用于在 APC 上表达抗原的方法是本领域公知的。在另一个实施方案中,技术包括 (1) 将编码本发明肽的裸 DNA 导入 APC, (2) 用表达本发明肽的重组载体感染 APC, 和 (3) 使用脂质体将本发明的肽导入 APC 的胞浆。(参见 Boczkowski D. 等人 (1996) J. Exp. Med. 184:465-472 ;Rouse 等人 (1994) J. Virol. 68:5685-5689 ;and Nair 等人 (1992) J. Exp. Med. 175:609-612)。

[0272] 在另一个实施方案中,如本文所举例的,使用培养的 APC 诸如来源于人细胞系 174xCEM. T2 (称为 T2) 的那些,其在它的抗原加工途径中包含突变,这限制了内源肽与细胞表面 MHC I 类分子的结合 (Zweerink 等人 (1993) J. Immunol. 150:1763-1771)。

[0273] 在另一个实施方案中,如本文所述,将对象暴露于肽或包括本发明肽 (其不同于表达的天然蛋白) 的组合物 / 细胞群,其中随后形成宿主免疫与天然蛋白 / 抗原的交叉反应。

[0274] 在另一个实施方案中,在本发明任意方法或实施方案中涉及的对象是人。在其他实施方案中,对象是哺乳动物,其可以是小鼠、大鼠、兔、仓鼠、豚鼠、马、牛、绵羊、山羊、猪、猫、狗、猴或猿。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0275] 在另一个实施方案中,本发明的肽、疫苗和组合物刺激导致肿瘤细胞裂解的免疫应答。

[0276] 在另一个实施方案中,使用本文描述的任意方法来引发 CTL,其是体外引发的。在另一个实施方案中,CTL 是离体引发的。在另一个实施方案中,CTL 是体外引发的。在另一个实施方案中,将获得的 CTL 给对象施用,从而治疗与肽、包括肽的表达产物或其同系物相关的病症。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0277] 在另一个实施方案中,所述方法要求使用例如一或多种核酸递送技术导入编码本发明肽的遗传序列。在另一个实施方案中,本发明的核酸包括 DNA、RNA 以及 DNA 和 RNA 的混合物,单独的或与非核酸组分联用。在另一个实施方案中,所述方法包括给对象施用包括核苷酸序列的载体,所述核苷酸序列编码本发明的肽 (Tindle, R. W. 等人 Virology (1994) 200:54)。在另一个实施方案中,所述方法包括给对象施用裸 DNA,所述裸 DNA 编码本发明的肽或在另一个实施方案中编码本发明的两种或更多种肽 (Nabel, 等人 PNAS-USA (1990) 90:11307)。在另一个实施方案中,使用多表位、基于类似物的癌症疫苗 (Fikes 等人, Design of multi-epitope, analogue-based cancer vaccines. Expert Opin Biol Ther. 2003 Sep ;3 (6) :985-93)。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0278] 核酸可以通过本领域已知的任意方法给对象施用,包括肠胃外或静脉内施用,或

在另一个实施方案中,通过基因枪。在另一个实施方案中,核酸在组合物中施用,其在其他实施方案中对应于本文所列的任意实施方案。

[0279] 用于本发明方法的载体可以包括有利于或允许本发明肽表达的任意载体。在一些实施方案中,载体包括减毒病毒,诸如牛痘或鸡痘,诸如描述于,美国专利 4,722,848,引入本文作为参考。在另一个实施方案中,载体是 BCG(结核活菌苗),诸如描述于 Stover 等人(Nature 351:456-460(1991))。可用于本发明肽的治疗性施用或免疫的多种其他载体,例如伤寒沙门氏菌载体等等,根据此处的描述对本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0280] 在另一个实施方案中,如本文所述,所述载体还编码免疫调节化合物。在另一个实施方案中,在给对象施用编码本发明肽的载体的同时、之前或之后,给所述对象施用编码免疫调节化合物的另外的载体。

[0281] 在另一个实施方案中,将本发明的肽、组合物和疫苗给对象施用,或在本发明的方法中使用,与其他抗癌化合物和化疗剂联用,包括单克隆抗体,其针对其他的(alternate)癌症抗原或在另一个实施方案中由 AA 序列组成的表位,所述 AA 序列对应于或部分对应于作为本发明肽来源的序列。

[0282] 本发明预期剂量范围的各种实施方案。在另一个实施方案中,剂量是 20 μg 每种肽每天。在另一个实施方案中,剂量是 10 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 30 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 40 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 60 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 80 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 100 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 150 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 200 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 300 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 400 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 600 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 800 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 1000 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 1500 μg /肽/天。在另一个实施方案中,剂量是 2000 μg /肽/天。

[0283] 在另一个实施方案中,剂量是 10 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 30 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 40 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 60 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 80 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 100 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 150 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 200 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 300 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 400 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 600 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 800 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 1000 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 1500 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 2000 μg /肽/剂量。

[0284] 在另一个实施方案中,剂量是 10-20 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 20-30 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 20-40 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 30-60 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 40-80 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 50-100 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 50-150 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 100-200 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 200-300 μg /肽/剂量。在另一个实施方案中,剂量是 300-400 μg /肽/剂量。在另一

个实施方案中,剂量是 400-600 μg / 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 500-800 μg / 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 800-1000 μg / 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 1000-1500 μg / 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 1500-2000 μg / 肽 / 剂量。

[0285] 在另一个实施方案中,每剂量或每天的肽总量是上述量之一。在另一个实施方案中,每剂量的总肽剂量是上述量之一。

[0286] 每种上述剂量代表本发明不同的实施方案。

[0287] 本发明预期剂量范围的各种实施方案。在另一个实施方案中,剂量是 20mg 每种肽每天。在另一个实施方案中,剂量是 10mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 30mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 40mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 60mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 80mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 100mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 150mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 200mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 300mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 400mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 600mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 800mg/ 肽 / 天。在另一个实施方案中,剂量是 1000mg/ 肽 / 天。

[0288] 在另一个实施方案中,剂量是 10mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 30mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 40mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 60mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 80mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 100mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 150mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 200mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 300mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 400mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 600mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 800mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 1000mg/ 肽 / 剂量。

[0289] 在另一个实施方案中,剂量是 10-20mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 20-30mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 20-40mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 30-60mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 40-80mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 50-100mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 50-150mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 100-200mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 200-300mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 300-400mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 400-600mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 500-800mg/ 肽 / 剂量。在另一个实施方案中,剂量是 800-1000mg/ 肽 / 剂量。

[0290] 在另一个实施方案中,每剂量或每天的肽总量是上述量之一。在另一个实施方案中,每剂量的总肽剂量是上述量之一。

[0291] 每种上述剂量代表本发明不同的实施方案。

[0292] 在另一个实施方案中,本发明提供一种包括本发明的肽、组合物或疫苗的试剂盒。在另一个实施方案中,所述试剂盒还包括标签或包装说明书。在另一个实施方案中,通过利用延迟型超敏反应测试,使用试剂盒来检测 WT-1 特异性 CD4 应答。在另一个实施方案中,所述试剂盒用于本文列举的任意其他方法。在另一个实施方案中,所述试剂盒用于本领域已知的任意其他方法。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

[0293] 在恶性细胞独有或差异表达的那些抗原中,WT-1 被认为是最有希望的之一 (47)。

但是, 先前鉴定和报道的免疫原性 WT-1 肽抗原的数目是非常有限的, 并主要限于 HLA 等位基因 A0201、A2402 和 DRB10401 呈递的一组肽中。由下文所述的实施例可以看出, 使用加载于自体 APC 的跨越 WT-1 氨基酸序列的重叠 15- 聚体肽库进行致敏, 从 41/56 (78%) 的正常供体的血液中产生 WT-1 肽特异性 $\text{IFN } \gamma^+ \text{CD4}^+$ 和 CD8^+ T 细胞, 从而鉴定引发这些应答的表位和它们的呈递 HLA 等位基因。在描述的 42 种 WT-1 肽抗原中, 迄今为止只有一种被鉴定过。鉴定的新免疫原性肽包括 I 类 HLA 等位基因呈递的 36 种肽和 II 类 HLA 等位基因呈递的 5 种肽。在 I 类 HLA 等位基因呈递的肽中, 鉴定出 10 个九聚体表位, 其可以由 2-4 个不同的 HLA 等位基因呈递。在 4 种十五肽中还鉴定出共诱导可区分的 $\text{CD4}^+ \text{IFN } \gamma^+$ 和 $\text{CD8}^+ \text{IFN } \gamma^+$ T 细胞的重叠 11- 聚体和九聚体序列。可以轻易的确定在遗传两种呈递 HLA 等位基因或 I 类和 II 类呈递 HLA 等位基因 (在这些情况下重叠序列包含于相同的 15- 聚体) 的个体中被超过一种等位基因呈递的表位是否可以引发增强的 WT-1 特异性应答及其程度; 但是, 在 WT-1 疫苗中包括这种肽可以将它们的适用范围显著变宽, 尤其在未遗传 HLA-A0201 或 A2402 的患者中。

[0294] 如实施例所示, 由 I 类 HLA 等位基因呈递的那些肽引发 $\text{IFN } \gamma^+ \text{CD8}^+$ T 细胞, 其在 50/51 (99%) 和 48/51 (94%) 的被测培养物中 (表 1, 2) 分别能够裂解加载肽的自体 APC 以及具有 T 细胞的限制性 HLA 等位基因的异基因 APC。更重要地, 在能够检测到的 36 个 HLA 限制性 WT-1 肽特异性 T 细胞系中, 对 29 种表位 (包括 II 类等位基因呈递的 2/4 表位和 I 类等位基因呈递的 27/32 表位) 特异的 T 细胞系还能够裂解具有 T 细胞的限制性 HLA 等位基因的 WT-1⁺ 白血病原始细胞。HLA 限制性 WT-1 表位特异性 T 细胞不能裂解来自相同白血病患者异基因 PHA 原始细胞 (表 3A), 以及与用单独的自体 EBVBLCL 致敏的相同 T 细胞的等分试样相比, 用加载 WT-1 肽的自体 EBVBLCL 致敏的 T 细胞的不同杀白血病细胞活性 (表 3B), 表明杀白血病活性是 WT-1 肽特异性的, 而非污染的同种反应性 T 细胞的结果。因此, 这些数据显示, 在适合于 WT-1 表位特异性 T 细胞识别和细胞溶解的浓度, 29/36 的所鉴定 WT-1 免疫原性肽 (80%) 能够被加工并被 WT-1⁺ 白血病细胞呈递。

[0295] 在图 4 中, 显示 WT-1 蛋白。图 4C 显示所有先前报道的由 HLA I 类和 II 类等位基因呈递的抗原性表位的位置; 图 4D 描述该报道鉴定的免疫原性肽的位置。可以看出, 先前报道的由 I 类呈递的 11 个表位和由 II 类 HLA 等位基因呈递的 10 个表位主要聚簇于外显子 1、7 和 10 编码的序列, 而用 WT-1 肽库致敏的正常 T 细胞识别的表位主要聚簇于前 5 个外显子编码的序列。因此, 26 个新表位被归入源于剪接变体的 4 种 WT-1 主要同种型中的每一种, 其包括或不包括外显子 5 的 17 氨基酸序列 (氨基酸 250-266) 以及锌指 3 和 4 之间的 3 氨基酸序列 (400-410KTS)。尽管表位是广泛分布的, 在外显子 1 的 RNA 识别域和接近外显子 5 的剪接 17aa 片段的活化域 (aa 181-250) (图 4F) 检测到表位簇。后一区域还包含被多个供体最常识别的那些表位 (图 4E)。有趣地是, 9 个新鉴定的表位定位到 N 端的 126 个氨基酸的序列 (由 Gessler 等人 (37) 最初描述的 WT-1 基因的片段编码) (即 WT-1 的 (Exon 5+, KTS+) 同种型的外显子 1 的着丝粒), 并包括 WT-1 的长同种型 (从位于外显子 1.50 的 AUG 起始子上游的 CUG 密码子开始)。令人惊讶的, 在该序列中鉴定的每一表位都引发 $\text{IFN } \gamma^+$ T 细胞, 其对共表达 WT-1 和 T 细胞的限制性 HLA 等位基因的白血病原始细胞是溶胞性的。

[0296] 在特定肿瘤差异表达的数种“自身”蛋白诸如 WT-1、NY-ESO-1、HER2/neu、MAGE 等

等中,只有 WT-1 和 MART-1 显示在正常供体中引发应答 (31, 32, 51-54)。与此相反,在一定比例的患有过表达这些蛋白的肿瘤的患者中,已经记录了对这些蛋白中每种特异的 T 细胞 (55)。具体来说,已经在患有白血病、骨髓瘤、乳腺癌和前列腺癌及其他实体瘤的患者中检测到对 WT-1 的 RMF 和 CMT 肽特异的 T 细胞 (31, 32, 56-61)。已经记载了当前研究中在 50-60% 的卵巢癌患者中鉴定到对数种 WT-1 表位的应答。考虑到在蛋白诸如 NY-ESO-1 和 HER2/neu (其在载有肿瘤的宿主中引发应答) 中较高数目的有效免疫原性表位 (62), 我们鉴定出的免疫原性 WT-1 肽的数目的不同之处不足以解释正常供体中 WT-1 应答的差异化存在。此外, Pospori 等人 (63) 已经证明,表达转导的 TCR (对 HLA-A0201 呈递的 WT-1 肽特异) 的 HSC 在 HLA-A0201 转基因小鼠的胸腺中没有被去除,并产生功能性记忆 T 细胞。但是,尽管这种缺乏“自体”耐受性的基础是不清楚的, Rezvani 等人的研究 (31) 和本文的数据 (图 1A) 表明,健康供体的血液中 WT-1 特异性 T 细胞的频率较低。在某种程度上,这反映了正常个体中 WT-1 表达的低水平和有限组织分布 (18-20)。最近, Rezvani 等人 (64) 还证明了在重复接种 WT-1 肽的患者中对 WT-1 的 T 细胞应答下降,表明这些应答受高度调控。Lehe 等人 (65) 最近还显示,在高浓度 IL-2 存在的条件下,用 DRB10402 呈递的 WT-1 肽对 T 细胞的致敏优选的刺激 CD25⁺FOXP3⁺GITR⁺CD127⁻ 调节性 T 细胞的产生,其能够抑制 CD8⁺WT-1 特异性 T 细胞应答。

[0297] 在本文使用的培养条件下,加载 WT-1 肽库的自体 DC 和 EBVBLCL 优选的在 41/56 的正常供体 (73%) 中诱导 CD8⁺和 CD4⁺IFN γ ⁺WT-1 肽特异性 T 细胞的产生。尽管每个供体只识别 1-3 个 WT-1 表位,对这些表位的 80% 特异的 T 细胞能够识别具有 T 细胞呈递 HLA 等位基因的 WT-1⁺白血病细胞的事实表明,异常表达的 WT-1 的更新和加工较高,允许这些白血病细胞表达的限制性 HLA 等位基因同时呈递数种不同的 WT-1 表位。这些表位的鉴定有利于用于继承性细胞疗法的有效杀肿瘤的 WT-1 特异性 T 细胞的体外产生,以及用于刺激 T 细胞应答 (用于消灭体内表达 WT-1 的克隆源性肿瘤细胞) 的更广泛适用范围疫苗的产生。

[0298] 在一个实施方案中,来自 WT-1 蛋白序列 (其位于外显子 1 的上游,即在 SEQ ID NO:194 的前 126 个氨基酸内) 的肽迄今为止未被识别为免疫原性表位的位点,因此未被认为是可用于本文目的的肽。

[0299] 实施例 1

[0300] HLA-A0201 和 -A0301 通过来源于 WT-1 的合成肽类似物结合

[0301] 材料和试验方法。肽由 Genemed Synthesis Inc, CA 使用茱甲氧羰酰化学法和固相合成法合成,并用高压液相层析 (HPLC) 纯化。通过 HPLC 分析评价肽的质量,并利用基质辅助的激光解吸质谱来测量预期分子量。肽是无菌的,并且纯度 >90%。将肽溶于 DMSO,并用 PBS (pH 7.4) 或盐溶液稀释以获得 5 毫克每毫升 (mg/ml) 的浓度,保存于 -80°C。对于体外实验,使用无关对照肽 HLA A24 共有序列 (consensus)。

[0302] 肽序列分析。使用 2 个数据库进行肽序列分析。第一个数据库是 Bioinformatics & Molecular Analysis Section (National Institutes of Health, Washington, DC) (Parker KC 等人, Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J Immunol 152:163-175, 1994) 的软件,其基于来自 HLA I 类分子的预测半衰期解离系数排列 9-聚体或 10-聚体肽。第二个数据库, SYFPEITHI 预测软件,描述于

Rammensee HG 等人 (SYFPEITHI:database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics 50:213-219,1999)。用于体外实验的无关对照肽是:对于 II 类是 RAS (TEYKLVVVGAPGVGKSALTIQ ;SEQ ID NO:49) 或 CML b2a2 (VHSIPLTINKEEALQRPVASFDFE ;SEQ ID NO:50),对于 I 类是 HIV pol (ILKEPVHGV ;SEQ ID NO:51) 或 CML F (YLKALQRPY ;SEQ ID NO:52)。

[0303] 细胞系。在添加 5% FCS、青霉素、链霉素、2mM 谷氨酰胺和 2- 巯基乙醇的 RPMI 1640 培养基中,在 37°C 包含 5% CO₂ 的湿润空气中培养细胞系。T2 是人细胞系,不含 TAP1 和 TAP2,因此不会呈递来源于细胞溶质蛋白的肽。Raji 细胞是显示高水平 TAP 表达的人伯基特淋巴瘤细胞。

[0304] 研究的人间皮瘤细胞系包括:肉瘤样的 (VAMT, H2373, H28)、上皮状的 (H2452) 和两相性的 (JMN, MSTO 和 H-Meso1A)。细胞系获自下列来源:H-Meso1A:NCI, Bethesda, MD ; JMN 和 VAMT:Dr. Sirotnak, Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) ;H-2452 和 H2373:Dr. Pass, Karmanos Cancer Institute, Wayne State University, Detroit, MI ;H28 和 MSTO: 美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA)。细胞系在供应商推荐的培养基中维持,并在含 5% CO₂ 的湿润培养箱中孵育。

[0305] 间皮瘤细胞系 Meso 11、Meso 34、Meso 37、Meso 47 和 Meso 56 获自 Dr. M Gregoire (Institute of Biology, Nantes, France), 并在 RPMI 1640 (Life Technologies)+10% 胎牛血清 (FCS)、1% 青霉素-链霉素和 1% L- 谷氨酰胺中培养。所有细胞都由 MSKCC 的细胞免疫学系进行 HLA 分型。黑色素瘤细胞系 Mewo (WT-1⁻A201⁺) 获自 ATCC。SKRC-52 肾细胞癌获自 Ludwig Institute 的 L. Old。白血病细胞系在 RPMI 1640+10% FCS、1% 青霉素-链霉素、2mM 谷氨酰胺和 2- 巯基乙醇,37°C /5% CO₂ 的条件下培养。LAMA81、BV173 和 697 都是 WT-1⁺ 和 A0201⁺ 的 Ph⁺ 白血病细胞,由 Dr. HJ Stauss (University College London) 提供。SKLY-16 是人 B 细胞淋巴瘤 (WT-1⁻, A0201⁺) ;K562、RwLeu4 和 HL60 都是 WT-1⁺ 白血病细胞,获自 ATCC。

[0306] 用于 HLA A0201 分子的肽结合和稳定的 T2 测定法。T2 细胞 (TAP⁻, HLA-A0201⁺) 按照 1×10⁶ 细胞/ml 的浓度,在添加 5 μg/ml 人 β_{2m} (Sigma, StLouis, MO) 的不含 FCS 的 RPMI 培养基中于 27°C 孵育过夜,所述 RPMI 培养基不含 (阴性对照) 或存在各种终浓度 (50, 10, 1 和 0.1 微克 (μg)/ml) 的阳性参照酪氨酸酶肽或测试肽。与 5 μg/ml 布雷菲尔德菌素 A (Sigma) 孵育 4 小时后,将 T2 细胞在 4°C 用饱和浓度的抗 HLA-A2.1 (BB7.2) mAb 标记 30 分钟,然后洗涤两次。然后将细胞与饱和浓度的缀合 FITC 的山羊 IgG F(ab')₂ 抗小鼠 Ig (Caltag, San Francisco, CA) 在 4°C 孵育 30 分钟,洗涤两次,在 PBS/1% 多聚甲醛中固定,并使用 FACS Calibur® 细胞荧光计 (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA) 进行分析。

[0307] 观察到的针对每种肽浓度的荧光平均强度 (MIF) (在除以不含肽的 MIF 之后) 被用作肽结合的指示,并表示为“荧光指数”。类似地进行稳定测定法。在时间为 0 时进行肽结合的初始评估之后,细胞用 RPMI 完全培养基洗涤以去除游离肽,并在 0.5 μg/ml 布雷菲尔德菌素-A 连续存在的条件下孵育 2, 4, 6 或 8 小时。

[0308] 如上所述通过免疫荧光估算稳定的肽-HLA-A2.1 复合物的数目。复合物的半衰期是时间为 0 时的 MIF 值降低 50% 所需时间的估值。

[0309] WT-1 肽。由 Gessler 等人 (37) 公开的 WT-1 蛋白序列 (其包括 575 个氨基酸并包括在 WT-116 的 (外显子 5+, KTS+) 同种型中 N 端缺失的前 126 个氨基酸) 被用于设计肽序列 (SEQ ID NO:1; 图 2A)。跨越该序列的 141 个十五肽 (每个与下一个重叠 11aa) 由 Invitrogen (Baltimore, MD) 按照已验证序列的说明进行合成, 95% 纯度, 无菌且不含内毒素。将这 141 个 15- 聚体等量混合以形成总肽库, 其中每种肽的浓度为 0.35mcg/ml。该库用于 T 细胞致敏。为了鉴定引发应答的肽, 建立包含 12 个十五肽 (4.17mcg/ml/ 肽) 的子库, 以形成其中每种肽只被包含入两个重叠子库的定位矩阵 (图 2B)。

[0310] WT-1 特异性 T 细胞的产生: 根据 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, NY) 伦理委员会批准的方案, 从 56 个知情同意的正常供体获得外周血。通过标准技术按照高分辨率将所有供体分型为 HLA-A, B, C, DR 和 DQ

[0311] 使用细胞因子活化的单核细胞 (CAM) 作为抗原呈递细胞 (APC), 并如先前所述 (32) 产生。简单来说, 通过粘附到塑料上分离外周血单核细胞, 并在包含 1% 自体血清的 RPMI 1640 中培养。在第 0, 2, 4 天, 添加 GM-CSF (Berlex, Montville, NJ) 和白介素 -4 (IL-4) (R&D Systems, Minneapolis, MN) 到终浓度分别为 2000U/ml 和 1000U/ml。在第 5 天, 这些细胞再用 TNF α (10ng/ml)、白介素 -6 (IL-6) (1000IU/ml)、IL1 ((400IU/ml)、PGE2 (25mM-3) (R&D Systems, Minneapolis, MN) 以及相同剂量的 GM-CSF 和 IL-4 进行处理。经 FACS 分析确定, 培养第 7 天收集的 CAM 表达 CD83、CD80、CD86 以及 HLA I 类和 II 类等位基因。

[0312] 如实验中所述, EBV-BLCL 也被用作加载 WT-1 肽和对照 APC 或作为靶标。如先前所述, 它们通过用 EBV 株 B95.8 (38, 39) 感染外周血单个核细胞 (PBMC) 产生。在存在无环鸟苷的条件下, 在含 10% 胎牛血清 (Gemini) 的 RPMI 1640 (Gemini) 中培养 EBV 转化的 BLCL (EBV-BLCL)。

[0313] WT-1 特异性 T 细胞的致敏和增殖。为了产生 WT-1 特异性 CTL, 通过 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心分离 PBMC。按照先前的描述 (32), 单核细胞通过粘附到塑料上去除, 而 NK 细胞吸附到免疫磁性 CD56 预包被微珠 (Miltenyi Biotech Inc, MA)。按照 20:1 的应答物: 刺激剂比例, 用自体 CAM 或 EBV-BLCL (已经在不含血清的培养基中用 WT-1 十五肽的总库预加载 3 小时并辐射到 3000cGy) 刺激富集 T 细胞的组分。T 细胞在添加 5% AB 人血清 (YH5, Gemini) 的 Yssel's 培养基中培养, 用加载自体 WT-1 总库的 CAM 或 EBV-BLCL 每周再刺激, 并且每 2-3 天按照 10-50U/ml 添加白介素 -2 (IL-2) (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)。

[0314] 细胞靶标 - 白血病细胞: 如先前所述 (32, 38), 使用鼠抗人 WT-1 单克隆抗体 (Neomarkers, Fremont, CA), 通过胞内 FACS 染色表征 24 种原代白血病细胞和 1 种白血病细胞系的 WT-1 表达。WT-1⁺ 白血病细胞包括来自 11 个原代 AML、3 个原代 ALL 和 1 个 B 细胞前体 ALL 细胞系的母细胞。使用 10 个 WT-1 白血病细胞作为对照, 并包括 3 个 B 细胞前体 ALL 和 7 个 AML。

[0315] 通过标准技术在高分辨率下将所有 EBV BLCL 和白血病细胞分型为 HLA A, B, C, DR 和 DQ 等位基因。

[0316] T 细胞应答的评价。

[0317] WT-1 特异性 T 细胞的 IFN γ 产生。如先前所述 (38, 40), 响应第二次刺激 (利用加载于自体 PBMC 的 WT-1 总库、WT-1 子库或单个 WT-1 15- 聚体或 9- 聚体 WT-1 肽) 产生

IFN γ 的 T 细胞的比例和表型 (CD4 和 CD8) 通过包含胞内 IFN γ 的 T 细胞的 FACS 分析进行测量。

[0318] 免疫原性表位的定位。将用 WT-1 总库刺激 35-42 天的 T 细胞的等分试样洗涤,用加载 WT-1 十五肽每种子库之一的自体 PBMC 再刺激过夜。如先前所述 (41),通过对包含胞内 IFN γ 的 T 细胞进行 FACS 分析,将针对每种子库的 T 细胞应答定量。然后使用定位网格 (图 2B) 鉴定被引发 T 细胞应答的 2 种子库独享的特异性 WT-1 15-聚体。这些 15-聚体以及 15-聚体内的 9-聚体或 11-聚体序列作为二次单肽刺激剂进行分析,以确认它们的免疫原性并确定在引发应答的 15-聚体内的免疫原性表位。

[0319] 细胞毒活性。在标准的 Cr51 释放测定法中测量致敏 T 细胞针对以下的 WT-1 特异性和 HLA 限制性细胞毒活性:一组 HLA 匹配和不匹配的 CAM 靶标 (未修饰的或加载总库的),如先前所描述 (32) 鉴定的引发 T 细胞应答的 WT-1 的 15-聚体,或 9-聚体或 11-聚体表位。此外,通过测量致敏 T 细胞针对一组异基因 CAM (预先加载肽,如先前描述每种具有在应答性 WT-1 特异性 T 细胞上表达的单个 HLA 等位基因 (41)) 的细胞毒性,鉴定出呈递每种免疫原性表位的限制性 HLA 等位基因。如先前所述 (32),在所述细胞毒性测定 Cr51 测定法中还评价了 WT-1 表位特异性 CTL 针对 WT-1⁻和 WT-1⁺白血病细胞系或表达限制性 HLA 等位基因的原代白血病细胞的细胞毒活性。

[0320] 鉴定的免疫优势 WT-1 来源表位的免疫原性。为了估算鉴定的 WT-1 肽表位在不同个体中的免疫原性,将从正常供体组的 PBMC 分离的富集 T 细胞 (表达一系列占优势的 HLA 等位基因 (即 HLA-A0201, A0301, A2402, B0702) 之一,其先前被鉴定为新鉴定的 WT-1 表位的呈递者) 在体外用人工抗原呈递细胞 (AAPC) 致敏 (42),所述 AAPC 表达该 HLA 等位基因并加载预先鉴定的 WT-1 表位或无关肽。AAPC 组包括表达下列单个 HLA 等位基因之一的 AAPC: HLA A0201, A0101, A0301, A2402, B0702 或 B0801,其如先前所述产生 (42)。将 T 细胞与加载肽的 AAPC 在存在 IL2 的条件下共培养 35 天后,CTL 用加载致敏肽或无关肽的自体 PBMC 进行第二次刺激过夜,检测它们的 IFN γ 应答。如果响应二次刺激 (利用加载刺激性 WT-1 来源肽的自体 PBMC) 的产生 IFN γ 的 T 细胞比例超过与 PBMC 单独孵育的 IFN γ T 细胞的背景比例两倍或更多,则应答被记为阳性的。

[0321] 实施例 2

[0322] 正常供体对 WT-1 十五肽的总库的应答。

[0323] 最初测量 WT-1 特异性 IFN γ ⁺T 细胞在 41 个正常供体的 PBMC 中的频率。这些频率范围在 0.01% 到 1.82% 之间,只在 10/41 的个体中超过在用自体 PBMC 单独刺激的 T 细胞中检测到的 IFN γ ⁺T 细胞背景 (图 1A)。对来自 56 个正常供体的 T 细胞进行体外致敏 (利用加载 WT-1 十五肽的总库的自体 CAM) 35-42 天导致在 41/56 的病例 (73%) 中 IFN γ ⁺T 细胞的显著扩增 (图 1A)。从 38/56 的供体产生的 T 细胞还显示针对自体 PHA 原始细胞 (加载 WT-1 总库) 的细胞毒活性 (图 1B),包括来自 38/41 的供体的 T 细胞,其对利用 WT-1 肽库的二次刺激发生应答而产生 IFN γ 。

[0324] 将先前报道的预测结合 HLA-A0201 等位基因的 WT-1 表位之一, ¹²⁶⁻¹³⁴RMFPNAPYL (SEQ ID NO:21;RMF) (43),与 WT-1 十五肽的总库比较当加载于自体 CAM 时在 HLA-A0201⁺正常供体 (n = 14) 中刺激 WT-1 反应性 T 细胞的能力。在 9/14 的供体中检测到最初用 RMF 肽致敏的 IFN γ ⁺T 细胞的频率增加,其中 7 个还对利用肽库的二次刺激产

生应答(图 1C)。与此相反,最初用 WT-1 肽库致敏的 12/14 的 CTL 系在用 WT-1 肽库二次刺激后产生高频率的 $\text{IFN } \gamma^+$ T 细胞,包括还对 RMF 产生应答的 6 个 CTL 系。对用总库致敏的 T 细胞识别的 WT-1 表位(参见下文)定位,在 12/14 的供体中鉴定出 RMF 以外的表位。对那些表位的应答大小要比对 RMF 肽的高得多(图 1C)。只有 4/14 的最初用 RMF 致敏的 CTL 系显示针对加载 RMF 的自体 PHA 原始细胞的细胞毒活性;其中 3 个还能够裂解加载 WT-1 库的自体 PHA 原始细胞(图 1D)。与此相反,10/14 的用 WT-1 肽库致敏的 CTL 对加载 WT-1 总库的 PHA 原始细胞显示细胞毒性,包括裂解加载 RMF 肽的原始细胞的 3/14(图 1D)。因此,在高比例的 HLA A0201⁺供体中,利用 WT-1 总库刺激 T 细胞比用单个 HLA A0201 结合 RMF 肽刺激更稳定地引发 WT-1 特异性 T 细胞应答。

[0325] 图 1 的详细说明。通过用加载 WT-1 来源的十五肽总库的自体 APC 刺激,从正常供体 ($n = 56$) 的 PBMC 产生的 CTL 的 WT-1 特异性应答:A. $\text{IFN } \gamma$ 在以下细胞中的产生:单独的 PBMC(作为背景),与十五肽(跨越 WT-1 蛋白全序列)总库共孵育过夜的 PBMC(PBMC+WT-1 库)以及预先产生的与加载 WT-1 肽的 PBMC 共孵育过夜的 WT-1 特异性 T 细胞;B. 用针对 WT-1⁻(自体 PHA 刺激的原始细胞)和 WT-1⁺(自体 PHA 刺激的原始细胞,加载 WT-1 十五肽的总库)靶标的 WT-1 总库,按照 50:1 的效应物:刺激剂比例进行刺激,体外产生的 WT-1 特异性 CTL 的细胞毒活性;C. 在用未修饰的或加载下列之一的自体 PBMC 进行二次过夜刺激后:RMF 肽、通过在 WT-1 总库致敏的 CTL 中进行表位定位法鉴定的 WT-1 优势表位(dominant epitope)、WT-1141 个十五肽的总库,不同应答细胞群(外周血来源的 PBMC,在体外用加载于自体 CAM 的 RMF 肽致敏的预先产生的 CTL,和用 WT-1 15-聚体的总库致敏的预先产生的 CTL)中通过 FACS 染色测量的 $\text{IFN } \gamma$ 应答;D. 体外产生,通过用加载 RMF 9-聚体或 WT-1 15-聚体总库的自体 CAM 进行致敏的 WT 特异性 T 细胞的细胞毒活性。评价针对自体 WT-1 阴性靶标(PHA 活化的原始细胞)以及加载 RMF 肽、WT-1 15-聚体总库或相同 T 细胞系鉴定的优势 WT-1 表位的相同靶标的 T 细胞的细胞毒性。

[0326] 实施例 3

[0327] WT-1 反应性 T 细胞识别的 WT-1 蛋白免疫原性表位的鉴定。

[0328] 用肽库致敏产生的 WT-1 CTL 是表位特异性和 HLA 限制性的。通过定量 $\text{IFN } \gamma^+$ T 细胞对形成的 WT-1 15-聚体子库的定位网格的应答来鉴定 T 细胞(在体外用重叠的 WT-1 十五肽的总库致敏)识别的表位(图 2A),这样的话任意单个 15-聚体只被两个交叉子库共享(图 2B)。如图 2C 的典型实施例所示,数量显著增加的 $\text{IFN } \gamma^+$ T 细胞响应具有十五肽 #_75 的子库 #3 和 #19 而选择性产生。然后用相邻的 15-聚体(每个与肽 #75 重叠 11aa)刺激 T 细胞。可以看出, $\text{IFN } \gamma^+$ T 细胞响应肽 #75 选择性产生(图 2D)。新鉴定的免疫原性 WT-1 表位是₁₇₄₋₁₈₂HSFKHEDPM。随后,评价这些 T 细胞针对一组异基因 CAM(未修饰的或加载所述肽,每种具有被测 CTL 表达的一个 HLA 等位基因)的细胞毒活性。如图 2E 所示, T 细胞选择性裂解加载肽的自体靶标和表达 HLA-B3501 等位基因的靶标,但是不裂解具有由 T 细胞供体遗传的其他 HLA 等位基因的加载肽的靶标。这些 T 细胞还裂解共表达 HLA-B3501 等位基因的 WT-1⁺BALL 细胞。

[0329] 图 2 的详细说明。用于产生跨越 WT-1 蛋白全序列的重叠十五肽的总库和表位定位的策略:A. 显示由 575 个氨基酸组成的 WT-1 蛋白的序列和 11 氨基酸重叠的十五肽的原则。跨越完整蛋白总共需要 141 个十五肽。使用由 Gessler 等人(37)公开的 575 个氨基

酸的序列。该序列包括 N 端的额外 126 个氨基酸。为了符合 WT-1 序列（使用最长的、最频繁描述的 WT-1 D 同种型）内的氨基酸序列编号，我们将前 126 个氨基酸用负值编号，使用正值给最长 D 同种型描述的后 449 个氨基酸编号；B. 定位网格由 24 个子库组成，每个包含最多 12 个 WT-1 来源的十五肽。每种肽独有地包含在两个交叉子库内；例如肽 75 被子库 3 和 19 独享；C. WT-1 致敏的 CTL 响应二次（secondary）过夜刺激（利用加载于自体 PBMC 的 WT-1 十五肽子库）导致的 IFN γ 产生。对于均包含一个共同十五肽 #75 的子库 #3 和 #19 都观察到优势应答；D. 根据在该图 2C 中确定的分析，WT-1 CTL 响应二次过夜刺激（利用包含于子库内的单个十五肽）引发最高的应答导致的 IFN γ 产生，证实了优势免疫原性序列包含于十五肽 #75 内；E. 响应肽 #75 的 WT-1 特异性 T 细胞的 HLA 限制性，通过 Cr51 释放测定法针对一组异基因 CAM 或 PHA 原始细胞鉴定，其符合 WT-1 CTL 供体表达的单个 HLA 等位基因。这些沿着图的 X 轴显示。用于所述测定法的 CAM 或 PHA 原始细胞是未修饰的（灰色柱）或加载 WT-1 优势表位（黑色柱）。WT-1 CTL 的 WT-1 特异性细胞毒活性受到 B3501 HLA 等位基因的限制。

[0330] 对引发 T 细胞应答的 WT-1 肽定位鉴定出由不同的 I 类和 II 类 HLA 等位基因呈递的多种免疫原性表位。使用相同方法定位，并最终鉴定了引发 T 细胞（来自其他 40 个应答正常供体）应答的 WT-1 表位。在这些供体中，8 (19%) 个只对一种 WT-1 肽应答，而 18 (43%) 个对两种肽应答，16 (39%) 个对三种肽应答。在引发针对超过一种 WT-1 肽的应答的培养中，对子库的 IFN γ ⁺ T 细胞应答模式是足够独特的，以便允许有效免疫原性肽的初步分离。然后单独鉴定每种候选肽以确定诱导 T 细胞应答的特定肽。

[0331] 鉴定的 WT-1 免疫原性肽和它们的呈递 HLA 等位基因列于表 1。在引发 T 细胞应答的 42 种 WT-1 肽中，41 种是新鉴定的；这些 WT-1 肽中只有一种，由 HLA-A0201 呈递的₁₂₆₋₁₃₄RMFPNAPYL 九聚体，先前已被描述并证明当被所述等位基因呈递时是免疫原性的 (43)。肽 91，₂₃₅₋₂₄₉CMTWNQMN LGATLKG 包含在本研究中引发受 HLA DRB1 0402 限制的 CD4⁺T 细胞应答的表位，还包含已知由 HLA A0201 和 HLA A2402 呈递的₂₃₅₋₂₄₃CMT 九聚体 (29)。对于由 I 类 HLA 等位基因呈递的 26 种肽，在最初研究的供体中鉴定出单个呈递 HLA 等位基因。但是，当检查不同供体中对这些肽的 T 细胞应答的 HLA 限制性时，发现当由 2 或 3 个不同的 I 类 HLA 等位基因呈递时，这些肽中的 10 种可以引发 T 细胞应答。一种序列，₂₃₈₋₂₄₆WNQMN LGAT 肽，当由 4 种不同 HLA I 类等位基因中的任一种在不同供体中呈递时，引发强 IFN γ ⁺ CD8⁺ T 细胞应答。

[0332] 表 1。使用跨越 WT-1 蛋白全序列的重叠十五肽库，通过用于 T 细胞应答的 IFN γ 产生测定法鉴定的 WT-1 来源免疫原性表位。阴影行表示可以由超过一个 HLA 等位基因呈递的肽。粗体肽序列代表实施例 5 中的那些被测肽，结果显示于表 3。

[0333]

包含优势表位的 15-聚体编号 (SEQ ID, 表 IV)	鉴定的序列	呈递 HLA 等位基因	细胞的 IFN γ 应答, % IFN γ ⁺ 细胞		细胞毒 CTL 应答, %(按 50:1) E:T 比例 vs			
			无 WT-1 肽	加载 WT-1 肽	WT-1 ⁻ 自体 APC	加载 WT-1 肽的自体 APC	WT-1 ⁻ 白血病细 胞	WT-1 ⁺ 白血病细 胞
#1	(-125)-(-117) RQRPHPGAL (SEQ ID NO: 142)	B0702	0.9	11.3	0	27	1	67
#2	(-119)-(-111) GALRNPTAC (SEQ ID NO: 143)	B0702	0.5	14.0	0	30	1	60
#4	(-110)-(-102) PLPHFPPSL (SEQ ID NO: 144)	A0201	0.98	5.75	0	30	2	22
#5	(-107)-(-99) HFPPSLPPT (SEQ ID NO: 145)	A3101	0.73	4.82	0	42	ND	ND
#7	(-99)-(-91)THSPTHPPR (SEQ ID NO: 146)	B4001	1.5	12.8	0	45	3	65
		A0201	0.4	5	2	50	0	38
#13	(-75)-(-67) AILDFLLQ (SEQ ID NO: 147)	A0201	0.61	5.07	0	18	3	19
#20	(-47)-(-39) PGCLQQPEQ (SEQ ID NO: 148)	A0201	0.2	3.67	6	54	5	19
		B4701	0.5	4.6	6	54	ND	ND
	(-47)-(-37) PGCLQQPEQQG (SEQ ID NO: 149)	DRB10101	0.33	3.1	6	54	ND	ND
#24-25	(-27)-(-19) KLGAAEASA	A0201	1.05	4.48	3	41	10	37

[0334]

包含优势表位的 15-聚体编号 (SEQ ID, 表 IV)	鉴定的序列	呈递 HLA 等位基因	细胞的 IFN γ 应答, % IFN γ ⁺ 细胞		细胞毒 CTL 应答, %(按 50:1) E:T 比例 vs			
			无 WT-1 肽	加载 WT-1 肽	WT-1 ⁻ 自体 APC	加载 WT-1 肽的自体 APC	WT-1 ⁻ 白血病细 胞	WT-1 ⁺ 白血病细 胞
	(SEQ ID NO: 150)							
#29-30	(-8)-(1) ASGSEPQQM (SEQ ID NO: 151)	B3501	0.07	1.0	5	73	5	39
#33	6-15 RDLNALLPAV** (SEQ ID NO: 152)	A0201	1.1	11.0	2	51	0	9
		B5701	0.19	1.24	3	44	ND	ND
#37	22-31 GGCALPVSGA (SEQ ID NO: 153)	A0201	0.07	0.9	8	32	3	47
#39	30-38 GAAQWAPVL (SEQ ID NO: 154)	B3901	0.1	1.3	2	31	ND	ND
#41	38-46 LDFAPPGAS (SEQ ID NO: 155)	A0201	0.2	4.18	0	73	0	40
		38-48LDFAPPGASAY (SEQ ID NO: 156)	DRB10402	0.2	1.41	0	73	0
#43	46-54SAYGSLGGP* (SEQ ID NO: 157)*	A0201	1.2	6.46	2	51	0	0
		B4001	1.09	6.84	2	41	3	68
#46	58-66 PAPPPPPPP** (SEQ ID NO: 158)	A0201	1.15	6.69	2	40	0	0
#58	106-114 ACRYGPFPG (SEQ ID NO: 159)	B4402	0.92	5.65	8	46	ND	ND
#62	122-130 SGQARMFPN*** (SEQ ID NO: 160)	B3503	0.78	2.0	0	84	ND	ND
		C0401	0.78	2.0	0	84	ND	ND
#62-63	126-134 RMFPNAPYL* (SEQ ID NO: 161)	A0201	0.52	2.17	3	41	2	25
#65-66	135-143 PSCLESQPA (SEQ ID NO: 162)	B3501	0.07	0.61	0	35	ND	ND
#68	146-154 NQGYSTVTF (SEQ ID NO: 163)	A0101	0.92	4.0	2	19	ND	ND

[0335]

包含优势表位的 15-聚体编号 (SEQ ID, 表 IV)	鉴定的序列	呈递 HLA 等位基因	细胞的 IFN γ 应答, % IFN γ ⁺ 细胞		细胞毒 CTL 应答, %(按 50:1) E:T 比例 vs			
			无 WT-1 肽	加载 WT-1 肽	WT-1 ⁻ 自体 APC	加载 WT-1 肽的自体 APC	WT-1 ⁻ 白血病细 胞	WT-1 ⁺ 白血病细 胞
#73	166-174 HHAAQFPNH (SEQ ID NO: 164)	B3801	0.81	3.14	0	26	ND	ND
#74-75	174-182 HSFKHEDPM (SEQ ID NO: 165)	B3501	1.3	18.0	0	50	5	45
#82	202-210 CHTPTDSCCT (SEQ ID NO: 166)	B4402	1.02	3.77	8	37	ND	ND
#83-84	209-217 CTGSQALLL (SEQ ID NO: 167)	A0101	0.03	0.29	0	21	3	33
#83	206-214 TDSCCTGSQA (SEQ ID NO: 168)	B3802	0.71	4.02	0	88	ND	ND
		B4402	1.01	4.2	1	36	1	56
#86	218-226 RTPYSSDNL*** (SEQ ID NO: 169)	B3503	0.84	3.0	0	84	4	48
		C0401	0.84	3.0	0	84	4	48
#87	225-233 NLYQMTSQL** (SEQ ID NO: 170)	A0201	0.13	0.9	3	87	0	0
#91	238-246 WNQMNLGAT (SEQ ID NO: 171)	A0201	1.34	8.0	0	18	1	19
		C1701	2.1	12.0	0	10	1	16
		A0101	2.1	7.31	0	26	ND	ND
		B3508	1.23	5.0	0	18	4	19
#91-92	239-248 NQMNLGATL (SEQ ID NO: 172)	A2402	0.02	0.14	4	9	1	17
#91	238-248 WNQMNLGATLK (SEQ ID NO: 173)	DRB11104	0.59	6.0	0	8	0	0
	235-249 CMTWNQMNLGATLK G (SEQ ID NO: 174)	DRB10402	0.07	0.53	4	16	1	17
#92	242-250	A0101	0.32	1.83	2	19	ND	ND

[0336]

包含优势表位的 15-聚体编号 (SEQ ID, 表 IV)	鉴定的序列	呈递 HLA 等位基因	细胞的 IFN γ 应答, % IFN γ ⁺ 细胞		细胞毒 CTL 应答, %(按 50:1) E:T 比例 vs			
			无 WT-1 肽	加载 WT-1 肽	WT-1 ⁻ 自体 APC	加载 WT-1 肽的自体 APC	WT-1 ⁻ 白血病细 胞	WT-1 ⁺ 白血病细 胞
	NLGATLKGV (SEQ ID NO: 175)							
		A0201	0.06	0.75	1	18	2	19
#92-93	243-252 LGATLKGVAA (SEQ ID NO: 176)	A0203	0.54	2.1	0	35	ND	ND
#93	246-253 TLGVAAGS (SEQ ID NO: 177)	A6901	0.09	1.85	4	80	ND	ND
#99-100	269-278 GYESDNHTT (SEQ ID NO: 178)	A0101	0.12	2.43	0	27	0	33
		B3501	0.1	0.61	0	35	ND	ND
#112-113	323-332 FMCAYPGCNK (SEQ ID NO: 179)	B3501	1.3	18.0	0	70	5	45
	320-334 KRPFMCAYPGC (SEQ ID NO: 180)	DRB10401	0.91	3.48	9	5	5	5
#129	390-398 RKFSRSDHL (SEQ ID NO: 181)	A0201	1.08	5.81	3	40	ND	ND
#131	398-406 LKTHTRTHT (SEQ ID NO: 182)	A0201	1.56	14.0	0	38	ND	ND
#141	436-445 NMHQRNHTKL** (SEQ ID NO: 183)	A0201	1.78	6.69	2	40	0	0
		B4001	2.1	7.71	0	31	3	72
		A2402	0.61	2.79	19	47	0	0

[0337] *- 通过计算机算法或文献的描述先前预测的表位

[0338] **-T 细胞的细胞毒针对加载自体 WT-1 肽的 APCs, 但不针对白血病细胞

[0339] ***- 不能因为缺乏遗传一种等位基因而不遗传其他的靶标, 将 HLA 限制性指定为一种或其他等位基因

[0340] 使用这种表位定位策略, 鉴定出 5 种新的 11-聚体肽, 其刺激受 HLA II 类等位基因限制的 CD4⁺T 细胞应答。响应这些表位中每一种产生的 CD4⁺T 细胞表达高水平的 IFN γ ⁺T 细胞。对所述 5 个肽表位中的 3 个响应的 CD4⁺T 细胞应答还显示针对加载肽的 PHA 原始细胞以及未修饰的 WT-1⁺白血病原始细胞 (选择性的具有限制性 II 类 HLA 等位基因) 的特异性细胞毒活性。

[0341] 在所测 56 个供体的 4 个中, 用 WT-1 15-聚体的完整库致敏的 T 细胞表位定位鉴

定出引发 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞应答的特定 15-聚体 (15-聚体肽 #20,41,91,112)。对引发这些应答的序列的精细定位鉴定出刺激 HLA II 类限制性 CD4⁺T 细胞应答的 4 个 11-聚体, 它们在它们的序列内还包含引发 HLA I 类限制性 CD8⁺T 细胞应答的 9-聚体。这些双重刺激肽之一的典型实施例显示于图 3。在这种情况下, 发现肽 41 引发 CD4⁺和 CD8⁺IFN γ ⁺T 细胞应答 (图 3A)。对引发 CD4⁺IFN γ ⁺T 细胞应答的肽 41 内的 11-聚体的精细定位 (图 3A) 表明, ₃₈₋₄₈LDFAPPGASAY 肽作为免疫原性最强的序列诱导 CD4⁺和 CD8⁺IFN γ ⁺T 细胞应答。令人惊讶的, 肽 41 致敏的 T 细胞裂解用 9aa 序列 (₃₈₋₄₆LDFAPPGAS) 或 11aa 序列 (₃₈₋₄₈LDFAPPGASAY) 致敏的 PHA 原始细胞, 但不裂解加载 ₃₆₋₄₆PVLDFAPPGAS 或 ₃₇₋₄₇VLDFAPPGASA 11-聚体的 PHA 原始细胞。对培养中 T 细胞 HLA 限制性的后续检查 (图 3D) 显示, 只有当加载 LDF 11-聚体时, II 类 HLA 限制性 T 细胞对具有等位基因 DRB1 0402 和 DQB1 0302 的靶标是选择性细胞毒的, 而受 HLA A0201 限制的 T 细胞能够裂解加载 11-聚体或 9-聚体 LDF 肽的靶标。在这种情况下, 无法确定 DRB1 0402 或 DQB1 0302 是否是限制性 II 类 HLA 等位基因, 因为在表达一种而无其他的组中没有可用细胞。

[0342] 图 3 的详细说明。在用加载于自体 CAM 上的 WT-1 重叠 15-聚体的总库致敏的 WT-1 CTL 中, HLA I 类和 II 类限制性 WT-1 特异性 T 细胞对来源于 WT-1 蛋白的相同免疫优势肽 15-聚体产生应答。A. 由 CD8⁺和 CD4⁺WT-1 特异性 T 细胞 (响应利用相同优势 WT-1 来源的 15-聚体 #41 的二次过夜刺激) 产生 IFN γ ; B. 在二次过夜刺激 (利用加载一组 9-聚体的自体 PBMC, 所述 9-聚体对肽 #41 (LDF-LDFAAPGAS) 是独特的, 或包含于相邻的重叠 15-聚体 #40 (PVL-PVLDFAPPG, VLD-VLDFAPPGA) 和 #42 (DFA-DFAPPGASA) 之内) 后通过 IFN γ 产生鉴定十五肽 #41 内的氨基酸的免疫原性序列。只有唯独在 15-聚体 #41 内呈递的 9-聚体, LDF, 引发 IFN γ 应答; C. 观察到 WT-1 CTL 针对 9-聚体和 11-聚体组 (包含于肽 #41 内, 并加载于自体 PHA 刺激的原始细胞) 的肽特异性细胞毒活性针对 11-聚体 LDF 和包含于 11-聚体 LDF 内的 9-聚体 LDF, 如按照 25:1 E:T 比例的标准 Cr51 释放测定法所确定; D. WT-1 CTL 的细胞毒活性的 HLA 限制性: 受 HLA-A0201 限制的 T 细胞裂解加载 11-聚体或 9-聚体的靶标, 而受 HLA DRB10402 限制的那些只裂解加载 11-聚体的靶标。

[0343] 实施例 4

[0344] 产生的针对新鉴定 WT-1 表位的 T 细胞显示针对 WT-1⁺白血病细胞的细胞毒活性。

[0345] 一旦确定了 WT-1 肽特异性以及应答 WT-1 肽库的 IFN γ ⁺T 细胞的 HLA 限制性, 检测它们的细胞毒活性, 所述细胞毒活性针对未修饰的和加载肽的自体 PHA 原始细胞和针对一系列加载所鉴定肽的异基因 PHA 原始细胞以及表达 WT-1 蛋白的原代急性白血病原始细胞, 其共表达 WT-1 特异性 T 细胞的限制性 HLA 等位基因。对于后一测试, 使用不表达限制性等位基因的 WT-1⁺白血病细胞和具有限制性等位基因的 WT-1⁻细胞作为对照。结果概述于表 1 和 2。

[0346] 从表 1 可见, 在用加载所鉴定肽的自体 APC 二次刺激后, 在产生 IFN γ ⁺CD8⁺T 细胞的 51 种培养物中, 50 种还显示针对加载靶标肽的自体 PHA 原始细胞的显著特异性细胞毒活性。在这些培养物中, 48 种还裂解加载异基因肽的 PHA 原始细胞或具有应答性 T 细胞的限制性 HLA 等位基因的 DC。对 3/5 鉴定的 II 类 HLA 等位基因呈递的 11-聚体肽应答的 CD4⁺IFN γ ⁺T 细胞还裂解加载肽的自体 and 具有 HLA 的异基因 II 类 + 靶标。

[0347] 在针对加载肽的靶标显示表位特异性细胞毒活性的 T 细胞培养物中, 36 种检测出

针对共表达 T 细胞的限制性 HLA 等位基因的 WT-1⁺白血病细胞的细胞毒活性。在这 36 种培养物中, 27 种显示针对 WT-1⁺白血病细胞的 HLA 限制性细胞毒活性 (表 2)。对 HLA A0201 呈递的 5 种肽 (₆₋₁₅RDL, ₄₆₋₅₄SAY, ₅₈₋₆₆PAP, ₂₂₅₋₂₃₃NLY 和 ₄₃₆₋₄₄₅NMH) 特异的 T 细胞不能够裂解 HLA-A0201⁺WT-1⁺白血病细胞。但是, 对于 ₄₆₋₅₄SAY 肽特异的 HLA B4001 限制性 T 细胞可以裂解共表达该 HLA 等位基因的 WT-1⁺白血病细胞。类似地, 裂解加载 NMH 肽的靶标的 NMH 肽特异性 HLA 限制性 T 细胞系 (共表达 HLA A0201, B4001 或 A2402) 只能裂解表达 HLA B4001 等位基因的 WT-1⁺白血病细胞。

[0348] 表 2。使用跨越 WT-1 蛋白全序列的重叠十五肽库, 通过用于 T 细胞应答的 IFN γ 产生测定法鉴定的 WT-1 来源的免疫原性表位。粗体序列表示如实施例 5 描述的被测肽, 结果提供于表 3。

[0349]

呈递 HLA 等位基因	鉴定的序列	预测算法		细胞毒 CTL 应答, % (按 50:1)E:T 比例 vs			
		结合指数	解离时间	具有限制性 HLA 等位基因的 WT-1 ⁻ APC	加载 WT-1 肽的具有限制性 HLA 等位基因的 WT-1 ⁺ APC	WT-1 ⁻ 白血病细胞	WT-1 ⁺ 白血病细胞
A0101	146-154 NQGYSTVTF SEQ ID NO: 163	3	0.001	4	15	ND	ND
	209-217 CTGSQALLL SEQ ID NO: 167	12	0.125	0	26	3	33
	238-246 WNQMNLGAT SEQ ID NO: 171	2	0	3	19	ND	ND
	242-250 NLGATLKGV SEQ ID NO: 175	3	0.01	1	17	ND	ND
	269-278 GYESDNHTT SEQ ID NO: 178	15	1.5	0	26	0	33
	323-332 FMCAYPGCNK** SEQ ID NO: 179	0	0.1	2	0	5	0
	A0201	(-110)-(-102) PLPHFPPSL SEQ ID NO: 144	21	2	1	24	2
(-99)-(-91) THSPTHPPR SEQ ID NO: 146		3	0	1	21	0	38
(-75)-(-67) AILDPELLQ SEQ ID NO: 147		19	0.272	3	17	3	19
(-47)-(-39) PGCLQQPEQ SEQ ID NO: 148		0	0	7	27	5	19
(-27)-(-19) KLGAAEASA SEQ ID NO: 150		19	17	2	22	10	37
6-15 RDLNALLPAV SEQ ID NO: 152		18	0.2	4	31	0	9
22-31 GGCALPVSGA SEQ ID NO: 153		13	0.003	3	25	3	47
38-46 LDFAPPGAS SEQ ID NO: 155		11	0	1	62	0	40
46-54 SAYGSLGGP**		14	0	5	31	0	0

[0350]

呈递 HLA 等位基因	鉴定的序列	预测算法		细胞毒 CTL 应答, % (按 50:1)E:T 比例 vs			
		结合指数	解离时间	具有限制性 HLA 等位基因的 WT-1 ⁻ APC	加载 WT-1 肽的 HLA 等位基因的 WT-1 ⁺ APC	WT-1 ⁻ 白血病细胞	WT-1 ⁺ 白血病细胞
	SEQ ID NO: 157 58-66 PAPPPPPP**	5	0	1	18	0	0
	SEQ ID NO: 158 126-134 RMFPNAPYL*	22	313	1	52	2	25
	SEQ ID NO: 161 225-233 NLYQMTSQLE**	23	68	3	28	0	0
	SEQ ID NO: 170 238-246 WNQMNLGAT	19	0.3	0	21	1	19
	SEQ ID NO: 171 242-250 NLGATLKGV	24	160	1	14	2	19
	SEQ ID NO: 175 390-398 RKFSRSDHL	11	0.054	1	27	ND	ND
	SEQ ID NO: 181 398-406 LKTHTRTHT	5	0.18	1	22	ND	ND
	SEQ ID NO: 182 436-445 NMHQRNHTKL**	20	15	4	32	0	0
A0203	SEQ ID NO: 183 243-252 LGATLKGVA	19	NA	0	21	ND	ND
A2402	SEQ ID NO: 176 239-248 NQMNLGATL	10	7.2	0	2	1	17
	SEQ ID NO: 172 436-445 NMHQRNHTKL**	13	0.6	13	27	0	0
	SEQ ID NO: 183						
A6901	246-253 TLGVAAGS	NA	NA	0	57	ND	ND
	SEQ ID NO: 177						
B0702	(-125)-(-117) RQRPHPGAL	15	40	1	53	1	67
	SEQ ID NO: 142 (-119)-(-111) GALRNPTAC	2	0.3	5	22	1	60
	SEQ ID NO: 143						
A3101	(-107)-(-99) HFPPSLPPT	NA	0.01	0	27	ND	ND
	SEQ ID NO: 145						
B3501	(-8)-(-1) ASGSEPQQM	NA	15	3	51	5	39
	SEQ ID NO: 151 135-143 PSCLESQPA	NA	0.075	0	21	ND	ND
	SEQ ID NO: 162						

[0351]

呈递 HLA 等位基因	鉴定的序列	预测算法		细胞毒 CTL 应答, % (按 50:1)E:T 比例 vs			
		结合指数	解离时间	具有限制性 HLA 等位基因的 WT-1 ⁻ APC	加载 WT-1 肽的 HLA 等位基因的 WT-1 ⁺ APC	WT-1 ⁻ 白血病细胞	WT-1 ⁺ 白血病细胞
	174-182 HSFKHEDPM SEQ ID NO: 165	NA	10	3	63	5	45
	269-278 GYESDNHTT SEQ ID NO: 178	NA	0.004	0	23	ND	ND
	323-332 FMCAYPGCNK SEQ ID NO: 179	NA	0.01	0	61	5	45
B3503	122-130 SGQARMFPN SEQ ID NO: 160	NA	NA	3	41	ND	ND
	218-226 RTPYSSDNL SEQ ID NO: 169	NA	NA	3	31	4	48
B3508	238-246 WNQMNLGAT SEQ ID NO: 171	NA	NA	2	21	4	19
B3802	206-214 TDSCTGSQA SEQ ID NO: 168	NA	NA	1	53	ND	ND
B3801	166-174 HHAAQFPNH SEQ ID NO: 164	11	0.3	1	17	ND	ND
B3901	30-38 GAAQWAPVL SEQ ID NO: 154	12	3	0	19	ND	ND
B4001	(-99)-(-91) THSPTHPPR SEQ ID NO: 146	3	0.02	0	31	3	65
	46-54 SAYGSLGGP SEQ ID NO: 157	1	0.002	8	24	3	68
	436-445 NMHQRNHTKL SEQ ID NO: 183	1	0.002	1	26	3	72
B4402	202-210 CHTPDTSCT SEQ ID NO: 166	3	NA	7	19	ND	ND
	206-214 TDSCTGSQA SEQ ID NO: 168	2	NA	0	88	1	56
	106-114 ACRYGPFGP SEQ ID NO: 159	4	NA	7	23	ND	ND
B4701	(-47)-(-37) PGCLQQPEQ SEQ ID NO: 148	1	NA	1	25	ND	ND
B5701	6-15 RDLNALLPAV SEQ ID NO: 152	NA	NA	1	22	ND	ND
C0401	122-130	NA	NA	3	41	ND	ND

[0352]

呈递 HLA 等位基因	鉴定的序列	预测算法		细胞毒 CTL 应答, % (按 50:1)E:T 比例 vs			
		结合指数	解离时间	具有限制性 HLA 等位基因的 WT-1 ⁻ APC	加载 WT-1 肽的限制性 HLA 等位基因的 WT-1 ⁺ APC	WT-1 ⁻ 白血病细胞	WT-1 ⁺ 白血病细胞
	SGQARMFPN SEQ ID NO: 160						
C1701	238-246 WNQMNLGAT SEQ ID NO: 171	NA	NA	0	7	1	16
DRB ₁ 0101	(-47)-(-37) PGCLQQPEQQG SEQ ID NO: 149	8	NA	1	25	ND	ND
DRB ₁ 0402	38-48 LDFAPPGASAY SEQ ID NO: 156	NA	NA	1	71	0	40
DRB ₁ 0402	235-249 CMTWNQMNLGATL KG SEQ ID NO: 174	NA	NA	2	15	1	17
DRB ₁ 0401	320-334 KRPFMCAYPGC SEQ ID NO: 180	22	NA	3	0	5	5
DRB ₁ 1104	238-248 WNQMNLGATLK SEQ ID NO: 173	NA	NA	2	1	0	0

[0353] *- 先前报道的表位 ;

[0354] **- 针对加载 WT-1 肽的自体 APC 但不针对白血病细胞的 T 细胞细胞毒。

[0355] 为了确定观察到的 WT-1 肽特异性 T 细胞针对异基因 WT-1⁺白血病细胞 (具有 T 细胞限制性等位基因) 的细胞毒活性不是反映 T 细胞系中异应答性 (alloresponsive) T 细胞的存在, 我们检测了这些针对从相同白血病患者培养的 WT-1⁺白血病细胞和 WT-1⁻ PHA 原始细胞的 HLA 限制性 WT-1 肽特异性 T 细胞系中的 13 种的细胞毒活性。如表 3a 所示, WT-1 特异性 T 细胞裂解来自相同患者的 WT-1⁺白血病细胞但不裂解 PHA 原始细胞。

[0356] 表 3a。对 WT-1 来源的免疫原性表位 (使用跨越 WT-1 蛋白全序列的重叠十五肽库, 通过用于 T 细胞应答的 IFN γ 产生测定法鉴定) 特异的 T 细胞的细胞毒活性, 并针对 WT-1 阳性原代白血病细胞和相同来源的 PHA 原始细胞的 T 细胞的细胞毒活性进行检测。

[0357]

包含优势表位的 15-聚体 编	鉴定的序列	呈递 HLA 等位基因	细胞毒 CTL 应答, % (按 50:1)E:T 比例 vs
-----------------	-------	-------------	---------------------------------

[0358]

号			WT-1 ⁺	PHA 原始
			白血病细胞 **	细胞 ***
#1	(-125)-(-117)RQRPHPGAL SEQ ID NO: 142	B0702	67	2
#2	(-119)-(-111)GALRNPTAC SEQ ID NO: 143	B0702	60	1
#4	(-110)-(-102)PLPHFPPSL SEQ ID NO: 144	A0201	22	1
#7	(-99)-(-91)THSPHPPR SEQ ID NO: 146	B4001	65	5
		A0201	38	3
#24-25	(-27)-(-19)KLGAAEASA SEQ ID NO: 150	A0201	37	8
#29-30	(-8)-(-1)ASGSEPQQM SEQ ID NO: 151	B3501	39	9
#37	22-31GGCALPVSGA SEQ ID NO: 153	A0201	47	6
#43	46-54SAYGSLGGP* SEQ ID NO: 157	B4001	68	3
#62-63	126-134RMFPNAPYL* SEQ ID NO: 161	A0201	25	3
#86	218-226RTPYSSDNL SEQ ID NO: 169	B3503	48	1
		C0401	48	1
#141	436-445NMHQRNHTKL* SEQ ID NO: 183	B4001	72	1

[0359] P<0.001

[0360] *- 通过计算机算法或文献的描述先前预测的表位

[0361] ***- 白血病细胞样品由永生化白血病细胞系或获自 WT-1⁺白血病患者的原代白血病细胞提供

[0362] ***-PHA 原始细胞从 PBMC 产生, 所述 PBMC 来源于与 WT-1⁺原代白血病细胞来源相同的患者

[0363] 不是本研究中提供白血病原始细胞的每个患者均能提供 PHA 原始细胞。尽管如此, 这些结果提供了以下证据, WT-1 特异性 T 细胞的细胞毒性不是归因于污染的异反应性。第二个 (内容更丰富的), 但较间接的证据由来源于 35 个供体 (已经在体外用加载的 WT-1 肽库或未修饰的自体 EBVBLCL 同时致敏) 的 T 细胞针对这些原代白血病细胞的应答的配对比较提供。如表 3b 所示, 在 25/35 的病例中, 用加载 WT-1 肽库的 EBVBLCL 致敏的 T 细胞裂解具有 T 细胞的限制性 HLA 等位基因的 WT-1⁺白血病细胞。与此相反, 用单独的自体 EBVBLCL 致敏的 T 细胞始终不能裂解相同的 WT-1⁺白血病细胞靶标。

[0364] 表 3b. 来自正常供体的指定表位特异性和 HLA 限制性 T 细胞 (用自体 EBV BLCL

或加载 WT-1 肽库的 EBV BLCL 致敏) 针对具有 T 细胞的限制性 HLA 等位基因的原代 WT-1+ 白血病细胞的杀白血病细胞 (leukemocidal) 活性。

[0365]

包含优势表位的 15-聚体 编号	鉴定的序列	呈递 HLA 等位基因	细胞毒 CTL 应答, %(按照 50:1) E:T 比例 vs 表 达限制性 HLA 等位基因的 WT-1 ⁺ 白血病细胞	
			WT-1 CTL	EBV CTL
#1	(-125)-(-117)RQRPHPGAL SEQ ID NO: 142	B0702	67	1
#2	(-119)-(-111)GALRNPTAC SEQ ID NO: 143	B0702	60	2
#4	(-110)-(-102)PLPHFPPSL SEQ ID NO: 144	A0201	22	3
#7	(-99)-(-91)THSPTHPPR SEQ ID NO: 146	B4001	65	0
		A0201	38	3
#13	(-75)-(-67)AILDFLLLQ SEQ ID NO: 142	A0201	19	5
#20	(-47)-(-39)PGCLQQPEQ SEQ ID NO: 1148	A0201	19	10
#24-25	(-27)-(-19)KLGAAEASA SEQ ID NO: 150	A0201	37	5
#29-30	(-8)-(1)ASGSEPQQM SEQ ID NO: 151	B3501	39	0
#33	6-15RDLNALLPAV** SEQ ID NO: 152	A0201	9	0
#37	22-31GGCALPVSGA SEQ ID NO: 153	A0201	47	3
#41	38-46LDFAPPGAS SEQ ID NO: 1554	A0201	40	0
	38-48LDFAPPGASAY SEQ ID NO: 156	DRB ₁ 0402	40	0
#43	46-54SAYGSLGGP* SEQ ID NO: 157	A0201	0	0

[0366]

		B4001	68	3
#46	58-66 PAPPPPPPP* SEQ ID NO: 158	A0201	0	0
#62-63	126-134 RMFPNAPYL* SEQ ID NO: 161	A0201	25	2
#74-75	174-182 HSFKHEDPM SEQ ID NO: 165	B3501	45	5
#83-84	209-217 CTGSQALLL SEQ ID NO: 167	A0101	33	3
#83	206-214 TDSCTGSQA SEQ ID NO: 168	B4402	56	1
#86	218-226 RTPYSSDNL SEQ ID NO: 169	B3503	48	4
		C0401	48	4
#87	225-233 NLYQMTSQLE* SEQ ID NO: 170	A0201	0	0
#91	238-246 WNQMNLGAT SEQ ID NO: 171	A0201	19	1
		C1701	16	1
		B3508	19	4
#91-92	239-248 NQMNLGATL SEQ ID NO: 172	A2402	17	1
#91	238-248 WNQMNLGATLK SEQ ID NO: 173	DRB ₁ 1104	0	0
	235-249 CMTWNQMNLGATL KG SEQ ID NO: 174	DRB ₁ 0402	17	1
#92	242-250 NLGATLKGV SEQ ID NO: 175	A0201	19	2
#99-100	269-278 GYESDNHTT SEQ ID NO: 178	A0101	33	0
#112-113	323-332 FMCAYPGCNK SEQ ID NO: 179	B3501	45	5
	320-334 KRPFMCAYPGC SEQ ID NO: 180	DRB ₁ 0401	5	5
#141	436-445 NMHQRNHTKL* SEQ ID NO: 183	A0201	0	0
		B4001	72	3
		A2402	0	0

[0367] p<0.001

[0368] *- 通过计算机算法或文献的描述先前预测的表位

[0369] 实施例 5

[0370] 新鉴定 WT-1 表位的免疫原性。

[0371] 为了确定在单个供体中通过定位应答鉴定的肽在高比例的个体（载有相同呈递 HLA 等位基因）中也是免疫原性的，测定这些表位是否可以在 6-12 个个体（表达所述 HLA 等位基因）的组中引发适当的限制性 T 细胞应答。为了这个目的，来自每个供体的 T 细胞用载于一组人工抗原呈递细胞 (AAPC) (42)（每种均表达单个 HLA 等位基因，具体来说是 A0201, A0301, A2402 或 B0702）上的鉴定的表位进行致敏。如表 4 所示，在鉴定的 9 个肽（由 HLA-A0201 呈递）中，所有都能够在一定比例的 HLA-A0201⁺ 个体中刺激 WT-1 特异性 IFN γ ⁺ T 细胞应答。先前报道的₁₂₆₋₁₃₄RMFPNAPYL 肽（由 HLA-A0201 等位基因呈递）在 5/12 (42%) 的测试 HLA-A0201⁺ 正常供体中引发应答。作为比较，其他 8 个测试肽中的 5 个在 50-75% 的相同 HLA-A0201⁺ 供体中引发 WT-1 肽特异性应答。由 HLA-B0702 等位基因呈递的两种 WT-1 表位还分别在 50% 和 63% 的测试个体中引发 WT-1 特异性 T 细胞应答（表 4）。所有测试肽在至少 2 个额外供体（载有它们的呈递 HLA 等位基因）中引发特异性应答。

[0372] 表 4。对鉴定的 WT-1 肽（加载于表达单个 HLA 等位基因的 AAPC 上）产生应答的正常供体比例。

[0373]

AAPC 表达的 HLA 等位基因	先前鉴定的序列，由 AAPC 表达的 HLA 等位基因呈递	在 CAM 总库刺激后鉴定的供体数目	对加载于 AAPC 的肽产生应答的正常供体比例(%)	预测的		当由 AAPC 表达的 HLA 等位基因呈递时，预测有免疫原性的 WT-1 序列	预测的		正常供体中对肽刺激的应答比例
				结合指数	解离时间		结合指数	解离时间	
A0201	(-99)-(-91) THSPTHPPR SEQ ID NO: 146	1	6/12 (50%)	3	0	(-99)-(-91) THSPTHPPR SEQ ID NO: 146	3	0	6/12 (50%)
	(-75)-(-67) AILD ⁺ LLLQ SEQ ID NO: 147	1	8/12 (67%)	19	0.272	(-78)-(-70) LLAAILDFL SEQ ID NO: 184	28	225	8/12 (67%)
	(-47)-(-39) PGCLQ ⁺ PEQ SEQ ID NO: 148	2	2/12 (16%)	0	0	(-45)-(-36) CLQQPE ⁺ QGV SEQ ID NO: 185	21	70	2/12 (16%)
	(-27)-(-19) KLGAAEASA SEQ ID NO: 149	1	8/12 (67%)	19	17	(-27)-(-19)KLGAAEASA SEQ ID NO: 150	19	17	8/12 (67%)
	6-15	1	3/12	18	0.2	7-15	27	12	3/12

[0374]

	22-31 GGCALPVSGA SEQ ID NO: 153	3	9/12 (75%)	13	0.003	22-31 GGCALPVSGA SEQ ID NO: 153	13	0.003	9/12 (75%)
	38-46 LDFAPPGAS SEQ ID NO: 155	2	8/12 (67%)	11	0	37-45 VLDFAPPGA SEQ ID NO: 188	16	4	0/12 (0%)
	126-134 RMFPNAPYL SEQ ID NO: 161	1	5/12 (42%)	22	313	126-134 RMFPNAPYL SEQ ID NO: 161	22	313	5/12 (42%)
	238-246 WNQMNLGAT SEQ ID NO: 171	2	3/12 (25%)	19	0.3	235-243 CMTWQMNL SEQ ID NO: 189	17	1.5	0/8
	总库	13/27 (48%)	8/12 (67%)						
A0301	126-134 RMFPNAPYL SEQ ID NO: 161	1	2/8 (25%)	10	4.5	124-133 QARMFPNAPY SEQ ID NO: 190	14	0.001	0/8
	总库	1/8 (12%)	2/8 (25%)						
A2402	239-248 NQMNLGATL SEQ ID NO: 172	1	4/6 (60%)	10	7.2	235-243 CMTWQMNL SEQ ID NO: 189	10	4	1/6 (17%)
	总库	2/6 (33%)	6/6 (100%)						
B0702	(-125)-(-117) RQRPHPGAL SEQ ID NO: 142	1	4/8 (50%)	15	40	(-125)-(-117) RQRPHPGAL SEQ ID NO: 142	15	40	4/8 (50%)
	(-119)-(-111) GALRNPTAC SEQ ID NO: 143	1	5/8 (63%)	2	0.3	(-118)-(-109) ALRNPTACPL SEQ ID NO: 191	15	120	5/8 (63%)
	323-332 FMCAYPGCNK SEQ ID NO: 179	1	3/8 (38%)	1	0.015	327-335 YPGCNKRYF SEQ ID NO: 192	17	0.4	4/8 (50%)
	总库	2/8 (25%)	3/8 (38%)						
DRB104 02	38-48 LDFAPPGASAY SEQ ID NO: 156	1	0/2 (在 CAMs 而 不是 AAPC 上测试)	NA	NA	35-49 APVLDFAPPGAS AYG SEQ ID NO: 193	20	NA	ND

[0375] 实施例 6

[0376] 将对肽（通过对混合 WT-1 15- 聚体的定位应答鉴定得到）的应答与对先前报道的 WT-1 肽（由结合算法预测有免疫原性的）的应答进行比较。

[0377] 针对单独的 WT-1 肽比较由正常供体 T 细胞产生的初次应答，所述 WT-1 肽由针对其他 WT-1 肽的应答的定位策略鉴定得到，所述其他 WT-1 肽包含侧翼序列，使用先前描述的结合算法 (44, 45) 经预测对呈递 HLA 等位基因具有更高的结合指数。如上文表 4 所示，8/12 定位的表位的预测结合指数只是稍微低于研究最多的 WT-1 肽，RMF（由 HLA A0201 呈递）。但是，它们的解离时间显著更低。尽管如此，在高比例的正常供体中引发了针对这些肽中每一种的 T 细胞应答。

[0378] 在 5 个例子中, 定位的肽特异性 (即 $_{(-99)-(-91)}$ THS, $_{(-22)-(-19)}$ KLG, $_{22-31}$ GGC, $_{126-134}$ RMF 和 $_{(-125)-(-117)}$ RQR) 与对呈递 HLA 等位基因具有最高亲和力的肽 (在刺激性 15-聚体内通过结合算法预测) 相同。在定位的序列和预测具有最高结合指数的序列不同的那些例子中, 对单独的定位的肽响应的供体比例等于或大于对预测具有更高亲和力的相邻表位响应产生的比例。例如, 在检测的 8/12 (67%) HLA A0201 供体中产生针对 $_{38-46}$ LDF 肽的 IFN γ ⁺T 细胞应答, 而没有供体对预测和先前报道 (46) 的表位 $_{37-45}$ VLDFAPPGA 产生应答。类似地, 在 HLA A2402⁺供体中, 4/6 的供体 (60%) 对 $_{239-248}$ NQMNLGATL 产生应答, 而只有 1/6 的供体对先前报道的由所述等位基因呈递 (29) 的 $_{235-243}$ CMTWNQMNL 肽产生应答。

[0379] 为了直接比较由 HLA A0201 呈递的肽 (由矩阵定位鉴定, 含有具有更高预测结合指数的侧翼肽), 将按相等浓度混合的肽加载于 HLA A0201⁺AAPC, 并用于致敏来自 8 个 HLA A0201⁺正常供体的 T 细胞。致敏 35 天后, 然后洗涤 T 细胞, 并用辐射过的自体 PBMC (加载各种单独肽) 的等分试样二次刺激 24 小时。然后通过 FACS 定量应答性 IFN γ ⁺T 细胞。如图 5 所示, 结果证明尽管 22-31GGC 肽具有最低的结合指数和最短的预测解离时间, 但它在 7/8 的供体中诱导强 IFN γ ⁺T 细胞应答。此外, 尽管 3/8 的供体对 $_{6-15}$ RDL、 $_{10-18}$ ALL 和 $_{7-15}$ DLN 肽产生应答, 但通过应答定位鉴定的 $_{6-15}$ RDL 肽引发更多数目的 IFN γ ⁺T 细胞。将 $_{(-75)-(-67)}$ AILDFLLLQ 和侧翼 $_{(-78)-(-70)}$ LLAAILDFL 序列进行比较, AIL 肽在更高比例的供体中 (6/8 对 3/8 供体) 引发更强的应答。类似地, 将定位的 $_{38-46}$ LDFAPPGAS 肽与先前报道的 $_{37-45}$ VLDFAPPGA 肽 (46) 进行比较, LDF 肽在 5/8 的供体中诱导强应答, 而 VLD 肽只在这些供体的 2 个中诱导低应答。

[0380] 图 5 的详细说明。针对 9-聚体肽 (通过体外应答的表位定位鉴定) 和相同 15-聚体或相邻重叠 15-聚体肽内的肽 (预测具有更高结合亲和力和免疫原性) 的等摩尔混合物的 IFN γ ⁺T 细胞应答。A. 对跨越氨基酸 +2 到 +31 的九聚体 (包括 $_{6-15}$ RDL 和 $_{22-31}$ GGC 肽, 在表位定位研究中 HLA A0201⁺供体对其产生应答) 的混合物的应答。B. 对体外定位的 $_{(-75)-(-67)}$ AILDFLLLQ 表位和具有更高预测结合亲和力的侧翼肽 $_{(-78)-(-70)}$ LLAAILDFL 的应答。C. 对体外定位的 $_{38-46}$ LDFAPPGAS 表位和预测具有更高结合亲和力的重叠 $_{37-45}$ VLDFAPPGA 的应答。

[0381] 图 5 显示 WT-1 蛋白的定位。图 5C 限定所有先前报道的由 HLA I 类和 II 类等位基因呈递的抗原性表位的定位; 图 5D 描述本报告鉴定的免疫原性肽的位置。可以看出, 先前报道的由 I 类呈递的 11 个表位和由 II 类 HLA 等位基因呈递的 10 个表位主要聚簇于外显子 1、7 和 10 编码的序列中, 而用 WT-1 肽库致敏的正常 T 细胞识别的表位主要聚簇于前 5 个外显子编码的序列中。因此, 26 个新表位被归入源于剪接变体的 4 种 WT-1 主要同种型中的每一种, 其包括或不包括外显子 5 的 17 氨基酸序列 (氨基酸 250-266) 或锌指 3 和 4 之间的 3 氨基酸序列 ($_{400-410}$ KTS)。由于表位是广泛分布的, 在外显子 1 的 RNA 识别域和接近外显子 5 的剪接 17aa 片段的活化域 (aa181-250) (图 5F) 中检测到表位簇。后一区域还包含被多个供体最常识别的那些表位 (图 5E)。9 个新鉴定的表位定位到由 WT-1 基因片段编码的 N 端的 126 个氨基酸序列, 所述 WT-1 基因最初由 Gessler 等人 (37) 描述, 其是 WT-1 (Exon 5+, KTS+) 同种型的外显子 1 的着丝粒点, 并包括起始于外显子 1 的 AUG 起始子的 CUG 密码子上游的 WT-1 长同种型。令人惊讶的, 该序列中鉴定的每种表位引发 IFN γ ⁺T 细胞, 其对共表达 WT-1 和 T 细胞的限制性 HLA 等位基因的白血病原始细胞是溶胞性的。

[0382] 实施例 7

[0383] 卵巢癌中肽的抑制作用

[0384] 在两项研究中鉴定本文所述肽在治疗卵巢癌中的应用。在第一项研究中,在将卵巢癌细胞注射入 NOD/SCID 小鼠之前,通过将不同剂量的 T 细胞与 SKOV3-A2 卵巢癌细胞预孵育,评估对不同 WT-1 肽特异的 T 细胞对卵巢肿瘤移植的抑制作用。使用如上所述的方法制备对下列免疫优势表位特异的 T 细胞培养物:A0201 限制性 WT-1 肽 LKHTTTRTHT (SEQ ID NO:182) 特异性 T 细胞;A0301 限制性 WT-1 肽 RQRPHPGAL (SEQ ID NO:142) 特异性 T 细胞,和 A0201 限制性 WT-1 肽 FPPSLPPT (SEQ ID NO:145) T 细胞。测试的 T 细胞与肿瘤细胞的比例是 50:1、10:1、5:1 和对照(无 T 细胞)。在肿瘤注射后,通过生物发光成像检测肿瘤荷重。对于每种剂量的所有 3 种 T 细胞系,与对照相比都观察到随时间的肿瘤荷重的显著降低。此外,通过将肿瘤细胞与 WT-1 肽特异性 T 细胞预孵育,小鼠存活时间被延长。在对照组中,所有小鼠都在肿瘤注射后 70 天死亡。观察到存活随着 T 细胞:肿瘤细胞剂量是剂量响应性增加的,对于 50:1 的剂量所有 T 细胞系,以及 10:1 的 LKHTTTRTHT 特定细胞系,在第 96 天仍有一些动物存活。

[0385] 在第二项实验中,给载有预先建立的卵巢癌 SKOV3-A2 异种移植物的 NOD/SCID 小鼠静脉内施用 WT-1 肽特异性 T 细胞。评估的 T 细胞系是:A0201 限制性 WT-1 肽 LKHTTTRTHT (SEQ ID NO:182) 特异性 T 细胞和 A0301 限制性 WT-1 肽 RQRPHPGAL (SEQ ID NO:142) 特异性 T 细胞。通过生物发光、评估的人 CD3⁺细胞的肿瘤浸入和记录的存活情况监测肿瘤荷重。在两种情况下,与对照相比给予的 WT-1 特异性 T 细胞降低肿瘤荷重,增加人 CD3⁺细胞的肿瘤浸入并提高存活。

[0386] 实施例 8

[0387] 白血病患者 T 细胞对表位的识别

[0388] 在从正常相关或无关供体的异基因骨髓移植后复发的患者的过继性疗法中,使用移植供体来源的 T 细胞(用如上所述 WT-1 来源的十五肽的完整库致敏)进行 I 期临床试验。HLA 限制性等位基因和相应的免疫优势 WT-1 表位如下所示:A0201, SEQ ID NO:147; A0203, SEQ ID NOs:176 和 183;B3503 和 C0401, SEQ ID NOs:161 和 169;A6901, SEQ ID NO:177;A0201, SEQ ID NO:182;B4701 和 DRB10102, SEQ ID NOs:148 和 149;A3101, SEQ ID NO:145;B4402, SEQ ID NOs:158 和 166;B3503, SEQ ID NOs:146 和 162;DRB11104, SEQ ID NO:149。注意到引发所用 WT-1 特异性 T 细胞的数种免疫优势表位针对基因 N 端区域(外显子 1 上游)的表位,即 SEQ ID NOs:145,147,148 和 149。供体中的两个对 PGCLQQPEQQG, SEQ ID NO:149 产生应答,并且这两名接受治疗的患者在过继性转移后具有 WT-1⁺白血病细胞的暂时清除。

[0389] 实施例 9

[0390] 十五肽

[0391] 合成下列十五肽。H₂N 代表肽的 N 端,-COOH 代表 C 端。

[0392] 表 5. 十五肽的序列

[0393] SEQ ID NO:1. H₂N-SRQRP HPGAL RNPTA-COOH

[0394] SEQ ID NO:2. H₂N-PHPGA LRNPT ACPLP-COOH

[0395] SEQ ID NO:3. H₂N-ALRNP TACPL PHFPP-COOH

[0396] SEQ ID NO:4. H₂N-PTACP LPHFP PSLPP-COOH

- [0397] SEQ ID NO:5. H2N-PLPHF PPSLP PTHSP-COOH
[0398] SEQ ID NO:6. H2N-FPPSL PPTHS PTHPP-COOH
[0399] SEQ ID NO:7. H2N-LPPTH SPTHP PRAGT-COOH
[0400] SEQ ID NO:8. H2N-HSPTH PPRAG TAAQA-COOH
[0401] SEQ ID NO:9. H2N-HPPRA GTAAQ APGPR-COOH
[0402] SEQ ID NO:10. H2N-AGTAA QAPGP RRLLA-COOH
[0403] SEQ ID NO:11. H2N-AQAPG PRRLA AAILD-COOH
[0404] SEQ ID NO:12. H2N-GPRRL LAAIL DFLLL-COOH
[0405] SEQ ID NO:13. H2N-LLAAI LDFLL LQDPA-COOH
[0406] SEQ ID NO:14. H2N-ILDFL LLQDP ASTCV-COOH
[0407] SEQ ID NO:15. H2N-LLLQD PASTC VPEPA-COOH
[0408] SEQ ID NO:16. H2N-DPAST CVPEP ASQHT-COOH
[0409] SEQ ID NO:17. H2N-TCVPE PASQH TLRSG-COOH
[0410] SEQ ID NO:18. H2N-EPASQ HTLRS GPGCL-COOH
[0411] SEQ ID NO:19. H2N-QHTLR SGPGC LQQPE-COOH
[0412] SEQ ID NO:20. H2N-RSGPG CLQQP EQQGV-COOH
[0413] SEQ ID NO:21. H2N-GCLQQ PEQQG VRDPG-COOH
[0414] SEQ ID NO:22. H2N-QPEQQ GVRDP GGIWA-COOH
[0415] SEQ ID NO:23. H2N-QGVRD PGGIW AKLGA-COOH
[0416] SEQ ID NO:24. H2N-DPGGI WAKLG AAEAS-COOH
[0417] SEQ ID NO:25. H2N-IWAKL GAAEA SAERL-COOH
[0418] SEQ ID NO:26. H2N-LGAAE ASAER LQGRR-COOH
[0419] SEQ ID NO:27. H2N-EASAE RLQGR RSRGA-COOH
[0420] SEQ ID NO:28. H2N-ERLQG RRSRG ASGSE-COOH
[0421] SEQ ID NO:29. H2N-GRRSR GASGS EPQQM-COOH
[0422] SEQ ID NO:30. H2N-RGASG SEPQQ MGSDV-COOH
[0423] SEQ ID NO:31. H2N-GSEPQ QMGSD VRDLN-COOH
[0424] SEQ ID NO:32. H2N-QQMGs DVRDL NALLP-COOH
[0425] SEQ ID NO:33. H2N-SDVRD LNALL PAVPS-COOH
[0426] SEQ ID NO:34. H2N-DLNAL LPAVP SLGGG-COOH
[0427] SEQ ID NO:35. H2N-LLPAV PSLGG GGGCA-COOH
[0428] SEQ ID NO:36. H2N-VPSLG GGGGC ALPVS-COOH
[0429] SEQ ID NO:37. H2N-GGGGG CALPV SGAAQ-COOH
[0430] SEQ ID NO:38. H2N-GCALP VSGAA QWAPV-COOH
[0431] SEQ ID NO:39. H2N-PVSGA AQWAP VLDFA-COOH
[0432] SEQ ID NO:40. H2N-AAQWA PVLDF APPGA-COOH
[0433] SEQ ID NO:41. H2N-APVLD FAPPG ASAYG-COOH
[0434] SEQ ID NO:42. H2N-DFAPP GASAY GSLGG-COOH
[0435] SEQ ID NO:43. H2N-PGASA YGSLG GPAPP-COOH

[0436] SEQ ID NO:44. H2N-AYGSL GGPAP PPAPP-COOH
[0437] SEQ ID NO:45. H2N-LGGPA PPPAP PPPPP-COOH
[0438] SEQ ID NO:46. H2N-APPPA PPPPP PPPPH-COOH
[0439] SEQ ID NO:47. H2N-APPPP PPPPP HSFIK-COOH
[0440] SEQ ID NO:48. H2N-PPPPP PHSFI KQEPS-COOH
[0441] SEQ ID NO:49. H2N-PPHSF IKQEP SWGGA-COOH
[0442] SEQ ID NO:50. H2N-FIKQE PSWGG AEPHE-COOH
[0443] SEQ ID NO:51. H2N-EPSWG GAEPH EEQCL-COOH
[0444] SEQ ID NO:52. H2N-GGAEP HEEQC LSAFT-COOH
[0445] SEQ ID NO:53. H2N-PHEEQ CLSAF TVHFS-COOH
[0446] SEQ ID NO:54. H2N-QCLSA FTVHF SGQFT-COOH
[0447] SEQ ID NO:55. H2N-AFTVH FSGQF TGTAG-COOH
[0448] SEQ ID NO:56. H2N-HFSGQ FTGTA GACRY-COOH
[0449] SEQ ID NO:57. H2N-QFTGT AGACR YGPFQ-COOH
[0450] SEQ ID NO:58. H2N-TAGAC RYGPQ GPPPP-COOH
[0451] SEQ ID NO:59. H2N-CRYGP FGPPP PSQAS-COOH
[0452] SEQ ID NO:60. H2N-PFGPP PPSQA SSGQA-COOH
[0453] SEQ ID NO:61. H2N-PPPSQ ASSGQ ARMFP-COOH
[0454] SEQ ID NO:62. H2N-QASSG QARMF PNAPY-COOH
[0455] SEQ ID NO:63. H2N-GQARM FPNAP YLPSC-COOH
[0456] SEQ ID NO:64. H2N-MFPNA PYLPS CLESQ-COOH
[0457] SEQ ID NO:65. H2N-APYLP SCLES QPAIR-COOH
[0458] SEQ ID NO:66. H2N-PSCLE SQPAI RNQGY-COOH
[0459] SEQ ID NO:67. H2N-ESQPA IRNQG YSTVT-COOH
[0460] SEQ ID NO:68. H2N-AIRNQ GYSTV TFDGT-COOH
[0461] SEQ ID NO:69. H2N-QGYST VTFDG TPSYG-COOH
[0462] SEQ ID NO:70. H2N-TVTFD GTPSY GHTPS-COOH
[0463] SEQ ID NO:71. H2N-DGTPS YGHTP SHHAA-COOH
[0464] SEQ ID NO:72. H2N-SYGHT PSHHA AQFPN-COOH
[0465] SEQ ID NO:73. H2N-TPSHH AAQFP NHSFK-COOH
[0466] SEQ ID NO:74. H2N-HAAQF PNHSF KHEDP-COOH
[0467] SEQ ID NO:75. H2N-FPNHS FKHED PMGQQ-COOH
[0468] SEQ ID NO:76. H2N-SFKHE DPMGQ QGSLG-COOH
[0469] SEQ ID NO:77. H2N-EDPMG QGSL GEQQY-COOH
[0470] SEQ ID NO:78. H2N-GQQGS LGEQQ YSVPP-COOH
[0471] SEQ ID NO:79. H2N-SLGEQ QYSVP PPVYG-COOH
[0472] SEQ ID NO:80. H2N-QQYSV PPPVY GCHTP-COOH
[0473] SEQ ID NO:81. H2N-VPPPV YGCHT PTDSC-COOH
[0474] SEQ ID NO:82. H2N-VYGCH TPTDS CTGSQ-COOH

- [0475] SEQ ID NO:83. H2N-HTPTD SCTGS QALLL-COOH
[0476] SEQ ID NO:84. H2N-DSCTG SQALL LRTPY-COOH
[0477] SEQ ID NO:85. H2N-GSQAL LLRTP YSSDN-COOH
[0478] SEQ ID NO:86. H2N-LLLRT PYSSD NLYQM - COOH
[0479] SEQ ID NO:87. H2N-TPYSS DNLYQ MTSQL-COOH
[0480] SEQ ID NO:88. H2N-SDNLY QMTSQ LECMT - COOH
[0481] SEQ ID NO:89. H2N-YQMTS QLECM TWNQM-COOH
[0482] SEQ ID NO:90. H2N-SQLEC MTWNQ MNLGA-COOH
[0483] SEQ ID NO:91. H2N-CMTWN QMNLG ATLKG-COOH
[0484] SEQ ID NO:92. H2N-NQMNL GATLK GVAAG-COOH
[0485] SEQ ID NO:93. H2N-LGATL KGVA GSSSS - COOH
[0486] SEQ ID NO:94. H2N-LKGVA AGSS SVKWT-COOH
[0487] SEQ ID NO:95. H2N-AAGSS SSVKW TEGQS - COOH
[0488] SEQ ID NO:96. H2N-SSSVK WTEGQ SNHST-COOH
[0489] SEQ ID NO:97. H2N-KWTEG QSNHS TGYES-COOH
[0490] SEQ ID NO:98. H2N-GQSNH STGYE SDNHT-COOH
[0491] SEQ ID NO:99. H2N-HSTGY ESDNH TTPIL-COOH
[0492] SEQ ID NO:100. H2N-YESDN HTTP I LCGAQ-COOH
[0493] SEQ ID NO:101. H2N-NHTTP ILCGA QYRIH-COOH
[0494] SEQ ID NO:102. H2N-PILCG AQYRI HTHGV-COOH
[0495] SEQ ID NO:103. H2N-GAQYR IHTHG VFRGI-COOH
[0496] SEQ ID NO:104. H2N-RIHTH GVFRG IQDVR-COOH
[0497] SEQ ID NO:105. H2N-HGVFR GIQDV RRVPG-COOH
[0498] SEQ ID NO:106. H2N-RGIQD VRRVP GVAPT-COOH
[0499] SEQ ID NO:107. H2N-DVRRV PGVAP TLVRS-COOH
[0500] SEQ ID NO:108. H2N-VPGVA PTLVR SASET-COOH
[0501] SEQ ID NO:109. H2N-APTLV RSASE TSEKR-COOH
[0502] SEQ ID NO:110. H2N-VRSAS ETSEK RPFMC-COOH
[0503] SEQ ID NO:111. H2N-SETSE KRPFM CAYPG-COOH
[0504] SEQ ID NO:112. H2N-EKRPF MCAYP GCNKR-COOH
[0505] SEQ ID NO:113. H2N-FMCAY PGCNK RYFKL-COOH
[0506] SEQ ID NO:114. H2N-YPGCN KRYFK LSHLQ-COOH
[0507] SEQ ID NO:115. H2N-NKRYF KLSHL QMHSR-COOH
[0508] SEQ ID NO:116. H2N-FKLSH LQMHS RKHTG-COOH
[0509] SEQ ID NO:117. H2N-HLQMH SRKHT GEKPY-COOH
[0510] SEQ ID NO:118. H2N-HSRKH TGEKP YQCDF-COOH
[0511] SEQ ID NO:119. H2N-HTGEK PYQCD FKDCE-COOH
[0512] SEQ ID NO:120. H2N-KPYQC DFKDC ERRFS-COOH
[0513] SEQ ID NO:121. H2N-CDFKD CERRF SRSDQ-COOH

- [0514] SEQ ID NO:122. H2N-DCERR FSRSD QLKRH-COOH
- [0515] SEQ ID NO:123. H2N-RFSRS DQLKR HQRRH-COOH
- [0516] SEQ ID NO:124. H2N-SDQLK RHQRR HTGVK-COOH
- [0517] SEQ ID NO:125. H2N-KRHQR RHTGV KPFQC-COOH
- [0518] SEQ ID NO:126. H2N-RRHTG VKPFQ CKTCQ-COOH
- [0519] SEQ ID NO:127. H2N-GVKPF QCKTC QRKFS-COOH
- [0520] SEQ ID NO:128. H2N-FQCKT CQRKF SRSDH-COOH
- [0521] SEQ ID NO:129. H2N-TCQRK FSRSD HLKTH-COOH
- [0522] SEQ ID NO:130. H2N-KFSRS DHLKT HTRTH-COOH
- [0523] SEQ ID NO:131. H2N-SDHLK THTRT HTGKT-COOH
- [0524] SEQ ID NO:132. H2N-KTHTR THTGK TSEKP-COOH
- [0525] SEQ ID NO:133. H2N-RTHTG KTSEK PFSCR-COOH
- [0526] SEQ ID NO:134. H2N-GKTSE KPFSC RWPSC-COOH
- [0527] SEQ ID NO:135. H2N-EKPFS CRWPS CQKKF-COOH
- [0528] SEQ ID NO:136. H2N-SCRWP SCQKK FARSD-COOH
- [0529] SEQ ID NO:137. H2N-PSCQK KFARS DELVR-COOH
- [0530] SEQ ID NO:138. H2N-KKFAR SDELV RHHNM-COOH
- [0531] SEQ ID NO:139. H2N-RSDEL VRHHN MHQRN-COOH
- [0532] SEQ ID NO:140. H2N-LVRHH NMHQR NMTKL-COOH
- [0533] SEQ ID NO:141. H2N-HNMHQ RNMTK LQLAL-COOH
- [0534] 参考文献

[0535] 1. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, 等人 Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990 ;76(12):2462-2465. Prepublished on 1990/12/15 as DOI.

[0536] 2. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, 等人 Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1994 ;330(17):1185-1191. Prepublished on 1994/04/28 as DOI 10.1056/NEJM199404283301703.

[0537] 3. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, 等人 Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002 ;298(5594):850-854. Prepublished on 2002/09/21 as DOI 10.1126/science.1076514.

[0538] 4. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, 等人 Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011 ;17(13):4550-4557. Prepublished on 2011/04/19 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.

[0539] 5. Yee C, Thompson JA, Byrd D, 等人 Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with

metastatic melanoma:in vivo persistence,migration,and antitumor effect of transferred T cells.Proc Natl Acad Sci U S A.2002 ;99(25):16168-16173. Prepublished on 2002/11/13as DOI 10.1073/pnas.242600099.

[0540] 6.Mackensen A,Meidenbauer N,Vogl S,Laumer M,Berger J,Andreesen R.Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma.J Clin Oncol.2006 ; 24(31):5060-5069.Prepublished on 2006/11/01 as DOI 10.1200/JCO.2006.07.1100.

[0541] 7.Robbins PF,Morgan RA,Feldman SA, 等人 Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1.J Clin Oncol.2011 ;29(7):917-924. Prepublished on 2011/02/02 as DOI 10.1200/JCO.2010.32.2537.

[0542] 8.Morgan RA,Dudley ME,Wunderlich JR, 等人 Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.Science.2006 ; 314(5796):126-129.Prepublished on 2006/09/02 as DOI 10.1126/science.1129003.

[0543] 9.Pule MA,Savoldo B,Myers GD, 等人 Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors:persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma.Nat Med.2008 ;14(11):1264-1270.Prepublished on 2008/11/04 as DOI 10.1038/nm.1882.

[0544] 10.Porter DL,Levine BL,Kalos M,Bagg A,June CH.Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.N Engl J Med.2011 ; 365(8):725-733.Prepublished on 2011/08/13 as DOI 10.1056/NEJMoa1103849.

[0545] 11.Brentjens RJ,Riviere I,Park JH, 等人 Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias.Blood.2011 ;118(18):4817-4828.Prepublished on 2011/08/19as DOI 10.1182/blood-2011-04-348540.

[0546] 12.Gao L,Xue SA,Hasserjian R, 等人 Human cytotoxic T lymphocytes specific for Wilms' tumor antigen-1 inhibit engraftment of leukemia-initiating stem cells in non-obese diabetic-severe combined immunodeficient recipients.Transplantation.2003 ;75(9):1429-1436.Prepublished on 2003/06/07 as DOI 10.1097/01.TP.0000061516.57346.E8.

[0547] 13.Gerber JM,Qin L,Kowalski J, 等人 Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells.Am J Hematol.2011 ;86(1):31-37.Prepublished on 2010/12/07 as DOI 10.1002/ajh.21915.

[0548] 14.Greiner J,Bullinger L,Guinn BA,Dohner H,Schmitt M.Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells.Clin Cancer Res.2008 ;14(22):7161-7166.Prepublished on 2008/11/18as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-08-1102.

[0549] 15.Call KM,Glaser T,Ito CY, 等人 Isolation and characterization of a

zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 1990 ;60(3):509-520. Prepublished on 1990/02/09 as DOI.

[0550] 16. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 ;88(21):9618-9622. Prepublished on 1991/11/01 as DOI.

[0551] 17. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, 等人 WT-1 is required for early kidney development. *Cell*. 1993 ;74(4):679-691. Prepublished on 1993/08/27 as DOI.

[0552] 18. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT-1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*. 2001 ;273(2):141-161. Prepublished on 2001/10/12 as DOI.

[0553] 19. Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT-1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J*. 2001 ;20(8):1897-1909. Prepublished on 2001/04/11 as DOI 10.1093/emboj/20.8.1897.

[0554] 20. Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, 等人 Very low frequencies of human normal CD34+haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT-1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2002 ;116(2):409-420. Prepublished on 2002/02/14 as DOI.

[0555] 21. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT-1 story. *Leukemia*. 2007 ;21(5):868-876. Prepublished on 2007/03/16 as DOI 10.1038/sj.leu.2404624.

[0556] 22. Bergmann L, Miething C, Maurer U, 等人 High levels of Wilms' tumor gene (WT-1)mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*. 1997 ;90(3):1217-1225. Prepublished on 1997/08/01 as DOI.

[0557] 23. Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, 等人 High WT-1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2006 ;24(10):1507-1515. Prepublished on 2006/04/01 as DOI 10.1200/JCO.2005.03.5303.

[0558] 24. Chen ZX, Kaeda J, Saunders S, Goldman JM. Expression patterns of WT-1 and Bcr-Abl measured by TaqMan quantitative real-time RT-PCR during follow-up of leukemia patients with the Ph chromosome. *Chin Med J(Engl)*. 2004 ;117(7):968-971. Prepublished on 2004/07/22 as DOI.

[0559] 25. Cilloni D, Gottardi E, Messa F, 等人 Significant correlation between the degree of WT-1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2003 ;21(10):1988-1995. Prepublished on 2003/05/14 as DOI 10.1200/JCO.2003.10.503.

[0560] 26. Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, 等人 The Wilms' tumor gene WT-1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1999 ;13(3):393-399. Prepublished on 1999/03/23 as DOI.

[0561] 27. Keilholz U, Letsch A, Busse A, 等人 A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1(WT-1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood*. 2009 ;113(26):6541-6548. Prepublished on 2009/04/25 as DOI 10.1182/blood-2009-02-202598.

[0562] 28. Tatsumi N, Oji Y, Tsuji N, 等人 Wilms' tumor gene WT-1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors. *Int J Oncol*. 2008 ;32(3):701-711. Prepublished on 2008/02/23 as DOI.

[0563] 29. Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT-1 peptide. *Blood*. 2000 ;95(1):286-293. Prepublished on 1999/12/23 as DOI.

[0564] 30. Oka Y, Elisseeva OA, Tsuboi A, 等人 Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene(WT-1) product. *Immunogenetics*. 2000 ;51(2):99-107. Prepublished on 2000/02/09 as DOI.

[0565] 31. Rezvani K, Brenchley JM, Price DA, 等人 T-cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res*. 2005 ;11(24Pt 1):8799-8807. Prepublished on 2005/12/20 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-05-1314.

[0566] 32. Doubrovina ES, Doubrovin MM, Lee S, 等人 In vitro stimulation with WT-1 peptide-loaded Epstein-Barr virus-positive B cells elicits high frequencies of WT-1 peptide-specific T cells with in vitro and in vivo tumoricidal activity. *Clin Cancer Res*. 2004 ;10(21):7207-7219. Prepublished on 2004/11/10 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-04-1040.

[0567] 33. Xue SA, Gao L, Hart D, 等人 Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT-1-TCR gene-transduced human T cells. *Blood*. 2005 ;106(9):3062-3067. Prepublished on 2005/07/16 as DOI 10.1182/blood-2005-01-0146.

[0568] 34. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, 等人 Induction of WT-1(Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT-1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 ;101(38):13885-13890. Prepublished on 2004/09/15 as DOI 10.1073/pnas.0405884101.

[0569] 35. Pinilla-Ibarz J, May RJ, Korontsvit T, 等人 Improved human T-cell responses against synthetic HLA-0201 analog peptides derived from the WT-1 oncoprotein. *Leukemia*. 2006 ;20(11):2025-2033. Prepublished on 2006/09/23 as DOI 10.1038/sj.leu.2404380.

[0570] 36. Rezvani K, Yong AS, Mielke S, 等人 Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT-1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood*. 2008 ;111(1):236-242. Prepublished on 2007/09/19 as DOI 10.1182/blood-2007-08-108241.

[0571] 37. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous

deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*. 1990 ;343(6260):774-778. Prepublished on 1990/02/22 as DOI 10.1038/343774a0.

[0572] 38. Koehne G, Smith KM, Ferguson TL, 等人 Quantitation, selection, and functional characterization of Epstein-Barr virus-specific and alloreactive T cells detected by intracellular interferon-gamma production and growth of cytotoxic precursors. *Blood*. 2002 ;99(5):1730-1740. Prepublished on 2002/02/28 as DOI.

[0573] 39. Roskrow MA, Suzuki N, Gan Y, 等人 Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease. *Blood*. 1998 ;91(8):2925-2934. Prepublished on 1998/05/16 as DOI.

[0574] 40. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest*. 1997 ;99(7):1739-1750. Prepublished on 1997/04/01 as DOI 10.1172/JCI119338.

[0575] 41. Trivedi D, Williams RY, O'Reilly RJ, Koehne G. Generation of CMV-specific T lymphocytes using protein-spanning pools of pp65-derived overlapping pentadecapeptides for adoptive immunotherapy. *Blood*. 2005 ;105(7):2793-2801. Prepublished on 2004/10/30 as DOI 10.1182/blood-2003-05-1433.

[0576] 42. Hasan AN, Kollen WJ, Trivedi D, 等人 A panel of artificial APCs expressing prevalent HLA alleles permits generation of cytotoxic T cells specific for both dominant and subdominant viral epitopes for adoptive therapy. *J Immunol*. 2009 ;183(4):2837-2850. Prepublished on 2009/07/29 as DOI 10.4049/jimmunol.0804178.

[0577] 43. Gao L, Bellantuono I, Elsasser A, 等人 Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT-1. *Blood*. 2000 ;95(7):2198-2203. Prepublished on 2000/03/25 as DOI.

[0578] 44. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999 ;50(3-4):213-219. Prepublished on 1999/12/22 as DOI.

[0579] 45. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol*. 1994 ;152(1):163-175. Prepublished on 1994/01/01 as DOI.

[0580] 46. Smithgall M, Misher L, Spies G, Cheever MA, Gaiger A. Identification of a novel WT-1 HLA A*0201-restricted CTL epitope using whole gene in vitro priming. . *ASH. Orlando, FL: Blood* ;2001:121a.

[0581] 47. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, 等人 The prioritization of cancer

antigens:a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res.* 2009 ;15(17):5323-5337. Prepublished on 2009/09/03 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-0737.

[0582] 48. Kiecker F, Streitz M, Ay B, 等人 Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose μ *Hum Immunol.* 2004 ;65(5):523-536. Prepublished on 2004/06/03 as DOI 10.1016/j.humimm.2004.02.017.

[0583] 49. Pelte C, Cherepnev G, Wang Y, Schoenemann C, Volk HD, Kern F. Random screening of proteins for HLA-A*0201-binding nine-amino acid peptides is not sufficient for identifying CD8 T cell epitopes recognized in the context of HLA-A*0201. *J Immunol.* 2004 ;172(11):6783-6789. Prepublished on 2004/05/22 as DOI.

[0584] 50. Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel WT-1 isoforms. *J Biol Chem.* 1996 ;271(15):8646-8654. Prepublished on 1996/04/12 as DOI.

[0585] 51. Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, 等人 High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med.* 1999 ;190(5):705-715. Prepublished on 1999/09/08 as DOI.

[0586] 52. Chen Q, Jackson H, Gibbs P, Davis ID, Trapani J, Cebon J. Spontaneous T cell responses to melanoma differentiation antigens from melanoma patients and healthy subjects. *Cancer Immunol Immunother.* 1998 ;47(4):191-197. Prepublished on 1999/01/06 as DOI.

[0587] 53. Pittet MJ, Zippelius A, Valmori D, Speiser DE, Cerottini JC, Romero P. Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor. *Trends Immunol.* 2002 ;23(7):325-328. Prepublished on 2002/07/10 as DOI.

[0588] 54. Weber G, Karbach J, Kuci S, 等人 WT-1 peptide-specific T cells generated from peripheral blood of healthy donors: possible implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2009 ;23(9):1634-1642. Prepublished on 2009/04/10 as DOI 10.1038/leu.2009.70.

[0589] 55. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola FM, Letsch A, Keilholz U. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 ;9(12):4296-4303. Prepublished on 2003/10/14 as DOI.

[0590] 56. Scheibenbogen C, Letsch A, Thiel E, 等人 CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT-1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002 ;100(6):2132-2137. Prepublished on 2002/08/30 as DOI 10.1182/blood-2002-01-0163.

[0591] 57. Elisseeva OA, Oka Y, Tsuboi A, 等人 Humoral immune responses against Wilms tumor gene WT-1 product in patients with hematopoietic malignancies. *Blood.* 2002 ;99(9):3272-3279. Prepublished on 2002/04/20 as DOI.

- [0592] 58. Tyler E, Jungbluth AA, O'Reilly RJ, Koehne G. WT-1-Specific Immune Responses in Patients with High-Risk Multiple Myeloma Undergoing Allogeneic T Cell-Depleted Hematopoietic Stem Cell Transplantation Followed by Donor Lymphocyte Infusions. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011 ;118(21):1993-.
- [0593] 59. King JW, Thomas S, Corsi F, 等人 IL15 can reverse the unresponsiveness of Wilms' tumor antigen-specific CTL in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 ;15(4):1145-1154. Prepublished on 2009/02/21 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-08-1821.
- [0594] 60. Gillmore R, Xue SA, Holler A, 等人 Detection of Wilms' tumor antigen--specific CTL in tumor-draining lymph nodes of patients with early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 ;12(1):34-42. Prepublished on 2006/01/07 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-05-1483.
- [0595] 61. Murao A, Oka Y, Tsuboi A, 等人 High frequencies of less differentiated and more proliferative WT-1-specific CD8+ T cells in bone marrow in tumor-bearing patients: an important role of bone marrow as a secondary lymphoid organ. *Cancer Sci*. 2010 ;101(4):848-854. Prepublished on 2010/02/09 as DOI 10.1111/j.1349-7006.2009.01468.x.
- [0596] 62. van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, van den Eynde B. Database of T-cell defined tumor antigens. <http://cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>. *Cancer Immunity*. 2012.
- [0597] 63. Pospori C, Xue SA, Holler A, 等人 Specificity for the tumor-associated self-antigen WT-1 drives the development of fully functional memory T cells in the absence of vaccination. *Blood*. 2011 ;117(25):6813-6824. Prepublished on 2011/03/31 as DOI 10.1182/blood-2010-08-304568.
- [0598] 64. Rezvani K, Yong AS, Mielke S, 等人 Repeated PR1 and WT-1 peptide vaccination in Montanide-adjuvant fails to induce sustained high-avidity, epitope-specific CD8+ T cells in myeloid malignancies. *Haematologica*. 2011 ;96(3):432-440. Prepublished on 2010/12/08 as DOI 10.3324/haematol.2010.031674.
- [0599] 65. Lehe C, Ghebeh H, Al-Sulaiman A, 等人 The Wilms' tumor antigen is a novel target for human CD4+ regulatory T cells: implications for immunotherapy. *Cancer Res*. 2008 ;68(15):6350-6359. Prepublished on 2008/08/05 as DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-0050.

[0001]

序列表

<110> 纪念斯隆凯特林癌症中心
 <120> 免疫原性 WT-1 肽及其使用方法
 <130> P-75493-PC
 <140> PCT/US13/999999
 <141> 2013-01-07
 <150> 61/586,177
 <151> 2012-01-13
 <150> 61/647,207
 <151> 2012-05-15
 <160> 197
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 Ser Arg Gln Arg Pro His Pro Gly Ala Leu Arg Asn Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2
 Pro His Pro Gly Ala Leu Arg Asn Pro Thr Ala Cys Pro Leu Pro
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3
 Ala Leu Arg Asn Pro Thr Ala Cys Pro Leu Pro His Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4
 Pro Thr Ala Cys Pro Leu Pro His Phe Pro Pro Ser Leu Pro Pro
 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 5
 Pro Leu Pro His Phe Pro Pro Ser Leu Pro Pro Thr His Ser Pro
 1 5 10 15

[0002]

<210>	6		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	6		
Phe Pro Pro Ser Leu Pro Pro Thr His Ser Pro Thr His Pro Pro			
1	5	10	15
<210>	7		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	7		
Leu Pro Pro Thr His Ser Pro Thr His Pro Pro Arg Ala Gly Thr			
1	5	10	15
<210>	8		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	8		
His Ser Pro Thr His Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala			
1	5	10	15
<210>	9		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	9		
His Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala Pro Gly Pro Arg			
1	5	10	15
<210>	10		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	10		
Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala Pro Gly Pro Arg Arg Leu Leu Ala			
1	5	10	15
<210>	11		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	11		
Ala Gln Ala Pro Gly Pro Arg Arg Leu Leu Ala Ala Ile Leu Asp			
1	5	10	15
<210>	12		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	12		

[0003]

Gly Pro Arg Arg Leu Leu Ala Ala Ile Leu Asp Phe Leu Leu Leu 1 5 10	15
<210> 13	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 13	
Leu Leu Ala Ala Ile Leu Asp Phe Leu Leu Leu Gln Asp Pro Ala 1 5 10	15
<210> 14	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 14	
Ile Leu Asp Phe Leu Leu Leu Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val 1 5 10	15
<210> 15	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 15	
Leu Leu Leu Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala 1 5 10	15
<210> 16	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 16	
Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His Thr 1 5 10	15
<210> 17	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 17	
Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His Thr Leu Arg Ser Gly 1 5 10	15
<210> 18	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 18	
Glu Pro Ala Ser Gln His Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu 1 5 10	15
<210> 19	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	

[0004]

<400>	19		
Gln His Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu			
1	5	10	15
<210>	20		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	20		
Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly Val			
1	5	10	15
<210>	21		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	21		
Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly Val Arg Asp Pro Gly			
1	5	10	15
<210>	22		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	22		
Gln Pro Glu Gln Gln Gly Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala			
1	5	10	15
<210>	23		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	23		
Gln Gly Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala			
1	5	10	15
<210>	24		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	24		
Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala Ser			
1	5	10	15
<210>	25		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	25		
Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala Ser Ala Glu Arg Leu			
1	5	10	15
<210>	26		
<211>	15		
<212>	PRT		

[0005]

<213>	智人	
<400>	26	
Leu Gly Ala Ala Glu Ala Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg	1 5 10	15
<210>	27	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	27	
Glu Ala Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala	1 5 10	15
<210>	28	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	28	
Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser Glu	1 5 10	15
<210>	29	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	29	
Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gln Gln Met	1 5 10	15
<210>	30	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	30	
Arg Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val	1 5 10	15
<210>	31	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	31	
Gly Ser Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn	1 5 10	15
<210>	32	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	32	
Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro	1 5 10	15
<210>	33	

[0006]

<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	33		
Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser			
1	5	10	15
<210>	34		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	34		
Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly			
1	5	10	15
<210>	35		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	35		
Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala			
1	5	10	15
<210>	36		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	36		
Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser			
1	5	10	15
<210>	37		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	37		
Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala Gln			
1	5	10	15
<210>	38		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	38		
Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val			
1	5	10	15
<210>	39		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	39		
Pro Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala			
1	5	10	15

[0007]

<210>	40	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	40	
Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala		
1	5	10
		15
<210>	41	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	41	
Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly		
1	5	10
		15
<210>	42	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	42	
Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly		
1	5	10
		15
<210>	43	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	43	
Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro		
1	5	10
		15
<210>	44	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	44	
Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro		
1	5	10
		15
<210>	45	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	45	
Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro		
1	5	10
		15
<210>	46	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	46	
Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His		

[0008]

1	5	10	15
<210> 47			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 47			
Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys			
1	5	10	15
<210> 48			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 48			
Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser			
1	5	10	15
<210> 49			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 49			
Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly Ala			
1	5	10	15
<210> 50			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 50			
Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu			
1	5	10	15
<210> 51			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 51			
Glu Pro Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu			
1	5	10	15
<210> 52			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 52			
Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr			
1	5	10	15
<210> 53			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 53			

[0009]

Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe Ser 1 5 10	15
<210> 54	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 54	
Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr 1 5 10	15
<210> 55	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 55	
Ala Phe Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly 1 5 10	15
<210> 56	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 56	
His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr 1 5 10	15
<210> 57	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 57	
Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly 1 5 10	15
<210> 58	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 58	
Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro 1 5 10	15
<210> 59	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 59	
Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser 1 5 10	15
<210> 60	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	

[0010]

<400>	60	
Pro Phe Gly Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala		
1	5	10
		15
<210>	61	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	61	
Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro		
1	5	10
		15
<210>	62	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	62	
Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr		
1	5	10
		15
<210>	63	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	63	
Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys		
1	5	10
		15
<210>	64	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	64	
Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln		
1	5	10
		15
<210>	65	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	65	
Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg		
1	5	10
		15
<210>	66	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	66	
Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr		
1	5	10
		15
<210>	67	
<211>	15	

[0011]

<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 67		
Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr		
1	5	10
		15
<210> 68		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 68		
Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr		
1	5	10
		15
<210> 69		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 69		
Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr Gly		
1	5	10
		15
<210> 70		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 70		
Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser		
1	5	10
		15
<210> 71		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 71		
Asp Gly Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala		
1	5	10
		15
<210> 72		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 72		
Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn		
1	5	10
		15
<210> 73		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 73		
Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe Lys		
1	5	10
		15

[0012]

<210>	74	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	74	
His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro		
1	5	10
		15
<210>	75	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	75	
Phe Pro Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln		
1	5	10
		15
<210>	76	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	76	
Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly		
1	5	10
		15
<210>	77	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	77	
Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr		
1	5	10
		15
<210>	78	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	78	
Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro		
1	5	10
		15
<210>	79	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	79	
Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly		
1	5	10
		15
<210>	80	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	80	
Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro		
1	5	10
		15

[0013]

<210>	81	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	81	
Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys		
1	5	10
		15
<210>	82	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	82	
Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln		
1	5	10
		15
<210>	83	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	83	
His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
		15
<210>	84	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	84	
Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr		
1	5	10
		15
<210>	85	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	85	
Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn		
1	5	10
		15
<210>	86	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	86	
Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met		
1	5	10
		15
<210>	87	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	87	

[0014]

Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu 1 5 10	15
<210> 88 <211> 15 <212> PRT <213> 智人	
<400> 88	
Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr 1 5 10	15
<210> 89 <211> 15 <212> PRT <213> 智人	
<400> 89	
Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met 1 5 10	15
<210> 90 <211> 15 <212> PRT <213> 智人	
<400> 90	
Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala 1 5 10	15
<210> 91 <211> 15 <212> PRT <213> 智人	
<400> 91	
Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly 1 5 10	15
<210> 92 <211> 15 <212> PRT <213> 智人	
<400> 92	
Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly 1 5 10	15
<210> 93 <211> 15 <212> PRT <213> 智人	
<400> 93	
Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser 1 5 10	15
<210> 94 <211> 15 <212> PRT <213> 智人	

[0015]

<400> 94		
Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr		
1	5	10
		15
<210> 95		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 95		
Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser		
1	5	10
		15
<210> 96		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 96		
Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr		
1	5	10
		15
<210> 97		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 97		
Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser		
1	5	10
		15
<210> 98		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 98		
Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr		
1	5	10
		15
<210> 99		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 99		
His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu		
1	5	10
		15
<210> 100		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 100		
Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln		
1	5	10
		15
<210> 101		
<211> 15		
<212> PRT		

[0016]

<213>	智人	
<400>	101	
Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His		
1	5	10
		15
<210>	102	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	102	
Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val		
1	5	10
		15
<210>	103	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	103	
Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile		
1	5	10
		15
<210>	104	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	104	
Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg		
1	5	10
		15
<210>	105	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	105	
His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly		
1	5	10
		15
<210>	106	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	106	
Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr		
1	5	10
		15
<210>	107	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	107	
Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser		
1	5	10
		15
<210>	108	

[0017]

<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	108		
Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr			
1	5	10	15
<210>	109		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	109		
Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg			
1	5	10	15
<210>	110		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	110		
Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys			
1	5	10	15
<210>	111		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	111		
Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly			
1	5	10	15
<210>	112		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	112		
Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg			
1	5	10	15
<210>	113		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	113		
Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu			
1	5	10	15
<210>	114		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	114		
Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln			
1	5	10	15

[0018]

<210>	115	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	115	
Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg		
1	5	10
		15
<210>	116	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	116	
Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly		
1	5	10
		15
<210>	117	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	117	
His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr		
1	5	10
		15
<210>	118	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	118	
His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe		
1	5	10
		15
<210>	119	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	119	
His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu		
1	5	10
		15
<210>	120	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	120	
Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser		
1	5	10
		15
<210>	121	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	121	
Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln		

[0019]

1	5	10	15
<210> 122			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 122			
Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His			
1	5	10	15
<210> 123			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 123			
Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His			
1	5	10	15
<210> 124			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 124			
Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys			
1	5	10	15
<210> 125			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 125			
Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys			
1	5	10	15
<210> 126			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 126			
Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln			
1	5	10	15
<210> 127			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 127			
Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser			
1	5	10	15
<210> 128			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 128			

[0020]

Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His 1 5 10	15
<210> 129	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 129	
Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His 1 5 10	15
<210> 130	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 130	
Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His 1 5 10	15
<210> 131	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 131	
Ser Asp His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr 1 5 10	15
<210> 132	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 132	
Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro 1 5 10	15
<210> 133	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 133	
Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg 1 5 10	15
<210> 134	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 134	
Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys 1 5 10	15
<210> 135	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 智人	

[0021]

<400>	135	
	Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe	
	1 5 10	15
<210>	136	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	136	
	Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp	
	1 5 10	15
<210>	137	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	137	
	Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg	
	1 5 10	15
<210>	138	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	138	
	Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met	
	1 5 10	15
<210>	139	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	139	
	Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn	
	1 5 10	15
<210>	140	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	140	
	Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu	
	1 5 10	15
<210>	141	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	141	
	His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu	
	1 5 10	15
<210>	142	
<211>	9	

[0022]

<212> PRT
<213> 智人

<400> 142

Arg Gln Arg Pro His Pro Gly Ala Leu
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 143

Gly Ala Leu Arg Asn Pro Thr Ala Cys
1 5

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 144

Pro Leu Pro His Phe Pro Pro Ser Leu
1 5

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 145

His Phe Pro Pro Ser Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 146

Thr His Ser Pro Thr His Pro Pro Arg
1 5

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 147

Ala Ile Leu Asp Phe Leu Leu Leu Gln
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 148

Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln
1 5

[0023]

<210> 149
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 149
 Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly
 1 5 10

<210> 150
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 150

Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala Ser Ala
 1 5

<210> 151
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 151

Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gln Gln Met
 1 5

<210> 152
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 152

Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
 1 5 10

<210> 153
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 153

Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala
 1 5 10

<210> 154
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 154

Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu
 1 5

<210> 155
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 155

Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser
 1 5

[0024]

<210> 156
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 156

Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 1 5 10

<210> 157
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 157

Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro
 1 5

<210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 158

Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5

<210> 159
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 159

Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro
 1 5

<210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 160

Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn
 1 5

<210> 161
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 161

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5

<210> 162
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 162

[0025]

Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 163

Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 164

His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 165

His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 166

Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr
1 5

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 167

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 168

Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

[0026]

<400> 169

Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu
1 5

<210> 170

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 170

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu
1 5 10

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 171

Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr
1 5

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 172

Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu
1 5

<210> 173

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 173

Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys
1 5 10

<210> 174

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 174

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly
1 5 10 15

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 175

Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val
1 5

<210> 176

<211> 10

<212> PRT

[0027]

<213> 智人
 <400> 176
 Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala
 1 5 10

<210> 177
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 177
 Thr Leu Gly Val Ala Ala Gly Ser
 1 5

<210> 178
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 178
 Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr
 1 5

<210> 179
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 179
 Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
 1 5 10

<210> 180
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 180
 Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys
 1 5 10

<210> 181
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 181
 Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu
 1 5

<210> 182
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 182
 Leu Lys Thr His Thr Thr Arg Thr His Thr
 1 5 10

<210> 183

[0028]

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 183
 Asn Met His Gln Arg Asn His Thr Lys Leu
 1 5 10

<210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 184
 Leu Leu Ala Ala Ile Leu Asp Phe Leu
 1 5

<210> 185
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 185
 Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly Val
 1 5 10

<210> 186
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 186
 Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
 1 5

<210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 187
 Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
 1 5

<210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 188
 Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala
 1 5

<210> 189
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 189
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

[0029]

<210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 190
 Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr
 1 5 10

 <210> 191
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 191
 Ala Leu Arg Asn Pro Thr Ala Cys Pro Leu
 1 5 10

 <210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 192
 Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe
 1 5

 <210> 193
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 193
 Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly
 1 5 10 15

 <210> 194
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 194
 Ser Arg Gln Arg Pro His Pro Gly Ala Leu Arg Asn Pro Thr Ala Cys
 1 5 10 15
 Pro Leu Pro His Phe Pro Pro Ser Leu Pro Pro Thr His Ser Pro Thr
 20 25 30
 His Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala Pro Gly Pro Arg Arg
 35 40 45
 Leu Leu Ala Ala Ile Leu Asp Phe Leu Leu Leu Gln Asp Pro Ala Ser
 50 55 60
 Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His Thr Leu Arg Ser Gly Pro
 65 70 75 80
 Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly Val Arg Asp Pro Gly Gly
 85 90 95

[0030]

Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala Ser Ala Glu Arg Leu Gln	
100 105 110	
Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gln Gln Met Gly	
115 120 125	
Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu	
130 135 140	
Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp	160
145 150 155	
Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser	175
165 170	
Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro	
180 185 190	
Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly Ala Glu	
195 200 205	
Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe Ser Gly	
210 215 220	
Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro	240
225 230 235	
Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn	255
245 250	
Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn	
260 265 270	
Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr Gly His	
275 280 285	
Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe Lys His	
290 295 300	
Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser	320
305 310 315	
Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr	335
325 330	
Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu	
340 345 350	
Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn	
355 360 365	
Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val	
370 375 380	
Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser Asp	400
385 390 395	

[0031]

Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His Thr 405 410	415
His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val 420 425 430	
Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro 435 440 445	
Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser 450 455 460	
His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln 465 470 475	480
Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu 485 490	495
Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys 500 505 510	
Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His Thr 515 520 525	
Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp 530 535 540	
Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His 545 550 555	560
His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu 565 570	575
<210> 195 <211> 449 <212> PRT <213> 智人	
<400> 195	
Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro 1 5 10	15
Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala 20 25 30	
Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr 35 40 45	
Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro 50 55 60	
Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly 65 70 75	80
Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe 85 90	95

[0032]

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

[0033]

385	390	395	400
His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys	405	410	415
Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val	420	425	430
Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala	435	440	445
Leu			
<210>	196		
<211>	453		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	196		
Ala Ala Glu Ala Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly	1	5	10
Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu	20	25	30
Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys	35	40	45
Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe	50	55	60
Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro	65	70	75
Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile	85	90	95
Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys	100	105	110
Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala	115	120	125
Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala	130	135	140
Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser	145	150	155
Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val	165	170	175
Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala	180	185	190
Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln			

[0034]

	195	200	205	
	Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr			
	210	215	220	
	Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu			240
	225	230	235	
	Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln			255
	245	250		
	Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys			
	260	265	270	
	Gly His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu			
	275	280	285	
	Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile			
	290	295	300	
	Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser			320
	305	310	315	
	Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly			335
	325	330		
	Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg			
	340	345	350	
	Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu			
	355	360	365	
	Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His			
	370	375	380	
	Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser			400
	385	390	395	
	Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys			415
	405	410		
	Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser			
	420	425	430	
	Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys			
	435	440	445	
	Leu Gln Leu Ala Leu			
	450			
	<210> 197			
	<211> 514			
	<212> PRT			
	<213> 智人			
	<400> 197			
	Met Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His			

[0035]

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

[0036]

Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala 305 310 315	320
Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser 325 330	335
Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala 340 345 350	
Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val 355 360 365	
Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu 370 375 380	
Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys 385 390 395	400
Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr 405 410	415
Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe 420 425 430	
Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val 435 440 445	
Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp 450 455 460	
His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser 465 470 475	480
Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu 485 490	495
Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu 500 505 510	
Ala Leu	

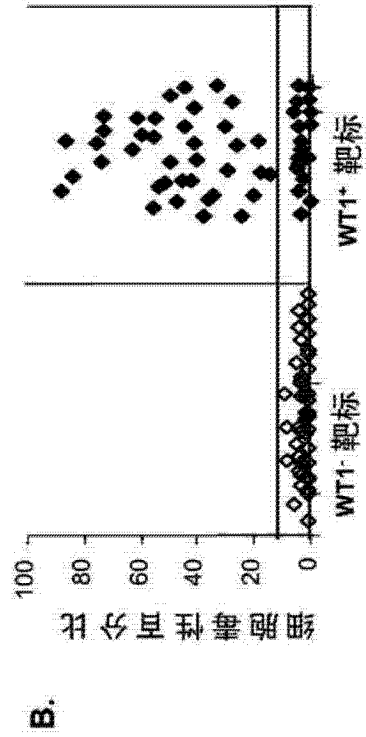
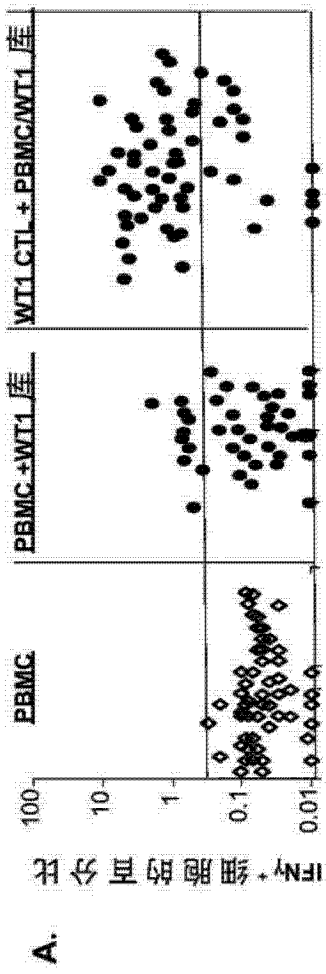


图 1A-B

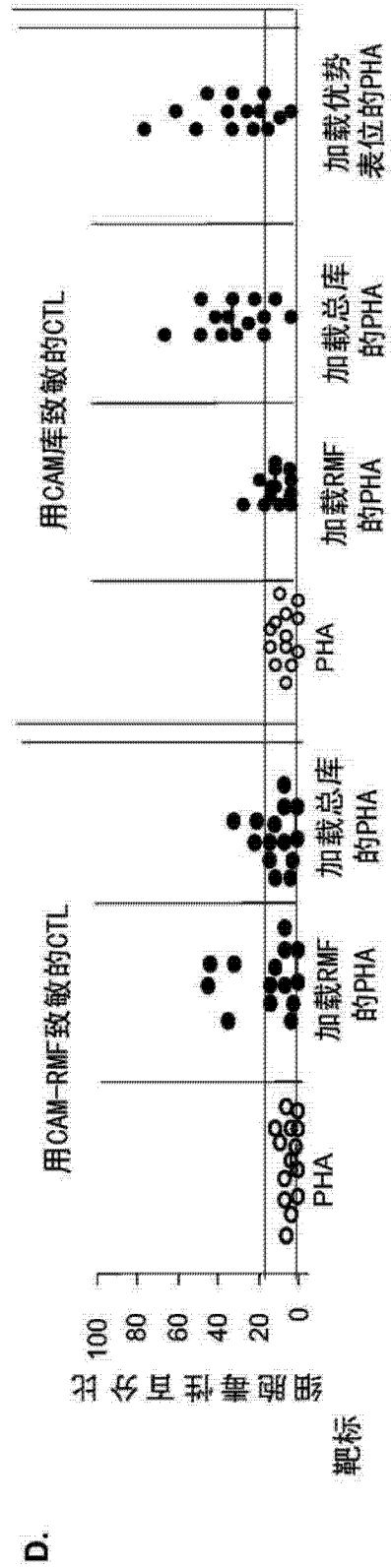
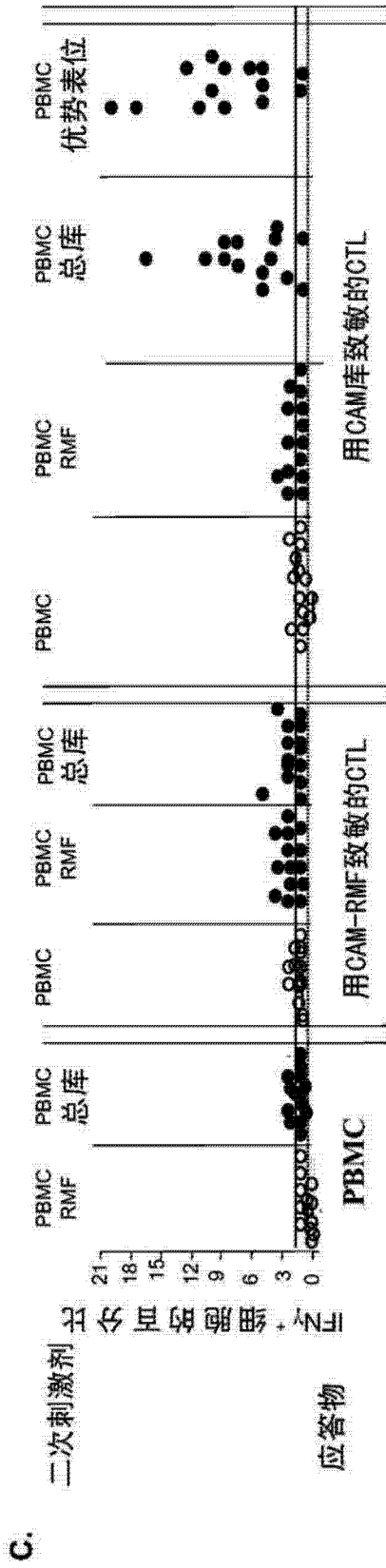


图 1C-D

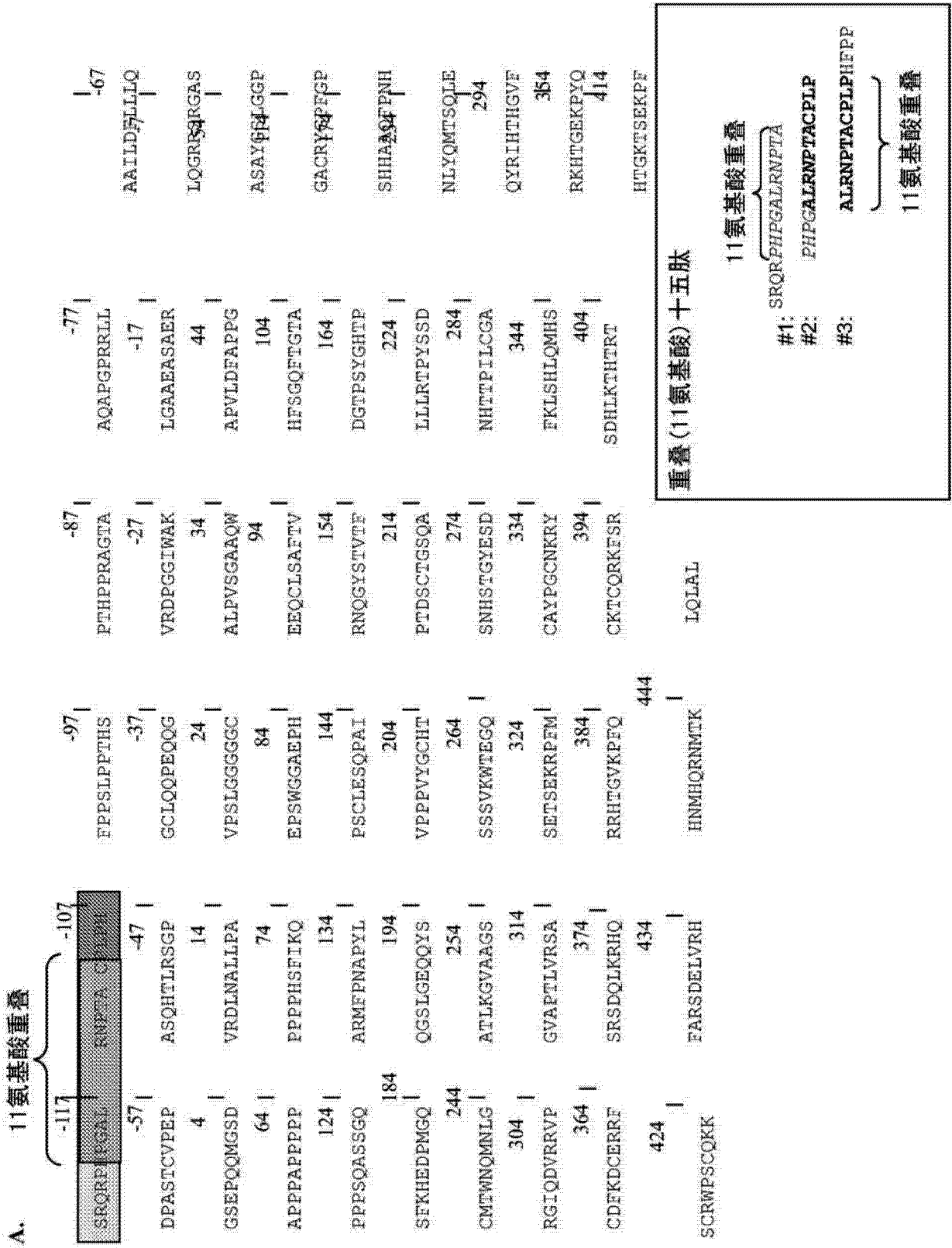
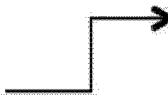



图 2A



W1肽子库3和19



十五肽#75

FPNHSFKHEDPMGQQ

Subpeptide #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
17	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
18	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
19	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
20	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
21	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
22	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
23	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
24	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44

图 2B

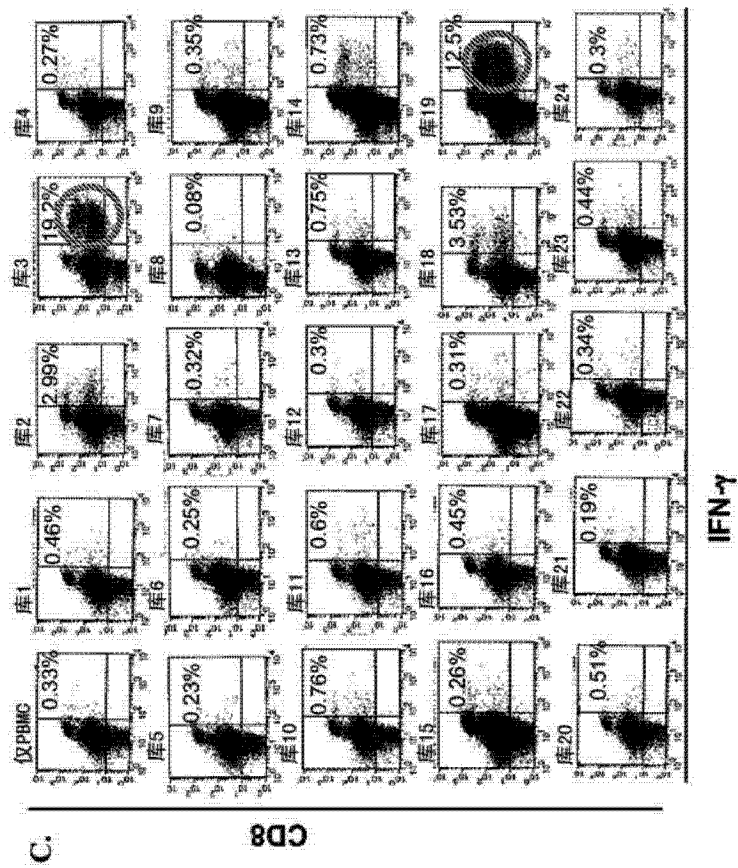
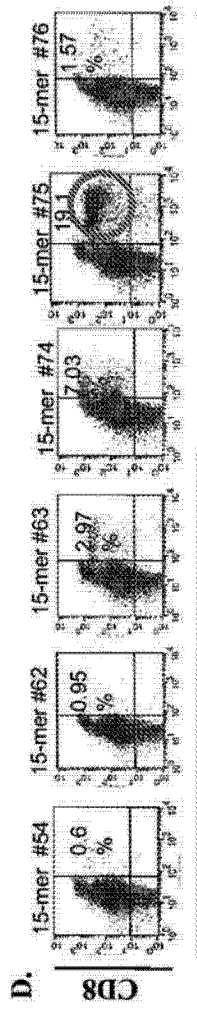


图 2C



IFN

肽 # 62: QASSGQARMFPNAPY
 肽 # 63: GQARMFPNAPLPSC
 肽 # 64: MFPNAPLPSCLESQ

肽 # 74: HAAQFPNHSFKHEDP
 肽 # 75: FPNHSEKHEDPMGQQ
 肽 # 76: SFKHEDPMGQQGSLG

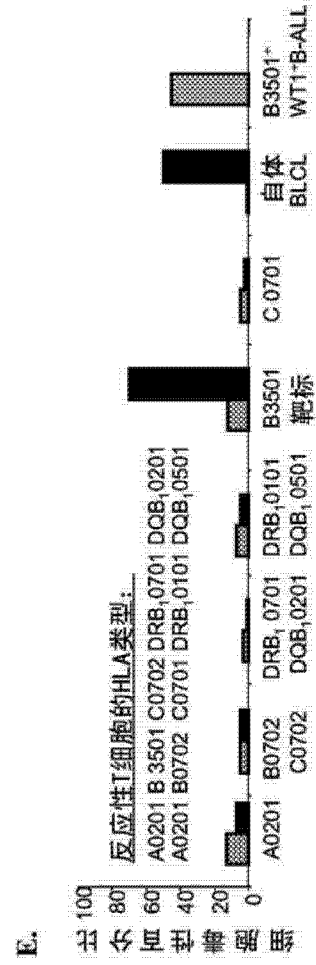


图 2D-E

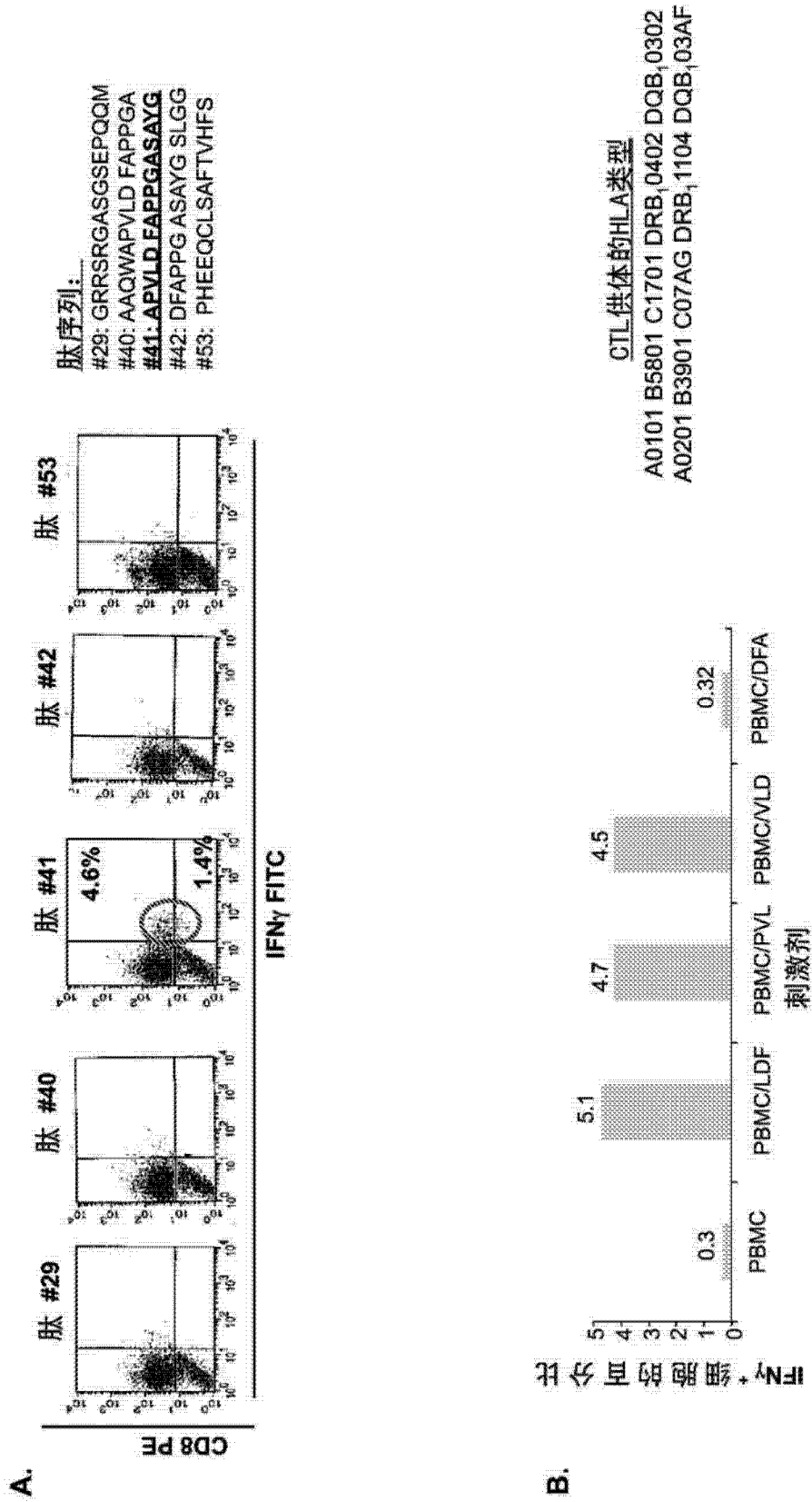
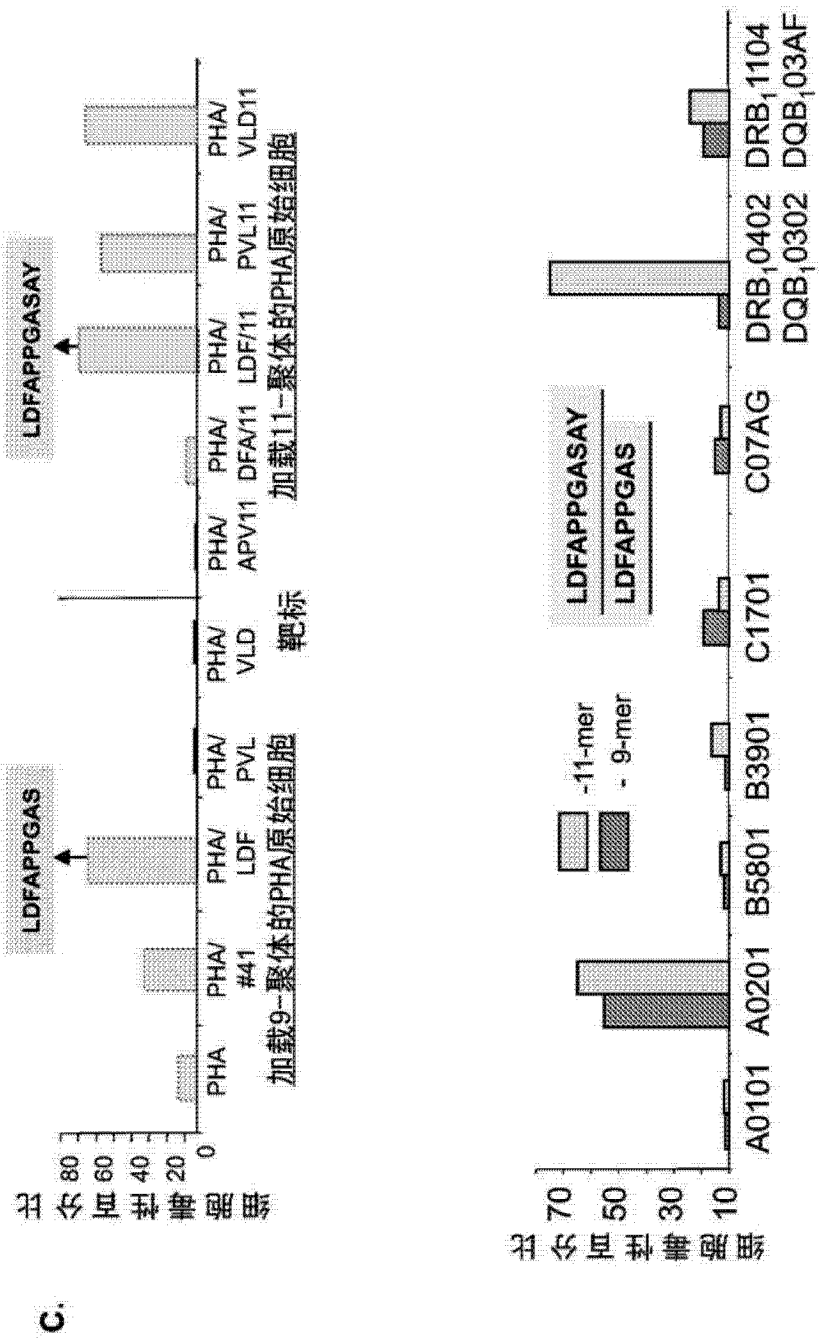


图 3A-B



加载源自WT1-十五肽#41的预先确定的表位的靶标

图 3C-D

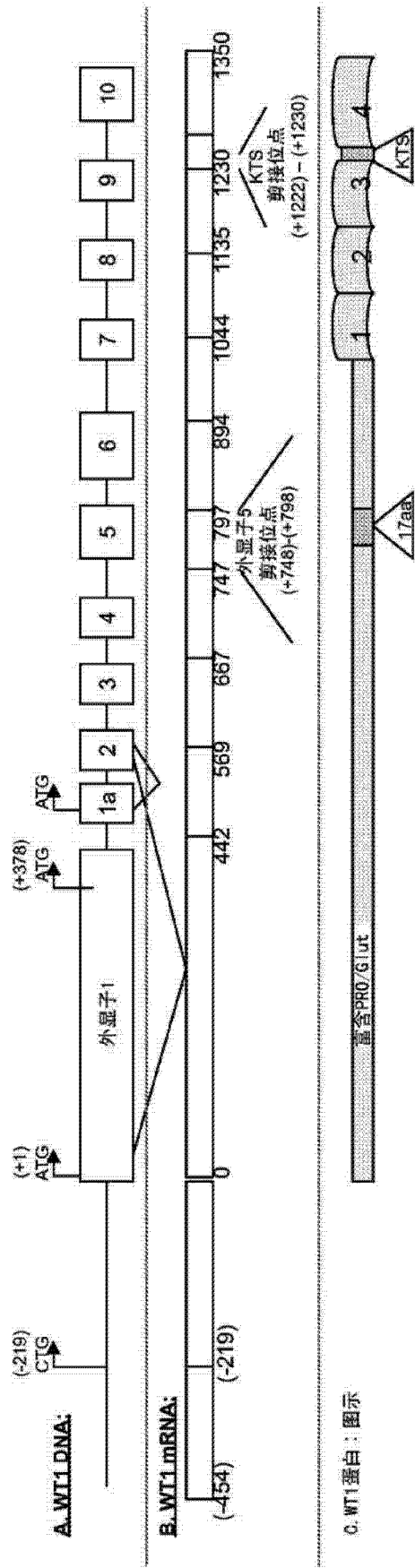


图 4A-C

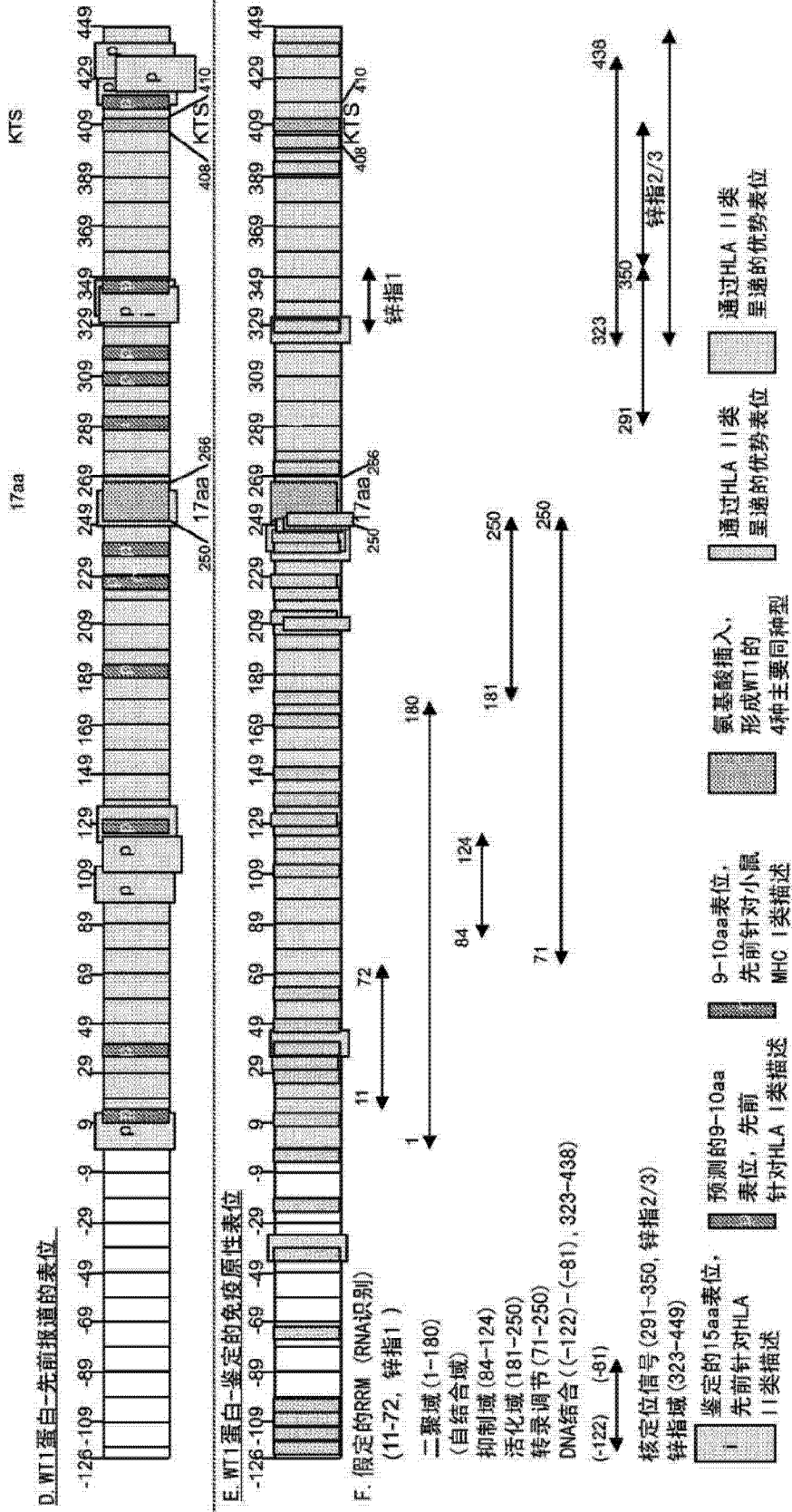


图 4D-F

8个正常A0201+供体中混合并加载于A0201-AAPC的A0201表位

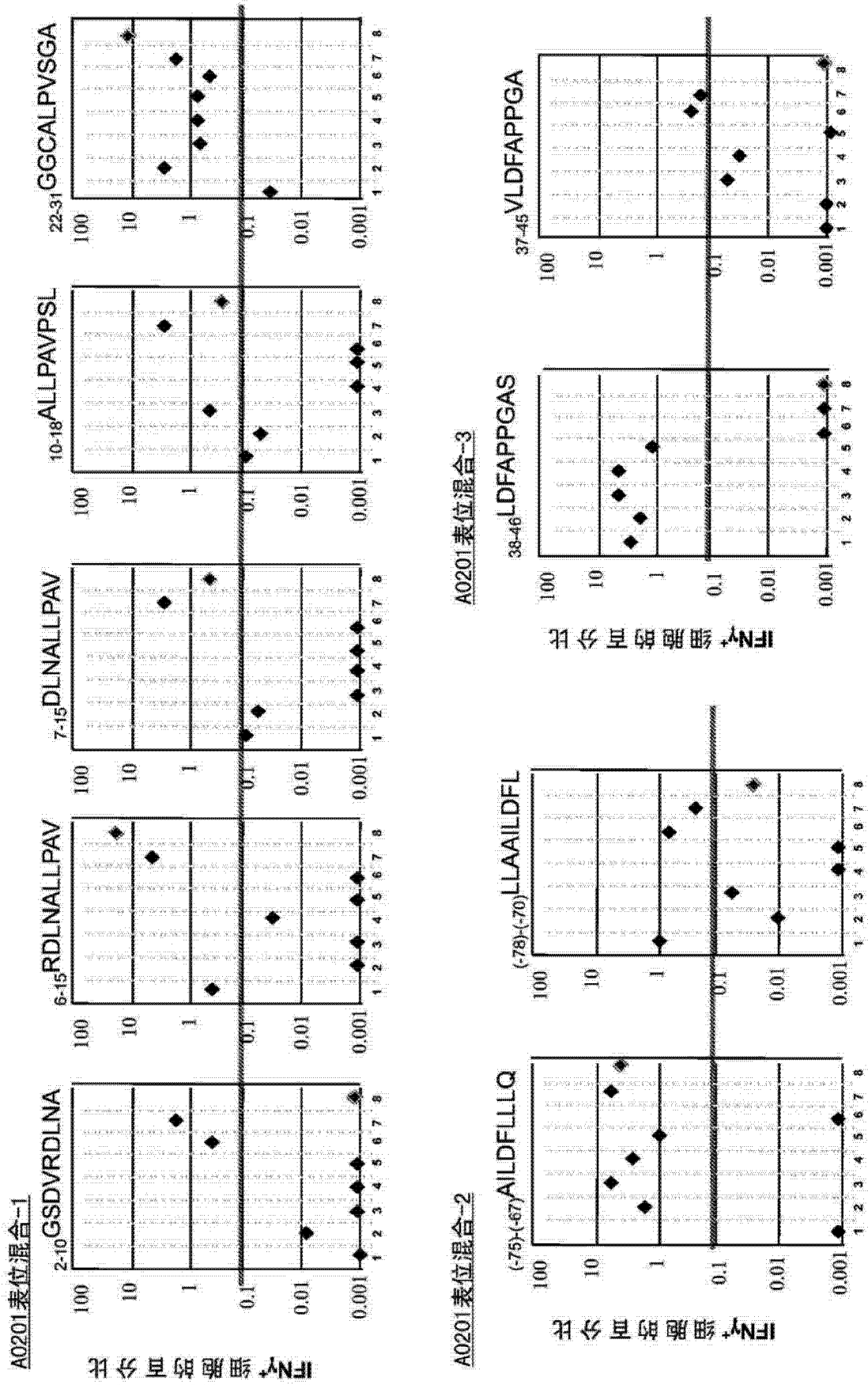


图 5