



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107188958 B

(45) 授权公告日 2020.09.29

(21) 申请号 201710546361.X

(22) 申请日 2017.07.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107188958 A

(43) 申请公布日 2017.09.22

(73) 专利权人 江苏迈健生物科技发展股份有限公司

地址 214000 江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道1699号无锡(惠山)生命科技园C区1号楼401-411室

(72) 发明人 常菁 冷晓燕 张超 段云飞
曹巍 虞强

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 黄欣

(51) Int.Cl.

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

江冠铭等. 树突状细胞活化TCR基因转染记忆性T细胞联合化疗治疗.《中国癌症防治杂志》.2016,第6卷(第2期),第167-171页.

Kazuya Ofuji等.A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer.《International Journal of Oncology》.2015,第46卷摘要、第499页左栏第4段.

审查员 季璇馨

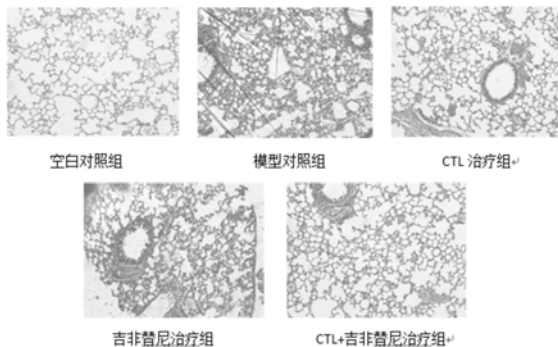
权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

抗原肽T790M-5及其在制备治疗非小细胞肺癌的药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了抗原肽T790M-5及其在制备治疗非小细胞肺癌的药物中的应用,所述抗原肽T790M-5的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示.该抗原肽具有激活T细胞靶向杀死非小细胞肺癌细胞的作用,可为预防和/或治疗EGFR T790M突变的非小细胞肺癌病人(EGFR-TKIs疗法)提供一种新的、有希望的免疫治疗方法。



1. 抗原肽T790M-5,其特征在于:其氨基酸序列如SEQ ID NO.1 所示。
2. 一种用于治疗非小细胞肺癌的药物,其特征在于:该药物含有权利要求1所述的抗原肽T790M-5。
3. 权利要求1所述的抗原肽T790M-5在制备治疗EGFR T790M 突变的非小细胞肺癌的药物中的应用。
4. 权利要求1所述的抗原肽T790M-5在制备用于诱导对具有EGFR T790M 突变的非小细胞肺癌的免疫的药物中的应用。
5. 权利要求1所述的抗原肽T790M-5在制备用于诱导肿瘤反应性T细胞的药物中的应用,其特征在于:所述肿瘤反应性T细胞是可以靶向抑制具有EGFR T790M 突变的非小细胞肺癌细胞生长的T细胞。

抗原肽T790M-5及其在制备治疗非小细胞肺癌的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及抗原肽T790M-5及其在制备治疗非小细胞肺癌的药物中的应用。

背景技术

[0002] 肺癌是全球癌症死亡的主因。而非小细胞肺癌又占肺癌病例的80%。虽然现今治疗手段有了很大发展,但对肺癌病人的预测仍显不足。但最近人们对此疾病在治疗方法上取得了重要的进展。特别是表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs),如吉非替尼、埃罗替尼已经被研发出来作为针对特定的非小细胞肺癌的新的治疗方式,这些病人EGFR基因的酪氨酸激酶区域发生了突变。采用EGFR-TKI药物对EGFR突变型非小细胞肺癌病人(如delE746-A750和L858R)实施的前期临床研究,显示出了较高的临床反应率,约80%。然而,随着时间的推移,大多数病人对EGFR-TKIs产生了获得性的耐药性。对非小细胞肺癌的深入研究鉴定出了次级突变T790M出现在50%的EGFR-TKIs耐药病患中。然而对于有这种突变的非小细胞肺癌病患来说,目前还没有有效的治疗方式。

[0003] 近几年,由于多种肿瘤相关抗原的鉴定,肿瘤免疫学领域取得了引人注目的进展。尤其是多种肿瘤免疫疗法的研发和临床试验,包括利用肿瘤相关蛋白或肽段的肿瘤疫苗。尽管早期临床实验中免疫疗法显示出了可行性以及低毒性,但是后期的随机试验,除少数以外,相比于现有的治疗方式,均未能显示出有益的治疗效果。这些意想不到的结果可能归因于,至少部分是由于疫苗抗原的类型。目前,大部分的疫苗抗原分离自未发生突变的自体抗原,由于中枢免疫耐受和/或外周免疫耐受机制的存在,它们不表现出高的免疫原性。相比之下,肿瘤特异的新抗原,由于含有突变的氨基酸序列,具有免疫原性,因为它们可被宿主免疫系统当做外来物而识别。特别是,来自驱动突变的疫苗抗原可能是免疫治疗的一个理想靶点,因为它们很少会从肿瘤细胞丢失。虽然有一些研究报告指出靶向突变抗原的免疫治疗具有可行性,但至今为止只有一小部分突变抗原被确认是免疫治疗的潜在的靶点。

[0004] 非小细胞肺癌中,源自突变抗原的一些T细胞表位已经被报道。但在我们的研究中,我们预测了来自EGFR T790M耐药突变体的HLA-A*0201(A2)限制性抗原的T细胞表位,它们对人的T细胞有很强的免疫原性,预测出的T细胞表位可为预防和/或治疗EGFR T790M突变的非小细胞肺癌病人(EGFR-TKIs疗法)提供一种新的、有希望的免疫治疗方法。

发明内容

[0005] 解决的技术问题:本发明的目的是提供抗原肽T790M-5及其在制备治疗非小细胞肺癌的药物中的应用,该抗原肽具有激活T细胞靶向杀死非小细胞肺癌细胞的作用。

[0006] 技术方案:抗原肽T790M-5,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0007] 进一步地,所述抗原肽T790M-5的氨基酸序列具有如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列中取代、缺失或添加一个或多个氨基酸残基得到的氨基酸序列。

- [0008] 一种用于治疗非小细胞肺癌的药物,该药物含有上述抗原肽T790M-5。
- [0009] 上述抗原肽T790M-5在制备预防和/或治疗EGFR T790M突变的非小细胞肺癌的药物中的应用。
- [0010] 上述抗原肽T790M-5在制备用于诱导对具有EGFR T790M突变的非小细胞肺癌的免疫的药物中的应用。
- [0011] 上述抗原肽T790M-5在制备用于诱导肿瘤反应性T细胞的药物中的应用,所述肿瘤反应性T细胞是可以靶向抑制具有EGFR T790M突变的非小细胞肺癌细胞生长的T细胞。
- [0012] 有益效果:本发明的抗原肽T790M-5具有激活T细胞靶向杀死非小细胞肺癌细胞的作用,为预防和/或治疗EGFR T790M突变的非小细胞肺癌病人(EGFR-TKIs疗法)提供一种新的、有希望的免疫治疗方法。

附图说明

- [0013] 图1为实施例2中成熟DC诱导的CTL细胞对H1975-A2和H1975的细胞毒活性柱状统计图;
- [0014] 图2为实施例2中CTL杀伤实验的裸鼠体重柱状统计图;
- [0015] 图3为实施例2中CTL杀伤实验的裸鼠肺组织病理切片-H&E染色结果。

具体实施方式

[0016] 下面通过具体实施方式对发明作进一步详细说明。但本领域技术人员将会理解下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。

[0017] 实施例1

[0018] 抗原肽T790M-5预测与合成

[0019] 近期的基序法分析显示,SYFPEITHI超基序法有效的HLA-A2结合肽预测系统。因此用来预测来自EGFR-T790M的9-mer的HLA-A2结合肽。采用SYFPEITHI对EGF-T790M的HLA-A*02:01限制性CTL表位进行远程预测,得到分值较高(13分)的十肽(TSTVQLIMQL)。

[0020] 采用化学合成的方法制备上述抗原肽,即本领域熟知的已经非常成熟的固相肽合成方法,既可以采用Boc方法也可以采用Fmoc方法。具体做法就是将被保护的氨基酸逐个偶联到惰性固相载体上去,然后利用强酸将肽链从载体上裂解下来,同时去除侧链保护。制备得到氨基酸序列为TSTVQLIMQL的肽。

[0021] 实施例2

[0022] 1. 外周血单核细胞分离实验

[0023] 无菌条件下取HLA-A*02:01阳性正常健康供者空腹静脉血20mL,用淋巴细胞分离液分离单核细胞,配制细胞悬液,以终质量浓度为 2×10^9 /L置于培养瓶内,置于37°C、5%CO₂培养箱孵育2h后,洗去非黏附细胞;收集黏附细胞(单核细胞)备用。

[0024] 2. 成熟DC诱导及抗原负载

[0025] 上述单核细胞按终质量浓度加入人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)1000mg/L、重组人白细胞介素-4(rhIL-4)500mg/L,隔天加首次1/2浓度的细胞因子,培养至第5天加入(A组)抗原肽,(B组)只加培养基作为对照组,于37°C、5%CO₂条件下培养2天,更换培养液,加入肿瘤坏死因子(TNF)- α (10mg/L),继续培养48h,收集细胞及上清备用。

[0026] 3.DC表面标志检测

[0027] 收集不同抗原诱导的DC细胞以1500r/min离心10min,提取细胞沉淀并以磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,室温下孵育30min,再使用PBS洗1次后加入FITC-鼠抗人CD80、CD83、CD86、CD1a、人类白细胞抗原DR位点(HLA-DR),以同种型荧光染色的Ig作为对照,使用流式细胞仪分析细胞表面分子的表达,见表一。

[0028] 表一抗原肽负载DC细胞表面分子标志的分析%, $n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	CD1a	CD 80	CD 83	HLA-DR	CD86
A	36.9±2.4	60.5±4.1	52.8±1.6	73.3±3.8	72.3±5.1
B	25.3±3.5	50.6±2.7	39.4±5.7	63.9±3.5	71.5±3.5

[0030] 4.成熟DC诱导的CTL细胞

[0031] 外周血来自同一献血者。将4mL自体抗凝血加入T淋巴细胞分离液的离心管,分层离心,吸取单核细胞。将 $2\times 10^8/L$ 的单核细胞与负载抗原的DC共培养5d,再去除贴壁细胞备用。

[0032] 5.MTT显色法测定CTL的杀伤活性

[0033] (1) 将成熟DC诱导的CTL细胞作为效应细胞,人非小细胞肺癌细胞H1975(HLA-A2⁻T790M⁺)、H1975-A2(H1975transfected with H1A-A2,HLA-A2⁺T790M⁺)作为靶细胞。调整效应细胞,靶细胞的效靶比为3:1、10:1。

[0034] (2) 使用96孔培养板(预先紫外照射20min)。实验组每孔加入效应细胞及靶细胞各100μL混匀,共加三个复孔;同时设效应细胞及靶细胞对照,均设三复孔,各取100μL,在所有对照孔中各加入RPMI-1640(含10%胎牛血清)培养液100μL,37℃,5%CO₂条件下共育24h。

[0035] (3) 24h后,吸弃上清液100μL,加入MTT储液(5mg/mL,溶于0.02M,pH7.4,0.05%葡萄糖的PBS中)20μL,37℃,5%CO₂条件下,再共育2~4h。

[0036] (4) 仔细吸弃上清液后加入二甲基亚砷150μL,放置20min。

[0037] (5) 在酶标测定OD490nm值。

[0038] 杀伤细胞活性以杀伤细胞毒活性百分数表示,按以下公式计算:

$$[0039] \text{杀伤细胞毒活性}\% = \left[1 - \frac{\text{实验孔OD值} - \text{单独效应细胞OD值}}{\text{单独靶细胞OD值}} \right] \times 100\%$$

[0040] 结果如表二所示:

[0041] 表二成熟DC诱导的CTL细胞对H1975-A2和H1975的细胞毒活性(% $n=3, \bar{x}\pm s$)

效靶比	杀伤率	
	H1975	H1975-A2
3:1	10.23±1.46	20.73±1.02
10:1	15.23±0.95	30.97±0.65

[0043] 以上结果显示成熟DC诱导的CTL细胞对H1975-A2的细胞毒活性高于H1975,表明本发明中成熟诱导的CTL细胞以一种HLA-A2限制性的方式来识别带有EGFR T790M突变的非小细胞肺癌细胞。由图1细胞毒活性柱状统计图更能直观的比较各组的差距。

[0044] 6.CTL杀伤实验:

[0045] (1) 非小细胞肺癌裸鼠模型的建立:常规培养鼠源非小细胞肺癌细胞(H1975-A2),

于对数生长期使用生理盐水制成 1×10^7 /mL的细胞悬液,并将细胞尾静脉移植于5~8周的雌性BALB/c裸鼠,间隔3天再移植一次,连续2-3周,1-2月后造模基本成功。以眼眶取血的方式获得裸鼠静脉血,分离单核细胞,按照“外周血单核细胞分离实验”和“DC表面标志检测”的方法诱导CTLs。

[0046] (2) 实验分组:随机分成5组(体重状态均一),每组5只:(A组)空白对照组:不做任何处理的对照组;(B组)模型对照组:移植鼠源非小细胞肺癌细胞(H1975-A2),后期注射生理盐水做阴性对照;(C组)CTL组,移植鼠源非小细胞肺癌细胞(H1975-A2),后期注射负载抗原肽的DC诱导的CTLs,每天会输 1×10^6 个细胞,连续处理一周;(D组)纯药物组:移植鼠源非小细胞肺癌细胞(H1975-A2),后期注射吉非替尼药物,每天注射一次50mg/kg,连续处理一周;(E组)药物+CTL组,移植鼠源非小细胞肺癌细胞(H1975-A2),后期每次注射吉非替尼50mg/kg和负载抗原肽的DC诱导的CTLs 1×10^6 ,连续处理一周。

[0047] (3) 检测指标:药物和CTL处理2周后,观察裸鼠体重变化以及裸鼠肺部病理变化情况。如表三数据可知,以空白组做正常裸鼠对照组,模型对照组和吉非替尼治疗组的裸鼠体重明显减轻;而CTL治疗组与CTL+吉非替尼治疗组裸鼠体重相对下降较少。由图2体重柱状统计图更能直观的比较各组的差距。由图3所示,模型对照组和吉非替尼治疗组的裸鼠的病理结果可知,肺组织病变较为明显,有明显的病灶,并且在组织中浸润大量的肿瘤细胞;CTL治疗组与CTL+吉非替尼治疗组裸鼠病灶明显较轻,并且组织中的肿瘤细胞数目明显降低。

[0048] 表三模型裸两周后体重比较

组别	体重 (g)				
	空白对照组	23.1	20.9	20.8	22.9
模型对照组	15.8	17.8	18.5	16.8	15.6
CTL 治疗组	20.1	22.2	19.9	19.1	21.8
吉非替尼治疗组	16.2	17.7	16.8	18.1	17.4
CTL+吉非替尼治疗组	18.7	20.8	20.1	19.9	20.5

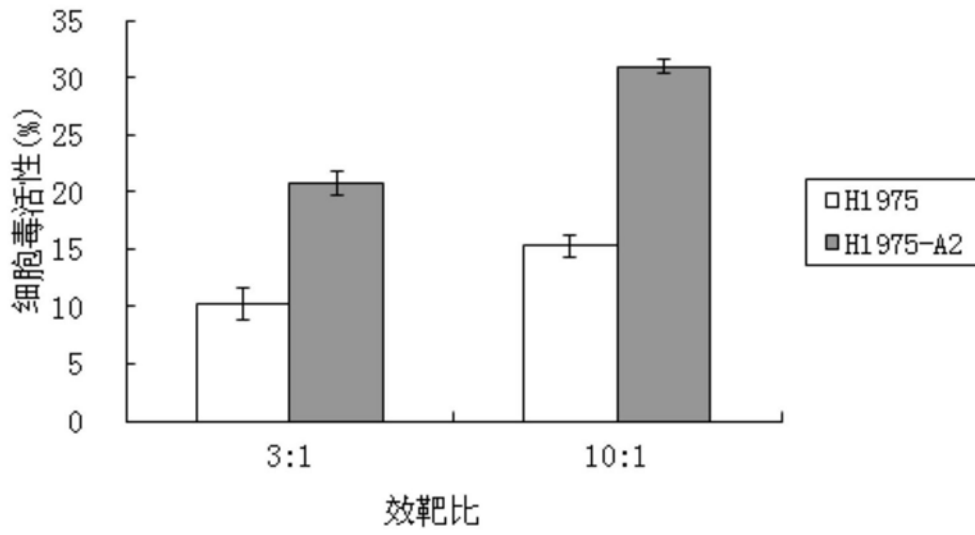


图1

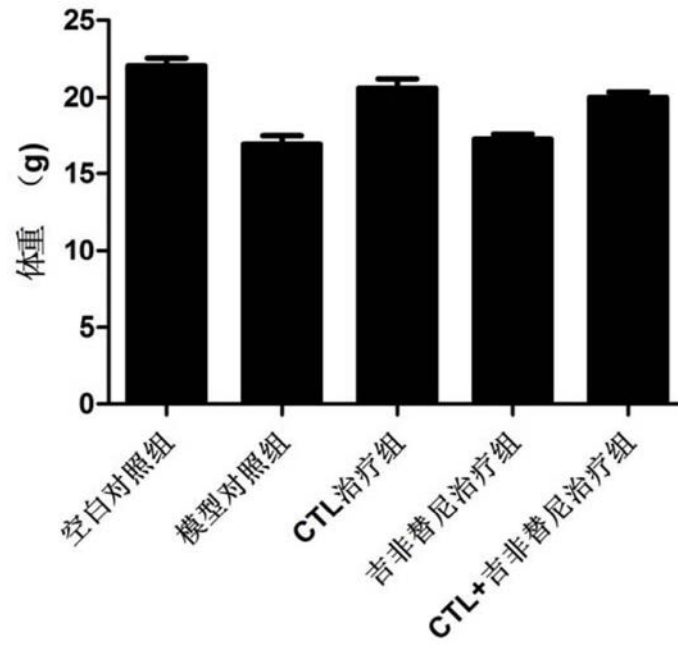


图2

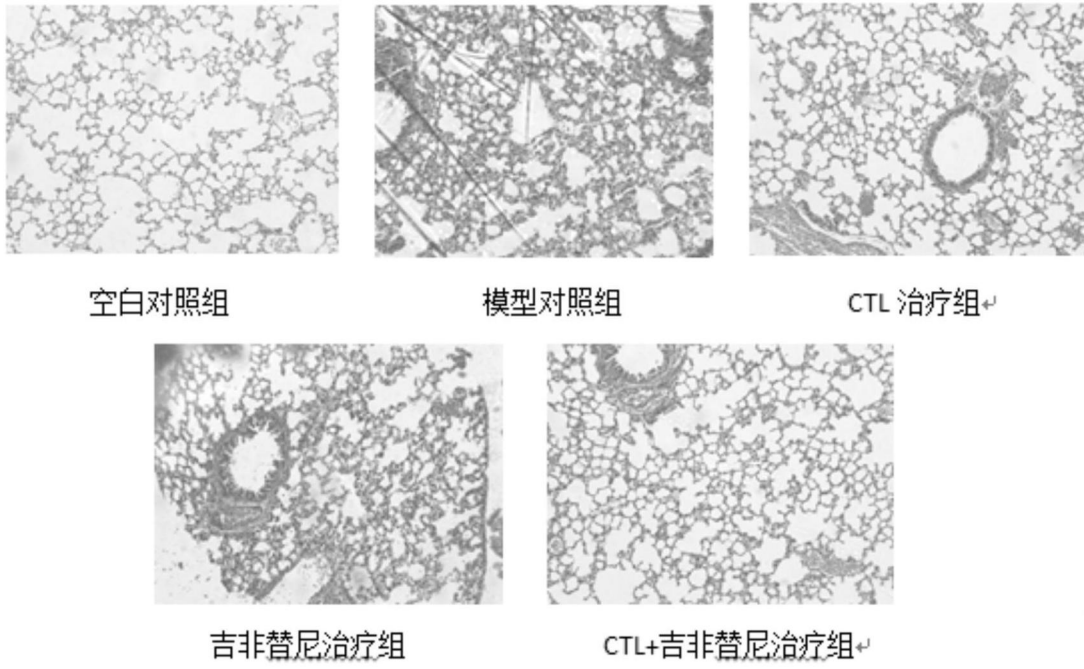


图3