



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112110995 A

(43)申请公布日 2020.12.22

(21)申请号 201910533938.2

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2019.06.19

(71)申请人 上海交通大学医学院

地址 200025 上海市黄浦区重庆南路280号

(72)发明人 王锋

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

公司 31266

代理人 徐迅 崔佳佳

(51)Int.Cl.

C07K 14/025(2006.01)

C07K 14/82(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

序列表14页 附图3页

(54)发明名称

肿瘤新抗原多肽及其用途

(57)摘要

本发明涉及肿瘤新抗原多肽及其用途。具体地,本发明提供了新发现的源自于人乳头瘤病毒HPV16和KRAS癌基因的肿瘤新抗原多肽及其筛选方法、所述多肽与MHC分子形成的复合物以及所述多肽与复合物的用途。同时,本发明还提供了与所述多肽或复合物结合的分子及细胞,以及这些分子及细胞的用途。

1. 一种分离的多肽或其变体,其特征在于,所述多肽或其变体包含下列氨基酸序列,所述氨基酸序列选自下组:

(a) SEQ ID NO:1-13中的任一种;

(b) SEQ ID NO:14-24中的任一种;和

(c) SEQ ID NO:1-24中具有1-3个氨基酸取代、插入或缺失所产生的变体序列中的任一种。

2. 如权利要求1所述的多肽或其变体,其特征在于,所述多肽的变体选自SEQ ID No:25-72中的任一种。

3. 如权利要求1或2所述的多肽或其变体,其特征在于,所述多肽或其变体可结合MHC分子形成复合物。

4. 一种多肽-MHC复合物,其特征在于,所述复合物包含权利要求1-3中任一所述的多肽或其变体。

5. 一种串联多肽,其特征在于,所述的串联多肽选自下组:

a) SEQ ID NO:1-13或其变体中的两种或两种以上;和

b) SEQ ID NO:14-24或其变体中的两种或两种以上。

6. 一种广谱的新抗原的筛选方法,其特征在于,所述的方法包括以下步骤:

a) 通过抗原数据库和/或文献检索挑选潜在的新抗原表位;

b) 通过多肽-HLA亲和力测试算法,预测野生型及各突变抗原多肽与不同HLA亚型分子的亲和力,选择可能结合HLA的候选多肽;

c) 亲和力实验测试:将合成的候选多肽进行体外和细胞水平亲和力测试;和

d) 肿瘤新抗原动物体内免疫原性的测试,以及靶向TCR受体的筛选。

7. 一种分离的细胞,其特征在于,所述细胞表面呈递如权利要求4所述多肽-MHC复合物。

8. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子包含编码如权利要求1或2中所述多肽或其变体的核酸序列或其互补序列。

9. 一种载体,其特征在于,所述载体含有如权利要求8所述的核酸分子。

10. 一种宿主细胞,其特征在于,所述细胞中含有如权利要求9所述的载体。

肿瘤新抗原多肽及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤免疫治疗领域,具体地涉及肿瘤新抗原多肽及其用途。更具体地,本发明涉及新发现的源自于人乳头瘤病毒HPV16和KRAS癌基因的肿瘤新抗原多肽及其筛选方法,复合物及其用途。同时,本发明还涉及与上述多肽或复合物结合的分子及细胞,以及这些分子及细胞的用途。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤已经成为造成人类死亡的主要原因。在中国,国家癌症中心根据全国肿瘤登记中心收集上报的2014年肿瘤登记数据,估计2014年新发恶性肿瘤病例约为380.4万例,死亡229.6万例^[1],给国民健康造成巨大威胁,给社会带来巨大成本。到目前为止,临床上对于癌症的治疗仍是以传统的手术、化疗和放疗为主,治疗效果仍不尽如人意。近年来,以CAR-T细胞治疗技术和PD-1免疫检查点抗体为代表的肿瘤免疫疗法已在临床上取得了重要进展。肿瘤疫苗是免疫治疗的一种方式,即利用肿瘤新抗原制作疫苗产生针对肿瘤的特异性免疫反应,从而治疗和预防肿瘤。肿瘤新抗原是肿瘤细胞在基因变异的基础上所产生的带有特异性突变氨基酸序列的T细胞表位,其只表达于肿瘤组织。由于肿瘤新抗原的肿瘤限制性表达,由其引起的免疫应答作用于肿瘤组织,不影响正常的自身组织,可大大降低由其引起自身免疫反应的危险性^[2]。

[0003] 抗肿瘤免疫反应过程中,T细胞对抗原的识别,并不是完整的抗原分子。先由抗原递呈细胞(APC)将肿瘤抗原加工处理,肿瘤相关抗原被酶分解成多肽,然后再在肽链转运蛋白的参与下被转运到内质网腔与新合成的HLA分子(human leukocyte antigen,人类白细胞抗原)结合并递呈抗原至APC表面,形成HLA/抗原肽复合物,T细胞通过其表面特异的TCR识别抗原呈递细胞表面的HLA/抗原肽复合物后,再受到协同刺激信号相互作用。在双信号刺激下,T细胞被激活并发生增殖,大部分进而分化成效应细胞。在肿瘤免疫治疗中,清除肿瘤细胞依靠肿瘤新抗原多肽特异性T细胞对新抗原多肽的识别,及对表达这些新抗原的肿瘤细胞的特异性杀伤。开发肿瘤免疫治疗的首个关键环节是筛选出具有主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex,MHC)高亲和力和强免疫原性,适合被T细胞靶向的肿瘤新抗原多肽。

[0004] 对新抗原的筛选研究已经进行了多年。主要筛选方法包括抑制文库的血清学分析(SEREX),全外显子组测序结合RNA-seq表位预测,和液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS),存在许多局限性。SEREX成本高周期长,无法保证筛选新抗原免疫原性;全外显子组测序结合RNA-seq表位预测受到MHC结合预测算法的准确性的限制;LC-MS/MS筛查策略需要肿瘤活检或手术,并受新鲜肿瘤样本的大小和质量的限制。

[0005] 宫颈癌是女性最常见恶性肿瘤之一,发病率在女性恶性肿瘤中位居第二位,死亡人数占我国女性恶性肿瘤死亡人数的18.4%^[3]。宫颈癌发生发展与人乳头瘤病毒(Human papillomavirus,HPV)的持续感染密切相关,其中HPV16病毒癌基因蛋白E6和E7选择性的表达于宫颈癌细胞,是宫颈癌免疫治疗的特异性靶抗原。而且,由于致癌病毒抗原与肿瘤新抗

原具有相似性,致癌病毒抗原同样只存在于肿瘤组织中,并且由于病毒基因组编码蛋白序列与人类蛋白序列相似度很少,受淋巴细胞的中枢耐受影响很低,具备很强的免疫抗原性。

[0006] KRAS致癌基因 (oncogene) 的点突变作为一类导致的细胞增殖失控的驱动突变 (driver mutation), 可持续激活下游控制细胞生长、增殖、分化和凋亡的信号通路, 造成细胞增殖失控, 是临床上肿瘤的常见诱因。Steven Rosenberg博士等人近期研究表明, 携带有KRAS G12D突变的结直肠癌肺转移的患者, 通过从肺转移灶中分离出针对KRAS G12D突变的肿瘤浸润淋巴细胞, 并在体外扩增回输入患者体内后, 可引起10个肺转移灶中的9个病灶的消退, 这一说明KRAS突变产生的肿瘤新抗原可作为肿瘤治疗的有效作用靶点^[4]。

[0007] 然而, 目前尚缺乏足够数量的效果令人满意的可作为肿瘤治疗的有效作用靶点的肿瘤新抗原。因此, 本领域迫切需要开发新的可有效作为肿瘤治疗的有效作用靶点的肿瘤新抗原。

[0008] 参考文献:

[0009] 1. 陈万青等, 2014年中国恶性肿瘤发病和死亡分析, 中华肿瘤杂志, 2018. 40 (1) : p. 5-13;

[0010] 2. Schumacher, T.N., W. Scheper, and P. Kvistborg, Cancer Neoantigens. Annu Rev Immunol, 2018;

[0011] 3. 刘萍, 中国大陆13年宫颈癌临床流行病学大数据评价. 中国实用妇科与产科杂志, 2018. 34 (1) : p. 41-45;

[0012] 4. Tran, E., et al., T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. N Engl J Med, 2016. 375 (23) : p. 2255-2262.

发明内容

[0013] 本发明的目的是提供新的可有效作为肿瘤治疗的有效作用靶点的肿瘤新抗原。尤其是新的源自于人乳头瘤病毒HPV16和KRAS癌基因蛋白的广谱的肿瘤新抗原多肽, 这些抗原多肽不是个体或肿瘤类型所特有的, 具有普适性。该多肽与MHC分子形成的复合物以及所述多肽与复合物的用途。

[0014] 本发明另一目的是提供与上述多肽或复合物结合的受体及细胞, 以及这些受体及细胞的用途。

[0015] 本发明的第一方面, 提供了一种多肽或其变体, 所述多肽包含与下列氨基酸序列相同或基本上相同的氨基酸序列, 所述氨基酸序列选自下组:

[0016] (a) AMFQDPQER (SEQ ID NO:1); FQDPQERPRK (SEQ ID NO:2); KLPQLCTEL (SEQ ID NO:3); IILECVYCK (SEQ ID NO:4); FAFRDLCIV (SEQ ID NO:5); IVYRDGNPY (SEQ ID NO:6); AVCDKCLK (SEQ ID NO:7); GTTLEQQYNK (SEQ ID NO:8); LLIRCINCQK (SEQ ID NO:9); YMLDLQPETT (SEQ ID NO:10); GTLGIVCPI (SEQ ID NO:11); TLGIVCPIC (SEQ ID NO:12); GIVCPICSQK (SEQ ID NO:13) 中的任一种;

[0017] (b) KLVVVGAGG (SEQ ID NO:14); KLVVVGAGGV (SEQ ID NO:15); LVVVGAGGV (SEQ ID NO:16); VVVGAGGVG (SEQ ID NO:17); VVVGAGGVGK (SEQ ID NO:18); VVGAGGVGK (SEQ ID NO:19); VVGAGGVGKS (SEQ ID NO:20); VGAGGVGKS (SEQ ID NO:21); GAGGVGKSA (SEQ ID NO:22); GAGGVGKSAL (SEQ ID NO:23); AGGVGKSAL (SEQ ID NO:24) 中的任一种; 和

[0018] (c) 在SEQ ID NO:1-24中具有1个、2个或3个氨基酸取代,和/或1个、2个或3个氨基酸插入,和/或1个、2个或3个氨基酸缺失的氨基酸序列;

[0019] 在另一优选例中,所述多肽或其变体由8-10个氨基酸组成。

[0020] 在另一优选例中,所述多肽的变体选自下组:TTLEQQYNK (SEQ ID NO:25); MLDLQPETT (SEQ ID NO:26); KLVVVGADG (SEQ ID NO:27); KLVVVGASG (SEQ ID NO:28); KLVVVGAVG (SEQ ID NO:29); KLVVVGACGV (SEQ ID NO:30); KLVVVGADGV (SEQ ID NO:31); KLVVVGASGV (SEQ ID NO:32); KLVVVGAVGV (SEQ ID NO:33); KLVVVGAGDV (SEQ ID NO:34); LVVVGACGV (SEQ ID NO:35); LVVVGADGV (SEQ ID NO:36); LVVVGASGV (SEQ ID NO:37); LVVVGAVGV (SEQ ID NO:38); LVVVGAGDV (SEQ ID NO:39); VVVGADGVG (SEQ ID NO:40); VVVGASGVG (SEQ ID NO:41); VVVGAVGVG (SEQ ID NO:42); VVVGACGVGK (SEQ ID NO:43); VVVGADGVGK (SEQ ID NO:44); VVVGASGVGK (SEQ ID NO:45); VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:46); VVVGAGDVGK (SEQ ID NO:47); VVGACGVGK (SEQ ID NO:48); VVGADGVGK (SEQ ID NO:49); VVGASGVGK (SEQ ID NO:50); VVGAVGVGK (SEQ ID NO:51); VVGAGDVGK (SEQ ID NO:52); VVGACGVGKS (SEQ ID NO:53); VVGADGVGKS (SEQ ID NO:54); VVGASGVGKS (SEQ ID NO:55); VVGAVGVGKS (SEQ ID NO:56); VVGAGDVGKS (SEQ ID NO:57); VGACGVGKS (SEQ ID NO:58); VGADGVGKS (SEQ ID NO:59); VGASGVGKS (SEQ ID NO:60); VGAVGVGKS (SEQ ID NO:61); VGAGDVGKS (SEQ ID NO:62); GADGVGKSA (SEQ ID NO:63); GACGVGKSAL (SEQ ID NO:64); GADGVGKSAL (SEQ ID NO:65); GASGVGKSAL (SEQ ID NO:66); GAVGVGKSAL (SEQ ID NO:67); GAGDVGKSAL (SEQ ID NO:68); ADGVGKSAL (SEQ ID NO:69); ASGVGKSAL (SEQ ID NO:70); AVGVGKSAL (SEQ ID NO:71); AGDVGKSAL (SEQ ID NO:72)中的任一种;

[0021] 在另一优选例中,所述多肽或其变体能够与MHC分子形成复合物。

[0022] 在另一优选例中,所述多肽或其变体能够与HLA分子形成复合物。

[0023] 在另一优选例中,所述多肽或其变体能够与HLA I分子形成复合物并被T细胞识别。

[0024] 在另一优选例中,MHC分子的类型是HLA-A*02。

[0025] 在另一优选例中,MHC分子的类型是HLA-A*02:01

[0026] 在另一优选例中,MHC分子的类型是HLA-A*11。

[0027] 在另一优选例中,MHC分子的类型是HLA-A*11:01

[0028] 本发明的第二方面,提供了一种多肽-MHC复合物,所述复合物包含本发明第一方面所述的多肽或其变体。

[0029] 在另一优选例中,MHC分子的类型是HLA-A*02。

[0030] 在另一优选例中,MHC分子的类型是HLA-A*02:01

[0031] 在另一优选例中,MHC分子的类型是HLA-A*11。

[0032] 在另一优选例中,MHC分子的类型是HLA-A*11:01

[0033] 本发明的第三方面,提供了一种串联多肽,所述的串联多肽选自下组:

[0034] a) SEQ ID NO:1-13或其变体中的两种或两种以上;和

[0035] b) SEQ ID NO:14-24或其变体中的两种或两种以上。

[0036] 本发明的第四方面,提供了一种广谱的新抗原的筛选方法,所述的方法包括以下步骤:

- [0037] a) 通过抗原数据库和/或文献检索挑选潜在的新抗原表位;
- [0038] b) 通过多肽-HLA亲和力测试算法,预测野生型及各突变抗原多肽与不同HLA亚型分子的亲和力,选择可能结合HLA的候选多肽;
- [0039] c) 亲和力实验测试:将通过候选多肽进行体外和细胞水平亲和力测试,确定病毒或致癌基因新抗原表位;和
- [0040] d) 肿瘤新抗原动物体内免疫原性的测试,以及靶向TCR受体的筛选。
- [0041] 在另一优选例中,所述抗原数据库为现有公开的抗原数据库;
- [0042] 在另一优选例中,所述抗原数据库为人乳头瘤病毒(HPV) T细胞抗原数据库。
- [0043] 在另一优选例中,所述多肽-HLA亲和力测试算法选自The promiscuous MHC binding peptide prediction server,major histocompatibility complex(MHC) databank,SYFPEITHI中的一种。
- [0044] 在另一优选例中,所述多肽-HLA亲和力测试算法为The promiscuous MHC binding peptide prediction server。
- [0045] 在另一优选例中,所述多肽-HLA亲和力测试算法预测的过程具体为包含KRAS G12C/D/S/V和KRAS G13D位点突变的,第5位氨基酸至第13位氨基酸、第5位氨基酸至第14位氨基酸、第6位氨基酸至第14位氨基酸、第7位氨基酸至第15位氨基酸、第7位氨基酸至第16位氨基酸、第8位氨基酸至第16位氨基酸、第8位氨基酸至第17位氨基酸、第9位氨基酸至第17位氨基酸、第10位氨基酸至第18位氨基酸、第10位氨基酸至第19位氨基酸和第11位氨基酸至第19位氨基酸的9个或10个多肽序列通过The promiscuous MHC binding peptide prediction server的在线分析,预测得出的一系列具有MHC亲和力的KRAS G12和G13位点突变的的多肽抗原序列。
- [0046] 在另一优选例中,所述体外亲和力测试选自多肽UV互换和HLA-IELISA检测,T2细胞测定多肽-HLA结合力试验中的一种或两种。
- [0047] 在另一优选例中,所述体外亲和力测试选自多肽UV互换和HLA-IELISA检测与T2细胞测定多肽-HLA结合力试验的结合。
- [0048] 在另一优选例中,所述体外亲和力测试具体为特定浓度的候选多肽分别与特定浓度的商品化UV介导的多肽HLA-A*02:01和HLA-A*11:01分子单体互换反应试剂等体积混合,经30分钟366nm的UV照射,得到结合了候选多肽的HLA I分子单体,通过抗B2微球蛋白的ELISA实验测试候选多肽与HLA I分子单体HLA-A*02:01和HLA-A*11:01的亲和力。同时,将候选多肽与分别表达HLA-A*02和HLA-A*11的T2细胞共孵育,通过流式细胞仪分别检测T2细胞表面抗HLA-A*02和HLA-A*11荧光抗体的荧光强度中位数,测试候选多肽与HLA I分子的亲和力。
- [0049] 在另一优选例中,所述动物体内的免疫原性的测试过程为,通过体外亲和力测试,得到的HLA-A*02:01和HLA-A*11:01高亲和力候选多肽分别免疫HLA-A*02:01和HLA-A*11:01转基因小鼠,免疫后2周,通过流式细胞仪检测小鼠的免疫细胞和功能性细胞因子水平,同时通过候选多肽-HLA-A*02:01和候选多肽-HLA-A*11:01四聚体荧光抗体,运用流式细胞技术分别分析小鼠体内HLA-A*02:01和HLA-A*11:01高亲和力候选多肽特异性的T细胞克隆的数量、比例及功能标记物,测试HLA-A*02:01和HLA-A*11:01高亲和力候选多肽的免疫原性。

[0050] 本发明的第五方面,提供了一种分离的细胞,所述细胞表面呈递本发明第二方面所述多肽-MHC复合物。

[0051] 本发明的第六方面,提供了一种核酸分子,所述核酸分子包含编码本发明第一方面所述多肽或其变体的核酸序列或其互补序列。

[0052] 本发明的第七方面,提供了一种载体,所述载体含有本发明第六方面所述的核酸分子。

[0053] 本发明的第八方面,提供了一种宿主细胞,所述细胞中含有本发明第七方面所述的载体。

[0054] 本发明的第九方面,提供了一种分子,所述分子能够结合本发明第一方面所述的肽和/或本发明第二方面所述的多肽-MHC复合物和/或本发明第三方面所述的串联多肽。

[0055] 在另一优选例中,所述分子能够特异性结合本发明第一方面所述的肽和/或本发明第二方面所述的多肽-MHC复合物和/或本发明第三方面所述的串联多肽。

[0056] 在另一优选例中,所述分子为T细胞受体(TCR)。

[0057] 在另一优选例中,所述分子为抗体或其结合片段。

[0058] 在另一优选例中,所述抗体为单克隆抗体。

[0059] 本发明的第十方面,提供了一种分离的单克隆T细胞,所述T细胞结合本发明第二方面所述多肽-MHC复合物。

[0060] 在另一优选例中,所述T细胞特异性结合本发明第二方面所述多肽-MHC复合物。

[0061] 本发明的第十一方面,提供了本发明第一方面所述肽、本发明第二方面所述多肽-MHC复合物或本发明第四方面所述的串联多肽或本发明第五方面所述细胞的用途,用于激活和/或分离T细胞。

[0062] 本发明的第十二方面,提供了本发明第一方面所述肽、本发明第二方面所述多肽-MHC复合物或本发明第四方面所述的串联多肽的用途,用于筛选T细胞受体或抗体文库。

[0063] 本发明的第十三方面,提供了本发明第一方面所述多肽或其变体(新抗原)的筛选方法的用途,用于肿瘤新抗原的筛选。

[0064] 本发明的第十四方面,提供了本发明第一方面所述肽、本发明第二方面所述多肽-MHC复合物、本发明第四方面所述的串联多肽、本发明第五方面所述细胞、本发明第六方面所述的核酸分子、本发明第九方面所述分子或本发明第十方面所述T细胞的用途,用于制备预防或治疗癌症的药物。

[0065] 在另一优选例中,所述用途为,用于制备预防或治疗肺癌、胰腺癌、结直肠癌和宫颈癌的药物。

[0066] 本发明的第十五方面,提供了一种药物组合物,所述组合物含有药学上可接受的载体以及本发明第一方面所述肽、本发明第二方面所述多肽-MHC复合物、本发明第四方面所述的串联多肽、本发明第五方面所述细胞、本发明第九方面所述分子或本发明第十方面所述T细胞。

[0067] 在另一优选例中,所述药物组合物为疫苗。

[0068] 本发明的第十六方面,提供了本发明第一方面所述肽、或本发明第四方面所述的串联多肽的用途,用于获取对抗原特异性反应的T细胞受体。

[0069] 本发明的第十七方面,提供了一种预防或治疗疾病的方法,包括给需要的对象施

用适量的本发明第一方面所述肽、本发明第二方面所述多肽-MHC复合物、本发明第四方面所述的串联多肽、本发明第五方面所述细胞、本发明第六方面所述的核酸分子、本发明第九方面所述分子或本发明第十方面所述T细胞。

[0070] 本发明的第十八方面,提供了一种获得与本发明第二方面所述多肽-MHC复合物结合的分子的方法,包括:

[0071] (i) 将备候选分子与本发明第二方面所述多肽-MHC复合物接触;

[0072] (ii) 筛选出与(i)中多肽-MHC复合物结合的分子。

[0073] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0074] 图1显示了HPV16来源的新抗原对HLA-A02单体在分子水平上的结合亲和力(A)和对T2细胞上的HLA-A02单体结合亲和力(B)。

[0075] 图2显示了KRAS来源的新抗原对HLA-A02单体在分子水平的结合亲和力(A)和对T2细胞上的HLA-A02分子的结合亲和力(B)。

[0076] 图3显示了在分子水平上对不同HPV16衍生的预测的新抗原与HLA-A11单体的结合亲和力分析。

[0077] 图4显示了在分子水平上对KRAS来源的候选新抗原与HLA-A11单体的亲和力分析。

[0078] 图5显示了新抗原的筛选方法示意图。

具体实施方式

[0079] 本发明人通过广泛而深入的研究,首次建立了一种广谱的新的肿瘤新抗原筛选方法,经过系统筛选,获得了一系列源自于HPV16和KRAS致癌突变的多肽。具体地,本发明人建立了一种高效的肿瘤新抗原筛选方法,利用人MHC分子与多肽结合的特点,通过对HPV16和KRAS蛋白序列的分析预测候选肽,结合体外和细胞HLA稳定性两种测定,获得了一系列HPV16来源的和KRAS致癌突变的多肽中,与人MHC分子具有高结合亲和力的新抗原多肽。这些表位可用于开发疫苗或选择抗肿瘤T细胞克隆以治疗/预防HPV和KRAS相关的癌症。本发明建立的筛选方法还可用于筛选来源于其他癌基因驱动突变和病毒蛋白的抗原表位。

[0080] 术语

[0081] 应理解,在本发明中,本发明的肽与本发明多肽可互换使用,都指本发明提供的源自于人乳头瘤病毒HPV16和KRAS癌基因的多肽和/或串联多肽。

[0082] 在本发明中,所述HLA-A2和HLA-A11皆分别为HLA-A*02:01与HLA-A*11:01等位基因产物。

[0083] 可作为新抗原的多肽或其变体

[0084] 本发明的第一方面,提供了一种多肽或其变体,所述多肽包含与下列氨基酸序列相同或基本上相同的氨基酸序列,所述氨基酸序列选自:

[0085] a) SEQ ID NO:1-24中的任一种;或

[0086] b) 在SEQ ID NO:1-24中具有1个、2个或3个氨基酸取代,和/或1个、2个或3个氨基

酸插入,和/或1个、2个或3个氨基酸缺失的氨基酸序列;

[0087] 氨基酸取代意味着在相同位置,某个氨基酸残基被其他氨基酸残基替代。插入的氨基酸残基可以在任何位置插入,插入的氨基酸残基也可以全部或部分彼此相邻,或插入的氨基酸之间都不彼此相邻。氨基酸缺失可以从可以在任何位置删除1、2或3个氨基酸。

[0088] 较佳地,所述多肽的变体包含SEQ ID NO:25-72中的任一种;

[0089] 本发明的另一方面,提供了一种串联多肽,所述的串联多肽选自:

[0090] a) SEQ ID NO:1-13或其变体中的两种或两种以上;或

[0091] b) SEQ ID NO:14-24或其变体中的两种或两种以上。

[0092] 本领域技术人员已知,本发明所述的多肽可以在氨基酸序列之间的一个或多个位置进行翻译后修饰。翻译后修饰的例子可以在Engelhard等Curr Opin Immunol.2006年2月;18(1):92-7中找到,并且包括磷酸化作用、乙酰化作用和脱酰氨基作用。

[0093] 肿瘤抗原在抗原递呈细胞内通过蛋白水解作用将其加工成为多肽片段,进而与内质网腔中的MHC分子结合形成多肽-MHC复合物,一起递呈到细胞表面。因此,本发明的另一方面提供了一种多肽-MHC复合物,所述复合物中包含本发明第一方面所述的肽。所述MHC分子可以是MHC I类分子或MHC II类分子,优选地,所述MHC分子是MHC I类分子。在一个优选的实施方式中,所述MHC分子是HLA-A*02,更优选地,所述MHC分子是HLA-A*02:01。在另一个优选的实施方式中,所述MHC分子的类型是HLA-A*11,更优选地,所述MHC分子的类型是HLA-A*11:01。

[0094] 多肽-MHC复合物及其制法和用途

[0095] 本发明一方面提供了源自于HPV16和KRAS致癌突变的多肽及其筛选方法,其中该多肽(或其变体)与MHC分子形成的复合物。在另一方面,本发明还提供了所述多肽(或其变体)与MHC形成的复合物及其用途。同时,本发明还提供了与上述肽或复合物结合的分子及细胞。

[0096] 产生本发明多肽-MHC复合物的方法是本领域技术人员已知的,包括,但不限于,HLA-A*02和HLA-A*11分子的重链和轻链分别在体外表达、纯化、复性、复性后纯化、生物素化、生物素化后的复合物纯化,将合成的新抗原多肽与HLA分子结合。

[0097] 本发明的多肽-MHC复合物可以用于筛选或检测与其结合的分子,如筛选TCR或抗体文库。

[0098] 本发明所述的肽可以与MHC复合物一起递呈到细胞表面。因此,本发明还提供了一种分离的细胞,所述细胞能够递呈本发明的多肽-MHC复合物到其表面。此类细胞可以是哺乳动物细胞,较佳地,免疫系统细胞,并且优选为专门的抗原呈递细胞,比如树突细胞或B细胞。其他优选的细胞包括T2细胞(Hosken,et al.,Science.1990.248:367-70)。呈递本发明所述的肽或多肽-MHC复合物的细胞可以是分离的,较佳地,以细胞群体的形式,或以基本上纯的形式提供。所述细胞可以不是天然递呈本发明所述的复合物的。递呈本发明所述多肽-MHC复合物的细胞可以被用于分离T细胞和T细胞受体,所述T细胞由所述细胞激活并进一步被分选出来,进而也能够获得表达在所述T细胞表面的T细胞受体。

[0099] 在一个优选的实施方式中,获得上述T细胞的方法包括利用上述递呈本发明多肽-MHC复合物的细胞刺激从健康志愿者处获得的新鲜血液。可以经过几轮的刺激,如3-4轮。激活的T细胞的鉴定可以通过在含有本发明的肽的T2细胞的存在下,来测定细胞因子的释放

(比如, IFN- γ ELISpot实验)和激活标记的表达(比如CD137检测)。利用标记抗体,激活细胞可以通过流式细胞仪(FACS)进行分选,分选的细胞可以扩大培养和进一步验证,例如,通过ELISpot检测和/或针对靶细胞的细胞毒性和/或多肽-MHC多聚体染色进行验证。来自经验证的T细胞克隆的TCR链可以通过cDNA末端快速扩增(RACE)被放大,并进行测序。

[0100] 本发明还提供了一种核酸分子,所述核酸分子包括编码本发明的肽的核酸序列。所述核酸可以是cDNA。所述核酸分子可以主要由编码本发明所述肽的核酸序列组成,或可以仅编码本发明所述的肽。此类核酸分子可以用本领域已知的方法合成。由于遗传密码的简并性,本领域技术人员应理解,不同核酸序列的核酸分子可以编码相同的氨基酸序列。

[0101] 本发明还提供了一种载体,所述载体中包括本发明所述的核酸序列。合适的载体是载体构建领域已知的,包括启动子的选择和其他调控元件,比如增强子元件。本发明所述的载体包括适合引入细胞的序列。比如,所述载体可以是表达载体,在该载体中,所述多肽的编码序列受到它自身顺式作用调控元件的控制,载体的设计便于宿主细胞的基因整合或基因替换等。

[0102] 本领域普通技术人员应理解,在本发明中,术语“载体”包括DNA分子,比如质粒、噬菌体、病毒或其他载体,它含有一个或多个异源的或重组的核酸序列。合适的噬菌体和病毒载体包括,但不限于: λ -噬菌体,EMBL噬菌体、猿猴病毒、牛痘病毒、Epstein-Barr病毒、腺病毒、疱疹病毒、小鼠肉瘤病毒、鼠类乳癌病毒、慢病毒等。

[0103] 本发明还提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞中包括本发明所述的载体,此类细胞可以是哺乳动物细胞,表达本发明的肽。

[0104] 本发明还提供了一种分子,所述分子可以用来作为免疫治疗剂或诊断试剂。该分子可以仅和肽结合,或与肽和MHC分子形成的复合物结合。在后一种情况,所述结合分子可以部分结合到MHC分子上,同时,它还与本发明的肽结合。

[0105] 在本发明的一个优选例中,所述结合分子是T细胞受体(TCR)。可以采用国际免疫遗传学信息系统(IMGT)来描述TCR。天然 $\alpha\beta$ 异源二聚TCR具有 α 链和 β 链。广义上讲,各链包含可变区、连接区和恒定区。

[0106] 本发明的TCR可以是本领域已知的任何形式。例如,所述TCR可以是异二聚体,或以单链的形式存在。所述TCR可以是可溶形式(即无跨膜或胞浆区),具体地,所述TCR可以包含全部或部分TCR胞外结构域。所述TCR也可以是包含其跨膜区的全长链。

[0107] 可以结合本领域中的现有技术来获得可溶性的TCR,例如,去除 α 与 β 链的跨膜区序列,在 $\alpha\beta$ TCR的 α 与 β 链的恒定域之间引入人工二硫键。

[0108] 本发明的TCR可用于将细胞毒性剂或免疫刺激剂递送到靶细胞,或被转化入T细胞,使表达该TCR的T细胞能够破坏肿瘤细胞,以便在被称为过继免疫治疗的治疗过程中给予患者。另外,本发明的TCR中也可以含有突变,优选地,突变后的TCR对本发明多肽-MHC复合物的亲和力有所提高。本发明的TCR可以单独使用,也可与偶联物以共价或其他方式结合,优选以共价方式结合。所述偶联物包括可检测标记物(为诊断目的,其中所述TCR用于检测呈递本发明多肽-MHC复合物的细胞的存在)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。本发明的TCR还可以与抗-CD3的抗体结合,优选以共价方式结合,以重定向T细胞,从而杀伤靶细胞。

[0109] 在另一优选例中,本发明的结合分子是抗体。如本文所用,术语“抗体”指免疫球蛋白

白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有特异性结合位点的分子,其可以全天然、或部分人工合成、或全部人工合成。术语“抗体”包括抗体片段、其衍生物、功能性等效物以及同源抗体、人源化抗体,所述抗体片段包括免疫球蛋白结合区,所述结合区是抗体结合区或与抗体结合区同源。其可以全天然、或部分人工合成、或全部人工合成。人源化抗体可以是修饰的抗体,其含有非人抗体的可变区(例如,小鼠)以及人抗体的恒定区。

[0110] 抗体的例子可以是同型免疫球蛋白(例如IgG、IgE、IgM、IgD以及IgA)以及它们同型的亚类;片段包括抗原结合区,比如Fab、scFv、Fv、dAb、Fd;以及双链抗体。抗体可以是多抗或单抗,优选为单克隆抗体。

[0111] 上述TCR与抗体的制备方法是本领域技术人员已知的,包括但不限于,从大肠杆菌细胞或昆虫细胞中表达,并纯化出来。

[0112] 所述TCR和/或抗体可以被提供到细胞表面,比如TCR到T细胞表面。因此本发明还提供了一种分离的单克隆T细胞,所述T细胞结合本发明第二方面所述多肽-MHC复合物。

[0113] 本发明还提供了所述的多肽及其变体、多肽-MHC复合物、串联多肽、细胞、核酸分子、分子或T细胞的用途,用于制备预防或治疗癌症的药物。

[0114] 本发明还提供了一种药物组合物,所述组合物含有药学上可接受的载体以及所述的肽、多肽-MHC复合物、串联多肽、细胞、分子或T细胞。

[0115] 所述药物组合物适用于任何适当的给药途径,如注射(包括皮下,肌肉,腹腔或静脉注射)、吸入或口服、或经鼻、或经肛门等途径。所述组合物可以通过药学领域已知的任何方法制备,例如在无菌条件下,通过将活性成分与载体或赋形剂混合。

[0116] 本发明的肽、pMHC复合物或递呈pMHC复合物的细胞可以以疫苗组合物的形式提供。所述疫苗组合物可以用于治疗或预防癌症。所有的这类组合物都包括在本发明中。应理解,所述疫苗可以为多种形式(Schlom J.J Natl Cancer Inst.2012104(8):599-613)。例如,本发明的肽可以直接用于免疫患者(Salgaller ML.Cancer Res.1996.56(20):4749-57and Marchand M.Int J Cancer.1999.80(2):219-230)。所述疫苗组合物可以包含额外的肽,使得本发明的肽是肽混合物中的一个。所述疫苗组合物可以加入佐剂,以增强免疫反应。或者,所述疫苗组合物可以是呈递本发明肽和MHC复合物的抗原递呈细胞的形式。

[0117] 优选地,所述抗原呈递细胞为免疫细胞,更优选地为树突细胞。所述肽也可以脉冲到细胞的表面(Thurner BI.et al.,J.Exp.Med.1999.190:1669),或者可以将本发明肽的编码核酸引入到树突细胞中,例如,利用电穿孔法(Van Tendeloo,VF.etal.,Blood 2001.98:49)。

[0118] 本发明的主要优点

[0119] (1) 本发明的筛选方法综合考虑HLA-多肽复合体分子在溶液中和细胞表面的稳定性,并以此为核心指标对抗原多肽进行筛选和验证,是兼顾准确性和高通量特点的最佳筛选方法,具有实验周期较短,不受实验材料限制的优点。

[0120] (2) 经过本发明的筛选方法具有MHC高亲和力和强免疫原性,适合被T细胞靶向的优点。

[0121] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor

Laboratory Press,1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0122] 实施例1.HLA-A2和HLA-A11高亲和力的KRAS和HPV16多肽。

[0123] 首先使用已建立的人乳头瘤病毒T细胞抗原数据库 (HPVdb) (Zhang,G.L.,et al., HPVdb:a data mining system for knowledge discovery in human papillomavirus with applications in T cell immunology and vaccinology.Database(Oxford), 2014.2014:p.bau031.) 和混杂的MHC结合肽预测服务器分别预测与HLA-A2和HLA-A11高亲和力的HPV16和KRAS来源的多肽。本发明预测到15种HPV16来源的多肽(表1),其显示了与HLA-A02和HLA-A11的结合能力。

[0124] 表1HPV16来源的多肽

[0125]

表位	序列	SEQ ID No.:
HPV16 E6 7-15 (E6 ₇₋₁₅)	AMFQDPQER	1
HPV16 E6 9-18 (E6 ₉₋₁₈)	FQDPQERPRK	2
HPV16 E6 18-26 (E6 ₁₈₋₂₆)	KLPQLCTEL	3
HPV16 E6 33-41 (E6 ₃₃₋₄₁)	IILECVYCK	4
HPV16 E6 52-60 (E6 ₅₂₋₆₀)	FAFRDLCIV	5
HPV16 E6 59-67 (E6 ₅₉₋₆₇)	IVYRDGNPY	6
HPV16 E6 68-75 (E6 ₆₈₋₇₅)	AVCDKCLK	7
HPV16 E6 92-101 (E6 ₉₂₋₁₀₁)	GTTLEQQYNK	8
HPV16 E6 93-101 (E6 ₉₃₋₁₀₁)	TTLEQQYNK	25
HPV16 E6 106-115 (E6 ₁₀₆₋₁₁₅)	LLIRCINCQK	9
HPV16 E7 11-20 (E7 ₁₁₋₂₀)	YMLDLQPETT	10
HPV16 E7 12-20 (E7 ₁₂₋₂₀)	MLDLQPETT	26
HPV16 E7 85-93 (E7 ₈₅₋₉₃)	GTLGIVCPI	11
HPV16 E7 86-94 (E7 ₈₆₋₉₄)	TLGIVCPIC	12
HPV16 E7 88-97 (E7 ₈₈₋₉₇)	GIVCPICSQK	13

[0126] 使用混杂的MHC结合肽预测服务器来分析KRAS蛋白质序列,并预测到57个KRAS来源的多肽,其显示出潜在的HLA I类分子结合能力。

[0127] 表2KRAS来源的多肽

表位	序列	SEQ ID No.:
KRAS ₅₋₁₃	KLVVVGAGG	14
KRAS ₅₋₁₃ G12D	KLVVVGADG	27
KRAS ₅₋₁₃ G12S	KLVVVGASG	28
KRAS ₅₋₁₃ G12V	KLVVVGAVG	29
KRAS ₅₋₁₄	KLVVVGAGGV	15

[0128]

[0129]

KRAS ₅₋₁₄ G12C	KLVVVGACGV	30
KRAS ₅₋₁₄ G12D	KLVVVGADGV	31
KRAS ₅₋₁₄ G12S	KLVVVGASGV	32
KRAS ₅₋₁₄ G12V	KLVVVGAVGV	33
KRAS ₅₋₁₄ G13D	KLVVVGAGDV	34
KRAS ₆₋₁₄	LVVVGAGGV	16
KRAS ₆₋₁₄ G12C	LVVVGACGV	35
KRAS ₆₋₁₄ G12D	LVVVGADGV	36
KRAS ₆₋₁₄ G12S	LVVVGASGV	37
KRAS ₆₋₁₄ G12V	LVVVGAVGV	38
KRAS ₆₋₁₄ G13D	LVVVGAGDV	39
KRAS ₇₋₁₅	VVVGAGGVG	17
KRAS ₇₋₁₅ G12D	VVVGADGVG	40
KRAS ₇₋₁₅ G12S	VVVGASGVG	41
KRAS ₇₋₁₅ G12V	VVVGAVGVG	42
KRAS ₇₋₁₆	VVVGAGGVGK	18
KRAS ₇₋₁₆ G12C	VVVGACGVGK	43
KRAS ₇₋₁₆ G12D	VVVGADGVGK	44
KRAS ₇₋₁₆ G12S	VVVGASGVGK	45
KRAS ₇₋₁₆ G12V	VVVGAVGVGK	46
KRAS ₇₋₁₆ G13D	VVVGAGDVGK	47
KRAS ₈₋₁₆	VVGAGGVGK	19
KRAS ₈₋₁₆ G12C	VVGACGVGK	48
KRAS ₈₋₁₆ G12D	VVGADGVGK	49
KRAS ₈₋₁₆ G12S	VVGASGVGK	50
KRAS ₈₋₁₆ G12V	VVGAVGVGK	51
KRAS ₈₋₁₆ G13D	VVGAGDVGK	52
KRAS ₈₋₁₇	VVGAGGVGKS	20
KRAS ₈₋₁₇ G12C	VVGACGVGKS	53
KRAS ₈₋₁₇ G12D	VVGADGVGKS	54
KRAS ₈₋₁₇ G12S	VVGASGVGKS	55
KRAS ₈₋₁₇ G12V	VVGAVGVGKS	56
KRAS ₈₋₁₇ G13D	VVGAGDVGKS	57
KRAS ₉₋₁₇	VGAGGVGKS	21
KRAS ₉₋₁₇ G12C	VGACGVGKS	58
KRAS ₉₋₁₇ G12D	VGADGVGKS	59
KRAS ₉₋₁₇ G12S	VGASGVGKS	60
KRAS ₉₋₁₇ G12V	VGAVGVGKS	61

[0130]	KRAS ₉₋₁₇ G13D	VGAGDVGKS	62
	KRAS ₁₀₋₁₈	GAGGVGKSA	22
	KRAS ₁₀₋₁₈ G12D	GADGVGKSA	63
	KRAS ₁₀₋₁₉	GAGGVGKSAL	23
	KRAS ₁₀₋₁₉ G12C	GACGVGKSAL	64
	KRAS ₁₀₋₁₉ G12D	GADGVGKSAL	65
	KRAS ₁₀₋₁₉ G12S	GASGVGKSAL	66
	KRAS ₁₀₋₁₉ G12V	GAVGVGKSAL	67
	KRAS ₁₀₋₁₉ G13D	GAGDVGKSAL	68
	KRAS ₁₁₋₁₉	AGGVGKSAL	24
	KRAS ₁₁₋₁₉ G12D	ADGVGKSAL	69
	KRAS ₁₁₋₁₉ G12S	ASGVGKSAL	70
	KRAS ₁₁₋₁₉ G12V	AVGVGKSAL	71
	KRAS ₁₁₋₁₉ G13D	AGDVGKSAL	72

[0131] 实施例2. 多肽UV互换分析和HLA-IELISA检测

[0132] 这些预测的多肽由Elim Biopharmaceuticals和吉尔生化上海公司定制合成, 纯度>80%。将合成的多肽在去离子水中重悬至10mM并储存在-80℃。

[0133] 以1×PBS稀释制备50μM和25μM多肽, 0.025mg/mL HLA-A02:01单体和0.0125mg/mL HLA-A11:01单体。将50μM多肽和0.025mg/mL含有UV敏感性肽的HLA-A02:01单体, 或25μM多肽和0.0125mg/mL含有UV敏感性肽的HLA-A11:01单体在冰上等体积混合。将混合物在366nm紫外光曝光下温育30分钟, 人MHC I类分子上的UV敏感型多肽被破坏, 人MHC I类分子的多肽结合位点暴露, 共孵育的靶肽可结合到人HLA凹槽中, 未结合多肽的HLA I类分子单体稳定性低被降解。最后用HLA I类分子ELISA试剂盒抗β2微球蛋白抗体检测互换效率, 以评价多肽与HLA-A02和HLA-A11单体的结合能力。步骤如下:

[0134] 1) 用1×稀释缓冲液(0.1M NaCl, 0.05M Tris, 0.1% BSA, 0.02% 吐温20, pH8.0) 稀释UV敏感的HLA多肽交换产物。将100μL稀释的交换产物, 阳性对照和阴性对照加入链霉亲和素(BioLegend, Cat. 280302) 预包被的ELISA板(BioLegend, Cat. 423501) 中, 将板密封并在37℃下温育1小时。

[0135] 2) 以1×洗涤缓冲液(Biolegend, Cat. 421601) 洗涤平板, 加入100μL稀释的HRP抗人β2-微球蛋白抗体(Biolegend, Cat. 280303) 到ELISA板每孔中。将ELISA板密封并在37℃下温育1小时。

[0136] 3) 用1x洗涤缓冲液洗涤ELISA板, 并与底物溶液(0.0059M柠檬酸, 0.0041M柠檬酸三钠, 0.8mM ABTS和0.006% H₂O₂) 在室温下孵育8分钟。

[0137] 4) 在每孔中加入50μL 2% (w/v) 草酸二水合物以终止显色反应。在30分钟内测量405nm波长处的光密度值。

[0138] 如附图1A所示, 结果表明HPV16 E₆₁₈₋₂₆ (47.7%), E₆₅₂₋₆₀ (60.6%), E₇₁₁₋₂₀ (79.95%), E₇₈₅₋₉₃ (75.6%) 和E₇₈₆₋₉₄ (22.8%) 肽显示出与HLA-A02单体的高结合亲和力并形成稳定的复合物。E₇₁₂₋₂₀ (4.1%) 和E₆₃₃₋₄₁ (3.15%) 显示出较低的结合亲和力。其他HPV16

来源的多肽未显示与HLA-A02单体的结合能力。

[0139] 如附图2A所示,野生型KRAS来源的多肽无法检测到多肽结合的信号,而KRAS5-14G12C(49.95%),KRAS5-14G12S(31.25%)和KRAS5-14G12V(46.5%)显示较高的HLA-A02:01亲和力。

[0140] 如附图3所示,HPV16来源的15种肽中的12种可结合于HLA-A11上。其中,多肽HPV16 E67-15(79.5%),E69-18(68.1%),E633-41(26.85%),E692-101(77.35%),E693-101(75.95%),E6106-115(50.85%),E788-97(46.4%)和E785-93(21.4%)肽显示出与HLA-A11的高亲和力。多肽E618-26(6.25%),E652-60(5%),E668-75(11.7%)和E711-20(6.3%)具有相对低的HLA-A11结合能力,与数据库预测相一致。

[0141] 如附图4所示,KRAS来源的多肽中的KRAS7-16WT(103.75%)/G12C(91.95%)/G12D(72.65%)/G12S(88.95%)/G12V(40.15%)/G13D(99.35%)和KRAS8-16WT(65.75%)/G12C(59.05%)/G12D(41.85%)/G12S(106.45%)/G12V(142.65%)/G13D(33.4%)与HLA-A11单体具有高亲和力。

[0142] 实施例3.多肽结合力试验

[0143] 用标准的T2细胞系测定多肽与HLA-A2或HLA-A11的结合。T2细胞系上的肽-HLA-A02或HLA-A11复合物具有低稳定性。外源肽与T2细胞上的HLA-A02或HLA-A11的结合增加了分子稳定性,并且细胞表面HLA-A02或HLA-A11可以通过抗HLA-A02或HLA-A11抗体检测。在含有10%FBS(Life Technologies)和1%青霉素-链霉素(Life Technologies)的IMDM(Life Technologies)培养基中培养T2细胞。将 1×10^5 个T2细胞悬浮于100 μ L无血清IMDM中,并与100 μ L的200 μ M多肽在37 $^{\circ}$ C下孵育6小时。以FITC抗人HLA-A2抗体(Biolegend,clone BB7.2)测定T2细胞表达的HLA-A2,通过流式细胞仪Fortessa X20及分析软件FlowJo V10测量分析荧光强度中位数(Median fluorescence intensity,MFI)。荧光指数(Fluorescence index,FI)通过下式计算:FI=(含多肽的T2细胞的MFI/不含肽的T2细胞的MFI)-1。

[0144] 结果

[0145] 如附图1B所示,在T2细胞上HPV16 E618-26(126.35%),E652-60(121.2%),E711-20(140.35%),E712-20(117.4%),E785-93(189.75%)和E786-94(146.35%)显示与HLA-A02较高的结合信号;其他9种HPV16来源的多肽则信号较低,这与算法预测的结果一致。

[0146] 如附图2B所示,(a)KRAS5-13G12S(3.4%),KRAS6-14G13D(3.65%),KRAS7-15G12S(3.05%)/G12V(3.5%),KRAS8-16G13D(5.75%),KRAS8-17G13D(8.75%),KRAS9-17G12S(2.15%)/G13D(2.3%),KRAS10-19G13D(2.75%)和KRAS11-19G12S(2.7%)/KRAS11-19G13D(2.65%)与HLA-A02结合能力较低;

[0147] (b)KRAS5-14WT(63.2%)/G12C(68.5%)/G12D(89.65%)/G12S(36.45%)/G12V(75.8%),KRAS6-14突变体G12C(48.5%)/G12D(37.45%)/G12S(37.2%)和KRAS7-15G12V(57.85%)具有较高的HLA-A02结合能力。

[0148] 实施例4.HPV16和KRAS来源的多肽的免疫原性的研究

[0149] 将通过含有候选新抗原多肽序列的重组HPV16和KRAS肿瘤蛋白,分别免疫HLA-A*02:01和HLA-A*11:01转基因小鼠。通过流式技术和ELISA技术监控小鼠体内免疫细胞和细胞因子水平,检测针对HLA-A2和HLA-A11高亲和力的,携带相关新抗原突变位点的HPV16和KRAS肿瘤蛋白在这些小鼠中对免疫应答的影响。步骤如下:

[0150] 在第0天和第14天分别给予6-8周龄的HLA-A*02:01和HLA-A*11:01转基因小鼠筛选出的HLA-A2或A11高亲和力HPV16和KRAS多肽腹腔注射,并以前期检测中MHC I类分子低亲和力或无结合的HPV16和KRAS肿瘤多肽作为阴性对照。在注射后第7天、第21天和第28天,取小鼠的脾脏和外周血,制备脾脏单细胞悬液,通过抗CD45、抗CD19、抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗CD27、抗CD137和抗CD28等抗体(Abcam)进行细胞表面染色,抗Eomes抗体(Abcam)进行核内转录因子染色,流式分析其免疫细胞表型及百分比等数量上的变化,同时通过ELISA监测血中IL1 β 、IL6、IL8、TNF α 和TGF β 等细胞因子的水平。通过链亲和素将高亲和力肿瘤新抗原多肽-HLA-A2或A11单体合成为多肽-HLA四聚体荧光抗体,将这些四聚体荧光抗体分别与脾脏单细胞悬液和外周血共孵育后,通过流式分析HLA-A2和A11高亲和力HPV16和KRAS新抗原多肽特异性的T细胞克隆的数量,比例和功能标记物,通过与对照组的结果比较,研究HLA-A2和A11高亲和力的HPV16和KRAS新抗原多肽的免疫原性,明确小鼠对这些多肽免疫应答的影响。

[0151] 实施例5. 肿瘤新抗原筛选方法

[0152] 在本实施例中,构建了一个新的系统来评估肽-HLA I类分子结合活性,所述系统如附图5所示。

[0153] 通过算法预测,预测了15种HPV16来源的多肽和57种KRAS来源的多肽,它们显示出HLA-A02和HLA-A11结合能力。再结合UV介导的HLA多肽互换反应和HLA I类分子ELISA检测,进一步筛选出几种具有高HLA-A02和A11单体亲和力的HPV16和KRAS来源的多肽。并且,通过T2系统检测多肽与HLA-A02的结合能力。通过HLA转基因小鼠,进一步确定新抗原多肽的免疫原性,从而获得兼顾MHC呈递和免疫原性的肿瘤新抗原。

[0154] 结合UV介导的HLA I类多肽结合系统、T2系统,HLA转基因小鼠免疫原性筛选,与算法预测,显示出对HLA I类高结合亲和力的致癌病毒和驱动突变来源的新抗原多肽筛选,具有可行性和高准确性,适合用于肿瘤新抗原多肽对HLA I类结合的筛选。这一系统可扩展应用于不同肿瘤突变抗原的筛选,所得多肽抗原可直接应用于临床抗肿瘤疫苗制备和抗肿瘤T细胞克隆鉴定。

[0155] 实施例6. 串联多肽的亲合力和免疫原性研究

[0156] 表1中筛选到的HPV16多肽组成的串联多肽,和表2的KRAS多肽构成的串联多肽,分别结合多肽UV互换分析和HLA-IELISA检测,和T2细胞HLA稳定性两种测定,表明与HLA-A02和HLA-A11分子具有高结合亲和力,分别免疫HLA-A*02:01和HLA-A*11:01转基因小鼠,检测串联多肽在这些小鼠中对免疫应答的影响。

[0157] 结果表明,HPV16和KRAS串联多肽具有较强的免疫原性。

[0158] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

<400> 5
Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 6
Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 7
Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 8
Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 9
Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 10
Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5 10

<210> 11

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 11
Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
1 5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 12
Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys
1 5
<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 13
Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys
1 5 10
<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 14
Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly
1 5
<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 15
Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val
1 5 10
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 16

Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 17

Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 18

Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 19

Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 20

Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 21

Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 22
Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala
1 5
<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 23
Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5 10
<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 24
Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5
<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 25
Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys
1 5
<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 26
Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5
<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 27
Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly

1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <400> 28
 Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly
 1 5
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <400> 29
 Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly
 1 5
 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <400> 30
 Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <400> 31
 Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <400> 32
 Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 33
Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val
1 5 10
<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 34
Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val
1 5 10
<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 35
Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val
1 5
<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 36
Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val
1 5
<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 37
Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val
1 5
<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 38
Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 39
Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly
1 5
<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 40
Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly
1 5
<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 41
Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly
1 5
<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 42
Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys
1 5 10
<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 43
Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys
1 5 10
<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 44
Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 45
Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 46
Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys
1 5 10

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 47
Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 48
Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 49
Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys
1 5

<210> 50

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 50
Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys
1 5
<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 51
Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys
1 5
<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 52
Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser
1 5 10
<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 53
Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser
1 5 10
<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 54
Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser
1 5 10
<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 55

Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser
1 5 10
<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 56

Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser
1 5 10
<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 57

Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser
1 5
<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 58

Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser
1 5
<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 59

Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser
1 5
<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 60

Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser
1 5
<210> 61
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 61
Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser
1 5
<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 62
Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala
1 5
<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 63
Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5 10
<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 64
Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5 10
<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 65
Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5 10
<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 66
Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

1	5	10
---	---	----

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 67
Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5 10
<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 68
Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5
<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 69
Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5
<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 70
Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5
<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 71
Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu
1 5
<210> 72
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 72

Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val

1

5

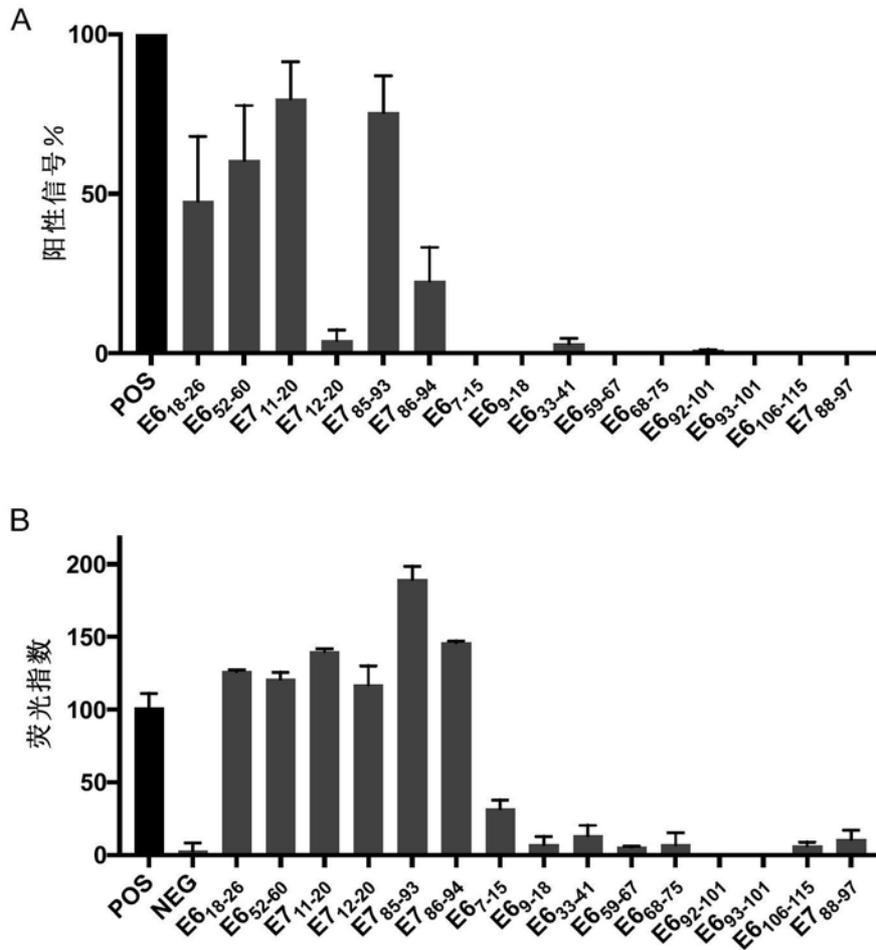


图1

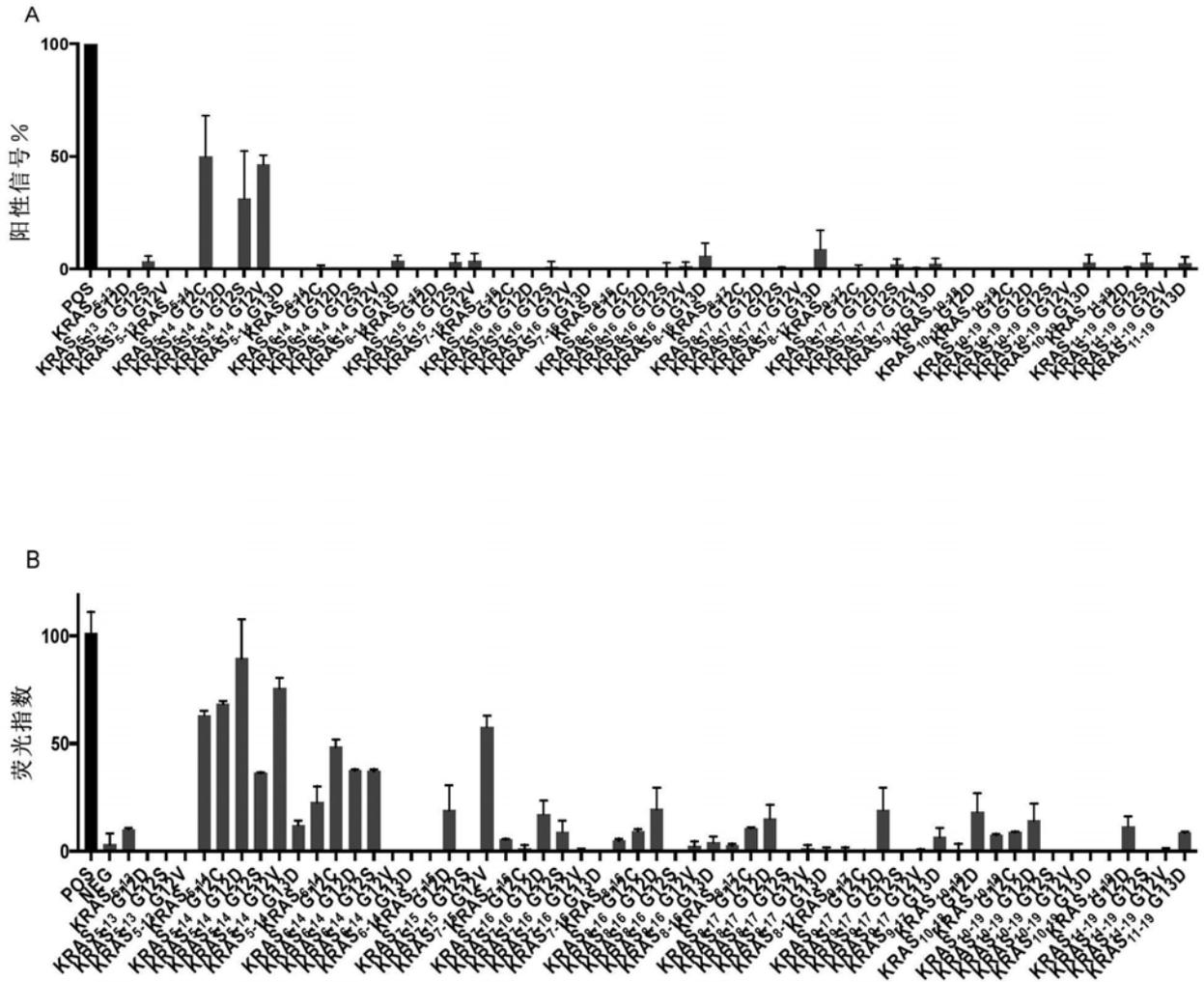


图2

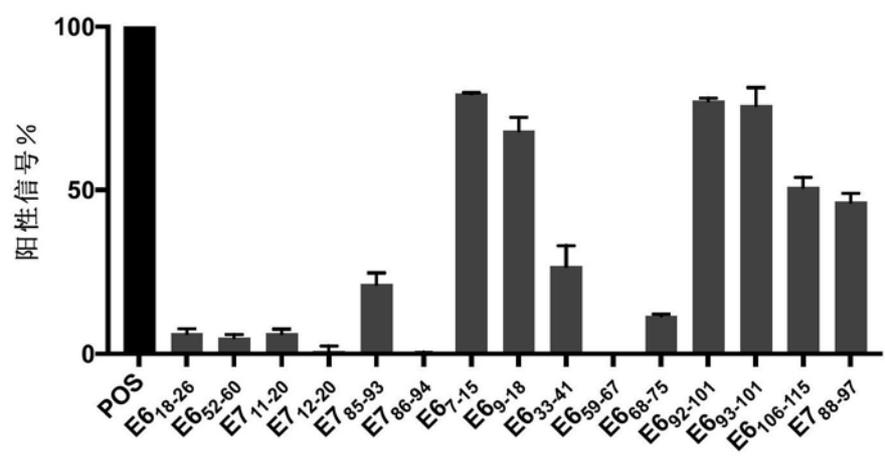


图3

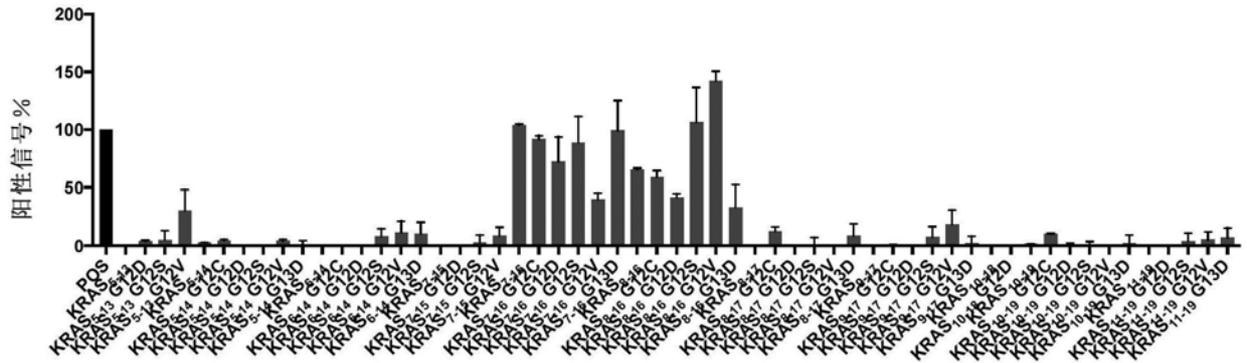


图4



图5