



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117586353 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 23

(21) 申请号 202210967650.8

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.12

A61K 39/385 (2006.01)

(71) 申请人 北京热体生物技术有限公司

A61K 47/64 (2017.01)

地址 100020 北京市朝阳区朝新嘉园东里
一区8号楼(成了未来孵化器0310号)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

(72) 发明人 孟颂东 鞠莹 王九儒 张含
王皓宇 王子豪

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 刘海罗

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

A61K 38/17 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

序列表(电子公布) 附图9页

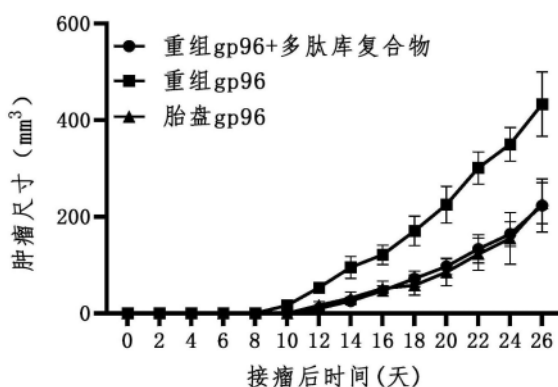
(54) 发明名称

肝癌相关多肽、复合物、药物组合物及用途

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域,涉及肝癌相关多肽、复合物、药物组合物及用途。本发明还涉及一组多肽库及其在治疗肝细胞癌中的应用。具体地,本发明涉及多肽或多肽组合,其选自SEQ IDNOs:1-14所示多肽中的任意一种或多种多肽。本发明的复合物或致敏的DC疫苗可以活化肿瘤特异性T细胞应答,有效杀伤肝癌细胞,显著抑制肝肿瘤生长,从而达到治疗肝细胞癌的目的。本发明作为一种肿瘤治疗性疫苗或免疫细胞疗法治疗肝细胞癌等恶性肿瘤,具有广阔的应用前景。

HEPG2细胞系



1. 多肽或多肽组合,其选自SEQ ID NOs:1-14所示多肽中的任意一种或多种多肽。
2. 根据权利要求1所述的多肽或多肽组合,其包含SEQ ID NOs:1-14所示的多肽;优选地,其由SEQ ID NOs:1-14所示的多肽组成。
3. gp96-多肽复合物,其中,所述多肽为一种或多种的权利要求1至2中任一权利要求所述的多肽。
4. 根据权利要求3所述的gp96-多肽复合物,其中,gp96与多肽的质量比为(1:5)至(5:1),优选为(1:2)至(2:1)或(1:1.5)至(1.5:1),更优选为1:1;
优选地,所述gp96为重组的人gp96蛋白;优选地,所述gp96的序列如SEQ ID NO:64所示。
5. gp96-多肽复合物组合,其由至少两种权利要求3至4中任一权利要求所述的gp96-多肽复合物组成;
优选地,所述gp96-多肽复合物组合由SEQ ID NOs:1-14所示多肽分别与gp96形成的14种gp96-多肽复合物组成;
优选地,按照其中多肽的质量计算,14种gp96-多肽复合物两两之间的质量比为(1:5)至(5:1),优选为(1:2)至(2:1)或(1:1.5)至(1.5:1),更优选为1:1。
6. 一种致敏的DC细胞,其由权利要求3至4中任一权利要求所述的gp96-多肽复合物或者权利要求5所述的gp96-多肽复合物组合处理DC细胞得到;
优选地,所述DC细胞为人DC细胞或小鼠DC细胞;
gp96-多肽复合物在DC细胞培养物中的浓度按照gp96蛋白的质量计算,为50 μ g/mL至200 μ g/mL;优选为80 μ g/mL至120 μ g/mL;更优选为100 μ g/mL。
7. 一种活化的人T细胞,其由权利要求6的致敏的DC细胞与人T细胞共同培养得到;
优选地,所述活化的人T细胞是活化的人细胞毒性T淋巴细胞;
优选地,所述致敏的DC细胞为致敏的人DC细胞;
优选地,致敏的人DC细胞与人T细胞的比例为1:10。
8. 一种药物组合物,其包含权利要求1至2中任一权利要求所述的多肽或多肽组合、权利要求3至4中任一权利要求所述的gp96-多肽复合物、权利要求5所述的gp96-多肽复合物组合、权利要求6所述的致敏的DC细胞或者权利要求7所述的活化的CTL细胞,以及一种或多种药学上可接受的辅料。
9. 一种疫苗组合物,其包含权利要求6所述的致敏的DC细胞以及细胞培养基,
优选地,细胞培养基是无血清的RPMI 1640;
优选地,所述疫苗组合物为用于治疗或预防肝癌的疫苗组合物;
优选地,所述肝癌是肝细胞癌;
优选地,所述肝癌是原发性肝癌或转移性肝癌。
10. 权利要求1至2中任一权利要求所述的多肽或其组合、权利要求3至4中任一权利要求所述的gp96-多肽复合物、权利要求5所述的gp96-多肽复合物组合、权利要求6所述的致敏的DC细胞或者权利要求7所述的活化的CTL细胞在制备治疗或预防肝癌的药物中的用途;
优选地,所述肝癌是肝细胞癌;
优选地,所述肝癌是原发性肝癌或转移性肝癌。

肝癌相关多肽、复合物、药物组合物及用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及肝癌相关多肽、复合物、药物组合物及用途。本发明还涉及一组多肽库及其在治疗肝细胞癌中的应用。

背景技术

[0002] 肝癌是指发生于肝脏的恶性肿瘤,包括原发性肝癌和转移性肝癌两种,其中大多数属于肝细胞癌。原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一。在世界范围内男性癌症患者中,肝癌比例排第六,死亡率排在第二;在女性癌症患者中,肝癌比例排第七,死亡率排第六。2008年,全世界共有748,300个新增肝癌病例,有695,900例肝癌患者死亡。而这些新增肝癌病例和死亡病例中有一半在中国。肝癌发生率最高的区域主要在东亚,东南亚,中非和西非国家。亚洲部分地区和非洲撒哈拉以南地区之所以肝癌发生率较高,可能是因为这些地区HBV盛行,因为这些地区8%的居民慢性感染HBV,在发展中国家60%的肝癌患者感染过HBV。

[0003] 由TAAs、TSAs、癌基因或抑癌基因突变蛋白及多肽所组成的疫苗目前归类为肿瘤多肽疫苗。T细胞主要通过识别与主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子结合呈递的抗原多肽。人工合成多肽能够直接与MHC I类分子相结合,不需要抗原呈递细胞(Antigen-presenting cells, APC)的加工处理。肿瘤多肽疫苗大多是由肿瘤细胞裂解或人工合成的肿瘤抗原肽段,单独或辅以佐剂用于肿瘤患者,肿瘤抗原肽段进入体内,直接诱导体内细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)的应答,激发机体的特异性肿瘤免疫反应。

[0004] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(Glypican-3, GPC3),也称MXR7, OCI-5, GTR2-2,是硫酸乙酰肝素糖蛋白(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)家族中的一员。人GPC3基因定位于染色体Xq26.10,是一种由糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜上的HSPG糖蛋白。GPC3编码580个氨基酸,核心蛋白相对分子质量约为70kDa。中间为Furin蛋白酶切位点。有研究提示, GPC3核心蛋白发挥作用,首先要通过Furin蛋白酶裂解Arg 358和Cys 359形成大约40kDa的N-端蛋白和30kDa左右含有两条硫酸乙酰肝素(HS)链的C-端蛋白,从而参与调节相关信号通路的传递。研究发现GPC3与多种癌症相关,且在肿瘤组织中的表达具有差异性。在肝癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、卵巢卵黄囊瘤、卵巢透明细胞癌和结肠癌中为高表达。

[0005] Paternally expressed gene 10(PEG10)位于人类染色体7q21.3上,来源于Ty3/Gypsy反转录转座子家族,是一个与肿瘤的增殖、凋亡和转移有关的癌基因。PEG 10的表达异常与细胞增殖、凋亡和恶性肿瘤的发生发展密切相关。PEG 10过表达与实体瘤发生率高、分化程度低、淋巴结转移增加有关。

[0006] 热休克蛋白(Heat shock protein, HSP)是一类在生物进化中高度保守且广泛存在于原核及真核生物中的蛋白质。HSP根据同源程度和分子量大小可分为HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、小分子HSP和泛素等多个亚家族。热休克蛋白(Heat shock protein, HSP) gp96属于HSP90亚家族的成员,该蛋白是细胞内质网上含量最丰富的热休克蛋白。热休

克蛋白gp96蛋白具有多肽结合特性,在内质网内其能接受来自TAP复合体的多肽片段,协助将其组装至MHC I类分子,递呈于细胞膜上。不同组织来源的热休克蛋白gp96能携带有其来源组织内特异性表达的多肽片段。

发明内容

[0007] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,得到了多肽或者多肽组合。本发明人惊奇地发现,该多肽或多肽组合能够与gp96形成复合物,致敏DC细胞,激活T细胞,能够有效地治疗和/或预防肝癌。由此提供了下述发明:

[0008] 本发明的一个方面涉及多肽或多肽组合,其选自SEQ ID NOs:1-14所示多肽中的任意一种或多种多肽。

[0009] 本发明所述多肽的氨基酸序列如下面的表1所示。

[0010] 表1

[0011]

SEQ ID NO:	多肽的氨基酸序列	所属蛋白
1	HSPLKLLTSMASVVCFFFLVH	GPC3
2	NVLLGLFSTIHDSIQYVQKNAGKLTTTIGK LCAHSQQRQYRSAYYPEDLFIDKKVLKV	
3	DLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLN MEQLLQSAS	
4	RDLKVFGNFPKLIMTQVSKSLQVTRIFLQA LNLGIEV	
5	YTNAMFKNNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSL	
6	HELKMKGPEPVVSQIIDKCLKHINQLLR	
7	AHLATYTEFVPQIPGYQTYPTYAAYPYTPV GFA	PEG10
8	LESHYLMHNYPAFMMEMKHVFEDPQRR EV	
9	DHRLVDPHIEMIPGAHSIPSGHVYSLSEPE MAALR	
10	NPDMLAPFMAQCQIFMEKSTRDFSVD	
11	YVAQNGIPLRIKDWPILVEAIDGRPIASGPV VHETHDL	
12	QVQKLTEENTTLREQVEPTPEDEDDDI	

[0012]	13 YVAQNGIPLRIKDWPIILVEAIDGRPIASGPV VHETHDL	
	14 VRWLSTHDPNITWSTRSIVFDSEYCRYHCR MYSPIPPSLPP	

[0013] 在本发明的一些实施方式中,所述的多肽或多肽组合,其包含SEQ ID NOs:1-14所示的多肽;优选地,其由SEQ ID NOs:1-14所示的多肽组成(本发明中也称为多肽库)。

[0014] 本发明的另一方面涉及gp96-多肽复合物,其中,所述多肽为一种或多种本发明所述的多肽。

[0015] 在本发明的一些实施方式中,所述的gp96-多肽复合物,其中,gp96与多肽的质量比为(1:5)至(5:1),优选为(1:2)至(2:1)或(1:1.5)至(1.5:1),更优选为1:1;

[0016] 优选地,所述gp96为重组的人gp96蛋白;优选地,所述gp96的序列如SEQ ID NO:64所示。

[0017] MDDEVVDVGTVEEDLGKSREGSRTDDEVVQREEEAIQLDGLNASQIRELREKSEKFAFQAEVNRMMKLIINSLYKNKEIFLRELISNASDALDKIRLISLTDENALSGNEELTVKIKCDKEKNLLHVTDTGVGMTREELVKNLGTIAKSGTSEFLNKMTEAQEDGQSTSELIGQFGVGFYSAFLVADKVIIVTSKHNNDTQHIWESDSNEFSVIADPRGNTLGRGTTITLVLKEEASDYLELDTIKNLVKKYSQFINFPIYVWSSKTETVEEPMEEEEAAKEEKEESDDEAAVEEEEEEEKPKTKKVEKTVWDWELMNDIKPIWQRPSKEVEEDEYKAFYKFSKESDDPMAYIHFTAEGEVTFKSILFVPTSAPRGLFDEYGSKSDYIKLYVRRVFITDDFHDMMPKYLNFKGVVDSDDLPLNVSRETLQQHKLLKVIRKKLVRKTLDMIKKIADDKYNDTFWKEFGTNIKLVIEDHSNRTRLAKLLRFQSSHPTDITSLDQYVERMKEKQDKIYFMAGS SRKEAESSPFVERLLKKGVEVIYLTEPVDEYCIQALPEFDGKRFQNVAKEGVKFDESEKTKESREAVEKEFEPELLNWMKDKALKDKIEKAVVSQRLTESPCALVASQYGSWGMERIMKAQAYQTGKDISTNYYASQKKTFEINPRHPLIRDMLRRIKEDDEDDKTVLDLAVVLFETATLRSGYLLPDTKAYGDRIERMLRSLNIDPDAKVEEPEEPEETAEDTTE DTEQDEDEEMDVGTDDEEETAKESTAE (SEQ ID NO:64)

[0018] 当所述多肽为多种例如采用前述的多肽库(SEQ ID NOs:1-14)时,一个gp96分子可以与相同或不同的多肽形成复合物,例如,gp96-多肽复合物中的多肽可以相同或不同。

[0019] 将所述多肽与热休克蛋白gp96在体外以自然吸附或热击方式形成复合物。

[0020] 分别化学合成本发明的多肽,优选按等质量比混合,用DMSO配制成浓度20mg/mL的多肽溶液,将多肽与热休克蛋白gp96按照质量比1:1或1:10混合,用pH7.4 0.01mol/L PBS缓冲液溶解至总体积4mL,在20℃或4℃下放置30分钟,或于55℃热击10分钟,在室温冷却30分钟,最后用50kD超滤管洗去未结合的多肽,即得gp96-多肽复合物。

[0021] 本发明中,gp96-多肽复合物也表示为gp96+多肽复合物。

[0022] 本发明的再一方面涉及一种gp96-多肽复合物组合,其由至少两种本发明中任一项所述的gp96-多肽复合物组成;

[0023] 优选地,所述gp96-多肽复合物组合由SEQ ID NOs:1-14所示多肽分别与gp96形成的14种gp96-多肽复合物组成;

[0024] 优选地,按照其中多肽的质量计算,14种gp96-多肽复合物两两之间的质量比为(1:5)至(5:1),优选为(1:2)至(2:1)或(1:1.5)至(1.5:1),更优选为1:1。

[0025] 本发明中,gp96-多肽库复合物也表示为gp96+多肽库复合物。

[0026] 本发明的再一方面涉及一种致敏的DC细胞,其由本发明中任一项所述的gp96-多肽复合物或者本发明的gp96-多肽复合物组合处理DC细胞得到;

[0027] 优选地,所述DC细胞为人DC细胞或小鼠DC细胞;

[0028] gp96-多肽复合物在DC细胞培养物中的浓度按照gp96蛋白的质量计算,为50 μ g/mL至200 μ g/mL;优选为80 μ g/mL至120 μ g/mL;更优选为100 μ g/mL。

[0029] 在本发明的一些实施方式中,所述致敏的DC细胞,其通过如下步骤获得:

[0030] (1) 分离人PBMC,按浓度为2~4 $\times 10^6$ /ml铺入培养瓶中,每瓶40ml,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中;

[0031] (2) 孵育2小时后,轻晃培养瓶,收集悬浮细胞用于培养T细胞,再用PBS洗瓶1~2次,加入DC培养液(1640培养基+20ng/ml IL-4+50ng/ml GM-CSF) 40ml后继续置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中;

[0032] (3) 第3天补加40ml/瓶DC培养基;

[0033] (4) 第6天加入终浓度20ng/ml的TNF- α ;

[0034] (5) 第7~8天收集1 $\times 10^7$ DC,在6孔板中溶于1ml的DC培养液,加入50 μ g本发明的gp96-多肽复合物,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中共刺激4h;

[0035] (6) 收集DC于50ml离心管,用0.9%生理盐水洗涤2次,每次1500rpm/min 5min。

[0036] 本发明的再一方面涉及一种活化的人T细胞,其由本发明的致敏的DC细胞与人T细胞共同培养得到;优选地,所述活化的人T细胞是活化的人细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, Tc细胞);优选地,所述致敏的DC细胞为致敏的人DC细胞;优选地,致敏的人DC细胞与人T细胞的比例为1:10。

[0037] 在本发明的一些实施方式中,所述致敏的DC细胞,其通过如下步骤获得:

[0038] 按照1:10的比例,将致敏的DC连同培养基一起转入T细胞培养袋中(T细胞数量达到3 $\times 10^8$)进行联合培养;

[0039] 第14天左右收集不少于3 $\times 10^9$ 的细胞,用生理盐水1500rpm/min离心洗涤3次,每次5min,得到活化的人T细胞。

[0040] 本发明的再一方面涉及一种药物组合物,其包含本发明中任一项所述的多肽或多肽组合、本发明中任一项所述的gp96-多肽复合物、本发明的gp96-多肽复合物组合、本发明的致敏的DC细胞或者本发明的活化的CTL细胞,以及一种或多种药学上可接受的辅料。

[0041] 本发明的再一方面涉及一种疫苗组合物,其包含本发明的致敏的DC细胞以及细胞培养基,

[0042] 优选地,细胞培养基是无血清的RPMI 1640;

[0043] 优选地,所述疫苗组合物为用于治疗或预防肝癌的疫苗组合物;

[0044] 优选地,所述肝癌是肝细胞癌;

[0045] 优选地,所述肝癌是原发性肝癌或转移性肝癌。

[0046] 本发明的药物(疫苗)活化的T细胞回输裸鼠后,可向裸鼠提供肿瘤特异性T细胞免疫,清除体内肿瘤细胞,以及原位移植的肿瘤细胞,从而达到治疗癌症的目的。本发明作为肿瘤治疗性疫苗(药物)或细胞疗法、细胞药物,预期能够有效帮助患者降低肿瘤载量,术后即时施治能有效防止转移和复发。

[0047] 本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的多肽或其组合、本发明中任一项所

述的gp96-多肽复合物、gp96-多肽复合物组合、本发明的致敏的DC细胞或者本发明的活化的CTL细胞在制备治疗或预防肝癌的药物中的用途；

[0048] 优选地,所述肝癌是肝细胞癌；

[0049] 优选地,所述肝癌是原发性肝癌或转移性肝癌。

[0050] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0051] 如本文中所使用的,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如,预防疾病(例如肝癌)有效量是指,足以预防,阻止,或延迟疾病(例如肝癌)发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄,体重和性别,药物的施用方式,以及同时施用的其他治疗等等。

[0052] 本发明中,术语“致敏”是指对机体或细胞进行某种处理,其反应性有所增强,称为致敏。具体地,致敏是机体或细胞因接触抗原性物质而自动产生,或因接受抗体或具有免疫活性的淋巴细胞后被动产生的免疫反应性增高的状态。

[0053] 发明的有益效果

[0054] 本发明取得了如下技术效果中的一项或者多项:

[0055] (1) 本发明的多肽与gp96形成的复合物或致敏的DC疫苗可以活化肿瘤特异性T细胞应答,有效杀伤肝癌细胞,显著抑制肝肿瘤生长。

[0056] (2) 本发明的多肽可以体外化学合成获得,与重组的gp96形成复合物,解决了人胎盘来源的gp96复合物的来源限制的问题。

[0057] (3) 本发明的上述多肽含有多个HLA I类分子限制的表位,基本涵盖了人类主要的HLA的分型,因此具有广谱性。新生抗原预测流程中最重要也是最核心的工作之一是确定HLA I类基因的亚型,只有与之相匹配的肿瘤抗原表位才能被CD8+T细胞识别,进而杀死肿瘤细胞。中国人群中常见的HLA-I类基因型主要为HLA-A2、HLA-A11、HLA-A24和HLA-A33,因此本发明选用了这四种HLA限制型作用研究对象,覆盖了中国绝大部分的人群。在使用时,如果将全部多肽混合后作为多肽库用于治疗肝癌,能够避免鉴定基因型的复杂程序。

附图说明

[0058] 图1:针对肝细胞癌(HCC)、人胎盘的GEO公共转录组数据集数据与胎盘gp96结合多肽所属蛋白比对的分析。其中GSE1133和GSE101685分别是人体组织相关转录组数据库和肝癌相关转录组数据库,均来自于NCBI的GEO(Gene Expression Omnibus data base)公共数据集。

[0059] 图2A至图2D: IFN- γ +ELISPOT检测多肽-gp96复合物免疫转基因小鼠T淋巴细胞的斑点数,PBS组为阴性对照。图中数据为3次重复试验数据平均值 \pm SD。其中,图2A至图2D分别使用HLA-A2转基因小鼠、HLA-A24转基因小鼠、HLA-A11转基因小鼠和HLA-A33转基因小鼠。

[0060] 图3A至图3D: IFN- γ +ELISPOT检测多肽-gp96复合物活化的小鼠BMDC疫苗免疫转基因小鼠T淋巴细胞的斑点数。图中数据为3次重复试验数据平均值 \pm SD。其中,图3A至图3D分别使用HLA-A2转基因小鼠、HLA-A24转基因小鼠、HLA-A11转基因小鼠和HLA-A33转基因小鼠。

[0061] 图4A至图4D: 多肽-gp96复合物活化的小鼠BMDC疫苗诱导转基因小鼠的特异性杀伤性T细胞(CTL)对靶细胞的杀伤作用。图中数据为3次重复试验数据平均值 \pm SD。其中,图4A至图4D的靶细胞分别是HepG2细胞、SK-HEP-1细胞、Huh-7细胞和PLC/PRF/5细胞。

[0062] 图5A至图5D: 回输多肽-gp96复合物活化的BMDC免疫后小鼠的淋巴细胞对小鼠肝癌肿瘤生长的抑制。图中数据为5只小鼠的平均值 \pm SD。其中,图5A至图5D分别是接种HepG2细胞并使用HLA-A2转基因小鼠的淋巴细胞回输、接种SK-HEP-1细胞并使用HLA-A24转基因小鼠的淋巴细胞回输、接种Huh-7细胞并使用HLA-A11转基因小鼠的淋巴细胞回输和接种PLC/PRF/5细胞并使用HLA-A33转基因小鼠的淋巴细胞回输。

具体实施方式

[0063] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是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。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0064] 以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0065] HLA-A2和裸鼠为北京维通利华实验动物有限责任公司产品。HLA-A24、HLA-A11和HLA-A33转基因小鼠由实验室自行构建。人类白细胞抗原(HLA)是人类的MHC分子,将人类细胞的抗原呈递给T细胞,介导T细胞的活化,将HLA分子通过转基因到小鼠体内,可在小鼠体内呈递和活化人类抗原并活化抗原特异性T细胞。HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11或HLA-A33分别代表人类HLA上的A位点主要的四个等位基因。嵌合的HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11或HLA-A33类分子的转基因小鼠可以介导小鼠T细胞的有效阳性选择,能够分别识别人类HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11或HLA-A33类所呈递的肽的完整的T细胞库分子。转基因小鼠T细胞呈递和识别的肽表位与HLA-A2+、HLA-A24+、HLA-A11+或HLA-A33+人类呈递的表位相同。

[0066] 多肽由上海吉尔生化有限公司合成。

[0067] HepG2细胞(人肝癌细胞)购自ATCC(美国菌种保藏中心),产品目录号为HB-8065,HLA-A2限制型细胞系。

[0068] SK-HEP-1细胞(人肝癌细胞)购自ATCC(美国菌种保藏中心),产品目录号为HTB-52,HLA-A24限制型细胞系。

[0069] Huh-7细胞(人肝癌细胞)购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,产品编号为1101HUM-PUMC000679,HLA-A11限制型细胞系。

[0070] PLC/PRF/5(人肝癌细胞)购自ATCC(美国菌种保藏中心),产品目录号为CRL-8024,HLA-A33限制型细胞系。

[0071] 实施例1:肝癌抗原多肽库的建立

[0072] 一、人胎盘来源gp96结合多肽的质谱分析与鉴定

[0073] 人胎盘来源的gp96参考文献进行制备(Meng S,Song J,Rao Z,Tien P,Gao

G.2002.Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *Journal of Immunological Methods*, 264 (1-2): 29-35.)。用该方法提取的gp96天然地结合胎盘中多种特异性抗原,使用酸洗脱法分离热休克蛋白gp96结合的多肽:分别取5mg热休克蛋白gp96,并将浓度均调整为1mg/mL,加入适量HPLC级的三氟乙酸(TFA),使其终浓度为0.2%。4℃反应一小时,使热休克蛋白gp96上结合的多肽充分解离。将该蛋白-多肽混合物使用3kD的超滤管离心,使游离多肽通过超滤膜,而热休克蛋白gp96则截留在超滤膜外。将通过超滤膜的多肽混合物冻干,进行HPLC纯化与分析。将所有的多肽洗脱峰汇集后,再使用Orbitrap fusion液质联用高压液相色谱仪(Thermo Scientific)进行多肽序列分析与蛋白鉴定。

[0074] 二、胎盘gp96结合的肝癌相关多肽的筛选与鉴定

[0075] 对人体组织转录组数据进行分析(GSE1133,人体组织相关转录组数据库),经过转录组数据处理,将胎盘组织相对于肝组织的高表达基因与肝癌相对于肝组织的高表达基因以及胎盘gp96中结合的肽段所属的蛋白(即上述酸洗脱下来的gp96结合的多肽)取交集(图1)。

[0076] 获得GPC3和PEG10两个蛋白,进一步通过对不同GEO数据集的肝癌转录组数据进行分析(GSE105130、GSE121248是两个肝癌相关转录组数据库),结果显示这两个基因在肝癌中为稳定高表达,因此,确定GPC3和PEG10两个蛋白为胎盘gp96中所结合的肝癌相关抗原。将胎盘来源热休克蛋白gp96结合GPC3和PEG10两个蛋白来源的全部多肽汇总,建立肝癌抗原相关多肽库,见表2。通过Immune Epitope Database (IEDB)网站对表位进行预测和评分。

[0077] 表2:肝癌抗原多肽库

[0078]

SEQ ID NO:	多肽	包含表位	所属限制型
1	HSPLKLLTSM AISVVCF FLVH	LLTSMAISV (SEQ ID NO: 15)	HLA-A*02:01
		KLLTSMAISV (SEQ ID NO: 16)	HLA-A*02:01
		SMAISVVCF (SEQ ID NO: 17)	HLA-A*24:02
2	NVLLGLFSTIH DSIQYVQKNA GKLTTTIGKL CAHSQQRQYR SAYYPEDLFID KKVLKV	FIDKKVLKV (SEQ ID NO: 18)	HLA-A*02:01
		TIHDSIQYV (SEQ ID NO: 19)	HLA-A*02:01
		AYYPEDLFI (SEQ ID NO: 20)	HLA-A*24:02
		STIHDSIQY (SEQ ID NO: 21)	HLA-A*11:01
3	DLQVCLPKGP TCCSRKMEEK YQLTARLNME QLQSAS	KYQLTARLNM (SEQ ID NO: 22)	HLA-A*24:02
		LPKGPTCCSR (SEQ ID NO: 23)	HLA-A*33:03
4	RDLKVFGNFP KLIMTQVSKS LQVTRIFLQA	KVFGNFPKL (SEQ ID NO: 24)	HLA-A*02:01
		VSKSLQVTR	HLA-A*33:03

[0079]

	LNLGIEV	(SEQ ID NO: 25)	
		QVSKSLQVTR (SEQ ID NO: 26)	HLA-A*33:03
		KLIMTQVSK (SEQ ID NO: 27)	HLA-A*11:01
		FLQALNLGI (SEQ ID NO: 28)	HLA-A*02:01
5	YTNAMFKNN YPSLTPQAFEF VGEFFTDVSL	NYPSLTPQAF (SEQ ID NO: 29)	HLA-A*24:02
		FVGEFFTDV (SEQ ID NO: 30)	HLA-A*02:01
6	HELKMKGPEP VVSQIIDKCLKH INQLLR	KLKHINQLL (SEQ ID NO: 31)	HLA-A*02:01
		VVSQIIDKCLK (SEQ ID NO: 32)	HLA-A*11:01
		KMKGPEPVV (SEQ ID NO: 33)	HLA-A*02:01
7	AHLATYTEFV PQIPGYQTYP TYAAYPYPV GFA	AYPTYPVGF (SEQ ID NO: 34)	HLA-A*24:02
		TYTEFVPQI (SEQ ID NO: 35)	HLA-A*24:02
		HLATYTEFV (SEQ ID NO: 36)	HLA-A*02:01
		AAYPYPVGF (SEQ ID NO: 37)	HLA-A*24:02
		QTYPTYAAY (SEQ ID NO: 38)	HLA-A*11:01
8	LESHYLMHN YPAFMMEMK HVFEDPQRRE V	HVFEDPQRR (SEQ ID NO: 39)	HLA-A*33:03
		HYLMHNYPAF (SEQ ID NO: 40)	HLA-A*24:02

[0080]

		NYPAFMMEM (SEQ ID NO: 41)	HLA-A*24:02
		HVFEDPQRR (SEQ ID NO: 42)	HLA-A*11:01
9	DHRLVDPHIE MIPGAHSIPSG HVYSLSEPEM AALR	RLVDPHIEM (SEQ ID NO: 43)	HLA-A*02:01
		LVDPHIEMI (SEQ ID NO: 44)	HLA-A*02:01
		SLSEPEMAAL (SEQ ID NO: 45)	HLA-A*02:01
		RLVDPHIEMI (SEQ ID NO: 46)	HLA-A*02:01
		SLSEPEMAA (SEQ ID NO: 47)	HLA-A*02:01
10	NPDMLAPFMA QCQIFMEKST RDFSVD	AQCQIFMEK (SEQ ID NO: 48)	HLA-A*11:01
		QIFMEKSTR (SEQ ID NO: 49)	HLA-A*33:03
		IFMEKSTRDF (SEQ ID NO: 50)	HLA-A*24:02
		MLAPFMAQC (SEQ ID NO: 51)	HLA-A*02:01
11	YVAQNGIPLRI KDWPILVEAI DGRPIASGPV VHETHDL	RIKDWPILV (SEQ ID NO: 52)	HLA-A*02:01
		AQNGIPLRIK (SEQ ID NO: 53)	HLA-A*11:01
12	QVQKLTEENT TLREQVEPTP EDEDDDI	KLTEENTTL (SEQ ID NO: 54)	HLA-A*02:01
		LTEENTTLR (SEQ ID NO: 55)	HLA-A*33:03
		KLTEENTTLR	HLA-A*11:01

		(SEQ ID NO: 56)	
13	YVAQNGIPLRI KDWPILVEAID GRPIASGPVV HETHDL	ALIGQCIHI (SEQ ID NO: 57)	HLA-A*02:01
[0081] 14	VRWLSTHDPN ITWSTRSIVFD SEYCRYHCRM YSPIPPSLPP	MYSPIPPSL (SEQ ID NO: 58)	HLA-A*24:02
		RMYSPIPPSL (SEQ ID NO: 59)	HLA-A*24:02
		IVFDSEYCR (SEQ ID NO: 60)	HLA-A*33:03
		TWSTRSIVF (SEQ ID NO: 61)	HLA-A*24:02
		RMYSPIPPSL (SEQ ID NO: 62)	HLA-A*02:01
		SIVFDSEYCR (SEQ ID NO: 63)	HLA-A*33:03

[0082] 三、重组gp96蛋白-多肽复合物的制备与鉴定

[0083] 重组gp96蛋白的表达与制备见文献(Liu W,Chen M,Li X,Zhao B,Hou J,Zheng H,Qiu L,Li Z,Meng S.Interaction of Toll-Like Receptors with the Molecular Chaperone Gp96 Is Essential for Its Activation of Cytotoxic T Lymphocyte Response.PLoS One.2016 May 16;11(5):e0155202.doi:10.1371/journal.pone.0155202.PMID:27183126;PMCID:PMC4868323.)。分别化学合成表1所示的多肽1-14,用DMSO配制成浓度20mg/mL的多肽溶液,或按等质量比例混合,用DMSO配制成浓度20mg/mL的多肽混合溶液,混合多肽按照全部多肽的质量计算。将多肽与热休克蛋白gp96按照质量比1:1,用pH7.4 0.01mol/L PBS缓冲液溶解至总体积4mL,在20℃或4℃下放置30分钟,或于55℃热激(作用是使多肽与gp96蛋白结合)10分钟,在室温冷却30分钟,最后用50kD超滤管洗去未结合的多肽,即得gp96-多肽复合物,分别是:

[0084] 重组gp96-肽1复合物、重组gp96-肽2复合物、重组gp96-肽3复合物、重组gp96-肽4复合物、重组gp96-肽5复合物、重组gp96-肽6复合物、重组gp96-肽7复合物、重组gp96-肽8复合物、重组gp96-肽9复合物、重组gp96-肽10复合物、重组gp96-肽11复合物、重组gp96-肽12复合物、重组gp96-肽13复合物、重组gp96-肽14复合物、重组gp96-多肽库复合物。其中重组gp96-多肽库复合物中的多肽库是肽1至肽14按照等质量比混合。

[0085] 热激可以让gp96短暂的出现构象的变化,能够与多肽结合形成gp96-多肽复合物。对制备的上述15种gp96-多肽复合物进行鉴定:首先通过超滤去除未结合的多肽,然后通过上述酸洗脱的方法分离gp96结合的多肽,通过液质联用的方法对结合的多肽进行鉴定,结

果证明利用上述热激的方法得到的产物为gp96-多肽复合物,而非gp96与多肽的混合物。

[0086] 实施例2:制备的gp96-多肽复合物致敏DC诱导小鼠特异性CTL细胞活性的评价及对于肝癌靶细胞杀伤效应

[0087] 一、小鼠骨髓来源DC (BMDC) 的培养

[0088] (1) 分别将HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11和HLA-A33小鼠用颈椎脱颈的方法处死,手术取出所有股骨和胫骨,去除毛皮后先用剪刀剪去多余的肌肉。

[0089] (2) 无菌剪刀剪去股骨两端,用注射器抽取PBS冲洗骨髓腔,将骨髓里的细胞冲入PBS中,直至骨完全变白。

[0090] (3) 将冲洗出的细胞装入15mL离心管,2000转离心10min。

[0091] (4) 收集骨髓悬液,用200目尼龙滤网进行过滤碎片和肌肉组织

[0092] (5) 按照1:1000的比例加入GM-CSF细胞因子进行分化(使用浓度为10ng/mL)。

[0093] (6) 放入37℃,含有5%CO₂的培养箱中进行培养。

[0094] (7) 培养两天后,换液并加入10mL新鲜的含10%胎牛血清的RPMI 1640,再加入GM-CSF细胞因子到培养皿中,GM-CSF的浓度为10ng/mL,继续在含有5%CO₂的37℃培养箱中进行培养。

[0095] (8) 第6天时,再进行一次换液。

[0096] (9) 第7天时,细胞分化完全,将培养皿轻轻晃匀,吸出上清,1500rpm离心5min,弃去上清,加入新鲜培养基将细胞沉淀充分重悬,计数,将细胞调至100万/mL。

[0097] 二、多肽-gp96复合物致敏的BMDC疫苗的制备(如果是人用疫苗,可分离人PBMC,诱导DC细胞,用于疫苗制备)

[0098] (1) 将培养至第7天的BMDC细胞取出,PBS洗涤两遍,计数。

[0099] (2) 将BMDC重悬为200万/mL的浓度。

[0100] (3) 将BMDC分配至2mL细胞冻存管中,每管加入1mL,共200万BMDC细胞。

[0101] (4) 于每管中分别加入不同的抗原:人胎盘gp96、重组gp96-多肽复合物和单独重组gp96蛋白。使热休克蛋白gp96的终浓度为100μg/mL(按照gp96蛋白计算)。

[0102] (5) 于37℃,含有5%CO₂的温箱中培养4小时。

[0103] (6) 将冻存管于4℃,1500rpm离心5分钟,弃去上清。

[0104] (7) 再加入PBS重悬,4℃,1500rpm离心5分钟,弃去上清。

[0105] (8) 于细胞沉淀中加入1mL无血清的RPMI 1640,吹匀细胞沉淀,准备免疫小鼠。

[0106] 三、小鼠免疫程序

[0107] 1、将6-8周的HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11和HLA-A33四种转基因小鼠各分为17组(每组10只),分别于第0天、第7天、第21天腹部皮下免疫:重组gp96-单独多肽复合物(重组gp96分别与肽1至肽14的复合物),重组gp96-多肽库复合物或人胎盘来源的gp96(实为gp96与多肽的复合物),以单独重组gp96疫苗作为阴性对照。每只小鼠免疫100μg蛋白(按照gp96蛋白计算)。

[0108] 2、将6-8周的HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11和HLA-A33四种转基因小鼠各分为17组(每组10只),分别于第0天、第7天、第21天腹部皮下免疫:重组gp96-单独多肽复合物活化的BMDC疫苗(重组gp96分别与肽1至肽14的复合物),重组gp96-多肽库复合物活化的BMDC疫苗或人胎盘来源的gp96活化的BMDC疫苗,以单独重组gp96活化的BMDC疫苗作为阴性对照。每

只小鼠免疫50万个BMDC细胞。

[0109] 四、多肽-gp96复合物致敏的BMDC免疫诱导产生HepG2、SK-HEP-1、Huh7和PLC/PRF/5细胞特异性的T细胞免疫反应

[0110] 最后一次免疫后一周处死小鼠，取小鼠脾脏分离制备小鼠脾脏淋巴细胞，用于本实施例后面的操作以及实施例3的操作。

[0111] 1、利用IFN- γ +ELISPOT检测淋巴细胞对多肽的免疫反应

[0112] 主要操作步骤如下：

[0113] (1) 预包被：用无菌PBS (pH 7.4) 稀释包被抗体至20mg/mL (1:200稀释)，将稀释好的包被抗体加入ELISPOT板中，每孔加入100 μ L，于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。以上操作应在超净台中进行。

[0114] (2) 封闭：弃去ELISPOT板中的包被液，用无菌PBS洗涤3次，每孔200 μ L。最后一次洗涤完后拍干，每孔加入200 μ L含10%血清的RPMI 1640培养基，室温孵育30分钟。

[0115] (3) 取适量小鼠淋巴细胞，用含10%血清的RPMI 1640培养基将其稀释为350万/mL的浓度。同时加入IL-2与anti-mouse CD28抗体，使其终浓度分别为20U/mL与1 μ g/mL。

[0116] (4) 将细胞分别加入各孔，每孔200 μ L，使得最终每孔中含有50万个细胞。分别以单独多肽片段作为刺激物，PMA与离子霉素进行刺激作为阳性对照。

[0117] (5) 置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的细胞培养箱中培养24小时。

[0118] (6) 培养结束后，取出ELISPOT板，弃掉细胞及培养基，拍干。

[0119] (7) 每孔加入200 μ L预冷的去离子水，放置3分钟，弃去，再重复一次，拍干。

[0120] (8) 每孔加入200 μ L的PBST，放置3分钟，弃去。共洗涤5次，最后一次在吸水纸上拍干。

[0121] (9) 用PBS配制生物素标记的anti-IFN- γ 单抗，1:200稀释。每孔加入100 μ L，室温孵育2小时。

[0122] (10) 弃去抗体，每孔加入200 μ L的PBST，放置3分钟，弃去。共洗涤5次，最后一次在吸水纸上拍干。

[0123] (11) 用PBS配制亲和素标记的HRP，1:100稀释。每孔加入100 μ L，室温孵育1小时。

[0124] (12) 弃去液体，每孔加入200 μ L的PBST，放置3分钟，弃去。共洗涤5次，再用PBS洗涤两次，最后一次在吸水纸上拍干。

[0125] (13) 配制AEC底物，加入ELISPOT板中，每孔100 μ L。

[0126] (14) 室温放置10分钟显色。

[0127] (15) 待斑点显色到适合的大小之后，用去离子水洗涤3遍，终止显色反应。再将板倒扣在吸水纸上，拍干细小的水珠，正面放在通风的地方，室温自然晾干。

[0128] (16) 用图像自动分析仪对ELISPOT板斑点计数，并记录斑点的各种参数，进行统计分析。

[0129] 实验结果见图2A至图2D、图3A至图3D。结果显示，胎盘提取的gp96和重组gp96-多肽复合物免疫或其致敏的DC疫苗均能活化多肽特异性T细胞，而单独重组gp96蛋白不能活化特异性T细胞。

[0130] 2、使用**CytoTox96[®]**非放射性细胞毒性检测 (Promega, 目录号G1780) 进行细胞毒活性检测，主要步骤如下 (更具体的操作请详见试剂盒使用说明书)：

[0131] (1) 分别以HepG2细胞作为靶细胞,接种靶细胞数目为 5×10^3 /孔,按照效靶比5:1、10:1和20:1的比例加入上述淋巴细胞作为效应细胞,效应细胞以 $50 \mu\text{l}$ /孔接种于96孔培养板中,终体积 $100 \mu\text{l}$;

[0132] 此外另设效应细胞自发LDH(乳酸脱氢酶)释放组,用来校准效应细胞自发释放出来的LDH(各组效应细胞以 $50 \mu\text{l}$ /孔加入96孔板,补充 $50 \mu\text{l}$ 含5%胎牛血清的RPMI-1640培养基至终体积 $100 \mu\text{l}$)。靶细胞自发LDH释放组,用来校正靶细胞自发释放出来的LDH(各组靶细胞以 $50 \mu\text{l}$ /孔加入96孔板,补充 $50 \mu\text{l}$ 含5%胎牛血清的RPMI-1640培养基至终浓度 $100 \mu\text{l}$)。靶细胞最大LDH释放组,用来计算时作为确定100%的LDH释放的参照(细胞上样同靶细胞自发释放组)。体积校正对照组,用来校正由于加入裂解液引起的体积变化(加入含5%胎牛血清的RPMI-1640培养基 $100 \mu\text{l}$)。培养基背景对照组,用来校正由培养基中血清产生的LDH活性以及酚红造成的背景吸收(加入含5%胎牛血清的RPMI-1640培养基 $100 \mu\text{l}$)。

[0133] (2) 细胞接种后,使用250g离心4min,接着于 37°C 培养箱中孵育4h;在收获上清前45min,向靶细胞最大LDH释放组中加入裂解液($10 \times$), $10 \mu\text{l}$ /孔;接着使用250g离心4min,收获上清;

[0134] (3) 转移 $50 \mu\text{l}$ 上清至酶标板中,用检测缓冲液配制底物,将配好的底物 $50 \mu\text{l}$ /孔加到酶标板中,盖好平板,室温避光反应30min,向每空加入 $50 \mu\text{l}$ 终止液,1h内于酶标仪检测490nm吸光值OD。

[0135] (4) 计算细胞杀伤率

[0136] 杀伤率(%) = $[(\text{实验组OD值} - \text{效应细胞自发释放组OD值} - \text{靶细胞自发释放组OD值}) / (\text{靶细胞最大释放组OD值} - \text{靶细胞自发释放组OD值})] \times 100\%$

[0137] 实验结果如图4A至图4D所示。结果显示,在效靶比为10:1的条件下,重组gp96-多肽复合物和胎盘来源的gp96致敏的DC疫苗活化的CTL对HepG2、SK-HEP-1、Huh-7和PLC/PRF/5细胞都具有明显的杀伤作用,而以单独重组gp96“致敏”的DC疫苗免疫基本没有杀伤活性。

[0138] 实施例3:多肽-gp96复合物致敏的DC活化的特异性CTL对肝癌的治疗作用

[0139] 取30只6-8周的雌性裸鼠,小鼠皮下接种 5×10^6 HEPG2肝癌细胞(HLA-A2限制型细胞系);肿瘤接种后第2天将小鼠分成3组,每组10只,分别进行如下处理:

[0140] 第一组:尾静脉回输胎盘gp96诱导的DC疫苗免疫活化的HLA-A2小鼠T淋巴细胞,第2、3、4天回输(每次0.5ml),单次回输剂量为 10^7 /只;

[0141] 第二组:尾静脉回输重组gp96-多肽库复合物诱导的DC疫苗免疫活化的HLA-A2小鼠T淋巴细胞,第2、3、4天回输(每次0.5ml),单次回输剂量为 10^7 /只;

[0142] 第三组:尾静脉回输重组gp96单独诱导的DC疫苗免疫活化的HLA-A2小鼠的淋巴细胞,第2、3、4天回输(每次0.5ml),单次回输剂量为 10^7 /只;

[0143] 其它三种肝癌细胞SK-HEP-1(HLA-A24限制型细胞系)、Huh-7(Huh-7细胞为HLA-A11限制型细胞系)和PLC/PRF/5(PLC/PRF/5为HLA-A33限制型细胞系)同上述接种及尾静脉回输方案。

[0144] 以上12组中:接种肿瘤细胞后第2、3、4天回输。从第一天回输开始,每天观察肿瘤生长情况,记录肿瘤大小,按以下公式计算肿瘤体积: $V = ab^2/2$ (V—体积,a—肿瘤长径,b—肿瘤短径)。

[0145] 肿瘤体积变化见图5A至图5D。

[0146] 结果显示,多肽库-重组gp96复合物致敏的DC疫苗活化的CTL均能够明显地抑制肝肿瘤的生长,与胎盘gp96致敏的DC疫苗效果无显著性差异。

[0147] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

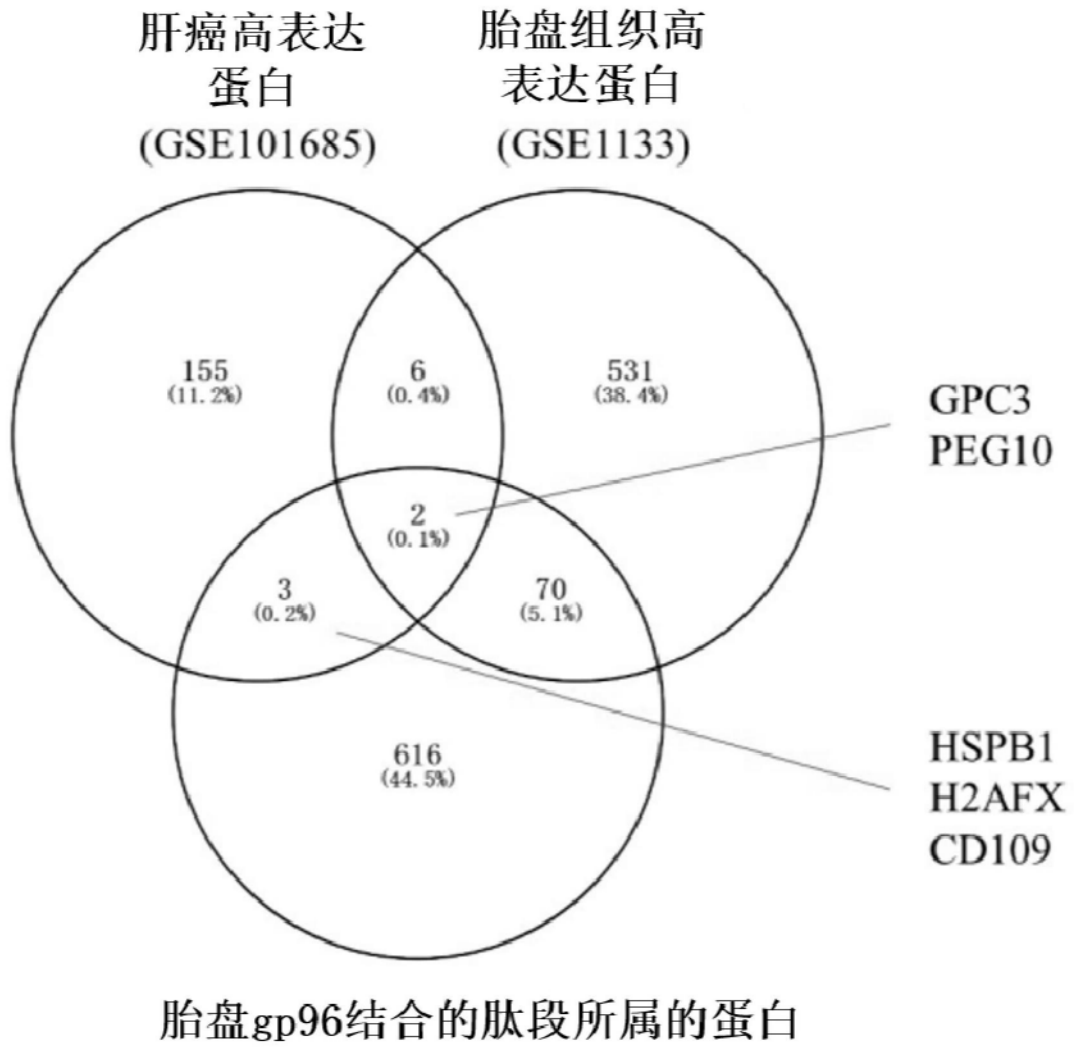


图1

HLA-A2

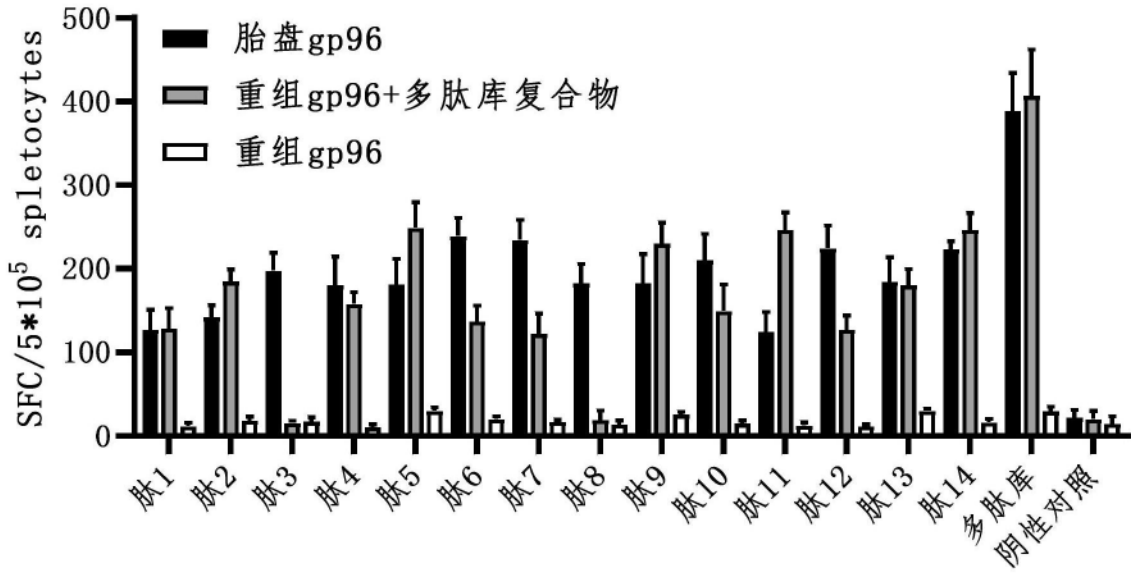


图2A

HLA-A24

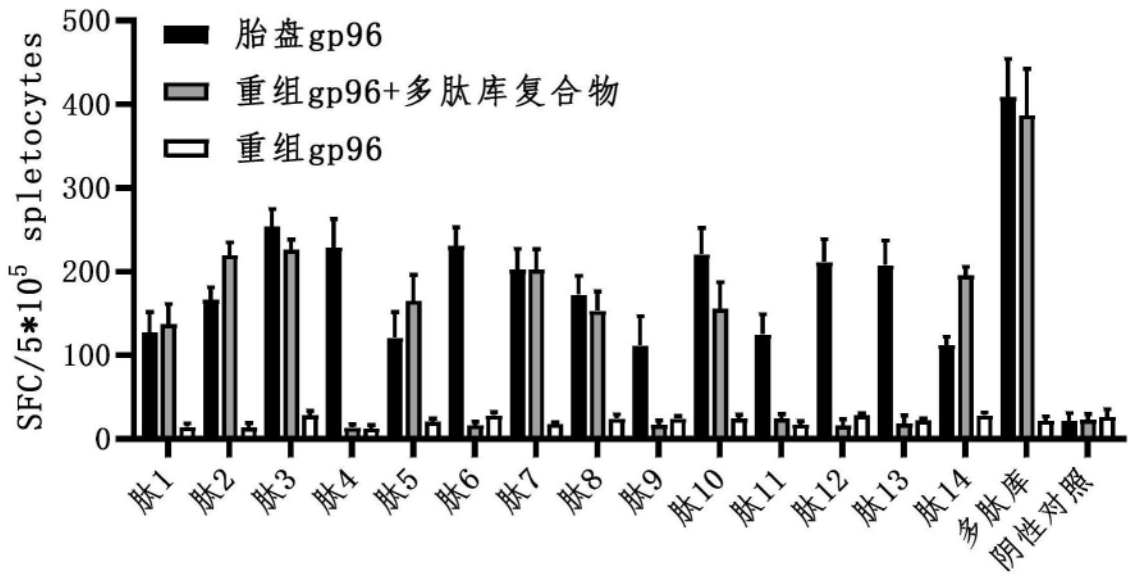


图2B

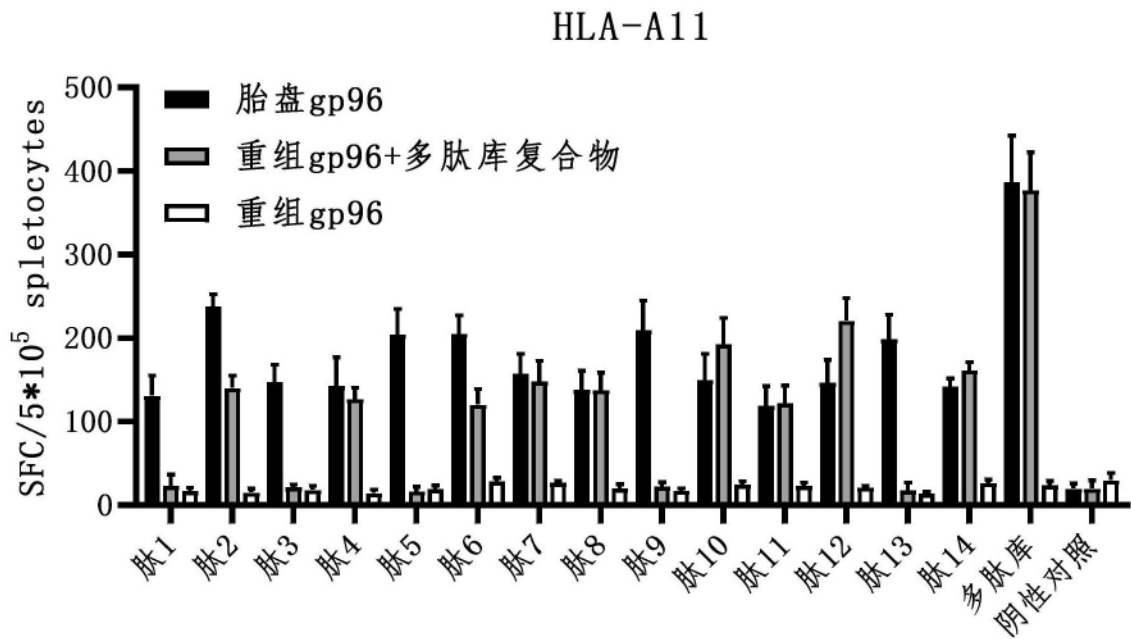


图2C

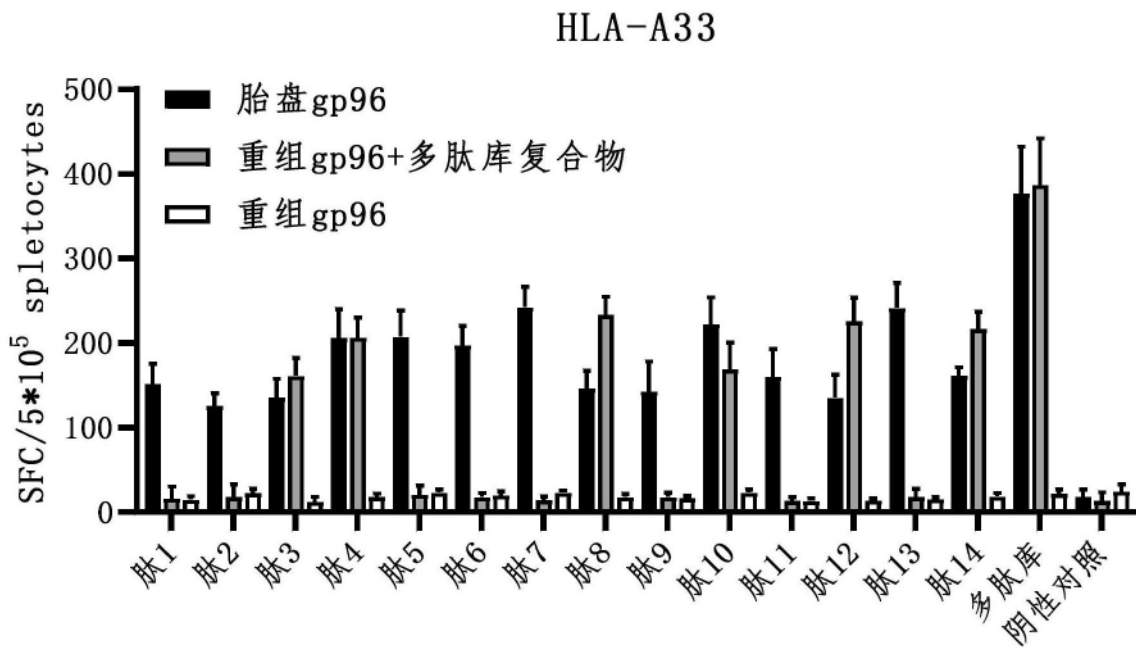


图2D

HLA-A2

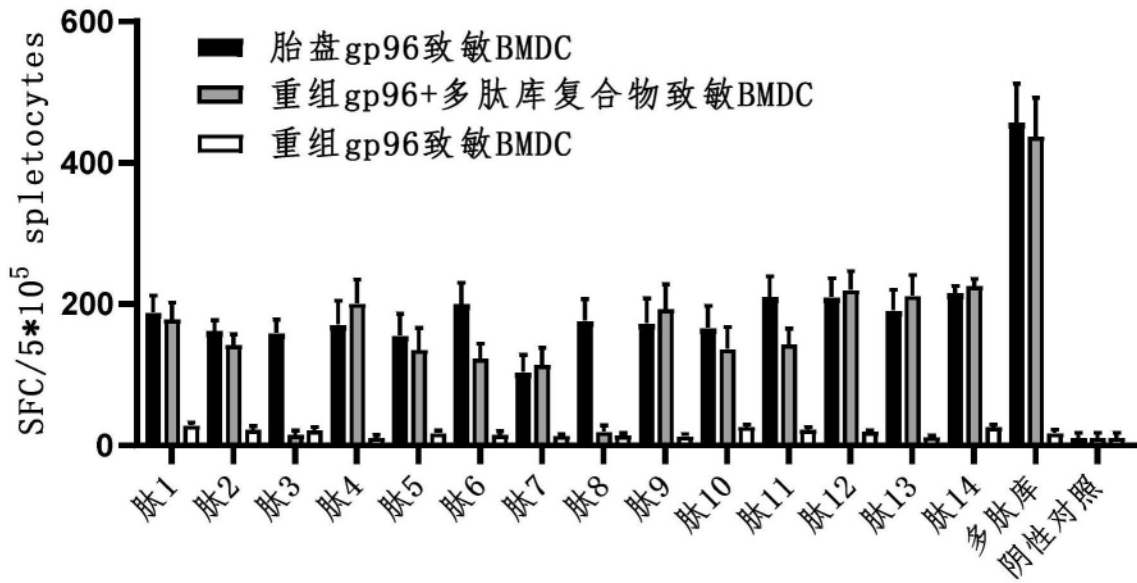


图3A

HLA-A24

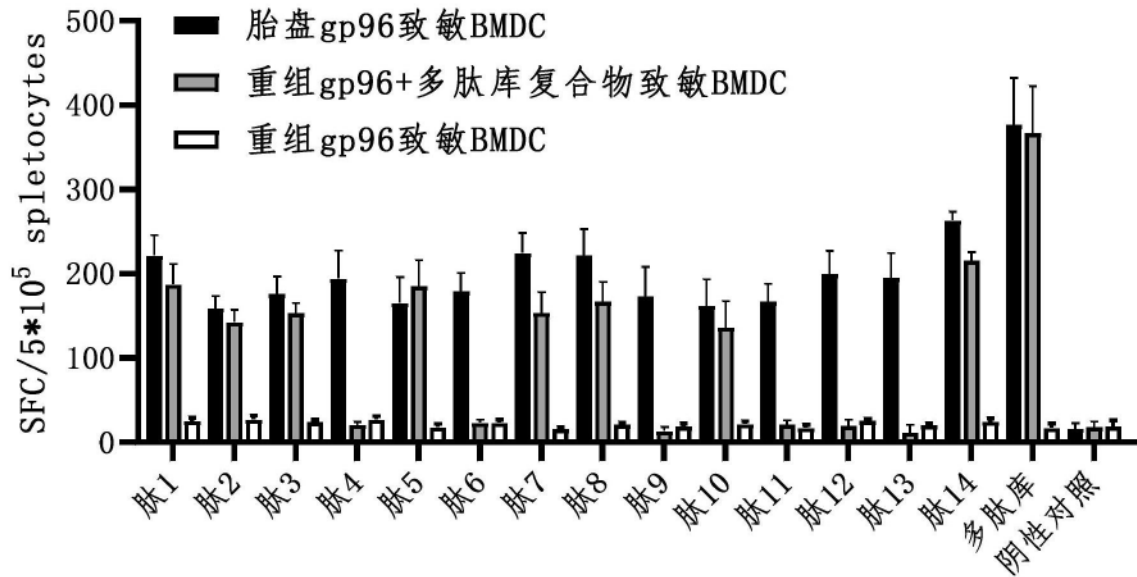


图3B

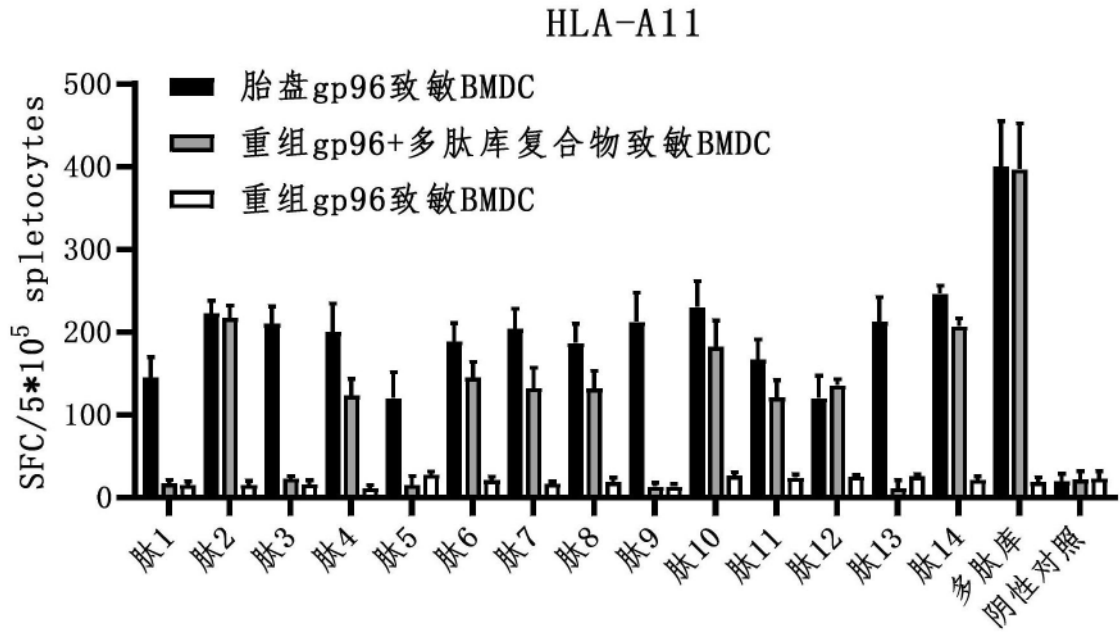


图3C

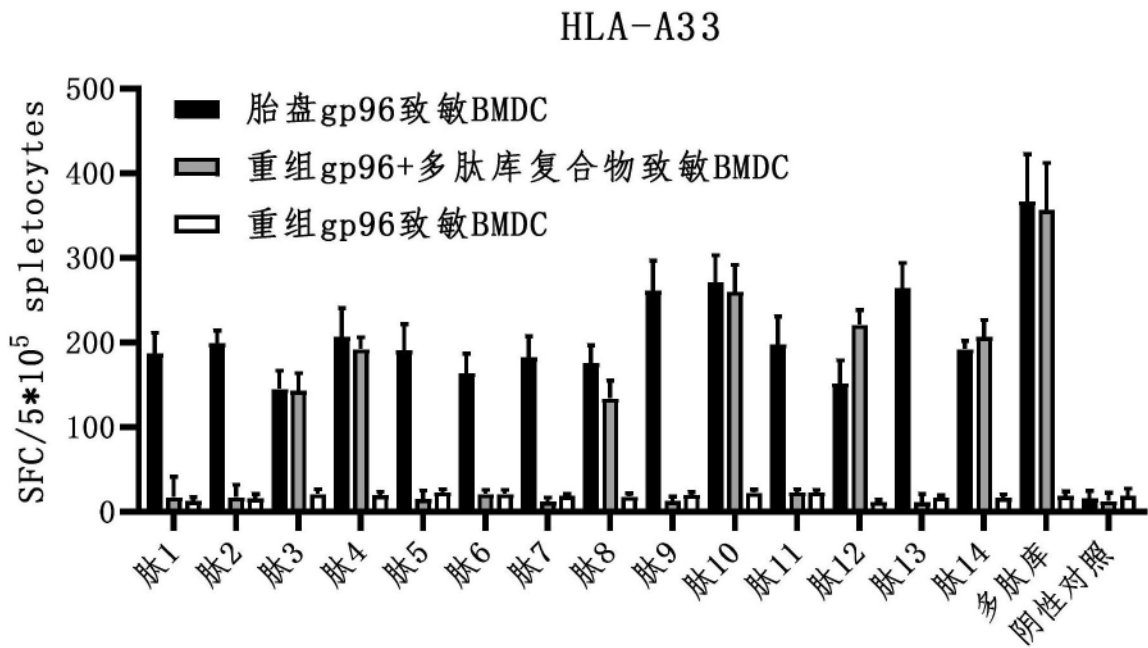


图3D

HepG-2

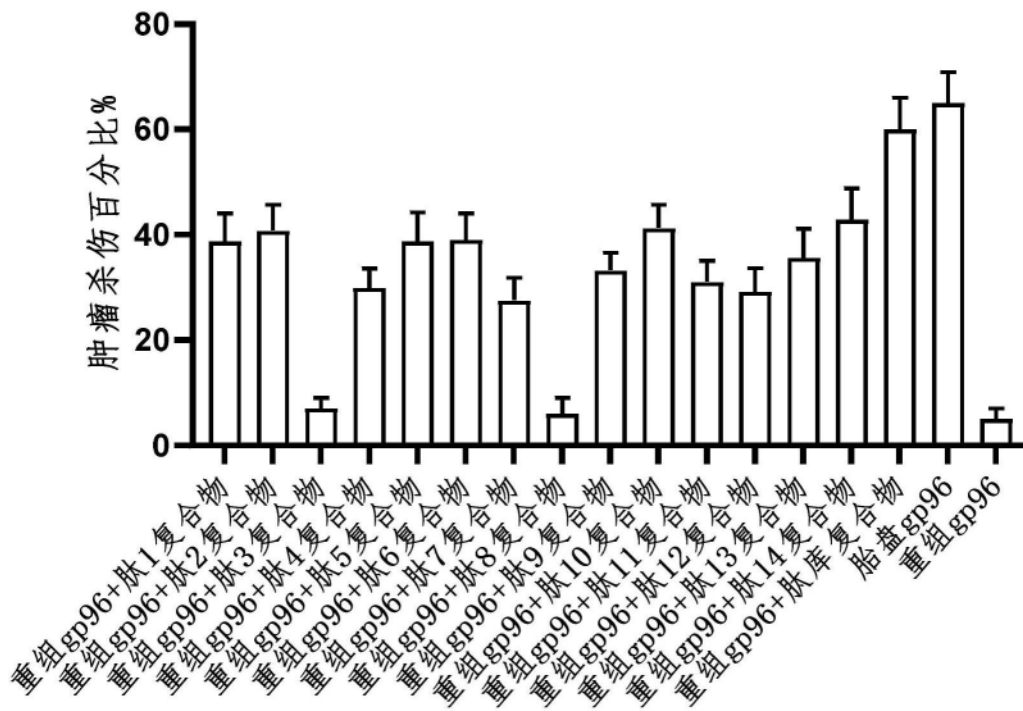


图4A

SK-HEP-1

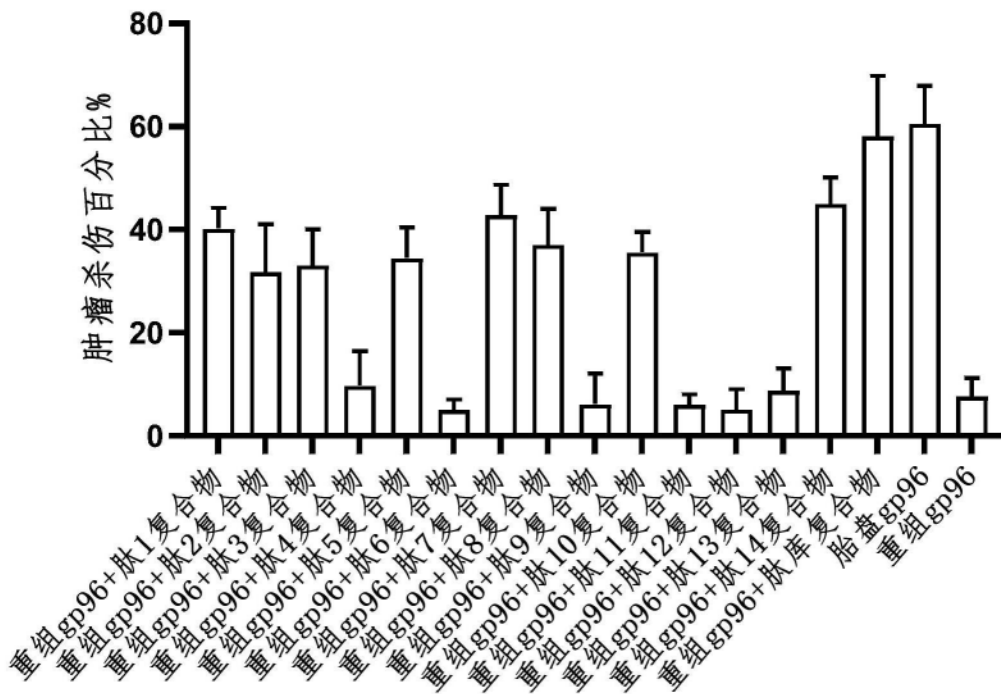


图4B

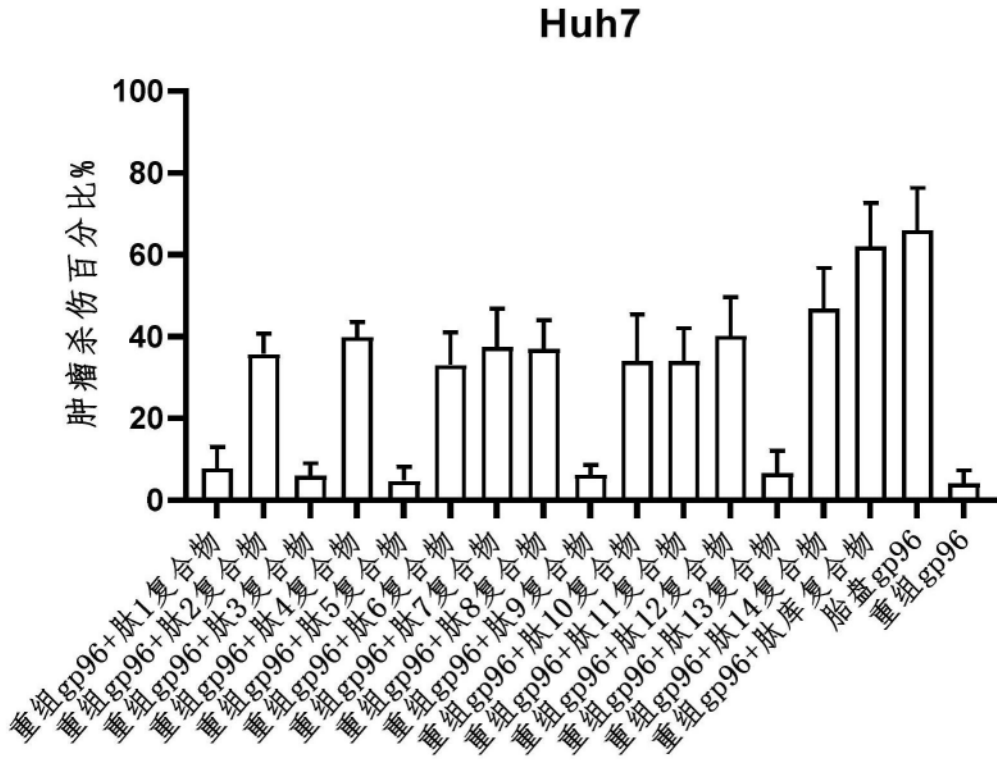


图4C

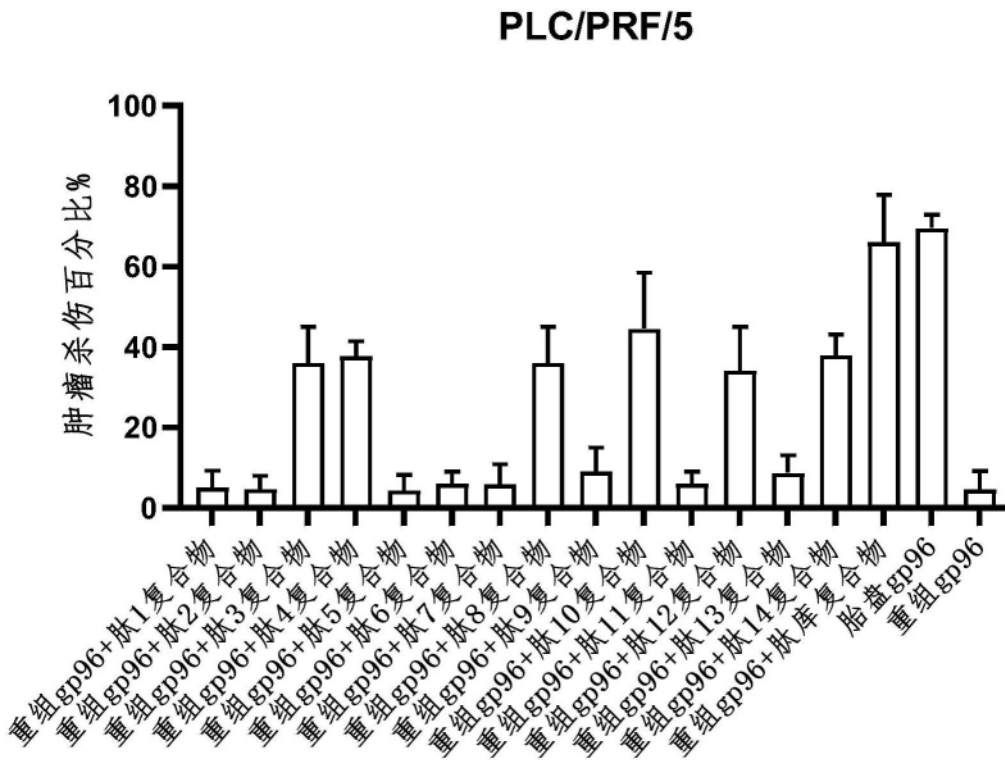


图4D

HEPG2细胞系

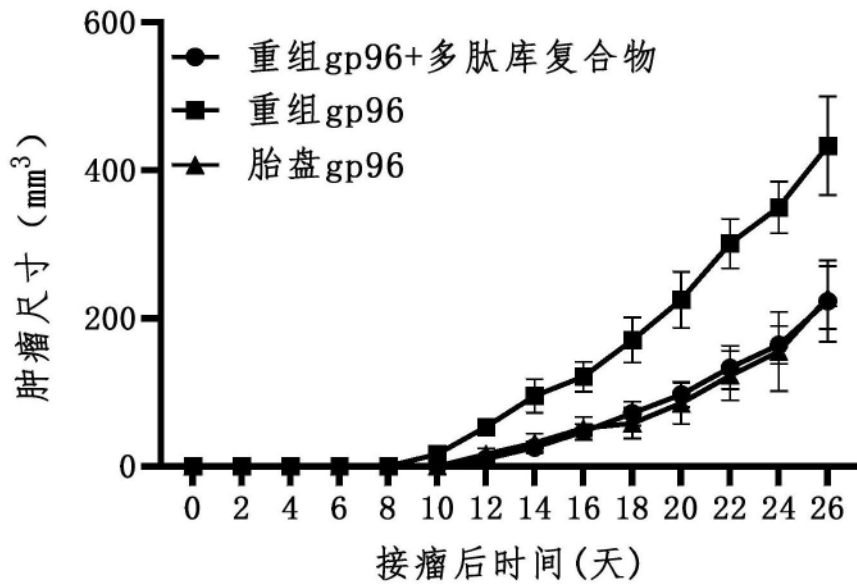


图5A

SK-HEP-1细胞系

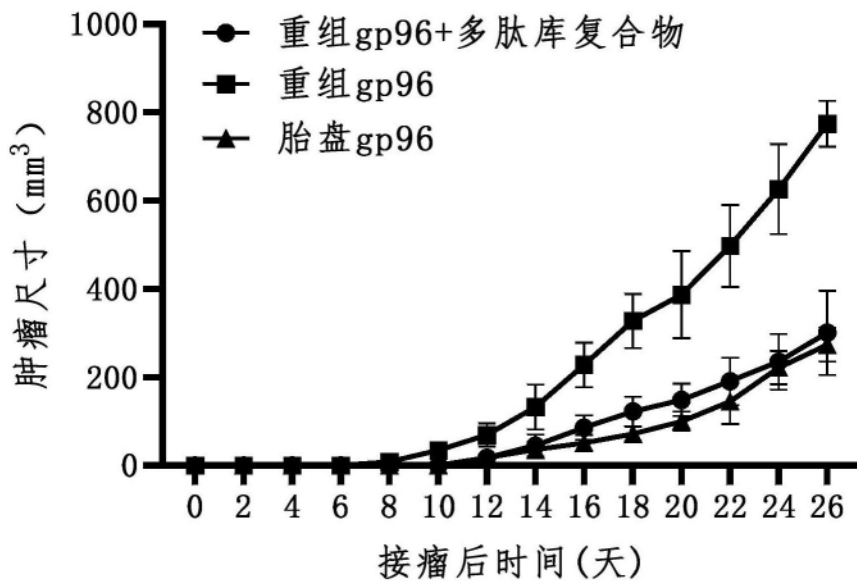


图5B

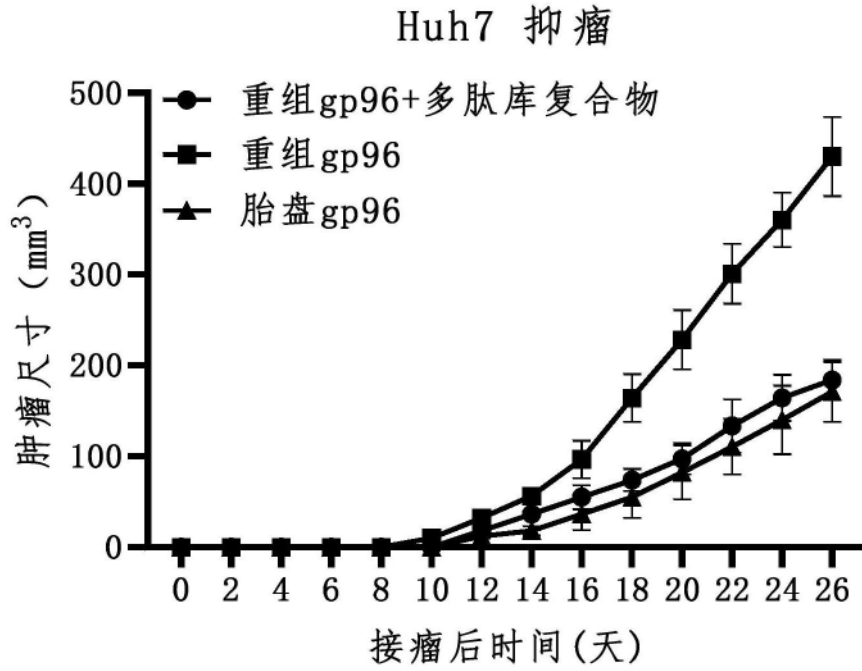


图5C

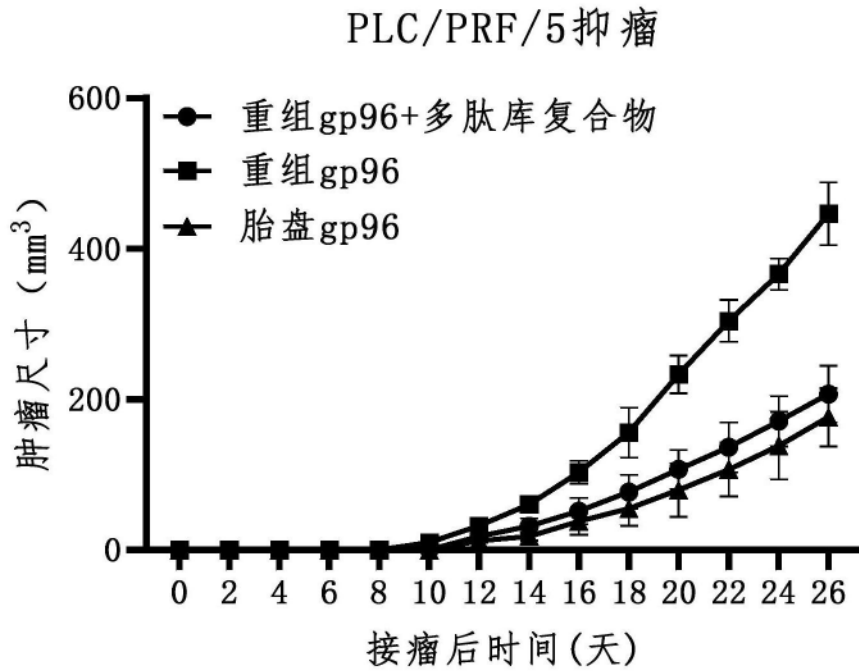


图5D