



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114650838 B

(45) 授权公告日 2024.05.17

(21) 申请号 201980102074.7

(22) 申请日 2019.11.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114650838 A

(43) 申请公布日 2022.06.21

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2019/116163 2019.11.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/087838 ZH 2021.05.14

(73) 专利权人 深圳吉诺因生物科技有限公司
地址 518083 广东省深圳市盐田区盐田街
道北山工业区综合楼5楼

(72) 发明人 李波 邱思 李佑平 张乐

(74) 专利代理机构 北京知帆远景知识产权代理
有限公司 11890
专利代理师 肖阳

(51) Int.Cl.
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 108434440 A, 2018.08.24
CN 109069604 A, 2018.12.21
CN 109310739 A, 2019.02.05
US 2019290686 A1, 2019.09.26

审查员 吕小蒙

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

肿瘤特异性多肽序列及其应用

(57) 摘要

提供了一种肿瘤特异性多肽序列及其应用, 该多肽包括第一肽组中的至少任意一种多肽, 还可选择性包括第二肽组中的至少任意一种多肽; 第一肽组包括具有SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示序列的多肽; 第二肽组包括SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示序列的衍生肽, 衍生肽包括依次相连的前肽段, 中肽段和后肽段, 中肽段与SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示序列具有至少80%以上的同源性, 前后肽段的长度之和为17~19个氨基酸。还提供了核酸, 构建体, 表达载体, 药物组合物, 抗原呈递细胞, 免疫效应细胞, 肿瘤疫苗, 以及多肽在制备预防或者治疗肿瘤的药物中的用途和治疗肿瘤患者的方法。

1. 一组分离的多肽,其特征在于,所述多肽包括第一肽组,还可选择性包括第二肽组;所述第一肽组为:
如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽;或者
如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽,以及如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的至少一种多肽;
所述第二肽组包括SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的衍生肽,所述衍生肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。
2. 根据权利要求1所述的多肽,其特征在于,所述多肽选自下列中的至少一组:
 - (1) 如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽,以及如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的至少一种多肽;
 - (2) 如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽,以及如SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的至少一种多肽。
3. 一种分离的核酸,其特征在于,所述核酸编码权利要求1~2中任一项所述的多肽或者为其互补序列。
4. 一种构建体,其特征在于,所述构建体包括权利要求3所述的核酸和控制序列,所述控制序列与所述核酸可操作地连接。
5. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体包括权利要求4所述的构建体。
6. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞携带有权利要求4所述的构建体或者权利要求5所述的表达载体。
7. 权利要求1~2中任一项所述的多肽在制备预防或者治疗肺癌的药物或者在制备诊断肺癌的试剂盒中的用途。
8. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括权利要求1~2中任一项所述的多肽和药学上可用的辅料。
9. 一种抗原呈递细胞,其特征在于,所述抗原呈递细胞呈递权利要求1~2中任一项所述的多肽。
10. 一种免疫效应细胞,其特征在于,所述免疫效应细胞可识别权利要求1~2中任一项所述的多肽或者识别权利要求9所述的抗原呈递细胞。
11. 一种肿瘤疫苗,其特征在于,所述肿瘤疫苗包括权利要求1~2中任一项所述的多肽,或者权利要求3所述的核酸,或者权利要求4所述的构建体,或者权利要求5所述的表达载体,或者权利要求6所述的宿主细胞,或者权利要求9所述的抗原呈递细胞,或者权利要求10所述的免疫效应细胞。

肿瘤特异性多肽序列及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,尤其涉及一种肿瘤特异性多肽序列及其应用,具体涉及一组分离的多肽,分离的核酸,构建体,表达载体,宿主细胞,药物组合物,抗原呈递细胞,免疫效应细胞,肿瘤疫苗,以及多肽在制备预防或者治疗肿瘤的药物中的用途和治疗肿瘤患者的方法。

背景技术

[0002] 癌症作为细胞内基因突变导致细胞增殖失控的一种疾病,目前已成为人类健康的重大威胁,是导致人类死亡的一个主要原因。国家癌症中心发布的《2015年中国恶性肿瘤流行情况分析》指出,2015年中国恶性肿瘤发病约392.9万人,死亡约233.8万人。癌症负担呈持续上升态势,近10多年来,恶性肿瘤发病率每年保持约3.9%的增幅,死亡率每年保持2.5%的增幅。其中,占主要的高发恶性肿瘤依次为肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、乳腺癌和食管癌等。因此,寻找高效特异的癌症治疗方法具有重大的临床价值。

[0003] 免疫疗法通过调动机体的免疫系统,增强肿瘤微环境抗肿瘤免疫力,从而达到控制和杀伤肿瘤细胞的目的,具有效率高、特异性强、耐受性好的优点,在肿瘤治疗中具有广阔的前景。免疫疗法主要包括细胞因子疗法、免疫检验点单抗、过继细胞回输、肿瘤免疫治疗疫苗等。其中,肿瘤免疫治疗疫苗主要包括肿瘤细胞疫苗、树突状细胞疫苗、蛋白&多肽疫苗、核酸疫苗、基因工程疫苗和抗独特型抗体疫苗,这些疫苗能够杀伤肿瘤的主要机制是通过引起患者针对于肿瘤的免疫反应,使得T细胞识别肿瘤细胞,进而杀伤肿瘤细胞。

[0004] 肿瘤免疫治疗疫苗靶向的肿瘤抗原,包括肿瘤相关抗原以及肿瘤新抗原(neoantigen)。肿瘤相关抗原来源于肿瘤组织中高表达,而在正常组织中低表达或者不表达的蛋白;而肿瘤新抗原来源于肿瘤基因组突变产生的变异蛋白。因为肿瘤新抗原只存在于肿瘤细胞中而不存在于正常细胞中,所以新抗原能绕过中枢免疫耐受而引起强的T细胞免疫反应,具有效果好的特点;同时,肿瘤特异性的特点使得肿瘤新抗原具有安全性好、副作用小的优点。然而合适的肿瘤免疫治疗疫苗靶向的肿瘤新抗原还有待于进一步改进。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出一种肿瘤特异性多肽序列及其应用,具体涉及一组分离的多肽,分离的核酸,构建体,表达载体,宿主细胞,药物组合物,抗原呈递细胞,免疫效应细胞,肿瘤疫苗,以及多肽在制备预防或者治疗肿瘤的药物中的用途和治疗肿瘤患者的方法。

[0006] 在对病人进行肿瘤免疫治疗时,常采用几种方案:1、通过使用在病人肿瘤中高表达的肿瘤相关抗原对病人进行治疗,这种治疗方式可能会由于肿瘤相关抗原在一些正常组织中也存在表达,免疫原性低从而使得效果差。2、使用在部分病人中已经经实验鉴定得到的肿瘤相关抗原或者肿瘤新抗原进行治疗。但是肿瘤突变具有病人特异性,而绝大部分肿瘤突变不会在多个病人中重复出现,因此在部分病人中鉴定的肿瘤特异性抗原,如果未经

过在大量肿瘤病人人群中的出现频率验证,在新病人中可以重复使用的概率较低,从而使得利用这些肿瘤新抗原能够治疗的病人数量少。3、针对每一位病人进行个体化的肿瘤新抗原筛选,例如可以通过对其基因组和转录组的测序数据进行分析得到该病人的肿瘤特异性突变以及这些突变可能产生的变异肽段,再通过机器学习算法预测哪些变异肽段可能被MHC分子呈递成为抗原,再将这些预测的肿瘤新抗原用于病人的治疗。基于测序的个体化的肿瘤新抗原筛选方案,虽然可以通过对某个病人进行基因组和转录组测序,通过测序数据分析和算法预测抗原筛选出对某位病人进行治疗的肿瘤新抗原,但是整个过程成本高,时间长,且由于目前抗原预测算法的准确性不高,筛选出的抗原假阳性较高,部分预测出的抗原不能有效引起病人机体内的免疫反应,因此导致病人的疗效不佳。4、结合上述各方案,即利用已鉴定的肿瘤相关抗原和肿瘤新抗原集合,联合个体化的肿瘤新抗原筛选方案。例如使用方案1或方案2中的已知抗原对病人进行第一阶段的治疗,同时参照方案3对病人进行个体化抗原筛选,再使用该筛选获得的抗原进行病人第二阶段的治疗。该方案虽然可以弥补个体化肿瘤新抗原筛选时间长的问题,但是由于还涉及到个体化的肿瘤新抗原筛选方案,治疗成本仍无法降低。

[0007] 本发明通过大量的数据分析和实验筛选,发现了在多种癌症中重复出现的高频突变基因PIK3CA(野生型PIK3CA基因PI3Ks的催化亚单位,PI3Ks是一种脂激酶家族,能特异性磷酸化磷脂酰肌醇的3位羟基,产生第二信使肌醇类物质),该高频突变基因导致其编码1047位点的氨基酸由组氨酸(H)变化为精氨酸(R)。该突变多肽能在肿瘤组织中特异性高表达。本发明通过实验验证了该突变多肽与HLA-A11:01亚型分子的高亲和力以及在肿瘤细胞中的呈递情况。进一步的,本发明对该突变多肽进行序列改进,通过大量的实验筛选出能和原突变多肽被同样的T细胞识别,但是激活T细胞和诱导诱导抗原特异性T细胞杀伤肿瘤能力更强的变形多肽。

[0008] 具体而言,本发明提供了如下技术方案:

[0009] 在本发明的第一方面,所述多肽包括第一肽组中的至少任意一种多肽,还可选择性包括第二肽组中的至少任意一种多肽;所述第一肽组包括具有SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的多肽;所述第二肽组包括SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的衍生肽,所述衍生肽包括依次相连的前肽段,中肽段和后肽段,所述中肽段与所述SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列具有至少80%以上的同源性,所述前肽段和所述后肽段的长度之和为17~19个氨基酸。

[0010] 本发明提出的多肽序列,作为肿瘤新抗原多肽序列,是由肿瘤基因突变所产生的肿瘤特异性抗原及其变体,不会在正常组织中表达和呈递,因此克服了使用肿瘤相关抗原治疗安全性低的问题。同时,本发明提出的多肽序列来自多种癌症中高频突变的基因,并可由人群中高频出现的HLA分子所呈递,因此可在多种癌症的病人肿瘤中重复出现,可覆盖目前已知的肿瘤新抗原序列无法覆盖的病人。

[0011] 根据本发明的实施例,以上所述的分离的多肽可以进一步包括如下技术特征:

[0012] 在本发明的一些实施例中,所述中肽段与所述SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列相同。

[0013] 在本发明的一些实施例中,所述衍生肽具有SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:8所示氨基酸序列。

[0014] 在本发明的一些实施例中,所述多肽选自下列中的至少一组:

[0015] (1) 具有SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的至少两种多肽;

[0016] (2) 具有SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的至少一种多肽,以及SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的至少一种多肽。

[0017] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种分离的核酸,根据本发明的实施例,所述核酸编码上述多肽或者为其互补序列。如前所述,上述多肽能被和其具有亲和力的HLA分子作为抗原呈递于肿瘤细胞表面,并且具备激活T细胞并指引这些T细胞杀伤肿瘤地能力,因此能够编码上述多肽的核酸序列或者编码上述多肽的核酸序列的互补序列可用于预防或治疗肿瘤。

[0018] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例,所述构建体包含本发明第二方面所述的核酸和控制序列,所述控制序列与所述编码序列可操作地连接。本发明实施例所提出的构建体可在适合条件下,在合适的宿主细胞中高效表达上述多肽,进而可有效用于对肿瘤的治疗或者预防。其中,所述控制序列可指导核酸在宿主中表达上述多肽,这些控制序列可以是一个或者多个。这些控制序列根据需要,可以是启动子、终止子、SD序列、用于调控基因表达的调节基因等等。

[0019] 在本发明的第四方面,本发明提出了一种表达载体。根据本发明的实施例,所述表达载体包含本发明第三方面所述的构建体。本发明实施例所述的表达载体可在合适条件下,在宿主中高效表达上述多肽,所述表达载体可有效用于对肿瘤的治疗或者预防。

[0020] 在本发明的第五方面,本发明提出了一种宿主细胞。根据本发明的实施例,所述宿主细胞携带本发明第三方面所述的构建体或者本发明第四方面所述的表达载体,宿主细胞可通过转染或者转化前述核酸构建体或者表达载体获得的。所述宿主细胞在合适条件下可高效表达上述多肽,所述宿主细胞可有效用于对肿瘤的治疗或者预防。

[0021] 在本发明的第六方面,本发明提出了上述多肽在制备预防或者治疗肿瘤的药物或者在制备诊断肿瘤的试剂盒中的用途。若肿瘤表达上述突变基因PIK3CA,该高频突变基因导致其编码1047位点的氨基酸由组氨酸(H)变化为精氨酸(R),以及表达与多肽具有亲和力的HLA分子,则根据本发明的实施例,上述多肽具有被和其具有亲和力的HLA分子作为抗原呈递于肿瘤细胞表面,激活T细胞并指引这些T细胞杀伤肿瘤的能力。因此,本发明实施例所提出的多肽可以用于预防和控制肿瘤。同时,如前所述,由于本发明提出的多肽特异性地表达于肿瘤细胞中,因此其用于治疗或预防肿瘤具有较好地安全性。也可以用于应用于制备诊断肿瘤的试剂盒中。

[0022] 在本发明的第七方面,本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例,所述药物组合物包括前面所述多肽以及药学上可用的辅料。包含前面所述多肽和辅料的药物组合物可显著刺激肿瘤特异性T细胞的增殖以及这些T细胞的细胞因子分泌,进而杀伤表达对应突变基因的肿瘤细胞,可用于对肿瘤的治疗或者预防。当然,所提供的药物组合物中还可以包括一些药学上可用的佐剂,这些佐剂作为非特异性免疫增强剂,当和前述多肽一起注射或者预先注入到机体中时,可以增强机体对多肽抗原的免疫应答或者改变免疫应答类型。可用的佐剂包括但不限于PD-1抑制剂。

[0023] 在本发明的第八方面,本发明提出了一种抗原呈递细胞。根据本发明的实施例,所述抗原呈递细胞可呈递前面所述的多肽。抗原呈递细胞可通过负载所述多肽、转染或者转

化前述核酸构建体或者表达载体,或吞噬前述宿主细胞等途径获得。根据本发明的实施例,呈递前述多肽的抗原呈递细胞显著刺激肿瘤特异性T细胞的增殖以及这些T细胞的细胞因子分泌,进而杀伤表达对应突变基因的肿瘤细胞,可用于对肿瘤的治疗或者预防。这些可用的抗原呈递细胞可以为树突状细胞、巨噬细胞、B细胞等。

[0024] 在本发明的第九方面,本发明提出了一种免疫效应细胞。根据本发明的实施例,所述免疫效应细胞可识别前面所述多肽或者识别本发明第八方面所述的抗原呈递细胞。所述免疫效应细胞可通过前述多肽或者前述抗原呈递细胞诱导得到。所述免疫效应细胞可特异性杀伤表达对应突变基因的肿瘤细胞,用于对肿瘤的治疗或者预防。这些可用的免疫效应细胞可以为T细胞、效应T细胞、NK细胞等。

[0025] 在本发明的第十方面,本发明提出了一种肿瘤疫苗。根据本发明的实施例,所述肿瘤疫苗包含前面所述的核酸,或前面所述的核酸构建体,或前面所述的表达载体,或前面所述的宿主细胞,或前面所述的抗原呈递细胞,或前面所述的免疫效应细胞。

[0026] 在本发明的第十一方面,本发明提供了一种治疗肿瘤患者的方法,该方法包括给予患者有效量的药物组合物或者有效量的肿瘤疫苗,所述药物组合物为本发明第七方面所述的药物组合物,所述肿瘤疫苗为本发明第十方面所述的肿瘤疫苗。其中,“有效量的”药物组合物指只要能够达到抑制肿瘤生长或者干预肿瘤增殖的目的即可。“有效量的”肿瘤疫苗,是指将这些肿瘤疫苗导入到患者体内,能够克服肿瘤引起的免疫抑制状态,激活患者自身的免疫系统,从而达到控制或者消除肿瘤的目的即可。

附图说明

[0027] 图1是根据本发明的实施例提供的突变多肽质谱鉴定结果图。

[0028] 图2是根据本发明的实施例提供的多肽与T2亲和力的流式验证结果图。

[0029] 图3是根据本发明的实施例提供的多肽与体外免疫原性ELISPOTs检测结果图。

[0030] 图4是根据本发明的实施例提供的多肽疫苗控制小鼠肿瘤生长的结果图。

[0031] 图5是根据本发明的实施例提供的多肽DC疫苗控制小鼠肿瘤生长的结果图。

[0032] 图6是根据本发明的实施例提供的DC-CTL疫苗控制小鼠肿瘤生长的结果图。

具体实施方式

[0033] 下面参考附图详细描述本发明的实施例,需要说明的是,这些实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0034] 同时,为了方便本领域技术人员的理解,对本发明的某些术语进行解释和说明,需要说明的是,这些解释和说明,仅用来帮助对于本发明技术方案的理解,而不应当看做是对本发明保护范围的限制。

[0035] 本文中,术语“第一肽组”或者“第二肽组”分别指包含有不同氨基酸序列的多肽。

[0036] 术语“衍生肽”用来表示由具有SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的多肽衍生的多肽序列,这些衍生的序列从N端到C端,依次包括相连的前肽段,中肽段和后肽段,其中中肽段与SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列具有至少80%以上的同源性,例如可以至少具有一个氨基酸不同,前肽段和后肽段的长度之和为17~19个氨基酸。对于前肽段和后肽段的氨基酸的具体类型可不作特殊限制。在至少一些实施方式中,这些衍

生肽可以为在SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示氨基酸序列往两侧延伸得到的总长度为26个氨基酸的长肽序列。在一些优选实施方式中,这些衍生肽可以是具有SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的多肽。

[0037] 在本发明的至少一些实施方式中,本发明所提供的分离的多肽选自下列中的至少一组:1)具有SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的多肽;(2)具有SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的至少任意一条多肽,以及SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的至少任意一条多肽。

[0038] 其中SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的多肽如下表1所示。

[0039] 表1多肽序列

SEQ ID	多肽序列	突变信息	SEQ ID	衍生肽序列
NO: 1	RAGGWTK	PIK3CA_H1047R	NO: 5	EALEYFMKQMNDARAGGWTKMDWIF
NO: 2	RHGGWTK	PIK3CA_H1047R	NO: 6	EALEYFMKQMNDARHGGWTKMDWIF
NO: 3	RSGGWTK	PIK3CA_H1047R	NO: 7	EALEYFMKQMNDARSGGWTKMDWIF
NO: 4	RVGGWTK	PIK3CA_H1047R	NO: 8	EALEYFMKQMNDARVGGWTKMDWIF

[0041] 这些多肽序列来源于肿瘤基因突变所产生的肿瘤特异性抗原,不会在正常组织中表达和呈递,因此其特异性更高,引起的免疫反应也是特异性更高,用于治疗安全性好,副作用小,且其结构简单、易于人工合成。同时,本发明提出的变形序列是经由对原始抗原序列进行改进和大量实验筛选得到,和原始肿瘤抗原相比,具备和HLA分子亲和能力、刺激T细胞扩增并分泌细胞因子能力、以及诱导抗原特异性T细胞杀伤靶细胞的能力强等特点,且不改变其与T细胞之间的特异性,具有更好的肿瘤控制效果。

[0042] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的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技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。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。

[0043] 实施例一

[0044] 基于公共数据库如TCGA/ICGC的大量肿瘤突变数据,统计其中高频发生的突变,对中国人群的高频分型进行预测、筛选,以及实验验证,得到了多肽,该多肽序列如SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4所示,同时还利用肿瘤突变数据,获得衍生肽,该衍生肽为多肽序列向两边延伸至26个氨基酸的长度形成的多肽序列,该衍生肽序列如SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:8所示。

[0045] 下面实施例对各多肽序列以及衍生肽序列的功能进行研究。其中为了表述方便,SEQ ID NO:2所示序列可称为突变型多肽,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4所示序列可称为变形多肽。

[0046] 实施例二 质谱实验验证多肽在肿瘤细胞表面被HLA分子呈递

[0047] 本发明将实施例一所获得多肽和衍生肽的编码基因通过慢病毒转染入肿瘤细胞,

再通过免疫共沉淀-质谱联合的方式,富集细胞表面的多肽-MHC复合体,对肿瘤细胞表面的MHC分子是否呈递了所述突变多肽进行了鉴定。具体方法如下:

[0048] 1、MHC-I限制性T细胞表位肽的分离与纯化:

[0049] 使用pan-MHC-I A/B/C抗体(克隆号:w6/32)与表面偶联protein A分子的sepharose CL-4B beads在4℃结合1小时,使用NanoDrop检测上清残余的抗体含量,抗体结合率>90%视为合格,制备pan-MHC-I A/B/C结合sepharose,4℃备用。细胞样本中加入40ml RIPA裂解液,4℃孵育1小时,12000rpm离心30min,上清加入sepharose CL-4B beads进行预杂交,4℃孵育1小时;离心去除beads,上清加入pan-MHC-A/B/C结合sepharose CL-4B beads,4℃孵育过夜(16-18小时)。使用4℃预冷的PBS洗涤beads,重复三次;使用超纯水洗涤beads;离心去除洗涤液,使用0.1N acetic acid洗脱beads表面的抗体-MHC-I蛋白复合物,抗体-MHC-I蛋白复合在酸性条件下解离,进一步,使用3kDa超滤管或c18固相萃取柱(25mg,waters)对洗脱产物中的蛋白和多肽进行分离纯化,使用冷冻真空离心机对纯化产物进行浓缩,浓缩产物-20℃保存至质谱上机。

[0050] 2、MHC-I限制性T细胞表位肽的质谱鉴定:

[0051] 浓缩的MHC-I限制性表位肽溶液通过在线连接nanoflow HPLC(Thermo Fisher Scientific)的Q Exactive质谱仪(Thermo Fisher Scientific)进行分析,采用ReproSil-Pur C18-AQ 1.9um填料手工填装长15cm,内径75um的分离柱进行分离,使用线性梯度2-30%的buffer B(80%ACN/0.5%acetic acid)洗脱多肽,流速设置250nl/min,洗脱时间90min。二级质谱采用HCD进行碎片化,数据采集选择数据依赖的“Top 20”方法。MS图谱的采集分辨率为70,000,200m/z,目标值为3E6离子;离子强度排行前10的离子通常采用最大注射时间为120ms进行分离和累积直至自动增益控制器的数值显示为1E5。多肽匹配选项设置“disable”,MS/MS分辨率设置17,500(200m/z)。

[0052] 3、MHC-I限制性T细胞表位肽的质谱数据分析:数据分析采用MaxQuant(version 1.3.10.15)比对质谱图谱和人全蛋白库(Uniprot,86,749个蛋白)、肿瘤相关抗原、肿瘤特异性突变肽段以及一个包含247个常见污染物(角蛋白、牛血清蛋白和蛋白酶)的数据集生成的图谱列表。可变修饰检测设置:N端乙酰化和甲硫氨酸氧化。第二位多肽鉴定设置:enable;特异性酶切设置:unspecific;多肽鉴定FDR(false discovery rate)设置1%,蛋白鉴定FDR不设置;序列匹配长度限制设置为8-15aa,最大多肽质量设置为1500Da,最大电荷状态设置为3。前导离子的初始允许质量偏差设置为6ppm,最大碎片质量偏差设置为20ppm。“match between runs”设置开启。鉴定结果输出保存在“peptide.txt”文件中,去除匹配到反库和污染库中的多肽,其余为MHC-I限制性表位的鉴定结果。

[0053] 实验结果表明无论是突变型多肽、变形多肽以及各衍生肽序列均可以表达并呈递于细胞表面的HLA分子上。以突变型多肽SEQ ID NO:2为例,该多肽的质谱谱图见图1,结果显示上述多肽可以表达并呈递于细胞表面的HLA分子。

[0054] 实施例三 多肽T2亲和力的验证

[0055] T2细胞是内源性抗原提呈途径中必需的抗原多肽转运蛋白缺陷细胞株,可用于研究抗原呈递过程和MHC分子的相互识别作用的强弱。

[0056] 为了检验外源性多肽与T2细胞的亲和力,以已经被证实与T2细胞有强的亲和力的多肽作为阳性对照,以不加多肽的T2细胞作为背景对照,通过外源性多肽与T2细胞表面MHC

I类分子的结合可使其表面MHC I类分子的表达量增加,二者结合越稳固,可检测到的MHC I类分子越多,最终以平均荧光强度为检测指标,以荧光系数(FI)作为衡量指标。以此判断多肽与T2细胞的亲和力大小,FI数值越高,多肽与T2细胞的亲和力越强,有利于后续特异性CD8⁺T细胞的识另。

[0057] 实验取合成好的多肽,加入到 2×10^5 个T2细胞中,并加入人类 $\beta 2$ 微球蛋白(最终浓度,3ug/ml),培养于24孔板中,在培养箱(37°C,5%CO₂),培养过夜。以没有加多肽的T2细胞被用作背景对照,以CMV多肽(其序列为NLVPMVATV,是一种病毒多肽,是已知的经证实与T2细胞存在强亲和力的多肽)作为阳性对照,实验设置2个复孔,取平均值。

[0058] 取培养的细胞200g,离心5分钟收集细胞。细胞用PBS洗涤两次后,将细胞直接用FITC标记的抗对应HLA分型(HLA-A*11:01)的单克隆抗体孵育,4°C维持30分钟。然后用流式细胞仪(BD FACSJazz™)及其软件检测并分析其平均荧光强度,见图2。T2亲和力结果,如下表2。

[0059] 表2 T2亲和力结果

多肽序列	FI	结论
阳性对照	1.63	
RHGGWTTK	2.12	高亲和力

[0061] 从表2的结果不难看出,相比较于阳性对照,所提供的多肽RHGGWTTK表现出高的亲和力。

[0062] 实施例四 多肽体外刺激扩增CD8⁺T细胞

[0063] 取多肽对应亚型呈阳性的志愿者的PBMC细胞, 2×10^7 个PBMC细胞,用贴壁法分离单核细胞(贴3h),以及CD8磁珠的方法分离得到CD8⁺的T细胞。采用GM-CSF(1000U/ml)和IL-4(1000U/ml)诱导贴壁单核细胞为未成熟DC,再用IFN-gamma(100U/ml)和LPS(10ng/ml),以及各多肽诱导贴壁细胞为多肽特异性成熟DC细胞。将所获得的多肽特异性成熟DC细胞与志愿者的CD8⁺T细胞共培养,并加入IL-21。3天后,补加IL-2和IL-7。之后于第5,7天补加一次IL-2和IL-7,第10天取共培养的细胞进行计数,和后续的ELISPOTs以及LDH检测。

[0064] 实施例五 ELISPOTs方法验证多肽激活CD8⁺T细胞免疫反应

[0065] ELISPOT方法即酶联免疫斑点实验(Enzyme linked immunospot assay),能够检测到单个细胞分泌的细胞因子情况。实验在培养板包被上特异性的单克隆抗体,然后加入待检测的细胞和抗原刺激物进行培养,在刺激物的刺激下,T细胞分泌相应的细胞因子,所分泌的细胞因子就被包被在培养板上的抗体捕获。洗去细胞后,被捕获的细胞因子可以荧光标记的第二抗体结合,形成斑点。即可以利用包被好的抗体捕获培养中的细胞分泌的细胞因子,并以酶联斑点显色的方式呈现出来,以此检测验证多肽激活CD8⁺T细胞的免疫反应的强弱。

[0066] 参照ELISPOTs试剂盒说明书中描述,将实施例四中培养后的细胞与负载过实验多肽(RHGGWTTK)和无关多肽(是指不会刺激T细胞分泌IFN-gamma干扰素的多肽,具体序列为LSYRNKPSI,以下实施例中用到的无关多肽与该序列相同)的T2细胞分别加入到ELISPOTs板中进行培养,20小时后进行ELISPOTs检测(见试剂盒说明书)。ELISPOTs结果见图3,结果总结见下表3所示:

[0067] 表3多肽刺激特异性CD8⁺T细胞分泌IFN-gamma干扰素

[0068]	多肽	实验多肽作为刺激剂物产生斑点数	无关多肽作为刺激物产生斑点数	倍数（实验/无关）	结论
[0069]	RHGGWTTK	104	11	9	具有免疫原性

[0070] 其中,表3中第二列和第三列分别代表利用实验多肽作为刺激物或者利用无关多肽作为刺激物,所检测到的斑点数,第四列倍数代表利用实验多肽作为刺激物与利用无关多肽作为刺激物所产生的斑点数的比值。通常来说当该比值超过一定的倍数(≥ 2)就视为有免疫原性,而且该比值越高,说明多肽的免疫原性越强。

[0071] 实施例六 LDH释放实验证明CD8⁺T细胞多肽特异性杀伤活性

[0072] LDH(乳酸脱氢酶)是存在于细胞质的一种酶,当细胞膜受到损伤时,LDH会释放到培养基中。由于释放出的LDH稳定,检测培养基中LDH的量可以作为测定死细胞和受损细胞数量的指标。

[0073] 实验例四中培养的细胞与与负载过实验多肽或无关多肽或未负载多肽的T2细胞进行共培养,实验中设置最大释放孔,体积校正孔,培养基对照孔,自发释放孔,不同效靶比(T细胞与T2细胞的数目比)等对照,每组设置3个复孔,4h后,取出共培养的细胞上清50u1,并加入到50u1 LDH底物混合液中,使细胞上清催化LDH底物反应,最终读取490nm波长和680nm参考波长,并根据对照孔,计算靶细胞杀伤T2的杀伤活性。其结果如下表4所示,表4中所示出的数值越大,代表杀伤作用越强。

[0074] 结果显示,这些多肽刺激产生的CD8⁺T细胞具有多肽特异性杀伤活性。

[0075] 表4 T细胞特异性识别并杀伤呈递实验多肽的靶细胞

多肽		T+T2+实验多肽			T+T2+无关多肽			T+T2（未负载多肽）			
[0076]	RHGGW TTK	E:T=10: 1	0.406	0.397	0.414	0.436	0.371	0.407	0.352	0.364	0.413
		E:T=1:1	0.324	0.324	0.351	0.278	0.293	0.308	0.279	0.298	0.322

[0077] 实施例七 小鼠皮下移植瘤模型的建立

[0078] 本模型用于验证本发明提出的多肽药物组合,抗原呈递细胞,疫苗对于肿瘤的控制效果。

[0079] 1、将各多肽的编码基因通过慢病毒转染的方式导入,构建并包装表达前述突变多肽或其变形的重组慢病毒。

[0080] 2、表达多肽的人源肺癌细胞系的建立

[0081] 人肺癌细胞系HCC827购买于ATCC(编号:CRL-2868),其HLA亚型为HLA-A*1101阳性。细胞培养于含10%胎牛血清,100U/mL青霉素和链霉素的DMEM培养基中。37℃,5%CO₂的孵箱中培养。将包装好的慢病毒转染HCC827细胞系,并采用Puromycin抗生素(嘌呤霉素),持续筛选存活的HCC827细胞系,最终建立表达多肽的HCC827细胞系。

[0082] 3、NOD SCID小鼠人免疫重建

[0083] 采集健康志愿者抗凝外周血600至900ml。Ficoll分离外周血单个核细胞

(peripheral blood mononuclear, PBMC), 收集细胞待用。取300只排除免疫渗漏的NOD SCID小鼠, 每只腹腔注射PBMC $2 \times 10^7 / 0.5\text{ml}$, 对NOD SCID小鼠进行免疫重建。4周后, 选取小鼠准备接种人肺癌细胞系模型。

[0084] 4、人肺癌肿瘤模型的构建

[0085] 已建系的人肺癌细胞系, 培养于含10%胎牛血清, 100U/mL青霉素和链霉素的DMEM培养基中。 37°C , 5% CO_2 的孵箱中培养。收集肿瘤细胞, 3000转离心, 用无菌生理盐水洗涤肿瘤细胞3次。做适当稀释, 取40微升细胞悬液加入10微升0.4%台酚蓝染色并镜检计数, 制成浓度为 1×10^8 个/ml的肿瘤细胞悬液, 选取免疫重建后的NOD/SCID小鼠, 每只小鼠皮下接种肿瘤细胞悬液100 μl 。接种完成后, 逐日观察接种部位有无感染, 肿瘤生长后有无自然消退。7天后, 小鼠皮下瘤可摸到约米粒大小肿瘤。对免疫重建4周的皮下瘤模型NOD/SCID小鼠分别进行DC疫苗治疗, 并每3-4天记录肿瘤的体积。

[0086] 实施例八 多肽疫苗的制备及治疗方案

[0087] 将免疫重建4周的HCC827皮下瘤模型NOD/SCID小鼠随机分为4组: 佐剂+野生型多肽组(该野生型多肽为HHGGWTTK)、佐剂+空白多肽组(即仅含有佐剂)、佐剂+突变型多肽组(该突变型多肽为RHGGWTTK)、佐剂+变形多肽组(其中根据所用到的变形多肽不同, 又可以分成三组, 所用到的变形多肽分别为RAGGWTTK、RSGGWTTK、RVGGWTTK), 每组各6只。其中所用到的佐剂为弗氏佐剂。

[0088] 各组多肽的首次免疫剂量为100 μl /只。上述多肽用PBS重悬后, 与150 μl /只弗氏完全佐剂混匀后, 用PBS调整至300 μl /只, 于背部皮下双点注射。2周后, 使用相同剂量进行加强免疫(第1次使用完全弗氏佐剂, 以后均用不完全弗氏佐剂), 共免疫4次。注射结束后观察小鼠生命体征, 每3-4天用游标卡尺测量肿瘤纵横大小。肿瘤体积计算为: 肿瘤体积 = $1/2 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ 。同时, 记录小鼠体重变化情况。结果见图4。

[0089] 结果显示, 相对于野生型多肽负载的多肽疫苗组和佐剂组, 突变多肽或变形多肽负载的多肽疫苗组可以明显的减缓小鼠肿瘤的生长。

[0090] 实施例九 DC多肽疫苗的制备及治疗方案

[0091] 采集健康志愿者抗凝外周血100至150ml。Ficoll分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear, PBMC), 收集PBMC细胞, 按 $2-3 \times 10^6 / \text{ml}$ 重悬于RPMI 1640培养基中, 37°C 孵育2h, 贴壁细胞即为DC, 吸取未贴壁细胞即是外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)备用。采用GM-CSF(1000U/ml), IL-4(1000U/ml), 诱导贴壁单核细胞为未成熟DC, 再加入IFN- γ (100U/ml), CD40L(10ng/ml), 最后分别加入野生型多肽组合、突变多肽组合(浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 诱导贴壁细胞为成熟DC细胞, 收获成熟DC, 用生理盐水洗涤3次。用生理盐水将负载多肽后的DC调整为 $(4.0 \pm 0.5) \times 10^7 / \text{ml}$, 用于后续实验。将小鼠随机分为4组: DC-负载野生型多肽组、DC-负载突变多肽组、DC-负载变形多肽组、空白多肽组, 每组各6只。制备DC-负载野生型多肽、DC-负载突变多肽、DC-负载变形多肽及空白DC-负载的多肽细胞悬液。对小鼠近腹股沟大腿内侧进行皮内注射, 每侧注射0.1ml, 每周注射1次。剂量为 $(4.0 \pm 0.5) \times 10^6$ 细胞/次, 共注射2次。注射结束后观察小鼠生命体征, 每3-4天用游标卡尺测量肿瘤纵横大小。肿瘤体积计算为: 肿瘤体积 = $1/2 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ 。同时, 记录小鼠体重变化情况。结果见图5。

[0092] 结果显示, 相对于野生型多肽负载的DC疫苗组和空白多肽负载的DC疫苗组, 突变

多肽或变形多肽负载的DC疫苗组可以明显的减缓小鼠肿瘤的生长。

[0093] 实施例十 多肽特异性DC-CTL疫苗的制备及治疗方案

[0094] 实施例九收集的PBL经过磁珠分选获得CD8⁺T细胞与负载空白多肽的DC、负载野生型多肽的DC、负载突变多肽的DC、负载变形多肽的DC共育致敏,细胞比例为DC:CD8⁺T细胞=1:4。培养液中加入500IU/ml IL-2和50ng/ml IL-7,37V 5%CO₂培养箱共同孵育,培养1周后进行细胞计数;第2周再用负载空白多肽的DC、负载野生型多肽的DC、负载突变多肽的DC、负载变形多肽的DC进行第二轮刺激。共刺激三轮,培养期间适当添加培养基。于培养第0,7,14和21天分别计数淋巴细胞数量,计算细胞增殖指数(proliferation index,PI)。其中,PI=扩增后细胞数/接种细胞数。培养至21天后收获细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic Tlymphocytes,CTL)。将细胞用生理盐水重悬,重悬体积为0.2ml,经尾静脉回输,每只肿瘤模型小鼠回输细胞数约为1*10⁸细胞。注射结束后观察小鼠生命体征,每3-4天用游标卡尺测量肿瘤纵横大小。肿瘤体积计算为:肿瘤体积=1/2*长*宽²。同时,记录小鼠体重变化情况。结果见图6。

[0095] 结果显示,相对于空白多肽对照组和野生型多肽组,突变多肽或变形多肽激活的DC-CTL疫苗可以明显的减缓小鼠肿瘤的生长。

[0096] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0097] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

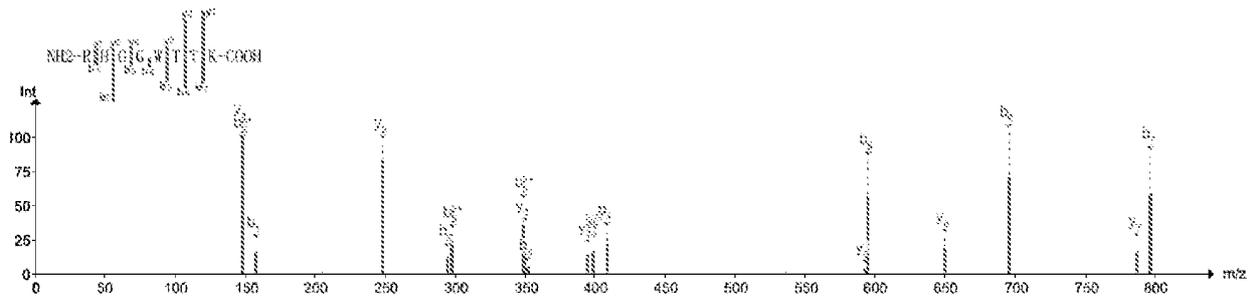


图1

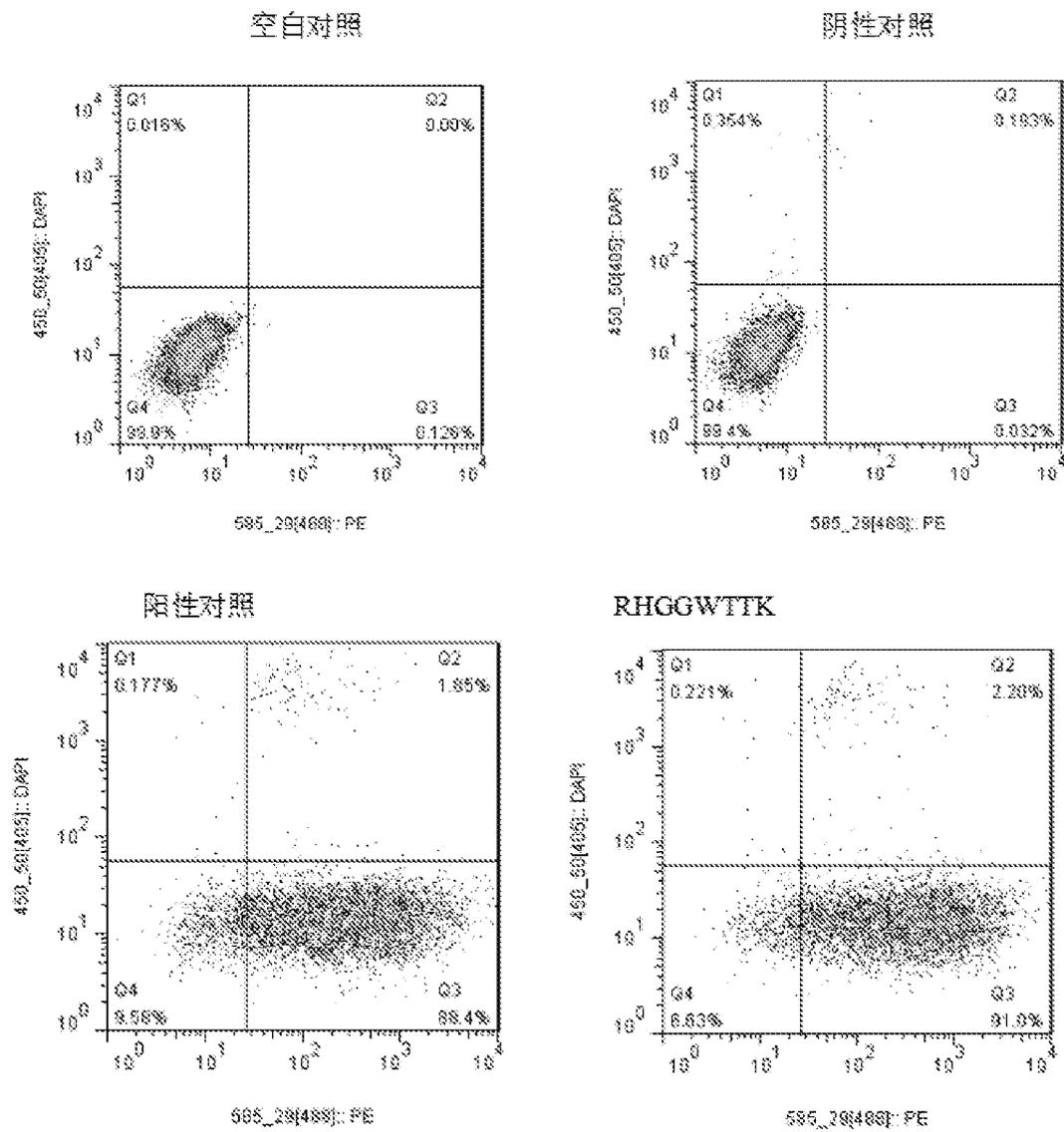


图2

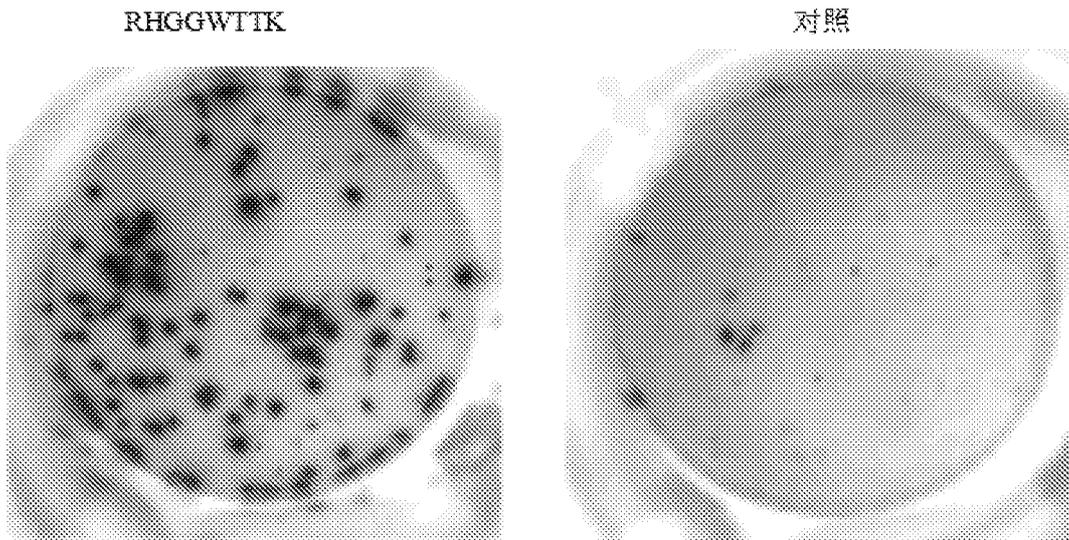


图3

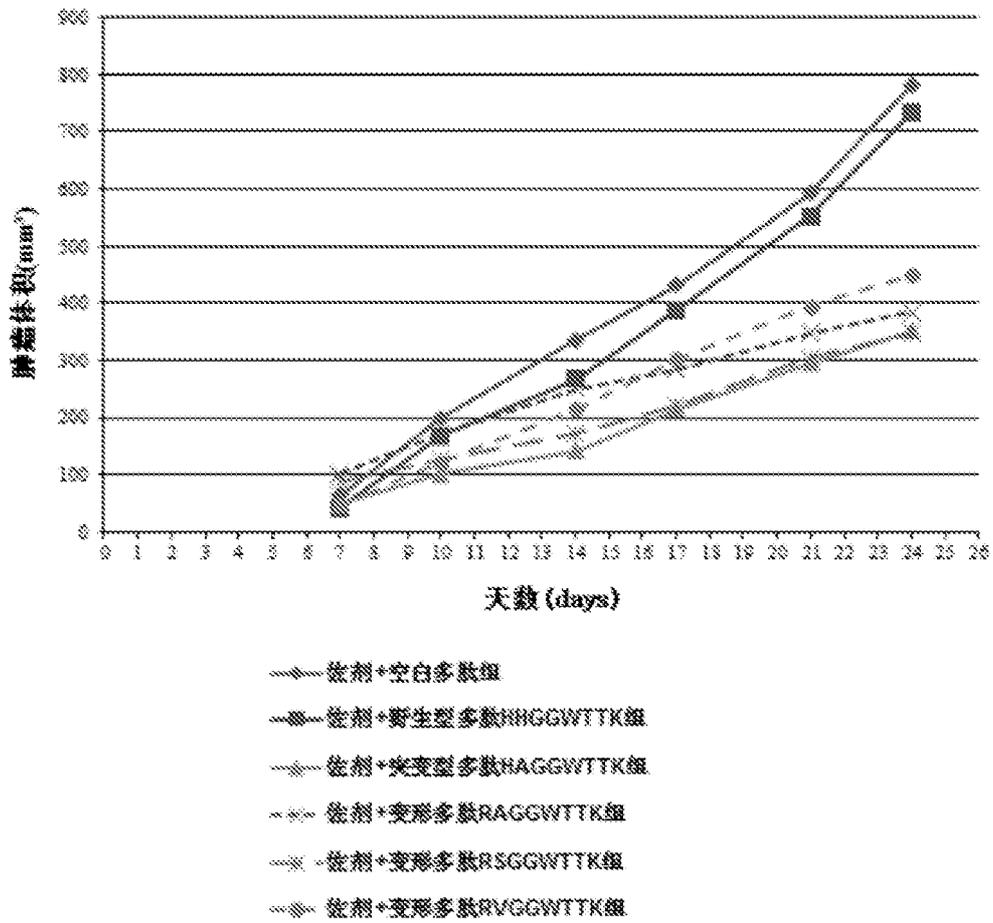


图4

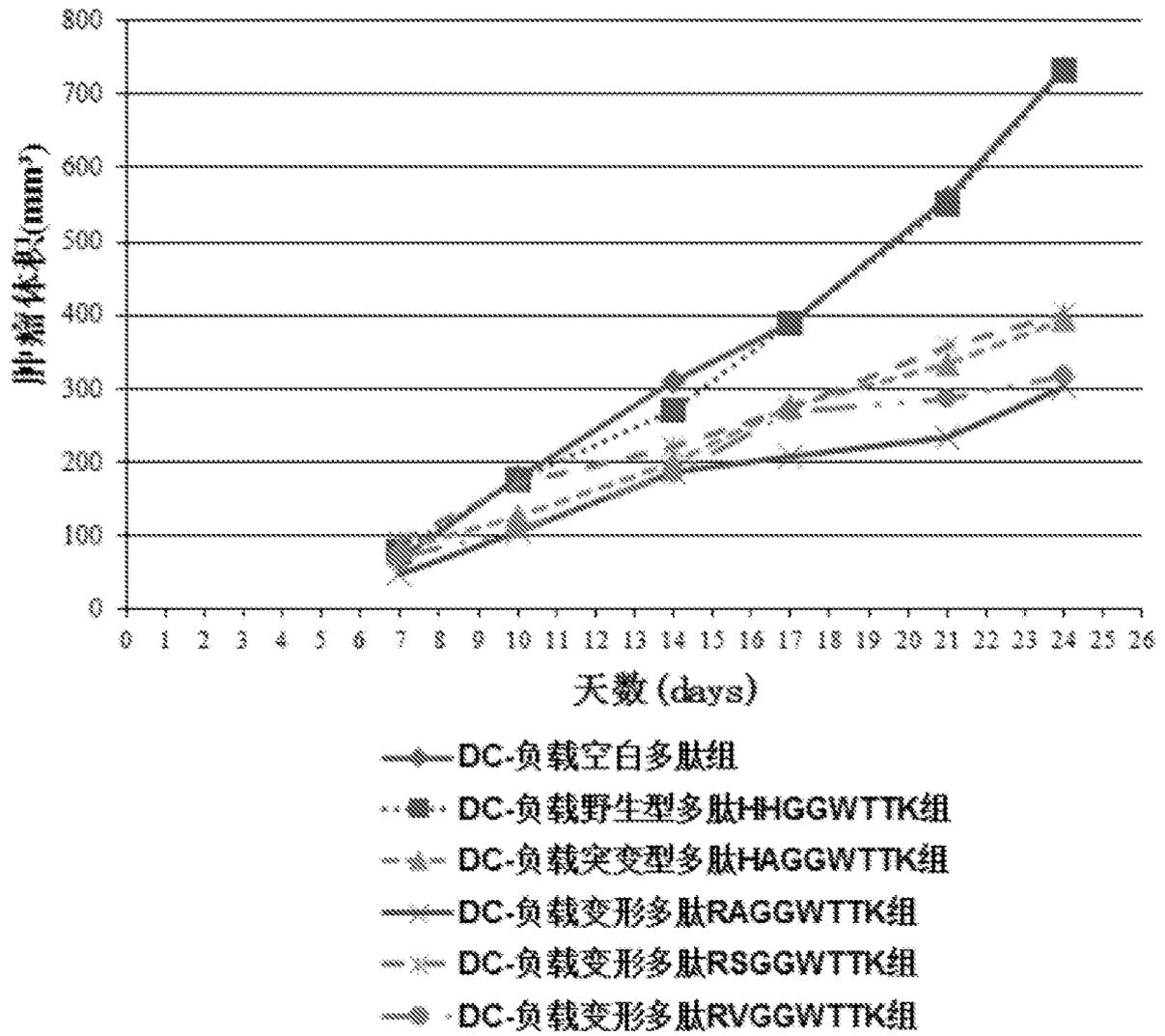


图5

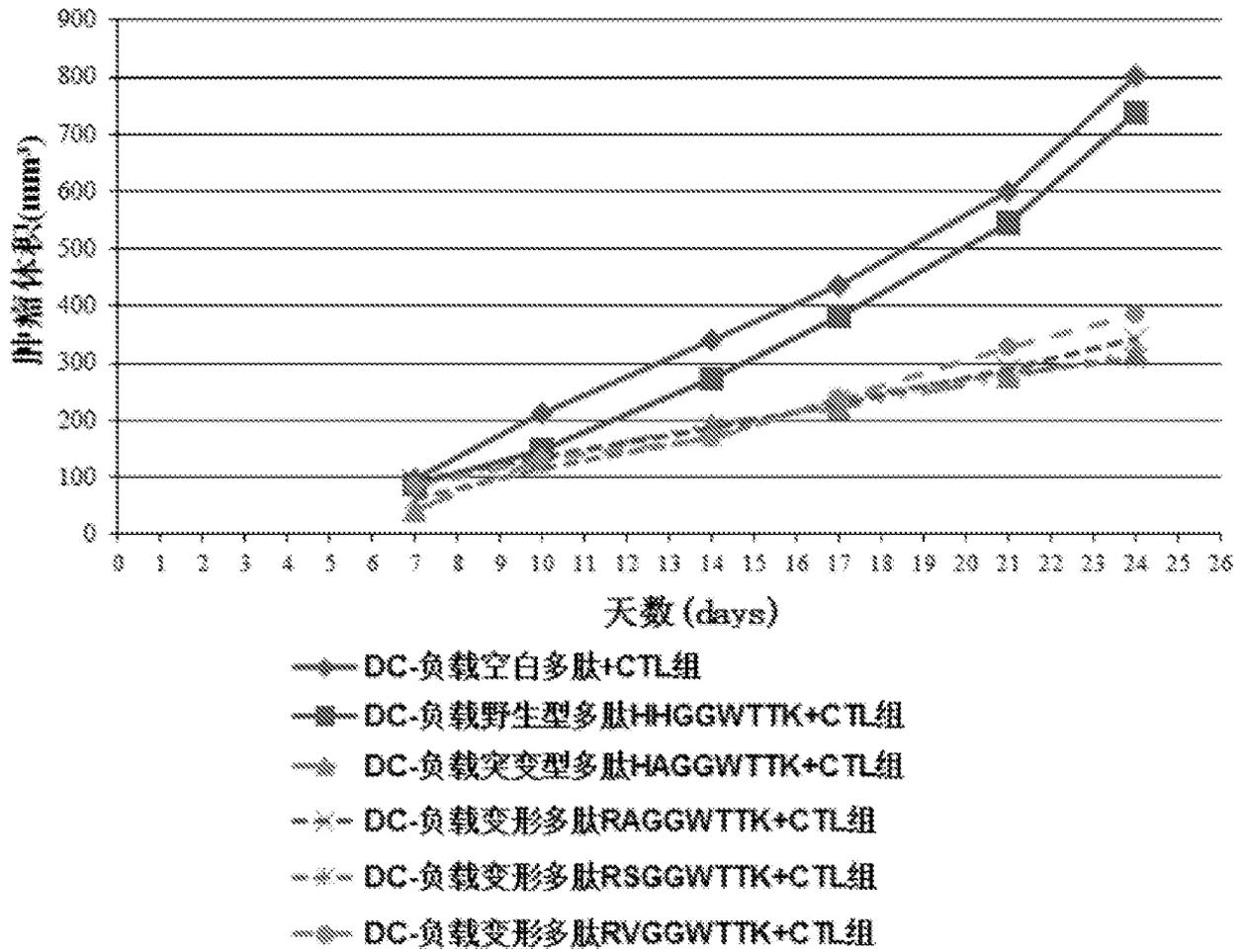


图6