



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114702569 B

(45) 授权公告日 2023.01.10

(21) 申请号 202210572194.7

(22) 申请日 2022.05.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114702569 A

(43) 申请公布日 2022.07.05

(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
专利权人 武汉华大吉诺因生物科技有限公
司

(72) 发明人 李波 李冬丽 张乐 黄英 刘耿

(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.

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

C12N 5/0781 (2010.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

审查员 李翠莹

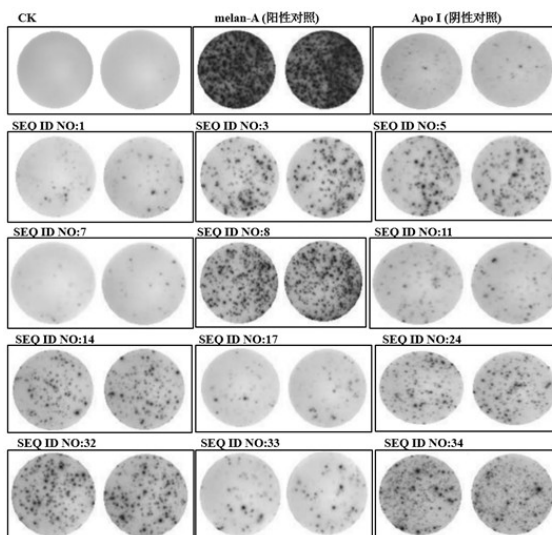
权利要求书2页 说明书14页
序列表15页 附图9页

(54) 发明名称

PD-L1相关疫苗及其应用

(57) 摘要

本发明提出了PD-L1相关疫苗及其应用,所述PD-L1相关疫苗包括:分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体,所述分离的多肽具有如SEQ ID NO:1、3、5、7、8、9、11、13、14、17、18、19、21、24、25、27、28、30~34任一项所示的氨基酸序列或其功能类似物。本发明的疫苗能够以免疫抑制蛋白PDL1表位作为靶点,提高肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫抑制细胞活性、数目,特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞、表达PDL1的肿瘤细胞,安全性高,在预防和治疗癌症方面具有重要意义。



1. 一种分离的多肽,其特征在於,所述分离的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3、8、24或32所示。

2. 一种分离的核酸,其特征在於,所述分离的核酸编码权利要求1所述多肽。

3. 根据权利要求2所述的分离的核酸,其特征在於,所述分离的核酸的核苷酸序列如SEQ ID NO:37、42、58或66所示。

4. 一种分离的抗原递呈细胞,其特征在於,所述分离的抗原递呈细胞表达HLA-A11:01或HLA-A24:02,

其中,表达HLA-A11:01的抗原递呈细胞用於呈递氨基酸序列如SEQ ID NO:8或32所述分离的多肽,表达HLA-A24:02的抗原递呈细胞用於呈递氨基酸序列如SEQ ID NO:3或24所述分离的多肽。

5. 根据权利要求4所述分离的抗原递呈细胞,其特征在於,所述分离的抗原递呈细胞为树突状细胞、B细胞或单核-吞噬细胞。

6. 一种分离的免疫细胞,其特征在於,所述分离的免疫细胞的结合靶标为权利要求1所述的分離的多肽或者权利要求4或5所述分离的抗原递呈细胞。

7. 根据权利要求6所述分离的免疫细胞,其特征在於,所述分离的免疫细胞是通过下列方式获得的:

将权利要求4或5所述分离的抗原递呈细胞与具有免疫效应能力的细胞接触。

8. 根据权利要求7所述分离的免疫细胞,其特征在於,所述具有免疫效应能力的细胞为CD8⁺T细胞。

9. 一种疫苗,其特征在於,包括:权利要求1所述分离的多肽、权利要求2或3所述分离的核酸、权利要求4或5所述分离的抗原递呈细胞和/或权利要求6~8任一项所述分离的免疫细胞。

10. 根据权利要求9所述疫苗,其特征在於,所述疫苗进一步包括佐剂。

11. 一种药物,其特征在於,包括:权利要求1所述分离的多肽、权利要求2或3所述分离的核酸、权利要求4或5所述分离的抗原递呈细胞和/或权利要求6~8任一项所述分离的免疫细胞。

12. 根据权利要求11所述药物,其特征在於,所述药物进一步包括药学上可接受的辅料。

13. 权利要求1所述分离的多肽、权利要求2或3所述分离的核酸、权利要求4或5所述分离的抗原递呈细胞和/或权利要求6~8任一项所述分离的免疫细胞在制备疫苗中的用途,其特征在於,所述疫苗用於预防癌症,所述癌症中肿瘤细胞表达PD-L1。

14. 根据权利要求13所述的用途,其特征在於,所述疫苗的受试者表达HLA-A11:01和/或HLA-A24:02。

15. 权利要求1所述分离的多肽、权利要求2或3所述分离的核酸、权利要求4或5所述分离的抗原递呈细胞和/或权利要求6~8任一项所述分离的免疫细胞在制备药物中的用途,其特征在於,所述药物用於治疗癌症,所述癌症中肿瘤细胞表达PD-L1。

16. 根据权利要求15所述的用途,其特征在於,所述药物的受试者表达HLA-A11:01和/或HLA-A24:02。

17. 根据权利要求13~16任一项所述用途,其特征在於,所述癌症为乳腺癌、肺癌、鼻咽

癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病、甲状腺癌、淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、子宫体癌、卵巢癌、胆囊癌、口腔癌、喉癌、骨癌、睾丸癌或脑癌。

18. 根据权利要求13~16任一项所述用途,其特征在於,所述癌症为黑色素瘤。

PD-L1相关疫苗及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域。具体地,本发明涉及PD-L1相关疫苗及其应用。

背景技术

[0002] 免疫系统中包含许多类型的调节性免疫细胞,它们的作用是控制机体免疫反应的强度,维持免疫平衡。调节性免疫细胞主要包括调节性T细胞(Tregs,Regulatory T cells)、M2巨噬细胞(M2 macrophage)、骨髓来源抑制细胞(MDSCs,myeloid-derived suppressor cells)和不同的树突状细胞(DCs,dendritic cell)亚群。调节性免疫细胞参与的免疫抑制过程,是控制特定免疫反应规模和时长的一种机制。免疫抑制与免疫耐受的不同之处在于免疫调节是一种主动的免疫激活。已有研究表明,调节性免疫细胞能够表达多种免疫抑制相关蛋白,如IDO、PD-L1、TDO、Arginase、CCL22等,减弱免疫应答效果,其机理有以下三种:(1)分解氨基酸代谢酶,减少免疫细胞生长和功能所需氨基酸,如色氨酸和精氨酸;(2)诱导靶细胞和T细胞上调免疫检查点相关分子表达,如PD-1、PD-L1、PD-L2;(3)分泌趋化因子,招募更多调节性免疫细胞亚群到炎症区域。

[0003] 调节性免疫细胞在健康人的免疫环境中被认为是有正向意义的,能够避免过强的免疫反应损伤自身细胞。然而,在肿瘤免疫环境中,调节性免疫细胞可能会抑制机体对恶性细胞的免疫杀伤反应。而且已有研究表明,许多类型的癌细胞已经适应了调节性免疫细胞的表型,和调节性免疫细胞一样能够表达多种免疫抑制蛋白,抑制抗肿瘤特异性T细胞在肿瘤微环境中的活性。为了平衡调节性免疫细胞引起的免疫抑制,免疫系统中同时也形成了拮抗免疫抑制的机制。在肿瘤免疫微环境中,部分促炎T细胞能够靶向识别表达免疫抑制蛋白的调节性免疫细胞,减少调节性免疫细胞数目,拮抗肿瘤免疫抑制作用,并通过在炎症部位分泌促炎细胞因子辅助增强适应性免疫应答,我们将这类细胞定义为Anti-TIS细胞。

[0004] Anti-TIS(Tumor ImmunoSuppression)技术即是基于Anti-TIS细胞的作用机理所提出的一种创新型的免疫治疗方案,旨在激活人体抗肿瘤免疫抑制的细胞,靶向调节性免疫细胞和肿瘤细胞,在可接受的毒性范围内,打破免疫抑制,尽可能多地激活免疫反应,产生抗肿瘤治疗效果。

发明内容

[0005] 需要说明的是,本发明是基于发明人的下列发现而完成的:

[0006] HLA是人类的主要组织相容性复合体(MHC)的表达产物,是具有高度多态性的同种异体抗原,不同地域人群的HLA等位分型会存在差异,例如欧美地区覆盖度较高的等位分型主要是HLA-A*02:01,中国覆盖度最高的前两种等位分型是HLA-A*11:01和HLA-A*24:02。

[0007] 细胞程序性死亡配体1(Programmed cell death 1 ligand 1,PD-L1)也称为表面抗原分化簇274(cluster of differentiation 274,CD274)是人类体内的一种跨膜蛋白,与免疫系统的自我调节密切相关。细胞程序性死亡受体(PD-1)与癌细胞或免疫调节细胞表面的PD-L1结合,可以传导免疫抑制的信号,减低CD8⁺T细胞的扩增和活化,减少淋巴结中抗

原特异性T细胞的聚集,从而导致癌细胞的免疫逃逸。

[0008] 有鉴于此,基于上述机制,发明人从众多癌症相关基因中选取PD-L1蛋白来筛选抗肿瘤免疫抑制的靶标。进一步地,PD-L1蛋白全长290个氨基酸,按照1步长位移滑动剪切,共计可得到8、9、10、11mer肽段1126条。发明人对所有的肽段进行分析,发现仅有极少数的肽段能够结合HLA-A11:01或HLA-A24:02分子形成HLA复合物,并与机体中的T细胞受体进一步结合,刺激机体产生免疫反应,而其余绝大多数肽段不具备HLA亲和力和免疫原性,不存在开发抗肿瘤免疫抑制疫苗的研究价值。因而,发明人从众多表位中筛选得到有免疫学功能的表位。这些多肽可以作为疫苗或药物,能够以免疫抑制蛋白PDL1表位作为靶点,提高肿瘤微环境中的Anti-TIS细胞活性、数目,特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞、表达PDL1的肿瘤细胞。另外,由于Anti-TIS细胞在体内自然存在,机体必然存在一种确保免疫稳态以控制它们的机制,因此触发自身免疫相关不良事件的风险极低。目前已开展的试验表明,接种了上述多肽的小鼠没有发生不良反应,而临床研究数据也证明了这种方法的安全性。由此,在预防和治疗癌症方面具有重要意义。

[0009] 在本发明的一个方面,本发明提出了一种分离的多肽。根据本发明的实施例,所述分离的多肽具有如SEQ ID NO:1、3、5、7、8、9、11、13、14、17、18、19、21、24、25、27、28、30~34任一项所示的氨基酸序列或其功能类似物。上述多肽对HLA-A11:01和/或HLA-A24:02具有亲和力,能够自然呈递到细胞表面并与特定的免疫效应细胞结合,并特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,具备成为免疫治疗靶点的潜在价值,在预防和治疗癌症方面具有重要意义。

[0010] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种分离的核酸。根据本发明的实施例,所述分离的核酸编码前述所述多肽或其功能类似物。

[0011] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种抗原递呈细胞。根据本发明的实施例,所述抗原递呈细胞用于递呈前面所述多肽。

[0012] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种免疫细胞。根据本发明的实施例,所述免疫细胞的结合靶标为前述分离的多肽或者前述抗原呈递细胞。

[0013] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种抗体。根据本发明的实施例,所述抗体特异性识别前述分离的多肽。

[0014] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种疫苗。根据本发明的实施例,所述疫苗包括:前述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体。

[0015] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种药物。根据本发明的实施例,所述药物包括:前述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体。

[0016] 在本发明的又一方面,本发明提出了前述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体在制备疫苗中的用途。根据本发明的实施例,所述疫苗用于预防癌症。

[0017] 在本发明的又一方面,本发明提出了前述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体在制备药物中的用途。根据本发明的实施例,所述药物用于治疗癌症。

[0018] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0019] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0020] 图1~图4分别显示了根据本发明实施例的多肽质谱图,质谱图的上半部分是eluted,下半部分是synthesis;

[0021] 图5显示了根据本发明实施例的多肽与体外免疫原性ELISPOTs检测的电镜图;

[0022] 图6和图7分别显示了根据本发明实施例的免疫细胞特异性杀伤呈递多肽的靶细胞分析示意图;

[0023] 图8和图9分别显示了根据本发明实施例的多肽疫苗控制小鼠肿瘤生长分析示意图。

具体实施方式

[0024] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0025] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0026] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义,否则本文中使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代20个常用L-氨基酸之一的标准3字母和/或1字母代码。

[0027] 在本发明的一个方面,本发明提出了一种分离的多肽。根据本发明的实施例,该分离的多肽具有如SEQ ID NO:1、3、5、7、8、9、11、13、14、17、18、19、21、24、25、27、28、30~34任一项所示的氨基酸序列或其功能类似物。上述多肽对HLA-A11:01和/或HLA-A24:02具有亲和力和,能够自然呈递到细胞表面并与特定的免疫效应细胞结合,并特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,具备成为免疫治疗靶点的潜在价值,在预防和治疗癌症方面具有重要意义。

[0028] 具体地,在上述多肽中,SEQ ID NO:1、3、5、7、8、11、14、17、24、32、33、34任一项所示的氨基酸序列或其功能类似物的多肽效果较佳。SEQ ID NO:3、5、8、24、32、34任一项所示的氨基酸序列或其功能类似物的多肽效果更佳,经鉴定能够表达并呈递于细胞表面的HLA分子,具有较强的免疫原性,具有刺激产生高杀伤效率特异性T细胞的能力。

[0029] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种分离的核酸。根据本发明的实施例,所述分离的核酸编码前述多肽或其互补序列。如前所述,上述本发明实施例所提出的核酸在合适条件下表达的多肽能够用于预防或治疗肿瘤,从而发挥免疫杀伤作用。进而,本发明实施例所提出的核酸在合适条件下表达的多肽能够用于预防或治疗肿瘤。

[0030] 根据本发明的实施例,所述分离的核酸具有如SEQ ID NO:35、37、39、41、42、43、45、47、48、51、52、53、55、58、59、61、62、64~68任一项所示的核苷酸序列或其功能类似物。具体的,上述分离的核酸中,SEQ ID NO:35、37、39、41、42、45、48、51、58、66、67、68任一项所示

的核苷酸序列或其功能类似物的核酸效果更佳,SEQ ID NO:37、39、42、58、66、68任一项所示的核苷酸序列或其功能类似物的核酸效果更佳。

[0031] 表1 多肽和核酸序列

[0032]

基因	氨基酸位点	SEQ ID	多肽序列	SEQ ID	核酸序列
PDL1	6-15	NO:1	VFIFMTYWHL	NO:35	GTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTG
PDL1	6-16	NO:2	VFIFMTYWHL	NO:36	GTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGCTG
PDL1	8-16	NO:3	IFMTYWHL	NO:37	ATATTCATGACCTACTGGCATTGCTG
PDL1	8-17	NO:4	IFMTYWHL	NO:38	ATATTCATGACCTACTGGCATTGCTGAAC
PDL1	11-19	NO:5	TYWHLNFAF	NO:39	ACCTACTGGCATTGCTGAACGCATT
PDL1	11-21	NO:6	TYWHLNFAFV	NO:40	ACCTACTGGCATTGCTGAACGCATTACTGTC
PDL1	15-25	NO:7	LLNAFTVTPK	NO:41	TTGCTGAACGCATTACTGTCACGGTCCCAAG
PDL1	17-25	NO:8	NAFTVTPK	NO:42	AACGCATTTACTGTCACGGTCCCAAG
PDL1	32-41	NO:9	YGSNMTIECK	NO:43	TATGGTAGCAATATGACAATTGAATGCAAA
PDL1	33-41	NO:10	GSNMTIECK	NO:44	GGTAGCAATATGACAATTGAATGCAAA
PDL1	36-46	NO:11	MTIECKFPVEK	NO:45	ATGACAATTGAATGCAAAATCCCAGTAGAAAAA
PDL1	37-46	NO:12	TIECKFPVEK	NO:46	ACAATTGAATGCAAAATCCCAGTAGAAAAA
PDL1	79-89	NO:13	SSYRQRARLLK	NO:47	AGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGCTGTTGAAG
PDL1	97-105	NO:14	AALQITDVK	NO:48	GCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAA
PDL1	105-113	NO:15	KLQDAGVYR	NO:49	AAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGC
PDL1	110-118	NO:16	GVYRCMISY	NO:50	GGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTAT
PDL1	116-124	NO:17	ISYGGADYK	NO:51	ATCAGCTATGGTGGTCCGACTACAAG
PDL1	116-125	NO:18	ISYGGADYKR	NO:52	ATCAGCTATGGTGGTCCGACTACAAGCGA
PDL1	117-126	NO:19	SYGGADYKRI	NO:53	AGCTATGGTGGTCCGACTACAAGCGAATT
PDL1	120-129	NO:20	GADYKRITVK	NO:54	GGTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAA
PDL1	126-136	NO:21	ITVKVNAPYNK	NO:55	ATTACTGTGAAAGTCAATGCCCATACAACAAA
PDL1	127-136	NO:22	TVKVNAPYNK	NO:56	ACTGTGAAAGTCAATGCCCATACAACAAA
PDL1	129-136	NO:23	KVNAPYNK	NO:57	AAAGTCAATGCCCATACAACAAA
PDL1	133-141	NO:24	PYNKINQRI	NO:58	CCATACAACAAAATCAACCAAGAATT
PDL1	153-162	NO:25	LTCQAEGYPK	NO:59	CTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCAAG
PDL1	159-167	NO:26	GYPKAEVIW	NO:60	GGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGG
PDL1	168-178	NO:27	TSSDHQVLSGK	NO:61	ACAAGCAGTGACCATCAAGTCCTGAGTGGTAAG
PDL1	169-178	NO:28	SSDHQVLSGK	NO:62	AGCAGTGACCATCAAGTCCTGAGTGGTAAG
PDL1	181-189	NO:29	TTNSKREEK	NO:63	ACCACCAATCCAAGAGAGAGGAGAAG
PDL1	189-198	NO:30	KLFNVTSTLR	NO:64	AAGCTTTTCAATGTGACCAGCACACTGAGA
PDL1	202-212	NO:31	TTNEIFYCTFR	NO:65	ACAATAATGAGATTTTCTACTGCACTTTTAGG
PDL1	252-260	NO:32	GVALTFIFR	NO:66	GGTGTAGCACTGACATTCATCTCCGT
PDL1	255-263	NO:33	LTFIFRLRK	NO:67	CTGACATTCATCTCCGTTTAAGAAAA
PDL1	273-281	NO:34	GIQDTNSKK	NO:68	GGCATCCAAGATACAAACTCAAAGAAG

[0033] 需要说明的是,对于本发明说明书和权利要求书中所提及的核酸,本领域技术人员应当理解,实际包括互补双链的任意一条,或者两条。为了方便,在本说明书和权利要求书中,虽然多数情况下只给出了一条链,但实际上也公开了与之互补的另一条链。另外,本

申请中的基因序列包括DNA形式或RNA形式,公开其中一种,意味着另一种也被公开。

[0034] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种抗原递呈细胞。根据本发明的实施例,所述抗原递呈细胞用于呈递前面所述分离的核酸。由此,利用本发明的抗原递呈细胞可以将多肽递送至抗肿瘤特异性T细胞上,从而激活T细胞特异性杀伤功能,有效地用于肿瘤的预防或治疗。

[0035] 根据本发明的实施例,所述抗原递呈细胞为树突状细胞、B细胞或单核-吞噬细胞,优选树突细胞。树突细胞具有极强的抗原内吞和加工处理能力,可将抗原呈递在细胞的表面。发明人选择树突细胞作为抗原呈递细胞,抗原呈递细胞在机体内启动、调节和维持针对所述多肽的免疫反应更加强烈。

[0036] 根据本发明的实施例,所述抗原递呈细胞表达HLA-A11:01和/或HLA-A24:02。上述多肽对HLA-A11:01和/或HLA-A24:02具有亲和力,能够自然呈递并与特定的免疫效应细胞结合,并特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,具备成为免疫治疗靶点的潜在价值,在预防和治疗癌症方面具有重要意义。

[0037] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种免疫细胞。根据本发明的实施例,所述免疫细胞的结合靶标为前面所述的分离的多肽或者前面所述抗原呈递细胞。由此,可以发挥免疫杀伤功能。

[0038] 根据本发明的实施例,所述免疫细胞是通过下列方式获得的:将前面所述的抗原呈递细胞与具有免疫效应能力的细胞接触,或从肿瘤组织中分选培养(如肿瘤浸润T细胞, Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs),或将能识别前面所述分离的多肽的T细胞受体(T cell receptor, TCR)基因转入T细胞(如TCR-T)。所具体地,所述具有免疫效应能力的细胞为CD8⁺T细胞。通过呈递前面所述的分离的肽的抗原呈递细胞与具有免疫效应能力的细胞接触,抗原呈递细胞可活化具有免疫效应能力的未激活细胞,递呈抗原-前面所述的多肽,进而激活具有免疫效应能力的细胞,大量产生免疫效应细胞,该免疫效应细胞具有特异性杀伤呈递抗原-所述多肽的靶细胞的作用。CD8⁺T细胞接受抗原呈递细胞激活作用的能力更强,获得的CD8⁺T细胞的特异性杀伤呈递抗原-所述分离的肽的靶细胞的作用更强。

[0039] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种抗体。根据本发明的实施例,所述抗体特异性识别前面所述的分离的多肽。由此,可特异性识别肿瘤抗原。根据本发明的实施例,发明发现,所述抗体可特异性识别抗原,与肿瘤细胞或被病毒(如HBV、HCV、HIV、EBV等)感染的细胞特异性结合,进而使得肿瘤细胞或被病毒感染的细胞被吞噬细胞吞噬,实现对肿瘤细胞或被病毒感染的细胞的特异性清除。

[0040] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种疫苗。根据本发明的实施例,所述疫苗包括:前面所述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体。由此,根据本发明实施例的疫苗进入机体内,可以特异性激活特异性T细胞(如CTL、TIL),达到特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,安全性好,在预防癌症方面具有重要意义。

[0041] 根据本发明的实施例,所述疫苗进一步包括佐剂。本发明对于佐剂的类型不做严格限定,可以选择本领域常规佐剂,具体可以根据实际需要灵活选择。

[0042] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种药物。根据本发明的实施例,所述药物包括:前面所述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体。由此,根据本发

明实施例的药物进入机体内,可以特异性激活特异性T细胞(如CTL、TIL),达到特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,安全性好,在治疗癌症方面具有重要意义。

[0043] 根据本发明的实施例,所述药物进一步包括药学上可接受的辅料。

[0044] 在本发明的又一方面,本发明提出了前述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体在制备疫苗中的用途。根据本发明的实施例,所述疫苗用于预防癌症。疫苗进入机体内,可以特异性激活特异性T细胞(如CTL、TIL),达到特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,在预防癌症方面具有重要意义。

[0045] 相应地,本发明提出一种预防癌症的方法,包括:向受试者施用前述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体。

[0046] 根据本发明的实施例,所述疫苗的受试者表达HLA-A11:01和/或HLA-A24:02。如前所述,上述多肽对HLA-A11:01和/或HLA-A24:02具有亲和力,能够自然呈递到细胞表面并与特定的免疫效应细胞结合,并特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,安全性高,在预防癌症方面具有重要意义。

[0047] 在本发明的又一方面,本发明提出了前述分离的多肽、分离的核酸、抗原递呈细胞、免疫细胞和/或抗体在制备药物中的用途。根据本发明的实施例,所述药物用于治疗癌症。药物进入机体内,可以特异性激活特异性T细胞(如CTL、TIL),达到特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,在治疗癌症方面具有重要意义。

[0048] 根据本发明的实施例,所述癌症为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病、甲状腺癌、淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、子宫体癌、卵巢癌、胆囊癌、口腔癌、喉癌、骨癌、睾丸癌或脑癌。

[0049] 根据本发明的实施例,所述药物的受试者表达HLA-A11:01和/或HLA-A24:02。如前所述,上述多肽对HLA-A11:01和/或HLA-A24:02具有亲和力,能够自然呈递到细胞表面并与特定的免疫效应细胞结合,并特异性清除肿瘤微环境中基质细胞、免疫细胞等负向调节的细胞以及表达PD-L1的肿瘤细胞,安全性高,在治疗癌症方面具有重要意义。

[0050] 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。

[0051] 实施例1 多肽的免疫原性预测

[0052] 本发明根据选定的HLA-A11:01和HLA-A24:02等位基因分型,利用生物信息分析流程将PDL1蛋白全长切割成8-11 mer氨基酸的多肽序列,PDL1基因编码的蛋白的长度为290个氨基酸,分子量大小为33275道尔顿,切割的多肽序列1126条。对这1126条多肽分别进行呈递能力预测和亲和力预测。呈递能力打分值用0-1的数值表示,打分值越高表明呈递能力越强,打分值大于0.1则表示该多肽具有呈递能力。亲和力打分值用IC50分值表示,IC50小于500表示该多肽具有亲和力,IC50小于50表示该多肽具有高亲和力。筛选条件是满足以下两个条件之一:(1)呈递打分值>0.5;(2)呈递打分值>0.1且IC50<500。满足条件的多肽序列

(表2和表3)进行下一步T2亲和力验证。

[0053] 表2 多肽序列与HLA-A11:01等位的呈递能力和亲和力预测得分

[0054]

SEQ ID	基因	氨基酸位点	多肽序列	HLA分型	呈递打分值	亲和力打分值
NO:7	PDL1	15-25	LLNAFTVTVPK	HLA-A11:01	0.2182	89.9590
NO:8	PDL1	17-25	NAFTVTVPK	HLA-A11:01	0.7874	15.0000
NO:9	PDL1	32-41	YGSNMTIECK	HLA-A11:01	0.1470	375.2523
NO:10	PDL1	33-41	GSNMTIECK	HLA-A11:01	0.3712	34.6272
NO:11	PDL1	36-46	MTIECKFPVEK	HLA-A11:01	0.5907	6.7074
NO:12	PDL1	37-46	TIECKFPVEK	HLA-A11:01	0.1814	31.6022
NO:13	PDL1	79-89	SSYRQARLLK	HLA-A11:01	0.4621	38.1700
NO:14	PDL1	97-105	AALQITDVK	HLA-A11:01	0.5077	90.5887
NO:15	PDL1	105-113	KLQDAGVYR	HLA-A11:01	0.2106	73.2814
NO:16	PDL1	110-118	GVYRCMISY	HLA-A11:01	0.2449	13.5977
NO:17	PDL1	116-124	ISYGGADYK	HLA-A11:01	0.2952	8.1088
NO:18	PDL1	116-125	ISYGGADYKR	HLA-A11:01	0.1865	71.6428
NO:20	PDL1	120-129	GADYKRITVK	HLA-A11:01	0.1239	58.2933
NO:21	PDL1	126-136	ITVKVNAPYNK	HLA-A11:01	0.3871	85.5169
NO:22	PDL1	127-136	TVKVNAPYNK	HLA-A11:01	0.3067	23.8387
NO:23	PDL1	129-136	KVNAPYNK	HLA-A11:01	0.1047	246.4766
NO:25	PDL1	153-162	LTCQAEGYPK	HLA-A11:01	0.3360	15.1653
NO:27	PDL1	168-178	TSSDHQVLSGK	HLA-A11:01	0.3165	37.5170
NO:28	PDL1	169-178	SSDHQVLSGK	HLA-A11:01	0.4771	56.6550
NO:29	PDL1	181-189	TTNSKREEK	HLA-A11:01	0.3763	36.1821
NO:30	PDL1	189-198	KLFNVTSTLR	HLA-A11:01	0.2815	25.7653
NO:31	PDL1	202-212	TTNEIFYCTFR	HLA-A11:01	0.1389	122.2114
NO:32	PDL1	252-260	GVALTFIFR	HLA-A11:01	0.6331	18.2811
NO:33	PDL1	255-263	LTFIFRLRK	HLA-A11:01	0.2900	6.6192
NO:34	PDL1	273-281	GIQDTNSKK	HLA-A11:01	0.5256	24.7917

[0055] 表3 多肽序列与HLA-A24:02等位的呈递能力和亲和力预测得分

[0056]

SEQ ID	基因	氨基酸位点	多肽序列	HLA分型	呈递打分值	亲和力打分值
NO:1	PDL1	6-15	VFIFMTYWHL	HLA-A24:02	0.3786	11.7606
NO:2	PDL1	6-16	VFIFMTYWHL	HLA-A24:02	0.1079	22.6598
NO:3	PDL1	8-16	IFMTYWHL	HLA-A24:02	0.8124	8.3178
NO:4	PDL1	8-17	IFMTYWHLN	HLA-A24:02	0.1026	69.4832
NO:5	PDL1	11-19	TYWHLNNAF	HLA-A24:02	0.9231	7.5832
NO:6	PDL1	11-21	TYWHLNNAFTV	HLA-A24:02	0.1202	28.6888
NO:19	PDL1	117-126	SYGGADYKRI	HLA-A24:02	0.2008	155.6688
NO:24	PDL1	133-141	PYNKINQRI	HLA-A24:02	0.8545	17.0088
NO:26	PDL1	159-167	GYPKAEVIW	HLA-A24:02	0.1978	74.1338

[0057] 实施例2 多肽T2亲和力验证

[0058] 取 2×10^5 个T2细胞铺用500 μ L含有人类 β_2 微球蛋白(最终浓度,3 μ g/ml)的IMDM无血清培养基重悬到24孔板里,加入表1中的多肽(最终浓度100 μ M),在培养箱(37 °C, 5%CO₂),培养过夜。每个组2个复孔;没有加多肽的T2细胞被用作背景对照。将细胞200g离心5分钟收集细胞。细胞用PBS洗涤两次后,将细胞直接用抗HLA-A11:01/HLA-A24:02的FITC单克隆抗体孵育,4°C维持30分钟。然后用流式细胞仪进行分析。荧光指数(FI)用下列公式计算:FI = [平均荧光强度(MFI)样品 - MFI_{background}] / MFI_{background},其中MFI_{background}代表不含肽的值。FI > 1.5表明该肽具有用于HLA-A11:01或HLA-A24:02分子的高亲和力,1.0 < FI < 1.5表明该肽具有对HLA-A11:01或HLA-A24:02分子中等亲和力,以及0.5 < FI < 1.0表明该肽为HLA-A11:01或HLA-A24:02分子低亲和力。

[0059] 结果如下表所示,选择T2亲和力验证具有高亲和力的12条多肽进行后续的质谱呈递验证、体外刺激扩增CD8⁺T细胞和ELISPOTs方法验证。

[0060] 表4 多肽序列与HLA等位的亲和力的检测结果

[0061]

样本	SEQ ID	加入多肽浓度	平均荧光强度	FI	结论
VFIFMTYWHL	NO:1	100 μ M	690	3.57	高亲和力
VFIFMTYWHL	NO:2	100 μ M	11	-0.93	无亲和力
IFMTYWHL	NO:3	100 μ M	970	5.42	高亲和力
IFMTYWHL	NO:4	100 μ M	103	-0.32	无亲和力
TYWHLNFAF	NO:5	100 μ M	1000	5.62	高亲和力
TYWHLNFAFTV	NO:6	100 μ M	131	-0.13	无亲和力
LLNAFTVTVPK	NO:7	100 μ M	531	2.51	高亲和力
NAFTVTVPK	NO:8	100 μ M	540	2.57	高亲和力
YGSNMTIECK	NO:9	100 μ M	236	0.56	低亲和力
GSNMTIECK	NO:10	100 μ M	102	-0.32	无亲和力
MTIECKFPVEK	NO:11	100 μ M	540	2.57	高亲和力
TIECKFPVEK	NO:12	100 μ M	226	0.50	无亲和力
SSYRQARLLK	NO:13	100 μ M	299	0.98	低亲和力
AALQITDVK	NO:14	100 μ M	738	3.89	高亲和力
KLQDAGVYR	NO:15	100 μ M	3	-0.98	无亲和力
GVYRCMISY	NO:16	100 μ M	31	-0.80	无亲和力
ISYGGADYK	NO:17	100 μ M	574	2.80	高亲和力
ISYGGADYKR	NO:18	100 μ M	348	1.31	中等亲和力
SYGGADYKRI	NO:19	100 μ M	341	1.26	中等亲和力
GADYKRITVK	NO:20	100 μ M	138	-0.09	无亲和力
ITVKVNAPYNK	NO:21	100 μ M	376	1.49	中等亲和力
TVKVNAPYNK	NO:22	100 μ M	39	-0.74	无亲和力
KVNAPYNK	NO:23	100 μ M	90	-0.41	无亲和力
PYNKINQRI	NO:24	100 μ M	990	5.55	高亲和力
LTCQAEGYPK	NO:25	100 μ M	304	1.01	中等亲和力

GYPKAEVIW	NO:26	100μM	29	-0.81	无亲和力
TSSDHQVLSGK	NO:27	100μM	237	0.57	低亲和力
SSDHQVLSGK	NO:28	100μM	344	1.28	中等亲和力
TTNSKREEK	NO:29	100μM	226	0.50	无亲和力
KLFNVTSTLR	NO:30	100μM	294	0.95	低亲和力
TTNEIFYCTFR	NO:31	100μM	373	1.47	中等亲和力
GVALTFIFR	NO:32	100μM	745	3.93	高亲和力
LTFIFRLRK	NO:33	100μM	681	3.51	高亲和力
GIQDTNSKK	NO:34	100μM	852	4.64	高亲和力
Blank		0μM	151	0.00	无亲和力
CMV		100μM	672	3.45	高亲和力

[0062] 实施例3 质谱实验验证多肽在肿瘤细胞表面被HLA分子呈递

[0063] 本发明通过免疫共沉淀-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多肽进行了鉴定。具体方法如下:

[0064] 1)MHC-I限制性T细胞表位肽的分离与纯化: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。SKMEL5及HCT8细胞样本中分别加入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。

[0065] 2)MHC-I限制性T细胞表位肽的质谱鉴定: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-PurC18-AQ1.9um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(200 m/z)。

[0066] 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。

[0067] 结果显示,表4的12条高亲和力多肽中,有11条可以在本实验中鉴定表达并呈递于细胞表面的HLA分子。相应多肽的质谱谱图见图1~4。

[0068] 实施例4 多肽体外刺激扩增CD8⁺T细胞

[0069] 取HLA-A11:01亚型阳性健康志愿者的PBMC细胞,2×10⁶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),IL-4(1000U/ml),诱导贴壁单核细胞为未成熟DC,再用IFN-gamma(100U/ml),LPS(10ng/ml),以及表4具有高亲和力的多肽序列诱导贴壁细胞为多肽特异性成熟DC细胞。将负载过多肽的成熟DC细胞辐照,并与同一志愿者的CD8⁺T细胞共培养,并加入IL-21,3天后,补加IL-2和IL-7,以后于第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。HLA-A24:02亚型也是进行如上操作。计数结果如下,由此表明,表5和表6中的多肽均可在体外刺激扩增CD8⁺T细胞。

[0070] 表5 HLA-A11:01分型多肽培养后计数结果

[0071]

多肽序列	HLA分型	培养前细胞总数	培养后细胞总数
LLNAFTVTVPK	HLA-A11:01	2.0×10 ⁶	7.87×10 ⁶
NAFTVTVPK	HLA-A11:01	2.0×10 ⁶	9.05×10 ⁶
MTIECKFPVEK	HLA-A11:01	2.0×10 ⁶	8.28×10 ⁶
AALQITDVK	HLA-A11:01	2.0×10 ⁶	8.32×10 ⁶
ISYGGADYK	HLA-A11:01	2.0×10 ⁶	8.40×10 ⁶
GVALTFIFR	HLA-A11:01	2.0×10 ⁶	8.30×10 ⁶
LTFIFRLRK	HLA-A11:01	2.0×10 ⁶	9.87×10 ⁶
GIQDTNSKK	HLA-A11:01	2.0×10 ⁶	9.82×10 ⁶

[0072] 表6 HLA-A24:02分型多肽培养后计数结果

[0073]

多肽序列	HLA分型	培养前细胞总数	培养后细胞总数
VFIFMTYWHL	HLA-A24:02	2.0×10 ⁶	7.51×10 ⁶
IFMTYWHL	HLA-A24:02	2.0×10 ⁶	9.95×10 ⁶
TYWHLNFAF	HLA-A24:02	2.0×10 ⁶	8.29×10 ⁶
PYNKINQRI	HLA-A24:02	2.0×10 ⁶	9.87×10 ⁶

[0074] 实施例5 ELISPOTs方法验证多肽激活CD8⁺T细胞免疫反应

[0075] 将实施例4中培养的T细胞与负载过实验多肽或无关多肽(ALADGVQKV)的T2分别加入到人IFN-gamma干扰素ELISPOTs板中进行培养,20小时后,依据ELISPOTs检测(见试剂盒说明书)对ELISPOT实验产生的斑点进行计数。实验多肽具有免疫原性的要求如下:斑点数(多肽)/斑点数(无关多肽)≥2,即实验多肽引起的斑点数超过无关多肽斑点数目的两倍及以上。

[0076] ELISPOTs检测方法原理:由于T2细胞表达HLA-A11:01/HLA-A24:02,因此,T2细胞可以向T细胞提呈HLA-A11:01/HLA-A24:02抗原肽。CD8⁺T细胞特异识别HLA-A11:01/HLA-A24:02和多肽的复合物之后,T细胞能再次激活并分泌IFN-gamma干扰素。而CD8⁺T细胞被激

活分泌的IFN- γ 干扰素可以被ELISPOTs板子上的抗体所捕获,识别IFN- γ 的抗体可以通过偶联在抗体上的酶,降解底物显色,最终产生斑点。斑点的数目代表了被激活分泌IFN- γ 干扰素的细胞数目。ELISPOTs结果见图5和表7。累计有7条多肽的实验组斑点数超过无关组斑点数的2倍及以上,具有较强的免疫原性。

[0077] 表7 多肽刺激特异性CD8⁺T细胞分泌IFN- γ 干扰素

SEQ ID	多肽序列	多肽斑点数	无关多肽斑点数	倍数(实验/无关)
NO:1	VFIFMTYWHL	18±2.72	22±1.41	0.82
NO:3	IFMTYWHL	52±3.79	22±1.41	2.36
NO:5	TYWHLNAF	49±0.18	22±1.41	2.23
NO:7	LLNAFTVTVPK	14±0.61	22±1.41	0.64
NO:8	NAFTVTVPK	65±4.32	22±1.41	2.95
NO:11	MTIECKFPVEK	36±3.37	22±1.41	1.64
NO:14	AALQITDVK	47±1.51	22±1.41	2.14
NO:17	ISYGGADYK	15±3.90	22±1.41	0.68
NO:24	PYNKINQRI	48±3.90	22±1.41	2.18
NO:32	GVALTFIFR	64±4.77	22±1.41	2.91
NO:33	LTFIFRLRK	38±3.86	22±1.41	1.73
NO:34	GIQDTNSKK	60±3.94	22±1.41	2.73

[0079] 实施例6 LDH释放实验证明CD8⁺T细胞多肽特异性杀伤活性

[0080] 将实施例4中培养的细胞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)作为对照,每组设置3个复孔,4h后,取出共培养的细胞上清50 μ l,并加入到50 μ lLDH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,按照下列公式计算靶细胞杀伤T2的杀伤活性。

[0081] 杀伤活性计算公式为:杀伤效率(%)=(实验孔-效应细胞自发释放-靶细胞自发释放+培养基孔)/(靶细胞最大释放-体积校正孔-靶细胞自发释放+培养基孔)×100%。

[0082] 结果见表8、图6和图7,前述具备免疫原性的7条多肽,其相对应的7组特异性T细胞在E:T=20:1组的杀伤效率显著高于无关肽组及不负载肽组,且杀伤效率均超过50%,表明这7条多肽具有刺激产生高杀伤效率特异性T细胞的能力。

[0083] 表8 T细胞特异性识别并杀伤呈递实验多肽的靶细胞

	E:T=1:1	E:T=10:1	E:T=20:1
T2	-2.62%	6.28%	14.99%
T2+Irrelevant	2.03%	8.25%	16.56%
T2+VFIFMTYWHL	4.06%	8.32%	12.84%
T2	0.79%	4.21%	10.66%
T2+Irrelevant	2.61%	7.40%	18.51%
T2+IFMTYWHL	6.73%	34.30%	77.67%
T2	-2.49%	4.89%	10.70%
T2+Irrelevant	0.27%	12.50%	15.22%

T2+TYWHLLNAF	8.65%	42.66%	74.54%
T2	-1.37%	8.83%	14.78%
T2+Irrelevant	-0.06%	5.39%	15.51%
T2+LLNAFTVTVPK	3.38%	9.66%	11.98%
T2	2.06%	5.28%	12.47%
T2+Irrelevant	4.66%	10.02%	13.33%
T2+NAFTVTVPK	9.48%	29.29%	60.41%
T2	-2.09%	4.20%	10.40%
T2+Irrelevant	-1.68%	6.21%	10.68%
T2+MTIECKFPVEK	2.03%	9.76%	11.63%
T2	0.06%	5.93%	10.57%
T2+Irrelevant	3.59%	9.18%	18.69%
T2+AALQITDVK	8.79%	31.20%	58.98%
T2	-0.61%	4.65%	10.98%
T2+Irrelevant	0.71%	6.78%	15.13%
T2+ISYGGADYK	3.17%	8.69%	14.22%
T2	-4.90%	6.22%	10.47%
T2+Irrelevant	2.45%	12.48%	18.35%
T2+PYNKINQRI	9.96%	39.50%	57.71%
T2	-0.76%	6.78%	9.27%
T2+Irrelevant	1.88%	8.76%	15.89%
T2+GVALTFIFR	7.78%	22.31%	52.78%
T2	-0.53%	5.40%	10.43%
T2+Irrelevant	1.62%	6.88%	12.74%
T2+LTFIFRLRK	2.40%	9.01%	16.77%
T2	-2.20%	4.95%	10.42%
T2+Irrelevant	2.32%	6.65%	19.87%
T2+GIQDTNSKK	7.97%	32.55%	59.97%

[0085] 实施例7多肽疫苗的制备及治疗方案

[0086] 1、构建并包装表达多肽的重组慢病毒

[0087] 合成多肽对应的DNA序列，并分别构建对应的慢病毒载体pHBLV-Puro。将慢病毒质粒与pSPAX2和pMD2G辅助质粒共同转染293T细胞，并包装出多肽的慢病毒。

[0088] 2、表达多肽的人源细胞系的建立

[0089] 人黑色素瘤细胞系SKMEL5购买于ATCC(编号:HTB-70)，其HLA亚型为HLA-A11:01阳性。人结直肠癌细胞系HCT8购买于ATCC(编号:CCL-244)，其HLA亚型为HLA-A24:02。细胞培养于含10%胎牛血清，100 U/mL青霉素和链霉素的DMEM培养基中。37℃，5% CO₂的孵箱中培养。将包装好的慢病毒分别转染SKMEL5和HCT8细胞系，并采用Puromycin 抗生素(嘌呤霉素)，持续筛选存活的SKMEL5和HCT8细胞系，最终建立表达多肽的SKMEL5和HCT8细胞系。

[0090] 3、NOD/SCID小鼠人免疫重建

[0091] 采集健康志愿者抗凝外周血600~900 ml。Ficoll分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear, PBMC),收集细胞待用。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小鼠进行人免疫重建。选取4周后免疫重建成功的小鼠准备接种人黑色素瘤细胞系和人结直肠癌细胞系模型。

[0092] 4、人黑色素瘤和人结直肠癌肿瘤模型的构建

[0093] 已建系的人黑色素瘤细胞系和人结直肠癌细胞系,培养于含10%胎牛血清,100 U/mL青霉素和链霉素的DMEM培养基中。37℃, 5% CO₂的孵箱中培养。收集肿瘤细胞,200g/min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%台盼蓝染色并镜检计数,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100ml。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,表明SKMEL5或HCT8皮下瘤模型NOD/SCID小鼠模型构建成功。

[0094] 5、多肽疫苗的制备

[0095] (1)选择实施例3和实施例5中等位分型为HLA-A11:01,并且具有双阳性结果(呈递验证阳性且免疫原性验证阳性)的3条多肽序列:NAFTVTVPK(SEQ ID NO:8)、GVALTFIFR(SEQ ID NO:32)和GIQDTNSKK(SEQ ID NO:34)进行多肽疫苗的制备。

[0096] 将免疫重建4周的SKMEL5皮下瘤模型NOD/SCID小鼠随机分为6组:佐剂组,佐剂+无关多肽组、佐剂+NAFTVTVPK多肽组、佐剂+GVALTFIFR多肽组、佐剂+GIQDTNSKK多肽组和佐剂+多肽(多肽序列为SEQ ID NO:8、32和34)组合组,每组各8只。无关多肽组和多肽组合的首次免疫剂量为100ml/只。上述多肽用PBS重悬后,与150ml/只弗氏完全佐剂混匀后,用PBS调整至300ml/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8中的A和B。

[0097] (2)选择实施例3和实施例5中等位分型为HLA-A24:02,并且具有双阳性结果(呈递验证阳性且免疫原性验证阳性)的3条多肽序列:IFMTYWHLL(SEQ ID NO:3)、TYWHLNNAF(SEQ ID NO:5)和PYNKINQRI(SEQ ID NO:24)进行多肽疫苗的制备。

[0098] 将免疫重建4周的HCT8皮下瘤模型NOD/SCID小鼠随机分为6组:佐剂组,佐剂+无关多肽组、佐剂+IFMTYWHLL多肽组、佐剂+TYWHLNNAF多肽组、佐剂+PYNKINQRI多肽组和佐剂+多肽(多肽序列为SEQ ID NO:3、5和24)组合组,每组各8只。无关多肽组和多肽组合的首次免疫剂量为100ml/只。上述多肽用PBS重悬后,与150ml/只弗氏完全佐剂混匀后,用PBS调整至300ml/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9中的C和D。

[0099] 结果显示,相对于无关多肽负载的多肽疫苗组和佐剂组,佐剂+核心多肽或多肽组合负载的多肽疫苗组可以明显的减缓小鼠肿瘤的生长,并延长小鼠的生存期。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0039] <223> 4
[0040] <400> 4
[0041] Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn
[0042] 1 5 10
[0043] <210> 5
[0044] <211> 9
[0045] <212> PRT
[0046] <213> Artificial Sequence
[0047] <220>
[0048] <223> 5
[0049] <400> 5
[0050] Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn Ala Phe
[0051] 1 5
[0052] <210> 6
[0053] <211> 11
[0054] <212> PRT
[0055] <213> Artificial Sequence
[0056] <220>
[0057] <223> 6
[0058] <400> 6
[0059] Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn Ala Phe Thr Val
[0060] 1 5 10
[0061] <210> 7
[0062] <211> 11
[0063] <212> PRT
[0064] <213> Artificial Sequence
[0065] <220>
[0066] <223> 7
[0067] <400> 7
[0068] Leu Leu Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys
[0069] 1 5 10
[0070] <210> 8
[0071] <211> 9
[0072] <212> PRT
[0073] <213> Artificial Sequence
[0074] <220>
[0075] <223> 8
[0076] <400> 8
[0077] Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys

[0078] 1 5
[0079] <210> 9
[0080] <211> 10
[0081] <212> PRT
[0082] <213> Artificial Sequence
[0083] <220>
[0084] <223> 9
[0085] <400> 9
[0086] Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys
[0087] 1 5 10
[0088] <210> 10
[0089] <211> 9
[0090] <212> PRT
[0091] <213> Artificial Sequence
[0092] <220>
[0093] <223> 10
[0094] <400> 10
[0095] Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys
[0096] 1 5
[0097] <210> 11
[0098] <211> 11
[0099] <212> PRT
[0100] <213> Artificial Sequence
[0101] <220>
[0102] <223> 11
[0103] <400> 11
[0104] Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys
[0105] 1 5 10
[0106] <210> 12
[0107] <211> 10
[0108] <212> PRT
[0109] <213> Artificial Sequence
[0110] <220>
[0111] <223> 12
[0112] <400> 12
[0113] Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys
[0114] 1 5 10
[0115] <210> 13
[0116] <211> 11

[0117] <212> PRT
[0118] <213> Artificial Sequence
[0119] <220>
[0120] <223> 13
[0121] <400> 13
[0122] Ser Ser Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys
[0123] 1 5 10
[0124] <210> 14
[0125] <211> 9
[0126] <212> PRT
[0127] <213> Artificial Sequence
[0128] <220>
[0129] <223> 14
[0130] <400> 14
[0131] Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys
[0132] 1 5
[0133] <210> 15
[0134] <211> 9
[0135] <212> PRT
[0136] <213> Artificial Sequence
[0137] <220>
[0138] <223> 15
[0139] <400> 15
[0140] Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
[0141] 1 5
[0142] <210> 16
[0143] <211> 9
[0144] <212> PRT
[0145] <213> Artificial Sequence
[0146] <220>
[0147] <223> 16
[0148] <400> 16
[0149] Gly Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr
[0150] 1 5
[0151] <210> 17
[0152] <211> 9
[0153] <212> PRT
[0154] <213> Artificial Sequence
[0155] <220>

[0156] <223> 17
[0157] <400> 17
[0158] Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys
[0159] 1 5
[0160] <210> 18
[0161] <211> 10
[0162] <212> PRT
[0163] <213> Artificial Sequence
[0164] <220>
[0165] <223> 18
[0166] <400> 18
[0167] Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg
[0168] 1 5 10
[0169] <210> 19
[0170] <211> 10
[0171] <212> PRT
[0172] <213> Artificial Sequence
[0173] <220>
[0174] <223> 19
[0175] <400> 19
[0176] Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile
[0177] 1 5 10
[0178] <210> 20
[0179] <211> 10
[0180] <212> PRT
[0181] <213> Artificial Sequence
[0182] <220>
[0183] <223> 20
[0184] <400> 20
[0185] Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
[0186] 1 5 10
[0187] <210> 21
[0188] <211> 11
[0189] <212> PRT
[0190] <213> Artificial Sequence
[0191] <220>
[0192] <223> 21
[0193] <400> 21
[0194] Ile Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys

[0195]	1	5	10
[0196]	<210>	22	
[0197]	<211>	10	
[0198]	<212>	PRT	
[0199]	<213>	Artificial Sequence	
[0200]	<220>		
[0201]	<223>	22	
[0202]	<400>	22	
[0203]	Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys		
[0204]	1	5	10
[0205]	<210>	23	
[0206]	<211>	10	
[0207]	<212>	PRT	
[0208]	<213>	Artificial Sequence	
[0209]	<220>		
[0210]	<223>	23	
[0211]	<400>	23	
[0212]	Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys		
[0213]	1	5	10
[0214]	<210>	24	
[0215]	<211>	9	
[0216]	<212>	PRT	
[0217]	<213>	Artificial Sequence	
[0218]	<220>		
[0219]	<223>	24	
[0220]	<400>	24	
[0221]	Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile		
[0222]	1	5	
[0223]	<210>	25	
[0224]	<211>	10	
[0225]	<212>	PRT	
[0226]	<213>	Artificial Sequence	
[0227]	<220>		
[0228]	<223>	25	
[0229]	<400>	25	
[0230]	Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys		
[0231]	1	5	10
[0232]	<210>	26	
[0233]	<211>	9	

- [0234] <212> PRT
[0235] <213> Artificial Sequence
[0236] <220>
[0237] <223> 26
[0238] <400> 26
[0239] Gly Tyr Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp
[0240] 1 5
[0241] <210> 27
[0242] <211> 11
[0243] <212> PRT
[0244] <213> Artificial Sequence
[0245] <220>
[0246] <223> 27
[0247] <400> 27
[0248] Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
[0249] 1 5 10
[0250] <210> 28
[0251] <211> 10
[0252] <212> PRT
[0253] <213> Artificial Sequence
[0254] <220>
[0255] <223> 28
[0256] <400> 28
[0257] Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
[0258] 1 5 10
[0259] <210> 29
[0260] <211> 9
[0261] <212> PRT
[0262] <213> Artificial Sequence
[0263] <220>
[0264] <223> 29
[0265] <400> 29
[0266] Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys
[0267] 1 5
[0268] <210> 30
[0269] <211> 10
[0270] <212> PRT
[0271] <213> Artificial Sequence
[0272] <220>

[0273]	<223>	30
[0274]	<400>	30
[0275]	Lys Leu Phe Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg	
[0276]	1	5 10
[0277]	<210>	31
[0278]	<211>	11
[0279]	<212>	PRT
[0280]	<213>	Artificial Sequence
[0281]	<220>	
[0282]	<223>	31
[0283]	<400>	31
[0284]	Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe Arg	
[0285]	1	5 10
[0286]	<210>	32
[0287]	<211>	9
[0288]	<212>	PRT
[0289]	<213>	Artificial Sequence
[0290]	<220>	
[0291]	<223>	32
[0292]	<400>	32
[0293]	Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile Phe Arg	
[0294]	1	5
[0295]	<210>	33
[0296]	<211>	9
[0297]	<212>	PRT
[0298]	<213>	Artificial Sequence
[0299]	<220>	
[0300]	<223>	33
[0301]	<400>	33
[0302]	Leu Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys	
[0303]	1	5
[0304]	<210>	34
[0305]	<211>	9
[0306]	<212>	PRT
[0307]	<213>	Artificial Sequence
[0308]	<220>	
[0309]	<223>	34
[0310]	<400>	34
[0311]	Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys	

- [0312] 1 5
- [0313] <210> 35
- [0314] <211> 30
- [0315] <212> DNA
- [0316] <213> Artificial Sequence
- [0317] <220>
- [0318] <223> 35
- [0319] <400> 35
- [0320] gtctttatat tcatgaccta ctggcatttg 30
- [0321] <210> 36
- [0322] <211> 33
- [0323] <212> DNA
- [0324] <213> Artificial Sequence
- [0325] <220>
- [0326] <223> 36
- [0327] <400> 36
- [0328] gtctttatat tcatgaccta ctggcatttg ctg 33
- [0329] <210> 37
- [0330] <211> 27
- [0331] <212> DNA
- [0332] <213> Artificial Sequence
- [0333] <220>
- [0334] <223> 37
- [0335] <400> 37
- [0336] atattcatga cctactggca tttgctg 27
- [0337] <210> 38
- [0338] <211> 30
- [0339] <212> DNA
- [0340] <213> Artificial Sequence
- [0341] <220>
- [0342] <223> 38
- [0343] <400> 38
- [0344] atattcatga cctactggca tttgctgaac 30
- [0345] <210> 39
- [0346] <211> 27
- [0347] <212> DNA
- [0348] <213> Artificial Sequence
- [0349] <220>
- [0350] <223> 39

- [0351] <400> 39
[0352] acctactggc atttgctgaa cgcattt 27
[0353] <210> 40
[0354] <211> 33
[0355] <212> DNA
[0356] <213> Artificial Sequence
[0357] <220>
[0358] <223> 40
[0359] <400> 40
[0360] acctactggc atttgctgaa cgcatttact gtc 33
[0361] <210> 41
[0362] <211> 33
[0363] <212> DNA
[0364] <213> Artificial Sequence
[0365] <220>
[0366] <223> 41
[0367] <400> 41
[0368] ttgctgaacg catttactgt cacggttccc aag 33
[0369] <210> 42
[0370] <211> 27
[0371] <212> DNA
[0372] <213> Artificial Sequence
[0373] <220>
[0374] <223> 42
[0375] <400> 42
[0376] aacgcattta ctgtcacggt tcccaag 27
[0377] <210> 43
[0378] <211> 30
[0379] <212> DNA
[0380] <213> Artificial Sequence
[0381] <220>
[0382] <223> 43
[0383] <400> 43
[0384] tatggtagca atatgacaat tgaatgcaaa 30
[0385] <210> 44
[0386] <211> 27
[0387] <212> DNA
[0388] <213> Artificial Sequence
[0389] <220>

- [0390] <223> 44
[0391] <400> 44
[0392] ggtagcaata tgacaattga atgcaaa 27
[0393] <210> 45
[0394] <211> 33
[0395] <212> DNA
[0396] <213> Artificial Sequence
[0397] <220>
[0398] <223> 45
[0399] <400> 45
[0400] atgacaattg aatgcaaatt cccagtagaa aaa 33
[0401] <210> 46
[0402] <211> 30
[0403] <212> DNA
[0404] <213> Artificial Sequence
[0405] <220>
[0406] <223> 46
[0407] <400> 46
[0408] acaattgaat gcaaattccc agtagaaaa 30
[0409] <210> 47
[0410] <211> 33
[0411] <212> DNA
[0412] <213> Artificial Sequence
[0413] <220>
[0414] <223> 47
[0415] <400> 47
[0416] agtagctaca gacagagggc cggctgttg aag 33
[0417] <210> 48
[0418] <211> 27
[0419] <212> DNA
[0420] <213> Artificial Sequence
[0421] <220>
[0422] <223> 48
[0423] <400> 48
[0424] gctgcacttc agatcacaga tgtgaaa 27
[0425] <210> 49
[0426] <211> 27
[0427] <212> DNA
[0428] <213> Artificial Sequence

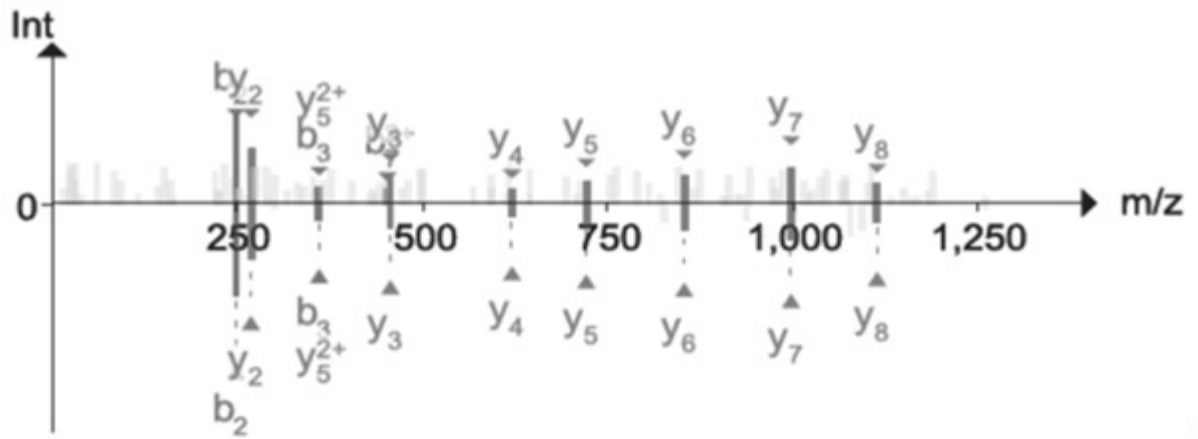
- [0429] <220>
[0430] <223> 49
[0431] <400> 49
[0432] aaattgcagg atgcaggggt gtaccgc 27
[0433] <210> 50
[0434] <211> 27
[0435] <212> DNA
[0436] <213> Artificial Sequence
[0437] <220>
[0438] <223> 50
[0439] <400> 50
[0440] ggggtgtacc gctgcatgat cagctat 27
[0441] <210> 51
[0442] <211> 27
[0443] <212> DNA
[0444] <213> Artificial Sequence
[0445] <220>
[0446] <223> 51
[0447] <400> 51
[0448] atcagctatg gtggtgccga ctacaag 27
[0449] <210> 52
[0450] <211> 30
[0451] <212> DNA
[0452] <213> Artificial Sequence
[0453] <220>
[0454] <223> 52
[0455] <400> 52
[0456] atcagctatg gtggtgccga ctacaagcga 30
[0457] <210> 53
[0458] <211> 30
[0459] <212> DNA
[0460] <213> Artificial Sequence
[0461] <220>
[0462] <223> 53
[0463] <400> 53
[0464] agctatggtg gtgccgacta caagcgaatt 30
[0465] <210> 54
[0466] <211> 30
[0467] <212> DNA

- [0468] <213> Artificial Sequence
[0469] <220>
[0470] <223> 54
[0471] <400> 54
[0472] ggtgccgact acaagcgaat tactgtgaaa 30
[0473] <210> 55
[0474] <211> 33
[0475] <212> DNA
[0476] <213> Artificial Sequence
[0477] <220>
[0478] <223> 55
[0479] <400> 55
[0480] attactgtga aagtcaatgc cccatacaac aaa 33
[0481] <210> 56
[0482] <211> 30
[0483] <212> DNA
[0484] <213> Artificial Sequence
[0485] <220>
[0486] <223> 56
[0487] <400> 56
[0488] actgtgaaag tcaatgcccc atacaacaaa 30
[0489] <210> 57
[0490] <211> 24
[0491] <212> DNA
[0492] <213> Artificial Sequence
[0493] <220>
[0494] <223> 57
[0495] <400> 57
[0496] aaagtcaatg cccatacaaa caaa 24
[0497] <210> 58
[0498] <211> 27
[0499] <212> DNA
[0500] <213> Artificial Sequence
[0501] <220>
[0502] <223> 58
[0503] <400> 58
[0504] ccatacaaca aatcaacca aagaatt 27
[0505] <210> 59
[0506] <211> 30

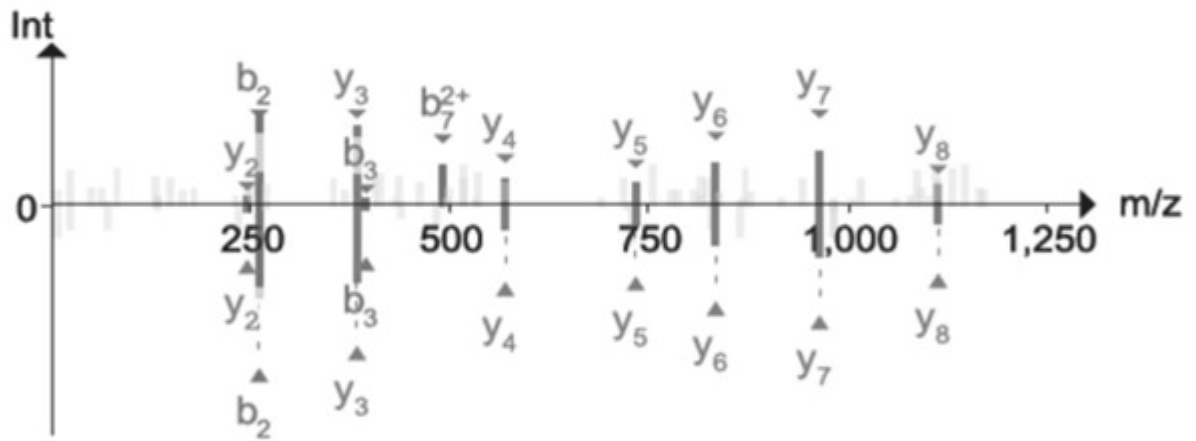
- [0507] <212> DNA
[0508] <213> Artificial Sequence
[0509] <220>
[0510] <223> 59
[0511] <400> 59
[0512] ctgacatgtc aggctgaggg ctaccccaag 30
[0513] <210> 60
[0514] <211> 27
[0515] <212> DNA
[0516] <213> Artificial Sequence
[0517] <220>
[0518] <223> 60
[0519] <400> 60
[0520] ggctacccca aggccgaagt catctgg 27
[0521] <210> 61
[0522] <211> 33
[0523] <212> DNA
[0524] <213> Artificial Sequence
[0525] <220>
[0526] <223> 61
[0527] <400> 61
[0528] acaagcagtg accatcaagt cctgagtggg aag 33
[0529] <210> 62
[0530] <211> 30
[0531] <212> DNA
[0532] <213> Artificial Sequence
[0533] <220>
[0534] <223> 62
[0535] <400> 62
[0536] agcagtgacc atcaagtctt gagggtgtaag 30
[0537] <210> 63
[0538] <211> 27
[0539] <212> DNA
[0540] <213> Artificial Sequence
[0541] <220>
[0542] <223> 63
[0543] <400> 63
[0544] accaccaatt ccaagagaga ggagaag 27
[0545] <210> 64

- [0546] <211> 30
[0547] <212> DNA
[0548] <213> Artificial Sequence
[0549] <220>
[0550] <223> 64
[0551] <400> 64
[0552] aagcttttca atgtgaccag cacactgaga 30
[0553] <210> 65
[0554] <211> 33
[0555] <212> DNA
[0556] <213> Artificial Sequence
[0557] <220>
[0558] <223> 65
[0559] <400> 65
[0560] acaactaatg agattttcta ctgcactttt agg 33
[0561] <210> 66
[0562] <211> 27
[0563] <212> DNA
[0564] <213> Artificial Sequence
[0565] <220>
[0566] <223> 66
[0567] <400> 66
[0568] ggtgtagcac tgacattcat cttccgt 27
[0569] <210> 67
[0570] <211> 27
[0571] <212> DNA
[0572] <213> Artificial Sequence
[0573] <220>
[0574] <223> 67
[0575] <400> 67
[0576] ctgacattca tcttccgttt aagaaaa 27
[0577] <210> 68
[0578] <211> 27
[0579] <212> DNA
[0580] <213> Artificial Sequence
[0581] <220>
[0582] <223> 68
[0583] <400> 68
[0584] ggcattcaag atacaaactc aaagaag 27

VFIFMTYWHL



IFMTYWHL



TYWHLNNAF

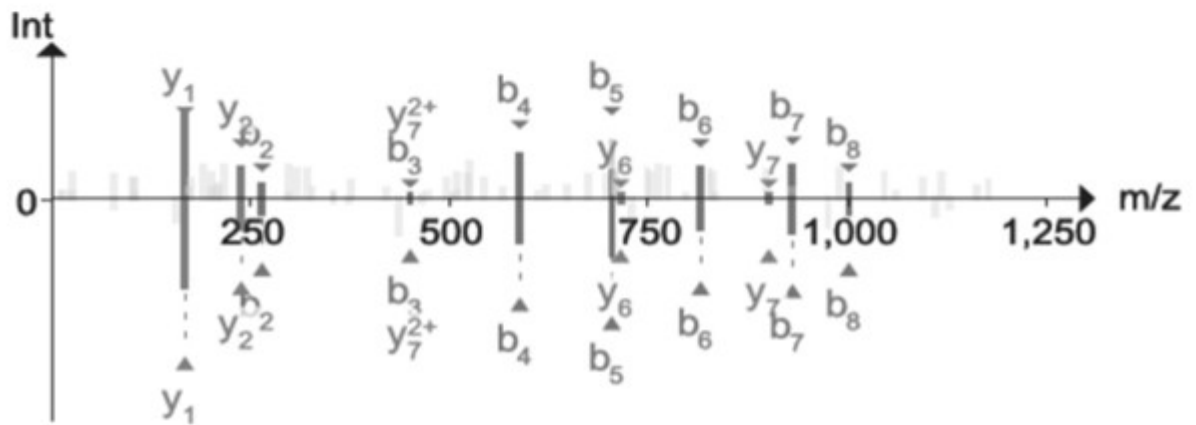
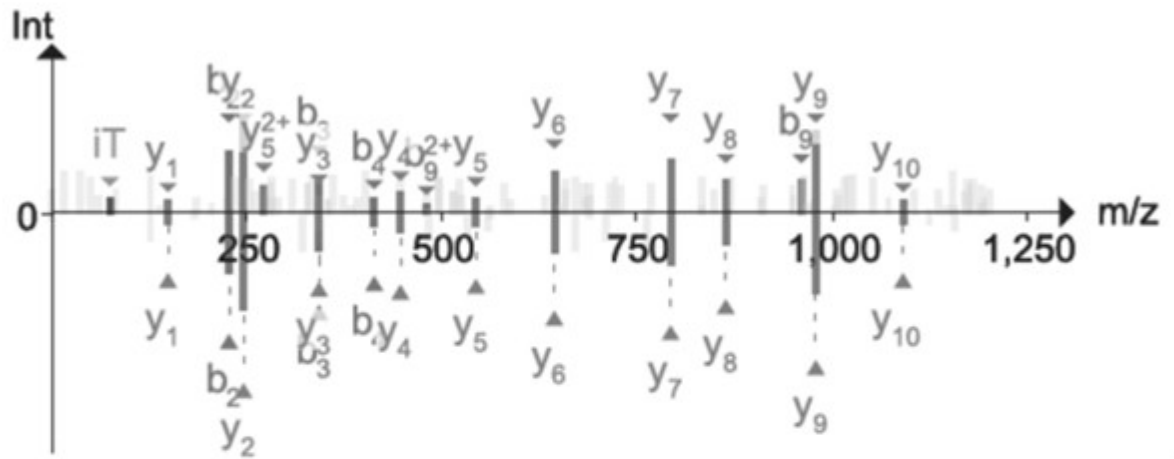
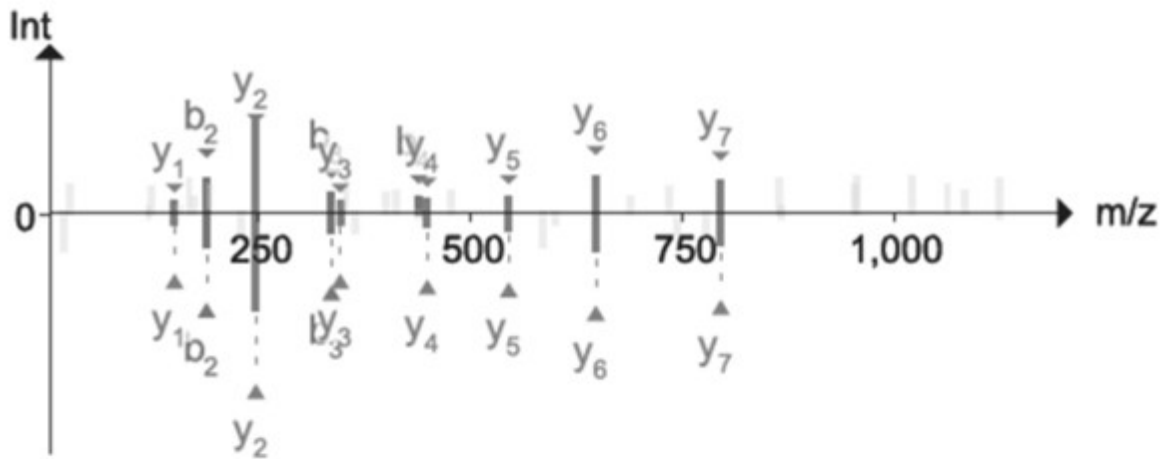


图1

LLNAFTVTVPK



NAFTVTVPK



MTIECKFPVEK

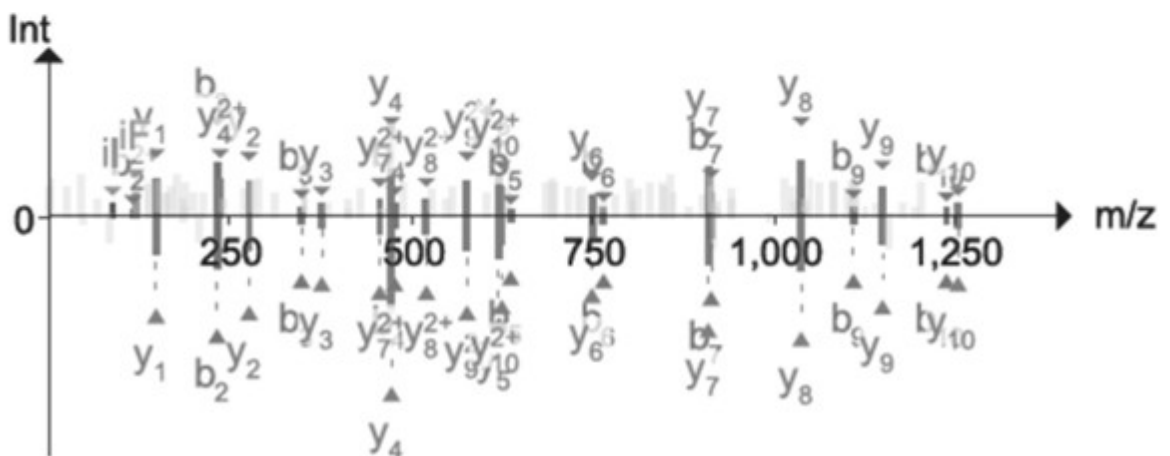
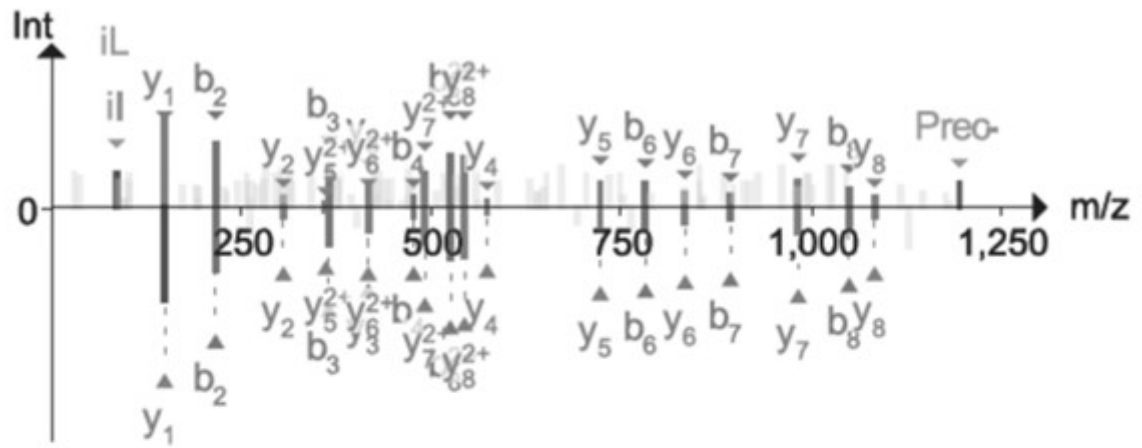


图2

LTFIFRLRK



GIQDTNSKK

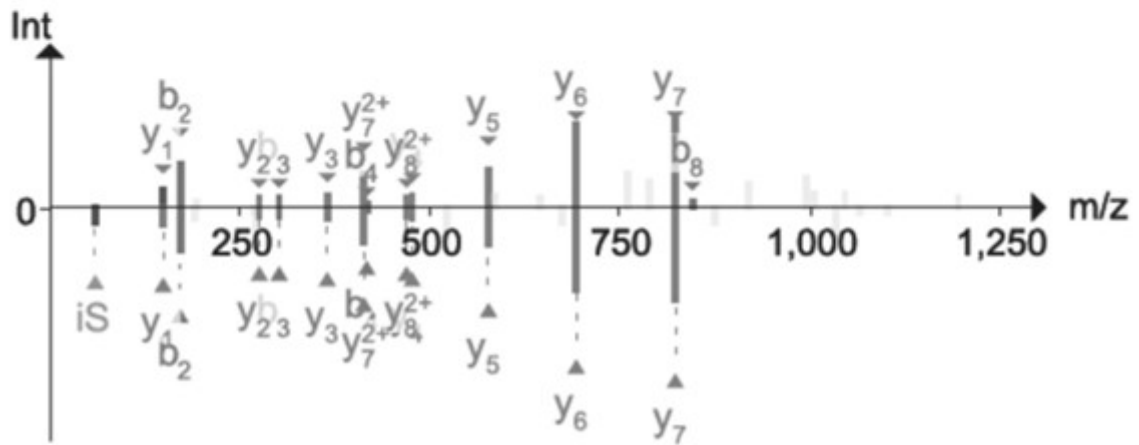


图4

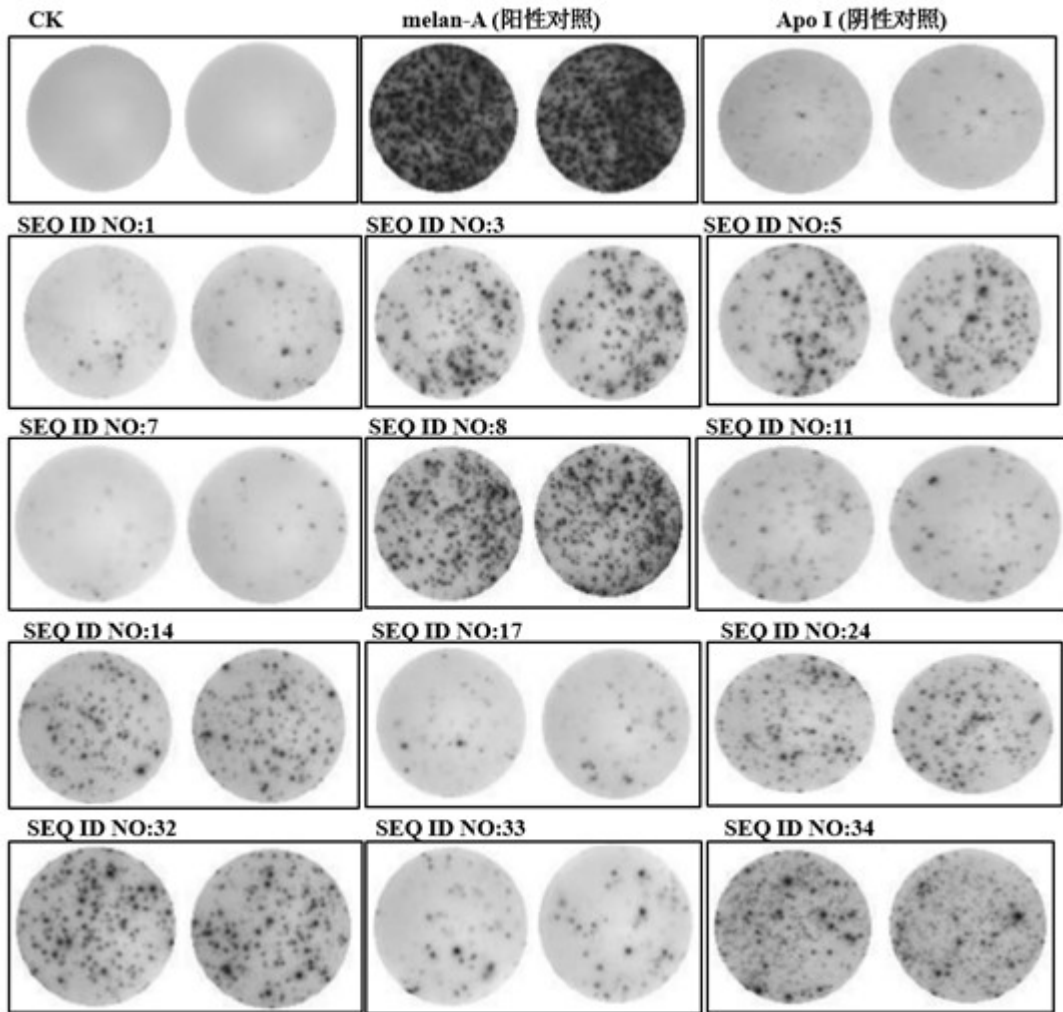


图5

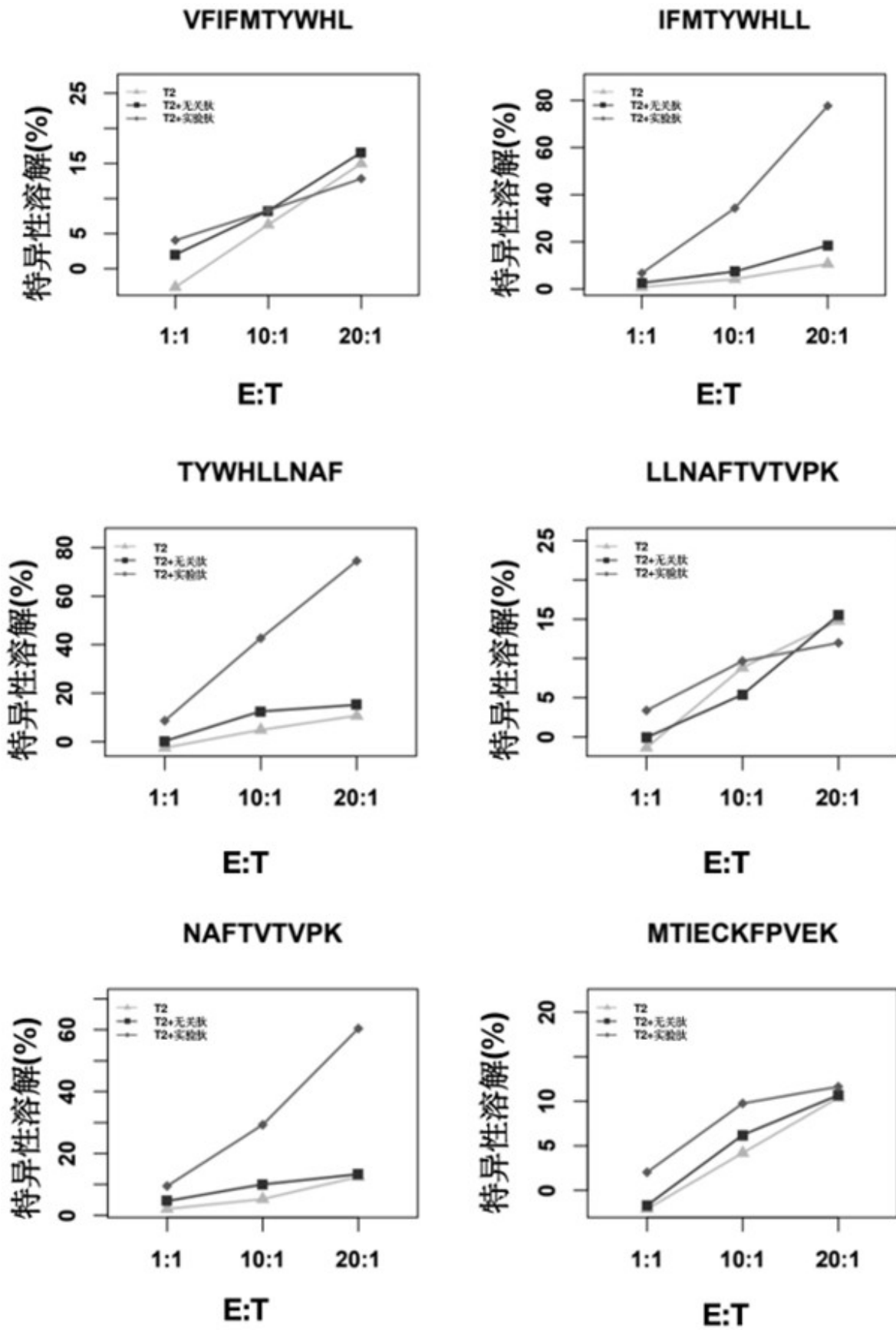


图6

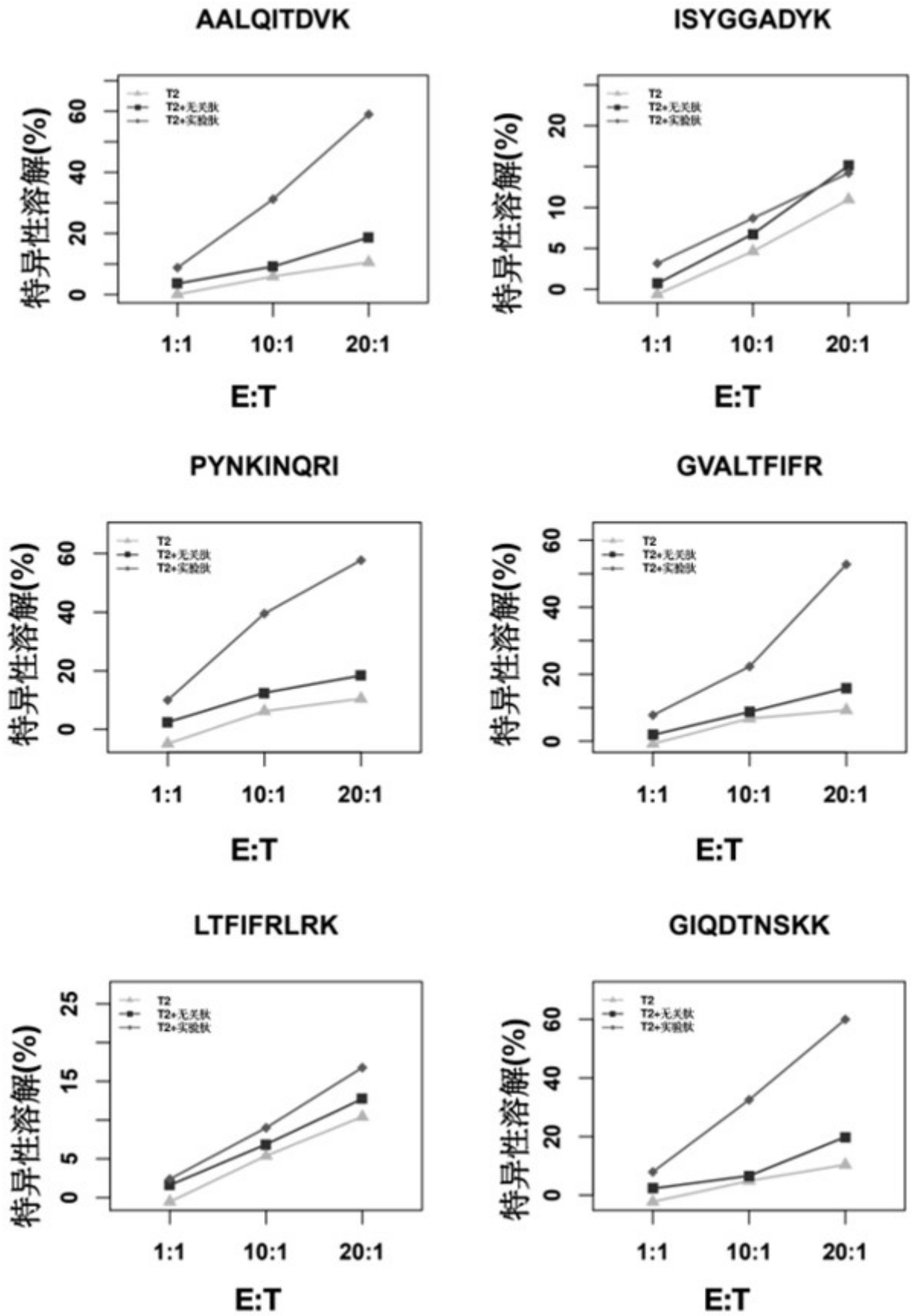


图7

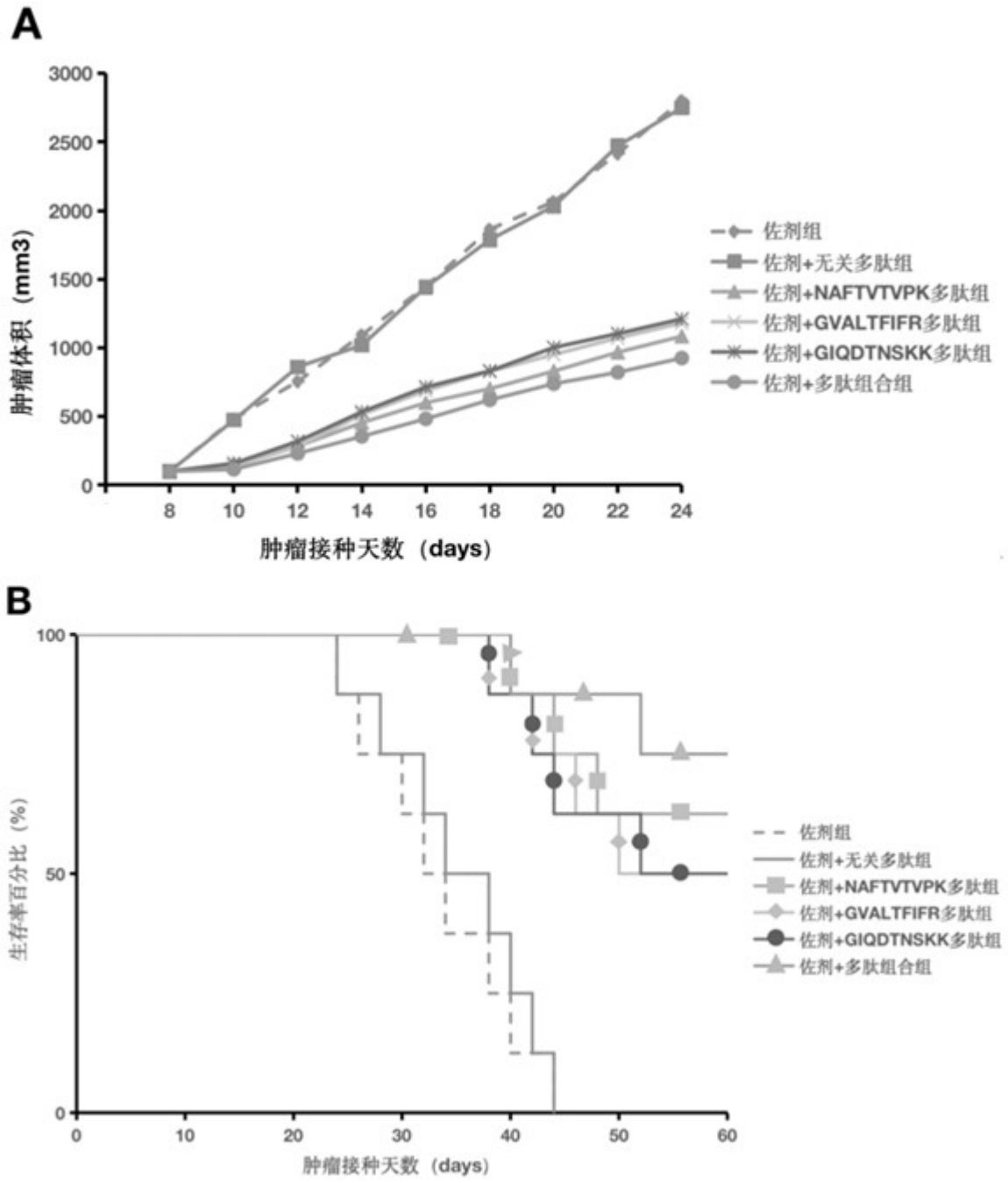


图8

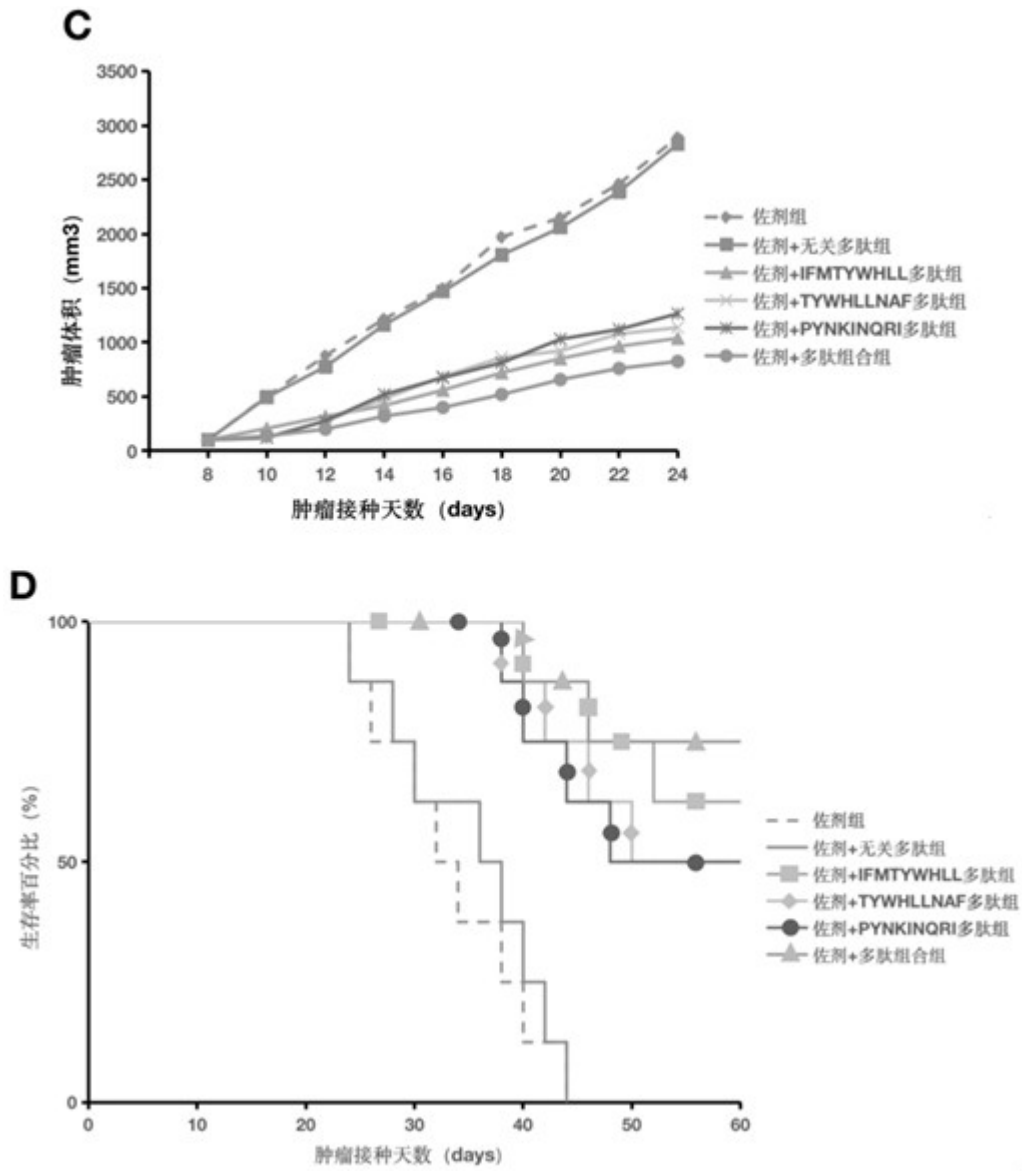


图9