



(21)申請案號：110148742

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 24 日

(51)Int. Cl.：

*C07K7/06 (2006.01)**C07K14/725 (2006.01)**C07K16/28 (2006.01)**C12N5/0783 (2010.01)**A61K35/17 (2015.01)**A61K39/00 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/01/15 德國

10 2021 100 809.3

2021/01/15 美國

63/137,985

2021/10/28 美國

63/272,878

(71)申請人：德商英麥提克生物技術股份有限公司 (德國) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)

德國

(72)發明人：漢能 里卡達 HANNEN, RICARDA (DE)；胡克曼 金斯 HUKELMANN, JENS (DE)；科勒 弗洛里安 KOHLER, FLORIAN (DE)；科瓦萊夫斯基 丹尼爾 KOWALEWSKI, DANIEL (DE)；舒斯特 海科 SCHUSTER, HEIKO (DE)；史古爾 奧利弗 SCHOOR, OLIVER (DE)；羅曼斯 邁克爾 ROMER, MICHAEL (DE)；鄒 志強 TSOU, CHIH-CHIANG (US)；弗里切 金斯 FRITSCH, JENS (DE)

(74)代理人：趙嘉文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：5 共 189 頁

(54)名稱

用於不同類型癌症免疫治療的 H L A 展示肽

(57)摘要

本發明涉及一種肽，其包含一胺基酸序列，所述胺基酸序列係選自由 (i) SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216、以及 (ii) 其一變體序列（其保持與 MHC 分子結合和/或誘導 T 細胞與所述變體肽交叉反應的能力）所組成之群組；或其一藥用鹽。

The invention relates to a peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of (i) SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 216, and (ii) a variant sequence thereof which maintains capacity to bind to MHC molecule(s) and/or induce T cells cross-reacting with said variant peptide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

指定代表圖：

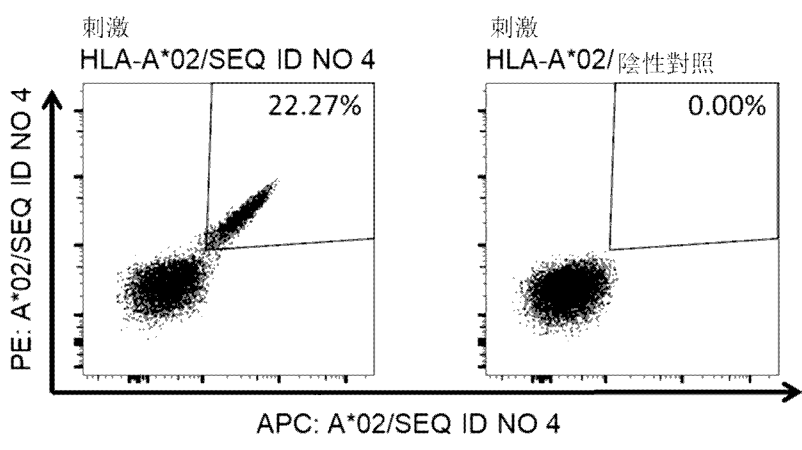


圖 5C

【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於不同類型癌症免疫治療的 HLA 展示肽

【英文發明名稱】 PEPTIDES DISPLAYED BY HLA FOR USE IN
IMMUNOTHERAPY AGAINST DIFFERENT TYPES OF CANCERS

【中文】

本發明涉及一種肽，其包含一胺基酸序列，所述胺基酸序列係選自由 (i) SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216、以及 (ii) 其一變體序列（其保持與 MHC 分子結合和/或誘導 T 細胞與所述變體肽交叉反應的能力）所組成之群組；或其一藥用鹽。

【英文】

The invention relates to a peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of (i) SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 216, and (ii) a variant sequence thereof which maintains capacity to bind to MHC molecule(s) and/or induce T cells cross-reacting with said variant peptide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

【指定代表圖】 圖5C

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於不同類型癌症免疫治療的 HLA 展示肽

【英文發明名稱】 PEPTIDES DISPLAYED BY HLA FOR USE IN

IMMUNOTHERAPY AGAINST DIFFERENT TYPES OF CANCERS

【技術領域】

【0001】 本發明涉及用於免疫治療方法的肽、蛋白質、核酸和細胞。特別是，本發明涉及癌症的免疫療法。本發明還涉及單獨使用或與其他腫瘤相關肽聯合使用的腫瘤相關 T 細胞肽表位，可作為例如刺激抗腫瘤免疫反應或體外刺激 T 細胞和轉入患者的疫苗組合物的活性藥物成分。與主要組織相容性複合體 (MHC) 分子結合的肽或與此同類的肽，亦可能是抗體、可溶性 T 細胞受體和其他結合分子的靶標。

【0002】 本發明涉及數種新型肽序列及其變體，其源自人類腫瘤細胞的 HLA-I 類分子，可用於引發抗腫瘤免疫反應的疫苗組合物中，或作為開發藥物/免疫活性化合物和細胞的目標。

【先前技術】

【0003】 根據世界衛生組織 (WHO) 的資料，癌症列於 2012 年全球範圍內四大非傳染性致命疾病之一。同年，結直腸癌、乳腺癌和呼吸道癌症在高收入國家被列為前 10 位死亡原因內。

【0004】 考慮到治療癌症相關的嚴重副作用和費用，有必要確定可用於治療癌症的因子。

【0005】 也有必要確定代表癌症生物標記的因子，從而更好地診斷癌症、評估預後和預測治療成功性。

【0006】 癌症免疫療法(cancer immunotherapy)

【0007】 癌症的免疫治療代表了特異性靶向癌症細胞的一個選項，同時最大限度地減少副作用。癌症免疫療法利用了腫瘤相關抗原的存在。

【0008】 腫瘤相關抗原 (tumor associated antigen, TAA) 的目前分類主要包括以下幾組：

【0009】 a) 腫瘤-睪丸抗原：有史以來發現的第一個可以被 T 細胞識別的 TAA 屬於此類，最初稱為腫瘤-睪丸 (CT) 抗原。由於睪丸細胞不表達 HLA I 類和 II 類分子，所以，在正常組織中，這些抗原不能被 T 細胞識別，因此在免疫學上可考慮為具有腫瘤特異性。CT 抗原著名的例子是 MAGE 家族成員和 NY-ESO-1。

【0010】 b) 分化抗原：腫瘤和腫瘤所源自的正常組織都含有這些 TAA。大多數已知的分化抗原發現於黑色素瘤和正常黑色素細胞中。實例包括，但不限於，黑色素瘤的酪胺酸酶和 Melan-A/MART-1 或攝護腺癌的 PSA。

【0011】 c) 過量表達的 TAA：在組織學不同類型的腫瘤中以及許多正常組織中都檢測到了編碼廣泛表達的 TAA 的基因，一般表達水準較低。有可能許多由正常組織加工和潛在提呈的表位係低於 T 細胞識別的閾值水準，而它們在腫瘤細胞中的過量表達能夠透過打破先前確立的耐受性而引發一抗癌反應。這類 TAA 的典型例子為 Her-2/neu、生存素(survivin)、端粒酶、或 WT1。

【0012】 d) 腫瘤特異性抗原：這些獨特的 TAA 產生於正常基因（如 β -catenin、CDK4 等）的突變。這些分子變化中有一些與致瘤性轉化和/或進展相

關。腫瘤特異性抗原一般可在不對正常組織帶來自體免疫反應風險的情況下誘導強烈的免疫反應。另一方面，這些 TAA 在多數情況下只與其上確認了有 TAA 的確切腫瘤相關，並且通常在許多個體腫瘤之間並不都共用 TAA。在含有腫瘤特異性（相關性）同種型的蛋白的情況下，如果肽源自腫瘤特異性（相關性）外顯子，也可能出現肽的腫瘤特異性（或相關性）。

【0013】 e) 腫瘤病毒蛋白(oncoviral protein)：這些 TTA 是病毒蛋白，可在致癌過程中發揮關鍵作用，並且由於他們是外源蛋白（非人源蛋白），所以能夠激發 T 細胞反應。這類蛋白的例子有人類乳頭狀瘤 16 型病毒蛋白 E6 和 E7，他們在子宮頸癌中表達。

【0014】 人類內源性反轉錄病毒 (HERV) 構成了人類基因組的顯著部分 (~8%)。這些病毒元素在數百萬年前即已融合入基因組，並從那時期開始一代一代地垂直傳播。絕大多數 HERV 透過突變或截短失去了功能活性，但是有些內源性反轉錄病毒（如HERV-K 進化枝的成員）仍然編碼功能基因，並被證明可形成反轉錄病毒樣顆粒。HERV 前病毒的轉錄受表觀遺傳程序控制，在正常生理條件下保持沉寂。但是，對於些許疾病，特別是各類型癌症，已描述存在再激活和過度表達，導致病毒蛋白的活性轉譯。HERV 衍生蛋白的這種腫瘤特異性表達可用於不同類型的癌症免疫療法。

【0015】 f) 由異常轉譯後修飾產生的 TAA：此類 TAA 可能由腫瘤中既不具有特異性也不過度表達的蛋白產生，但其仍然具有腫瘤相關性（所述相關性由主要在腫瘤中具有活性的轉譯後加工所致）。此類 TAA 產生實例為糖基化模式的改變，導致腫瘤產生 MUC1 的新型表位或在降解過程中導致諸如蛋白剪接的事件，這可能具有也可能不具有腫瘤特異性。

【0016】基於 T 細胞的免疫治療靶向作用於 MHC 分子提呈的來源於腫瘤相關性或腫瘤特異性蛋白的肽表位。腫瘤特異性 T 淋巴細胞所識別的抗原，亦即其表位，可以是源自所有蛋白類型的分子，例如酶、受體、轉錄因子等，其在相對應腫瘤的細胞中被表達，並且與同源未變的細胞相比通常上調。

【0017】MHC 分子有兩類：MHC I 類和 MHC II 類。MHC I 類分子由一條 α 重鏈和 β -2-微球蛋白組成，MHC II 類分子由一條 α 鏈和一條 β 鏈組成。其三維構形形成一個結合槽，用於與肽進行非共價相互作用。

【0018】大部分有核細胞上都可發現 MHC I 類分子。它們提呈主要為內源性蛋白、缺陷核糖體產物 (DRIP) 和較大肽的蛋白水解切割生成的肽。但是，源自內體隔室或外源性來源的肽也經常在 MHC I 類分子上發現。這種 I 類分子的非經典提呈方式在文獻中被稱為交叉提呈 (參見「Brossart and Bevan, 1997」；「Rock et al., 1990」)。MHC II 類分子主要發現於專職抗原呈現細胞 (APC) 上，並且主要提呈由 APC 攝入(例如，在胞吞作用期間，並且隨後被加工)的外源性或跨膜蛋白的肽。

【0019】肽和 MHC I 類分子的複合體，係由負載相應 T 細胞受體 (TCR) 的 CD8 陽性 T 細胞進行識別，而肽和 MHC II 類分子的複合體，係由負載相應 TCR 的 CD4 陽性輔助 T 細胞進行識別。本領域已熟知，TCR、肽和 MHC 由此按 1:1:1 的化學計算量而存在。

【0020】CD4 陽性輔助 T 細胞在誘導和維持 CD8 陽性細胞毒性 T 細胞的有效反應中發揮重要作用。腫瘤相關抗原 (TAA) 衍生的 CD4 陽性 T 細胞表位的識別，對開發能觸發抗腫瘤免疫反應的藥物產品非常重要。在腫瘤部位，輔助 T

細胞維持著對細胞毒性 T 細胞 (CTL) 友好的細胞因子環境，並吸引效應細胞，如 CTL、自然殺手 (NK) 細胞、巨噬細胞和顆粒球。

【0021】 在沒有炎症的情況下，MHC II 類分子的表達主要局限於免疫系統的細胞，尤其是專職抗原呈現細胞 (APC)，例如，單核細胞、單核細胞源性細胞、巨噬細胞、樹突細胞。在癌症患者的腫瘤細胞中發現有 MHC II 類分子的表達 (參見「Dengjel et al., 2006」)。

【0022】 本發明的拉長（較長）肽可充當 MHC II 類活性表位。

【0023】 受MHC II 類表位激活的輔助 T 細胞，其在協調 CTL 於抗腫瘤免疫中的效應功能中發揮著重要作用。觸發 TH1 類型輔助 T 細胞反應的輔助 T 細胞表位，係支援 CD8 陽性殺手 T 細胞的效應功能，其中包括以腫瘤細胞為目標的細胞毒性功能（該類腫瘤細胞表面展示有腫瘤相關肽-MHC 複合體）。以此種方式，腫瘤相關輔助 T 細胞肽表位於單獨使用或與其他腫瘤相關肽聯合使用，可作為刺激抗腫瘤免疫反應的疫苗組合物的活性藥物成分。

【0024】 由於 HLA II 類分子的組成性表達通常僅限於免疫細胞，因此，直接從原發性腫瘤中分離 II 類肽之前被認為是不可能的事。然而，Dengjel 等人成功地在腫瘤中直接識別了多個 MHC II 類表位（參見WO 2007/028574、EP 1 760 088 B1，其內容透過引用整體併入本文）。

【0025】 對於MHC I 類肽若要觸發（引發）細胞免疫反應，其亦必須與 MHC 分子結合。這一過程依賴於 MHC 分子的等位基因(allele)以及肽的胺基酸序列的特異性多型性。MHC I 類結合肽的長度通常為 8-12 個胺基酸殘基，並且在其與 MHC 分子相應結合槽相互作用的序列中通常包含兩個保守殘基（「錨

(anchor)」)。通過這種方式，每個 MHC 的等位基因都有「結合基序(binding motif)」，從而確定哪些肽能與結合槽特異性結合。

【0026】在 MHC I 類依賴性免疫反應中，肽不僅必須能與腫瘤細胞表達的些許 MHC I 類分子結合，它們之後還必須能被負載特異性 TCR 的 T 細胞識別。

【0027】對於被 T 淋巴細胞識別為腫瘤特異性抗原或相關性抗原、以及用於治療的蛋白質，必須具備特定的先決條件。所述抗原應主要由腫瘤細胞表達，而不由正常健康組織表達，或表達數量相對較少。與正常健康組織相比，腫瘤細胞過度提呈肽可能是有利的。更為適宜的情況是，該相應抗原不僅出現於一種腫瘤中，而且濃度（即每個細胞的相應肽的拷貝數目）亦高。腫瘤特異性抗原和腫瘤相關抗原往往是源自因其功能(例如細胞週期控制或細胞凋亡抑制)直接參與正常細胞轉化為腫瘤細胞的蛋白。另外，這些直接導致轉化事件的蛋白的下游靶標可能會被上調，因此可能與腫瘤間接相關。這些間接腫瘤相關抗原也可能是疫苗接種方法的靶標（參見「Singh-Jasuja et al., 2004」，其內容透過引用整體併入）。至關重要的是，表位存在於抗原的胺基酸序列中，以確保這種來自腫瘤相關抗原的肽（「免疫原性肽」）可導致體外或體內 T 細胞反應。

【0028】TAA 可能是開發基於 T 細胞的免疫治療的起點。用於識別和表徵 TAA 的方法通常基於可分離自患者或健康受試者的 T 細胞的使用情況，或基於腫瘤與正常組織之間差別轉錄特性或差別肽表達模式的產生。但是，識別腫瘤組織或人類腫瘤細胞株中過量或選擇性表達的基因，不能提供免疫療法中使用這些基因所轉錄的抗原的準確資訊。這是因為，有著相應 TCR 的 T 細胞必須存在，而且對這個特定表位的免疫耐受性必須不存在或為最低水準，因此，只有這些抗原的表位的單個亞群適合這種應用。

【0029】 在透過根據本發明的特異性 TCR（例如可溶性 TCR）和抗體或其他結合分子（支架）靶向作用於肽-MHC 的情況下，潛在肽的免疫原性是次要的。在這些情況下，提呈是決定因素。

【發明內容】

【0030】 第一方面，本發明涉及一種肽，其包含一胺基酸序列，所述胺基酸序列係選自由 SEQ ID NO 1 至 SEQ ID NO 216、及其變體序列所組成之群組，所述變體序列與 MHC 分子結合和/或誘導 T 細胞與所述變體肽交叉反應；或其一藥用鹽。

【0031】 下表（表 1A）顯示了本發明所述的肽及其各自的序列號 (SEQ ID NO)。

[表 1A] 本發明所述的肽及其各自的 SEQ ID NO。

SEQ ID NO	序列	SEQ ID NO	序列	SEQ ID NO	序列
1	AILAPPAILK	73	NQKGLISL	145	HLFSVLSAI
2	GTVFVLLSK	74	TLNVLITL	146	KVLVDFLK
3	VYIASSFKI	75	TTAAVYILK	147	VEAPHLPSF
4	IQAPALLKV	76	VQSGVPSRF	148	SVYMATTLK
5	METADRPEW	77	YPDVPIGQL	149	SMNSKALRWK
6	SHSLPAFTL	78	TPSHSTPSF	150	IVFLLQQGEK
7	IYIPTNSIYKF	79	SLFRLSISF	151	AVFVNWEQTKK
8	VIYNQTLMK	80	IFDLSDPRF	152	KIMEILNLK
9	LLGVVSHSV	81	KLIAGLIFLK	153	ALNLSRLTV
10	ILMILQPQL	82	VLQSLQHEL	154	TVTSAIVNR
11	TEIGTVIKLF	83	EAAPNIMHY	155	MPWVLMSPF
12	RLQEGLAAL	84	KEFAFLEHSL	156	SLRVSPAL
13	LYDTVTHTF	85	LPHPVNSSL	157	APLRAGWAA
14	ILAPPQRISF	86	VANDRLSFL	158	FQLSGPVT
15	SPVETRSL	87	LHLNPGLSF	159	ASAIPAGAK
16	NFHTLAQQLF	88	KVGAVVHLK	160	EYLGSENVF
17	MVNWSLTNK	89	SPSSPLLLA	161	ILAASFQAR
18	SLSKLVATV	90	LALLGAPPPK	162	LPVHGPLPLL

19	RILEVVRQPK	91	RIVTYIVAK	163	LWALAIPSL
20	ILAPPAILK	92	LNFSDVFLY	164	SHSSPTVSF
21	MLSAQFILK	93	SPIGLSLIL	165	FYNPRPPLI
22	RVIEVVMNSK	94	AVFLGNPSNQK	166	VIFLHQPPK
23	AETKQFWSA	95	YAFRNQTL	167	FALGPIIKQL
24	LIYIPTNSIYK	96	HPRESLNMLVAF	168	AEGPDHHS�
25	GVCSTLTIK	97	ALIVLHLSL	169	RPQGVGPAA
26	ETNTIEFIY	98	FSEIFQDFL	170	LLDSWNILI
27	SQAKQITIW	99	RADEEQASF	171	NVSFEVSLLY
28	ATLQAVTLYK K	100	SPAPSLARFLSL	172	LLYKTLIIL
29	GTFIAPVMK	101	ATNSFLLIK	173	IFTGRNAYF
30	SLKSSILFL	102	FLLLEKGGEL	174	LSGPVTFLR
31	VFLLLPYPRF	103	RPWLSSPTGL	175	MPFLKVPPL
32	TAMTTLMAF	104	GSLQTLPPK	176	AFLLSLISL
33	AYIPFPPLI	105	LVFESVVAA	177	SYLKDHLISL
34	LLFKGLMWK	106	GLLDAFLRL	178	SLFGGLFTR
35	SLATAISAK	107	SVISVLTPK	179	MIFSGVFLR
36	KEIEAQEAA	108	SLQESLPNA	180	QYLTYYPSF
37	RLYSGSSFLY	109	MPKLFLTAC	181	FDLNIGSAY
38	AVVSHFILY	110	APSLARFLSL	182	RPSLPCRSF
39	RELGVGIAL	111	RPIWDVRSA	183	VFVISGSHLF
40	LYQTTIELF	112	ETYGTFVLR	184	VVHGGMSIF
41	APQPRSLAA	113	ALGPMAFRV	185	MPAFLSRASAL
42	LLSRGILIL	114	VPHHLLSSV	186	SQIKSPVVF
43	VFIPSVINL	115	LWEEKPVCL	187	RLCPAAPTGK
44	SLFPYFLNK	116	IYLTKSNLVNM	188	KLPFFTNFL
45	SLFPISLTV	117	GEAAAARPV	189	IWRALGSLF
46	GESIYLLVRKW	118	RLLRLIPIL	190	STQSSLLYLK
47	LYIFTTRPF	119	VLHGLLFTL	191	APLLPGPAA
48	TEMSVSALY	120	APGPRSQGL	192	IPLHFSTAF
49	IYFHLNNWTI	121	ILVTAWKGV	193	ILQLITVNR
50	KTIDLVIVR	122	FTQKINSTW	194	VLYPSHSSF
51	SVFSLVHLFDK	123	TYLESSVRI	195	AWNESSAWLL
52	SPLPHLGPL	124	SPSSNSREL	196	NSENLLVY
53	TTLENLPQK	125	ALAQGANKL	197	HHTQLVFVF
54	ASSPVILL	126	NPELLVILL	198	MTYQQPFSSNR
55	SPVSASWIL	127	TVATQVATSK	199	RAPLPLLLL
56	DVDIHKDLY	128	MTFVPLLAR	200	GLLGTLRVL
57	IIDRILL	129	IPISIFKMA	201	VWILQKVNLA
58	REQLDGATL	130	ITPDSIPSV	202	KLLLLSSVK
59	AVDLGVLEL	131	TILAKQNVL	203	AILVPQPPK
60	VSPDEVLLALW	132	LYLETRSEF	204	VVRASSGLK

61	GLIAFAIFK	133	KFPPSASEF	205	SLIPIVPFKS
62	SFSLLLPYL	134	MPCTTILRI	206	VEGVHVFVQLL
63	MPANFETIGF	135	SADTAELLL	207	LPALLRSL
64	LPTRSLPAF	136	YSSEIWDLY	208	YVGPTRLEL
65	NSDLFYLLL	137	MPIQVLKGL	209	AILLPQLPK
66	RPLILIRI	138	RTLPLEGSPK	210	ASRIQVILL
67	GRFWLPFNF	139	EEGRIITKW	211	VVTIVMHIYK
68	TVDKGELLY	140	QPAPQPLL	212	WETRLHNLW
69	KYPTIICGF	141	REVAGASAL	213	TLLSFKTVLFK
70	LIAGLIFLK	142	YMLEMDNSMKI	214	RPSPVRVAAL
71	LIDSLLLLL	143	AVLGALLRH	215	TPLTRTTL
72	GSCSFALSR	144	IIVPSFYK	216	ILRTVLPST

[表 1B]本發明所述的肽。

SEQ ID NO	序列
217	ELAGIGILTV
218	YLLPAIVHI

【0032】 本發明總體上進一步涉及本發明所述的肽用於治療增殖性疾病。該背景下的增殖性疾病為，例如，急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌、及子宮內膜癌。

【0033】 特別優選為，本發明所述的肽（單獨或組合），其選自由 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 所組成之群組。

【0034】 因此，本發明的另一方面涉及本發明所述的肽（優選為組合）用於治療增殖性疾病的用途。

【0035】 本發明還涉及本發明所述的肽，其具有與 MHC I 類分子或以拉長形式(例如長度變體)與 MHC-II 類分子結合的能力。

【0036】本發明進一步涉及拉長肽，其在給藥（例如作為疫苗）後可在細胞內加工，產生由或基本上由根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的胺基酸序列組成的較短肽，然後由 HLA 提呈於細胞表面。

【0037】本發明進一步涉及本發明所述的肽，其中，所述肽（每種肽）由或基本上由根據 SEQ ID NO 1 至 SEQ ID NO 216 的一胺基酸序列組成。

【0038】本發明進一步涉及本發明所述的肽，其中，所述肽包含非肽鍵。

【0039】本發明進一步涉及本發明所述的肽，其中，所述肽為一融合蛋白的一部分，特別是與 HLA-DR 抗原相關不變鏈 (Ii) 的 N-端胺基酸融合，或與抗體（例如，對樹突細胞特異性的抗體）融合(或進入抗體的序列)。

【0040】本發明進一步涉及一種核酸，其編碼本發明的肽。本發明進一步涉及本發明所述的核酸，為 DNA、cDNA、PNA、RNA、或其組合。

【0041】本發明進一步涉及一種表達載體，其能表達和/或表達本發明的核酸。

【0042】本發明進一步涉及本發明的肽、本發明的核酸或本發明的表達載體，用於治療疾病及用於藥物中，特別是用於治療癌症。

【0043】本發明進一步涉及一種抗體，其對本發明的肽或本發明的肽與 MHC 的複合體具特異性，以及一種製造這些抗體的方法。

【0044】本發明還可能涉及一種產生抗體的方法，所述抗體特異性結合於一與肽複合的 MHC I 類分子，所述肽包含根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 所述的一胺基酸序列（或由其組成或基本上由其組成），所述方法包括：用一與肽複合的可溶性形式 MHC I 類分子，對含有表達所述 MHC I 類分子的細胞的基因工程改造非人類哺乳動物進行免疫，所述肽由根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 所述的一胺基酸序列組成或基本上由其組成，；分離所述非人類哺乳動物的抗體產生細胞的 mRNA 分子；產生一個噬菌體展示庫，其展示由所述 mRNA

第10頁，共 122 頁(發明說明書)

分子編碼的蛋白分子；以及分離所述噬菌體展示庫的至少一個噬菌體，其中，所述至少一個噬菌體展示特異性結合於所述 MHC I 類分子的所述抗體，所述 MHC I 類分子與一肽複合，所述肽包含根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 所述的一胺基酸序列（或由其組成或基本上由其組成）。另一方面，抗體可為一單株抗體。

【0045】於一方面，所述抗體可結合於與一抗原複合的所述 MHC I 類分子，所述抗原包含根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 所述的一胺基酸序列（或由其組成或基本上由其組成），其結合親和力 (K_d) 為 < 100 nM，更優選為 < 50 nM，更優選為 < 10 nM，更優選為 < 1 nM，更優選為 < 0.1 nM，更優選為 < 0.01 nM。

【0046】另一方面，所述產生抗體的方法還可包括將抗體人源化。在一些方面，所述產生抗體的方法可進一步包括將抗體與一毒素偶合。另一方面，所述產生抗體的方法還可包括將抗體與一免疫刺激結構域偶合。

【0047】於一方面，所述產生抗體的方法可進一步包括將抗體修飾為雙特異性抗體形式。另一方面，所述產生抗體的方法可進一步包括將抗體修飾為嵌合抗體形式。另一方面，所述產生抗體的方法可進一步包括將抗體修飾為 Fv 形式。於一方面，所述產生抗體的方法可進一步包括將抗體修飾為 Fab 形式。另一方面，所述產生抗體的方法可進一步包括將抗體修飾為 Fab' 形式。另一方面，所述產生抗體的方法可進一步包括用一放射性核苷酸標記抗體，所述放射性核苷酸可選自由 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P 和 ^{35}S 所組成的群組。另一方面，所述非人類哺乳動物可為小鼠。

【0048】本發明進一步涉及一種 TCR，特別是可溶性 TCR 和改造至自體或異體 T 細胞中的克隆 TCR，以及一種製造這些 TCR 以及載有所述 TCR 或與所述 TCR 發生交叉反應的 NK 細胞或其他細胞的方法。可溶性 TCR 的結合親和力 (K_d) 可為 < 100 nM，更優選為 < 50 nM，更優選為 < 10 nM，更優選為 < 1 nM，

更優選為 $<0.1\text{ nM}$ ，更優選為 $<0.01\text{ nM}$ 。而基於克隆細胞的 TCR 的結合親和力 (K_d) 可為 $<50\text{ }\mu\text{M}$ ，更優選為 $<25\text{ }\mu\text{M}$ ，更優選為 $<10\text{ }\mu\text{M}$ ，更優選為 $<1\text{ }\mu\text{M}$ ，更優選為 $<0.1\text{ }\mu\text{M}$ 。

【0049】 所述抗體和 TCR 是本發明所述的肽於現有免疫治療用途的另外實施方案。

【0050】 本發明進一步涉及一種宿主細胞，其包含本發明的核酸或前述表達載體。本發明進一步涉及本發明的宿主細胞，其為一抗原呈現細胞，優選為樹突細胞。

【0051】 本發明進一步涉及本發明所述的方法，其中，透過使一足夠量的抗原與一抗原呈現細胞接觸，以將抗原載入表達於合適的抗原呈現細胞或人工的抗原呈現細胞表面的 MHC I 或 II 類分子。

【0052】 本發明進一步涉及本發明所述的方法，其中，該抗原呈現細胞包括一表達載體，該表達載體有能力表達含 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的所述肽。

【0053】 本發明進一步涉及一種以本發明的方法製造的激活 T 細胞，其中，所述 T 細胞有選擇性地識別一表達一多肽的細胞，所述多肽包含一本發明的胺基酸序列。

【0054】 本發明進一步涉及一種殺傷患者體內靶細胞的方法，其中，患者體內的靶細胞異常表達一含本發明任何一胺基酸序列的多肽，所述方法包括給予患者按本發明製造的一有效量 T 細胞。

【0055】 本發明進一步涉及一種根據本發明所述的任何肽、核酸、表達載體、細胞、激活 T 淋巴細胞、TCR 或抗體或其他肽及/或肽-MHC 結合分子之用途，其係用於一藥物或製造一藥物。所述藥物優選為具有抗癌活性。優選情況為，所述藥物為基於可溶性 TCR 或抗體的細胞療法、疫苗或蛋白質。

【0056】 本發明進一步涉及本發明所述的用途，其中，所述癌症為急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌，優選為急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌細胞。

【0057】 本發明進一步涉及一種基於本發明所述的肽的生物標記 (biomarker)，本文稱為「靶標(targets)」，其可用於診斷癌症，優選為急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌。所述生物標記可為肽本身的過度提呈，或相對應基因的過度表達。所述生物標記也可以用於預測治療成功的可能性，優選為免疫療法，最優選為靶向作用於所述生物標記識別的相同靶標的免疫療法。例如，抗體或可溶性 TCR 可用於對腫瘤切片進行染色，以檢測與 MHC 複合之目標肽的存在。

【0058】 或者，所述抗體具有進一步的效應功能，如免疫刺激域或毒素。

【0059】 本發明還涉及這些新靶標在癌症治療中的用途。

【圖式簡單說明】

【0060】

[圖 1A] 至 [圖1E] 顯示了與正常組織相比各種肽在不同癌症組織中的過度提呈。上面部分：根據技術重複測量值的中位 MS 信號強度繪製為點，檢測到該肽的相應 HLA 同種異型的單一正常組織為灰色點（圖左側），腫瘤樣本為黑點（圖右側）。盒顯示了標準化信號強度的中位、第 25 和第 75 百分位數，而鬚延伸到最低數據點仍在下四分位數的 1.5 四分位數間距 (IQR) 內，最高資料點仍在下四分位數的 1.5 IQR 內。下面部分：每個器官的相對肽檢測頻率顯示為脊柱圖。圖表下方的數字表示針對每個器官（HLA-A*02 陽性正常樣本 N > 750，HLA-A*03 陽性正常樣本 N > 210，HLA-A*24 正常樣本 N > 180，HLA-B*44 正常樣本 N > 210）或腫瘤適應症（HLA-A*02 陽性癌症樣本 N > 675，HLA-A*03 陽性癌症樣本 N > 180，HLA-A*24 陽性癌症樣本 N > 330，HLA-B*44 陽性癌症樣本 N > 210）分析的樣本總數中檢測到肽的樣本數。

如果在一個樣本上檢測到肽，但因技術原因無法量化，則該樣本納入檢測頻率圖中，但圖表上面部分不顯示任何點。組織（從左到右）：正常樣本：脂肪（脂肪組織）；adrenal gl（腎上腺）；膽管；膀胱；血細胞；bloodvess（血管）；骨髓；腦；乳腺；esoph（食管）；眼；gall bl（膽囊）；頭頸；心臟；intest. la（大腸）；intest. sm（小腸）；腎；肝；肺；淋巴結；nerve cent（中樞神經）；nerve perith（周圍神經）；卵巢；胰腺；parathy（甲狀旁腺）；perit（腹膜）；pituit（垂體）；胎盤；胸膜；攝護腺；skel. mus（骨骼肌）；皮膚；脊髓；脾；胃；睪丸；胸腺；甲狀腺；氣管；輸尿管；子宮。腫瘤樣本：AML（急性骨髓性白血病）；BRCA（乳腺癌）；CCC（膽管細胞癌）；CLL（慢性淋巴細胞白血病）；CRC（結直腸癌）；GBC（膽囊癌）；GBM（膠質母細胞瘤）；GC（胃癌）；GEJC（胃食管交界癌）；HCC（肝細胞癌）；HNSCC（頭頸部鱗狀細胞癌）；MEL（黑色素瘤）；NHL（非霍奇金淋巴瘤）；NSCLCaden（非小細胞

肺癌腺癌)；NSCLCother (不能明確命名為 NSCLCadeno 或 NSCLCsquam 的 NSCLC 樣本)；NSCLCsquam (鱗狀細胞非小細胞肺癌)；OC (卵巢癌)；OSCAR (食管癌)；PACA (胰腺癌)；PRCA (攝護腺癌)；RCC (腎細胞癌)；SCLC (小細胞肺癌)；UBC (膀胱癌) 和 UEC (子宮內膜癌)。圖 1A) 肽：AILAPPAILK (SEQ ID NO: 1)，圖 1B) 肽：GTVFVLLSK (SEQ ID NO: 2)，圖 1C) 肽：VYIASSFKI (SEQ ID NO: 3)，圖 1D) 肽：IQAPALLKV (SEQ ID NO: 4)，圖 1E) 肽：METADRPEW (SEQ ID NO: 5)。

[圖 2A] 至 [圖 2E] 顯示了本發明的源基因的示例性表現圖譜，其在不同癌症樣本中過度表現。腫瘤 (黑點) 和正常 (灰點) 樣本根據器官起源進行分組。盒鬚圖代表中位值、第 25 和第 75 百分位數 (盒) + 鬚，鬚延伸到最低數據點仍在下四分位數的 1.5 四分位數間距 (IQR) 內，最高資料點仍在四分位數的 1.5 IQR 內。組織 (從左到右)：正常樣本：脂肪 (脂肪組織)；adrenal gl (腎上腺)；膽管；膀胱；血細胞；bloodvess (血管)；骨髓；腦；乳腺；esoph (食管)；眼；gall bl (膽囊)；頭頸；心臟；intest. la (大腸)；intest. sm (小腸)；腎；肝；肺；淋巴結；nerve perith (周圍神經)；卵巢；胰腺；parathy (甲狀旁腺)；perit (腹膜)；pituit (垂體)；胎盤；胸膜；攝護腺；skel. mus (骨骼肌)；皮膚；脊髓；脾；胃；睪丸；胸腺；甲狀腺；氣管；輸尿管；子宮。腫瘤樣本：AML (急性骨髓性白血病)；BRCA (乳腺癌)；CCC (膽管細胞癌)；CLL (慢性淋巴細胞白血病)；CRC (結直腸癌)；GBC (膽囊癌)；GBM (膠質母細胞瘤)；GC (胃癌)；GEJC (胃食管交界癌)；HCC (肝細胞癌)；HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)；MEL (黑色素瘤)；NHL (非霍奇金淋巴瘤)；NSCLCadeno (非小細胞肺癌腺癌)；NSCLCother (不能明確命名為 NSCLCadeno 或 NSCLCsquam 的 NSCLC 樣本)；NSCLCsquam (鱗狀細胞非小細胞肺癌)；OC (卵巢癌)；OSCAR (食管癌)；PACA (胰腺癌)；PRCA (攝護腺癌)；

RCC（腎細胞癌）；SCLC（小細胞肺癌）；UBC（膀胱癌）和 UEC（子宮內膜癌）。圖 2A) 肽：SHSLPAFTL (SEQ ID NO: 6)，圖 2B) 肽：IYIPTNSIYKF (SEQ ID NO: 7)，圖 2C) 肽：VIYNQTLMK (SEQ ID NO: 8)，圖 2D) 肽：LLGVVSHSV (SEQ ID NO: 9)，圖 2E) 肽：ILMILQPQL (SEQ ID NO: 10)。

[圖 3] 顯示了一種示例性肽 TEIGTVIKLF (SEQ ID NO: 11) 的 IdentControl 實驗結果。透過 IdentControl 比較穩定同位素標記 (SIL) 標準品在資料依賴性採集 (DDA) 模式下的片段，確認了該肽。使用內部確定的光譜相關閾值確認了同一性。

[圖 4] 顯示了肽 ALGPMAFRV (SEQ ID NO: 113) 的 CoElution 實驗的一個示例性結果。透過 CoElution 使用穩定同位素標記 (SIL) 內標和靶向 MS (sPRM 或 IS-PRM)，確認了該肽。使用了 SIL 肽和天然肽的非重疊 MS2 分離窗。使用非 HLA 肽組樣本（例如，胰蛋白酶消化物或 5% FA）作為基質進行了對照實驗，以確認 SIL 內標的同位素純度。根據專家人工審查的客觀、預確定標準確認了肽同一性。

[圖 5A] 至 [圖5E] 顯示了健康 HLA-A*02+、A*03+、A*24+ 或 B*44+ 供體的肽特異性體外 CD8+ T 細胞反應的示例性結果。CD8+ T 細胞使用人工 APC 促發，該人工 APC 塗覆有抗 CD28 mAb 和與 SEQ ID NO: 1 (A，左圖)、SEQ ID NO: 3 (B，左圖)、SEQ ID NO: 4 (C，左圖)、SEQ ID NO: 5 (D，左圖)、或 SEQ ID NO: 11 (E，左圖) 複合的 HLA-A*02、A*03、A*24、或 B*44。經過 3 個週期的刺激後，用 A*03/SEQ ID NO: 1 (A)、A*24/SEQ ID NO: 3 (B)、A*02/SEQ ID NO: 4 (C)、B*44/SEQ ID NO: 5 (D)、或 B*44/SEQ ID NO: 11 (E) 的 2D 多聚體染色法對肽反應性細胞進行檢測。右圖 (A、B、C、D 和 E) 顯示了用與目標複合體相同同種異型的無關 HLA/肽複合體刺激的細胞的對照染色。針對 CD8+ 淋巴細胞對活的單細胞進行門控。Boolean 門控有助於排除使用對不同

肽特異性的多聚體檢測的假陽性事件。提示了在CD8+ 淋巴細胞中特異性多聚體 + 細胞的頻率。

【實施方式】

【0061】 是否能刺激免疫反應取決於是否存在被宿主免疫系統視為外來物的抗原。發現腫瘤相關抗原的存在增加了運用宿主免疫系統干預腫瘤生長的可能性。對於癌症免疫療法，目前正在探索各種利用免疫系統的體液和細胞免疫作用的機制。

【0062】 細胞免疫反應的特定元素能特異性地識別和破壞腫瘤細胞。從腫瘤浸潤細胞群或外周血中分離出的 T 細胞，表明這些細胞在癌症的天然免疫防禦中發揮了重要作用。特別是 CD8 陽性 T 細胞在這種反應中發揮重要作用，其識別負載通常為8 至 12 個胺基酸殘基的肽的MHC I 類分子，所述肽源自位於細胞質液中的蛋白或缺損核糖體產物 (DRiPs)。人類的 MHC 分子也稱為人類白血球抗原 (HLA)。

【0063】 除非另有說明，否則本文使用的所有術語定義如下。

【0064】 術語「T 細胞反應」是指由一種肽在體外或體內誘導的特異性增殖和效應功能的激活。對於 MHC I 類限制性細胞毒性 T 細胞，效應功能可能為肽脈衝、肽前體脈衝或天然肽提呈靶細胞的裂解、細胞因子(優選為肽誘導的干擾素- γ 、TNF- α 或 IL-2)的分泌、效應分子(優選為肽誘導的顆粒酶或穿孔素)的分泌、或去顆粒作用。

【0065】 本文所用術語「肽」係指一系列的胺基酸殘基，通常透過相鄰胺基酸的 α -胺基和羧基之間的肽鍵來彼此連接。

【0066】此外，術語「肽」應包括一系列的胺基酸殘基的鹽，通常透過相鄰胺基酸的 α -胺基和羧基之間的肽鍵來彼此連接。優選的情況是，鹽為肽的藥用鹽，例如：氯化物或乙酸（三氟乙酸）鹽。必須注意的是，本發明所述的肽的鹽與其於體內狀態的肽顯著不同，因為所述肽在體內不是鹽形式或不與相對離子相關。

【0067】術語「肽」應也包括「寡肽」。本文使用的術語「寡肽」是指一系列的胺基酸殘基，通常透過相鄰胺基酸的 α -胺基和羧基之間的肽鍵來彼此連接。寡肽的長度對於本發明來說並不十分關鍵，只要在寡肽中保持正確的表位即可。

【0068】術語「多肽」係指一系列的胺基酸殘基，通常透過相鄰胺基酸的 α -胺基和羧基之間的肽鍵來彼此連接。多肽的長度對於本發明來說並不十分關鍵，只要保持正確的表位即可。與術語肽或寡肽相對，多肽這一術語是指包含多於約 30 個胺基酸殘基的分子。

【0069】肽、寡肽、蛋白質或編碼所述分子的多核苷酸如果能誘導一免疫反應，則具有「免疫原性(immunogenic)」(因此是本發明中的一種「免疫原(immunogen)」)。在本發明的情況下，免疫原性的更具體定義是誘導一 T 細胞反應的能力。因此，「免疫原」是一種能夠誘導一免疫反應的分子，並且在本發明的情況下，是一種能誘導 T 細胞反應的分子。另一方面，所述免疫原可以是肽、肽與 MHC 的複合體、寡肽、及/或蛋白，用於提高與其對抗之特異性抗體或 TCR。

【0070】I 類 T 細胞「表位」需要一種結合至 MHC I 類分子上的短肽，從而形成一種三元複合體(MHC I 類 α 鏈、 β -2-微球蛋白、及肽)，其可以被帶有匹配 T 細胞受體的 T 細胞識別，所述 T 細胞受體以適當親和力與 MHC-肽複合體

結合。結合至 MHC I 類分子的肽的典型長度為 8-12 個胺基酸，最典型為 9 個胺基酸長度。

【0071】 本發明的肽，優選地當如本文所述納入本發明的疫苗時，與選自由 HLA-A*01:01、HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-A*24:02、HLA-B*07:02、HLA-B*08:01 及 HLA-B*44:02、以及可選的其他 HLA 同種異型所組成之群組中的至少一種結合。由於結合模式相似，例如相關錨定位置，一些肽與多個等位基因結合，此類重疊很可能為，但不限於，亦與 HLA-B*15 結合的 HLA-A*01 結合肽、亦與 HLA-A*11 結合的 HLA-A*03 結合肽、亦與 HLA-B*35 和 HLA-B*51 結合的 HLA-B*07 結合肽。

【0072】 疫苗還可能包括泛結合(pan-binding) MHC II 類肽。因此，本發明的疫苗可用於治療對相應 HLA 呈陽性患者中的癌症，而由於這些肽的泛結合性質，不須選擇 MHC II 類同種異型。

【0073】 如果本發明的肽與結合至另一個等位基因的肽組合，與單獨的 MHC I 類等位基因相比，可治療更高比例的患者群體。例如，使用 HLA-A*02:01 結合肽與 HLA-A*24:02 結合肽的組合，可治療任何相關人群中 60% 的患者，而任一等位基因單獨可治療在大多數人群中不到 50% 的患者。

【0074】 在一優選實施例中，術語「核苷酸序列」係指去氧核苷酸的雜聚物(heteropolymer)。

【0075】 編碼特定肽、寡肽、或多肽的核苷酸序列可為天然存在的核苷酸序列，也可為合成構建的核苷酸序列。一般來說，編碼本發明的肽、多肽以及蛋白的 DNA 片段係由 cDNA 片段和短寡核苷酸連結子(linker)組裝，或由一系列寡核苷酸組裝，以提供一種合成基因，能夠在包含源自微生物或病毒操縱組(operon)的調節元素的重組轉錄單元中被表達。

【0076】 本文所用的術語「編碼肽的核苷酸」係指編碼肽的一核苷酸序列，其包括與表達該序列的生物系統相容的人工（人造）啟動和停止密碼子，所述生物系統例如用於產生 TCR 的樹突細胞或另一細胞系統。

【0077】 本文提到的核酸序列既包括單鏈核酸也包括雙鏈核酸。因此，除非本文另有所指，否則，例如對於 DNA，具體的序列是此類序列的單鏈 DNA、此類序列與其互補序列的雙鏈體（雙鏈 DNA）、以及此類序列的互補序列。

【0078】 術語「編碼區」係指在基因的天然基因組環境中天然或正常編碼所述基因的表達產物的基因部分，亦即，體內編碼所述基因的天然表達產物的區域。

【0079】 編碼區可來自非突變（「正常」）基因、突變基因或異常基因，甚至可來自完全可在實驗室中使用本領域熟知的 DNA 合成方法合成的 DNA 序列或基因。

【0080】 術語「表達產物」係指多肽或蛋白，其為基因的天然轉譯產物，以及任何因遺傳密碼簡併性而編碼相同胺基酸所造成的核酸序列編碼同等物。

【0081】 術語「片段」當指的是一種編碼序列時，表示包含少於完整編碼區的 DNA 的一部分，其表達產物與完整編碼區的表達產物基本上具有相同的生物學功能或活性。

【0082】 術語「DNA 片段」係指一種 DNA 聚合物，以一單獨的片段形式或一較大 DNA 構建體的組分形式存在，其衍生自至少一次以基本上純的形式分離的 DNA，亦即，不含污染內源性材料，並且其數量或濃度使得能使用標準生化方法（如，使用克隆載體）進行識別、處理、及回收片段和其組分核苷酸序列。此類片段以未被內部非轉譯序列或內含子（通常存在於真核基因中）打斷的一開放閱讀框(open reading frame)形式存在。非轉譯 DNA 序列可能存在於開放閱讀框的下游，其不會干預編碼區的操縱或表達。

第20頁，共 122 頁(發明說明書)

【0083】術語「藥用鹽」係指本發明的肽的衍生物，其中，所述肽藉由製造試劑的酸式或鹼式鹽進行修飾。例如，用與合適的酸反應的游離鹼（通常藥物的中性形態有一個中性-NH₂基團）製備酸式鹽。適合製備酸式鹽的酸包括有機酸，如：乙酸、丙酸、羥基酸、丙酮酸、草酸、蘋果酸、丙二酸、丁二酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、對甲苯磺酸、水楊酸等等，以及無機酸，如：鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、和磷酸等。相反，可存在於肽上的酸部分的鹼式鹽係使用藥用鹼進行製備，如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、三甲胺等等。在一優選實施例中，藥物組合物包括為乙酸（醋酸）、三氟乙酸或鹽酸（氯化物）鹽形式的肽。

【0084】術語「啟動子」表示參與 RNA 聚合酶的結合從而啟動轉錄的 DNA 區域。

【0085】術語「分離」表示一種物質從其原來的環境（例如，如果是天然發生的則是天然環境）中被移除。例如，存在於活體動物中的天然多核苷酸或多肽不是分離的，但是，相同的多核苷酸或多肽若與天然系統中一些或所有共存物質分開則是分離的。此類多核苷酸可為載體的一部分，和/或此類多核苷酸或多肽可為組合物的一部分，並且仍然是分離的，由於所述載體或組合物不是其天然環境的一部分。

【0086】本發明的多核苷酸和重組或免疫原性多肽也可能以「純化」的形式存在。術語「純化」並非要求絕對的純度，它只是一個相對的定義，可以包括高度純化或僅部分純化的製備，如相關領域技術人員能理解的這些術語。例如，各個從 cDNA 庫中分離出的克隆物已用傳統方法純化為具有電泳同質性。明確考慮到將起始材料或天然材料純化至少一個數量級，優選為兩或三個數量級，更優選為四或五個數量級。此外，明確涵蓋申請專利範圍中的多肽的純度

優選為 99.999%，或至少為 99.99% 或 99.9%；甚至，適宜為以重量計 99% 或更高。

【0087】根據本發明公開的核酸和多肽表達產物，以及包含此類核酸和/或此類多肽的表達載體，可以「濃縮的形式(enriched form)」存在。本文使用的術語「濃縮(enriched)」是指材料的濃度至少是其自然濃度的大約 2、5、10、100 或 1000 倍，（例如）有優勢的是，按重量計為 0.01%，優選為按重量計至少約 0.1%。也考慮到，按重量計約為 0.5%、1%、5%、10% 和 20% 的濃縮製備。本發明包含的序列、構建體、載體、克隆物以及其他材料可有優勢地以濃縮或分離的形式存在。

【0088】術語「活性片段」係指當不論是單獨或可選地與合適的佐劑一起或在載體中給予動物，比如哺乳動物，例如小鼠、大鼠、美洲駝、綿羊、山羊、狗或馬，也包括人時，產生一免疫反應（即具有免疫原性活性）的一片段，通常是一種肽、多肽或核酸序列；這種免疫反應採用的形式是在接受動物（如：人）體內刺激一 T 細胞反應。或者，「活性片段」也可用於在體外誘導一 T 細胞反應。

【0089】本文使用的「部分(portion)」、「節段(segment)」、「片段(fragment)」這幾個術語，當與多肽相關地使用時是指殘基的連續序列，比如胺基酸殘基，其序列形成一個較大序列的子集。例如，如果一個多肽以任一種常用肽鏈內切肽酶（如胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶）進行處理，則所述處理獲得的寡肽會代表起始多肽的部分、節段或片段。當與多核苷酸相關地使用時，這些術語係指用任何核酸內切酶處理所述多核苷酸產生的產物。

【0090】根據本發明，術語「等同度百分比(percent identity)」或「等同百分比(percent identical)」，如果指的是序列，則表示在待比對序列（「被比對序列」）與所述序列或權利要求的序列（「參考序列」）對準(alignment)之後，將

被比對序列與所述序列或權利要求的序列進行比較。之後，根據下列公式計算等同度百分比：

【0091】 等同度百分比= $100 [1 -(C/R)]$

【0092】 其中，C 是參考序列與被比對序列之間對準長度上參考序列與被比對序列之間的差異數量，其中

【0093】 (i) 參考序列中每個鹼基或胺基酸序列在被比對序列中沒有對應的對準鹼基或胺基酸，以及

【0094】 (ii) 參考序列中每個空隙，以及

【0095】 (iii) 參考序列中每個對準鹼基或胺基酸與被比對序列中對準鹼基或胺基酸不同，即構成一個差異，以及

【0096】 (iiii) 必須在對準序列的第 1 位置開始對準；

【0097】 並且，R 是在與被比對序列的對準長度上參考序列中的鹼基或胺基酸數目，在參考序列中產生任何空隙也計算為一個鹼基或胺基酸。

【0098】 如果被比對序列和參考序列之間存在的一個對準，其按上述計算的等同度百分比大致等於或大於一指定的最低等同度百分比，則被比對序列與參考序列具有指定的最低等同度百分比，雖然可能存在按本文上述計算的等同度百分比低於指定等同度百分比的對準。

【0099】 因此，如上所述，本發明提供一種肽，其包含選自由 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 或其一變體所組成之群組的一序列，該變體誘導 T 細胞與所述肽發生交叉反應。本發明的肽具有與一 MHC I 類分子結合的能力，或拉長版本的所述肽與 MHC II 類分子結合的能力。

【0100】 在本發明中，術語「同源性」係指兩個胺基酸序列如肽或多肽序列之間的同一性程度（參見上文的等同度百分比）。前文所述的「同源」是透過將理想條件下對準的兩個序列與待比較序列進行比對後確定的。此類序列同

源性可透過使用 ClustalW 等演算法創建對準而進行計算。公共資料庫提供一般序列分析軟體，更具體地，為 Vector NTI、GENETYX 或其他工具。

【0101】本領域技術人員能評估，一特定肽的變體誘導的 T 細胞是否可與所述肽本身發生交叉反應（參見，例如，「Appay et al., 2006」；「Colombetti et al., 2006」；「Fong et al., 2001」；「Zaremba et al., 1997」，內容透過引用整體併入本文）。

【0102】發明人用給定胺基酸序列的「變體」表示，一個或兩個胺基酸殘基的側鏈發生改變（透過被另一個天然胺基酸殘基的側鏈或其他側鏈取代），使得這種肽仍然能夠以由給定胺基酸序列 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 所組成的肽大致同樣的方式與 HLA 分子結合。例如，一種肽可能被修飾以便至少維持（如沒有提高）其能與合適 MHC 分子的結合槽相互作用和結合的能力，以及至少維持（如沒有提高）其與激活 T 細胞的 TCR 結合的能力。

【0103】隨後，這些 T 細胞可與細胞發生交叉反應和殺傷細胞，這些細胞表達一多肽，，所述多肽包含本發明中定義的同源肽的天然胺基酸序列。正如科學文獻和資料庫（參見「Rammensee et al., 1999」；「Godkin et al., 1997」，其內容透過引用整體併入）中所述，HLA 結合肽的些許位置通常為錨定殘基，可形成一與 HLA 分子的結合基序相稱的核心序列，其定義由構成結合槽的多肽鏈的極性、電物理、疏水性和空間特性確定。因此，本領域技術人員能夠透過保持已知的錨定殘基來修飾 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 中列出的胺基酸序列，並且能確定這些變體是否保持與 MHC I 或 II 類分子結合的能力。本發明的變體保持與激活 T 細胞的 TCR 結合的能力，隨後，這些 T 細胞可與表達包含本發明定義的同源肽的天然胺基酸序列的多肽的細胞發生交叉反應並殺死該等細胞。

【0104】 如果無另有說明，本發明的原始（未修飾）肽可以透過在肽鏈內的不同（可能為選擇性）位點上取代一個或多個殘基而被修飾。優選情況是，這些取代位於胺基酸鏈的末端。此類取代可能是保守性的，例如，其中一個胺基酸被具有類似結構和特點的另一個胺基酸所取代，比如其中一個疏水性胺基酸被另一個疏水性胺基酸取代。更保守的取代是具有相同或類似的大小和化學性質的胺基酸間的取代，例如，白胺酸被異白胺酸取代。在天然同源蛋白質家族的序列變異的研究中，些許胺基酸的取代往往比其他胺基酸更具有耐受性，這些取代往往表現出原胺基酸與其取代之間大小、電荷、極性和疏水性的相似性，這是定義「保守取代(conservative substitution)」的基礎。

【0105】 在本文中，保守取代定義為在以下五種群組之一的內部進行交換：群組 1 — 小脂肪族、非極性或略具極性的殘基 (Ala、Ser、Thr、Pro、Gly)；群組 2 — 極性、帶負電荷的殘基及其醯胺 (Asp、Asn、Glu、Gln)；群組 3 — 極性、帶正電荷的殘基 (His、Arg、Lys)；群組 4 — 大脂肪族、非極性殘基 (Met、Leu、Ile、Val、Cys) 以及群組 5 — 大芳香殘基 (Phe、Tyr、Trp)。

【0106】 一方面，保守取代可能包括由 Dayhoff 在「The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5, Natl.Biomedical Research」中所述的取代，其內容透過引用整體併入本文。例如，一方面，屬於以下群組之一的胺基酸可彼此交換，因此構成保守交換：群組 1：丙胺酸 (A)、脯胺酸 (P)、甘胺酸 (G)、天冬醯胺 (N)、絲胺酸 (S)、蘇胺酸 (T)；群組 2：半胱胺酸 (C)、絲胺酸 (S)、酪胺酸 (Y)、蘇胺酸 (T)；群組 3：纈胺酸 (V)、異白胺酸 (I)、白胺酸 (L)、甲硫胺酸 (M)、丙胺酸 (A)、苯丙胺酸 (F)；群組 4：賴胺酸 (K)、精胺酸 (R)、組胺酸 (H)；群組 5：苯丙胺酸 (F)、酪胺酸 (Y)、色胺酸 (W)、組胺酸 (H)；和群組 6：天冬胺酸 (D)、麩胺酸 (E)。一方面，保守胺基酸取代可選自以下取代：T→A、G→A、A→I、T→V、A→M、T→I、A→V、T→G、及/或 T→S。

第25頁，共 122 頁(發明說明書)

【0107】 一方面，保守胺基酸取代可包括用相同類別的另一個胺基酸取代一胺基酸，例如，(1) 非極性：Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp；(2) 不帶電的極性：Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln；(3) 酸性：Asp、Glu；和(4) 鹼性：Lys、Arg、His。其他保守胺基酸取代也可以按如下進行：(1) 芳香族：Phe、Tyr、His；(2) 質子供給者：Asn、Gln、Lys、Arg、His、Trp；和(3) 質子受體：Glu、Asp、Thr、Ser、Tyr、Asn、Gln（參見美國專利號 10,106,805，其內容透過引用整體併入本文）。

【0108】 另一方面，保守取代可以根據表 2 進行。用於預測蛋白質修飾的耐受性的方法可參見文獻（例如，「Guo et al., 2004」，其內容透過引用整體併入）。

[表 2] 保守胺基酸取代列表。

原始殘基	保守取代（其他在本領域中已知）
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

【0109】 另一方面，取代可以為表 3 中所示的那些取代。如果此類取代導致生物活性改變，則可引入表 3 中稱為「示例性取代」的更實質性改變並且在需要時篩選產品。

[表 3] 示例性胺基酸取代。

原始殘基	示例性取代（其他在本領域中已知）
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln, His, Asp, Lys, Arg
Asp	Glu, Asn
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn, Glu
Glu	Asp, Gln
Gly	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucin
Leu	Norleucin, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr
Thr	Ser, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucin

【0110】 當然，此類取代可能涉及普通 L-胺基酸之外的其他結構。因此，D-胺基酸可能被本發明的抗原肽中常見的 L-胺基酸取代，也仍在本公開的範圍之內。此外，非標準胺基酸（即，除了常見的天然蛋白原胺基酸）也可以用於取代之目的，以生產根據本發明的免疫原和免疫原性多肽。

【0111】 如果在一個以上位置上的取代發現導致肽的抗原活性基本上等於或大於以下定義值，則對這些取代的組合進行測試，以確定組合的取代是否產生肽抗原性的疊加或協同效應。

【0112】基本上由本文所指胺基酸序列組成的一種肽可具有一個或兩個非錨定胺基酸（見下面錨定基序相關內容）被交換，相比於未修飾的肽，其與 MHC I 或 II 類分子的結合能力基本上不被改變或不受到不利影響。在另一實施例中，在基本上由本文所述胺基酸序列組成的一種肽中，一個或兩個胺基酸可與其保守交換夥伴交換（見下文），相比於未修飾的肽，其與 MHC I 或 II 類分子的結合能力基本上不被改變或不受到不利影響。

【0113】這些基本不與 T 細胞受體相互作用的胺基酸殘基可透過取代為其他胺基酸而得到修飾，這些其他胺基酸的摻入幾乎不影響 T 細胞反應並不妨礙與相關 MHC 的結合。因此，除了特定限制性條件外，本發明的肽可能為任何包括給定胺基酸序列或其部分或其變體的肽（發明人所用的這個術語包括寡肽或多肽）。

【0114】較長（拉長）的肽也可能適合。MHC I 類表位（雖然通常長度為 8 至 12 個胺基酸）可能從包含實際表位的較長的肽或蛋白透過肽加工而產生。優選地，在實際表位兩側的殘基為在加工過程中幾乎不影響暴露實際表位所需蛋白裂解切割的殘基。

【0115】本發明的肽可被拉長多達四個胺基酸，即 1、2、3 或 4 個胺基酸，可按照 4:0 與 0:4 之間的任何組合添加至任意一端。本發明的拉長組合可見表 4。

[表 4] 本發明的肽的拉長組合。

C-端	N-端
4	0
3	0 或 1
2	0 或 1 或 2
1	0 或 1 或 2 或 3
0	0 或 1 或 2 或 3 或 4
N-端	C-端
4	0
3	0 或 1

C-端	N-端
2	0 或 1 或 2
1	0 或 1 或 2 或 3
0	0 或 1 或 2 或 3 或 4

【0116】 用於拉長(elongation)/延長(extension)的胺基酸可以是所述蛋白的原序列的肽或任何其他胺基酸。拉長可用於增強所述肽的穩定性或溶解性。

【0117】 因此，本發明所述的表位可能與天然腫瘤相關表位或腫瘤特異性表位相同，也可能包括與參考肽的差異不超過四個殘基的表位，只要他們有基本相同的抗原活性即可。

【0118】 在一替代實施例中，肽的一邊或雙邊被拉長 4 個以上的胺基酸，優選至最多 30 個胺基酸的總長度。這可形成 MHC II 類結合肽。與 MHC II 類的結合可透過本領域中已知的方法進行測試。

【0119】 因此，本發明提出了 MHC I 類表位的肽和變體，其中，所述肽或變體的總長度為 8 至 100 個、優選為 8 至 30 個、最優選為 8 至 12 個胺基酸長度（即 8、9、10、11、12 個胺基酸，如果為拉長 II 類結合肽時，長度也可為 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 個胺基酸）。

【0120】 當然，本發明的肽或變體能與 MHC I 或 II 類分子結合。肽或變體與 MHC 複合體的結合可用本領域內的已知方法進行測試。

【0121】 優選情況是，當對本發明的肽具特異性的 T 細胞針對取代的肽檢測時，取代的肽相對於背景達到最大溶解增加的一半的肽濃度不超過約 1 mM，優選為不超過約 1 μM，更優選為不超過約 1 nM，再優選為不超過約 100 pM，最優選為不超過約 10 pM。也優選為，取代的肽被來自一個以上個體，至少為 2 個，更優選為 3 個個體的 T 細胞識別。

【0122】 在本發明的一特別優選實施例中，肽係由或基本由根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的一胺基酸序列組成。

【0123】「基本由...組成」係指本發明的肽，除了根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 中的任一序列或其變體外，還含有其他位於 N 和/或 C 端延伸處的胺基酸，而他們不一定能形成作用為 MHC 分子表位的肽的一部分。

【0124】然而，這些延伸區域對有效將本發明的肽引進細胞具有重要作用。在本發明的一實施例中，所述肽為融合蛋白的一部分，所述融合蛋白包含來自 NCBI GenBank 登錄號 X00497 的 HLA-DR 抗原相關不變鏈（p33，以下稱為「Ii」）的 80 個 N-端胺基酸等。在其他的融合中，本發明的肽可以被融合到本文所述的抗體、或其功能性部分，特別是融合入抗體的序列，以便所述抗體進行特異性靶向作用，或者，例如，進入本文所述的對樹突細胞特異性的抗體。

【0125】此外，所述肽或變體可進一步修飾以提高穩定性和/或與 MHC 分子結合，從而引發更強的免疫反應。肽序列的該類優化方法是本領域內所熟知的，包括，例如，反式肽鍵和非肽鍵的引入。

【0126】在反式肽鍵中，胺基酸殘基並非由肽 (-CO-NH-) 鏈連接，但肽鍵是反向的。這種逆向反向模擬肽 (retro-inverso peptidomimetics) 可透過本領域已知的方法製備，例如：Meziere 及其同事所述的方法（參見「Meziere et al., 1997」，透過引用併入本文）。這種方法涉及製備包含涉及骨架（而非側鏈方向）改變的偽肽。結果顯示，這些偽肽有利於 MHC 的結合和輔助 T 細胞的反應。含有 NH-CO 鍵而非 CO-NH 肽鍵的逆向反向肽大大地提高了抗蛋白裂解性能（參見「Meziere et al., 1997」）。

【0127】非肽鍵為例如，-CH₂-NH、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂- 和 -CH₂SO- 等。美國 4897445 號專利提出了多肽鏈中非肽鍵 (-CH₂-NH) 的固相合成法，所述方法涉及按標準程序合成的多肽，以及透過胺基醛和胺基酸在 NaCNBH₃ 存在下反應而合成的非肽鍵。

【0128】 含上述鍵的肽可經合成為在其胺基和/或羧基末端存在其他化學基團，從而提高肽的穩定性、生物利用度、及/或親和力等。例如，疏水基團如苄氧羰基(carbobenzoyl)、丹醯基(dansyl)、或叔丁氧羰基(t-butyloxycarbonyl)團等，係可加入肽的胺基末端。同樣，乙醯基(acetyl)或9-芴基甲氧羰基(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)可能位於肽的胺基末端。此外，疏水基團、叔丁氧羰基團(t-butyloxycarbonyl)或醯胺基(amido)團都可能被加入肽的羧基末端。

【0129】 另外，本發明中的所有肽都可能經合成而改變其空間構型。例如，可能使用這些肽的一個或多個胺基酸殘基的D-異構物，而不是常見的L-異構物。更進一步地，本發明的肽的至少一個胺基酸殘基可被熟知的一個非天然胺基酸殘基取代。諸如此類的改變可能有助於增加本發明的肽的穩定性、生物利用度和/或結合作用。

【0130】 同樣，本發明中的肽或變體可在合成肽之前或之後透過特定胺基酸的反應而進行化學修飾。此類修飾的實施例為本領域所熟知（參見「Lundblad, 2004」，透過引用併入本文）。胺基酸的化學修飾方法包括，但不限於，透過以下方法修飾：醯基化、脒基化(amidination)、賴胺酸的吡哆基化(pyridoxylation)、還原烷基化、以2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)將胺基團三硝基苯基化(trinitrobenzylation)、羧基團的醯胺修飾及將半胱胺酸過甲酸氧化為磺基丙胺酸的巯基修飾、形成易變衍生物、與其他巯基化合物形成混合二硫化合物、與馬來醯亞胺反應，與碘乙酸或碘乙醯胺進行羧甲基化(carboxymethylation)、在鹼性 pH 值下與氰酸鹽進行氨甲醯化(carbamoylation)（參見「Coligan et al., 1995」，其內容透過引用整體併入本文）。

【0131】 簡言之，修飾蛋白質的精氨酸殘基等往往基於於鄰二羰基化合物（如苯甲醯甲醛、2,3-丁二酮及1,2-環己二酮）的反應而形成加成物。另一實施例為丙酮醛與精氨酸殘基的反應。半胱胺酸可在賴胺酸和組胺酸等親核位點不

作隨同修飾的情況下就得到修飾。因此，有大量試劑可進行半胱胺酸的修飾。Sigma-Aldrich (www.sigma-aldrich.com) 等公司的網站提供具體試劑的資訊。

【0132】蛋白質中雙硫鍵的選擇性還原也很常見。雙硫鍵可在生物制藥的熱處理中形成和氧化。伍德沃德氏試劑 K 可用於修飾特定的麩胺酸殘基。N-(3-(二甲氨基)丙基)-N'-乙基碳二亞胺可用於形成賴胺酸殘基和麩胺酸殘基之間的分子內交聯。例如：焦碳酸二乙酯是修飾蛋白質中組胺酸殘基的試劑。組胺酸也可使用 4-羥基-2-壬烯醛進行修飾。賴胺酸殘基與其他 α -胺基團的反應，例如，有利於肽結合到蛋白/肽的表面或交聯處。賴胺酸是聚乙二醇的附著點，也是蛋白質醯基化的主要修飾位點。蛋白質的甲硫胺酸殘基可透過碘乙醯胺、溴乙胺、氯胺 T 等被修飾。

【0133】四硝基甲烷和 N-乙醯基咪唑可用於酪胺酸殘基的修飾。經二酪胺酸形成的交聯可透過過氧化氫/銅離子完成。

【0134】對色胺酸修飾的最近研究中使用了 N-溴代琥珀醯亞胺、2-羥基-5-硝基苄溴或 3-溴-3-甲基-2-(2-硝基苄基)-3H-吡啶 (BPNS-糞臭素)。

【0135】當蛋白與戊二醛、聚乙二醇二丙烯酸酯和甲醛交聯用於配製水凝膠時，以聚乙二醇(PEG)進行治療性蛋白和肽的成功修飾往往可延長循環半衰期。針對免疫治療中過敏原的化學修飾往往透過氰酸鉀的氨基甲醯化實現。

【0136】本發明的另一實施例涉及一種非天然肽，其中，所述肽係由或基本由根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的一胺基酸序列組成，並經合成產生（即，合成）為一種藥用鹽。合成產生肽的方法是本領域公知的。本發明的肽的鹽與其生物體內狀態的肽基本上不同，因為這些體內產生的肽不是鹽。所述肽的非天然鹽形式介導肽的溶解度，特別是在包含所述肽的藥物組合物的情況下，例如，本文所公開的肽疫苗。為了向需治療的受試者有效地提供肽，需要肽具有充分、至少基本的溶解度。優選地，鹽為肽的藥用鹽。本發明的這些鹽

包括鹼和鹼土鹽類，諸如 Hofmeister 系列的鹽，包含陰離子 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 I^- 、 SCN^- 和陽離子 NH_4^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ba^{2+} 。特別地，鹽選自 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 、 NH_4Cl 、 NH_4Br 、 NH_4NO_3 、 NH_4ClO_4 、 NH_4I 、 NH_4SCN 、 Rb_3PO_4 、 Rb_2HPO_4 、 RbH_2PO_4 、 Rb_2SO_4 、 $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 、 Rb_4Cl 、 Rb_4Br 、 Rb_4NO_3 、 Rb_4ClO_4 、 Rb_4I 、 Rb_4SCN 、 K_3PO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2SO_4 、 KCH_3COO 、 KCl 、 KBr 、 KNO_3 、 KClO_4 、 KI 、 KSCN 、 Na_3PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 NaCH_3COO 、 NaCl 、 NaBr 、 NaNO_3 、 NaClO_4 、 NaI 、 NaSCN 、 ZnCl_2 、 Cs_3PO_4 、 Cs_2HPO_4 、 CsH_2PO_4 、 Cs_2SO_4 、 CsCH_3COO 、 CsCl 、 CsBr 、 CsNO_3 、 CsClO_4 、 CsI 、 CsSCN 、 Li_3PO_4 、 Li_2HPO_4 、 LiH_2PO_4 、 Li_2SO_4 、 LiCH_3COO 、 LiCl 、 LiBr 、 LiNO_3 、 LiClO_4 、 LiI 、 LiSCN 、 Cu_2SO_4 、 $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 Mg_2HPO_4 、 $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 Mg_2SO_4 、 $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 MgCl_2 、 MgBr_2 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 、 MgI_2 、 $\text{Mg}(\text{SCN})_2$ 、 MnCl_2 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 Ca_2HPO_4 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 CaSO_4 、 $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 CaCl_2 、 CaBr_2 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 、 CaI_2 、 $\text{Ca}(\text{SCN})_2$ 、 $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 Ba_2HPO_4 、 $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 BaSO_4 、 $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 BaCl_2 、 BaBr_2 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ 、 BaI_2 和 $\text{Ba}(\text{SCN})_2$ 。特別優選為 NH 乙酸、 MgCl_2 、 KH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 KCl 、 NaCl 、及 CaCl_2 ，例如：氯化物或乙酸鹽（三氟乙酸）鹽（例如，參見「Berge et al., 1977」，其內容透過引用整體併入本文）。

【0137】一般來說，肽和變體（至少該些含有胺基酸殘基之間的肽鏈的變體）可使用 Lukas 等人（參見「Lukas et al., 1981」，其內容透過引用整體併入本文）及此處引用參考文獻所揭露的固相肽合成的 Fmoc-聚醯胺模式進行合成。9-芴基甲氧羰基 (Fmoc) 團對 N -胺基提供臨時保護。使用20% 哌啶的 N , N -二甲基甲醯胺溶液對這種高度鹼基不穩定的保護基團進行重複切割。由於他們的丁基醚（在絲胺酸、蘇胺酸和酪胺酸的情況下）、丁基酯（在麩胺酸和天門冬胺

酸的情況下）、丁氧羰基衍生物（在賴胺酸和組胺酸的情況下）、三苯甲基衍生物（在半胱胺酸的情況下）及 4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺醯基衍生物（在精胺酸的情況下），側鏈功能可能會受到保護。當麩醯胺酸和天冬醯胺為 C-末端殘基時，使用4,4'-二甲氧基二苯甲基團來保護側鏈醯胺官能基。固相支撐基於聚二甲基丙烯醯胺聚合物，其由三個單體二甲基丙烯醯胺（骨架單體）、雙丙烯醯乙烯二胺（交聯劑）和丙烯醯肌胺酸甲酯（功能劑）構成。使用的肽-樹脂可切割聯劑為酸性不穩定的 4 -羥甲基苯氧乙酸衍生物。所有的胺基酸衍生物均作為其預製的對稱酸酐衍生物加入，但是天冬醯胺和麩醯胺酸除外，他們使用反向 N,N-二環己基碳二亞胺/1-羥基苯並三唑介導的耦合程序而加入。所有的耦合和去保護反應使用茚三酮、硝基苯磺酸或 isotin 測試程序監測。合成完成後，用含有 50% 清除劑混合物(scavenger mix)的95%三氟醋酸處理，從樹脂支承物切割肽伴隨去除側鏈保護基團。常用的清除劑混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水，準確的選擇取決於正在合成的肽的胺基酸組成。此外，結合固相和液相方法進行肽合成是可能的（例如，參見「Bruckdorfer et al., 2004」以及本文引用的參考文獻，其內容透過引用整體併入本文）。

【0138】 用真空蒸發去除三氟乙酸、隨後用乙醚研磨以製得粗肽。用簡單萃取程序（水相凍乾後，所述程序製得不含清除劑混合物的粗肽）清除任何存在的清除劑混合物。肽合成的試劑一般可從 Calbiochem-Novabiochem（英國，諾丁漢）獲得。

【0139】 純化可透過以下技術的任何一種或組合方法進行，如：再結晶法、體積排阻層析法、離子交換層析法、疏水相互作用層析法、以及（通常）反相高效液相層析法（如使用乙腈/水梯度分離）。

【0140】 肽的分析可使用以下方法進行：薄層層析法、電泳(特別是，毛細管電泳法)、固相萃取法 (CSPE)、反相高效液相層析法、酸水解後的胺基酸分析、快原子轟擊 (FAB) 質譜分析法、以及 MALDI及ESI-Q-TOF 質譜分析法。

【0141】 為了選擇過度提呈的肽，計算了提呈分布圖，其顯示樣本中位提呈量以及複製變化。所述分布圖將目標腫瘤實體的樣本與正常組織樣本的基線並列。接著可透過計算線性混合效應模型 (參見「Pinheiro et al., 2015」) 的 p 值，將以上每個分布圖合併至一過度提呈分數中，以透過錯誤發現率 (參見「Benjamini and Hochberg, 1995」，其透過引用整體併入本文) 調整多項檢驗。

【0142】 對於透過質譜法對 HLA 配體的識別和相對定量，對來自急速冷凍組織樣本的 HLA 分子進行純化並對 HLA 相關肽進行分離。分離的肽分開，並透過線上奈米-電噴霧-電離 (nanoESI) 液相層析-質譜 (LC-MS) 實驗進行序列鑒定。由此產生的肽序列的驗證方法是，將急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌樣本 (N > 750 個樣本) 中記錄的天然腫瘤相關肽 (TUMAP) 的片段化模式，與具有相同序列的相應合成參考肽的片段化模式進行比較。由於這些肽被直接鑒定為原發性腫瘤的 HLA 分子的配體，因此，這些結果為自急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌患者獲得的原發性癌症組織上鑑定的肽的天然加工和提呈提供了直接證據 (參考實施例 1、圖 1A 至 1E)。

【0143】發現管道 XPRESIDENT® v2.1 可識別和選擇相關過度提呈的肽，其基於癌組織上 HLA 限制性肽含量的直接相對定量，與幾種不同的非癌組織和器官相比，這些肽是免疫治療的潛在靶標。參見，例如美國專利申請公開號 2013/0096016，其內容透過引用整體併入。這透過以下方法實現：使用專有資料分析管道處理的 LC-MS 採集資料、結合序列識別演算法、譜聚類、計算離子、滯留時間調整、帶電狀態反摺續以及正規化而開發無標記差異化定量方法。

【0144】來自公共資源的額外序列資訊（參見「Olexiouk et al., 2016」；「Subramanian et al., 2011」，其內容透過引用整體併入）被整合入 XPRESIDENT® 發現管道，以便鑒定非典型來源的 TUMAP。為每種肽和樣本確立了提呈量，包括誤差估計值。僅在腫瘤組織提呈的肽以及在腫瘤與非腫瘤組織和器官中過度提呈的肽已經得到確定。

【0145】來自急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌組織樣本的 HLA 肽複合體進行純化，並且使用 LC-MS 對 HLA 相關肽進行分離和分析（見實施例 1）。本發明中包含的所有 TUMAP 均使用這種方法於急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌樣本上進行鑒定，確認其在急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素

瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌、子宮內膜癌、及其組合上的提呈。

【0146】在多個急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌和正常組織上鑑定的 TUMAP，係用無標記 LC-MS 數據的離子計數方法進行量化。所述方法假設肽的 LC-MS 信號區域與樣本中其豐度相關。各種 LC-MS 實驗中肽的所有量化信號在集中趨勢基礎上進行正規化，對每個樣品進行平均，並合併入柱狀圖（被稱為提呈分布圖）。提呈分布圖整合了不同分析方法，如：蛋白資料庫檢索、譜聚類、帶電狀態反摺續（除電）和滯留時間校準和正規化。

【0147】除了過度提呈肽之外，也測試了潛在基因的 mRNA 表達。mRNA 資料透過 RNA 測序分析正常組織和癌組織獲得（參見實施例 2、圖 2A-2E）。正常組織資料的額外來源是從大約 3000 個正常組織樣本中公開發得的 RNA 表達資料的資料庫（參見「Lonsdale, 2013」，其內容透過引用整體併入）。獲得自在癌組織中顯示高表達編碼 mRNA，但是在重要正常組織中非常低或不存在的蛋白的肽，係優選納入本發明。

【0148】本發明提出了有利於治療癌症/腫瘤的肽，優選為過度提呈或只提呈本發明的肽的急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌。這些肽由 MS 法直接顯示出，由 HLA 分子自然提呈於原發性人類急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母

細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌樣本中。

【0149】 與正常組織相比，肽來源的許多源基因/蛋白質（也稱為「全長蛋白」或「潛在蛋白」）於癌症中顯示高度過量表達，本發明相關的「正常組織」應是指健康血液、大腦、心臟、肝臟、肺、脂肪組織、腎上腺、膽管、膀胱、骨骼、骨髓、食道、眼、膽囊、頭頸、大腸、小腸、腎、淋巴結、中樞神經、周圍神經、胰腺、甲狀旁腺、腹膜、垂體、胸膜、骨骼肌、皮膚、脊髓、脾、胃、甲狀腺、氣管、及輸尿管細胞或其他正常組織細胞（如乳腺、卵巢、胎盤、攝護腺、睪丸、胸腺和子宮細胞），證明這些源基因的高度腫瘤關聯性（見實施例 2）。此外，這些肽本身也在腫瘤組織中大量過度提呈（本發明相關的「腫瘤組織」應是指來自急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌患者的樣本），但不在正常組織中大量過度提呈（見實施例 1）。

【0150】 HLA 結合肽能夠被免疫系統識別，特別是 T 淋巴細胞。T 細胞可破壞提呈被識別 HLA-肽複合體的細胞，如：提呈衍生肽的急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌細胞。

【0151】 與正常組織相比，本發明的肽在癌組織中過度提呈，因此可用於產生抗體和/或 TCR，例如根據本發明所述的可溶性 TCR（參見表 9）。此外，

肽與相應的 MHC 複合時，也可用於製備本發明的抗體和/或 TCR，特別是可溶性 TCR。各個方法均為本領域技術人員所熟知，並在各個文獻中可找到（同時參閱下文）。因此，本發明的肽可用於在患者中產生免疫反應，從而能夠毀滅腫瘤細胞。患者的免疫反應能夠透過直接給予患者所述肽或合適前驅物質（如，拉長肽、蛋白、或編碼這些肽的核酸），較理想是與加強免疫原性的製劑（即佐劑）組合，而進行誘導。源自該治療性疫苗的免疫反應預期能夠高度特異性地對抗腫瘤細胞，因為本發明的目標肽在正常組織上提呈的複製數目較少，防止患者發生對抗正常細胞的不良自體免疫反應的風險。

【0152】本發明還涉及包含一 α 鏈和一 β 鏈的 TCR（「 α/β TCR」）。還提供了由 MHC 分子提呈時可與 TCR 和抗體結合的本發明的肽。

【0153】本發明還涉及 TCR 片段，其能夠結合於由 HLA 分子提呈時的本發明的肽抗原。所述術語特別涉及可溶性 TCR 片段，例如缺失跨膜部分和/或恆定區的 TCR、單鏈 TCR、及其與例如免疫球蛋白的融合物。

【0154】本發明還涉及表達本發明的 TCR 和肽的核酸、載體和宿主細胞；以及使用他們的方法。

【0155】術語「T 細胞受體」（縮寫 TCR）是指一種異二聚體分子，其包含一個 α 多肽鏈（ α 鏈）和一個 β 多肽鏈（ β 鏈），其中，所述異二聚體受體能夠結合於由 HLA 分子提呈的肽抗原。所述術語還包括所謂的 γ/δ TCR。

【0156】在一實施例中，本發明提供了如本文中所描述的產生 TCR 的方法，所述方法包括在適於促進 TCR 表達的條件下培養能夠表達 TCR 的宿主細胞。

【0157】另一方面，本發明涉及一種根據本發明的方法，其中，所述抗原係透過使足夠量的抗原與抗原呈現細胞接觸來載入表達於合適抗原呈現細胞或

人工抗原呈現細胞表面的 MHC I 或 II 類分子，或所述抗原係透過四聚化抗原/MHC I 或 II 類複合體單體來載入於 MHC I 或 II 類四聚體。

【0158】 α/β TCR 的 α 和 β 鏈以及 γ/δ TCR 的 γ 和 δ 鏈通常被認為各具有兩個「結構域」，即可變和恆定結構域。可變結構域由可變區 (V) 和連接區 (J) 串聯組成。可變結構域還可包括一個前導區 (L)。 β 和 δ 鏈還可包括一個多樣區 (D)。 α 和 β 恆定結構域還可包括錨定 α 和 β 鏈至細胞膜的 C 末端跨膜 (TM) 結構域。

【0159】 相對於 γ/δ TCR，如本文所用的術語「TCR γ 可變結構域」係指無前導區 (L) 的 TCR γ V (TRGV) 區和 TCR γ J (TRGJ) 區的串聯，術語「TCR γ 恆定結構域」是指細胞外 TRGC 區域或 C-末端截短 TRGC 序列。同樣地，術語「TCR δ 可變結構域」係指無前導區 (L) 的 TCR δ V (TRDV) 區與 TCR δ D/J (TRDD/TRDJ) 區的串聯，術語「TCR δ 恆定結構域」係指細胞外 TRDC 區域或 C 末端截短 TRDC 序列。

【0160】 本發明的 α/β 異二聚體 TCR 可具有其恆定結構域之間的引入雙硫鍵。這種類型的優選 TCR 包括那些具有一個 TRAC 恆定域序列和 TRBC1 或 TRBC2 恆定域序列的 TCR，不同的是 TRAC 的蘇胺酸 48 和 TRBC1 或 TRBC2 的絲胺酸 57 被半胱胺酸殘基取代，所述半胱胺酸在 TCR 的 TRAC 恆定域序列和 TRBC1 或 TRBC2 恆定區序列之間形成雙硫鍵。

【0161】 不論具有或不具有上述的引入鏈間鍵，本發明的 α/β 異二聚體 TCR 可具有一個 TRAC 恆定域序列和一個 TRBC1 或 TRBC2 恆定結構域序列，並且 TCR 的 TRAC 恆定結構域序列和 TRBC1 或 TRBC2 恆定結構域序列，係可透過 TRAC 外顯子 2 的 Cys4 和 TRBC1 或 TRBC2 外顯子 2 的 Cys2 之間的天然雙硫鍵相連。

【0162】本發明的 TCR 可包括一可檢測標記，其選自由放射性核素、螢光團、及生物素所組成之群組。本發明的 TCR 可被共軛至一治療活性劑，如放射性核素、化學治療劑、或毒素。

【0163】可檢測標記

【0164】可檢測標記可為例如螢光染料、酶、基質、生物發光材料、放射性材料、及化學發光標記。示例性酶標記包括但不限於辣根過氧化物酶、乙醯膽鹼酯酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和螢光素酶。示例性螢光團（螢光材料）包括但不限於羅丹明、螢光素、異硫氰酸螢光素、傘形酮、二氯三嗪胺、藻紅蛋白和丹磺醯氯。示例性化學發光標記包括但不限於魯米諾。示例性生物發光材料包括但不限於螢光素和水母發光蛋白。示例性放射性材料包括但不限於銻-213 (^{213}Bs)、碳-14 (^{14}C)、碳-11 (^{11}C)、氯-18 (^{18}Cl)、鉻-51 (^{51}Cr)、鈷-57 (^{57}Co)、鈷-60 (^{60}Co)、銅-64 (^{64}Cu)、銅-67 (^{67}Cu)、鐳-165 (^{165}Dy)、鉕-169 (^{169}Er)、氟-18 (^{18}F)、鎵-67 (^{67}Ga)、鎵-68 (^{68}Ga)、鍳-68 (^{68}Ge)、釷-166 (^{166}Ho)、銦-111 (^{111}In)、碘-123 (^{123}I)、碘-124 (^{124}I)、碘-125 (^{125}I)、碘-131 (^{131}I)、銥-192 (^{192}Ir)、鐵-59 (^{59}Fe)、氪-81 (^{81}Kr)、鉛-212 (^{212}Pb)、鐳-177 (^{177}Lu)、鉬-99 (^{99}Mo)、氮-13 (^{13}N)、氧-15 (^{15}O)、鈀-103 (^{103}Pd)、磷-32 (^{32}P)、鉀-42 (^{42}K)、釷-186 (^{186}Re)、釷-188 (^{188}Re)、銣-81 (^{81}Rb)、銣-82 (^{82}Rb)、釷-153 (^{153}Sm)、硒-75 (^{75}Se)、鈉-24 (^{24}Na)、銣-82 (^{82}Sr)、銣-89 (^{89}Sr)、硫 35 (^{35}S)、錒-99m (^{99}Tc)、鉍-201 (^{201}Tl)、氚 (^3H)、氙-133 (^{133}Xe)、鐳-169 (^{169}Yb)、鐳-177 (^{177}Yb)、及鐳-90 (^{90}Y)。

【0165】放射性核素

【0166】放射性核素會發射 α 或 β 粒子（例如，放射免疫偶聯物）。此類放射性同位素包括但不限於 β 發射體，例如，磷-32 (^{32}P)、釷-47 (^{47}Sc)、銅-67 (^{67}Cu)、鎵-67 (^{67}Ga)、釷-88 (^{88}Y)、釷-90 (^{90}Y)、碘-125 (^{125}I)、碘-131 (^{131}I)、釷-153

(¹⁵³Sm)、鐮-177 (¹⁷⁷Lu)、銻-186 (¹⁸⁶Re)、銻-188 (¹⁸⁸Re)，以及 α 發射體，例如，砒-211 (²¹¹At)、鉛-212 (²¹²Pb)、鉍-212 (²¹²Bi)、鉍-213 (²¹³Bi) 或銻-225 (²²⁵Ac)。

【0167】 毒素

【0168】 毒素包括但不限於胺甲蝶呤、胺基蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶達卡巴嗪；烷化劑，如：甲氯乙胺、噻替呱苯丁酸氮芥、美法侖、卡莫司汀 (BSNU)、洛莫司汀 (CCNU)、1-甲基亞硝基脲、環磷醯胺、甲氯乙胺、白消安、二溴甘露醇、鏈脲佐菌素、絲裂黴素 C、順-二氯二氨基鉑 (II) (DDP) 順鉑和卡鉑（伯爾定）；蔥環類藥物，包括柔紅黴素（以前稱為道諾黴素）、多柔比星（阿黴素）、地托比星、甘氨黴素、伊達比星、表柔比星、米托蒽醌和比生群；抗生素，包括放線菌素（放線菌素 D）、博來黴素、加利車黴素、光神黴素和蔥黴素 (AMC)；以及抗有絲分裂藥物，如長春花生物鹼、長春新鹼和長春鹼。其他細胞毒性藥物包括紫杉醇（泰素®）、蓖麻毒蛋白、假單胞菌外毒素、吉西他濱、細胞鬆弛素 B、短桿菌肽 D、溴化乙錠、依米汀、依託泊苷、替諾泊苷、秋水仙素、二氫基蔥二酮、1-脫氫甾酮、糖皮質激素、普羅卡因、四卡因、利多卡因、普萘洛爾、嘌呤黴素、丙卡巴肼、羥基脲、天冬醯胺酶、皮質類固醇、米托坦 (O,P'-(DDD))、干擾素、及這些細胞毒劑的組合。

【0169】 治療劑包括但不限於卡鉑、順鉑、紫杉醇、吉西他濱、加利車黴素、多柔比星、5-氟尿嘧啶、絲裂黴素 C、放線菌素 D、環磷醯胺、長春新鹼、博來黴素、VEGF 拮抗劑、EGFR 拮抗劑、鉑類、紫杉醇類、伊立替康、亞葉酸、類固醇、環磷醯胺、美法侖、長春花生物鹼、氮芥類、酪胺酸激酶抑制劑、放療、性激素拮抗劑、選擇性雄激素受體調節劑、選擇性雌激素受體調節劑、PDGF 拮抗劑、TNF 拮抗劑、IL-1 拮抗劑、介白素（例如 IL-12 或 IL-2）、IL-12R 拮抗劑、毒素偶聯單株抗體、腫瘤抗原特異性單株抗體、愛必妥®、阿瓦斯丁®、帕妥珠單抗、抗 CD20 抗體、Rituxan、RTM、奧瑞組單抗、奧法木單抗、DXL625、

赫賽汀® 或其任何組合。來自植物和細菌的毒性酶，如蓖麻毒素、白喉毒素和假單胞菌毒素，可用於產生細胞類型特異性殺傷試劑（參見「Youle et al., 1980」、「Gilliland et al., 1980」、「Krolick et al., 1980」）。其他細胞毒性藥物包括細胞毒性核糖核酸酶（參見美國專利 6,653,104 號，各參考文獻內容均透過引用整體併入）。

【0170】 在一實施例中，與未突變的 TCR 相比，在 α 鏈中具有至少一個突變和/或在 β 鏈中具有至少一個突變的本發明的 TCR，係具有修飾的醮基化。

【0171】 在一實施例中，在 TCR α 鏈和/或 TCR β 鏈中包括至少一個突變的 TCR，其對肽-HLA 分子複合體的結合親和力和/或結合半衰期，是包含未突變 TCR α 鏈和/或未突變 TCR β 鏈的 TCR 的至少兩倍。腫瘤特異性 TCR 的親和力增強及其開發依賴於最佳 TCR 親和力的視窗的存在。這樣視窗的存在是根據觀察結果：例如，對 HLA 限制性病原體特異性的 TCR 與對 HLA 限制性腫瘤相關自身抗原特異性的 TCR 相比， K_d 值通常大約低 10 倍。現已知，儘管腫瘤抗原可能具有免疫原性，但是因為腫瘤來自個體自身的細胞，因此僅突變蛋白質或轉譯加工改變的蛋白將被免疫系統視為外來物質。上調或過度表達的抗原（所謂的自體抗原）不一定誘導針對腫瘤的功能免疫反應：表達對這些抗原具有高度反應性的 TCR 的 T 細胞會在一種稱為中樞耐受的程序中在胸腺內被負向選擇 (negatively selected)，也就是說，僅保留對自身抗原具有低親和力 TCR 的 T 細胞。因此，本發明的 TCR 或變體對肽的親和力可透過本領域熟知的方法來增強。

【0172】 本發明還涉及一種識別和分離本發明的 TCR 的方法，所述方法包括：用 HLA-肽單體培養對相應 HLA 同種異型呈陰性的健康供體的 PBMC，用四聚體-藻紅蛋白 (PE) 培養 PBMC，以及透過螢光激活細胞分選 (FACS) Calibur 分析分離高親合力(avidity) T 細胞。

【0173】 本發明還涉及一種識別和分離本發明的 TCR 的方法，所述方法包括：獲得含整個人體 TCR $\alpha\beta$ 基因位點（1.1 和 0.7 Mb）的轉基因小鼠（其 T 細胞表達多樣化人類 TCR 貯庫，用於補償小鼠 TCR 缺乏），用一種肽對小鼠進行免疫處理，用四聚體-藻紅蛋白 (PE) 培養從轉基因小鼠中獲得的 PBMC，以及透過螢光激活細胞分選 (FACS) Calibur 分析分離高親合力(avidity) T 細胞。

【0174】 一方面，為了獲得表達本發明的 TCR 的 T 細胞，編碼本發明的 TCR- α 和/或 TCR- β 鏈的核酸被克隆入表達載體，諸如 γ 反轉錄病毒或慢病毒。產生重組病毒，然後測試其功能，如抗原特異性和功能性親合力(avidity)。然後，使用最終產品的等分試樣轉導目標 T 細胞群體（一般純化自患者的 PBMC），在輸入患者體內前將其擴增。

【0175】 另一方面，為了獲得表達本發明的 TCR 的 T 細胞，TCR RNA 透過本領域中已知的技術（例如，體外轉錄系統）合成。然後，體外合成的 TCR RNA 透過電穿孔被引入獲得自健康供體的初代 CD8 陽性 T 細胞，來重新表達腫瘤特異性 TCR- α 和/或 TCR- β 鏈。

【0176】 為了增加表達，編碼本發明的 TCR 的核酸在操作上可連接到強啟動子，例如反轉錄病毒長末端重複序列 (LTR)、巨細胞病毒 (CMV)、鼠幹細胞病毒 (MSCV) U3、磷酸甘油酸激酶 (PGK)、 β -肌動蛋白、泛素蛋白、和猿猴病毒 40 (SV40)/CD43 複合啟動子、拉長因子 (EF)-1a 和脾臟病灶形成病毒 (SFFV) 啟動子。在一優選實施例中，啟動子與被表達的核酸異源。

【0177】 除了強啟動子外，本發明的 TCR 表達匣(expression cassette)可能含有附加的元素，可提高轉基因表達，包括中樞多聚嘧啶區 (cPPT)，其促進了慢病毒構建體的核易位(nuclear translocation) (參見「Follenzi et al., 2000」)，和土撥鼠肝炎病毒轉錄後調控元素 (wPRE)，其透過提高 RNA 穩定性增加轉基因表達的程度（參見「Zufferey et al., 1999」，其內容透過引用整體併入）。

第44頁，共 122 頁(發明說明書)

【0178】本發明的 TCR 的 α 和 β 鏈可由位於不同載體中的核酸進行編碼，或者可透過位於同一載體的多核苷酸編碼。

【0179】實現高程度的 TCR 表面表達需要引入 TCR 的 TCR- α 和 TCR- β 鏈都以高程度轉錄。為此，本發明的 TCR- α 和 TCR- β 鏈可被克隆入單一載體的雙順反子構建體中，其已被證明能夠克服這一障礙。使用在 TCR- α 和 TCR- β 鏈之間的病毒內部核糖體進入位元點 (IRES) 導致兩鏈的協同表達，因為 TCR- α 和 TCR- β 鏈係由在轉譯過程中分成兩個蛋白質的單一轉錄物產生，從而確保了產生 TCR- α 和 TCR- β 鏈的相等莫耳比（參見「Schmitt et al., 2009」，其內容透過引用整體併入）。

【0180】編碼本發明的 TCR 的核酸可被密碼子優化以增加來自宿主細胞的表達。遺傳密碼冗餘(redundancy)讓一些胺基酸被一個以上的密碼子編碼，但些許密碼子沒有其他密碼子「理想」，因為匹配 tRNA 的相對可用性以及其他因素（參見「Gustafsson et al., 2004」）。修改 TCR- α 和 TCR- β 基因序列使得每個胺基酸被用於哺乳動物基因表達的最佳密碼子編碼，以及消除 mRNA 不穩定性基序或隱蔽剪接位元點，已顯示可顯著提高 TCR- α 和 TCR- β 基因表達（參見「Scholten et al., 2006」，這些參考文獻的內容透過引用整體併入本文）。

【0181】此外，引入的和內源性 TCR 鏈之間的錯配可能會導致獲得特異性，這些特異性對自身免疫構成顯著風險。例如，混合 TCR 二聚體的形成可能會減少可用以形成正確配對 TCR 複合體的 CD3 分子數目，因此，會顯著降低表達所引入 TCR 的細胞的功能性親合力（參見「Kuball et al., 2007」，其內容透過引用整體併入）。

【0182】為了減少錯配，本發明引入的 TCR 鏈的 C-末端結構域可以進行修飾以促進鏈間親和力，而降低引入鏈與內源 TCR 配對的能力。這些策略可能包括將人類 TCR- α 和 TCR- β C 端結構域替換為其鼠對應物（鼠化 C-末端結構

第45頁，共 122 頁(發明說明書)

域)；透過引入第二半胱胺酸殘基到引入 TCR 的 TCR- α 和 TCR- β 鏈，產生 C 末端結構域的第二鏈間雙硫鍵（半胱胺酸修飾）；交換 TCR- α 和 TCR- β 鏈 C 末端結構域的相互作用殘基（「杵臼結構(knob-in-hole)」）；以及將 TCR- α 和 TCR- β 鏈的可變結構域直接融合至 CD3 ζ （CD3 ζ 融合）(參見「Schmitt et al., 2009」)。

【0183】 在一實施例中，宿主細胞被改變結構以表達本發明的 TCR。在一優選實施例中，宿主細胞為人類 T 細胞或 T 細胞前驅細胞。在一些實施例中，T 細胞或 T 細胞前驅細胞從癌症患者中獲得。在另一些實施例中，T 細胞或 T 細胞前驅細胞從健康供體中獲得。本發明的宿主細胞相對於待治療的患者可以為同種異體或自體的。在一實施例中，宿主是被轉化以表達 α/β TCR 的 γ/δ T 細胞。

【0184】 「藥物組合物」是指適合在醫療環境中給予人體的組合物。優選地，藥物組合物為無菌狀態，並根據 GMP 指南生產。

【0185】 藥物組合物包括以游離形式或以一藥用鹽形式存在的肽（亦參見上文）。此處所述的「藥用鹽」係指所本發明的肽的一種衍生物，其中，所述肽藉由製造藥物的酸式或鹼式鹽進行修飾。例如，用與適合的酸反應的游離鹼（通常該藥物的中性形式具有一中性-NH₂ 基團）製備酸式鹽。適合製備酸式鹽的酸包括有機酸，如：乙酸、丙酸、羥基酸、丙酮酸、草酸、蘋果酸、丙二酸、丁二酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、對甲苯磺酸、水楊酸等等、以及無機酸，如：鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸和磷酸等。相反地，可存在肽上的酸性基團的鹼式鹽可使用藥用鹼基進行製備，如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、三甲胺等等。

【0186】 在特別優選的實施例中，藥物組合物包括以乙酸（醋酸鹽）、三氟乙酸鹽或鹽酸（氯化物）鹽形式的肽。

【0187】 本發明中所述的藥物優選為一種免疫治療藥物，例如，一種疫苗，其可直接施用予患者、施用至受影響器官，或可透過靜脈內 (i.v.)、皮下 (s.c.)、

皮內 (i.d.)、腹膜內 (i.p.)、肌肉內 (i.m.) 方式全身給藥，或體外應用到來自患者或人類細胞株的細胞（隨後再將這些細胞注入到患者中），或體外用於選擇來自患者的免疫細胞的一個細胞亞群（然後再將細胞重新施用予患者）。如果在體外將核酸施用予細胞，可能有益於細胞轉染，以共同表達免疫刺激細胞因子（如介白素-2）。所述肽可完全單獨給藥、或與免疫刺激佐劑相結合（見下文）、或與免疫刺激細胞因子聯合使用、或以適當的輸送系統給藥（例如脂質體）。所述肽也可共軛到合適的載劑（如鑰孔血藍蛋白 (KLH) 或甘露）（參閱 WO 95/18145 及「Longenecker et al., 1993」，其內容均透過引用整體併入）。所述肽也可進行標記、或可能是一種融合蛋白或是雜合分子。本發明中給出其序列的肽預期可刺激 CD4 或 CD8 T 細胞。但是，在有 CD4 T 輔助細胞的幫助時，CD8 T 細胞刺激更加有效。因此，對於刺激 CD8 T 細胞的 MHC I 類表位，一種雜合分子的融合夥伴或片段適當地提供了刺激 CD4 陽性 T 細胞的表位。CD4 和 CD8 刺激表位為本領域所熟知、並包括本發明中確定的表位。

【0188】一方面，所述疫苗包含至少一個含有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 中所示胺基酸序列的肽，以及至少一個另外的肽，優選為 2 至 50 個、更優選為 2 至 25 個、再優選為 2 至 20 個、最優選為 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18 個肽。肽可能從一個或多個特定 TAA 中衍生，並且可能與 MHC I 類分子結合。

【0189】另一方面，本發明提供一種核酸（如多核苷酸），其編碼本發明的肽或肽變體。多核苷酸可能為，例如，DNA、cDNA、PNA、RNA 或其組合，其可為單鏈和/或雙鏈、或多核苷酸的原生或穩定形式（如：具有硫代磷酸 (phosphorothioate) 骨架的多核苷酸），並且只要編碼肽，就可能包含也可能不包含內含子。當然，多核苷酸只能編碼含有由天然肽鏈連接之天然胺基酸殘基的肽。另一方面，本發明提供一種可表達本發明的多肽的表達載體。

【0190】對於連接多核苷酸(尤其是 DNA)至載體，已經開發出多種方法，例如透過互補可連接性末端。例如，可向 DNA 片段加入互補均聚物區，之後 DNA 片段被插入到載體 DNA。然後，載體和 DNA 片段透過互補均聚物尾巴之間的氫鍵連接，從而形成重組 DNA 分子。

【0191】含有一個或多個限制位(restriction site)的合成接頭為 DNA 片段與載體連接提供了另一種方法。含各種限制性核酸內切酶位點的合成接頭可透過多種管道購得，其中包括從國際生物技術公司(International Biotechnologies Inc，紐哈芬市，康涅狄格州，美國)購得。

【0192】編碼本發明多肽的 DNA 的理想修飾方法是使用 Saiki 等人(參見「Saiki et al., 1988」，其內容透過引用整體併入)所採用的聚合酶連鎖反應方法。此方法可用於將 DNA 引入合適的載體(例如，透過設計合適的限制位)，也可用於本領域已知的其他有用方法修飾 DNA。如果使用病毒載體，痘病毒載體或腺病毒載體為優選。

【0193】之後，DNA(或在反轉錄病毒載體情況下，RNA)可能表達於合適的宿主，從而製造含有本發明的肽或變體的多肽。因此，可根據已知技術使用編碼本發明的肽或變體的 DNA，用本文所述方法適當修飾後，構建一表達載體，然後表達載體用於轉化合適的宿主細胞，從而表達和生產本發明的多肽。此類技術包括那些公開於，例如，美國專利 4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075 和 4,810,648 的技術，各篇內容均透過引用整體併入本文。

【0194】編碼構成本發明化合物之多肽的 DNA(或在反轉錄病毒載體情況下，RNA)可能被加入到其他多種 DNA 序列，從而引入到合適的宿主中。伴生 DNA 將取決於宿主的性質、DNA 引入宿主的方式、以及是否需要保持為游離體還是要整合。

【0195】一般來說，DNA 可以適當的表達方向和正確的閱讀框插入到表達載體（如質體）中。如有必要，所述 DNA 可連接到所需宿主所識別的適當轉錄和轉譯調節控制核苷酸序列，儘管表達載體中一般存在此類控制功能。之後，所述載體透過標準方法被引入宿主。一般來說，並不是所有的宿主都會被載體轉化。因此，有必要選擇轉化過的宿主細胞。選擇方法涉及將一 DNA 序列插入表達載體中，以具有任何必要控制元素，所述控制元素編碼轉化細胞的可選擇屬性，例如抗生素抗藥性。

【0196】另外，有這種可選擇屬性的基因可在另外一個載體上，所述載體用來協同轉化所需的宿主細胞。

【0197】之後，經由本發明的重組 DNA 所轉化的宿主細胞在本領域技術人員熟悉的合適條件下培養足夠長的時間，從而表達之後可回收的多肽。

【0198】有許多已知的表達系統，包括細菌（如大腸桿菌*E. coli*和枯草芽孢桿菌*Bacillus subtilis*）、酵母菌（如釀酒酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*）、絲狀真菌（如曲黴菌*Aspergillus spec.*）、植物細胞、動物細胞及昆蟲細胞。所述系統可優選為哺乳動物細胞，如來自 ATCC 細胞生物學庫 (Cell Biology Collection) 中的 CHO 細胞。

【0199】用於組成型表達的典型哺乳動物細胞載體質體，其包括具合適的多聚 A 尾巴及抗性標誌物（如新黴素）的 CMV 或 SV40 啟動子。一個實例為從 Pharmacia 公司（皮斯卡特維，新澤西州，美國）獲得的 pSVL。一種可誘導型哺乳動物表達載體的例子是 pMSG，也可以從 Pharmacia 公司獲得。有用的酵母質體載體是 pRS403-406 和 pRS413-416，一般可從 Stratagene Cloning Systems 公司（拉霍亞，加州 92037，美國）獲得。質體 pRS403、pRS404、pRS405 和 pRS406 是酵母整合型質體 (YIp)，並插入了酵母可選擇性標記物 HIS3、TRP1、LEU2 和 URA3。pRS413-416 質體為酵母著絲粒質體 (Ycp)。基於 CMV 啟動子的載體

第49頁，共 122 頁(發明說明書)

(如，來自於 Sigma-Aldrich 公司) 提供了暫態或穩定的表達、胞漿表達或分泌、以及以 FLAG、3xFLAG、c-myc 或 MAT 的各種組合的 N-端或 C-端標記。這些融合蛋白可用於檢測、純化及分析重組蛋白。雙標融合為檢測提供了靈活性。

【0200】強勁的人類巨細胞病毒 (CMV) 啟動子調控區使得 COS 細胞中的組成蛋白表達程度高達 1 mg/L。對於較弱的細胞株，蛋白程度一般約 0.1 mg/L。SV40 複製原點的存在將導致 DNA 在 SV40 複製容納性 COS 細胞中高程度複製。例如，CMV 載體可包含細菌細胞中的 pMB1 (pBR322 的衍生物) 複製原點、細菌中進行安比西林抗性選殖的 b-內酰胺酶基因、hGH polyA、及 fl 的原點。含前胰島素原引導 (PPT) 序列的載體可引導 FLAG 融合蛋白分泌到培養基中，並使用抗 FLAG 抗體、樹脂和板進行純化。其他與各種宿主細胞一起應用的載體和表達系統是本領域熟知眾所周知的。

【0201】在另一實施例中，對本發明的兩個或更多的肽或肽變體進行編碼，並因此以一個連續順序（類似於「串珠狀結構」的構建體）表達。為達到目標，所述肽或肽變體可能透過連接子氨基酸的延伸處（例如 LLLLLL）連接或融合一起，也可能他們之間沒有任何附加的肽而被連接。這些構建體也可用於癌症治療，可誘導涉及 MHC I 和 MHC II 類分子的免疫反應。

【0202】本發明還涉及一種宿主細胞，其以本發明的多核苷酸載體構建轉化而來。宿主細胞可為原核細胞，也可為真核細胞。在些許情況下，細菌細胞為優選原核宿主細胞，典型為大腸桿菌，例如，大腸桿菌菌株 DH5（從 Bethesda Research Laboratories 公司（貝塞斯達，馬里蘭州，美國）獲得）和 RR1（從美國菌種保藏中心（ATCC，羅克維爾，馬里蘭州，美國），ATCC 編號 31343 獲得）。優選的真核宿主細胞包括酵母、昆蟲和哺乳動物細胞，優選為脊椎動物細胞，如：小鼠、大鼠、猴子或人類成纖維細胞和結腸細胞株中的細胞。酵母宿主細胞包括 YPH499、YPH500 和 YPH501，一般可從 Stratagene Cloning

Systems 公司（拉霍亞，加州 92037，美國）獲得。優選哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞(為 ATCC 中的 CCL61 細胞)、NIH 瑞士小鼠胚胎細胞 NIH/3T3 (為 ATCC 中的 CRL 1658 細胞)、猴腎源性 COS-1 細胞(為 ATCC 中的 CRL 1650 細胞)以及人類胚胎腎細胞的 293 細胞。優選的昆蟲細胞為 Sf9 細胞，可用杆狀病毒表達載體轉染。有關針對表達選擇合適宿主細胞的概要參見文獻「Balbás and Lorence, 2004」。

【0203】 含本發明 DNA 構建體的適當宿主細胞的轉化可使用本領域熟知的方法完成，通常取決於使用載體的類型。關於原核宿主細胞的轉化，請參見，例如，Cohen 等人或 Green and Sambrook 的文獻 (參見「Cohen et al., 1972」;「Green and Sambrook, 2012」)。酵母細胞的轉化在 Sherman 等人的文章 (參見「Sherman et al., 1986」) 中進行了描述。Beggs (參見「Beggs, 1978」) 中所述的方法也很有用。對於脊椎動物細胞，轉染這些細胞的試劑等，例如，磷酸鈣和 DEAE-葡聚糖或脂質體配方，可從 Stratagene Cloning Systems 公司或 Life Technologies 公司（蓋瑟斯堡，馬里蘭州 20877，美國）獲得。電穿孔也可用於轉化和/或轉染細胞，是本領域用於轉化酵母細胞、細菌細胞、昆蟲細胞和脊椎動物細胞熟知的方法。這些參考文獻的內容透過引用整體併入本文。

【0204】 被成功轉化的細胞（即含本發明 DNA 構建體的細胞）可用本領域熟知的方法（如 PCR）進行識別。另外，上清液存在的蛋白可使用抗體進行檢測。

【0205】 應瞭解，本發明的些許宿主細胞用於製備本發明的肽，例如細菌細胞、酵母細胞和昆蟲細胞。但是，其他宿主細胞可能對些許治療方法有用。例如，抗原呈現細胞 (APC)（如樹突細胞）可用於表達本發明的肽，使他們可以加載入相應的 MHC 分子中。因此，本發明提供一種宿主細胞，其包含本發明的核酸或表達載體。

【0206】 在一優選實施例中，宿主細胞為抗原呈現細胞，尤其是樹突細胞或抗原呈現細胞。2010 年 4 月 29 日，美國食品藥物管理局 (FDA) 批准載有含攝護腺酸性磷酸酶 (PAP) 的重組融合蛋白的 APC，可用於治療無症狀或症狀輕微的轉移性 HRPC (Sipuleucel-T) (參見「Rini et al., 2006」；「Small et al., 2006」，其內容透過引用整體併入)。

【0207】 另一方面，本發明提供一種製備一種肽及其變體的方法，所述方法包括培養一宿主細胞和從宿主細胞或其培養基中分離肽。

【0208】 在另一實施例中，本發明的肽、核酸或表達載體係用於藥物中。例如，肽或其變體可製備為 i.v.、s.c.、i.d.、i.p.、i.m. 注射。肽注射的優選方法包括 s.c.、i.d.、i.p.、i.m. 和 i.v. 注射。DNA 注射的優選方法為 i.d.、i.m.、s.c.、i.p. 和 i.v. 注射。給予劑量例如 50 µg 至 1.5 mg，優選為 125 µg 至 500 µg 的肽或 DNA，這取決於各自的肽或 DNA。上述劑量範圍在先前的試驗中成功使用 (參見「Walter et al., 2012」)。

【0209】 用於主動免疫接種的多核苷酸可為基本純化形式，也可包含於合適載體或輸送系統。核酸可能為 DNA、cDNA、PNA、RNA、或其組合。此類核酸的設計和引入方法為本領域所熟知。Teufel 等人提供了概述 (參見「Teufel et al., 2005」，其內容透過引用整體併入)。多核苷酸疫苗很容易製備，但這些載體誘導免疫反應的作用模式尚未完全瞭解。合適的載體和輸送系統包括病毒 DNA 和/或 RNA，如基於腺病毒、牛痘病毒、反轉錄病毒、疱疹病毒、腺相關病毒或含一種以上病毒元素的雜交物的系統。非病毒輸送系統包括陽離子脂質和陽離子聚合物，是 DNA 輸送所屬領域內熟知的系統。也可使用物理輸送系統，如透過「基因槍」。肽或核酸編碼的肽可以是一種融合蛋白，例如，含刺激 T 細胞用於上述各別相反 CDR 的表位。

【0210】 本發明的藥物也可能包括一種或多種佐劑。佐劑是非特異性地增強或加強免疫反應的物質，例如，透過 CD8-陽性 T 細胞和輔助 T (TH) 細胞介導的對一種抗原的免疫反應，因此被視為對本發明的藥物有用。

【0211】 適合的佐劑包括（但不限於）1018 ISS、鋁鹽、AMPLIVAX®、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、鞭毛蛋白或鞭毛蛋白衍生的 TLR5 配體、FLT3 配體、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特 (ALDARA®)、瑞喹莫德、ImuFact IMP321、介白素 IL-2、IL-13、IL-21、干擾素 α 或 β 或其聚乙二醇衍生物、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、JuvImmune®、LipoVac、MALP2、MF59、單磷醯脂A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、水包油和油包水乳狀液、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、PepTel® 載體系統、基於聚（乳酸共-乙醇酸）[PLG] 和右旋糖苷微粒、重組人乳鐵傳遞蛋白 SRL172、病毒顆粒和其他病毒樣顆粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys、、分支桿菌提取物和細菌細胞壁合成模擬物的 Aquila 公司的 QS21 stimulon (源自皂苷)、以及其他專有佐劑，如：Ribi公司的Detox、Quil 或 Superfos。優選佐劑如：弗氏佐劑或 GM-CSF。於習知文獻中對一些樹突細胞特異性的免疫佐劑（如 MF59）及其製備方法進行了描述（參見「Allison and Krummel, 1995」，其內容透過引用整體併入）。

【0212】 也可使用細胞因子。一些細胞因子（如，GM-CSF、IL-1 和 IL-4）直接影響樹突細胞向淋巴組織（如，TNF）移動，加速樹突細胞成熟為 T 淋巴細胞的有效抗原呈現細胞（美國 5849589號專利，透過引用整體併入本文），並充當免疫佐劑（如 IL-12、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、IFN- α 、IFN- β ）（參見「Gabrilovich et al., 1996」，其內容透過引用整體併入）。一方面，細胞

因子和免疫佐劑可體外(in vitro)使用，例如用於 T 細胞的擴增或激活，或用於離體(ex vivo)用途。

【0213】 根據習知文獻，CpG 免疫刺激寡核苷酸可提高佐劑在疫苗中的作用。如果沒有理論的約束，CpG 寡核苷酸可透過 Toll 樣受體 (TLR) (主要為 TLR9) 激活先天 (非適應性) 免疫系統從而起作用。CpG 引發的 TLR9 激活作用提高了對各種抗原的抗原特異性體液和細胞反應，這些抗原包括肽或蛋白抗原、活病毒或被殺死的病毒、樹突細胞疫苗、自體細胞疫苗以及預防性和治療性疫苗中的多醣結合物。更重要的是，他會增強樹突細胞的成熟和分化，導致 TH1 細胞的激活增強以及強烈的細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL) 生成，甚至在 CD4 T 細胞幫助不存在下亦同。甚至有疫苗佐劑的存在也能維持 TLR9 激活作用誘發的 TH1 偏移，這些佐劑如：正常促進 TH2 偏移的明礬或弗氏不完全佐劑 (IFA)。CpG 寡核苷酸與以下其他佐劑或配方一起製備或聯合給藥時，表現出更強的佐劑活性，如微粒、奈米粒子、脂肪乳或類似配方，當抗原相對較弱時，這些對誘發強烈反應尤為必要。他們還能加速免疫反應，使抗原劑量減少約兩個數量級，在有些實驗中，對不含 CpG 的全劑量疫苗也能產生類似的抗體反應 (參見「Krieg, 2006」)。美國 6,406,705 B1 號專利 (透過引用整體併入) 揭露了 CpG 寡核苷酸、非核酸佐劑和抗原的結合使用，以促使抗原特異性免疫反應。一種 CpG TLR9 拮抗劑為 Mologen 公司 (德國柏林) 的 dSLIM (雙幹環免疫調節劑)，這是本發明的藥物組合物的優選成分。也可使用其他 TLR 結合分子，如：RNA 結合 TLR7、TLR8 和/或 TLR9。

【0214】 其他有用的佐劑例子包括 (但不限於) 化學修飾性 CpG (如 CpR、Idera)、dsRNA 模擬物，如，Poly(I:C) 及其衍生物 (如：AmpliGen®、Hiltonol®、多聚-(ICLC)、多聚 (IC-R)、多聚 (I:C12U))、非 CpG 細菌性 DNA 或 RNA 以及免疫活性小分子和抗體，如：環磷醯胺、舒尼替尼、免疫檢查點抑制劑 (包括

第54頁，共 122 頁(發明說明書)

ipilimumab、nivolumab、pembrolizumab、atezolizumab、avelumab、durvalumab 和 cemiplimab）、貝伐單抗®、西樂葆、NCX-4016、西地那非、他達拉非、伐地那非、索拉非尼、替莫唑胺、替西羅莫司、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗-CTLA4、免疫系統的其他抗體靶向性主要結構（如：抗-CD40、抗-TGF- β 、抗-TNF- α 受體）和 SC58175，這些藥物都可能有治療作用和/或充當佐劑。本領域技術人員無需過度進行實驗即可容易確定本發明中有用的佐劑和添加劑的數量和濃度。

【0215】 首選佐劑是抗-CD40、咪喹莫特、瑞喹莫德、GM-CSF、環磷醯胺、舒尼替尼、貝伐單抗、干擾素 α 、CpG 寡核苷酸及衍生物、聚(I:C)及衍生物、RNA、西地那非、及 PLG 或病毒顆粒的微粒製劑。

【0216】 本發明藥物組合物的一個優選實施例中，佐劑係選自由集落刺激因子，如 GM-CSF、沙格司亭、環磷醯胺、咪喹莫特、瑞喹莫德、干擾素- α 或其組合所組成的群組。

【0217】 在本發明藥物組合物的一優選實施例中，佐劑為環磷醯胺、咪喹莫特或瑞喹莫德。更優選的佐劑是 Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、聚-ICLC (Hiltonol®) 和抗 CD40 mAb、或其組合。

【0218】 此組合物為腸道外給藥(parenteral administration)，如皮下、皮內、肌肉注射、或口服。組合物可透過皮下、肌內、靜脈內、腹膜內、胸膜內、囊內、鞘內、局部、口服給藥、或組合途徑進行給藥。為此，肽和任選其他分子在藥用載劑(優選為水載劑)中溶解或懸浮。此外，組合物可包含賦形劑，如：緩衝劑、結合劑、衝擊劑、稀釋劑、香料、潤滑劑等。藥用載劑包括(但不限於)賦形劑、潤滑劑、乳化劑、穩定劑、溶劑、稀釋劑、緩衝劑、載體、或其組合。

肽或識別與 MHC 分子複合的本發明所述肽的 T 細胞也可以與免疫刺激物質（例如表 5 中所示的細胞因子）一起施用。

[表 5] 免疫刺激細胞因子。

細胞因子	
EOTAXIN	IL-15
G-CSF	IL-17
GM-CSF	IP-10
INF- γ	MIP-2
IL-1 α	KC
M-CSF	LIF
IL-1 β	LIX
IL-2	MCP-1
IL-3	MIP-1 α
IL-4	MIP-1 β
IL-5	MIG
IL-6	RANTES
IL-7	TNF α
IL-10	IL-12 (P70)
IL-12 (p40)	VEGF
IL-13	IL-9
IL-18	IL-21

【0219】 細胞因子（例如 IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IFN- α 和 IFN- β ）也可用於激活和/或擴增 T 細胞，例如識別與 MHC 分子複合的本發明的肽的 T 細胞。

【0220】 可用於此類組合物的更多賦形劑可從 A. Kibbe 所著的「Handbook of Pharmaceutical Excipients」（參見「Kibbe, 2000」）等書中獲知。合適藥物載劑的其他實例描述見 Remington 所著的「Pharmaceutical Sciences」（參見「Gennaro, 1997」；「Banker and Rhodes, 2002」，其內容透過引用整體併入本文）。此組合物可用於阻止、預防和/或治療腺瘤或癌性疾病。例如，EP2112253 中有示例性製劑。

【0221】 重要的是要認識到，透過本發明的疫苗引發的免疫反應在不同的細胞階段和發展的不同階段攻擊癌症。此外，不同的癌症相關訊息傳遞路徑被

攻擊。這是相對於其他疫苗的一個優勢，其他疫苗只針對一個或少許靶標，這可能會導致腫瘤很容易適應於攻擊（腫瘤逃逸）。此外，並非所有的個體腫瘤都表達相同模式的抗原。因此，些許腫瘤相關肽的組合確保了每個腫瘤都帶有至少一些靶標。所述組合物以這樣的方式設計，預期每個腫瘤可表達些許抗原並覆蓋腫瘤生長和維持所需要的些許獨立路徑。因此，疫苗可易於「現成的」用於較大患者群體。這意味著，預選擇接受疫苗治療的患者可限制為 HLA 分型，無需抗原表達的任何額外的生物標記評估，但仍然確保多個靶標同時被誘導的免疫反應攻擊，這對於療效很重要（參見「Banchereau et al., 2001」；「Walter et al., 2012」，其內容透過引用整體併入）。

【0222】本文所用的術語「支架」是指與（如抗原）決定因子特異性結合的分子。在一實施例中，支架是能夠引導其所連接的實體（例如，（第二）抗原結合部分）至目標靶點，例如，至特定類型的腫瘤細胞或承載抗原決定簇的腫瘤基質（如根據本發明的肽和 MHC 的複合體）。在另一實施例中，支架能夠透過其靶抗原（例如 T 細胞受體複合體抗原）激活訊息傳遞。支架包括（但不限於）抗體及其片段、抗體的抗原結合區（包含抗體重鏈可變區和抗體輕鏈可變區）、結合蛋白（包括至少一個錨蛋白重複基序和單域抗原結合 (SDAB) 分子）、適體、（可溶）TCR 和（經修飾的）細胞，例如同種異體或自體 T 細胞。為了評估分子是否是結合至靶點的支架，可進行結合測定。

【0223】「特異性」結合係指，與其他天然肽-MHC 複合體相比，所述支架與目標的肽-MHC 複合體更好地結合，結合程度為，擁有能夠殺死承載特定靶點細胞的活性分子的支架，其不能夠殺死無特定靶點但提呈其他肽-MHC 複合體的另一細胞。如果交叉反應性肽-MHC 的肽並不是天然的，即，並非來自人類 HLA 多肽組，則結合至其他肽-MHC 複合體是無關緊要的。評估靶細胞殺傷的

測試在本領域中是公知的。他們應該用含有未改變的肽-MHC 提呈的靶細胞（初代細胞或細胞株）、或載有肽以便達到天然肽-MHC 的程度的細胞進行。

【0224】 各支架可包括一個標記，其透過確定是否存在或不存在標記所提供的信號可檢測到結合支架。例如，所述支架可用螢光染料或任何其他適用的細胞標記分子進行標記。此類標記分子是本領域中公知的。例如，透過螢光染料進行的螢光標記可透過螢光或鐳射掃描顯微術或流式細胞術提供結合適體的視覺化。

【0225】 各支架可與一第二活性分子（例如 IL-21、抗 CD3、抗 CD28）偶合。

【0226】 關於多肽支架的進一步資訊，可參閱，例如，在 WO 2014/071978A1 的先前技術部分以及該文引用的參考文獻，其內容透過引用整體併入。

【0227】 本發明的肽可用於生成和開發出針對 MHC-肽複合體的特異性抗體。這些抗體可用於治療，將毒素或放射性物質靶向病變組織。這些抗體的另一用途是為了成像之目的（如 PET）將放射性核素靶向病變組織。這可有助於檢測小轉移灶或確定病變組織的大小和準確位置。

【0228】 因此，本發明的另一方面是提供一種產生重組抗體的方法，所述重組抗體特異性結合至與 HLA 限制性抗原（優選為本發明的肽）複合的 MHC I 或 II 類分子，所述方法包括：用可溶形式的與 HLA 限制性抗原複合的 MHC I 或 II 類分子對基因工程非人類哺乳動物進行免疫，該基因工程非人類哺乳動物包含表達所述人類 MHC I 或 II 類分子的細胞；從所述非人哺乳動物的抗體產生細胞分離 mRNA 分子；產生一個噬菌體展示庫，展示由所述 mRNA 分子編碼的蛋白分子；以及從所述噬菌體展示庫分離至少一個噬菌體，所述的至少一個噬菌體

展示所述抗體，所述抗體特異性地結合至與 HLA 限制性抗原複合的所述 MHC I 或 II 類分子。

【0229】 因此，本發明的另一方面提供一種抗體，其特異性結合至與 HLA 限制性抗原複合的 MHC I 或 II 類分子，其中，所述抗體優選為多株抗體、單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、其抗體片段、或其組合。

【0230】 雙特異性抗體

【0231】 一方面，雙特異性抗體包括能夠選擇性結合兩個或更多表位的一抗體。雙特異性抗體可透過多種方式製造（參見「Holliger & Winter, 1993」，其內容透過引用整體併入），例如，透過化學方式製備或採用融合瘤製備，或者可以為上述任何雙特異性抗體片段。可使用 scFv 二聚體(dimers)或雙價抗體(diabodies)，而不是使用完整抗體。雙價抗體和 scFv 可以在沒有 Fc 區的情況下構建，僅使用可變結構域（通常包括來自源抗體的輕鏈和重鏈的可變結構域成分），這可能會降低抗獨特型(anti-idiotypic)反應的影響。其他形式的雙特異性抗體包括 Traunecker 及其同事（參見「Traunecker et al., 1991」，其內容透過引用整體併入）描述的單鏈「Janusins」。

【0232】 雙特異性抗體通常包括兩個不同的結合域，每個結合結構域特異性結合兩個不同抗原或同一抗原上的不同表位。如果雙特異性抗體能夠選擇性結合兩個不同的表位（第一表位和第二表位），則第一結合域對第一表位的親和力通常會比第一結合域對第二表位的親和力低至少一個至兩個或三個或四個數量級，反之亦然。雙特異性抗體識別的表位可在相同或不同的靶標上（例如，在相同或不同的蛋白質上）。例如，可透過組合識別相同抗原的不同表位的結合域來製備雙特異性抗體。

【0233】 一些示例性雙特異性抗體具有兩條重鏈（每條有三個重鏈 CDR，然後為（按 N 端到 C 端順序）CH1 結構域、鉸鏈、CH2 結構域、和 CH3 結構

第59頁，共 122 頁(發明說明書)

域)，以及透過與每條重鏈結合賦予抗原結合特異性的兩條免疫球蛋白輕鏈。然而，設想了其他結構，包括雙特異性抗體，其輕鏈與每條重鏈相關但不（或最低限度）促成抗原結合特異性，或者可結合一個或多個由重鏈抗原結合區結合的表位，或者可與每條重鏈相關並使一條或兩條重鏈與一個或兩個表位結合。

【0234】 在特定實施例中，雙特異性抗體可包括抗體臂，其與結合白血球上觸發分子的臂組合，例如，T 細胞受體分子（例如，CD3）或 IgG 的 Fc 受體 (Fc γ R)（例如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD 16)，以便將細胞防禦機制集中和定位至靶標疾病細胞。雙特異性抗體還可用於將細胞毒劑定位至靶標疾病細胞。

【0235】 雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段（例如，F(ab')₂ 雙特異性抗體）。參見，例如 WO 1996/016673；美國專利號 5,837,234；WO 1998/002463；美國專利號 5,821,337，其內容透過引用整體併入。

【0236】 雙特異性抗體半衰期可能延長。在特定實施例中，雙特異性抗體的半衰期延長可以透過以下方式實現：透過與惰性聚合物（如聚乙二醇）或其他模擬親水聚合物偶聯，來增加抗體的流體力學體積；與大的無序肽融合或偶合；或將抗體與配體融合或偶聯。這些改變以及許多其他改變在別處有描述（美國專利號 7,083,784、美國專利號 7,670,600、美國專利申請公開號 2010/0234575、及「Zwolak et al., 2017」，其內容透過引用整體併入）。半衰期延長的雙特異性抗體描述參見，例如，美國專利號 8,921,528 和美國專利申請公開號 2014/0308285，其內容透過引用整體併入。

【0237】 製備雙特異性抗體的方法為本領域已知。全長雙特異性抗體的製造係基於兩條免疫球蛋白重鏈-輕鏈對的共表達，其中兩條鏈具有不同的特異性。參見，例如，WO 1993/008829 和「Traunecker et al., 1991」，其內容透過引用整體併入。

【0238】 多株抗體

【0239】 製備多株抗體的方法為本領域已知。多株抗體是源自抗原免疫動物血清的抗體分子異質群體。選擇性結合根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的肽的多株抗體或其變體或片段，係可透過本領域熟知的方法製備（參見，例如「Howard & Kaser, 2007」，其內容透過引用整體併入）。

【0240】 嵌合抗體

【0241】 嵌合抗體是其不同部分源自不同動物物種的分子，例如具有源自鼠抗體的可變區和人類免疫球蛋白恆定區的分子，其主要用於降低應用中的免疫原性並提高生產產量，例如，其中鼠單株抗體來自融合瘤的產量更高，但在人類中具有更高的免疫原性，因此使用人鼠嵌合單株抗體。嵌合抗體及其生產方法為本領域已知（參見「Cabilly et al., 1984」；「Morrison et al., 1984」；「Boulianne et al., 1984」；歐洲專利申請 173494 (1986)；WO 86/01533 (1986)；歐洲專利申請 184187 (1986)；「Sahagan et al., 1986」；「Liu et al., 1987」；「Sun et al., 1987」；「Better et al., 1988」；「Harlow & Lane, 1998」；美國專利號 5,624,659，其內容透過引用整體併入）。

【0242】 抗體片段

【0243】 除了完整的免疫球蛋白（或其重組對應物）之外，還可以合成包含表位結合位點的免疫球蛋白片段（例如，Fab'、F(ab')₂、或其他片段）。可以利用重組免疫球蛋白技術設計「片段」或最低免疫球蛋白。例如，用於本發明的「Fv」免疫球蛋白可透過合成融合的輕鏈可變區和重鏈可變區來生產。抗體的組合也令人感興趣，例如雙價抗體(diabodies)，其包含兩種不同的 Fv 特異性。免疫球蛋白的抗原結合片段包括(但不限於) SMIP（小分子免疫藥物）、駱駝抗體(camelbodies)、奈米抗體和 IgNAR。

【0244】產生此類抗體和單鏈 MHC I 類複合體的相應方法，以及產生這些抗體的其他工具已在 WO 03/068201、WO 2004/084798、WO 01/72768、WO 03/070752、以及出版物（參見「Cohen et al., 2003a」；「Cohen et al., 2003b」；「Denkberg et al., 2003」，為了本發明之目的，透過引用整體併入）中揭露。

【0245】優選地，抗體以 <100 nM，更優選為 <50 nM，更優選為 <10 nM，更優選為 <1 nM，更優選為 <0.1 nM，更優選為 <0.01 nM 的結合親和力與複合體結合，其在本發明背景中也視為「具有特異性」。

【0246】本發明涉及一種肽，其包含一胺基酸序列，所述胺基酸序列係選自由以下項目所組成之群組：

【0247】SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216，

【0248】以及其變體序列，其保持與 MHC 分子結合和/或誘導 T 細胞與所述變體肽交叉反應的能力；

【0249】或其藥用鹽。

【0250】所公開的肽與 HLA-A*01、HLA-A*02、HLA-A*03、HLA-A*24、HLA-B*07、HLA-B*08、HLA-B*44 同種異型 MHC 分子結合。同樣，肽變體與 MHC 分子結合的能力與這些 HLA 同種異型 MHC 分子之一有關。

【0251】在一實施例中，上述含義中要求保護的肽的變體序列是在其所謂「錨定位置(anchoring position)」具有取代的序列。

【0252】必須注意，MHC 限制性肽中的這些錨定位置包含胺基酸殘基，其介導肽與 MHC 中肽結合槽結合。他們在結合多肽和肽-MHC 複合體之間的結合反應中僅起較小作用，這意味著這些位置的取代不會顯著影響以此類方式修飾的肽的免疫原性或 TCR/抗體結合。

【0253】對於結合本發明的肽的 HLA 等位基因，各 MHC 限制性肽的錨定位置以及這些位置的優選胺基酸殘基見表 6。

[表 6] 本發明的肽結合的 HLA 等位基因的錨定位和這些位置的優選胺基酸。

HLA 亞型	錨定位 置 1	接受的胺基 酸殘基	錨定位 置 2	接受的胺基 酸殘基	錨定位 置 3	接受的胺基 酸殘基
HLA-A*01:01	位置 2	蘇胺酸 (T) 絲胺酸 (S)	位置 3	天冬胺酸 (D) 麩胺酸 (E)	C 端	酪胺酸 (Y)
HLA-A*02:01	位置 2	白胺酸 (L) 甲硫胺酸 (M)	n/a	n/a	位置 9	白胺酸 (L) 纈胺酸 (V)
HLA-A*03:01	位置 2	白胺酸 (L) 纈胺酸 (V)	n/a	n/a	C 端	賴胺酸 (K)
HLA-A*24:02	位置 2	酪胺酸 (Y)	n/a	n/a	C 端	苯丙胺酸 (F)
HLA-B*07:02	位置 2	脯胺酸 (P)	n/a	n/a	C 端	白胺酸 (L)
HLA-B*08:01	位置 3	賴胺酸 (K)	位置 5	賴胺酸 (K) 精胺酸 (R)	C 端	白胺酸 (L)
HLA-B*44:02	位置 2	麩胺酸 (E)	n/a	n/a	C 端	色胺酸 (W) 苯丙胺酸 (F) 酪胺酸 (Y)

【0254】 此外，本發明涉及與 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 至少 88% 同源的變體，條件是它們與 MHC 分子結合和/或誘導 T 細胞與所述變體肽交叉反應。

【0255】 在一實施例中，上述含義中要求保護的肽的變體序列是透過至少一個保守胺基酸取代修飾的序列。術語「保守胺基酸取代」的定義和範圍在表 2 和表 3 以及與其相關的描述中公開。

【0256】 在一實施例中，所述肽能夠與 MHC I 類分子結合，並且當與所述 MHC I 類分子結合時，能夠被 CD4 和/或 CD8 T 細胞識別。

【0257】 在一實施例中，MHC I 類分子是上述 HLA 同種異型 MHC 分子之一。

【0258】 本發明進一步涉及一種肽，其包含選自由 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:216 或其變體所組成的群組的一序列，該變體與 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 具有至少 88% 同源性（優選為相同），其中，所述肽或變體的總長度為 8 至 30 個，優選為 8 至 12 個胺基酸，或 9 至 30 個，優選為 9 至 12 個胺基酸（如果所選肽的長度為 9 個胺基酸），或 10 至 30 個，優選為 10 至 12 個胺基酸（如果所選肽的長度為 10 個胺基酸）。

【0259】 在一實施例中，所述肽或其變體在相應序列的 C-和/或N-端包含 1 至 4 個額外的胺基酸。更多詳情請參見表 4。

【0260】 在一實施例中，所述肽或其變體的長度最長為 30 個胺基酸。在一實施例中，所述肽或其變體的長度最長為 16 個胺基酸。在一實施例中，所述肽或其變體的長度最長為 12 個胺基酸。

【0261】 在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 8 至 30 個胺基酸。在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 8 至 16 個胺基酸。在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 8 至 12 個胺基酸。

【0262】 在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 9 至 30 個胺基酸。在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 9 至 16 個胺基酸。在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 9 至 12 個胺基酸。

【0263】 在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 10 至 30 個胺基酸。在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 10 至 16 個胺基酸。在一實施例中，所述肽或其變體的總體長度為 10 至 12 個胺基酸。

【0264】 在一實施例中，所述肽或其變體具有根據相應 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的一長度。在一實施例中，所述肽由根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的胺基酸序列組成或基本上由其組成。

【0265】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中所述肽包含非肽鍵。

【0266】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中所述肽為一融合蛋白的一部分，特別包括 HLA-DR 抗原相關不變鏈 (Ii) 的 N-端胺基酸，或其中所述肽與抗體（例如，對樹突細胞特異性的抗體）融合(或進入抗體的序列)。

【0267】 本發明進一步涉及一種抗體或其功能片段，其特異性識別或結合至本發明的肽或其變體，或當與 MHC 分子結合時的本發明的肽或其變體。

【0268】 在一實施例中，MHC 分子為同種異型 HLA-A*01:01、HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-A*24:02、HLA-B*07:02、HLA-B*08:01、HLA-B*44:02、以及可選其他 HLA 同種異型的 MHC 分子。

【0269】 在進一步的實施例中，此類抗體為可溶性或與膜結合。在進一步的實施例中，此類抗體為單株抗體或其片段。在進一步的實施例中，此類抗體具有進一步的效應功能，如免疫刺激結構域或毒素。

【0270】 本發明進一步涉及一種 T 細胞受體或其功能片段，其與一 MHC 配體反應或結合，其中，所述配體為本發明的肽或其變體，或當與 MHC 分子結合時的本發明的肽或其變體。

【0271】 在一實施例中，MHC 分子為至少一種選自由 HLA-A*01:01、HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-A*24:02、HLA-B*07:02、HLA-B*08:01 和 HLA-B*44:02 以及可選其他 HLA 同種異型所組成之群組的 MHC 分子。

【0272】 在進一步的實施例中，所述 T 細胞受體以可溶性分子形式提供。在進一步的實施例中，所述 T 細胞受體具有進一步的效應功能，如免疫刺激結構域或毒素。

【0273】 本發明進一步涉及一種核酸，其編碼本發明的肽或其變體、本發明的抗體或其片段、或本發明的 T 細胞受體或其片段。

【0274】 本發明進一步涉及本發明的核酸，為 DNA、cDNA、PNA、RNA、或其組合。

【0275】 在一實施例中，所述核酸與異源啟動子序列連接。在一實施例中，所述核酸以一表達和/或包含所述核酸的表達載體形式提供。

【0276】 本發明進一步涉及一種重組宿主細胞，其包含本發明的肽或其變體、本發明的抗體或其片段、本發明的 T 細胞受體或其片段、或本發明的核酸或表達載體。

【0277】 本發明進一步涉及一種體外製備激活 T 淋巴細胞的方法，所述方法包括將 T 細胞與載有抗原的人類 MHC I 或 II 類分子進行體外接觸足夠的一段時間，從而以抗原特異性方式激活所述 T 細胞，其中，所述 MHC I 或 II 類分子在合適的抗原呈現細胞或人工建構類比的抗原呈現細胞的表面上表達，所述抗原為根據各自描述的肽或其變體。

【0278】 在一實施例中，抗原呈現細胞包括一個表達載體，其有能力表達含 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的所述肽或所述變體胺基酸序列。

【0279】 本發明進一步涉及一種體外製備本發明的肽的方法，所述方法包括培養本發明的宿主細胞，以及從所述宿主細胞或其培養基中分離肽。

【0280】 本發明進一步涉及一種透過本發明的方法製成的激活 T 淋巴細胞，其中，所述 T 淋巴細胞選擇性識別一細胞，所述細胞提呈本發明的肽或其變體。所述提呈可以為異常提呈或異常表達。

【0281】 本發明進一步涉及一種藥物組合物，其包括至少一活性成分及一藥用載體，所述活性成分係選自由以下項目所組成的群組：

【0282】 本發明的肽或其變體、

第66頁，共 122 頁(發明說明書)

【0283】 本發明的抗體或其片段、

【0284】 本發明的 T 細胞受體或其片段、

【0285】 本發明的核酸或表達載體、

【0286】 本發明的宿主細胞、

【0287】 或本發明的激活 T 淋巴細胞。

【0288】 在一實施例中，此類藥物組合物為用於個體患者的個人化藥物組合物。在一實施例中，藥物組合物為一種疫苗。所述方法也可適用於製備用於下游應用的 T 細胞克隆物，如：TCR 分離物，或可溶性抗體和其他治療選擇。

【0289】 「個人化藥物」係指專門針對個體患者的治療，將僅用於治療該等個體患者，包括個人化活性癌症疫苗以及使用自體患者組織的過繼細胞療法 (adoptive cellular therapy)。

【0290】 本發明進一步涉及一種方法，用於製備本發明的肽或其變體、本發明的抗體或其片段、或本發明的 T 細胞受體或其片段，以及從所述宿主細胞和/或其培養基中分離所述肽或其變體、所述抗體或其片段、或所述 T 細胞受體或其片段。

【0291】 本發明進一步涉及一種本發明的肽或其變體、本發明的抗體或其片段、本發明的 T 細胞受體或其片段、本發明的核酸或表達載體、本發明的宿主細胞、或本發明的激活 T 淋巴細胞的用途，其係用於藥物或用於製備藥物。

【0292】 本發明進一步涉及一種殺滅患者體內靶細胞的方法，所述靶細胞異常表達一包含本發明任何胺基酸序列的多肽。所述方法包括向患者施用一有效量的本發明的激活 T 淋巴細胞。

【0293】 同樣，本發明涉及一種本發明的激活 T 淋巴細胞的用途，其係用於殺滅患者體內的靶細胞，所述靶細胞提呈一包含本發明任何胺基酸序列的多肽，或係用於製備殺滅此類靶細胞的藥物。

【0294】 本發明進一步涉及一種治療被診斷有癌症、患有癌症、或有罹患癌症風險之患者的方法，所述方法包括向患者施用一有效量的本發明的肽或其變體、本發明的抗體或其片段、本發明的 T 細胞受體或其片段、本發明的核酸或表達載體、本發明的宿主細胞、或本發明的激活 T 淋巴細胞。

【0295】 本發明進一步涉及一種在被診斷有癌症、患有癌症、或有罹患癌症風險之患者中引發免疫反應的方法，所述方法包括向患者施用一有效量的本發明的肽或其變體、本發明的抗體或其片段、本發明的 T 細胞受體或其片段、本發明的核酸或表達載體、本發明的宿主細胞、或本發明的激活 T 淋巴細胞。

【0296】 同樣，本發明還涉及一種本發明的肽或其變體、本發明的抗體或其片段、本發明的 T 細胞受體或其片段、本發明的核酸或表達載體、本發明的宿主細胞、或本發明的激活 T 淋巴細胞的用途，其係用於治療被診斷有癌症、患有癌症、或有罹患癌症風險之患者，或係用於製備治療此類患者的藥物。

【0297】 本發明進一步涉及本發明的用途，其中，所述藥物為一種疫苗。

【0298】 本發明進一步涉及本發明的方法或肽、抗體、T 細胞受體、核酸、宿主細胞或激活 T 淋巴細胞的用途，其中，所述癌症係選自由急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌、及子宮內膜癌所組成的群組。

【0299】 本發明還涉及一種套件，其包括：

【0300】 (a) 一容器，其包含一藥物組合物，所述藥物組合物含有溶液或凍乾形式的本發明的藥物組合物；

【0301】 (b) 可選地，一第二容器，其含有用於凍乾粉製劑的稀釋劑或重組溶液；

【0302】 (c) 可選地，至少一種以上肽，其選自由 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 所組成的群組。

【0303】 在進一步的實施例中，套件包括緩衝液、稀釋劑、過濾器、針頭、或注射器中的一者或多者。

【0304】 本發明進一步涉及一種基於本發明的肽的特定標誌物蛋白和生物標記，本文稱為「靶標」，其可用於診斷和/或判斷急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌中至少一種的預後。

【0305】 本文中術語「抗體」為廣義上的定義，既包括多株也包括單株抗體。除了無損或「完整」的免疫球蛋白分子外，術語「抗體」還包括這些免疫球蛋白分子的片段（例如 CDR、Fv、Fab 和 Fc 片段）或聚合物、以及免疫球蛋白分子的人源化版本，只要它們表現出根據本發明的任何所需特性（例如，與急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌標誌物多肽的特異性結合）。

【0306】 只要有可能，本發明的抗體可從商業來源購買。本發明的抗體也可能使用已知的方法製得。本領域技術人員會瞭解急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌的全長標誌物多肽或其片段可用於製備本發明的抗體。用

於產生本發明抗體的多肽可部分或全部地由天然來源經純化而得，也可利用重組 DNA 技術生產。

【0307】 例如，編碼本發明的肽（例如根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 多肽的肽）的cDNA，或其變體或片段，可在原核細胞中（如：細菌）或真核細胞（如：酵母、昆蟲或哺乳動物細胞）中表達，之後，可純化重組蛋白，並用於產生單株或多株抗體製劑，該單株或多株抗體製劑與用於產生本發明抗體的急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌標誌物多肽特異性結合。

【0308】 本領域的技術人員會認識到，產生兩種或兩種以上不同集合的單株抗體或多株抗體能最大化獲得具有預期用途（例如，ELISA 法、免疫組織化學、體內成像、免疫毒素療法）所需的特異性和親和力的抗體的可能性。根據抗體的用途（例如，ELISA 法、免疫組織化學、免疫治療等（參見「Greenfield, 2014」，其內容透過引用整體併入）），用已知的方法對其期望活性進行測試。例如，所述抗體可在福馬林固定的癌組織或冰凍的組織切片的 ELISA 法、西方墨點法、或免疫組織化學染色進行檢測。在初次體外表徵後，用於治療或體內診斷用途的抗體根據已知的臨床測試方法進行檢測。

【0309】 此處使用的術語「單株抗體」係指從基本上同質抗體群中獲得的抗體，即，組成抗體群的個別抗體為相同，但可能少量存在的自然突變除外。此處所述的單株抗體具體包括「嵌合(chimeric)」抗體，其中一部分重鏈和/或輕鏈係與從特定物種中獲得的抗體或屬於特定抗體類型或子類型的抗體的相應序列相同（同質），同時，剩餘鏈係與從其他物種中獲得的抗體或屬於另一抗體

類型或子類型的抗體以及這些抗體的片段的相應序列相同（同質），只要他們表現出預期的拮抗活性（參見美國專利號 4,816,567，其透過引用整體併入本文）。

【0310】 本發明的單株抗體可能使用融合瘤方法製得。在融合瘤方法中，通常用免疫製劑對小鼠或其他適當的宿主動物進行免疫，以引發產生或能產生將特異性結合至免疫製劑的抗體的淋巴細胞。或者，淋巴細胞可在體外進行免疫。

【0311】 單株抗體也可由 DNA 重組方法製得，如：美國專利號 4,816,567 所述。編碼本發明單株抗體的 DNA 可很容易地使用傳統程序進行分離和測序（例如：透過使用能與編碼鼠抗體的重鏈和輕鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針）。

【0312】 體外方法也適用於製備單價抗體。抗體消化以產生抗體的片段，尤其是 Fab 片段，可以透過使用本領域已知的常規技術完成。例如，可以透過使用木瓜蛋白酶完成消化。木瓜蛋白酶消化的實施例描述參見 WO 94/29348 和美國專利號 4,342,566，其內容透過引用整體併入。抗體的木瓜蛋白酶消化通常會產生兩個相同的抗原結合片段，稱為 Fab 片段，每個片段都有一個抗原結合位點和一個殘餘 Fc 片段。胃蛋白酶處理產生一個 F(ab')₂ 片段和一個 pFc' 片段。

【0313】 抗體片段，不論其是否附著於其他序列，均可包括特定區域或特定胺基酸殘基的插入、刪除、替換、或其他選擇性修飾，但前提是，與非修飾的抗體或抗體片段相比，片段的活性沒有顯著的改變或損害。這些修飾可提供一些額外的屬性，如：刪除/添加可形成雙硫鍵的胺基酸、增加其生物壽命、改變其分泌特性等。在任何情況下，抗體片段必須擁有生物活性的特性，如：結合活性、調節結合域的結合力等。抗體的功能性或活性區域可透過蛋白特定區域的基因突變、隨後表達和測試所表達的多肽進行確定。這些方法為本領域技術人員所熟知，可包括編碼抗體片段的核酸的特定位點基因突變。

【0314】本發明的抗體可進一步包括人源化抗體或人類抗體。非人類（如：鼠）抗體的人源化形式為嵌合抗體免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段（如：Fv、Fab、Fab' 或抗體的其他抗原結合子序列），其中包含從非人類免疫球蛋白中獲得的最小序列。人源化抗體包括人類免疫球蛋白（受體抗體），其中來自受體互補決定區 (CDR) 的殘基被具有預期特異性、親和力和能力的來自非人類物種（供體抗體）（如小鼠、大鼠或兔子）CDR 的殘基取代。在些許情況下，人類免疫球蛋白的 Fv 框架 (FR) 殘基被相應的非人類殘基取代。人源化抗體可能還包括既非受體抗體、也非輸入 CDR 或框架序列中發現的殘基。一般來說，人源化抗體將包括基本上所有的至少一個、通常為二個可變域，其中，全部或基本上全部的 CDR 區域均對應於非人類免疫球蛋白的區域，並且全部或基本上全部的 FR 區域均為人類免疫球蛋白共通序列(consensus sequence)的區域。理想情況是，人源化抗體還將包括免疫球蛋白恆定區 (Fc) 的至少一部分，通常是人類免疫球蛋白的恆定區的一部分。

【0315】人源化非人類抗體的方法為本領域所熟知。一般來說，人源化抗體具有一個或多個從非人類源頭引入的胺基酸殘基。這些非人類胺基酸殘基往往被稱為「輸入」殘基，通常從「輸入」可變結構域中獲得。人源化基本上可以通過用齧齒動物 CDR 或 CDR 序列取代人類抗體的相應序列而完成。因此，這種「人源化」抗體為嵌合抗體（參見美國專利號 4,816,567，其內容透過引用整體併入），其中基本上少於完整的人類可變結構域被來自於非人類物種的相應序列取代。在實踐中，人源化抗體通常為人抗體，其中有些 CDR 殘基以及可能的一些 FR 殘基被來自齧齒動物抗體中的類似位點的殘基取代。

【0316】可使用免疫後在不產生內源性免疫球蛋白的情況下產生完整人類抗體貯庫的轉基因動物（如：小鼠）。例如，他被描述為，嵌合和種系突變小鼠中的抗體重鏈連接區域基因的同型接合子缺失(homozygous deletion)導致內

源性抗體生成的完全抑制。在此種種系突變小鼠中人類種系免疫球蛋白基因陣列的轉移在抗原攻擊後將導致人類抗體的生成。人類抗體也可在噬菌體展示庫中產生。

【0317】一方面，本發明的抗體還可以透過噬菌體展示、或核糖體展示、或酵母展示、或細菌展示、或杆狀病毒展示、或哺乳動物細胞展示、或 mRNA 展示獲得。這些方法都是本領域的常規技術，其具體操作可參見相應的教科書或操作手冊（參見「Mondon et al., 2008」；其內容透過引用整體併入本文）。以噬菌體展示為例，可將單獨的抗體基因插入噬菌體的 DNA 中，使抗體分子上能夠結合抗原的可變區與噬菌體的衣殼蛋白偶聯。噬菌體感染大腸桿菌後，單鏈 DNA 可在大腸桿菌中複製，噬菌體可重新組裝並分泌至培養基中，而大腸桿菌可能不會被裂解。噬菌體可與靶標抗原共同培養；分離出結合的噬菌體後，可進行擴增和純化，從而篩選出大量克隆物。噬菌體展示技術可參見文獻（參見「Liu et al., 2004」；其內容透過引用整體併入本文）。

【0318】另一方面，本發明可包括使用噬菌體展示法產生單株抗體的方法。具體而言，mRNA 可從透過免疫動物方法接受免疫的動物，例如兔、大鼠、小鼠、豚鼠、倉鼠、山羊、馬、雞、綿羊和駱駝科動物（例如美洲駝）中製備，因此可使用 mRNA 作為模板來製備 cDNA，從而可以製備僅編碼抗體可變區的單鏈抗體 (scFv) 基因。基因可克隆至噬菌粒(phagemid)載體。轉導入噬菌粒載體的大腸桿菌感染噬菌體，以便在噬菌體衣殼上表達 scFv 抗體。篩選以這種方式表達的對抗抗原蛋白或對抗肽-MHC 複合體的 scFv，可製備對抗原蛋白或肽-MHC 複合體具有特異性的單株 scFv 抗體。本文中，mRNA 的製備、cDNA 的製備、亞克隆至噬菌粒或轉導至大腸桿菌、噬菌體感染、和篩選對抗原蛋白或肽-MHC 複合體具有特異性的單株 scFv 抗體均可透過已知方法進行。例如，將 scFv 基因亞克隆至一噬菌粒載體上，所述噬菌粒載體含有由編碼前導序列（信

號序列)和噬菌體衣殼蛋白 III 的基因片段和 M13 複製起點組成的兩個元件，並使用 M13 噬菌體作為噬菌體可在 M13 噬菌體上表達 scFV 抗體。此外，透過篩選獲得的噬菌體可被感染至特定的細菌並被培養，從而也可以從培養物中大量收集對抗原蛋白具有特異性的單株抗體。根據本發明的製備單株抗體的方法，不僅可以製備 scFV 抗體，還可以製備不具有恆定區的抗體片段，例如 Fab 抗體片段。

【0319】 另一方面，本發明可包括噬菌體展示庫，其中可以合成抗體的重鏈和輕鏈可變區，使得它們包括幾乎所有可能的特異性。

【0320】 另一方面，本發明可包括產生含有除 M13 之外噬菌體的噬菌體展示庫。其他噬菌體（如 λ 噬菌體）也可用於本發明的方法中。已產生 λ 噬菌體展示庫，其在表面展示由異源 DNA 編碼的肽（參見「Sternberg et al., 1995」；其內容透過引用整體併入本文）。此外，本發明的方法可進行擴展，以包括除噬菌體之外的病毒（如真核病毒）。可產生真核病毒，其編碼適合遞送至哺乳動物的基因，並編碼和展示能夠靶向作用於基因被遞送進入的特定細胞類型或組織的抗體。例如，已產生反轉錄病毒載體，其展示功能性抗體片段（參見「Russell et al., 1993」；其內容透過引用整體併入本文）。

【0321】 另一方面，本發明提供一種產生重組抗體的方法，所述重組抗體係特異性結合至與 HLA 限制性抗原（優選由根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的一胺基酸序列組成或基本由其組成的一肽）複合的 MHC I 類或 II 類分子，所述方法可包括用可溶性形式的與所述 HLA 限制性抗原複合的 MHC I 類或 II 類分子對基因改造的非人類哺乳動物進行免疫，所述非人類哺乳動物包含表達所述 MHC I 類或 II 類的細胞；從所述非人哺乳動物的抗體產生細胞中分離 mRNA 分子；產生展示由所述 mRNA 分子編碼的蛋白質分子的噬菌體展示庫；

從所述噬菌體展示庫中分離至少一種噬菌體，所述至少一種噬菌體展示特異性結合至與所述 HLA 限制性抗原複合的所述 MHC I 類或 II 類分子的所述抗體。

【0322】本發明的抗體優選為在藥用載劑中給予受試者。通常，在製劑中使用適量的藥用鹽，以使製劑等滲。藥用載劑的例子包括生理鹽水、林格氏液和葡萄糖溶液。溶液的 pH 值優選為約 5 至約 8，更優選為約 7 至約 7.5。此外，載劑還包括緩釋製劑，如：含有抗體的固體疏水性聚合物半透性基質，其中基質為有形物品形式，如：薄膜、脂質體或微粒。本領域的技術人員熟知，些許載劑可能為更優選，取決於例如，抗體的給藥途徑和濃度。

【0323】所述抗體可透過注射（如：靜脈內、腹腔內、皮下、肌肉內）或透過輸注等其他方法給予受試者、患者、或細胞，確保其以有效的形式傳輸到血液中。這些抗體也可以透過瘤內(intratumoral)或瘤周(peritumoral)途徑給予，從而發揮局部和全身的治療作用。局部或靜脈注射為優選。

【0324】抗體給藥的有效劑量和時間表可根據經驗確定，並且作出此類決定屬本領域的技術範圍內。本領域的技術人員會明白，必須給予的抗體劑量根據以下因素會有所不同，例如：接受抗體的受試者、給藥途徑、使用的抗體的特定類型以及其他正在使用的藥物。單獨使用的抗體的通常日劑量可能為每天約 1 $\mu\text{g/kg}$ 至最多 100 mg/kg 體重或更多，這取決於上述因素。給予優選為治療急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌的抗體後，治療抗體的療效可透過本領域技術人員熟知的不同方法評估。例如：接受治療的受試者的癌症的大小、數量、和/或分佈可使用標準腫瘤成像技術進行監測。與不給予抗體

時的病程相比，治療性給予的抗體可阻止腫瘤生長、導致腫瘤縮小、和/或阻止新腫瘤的發展，這樣的抗體是一種有效治療癌症的抗體。

【0325】本發明的另一方面提供一種製備識別特異性肽-MHC複合體的可溶性 T 細胞受體的方法。這種可溶性 T 細胞受體可從特異性 T 細胞克隆中產生，並且他們的親和力可以透過互補決定區靶向誘變而增加。為了 T 細胞受體選擇之目的，可以使用噬菌體展示(參見美國 2010/0113300，「Liddy et al., 2012」，其內容透過引用整體併入)。為了在噬菌體展示期間以及實際使用為藥物時穩定 T 細胞受體之目的，可透過非天然雙硫鍵、其他共價鍵(單鏈 T 細胞受體)、或透過二聚化結構域連接 α 和 β 鏈(參見「Boulter et al., 2003」；「Card et al., 2004」；「Willcox et al., 1999」，其內容透過引用整體併入)。T 細胞受體可以連接到毒素、藥物、細胞因子(參見US 2013/0115191，其內容透過引用整體併入)、招募效應細胞的結構域，如抗 CD3 域等，以便對靶細胞執行特定的功能。此外，他可能表達於用於過繼轉移(adoptive transfer)的 T 細胞。進一步的資訊可參閱 WO 2004/033685A1 和 WO 2004/074322A1。WO 2012/056407A1 描述了可溶性 TCR 之組合。WO 2013/057586A1 公開了進一步的製備方法，其內容透過引用整體併入。

【0326】此外，可使用本發明的肽和/或 TCR 或抗體或其他結合分子，以在活檢樣本的基礎上驗證病理學家對癌症的診斷。

【0327】所述抗體或 TCR 也可用於體內診斷實驗。一般來說，抗體用放射性核素標記(如： ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S)，從而可使用免疫閃爍掃描法(immunosciintigraphy)定位腫瘤。在一實施例中，抗體或其片段與一蛋白的兩個或更多個靶標的胞外結構域結合，所述蛋白選自由上述蛋白所組成之群組，並且結合親和力(K_d)為 $<100\text{ nM}$ ，更優選為 $<50\text{ nM}$ ，更優選為 $<10\text{ nM}$ ，更優選為 $<1\text{ nM}$ ，更優選為 $<0.1\text{ nM}$ ，更優選為 $<0.01\text{ nM}$ 。

第76頁，共 122 頁(發明說明書)

【0328】 診斷用抗體可透過各種影像學方法使用適合檢測的探針進行標記。探針的檢測方法包括但不限於，螢光、光、共聚焦和電子顯微鏡方法；磁共振成像和光譜學技術；螢光透視、電腦斷層掃描和正電子放射斷層攝影。合適的探針包括但不限於，螢光素、羅丹明、曙紅及其他螢光團、放射性同位素、黃金、釷和其他稀土、順磁鐵、氟-18 和其他正電子發射放射性核素。此外，探針可能是雙功能或多功能的，並且用一種以上的上述方法可進行檢測。這些抗體可用所述的探針直接或間接進行標記。抗體與探針的連接包括探針的共價連接、將探針融合入抗體、以及螯合化合物的共價連接從而結合探針、以及其他本領域熟知的方法。對於免疫組織化學方法，疾病組織樣本可能是新鮮、或冷凍、或可能包埋於石蠟中以及用福馬林等防腐劑固定。固定或包埋的切片包括與標記一級抗體和二級抗體接觸的樣本，其中所述抗體用於原位(in situ)檢測蛋白的表達。

【0329】 本發明的另一方面包括一種體外製備激活 T 細胞的方法，所述方法包括將 T 細胞與載有肽的人類 MHC 分子進行體外接觸足夠的一段時間，從而以抗原特異性方式激活 T 細胞，其中，所述人類 MHC 分子在合適的抗原呈現細胞的表面上表達，所述抗原為根據本發明所述的一種肽。優選情況是足夠量的抗原與抗原呈現細胞一同使用。

【0330】 優選情況是，哺乳動物細胞的 TAP 肽轉運蛋白缺乏或水準下降或功能降低。缺乏 TAP 肽轉運蛋白的適合細胞包括 T2、RMA-S 和果蠅細胞。TAP 是與抗原加工相關的轉運蛋白。

【0331】 人類肽載入的缺陷細胞株 T2 可從美國標準生物品收藏中心（ATCC，12301 Parklawn Drive，羅克維爾，馬里蘭州20852，美國）目錄號 CRL1992獲得；果蠅細胞株 Schneider 2 號株可從 ATCC 目錄號 CRL 19863獲

得；小鼠 RMA-S 細胞株 Ljunggren 等人描述過（參見「Ljunggren and Karre, 1985」，其內容透過引用整體併入）。

【0332】 優選情況是，宿主細胞在轉染前基本上不表達 MHC I 類分子。更優選為，刺激細胞表達對於為 T 細胞提供共刺激信號重要的分子，如 B7.1、B7.2、ICAM-1 和 LFA3 中的任一種。多種 MHC I 類分子和共刺激分子的核酸序列可從 GenBank 和 EMBL 資料庫中公開獲得。

【0333】 當 MHC I 類表位作為一種抗原時，T 細胞為 CD8 陽性 T 細胞。

【0334】 如果抗原呈現細胞受到轉染而表達這種表位，則優選的細胞包括一個表達載體，所述載體有能力表達含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:216、或其變體胺基酸序列的肽。

【0335】 可使用其他一些方法來體外生成 T 細胞。例如，自體腫瘤浸潤性淋巴細胞可用於生成 CTL。Plebanski 等人在（參見「Plebanski et al., 1995」）使用自體外周血淋巴細胞 (PLB) 製得 T 細胞。另外，也可用肽或多肽脈衝處理樹突細胞、或透過重組病毒感染，以製成自體 T 細胞。此外，B 細胞可用於製備自體 T 細胞。此外，用肽或多肽脈衝處理或用重組病毒感染的巨噬細胞可用於製備自體 T 細胞。S. Walter 等人（參見「Walter et al., 2003」，其內容透過引用整體併入）描述了透過使用人工抗原呈現細胞 (aAPC) 體外促發 T 細胞，這也是生成作用於所選肽的 T 細胞的一種合適方法。在本發明中，根據生物素：鏈黴親和素生物化學方法，透過將預製的 MHC-肽複合體耦合到聚苯乙烯顆粒（微球）表面而生成 aAPC。該系統實現了對 aAPC 上的 MHC 密度進行精確控制，這使得可以在血液樣本中選擇地引發高或低親合力的高效抗原特異性 T 細胞反應。除了 MHC-肽複合體外，aAPC 還應攜運含共刺激活性的其他蛋白，如耦合至表面的抗-CD28 抗體。此外，此類基於 aAPC 的系統往往需要加入適當的可溶性因子，例如，諸如介白素-12 的細胞因子。

【0336】也可用同種異體細胞製得 T 細胞，在 WO 97/26328（透過引用整體併入本文）中詳細描述了一種方法。例如，除了果蠅細胞和 T2 細胞，也可用其他細胞來提呈抗原，如 CHO 細胞、杆狀病毒感染的昆蟲細胞、細菌、酵母、及牛痘感染的靶細胞。此外，也可使用植物病毒，例如，參閱 Porta 等人的文章（參見「Porta et al., 1994」，其內容透過引用整體併入），其中描述了將豇豆花葉病毒開發為一種提呈外來肽的高產系統。

【0337】被激活的 T 細胞以本發明的肽為目標，可用於治療。因此，本發明的另一方面提供一種用本發明前述方法製得的激活 T 細胞。

【0338】按上述方法製成的激活 T 細胞將會有選擇性地識別異常表達一多肽的細胞，所述多肽包含根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216 的一胺基酸序列。

【0339】優選情況是，所述 T 細胞透過其 TCR 與 HLA-肽複合體的相互作用（如，結合）而識別所述細胞。所述 T 細胞可用於殺傷患者靶細胞的方法，患者的靶細胞異常表達一含本發明胺基酸序列的多肽，其中給予所述患者有效量的激活 T 細胞。給予所述患者的 T 細胞可能源自所述患者並按上述方法激活（即，為自體 T 細胞）。或者，所述 T 細胞不是源自所述患者，而是來自另一個體。當然，優選情況是，所述個體為健康個體。本發明使用「健康個體」係指該個體一般健康狀況良好，優選為免疫系統合格，更優選為無任何可很容易測試或檢測到的疾病。

【0340】於體內，根據本發明的 CD8-陽性 T 細胞的靶細胞可為腫瘤細胞（有時表達 MHC II 類分子）和/或腫瘤周圍的基質細胞（有時也表達 MHC II 類分子）（參見「Dengjel et al., 2006」）。

【0341】本發明所述的 T 細胞可用作一治療性組合物中的活性成分。因此，本發明亦提供一種殺傷患者靶細胞的方法，其中患者的靶細胞異常表達一含本發明胺基酸序列的多肽，所述方法包括給予患者上述有效量的 T 細胞。

【0342】本發明所用的「異常表達」亦指，與正常組織中的表達程度相比，多肽為過量表達，或所述基因在腫瘤源自的組織中靜默，但是在所述腫瘤中卻表達。「過量表達」係指多肽呈現程度至少為正常組織中的 1.2 倍；優選為至少為正常組織中的 2 倍，更優選為至少 5 或 10 倍。

【0343】T 細胞可用本領域已知的方法製得（如，上述方法）。

【0344】所述 T 細胞的過繼轉移(adoptive transfer)的方法指南為本領域所熟知。綜述可參見「Gattinoni et al., 2006」；「Morgan et al., 2006」，其內容透過引用整體併入。

【0345】本發明的另一個方面包括使用與 MHC 複合的肽，以生成 T 細胞受體，其核酸被克隆並被引入至宿主細胞，優選為 T 細胞。然後，所述透過基因工程改變的 T 細胞可轉移至患者用於癌症治療。

【0346】本發明的任一分子（即肽、核酸、抗體、表達載體、細胞、激活 T 細胞、T 細胞受體或編碼它的核酸）都可用於治療以逃避免疫反應之細胞為特點的疾病。因此，本發明的任一分子都可用作藥物或用於製備藥物。這種分子可單獨使用，亦可與本發明中的其他分子或已知分子聯合使用。

【0347】本發明的套件優選包含一置於一合適容器中的本發明凍乾製劑以及其回溶和/或使用說明。適當的容器包括，例如瓶子、西林瓶（如雙室瓶）、注射器（如雙室注射器）和試管。所述容器可能由多種材料製成，如玻璃或塑膠。優選地，套件和/或容器具有在容器上或與容器相連的說明，以表明回溶和/或使用的指示。例如，標籤可指示凍乾製劑將被回溶為上述的肽濃度。所述標籤可進一步指示製劑用於或預期用於皮下注射。

【0348】 存放製劑的容器可為多次使用西林瓶，使得可重複給予（例如，2-6 次）回溶的製劑。所述套件可進一步包括一裝有合適稀釋劑（如碳酸氫鈉溶液）的第二容器。

【0349】 稀釋劑和凍乾製劑混合後，回溶製劑中的最終肽濃度優選為至少 0.15 mg/mL/肽 (=75 μ g)，優選為不超過 3 mg/mL/肽 (=1500 μ g)。該套件還可包括商業和用戶角度來說需要的其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器、及帶有使用說明書的包裝仿單。

【0350】 本發明的套件可具有一單獨的容器，其包含本發明所述藥物組合物的製劑，且含有或沒有其他組分（例如，其他化合物或這些其他化合物的藥物組合物），或者本發明的套件可具有用於每種組分的不同容器。

【0351】 優選為，本發明的套件包括一本發明的製劑，其包裝為與一第二化合物（如佐劑（例如 GM-CSF）、化療藥物、天然產品、激素或拮抗劑、抗血管生成劑或抑制劑、凋亡誘導劑或螯合劑）或其藥物組合物聯合使用。該套件的組分可進行預複合或每種組分在給予患者之前可放置於單獨的不同容器。該套件的組分可以是一種或多種溶液，優選為水溶液，更優選為無菌水溶液。該套件的組分也可為固體形式，加入合適的溶劑後轉換為液體，該合適的溶劑最好放置於另一個不同的容器中。

【0352】 治療套件的容器可能為西林瓶、試管、燒瓶、瓶子、注射器、或任何其他盛裝固體或液體的工具。通常，當組分不只一種時，套件將包含第二個西林瓶或其他容器，使之可以單獨投藥。該套件還可能包含另一個裝載藥用液體的容器。優選情況是，治療套件將包含一個設備（如，一個或多個針頭、注射器、滴眼器、吸液管等），使得可投予本發明的藥物（即本套件的組分）。

【0353】 本發明的藥物配方適合以任何可接受的途徑進行肽給藥，如口服（腸道）、鼻內、眼內、皮下、皮內、肌內、靜脈或經皮給藥。優選為皮下(s.c.)給藥，最優選為透過輸液泵皮內(i.d.)給藥。

【0354】 由於本發明的肽分離自急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌，因此，本發明的藥物優選用於治療急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌。

【0355】 在一示例性實施例中，疫苗中所含肽透過以下方法確定：(a) 識別由來自個體患者的腫瘤樣本提呈的腫瘤相關肽 (TUMAP)；以及 (b) 在 (a) 中選擇至少一種重新(de novo)確定的肽，並確認其免疫原性。

【0356】 一旦選定了用於個體化肽疫苗的肽時，則可生產疫苗。該疫苗優選為一種由個體肽組成的液體製劑，所述肽溶解於 20-40% DMSO，優選為約 30-35% DMSO，例如，約 33% DMSO。

【0357】 列入產品的每一個肽都溶於 DMSO 中。單個肽溶液濃度的選擇取決於要列入產品中的肽的數量。單個肽-DMSO 溶液為均等混合，以實現一種溶液中包含要列入產品中的所有肽，且濃度約為 2.5 mg/ml/肽。然後該混合溶液按照 1:3 比例用注射用水進行稀釋，以達到在 33% DMSO 中 0.826 mg/ml/肽的濃度。稀釋的溶液透過 0.22 μ m 無菌過濾器進行過濾。從而獲得最終本體溶液。

【0358】最終本體溶液填充到西林瓶中，在使用前儲存於 -20°C 下。一個西林瓶包含 $700\ \mu\text{L}$ 溶液，其中含有 $0.578\ \text{mg}$ 的每種肽。其中的 $500\ \mu\text{L}$ （每種肽約 $400\ \mu\text{g}$ ）將用於皮內注射。

【0359】本發明的肽除了用於治療癌症，也可用於診斷。由於肽由急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌細胞產生，並且已確定這些肽在正常組織中不存在或表現程度較低，因此，這些肽可用於診斷是否存在癌症。

【0360】血液樣本中組織活檢物含本發明的肽，可有助於病理學家診斷癌症。用抗體、質譜或其他本領域內已知的方法檢測些許肽可使病理學家判斷該組織樣本為惡性的還是炎症或一般病變，也可用作急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌和子宮內膜癌的生物標記。肽的群組的存在使得能對病變組織進行分類或子分類。

【0361】對病變組織標本中肽的檢測，使得能對免疫系統治療方法的益處進行判斷，特別是如果 T- 淋巴細胞已知或預計與作用機制有關。喪失 MHC 表達是受感染的或惡性細胞藉以逃避免疫監視的機制，該機制已於本領域中被充分研究說明。因此，肽的存在表明所分析的細胞並沒有利用這種機制。

【0362】本發明的肽可用於分析淋巴細胞對肽的反應（如 T 細胞反應），或抗體對肽或與 MHC 分子複合肽的反應。這些淋巴細胞反應可以作為預後指標，決定是否採取進一步的治療。這些反應也可以用作免疫療法中的替代反應

指標，旨在以不同方式誘導淋巴細胞反應，如接種蛋白、核酸、自體材料、淋巴細胞過繼轉移。於基因治療中，可將淋巴細胞對肽發生的反應在副作用的評估中列入考慮。淋巴細胞反應的監測也可成為移植療法追蹤檢查中的一種有價值的工具，例如：用於檢測移植物抵抗宿主和宿主抵抗移植物的疾病。

【0363】 下列描述優選方案的實施例將對本發明進行說明，並參見隨附圖式（但是不限於此）。為了本發明之目的，所有參考文獻均以完整引用的形式併入本文。

【0364】 此外，請注意，本發明可能僅針對申請專利範圍的一組選定肽公開實驗資料和圖式。儘管對於本發明公開和申請專利範圍的所有肽，已生成完整的資料集並可根據要求提供，但申請人已決定不將所有這些完整的資料集併入本文，因為這將超出本申請文本的可管理範圍。

【0365】 實施例

【0366】 實施例 1

【0367】 細胞表面提呈的腫瘤相關肽的識別和定量

【0368】 組織樣本

【0369】 患者的組織獲得自：

【0370】 BioIVT(美國密歇根州底特律和英國赫茨羅伊斯頓)；Bio-Options Inc.(美國加利福尼亞州佈雷亞)；BioServe(美國馬里蘭州貝爾茨維爾)；Capital BioScience Inc.(美國馬里蘭州羅克維爾)；Conversant Bio(美國阿拉巴馬州亨茨維爾)；Cureline Inc.(美國加利福尼亞州布里斯班)；DxBiosamples(美國加利福尼亞州聖地牙哥)；Geneticist Inc.(美國加利福尼亞州格倫代爾)；Indivumed GmbH(德國漢堡)；京都府立醫科大學 (KPUM)(日本京都)；大阪府立大學 (OCU)(日本大阪)；ProteoGenex Inc.(美國加利福尼亞州卡爾弗城)；Tissue Solutions Ltd(英國格拉斯哥)；波恩大學(德國波恩)；Asklepios

Clinic St. Georg (德國漢堡)；Val d'Hebron 大學醫院 (西班牙巴賽隆納)；Herlev 醫院癌症免疫治療中心 (CCIT) (丹麥海萊烏)；萊頓大學醫學中心 (LUMC) (荷蘭萊頓)；Istituto Nazionale Tumori "Pascale" 分子生物學和病毒腫瘤科 (義大利那不勒斯)；斯坦福癌症中心 (美國加利福尼亞州帕洛阿爾托)；日內瓦大學醫院 (瑞士日內瓦)；海德堡大學醫院 (德國海德堡)；慕尼黑大學醫院 (德國慕尼黑)；圖賓根大學醫院 (德國圖賓根)。

【0371】所有患者在手術或剖檢前都已簽屬書面知情同意書。切除後組織立即進行急速冷凍處理，在分離 TUMAP 前儲存於 -70°C 或以下。

【0372】從組織樣本中分離 HLA 肽

【0373】根據略加修改的方案 (參見「Falk et al., 1991」；「Seeger et al., 1999」)，使用HLA-A*02特異性抗體BB7.2、HLA-A、HLA-B、HLA-C特異性抗體 w6/32、HLA-DR 特異性抗體 L243 和 HLA-DP 特異性抗體 B7/21、CNBr 激活的瓊脂糖凝膠、酸處理、以及超濾方法，以固體組織的免疫沉澱法從急速冷凍組織樣本獲得 HLA 肽庫。

【0374】表 7 顯示了肽和其所結合的 HLA 同種異型，其來自由 HLA-A*01:01、HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-A*24:02、HLA-B*07:02、HLA-B*08:01 和 HLA-B*44:02 所組成之群組。然而，由於結合模式相似，例如相關錨定位置，一些肽與多個等位基因結合，此類重疊很可能為但不限於，HLA-A*01 結合肽亦與 HLA-B*15 結合、HLA-A*03 結合肽亦與 HLA-A*11 結合、HLA-B*07 結合肽亦與 HLA-B*35 和 HLA-B*51 結合。

[表 7] 本發明的肽所結合的 HLA 等位基因。

SEQ ID NO.	序列	結合物	SEQ ID NO.	序列	結合物
1	AILAPPAILK	HLA-A*03:01	109	MPKLFLTAC	HLA-B*07:02
2	GTVFVLLSK	HLA-A*03:01	110	APSLARFLSL	HLA-B*07:02
3	VYIASSFKI	HLA-A*24:02	111	RPIWDVRSA	HLA-B*07:02

4	IQAPALLKV	HLA-A*02:01	112	ETYGTFVLR	HLA-A*03:01
5	METADRPEW	HLA-B*44:02	113	ALGPMAFRV	HLA-A*02:01
6	SHSLPAFTL	HLA-A*24:02	114	VPHHLLSSV	HLA-B*07:02
7	IYIPTNSIYKF	HLA-A*24:02	115	LWEEKPVCL	HLA-A*24:02
8	VIYNQTLMK	HLA-A*03:01	116	IYLTKSNLVNM	HLA-A*24:02
9	LLGVVSHSV	HLA-A*02:01	117	GEAAAARPV	HLA-B*44:02
10	ILMILQPQL	HLA-A*02:01	118	RLLRLIPIL	HLA-A*02:01
11	TEIGTVIKLF	HLA-B*44:02	119	VLHGLLFTL	HLA-A*02:01
12	RLQEGLAAL	HLA-A*02:01	120	APGPRSQGL	HLA-B*07:02
13	LYDTVHTHF	HLA-A*24:02	121	ILVTAWKGV	HLA-A*02:01
14	ILAPPQRISF	HLA-A*24:02	122	FTQKINSTW	HLA-A*01:01
15	SPVETRSL	HLA-B*07:02	123	TYLESSVRI	HLA-A*24:02
16	NFHTLAQQLF	HLA-A*24:02	124	SPSSNSREL	HLA-B*07:02
17	MVNWSLTNK	HLA-A*03:01	125	ALAQGANLK	HLA-A*03:01
18	SLSKLVATV	HLA-A*02:01	126	NPELLVILL	HLA-B*07:02
19	RILEVVRQPK	HLA-A*03:01	127	TVATQVATSK	HLA-A*03:01
20	ILAPPAILK	HLA-A*03:01	128	MTFVPLLAR	HLA-A*03:01
21	MLSAQFILK	HLA-A*03:01	129	IPISIFKMA	HLA-B*07:02
22	RVIEVVMNSK	HLA-A*03:01	130	ITPDSIPSV	HLA-A*02:01
23	AETKQFWSA	HLA-B*44:02	131	TILAKQNVL	HLA-B*08:01
24	LIYIPTNSIYK	HLA-A*03:01	132	LYLETRSEF	HLA-A*24:02
25	GVCSTLTIK	HLA-A*03:01	133	KFPPSASEF	HLA-A*24:02
26	ETNTIEFIY	HLA-A*01:01	134	MPCTTILRI	HLA-B*07:02
27	SQAKQITIW	HLA-B*44:02	135	SADTAELL	HLA-A*01:01
28	ATLQAVTLYKK	HLA-A*03:01	136	YSSEIWDLY	HLA-A*01:01
29	GTFIAPVMK	HLA-A*03:01	137	MPIQVLKGL	HLA-B*07:02
30	SLKSSILFL	HLA-A*02:01	138	RTLPLEGSPK	HLA-A*03:01
31	VFLLLPYPRF	HLA-A*24:02	139	EEGRIITKW	HLA-B*44:02
32	TAMTTLMAF	HLA-B*08:01	140	QPAPQPLL	HLA-B*07:02
33	AYIPFPPLI	HLA-A*24:02	141	REVAGASAL	HLA-B*44:02
34	LLFKGLMWK	HLA-A*03:01	142	YMLEMDNSMKI	HLA-A*02:01
35	SLATAISAK	HLA-A*03:01	143	AVLGALLRH	HLA-A*03:01
36	KEIEAQEAA	HLA-B*44:02	144	IIVPSFYK	HLA-A*03:01
37	RLYSGSSFLY	HLA-A*03:01	145	HLFSVLSAI	HLA-A*02:01
38	AVVSHFILY	HLA-A*03:01	146	KVLVDFLK	HLA-A*03:01
39	RELGVGIAL	HLA-B*44:02	147	VEAPHLPSF	HLA-B*44:02
40	LYQTTIELF	HLA-A*24:02	148	SVYMATTLK	HLA-A*03:01
41	APQPRSLAA	HLA-B*07:02	149	SMNSKALRWK	HLA-A*03:01
42	LLSRGILIL	HLA-A*02:01	150	IVFLLQQGEK	HLA-A*03:01
43	VFIPSVINL	HLA-A*24:02	151	AVFVNWEQTKK	HLA-A*03:01
44	SLFPYFLNK	HLA-A*03:01	152	KIMEILNLK	HLA-A*03:01
45	SLFPISLTV	HLA-A*02:01	153	ALNLSRLTV	HLA-A*02:01
46	GESIYLLVRKW	HLA-B*44:02	154	TVTSAIVNR	HLA-A*03:01
47	LYIFTTRPF	HLA-A*24:02	155	MPWVLMSPF	HLA-B*07:02
48	TEMSVSALY	HLA-B*44:02	156	SLRVSPAL	HLA-B*07:02
49	IYFHLNNWTI	HLA-A*24:02	157	APLRAGWAA	HLA-B*07:02
50	KTIDLIVIR	HLA-A*03:01	158	FQLSGPVTF	HLA-A*24:02
51	SVFSLVHLFDK	HLA-A*03:01	159	ASAIPAGAK	HLA-A*03:01

52	SPLPHLGPL	HLA-B*07:02	160	EYLGSENVF	HLA-A*24:02
53	TTLENLPQK	HLA-A*03:01	161	ILAASFQAR	HLA-A*03:01
54	ASSPVILLL	HLA-A*01:01	162	LPVHGPLPLLL	HLA-B*07:02
55	SPVSASWIL	HLA-B*07:02	163	LWALAIPSL	HLA-A*24:02
56	DVDIHKDLY	HLA-A*01:01	164	SHSSPTVSF	HLA-A*24:02
57	IIDRILLL	HLA-A*02:01	165	FYNRPPLI	HLA-A*24:02
58	REQLDGATL	HLA-B*44:02	166	VIFLHQPPK	HLA-A*03:01
59	AVDLGVLEL	HLA-B*07:02	167	FALGPIIKQL	HLA-A*02:01
60	VSPDEVLALW	HLA-A*01:01	168	AEGPDHHS�	HLA-B*44:02
61	GLIAFAIFK	HLA-A*03:01	169	RPQGVGPAA	HLA-B*07:02
62	SFSLLLPYL	HLA-A*24:02	170	LLDSWNILI	HLA-A*02:01
63	MPANFETIGF	HLA-B*07:02	171	NVSFEVSLLY	HLA-A*01:01
64	LPTRSLPAF	HLA-B*07:02	172	LLYKTLIL	HLA-A*02:01
65	NSDLFYLLL	HLA-A*01:01	173	IFTGRNAYF	HLA-A*24:02
66	RPLILIRI	HLA-B*07:02	174	LSGPVTFLR	HLA-A*03:01
67	GRFWLPFNF	HLA-A*24:02	175	MPFLKVPPL	HLA-B*07:02
68	TVDKGELLY	HLA-A*01:01	176	AFLLSLISL	HLA-A*24:02
69	KYPTIICGF	HLA-A*24:02	177	SYLKDHLSL	HLA-A*24:02
70	LIAGLIFLK	HLA-A*03:01	178	SLFGGLFTR	HLA-A*03:01
71	LIDSLLLLL	HLA-A*01:01	179	MIFSGVFLR	HLA-A*03:01
72	GSCSFALSR	HLA-A*03:01	180	QYLTYYPSF	HLA-A*24:02
73	NQKGLISL	HLA-B*08:01	181	FDLNIGSAY	HLA-B*44:02
74	TLNVLITL	HLA-A*02:01	182	RPSLPCRSF	HLA-B*07:02
75	TTAAVYILK	HLA-A*03:01	183	VFVISGSHLF	HLA-A*24:02
76	VQSGVPSRF	HLA-A*24:02	184	VVHGGMSIF	HLA-B*07:02
77	YPDVPIGQL	HLA-B*07:02	185	MPAFLSRASAL	HLA-B*07:02
78	TPSHSTPSF	HLA-B*07:02	186	SQIKSPVVF	HLA-A*24:02
79	SLFRLSISF	HLA-A*24:02	187	RLCPAAPTGK	HLA-A*03:01
80	IFDLSDPFR	HLA-A*24:02	188	KLPFFTNFL	HLA-A*02:01
81	KLIAGLIFLK	HLA-A*03:01	189	IWRALGSLF	HLA-A*24:02
82	VLQSLQHEL	HLA-A*02:01	190	STQSSLLYK	HLA-A*03:01
83	EAAPNIMHY	HLA-A*01:01	191	APLLPGPAA	HLA-B*07:02
84	KEFAFLEHSL	HLA-B*44:02	192	IPLHFSTAF	HLA-B*07:02
85	LPHPVNSGL	HLA-B*07:02	193	ILQLITVNR	HLA-A*03:01
86	VANDRLSFL	HLA-B*08:01	194	VLYPSSHSSF	HLA-A*24:02
87	LHLNPGLSF	HLA-A*24:02	195	AWNESSAWLL	HLA-A*24:02
88	KVGAVVHLK	HLA-A*03:01	196	NSENLLVY	HLA-A*01:01
89	SPSSPLLLLA	HLA-B*07:02	197	HHTQLVFVF	HLA-A*24:02
90	LALLGAPPPK	HLA-A*03:01	198	MTYQQPFSSNR	HLA-A*03:01
91	RIVTYIVAK	HLA-A*03:01	199	RAPLPLLLL	HLA-B*07:02
92	LNFSVDVFLY	HLA-A*01:01	200	GLLGTLRVL	HLA-A*02:01
93	SPIGLSLIL	HLA-B*07:02	201	VWILQKVNLAFL	HLA-A*24:02
94	AVFLGNPSNQK	HLA-A*03:01	202	KLLLLSSVK	HLA-A*03:01
95	YAFRNQTL	HLA-B*08:01	203	AILVPQPPK	HLA-A*03:01
96	HPRESLNMLVAF	HLA-B*07:02	204	VVRASSGLK	HLA-A*03:01
97	ALIVLHLSL	HLA-A*02:01	205	SLIPIVPFKS	HLA-A*03:01
98	FSEIFQDFL	HLA-A*01:01	206	VEGVHFVQLL	HLA-B*44:02
99	RADEEQASF	HLA-A*01:01	207	LPALLRSL	HLA-B*07:02

100	SPAPSLARFLSL	HLA-B*07:02	208	YVGPTRLEL	HLA-B*07:02
101	ATNSFLLIK	HLA-A*03:01	209	AILLPQLPK	HLA-A*03:01
102	FLLEKGGEL	HLA-A*02:01	210	ASRIQVILL	HLA-B*07:02
103	RPWLSSPTGL	HLA-B*07:02	211	VVTIVMHIYK	HLA-A*03:01
104	GSLQTLPPK	HLA-A*03:01	212	WETRLHNLW	HLA-B*44:02
105	LVFESVVAA	HLA-A*02:01	213	TLLSFKTVLFK	HLA-A*03:01
106	GLLDAFLRL	HLA-A*02:01	214	RPSPVRVAAL	HLA-B*07:02
107	SVISVLTPK	HLA-A*03:01	215	TPLTRTTL	HLA-B*07:02
108	SLQESLPNA	HLA-A*02:01	216	ILRTVLPSL	HLA-B*08:01

【0375】 質譜分析

【0376】 獲得的 HLA 肽庫根據其疏水性使用反相色譜 (nanoAcquity UPLC system, Waters) 分離，沖提肽用裝有電噴霧源的 LTQ-velos 和融合雜交質譜 (ThermoElectron) 進行了分析。肽庫被直接載入填充有 1.7 μm C18 反相材料 (Waters) 的分析用熔煉石英微毛細管柱 (75 μm 內徑x 250 mm)，應用流速為每分鐘400 nL。隨後，使用來自流速為每分鐘 300 nL、濃度為10% 至 33% 溶劑 B 中的兩步 180 分鐘二元梯度法，對肽進行分離。梯度由溶劑 A (含0.1% 甲酸的水) 和溶劑 B(含0.1 % 甲酸的乙腈)組成。金鍍膜玻璃毛細管 (PicoTip, New Objective) 用於引入到 nanoESI 源。使用前 5 (TOP5) 策略在資料依賴模式下操作 LTQ-Orbitrap 質譜儀。簡言之，在軌道阱(orbitrap) (R= 30000)中以高質量精度的完全掃描開始一個掃描週期，之後也在軌道阱(orbitrap) (R = 7500)中用先前選定離子的動態排除技術對 5 種含量最為豐富的前體離子進行 MS/MS 掃描。串聯質譜由 SEQUEST 以固定的錯誤發現率 (q≤0.05) 和額外的手動控制進行解讀。在被識別的肽序列不確定的情況下，透過比較生成的天然肽片段化模式與合成序列相同參考肽的片段化模式，進一步驗證所述肽序列。

【0377】 無標記相對 LC-MS定量係透過離子計數(即透過LC-MS特徵提取和分析)來進行(參見「Mueller et al., 2007」)。該方法假定肽的 LC-MS 信號區域與樣本中其豐度相關。提取的特徵透過帶電狀態反摺續和滯留時間校準進行進一步處理(參見「Mueller et al., 2008」；「Sturm et al., 2008」)。最後，所有的

LC-MS 特徵與序列鑒定結果交叉比對，以將不同樣本和組織的定量資料與肽提呈分布結合。定量資料根據集中趨勢以兩層方式進行正規化處理，以說明技術和生物學複製變異。因此，每個被識別的肽均可與定量資料相關，從而可在樣本和組織之間進行相對定量。此外，對候選肽獲得的所有定量資料進行手動檢查，以確保資料的一致性，並驗證自動化分析的準確度。對於每種肽，計算了提呈分布，其顯示樣本平均提呈量以及複製變化。這些分布並列 AML（急性骨髓性白血病）；BRCA（乳腺癌）；CCC（膽管細胞癌）；CLL（慢性淋巴細胞白血病）；CRC（結直腸癌）；GBC（膽囊癌）；GBM（膠質母細胞瘤）；GC（胃癌）；GEJC（胃食管交界癌）；HCC（肝細胞癌）；HNSCC（頭頸部鱗狀細胞癌）；MEL（黑色素瘤）；NHL（非霍奇金淋巴瘤）；NSCLCadeno（非小細胞肺癌腺癌）；NSCLCother（不能明確命名為 NSCLCadeno 或 NSCLCsquam 的 NSCLC 樣本）；NSCLCsquam（鱗狀細胞非小細胞肺癌）；OC（卵巢癌）；OSCAR（食管癌）；PACA（胰腺癌）；PRCA（攝護腺癌）；RCC（腎細胞癌）；SCLC（小細胞肺癌）；UBC（膀胱癌）和 UEC（子宮內膜癌）樣本，以正常組織樣本為基線。示例性過度提呈肽的提呈分布如圖 1A-1E 所示。這些圖僅將肽的鑒定結果顯示為點，所述鑒定是在使用 HLA 特異性抗體處理的對相應 HLA 同種異型呈陽性的組織樣本上進行的。

【0378】所有肽（SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216）在各種適應症的肽提呈顯示於表 8 中。該表列出了相應肽至少被鑒定一次的所有適應症（與樣本的 HLA 分型或處理所述樣本的抗體無關）。

[表 8] 本發明的肽在各種癌症實體的提呈，以及因此所提及的肽對於所指示癌症的診斷和/或治療的特定相關性。癌症類型：AML（急性骨髓性白血病）；BRCA（乳腺癌）；CCC（膽管細胞癌）；CLL（慢性淋巴細胞白血病）；CRC（結直腸癌）；GBC（膽囊癌）；GBM（膠質母細胞瘤）；GC（胃癌）；GEJC（胃

食管交界癌)；HCC(肝細胞癌)；HNSCC(頭頸部鱗狀細胞癌)；MEL(黑色素瘤)；NHL(非霍奇金淋巴瘤)；NSCLC(非小細胞肺癌)；OC(卵巢癌)；OSCAR(食管癌)；PACA(胰腺癌)；PRCA(攝護腺癌)；RCC(腎細胞癌)；SCLC(小細胞肺癌)；UBC(膀胱癌)和UEC(子宮內膜癌)。

SEQ ID NO.	序列	肽提呈於癌症類型上
1	AILAPPAILK	BRCA,CCC,CRC,GBC,HCC,HNSCC,MEL,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,PRCA,UBC,UEC
2	GTVFVLLSK	HNSCC,NSCLC,OSCAR,RCC
3	VYIASSFKI	HCC,NSCLC
4	IQAPALLKV	CLL,CRC,NHL
5	METADRPEW	BRCA,PRCA
6	SHSLPAFTL	PRCA
7	IYIPTNSIYKF	HCC,PRCA
8	VIYNQTLMK	CCC,HCC
9	LLGVVSHSV	CLL,NHL
10	ILMILQPQL	HNSCC,NSCLC,NSCLC,RCC,UEC
11	TEIGTVIKLF	PRCA
12	RLQEGLAAL	RCC
13	LYDTVTHTF	GC,RCC
14	ILAPPQRISF	CRC,GBC,HNSCC,NSCLC,OSCAR,PACA,SCLC
15	SPVETRSL	CCC,HNSCC,NSCLC,PACA
16	NFHTLAQQLF	HNSCC,NSCLC
17	MVNWSLTNK	HNSCC,OSCAR,UEC
18	SLSKLVATV	CCC,CRC,GC,OSCAR,PACA
19	RILEVVRQPK	HCC,HNSCC,MEL,NSCLC,UBC
20	ILAPPAILK	BRCA,CCC,CRC,GBC,HCC,HNSCC,MEL,NSCLC,OC,OSCAR,UBC,UEC
21	MLSAQFILK	NHL
22	RVIEVVMNSK	GBM,HCC,HNSCC,MEL
23	AETKQFWSA	GC,OSCAR,PRCA,UTC
24	LIYIPTNSIYK	HCC,PRCA
25	GVCSTLTIK	CRC,GC,NSCLC,RCC,UBC
26	ETNTIEFIY	BRCA,CRC,NSCLC,MEL,RCC,UBC
27	SQAKQITIW	AML,CCC,HCC,PACA
28	ATLQAVTLYKK	MEL

29	GTFIAPVMK	CRC,HNSCC,NSCLC,OSCAR
30	SLKSSILFL	CCC,GC,HNSCC,NSCLC,PACA
31	VFLLLPYPRF	OC,RCC
32	TAMTTLMAF	HNSCC,MEL,OSCAR,PACA,UEC
33	AYIPFPPLI	HCC,PRCA
34	LLFKGLMWK	HCC,MEL,UBC
35	SLATAISAK	CLL,NHL
36	KEIEAQEAA	CRC,OC,RCC,UEC
37	RLYSGSSFLY	MEL
38	AVVSHFILY	AML,GBC,MEL
39	RELGVGIAL	HNSCC,OSCAR,UBC
40	LYQTTIELF	PRCA
41	APQPRSLAA	BRCA,CCC,GC,HCC,HNSCC,MEL,NHL,NSCLC
42	LLSRGILIL	CCC,CRC,GC,NSCLC,PRCA
43	VFIPSVINL	PRCA
44	SLFPYFLNK	MEL
45	SLFPISLTV	HNSCC,NSCLC,SCLC
46	GESIYLLVRKW	CLL,NHL
47	LYIFTTRPF	MEL,NSCLC
48	TEMSVSALY	BRCA
49	IYFHLNNWTI	HNSCC,NSCLC
50	KTIDLVIVR	HNSCC,NSCLC,UBC
51	SVFSLVHLFDK	NHL,RCC
52	SPLPHLGPL	BRCA,CRC,GC,HCC,RCC
53	TTLENLPQK	BRCA,GBC,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,UEC
54	ASSPVILL	HCC,HNSCC,MEL,NSCLC,OC,UBC,UEC
55	SPVSASWIL	MEL,UEC
56	DVDIHKDLY	PRCA
57	IIIDRILL	NSCLC
58	REQLDGATL	BRCA,CCC,CRC,GBC,GC,HNSCC,MEL,NSCLC,OC,OSCAR,PACA
59	AVDLGVLEL	NHL,MEL,OC,RCC
60	VSPDEV LALW	HNSCC,MEL,OC,UBC
61	GLIAFAIFK	CRC,GC
62	SFSLLLPYL	AML,CRC,HCC,MEL,NSCLC
63	MPANFETIGF	OC
64	LPTRSLPAF	RCC
65	NSDLFYLLL	NSCLC,OSCAR,PACA,UBC
66	RPLILIRI	AML,CRC,GBC,HNSCC,RCC
67	GRFWLPFNF	MEL,PRCA,SCLC,UEC
68	TVDKGELLY	BRCA,GBC,GC,HCC,HNSCC,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,RCC,UBC

69	KYPTIICGF	CRC,GBC
70	LIAGLIFLK	CLL,NHL,OC,RCC,UBC,UEC
71	LIDSLLLL	MEL,NHL,OC
72	GSCSFALSR	CCC,GC,UBC
73	NQKGLISL	CLL,GBC,MEL,NHL,NSCLC,RCC
74	TLNVLITL	CRC,GC,MEL,NSCLC,OC,RCC
75	TTAAVYILK	NHL,OC
76	VQSGVPSRF	GBC,GC,NSCLC
77	YPDVPIGQL	CRC
78	TPSHSTPSF	GC,PACA
79	SLFRLSISF	BRCA,NSCLC,PACA,RCC,UBC
80	IFDLSDPRF	GBC,GC,HNSCC,MEL,UBC,UEC
81	KLIAGLIFLK	AML,NHL,OC,RCC,UBC,UEC
82	VLQSLQHEL	RCC
83	EAAPNIMHY	PRCA
84	KEFAFLEHSL	CRC,GC,HNSCC,NSCLC,OC,OSCAR,UBC,UEC
85	LPHPVNSGL	CCC,NSCLC,NSCLC,NSCLC,UBC
86	VANDRLSFL	NSCLC,PRCA
87	LHLNPGLSF	BRCA,GC,MEL,NHL,PACA
88	KVGAVVHLK	BRCA,HCC,NSCLC,OC,OSCAR,RCC,UBC,UEC
89	SPSSPLLLLA	BRCA,GC,OC,SCLC,UBC
90	LALLGAPPPK	AML,CCC,CRC,GBC,GC,HCC,HNSCC,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,PRCA,RCC,SCLC,UEC
91	RIVTYIVAK	AML,BRCA,CCC,HCC,MEL,NHL,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,PRCA,UBC,UEC
92	LNFSDVFLY	GC,HNSCC,MEL,NHL,NSCLC,PRCA
93	SPIGLSLIL	CCC,HNSCC,NSCLC,OSCAR,SCLC,UBC
94	AVFLGNPSNQK	CCC,GC,NHL,NSCLC,OSCAR
95	YAFRNQTL	PRCA,SCLC
96	HPRESLNMLVAF	CCC,GBC,MEL,NSCLC,PACA,UBC
97	ALIVLHLSL	AML,CRC,MEL,NHL,OSCAR
98	FSEIFQDFL	AML,BRCA,GC,HNSCC,NHL,RCC,UEC
99	RADEEQASF	CRC,NSCLC,OSCAR,PACA,UBC,UEC
100	SPAPSLARFLSL	BRCA,HNSCC,NSCLC,MEL
101	ATNSFLLIK	GC,NSCLC,SCLC,PACA,PRCA
102	FLLLEKGGEL	BRCA,CRC,HCC,HNSCC,NSCLC,PACA
103	RPWLSSPTGL	GBC,GC,HNSCC,NHL,NSCLC,OC,PACA,RCC
104	GSLQTLPPK	GBC,OSCAR,UBC
105	LVFESVVAA	GBC,HNSCC,NHL,NSCLC,RCC,UBC

106	GLLDAFLRL	HCC
107	SVISVLTPPK	GBC,NSCLC,OSCAR,UBC,UEC
108	SLQESLPNA	AML
109	MPKLFLTAC	AML,CCC,CLL,CRC,GC,HCC,NSCLC,RCC
110	APSLARFLSL	BRCA,HNSCC,MEL,NSCLC,OC,OSCAR,RCC,SCLC
111	RPIWDVRSA	HNSCC,NSCLC,SCLC
112	ETYGTFVLR	BRCA,CCC,CRC,GBC,HCC,HNSCC,NSCLC,OC,OSCAR,SCLC,RCC,UBC
113	ALGPMAFRV	BRCA,CRC,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,RCC
114	VPHHLLSSV	GBC,GC,PACA,RCC
115	LWEEKPVCL	CCC,CRC,GBC,HCC,NSCLC,PACA,PRCA,UBC,UEC
116	IYLTKSNLVNM	HNSCC,NHL,NSCLC,OSCAR
117	GEAAAARPV	HCC,MEL,NSCLC
118	RLLRLIPIL	GBC,HNSCC,MEL,NSCLC,OC,PACA,RCC
119	VLHGLLFTL	AML,NHL,NSCLC,RCC
120	APGPRSQGL	BRCA,CRC,GC,PRCA,UBC
121	ILVTAWKGV	GBC,GC,HCC,NHL,NSCLC,OSCAR,RCC
122	FTQKINSTW	BRCA,CCC,CLL,CRC,GBC,GC,HNSCC,MEL,NSCLC,PRCA,RCC,SCLC,UBC
123	TYLESSVRI	HCC
124	SPSSNSREL	AML,CRC,GBC,GC,HNSCC,MEL,OC,UBC
125	ALAQGANLK	GB,MEL,RCC
126	NPELLVILL	HNSCC,NSCLC,OSCAR,RCC
127	TVATQVATSK	BRCA,HNSCC,NSCLC,OC,OSCAR,UBC
128	MTFVPLLAR	CRC,GBC,GC,HCC,NHL,MEL,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,UBC,UEC
129	IPISIFKMA	CCC,HCC,NHL,PACA,RCC,SCLC,UBC
130	ITPDSIPSV	AML,GBC,NHL,OC,SCLC
131	TILAKQNVL	AML,HCC,OC,RCC
132	LYLETRSEF	BRCA,GBC,GC,HCC,MEL,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,PRCA,RCC
133	KFPPSASEF	CRC,GC,NSCLC,PRCA,UBC
134	MPCTTILRI	AML,CLL,CRC,GC,HCC,HNSCC,MEL,NHL,NSCLC,OSCAR,RCC,PACA,PRCA,UBC,UEC
135	SADTAELLL	CCC,HCC
136	YSSEIWDLY	BRCA,GBC,HCC,MEL,UEC
137	MPIQVLKGL	BRCA,GC,NHL,RCC,PRCA
138	RTLPLEGSPK	BRCA,CCC,GBM,NSCLC,PACA,PRCA,UEC

139	EEGRIITKW	BRCA,CRC,CCC,GBC,HCC,HNSCC,MEL,NSCLC,OSCAR,PACA,RCC,UBC
140	QPAPQPLL	BRCA,CRC,HNSCC,NHL,OSCAR,RCC,SCLC,UBC
141	REVAGASAL	NSCLC,PACA
142	YMLEMDNSMKI	CCC,CRC,NSCLC,PACA
143	AVLGALLRH	BRCA,GC,GBC,HCC,NSCLC,OSCARPACA,PRCA,RCC,SCLC
144	IIVPSFYK	CCC,CRC,GBC,GBM,GC,HCC,MEL,NSCLC,RCC
145	HLFSVLSAI	BRCA,CCC,CLL,CRC,GBC,GC,HCC,HNSCC,MEL,NHL,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,RCC,SCLC
146	KVLVDLLK	AML,BRCA,CCC,CRC,HNSCC,MEL,NHL,RCC,SCLC,UBC
147	VEAPHLPSF	BRCA,CCC,CRC,GBC,GBM,GC,HCC,HNSCC,MEL,NHL,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,RCC,SCLC,UBC,UEC
148	SVYMATTLK	NSCLC,OC,PACA,UBC,UEC
149	SMNSKALRWK	CCC,MEL,NHL
150	IVFLLQQGEK	AML,BRCA,CCC,CRC,GC,MEL,NHL,NSCLC,OSCAR,PACA,SCLC,UBC,UEC
151	AVFVNWEQTKK	HNSCC,MEL,NHL,NSCLC,OSCAR
152	KIMEILNLK	AML,GC,MEL,NHL,NSCLC,OC,OSCAR,RCC,UBC,UEC
153	ALNLSRLTV	HCC, NSCLC, OSCAR, MEL, PRCA, HNSCC, NHL, RCC, CRC, GC, OC, CLL
154	TVTSAIVNR	CRC,GBC,GC,PACA,PRCA,SCLC,UBC
155	MPWVLMSPF	AML,CRC,NHL,NSCLC,OC,SCLC
156	SLRVPSPAL	BRCA,CRC,HNSCC,NHL,NSCLC,PRCA,RCC,UEC
157	APLRAGWAA	CCC,GC,GBC,HCC,NHL,PACA,RCC
158	FQLSGPVTF	BRCA,CRC,GBC,GC,NSCLC,OC,UEC
159	ASAIPAGAK	CRC,HNSCC,OC,RCC
160	EYLGSENVF	GC,PRCA
161	ILAASFQAR	CRC,GBM,HCC,HNSCC,RCC,UBC
162	LPVHGPLPLLL	BRCA,CCC,CRC,GBC,GC,HCC,HNSCC,NSCLC,OC,SCLC,UEC
163	LWALAIPSL	BRCA,GBC,NHL,NSCLC,OC,UEC
164	SHSSPTVSF	GC,PRCA,RCC
165	FYNPRPPLI	GBC

166	VIFLHQPPK	MEL
167	FALGPIIKQL	GBC,MEL,NSCLC,OSCAR,PRCA,UEC
168	AEGPDHHS�	AML,CRC, GBC,GC,HCC,HNSCC,OC, RCC
169	RPQGVGPAA	BRCA,GC,GBC,HNSCC,MEL,NSCLC,RCC,UBC
170	LLDSWNILI	NHL,MEL,OC,PRCA
171	NVSFEVSLLY	GC,HNSCC,NSCLC,OC,PACA,PRCA,RCC
172	LLYKTLIL	AML,CRC,HCC,NHL,NSCLC,PACA,PRCA
173	IFTGRNAYF	GBM,GC,HCC,NSCLC,OC,UBC,UEC
174	LSGPVTFLR	BRCA,CCC,OSCAR
175	MPFLKVPPL	CLL,NHL,NSCLC,SCLC
176	AFLLSLISL	BRCA,GC,MEL,NHL,NSCLC,OSCAR,UBC
177	SYLKDHLISL	CLL,GC,NSCLC,UBC
178	SLFGGLFTR	CCC,GBC,GC,HNSCC,NSCLC,UBC
179	MIFSGVFLR	AML,BRCA,CCC,GBC,GC,HCC,HNSCC,MEL,NSCLC,OC,OSCAR,RCC,PACA,UBC,UEC
180	QYLTYYPST	CLL,CRC,NHL,NSCLC,OSCAR,PRCA,UBC,UEC
181	FDLNIGSAY	GBC,GC,HCC,HNSCC,NHL
182	RPSLPCRSF	BRCA,HNSCC,NHL,NSCLC,OSCAR,RCC,PACA,UEC
183	VFVISGSHLF	NHL,NSCLC,UBC,UEC
184	VVHGGMSIF	AML,BRCA,CCC,GC,NSCLC
185	MPAFLSRASAL	BRCA,CRC,GBC,GC,HNSCC,MEL,NSCLC,OSCAR,UBC
186	SQIKSPVVF	BRCA,CRC,GBM,GC,HCC,NSCLC,OC,RCC,SCLC
187	RLCPAAPTGK	BRCA,HCC,HNSCC,NSCLC,OSCAR
188	KLPFFTNFL	BRCA,CCC,CLL,CRC,GBC,GC,HNSCC,MEL,NHL,NSCLC,PACA,RCC,UBC,UEC
189	IWRALGSLF	GC,MEL,NSCLC,UBC
190	STQSSLLYLK	CCC,NHL,NSCLC,OC,RCC
191	APLLPGPAA	CCC,GC,MEL,NSCLC,PACA,RCC,
192	IPLHFSTAF	AML,BRCA,GBC,GC,HCC,HNSCC,NHL,NSCLC,OC,OSCAR,RCC,SCLC,UBC,UEC
193	ILQLITVNR	BRCA,CCC,CRC,GBC,GC,HCC,HNSCC,NSCLC,OC,OSCAR,PACA,RCC,SCLC,UBC,UEC
194	VLYPSHSSF	GBC,HCC
195	AWNESSAWLL	CRC,HCC
196	NSENLLVY	CCC,CRC,MEL,NHL,NSCLC

197	HHTQLVFVF	NHL,NSCLC,OC,UBC
198	MTYQQPFSNR	GBC,HCC,HNSCC,NHL,MEL,NSCLC,OC,OSCAR,UBC,UEC
199	RAPLPLLLL	GC,HNSCC,NSCLC,UBC
200	GLLGTLRVL	GBC,HCC,NSCLC,UBC
201	VWILQKVNLA	CCC,CRC,GBC,HCC,HNSCC,PRCA,UBC
202	KLLLLSSVK	GC,GBC,HCC,NSCLC,PACA
203	AILVPQPPK	BRCA,CCC,CRC,GC,HCC,HNSCC,NHL,NSCLC,OC,OSCAR,SCLC
204	VVRASSGLK	AML,CLL,CRC,GBM,HCC,NSCLC,PACA,PRCA,RCC
205	SLIPIVPFKS	CLL,NHL
206	VEGVHFVQLL	CLL,HCC,NHL,OSCAR
207	LPALLRSL	BRCA,CLL,CRC,NSCLC
208	YVGPTRLEL	BRCA,CLL,GBM,MEL,NSCLC
209	AILLPQLPK	BRCA,CCC,HCC,GC,NSCLC,OSCAR,PACA,PRCA,RCC,SCLC,UTC
210	ASRIQVILL	BRCA,NSCLC,PRCA,SCLC,UTC
211	VVTIVMHIYK	AML,CCC,BRCA,MEL
212	WETRLHNLW	AML,BRCA,CLL,CRC,GC,HCC,HNSCC,MEL,NHL,NSCLC,OSCAR,PACA,PRCA,RCC,SCLC
213	TLLSFKTVLFK	AML,CRC,MEL,NHL,NSCLC,UEC
214	RPSPVRVAAL	AML,BRCA,CRC,GBC,GC,MEL,NHL,NSCLC,OSCAR,PACA,RCC,UBC,UEC
215	TPLTRTTL	CCC,CRC,GBM,MEL,NSCLC,OC,PACA,UBC
216	ILRTVLPSL	AML,HCC,HNSCC,NHL,NSCLC,OC,OSCAR,RCC,UEC

【0379】 實施例 2

【0380】 編碼本發明的肽的基因的表現圖譜

【0381】 與正常細胞相比，在腫瘤細胞上之肽的過度提呈或特異性提呈足夠其在免疫治療中有效使用，一些肽為腫瘤特異性的，儘管其源蛋白也存在於正常組織中。但是，mRNA 表現圖譜在選擇用於免疫治療的目標肽時增加了額外的安全性。特別是對於具有高安全性風險的治療選擇，諸如親和力成熟的TCR，理想的目標肽將來源於該腫瘤特有的且不出現於正常組織中的蛋白。

【0382】 RNA 來源與製備

【0383】手術切除組織標本按如上所述（參見實施例 1）在獲得每名患者的書面知情同意後提供。手術後立即速凍腫瘤組織標本，之後在液態氮中用杵臼勻漿。使用 TRI 試劑（Ambion 公司，達姆城，德國）從這些樣本中製備總 RNA，之後用 RNeasy（QIAGEN 公司，Hilden，德國）淨化；這兩種方法都根據製造商的操作指南進行。

【0384】用於 RNASeq 實驗來自健康人體組織的總 RNA 獲得自：Asterand（美國密歇根州底特律和英國赫茨羅伊斯頓）；Bio-Options Inc.（美國加利福尼亞州佈雷亞）；Geneticist Inc.（美國加利福尼亞州格倫代爾）；ProteoGenex Inc.（美國加利福尼亞州卡爾弗城）；Tissue Solutions Ltd（英國格拉斯哥）。

【0385】用於 RNASeq 實驗來自腫瘤組織的總 RNA 獲得自：Asterand（美國密歇根州底特律和英國赫茨羅伊斯頓）；BioCat GmbH（德國海德堡）；BioServe（美國馬里蘭州貝爾茨維爾）；Geneticist Inc.（美國加利福尼亞州格倫代爾）；Istituto Nazionale Tumori "Pascale"（義大利那不勒斯）；ProteoGenex Inc.（美國加利福尼亞州卡爾弗城）；海德堡大學醫院（德國海德堡）。

【0386】所有 RNA 樣本的品質和數量都在 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析儀（Agilent 公司，瓦爾德布龍，德國）上使用 RNA 6000 Pico LabChip Kit（Agilent 公司）進行評估。

【0387】RNAseq 實驗

【0388】透過新一代測序技術（RNAseq）由CeGaT（蒂賓根，德國）對腫瘤和正常組織的 RNA 樣本進行基因表現分析。簡言之，根據供應商的操作指南（Illumina Inc.，聖地亞哥，加州，美國），測序文庫利用 Illumina HiSeq v4 試劑盒製備，其中包括 RNA 片段化、cDNA 轉換和測序接頭的添加。根據製造商的說明，從多個樣本獲得的文庫等莫耳混合並在 Illumina HiSeq 2500 定序器上測序，以產生 50bp 的單端讀數。支援肽的 RNA 讀數被計數並顯示為圖 2A-2E 中的本

第97頁，共 122 頁(發明說明書)

發明肽的示例性表現圖譜，所述肽在 AML（急性骨髓性白血病）；BRCA（乳腺癌）；CCC（膽管細胞癌）；CLL（慢性淋巴細胞白血病）；CRC（結直腸癌）；GBC（膽囊癌）；GBM（膠質母細胞瘤）；GC（胃癌）；GEJC（胃食管交界癌）；HCC（肝細胞癌）；HNSCC（頭頸部鱗狀細胞癌）；MEL（黑色素瘤）；NHL（非霍奇金淋巴瘤）；NSCLC（非小細胞肺癌）；OC（卵巢癌）；OSCAR（食管癌）；PACA（胰腺癌）；PRCA（攝護腺癌）；RCC（腎細胞癌）；SCLC（小細胞肺癌）；UBC（膀胱癌）和 UEC（子宮內膜癌）中高度過度表現或專門表現。此外，表 9 中列出了來自 RNAseq 實驗的表現分數。

[表 9] 表現分數。根據 RNAseq 實驗，該表列出了與一系列正常組織相比在腫瘤上非常高度過量表現 (+++)，或與一系列正常組織相比在腫瘤上高度過量表現 (++)，或與一系列正常組織相比在腫瘤上過量表現 (+) 的肽。該分數的基線係根據以下相關正常組織的測量值計算：脂肪組織；腎上腺；膽管；膀胱；血細胞；血管；骨髓；腦；乳腺；食管；眼；膽囊；頭頸；心；大腸；小腸；腎；肝；肺；淋巴結；周圍神經；卵巢；胰腺；甲狀旁腺；腹膜；垂體；胎盤；胸膜；攝護腺；骨骼肌；皮膚；脊髓；脾；胃；睪丸；胸腺；甲狀腺；氣管；輸尿管；子宮。如果獲得相同組織類型的幾個樣本的表現資料，則使用所有各樣本的算術平均值進行計算。

SEQ ID NO.	序列	過量表現 (+)	高度過量表現 (++)	非常高度過量表現 (+++)
1	AILAPPAILK	GC, OC, SCLC	CCC, MEL, NSCLC, OSCAR, PACA	GBC, UBC
2	GTVFVLLSK		BRCA, UBC	HNSCC, NSCLC, OSCAR, RCC
3	VYIASSFKI		HCC, PRCA	
4	IQAPALLKV	CLL, NHL		
5	METADRPEW		BRCA	PRCA
6	SHSLPAFTL			PRCA
7	IYIPTNSIYKF		HCC, PRCA	

8	VIYNQTLMK		GBC, HCC, RCC	CCC
9	LLGVVSHSV		CLL	
10	ILMILQPQL	SCLC	GBC, GC, HCC, HNSCC, OC, OSCAR, PACA, RCC	NSCLC, UEC
11	TEIGTVIKLF		BRCA	PRCA
12	RLQEGLAAL	SCLC		RCC
13	LYDTVTHTF	GC, NHL, OC	CRC, GBC, PRCA	RCC
14	ILAPPQRISF	GC, NHL, OC	CRC, GBC, HNSCC, NSCLC, OSCAR, PACA, SCLC	MEL
16	NFHTLAQQLF		NSCLC, OSCAR	HNSCC
17	MVNWSLTNK	NHL, OC	GC, NSCLC, PACA, SCLC, UEC	HNSCC, NSCLC, OSCAR, UBC
18	SLSKLVATV	SCLC	CCC, GC, OSCAR, PACA	CRC
19	RILEVVRQPK		CCC, HNSCC, NSCLC, OSCARSCLC, UBC	HCC, MEL
20	ILAPPAILK	BRCA, GC	CCC, MEL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC	UBC
21	MLSAQFILK		NHL	CLL
22	RVIEVVMNSK		GBM, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UBC	GBC
23	AETKQFWSA			PRCA
24	LIYIPTNSIYK		HCC, PRCA	
28	ATLQAVTLYKK		MEL	
29	GTFIAPVMK	CCC	CRC, HNSCC, NSCLC, OSCAR, UBC	
31	VFLLLPYPRF		RCC	
32	TAMTTLMAF	GBC, GC, NSCLC, OC, UEC	CCC, HNSCC, OSCAR, PACA, UBC	
33	AYIPFPPLI	GC, HCCNSCLC, PACA, UBC	PRCA, SCLC, UEC	
34	LLFKGLMWK	HCC	MEL	

35	SLATAISAK	CLL	NHL	
36	KEIEAQEAA	HCC, OC, UEC	CCC	
37	RLYSGSSFLY		HNSCC	
38	AVVSHFILY	MEL	AML	
39	RELGVGIAL	UBC	HNSCC, OSCAR	
40	LYQTTIELF		PRCA	
41	APQPRSLAA	GBC, HNSCC, NHL, OSCAR	MEL	
42	LLSRGILIL		NHL, OC, UEC	
43	VFIPSVINL		PRCA	
44	SLFPYFLNK		MEL	
45	SLFPISLTV		HNSCC, NSCLC, SCLC	
47	LYIFTTRPF		MEL, NSCLC, SCLC	
48	TEMSVSALY		BRCA	
49	IYFHLNNWTI	BRCA, OC, SCLC, UBC	GC, HNSCC, NSCLC, OSCAR, PACA, RCC, UEC	
50	KTIDLIVVR		UBC	
51	SVFSLVHLFDK		MEL, NHL, RCC	
53	TTLENLPQK	CCC, GBC, HNSCC, NSCLC, OSCAR, PACA	BRCA, MEL, NSCLC	
55	SPVSASWIL	UEC	MEL	
56	DVDIHKDLY		PRCA	
57	IIIDRILL	GC	NSCLC	
58	REQLDGATL	BRCA, GBC, MEL, NSCLC, UBC, UEC	GBC, GC, OSCAR, PACA	
61	GLIAFAIFK	UEC	CRC, GC	
63	MPANFETIGF		OC	
64	LPTRSLPAF		RCC	
67	GRFWLPFNF	HCC	BRCA, SCLC	
68	TVDKGELLY	CCC	NSCLC	
69	KYPTIICGF	GBC	CRC	
70	LIAGLIFLK	CCC, RCC	OC, UEC	

72	GSCSFALSR	BRCA, GC, PACA	UBC	
75	TTAAVYILK	NHL	CLL	
76	VQSGVPSRF		GBC	
77	YPDVPIGQL		CRC	
78	TPSHSTPSF		PACA	
79	SLFRLSISF		PRCA	
80	IFDLSDPRF	CRC, GBM, GC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR	SCLC	
81	KLIAGLIFLK	CLL, RCC, UEC	OC	
82	VLQSLQHEL		RCC	
83	EAAPNIMHY		PRCA	
84	KEFAFLEHSL	CRC, GBC, HNSCC, NSCLC, UBC	OSCAR	
85	LPHPVNSGL	HNSCC	NSCLC	
86	VANDRLSFL	GBC, SCLC	PRCA	
88	KVGAVVHLK	CCC, GBC, MEL, UBC		
89	SPSSPLLLLA	PACA		
90	LALLGAPPPK	NSCLC		
91	RIVTYIVAK	OC, SCLC		
92	LNFSDVFLY	CLL		
93	SPIGLSLIL	MEL		
94	AVFLGNPSNQK	NSCLC		
95	YAFRNQTL	PRCA		
99	RADEEQASF	BRCA, GBC, GC		
100	SPAPSLARFLSL	BRCA, MEL		
101	ATNSFLLIK	GBM		
102	FLLLEKGGEL	CLL		
103	RPWLSSPTGL	CCC, CLL, GBC, HNSCC, UBC		
104	GSLQTLPPK	NSCLC		
106	GLLDAFLRL	HCC		
108	SLQESLPNA	AML		

109	MPKLFLTAC	CLL		
110	APSLARFLSL	MEL		
111	RPIWDVRSR	HNSCC		
112	ETYGTFVLR	PRCA		

【0389】 實施例 3

【0390】 透過 IdentControl 和 CoElution 驗證肽

【0391】 為了驗證本發明的肽，使用標準和完善的固相肽合成法應用 Fmoc 策略合成所有肽。如有必要，使用穩定同位素標記 (SIL-) 胺基酸來引入區分質量轉移物，並允許使用這些標記肽作為內標（例如，如果在 CoElution 實驗中選擇肽進行同一性確認）。每個個體肽的同一性(identity)和純度使用質譜和 RP-HPLC 分析法確定。肽以>50%的純度獲得為白色至類白色的凍乾物（三氟乙酸鹽），。所有的 TUMAP 首選作為三氟乙酸鹽或乙酸鹽進行給藥，其他鹽形式亦可。

【0392】 IdentControl 透過光譜比較實現了肽的初始驗證。為此，合成肽用於透過使用匹配的片段化模式和碰撞能量獲取高解析度參考 MS2 光譜（就像獲取自然光譜一樣）來驗證肽的鑒定結果。使用光譜相關性的敏感度量進行自動光譜比較，基於包含 >10,000 個手動驗證光譜的基準資料集，確定在 <1% FDR 下形成 90% 靈敏度的截止分數。模糊的鑒定結果在 CoElution 實驗中進一步接受驗證。

[表 10] IdentControl 結果。光譜相關性(spectral correlation)表明內源性檢測肽的 MS/MS 光譜與合成肽相似，值越高，光譜越相似。當閾值滿足 0.872 或透過手動審查認為光譜相同時，則肽得到驗證。

SEQ ID NO.	序列	光譜相關性	SEQ ID NO.	序列	光譜相關性
1	AILAPPAILK	0.987	109	MPKLFLTAC	0.888
2	GTVFVLLSK	0.923	110	APSLARFLSL	0.920
3	VYIASSFKI	0.988	111	RPIWDVRSR	0.956
4	IQAPALLKV	0.978	112	ETYGTFVLR	0.965

5	METADRPEW	0.982	113	ALGPMAFRV	0.972
6	SHSLPAFTL	0.911	114	VPHHLLSSV	0.891
7	IYIPTNSIYKF	0.941	115	LWEEKPVCL	0.972
8	VIYNQTLMK	0.945	116	IYLTКСNLVNM	0.919
9	LLGVVSHSV	0.979	117	GEAAAARPV	0.885
10	ILMILQPQL	0.967	118	RLLRLIPIL	0.941
11	TEIGTVIKLF	0.929	119	VLHGLLFTL	0.905
12	RLQEGLAAL	0.988	120	APGPRSQGL	0.935
13	LYDTVTHTF	0.954	121	ILVTAWKGV	0.971
14	ILAPPQRISF	0.926	122	FTQKINSTW	0.951
15	SPVETRSL	0.900	123	TYLESSVRI	0.969
16	NFHTLAQQLF	0.964	124	SPSSNSREL	0.911
17	MVNWSLTNK	0.945	125	ALAQGANLK	0.967
18	SLSKLVATV	0.991	126	NPELLVILL	0.914
19	RILEVVRQPK	0.981	127	TVATQVATSK	0.947
20	ILAPPAILK	0.960	128	MTFVPLLAR	0.956
21	MLSAQFILK	0.964	129	IPISIFKMA	0.894
22	RVIEVVMNSK	0.925	130	ITPDSIPSV	0.947
23	AETKQFWSA	0.964	131	TILAKQNVL	0.945
24	LIYIPTNSIYK	0.981	132	LYLETRSEF	0.976
25	GVCSTLTIK	0.896	133	KFPPSASEF	0.910
26	ETNTIEFIY	0.891	134	MPCTTILRI	0.957
27	SQAKQITIW	0.952	135	SADTAELL	0.973
28	ATLQAVTLYKK	0.919	136	YSSEIWDLY	0.977
29	GTFIAPVMK	0.908	137	MPIQVLKGL	0.902
30	SLKSSILFL	0.931	138	RTLPLEGSPK	0.981
31	VFLLLPYPRF	0.936	139	EEGRIITKW	0.918
32	TAMTTLMAF	0.920	140	QPAPQPLL	0.973
33	AYIPFPPLI	0.958	141	REVAGASAL	0.873
34	LLFKGLMWK	0.923	142	YMLEMDNSMKI	0.914
35	SLATAISAK	0.959	143	AVLGALLRH	0.928
36	KEIEAQEAA	0.981	144	IIVPSFYK	0.993
37	RLYSGSSFLY	0.969	145	HLFSVLSAI	0.904
38	AVVSHFILY	0.966	146	KVLVDFLK	0.962
39	RELGVGIAL	0.875	147	VEAPHLPSF	0.939
40	LYQTTIELF	0.873	148	SVYMATTLK	0.941
41	APQPRSLAA	0.976	149	SMNSKALRWK	0.890
42	LLSRGILIL	0.975	150	IVFLLQQGEK	0.913
43	VFIPSVINL	0.926	151	AVFVNWEQTKK	0.928
44	SLFPYFLNK	0.925	152	KIMEILNLK	0.970
45	SLFPISLTV	0.875	153	ALNLSRLTV	0.966
46	GESIYLLVRKW	0.890	154	TVTSAIVNR	0.948
47	LYIFTTRPF	0.890	155	MPWVLMSPF	0.962

48	TEMSVSALY	0.883	156	SLRVPSPAL	0.968
49	IYFHLNNWTI	0.949	157	APLRAGWAA	0.932
50	KTIDLIVIR	0.875	158	FQLSGPVTf	0.959
51	SVFSLVHLFDK	0.889	159	ASAIPAGAK	0.934
52	SPLPHLGPL	0.966	160	EYLGSENVF	0.956
53	TTLENLPQK	0.875	161	ILAASFQAR	0.932
54	ASSPVILLL	0.935	162	LPVHGPLPLLL	0.903
55	SPVSASWIL	0.913	163	LWALAIPSL	0.996
56	DVDIHKDLY	0.959	164	SHSSPTVSF	0.973
57	IIIDRILLL	0.975	165	FYNPRPPLI	0.940
58	REQLDGATL	0.950	166	VIFLHQPPK	0.962
59	AVDLGVLEL	0.881	167	FALGPllKQL	0.867
60	VSPDEVLALW	0.897	168	AEGPDHHS�	0.904
61	GLIAFAIFK	0.898	169	RPQGVGPAA	0.900
62	SFSLLLPYL	0.926	170	LLDSWNILI	0.895
63	MPANFETIGF	0.941	171	NVSFEVSLLY	0.939
64	LPTRSLPAF	0.918	172	LLYKTLIIL	0.910
65	NSDLFYLLL	0.898	173	IFTGRNAYF	0.931
66	RPLILIRI	0.911	174	LSGPVTFLR	0.946
67	GRFWLPFNF	0.958	175	MPFLKVPPL	0.901
68	TVDKGELLY	0.975	176	AFLLSLISL	0.913
69	KYPTIICGF	0.975	177	SYLKDHLSL	0.959
70	LIAGLIFLK	0.953	178	SLFGGLFTR	0.925
71	LIDSLLLLL	0.914	179	MIFSGVFLR	0.962
72	GSCSFALSR	0.951	180	QYLTYYPSF	0.950
73	NQKGLISL	0.929	181	FDLNIGSAY	0.896
74	TLNVLITL	0.941	182	RPSLPCRSF	0.921
75	TTAAVYILK	0.918	183	VFVISGSHLF	0.936
76	VQSGVPSRF	0.946	184	VVHGGMSIF	0.953
77	YPDVPiGQL	0.983	185	MPAFLSRASAL	0.899
78	TPSHSTPSF	0.936	186	SQIKSPVVF	0.970
79	SLFRLSISF	0.908	187	RLCPAAPTgK	0.926
80	IFDLSDPRF	0.944	188	KLPFFTNFL	0.951
81	KLIAGLIFLK	0.977	189	IWRALGS�F	0.920
82	VLQSLQHEL	0.891	190	STQSSLLYLK	0.964
83	EAAPNIMHY	0.981	191	APLLPGPAA	0.944
84	KEFAFLEHSL	0.877	192	IPLHFSTAF	0.951
85	LPHPVNSGL	0.939	193	ILQLITVNR	0.955
86	VANDRLSFL	0.876	194	VLYPSHSSF	0.967
87	LHLNPGLSF	0.880	195	AWNESSAWLL	0.956
88	KVGAVVHLK	0.948	196	NSENLLVY	0.873
89	SPSSPLLLLA	0.911	197	HHTQLVFVF	0.943
90	LALLGAPPPK	0.929	198	MTYQQPFsNR	0.959

91	RIVTYIVAK	0.972	199	RAPLPLLLL	0.962
92	LNFSDVFLY	0.890	200	GLLGTLRVL	0.945
93	SPIGLSLIL	0.941	201	VWILQKVNLA	0.960
94	AVFLGNPSNQK	0.916	202	KLLLLSSVK	0.884
95	YAFRNQTL	0.932	203	AILVPQPPK	0.961
96	HPRESLNMLVAF	0.967	204	VVRASSGLK	0.984
97	ALIVLHLSL	0.884	205	SLIPIVPFKS	0.949
98	FSEIFQDFL	0.937	206	VEGVHVFVQLL	0.904
99	RADEEQASF	0.966	207	LPALLRSL	0.936
100	SPAPSLARFLSL	0.955	208	YVGPTRLEL	0.904
101	ATNSFLLIK	0.937	209	AILLPQLPK	0.976
102	FLLLEKGGEL	0.888	210	ASRIQVILL	0.976
103	RPWLSSPTGL	0.958	211	VVTIVMHIYK	0.940
104	GSLQTLPPK	0.915	212	WETRLHNLW	0.903
105	LVFESVVAA	0.937	213	TLLSFKTVLFLK	0.956
106	GLLDAFLRL	0.980	214	RPSPVRVAAL	0.874
107	SVISVLTPPK	0.893	215	TPLTRTTL	0.962
108	SLQESLPNA	0.918	216	ILRTVLPSL	0.983

【0393】 為了進一步驗證，使用 SIL 內標肽對肽進行 CoElution 實驗。為此，將 SIL 肽加標至樣本的 HLA 肽組提取物中，並進行液相色譜-靶向質譜 (LC-MS) 分析，以根據光譜相似性以及滯留時間維度的 CoElution 確認肽同一性。如有必要，根據肽特定的電離因子（在校準曲線中確定）調整加標的 SIL 肽量。LC-MS 使用預定義的靶向 MS2 掃描事件進行，SIL 肽和天然肽種類的分離窗不重疊，以避免共片段化。為了確認同位素純度以及不存在 SIL 肽和天然肽的共片段化，在含有胰蛋白酶基質的非 HLA 肽中進行了對照實驗，必須確認不存在任何未標記信號。CoElution 的肽檢測和驗證透過人工專家審查確定，其基於多個預定義的客觀標準，包括 SIL 肽與未標記肽 MS2 跡線相比的點積 (dotP)、多次連續掃描中存在最強烈躍遷以及對齊峰頂點。透過 CoElution 驗證的肽列表如表 11 所示。

[表 11] CoElution 實驗結果為陽性的肽。

SEQ ID NO.	序列	SEQ ID NO.	序列
1	AILAPPAILK	103	RPWLSSPTGL

2	GTVFVLLSK	107	SVISVLTPPK
3	VYIASSFKI	109	MPKLFLTAC
4	IQAPALLKV	110	APSLARFLSL
5	METADRPEW	113	ALGPMAFRV
10	ILMILQPQL	114	VPHHLLSSV
11	TEIGTVIKLF	115	LWEEKPVCL
12	RLQEGLAAL	116	IYLTKSNLVNM
13	LYDTVTHTF	122	FTQKINSTW
14	ILAPPQRISF	123	TYLESSVRI
16	NFHTLAQQLF	124	SPSSNSREL
17	MVNWSLTNK	127	TVATQVATSK
18	SLSKLVATV	128	MTFVPLLAR
19	RILEVVRQPK	132	LYLETRSEF
20	ILAPPAILK	134	MPCTTILRI
21	MLSAQFILK	135	SADTAELLL
22	RVIEVVMNSK	138	RTLPLEGSPK
23	AETKQFWSA	139	EEGRIITKW
24	LIYIPTNSIYK	143	AVLGALLRH
25	GVCSTLTIK	144	IIVPSFYK
28	ATLQAVTLYKK	145	HLFSVLSAI
29	GTFIAPVMK	146	KVLVDFLK
31	VFLLLPYPRF	147	VEAPHLPSF
32	TAMTTLMAF	148	SVYMATTLK
33	AYIPFPPLI	149	SMNSKALRWK
34	LLFKGLMWK	152	KIMEILNLK
35	SLATAISAK	158	FQLSGPVTF
36	KEIEAQEAA	169	RPQGVGPAA
38	AVVSHFILY	173	IFTGRNAYF
39	RELGVGIAL	177	SYLKDHLSL
41	APQPRSLAA	179	MIFSGVFLR
44	SLFPYFLNK	180	QYLTYYPSTF
50	KTIDLIVIR	182	RPSLPCRSTF
53	TTLENLPQK	185	MPAFLSRASAL
58	REQLDGATL	186	SQIKSPVVF
68	TVDKGELLY	188	KLPFFTNFL
69	KYPTIICGF	192	IPLHFSTAF
70	LIAGLIFLK	193	ILQLITVNR
80	IFDLS DPRF	198	MTYQQPFSTNR
81	KLIAGLIFLK	203	AILVPQPPK
84	KEFAFLEHSL	204	VVRASSGLK
88	KVGAVVHLK	212	WETRLHNLW
91	RIVTYIVAK	213	TLLSFKTVLTK
94	AVFLGNPSNQK	214	RPSPVRVAAL

【0394】 實施例 4

【0395】 MHC I 類提呈肽的體外免疫原性

【0396】 為了獲得關於本發明 TUMAP 的免疫原性資訊，本發明使用體外 T 細胞促發分析方法進行了研究，其中該分析方法基於使用裝載肽/MHC 複合體和抗 CD28 抗體的人工抗原提呈細胞 (aAPC) 進行 CD8+ T 細胞的反覆刺激。用這種方法，可證明本發明的 MHC I 類限制性 TUMAP 具有免疫原性，這表明這些肽為針對存在人類中之 CD8+ 前體 T 細胞的 T 細胞表位（表 12A 至 12E）。

【0397】 CD8+ T 細胞的體外促發

【0398】 為了用載有肽-MHC複合體 (pMHC) 和抗 CD28 抗體的人工抗原提呈細胞進行體外刺激，本發明首先透過使用CD8 微珠 (Miltenyi Biotec，貝吉施格拉德巴赫，德國) 的正向選擇，從在知情同意之後獲得自德國 University clinics Mannheim的健康供體的新鮮HLA-A*02、HLA-A*03、HLA-A*24、HLA-B*07 或 HLA-B*44 白血球分離術產物中分離出 CD8+ T 細胞。

【0399】 PBMC 和分離出的 CD8+ 淋巴細胞使用前在 T 細胞培養基 (TCM) 中培養，培養基包括 RPMI-Glutamax (Invitrogen 公司，卡爾斯魯爾，德國) 並補充 10% 熱滅活人類 AB 血清 (PAN-Biotech 公司，艾登巴赫，德國)、100 U/ml 青黴素/100 µg/ml 鏈黴素 (Cambrex 公司，科隆，德國)、1 mM 丙酮酸鈉 (CC Pro公司，上多爾拉，德國)、和20 µg/ml 慶大黴素 (Cambrex 公司)。在此步驟，2.5 ng/ml 的 IL-7 (PromoCell公司，海德堡，德國)和 10 U/ml 的 IL-2 (Novartis Pharma 公司，紐倫堡，德國) 也加入 TCM 中。

【0400】 對於 pMHC/抗-CD28 塗層珠的生成、T 細胞的刺激和讀出係在高度限定的體外系統中進行，每種刺激條件使用四個不同的 pMHC 分子以及每個讀出條件使用 8 個不同的 pMHC 分子。

【0401】純化的共刺激小鼠 IgG2a 抗人類 CD28 抗體 9.3 (參見「Jung et al., 1987」), 其使用製造商 (Perbio公司, 波恩, 德國) 推薦的硫基-N-羥基琥珀鹽亞胺生物素進行化學生物素化處理。所用珠為直徑 5.6 μm 塗覆有鏈黴親和素的多聚苯乙烯顆粒 (Bangs Laboratories, 伊利諾州, 美國)。

【0402】用於陽性和陰性對照刺激物的 pMHC 分別為 A*02:01/MLA-001 (從 Melan-A/MART-1 中修飾製得的肽 ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 217)) 和 A*02:01/DDX5-001 (從 DDX5 中獲得的 YLLPAIVHI (SEQ ID NO: 218))。

【0403】800,000 珠/200 μl 塗覆於含有 4 x 12.5 ng 不同生物素-pMHC 的 96 孔板, 進行洗滌, 隨後加入體積為 200 μl 的 600 ng 生物素抗-CD28。在 37°C 下, 在含 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) 的 200 μl TCM 中共培養 1×10^6 個 CD8+T 細胞與 2×10^5 個清洗塗層珠 3 天, 從而在 96 孔板中啟動刺激。之後, 以含有 80 U/ml IL-2 的新鮮 TCM 更換一半培養基, 並且在 37°C 下持續培養 4 天。這種刺激週期總共進行 3 次。對於每種條件使用 8 種不同 pMHC 分子的 pMHC 多聚體讀出, 二維組合編碼方法如前述使用 (參見「Andersen et al., 2012」), 稍作修飾, 涵蓋耦合至 5 種不同的螢光染料。最後, 通過用 Live/dead near IR 染料 (Invitrogen 公司, 卡爾斯魯爾, 德國)、CD8-FITC 抗體克隆 SK1 (BD 公司, 海德堡, 德國) 和螢光 pMHC 多聚體染色細胞而執行多聚體分析。使用配有合適雷射儀和過濾器的 BD LSRII SORP 細胞儀進行分析。肽特異性細胞以佔總 CD8+ 細胞的百分比形式進行計算。多聚體分析結果使用 FlowJo 軟體 (Tree Star 公司, 奧勒岡州, 美國) 進行評估。特異性多聚體+ CD8+ 淋巴細胞的體外促發使用與陰性對照刺激組比較而進行檢測。如果一個健康供體中的至少一個可評估的體外刺激孔在體外刺激後發現含有特異性 CD8+ T 細胞株 (即該孔包含至少 1% 特異性多聚體+ CD8+ T 細胞, 並且特異性多聚體+ 細胞的百分比至少為陰性對照刺激組的中位數的 10 倍), 則檢測到給定抗原的免疫原性。

第108頁, 共 122 頁(發明說明書)

【0404】 體外免疫原性

【0405】 對於受到測試的 HLA-I 類肽，可透過肽特異性 T 細胞株的生成證明其體外免疫原性。對本發明的 5 種肽進行TUMAP 特異性多聚體染色後的示例性流式細胞儀檢測的結果如圖 5 所示，同時也含有相應的陰性對照組資訊。本發明 33 種肽的結果匯總於表 12A 至 12E。

[表 12A] 本發明 HLA-A*02肽的體外免疫原性。對本發明的 HLA-A*02 限制肽所做的體外免疫原性實驗的示例性結果。提示了體外免疫原性實驗的結果。陽性孔和供體（於可評估中）的百分比概括為 <20 % = +；20 % - 49 % = ++；50 % - 69 % = +++；>= 70 % = ++++

SEQ ID NO.	序列	陽性孔 [%]
4	IQAPALLKV	++
10	ILMILQPQL	+
12	RLQEGLAAL	+
18	SLSKLVATV	+
113	ALGPMAFRV	++
188	KLPFTNFL	+

[表 12B] 本發明 HLA-A*03 肽的體外免疫原性。對本發明的 HLA-A*03 限制肽所做的體外免疫原性實驗的示例性結果。提示了體外免疫原性實驗的結果。陽性孔和供體（於可評估中）的百分比概括為 <20 % = +；20 % - 49 % = ++；50 % - 69 % = +++；>= 70 % = ++++

SEQ ID NO.	序列	陽性孔 [%]
1	AILAPPAILK	+
2	GTVFVLLSK	+
17	MVNWSLTNK	++++
20	ILAPPAILK	++
21	MLSAQFILK	+
22	RVIEVVMNSK	+
25	GVCSTLTIK	+
38	AVVSHFILY	+

SEQ ID NO.	序列	陽性孔 [%]
50	KTIDLVIVR	+
91	RIVTYIVAK	+
94	AVFLGNPSNQK	+
128	MTFVPLLAR	+
146	KVLVDFLK	+
148	SVYMATTLK	+
149	SMNSKALRWK	++

[表 12C] 本發明 HLA-A*24 肽的體外免疫原性。對本發明的 HLA-A*24 限制肽所做的體外免疫原性實驗的示例性結果。提示了體外免疫原性實驗的結果。陽性孔和供體（於可評估中）的百分比概括為 <20 % = + ； 20 % - 49 % = ++ ； 50 % - 69 % = +++ ； >= 70 % = ++++

SEQ ID NO.	序列	陽性孔 [%]
3	VYIASSFKI	+
16	NFHTLAQQLLF	+
31	VFLLLPYPRF	+++
33	AYIPFPPLI	++
116	IYLTKSNLVNM	+
123	TYLESSVRI	++
132	LYLETRSEF	+
180	QYLTYYPSF	+

[表 12D] 本發明 HLA-B*07 肽的體外免疫原性。對本發明的 HLA-B*07 限制肽所做的體外免疫原性實驗的示例性結果。提示了體外免疫原性實驗的結果。陽性孔和供體（於可評估中）的百分比概括為 <20 % = + ； 20 % - 49 % = ++ ； 50 % - 69 % = +++ ； >= 70 % = ++++

SEQ ID NO.	序列	陽性孔 [%]
41	APQPRSLAA	+
109	MPKLFLTAC	+
110	APSLARFLSL	++++
114	VPHHLLSSV	+

SEQ ID NO.	序列	陽性孔 [%]
124	SPSSNSREL	+
134	MPCTTILRI	+
169	RPQGVGPAA	++
182	RPSLPCRSF	++
185	MPAFLSRASAL	++
214	RPSPVRVAAL	+

[表 12E] 本發明 HLA-B*44 肽的體外免疫原性。對本發明的 HLA-B*44 限制肽所做的體外免疫原性實驗的示例性結果。提示了體外免疫原性實驗的結果。陽性孔和供體（於可評估中）的百分比概括為 <20 % = +；20 % - 49 % = ++；50 % - 69 % = +++；>= 70 % = ++++

SEQ ID NO.	序列	陽性孔 [%]
5	METADRPEW	+
11	TEIGTVIKLF	++
39	RELGVGIAL	+
212	WETRLHNLW	++

【0406】 實施例 5

【0407】 MHC 結合測定

【0408】 本發明基於 T 細胞療法的候選肽進一步測試其 MHC 結合能力（親和性）。單個肽-MHC 複合體透過 UV-配體交換產生，其中，UV敏感肽經 UV照射後裂解，並與分析的目標肽交換。只有能夠有效地結合並穩定肽接受 MHC 分子的候選肽才能阻止 MHC 複合體的解離。為了確定交換反應的產率，將基於穩定 MHC 複合體的輕鏈 (β2m) 的檢測進行 ELISA 測定。測定總體上按照 Rodenko 等人 (參見「Rodenko et al., 2006」) 描述的方法進行。

【0409】 96 孔 Maxisorp 板 (NUNC) 於室溫下在含有 2 μg/ml 鏈黴親和素的 PBS 中塗覆過夜，洗滌 4 次，並在 37°C 下在含 2% BSA 的封閉緩衝液中封閉 1 小時。再折疊的 HLA-A*02:01/MLA-001 單體作為標準品，涵蓋 15-500 ng/ml 的範

圍。UV交換反應的肽-MHC 單體在封閉緩衝液中稀釋 100 倍。樣本在 37°C 下培養 1 小時，洗滌四次，在 37°C 下以 2 µg/ml HRP 偶合抗-β2m 培養 1 小時，再次洗滌，並以 NH₂SO₄ 終止的 TMB 溶液進行檢測。在 450 nm 處測量吸收。在生成和產生抗體或其片段、和/或 T 細胞受體或其片段時，通常優選為顯示高交換產率（優選為高於 50%，最優選為高於 75%）的候選肽，這是因為它們對 MHC 分子表現出足夠的親合力，並能防止 MHC 複合體的解離。

【0410】 來自本發明的 208 種肽的 MHC-肽結合結果匯總於表 13A 至 13G 中。

[表 13A] MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-A*01:01 的結合根據肽交換產率分類： ≥10% = +； ≥20% = ++； ≥50% = +++； ≥75% = ++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
26	ETNTIEFIY	++++
54	ASSPVILLL	++
56	DVDIHKDLY	++++
60	VSPDEVLALW	++
65	NSDLFYLLL	++++
68	TVDKGELLY	++++
71	LIDSLLLLL	+++
83	EAAPNIMHY	++
92	LNFSDEVFLY	++
98	FSEIFQDFL	+++
99	RADEEQASF	++
122	FTQKINSTW	++
135	SADTAELLL	++
136	YSSEIWDLY	++++
171	NVSFEVSLLY	++++
196	NSENLLVY	+++

[表 13B] MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-A*02:01 的結合根據肽交換產率分類： ≥10% = +； ≥20% = ++； ≥50% = +++； ≥75% = ++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
------------	----	-----

SEQ ID NO.	序列	肽交換
4	IQAPALLKV	++++
9	LLGVVSHSV	++++
10	ILMILQPQL	++++
12	RLQEGLAAL	++++
18	SLSKLVATV	++++
30	SLKSSILFL	+++
42	LLSRGILIL	++++
45	SLFPISLTV	++++
57	IIDRILL	++++
74	TLNVLITL	++
82	VLQSLQHEL	++++
97	ALIVLHLSL	++
102	FLLLEKGGEL	++++
105	LVFESVAA	++++
106	GLLDAFLRL	++++
108	SLQESLPNA	+++
113	ALGPMAFRV	++++
118	RLLRLIPIL	++++
121	ILVTAWKGV	+++
130	ITPDSIPSV	+++
142	YMLEMDNSMKI	++++
145	HLFSVLSAI	++++
153	ALNLSRLTV	++++
167	FALGPIIKQL	+++
170	LLDSWNILI	++++
188	KLPFFTNFL	++++
200	GLLGTLRVL	++++

[表 13C] MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-A*03:01 的結合根據肽交換產率分類： ≥10% = + ； ≥20% = ++ ； ≥50% = +++ ； ≥75% = ++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
1	AILAPPAILK	++++
2	GTVFVLLSK	++
8	VIYNQTLMK	++++
17	MVNWSLTNK	++++
19	RILEVVRQPK	++++
20	ILAPPAILK	++++
21	MLSAQFILK	++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
22	RVIEVVMNSK	++++
24	LIYIPTNSIYK	++++
25	GVCSTLTIK	++++
28	ATLQAVTLYKK	++++
29	GTFIAPVMK	++++
34	LLFKGLMWK	++++
35	SLATAISAK	+++
37	RLYSGSSFLY	++++
38	AVVSHFILY	+++
44	SLFPYFLNK	++++
50	KTIDLVIVR	++++
51	SVFSLVHLFDK	++++
53	TTLENLPQK	+++
70	LIAGLIFLK	+++
72	GSCSFALSR	++++
75	TTAAVYILK	+++
81	KLIAGLIFLK	+++
88	KVGAVVHLK	+++
90	LALLGAPPPK	++
91	RIVTYIVAK	+++
94	AVFLGNPSNQK	++++
101	ATNSFLLIK	++++
104	GSLQTLPPK	+++
107	SVISVLTTPK	++++
112	ETYGTFVLR	+++
125	ALAQGANLK	+++
127	TVATQVATSK	+++
128	MTFVPLLAR	++++
138	RTLPLEGSPK	+++
143	AVLGALLRH	++++
144	IIVPSFYK	+++
146	KVLVDFLK	+++
148	SVYMATTLK	++++
149	SMNSKALRWK	+++
150	IVFLLQQGEK	+++
151	AVFVNWEQTKK	++++
152	KIMEILNLK	++++
154	TVTSAIVNR	+++
159	ASAIPAGAK	+++
161	ILAASFQAR	+++
166	VIFLHQPPK	++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
174	LSGPVTFLR	+++
178	SLFGGLFTR	++++
179	MIFSGVFLR	++++
187	RLCPAAPTGK	++++
190	STQSSLLYLK	+++
193	ILQLITVNR	+++
198	MTYQQPFSNR	++++
202	KLLLLSSVK	+++
203	AILVPQPPK	+++
204	VVRASSGLK	+++
205	SLIIVPFKS	++
209	AILLPQLPK	++++
213	TLLSFKTVLFK	++++

[表 13D] MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-A*24:02 的結合根據肽交換產率分類：≥10% = +；≥20% = ++；≥50% = +++；≥75% = ++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
3	VYIASSFKI	++++
6	SHSLPAFTL	++
7	IYIPTNSIYKF	++++
13	LYDTVTHTF	++++
14	ILAPPQRISF	++++
16	NFHTLAQQLLF	++++
31	VFLLLPYPRF	++++
33	AYIPFPPLI	++++
40	LYQTTIELF	++++
43	VFIPSVINL	++++
47	LYIFTTRPF	++++
49	IYFHLNNWTI	++++
62	SFSLLLPYL	+++
67	GRFWLPFNF	++
69	KYPTIICGF	++++
76	VQSGVPSRF	++
80	IFDLS DPRF	++
87	LHLNPGLSF	++
115	LWEEKPVCL	++
116	IYLTKSNLVNM	++++
123	TYLESSVRI	++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
132	LYLETRSEF	++++
133	KFPPSASEF	++++
158	FQLSGPVTF	++
160	EYLGSENVF	+++
163	LWALAIPSL	+++
164	SHSSPTVSF	++
165	FYNPRPPLI	++++
173	IFTGRNAYF	++++
177	SYLKDHLSL	++++
180	QYLTYYPSTF	++++
183	VFVISGSHLF	++++
186	SQIKSPVVF	+
189	IWRALGSLF	++++
194	VLYPSHSSF	++
195	AWNESSAWLL	++++
201	VWILQKVNLA	+++

[表 13E] MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-B*07:02 的結合根據肽交換產率分類： ≥10% = + ； ≥20% = ++ ； ≥50% = +++ ； ≥75% = ++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
15	SPVETRSL	+++
41	APQPRSLAA	++++
52	SPLPHLGPL	+++
55	SPVSASWIL	++++
59	AVDLGVLEL	+++
63	MPANFETIGF	++++
64	LPTRSLPAF	+++
66	RPLILIRI	++
77	YPDVPIGQL	+++
78	TPSHSTPSF	+++
85	LPHPVNSGL	+++
89	SPSSPLLLA	+++
93	SPIGLSLIL	++++
96	HPRESLNMLVAF	++++
100	SPAPSLARFLSL	++++
103	RPWLSSPTGL	++++
109	MPKLFLTAC	++++
110	APSLARFLSL	++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
111	RPIWDVRS	++++
114	VPHLLSSV	++++
120	APGPRSQGL	+++
124	SPSSNSREL	+++
126	NPELLVILL	+++
129	IPISIFKMA	+++
134	MPCTTILRI	++++
137	MPIQVLKGL	++++
140	QPAPQPLL	+++
155	MPWVLMSPF	++++
156	SLRVSPAL	+++
157	APLRAGWAA	++++
162	LPVHGPLPLL	+++
169	RPQGVGPAA	++++
175	MPFLKVPPL	++++
182	RPSLPCRSF	+++
184	VVHGGMSIF	++
185	MPAFLSRASAL	++++
191	APLLPGPAA	++++
192	IPLHFSTAF	++++
199	RAPLPLLLL	+++
207	LPALLRSL	++++
208	YVGPTRLEL	++++
210	ASRIQVILL	+++
214	RPSPVRVAAL	++++
215	TPLTRTTL	+++

[表 13F] MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-B*08:01 的結合根據肽交換產率分類： ≥10% = +； ≥20% = ++； ≥50% = +++； ≥75% = ++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
32	TAMTTLMAF	+++
73	NQKGLISL	+++
86	VANDRLSFL	+++
95	YAFRNQTL	+++
131	TILAKQNVL	+++
216	ILRTVLPSL	+++

[表 13G] MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-B*44:05 的結合根據肽交換產率分類：≥10% = +；≥20% = ++；≥50% = +++；≥75% = ++++

SEQ ID NO.	序列	肽交換
5	METADRPEW	++++
11	TEIGTVIKLF	++++
23	AETKQFWSA	++++
27	SQAKQITIW	++++
36	KEIEAQEAA	++++
39	RELGVGIAL	++++
48	TEMSVSALY	++++
58	REQLDGATL	++++
84	KEFAFLEHSL	++++
117	GEAAAARPV	+++
139	EEGRIITKW	++++
141	REVAGASAL	+++
147	VEAPHLPSF	++++
168	AEGPDHHS�	++++
181	FDLNIGSAY	++++
206	VEGVHFVQLL	++++
212	WETRLHNLW	++++

【0411】 參考文獻列表

【0412】 Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. 11 (2011): 124.

【0413】 Allison, J. P. et al., Science 270 (1995): 932-933.

【0414】 Andersen, R. S. et al., Nat Protoc. 7 (2012): 891-902.

【0415】 Appay, V. et al., Eur.J Immunol. 36 (2006): 1805-1814.

【0416】 Balbás R and Lorence A. “Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols” (2004).

【0417】 Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001): 271-274.

【0418】 Banker, G. and Rhodes, C. “Modern Pharmaceutics”, CRC Press (2002).

【0419】 Beggs, J. D. et al., Nature 275 (1978): 104-109.

【0420】 Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995): 289-300.

【0421】 Berge, S. M. et al., Journal of Pharmaceutical Science 66 (1977):1-19.

【0422】 Better, M. et al., Science 240 (1988): 1041-1043.

【0423】 Boulianne, G. L. et al. Nature 312 (1984):643-646.

【0424】 Boulter, J. M. et al., Protein Eng 16 (2003): 707-711.

【0425】 Brossart, P. et al., Blood 90 (1997): 1594-1599.

【0426】 Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004): 29-43.

【0427】 Cabilly, S. et al. Proc Natl Acad Sci 81 (1984): 3273-3277.

【0428】 Card, K. F. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004): 345-357.

【0429】 Cohen, C. J. et al., J Immunol. 170 (2003b): 4349-4361.

【0430】 Cohen, C. J. et al., J Mol.Recognit. 16 (2003a): 324-332.

【0431】 Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69 (1972): 2110-2114.

【0432】 Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995).

【0433】 Colombetti, S. et al., J Immunol. 176 (2006): 2730-2738

【0434】 Dayhoff, M. O. et al. „The Atlas of Protein Sequence and Structure” Natl Biomedical Research (1965).

【0435】 Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006): 4163-4170.

【0436】 Denkberg, G. et al., J Immunol. 171 (2003): 2197-2207.

【0437】 Falk, K. et al., Nature 351 (1991): 290-296.

【0438】 Follenzi, A. et al., Nat Genet. 25 (2000): 217-222.

【0439】 Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98 (2001): 8809-8814.

【0440】 Forsey, R. W. et al., Biotechnol.Lett. 31 (2009): 819-823.

【0441】 Gabrilovich, D. I. et al., Nat.Med 2 (1996): 1096-1103.

第119頁，共 122 頁(發明說明書)

- 【0442】 Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. 6 (2006): 383-393.
- 【0443】 Gennaro, A. “Remington’s: The Science and Practice of Pharmacy”, Lippincott Williams & Wilkins (1997).
- 【0444】 Gilliland, D. G. et al., Proc Natl Acad Sci 77 (1980): 4539
- 【0445】 Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th (2012).
- 【0446】 Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual 2nd (2014).
- 【0447】 Guo, H. H. et al., Proc Natl Acad Sci 101 (25): 9205-9210 (2004).
- 【0448】 Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. 22 (2004): 346-353.
- 【0449】 Harlow, E. & Lane, D. “Using Antibodies - A laboratory manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).
- 【0450】 Holliger, P. et al. Proc Natl Acad Sci, 90 (1993): 6444-6448.
- 【0451】 Howard, G. C. & Kaser, M. R. “Making and Using antibodies: A practical handbook”, CRC Press (2007).
- 【0452】 Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 84 (1987): 4611-4615.
- 【0453】 Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients rd (2000).
- 【0454】 Krieg, A. M., Nat.Rev.Drug Discov. 5 (2006): 471-484.
- 【0455】 Krolick, K. A. et al., Proc Nat’l Acad Sci 77 (1980): 5419.
- 【0456】 Kuball, J. et al., Blood 109 (2007): 2331-2338.
- 【0457】 Liddy, N. et al., Nat.Med. 18 (2012): 980-987.
- 【0458】 Liu, et al., Proc Natl Acad Sci 84 (1987):3439-3443
- 【0459】 Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med 162 (1985): 1745-1759.
- 【0460】 Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. 690 (1993): 276-291
- 【0461】 Lonsdale, J., Nat.Genet. 45 (2013): 580-585

- 【0462】 Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78 (1981): 2791-2795
- 【0463】 Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification 3rd
(2004)
- 【0464】 Meziere, C. et al., J Immunol 159 (1997): 3230-3237.
- 【0465】 Mondon R et al Front BioSci 13 (2008):1117-1129, 1008.
- 【0466】 Morgan, R. A. et al., Science 314 (2006): 126-129.
- 【0467】 Morrison S. L. et al., Proc Natl Acad Sci (1984): 6851-6855.
- 【0468】 Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res. 7 (2008): 51-61.
- 【0469】 Mueller, L. N. et al., Proteomics. 7 (2007): 3470-3480.
- 【0470】 Olexiouk, V. et al., Nucleic Acids Res 44 (2016): D324-D329.
- 【0471】 Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models
(CRAN.R-project.org/packge=nlme) (2015)
- 【0472】 Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol 25 (1995): 1783-1787.
- 【0473】 Porta, C. et al., Virology 202 (1994): 949-955.
- 【0474】 Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics 50 (1999): 213-219
- 【0475】 Rini, B. I. et al., Cancer 107 (2006): 67-74.
- 【0476】 Rock, K. L. et al., Science 249 (1990): 918-921.
- 【0477】 Rodenko, B. et al., Nat Protoc. 1 (2006): 1120-1132.
- 【0478】 Russell, S. J. et al., Nucl Acids Res 21 (1993):1081-1085.
- 【0479】 Saiki, R. K. et al., Science 239 (1988): 487-491
- 【0480】 Schmitt, T. M. et al., Hum.Gene Ther. 20 (2009): 1240-1248.
- 【0481】 Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. 119 (2006): 135-145.
- 【0482】 Seeger, F. H. et al., Immunogenetics 49 (1999): 571-576.

【0483】 Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986).

【0484】 Silva, L. P. et al., Anal.Chem. 85 (2013): 9536-9542.

【0485】 Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004): 187-195.

【0486】 Small, E. J. et al., J Clin Oncol. 24 (2006): 3089-3094.

【0487】 Sternberg, N. et al. Proc Natl Acad Sci 92 (1995): 1609-1613.

【0488】 Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. 9 (2008): 163.

【0489】 Subramanian, R. P. et al., Retrovirology. 8 (2011): 90.

【0490】 Sun, L. K. et al., Proc Natl Acad Sci 84 (1987): 214-218.

【0491】 Teufel, R. et al., Cell Mol.Life Sci. 62 (2005): 1755-1762.

【0492】 Traunecker, A. et al., EMBO 10 (1991): 3655-3659.

【0493】 Walter, S. et al., J.Immunol. 171 (2003): 4974-4978.

【0494】 Walter, S. et al., Nat Med. 18 (2012): 1254-1261.

【0495】 Willcox, B. E. et al., Protein Sci. 8 (1999): 2418-2423.

【0496】 Youle, R. J. et al., Proc Natl Acad Sci 77 (1980): 5483-5486.

【0497】 Zaremba, S. et al., Cancer Res. 57 (1997): 4570-4577.

【0498】 Zufferey, R. et al., J Virol. 73 (1999): 2886-2892.

【符號說明】

【0499】

無

序列表

<110> 德商英麥提克生物技術股份有限公司(Immatics Biotechnologies GmbH)

<120> 用於不同類型癌症免疫治療的 HLA 展示肽

<130> P223US01, 2912919-106001

<150> US 63/137,985

<151> 2021-01-15

<160> 218

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Ile Leu Ala Pro Pro Ala Ile Leu Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Thr Val Phe Val Leu Leu Ser Lys
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Tyr Ile Ala Ser Ser Phe Lys Ile
1 5

<210> 4

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Gln Ala Pro Ala Leu Leu Lys Val
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Glu Thr Ala Asp Arg Pro Glu Trp
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser His Ser Leu Pro Ala Phe Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Tyr Ile Pro Thr Asn Ser Ile Tyr Lys Phe
1 5 10

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Ile Tyr Asn Gln Thr Leu Met Lys
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Leu Gly Val Val Ser His Ser Val
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Leu Met Ile Leu Gln Pro Gln Leu
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Thr Glu Ile Gly Thr Val Ile Lys Leu Phe
1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Leu Gln Glu Gly Leu Ala Ala Leu
1 5

<210> 13
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Tyr Asp Thr Val Thr His Thr Phe
1 5

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ile Leu Ala Pro Pro Gln Arg Ile Ser Phe
1 5 10

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Pro Val Glu Thr Arg Ser Leu Leu
1 5

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Asn Phe His Thr Leu Ala Gln Gln Leu Leu Phe
1 5 10

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Val Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys

15

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Leu Ser Lys Leu Val Ala Thr Val
15

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Ile Leu Glu Val Val Arg Gln Pro Lys
1510

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Ile Leu Ala Pro Pro Ala Ile Leu Lys
15

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Leu Ser Ala Gln Phe Ile Leu Lys
15

<210> 22
<211> 10
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Val Ile Glu Val Val Met Asn Ser Lys
1 5 10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Glu Thr Lys Gln Phe Trp Ser Ala
1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Leu Ile Tyr Ile Pro Thr Asn Ser Ile Tyr Lys
1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Gly Val Cys Ser Thr Leu Thr Ile Lys
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Thr Asn Thr Ile Glu Phe Ile Tyr
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Ser Gln Ala Lys Gln Ile Thr Ile Trp
1 5

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Thr Leu Gln Ala Val Thr Leu Tyr Lys Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Gly Thr Phe Ile Ala Pro Val Met Lys
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Leu Lys Ser Ser Ile Leu Phe Leu
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Phe Leu Leu Leu Pro Tyr Pro Arg Phe
1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Thr Ala Met Thr Thr Leu Met Ala Phe
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Tyr Ile Pro Phe Pro Pro Leu Ile
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Leu Leu Phe Lys Gly Leu Met Trp Lys
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ser Leu Ala Thr Ala Ile Ser Ala Lys
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Lys Glu Ile Glu Ala Gln Glu Ala Ala
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Arg Leu Tyr Ser Gly Ser Ser Phe Leu Tyr
1 5 10

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Ala Val Val Ser His Phe Ile Leu Tyr
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Glu Leu Gly Val Gly Ile Ala Leu
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Leu Tyr Gln Thr Thr Ile Glu Leu Phe
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ala Pro Gln Pro Arg Ser Leu Ala Ala
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Leu Leu Ser Arg Gly Ile Leu Ile Leu
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Val Phe Ile Pro Ser Val Ile Asn Leu
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ser Leu Phe Pro Tyr Phe Leu Asn Lys
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Ser Leu Phe Pro Ile Ser Leu Thr Val
1 5

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Glu Ser Ile Tyr Leu Leu Val Arg Lys Trp
1 5 10

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Leu Tyr Ile Phe Thr Thr Arg Pro Phe
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Thr Glu Met Ser Val Ser Ala Leu Tyr
1 5

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Ile Tyr Phe His Leu Asn Asn Trp Thr Ile
1 5 10

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Lys Thr Ile Asp Leu Val Ile Val Arg
1 5

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Ser Val Phe Ser Leu Val His Leu Phe Asp Lys
1 5 10

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Ser Pro Leu Pro His Leu Gly Pro Leu
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Thr Thr Leu Glu Asn Leu Pro Gln Lys
1 5

<210> 54

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Ser Ser Pro Val Ile Leu Leu Leu
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Ser Pro Val Ser Ala Ser Trp Ile Leu
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Val Asp Ile His Lys Asp Leu Tyr
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Ile Ile Ile Asp Arg Ile Leu Leu Leu
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Arg Glu Gln Leu Asp Gly Ala Thr Leu
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Ala Val Asp Leu Gly Val Leu Glu Leu
1 5

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Ser Pro Asp Glu Val Leu Ala Leu Trp
1 5 10

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Gly Leu Ile Ala Phe Ala Ile Phe Lys
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser Phe Ser Leu Leu Leu Pro Tyr Leu
1 5

<210> 63
<211> 10

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Met Pro Ala Asn Phe Glu Thr Ile Gly Phe
1 5 10

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Pro Thr Arg Ser Leu Pro Ala Phe
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Leu Leu Leu
1 5

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Arg Pro Leu Ile Leu Ile Arg Ile
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Gly Arg Phe Trp Leu Pro Phe Asn Phe

15

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Thr Val Asp Lys Gly Glu Leu Leu Tyr
15

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Lys Tyr Pro Thr Ile Ile Cys Gly Phe
15

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Leu Ile Ala Gly Leu Ile Phe Leu Lys
15

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Leu Ile Asp Ser Leu Leu Leu Leu Leu
15

<210> 72
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Ser Cys Ser Phe Ala Leu Ser Arg
1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Asn Gln Lys Gly Leu Ile Ser Leu
1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Thr Leu Asn Val Leu Ile Thr Leu
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Thr Ala Ala Val Tyr Ile Leu Lys
1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Val Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Tyr Pro Asp Val Pro Ile Gly Gln Leu
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Pro Ser His Ser Thr Pro Ser Phe
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Leu Phe Arg Leu Ser Ile Ser Phe
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

Ile Phe Asp Leu Ser Asp Pro Arg Phe
1 5

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Lys Leu Ile Ala Gly Leu Ile Phe Leu Lys
1 5 10

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Val Leu Gln Ser Leu Gln His Glu Leu
1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Glu Ala Ala Pro Asn Ile Met His Tyr
1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Lys Glu Phe Ala Phe Leu Glu His Ser Leu
1 5 10

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Leu Pro His Pro Val Asn Ser Gly Leu
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Val Ala Asn Asp Arg Leu Ser Phe Leu
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu His Leu Asn Pro Gly Leu Ser Phe
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Lys Val Gly Ala Val Val His Leu Lys
1 5

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

Ser Pro Ser Ser Pro Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

Leu Ala Leu Leu Gly Ala Pro Pro Pro Lys
1 5 10

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

Arg Ile Val Thr Tyr Ile Val Ala Lys
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

Leu Asn Phe Ser Asp Val Phe Leu Tyr
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

Ser Pro Ile Gly Leu Ser Leu Ile Leu
1 5

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

Ala Val Phe Leu Gly Asn Pro Ser Asn Gln Lys
1 5 10

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

Tyr Ala Phe Arg Asn Gln Thr Leu
1 5

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

His Pro Arg Glu Ser Leu Asn Met Leu Val Ala Phe
1 5 10

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

Ala Leu Ile Val Leu His Leu Ser Leu
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

Phe Ser Glu Ile Phe Gln Asp Phe Leu
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

Arg Ala Asp Glu Glu Gln Ala Ser Phe
1 5

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

Ser Pro Ala Pro Ser Leu Ala Arg Phe Leu Ser Leu
1 5 10

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

Ala Thr Asn Ser Phe Leu Leu Ile Lys
1 5

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102

Phe Leu Leu Leu Glu Lys Gly Gly Glu Leu
1 5 10

<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

Arg Pro Trp Leu Ser Ser Pro Thr Gly Leu
1 5 10

<210> 104

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104

Gly Ser Leu Gln Thr Leu Pro Pro Lys
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105

Leu Val Phe Glu Ser Val Val Ala Ala
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

Gly Leu Leu Asp Ala Phe Leu Arg Leu
1 5

<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Ser Val Ile Ser Val Leu Thr Thr Pro Lys
1 5 10

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108

Ser Leu Gln Glu Ser Leu Pro Asn Ala
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 109

Met Pro Lys Leu Phe Leu Thr Ala Cys
1 5

<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110

Ala Pro Ser Leu Ala Arg Phe Leu Ser Leu
1 5 10

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111

Arg Pro Ile Trp Asp Val Arg Ser Ala
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

Glu Thr Tyr Gly Thr Phe Val Leu Arg
1 5

<210> 113
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

Ala Leu Gly Pro Met Ala Phe Arg Val
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Val Pro His His Leu Leu Ser Ser Val
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115

Leu Trp Glu Glu Lys Pro Val Cys Leu
1 5

<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

Ile Tyr Leu Thr Lys Ser Asn Leu Val Asn Met
1 5 10

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 117

Gly Glu Ala Ala Ala Ala Arg Pro Val

15

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

Arg Leu Leu Arg Leu Ile Pro Ile Leu
15

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

Val Leu His Gly Leu Leu Phe Thr Leu
15

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Ala Pro Gly Pro Arg Ser Gln Gly Leu
15

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

Ile Leu Val Thr Ala Trp Lys Gly Val
15

<210> 122
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Phe Thr Gln Lys Ile Asn Ser Thr Trp
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Thr Tyr Leu Glu Ser Ser Val Arg Ile
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Ser Pro Ser Ser Asn Ser Arg Glu Leu
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Ala Leu Ala Gln Gly Ala Asn Leu Lys
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Asn Pro Glu Leu Leu Val Ile Leu Leu
1 5

<210> 127
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 127

Thr Val Ala Thr Gln Val Ala Thr Ser Lys
1 5 10

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 128

Met Thr Phe Val Pro Leu Leu Ala Arg
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 129

Ile Pro Ile Ser Ile Phe Lys Met Ala
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 130

Ile Thr Pro Asp Ser Ile Pro Ser Val
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131

Thr Ile Leu Ala Lys Gln Asn Val Leu
1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Leu Tyr Leu Glu Thr Arg Ser Glu Phe
1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Lys Phe Pro Pro Ser Ala Ser Glu Phe
1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Met Pro Cys Thr Thr Ile Leu Arg Ile
1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Ser Ala Asp Thr Ala Glu Leu Leu Leu
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136

Tyr Ser Ser Glu Ile Trp Asp Leu Tyr
1 5

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

Met Pro Ile Gln Val Leu Lys Gly Leu
1 5

<210> 138
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

Arg Thr Leu Pro Leu Glu Gly Ser Pro Lys
1 5 10

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139

Glu Glu Gly Arg Ile Ile Thr Lys Trp
1 5

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 140

Gln Pro Ala Pro Gln Pro Leu Leu
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 141

Arg Glu Val Ala Gly Ala Ser Ala Leu
1 5

<210> 142
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 142

Tyr Met Leu Glu Met Asp Asn Ser Met Lys Ile
1 5 10

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 143

Ala Val Leu Gly Ala Leu Leu Arg His
1 5

<210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 144

Ile Ile Val Pro Ser Phe Tyr Lys
1 5

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 145

His Leu Phe Ser Val Leu Ser Ala Ile
1 5

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146

Lys Val Leu Val Asp Phe Leu Leu Lys
1 5

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147

Val Glu Ala Pro His Leu Pro Ser Phe
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148

Ser Val Tyr Met Ala Thr Thr Leu Lys
1 5

<210> 149
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 149

Ser Met Asn Ser Lys Ala Leu Arg Trp Lys
1 5 10

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

Ile Val Phe Leu Leu Gln Gln Gly Glu Lys
1 5 10

<210> 151
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151

Ala Val Phe Val Asn Trp Glu Gln Thr Lys Lys
1 5 10

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 152

Lys Ile Met Glu Ile Leu Asn Leu Lys
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 153

Ala Leu Asn Leu Ser Arg Leu Thr Val
1 5

<210> 154

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 154

Thr Val Thr Ser Ala Ile Val Asn Arg
1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 155

Met Pro Trp Val Leu Met Ser Pro Phe
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 156

Ser Leu Arg Val Pro Ser Pro Ala Leu
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 157

Ala Pro Leu Arg Ala Gly Trp Ala Ala
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 158

Phe Gln Leu Ser Gly Pro Val Thr Phe
1 5

<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 159

Ala Ser Ala Ile Pro Ala Gly Ala Lys
1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 160

Glu Tyr Leu Gly Ser Glu Asn Val Phe
1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 161

Ile Leu Ala Ala Ser Phe Gln Ala Arg
1 5

<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 162

Leu Pro Val His Gly Pro Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 163
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 163

Leu Trp Ala Leu Ala Ile Pro Ser Leu
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 164

Ser His Ser Ser Pro Thr Val Ser Phe
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 165

Phe Tyr Asn Pro Arg Pro Pro Leu Ile
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 166

Val Ile Phe Leu His Gln Pro Pro Lys
1 5

<210> 167
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 167

Phe Ala Leu Gly Pro Ile Ile Lys Gln Leu

1510

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 168

Ala Glu Gly Pro Asp His His Ser Leu
15

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 169

Arg Pro Gln Gly Val Gly Pro Ala Ala
15

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 170

Leu Leu Asp Ser Trp Asn Ile Leu Ile
15

<210> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 171

Asn Val Ser Phe Glu Val Ser Leu Leu Tyr
1510

<210> 172
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 172

Leu Leu Tyr Lys Thr Leu Ile Ile Leu
1 5

<210> 173

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 173

Ile Phe Thr Gly Arg Asn Ala Tyr Phe
1 5

<210> 174

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Leu Ser Gly Pro Val Thr Phe Leu Arg
1 5

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 175

Met Pro Phe Leu Lys Val Pro Pro Leu
1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 176

Ala Phe Leu Leu Ser Leu Ile Ser Leu
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 177

Ser Tyr Leu Lys Asp His Leu Ser Leu
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 178

Ser Leu Phe Gly Gly Leu Phe Thr Arg
1 5

<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 179

Met Ile Phe Ser Gly Val Phe Leu Arg
1 5

<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 180

Gln Tyr Leu Thr Tyr Tyr Pro Ser Phe
1 5

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 181

Phe Asp Leu Asn Ile Gly Ser Ala Tyr
1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Arg Pro Ser Leu Pro Cys Arg Ser Phe
1 5

<210> 183

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

Val Phe Val Ile Ser Gly Ser His Leu Phe
1 5 10

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

Val Val His Gly Gly Met Ser Ile Phe
1 5

<210> 185

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 185

Met Pro Ala Phe Leu Ser Arg Ala Ser Ala Leu
1 5 10

<210> 186
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 186

Ser Gln Ile Lys Ser Pro Val Val Phe
1 5

<210> 187
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 187

Arg Leu Cys Pro Ala Ala Pro Thr Gly Lys
1 5 10

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 188

Lys Leu Pro Phe Phe Thr Asn Phe Leu
1 5

<210> 189
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 189

Ile Trp Arg Ala Leu Gly Ser Leu Phe
1 5

<210> 190
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 190

Ser Thr Gln Ser Ser Leu Leu Tyr Leu Lys
1 5 10

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

Ala Pro Leu Leu Pro Gly Pro Ala Ala
1 5

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

Ile Pro Leu His Phe Ser Thr Ala Phe
1 5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Ile Leu Gln Leu Ile Thr Val Asn Arg
1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Val Leu Tyr Pro Ser His Ser Ser Phe
1 5

<210> 195
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 195

Ala Trp Asn Glu Ser Ser Ala Trp Leu Leu
1 5 10

<210> 196
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 196

Asn Ser Glu Asn Leu Leu Val Tyr
1 5

<210> 197
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 197

His His Thr Gln Leu Val Phe Val Phe
1 5

<210> 198
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 198

Met Thr Tyr Gln Gln Pro Phe Ser Asn Arg
1 5 10

<210> 199
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 199

Arg Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu
1 5

<210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 200

Gly Leu Leu Gly Thr Leu Arg Val Leu
1 5

<210> 201
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 201

Val Trp Ile Leu Gln Lys Val Asn Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 202
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 202

Lys Leu Leu Leu Leu Ser Ser Val Lys
1 5

<210> 203
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 203

Ala Ile Leu Val Pro Gln Pro Pro Lys
1 5

<210> 204

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 204

Val Val Arg Ala Ser Ser Gly Leu Lys
1 5

<210> 205
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 205

Ser Leu Ile Pro Ile Val Pro Phe Lys Ser
1 5 10

<210> 206
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 206

Val Glu Gly Val His Phe Val Gln Leu Leu
1 5 10

<210> 207
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 207

Leu Pro Ala Leu Leu Arg Ser Leu
1 5

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 208

Tyr Val Gly Pro Thr Arg Leu Glu Leu
1 5

<210> 209
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 209

Ala Ile Leu Leu Pro Gln Leu Pro Lys
1 5

<210> 210
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 210

Ala Ser Arg Ile Gln Val Ile Leu Leu
1 5

<210> 211
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 211

Val Val Thr Ile Val Met His Ile Tyr Lys
1 5 10

<210> 212
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 212

Trp Glu Thr Arg Leu His Asn Leu Trp
1 5

<210> 213
<211> 11

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 213

Thr Leu Leu Ser Phe Lys Thr Val Leu Phe Lys
1 5 10

<210> 214
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 214

Arg Pro Ser Pro Val Arg Val Ala Ala Leu
1 5 10

<210> 215
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 215

Thr Pro Leu Thr Arg Thr Thr Leu
1 5

<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 216

Ile Leu Arg Thr Val Leu Pro Ser Leu
1 5

<210> 217
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 217

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 218
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 218

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種肽或其變體，其包含一胺基酸序列，所述胺基酸序列係選自由以下項目所組成之群組：

(i)SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 216、以及

(ii)其一變體序列，其保持與MHC分子結合和/或誘導T細胞與所述變體肽交叉反應的能力；
或其一藥用鹽。

【請求項2】 如請求項1所述之肽或其變體，其中，所述肽能夠與MHC I類分子結合，和/或其中，當與所述MHC I類分子結合時，所述肽能夠被CD4和/或CD8 T細胞識別。

【請求項3】 如請求項1或2所述之肽或其變體，其中，所述肽或其變體的總長度為8至30個胺基酸。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項所述之肽或其變體，其中，所述肽包括非肽鍵。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項所述之肽或其變體，其中，所述肽是一融合蛋白的一部分。

【請求項6】 一種抗體或其功能片段，其特異性地識別或結合於如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體，或當與MHC分子結合時的如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體。

【請求項7】 一種T細胞受體或其功能片段，其與一MHC配體反應或結合，其中，所述配體是如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體，或當與MHC分子結合時的如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體。

【請求項8】 一種核酸或表達載體，其編碼如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體、如請求項6所述之抗體或其功能片段、或如請求項7所述之T細胞受體或其功能片段。

【請求項9】 一種重組宿主細胞，其包含如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體、如請求項6所述之抗體或其功能片段、如請求項7所述之T細胞受體或其功能片段、或如請求項8所述之核酸或表達載體。

【請求項10】 一種體外製備激活T淋巴細胞之方法，所述方法包括將T細胞與載有抗原的人類MHC I或II類分子進行體外接觸足夠的一段時間，從而以抗原特異性方式激活所述T細胞，其中，所述MHC I或II類分子在合適的抗原呈現細胞或人工建構類比的抗原呈現細胞的表面上表達，所述抗原為如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體。

【請求項11】 一種透過如請求項11所述之方法製成之激活T淋巴細胞，其有選擇性地識別一細胞，所述細胞提呈如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體。

【請求項12】 一種藥物組合物，其包括至少一活性成分及一藥用載體，其中，所述活性成分係選自由以下項目所組成之群組：

如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體、

如請求項6所述之抗體或其功能片段、

如請求項7所述之T細胞受體或其功能片段、

如請求項8所述之核酸或表達載體、

如請求項9所述之重組宿主細胞、

或如請求項11所述之激活T淋巴細胞。

【請求項13】一種用於製備如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體、如請求項6所述之抗體或其功能片段、或如請求項7所述之T細胞受體或其功能片段之方法，所述方法包括培養如請求項9所述之重組宿主細胞，以及從所述重組宿主細胞和/或其培養基中分離所述肽或其變體、所述抗體或其功能片段、或所述T細胞受體或其功能片段。

【請求項14】一種如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體、如請求項6所述之抗體或其功能片段、如請求項7所述之T細胞受體或其功能片段、如請求項8所述之核酸或表達載體、如請求項9所述之重組宿主細胞、或如請求項11所述之激活T淋巴細胞之用途，其係用作藥物或係用於製備一藥物。

【請求項15】一種殺滅患者體內靶細胞之方法，其中，靶細胞提呈一多肽，其含有如請求項1至5中任一項給定的胺基酸序列，所述方法包括給予患者一有效量之如請求項11所述之激活T淋巴細胞。

【請求項16】一種如請求項11所述之激活T淋巴細胞之用途，其係用於

- a) 殺滅患者體內靶細胞，其中，靶細胞提呈一多肽，其含有如請求項1至5中任一項給定的胺基酸序列，或係用於
- b) 製備殺滅此類靶細胞之藥物。

【請求項17】一種治療被診斷有癌症、患有癌症、或有罹患癌症風險之患者的方法，所述方法包括向患者施用一有效量之如請求項1至5中任一項所述之肽或其變體、如請求項6所述之抗體或其功能片段、如請求項7所述之T細胞受體或其功能片段、如請求項8所述之核酸或表達載體、如請求項9所述之重組宿主細胞、或如請求項11所述之激活T淋巴細胞。

【請求項18】一種如請求項1至5任一項中所述之肽或其變體、如請求項6所述之抗體或其功能片段、如請求項7所述之T細胞受體或其功能片段、如請求項8所述之核酸或表達載體、如請求項9所述之重組宿主細胞、或如請求項11所述之

激活T淋巴細胞之用途，其係用於治療被診斷有癌症、患有癌症、或有罹患癌症風險之患者，或係用於製備治療此類患者之藥物。

【請求項19】 如請求項17所述之方法或如請求項18所述之用途，其中，所述癌症係選自由急性骨髓性白血病、乳腺癌、膽管細胞癌、慢性淋巴細胞白血病、結直腸癌、膽囊癌、膠質母細胞瘤、胃癌、胃食管交界癌、肝細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌、及子宮內膜癌所組成之群組。

【請求項20】 一種套件，其包括：

(a) 一容器，其包含一藥物組合物，所述藥物組合物含有溶液或凍乾形式之如請求項12所述之藥物組合物；

(b) 可選地，一第二容器，其含有用於凍乾粉製劑的稀釋劑或重組溶液；

(c) 可選地，至少一種以上肽，其選自由SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 216所組成之群組。

【請求項21】 如請求項20所述之套件，其進一步包括緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭、或注射器中的一者或多者。

|(發明圖式)|

肽：AII APIAIK
SEQ ID NO: 1
IIA: A*03:01

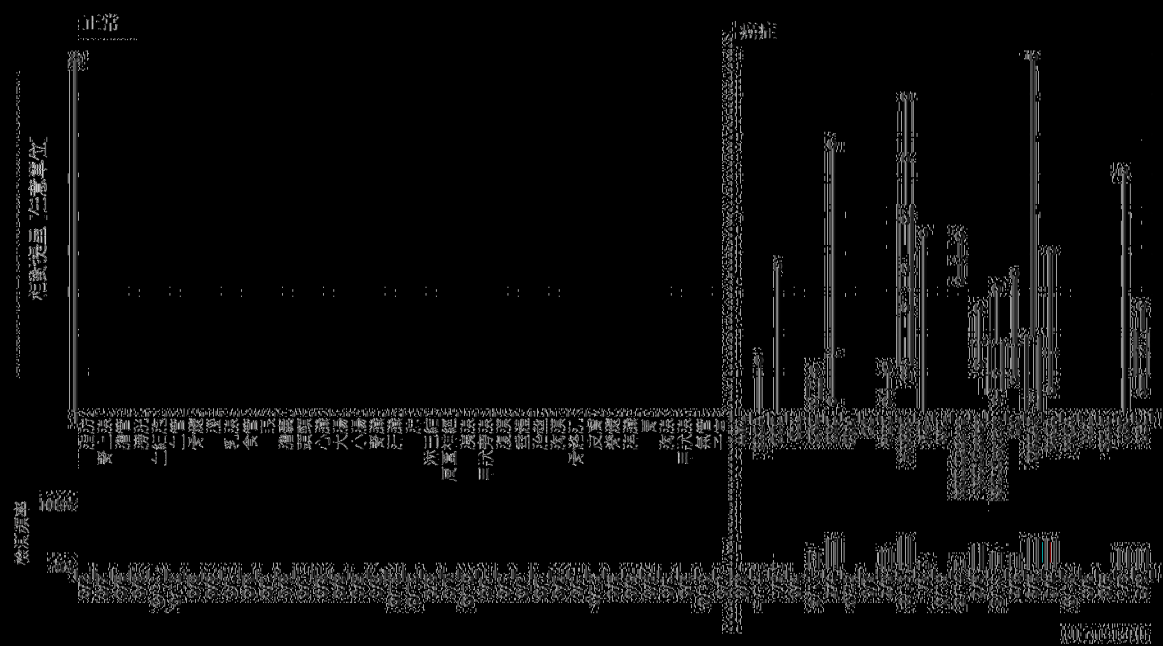


圖 1A

肽：CIVIVII SK
SEQ ID NO: 2
IIA: A*03:01

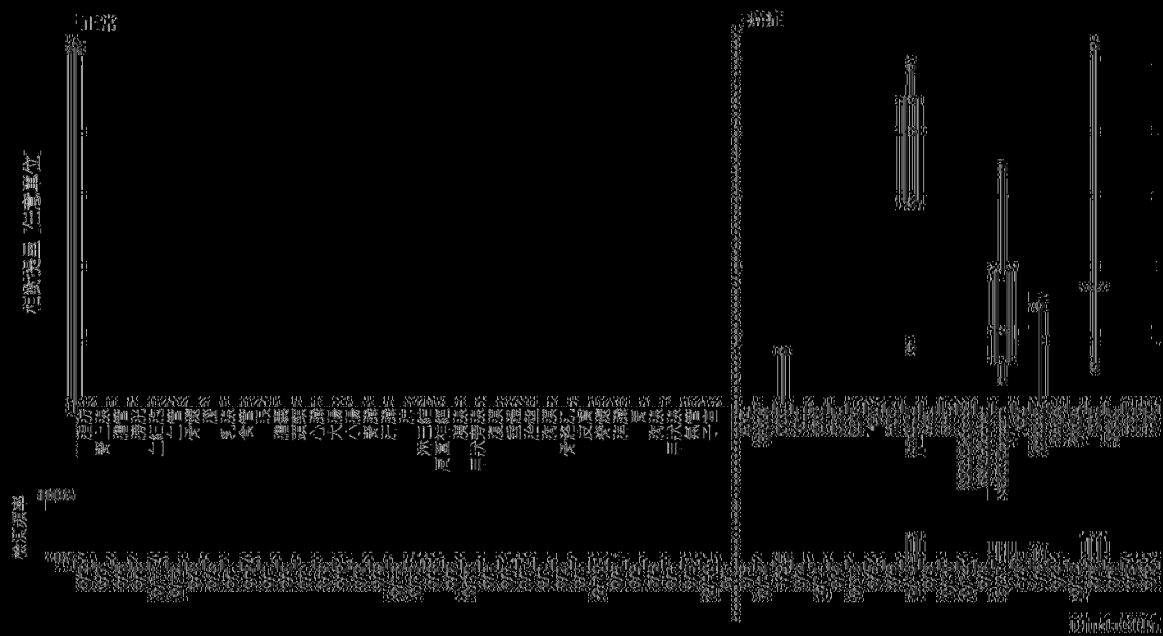


圖 1B

肽：VYIASSI-FKI
SEQ ID NO: 3
HLA: A*24:02

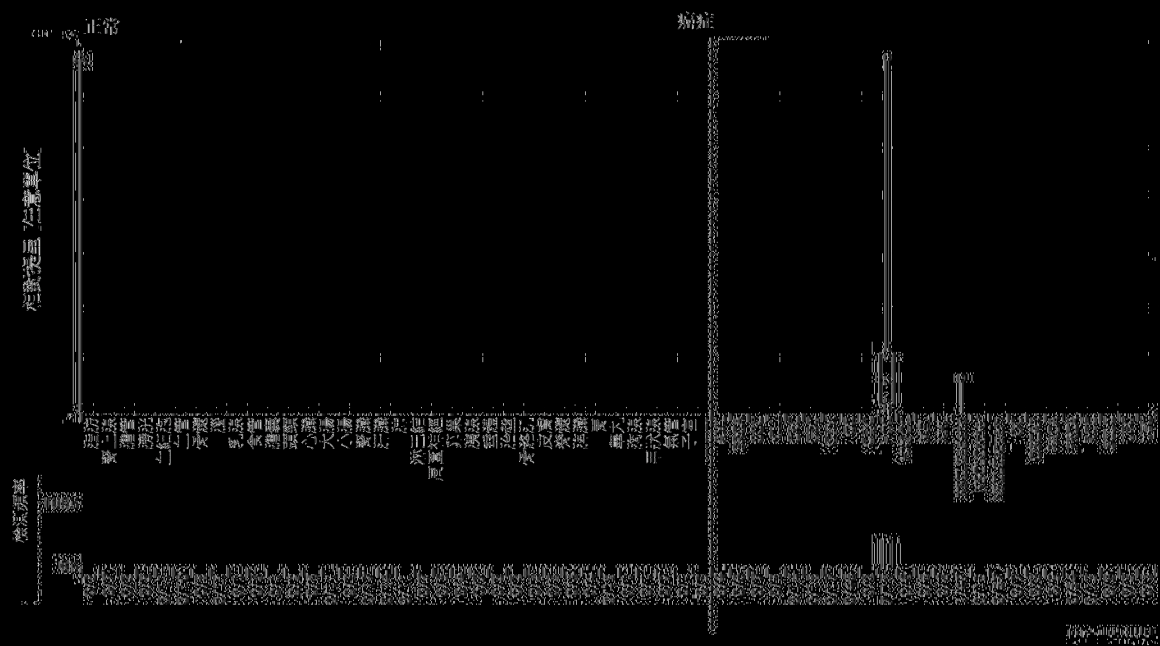


图 1C

肽：IQAPAIJ-KV
SEQ ID NO: 4
HLA: A*02:01

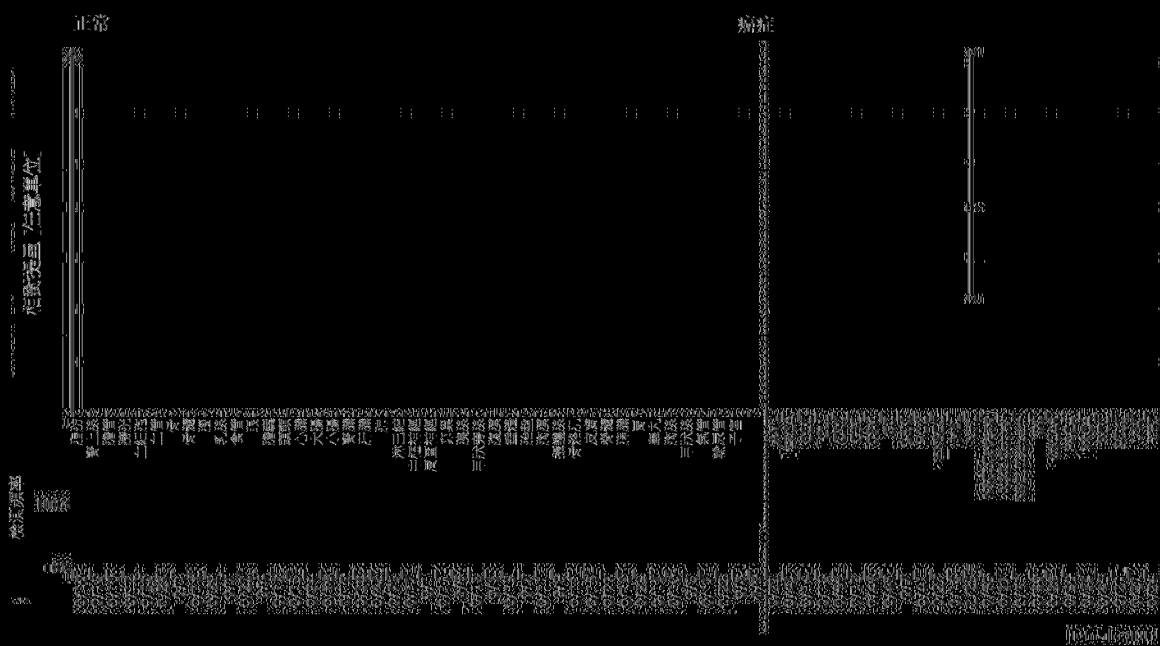


图 1D

肽：MELADRIPLW
SEQ ID NO: 5
HIA: A*44:02/03

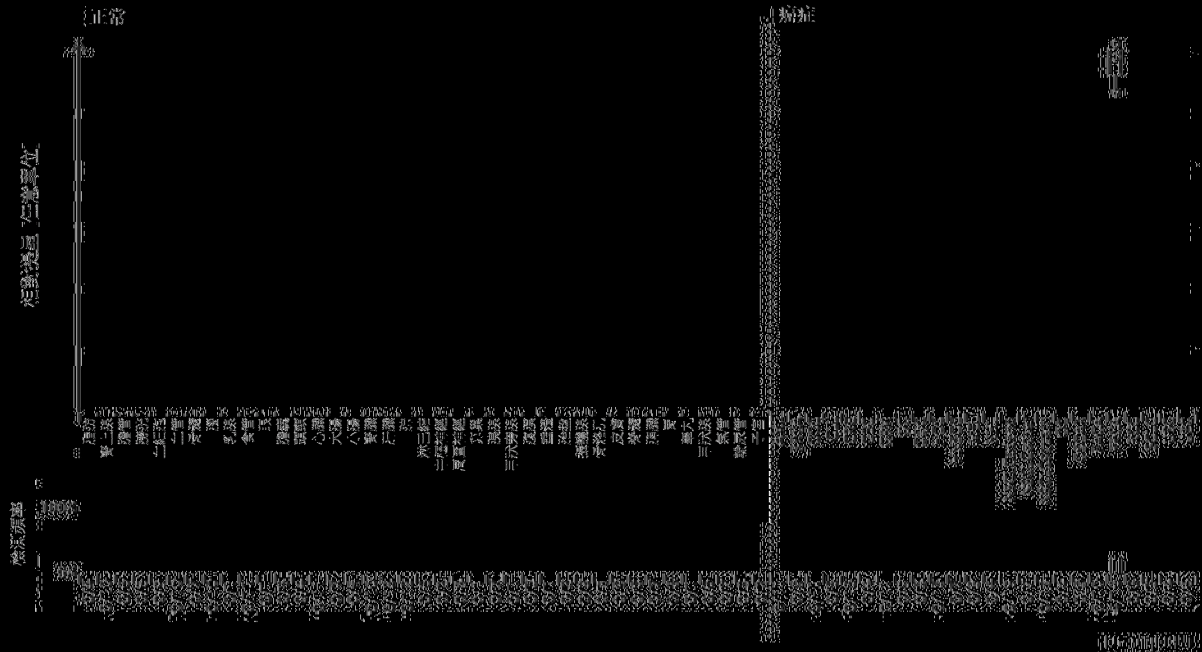


圖 11

肽：SHSLPAFHL
SEQ ID NO: 6

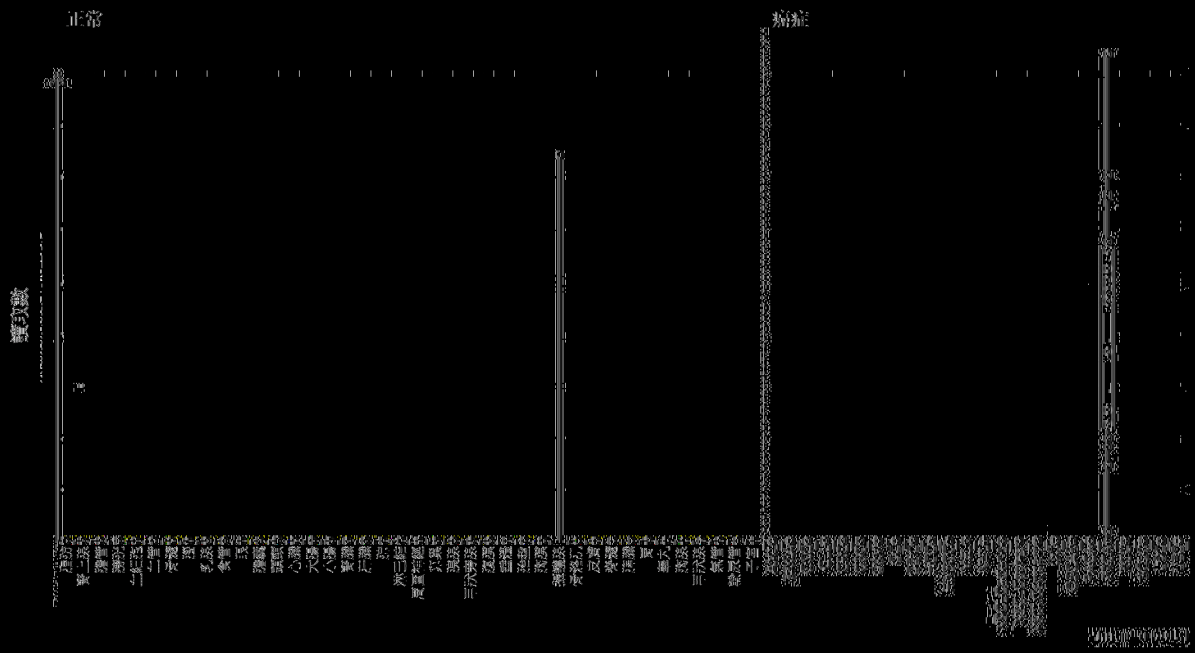


圖 2A

肽：MIPINSYKIP
SEQ ID NO: 7

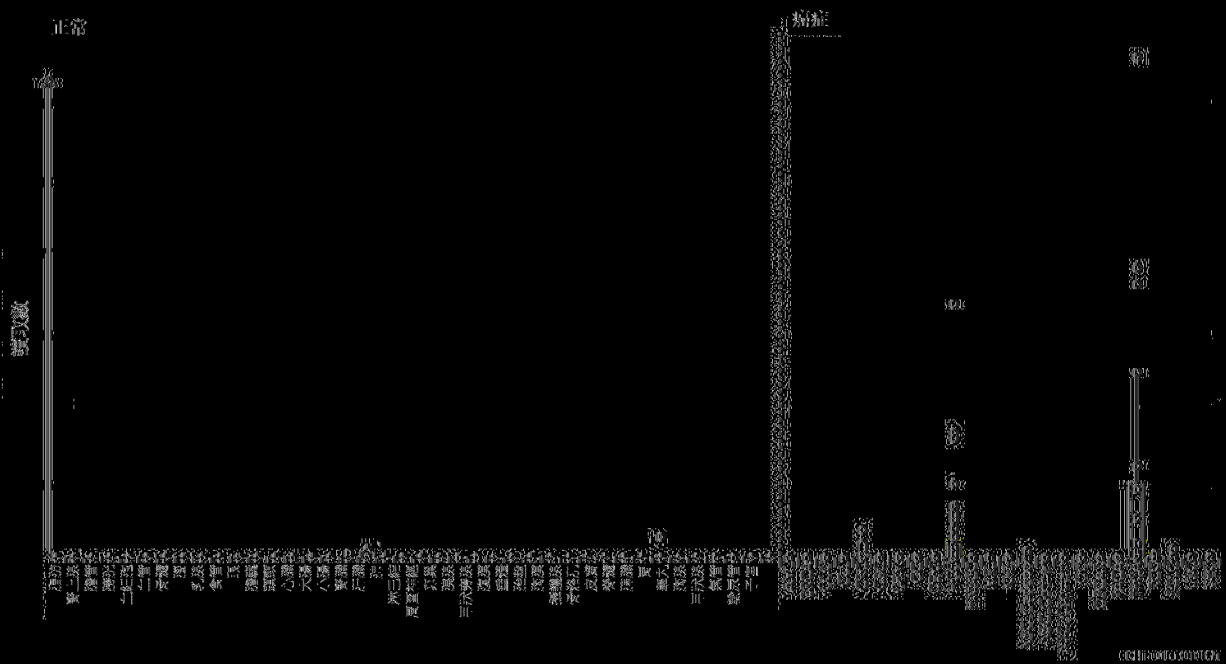


圖 2B

肽：VIYNQITMK
SEQ ID NO: 8

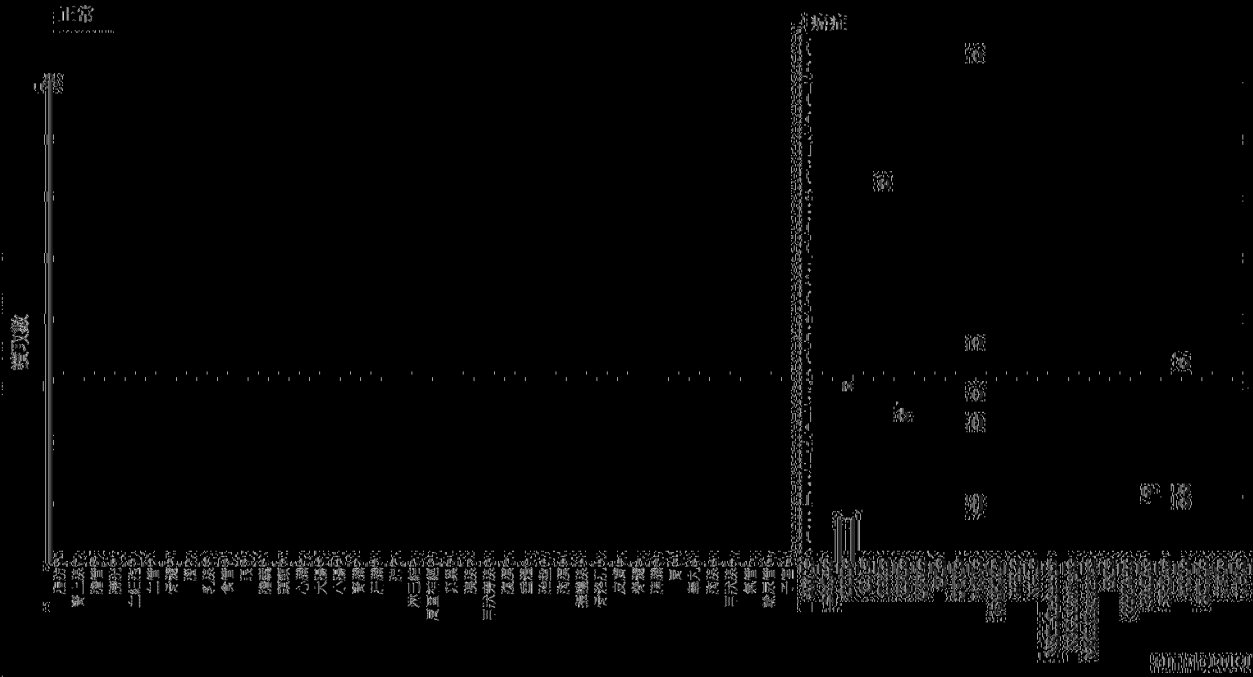


圖 2C

肽：ILCVSHISV
SEQ ID NO: 9

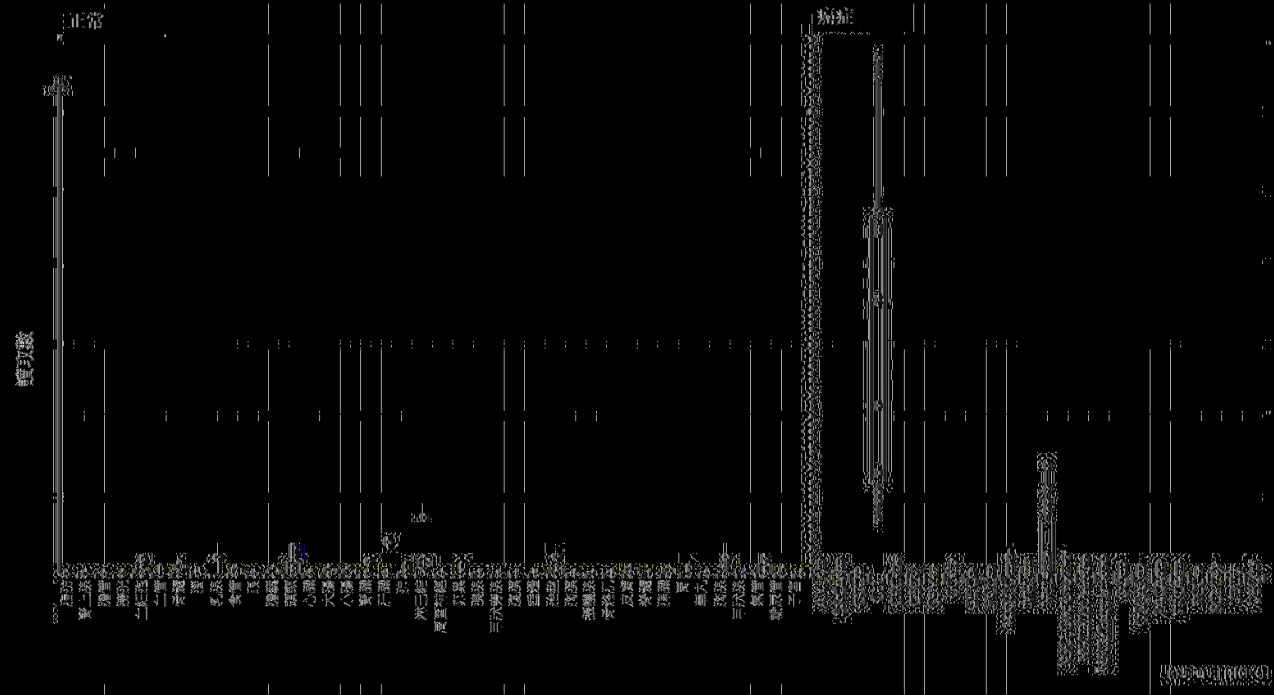


圖 2D

肽：ILMIIPQI
SEQ ID NO: 10

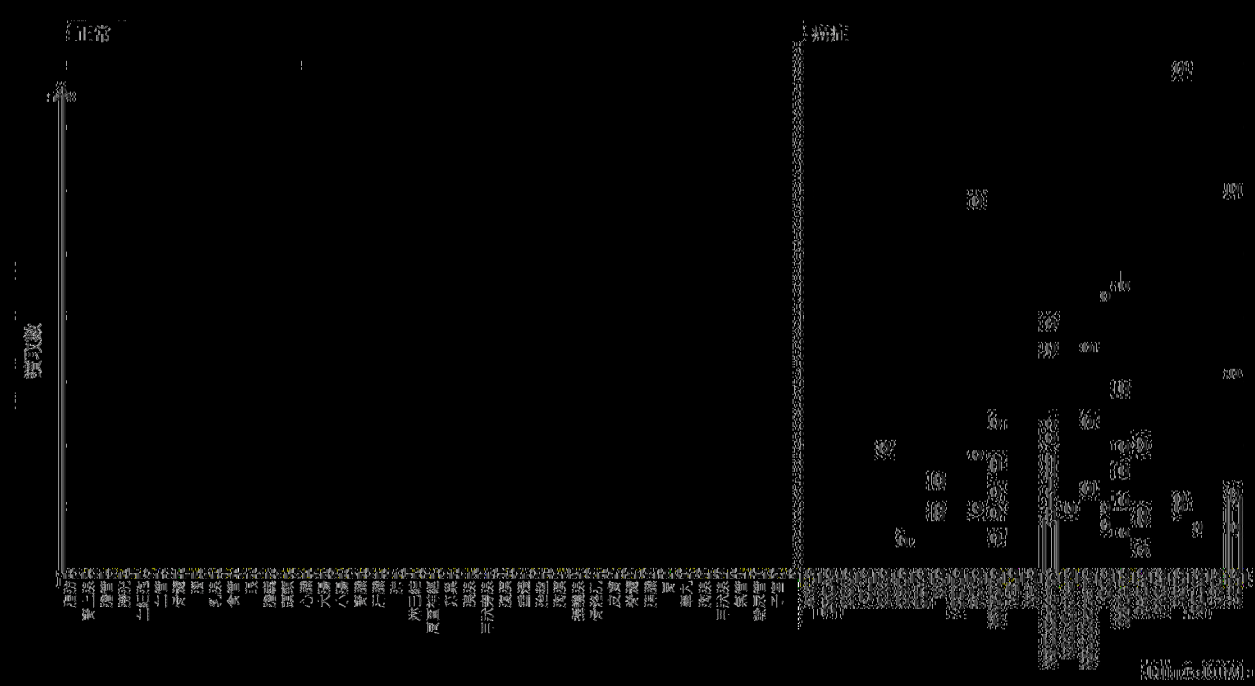


圖 21

肽：TEICIVKLEF
SEQ ID NO: 11

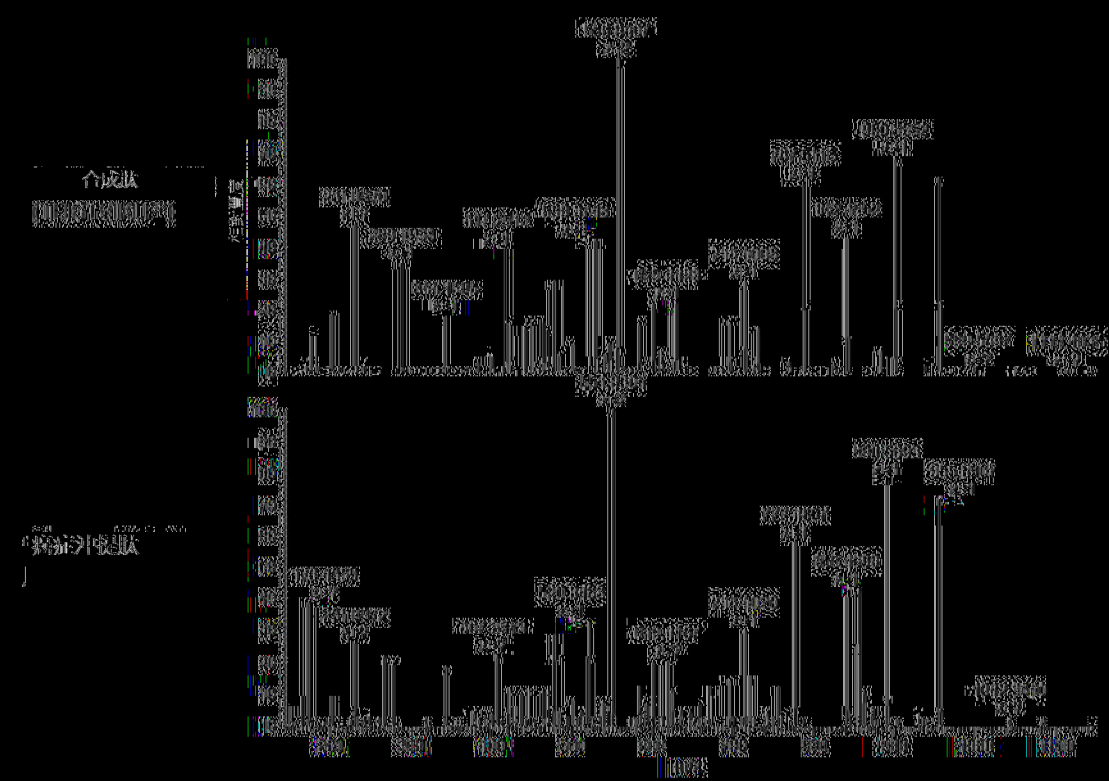


图 3

肽：ALCPMAIRV
SEQ ID NO: 113

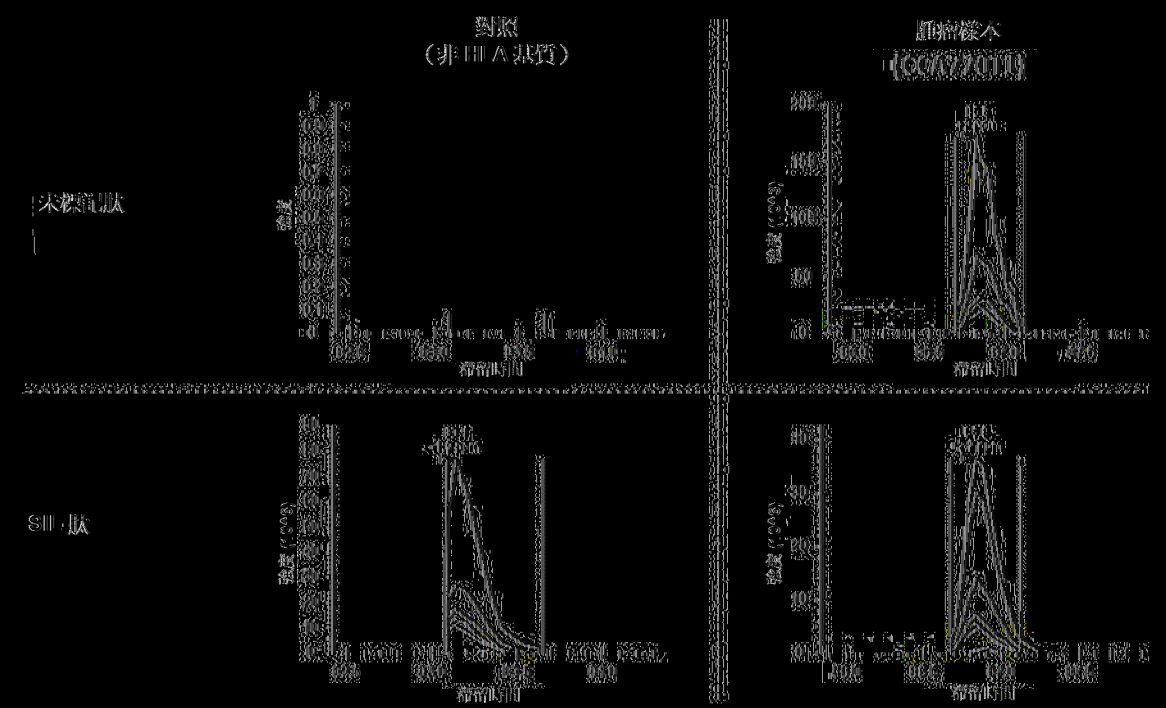
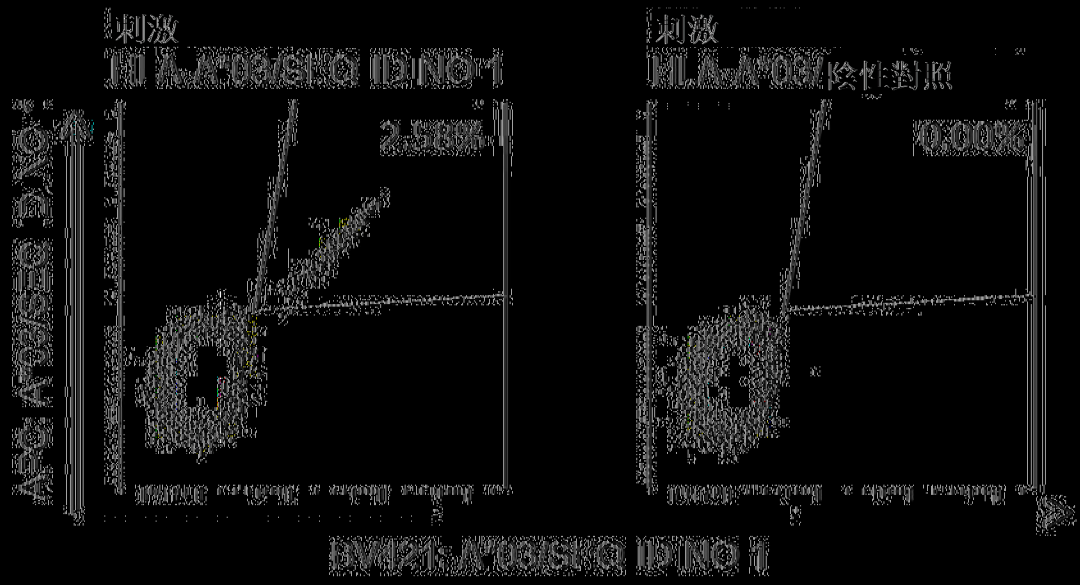
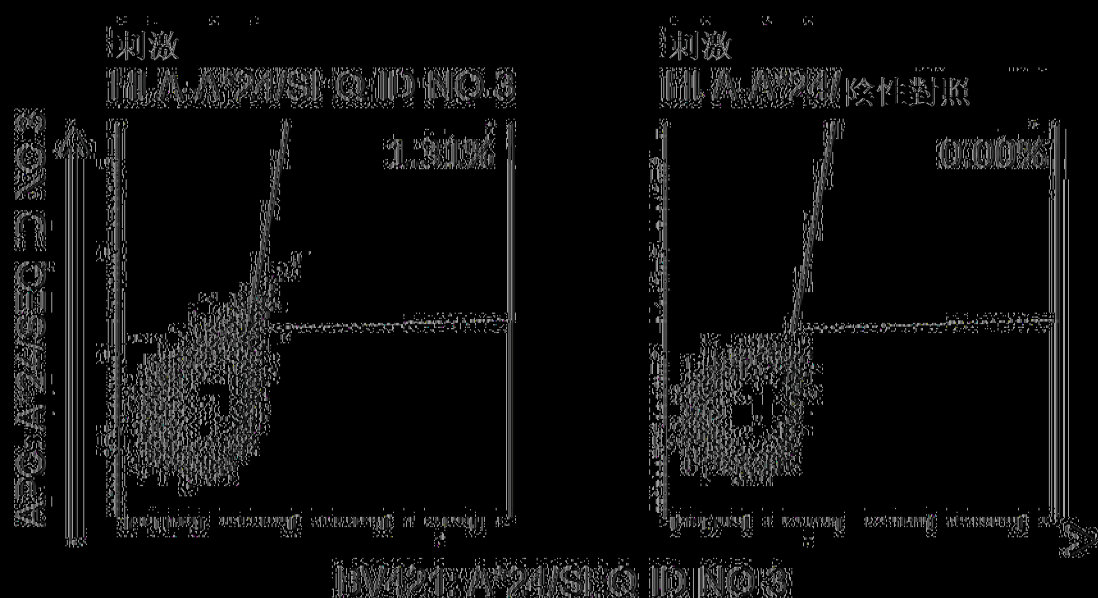


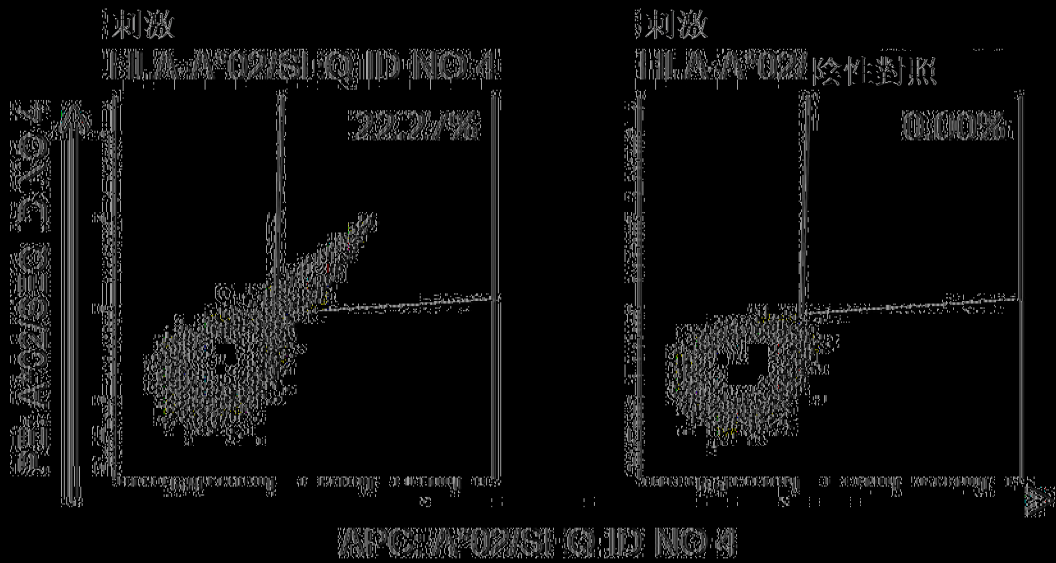
圖 4



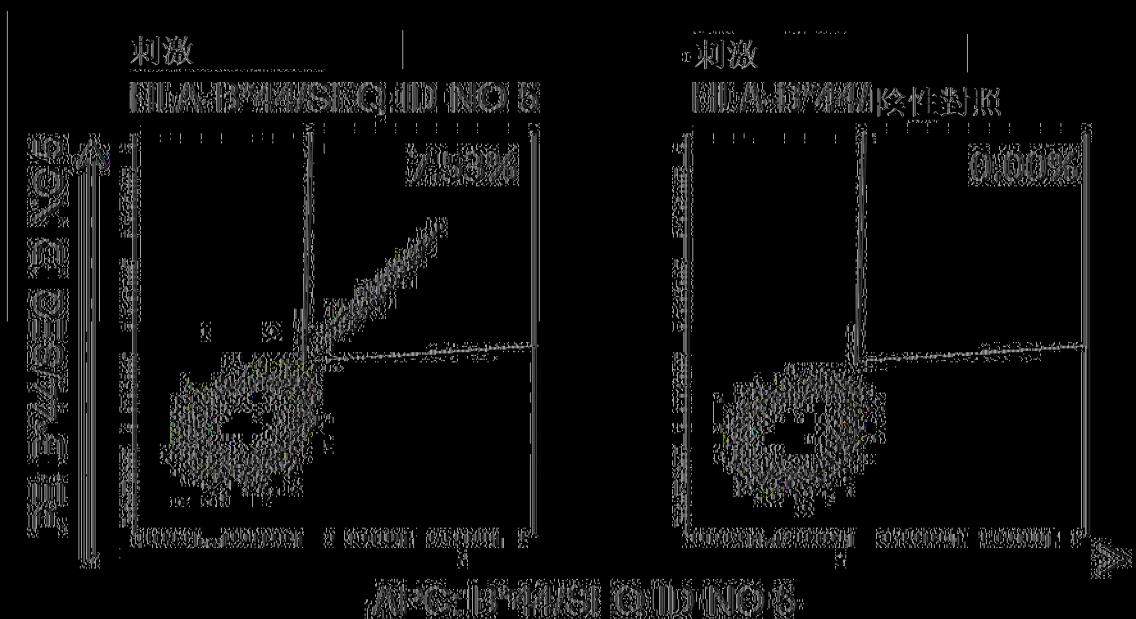
[H] 5A



ER 513



[H] 5C



[4] 5D

