



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I837747 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：111128553 (22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 21 日

(51)Int. Cl. : C07K14/47 (2006.01) C07K7/06 (2006.01)
C07K14/725 (2006.01) A61K38/08 (2019.01)
A61K35/17 (2015.01) A61K39/395 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/02/21 德國 10 2018 103 944.1
2018/02/21 美國 62/633,325
2018/03/27 德國 10 2018 107 224.4

(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：舒斯特 海科 SCHUSTER, HEIKO (DE)；侯夫賈爾 佛蘭西斯卡 HOFFGAARD, FRANZISKA (DE)；弗里切 金斯 FRITSCH, JENS (DE)；薛歐 奧利佛 SCHOOR, OLIVER (DE)；文史恩克 湯尼 WEINSCHENK, TONI (DE)；柯華李 維斯基 丹尼爾 KOWALEWSKI, DANIEL (DE)；鄒 致將 TSOU, CHIH-CHIANG (US)

(74)代理人：李世章；彭國洋

(56)參考文獻：
WO 2015018805A1

審查人員：王顥棟

申請專利範圍項數：36 項 圖式數：4 共 193 頁

(54)名稱
用於不同類型癌症免疫治療的非經典來源的肽和肽組合

(57)摘要
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（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複合物的活性藥物成分）聯合使用的腫瘤相關 T 細胞(CTL)肽表位。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也可能是抗體、可溶性 T 細胞受體和其他結合分子的靶標。

The present invention relates to peptides, proteins, nucleic acids and cells for use in immunotherapeutic methods. In particular, the present invention relates to the immunotherapy of cancer. The present invention furthermore relates to tumor-associated T-cell peptide epitopes, alone or in combination with other tumor-associated peptides that can for example serve as active pharmaceutical ingredients of vaccine compositions that stimulate anti-tumor immune responses, or to stimulate T cells ex vivo and transfer into patients. Peptides bound to molecules of the major histocompatibility complex (MHC), or peptides as such, can also be targets of antibodies, soluble T-cell receptors, and other binding molecules.

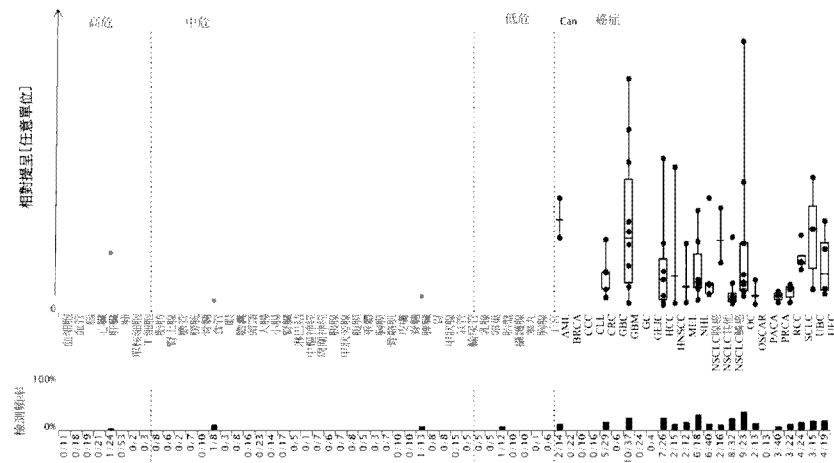
TW I837747 B

TW I837747 B

指定代表圖：

圖 1A

肽： KLLDFSTRI (A*02)
SEQ ID NO: 1





I837747

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於不同類型癌症免疫治療的非經典來源的肽和肽組合

【英文發明名稱】 PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES OF
NON-CANONICAL ORIGIN FOR USE IN IMMUNOTHERAPY AGAINST
DIFFERENT TYPES OF CANCERS

【中文】

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（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複合物的活性藥物成分）聯合使用的腫瘤相關 T 細胞（CTL）肽表位。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也可能是抗體、可溶性 T 細胞受體和其他結合分子的靶標。

【英文】

The present invention relates to peptides, proteins, nucleic acids and cells for use in immunotherapeutic methods. In particular, the present invention relates to the immunotherapy of cancer. The present invention furthermore relates to tumor-associated T-cell peptide epitopes, alone or in combination with other tumor-associated peptides that can for example serve as active pharmaceutical ingredients of vaccine compositions that stimulate anti-tumor immune responses, or to stimulate T cells ex vivo and transfer into patients. Peptides bound to molecules of the

major histocompatibility complex (MHC), or peptides as such, can also be targets of antibodies, soluble T-cell receptors, and other binding molecules.

【指定代表圖】第（ 1A ）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於不同類型癌症免疫治療的非經典來源的肽和肽組合

【英文發明名稱】 PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES OF
NON-CANONICAL ORIGIN 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（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複合物的活性藥物成分）聯合使用的腫瘤相關T細胞（CTL）肽表位。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也可能是抗體、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，他們源自人腫瘤細胞的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）的數據，癌症是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】 GBM是最常見的中樞神經系統惡性腫瘤，在美國，年齡調整發病率為每10萬居民3.19人。GBM預後極差，1年生存率為35%，5年生存率低於5%。男性性別、較大年齡和種族似乎是GBM的危險因素(Thakkar et al., 2014)。

【0005】 CLL是西方世界最常見的白血病，其中大約占全部白血病病例的三分之一。美國和歐洲的發病率相似，估計每年新發病例約有16,000名。CLL在白種人中比在非洲人中更常見，在西班牙裔和美國原住民中較少見，在亞洲人中很少見。在亞洲血統的人群中，CLL的發生率比白種人低3倍(Gunawardana et al., 2008)。CLL患者的五年總生存率約為79%。

【0006】 AML是在成人和兒童中得到診斷的第二最常見的白血病類型。在美國，估計的新發病例每年約21,000例。AML患者的五年生存率約為25%。

【0007】 肺癌是全球範圍內最常見的癌症類型，在很多國家是癌症死亡的首要原因。肺癌分為小細胞肺癌和非小細胞肺癌。NSCLC包括組織學類型腺癌、鱗狀細胞癌、大細胞癌，在美國，約占所有肺癌病例的85%。NSCLC的發生與吸煙史密切相關，包括目前和之前吸煙者，據報告，五年生存率為15%(World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008)。

【0008】 考慮到嚴重副作用和治療癌症相關的費用，需要確定可用於治療一般癌症，尤其是AML（急性髓性白血病）、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）的因素。還需要確定代表一般癌症，尤其是急性髓性白血病、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生物標誌物的因素，從而可以更好地診斷癌症、評估預後、預測治療成功率。

【0009】 癌症免疫治療代表了癌症細胞特異性靶向作用的一個選項，同時最大限度地減少副作用。癌症免疫療法利用存在的腫瘤相關抗原。

【0010】 腫瘤相關抗原(TAA)的目前分類主要包括以下幾組：

a) 癌 - 睪丸抗原：細胞能夠識別的最先確認的 T A A 屬於這一類抗原，由於其成員表達於組織學相異的人腫瘤中、正常組織中、僅在睪丸的精母細胞 / 精原細胞中、偶爾在胎盤中，因此，他最初被稱為癌 - 睪丸 (C T) 抗原。由於睪丸細胞不表達 H L A 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。C T 抗原大家熟知的例子是 M A G E 家族成員和 N Y - E S O - 1 。

b) 分化抗原：腫瘤和正常組織（腫瘤源自所述組織）都含有 T A A 。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。許多此類黑色素細胞譜系相關蛋白參與黑色素的生物合成，因此這些蛋白不具有腫瘤特異性，但是仍然被廣泛用於癌症的免疫治療。實例包括但不僅限於黑色素瘤的酪氨酸酶和 M e l a n - A / M A R T - 1 或攝護腺癌的 P S A 。

c) 多度表達的 T A A ：在組織學相異的腫瘤中以及許多正常組織中都檢測到了基因編碼被廣泛表達的 T A A ，一般表達水平較低。有可能許多由正常組織加工和潛在提呈的表位低於 T 細胞識別的閾值水平，而他們在腫瘤細胞中的多度表達能夠透過打破先前確立的耐受性而引發抗癌反應。這類 T A A 的典型例子為 H e r - 2 / n e u 、生存素、端粒酶或 W T 1 。

d) 腫瘤特異性抗原：這些獨特的 T A A 產生於正常基因（如 β - c a t e n i n 、 C D K 4 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很強的免疫反應。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。在含有腫瘤特定（相關）同種型蛋白的情況下，如果肽源自腫瘤（相關）外顯子也可能出現肽腫瘤特異性（或相關性）。

e) 由異常翻譯後修飾產生的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（所述相關性由主要對腫瘤具有活性的翻譯後加工所致）。此類TAA產生於變糖基化模式的改變，導致腫瘤產生針對MUC1的新型表位或在降解過程中導致諸如蛋白拼接的事件，這可能具有也可能不具有腫瘤特異性。

f) 腫瘤病毒蛋白：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乳頭狀瘤16型病毒蛋白、E6和E7，他們在宮頸癌中表達。

【0011】 很大一部分人類蛋白質組來源於非經典來源，如：替代開放閱讀框（altORF（Vanderperre et al., 2013））、內源性逆轉錄病毒元件，或涉及額外的轉錄後（RNA的選擇性剪接（Nilsen and Graveley, 2010））或翻譯後處理（翻譯後修飾（Khoury et al., 2011）、蛋白酶體剪接（Liepe et al., 2016））步驟。由於癌細胞中參與這些非經典蛋白質和肽生成的許多細胞過程經常發

生改變，因此，這一部分蛋白質組為TAA提供了豐富的來源(Laumont and Perreault, 2018)。

【0012】 許多信使RNA (mRNA)除了包含參考開放閱讀框(ORF)外，還包含非傳統替代開放閱讀框(altORF, (de Klerk and 't Hoen, 2015))。這些額外的編碼序列可為較少個密碼子，即，通常少於100(小開放閱讀框；sORF (Olexiouk et al., 2016))個密碼子至數百個密碼子大小，可位於參考ORF的上游、下游或甚至與參考ORF重疊。這些altORF的翻譯出現在不同的翻譯啟動位點，並且可能發生於作為參考ORF的不同閱讀框。小開放閱讀框不僅存在於mRNA，還被描述存在於之前視為非編碼的其他調節RNA (ncRNA, (Nam et al., 2016))。研究顯示，許多長非編碼RNA (lncRNA)和微小RNA (miRNA)可編碼並廣泛地翻譯小肽(Anderson et al., 2015; Aspden et al., 2014)。

【0013】 人內源性逆轉錄病毒(HERV)構成了人類基因組的很大部分(~8%)。這些病毒元素在數百萬年前即已融合入基因組，並從那時起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，但是有些內源性逆轉錄病毒(如HERV-K進化枝的成員)仍然編碼功能基因，並被證明可形成逆轉錄病毒樣顆粒(Subramanian et al., 2011)。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，對於某些疾病，特別是各類型癌症，已描述存在再活化和過度表達，導致

病毒蛋白活性翻譯 (Gonzalez-Cao et al., 2016; Kassiotis and Stoye, 2017)。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治療 (Krishnamurthy et al., 2015; Schiavetti et al., 2002)。

【0014】 基於 T 細胞的免疫治療靶向作用於主要組織相容性複合體 (MHC) 分子提呈的來源於腫瘤相關蛋白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，即其表位，可以是源自所有蛋白類型的分子，如酶、受體、轉錄因子等，他們在相應腫瘤的細胞中被表達，並且與同源未變的細胞相比，其表達通常上調。

【0015】 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，MHC II 類分子由一條 α 和一條 β 鏈組成。其三位構造形成一個結合槽，用於與肽進行非共價相互作用。

【0016】 大部分有核細胞上都可發現 MHC-I 類分子。他們提呈主要為內源性的蛋白、缺陷核糖體產物 (DRIP) 和較大肽裂解生成的肽。然而，源自內體結構或外源性來源的肽也經常在 MHC-I 類分子上發現。這種 I-類分子非經典提呈方式在文獻中被稱為交叉提呈 (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990)。MHC II 類分子主要發現於專業抗原提呈細胞 (APC) 上，並且主要提呈，例如，在內吞作用過程中被 APC 攝入並且隨後被加工的外源性或跨膜蛋白的肽。

【0017】 肽和 MHC I 類的複合體由負載相應 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。

【0018】 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 細胞表位元的識別對開發能引發抗腫瘤免疫反應的藥物產品可能非常重要 (Gnjatic et al., 2003)。在腫瘤部位，T 輔助細胞維持著對細胞毒性 T 細胞 (CTL) 友好的細胞因子環境 (Mortara et al., 2006) 並吸引效應細胞，如 CTL、天然殺傷 (NK) 細胞、巨噬細胞和粒細胞 (Hwang et al., 2007)。

【0019】 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細胞，尤其是專業抗原提呈細胞 (APC)，例如，單核細胞、單核細胞源性細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞。在癌症患者的腫瘤細胞中發現有 MHC II 類分子的表達 (Dengjel et al., 2006)。

【0020】 本發明的拉長（較長）肽可充當 MHC II 類活性表位。

【0021】 MHC-II 類表位活化的輔助 T 細胞在編排抗腫瘤免疫的 CTL 效應子功能中發揮著重要作用。觸發 TH1 細胞反應的輔助 T 細胞表位元支援 CD8 陽性殺傷 T 細胞的效應子功能，其中包括直接作用於腫瘤細胞的細胞毒性功能（此

類腫瘤細胞表面顯示有腫瘤相關肽/MHC複合體)。這樣，腫瘤相關T輔助細胞表位單獨使用或與其他腫瘤相關肽結合使用可作為刺激抗腫瘤免疫反應的疫苗化合物的活性藥物成分。

【0022】 哺乳動物(如小鼠)模型顯示，即使沒有CD8陽性T淋巴細胞，CD4陽性T細胞也能透過分泌干擾素- γ (IFN γ)抑制血管生成而足以抑制腫瘤的表現(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999)。沒有CD4 T細胞作為直接抗腫瘤效應因子的證據(Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014)。

【0023】 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(WO 2007/028574, EP 1760 088 B1)。

【0024】 由於CD8依賴型和CD4依賴型這兩種反應共同並協同地促進抗腫瘤作用，因此，確定和表徵由CD8+T細胞(配體：MHC I類分子+肽表位)或CD4陽性T輔助細胞(配體：MHC II類分子)識別的腫瘤相關抗原對開發腫瘤疫苗非常重要。

【0025】 對於MHC I類肽觸發(引發)細胞免疫反應的肽，他也必須與MHC分子結合。這一過程依賴於MHC分子的等位基因以及肽氨基酸序列的特異性多態性。MHC-I類-結合肽的長度通常為8-12個氨基酸殘基，並且在其與

MHC 分子相應結合溝槽相互作用的序列中通常包含兩個保守殘基（「錨」）。這樣，每個 MHC 的等位基因都有「結合基序」，從而確定哪些肽能與結合溝槽特異性結合。

【0026】 在 MHC-I 類依賴性免疫反應中，肽不僅能與腫瘤細胞表達的某些 MHC-I 類分子結合，而且他們之後還必須能被 T 細胞負載的特異性 T 細胞受體 (TCR) 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，必須具備特殊的條件。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。在一個優選的實施方案中，與正常健康組織相比，所述肽應在腫瘤細胞中過度提呈。更為適宜的情況是，所述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拷貝數目）高。腫瘤特異性抗原和腫瘤相關抗原往往是源自直接參與因細胞週期控制或凋亡抑制中的其功能而發生的正常細胞向腫瘤細胞轉化的蛋白。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預防接種方法的靶標 (Singh-Jasuja et al., 2004)。至關重要的是，表位存在於抗原氨基酸序列中，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】 基本上，任何能與 MHC 分子結合的肽都可能充當一個 T 細胞表位。誘導體外或體內 T 細胞反應的前提是存在

具有相應 T C R 的 T 細胞並且不存在對所述特定表位的免疫耐受性。

【0029】 因此，T A A 是基於 T 細胞療法（包括但不限於腫瘤疫苗）研發的起點。識別和表徵 T A A 的方法通常基於對患者或健康受試者 T 細胞的使用情況，或基於腫瘤與正常組織肽之間差別轉錄特性或差別表達模式的產生。然而，對腫瘤組織或人腫瘤細胞株中多度表達或選擇性表達的基因的識別並不提供在免疫療法中使用這些基因所轉錄抗原的準確資訊。這是因為，有著相應 T C R 的 T 細胞必須要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平，因此，這些抗原的表位只有一部分適合這種應用。因此，在本發明的一非常優選的實施例中，只選擇那些針對可發現功能性和 / 或增殖性 T 細胞情況的過度提呈或選擇性提呈肽，這一點非常重要。這種功能性 T 細胞被定義為在以特異性抗原刺激後能夠克隆地擴展並能夠執行效應子功能（「效應子 T 細胞」）的 T 細胞。

【0030】 在透過根據本發明的特定 T C R（例如可溶性 T C R）和抗體或其他結合分子（支架）靶向作用於肽 - M H C 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】

【0031】 在本發明的第一方面，本發明涉及一種肽，包含選自 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 1 0 1 組成群組的一個

氨基酸序列、或與SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101具有至少77%，優選至少88%同源性（優選至少77%或至少88%相同）的其變體序列（其中所述變體與MHC結合和/或誘導T細胞與所述肽發生交叉反應），或其藥用鹽（其中所述肽不是潛在全長多肽）。

【0032】 本發明進一步涉及本發明的一種肽，包含選自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101組成群組的一個序列、或與SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101具有至少77%，優選至少88%同源性（優選至少77%或至少88%相同）的其變體，其中所述肽或其變體的總長度為8至100個、優選為8至30個、最優選為8至14個氨基酸。

【0033】 下表顯示了根據本發明的肽、他們各自的SEQ ID NO、以及這些肽的可能源（潛在）基因。表3中的肽為源自所謂的「替代」或「短」開放閱讀框的肽。每個肽序列提出了一種代表性源轉錄物ID（Ensemble（Aken et al., 2016）或RefSeq（O'Leary et al., 2016）注釋）。這些肽可進一步源自本文未列出的其他額外或替代轉錄物。

【0034】 表3中，含有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:71的肽與HLA-A*02結合。表4中的肽為源自人內源性逆轉錄病毒的肽。每種肽列出了一種代表性染色體位置。這些肽可進一步映射到本文未列出的額外或替代染色體位置。表4中，含有SEQ ID NO:72至SEQ ID NO:74的肽與HLA-A*02結合，含有SEQ ID NO:75至SEQ ID

NO:95 的肽與不同的 HLA-I 類結合（參見 HLA 等位基因）。表 5 中的肽為人類基因組中無直接參照的肽。表 5 中，含有 SEQ ID NO:96 至 SEQ ID NO:101 的肽與 HLA-A*02 結合。

表 3：來自替代或短開放閱讀框的本發明肽。

序列 ID 號	序列	肽代碼	代表性源轉錄物 ID
1	KLLDFSTRI	NUDCD2-001	ENST00000521797
2	ALLDVLVKL	COLPDG-001	ENST00000225964
3	FLLVPSPIWQL	altORF-001	ENST00000430553
4	YLGDSHVLL	altORF-002	ENST00000356971
5	LVWEVVESV	altORF-003	ENST00000425076
6	ALHDSPVYL	altORF-004	ENST00000584912
7	ALWEEVKATSL	altORF-005	ENST00000361298
8	ILQSLVPAA	altORF-006	ENST00000595125
9	FLQEGDLISV	altORF-007	ENST00000463488
10	SLLDKLSGI	altORF-008	ENST00000374472
11	ALLPHAPEAV	altORF-009	ENST00000621654
12	HLDSMNVSI	altORF-010	ENST00000558088
13	FLDEGSLLRL	altORF-011	ENST00000484411
14	LLIEVSEEL	altORF-012	ENST00000561317
15	NLVMPLLHI	altORF-013	ENST00000326799
16	ALLDAEQSPVAL	altORF-014	ENST00000559705
17	VLWDLRPSSLI	altORF-015	ENST00000503454
18	KMMTFFQGL	altORF-016	ENST00000559195
19	MLLPWLPKL	altORF-017	ENST00000568176
20	VLISLPGKV	altORF-018	ENST00000342308
21	FVFISPSFL	altORF-019	ENST00000579991
22	SLYDVPVGA	altORF-020	ENST00000540839
23	GLEVLDALL	altORF-021	ENST00000344922
24	TLTSLNILL	altORF-022	ENST00000451303
25	ISVLNLSAI	altORF-023	ENST00000490069
26	KLWTSLVNL	altORF-024	ENST00000513284
27	IAAGVPNTDA	altORF-025	ENST00000447802
28	SQLEKPETA	altORF-026	ENST00000412585
29	LLWEFPSMA	altORF-027	ENST00000465527
30	LLRLTLLPL	altORF-028	XM_005265671
31	VVLPIVITL	altORF-029	ENST00000335507
32	VLSVSAVLGA	altORF-030	ENST00000414310
33	FASERPPSV	altORF-031	ENST00000617924

序列 ID 號	序列	肽代碼	代表性源轉錄物 ID
34	LLNVEPAGA	altORF-032	ENST00000525179
35	VLLNSNYPV	altORF-033	ENST00000433310
36	FQVTRTTGV	altORF-034	ENST00000406361
37	KILDEFYNV	altORF-035	ENST00000464456
38	SLSAWLPSL	altORF-036	ENST00000430083
39	YIYEDEVRL	altORF-037	ENST00000603198
40	FTLPFLVNL	altORF-038	ENST00000522371
41	LMASEGIWESSL	altORF-039	ENST00000233242
42	WITPVIPAL	altORF-040	ENST00000421212
43	AIWSTILIA	altORF-041	ENST00000420453
44	WLIPRQLAAA	altORF-042	ENST00000367145
45	ALYHQSPLL	altORF-043	ENST00000555447
46	AMVEIIPKV	altORF-044	ENST00000425544
47	ALLPGVPGL	altORF-045	ENST00000434646
48	MLAEIHPKA	altORF-046	ENST00000558952
49	FLWDPRDVVL	altORF-047	ENST00000491641
50	GLASYLDRV	altORF-048	ENST00000411618
51	GLLTQVHIL	altORF-049	ENST00000521282
52	LAFVSHVLI	altORF-050	ENST00000361835
53	TISISLSSV	altORF-051	ENST00000254627
54	GLSPDQVFL	altORF-052	ENST00000394904
55	MVQQEKLFV	altORF-053	ENST00000611855
56	IITNLIVNI	altORF-054	ENST00000263321
57	YVLMTSLLL	altORF-055	ENST00000414195
58	MIISHRALEL	altORF-056	ENST00000452840
59	LAASTTFLGV	altORF-057	ENST00000605962
60	LLLATLENL	altORF-058	ENST00000484275
61	VLPWQPLLL	altORF-059	ENST00000492470
62	SLLGKPGLTI	altORF-060	ENST00000359318
63	LSFKRSLSI	altORF-061	ENST00000469017
64	LLLALRLSL	altORF-062	ENST00000375105
65	IAISQLTFV	altORF-063	ENST00000473984
66	ILNELLNSI	altORF-064	ENST00000505646
67	ALKELMGPA	altORF-065	ENST00000308370
68	KLLADAFKV	altORF-066	ENST00000569593
69	LLCPVVLQL	altORF-067	ENST00000497492
70	LLLQIEPAA	altORF-068	ENST00000624543
71	WLMPVMPAL	altORF-069	ENST00000473202

表 4：來自人內源性逆轉錄病毒的本發明額外肽。

序列 ID 號	序列	肽代碼	HLA 等位基因	代表性染色體位置
72	YLSFIKILL	HERVK-001	A*02	GRCh38:3:1:198295559:1 位置：75551556-75551582
73	STTIINLIL	HERVK-002	A*02	GRCh38:22:1:50818468:1 位置：18946733-18946759
74	TLLSYSIPL	HERVK-003	A*02	GRCh38:19:1:58617616:1 位置：58312367-58312399
75	TTQEAEKLLER	HERVK-004	A*68 /A*03	GRCh38:19:1:58617616:1 位置：58312301-58312330
76	TEQGPTGVTM	HERVK-005	B*40/B*44/B*49	GRCh38:3:1:198295559:1 位置：101694496-101694528
77	VPAGVDVITEY	HERVK-006	A*29/B*35/B*07	GRCh38:19:1:58617616:1 位置：58312250-58312276
78	GLLPPVRAM	HERVK-007	B*15	GRCh38:22:1:50818468:1 位置：23540302-23540328
79	KIQDPGTAF	HERVK-008	A*03	GRCh38:8:1:145138636:1 位置：42918854-42918828
80	RDQIVTVSV	HERVK-009	B*41/B*44	GRCh38:7:1:159345973:1 位置：4587989-4587954
81	SLLGAATVEPPK	HERVK-010	A*03	GRCh38:6:1:170805979:1 位置：28690343-28690369
82	LAPQMIAL	HERVK-011	B*15/B*51	GRCh38:7:1:159345973:1 位置：141755441-141755418
83	KPRGPTPL	HERVK-012	B*08	GRCh38:20:1:64444167:1 位置：32723848-32723877
84	RLCPAAPSEK	HERVK-013	A*03	GRCh38:20:1:64444167:1 位置：32717605-32717631
85	VYLLTFPPL	UNKN-007	A*24	GRCh38:10:1:133797422:1 位置：6825699-6825676
86	LMIGKRIL	HERVK-014	B*08	GRCh38:4:1:190214555:1 位置：9130103-9130138
87	LNLVSETEAMVK	HERVK-015	A*11 (A*03)	GRCh38:1:1:248956422:1 位置：150635421-150635392
88	DEQETDAFL	HERVK-016	B*18/B*44	GRCh38:6:1:170805979:1 位置：77721912-77721889
89	MIFYVLQK	HERVK-017	A*03	GRCh38:4:1:190214555:1 位置：190112774-190112748
90	YLRDFKIKR	HERVK-018	A*31 (A*03)	GRCh38:4:1:190214555:1 位置：190107560-190107534
91	SSHFILVTF	HERVK-019	A*24	GRCh38:3:1:198295559:1 位置：75556001-75556027
92	ELVAVTSVL	HERVK-020	B*13	GRCh38:8:1:145138636:1 位置：145025405-145025379
93	WQKNSMRL	HERVK-021	B*15	GRCh38:20:1:64444167:1 位置：34135051-34135074

序列 ID 號	序列	肽代碼	HLA 等位基因	代表性染色體位置
94	MGRRRNLY	HERVK-022	B*15	GRCh38:4:1:190214555:1 位置：165000827-165000850
95	QVKIVTLL	HERVK-023	B*52	GRCh38:12:1:133275309:1 位置：34627138-34627115

表 5：本發明人類基因組中無直接參照的本發明額外肽。

序列 ID 號	序列	肽代碼
96	KIIEDLANTV	KRT18-001
97	GLIDDKGTIKL	CDC2-006
98	SLMEVTHDL	LARS-001
99	ALMDGSESFFV	BSG-001
100	SLGPPVGV	CIZ1-001
101	KLPEGHLPEV	AHNAK2-003

表 6：用於個性化癌症療法之本發明肽。

序列 ID 號	序列	肽代碼
102	GLDPTQFRV	POLA1-003
103	SLVSYLDKV	KRT16P-001

【0035】 在本發明背景中，令人驚訝地發現替代開放閱讀框為有效腫瘤相關抗原的來源。迄今為止，只有極少數報告描述了此類抗原，例如源自 gp75 (Wang et al., Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. J Exp Med. 1996 Mar 1;183(3):1131-40) 和 NY-ESO-1/LAGE-1 ORF2 (Mandic, et al., The alternative open reading frame of LAGE-1 gives rise to multiple promiscuous HLA-DR-restricted epitopes recognized by T-helper 1-type tumor-reactive

CD4+ T cells, Cancer Res.2003 Oct 1;63(19):6506-15)的抗原。同樣，也只有少數報告討論了內源性逆轉錄病毒(HERV)序列為腫瘤相關抗原的實際來源 (Mullins CS and Linnebacher M. Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens:an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes.Cancer Immunol Immunother.2012 Jul;61(7):1093-100; 和 Attermann AS, et al., Human endogenous retroviruses and their implication for immunotherapeutics of cancer. Ann Oncol.2018 Nov 1;29(11):2183-2191)。HERV被提議作為「內在佐劑」，可能使癌細胞對免疫識別敏感，或作為自身抗原，可誘導神經精神疾病（如：多發性硬化和精神分裂症）的自身免疫 (Tu X, et al., Human leukemia antigen-A*0201-restricted epitopes of human endogenous retrovirus W family envelope (HERV-W env) induce strong cytotoxic T lymphocyte responses.Virol Sin.2017 Aug;32(4):280-289)。

【0036】 本發明一般還涉及根據本發明的肽，其用於治療增殖性疾病，例如，急性髓性白血病、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。

【0037】 特別優選的是根據本發明的肽（單獨或組合），其選自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101組成的群組。更優選的是選自SEQ ID No. 1至SEQ ID No. 14、SEQ ID No. 72至SEQ ID No. 81、SEQ ID No. 96至SEQ ID No. 101組成群組（見表3、表4和表5）的肽（單獨或組合）以及彼等在急性髓性白血病、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免疫治療中的用途。

【0038】 因此，本發明的另一方面涉及根據本發明肽的用途 - 優選聯合用於治療選自急性髓性白血病、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中的增殖性疾病。

【0039】 本發明還涉及本發明的肽，其具有與主要組織相容性複合體(MHC) I或以拉長形式存在的例如長度變化的-MHC-II類分子結合的能力。

【0040】 本發明進一步涉及本發明中的肽，其中所述肽(每種肽)系由或基本系由根據SEQ ID NO 1至SEQ ID NO 101的一個氨基酸序列組成。

【0041】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中所述肽被修飾和/或包含非肽鍵。

【0042】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中所述肽為融合蛋白的一部分，特別是與HLA-DR抗原相關不變鏈(Ii)的N-端氨基酸融合，或與抗體(例如，樹突狀細胞特定抗體)或抗體的序列融合。

【0043】 本發明進一步涉及一種核酸，其編碼本發明的肽。本發明進一步涉及一種本發明的核酸，為DNA、cDNA、PNA、RNA，也可能為其組合。

【0044】 本發明進一步涉及一種能表達和/或表達本發明核酸的表達載體。

【0045】 本發明進一步涉及本發明的一種肽、本發明的一種核酸或本發明的一種治療疾病的藥用表達載體，特別是用於治療癌症。

【0046】 本發明進一步涉及特異性地對抗本發明中肽或本發明中所述肽與MHC之複合體的抗體以及製造這些抗體的方法。

【0047】 本發明進一步涉及本發明的T細胞受體(TCR)，特別是可溶性TCR (sTCRs)和加工為自體或異體T細胞的克隆TCR，以及製造這些TCR的方法和載有所述TCR或所述TCR交叉反應的NK細胞的製造方法。

【0048】 抗體和TCR是根據本發明的肽現有免疫治療用途的另外實施方案。

【0049】 本發明進一步涉及含本發明核酸或前述表達載體的一種宿主細胞。本發明進一步涉及本發明的宿主細胞，其為抗原提呈細胞，優選為樹突細胞。

【0050】 本發明進一步涉及配製本發明一種肽的一種方法，所述方法包括培養本發明的宿主細胞和從所述宿主細胞或其培養基中分離肽。

【0051】 本發明進一步涉及本發明中的所述方法，其中抗原透過與足夠量的含抗原提成細胞的抗原結合被載入表達於合適抗原提呈細胞或人工抗原呈遞細胞表面的I或II類MHC分子。

【0052】 本發明進一步涉及本發明的方法，其中抗原提呈細胞包含能表達或表達含SEQ ID NO.1至SEQ ID NO.101、優選為含SEQ ID No. 1至SEQ ID No. 14、SEQ ID No. 72至SEQ ID No. 81、SEQ ID No. 96至SEQ ID No. 101之所述肽或變體氨基酸序列的一種表達載體。

【0053】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的活化T細胞，其中所述T細胞有選擇性地識別一種細胞，所述細胞表達含一種本發明氨基酸序列的多肽。

【0054】 本發明進一步涉及一種殺傷患者靶細胞的方法，其中患者的靶細胞異常表達含本發明任何氨基酸序列的多肽，所述方法包括給予患者按本發明方法製造的有效量T細胞。

【0055】 本發明進一步涉及任何所述肽、本發明的核酸、本發明的表達載體、本發明的細胞、本發明的活化T淋巴細胞、T細胞受體或抗體或其他肽-和/或肽-MHC結合分子作為藥劑或製造藥劑的用途。所述藥劑優選為具有抗癌活性。

【0056】 優選情況為，所述藥劑為基於可溶性TCR或抗體的細胞治療藥物、疫苗或蛋白質。

【0057】 本發明進一步涉及根據本發明的用途，其中所述癌細胞為急性髓性白血病、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。

【0058】 本發明進一步涉及一種基於本發明肽的生物標誌物，本文稱為「靶標」，其可用於診斷癌症，優選為急性髓性白血病、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。所述標誌物可以肽本身過度提呈或相應基因過度表達。標誌物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誌物識別的相同靶標的免疫療法。例如，抗體或可溶性 T C R 可用於染色腫瘤切片以檢測是否存在相關肽與 M H C 複合。

【0059】 可選地，抗體具有進一步的效應子功能，如免疫刺激域或毒素。

【0060】 本發明還涉及這些癌症治療中新靶點的用途。

【圖式簡單說明】

【0061】 圖 1 A 至 1 F 顯示了各種肽在不同癌症組織中的過度提呈（黑點）。上面部分：根據技術重複測量值的中值 M S 信號強度繪製為點，檢測到該肽的單一 H L A - A * 0 2 陽性正常組織為灰色點（左圖），腫瘤樣本為黑點（右圖）。盒顯示了標準化信號強度的中位數、第 2 5 和第 7 5 百分位

數，而鬚延伸到仍在下四分位數的 1.5 四分位距 (IQR) 內的最低數據點及仍在上四分位數的 1.5 IQR 內的最高數據點。正常器官根據風險類別排列順序 (血細胞、血管、腦、肝、肺：高風險，灰色點；生殖器官、乳腺、攝護腺：低風險，灰色點；所有其他器官：中等風險；灰色點)。下面部分：每個器官的相對肽檢測頻率顯示為脊柱圖。圖表下面的數字表示每個器官分析的總樣本數中檢測到肽的樣本數 (正常樣本 N = 440，腫瘤樣本 N = 490)。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，但圖表上部分不顯示任何點。組織 (從左到右)：正常樣本：血細胞；bloodvess (血管)；腦；心；肝；肺；單核細胞；T細胞；脂肪 (脂肪組織)；adrenal gl (腎上腺)；膽管；膀胱；骨髓；esoph (食管)；眼；gallbl (膽囊)；頭頸部；intest.la (大腸)；intest.sm (小腸)；腎；淋巴結；nerve cent (中樞神經)；nerve perith (外周神經)；胰腺；parathy (甲狀旁腺)；perit (腹膜)；pituit (垂體)；胸膜；skel.mus skel (骨骼肌)；皮膚；脊髓；脾；胃；甲狀腺；氣管；輸尿管；乳房；卵巢；胎盤；攝護腺；睪丸；胸腺；子宮。腫瘤樣本：AML (急性髓性白血病)；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) ; NSCLCadenoc (非小細胞肺癌腺癌) ; NSCLCother (NSCLC樣本, 不能明確分配為NSCLCadenoc或NSCLCsquamous) ; NSCLCsquamous (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: KLLDFSTRI (SEQ ID NO.:1), 圖1B) 肽: ALLDVLVKL (SEQ ID NO.:2), 圖1C) 肽: FLLVPSPIWQL (SEQ ID NO.:3), 圖1D) 肽: LVWEVVESV (SEQ ID NO.:5), 圖1E) 肽: SLLDKLSGI (SEQ ID NO.:10) 。圖1F顯示了各種肽在不同癌症組織中的過度提呈 (黑點) 。上面部分: 根據技術重複測量值的中值MS信號強度繪製為點, 檢測到該肽的單一HLA-A*03陽性正常組織為灰色點 (左圖), 腫瘤樣本為黑點 (右圖) 。盒顯示了標準化信號強度的中位數、第25和第75百分位數, 而鬚延伸到仍在下四分位數的1.5四分位距 (IQR) 內的最低數據點及仍在上四分位數的1.5 IQR 內的最高數據點。正常器官根據風險類別排列順序 (血細胞、血管、腦、肝、肺: 高風險, 灰色點; 生殖器官、乳腺、攝護腺: 低風險, 灰色點; 所有其他器官: 中等風險; 灰色點) 。下面部分: 每個器官的相對肽檢測頻率顯示為脊柱圖。圖表下面的數字表示每個器官分析的總樣本數中檢測到肽的樣本數 (正常樣本 N=36, 腫瘤樣本 N=107) 。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，但圖表上部分不顯示任何點。組織(從左到右):正常樣本:血細胞;blood vess (血管);腦;心;肝;肺;adrenal gl (腎上腺)膀胱;gall bl (膽囊);intest. sm (小腸);淋巴結;胰腺;皮膚;氣管。腫瘤樣本:AML (急性髓性白血病);BRCA (乳腺癌);CCC (膽管細胞癌);CLL (慢性淋巴細胞性白血病);CRC (結直腸癌);GBC (膽囊癌);GBM (膠質母細胞瘤);GC (胃癌);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 adeno (非小細胞肺癌腺癌);NSCLC other (NSCLC 樣本，不能明確分配為NSCLC adeno或NSCLC squam);NSCLC squam (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);UEC (子宮內膜癌)圖1F)肽:SLLG AATVEPPK (SEQ ID NO.: 81; A*03)。

【0062】 圖2A至2G顯示了本發明的源基因的代表性表達特徵，其在不同癌症樣本中過度表達。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FPKM值、第25和第75百分位數(盒)+鬚，鬚延伸到仍在下四分位數的1.5四分位距(IQR)內的最低數據點及仍在上四分位數的1.5 IQR內的最高數據點。正常器官根據風險類別排列順序。FPKM:每百萬映射讀數每千鹼基片

段。組織（從左到右）：正常樣本：血細胞；bloodvess（血管）；腦；心；肝；肺；脂肪（脂肪組織）；adrenal gl（腎上腺）；膽管；膀胱；骨髓；esoph（食管）；眼；gallbl（膽囊）；頭頸部；intest.la（大腸）；intest.sm（小腸）；腎；淋巴結；nerve perith（外周神經）；胰腺；parathy（甲狀旁腺）；perit（腹膜）；pituit（垂體）；胸膜；skel.mus skel（骨骼肌）；皮膚；脾；胃；甲狀腺；氣管；輸尿管；乳房；卵巢；胎盤；攝護腺；睪丸；胸腺；子宮。腫瘤樣本：AML（急性髓性白血病）；BRCA（乳腺癌）；CCC（膽管細胞癌）；CLL（慢性淋巴細胞性白血病）；CRC（結直腸癌）；GBC（膽囊癌）；GBM（膠質母細胞瘤）；GC（胃癌）；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（NSCLC樣本，不能明確分配為NSCLCaden或NSCLCsquam）；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）；UEC（子宮內膜癌）。圖2A）Ensembl ID：ENST00000225964，肽：ALLDVLVKL（SEQ ID No.:2），圖2B）Ensembl ID：ENST00000374472，肽：SLLDKLSGI（SEQ ID No 10），圖2C）Ensembl ID：ENST00000617924，肽：FASERPPSV（SEQ ID

No.:33), 圖 2D) Ensembl ID: ENST00000603198, 肽: YIYEDEVRL (SEQ ID No.:39), 圖 2E) Ensembl ID: ENST00000420453, 肽: AIWSTILIA (SEQ ID No.:43), 圖 2F) Ensembl ID: ENST00000473984, 肽: IAISQLTFV (SEQ ID No.:65), 圖 2G) Ensembl ID: ENST00000375105.7, 肽: LLLALRLSL (SEQ ID No.: 64)。

【0063】 圖 3 顯示了健康 HLA-A*02+ 供體的肽特異性 CD8+T 細胞體外反應的代表性結果。CD8+T 細胞使用人工 APC 啟動，該等人工 APC 用抗 CD28 mAb 和與 Seq ID No 102 肽 (GLDPTQFRV, 肽代碼: POLA1-003) (A, 左圖) 和 Seq ID No 103 肽 (SLVSYLDKV, 肽代碼: KRT16P-001) (B, 左圖) 複合之 HLA-A*02 塗層。經過 3 個週期的刺激後，用 A*02/Seq ID No 102 (A) 和 A*02/Seq ID No 103 (B) 的 2D 多聚體染色法對肽反應性細胞進行檢測。右圖 (A 和 B) 顯示用不相關 A*02/肽複合體刺激的細胞對照染色。活單細胞在 CD8+ 淋巴細胞上得到門控。Boolean 門控幫助排除用不同肽特定的多聚體檢測的假陽性事件。提示了特異性多聚體+細胞和 CD8+ 淋巴細胞的頻率。

【0064】 圖 4 顯示了健康 HLA-A*02+ 供體的肽特異性 CD8+T 細胞體外反應的代表性結果。CD8+T 細胞使用人工 APC 啟動，該等人工 APC 用抗 CD28 mAb 和分別與 Seq ID No 18 肽 (KMMTFFQGL) (A, 左圖)、Seq ID

No 68 肽 (K L L A D A F K V) (B, 左圖)、SeqID No 40 肽 (F T L P F L V N L) (C, 左圖)、SeqID No 19 肽 (M L L P W L P K L) (D, 左圖) 或 SeqID No 48 肽 (M L A E I H P K A) (E, 左圖) 複合之 H L A - A * 0 2 塗層。經過 3 個週期的刺激後，用 A * 0 2 / SeqID No 18 (A)、A * 0 2 / SeqID No 68 (B)、A * 0 2 / SeqID No 40 (C)、A * 0 2 / SeqID No 19 (D) 或 A * 0 2 / SeqID No 48 (E) 的 2 D 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) 顯示用不相關 A * 0 2 / 肽複合體刺激的細胞對照染色。活單細胞在 C D 8 + 淋巴細胞上得到門控。Boolean 門控幫助排除用不同肽特定的多聚體檢測的假陽性事件。提示了特異性多聚體 + 細胞和 C D 8 + 淋巴細胞的頻率。

【實施方式】

【0065】 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異物的抗原。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。

【0066】 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 C D 8 陽性 T 細胞在這種反應中發揮重要作用，該等

細胞能識別通常 8 至 10 個源自位於細胞質的蛋白或缺損核糖體產物 (DRIP) 的氨基酸殘基的主要組織相容性複合體 (MHC) 所載的肽中所含的 I 類分子。人 MHC 分子也稱為人白血球 - 抗原 (HLA)。

【0067】 除非另有說明，否則本文使用的所有術語定義如下。

【0068】 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子功能的活化。對於 MHC I 類限制性細胞毒性 T 細胞，效應子功能可能為溶解肽脈衝的、肽前體脈衝的或天然肽提呈的靶細胞、分泌細胞因子，優選為肽誘導的干擾素- γ ，TNF- α 或 IL-2，分泌效應分子，優選為肽誘導的顆粒酶或穿孔素，或脫顆粒。

【0069】 本文所用「肽」這一術語，系指一系列氨基酸殘基，通常透過相鄰氨基酸的 α -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。這些肽的長度優選為 9 個氨基酸，但至短可為 8 個氨基酸長度，至長可為 10、11 或 12 個氨基酸長度或更長，如果為 MHC-II 類肽時（本發明肽的拉長變體），至長可為 13、14、15、16、17、18、19 或 20 個氨基酸長度或更長。

【0070】 因此，「肽」這一術語應包括一系列氨基酸殘基的鹽，通常透過相鄰氨基酸的 α -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。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，本發明肽的鹽與其體內狀態的肽顯著不同，因為所述肽不是鹽形式或與體內相對離子相關。

【0071】術語「肽」應也包括「寡肽」。本文使用的術語「寡肽」是指一系列氨基酸殘基，通常透過相鄰氨基酸的 α -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。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。通常，寡肽長度約小於30個氨基酸殘基，約長於15個氨基酸。

【0072】「多肽」這一術語是指一系列氨基酸殘基，通常透過相鄰氨基酸的 α -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。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個氨基酸殘基的分子。

【0073】一種肽、寡肽、蛋白質或編碼所述分子的核苷酸如果能誘導免疫反應，則具有「免疫原性」（因此是本發明中的一種「免疫原」）。在本發明的情況下，免疫原性的更具體定義是誘導T細胞反應的能力。因此，「免疫原」是一種能夠誘導免疫反應的分子，並且在本發明的情況下，是一種能誘導T細胞反應的分子。在另一方面，所述免疫原可以是肽，肽與MHC的複合體、和/或用於提高特異性抗體或TCR抗性的蛋白。

【0074】I類T細胞「表位」要求的是一種結合至MHC I類受體上的短肽，從而形成一種三元複合體（MHC I類 α 鏈、 β -2-微球蛋白和肽），其可以透過T細胞負載匹配T細胞受體與具有適當親和力的MHC/肽複合體結合來識別。結合至MHC I類分子的肽的典型長度為8-14個氨基酸，最典型為9個氨基酸長度。

【0075】 在人類中，有三種編碼 MHC I 類分子的不同基因位點（人 MHC 分子也是指定的人白血球抗原（HLA））：HLA - A、HLA - B 和 HLA - C。HLA - A * 01、HLA - A * 02 和 HLA - B * 07 是可從這些基因位點表達的不同 MHC I 類等位基因的實例。

【0076】 表 7：HLA - A * 02、HLA - A * 01、HLA - A * 03、HLA - A * 24、HLA - B * 07、HLA - B * 08 和 HLA - B * 44 血清類型的表達頻率 F。單體型頻率 Gf 來源於一項研究，該研究使用了來自美國超過 650 萬名志願捐獻者登記的 HLA 分型數據 (Gragert et al., 2013)。所述單體型頻率是個體染色體上獨特等位基因的頻率。由於哺乳動物細胞內的二倍體染色體組，所述等位基因的基因型出現頻率較高，可以使用 Hardy - Weinberg 定律 ($F = 1 - (1 - Gf)^2$) 進行計算。

等位基因	人群	根據等位基因頻率(F) 算得的顯型
A*02	非洲人(N=28557)	32.3%
	歐洲白人(N=1242890)	49.3%
	日本人(N=24582)	42.7%
	西班牙裔，中南美(N=146714)	46.1%
	東南亞人(N=27978)	30.4%
A*01	非洲人(N=28557)	10.2%
	歐洲白人(N=1242890)	30.2%
	日本人(N=24582)	1.8%
	西班牙裔，中南美(N=146714)	14.0%
	東南亞人(N=27978)	21.0%
A*03	非洲人(N=28557)	14.8%
	歐洲白人(N=1242890)	26.4%
	日本人(N=24582)	1.8%
	西班牙裔，中南美(N=146714)	14.4%
	東南亞人(N=27978)	10.6%
A*24	非洲人(N=28557)	2.0%

	歐洲白人(N=1242890)	8.6%
	日本人(N=24582)	35.5%
	西班牙裔，中南美(N=146714)	13.6%
	東南亞人(N=27978)	16.9%
B*07	非洲人(N=28557)	14.7%
	歐洲白人(N=1242890)	25.0%
	日本人(N=24582)	11.4%
	西班牙裔，中南美(N=146714)	12.2%
	東南亞人(N=27978)	10.4%
B*08	非洲人(N=28557)	6.0%
	歐洲白人(N=1242890)	21.6%
	日本人(N=24582)	1.0%
	西班牙裔，中南美(N=146714)	7.6%
	東南亞人(N=27978)	6.2%
B*44	非洲人(N=28557)	10.6%
	歐洲白人(N=1242890)	26.9%
	日本人(N=24582)	13.0%
	西班牙裔，中南美(N=146714)	18.2%
	東南亞人(N=27978)	13.1%

【0077】 本發明的肽，優選當如本文描述納入本發明的疫苗時與 A * 0 2 結合。疫苗還可能包括泛結合 M H C II 類肽。因此，本發明的疫苗可用於治療 A * 0 2 陽性患者中的癌症，但不需要選擇 M H C II 類同種異型，因為這些肽具有泛結合性。

【0078】 如果本發明的 A * 0 2 肽與結合至另一個等位基因的肽（例如，A * 2 4）組合，與單獨的 M H C I 類等位基因相比，可治療更高比例的患者群體。雖然在大多數人群中，低於 5 0 % 的患者可由單獨的等位基因來解決問題，但是本發明中一種含 H L A - A * 2 4 和 H L A - A * 0 2 表位的疫苗可以治療任何相關人群中至少 6 0 % 的患者。具體來說，各區域中，以下比例的患者這些等位基因中的至少一個有肯定效

果：美國 61 %、西歐 62 %、中國 75 %、南韓 77 %、日本 86 %
(根據 www.allelefrequencies.net 計算) 。

表 8：歐洲白人人群中 H L A 等位基因覆蓋 (根據 (G r a g e r t
e t a l . , 2 0 1 3) 中所述的方法計算) 。

	覆蓋率(至少一個 A 等位基因)	與 B*07 組合	與 B*44 組合	與 B*07 和 B*44 組合
A*02 / A*01	70%	78%	78%	84%
A*02 / A*03	68%	76%	76%	83%
A*02 / A*24	61%	71%	71%	80%
A*01 / A*03	52%	64%	65%	75%
A*01 / A*24	44%	58%	59%	71%
A*03 / A*24	40%	55%	56%	69%
A*02 / A*01 / A*03	84%	88%	88%	91%
A*02 / A*01 / A*24	79%	84%	84%	89%
A*02 / A*03 / A*24	77%	82%	83%	88%
A*01 / A*03 / A*24	63%	72%	73%	81%
A*02 / A*01 / A*03 / A*24	90%	92%	93%	95%

【0079】 在一項優選的實施方案中，術語「核苷酸序列」系指去氧核苷酸的雜聚物。

【0080】 編碼特定肽、寡肽或多肽的核苷酸序列可為天然核苷酸序列，也可為合成核苷酸序列。一般來說，編碼肽、多肽以及本發明蛋白的 D N A 片段由 c D N A 片段和短寡核苷酸銜接物，或一系列寡核苷酸組成，以提供一種合成基因，所述基因能夠在包含源自微生物或病毒操縱子的調節元素的重組轉錄單元中被表達。

【0081】 如本文所用的術語「編碼肽的核苷酸」系指編碼肽的核苷酸序列，所述核苷酸序列包括與用於表達所述序列的生物系統相容的人工（人造）啟動和停止密碼子，所

述生物系統例如樹突細胞或用於產生TCR的另一細胞系統。

【0082】 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，具體的序列是所述序列的單鏈DNA、所述序列與其互補序列的雙工（雙鏈DNA）以及所述序列的互補序列。

【0083】 術語「編碼區」系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那部分基因，即，體內編碼所述基因的天然表達產物的區域。

【0084】 編碼區可來自非突變（「正常」）基因、突變基因或異常基因，甚至還可以來自DNA序列，完全可在實驗室中使用本領域熟知的DNA合成方法合成。

【0085】 「表達產物」這一術語是指多肽或蛋白，他是基因和遺傳碼退化並因而編碼同樣的氨基酸所造成的任何核酸序列編碼同等物的翻譯產物。

【0086】 「片斷」這一術語，當指的是一種編碼序列時，表示包含非完整編碼區的DNA的一部分，其表達產物與完整編碼區表達產物基本上具有相同的生物學功能或活性。

【0087】 術語「DNA片段」系指一種DNA聚合物，以單獨的片段形式或一種較大DNA結構的組分形式存在，他們從至少分離過一次的DNA中以基本純淨的形式獲得，即不含污染性內源性材料，並且獲得的數量或濃度能夠使用標準生化方法，例如使用克隆載體，進行識別、操縱和回收所述片段及其組分核苷酸序列。此類片段以開放閱讀框（未

被內部未翻譯序列打斷)或內含子(通常提呈於真核基因中)的形式存在。未翻譯DNA序列可能存在於開放閱讀框的下游,在那裏其不會干預編碼區的操縱或表達。

【0088】 「引物」這一術語表示一種短核酸序列,其可與一個DNA鏈配對,並在DNA聚合酶開始合成去氧核糖核酸鏈之處提供一個遊離的3'-OH末端。

【0089】 「啟動子」這一術語表示參與RNA聚合酶的結合從而啟動轉錄的DNA區域。

【0090】 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)中被移走。例如,活體動物中的天然核苷酸或多肽不是分離的,但是,從天然系統中一些或所有共存物質中分離出來的核苷酸或多肽是分離的。此類多核苷酸可能是載體的一部分和/或此類多核苷酸和多肽可能是一種組合物的一部分,並且由於所述載體或組合物不是其天然環境的一部分,因此他仍然是分離的。

【0091】 本發明中披露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;他只是一個相對的定義,可以包括高度純化或部分純化的製劑,相關領域技術人員能理解這些術語。例如,各個從已用傳統方法純化為具有電泳同質性的cDNA庫中分離出的各種克隆物。明確考慮到將起始材料或天然物質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,明確涵蓋所述多肽的純度優

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

【0092】 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/或多肽的表達載體可能以「濃縮的形式」存在。本文使用的術語「濃縮」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，有優勢的是，按重量計為0.01%，優選為至少0.1%。也明確考慮到，按重量計約為0.5%、1%、5%、10%和20%的濃縮製劑。序列、構型、載體、克隆物以及包含本發明的其他材料可有優勢地以濃縮或分離的形式存在。「活性片段」這一術語是指產生免疫反應的片段（即具有免疫原性活性），通常是一種肽、多肽或核酸序列的片段，不論是單獨或可選地與合適的佐劑一起或在載體中給予一種動物，比如哺乳動物，例如兔子或小鼠，也包括人；這種免疫反應採用的形式是在接受動物（如：人）體內刺激T細胞反應。或者，「活性片段」也可用於誘導體外T細胞反應。

【0093】 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，比如氨基酸殘基，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肽鏈內切肽酶（如胰蛋白酶或糜蛋白酶）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，這些術語系指用任何核酸內切酶處理所述多核苷酸產生的產物。

【0094】 根據本發明，術語「等同度百分比」或「等同百分比」，如果指的是序列，則表示在待對比序列（「被對比序列」）與所述序列或申請專利範圍的序列（「參考序列」）對準之後將被對比序列與所述序列或申請專利範圍的序列進行比較。然後根據下列公式計算等同度百分比：

$$\text{等同度百分比} = 100 [1 - (C/R)]$$

其中 C 是參考序列與被對比序列之間對準長度上參考序列與被對比序列之間的差異數量，其中

(i) 參考序列中每個鹼基或氨基酸序列在被對比序列中沒有對應的對準鹼基或氨基酸；

(ii) 參考序列中每個空隙，以及

(iii) 參考序列中每個對準鹼基或氨基酸與被對比序列中對準鹼基或氨基酸不同，即構成一個差異以及

(iiii) 必須在對準序列的第 1 位置開始對準；

並且 R 是參考序列與被對比序列對準長度上在參考序列中產生任何空隙也計算為一個鹼基或氨基酸的參考序列中的鹼基或氨基酸數目。

【0095】 如果「被對比序列」和「參考序列」之間存在的一個對準按上述計算的等同度百分比大致等於或大於指定的最低等同度百分比，則被對比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。

【0096】 因此，如上所述，本發明提出了一種肽，其包括選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:101 組成群組的一個

序列或與 SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101具有88%同源性的其變體，或誘導T細胞與所述肽發生交叉反應的其變體。本發明所述的肽具有與主要組織相容性複合體(MHC) I或所述肽拉長版本的II類分子結合的能力。

【0097】 在本發明中，「同源性」一詞系指兩個氨基酸序列之間的同一度（參見上文的等同度百分比，如肽或多肽序列。前文所述的「同源」是透過將理想條件下調整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等演算法創建一個排列而進行計算。也可用使用一般序列分析軟體，更具體地說，是Vector NTI、GENETYX或由公共數據庫提供的其他工具。

【0098】 本領域技術人員能評估特定肽變體誘導的T細胞是否可與所述肽本身發生交叉反應(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997)。

【0099】 發明人用給定氨基酸序列的「變體」表示，一個或兩個氨基酸殘基等的側鏈（例如透過被另一個天然發生氨基酸殘基的側鏈或一些其他側鏈取代而）發生改變，這樣，這種肽仍然能夠以由給定氨基酸序列（由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101組成）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HLA-A*02或-DR等合適MHC分子的結合槽相互作用和結合的能力，且如此至少維持（如沒有提高）其與活化T細胞的TCR結合的能力。

【0100】 隨後，這些T細胞可與細胞和殺傷細胞發生交叉反應，這些細胞表達多肽（其中包含本發明中定義的同源肽的天然氨基酸序列）。正如科學文獻和數據庫（Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997）中所述，HLA-A結合肽的某些位點通常為錨定殘基，可形成一種與HLA結合槽的結合模式相稱的核心序列，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殘基來修飾SEQ ID No: 1至SEQ ID NO:101提出的氨基酸序列，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活化T細胞的TCR結合的能力，隨後，這些T細胞可與表達一種包含本發明定義的同源肽的天然氨基酸序列的多肽的細胞發生交叉反應並殺死該等細胞。

【0101】 如果無另有說明，那麼本文公開的原始（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。首選情況是，這些取代位於氨基酸鏈的末端。此取代可能是保守性的，例如，其中一個氨基酸被具有類似結構和特點的另一個氨基酸所取代，比如其中一個疏水性氨基酸被另一個疏水性氨基酸取代。更保守的取代是具有相同或類似的大小和化學性質的氨基酸間的取代，例如，亮氨酸被異亮氨酸取代。在天然同源蛋白質家族序列變異的研究中，某些氨基酸的取代往往比其他氨基酸更具有耐受性，這些氨基酸往往表現出與原氨基

酸的大小、電荷、極性和疏水性之間的相似性相關，這是確定「保守取代」的基礎。

【0102】 在本文中，保守取代定義為在以下五種基團之一的內部進行交換：基團1—小脂肪族、非極性或略具極性的殘基 (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly)；基團2—極性、帶負電荷的殘基及其醯胺 (Asp, Asn, Glu, Gln)；基團3—極性、帶正電荷的殘基 (His, Arg, Lys)；基團4—大脂肪族非極性殘基 (Met, Leu, Ile, Val, Cys) 以及基團5—大芳香殘基 (Phe, Tyr, Trp)。

【0103】 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，屬於以下組之一的氨基酸可彼此交換，因此構成保守交換：第1組：丙氨酸 (A)、脯氨酸 (P)、甘氨酸 (G)、天冬醯胺 (N)、絲氨酸 (S)、蘇氨酸 (T)；第2組：半胱氨酸 (C)、絲氨酸 (S)、酪氨酸 (Y)、蘇氨酸 (T)；第3組：纈氨酸 (V)、異亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、丙氨酸 (A)、苯丙氨酸 (F)；第4組：賴氨酸 (K)、精氨酸 (R)、組氨酸 (H)；第5組：苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)、組氨酸 (H)；和第6組：天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)。一方面，保守氨基酸取代可選自以下取代： $T \rightarrow A$ 、 $G \rightarrow A$ 、 $A \rightarrow I$ 、 $T \rightarrow V$ 、 $A \rightarrow M$ 、 $T \rightarrow I$ 、 $A \rightarrow V$ 、 $T \rightarrow G$ 和 / 或 $T \rightarrow S$ 。

【0104】 一方面，保守氨基酸取代可包括用相同類別的另一個氨基酸取代一個氨基酸，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。其他保守氨基酸取代也可以按如下進行：(1) 芳香族：Phe、Tyr、His；(2) 質子供體：Asn、Gln、Lys、Arg、His、Trp；和(3) 質子受體：Glu、Asp、Thr、Ser、Tyr、Asn、Gln（參見例如美國專利號10,106,805，其內容透過引用整體併入本文）。

【0105】 另一方面，保守取代可以根據表A進行。用於預測蛋白質修飾耐受性的方法可參加，例如，Guo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 101(25):9205-9210 (2004)，其內容透過引用整體併入。

表 A

保守的氨基酸取代	
氨基酸	取代基（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

【0106】 另一方面，保守取代可能為表 B 中「保守取代基」標題下所示的取代。如果此類取代導致生物活性改變，則可能引入表 B 中稱為「代表性取代基」的重大改變，並且在需要時篩選產品。

表 B

氨基酸取代		
原始殘基 (天然氨基酸)	保守取代基	代表性取代基
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Iyr	Leu; Val; Ile; Ala; Iyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Ihr	Ihr
Ihr (I)	Ser	Ser
Irp (W)	Iyr	Iyr; Phe
Iyr (Y)	Phe	Irp; Phe; Ihr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

【0107】 較不保守的取代可能涉及一個氨基酸被另一個具有類似特點但在大小上有所不同的氨基酸所取代，如：丙氨酸被異亮氨酸殘基取代。高度不保守的取代可能涉及一個酸性氨基酸被另一個具有極性或甚至具有鹼性性質的氨基酸所取代。然而，這種「激進」取代不能認為是無效的而不予考慮，因為化學作用是不完全可預測的，激進的取代可能會帶來其簡單化學原理中無法預見的偶然效果。

【0108】 當然，這種取代可能涉及普通 L - 氨基酸之外的其他結構。因此，D - 氨基酸可能被本發明的抗原肽中常見的

L-氨基酸取代，也仍在本公開的範圍之內。此外，非標準氨基酸（即，除了常見的天然發生蛋白原氨基酸）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。

【0109】 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對肽抗原性的疊加或協同效應。肽內被同時取代的位置最多不能超過4個。

【0110】 基本上由本文所指氨基酸序列組成的一種肽可能有一個或兩個非錨定氨基酸（見下麵錨基序相關內容）被交換，而不存在這種情況，即相比於未修飾的肽，與人類主要組織相容性複合體（MHC）-I或II類分子的能力基本上被改變或受到不利影響。在另一實施方案中，在基本上由本文所述氨基酸序列組成的肽中，一個或兩個氨基酸可與其保守交換夥伴交換（見下文），而不存在這種情況，即相比於未修飾的肽，與人類主要組織相容性複合體（MHC）-I或II類分子的能力基本上被改變或受到不利影響。

【0111】 這些基本不與T細胞受體互動的氨基酸殘基可透過取代其他幾乎不影響T細胞反應並不妨礙與相關MHC結合的氨基酸而得到修飾。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氨基酸序列或部分或其變體的肽（發明人所用的這個術語包括寡肽或多肽）。

表 9：根據 SEQ ID NO: 4、8、72、74、96 和 97 的肽變體和基序。

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 4	Y	L	G	D	S	H	V	L	L		
變體									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									
		M							A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		
		T							V		
		T							I		
		T									
		T							A		
		Q							V		
		Q							I		
		Q									
		Q							A		
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 8	I	L	Q	S	L	V	P	A	A		
變體									V		
									I		
									L		
		M							V		
		M							I		
		M							L		
		M									
		A							V		
		A							I		
		A							L		
		A									
		V							V		
		V							I		

		V							L		
		V									
		T							V		
		T							I		
		T							L		
		T									
		Q							V		
		Q							I		
		Q							L		
		Q									
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 72	Y	L	S	F	I	K	I	L	L		
變體									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									
		M							A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		
		T							V		
		T							I		
		T									
		T							A		
		Q							V		
		Q							I		
		Q									
		Q							A		
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 74	T	L	L	S	Y	S	I	P	L		
變體									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									

		M							A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		
		T							V		
		T							I		
		T									
		T							A		
		Q							V		
		Q							I		
		Q									
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
SEQ ID No 96	K	I	I	E	D	L	A	N	T	V	
變體		L									
		L								I	
		L								L	
		L								A	
		M									
		M								I	
		M								L	
		M								A	
		A									
		A								I	
		A								L	
		A								A	
		V									
		V								I	
		V								L	
		V								A	
		T									
		T								I	
		T								L	
		T								A	
		Q									
		Q								I	
		Q								L	
		Q								A	
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

SEQ ID No 97	G	L	I	D	D	K	G	T	I	K	L
變體											V
											I
											A
		M									V
		M									I
		M									
		M									A
		A									V
		A									I
		A									
		A									A
		V									V
		V									I
		V									
		V									A
		T									V
		T									I
		T									
		T									A
		Q									V
		Q									I
		Q									
		Q									A

【0112】 較長（拉長）的肽也可能適合。MHC I類表位（通常長度為8至11個氨基酸）可能由肽從較長的肽或包含實際表位的蛋白中加工而產生。兩側有實際表位的殘基優選為在加工過程中幾乎不影響暴露實際表位所需蛋白裂解的殘基。

【0113】 本發明的肽可被拉長多達四個氨基酸，即1、2、3或4個氨基酸，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10。

表10：本發明肽的拉長組合

C-端	N-端
4	0
3	0或1
2	0或1或2

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

【0114】 拉長/延長的氨基酸可以是所述蛋白或任何其他氨基酸的原序列肽。拉長可用於增強所述肽的穩定性或溶解性。

【0115】 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，也可能包括來自參考肽的不超過四個殘基的不同肽，只要他們有基本相同的抗原活性即可。

【0116】 在一項替代實施方案中，肽的一邊或雙邊被拉長4個以上的氨基酸，優選最多30個氨基酸的總長度。這可形成MHC-II類結合肽。結合至MHC II類肽可透過本領域中已知的方法進行測試。

【0117】 因此，本發明提出了MHC I類表位的肽和變體，其中所述肽或抗體的總長度為8至100個、優選為8至30個、最優選為8至14個氨基酸長度（即10、11、12、13、14個氨基酸，如果為拉長II類結合肽時，長度也可為15、16、17、18、19、20、21或22個氨基酸）。

【0118】 當然，本發明的肽或變體能與人主要組織相容性複合體（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。

【0119】 優選情況是，當本發明的肽特異性T細胞相比於取代肽受到檢測時，如果取代肽在相對於背景肽溶解度增加達到最大值的一半，則所述肽濃度不超過約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，取代肽被一個以上的T細胞識別，最少為2個，更優選為3個。

【0120】 在本發明的一個特別優選實施方案中，肽系由或基本系由根據SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 101所選的氨基酸序列組成。

【0121】 「基本由..組成」系指本發明的肽，除了根據SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 101中的任一序列或其變體組成外，還含有位於其他N和/或C端延伸處的氨基酸，而他們不一定能形成作為MHC分子表位的肽。

【0122】 但這些延伸區域對有效將本發明中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，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-端氨基酸等。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樹突狀細胞特異性抗體。

【0123】 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。

【0124】 在反式肽鍵中，氨基酸殘基並非由肽(-CO-NH-)聯接連接，但是肽鍵是反向的。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等人在(Meziere et al., 1997)中所述的方法，以引用的方式併入本文。這種方法涉及製備包含骨架(而並非側鏈)改變的模擬肽。Meziere等人(Meziere et al., 1997)的研究顯示，這些模擬肽有利於MHC的結合和輔助性T細胞的反應。以NH-CO鍵替代CO-NH肽鍵的逆向反向肽大大地提高了抗水解性能。

【0125】 非肽鍵為-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)的非固相合成法，所述方法涉及按標準程序合成的多肽以及透過氨基醛和一種含NaCNBH₃的氨基酸相互作用而合成的非肽鍵。

【0126】 含上述序列的肽可與其氨基和/或羧基末端的其他化學基團進行合成，從而提高肽的穩定性、生物利用度、和/或親和力等。例如，苄氧羰基、丹醯基等疏水基團或叔丁氧羰基團可加入肽的氨基末端。同樣，乙醯基或9-芴甲氧羰基可能位於肽的氨基末端。此外，疏水基團、叔丁氧羰基團或氨基團都可能被加入肽的羧基末端。

【0127】 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氨基酸殘基的右旋體，通常不是其左旋體。更進一步地，本發明中肽的至少一個氨基酸殘基可被熟知的一個非天然氨基酸殘基取代。諸如此類的改變可能有助於增加本發明肽的穩定性、生物利用度和/或結合作用。

【0128】 同樣，本發明中的肽或變體可在合成肽之前或之後透過特異氨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，例如，在 R. Lundblad 所著的《Chemical Reagents for Protein Modification》(3rd ed. CRC Press, 2004) (Lundblad, 2004) 中有概述，以引用的方式併入本文。雖然氨基酸的化學修飾方法無限制，但其包括（但不限於）透過以下方法修飾：醯基化、脒基化、賴氨酸吡哆基化、還原烷基化、以 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 三硝基苯基化氨基團、透過將半胱氨酸過甲酸氧化為磺基丙氨酸而對羧基團和巰基進行氨基修飾、形成易變衍生物、與其他巰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羧甲基化、在鹼性 pH 值下與氰酸鹽甲氨醯化。在這方面，技術人員參考了《Current Protocols In Protein Science》(Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) 中第 15 章所述的在蛋白質化學修飾相關的廣泛方法。

【0129】 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-丁二酮以及1,2-烯巳二酮）的反應而形成加合物。另一個實施例是丙酮醛與精氨酸殘基的反應。半胱氨酸可在賴氨酸和組氨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氨酸的修飾。Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) 等公司的網站含有具體試劑的資訊。

【0130】 蛋白質中二硫鍵的選擇性還原也很普遍。二硫鍵可在生物制藥熱處理中形成和氧化。伍德沃德氏試劑K可用於修飾特定的谷氨酸殘基。N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基-碳二亞胺可用於形成賴氨酸殘基和谷氨酸殘基的分子內交聯。例如：焦碳酸二乙酯是修飾蛋白質組氨酸殘基的試劑。組氨酸也可使用4-羥基-2-壬烯醛進行修飾。賴氨酸殘基與其他 α -氨基基團的反應，例如，有利於肽結合到蛋白/肽的表面或交聯處。賴氨酸聚是多(乙烯)乙二醇的附著點，也是蛋白質糖基化的主要修飾位點。蛋白質的蛋氨酸殘基可透過碘乙醯胺、溴乙胺、氯胺T等被修飾。

【0131】 四硝基甲烷和N-乙醯基咪唑可用於酪氨酸殘基的修飾。經二酪氨酸形成的交聯可透過過氧化氫/銅離子完成。

【0132】 對色氨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-硝苯巰基)-3H-吡啶(BPNS-糞臭素)。

【0133】 當蛋白與戊二醛、聚乙二醇二丙烯酸酯和甲醛的交聯用於配製水凝膠時，治療性蛋白和含聚乙二醇的肽的成功修飾往往可延長迴圈半衰期。針對免疫治療的變態反應原化學修飾往往透過氰酸鉀的氨基甲醯化實現。

【0134】 一種肽或變體，其中肽被修飾或含非肽鍵，優選為本發明的實施例。

【0135】 本發明的另一實施方案涉及一種非天然肽，其中所述肽系由或基本系由根據 SEQ ID No:1 至 SEQ ID No:101 的一個氨基酸序列組成，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。本發明肽的鹽與其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乙酸鹽、 MgCl_2 、 KH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 KCl 、 NaCl 和 CaCl_2 ，
 例如：氯化物或乙酸鹽（三氟乙酸）鹽。

【0136】 一般來說，肽和變體（至少含氨基酸殘基之間的肽聯接）可使用Lukas等人(Lukas et al., 1981)以及此處引用的參考文獻所披露的固相肽合成Fmoc-聚醯胺模式進行合成。9-芴甲氧羰基(Fmoc)集團對N-氨基提供臨時保護。使用N,N-二甲基甲醯胺中的20%二甲基吡啶中對

這種鹼高度敏感的保護基團進行重複分裂。由於他們的丁基醚(在絲氨酸蘇氨酸和酪氨酸的情況下)、丁基酯(在谷氨酸和天門冬氨酸的情況下)、叔丁氧羰基衍生物(在賴氨酸和組氨酸的情況下)、三苯甲基衍生物(在半胱氨酸的情況下)及4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺醯基衍生物(在精氨酸的情況下)，側鏈功能可能會受到保護。只要穀氨醯胺和天冬醯胺為C-末端殘基，側鏈氨基功能保護所使用的是由4,4'-二甲氧基二苯基團。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N-丙烯醯肌胺酸甲酯（功能劑）構成。使用的肽-樹脂聯劑為酸敏感的4-羥甲基苯氧乙酸衍生物。所有的氨基酸衍生物均作為其預製對稱酸酐衍生物加入，但是天冬醯胺和穀氨醯胺除外，他們使用被逆轉的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。所有的耦合和脫保護反應用茚三酮、硝基苯磺酸或isotin測試程序監測。合成完成後，用濃度為95%含50%清道夫混合物的三氟醋酸，從伴隨去除側鏈保護基團的樹脂支承物中裂解肽。常用的清道夫混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水，準確的選擇依據合成肽的氨基酸組成。此外，固相和液相方法結合使用對肽進行合成是可能的（例如，請參閱(Bruckdorfer et al., 2004)以及本文引用的參考文獻）。

【0137】 三氟乙酸用真空中蒸發、隨後用承載粗肽的二乙基乙醚滴定進行去除。用簡單萃取程序（水相凍乾後，所

述程序制得不含清道夫混合物的肽) 清除任何存在的清道夫混合物。肽合成試劑一般可從 Calbiochem-Novabiochem (英國諾丁漢) 獲得。

【0138】 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、體積排阻色譜法、離子交換色譜法、疏水作用色譜法以及(通常)反相高效液相色譜法(如使用乙腈/水梯度分離)。

【0139】 肽分析可使用以下方法進行：薄層色譜法、電泳法、特別是，毛細管電泳法、固相萃取法(CSPE)、反相高效液相色譜法、酸水解後的氨基酸分析、快原子轟擊(FAB)質譜分析法以及MALDI、ESI-Q-TOF質譜分析法。

【0140】 為了選擇過度提呈的肽，計算了提呈圖，其顯示樣本中位元提呈量以及複製變化。所述特徵使相關腫瘤實體的樣本與正常組織樣本的基線值並列。可透過計算調節線性混合效應模型(Pinheiro et al., 2015)的p值將以上每個特點併入過度提呈分數中，從而透過假髮現率(Benjamini and Hochberg, 1995)調整多項檢驗(參考實施例1、圖1)。

【0141】 對於透過質譜法對HLA配體的識別和相對定量，對來自衝擊冷凍組織樣本的HLA分子進行純化並對HLA相關肽進行分離。分離的肽分開，並透過線上納米-電噴霧-電離(nanoESI)液相色譜-譜(LC-MS)實驗進行鑒定。由此產生的肽序列的驗證方法是，將急性髓性白血病、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（ $N = 490$ 個樣本）中記錄的天然腫瘤相關肽（TUMAP）的片段化模式與相同序列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HLA分子的配體，因此，這些結果為獲得自急性髓性白血病、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原發性癌症組織上確定肽的天然加工和提呈提供了直接證據。

【0142】 發現管道XPRESIDENT® v2.1（例如，參見US 2013-0096016，並在此透過引用將其整體併入本文）考慮到識別和選擇相關過度提呈的候選肽疫苗，這基於與幾種不同的非癌組織和器官相比癌症或其他受感染組織的HLA限制肽水平直接相對定量結果。這透過以下方法實現：使用專有數據分析管道處理的LC-MS採集數據、結合序列識別演算法、譜聚類、計算離子、保留時間調整、充電狀態卷積以及正態化而開發無標記差異化定量方法。

【0143】 來自公共資源（Olexiouk et al., 2016; Subramanian et al., 2011）的額外序列資訊被整合入

X P R E S I D E N T® 發現管道，以便鑒定非經典來源的 T U M A P。正交數據庫獨立搜索策略中使用了從頭測序法鑒定腫瘤特異性譜簇的肽序列（由 X P R E S I D E N T® 確定）。由此可鑒定人基因組或蛋白質組數據庫中無直接參考的新型 T U M A P。為每種肽和樣本確立了提呈水平，包括誤差估計值。腫瘤組織排他提呈的肽以及腫瘤與非腫瘤組織和器官中過度提呈的肽已經得到確定。

【0144】 來自急性髓性白血病、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 H L A 肽複合體進行純化，並且對 H L A 相關肽使用 L C - M S 進行分離和分析（見實施例 1）。本申請中包含的所有 T U M A P 使用此方式在急性髓性白血病、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進行鑒定，確認其在急性髓性白血病、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上的提呈。

【0145】 在多個急性髓性白血病、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確定的 TUMAP 用無標記 LC-MS 數據的離子計數方法進行量化。所述方法假定肽的 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常化，根據每個樣品進行平均，併合併入柱狀圖（被稱為提呈圖）。提呈圖整合了不同分析方法，如：蛋白數據庫檢索、譜聚類、充電狀態卷積（除電）和保留時間校準和正態化。

【0146】 此外，發現管道 XPRESIDENT® 可對癌症或其他感染組織上的 MHC-肽，優選為 HLA 限制性肽進行直接的絕對定量。簡言之，總細胞計數根據被分析的組織樣本的總 DNA 含量來計算。透過 nano LC-MS/MS 測量組織樣本中 TUMAP 的肽總含量為天然 TUMAP 與已知量同位素標記形式 TUMAP（所謂的內標）之間的比率。在 TUMAP 分離程序最早的可能時間點將所有選定 TUMAP 的肽:MHC 複合體摻入組織裂解物中並在完成肽分離程序後使用 nano LC-MS/MS 檢測來確定 TUMAP 分離的效率。總細胞計數和總肽量根據每份組織樣本三次測量值來計

算。所述肽特異性分離效率計算為各三次重複測量9次加標實驗的平均值（見實施例6和表15）。

【0147】 除了過度提呈肽之外，也測試了潛在基因的mRNA表達。mRNA數據透過RNA測序分析正常組織和癌組織獲得（參考實施例2、圖2）。正常組織數據的額外來源是從3000個正常組織樣本中公開發得的RNA表達數據的數據庫（Lonsdale, 2013）。獲得自蛋白的肽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，這些肽作為優選肽納入本發明。

【0148】 本發明提出了有利於治療癌症/腫瘤的肽，優選為治療過度提呈或排他提呈本發明肽的急性髓性白血病、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。這些肽由質譜分析法顯示出為由HLA分子自然提呈於原發性人急性髓性白血病、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，癌症中高度過量表達肽來源的許多源基因/蛋白質（也稱為「全長蛋白」或「潛在蛋白」）

- 本發明相關的「正常組織」應是指健康血液、腦、心臟、肝臟、肺、脂肪組織、腎上腺、膽管、膀胱、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、氣管和輸尿管細胞或其他正常組織細胞，這表明腫瘤與這些源基因的高度關聯性（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】 本發明的所有肽已被證明具有刺激T細胞反應的能力和/或過度提呈，因而可用於製備本發明的抗體和/或

T C R，例如可溶性 T C R（參見實施例 3）。此外，肽與相應的 M H C 組合時，也可用於製備本發明的抗體和 / 或 T C R，特別是 s T C R。各個方法均為技術人員所熟知，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前體物質（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相結合，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】 本說明書還涉及包含一個 α 鏈和一個 β 鏈 (α / β T C R) 的 T 細胞受體 (T C R)。還提供了由 M H C 分子提呈時可與 T C R 和抗體結合的本發明肽。

【0153】 本說明書還涉及由 H L A 分子提呈能夠與本發明的肽抗原結合的本發明的 T C R 片段。所述術語特別涉及可溶性 T C R 片段，例如缺失跨膜部分和 / 或恒定區的 T C R、單鏈 T C R 及其與例如 I g 的融合物。

【0154】 本說明書還涉及核酸、載體和用於表達 T C R 的宿主細胞和本說明書的肽；以及使用他們的方法。

【0155】 術語「T 細胞受體」（縮寫 T C R）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】 在一項實施方案中，所述說明書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】 另一個方面，本說明書涉及一種根據本說明書的方法，其中所述抗原透過與足夠量的含抗原提成細胞的抗原結合被載入表達於合適抗原提呈細胞或人工抗原呈遞細胞表面的I或II類MHC分子，或所述抗原透過四聚化被載入I或II類MHC四聚體/I或II類MHC複合單體。

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

【0159】 相對於 γ/δ 的TCR，如本文所用的術語「TCR γ 可變域」是指無前導區(L)的TCR γ V (TRGV)區與TCR γ (TRGJ)區的組合，術語TCR γ 恒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」系指無前導區(L)的TCR δ V (TRDV)區與TCR δ D/J (TRDD/TRDJ)區的組合，術語「TCR δ 恒定結構域」系指細胞外 TRDC區域或C末端截短TRDC序列。

【0160】 本說明書的TCR優選結合至肽HLA分子複合體，其具有約100 μ M或更小、約50 μ M或更小、約25 μ M或更小或約10 μ M或更小的結合親和力(KD)。更為優選的情況是具有約1 μ M或更小、約100 nM或更小、約50 nM或更小或約25 nM或更小結合親和力的高親和力TCR。本發明TCR優選結合親和力範圍的非限制性示例包括約1 nM至約10 nM；約10 nM至約20 nM；約20 nM至約30 nM；約30 nM至約40 nM；約40 nM至約50 nM；約50 nM至約60 nM；約60 nM至約70 nM；約70 nM至約80 nM；約80 nM至約90 nM；以及約90 nM至約100 nM。

【0161】 用於與本說明書TCR的相關情形時，本文所使用的「特異性結合」及其語法變體用於表示對100 μ M或更小的肽-HLA分子複合體有結合親和力(KD)的TCR。

【0162】 本說明書的 α/β 異二聚體TCR可能具有其恒定結構域之間的引入二硫鍵。這種類型的優選TCR包括那些具有一個TRAC恒定域序列和TRBC1或TRBC2恒定域序列的TCR，除非TRAC的那蘇氨酸48和TRBC1或TRBC2的絲氨酸57被半胱氨酸殘基取代，所述半胱氨酸形成TRAC恒定域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定區序列之間的二硫鍵。

【0163】 不論具有或不具有上述的引入鏈間鍵，本說明書的 α/β 雜二聚體TCR可能具有一個TRAC恒定域序列和一個TRBC1或TRBC2恒定結構域序列，並且TRAC恒定結構域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定結構域序列可

能透過 T R A C 外顯子 2 的 C y s 4 和 T R B C 1 或 T R B C 2 外顯子 2 的 C y s 4 之間的天然二硫鍵相連。

【0164】 本說明書的 T C R 可能包括選自由放射性核素、螢光團和生物素組成組中的可檢測標記。本說明書的 T C R 可能被共軛為治療活性劑，如放射性核素、化學治療劑或毒素。

【0165】 在一個實施方案中，本說明書具有在 α 鏈中至少一個突變和 / 或具有在 β 鏈中至少一個突變的 T C R 與未突變的 T C R 相比，已經修改了糖基化。

【0166】 在一個實施方案中，在 T C R α 鏈和 / 或 T C R β 鏈中包括至少一個突變的 T C R 對肽 H L A 分子複合體有結合親和力和 / 或結合半衰期，其是包含未突變 T C R α 鏈和 / 或未突變 T C R β 鏈的 T C R 的至少兩倍。腫瘤特異性 T C R 親和力增強及其開發依賴於存在最佳 T C R 親和力的窗口。這樣窗口的存在是根據觀察結果：H L A - A 2 限制性病原體等特異性 T C R 與 H L A - A 2 限制性腫瘤相關自身抗原等特異性 T C R 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翻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（所謂的自體抗原）的抗原不一定誘導針對腫瘤的功能免疫應答：表達對這些抗原具有高度反應性的 T C R 的 T 細胞會在一種稱為中樞耐受的程序中在胸腺內被不利選擇，也就是說只有對自身抗原具有低親和力 T C R 的細胞才仍然存在。因此，本說明書

的 T C R 或變體對肽的親和力可透過本領域熟知的方法來增強。

【0167】 本說明書還涉及一種識別和分離本說明書 T C R 的一種方法，所述方法包括：用 A 2 / 肽單體孵育來自 H L A - A * 0 2 陰性健康供體的 P B M C，用四聚體-藻紅蛋白 (P E) 孵育 P B M C 並透過螢光活化細胞分選 (F A C S) 方法 - C a l i b u r 分析分離高親和力 T 細胞。

【0168】 本說明書還涉及一種識別和分離本說明書 T C R 的一種方法，所述方法包括：獲得含整個人體 T C R $\alpha \beta$ 基因位點 (1 . 1 和 0 . 7 M b) 的轉基因小鼠 (其 T 細胞表達多樣化人類 T C R，用於補償小鼠 T C R 缺乏)，用一種肽對小鼠進行免疫處理，用四聚體-藻紅蛋白 (P E) 孵育從轉基因小鼠中獲得的 P B M C，並透過螢光活化細胞分選 (F A C S) 方法 - C a l i b u r 分析分離高親和力 T 細胞。

【0169】 一方面，為了獲得表達本說明書 T C R 的 T 細胞，編碼本說明書 T C R - α 和 / 或 T C R - 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。重組病毒產生，然後測試功能，如抗原特異性和功能性親合力。然後，最終產品的等分試樣被用於轉導靶 T 細胞群體 (一般純化自患者的 P B M C)，在輸入患者前展開。

【0170】 另一方面，為了獲得表達本說明書 T C R 的 T 細胞，T C R R N A 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 T C R R N A 透過電穿孔

來重新表達腫瘤特異性 T C R - α 和 / 或 T C R - β 鏈被引入獲得自健康供體的原代 C D 8 + T 細胞。

【0171】 為了增加表達，編碼本說明書 T C R 的核酸在操作上可連接到強啟動子，例如逆轉錄病毒長末端重複序列 (L T R)、巨細胞病毒 (C M V)、鼠幹細胞病毒 (M S C V) U 3、磷酸甘油酸激酶 (P G K)、 β -肌動蛋白、泛素蛋白和猿猴病毒 4 0 (S V 4 0) / C D 4 3 複合啟動子、拉長因子 (E F) - 1 a 和脾臟病灶形成病毒 (S F F V) 啟動子。在一優選實施方案中，啟動子與被表達的核酸異源。

【0172】 除了強啟動子外，本說明書的 T C R 表達盒可能含有附加的元素，可提高轉基因表達，包括中樞多聚嘌呤區 (c P P T)，其促進了慢病毒構建體的核易位 (F o l l e n z i e t a l . , 2 0 0 0)，和土撥鼠肝炎病毒轉錄後調控元素 (w P R E)，其透過提高 R N A 穩定性增加轉基因表達水平 (Z u f f e r e y e t a l . , 1 9 9 9)。

【0173】 本發明 T C R 的 α 和 β 鏈可由位於分開的載體核酸進行編碼，或者可透過位於同一載體的多核苷酸編碼。

【0174】 實現高水平的 T C R 表面表達需要引入 T C R 的 T C R - α 和 T C R - β 鏈高水平轉錄。為了實現他，本說明書的 T C R - α 和 T C R - β 鏈可在單一的載體中被克隆入雙順反子構建體，其已被證明能夠克服這一障礙。使用在 T C R - α 和 T C R - β 鏈之間的病毒核糖體內進入位元點 (I R E S) 導致兩鏈的協同表達，因為 T C R - α 和 T C R - β 鏈均由在翻譯過程中

分成兩個蛋白質的單一轉錄物產生，從而確保了產生 T C R - α 和 T C R - β 鏈的相等莫耳比。

【0175】 編碼本說明書 T C R 的核酸可以是被優化以從宿主細胞增加表達的密碼子。遺傳密碼冗餘讓一些氨基酸被一個以上的密碼子編碼，但某些密碼子沒有其他密碼子「理想」，因為匹配 t R N A 以及其他因子的相對可用性 (G u s t a f s s o n e t a l . , 2 0 0 4) 。修改 T C R - α 和 T C R - β 基因序列使得每個氨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 m R N A 不穩定性基序或隱蔽剪接位元點，已顯示可顯著提高 T C R - α 和 T C R - β 基因表達 (S c h o l t e n e t a l . , 2 0 0 6) 。

【0176】 此外，引入的和內源性 T C R 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 T C R 二聚體的形成可能會減少可用以形成正確配對 T C R 複合體的 C D 3 分子數目，因此，可以顯著降低表達所引入 T C R 的細胞的功能性親合力 (K u b a l l e t a l . , 2 0 0 7) 。

【0177】 為了減少錯配，本說明書引入的 T C R 鏈的 C - 末端結構域可以進行修改以促進鏈間親和力，而降低引入鏈與內源 T C R 配對的能力。這些策略可能包括用鼠配對物取代人類 T C R - α 和 T C R - β C 端結構域（鼠化 C 端結構域）；透過引入第二半胱氨酸殘基到引入 T C R 的 T C R - α 和 T C R - β 鏈產生 C 末端結構域的第二鏈間二硫鍵（半胱氨酸修飾）；交換 T C R - α 和 T C R - β 鏈 C 端結構域的相互作用殘基（「杵

白結構」)；直接融合 T C R - α 和 T C R - β 鏈可變結構域至 C D 3 ζ (C D 3 ζ 融合) (S c h m i t t e t a l . , 2 0 0 9) 。

【0178】 在一實施方案中，宿主細胞被改變結構以表達本說明書的 T C R 。在一優選實施方案中，宿主細胞為人 T 細胞或 T 細胞祖細胞。在一些實施方案中，T 細胞或 T 細胞祖細胞從癌症患者中獲得。在另一些實施方案中，T 細胞或 T 細胞祖細胞從健康供體中獲得。本說明書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。在一實施方案中，宿主是被轉化以表達 α / β T C R 的 γ / δ T 細胞。

【0179】 「藥物組合物」是指適合在醫療機構用於人體的組合物。優選地，藥物組合物為無菌狀態，並根據 G M P 指南生產。

【0180】 藥物組合物包括遊離形式或以一種藥用鹽形式存在的肽（也參見上文）。此處使用的「藥用鹽」系指所公開的肽的一種衍生物，其中所述肽由制酸或藥劑的鹼鹽進行改性。例如，用與適合的酸反應的遊離鹼（通常其中的中性藥物有一個中性 - N H 2 基團）製備酸式鹽。適合製備酸鹽的酸包括有機酸，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、甲磺酸、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，可在一種肽上提呈的酸性基團的鹼鹽製劑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。

【0181】 在特別優選的實施方案中，藥物組合物包括乙酸（醋酸鹽）、三氟乙酸鹽或鹽酸（氯化物）形式的肽。

【0182】 本發明中所述的藥劑優選為一種免疫治療藥劑，例如，一種疫苗。所述疫苗可直接給到患者的受影響器官，也可 i.d.、i.m.、s.c.、i.p. 和 i.v. 注射方式全身給藥，或體外應用到來自患者或人細胞株的細胞（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亞群（然後再將該亞群重新給予患者）。如果核酸體外注入細胞，可能有益於細胞轉染，以共同表達免疫刺激細胞因子（如白血球介素-2）。肽可為基本純淨或與免疫刺激佐劑組合（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）。所述肽也可共軛形成一種合適的載體（如鑰孔蟲戚血藍蛋白(KLH)或甘露）到合適的載體（參閱 WO 95/18145 及 (Longenecker et al., 1993)）。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。本發明中給出肽序列的肽預期會刺激 CD4 或 CD8 T 細胞。然而，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提供了刺激 CD4 陽性 T 細胞的適當表位。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。

【0183】 一方面，疫苗包括至少含有 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:101 中提出的氨基酸序列的一種肽以及至少另外一種肽，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。

【0184】 另一方面，本發明提出了一種編碼本發明中肽或肽變體的核酸（如多聚核苷酸）。多聚核苷酸可能為，例如，DNA、cDNA、PNA、RNA 或其組合物，他們可為單鏈和 / 或雙鏈、或多聚核苷酸的原生或穩定形式（如：具有硫代磷酸骨架的多聚核苷酸），並且只要他編碼肽，就可能包含也可能不包含內含子。當然，多聚核苷酸只能編碼加入天然肽鏈並含有天然氨基酸殘基的肽。另一個方面，本發明提出了一種可根據本發明表達多肽的表達載體。

【0185】 對於連接多核苷酸，已經開發出多種方法，尤其是針對 DNA，可透過向載體補充可連接性末端等方法進行連接。例如，可向 DNA 片段加入補充性均聚物軌道，之後 DNA 片段被插入到載體 DNA。然後，透過補充性均聚物尾巴的氫鍵結合，將載體和 DNA 片段結合，從而形成重組 DNA 分子。

【0186】 含有一個或多個酶切位點的合成接頭為 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, New Haven, 康涅狄格州，美國）購得。

【0187】 編碼本發明多肽的DNA理想修飾方法利用Saiki R K等人(Saiki et al., 1988)披露的聚合酶鏈反應方法。此方法可用於將DNA引入合適的載體(例如,透過設計合適的酶切位點),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。

【0188】 之後,DNA(或在逆轉錄病毒載體情況下,RNA)可能表達於合適的宿主,從而製成含本發明肽或變體的多肽。因此,可根據已知技術使用編碼本發明肽或變體的DNA,用本文所述方法適當修飾後,構建表達載體,然後表達載體用於轉化合適宿主細胞,從而表達和產生本發明中的多肽。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。

【0189】 編碼含本發明化合物多肽的DNA(或在逆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。同伴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遊離體還是要相互結合。

【0190】 一般來說,DNA可以適當的方向和正確的表達閱讀框架附著到一種表達載體(如質粒)中。如有必要,所述DNA可能與所需宿主所識別的相應轉錄和翻譯調節控制核苷酸序列連接,儘管表達載體中一般存在此類控制功

能。然後，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。選擇方法包括用任何必要的控制元素向表達載體插入一個DNA序列，所述序列對轉化細胞中的可選擇性屬性（如抗生素耐藥性）進行編碼。

【0191】 另外，有這種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。

【0192】 然後，本發明中的重組DNA所轉化的宿主細胞在本文所述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肽。

【0193】 有許多已知的表達系統，包括細菌（如大腸桿菌和枯草芽孢桿菌）、酵母（如酵母菌）、絲狀真菌（如曲黴菌）、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。

【0194】 典型的哺乳動物細胞組成型表達載體質粒包括CMV或含一個合適的多聚A尾巴的SV40啟動子以及抗性標誌物（如新黴素）。一個實例為從Pharmacia公司（Piscataway，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。有用的酵母質粒載體是pRS403-406和pRS413-416，一般可從Stratagene Cloning Systems公司（La Jolla，加州 92037，美國）獲得。質粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406

是酵母整合型質粒(YIp)，並插入了酵母可選擇性標記物HIS3、TRP1、LEU2和URA3。pRS413-416質粒為酵母著絲粒質粒(Ycp)。基於CMV啟動子的載體(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FLAG、3xFLAG、c-myc或MATN不同組合物中的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。

【0195】 強勁的人巨細胞病毒(CMV)啟動子調控區使得COS細胞中的組成蛋白表達水平高達1 mg/L。對於較弱的細胞株，蛋白水平一般低於0.1 mg/L。SV40複製原點的出現將導致DNA在SV40複製容納性COS細胞中高水平複製。例如，CMV載體可包含細菌細胞中的pMB1(pBR322的衍生物)複製原點、細菌中進行氨苄青黴素抗性選育的 β -內酰胺酶基因、hGH polyA和f1的原點。含前胰島素原引導(PPT)序列的載體可使用抗FLAG抗體、樹脂和板引導FLAG融合蛋白分泌到進行純化的培養基中。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。

【0196】 在另一個實施方案中，對本發明的兩個或更多的肽或肽變體進行編碼，因此，以一個連續順序(類似於「串珠狀結構」的構建體)表達。在達到目標，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的免疫應答。

【0197】 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。在有些情況下，細菌細胞為優選原核宿主細胞，典型為大腸桿菌株，例如，大腸桿菌菌株DH5（從Bethesda Research Laboratories公司（Bethesda，馬裏蘭州，美國）獲得）和RR1（從美國菌種保藏中心（ATCC，Rockville，馬裏蘭州，美國），ATCC編號31343獲得）。首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、猴子或人成纖維細胞和結腸癌細胞株中的細胞。酵母宿主細胞包括YPH499、YPH500和YPH501，一般可從Stratagene Cloning Systems公司（La Jolla，加州92037，美國）獲得。首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細胞以及人胚胎腎細胞的293號細胞。首選昆蟲細胞為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，可從教科書(Paulina Balbás and Argelia Lorence 《Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols》Part One, Second Edition, ISBN

9 7 8 - 1 - 5 8 8 2 9 - 2 6 2 - 9) 和 本 領 域 技 術 人 員 知 道 的 其 他 文 獻 中 查 到 。

【0198】 含本發明DNA結構的適當宿主細胞的轉化可使用大家熟知的方法完成，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等人的文獻（Cohen et al., 1972）和（Green and Sambrook, 2012）。酵母細胞的轉化在Sherman等人的文章（Sherman et al., 1986）中進行了描述。Beggs（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（Gaithersburg, 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大家熟知的方法。

【0199】 被成功轉化的細胞（即含本發明DNA結構的細胞）可用大家熟知的方法（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。

【0200】 應瞭解，本發明中的某些宿主細胞用於製備本發明中的肽，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某些治療方法有用。例如，抗原提呈細胞（如樹突狀細胞）可用於表達本發明中的肽，使他們可以加載入相應的MHC分子中。因此，本發明提出了含本發明中核酸或表達載體的一種宿主細胞。

【0201】 在一個優選實施方案中，宿主細胞為抗原提呈細胞，尤其是樹突狀細胞或抗原提呈細胞。2010年4月29日，美國食品和藥物管理局(FDA)批准載有含攝護腺酸性磷酸酶(PAP)的重組融合蛋白可用於治療無症狀或症狀輕微的轉移性HRPC (Rini et al., 2006; Small et al., 2006)。

【0202】 另一方面，本發明提出了一種配製一種肽及其變體的方法，所述方法包括培養宿主細胞和從宿主細胞或其培養基中分離肽。

【0203】 在另一個實施方案中，本發明中的肽、核酸或表達載體用於藥物中。例如，肽或其變體可製備為靜脈(i.v.)注射劑、皮下(s.c.)注射劑、皮內(i.d.)注射劑、腹膜內(i.p.)注射劑、肌肉(i.m.)注射劑。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。例如，給予50 µg至1.5 mg，優選為125 µg至500 µg的肽或DNA，這取決於具體的肽或DNA。上述劑量範圍在以前的試驗中成功使用(Walter et al., 2012)。

【0204】 用於主動免疫接種的多聚核苷酸可為基本純淨或包含於適合載體或輸送系統中。核酸可能為DNA、cDNA、PNA、RNA，也可能為其組合。這種核酸的設計和引入方法為本領域所熟知。例如，文獻中有其概述(Teufel et al., 2005)。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、逆轉錄病毒、疱疹病毒、腺相關病毒或含一種以上病毒元素的混合病毒的系統。非病毒輸送系統包括陽離子脂質體和陽離子聚合物，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細胞進行上述CDR的表位。

【0205】 本發明的藥劑也可能包括一種或多種佐劑。佐劑是那些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應答，因此被視為對本發明的藥劑有用。適合的佐劑包括（但不僅限於）1018ISS、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®）、雷西莫特、ImuFact IMP321、白血球介素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、基於聚丙交酯複合乙交酯[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、源自皂角苷、分支桿菌提取物和細菌細胞壁合成模擬物的Aquila公司的QS21刺激子，以及其他專有佐劑，如：Ribi's Detox、Quil或Superfos。優選佐劑如：弗氏佐劑或GM-CSF。前人對一些樹突狀細胞特異性免疫佐劑（如MF59）及其製備進行了描述（Allison and Krummel, 1995）。也可使用細胞因子。一些細胞因子被直接聯結到影響樹突狀細胞向淋巴組織遷移（如，TNF-），加速樹突狀細胞成熟為T淋巴細胞的有效抗原提呈細胞（如，GM-CSF、IL-1和IL-4）（美國5849589號專利，特別以其完整引用形式併入本文），並充當免疫佐劑（如IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN- α 、IFN- β ）（Gabrilovich et al., 1996）。

【0206】 據報告，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）活化先天（非適應性）免疫系統從而起作用。CpG引發的TLR9活化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、樹突狀細胞疫苗、自體細胞疫苗以及預防性和治療性疫苗中的多糖結合物。更重要的是，他會增強樹突狀細胞的成熟和分化，導致TH1細胞的活化增強以及細胞毒性T淋巴細胞（CTL）生成加強，甚至CD4T細胞幫助的缺失。甚至有疫苗佐劑的存在也能維持TLR9刺激作用誘發的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、納米粒子、脂肪乳或類似製劑，當抗原相對較弱時，這些對誘發強反應尤為必要。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(Krieg, 2006)。美國6406705 B1號專利對CpG寡核苷酸、非核酸佐劑和抗原結合使用促使抗原特異性免疫反應進行了描述。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)，這是本發明藥物組合物的優選成分。也可使用其他如TLR結合分子，如：RNA結合TLR7、TLR8和/或TLR9。

【0207】 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、舒尼替單抗、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、靶向免疫系統主要結構的其他抗體(如：抗-CD40、抗-TGFβ、抗-TNFα受體)和SC58175，這些藥物都可能具有治療作用

和/或充當佐劑。技術人員無需過度進行不當實驗就很容易確定本發明中有用的佐劑和添加劑的數量和濃度。

【0208】 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、多聚(I:C)及衍生物、RNA、西地那非和PLG或病毒顆粒的微粒製劑。

【0209】 本發明藥物組合物的一個優選實施方案中，佐劑從含集落刺激因子製劑中選擇，如粒細胞巨噬細胞集落刺激因子（GM-CSF，沙格司亭）、環磷醯胺、咪喹莫特、雷西莫特和干擾素- α 。

【0210】 本發明藥物組合物的一個優選實施方案中，佐劑從含集落刺激因子製劑中選擇，如粒細胞巨噬細胞集落刺激因子（GM-CSF，沙格司亭）、環磷醯胺、咪喹莫特和雷西莫特。在本發明藥物組合物的一個優選實施方案中，佐劑為環磷醯胺、咪喹莫特或雷西莫特。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。

【0211】 此組合藥物為非腸道注射使用，如皮下、皮內、肌肉注射，也可口服。為此，肽和任選其他分子在藥用載體中分解或懸浮，優選為水載體。此外，組合物可包含輔料，如：緩衝劑、結合劑、衝擊劑、稀釋劑、香料、潤滑劑等。這些肽也可與免疫刺激物質合用，如：細胞因子。可用於此類組合物的更多輔料可在從A. Kibbe所著的

Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000) 等書中獲知。此組合藥物可用於阻止、預防和/或治療腺瘤或癌性疾病。例如，EP 2 112 253 中有代表性製劑。

【0212】 重要的是要認識到，透過本發明的疫苗引發的免疫應答在不同的細胞階段和開發的不同階段攻擊癌症。而且不同的癌症相關信號通路被攻擊。這相對於其他疫苗的優勢，這些疫苗只針對一個或幾個靶標，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，幾個腫瘤相關肽的組合確保了每個腫瘤都承擔至少一些靶標。所述組合物以這樣的方式設計，預期每個腫瘤可表達幾種抗原並覆蓋腫瘤生長和維持所需要的幾種獨立的途徑。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誌物評估，但仍然確保多個靶標同時被誘導的免疫應答攻擊，這對於療效很重要(Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012)。

【0213】 本文所用的「支架」一詞是指與（如抗原）決定因子特異性結合的分子。在一項實施方案中，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（如根據目前申請中肽和MHC的複合體）。在另一項實施例中，支架能夠透過其靶抗原（例如T細胞受體複合體抗原）活化信號通路。支架包括但不限於抗體及

其片段，抗體的抗原結合區，其包含抗體重鏈可變區和抗體輕鏈可變區，結合的蛋白包括至少一個錨蛋白重複序列基元和單域抗原結合(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。為了評估某個分子是否是結合至靶點的支架，可進行結合測定。

【0214】 「特異性」結合系指，與其他天然肽-MHC複合體相比，所述支架與感興趣的肽-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不能夠殺死無特定靶點但提呈一個或多個其他肽-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。他們應該含有未改變的肽-MHC提呈的靶細胞(原發細胞或細胞系)或載有肽的細胞進行，以便達到天然肽-MHC的水平。

【0215】 各支架可包括一個標記，其透過確定是否存在或不存在標籤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。

【0216】 各支架可與第二個活性分子(例如IL-21、抗CD3、抗CD28)共軛。

【0217】 關於多肽支架的進一步資訊，可參閱，例如，在 W O 2 0 1 4 / 0 7 1 9 7 8 A 1 背景技術部分以及其中引用的參考文獻。

【0218】 本發明還涉及適體。適體（例如，參見 W O 2 0 1 4 / 1 9 1 3 5 9 及其中引用的文獻）是短的單鏈核酸分子，其可以折疊為所定義的三維結構並識別特定的靶標結構。他們似乎是開發靶向治療的合適替代方法。適體已顯示可選擇性與具有高親和力和特異性的複合體靶標相結合。

【0219】 識別細胞表面分子的適體在過去十年內已經確定，並為開發診斷和治療方法提供了手段。由於適體已顯示幾乎無毒性和免疫原性，因此，他們是生物醫學應用中有前景的候選物質。事實上適體，例如攝護腺特異性膜抗原識別適體，已被成功地用於靶向治療並在體內模型的異種移植物中顯示出功能。此外，認識到特定腫瘤細胞系的適體也已確定。

【0220】 可選擇 D N A 適體來揭示各種癌細胞的廣譜識別屬性，特別是那些來自於實體瘤的細胞，而非致瘤和主要健康細胞不被識別。如果所識別的適體不僅識別腫瘤特異性子類型，而且與一系列腫瘤相互作用，這使適體適用於作為所謂的廣譜診斷和治療手段。

【0221】 此外，用流式細胞儀對細胞結合行為的研究顯示，適體在奈莫耳範圍內顯示出很好的親和力。

【0222】 適體用於診斷和治療目的。此外，也可能顯示，一些適體被腫瘤細胞吸取，因而可作為抗癌劑靶向遞送的分子賦形劑，例如 siRNA 進入腫瘤細胞。

【0223】 可選擇適體針對複合體的靶標，如細胞和組織以及根據當前發明包含（優選由下列組成）根據任何 SEQ ID NO 1 至 SEQ ID NO 101 的一個序列的肽與 MHC 分子之複合體，使用細胞 SELEX（透過指數富集的配體系統進化）技術。

【0224】 本發明中的肽可用於生成和開發出針對 MHC / 肽複合體的特定抗體。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。

【0225】 因此，本發明的另一方面是提出產生特異性結合至與 HLA 限制性抗原（優選為根據本發明的肽）絡合的 I 或 II 類人主要組織相容性複合體（MHC）的一種重組抗體的方法，所述方法包括：用可溶形式的與 HLA 限制性抗原絡合的（MHC）I 或 II 類分子對包含表達所述主要組織相容性複合體（MHC）I 或 II 類的基因工程非人哺乳動物進行免疫；將 mRNA 分子與產生所述非人哺乳動物細胞的抗體分離；產生一個噬菌體顯示庫，顯示由所述 mRNA 分子編碼的蛋白分子；以及將至少一個噬菌體與所述噬菌體顯示庫分離，所述的至少一個噬菌體顯示所述抗體特異性地結合

至與HLA限制性抗原絡合的所述人主要組織相容性複合體(MHC) I或II類。

【0226】 因此，本發明的另一方面提出一種抗體，其特異性結合至與一種HLA限制性抗原絡合的I或II類人主要組織相容性複合體(MHC)，其中所述抗體優選為多克隆抗體、單克隆抗體、雙特異性抗體和/或嵌合抗體。

【0227】 產生這種抗體和單鏈I類主要組織相容性複合體的相應方法，以及產生這些抗體的其他工具在WO 03/068201、WO 2004/084798、WO 01/72768、WO 03/070752以及出版物(Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003)中進行了披露，為了本發明之目的，所有參考文獻透過引用被完整地併入本文。

【0228】 優選地，所述抗體與複合體的結合親和力低於20奈莫耳，優選為低於10奈莫耳，這在本發明情況下也被視為具有「特異性」。

【0229】 本發明涉及一種肽，包含選自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101組成群組的一個序列或與SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101具有至少88%同源性（優選為相同）的其變體，或誘導T細胞與所述肽發生交叉反應的其變體，其中，所述肽不是潛在全長多肽。

【0230】 本發明進一步涉及一種肽，包含選自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101的組的一個序列、或與SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101具有至少88%同源性（優選為

相同)的一種變體，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14個氨基酸。

【0231】 本發明進一步涉及本發明的肽，其具有與主要組織相容性複合體(MHC) I或II類分子結合的能力。

【0232】 本發明進一步涉及本發明中的肽，其中肽系由或基本系由根據SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101的一個氨基酸序列組成。

【0233】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中所述肽(在化學上)被修飾和/或包含非肽鍵。

【0234】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中所述肽為融合蛋白的一部分，特別包括HLA-DR抗原相關不變鏈(Ii)的N-端氨基酸，或其中所述肽與一種抗體(例如，樹突狀細胞特定抗體)融合。

【0235】 本發明進一步涉及一種核酸，其編碼本發明所述肽，前提是所述肽並非完整(完全)的人蛋白。

【0236】 本發明進一步涉及一種本發明的核酸，為DNA、cDNA、PNA、RNA，也可能為其組合物。

【0237】 本發明進一步涉及一種能表達本發明核酸的表達載體。

【0238】 本發明進一步涉及本發明的一種肽、本發明的一種核酸或本發明的一種表達載體在藥物中的用途，特別是用於治療急性髓性白血病、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。

【0239】 本發明進一步涉及含本發明核酸或本發明表達載體的一種宿主細胞。

【0240】 本發明進一步涉及本發明的宿主細胞，其為抗原提呈細胞，優選為樹突細胞。

【0241】 本發明進一步涉及配製本發明一種肽的一種方法，所述方法包括培養本發明的宿主細胞和從所述宿主細胞或其培養基中分離肽。

【0242】 本發明進一步涉及本發明中的方法，其中抗原透過與足夠量的含抗原提成細胞的抗原結合被載入表達於合適抗原提呈細胞表面的I或II類MHC分子。

【0243】 本發明進一步涉及本發明的方法，其中所述抗原提呈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:101的所述肽或所述變體氨基酸序列。

【0244】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的活化T細胞，其中所述T細胞有選擇性地識別一種細胞，所述細胞異常表達含一種本發明氨基酸序列的多肽。

【0245】 本發明進一步涉及一種殺傷患者靶細胞的方法，其中患者的靶細胞異常表達含本發明任何氨基酸序列的多肽，所述方法包括給予患者本發明的有效量T細胞。

【0246】 本發明進一步涉及任何所述肽、本發明的一種核酸、本發明的一種表達載體、本發明的一種細胞、本發明一種作為藥劑或製造藥劑的活化細胞毒性T淋巴細胞的用途。本發明進一步涉及一種本發明的用途，其中藥劑可有效抗癌。

【0247】 本發明進一步涉及一種本發明的用途，其中所述藥劑為一種疫苗。本發明進一步涉及一種本發明的用途，其中藥劑可有效抗癌。

【0248】 本發明進一步涉及根據本發明的用途，其中所述癌細胞為急性髓性白血病、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，或其他實體或血液腫瘤細胞，如：急性髓性白血病、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。

【0249】 本發明進一步涉及一種基於本發明肽的特定標誌物蛋白和生物標誌物，在此稱為「靶標」，其可用於診斷和/或判斷急性髓性白血病、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預後。本發明還涉及這些供癌症治療使用的新靶點。

【0250】 本文中術語「抗體」為廣義上的定義，既包括多克隆也包括單克隆抗體。除了完整或「全」免疫球蛋白分子，「抗體」這一術語還包括這些免疫球蛋白分子和人源化免疫球蛋白分子的片段（如，CDR、Fv、Fab和Fc片段）或聚合物，只要他們表現出本發明的任何期望屬性（例如，急性髓性白血病、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、將毒素傳遞給癌症標誌物基因表達水平增加的急性髓性白血病、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、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和/或抑制急性髓性白血病、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活性)。

【0251】 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制得。技術人員會瞭解全長急性髓性白血病、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源經純化而得，也可利用重組DNA技術生產。

【0252】 例如，編碼本發明肽（例如，根據SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:101多肽的肽）或其變體或片段的cDNA，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，並用於產生一種特異性結合用於產生本發明抗體的急性髓性白血病、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單克隆或多克隆抗體製劑。

【0253】 本領域的技術人員會認識到，兩種或兩種以上不同集合的單克隆抗體或多克隆抗體能最大限度地增加獲得一種含預期用途所需的特異性和親和力（例如，ELISA法、免疫組織化學、體內成像、免疫毒素療法）的抗體的可能性。根據抗體的用途，用已知的方法對其期望活性進行測試（例如，ELISA法、免疫組織化學、免疫治療等；要獲取產生和測試抗體的進一步指導，請參閱，例如，Greenfield, 2014（Greenfield, 2014）。例如，所述抗體可用ELISA法或免疫印跡法、免疫組織化學染色福馬林固定的癌組織或冰凍的組織切片進行檢測。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。

【0254】 此處使用的術語「單克隆抗體」系指從大量同質抗體中獲得的一種抗體，即，由相同的抗體組成的抗體群，但可能少量提呈的自然突變除外。此處所述的單克隆抗體具體包括「嵌合」抗體，其中一部分重鏈和/或輕鏈與從特定物種中獲得的抗體或屬於特定抗體類型和分類型抗體的相應序列相同（同質），同時，剩餘鏈與從其他物種中獲得的抗體或屬於特定抗體類型和子類型抗體的相應序列以及這些抗體的片段相同（同質），只要他們表現出預期的拮抗活性（美國4816567號專利，其在此以其整體併入）。

【0255】 本發明的單克隆抗體可能使用雜交瘤方法制得。在雜交瘤方法中，老鼠或其他適當的宿主動物，通常用免

疫製劑以引發產生或能產生將特異性結合至免疫製劑的抗體。或者，淋巴細胞可在體外進行免疫。

【0256】 單克隆抗體也可由DNA重組方法制得，如：美國4816567號專利所述。編碼本發明單克隆抗體的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重鏈和輕鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針）。

【0257】 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在WO 94/29348和美國4342566號專利中有描述。抗體的木瓜蛋白酶消化通常產生兩種相同的抗原結合性片段，稱為Fab片段（每個片段都有一個抗原結合點）和殘餘Fc片段。胃蛋白酶處理產生aF(ab')₂片段和pFc'片段。

【0258】 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氨基酸殘基的插入、刪除、替換、或其他選擇性修飾，但前提是，片段的活性與非修飾的抗體或抗體片段相比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/添加可與二硫鍵結合的氨基酸，以增加其生物壽命、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。這些方法為本行業技術人員所熟知，可包括編碼抗體片段的核酸的特定位點基因突變。

【0259】 本發明的抗體可進一步包括人源化抗體或人抗體。非人（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序列），其中包含從非人免疫球蛋白中獲得的最小序列。人源化抗體包括人免疫球蛋白（受體抗體），其中來自受體互補決定區（CDR）的殘基被來自非人物種（供體抗體）（如具有與其特異性、親和力和能力的小鼠、大鼠或兔子）CDR的殘基取代。在某些情況下，人類免疫球蛋白的Fv框架（FR）殘基被相應的非人殘基取代。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，人源化抗體將包括幾乎所有的至少一個、通常為二個可變域，其中，全部或幾乎全部的CDR區域均對應於非人免疫球蛋白的區域並且全部或幾乎全部的FR區域均為人免疫球蛋白相同序列的區域。理想情況是，人源化抗體還將包括至少免疫球蛋白恒定區（Fc）的一部分，通常是人免疫球蛋白的恒定區的一部分。

【0260】 人源化非人抗體的方法為本行業所熟知。一般來說，人源化抗體具有一個或多個從非人源頭引入的氨基酸殘基。這些非人氨基酸殘基往往被稱為「輸入」殘基，通常從「輸入」可變域中獲得。人源化基本上可以透過將齧齒動物CDR或CDR序列取代為相應的人抗體序列而完

成。因此，這種「人源化」抗體為嵌合抗體（美國 4 8 1 6 5 6 7 號專利），其中大大少於完整的人可變域被來自於非人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 C D R 殘基以及可能的一些 F R 殘基被來自齧齒動物抗體中的類似位點的殘基取代。

【0261】 可使用免疫後在內源性免疫球蛋白產生缺失時能產生完整人抗體的轉基因動物（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純合性缺失導致內源性抗體生成的完全抑制。在此種系變種小鼠中人種系免疫球蛋白基因陣列的轉移在抗原挑戰後將導致人抗體的生成。人抗體也可在噬菌體展示庫中產生。

【0262】 本發明的抗體優選為透過藥用載體的形式給予受試者。通常，在製劑中使用適量的藥用鹽，以使製劑等滲。藥用載體的例子包括生理鹽水、林格氏液和葡萄糖溶液。溶液的 p H 值優選為約 5 至 8，更優選為約 7 至 7.5。此外，載體還包括緩釋製劑，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。本行業的技術人員熟知，某些載體可能為更優選，取決於例如，抗體的給藥途徑和濃度。

【0263】 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

以透過瘤內或瘤周途徑給予，從而發揮局部和全身的治療作用。局部或靜脈注射為優選。

【0264】 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行業的技術範圍內。本行業的技術人員會明白，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、使用的抗體以及其他正在使用的藥物的特定類型。單獨使用的抗體的通常日劑量可能為約 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至最多 $100\ \text{mg}/\text{kg}$ 體重或更多，這取決於上述因素。給予抗體，優選為治療急性髓性白血病、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後，治療抗體的療效可透過技術人員熟知的不同方法評估。例如：接受治療的受試者癌症的大小、數量和/或分佈可使用標準腫瘤成像技術進行監測。因治療而給予的抗體與不給予抗體時的病程相比，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。

【0265】 本發明的另一方面提出了製備識別特異性肽-MHC複合體的可溶性T細胞受體(sTCR)的一種方法。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（美國

2010/0113300, (Liddy et al., 2012))。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，可透過例如非天然二硫鍵、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(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T細胞受體可以連接到毒素、藥物、細胞因子（參見US 2013/0115191）、域招募效應細胞，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sTCR之組合。WO 2013/057586A1公開了進一步的產生方法。

【0266】此外，可用本發明的肽和/或TCR或抗體或其他結合分子在活檢樣本的基礎上驗證病理師對癌症的診斷。

【0267】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 ），從而可免疫閃爍掃描法使腫瘤局限化。在一實施方案中，其中的抗體或片段與兩個或兩個以上選自包括上述蛋白的組的蛋白質靶標的細胞外域結合，並且親和力值(Kd)低於 $1 \times 10 \mu\text{M}$ 。

【0268】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。探針檢測方法包括但不限於，螢光、光、共聚焦和電鏡方法；磁共振成像和光譜學技術；透視、電腦斷層掃描和正電子發射斷層掃描。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、以及其他本行業熟知的方法。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抗和二抗接觸的樣本，其中所述抗體用於檢測原位蛋白的表達。

【0269】 本發明的另一方面包括一種體外製備活化的T細胞的方法，所述方法包括將T細胞與載有抗原的人MHC分子進行體外連接，這些分子在合適的抗原提呈細胞表面表達足夠的一段時間從而以抗原特異性方式活化T細胞，其中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提呈細胞一同使用。

【0270】 優選情況是，哺乳動物細胞的TAP肽轉運載體缺乏或水平下降或功能降低。缺乏TAP肽轉運載體的適合細胞包括T2、RMA-S和果蠅細胞。TAP是與抗原加工相關的轉運載體。

【0271】 人體肽載入的缺陷細胞株T2可得自美國菌種保藏中心（12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852，美國）目錄號CRL1992；果蠅細胞

株 *Schneider* 2 號株可得自 ATCC 目錄號 CRL 19863；小鼠 RMA-S 細胞株由 *Ljunggren* 等人 (*Ljunggren and Karre*, 1985) 描述過。

【0272】 優選情況是，宿主細胞在轉染前基本上不表達 MHC I 類分子。刺激因子細胞還優選為表達對 T 細胞共刺激信號起到重要作用的分子，如，B7.1、B7.2、ICAM-1 和 LFA 3 中的任一種分子。大量 MHC I 類分子和共刺激分子的核酸序列可從 GenBank 和 EMBL 數據庫中公開獲得。

【0273】 當 MHC I 類表位用作一種抗原時，T 細胞為 CD8 陽性 T 細胞。

【0274】 如果抗原提呈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:101 的肽或其變體氨基酸序列。

【0275】 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 (*Plebanski et al.*, 1995) 使用自體外周血淋巴細胞 (PLB) 制得 T 細胞。另外，也可能用肽或多肽脈衝處理樹突狀細胞或透過與重組病毒感染而製成自體 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配製自體 T 細胞。*S. Walter* 等人在 (*Walter et al.*, 2003) 中描述了透過使用人工抗原提呈細胞 (aAPC) 體外起動 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）而生成aAPC。所述系統實現了對aAPC上的MHC密度進行精確調節，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，諸如白血球介素-12的細胞因子。

【0276】 也可用同種異體細胞制得T細胞，在WO 97/26328中詳細描述了一種方法，以參考文獻方式併入本文。例如，除了果蠅細胞和T2細胞，也可用其他細胞來提呈肽，如CHO細胞、杆狀病毒感染的昆蟲細胞、細菌、酵母、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(Porta et al., 1994)，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）。

【0277】 被活化的T細胞直接針對本發明中的肽，有助於治療。因此，本發明的另一方面提出了用本發明前述方法制得的活化T細胞。

【0278】 按上述方法製成的活化T細胞將會有選擇性地識別異常表達含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO 101氨基酸序列的多肽的細胞。

【0279】 優選情況是，T細胞透過與其含HLA/肽複合體的TCR相互作用（如，結合）而識別所述細胞。T細胞是殺

傷患者靶細胞方法中有用的細胞，其靶細胞異常表達含本發明中氨基酸序列的多肽，其中所述患者給予有效量的活化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活化（即，他們為自體T細胞）。或者，T細胞不是源自所述患者，而是來自另一個人。當然，優選情況是，所述個體為健康人。發明人使用「健康個人」系指一個人一般健康良好，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。

【0280】 根據本發明，CD8-陽性T細胞的體內靶細胞可為腫瘤細胞（有時表達MHC-II類抗原）和/或腫瘤周圍的基質細胞（腫瘤細胞）（有時也表達MHC-II類抗原；（Dengjel et al., 2006））。

【0281】 本發明所述的T細胞可用作治療性組合物中的活性成分。因此，本發明也提出了一種殺傷患者靶細胞的方法，其中患者的靶細胞異常表達含本發明中氨基酸序列的多肽，所述方法包括給予患者上述有效量的T細胞。

【0282】 發明人所用的「異常表達」還指，與正常組織中的表達水平相比，多肽過度表達，或所述基因在腫瘤源自的組織中未表達，但是在所述腫瘤中卻表達。「過度表達」系指多肽水平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。

【0283】 T細胞可用本領域已知的方法制得（如，上述方法）。

【0284】 T細胞繼轉移方案為本領域所熟知的方案。綜述可發現於：Gattioni 等人和 Morgan 等人的文章 (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006)。

【0285】 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細胞可轉給患者用於癌症治療。

【0286】 本發明的任一分子（即肽、核酸、抗體、表達載體、細胞、活化T細胞、T細胞受體或編碼核酸）都有益於治療疾病，其特點在於細胞逃避免疫反應的打擊。因此，本發明的任一分子都可用作藥劑或用於製造藥劑。這種分子可單獨使用也可與本發明中的其他分子或已知分子聯合使用。

【0287】 本發明還涉及一種套件，其包括：

- (a) 一個容器，包含上述溶液或凍乾粉形式的藥物組合物；
- (b) 可選地，第二個容器，其含有凍乾粉劑型的稀釋劑或重組溶液；和
- (c) 可選地，(i)使用溶液或(ii)重組和/或使用凍乾粉劑型的說明書。

【0288】 所述套件還步包括一個或多個(iii)緩衝劑，(iv)稀釋劑，(v)過濾液，(vi)針頭，或(v)注射器。容器最好是瓶子、西林瓶、注射器或試管，可以為多用途容器。藥物組合物優選為凍乾粉劑。

【0289】 本發明中的套件優選包含一種置於合適容器中的凍乾製劑以及重組和/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。試劑盒和/或容器最好有容器或關於容器的說明書，指明重組和/或使用的方向。例如，標籤可能表明凍乾劑型將重組為上述肽濃度。所述標籤可進一步表明製劑用於皮下注射。

【0290】 存放製劑的容器可使用多用途西林瓶，使得可重複給予（例如，2 - 6次）重組劑型。所述套件可進一步包括裝有合適稀釋劑（如碳酸氫鈉溶液）的第二個容器。

【0291】 稀釋液和凍乾製劑混合後，重組製劑中的肽終濃度優選為至少 0.15 mg/mL/肽 ($= 75 \mu\text{g}$)，不超過 3 mg/mL/肽 ($= 1500 \mu\text{g}$)。該套件還可包括商業和用戶角度來說可取的其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑，過濾液、針頭、注射器和帶有使用說明書的包裝插頁。

【0292】 本發明中的套件可能有一個單獨的容器，其中包含本發明所述的藥物組合物製劑，該製劑可有其他成分（例如，其他化合物或及其藥物組合物），也可無其他成分，或者每種成分都有其不同容器。

【0293】 優選情況是，本發明的套件包括與本發明的一種製劑，包裝後與第二種化合物（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。該套件的成分可進行預絡合或每種成分在給予患者之前可

放置於單獨的不同容器。該套件的成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。該套件的成分也可為固體形式，加入合適的溶劑後轉換為液體，最好放置於另一個不同的容器中。

【0294】 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，當成分不只一種時，套件將包含第二個西林瓶或其他容器，使之可以單獨定量。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），使得可注射本發明的藥物（本套件的組合物）。

【0295】 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。優選為皮下給藥，最優選為皮內給藥可透過輸液泵給藥。

【0296】 由於本發明的肽分離自急性髓性白血病、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，本發明的藥劑優選用於治療急性髓性白血病、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。

【0297】 本發明進一步涉及為個體患者製備個體化藥物的一種方法，其中包括：製造含選自預篩選 T U M A P 存儲庫至少一種肽的藥物組合物，其中藥物組合物中所用的至少一種肽選擇為適合於個體患者。在一項實施方案中，藥物組合物為一種疫苗。該方法也可以改動以產生下游應用的 T 細胞克隆物，如：T C R 隔離物或可溶性抗體和其他治療選擇。

【0298】 「個體化藥物」系指專門針對個體患者的治療，將僅用於該等個體患者，包括個體化活性癌症疫苗以及使用自體組織的過繼細胞療法。

【0299】 如本文所述，「存儲庫」應指已經接受免疫原性預篩查和 / 或在特定腫瘤類型中過度提呈的一組或一系列肽。「存儲庫」一詞並不暗示，疫苗中包括的特定肽已預先製造並儲存於物理設備中，雖然預期有這種可能性。明確預期所述肽可以用於新製造每種個體化疫苗，也可能被預先製造和儲存。存儲庫（例如，數據庫形式）由腫瘤相關肽組成，其在具有各種 H L A - A H L A - B 和 H L A - C 等位基因的急性髓性白血病、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腫瘤組織中高度過度表達。其可能含有包括 MHC I 類和 MHC II 類肽或拉長的 MHC I 類肽。除了從幾種急性髓性白血病、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、膀胱癌和子宮內膜組織癌組織中採集的腫瘤相關肽外，存儲庫還可能包含 HLA-A*02、HLA-A*01、HLA-A*03、HLA-A*24、HLA-B*07、HLA-B*08 和 HLA-B*44 標記肽。這些肽可對 TUMAP 誘導的 T 細胞免疫進行量化比較，從而可得出疫苗抗腫瘤反應能力的重要結論。其次，在沒有觀察到來自患者「自身」抗原 TUMAP 的任何疫苗誘導的 T 細胞反應時，他們可作為來自「非自身」抗原的重要陽性對照肽。第三，他還可對患者的免疫功能狀態得出結論。

【0300】 存儲庫的 TUMAP 透過使用一種功能基因組學方法進行鑒定，該方法結合了基因表達分析、質譜法和 T 細胞免疫學 (XPresident®)。該方法確保了只選擇真實存在於高百分比腫瘤但在正常組織中不表達或僅很少量表達的 TUMAP 用於進一步分析。對於初始肽的選擇，患者的急性髓性白血病、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和健康供體的血液以循序漸進的方法進行分析：

1. 惡性材料的 H L A 配體用質譜法確定

2. 使用全基因組信使核糖核酸 (m R N A) 表達分析法用於確定惡性腫瘤組織 (急性髓性白血病、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) 與一系列正常器官和組織相比過度表達的基因

3. 確定的 H L A 配體與基因表達數據進行比較。腫瘤組織上過度提呈或選擇性提呈的肽，優選為第2步中檢測到的選擇性表達或過度表達基因所編碼的考慮為多肽疫苗的合適候選 T U M A P 。

4. 文獻檢索以確定更多證據以支持確認為 T U M P 的肽的相關性

5. 過度表達在 m R N A 水平的相關性由腫瘤組織第3步選定的 T U M A P 重新檢測而確定，並且在健康組織上缺乏 (或不經常) 檢測。

6. 為了評估透過選定的肽誘導體內 T 細胞反應是否可行，使用健康供體以及急性髓性白血病、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人T細胞進行體外免疫原性測定。

【0301】 一方面，在將所述肽加入存儲庫之前，對其進行篩查以瞭解免疫原性。舉例來說（但不限於此），納入存儲庫的肽的免疫原性的確定方法包括體外T細胞起動，具體為：用裝載肽/MHC複合體和抗CD28抗體的人工抗原提呈細胞反復刺激來自健康供體的CD8+T細胞。

【0302】 這種方法優選用於罕見癌症以及有罕見表達譜的患者。與含目前開發為固定組分的多肽雞尾酒相反的是，存儲庫可將腫瘤中抗原的實際表達於疫苗進行更高程度的匹配。在多目標方法中，每名患者將使用幾種「現成」肽的選定單一肽或組合。理論上來說，基於從50抗原肽庫中選擇例如5種不同抗原肽的一種方法可提供大約170萬種可能的藥物產品（DP）組分。

【0303】 在一方面，選擇所述肽用於疫苗，其基於個體患者的適合性，並使用本發明此處或後文所述的方法。

【0304】 HLA表型、轉錄和肽組學數據從患者的腫瘤材料和血液樣本中收集，以確定最合適每名患者且含有「存儲庫」和患者獨特（即突變）TUMAP的肽。將選擇的那些肽選擇性地或過度表達於患者腫瘤中，並且可能的情況下，如果用患者個體PBMC進行檢測，則表現出很強的體外免疫原性。

【0305】 優選的情況是，疫苗所包括的肽的一種確定方法包括：(a) 識別由來自個體患者腫瘤樣本提呈的腫瘤相關肽(TUMAP)；(b) 將(a)中鑒定的肽與上述肽的存儲庫(數據庫)進行比對；且(c)從與患者中確定的腫瘤相關肽相關的存儲庫(數據庫)中選擇至少一種肽。例如，腫瘤樣本提呈的TUMAP的鑒定方法有：(a1)將來自腫瘤樣本的表達數據與所述腫瘤樣本組織類型相對應的正常組織樣本的表達數據相比對，以識別腫瘤組織中過度表達或異常表達的蛋白；以及(a2)將表達數據與結合到腫瘤樣本中I類MHC和/或II類分子的MHC配體序列想關聯，以確定來源於腫瘤過度表達或異常表達的蛋白質的MHC配體。優選情況是，MHC配體的序列的確定方法是：洗脫來自腫瘤樣本分離的MHC分子結合肽，並測序洗脫配體。優選情況是，腫瘤樣本和正常組織從同一患者獲得。

【0306】 除了使用存儲庫(數據庫)模型選擇肽以外，或作為一種替代方法，TUMAP可能在新患者中進行鑒定，然後列入疫苗中。作為一種實施例，患者中的候選TUMAP可透過以下方法進行鑒定：(a1)將來自腫瘤樣本的表達數據與所述腫瘤樣本組織類型相對應的正常組織樣本的表達數據相比對，以識別腫瘤組織中過度表達或異常表達的蛋白；以及(a2)將表達數據與結合到腫瘤樣本中I類MHC和/或II類分子的MHC配體序列想關聯，以確定來源於腫瘤過度表達或異常表達的蛋白質的MHC配體。作為另一實施例，蛋白的鑒定方法為可包含突變，其對於腫瘤樣本相對

於個體患者的相應正常組織是獨特的，並且TUMAP可透過特異性靶向作用於變異來鑒定。例如，腫瘤以及相應正常組織的基因組可透過全基因組測序方法進行測序：為了發現基因蛋白質編碼區域的非同義突變，從腫瘤組織中萃取基因組DNA和RNA，從外周血單核細胞(PBMC)中提取正常非突變基因組種系DNA。運用的NGS方法只限於蛋白編碼區的重測序（外顯子組重測序）。為了這一目的，使用供應商提供的靶序列富集試劑盒來捕獲來自人樣本的外顯子DNA，隨後使用HiSeq2000（Illumina公司）進行測序。此外，對腫瘤的mRNA進行測序，以直接定量基因表達，並確認突變基因在患者腫瘤中表達。得到的數以百萬計的序列讀數透過軟體演算法處理。輸出列表中包含突變和基因表達。腫瘤特異性體突變透過與PBMC衍生的種系變化比較來確定，並進行優化。然後，為了存儲庫可能測試新確定的肽瞭解如上所述的免疫原性，並且選擇具有合適免疫原性的候選TUMAP用於疫苗。

【0307】 在一個示範實施方案中，疫苗中所含肽透過以下方法確定：(a)用上述方法識別由來自個體患者腫瘤樣本提呈的腫瘤相關肽(TUMAP)；(b)將(a)中鑒定的肽與進行腫瘤（與相應的正常組織相比）免疫原性和過度提呈預篩查肽的存儲庫進行比對；(c)從與患者中確定的腫瘤相關肽相關的存儲庫中選擇至少一種肽；及(d)可選地在(a)中選擇至少一種新確定的肽，確認其免疫原性。

【0308】 在一個示範實施方案中，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)中選擇至少一種新確定的肽，並確認其免疫原性。

【0309】 一旦選定了用於個體化肽疫苗的肽時，則產生疫苗。該疫苗優選為一種液體製劑，包括溶解於20-40% DMSO之間，優選為約30-35% DMSO，例如，約33% DMSO中的個體肽。

【0310】 列入產品的每種肽都溶於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。單肽-DMSO溶液均等混合，以實現一種溶液中包含所有的肽，且濃度為每肽 $\sim 2.5\text{ mg/ml}$ 。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中每肽 0.826 mg/ml 的濃度。稀釋的溶液透過 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 無菌篩檢程序進行過濾。從而獲得最終本體溶液。

【0311】 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 $700\text{ }\mu\text{L}$ 溶液，其中每種肽含有 0.578 mg 。其中的 $500\text{ }\mu\text{L}$ （每種肽約 $400\text{ }\mu\text{g}$ ）將用於皮內注射。

【0312】 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水平較低，因此，這些肽可用於診斷是否存在癌症。

【0313】 血液樣本中組織活檢物含申請專利範圍的肽，可有助於病理師診斷癌症。用抗體、質譜或其他本領域內已知的方法檢測某些肽可使病理師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誌物。肽基團的提呈使得能對病變組織進行分類或進一步分成子類。

【0314】 對病變標本中肽的檢測使得能對免疫系統治療方法的利益進行判斷，特別是如果 T-淋巴細胞已知或預計與作用機制有關。MHC 表達的缺失是一種機制，充分說明瞭哪些受感染的惡性細胞逃避了免疫監視。因此，肽的提呈表明，分析過的細胞並沒有利用這種機制。

【0315】 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 MHC 分子絡合的肽發生的反應。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，如接種蛋白疫苗、核酸、自體材料、淋巴細胞過繼轉移。基因治療中，

淋巴細胞對肽發生的反應可以在副作用的評估中考慮。淋巴細胞反應監測也可能成為移植療法隨訪檢查中的一種有價值的工具，如：用於檢測移植物抗宿主和宿主抗移植物疾病。

【0316】 下列描述優選方案的實施例將對本發明進行說明，並參照隨附圖表（但是不僅限於此）。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。

實施例

實施例 1

細胞表面提呈的腫瘤相關肽的識別和定量 組織樣本

【0317】 患者的腫瘤組織獲得自：Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK)、Bio-Options Inc. (Brea, CA, USA)、Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA)、海德堡大學醫院(Heidelberg, Germany)、ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA)、Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK)、慕尼黑大學醫院(Munich, Germany)。正常組織獲得自 Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK)、BioCat GmbH (Heidelberg, Germany)、Bio-Options Inc. (Brea, CA, USA)、Bio-Options Inc. (Brea, CA, USA)、BioServe (Beltsville, MD, USA)、Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, USA)、蒂賓根臨床輸血醫療中心(Tübingen,

Germany)、Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA)、京都府立醫科大學(KPUM) (Kyoto, Japan)、大阪市立大學(OCU) (Osaka, Japan)、ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA)、Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK)、日內瓦大學醫院(Geneva, Switzerland)、海德堡大學醫院(Heidelberg, Germany)、蒂賓根大學醫院(Tübingen, Germany)、慕尼黑大學醫院(Munich, Germany)。

【0318】 所有患者在手術或屍檢前都獲得了書面知情同意。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。

從組織樣本中分離HLA肽

【0319】 根據略加修改的方案(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活化的瓊脂糖凝膠、酸處理和超濾方法以固體組織的免疫沉澱法獲得了冷休克組織樣本的HLA肽庫。

質譜分析

【0320】 獲得的HLA肽庫根據其疏水性用反相色譜(nanoAcquity UPLC system, Waters)分離，洗脫肽用裝有電噴霧源的LTQ-velos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 $\times$ 250 mm)，應用流速為 400 nL 每分鐘。隨後，使用來自流速為 300 nL 每分鐘、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)。金鍍膜玻璃毛細管 (PicoTip, New Objective) 用於引入到納升電噴霧源。使用前 5 (TOP5) 策略在數據依賴模式下操作 LTQ-Orbitrap 質譜儀。簡言之，首先以高精確品質完全掃描在 orbitrap 開始一個掃描週期 ($R=30\ 000$)，之後用先前選定離子的動態排除技術在 orbitrap 中對 5 種含量最為豐富的前體離子進行 MS/MS 掃描 ($R=7500$)。串聯質譜由 SEQUEST 以固定的錯誤發現率 ($q \leq 0.05$) 和額外的手動控制器進行解讀。在確定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來進一步驗證。

【0321】 無標記相對 LC-MS 定量透過離子計數 (即透過 LC-MS 功能提取和分析) 來進行 (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。提取的特徵透過充電狀態去卷積和保留時間校準進行進一步處理 (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引用，以將不同樣本和組織的定量數據與肽呈遞特徵結合。定量數據根據集中數據以兩層方式進行正態化處理，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數據相關，從而可得出樣本和組織之間的相對定量。此外，對候選肽獲得的所有定量數據進行手動檢查，以確保數據的一致性，並驗證自動化分析的準確度。對於每種肽，計算了提呈圖，其顯示樣本平均提呈量以及複製變化。這些特徵使急性髓性白血病、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與正常組織樣本的基線值並列。示範性過度提呈肽的提呈譜示於圖 1 中。示範性肽在腫瘤上的肽提呈見表 1 1。

【0322】 表 1 1 顯示了選定肽在各種癌症實體上的提呈，因此顯示所提及的肽用於診斷和 / 或治療所示的癌症的特別相關性（例如，肽 SEQ ID No. 1 用於急性髓性白血病、結直腸癌、膠質母細胞瘤、胃癌、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、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌、子宮內膜癌，肽 SEQ ID No. 2 用於乳腺癌、結直腸癌、膽囊癌、胃食管交界癌、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、小細胞肺癌、子宮內膜癌）。

表 1 1：本發明選定腫瘤相關肽在各實體中提呈概述。

【0323】 癌症類型：A M L（急性髓性白血病）；B R C A（乳腺癌）；C C C（膽管細胞癌）；C L L（慢性淋巴細胞白血病）；C R C（結直腸癌）；G B C（膽囊癌）；G B M（膠質母細胞瘤）；G C（胃癌）；G E J C（胃食管交界癌）；H C C（肝細胞癌）；H N S C C（頭頸部鱗狀細胞癌）；M E L（黑色素瘤）；N H L（非霍奇金淋巴瘤）；N S C L C a d e n o（非小細胞肺癌腺癌）；N S C L C o t h e r（N S C L C 樣本，不能明確分配為 N S C L C a d e n o 或 N S C L C s q u a m）；N S C L C s q u a m（鱗狀細胞非小細胞肺癌）；O C（卵巢癌）；O S C A R（食管癌）；P A C A（胰腺癌）；P R C A（攝護腺癌）；R C C（腎細胞癌）；S C L C（小細胞肺癌）；U B C（膀胱癌）和 U E C（子宮內膜癌）

序列 ID 號	序列	癌症類型上的肽提呈
1	KLLDFSTRI	AML, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
2	ALLDVLVKL	BRCA, CRC, GBC, GEJC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UEC
3	FLLVPSPIWQL	AML, CLL, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, RCC, SCLC, UEC
4	YLGDSHVLL	AML, BRCA, CLL, CEC, GBM, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OSCAR, RCC, SCLC, UBC
5	LVWEVVESV	HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR
6	ALHDSPVYL	AML, BRCA, CCC, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, RCC, SCLC, UBC, UEC
7	ALWEEVKATSL	GBM, HCC, MEL, NSCLC, OC, SCLC, UEC
8	ILQSLVPAA	CRC, NHL, NSCLC, OC, RCC
9	FLQEGDLISV	CLL, CRC, NHL, NSCLC, OSCAR, SCLC
10	SLLDKLSGI	CLL, CRC, NHL
11	ALLPHAPEAV	BRCA, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UBC
12	HLDSMNVSI	AML, CLL, GC, MEL, NHL, PACA, PRCA
13	FLDEGSLLRL	GC, HCC, HNSCC, MEL, OC, PACA, SCLC, UBC
14	LLIEVSEEL	BRCA, CRC, GBM, HCC, OSCAR, MEL, NHL, NSCLC, PACA, SCLC
15	NLVMPLLHI	AML, CLL, CRC, MEL, NSCLC, OC, PACA, UEC
16	ALLDAEQSPVAL	AML, CLL, HCC, MEL, NHL, NSCLC, RCC

序列 ID 號	序列	癌症類型上的肽提呈
17	VLWDLRPSSLI	CLL, HNSCC, NHL, NSCLC, PACA, SCLC
18	KMMTFFQGL	HCC, NSCLC, NHL, OSCAR, PRCA, UBC
19	MLLPWLPKL	CLL, GBM, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC
20	VLISLPGKV	HCC, MEL, NSCLC
21	FVFISPSFL	AML, BRCA, CCC, CRC, GC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, PACA, PRCA
22	SLYDVPVGA	CLL, CRC, GBM, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, RCC, UBC
23	GLEVLDALL	BRCA, CRC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, RCC, UEC
24	TLTSLNILL	AML, CRC, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UEC
25	ISVLNLSAI	CCC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, PRCA, SCLC
26	KLWTSVLNL	AML, CLL, CRC, GC, HNSCC, MEL, NSCLC, PACA, SCLC
27	IAAGVPNTDA	BRCA, CLL, HCC, MEL, NSCLC, OC, RCC
28	SQLEKPETA	HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, SCLC, UEC
29	LLWEFPSMA	AML, CLL, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, UEC
30	LLRLTLLPL	CLL, HCC, NHL, NSCLC, OC, UEC
31	VVLPIVITL	GC, HCC, NHL, NSCLC, RCC, PACA
32	VLSVSAVLGA	CLL, GBM, GC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, RCC
33	FASERPPSV	BRCA, CRC, GC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UBC
34	LLNVEPAGA	AML, BRCA, CLL, GBM, HCC, MEL, NHL, UEC
35	VLLNSNYPV	NSCLC, PRCA, UBC
36	FQVTRTTGV	GBC, HCC, NHL, NSCLC, RCC
37	KILDEFYNV	CRC, GC, HCC, NSCLC
38	SLSAWLPSL	GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, RCC, UBC, UEC
39	YIYEDEVRL	BRCA, CRC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UEC
40	FTLPFLVNL	AML, CLL, CRC, GC, NHL, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, UBC
41	LMASEGIWESS L	CRC, GC, NSCLC, PRCA
42	WITPVIPAL	AML, CLL, CRC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, OC, PACA, RCC, SCLC, UBC, UEC
43	AIWSTILIA	BRCA, CRC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, SCLC
44	WLIPRQLAAA	PRCA
45	ALYHQSPLL	HNSCC, NSCLC, OSCAR, OC
46	AMVEIIPKV	NSCLC, SCLC, UBC
47	ALLPGVPGL	CRC, GBC, HNSCC, NSCLC, OC, RCC
48	MLAEIHPKA	AML, BRCA, GBM, MEL, NSCLC
49	FLWDPRDVVL	GBM, OC
50	GLASYLDRV	BRCA, CRC, HCC, RCC, OC, OSCAR, SCLC, UBC
51	GLLTQVHIL	AML, BRCA, CRC, GBM, HCC, NSCLC, PACA, UBC
52	LAFVSHVLI	CRC, GC
53	TISISLSSV	AML, CLL, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
54	GLSPDQVFL	GBM, HNSCC, MEL, NHL
55	MVQQEKLFV	AML, BRCA, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC,

序列 ID 號	序列	癌症類型上的肽提呈
		OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
56	IITNLIVNI	AML, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, RCC, SCLC, UEC
57	YVLMTSLLL	BRCA, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, PRCA, SCLC
58	MIISHRALEL	CLL, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OC, PRCA, UBC
59	LAASITFLGV	HNSCC, NHL, NSCLC, OSCAR, PACA, UBC
60	LLLATLENL	AML, CRC, GBM, MEL, NSCLC, SCLC, UBC, UEC
61	VLPWQPLLL	AML, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, PACA
62	SLLGKPGTLTI	BRCA, CLL, CRC, GBC, HCC, NHL, NSCLC, OSCAR, RCC, PRCA, UBC, UEC
63	LSFKRSLSI	AML, BRCA, CRC, GBM, HCC, NSCLC, PRCA, RCC, UBC
64	LLLALRLSL	GBC, HCC, NHL, MEL, NSCLC, OSCAR, PACA
65	IAISQLTFV	CLL, HCC, NHL, NSCLC, OSCAR, PRCA, SCLC, UEC
66	ILNELLNSI	GBC, GC, HCC, MEL, NHL, PRCA, SCLC
67	ALKELMGPA	NHL, NSCLC, RCC
68	KLLADAFKV	AML, HCC, HNSCC, NSCLC, RCC, UBC, UEC
69	LLCPVVLQL	AML, CLL, CRC, NSCLC, RCC, UBC, UEC
70	LLLQIEPAA	GBM, HNSCC, NHL, NSCLC, UBC
71	WLMPVMPAL	CLL, GBM, GC, MEL
72	YLSFIKILL	MEL, PRCA
73	STTIINLIL	AML, BRCA, CRC, HNSCC, HCC, NSCLC, OC, PACA
74	TLLSYSIPL	CRC, GC, MEL, PACA, PRCA, UEC
75	TTQEAELLLER	BRCA, GBC, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
76	TEQGPTGVTM	AML, CLL, CRC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, OC, RCC, UEC
77	VPAGVDVITEY	PRCA
78	GLPPVVRAM	GBC, NHL, OSCAR
79	KIQDPGTAF	PRCA
80	RDQIVTVSV	AML, BRCA, NHL, SCLC, UBC, UEC
81	SLLGAATVEPP K	AML, BRCA, CC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
82	LAPQMIAL	CLL, GBC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, UBC, SCLC
83	KPRGPTPL	BRCA, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, PACA, RCC, SCLC, UBC
84	RLCPAAPSEK	BRCA, CCC, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, RCC, UBC, UEC
85	VYLLTFPPL	BRCA, GC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, UBC, UEC
86	LMIGKRIL	HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UEC
87	LNLVSETEAMV K	CRC, UEC
88	DEQETDAFL	NSCLC
89	MIFYVLQK	AML, BRCA, CCC, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC

序列 ID 號	序列	癌症類型上的肽提呈
90	YLRDFKIKR	AML, BRCA, GBM, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
91	SSHFILVTF	CCC, GC, HCC, RCC
92	ELVAVTSVL	CLL, NHL, PACA, SCLC, UEC
93	WQKNSMRL	NSCLC
94	MGRRRNLY	CCC, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
95	QVKIVTLL	GC, NSCLC, OC, PACA, PRCA, RCC
96	KIIEDLANTV	CCC, CRC, HCC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, SCLC, UBC, UEC
97	GLIDDKGTIKL	AML, BRCA, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UBC, UEC
98	SLMEVTHDL	BRCA, GBM, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, UBC, UEC
99	ALMDGSESRRF V	BRCA, CLL, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, UEC
100	SLGPPVGV	AML, GBM, OC, UBC
101	KLPEGHLPEV	HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, PACA, RCC

實施例 2

編碼本發明肽的基因的表達譜

【0324】 與正常細胞相比在腫瘤細胞上一種肽過度提呈或特定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，儘管存在其源蛋白也存在於正常組織中。但是，mRNA 表達譜增加了免疫治療目標肽選擇中其他級別的安全性。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對該腫瘤獨一無二且不出現於正常組織中的蛋白。

RNA 來源與製備

【0325】 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，Darmstadt，德國）之後用 RNeasy

(Q I A G E N 公 司 , H i l d e n , 德 國) 清 理 從 這 些 樣 本 中 製 備 總 R N A ; 這 兩 種 方 法 都 根 據 製 造 商 的 方 案 進 行 。

【0326】 用 於 R N A S e q 實 驗 來 自 健 康 人 體 組 織 的 總 R N A 獲 得 自 : A s t e r a n d (D e t r o i t , M I , U S A & R o y s t o n , H e r t s , U K) 、 B i o - O p t i o n s I n c . (B r e a , C A , U S A) 、 G e n e t i c i s t I n c . (G l e n d a l e , C A , U S A) 、 P r o t e o G e n e x I n c . (C u l v e r C i t y , C A , U S A) 、 T i s s u e S o l u t i o n s L t d (G l a s g o w , U K) 。

【0327】 用 於 R N A S e q 實 驗 來 自 腫 瘤 組 織 的 總 R N A 獲 得 自 : A s t e r a n d (D e t r o i t , M I , U S A & R o y s t o n , H e r t s , U K) 、 B i o C a t G m b H (H e i d e l b e r g , G e r m a n y) 、 B i o S e r v e (B e l t s v i l l e , M D , U S A) 、 G e n e t i c i s t I n c . (G l e n d a l e , C A , U S A) 、 I s t i t u t o N a z i o n a l e T u m o r i " P a s c a l e " (N a p l e s , I t a l y) 、 P r o t e o G e n e x I n c . (C u l v e r C i t y , C A , U S A) 、 海 德 堡 大 學 醫 院 (H e i d e l b e r g , G e r m a n y) 。

【0328】 所 有 R N A 樣 本 的 品 質 和 數 量 都 在 A g i l e n t 2 1 0 0 B i o a n a l y z e r 分 析 儀 (A g i l e n t 公 司 , W a l d b r o n n , 德 國) 上 使 用 R N A 6 0 0 0 P i c o L a b C h i p K i t 試 劑 盒 (A g i l e n t 公 司) 進 行 評 估 。

R N A s e q 實 驗

【0329】 透 過 新 一 代 測 序 技 術 (R N A s e q) 由 C e G a T (T ü b i n g e n , G e r m a n y) 對 腫 瘤 和 正 常 組 織 的 R N A 樣 本 進 行 基 因 表 達 分 析 。 簡 言 之 , 根 據 供 應 商 的 方 案 (I l l u m i n a

Inc., San Diego, CA, USA), 其中包括RNA碎片化、cDNA轉化和測序適配子的加入, 利用Illumina HiSeq v4試劑盒準備測序文庫。從多個樣本獲得的文庫根據製造商的說明等莫耳混合並在Illumina HiSeq 2500定序器上測序, 產生50bp的單端讀數。處理的讀數使用STAR軟體映射至人類基因組(GRCh38)。根據ENSEMBL序列數據庫的說明(Ensembl77), 表達數據提供為轉錄水平的RPKM(每百萬映射讀數每千鹼基讀數, 由Cufflinks軟體生成)及外顯子水平(總讀數, 由Bedtools軟體生成)。外顯子讀數被歸為外顯子長度和校準尺寸, 以獲得RPKM值。

【0330】 在急性髓性白血病、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高度過度表達或排他表達的本發明的源基因的代表性表達譜如圖1所示。進一步代表性基因的表達分數見表12。

【0331】 表12：表達分數。該表列出了來自與一系列正常組織相比在腫瘤上非常高度過度表達(+++)、與一系列正常組織相比在腫瘤上高度過度表達(++)或與一系列正常組織相比在腫瘤上過度表達(+)的基因的肽。本基線得分根據以下相關正常組織的測量值計算：血細胞；血管；腦；

心；肝；肺；脂肪組織；腎上腺；膽管；膀胱；骨髓；軟骨；食管；眼；膽囊；頭頸部；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；輸尿管。

【0332】 如果獲得同一組織類型幾個樣本的表達數據，則使用各樣本的算術平均值進行計算。

序列 ID 號	序列	基因表達
3	FLLVPSPIWQL	+
5	LVWEVVESV	+
9	FLQEGDLISV	+
10	SLLDKLSGI	++
14	LLIEVSEEL	++
17	VLWDLRPSSLI	++
18	KMMTFFQGL	+
19	MLLPWLPKL	+
24	TLTSLNILL	+
31	VVLPIVITL	+
32	VLSVSAVLGA	++
33	FASERPPSV	+++
34	LLNVEPAGA	++
35	VLLNSNYPV	+++
36	FQVTRTTGV	+++
37	KILDEFYNV	++
38	SLSAWLPSL	+++
39	YIYEDEVRL	+++
40	FTLPFLVNL	++
41	LMASEGIWESSL	++
42	WITPVIPAL	+
43	AIWSTILIA	++++
44	WLIPRQLAAA	++++
46	AMVEIIPKV	+
47	ALLPGVPGL	++
48	MLAEIHPKA	++
49	FLWDPRDVVL	++
51	GLLTQVHIL	++
52	LAFVSHVLI	+++
53	TISISLSSV	++
54	GLSPDQVFL	++
56	IITNLIVNI	++++

序列 ID 號	序列	基因表達
57	YVLMTSLLL	+++
59	LAASTTFLGV	++
60	LLLATLENL	+
62	SLLGKPGLTI	++
63	LSFKRSLSI	++
64	LLLALRLSL	+++
65	IAISQLTFV	++++
66	ILNELLNSI	+
67	ALKELMGPA	++
68	KLLADAFKV	+++
69	LLCPVVLQL	+++
70	LLLQIEPAA	+++
71	WLMPVMPAL	++

實施例 3

MHC-I 類提呈肽的體外免疫原性

【0333】 為了獲得關於本發明 TUMAP 的免疫原性資訊，發明人使用體外 T 細胞起動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) 進行反復刺激。用這種方法，發明人可證明本發明的 HLA-A*02:01 限制性 TUMAP 具有免疫原性，這表明這些肽為存在於人的 CD8+ 前體 T 細胞的 T 細胞表位（表 13a 和 13b）。

CD8+ T 細胞體外起動

【0334】 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，發明人首先使用從 University clinics Mannheim, Germany 中獲取知情同意健康供體 CD8 微珠 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) 透過陽性選擇從新鮮 HLA-A*02 白血球清除術產物分離出 CD8+ T 細胞。

【0335】 P B M C 和 分 離 出 的 C D 8 + 淋 巴 細 胞 使 用 前 在 T 細 胞 培 養 基 (T C M) 中 培 養 ， 培 養 基 包 括 R P M I - G l u t a m a x (I n v i t r o g e n 公 司 ， K a r l s r u h e ， 德 國) 並 補 充 10 % 熱 滅 活 人 A B 血 清 (P A N - B i o t e c h 公 司 ， A i d e n b a c h ， 德 國) 、 100 U / m l 青 黴 素 / 100 μ g / m l 鏈 黴 素 (C a m b r e x 公 司 ， C o l o g n e ， 德 國) ， 1 m M 丙 酮 酸 鈉 (C C P r o 公 司 ， O b e r d o r l a ， 德 國) 和 20 μ g / m l 慶 大 黴 素 (C a m b r e x 公 司) 。 在 此 步 驟 ， 2.5 n g / m l 的 I L - 7 (P r o m o C e l l 公 司 ， H e i d e l b e r g ， 德 國) 和 10 U / m l 的 I L - 2 (N o v a r t i s P h a r m a 公 司 ， N ü r n b e r g ， 德 國) 也 加 入 T C M 。

【0336】 對於 p M H C / 抗 - C D 28 塗 層 珠 的 生 成 、 T 細 胞 的 刺 激 和 讀 出 ， 使 用 每 刺 激 條 件 四 個 不 同 p M H C 分 子 以 及 每 個 讀 出 條 件 8 個 不 同 的 p M H C 分 子 在 高 度 限 定 的 體 外 系 統 中 進 行 。

【0337】 純 化 的 共 刺 激 小 鼠 I g G 2 a 抗 人 C D 28 抗 體 9.3 (J u n g e t a l . , 1987) 使 用 製 造 商 (P e r b i o 公 司 ， 波 恩 ， 德 國) 推 薦 的 磺 酸 基 - N - 羥 基 琥 珀 醯 亞 胺 生 物 素 進 行 化 學 生 物 素 化 處 理 。 所 用 珠 為 5.6 μ m 的 鏈 黴 抗 生 物 素 蛋 白 包 裹 的 多 聚 苯 乙 烯 顆 粒 (B a n g s L a b o r a t o r i e s ， 伊 利 諾 州 ， 美 國) 。

【0338】 用 於 陽 性 和 陰 性 對 照 刺 激 物 的 p M H C 分 別 為 A * 0201 / M L A - 001 (從 M e l a n - A / M A R T - 1 中 修 飾 制 得 的 肽 E L A G I G I L T V (S E Q I D N O . 104)) 和

A*0201/DDX5-001 (從DDX5中獲得的YLLPAIVHI (SEQ ID NO.105))。

【0339】 800.000 珠/200 μ l包裹於含有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 μ l的600 ng生物素抗-CD28。在37°C下，在含5 ng/ml IL-12 (PromoCell)的200 μ l TCM中共培養 1×10^6 CD8+T細胞與 2×10^5 的清洗塗層珠3天，從而在96孔板中啟動刺激。之後，一半培養基與補充80 U/ml IL-2的新鮮TCM進行交換，並且在37°C下持續培養4天。這種刺激週期總共進行3次。對於使用每條件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 (Andersen et al., 2012)，稍作修飾，涵蓋耦合至5種不同的螢光染料。最後，用Live/dead near IR染料 (Invitrogen公司，Karlsruhe，德國)、CD8-FITC抗體克隆SK1 (BD公司，Heidelberg，德國)和螢光pMHC多聚體而執行多聚體分析。使用配有合適鐳射儀和篩檢程序的BD LSR II SORP細胞儀進行分析。肽特異性細胞以占總CD8+細胞的百分比形式進行計算。多聚體分析評估使用FlowJo軟體 (Tree Star公司，Oregon，美國)進行。特定多聚體+ CD8+淋巴細胞的體外起動與陰性對照刺激組比較而進行檢測。如果一名健康供體中的至少一個可評價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%特定多聚體+ CD8+T

細胞，並且特定多聚體 + 細胞的百分比至少為陰性對照刺激中位數的 10 倍），則檢測給定抗原的免疫原性。

【0340】 急性髓性白血病、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肽的體外免疫原性。

【0341】 對於受到測試的 H L A - 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 7 種肽的 T U M A P 特異性多聚體染色後流式細胞儀檢測的代表性結果如圖 3 A 和 3 B 以及圖 4 A - E 所示，同時也含有相應的陰性對照資訊。本發明 30 種肽的結果匯總於表 13 a 和 13 b。

表 13 a：本發明中 H L A I 類肽的體外免疫原性

【0342】 申請人對本發明的肽所做的體外免疫原性實驗的代表性結果。 < 20 % = +； 20 % - 49 % = ++； 50 % - 69 % = +++； ≥ 70 % = ++++

序列 ID 號	序列	陽性孔 [%]
102	GLDPTQFRV	++++
103	SLVSYLDKV	+

表 13 b：本發明中 H L A I 類肽的體外免疫原性

【0343】 申請人對本發明的肽所做的體外免疫原性實驗的代表性結果。 < 20 % = +； 20 - 49 % = ++； 50 - 69 % = +++； ≥ 70 % = ++++

序列 ID 號	序列	陽性孔 [%]
1	KLLDFSTRI	+
2	ALLDVLVKL	+

3	FLLVPSPIWQL	+
4	YLGDSHVLL	+
6	ALHDSPVYL	++
7	ALWEEVKATSL	+
13	FLDEGSLLRL	+
18	KMMTFFQGL	++++
19	MLLPWLPKL	+++
26	KLWTSLVNL	+++
29	LLWEFPSMA	++
31	VVLPIVITL	++
33	FASERPPSV	+++
36	FQVTRTTGV	+
37	KILDEFYNV	+++
38	SLSAWLPSL	+
40	FTLPFLVNL	+++
46	AMVEIIPKV	+
47	ALLPGVPGL	++
48	MLAEIHPKA	+++
49	FLWDPRDVVL	+
50	GLASYLDRV	+
51	GLLTQVHIL	+
65	IAISQLTFV	+
68	KLLADAFKV	++++
74	TLLSYSIPL	+
96	KIIEDLANTV	++
101	KLPEGHLPEV	+

實施例 4

肽的合成

【0344】 所有的肽透過使用 F m o c 策略以標準、廣為接受的固相肽合成法合成。每個肽的身份和純度已使用質譜和 R P - H P L C 分析法確定。用凍乾法（三氟乙酸鹽）獲得白色至類白色的肽，純度為 > 5 0 %。所有的 T U M A P 優選作為三氟乙酸鹽或乙酸鹽進行給藥，其他鹽形式也可以。

實施例 5

M H C 結合測定

【0345】 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）。本發明79種肽的結果匯總於表14。

【0346】 單個肽-MHC複合體透過UV-配體交換產生，其中，紫外線敏感肽經紫外線照射後裂解，與分析的相關肽交換。只有可以與肽接受MHC分子有效地結合並穩定的候選肽才能防止MHC複合體的解離。為了確定交換反應的產率，將基於穩定MHC複合體輕鏈($\beta 2m$)的檢測結果進行ELISA測定。檢測總體上按照Rodenko等人在(Rodenko et al., 2006)中描述的方法進行。

【0347】 96孔MAXISorp板(NUNC)在室溫下在PBS中以2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鏈黴抗生物素蛋白包被過夜，用4倍洗滌並在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在含封閉緩衝液的2% BSA中封閉1小時。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。紫外線交換反應的肽-MHC單體在封閉緩衝液中稀釋100倍。樣本在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小時，洗滌四次，在37 $^{\circ}\text{C}$ 下以2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HRP綴合抗- $\beta 2m$ 溫育1小時，再次洗滌，並以 NH_2SO_4 封堵的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時和/或T細胞受體或其片段時，通常優選顯示為高交換產率（優選為高於50%，最優選為高於75%）的候選肽，這是因為他們對MHC分子表現出足夠的親合力，並能防止MHC複合體的解離。

【0348】 表 1 4 : M H C - I 類 結 合 分 數 。 H L A - I 類 限 制 肽 與
H L A - A * 0 2 : 0 1 的 結 合 根 據 肽 交 換 產 量 分 類 : ≥ 1 0 % = + ;
≥ 2 0 % = + + ; ≥ 5 0 = + + + ; ≥ 7 5 % = + + + +

序列 ID 號	序列	肽交換
1	KLLDFSTRI	++++
2	ALLDVLVKL	++++
3	FLLVPSPIWQL	++++
4	YLGDSHVLL	++++
5	LVWEVVESV	++++
6	ALHDSPVYL	++++
7	ALWEEVKATSL	++++
8	ILQSLVPAA	++++
9	FLQEGDLISV	++++
10	SLLDKLSGI	++++
11	ALLPHAPEAV	+++
12	HLDSMNVSI	++++
13	FLDEGSLLRL	++++
14	LLIEVSEEL	++++
15	NLVMPLLHI	++
16	ALLDAEQSPVAL	++++
17	VLWDLRPSSLI	++++
18	KMMTFFQGL	++++
19	MLLPWLPKL	++++
20	VLISLPGKV	++
21	FVFISPSFL	+++
22	SLYDVPVGA	++++
23	GLEVLDALL	++
24	TLTSLNILL	++++
25	ISVLNLSAI	++
26	KLWTSLVNL	++++
27	IAAGVPNTDA	++
28	SQLEKPETA	+++
29	LLWEFPSMA	++++
30	LLRLTLLPL	++
31	VVLPIVITL	++++
32	VLSVSAVLGA	+++
33	FASERPPSV	++++
34	LLNVEPAGA	++++
35	VLLNSNYPV	++++
36	FQVTRTTGV	++++
37	KILDEFYNV	++++
38	SLSAWLPSL	++++
39	YIYEDEVRL	++++
40	FTLPFLVNL	++++

41	LMASEGIWESSL	+++
42	WITPVIPAL	++++
43	AIWSTILIA	++
44	WLIPRQLAAA	++++
45	ALYHQSPLL	++++
46	AMVEIIPKV	++++
47	ALLPGVPGL	++++
48	MLAEIHPKA	++++
49	FLWDPRDVVL	++++
50	GLASYLDRV	++++
51	GLLTQVHIL	++++
52	LAFVSHVLI	++
53	TISISLSSV	++++
54	GLSPDQVFL	++++
55	MVQQEKLFV	+++
56	IITNLIVNI	+++
57	YVLMTSLLL	++++
58	MIISHRALEL	++
59	LAASTTFLGV	++++
60	LLLATLENL	++++
61	VLPWQPLLL	++
62	SLLGKPGLTI	++++
63	LSFKRSLSI	++
64	LLLALRLSL	+
65	IAISQLTFV	++++
66	ILNELLNSI	++++
67	ALKELMGPA	++
68	KLLADAFKV	++++
69	LLCPVVLQL	++++
70	LLLQIEPAA	++++
71	WLMPVMPAL	++++
73	STTIINLIL	++
74	TLLSYSIPL	++++
96	KIIEDLANTV	++++
97	GLIDDKGTIKL	++++
98	SLMEVTHDL	++++
99	ALMDGSESFFV	++++
100	SLGPPVGV	++++
101	KLPEGHLPEV	++++

實施例 6

細胞表面提呈的腫瘤相關肽的絕對定量

【0349】 結合劑例如抗體和 / 或 T C R 的產生是一個費力的過程，其可以僅針對一些選定靶標進行。在腫瘤相關和特

異性肽的情況下，選擇標準包括但不限於提呈的排他性和細胞表面上提呈肽的密度。除了如實施例1中所述肽的分離和相對定量，發明人也分析了每個細胞的絕對肽拷貝數，如WO 2016/107740所述。實體腫瘤樣本中每個細胞的TUMAP拷貝數定量需要分離TUMAP的絕對定量、TUMAP分離工藝的效率和分析的組織樣本細胞計數。

nano LC-MS/MS 肽定量

【0350】 為了透過質譜法準確定量肽，使用兩種不同的同位素標記的肽變體（在TUMAP合成期間包括一個或兩個同位素標記的氨基酸）生成每種肽的校準曲線。這些同位素標記變體與腫瘤相關肽僅在質量上不同，在其他的物理化學性質方面無差異（Anderson et al., 2012）。對於肽校準曲線，進行了一系列nano LC-MS/MS測量以確定滴定（單同位素標記的肽）與恒定（雙同位素標記的肽）同位素標記肽的MS/MS信號比例。

【0351】 將雙同位素標記肽（也稱為內標）進一步摻入每個MS樣本，並將所有MS信號標準化為內標MS信號，從而平衡MS實驗之間的潛在技術差異。

【0352】 使用至少三種不同的基質製作校準曲線，基質即來自天然樣本（類似於常規MS樣本）的HLA肽洗脫液，每次製作後均運行兩次MS進行測量。為了進行評估，將MS信號標準化為內標信號，並透過邏輯回歸計算校準曲線。

【0353】 對於來自組織樣本的腫瘤相關肽的定量，各樣本也摻有內標；MS信號標準化為內標並使用該肽校準曲線進行定量。

肽/MHC分離的效率

【0354】 任何蛋白質純化工藝中，從組織樣本中分離蛋白質均與關注蛋白質的某些損失相關。為了確定TUMAP分離的效率，針對選定為絕對定量的所有TUMAP產生了肽/MHC複合體。為了能夠區別天然肽/MHC複合體與摻入物，使用了單同位素標記版本的TUMAP，即TUMAP合成期間納入1個同位素標記的氨基酸。這些複合體被摻入新製備的組織裂解物中，例如，在TUMAP分離過程中最早可能時間點，然後在之後的親和純化中像天然肽/MHC複合體被捕獲。因此，測量單標記TUMAP的回收可得到個體TUMAP分離效率相關的結論。

【0355】 分離效率使用少量樣本進行分析，且這些組織樣本可比較。與此相反，個體肽之間的分離效率不同。這表明，分離效率雖然只在有限數量的樣本中進行測定，但可外推至任何其他組織制備品中。然而，由於分離效率可能不會從一種肽外推至其他肽，因此，有必要單個分析每個TUMAP。

固體、冷凍組織中細胞計數的測定

【0356】 為了確定進行絕對肽定量的組織樣本的細胞計數，發明人應用了DNA含量分析方法。此方法適用於不同來源的廣泛樣本，最重要的是，冷凍樣本(Alcoser et al.,

2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013)。在執行肽分離方案期間，將組織樣本加工成均勻的裂解物，從中取裂解物小等分試樣。樣本等分為三份，從中分離DNA（QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden，德國）。每次DNA分離的總DNA含量至少重複兩次使用基於螢光的DNA定量測定法(Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt，德國)進行定量。

【0357】 為了計算細胞數，使用一系列指定的細胞數，生成了來自幾個供體的分離健康血細胞等分試樣的DNA標準曲線。標準曲線用於計算每次DNA分離總DNA含量的總細胞含量。然後，用於肽分離的組織樣本平均總細胞計數，在考慮裂解物等份的已知體積和總裂解物體積的情況下進行推算。

每細胞的肽拷貝數

【0358】 本發明人利用上述實驗的數據，透過將總肽量除以樣本的總細胞數，然後除以分離效率來計算每個細胞的TUMAP拷貝數。選定肽的細胞拷貝數如表15所示。

【0359】 表15：絕對拷貝數。該表列出了腫瘤樣本中絕對肽定量的結果。針對每種肽，每個細胞的中位元拷貝數表示： $< 25 = +$ ； $\geq 25 = ++$ ； $\geq 50 = +++$ ； $\geq 75 = ++++$ 。提示樣本數量，其中提供了可評估的高品質MS數據。

序列 ID 號	肽代碼	每細胞拷貝 數(中位數)	樣本數量
1	NUDCD2-001	+++	8

2	COLPDG-001	++++	12
4	altORF-002	+	7
5	altORF-003	++++	13
6	altORF-004	+	23
7	altORF-005	+	1
8	altORF-006	++++	12
9	altORF-007	++	11
10	altORF-008	+	11
11	altORF-009	+	13
39	altORF-037	++	4
96	KRT18-001	++	1
97	CDC2-006	++	10
100	CIZ1-001	+	1

參 考 文 獻 列 表

Accardi, L. et al., Int.J Cancer 134 (2014): 2742-2747

Aken, B. L. et al., Database.(Oxford) 2016 (2016)

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

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

American Cancer Society, (2015a), www.cancer.org

American Cancer Society, (2015b), www.cancer.org

Ampie, L. et al., Front Oncol. 5 (2015): 12

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

Anderson, D. M. et al., Cell 160 (2015): 595-606

Anderson,N. L. et al., J Proteome.Res 11 (2012): 1868-1878

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

Armitage, J. O., Blood 110 (2007): 29-36

Aspden, J. L. et al., Elife. 3 (2014): e03528

Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. 10 (2004): 4699-4708

Azevedo, R. et al., J Control Release 214 (2015): 40-61

- Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., J Immunol 166 (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., Nature 275 (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995): 289-300
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng 16 (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Bray, F. et al., Int J Cancer 132 (2013): 1133-1145
- Bridgewater, J. et al., J Hepatol. 60 (2014): 1268-1289
- Brossart, P. et al., Blood 90 (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004): 29-43
- Bujas, T. et al., Eur.J Histochem. 55 (2011): e7
- Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. 12 (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. 9 (2003): 5902-5908
- Byrd, J. C. et al., N.Engl.J Med. 369 (2013): 32-42
- Carballido, E. et al., Cancer Control 19 (2012): 54-67
- Card, K. F. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004): 345-357
- Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. 59 (2007): 561-574
- Chapiro, J. et al., Radiol.Med. 119 (2014): 476-482
- ClinicalTrials.gov, (2015), <http://www.clinicaltrials.gov>
- Cohen, C. J. et al., J Mol.Recognit. 16 (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., J Immunol. 170 (2003b): 4349-4361

- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69 (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. 176 (2006): 2730-2738
- Coosemans, A. et al., Anticancer Res 33 (2013): 5495-5500
- Counter, C. M. et al., Blood 85 (1995): 2315-2320
- de, Klerk E. et al., Trends Genet. 31 (2015): 128-139
- Dedes, K. J. et al., Sci.Transl.Med. 2 (2010): 53ra75
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol. 171 (2003): 2197-2207
- Economopoulou, P. et al., Ann.Transl.Med. 4 (2016): 173
- Eichhorst, B. F. et al., Blood 107 (2006): 885-891
- Emens, L. A., Expert.Rev.Anticancer Ther. 12 (2012): 1597-1611
- Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. 6 (2014): 716-737
- Estey, E. H., Am.J Hematol. 89 (2014): 1063-1081
- Falk, K. et al., Nature 351 (1991): 290-296
- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Follenzi, A. et al., Nat Genet. 25 (2000): 217-222
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98 (2001): 8809-8814
- Forsey, R. W. et al., Biotechnol.Lett. 31 (2009): 819-823
- Fuge, O. et al., Res Rep.Urol. 7 (2015): 65-79
- Furman, R. R. et al., N.Engl.J Med. 370 (2014): 997-1007
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat.Med 2 (1996): 1096-1103
- Gandhi, A. V. et al., Ann Surg.Oncol 20 Suppl 3 (2013): S636-S643

- Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. 6 (2006): 383-393
- Giannopoulos, K. et al., Leukemia 24 (2010): 798-805
- Giannopoulos, K. et al., Int.J Oncol 29 (2006): 95-103
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100 (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., Int.Immunol 9 (1997): 905-911
- Goede, V. et al., N.Engl.J Med. 370 (2014): 1101-1110
- Gonzalez-Cao, M. et al., Cancer Biol Med 13 (2016): 483-488
- Gragert, L. et al., Hum.Immunol. 74 (2013): 1313-1320
- Granziero, L. et al., Blood 97 (2001): 2777-2783
- Green, J. et al., Cochrane.Database.Syst.Rev (2005): CD002225
- Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th (2012)
- Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual 2nd (2014)
- Grivas, P. D. et al., Semin.Cancer Biol 35 (2015): 125-132
- Gunawardana, C. et al., Br.J Haematol. 142 (2008): 606-609
- Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. 22 (2004): 346-353
- Hallek, Michael et al., ASH Annual Meeting Abstracts 112 (2008): 325
- Harig, S. et al., Blood 98 (2001): 2999-3005
- Hinrichs, C. S. et al., Nat Biotechnol. 31 (2013): 999-1008
- Holti, L. et al., Clin.Cancer Res. 8 (2002): 3369-3376
- Horig, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. 49 (2000): 504-514
- Hung, C. F. et al., Immunol.Rev 222 (2008): 43-69
- Hus, I. et al., Oncol Rep. 20 (2008): 443-451
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. 179 (2007): 5829-5838
- Inoue, H. et al., Int.J Cancer 63 (1995): 523-526

- Jones, R. T. et al., Urol.Clin North Am. 43 (2016): 77-86
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987): 4611-4615
- Kalos, M. et al., Sci.Transl.Med 3 (2011): 95ra73
- Kanthan, R. et al., J Oncol 2015 (2015): 967472
- Kassiotis, G. et al., Philos.Trans.R Soc.Lond B Biol Sci. 372 (2017)
- Kaufman, H. L. et al., Clin Cancer Res. 14 (2008): 4843-4849
- Khoury, G. A. et al., Sci.Rep. 1 (2011)
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients rd (2000)
- Kimura, H. et al., Int.J Oncol 30 (2007): 171-179
- Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. 7 (2015a): 312-330
- Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. 7 (2015b): 312-330
- Koido, S. et al., World J Gastroenterol. 19 (2013): 8531-8542
- Kono, K. et al., Cancer Sci. 100 (2009): 1502-1509
- Krackhardt, A. M. et al., Blood 100 (2002): 2123-2131
- Krieg, A. M., Nat.Rev.Drug Discov. 5 (2006): 471-484
- Krishnamurthy, J. et al., Clin Cancer Res 21 (2015): 3241-3251
- Kronenberger, K. et al., J Immunother. 31 (2008): 723-730
- Kuball, J. et al., Blood 109 (2007): 2331-2338
- Laumont, C. M. et al., Cell Mol.Life Sci. 75 (2018): 607-621
- Lee, W. C. et al., J Immunother. 28 (2005): 496-504
- Leitlinie Endometriumkarzinom, 032/034, (2008)
- Leitlinie Magenkarzinom, 032-009OL, (2012)
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 030/099, (2014)
- Li, Y. et al., Cancer Epidemiol. 39 (2015): 8-13

- Liang, Z. et al., Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi. 27 (2005): 534-537
- Liddy, N. et al., Nat.Med. 18 (2012): 980-987
- Liepe, J. et al., Science 354 (2016): 354-358
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med 162 (1985): 1745-1759
- Llovet, J. M. et al., N.Engl.J Med. 359 (2008): 378-390
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. 690 (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat.Genet. 45 (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78 (1981): 2791-2795
- Lukka, H. et al., Clin Oncol (R Coll.Radiol.) 14 (2002): 203-212
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification 3rd (2004)
- Mantia-Smaldone, G. M. et al., Hum.Vaccin.Immunother. 8 (2012): 1179-1191
- Marten, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. 51 (2002): 637-644
- Massari, F. et al., Cancer Treat.Rev. 41 (2015): 114-121
- Matsueda, S. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014): 1657-1666
- Maus, M. V. et al., Blood 123 (2014): 2625-2635
- Mayr, C. et al., Exp.Hematol. 34 (2006): 44-53
- Mayr, C. et al., Blood 105 (2005): 1566-1573
- Meziere, C. et al., J Immunol 159 (1997): 3230-3237
- Miyagi, Y. et al., Clin.Cancer Res. 7 (2001): 3950-3962
- Molina, J. R. et al., Mayo Clin Proc. 83 (2008): 584-594
- Morgan, R. A. et al., Science 314 (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. 12 (2006): 3435-3443
- Moulton, H. M. et al., Clin Cancer Res. 8 (2002): 2044-2051
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res. 7 (2008): 51-61

- Mueller, L. N. et al., *Proteomics*. 7 (2007): 3470-3480
- Muller, M. R. et al., *Blood* 103 (2004): 1763-1769
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999): 8633-8638
- Nam, J. W. et al., *Mol.Cells* 39 (2016): 367-374
- National Cancer Institute, (6-5-2015), www.cancer.gov
- National Cancer Institute (NCI), (1-19-2011),
<http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/kidney/page3>
- Nilsen, T. W. et al., *Nature* 463 (2010): 457-463
- O'Brien, S. et al., *Lancet Oncol* 15 (2014): 48-58
- O'Leary, N. A. et al., *Nucleic Acids Res* 44 (2016): D733-D745
- Ohigashi, Y. et al., *Clin Cancer Res.* 11 (2005): 2947-2953
- Okuno, K. et al., *Exp.Ther.Med.* 2 (2011): 73-79
- Olexiouk, V. et al., *Nucleic Acids Res* 44 (2016): D324-D329
- Palma, M. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 57 (2008): 1705-1710
- Palmer, D. H. et al., *Hepatology* 49 (2009): 124-132
- Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* 14 (2012): 433-440
- Parikh, S. A. et al., *Blood* 118 (2011): 2062-2068
- Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 289-297
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*
 (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994): 949-955
- Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* 365 (2011): 725-733
- Quillien, V. et al., *Anticancer Res.* 17 (1997): 387-391

- Quinn, D. I. et al., Urol.Oncol 33 (2015): 245-260
- Rakic, M. et al., Hepatobiliary.Surg.Nutr. 3 (2014): 221-226
- Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics 50 (1999): 213-219
- Reinisch, W. et al., J Immunother. 25 (2002): 489-499
- Reinmuth, N. et al., Dtsch.Med.Wochenschr. 140 (2015): 329-333
- Richards, S. et al., J Natl.Cancer Inst. 91 (1999): 861-868
- Rini, B. I. et al., Curr.Opin.Oncol. 20 (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., Cancer 107 (2006): 67-74
- Robak, T. et al., Expert.Opin.Biol.Ther 14 (2014): 651-661
- Rock, K. L. et al., Science 249 (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., Nat.Protoc. 1 (2006): 1120-1132
- Rouanne, M. et al., Crit Rev Oncol Hematol. 98 (2016): 106-115
- Rucki, A. A. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014): 2237-2246
- S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 032-010OL, (2013)
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 020/007, (2011a)
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 020/007, (2011b)
- S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 032-035OL, (2013)
- S3-Leitlinie Mammakarzinom, 032-045OL, (2012)
- S3-Leitlinie Melanom, 032-024OL, (2013)
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 043/022OL, (2014)
- S3-Leitlinie Zervixkarzinom, 032/033OL, (2014)
- Saiki, R. K. et al., Science 239 (1988): 487-491
- Salman, B. et al., Oncoimmunology. 2 (2013): e26662
- Sangro, B. et al., J Clin.Oncol. 22 (2004): 1389-1397

- Schetelig, J. et al., J Clin Oncol 26 (2008): 5094-5100
- Schiavetti, F. et al., Cancer Res 62 (2002): 5510-5516
- Schmidt, S. M. et al., Cancer Res. 64 (2004): 1164-1170
- Schmitt, T. M. et al., Hum.Gene Ther. 20 (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. 119 (2006): 135-145
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics 49 (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Shi, M. et al., World J Gastroenterol. 10 (2004): 1146-1151
- Showel, M. M. et al., F1000Prime.Rep. 6 (2014): 96
- Siegel, S. et al., Blood 102 (2003): 4416-4423
- Silva, L. P. et al., Anal.Chem. 85 (2013): 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. 24 (2006): 3089-3094
- Spaner, D. E. et al., Cancer Immunol.Immunother. 54 (2005): 635-646
- Srivastava, N. et al., Cancer Manag.Res. 6 (2014): 279-289
- Stahl, M. et al., Ann.Oncol. 24 Suppl 6 (2013): vi51-vi56
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016a)
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016b)
- Stevanovic, S. et al., J Clin Oncol 33 (2015): 1543-1550
- Stintzing, S., F1000Prime.Rep. 6 (2014): 108
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. 9 (2008): 163
- Su, Z. et al., Cancer Res. 63 (2003): 2127-2133
- Subramanian, R. P. et al., Retrovirology. 8 (2011): 90
- Takayama, T. et al., Cancer 68 (1991): 2391-2396

- Takayama, T. et al., Lancet 356 (2000): 802-807
- Tanaka, F. et al., Int.J Oncol 10 (1997): 1113-1117
- Teufel, R. et al., Cell Mol.Life Sci. 62 (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 23 (2014): 1985-1996
- Toh, U. et al., Int.J Clin Oncol 7 (2002): 372-375
- Toh, U. et al., Clin Cancer Res. 6 (2000): 4663-4673
- Toomey, P. G. et al., Cancer Control 20 (2013): 32-42
- Tran, E. et al., Science 344 (2014): 641-645
- Vanderperre, B. et al., PLoS.One. 8 (2013): e70698
- Vici, P. et al., J Exp.Clin Cancer Res 33 (2014): 29
- Von Hoff, D. D. et al., N.Engl.J Med. 369 (2013): 1691-1703
- von Rundstedt, F. C. et al., Transl.Androl Urol. 4 (2015): 244-253
- Walter, S. et al., J.Immunol. 171 (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. 18 (2012): 1254-1261
- Wang, N. et al., Arch.Gynecol.Obstet. 283 (2011): 103-108
- Wierda, W. G. et al., Blood 118 (2011): 5126-5129
- Wilhelm, S. M. et al., Cancer Res. 64 (2004): 7099-7109
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. 8 (1999): 2418-2423
- Wilson, P. M. et al., Nat Rev.Clin Oncol 11 (2014): 282-298
- Wittig, B. et al., Hum.Gene Ther. 12 (2001): 267-278
- World Cancer Report, (2014)
- World Health Organization, (2014), <http://www.who.int/en/>
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. 57 (1997): 4570-4577
- Zufferey, R. et al., J Virol. 73 (1999): 2886-2892

【符號說明】

【0360】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊(請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

國外寄存資訊(請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

無

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT
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非經典來源的肽和肽組合

<130> I33148WO

<150> US 62/633,325

<151> 2018-02-21

<150> DE 10 2018 103 944.1

<151> 2018-02-21

<150> DE 10 2018 107 224.4

<151> 2018-03-27

<160> 105

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Leu Leu Asp Phe Ser Thr Arg Ile
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Leu Leu Asp Val Leu Val Lys Leu
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Leu Leu Val Pro Ser Pro Ile Trp Gln Leu
1 5 10

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Tyr Leu Gly Asp Ser His Val Leu Leu
1 5

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

<400> 5

Leu Val Trp Glu Val Val Glu Ser Val
1 5

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

<400> 6

Ala Leu His Asp Ser Pro Val Tyr Leu
1 5

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

<400> 7

Ala Leu Trp Glu Glu Val Lys Ala Thr Ser Leu
1 5 10

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

<400> 8

Ile Leu Gln Ser Leu Val Pro Ala Ala
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

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

<400> 9

Phe Leu Gln Glu Gly Asp Leu Ile Ser Val
1 5 10

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

<400> 10

Ser Leu Leu Asp Lys Leu Ser Gly Ile
1 5

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

<400> 11

Ala Leu Leu Pro His Ala Pro Glu Ala Val
1 5 10

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

<400> 12

His Leu Asp Ser Met Asn Val Ser Ile
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Phe Leu Asp Glu Gly Ser Leu Leu Arg Leu
1 5 10

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Leu
1 5

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

<400> 15

Asn Leu Val Met Pro Leu Leu His Ile
1 5

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Leu Trp Asp Leu Arg Pro Ser Ser Leu Ile
1 5 10

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

<400> 18

Lys Met Met Thr Phe Phe Gln Gly Leu
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Leu Leu Pro Trp Leu Pro Lys Leu
1 5

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

<400> 20

Val Leu Ile Ser Leu Pro Gly Lys Val
1 5

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

<400> 21

Phe Val Phe Ile Ser Pro Ser Phe Leu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Leu Tyr Asp Val Pro Val Gly Ala
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Gly Leu Glu Val Leu Asp Ala Leu Leu
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Thr Leu Thr Ser Leu Asn Ile Leu Leu
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Ile Ser Val Leu Asn Leu Ser Ala Ile
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Lys Leu Trp Thr Ser Leu Val Asn Leu
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Ile Ala Ala Gly Val Pro Asn Thr Asp Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Gln Leu Glu Lys Pro Glu Thr Ala
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

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

<400> 29

Leu Leu Trp Glu Phe Pro Ser Met Ala
1 5

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

<400> 30

Leu Leu Arg Leu Thr Leu Leu Pro Leu
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Val Leu Pro Ile Val Ile Thr Leu
1 5

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Val Leu Ser Val Ser Ala Val Leu Gly Ala
1 5 10

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Ala Ser Glu Arg Pro Pro Ser Val
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Leu Leu Asn Val Glu Pro Ala Gly Ala
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Leu Leu Asn Ser Asn Tyr Pro Val
1 5

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

<400> 36

Phe Gln Val Thr Arg Thr Thr Gly Val
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Lys Ile Leu Asp Glu Phe Tyr Asn Val
1 5

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

<400> 38

Ser Leu Ser Ala Trp Leu Pro Ser Leu
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

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

<400> 39

Tyr Ile Tyr Glu Asp Glu Val Arg Leu
1 5

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

<400> 40

Phe Thr Leu Pro Phe Leu Val Asn Leu
1 5

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Leu Met Ala Ser Glu Gly Ile Trp Glu Ser Ser Leu
1 5 10

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Trp Ile Thr Pro Val Ile Pro Ala Leu
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Ile Trp Ser Thr Ile Leu Ile Ala
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Trp Leu Ile Pro Arg Gln Leu Ala Ala Ala
1 5 10

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

<400> 45

Ala Leu Tyr His Gln Ser Pro Leu Leu
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Met Val Glu Ile Ile Pro Lys Val
1 5

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

<400> 47

Ala Leu Leu Pro Gly Val Pro Gly Leu
1 5

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

<400> 48

Met Leu Ala Glu Ile His Pro Lys Ala
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

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

<400> 49

Phe Leu Trp Asp Pro Arg Asp Val Val Leu
1 5 10

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

<400> 50

Gly Leu Ala Ser Tyr Leu Asp Arg Val
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Leu Leu Thr Gln Val His Ile Leu
1 5

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

<400> 52

Leu Ala Phe Val Ser His Val Leu Ile
1 5

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

<400> 53

Thr Ile Ser Ile Ser Leu Ser Ser Val
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Leu Ser Pro Asp Gln Val Phe Leu
1 5

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

<400> 55

Met Val Gln Gln Glu Lys Leu Phe Val
1 5

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

<400> 56

Ile Ile Thr Asn Leu Ile Val Asn Ile
1 5

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

<400> 57

Tyr Val Leu Met Thr Ser Leu Leu Leu
1 5

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Met Ile Ile Ser His Arg Ala Leu Glu Leu
1 5 10

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Leu Ala Ala Ser Thr Thr Phe Leu Gly Val
1 5 10

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Glu Asn Leu
1 5

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

<400> 61

Val Leu Pro Trp Gln Pro Leu Leu Leu
1 5

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

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

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Leu Ser Phe Lys Arg Ser Leu Ser Ile
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

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

<400> 64

Leu Leu Leu Ala Leu Arg Leu Ser Leu
1 5

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

<400> 65

Ile Ala Ile Ser Gln Leu Thr Phe Val
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Ile Leu Asn Glu Leu Leu Asn Ser Ile
1 5

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

<400> 67

Ala Leu Lys Glu Leu Met Gly Pro Ala
1 5

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

<400> 68

Lys Leu Leu Ala Asp Ala Phe Lys Val
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

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

<400> 69

Leu Leu Cys Pro Val Val Leu Gln Leu
1 5

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

<400> 70

Leu Leu Leu Gln Ile Glu Pro Ala Ala
1 5

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

<400> 71

Trp Leu Met Pro Val Met Pro Ala Leu
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Leu Ser Phe Ile Lys Ile Leu Leu
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Ser Thr Thr Ile Ile Asn Leu Ile Leu
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Thr Leu Leu Ser Tyr Ser Ile Pro Leu
1 5

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Thr Gln Glu Ala Glu Lys Leu Leu Glu Arg
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Thr Glu Gln Gly Pro Thr Gly Val Thr Met
1 5 10

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Val Pro Ala Gly Val Asp Val Ile Thr Glu Tyr
1 5 10

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

<400> 78

Gly Leu Leu Pro Pro Val Arg Ala Met
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

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

<400> 79

Lys Ile Gln Asp Pro Gly Thr Ala Phe
1 5

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

<400> 80

Arg Asp Gln Ile Val Thr Val Ser Val
1 5

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ser Leu Leu Gly Ala Ala Thr Val Glu Pro Pro Lys
1 5 10

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Leu Ala Pro Gln Met Ile Ile Ala Leu
1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Lys Pro Arg Gly Pro Thr Pro Leu
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

Arg Leu Cys Pro Ala Ala Pro Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

Val Tyr Leu Leu Thr Phe Pro Pro Leu
1 5

<210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Met Ile Gly Lys Arg Ile Leu
1 5

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Asn Leu Val Ser Glu Thr Glu Ala Met Val Lys
1 5 10

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Asp Glu Gln Glu Thr Asp Ala Phe Leu Leu
1 5 10

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

Met Ile Phe Tyr Val Leu Gln Lys
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

Tyr Leu Arg Asp Phe Lys Ile Lys Arg
1 5

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

<400> 91

Ser Ser His Phe Ile Leu Val Thr Phe
1 5

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

<400> 92

Glu Leu Val Ala Val Thr Ser Val Leu
1 5

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

Trp Gln Lys Asn Ser Met Arg Leu
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

Met Gly Arg Arg Arg Asn Leu Tyr
1 5

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

<400> 95

Gln Val Lys Ile Val Thr Leu Leu
1 5

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

Lys Ile Ile Glu Asp Leu Ala Asn Thr Val
1 5 10

<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

Gly Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu
1 5 10

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

<400> 98

Ser Leu Met Glu Val Thr His Asp Leu
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

Ala Leu Met Asp Gly Ser Glu Ser Arg Phe Phe Val
1 5 10

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

Ser Leu Gly Pro Pro Pro Val Gly Val
1 5

<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

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

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102

Gly Leu Asp Pro Thr Gln Phe Arg Val
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

Ser Leu Val Ser Tyr Leu Asp Lys Val
1 5

PI-30045.2_SEQ_LIST.TXT

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

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

<400> 105

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5

- 1 -

【發明申請專利範圍】

- 【請求項1】 一種肽，其由 SEQ ID No. 2 組成，或彼之一藥用鹽。
- 【請求項2】 如請求項1所述之肽，其中該肽有能力與一 MHC-I 類分子結合，以及其中該肽與該 MHC-I 類分子結合時能夠被 CD8 T 細胞識別。
- 【請求項3】 一種抗體，其特異性地識別如請求項1-2任一項所述之肽。
- 【請求項4】 如請求項3所述之抗體，其中該抗體是一可溶性或膜結合性抗體。
- 【請求項5】 如請求項3所述之抗體，其中該抗體為一單克隆抗體或其片段。
- 【請求項6】 如請求項3所述之抗體，其中該肽與一 MHC 分子結合。
- 【請求項7】 一種 T 細胞受體，其與一 HLA 配體反應，其中該配體是如請求項1-2任一項所述之肽。
- 【請求項8】 如請求項7所述之 T 細胞受體，其中該 T 細胞受體為可溶性或膜結合性受體或其一片段。
- 【請求項9】 如請求項7所述之 T 細胞受體，其中該肽與一 MHC 分子結合。
- 【請求項10】 如請求項7所述之 T 細胞受體，其中該 T 細胞受體作為一可溶性分子提供。
- 【請求項11】 如請求項10所述之 T 細胞受體，其中該 T 細胞受體具有一進一步的效應子功能。

- 【請求項12】如請求項11所述之T細胞受體，其中該進一步的效應子功能為一免疫刺激域或毒素。
- 【請求項13】一種核酸，其編碼如請求項1-2任一項所述之肽、如請求項3-6任一項所述之抗體，或如請求項7-12任一項所述之T細胞受體。
- 【請求項14】如請求項13所述之核酸，其中該核酸連接到一異源啟動子序列。
- 【請求項15】一種表達載體，其表達如請求項13或14所述之核酸。
- 【請求項16】一種重組宿主細胞，其包含如請求項1-2任一項所述之肽、如請求項3-6任一項所述之抗體、如請求項7-12任一項所述之T細胞受體、如請求項13或14所述之核酸，或如請求項15所述之表達載體。
- 【請求項17】如請求項16所述之重組宿主細胞，其中該重組宿主細胞選自一抗原提呈細胞。
- 【請求項18】如請求項17所述之重組宿主細胞，其中該抗原提呈細胞為一樹突細胞、一T細胞或一NK細胞。
- 【請求項19】一種體外製備活化的T淋巴細胞的方法，該方法包括將T細胞與載有抗原的人I或II類MHC分子進行體外連接足夠的一段時間，該等分子在一合適的抗原提呈細胞表面或一人工模擬的抗原提呈細胞結構表面上表達，從而以一抗原特異性方式活化T細胞，其中該抗原為如請求項1-2任一項所述之肽。
- 【請求項20】一種藥物組合物，其包括至少一活性成分，

該活性成分選自如請求項 1 - 2 任一項所述之肽、如請求項 3 - 6 任一項所述之抗體、如請求項 7 - 12 任一項所述之 T 細胞受體、如請求項 13 或 14 所述之核酸、如請求項 15 所述之表達載體、如請求項 16 - 18 任一項所述之重組宿主細胞，或如請求項 19 所述之方法所製備的活化 T 淋巴細胞，或一共軛或標記的活性成分，以及一藥用載體。

【請求項 21】如請求項 20 所述之藥物組合物，其進一步包含藥用賦形劑和 / 或穩定劑。

【請求項 22】如請求項 20 所述之藥物組合物，其進一步包含一或更多佐劑，其中該一或更多佐劑選自白血球介素及免疫佐劑。

【請求項 23】如請求項 22 所述之藥物組合物，其中

a) 該白血球介素為 IL - 2 ；和 / 或

b) 該免疫佐劑為 IL - 15 。

【請求項 24】一種如請求項 1 - 2 任一項所述之肽、如請求項 3 - 6 任一項所述之抗體、如請求項 7 - 12 任一項所述之 T 細胞受體、如請求項 13 或 14 所述之核酸、如請求項 15 所述之表達載體、如請求項 16 - 18 任一項所述之重組宿主細胞，或如請求項 19 所述之方法所製備的活化 T 淋巴細胞在製造癌症治療之一藥物中的用途。

【請求項 25】如請求項 24 所述之用途，其中該癌症選自黑色素瘤、急性髓性白血病、乳腺癌、膽管癌、腦癌、慢性淋巴細胞白血病、結腸直腸癌、食道癌、膽囊癌、

胃癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、膀胱癌及子宮癌和其他腫瘤組成的群組，該等其他腫瘤顯示過度表現由 SEQ ID No. 2 組成的一肽。

【請求項 26】一種醫藥套件，包括：

a) 包含溶液或凍乾粉形式的一藥物組合物的一容器，該藥物組合物包含如請求項 1-2 任一項所述之肽、如請求項 3-6 任一項所述之抗體、如請求項 7-12 任一項所述之 T 細胞受體、如請求項 13 或 14 所述之核酸、如請求項 15 所述之表達載體、如請求項 16-18 任一項所述之重組宿主細胞，或如請求項 19 所述之方法所製備的活化 T 淋巴細胞。

【請求項 27】如請求項 26 所述之醫藥套件，進一步包含 (b) 一第二容器，其含有凍乾粉劑型的一稀釋劑或重組溶液和 / 或 (c) 至少一或更多的肽，選自由 SEQ ID No. 1-101 所組成的群組。

【請求項 28】如請求項 26 或 27 所述之醫藥套件，進一步包括 (iii) 一緩衝劑、(iv) 一稀釋劑、(v) 一過濾液、(vi) 一針頭、(vii) 一注射器，或 (viii) 一佐劑之一或多者。

【請求項 29】一種用於生產一藥物之方法，該藥物為用於個體患者之一個性化抗癌疫苗或一細胞療法，該方法包含以下步驟：

a) 識別由該個體患者之一腫瘤樣本所提呈的腫瘤相關肽 (TUMAP)；

- b) 將 a) 中識別的肽與已經接受過免疫原性預篩查和 / 或與正常組織相比在腫瘤中過度提呈的肽之存儲庫進行比較；
- c) 選擇與患者中識別的 T U M A P 匹配的存儲庫中的至少一肽；及
- d) 基於步驟 c) 製造和 / 或配製該個性化疫苗或基於化合物的療法或細胞療法；

其中該選擇的存儲庫肽由 S E Q I D N o . 2 組成。

【請求項30】如請求項29所述之方法，其中該 T U M A P 透過以下方法識別：

a 1) 將來自該腫瘤樣本的表達數據與該腫瘤樣本之組織類型相對應的一正常組織樣本的表達數據相比對，以識別該腫瘤組織中過度表達或異常表達的蛋白；及

a 2) 將表達數據與該腫瘤樣本中 M H C I 類和 / 或 II 類分子結合的 M H C 配體序列相關聯，以識別由腫瘤過度表達或異常的蛋白質所衍生的 M H C 配體。

【請求項31】如請求項29或30所述之方法，其中 M H C 配體的序列的確定方法是：洗脫由該腫瘤樣本分離的 M H C 分子結合之肽，並定序洗脫的配體。

【請求項32】如請求項29或30所述之方法，其中該相應該腫瘤樣本之組織類型的正常組織獲得自同一患者。

【請求項33】如請求項29或30所述之方法，其中該存儲庫包含的肽用基於以下的步驟進行識別：

a a . 透過高度並行的方法，進行全基因組信使核糖核酸

(mRNA) 表達分析，其包含識別相較於正常組織在一惡性組織中過度表達的基因；

a b . 選擇步驟 a a 中檢測到的特異性表達或多度表達的基因所編碼的肽，以及

a c . 透過選定的肽確定誘導體內 T 細胞反應，包含使用健康供體或該患者的人類 T 細胞的體外免疫原性測定；或

b a . 使用質譜法識別來自該腫瘤樣本的 HLA 配體；

b b . 透過高度並行的方法，進行全基因組信使核糖核酸 (mRNA) 表達分析，其包含識別相較於正常組織在一惡性組織中過度表達的基因；

b c . 比較識別的 HLA 配體與該基因表達數據；

b d . 選擇步驟 b c 中檢測到的特異性表達或多度表達的基因所編碼的肽；

b e . 重新檢測腫瘤組織上來自步驟 b d 的選定 TUMAP、其在健康組織上缺乏或不經常檢測，並確定在 mRNA 水平上過度表達的相關性；以及

b f . 透過選定的肽確定誘導體內 T 細胞反應，包含使用健康供體或該患者的人類 T 細胞的體外免疫原性測定。

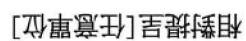
【請求項 34】如請求項 29 或 30 所述之方法，其中存儲庫所包括的肽之免疫原性由包含有體外免疫原性實驗、個體 HLA 結合性患者免疫監測、MHC 多聚體染色、ELISPOT 分析和 / 或細胞內細胞因子染色的一方法確

定。

【請求項35】如請求項29或30所述之方法，其進一步包含識別與該個體患者之正常相應組織相比對該腫瘤樣本為獨特的至少一突變，以及選擇與該突變相關的一肽用於包含於疫苗中或用於產生細胞療法。

【請求項36】如請求項35所述之方法，其中該至少一突變透過全基因組定序識別。

SEQ ID NO: 1



肽： ALLDVLVKL (A*02)
SEQ ID NO: 2

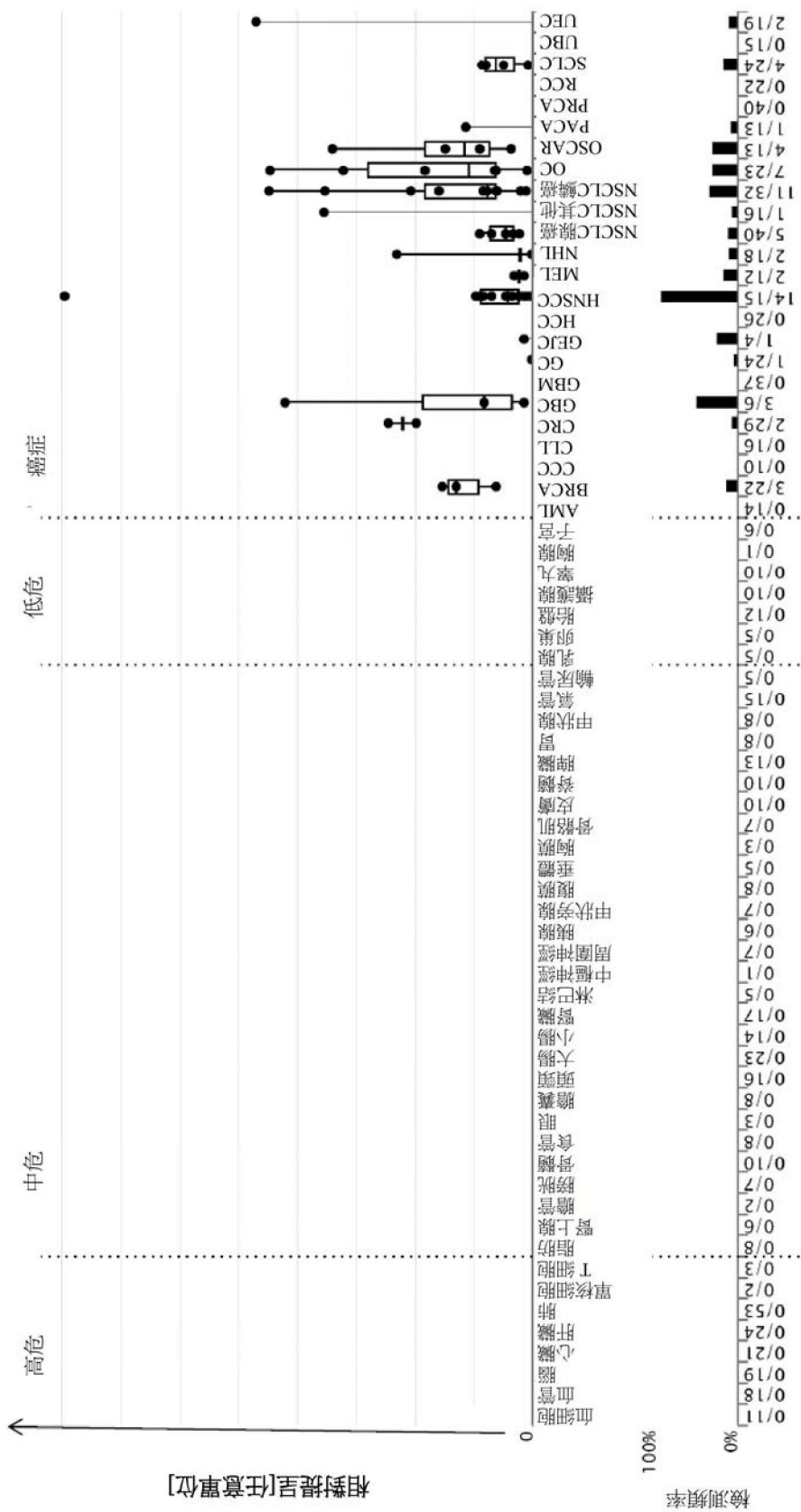


圖 1C

肽： FLLVPSPIWQL (A*02)
SEQ ID NO: 3

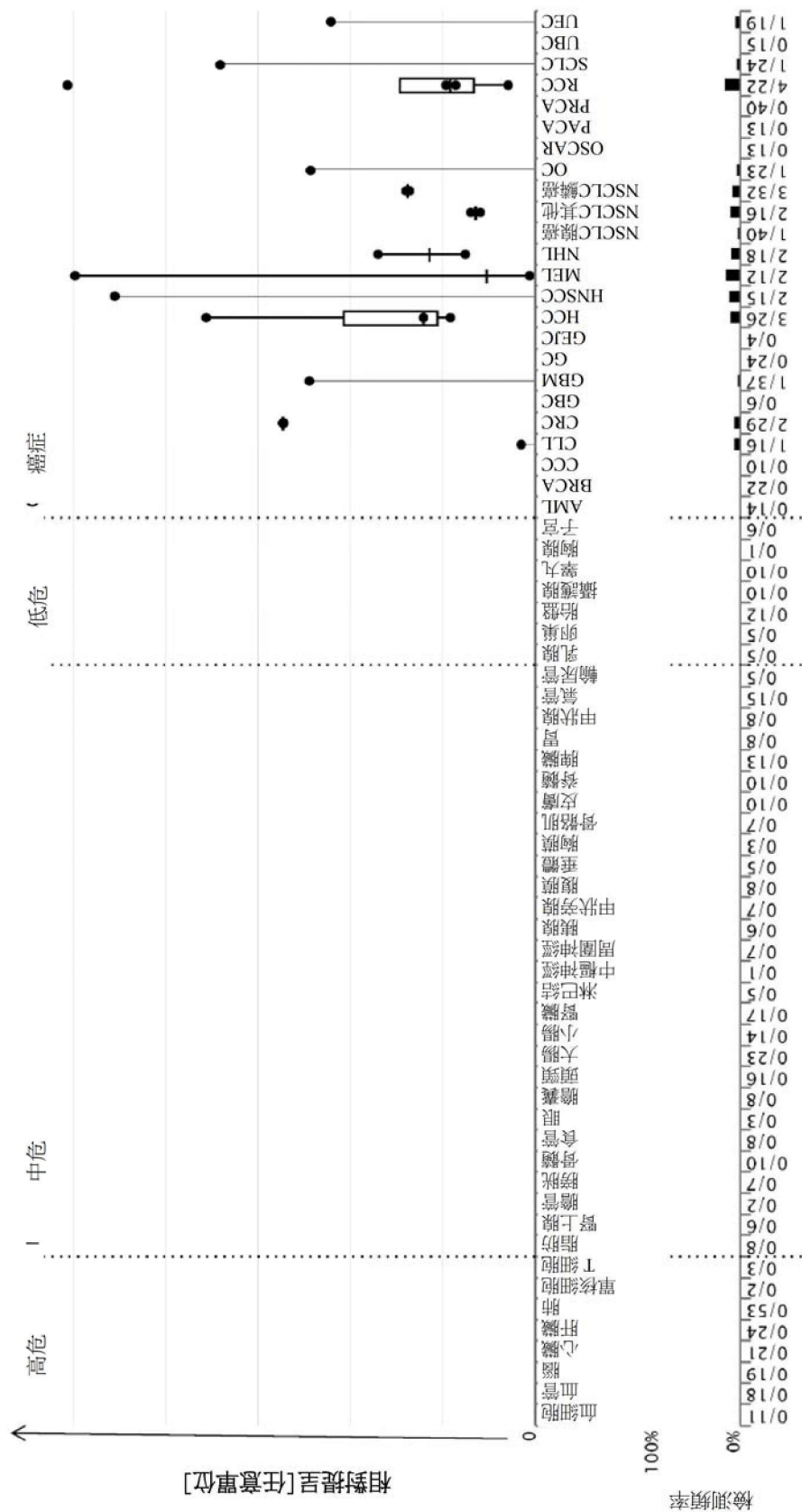


圖 1D

肽：LVWEVVESV (A*02)
SEQ ID NO: 5

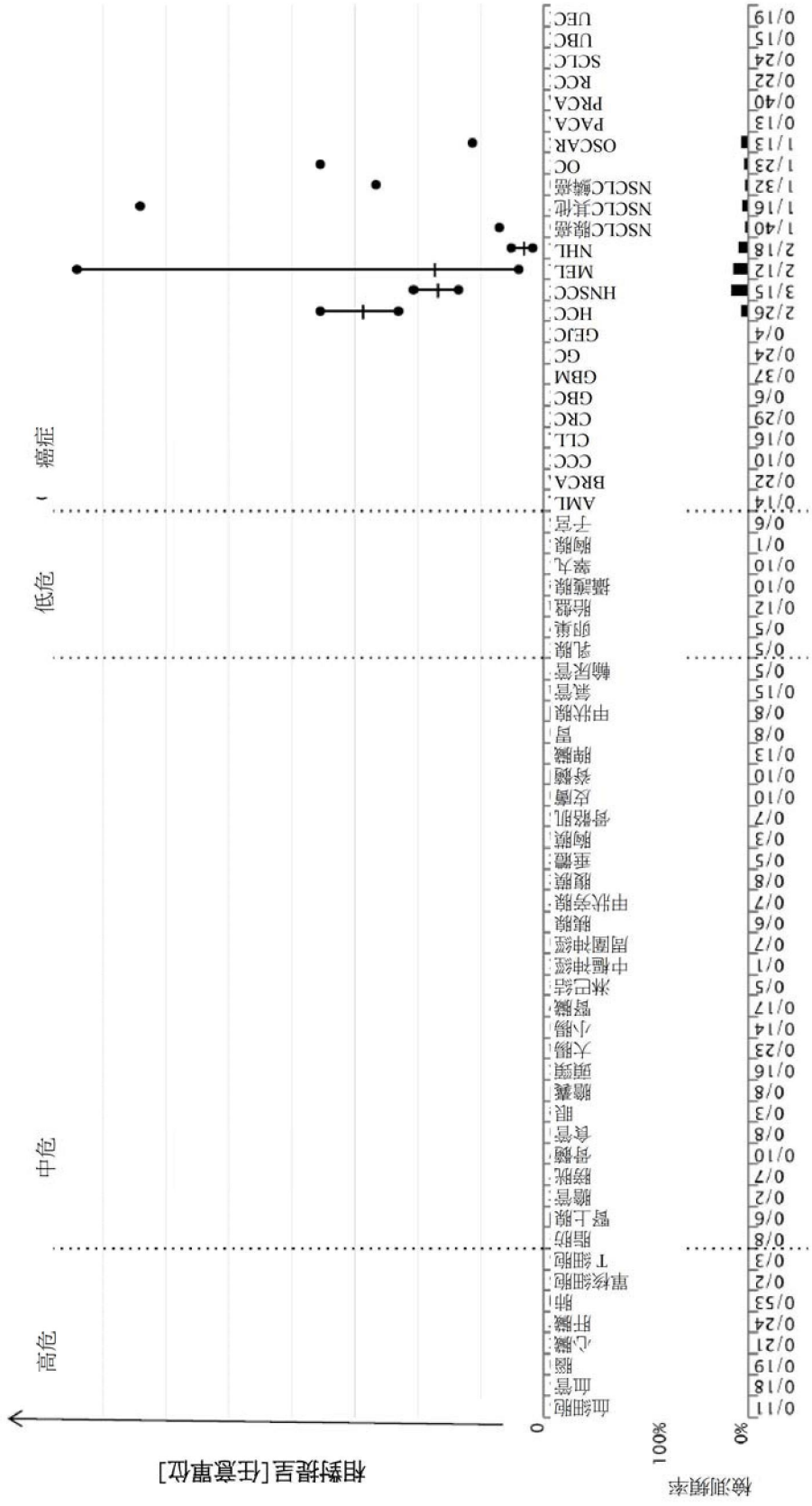


圖 1E

肽：SLLDKLSGI (A*02)
SEQ ID NO: 10

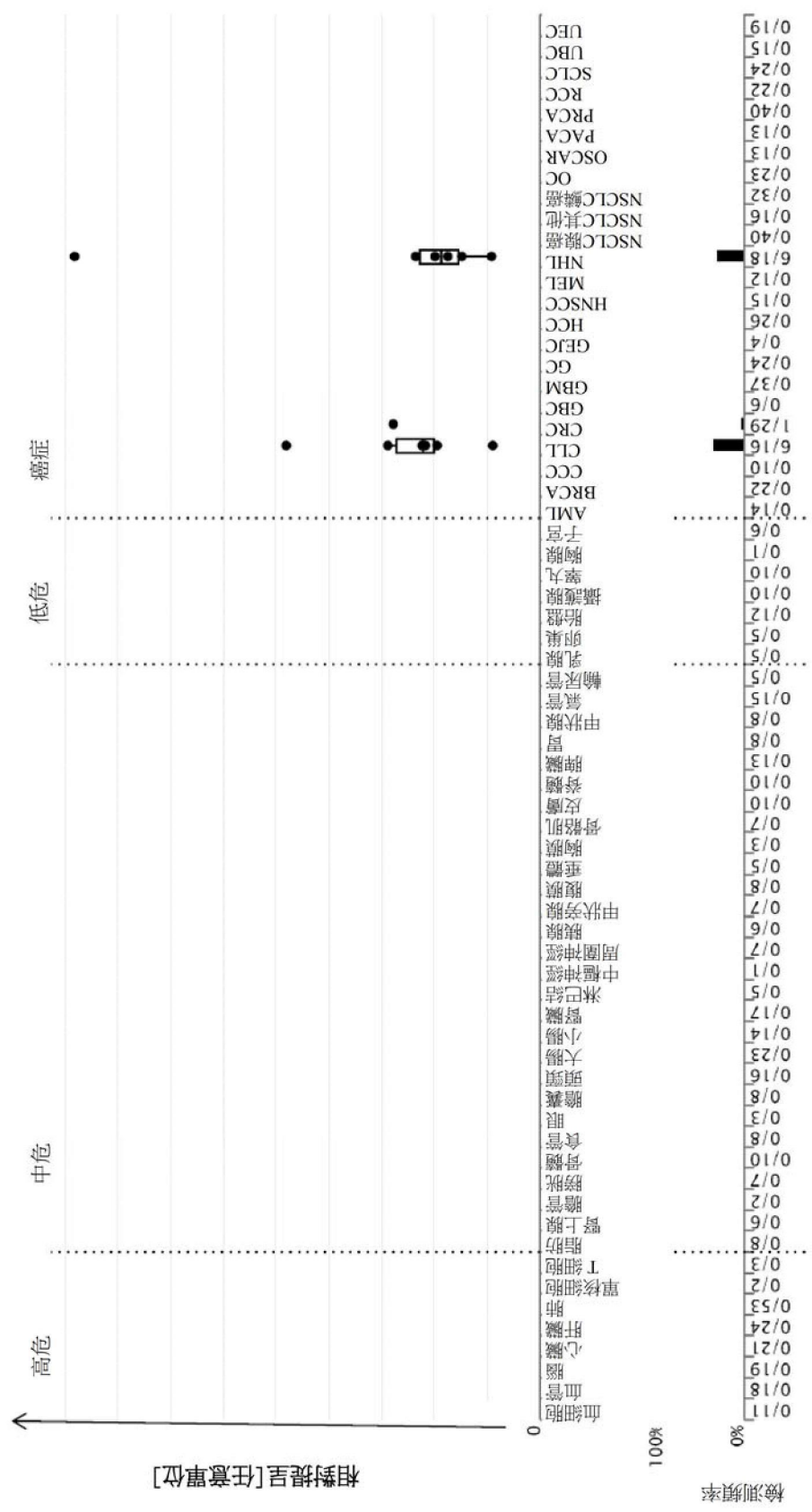


圖 1F

肽： SLLGAATVEPPK (A*03)
SEQ ID NO: 81

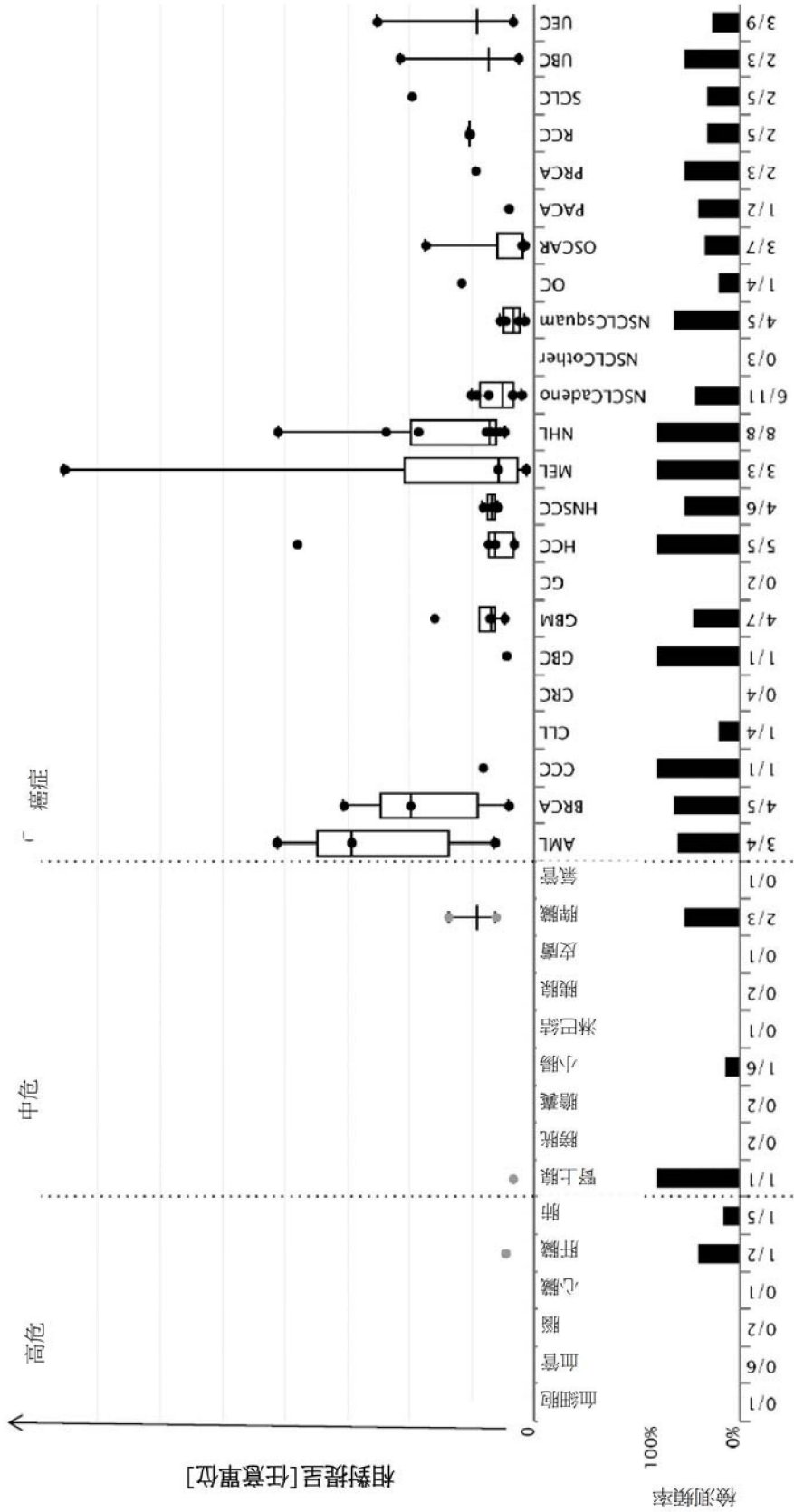


圖 2A

Ensembl ID: ENST00000225964
肽：ALLDVLVKL
SEQ ID NO: 2

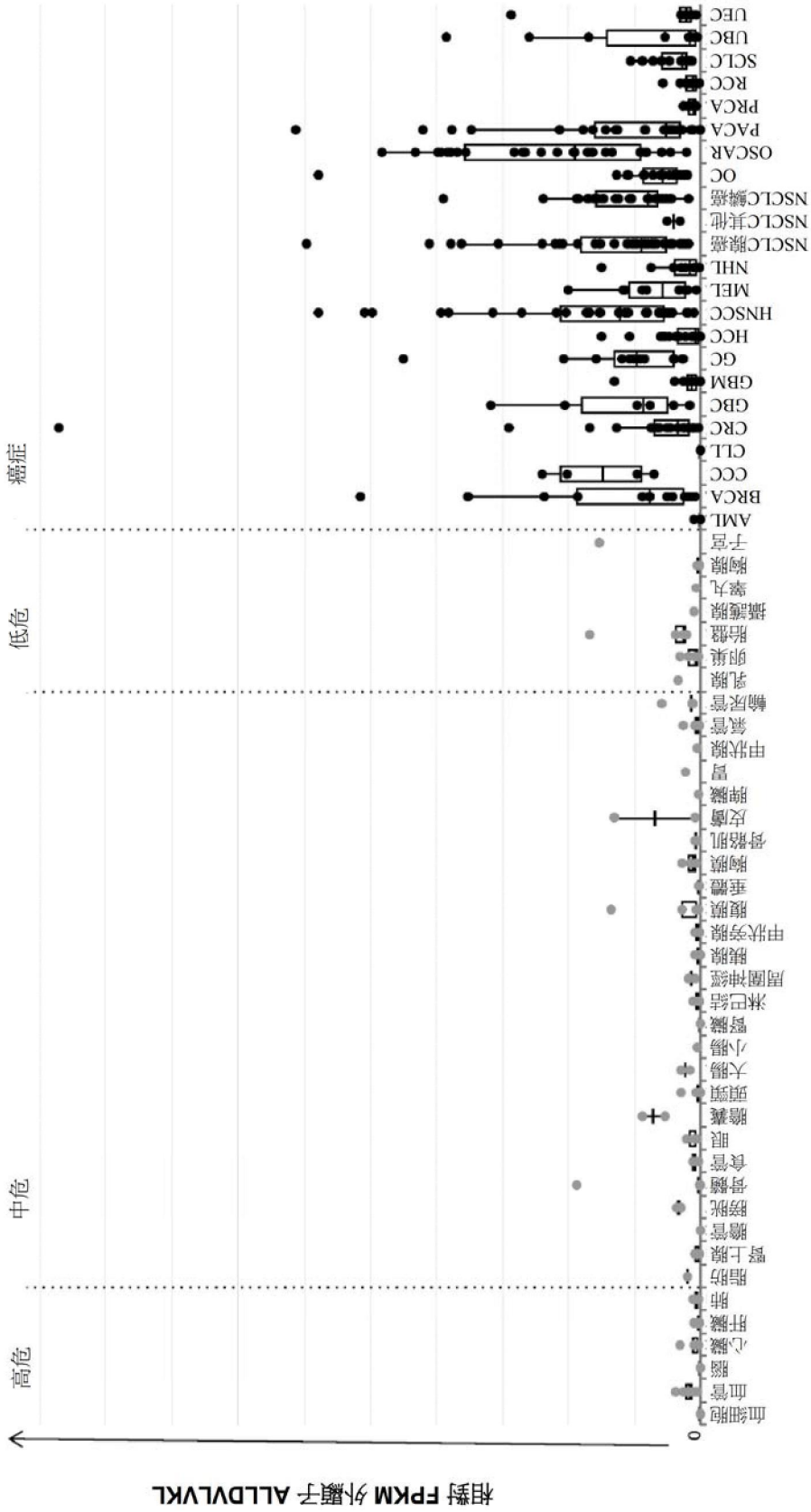


圖 2B

Ensembl ID: ENST000000374472
肽：SLLDKLSGI
SEQ ID NO: 10

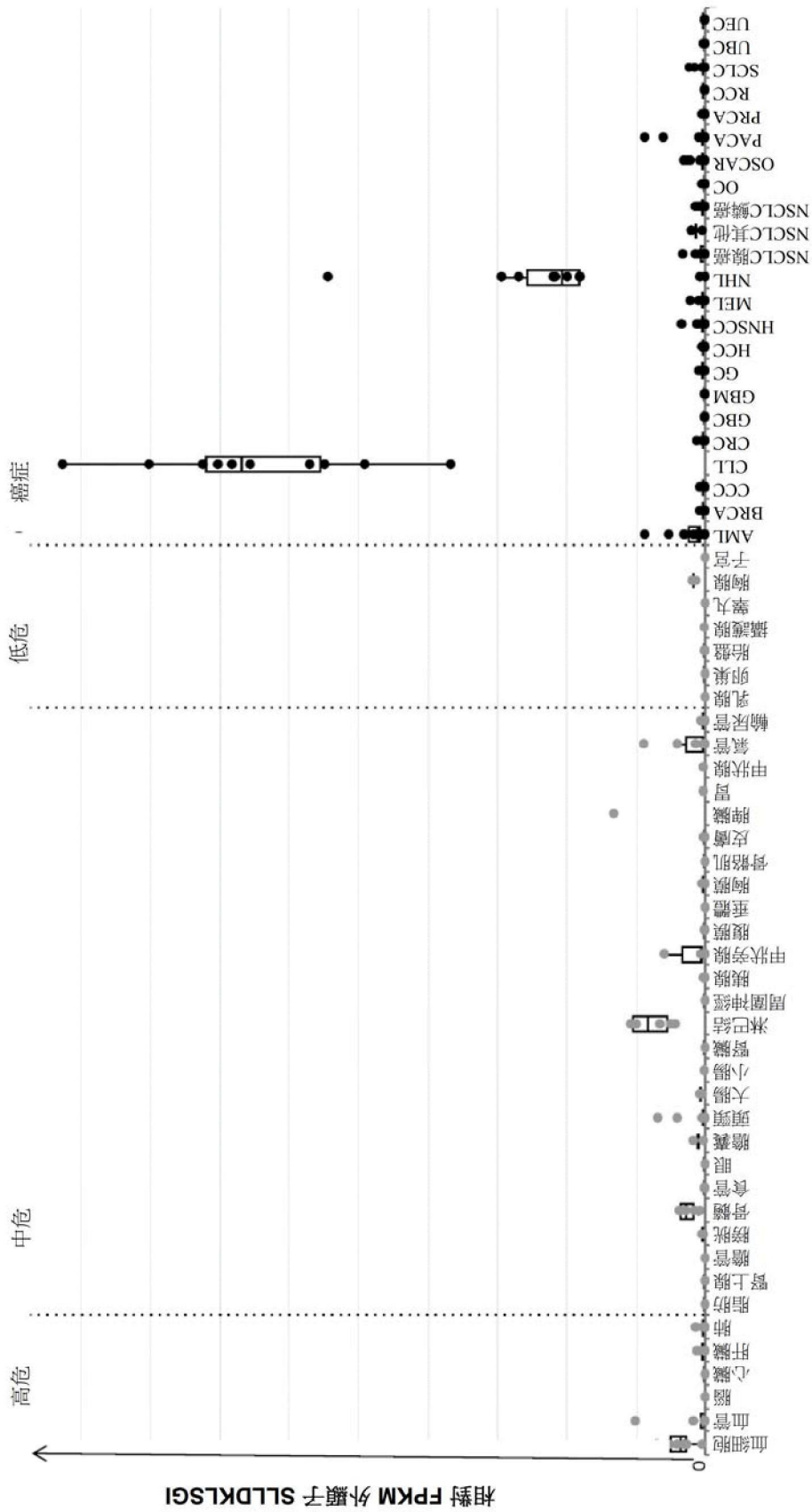


圖 2C

Ensembl ID: ENST000000617924
肽：FASERPPSV
SEQ ID NO: 33

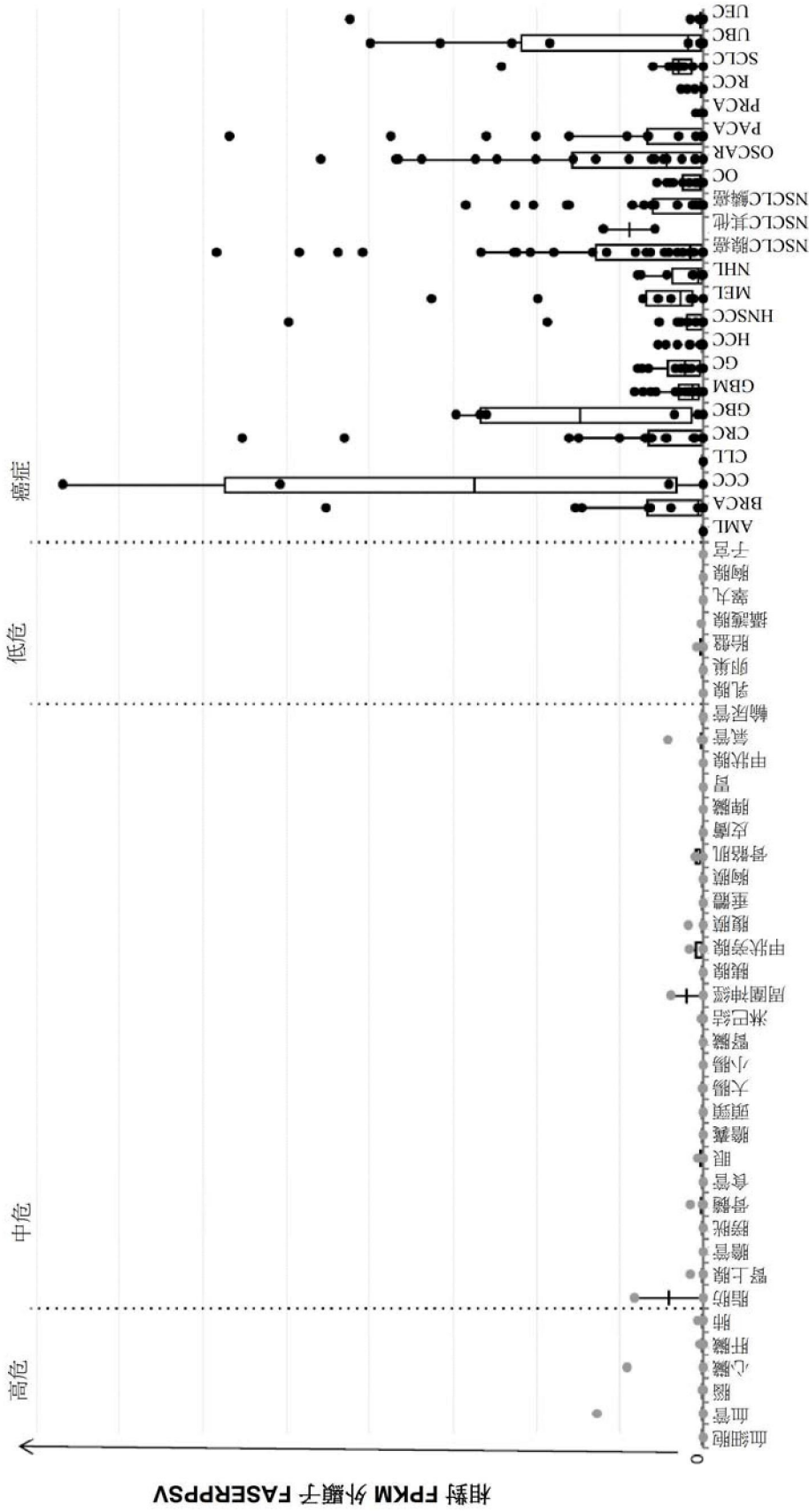


圖 2D

Ensembl ID: ENST00000603198
肽：YIYEDVRL
SEQ ID NO: 39

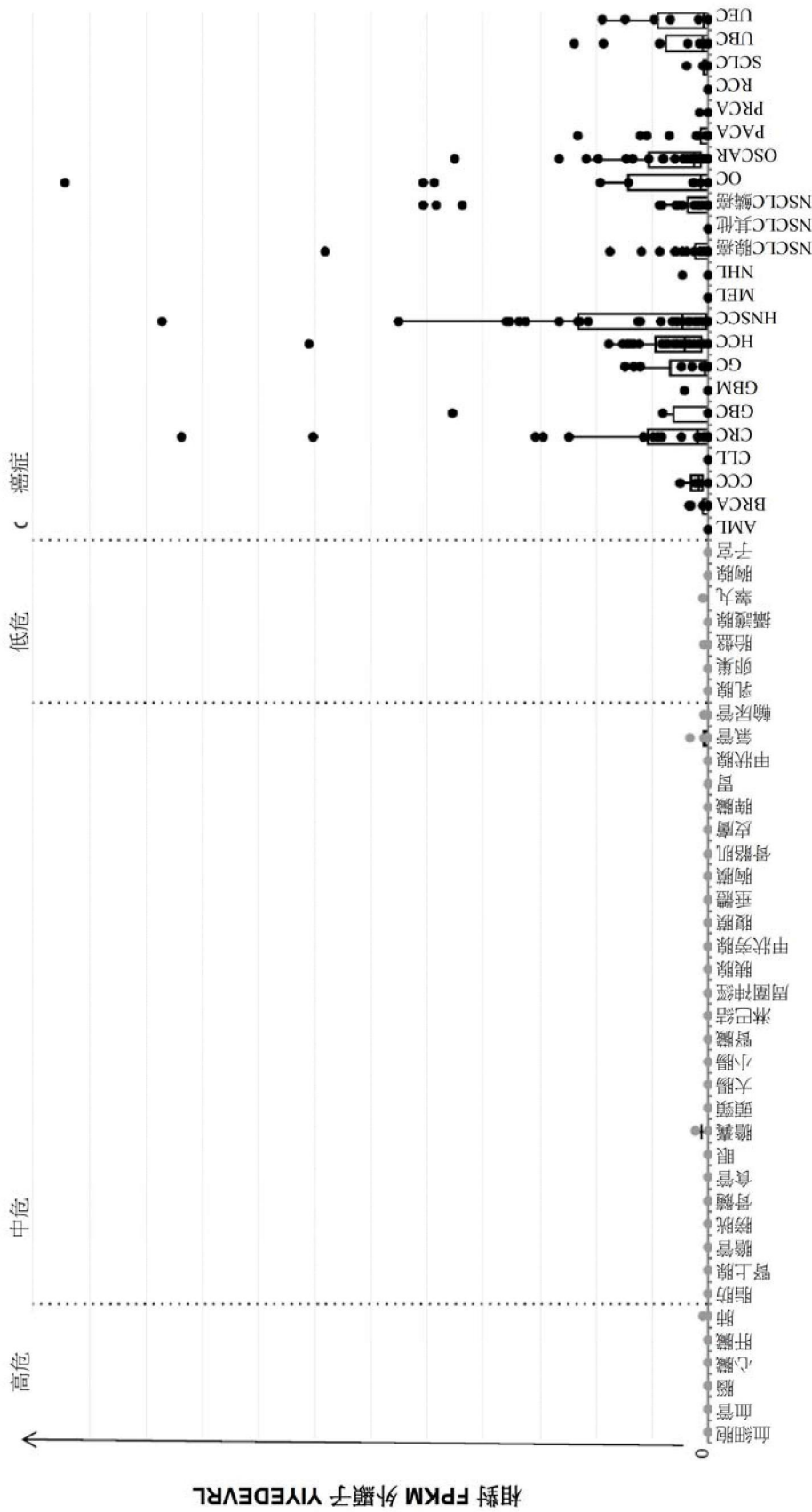


圖 2E

Ensembl ID: ENST000000420453
肽： AIWSTILIA
SEQ ID NO: 43

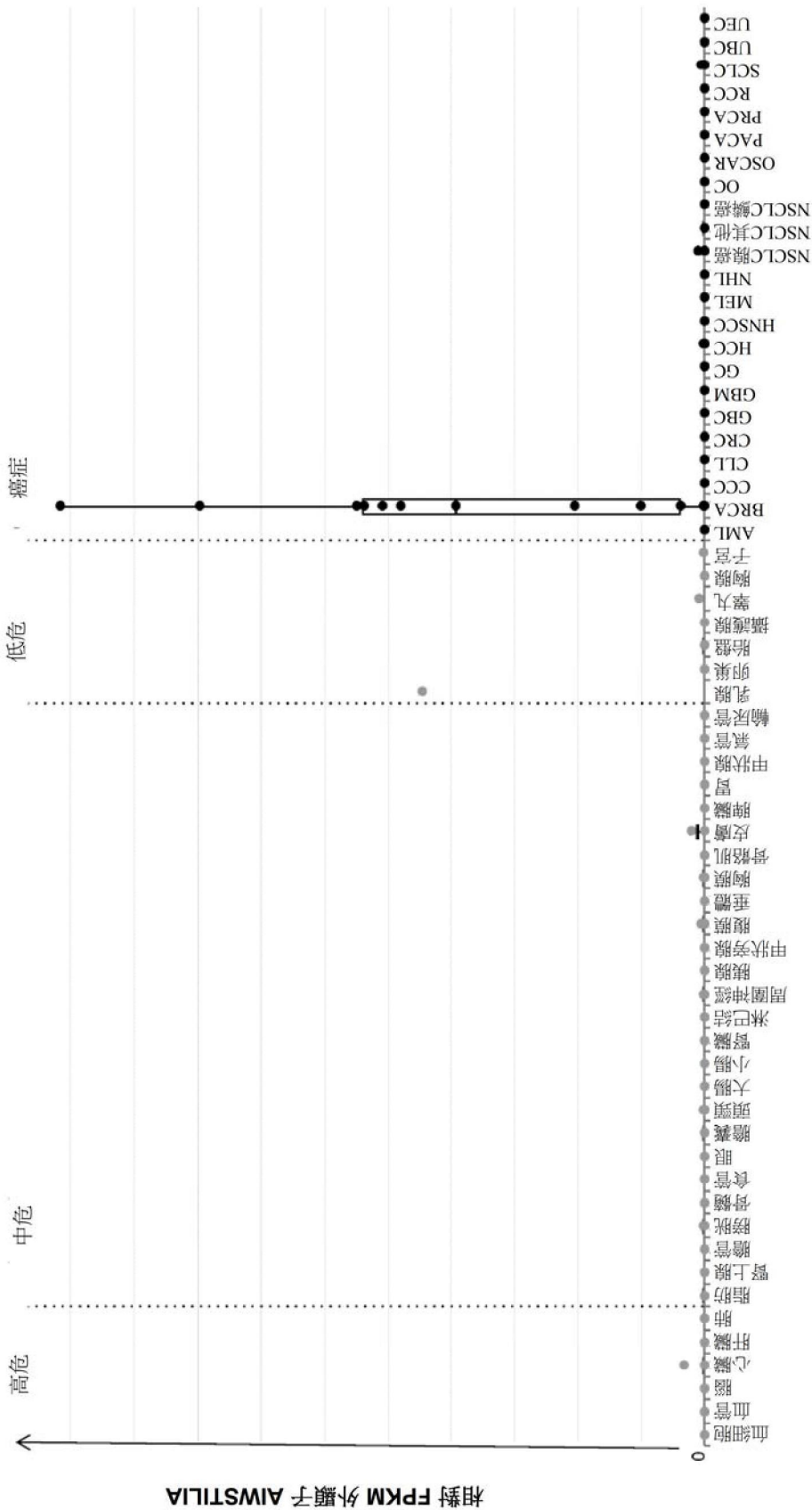


圖2F Ensembl ID: ENST000000473984
肽：IAISQLTFV
SEQ ID NO: 65

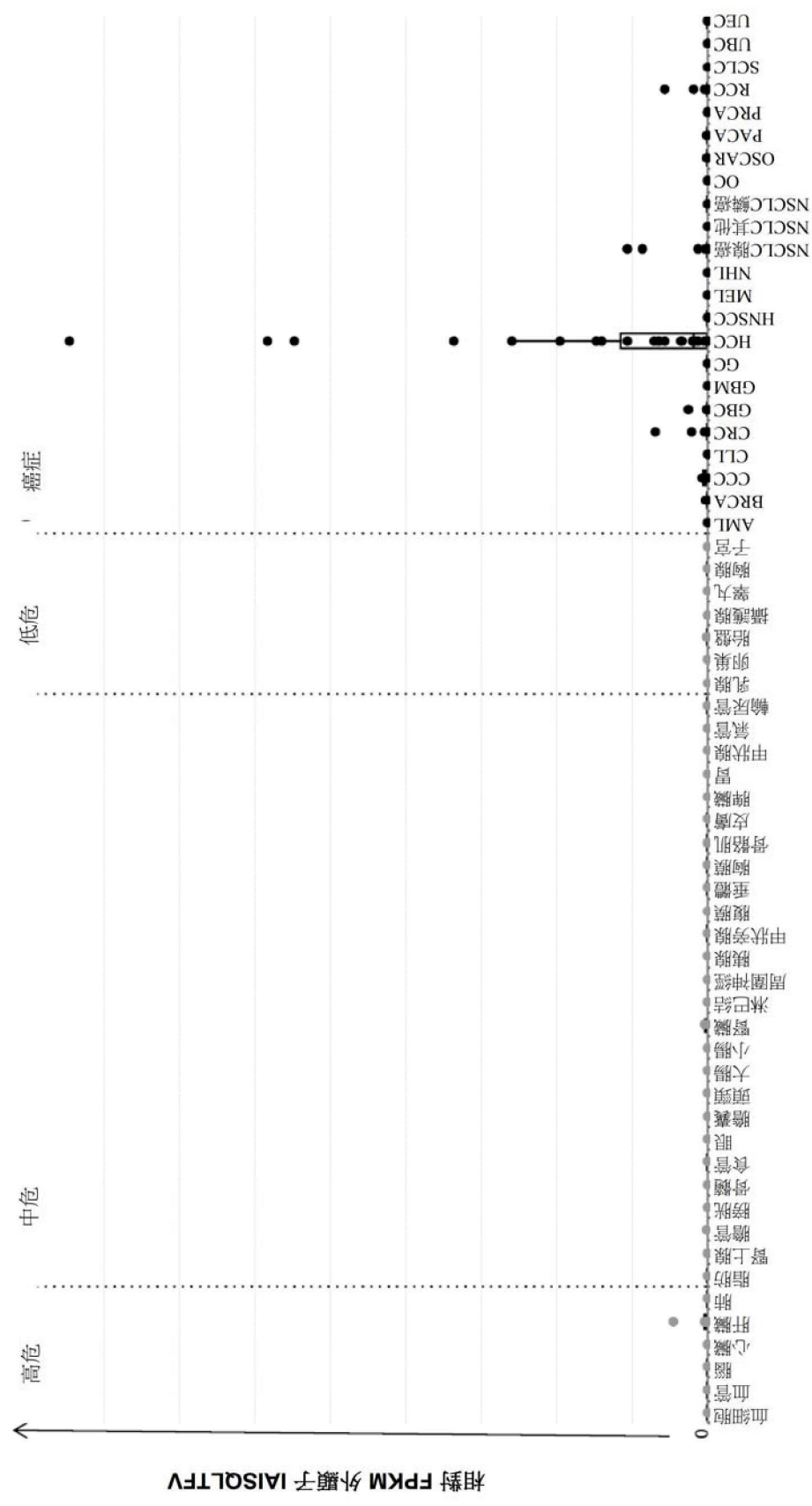


圖 2G

Ensembl ID: ENST00000375105
肽： LLLALRLSL
SEQ ID NO: 64

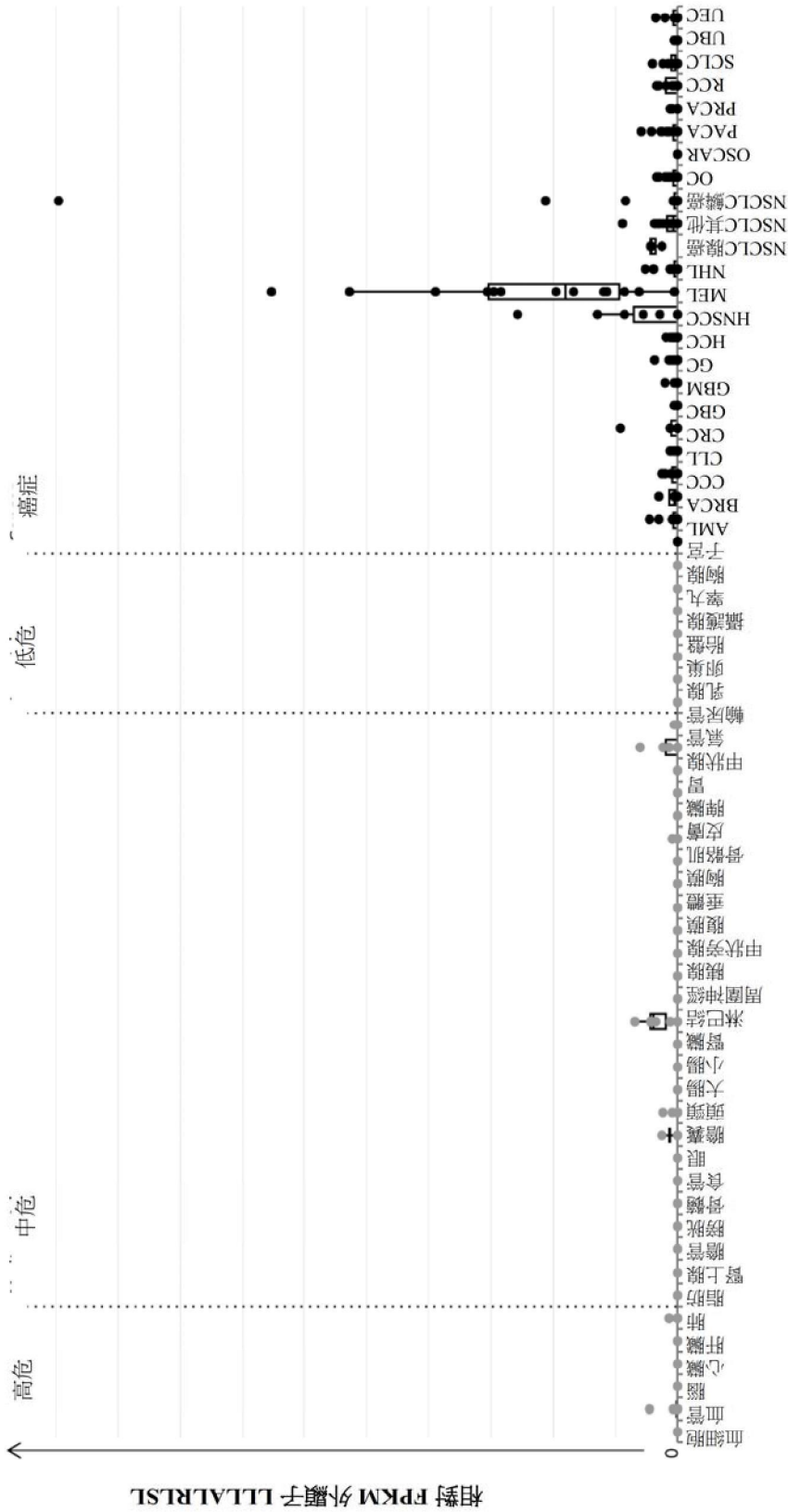


圖 3

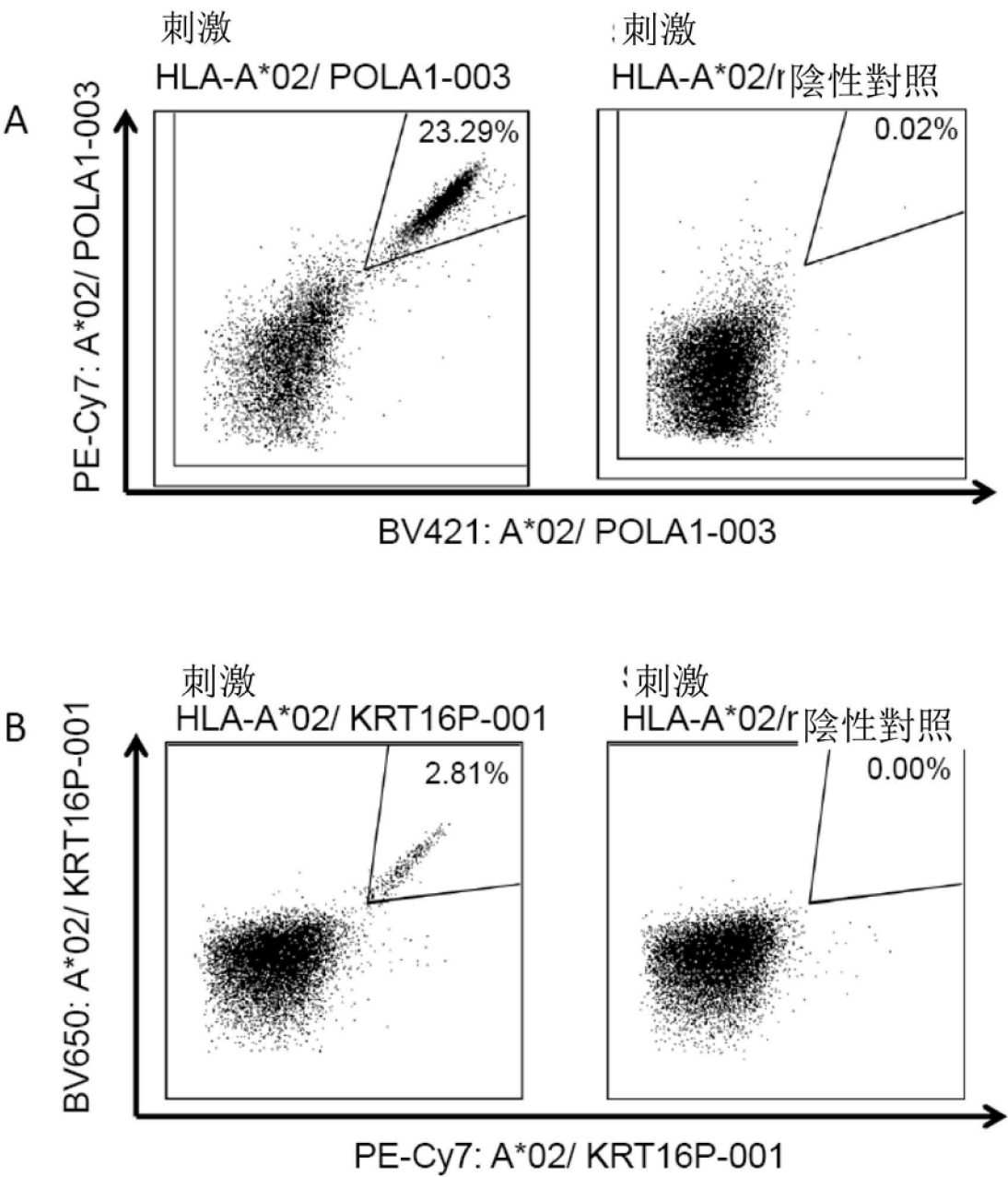


圖 4

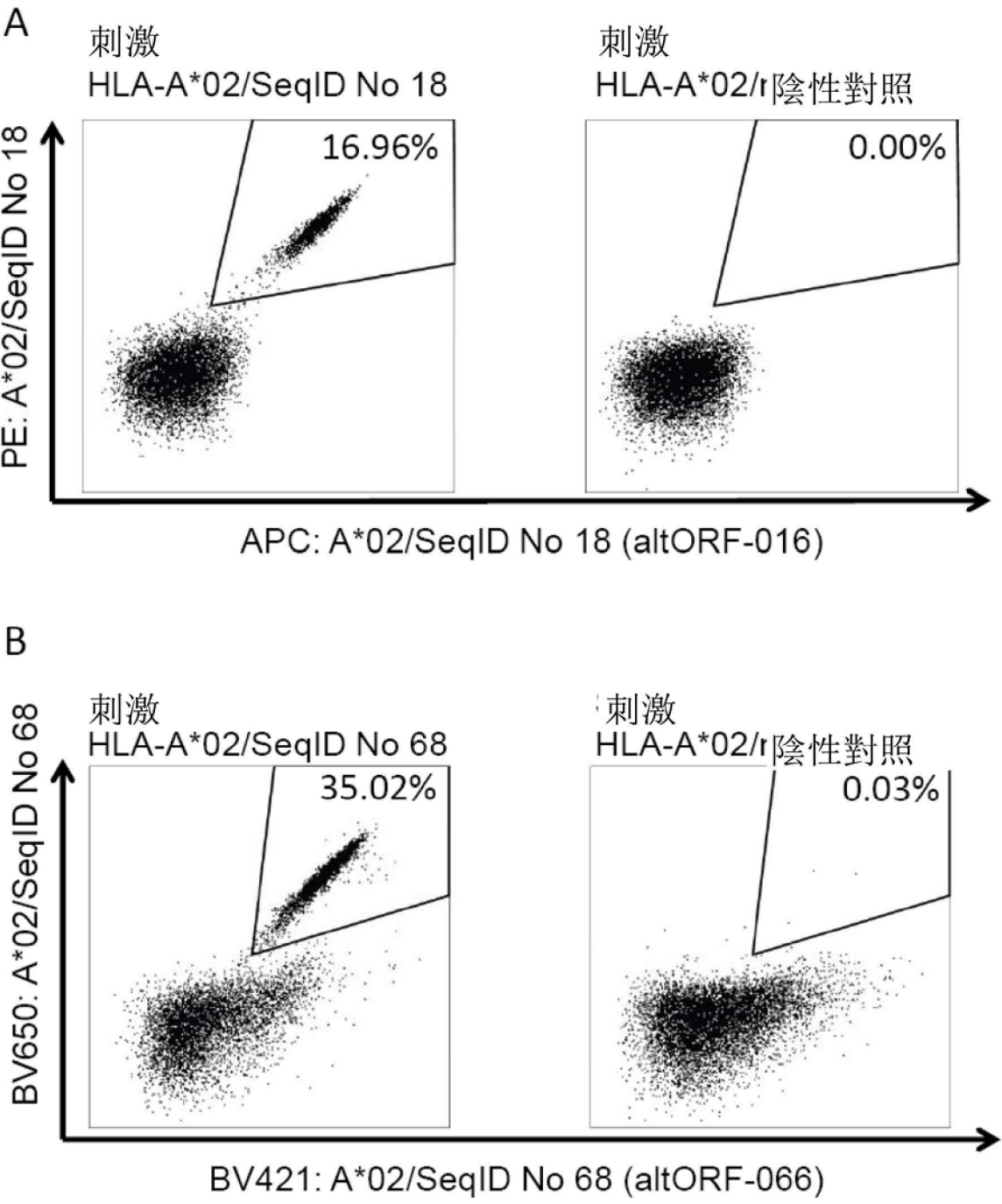


圖 4 (續)

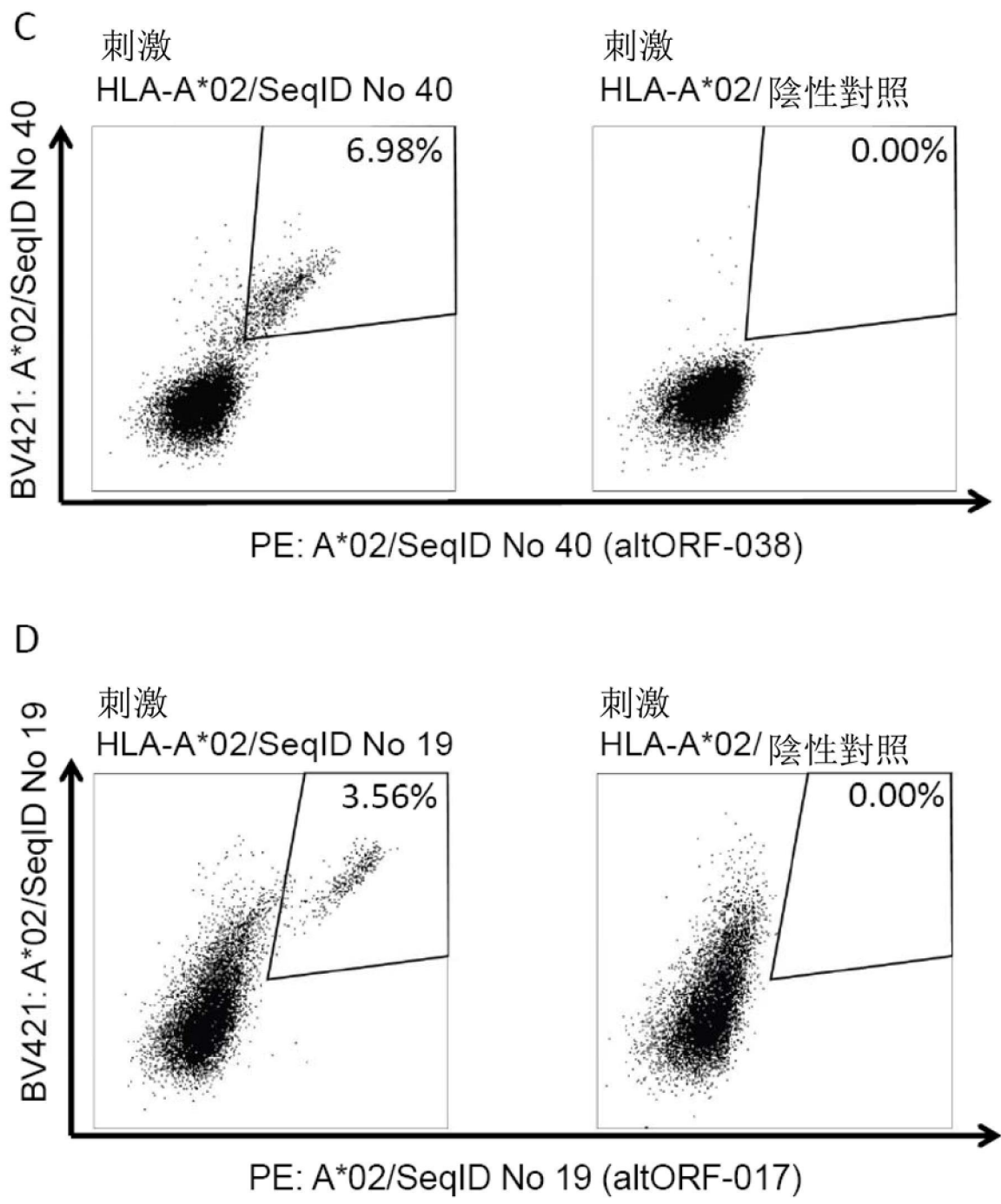


圖 4 (續)

