



(21)申請案號：105140777

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 09 日

(51)Int. Cl. : C07K14/725 (2006.01)

C12N5/0783 (2010.01)

C12Q1/68 (2006.01)

A61K35/17 (2015.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/12/11 美國

62/266,233

2015/12/11 英國

1521894.4

(71)申請人：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：馬爾 安德列 MAHR, ANDREA (DE)；文史恩克 湯尼 WEINSCHENK, TONI
(DE)；宋 寇雷特 SONG, COLETTE (DE)；史古兒 奧利佛 SCHOOR, OLIVER
(DE)；弗里切 金斯 FRITSCH, JENS (DE)；辛格 哈皮特 SINGH, HARPREET
(DE)

(74)代理人：李世章；彭國洋

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：5 共 406 頁

(54)名稱

用於對抗多種癌症的免疫療法的新胜肽及胜肽組合

NOVEL PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES FOR USE IN IMMUNOTHERAPY
AGAINST VARIOUS CANCERS

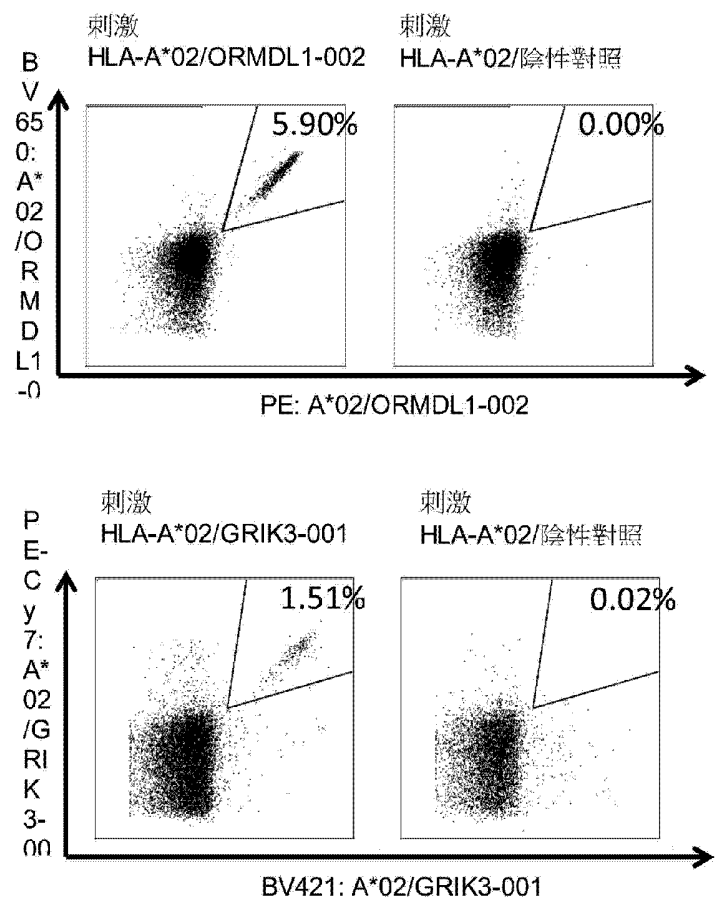
(57)摘要

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.

指定代表圖：

圖 3



【發明說明書】

【中文發明名稱】用於對抗多種癌症的免疫療法的新胜肽及肽胜組合

【英文發明名稱】NOVEL PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES
FOR USE IN IMMUNOTHERAPY AGAINST VARIOUS 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，它們源自人腫瘤細胞的 HLA-I 類分子，可用于引發抗腫瘤免疫反應的疫苗組合物中或作為開發藥物/免疫活性化合物和細胞的目標。

【先前技術】

【0003】 根據世界衛生組織（WHO）的資料，癌症是 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

(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>)。

流行病學

【0004】 2012 年，估計全球有 1,410 萬新增癌症病例，3,260 萬癌症患者（5 年之內確診），820 萬癌症死亡病例（Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013）。表 1 和表 2 分別提供了全世界和選定區域中與本干預相關不同癌症類型的估計發病率、5 年流行率和死亡率的概述。

表 1：2012 年全球不同癌症類型的估計發病率、5 年流行率和死亡率（成年人群，男性和女性）（Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013）。

癌症	發病率	流行率 (5 年)	死亡率
腦、神經系統	256213	342914	189382
乳腺	1671149	6232108	521907
結直腸	1360602	3543582	693933
食管	455784	464063	400169
腎臟	337860	906746	143406
白血病	351965	500934	265471
肝臟	782451	633170	745533
肺	1824701	1893078	1589925
黑色素瘤	232130	869754	55488
卵巢	238719	586624	151917
胰腺	337872	211544	330391
攝護腺	1094916	3857500	307481
胃	951594	1538127	723073
膽囊	178101	205646	142823
膀胱	429793	1319749	165084
子宮體	319605	1216504	76160
非霍奇金淋巴瘤	385741	832843	199670

表 2：2012 年美國、歐盟 28 國、中國和日本不同癌症類型的估計發病率、5 年流行率和死亡率（成年人群，男性和女性）（Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013）。

癌症	發病率	流行率	死亡率
----	-----	-----	-----

		(5年)	
腦、神經系統	135884	172497	100865
乳腺	837245	3358034	197279
結直腸	845797	2334303	396066
食管	294734	323723	255752
腎臟	226733	631350	83741
白血病	178296	309154	129500
肝臟	513172	441007	488485
肺	1274568	1394735	1107546
黑色素瘤	163043	636364	32999
卵巢	108947	270204	65130
胰腺	220842	134864	214886
攝護腺	681069	2586710	136419
胃	615641	1076332	447735
膽囊	106202	118588	81391
膀胱	270335	879140	91553
子宮體	199211	765101	41734
非霍奇金淋巴瘤	205955	515154	90092

【0005】 在腦癌、白血病和肺癌組群內，本發明特別分別著重於膠質母細胞瘤（GB）、慢性淋巴細胞白血病（CLL）、急性髓性白血病（AML）和非小細胞和小細胞肺癌（NSCLC 和 SCLC）。

【0006】 GB 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 3.19 例每 10 萬居民。GB 的預後極差，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 GB 的危險因素（Thakkar et al., 2014）。

【0007】 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，在西班牙裔和美洲原住民中更罕見，在亞洲人中很少發生。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%。

【0008】 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%。

【0009】 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，約占有所有肺癌病例的 85%。NSCLC 的發生與吸煙史密切相關，包括目前和之前的吸煙者，據報告，五年生存率為 15% (World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008)。

【0010】 治療

【0011】 乳腺癌

【0012】 乳腺癌是一種免疫原性腫瘤實體，原發腫瘤中不同類型的浸潤免疫細胞表現出不同的預後和預測意義。在乳腺癌患者中進行過大量的早期免疫試驗。大部分已完成的疫苗接種研究均針對 HER2 和糖類抗原如 MUC-1 的，並顯示了令人失望的結果。對於在乳腺癌患者中使用易普利姆瑪和其他 T 細胞活化抗體進行免疫步驟調製的作用，正在出現臨床資料 (Emens, 2012)。

【0013】 慢性淋巴細胞白血病

【0014】 雖然目前 CLL 不可治癒，很多患者只顯示緩慢的病情進展或症狀惡化。由於患者並沒有從早期治療

中獲益，因此最初方法是「觀望和等待」(Richards et al., 1999)。對於有症狀或疾病進展迅速的患者，有幾種治療方案可供選擇。這些包括化學療法、靶向治療、基於免疫的療法(如單克隆抗體、嵌合抗原受體(CARS)和主動免疫療法)和幹細胞移植。

【0015】 單克隆抗體被廣泛應用於血液惡性疾病。這是由於基於免疫細胞表面分子良好表徵和血液或骨髓腫瘤細胞可取性瞭解了合適的抗原。CLL 治療中所用的常見單克隆抗體靶向作用於 CD20 或 CD52。利妥昔單抗是第一個經 FDA 批准用於治療 NHL 的單克隆抗 CD20 抗體，現已廣泛應用於 CLL 治療。與氟達拉濱/環磷醯胺組合治療相比，利妥昔單抗/氟達拉濱/環磷醯胺組合治療帶來了更高的 CR 率並提高了總生存率(OS)，後者已成為首選治療方案(Hallek et al., 2008)。Ofatumomab 靶向作用於 CD20，用於治療難治性 CLL 患者(Wierda et al., 2011)。Obinutuzumab 是與苯丁酸氮芥組合的一線治療中使用的另一種單克隆抗 CD20 抗體(Goede et al., 2014)。

【0016】 阿侖單抗是一種抗 CD52 抗體，用於治療化療耐藥性疾病患者或存在不良預後因素(如 del 17p 或 p53 突變)的患者(Parikh et al., 2011)。

【0017】 新型單克隆抗體靶向作用於 CD37 (otlertuzumab、BI 836826、IMGN529 和 (177)Lu-tetulumab) 或 CD40 (dacetuzumab 和

lucatumumab)，並在臨床前環境中進行了測試 (Robak and Robak, 2014)。

【0018】 一些已完成和正在進行的試驗是基於具有 CD19 特異性的工程自體嵌合抗原受體 (CAR) 修飾的 T 細胞 (Maus et al., 2014)。到目前為止，只有少數患者顯示出可檢測到或持續性的 CAR。Porter 等人和 Kalos 等人在 CAR T 細胞試驗中檢測到了一例部分反應 (PR) 和 2 例完全反應 (CR) (Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011)。

【0019】 主動免疫治療包括以下策略：基因治療、整體修飾的腫瘤細胞疫苗、基於 DC 的疫苗和腫瘤相關抗原 (TAA) 衍生肽疫苗。

【0020】 基因治療方法利用自體基因修飾腫瘤細胞。這些 B-CLL 細胞用免疫（共同）刺激基因（如 IL-2、IL-12、TNF- α 、GM-CSF、CD80、CD40L、LFA-3 和 ICAM-1）轉染，以提高抗原提呈和 T 細胞活化 (Carballido et al., 2012)。雖然腫瘤細胞中的特異性 T 細胞應答和減少是很容易觀察到，但是免疫應答僅僅是短暫性的。

【0021】 幾項研究已經使用自體 DC 作為抗原提呈細胞來引起抗腫瘤反應。DC 已經在體外載有腫瘤相關肽、全腫瘤細胞裂解物和腫瘤衍生 RNA 或 DNA。另一種策略採用全腫瘤細胞與 DC 融合並產生 DC-B-CLL 細胞雜合物。轉染的 DC 引發 CD4+ 和 CD8+ T 細胞應答

(Muller et al., 2004)。載有腫瘤細胞裂解物或凋亡體的融合雜合體和 DC 增加腫瘤特異性 CD8+ T 細胞應答。顯示出臨床反應的患者 IL-12 血清水準增加，Tregs 數量減少 (Palma et al., 2008)。

【0022】不同的方法使用改變的腫瘤細胞來引發或增加 CLL 特異性免疫應答。此策略的一個實例是產生三瘤細胞：B-CLL 細胞融合至具有抗 APC 特異性的抗 Fc 受體表達雜交瘤細胞。三瘤細胞在體外誘導 CLL 特異性 T 細胞應答 (Kronenberger et al., 2008)。

【0023】另一種策略利用以芽孢桿菌卡介苗作為佐劑的照射自體 CLL 細胞充當一種疫苗。數名患者顯示白細胞水準下降或病情穩定 (Hus et al., 2008)。

【0024】除了分離的 CLL 細胞之外，在製備於血液治療單位後，使用來自 CLL 患者的全血作為疫苗。該疫苗引發 CLL 特異性 T 細胞反應，並在幾名患者中帶來部分臨床反應或穩定病情 (Spaner et al., 2005)。

【0025】幾種 TAA 在 CLL 中呈過度表達並適於接種。這些包括纖維調節素 (Mayr et al., 2005)、RHAMM/CD168 (Giannopoulos et al., 2006)、MDM2 (Mayr et al., 2006)、hTERT (Counter et al., 1995)、癌胚抗原未成熟層黏連蛋白受體蛋白質 (OFAiLRP) (Siegel et al., 2003)、脂肪分化相關蛋白 (Schmidt et al., 2004)、生存素 (Graziero et al., 2001)、KW1 至 KW14 (Krackhardt et al.,

2002) 以及腫瘤衍生的 IgVHCDR3 區域 (Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012)。一項 I 期臨床試驗使用 RHAMM 衍生 R3 肽作為疫苗。6 名患者中有 5 名可檢測到 R3 特異性 CD8 + T 細胞應答 (Giannopoulos et al., 2010)。

【0026】 結直腸癌

【0027】 根據所述結直腸癌 (CRC) 期別，有不同的標準療法可用於結腸癌和直腸癌。標準方法包括外科手術、放射治療、化學治療和靶向治療 CRC (Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b)。

【0028】 腫瘤切除對 CRC 治療至關重要。對於化學治療，使用藥物卡培他濱或 5-氟尿嘧啶 (5-FU)。對於聯合化療，推薦含 5-FU、亞葉酸和奧沙利鉑的雞尾酒療法 (FOLFOX) (Stintzing, 2014; Berman et al., 2015b)。除了化療藥物外，靶向作用於表皮生長因子受體 (EGFR、西妥昔單抗、帕尼單抗) 或血管內皮生長因子-A (VEGF-A、貝伐單抗) 的若干單克隆抗體施用給疾病期別高的患者。對於二線治療和之後的治療，可使用 VEGF 抑制劑阿柏西普、酪氨酸激酶抑制劑瑞戈非尼、胸苷酸合成酶抑制劑 TAS-102 和磷酸酶抑制劑 TAS-114 (Stintzing, 2014; Wilson et al., 2014)。

【0029】 最近的臨床試驗分析了主動免疫療法作為 CRC 的一種治療選擇。這些治療策略包括用腫瘤相關抗

原 (TAA) 的肽、全腫瘤細胞、樹突狀細胞 (DC) 疫苗和病毒載體進行疫苗接種 (Koido et al., 2013)。

【0030】 迄今為止的肽疫苗針對癌胚抗原 (CEA)、黏蛋白 1、EGFR、T 細胞識別的鱗狀細胞癌抗原 3 (SART3)、 β -人絨毛膜促性腺激素 (β -hCG)、腎母細胞瘤抗原 1 (WT1)、生存素-2B、MAGE3、p53、環指蛋白 43 和線粒體外膜移位酶 34 (TOMM34) 或突變 KRAS。在幾項一期和二期臨床試驗中，患者表現為抗原特異性 CTL 反應或產生抗體。與免疫反應相反，許多患者沒有從肽疫苗中獲得臨床水準上的利益 (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011)。

【0031】 樹突細胞疫苗包括用 TAA 衍生肽、腫瘤細胞裂解物、凋亡腫瘤細胞脈衝處理的 DC 或腫瘤 RNA 或 DC 腫瘤細胞融合產物。雖然 I/II 期試驗的許多患者表現出特異性免疫反應，但只有少數人獲得臨床益處 (Koido et al., 2013)。

【0032】 全腫瘤細胞疫苗由自體腫瘤細胞組成，被修飾以分泌 GM-CSF，透過輻射或病毒感染、照射細胞被修飾。多數患者在幾項 II/III 期臨床試驗中沒有表現獲得臨床利益 (Koido et al., 2013)。

【0033】 編碼 CEA 以及 B7.1、ICAM-1 和 LFA-3 的牛痘病毒或複製缺陷型禽流痘病毒已經在 I 期臨床試驗的病毒載體疫苗中被用作賦形劑。不同的研究使用了編

碼 CEA 和 B7.1 的非複製型金絲雀痘病毒。除了誘導 CEA 特異性 T 細胞應答外，40% 的患者表現出客觀臨床反應 (Horig et al., 2000; Kaufman et al., 2008)。

【0034】 食管癌

【0035】 免疫療法可能是治療晚期食管癌有前途的一種新方法。幾個癌症相關基因和癌症-睪丸抗原被證明在食管癌中過度表達，包括不同的 MAGE 基因、NY-ESO-1 和 EpCAM (Kimura et al., 2007; Liang et al., 2005; Inoue et al., 1995; Bujas et al., 2011; Tanaka et al., 1997; Quillien et al., 1997)。這些基因代表著免疫治療非常有興趣的靶標，其中大部分正在接受研究用於治療其他惡性腫瘤 (ClinicalTrials.gov, 2015)。此外，PD-L1 和 PD-L2 被描述在食管癌中上調，這與較差預後相關。因此，腫瘤呈 PD-L1 陽性的食管癌患者可能會從抗 PD-L1 免疫治療中獲益 (Ohigashi et al., 2005)。

【0036】 食管癌免疫治療方法的臨床資料目前仍然較少，這是因為只進行了數量很有限的早期階段臨床試驗。在一項 I 期試驗中，晚期食管癌患者被給予一種疫苗，其包含來自三個不同癌症-睪丸抗原 (TTK 蛋白激酶、淋巴細胞抗原 6 複合體基因座 K 和胰島素樣生長因子 (IGF)-II mRNA 結合蛋白 3)，結果一般。在一項 I/II 期研究中，11 名患者中有 4 名患者自體腫瘤細胞在體

外刺激後腫瘤內注入啟動的 T 細胞引起完全或部分腫瘤反應 (Toomey et al., 2013)。在一項 I 期試驗中，晚期食管癌患者被給予一種疫苗，其包含來自三個不同癌症-睪丸抗原 (TTK 蛋白激酶、淋巴細胞抗原 6 複合體基因座 K 和胰島素樣生長因數 (IGF)-II mRNA 結合蛋白 3)，結果一般 (Kono et al., 2009)。在一項 I/II 期研究中，11 名患者中有 4 名患者自體腫瘤細胞和白細胞介素 2 在體外刺激後腫瘤內注入啟動的 T 細胞引起完全或部分腫瘤反應 (Toh et al., 2000; Toh et al., 2002)。目前正在進行進一步的臨床試驗，以評估不同免疫療法對食管癌的影響，包括繼細胞治療 (NCT01691625、NCT01691664、NCT01795976、NCT02096614、NCT02457650) 疫苗接種策略 (NCT01143545、NCT01522820) 和抗 PD-L1 療法 (NCT02340975) (ClinicalTrials.gov, 2015)。

【0037】 胃癌

【0038】 對於晚期胃癌，當前治療方案的療效都較差，導致 5 年生存率低。免疫療法可能是改善胃癌患者生存期的另一種方法。在胃癌臨床試驗中，腫瘤相關淋巴細胞和細胞因子誘導的殺傷細胞、基於肽的 HER2/neu 靶向疫苗、MAGE-3 或血管內皮生長因子受體 1 和 2 以及基於樹突狀細胞的 HER2/neu 靶向疫苗的過繼轉移顯示出有希望的結果。免疫步驟抑制和工程 T 細胞可能代

表了更多的治療選擇，目前正在臨床前研究和臨床研究中進行評估（Matsueda and Graham, 2014）。

【0039】 膠質母細胞瘤

【0040】 膠質母細胞瘤（WHO IV 級）的治療選擇非常有限。不同免疫治療方法針對膠質母細胞瘤（GB）進行了研究，包括免疫檢查點抑制、疫苗接種和工程化 T 細胞過繼轉移。

【0041】 針對抑制 T 細胞受體或其配體的抗體被證明可有效地提高在不同癌症類型（包括黑素瘤和膀胱癌）中的 T 細胞介導抗腫瘤免疫應答。因此，易普利姆瑪和 nivolumab 等 T 細胞活化抗體的效果在臨床 GB 試驗中進行了評估，但初步資料顯示了自身免疫相關不良事件。

【0042】 GB 患者的不同疫苗接種策略目前正在研究，包括基於肽的疫苗、熱休克蛋白疫苗、自體腫瘤細胞疫苗、基於樹突狀細胞的疫苗以及基於病毒蛋白的疫苗。在這些方法中，來自 GB 相關蛋白衍生的肽，如表皮生長因子受體變體 III（EGFRvIII）或熱休克蛋白或用自體腫瘤細胞裂解物或巨細胞病毒組分刺激的樹突細胞用於誘導 GB 患者的抗腫瘤免疫應答。其中一些研究顯示出良好的安全性和耐受性以及有前景的療效資料。

【0043】 轉基因 T 細胞的過繼轉移是 GB 治療的另一個免疫治療方法。不同的臨床試驗目前評估嵌合抗原受體

的安全性和有效性，其載有針對 HER2、IL-13 受體 α 2 和 EGFRvIII 的 T 細胞 (Ampie et al., 2015)。

【0044】 肝癌

【0045】 晚期不可切除 HCC 的治療選項僅限於索拉非尼(一種多酪氨酸激酶抑制劑)(Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004)。索拉非尼是被證實可延長生存期大約 3 個月的唯一的全身藥物，目前是此類患者的唯一實驗性治療方案 (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008)。最近，對於 HCC 進行了少量的免疫療法試驗。細胞因子已被用於啟動免疫細胞的亞群和/或增加腫瘤免疫原性 (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004)。其他的試驗主要關注腫瘤浸潤性淋巴細胞或活化外周血淋巴細胞的輸注 (Shi et al., 2004; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000)。

【0046】 到目前為止，已經進行了少量的治療性疫苗接種試驗。Butterfield等人使用源自甲胎蛋白 (AFP) 的肽或載有 AFP 肽的 DC 進行了兩項體外試驗 (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006)。在兩項不同的研究中，自體樹突細胞 (DC) 用自體腫瘤裂解物 (Lee et al., 2005) 或肝母細胞瘤細胞系 HepG2 的裂解物 (Palmer et al., 2009) 進行體外衝擊。到目前為止，疫苗接種試驗僅顯示臨床結果的有限改善。

【0047】 黑色素瘤

【0048】 增強抗腫瘤免疫反應似乎是晚期黑色素瘤治療的一種有前景的策略。在美國，免疫檢查點抑制劑易普利姆瑪以及 BRAF 激酶抑制劑 vemurafenib 和 dabrafenib 和 MEK 抑制劑 trametinib 已經被批准用於治療晚期黑色素瘤。這兩種方法均可增加患者的抗腫瘤免疫性——易普利姆瑪直接透過減少 T 細胞抑制起作用，激酶抑制劑間接透過增強黑色素細胞分化抗原的表達起作用。目前正在臨床研究中測試其他檢查點抑制劑（nivolumab 和 pembrolizumab），取得了初步令人鼓舞的結果。此外，針對抗腫瘤免疫應答的不同聯合療法正在臨床試驗中測試，包括易普利姆瑪 + nivolumab，易普利姆瑪 + gp100 衍生肽疫苗，易普利姆瑪 + 達卡巴嗪，易普利姆瑪 + IL-2 和易普利姆瑪 + GM-CSF（Srivastava and McDermott, 2014）。

【0049】 幾種不同的疫苗接種方法已經在晚期黑色素瘤中進行了評估。到目前為止，III 期臨床試驗顯示相當令人失望的結果，疫苗接種策略顯然需要加以改進。因此，新的臨床試驗，如 OncoVEX GM-CSF 試驗或 DERMA 試驗均針對提高臨床療效而不降低耐受性（<http://www.cancerresearchuk.org>）。

【0050】 T 細胞過繼轉移顯示了晚期黑色素瘤治療的巨大潛力。浸潤淋巴細胞的體外增大自體腫瘤以及含有對癌症-睪丸抗原 NY-ESO-1 具有高親和力的 T 細胞受

體的 T 細胞在轉移到黑素瘤患者時具有顯著有益的和較低的毒性作用。不幸的是，含有對黑素細胞特異性抗原 MART1 和 gp100 以及癌症-睪丸抗原 MAGEA3 具有高親和力 T 細胞受體的 T 細胞在臨床試驗中誘導相當的毒性作用。因此，T 細胞過繼轉移具有較高的治療潛力，但這些治療的安全性和耐受性需要進一步提高 (Phan and Rosenberg, 2013; Hinrichs and Restifo, 2013)。

【0051】 非小細胞肺癌

【0052】 由於該疾病在發現時通常已經擴散，因此，常常使用放射和化療，有時與手術聯合使用 (S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011)。為了擴大 NSCLC 的治療方案，已經研究了或正在研究不同的免疫治療方法。雖然用 L-BLP25 或 MAGEA3 進行疫苗接種未能證明在 NSCLC 患者中疫苗介導的生存優勢，但是同種異體細胞源性疫苗在臨床研究中表現出有希望的結果。此外，針對神經節苷脂、表皮生長因子受體和其他幾個抗原的進一步接種試驗目前正在進行中。增強患者抗腫瘤 T 細胞反應的另一策略包括使用特異性抗體阻斷抑制性 T 細胞受體或其配體。目前，正在臨床試驗中評估上述幾種抗體（包括 ipilimumab、nivolumab、pembrolizumab、MPDL3280A 和 MEDI-4736）在 NSCLC 中的治療潛力 (Reinmuth et al., 2015)。

【0053】 卵巢癌

【0054】 免疫療法似乎是改善卵巢癌患者治療的一種有前景的策略，因為存在促炎性腫瘤浸潤淋巴細胞，尤其是 CD8 陽性 T 細胞與良好的預後相關，腫瘤相關肽特異性 T 細胞可從癌組織中分離。

【0055】 因此，大量的科學工作均投入到卵巢癌不同免疫療法的研究中。已經進行了相當多的臨床前研究和臨床研究，進一步的研究目前正在進行中。對於細胞因子療法、接種疫苗、單克隆抗體治療、細胞過繼轉移和免疫調節，目前有臨床資料。

【0056】 使用白介素-2、干擾素- α 、干擾素- γ 或粒細胞-巨噬細胞集落刺激因子的細胞因子治療目的在於增強患者自身的抗腫瘤免疫反應，這些治療已經在小型研究組中顯示出有前景的結果。

【0057】 使用來自幾種腫瘤相關蛋白（HER2/neu、NY-ESO-1、p53、Wilms 腫瘤-1）的單個或多個肽或來自自體腫瘤細胞的全腫瘤抗原的 I 期和 II 期疫苗接種研究顯示了良好的安全性和耐受性特性，但臨床效果僅為低至中等。

【0058】 特異性識別腫瘤相關蛋白的單克隆抗體被視為可增強對腫瘤細胞的免疫細胞介導的殺傷力。抗 CA-125 抗體 oregovomab 和 abagovomab 以及抗 EpCAM 抗體 catumaxomab 在 II 期和 III 期研究中取得了有前景的結果。與此相反，抗 MUC1 抗體 HMFG1 在 III 期研究中未能明確地提高生存期。

【0059】 另一種方法使用單克隆抗體來靶向作用於並阻止腫瘤細胞上的生長因子和存活受體。雖然施用曲妥單抗（抗HER2/neu抗體）和MOv18與MORAb-003（抗葉酸受體 α 抗體）僅對卵巢癌具有有限的臨床益處，但是在標準化療中加入貝伐單抗（抗VEGF抗體）對晚期卵巢癌似乎是有利的。

【0060】 免疫細胞的過繼轉移實現了臨床試驗中的異質結果。自體、體外增大的腫瘤浸潤性T細胞的過繼轉移在中試試驗中被證明是一種有希望的方法。相反，轉移含有葉酸受體 α 特異性嵌合抗原受體的T細胞在I期試驗中不會誘導顯著臨床反應。用腫瘤細胞裂解物或腫瘤相關蛋白體外刺激的樹突細胞顯示可在轉移後增強抗腫瘤T細胞反應，但T細胞活化的程度與臨床效果無關。在II期研究中，自然殺傷細胞的轉移造成明顯的毒性。

【0061】 內在抗腫瘤免疫性以及免疫治療受免疫抑制腫瘤微環境影響。為了克服這個障礙，免疫調節藥物（如環磷醯胺、抗CD25抗體和聚乙二醇化脂質體多柔比星）與免疫療法組合進行了測試。

【0062】 增強T細胞活性的易普利姆瑪、抗CTLA4抗體目前有最可靠的資料。易普利姆瑪被證明可在卵巢癌患者中產生顯著的抗腫瘤效果（Mantia-Smaldone et al., 2012）。

【0063】 胰腺癌

【0064】 胰腺癌患者的治療選擇非常有限。有效治療的一個主要問題是在確診時通常處於腫瘤晚期。疫苗接種策略作為胰腺癌治療的進一步創新和有前途的替代方法進行了研究。靶向作用於 K R A S 突變、活性端粒酶、胃泌素、存活蛋白、C E A 和 M U C 1 已經在臨床試驗中進行評估，部分顯示有希望的結果。此外，針對胰腺癌患者的樹突狀細胞疫苗、異基因 G M - C S F 分泌疫苗和 a l g e n p a n t u c e l - L 臨床試驗還顯示了免疫療法的有益效果。進一步研究不同疫苗接種方案效率的臨床試驗目前正在進行中 (S a l m a n e t a l . , 2 0 1 3) 。

【0065】 攝護腺癌

【0066】 基於樹突狀細胞的疫苗 s i p u l e u c e l - T 是 F D A 批准的第一個抗癌疫苗。由於其對 C R P C 患者的生存有積極效果，許多努力被投入到進一步免疫療法的開發上。關於疫苗接種策略，肽疫苗攝護腺特異性抗原 (P S A) - T R I C O M 、 個性化肽疫苗 P P V 、 D N A 疫苗 p T V G - H P 以及表達 G M - C S F G V A X 的全細胞疫苗在不同的臨床試驗中均表現出有希望的結果。此外，除了 s i p u l e u c e l - T 外，基於樹突狀細胞的疫苗，即 B P X - 1 0 1 和 D C V A C / P a 被證明可引起攝護腺癌患者的臨床反應。免疫步驟抑制劑，如易普利姆瑪 (i p i l i m u m a b) 和 n i v o l u m a b 目前正在臨床研究中作為單一療法以及與其他治療（包括雄激素剝奪療法、局部放射治療、P S A - T R I C O M 和 G V A X ）聯合進行評

估。在 II 期臨床試驗中顯著減緩進展和增加無進展生存期的免疫調節物質 tasquinimod 目前正在 III 期臨床試驗中進行進一步的研究。另一種免疫調節劑來那度胺在早期臨床研究中誘導出有前途的作用，但在 III 期臨床試驗中未能改善生存。儘管有這些令人失望的結果，但是來那度胺的進一步試驗正在進行中 (Quinn et al., 2015)。

【0067】 腎細胞癌

【0068】 RCC 的已知免疫原性代表了支持在晚期 RCC 中使用免疫治療和癌症疫苗的基礎。淋巴細胞 PD-1 表達和 RCC 晚期分期、分級和預後以及 RCC 腫瘤細胞選擇性 PD-L1 表達之間的有趣相關性以及其與較差臨床結果的潛在關聯性導致新的抗 PD-1/PD-L1 製劑的開發，單獨使用或與抗血管生成藥物或其他免疫治療方法聯合使用治療 RCC (Massari et al., 2015)。在晚期 RCC 中，一項名為 TRIST 研究的 III 期癌症疫苗試驗評估了 TroVax (使用腫瘤相關抗原 5T4 的疫苗，含痘病毒載體) 加入到一線標準治療後是否延長局部晚期或 mRCC 患者的生存期。兩組均未達到平均生存期，399 名患者 (54%) 繼續參加研究，但是資料分析證實了之前的臨床效果，這表明 TroVax 具有免疫活性，5T4-特異性抗體反應強度與生存期改善存在相關性。另外，有幾項研究尋找在 RCC 中過度表達的使用表位的肽疫苗。

【0069】 腫瘤疫苗的各種方法已在研究中。採用全腫瘤方法（包括腫瘤細胞裂解物，與腫瘤細胞的樹突狀細胞融合體或整個腫瘤 RNA）的研究在 RCC 患者中完成，在一些試驗中報告了腫瘤病灶的緩解（Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001）。

【0070】 小細胞肺癌

【0071】 關於 SCLC 的檢測、診斷和治療已經有了創新。結果顯示，使用 CT 掃描代替 x 射線進行早期癌症檢測降低了肺癌死亡的風險。如今，SCLC 的診斷可採用螢光或虛擬支氣管鏡檢查；即時腫瘤影像學可通過放射治療來實現。新型抗血管生成藥物，如貝伐單抗（Avastin）、舒尼替尼（Sutent）和 nintedanib（BIBF 1120）顯示在 SCLC 治療中具有治療作用（American Cancer Society, 2015）。免疫療法是癌症治療的過度研究領域。對於 SCLC 的治療研究了各種方法。其中一種方法靶向阻斷 CTLA-4，這是一種天然的人免疫抑制物。CTLA-4 的抑制旨在增強對抗癌症的免疫系統。最近，開始研發用於治療 SCLC 的有前景的免疫步驟抑制劑。另一種方法基於防癌疫苗，這是目前可用於臨床研究的 SCLC 治療方法（American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute (NCI), 2011）。

【0072】 急性髓性白血病

【0073】 一種治療選擇是用抗體-藥物偶聯物（抗 CD33 + calechiamicin、SGN-CD33a、抗 CD33 + 鋼-225）、雙特異性抗體（識別 CD33 + CD3（AMG 330）或 CD33 + CD16）和嵌合抗原受體（CAR）靶向作用 CD33（Estey, 2014）。

【0074】 非霍奇金淋巴瘤

【0075】 非霍奇金淋巴瘤（NHL）的治療取決於組織類型和分期（National Cancer Institute, 2015）。在淋巴瘤患者中可觀察到腫瘤自發消退。因此，主動免疫療法是一種治療選擇（Palomba, 2012）。

【0076】 一種重要的疫苗接種方案包括 Id 疫苗。B 淋巴細胞表達在其重鏈和輕鏈可變區以特定的氨基酸序列表達表面免疫球蛋白，每個細胞克隆都是獨特的（=個體基因型，Id）。個體基因型作為腫瘤相關抗原。

【0077】 被動免疫包括單獨注射重組鼠抗-Id 單克隆抗體或與干擾素 α 、IL2 或苯丁酸氮芥聯合使用。

【0078】 主動免疫包括注射偶聯至佐劑（KLH）的重組蛋白（Id），其與 GM-CSF 一起作為免疫佐劑給予。腫瘤特異性 Id 透過雜交瘤培養物或使用重組 DNA 技術（質粒）透過細菌、昆蟲或哺乳動物細胞培養物產生。

【0079】 已經進行了三項 III 期臨床試驗（Biovest、Genitope、Favrille）。在兩項試驗中，患者接受了利妥昔單抗。所有三項試驗均給予 GM-CSF。Biovest 使用了雜交瘤產生的蛋白質，Genitope 和 Favrille 使

用了重組蛋白。在所有三項試驗中，Id 均偶聯至 KLH。只有 Biovest 獲得有意義的結果。

【0080】除了 Id 之外的疫苗包括癌睪丸抗原 MAGE、NY-ESO1 和 PASD-1、B 細胞抗原 CD20 或細胞疫苗。最新提及的包括凋亡腫瘤細胞脈衝處理的 DC、腫瘤細胞裂解物、DC-腫瘤細胞融合物或腫瘤衍生 RNA 脈衝處理的 DC。

【0081】原位接種涉及使用腫瘤內 CpG 與化療或在出現 GM-CSF 和收集/擴展/再灌注 T 細胞情況下生長的照射腫瘤細胞聯合進行免疫接種。

【0082】採用可改變免疫檢查點的抗體進行接種包括抗 CD40、抗 OX40、抗 41BB、抗 CD27、抗 GITR（直接增強抗腫瘤反應的激動劑抗體）或抗 PD1、抗 CTLA-4（阻斷會妨礙免疫應答的檢查點的阻滯抗體）。實例為易普利姆瑪（抗 CTLA-4）和 CT-011（抗 PD1）（Palomba, 2012）。

【0083】子宮癌

【0084】目前也正在測試一些免疫治療方法。在一項 I/II 期臨床試驗中，子宮癌患者採用 Wilms 腫瘤基因 1（WT1）mRNA 電穿孔的自體樹突狀細胞（DC）接種。除了一例對佐劑局部過敏反應的病例，沒有觀察到不良反應，6 名患者中有 3 名表現出免疫應答（Coosemans et al., 2013）。

【0085】 如上所述，HPV 感染引發的病變可能最終導致宮頸癌。因此，在高度病變和癌症中組成性表達且是惡性表型發生和維持所需的 HPV 病毒癌蛋白 E6 和 E7 被視為免疫治療方法的有前景的靶標 (Hung et al., 2008; Vici et al., 2014)。一項研究在轉移性宮頸癌患者中進行了過繼 T 細胞療法 (ACT)。患者接受 E6 和 E7 反應性腫瘤浸潤性 T 細胞 (TIL) 輸注，9 名患者中，2 名完全消退，1 名有部分反應 (Stevanovic et al., 2015)。此外，根據報告，靶向作用於 E7 的細胞內抗體可阻止小鼠腫瘤生長 (Accardi et al., 2014)。此外，靶向作用於 HPV E6 和 E7 的肽、DNA 和基於 DC 的疫苗也在臨床試驗中進行研究 (Vici et al., 2014)。

【0086】 膽囊腺癌及膽管癌

【0087】 由於診斷困難，膽管癌 (CCC) 發現時大多數是晚期。膽管癌難以治療，通常是致命的。膽囊癌 (GBC) 是世界範圍內最常見和侵襲性最強的膽道惡性腫瘤。對於 GBC，只有 10% 的腫瘤是可切除的，甚至手術後大多數進展為轉移性疾病，預後甚至比 CCC 更差，5 年生存率小於 5%。雖然大多數腫瘤是不可切除的，但仍然無有效的輔助療法 (Rakic et al., 2014)。一些研究表明，化療藥物聯合或靶向療法 (抗 VEGFR/EGFR) 與化療聯合能夠提高總生存期，並且可能是未來有前景的治療選項 (Kanthan et al.,

2015)。由於膽道癌較罕見，總體上只有少數 GBC 或 CCC 特定的研究，而其中大多數包括所有膽道癌。這就是為什麼過去幾十年中治療沒有改善的原因，R0 切除仍是唯一的有效治療選擇。

【0088】 膀胱癌

【0089】 膀胱癌的標準治療包括手術、放射療法、化學療法和免疫療法。

【0090】 一種有效的免疫治療方法在治療侵襲性非肌層浸潤性膀胱癌 (NMIBC) 中得到確定。由此，一種弱化形式的細菌牛型分枝桿菌 (卡介苗 = BCG) 作為一種膀胱內解決方案。BCG 治療的主要作用很長期 (長達10年) 阻止癌症復發並降低進展率。原則上，用 BCG 治療可誘導局部炎症反應，其刺激細胞免疫應答。BCG 免疫應答基於以下關鍵步驟：透過 BCG 感染尿路上皮和膀胱癌細胞，之後增加抗原呈遞分子的表達，透過細胞因子釋放介導而誘導免疫應答，透過各種免疫細胞 (細胞毒性 T 淋巴細胞、中性粒細胞、自然殺傷細胞和巨噬細胞) 的參與誘導抗腫瘤活性 (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013)。

【0091】 BCG 治療一般患者耐受性良好，但是特別對於免疫缺陷患者可能是致命的。約 30-40% 的患者中觀察到了 BCG 的難治性 (Fuge et al., 2015; Steinberg et al., 2016a) 對於 BCG 療法失敗的患者，治療具有挑戰性。BCG 治療失敗的患者存在發生肌

層浸潤性疾病的高風險。根治性膀胱切除是無應答者優選的治療選擇 (Steinberg et al., 2016b; von Rundstedt and Lerner, 2015)。對於希望保留膀胱的患者，FDA 批准的 BCG 失敗 NMIBC 二線治療為戊柔比星化學治療。其他一些二線療法目前可獲得或正在研究中，包括免疫治療方法，如 BCG-干擾素聯合或 BCG-檢查點抑制劑治療，前 BCG 透皮疫苗接種，草分枝桿菌細胞壁核酸 (MCNA) 複合物，單獨化療或配合各種藥物如像絲裂黴素 C、吉西他濱、多西他賽、白蛋白結合型紫杉醇、表柔比星聯合化療，絲裂黴素/吉西他濱，吉西他濱/多西他賽，以及裝置輔助化療如熱化療、放化療、電療或光動力療法 (Fuge et al., 2015; Steinberg et al., 2016b; von Rundstedt and Lerner, 2015)。仍然需要在臨床試驗中進一步評估現有的治療。

【0092】對於晚期膀胱癌的替代治療方案在正在進行的臨床試驗中進行研究。目前的臨床試驗集中于分子靶向療法和免疫療法的開發。靶向療法研究致癌相關途徑抑制劑（即 mTOR、血管內皮、成纖維細胞或表皮生長因子受體、抗血管生成或細胞週期抑制劑）在治療膀胱癌中的效果。由於膀胱癌的高度因子多樣性，因此，分子靶向治療的開發仍具有挑戰性。當前免疫治療的主要焦點是開發檢查點阻斷劑，如抗 PD1 單克隆抗體和過繼 T 細胞轉

移 (Knollman et al., 2015b; Grivas et al., 2015; Jones et al., 2016; Rouanne et al., 2016)。

【0093】 頭頸部鱗狀細胞癌

【0094】 頭頸部鱗狀細胞癌 (HNSCC) 是異構腫瘤，其流行病學、病因和治療均具有差異 (Economopoulou et al., 2016)。早期 HNSCC 的治療包括手術或放射的單一模式治療 (World Health Organization, 2014)。晚期癌症通過化療聯合手術和 / 或放療進行治療。

【0095】 HNSCC 被視為是一種免疫抑制疾病，其特徵在於免疫活性細胞和受損細胞因子分泌的失調 (Economopoulou et al., 2016)。HPV 陰性和 HPV 陽性腫瘤的免疫治療策略不同。

【0096】 對於 HPV 陽性腫瘤，病毒癌蛋白 E6 和 E7 代表著良好的靶標，這是因為他們連續地透過腫瘤細胞中表達，對於保持 HPV 陽性癌細胞的轉化狀態必不可少。幾種疫苗療法目前正在 HPV 陽性 HNSCC 中進行研究，包括 DNA 疫苗、肽疫苗和涉及樹突狀細胞 (DC) 的疫苗。此外，正在進行的 II 期臨床試驗在 HPV 陽性腫瘤患者中研究了淋巴細胞耗竭繼而自體輸注 TIL 的療效 (Economopoulou et al., 2016)。

【0097】 在 HPV 陰性腫瘤中，目前正在使用和研究幾種免疫治療策略。嵌合 IgG1 抗 EGFR 單克隆抗體西妥昔單抗已被 FDA 批准用於組合化療，作為復發 / 轉

移性 HNSCC 的標準一線治療。其他的抗 EGFR 單克隆抗體（包括帕尼單抗、尼妥珠單抗和紮妥木單抗）在 HNSCC 中進行了評估。一些免疫檢查點抑制劑在 HNSCC 的用途在臨床試驗中進行了研究。他們包括以下抗體：易普利姆瑪（抗 CTLA-4）、tremelimumab（抗 CTLA-4）、pembrolizumab（抗 PD-1）、nivolumab（抗 PD-1）、durvalumab（抗 PD-1）、抗 KIR、urelumab（抗 CD137）和抗 LAG-3。

【0098】 HNSCC 患者的兩項臨床研究評估了載有 p53 肽或凋亡腫瘤細胞的 DC 的用途。免疫應答令人滿意的，副作用可以接受。

【0099】 數項研究使用了過繼性 T 細胞療法（ACT）進行。T 細胞被誘導對抗任何輻照的自體腫瘤細胞或 EB 病毒。疾病控制和總生存率結果是看好的（Economopoulou et al., 2016）。

【0100】 考慮到嚴重的副作用及與治療癌症相關的費用，有必要確定可用於總體上治療癌症，尤其是腦膠質細胞瘤（GB）、乳腺癌（BRCA）、結直腸癌（CRC）、腎細胞癌（RCC）、慢性淋巴細胞白血病（CLL）、肝細胞癌（HCC）、非小細胞和小細胞肺癌（NSCLC、SCLC）、非霍奇金淋巴瘤（NHL）、急性骨髓性白血病（AML）、卵巢癌（OC）、胰腺癌（PC）、攝護腺癌（PCA）、包括胃食管交界癌（OSCAR）的食管癌、膽囊癌和膽管癌（GBC、CCC）、黑色素瘤（MEL）、胃癌（GC）、膀

膀胱癌 (UBC)、頭頸部鱗狀細胞癌 (HNSCC)、子宮癌 (UEC)。通常也有必要確定代表癌症生物標誌物的因子，尤其是上述癌症類型，從而更好地診斷癌症、評估預後和預測治療成功性。

【0101】 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。

【0102】 腫瘤相關抗原 (TAA) 的目前分類主要包括以下幾組：

【0103】 a) 癌-睪丸抗原：T 細胞能夠識別的最先確認的 TAA 屬於這一類抗原，由於其成員表達于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，它最初被稱為癌-睪丸 (CT) 抗原。由於睪丸細胞不表達 HLA I 類和 II 類分子，所以，在正常組織中，這些抗原不能被 T 細胞識別，因此在免疫學上可考慮為具有腫瘤特異性。CT 抗原大家熟知的例子是 MAGE 家族成員和 NY-ESO-1。

【0104】 b) 分化抗原：腫瘤和正常組織（腫瘤源自該組織）都含有 TAA。大多數已知的分化抗原發現於黑色素瘤和正常黑色素細胞中。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。例子包括，但不僅限於，黑色素瘤的酪氨酸酶和 Melan-A/MART-1 或攝護腺癌的 PSA。

【0105】 c) 過量表達的 TAA：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 TAA，一般表達水準較低。有可能許多由正常組織加工和潛在提呈的表位低於 T 細胞識別的閾值水準，而它們在腫瘤細胞中的過量表達能夠透過打破先前確立的耐受性而引發抗癌反應。這類 TAA 的典型例子為 Her-2/neu、生存素、端粒酶或 WT1。

【0106】 d) 腫瘤特異性抗原：這些獨特的 TAA 產生于正常基因（如 β -catenin、CDK4 等）的突變。這些分子變化中有一些與致瘤性轉化和/或進展相關。腫瘤特異性抗原一般可在不對正常組織帶來自體免疫反應風險的情況下誘導很強的免疫反應。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）。

【0107】 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量表達的蛋白產生，但其仍然具有腫瘤相關性（該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。

【0108】 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，並且由於它們是外源蛋白（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，它們在宮頸癌中表達。

【0109】 基於 T 細胞的免疫治療靶向作用于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，它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。

【0110】 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。

【0111】 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 類分子主要發現于專業抗原提呈細胞（APC）上，並且主要提呈，例如，在內吞作用過程中由 APC 佔據並且隨後被加工的外源性或跨膜蛋白的肽。

【0112】 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。因此，TCR、肽和 MHC 按照 1:1:1 的化學計量呈現，這一點已是共識。

【0113】 CD4 陽性輔助 T 細胞在誘導和維持 CD8 陽性細胞毒性 T 細胞的有效反應中發揮重要作用。腫瘤相關抗原 (TAA) 衍生的 CD4 陽性 T 細胞表位的識別對開發能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)。

【0114】 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)。

【0115】 本發明的拉長 (較長) 肽可作為 MHC-II 類活性表位。

【0116】 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（該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。

【0117】 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）。

【0118】 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 1 760 088 B1）。

【0119】 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。

【0120】 對於 MHC I 類肽觸發（引發）細胞免疫反應的肽，它也必須與 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。

【0121】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，而且它們之後還必須能被 T 細胞負載的特異性 T 細胞受體（TCR）識別。

【0122】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。該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，該相應抗原不僅出現於一種腫瘤中，而且濃度（即每個細胞的相應肽拷貝數目）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。

【0123】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 TCR 的 T 細胞並且不存在對該特定表位的免疫耐受性。

【0124】因此，TAA 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 TAA 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過量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 TCR 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準，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 細胞情況的過量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。

【0125】在透過根據本發明的特定 TCR（例如可溶性 TCR）和抗體或其他結合分子（支架）靶向作用於肽

-MHC 的情況下，潛在肽的免疫原性是次要的。在這些情況下，提呈是決定因素。

【發明內容】

【0126】 在本發明的第一方面，本發明涉及一種肽，包含選自包括 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 289、SEQ ID NO: 305 和 SEQ ID NO: 306 的組的一個氨基酸序列、或該序列的與 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 289、SEQ ID NO: 305 和 SEQ ID NO: 306 具有至少 77%，優選至少 88% 同源（優選至少 77% 或至少 88% 相同）的一種變體序列（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）。

【0127】 雖然作為癌症治療靶標的肽最重要的標準是其在原發腫瘤組織中相比于正常組織過度提呈，但是，相應基因或外顯子的 RNA 表達譜也可有助於選擇適當的肽。特別是，由於它們的化學性質或在細胞上的低拷貝數，部分肽很難透過質譜檢測，側重於肽提呈檢測的篩選方法可能無法識別這些靶標。然而，這些靶標可透過另一種方法來檢測，開始分析腫瘤組織和正常組織的基因和外顯子表達，其次評估腫瘤肽提呈。這種方法在本發明中使用兩個 mRNA 資料庫（TCGA 研究網路：<http://cancergenome.nih.gov/> 用於腫瘤樣本和 GTEx 資料庫（Lonsdale, 2013）用於正常組織樣本）以及肽提呈資料實現。如果與正常組織相比，基因或外顯

子的 mRNA 在腫瘤組織中過度表達，則認為與腫瘤相關。雖然此類肽僅在一小部分腫瘤組織中被發現，但其代表了令人關注的靶標。常規質譜分析不夠敏感，無法在肽水準上評估靶標範圍。相反，腫瘤 mRNA 表達可用於評估靶標範圍。為了檢測肽本身，比在常規篩選中敏感度更高的靶向質譜方法可能是必要的，並可能更好地在肽提呈水準上評估靶標範圍。

【0128】 本發明進一步涉及本發明的一種肽，包含選自包括 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 289、SEQ ID NO: 305 和 SEQ ID NO: 306 的組的一個序列、或與 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 289、SEQ ID NO: 305 和 SEQ ID NO: 306 具有至少 77%、優選至少 88% 同源性（優選為至少 77% 或至少 88% 相同）的一種變體，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。

【0129】 本發明還涉及由選自 SEQ ID NO: 2、24、32、39、64、72、106、149、251、305 和 306 的序列組成的本發明的一種肽。

【0130】 下表顯示了根據本發明的肽、它們各自的 SEQ ID NO、以及這些肽的可能源（潛在）基因。表 3、表 5 和表 7（A+B）中的所有肽均與 HLA-A*02 結合。表 4、表 6 和表 8 中的所有肽均與 HLA-A*24 結合。表 5 和表 6 中的肽之前在大型列表中披露，作為高通量篩查結果，錯誤率高，或使用演算法計算出，但之前

與癌症毫無關聯。表 7 (A + B) 和表 8 中的肽是可與本發明其他肽組合使用的其他肽。

表 3：與 H L A - A * 0 2 結合的本發明 肽

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
1	LLYPEPWSV	220382	FAM181B
2	GLIAGVVS	4233	MET
3	KLEENGDLYL	55255	WDR41
4	KLMPGTYTL	2201	FBN2
5	GIVAHIQEV	440193	CCDC88C
6	ALFDSLRLHV	220382	FAM181B
7	ILDHEVPSL	199990	C1orf86
8	SIYQFLIAV	2237	FEN1
9	FLVDGSYSI	1303	COL12A1
10	GIAGSLKTV	3720	JARID2
11	ALSPSYLTV	57674	RNF213
12	GLLPLLHRA	100529261, 2342, 91612	CHURC1-FNTB, FNTB, CHURC1
13	ALMAMLVYV	91319	DERL3
14	ILAKDLFEI	83990	BRIP1
15	YLDLSHNQL	10333, 79883	PODNL1, TLR6
16	YTLDIPVLFGV	29028	ATAD2
17	AVFPDDMPTL	4297	MLL
18	ILLDLTDNRL	135228	CD109
19	SISDNVWEV	55589	BMP2K
20	GLSQITNQL	9736	USP34
21	AIQDEIRSV	4085	MAD2L1
22	FVDPNTQEKV	83481	EPPK1
23	SLFSDEFKV	102	ADAM10
24	TLDEKVAEL	51438	MAGEC2
25	TMDSVLVTV	94025	MUC16
26	ALQEELTEL	22995	CEP152
27	RLMEENWNA	7784	ZP3
28	SLPNGKPVSV	23682	RAB38
29	YLLDPSITL	10102	TSFM
30	AMIEEVFEA	221443	OARD1
31	TITETTVEV	7143	TNR
32	VQLDSIEDLEV	23532	PRAME
33	YIKTELISV	6772	STAT1
34	FLLATEVVTV	10075	HUWE1
35	FLLPFSTVYL	9204	ZMYM6
36	SLADTNSLAVV	6490	PMEL
37	ILAPFSVDL	85413	SLC22A16
38	FLGPRIIGL	202309	GAPT

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
39	HLLEGSVGV	85320	ABCC11
40	VLIDPQWVLT	3003	GZMK
41	ALFENTPKA	5260	PHKG1
42	LLDSVSRL	3918	LAMC2
43	KAIEVLLTL	57650	KIAA1524
44	SLFETAWEA	9735	KNTC1
45	SLTEVSLPL	580	BARD1
46	SQFPLPLAV	80055	PGAP1
47	ALLERGELFV	79050	NOC4L
48	QVIEDSTGV	64778	FNDC3B
49	ALNIATHVL	24140	FTSJ1
50	ILFHGVFYA	55744	COA1
51	LLFSRLCGA	25945	PVRL3
52	RLAVLFSGA	968	CD68
53	KMVGLVVAI	80324	PUS1
54	VLNPLITAV	10827	FAM114A2
55	SLATKIVEA	152110	NEK10
56	FLHDEKEGIYI	10225	CD96
57	TVFTDHMLTV	586	BCAT1
58	YLLPLLAL	338645	LUZP2
59	KLLDPQEFTL	3371	TNC
60	ALFAPLVHL	26251	KCNG2
61	AIVKEIVNI	4436	MSH2
62	ALNPELVQA	4233	MET
63	SQIPAQPSV	23215	PRRC2C
64	SLFPDSLIV	261729	STEAP2
65	SVVPDVRSV	6605	SMARCE1
66	KLIFSVEAV	65985	AACS
67	TLLQRLTEV	11064	CNTRL
68	SLSNRLYYL	9271	PIWIL1
69	FLAVGLVDV	28559	TRBV28
70	LLLGDSALYL	28609, 28610	TRBV5-6, TRBV5-5
71	VLHSKFVVV	122618	PLD4
72	FLTAINYLL	440712	C1orf186
73	YTLREVDTV	4521	NUDT1
74	TLFGYSVVL	3676	ITGA4
75	AVIKFLELL	4436	MSH2
76	AVGPVHNSV	57448	BIRC6
77	TLIDEQDIPLV	116225	ZMYND19
78	TVVTRLDEI	9459	ARHGEF6
79	VTFKEYVTV	8535	CBX4
80	KLYEADFVL	55501	CHST12
81	NALDKVLSV	79053	ALG8
82	FIFDEAEKL	64222	TOR3A
83	GQASYFYVA	4486	MST1R

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
84	ALCPRIHEV	1762	DMWD
85	VLNDILVRA	5016	OVGP1
86	SVDSHFQEV	4968	OGG1
87	TIYKDFVYI	79786	KLHL36
88	AQADHLPQL	64689	GORASP1
89	QLAPVFQRV	84342	COG8
90	FLQDLEQRL	128272	ARHGEF19
91	KLFDESILI	8295	TRRAP
92	GLLFSLSRV	79064	TMEM223
93	QVLELDVADI	9675	TTI1
94	LLPAVPVGA	1953	MEGF6
95	GLLGSLLFL	91319	DERL3
96	LLVSHLYLV	84885	ZDHC12
97	STLPKSLSL	4605	MYBL2
98	RLFPDFFTRVAL	5657	PRTN3
99	YLLQSVNQLLL	23347	SMCHD1
100	ALLGMIIVGV	6571	SLC18A2
101	ALADFMLSL	2854	GPR32
102	VLLDIQEVFQI	201305	SPNS3
103	YLVSEIFKA	6005	RHAG
104	ALISWQPPRA	7143	TNR
105	ALLGTKILL	147945	NLRP4
106	FINDSIVYL	89766	UMODL1
107	LLVPTSGIYFV	4049	LTA
108	ILLKNLVTI	129868, 653192	TRIM43, TRIM43B
109	SLDPSVTHL	250, 251	ALPPL2, ALPP
110	FLLGVSKEV	23251	KIAA1024
111	AIVDLIHDI	23225	NUP210
112	SLGKFTFDV	6676	SPAG4
113	FLERGLESA	10535	RNASEH2A
114	QLIQT LHAV	1004	CDH6
115	SLDPDTLPAV	352954, 389523, 729438	GATSL2, GATS, GATSL1
116	TIDESGSIL	29127	RACGAP1
117	KMPDVELFV	79070	KDELC1
118	QLWQFLVTL	2119	ETV5
119	FIIQGLRSVGA	3117, 3118	HLA-DQA2, HLA-DQA1
120	VTPVTVSAV	3054	HCFC1
121	FTIFRTISV	83743	GRWD1
122	GVVDPVHGV	83481	EPPK1
123	VLDPALPALV	4486	MST1R
124	KVMATIEKV	9274	BCL7C
125	SLADYEHFV	357	SHROOM2
126	QMFQYFITV	51290	ERGIC2
127	KLDGNELDL	55379	LRRC59
128	TQSPATLSV	28299, 28875, 28902, 28913,	IGKV1-5, IGKV3-15,

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
		3514, 50802	IGKV3D-15, IGKC, IGKV1D-13, IGK@
129	RLQDILWFL	150771	ITPRIPL1
130	SLLGGTFVGI	55266	TMEM19
131	VTSNSGILGV	22828	SCAF8
132	ILGEVLAQL	124044	SPATA2L
133	ALLPRLHQL	85414	SLC45A3
134	GLAVPTPSV	647024	C6orf132
135	HLSTIIHEA	1147	CHUK
136	FLFGGVLMTL	91319	DERL3
137	EIASITEQL	55183	RIF1
138	ALLAKILQI	5591	PRKDC
139	FLLPTGAEA	1511	CTSG
140	VLLEELEAL	10142	AKAP9
141	FLDKVLVAA	54497	HEATR5B
142	ILVEGISTV	1462	VCAN
143	ALLPELREV	1140	CHRNA1
144	ALLAFFPGL	80267	EDEM3
145	YLWATIQR	2650	GCNT1
146	ALHFSEDEI	6097	RORC
147	YLMDDTVEI	114327	EFHC1
148	MLAGIAITV	63826	SRR
149	ILNTHITEL	131578	LRRC15
150	VLYDRPLKI	64783	RBM15
151	SVLDSTAKV	54885	TBC1D8B
152	MMVGDLLEV	5927	KDM5A
153	FISERVEVV	128869	PIGU
154	RLLGTEFQV	51151	SLC45A2
155	LLNPVVEFV	5591	PRKDC
156	ILGDLSHLL	11015	KDELR3
157	TLTSLLAQA	83481	EPPK1

表 4：與 HLA-A*24 類結合的本發明肽。

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
158	HYSQELSLLYL	5591	PRKDC
159	LYNKGFIYL	157769	FAM91A1
160	VYTLDIPVL	29028	ATAD2
161	IYLVSIPEL	23545	ATP6V0A2
162	VFTRVSSFL	1511	CTSG
163	DYLKGLASF	1130	LYST
164	KFSSFSLFF	3003	GZMK
165	DYTTWTALL	10615	SPAG5
166	YYVESGKLF	23279	NUP160
167	NYINRILKL	51691	NAA38

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
168	KYQDILETI	79730	NSUN7
169	AYTLIAPNI	94240	EPSTI1
170	VYEDQVGKF	23065	EMC1
171	LFIPSSKLLFL	101060416, 101060589, 23049, 440345, 440354, 552900, 641298	LOC101060416, SMG1, BOLA2, 61E3.4, LOC101060589, SMG1P1, LOC440354
172	TYTTVPRVAF	10882	C1QL1
173	IYSWILDHF	3344	FOXN2
174	VYVGGGQIIHL	151354	FAM84A
175	YYEVHKELF	9055	PRC1
176	EYNQWFTKL	55604	LRRC16A
177	VYPWLGALL	54905	CYP2W1
178	IFIEVFSHF	284293	HMSD
179	MYDSYWRQF	143686	SESN3
180	IYDDSFIRPVTf	56886	UGGT1
181	LYLDIINLF	51643	TMBIM4
182	IYQLDTASI	55003	PAK1IP1
183	VFTSTARAF	10225	CD96
184	VFQNFPLLF	56890	MDM1
185	IYKVGAPTI	10978	CLP1
186	IFPQFLYQF	23250	ATP11A
187	TYLRDQHFL	898	CCNE1
188	RYFKGLVF	166614	DCLK2
189	WYVNGVNYF	79054	TRPM8
190	GFFIFNERF	10206	TRIM13
191	VFKASKITF	5803	PTPRZ1
192	SYALLTYMI	7298	TYMS
193	RFHPTPLLL	51605	TRMT6
194	EFGSLHLEFL	57134	MAN1C1
195	TYSVSFPMF	257202, 2882	GPX6, GPX7
196	LYIDRPLPYL	253725, 387680, 55747	FAM21C, FAM21B, FAM21A
197	EYSLFPGQVVI	23649	POLA2
198	LYLDKATLI	55916	NXT2
199	RYAEEVGIF	54187	NANS
200	YYGPSLFLL	10075	HUWE1
201	IYATEAHVF	55706	TMEM48
202	VYWDSAGAAHF	55501	CHST12
203	FYSRLLQKF	55055	ZWILCH
204	TYELRYFQI	200916	RPL22L1
205	VHIPEVYLI	57705	WDFY4
206	EYQENFLSF	441027	TMEM150C
207	AYVVVFVSTL	25938	HEATR5A
208	TYTQDFNKF	796	CALCA

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
209	TYKDEGNDYF	7268	TTC4
210	IYTMIRNL	4193	MDM2
211	YYLEVVKTLI	80267	EDEM3
212	YYTFHFLYF	26273	FBXO3
213	IFDEAEKL	64222	TOR3A
214	LYLKLWNLI	11274, 373856	USP18, USP41
215	YFDKVVTI	374654	KIF7
216	QYSSVFKSL	25938	HEATR5A
217	FFPPTRQMGLLF	85415	RHPN2
218	YYKSTSSAF	79690	GAL3ST4
219	EYPLVINTL	100129460, 23333	DPY19L1P1, DPY19L1
220	GYIDNVTLI	3918	LAMC2
221	RYSTGLAGNLL	54921	CHTF8
222	TFSVSSHLF	90874	ZNF697
223	KYIPYKYVI	57674	RNF213
224	QYLENLEKL	101060589, 23049, 440345, 641298	61E3.4, SMG1P1, SMG1, LOC101060589
225	YYVYIMNHL	10655	DMRT2
226	VYRDETSELF	84455	EFCAB7
227	IFLDYEAGTSLF	202658, 56658	TRIM39, TRIM39-RPP21
228	KYTSWYVAL	2247	FGF2

表 5：與 H L A - A * 0 2 結合、之前與癌症無已知的關聯的本發明其他肽

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
229	AILAHLNTV	8914	TIMELESS
230	KLQNIMMLL	3070	HELLS
231	MLDKYSHYL	139818	DOCK11
232	KIFPAALQLV	2618	GART
233	HLFDAFVSV	55789	DEPDC1B
234	LLSPHPAL	10884	MRPS30
235	KIIDFLSAL	2956	MSH6
236	STIAILNSV	23310	NCAPD3
237	ALAPHLDDA	54919	HEATR2
238	GLYERPTAA	2672	GFI1
239	KMNESTRSV	4173	MCM4
240	YMGEKLIASV	23404	EXOSC2
241	KTIQQLETV	55127	HEATR1
242	WLYGEDHQI	586	BCAT1
243	FMADDIFSV	50615	IL21R
244	YLLEKNRVV	4651	MYO10
245	SLLDLPLSL	9487	PIGL
246	TVSDVLNSV	22796	COG2

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
247	ALYEGYATV	10072, 582	DPP3, BBS1
248	YLDRFLAGV	894	CCND2
249	GLCERLVSL	5591	PRKDC
250	SLAPATPEV	9308	CD83
251	ALSVLRAL	6691	SPINK2
252	RLMEICESL	1063	CENPF
253	ALAEIDNSL	23347	SMCHD1
254	KLQGKLPEL	5198	PFAS
255	SLLHFTENL	157570	ESCO2
256	SLGEEQFSV	157570	ESCO2
257	GLYTDPCGV	55007	FAM118A
258	LLSERFINV	56647	BCCIP
259	ILLPRIIEA	83959	SLC4A11
260	ILLEKILSL	9373	PLAA
261	QLQDRVYAL	55374	TMCO6
262	FMVDKAIYL	55068	ENOX1
263	VLLSEQGDVKL	10494, 51765, 6788	STK25, MST4, STK3
264	KLFPQETLFL	11124	FAF1
265	NTCPYVHNI	51728	POLR3K
266	YAIGLVMRL	401494	PTPLAD2

表 6：與 H L A - A * 2 4 結合、之前與癌症無已知的關聯的
本發明其他肽

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
267	KYMVYPQTF	10884	MRPS30
268	QYLGQIQHI	7298	TYMS
269	YFIDSTNLKTHF	51042	ZNF593
270	NYYEVBHKEF	9055	PRC1
271	LYHDIFSRL	9603	NFE2L3
272	QYLQDAYSF	9918	NCAPD2
273	TYIKPISKL	4644	MYO5A
274	AYLHSHALI	51347	TAOK3
275	EYINQGDLHEF	4919	ROR1
276	VYGFQWRHF	7298	TYMS
277	VYQGHTALL	5754	PTK7
278	RYISDQLFTNF	23268	DNMBP
279	TYIESASEL	79623	GALNT14
280	RYPDNLKHLYL	29080	CCDC59
281	PYRLIFEKF	5591	PRKDC
282	KFVDSTFYL	9688	NUP93
283	TYGDAGLTYTF	121642	ALKBH2
284	RYLNKAFHI	23310	NCAPD3
285	HYPPVQVLF	2956	MSH6

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
286	RYPDNLKHL	29080	CCDC59
287	LYITEPKTI	11219, 55559	TREX2, HAUS7
288	VYVSDIQEL	23225, 255330	NUP210P1, NUP210
289	KYPVEWAKF	51101	ZC2HC1A

表 7A：用於癌症療法（例如個性化癌症療法）、與 H L A - A * 0 2 結合的肽

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
290	KIVDFSYSV	701	BUB1B
291	KLDETGNLSL	7153	TOP2A
292	GMMTAILGV	79939	SLC35E1
293	FLVDGSWSI	57642	COL20A1
294	GLMKYIGEV	79054	TRPM8

表 7B：用於癌症療法（例如個性化癌症療法）、與 H L A - A * 0 2 結合的肽

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
305	KLFTSVFGV	1791	DNTT
306	ALLSSLNEL	367	AR

表 8：用於癌症療法（例如個性化癌症療法）、與 H L A - A * 2 4 結合的肽

SEQ ID No.	序列	基因 ID	正式基因符號
295	YYPGVILGF	55026	TMEM255A
296	TYVDSSHTI	1462	VCAN
297	PFLQASPHF	84985	FAM83A
298	RYLEGTSCI	83481	EPPK1
299	VYFVAPAKF	3918	LAMC2
300	AYVLRLETL	10687	PNMA2
301	AYKPGALTF	84883	AIFM2
302	RYMPPAHRNF	3620	IDO1

【0131】 本發明還一般涉及本發明的肽用於治療增殖性疾病，例如，腦膠質細胞瘤（GB）、乳腺癌（BRCA）、結直腸癌（CRC）、腎細胞癌（RCC）、慢性淋巴細胞白血病（CLL）、肝細胞癌（HCC）、非小細胞和小細胞肺

癌 (NSCLC 、 SCLC) 、 非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 、 急性骨髓性白血病 (AML) 、 卵巢癌 (OC) 、 胰腺癌 (PC) 、 攝護腺癌 (PCA) 、 包括胃食管交界癌 (OSCAR) 的食管癌、膽囊癌和膽管癌 (GBC 、 CCC) 、 黑色素瘤 (MEL) 、 胃癌 (GC) 、 膀胱癌 (UBC) 、 頭頸部鱗狀細胞癌 (HNSCC) 、 子宮癌 (UEC) 。

【0132】 特別優選的是本發明的肽 (單獨或組合) ， 其選自包括 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 289 、 SEQ ID NO: 305 和 SEQ ID NO: 306 的組團。更優選的是所述肽 (單獨或組合) 選自包括 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 149 的組團 (見表 4) 以及 SEQ ID NO: 305 和 SEQ ID NO: 306 ， 尤其包括選自 SEQ ID NO: 2 、 24 、 32 、 39 、 64 、 72 、 106 、 149 、 251 、 305 和 306 組成的組團的序列，並且其用於免疫治療腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌 (HNSCC) 或子宮癌。

【0133】 如示實施例 1 所示，其中本發明的許多肽也發現於各種類型腫瘤中，因此也可用於其他適應症的免疫治療。如實施例 2 所示，潛在肽在各種癌症中過度表達提示在各種其他腫瘤適應症中這些肽的有用性。

【0134】 因此，本發明的另一個方面涉及本發明中肽的用途 - 優選聯合用於治療選自腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌組中的增殖性疾病。

【0135】 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。

【0136】 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: 289、SEQ ID NO: 305 和 SEQ ID NO: 306 的一個氨基酸序列組成。

【0137】 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。

【0138】 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。

【0139】 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，也可能為其組合物。

【0140】 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。

【0141】 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。

【0142】 本發明進一步涉及本發明中肽或本發明中所述肽複合體（含有 MHC）的特定抗體以及製造這些抗體的方法。

【0143】 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。

【0144】 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。

【0145】 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。

【0146】 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。

【0147】 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。

【0148】 本發明進一步涉及本發明的方法，其中抗原提呈細胞由能表達含 SEQ ID NO.1 至 SEQ ID NO: 289、優選為含 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 149 和 SEQ ID NO: 158 至 SEQ ID NO: 213 所述肽的一個表達載體、或一個變體氨基酸序列組成。

【0149】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的啟動 T 細胞，其中所述 T 細胞有選擇性地識別一種細胞，該細胞表達含一種本發明氨基酸序列的多肽。

【0150】 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，該方法包括給予患者按本發明方法製造的有效量 T 細胞。

【0151】 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、本發明的作為藥劑或製造藥劑的啟動 T 淋巴細胞、T 細胞受體或抗體或其他肽 - 和 / 或肽 - MHC 結合分子的用途。所述藥劑優選為具有抗癌活性。

【0152】 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。

【0153】 本發明還一般涉及本發明的用途，其中所述癌細胞為腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺

癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌細胞。

【0154】 本發明進一步涉及一種基於本發明肽的生物標誌物，在此成為「靶標」，其可用於診斷癌症，優選為腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌。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該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 TCR 可用於染色腫瘤切片以檢測是否存在相關肽與 MHC 複合。

【0155】 或者，抗體具有進一步的效應子功能，如免疫刺激域或毒素。

【0156】 本發明還涉及這些癌症治療中靶點的用途。

【0157】 ABCC11 的單核苷酸多態性被證明與接受 S-1 輔助化療治療的非小細胞肺癌患者的較短無復發生存期相關 (Tsuchiya et al., 2016)。ABCC11 被描述為乳腺癌中多藥物抗性表型的啟動子。此外，ABCC11 在乳腺腫瘤中高表達顯示與侵襲性亞型和低無病生存相

關 (Honorat et al., 2013; Yamada et al., 2013)。結直腸癌患者的 ABCC11 轉錄物水準顯示對姑息化療無反應者中顯著低於有反應者，這與明顯較短的無病間隔相關 (Hlavata et al., 2012)。ABCC11 被描述為肺腺癌培美曲塞 (MTA) 治療的潛在生物標誌物 (Uemura et al., 2010)。ABCC11 在急性骨髓性白血病中上調表明與 4 年內評估的總體生存低概率相關，並且可以作為預測標誌物 (Guo et al., 2009)。ABCC11 被證明在肝細胞癌中上調 (Borel et al., 2012)。

【0158】 AR 編碼長度大於 90kb 的雄激素受體基因，並且編碼具有以下 3 個主要功能結構域的蛋白質：N-端結構域、DNA 結合結構域和雄激素結合結構域。該蛋白質充當類固醇激素啟動轉錄因數的作用。在結合激素配體後，受體從輔助蛋白中解離，易位到細胞核中，二聚化，然後刺激雄激素應答基因的轉錄。該基因含有 2 個多態性三核苷酸重複片段，其在蛋白質的 N-端反式啟動結構域中編碼聚穀氨醯胺和聚甘氨酸束。聚穀氨醯胺束從正常的 9-34 重複片段擴散到致病性的 38-62 重複片段導致脊髓延髓肌肉萎縮（甘迺迪病）。此基因的突變也與完全型雄激素不敏感性（CAIS）有關。編碼不同異構體的另外兩種剪接變體也進行了描述。US20150306197A1 公開了 SEQ ID NO. 305 作為 AR LBD（配體結合結構域）肽表位元，其通過掃描符合

HLA-A2 共有結合序列 9 聚體或 10 聚體肽的 AR LBD 的蛋白序列並通過它們對 HLA-A2 的結合親和力來確定。該肽被專門提出用於攝護腺癌疫苗。

【0159】 C1orf186 編碼染色體 1 開放閱讀框 186，位於染色體 1q32.1 上 (RefSeq, 2002)。Krppe1 樣因數 9 抑制子宮內膜癌細胞的 C1orf186 表達 (Simmen et al., 2008)。C1orf186 與 ER 陽性乳腺癌相關 (Triulzi et al., 2015)。

【0160】 DNTT 編碼 DNA 核苷酸轉移酶。在體內，編碼的蛋白在早期分化過程中在正常和惡性前 B 淋巴細胞和前 T 淋巴細胞的限制性群體中表達，其中它通過在重排 Ig 重鏈和 T 細胞受體基因區段結合處合成非生殖細胞元件 (N 區) 產生抗原受體多樣性。另外描述編碼此基因不同異構體的剪接轉錄變體。US20110142842A1 預測 SEQ ID NO. 305 的肽作為作為造血細胞特異性蛋白序列結合至 HLA-A*0201。該肽未進一步測試，出版物推測了關於許多不同類型癌症 (包括白血病、淋巴瘤例如：非霍奇金淋巴瘤和多發性骨髓瘤) 的治療方法。

【0161】 LRRC15 編碼含富亮氨酸重複 15，位於染色體 3q29 上 (RefSeq, 2002)。EWSR1-WT1 是一種致癌轉錄因數，顯示可影響 LRRC15 的表達 (Cliteur et al., 2012; Reynolds et al., 2003)。LRRC15 是在多種實體中過度表達的腫瘤抗原

(O'Prey et al., 2008)。LRRC15 與乳腺癌侵襲相關 (Schuetz et al., 2006)。LRRC15 與雄激素非依賴性轉移性攝護腺腫瘤的侵襲行為相關 (Stanbrough et al., 2006)。LRRC15 自身抗體與乳腺癌呈負相關 (Evans et al., 2014)。

【0162】MAGEC2 編碼 MAGE 家族成員 C2，這是一種像其他 MAGEC 基因一樣聚集在染色體 Xq26-q27 上的基因 (RefSeq, 2002)。MAGEC2 過度表達增加細胞週期蛋白 E 的水準，並促進 G1-S 轉換和細胞增殖 (Hao et al., 2015)。MAGEC2 在多發性骨髓瘤中促進增殖和對細胞凋亡的抗性，表明 MAGEC2 特異性免疫治療有可能根除最惡性細胞 (Lajmi et al., 2015)。MAGEC2 是一種上皮-間充質轉換誘導因數，與乳腺癌轉移相關。多變數分析顯示，MAGEC2 表達是患者總體生存和無轉移生存的獨立危險因素 (Yang et al., 2014)。

【0163】MET 編碼肝細胞生長因數受體並編碼酪氨酸激酶活性 (RefSeq, 2002)。MET 被證明在去分化脂肪肉瘤中上調，並且與黑素細胞瘤、肝細胞癌、非小細胞肺癌、遺傳性乳頭狀腎癌和胃腺癌相關 (Petrini, 2015; Finocchiaro et al., 2015; Steinway et al., 2015; Bill et al., 2015; Yeh et al., 2015)。

【0164】PRAME 編碼在人黑色素瘤中優先表達的抗原，並且充當視黃酸受體的抑制因數，可能通過該功能賦

予癌細胞生長優勢 (RefSeq, 2002)。PRAME 在多發性骨髓瘤、透明細胞腎細胞癌、乳腺癌、急性骨髓性白血病、黑色素瘤、慢性粒細胞白血病、頭頸部鱗狀細胞癌和骨肉瘤細胞系中上調 (Dannenmann et al., 2013; Yao et al., 2014; Zou et al., 2012; Szczepanski and Whiteside, 2013; Zhang et al., 2013; Beard et al., 2013; Abdelmalak et al., 2014; Qin et al., 2014)。PRAME 與黏液樣和圓形細胞脂肪肉瘤相關 (Hemming et al., 2014)。PRAME 與接受 R-CHOP 治療的彌漫性大 B 細胞淋巴瘤的較短無進展生存期和化療反應、頭頸部鱗狀細胞癌不良預後的指標、尿路上皮癌的化療反應不佳以及骨肉瘤的不良預後和肺轉移相關 (Tan et al., 2012; Dyrskjot et al., 2012; Szczepanski et al., 2013; Mitsuhashi et al., 2014)。PRAME 與急性淋巴細胞性白血病的較低復發、較低死亡率和總生存率相關 (Abdelmalak et al., 2014)。PRAME 可能是接受 R-CHOP 療法治療的彌漫性大 B 細胞淋巴瘤的預後標誌物 (Mitsuhashi et al., 2014)。

【0165】 SPINK2 編碼 Kazal 型絲氨酸蛋白酶抑制劑家族的成員，其在生殖道中充當胰蛋白酶和頭孢菌素抑制劑，並位於精子中 (RefSeq, 2002)。SPINK2 被證明在除了 B 淋巴母細胞 TK-6 細胞之外的大多數白

血病細胞系中顯著上調，表明在腫瘤進展和治療反應中起重要作用 (Chen et al., 2009)。

【0166】 STEAP2 編碼 STEAP2 金屬內切酶，其編碼多通道膜蛋白，是定位於高爾基複合體、質膜以及胞質溶膠的囊泡管狀結構。人類基因轉錄表達增加與攝護腺癌進展相關 (RefSeq, 2002)。STEAP2 通過 TNF- α 處理被誘導，並通過 NF- κ B 處理被抑制。NF- κ B 沉默導致抗細胞凋亡蛋白 STEAP2 的過度表達，其隨後抑制 p53 (Gonen-Korkmaz et al., 2014)。STEAP2 在許多癌症實體中過度表達，如攝護腺、膀胱、結腸、胰腺、卵巢、睪丸、乳腺，宮頸和尤因肉瘤 (Wang et al., 2010; Gomes et al., 2012; Grunewald et al., 2012)。STEAP2 可能促使攝護腺癌細胞遷移和侵襲。STEAP2 過度表達與局部晚期疾病狀態相關 (Whiteland et al., 2014)。

【0167】 STEAP2 在去勢抗性攝護腺癌中具有較大比例的未剪接 RNA (Sowalsky et al., 2015)。STEAP2 可用作攝護腺癌的生物標誌物 (Edwards et al., 2005)。STEAP2 與辛伐他汀和洛伐他汀的抗性相關 (Savas et al., 2011)。

【0168】 UMODL1 編碼尿調節素樣 1，並且位於染色體 21q22.3 上 (RefSeq, 2002)。UMODL1 可能促使肺腺癌轉移 (Tan et al., 2016)。長的非編碼 RNA

嵌合體 UMODL1-AS1 可用作乳腺癌復發的預後因數 (Liu et al., 2016)。

【0169】 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。目前，針對癌症免疫治療，正在探索利用免疫系統的體液和細胞進行免疫的各種機制。

【0170】 細胞免疫反應的特定元素能特異性地識別和破壞腫瘤細胞。從腫瘤浸潤細胞群或外周血中分離出的 T-細胞表明，這些細胞在癌症的天然免疫防禦中發揮了重要作用。特別是 CD8 陽性 T 細胞在這種反應中發揮重要作用，TC₈⁺ 能識別通常 8 至 10 個源自蛋白或位於細胞質的缺損核糖體產物 (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 分子也稱為人白細胞-抗原 (HLA)。

【0171】 除非另有說明，否則本文使用的所有術語定義如下。

【0172】 術語「T 細胞反應」指由一種肽在體外或體內誘導的效應子功能的特異性擴散和啟動。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。

【0173】 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。

【0174】 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基本上不同，因為該不是體內的鹽。

【0175】 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。

【0176】 「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。

【0177】 一種肽、寡肽、蛋白質或編碼該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。

【0178】 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/肽複合物結合來識別。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。

【0179】 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細胞抗原（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 類等位元基因的實例。

【0180】 表 9：HLA-A*02 和 HLA-A*24 和最常見 HLA-DR 血清類型的表達頻率 F。頻率根據 Mori 等人（Mori et al., 1997）使用的 Hardy-Weinberg 公式 $F = 1 - (1 - Gf)^2$ 改編，從美國人群範圍內的單體型頻率中推導出。由於連鎖不平衡，某些 HLA-DR 等

位基因內的 A*02 或 A*24 組合與其預期單一頻率相比，可能是濃縮的或頻率較低。有關詳細資訊，請參閱 Chanock 等人的文獻 (Chanock et al., 2004)。

等位基因	人群	根據等位元基因頻率算得的顯型
A*02	高加索人（北美）	49.1%
A*02	非裔美國人（北美）	34.1%
A*02	亞裔美國人（北美）	43.2%
A*02	拉丁美洲（北美）	48.3%
DR1	高加索人（北美）	19.4%
DR2	高加索人（北美）	28.2%
DR3	高加索人（北美）	20.6%
DR4	高加索人（北美）	30.7%
DR5	高加索人（北美）	23.3%
DR6	高加索人（北美）	26.7%
DR7	高加索人（北美）	24.8%
DR8	高加索人（北美）	5.7%
DR9	高加索人（北美）	2.1%
DR1	非裔（北）美人	13.20%
DR2	非裔（北）美人	29.80%
DR3	非裔（北）美人	24.80%
DR4	非裔（北）美人	11.10%
DR5	非裔（北）美人	31.10%
DR6	非裔（北）美人	33.70%
DR7	非裔（北）美人	19.20%
DR8	非裔（北）美人	12.10%
DR9	非裔（北）美人	5.80%
DR1	亞裔（北）美人	6.80%
DR2	亞裔（北）美人	33.80%
DR3	亞裔（北）美人	9.20%
DR4	亞裔（北）美人	28.60%
DR5	亞裔（北）美人	30.00%
DR6	亞裔（北）美人	25.10%
DR7	亞裔（北）美人	13.40%
DR8	亞裔（北）美人	12.70%
DR9	亞裔（北）美人	18.60%
DR1	拉丁裔（北）美人	15.30%

等位基因	人群	根據等位元基因頻率算得的顯型
DR2	拉丁裔（北）美人	21.20%
DR3	拉丁裔（北）美人	15.20%
DR4	拉丁裔（北）美人	36.80%
DR5	拉丁裔（北）美人	20.00%
DR6	拉丁裔（北）美人	31.10%
DR7	拉丁裔（北）美人	20.20%
DR8	拉丁裔（北）美人	18.60%
DR9	拉丁裔（北）美人	2.10%
A*24	菲律賓	65%
A*24	俄羅斯涅涅茨人	61%
A*24:02	日本	59%
A*24	馬來西亞	58%
A*24:02	菲律賓	54%
A*24	印度	47%
A*24	韓國	40%
A*24	斯里蘭卡人	37%
A*24	中國	32%
A*24:02	印度	29%
A*24	澳大利亞西部人	22%
A*24	美國	22%
A*24	俄羅斯薩馬拉人	20%
A*24	南美	20%
A*24	歐洲	18%

【0181】 本發明的肽，優選當如本文描述納入本發明的疫苗時優選與 A*02 或 A*24 結合。疫苗還可能包括泛結合 MHC II 類肽。因此，本發明的疫苗可用於治療 A*02 或 A*24 陽性患者中的癌症，但不因為這些肽的廣泛結核性而必須選擇 II 類 MHC 同種異型。

【0182】 如果本發明的 A*02 肽與結合至另一等位基因例如 A*24 的肽組合，與單獨的 MHC I 類等位基因相比，可治療更高比例的患者群體。雖然在大多數人群

中，低於 50% 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 HLA-A*24 和 HLA-A*02 表位的疫苗可以治療任何相關人群中至少 60% 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%、韓國 77%、日本 86%。

【0183】 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。

【0184】 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 DNA 片段由 cDNA 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，該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。

【0185】 如本文所用的術語「肽的核苷酸編碼」系指對肽進行核苷酸序列編碼，其中該肽包括與將由用於產生 TCR 的樹突細胞或另一細胞系統所表達該序列的生物系統相容的人工（人造）啟動和停止密碼子。

【0186】 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，具體的序列是該序列的單鏈 DNA、該序列與其互補序列的雙工（雙鏈 DNA）以及該序列的互補序列。

【0187】 「編碼區」這一術語是指在基因的天然基因組環境中天然或正常編碼該基因的表達產物的那部分基因，即，體內編碼該基因的天然表達產物的區域。

【0188】 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。

【0189】 「表達產物」這一術語是指多肽或蛋白，它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。

【0190】 「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。

【0191】 「DNA 片段」這一術語是指一種 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，它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、操縱和回收該片段及其組分核苷酸序列。此類片段以開放閱讀框架（未被內部未翻譯序列打斷）或內含子（通常提呈于真核基因中）的形式存在。未翻譯 DNA 序列可能存在於開放閱讀框架的下游，在那裏其不會干預編碼區的操縱或表達。

【0192】 「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游離的 3'-OH 末端。

【0193】 「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。

【0194】 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，並且由於該載體或組合物不是其天然環境的一部分，因此它仍然是分離的。

【0195】 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；它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。

【0196】 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。

【0197】 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，則該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。

【0198】 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」）與所述序列或權利要求的序列（「參考序列」）對準之後將被對比序列與所述序列或權利要求的序列進行比較。然後根據下列公式計算等同度百分比：

【0199】 等同度百分比 = $100 [1 - (C/R)]$

【0200】 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

【0201】 (i) 參考序列中每個域基或氨基酸序列在被對比序列中沒有對應的對準域基或氨基酸；

【0202】 (ii) 參考序列中每個空隙，以及

【0203】 (iii) 參考序列中每個對準域基或氨基酸與被對比序列中對準域基或氨基酸不同，即構成一個差異以及

【0204】 (iiii) 必須在對準序列的第 1 位置開始對準；

【0205】 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域基或氨基酸的參考序列中的域基或氨基酸數目。

【0206】 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。

【0207】 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:289 組成的組團的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289 具有 88% 同源性的其變體、或誘導與該肽發生 T 細胞交叉反應的一個變體。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。

【0208】 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 或由公共資料庫提供的其他工具。

【0209】 本領域技術人員能評估特定肽變體誘導的 T 細胞是否可與該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)。

【0210】 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透過被另一個天然氨基酸殘基的側鏈或其他側鏈取代而發生改變，這樣，這種肽仍然能夠以含有給定氨基酸序列（由 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289 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 H L A - A * 0 2 或 - D R 等合適 M H C 分子的結合槽相互作用和結合，以及至少維持（如沒有提高）其與啟動 T 細胞的 T C R 結合的能力。

【0211】 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）。正如科學文獻和資料庫（R a m m e n s e e e t a l . , 1 9 9 9 ; G o d k i n e t a l . , 1 9 9 7）中所述，H L A - A 結合肽的某些位點通常為錨定殘基，可形成一種與 H L A 結合槽的結合模序相稱的核心序列，其定義由構成結合槽的多肽鏈的極性、電物理、疏水性和空間特性確定。因此，本領域技術人員能夠透過保持已知的錨殘基來修飾 S E Q I D N o : 1 至 S E Q I D N O : 2 8 9 , 3 0 5 和 3 0 6 提出的氨基酸序列，並且能確定這些變體是否保持與 M H C I 或 I I 類分子結合的能力。本發明的變體保持與啟動 T 細胞的 T C R 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。

【0212】 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。優選情況是，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。

【0213】 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)。

【0214】 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。

【0215】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。

【0216】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。

【0217】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（見下面錨基序相關內容）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。

【0218】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 10：根據 SEQ ID NO: 1、2 和 3 的 HLA-A*02

結合肽的變體和基序

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID NO. 1	L	L	Y	P	E	P	W	S	V	
變體									I	
									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
SEQ ID NO. 2	G	L	I	A	G	V	V	S	I	
變體									V	
									L	
									A	
		M							V	
		M								
		M							L	
		M							A	
		A							V	
		A								
		A							L	

		A							A	
		V							V	
		V								
		V							L	
		V							A	
		T							V	
		T								
		T							L	
		T							A	
		Q							V	
		Q								
		Q							L	
		Q							A	
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID NO. 3	K	L	E	E	N	G	D	L	Y	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

表 11：根據 SEQ ID NO： 158、159 和 160 的 H L A - A * 2 4 結合肽的變體和基序

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID NO. 158	H	Y	S	Q	E	L	S	L	L	Y	L

變體											I
											F
		F									I
		F									
		F									F
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID NO. 159	L	Y	N	K	G	F	I	Y	L		
變體									I		
									F		
		F							I		
		F									
		F							F		
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID NO. 160	V	Y	T	L	D	I	P	V	L		
變體									I		
									F		
		F							I		
		F									
		F							F		

【0219】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。

【0220】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 12。

表 12：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
1	0 或 1 或 2 或 3
0	0 或 1 或 2 或 3 或 4

C-端	N-端
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

【0221】 拉伸/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。拉長可用于增強所述肽的穩定性或溶解性。

【0222】 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，只要它們有基本相同的抗原活性即可。

【0223】 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。

【0224】 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）。

【0225】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 複合物的結合可用本領域內的已知方法進行測試。

【0226】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，則該肽濃度不超過約 1 mM，優選為不超過約 1 μ M，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。

【0227】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: 289、305 和 306 所選的氨基酸序列組成。

【0228】基本由「...組成」系指本發明的肽，除了根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 289、305 和 306 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，而它們不一定能形成作為 MHC 分子表位的肽。

【0229】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，該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。

【0230】此外，該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。

【0231】在反式肽鍵氨基酸中，肽 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) 並未連接其殘基，但是其肽鍵是反向的。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，這些類比肽有利於 MHC 的結合和輔助性 T 細胞的反應。以 $\text{NH}-\text{CO}$ 鍵替代 $\text{CO}-\text{NH}$ 肽鍵的逆向反向肽大大地提高了抗水解性能。

【0232】非肽鍵為 $-\text{CH}_2-\text{NH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 等。美國 4897445 號專利提出了多肽鏈中非肽鍵 ($-\text{CH}_2-\text{NH}$) 的非固相合成法，該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 NaCNBH_3 的氨基酸相互作用而合成的非肽鍵。

【0233】 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。

【0234】 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。

【0235】 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，以參考文獻的方式併入本文。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 and 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。

【0236】簡言之，修飾蛋白質的精氨醯殘基等往往基於鄰二羰基化合物（如苯甲醯甲醛、2,3 - 丁二酮以及 1,2 - 烯巴二酮）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。

【0237】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 - 碳二亞胺可用于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。

【0238】 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。

【0239】 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)。

【0240】 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。

【0241】 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。

【0242】 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:289、SEQ ID NO:305 和 SEQ ID NO:306 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。該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域和域土鹽類，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 $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 、 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。

【0243】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。芴甲氧羰基 (Fmoc) 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高度敏感的保護基團進行重複分裂。由於它們的丁基醚（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，它們使用被逆轉的 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）

【0244】 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，該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。

【0245】 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）。

【0246】 可以使用薄層色譜法、電泳特別是毛細管電泳、固相萃取（CSPE）、反相高效液相色譜法、酸解後的氨基酸分析、快原子轟擊（FAB）質譜分析以及 MALDI 和 ESI-Q-TOF 質譜分析進行肽分析。

【0247】 為了確定本發明的肽，將 RNA 表達資料的以下兩個資料庫一起進行了比較：由 TCGA 研究網路

(<http://cancergenome.nih.gov/>) 產生的 RNASeq 腫瘤資料以及覆蓋約 3000 個正常（健康）組織樣本的 RNASeq 資料（GTEx）（Lonsdale, 2013）。基因進行了篩選，與正常（健康）組織樣本相比，在腫瘤組織樣本中過度表達。然後，從這些基因的蛋白質產物衍生的癌相關肽通過使用如本文所述的 XPRESIDENT™ 平臺質譜法識別。

【0248】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。該特點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，從而透過假發現率（Benjamini and Hochberg, 1995）調整多項檢驗（參見實施例 1、圖 1）。

【0249】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，將癌症樣本（N = 450 個 A*02 陽性樣本，N = 211 個 A*24 陽性樣本）中記錄的自然腫瘤相關肽（TUMAP）的片段模式與相同序列相應合成參考肽的片段模式進行比較。由於這些肽被直接鑒定為原發腫瘤 HLA 分子的配體，因此這些結果為來自 A*02 和 / 或

A*24 陽性癌症患者的原發癌症組織上確定肽的自然加工和提呈提供了直接證據。

【0250】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量提呈的候選肽疫苗，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 限制肽水準直接相對定量結果。這透過以下方法實現：使用專有資料分析管道處理的 LC-MS 採集資料、結合序列識別演算法、譜聚類、計算離子、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。

【0251】為每種肽和樣本確立了提呈水準，包括誤差估計值。腫瘤組織大量提呈的肽以及腫瘤與非腫瘤組織和器官中過量提呈的肽已經得到確定。

【0252】對來自組織樣本的 HLA 肽複合物進行純化，並且對 HLA 相關肽使用 LC-MS 進行分離和分析（見實施例）。本申請中包含的所有 TUMAP 用此方式確定于原發性癌症樣本上，證實它們提呈于原發性腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌或子宮癌。

【0253】 在多個癌症和正常組織上確定的 TUMAP 用無標記 LC-MS 資料的離子計數方法進行量化。該方法假定肽的 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：蛋白資料庫檢索、譜聚類、充電狀態卷積（除電）和保留時間校準和正態化。

【0254】 此外，發現管道 XPRESIDENT® v2.1 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。組織樣本中 TUMAP 的總肽量用 nanoLC-MS/MS 測定為天然 TUMAP 的比率以及 TUMAP 同位素標記版本的已知量，稱為內部標準。TUMAP 分離效率確定方法：把肽：所有選定 TUMAP 的 MHC 在 TUMAP 分離程序儘早的時間點加入組織裂解液，並在肽分離成後完成後透過 nanoLC-MS/MS 檢測。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。所述肽特異性隔離效率計算為三次測量 10 次加標實驗的平均值（見實施例 6 和表 22）。

【0255】 RNA 表達和質譜分析資料的這種組合分析獲得本發明的 289 種肽。

【0256】除了過量提呈肽之外，也測試了潛在基因的 mRNA 表達。mRNA 資料通過 RNA 測序分析正常組織和癌組織獲得（見實施例 2、圖 2）。正常組織資料的額外來源是從 3000 個正常組織樣本中公開獲得的 RNA 表達資料的資料庫（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。

【0257】本發明提出了有利於治療癌腫/腫瘤，優選為治療過量提呈或只提呈本發明肽的腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌。這些肽由質譜分析法直接顯示出，而由 HLA 分子自然提呈于人原發癌樣本中。

【0258】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（也指定為「全長蛋白」或「潛在蛋白」）- 本發明相關的「正常組織」應指源自與腫瘤相同器官的健康細胞或組織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過度提呈（本發明相關的「腫瘤組織」是指來自癌症患者的樣本），但不在正常組織中過度提呈（見實施例 1）。

【0259】 H L A 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 H L A / 肽複合體的細胞（如：提呈衍生肽的腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌或子宮癌細胞）。

【0260】 本發明的所有肽已被證明具有刺激 T 細胞反應的能力，並過量提呈，因而可用于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，也可用于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（也參見下文）中可找到。因此，本發明的肽可用于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，加長肽、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。在這種情況下，特別優選的肽為選自 S E Q I D N O： 2、24、32、39、64、72、106、149、251、305 和 306 的組的本發明肽。

【0261】 本說明書還涉及包含一個 α 鏈和一個 β 鏈 (「 α/β TCR」) 的 T 細胞受體 (TCR)。還提供了由 MHC 分子提呈時可與 TCR 和抗體結合的本發明的肽。本說明書還涉及核酸、載體和用於表達 TCR 的宿主細胞和本說明書的肽；以及使用它們的方法。同樣，在這種情況下特別優選的肽為選自 SEQ ID NO: 2、24、32、39、64、72、106、149、251、305 和 306 的組的本發明肽。

【0262】 術語「T細胞受體」(縮寫 TCR) 是指一種異二聚體分子，其包含一個 α 多肽鏈 (α 鏈) 和一個 β 多肽鏈 (β 鏈)，其中所述異二聚體受體能夠結合由 HLA 分子提呈的肽抗原。該術語還包括所謂的 γ/δ TCR。

【0263】 在一個實施方案中，本說明書提供了如本文中所描述的產生 TCR 的方法，該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。

【0264】 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，或該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。

【0265】 α/β TCR 的 α 和 β 鏈和 γ/δ TCR 的 γ 和 δ 鏈通常被視為各自有兩個「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。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。

【0266】 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，「TCR δ 可變域」是指無前導區 (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」是指細胞外 TRDC 區域，或 C-末端截短 TRDC 序列。

【0267】 本說明書的 TCR 優選結合至肽 HLA 分子複合體，其具有約 100 μM 或更小、約 50 μM 或更小、約 25 μM 或更小或約 10 μM 或更小的結合親和力 (KD)。更為優選的情況是具有約 1 μM 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。

【0268】與本說明書 TCR 相關，本文使用的「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。

【0269】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。

【0270】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 TRAC 外顯子 2 的 Cys4 和 TRBC1 或 TRBC2 外顯子 2 的 Cys4 之間的天然二硫鍵相連。

【0271】本說明書的 TCR 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 TCR 可能共軛至治療活性劑，如放射性核素、化學治療劑或毒素。

【0272】 在一個實施方案中，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 TCR 與未突變 TCR 相比，已經修改了糖基化。

【0273】 在一個實施方案中，在 TCR α 鏈和/或 TCR β 鏈中包括至少一個突變的 TCR 對肽 HLA 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 TCR α 鏈和/或未突變 TCR β 鏈的 TCR 的結合親和力的至少兩倍。腫瘤特異性 TCR 親和力增強及其開發依賴於存在最佳 TCR 親和力的窗口。這樣窗口的存在是根據觀察結果：HLA-A2 限制性病原體特異性 TCR 與 HLA-A2 限制性腫瘤相關自身抗原特異性 TCR 相比，KD 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 TCR 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 TCR 的細胞才仍然存在。因此，本說明書的 TCR 或變體對肽的親和力可透過本領域熟知的方法來增強。

【0274】 本說明書還涉及一種識別和分離本發明 TCR 的一種方法，所述方法包括：用 A2/肽單體從 HLA-A*02 陰性健康供體孵育 PBMC，用四聚體-藻

紅蛋白 (PE) 孵育 PBMC 並透過螢光啟動細胞分選 (FACS) - Calibur 方法分析分離高親和力 T 細胞。

【0275】 本說明書還涉及一種識別和分離本發明 TCR 的一種方法，所述方法包括：獲得含整個人體 TCR $\alpha\beta$ 基因位點 (1.1 and 0.7 Mb) 的轉基因小鼠 (其 T 細胞表達多樣化人類 TCR，用於補償小鼠 TCR 缺乏)，用肽對小鼠進行免疫處理，用四聚體 - 藻紅蛋白 (PE) 孵育從轉基因小鼠中獲得的 PBMC，並透過螢光啟動細胞分選 (FACS) - Calibur 方法分析分離高親和力 T 細胞。

【0276】 一方面，為了獲得表達本說明書 TCR 的 T 細胞，編碼本說明書 TCR- α 和 / 或 TCR- β 鏈的核酸被克隆入表達載體，諸如 γ 反轉錄病毒或慢病毒。重組病毒產生，然後測試功能，如抗原專一性和功能性親合力。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 PBMC)，在輸入患者前展開。另一方面，為了獲得表達本說明書 TCR 的 T 細胞，TCR RNA 透過本領域中已知的技術 (例如，體外轉錄系統) 合成。然後，體外合成的 TCR RNA 透過電穿孔來重新表達腫瘤特異性 TCR- α 和 / 或 TCR- β 鏈被引入獲得自健康供體的初級 CD8+ T 細胞。

【0277】 為了增加表達，編碼本說明書 TCR 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 (LTR)、巨細胞病毒 (CMV)、鼠幹細胞病毒 (MSCV) U3、磷酸甘油酸激酶 (PGK)、 β 肌動蛋白、

泛素蛋白和猿猴病毒 40 (SV40)/CD43 複合啟動子、延伸因子 (EF) - 1a 和脾臟病灶形成病毒 (SFV) 啟動子。在一優選實施方案中，啟動子與被表達的核酸異源。除了強啟動子外，本說明書的 TCR 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 (CPPT)，其促進了慢病毒構建體的核易位 (Follenzi et al., 2000)，和土撥鼠肝炎病毒轉錄後調控元素 (WPRE)，其透過提高 RNA 穩定性增加轉基因表達水準 (Zufferey et al., 1999)。

【0278】 本發明 TCR 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。

【0279】 實現高水準的 TCR 表面表達需要引入 TCR 的 TCR- α 和 TCR- β 鏈高水準轉錄。為了實現它，本說明書的 TCR- α 和 TCR- 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 TCR- α 和 TCR- β 鏈在之間的病毒核糖體間進入位元點 (IRES) 導致兩鏈的協同表達，因為 TCR- α 和 TCR- 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 TCR- α 和 TCR- β 鏈的相等摩爾比。(Schmitt et al. 2009)。

【0280】 編碼本說明書 TCR 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「優化」，因為匹配 tRNA 以及其他因子的相對可用性 (Gustafsson et al., 2004)。修改 TCR- α 和 TCR- 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 mRNA 不穩定性基序或隱蔽剪接位元點，已顯示可顯著提高 TCR- α 和 TCR- β 基因表達 (Scholten et al., 2006)。

【0281】此外，引入的和內源性 TCR 鏈之間的錯配可能會導致獲得特異性，其構成自身免疫的顯著風險。例如，混合 TCR 二聚體的形成可能會減少可用以形成正確配對 TCR 複合體的 CD3 分子數目，因此，可以顯著降低表達所引入 TCR 的細胞的功能性親合力 (Kuball et al., 2007)。

【0282】為了減少錯配，本說明書引入的 TCR 鏈的 C-末端結構域可以進行修改以促進鏈間親和力，同時降低引入鏈與內源 TCR 配對的能力。這些策略可能包括用鼠配對物取代人類 TCR- α 和 TCR- β C 端結構域(鼠化 C 端結構域)；透過引入第二個半胱氨酸殘基到引入 TCR 的 TCR- α 和 TCR- β 鏈產生 C 末端結構域的第二個鏈間二硫鍵(半胱氨酸修飾)；交換 TCR- α 和 TCR- β 鏈 C 端結構域的相互作用殘基(「杵臼結構」)；直接融合 TCR- α 和 TCR- β 鏈可變結構域至 CD3 ζ (CD3 ζ 融合) (Schmitt et al. 2009)。

【0283】在一實施方案中，宿主細胞被改變結構以表達本說明書的 TCR。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 TCR 的 γ / δ T 細胞。

【0284】 「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 GMP 指南生產。

【0285】 藥物組合物包括游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，其中該肽由制酸或藥劑的城鹽進行改性。例如，用與適合的酸反應的游離城（通常其中的中性藥物有一個中性 -NH₂ 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城鹽製劑使用藥用城基進行製備，如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、三甲胺等等。

【0286】 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。

【0287】 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。該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其細胞株的細胞（隨後再將這些細胞注入到患者中），或體外用於從來自患者的免疫細胞的一個細胞亞群（然後再將細胞重新給予患者）。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（如白細胞介素-2）。肽可完全單獨給藥，也可與免疫刺激佐劑相結合（見下文）、或與免疫刺激細胞因子聯合使用、或以適當的輸送系統給藥（例如脂質體）。該肽也可共軛形成一種合適的載體（如鑰孔蟲血藍蛋白（KLH）或甘露）到合適的載體（參閱 WO 95/18145 及 (Longenecker et al., 1993)）。肽也可能被標記，可能是融合蛋白，或可能是雜交分子。在本發明中給出序列的肽預計能刺激 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。

【0288】 一方面，疫苗包括至少含有 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO: 289、305 和 306 中提出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。

【0289】 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，它們可為單鏈和/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），並且只要它編碼肽，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。

【0290】 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。

【0291】 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, CN, 美國）購得。

【0292】 編碼本發明多肽的 DNA 理想修飾方法是使用 Saiki 等人 (Saiki et al., 1988) 所採用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。

【0293】 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。

【0294】 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游離體還是要相互結合。

【0295】 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, 該 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，該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，該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。

【0296】 另外，有這種選擇屬性的基因可在另外一個載體上，該載體用來協同轉化所需的宿主細胞。

【0297】 然後，本發明中的重組 DNA 所轉化的宿主細胞在本文中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。

【0298】 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。該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。

【0299】 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，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，CA 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。

【0300】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準高達 1 mg/L。對於較弱的細胞株，蛋白水準一般低於 0.1 mg/L。SV40 複製原點的出現將導致 DNA 在 SV40 複製容納性 COS 細胞中高水準複製。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 鈣-內鹼胺酶基因、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。

【0301】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「一串珠子」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 類分子的免疫應答。

【0302】 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, MD, 美國）獲得）和 RR1（從美國菌種保藏中心（ATCC, Rockville, MD, 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, CA 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 978-1-58829-262-9) 和技術人員知道的其他文獻中查到。

【0303】 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, MD 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。

【0304】 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。

【0305】 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) 可用于表達本發明中的肽，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。

【0306】 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）。

【0307】 另一方面，本發明提出了一種配製一種肽及其變體的方法，該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。

【0308】 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 μ g 至 1.5 mg，優選為 125 μ g 至 500 μ g 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）。

【0309】 用於主動免疫接種的多聚核苷酸可為基本純化形式，也可包被於載體或輸送系統。核酸可能為 DNA、cDNA、PNA、RNA，也可能為其組合物。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。

【0310】 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®)、resiquimod、ImuFact IMP321、白細胞介素 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）及其製備方法進行了描述（Allison and Krummel, 1995）。也可能使用細胞因子。一些細胞因子直接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）。

【0311】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）啟動先天（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，它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 CD4 T 細胞說明的缺失。甚至有疫苗佐劑的存在也能維持 TLR9 活化作用誘發的 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。

【0312】 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、temsirolimus、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗-CTLA4、免疫系統的其他抗體靶向性主要結構（如：抗-CD40、抗-TGF β 、抗-TNF α 受體）和SC58175，這些藥物都可能有治療作用和/或充當佐劑。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。

【0313】 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。

【0314】 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、resiquimod 和干擾素- α 。

【0315】 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 resiquimod。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 resiquimod。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 或其組合物。

【0316】 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，肽和其他選擇性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，EP2112253 中有示例製劑。

【0317】 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。該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 (Bancheau et al., 2001; Walter et al., 2012)。

【0318】 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）啟動信號通路。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。

【0319】 「特定」結合系指，與其他天然肽-MHC 複合體相比，該支架與感興趣的肽-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。它們應該含有未改變的

肽 - M H C 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 - M H C 的水準。

【0320】 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，該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。

【0321】 各支架可與第二個活性分子（例如 I L - 2 1 、抗 C D 3 、抗 C D 2 8 ）共軛。

【0322】 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，並作為參考文獻引用。

【0323】 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。它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。

【0324】 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，它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。

【0325】可選擇 DNA 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。

【0326】此外，用流式細胞儀對細胞結合行為的研究顯示，適體在納摩爾範圍內顯示出很好的親和力。

【0327】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。

【0328】可選擇適體針對複合體的靶標，如細胞和組織以及包含、優選包括根據任何 SEQ ID NO 1 至 SEQ ID NO 289、305 和 306 的一個序列、根據當前發明的肽複合體與 MHC 分子，使用細胞 SELEX（透過指數富集的配體系統進化）技術。

【0329】本發明中的肽可用于生成和開發出針對 MHC/肽複合物的特定抗體。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。

【0330】 因此，本發明的另一方面是提出產生特異性結合至與 H L A 限制性抗原絡合的 I 或 II 類人主要組織相容性複合體 (M H C) 的一種重組抗體的方法，該方法包括：用可溶形式的與 H L A 限制性抗原（優選為本發明的一種肽）絡合的 (M H C) I 或 II 類分子對包含表達所述主要組織相容性說複合體 (M H C) I 或 II 類的基因工程非人哺乳動物進行免疫；將 m R N A 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 m R N A 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 H L A 限制性抗原絡合的所述人主要組織相容性說複合體 (M H C) I 或 II 類。

【0331】 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 H L A 限制性抗原絡合的 I 或 II 類人主要組織相容性說複合體 (M H C)，其中該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。

【0332】 產生這種抗體和單鏈 I 類主要組織相容性複合物的相應方法，以及產生這些抗體的其他工具在 W O 03/068201、W O 2004/084798、W O 01/72768、W O 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。

【0333】 優選地，該抗體與複合體的結合親和力低於 20 納摩爾，優選為低於 10 納摩爾，這在本發明情況下也被視為具有「特異性」。

【0334】 本發明涉及一種肽，包含選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289、305 和 306 組成的組的一個序列或該序列的與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289、305 和 306 具有 88% 同源性（優選為相同）的一種變體，或誘導與所述變異肽發生 T 細胞交叉反應的一種變體，其中，所述肽不是基本的全長多肽。

【0335】 本發明進一步涉及一種肽，包含選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289、305 和 306 組成的組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289、305 和 306 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。

【0336】 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。

【0337】 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:289、305 和 306 的一個氨基酸序列組成。

【0338】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中該肽（在化學上）被修飾和/或包含非肽鍵。

【0339】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中該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，或其中該肽與一種抗體（例如，樹突狀細胞特定抗體）融合。

【0340】 本發明進一步涉及一種核酸，其編碼本發明所述肽，前提是該肽並非完整（完全）的人蛋白。

【0341】 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。

【0342】 本發明進一步涉及一種能表達本發明核酸的表達載體。

【0343】 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藥用表達載體，特別是用於治療癌症，例如，腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌。

【0344】 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。

【0345】 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。

【0346】 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。

【0347】 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呈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。

【0348】 本發明進一步涉及本發明的方法，其中該抗原提呈細胞包括一個表達載體，該載體有能力表達含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289、305 和 306 的肽或所述變體氨基酸序列。

【0349】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的啟動 T 細胞，其中所述 T 細胞有選擇性地識別一種細胞，該細胞異常表達含一種本發明氨基酸序列的多肽。

【0350】 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，該方法包括給予患者本發明的有效量 T 細胞。

【0351】 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啟動細胞毒性 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。

【0352】 本發明進一步涉及一種本發明的用途，其中該藥劑為一種疫苗。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。

【0353】 本發明還一般涉及本發明的用途，其中所述癌細胞為細胞或其他實體或血液腫瘤細胞，如：例如，腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞

性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌細胞。

【0354】 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，在此成為「靶標」，其可用於診斷和/或判斷腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌的預後。本發明還涉及這些供癌症治療使用的新靶點。

【0355】 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「全部」的免疫球蛋白分子，「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，只要它們表現出本發明的任何期望屬性（例如，腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌標誌物（多）肽的特異性結合、將毒素傳遞給癌

症標誌物基因表達水準增加時的癌細胞和/或抑制癌標誌物多肽的活性)。

【0356】 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腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌標誌物多肽或其片段可用于產生本發明的抗體。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。

【0357】 例如，本發明的編碼肽的 cDNA，例如，該肽為根據 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289、305 和 306 多肽的肽，或其中一個變體或片段，可在原核細胞中（如：細菌）或真核細胞（如：酵母、昆蟲或哺乳動物細胞）中表達，之後，可純化重組蛋白，並用於產生一種特異性結合用於產生本發明抗體的上述癌症標誌物多肽的單克隆或多克隆抗體製劑。

【0358】 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，該抗體可用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。

【0359】 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）。

【0360】 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。

【0361】 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)。

【0362】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。胃蛋白酶處理產生一個 F(ab')₂ 片段和一個 pFc' 片段。

【0363】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。

【0364】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。

【0365】 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 4816567 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 CDR 殘基以及可能的一些 FR 殘基被來自齧齒動物抗體中的類似位點的殘基取代。

【0366】 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，它被描述為，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。

【0367】 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 pH 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。

【0368】 該抗體可透過注射（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疗作用。局部或靜脈注射為優選。

【0369】 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，優選為治療腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌後，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。

【0370】 本發明的另一方面提出了製備識別特異性肽-MHC複合物的可溶性 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，並且它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，它可能表達於用於過繼轉移的 T 細胞。進一步的資訊可在 WO 2004/033685A1 和 WO 2004/074322A1 中找到。sTCR 的組合在 WO 2012/056407A1 中進行了描述。WO 2013/057586A1 中公開了製備的進一步的方法。

【0371】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。

【0372】該抗體或 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 (K_d) 低於 $1 \times 10 \mu\text{M}$ 。

【0373】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、曙紅及其它螢光團、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，其中該抗體用於檢測原位蛋白的表達。

【0374】 本發明的另一方面包括一種體外製備啟動的T細胞的方法，該方法包括將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啟動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。

【0375】 優選情況是，哺乳動物細胞的TAP肽轉運載體缺乏或水準下降或功能降低。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。

【0376】 人體肽載入的缺陷細胞株T2從屬美國菌種保藏中心（ATCC，12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852，美國）目錄號CRL1992；果蠅細胞株Schneider 2號株從屬ATCC目錄CRL19863；小鼠RMA-S細胞株Ljunggren等人描述過（Ljunggren and Karre, 1985）。

【0377】 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 資料庫中公開獲得。

【0378】 當 MHC I 類表位用作一種抗原時，T 細胞為 CD8 陽性 T 細胞。

【0379】 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，該載體有能力表達含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:289、305 和 306 的肽或變體氨基酸序列。

【0380】 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于生成 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) 體外啟動 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

物耦合到聚苯乙烯顆粒（微球）而生成 a A P C。該系統實現了對 a A P C 上的 M H C 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 M H C：肽複合物外，a A P C 還應攜運含共刺激活性的其他蛋白，如耦合至表面的抗 - C D 2 8 抗體。此外，此類基於 a A P C 的系統往往需要加入適當的可溶性因子，例如，諸如白細胞介素 1 2 的細胞因子。

【0381】也可用同種異體細胞制得 T 細胞，在 W O 9 7 / 2 6 3 2 8 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 T 2 細胞，也可用其他細胞來提呈肽，如 C H O 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 P o r t a 等人在（P o r t a e t a l., 1 9 9 4）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。

【0382】被啟動的 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啟動 T 細胞。

【0383】按上述方法製成的啟動 T 細胞將會有選擇性地識別異常表達含 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 2 8 9、3 0 5 和 3 0 6 氨基酸序列的多肽。

【0384】優選情況是，T 細胞透過與其含 H L A / 肽複合物的 T C R 相互作用（如，結合）而識別該細胞。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。此類患者給予有效量的啟動 T 細胞。給予患者的 T 細胞可能源自該患者，並按上述方法啟動（即，它們為自體 T 細胞）。或者，T 細胞不是源自該患者，而是來自另一個人。當然，優選情況是該供體為健康人。發明人使用「健康個人」系指一個人一般狀況良好，優選為免疫系統合格，更優選為無任何可很容易測試或檢測到的疾病。

【0385】 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））。

【0386】 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，該方法包括給予患者上述有效量的 T 細胞。

【0387】 發明人所用的「異常表達」的意思還包括，與正常組織表達水準相比，多肽過量表達，或該基因在從腫瘤獲得的組織中未表達而在腫瘤中表達。「過量表達」系指多肽水準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。

【0388】 T 細胞可用本領域已知的方法制得（如，上述方法）。

【0389】 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 et al. 和 Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006)。

【0390】 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，該透過基因工程改變的 T 細胞可轉給患者用於癌症治療。

【0391】 本發明的任一分子（即肽、核酸、抗體、表達載體、細胞，啟動 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。

【0392】 本發明還涉及一種套件，其包括：

【0393】 (a) 一個容器，包含上述溶液或凍乾粉形式的藥物組合物；

【0394】 (b) 可選的第二個容器，其含有凍乾粉劑型的稀釋劑或重組溶液；和

【0395】 (c) 可選的 (i) 溶液使用或 (ii) 重組和 / 或凍乾製劑使用的說明。

【0396】 該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，或 (v) 注射器。容器最好是瓶子、小瓶、注射器或試管，可以為多用途容器。藥物組合物最好是凍乾的。

【0397】 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。該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。該標籤可進一步表明製劑用於皮下注射。

【0398】 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。該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。

【0399】 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。

【0400】 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。

【0401】 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。

【0402】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）。

【0403】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，也可透過輸液泵給藥。

【0404】由於本發明的肽分離自腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、食管癌（包括胃食管交界癌）、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌或子宮癌，因此，本發明的藥劑優選用於治療腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋

巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、食管癌（包括胃食管交界癌）、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌。

【0405】 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 TUMAP 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：TCR 隔離物或可溶性抗體和其他治療選擇。

【0406】 「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。

【0407】 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量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，資料庫形式）由腫瘤相關肽組成，其在各種 HLA-A HLA-B 和 HLA-C 等位元基因腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽

管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮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。除了從幾種癌症組織中採集的腫瘤相關肽外，存儲庫還可能包含 HLA-A*02 和 HLA-A*24 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，它們可作為來自「非自身」抗原的重要陽性對照肽。第三，它還可對患者的免疫功能狀態得出結論。

【0408】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于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，患者腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌樣本和健康供體的血液以循序漸進的方法進行分析：

【0409】1. 惡性材料的 HLA 配體用質譜法確定

【0410】 2. 使用全基因組信使核糖核酸 (mRNA) 表達分析法用於確定惡性腫瘤組織與一系列正常器官和組織相比過度表達的基因。

【0411】 3. 確定的 HLA 配體與基因表達資料進行比較。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量表達基因所編碼的考慮為多肽疫苗的合適候選 TUMP。

【0412】 4. 文獻檢索以確定更多證據以支持確認為 TUMP 的肽的相關性

【0413】 5. 過度表達在 mRNA 水準的相關性由腫瘤組織第 3 步選定的 TUMP 重新檢測而確定，並且在健康組織上缺乏（或不經常）檢測。

【0414】 6. 為了評估透過選定的肽誘導體內 T 細胞反應是否可行，使用健康供體以及癌症患者的人 T 細胞進行體外免疫原性測定。

【0415】 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 細胞啟動，具體為：用裝載肽/MHC 複合物和抗 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。

【0416】 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。

【0417】 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。

【0418】 HLA 表型、轉錄和肽組學資料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于患者腫瘤中，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。

【0419】 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（資料庫）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（資料庫）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資料與所述腫瘤樣本組織類型相對應的正常組織樣本的表達資料相比對，以識別腫瘤組織中過量表達或異常表達的蛋白；以及（a2）將表達資料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量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。

【0420】除了使用存儲庫（資料庫）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資料與所述腫瘤樣本組織類型相對應的正常組織樣本的表達資料相比對，以識別腫瘤組織中過量表達或異常表達的蛋白；以及（a2）將表達資料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量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 方法只限于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 P B M C 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 T U M A P 用於疫苗。

【0421】 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 (T U M A P)；(b) 將 (a) 中鑒定的肽與進行腫瘤（與相應的正常組織相比）免疫原性和過量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。

【0422】 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 (T U M A P)；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。

【0423】 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 % D M S O 之間，優選為約 30 - 35 % D M S O，例如，約 33 % D M S O 中的個體肽。

【0424】 列入產品的每種肽都溶於 D M S O 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。

【0425】 最終本體溶液填充到小瓶中，在使用前儲存於 -20°C 下。一個小瓶包含 $700 \text{ }\mu\text{L}$ 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。

【0426】 本發明的肽除了用於治療癌症，也可用於診斷。由於肽由腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌細胞產生，並且已確定這些肽在正常組織中不存在或水準較低，因此這些肽可用於診斷癌症是否存在。

【0427】 血液樣本中組織活檢物含權利要求的肽，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，也可用作腦膠質細胞瘤、乳腺癌、結直腸癌、腎細胞癌、慢性淋巴細胞性白血病、肝細胞癌、非小細胞和小細胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、包括胃食管交界癌的

食管癌、膽囊癌和膽管癌、黑色素瘤、胃癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌或子宮癌的生物標誌物。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。

【0428】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，充分說明了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。

【0429】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。

【0430】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）。考慮到本發明的目的，文中引用的所有參考文獻透過引用的方式併入在本文中。

【圖式簡單說明】

【0431】圖 1A 至 T 顯示了正常組織（白色柱）和不同癌症（黑色柱）中各種肽的過量提呈。圖 1A - MET，肽：GLIAGVVSI (SEQ ID NO.:2) - 從左到右的組織：4 細胞系（1 腎，2 胰腺，1 黑色素瘤），24 癌組織（1 腦癌，1 膽囊癌，7 腎癌，1 直腸癌，1 肝癌，7 肺癌，2 胃癌，4 膀胱癌）；圖 1B) - TMM223，肽：GLLFSLRSV (SEQ ID NO.:92) - 從左到右的組織：2 細胞系（2 胰腺）1 正常組織（1 淋巴結），14 癌組織（4 白細胞白血病，2 骨髓細胞癌，1 骨髓癌，1 乳腺癌，1 淋巴結癌，1 卵巢癌，2 攝護腺癌，1 皮膚癌，1 膀胱癌）；圖 1C - PRKDC，肽：HYSQE LSLLYL (SEQ ID NO.:158) - 從左到右的組織：19 癌組織（1 腦癌，1 腎癌，2 肝癌，9 肺癌，2 攝護腺癌，4 胃癌）；圖 1D - GPX6，GPX7，肽：TYSVSFPMF (SEQ ID NO.:195) - 從左到右的組織：3 細胞系（3 良性攝護腺增生），1 正常組織（1 胃），58 癌組織（1 腦癌，2 肝癌，47 肺癌，7 攝護腺癌，1 胃癌）。圖 1E 至 R 顯示了與正常組織相比各種肽在不同癌症組織中的過度提呈。分析包括來自超過超過 490 個 A*02 陽性正常組織樣本和 70 個 A*24 陽性正常組織樣本，543 個 A*02 陽性癌症樣本和 200 個 A*24 陽性癌症樣本的資料。顯示的僅是被發現提呈肽的樣本。圖 1E) 基因符號：FEN1，肽：SIYQFLIAV (SEQ ID NO.:8) - 從左到右的組織：2 細胞系（1 血細胞，1 胰腺），14 癌組織（3 白細胞白血病，1 骨髓細胞

癌，1 乳腺癌，1 膽囊癌，1 頭頸癌，1 結腸癌，2 肺癌，3 淋巴結癌，1 子宮癌)；圖 1F) 基因符號：DERL3，肽：ALMAMLVYV (SEQ ID NO:13) - 從左到右的組織：17 癌組織 (1 膽管癌，2 乳腺癌，1 膽囊癌，3 頭頸癌，7 肺癌，1 淋巴結癌，1 卵巢癌，1 胃癌)；圖 1G) 基因符號：HEATR2，肽：ALAPHLDDA (SEQ ID NO:237) - 從左到右的組織：1 細胞系 (血細胞)，10 癌組織 (1 骨髓細胞癌，2 腦癌，1 乳腺癌，1 肺癌，1 卵巢癌，1 皮膚癌，1 膀胱癌，2 子宮癌)；圖 1H) 基因符號：SLC4A11，肽：ILLPRIIEA (SEQ ID NO:259) - 從左到右的組織：1 細胞系 (1 胰腺)，27 癌組織 (3 白細胞白血病，1 腦癌，2 乳腺癌，3 頭頸癌，1 結腸癌，1 直腸癌，6 肺癌，5 卵巢癌，1 胰腺癌，2 皮膚癌，1 胃癌，1 子宮癌)；圖 1I) 基因符號：ABCC11，肽：HLLGSGVGV (SEQ ID NO:39) - 從左到右的組織：7 癌組織 (5 乳腺癌，1 肝癌，1 皮膚癌)；圖 1J) 基因符號：PRAME，肽：VQLDSIEDLEV (SEQ ID NO:32) - 從左到右的組織：10 癌組織 (1 白細胞白血病，1 肺癌，4 卵巢癌，3 皮膚癌，1 子宮癌)；圖 1K) 基因符號：ZWILCH，肽：FYSRLLQKF (SEQ ID NO:203) - 從左到右的組織：1 細胞系 (1 良性攝護腺增生)，15 癌組織 (13 肺癌，2 胃癌)；圖 1L) 基因符號：PRC1，肽：NYYE VHKELF (SEQ ID NO:270) - 從左到右的組織：14 癌組織 (1 腦癌，11 肺癌，2 胃癌)；

圖 1 M) 基因符號：G Z M K，肽：K F S S F S L F F (S E Q I D N O : 1 6 4) - 從左到右的組織：2 細胞系 (2 良性攝護腺增生)，1 4 癌組織 (1 1 肺癌，1 攝護腺癌，2 胃癌)；圖 1 N) 基因符號：T R E X 2、H A U S 7，肽：L Y I T E P K T I (S E Q I D N O : 2 8 7) - 從左到右的組織：1 2 癌組織 (3 腦癌，1 肝癌，7 肺癌，1 胃癌)；圖 1 O) 基因符號：D N M B P，肽：R Y I S D Q L F T N F (S E Q I D N O : 2 7 8) - 從左到右的組織：1 正常組織 (1 肺)，3 1 癌組織 (2 腦癌，1 腎癌，2 肝癌，2 0 肺癌，2 攝護腺癌，4 胃癌)；圖 1 P) 基因符號：P T K 7，肽：V Y Q G H T A L L (S E Q I D N O : 2 7 7) - 從左到右的組織：2 細胞系 (2 良性攝護腺增生)，4 正常組織 (1 直腸，2 肺，1 胰腺)，6 4 癌組織 (5 腦癌，4 8 肺癌，6 攝護腺癌，5 胃癌)；圖 1 Q) 基因符號：N U P 2 1 0 P 1、N U P 2 1 0，肽：V Y V S D I Q E L (S E Q I D N O : 2 8 8) - 從左到右的組織：2 正常組織 (1 結腸，1 垂體腺)，2 1 癌組織 (1 肝癌，1 4 肺癌，1 攝護腺癌，5 胃癌)；圖 1 R) 基因符號：A T A D 2，肽：V Y T L D I P V L (S E Q I D N O : 1 6 0) - 從左到右的組織：1 7 癌組織 (1 肝癌，9 肺癌，1 攝護腺癌，6 胃癌)；圖 1 S) 基因符號：D N T T，肽：K L F T S V F G V (S E Q I D N O : 3 0 5) - 從左到右的組織：5 癌組織 (5 血細胞癌)；圖 1 T) 基因符號：A R，肽：A L L S S L N E L (S E Q I D N O : 3 0 6) - 從左到右的組織：3 細胞系 (1 腎，2 攝護腺)，4 正常組織 (1 肝，1 肺，1 卵巢，1 子宮)，2 9 癌組織 (1 膽管癌，2

血細胞癌，1 腦癌，3 乳腺癌，1 腎癌，5 肝癌，1 肺癌，1 淋巴結癌，4 卵巢癌，6 攝護腺癌，1 膀胱癌，3 子宮癌）。

【0432】圖 2A 至 I 顯示了本發明的源基因的代表性表達特徵，這些基因在一系列正常組織（白色柱）的不同癌症中以及不同癌症樣本（黑色柱）中高度過度表達或專門表達。圖 2A - TNC，肽：KLLDPQEFTL，(SEQ ID NO.:59) - 從左到右的組織：73 正常組織樣本（6 動脈，1 血細胞，1 腦，1 心臟，2 肝臟，2 肺，2 靜脈，1 脂肪組織，1 腎上腺，6 骨髓，1 軟骨，1 結腸，1 食道，2 眼睛，2 膽囊，1 腎臟，6 淋巴結，5 胰腺，2 垂體腺，1 直腸，1 唾液腺，1 骨骼肌，1 皮膚，1 小腸，1 脾，1 胃，1 甲狀腺，7 氣管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，3 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，1 胸腺，1 子宮）和 46 癌症樣本（24 腦癌，11 肺癌，11 食管癌）；圖 2B - LRRC15，肽：ILNTHITEL，(SEQ ID NO.:149) - 從左到右的組織：73 正常組織樣本（6 動脈，1 血細胞，1 腦，1 心臟，2 肝臟，2 肺，2 靜脈，1 脂肪組織，1 腎上腺，6 骨髓，1 軟骨，1 結腸，1 食道，2 眼睛，2 膽囊，1 腎臟，6 淋巴結，5 胰腺，2 垂體腺，1 直腸，1 唾液腺，1 骨骼肌，1 皮膚，1 小腸，1 脾，1 胃，1 甲狀腺，7 氣管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，3 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，1 胸腺，1 子宮）和 56 癌症樣本（10 乳腺癌，3 膽囊癌，11 胃癌，10 淋巴結癌，11 肺癌，11 食管癌），圖 2C - C1QL1，肽：TYTTVPRVAF，(SEQ ID NO.:172) - 從左到右的組織：73 正常組織樣本（6 動

脈，1 血細胞，1 腦，1 心臟，2 肝臟，2 肺，2 靜脈，1 脂肪組織，1 腎上腺，6 骨髓，1 軟骨，1 結腸，1 食道，2 眼睛，2 膽囊，1 腎臟，6 淋巴結，5 胰腺，2 垂體腺，1 直腸，1 唾液腺，1 骨骼肌，1 皮膚，1 小腸，1 脾，1 胃，1 甲狀腺，7 氣管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，3 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，1 胸腺，1 子宮）和 34 癌症樣本（24 腦癌，10 腎癌）；圖 2D - AMC2，肽：GYIDNVTLI, (SEQ ID NO.:220) - 從左到右的組織：73 正常組織樣本（6 動脈，1 血細胞，1 腦，1 心臟，2 肝臟，2 肺，2 靜脈，1 脂肪組織，1 腎上腺，6 骨髓，1 軟骨，1 結腸，1 食道，2 眼睛，2 膽囊，1 腎臟，6 淋巴結，5 胰腺，2 垂體腺，1 直腸，1 唾液腺，1 骨骼肌，1 皮膚，1 小腸，1 脾，1 胃，1 甲狀腺，7 氣管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，3 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，1 胸腺，1 子宮）和 48 癌症樣本（11 肺癌，11 食管癌，26 胰腺癌）。圖 2E - ABCC11，肽：HLLGSGVG, (SEQ ID NO.:39) - 從左到右的組織：6 動脈，2 血細胞，6 腦，4 心臟，8 肝臟，6 肺，2 靜脈，1 脂肪組織，5 腎上腺，1 膽管，5 骨髓，1 軟骨，1 胸壁和骨骼肌，1 結腸，5 食道，2 眼睛，2 膽囊，8 頭頸部，5 頭頸部和唾液腺，1 腎，6 淋巴結，4 胰腺，3 甲狀旁腺，2 外周神經，3 腹膜，2 垂體腺，3 胸膜，1 直腸，1 骨骼肌，2 皮膚，1 小腸，1 脾，1 甲狀腺，7 氣管，5 輸尿管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，5 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，2 胸腺，1 子宮和 10 個乳腺癌樣本。圖 2F - PRAME，肽：

VQLDSIEDLEV, (SEQ ID NO.:32) - 從左到右的組織：6動脈，2血細胞，6腦，4心臟，8肝臟，6肺，2靜脈，1脂肪組織，5腎上腺，1膽管，5骨髓，1軟骨，1胸壁和骨骼肌，1結腸，5食道，2眼睛，2膽囊，8頭頸部，5頭頸部和唾液腺，1腎，6淋巴結，4胰腺，3甲狀旁腺，2外周神經，3腹膜，2垂體腺，3胸膜，1直腸，1骨骼肌，2皮膚，1小腸，1脾，1甲狀腺，7氣管，5輸尿管，1膀胱，1乳腺，5卵巢，5胎盤，1攝護腺，1睪丸，2胸腺，1子宮和37個癌症樣本（10黑色素瘤，17卵巢癌，10子宮癌）。圖 2G - SPINK2，肽：ALSVLRLLAL, (SEQ ID NO.:251) - 從左到右的組織：6動脈，2血細胞，6腦，4心臟，8肝臟，6肺，2靜脈，1脂肪組織，5腎上腺，1膽管，5骨髓，1軟骨，1胸壁和骨骼肌，1結腸，5食道，2眼睛，2膽囊，8頭頸部，5頭頸部和唾液腺，1腎，6淋巴結，4胰腺，3甲狀旁腺，2外周神經，3腹膜，2垂體腺，3胸膜，1直腸，1骨骼肌，2皮膚，1小腸，1脾，1甲狀腺，7氣管，5輸尿管，1膀胱，1乳腺，5卵巢，5胎盤，1攝護腺，1睪丸，2胸腺，1子宮和11個急性髓樣白血病樣本。圖 2H - MAGEC2，肽：TLDEKVAEL, (SEQ ID NO.:24) - 從左到右的組織：6動脈，2血細胞，6腦，4心臟，8肝臟，6肺，2靜脈，1脂肪組織，5腎上腺，1膽管，5骨髓，1軟骨，1胸壁和骨骼肌，1結腸，5食道，2眼睛，2膽囊，8頭頸部，5頭頸部和唾液腺，1腎，6淋巴結，4胰腺，3甲狀旁腺，

2 外周神經，3 腹膜，2 垂體腺，3 胸膜，1 直腸，1 骨骼肌，2 皮膚，1 小腸，1 脾，1 甲狀腺，7 氣管，5 輸尿管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，5 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，2 胸腺，1 子宮和 29 個癌症樣本（19 肝癌，10 黑色素瘤）。圖 2 I - C1orf186，肽：FLTAINYLL, (SEQ ID NO.:72) - 從左到右的組織：6 動脈，2 血細胞，6 腦，4 心臟，8 肝臟，6 肺，2 靜脈，1 脂肪組織，5 腎上腺，1 膽管，5 骨髓，1 軟骨，1 胸壁和骨骼肌，1 結腸，5 食道，2 眼睛，2 膽囊，8 頭頸部，5 頭頸部和唾液腺，1 腎，6 淋巴結，4 胰腺，3 甲狀旁腺，2 外周神經，3 腹膜，2 垂體腺，3 胸膜，1 直腸，1 骨骼肌，2 皮膚，1 小腸，1 脾，1 甲狀腺，7 氣管，5 輸尿管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，5 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，2 胸腺，1 子宮和 49 個癌症樣本（11 急性骨髓性白血病樣本，17 卵巢癌樣本，11 腎細胞癌樣本，10 子宮癌樣本）。

【0433】圖 3 顯示了示例性的免疫原性資料：肽特定多聚體染色後流式細胞儀結果。

【0434】圖 4A 至 D 顯示了健康 HLA-A*02+ 供應的肽特異性 CD8+ T 細胞體外反應的示例性結果。CD8+ T 細胞製備的方法為：使用抗 CD28 mAb 和 HLA-A*02 塗層的人工 APC 分別與 SeqID No 27 肽（A，左圖）、SeqID No 229 肽（B，左圖）、SeqID No 230 肽（C，左圖）和 SeqID No 235（D，左圖）合成。經過 3 個週期的刺激後，用 A*02/SeqID No 27

(A)、A*02/SeqID No 229 (B)、A*02/SeqID No 230 (C) 或 A*02/SeqID No 235 (D) 的 2D 多聚體染色法對肽反應性細胞進行檢測。右圖 (A、B 和 C) 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。

【0435】 圖 5A 至 C 顯示了健康 HLA-A*24+ 供體的肽特異性 CD8+ T 細胞體外反應的示例性結果。CD8+ T 細胞製備的方法為：使用抗 CD28 mAb 和 HLA-A*24 塗層的人工 APC 分別與 SeqID No 159 肽 (A, 左圖) 或 SeqID No 161 肽 (B, 左圖) 和 SeqID No 281 肽 (C, 左圖) 合成。經過 3 個週期的刺激後，用 A*24/SeqID No 159 (A)、A*24/SeqID No 161 (B) 或 A*24/SeqID No 281 (D) 的 2D 多聚體染色法對肽反應性細胞進行檢測。右圖 (A、B 和 C) 顯示用不相關 A*24/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。

【實施方式】

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

患者的腫瘤組織的獲得自：

【0436】 Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK)、Bio-Options Inc. (Brea, CA, USA)、BioServe (Beltsville, MD, USA)、癌症免疫治療中心 (CCIT)、Herlev 醫院 (Herlev, Denmark)、Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA)、Indivumed GmbH (Hamburg, Germany)、Istituto Nazionale Tumori "Pascali" (Naples, Italy)、京都府立醫科大學 (KPUM) (Kyoto, Japan)、萊頓大學醫療中心 (LUMC) (Leiden, Netherlands)、ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA)、Saint Savas 醫院 (Athens, Greece)、斯坦福癌症中心 (Stanford, CA, USA)、Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK)、波恩大學醫院 (Bonn, Germany)、日內瓦大學醫院 (Geneva, Switzerland)、海德堡大學醫院 (Heidelberg, Germany)、慕尼黑大學醫院 (Munich, Germany)、大阪市立大學 (OCU) (Osaka, Japan)、蒂賓根大學醫院 (Tbingen, Germany)、瓦爾德希布倫大學醫院 (Barcelona, Spain)。

【0437】 正常組織獲得自

【0438】 Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK) 、 BioCat GmbH (Heidelberg, Germany) 、 Bio-Options Inc. (Brea, CA, USA) 、 BioServe (Beltsville, MD, USA) 、 Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, USA) 、 Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA) 、 京都府立醫科大學 (KPUM) (Kyoto, 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) 、 慕尼黑大學醫院 (Munich, Germany) 、 大阪市立大學 (OCU) (Osaka, Japan) 、 蒂賓根大學醫院 (Tübingen, Germany) 。

【0439】 所有患者在手術或屍檢前都給予了書面知情同意。切除後組織立即進行冷休克處理，在分離 TUMAP 前儲存於 -70°C 或以下。

【0440】 如果以下三個條件是真實的，則選擇肽：(1) 其潛在轉錄物和/或外顯子表達水準低，對於以下器官，每百萬讀數每千城基讀數中值 (RPKM) 要求小於 10：腦、血管、心臟、肝、肺、血液。此外，對於以下器官的中位 RPKM 要求小於 50：膀胱、唾液腺、胃、腎上腺、結腸、小腸、脾、骨髓、胰腺、肌肉、脂肪組織、皮膚、食管、腎、甲狀腺、腦垂體、神經。(2) 如果腫瘤樣本中表達水準的最高 90% 百分位數 (基於由 TCGA 研究網

路：<http://cancergenome.nih.gov/> 產生的資料）比基於覆蓋約 3000 個正常組織樣本的 RNAseq 資料庫中正常樣本確定的表達水準最高 75% 百分位高 6 倍以上，其潛在的轉錄物和 / 或外顯子則視為過度表達（Lonsdale, 2013）。(3) 肽與腫瘤相關，即，特異發現或在腫瘤上或與基線正常組織相比過度表達（參照實施例 1）。

【0441】 HLA-A*02 TUMAP 選擇的樣本數量為：胰腺癌 N=16，腎癌 N=20，結直腸癌 N=28，包括胃食管交界癌的食管癌 N=17，攝護腺腫瘤 N=39，肝細胞癌 N=16，非小細胞肺癌 N=90，胃癌 N=29，乳腺癌 N=17，黑色素瘤 N=7，卵巢癌 N=20，慢性淋巴細胞性白血病 N=17，膀胱癌 N=16，小細胞肺癌 N=19，膽囊癌和膽管癌 N=6，急性骨髓性白血病 N=18，腦膠質細胞瘤 N=41，睪丸癌 N=1，非霍奇金淋巴瘤 N=18，子宮癌 N=15，正常組織 N=262。

【0442】 HLA-A*24 TUMAP 選擇的樣本數量為：胃癌 N=44，攝護腺腫瘤 N=40，非小細胞肺癌 N=91，肝細胞癌 N=15，腎癌 N=2，結直腸癌 N=1，腦膠質細胞瘤 N=18，正常組織 N=70。

【0443】 圖 1 還顯示了包括腎癌細胞系、黑色素瘤細胞系、胰腺癌細胞系和良性攝護腺增生細胞系的結果。從組織樣本中分離 HLA 肽

【0444】 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、CNBr 活化的瓊脂糖凝膠、酸處理和超濾方法以免疫沉澱法從實體組織中獲得了冷凍組織樣本的 HLA 肽庫。

質譜分析

【0445】 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 x 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) 策略在資料依賴模式下操作 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 ($R = 30000$), 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 ($R = 7500$)。串聯質譜以 SEQUEST 和另一種手動控制

器進行解讀。生成的自然肽破碎模式與合成序列相同參考肽的破碎模式進行比較後，確保了被識別的肽序列。

【0446】 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資料與肽呈遞特徵結合。定量資料根據集中資料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資料相關，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資料進行手動檢查，以確保資料的一致性，並驗證自動化分析的準確度。對於每種肽，計算了提呈圖，其顯示樣本平均提呈量以及複製變化。這些特徵使不同樣本與正常組織樣本的基線值並列。

【0447】 示範性過度提呈肽的提呈譜示於圖 1 中。示範性肽的提呈分數見表 15 和表 16。

【0448】 表 13（A 和 B）和圖 14（A 和 B）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特別相關性用於診斷和/或治療所示的癌症（例如，肽序列號 1 用於膠質母細胞瘤、非小細胞肺癌和卵巢癌，肽序列號 2 用於膠質母細胞瘤、胃癌、非小細胞肺癌、膀

胱癌、膽囊腺癌和膽管癌、腎細胞癌、結直腸癌和胰腺癌)。

【0449】表 13A：本發明選定 HLA-A*02 結合腫瘤相關肽在各種實體中提呈概述。

【0450】GB = 膠質母細胞瘤，BRCA = 乳腺癌，CRC = 結直腸癌，RCC = 腎細胞癌，CLL = 慢性淋巴細胞性白血病，HCC = 肝細胞癌，NSCLC = 非小細胞肺癌，SCLC = 小細胞肺癌，NHL = 非霍奇金淋巴瘤，AML = 急性骨髓性白血病，OC = 卵巢癌，PC = 胰腺癌，PCA = 攝護腺癌和良性攝護腺增生，OSCAR = 食管癌，包括胃食管交界處癌，GBC_CCC = 膽囊腺癌和膽管癌，MEL = 黑色素瘤，GC = 胃癌，UBC = 膀胱癌，UTC = 子宮癌。

序列 ID 號	序列	癌症實體上的肽提呈
1	LLYPEPWSV	GB, NSCLC, OC
2	GLIAGVVS	GB, GC, NSCLC, UBC, GBC_CCC, RCC, CRC, PC
3	KLEENGDLYL	NSCLC, OC, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, NHL
4	KLMPGTYTL	NSCLC, OC, UEC, AML, NHL
5	GIVAHIQEV	GC, NSCLC, PCA, CLL, OSCAR, OC, CRC, AML, NHL
6	ALFDSL RHV	GB
7	ILDHEVPSL	NSCLC, CLL, OSCAR, OC, UBC, MEL, RCC, AML,
8	SIYQFLIAV	NSCLC, CLL, GBC_CCC, AML, NHL
9	FLVDGSYSI	NSCLC, OSCAR, GBC_CCC, CRC
10	GIAGSLKTV	NSCLC, OSCAR, UBC, UEC, CRC, AML
11	ALSPSYLTV	GC, NSCLC, CLL, BRCA, GBC_CCC, NHL
12	GLLPLLHRA	GB, NSCLC, UEC, RCC
13	ALMAMLVYV	GC, NSCLC, OC, SCLC, BRCA, GBC_CCC
14	ILAKDLFEI	NSCLC, HCC, OSCAR, UBC, AML, NHL
15	YLDLSHNQL	NSCLC, CLL, BRCA, GBC_CCC
16	YTLDIPVLFV	NSCLC, HCC, CLL, MEL, NHL
17	AVFPDDMPTL	GC, NSCLC, OSCAR, OC, NHL
18	ILLDLTDNRL	NSCLC, OSCAR, UBC, BRCA, MEL, RCC, CRC
19	SISDNVWEV	GB, OSCAR, OC, UEC, BRCA, MEL, NHL
20	GLSQITNQL	CLL, UBC, NHL
21	AIQDEIRSV	GB, NSCLC, OSCAR, OC, BRCA, NHL

22	FVDPNTQEKV	GC, HCC, OSCAR, OC, UBC, BRCA,
23	SLFSDEFKV	NSCLC, OSCAR, UBC, RCC, CRC, AML,
24	TLDEKVAEL	NSCLC, HCC, OSCAR, MEL,
25	TMDSVLVTV	OC, UEC
26	ALQEELTEL	BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
27	RLMEENWNA	NSCLC, OSCAR, OC, UEC, CRC
28	SLPNGKPVSV	NSCLC, OC, UBC, NHL
29	YLLDPSITL	NSCLC, CLL, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
30	AMIEEVFEA	PCA, OC, SCLC, UBC, BRCA, MEL
31	TITETTVEV	GB
32	VQLDSIEDLEV	CLL, OC
33	YIKTELISV	GC, NSCLC, OSCAR, OC, NHL
34	FLLATEVVTV	OC, SCLC, AML, NHL
35	FLLPFSTVYL	NSCLC, CLL, OC, AML, NHL
36	SLADTNSLAVV	SCLC, MEL
37	ILAPFSVDL	AML
38	FLGPRIIGL	CLL, AML, NHL
39	HLLEGSVGV	BRCA
40	VLIDPQWVLTA	OC, NHL
41	ALFENTPKA	GB
42	LLDSVSRL	NSCLC, GBC_CCC, CRC
43	KAIEVLLTL	GC, OSCAR, AML
44	SLFETAWEA	NSCLC, MEL, AML, NHL
45	SLTEVSLPL	OC, GBC_CCC, AML, NHL
46	SQFPLPLAV	GC, NSCLC, OSCAR, UBC
47	ALLERGELFV	NSCLC, CLL, OC, NHL
48	QVIEDSTGV	GC, NSCLC, OSCAR, OC
49	ALNIATHVL	NSCLC, CLL, UBC, NHL
50	ILFHGVFYA	NSCLC, OC, UBC, BRCA
51	LLFSRLCGA	GB, NSCLC
52	RLAVLFSGA	GC, NSCLC, OSCAR, OC
53	KMVGLVVAI	CLL, AML, NHL
54	VLNPLITAV	NSCLC, PCA, AML, NHL
55	SLATKIVEA	PCA, OC, BRCA, AML
56	FLHDEKEGIYI	NSCLC, OC, NHL
57	TVFTDHMLTV	NSCLC, OSCAR, OC, NHL
58	YLLPLLPAL	GB
59	KLLDPQEFTL	GB, NSCLC
60	ALFAPLVHL	AML
61	AIVKEIVNI	GC, NSCLC, OSCAR
62	ALNPELVQA	GB, NSCLC, RCC
63	SQIPAQPSV	GC, NSCLC, OSCAR
64	SLFPDSLIV	PCA
65	SVVPDVRSV	GC, NSCLC, OSCAR
66	KLIFSVEAV	NSCLC, SCLC, UEC, BRCA
67	TLLQRLTEV	NSCLC, CLL, RCC, AML

68	SLSNRLYYL	GC, OSCAR, CRC
69	FLAVGLVDV	AML, NHL
70	LLLGDSALYL	RCC, NHL
71	VLHSKFWVV	CLL, NHL
72	FLTAINYLL	OC, RCC
73	YTLREVDTV	NSCLC, OSCAR, OC
74	TLFGYSVVL	AML
75	AVIKFLELL	GC, NSCLC, OSCAR
76	AVGPVHNSV	GC, OSCAR
77	TLIDEQDIPLV	NSCLC, OC, SCLC
78	TVVTRLDEI	GC, OSCAR, OC
79	VTFKEYVTV	GC, NSCLC, OSCAR
80	KLYEADFVL	NSCLC, AML, NHL
81	NALDKVLSV	GC, NSCLC, OSCAR
82	FIFDEAEKL	GC, NSCLC, OSCAR
83	GQASYFYVA	CRC, AML
84	ALCPRIHEV	GB
85	VLNDILVRA	OC, UEC
86	SVDSHFQEV	GC, OSCAR, OC
87	TIYKDFVYI	GC, NSCLC, OSCAR
88	AQADHLPQL	GC, NSCLC, OSCAR
89	QLAPVFQRV	CLL, OC, NHL
90	FLQDLEQRL	GC, NSCLC, PCA, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UEC, BRCA, GBC_CCC, CRC, NHL
91	KLFDESILI	GC, NSCLC, PCA, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UEC, BRCA, AML, NHL
92	GLLFSLRSV	NSCLC, HCC, PCA, CLL, OSCAR, OC, UBC, BRCA, MEL, RCC, CRC, AML, NHL
93	QVLELDVADI	GC, NSCLC, PCA, SCLC, UBC, UEC, BRCA, CRC, AML, NHL
94	LLPAVPVGA	GB, NSCLC, OC, UBC, CRC, AML
95	GLLGSLFFL	NSCLC, OC, SCLC, UEC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
96	LLVSHLYLV	NSCLC, CLL, OC, UBC, NHL
97	STLPKSLSL	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA, OSCAR, OC, BRCA, NHL
98	RLFPDFFTRVAL	NSCLC
99	YLLQSVNQLLL	NSCLC, CLL, NHL
100	ALLGMIIVGV	PCA, SCLC, BRCA
101	ALADFMLSL	AML
102	VLLDIQEVFQI	AML
103	YLVSEIFKA	AML
104	ALISWQPPRA	GB
105	ALLGTKILL	NHL
106	FINDSIVYL	AML
107	LLVPTSGIYFV	NHL
108	ILLKNLVTI	BRCA
109	SLDPSVTHL	UEC
110	FLLGVSKEV	MEL
111	AIVDLIHDI	GC, NSCLC, OSCAR

112	SLGKFTFDV	NSCLC, UEC
113	FLERGLESA	GC, OSCAR, UBC
114	QLIQT LHAV	OC, RCC
115	SLDPDTLPAV	NSCLC, OC
116	TIDESGSIL	UBC, NHL
117	KMPDV E L F V	NSCLC
118	QLWQFLVTL	OC
119	FIIQGLRSVGA	NSCLC, OC
120	VTPVTVSAV	GC, OSCAR
121	FTIFRTISV	CLL
122	GVVDPVHGV	GC, NSCLC, OSCAR
123	VLDPALPALV	OC, UBC
124	KVMATIEKV	NSCLC, OC
125	SLADYEHFV	GB, PCA
126	QMFQYFITV	NSCLC, CLL
127	KLDGNELDL	NSCLC
128	TQSPATLSV	GC, OSCAR
129	RLQDILWFL	NSCLC, AML
130	SLLGGTFVGI	UBC
131	VTSNSGILGV	CLL, NHL
132	ILGEVLAQL	CLL, NHL
133	ALLPRLHQL	PCA
134	GLAVPTPSV	NSCLC, OC
135	HLSTIIHEA	NSCLC, CLL
136	FLFGGVLMTL	OC, NHL
137	EIASITEQL	GB, NSCLC
138	ALLAKILQI	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, RCC, CRC, AML, NHL
139	FLLPTGAEA	GC, NSCLC, HCC, PCA, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UEC, BRCA, MEL, RCC, CRC, PC, AML, NHL
140	VLLEELEAL	NSCLC, PCA, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UEC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
141	FLDKVLVAA	GC, NSCLC, PCA, CLL, OSCAR, UBC, RCC, AML, NHL
142	ILVEGISTV	GB, NSCLC, PCA, OC, SCLC, BRCA, GBC_CCC
143	ALLPELREV	GB, GC, NSCLC, HCC, BRCA, GBC_CCC, RCC, CRC
144	ALLAFFPGL	GB, GC, NSCLC, OSCAR, OC, UBC, BRCA, MEL, CRC, PC, AML, NHL
145	YLWATIQR I	NSCLC, OSCAR, OC, AML
146	ALHFSEDEI	PCA, UEC
147	YLMDDTVEI	OC, GBC_CCC
148	MLAGIAITV	GB, GBC_CCC
149	ILNTHITEL	NHL
150	VLYDRPLKI	NSCLC, CLL, OSCAR, OC, MEL, RCC, CRC, NHL
151	SVLDSTAKV	GC, NSCLC, OSCAR, OC, UBC, BRCA, RCC, CRC, NHL
152	MMVGDLLEV	GB, GC, NSCLC, CLL, MEL, CRC, AML, NHL
153	FISERVEVV	NSCLC, PCA, CLL, OSCAR, OC, UBC, NHL
154	RLLGTEFQV	NSCLC, HCC, MEL,

155	LLNPVVEFV	CLL, OC, GBC_CCC, NHL
156	ILGDLSHLL	NSCLC, PC
157	TLTSLLAQA	UBC
229	AILAHLNTV	GB, NSCLC, HCC, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, BRCA, CRC, AML, NHL
230	KLQNIMMLL	NSCLC, HCC, CLL, UBC, BRCA, GBC_CCC, RCC, CRC, AML, NHL
231	MLDKYSHYL	NSCLC, CLL, OSCAR, OC, NHL
232	KIFPAALQLV	NSCLC, HCC, CLL, OC, SCLC, UBC, UEC, GBC_CCC, CRC, NHL
233	HLFDAFVSV	NSCLC, UBC, BRCA, CRC, AML, NHL
234	LLSPHPAL	NSCLC, CLL, OSCAR, OC, UBC, BRCA, NHL
235	KIIDFLSAL	OC, UEC, AML, NHL
236	STIAILNSV	GB, GC, NSCLC, PCA, CLL, OSCAR, NHL
237	ALAPHLDDA	GB, NSCLC, HCC, OC, UBC, UEC, BRCA, MEL
238	GLYERPTAA	NSCLC, PCA, PC, AML
239	KMNESTRSV	NSCLC, GBC_CCC, NHL
240	YMGECKLIASV	NSCLC, CLL, OC, UBC, MEL,
241	KTIQQLETV	NSCLC, OC, NHL
242	WLYGEDHQI	NSCLC, UEC, AML
243	FMADDIFSV	NHL
244	YLLEKNRVV	NSCLC, OSCAR, OC
245	SLLDLPLSL	CLL, NHL
246	TVSDVLNSV	GB, NSCLC, CLL
247	ALYEGYATV	NSCLC, HCC, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UEC, BRCA, GBC_CCC, MEL, RCC, CRC, PC, NHL
248	YLDRFLAGV	GB, NSCLC, PCA, CLL, CRC, AML, NHL
249	GLCERLVSL	GB, NSCLC, CLL, RCC, CRC
250	SLAPATPEV	MEL, NHL
251	ALSVLRLAL	AML
252	RLMEICESL	AML
253	ALAEIDNSL	CLL
254	KLQGKLPEL	NSCLC, NHL
255	SLLHFTENL	AML, NHL
256	SLGEEQFSV	MEL, NHL
257	GLYTDPCGV	NSCLC, NHL
258	LLSERFINV	HCC, PCA
259	ILLPRIIEA	NSCLC, OC
260	ILLEKILSL	NSCLC, CRC
261	QLQDRVYAL	NSCLC, HCC, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, BRCA, RCC, CRC, NHL
262	FMVDKAIYL	GC, NSCLC, PCA, OSCAR, OC, SCLC, BRCA, GBC_CCC, CRC, PC, NHL
263	VLLSEQGDVKL	NSCLC, PCA, CLL, OSCAR, OC, MEL, NHL
264	KLFPQETLFL	NSCLC, CLL, OSCAR, AML, NHL
265	NTCPYVHNI	GB, CLL
266	YAIGLVMRL	CLL, BRCA, AML

290	KIVDFSYSV	GB, GC, NSCLC, HCC, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UEC, BRCA, MEL, CRC, AML, NHL
291	KLDETGNSL	GB, GC, NSCLC, HCC, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UEC, MEL, RCC, CRC, PC, AML, NHL
292	GMMTAILGV	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA, CLL, UEC, GBC_CCC, RCC, CRC, PC, AML, NHL
293	FLVDGSWSI	GB
294	GLMKYIGEV	PCA

【0451】表 13B 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特別相關性用於診斷和/或治療所示的癌症。

【0452】表 13B：本發明選定 HLA-A*02 結合腫瘤相關肽在各種實體中提呈概述。

【0453】GB = 膠質母細胞瘤，BRCA = 乳腺癌，CRC = 結直腸癌，RCC = 腎細胞癌，CLL = 慢性淋巴細胞性白血病，HCC = 肝細胞癌，NSCLC = 非小細胞肺癌，SCLC = 小細胞肺癌，NHL = 非霍奇金淋巴瘤，AML = 急性骨髓性白血病，OC = 卵巢癌，PC = 胰腺癌，PCA = 攝護腺癌和良性攝護腺增生，OSCAR = 食管癌，包括胃食管交界處癌，GBC_CCC = 膽囊腺癌和膽管癌，MEL = 黑色素瘤，GC = 胃癌，UBC = 膀胱癌，UEC = 子宮癌。

SEQ ID No.	序列	癌症實體上肽提呈
1	LLYPEPWSV	SCLC, UEC, HNSCC
2	GLIAGVVS	HCC, UEC, HNSCC
3	KLEENGDLYL	HCC, UEC, AML, HNSCC
4	KLMPGTYTL	MEL, HNSCC
5	GIVAHIQEV	UEC, MEL
7	ILDHEVPSL	HNSCC
8	SIYQFLIAV	UEC, BRCA, CRC, HNSCC
10	GIAGSLKTV	SCLC, MEL, AML
11	ALSPSYLTV	HNSCC
12	GLLPLLHRA	MEL, RCC
13	ALMAMLVYV	GBC_CCC, MEL, NHL, HNSCC
14	ILAKDLFEI	SCLC
15	YLDLSHNQL	OSCAR, GBC_CCC, HNSCC

16	YTL DIPVLFGV	HNSCC
18	ILLDLTDNRL	AML, HNSCC
19	SISDNVWEV	HNSCC
20	GLSQITNQL	MEL, AML
21	AIQDEIRSV	MEL, CRC, AML
22	FVDPNTQEKV	HNSCC
23	SLFSDEFKV	MEL
26	ALQEELTEL	NSCLC, CRC, HNSCC
28	SLPNGKPVSV	OSCAR, SCLC, HNSCC
29	YLLDPSITL	HCC, SCLC, MEL, HNSCC
30	AMIEEVFEA	NSCLC, HCC, UEC, GBC_CCC, NHL, HNSCC
32	VQLDSIEDLEV	NSCLC, OC, UEC, MEL
33	YIKTELISV	HCC
35	FLLPFSTVYL	HNSCC
38	FLGPRIIGL	CRC
39	HLLEGSVGV	HCC, MEL
40	VLIDPQWVLTA	CRC
42	LLDSVSRL	CRC
43	KAIEVLLTL	NSCLC, AML
44	SLFETAWEA	UEC, CRC, HNSCC
45	SLTEVSLPL	NSCLC, CRC, HNSCC
46	SQFPLPLAV	MEL, HNSCC
47	ALLERGELFV	OSCAR, UBC, AML
48	QVIEDSTGV	OC
49	ALNIATHVL	CRC
50	ILFHGVFYA	SCLC
51	LLFSRLCGA	UEC
52	RLAVLFSGA	HCC
53	KMVGLVVAI	MEL
54	VLNPLITAV	HCC, SCLC, UEC, MEL, RCC
55	SLATKIVEA	AML
56	FLHDEKEGIYI	AML
60	ALFAPLVHL	NHL
63	SQIPAQPSV	AML, HNSCC
64	SLFPDSLIV	NSCLC, HCC, BRCA, PC
66	KLIFSVEAV	OC, UBC, BRCA
67	TLLQRLTEV	NHL
69	FLAVGLVDV	SCLC
70	LLLGDSALYL	CRC
72	FLTAINYLL	UEC, RCC, AML
73	YTLREVDTV	AML
76	AVGPVHNSV	NSCLC
77	TLIDEQDIPLV	SCLC, NHL, HNSCC
85	VLNDILVRA	UEC
86	SVDSHFQEV	NSCLC, OC
87	TIYKDFVYI	OC

90	FLQDLEQRL	HNSCC
91	KLFDESILI	HCC, HNSCC
92	GLLFSLRSV	SCLC, HNSCC
93	QVLELDVADI	HNSCC
94	LLPAVPVGA	SCLC
95	GLLGSFLFL	GC, OSCAR, UBC, MEL, RCC, CRC, PC, HNSCC
96	LLVSHLYLV	UEC, CRC, HNSCC
98	RLFPDFFTRVAL	NSCLC
100	ALLGMIIVGV	HCC, AML
106	FINDSIVYL	NSCLC, HCC, CRC, NHL
110	FLLGVSKEV	NHL
116	TIDESGSIL	MEL, AML
117	KMPDVELFV	NSCLC, SCLC, MEL
118	QLWQFLVTL	MEL
123	VLDPALPALV	NSCLC, UEC, HNSCC
126	QMFQYFITV	UEC
130	SLLGGTFVGI	HCC
134	GLAVPTPSV	HNSCC
135	HLSTIIHEA	CLL, UEC
138	ALLAKILQI	HNSCC
139	FLLPTGAEA	GBC_CCC, HNSCC
140	VLLEELEAL	HCC, CRC, HNSCC
141	FLDKVLVAA	HCC, OC, UEC, BRCA, MEL, CRC, HNSCC
143	ALLPELREV	OC, SCLC, AML, HNSCC
145	YLWATIQRI	UEC
148	MLAGIAITV	GBC_CCC, NHL
149	ILNTHITEL	BRCA
150	VLYDRPLKI	HCC, SCLC, UEC, BRCA
151	SVLDSTAKV	HCC, UEC, GBC_CCC, MEL, HNSCC
152	MMVGDLEEV	UEC, HNSCC
153	FISERVEVV	SCLC, UEC
154	RLLGTEFQV	SCLC
155	LLNPVVEFV	NSCLC, HCC, BRCA, CRC, HNSCC
157	TLTSLAQA	NSCLC, CRC, HNSCC
229	AILAHLNTV	UEC, HNSCC
230	KLQNIMMLL	HNSCC
233	HLFDAFVSV	MEL
234	LLSPHPAL	GB, HCC, SCLC, UEC, MEL, RCC
235	KIIDFLSAL	NSCLC, HCC, MEL, HNSCC
236	STIAILNSV	MEL
237	ALAPHLDDA	SCLC, AML
238	GLYERPTAA	GC, MCC, OSCAR, CRC, NHL
239	KMNSTRSV	GB, CRC
240	YMGEKLIASV	UEC, NHL
243	FMADDIFSV	SCLC
244	YLLEKNRVV	HNSCC

245	SLLDLPLSL	NSCLC, RCC, AML, HNSCC
247	ALYEGYATV	AML, HNSCC
248	YLDRFLAGV	SCLC, HNSCC
249	GLCERLVSL	MEL, NHL, HNSCC
250	SLAPATPEV	BRCA, HNSCC
252	RLMEICESL	UEC, MEL
253	ALAELIDNSL	NSCLC, AML
254	KLQGKLPEL	UEC, AML
255	SLLHFTENL	NSCLC, CRC
257	GLYTDPCGV	HNSCC
259	ILLPRIIEA	GB, GC, CLL, SCLC, UEC, BRCA, MEL, CRC, PC, HNSCC
260	ILLEKILSL	GC, HCC, PCA, CLL, OC, SCLC, UEC, BRCA, GBC_CCC, MEL, PC, AML, NHL, HNSCC
261	QLQDRVYAL	MEL
262	FMVDKAIYL	UEC, MEL, HNSCC
263	VLLSEQGDVKL	UEC, AML
266	YAIGLVMRL	HCC, GBC_CCC, MEL
305	KLFTSVFGV	AML
306	ALLSSLNEL	AML, PCA, BRCA, GBC_CCC, HCC, NHL, NSCLC, OC, GB, RCC, UBC, UEC

【0454】 表 14A：本發明選定 HLA-A*24 結合腫瘤相關肽在各種實體中提呈概述。

【0455】 GB = 腦膠質細胞瘤，HCC = 肝細胞癌，NSCLC = 非小細胞肺癌，PCA = 攝護腺癌，GC = 胃癌，CRC = 結直腸癌，RCC = 腎細胞癌。

序列 ID 號	序列	癌症實體上的肽提呈
158	HYSQELSLLYL	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA, RCC
159	LYNKGFIYL	GB, NSCLC, RCC
160	VYTLDIPVL	GC, NSCLC, HCC, PCA
161	IYLVSIPEL	GC, NSCLC, PCA
162	VFTRVSSFL	GB, GC, NSCLC
163	DYLGKGLASF	GB, GC, NSCLC
164	KFSSFSLFF	GC, NSCLC, PCA
165	DYTTWTALL	GC, NSCLC
166	YYVESGKLF	GB, NSCLC, HCC
167	NYINRILKL	GC
168	KYQDILETI	NSCLC, PCA
169	AYTLIAPNI	GC, NSCLC, HCC

170	VYEDQVGKF	GB, NSCLC
171	LFIPSSKLLFL	NSCLC, HCC, RCC
172	TYTTVPRVAF	GB, RCC
173	IYSWILDHF	GC, NSCLC, HCC, RCC
174	VYVGGGQIIHL	GB, GC, NSCLC
175	YYEVHKELF	GC, NSCLC, HCC
176	EYNQWFTKL	GC, NSCLC
177	VYPWLGALL	GC
178	IFIEVFSHF	GC, NSCLC
179	MYDSYWRQF	GB, NSCLC
180	IYDDSFIRPVTf	NSCLC, HCC
181	LYLDIINLF	GC, NSCLC, PCA
182	IYQLDTASI	GC, NSCLC, PCA
183	VFTSTARAF	NSCLC, PCA
184	VFQNFPLLF	GB, GC
185	IYKVGAPTI	NSCLC
186	IFPQFLYQF	GC, NSCLC
187	TYLRDQHFL	GC, NSCLC, HCC
188	RYFKGLVF	GB
189	WYVNGVNYF	NSCLC, PCA
190	GFFIFNERF	NSCLC, PCA
191	VFKASKITF	GB
192	SYALLTYMI	NSCLC
193	RFHPTPLLL	NSCLC, HCC, PCA
194	EFGSLHLEFL	GB
195	TYSVSFPMF	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA
196	LYIDRPLPYL	GC, NSCLC, HCC, PCA, RCC
197	EYSLFPGQVVI	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA
198	LYLDKATLI	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA
199	RYAEEVGIF	GC, NSCLC, HCC, PCA
200	YYGPSLFL	GC, NSCLC, RCC
201	IYATEAHVF	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA
202	VYWDSAGAAHF	NSCLC
203	FYSRLLQKF	GC, NSCLC
204	TYELRYFQI	GB, GC, NSCLC, HCC
205	VHIPEVYLI	GC, NSCLC
206	EYQENFLSF	NSCLC, PCA
207	AYVVVFVSTL	GB, GC, NSCLC
208	TYTQDFNKF	NSCLC, HCC
209	TYKDEGNDYF	GB, NSCLC
210	IYTMiYRNL	GB, GC, NSCLC
211	YYLEVgKTLI	GC, NSCLC, HCC
212	YYTFHFLYF	GC, NSCLC, HCC
213	IFDEAEKL	NSCLC, PCA
214	LYLKLWNLI	NSCLC, HCC
215	YFDKVVTl	NSCLC, HCC

216	QYSSVFKSL	GB, GC
217	FFPPTRQMGLLF	GC
218	YYKSTSSAF	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA
219	EYPLVINTL	GB, GC, NSCLC, HCC, RCC
220	GYIDNVTLI	GC, NSCLC, HCC
221	RYSTGLAGNLL	GB, NSCLC, HCC, PCA
222	TFSVSSHLLF	GB, NSCLC, HCC
223	KYIPYKYVI	NSCLC, HCC
224	QYLENLEKL	GB, NSCLC, HCC
225	YYVYIMNHL	GB, NSCLC
226	VYRDETGELF	GB, NSCLC, HCC, PCA
227	IFLDYEAGTLSF	GC, RCC
228	KYT SWYVAL	GB, PCA
267	KYMVYPQTF	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA
268	QYLGQIQHI	GB, GC, NSCLC, HCC
269	YFIDSTNLKTHF	GC, NSCLC, HCC
270	NYEVEHKELF	GB, GC, NSCLC
271	LYHDIFSRL	GC, NSCLC, HCC
272	QYLQDAYSF	GB, NSCLC
273	TYIKPISKL	GB, NSCLC
274	AYLHSHALI	NSCLC, PCA
275	EYINQGDLHEF	NSCLC, PCA
276	VYGFQWRHF	NSCLC
277	VYQGHTALL	GB, GC, NSCLC, PCA
278	RYISDQLFTNF	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA, RCC
279	TYIESASEL	NSCLC, RCC
280	RYPDNLKHLYL	GC, NSCLC, HCC
281	PYRLIFEKF	NSCLC, HCC
282	KFVDSTFYL	GB, GC, NSCLC, HCC
283	TYGDAGLTYTF	GB, GC, NSCLC, PCA, RCC
284	RYLNKAFHI	PCA
285	HYPPVQVLF	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA
286	RYPDNLKHL	NSCLC, HCC, PCA
287	LYITEPKTI	GB, GC, NSCLC, HCC
288	VYVSDIQEL	GC, NSCLC, HCC, PCA
289	KYPVEWAKF	PCA, RCC
295	YYPGVILGF	GB, NSCLC, RCC
296	TYVDSSHTI	GB, GC, NSCLC, HCC, PCA
297	PFLQASPHF	GC, NSCLC
298	RYLEGTSCI	GB, GC, NSCLC, HCC
299	VYFVAPAKF	GC, NSCLC
300	AYVLRLETL	GB, GC, NSCLC, RCC
301	AYKPGALTF	NSCLC, HCC
302	RYMPPAHRNF	GC, NSCLC

【0456】 表 14B 顯示選定肽在其他癌症實體中的提呈，因此顯示所提及的肽特別相關性用於診斷和/或治療所示的癌症。

【0457】 表 14B：本發明選定 HLA-A*24 結合腫瘤相關肽在各種實體中提呈概述。

【0458】 GB = 腦膠質細胞瘤，HCC = 肝細胞癌，NSCLC = 非小細胞肺癌，PCA = 攝護腺癌，GC = 胃癌，CRC = 結直腸癌，RCC = 腎細胞癌。

序列 ID 號	序列	癌症實體上的肽提呈
162	VFTRVSSFL	HCC
163	DYLGGLASF	PCA
164	KFSSFSLFF	PCA
167	NYINRILKL	NSCLC
178	IFIEVFSHF	HCC
180	IYDDSFIRPVT	HCC
184	VFQNFPLLF	NSCLC
206	EYQENFLSF	GB
212	YYTFHFLYF	PCA
216	QYSSVFKSL	NSCLC, HCC
218	YYKSTSSAF	SCLC
227	IFLDYEAGTSLF	NSCLC

【0459】 表 15：提呈分數：該表列出了在腫瘤上特異性提呈（++++）、與一系列正常組織相比在腫瘤上非常高度過量提呈（+++）、與一系列正常組織相比在腫瘤上高度過量提呈（++）或與一系列正常組織相比在腫瘤上過量提呈（+）的 HLA-A*02 肽。

【0460】 GB = 膠質母細胞瘤（N = 41），BRCA = 乳腺癌（N = 17），CRC = 結直腸癌（N = 28），RCC = 腎細胞癌（N = 20），CLL = 慢性淋巴細胞性白血病（N = 17），HCC = 肝細胞癌（N = 16），NSCLC = 非小細

胞肺癌 (N = 90), SCLC = 小細胞肺癌 (N = 19), NHL = 非霍奇金淋巴瘤 (N = 18), AML = 急性骨髓性白血病 (N = 18), OC = 卵巢癌 (N = 20), PC = 胰腺癌 (N = 16), PCA = 攝護腺癌和良性攝護腺增生 (N = 39), OSCAR = 食管癌, 包括胃食管交界處癌 (N = 17), GBC_CCC = 膽囊腺癌和膽管癌 (N = 6), MEL = 黑色素瘤 (N = 7), GC = 胃癌 (N = 29), UBC = 膀胱癌 (N = 16), UTC = 子宮癌 (N = 15)。被認為與腫瘤比較相關的一系列正常組織 (N = 262) 包括：脂肪組織、腎上腺、動脈、靜脈、骨髓、腦、中樞和周圍神經、眼、結腸、直腸、小腸（包括十二指腸）、食道、膽囊、心臟、腎、肝、肺、淋巴結、單核白細胞、胰腺、腹膜、垂體、胸膜、唾液腺、骨骼肌、皮膚、脾、胃、胸腺、甲狀腺、氣管、輸尿管、膀胱。

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
1					++ ++						++ ++	++ ++							
2				++ ++	++ ++	++ ++	++ ++				++ ++			++ ++		++ ++		++ ++	
3										+								++ +	
5	++		+									+							
6					++ ++														
7	++		+						+				++ +						
8	++ ++		++ ++			++ ++				++ ++	++ ++								
9				++ ++		++ ++					++ ++		++ ++						
10	++										+								+
11		++ +	++ +			++ +	++ +			++ +	++ +								

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
12					++ ++						++ ++					++ ++			++ ++
13		++ ++				++ ++	++ ++				++ ++	++ ++					++ ++		
14	++ ++							++ ++		++ ++	++ ++		++ ++					++ ++	
15		++ ++	++ ++			++ ++					++ ++								
16			++ ++					++ ++	++ ++	++ ++	++ ++								
17							++ ++			++ ++	++ ++	++ ++	++ ++						
18		++ ++		++ ++					++ ++		++ ++		++ ++			++ ++		++ ++	
19		++ ++			++ ++				++ ++	++ ++		++ ++	++ ++						++ ++
20			++ ++							++ ++								++ ++	
21		++ ++			++ ++					++ ++	++ ++	++ ++	++ ++						
22		++ ++					++ ++	++ ++				++ ++	++ ++					++ ++	
23	++			++							+		+			+		++ +	
24								++ ++	++ ++		++ ++		++ ++						
25												++ ++							++ ++
26	++ ++	++ ++				++ ++			++ ++	++ ++									
27				++ ++							++ ++	++ ++	++ ++						++ ++
28										++ ++	++ ++	++ ++						++ ++	
29	++ +	++ +	++ +			++ +				++ +	++ +								
30		++ +							++ +			++ +			++ +		++ +	++ +	
31					++ ++														
32			++ ++									++ ++							
33							++ ++			++ ++	++ ++	++ ++	++ ++						
34	++ ++									++ ++		++ ++					++ ++		
35	+		++								+	++ +							
36									++ ++								++ ++		
37	++																		

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
	++																		
38	++ ++		++ ++							++ ++									
39		++ ++																	
40										++ ++		++ ++							
41					++ ++														
42				++ ++		++ ++					++ ++								
43	++ ++						++ ++						++ ++						
44	++ ++								++ ++	++ ++	++ ++								
45	++ ++					++ ++				++ ++		++ ++							
46							++ ++				++ ++		++ ++					++ ++	
47			++ ++							++ ++	++ ++	++ ++							
48							++ ++				++ ++	++ ++	++ ++						
49			++ ++							++ ++	++ ++							++ ++	
50		++ ++									++ ++	++ ++						++ ++	
51					++ ++						++ ++								
52							++ ++				++ ++	++ ++	++ ++						
53	++ +		++ +							++ +									
54	++ +									++ +	++ +				++ +				
55	++ +	++ +										++ +			++ +				
56										++ ++	++ ++	++ ++							
57										++ ++	++ ++	++ ++	++ ++						
58					++ ++														
59					++ ++						++ ++								
60	++ ++																		
61							++ ++				++ ++		++ ++						
62					++ ++						++ ++					++ ++			

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
63							++ ++				++ ++		++ ++						
64															++ ++				
65							++ ++				++ ++		++ ++						
66		++ ++									++ ++						++ ++		++ ++
67	++ +		++ +								++ +					++ +			
68				++ ++			++ ++						++ ++						
69	++ ++									++ ++									
70										++ ++						++ ++			
71			++ ++							++ ++									
72												++ ++				++ ++			
73											++ ++	++ ++	++ ++						
74	++ ++																		
75							++ ++				++ ++		++ ++						
76							++ ++						++ ++						
77											++ ++	++ ++					++ ++		
78							++ ++					++ ++	++ ++						
79							++ ++				++ ++		++ ++						
80	++ ++									++ ++	++ ++								
81							++ ++				++ ++		++ ++						
82							++ ++				++ ++		++ ++						
84					++ ++														
85												++ ++							++ ++
86							++ ++					++ ++	++ ++						
87							++ ++				++ ++		++ ++						
88							++ ++				++ ++		++ ++						
89			++							++		++							

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
			++							++		++							
90																	++	+	
91	+									+	++	+							
92													+			+			
93	++ +	++ +		++ +			++ +			++ +	++ +				++ +		++ +	++ +	++ +
94	++ +			++ +	+						+								
95		++				++ +				++	++	+					+		
96			++ +							++ +	+							++ +	
97					+		++ +					++ +	++ +						
98											+								
99			++ +							++ +									
100		++ +																	
101	++ ++																		
102	++ ++																		
103	++ ++																		
104					++ ++														
105										++ ++									
106	++ ++																		
107										++ ++									
108		++ ++																	
109																		++ ++	
110									++ ++										
111							++ ++				++ ++		++ ++						
112											++ ++							++ ++	
113							++ ++						++ ++					++ ++	
114												++ ++				++ ++			
115											++ ++	++ ++							

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
116										++ ++								++ ++	
117											+								
118												++ ++							
119											++ ++	++ ++							
120							++ ++						++ ++						
121			++ ++																
122							++ ++				++ ++		++ ++						
123												++ ++						++ ++	
124											++ ++	++ ++							
125					++ ++										++ ++				
126			++ ++								++ ++								
127											++ ++								
128							++ ++						++ ++						
129	++ ++										++ ++								
130																		++ ++	
131			++ ++							++ ++									
132			++ ++							++ ++									
133															++ ++				
134											++ ++	++ ++							
135			++ ++								++ ++								
136										++ ++		++ ++							
137					++ +						++ +								
138	++ +	+	++ +	++			++ +		++	+	+	+				++		+	
139	++ +		+																+
140	++		++			+				+		+						++ +	
141	++		+																
142											++				+				

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
											+								
143					+	+		+			+								
144	++ +	+		+	++ +		++				++		++ +						
145	++										+	++ +	+						
146															++ +				+
147						++ +						++ +							
148					++ +														
149										++ ++									
150			++	++					+	+			+						
151							+					++	+			+			
152	++ +		++ +	++ +	++ +					+	++ +								
153			+							++		++	+					+	
154									+										
155			++ +			++				+									
156														++					
157																		+	
229	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++			++ ++		++ ++	++ ++	++ ++	++ ++				++ ++	++ ++	
230	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++		++ ++		++ ++		++ ++	++ ++					++ ++		++ ++	
231			+																
232				+				++									++		
233	++ ++	++ ++		++ ++						++ ++	++ ++							++ ++	
234		++ ++	++ ++							++ ++	++ ++	++ ++	++ ++					++ ++	
235	++ ++									++ ++		++ ++							++ ++
236			++ ++		++ ++		++ ++			++ ++	++ ++		++ ++		++ ++				
237		++ ++			++ ++			++ ++	++ ++		++ ++	++ ++						++ ++	++ ++
238	++																		
239						++ ++				++ ++	++ ++								
240			++						+		+							+	
241										++ ++	++ ++	++ ++							
242	++ ++										++ ++								++ ++
243										++									

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
										++									
244											++ ++	++ ++	++ ++						
245			++ ++							++ ++									
246			++ ++		++ ++						++ ++								
247		++											+				+	++ +	
248	+																		
249			+	++ +	++						+					++ +			
251	++ ++																		
252	++ ++																		
253			++ ++																
254										++ ++	++ ++								
255	++ ++									++ ++									
256									++ ++	++ ++									
257										++ ++	++ ++								
258								++ ++							++ ++				
259											++ ++	++ ++							
260				++							++ +								
261				+						+	+	+							
262		+		++		+				++ +	++ +				+		++ +		
263			+						+	+	++ +		+						
264	+		+								+								
265			+		++ +														
266	++ +		+																
290		++							++										
291	++				+			+	++ +	++		++					+		++ +
292				++ +	++ +	++ +				++	++ +								++ +
293					++ ++														
294															++				

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	MEL	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
															++				

【0461】 表 16：提呈分數：該表列出了在腫瘤上特異性提呈（++++）、與一系列正常組織相比在腫瘤上非常高度過量提呈（+++）、與一系列正常組織相比在腫瘤上高度過量提呈（++）或與一系列正常組織相比在腫瘤上過量提呈（+）的 H L A - A * 2 4 肽。

【0462】 G B = 腦膠質細胞瘤（N = 18），H C C = 肝細胞癌（N = 15），N S C L C = 非小細胞肺癌（N = 91），P C A = 攝護腺癌（N = 40），G C = 胃癌（N = 44），R C C = 腎細胞癌（N = 2）。被認為與腫瘤比較相關的一系列正常組織（N = 70）包括：腎上腺、腦、結腸、直腸、心臟、腎、肝、肺、胰腺、垂體、皮膚、脾、胃和胸腺。

SEQ ID No.	GB	GC	HCC	NSCLC	PCA	RCC
158	++++	++++	++++	++++	++++	++++
159	++++			++++		++++
160		++++	++++	++++	++++	
161		++++		++++	++++	
162	++++	++++		++++		
163	++++	++++		++++		
164		++++		++++	++++	
165		++++		++++		
166	++++		++++	++++		
167		++++				
168				++++	++++	
169		++++	++++	++++		
170	++++			++++		
171			+++	+++		+++
172	++++					++++
173		++++	++++	++++		++++

SEQ ID No.	GB	GC	HCC	NSCL C	PCA	RCC
174	++++	++++		++++		
175		++++	++++	++++		
176		++++		++++		
177		++++				
178		++++		++++		
179	++++			++++		
180			++++	++++		
181		++++		++++	++++	
182		++++		++++	++++	
183				++++	++++	
184	++++	++++				
185				++++		
186		++++		++++		
187		++++	++++	++++		
188	++++					
189				++++	++++	
190				++++	++++	
191	++++					
192				++++		
193			++++	++++	++++	
194	++++					
195	+++			+		
196			+			+
197		+			+	
198		++	++	+		
199		+			++	
200		+		+		
201	+++	+		++		
202				+		
203		+				
204	++	+++	+	+++		
207	+++	+++				
208			+	+++		
209	+++			+		
210	+++	+				
211		+++				
212		+++	+++	+++		
213				++	+++	
214			++++	++++		
215			++++	++++		
216	++++	++++				
217		++++				
218	++	+		++		
219	+++		+	+		++

SEQ ID No.	GB	GC	HCC	NSCL C	PCA	RCC
222			+	+		
224	+		+	+		
225				++		
227		+++				+++
228	++				+	
267	+++	+++	+++	+++	+++	
268	++++	++++	++++	++++		
269		++++	++++	++++		
270	++++	++++		++++		
271		++++	++++	++++		
272	++++			++++		
273	++++			++++		
274				++++	++++	
275				++++	++++	
276				++++		
277		++		+++	+	
278	+	++				
279						+++
280			+			
281			+++	+++		
282	+++	+++	+++	+++		
283	+	++		+++	+++	+++
284					++++	
285	+			+		
286			++	+		
287	+	+				
288		+	+	+		
289					+++	+++
295	++++			++++		++++
296						
297		+++		+++		
298	+			+++		
299				++		
300	+++	+++		+++		+++
301			++++	++++		
302		++++		++++		

實施例 2

編碼本發明肽的基因的表達譜

【0463】 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于正常組織中。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于正常組織中的蛋白。

【0464】對於本發明的 HLA-I 類肽，根據涵蓋大約 3000 個正常組織樣本 RNASeq 資料的數據庫，所有源基因的正常組織表達被證明是最少的 (Lonsdale, 2013)。此外，腫瘤與正常組織的基因和外顯子表達數據進行了分析，以評估在各種腫瘤實體中靶標覆蓋情況。

RNA 來源與製備

【0465】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 (QIAGEN 公司, Hilden, 德國) 清理從這些樣本中製備總 RNA；這兩種方法都根據製造商的方案進行。

【0466】用於 RNASeq 實驗來自健康人體組織的總 RNA 獲得自：Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK)、BioCat GmbH (Heidelberg, Germany)、BioServe (Beltsville, MD, USA)、Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA)、Istituto Nazionale Tumori "Pascale"

(Naples, Italy)、ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA)、海德堡大學醫院 (Heidelberg, Germany)。

【0467】 用於 RNASeq 實驗來自腫瘤組織的總 RNA 獲得自：

Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK)、Bio-Options Inc. (Brea, CA, USA)、BioServe (Beltsville, MD, USA)、癌症免疫治療中心 (CCIT), Herlev 醫院 (Herlev, Denmark)、Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA)、Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Naples, Italy)、京都府立醫科大學 (KPUM) (Kyoto, Japan)、萊頓大學醫療中心 (LUMC) (Leiden, Netherlands)、Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK)、波恩大學醫院 (Bonn, Germany)、日內瓦大學醫院 (Geneva, Switzerland)、海德堡大學醫院 (Heidelberg, Germany)、大阪市立大學 (OCU) (Osaka, Japan)、蒂賓根大學醫院 (Tbingen, Germany)、瓦爾德希布倫大學醫院 (Barcelona, Spain)。

【0468】 所有 RNA 樣本的品質和數量都在 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析儀 (Agilent 公司, Waldbronn, 德國) 上使用 RNA 6000 Pico LabChip Kit 試劑盒 (Agilent 公司) 進行評估。

RNA 序列實驗

【0469】 腫瘤和正常組織的 RNA 樣本都透過新一代測序技術 (RNAseq) 由 CeGaT (Tübingen, Germany) 對腫瘤和正常組織的 RNA 樣本進行基因表達分析。簡言之，根據供應商的方案 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)，其中包括 RNA 碎片化、cDNA 轉化和測序適配器的加入，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摩爾混合並在 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)，表達資料在轉錄水準設置為 RPKM (每百萬映射讀數每千碱基讀數，由 Cufflinks 軟體生成) 並在外顯子水準上設置 (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。

【0470】 本發明的代表性源基因在不同癌症中高度過量表達的表達譜如圖 2 所示。不同實體的表達資料和進一步的示例性肽總結於表 17 中，其基於來自 TCGA 研究網路 (<http://cancergenome.nih.gov/>) 的腫瘤樣本與正常組織樣本 (Lonsdale, 2013) 比較產生的資料。根據內部 RNA 測序分析，進一步的示例性基因的表達分數如表 18 所示。

【0471】 表 17：各種腫瘤實體內的靶標覆蓋，針對選定肽源基因的表達：

【0472】 如果腫瘤樣本中表達水準超過中高風險正常組織樣本測定的最高 75% 百分位數 2 倍以上，則視為基因過度表達。過度表達類別分為「A」（ $\geq 50\%$ 的腫瘤高於臨界值）、「B」（ $\geq 20\%$ 但 $< 50\%$ 的腫瘤高於臨界值）和「C」（ $\geq 5\%$ 但 $< 20\%$ 的腫瘤高於臨界值）。

【0473】 BLCA = 膀胱尿路上皮癌 (N=408)，BRCA = 乳腺癌 (N=1104)，CHOL = 膽管癌 (N=36)，COAD = 結腸和直腸腺癌 (N=462)，DLBC = 淋巴腫瘤彌散性大 B 細胞淋巴瘤 (N=48)，ESCA = 食管癌 (N=185)，GBM = 多形性膠質母細胞瘤 (N=169)，KICH = 腎嫌色細胞癌 (N=66)，KIRC = 透明細胞腎癌 (N=534)，KIRP = 乳頭狀腎癌 (N=291)，LAMLL = 急性骨髓性白血病 (N=173)，LGG = 低級別神經膠質瘤 (N=534)，LIHC = 肝細胞癌 (N=374)，LUAD = 肺腺癌 (N=517)，LUSC = 肺鱗狀細胞癌 (N=503)，OV = 卵巢漿液性囊腺癌 (N=309)，PAAD = 胰腺導管腺癌 (N=179)，PRAD = 攝護腺腺癌 (N=498)，結直腸腺癌 (N=167)，SKCM = 皮膚黑色素瘤 (N=473)，STAD = 胃腺癌 (N=415)，UCEC = 宮體子宮內膜癌 (N=546)。

SEQ ID No.	BRCA	BLCA	CHOL	COAD	DLBC	ESCA	GBM	KICH	KIRC	KIRP	LAMLL	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	PRAD	READ	SKCM	STAD	UCEC
1							A					A										
2	C	C	B	A		A		A	A	A			B	A	A		B		A	B	B	C
3	A	B	B	C	A	A	A	B	A	B	A	A	C	B	A	C	C	B	C	A	B	B
4		C				C									B	C						B

SEQ ID No.	BRCA	BLCA	CHOL	COAD	DLBC	ESCA	GBM	KICH	KIRC	KIRP	LAML	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	PRAD	READ	SKCM	STAD	UCEC
5	B			C	B	B					A			C	B	C		B	C		A	C
6							A					A										
7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
8	B	A	C	B	A	B	B				B	C	C	C	B	C			B	A	C	B
9	B	C		C		B								C	C		B		C	C	C	
10	C					B					A				C	C				B	C	
11	B	C			C	B			C	B	A			C		B				C	B	C
12	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
13														C	C							
14	B	B		B	C	B	C				A	C	C	C	B	C			B	B	C	C
15	C	C				C	C							C	C	B	C			C	C	
16	A	B	C	B	B	A	C				A	C	C	B	A	A		C	B	B	A	C
17											A											
18	C	C				B			B	C	C			C	A	C	C			B		
19	C				B	B	C	C	B	C	A	C				C				C	B	
20	B					A			C		A	B			C			C		C	B	
21	A	A	C	A	A	A	A				A	C	C	B	A	A	C		A	A	A	B
22	C			C		B										C			C		C	
23	B	B	B	C		A		C	B	B	A			C	C	C	C	B		B	A	
24	C	B		C		C	C						B	B	B	C		C	C	A	C	C
25	C	C												C		A	C					A
26						B		C			A				C							
27	B	B	C	A		B	C		C	B	B			B	A	A	C	A	A	B	B	B
28						C									C					B		
29	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
30	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A
31							C					A										
32	B	C	B		B	B			B	B	B		C	B	A	A				A	B	A
33	B	B	A	B	A	A	C		B	B		C	B	A	B	B	C	C	C	B	B	B
34	B			C		A		C	B	C	A	B		C	C	B	C	C	C	B	A	C
35						C					A											
36																				A		
37											A											C
38											A											
39	A												C					B		C		
40					A				C													
41							C															
42	C	B	A	A		A				B				A	A	B	A	C	A		B	B
43	B	B	C	B	A	A	B		C		A			C	A	B			B	B	B	B
44	B	C		B	B	A	C				A			C	B	C			B	B	B	
45						C					C											
46						C						C										
47	B	A	A	A	A	A	B	B	C	A	B	B	B	B	B	A	B	B	A	A	A	A
48	C	C	C	C		A		C	B	C	A			C	B	B	C		C	C	A	C

SEQ ID No.	BRCA	BLCA	CHOL	COAD	DLBC	ESCA	GBM	KICH	KIRC	KIRP	LAML	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	PRAD	READ	SKCM	STAD	UCEC
49	A	A	A	A	A	A	A		C	C	A	B	C	A	A	A	A	B	A	A	A	A
50	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
51			B	B		B	C	B	B	C		C	C	C	C	A	C	B	B	C	A	C
52	B	B	B	A	A	A	A	C	A	A	A	B	B	A	A	A	A		A	A	A	C
53		C		B	A								C		C				B			B
54	A	B	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	A	B	A	B	B
55	B										C											
56					C						A										C	
57					C		C				B			C	C	B						C
58							B					A						B				
59						B	A					B		C	C					B		
60											C											
61	B	B		B	B	B	B				B	C		C	B	A			B	B	C	B
62		C	B	A		A		A	A	A			B	A	B		B		A	B	B	C
63	B	C				A			C	C	A			B	C	A				C	A	C
64	C					C												A			C	
65	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
66	B	C	B	A	C	A		B		C		C		B	B	B	B	B	A	C	B	B
67					B	C					A									C		
68				C		C													C		C	
69					B				C		B									C	C	
70					B						B									C		
71					C		B		C		A	B										
72			C						B	A	A					A						A
73	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	A	A	B	A	A	A	A	B	A	A	A	A
74					C				C		A									C	C	
75	B	C		B	B	C	C				A	C		C	B	B			C	B	C	C
76	B					B		C	C	C	A	C						C			B	
77	C	B		B	C	C	B					C		C	B	B		C	B	C	B	B
78	C						A				A	A										
79	B		C	C		C					C	C		C	C	C		C	C	B	B	
80											C											
81	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
82	B	B	B	B	A		B						C	B	A	C	C		B	C	C	B
83				C		C											C		C		C	
84		C				C	B					B			C	B				C	C	
85																C						B
86				C	A		B			B		C	C			B			C			
87		C	C	C		B		B	C	B	B				C				C		C	C
88	C	B		C		C	B	B		C		A				C		B	C	C	C	B
89	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
90		C												C	C							C
91	B			C	C	A		C	C	C	A	C		C	C	B		C	C	C	A	C
92	C	C	C	C				B		C			C	C	C	B		C	C	C		B

SEQ ID No.	BRCA	BLCA	CHOL	COAD	DLBC	ESCA	GBM	KICH	KIRC	KIRP	LAML	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	PRAD	READ	SKCM	STAD	UCEC
93	C	B	C	B	C	A	B	C		C	A	C	C	C	B	A		C	A	B	B	B
94											B					C						
95														C	C							
96	B	A	A	A	A	A	C	B	C	A	A		B	A	A	A	A	A	A	B	A	A
97	C	B		B	A	B	C							C	B	B			B		C	B
98											A											
99	C					B					A										B	
100											C											
101						C					A										C	C
102											A											
103											B											
104							C					A										
105					B	C						C				C				C	C	
106	B			B		C		B			A			B	C	C			B			B
107					A																	
108	C					C									C	B						B
109		C		B		B								B		A	B		B		B	A
110																						
111	B	C		B	B	B		C			A			B	B	A		C	B	B	B	B
112		B					C	C	A	C				C		B						B
113	A	A	B	A	A	A	A		C	C	A	A	B	A	A	A	B	C	A	A	A	A
114			B						A	A						A						C
115	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
116	A	A	C	A	A	A	A	C			A	C	C	B	A	A			A	A	A	B
117	B	B	A	C		C	B		A	A	C		B	C	B	C	B		C	B	C	B
118						C	A					B		C	C	C				A	C	C
119	A	B	A	B	A	B	B	B	A	A	B	C	B	A	A	B	A	B	B	A	B	B
120	C	C		B	B	A	C	C		C	A	B		C	B	A		C	B	B	A	B
121	C	B	C	B	A	B	C				C		C		C	B		C	B	B	B	B
122	C			C		B										C			C		C	
123				C		C											C		C		C	
124	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
125							C													C		
126	A	A	A	A	B	A	A	A	A	B	A	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
127	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
128	A	A	B	A	A	A	C	C	A	B	A		B	A	A	A	A	B	A	A	A	A
129					C						C											
130	C	C		C	C	C	C		B	C				C	B	C			C	C	C	
131	B			C		B	C		C		A	C			C	C		C	C	C	B	C
132			C							C									C			C
133											B							A				
135	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B
136														C	C							
137	B				C	A			B	C	A	C		C	C		C	C	C	C	A	

SEQ ID No.	BRCA	BLCA	CHOL	COAD	DLBC	ESCA	GBM	KICH	KIRC	KIRP	LAML	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	PRAD	READ	SKCM	STAD	UCEC
138	A	B	C	B	C	A	C	C	C	C	A	B		B	A	C	C	C	B	A	A	C
139											A											
140											A									C		
141	C										A							C			C	
142							A			C	B	A										
144	B		C	C		B					A			C			C	B	C	C	B	
145																		B				C
146	C							B	C				B	C				B				
147																						C
148	A	B	B	B	A	B	A	C	B	A	A	A	C	B	B	A	B	A	B	A	B	A
149	A					C								C	C	C	C					
150	B	A	B	B	A	A	B		B	B	A	B	B	B	B	C	A	A	B	B	B	A
151									C													
152	C					B					A				C	C				C	B	
153	A	A	A	A	B	A	A	C	C	B	B	B	B	B	A	A	B	B	A	A	A	A
154										C			C					B		A		
155	A	B	C	B	C	A	C	C	C	C	A	B		B	A	B	C	C	B	A	A	C
156	B	B	B	B		B	C		C	B			C	A	B	B	A	B	B	A	A	B
157	C			C		B										C			C		C	
229	B	B		B	B	B	B				B		C	C	B	B			B	C	B	B
230	B	B		B	A	A	C				A			C	B	C			B	C	B	B
231											A											
232	B	A	B	A	A	B	C				C		C	C	B	B	C		A	B	B	B
233	B	B	A	A	A	A	B	C			A	C	C	B	A	A	C		A	B	A	B
234	B			B	C	C		B							C	B			B	C	B	
235	A	A	A	A	A	A	A		A	B	A	B	A	A	A	A	B	A	A	A	B	A
236	B	B		A	A	B	B				A	C		C	B	B		A	A	C	B	B
237	B	B	B	A	C	A	A		C	B		C		B	B	B			A	B	B	B
238					C						A											
239	B	B		A	B	A	B				A	C		C	A	B			A	B	B	B
240	B	B	B	A	A	B	A		B	C	A	A	C	B	A	B	C	B	A	B	B	B
241	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
242					C		B				B			C	C	B						B
243					A									C	C					C	C	
244	B	C	B	B		A		A	C	C				B	B	A	B	C	B	A	A	B
245						C					A										C	
246	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
247	B	A	A	A	A	A	C	C		B	C		C	B	A	A	B	B	A	B	A	A
248				C	C	C	C				B	C			C	C			C		C	
249	A	B	C	B	B	A	C	C	C	C	A	B		B	A	B	C	C	B	A	A	C
250					A		C	C				C		C	C					C		
251					B						A											
252	A	A	A	A	A	A	A	C	C	C	A	B	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A
253	C				C	B					A	C						C		C	B	

SEQ ID No.	BRCA	BLCA	CHOL	COAD	DLBC	ESCA	GBM	KICH	KIRC	KIRP	LAML	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	PRAD	READ	SKCM	STAD	UCEC
254				C	B	C	C			C	A	C				C			C	B	C	B
255	C			B	B	A	B				B				C	B			B	C	A	C
256	B	B		A	B	A	B				A	C		B	A	B			A	B	A	B
257		C	C	C	C	C	C				B				C		C	C	C		C	C
258	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
260	C																		C			
261													C			B						
262							C					C						C				
263	C			C	C	B					A			C	C				C		C	
264	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
265	A	A	A	A	A	C	A	A	C	A	C	A	B	A	A	A	A	A	A	A	B	A
266	C	C			B	C					A			C		B					C	
290	A	A	B	A	A	A	B				A	C	C	B	A	A	C		A	A	A	A
291	A	B	C	A	B	A	B				A	C	C	B	A	C	C		A	B	A	B
292	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
293							B					B								C		
294			C				C			C			B	C				A		C		
158	A	B	C	B	C	A	C				A	C		B	A	C		C	B	A	B	C
159	A	C	C	B	C	A	C	B	B	C	A	C	C	B	A	A	B	C	B	A	A	C
160	A	B	C	B	B	A	C				A	C	C	B	A	A		C	B	B	A	C
161				C	C						A					C				C		
162											A											
163											A									B		
164					A				B		C									C		
165	C	B	C	C	A	B	C				C		C	C	B				C	C	C	B
166	B	B	B	A	B	A	B	B	B	B	A	B	C	B	A	B	B	B	A	A	A	C
167	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
168	C	C		B		C		A						B	C	A		B	C		C	B
169	B	B	C	A	A	A	C		B		C		C	B	B	A	A		A	C	A	C
170	A	A	B	A	B	A	A	C	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
171	B	C	C	B	B	B		B	C	C	A	C		C	B	C	C		A	B	B	A
172			C				A		C			A				C						
173						B					A	C								C	B	
174	C	B		A		B	B	C				C			B	C		B	A		B	B
175	B	B	C	B	B	A	B				B	C		C	A	B			B	B	B	C
176			C	C		B									C				C	C	B	C
177				B		C													B		C	
179						B					B	C			B							
180	A	B	B	A	C	A	A	C	B	B	A	B	B	A	A	A	B	B	A	A	A	B
181	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
182	B	B	C	A	B	A	A				B	C	C	B	A	A		A	A	A	B	B
183					C						A											
184											C											
185					C																	

SEQ ID No.	BRCA	BLCA	CHOL	COAD	DLBC	ESCA	GBM	KICH	KIRC	KIRP	LAML	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	PRAD	READ	SKCM	STAD	UCEC
186			C	C		B			A	B	A			A		C			C	C	A	
187	C	A	C	B	A	B	C				B		C	C	B	A			B	C	B	A
188							A					A										
189			C							C			C	C				A		C		
190									C		A							C				
191						C	A					A			C					C		
192	B	B	C	B	A	B	A		B	B	A	C	C	C	B	B			B	A	B	A
193	B	A	B	B	A	B	C			C	B		C	B	A	A	C		B	B	B	B
194	C	B					A	A	C	C		B	C				C	A		C	C	
195	C	C	C		B		A		C	C	B			C	B	A	C			B		B
196	A	B	B	A	B	A	C	B	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	A	A	A	B
197	B	B		A	A	A	B				A			C	A	A			A	B	A	B
198	B	C	C	B	B	A	A		B	C	A	B	C	B	A	A		C	A	B	B	C
199	A	B	C	A	A	C								C	C	C	B	A	A	B	B	B
200	B			C		A		C	B	C	A	B		C	C	B	C	C	C	B	A	C
201	A	B	B	A	B	A	B		C	C	A		C	B	A	A	C	C	A	B	A	B
202											C											
203	A	A	B	A	A	A	A	C		C	A	C	C	B	A	A	C	C	A	A	A	A
204		C	B	B	A	C	C			C			C		C	C		C	C	C	B	B
205					B						A											
206	C																					
207	C			C		B	A					B		C	B	B		C	C	C	C	C
208			C					B						C								
209	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
210	A	B	B	C	C	A	B	C	A	B	A	C	C	B	B	C	C	C	C	B	A	B
211	B			C		A					A			C			C	B	C	C	B	
212	A	C	B	C		B	A	B	A	B	C	B		C	B	B	C	B	B	C	B	
213	B	B	B	B	A		B						C	B	A	C	C		B	C	C	B
214	A	A	B	A	B	B	B	B	B	B	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	B	A
215												C								C		
216	C					B	C				C	B		C						C	C	
217	B	C	A	A		B	C	B	B	A		C	C	C	C	A	B	A	A		A	B
218							C															
219				C		A	A	C	C	C	B	C		B	C	C	C		C	C	A	
220	C	B	A	B		A				C				B	A	A	A		B		A	B
221	A	A	A	A	A	A	C	B	B	A	A		C	A	A	A	B	A	A	A	A	B
222										C								B		A		
223	B	C			C	A			B	B	A			C		B				C	A	
224	C					C					A											
225								A														
226							B					C										C
227	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
228	C						B	C	C	C		A			C		C			C	C	
267	B			B	C	C		B							C	B			B	C	B	

SEQ ID No.	BRCA	BLCA	CHOL	COAD	DLBC	ESCA	GBM	KICH	KIRC	KIRP	LAML	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	PRAD	READ	SKCM	STAD	UCEC
268	B	A	A	A	A	A	A		A	B	A	C	B	B	A	A	C		B	A	A	A
269	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
270	B	B	C	B	B	A	B				B	C		C	A	B			B	B	B	C
271	C	B	B	A	C	B			C	C				B	B	C	B		A	C	B	C
272	B	B		B	B	A	C				A			C	A	A			B	B	A	C
273						C					B	C								B		
274						C					A							B			B	
275						C										C					C	
276	B	A	B	A	A	A	A		A	B	A	C	B	B	A	A	C		B	A	A	B
277	B	B	C	B		B				C				A	A	A	B	B	B	B	C	A
278				B		B											C		B		B	
279		C							A	A				C	C							
280	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	A	A	B	B	A	B	A	B
281	A	B	C	B	C	A	C	C	C	C	A	B		B	A	B	C	C	B	A	A	C
282	B	A	B	A	A	A	A		C	B	A	A	C	B	A	A	B	A	A	A	A	A
283	C	C	C	C	C		B					B	B		C	C		B	C	C		B
284	B	C		B	C	A	C				A	C		C	B	B		A	B	C	B	C
285	A	A	A	A	A	A	A		A	B	A	B	A	A	A	A	B	A	A	A	B	A
286	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	A	A	B	B	A	B	A	B
287	B	A	B	A	A	B	A	C	A	A	B	A	B	B	A	A	B	B	A	A	B	A
288	C	C		C	B	B					A			C	C	B			C	C	C	C
289								C														
295							A	A				B								C		
296							A			C	B	A										
297		B				C								C	C							
298	C			C		B										C			C		C	
299	C	B	A	A		A				B				A	A	A	A	C	A		A	B
300							B		C			A										
301				C									C									C
302	B	B	C	B	A	B		C	A					A	A	A	C	C	B	B	B	A

【0474】 表 18：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量表達（+++）、與一系列正常組織相比在腫瘤上高度過量表達（++）或與一系列正常組織相比在腫瘤上過量表達（+）的基因的肽。

【0475】 AML = 急性骨髓性白血病（N = 11），CLL = 慢性淋巴細胞性白血病（N = 10），CRC = 結直腸癌（N = 20），GB = 膠質母細胞瘤（N = 24），GBC_CCC =

膽囊腺癌和膽管癌 (N = 3) , GC = 胃癌 (N = 11) , HCC = 肝細胞癌 (N = 15) , NHL = 非霍奇金淋巴瘤 (N = 10) , NSCLC = 非小細胞肺癌 (N = 11) , OC = 卵巢癌 (N = 12) , OSCAR = 食管癌包括胃食管交界處癌 (N = 11) , PC = 胰腺癌 (N = 26) , PCA = 攝護腺癌和良性攝護腺增生 (N = 5) , RCC = 腎細胞癌 (N = 10) , SCLC = 小細胞肺癌 (N = 10) , UBC = 膀胱癌 (N = 10) , UEC = 子宮癌 (N = 10) 。本基線得分根據以下相關正常組織的測量值計算：脂肪組織、腎上腺、動脈、血細胞、骨髓、腦、軟骨、結腸、食道、膽囊、心臟、腎、肝、肺、淋巴結、胰腺、垂體、直腸、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、甲狀腺、氣管、膀胱和靜脈。

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
1					++ +													
2				+	+	++	++	+		++	+		+		++			+
4					++					++	++	++				+		++
5	+		+						+		+					+		
6					++ +													
8					+				+	+	+	+				+		+
9		++ +		+		++ +	++			++	+	++ +	++				+	++
10	++ +		+		+					+	+	+				+	++	
11		+							+	+	++	+	+			+		
12					+						+	+						
13		+					+				+					+		
14	+	++ +		++	++	+	+	+	++	++	+	++	+			++ +	+	+
15		+	+			+				+		+	+					

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
16		+		+		+			+	+	++	+				++ +		
17			+															
18						++	+			++		++ +			+			
19					+				+									
20		+	+		+				+	+	+					+		+
21	+	+		+	+	+	+		++ +	+	+	+	+			++	+	+
22		++		+		++ +	++			+	++ +	++ +	+			+	++	
23						+				+			+	+			++ +	+
24		++ +			++ +			++ +		++ +		++ +	+			++ +		
25											++ +		+					++
26	+				+				++		+	+				+		
27	+	++		++ +		+	+		+	+	++ +	++ +	+		++	+	+	+
28										++	+	++ +					++	
29					+							+						
31					++ +													
32	++ +	++ +		++ +	++ +	++ +	++ +	++	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +		++ +	++ +	++ +	++ +
33		++					+		++ +	++	++ +	++ +	+		++	+	+	
34		+			+					+	+	+				+		
35	+		++															
37	+																	
38	+		+															
39		++ +						+						++ +				+
40									+		+				+			
41					+													
42				++		++ +	++ +			++ +	++ +	++ +	++ +				++ +	++ +
43				+	+				++	+	+	+				++		
44	+	+	++	+	+				++ +	++	+	+				++ +	+	+
45		+			+	+			++	+	+					++		+
46					+											+		
47									+			+					+	

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
48				+		+				++	+	+	+		+		+	+
49												+					+	
50									+									
51							+				+							+
52							+		+		+	+			++			
53	+								+		+	+					+	
54															+			
55		+																
56	+								+									
57					++				+	++	++							++ +
58					++ +												+	
59					++ +				+	++ +		++ +					+	
60	++ +																	
61		+			+	+			+	+	++	+				++ +		+
62				+	++	++	++	+		++ +	+		+		++ +		+	
63		+	+		+	+				+	+	+			+	+	+	+
64										+				++ +				
65					+				+		++ +	++					+	+
67	++		++						++									
68				++ +		+	++				++	++ +	++ +				++ +	++
69	+																	
70									+									
71	+				+													
72	++ +	+									++ +				++ +			++ +
73	+											+						
74	++ +								++									
75		+		+	+	+			+	+	++	+				++ +	+	+
76		+	+		+				+	+	+							
78	+				+													
79		+	+					+				+						
80	+																	
81								+			+							

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
82		+							++		+	+						+
83				++		+	++			+	+	+	++				++	
84					+													
85			+								++							++
86					+				+									
90		+								+	++	+				++	++	+
91			+		+				+	+	+					+		
93				+						+	+					+		
94	++									+	+		+			+		++
95		+					+				+					+		
96												+						
97	+	+	+	+	+		+		++	+	++	++				++	+	
98																		
99	+		++		+	+	+		+	+	+		+	+		++		+
100								++						++	++			+
101	++																	
102	++																	
104					++													
105			++		++				++		++						++	
106	++	++	+	++	+			+	++	++	++	++	++			++		++
107			+						++									
108		++						++			++							++
109						++	+				++	++	+					++
111	++	+	++		+				++	++	++	+				++		
112											+		+		++		+	+
113	+				+				+	+	+	+				++	+	
114											++				++			
115					+													

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
116		+		+	+				+	++	+	+				++	+	
117						+						+	+		+	+		
118					+													
119			+						+									
120	+				+				+	+	+	+				+		
121												+						
122		++		+		++	++			+	++	++	+			+	++	
123				++		+	++			+	+	+	++				++	
127		+		+	+		+			+	+	+					+	+
128		++					+			+	+		+			+		
129			+		+				++									
130			++			+			+		+	+					+	
133	++						+						+	++			+	
134							+				+	+						
135																		
136		+					+				+					+		
137				+	+	+			+	+	+	+				+		+
138	+	+		+	+	+			+	++	++	+	+			++	+	
140											+	+				+		
141	+	+	+			+												
142					++	+				+			+					
144		+		+			+						+					+
145	+					+	+				+		+	+				++
146								+										
147																+		
148					++											+		
149		++		+		++	++		++	++		++	++			+	+	++
150	+	+	++		+				+	+	+	+				+		
151		+		+		+	+				+	+	+	+	+		+	+
152	+		+						+		+	+				+		
153		+		+							+	+				+	+	
154								++					++	+				
155	+	+		+	+	+			+	+	+	+				+		
156		+		+			+			+	+	+	+		+			+
157		++		+		++	++			+	++	++	+			+	++	

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
229		+	++		++	+			++	++	++	++			+	++	+	+
230	+	+		+	+	+	+		++	++	++	++	+		+	++	+	++
231	+		+															
232	+			+		+			++	+	+	+				+	+	+
233				+	+	+	+		++	+	+	++				++		+
234		++																
235	+	+							+	+	++	+				++	+	
236									+	+	+			++		+		
237		+			+	+	+		+		+	+	+				+	+
238	+																	
239	+	+		+	+				+	+	+	+				++	+	
240									+			+						
241		+							+	+	+	+				+		+
242					++				++	++	++							++
243			++						++	+	++				+	+		
244				+	+		+			+	++	++	+			+	+	+
245								+				+						
246		+																+
247	+	+					+		+	+	+	++				+	+	+
248				+	++				+									
249	+	+		+	+	+	+		+	++	+	+	+			++	+	+
250									++		+							+
251	++								+									
252	+	++		++	++	++	+		++	++	++	++	+			++	++	++
253	+		++			+				+						++		
254	+				+		+		++	+	+					+		+
255	+	+		+	++	+	++		++	++	+	++				++		++
256				+	+	+	+		++	+		+				++		+
257													+				+	
259											+							
263	++		+						+									
264																+		
265									+							+		
266	+		+															

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
290	+	+		+	+		+		++ +	+	++	++				++ +	+	+
291	+	++		++	++	+	+		++ +	++	++	++	+			++ +	+	+
292											+							
293					++ +													
294					++ +			++					+	++ +		++ +		+
158		+		+	+				+	+	+	+				+		
159	+	+		+	+	+		+		++	+	+	+		+	+		
160		+		+		+			+	+	++	+				++ +		
161	+		+							+								
163	+		+															
164		+				+			+	+			+		++	+		
165		+			+				++	+	+	+				++	+	
166					+				+	+	+	+				+		
167							+		++		+						+	
168											+			+		+		+
169				+			+		+	+	+	++	+				+	
170					+					+	+	+					+	
172					++ +			+			+				++ +	++		
173	+		+		+				+									
174				++		+											+	
175					+				+	+	+	++				++	+	
176											+							+
177				++ +		++ +	++ +				++ +	++	+	+			+	
178									++ +							++ +		
179			++							+								
180				+	+	+	+	+		+			+			+		+
182											+	+		++ +		+		+
183	++								+									
184					+											+		
185												+						
186										+					+			
187									+	+	++ +	+				++	+	+
188					++ +													

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
189					+			++						++ +		++ +		
190			+															
191					++ +													
192	+				+				++	+	+	+				++ +	+	
193		+		+		+			+	+	+	+				+		
194					+													
195					+				+	+	+					+		+
196											+							
197									+		+					+		
198	+	+		+	+	+			++							+		+
199														+				
200		+			+					+	+	+				+		
201		+		+	+	+	+		++	+	++	++	+			++	+	+
202	+																	
203				+	+	+	+		+	+	+	+				+	+	+
204		+		+				+	++									+
205	+		++ +						++									
206		+																
207					+					+								
208								++ +					++ +			++ +		
210	+	+			++	++			+	+		+			+		+	+
211		+		+									+					+
213		+							++		+	+						+
214	+	++								+	++	++	+			++ +	+	+
215					+													
216					+													
217		+		++	+	+	++				+	+	++	++ +	+	+		+
218					++	+				+					+			
219					++					++								
220				++ +		++ +	++ +			++ +	++ +	++ +	++ +				++ +	++ +
221																	+	+
222														+				
223		+							+	+	++	+	+			+		
224			+															
225																++		

SEQ ID No.	AML	BRCA	CLL	CRC	GB	GBC_CCC	GC	HCC	NHL	NSCLC	OC	OSCAR	PC	PCA	RCC	SCLC	UBC	UEC
																+		
226																+		
267		++																
268	+				+				++		++	+				++	+	
270					+				+	+	+	++				++	+	
271		++		++		++	+	+	++	++	++	++	++		+	+	++	++
272									+	+	++	+				+		
274	+				+				+									
275			+															
276	+				+				++		+	+				++	+	
277		++		+		++	+			++	++	++	+	+		++	++	++
278			++	+			+											+
279										+		+			++		+	
281		+		+	+	+			+	+	+	+				+		
282									+							+		
283					+			+			+							
284					+				+	+	+			++		+		
285	+	+							+	+	++	+				++	+	
287					+													
288	++		+						++	+	+	+				+		
295					++													
296					++	+				+			+					
297						++				++	+	++	+				++	
298		++		+		++	++			+	++	++	+			+	++	
299		+		++		++	++			++	++	++	++				++	++
302		+							+	++	++	++	+		+	++	+	++

實施例 3

MHC-I 類提呈肽的體外免疫原性

【0476】 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 細胞擴增分析方法進行了研究，其中該分析方法基於使用裝載肽/MHC 複合物和抗 CD28 抗體的人工抗原提呈細胞 (aAPC) 進行反復刺激。用這種方法，發明人可顯示本發明的 HLA-A*0201 和 HLA-A*24 的免疫原性，這表明這些肽為對抗人 CD8+ 前體 T 細胞的 T 細胞表位 (表 19)。

CD8+ T 細胞體外啟動

【0477】 為了用載有肽-MHC 複合物 (pMHC) 和抗 CD28 抗體的人工抗原提呈細胞進行體外刺激，發明人首先從 University clinics Mannheim, Germany 中獲取健康供體 CD8 微珠 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) 透過積極選擇白細胞清除術後新鮮 HLA-A*02 產物而分離出 CD8+ T 細胞。

【0478】 PBMC 和分離出的 CD8+ 淋巴細胞使用前在 T 細胞培養基 (TCM) 中培養，培養基包括 RPMI-Glutamax (Invitrogen 公司, Karlsruhe, 德國) 並補充 10% 熱滅活人 AB 血清 (PAN-Biotech 公司, Aidenbach, 德國)、100 U/ml 青黴素 / 100 µg/ml 鏈黴素 (Cambrex 公司, Cologne, 德國)，1 mM 丙酮酸鈉 (CC Pro 公司, Oberdorla, 德國) 和 20 µg/ml 慶大黴素 (Cambrex 公司)。在此步驟，2.5 ng/ml 的 IL-7 (PromoCell 公司, Heidelberg, 德國) 和 10

U / ml 的 IL - 2 (Novartis Pharma 公司 , Nürnberg , 德國) 也加入 TCM 。

【0479】對於 pMHC / 抗 - CD28 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 pMHC 分子以及每個讀出條件 8 個不同的 pMHC 分子在高度限定的體外系統中進行。

【0480】純化的共刺激小鼠 IgG2a 抗人 CD28 抗體 9.3 (Jung et al., 1987) 使用製造商 (Perbio 公司 , 波恩 , 德國) 推薦的 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 (Bangs Laboratories , 伊利諾州 , 美國) 。

【0481】用於陽性和陰性對照刺激物的 pMHC 分別為 A*0201/MLA-001 (從 Melan-A/MART-1 中修飾制得的肽 ELAGIGILT V (SEQ ID NO. 303)) 和 A*0201/DDX5-001 (從 DDX5 中獲得的 YLLPAIVHI (SEQ ID NO. 304)) 。

【0482】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 $^{\circ}$ 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，並且培養在 37 $^{\circ}$ C

下持續 4 天。這種刺激性週期總共進行 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。對於分析，使用了配有合適鐳射儀和篩檢程序的 BD LSRII SORP 細胞儀。肽特異性細胞以占總 CD8+ 細胞的百分比形式進行計算。多聚體分析結果使用 FlowJo 軟體 (Tree Star 公司，Oregon，美國) 進行評估。特定多聚體 + CD8+ 淋巴細胞的體外填裝用與陰性對照刺激組比較而進行檢測。如果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 + 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。

不同癌症肽體外免疫原性

【0483】對於受到測試的 HLA-I 類肽，可透過肽特異性 T 細胞株的生成證明其體外免疫原性。TUMAP 特異性多聚體對本發明的 2 種肽染色後流式細胞儀檢測的典型結果如圖 3 所示，同時也含有相應的陰性對照資訊。本發明 10 種肽的結果匯總於表 19 A。TUMAP 特異

性多聚體對本發明的 7 種肽染色後流式細胞儀檢測的典型結果如圖 4 和 5 所示，同時也含有相應的陰性對照資訊。本發明 60 種肽的結果匯總於表 19 B。

表 19 A：本發明中 H L A I 類肽的體外免疫原性

【0484】申請人對本發明的肽所做的體外免疫原性實驗的示例性結果。 $<20\% = +$ ； $20\% - 49\% = ++$ ； $50\% - 69\% = +++$ ； $\geq 70\% = ++++$

Seq ID	序列	孔
290	KIVDFSYSV	++
291	KLDETGNSL	+
292	GMMTAILGV	+
293	FLVDGSWSI	+
295	YYPGVILGF	++
296	TYVDSSHTI	+
297	PFLQASPHF	++
298	RYLEGTSCI	+
300	AYVLRLETL	+
301	AYKPGALTF	+

表 19 B：本發明 H L A - I 類肽的體外免疫原性

【0485】申請人對本發明的肽所做的體外免疫原性實驗的示例性結果。 $<20\% = +$ ； $20\% - 49\% = ++$ ； $50\% - 69\% = +++$ ； $\geq 70\% = ++++$

SEQ ID	序列	陽性孔[%]
1	LLYPEPWSV	++
2	GLIAGVVS	++
4	KLMPGTYTL	+
5	GIVAHIQEV	+
6	ALFDSL RHV	++
7	ILDHEVPSL	++
11	ALSPSYLTV	++
12	GLLPLLHRA	++++
14	ILAKDLFEI	++
18	ILLDLTDNRL	+

20	GLSQITNQL	++
23	SLFSDEFKV	++++
26	ALQEELTEL	+
27	RLMEENWNA	+++
29	YLLDPSITL	+
31	TITETTVEV	+
35	FLLPFSTVYL	+
90	FLQDLEQRL	+
92	GLLFSLRSV	++
96	LLVSHLYLV	++
138	ALLAKILQI	++
141	FLDKVLVAA	+
144	ALLAFFPGL	+++
149	ILNTHITEL	+
150	VLYDRPLKI	++
151	SVLDSTAKV	++
229	AILAHLNTV	++
230	KLQNIMMLL	++++
232	KIFPAALQLV	++
233	HLFDAFVSV	++
235	KIIDFLSAL	+++
247	ALYEGYATV	++
248	YLDRFLAGV	++
249	GLCERLVSL	+
251	ALSVLRLAL	++
158	HYSQELSLLYL	+
159	LYNKGFIYL	++++
160	VYTL DIPVL	++
161	IYLVSIPEL	++
162	VFTRVSSFL	++
163	DYLGKGLASF	+
165	DYTTWTALL	+
166	YYVESGKLF	+++
167	NYINRILKL	+
168	KYQDILETI	++
169	AYTLIAPNI	+++
173	IYSWILDHF	++
176	EYNQWFTKL	+++

196	LYIDRPLPYL	++++
197	EYSLFPGQVVI	+
199	RYAEEVGIF	++
200	YYGPSLFL	++
204	TYELRYFQI	+
207	AYVVFVSTL	+
218	YYKSTSSAF	+
222	TFSVSSHLL	++
268	QYLGQIQHI	+
269	YFIDSTNLKTHF	+
281	PYRLIFEKF	+++
285	HYPPVQVLF	+

實施例 4

肽的合成

【0486】 所有的肽透過使用 Fmoc 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 RP-HPLC 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 >50%。所有的 TUMAP 優選作為三氟乙酸鹽或乙酸鹽進行給藥，其他藥用鹽形式也可以。

實施例 5

MHC 結合測定

【0487】 本發明基於 T 細胞療法的候選肽進一步測試其 MHC 結合能力（親和性）。單個肽-MHC 複合體透過 UV-配體交換產生，其中，紫外線敏感肽經紫外線照射後裂解，與分析的相關肽交換。只有能夠有效地結合並穩定肽接受 MHC 分子的候選肽才能阻止 MHC 複合物的解離。為了確定交換反應的產率，將基於穩定 MHC 複

合物輕鏈 ($\beta 2m$) 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。

【0488】 96 孔 Maxisorp 板 (NUNC) 在室溫下在 PBS 中以 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 鏈黴包被過夜，用 4 倍洗滌並在 37°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 $15-500\text{ ng/ml}$ 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°C 下孵育 1 小時，洗滌四次，在 37°C 下以 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 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，這是因為它們對 MHC 分子表現出足夠的親合力，並能防止 MHC 複合物的解離。

【0489】 表 20：MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-A*02 的結合根據肽交換產量進行範圍劃分： $<20\% = +$ ； $20\% - 49\% = ++$ ； $50\% - 75\% = +++$ ； $\geq 75\% = ++++$

序列 ID	肽代碼	肽交換
1	LLYPEPWSV	++++
2	GLIAGVVS	+++
3	KLENGDLYL	++++
4	KLMPGTYTL	++++
5	GIVAHIQEV	+++
6	ALFDSL RHV	+++

7	ILDHEVPSL	+++
9	FLVDGSYSI	+++
10	GIAGSLKTV	+++
11	ALSPSYLTV	+++
12	GLLPLLHRA	++++
13	ALMAMLVYV	++
14	ILAKDLFEI	++++
15	YLDLSHNQL	+++
16	YTLDIPVLFGV	++++
18	ILLDLTDNRL	+++
19	SISDNVWEV	+++
20	GLSQITNQL	+++
21	AIQDEIRSV	+++
22	FVDPNTQEKV	++
23	SLFSDEFKV	+++
24	TLDEKVAEL	+++
25	TMDSVLVTV	+++
26	ALQEELTEL	+++
27	RLMEENWNA	+++
28	SLPNGKPVSV	+++
29	YLLDPSITL	+++
30	AMIEEVFEA	++
31	TITETTVEV	+++
32	VQLDSIEDLEV	+++
33	YIKTELISV	+++
34	FLLATEVVTV	++++
35	FLLPFSTVYL	+++
36	SLADTNSLAVV	+++
37	ILAPFSVDL	+++
38	FLGPRIIGL	+++
39	HLLEGSVGV	+++
40	VLIDPQWVLTA	+++
41	ALFENTPKA	++
42	LLDSVSRL	+
43	KAIEVLLTL	+++
44	SLFETAWEA	+++
45	SLTEVSLPL	+++
46	SQFPLPLAV	++
47	ALLERGELFV	+++
48	QVIEDSTGV	++
49	ALNIATHVL	+++
50	ILFHGVFYA	+++
51	LLFSRLCGA	++++
53	KMVGLVVAI	+++

54	VLNPLITAV	+++
55	SLATKIVEA	+++
56	FLHDEKEGIYI	+++
57	TVFTDHMLTV	++
58	YLLPLLPAI	+++
59	KLLDPQEFTL	+++
60	ALFAPLVHL	+++
61	AIVKEIVNI	++
62	ALNPELVQA	++
63	SQIPAQPSV	++
64	SLFPDSLIV	++
65	SVVPDVRSV	++
66	KLIFSVEAV	+++
67	TLLQRLTEV	+++
68	SLSNRLYYL	+++
69	FLAVGLVDV	+++
70	LLLGDSALYL	+++
71	VLHSKFWVV	+++
72	FLTAINYLL	+++
73	YTLREVDTV	++
74	TLFGYSVVL	+++
75	AVIKFLELL	+++
76	AVGPVHNSV	++
77	TLIDEQDIPLV	+++
78	TVVTRLDEI	++
79	VTFKEYVTV	++
80	KLYEADFVL	++
81	NALDKVLSV	+++
82	FIFDEAEKL	+
83	GQASYFYVA	++
84	ALCPRIHEV	++++
85	VLNDILVRA	+++
86	SVDSHFQEV	++
87	TIYKDFVYI	++
88	AQADHLPQL	++
89	QLAPVFQRV	++
90	FLQDLEQRL	+++
92	GLLFSLRSV	++++
94	LLPAVPVGA	+++
95	GLLGSFLFL	++++
96	LLVSHLYLV	++
98	RLFPDFFTRVAL	++
99	YLLQSVNQLLL	++
100	ALLGMIIVGV	+

101	ALADFMLSL	+++
102	VLLDIQEVFQI	+++
103	YLVSEIFKA	+++
104	ALISWQPPRA	+++
105	ALLGTKILL	+++
106	FINDSIVYL	+++
107	LLVPTSGIYFV	+++
108	ILLKNLVTI	++
109	SLDPSVTHL	++
110	FLLGVSKEV	+++
111	AIVDLIHD	++
112	SLGKFTFDV	++++
113	FLERGLESA	++
114	QLIQLHAV	+++
115	SLDPDTLPAV	++
117	KMPDVELFV	+++
118	QLWQFLVTL	+++
119	FIIQGLRSVGA	+++
120	VTPVTVSAV	+
121	FTIFRTISV	+++
122	GVVDPVHGV	++
123	VLDPALPALV	++
124	KVMATIEKV	++
125	SLADYEHFV	++++
126	QMFQYFITV	++++
127	KLDGNELDL	+++
128	TQSPATLSV	++
129	RLQDILWFL	++++
130	SLLGGTFVGI	+++
131	VTSNSGILGV	+++
132	ILGEVLAQL	+++
133	ALLPRLHQL	++++
134	GLAVPTPSV	+++
135	HLSTIIHEA	+++
136	FLFGGVLMTL	++
138	ALLAKILQI	+++
139	FLLPTGAEA	++
141	FLDKVLVAA	+++
142	ILVEGISTV	+++
143	ALLPELREV	+++
144	ALLAFFPGL	+++
145	YLWATIQR	+++
146	ALHFSEDEI	++
147	YLMDDTVEI	++++

148	MLAGIAITV	+++
149	ILNTHITEL	+++
150	VL YDRPLKI	+++
151	SVLDSTAKV	++
152	MMVGDLLEV	+++
153	FISERVEVV	++++
154	RLLGTEFQV	+++
155	LLNPVVEFV	+++
156	ILGDLSHLL	+++
157	TLTSLLAQA	+++
229	AILAHLNTV	++++
230	KLQNIMMLL	++
231	MLDKYSHYL	+++
232	KIFPAALQLV	+++
233	HLFDAFVSV	+++
234	LLSPHNPAL	+++
235	KIIDFLSAL	+++
236	STIAILNSV	+++
237	ALAPHLDDA	+++
238	GLYERPTAA	++
239	KMNESTRSV	++
240	YMGEKLIASV	+++
241	KTIQQLETV	++
242	WLYGEDHQL	++
243	FMADDIFSV	+++
244	YLLEKNRVV	++
245	SLLDLPLSL	++++
246	TVSDVLNSV	+++
247	ALYEGYATV	+++
248	YLDRFLAGV	++++
249	GLCERLVSL	++++
250	SLAPATPEV	+++
251	ALSVLRLAL	+++
252	RLMEICESL	+++
253	ALAEIDNSL	+++
254	KLQGKLPKL	++
255	SLLHFTENL	+++
256	SLGEEQFSV	++
257	GLYTDPCGV	++++
258	LLSERFINV	++++
259	ILLPRIIEA	+++
260	ILLEKILSL	+++
261	QLQDRVYAL	+++
262	FMVDKAIYL	+++

263	VLLSEQGDVKL	++
264	KLFPQETLFL	+++
265	NTCPYVHNI	+++
266	YAIGLVMRL	+++

【0490】 表 21：MHC-I 類結合分數。HLA-I 類限制肽與 HLA-A*24 的結合根據肽交換產量進行範圍劃分： $<20\% = +$ ； $20\% - 49\% = ++$ ； $50\% - 75\% = +++$ ； $\geq 75\% = ++++$

序列 ID	肽代碼	肽交換
172	TYTTVPRVAF	++++
177	VYPWLGALL	++++
178	IFIEVFSHF	+++
179	MYDSYWRQF	++++
180	IYDDSFIRPVT	+++
181	LYLDIINLF	++++
182	IYQLDTASI	+++
183	VFTSTARAF	+++
184	VFQNFPLLF	++++
185	IYKVGAPTI	+++
186	IFPQFLYQF	++++
187	TYLRDQHFL	++++
188	RYFKGLVF	+++
189	WYVNGVNYF	++
190	GFFIFNERF	+++
191	VFKASKITF	+++
192	SYALLTYMI	++++
193	RFHPTPLLL	++++
194	EFGSLHLEFL	+
198	LYLDKATLI	+++
203	FYSRLQKF	+++
205	VHIPEVYLI	+++
206	EYQENFLSF	+++
208	TYTQDFNKF	+++
210	IYTMIRNL	++++
211	YYLEVGTLI	++++
214	LYLKLWNLI	+++
215	YFDKVVTL	++
216	QYSSVFKSL	++++
217	FFPTRQMGLLF	++++
219	EYPLVINTL	+++
220	GYIDNVTLI	++++

221	RYSTGLAGNLL	+++
223	KYIPYKYVI	+++
224	QYLENLEKL	+++
225	YYVYIMNHL	+++
226	VYRDETGELEF	+++
227	IFLDYEAGTSLF	++++
228	KYTSWYVAL	++++
267	KYMVYPQTF	++++
271	LYHDIFSRL	++++
272	QYLQDAYSF	++++
273	TYIKPISKL	+++
274	AYLHSHALI	++++
275	EYINQGDLHEF	+++
276	VYGFQWRHF	++++
278	RYISDQLFTNF	++++
279	TYIESASEL	+++
280	RYPDNLKHLYL	++++
282	KFVDSTFYL	++++
283	TYGDAGLTYTF	+++
284	RYLNKAFHI	+++
286	RYPDNLKHL	++
288	VYVSDIQEL	+++
289	KYPVEWAKF	++++
158	HYSQELSLLYL	++++
159	LYNKGFIYL	++++
160	VYTL DIPVL	++++
161	IYLVSIPEL	++++
162	VFTRVSSFL	+++
163	DYLNKGLASF	++++
164	KFSSFSLFF	+++
165	DYTTWTALL	++++
166	YYVESGKLF	++++
167	NYINRILKL	++++
168	KYQDILETI	++++
169	AYTLIAPNI	+++
170	VYEDQVGKF	++
171	LFIPSSKLLFL	+++
173	IYSWILDHF	++++
174	VYVGGGQIIHL	+++
175	YYEVHKELF	++++
176	EYNQWFTKL	+++
195	TYSVSFPMF	++++
196	LYIDRPLPYL	+++
197	EYSLFPGQVVI	+++

199	RYAEEVGIF	+++
200	YYGPSLFL	+++
201	IYATEAHVF	+++
202	VYWDSAGAAHF	++++
204	TYELRYFQI	++++
207	AYVVFVSTL	++
209	TYKDEGNDYF	+++
218	YYKSTSSAF	+++
222	TFSVSSHFL	+++
268	QYLGQIQHI	+++
269	YFIDSTNLKTHF	+++
270	NYEYVHKELF	+++
277	VYQGHTALL	++++
281	PYRLIFEKF	++
285	HYPPVQVLF	+++
287	LYITEPKTI	+++

實施例 6

細胞表面提呈的腫瘤相關肽的絕對定量

【0491】黏合劑例如抗體和/或 TCR 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排除提呈於細胞表面上肽的提呈和濃度。除了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，如實施例 1 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 分離效率和分析的組織樣本細胞計數。

nanoLC-MS/MS 肽定量

【0492】對於透過質譜法對肽的準確定量，使用內標法生成每種肽的校準曲線。內標是每種肽的雙同位素標記的變體，即，TUMAP 合成中納入 2 個同位素標記的氨基酸。它與腫瘤相關肽僅在品質上不同，但在其他的物理化

學性質方面無差異 (Anderson et al., 2012)。內標被摻入到每個 MS 樣本，所有 MS 信號均標準化為內標 MS 信號，以平衡 MS 實驗之間潛在的技術差異。

【0493】 校準曲線用至少三種不同的矩陣繪製，即，來自于類似於常規 MS 樣本的天然樣本的 HLA 肽洗脫液，並且每個制備品以重複 MS 運行進行測量。對於評價，MS 信號被標準化為內標信號，校準曲線透過 logistic 回歸計算。

【0494】 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正曲線進行定量。

肽/MHC 分離的效率

【0495】 對於任何蛋白質純化過程，來自組織樣本蛋白的分離與相關蛋白的一定損失相關聯。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。為了能夠天然肽 MHC/複合體與加樣物，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。這些複合物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/複合物被獲取。因此，測量單標記 TUMAP 的恢復可得到個體 TUMAP 分離效率相關的結論。

【0496】 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。但是，由於分離效率不能從一種肽外推至其他肽，因此，有必要單獨分析每個 T U M A P 。

【0497】 固體、冷凍組織中細胞計數的測定

【0498】 為了確定經過絕對肽定量的組織樣本的細胞數，發明人採用了 DNA 含量分析。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)。在肽分離方案期間，組織樣本被加工為均勻的裂解物，從中取一小等份裂解物。樣本等分為三份，從中分離 DNA 被分離 (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。

【0499】 為了計算細胞數，生成了來自單個健康血細胞等分試樣的 DNA 標準曲線，使用一系列指定的細胞數。標準曲線用於計算每次 DNA 分離總 DNA 含量的總細胞含量。用於肽分離的組織樣本的平均總細胞計數，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

【0500】 使用前述實驗的資料，發明人以總肽量除以樣本總細胞計數計算得出每個細胞的 TUMAP 拷貝數，隨後除以分離效率。選定肽的細胞拷貝數如表 22 所示。

【0501】 表 22：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： $<100 = +$ ； $\geq 100 = ++$ ； $\geq 1,000 = +++$ ； $\geq 10,000 = ++++$ 。提示樣本數量，其中提供評估的高品質 MS 資料。

序列 ID 號	肽代碼	每細胞拷貝數（中位數）	樣本數量
2	MET-007	+	15
24	MAGEC2-001	+	16
32	PRAME-006	++	17
39	ABCC11-001	+	14
251	SPINK2-001	++	16

參考文獻列表

- Abdelmalak, C. A. et al., Clin Lab **60** (2014): 55-61
- Accardi, L. et al., Int.J Cancer **134** (2014): 2742-2747
- Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124
- Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933
- American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
- Ampie, L. et al., Front Oncol. **5** (2015): 12
- Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902
- Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res **11** (2012): 1868-1878
- Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814
- Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708

- Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274
- Beard, R. E. et al., Clin Cancer Res **19** (2013): 4941-4950
- 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)
- Bill, K. L. et al., Lab Invest (2015)
- Borel, F. et al., Hepatology **55** (2012): 821-832
- 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
- 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
- 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
- Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. **65** (2004): 1211-1223

- Chapiro, J. et al., Radiol.Med. **119** (2014): 476-482
- Chen, T. et al., Proteins **77** (2009): 209-219
- ClinicalTrials.gov, (2015), <http://www.clinicaltrials.gov>
- Cliteur, V. P. et al., Clin Sarcoma.Res **2** (2012): 3
- 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
- Dannenmann, S. R. et al., Cancer Immunol.Res. **1** (2013): 288-295
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol **171** (2003): 2197-2207
- Dyrskjot, L. et al., Br.J Cancer **107** (2012): 116-122
- Economopoulou, P. et al., Ann.Transl.Med. **4** (2016): 173
- Edwards, S. et al., Br.J Cancer **92** (2005): 376-381
- Emens, L. A., Expert.Rev.Anticancer Ther. **12** (2012): 1597-1611
- Estey, E. H., Am.J Hematol. **89** (2014): 1063-1081
- Evans, R. L. et al., Cancer Prev.Res (Phila) **7** (2014): 545-555
- 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>

- Finocchiaro, G. et al., *Ann.Transl.Med.* **3** (2015): 83
- 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
- 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
- Gomes, I. M. et al., *Mol.Cancer Res* **10** (2012): 573-587
- Gonen-Korkmaz, C. et al., *Exp.Ther.Med* **8** (2014): 1695-1700
- Granziero, L. et al., *Blood* **97** (2001): 2777-2783
- 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
- Grunewald, T. G. et al., *Biol Cell* **104** (2012): 641-657
- Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008): 606-609
- Guo, Y. et al., *Clin Cancer Res* **15** (2009): 1762-1769
- Gustafsson, C. et al., *Trends Biotechnol.* **22** (2004): 346-353
- Hallek, Michael et al., *ASH Annual Meeting Abstracts* **112** (2008): 325

- Hao, J. et al., *Oncotarget*. **6** (2015): 42028-42039
- Harig, S. et al., *Blood* **98** (2001): 2999-3005
- Hemminger, J. A. et al., *Mod.Pathol.* **27** (2014): 1238-1245
- Hinrichs, C. S. et al., *Nat.Biotechnol.* **31** (2013): 999-1008
- Hlavata, I. et al., *Mutagenesis* **27** (2012): 187-196
- Holtl, L. et al., *Clin.Cancer Res.* **8** (2002): 3369-3376
- Honorat, M. et al., *BMC.Struct.Biol* **13** (2013): 7
- 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
- Kaufman, H. L. et al., *Clin Cancer Res* **14** (2008): 4843-4849
- 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** (2015): 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

- Kronenberger, K. et al., J Immunother. **31** (2008): 723-730
- Kuball, J. et al., Blood **109** (2007): 2331-2338
- Lajmi, N. et al., Br.J Haematol. **171** (2015): 752-762
- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005): 496-504
- Liang, Z. et al., Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi. **27** (2005): 534-537
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
- Liu, H. et al., Oncotarget. (2016)
- 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
- 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
- Mitsuhashi, K. et al., Int.J Hematol. **100** (2014): 88-95
- 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
- Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027
- 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
- National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
- National Cancer Institute (NCI), (19-1-2011),
<http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/kidney/page3>
- O'Prey, J. et al., J Virol. **82** (2008): 5933-5939
- Ohigashi, Y. et al., Clin Cancer Res. **11** (2005): 2947-2953
- Okuno, K. et al., Exp.Ther Med. **2** (2011): 73-79
- 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
- Petrini, I., Ann.Transl.Med. **3** (2015): 82
- 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
- Qin, Y. et al., Chin Med.J (Engl.) **127** (2014): 1666-1671
- Quillien, V. et al., Anticancer Res. **17** (1997): 387-391
- Quinn, D. I. et al., Urol.Oncol. (2015)
- Rakic, M. et al., Hepatobiliary.Surg.Nutr. **3** (2014): 221-226
- Rammensee, H. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002),
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Reinisch, W. et al., J Immunother. **25** (2002): 489-499
- Reinmuth, N. et al., Dtsch.Med.Wochenschr. **140** (2015): 329-333
- Reynolds, P. A. et al., Genes Dev. **17** (2003): 2094-2107
- Richards, S. et al., J Natl.Cancer Inst. **91** (1999): 861-868
- 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
- Rouanne, M. et al., Crit Rev Oncol Hematol. **98** (2016): 106-115
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011)
- 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
- Savas, S. et al., PLoS.One. **6** (2011): e18306
- 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
- Schuetz, C. S. et al., Cancer Res **66** (2006): 5278-5286
- 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
- Siegel, S. et al., Blood **102** (2003): 4416-4423
- Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Simmen, F. A. et al., Reprod.Biol Endocrinol. **6** (2008): 41
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Sowalsky, A. G. et al., Mol.Cancer Res. **13** (2015): 98-106
- Spaner, D. E. et al., Cancer Immunol Immunother. **54** (2005): 635-646
- Srivastava, N. et al., Cancer Manag.Res. **6** (2014): 279-289
- Stanbrough, M. et al., Cancer Res **66** (2006): 2815-2825
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016a)
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016b)
- Steinway, S. N. et al., PLoS.One. **10** (2015): e0128159
- 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
- Szczepanski, M. J. et al., Oral Oncol **49** (2013): 144-151
- Szczepanski, M. J. et al., Biomark.Med. **7** (2013): 575-578

- Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991): 2391-2396
- Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000): 802-807
- Tan, P. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **419** (2012): 801-808
- Tan, Q. et al., Cell Physiol Biochem. **38** (2016): 469-486
- 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
- Triulzi, T. et al., Oncotarget. **6** (2015): 28173-28182
- Tsuchiya, T. et al., Chemotherapy **61** (2016): 77-86
- Uemura, T. et al., Cancer Sci. **101** (2010): 2404-2410
- Vici, P. et al., J Exp.Clin Cancer Res **33** (2014): 29
- 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, L. et al., Cancer Res **70** (2010): 5818-5828
- Whiteland, H. et al., Clin Exp.Metastasis **31** (2014): 909-920
- 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/>
- Yamada, A. et al., Breast Cancer Res Treat. **137** (2013): 773-782
- Yang, F. et al., Breast Cancer Res Treat. **145** (2014): 23-32
- Yao, J. et al., Cancer Immunol.Res. **2** (2014): 371-379
- Yeh, I. et al., Nat.Comm. **6** (2015): 7174
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zhang, W. et al., Acta Haematol. **130** (2013): 297-304
- Zou, C. et al., Cancer **118** (2012): 1845-1855
- Zufferey, R. et al., J Virol. **73** (1999): 2886-2892

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> 用於對抗多種癌症的免疫療法的新胜肽及肽胜組合

<130> I32936WO

<150> GB1521894.4

<151> 2015-12-11

<150> US 62/266,233

<151> 2015-12-11

<160> 306

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Leu Tyr Pro Glu Pro Trp Ser Val

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile

1

5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Leu Glu Glu Asn Gly Asp Leu Tyr Leu

1

5

10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Leu Met Pro Gly Thr Tyr Thr Leu

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Ile Val Ala His Ile Gln Glu Val

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Leu Phe Asp Ser Leu Arg His Val

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Leu Asp His Glu Val Pro Ser Leu

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Ile Tyr Gln Phe Leu Ile Ala Val

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Leu Val Asp Gly Ser Tyr Ser Ile

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Ile Ala Gly Ser Leu Lys Thr Val

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Leu Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Val

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Leu Leu Pro Leu Leu His Arg Ala

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ala Leu Met Ala Met Leu Val Tyr Val

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ile Leu Ala Lys Asp Leu Phe Glu Ile

1

5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Tyr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu

1

5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Tyr Thr Leu Asp Ile Pro Val Leu Phe Gly Val

1

5

10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Val Phe Pro Asp Asp Met Pro Thr Leu
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ile Leu Leu Asp Leu Thr Asp Asn Arg Leu
1 5 10

<210> 19
<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Ile Ser Asp Asn Val Trp Glu Val

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Leu Ser Gln Ile Thr Asn Gln Leu

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Ile Gln Asp Glu Ile Arg Ser Val

1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Phe Val Asp Pro Asn Thr Gln Glu Lys Val

1 5 10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Leu Phe Ser Asp Glu Phe Lys Val

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Thr Leu Asp Glu Lys Val Ala Glu Leu

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Thr Met Asp Ser Val Leu Val Thr Val

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Leu Gln Glu Glu Leu Thr Glu Leu

1

5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Leu Met Glu Glu Asn Trp Asn Ala

1

5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Leu Pro Asn Gly Lys Pro Val Ser Val

1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Ile Thr Leu

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Met Ile Glu Glu Val Phe Glu Ala

1

5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Thr Ile Thr Glu Thr Thr Val Glu Val

1

5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Tyr Ile Lys Thr Glu Leu Ile Ser Val
1 5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Phe Leu Leu Ala Thr Glu Val Val Thr Val

1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Phe Leu Leu Pro Phe Ser Thr Val Tyr Leu

1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val Val

1 5 10

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ile Leu Ala Pro Phe Ser Val Asp Leu

1

5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Phe Leu Gly Pro Arg Ile Ile Gly Leu

1

5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

His Leu Leu Glu Gly Ser Val Gly Val

1

5

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Val Leu Ile Asp Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala

1

5

10

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ala Leu Phe Glu Asn Thr Pro Lys Ala

1

5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu

1

5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Lys Ala Ile Glu Val Leu Leu Thr Leu

1

5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ser Leu Phe Glu Thr Ala Trp Glu Ala

1

5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ser Leu Thr Glu Val Ser Leu Pro Leu

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ser Gln Phe Pro Leu Pro Leu Ala Val

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Leu Leu Glu Arg Gly Glu Leu Phe Val

1 5 10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Val Ile Glu Asp Ser Thr Gly Val

1

5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Leu Asn Ile Ala Thr His Val Leu

1

5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ile Leu Phe His Gly Val Phe Tyr Ala

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Leu Leu Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Leu Ala Val Leu Phe Ser Gly Ala

1

5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Lys Met Val Gly Leu Val Val Ala Ile

1

5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Val Leu Asn Pro Leu Ile Thr Ala Val

1

5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ser Leu Ala Thr Lys Ile Val Glu Ala

1

5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Phe Leu His Asp Glu Lys Glu Gly Ile Tyr Ile

1

5

10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Thr Val Phe Thr Asp His Met Leu Thr Val

1

5

10

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala Leu

1

5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu

1

5

10

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Leu Phe Ala Pro Leu Val His Leu

1

5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Ile Val Lys Glu Ile Val Asn Ile

1

5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala

1

5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ser Val

1

5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ser Leu Phe Pro Asp Ser Leu Ile Val

1

5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ser Val Val Pro Asp Val Arg Ser Val

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Lys Leu Ile Phe Ser Val Glu Ala Val

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Thr Leu Leu Gln Arg Leu Thr Glu Val

1

5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Ser Leu Ser Asn Arg Leu Tyr Tyr Leu

1

5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val

1

5

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu

1

5

10

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Val Leu His Ser Lys Phe Trp Val Val

1

5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Phe Leu Thr Ala Ile Asn Tyr Leu Leu

1

5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Tyr Thr Leu Arg Glu Val Asp Thr Val

1

5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu

1

5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Val Ile Lys Phe Leu Glu Leu Leu

1

5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ala Val Gly Pro Val His Asn Ser Val

1 5

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Leu Ile Asp Glu Gln Asp Ile Pro Leu Val

1 5 10

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Val Val Thr Arg Leu Asp Glu Ile

1

5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Val Thr Phe Lys Glu Tyr Val Thr Val

1

5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Lys Leu Tyr Glu Ala Asp Phe Val Leu

1

5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Asn Ala Leu Asp Lys Val Leu Ser Val

1

5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Phe Ile Phe Asp Glu Ala Glu Lys Leu

1

5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Gln Ala Ser Tyr Phe Tyr Val Ala

1

5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Ala Leu Cys Pro Arg Ile His Glu Val

1

5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Val Leu Asn Asp Ile Leu Val Arg Ala

1

5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Val Asp Ser His Phe Gln Glu Val

1

5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Thr Ile Tyr Lys Asp Phe Val Tyr Ile

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Ala Gln Ala Asp His Leu Pro Gln Leu

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gln Leu Ala Pro Val Phe Gln Arg Val

1

5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Leu Gln Asp Leu Glu Gln Arg Leu

1

5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Lys Leu Phe Asp Glu Ser Ile Leu Ile

1

5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Gly Leu Leu Phe Ser Leu Arg Ser Val

1

5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gln Val Leu Glu Leu Asp Val Ala Asp Ile

1

5

10

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Leu Leu Leu Pro Ala Val Pro Val Gly Ala

1 5 10

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Gly Leu Leu Gly Ser Leu Phe Phe Leu

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Leu Leu Val Ser His Leu Tyr Leu Val

1

5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Ser Thr Leu Pro Lys Ser Leu Ser Leu

1

5

<210> 98

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Arg Leu Phe Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu
1 5 10

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Tyr Leu Leu Gln Ser Val Asn Gln Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Ala Leu Leu Gly Met Ile Ile Val Gly Val

1 5 10

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Ala Leu Ala Asp Phe Met Leu Ser Leu

1 5

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Val Leu Leu Asp Ile Gln Glu Val Phe Gln Ile

1 5 10

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

<400> 103

Tyr Leu Val Ser Glu Ile Phe Lys Ala
1 5

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

<400> 104

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

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Leu Leu Gly Thr Lys Ile Leu Leu

1

5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Phe Ile Asn Asp Ser Ile Val Tyr Leu

1

5

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile Tyr Phe Val

1 5 10

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Ile Leu Leu Lys Asn Leu Val Thr Ile

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Phe Leu Leu Gly Val Ser Lys Glu Val

1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Ala Ile Val Asp Leu Ile His Asp Ile

1

5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Ser Leu Gly Lys Phe Thr Phe Asp Val

1

5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Phe Leu Glu Arg Gly Leu Glu Ser Ala

1

5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Gln Leu Ile Gln Thr Leu His Ala Val

1

5

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Ser Leu Asp Pro Asp Thr Leu Pro Ala Val

1

5

10

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Thr Ile Asp Glu Ser Gly Ser Ile Leu

1

5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Lys Met Pro Asp Val Glu Leu Phe Val

1

5

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Gln Leu Trp Gln Phe Leu Val Thr Leu

1 5

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Phe Ile Ile Gln Gly Leu Arg Ser Val Gly Ala

1 5 10

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Val Thr Pro Val Thr Val Ser Ala Val

1

5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Phe Thr Ile Phe Arg Thr Ile Ser Val

1

5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Gly Val Val Asp Pro Val His Gly Val

1 5

<210> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Val Leu Asp Pro Ala Leu Pro Ala Leu Val

1 5 10

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Lys Val Met Ala Thr Ile Glu Lys Val

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Ser Leu Ala Asp Tyr Glu His Phe Val

1

5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Gln Met Phe Gln Tyr Phe Ile Thr Val

1

5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Lys Leu Asp Gly Asn Glu Leu Asp Leu

1

5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val

1

5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Arg Leu Gln Asp Ile Leu Trp Phe Leu

1 5

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Ser Leu Leu Gly Gly Thr Phe Val Gly Ile

1 5 10

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Val Thr Ser Asn Ser Gly Ile Leu Gly Val
1 5 10

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Ile Leu Gly Glu Val Leu Ala Gln Leu
1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Ala Leu Leu Pro Arg Leu His Gln Leu

1

5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Gly Leu Ala Val Pro Thr Pro Ser Val

1

5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

His Leu Ser Thr Ile Ile His Glu Ala

1

5

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Phe Leu Phe Gly Gly Val Leu Met Thr Leu

1

5

10

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Glu Ile Ala Ser Ile Thr Glu Gln Leu

1

5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Ala Leu Leu Ala Lys Ile Leu Gln Ile

1

5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Phe Leu Leu Pro Thr Gly Ala Glu Ala

1

5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Val Leu Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu

1

5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Phe Leu Asp Lys Val Leu Val Ala Ala

1

5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Ile Leu Val Glu Gly Ile Ser Thr Val

1

5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Ala Leu Leu Pro Glu Leu Arg Glu Val

1

5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Ala Leu Leu Ala Phe Phe Pro Gly Leu

1

5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Tyr Leu Trp Ala Thr Ile Gln Arg Ile

1

5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Ala Leu His Phe Ser Glu Asp Glu Ile

1

5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Tyr Leu Met Asp Asp Thr Val Glu Ile

1

5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Met Leu Ala Gly Ile Ala Ile Thr Val

1

5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Ile Leu Asn Thr His Ile Thr Glu Leu

1

5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Val Leu Tyr Asp Arg Pro Leu Lys Ile

1

5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Ser Val Leu Asp Ser Thr Ala Lys Val

1

5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Met Met Val Gly Asp Leu Leu Glu Val

1

5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Phe Ile Ser Glu Arg Val Glu Val Val

1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Arg Leu Leu Gly Thr Glu Phe Gln Val

1 5

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Leu Leu Asn Pro Val Val Glu Phe Val

1

5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Ile Leu Gly Asp Leu Ser His Leu Leu

1

5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Thr Leu Thr Ser Leu Leu Ala Gln Ala

1

5

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

His Tyr Ser Gln Glu Leu Ser Leu Leu Tyr Leu

1

5

10

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 159

Leu Tyr Asn Lys Gly Phe Ile Tyr Leu

1

5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

Val Tyr Thr Leu Asp Ile Pro Val Leu

1

5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 161

Ile Tyr Leu Val Ser Ile Pro Glu Leu

1

5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

Val Phe Thr Arg Val Ser Ser Phe Leu

1

5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Ala Ser Phe

1

5

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 164

Lys Phe Ser Ser Phe Ser Leu Phe Phe

1

5

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

Asp Tyr Thr Thr Trp Thr Ala Leu Leu

1

5

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

Tyr Tyr Val Glu Ser Gly Lys Leu Phe

1 5

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 167

Asn Tyr Ile Asn Arg Ile Leu Lys Leu

1 5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

Lys Tyr Gln Asp Ile Leu Glu Thr Ile

1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

Ala Tyr Thr Leu Ile Ala Pro Asn Ile

1

5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 170

Val Tyr Glu Asp Gln Val Gly Lys Phe

1

5

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 171

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

<210> 172
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 172

Thr Tyr Thr Thr Val Pro Arg Val Ala Phe
1 5 10

<210> 173
<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 173

Ile Tyr Ser Trp Ile Leu Asp His Phe

1

5

<210> 174

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Val Tyr Val Gly Gly Gly Gln Ile Ile His Leu

1

5

10

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 175

Tyr Tyr Glu Val His Lys Glu Leu Phe

1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 176

Glu Tyr Asn Gln Trp Phe Thr Lys Leu

1 5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177

Val Tyr Pro Trp Leu Gly Ala Leu Leu

1

5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 178

Ile Phe Ile Glu Val Phe Ser His Phe

1

5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 179

Met Tyr Asp Ser Tyr Trp Arg Gln Phe

1

5

<210> 180

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

Ile Tyr Asp Asp Ser Phe Ile Arg Pro Val Thr Phe

1

5

10

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

Leu Tyr Leu Asp Ile Ile Asn Leu Phe

1

5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Ile Tyr Gln Leu Asp Thr Ala Ser Ile

1

5

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

Val Phe Thr Ser Thr Ala Arg Ala Phe

1

5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

Val Phe Gln Asn Phe Pro Leu Leu Phe

1

5

<210> 185

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 185

Ile Tyr Lys Val Gly Ala Pro Thr Ile

1

5

<210> 186

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Ile Phe Pro Gln Phe Leu Tyr Gln Phe

1

5

<210> 187

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 187

Thr Tyr Leu Arg Asp Gln His Phe Leu

1

5

<210> 188

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

Arg Tyr Phe Lys Gly Leu Val Phe

1 5

<210> 189

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

Trp Tyr Val Asn Gly Val Asn Tyr Phe

1 5

<210> 190

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 190

Gly Phe Phe Ile Phe Asn Glu Arg Phe

1 5

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

Val Phe Lys Ala Ser Lys Ile Thr Phe

1

5

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

Ser Tyr Ala Leu Leu Thr Tyr Met Ile

1

5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Arg Phe His Pro Thr Pro Leu Leu Leu

1 5

<210> 194

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Glu Phe Gly Ser Leu His Leu Glu Phe Leu

1 5 10

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

Thr Tyr Ser Val Ser Phe Pro Met Phe

1 5

<210> 196

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

Leu Tyr Ile Asp Arg Pro Leu Pro Tyr Leu

1 5 10

<210> 197

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

Glu Tyr Ser Leu Phe Pro Gly Gln Val Val Ile
1 5 10

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Leu Tyr Leu Asp Lys Ala Thr Leu Ile
1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 199

Arg Tyr Ala Glu Glu Val Gly Ile Phe

1

5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Tyr Tyr Gly Pro Ser Leu Phe Leu Leu

1

5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Ile Tyr Ala Thr Glu Ala His Val Phe

1

5

<210> 202

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Val Tyr Trp Asp Ser Ala Gly Ala Ala His Phe

1

5

10

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

Phe Tyr Ser Arg Leu Leu Gln Lys Phe

1

5

<210> 204

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

Thr Tyr Glu Leu Arg Tyr Phe Gln Ile

1

5

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

Val His Ile Pro Glu Val Tyr Leu Ile

1

5

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

Glu Tyr Gln Glu Asn Phe Leu Ser Phe

1 5

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

Ala Tyr Val Val Phe Val Ser Thr Leu

1 5

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 208

Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe
1 5

<210> 209

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

Thr Tyr Lys Asp Glu Gly Asn Asp Tyr Phe
1 5 10

<210> 210

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 210

Ile Tyr Thr Met Ile Tyr Arg Asn Leu

1 5

<210> 211

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 211

Tyr Tyr Leu Glu Val Gly Lys Thr Leu Ile

1 5 10

<210> 212

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 212

Tyr Tyr Thr Phe His Phe Leu Tyr Phe

1 5

<210> 213

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 213

Ile Phe Asp Glu Ala Glu Lys Leu

1

5

<210> 214

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 214

Leu Tyr Leu Lys Leu Trp Asn Leu Ile

1

5

<210> 215

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 215

Tyr Phe Asp Lys Val Val Thr Leu

1

5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 216

Gln Tyr Ser Ser Val Phe Lys Ser Leu

1

5

<210> 217

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 217

Phe Phe Pro Pro Thr Arg Gln Met Gly Leu Leu Phe

1

5

10

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 218

Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Ser Ala Phe

1

5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 219

Glu Tyr Pro Leu Val Ile Asn Thr Leu

1

5

<210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

Gly Tyr Ile Asp Asn Val Thr Leu Ile

1

5

<210> 221

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 221

Arg Tyr Ser Thr Gly Leu Ala Gly Asn Leu Leu

1

5

10

<210> 222

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 222

Thr Phe Ser Val Ser Ser His Leu Phe

1

5

<210> 223

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 223

Lys Tyr Ile Pro Tyr Lys Tyr Val Ile

1

5

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 224

Gln Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Lys Leu

1

5

<210> 225

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 225

Tyr Tyr Val Tyr Ile Met Asn His Leu

1

5

<210> 226

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 226

Val Tyr Arg Asp Glu Thr Gly Glu Leu Phe

1

5

10

<210> 227

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 227

Ile Phe Leu Asp Tyr Glu Ala Gly Thr Leu Ser Phe

1

5

10

<210> 228

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 228

Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu

1

5

<210> 229

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 229

Ala Ile Leu Ala His Leu Asn Thr Val

1

5

<210> 230

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 230

Lys Leu Gln Asn Ile Met Met Leu Leu

1

5

<210> 231

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 231

Met Leu Asp Lys Tyr Ser His Tyr Leu

1

5

<210> 232

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 232

Lys Ile Phe Pro Ala Ala Leu Gln Leu Val

1 5 10

<210> 233

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 233

His Leu Phe Asp Ala Phe Val Ser Val

1 5

<210> 234

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 234

Leu Leu Ser Pro His Asn Pro Ala Leu

1 5

<210> 235

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 235

Lys Ile Ile Asp Phe Leu Ser Ala Leu

1

5

<210> 236

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 236

Ser Thr Ile Ala Ile Leu Asn Ser Val

1

5

<210> 237

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 237

Ala Leu Ala Pro His Leu Asp Asp Ala

1

5

<210> 238

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 238

Gly Leu Tyr Glu Arg Pro Thr Ala Ala

1

5

<210> 239

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 239

Lys Met Asn Glu Ser Thr Arg Ser Val

1

5

<210> 240

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 240

Tyr Met Gly Glu Glu Lys Leu Ile Ala Ser Val

1

5

10

<210> 241

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 241

Lys Thr Ile Gln Gln Leu Glu Thr Val

1

5

<210> 242

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 242

Trp Leu Tyr Gly Glu Asp His Gln Ile

1

5

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 243

Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val

1

5

<210> 244

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 244

Tyr Leu Leu Glu Lys Asn Arg Val Val

1

5

<210> 245

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 245

Ser Leu Leu Asp Leu Pro Leu Ser Leu

1

5

<210> 246

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 246

Thr Val Ser Asp Val Leu Asn Ser Val

1

5

<210> 247

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 247

Ala Leu Tyr Glu Gly Tyr Ala Thr Val

1

5

<210> 248

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 248

Tyr Leu Asp Arg Phe Leu Ala Gly Val

1

5

<210> 249

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 249

Gly Leu Cys Glu Arg Leu Val Ser Leu

1

5

<210> 250

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 250

Ser Leu Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val

1 5

<210> 251

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 251

Ala Leu Ser Val Leu Arg Leu Ala Leu

1 5

<210> 252

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 252

Arg Leu Met Glu Ile Cys Glu Ser Leu

1 5

<210> 253

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 253

Ala Leu Ala Glu Leu Ile Asp Asn Ser Leu

1 5 10

<210> 254

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 254

Lys Leu Gln Gly Lys Leu Pro Glu Leu

1

5

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 255

Ser Leu Leu His Phe Thr Glu Asn Leu

1

5

<210> 256

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 256

Ser Leu Gly Glu Glu Gln Phe Ser Val

1

5

<210> 257

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 257

Gly Leu Tyr Thr Asp Pro Cys Gly Val

1

5

<210> 258

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 258

Leu Leu Ser Glu Arg Phe Ile Asn Val

1

5

<210> 259

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 259

Ile Leu Leu Pro Arg Ile Ile Glu Ala

1

5

<210> 260

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 260

Ile Leu Leu Glu Lys Ile Leu Ser Leu

1

5

<210> 261

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 261

Gln Leu Gln Asp Arg Val Tyr Ala Leu

1

5

<210> 262

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 262

Phe Met Val Asp Lys Ala Ile Tyr Leu

1

5

<210> 263

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 263

Val Leu Leu Ser Glu Gln Gly Asp Val Lys Leu
1 5 10

<210> 264

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 264

Lys Leu Phe Pro Gln Glu Thr Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 265

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 265

Asn Thr Cys Pro Tyr Val His Asn Ile

1

5

<210> 266

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 266

Tyr Ala Ile Gly Leu Val Met Arg Leu

1

5

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 267

Lys Tyr Met Val Tyr Pro Gln Thr Phe

1

5

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 268

Gln Tyr Leu Gly Gln Ile Gln His Ile

1

5

<210> 269

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 269

Tyr Phe Ile Asp Ser Thr Asn Leu Lys Thr His Phe

1

5

10

<210> 270

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 270

Asn Tyr Tyr Glu Val His Lys Glu Leu Phe

1

5

10

<210> 271

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 271

Leu Tyr His Asp Ile Phe Ser Arg Leu

1

5

<210> 272

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 272

Gln Tyr Leu Gln Asp Ala Tyr Ser Phe

1

5

<210> 273

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 273

Thr Tyr Ile Lys Pro Ile Ser Lys Leu

1

5

<210> 274

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 274

Ala Tyr Leu His Ser His Ala Leu Ile

1 5

<210> 275

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 275

Glu Tyr Ile Asn Gln Gly Asp Leu His Glu Phe

1 5 10

<210> 276

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 276

Val Tyr Gly Phe Gln Trp Arg His Phe

1 5

<210> 277

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 277

Val Tyr Gln Gly His Thr Ala Leu Leu

1 5

<210> 278

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 278

Arg Tyr Ile Ser Asp Gln Leu Phe Thr Asn Phe

1 5 10

<210> 279

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 279

Thr Tyr Ile Glu Ser Ala Ser Glu Leu

1

5

<210> 280

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 280

Arg Tyr Pro Asp Asn Leu Lys His Leu Tyr Leu

1

5

10

<210> 281

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

Pro Tyr Arg Leu Ile Phe Glu Lys Phe

1

5

<210> 282

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 282

Lys Phe Val Asp Ser Thr Phe Tyr Leu

1

5

<210> 283

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 283

Thr Tyr Gly Asp Ala Gly Leu Thr Tyr Thr Phe

1

5

10

<210> 284

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 284

Arg Tyr Leu Asn Lys Ala Phe His Ile

1

5

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 285

His Tyr Pro Pro Val Gln Val Leu Phe

1

5

<210> 286

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 286

Arg Tyr Pro Asp Asn Leu Lys His Leu

1

5

<210> 287

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 287

Leu Tyr Ile Thr Glu Pro Lys Thr Ile

1

5

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 288

Val Tyr Val Ser Asp Ile Gln Glu Leu

1

5

<210> 289

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 289

Lys Tyr Pro Val Glu Trp Ala Lys Phe

1

5

<210> 290

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 290

Lys Ile Val Asp Phe Ser Tyr Ser Val

1

5

<210> 291

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 291

Lys Leu Asp Glu Thr Gly Asn Ser Leu

1

5

<210> 292

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 292

Gly Met Met Thr Ala Ile Leu Gly Val

1

5

<210> 293

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 293

Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Ile

1

5

<210> 294

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 294

Gly Leu Met Lys Tyr Ile Gly Glu Val

1

5

<210> 295

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 295

Tyr Tyr Pro Gly Val Ile Leu Gly Phe

1

5

<210> 296

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 296

Thr Tyr Val Asp Ser Ser His Thr Ile

1 5

<210> 297

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 297

Pro Phe Leu Gln Ala Ser Pro His Phe

1 5

<210> 298

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 298

Arg Tyr Leu Glu Gly Thr Ser Cys Ile

1

5

<210> 299

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 299

Val Tyr Phe Val Ala Pro Ala Lys Phe

1

5

<210> 300

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 300

Ala Tyr Val Leu Arg Leu Glu Thr Leu

1

5

<210> 301

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 301

Ala Tyr Lys Pro Gly Ala Leu Thr Phe

1

5

<210> 302

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 302

Arg Tyr Met Pro Pro Ala His Arg Asn Phe

1

5

10

<210> 303

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 303

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 304

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 304

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1 5

<210> 305

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 305

Lys Leu Phe Thr Ser Val Phe Gly Val

1

5

<210> 306

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 306

Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu

1

5



201726723

【發明摘要】

IPC分類:

G07K 14/725 (2006.01)
G12N 5/0783 (2010.01)
G12Q 1/68 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【中文發明名稱】用於對抗多種癌症的免疫療法的新胜肽及肽胜組合

【英文發明名稱】NOVEL PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES FOR

USE IN IMMUNOTHERAPY AGAINST VARIOUS 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（ 3 ）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

201726723

申請案號：

申請日：

IPC 分類：

無

【特徵化學式】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種肽，其包括選自 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 組成的組團的一個氨基酸序列、以及與 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 具有至少 88% 同源性的其變體序列、其中所述變體與主要組織相容性複合體（MHC）結合和/或誘導與該變體肽發生 T 細胞交叉反應，及其一種藥用鹽，其中所述肽不是一種全長多肽。

【第2項】 根據權利要求 1 中所述的肽，其中所述肽有能力與 MHC-I 或 -II 類分子結合，其中所述肽與 MHC 結合時能夠被 CD4 和/或 CD8 T 細胞識別。

【第3項】 根據權利要求 1 或 2 中所述的肽或其變體，其中氨基酸序列包括任意 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 的一個連續的氨基酸延伸區。

【第4項】 根據權利要求 1 或 2 中所述的肽或其變體，其中所述肽或其變體的總長度為 8 至 100 個氨基酸、優選為 8 至 30 個氨基酸、更優選為 8 至 16 個氨基酸、最優選為該肽系由或基本系由根據任意 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 的氨基酸序列組成，優選為 SEQ

ID NO: 2、24、32、39、64、72、106、149、
251、305 和 306。

【第5項】 根據權利要求 1 或 2 中所述的肽或其變體，
其中所述肽被修飾和 / 或包含非肽鏈。

【第6項】 根據權利要求 1 或 2 中所述的肽或其變體，
其中所述肽為融合蛋白的一部分，尤其包含 HLA-DR
抗原相關不變鏈 (Ii) 的 N-端氨基酸。

【第7項】 根據權利要求 1 至 6 任一項中所述的一種編
碼肽或其變體的核酸，任選連接到一個異源啟動子序
列。

【第8項】 根據權利要求 7 中所述的一種可表達核酸的
表達載體。

【第9項】 一種重組宿主細胞，其包括根據權利要求 1 至
6 中所述的肽、根據權利要求 7 中所述的核酸、根據
權利要求 8 中所述的表達載體，其中所述宿主細胞優
選為抗原提呈細胞，例如樹突狀細胞。

【第10項】 根據權利要求 1 至 6 任一項中所述的肽
或其變體、根據權利要求 7 中所述的核酸、根據權利
要求 8 中所述或根據權利要求 9 中所述的藥用表達
載體。

【第11項】 一種製備根據權利要求 1 至 6 任一項所
述的肽或其變體的方法，該方法包括培養根據權利要

求 9 所述的宿主細胞、其提呈根據權利要求 1 至 6 所述的肽或表達根據權利要求 7 所述的核酸或包括根據權利要求 8 所述的表達載體，以及從該宿主細胞或其培養基中分離出肽或其變體。

【第 12 項】 一種體外製備啟動的 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，這些分子在合適的抗原提呈細胞表面或人工類比的抗原提呈細胞結構表面上表達足夠的一段時間從而以抗原特異性方式啟動 T 細胞，其中所述抗原為權利要求 1 至 4 任一項中所述的肽。

【第 13 項】 根據權利要求 12 中所述的方法製成的啟動 T 淋巴細胞，其有選擇性地識別一種細胞，該細胞提呈含權利要求 1 至 4 任一項中給定氨基酸序列的多肽。

【第 14 項】 一種權利要求 13 中定義的有效量的活性 T 細胞用於製造藥劑的用途，該用途用於殺滅患者體內靶向細胞，其中靶向細胞提呈一種多肽，該多肽含權利要求 1 至 4 任一項中給定的氨基酸序列。

【第 15 項】 一種抗體，特別是可溶性或膜結合性抗體，其特異性地識別根據權利要求 1 至 5 中的肽或其變體，與 MHC 分子結合時優選為根據權利要求 1 至 5 中任一項所述的肽或變體。

【第16項】 根據權利要求 1 至 6 任一項中所述的一種肽、根據權利要求 7 中所述的核酸、根據權利要求 8 中所述的一種表達載體、根據權利要求 9 中所述的細胞或根據權利要求 13 中所述的啟動毒性 T 淋巴細胞或根據權利要求 15 中所述的抗體在製造抗癌藥劑中的用途。

【第17項】 根據權利要求 16 所述的用途，其中所述癌症為選自根據權利要求 16 所述的用途，其中所述癌症為選自腦膠質細胞瘤 (GB)、乳腺癌 (BRCA)、結直腸癌 (CRC)、腎細胞癌 (RCC)、慢性淋巴細胞白血病 (CLL)、肝細胞癌 (HCC)、非小細胞和小細胞肺癌 (NSCLC、SCLC)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、急性骨髓性白血病 (AML)、卵巢癌 (OC)、胰腺癌 (PC)、攝護腺癌 (PCA)、包括胃食管交界癌 (OSCAR) 的食管癌、膽囊癌和膽管癌 (GBC、CCC)、黑色素瘤 (MEL)、胃癌 (GC)、膀胱癌 (UBC)、子宮癌 (UEC) 和其他腫瘤，這些腫瘤過度表達來自根據 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 的肽所衍生的蛋白。

【第18項】 一種藥盒套件，包括：

(a) 一個容器包含一種藥物組合物，其含有根據權利要求 1 至 6 任一項所述的肽或變體、根據權利要

求 7 所述的核酸、根據權利要求 8 所述的表達載體、根據權利要求 10 所述的細胞、根據權利要求 13 所述的啟動 T 淋巴細胞或根據權利要求 15 所述的溶液或凍乾形式的抗體；

(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；

(c) 可選地，至少一種以上肽，選自由 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 302、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 基團，以及

(d) 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。

【第 19 項】 根據權利要求 18 所述的藥盒套件，進一步包括一個或多個 (iii) 緩衝劑，(iv) 稀釋劑，(v) 過濾液，(vi) 針，或 (v) 注射器。

【第 20 項】 根據權利要求 18 或 19 所述的藥盒套件，其中所述肽系選自 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 組成的組團。

【第 21 項】 一種用於生產個性化抗癌疫苗或用作個體患者的基於化合物的和 / 或細胞療法，所述方法包括：

a) 識別所述個體患者腫瘤樣本提呈的腫瘤相關肽 (TUMAP)；

b) 將 a) 中確定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 存 儲 庫 的 肽 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 種 肽 ； 和

d) 製 造 和 / 或 構 想 基 於 步 驟 c) 的 所 述 個 性 化 疫 苗 或 基 於 化 合 物 的 或 細 胞 療 法 。

【第 2 2 項】 根 據 權 利 要 求 2 1 中 所 述 的 方 法 ， 其 中 所 述 T U M A P 透 過 以 下 方 法 識 別 ：

a 1) 將 腫 瘤 樣 本 的 表 達 資 料 與 腫 瘤 樣 本 組 織 類 型 相 應 的 正 常 組 織 樣 本 的 表 達 資 料 進 行 比 較 ， 以 識 別 在 腫 瘤 樣 本 中 過 度 表 達 或 異 常 表 達 的 蛋 白 ； 和

a 2) 將 表 達 資 料 與 腫 瘤 樣 本 中 M H C I 類 和 / 或 I I 類 分 子 結 合 的 M H C 配 體 序 列 相 關 聯 ， 以 識 別 腫 瘤 過 度 表 達 或 異 常 的 蛋 白 質 衍 生 的 M H C 配 體 。

【第 2 3 項】 根 據 權 利 要 求 2 1 或 2 2 所 述 的 方 法 ， 其 中 M H C 配 體 的 序 列 的 確 定 方 法 是 ； 洗 脫 來 自 腫 瘤 樣 本 分 離 的 M H C 分 子 結 合 肽 ， 並 測 序 洗 脫 配 體 。

【第 2 4 項】 根 據 權 利 要 求 2 1 或 2 2 所 述 的 方 法 ， 其 中 該 類 型 腫 瘤 樣 本 相 應 的 正 常 組 織 樣 本 獲 得 自 同 一 患 者 。

【第 2 5 項】 根 據 權 利 要 求 2 1 或 2 2 所 述 的 方 法 ， 其 中 存 儲 庫 包 含 的 肽 用 基 於 以 下 步 驟 進 行 識 別 ：

a a . 透過高度並行的方法，例如微陣列或基於測序的表達譜，進行全基因組信使核糖核酸（mRNA）表達分析，其包括識別相較于正常組織在惡性組織中過度表達的基因；

a b . 選擇步驟 a a 檢測到的特異性表達或過量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，包括使用健康供體或所述患者的人類 T 細胞的體外免疫原性測定；或

b a . 用質譜法識別來自所述腫瘤樣本的 HLA 配體；

b b . 透過高度並行的方法，例如微陣列或基於測序的表達譜，進行全基因組信使核糖核酸（mRNA）表達分析，其包括識別相較于正常組織在惡性組織中過度表達的基因；

b c . 比較識別的 HLA 配體與所述基因表達資料；

b d . 選擇步驟 b c 檢測到的特異性表達或過量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到，並確定在 mRNA 水準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，包括

使用健康供體或所述患者的人類 T 細胞的體外免疫原性測定。

【第 26 項】 根據權利要求 21 或 22 所述的方法，其中存儲庫是否包括肽免疫原性由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種方法確定。

【第 27 項】 根據權利要求 21 或 22 所述的方法，其中所述存儲庫包括選自 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 302、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 組成的組團的多個肽。

【第 28 項】 根據權利要求 21 或 22 所述的方法，其進一步包括以下步驟：識別與該個體患者相應正常組織相比對所述腫瘤樣本具有唯一性的至少一種突變，以及選擇與突變相關並包含於疫苗或用於產生細胞療法的一種肽。

【第 29 項】 根據權利要求 28 中所述的方法，其中所述至少一種突變透過全基因組測序鑒定。

【第 30 項】 一種 T 細胞受體，優選為與 HLA 配體反應的重組可溶性或膜結合 T 細胞受體，其中所述配體由與選自 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 組成的組團

的氨基酸序列至少 75% 同源性。

【第31項】 根據權利要求 30 所述的 T 細胞受體，其中所述氨基酸序列與 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 至少 88% 同源。

【第32項】 根據權利要求 30 或 31 所述的 T 細胞受體，其中所述氨基酸序列包含 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 中的任何一個。

【第33項】 根據權利要求 30 或 31 所述的 T 細胞受體，其中所述 T 細胞受體作為可溶性分子提供並任選具有進一步的效應子功能，如免疫刺激結構域或毒素。

【第34項】 根據權利要求 30 至 33 任一項中所述的一種編碼 TCR 的核酸，任選連接到一個異源啟動子序列。

【第35項】 根據權利要求 34 中所述的一種能夠表達核酸的表達載體。

【第36項】 一種宿主細胞，其包括根據權利要求 34 中所述的核酸或編碼根據權利要求 15 中所述的一種抗體或根據權利要求 35 所述的表達載體，其中所述宿主細胞優選為 T 細胞或 NK 細胞。

【第37項】 根據權利要求30至33任一項中所述的一種製備T細胞受體的方法，所述方法包括根據權利要求36中所述的培養宿主細胞，以及從宿主細胞和/或其培養基中分離出所述T細胞受體。

【第38項】 一種藥物組合物，其包括至少一種活性成分，該成分選自以下項組成的組

a) 選自由SEQ ID No 1至SEQ ID No 289、SEQ ID No 305和SEQ ID No 306組成的組團的一種肽；

b) 與根據a)中的肽和/或肽MHC複合體產生反應的一種T細胞受體；

c) 由根據a)中所述的肽以及HLA-DR抗原相關不變鏈(Ii)的第1至80N-端氨基酸組成的融合蛋白；

d) 編碼a)至c)任一項的一種核酸或一種包含所述核酸的表達載體。

e) 包括d中表達載體的宿主細胞，

f) 一種啟動的T淋巴細胞，透過一種方法獲得，該方法包括將T細胞與a)中所述肽進行體外連接，該肽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啟動所述T細胞；以及將這些活化的T細胞轉入自體或其他患者的方法；

g) 與 a) 中一種肽和 / 或肽 - MHC 複合體反應的一種抗體或可溶性 T 細胞受體和 / 或提供根據 a) 所述的並有可能透過與免疫啟動結構域或毒素融合而修飾的一種肽，

h) 一種適體，其識別選自包含 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 組成的組團的一種肽和 / 或選自包含 SEQ ID No 1 至 SEQ ID No 289、SEQ ID No 305 和 SEQ ID No 306 組成的組團一種肽與 MHC 分子的一種複合體，

i) 根據 a) 至 h) 任一項的一種共軛或標記肽或支架以及藥用載體，或藥用賦形劑和 / 或穩定劑。

【第 39 項】 一種適體，其特異性地識別根據權利要求 1 至 5 中的肽或其變體，優選為根據權利要求 1 至 5 中任一項所述的、與 MHC 分子結合的肽或變體。

