



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201700496 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：105109711

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 28 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/47 (2006.01)

C07H21/04 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

C07K16/30 (2006.01)

(30)優先權：2015/03/27

美國

62/139,189

2015/03/27

英國

1505305.1

(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)；
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)；史帝佛曼莉雅 STEVERMANN, LEA (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：7 共 339 頁

(54)名稱

用於各種腫瘤免疫治療的新型肽和肽複合物

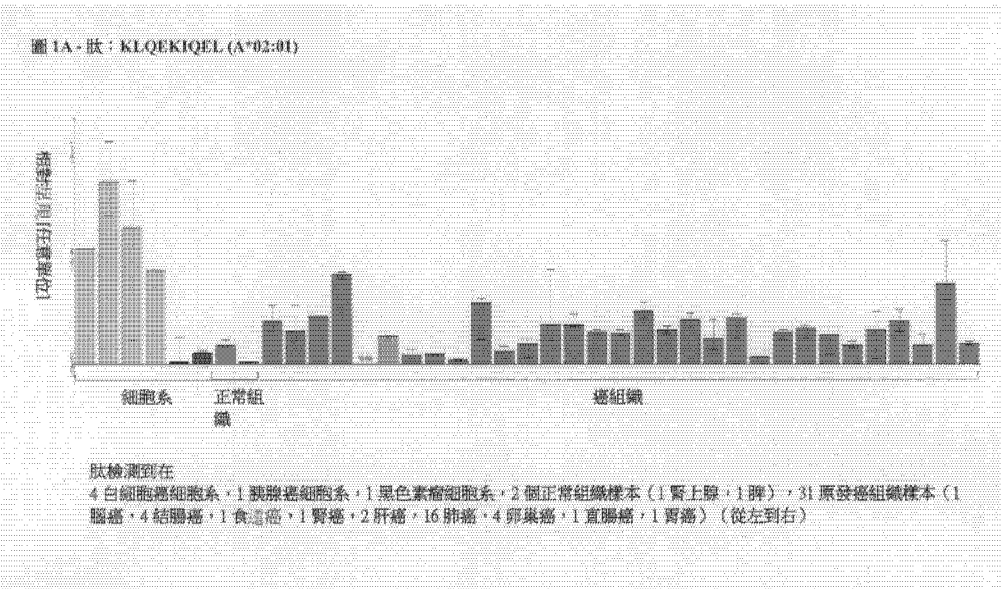
NOVEL PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES FOR USE IN IMMUNOTHERAPY
AGAINST VARIOUS TUMORS

(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（例如，刺激抗腫瘤免疫反應或活體外刺激 T 細胞並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標靶。

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：





申請日: 105年3月28日

201700496

【發明摘要】

IPC分類: C07K 14/47 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)

【中文發明名稱】用於各種腫瘤免疫治療的新型肽和肽複合物 C07K 16/30 (2006.01)

【英文發明名稱】 Novel peptides and combination of peptides for use in immunotherapy against various tumors

【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（例如，刺激抗腫瘤免疫反應或活體外刺激T細胞並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標靶。

【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.

申請案號：105109711

申請日：2016 年 3 月 28 日

IPC 分類：

【指定代表圖】第（ 1A ）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於各種腫瘤免疫治療的新型肽和肽複合物

【英文發明名稱】 Novel peptides and combination of peptides for use in immunotherapy against various tumors

【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活體外刺激T細胞並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標靶。

【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，可用於引發抗腫瘤免疫反應的疫苗複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/>）。

【0004】 流行病學

【0005】 2012年，估計全球有1410萬新增癌症病例，3260萬癌症患者（5年之內確診），820萬癌症死亡病例（Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013）。

【0006】 在腦癌、白血病和肺癌群活體內，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）和急性骨髓性白血病（AML）、非小細胞和小細胞肺癌（NSCLC和SCLC）。

【0007】 GB是最常見的中樞神經系統惡性腫瘤，在美國，年齡調整的發病率為每10萬居民3.19名。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）。

【0008】 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在白種人中比非洲人更常見，在西班牙裔和土著美國人中較罕見，在亞洲人中很少見。在亞洲血統的人群中，CLL的發生率比白種人低3倍（Gunawardana et al., 2008）。CLL患者的五年總生存率約為79%（<http://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/statistics>）。

【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】 乳腺癌患者的標準治療取決於不同的參數：腫瘤分期、激素受體狀態和HER2表現模式。標準治療包括腫瘤手術完全切除，隨後放射治療。在切除之前或之後可能活化以蒽環類和紫杉烷類為主的化療。HER2陽性腫瘤患者除了化療藥物外，還接受抗HER2抗體曲妥單抗（S3-Leitlinie Mammarkarzinom, 2012）。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。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作用的臨床資料正在出現（Emens, 2012）。

【0013】 慢性淋巴細胞白血病

【0014】 雖然目前CLL不可治癒，但是很多患者只顯示緩慢的病情進展或症狀惡化。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（如單株抗體、嵌合抗原受體（CARs）和主動免疫療法）和幹細胞移植。

【0015】 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CART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）。

【0016】 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。

【0017】 幾種TAA在CLL中呈過度表現並適於接種。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）。

【0018】 結直腸癌

【0019】 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）。

【0020】 最新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）。

【0021】 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和線粒活體外膜移位酶34（TOMM34）或突變KRAS。在幾項I期和II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益處（Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011）。

【0022】 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）。

【0023】 食道癌

【0024】 食道癌的主要治療策略取決於腫瘤分期和位置、組織學類型和患者病情。化療方案包括奧沙利鉑+氟尿嘧啶，卡鉑+紫杉醇，順鉑+氟尿嘧啶，FOLFOX和順鉑+伊立替康。腫瘤HER2陽性的患者應當根據胃癌治療指南進行治療，這是因為食道癌靶向治療的隨機化資料非常有限（Stahl et al., 2013）。

【0025】 食道癌免疫治療方法的資料很少，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，晚期食道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活體外刺激後腫瘤內注入活化的T細胞引起完全或部分腫瘤反應（Toomey et al., 2013）。

【0026】 胃癌

【0027】 胃癌（GC）首先發生於黏膜層內壁，隨著生長而擴散至外層。有四種標準治療方法可治療胃癌。胃癌治療方法包括內窺鏡或手術切除、化療、放療或放化療（Leitlinie Magenkarzinom, 2012）。

【0028】 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介素誘導的殺手細胞、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）。

【0029】 膠質母細胞瘤

【0030】 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，包括免疫步驟抑制、疫苗接種和工程化 T 細胞過繼轉移。

【0031】 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。

【0032】 基因改造 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 $\alpha 2$ 和 EGFRvIII 的 T 細胞（Ampie et al., 2015）。

【0033】 肝癌

【0034】 疾病管理取決於診斷時腫瘤的階段以及肝臟的整體狀況。HCC的化療包括用於全身治療的多柔比星、5-氟尿嘧啶和順鉑的群組合以及用於肝動脈輸注的多柔比星、氟尿苷和絲裂黴素C。但是，大多數HCC病例均於對化療藥物表現出很高的抗藥性（Enguita-German and Fortes, 2014）。

【0035】 晚期不可切除HCC的治療選項僅限於索拉非尼（一種多酪胺酸激酶抑制劑）（Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004）。索拉非尼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）。

【0036】 最近，對於HCC進行了少量的免疫療法試驗。細胞介素已被用於活化免疫細胞的亞群和/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）。

【0037】 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進行了兩項活體外試驗（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 Hep G2 的裂解物 (Palmer et al., 2009) 進行活體外衝擊。到目前為止，疫苗接種試驗僅顯示臨床結果的有限改善。

【0038】 黑色素瘤

【0039】 黑色素瘤的標準療法是手術完全切除並且切除周圍健康組織。治療選項包括單藥化療、多藥化療和特異性抑制劑靶向治療 (S3-Leitlinie Melanom, 2013) 。

【0040】 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，第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>) 。

【0041】 T細胞過繼轉移顯示了晚期黑色素瘤治療的巨大潛力。浸潤淋巴細胞的活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)。

【0042】 非小細胞肺癌

【0043】 治療選擇根據癌症的類型（小細胞和非小細胞肺癌）和階段進行確定，包括手術、放療、化療、靶向生物治療，如貝伐單抗、埃羅替尼和吉非替尼（S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011）。

【0044】 爲了擴大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）。

【0045】 卵巢癌

【0046】 手術切除是早期和晚期卵巢癌的主要治療方法（S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 2013）。

【0047】 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。

【0048】 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。對於細胞介素療法、接種疫苗、單株抗體治療、細胞過繼轉移和免疫調節，目前有臨床資料。

【0049】 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。

【0050】 免疫細胞的過繼轉移實現了臨床試驗中的異質結果。自體、活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活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，自然殺手細胞的轉移造成明顯的毒性。

【0051】 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。爲了克服這個障礙，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。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）。

【0052】 胰腺癌

【0053】 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。

【0054】 已對疫苗接種策略進行了研究，其作為胰腺癌治療的進一步創新和有前途的替代方法。靶向作用於KRAS突變、活性端粒酶、胃泌素、存活蛋白、CEA和MUC1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GM-CSF分泌疫苗和algenpantucel-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（Salman et al., 2013）。

【0055】 攝護腺癌

【0056】 攝護腺癌的治療策略主要取決於癌症的分期。對於局部限制非轉移性攝護腺癌，治療方案包括主動監測（等待和觀察）、手術完全切除攝護腺及局部高

劑量放射治療聯合或不聯合近距離放療 (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2014)。

【0057】基於樹突狀細胞的疫苗 sipuleucel-T 是 FDA 批准的第一個抗癌疫苗。由於其對 CRPC 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 (PSA)-TRICOM、個體化肽疫苗 PPV、DNA 疫苗 pTVG-HP 以及表現 GM-CSF GVAX 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 sipuleucel-T 外，基於樹突狀細胞的疫苗，即 BPX-101 和 DCVAC/Pa 被證明可引起攝護腺癌患者的臨床反應。免疫步驟抑制劑，如易普利姆瑪和 nivolumab 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、PSA-TRICOM 和 GVAX）聯合進行評估。在 II 期臨床試驗中顯著放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氨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，但是來那度氨的進一步試驗正在進行中 (Quinn et al., 2015)。

【0058】腎細胞癌

【0059】初始治療最常見是部分或完全切除患病腎臟，仍然是主要的有效治療方法 (Rini et al., 2008)。

對於預後得分較差患者的一線治療，數個癌症組織和協會制定的指南推薦受體酪胺酸激酶抑制劑（TKI）舒尼替尼和帕唑帕尼、單株抗體貝伐單抗與干擾素 α （IFN- α ）和mTOR抑制劑temsirolimus組合。根據美國NCCN以及歐洲EAU和ESMO指定的指南，TKI索拉非尼、帕唑帕尼或最近的阿西替尼被推薦作為之前細胞介素（IFN- α 、IL-2）治療失敗的RCC患者的二線治療。NCCN指南還建議舒尼替尼用於此情況（根據NCCN分類I的高水準證據）。

【0060】 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表現和RCC晚期分期、分級和預後以及RCC腫瘤細胞選擇性PD-L1表現之間的值得注意的相關性，以及其與較差臨床結果的潛在關聯性導致新抗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，和痘病毒載體）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中過度表現的使用表位的肽疫苗。

【0061】 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）。

【0062】 小細胞肺癌

【0063】 小細胞肺癌（SCLC）的治療和預後非常依賴確診癌症分期。基於臨床結果的SCLC分期比病理分期更常見。臨床分期使用體檢、各種成像測試和活檢的結果。SCLC的標準化學治療使用依託泊苷或伊立替康聯合順鉑或卡鉑（American Cancer Society, 2015; S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011）。

【0064】 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, 2015）。

【0065】 急性髓性白血病

【0066】 AML的治療分為兩個階段：誘導治療和緩解後/「鞏固治療」。誘導治療是誘導緩解和包括聯合化療。鞏固治療包括額外的化療或造血幹細胞移植（HCT）（Showell and Levis, 2014）。

【0067】 對於屬於不利和中等-2預後組的患者推薦臨床試驗。治療選擇包括去甲基化藥物（HMA），如阿扎胞苷或地西他濱、CPX-351（柔紅黴素和阿糖胞苷以1:5「最佳」莫耳比製成的脂質體製劑）以及volasertib（一種Polo激酶抑制劑）。Volasertib與LDAC（低劑量阿糖胞苷）聯合給藥。幾種不同的FLT3抑制劑可在FLT3突變的情況下給藥。這些包括索拉非尼（與3+7聯合給藥）、quizartinib（FLT3 ITD的一種更具選擇性的抑制劑，也抑制CKIT）、crenolanib和米哚妥林（一種非選擇性FLT3 ITD抑制劑）。另一種治療選擇是用抗體-藥物偶聯物（抗CD33+calicheamicin、SGN-CD33a、抗CD33+銅-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）。

【0068】 非霍奇金淋巴瘤

【0069】 非霍奇金淋巴瘤（NHL）有60多種亞型。三種最常見的亞型為瀰漫性大B細胞淋巴瘤（DLBCL，最常見的亞型）、濾泡性淋巴瘤（FL，第二最常見的亞型）和小淋巴細胞淋巴瘤/慢性淋巴細胞性淋巴瘤

(SLL/CLL，第三最常見的亞型)。DLBCL、FL和SLL/CLL占NHL的85%左右(Li et al., 2015)。NHL的治療取決於組織學類型和階段(National Cancer Institute, 2015)。

【0070】 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)。

【0071】 一種重要的疫苗接種方案包括Id疫苗。B淋巴細胞表現在其重鏈和輕鏈可變區以特定的胺基酸序列表現表面免疫球蛋白，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。

【0072】 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(質體)透過細菌、昆蟲或哺乳動物細胞培養物產生。

【0073】 子宮癌

【0074】 80%以上的子宮內膜癌發生形式為子宮內膜腺癌(I型)，這與雌激素暴露有關，並且分化為良好至中度。子宮內膜癌和宮頸癌的治療與分期相關(World Cancer Report, 2014)。

【0075】 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）。

【0076】 膽囊腺癌及膽管癌

【0077】 膽管癌（CCC）難以治療，通常是致命的。唯一的有效治療方法是完全切除（R0）。膽管癌生物療法的療效好壞參半。對於治療CCC，現在研究了血管生長的靶向藥物，如索拉非尼、貝伐單抗、帕唑帕尼和regorafenib。此外，靶向作用於EGFR的藥物，如西妥昔單抗和帕尼單抗藥物在臨床研究中與化學療法聯合使用（American Cancer Society, 2015）。對於至今測試的大多數藥物，疾病控制和總生存期沒有顯著改善，但進一步的臨床試驗正在進行。

【0078】 膽囊癌（GBC）是世界範圍內最常見和侵襲性最強的膽管惡性腫瘤。由於膽管癌較罕見，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管癌。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。

【0079】 膀胱癌

【0080】 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（National Cancer Institute, 2015）。

【0081】 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，之後增加抗原呈現分子的表現，透過細胞介素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、嗜中性白血球、自然殺手細胞和巨噬細胞）的參與誘導抗腫瘤活性（Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013）。

【0082】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，尤其是治療肝細胞癌（HCC）、結直腸癌（CRC）、膠質母細胞瘤（GB）、胃癌（GC）、食道癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胰腺癌（PC）、腎細胞癌（RCC）、良性攝護腺增生（BPH）、攝護腺癌（PCA）、卵巢癌（OC）、黑色素瘤、乳腺癌、慢性淋巴細胞白血病（CLL）、梅克爾細胞癌（MCC）、小細胞肺癌（SCLC）、非何傑金氏淋巴瘤（NHL）、急性骨髓性白血病（AML）、膽囊癌和膽管癌（GBC、CCC）、膀胱癌（UBC）、子宮癌（UEC）的因子。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。

【0083】 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。

【0084】 腫瘤相關抗原（TAA）的目前分類主要包括以下幾組：

【0085】 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，由於其成員表現表現於組織學相異的人腫瘤中、正常組織中、僅在睪丸的精母細胞/精原細胞中、偶爾在胎盤中，因此，它最初被稱為癌-睪丸（CT）抗原。由於睪丸細胞不表現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。

【0086】 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，黑色素瘤的酪胺酸酶和Melan-A/MART-1或攝護腺癌的PSA。

【0087】 c） 過度表現的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現的TAA，一般表現水準較低。有可能許多由正常組織加工和潛在呈現的表位低於T細胞識別的閾值水準，而

它們在腫瘤細胞中的過度表現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。

【0088】 d) 腫瘤特異性抗原：這些獨特的 TAA 產生於正常基因（如 β -catenin、CDK4 等）的突變。這些分子變化中有一些與致瘤性轉化和/或進展相關。腫瘤特異性抗原一般可在不對正常組織帶來自體免疫反應風險的情況下誘導很強的免疫反應。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）。

【0089】 e) 由異常轉譯後修飾產生的 TAA：此類 TAA 可能由腫瘤中既不具有特異性也不過度表現的蛋白產生，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轉譯後加工所致）。此類 TAA 產生於糖化模式的改變，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剪接的事件，這可能具有也可能不具有腫瘤特異性。

【0090】 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，它們在宮頸癌中表現。

【0091】 基於T細胞的免疫治療靶向作用於主要組織相容性複合體（MHC）分子呈現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現，並且與同源未變的細胞相比，其表現通常上調。

【0092】 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。

【0093】 大部分有核細胞上都可發現MHC-I類分子。他們呈現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-類分子非經典呈現方式在文獻中被稱為交叉呈現（Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990）。MHC II類分子主要發現於專業抗原呈現細胞（APC）上，並且主要呈現，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。

【0094】 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。

【0095】 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）友好的細胞介素環境（Mortara et al., 2006）並吸引效應細胞，如CTL、天然殺手（NK）細胞、巨噬細胞和粒細胞（Hwang et al., 2007）。

【0096】 在沒有炎症的情況下，MHC II類分子的表現主要局限於免疫系統細胞，尤其是專業抗原呈現細胞（APC），例如，單核細胞、單核細胞源性細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞。在癌症患者的腫瘤細胞中發現有MHC II類分子的表現（Dengjel et al., 2006）。

【0097】 本發明的拉長肽可作為MHC-II類活性表位。

【0098】 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陽性殺手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。

【0099】 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CD4T細胞作為直接抗腫瘤效應因子的證據 (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014)。

【0100】 由於HLAII類分子的群組成性表現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MHCII類表位 (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1)。

【0101】 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。

【0102】 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胺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個胺基酸殘

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。

【0103】 在 MHC-I 類依賴性免疫反應中，肽不僅能與腫瘤細胞表現的某些 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。

【0104】 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現，而不由正常健康組織表現，或表現數量相對較少。在一個較佳的實施方案中，與正常健康組織相比，所述肽應在腫瘤細胞中過度呈現。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周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標靶可能會被上調，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標靶（Singh-Jasuja et al., 2004）。至關重要的是，表位存在於抗原胺基酸序列中，以確保這種來自腫瘤相關抗原的肽（「免疫原性肽」）可導致活體外或活體內 T 細胞反應。

【0105】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。誘導活體外或活體內 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。

【0106】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現模式的產生。然而，對腫瘤組織或人腫瘤細胞株中過度表現或選擇性表現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，在本發明的一非常較佳的實施例中，只選擇那些針對可發現功能性和/或增殖性 T 細胞情況的過量呈現或選擇性呈現肽，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。

【0107】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，呈現是決定因素。

【發明內容】

【0108】 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:288 的群組的一個胺基酸序列、或該序列的與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 具有至少 77%，較佳至少 88% 同源（較佳至少 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），或其藥學上可接受之鹽（其中所述肽不是潛在全長多肽）。

【0109】 雖然作為癌症治療標靶的肽最重要的標準是其在原發腫瘤組織中相比於正常組織過度呈現，但是，相應基因的 RNA 表現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，側重於肽呈現檢測的篩選方法可能無法識別這些標靶。然而，這些標靶可透過另一種方法來檢測，開始分析正常組織的基因表現，其次評估腫瘤肽呈現和基因表現。這種方法在本發明中使用來自公開可用的資料庫（Lonsdale, 2013）的 mRNA 資料結合進一步的基因表現資料（包括腫瘤樣本）以及肽呈現資料實現。如果一個基因的 mRNA 在正常組織中幾乎不存在，特別是在重要器官系統中不存在，透過很有效的策略（例如雙特異性親和力優化的抗體或 T 細胞受體）靶向作用於相應肽更可能是安全的。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標靶。常規質譜分析不夠敏感，無法在肽水準上評估標

靶範圍。相反，腫瘤 mRNA 表現可用於評估標靶範圍。爲了檢測肽本身，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，並可能更好地在肽呈現水準上評估標靶範圍。

【0110】 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:288 的群組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 具有至少 77%、較佳至少 88% 同源性(較佳為至少 77% 或 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、較佳為 8 至 30 個、最佳為 8 至 14 個胺基酸。

【0111】 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 1 和表 2 中的所有肽均與 HLA-A*02 結合。表 2 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 1：本發明中的肽

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
1	KLQEKIQEL	1062	CENPE
2	SVLEKEIYSI	127602	DNAH14
3	RVIDDSLTVGV	2187	FANCB
4	VLFGELPAL	8701	DNAH11
5	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
6	FLNAIETAL	8701	DNAH11
7	ALLQALMEL	51236,728071	FAM203A,FAM203B
8	ALSSSQAEV	3833	KIFC1
9	SLITGQDLLSV	51804	SIX4
10	QLIEKNWLL	56992	KIF15
11	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	26762	HAVCR1
13	RLHDENILL	23322	RPGRIPI1
14	YTFSGDVQL	4312	MMP1

15	GLPSATTTV	94025	MUC16
16	SLADLSLLL	134391	GPR151
17	GLLPSAESIKL	132989	C4orf36
18	KTASINQNV	81930	KIF18A
19	KVFELDLVTL	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	1063	CENPF
21	YLMDDFSSL	1293	COL6A3
22	LMYPYIYHV	54954	FAM120C
23	ALLSPLSLA	4017,9583	LOXL2,ENTPD4
24	KVWSDVTPL	4320,4322	MMP11,MMP13
25	LLWGHPRVALA	25878	MXRA5
26	VLDGKVAVV	6660	SOX5
27	GLLGKVTSV	51297	BPIFA1
28	IKVTDQPQLEL	51297	BPIFA1
29	KMISAIPTL	94025	MUC16
30	IITEVITRL	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	94025	MUC16
32	VVMVLVLML	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	94025	MUC16
35	VIIKGLEEI	3832	KIF11
36	TVLQELINV	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	3832	KIF11
38	VLQQESNFL	63967	CLSPN
39	YLEDGFAYV	5558	PRIM2
40	KIWEELSVLEV	4102,4105	MAGEA3,MAGEA6
41	IVTEIIEI	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	64151	NCAPG
43	LLIPFTIFM	1237	CCR8
44	AVFNLVHVV	56923	NMUR2
45	FLPVSVVYV	56923	NMUR2
46	ISLDEVAVSL	144455	E2F7
47	GLNGFNVLL	144455	E2F7
48	KISDFGLATV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	8532	CPZ
51	LDSEALLTL	84467	FBN3
52	TIGIPFPNV	83990	BRIP1
53	AQHLSTLLL	1469	CST1
54	YLVPGLVAA	64180	DPEP3
55	HLFDKIKI	654463	FER1L6
56	VLQENSSDYQSNL	3188	HNRNPH2
57	TLYPGRFDYV	338322	NLRP10
58	HLLGEGAFAQV	699	BUB1
59	ALADGIKSFL	5296	PIK3R2
60	YLFSQGLQGL	2491	CENPI
61	ALYPKEITL	203102	ADAM32
62	SLVENIHVL	675	BRCA2
63	KLLPMVIQL	246	ALOX15
64	SLYAGSNNQV	246	ALOX15

65	SLSEKSPEV	158511,728461	CSAG1,CSAG2
66	AMFPDTIPRV	285220	EPHA6
67	FLIENLLAA	3166	HMX1
68	QLMNLIRSV	51124	IER3IP1
69	LKVLKADVVL	259307	IL4I1
70	GLTEKTVLV	24137,285643	KIF4A,KIF4B
71	HMSGKLTNV	55771	PRR11
72	VLSTRVTNV	55771	PRR11
73	SVPKTLGV	11280	SCN11A
74	GLAFLPASV	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	6570	SLC18A1
76	FTAEFLEKV	79801	SHCBP1
77	ALYGNVQQV	91646	TDRD12
78	LFQSRIAGV	7579	ZSCAN20
79	TVLEEIGNRV	9133	CCNB2
80	VLTGQVHEL	10715	CERS1
81	ILAEPIYI	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	55655	NLRP2
83	GLLENSPHL	25788	RAD54B
84	FLLEREQLL	165055	CCDC138
85	KLLDKPEQFL	342184	FMN1
86	SLFSNIESV	54848	ARHGEF38
87	KLLSLLEEA	54848	ARHGEF38
88	LLPLELSLA	374946	DRAVIN
89	SLAETIFIV	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	3359	HTR3A
92	RLFEEVLGV	9816	URB2
93	RLYGYFHDA	6790	AURKA
94	YLDEVAFML	1238	CCBP2
95	KLIDEDEPLFL	1767	DNAH5
96	ALDTTRHEL	93323	HAUS8
97	KLFEKSTGL	23421	ITGB3BP
98	FVQEKIPEL	84944	MAEL
99	TLFGIQLTEA	84944	MAEL
100	ALQSFEFRV	56130	PCDHB6
101	SLLEVNEASSV	149628	PYHIN1
102	GLYPVTLVGV	83696	TRAPPC9
103	YLADTVQKL	100526761,54937	CCDC169-SOHLH2,SOHLH2
104	DLPTQEPALGTT	354	KLK3
105	AMLASQTEA	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	4477	MSMB
107	RVLPGQAVTG	55247	NEIL3
108	FIANLPPELKA	6013	RLN1
109	ILGSFELQL	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	7047	TGM4
111	AQLEGKLVSI	3161	HMMR
112	ILAQDVAQL	24137	KIF4A
113	FLFLKEVKV	54596	L1TD1

114	LLFPSDVQTL	23397	NCAPH
115	ILHGEVNKV	54830	NUP62CL
116	ALLSSVAEA	9048	ARTN
117	TLLEGISRA	26256	CABYR
118	IAYNPNGNAL	3824	KLRD1
119	SLIEESEEL	284217	LAMA1
120	LQLJPLKGLSL	6241	RRM2
121	ALYVQAPTV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	150737,92104	TTC30B,TTC30A
124	ALLRLFTI	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	11130	ZWINT
127	IMKATGLGIQL	154664	ABCA13
128	SILTNISEV	24	ABCA4
129	KMASKVTQV	132612	ADAD1
130	QLYGSAIL	158067	AK8
131	SLYPHFTLL	440138	ALG11
132	ALLNNVIEV	57101	ANO2
133	FLDGRPLTL	83734	ATG10
134	SLYKSFLQL	527	ATP6V0C
135	HLDTVKIEV	135152	B3GAT2
136	LLWDAPAKC	192134	B3GNT6
137	KLIYKDLVSV	85016	C11orf70
138	GIINKLVTV	440087	C12orf69
139	IILENIQSL	55732	C1orf112
140	FLDSQITTV	255119	C4orf22
141	NIDINNNE	57082	CASC5
142	LLDAAHASI	284992	CCDC150
143	MLWESIMRV	166979	CDC20B
144	FLISQTPLL	60437	CDH26
145	ALEEKLENV	79172	CENPO
146	VVA AHLAGA	148113	CILP2
147	GLLSALENV	1269	CNR2
148	YLILSSHQL	1269	CNR2
149	NMADGQLHQV	728577,79937	CNTNAP3B,CNTNAP3
150	VLLDMVHSL	100507170,255313,653282,728036,728042,728049,728062,728072,728075,728082,728090,728096	CT47A12,CT47A11,CT47A7,CT47A10,CT47A9,CT47A8,CT47A6,CT47A5,CT47A4,CT47A3,CT47A2,CT47A1
151	DISKRIQSL	100128553,220429,341689,4253,64693	CTAGE4,CTAGE10P,CTAGE16P,CTAGE5,CTAGE1
152	ILVTSIFFL	643	CXCR5
153	KLVELEHTL	203413	CXorf61
154	AIKEIQTV	1588	CYP19A1
155	TLDSYLKAV	163720,199974	CYP4Z2P,CYP4Z1
156	VILTSSPFL	10800	CYSLTR1
157	ILQDGQFLV	138009	DCAF4L2
158	YLDPLWHQL	2072	ERCC4
159	QLGPVPVTI	285966	FAM115C

160	TLQEWLTEV	167555	FAM151B
161	NLLDENVCL	26290	GALNT8
162	GLLGNLLTSL	51608	GET4
163	GLEERLYTA	29933	GPR132
164	MLIIRVPSV	80000	GREB1L
165	SLLDYEVS	116444	GRIN3B
166	LLGDSSFFL	283254	HARBI1
167	LVVDEGSLVSV	92797	HELB
168	VIFEGEPMYL	84072	HORMAD1
169	ALADLSVAV	3363	HTR7
170	FIAAVVEKV	203100	HTRA4
171	LLLLDVPTA	10437	IFI30
172	SLYLQMNSLRTE	28426	IGHV3-43
173	RLIDIYKNV	338567	KCNK18
174	ALYSGDLHAA	157855	KCNU1
175	SLLDLVQSL	57536	KIAA1328
176	VQSGLRILL	57650	KIAA1524
177	ALINVLNAL	146909	KIF18B
178	SLVSWQLLL	3814	KISS1
179	TLGEIHKGV	402569	KPNA7
180	RLYEEEIRI	3887,3889	KRT81,KRT83
181	LLWAPTAQA	389812	LCN15
182	GLQDGFQITV	284194,654346	LGALS9B,LGALS9C
183	ALSYILPYL	147172	LRRC37BP1
184	ALDSTIAHL	149499	LRRC71
185	TLYQGLPAEV	80131	LRRC8E
186	SLLSLESRL	57408	LRTM1
187	SILKEDPFL	346389	MACC1
188	VLGEEQEGV	4108,728269	MAGEA9,MAGEA9B
189	MAVSDLLIL	2862	MLNR
190	SLSTELFKV	4622,4626	MYH4,MYH8
191	AAIEIFEKV	55728	N4BP2
192	TLLPSSGLVTL	344148	NCKAP5
193	ALFHMNILL	126206	NLRP5
194	KLLEEVQLL	126206	NLRP5
195	VIIQNLPAL	387129	NPSR1
196	TLHQWIYYL	120406	NXPE2
197	LGGPTSLLHV	390038	OR51D1
198	ILTNKVVS	119678	OR52E2
199	SVADLAHVL	27334	P2RY10
200	IMPTFDLTKV	203569,389860	PAGE2,PAGE2B
201	LLFSLCEA	51050	PII5
202	ALAKDELSL	120379	PIH1D2
203	FLFVDPELV	146850	PIK3R6
204	SEWGSPHAAVP	5539	PPY
205	LAFGYDDEL	391004,654348	PRAMEF17,PRAMEF16
206	GLDAFRIFL	431704	RGS21
207	KLFETVEEL	6121	RPE65
208	HLNNDNRNPL	6406	SEMG1
209	VLQTEELVAN	6406	SEMG1

210	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
211	LLTTVLINA	6582	SLC22A2
212	MTLSEIHAV	9153	SLC28A2
213	ILAVDGVLSV	169026	SLC30A8
214	ALFETLIQL	139420	SMEK3P
215	QIADIVTSV	139420	SMEK3P
216	ALSTVTPRI	166378	SPATA5
217	LLWPSSVPA	246777,79400	SPESP1,NOX5
218	SLTGANITV	83932	SPRTN
219	GVVPTIQKV	64220	STRA6
220	ALSELERVL	51298	THEG
221	IMLNSVEEI	387357	THEMIS
222	LLTGVFAQL	388564	TMEM238
223	ALHPVQFYL	93587	TRMT10A
224	LLFDWSGTGRADA	79465	ULBP3
225	FLPQPVPLSV	57695	USP37
226	SLAGNLQEL	11023	VAX1
227	SEMEELPSV	26609,425054,51481	VCX,VCX3B,VCX3A
228	SLLELDGINLRL	221806	VWDE
229	YLYELEHAL	80217	WDR96
230	KLLNMIFSI	2829	XCR1
231	LLDDIFIRL	143570	XRRA1
232	LVVGGIATV	84614	ZBTB37
233	SLFESLEYL	132625	ZFP42

【 0 1 1 2 】 表 2：本發明中的其他肽，之前與癌症無已知的關聯

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
234	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
235	SLLNQPKAV	63967	CLSPN
236	KMSELQTYV	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMSL	1063	CENPF
238	HLQEKLQSL	1063	CENPF
239	VIKGLEEITV	3832	KIF11
240	SVQENIQQK	3832	KIF11
241	KQFEGTVEI	675	BRCA2
242	KLQEEIPVL	1062	CENPE
243	GLAEFQENV	57405	SPC25
244	NVAEIVIH	83540	NUF2
245	ALLEEEGV	4103	MAGEA4
246	ALAGIVTNV	11077	HSF2BP
247	NLLIDDKGTIKL	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	983	CDK1
249	YLYQILQGI	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	983	CDK1
251	LLWGNLPEI	653820,729533	FAM72B,FAM72A

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
252	SLMEKNQSL	24137,285643	KIF4A,KIF4B
253	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
254	ALGDKFLLRV	4608	MYBPH
255	FLMKNSDLYGA	79801	SHCBP1
256	FLNDIFERI	337873,337874	HIST2H2BC,HIST2H2BD
257	KLIDHQGLYL	7579	ZSCAN20
258	QLVQRVASV	5683	PSMA2
259	GPGIFPPPPQP	10879	SMR3B
260	ALNESLVEC	55165	CEP55
261	GLAALAVHL	2175	FANCA
262	LLLEAVWHL	2175	FANCA
263	SIIEYLPTL	79915	ATAD5
264	TLHDQVHLL	2099	ESR1
265	FLLDKPQDLSI	346389	MACC1
266	FLLDKPQDL	346389	MACC1
267	YLLDMPLWYL	7153	TOP2A
268	SLDKDIVAL	7153	TOP2A
269	GLLDCPIFL	2177	FANCD2
270	TLLTFFHEL	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	55215	FANCI
272	FVMEGEPPKL	348654	GEN1
273	SLNKQIETV	57650	KIAA1524
274	TLYNPERTITV	10642,10643	IGF2BP1,IGF2BP3
275	AVPPPPSSV	10642	IGF2BP1
276	RMPTVLQCV	9622	KLK4
277	KLQEELNKV	3161	HMMR
278	VLEDKVLSV	128239	IQGAP3
279	VLMDEGAVLTL	54596	L1TD1
280	HLWGHALFL	89866	SEC16B
281	LLLESDPKVYSL	6491	STIL
282	SLYALHVKA	79001	VKORC1
283	ALSELLQQV	9816	URB2
284	KLMDPGSLPPL	2118	ETV4
285	MLLDTVQKV	54892	NCAPG2
286	FLTEMVHFI	93517	SDR42E1
287	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
288	SLYKGLLSV	25788	RAD54B

【 0 1 1 3 】 J = 磷 酸 絲 胺 酸

【 0 1 1 4 】 特 別 較 佳 的 是 本 發 明 的 肽 （ 單 獨 或 組 合 ） ，
其 選 自 包 括 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 2 8 8 的 群

組。更佳的是所述肽（單獨或組合）選自包括 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:126 的群組（見表 1）並且其用於免疫治療肝細胞癌（HCC）、結直腸癌（CRC）、膠質母細胞瘤（GB）、胃癌（GC）、食道癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胰腺癌（PC）、腎細胞癌（RCC）、良性攝護腺增生（BPH）、攝護腺癌（PCA）、卵巢癌（OC）、黑色素瘤、乳腺癌、慢性淋巴細胞白血病（CLL）、梅克爾細胞癌（MCC）、小細胞肺癌（SCLC）、非霍奇金淋巴瘤（NHL）、急性骨髓性白血病（AML）、膽囊癌和膽管癌（GBC、CCC）、膀胱癌（UBC）、子宮癌（UEC）。

【0115】 最佳的是所述單獨或組合的肽 - 選自由 SEQ ID NO: 274、14、21、23、25、157、168、11、253、85、89、40、264、155、233 和 245 組成的群組（見表 1、2 和 10）以及它們在 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL 免疫治療中的用途。

【0116】 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。

【0117】 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 288 的一個胺基酸序列組成。

【0118】 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。

【0119】 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-端胺基酸融合，或與抗體（例如，樹突狀細胞特定抗體）或抗體的序列融合。

【0120】 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，也可能為其複合物。

【0121】 本發明進一步涉及一種能表現和/或表現本發明核酸的表現載體。

【0122】 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現載體，特別是用於治療癌症。

【0123】 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。

【0124】 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。

【0125】 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。

【0126】 本發明進一步涉及含本發明核酸或前述表現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，其為抗原呈現細胞，較佳為樹突細胞。

【0127】 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。

【0128】 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呈現細胞的抗原結合被載入表現表現於合適抗原呈現細胞或人工抗原呈現細胞表面的 I 或 II 類 MHC 分子。

【0129】 本發明進一步涉及本發明的方法，其中抗原呈現細胞由能表現含 SEQ ID NO.1 至 SEQ ID NO.288、較佳為含 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 126 所述肽的一個表現載體、或一個變體胺基酸序列組成。

【0130】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的活化 T 細胞，其中所述 T 細胞有選擇性地識別一種細胞，該細胞表現含一種本發明胺基酸序列的多肽。

【0131】 本發明進一步涉及一種殺傷患者標靶細胞的方法，其中患者的標靶細胞異常表現含本發明任何胺基酸序列的多肽，該方法包括給予患者按本發明方法製造的有效量 T 細胞。

【0132】 本發明進一步涉及任何所述肽、本發明的核酸、本發明的表現載體、本發明的細胞、本發明的作為

藥劑或製造藥劑的活化 T 淋巴細胞、T 細胞受體或抗體或其他肽 - 和 / 或肽 - MHC 結合分子的用途。所述藥劑較佳為具有抗癌活性。

【0133】 較佳情況為，所述藥劑適合用於基於可溶性 TCR 或抗體的細胞治療藥物、疫苗或蛋白質。

【0134】 本發明進一步涉及一種本發明的用途，其中所述癌細胞為 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL 細胞。

【0135】 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「標靶」，其可用於診斷癌症，較佳為 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL。所述標誌物可以肽本身過度呈現或相應基因過度表現。標誌物也可以用於預測治療成功的可能性，較佳為免疫療法，最佳為靶向作用於該生物標誌物識別的相同標靶的免疫療法。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。

【0136】 或者，抗體具有進一步的效應子功能，如免疫刺激域或毒素。

【0137】 本發明還涉及這些癌症治療中新靶點的用途。

【0138】 CABYR 編碼位於纖維鞘相關的精子鞭毛主段的一種蛋白，在獲能過程中當被磷酸化時表現出鈣結合性（RefSeq, 2002）。在非小細胞肺癌細胞系NCI-H460和A549中CABYR亞型CABYR-a和CABYR-b的敲除被證明可導致增殖的抑制和組成型活性Akt磷酸的衰減（Qian et al., 2014）。CABYR表現的沉寂被證明可影響Akt途徑的下游組件，如磷酸化GSK-3 β 以及p53和p27蛋白（Qian et al., 2014）。此外，CABYR的敲除被證明可顯著增加敏感性，以在活體內外回應於化療藥物和藥物誘導的細胞凋亡，因而可能是改善肺癌凋亡反應和化學敏感性的一種新方法（Qian et al., 2014）。CABYR被描述為一種初始睪丸特異性蛋白，隨後顯示存在於腦腫瘤、胰腺癌和肺癌（Hsu et al., 2005; Luo et al., 2007; Li et al., 2012）。CABYR被證明在肝細胞癌中上調，可能在肝癌形成及其進展中起到致癌作用（Li et al., 2012）。

【0139】 COL6A3 編碼膠原、VI型、 $\alpha 3$ ，即VI型膠原蛋白的三種 α 鏈之一，這是在大多數結締組織中發現的一種珠狀絲膠原，對於基質組分組織很重要（RefSeq, 2002）。COL6A3編碼VI型膠原蛋白的 $\alpha - 3$ 鏈，這是在大多數結締組織中發現的一種珠狀絲膠原，在基質組分的群組織中起著重要作用（RefSeq, 2002）。COL6A3在結腸癌、膀胱癌和攝護腺癌中可

變地剪接。COL6A3 的長同種型幾乎在癌症樣本中特有表現，可潛在地作為新的癌症標誌物（Thorsen et al., 2008）。COL6A3 在胰腺導管腺癌組織中高度表現，並進行腫瘤特異性選擇性剪接（Kang et al., 2014）。COL6A3 已被證明與高級別的卵巢癌相關，並有助於順鉑抗性的形成。COL6A3 被觀察到在胃癌組織中頻繁過度表現（Xie et al., 2014）。COL6A3 突變可明顯預測結直腸癌患者具有更好的整體生存率，與腫瘤分化和 TNM 分期無關（Yu et al., 2015）。據報告，COL6A3 表現在胰腺癌、結腸癌、胃癌、黏液表皮樣癌和卵巢癌中增加。在結腸癌、膀胱癌、攝護腺癌和胰腺癌中檢測到包括外顯子 3、4 和 6 的癌症相關轉錄物變體（Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008）。在卵巢癌中，COL6A3 水準與較高的腫瘤分級相關，在胰腺癌中，COL6A3 被證明可呈現一種合適的診斷血清生物標誌物（Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014）。

【0140】 CXorf61，也被稱為 CT83，編碼癌症/睪丸抗原 83，位於染色體 Xq23 上（RefSeq, 2002）。CXorf61 的表現已在不同癌症類型中描述，包括乳腺癌和肺癌（Yao et al., 2014; Hanagiri et al.,

2013; Baba et al., 2013)。CXorf61 被證明是肺癌的免疫原性癌-睪丸抗原。因此，它可能代表了抗腫瘤免疫治療的有希望的候選 (Fukuyama et al., 2006)。

【0141】 CYP4Z1 編碼酶細胞色素 P450 超家族的一員。細胞色素 P450 蛋白是單加氧酶，其催化涉及藥物代謝和膽固醇、類固醇和其他脂質合成的許多反應 (RefSeq, 2002)。在乳腺癌中，CYP4Z1 過度表現與較高的腫瘤分級和較差的預後相關。從功能上來說，CYP4Z1 部分透過 PI3/Akt 和 ERK1/2 信號傳導促進乳腺癌的腫瘤血管生成和生長 (Yu et al., 2012; Murray et al., 2010)。此外，CYP4Z1 被描述可在非小細胞肺癌進展中發揮作用 (Bankovic et al., 2010)。在攝護腺癌和卵巢癌中，CYP4Z1 已被確定為獨立預測標誌物 (Tradonsky et al., 2012; Downie et al., 2005)。CYP4Z2P 是位於染色體 1p33 上的一種假基因 (RefSeq, 2002)。

【0142】 DCAF4L2 編碼 DDB1 和 CUL4 相關因子 4 樣 2。此蛋白的特定功能尚待闡明；不過 DCAF4L2 基因被證明與視盤形態和唇裂發育有關 (Springelkamp et al., 2015; Beaty et al., 2013)。

【0143】 ESR1 編碼一種雌激素受體，是一種配體活化的轉錄因子，對於激素結合、DNA 結合和轉錄活化非

常重要，是對性發育和生殖功能必不可少的（RefSeq, 2002）。ESR1 的突變和單核苷酸多態性與不同癌症類型的風險相關，包括肝癌、攝護腺癌、膽囊和乳腺癌。ESR1 表現的上調與細胞增殖和腫瘤生長相關，但是，ESR1 陽性腫瘤患者由於使用選擇性雌激素受體調節劑成功治療總體生存更好（Sun et al., 2015; Hayashi et al., 2003; Bogush et al., 2009; Miyoshi et al., 2010; Xu et al., 2011; Yakimchuk et al., 2013; Fuqua et al., 2014）。ESR1 信令干擾負責細胞轉化、生長和存活的不同途徑，如 EGFR/IGFR、PI3K/Akt/mTOR、p53、HER2、NFκB 和 TGF-β 途徑（Frasor et al., 2015; Band and Laiho, 2011; Berger et al., 2013; Skandalis et al., 2014; Mehta and Tripathy, 2014; Ciruelos Gil, 2014）。

【0144】 FMN1 編碼甲精 1，這是一種在黏附結形成和線性肌動蛋白索聚合作用中起作用的蛋白質（RefSeq, 2002）。FMN1 的單核苷酸多態性與攝護腺癌的風險增加有關（Lisitskaia et al., 2010）。

【0145】 HAVCR1，也被稱為甲型肝炎病毒細胞受體 1 或 KIM-1，編碼人類甲肝病毒和 TIMD4 的一種膜受體蛋白，並可能參與哮喘和過敏性疾病的穩定（RefSeq, 2002）。HAVCR1 被描述為與卵巢透明細胞癌和腎細胞癌相關的新候選生物標誌物（Bonventre, 2014;

Kobayashi et al., 2015)。HAVCR1 被證明可活化透明細胞腎細胞癌來源細胞系中的 IL-6/STAT-3/HIF-1A 軸，並確定腫瘤進展和患者結果 (Cuadros et al., 2014)。HAVCR1 在腎臟中組成型表現被描述為透明細胞腎細胞癌發生的一個潛在的敏感性特徵 (Cuadros et al., 2013)。此外，增強的 HAVCR1 外生域脫落被證明可促進活體外浸潤性表型和活體內更具侵襲性的腫瘤 (Cuadros et al., 2013)。HAVCR1 被描述為在腎癌、卵巢透明細胞癌和結直腸癌中上調 (Wang et al., 2013b)。HAVCR1 上調被描述為結直腸癌的一個潛在診斷生物標誌物，是手術後較長無病間隔 (可能也涉及結直腸癌轉移級聯) 的預後標記 (Wang et al., 2013b)。HAVCR1 被證明與 T 細胞大顆粒淋巴細胞白血病有關 (Wlodarski et al., 2008)。

【0146】HORMAD1 (也稱為 CT46) 編碼一種可能在減數分裂中發揮作用的含 HORMA 結構域的蛋白。HORMA 結構域參與染色質結合和細胞周期調節 (RefSeq, 2002)。HORMAD1 是一種癌症/睪丸抗原，在不同癌症類型 (包括乳腺癌、胃癌和卵巢癌) 中過度表現，從而成為潛在的生物標誌物和免疫治療標靶 (Yao et al., 2014; Shahzad et al., 2013; Chen et al., 2005; Aung et al., 2006; Adelaide et al., 2007)。HORMAD1 下調導致浸潤、遷移的減少和腫

瘤重量下降，以及 VEGF 蛋白水準降低 (Shahzad et al., 2013)。

【0147】 HSF2BP 編碼與 HSF2 相關的 HSF2 結合蛋白，可能參與調節 HSF2 活化 (RefSeq, 2002)。

【0148】 HSF4 編碼熱休克轉錄因子 4，其活化熱或其他應力條件下的熱休克反應基因 (RefSeq, 2002)。HSF4 被證明在膠質母細胞瘤中下調 (Mustafa et al., 2010)。

【0149】 HTR3A 編碼屬於配體-門控離子通道受體超家族的一種 5-羥色胺 (血清素) 受體，其導致神經元在活化後快速去極化反應 (RefSeq, 2002)。HTR3A (也稱為 5-HT3) 在幾種癌症類型中失調節，例如，在套細胞淋巴瘤中下調，在不同的 B 細胞腫瘤中差異表現，在乳腺癌細胞系中表現降低 (Pai et al., 2009; Rinaldi et al., 2010; Ek et al., 2002)。

【0150】 IGF2BP1，也稱為 CRD-BP，編碼胰島素樣生長因子 2 mRNA 結合蛋白家族中的一員，其透過結合到某些基因的 mRNA 和調節它們的轉譯發揮作用 (RefSeq, 2002)。IGF2 mRNA 結合蛋白家族的兩個成員，包括 IGF2BP1 被描述為真正的癌胚蛋白，在各種人類癌症中重新合成，並且可能是腫瘤生長、抗藥性和轉移的強大的轉錄後癌基因 (Lederer et al., 2014)。據報告，IGF2BP1 的表現與各種人類癌症的總體預後差和轉移相關 (Lederer et al., 2014)。

因此，IGF2BP1 被認為是一種有力的生物標誌物，是癌症治療的候選標靶（Lederer et al., 2014）。IGF2BP 家族成員被描述為與癌症轉移和致癌因子（如 KRAS、MYC 和 MDR1）表現高度相關（Bell et al., 2013）。IGF2BP1 被證明與 C-MYC 相互作用，並被發現在絕大多數結腸和乳腺腫瘤和肉瘤以及良性腫瘤（如乳房纖維腺瘤和腦膜瘤）中表現（Ioannidis et al., 2003）。IGF2BP1 被證明在肝細胞癌和基底細胞癌中上調（Noubissi et al., 2014; Zhang et al., 2015a）。IGF2BP1 和其他基因的上調被證明與肝細胞癌手術後預後差顯著相關（Zhang et al., 2015a）。IGF2BP1 被證明分別是肝細胞癌和腎細胞癌中 miR-9 和 miR-372 腫瘤抑制因子的一個標靶（Huang et al., 2015; Zhang et al., 2015a）。基質 IGF2BP1 的減少被證明可促進結腸中致瘤微環境，這表明 IGF2BP1 在結腸基質細胞中起著腫瘤抑制作用（Hamilton et al., 2015）。IGF2BP1 被證明與 4 期腫瘤、患者生存期降低以及神經母細胞瘤 MYCN 基因擴增相關，因此可能是神經母細胞瘤的一種潛在致癌基因和一種獨立的負預後因子（Bell et al., 2015）。IGF2BP1 被描述為 WNT/ β -連環蛋白信號通路的直接標靶，其在基底細胞癌的發展中調節 GLI1 表現和活性（Noubissi et al., 2014）。

【0151】 IGF2BP3 編碼胰島素樣生長因子 II mRNA 結合蛋白 3，這是一種癌胚蛋白，其壓制胰島素樣生長因子 II 的轉譯 (RefSeq, 2002)。幾項研究表明，IGF2BP3 在細胞功能的各個重要方面發揮作用，例如細胞極化、遷移、形態、代謝、增殖和分化。活體外研究表明，IGF2BP3 促進腫瘤細胞的增殖、黏附和侵襲。此外，IGF2BP3 已經顯示與侵襲性和晚期癌症相關 (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014)。IGF2BP3 過度表現在許多腫瘤類型中均已有闡述，並與預後較差、腫瘤期別高和轉移相關，例如在神經母細胞瘤、結直腸癌、肝內膽管癌、肝細胞癌、攝護腺癌和腎細胞癌中過度表現 (Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013; Yuan et al., 2009)。

【0152】 MAGEA3 編碼黑素瘤相關抗原家族成員 A3。MAGEA3 被廣泛地稱為癌-睪丸抗原 (RefSeq, 2002; Pineda et al., 2015; De et al., 1994)。長期以來，MAGEA3 已知用於轉移性黑色素瘤癌的治療性疫苗接種試驗中。用晚期黑色素瘤患者的 MAGEA3 和 4 個其他抗原目前進行的經皮膚免疫已被證明與不完全應答者相比顯著有助於延長完全應答者的總生存期 (Coulie et al., 2002; Fujiyama et al.,

2014)。在 NSCLC 中，MAGEA3 被證明頻繁表現。MAGEA3 的表現與 NSCLC 組織樣本中較高數目的腫瘤壞死相關，並顯示可抑制增殖和侵襲並促進肺癌細胞系的細胞凋亡。對於腺癌患者，MAGEA3 的表現與更好的生存期相關。目前，全細胞抗 MAGEA3 疫苗正在有前途的 III 期臨床試驗中進行研究，用於治療 NSCLC (Perez et al., 2011; Reck, 2012; Hall et al., 2013; Grah et al., 2014; Liu et al., 2015)。MAGEA3 與其他 4 個基因被證明在 HCC 中頻繁表現。那些基因的表現與 HCC 患者的迴圈腫瘤細胞數量、高腫瘤分級和較晚期別相關。肝轉移的頻率被證明在表現 MAGE3 的腫瘤樣本的病例中顯著高於那些不表現該基因的病例 (Bahnassy et al., 2014; Hasegawa et al., 1998)。從膀胱癌細胞系以及肺癌、結腸癌或乳腺癌細胞系分離出來的癌幹細胞樣側群細胞顯示表現其他癌症-睪丸抗原中的 MAGEA3。總體來說，癌症幹細胞已知為對當前癌症治療產生抗性，並導致治療後癌症復發和進展。因此，MAGEA3 可作為免疫治療特別是膀胱癌治療的新靶點 (Yamada et al., 2013; Yin et al., 2014)。在頭頸部鱗狀細胞癌中，MAGEA3 的表現被證明與更好的無病生存期相關 (Zamuner et al., 2015)。此外，MAGEA3 可用作卵巢癌的預後標誌物 (Szajnik et al., 2013)。

【0153】MAGEA4，也被稱為MAGE4，編碼MAGEA基因家族的一員，位於染色體Xq28上（RefSeq, 2002）。MAGEA4被描述為一種癌症睪丸抗原，發現於在一小部分典型精原細胞瘤中表現，但不在非精睪丸生殖細胞腫瘤中表現，在乳腺癌、霍奇金淋巴瘤EB病毒陰性病例、食道癌、肺癌、膀胱癌、頭頸部癌、結直腸癌、口腔鱗狀細胞癌和肝細胞癌中表現（Ries et al., 2005; Bode et al., 2014; Li et al., 2005; Ottaviani et al., 2006; Hennard et al., 2006; Chen et al., 2003）。MAGEA4被證明在頭頸部原發性黏膜黑色素瘤中頻繁表現，因此可能是基於癌症睪丸抗原的免疫治療的潛在標靶（Prasad et al., 2004）。MAGEA4被證明在來自LHK2乳腺癌細胞的癌幹細胞樣細胞、SW480結腸腺癌細胞和MCF7乳腺癌細胞中優先表現（Yamada et al., 2013）。MAGEA4在自發轉化的正常口腔角質中過度表現表明可透過阻止細胞週期阻滯和透過抑制p53轉錄標靶BAX和CDKN1A介導的細胞凋亡而促進生長（Bhan et al., 2012）。MAGEA4被證明在丙型肝炎病毒感染的肝硬化和晚期肝細胞癌患者中比早期肝細胞癌患者中更頻繁表現，從而使MAGEA4轉錄物的檢測潛在有助於預測預後（Hussein et al., 2012）。MAGEA4被證明是幾種癌症/睪丸抗原之一，其在肺癌中表現並可作為肺癌患者的多價免疫治療的潛在候選抗

原 (Kim et al., 2012)。MAGEA4 被描述為在食道癌和肝細胞癌中上調 (Zhao et al., 2002; Wu et al., 2011)。稱為 p286-1Y2L9L 的 MAGEA4 衍生原生肽類似物被描述為適用於開發針對食道癌肽疫苗的一個新候選表位 (Wu et al., 2011)。MAGE 基因家族的幾個成員，包括 MAGEA4，均顯示在黑色素瘤中經常發生突變 (Caballero et al., 2010)。

【0154】 MAGEA6 編碼黑素瘤相關抗原家族成員 A6。MAGEA3 被廣泛地稱為癌-睪丸抗原 (RefSeq, 2002; Pineda et al., 2015; De et al., 1994)。MAGEA6 被證明在黑色素瘤、晚期骨髓瘤、兒童橫紋肌肉瘤、肉瘤、肺癌、膀胱癌、攝護腺癌、乳腺癌、結直腸癌、頭頸部鱗狀上皮細胞癌、食道鱗狀細胞癌、口腔鱗狀細胞癌中頻繁表現 (Ries et al., 2005; Hasegawa et al., 1998; Gibbs et al., 2000; Dalerba et al., 2001; Otte et al., 2001; van der Bruggen et al., 2002; Lin et al., 2004; Tanaka et al., 1997)。MAGEA6 表現與多發性骨髓瘤患者較短的無進展生存期有關。相比較而言，在頭頸部鱗狀細胞癌中，MAGEA6 的表現被證明與更好的無病生存期相關 (van et al., 2011; Zamuner et al., 2015)。MAGEA6 是在耐紫杉醇卵巢癌細胞系中過度表現的一組基因中的一員。此外，MAGEA6 轉染也增加了紫杉醇敏感性細胞的抗藥性 (Duan et al.,

2003)。MAGEA6 可用作卵巢癌的預後標誌物 (Szajnik et al., 2013)。從肺、結腸或乳腺癌細胞系分離出來的癌幹細胞樣側群細胞顯示表現其他癌症-睪丸抗原中的 MAGEA6 (Yamada et al., 2013)。

【0155】 MAGEA9，也被稱為 MAGE9 或 MAGE-A9，編碼 MAGEA 基因家族的一員，位於染色體 Xq28 上 (RefSeq, 2002)。非小細胞肺癌腫瘤和基質細胞中 MAGEA9 的高表現與存活差相關 (Zhang et al., 2015b)。MAGEA9 表現被描述為非小細胞肺癌患者五年生存率的一個獨立預後因素 (Zhang et al., 2015b)。多發性骨髓瘤的新診斷病例中存在 MAGEA9 顯示與較短的總生存期相關 (van et al., 2011)。MAGEA9 被描述為一種腎細胞癌抗原，其在 BALB/c 小鼠樹突狀細胞疫苗接種中的應用被證明可導致低劑量 RENCA-MAGEA9 腎細胞癌移植的排斥反應 (Herbert et al., 2010)。MAGEA9 肽特異性細胞毒性 T 淋巴細胞系被證明對肽負載 T2 細胞和天然 MAGEA9 表現腎細胞癌細胞系表現出高細胞毒性活性，這使得 MAGEA9 成為腎細胞癌免疫治療的一種潛在合適的標靶 (Oehlrich et al., 2005)。MAGEA9 被證明是在子宮癌最常表現的癌睪丸抗原之一 (Risinger et al., 2007)。MAGEA9 被描述為一個 MAGE 家族成員，在睪丸癌中表現 (Zhan et al., 2015)。MAGEA9 高表現被證明與結直腸癌的靜脈侵

襲和淋巴結轉移相關(Zhan et al., 2015)。MAGEA9 表現被證明與結直腸癌的較低生存率相關，MAGEA9 高表現被描述為結直腸癌患者的不良預後因素(Zhan et al., 2015)。因此，MAGEA9 有望成為結直腸癌治療的新靶點(Zhan et al., 2015)。MAGEA9 過度表現被證明可預測上皮性卵巢癌、乳腺浸潤性導管癌、喉鱗狀細胞癌和肝細胞癌的較差預後(Gu et al., 2014; Han et al., 2014; Xu et al., 2014; Xu et al., 2015)。MAGEA9 被證明在喉鱗狀細胞癌、乳腺浸潤性導管癌、上皮卵巢癌、結腸癌和肝細胞癌中上調(Gu et al., 2014; Han et al., 2014; Xu et al., 2014; Xu et al., 2015; Zhan et al., 2015)。

【0156】 MAGEA9B 編碼 X 染色體上 MAGEA9 蛋白的複製物。腫瘤分期 Ib 期非小細胞肺癌中 MAGEA9B 的表現與患者生存期相關(Urgard et al., 2011)。

【0157】 MMP1 編碼基質金屬蛋白酶(MMP)肽酶 M10 家族的一員。此家族的蛋白在正常生理過程(如胚胎發育、生殖和組織重塑)以及疾病過程(如關節炎和轉移)中參與細胞外基質的破壞(RefSeq, 2002)。許多作者已經證明 MMP 表現模式與腫瘤侵襲和轉移性之間正相關，包括：直腸癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、攝護腺癌、甲狀腺癌和腦瘤(Velinov et al., 2010)。MMP1 被確定為喉鱗狀細胞癌的一種生物標

誌物，呈腫瘤期別相關表現（Hui et al., 2015）。外周血中迴圈腫瘤細胞存在上皮-間質轉化（CTC-EMT）的乳腺癌患者與沒有 CTC-EMT 的患者相比，腫瘤細胞（ $p=0.02$ ）和腫瘤相關基質（ $p=0.05$ ）中 MMP1 的表現顯著增加（CieRNA et al., 2014）。在小鼠模型中，MMP1 的表現和分泌被特定抗 FGFR3 單株抗體阻斷，其基本上阻止了腫瘤進展（Du et al., 2014）。

【0158】基質金屬蛋白酶（MMP）家族的蛋白在正常生理過程（如胚胎發育、生殖和組織重塑）以及疾病過程（如關節炎和轉移）中參與細胞外基質的破壞。但是，由該基因編碼的酶在細胞內透過組成型分泌途徑中的弗林蛋白酶被活化。另外，相對於其他的 MMP，這種酶裂解 $\alpha 1$ -蛋白酶抑制劑，但較弱地降解細胞外基質的結構蛋白（RefSeq, 2002）。MMP-11，也稱為基質溶素-3，為屬於蛋白酶超家族基質溶素子亞組的一員，這已在癌症細胞、基質細胞和鄰近微環境中檢測到。不同的是，MMP-11 對腫瘤具有雙重作用。一方面，MMP-11 透過抑制細胞凋亡以及增強癌細胞的遷移和侵襲促進癌症進展；另一方面，在動物模型中，MMP-11 透過抑制轉移而對癌症發展起著負作用。與正常對照組相比，MMP-11 在癌症患者的血清中發現呈過度表現，在多種腫瘤組織樣本（如胃癌、乳腺癌和胰腺癌）中也呈過度表現（Zhang et al., 2016）。MMP-11 被證

明與相應的正常黏膜相比在 CRC 組織中在 mRNA 水準和蛋白水準呈過度表現。此外，MMP-11 的表現與 CRC 淋巴結轉移、遠處轉移和 TNM 分期相關 (Tian et al., 2015)。MMP-11 過度表現與上尿路尿道上皮細胞癌 (UTUC) 和膀胱尿道上皮細胞癌 (UBUC) 的侵襲性腫瘤表現型和不良臨床結果相關，這表明它可作為一種新的預後和治療標靶 (Li et al., 2016)。

【0159】 MXRA5 編碼基質重塑相關蛋白，其包含與基底膜蛋白多糖相關的 7 個富含亮胺酸重複序列以及 12 個免疫球蛋白樣 C2 型結構域 (RefSeq, 2002)。一項中國的研究確定 MXRA5 為非小細胞肺癌中第二最常見的突變基因 (Xiong et al., 2012)。在結腸癌中，MXRA5 被證明過度表現，並可能作為早期診斷和網膜轉移的生物標誌物 (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a)。

【0160】 RAD54 編碼屬於 DEAD 樣解旋酶家族的一種蛋白質。釀酒酵母 RAD54 和 RDH54 具有相似性，兩者均參與 DNA 同源重組和修復。該蛋白結合至雙股 DNA，並在存在 DNA 時顯示 ATP 酶活性。該基因在睪丸和脾臟中高度表現，這表明在減數分裂和有絲分裂重組中具有活性作用 (RefSeq, 2002)。在原發性淋巴瘤和結腸癌中觀察到了 RAD54B 的純合突變 (Hiramoto et al., 1999)。RAD54B 抵消了人類

腫瘤細胞中 RAD51 直接結合至 dsDNA 的基因組不穩定影響 (Mason et al., 2015)。

【0161】 ZFP42 (也稱為 REX1) 編碼一種鋅指蛋白，其作為幹細胞標誌物並對於多能性和重新編程很關鍵 (Son et al., 2013; Mongan et al., 2006)。ZFP42 表現在攝護腺癌細胞和腎細胞癌中下調，但與此相反在鱗狀細胞癌中上調 (Raman et al., 2006; Lee et al., 2010; Reinisch et al., 2011)。ZFP42 經由 SOCS3 表現的調節抑制 JAK/STAT 信號通路，從而調節細胞分化 (Xu et al., 2008)。

【0162】 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。

【0163】 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，TCD8⁺ 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) 的胺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)。

【0164】術語「T 細胞反應」是指由一種肽在活體外或活體內誘導的效應子功能的特異性擴散和活化。對於 MHC I 類限制性細胞毒性 T 細胞，效應子功能可能為溶解肽脈衝的、肽前體脈衝的或天然肽呈現的標靶細胞、分泌細胞介素，較佳為肽誘導的干擾素- γ ，TNF- α 或 IL-2，分泌效應分子，較佳為肽誘導的顆粒酶或穿孔素，或脫顆粒。

【0165】本文所用「肽」這一術語，系指一系列胺基酸殘基，通常透過相鄰胺基酸的 α -胺基和羧基之間的肽鍵來連接。這些肽的長度較佳為 9 個胺基酸，但至短可為 8 個胺基酸長度，至長可為 10、11、12 或 13 個胺基酸長度或更長，如果為 MHC-II 類肽時（本發明肽的拉長變體），至長可為 14、15、16、17、18、19 或 20 個胺基酸長度或更長。

【0166】因此，「肽」這一術語應包括一系列胺基酸殘基的鹽，通常透過相鄰胺基酸的 α -胺基和羧基之間的肽鍵來連接。較佳的情況是，鹽為肽的藥學上可接受之鹽，例如：氯化物或乙酸（三氟乙酸）鹽。必須注意的是，本發明肽的鹽與其活體內狀態的肽基本上不同，因為該不是活體內的鹽。

【0167】術語「肽」應也包括「寡肽」。本文使用的術語「寡肽」是指一系列胺基酸殘基，通常透過相鄰胺基酸的 α -胺基和羧基之間的肽鍵來連接。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 個胺基酸殘基，約長於 15 個胺基酸。

【0168】「多肽」這一術語是指一系列胺基酸殘基，通常透過相鄰胺基酸的 α -胺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 個胺基酸殘基的分子。

【0169】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。

【0170】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 個胺基酸，最典型為 9 個胺基酸長度。

【0171】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現的不同 MHC I 類等位基因的實例。

【0172】 表 1:HLA-A*02 和 HLA-A*24 和最常見 HLA-DR 血清類型的表現頻率 F。頻率根據 Mori 等人 (Mori et al., 1997) 使用的 Hardy-Weinberg 公式 $F = 1 - (1 - G_f)^2$ 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	根據等位基因頻率算得的表現型
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%

等位基因	人群	根據等位基因頻率算得的表現型
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%
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	斯裏蘭卡人	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%

【0173】 本發明的肽，較佳當如本文描述納入本發明的疫苗時與 A*02 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 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。

【0174】 如果本發明的 A*02 肽與結合至另一個等位基因的肽（例如，A*24）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%（根據 www.allelefrequencys.net 計算）。

【0175】 在一項較佳的實施方案中，術語「核苷酸序列」系指去氧核苷酸的雜聚物。

【0176】 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，該基因能够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現。

【0177】 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現該序列的生物系統相容的人工（人造）起始和停止密碼子。

【0178】 本文提到的核酸序列既包括單股核酸也包括雙股核酸。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股 DNA、該序列與其互補序列的雙工（雙股 DNA）以及該序列的互補序列。

【0179】「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現產物的那部分基因，即，活體內編碼該基因的天然表現產物的區域。

【0180】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。

【0181】「表現產物」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胺基酸所造成的任何核酸序列編碼同等物的轉譯產物。

【0182】「片段」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，其表現產物與完整編碼區表現產物基本上具有相同的生物學功能或活性。

【0183】「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 結構的群組形式存在，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（未被內部未轉譯序列打斷）或內含子（通常呈現於真核基因中）的形式存在。未轉

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現。

【0184】 「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。

【0185】 「啟動子」這一術語表示參與 RNA 聚合酶的結合從而活化轉錄的 DNA 區域。

【0186】 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複合物的一部分，並且由於該載體或複合物不是其天然環境的一部分，因此它仍然是分離的。

【0187】 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，較佳為兩或三個數量級，更佳為四或五個數量級。此外，明確涵蓋

所述多肽的純度較佳為 99.999%，或至少為 99.99% 或 99.9%；甚而適宜為以重量計 99% 或更高。

【0188】根據本發明公開的核酸和多肽表現產物，以及包含此類核酸和/或多肽的表現載體可能以「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%，較佳為至少 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）活體內刺激 T 細胞反應。或者，「活性片段」也可用於誘導活體外 T 細胞反應。

【0189】本文使用的「部分」（portion）、「片段」（segment）、「片段」（fragment）這幾個術語，當與多肽相關地使用時是指殘基的連續序列，比如胺基酸殘基，其序列形成一個較大序列的子集。例如，如果一個多肽以任一種肽鏈內切肽酶（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、片段或片段。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。

【0190】 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：

【0191】 等同度百分比 = $100[1 - (C/R)]$

【0192】 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

【0193】 (i) 參考序列中每個鹼基或胺基酸序列在被對比序列中沒有對應的對準鹼基或胺基酸；

【0194】 (ii) 參考序列中每個空隙，以及

【0195】 (iii) 參考序列中每個對準鹼基或胺基酸與被對比序列中對準鹼基或胺基酸不同，即構成一個差異以及

【0196】 (iiii) 必須在對準序列的第 1 位置開始對準；

【0197】 並且 R 是參考序列與被對比序列對準長度上在參考序列中產生任何空隙也計算為一個鹼基或胺基酸的參考序列中的鹼基或胺基酸數目。

【0198】 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。

【0199】 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:288 群組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 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。

【0200】 在本發明中，「同源性」一詞系指兩個胺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。

【0201】 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)。

【0202】 發明人用給定胺基酸序列的「變體」表示，一個或兩個胺基酸殘基等的側鏈透過被另一個天然胺基酸殘基的側鏈或其他側鏈取代而發生改變，這樣，這種

肽仍然能够以含有给定胺基酸序列（由 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 組成）的肽大致同樣的方式與 HLA 分子結合。例如，一種肽可能被修飾以便至少維持（如沒有提高）其能與 HLA-A*02 或-DR 等合適 MHC 分子的結合槽相互作用和結合，以及至少維持（如沒有提高）其與活化 T 細胞的 TCR 結合的能力。

【0203】隨後，這些 T 細胞可與細胞和殺手細胞發生交叉反應，這些細胞表現多肽（其中包含本發明中定義的同源肽的天然胺基酸序列）。正如科學文獻和資料庫（Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997）中所述，HLA-A 結合肽的某些位點通常為錨定殘基，可形成一種與 HLA 結合槽的結合模序相稱的核心序列，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 SEQ ID No:1 至 SEQ ID NO:288 提出的胺基酸序列，並且能確定這些變體是否保持與 MHC I 或 II 類分子結合的能力。本發明的變體保持與活化 T 細胞的 TCR 結合的能力，隨後，這些 T 細胞可與表現一種包含本發明定義的同源肽的天然胺基酸序列的多肽的細胞發生交叉反應並殺死該等細胞。

【0204】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。較佳情況是，這些取代位於胺基酸鏈的末端。此取代可能是保守性的，例

如，其中一個胺基酸被具有類似結構和特點的另一個胺基酸所取代，比如其中一個疏水性胺基酸被另一個疏水性胺基酸取代。更保守的取代是具有相同或類似的大小和化學性質的胺基酸間的取代，例如，亮胺酸被異亮胺酸取代。在天然同源蛋白質家族序列變異的研究中，某些胺基酸的取代往往比其他胺基酸更具有耐受性，這些胺基酸往往表現出與原胺基酸的大小、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。

【0205】 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)。

【0206】 較不保守的取代可能涉及一個胺基酸被另一個具有類似特點但在大小上有所不同的胺基酸所取代，如：丙胺酸被異亮胺酸殘基取代。高度不保守的取代可能涉及一個酸性胺基酸被另一個具有極性或甚至具有鹼性性質的胺基酸所取代。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。

【0207】當然，這種取代可能涉及普通 L-胺基酸之外的其他結構。因此，D-胺基酸可能被本發明的抗原肽中常見的 L-胺基酸取代，也仍在本公開的範圍之內。此外，非標準胺基酸（即，除了常見的天然蛋白原胺基酸）也可以用於取代之目的，以生產根據本發明的免疫原和免疫原性多肽。

【0208】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，則對這些取代的群組合進行測試，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。

【0209】基本上由本文所指胺基酸序列組成的一種肽可能有一個或兩個非錨定胺基酸（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胺基酸序列組成的肽中，一個或兩個胺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。

【0210】這些基本不與 T 細胞受體互動的胺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 結合的胺基酸而得到修飾。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胺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 2：根據 SEQ ID NO: 4、13 和 15 的肽變體和基序。

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 4	V	L	F	G	E	L	P	A	L
變體									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 15	G	L	P	S	A	T	T	T	V
變體		I							L
		I							I
		I							
		I							A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A

		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		V							L
		V							I
		V							
		V							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 13	R	L	H	D	E	N	I	L	L
變體									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

【0211】 較長（拉長）的肽也可能適合。MHC I 類表位（通常長度為 8 至 11 個胺基酸）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較佳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。

【0212】 本發明的肽可被拉長多達四個胺基酸，即1、2、3或4個胺基酸，可按照4:0與0:4之間的任何組合添加至任意一端。本發明的拉長組合可見表3。

【0213】 表3：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
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

【0214】 拉伸/延長的胺基酸可以是所述蛋白或任何其他胺基酸的原序列肽。拉長可用於增強所述肽的穩定性或溶解性。

【0215】 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。

【0216】 在一項替代實施方案中，肽的一邊或雙邊被拉長4個以上的胺基酸，較佳最多30個胺基酸的總長

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。

【0217】 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、較佳為 8 至 30 個、最佳為 8 至 14 個胺基酸長度（即 10、11、12、13、14 個胺基酸，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 個胺基酸）。

【0218】 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。

【0219】 較佳情況是，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，較佳為不超過約 1 μ M，更佳為不超過約 1 nM，再較佳為不超過約 100 pM，最佳為不超過約 10 pM。也較佳為，取代肽被一個以上的 T 細胞識別，最少為 2 個，更佳為 3 個。

【0220】 在本發明的一個特別較佳實施方案中，肽系由或基本系由根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 288 所選的胺基酸序列組成。

【0221】 「基本由...組成」系指本發明的肽，除了根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 288 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

處的胺基酸，而它們不一定能形成作為 MHC 分子表位的肽。

【0222】 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-端胺基酸等。在其他的融合中，本發明的肽可以被融合到本文所述的抗體、或其功能性部分，特別是融合入抗體的序列，以便所述抗體進行特異性靶向作用，或者，例如進入本文所述的樹突狀細胞特異性抗體。

【0223】 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。

【0224】 在反式肽鍵胺基酸中，肽（-CO-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。

【0225】 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胺基醛和一種含 NaCNBH_3 的胺基酸相互作用而合成的非肽鍵。

【0226】 含上述序列的肽可與其胺基和 / 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胺基末端。同樣，乙醯基或 9-芴甲氧羰基可能位於肽的胺基末端。此外，疏水基團、叔丁氧羰基團或胺基團都可能被加入肽的羧基末端。

【0227】 另外，本發明中的所有肽都可能經合成而改變其空間構型。例如，可能使用這些肽的一個或多個胺基酸殘基的右旋體，通常不是其左旋體。更進一步地，本發明中肽的至少一個胺基酸殘基可被熟知的一個非天然胺基酸殘基取代。諸如此類的改變可能有助於增加本發明肽的穩定性、生物利用度和 / 或結合作用。

【0228】 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胺基酸的反應而進行化學修飾。此類修飾的實施例為本領域所熟知，例如，在 R. Lundblad

所著的《Chemical Reagents for Protein Modification》(3rd ed. CRC Press, 2004) (Lundblad, 2004) 中有概述，以參考文獻的方式並入本文。雖然胺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、賴胺酸吡哆基化、還原烷基化、以 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 三硝基苯基化胺基團、透過將半胱胺酸過甲酸氧化為磺基丙胺酸而對羧基團和巰基進行胺基修飾、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 值下與氰酸鹽甲胺醯化。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。

【0229】簡言之，修飾蛋白質的精胺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-烯己二酮）的反應而形成加合物。另一個實施例是丙酮醛與精胺酸殘基的反應。半胱胺酸可在賴胺酸和組胺酸等親核位點不作隨同修飾的情況下就得到修飾。因此，有大量試劑可進行半胱胺酸的修飾。

Sigma-Aldrich

(<http://www.sigma-aldrich.com>) 等公司的網站含有具體試劑的資訊。

【0230】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胺酸殘基。N-(3-二甲胺基丙基)-N'-乙基-碳二亞胺可用於形成賴胺酸殘基和谷胺酸殘基的分子內交聯。例如：焦碳酸二乙酯是修飾蛋白質組胺酸殘基的試劑。組胺酸也可使用 4-羥基-2-壬烯醛進行修飾。賴胺酸殘基與其他 α -胺基團的反應，例如，有利於肽結合到蛋白/肽的表面或交聯處。賴胺酸聚是多(乙烯)乙二醇的附著點，也是蛋白質糖化的主要修飾位點。蛋白質的蛋胺酸殘基可透過碘乙醯胺、溴乙胺、氯胺 T 等被修飾。

【0231】四硝基甲烷和 N-乙醯基咪唑可用於酪胺酸殘基的修飾。經二酪胺酸形成的交聯可透過過氧化氫/銅離子完成。

【0232】對色胺酸修飾的最近研究中使用了 N-溴代琥珀醯亞胺、2-羥基-5-硝基苄溴或 3-溴-3-甲基-2-(2-硝基苄基)-3H-吡啶 (BPNS-糞臭素)。

【0233】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胺基甲醯化實現。

【0234】一種肽或變體，其中肽被修飾或含非肽鍵，較佳為本發明的實施例。一般來說，肽和變體(至少含

胺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-胺基提供臨時保護。使用 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 二甲基吡啶中對這種鹼高度敏感的保護基團進行重複分裂。由於它們的丁基醚 (在絲胺酸、蘇胺酸和酪胺酸的情況下)、丁基酯 (在谷胺酸和天門冬胺酸的情況下)、叔丁氧羰基衍生物 (在賴胺酸和組胺酸的情況下)、三苯甲基衍生物 (在半胱胺酸的情況下) 及 4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺醯基衍生物 (在精胺酸的情況下), 側鏈功能可能會受到保護。只要穀胺醯胺和天冬醯胺為 C-末端殘基, 側鏈胺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酸醯胺聚合物, 其由三個單體二甲基丙烯酸醯胺 (骨架單體)、雙丙烯酸醯胺 (交聯劑) 和 N-丙烯酸肌胺酸甲酯 (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。所有的胺基酸衍生物均作為其預製對稱酸酐衍生物加入, 但是天冬醯胺和穀胺醯胺除外, 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胺基酸組成。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）。

【0235】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。

【0236】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）。

【0237】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、酸解後的胺基酸分析、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。

【0238】為了識別本發明的肽，對可公開獲得的約3000個正常組織樣本的RNA表現資料庫（Lonsdale, 2013）進行了篩選在重要器官系統中近乎無表現而在其他重要器官系統中低表現的基因。在第二步驟中，從這些基因的蛋白質產物衍生的癌相關肽透過使用如本文所述的XPRESIDENT™平臺質譜法識別。

【0239】 詳細地說，爲了使用來自所述資料庫中的RNASeq資料選擇相關基因，考慮的重要器官系統爲：腦、心臟、血管、肺和肝。基因選擇時，重要器官的每百萬讀數每千鹼基讀數中值(RPKM)要求小於2，75%百分位數要求小於5 RPKM。如果器官系統被多個樣本類型涵蓋，例如，單獨分析的不同腦區，則多個樣本類型的最大中位元值和最大75%百分位數用於計算。考慮的其他重要器官系統爲：皮膚、神經、垂體、結腸、腎臟、脂肪組織、腎上腺、膀胱、全血、食道、肌肉、胰腺、唾液腺、小腸、胃、乳腺、脾、甲狀腺。在選擇基因時，這些器官的最大中位 RPKM 要求小於10。其他器官被視爲非重要的，因此不應用基因表現的截止值。這些器官是宮頸和子宮、輸卵管、陰道、攝護腺、睪丸和卵巢。使用這種篩選方法，選擇約14,000個候選基因。接著，分析相應蛋白衍生的肽的呈現特徵。如果肽呈現於所分析的一組超過170個正常（即非癌性）樣本中少於五個正常樣本，以及如果正常組織最高呈現低於中位數腫瘤信號的30%（所有腫瘤樣本），則該肽視爲相關肽。

【0240】 爲了選擇過度呈現的肽，計算了呈現圖，其顯示樣本中位元呈現量以及複製變化。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呈現分數中，從而透過

假發現率 (Benjamini and Hochberg, 1995) 調整多項檢驗。

【0241】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，並透過線上奈米 - 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，將原發腫瘤樣本中記錄的天然 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性腫瘤 HLA 分子的配體，因此這些結果為原發性癌症組織上確定肽的天然加工和呈現提供了直接證據。

【0242】樣本數分別為 (全部 / 透過 QC 的樣本) : PC N=39 (36) 、 RCC N=22 (18) 、 CRC N=31 (28) 、食道癌 N=14 (11) 、BPH 和攝護腺癌 N=53 (43) 、HCC N=15 (15) 、NSCLC N=96 (87) 、GC N=35 (33) 、GB N=38 (27) 、乳腺癌 N=2 (2) 、黑色素瘤 N=5 (2) 、卵巢癌 N=21 (20) 、CLL N=5 (4) 、SCLC N=18 (17) 、NHL N=18 (18) 、AML N=23 (18) 、GBC、CCC N=18 (17) 、UBC N=17 (15) 、UEC N=19 (16) 。如果採集 5 次質譜重複或樣本被完全消耗，則透過 QC，用於計算歸一化因子的肽 (即發生於同一樣本技術重複且變異少於 50 % ，以及發生於 2 個獨立樣本) 是樣本中所測量所有

肽的至少 30%。亞型分型後亞型樣本很少的樣本（如 A*02:05、A*02:06）被排除於本發明肽的選擇。

【0243】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呈現的候選肽疫苗，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。

【0244】為每種肽和樣本確立了呈現水準，包括誤差估計值。腫瘤組織大量呈現的肽以及腫瘤與非腫瘤組織和器官中過量呈現的肽已經得到確定。

【0245】對來自原發性 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL 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 使用 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL 樣本的方法進行鑒定，確認其在這些腫瘤上的呈現。

【0246】 在多個腫瘤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，並合並入柱狀圖（被稱為呈現圖）。呈現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。

【0247】 此外，發現管道 XPRESIDENT® v2.x 可對癌症或其他感染組織上的 MHC-肽（較佳為 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群組織樣本的總 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 11）。

【0248】 RNA 表現和質譜分析資料的這種組合分析獲得本發明的 288 種肽。在許多情況下，該肽僅在少量

的腫瘤上發現。但是，由於常規質譜分析靈敏度有限，RNA 資料為範圍評估提供了更好的基礎(見實施例 2)。

【0249】 本發明提出了有利於治療癌腫/腫瘤，較佳為治療過量呈現或只呈現本發明肽的 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL。這些肽由質譜分析法直接顯示出，而由 HLA 分子自然呈現於人原發性人 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL 樣本和/或 PC 樣本。

【0250】 與正常組織相比，癌症中高度過度表現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」是腫瘤相應類型的健康組織(肝、結腸/直腸、腦、胃、食道、肺、胰、腎、攝護腺、卵巢、皮膚、乳腺和白細胞)或其他正常組織細胞，這表明腫瘤與這些源基因的高度關聯性(見實施例 2)。此外，這些肽本身也在腫瘤組織中過度呈現(本發明相關的「腫瘤組織」是指來自 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 患者的樣本)，但不在正常組織中過度呈現(見實施例 1)。

【0251】 HLA 結合肽能够被免疫系統識別，特別是 T 淋巴細胞。T 細胞可破壞呈現被識別 HLA/肽複合體的細胞（如：呈現衍生肽的 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 細胞）。

【0252】 本發明的所有肽已被證明具有刺激 T 細胞反應的能力，並過量呈現，因而可用於製備本發明的抗體和/或 TCR，例如可溶性 TCR（參見實施例 3 和實施例 4）。此外，肽與相應的 MHC 組合時，也可用於製備本發明的抗體和/或 TCR，特別是 sTCR。各個方法均為技術人員所熟知，並在各個文獻中可找到。因此，本發明的肽可用於在患者中產生免疫反應，從而能夠毀滅腫瘤細胞。患者的免疫反應能夠透過直接給予患者所述肽或前體物質（如，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呈現的複製數目較少，防止患者發生對抗正常細胞的不良自體免疫反應的風險。

【0253】 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 分子呈現時可與 TCR 和抗體結合的肽。本說明書

還涉及核酸、載體和用於表現 TCR 的宿主細胞和本說明書的肽；以及使用它們的方法。

【0254】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够結合由 HLA 分子呈現的肽抗原。該術語還包括所謂的 γ/δ TCR。

【0255】在一個實施方案中，該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 表現的條件下培養能够表現 TCR 的宿主細胞。

【0256】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够量的含抗原呈現細胞的抗原結合被載入表現表現於合適抗原呈現細胞或人工抗原呈現細胞表面的 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。

【0257】 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）的群組合。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。

【0258】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 $\text{TCR}\gamma$ (TRGJ) 區的群組合，術語 $\text{TCR}\gamma$ 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，「 $\text{TCR}\delta$ 可變域」是指無前導區 (L) 的 $\text{TCR}\delta$ V (TRDV) 區與 $\text{TCR}\delta$ D/J (TRDD/TRDJ) 區的群組合，術語「 $\text{TCR}\delta$ 恒定結構域」是指細胞外 TRDC 區域，或 C-末端截短 TRDC 序列。

【0259】本說明書的 TCR 較佳結合至肽 HLA 分子複合體，其具有約 $100\ \mu\text{M}$ 或更小、約 $50\ \mu\text{M}$ 或更小、約 $25\ \mu\text{M}$ 或更小或約 $10\ \mu\text{M}$ 或更小的結合親和力 (KD)。更為較佳的情況是具有約 $1\ \mu\text{M}$ 或更小、約 $100\ \text{nM}$ 或更小、約 $50\ \text{nM}$ 或更小或約 $25\ \text{nM}$ 或更小結合親和力的高親和力 TCR 。本發明 TCR 較佳結合親和力範圍的非限制性示例包括約 $1\ \text{nM}$ 至約 $10\ \text{nM}$ ；約 $10\ \text{nM}$ 至約 $20\ \text{nM}$ ；約 $20\ \text{nM}$ 至約 $30\ \text{nM}$ ；約 $30\ \text{nM}$ 至約 $40\ \text{nM}$ ；約 $40\ \text{nM}$ 至約 $50\ \text{nM}$ ；約 $50\ \text{nM}$ 至約 $60\ \text{nM}$ ；約 $60\ \text{nM}$ 至約 $70\ \text{nM}$ ；約 $70\ \text{nM}$ 至約 $80\ \text{nM}$ ；約 $80\ \text{nM}$ 至約 $90\ \text{nM}$ ；以及約 $90\ \text{nM}$ 至約 $100\ \text{nM}$ 。

【0260】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 $100\ \mu\text{M}$ 或更小的肽- HLA 分子複合體有結合親和力 (KD) 的 TCR 。

【0261】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。這種類型的較佳 TCR 包括那些具有一個 TRAC 恒定域序列和 TRBC1 或

TRBC2 恒定域序列的 TCR，除非 TRAC 的那蘇胺酸 48 和 TRBC1 或 TRBC2 的絲胺酸 57 被半胱胺酸殘基取代，所述半胱胺酸形成 TRAC 恒定域序列和 TCR 的 TRBC1 或 TRBC2 恒定區序列之間的二硫鍵。

【0262】 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。

【0263】 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。

【0264】 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 與未突變的 TCR 相比，已經修改了糖化。

【0265】 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。這樣視窗的存在是根據觀察

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轉譯加工改變的蛋白將被免疫系統視為外來物質。上調或過度表現（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：表現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 或變體對根據本發明肽的親和力可透過本領域熟知的方法來增強。

【0266】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 陰性健康供體培育 PBMC，用四聚體-藻紅蛋白（PE）培育 PBMC 並透過螢光活化細胞分選（FACS）方法 - Calibur 分析分離高親和力 T 細胞。

【0267】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）的基因改造小鼠（其 T 細胞表現多樣化人類 TCR，用於補償小鼠 TCR 缺乏），用相關肽對小鼠進行免疫處理，用四聚體-藻紅蛋白（PE）培育從基因改造小鼠中獲得的 PBMC，

並透過螢光活化細胞分選 (F A C S) 方法 - C a l i b u r 分析分離高親和力 T 細胞。

【0268】 一方面，爲了獲得表現本說明書 T C R 的 T 細胞，編碼本說明書 T C R - α 和 / 或 T C R - β 鏈的核酸被克隆入表現載體，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 P B M C)，在輸入患者前展開。

【0269】 另一方面，爲了獲得表現本說明書 T C R 的 T 細胞，T C R R N A 透過本領域中已知的技術(例如，活體外轉錄系統)合成。然後，活體外合成的 T C R R N A 透過電穿孔來重新表現腫瘤特異性 T C R - α 和 / 或 T C R - β 鏈被引入獲得自健康供體的初級 C D 8 + T 細胞。

【0270】 爲了增加表現，編碼本說明書 T C R 的核酸在操作上可連接到強啟動子，例如反轉錄病毒長末端重複序列 (L T R)、巨細胞病毒 (C M V)、鼠幹細胞病毒 (M S C V) U 3、磷酸甘油酸激酶 (P G K)、 β 肌動蛋白、泛素蛋白和猿猴病毒 40 (S V 40) / C D 43 複合啟動子、延伸因子 (E F) - 1 a 和脾臟病灶形成病毒 (S F F V) 啟動子。在一較佳實施方案中，啟動子與被表現的核酸異源。

【0271】 除了強啟動子外，本說明書的 T C R 表現盒可能含有附加的元素，可提高基因改造表現，包括中樞多聚嘌呤區 (C P P T)，其促進了慢病毒構建體的核易

位 (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 穩定性增加基因改造表現水準 (Zufferey et al., 1999)。

【0272】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。

【0273】實現高水準的 TCR 表面表現需要引入 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) 導致兩鏈的協同表現，因為 TCR- α 和 TCR- β 鏈均由在轉譯過程中分成兩個蛋白質的單一轉錄物產生，從而確保了產生 TCR- α 和 TCR- β 鏈的相等莫耳比。(Schmitt et al. 2009)。

【0274】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現的密碼子。遺傳密碼冗餘讓一些胺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「最佳化」，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 基因序列使得每個胺基酸被用於哺乳動物基因表現的最佳密碼子編碼，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 基因表現 (Scholten et al., 2006)。

【0275】此外，引入的和內源性 TCR 鏈之間的錯配可能會導致獲得特異性，這些特異性對自身免疫構成顯著風險。例如，混合 TCR 二聚體的形成可能會減少可用以形成正確配對 TCR 複合體的 CD3 分子數目，因此，可以顯著降低表現所引入 TCR 的細胞的功能性親合力（Kuball et al., 2007）。

【0276】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，而降低引入鏈與內源 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）；透過引入第二半胱胺酸殘基到引入 TCR 的 TCR- α 和 TCR- β 鏈產生 C 末端結構域的第二間二硫鍵（半胱胺酸修飾）；交換 TCR- α 和 TCR- β 鏈 C 端結構域的相互作用殘基（「杵臼結構」‘‘knob-in-hole’’）；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）。

【0277】在一實施方案中，宿主細胞被改變結構以表現本說明書的 TCR。在一較佳實施方案中，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，宿主是被轉化以表現 α/β TCR 的 γ/δ T 細胞。

【0278】 「藥物組合物」是指適合在醫療機構用於人體的群複合物。較佳地，藥物組合物為無菌狀態，並根據 GMP 指南生產。

【0279】 藥物組合物包括游離形式或以一種藥學上可接受之鹽形式存在的肽（也參見上文）。此處使用的「藥學上可接受之鹽」系指所公開的肽的一種衍生物，其中該肽由制酸或藥劑的鹼鹽進行改性。例如，用與適合的酸反應的游離碱（通常其中的中性藥物有一個中性 $-NH_2$ 基團）製備酸式鹽。適合製備酸鹽的酸包括有機酸，如：乙酸、丙酸、羥基酸、丙酮酸、草酸、蘋果酸、丙二酸、丁二酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、甲磺酸、苯磺酸、水楊酸等等、以及無機酸，如：鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸和磷酸等。相反，可在一種肽上呈現的酸性基團的鹼鹽製劑使用藥用鹼基進行製備，如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、三甲胺等等。

【0280】 在特別較佳的實施方案中，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。

【0281】 本發明中所述的藥劑較佳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，或活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），或活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）。如果核酸活體外注入細胞，可能有益於細胞轉染，以共同表現免疫刺激細胞介素（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）、或與免疫刺激細胞介素聯合使用、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。

【0282】一方面，疫苗包括至少含有 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 中提出的一種肽以及至少另外一種肽，較佳為 2 至 50 個、更佳為 2 至 25 個、再較佳為 2 至 20 個、最佳為 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 T A A 中衍生，並且可能與 M H C I 類分子結合。

【0283】 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 或其複合物，它們可為單股和/或雙股、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鍵並含有天然胺基酸殘基的肽。另一個方面，本發明提出了一種可根據本發明表現多肽的表現載體。

【0284】 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。

【0285】 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。

【0286】 編碼本發明多肽的 DNA 理想修飾方法利用 Saiki RK 等人 (Saiki et al., 1988) 披露的聚合酶鏈反應方法。此方法可用於將 DNA 引入合適的載體 (例如, 透過設計合適的酶切位點), 也可用於本領域已知的其他有用方法修飾 DNA。如果使用病毒載體, 痘病毒載體或腺病毒載體為較佳。

【0287】 之後, DNA (或在反轉錄病毒載體情況下, RNA) 可能表現於合適的宿主, 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, 構建表現載體, 然後表現載體用於轉化合適宿主細胞, 從而表現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。

【0288】 編碼含本發明化合物多肽的 DNA (或在反轉錄病毒載體情況下, RNA) 可能被加入到其他多種 DNA 序列, 從而引入到合適的宿主中。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。

【0289】 一般來說, DNA 可以適當的方向和正確的表現閱讀框架附著到一種表現載體 (如質體) 中。如有必要, 該 DNA 可能與所需宿主所識別的相應轉錄和轉譯調節控制核苷酸序列連接, 儘管表現載體中一般存在此

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現載體插入一個 DNA 序列，該序列對轉化細胞中的可選擇性屬性（如抗生素抗藥性）進行編碼。

【0290】 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。

【0291】 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，從而表現之後可回收的肽。

【0292】 有許多已知的表現系統，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。該系統可較佳為哺乳動物細胞，如來自 ATCC 細胞生物學庫（Cell Biology Collection）中的 CHO 細胞。

【0293】 典型的哺乳動物細胞組成型表現載體質體包括 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現載體的例子是 pMSG，也可以從 Pharmacia 公司獲得。有用的酵母質體載體是 pRS403-406 和 pRS413-416，一般可從 Stratagene Cloning Systems 公司（La Jolla, CA

92037, 美國)獲得。質體 pRS403、pRS404、pRS405 和 pRS406 是酵母整合型質體 (YIp), 並插入了酵母可選擇性標記物 HIS3、TRP1、LEU2 和 URA3。pRS413-416 質體為酵母著絲粒質體 (Ycp)。基於 CMV 啟動子的載體 (如, 來自於 Sigma-Aldrich 公司) 提供了暫態或穩定的表現、胞漿表現或分泌, 以及 FLAG、3xFLAG、c-myc 或 MATN 不同複合物中的 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。

【0294】強勁的人巨細胞病毒 (CMV) 啟動子調控區使得 COS 細胞中的群組成蛋白表現水準高達 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、細菌中進行胺苄青黴素抗性選育的鈣-內鹼胺酶基因、hGH polyA 和 fl 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現系統是本領域熟知眾所周知的。

【0295】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) 表現。在達到目標, 所述

肽或肽變體可能透過連接子胺基酸的延伸處（例如 L L L L L L）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 M H C I 和 M H C II 類分子的免疫應答。

【0296】 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，細菌細胞為較佳原核宿主細胞，典型為大腸桿菌株，例如，大腸桿菌菌株 D H 5（從 Bethesda Research Laboratories 公司（Bethesda, MD, 美國）獲得）和 R R 1（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，較佳為脊椎動物細胞，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 Y P H 4 9 9、Y P H 5 0 0 和 Y P H 5 0 1，一般可從 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 C C L 6 1 細胞、NIH 瑞士小鼠胚胎細胞 N I H / 3 T 3 為 ATCC 中的 C R L 1 6 5 8 細胞、猴腎源性 C O S - 1 細胞為 ATCC 中的 C R L 1 6 5 0 細胞以及人胚胎腎細胞的 2 9 3 號細胞。首選昆蟲細胞為 S f 9 細胞，可用杆狀病毒表現載體轉染。有關針對表現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) 和本領域技術人員知道的其他文獻中查到。

【0297】 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。

【0298】 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。

【0299】 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，抗原呈現細胞（如樹突狀細胞）可用於表現本發明中的肽，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現載體的一種宿主細胞。

【0300】 在一個較佳實施方案中，宿主細胞為抗原呈現細胞，尤其是樹突狀細胞或抗原呈現細胞。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)。

【0301】 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。

【0302】 在另一個實施方案中，本發明中的肽、核酸或表現載體用於藥物中。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。肽注射的較佳方法包括 s.c.、i.d.、i.p.、i.m. 和 i.v. 注射。DNA 注射的較佳方法為 i.d.、i.m.、s.c.、i.p. 和 i.v. 注射。例如，給予 50 μ g 至 1.5 mg，較佳為 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)。

【0303】 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，也可能為其複合物。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、反轉錄病毒、疱疹病毒、腺相關病毒或含一種以上病毒元素的混合病毒的系統。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。

【0304】 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 IMS1312、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、分支杆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。較佳佐劑如：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）。也可能使用細胞介素。一些細胞介素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呈現細胞（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）。

【0305】 據報告，CpG 免疫刺激寡核苷酸可提高佐劑在疫苗中的作用。如果沒有理論的約束，CpG 寡核苷酸可透過 Toll 樣受體（TLR）（主要為 TLR9）活化先天（非適應性）免疫系統從而起作用。CpG 引發的 TLR9 活化作用提高了對各種抗原的抗原特異性體液和細胞反應，這些抗原包括肽或蛋白抗原、活病毒或被殺死的病毒、樹突狀細胞疫苗、自體細胞疫苗以及預防性和治療性疫苗中的多糖結合物。更重要的是，它會增強樹突狀細胞的成熟和分化，導致 T_{H1} 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 T_{H1} 偏移，這些佐劑如：正常促進 T_{H2} 偏移的明礬或弗氏不完全佐劑（IFA）。CpG 寡核苷酸與以下其他佐劑或配方一起製備或聯合給藥時，表現出更強的佐劑活性，如微粒、奈米粒子、脂肪乳或類似製劑，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 CpGTLR9 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較佳成分。也可

使用其他如 TLR 結合分子，如：RNA 結合 TLR7、TLR8 和 / 或 TLR9。

【0306】 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。

【0307】 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。

【0308】 本發明藥物組合物的一個較佳實施方案中，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 。

【0309】 本發明藥物組合物的一個較佳實施方案中，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 resimiquimod。在本發明藥物組合物的一個較佳實施方案中，佐劑為環磷醯胺、咪喹莫特或 resiquimod。更佳的佐劑是 Montanide IMS1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、聚-ICLC（Hiltonol®）和抗 CD40 mAB 或其複合物。

【0310】 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，較佳為水載體。此外，複合物可包含輔料，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：細胞介素。可用於此類複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。

【0311】 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標靶，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現相同模式的抗原。因此，幾個腫瘤相關肽的群組合確保了每個腫瘤都承擔至少一些標靶。該複合物以這樣的方式設計，預期每個腫瘤可表現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，無需抗原表現的任何額外的生物標誌物評估，但仍然確保多個標靶同時被誘導的免疫應答攻擊，這對於療效很重要（Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012）。

【0312】 本文所用的「支架」一詞是指與（如抗原）決定因子特異性結合的分子。在一項實施方案中，支架是能夠引導其所連接的實體（例如，（第二）抗原結合部分）至目標靶點，例如，至特定類型的腫瘤細胞或承載抗原決定簇的腫瘤基質（如根據目前申請中肽和 MHC 的複合體）。在另一項實施例中，支架能夠透過其靶抗原（例如 T 細胞受體複合體抗原）活化信號通路。支架包括但不限於抗體及其片段，抗體的抗原結合區，其包含抗體重鏈可變區和抗體輕鏈可變區，結合的蛋白包括至少一個錨蛋白重複序列基元和單域抗原結合（SDAB）分子、適體、（可溶）TCR 和（經修飾的）細胞，例如同種異體或自體 T 細胞。為了評估某個分子是否是結合至靶點的支架，可進行結合測定。

【0313】 「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呈現一個或多個其他肽-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。評估標靶細胞殺手的測試在本領域中是公知的。它們應該含有未改變的肽-MHC 呈現的標靶細胞（原發細胞或細胞系）或載有肽的細胞進行，以便達到天然肽-MHC 的水準。

【0314】 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雷射掃描顯微術或流式細胞術提供結合適體的視覺化。

【0315】 各支架可與第二個活性分子（例如 IL-21、抗 CD3、抗 CD28）共軛。

【0316】 關於多肽支架的進一步資訊，可參閱，例如，在 WO 2014/071978A1 背景技術部分，並作為參考文獻引用。

【0317】 本發明還涉及適體。適體（例如，參見 WO 2014/191359 及其中引用的文獻）是短的單股核酸分

子，其可以折疊為所定義的三維結構並識別特定的標靶結構。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標靶相結合。

【0318】 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活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。

【0319】 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。

【0320】 此外，用流式細胞儀對細胞結合行為的研究顯示，適體在奈莫耳範圍內顯示出很好的親和力。

【0321】 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。

【0322】 可選擇適體針對複合體的標靶，如細胞和組織以及包含、較佳包括根據任何 SEQ ID NO 1 至 SEQ ID NO 288 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。

【0323】本發明中的肽可用於生成和開發出針對 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爲了成像之目的（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。

【0324】因此，本發明的另一方面是提出產生特異性結合至與 HLA 限制性抗原絡合的 I 或 II 類人主要組織相容性複合體（MHC）的一種重組抗體的方法，該方法包括：用可溶形式的與 HLA 限制性抗原絡合的（MHC）I 或 II 類分子對包含表現所述主要組織相容性說複合體（MHC）I 或 II 類的基因工程非人哺乳動物進行免疫；將 mRNA 分子與產生所述非人哺乳動物細胞的抗體分離；產生一個噬菌體顯示庫，顯示由所述 mRNA 分子編碼的蛋白分子；以及將至少一個噬菌體與所述噬菌體顯示庫分離，所述的至少一個噬菌體顯示所述抗體特異性地結合至與 HLA 限制性抗原絡合的所述人主要組織相容性說複合體（MHC）I 或 II 類。

【0325】本發明的另一方面提出一種抗體，其特異性結合至與一種 HLA 限制性抗原絡合的 I 或 II 類人主要組織相容性說複合體（MHC），其中該抗體較佳爲多克隆抗體、單株抗體、雙特異性抗體和/或嵌合抗體。

【0326】 產生這種抗體和單股 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 WO 03/068201、WO 2004/084798、WO 01/72768、WO 03/070752 以及出版物 (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003) 中進行了披露，爲了本發明之目的，所有參考文獻透過引用被完整地併入本文。

【0327】 較佳地，該抗體與複合體的結合親和力低於 20 奈莫耳，較佳為低於 10 奈莫耳，這在本發明情況下也被視為具有「特異性」。

【0328】 本發明涉及一種肽，包含選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 的群組的一個序列或該序列的與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 具有 88% 同源性（較佳為相同）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。

【0329】 本發明進一步涉及一種肽，包含選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 的群組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 具有至少 88% 同源性（較佳為相同）的一種變體，其中所述肽或變體的總長度為 8 至 100 個、較佳為 8 至 30 個、最佳為 8 至 14 個胺基酸。

【0330】 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。

【0331】 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:288 的一個胺基酸序列組成。

【0332】 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。

【0333】 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-端胺基酸，或其中該肽與一種抗體（例如，樹突狀細胞特定抗體）融合。

【0334】 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。

【0335】 本發明進一步涉及一種本發明的核酸，為 DNA、cDNA、PNA、RNA，也可能為其複合物。

【0336】 本發明進一步涉及一種能表現本發明核酸的表現載體。

【0337】 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現載體，特別是用於治療 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL。

【0338】 本發明進一步涉及含本發明核酸或本發明表現載體的一種宿主細胞。

【0339】 本發明進一步涉及本發明的宿主細胞，其為抗原呈現細胞，較佳為樹突細胞。

【0340】 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。

【0341】 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呈現細胞的抗原結合被載入表現於合適抗原呈現細胞表面的 I 或 II 類 MHC 分子。

【0342】 本發明進一步涉及本發明的方法，其中該抗原呈現細胞包括一個表現載體，該載體有能力表現含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 的肽或所述變體胺基酸序列。

【0343】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的活化 T 細胞，其中所述 T 細胞有選擇性地識別一種細胞，該細胞異常表現含一種本發明胺基酸序列的多肽。

【0344】 本發明進一步涉及一種殺傷患者標靶細胞的方法，其中患者的標靶細胞異常表現含本發明任何胺基酸序列的多肽，該方法包括給予患者本發明的有效量 T 細胞。

【0345】 本發明進一步涉及任何所述肽、本發明的一種核酸、本發明的一種表現載體、本發明的一種細胞、本發明一種作為藥劑或製造藥劑的活化細胞毒性 T 淋巴

細胞的用途。本發明進一步涉及一種本發明的用途，其中藥劑可有效抗癌。

【0346】 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。

【0347】 本發明進一步涉及一種本發明的用途，其中所述癌細胞為 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 細胞。

【0348】 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「標靶」，其可用於診斷和/或判斷 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 的預後。本發明還涉及這些供癌症治療使用的新靶點。

【0349】 本文中術語「抗體」為廣義上的定義，既包括多克隆也包括單株抗體。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，HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色

素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 標誌物（多）肽的特異性結合、將毒素傳遞給癌細胞標誌物基因表現水準增加時的 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 細胞和 / 或抑制 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 標誌物多肽的活性）。

【0350】 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 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 標誌物多肽或其片段可用於製備本發明的抗體。用於產生本發明抗體的多肽可部分或全部地由天然源經純化而得，也可利用重組 DNA 技術生產。

【0351】 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:288 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）中表現，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 HCC、CRC、GB、GC、

食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 標誌物多肽的單克隆或多克隆抗體製劑。

【0352】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株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、活體內成像、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群組織切片進行檢測。在初次活體外表徵後，用於治療或活體內診斷用途的抗體根據已知的臨床測試方法進行檢測。

【0353】此處使用的術語「單株抗體」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，但可能少量呈現的自然突變除外。此處所述的單株抗體具體包括「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）。

【0354】 本發明的單株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，淋巴細胞可在活體外進行免疫。

【0355】 單株抗體也可由 DNA 重組方法制得，如：美國 4816567 號專利所述。編碼本發明單株抗體的 DNA 可很容易地使用傳統程序進行分離和定序（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）。

【0356】 活體外方法也適用於製備單價抗體。抗體消化以產生抗體的片段，尤其是 Fab 片段，可以透過使用本領域已知的常規技術完成。例如，可以透過使用木瓜蛋白酶完成消化。木瓜蛋白酶消化的實施例在 WO 94/29348 和美國 4342566 號專利中有描述。抗體的木瓜蛋白酶消化通常產生兩種相同的抗原結合性片段，稱為 Fab 片段（每個片段都有一個抗原結合點）和殘餘 Fc 片段。胃蛋白酶處理產生 $aF(ab')_2$ 片段和 pFc' 片段。

【0357】 抗體片段，不論其是否附著於其他序列，均可包括特定區域或特定胺基酸殘基的插入、刪除、替換、或其他選擇性修飾，但前提是，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胺基酸，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、隨後表現和測試所表現的多肽進行確定。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。

【0358】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。

【0359】 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胺基酸殘基。這些非人胺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。

【0360】 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基因改造動物（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。

【0361】 本發明的抗體較佳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學上可接受之鹽，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值較佳為約5至8，

更佳為約 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，某些載體可能為更佳，取決於例如，抗體的給藥途徑和濃度。

【0362】 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療作用。局部或靜脈注射為較佳。

【0363】 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 mg/kg 體重或更多，這取決於上述因素。給予抗體，較佳為治療 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 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。

【0364】 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(單股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、細胞介素(參見US 2013/0115191)、域招募效應細胞，如抗CD3域等，以便對標靶細胞執行特定的功能。此外，它可能表現表現於用於過繼轉移的T細胞。進一步的資訊可在WO 2004/033685A1和WO 2004/074322A1中找到。sTCR的群組合在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。

【0365】 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。

【0366】 該抗體或 TCR 也可用於活體內診斷實驗。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群組的蛋白質標靶的細胞外域結合，並且親和力值（ K_d ）低於 $1 \times 10 \mu\text{M}$ 。

【0367】 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現。

【0368】 本發明的另一方面包括一種活體外製備活化的 T 細胞的方法，該方法包括將 T 細胞與載有抗原的人 MHC 分子進行活體外連接，這些分子在合適的抗原呈現細胞表面表現足夠的一段時間從而以抗原特異性方式活化 T 細胞，其中所述抗原為根據本發明所述的一種肽。較佳情況是足夠量的抗原與抗原呈現細胞一同使用。

【0369】 較佳情況是，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。

【0370】 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 CRL 19863；小鼠 RMA-S 細胞株 Ljunggren 等人描述過（Ljunggren and Karre, 1985）。

【0371】 較佳情況是，宿主細胞在轉染前基本上不表現 MHC I 類分子。刺激因子細胞還較佳為表現對 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。

【0372】 當 MHC I 類表位用作一種抗原時，T 細胞為 CD8 陽性 T 細胞。

【0373】 如果抗原呈現細胞受到轉染而表現這種表位，則較佳的細胞包括一個表現載體，該載體有能力表現含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 的肽或變體胺基酸序列。

【0374】 可使用其他一些方法來活體外生成 T 細胞。例如，自體腫瘤浸潤性淋巴細胞可用於生成 CTL。Plebanski 等人在 (Plebanski et al., 1995) 使用自活體外周血淋巴細胞 (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呈現細胞 (aAPC) 活體外活化 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 aAPC。該系統實現了對 aAPC 上的 MHC 密度進行精確調節，這使得可以在血液樣本中選擇地引發高或低親合力的高效抗原特異性 T 細胞反應。除了 MHC：肽複合物外，aAPC 還應攜運含共刺激活性的其他蛋白，如耦合至表面的抗-CD28 抗體。此外，此類基於 aAPC 的系統往往需要加入適當的可溶性因子，例如，諸如白細胞介素-12 的細胞介素。

【0375】 也可用同種異體細胞制得 T 細胞，在 WO 97/26328 中詳細描述了一種方法，以參考文獻方式並入本文。例如，除了果蠅細胞和 T2 細胞，也可用其他細胞來呈現肽，如 CHO 細胞、杆狀病毒感染的昆蟲細胞、細菌、酵母、牛痘感染的標靶細胞。此外，也可使用植物病毒（例如，參閱 Porta 等人在（Porta et al., 1994）中描述了將豇豆嵌紋病毒開發為一種呈現外來肽的高產系統。

【0376】 被活化的 T 細胞直接針對本發明中的肽，有助於治療。因此，本發明的另一方面提出了用本發明前述方法制得的活化 T 細胞。

【0377】 按上述方法製成的活化 T 細胞將會有選擇性地識別異常表現含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO 288 胺基酸序列的多肽。

【0378】 較佳情況是，T 細胞透過與其含 HLA/肽複合物的 TCR 相互作用（如，結合）而識別該細胞。T 細胞是殺手患者標靶細胞方法中有用的細胞，其標靶細胞異常表現含本發明中胺基酸序列的多肽。此類患者給予有效量的活化 T 細胞。給予患者的 T 細胞可能源自該患者，並按上述方法活化（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，較佳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，較佳為免疫系統合格，更佳為無任何可很容易測試或檢測到的疾病。

【0379】 根據本發明，CD8-陽性 T 細胞的活體內標靶細胞可為腫瘤細胞（有時表現 MHC-II 類抗原）和/或腫瘤周圍的基質細胞（腫瘤細胞）（有時也表現 MHC-II 類抗原；（Dengjel et al., 2006））。

【0380】 本發明所述的 T 細胞可用作治療性複合物中的活性成分。因此，本發明也提出了一種殺傷患者標靶細胞的方法，其中患者的標靶細胞異常表現含本發明中胺基酸序列的多肽，該方法包括給予患者上述有效量的 T 細胞。

【0381】 發明人所用的「異常表現」的意思還包括，與正常表現水準相比，多肽過度表現，或該基因在源自腫瘤的群組織中未表現，但是在該腫瘤中却表現。「過度表現」系指多肽水準至少為正常組織中的 1.2 倍；較佳為至少為正常組織中的 2 倍，更佳為至少 5 或 10 倍。

【0382】 T 細胞可用本領域已知的方法制得（如，上述方法）。

【0383】 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）。

【0384】 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，較佳為 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。

【0385】 本發明的任一分子（即肽、核酸、抗體、表現載體、細胞，活化 T 細胞、T 細胞受體或編碼核酸）都有益於治療疾病，其特點在於細胞逃避免疫反應的打擊。因此，本發明的任一分子都可用作藥劑或用於製造藥劑。這種分子可單獨使用也可與本發明中的其他分子或已知分子聯合使用。

【0386】 本發明進一步提出了一種藥劑，其用於治療癌症，特別是 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 和其他惡性腫瘤。

【0387】 本發明還涉及一種套件，其包括：

【0388】 （a） 一個容器，包含上述溶液或凍乾粉形式的藥物組合物；

【0389】 （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

【0390】 （c） 可選的（i）溶液使用或（ii）重組和/或凍乾製劑使用的說明。

【0391】 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。

【0392】 本發明中的套件較佳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。

【0393】 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。

【0394】 稀釋液和凍乾製劑混合後，重組製劑中的肽終濃度較佳為至少 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。

【0395】 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。

【0396】 較佳情況是，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，較佳為水溶液，更佳為無菌水溶液。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。

【0397】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。較佳情況是，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（本套件的群複合物）。

【0398】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。較佳為皮下給藥，最佳為皮內給藥，也可透過輸液泵給藥。

【0399】由於本發明的肽從 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL 中分離而得，因此，本發明的藥劑較佳用於治療 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 和 CLL。

【0400】 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。

【0401】 「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。

【0402】 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呈現的一組或一系列肽。「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 等位基因 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 患者的腫瘤組織中高度過度表現。其可能含有包括 MHC I 類和 MHC II 類肽或拉長的 MHC I 類肽。除了從幾種腫瘤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。

【0403】 本發明和存儲庫的 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現分析、質譜法和 T 細胞免疫學（XPresident®）。該方法確保了只選擇真實存在於高百分比腫瘤但在正常組織中不表現或僅很少量表現的 TUMAP 用於進一步分析。對於初始肽的選擇，患者的 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 樣本和健康供體的血液以循序漸進的方法進行分析：

【0404】 1. 使用全基因組信使核糖核酸（mRNA）表現分析法用於確定在重要正常（非癌性）組織中以非常低水平表現的基因。評估這些基因在惡性腫瘤組織（HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC、CLL）與一系列正常器官和組織相比是否過度表現。

【0405】 2. 惡性材料 (HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC、CLL) 的 HLA 配體用質譜法測定。

【0406】 3. 確定的 HLA 配體與基因表現資料進行比較。腫瘤組織上過度呈現或選擇性呈現的肽，較佳為第 2 步中檢測到的選擇性表現或過度表現基因所編碼的考慮為多肽疫苗的合適候選 TUMAP。

【0407】 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

【0408】 5. 過度表現在 mRNA 水準的相關性由腫瘤組織第 3 步選定的 TUMAP 重新檢測而確定，並且在健康組織上缺乏 (或不經常) 檢測。

【0409】 6. 為了評估透過選定的肽誘導活體內 T 細胞反應是否可行，使用健康供體以及 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 患者的人 T 細胞進行活體外免疫原性測定。

【0410】 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活體外 T 細胞活化，具體為：用裝載肽/MHC 複合物和抗 CD28 抗

體的人工抗原呈現細胞反復刺激來自健康供體的 CD8 + T 細胞。

【0411】 這種方法較佳用於罕見癌症以及有罕見表現譜的患者。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現表現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。

【0412】 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。

【0413】 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現表現於患者腫瘤中，並且可能的情況下，如果用患者個體 PBMC 進行檢測，則表現出很强的活體外免疫原性。

【0414】 較佳的情況是，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呈現的腫瘤相關肽（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，腫瘤樣本呈現的 TUMAP 的鑒定方法有：（a1）將來自腫瘤樣本的表現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現資料相比對，以識別腫瘤組織中過度表現或異常表現的蛋白；以及（a2）將表現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度表現或異常表現的蛋白質的 MHC 配體。較佳情況是，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，並定序洗脫配體。較佳情況是，腫瘤樣本和正常組織從同一患者獲得。

【0415】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現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現資料相比對，以識別腫瘤組織中過度表現或異常表現的蛋白；以及（a2）將表現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度表現或異常表現的蛋白質的 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定序方法進行定序：為了發現基因蛋白質編碼區域的非同義突變，從腫瘤組織中萃取基因組 DNA 和 RNA，從外周血單核細胞（PBMC）中提取正

常非突變基因組種系 DNA。運用的 NGS 方法只限於蛋白編碼區的重定序（外顯子組重定序）。爲了這一目的，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 HiSeq 2000（Illumina 公司）進行定序。此外，對腫瘤的 mRNA 進行定序，以直接定量基因表現，並確認突變基因在患者腫瘤中表現。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現。腫瘤特異性體突變透過與 PBMC 衍生的種系變化比較來確定，並進行優化。然後，爲了存儲庫可能測試新確定的肽瞭解如上所述的免疫原性，並且選擇具有合適免疫原性的候選 TUMAP 用於疫苗。

【0416】 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呈現的腫瘤相關肽（TUMAP）；（b）將（a）中鑒定的肽與進行腫瘤（與相應的正常組織相比）免疫原性和過量呈現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。

【0417】 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呈現的腫瘤相關肽（TUMAP）；以及（b）在（a）中選擇至少一種新確定的肽，並確認其免疫原性。

【0418】 一旦選定了用於個體化肽疫苗的肽時，則產生疫苗。該疫苗較佳為一種液體製劑，包括溶解於20-40% DMSO之間，較佳為約30-35% DMSO，例如，約33% DMSO中的個體肽。

【0419】 列入產品的每種肽都溶於DMSO中。單個肽溶液濃度的選擇取決於要列入產品中的肽的數量。單肽-DMSO溶液均等混合，以實現一種溶液中包含所有的肽，且濃度為每肽 $\sim 2.5 \text{ mg/ml}$ 。然後該混合溶液按照1:3比例用注射用水進行稀釋，以達到在33% DMSO中每肽 0.826 mg/ml 的濃度。稀釋的溶液透過 $0.22 \mu\text{m}$ 無菌篩檢程序進行過濾。從而獲得最終本體溶液。

【0420】 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 $700 \mu\text{L}$ 溶液，其中每種肽含有 0.578 mg 。其中的 $500 \mu\text{L}$ （每種肽約 $400 \mu\text{g}$ ）將用於皮內注射。

【0421】 本發明的肽除了用於治療癌症，也可用於診斷。由於肽由HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL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。

【0422】 血液樣本中組織活檢物含請求的肽，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 HCC、CRC、GB、GC、食道癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 的生物標誌物。肽基團的呈現使得能對病變組織進行分類或進一步分成子類。

【0423】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 表現的缺失是一種機制，充分說明瞭哪些受感染的惡性細胞逃避了免疫監視。因此，肽的呈現表明，分析過的細胞並沒有利用這種機制。

【0424】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，用於檢測移植植物抗宿主和宿主抗移植植物疾病。

【0425】下列描述較佳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】

【0426】圖1顯示了與正常組織相比各種肽在不同癌症組織中的過度呈現。分析包括來自170多個正常組織樣本以及376個癌症樣本的資料。顯示的僅是被發現呈現肽的樣本。圖1A)基因：CENPE，肽：KLQEKIQEL (SEQ ID NO.:1) -從左至右的群組織：4 白細胞癌細胞系，1 胰腺癌細胞系，1 黑色素瘤細胞系，2 個正常組織樣本 (1 腎上腺，1 脾)，31 原發癌組織樣本 (1 腦癌，4 結腸癌，1 食道癌，1 腎癌，2 肝癌，16 肺癌，4 卵巢癌，1 直腸癌，1 胃癌)，圖1B)基因：KIF15，肽：QLIEKNWLL (SEQ ID NO.:10) -從左至右的群組織：5 白細胞癌細胞系，1 胰腺癌細胞系，1 粒細胞白血病細胞系，1 個正常組織樣本 (1 腎上腺)，29 個癌組織樣本 (4 結腸癌，2 食道癌，1 白細胞癌，1 肝癌，10 肺癌，11 卵巢癌)，圖1C)基因：HAVCR1，肽：LLDPKTIFL (SEQ ID NO.:11) -從左至右的群組織：1 腎癌細胞系，13 個癌組織樣本 (8 腎癌，1 肝癌，2 肺癌，2 直腸癌)，圖1D)基因：RPGRIPL，肽：RLHDENILL (SEQ ID NO.:13) -從左至右的群組織：1 腎癌細胞系，1 攝護腺癌細胞系，1 黑色素瘤細胞系，50 個癌組織樣本 (4 腦癌，1 結腸癌，2 食道癌，3 腎癌，2 肝癌，23 肺癌，7 卵巢癌，2 胰腺癌，2 攝護腺癌，3 直腸癌症，1 胃癌)，圖1E - J 顯示了與正常組織相比各種肽在不同癌症組織中過度呈現。分析包括

來自 320 多個正常組織樣本以及 462 個癌症樣本的資料。顯示的僅是被發現呈現肽的樣本。圖 1E) 基因：DNAH14，肽：SVLEKEIYSI (SEQ ID NO.:2) - 從左至右的組織：4 細胞系 (3 血細胞，1 胰腺)，2 正常組織 (1 淋巴結，1 氣管)，52 癌組織 (2 膽管癌症，1 骨髓細胞癌，3 白細胞白血病癌症，5 乳腺癌，1 食道癌，1 食道和胃癌，1 膽囊癌，4 結腸癌，7 肺癌，6 淋巴結癌，7 卵巢癌，4 攝護腺癌，4 皮膚癌，2 膀胱癌，4 子宮癌)，圖 1F) 基因：MAGEA3、MAGEA6，肽：KIWEELSVLEV (SEQ ID NO.:40) - 從左至右的組織：8 癌組織 (1 肝癌，3 肺癌，2 皮膚癌，1 胃癌，1 膀胱癌)，圖 1G) 基因：HMX1，肽：FLIENLLAA (SEQ ID NO.:67) - 從左至右的組織：7 癌組織 (4 腦癌，2 肺癌，1 子宮癌)，圖 1H) 基因：CCDC138，肽：FLLEREQLL (SEQ ID NO.:84) - 從左至右的組織：3 細胞系 (2 血細胞，1 皮膚)，24 癌組織 (1 骨髓細胞癌，3 白細胞白血病癌症，1 骨髓癌，1 乳腺癌，1 腎癌，2 結腸癌，3 直腸癌，1 肺癌，7 淋巴結癌，3 膀胱癌，1 子宮癌)，圖 1I) 基因：CLSPN，肽：SLLNQPKAV (SEQ ID NO.:235) - 從左至右的組織：13 細胞系 (3 血細胞，2 腎，8 胰腺)，30 癌組織 (1 骨髓細胞癌，1 白細胞白血病癌症，2 腦癌，2 乳腺癌，2 食道癌，1 膽囊癌，1 直腸癌，2 肝癌，4 肺癌，5 淋巴結癌，2 卵巢癌，2 皮膚癌，4 膀胱癌，1 子宮癌)，

圖 1 J) 基 因 : S P C 2 5 , 肽 : G L A E F Q E N V (S E Q I D N O . : 2 4 3) - 從 左 至 右 的 組 織 : 3 細 胞 系 (1 血 細 胞 , 1 腎 , 1 胰 腺) , 6 7 癌 組 織 (1 膽 管 癌 , 4 白 細 胞 白 血 病 癌 症 , 1 骨 髓 細 胞 癌 , 2 腦 癌 , 3 乳 腺 癌 , 4 食 道 癌 , 2 膽 囊 癌 , 2 結 腸 癌 , 1 直 腸 癌 , 2 肝 癌 , 1 5 肺 癌 , 8 淋 巴 結 癌 , 9 卵 巢 癌 , 3 皮 膚 癌 , 4 膀 胱 癌 , 6 子 宮 癌) 。

【 0 4 2 7 】 圖 2 顯 示 了 本 發 明 的 源 基 因 的 代 表 性 表 現 特 徵 (與 正 常 腎 臟 相 比 的 相 對 表 現) , 這 些 基 因 在 與 一 系 列 正 常 組 織 相 比 在 不 同 癌 症 中 高 度 過 度 表 現 或 專 門 表 現 。 圖 2 A) P R I M 2 , 從 左 到 右 的 群 組 織 : 腎 上 腺 、 動 脈 、 骨 髓 、 腦 (全 部) 、 乳 腺 、 結 腸 、 食 道 、 心 臟 、 腎 (三 份) 、 白 細 胞 、 肝 、 肺 、 淋 巴 結 、 卵 巢 、 胰 腺 、 胎 盤 、 攝 護 腺 、 唾 液 腺 腺 、 骨 骼 肌 、 皮 膚 、 小 腸 、 脾 、 胃 、 睪 丸 、 胸 腺 、 甲 狀 腺 、 膀 胱 、 宮 頸 、 子 宮 、 靜 脈 (每 個 正 常 樣 本 代 表 幾 個 供 體 的 庫) 、 2 2 個 攝 護 腺 癌 樣 本 , 圖 2 B) C H E K 1 - 從 左 到 右 的 組 織 : 腎 上 腺 、 動 脈 、 骨 髓 、 腦 (全 部) 、 乳 腺 、 結 腸 、 食 道 、 心 臟 、 腎 (三 份) 、 白 細 胞 、 肝 、 肺 、 淋 巴 結 、 卵 巢 、 胰 腺 、 胎 盤 、 攝 護 腺 、 唾 液 腺 腺 、 骨 骼 肌 、 皮 膚 、 小 腸 、 脾 、 胃 、 睪 丸 、 胸 腺 、 甲 狀 腺 、 膀 胱 、 宮 頸 、 子 宮 、 靜 脈 (每 個 正 常 樣 本 代 表 幾 個 供 體 的 庫) 、 3 個 正 常 結 腸 樣 本 , 1 0 個 結 直 腸 癌 樣 本 , 圖 2 C) T T C 3 0 A - 從 左 到 右 的 組 織 : 腎 上 腺 、 動 脈 、 骨 髓 、 腦 (全 部) 、 乳 腺 、 結 腸 、 食 道 、 心 臟 、 腎 (三 份) 、 白 細 胞 、 肝 、 肺 、 淋 巴 結 、 卵 巢 、 胰 腺 、 胎

盤、攝護腺、唾液腺、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、睪丸、胸腺、甲狀腺、膀胱、宮頸、子宮、靜脈（每個正常樣本代表幾個供體的庫）、30個腦癌樣本，圖2D）

TRIP13 - 從左到右的組織：腎上腺、動脈、骨髓、腦（全部）、乳腺、結腸、食道、心臟、腎（三份）、白細胞、肝、肺、淋巴結、卵巢、胰腺、胎盤、攝護腺、唾液腺、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、睪丸、胸腺、甲狀腺、膀胱、宮頸、子宮、靜脈（每個正常樣本代表幾個供體的庫）、1個正常肺樣本，38個肺癌樣本，圖2E）

MXRA5 - 從左到右的組織：腎上腺、動脈、骨髓、腦（全部）、乳腺、結腸、食道、心臟、腎（三份）、白細胞、肝、肺、淋巴結、卵巢、胰腺、胎盤、攝護腺、唾液腺、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、睪丸、胸腺、甲狀腺、膀胱、宮頸、子宮、靜脈（每個正常樣本代表幾個供體的庫）、9個胰腺癌樣本。圖2F至H顯示了本發明的源基因的代表性表現特徵，這些基因在一系列正常組織（白色柱）的癌症中以及不同癌症樣本（黑色柱）中高度過度表現或專門表現。圖2F）MMP11，MMP13（Seq ID No 24）- 從左至右的組織：80正常組織樣本（6動脈，2血細胞，2大腦，1心臟，2肝，3肺，2靜脈，1脂肪組織，1腎上腺，5骨髓，1軟骨，1結腸，1食道，2眼，2膽囊，1腎臟，6淋巴結，4胰腺，2末梢神經，2腦下垂體，1直腸，2唾液腺，2骨骼肌肉，1皮膚，1小腸，1脾臟，1胃，1甲狀腺，

7 氣管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，5 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，1 胸腺，1 子宮），50 癌樣本（10 乳腺癌，4 膽管癌，6 膽囊癌，11 食道癌，10 膀胱癌，10 子宮癌），圖 2G) HORMAD1 (SEQ ID NO 168) - 從左到右的組織：80 正常組織樣本（6 動脈，2 血細胞，2 大腦，1 心臟，2 肝，3 肺，2 靜脈，1 脂肪組織，1 腎上腺，5 骨髓，1 軟骨，1 結腸，1 食道，2 眼，2 膽囊，1 腎臟，6 淋巴結，4 胰腺，2 末梢神經，2 腦下垂體，1 直腸，2 唾液腺，2 骨骼肌肉，1 皮膚，1 小腸，1 脾臟，1 胃，1 甲狀腺，7 氣管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，5 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，1 胸腺，1 子宮），41 癌樣本（10 乳腺癌，10 皮膚癌，11 非小細胞肺癌，10 小細胞肺癌），圖 2H) IGF2BP1, IGF2BP3 (Seq ID No 274) - 從左到右的組織：80 正常組織樣本（6 動脈，2 血細胞，2 大腦，1 心臟，2 肝，3 肺，2 靜脈，1 脂肪組織，1 腎上腺，5 骨髓，1 軟骨，1 結腸，1 食道，2 眼，2 膽囊，1 腎臟，6 淋巴結，4 胰腺，2 末梢神經，2 腦下垂體，1 直腸，2 唾液腺，2 骨骼肌肉，1 皮膚，1 小腸，1 脾臟，1 胃，1 甲狀腺，7 氣管，1 膀胱，1 乳腺，5 卵巢，5 胎盤，1 攝護腺，1 睪丸，1 胸腺，1 子宮），53 癌樣本（4 膽管癌，6 膽囊癌，10 淋巴結癌，12 卵巢癌，11 食道癌，10 肺癌）。

【0428】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。

【0429】圖4A-R顯示上部分：根據技術重複測量值的中值MS信號強度繪製為彩色點，單一HLA-A*02陽性正常組織為綠色或灰色點，檢測到該肽的腫瘤樣本為紅色點。腫瘤和正常樣本按照器官起源分組，箱須圖代表了多個樣本歸一化信號強度的中位數，第25和第75百分位（箱）以及最小值和最大值（須）。正常器官根據風險類別排列順序（血細胞、心血管系統、腦、肝、肺：高風險，深綠色點；生殖器官、乳腺、攝護腺：低風險，灰色點；所有其他器官：中等風險；淺綠色點）。下部分：每個器官的相對肽檢測頻率顯示為脊柱圖。圖表下面的數位表示每個器官分析的總樣本數中檢測到肽的樣本數（正常樣本N=298，腫瘤樣本N=461）。如果在一個樣本上檢測到肽，但因技術原因無法量化，則該樣本納入檢測頻率圖中，但圖表上部分不顯示任何點。組織（從左到右）：正常樣本：動脈；血細胞；腦；心；肝；肺；靜脈；脂肪：脂肪組織；adren.gland：腎上腺；BM：骨髓；colorect：結腸和直腸；duod：十二指腸；esoph：食道；gallb：膽囊；LN：淋巴結；panc：胰腺；parathyroid：甲狀旁腺；perit：腹膜；pituit：垂體；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮膚；sm.int：小腸；脾；胃；甲狀腺；氣管；輸尿管；膀胱；乳房；卵巢；胎盤；攝護腺；睪丸；胸腺；子宮。腫瘤樣本AML：急性髓性白血病；PCA：攝護腺癌；BRCA：乳腺癌；CLL：慢性淋巴細胞白血

病；CRC：結直腸癌；GALB：膽囊癌；HCC：肝細胞癌；MEL：黑色素瘤；NHL：非霍奇金淋巴瘤；OC：卵巢癌；OSCAR：食道癌；OSC_GC：食道/胃癌；PC：胰腺癌；GB：膠質母細胞瘤；GC：胃癌；NSCLC：非小細胞肺癌；RCC：腎細胞癌；SCLC：小細胞肺癌；UBC：膀胱癌；UEC：子宮和子宮內膜癌。

【0430】圖5A-R顯示本發明的源基因的代表性表現特徵，其在不同癌症樣本中過度表現。腫瘤（紅色點）和正常（綠色或灰色點）樣本按照器官起源分組，箱須圖代表了中位數、第25和第75百分位（箱）以及最小和最大（須）RPKM值。正常器官根據風險類別排列順序。RPKM=每百萬映射讀數每千鹼基讀數。正常樣本：動脈；血細胞；腦；心；肝；肺；靜脈；脂肪：脂肪組織；adren.gl.：腎上腺；BM：骨髓；軟骨；colorect：結腸和直腸；esoph：食道；眼睛；gallb：膽囊；腎臟；LN：淋巴結；神經；panc：胰腺；pituit：垂體；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮膚；sm.int：小腸；脾；胃；甲狀腺；氣管；膀胱；乳房；卵巢；胎盤；攝護腺；睪丸；胸腺；子宮。腫瘤樣本AML：急性髓性白血病；PCA：攝護腺癌；BRCA：乳腺癌；CLL：慢性淋巴細胞白血病；CRC：結直腸癌；GALB：膽囊癌；HCC：肝細胞癌；MEL：黑色素瘤；NHL：非霍奇金淋巴瘤；OC：卵巢癌；OSCAR：食道癌；PC：胰腺癌；GB：膠質母細胞瘤；GC：胃癌；NSCLC：非

小細胞肺癌；RCC：腎細胞癌；SCLC：小細胞肺癌；
 UBC：膀胱癌；UEC：子宮和子宮內膜癌。

【0431】圖 6A 至 M 顯示了健康 HLA-A*02+ 供體的肽特異性 CD8+T 細胞活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 分別與例如 SeqID No 11 肽（A，左圖）或 SeqID No 14 肽（B，左圖）合成（SeqID No 157（C）、233（D）、85（E）、89（F）、155（G）、153（H）、264（I）、117（J）、253（K）、39（L）和 203（M））。經過 3 個週期的刺激後，用相關多聚體，例如，A*02/SeqID No 11（A）或 A*02/SeqID No 14（B）的 2D 多聚體染色法對肽反應性細胞進行檢測。右圖（例如，A 和 B）顯示用不相關 A*02/肽複合體刺激的細胞對照染色。活單細胞在 CD8+ 淋巴細胞上得到門控。Boolean 門控幫助排除用不同肽特定的多聚體檢測的假陽性事件。提示了特異性多聚體+細胞和 CD8+ 淋巴細胞的頻率。

【0432】圖 7A - C 顯示了與正常組織相比各種肽在不同癌症組織中的過度呈現。分析包括來自 320 多個正常組織樣本以及 462 個癌症樣本的資料。顯示的僅是被發現呈現肽的樣本。圖 7A）基因：CCR8，肽：LLIPFTIFM（SEQ ID NO.: 43）- 從左至右的組織：16 癌組織（1 膽管癌，1 乳腺癌，1 結腸癌，7 肺癌，2

淋巴結癌，3 卵巢癌，1 皮膚癌)；圖 7B)基因：CXCR5，
肽：ILVTSIFFL (SEQ ID NO.:152) -從左至右的
組織：6 正常組織 (1 淋巴結，5 脾)，16 癌組織 (8
白細胞白血病癌症，8 淋巴結癌)；圖 7C)基因：
CYSLTR1，肽：VILTSSPFL (SEQ ID NO.:156)
-從左至右的組織：3 正常組織 (1 肺，1 淋巴結，1 脾)，
11 癌組織 (2 乳腺癌，5 白細胞白血病癌症，3 淋巴結
癌，1 骨髓細胞癌)。

【實施方式】

【0433】 實施例 1

【0434】 細胞表面呈現的腫瘤相關肽的識別和定量

【0435】 組織樣本

【0436】 患者腫瘤組織獲得自 Asterand (Detroit, USA and Royston, Herts, UK)、Val d'Hebron 大學醫院 (Barcelona)、BioServe (Beltsville, MD, USA)、癌症免疫治療中心 (CCIT)、Herlev 醫院 (Herlev)；Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA)、日內瓦大學醫院、海德堡大學醫院、慕尼黑大學醫院、京都府立醫科大學 (KPUM)、大阪市立大學 (OCU)、ProteoGenex Inc., (Culver City, CA, USA)、蒂賓根大學醫院。正常組織獲得自 Bio-Options Inc., CA, USA、BioServe, Beltsville, MD, USA、Capital BioScience Inc., Rockville, MD, USA、Geneticist Inc.,

Glendale, CA, USA、日內瓦大學醫院、海德堡大學醫院、慕尼黑大學醫院、ProteoGenex Inc., Culver City, CA, USA、蒂賓根大學醫院。所有患者在手術或尸檢前都獲得了書面知情同意。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。

【0437】 從組織樣本中分離 HLA 肽

【0438】 根據方案 (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) 略加修改，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固體組織的免疫沉澱法獲得了冷休克組織樣本的 HLA 肽庫。

【0439】 質譜分析

【0440】 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 $1.7\ \mu\text{m}$ C18 反相材料 (Waters) 的分析用熔煉石英微毛細管柱 ($75\ \mu\text{m}$ 內徑 $\times$ $250\ \text{mm}$)，應用流速為 $400\ \text{nL}$ 每分鐘。隨後，使用來自流速為 $300\ \text{nL}$ 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

到奈升電噴霧源。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 ($R=30\ 000$)，之後用先前選定離子的動態排除技術在 orbitrap 中對 5 種含量最為豐富的前體離子進行 MS/MS 掃描 ($R=7\ 500$)。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。

【0441】 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現特徵結合。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，計算了呈現圖，其顯示樣本平均呈現量以及複製變化。這些特徵使胰腺癌樣本

與正常組織樣本的基線值並列。示範性過度呈現肽的呈現譜示於圖 1 中。選定肽在各種實體中呈現概述見表 4。

【 0 4 4 2 】 表 4：選定肽在各種實體中呈現概述。如果一種肽相比於正常組織在一種實體癌樣本上過度呈現，則認為與該實體相關。M E L = 黑色素瘤，B R C A = 乳腺癌，O S C A R = 食道癌。B P H 包括良性攝護腺增生以及胰腺癌。

序列 ID 號	序列	特定相關實體
1	KLQEKIQEL	GB,GC,NSCLC,HCC,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR
2	SVLEKEIYSI	NSCLC,HCC,BPH,OC,CRC,PC
3	RVIDDSL VVG V	NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC, OSCAR
4	VLFGELPAL	GB,NSCLC,BRCA,RCC,PC, OC, PC
5	GLVDIMVHL	NSCLC,RCC, OC
7	ALLQALMEL	GC,NSCLC,RCC,CRC,PC
8	ALSSSQAEV	GB,NSCLC,OC,CRC,PC
9	SLITGQDLLSV	NSCLC,BPH,OC,MEL,PC, OSCAR
10	QLIEKNWLL	NSCLC,OC,CRC,PC,HCC, CLL, OSCAR
11	LLDPKTIFL	NSCLC,HCC,RCC,CRC
12	RLLDPKTIFL	NSCLC,RCC
13	RLHDENILL	GB,GC,NSCLC,HCC,BPH,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR
14	YTFSGDVQL	GC,NSCLC,CRC,PC, OSCAR
15	GLPSATTTV	GC, NSCLC, OC, PC
16	SLADLSLLL	NSCLC,HCC,PC
17	GLLPSAESIKL	NSCLC,BPH,OC, OSCAR
18	KTASINQNV	NSCLC,CRC,PC, OSCAR, OC
19	KVFELDLVTL	GC,NSCLC,CRC, OSCAR
21	YLMDDFSSL	PC, NSCLC
22	LMYPYIYHV	GB, NSCLC, OC, OSCAR
23	ALLSPLSLA	PC
24	KVWSDVTPL	PC, NSCLC
25	LLWGHPRVALA	CRC, PC, NSCLC
26	VLDGKVAVV	HCC, MEL, OC, GB, GC, NSCLC
27	GLLGKVTSV	NSCLC,BRCA
29	KMISAPTL	NSCLC,OC
34	TLNTLDINL	OC, PC
35	VIKGLEEI	GC,NSCLC, OSCAR
36	TVLQELINV	NSCLC,PC, OSCAR
37	QIVELIEKI	GC,NSCLC, OSCAR
39	YLEDGFAYV	GB,NSCLC,HCC,PC

40	KIWEELSVLEV	GC,NSCLC,HCC,MEL
43	LLIPFTIFM	NSCLC,MEL,CRC, OC
44	AVFNLVHVV	GC,NSCLC,PC
46	ISLDEVAVSL	GB,NSCLC,HCC, OC
47	GLNGFNVLL	PC, OSCAR
48	KISDFGLATV	GB,NSCLC,PC, OSCAR
49	KLIGNIHGNEV	GB,NSCLC,OC
50	ILLSVLHQL	NSCLC,CRC
51	LDSEALLTL	GB,NSCLC,HCC
52	TIGIPFPNV	NSCLC,PC, OC
53	AQHLSTLLL	GC,NSCLC
54	YLVPLVAA	NSCLC,OC
55	HLFDKIIKI	GC,CRC
56	VLQENSSDYQSNL	NSCLC,HCC
57	TLYPGRFDYV	NSCLC,PC
58	HLLGEGAFAQV	NSCLC,PC
59	ALADGIKSFL	NSCLC,PC
60	YLFSQGLQGL	NSCLC,PC
61	ALYPKEITL	NSCLC,CRC
63	KLLPMVIQL	NSCLC,PC
65	SLSEKSPEV	NSCLC,OC, OSCAR, MEL
66	AMFPDTIPRV	NSCLC,OC
67	FLIENLLAA	GB,NSCLC
68	QLMNLIRSV	HCC,PC
69	LKVLKADVVL	GC,NSCLC
70	GLTEKTVLV	NSCLC,PC
71	HMSGKLTNV	NSCLC,PC
73	SVPKTLGV	GB,RCC
74	GLAFLPASV	GC,CRC
76	FTAEFLEKV	NSCLC,PC, GB, OSCAR
77	ALYGNVQQV	NSCLC,OC
82	ILAEPIYIRV	NSCLC,PC, OSCAR, OC
83	GLLENSPHL	NSCLC, OC
84	FLLEREQLL	NSCLC,MEL,RCC,CRC,PC
85	KLLDKPEQFL	NSCLC,OC,MEL,CRC
86	SLFSNIESV	NSCLC,BPH,CRC
88	LLPLELSLA	GB,NSCLC,PC
89	SLAETIFIV	GC,NSCLC,OC
92	RLFEEVLGV	NSCLC,HCC,OC, OC
93	RLYGYFHDA	NSCLC,PC
94	YLDEVAFML	NSCLC,HCC, OC
95	KLIDEDEPLFL	NSCLC,OC
96	ALDTTRHEL	NSCLC,PC
97	KLFEKSTGL	NSCLC,CRC
98	FVQEKIPEL	GC,CRC
100	ALQSFEFRV	OC,RCC

101	SLLEVNEASSV	GC,CLL
102	GLYPVTLVGV	BPH,OC
114	LLFPSDVQTL	PC, OSCAR
116	ALLSSVAEA	NSCLC, OSCAR, OC
117	TLLEGISRA	NSCLC, OC
134	SLYKSFLQL	NSCLC, OSCAR, OC
137	KLIYKDLVSV	NSCLC, OC, PC
146	VVA AHLAGA	NSCLC, OSCAR, OC
158	YLDPLWHQL	PC, OC
165	SLLDYEVS	NSCLC, OSCAR, OC
166	LLGDSSFFL	NSCLC,HCC, OSCAR, OC, PC
170	FIAAVVEKV	NSCLC, OC
175	SLLDLVQSL	PC, OC
176	VQSGLRILL	NSCLC, OSCAR
184	ALDSTIAHL	NSCLC, OC
191	AAIEIFEKV	NSCLC, OSCAR, OC
203	FLFVDPELV	NSCLC, GC, OC
229	YLYELEHAL	NSCLC, OC
233	SLFESLEYL	NSCLC, OSCAR, OC
234	VLLNEILEQV	GC,NSCLC,HCC,OC,MEL,RCC,CRC,PC, OSCAR
235	SLLNQPKAV	GB,NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC, OSCAR
236	KMSELQTYV	GB,NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC
237	ALLEQTGDMSL	NSCLC,OC,MEL,CRC
239	VIKGLEEITV	GC,NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC
241	KQFEGTVEI	NSCLC,MCC,OC,CRC,PC, OSCAR
242	KLQEEIPVL	GB,NSCLC,CRC
243	GLAEFQENV	GB,NSCLC,HCC,OC,CRC,PC, OSCAR
244	NVAEIVIH	GC,NSCLC
246	ALAGIVTNV	NSCLC,HCC,OC,MEL,RCC
247	NLLIDDKGTIKL	NSCLC,HCC,MEL,CRC,PC
248	VLMQDSRLYL	NSCLC,CRC,PC
251	LLWGNLPEI	NSCLC,MEL,CRC,PC, OC
252	SLMEKNQSL	NSCLC,OC,CRC, OSCAR, RCC
253	KLLAVIHEL	NSCLC,RCC,CRC,PC, OSCAR, OC
254	ALGDKFLLRV	NSCLC,HCC,MEL, OC
255	FLMKNSDLYGA	NSCLC,HCC,MEL,PC, OSCAR
256	FLNDIFERI	NSCLC,HCC,CLL, OC
257	KLIDHQGLYL	NSCLC,OC,CRC, OSCAR
258	QLVQRVASV	NSCLC,OC
259	GPGIFPPPPQP	NSCLC,BPH, OSCAR, OC
260	ALNESLVEC	NSCLC,MEL, OSCAR, OC
261	GLAALAVHL	NSCLC,OC,MEL,CRC,PC, OSCAR
262	LLLEAVWHL	NSCLC,CRC
263	SIIEYLPTL	NSCLC,MEL,PC
264	TLHDQVHLL	NSCLC,BPH,OC
265	FLLDKPQDLSI	NSCLC,OC,RCC

266	FLLDKPQDL	RCC, OC
267	YLLDMPLWYL	NSCLC,RCC,CRC, OC, MEL
269	GLLDCPIFL	NSCLC,CRC, OSCAR, OC
270	TLLTFFHEL	GB,PC
271	VLIEYNFSI	NSCLC, OC
272	FVMEGEPPKL	NSCLC,OC
273	SLNKQIETV	NSCLC,OC
274	TLYNPERTITV	NSCLC, PC,HCC
277	KLQEELNKV	HCC, OC
281	LLLESDPKVYSL	PC, OC
284	KLMDPGSLPPL	NSCLC, OC
287	KIQEILTQV	GB,GC,NSCLC,HCC,CLL,OC,MEL,RCC,CRC,PC, OSCAR
288	SLYKGLLSV	GB,NSCLC,HCC,BPH,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR

【 0 4 4 3 】 表 4 B：選定肽在各種實體中呈現概述。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，BPH = 攝護腺癌和良性攝護腺增生，OSCAR = 食道癌，包括胃食道交界處癌，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	特定相關實體
1	KLQEKIQEL	MEL, AML, NHL
2	SVLEKEIYSI	GC, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
3	RVIDDSL VGV	UBC
4	VLFGELPAL	SCLC, UBC, UTC
5	GLVDIMVHL	SCLC, UBC, BRCA, MEL, PC
6	FLNAIETAL	RCC
7	ALLQALMEL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
8	ALSSSQA EV	BPH, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
9	SLITGQDLLSV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC
10	QLIEKNWLL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL

11	LLDPKTIFL	GBC_CCC
13	RLHDENILL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, MEL, AML, NHL
14	YTFSGDVQL	SCLC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL
15	GLPSATTTV	UBC, UTC, MEL
16	SLADLSLLL	GB, GC, BPH, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, RCC, CRC, AML, NHL
17	GLLPSAESIKL	UBC
18	KTASINQNV	SCLC, UBC, UTC, MEL
19	KVFELDLVTL	AML, NHL
21	YLMDDFSSL	OSCAR, OC, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
22	LMYPYIYHV	HCC, CLL, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, CRC, NHL
24	KVWSDVTPL	BRCA
26	VLDGKVAVV	CLL, UTC, NHL
27	GLLGKVTSTV	SCLC, UBC
28	IKVTDQPQLEL	NSCLC, MEL
29	KMISAIPTL	UTC
30	IITEVITRL	OC, UTC
31	GLLETTGLLAT	OC
33	TLDRNSLYV	OC, UTC
34	TLNTLDINL	UTC
35	VIKGLEEI	OC
36	TVLQELINV	UBC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
38	VLQQESNFL	AML
39	YLEDGFAYV	CLL, UBC, UTC, MEL, NHL
40	KIWEELSVLEV	SCLC, UBC
41	IVTEIIEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
43	LLIPFTIFM	SCLC, GBC_CCC, NHL
46	ISLDEVAVSL	BRCA
47	GLNGFNVLL	SCLC, UTC, GBC_CCC, MEL, CRC, AML, NHL
48	KISDFGLATV	OC, MEL
51	LDSEALLTL	BRCA
52	TIGIPFPNV	MEL, NHL
53	AQHLSTLLL	SCLC, GBC_CCC
56	VLQENSDDYQSNL	UTC
57	TLYPGRFDYV	OSCAR, UBC
59	ALADGIKSFL	BRCA, MEL
64	SLYAGSNNQV	NSCLC
65	SLSEKSPEV	HCC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, NHL
67	FLIENLLAA	UTC
68	QLMNLIRSV	UBC, AML
70	GLTEKTVLV	CRC, AML, NHL
75	ALLDGALQL	GC, CRC
76	FTAEFLEKV	UBC, MEL, AML, NHL
77	ALYGNVQQV	BRCA, NHL
78	LFQSRIAGV	BPH

80	VLTGQVHEL	GB
83	GLLENSPHL	BRCA, MEL, AML, NHL
84	FLLEREQLL	CLL, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
85	KLLDKPEQFL	NHL
86	SLFSNIESV	SCLC, BRCA, GBC_CCC
87	KLLSLLEEA	NSCLC, BPH
89	SLAETIFIV	SCLC, GBC_CCC, RCC, NHL
90	AILNVDEKNQV	OC
91	LLPSIFLMV	OC
92	RLFEEVLGV	OSCAR, SCLC, UBC, BRCA, AML
94	YLDEVAFML	UBC, BRCA, GBC_CCC
95	KLIDEDEPLFL	SCLC, UTC, GBC_CCC
96	ALDTTRHEL	OSCAR, UBC, UTC
98	FVQEKIPEL	GBC_CCC
99	TLFGIQLTEA	GC, GBC_CCC
101	SLLEVNEASSV	NHL
102	GLYPVTLVGV	SCLC, BRCA, AML
103	YLADTVQKL	NSCLC
104	DLPTQEPALGTT	BPH
106	VLLGSVVIFA	BPH
108	FIANLPPELKA	BPH
109	ILGSFELQL	BPH
110	QIQGQVSEV	BPH
112	ILAQDVAQL	MEL, AML, NHL
113	FLFLKEVKV	CRC
116	ALLSSVAEA	SCLC, BRCA, CRC
117	TLLEGISRA	BRCA
118	IAYNPNGNAL	NSCLC, CLL, AML
119	SLIEESEEL	OC, UTC
121	ALYVQAPTV	NSCLC, UTC, NHL
122	SIIDTELKV	AML
124	ALLRLFTI	NSCLC
128	SILTNISEV	NSCLC
129	KMASKVTQV	HCC
130	QLYGSAITL	HCC
132	ALLNNVIEV	HCC, BRCA
133	FLDGRPLTL	UTC, MEL
135	HLDTVKIEV	GB
136	LLWDAPAKC	CRC
139	IILENIQSL	UBC, BRCA, AML
140	FLDSQITTV	MEL
142	LLDAAHASI	NSCLC
143	MLWESIMRV	NSCLC, UTC
144	FLISQTPLL	NSCLC, SCLC, UBC
145	ALEEKLENV	NSCLC
146	VVA AHLAGA	GC, MEL

147	GLLSALENV	CLL, NHL
148	YLILSSHQL	CLL, NHL
150	VLLDMVHSL	HCC, UTC
151	DISKRIQSL	NSCLC
152	ILVTSIFFL	CLL, NHL
153	KLVELEHTL	GC, NSCLC, OSCAR
154	AIKEIQTV	GB, NSCLC, HCC, UBC, MEL
155	TLDSYLKAV	OC, BRCA
156	VILTSSPFL	CLL, BRCA, AML, NHL
157	ILQDGQFLV	HCC, UBC
158	YLDPLWHQL	CLL, MEL, NHL
159	QLGPVPVTI	UBC, RCC, NHL
160	TLQEWLTEV	NSCLC, GBC_CCC
161	NLLDENVCL	CRC
162	GLLGNLLTSL	NSCLC
163	GLEERLYTA	NSCLC, CLL, AML, NHL
164	MLIIRVPSV	NSCLC
165	SLLDYEVS	GBC_CCC
166	LLGDSSFFL	CLL, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML
167	LVVDEGSLVSV	OC, SCLC
168	VIFEGEPMYL	NSCLC, BRCA, NHL
169	ALADLSVAV	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL, AML
170	FIAAVVEKV	SCLC, NHL
171	LLLLDVPTA	NSCLC, UTC, BRCA, CRC, NHL
172	SLYLQMNSLRTE	NSCLC
173	RLIDIYKNV	OC
174	ALYSGDLHAA	HCC
175	SLLDLVQSL	BRCA, AML, NHL
177	ALINVLNAL	AML
179	TLGEIIKGV	NSCLC
180	RLYEEEIRI	NSCLC
181	LLWAPTAQA	GB, NSCLC, RCC, CRC
182	GLQDGFQITV	GC
183	ALSYILPYL	NSCLC, SCLC, UTC, BRCA, CRC, AML, NHL
184	ALDSTIAHL	UTC, MEL
185	TLYQGLPAEV	GC, NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, BRCA, RCC, CRC
186	SLLSLESRL	GC
187	SILKEDPFL	NSCLC
188	VLGEEQEGV	NSCLC
189	MAVSDLLIL	GB
190	SLSTELFKV	HCC
192	TLLPSSGLVTL	BRCA
193	ALFHMNILL	NSCLC
194	KLLEEVQLL	NSCLC
195	VIIQNLPAL	CRC

196	TLHQWIYYL	CRC
198	ILTNKVSV	OC
199	SVADLAHVL	GC
200	IMPTFDLTKV	HCC
201	LLFSLLCEA	BPH
203	FLFVDPELV	CRC, AML, NHL
204	SEWGSPHAAVP	PC
205	LAFGYDDEL	HCC
206	GLDAFRIFL	CRC
207	KLFETVEEL	GB
208	HLNDRNPL	BPH
210	GLAGDNIYL	RCC
211	LLTTVLINA	RCC
212	MTLSEIHAV	CRC
213	ILAVDGVLSV	NSCLC, BRCA, MEL
214	ALFETLIQL	HCC
215	QIADIVTSV	HCC
216	ALSTVTPRI	HCC
217	LLWPSSVPA	GB, MEL, AML
220	ALSELERV	BPH, UTC
221	IMLNSVEEI	BPH, NHL
222	LLTGVFAQL	CLL, UTC, BRCA, CRC, NHL
223	ALHPVQFYL	OC, CRC
224	LLFDWSGTGRADA	GBC_CCC
225	FLPQPVPLSV	CLL, MEL, NHL
226	SLAGNLQEL	GB
227	SEMEELPSV	HCC
228	SLLELDGINLRL	NSCLC
230	KLLNMIFSI	BPH
231	LLDDIFIRL	MEL
233	SLFESLEYL	UTC, RCC
234	VLLNEILEQV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
235	SLLNQPKAV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
236	KMSELQTYV	GC, BPH, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, RCC, AML, NHL
237	ALLEQTGDMSL	SCLC, UBC, BRCA, AML, NHL
238	HLQEKLSL	HCC
239	VIIKGLLEITV	CLL, SCLC, UBC, UTC, AML, NHL
240	SVQENIQK	RCC, NHL
241	KQFEGTVEI	CLL, NHL
242	KLQEEIPVL	BRCA, MEL, NHL
243	GLAEFQENV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
244	NVAEIVIH	GB
245	ALLEEEGV	NSCLC, UBC, GBC_CCC
246	ALAGIVTNV	GB, CLL, SCLC, BRCA, GBC_CCC, AML
248	VLMQDSRLYL	CLL, UBC, UTC, AML, NHL

251	LLWGNLPEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
252	SLMEKNQSL	AML
253	KLLAVIHEL	UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
254	ALGDKFLLRV	NHL
255	FLMKNSDLYGA	UBC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
256	FLNDIFERI	UTC, MEL, AML, NHL
258	QLVQRVASV	UBC, NHL
260	ALNESLVEC	SCLC, UBC, UTC, CRC, AML, NHL
261	GLAALAVHL	GC, CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
262	LLLEAVWHL	BRCA, NHL
263	SHEYLPTL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, GBC_CCC, AML, NHL
264	TLHDQVHLL	UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL
265	FLLDKPQDLSI	GBC_CCC
267	YLLDMPLWYL	AML, NHL
269	GLLDCPIFL	CLL, UTC, AML, NHL
270	TLLTFFHEL	UTC, GBC_CCC, AML, NHL
271	VLIEYNFSI	CLL, SCLC, MEL, AML, NHL
272	FVMEGEPPKL	CLL, UTC
273	SLNKQIETV	AML
275	AVPPPPSSV	NSCLC,HCC
276	RMPTVLQCV	BPH
277	KLQEELNKV	NSCLC, OSCAR, UBC, BRCA, NHL
279	VLMDEGAVLTL	CLL, CRC, NHL
280	HLWGHALFL	HCC
281	LLLESDPKVYSL	OSCAR, SCLC
282	SLYALHVKA	OC, SCLC
283	ALSELLQQV	NSCLC,HCC, OC, SCLC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
285	MLLDTVQKV	NSCLC
286	FLTEMVHFI	NSCLC, CLL, SCLC, UBC, NHL

【 0 4 4 4 】 實 施 例 2

【 0 4 4 5 】 編 碼 本 發 明 肽 的 基 因 的 表 現 譜

【 0 4 4 6 】 與 正 常 細 胞 相 比 在 腫 瘤 細 胞 上 一 種 肽 過 度 呈 現 或 特 定 呈 現 足 够 其 在 免 疫 治 療 中 有 效 使 用 ， 一 些 肽 為 腫 瘤 特 異 性 的 ， 儘 管 存 在 其 源 蛋 白 也 存 在 於 正 常 組 織 中 。 但 是 ， m R N A 表 現 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 T C R ， 理 想 的 目 標 肽 將 來 源

於對該腫瘤獨一無二且不出現於正常組織中的蛋白。對於本發明，根據上述涵蓋大約 3000 個正常組織樣本 RNA 表現資料的資料庫，所有源基因的正常組織表現被證明是最小的。在一些癌症實體病例（HCC、CRC、GB、GC、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA）中加入正常組織和腫瘤組織的進一步 RNA 分析以估算各癌症患者群體的標靶範圍。

【0447】 RNA 來源與製備

【0448】 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。

【0449】 健康人體組織中的總 RNA 從商業途徑獲得（Ambion 公司，Huntingdon，英國；Clontech 公司，海德堡，德國；Stratagene 公司，阿姆斯特丹，荷蘭；BioChain 公司，Hayward, CA, 美國）。混合數個人（2 至 123 個人）的 RNA，從而使每個人的 RNA 得到等加權。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 RNA6000 Pico LabChip Kit 試劑盒（Agilent 公司）進行評估。

【0450】 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)、Capital BioScience Inc.(Rockville, 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)。

【0451】 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)、Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA)、ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA)、Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK)、波恩大學醫院 (Bonn, Germany)、海德堡大學醫院 (Heidelberg, Germany)、蒂賓根大學醫院 (Tübingen, Germany)。

【0452】 微陣列實驗

【0453】 範圍透過分析 30 GB、16 CRC、56 RCC、12 HCC、38 NSCLC、11 PC、34 GC 和 20 個攝護

腺癌樣本的 RNA 表現譜 (Affymetrix 微列陣) 進行估計。

【0454】 所有腫瘤和正常組織的 RNA 樣本都使用 Affymetrix Human Genome (HG) U133A 或 HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix 寡核苷酸晶片 (Affymetrix 公司, Santa Clara, CA, 美國) 進行基因表現分析。所有步驟都根據 Affymetrix 手冊進行。簡言之, 如手冊中所述, 使用 SuperScript RTII (Invitrogen 公司) 以及 oligo-dT-T7 引物 (MWG Biotech 公司, Ebersberg, 德國) 從 5-8 μ g RNA 中合成雙股 cDNA。用 BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics 公司, Farmingdale, NY, 美國) 進行 U133A 測定或用 GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix 公司) 進行 U133 Plus 2.0 測定, 之後用鏈黴親和素-藻紅蛋白和生物素化抗鏈黴素蛋白抗體 (Molecular Probes 公司, Leiden, 荷蘭) 進行破碎、雜交和染色, 這樣完成活體外轉錄。用 Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) 或 Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0) 對圖像進行掃描, 用 GCOS 軟體 (Affymetrix 公司) 在所有參數默認設置情況下對資料進行分析。爲了實現標準化, 使用了 Affymetrix 公司提供的 100 種管家基因 (housekeeping gene)。

相對表現值用軟體給定的 `signal log ratio` 進行計算，正常腎組織樣本的值任意設置為 1.0。本發明的代表性源基因在 HCC、CRC、GB、GC、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA 中高度過度表現的表現譜如圖 2 所示。選定肽源基因的目標範圍概述見表。

【0455】表 5A：選定肽源基因的目標範圍。過度表現被定義為相比最高表現該基因的相關正常組織，在腫瘤上的表現超過 1.5 倍。<19% 過度表現 = I，20 - 49% = II，50 - 69% = III，>70% = IV。如果一種肽能夠從多個源基因獲得，最少範圍的基因則是決定性的。

SEQ ID NO.	序列	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	基因 ID	正式基因符號
116	ALLSSVAEA	I	II	I	I	II	I	I	I	9048	ARTN
263	SIIEYLPTL	I	II	I	I	I	I	I	I	79915	ATAD5
93	RLYGYFHDA	II	III	I	II	II	II	I	III	6790	AURKA
27	GLLGKVTSV	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
28	IKVTDPQLEL	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
62	SLVENIHVL	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
241	KQFEGTVEI	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
52	TIGIPFPNV	III	I	I	II	II	I	I	II	83990	BRIP1
58	HLLGEGAFAQV	III	III	I	I	III	II	I	III	699	BUB1
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	II	II	I	I	26256	CABYR
94	YLDEVAFML	I	I	I	I	I	II	I	I	1238	CCBP2
103	YLADTVQKL	II	I	I	I	I	I	I	I	100526761, 54937	CCDC169-SOHLH2, SOHLH2
79	TVLEEIGNRV	II	IV	I	I	II	I	I	II	9133	CCNB2
247	NLLIDDKGTIKL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
249	YLYQILQGI	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
1	KLQEKIQEL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE

SEQ ID NO.	序列	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	基因 ID	正式基因符号
242	KLQEEIPVL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
19	KVFELDLVTL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
236	KMSELQTYV	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
238	HLQEKQLQSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
60	YLFSQGLQGL	III	IV	I	III	III	II	I	III	2491	CENPI
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	I	II	55165	CEP55
48	KISDFGLATV	IV	IV	II	II	IV	II	I	IV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
284	KLMDPGSLPPL	I	IV	I	I	II	I	I	II	2118	ETV4
261	GLAALAVHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA
262	LLLEAVWHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA
270	TLLTFFHEL	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
11	LLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
111	AQLEGKLVSI	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
277	KLQEELNKV	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
67	FLIENLLAA	I	I	I	II	I	I	I	I	3166	HMX1
56	VLQENSSDYQSN L	II	III	I	I	I	I	I	I	3188	HNRNPH2
89	SLAETIFIV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
287	KIQEILTQV	IV	II	II	III	IV	IV	I	II	10643	IGF2BP3
97	KLFEKSTGL	IV	IV	II	II	I	II	III	II	23421	ITGB3BP
35	VIKGLEEI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
36	TVLQELINV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
239	VIKGLEEITV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
240	SVQENIQQK	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
10	QLIEKNWLL	IV	IV	I	II	III	II	I	IV	56992	KIF15
112	ILAQDVAQL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24137	KIF4A
70	GLTEKTVLV	III	IV	I	I	II	II	I	III	24,137,285 ,643	KIF4A, KIF4B

SEQ ID NO.	序列	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	基因 ID	正式基因符号
252	SLMEKNQSL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24,137,285,643	KIF4A, KIF4B
104	DLPTQEPALGTT	I	I	I	I	I	I	IV	I	354	KLK3
118	IAYNPNGNAL	I	I	I	I	I	II	I	I	3824	KLRD1
113	FLFLKEVKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
279	VLMDEGAVLTL	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
119	SLIEESEEL	I	II	I	I	I	I	I	I	284217	LAMA1
105	AMLASQTEA	II	I	I	II	I	IV	I	I	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	I	I	I	I	I	I	IV	II	4477	MSMB
29	KMISAIPTL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
30	IITEVITRL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
32	VVMVLVLMML	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
41	IVTEIIEI	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
234	VLLNEILEQV	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
285	MLLDTVQKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54892	NCAPG2
114	LLFPSDVQTL	II	III	I	I	III	I	I	III	23397	NCAPH
107	RVLPGQAVTGV	I	III	I	I	I	I	I	I	55247	NEIL3
81	ILAEPIYI	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
115	ILHGEVNKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54830	NUP62CL
39	YLEDGFAYV	II	IV	I	I	III	II	IV	IV	5558	PRIM2
83	GLLENSPHL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
253	KLLAVIHEL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
288	SLYKGLLSV	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
108	FIANLPPELKA	I	II	I	I	I	I	IV	I	6013	RLN1
13	RLHDENILL	III	II	II	I	I	I	I	I	23322	RPGRIP1L
120	LQLJPLKGLSL	II	IV	I	II	III	II	I	III	6241	RRM2
76	FTAEFLEKV	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
255	FLMKNSDLYGA	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
74	GLAFLPASV	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
243	GLAEFQENV	II	I	I	I	II	II	I	II	57405	SPC25
281	LLLESDPKVYSL	I	III	I	I	I	I	I	I	6491	STIL

SEQ ID NO.	序列	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	基因 ID	正式基因符號
109	ILGSFELQL	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
267	YLLDMPLWYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A
268	SLDKDIVAL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A
121	ALYVQAPTV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	IV	II	III	III	III	II	IV	III	15,073,792,104	TTC30B, TTC30A
124	ALLLRLFTI	III	IV	II	II	IV	IV	I	IV	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT

【 0 4 5 6 】 R N A s e q 實 驗

【 0 4 5 7 】 透 過 新 一 代 定 序 技 術 (R N A s e q) 由 C e G a T (T ü b i n g e n , G e r m a n y) 對 腫 瘤 和 正 常 組 織 的 R N A 樣 本 進 行 基 因 表 現 分 析 。 簡 言 之 ， 根 據 供 應 商 的 方 案 (I l l u m i n a I n c . , S a n D i e g o , C A , U S A) ， 其 中 包 括 R N A 碎 片 化 、 c D N A 轉 化 和 定 序 適 配 器 的 加 入 ， 利 用 I l l u m i n a H i S e q v 4 試 劑 盒 準 備 定 序 文 庫 。 從 多 個 樣 本 獲 得 的 文 庫 根 據 製 造 商 的 說 明 等 莫 耳 混 合 並 在 I l l u m i n a H i S e q 2 5 0 0 定 序 器 上 定 序 ， 產 生 5 0 b p 的 單 端 讀 數 。 處 理 的 讀 數 使 用 S T A R 軟 體 映 射 至 人 類 基 因 組 (G R C h 3 8) 。 根 據 E N S E M B L 序 列 資 料 庫 的 說 明 (E n s e m b l 7 7) ， 表 現 資 料 在 轉 錄 水 準 設 置 為 R P K M (每 百 萬 映 射 讀 數 每 千 鹼 基 讀 數 ， 由 C u f f l i n k s 軟 體 生 成) 並 在 外 顯 子 水 準 上 設 置 (總 讀 數 ， 由 B e d t o o l s 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。

【0458】本發明的代表性源基因在 NHL、BRCA、GBC、CCC、MEL、OC、OSCAR、SCLC、UBC、UEC 中高度過量表現的表現譜如圖 2 F-H 所示。進一步代表性基因的表現分數見表 5B。

【0459】表 5B：選定肽源基因的目標範圍。

【0460】過度表現被定義為相比最高表現該基因的相關正常組織，在腫瘤上的表現超過 1.5 倍。 $<19\%$ 過度表現 = I, $20 - 49\% = \text{II}$, $50 - 69\% = \text{III}$, $>70\% = \text{IV}$ 。如果一種肽能夠從多個源基因獲得，最少範圍的基因則是決定性的。基線包括以下相關正常組織：脂肪組織、腎上腺、動脈、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、胸腺、甲狀腺、氣管、膀胱和靜脈。如果獲得同一組織類型幾個樣本的表現資料，則使用各樣本的算術平均值進行計算。AML = 急性骨髓性白血病，NHL = 非霍奇金淋巴瘤，BRCA = 乳腺癌，CLL = 慢性淋巴細胞白血病，GBC_CCC = 膽囊腺癌和膽管癌，MEL = 黑素瘤，OC = 卵巢癌，OSCAR = 食道癌，包括胃-食道交界處癌症，SCLC = 小細胞肺癌，UBC = 膀胱癌，UTC = 子宮癌。

SEQ ID NO.	序列	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
1	KLQEKIQEL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
2	SVLEKEIYSI	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
3	RVIDDSL VVG V	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
4	VLFGELPAL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
5	GLVDIMVHL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
7	ALLQALMEL	I	II	II	I	II	III	II	II	I	II	I
8	ALSSSQAEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
9	SLITGQDLLSV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
10	QLIEKNWLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
11	LLDPKTIFL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I
13	RLHDENILL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
14	YTFSGDVQL	I	I	I	I	I	II	I	IV	I	III	I
17	GLLPSAESIKL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
18	KTASINQNV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
21	YLMDDFSSL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
22	LMYPYIYHV	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I
24	KVWSDVTPL	I	I	IV	I	IV	II	II	IV	II	IV	IV
39	YLEDGFAYV	I	II	II	I	II	II	III	I	III	I	I
40	KIWEELSVLEV	I	I	II	I	III	IV	I	III	IV	III	II
41	IVTEIHSEI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
43	LLIPFTIFM	I	II	II	I	II	II	I	IV	I	II	I
46	ISLDEVAVSL	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
47	GLNGFNVLL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	II
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
67	FLIENLLAA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
76	FTAEFLEKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
83	GLLENSPHL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
84	FLLEREQLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	II
85	KLLDKPEQFL	I	I	I	I	I	IV	I	I	I	I	I
86	SLFSNIESV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
88	LLLPLELSLA	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
89	SLAETIFIV	I	III	I	I	I	I	II	I	II	I	I
92	RLFEEVLGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
95	KLIDEDEPLFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
96	ALDTTRHEL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
102	GLYPVTLVGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
116	ALLSSVAEA	I	I	II	I	I	I	I	IV	I	II	I
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
147	GLLSALENV	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
148	YLILSSHQL	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I

SEQ ID NO.	序列	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
152	ILVTSIFFL	I	II	I	II	I	I	I	I	I	I	I
153	KLVELEHTL	I	I	II	I	II	II	I	II	I	II	I
155	TLDSYLKAV	I	I	III	I	I	I	I	I	I	I	I
156	VILTSSPFL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
157	ILQDGQFLV	I	I	I	II	I	III	I	I	II	I	I
158	YLDPLWHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
166	LLGDSSFFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
169	ALADLSVAV	I	I	I	I	I	I	I	II	I	III	I
170	FIAAVVEKV	I	I	I	I	I	II	II	I	I	I	I
181	LLWAPTAQA	I	I	I	I	II	I	I	I	II	I	I
185	TLYQGLPAEV	I	I	II	I	I	I	III	IV	I	II	IV
203	FLFVDPELV	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
220	ALSELERV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
222	LLTGVFAQL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	II	I
233	SLFESLEYL	I	I	II	I	II	II	II	II	I	I	I
234	VLLNEILEQV	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
235	SLLNQPKAV	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
236	KMSELQTYV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
237	ALLEQTGDMSL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
241	KQFEGTVEI	I	II	II	I	I	I	I	I	II	I	I
242	KLQEEIPVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
243	GLAEFQENV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
245	ALLEEEEGV	I	I	I	I	I	II	I	II	II	II	I
246	ALAGIVTNV	I	I	II	I	II	I	III	I	I	II	I
248	VLMQDSRLYL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
251	LLWGNLPEI	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
252	SLMEKNQSL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
253	KLLAVIHEL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
255	FLMKNSDLYGA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
257	KLIDHQGLYL	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	II	IV	II	II	II
261	GLAALAVHL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
263	SIIEYLPTL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
264	TLHDQVHLL	I	I	IV	I	I	I	IV	I	I	I	IV
265	FLLDKPQDLSI	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	I
267	YLLDMPLWYL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
269	GLLDCPIFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
270	TLLTFFHEL	I	I	I	I	I	II	I	II	II	I	I
271	VLIEYNFSI	I	I	I	I	I	II	I	III	II	I	I
274	TLYNPERTITV	II	IV	II	III	IV	IV	IV	IV	IV	II	II
277	KLQEELNKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

SEQ ID NO.	序列	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
279	VLMDEGAVLTL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
283	ALSELLQQV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
286	FLTEMVHFI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	II	I

【 0 4 6 1 】 實 施 例 3

【 0 4 6 2 】 M H C - I 類 呈 現 肽 的 活 體 外 免 疫 原 性

【 0 4 6 3 】 爲 了 獲 得 關 於 本 發 明 T U M A P 的 免 疫 原 性 資 訊，發 明 人 使 用 活 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 / M H C 複 合 物 和 抗 C D 2 8 抗 體 的 人 工 抗 原 呈 現 細 胞 (a A P C) 進 行 反 復 刺 激。用 這 種 方 法，發 明 人 可 顯 示 出 本 發 明 目 前 爲 止 4 7 種 H L A - A * 0 2 0 1 限 制 T U M A P 具 有 免 疫 原 性，這 表 明 這 些 肽 爲 對 抗 人 C D 8 + 前 體 T 細 胞 的 T 細 胞 表 位 (表 6 A 和 B) 。

【 0 4 6 4 】 C D 8 + T 細 胞 活 體 外 活 化

【 0 4 6 5 】 爲 了 用 載 有 肽 - M H C 複 合 物 (p M H C) 和 抗 C D 2 8 抗 體 的 人 工 抗 原 呈 現 細 胞 進 行 活 體 外 刺 激，發 明 人 首 先 從 U n i v e r s i t y c l i n i c s M a n n h e i m , G e r m a n y 中 獲 取 健 康 供 體 C D 8 微 珠 (M i l t e n y i B i o t e c , B e r g i s c h - G l a d b a c h , G e r m a n y) 透 過 積 極 選 擇 白 細 胞 清 除 術 後 新 鮮 H L A - A * 0 2 產 物 而 分 離 出 C D 8 + T 細 胞。

【0466】 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。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 分子在高度限定的活體外系統中進行。

【0467】 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 µm 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)。

【0468】 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 ELAGIGILTV (SEQ ID NO:289)) 和

A*0201/DDX5-001 (從 DDX5 中 獲 得 的 YLLPAIVHI (SEQ ID NO:290)) 。

【0469】 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，從而活化刺激。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，使用了配有合適雷射儀和篩檢程序的 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+淋巴細胞的活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活體外刺激孔在活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 + C D 8 + 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 1 0 倍），則檢測給定抗原的免疫原性。

【 0 4 7 0 】 胰腺癌肽活體外免疫原性

【 0 4 7 1 】 對於受到測試的 H L A - I 類肽，可透過肽特異性 T 細胞株的生成證明其活體外免疫原性。T U M A P 特異性多聚體對本發明的 1 5 種肽染色後流式細胞儀檢測的典型結果如圖 3 和圖 6 所示，同時也含有相應的陰性對照資訊。本發明 2 種肽的結果匯總於表 6 A 和 B。

【 0 4 7 2 】 表 6 A：本發明中 H L A I 類肽的活體外免疫原性

【 0 4 7 3 】 申請人對本發明的肽所做的活體外免疫原性實驗的示例性結果。< 2 0 % = +；2 1 % - 4 9 % = ++；5 0 % - 6 9 % = +++；> = 7 0 % = ++++

序列號	孔	供體
288	SLYKGLLSV	++
287	KIQEILTQV	+

【 0 4 7 4 】 表 6 B：本發明中 H L A I 類肽的活體外免疫原性。

【 0 4 7 5 】 申請人對本發明的 H L A - A * 0 2 限制肽所做的活體外免疫原性實驗的示例性結果。提示了活體外免疫原性實驗的結果。陽性孔和供體（其他可評價）的百分比概括為< 2 0 % = +；2 0 % - 4 9 % = ++；5 0 % - 6 9 % = +++；> = 7 0 % = ++++

序列 ID 號	序列	陽性孔[%]
4	VLFGELPAL	+

7	ALLQALMEL	++
9	SLITGQDLLSV	+
11	LLDPKTIFL	++
14	YTFSGDVQL	+
17	GLLPSAESIKL	+
18	KTASINQNV	+++
27	GLLGKVTSTV	+
29	KMISAIPTL	+
34	TLNTLDINL	++++
35	VIIKGLEEI	+
39	YLEDGFAYV	++++
48	KISDFGLATV	++
50	ILLSVLHQL	+
66	AMFPDTIPRV	+
77	ALYGNVQQV	+
82	ILAEPIYIRV	+++
89	SLAETIFIV	+
92	RLFEEVLGV	++
97	KLFESTGL	+
101	SLLEVNEASSV	+
102	GLYPVTLVGV	+
117	TLLEGISRA	++
121	ALYVQAPTV	+
157	ILQDQGFLV	+
166	LLGDSSFFL	++
183	ALSYILPYL	+++
203	FLFVDPELV	+++
233	SLFESLEYL	+
234	VLLNEILEQV	++
236	KMSELQTYV	+
242	KLQEEIPVL	+
246	ALAGIVTNV	+
248	VLMQDSRLYL	++
251	LLWGNLPEI	++
253	KLLAVIHEL	++

254	ALGDKFLLRV	+
255	FLMKNSDLYGA	+
257	KLIDHQGLYL	+
260	ALNESLVEC	+
261	GLAALAVHL	++
263	SIIEYLPTL	+
264	TLHDQVHLL	+
267	YLLDMPLWYL	+
275	AVPPPPSSV	++

【0476】 實施例 4

【0477】 肽的合成

【0478】 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。

【0479】 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%。

【0480】 所有的 TUMAP 較佳作為三氟乙酸鹽或乙酸鹽進行給藥，其他鹽形式也可以。

【0481】 實施例 5

【0482】 MHC 結合測定

【0483】 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。只有能够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。

【0484】 96 孔 Maxisorp 板 (NUNC) 在室溫下在 PBS 中以 2ug/ml 鏈黴包被過夜，用 4 倍洗滌並在 37℃ 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 15-500ng/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℃ 下培育 1 小時，洗滌四次，在 37℃ 下以 2ug/ml HRP 結合抗-β2m 溫育 1 小時，再次洗滌，並以 NH₂SO₄ 封堵的 TMB 溶液進行檢測。在 450nm 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，通常較佳顯示為高交換產率（較佳為高於 50%，最佳為高於 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。

【0485】 表 7：MHC-I 類結合分數。

【0486】 HLA-I 類限制肽與 HLA-A*02:01 的結合根據肽交換產量評估：
≥10% = +; ≥20% = ++; 20% - 49% = +++; % = ++++; ≥50% = +++++; ≥75% = ++++++;
>=75% = ++++++

序列 ID 號	序列	肽交換
1	KLQEKIQEL	++++
3	RVIDDSL VGV	+++
4	VLFGELPAL	+++
5	GLVDIMVHL	+++
6	FLNAIETAL	++++
7	ALLQALMEL	+++
9	SLITGQDLLSV	+++

序列 ID 號	序列	肽交換
10	QLIEKNWLL	+++
11	LLDPKTIFL	+++
12	RLLDPKTIFL	+++
13	RLHDENILL	+++
14	YTFSGDVQL	+++
16	SLADLSLL	+++
17	GLLPSAESIKL	++++
18	KTASINQNV	++
19	KVFELDLVTL	++
20	ALVEKGEFAL	++
21	YLMDDFSSL	+++
22	LMYPYIYHV	+++
23	ALLSPLSLA	+++
24	KVWSDVTPL	+++
25	LLWGHPRVALA	+++
26	VLDGKVAVV	+++
27	GLLGKVTSV	+++
28	IKVTDQPQLEL	++
29	KMISAIPTL	++
30	IITEVITRL	+++
31	GLLETTGLLAT	+++
33	TLDRNSLYV	++
34	TLNTLDINL	+++
35	VIKGLEEI	++
36	TVLQELINV	+++
37	QIVELIEKI	++
38	VLQQESNFL	++
39	YLEDGFAYV	+++
40	KIWEELSVLEV	+++
41	IVTEIISEI	+++
42	KQMSISTGL	++
44	AVFNLVHV	+++
45	FLPVSVVYV	+++
47	GLNGFNVLL	+++
48	KISDFGLATV	+++
49	KLIGNIHGNEV	++
50	ILLSVLHQL	+++
51	LDSEALLTL	++
52	TIGIPFPNV	++
53	AQHLSTLLL	+
54	YLVPGLVAA	+++
55	HLFDKIIKI	+++
57	TLYPGRFDYV	++
58	HLLGEGAFAQV	+++
59	ALADGIKSFL	+++
60	YLFSQGLQGL	+++
61	ALYPKEITL	+++
62	SLVENIHVL	+++
63	KLLPMVIQL	+++

序列 ID 號	序列	肽交換
64	SLYAGSNNQV	++
65	SLSEKSPEV	++
66	AMFPDTIPRV	++
67	FLIENLLAA	+++
68	QLMNLIRSV	+++
69	LKVLKADVVL	++
70	GLTEKTVLV	++
71	HMSGKLTNV	++
72	VLSTRVTNV	++
74	GLAFLPASV	++
75	ALLDGALQL	+++
76	FTAEFLEKV	+++
77	ALYGNVQQV	+++
79	TVLEEIGNRV	++
80	VLTGQVHEL	+++
81	ILAEPIYI	++
82	ILAEPIYIRV	+++
83	GLLENSPHL	++
84	FLLEREQLL	++++
85	KLLDKPEQFL	++
86	SLFSNIESV	+++
87	KLLSLLEEA	+++
88	LLLPLELSLA	+++
89	SLAETIFIV	+++
90	AILNVDEKNQV	++
91	LLPSIFLMV	++
92	RLFEEVLGV	++++
93	RLYGYFHDA	++
94	YLDEVAFML	+++
95	KLIDEDEPLFL	+++
96	ALDTTRHEL	++
97	KLFESTGL	+++
98	FVQEKIPEL	+++
99	TLFGIQLTEA	+++
100	ALQSFEFRV	+++
101	SLLEVNEASSV	+++
102	GLYPVTLVGV	+++
103	YLADTVQKL	++
105	AMLASQTEA	++
106	VLLGSVVIFA	++
107	RVLPQAVTGV	++
108	FIANLPPELKA	+++
109	ILGSFELQL	+++
110	QIQGVSEV	++
111	AQLEGKLVSI	+++
112	ILAQDVAQL	+++
113	FLFLKEVKV	++
114	LLFPSDVQTL	++
115	ILHGEVNVK	++

序列 ID 號	序列	肽交換
116	ALLSSVAEA	++
117	TLLEGISRA	++
119	SLIEESEEL	++
121	ALYVQAPTV	++
122	SIIDTELKV	+++
123	QTAPEEAFIKL	+
124	ALLRLFTI	++
125	AALEVLAEV	+++
126	QLREAFEQL	+++
128	SILTNISEV	++
129	KMASKVTQV	++
130	QLYGSAITL	+++
131	SLYPHFTLL	+++
132	ALLNNVIEV	+++
133	FLDGRPLTL	++
134	SLYKSFLQL	++
136	LLWDAPAKC	+++
137	KLIYKDLVSV	++
138	GIINKLVTV	++
139	IILENIQSL	+++
140	FLDSQITTV	+++
141	NIDINNNE	++
142	LLDAAHASI	++
143	MLWESIMRV	+++
144	FLISQTPLL	+++
145	ALEEKLENV	+++
146	VVAAHLAGA	++
147	GLLSALENV	+++
148	YLILSSHQL	+++
149	NMADGQLHQV	++
150	VLLDMVHSL	+++
151	DISKRIQSL	++
153	KLVELEHTL	+++
154	AIIEKIQTV	++
155	TLDSYLKAV	++
157	ILQDGQFLV	++
158	YLDPLWHQL	+++
159	QLGPVPVTI	+++
160	TLQEWLTEV	+++
161	NLLDENVCL	++++
162	GLLGNTLSL	+++
163	GLEERLYTA	++
164	MLIIRVPSV	+++
165	SLLDYEVS	+++
166	LLGDSSFFL	+++
167	LVVDEGSLVSV	+++
168	VIFEGEPMYL	+++
169	ALADLSVAV	+++
170	FIAAVVEKV	++

序列 ID 號	序列	肽交換
171	LLLLDVPTA	++
173	RLIDIYKNV	+++
174	ALYSGDLHAA	++
175	SLLDLVQSL	+++
176	VQSGLRILL	++
177	ALINVLNAL	+++
178	SLVSWQLLL	++++
179	TLGEIHKGV	+++
180	RLYEEEIRI	+++
181	LLWAPTAQA	+++
182	GLQDGFQITV	+++
183	ALSYILPYL	+++
184	ALDSTIAHL	++
185	TLYQGLPAEV	++
187	SILKEDPFL	++
188	VLGEEQEGV	++
190	SLSTELFKV	+++
191	AAIEIFEKV	+++
192	TLLPSSGLVTL	++
193	ALFHMNILL	+++
194	KLLEEVQLL	++
195	VIIQNLPAL	+++
198	ILTNKVVS	++
199	SVADLAHVL	++
200	IMPTFDLTKV	+++
203	FLFVDPELV	++
204	SEWGSPHAAVP	+++
206	GLDAFRIFL	++++
207	KLFETVEEL	+++
208	HLNNDNRNPL	++
210	GLAGDNIYL	+++
211	LLTTVLINA	+++
212	MTLSEIHAV	++
213	ILAVDGVLSV	+++
214	ALFETLIQL	+++
215	QIADIVTSV	++
216	ALSTVTPRI	++
217	LLWPSSVPA	+++
218	SLTGANITV	+++
219	GVVPTIQKV	++
220	ALSELERVL	+++
221	IMLNSVEEI	++
222	LLTGVFAQL	++
223	ALHPVQFYL	+++
224	LLFDWSGTGRADA	+++
225	FLPQPVPPLSV	+++
226	SLAGNLQEL	+++
227	SEMEELPSV	+
228	SLLELDGINLRL	+++

序列 ID 號	序列	肽交換
229	YLYELEHAL	++
230	KLLNMIFSI	+++
231	LLDDIFIRL	+++
233	SLFESLEYL	+++
234	VLLNEILEQV	++++
235	SLLNQPKAV	++
236	KMSELQTYV	+++
237	ALLEQTGDMSL	+++
238	HLQEKLQSL	++
239	VIIKGLEEITV	+++
241	KQFEGTVEI	+++
242	KLQEEIPVL	+++
243	GLAEFQENV	++
244	NVAEIVIHI	+++
245	ALLEEEEGV	++
246	ALAGIVTNV	+++
247	NLLIDDKGTIKL	++
248	VLMQDSRLYL	+++
249	YLYQILQGI	+++
250	LMQDSRLYL	+++
251	LLWGNLPEI	+++
252	SLMEKNQSL	++
253	KLLAVIHEL	+++
254	ALGDKFLLRV	++
255	FLMKNSDLYGA	+++
256	FLNDIFERI	+++
257	KLIDHQGLYL	+++
258	QLVQRVASV	++
259	GPGIFPPPPQP	+
260	ALNESLVEC	+++
261	GLAALAVHL	+++
262	LLLEAVWHL	+++
263	SIIEYLPTL	+++
264	TLHDQVHLL	++
265	FLLDKPQDLSI	+++
266	FLLDKPQDL	++
267	YLLDMPLWYL	+++
268	SLDKDIVAL	++
269	GLLDCPIFL	++++
270	TLLTFFHEL	+++
271	VLIEYNFSI	+++
272	FVMEGEPPKL	++
273	SLNKQIETV	++
274	TLYNPRTITV	+++
275	AVPPPPSSV	++
276	RMPTVLQCV	+++
277	KLQEELNKV	+++
278	VLEDKVLSV	+++
279	VLMDEGAVLTL	++

序列 ID 號	序列	肽交換
280	HLWGHALFL	+++
281	LLLESDPKVYSL	++
282	SLYALHVKA	++
283	ALSELLQQV	+++
284	KLMDPGSLPPL	++
285	MLLDTVQKV	+++
286	FLTEMVHFI	+++

【 0 4 8 7 】 實 施 例 6

【 0 4 8 8 】 表 8：本發明中的較佳肽

序列 ID 號	序列	肽代碼
11	LLDPKTIFL	HAVCR1-001
14	YTFSGDVQL	MMP1-003
21	YLMDDFSSL	COL6A3-015
24	KVWSDVTPL	MMP-002
25	LLWGHPRVALA	MXRA5-003
40	KIWEELSVLEV	MAGEA3-003
85	KLLDKPEQFL	FMN1-001
89	SLAETIFIV	HTR3A-001
117	TLLEGISRA	CABY-001
153	KLVELEHTL	CT83-001
155	TLDSYLKAV	CYP4Z-001
157	ILQDGQFLV	DCAF4L2-001
168	VIFEGEPMYL	HORMAD1-001
233	SLFESLEYL	ZFP42-001
245	ALLEEEEGV	MAGEA4-003
253	KLLAVIHEL	RAD54B-002
264	TLHDQVHLL	ESR1-001
274	TLYNPRTITV	IGF-004

【 0 4 8 9 】 細胞表面呈現的腫瘤相關肽的絕對定量

【 0 4 9 0 】 黏合劑例如抗體和 / 或 T C R 的產生是一個費力的過程，其可以僅針對一些選定標靶進行。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呈現於細胞表面上肽的呈現和濃度。除了本文所述肽的分離和相對定量，發明人也分析了所述每個細胞的絕對肽拷貝數。實體腫瘤樣本中每個細胞的 T U M A P 拷貝數定

量需要分離 TUMAP 的絕對定量、TUMAP 分離效率和分析的群組織樣本細胞計數。

【0491】 Nano LC-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 個同位素標記的胺基酸。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，來自於類似於常規 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。

【0495】 肽/MHC 分離的效率

【0496】 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 個同位素標記的胺基酸。這些複合物被摻入新製備的群組織裂解物中，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。

【0497】 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 TUMAP。

【0498】 固體、冷凍組織中細胞計數的測定

【0499】 爲了確定經過絕對肽定量的群組織樣本的細胞數，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，且最重要的是，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 (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。

【0500】 爲了計算細胞數，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。用於肽分離的群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。

【0501】 每個細胞的肽拷貝數

【0502】 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 9 所示。

【0503】 表 9：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 數據。

序列 ID 號	肽代碼	每細胞拷貝數 (中位數)	樣本數量
11	HAVCR1-001	+	22
14	MMP1-003	++	10
21	COL6A3-015	+	35
24	MMP-002	+	33
85	FMN1-001	+	18
89	HTR3A-001	+++	17
117	CABY-001	+	17
155	CYP4Z-001	++	18
157	DCAF4L2-001	++	16
245	MAGEA4-003	+	33
253	RAD54B-002	+++	6

序列 ID 號	肽代碼	每細胞拷貝數 (中位數)	樣本數量
264	ESR1-001	+	16
274	IGF-004	+	6

參考文獻列表

- Adelaide, J. et al., Cancer Res **67** (2007) : 11565-11575
- 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
- Arafat, H. et al., Surgery **150** (2011) : 306-315
- Aung, P. P. et al., Oncogene **25** (2006) : 2546-2557
- Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004) : 4699-4708
- Baba, T. et al., Eur.J Cardiothorac.Surg. **43** (2013) : 759-764
- Bahnassy, A. A. et al., WOrld J Gastroenterol. **20** (2014) : 18240-18248
- Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001) : 271-274
- Band, A. M. et al., J Mammary.Gland.Biol Neoplasia. **16** (2011) : 109-115
- Bankovic, J. et al., Lung Cancer **67** (2010) : 151-159
- Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001) : 2276-2282
- Beaty, T. H. et al., Hum.Genet. **132** (2013) : 771-781
- Beggs, J. D., Nature **275** (1978) : 104-109

- Bell, J. L. et al., J Clin Oncol **33** (2015) : 1285-1293
- Bell, J. L. et al., Cell Mol Life Sci. **70** (2013) : 2657-2675
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological) , **57** (1995) : 289-300
- Berger, C. et al., Curr.Mol.Med. **13** (2013) : 1229-1240
- 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)
- Bhan, S. et al., Oncol Rep. **28** (2012) : 1498-1502
- Bode, P. K. et al., Mod.Pathol. **27** (2014) : 899-905
- Bogush, T. A. et al., Antibiot.Khimioter. **54** (2009) : 41-49
- Bonventre, J. V., Trans.Am.Clin Climatol.Assoc. **125** (2014) : 293-299
- 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
- Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res **12** (2006) : 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res **9** (2003) : 5902-5908
- Caballero, O. L. et al., PLoS.One. **5** (2010)
- 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, H. S. et al., Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi. **11** (2003) : 145-148
- Chen, S. T. et al., Cancer Sci. **102** (2011b) : 2191-2198
- Chen, Y. L. et al., Int J Surg. **11** (2013c) : 85-91
- Chen, Y. T. et al., Cancer Immun. **5** (2005) : 9
- Cierna, Z. et al., BMC.Cancer **14** (2014) : 472
- Ciruelos Gil, E. M., Cancer Treat.Rev **40** (2014) : 862-871
- 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
- Coulie, P. G. et al., Immunol.Rev **188** (2002) : 33-42
- Counter, C. M. et al., Blood **85** (1995) : 2315-2320
- Cuadros, T. et al., Cancer Res **74** (2014) : 1416-1428
- Cuadros, T. et al., Eur.J Cancer **49** (2013) : 2034-2047
- Dalerba, P. et al., Int.J Cancer **93** (2001) : 85-90
- De, Plaen E. et al., Immunogenetics **40** (1994) : 360-369
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006) : 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol **171** (2003) : 2197-2207
- Downie, D. et al., Clin Cancer Res. **11** (2005) : 7369-7375
- Du, X. et al., Clin Cancer Res **20** (2014) : 6324-6335

- Duan, Z. et al., Clin Cancer Res **9** (2003) : 2778-2785
- Ek, S. et al., Cancer Res **62** (2002) : 4398-4405
- Emens, L. A., Expert.Rev.Anticancer Ther. **12** (2012) : 1597-1611
- Enguita-German, M. et al., WOrld J Hepatol. **6** (2014) : 716-737
- Estey, E. H., Am.J Hematol. **89** (2014) : 1063-1081
- Falk, K. et al., Nature **351** (1991) : 290-296
- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013) , <http://globocan.iarc.fr>
- Findeis-Hosey, J. J. et al., Biotech.Histochem. **87** (2012) : 24-29
- 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
- Frasor, J. et al., Mol.Cell Endocrinol. **418 Pt 3** (2015) : 235-239
- Fuge, O. et al., Res Rep.Urol. **7** (2015) : 65-79
- Fujiyama, T. et al., J Dermatol.Sci. **75** (2014) : 43-48
- Fukuyama, T. et al., Cancer Res. **66** (2006) : 4922-4928
- Fuqua, S. A. et al., Breast Cancer Res Treat. **144** (2014) : 11-19
- 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
- Gardina, P. J. et al., BMC.Genomics **7** (2006) : 325
- 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
- Gibbs, P. et al., Melanoma Res **10** (2000) : 259-264
- 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
- Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* **21** (2014) : 191-200
- Grah, J. J. et al., *Tumori* **100** (2014) : 60-68
- 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)
- Gu, X. et al., *Sci.Rep.* **4** (2014) : 6625
- Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008) : 606-609
- Hall, R. D. et al., *Cancer Control* **20** (2013) : 22-31
- Hamilton, K. E. et al., *Mol.Cancer Res* **13** (2015) : 1478-1486
- Han, L. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014) : 6734-6742
- Hanagiri, T. et al., *Anticancer Res.* **33** (2013) : 2123-2128
- Harig, S. et al., *Blood* **98** (2001) : 2999-3005
- Hasegawa, H. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* **122** (1998) : 551-554
- Hayashi, S. I. et al., *Endocr.Relat Cancer* **10** (2003) : 193-202
- Hennard, C. et al., *J Pathol.* **209** (2006) : 430-435
- Herbert, N. et al., *J Immunol.* **185** (2010) : 902-916
- Hinrichs, C. S. et al., *Nat.Biotechnol.* **31** (2013) : 999-1008
- Hiramoto, T. et al., *Oncogene* **18** (1999) : 3422-3426
- Hoffmann, N. E. et al., *Cancer* **112** (2008) : 1471-1479
- Holti, L. et al., *Clin.Cancer Res.* **8** (2002) : 3369-3376
- Hsu, H. C. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **329** (2005) : 1108-1117
- Hu, S. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* **140** (2014) : 883-893
- Huang, X. et al., *Cell Prolif.* **48** (2015b) : 593-599

- Hui, L. et al., Oncol Rep. **34** (2015) : 2627-2635
- Hussein, Y. M. et al., Med.Oncol **29** (2012) : 3055-3062
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007) : 5829-5838
- Ioannidis, P. et al., Anticancer Res **23** (2003) : 2179-2183
- Jeng, Y. M. et al., Br.J Surg. **96** (2009) : 66-73
- 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
- Kang, C. Y. et al., J Gastrointest.Surg. **18** (2014) : 7-15
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Kim, Y. D. et al., Int.J Mol.Med. **29** (2012) : 656-662
- Kobayashi, H. et al., Oncol Lett. **10** (2015) : 612-618
- Koido, S. et al.,WOrld J Gastroenterol. **19** (2013) : 8531-8542
- Krackhardt, A. M. et al., Blood **100** (2002) : 2123-2131
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006) : 471-484
- Lederer, M. et al., Semin.Cancer Biol **29** (2014) : 3-12
- Lee, M. Y. et al., J Cell Physiol **224** (2010) : 17-27
- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005) : 496-504
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)
- Leivo, I. et al., Cancer Genet.Cytogenet. **156** (2005) : 104-113
- Leonetti, M. D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **109** (2012) : 19274-19279
- Li, H. et al., Bull.Cancer **99** (2012) : E26-E33
- Li, M. et al., Clin Cancer Res **11** (2005) : 1809-1814
- Li, W. M. et al., J Surg.Oncol (2016)
- Li, Y. et al., Cancer Epidemiol. **39** (2015) : 8-13

- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012) : 980-987
- Lin, J. et al., Clin Cancer Res **10** (2004) : 5708-5716
- Lin, L. et al., Oncol Lett. **6** (2013) : 740-744
- Lisitskaia, K. V. et al., Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol. (2010) : 34-37
- Liu, X. et al., Int.Immunopharmacol. **25** (2015) : 416-424
- 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)
- Luo, C. et al., Clin Cancer Res **13** (2007) : 1288-1297
- Mantia-Smaldone, G. M. et al., Hum.Vaccin.Immunother. **8** (2012) : 1179-1191
- Marten, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002) : 637-644
- Mason, J. M. et al., Nucleic Acids Res. **43** (2015) : 3180-3196
- 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
- Mehta, A. et al., Breast **23** (2014) : 2-9
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997) : 3230-3237
- Miyagi, Y. et al., Clin Cancer Res **7** (2001) : 3950-3962
- Miyoshi, Y. et al., Med.Mol.Morphol. **43** (2010) : 193-196

- Molina, J. R. et al., Mayo Clin Proc. **83** (2008) : 584-594
- Mongan, N. P. et al., Mol.Carcinog **45** (2006) : 887-900
- 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
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999) : 8633-8638
- Murray, G. I. et al., Histopathology **57** (2010) : 202-211
- National Cancer Institute, (5-6-2015) , www.cancer.gov
- Noubissi, F. K. et al., J Invest Dermatol. **134** (2014) : 1718-1724
- Oehlrich, N. et al., Int.J Cancer **117** (2005) : 256-264
- Okuno, K. et al., Exp.Ther Med. **2** (2011) : 73-79
- Ottaviani, S. et al., Cancer Immunol.Immunother. **55** (2006) : 867-872
- Otte, M. et al., Cancer Res **61** (2001) : 6682-6687
- Ozeki, N. et al., Int.J Mol.Sci. **17** (2016)
- Pai, V. P. et al., Breast Cancer Res **11** (2009) : R81
- Palmer, D. H. et al., Hepatology **49** (2009) : 124-132
- Palomba, M. L., Curr.Oncol Rep. **14** (2012) : 433-440
- Perez, C. A. et al., Expert.Rev Anticancer Ther. **11** (2011) : 1599-1605
- Phan, G. Q. et al., Cancer Control **20** (2013) : 289-297
- Pineda, C. T. et al., Cell **160** (2015) : 715-728

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

Prasad, M. L. et al., Head Neck **26** (2004) : 1053-1057

Qian, Z. et al., Mol.Cancer Res **12** (2014) : 335-347

Quinn, D. I. et al., Urol.Oncol. (2015)

Raman, J. D. et al., Carcinogenesis **27** (2006) : 499-507

Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics **50** (1999) : 213-219

Reck, M., Ann.Oncol **23 Suppl 8** (2012) : viii28-viii34

RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002) ,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>

Reinisch, C. M. et al., Int.J Exp.Pathol. **92** (2011) : 326-332

Reinisch, W. et al., J Immunother. **25** (2002) : 489-499

Reinmuth, N. et al., Dtsch.Med.Wochenschr. **140** (2015) : 329-333

Ries, J. et al., Int.J Oncol **26** (2005) : 817-824

Rinaldi, A. et al., Pathobiology **77** (2010) : 129-135

Rini, B. I. et al., Curr.Opin.Oncol. **20** (2008) : 300-306

Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006) : 67-74

Risinger, J. I. et al., Clin Cancer Res **13** (2007) : 1713-1719

Rock, K. L. et al., Science **249** (1990) : 918-921

Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006) : 1120-1132

S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, **032-0100L**, (2013)

- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011)
- S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, **032-035OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Mammakarzinom, **032-045OL**, (2012)
- S3-Leitlinie Melanom, **032-024OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom, **043/022OL**, (2014)
- 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
- Schmidt, S. M. et al., Cancer Res **64** (2004) : 1164-1170
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999) : 571-576
- Shahzad, M. M. et al., Cancer Lett. **330** (2013) : 123-129
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. (1986)
- Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell **3** (2003) : 377-386
- Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004) : 1146-1151
- Showel, M. M. et al., F1000Prime.Rep. **6** (2014) : 96
- Siegel, S. et al., Blood **102** (2003) : 4416-4423
- Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013) : 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004) : 187-195
- Skandalis, S. S. et al., Matrix Biol **35** (2014) : 182-193
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006) : 3089-3094
- Smith, M. J. et al., Br.J Cancer **100** (2009) : 1452-1464
- Son, M. Y. et al., Stem Cells **31** (2013) : 2374-2387
- Springelkamp, H. et al., Genet.Epidemiol. **39** (2015) : 207-216

- Stahl, M. et al., Ann.Oncol. **24 Suppl 6** (2013) : vi51-vi56
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008) : 163
- Su, Z. et al., Cancer Res. **63** (2003) : 2127-2133
- Sun, H. et al., J BUON. **20** (2015) : 296-308
- Szajnik, M. et al., Gynecol.Obstet. (Sunnyvale.) **Suppl 4** (2013) : 3
- Szarvas, T. et al., Int J Cancer **135** (2014) : 1596-1604
- Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991) : 2391-2396
- Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000) : 802-807
- Tanaka, F. et al., Int.J Oncol **10** (1997) : 1113-1117
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005) : 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **23** (2014) : 1985-1996
- Thorsen, K. et al., Mol Cell Proteomics. **7** (2008) : 1214-1224
- Tian, X. et al., J Transl.Med. **13** (2015) : 337
- Toomey, P. G. et al., Cancer Control **20** (2013) : 32-42
- Tradonsky, A. et al., Am.J Clin Pathol. **137** (2012) : 918-930
- Tran, E. et al., Science **344** (2014) : 641-645
- Urgard, E. et al., Cancer Inform. **10** (2011) : 175-183
- van der Bruggen, P. et al., Immunol.Rev **188** (2002) : 51-64
- van, Duin M. et al., Haematologica **96** (2011) : 1662-1669
- Velinov, N. et al., Khirurgiia (Sofiia) (2010) : 44-49
- Walter, S. et al., J Immunol **171** (2003) : 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012) : 1254-1261
- Wang, G. H. et al., Oncol Lett. **5** (2013) : 544-548
- Wang, Y. et al., Anticancer Res **33** (2013) : 207-214

- Wilhelm, S. M. et al., Cancer Res **64** (2004) : 7099-7109
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999) : 2418-2423
- Wittig, B. et al., Hum.Gene Ther. **12** (2001) : 267-278
- Wlodarski, M. W. et al., J Leukoc.Biol **83** (2008) : 589-601
- World Cancer Report, (2014)
- Wu, Z. Y. et al., Scand.J Immunol. **74** (2011) : 561-567
- Xie, X. et al., Oncol Lett. **7** (2014) : 1537-1543
- Xiong, D. et al., Carcinogenesis **33** (2012) : 1797-1805
- Xu, J. et al., J Mol.Biol **377** (2008) : 28-46
- Xu, L. et al., Zhongguo Fei.Ai.Za Zhi. **14** (2011) : 727-732
- Xu, X. et al., Exp.Mol.Pathol. **97** (2014) : 579-584
- Xu, Y. et al., Sci.Rep. **5** (2015) : 12104
- Yakimchuk, K. et al., Mol.Cell Endocrinol. **375** (2013) : 121-129
- Yamada, R. et al., Tissue Antigens **81** (2013) : 428-434
- Yang, S. et al., Biochim.Biophys.Acta **1772** (2007) : 1033-1040
- Yao, J. et al., Cancer Immunol.Res. **2** (2014) : 371-379
- Yin, B. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014a) : 2934-2941
- Yu, J. et al., Gut **64** (2015) : 636-645
- Yu, W. et al., Toxicol.Appl.Pharmacol. **264** (2012) : 73-83
- Yuan, R. H. et al., Ann Surg.Oncol **16** (2009) : 1711-1719
- Zamuner, F. T. et al., Mol.Cancer Ther. **14** (2015) : 828-834
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997) : 4570-4577
- Zhan, W. et al., Clin Res Hepatol.Gastroenterol. (2015)
- Zhang, H. et al., Carcinogenesis **35** (2014) : 1863-1871

- Zhang, J. et al., Oncotarget. **6** (2015) : 42040-42052
- Zhang, S. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **8** (2015) : 541-550
- Zhang, X. et al., Int.J Oncol (2016)
- Zhao, H. et al., Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi. **10** (2002) : 100-102
- Zou, T. T. et al., Oncogene **21** (2002) : 4855-4862
- Follenzi A, et al. Nat Genet. 2000 Jun;25 (2) :217-22.
- Zufferey R, et al. J Virol. 1999 Apr;73 (4) :2886-92.
- Scholten KB, et al. Clin Immunol. 2006 May;119 (2) :135-45.
- Gustafsson C, et al. Trends Biotechnol. 2004 Jul;22 (7) :346-53. Review.
- Kuball, J., et al. (2007) . *Blood* 109, 2331–2338.
- Schmitt, T. M., et al. (2009) . *Hum. Gene Ther.* 20, 1240–1248

【符號說明】

【 0 5 0 4 】

無

【生物材料寄存】

【 0 5 0 5 】 國內寄存資訊（請依寄存機構、日期、號碼順序註記）

無

【 0 5 0 6 】 國外寄存資訊（請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記）

無

【序列表】（請換頁單獨記載）

<110> 英麥提克生物技術股份有限公司

<120> 用於各種腫瘤免疫治療的新型肽和肽組合物

<130> I32799WO

<150> GB1505305.1

<151> 2015-03-27

<150> US62/139,189

<151> 2015-03-27

<160> 290

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile

1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Val Val Gly Val
1 5 10

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Ala Leu Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Ala Leu Ser Ser Ser Gln Ala Glu Val
1 5

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Ser Leu Ile Thr Gly Gln Asp Leu Leu Ser Val
1 5 10

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
1 5

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Arg Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Gly Leu Pro Ser Ala Thr Thr Thr Val
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Ser Leu Ala Asp Leu Ser Leu Leu Leu

1 5

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu
1 5 10

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Lys Thr Ala Ser Ile Asn Gln Asn Val
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Lys Val Phe Glu Leu Asp Leu Val Thr Leu
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

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

<210> 21

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Leu Met Tyr Pro Tyr Ile Tyr His Val
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu
1 5

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 26

Val Leu Asp Gly Lys Val Ala Val Val
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr Ser Val
1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Ile Lys Val Thr Asp Pro Gln Leu Leu Glu Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu
1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 30

Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu
 1 5

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31

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

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32

Val Val Met Val Leu Val Leu Met Leu
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33

Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val
 1 5

<210> 34
 <211> 9

<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Thr Leu Asn Thr Leu Asp Ile Asn Leu
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Thr Val Leu Gln Glu Leu Ile Asn Val
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Gln Ile Val Glu Leu Ile Glu Lys Ile
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Val Leu Gln Gln Glu Ser Asn Phe Leu
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Tyr Leu Glu Asp Gly Phe Ala Tyr Val
1 5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val
1 5 10

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Ile Val Thr Glu Ile Ile Ser Glu Ile
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Lys Gln Met Ser Ile Ser Thr Gly Leu
1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 43

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 44

Ala Val Phe Asn Leu Val His Val Val
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 45

Phe Leu Pro Val Ser Val Val Tyr Val
 1 5

<210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 46

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

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Gly Leu Asn Gly Phe Asn Val Leu Leu
1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 48

Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val
1 5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 49

Lys Leu Ile Gly Asn Ile His Gly Asn Glu Val
1 5 10

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

Ile Leu Leu Ser Val Leu His Gln Leu
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Leu Asp Ser Glu Ala Leu Leu Thr Leu
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Thr Ile Gly Ile Pro Phe Pro Asn Val
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Ala Gln His Leu Ser Thr Leu Leu Leu
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Tyr Leu Val Pro Gly Leu Val Ala Ala
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

His Leu Phe Asp Lys Ile Ile Lys Ile
1 5

<210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 56

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

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 57

Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Phe Asp Tyr Val
 1 5 10

<210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 58

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

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 59

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

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 60

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

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Ala Leu Tyr Pro Lys Glu Ile Thr Leu
1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Ser Leu Val Glu Asn Ile His Val Leu
1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Lys Leu Leu Pro Met Val Ile Gln Leu
1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Ser Leu Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Gln Val

1 5 10

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 65

Ser Leu Ser Glu Lys Ser Pro Glu Val
1 5

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66

Ala Met Phe Pro Asp Thr Ile Pro Arg Val
1 5 10

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68

Gln Leu Met Asn Leu Ile Arg Ser Val
1 5

<210> 69

<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69

Leu Lys Val Leu Lys Ala Asp Val Val Leu
1 5 10

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

Gly Leu Thr Glu Lys Thr Val Leu Val
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

His Met Ser Gly Lys Leu Thr Asn Val
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

Val Leu Ser Thr Arg Val Thr Asn Val
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Ser Val Pro Lys Thr Leu Gly Val
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 74

Gly Leu Ala Phe Leu Pro Ala Ser Val
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 75

Ala Leu Leu Asp Gly Ala Leu Gln Leu
1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 76

Phe Thr Ala Glu Phe Leu Glu Lys Val
1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

Ala Leu Tyr Gly Asn Val Gln Gln Val
1 5

<210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 78

Leu Phe Gln Ser Arg Ile Ala Gly Val
 1 5

<210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 79

Thr Val Leu Glu Glu Ile Gly Asn Arg Val
 1 5 10

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 80

Val Leu Thr Gly Gln Val His Glu Leu
 1 5

<210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 81

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile
 1 5

<210> 82
 <211> 11

<212> PRT
<213> 智人

<400> 82

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val
1 5 10

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83

Gly Leu Leu Glu Asn Ser Pro His Leu
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu
1 5

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85

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

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86

Ser Leu Phe Ser Asn Ile Glu Ser Val
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87

Lys Leu Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ala
1 5

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88

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

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 89

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val
1 5

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 90

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

<210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 91

Leu Leu Pro Ser Ile Phe Leu Met Val
 1 5

<210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 92

Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 93

Arg Leu Tyr Gly Tyr Phe His Asp Ala
 1 5

<210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 94

Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe Met Leu
 1 5

<210> 95
 <211> 11
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 95

Lys Leu Ile Asp Glu Asp Glu Pro Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 96

Ala Leu Asp Thr Thr Arg His Glu Leu
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 97

Lys Leu Phe Glu Lys Ser Thr Gly Leu
1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 98

Phe Val Gln Glu Lys Ile Pro Glu Leu
1 5

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 99

Thr Leu Phe Gly Ile Gln Leu Thr Glu Ala
1 5 10

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 100

Ala Leu Gln Ser Phe Glu Phe Arg Val
1 5

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 101

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

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102

Gly Leu Tyr Pro Val Thr Leu Val Gly Val
1 5 10

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Tyr Leu Ala Asp Thr Val Gln Lys Leu
1 5

<210> 104
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 104

Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr
 1 5 10

<210> 105
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 105

Ala Met Leu Ala Ser Gln Thr Glu Ala
 1 5

<210> 106
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 106

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

<210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 107

Arg Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val
 1 5 10

<210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 108

Phe Ile Ala Asn Leu Pro Pro Glu Leu Lys Ala
1 5 10

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 109

Ile Leu Gly Ser Phe Glu Leu Gln Leu
1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 110

Gln Ile Gln Gly Gln Val Ser Glu Val
1 5

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 111

Ala Gln Leu Glu Gly Lys Leu Val Ser Ile
1 5 10

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 112

Ile Leu Ala Gln Asp Val Ala Gln Leu

1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113

Phe Leu Phe Leu Lys Glu Val Lys Val
1 5

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

Leu Leu Phe Pro Ser Asp Val Gln Thr Leu
1 5 10

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 115

Ile Leu His Gly Glu Val Asn Lys Val
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala
1 5

<210> 117

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 117

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala
 1 5

<210> 118
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 118

Ile Ala Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu
 1 5 10

<210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 119

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Glu Glu Leu
 1 5

<210> 120
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 120

Leu Gln Leu Ser Pro Leu Lys Gly Leu Ser Leu
 1 5 10

<210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 121

Ala Leu Tyr Val Gln Ala Pro Thr Val
1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 122

Ser Ile Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val
1 5

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 123

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

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 124

Ala Leu Leu Leu Arg Leu Phe Thr Ile
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 125

Ala Ala Leu Glu Val Leu Ala Glu Val
1 5

<210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 126

Gln Leu Arg Glu Ala Phe Glu Gln Leu
 1 5

<210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 127

Ile Met Lys Ala Thr Gly Leu Gly Ile Gln Leu
 1 5 10

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 128

Ser Ile Leu Thr Asn Ile Ser Glu Val
 1 5

<210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 129

Lys Met Ala Ser Lys Val Thr Gln Val
 1 5

<210> 130
 <211> 9

<212> PRT
<213> 智人

<400> 130

Gln Leu Tyr Gly Ser Ala Ile Thr Leu
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131

Ser Leu Tyr Pro His Phe Thr Leu Leu
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 132

Ala Leu Leu Asn Asn Val Ile Glu Val
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 133

Phe Leu Asp Gly Arg Pro Leu Thr Leu
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 134

Ser Leu Tyr Lys Ser Phe Leu Gln Leu
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 135

His Leu Asp Thr Val Lys Ile Glu Val
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 136

Leu Leu Trp Asp Ala Pro Ala Lys Cys
1 5

<210> 137
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 137

Lys Leu Ile Tyr Lys Asp Leu Val Ser Val
1 5 10

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 138

Gly Ile Ile Asn Lys Leu Val Thr Val
1 5

<210> 139
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 139

Ile Ile Leu Glu Asn Ile Gln Ser Leu
 1 5

<210> 140
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 140

Phe Leu Asp Ser Gln Ile Thr Thr Val
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 141

Asn Ile Asp Ile Asn Asn Asn Glu Leu
 1 5

<210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 142

Leu Leu Asp Ala Ala His Ala Ser Ile
 1 5

<210> 143
 <211> 9
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 143

Met Leu Trp Glu Ser Ile Met Arg Val
1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 144

Phe Leu Ile Ser Gln Thr Pro Leu Leu
1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 145

Ala Leu Glu Glu Lys Leu Glu Asn Val
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 146

Val Val Ala Ala His Leu Ala Gly Ala
1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 147

Gly Leu Leu Ser Ala Leu Glu Asn Val
1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 148

Tyr Leu Ile Leu Ser Ser His Gln Leu
1 5

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 149

Asn Met Ala Asp Gly Gln Leu His Gln Val
1 5 10

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 150

Val Leu Leu Asp Met Val His Ser Leu
1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 151

Asp Ile Ser Lys Arg Ile Gln Ser Leu
1 5

<210> 152
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 152

Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu
 1 5

<210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 153

Lys Leu Val Glu Leu Glu His Thr Leu
 1 5

<210> 154
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 154

Ala Ile Ile Lys Glu Ile Gln Thr Val
 1 5

<210> 155
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 155

Thr Leu Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Val
 1 5

<210> 156
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 156

Val Ile Leu Thr Ser Ser Pro Phe Leu
1 5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 157

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val
1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 158

Tyr Leu Asp Pro Leu Trp His Gln Leu
1 5

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 159

Gln Leu Gly Pro Val Pro Val Thr Ile
1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 160

Thr Leu Gln Glu Trp Leu Thr Glu Val

1

5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 161

Asn Leu Leu Asp Glu Asn Val Cys Leu

1

5

<210> 162

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 162

Gly Leu Leu Gly Asn Leu Leu Thr Ser Leu

1

5

10

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 163

Gly Leu Glu Glu Arg Leu Tyr Thr Ala

1

5

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 164

Met Leu Ile Ile Arg Val Pro Ser Val

1

5

<210> 165

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 165

Ser Leu Leu Asp Tyr Glu Val Ser Ile
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 166

Leu Leu Gly Asp Ser Ser Phe Phe Leu
1 5

<210> 167
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 167

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

<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 168

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu
1 5 10

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 169

Ala Leu Ala Asp Leu Ser Val Ala Val
1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 170

Phe Ile Ala Ala Val Val Glu Lys Val
1 5

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 171

Leu Leu Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala
1 5

<210> 172

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 172

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu
1 5 10

<210> 173

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 173

Arg Leu Ile Asp Ile Tyr Lys Asn Val
1 5

<210> 174
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 174

Ala Leu Tyr Ser Gly Asp Leu His Ala Ala
 1 5 10

<210> 175
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 175

Ser Leu Leu Asp Leu Val Gln Ser Leu
 1 5

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 176

Val Gln Ser Gly Leu Arg Ile Leu Leu
 1 5

<210> 177
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 177

Ala Leu Ile Asn Val Leu Asn Ala Leu
 1 5

<210> 178
 <211> 9

<212> PRT
<213> 智人

<400> 178

Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu
1 5

<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 179

Thr Leu Gly Glu Ile Ile Lys Gly Val
1 5

<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 180

Arg Leu Tyr Glu Glu Glu Ile Arg Ile
1 5

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 181

Leu Leu Trp Ala Pro Thr Ala Gln Ala
1 5

<210> 182
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 182

Gly Leu Gln Asp Gly Phe Gln Ile Thr Val
1 5 10

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 183

Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Pro Tyr Leu
1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 184

Ala Leu Asp Ser Thr Ile Ala His Leu
1 5

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 185

Thr Leu Tyr Gln Gly Leu Pro Ala Glu Val
1 5 10

<210> 186

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 186

Ser Leu Leu Ser Leu Glu Ser Arg Leu
1 5

<210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 187

Ser Ile Leu Lys Glu Asp Pro Phe Leu
 1 5

<210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 188

Val Leu Gly Glu Glu Gln Glu Gly Val
 1 5

<210> 189
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 189

Met Ala Val Ser Asp Leu Leu Ile Leu
 1 5

<210> 190
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 190

Ser Leu Ser Thr Glu Leu Phe Lys Val
 1 5

<210> 191
 <211> 9
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 191

Ala Ala Ile Glu Ile Phe Glu Lys Val
1 5

<210> 192

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 192

Thr Leu Leu Pro Ser Ser Gly Leu Val Thr Leu
1 5 10

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 193

Ala Leu Phe His Met Asn Ile Leu Leu
1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 194

Lys Leu Leu Glu Glu Val Gln Leu Leu
1 5

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 195

Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala Leu
1 5

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 196

Thr Leu His Gln Trp Ile Tyr Tyr Leu
1 5

<210> 197
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 197

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

<210> 198
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 198

Ile Leu Thr Asn Lys Val Val Ser Val
1 5

<210> 199
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 199

Ser Val Ala Asp Leu Ala His Val Leu
1 5

<210> 200
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 200

Ile	Met	Pro	Thr	Phe	Asp	Leu	Thr	Lys	Val
1				5					10

<210> 201
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 201

Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Leu	Cys	Glu	Ala
1				5				

<210> 202
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 202

Ala	Leu	Ala	Lys	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu
1				5				

<210> 203
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 203

Phe	Leu	Phe	Val	Asp	Pro	Glu	Leu	Val
1				5				

<210> 204
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 204

Ser Glu Trp Gly Ser Pro His Ala Ala Val Pro
1 5 10

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 205

Leu Ala Phe Gly Tyr Asp Asp Glu Leu
1 5

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 206

Gly Leu Asp Ala Phe Arg Ile Phe Leu
1 5

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 207

Lys Leu Phe Glu Thr Val Glu Glu Leu
1 5

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 208

His Leu Asn Asn Asp Arg Asn Pro Leu

1 5

<210> 209
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 209

Val Leu Gln Thr Glu Glu Leu Val Ala Asn
1 5 10

<210> 210
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 210

Gly Leu Ala Gly Asp Asn Ile Tyr Leu
1 5

<210> 211
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 211

Leu Leu Thr Thr Val Leu Ile Asn Ala
1 5

<210> 212
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 212

Met Thr Leu Ser Glu Ile His Ala Val
1 5

<210> 213

<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 213

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

<210> 214
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 214

Ala Leu Phe Glu Thr Leu Ile Gln Leu
1 5

<210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 215

Gln Ile Ala Asp Ile Val Thr Ser Val
1 5

<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 216

Ala Leu Ser Thr Val Thr Pro Arg Ile
1 5

<210> 217
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 217

Leu Leu Trp Pro Ser Ser Val Pro Ala
1 5

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 218

Ser Leu Thr Gly Ala Asn Ile Thr Val
1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 219

Gly Val Val Pro Thr Ile Gln Lys Val
1 5

<210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 220

Ala Leu Ser Glu Leu Glu Arg Val Leu
1 5

<210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 221

Ile Met Leu Asn Ser Val Glu Glu Ile
1 5

<210> 222
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 222

Leu Leu Thr Gly Val Phe Ala Gln Leu
 1 5

<210> 223
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 223

Ala Leu His Pro Val Gln Phe Tyr Leu
 1 5

<210> 224
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 224

Leu Leu Phe Asp Trp Ser Gly Thr Gly Arg Ala Asp Ala
 1 5 10

<210> 225
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 225

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

<210> 226
 <211> 9

<212> PRT
<213> 智人

<400> 226

Ser Leu Ala Gly Asn Leu Gln Glu Leu
1 5

<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 227

Ser Glu Met Glu Glu Leu Pro Ser Val
1 5

<210> 228
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 228

Ser Leu Leu Glu Leu Asp Gly Ile Asn Leu Arg Leu
1 5 10

<210> 229
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 229

Tyr Leu Tyr Glu Leu Glu His Ala Leu
1 5

<210> 230
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 230

Lys Leu Leu Asn Met Ile Phe Ser Ile
1 5

<210> 231
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 231

Leu Leu Asp Asp Ile Phe Ile Arg Leu
1 5

<210> 232
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 232

Leu Val Val Gly Gly Ile Ala Thr Val
1 5

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 233

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu
1 5

<210> 234
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 234

Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val
1 5 10

<210> 235
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 235

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val
 1 5

<210> 236
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 236

Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val
 1 5

<210> 237
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 237

Ala Leu Leu Glu Gln Thr Gly Asp Met Ser Leu
 1 5 10

<210> 238
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 238

His Leu Gln Glu Lys Leu Gln Ser Leu
 1 5

<210> 239
 <211> 11
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 239

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

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 240

Ser Val Gln Glu Asn Ile Gln Gln Lys
1 5

<210> 241

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 241

Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile
1 5

<210> 242

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 242

Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu
1 5

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 243

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val
1 5

<210> 244
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 244

Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile
1 5

<210> 245
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 245

Ala Leu Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val
1 5

<210> 246
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 246

Ala Leu Ala Gly Ile Val Thr Asn Val
1 5

<210> 247
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 247

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

<210> 248
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 248

Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu
 1 5 10

<210> 249
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 249

Tyr Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile
 1 5

<210> 250
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 250

Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu
 1 5

<210> 251
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 251

Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile
 1 5

<210> 252
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 252

Ser Leu Met Glu Lys Asn Gln Ser Leu
1 5

<210> 253

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 253

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu
1 5

<210> 254

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 254

Ala Leu Gly Asp Lys Phe Leu Leu Arg Val
1 5 10

<210> 255

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 255

Phe Leu Met Lys Asn Ser Asp Leu Tyr Gly Ala
1 5 10

<210> 256

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 256

Phe Leu Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile

1 5

<210> 257
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 257

Lys Leu Ile Asp His Gln Gly Leu Tyr Leu
1 5 10

<210> 258
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 258

Gln Leu Val Gln Arg Val Ala Ser Val
1 5

<210> 259
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 259

Gly Pro Gly Ile Phe Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro
1 5 10

<210> 260
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 260

Ala Leu Asn Glu Ser Leu Val Glu Cys
1 5

<210> 261

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 261

Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu
1 5

<210> 262
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 262

Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu
1 5

<210> 263
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 263

Ser Ile Ile Glu Tyr Leu Pro Thr Leu
1 5

<210> 264
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 264

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu
1 5

<210> 265
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 265

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

<210> 266

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 266

Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu
1 5

<210> 267

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 267

Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu
1 5 10

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 268

Ser Leu Asp Lys Asp Ile Val Ala Leu
1 5

<210> 269

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 269

Gly Leu Leu Asp Cys Pro Ile Phe Leu
1 5

<210> 270
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 270

Thr Leu Leu Thr Phe Phe His Glu Leu
1 5

<210> 271
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 271

Val Leu Ile Glu Tyr Asn Phe Ser Ile
1 5

<210> 272
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 272

Phe Val Met Glu Gly Glu Pro Pro Lys Leu
1 5 10

<210> 273
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 273

Ser Leu Asn Lys Gln Ile Glu Thr Val
1 5

<210> 274
<211> 11

<212> PRT
<213> 智人

<400> 274

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val
1 5 10

<210> 275
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 275

Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Val
1 5

<210> 276
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 276

Arg Met Pro Thr Val Leu Gln Cys Val
1 5

<210> 277
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 277

Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asn Lys Val
1 5

<210> 278
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 278

Val Leu Glu Asp Lys Val Leu Ser Val
1 5

<210> 279
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 279

Val Leu Met Asp Glu Gly Ala Val Leu Thr Leu
1 5 10

<210> 280
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 280

His Leu Trp Gly His Ala Leu Phe Leu
1 5

<210> 281
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 281

Leu Leu Leu Glu Ser Asp Pro Lys Val Tyr Ser Leu
1 5 10

<210> 282
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 282

Ser Leu Tyr Ala Leu His Val Lys Ala
1 5

<210> 283
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 283

Ala Leu Ser Glu Leu Leu Gln Gln Val
 1 5

<210> 284
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 284

Lys Leu Met Asp Pro Gly Ser Leu Pro Pro Leu
 1 5 10

<210> 285
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 285

Met Leu Leu Asp Thr Val Gln Lys Val
 1 5

<210> 286
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 286

Phe Leu Thr Glu Met Val His Phe Ile
 1 5

<210> 287
 <211> 9
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 287

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 288

Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val
1 5

<210> 289

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 289

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

<210> 290

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 290

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5

- 1 -

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種肽，其包括選自由 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 288 所組成之群組的一個胺基酸序列、以及與 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 288 具有至少 88%同源性的變體序列，以及其中該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；以及包括其之藥學上可接受之鹽，其中該肽不是全長多肽。

【第2項】 如請求項 1 所述之肽，其中該肽有能力與 MHC-I 或 -II 類分子結合，以及其中該肽與 MHC 結合時能够被 CD4 和/或 CD8 T 細胞識別。

【第3項】 如請求項 1 或 2 所述之肽或其變體，其中該胺基酸序列包括 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 288 任何一個序列中的一個連續的胺基酸延伸區。

【第4項】 如請求項 1 至 3 任一項所述之肽或其變體，其中該肽或其變體的總長度為 8 至 100 個胺基酸、較佳為 8 至 30 個胺基酸、更佳為 8 至 16 個胺基酸、最佳為該肽由或基本由根據 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 288 任何的胺基酸序列組成。

【第5項】 如請求項 1 至 4 任一項所述之肽或其變體，其中該肽被修飾和/或包含非肽鍵。

【第6項】 如請求項 1 至 5 任一項所述之肽或其變體，

其中該肽為融合蛋白的一部分，尤其包含 H L A - D R 抗原相關不變鏈（I i）的 N-端胺基酸。

【第 7 項】 一種核酸，編碼根據請求項 1 至 6 任一項所述之肽或其變體，任選地連接到一異源啟動子序列。

【第 8 項】 一種表現載體，其表現根據請求項 7 所述之核酸。

【第 9 項】 一種重組宿主細胞，其包括如請求項 1 至 6 所述之肽、如請求項 7 所述之核酸、如請求項 8 所述之表現載體，其中該宿主細胞較佳為抗原呈現細胞，例如樹突狀細胞。

【第 10 項】 一種如請求項 1 至 6 任一項所述之肽或其變體、如請求項 7 所述之核酸、如請求項 8 所述之表現載體，或如請求項 9 所述之宿主細胞於醫藥上之用途。

【第 11 項】 一種製備如請求項 1 至 6 任一項所述之肽或其變體的方法，該方法包括培養如請求項 9 所述之宿主細胞，該宿主細胞呈現如請求項 1 至 6 所述之肽或表現如請求項 7 所述之核酸或包括如請求項 8 所述之表現載體，以及從該宿主細胞或其培養基中分離出該肽或其變體。

【第 12 項】 一種活體外製備活化的 T 淋巴細胞的方法，該方法包括將 T 細胞與載有抗原的人 I 或 II 類

MHC 分子進行活體外接觸，該等分子在合適的抗原呈現細胞表面或人工構築之模擬抗原呈現細胞表面上表現一段足夠的時間，以抗原特異性方式活化 T 細胞，其中該抗原為如請求項 1 至 4 任一項中之肽。

【第 13 項】 一種根據請求項 12 所述之方法所製成之活化的 T 淋巴細胞，該活化的 T 淋巴細胞選擇性地識別一細胞，該細胞呈現一多肽，該多肽包含請求項 1 至 4 任一項定義的胺基酸序列。

【第 14 項】 一種殺滅患者中標靶細胞的方法，其中該標靶細胞呈現一多肽，該多肽包含請求項 1 至 4 任一項定義的胺基酸序列，該方法包括投予患者有效量之如請求項 13 所定義之活化的 T 細胞。

【第 15 項】 一種抗體，特別是可溶性或膜結合性抗體，其特異性地識別如請求項 1 至 5 任一項之肽或其變體，較佳為與 MHC 分子結合時之如請求項 1 至 5 任一項之肽或變體。

【第 16 項】 一種如請求項 1 至 6 任一項所述之肽、如請求項 7 所述之核酸、如請求項 8 所述之表現載體、如請求項 9 所述之細胞、如請求項 13 所述之活化的 T 淋巴細胞，或如請求項 15 所述之抗體於製造抗癌症藥物之用途。

【第 17 項】 如請求項 1 至 6 任一項所述之肽、如請求

項 7 所述之核酸、如請求項 8 所述之表現載體、如請求項 9 所述之細胞、如請求項 13 所述之活化的 T 淋巴細胞，或如請求項 15 所述之抗體於如請求項 16 所述之用途，其中該癌症選自由肝細胞癌（HCC）、結直腸癌（CRC）、膠質母細胞瘤（GB）、胃癌（GC）、食道癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胰腺癌（PC）、腎細胞癌（RCC）、良性攝護腺增生（BPH）、攝護腺癌（PCA）、卵巢癌（OC）、黑色素瘤、乳腺癌、慢性淋巴細胞白血症（CLL）、梅克爾細胞癌（MCC）、小細胞肺癌（SCLC）、非霍奇金淋巴瘤（NHL）、急性骨髓性白血症（AML）、膽囊癌和膽管癌（GBC、CCC）、膀胱癌（UBC）、子宮癌（UEC）以及過度表現由 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 288 的肽所衍生的蛋白之其他腫瘤所組成的群組。

【第 18 項】 一種藥盒，包括：

（a）一包含一藥物組合物的容器，該藥物組合物含有呈溶液或凍乾形式的如請求項 1 至 6 任一項所述之肽或變體、如請求項 7 所述之核酸、如請求項 8 所述之表現載體、如請求項 10 所述之細胞、如請求項 13 所述之活化的 T 淋巴細胞，或如請求項 15 所述之抗體；

(b) 可選地，一第二容器，該容器含有凍乾粉劑型的稀釋劑或重組溶液；

(c) 可選地，至少一種以上之選自由 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 288 所組成之群組的肽，以及

(d) 可選地，(i) 溶液用途或(ii) 重組和/或凍乾粉劑型用途的說明書。

【第19項】 如請求項 18 所述之藥盒，進一步包括一或多種(iii) 緩衝劑、(iv) 稀釋劑、(v) 過濾液、(vi) 針，或(v) 注射器。

【第20項】 如請求項 18 或 19 所述之藥盒，其中該肽系選自由 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 288 所組成的群組。

【第21項】 一種用於生產個體化抗癌疫苗之方法，該方法包括：

a) 識別個體患者之腫瘤樣本呈現的腫瘤相關肽(TUMAP)；

b) 將 a) 中識別的肽與已經接受過免疫原性預篩查和/或與正常組織相比在腫瘤中過度呈現的存儲庫的肽進行比較；

c) 選擇與該患者中識別的 TUMAP 匹配的存儲庫中的至少一種肽；以及

d) 調製基於步驟 c) 的個體化疫苗。

【第22項】 如請求項 21 所述之方法，其中該 TUMAP 透過以下方法識別：

a 1) 將腫瘤樣本的表現資料與腫瘤樣本組織類型相應的正常組織樣本的表現資料進行比較，以識別在腫瘤樣本中過度表現或異常表現的蛋白質；和

a 2) 將表現資料與腫瘤樣本中 MHC I 類和 / 或 II 類分子結合的 MHC 配體序列相關聯，以識別由腫瘤過度表現或異常表現的蛋白質衍生的 MHC 配體。

【第23項】 如請求項 21 或 22 所述之方法，其中 MHC 配體的序列的識別方法是：洗脫來自腫瘤樣本分離的 MHC 分子的結合肽，並定序洗脫的配體。

【第24項】 如請求項 21 至 23 任一項所述之方法，其中與該腫瘤樣本的組織類型相應的正常組織獲得自同一患者。

【第25項】 如請求項 21 至 24 任一項所述之方法，其中該存儲庫包含的肽用以下步驟進行識別：

a a . 透過高度並行的方法，例如微陣列或基於定序的表現譜，進行全基因組信使核糖核酸 (mRNA) 表現分析，包括識別相較於正常組織在惡性組織中過度表現的基因；

a b . 選擇步驟 a a 中檢測到的選擇性表現或過度表現的基因所編碼的肽，以及

a c . 透過選定的肽確定誘導活體內 T 細胞反應，包括使用健康供體或該患者的人 T 細胞的活體外免疫原性測定；或

b a . 用質譜法識別來自該腫瘤樣本的 H L A 配體；

b b . 透過高度並行的方法，例如微陣列或基於定序的表現譜，進行全基因組信使核糖核酸（m R N A）表現分析，包括識別相較於正常組織在惡性組織中過度表現的基因；

b c . 比較識別的 H L A 配體與該基因表現資料；

b d . 選擇步驟 b c 中檢測到的選擇性表現或過度表現的基因所編碼的肽；

b e . 重新檢測腫瘤組織上來自步驟 b d 的選定 T U M A P，其在健康組織上缺乏或不經常檢測，並確定在 m R N A 水準上過度表現的相關性；以及

b f . 透過選定的肽確定誘導活體內 T 細胞反應，包括使用健康供體或該患者的人 T 細胞的活體外免疫原性測定。

【第 26 項】 如請求項 21 至 25 任一項所述之方法，其中經由含有活體外免疫原性實驗、個體 H L A 結合性患者免疫監測、M H C 多聚體染色、E L I S P O T 分析和 / 或細胞內細胞介素染色的一方法來確定存儲庫包括之肽的免疫原性。

【第27項】 如請求項21至26任一項所述之方法，其中該存儲庫包括選自由SEQ ID No. 1至SEQ ID No. 288所組成的群組的多個肽。

【第28項】 如請求項21至27任一項所述之方法，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該腫瘤樣本具有唯一性的至少一突變，以及選擇與突變相關以包含於疫苗中或用於產生細胞療法的一肽。

【第29項】 如請求項28中所述之方法，其中該至少一突變經由全基因組定序識別。

【第30項】 一種T細胞受體，較佳為重組、可溶性或膜結合T細胞受體，該T細胞受體與HLA配體反應，其中該配體由與選自由SEQ ID No. 1至SEQ ID No. 288所組成的群組的胺基酸序列具有至少75%的同源性。

【第31項】 如請求項30所述之T細胞受體，其中該胺基酸序列與SEQ ID No. 1至SEQ ID No. 288至少88%同源。

【第32項】 如請求項30或31所述之T細胞受體，其中該胺基酸序列由SEQ ID No. 1至SEQ ID No. 288中的任一者組成。

【第33項】 如請求項30至32任一項所述之T細胞

受體，其中該 T 細胞受體作為可溶性分子提供並任選地具有進一步的效應子功能，如免疫刺激域或毒素。

【第 34 項】 一種核酸，編碼如請求項 30 至 33 任一項所述之 TCR，任選地連接到一異源啟動子序列。

【第 35 項】 一種表現載體，表現如請求項 34 所述之核酸。

【第 36 項】 一種重組宿主細胞，包括如請求項 34 所述之核酸或編碼如請求項 15 所述之抗體的核酸或如請求項 35 所述之表現載體，其中該宿主細胞較佳為 T 細胞或 NK 細胞。

【第 37 項】 如請求項 30 至 33 任一項所述之製備 T 細胞受體的方法，該方法包括培養如請求項 36 所述之宿主細胞，以及從該宿主細胞和 / 或其培養基中分離出該 T 細胞受體。

【第 38 項】 一種適體，該適體特異性地識別如請求項 1 至 5 任一項之肽或其變體，較佳為與 MHC 分子結合的如請求項 1 至 5 任一項所述之肽或變體。

【第 39 項】 一種藥物組合物，包括至少一種活性成分，該活性成分選自由如請求項 1 至 6 任一項所述之肽、如請求項 7 所述之核酸、如請求項 8 所述之表現載體、如請求項 9 所述之細胞、如請求項 13 所述之活化的 T 淋巴細胞，或如請求項 15 所述之抗體，或

如請求項 30 至 32 任一項所述之 T 細胞受體，或如請求項 38 所述之適體所組成的群組，以及醫藥上可接受的載體，以及任選地額外的醫藥上可接受的賦形劑和 / 或穩定劑。