



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I782375 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：109145679

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 06 日

(51)Int. Cl.：

C07K7/06 (2006.01)**C07K7/08 (2006.01)****C07K14/725 (2006.01)****C07K16/28 (2006.01)****C12N15/115 (2010.01)****C12N5/0783 (2010.01)****A61K39/00 (2006.01)****A61P35/00 (2006.01)**

(30)優先權：2016/04/06 英國

1605872.9

2016/04/06 美國

62/319,141

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

德國

(72)發明人：馬爾 安德列 MAHR, ANDREA (DE)；文史恩克 湯尼 WEINSCHENK, TONI (DE)；維比 艾尼塔 WIEBE, ANITA (DE)；薛歐 奧利佛 SCHOOR, OLIVER (DE)；弗里切 金斯 FRITSCH, JENS (DE)；辛格 哈皮特 SINGH, HARPREET (US)

(74)代理人：李世章；彭國洋

(56)參考文獻：

WO 2009/036246A2

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：3 共 185 頁

(54)名稱

用於 AML 和其他癌症免疫治療的新型肽和肽組合物

(57)摘要

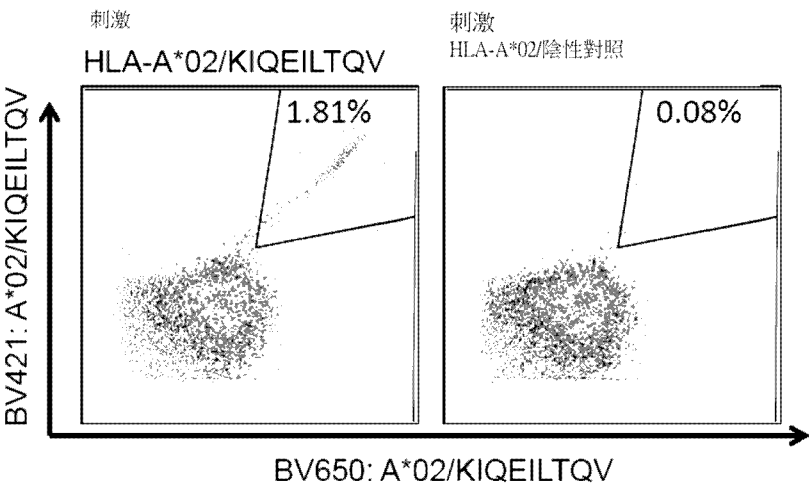
本發明涉及用於免疫治療方法的肽、蛋白質、核酸和細胞。特別是，本發明涉及癌症的免疫療法。本發明還涉及單獨使用或與其他腫瘤相關肽（刺激抗腫瘤免疫反應或體外刺激 T 細胞和轉入患者的疫苗複合物的活性藥物成分）聯合使用的腫瘤相關 T 細胞 (CTL) 肽表位。與主要組織相容性複合體 (MHC) 分子結合的肽或與此同類的肽也可能是抗體、可溶性 T 細胞受體和其他結合分子的靶標。

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

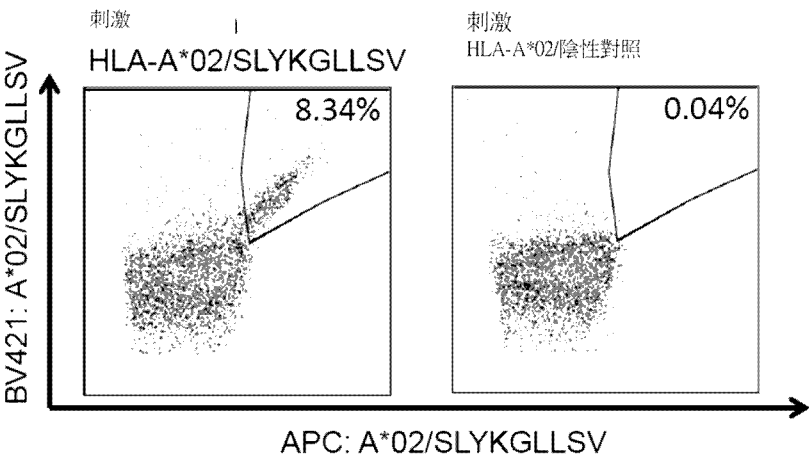
指定代表圖：

圖 3

A SEQ ID NO : 198



B SEQ ID NO : 190





I782375

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於 AML 和其他癌症免疫治療的新型肽和肽組合物

【英文發明名稱】NOVEL PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES FOR
USE IN IMMUNOTHERAPY AGAINST AML AND OTHER CANCERS

【中文】

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

【英文】

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

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

【指定代表圖】第（ 3 ）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於 AML 和其他癌症免疫治療的新型肽和肽組合物

【英文發明名稱】NOVEL PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES FOR USE IN IMMUNOTHERAPY AGAINST AML AND OTHER CANCERS

【技術領域】

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

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

【先前技術】

【0003】 急性骨髓性白血病/急性髓細胞樣白血病（AML）是一種骨髓增生性疾病，其特徵在於骨髓和外周血中未成

熟骨髓細胞數量升高。它是成人中最常見的白血病類型，占西方世界所有白血病約 25%。美國、澳大利亞和西歐發病率最高，在美國和歐洲每 100,000 人中約有 3.8 人發病 (Deschler and Lubbert, 2006; Showel and Levis, 2014)。

【0004】 AML 是一種老年疾病：60 歲以上成人的發病率為每 100,000 人中 15 例 (Showel and Levis, 2014)。新診斷為 AML 患者的中位年齡為 67 歲 (American Cancer Society, 2015)。在大多數國家，男性發生 AML 的風險略高 (Deschler and Lubbert, 2006)。

【0005】 AML 在所有白血病中生存率最低 (Deschler and Lubbert, 2006)。75 歲以上患者的 5 年總體生存率 (OS) 低於 10%，在過去 30 年內沒有改善。25 歲至 39 歲患者的 5 年 OS 從不到 10% 提高到 50% (Showel and Levis, 2014)。男性死亡率高於女性。白人 AML 的死亡率高於黑人 (Deschler and Lubbert, 2006)。

【0006】 當骨髓或血液中存在至少 20% (世界衛生組織 (WHO) 分類) 或至少 30% (法國-美國-英國 (FAB) 分類) 骨髓譜系母細胞時，則診斷為 AML。使用血液或骨髓樣本進行診斷。測試包括全套血細胞計數和鏡下檢查、細胞化學、免疫組織化學、流式細胞術、逆轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 和螢光原位雜交 (FISH) (National Cancer Institute, 2015)。

【0007】 A M L 的症狀通常是非特異性的，包括體重減輕、食欲不振、疲勞、發熱、頭痛和嗜睡。A M L 的危險因素包括吸煙、男性、接觸苯、烷化劑或拓撲異構酶 II 抑制劑化學治療和放射線暴露（National Cancer Institute, 2015）。

【0008】 由於 A M L 是一種非常異質性的疾病，因此，沒有獨特的分類系統。W H O 根據形態學、細胞遺傳學、分子遺傳學和免疫學標誌物對 A M L 進行分類。F A B 系統使用由分化程度和細胞成熟增加確定的形態學對 A M L 進行分類。根據上述標準，W H O 和 F A B （National Cancer Institute, 2015）分類中存在以下 A M L 亞型：

W H O：

分類	描述	AML 百分比
特徵性遺傳異常 AML	伴有 t(8;21)(q22;q22) (AML/ETO) 的 AML	5-12%
	伴有 inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22) (CBF /MYH11) 的 AML	10-12%
	APL：伴有 t(15;17)(q22;q12) (PML/RARA 和變體) 的 AML	5-8%
	11q23 (MLL) 異常 AML	5-6%
FLT3、 NPM1、 CEBPA、 MLLT3/MLL、 DEK/NUP214、	伴有 FLT3 突變的 AML (FLT3/ITD:23%，FLT3 點突變：7%)	20-30%
	伴有 NPM1 突變的 AML	
	伴有 CEBPA 突變的 AML	
	伴有 t(9;11)(p22;q23) (MLLT3/MLL) 的 AML	
	伴有 t(6;9)(p23;q34) (DEK/NUP214) 的 AML	
	伴有 inv(3)(q21q26.2) 或 t(3;3)(q21;q26.2)	

RPN1/EVI1、 RBM15/MKL1 基因異常的 AML	(RPN1/EVI1) 的 AML	
	伴有 t(1;22)(p13;q13) (RBM15/MKL1) 的 AML	
多發性發育不良 AML	從 MDS 演變而來或在 MDS 之後發生的 AML，變體：具有複雜核型的 AML，伴有以下染色體缺失/畸變的 AML：del(7q)、del(5q)、i(17q)7t(17p)、del(13q)、del(11q)、del(12p)/t(12p)、del(9q)、idic(X)(q13)，伴有以下染色體之間易位的 AML：t(11;16)(q23;q13.3)、t(3;21)(q26.2;q22.1)、t(1;3)(p36.3;q21.1)、t(2;11)(p21;q23)、t(5;12)(q33;p12)、t(5;7)(q33;q11.2)、t(5;17)(q33;p13)、t(5;10)(q33;q21)、t(3;5)(q25;q34)	
治療相關的 AML 和 MDS	烷化劑相關的 AML 和 MDS	
	拓撲異構酶 II 抑制劑相關的 AML	
未另類分類的 AML	急性骨髓細胞白血病，微分化	5%
	急性骨髓細胞白血病，未成熟	10%
	急性骨髓細胞白血病，成熟	30-45%
	急性骨髓單核細胞白血病 (AMML)	15-25%
	急性成單核細胞性白血病和急性單核細胞白血病	5-8%
	急性紅細胞性白血病	5-6%
	急性巨核細胞白血病，變異：唐氏綜合症中的短暫性骨髓增生性疾病	3-5%
	急性嗜鹼性白血病	<1%
	急性全身性骨髓瘤伴骨髓纖維化	
	骨髓肉瘤	2-8%
不明譜系的急 性白血病	不確定譜系的急性白血病	
	混合表型急性白血病	
	混合譜系急性白血病	
	混合型急性白血病	

F A B：

分類	名稱	細胞遺傳學
M0	急性成髓細胞白血病，微分化	
M1	急性成髓細胞白血病，未成熟	
M2	急性成髓細胞白血病，成熟	t(8;21)(q22;q22)、 t(6;9)
M3	急性早幼粒細胞白血病 (APL)	t(15;17)
M4	急性骨髓單核細胞白血病 (AMML)	inv(16)(p13q22)、 del(16q)
M4(Eo)	急性骨髓單核細胞白血病伴骨髓嗜酸性粒細胞增多	inv(16)、t(16;16)
M5a 和 M5b	急性成單核細胞性白血病和急性單核細胞白血病	del(11q)、t(9;11)、 t(11;19)
M6a 和 M6b	急性紅細胞性白血病	
M7	急性巨核細胞白血病	t(1;22)
M8	急性嗜鹼性白血病	

【0009】 A M L 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 (H C T) (S h o w e l a n d L e v i s , 2 0 1 4) 。

【0010】 A M L 最常用的化學治療藥物是阿糖胞苷、柔紅黴素、伊達比星和米托蒽醌，其次是克拉屈濱、氟達拉濱和多種其他藥物。阿黴素和地西他濱 (D N A 低甲基化劑) 現在用於治療 M D S / A M L 。 A P L / A M L M 3 的治療包括全反式視黃酸 (A T R A) 和三氧化二砷 (A T O) (N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e , 2 0 1 5) 。

【0011】 A M L 的「標準治療」為「3 + 7」方案：3 天伊達比星或柔紅黴素和 7 天阿糖胞苷，接著幾個相似的療程以達到完全緩解（C R）（E s t e y，2014）。標準治療與臨床試驗之間的決定基於風險分層。歐洲白血病網（E L N）系統區分了以下預後組：

預後組	亞型
「良好」	inv(16) 或 t(16;16)；t(8;21)；NK 和 NPM1+/FLT3 ITD-；NK 和 CEBPA+/+
中等-1	NK 和 NPM1-/FLT3 ITD-；CEBPA+/-
中等-2	細胞遺傳學異常不在「良好」或「不良」組；FLT3 ITD+
「不良」	-5、-7、5q-、abn 3q、17p、11q（除了 9;11）、t(6;9)、複合體；用於分析的中期不足

【0012】 具有中度風險核型的 A M L 病例顯示無核型異常或僅有一個或兩個未被歸類為高危或低危的異常。

【0013】 F L T 3 突變與侵襲型 A M L 和不良預後相關。它們經常與 N P M 1 和 D N M T 3 a（D N A 甲基轉移酶 3 A）突變一起發生。如果 N P M 1（核磷蛋白）突變不與 F L T 3 突變一起發生，則是有利的預後指標。在沒有野生型表達的雙重或純合 C E B P A 突變的情況下，C E P B A（C C A A T-增強子結合蛋白 α / C / E B P α ）突變提供了生存優勢。多種基因中甲基化模式變化是由異檸檬酸脫氫酶（I D H 1 和 I D H 2）和 D N M T 3 A 突變引起的。這些突變與生存差相關。

【0014】 具有良好風險核型的 A M L 病例由 A P L（急性早幼粒細胞白血病）和 C B F（核心結合因數）白血病組成。

APL 病例與骨髓轉錄因數 PML 與視黃酸受體亞基 α (RARA) 融合相關。PML/RARA 易位是有利的預後突變。CBF 白血病患者病例顯示涉及 CBF 亞基的易位。在 $t(8;21)$ 中，CBF α 與 ETO 基因融合。在 $inv(16)$ 中，CBF β 與平滑肌肌球蛋白重鏈融合。CBF 易位是非常良好的預後突變。

【0015】 具有不良風險核型的 AML 病例特徵在於複雜核型，包括染色體畸變，如易位、重排失衡和整個染色體增加/丟失。他們與預後不良相關。

【0016】 MDS/AML 病例從骨髓增生異常綜合徵發展而來，預後差於其他 AML 亞組 (Showell and Levis, 2014)。

【0017】 除上述預後因素外，其他分子標誌物或標記物組合可用於判斷特定細胞遺傳學亞型的預後：

【0018】 TP53 突變是 AML 中最不利的基因改變。NPM1 突變和 FLT3 野生型與 IDH1 或 IDH2 突變一起發生被認為是有利的。不利因素包括 MLL 基因部分串聯複製、TET2 基因突變、FLT3 ITD + 伴有 DNMT3a 和 CEBPA 突變、FLT3 ITD - 伴有 ASXL1 或 PHF6 突變，以及 CD25 表達（幹細胞樣「簽名」和較差的結果）。CKIT 突變的存在將有利的 $inv(16)$ 或 $t(8;21)$ 患者的預後轉化為更趨於中等的範圍。SPARC 在具有不利基因表達簽名的 NK（正常染色體核型）患者中上調，在有利 NPM1 突變時下調。miR-155 過度表達預示 NK AML 的不良

預後。當差異甲基化區域（DMR）被發現與幾個基因（FLT3 突變、NPM1 突變）相關時，則有預後意義。在這種情況下，較低的表達與更好的預後相關（Estey, 2014）。

【0019】 治療後資訊 / 關於最小殘留病灶（MRD）的資訊應納入以下治療決定。這些包括對誘導治療的反應、融合轉錄物 PCR、突變基因和過度表達基因以檢測 MRD，以及多參數流式細胞術以觀察表面抗原的異常表達。

【0020】 下表結合了 AML 預後組和治療建議：

預後組	亞型	誘導	緩解後
「良好」	inv(16) 或 t(16;16)； t(8;21)；NK 和 NPM1+/FLT3 ITD-； NK 和 CEBPA+/+	3+7；如果年齡 < 60-65，則考慮 FLAG-ida	ara-C（6 劑 x 2 療程），可能之前有 1 療程的 FLAG-ida
中等-1/Int-1	NK 和 NPM1-/FLT3 ITD-；CEBPA+/-	3+7；考慮 (a) FLAG-ida 如果年齡 < 60-65，或考慮 (b) 臨床試驗	如果風險 NRM < 20-25%，則考慮來自匹配同胞供體 (MSD) 的 HCT；如果不是 HCT 候選 FLAG-ida，則考慮 ara-C 或臨床試驗
中等-2/Int-2	細胞遺傳學異常不在「良好」或「不良」組；FLT3 ITD+	3+7；考慮 (a) FLAG-ida 如果年齡 < 60-65，或考慮 (b) 臨床試驗；化學治療與 FLT3 抑制劑（如：quizartinib、crenolanib）聯合使用	如果風險 NRM < 30%，則考慮來自 MSD 或 URD 的 HCT；如果 FLT3+/FLT3 ITD+，則在 HCT 後考慮 FLT3 抑制劑

		的臨床試驗	
「不良」	-5、-7、5q-、abn 3q、17p、11q（除了 9;11）、t(6;9)、複合體；用於分析的中期不足	臨床試驗	如果風險 NRM < 40%，則考慮來自 MSD 或 URD 的 HCT；考慮 HCT 後試驗；如果不進行 HCT：候選臨床試驗

N R M：H C T 後非復發死亡率

【0021】 預後組良好的、中等 1 和 可能中等 2 的治療方案包括「標準治療」「3 + 7」，即，柔紅黴素和阿糖胞苷或伊達比星和阿糖胞苷組合，或給予 F L A G - i d a，即，氟達拉濱、阿糖胞苷、G - C S F 和伊達比星的組合。第三種方案是吉妥珠單抗奧佐黴素（G O），這是抗 C D 3 3 單株抗體和細胞毒性劑卡替卡星的共軛物。由於 C D 3 3 在 > 9 0 % 的 A M L 患者中表達，所以 G O 與 3 + 7 或 F L A G - i d a 聯合可能緩解和生存時間更長。達沙替尼與 3 + 7 聯合，然後與大劑量阿糖胞苷聯合應用於 i n v (1 6) 和 t (8 ; 2 1) A M L 有 C K I T 突變的患者中（E s t e y，2 0 1 4）。

【0022】 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（H M A），如阿扎胞苷或地西他濱、C P X - 3 5 1（柔紅黴素和阿糖胞苷以 1 : 5「最優」摩爾比製成的脂質體製劑）以及 v o l a s e r t i b（一種馬球樣激酶抑制劑）。V o l a s e r t i b 與 L D A C（低劑量阿糖胞苷）聯合給藥。幾種不同的 F L T 3 抑制劑可在 F L T 3 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 (內部串聯重複)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 + calechiamicin、SGN-CD33a、抗CD33 + 鋼-225)、雙特異性抗體(識別CD33 + CD3 (AMG 330)或CD33 + CD16)和嵌合抗原受體(CAR)靶向作用CD33 (Estey, 2014)。

【0023】 如果有可能,AML患者可進行同種異體造血細胞移植(HCT)。如果預期復發風險降低大於HCT相關併發症的風險,則應執行CR(完全緩解)1的HCT。HCT也可以在CR2或活動性疾病時進行,因為一些獲得CR1未接受HCT後復發的患者仍然可以治癒。被認為不適合清髓性(MA)強度HCT的患者(患者>70-75歲,體弱的年輕患者)可進行低強度的HCT(RIC-HCT)。可能的供體是MUD(匹配的非血緣關係供體)、單倍體供體或來自超過MSD數量的臍帶細胞(匹配的同胞供體)。三分之一的患者有HLA匹配的同胞,約50%有潛在的匹配非血緣關係供體(MUD) (Estey, 2014)。

【0024】 考慮到治療癌症相關的嚴重副作用和費用,通常有必要確定可用於治療癌症的因子,尤其是AML。通常也有必要確定代表癌症生物標誌物的因子,尤其是AML,從而更好地診斷癌症、評估預後和預測治療成功性。

【0025】 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。

【0026】 腫瘤相關抗原（TAA）的目前分類主要包括以下幾組：

a) 癌-睪丸抗原：T 細胞能夠識別的最先確認的 TAA 屬於這一類抗原，由於其成員表達于組織學相異的人腫瘤中、正常組織中、僅在睪丸的精母細胞/精原細胞中、偶爾在胎盤中，因此，它最初被稱為癌-睪丸（CT）抗原。由於睪丸細胞不表達 HLA I 類和 II 類分子，所以，在正常組織中，這些抗原不能被 T 細胞識別，因此在免疫學上可考慮為具有腫瘤特異性。CT 抗原大家熟知的例子是 MAGE 家族成員和 NY-ESO-1。

b) 分化抗原：腫瘤和正常組織（腫瘤源自該組織）都含有 TAA。大多數已知的分化抗原發現於黑色素瘤和正常黑色素細胞中。許多此類黑色素細胞譜系相關蛋白參與黑色素的生物合成，因此這些蛋白不具有腫瘤特異性，但是仍然被廣泛用於癌症的免疫治療。例子包括，但不僅限於，黑色素瘤的酪氨酸酶和 Melan-A/MART-1 或攝護腺癌的 PSA。

c) 過量表達的 TAA：在組織學相異的腫瘤中以及許多正常組織中都檢測到了基因編碼被廣泛表達的 TAA，一般表達水準較低。有可能許多由正常組織加工和潛在呈現的表位低於 T 細胞識別的閾值水準，而它們在腫瘤細胞中的過

量表達能夠透過打破先前確立的耐受性而引發抗癌反應。這類 T A A 的典型例子為 H e r - 2 / n e u 、生存素、端粒酶或 W T 1 。

d) 腫瘤特異性抗原：這些獨特的 T A A 產生于正常基因（如 β -c a t e n i n 、C D K 4 等）的突變。這些分子變化中有一些與致瘤性轉化和 / 或進展相關。腫瘤特異性抗原一般可在不對正常組織帶來自體免疫反應風險的情況下誘導很強的免疫反應。另一方面，這些 T A A 在多數情況下只與其上確認了有 T A A 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 T A A 。在含有腫瘤特定（相關）同種型蛋白的情況下，如果肽源自腫瘤（相關）外顯子也可能出現肽腫瘤特異性（或相關性）。

e) 由異常翻譯後修飾產生的 T A A ：此類 T A A 可能由腫瘤中既不具有特異性也不過量表達的蛋白產生，但其仍然具有腫瘤相關性（該相關性由主要對腫瘤具有活性的翻譯後加工所致）。此類 T A A 產生於變糖基化模式的改變，導致腫瘤產生針對 M U C 1 的新型表位或在降解過程中導致諸如蛋白拼接的事件，這可能具有也可能不具有腫瘤特異性。

f) 腫瘤病毒蛋白：這些 T T A 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 1 6 型病毒蛋白、E 6 和 E 7 ，它們在宮頸癌中表達。

【0027】 基於 T 細胞的免疫治療靶向作用于主要組織相容性複合體 (MHC) 分子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達，並且與同源未變的細胞相比，其表達通常上調。

【0028】 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。

【0029】 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 類分子主要發現于專業抗原呈現細胞 (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。

【0030】 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。

【0031】 CD4 陽性輔助 T 細胞在誘導和維持 CD8 陽性細胞毒性 T 細胞的有效反應中發揮重要作用。腫瘤相關抗原 (TAA) 衍生的 CD4 陽性 T 細胞表位的識別對開發能引發抗腫瘤免疫反應的藥物產品可能非常重要 (Gnjatic et al., 2003)。在腫瘤部位，T 輔助細胞維持著對細胞毒性 T 細胞 (CTL) 友好的細胞因子環境 (Mortara et al., 2006) 並吸引效應細胞，如 CTL、天然殺傷 (NK) 細胞、巨噬細胞和粒細胞 (Hwang et al., 2007)。

【0032】 在沒有炎症的情況下，MHC II 類分子的表達主要局限於免疫系統細胞，尤其是專業抗原呈現細胞 (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 類分子的表達 (Dengjel et al., 2006)。

【0033】 本發明的拉長 (較長) 肽可作為 MHC-II 類活性表位。

【0034】 MHC-II 類表位活化的輔助 T 細胞在編排抗腫瘤免疫的 CTL 效應子功能中發揮著重要作用。觸發 TH1 細胞反應的輔助 T 細胞表位支援 CD8 陽性殺傷 T 細胞的效應子功能，其中包括直接作用於腫瘤細胞的細胞毒性功能 (該類腫瘤細胞表面顯示有腫瘤相關肽/MHC 複合體)。這樣，腫瘤相關 T 輔助細胞表位單獨使用或與其他腫瘤相關肽結合使用可作為刺激抗腫瘤免疫反應的疫苗化合物的活性藥物成分。

【0035】 哺乳動物（如小鼠）模型顯示，即使沒有 CD8 陽性 T 淋巴細胞，CD4 陽性 T 細胞也能透過分泌干擾素- γ (IFN γ) 抑制血管生成而足以抑制腫瘤的表現 (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999)。沒有 CD4 T 細胞作為直接抗腫瘤效應因子的證據 (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014)。

【0036】 由於 HLA II 類分子的組成性表達通常僅限於免疫細胞，因此，直接從原發腫瘤中分離 II 類肽之前被認為是不可能的事。然而，Dengjel 等人成功地在腫瘤中直接識別了多個 MHC II 類表位 (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1)。

【0037】 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。

【0038】 對於 MHC I 類肽觸發（引發）細胞免疫反應的肽，它也必須與 MHC 分子結合。這一過程依賴於 MHC 分子的等位基因以及肽氨基酸序列的特異性多態性。MHC-I 類-結合肽的長度通常為 8-12 個氨基酸殘基，並且在其與 MHC 分子相應結合溝槽相互作用的序列中通常包含兩個保守殘基（「錨」）。這樣，每個 MHC 的等位基因都有「結合基序」，從而確定哪些肽能與結合溝槽特異性結合。

【0039】 在 M H C - I 類依賴性免疫反應中，肽不僅能與腫瘤細胞表達的某些 M H C - 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（T C R）識別。

【0040】 對於被 T 淋巴細胞識別為腫瘤特異性抗原或相關性抗原以及用於治療的蛋白質，必須具備特殊的條件。該抗原應主要由腫瘤細胞表達，而不由正常健康組織表達，或表達數量相對較少。在一個優選的實施方案中，與正常健康組織相比，所述肽應在腫瘤細胞中過度呈現。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週期控制或凋亡抑制中的其功能而發生的正常細胞向腫瘤細胞轉化的蛋白。另外，這些直接導致轉化事件的蛋白的下游靶標可能會被上調，因此可能與腫瘤間接相關。這些間接腫瘤相關抗原也可能是預防接種方法的靶標（S i n g h - J a s u j a e t a l . , 2 0 0 4）。至關重要的是，表位存在於抗原氨基酸序列中，以確保這種來自腫瘤相關抗原的肽（「免疫原性肽」）可導致體外或體內 T 細胞反應。

【0041】 基本上，任何能與 M H C 分子結合的肽都可能充當一個 T 細胞表位。誘導體外或體內 T 細胞反應的前提是存在具有相應 T C R 的 T 細胞並且不存在對該特定表位的免疫耐受性。

【0042】 因此，T A A 是基於 T 細胞療法（包括但不限於腫瘤疫苗）研發的起點。識別和表徵 T A A 的方法通常基

於對患者或健康受試者 T 細胞的使用情況，或基於腫瘤與正常組織肽之間差別轉錄特性或差別表達模式的產生。然而，對腫瘤組織或人腫瘤細胞株中過量表達或選擇性表達的基因的識別並不提供在免疫療法中使用這些基因所轉錄抗原的準確資訊。這是因為，有著相應 T C R 的 T 細胞必須要存在而且對這個特定表位的免疫耐受性必須不存在或為最低水準，因此，這些抗原的表位只有一部分適合這種應用。因此，在本發明的一非常優選的實施例中，只選擇那些針對可發現功能性和/或增殖性 T 細胞情況的過量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選殖地擴展並能夠執行效應子功能（「效應子 T 細胞」）的 T 細胞。

【0043】 在透過根據本發明的特定 T C R（例如可溶性 T C R）和抗體或其他結合分子（支架）靶向作用於肽-M H C 的情況下，潛在肽的免疫原性是次要的。在這些情況下，呈現是決定因素。

【發明內容】

【0044】 在本發明的第一方面，本發明涉及一種肽，包含選自包括 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 1 8 8 的組的一個氨基酸序列、或該序列的與 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 1 8 8 具有至少 7 7 % ，優選至少 8 8 % 同源（優選至少 7 7 % 或至少 8 8 % 相同）的一種變體序列（其中所

述變體與 MHC 結合和 / 或誘導 T 細胞與所述肽發生交叉反應），或其藥用鹽（其中所述肽不是潛在全長多肽）。

【0045】 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:188 的組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 具有至少 77%、優選至少 88% 同源性（優選為至少 77% 或至少 88% 相同）的一種變體，其中所述肽或其變體的總長度為 8 至 100 個、優選為 8 至 30 個、最優選為 8 至 14 個氨基酸。

【0046】 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 3 中的肽是可與本發明其他肽組合使用的其他肽。表 4 中的肽還可用於診斷和 / 或治療各種其他惡性疾病，這些疾病涉及過量表達或過度呈現各潛在多肽。

表 1：本發明中的肽。J = 磷酸絲氨酸

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
1	LLDSAVYYL	2769	GNA15
2	VLLKAVAQA	3978	LIG1
3	ALYDKTKRIFL	1791	DNTT
4	FLPDAFVTM	1791	DNTT
5	FLYYEDLVSC	1791	DNTT
6	GLAEVLLAA	4261	CIITA
7	LLWGDIMEL	79009	DDX50
8	LLWPGAALLV	7462	LAT2

9	SLLAYLEQA	57617	VPS18
10	VILDPVHSV	653659,92703	TMEM183B,TMEM183A
11	ILTQIDHIL	26574	AATF
12	ALIESNTAL	255631	COL24A1
13	ALVPGVTQV	64745	METT17
14	ALWWGTITL	56479	KCNQ5
15	FIDEEVEDMYL	51244	CCDC174
16	FLDTQAPSL	116931	MED12L
17	FLLGLSEQL	389119	FAM212A
18	GIIEENWQL	221143	N6AMT2
19	GIVEYLSLV	5557	PRIM1
20	GLDAFLLEL	57674	RNF213
21	GLFHGTLL	5291	PIK3CB
22	GLQLDTAFV	116115	ZNF526
23	GLLQPPVRIV	55749	CCAR1
24	GLVELLNRV	10636	RGS14
25	GVEGSLIVEKI	3329	HSPD1
26	NAGVEGSLIVEKI	3329	HSPD1
27	KANPALYVL	10594	PRPF8
28	LLDQMETPL	1511	CTSG
29	RLGPSVVGL	22984	PDCD11
30	SIISDSSAL	672	BRCA1
31	SLFVFIPMV	78992	YIPF2
32	SLSDRSWHL	29970	SCHIP1
33	TIMNQEKLAKL	643412,652963,689	BTF3P16,BTF3P12,BTF3
34	TLSPWSFLI	79465	ULBP3
35	VLFEHAVGYAL	10528	NOP56
36	VLGPSPSSV	57597	BAHCC1
37	VVAPAPVVEAV	3609	ILF3
38	AAIASTPTL	79612	NAA16
39	AIFAGTMQL	55144	LRRC8D
40	ALAAGGYDVEKN	3009	HIST1H1B
41	ALFILPFVSV	10721	POLQ
42	ALTTYTIEV	54549	SDK2
43	AMLDFVSSL	55732	C1orf112
44	FAVDNVGNRTL	55105	GPATCH2
45	FLFTDVLLM	84904	ARHGEF39
46	GLDQYLQEV	79825	CCDC48
47	GLIIPNVQL	79733	E2F8
48	IAIEALTQL	200424	TET3
49	IIDDNHAIV	345645,5700	PSMC1P4,PSMC1
50	IIWATSLLL	55728	N4BP2
51	SLLSSSLNV	55728	N4BP2
52	IVDPVDSTL	5591	PRKDC
53	KAFLGELTL	257218	SHPRH
54	KLPEFLVQL	203430	ZCCHC5

55	KTLDLINKL	57650	KIAA1524
56	LANPTTSAL	8295	TRRAP
57	LLDFGSLSNLQV	100505503,402057,6218	RPS17L,RPS17P16,RPS17
58	LLLATLQEA	790955	C11orf83
59	LSVPEGAIVSL	28672	TRAV12-3
60	NLLNVLEYL	167127	UGT3A2
61	FLLPGVLLSEA	167127	UGT3A2
62	RLLFNLSEV	253714	MMS22L
63	RLNDTIQLL	29128	UHRF1
64	SLANIKIWV	79895	ATP8B4
65	SLEEQLSALTL	8458	TTF2
66	SLKNEVGGLV	121278	TPH2
67	SLQDRVIAL	145508	CEP128
68	TGITTPVASV	23269	MGA
69	TIIGLVRVI	4998	ORC1
70	TLTDSNAQL	64105	CENPK
71	TLTSSLATV	79571	GCC1
72	VAFPSGDASSL	23312	DMXL2
73	VAIPDVDPL	777	CACNA1E
74	VANPVLVYL	11251	PTGDR2
75	VLAPLGFTL	116150,729148	NUS1,NUS1P1
76	VLLJPVEL	64682	ANAPC1
77	VLNMKPPEI	10592	SMC2
78	VLSEVECHL	261734	NPHP4
79	YLMDPDTFTF	9582	APOBEC3B
80	YLTEALQSI	5427	POLE2
81	YVTEELPQL	2098	ESD
82	LLPDNFIAA	2098	ESD
83	GLGAGVAEAV	6576	SLC25A1
84	GLLGSVLTl	8204	NRIP1
85	GLVPFGLYL	65250	C5orf42
86	HLLGDPMANV	10897	YIF1A
87	ILKPFGNSI	3930	LBR
88	LALNFGSTL	201266	SLC39A11
89	LLESPVDGWQV	54892	NCAPG2
90	LLLDTVTSI	4130	MAP1A
91	RLAHYIDRV	84823	LMNB2
92	RLWDIQHQL	151790	WDR49
93	SLINDVLAE	340554	ZC3H12B
94	SLLEFAQYL	2175	FANCA
95	SVAEINVLI	221527	ZBTB12
96	TLLASYVFL	201305	SPNS3
97	TIMTGVIGV	201305	SPNS3
98	TQFGFLMEV	84674	CARD6
99	YLAPFSLSNY	79968	WDR76
100	AAPAVLGEVDTSL V	4353	MPO

101	AINKDPEAPIFQV	2108	ETFA
102	ALAQGAERV	23630	KCNE1L
103	ALGDFGIRL	114548	NLRP3
104	ALIPETTTTL	100529251,51192	CKLF-CMTM1,CKLF
105	GVFALVTAV	100529251,51192	CKLF-CMTM1,CKLF
106	ALLEELERSTL	9404	LPXN
107	ALLGMLPLL	8698	S1PR4
108	ELEMNSDLKAQL	100128060,6201	RPS7P10,RPS7
109	GLLAVPLLAA	4232	MEST
110	GLTHTAVVPLDLV	5250	SLC25A3
111	GVEPAADGKGVVV V	6158	RPL28
112	ILRDALNQA	6238	RRBP1
113	NLQSEVEGV	8673	VAMP8
114	RLAQEAAQV	114822	RHPN1
115	SLPDLTTPL	55904	MLL5
116	TILEILPEL	1462	VCAN
117	TILPTILFL	54497	HEATR5B
118	TLLTVLTQA	57508	INTS2
119	TLTDELAAL	51170	HSD17B11
120	VIQDLVVSV	23556	PIGN
121	VLQAGQYGV	1786	DNMT1
122	VLYLEEVLL	9392	TGFBRAP1
123	YTVKINPTL	219972	MPEG1
124	GLPELVIQL	23279	NUP160
125	GLFGYLVFL	10312	TCIRG1
126	GLLPQQIQAV	25777	SUN2
127	KIISALPQL	152579	SCFD2
128	NLSTKTEAV	140890	SREK1
129	RMAVLNEQV	4678	NASP
130	GVLGNALEGV	4678	NASP
131	SLFSGSLEPV	6733	SRPK2
132	SLYPVLNFL	94005	PIGS
133	TVIGTLLFL	84876	ORAI1
134	AAGAGLPESV	9761	MLEC
135	GIIDRIFQA	6894	TARBP1
136	GLSSIETLL	1602	DACH1
137	ILAPLAWDL	11270	NRM
138	ILSDNLRQV	5987	TRIM27
139	NLIIFSPSV	1650	DDOST
140	YIPDFLTLL	64860	ARMCX5
141	GLLPPLRIPELL	79171	RBM42
142	GLSDGYGFTT	3185	HNRNPF
143	YLLPHILVY	545	ATR
144	GLFMGLVLV	56255	TMX4
145	VLLPLIFTI	146722	CD300LF
146	ALDTRVVEL	6320	CLEC11A

147	FALPILNAL	51202	DDX47
148	FLYFEDHGL	55255	WDR41
149	GLAEILVLV	9903	KLHL21
150	GLFGVLNEI	8086	AAAS
151	GLLPFPEVTL	25909,285116	AHCTF1,AHCTF1P1
152	GLSNHIAAL	29028	ATAD2
153	GLYTGQLAL	706	TSPO
154	IIADNIIFL	6742	SSBP1
155	ILDLIQVfV	100526783,10239,1176,348110	C15orf38-AP3S2,AP3S2,AP3S1,C15orf38
156	ILMPELASL	5330	PLCB2
157	ILTETQQGL	26057	ANKRD17
158	LLGGTALA	1991	ELANE
159	LLPLAPAAA	84519	ACRBP
160	RLVPFLVFV	3954	LETM1
161	SLIGIAIAL	9056	SLC7A7
162	SLLDFLTFA	23317	DNAJC13
163	SLMIDLIEV	57488	ESYT2
164	SLNPQEDVEF	84365	MKI67IP
165	SLVDRVAAA	4883	NPR3
166	VLFPNLQL	1378,1379	CR1,CR1L
167	VLLDVALGL	9091	PIGQ
168	VLLFETALL	3326,3327	HSP90AB1,HSP90AB3P
169	VLQDPIWLL	5187,8864	PER1,PER2

表 2：本發明中的其他肽，之前與癌症無已知的關聯。J = 磷酸絲氨酸

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
170	IVTEVAVGV	58155	PTBP2
171	KLLKQVDFL	55272	IMP3
172	KLLWGDIMEL	79009	DDX50
173	KMQETLVGL	8379	MAD1L1
174	NLTENLQYV	55344	PLCXD1
175	KMDJFLDMQL	55728	N4BP2
176	HLWTGEEQL	146850	PIK3R6
177	KITTVIQHV	64946	CENPH
178	KLWPLFVKL	55183	RIF1
179	RLISTLENL	641	BLM
180	ALDQEIIIEV	100505503,402057,442216,6218	RPS17L,RPS17P16,RPS17P5,RPS17
181	KLLNHVTQL	79075	DSCC1
182	SLSEYDQCL	2769	GNA15
183	SVIGVSPAV	8567	MADD
184	RMTDQEAIQDL	4869	NPM1
185	RLIPIIVLL	64005	MYO1G

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
186	IILDEAHNV	8458	TTF2
187	MLPPPPLTA	3978	LIG1
188	RLLDFPTLL	54627	KIAA1383

表 3：用於個性化癌症療法的肽。

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
189	RLFEEVLGV	9816	URB2
190	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
191	ALSVLRLAL	6691	SPINK2
192	GLAALAVHL	2175	FANCA
193	FLLAEDTKV	10592	SMC2
194	LLWGNLPEI	653820,729533	FAM72B,FAM72A
195	FLFVDPELV	146850	PIK3R6
196	ILVDWLQVQV	9133	CCNB2
197	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
198	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3

【0047】 本發明還一般涉及本發明的肽用於治療增殖性疾病，例如，膽管癌、腦癌、乳腺癌、慢性淋巴細胞性白血病、結腸或直腸癌、食管癌、膽囊癌、肝癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、膀胱癌、子宮癌。

【0048】 特別優選的是本發明的肽（單獨或組合），其選自包括 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 組成的組。更優選的是所述肽（單獨或組合）選自包括 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:100 組成的組（見表 1）並且其用於免疫治療 AML、膽管癌、腦癌、乳腺癌、慢性淋巴細胞性白血病、結腸或直腸癌、食管癌、膽囊癌、肝癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、膀胱癌、子宮癌，優選為 AML。

【0049】 如示下面的表 4 所示，其中本發明的許多肽也發現於其他腫瘤中，因此也可用於其他適應症的免疫治療。另請參閱圖 1 和實施例 1。

表 4：本發明的肽及其在其他增殖性疾病（特別是其他癌症疾病）中的特定用途。該表顯示，對於其他腫瘤類型的選定肽，發現他們過量呈現（特定呈現）於 5 % 以上測定的腫瘤樣本，或呈現於 5 % 以上測定的腫瘤樣本且幾何學平均值腫瘤與正常組織的比值大於 3。過度呈現定義為與最高呈現的正常樣本相比在腫瘤樣本上呈現更高。經測試相比過度呈現的正常組織有：脂肪組織、腎上腺、動脈、血細胞、骨髓、腦、中樞神經、結腸、十二指腸、食道、眼、膽囊、心臟、腎、肝、肺、淋巴結、胰腺、甲狀旁腺、外周神經、腹膜、垂體腺、胸膜、直腸、唾液腺、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、甲狀腺、氣管、輸尿管、膀胱、靜脈。

序列 ID 號	序列	其他相關器官/疾病
1	LLDSAVYYL	黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
6	GLAEVLLAA	NHL、子宮癌
7	LLWGDIMEL	NHL
8	LLWPGAALLV	NHL
9	SLLAYLEQA	BRCA
10	VILDPVHSV	SCLC、NHL、BRCA、子宮癌
13	ALVPGVTQV	CLL、NHL、黑色素瘤、子宮癌
14	ALWWGTITL	CLL、NHL
15	FIDEEVEDMYL	NHL、膀胱癌、膽囊癌、膽管癌
20	GLDAFLLEL	NHL、膽囊癌、膽管癌
23	GLLQPPVRIV	HCC
24	GLVELLNRV	NHL
27	KANPALYVL	CLL

序列 ID 號	序列	其他相關器官/疾病
28	LLDQMETPL	黑色素瘤
29	RLGPSVVGL	黑色素瘤
31	SLFVFIPMV	膀胱癌
32	SLSDRSWHL	腦癌
33	TIMNQEKLAKL	CRC、NHL、子宮癌
34	TLSPWSFLI	NSCLC、子宮癌
35	VLFEHAVGYAL	CRC、CLL、NHL、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌
36	VLGPSPSSV	BRCA、黑色素瘤
37	VVAPAPVVEAV	PC
43	AMLDFVSSL	NHL
45	FLFTDVLLM	NHL
49	IIDDNHAIIV	黑色素瘤
52	IVDPVDSTL	黑色素瘤
56	LANPTTSAL	CLL、膽囊癌、膽管癌
75	VLAPLGFTL	BRCA
78	VLSEVECHL	黑色素瘤
79	YLMDPDTFTF	SCLC
80	YLTEALQSI	CLL、NHL
82	LLPDNFIAA	腦癌、HCC、PC、NHL、BRCA、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
83	GLGAGVAEAV	CLL
84	GLLGSVLTI	HCC、NHL、BRCA、膀胱癌、子宮癌
86	HLLGDPMANV	SCLC、OC
90	LLLDTVTSI	腦癌、BRCA
93	SLINDVLAE	CLL
94	SLLEFAQYL	NHL
103	ALGDFGIRL	黑色素瘤、食管癌、膽囊癌、膽管癌
104	ALIPETTTL	NHL、黑色素瘤
105	GVFALVTAV	NHL、BRCA、黑色素瘤、子宮癌
106	ALLEELERSTL	NHL
107	ALLGMLPLL	CLL、NHL
108	ELEMNSDLKAQL	子宮癌
112	ILRDALNQA	RCC、CLL、NHL、黑色素瘤
113	NLQSEVEGV	PC、CLL
114	RLAQEAAQV	RCC、OC、子宮癌
115	SLPDLTTPL	CLL、NHL、BRCA、黑色素瘤
116	TILEILPEL	RCC、黑色素瘤、膽囊癌、膽管癌
117	TILPTILFL	CLL
118	TLLTVLTQA	CLL、NHL
119	TLTDELAAL	膽囊癌、膽管癌
120	VIQDLVSV	黑色素瘤、子宮癌
121	VLQAGQYGV	CLL、NHL、子宮癌

序列 ID 號	序列	其他相關器官/疾病
122	VLYLEEVLL	CLL、NHL、子宮癌
123	YTVKINPTL	膽囊癌、膽管癌
124	GLPELVIQL	HCC、CLL、NHL、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
125	GLFGYLVFL	SCLC、PC
127	KIISALPQL	CLL、NHL、食管癌、OC、膽囊癌、膽管癌
128	NLSTKTEAV	NHL、OC、子宮癌
129	RMAVLNEQV	SCLC、NHL
132	SLYPVLNFL	膀胱癌、子宮癌
133	TVIGTLLFL	NHL
135	GIIDRIFQA	CRC、HCC、BRCA
136	GLSSIETLL	BRCA
137	ILAPLAWDL	CLL、NHL、子宮癌
138	ILSDNLRQV	NSCLC、HCC、CLL、NHL、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌
140	YIPDFLTLL	CLL、黑色素瘤
141	GLLPPLRIPELL	PC、CLL、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
142	GLSDGYGFTT	CRC、PC、CLL、NHL、BRCA、食管癌、OC、膀胱癌
143	YLLPHILVY	RCC、黑色素瘤
144	GLFMGLVLV	NHL、BRCA、黑色素瘤
148	FLYFEDHGL	SCLC、CLL、NHL、黑色素瘤、子宮癌
149	GLAEILVLV	RCC、腦癌、NHL、黑色素瘤
150	GLFGVLNEI	CLL、NHL、子宮癌
151	GLLPFPEVTL	CLL、NHL
152	GLSNHIAAL	PC、NHL
154	IIADNIIFL	SCLC、RCC、CRC、HCC、CLL、NHL、BRCA、黑色素瘤、食管癌、OC、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
155	ILDLIQVFV	RCC、CLL、NHL、黑色素瘤、子宮癌
157	ILTETQQGL	NSCLC、CRC、NHL、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌
160	RLVPFLVFV	CLL
161	SLIGIAIAL	BRCA、食管癌、膽囊癌、膽管癌
162	SLLDFLTFA	NHL
163	SLMIDLIEV	黑色素瘤、OC
166	VLFPLNLQL	CLL
167	VLLDVALGL	RCC、NHL、BRCA、黑色素瘤
168	VLLFETALL	CLL、BRCA、膀胱癌
169	VLQDPIWLL	CLL、NHL
170	IVTEVAVG	RCC、CLL、NHL、黑色素瘤、子宮癌
172	KLLWGDIMEL	膽囊癌、膽管癌

序列 ID 號	序列	其他相關器官/疾病
173	KMQETLVGL	腦癌、PrC、NHL、BRCA、黑色素瘤、食管癌、膽囊癌、膽管癌
174	NLTENLQYV	NHL
183	SVIGVSPAV	腦癌、NHL、BRCA、黑色素瘤
184	RMTDQEAIQDL	NHL、黑色素瘤
185	RLPIHIVLL	SCLC、NHL、膽囊癌、膽管癌
186	IILDEAHNV	CLL、NHL、黑色素瘤、子宮癌
187	MLPPPPLTA	SCLC、RCC、腦癌、CLL、NHL、BRCA、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
188	RLLDFPTLL	SCLC、RCC、CRC、HCC、CLL、NHL、BRCA、OC

N S C L C = 非 小 細 胞 肺 癌 ， S C L C = 小 細 胞 肺 癌 ， R C C = 腎 癌 ， C R C = 結 腸 癌 或 直 腸 癌 ， H C C = 肝 癌 ， P C = 胰 腺 癌 ， P r C = 攝 護 腺 癌 ， B R C A = 乳 腺 癌 ， O C = 卵 巢 癌 ， C L L = 慢 性 淋 巴 細 胞 性 白 血 病 ， N H L = 非 霍 奇 金 淋 巴 瘤 。

【0050】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 37、82、113、125、141、142 和 152 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療胰腺癌。

【0051】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 32、82、90、149、173、183 和 187 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療腦癌。

【0052】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 1、15、20、56、82、103、116、119、123、124、127、141、154、161、172、173、185 和 187 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療膽囊癌和膽管癌。

【0053】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 9、10、35、36、75、82、84、90、105、115、124、135、136、142、144、154、157、161、167、168、173、183、187 和 188 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療乳腺癌。

【0054】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 13、14、27、35、56、80、83、93、107、112、113、115、117、118、121、122、124、127、137、138、140、141、142、148、150、151、154、155、160、166、168、169、170、186、187 和 188 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療慢性淋巴細胞性白血病。

【0055】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 33、35、135、142、154、157 和 188 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療結直腸癌。

【0056】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 1、82、103、127、138、142、154、161、173 和 187 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療食管癌。

【0057】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 23、82、84、124、135、138、154 和 188 中

任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療肝癌。

【0058】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 1、13、28、29、35、36、49、52、78、82、103、104、105、112、115、116、120、124、138、140、143、144、148、149、154、155、157、163、167、170、173、183、184、186 和 187 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療黑色素瘤。

【0059】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 6、7、8、10、13、14、15、20、24、33、35、43、45、80、82、84、94、104、105、106、107、112、115、118、121、122、124、127、128、129、133、137、138、142、144、148、149、150、151、152、154、155、157、162、167、169、170、173、174、183、184、185、186、187 和 188 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療非霍奇金淋巴瘤。

【0060】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 34、138 和 157 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療非小細胞肺癌。

【0061】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 86、114、127、128、142、154、163 和 188 中

任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療卵巢癌。

【0062】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 173 所述的本發明的肽用於治療攝護腺癌。

【0063】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 112、114、116、143、149、154、155、167、170、187 和 188 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療腎癌。

【0064】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 10、79、86、125、129、148、154、185、187 和 188 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療小細胞肺癌。

【0065】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 1、15、31、35、82、84、124、132、138、141、142、154、157、168 和 187 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療膀胱癌。

【0066】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID No. 1、6、10、13、33、34、82、84、105、108、114、120、121、122、124、128、132、137、141、148、150、154、155、170、186 和 187 中任一項所述的本發明的至少一種肽（在一種優選實施方案中聯合）用於治療子宮癌。

【0067】 因此，本發明的另一個方面涉及本發明中肽的用途（優選聯合）用於治療選自 A M L、膽管癌、腦癌、乳腺癌、慢性淋巴細胞性白血病、結腸或直腸癌、食管癌、膽囊癌、肝癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、膀胱癌、子宮癌組中的增殖性疾病。

【0068】 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（M H C）I 或以拉長形式存在的例如長度變化的 - M H C - II 類分子結合的能力。

【0069】 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 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 1 8 8 的一個氨基酸序列組成。

【0070】 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。

【0071】 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 H L A - D R 抗原相關不變鏈（I i）的 N - 端氨基酸融合，或與抗體（例如，樹突狀細胞特定抗體）或抗體的序列融合。

【0072】 本發明進一步涉及一種編碼本發明肽的核酸。本發明進一步涉及的本發明核酸為 D N A、c D N A、P N A、R N A 或前述核酸的組合。

【0073】 本發明進一步涉及一種能表達和 / 或表達本發明核酸的表達載體。

【0074】 本發明進一步涉及本發明的一種肽、本發明的一種核酸或本發明的一種治療疾病的藥用表達載體，特別是用於治療癌症。

【0075】 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。

【0076】 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 細胞的選殖 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。

【0077】 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。

【0078】 本發明進一步涉及含本發明核酸或前述表達載體的一種宿主細胞。本發明進一步涉及本發明的宿主細胞，其為抗原呈現細胞，優選為樹突細胞。

【0079】 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。

【0080】 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達於合適抗原呈現細胞或人工抗原呈遞細胞表面的 I 或 II 類 MHC 分子。

【0081】 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達含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188、優選為含 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID No: 100 所述肽的一個表達載體、或一個變體氨基酸序列組成。

【0082】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的活化的 T 細胞，其中所述 T 細胞有選擇性地識別一種細胞，該細胞表達含一種本發明氨基酸序列的多肽。

【0083】 本發明進一步涉及一種殺傷患者靶細胞的方法，其中患者的靶細胞異常表達含本發明任何氨基酸序列的多肽，該方法包括給予患者按本發明方法製造的有效量 T 細胞。

【0084】 本發明進一步涉及任何所述肽、本發明的核酸、本發明的表達載體、本發明的細胞、本發明的作為藥劑或製造藥劑的活化的 T 淋巴細胞、T 細胞受體或抗體或其他肽 - 和 / 或肽 - MHC 結合分子的用途。所述藥劑優選為具有抗癌活性。

【0085】 優選情況為，所述藥劑為基於可溶性 TCR 或抗體的細胞治療藥物、疫苗或蛋白質。

【0086】 本發明進一步涉及本發明中的用途，其中所述癌細胞為 AML、膽管癌、腦癌、乳腺癌、慢性淋巴細胞性白血病、結腸或直腸癌、食管癌、膽囊癌、肝癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、膀胱癌、子宮癌，優選為 AML 細胞。

【0087】 本發明進一步涉及一種基於本發明肽的生物標誌物，在此成為「靶標」，其可用於診斷癌症，優選 A M L。所述標誌物可以肽本身過度呈現或相應基因過度表達。標誌物也可以用於預測治療成功的可能性，優選為免疫療法，最優選為靶向作用於該生物標誌物識別的相同靶標的免疫療法。例如，抗體或可溶性 T C R 可用於染色腫瘤切片以檢測是否存在相關肽與 M H C 複合。

【0088】 或者，抗體具有進一步的效應子功能，如免疫刺激域或毒素。

【0089】 本發明還涉及這些癌症治療中新靶點的用途。

【圖式簡單說明】

【0090】 圖 1 A 至 1 D 顯示了正常組織（白色柱）和 A M L（黑色柱）中各種肽的過量呈現。圖 1 A）基因符號：G N A 1 5，肽：L L D S A V Y Y L（S E Q I D N O.: 1），從左至右的組織：5 脂肪組織，5 腎上腺，1 5 血管，1 4 大腦，7 乳房，7 食道，2 眼，3 膽囊，1 6 心，1 7 腎，2 0 大腸，2 4 肝，4 9 肺，7 淋巴結，1 2 神經，2 卵巢，8 胰腺，6 甲狀旁腺，1 腹膜，5 垂體腺，7 胎盤，1 胸膜，3 攝護腺，7 唾液腺，5 骨骼肌，1 1 皮膚，4 小腸，1 2 脾，5 胃，5 睪丸，2 胸腺，2 甲狀腺，1 1 氣管，7 輸尿管，8 膀胱，6 子宮，2 4 血細胞，1 0 骨髓，1 7 A M L 樣本。該肽還在 1 / 1 7 膽囊和膽管癌，2 / 1 8 黑素瘤，1 / 2 0 卵巢癌，2 / 1 7 食管癌，4 / 8 5 非小細胞肺癌，1 / 1 5 膀胱癌和 1 / 1 6 子宮癌中檢測出。圖 1 B）

基因符號：DDX50，肽：LLWGDIMEL (SEQ ID NO.: 7)，從左至右的組織：5脂肪組織，5腎上腺，15血管，14大腦，7乳房，7食道，2眼，3膽囊，16心，17腎，20大腸，24肝，49肺，7淋巴結，12神經，2卵巢，8胰腺，6甲狀旁腺，1腹膜，5垂體腺，7胎盤，1胸膜，3攝護腺，7唾液腺，5骨骼肌，11皮膚，4小腸，12脾，5胃，5睪丸，2胸腺，2甲狀腺，11氣管，7輸尿管，8膀胱，6子宮，24血細胞，10骨髓，17AML樣本。該肽還在2/20非霍奇金淋巴瘤中檢測出。圖1C) 基因符號：TMEM183B、TMEM183A，肽：VILDPVHSV (SEQ ID NO.: 10)，從左至右的組織：5脂肪組織，5腎上腺，15血管，14大腦，7乳房，7食道，2眼，3膽囊，16心，17腎，20大腸，24肝，49肺，7淋巴結，12神經，2卵巢，8胰腺，6甲狀旁腺，1腹膜，5垂體腺，7胎盤，1胸膜，3攝護腺，7唾液腺，5骨骼肌，11皮膚，4小腸，12脾，5胃，5睪丸，2胸腺，2甲狀腺，11氣管，7輸尿管，8膀胱，6子宮，24血細胞，10骨髓，17AML樣本。該肽還在1/18乳腺癌，2/20非霍奇金淋巴瘤，1/20卵巢癌，1/85非小細胞肺癌，1/17小細胞肺癌，1/16子宮癌中檢測出。圖1D) 基因符號：TRIM27，肽：ILSDNLRQV (SEQ ID NO.: 38)，從左至右的樣本：2癌細胞系，1原發性癌症培養物，5正常組織（1腎上腺，1骨髓，1結腸，1腎臟，1胃），34癌組織（2骨髓癌，2乳腺癌，1食管癌，1腎癌，3白血球白

血病，2 肝癌，8 肺癌，5 淋巴結癌，2 骨髓細胞癌，1 卵巢癌，1 攝護腺癌，1 直腸癌，2 皮膚癌，3 膀胱癌）。

【0091】 圖 2 A) 至 2 C) 顯示了本發明的源基因的代表性表達特徵，這些基因在一系列正常組織（白色柱）的 AML 中以及 11 個 AML 症樣本（黑色柱）中高度過度表達或專門表達。從左到右的組織：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 腦垂體、1 直腸、2 唾液腺、2 骨骼肌、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、11 個 AML 樣本。圖 2 A) 基因符號：COL24A1；圖 2 B) 基因符號：SPNS3；圖 2 C) 基因符號：KCNE1L。

【0092】 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。

【實施方式】

【0093】 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。

【0094】 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）的氨基酸殘基的主要組織相容性複合體（MHC）所載的肽中所含的 I 類分子。人 MHC 分子也稱為人類白血球抗原（HLA）。

【0095】 除非另有說明，否則本文使用的所有術語定義如下。

【0096】 術語「T 細胞反應」是指由一種肽在體外或體內誘導的效應子功能的特異性擴散和啟動。對於 MHC I 類限制性細胞毒性 T 細胞，效應子功能可能為溶解肽脈衝的、肽前體脈衝的或天然肽呈現靶細胞、分泌細胞因子，優選為肽誘導的干擾素- γ ，TNF- α 或 IL-2，分泌效應分子，優選為肽誘導的顆粒酶或穿孔素，或脫顆粒。

【0097】 本文所用「肽」這一術語，系指一系列氨基酸殘基，通常透過相鄰氨基酸的 α -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。這些肽的長度優選為 9 個氨基酸，但至短可為 8 個氨基酸長度，至長可為 10、11、12、13 或 14 個氨基酸或更長，如果為 MHC-II 類肽時（本發明肽的拉長變體），至長可為 15、16、17、18、19 或 20 個氨基酸長度或更長。

【0098】 因此，「肽」這一術語應包括一系列氨基酸殘基的鹽，通常透過相鄰氨基酸的 α -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。優選的情況是，鹽為肽的藥用鹽，例如：氯化物或

乙酸（三氟乙酸）鹽。必須注意的是，本發明肽的鹽與其體內狀態的肽基本上不同，因為該不是體內的鹽。

【0099】術語「肽」應也包括「寡肽」。本文使用的術語「寡肽」是指一系列氨基酸殘基，通常透過相鄰氨基酸的 α -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。寡肽的長度對於本發明來說並不十分關鍵，只要在寡肽中保持正確的表位即可。通常，寡肽長度約小於 30 個氨基酸殘基，約長於 15 個氨基酸。

【0100】「多肽」這一術語是指一系列氨基酸殘基，通常透過相鄰氨基酸的 α -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。多肽的長度對於本發明來說並不十分關鍵，只要保持正確的表位即可。與術語肽或寡肽相對，「多肽」這一術語是指包含多於約 30 個氨基酸殘基的分子。

【0101】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/或用於提高特异性抗體或 TCR 抗性的蛋白。

【0102】I 類 T 細胞「表位」要求的是一種結合至 MHC I 類受體上的短肽，從而形成一種三元複合體（MHC I 類 α 鏈、 β -2-微球蛋白和肽），其可以透過 T 細胞負載匹配

T 細胞受體與具有適當親和力的 MHC / 肽複合物結合來識別。結合至 MHC I 類分子的肽的典型長度為 8 - 14 個氨基酸，最典型為 9 個氨基酸長度。

【0103】 在人類中，有三種編碼 MHC I 類分子的不同基因位點（人 MHC 分子也是指定的人類白血球抗原（HLA））：HLA - A、HLA - B 和 HLA - C。HLA - A * 01、HLA - A * 02 和 HLA - B * 07 是可從這些基因位點表達的不同 MHC I 類等位元基因的實例。

表 5：HLA - A * 02 和 HLA - A * 24 和最常見 HLA - DR 血清類型的表達頻率 F。頻率根據 Mori 等人 (Mori et al., 1997) 使用的 Hardy - Weinberg 公式 $F = 1 - (1 - Gf)^2$ 改編，從美國人群範圍內的單體型頻率中推導出。由於連鎖不平衡，某些 HLA - DR 等位基因內的 A * 02 或 A * 24 組合與其預期單一頻率相比，可能是濃縮的或頻率較低。有關詳細資訊，請參閱 Chanock 等人的文獻 (Chanock et al., 2004)。

等位基因	人群	根據等位元基因頻率算得的顯型
A*02	高加索人（北美）	49.1%
A*02	非裔美國人（北美）	34.1%
A*02	亞裔美國人（北美）	43.2%
A*02	拉丁美洲（北美）	48.3%
DR1	高加索人（北美）	19.4%
DR2	高加索人（北美）	28.2%
DR3	高加索人（北美）	20.6%

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

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

【0104】 本發明的肽，優選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。

【0105】 如果本發明的 A*02 肽與結合至另一等位基因例如 A*24 的肽組合，與單獨的 MHC I 類等位基因相比，可治療更高比例的患者群體。雖然在大多數人群中，低於 50% 的患者可由單獨的等位基因來解決問題，但是本發明中一種含 HLA-A*24 和 HLA-A*02 表位的疫苗可以治療任何相關人群中至少 60% 的患者。具體來說，各區域中，以下比例的患者這些等位基因中的至少一個有肯定效果：美國 61%、西歐 62%、中國 75%、韓國 77%、日本 86%（根據 www.allele frequencies.net 計算）。

【0106】 在一項優選的實施方案中，術語「核苷酸序列」系指去氧核苷酸的雜聚物。

【0107】 編碼特定肽、寡肽或多肽的核苷酸序列可為天然核苷酸序列，也可為合成核苷酸序列。一般來說，編碼肽、多肽以及本發明蛋白的 DNA 片段由 cDNA 片段和短寡核苷酸銜接物，或一系列寡核苷酸組成，以提供一種合成基因，該基因能夠在包含源自微生物或病毒操縱子的調節元素的重組轉錄單元中被表達。

【0108】 如本文所用的術語「肽的核苷酸編碼」系指對肽進行核苷酸序列編碼，其中該肽包括與將由用於產生 TCR 的樹突細胞或另一細胞系統所表達該序列的生物系統相容的人工（人造）啟動和停止密碼子。

【0109】 本文提到的核酸序列既包括單鏈核酸也包括雙鏈核酸。因此，除非本文另有所指，否則，例如對於 DNA，

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

【0110】 「編碼區」這一術語是指在基因的天然基因組環境中天然或正常編碼該基因的表達產物的那部分基因，即，體內編碼該基因的天然表達產物的區域。

【0111】 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。

【0112】 「表達產物」這一術語是指多肽或蛋白，它是基因和遺傳碼退化並因而編碼同樣的氨基酸所造成的任何核酸序列編碼同等物的翻譯產物。

【0113】 「片斷」這一術語，當指的是一種編碼序列時，表示包含非完整編碼區的 DNA 的一部分，其表達產物與完整編碼區表達產物基本上具有相同的生物學功能或活性。

【0114】 「DNA 片段」這一術語是指一種 DNA 聚合物，以單獨的片段形式或一種較大 DNA 結構的組分形式存在，它們從至少分離過一次的 DNA 中以基本純淨的形式獲得，即不含污染性內源性材料，並且獲得的數量或濃度能夠使用標準生化方法，例如使用選殖載體，進行識別、操縱和回收該片段及其組分核苷酸序列。此類片段以開放閱讀框架（未被內部未翻譯序列打斷）或內含子（通常呈現於真核基因中）的形式存在。未翻譯 DNA 序列可能存

在於開放閱讀框架的下游，在那裏其不會干預編碼區的操縱或表達。

【0115】 「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。

【0116】 「啟動子」這一術語表示參與 RNA 聚合酶的結合從而啟動轉錄的 DNA 區域。

【0117】 術語「分離」表示一種物質從其原來的環境（例如，如果是天然發生的則是天然環境）中被移走。例如，活體動物中的天然核苷酸或多肽不是分離的，但是，從天然系統中一些或所有共存物質中分離出來的核苷酸或多肽是分離的。此類多核苷酸可能是載體的一部分和/或此類多核苷酸和多肽可能是一種組合物的一部分，並且由於該載體或組合物不是其天然環境的一部分，因此它仍然是分離的。

【0118】 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 庫中分離出的各種選殖株。明確考慮到將起始材料或天然物質純化至少一個數量級，優選為兩或三個數量級，更優選為四或五個數量級。此外，明確涵蓋所述多肽的純度優

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

【0119】 根據本發明公開的核酸和多肽表達產物，以及包含此類核酸和/或多肽的表達載體可能以「濃縮的形式」存在。本文使用的術語「濃縮」是指材料的濃度至少是其自然濃度的大約 2、5、10、100 或 1000 倍，有優勢的是，按重量計為 0.01%，優選為至少 0.1%。也明確考慮到，按重量計約為 0.5%、1%、5%、10% 和 20% 的濃縮製劑。序列、構型、載體、選植株以及包含本發明的其他材料可有優勢地以濃縮或分離的形式存在。「活性片段」這一術語是指產生免疫反應的片段（即具有免疫原性活性），通常是一種肽、多肽或核酸序列的片段，不論是單獨或可選地與合適的佐劑一起或在載體中給予一種動物，比如哺乳動物，例如兔子或小鼠，也包括人；這種免疫反應採用的形式是在接受動物（如：人）體內刺激 T 細胞反應。或者，「活性片段」也可用於誘導體外 T 細胞反應。

【0120】 本文使用的「部分」（portion）、「節段」（segment）、「片段」（fragment）這幾個術語，當與多肽相關地使用時是指殘基的連續序列，比如氨基酸殘基，其序列形成一個較大序列的子集。例如，如果一個多肽以任一種肽鏈內切肽酶（如胰蛋白酶或糜蛋白酶）進行處理，則該處理獲得的寡肽會代表起始多肽的部分、節段或片段。當與多核苷酸相關地使用時，這些術語系指用任何核酸內切酶處理所述多核苷酸產生的產物。

【0121】 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」）與所述序列或請求項的序列（「參考序列」）對準之後將被對比序列與所述序列或請求項的序列進行比較。然後根據下列公式計算等同度百分比：

$$\text{等同度百分比} = 100 [1 - (C/R)]$$

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

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

(ii) 參考序列中每個空隙，以及

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

(iiii) 必須在對準序列的第 1 位置開始對準；

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

【0122】 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。

【0123】 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:188 群組的一個

序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 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。

【0124】 在本發明中，「同源性」一詞系指兩個氨基酸序列之間的同一度（參見上文的等同度百分比，如肽或多肽序列。前文所述的「同源」是透過將理想條件下調整的兩個序列與待比較序列進行比對後確定的。此類序列同源性可透過使用 ClustalW 等演算法創建一個排列而進行計算。也可用使用一般序列分析軟體，更具體地說，是 Vector NTI、GENETYX 或由公共資料庫提供的其他工具。

【0125】 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)。

【0126】 發明人用給定氨基酸序列的「變體」表示，一個或兩個氨基酸殘基等的側鏈透過被另一個天然氨基酸殘基的側鏈或其他側鏈取代而發生改變，這樣，這種肽仍然能夠以含有給定氨基酸序列（由 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 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）其與活化的 T 細胞的 TCR 結合的能力。

【0127】 隨後，這些 T 細胞可與細胞和殺傷細胞發生交叉反應，這些細胞表達多肽（其中包含本發明中定義的同源肽的天然氨基酸序列）。正如科學文獻和資料庫（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:188 提出的氨基酸序列，並且能確定這些變體是否保持與 MHC I 或 II 類分子結合的能力。本發明的變體保持與活化的 T 細胞的 TCR 結合的能力，隨後，這些 T 細胞可與表達一種包含本發明定義的同源肽的天然氨基酸序列的多肽的細胞發生交叉反應並殺死該等細胞。

【0128】 如果無另有說明，那麼本文公開的原始（未修飾）肽可以透過在肽鏈內的不同（可能為選擇性）位點上取代一個或多個殘基而被修飾。優選情況是，這些取代位於氨基酸鏈的末端。此取代可能是保守性的，例如，其中一個氨基酸被具有類似結構和特點的另一個氨基酸所取代，比如其中一個疏水性氨基酸被另一個疏水性氨基酸取代。更保守的取代是具有相同或類似的大小和化學性質的氨基酸間的取代，例如，亮氨酸被異亮氨酸取代。在天然同源蛋白質家族序列變異的研究中，某些氨基酸的取代往往比其他氨基酸更具有耐受性，這些氨基酸往往表現出與原氨基

酸的大小、電荷、極性和疏水性之間的相似性相關，這是確定「保守取代」的基礎。

【0129】 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 (A l a, S e r, T h r, P r o, G l y)；基團 2 — 極性、帶負電荷的殘基及其鹽胺 (A s p, A s n, G l u, G l n)；基團 3 — 極性、帶正電荷的殘基 (H i s, A r g, L y s)；基團 4 — 大脂肪族非極性殘基 (M e t, L e u, I l e, V a l, C y s) 以及基團 5 — 大芳香殘基 (P h e, T y r, T r p)。

【0130】 較不保守的取代可能涉及一個氨基酸被另一個具有類似特點但在大小上有所不同的氨基酸所取代，如：丙氨酸被異亮氨酸殘基取代。高度不保守的取代可能涉及一個酸性氨基酸被另一個具有極性或甚至具有鹼性性質的氨基酸所取代。然而，這種「激進」取代不能認為是無效的而不予考慮，因為化學作用是不完全可預測的，激進的取代可能會帶來其簡單化學原理中無法預見的偶然效果。

【0131】 當然，這種取代可能涉及普通 L-氨基酸之外的其他結構。因此，D-氨基酸可能被本發明的抗原肽中常見的 L-氨基酸取代，也仍在本公開的範圍之內。此外，非標準氨基酸（即，除了常見的天然蛋白原氨基酸）也可以用於取代之目的，以生產根據本發明的免疫原和免疫原性多肽。

【0132】 如果在一個以上位置上的取代發現導致肽的抗原活性基本上等於或大於以下定義值，則對這些取代的組合

進行測試，以確定組合的取代是否產生對肽抗原性的疊加或協同效應。肽內被同時取代的位置最多不能超過 4 個。

【0133】基本上由本文所指氨基酸序列組成的一種肽可能有一個或兩個非錨定氨基酸（見下面錨基序相關內容）被交換，而不存在這種情況，即相比於未修飾的肽，與人類主要組織相容性複合體（MHC）-I 或 II 類分子的能力基本上被改變或受到不利影響。在另一實施方案中，在基本上由本文所述氨基酸序列組成的肽中，一個或兩個氨基酸可與其保守交換夥伴交換（見下文），而不存在這種情況，即相比於未修飾的肽，與人類主要組織相容性複合體（MHC）-I 或 II 類分子的能力基本上被改變或受到不利影響。

【0134】這些基本不與 T 細胞受體互動的氨基酸殘基可透過取代其他幾乎不影響 T 細胞反應並不妨礙與相關 MHC 結合的氨基酸而得到修飾。因此，除了特定限制性條件外，本發明的肽可能為任何包括給定氨基酸序列或部分或其變體的肽（發明人所用的這個術語包括寡肽或多肽）。

表 6：根據 SEQ ID NO：1、9 和 82 的肽的變體和基序

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 1	L	L	D	S	A	V	Y	Y	L
變體									A
									I
									V
		M							
		M							A

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

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 82	L	L	P	D	N	F	I	A	A
變體									V
									I
									L
		M							
		M							V
		M							I
		M							L
		A							
		A							V
		A							I
		A							L
		V							
		V							V
		V							I
		V							L
		T							
		T							V
		T							I
		T							L
		Q							
		Q							V
		Q							I
		Q							L

【0135】 較長（拉長）的肽也可能適合。MHC I 類表位（通常長度為 8 至 11 個氨基酸）可能由肽從較長的肽或包含實際表位的蛋白中加工而產生。兩側有實際表位的殘基優選為在加工過程中幾乎不影響暴露實際表位所需蛋白裂解的殘基。

【0136】 本發明的肽可被拉長多達四個氨基酸，即 1、2、3 或 4 個氨基酸，可按照 4:0 與 0:4 之間的任何組合添加至任意一端。本發明的拉長組合可見表 7。

表 7：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

【0137】 拉伸 / 延長的氨基酸可以是所述蛋白或任何其他氨基酸的原序列肽。拉長可用于增強所述肽的穩定性或溶解性。

【0138】 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。

【0139】 在一項替代實施方案中，肽的一邊或雙邊被拉長 4 個以上的氨基酸，優選最多 30 個氨基酸的總長度。這可形成 MHC-II 類結合肽。結合至 MHC II 類肽可透過本領域中已知的方法進行測試。

【0140】 因此，本發明提出了 MHC I 類表位的肽和變體，其中所述肽或抗體的總長度為 8 至 100 個、優選為 8 至 30 個、最優選為 8 至 14 個氨基酸長度（即 10、11、

12、13、14 個氨基酸，如果為拉長 II 類結合肽時，長度也可為 15、16、17、18、19、20、21 或 22 個氨基酸）。

【0141】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。

【0142】優選情況是，當本發明的肽特異性 T 細胞相比於取代肽受到檢測時，如果取代肽在相對於背景肽溶解度增加達到最大值的一半，則該肽濃度不超過約 1 mM，優選為不超過約 1 μ M，更優選為不超過約 1 nM，再優選為不超過約 100 pM，最優選為不超過約 10 pM。也優選為，取代肽被一個以上的 T 細胞識別，最少為 2 個，更優選為 3 個。

【0143】在本發明的一個特別優選實施方案中，肽系由或基本系由根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 188 所選的氨基酸序列組成。

【0144】基本由「...組成」系指本發明的肽，除了根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 188 中的任一序列或其變體組成外，還含有位於其他 N 和/或 C 端延伸處的氨基酸，而它們不一定能形成作為 MHC 分子表位的肽。

【0145】但這些延伸區域對有效將本發明中的肽引進細胞具有重要作用。在本發明的一實施例中，該肽為融合蛋白的一部分，含來自 NCBI、GenBank 登錄號 X00497 的 HLA-DR 抗原相關不變鏈（p33，以下稱為「Ii」）的 80

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

【0146】 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。

【0147】 在反式肽鍵氨基酸中，肽 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) 並未連接其殘基，但是其肽鍵是反向的。這種逆向反向模擬肽 (*retro-inverso peptidomimetics*) 可透過本領域已知的方法製備，例如：Mezriere 等人在 (Mezriere 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。Mezriere 等人 (Mezriere 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。

【0148】 非肽鍵為 $-\text{CH}_2-\text{NH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 等。美國 4897445 號專利提出了多肽鏈中非肽鍵 ($-\text{CH}_2-\text{NH}$) 的非固相合成法，該方法涉及按標準程序合成的多肽以及透過氨基醛和一種含 NaCNBH_3 的氨基酸相互作用而合成的非肽鍵。

【0149】 含上述序列的肽可與其氨基和/或羧基末端的其他化學基團進行合成，從而提高肽的穩定性、生物利用度、和/或親和力等。例如，苄氧羰基、丹醯基等疏水基團或叔丁氧羰基團可加入肽的氨基末端。同樣，乙醯基或 9-芴甲氧羰基可能位於肽的氨基末端。此外，疏水基團、叔丁氧羰基團或氨基團都可能被加入肽的羧基末端。

【0150】 另外，本發明中的所有肽都可能經合成而改變其空間構型。例如，可能使用這些肽的一個或多個氨基酸殘基的右旋體，通常不是其左旋體。更進一步地，本發明中肽的至少一個氨基酸殘基可被熟知的一個非天然氨基酸殘基取代。諸如此類的改變可能有助於增加本發明肽的穩定性、生物利用度和/或結合作用。

【0151】 同樣，本發明中的肽或變體可在合成肽之前或之後透過特異氨基酸的反應而進行化學修飾。此類修飾的實施例為本領域所熟知，例如，在 R. Lundblad 所著的《Chemical Reagents for Protein Modification》(3rd ed. CRC Press, 2004) (Lundblad, 2004) 中有概述，以參考文獻的方式併入本文。雖然氨基酸的化學修飾方法無限制，但其包括（但不限於）透過以下方法修飾：醯基化、脒基化、賴氨酸吡哆基化、還原烷基化、以 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 三硝基苯基化氨基團、透過將半胱氨酸過甲酸氧化為磺基丙氨酸而對羧基團和巯基進行氨基修飾、形成易變衍生物、與其他巯基化合物形成混合二硫化合物、與馬來醯亞胺反應，與碘乙酸或碘乙醯

胺羧甲基化、在鹼性 pH 值下與氰酸鹽甲氨醯化。在這方面，技術人員參考了《Current Protocols In Protein Science》(Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000)) (Coligan et al., 1995) 中第 15 章所述的在蛋白質化學修飾相關的廣泛方法。

【0152】 簡言之，修飾蛋白質的精氨醯殘基等往往基於於鄰二羰基化合物（如苯甲醯甲醛、2,3 - 丁二酮以及 1,2 - 烯巴二酮）的反應而形成加合物。另一個實施例是丙酮醛與精氨酸殘基的反應。半胱氨酸可在賴氨酸和組氨酸等親核位點不作隨同修飾的情況下就得到修飾。因此，有大量試劑可進行半胱氨酸的修飾。Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) 等公司的網站含有具體試劑的資訊。

【0153】 蛋白質中二硫鍵的選擇性還原也很普遍。二硫鍵可在生物制藥熱處理中形成和氧化。伍德沃德氏試劑 K 可用於修飾特定的谷氨酸殘基。N - (3 - 二甲氨基丙基) - N' - 乙基 - 碳二亞胺可用于形成賴氨酸殘基和谷氨酸殘基的分子內交聯。例如：焦碳酸二乙酯是修飾蛋白質組氨酸殘基的試劑。組氨酸也可使用 4 - 羥基 - 2 - 壬烯醛進行修飾。賴氨酸殘基與其他 α - 氨基團的反應，例如，有利於肽結合到蛋白 / 肽的表面或交聯處。賴氨酸聚是多（乙烯）乙二醇的附著點，也是蛋白質糖基化的主要修飾位點。蛋白質的蛋氨酸殘基可透過碘乙醯胺、溴乙胺、氯胺 T 等被修飾。

【0154】 四硝基甲烷和 N-乙醯基咪唑可用於酪氨酸殘基的修飾。經二酪氨酸形成的交聯可透過過氧化氫/銅離子完成。

【0155】 對色氨酸修飾的最近研究中使用了 N-溴代琥珀醯亞胺、2-羥基-5-硝基苄溴或 3-溴-3-甲基-2-(2-硝基苄基)-3H-吡啶 (BPNS-糞臭素)。

【0156】 當蛋白與戊二醛、聚乙二醇二丙烯酸酯和甲醛的交聯用於配製水凝膠時，治療性蛋白和含聚乙二醇的肽的成功修飾往往可延長迴圈半衰期。針對免疫治療的變態反應原化學修飾往往透過氰酸鉀的氨基甲醯化實現。

【0157】 一種肽或變體，其中肽被修飾或含非肽鍵，優選為本發明的實施例。一般來說，肽和變體（至少含氨基酸殘基之間的肽聯接）可使用 Lukas 等人 (Lukas et al., 1981) 以及此處引用的參考文獻所披露的固相肽合成 Fmoc-聚醯胺模式進行合成。芴甲氧羰基 (Fmoc) 團對 N-氨基提供臨時保護。使用 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 二甲基吡啶中對這種域高度敏感的保護基團進行重複分裂。由於它們的丁基醚（在絲氨酸蘇氨酸和酪氨酸的情況下）、丁基酯（在谷氨酸和天門冬氨酸的情況下）、叔丁氧羰基衍生物（在賴氨酸和組氨酸的情況下）、三苯甲基衍生物（在半胱氨酸的情況下）及 4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺醯基衍生物（在精氨酸的情況下），側鏈功能可能會受到保護。只要穀氨醯胺和天冬醯胺為 C-末端殘基，側鏈氨基功能保護所使用的是由 4,4'-二甲氧基二苯基團。固相支

撐基於聚二甲基丙烯酸胺聚合物，其由三個單體二甲基丙烯酸胺（骨架單體）、雙丙烯酸乙烯二胺（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。所有的氨基酸衍生物均作為其預製對稱酸酐衍生物加入，但是天冬醯胺和穀氨醯胺除外，它們使用被逆轉的 N, N-二環己基碳二亞胺 / 1-羥基苯並三唑介導的耦合程序而加入。所有的耦合和脫保護反應用茚三酮、硝基苯磺酸或 isotin 測試程序監測。合成完成後，用濃度為 95% 含 50% 清道夫混合物的三氟醋酸，從伴隨去除側鏈保護基團的樹脂支承物中裂解肽。常用的清道夫混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水，準確的選擇依據合成肽的氨基酸組成。此外，固相和液相方法結合使用對肽進行合成是可能的（例如，請參閱 (Bruckdorfer et al., 2004) 以及本文引用的參考文獻）

【0158】 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。

【0159】 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）。

【0160】 可以使用薄層色譜法、電泳特別是毛細管電泳、固相萃取（C S P E）、反相高效液相色譜法、酸解後的氨基酸分析、快原子轟擊（F A B）質譜分析以及M A L D I和E S I - Q - T O F質譜分析進行肽分析。

【0161】 為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（P i n h e i r o e t a l . , 2 0 1 5）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（B e n j a m i n i a n d H o c h b e r g , 1 9 9 5）調整多項檢驗（參見實施例 1、圖 1）。

【0162】 對於透過質譜法對 H L A 配體的識別和相對定量，對來自衝擊冷凍組織樣本的 H L A 分子進行純化並對 H L A 相關肽進行分離。分離的肽分開，並透過線上納米-電噴霧-電離（n a n o E S I）液相色譜-譜（L C - M S）實驗進行鑒定。由此產生的肽序列的驗證方法是，將 A M L 樣本（N = 1 7 個 A * 0 2 陽性樣本）中記錄的自然腫瘤相關肽（T U M A P）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 H L A 分子的配體，因此這些結果為來自 1 6 名 A M L 患者的原發癌症組織上確定肽的自然加工和呈現提供了直接證據。

【0163】 發現管道 X P R E S I D E N T ® v 2 . 1（例如，參見 U S 2 0 1 3 - 0 0 9 6 0 1 6，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 H L A 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 L C - M S 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。

【0164】 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。

【0165】 對來自 A M L 組織樣本的 H L A 肽複合物進行純化，並且對 H L A 相關肽使用 L C - M S 進行分離和分析（見實施例）。本申請中包含的所有 T U M A P 使用原發性 A M L 樣本的方法進行鑒定，確認其在原發性 A M L 上的呈現。

【0166】 在多個 A M L 和正常組織上確定的 T U M A P 用無標記 L C - M S 資料的離子計數方法進行量化。該方法假定肽的 L C - M S 信號區域與樣本中其豐度相關。各種 L C - M S 實驗中肽的所有量化信號在集中趨勢基礎上進行正常化，根據每個樣品進行平均，併合併入柱狀圖（被稱為呈現圖）。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。

【0167】 除了過量呈現肽之外，也測試了潛在基因的 m R N A 表達。m R N A 資料通過 R N A 測序分析正常組織

和癌組織獲得（見實施例 2、圖 2）。正常組織資料的額外來源是從 3000 個正常組織樣本中公開發得的 RNA 表達資料的資料庫（Lonsdale, 2013）。獲得自蛋白的肽在癌組織中顯示高表達編碼 mRNA，但是在重要正常組織中非常低或不存在，這些肽作為優選肽納入本發明。

【0168】 本發明提出了有利於治療癌腫/腫瘤，優選為治療過量呈現或只呈現本發明肽的 AML。這些肽由質譜分析法直接顯示出，而由 HLA 分子自然呈現於原發性 AML 樣本中。

【0169】 與正常組織相比，癌症中高度過量表達肽來源的許多源基因/蛋白質（也指定為「全長蛋白」或「潛在蛋白」）- 本發明相關的「正常組織」是健康骨髓和血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 AML 患者的樣本），但不在正常組織中過度呈現（見實施例 1）。

【0170】 HLA 結合肽能夠被免疫系統識別，特別是 T 淋巴細胞。T 細胞可破壞呈現被識別 HLA/肽複合體的細胞（如：呈現衍生肽的 AML 細胞）。

【0171】 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，因而可用于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，也可用于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，本發明的肽可用于在患者中產生免疫反應，從而能夠毀滅腫瘤細胞。患者的免疫反應能夠透過直接給予患者所述肽或前體物質（如，加長肽、蛋白或編碼這些肽的核酸），較理想是與加強免疫原性的製劑相結合，而進行誘導。源自該治療性疫苗的免疫反應預期能夠高度特異性地對抗腫瘤細胞，因為本發明的目標肽在正常組織上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。

【0172】 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 和抗體結合的本發明的肽。本說明書還涉及核酸、載體和用於表達 TCR 的宿主細胞和本說明書的肽；以及使用它們的方法。

【0173】 術語「T細胞受體」（縮寫 TCR）是指一種異二聚體分子，其包含一個 α 多肽鏈（ α 鏈）和一個 β 多肽鏈（ β 鏈），其中所述異二聚體受體能夠結合由 HLA 分子呈現的肽抗原。該術語還包括所謂的 γ/δ TCR。

【0174】 在一個實施方案中，本說明書提供了如本文中所描述的產生 TCR 的方法，該方法包括在適於促進 TCR 表達的條件下培養能夠表達 TCR 的宿主細胞。

【0175】 另一個方面，本說明書涉及一種根據本說明書的方法，其中所述抗原透過與足夠量的含抗原呈現細胞的抗原結合被載入表達於合適抗原呈現細胞或人工抗原呈遞細胞表面的 I 或 II 類 MHC 分子，或該抗原透過四聚化被

載入 I 或 II 類 MHC 四聚體 / I 或 II 類 MHC 複合單體。

【0176】 α/β TCR 的 α 和 β 鏈和 γ/δ TCR 的 γ 和 δ 鏈通常被視為各自有兩個「結構域」，即可變和恒定結構域。可變結構域由可變區 (V) 和連接區 (J) 的組合。可變結構域還可能包括一個前導區 (L)。 β 和 δ 鏈還可能包括一個多樣區 (D)。 α 和 β 恒定結構域還可能包括錨定 α 和 β 鏈至細胞膜的 C 末端跨膜 (TM) 結構域。

【0177】 相對於 γ/δ 的 TCR，如本文所用的術語「TCR γ 可變域」是指無前導區 (L) 的 TCR γ V (TRGV) 區與 TCR γ (TRGJ) 區的組合，術語 TCR γ 恒定結構域是指細胞外 TRGC 區域，或 C-末端截短 TRGC 序列。同樣地，「TCR δ 可變域」是指無前導區 (L) 的 TCR δ V (TRDV) 區與 TCR δ D/J (TRDD/TRDJ) 區的組合，術語「TCR δ 恒定結構域」是指細胞外 TRDC 區域，或 C-末端截短 TRDC 序列。

【0178】 本說明書的 TCR 優選結合至肽 HLA 分子複合體，其具有約 100 μ M 或更小、約 50 μ M 或更小、約 25 μ M 或更小或約 10 μ M 或更小的結合親和力 (KD)。更為優選的情況是具有約 1 μ M 或更小、約 100 nM 或更小、約 50 nM 或更小或約 25 nM 或更小結合親和力的高親和力 TCR。本發明 TCR 優選結合親和力範圍的非限制性示例包括約 1 nM 至約 10 nM；約 10 nM 至約 20 nM；約 20 nM 至約 30 nM；約 30 nM 至約 40 nM；約 40

nM 至約 50 nM；約 50 nM 至約 60 nM；約 60 nM 至約 70 nM；約 70 nM 至約 80 nM；約 80 nM 至約 90 nM；以及約 90 nM 至約 100 nM。

【0179】 與本說明書 TCR 相關，本文使用的「特異性結合」及其語法變體用於表示對 100 μ M 或更小的肽-HLA 分子複合體有結合親和力 (KD) 的 TCR。

【0180】 本說明書的 α/β 異二聚體 TCR 可能具有其恒定結構域之間的引入二硫鍵。這種類型的優選 TCR 包括那些具有一個 TRAC 恒定域序列和 TRBC1 或 TRBC2 恒定域序列的 TCR，除非 TRAC 的蘇氨酸 48 和 TRBC1 或 TRBC2 的絲氨酸 57 被半胱氨酸殘基取代，所述半胱氨酸形成 TRAC 恒定域序列和 TCR 的 TRBC1 或 TRBC2 恒定區序列之間的二硫鍵。

【0181】 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。

【0182】 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。

【0183】 在一個實施方案中，具有在 α 鏈中至少一個突變和/或具有在 β 鏈中至少一個突變的 TCR 與未突變 TCR 相比，已經修改了糖基化。

【0184】 在一個實施方案中，在 TCR α 鏈和/或 TCR β 鏈中包括至少一個突變的 TCR 對肽 HLA 分子複合體有結合親和力和/或結合半衰期，其是包含未突變 TCR α 鏈和/或未突變 TCR β 鏈的 TCR 的結合親和力的至少兩倍。腫瘤特異性 TCR 親和力增強及其開發依賴於存在最佳 TCR 親和力的窗口。這樣窗口的存在是根據觀察結果：HLA-A2 限制性病原體特異性 TCR 與 HLA-A2 限制性腫瘤相關自身抗原特異性 TCR 相比，KD 值通常大約低 10 倍。現已知，儘管腫瘤抗原可能具有免疫原性，但是因為腫瘤來自個體自身的細胞，因此僅突變蛋白質或翻譯加工改變的蛋白將被免疫系統視為外來物質。上調或過度表達（所謂的自體抗原）的抗原不一定誘導針對腫瘤的功能免疫應答：表達對這些抗原具有高度反應性的 TCR 的 T 細胞會在一種稱為中樞耐受的程序中在胸腺內被不利選擇，也就是說只有對自身抗原具有低親和力 TCR 的細胞才仍然存在。因此，本說明書的 TCR 或變體對肽的親和力可透過本領域熟知的方法來增強。

【0185】 本說明書還涉及一種識別和分離本發明 TCR 的一種方法，所述方法包括：用 A2/肽單體從 HLA-A*02 陰性健康供體孵育 PBMC，用四聚體-藻紅蛋白（PE）孵育

P B M C 並透過螢光啟動細胞分選 (F A C S) - C a l i b u r 方法分析分離高親和力 T 細胞。

【0186】 本說明書還涉及一種識別和分離本發明 T C R 的一種方法，所述方法包括：獲得含整個人體 T C R $\alpha\beta$ 基因位點 (1 . 1 a n d 0 . 7 M b) 的轉基因小鼠 (其 T 細胞表達多樣化人類 T C R ，用於補償小鼠 T C R 缺乏) ，用一種肽對小鼠進行免疫處理，用四聚體 - 藻紅蛋白 (P E) 孵育從轉基因小鼠中獲得的 P B M C ，並透過螢光啟動細胞分選 (F A C S) - C a l i b u r 方法分析分離高親和力 T 細胞。

【0187】 一方面，為了獲得表達本說明書 T C R 的 T 細胞，編碼本說明書 T C R - α 和 / 或 T C R - β 鏈的核酸被選殖入表達載體，諸如 γ 反轉錄病毒或慢病毒。重組病毒產生，然後測試功能，如抗原專一性和功能性親合力。然後，最終產品的等分試樣被用於轉導靶 T 細胞群體 (一般純化自患者的 P B M C) ，在輸入患者前展開。

【0188】 另一方面，為了獲得表達本說明書 T C R 的 T 細胞，T C R R N A 透過本領域中已知的技術 (例如，體外轉錄系統) 合成。然後，體外合成的 T C R R N A 透過電穿孔來重新表達腫瘤特異性 T C R - α 和 / 或 T C R - β 鏈被引入獲得自健康供體的初級 C D 8 + T 細胞。

【0189】 為了增加表達，編碼本說明書 T C R 的核酸在操作上可連接到強啟動子，例如逆轉錄病毒長末端重複序列 (L T R) 、巨細胞病毒 (C M V) 、鼠幹細胞病毒 (M S C V) U 3 、磷酸甘油酸激酶 (P G K) 、 β 肌動蛋白、泛素蛋白和

猿猴病毒 40 (SV40)/CD43 複合啟動子、延伸因子 (EF)-1a 和脾臟病灶形成病毒 (SFV) 啟動子。在一優選實施方案中，啟動子與被表達的核酸異源。

【0190】 除了強啟動子外，本說明書的 TCR 表達盒可能含有附加的元素，可提高轉基因表達，包括中樞多聚嘧啶區 (CPPT)，其促進了慢病毒構建體的核易位 (Follenzi et al., 2000)，和土撥鼠肝炎病毒轉錄後調控元素 (WPRE)，其透過提高 RNA 穩定性增加轉基因表達水準 (Zufferey et al., 1999)。

【0191】 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。

【0192】 實現高水準的 TCR 表面表達需要引入 TCR 的 TCR- α 和 TCR- β 鏈高水準轉錄。為了實現它，本說明書的 TCR- α 和 TCR- β 鏈可在單一的載體中被選殖入雙順反子構建體，其已被證明能夠克服這一障礙。使用 TCR- α 和 TCR- β 鏈在之間的病毒核糖體間進入位元點 (IRES) 導致兩鏈的協同表達，因為 TCR- α 和 TCR- β 鏈均由在翻譯過程中分成兩個蛋白質的單一轉錄物產生，從而確保了產生 TCR- α 和 TCR- β 鏈的相等摩爾比。(Schmitt et al. 2009)。

【0193】 編碼本說明書 TCR 的核酸可以是被優化以從宿主細胞增加表達的密碼子。遺傳密碼冗餘讓一些氨基酸被一個以上的密碼子編碼，但某些密碼子沒有其他密碼子「優化」，因為匹配 tRNA 以及其他因子的相對可用性

(Gustafsson et al., 2004)。修改 TCR- α 和 TCR- β 基因序列使得每個氨基酸被用於哺乳動物基因表達的最佳密碼子編碼，以及消除 mRNA 不穩定性基序或隱蔽剪接位元點，已顯示可顯著提高 TCR- α 和 TCR- β 基因表達 (Scholten et al., 2006)。

【0194】 此外，引入的和內源性 TCR 鏈之間的錯配可能會導致獲得特異性，其構成自身免疫的顯著風險。例如，混合 TCR 二聚體的形成可能會減少可用以形成正確配對 TCR 複合體的 CD3 分子數目，因此，可以顯著降低表達所引入 TCR 的細胞的功能性親合力 (Kuball et al., 2007)。

【0195】 為了減少錯配，本說明書引入的 TCR 鏈的 C-末端結構域可以進行修改以促進鏈間親和力，同時降低引入鏈與內源 TCR 配對的能力。這些策略可能包括用鼠配對物取代人類 TCR- α 和 TCR- β C端結構域（鼠化 C 端結構域）；透過引入第二個半胱氨酸殘基到引入 TCR 的 TCR- α 和 TCR- β 鏈產生 C 末端結構域的第二個鏈間二硫鍵（半胱氨酸修飾）；交換 TCR- α 和 TCR- β 鏈 C 端結構域的相互作用殘基（「杵臼結構」）；直接融合 TCR- α 和 TCR- β 鏈可變結構域至 CD3 ζ （CD3 ζ 融合） (Schmitt et al. 2009)。

【0196】 在一實施方案中，宿主細胞被改變結構以表達本說明書的 TCR。在一優選實施方案中，宿主細胞為人 T 細胞或 T 細胞祖細胞。在一些實施方案中，T 細胞或 T 細

胞祖細胞從癌症患者中獲得。在另一些實施方案中，T 細胞或 T 細胞祖細胞從健康供體中獲得。本說明書的宿主細胞相對於待治療的患者可以為同種異體或自體的。在一實施方案中，宿主是被轉化以表達 α/β TCR 的 γ/δ T 細胞。

【0197】 「藥物組合物」是指適合在醫療機構用於人體的組合物。優選地，藥物組合物為無菌狀態，並根據 GMP 指南生產。

【0198】 藥物組合物包括游離形式或以一種藥用鹽形式存在的肽或 TCR 蛋白（也參見上文）。此處使用的「藥用鹽」系指所公開的肽的一種衍生物，其中該肽由制酸或藥劑的城鹽進行改性。例如，用與適合的酸反應的游離城（通常其中的中性藥物有一個中性 $-NH_2$ 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城鹽製劑使用藥用城基進行製備，如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、三甲胺等等。

【0199】 本發明的另一實施方案涉及一種非天然肽，其中所述肽系由或基本系由根據 SEQ ID No:1 至 SEQ ID No:188 的一個氨基酸序列組成，並經合成產生（即，合成）為一種藥用鹽。合成產生肽的方法是本領域公知的。

本發明肽的鹽與其體內狀態的肽基本上不同，因為這些體內產生的肽不是鹽。該肽的非天然鹽形式介導肽的溶解度，特別是包含所述肽的藥物組合物的情況下，例如，本文所公開的肽疫苗。為了向需治療的受試者有效地提供肽，需要肽具有充分、至少基本的溶解度。優選地，鹽為肽的藥用鹽。本發明的這些鹽包括域和域土鹽類，諸如 Hofmeister 系列的鹽，包含陰離子 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 I^- 、 SCN^- 和陽離子 NH_4^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ba^{2+} 。特別地，鹽選自 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 、 NH_4Cl 、 NH_4Br 、 NH_4NO_3 、 NH_4ClO_4 、 NH_4I 、 NH_4SCN 、 Rb_3PO_4 、 Rb_2HPO_4 、 RbH_2PO_4 、 Rb_2SO_4 、 $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 、 Rb_4Cl 、 Rb_4Br 、 Rb_4NO_3 、 Rb_4ClO_4 、 Rb_4I 、 Rb_4SCN 、 K_3PO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2SO_4 、 KCH_3COO 、 KCl 、 KBr 、 KNO_3 、 KClO_4 、 KI 、 KSCN 、 Na_3PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 NaCH_3COO 、 NaCl 、 NaBr 、 NaNO_3 、 NaClO_4 、 NaI 、 NaSCN 、 ZnCl_2 、 Cs_3PO_4 、 Cs_2HPO_4 、 CsH_2PO_4 、 Cs_2SO_4 、 CsCH_3COO 、 CsCl 、 CsBr 、 CsNO_3 、 CsClO_4 、 CsI 、 CsSCN 、 Li_3PO_4 、 Li_2HPO_4 、 LiH_2PO_4 、 Li_2SO_4 、 LiCH_3COO 、 LiCl 、 LiBr 、 LiNO_3 、 LiClO_4 、 LiI 、 LiSCN 、 Cu_2SO_4 、 $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 Mg_2HPO_4 、

$Mg(H_2PO_4)_2$ 、 Mg_2SO_4 、 $Mg(CH_3COO)_2$ 、 $MgCl_2$ 、 $MgBr_2$ 、 $Mg(NO_3)_2$ 、 $Mg(ClO_4)_2$ 、 MgI_2 、 $Mg(SCN)_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $Ca_3(PO_4)_2$ 、 Ca_2HPO_4 、 $Ca(H_2PO_4)_2$ 、 $CaSO_4$ 、 $Ca(CH_3COO)_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $CaBr_2$ 、 $Ca(NO_3)_2$ 、 $Ca(ClO_4)_2$ 、 CaI_2 、 $Ca(SCN)_2$ 、 $Ba_3(PO_4)_2$ 、 Ba_2HPO_4 、 $Ba(H_2PO_4)_2$ 、 $BaSO_4$ 、 $Ba(CH_3COO)_2$ 、 $BaCl_2$ 、 $BaBr_2$ 、 $Ba(NO_3)_2$ 、 $Ba(ClO_4)_2$ 、 BaI_2 和 $Ba(SCN)_2$ 。特別優選為 NH 乙酸、 $MgCl_2$ 、 KH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 KCl 、 $NaCl$ 和 $CaCl_2$ ，例如：氯化物或乙酸鹽（三氟乙酸）鹽。

【0200】 在特別優選的實施方案中，藥物組合物包括乙酸（醋酸鹽），三氟乙酸鹽或鹽酸（氯化物）形式的肽或 TCR 蛋白。

【0201】 本發明中所述的藥劑優選為一種免疫治療藥劑，例如，一種疫苗。該疫苗可直接給到患者的受影響器官，也可 i.d.、i.m.、s.c.、i.p. 和 i.v. 注射方式全身給藥，或體外應用到來自患者或其細胞株的細胞（隨後再將這些細胞注入到患者中），或體外用於從來自患者的免疫細胞的一個細胞亞群（然後再將細胞重新給予患者）。如果核酸體外注入細胞，可能有益於細胞轉染，以共同表達免疫刺激細胞因子（如白細胞介素-2）。肽可完全單獨給藥，也可與免疫刺激佐劑相結合（見下文）、或與免疫刺激細胞因子聯合使用、或以適當的輸送系統給藥（例如脂質體）。該肽也可共軛形成一種合適的載體（如鑰孔蟲戚血

藍蛋白 (KLH) 或甘露) 到合適的載體 (參閱 WO 95/18145 及 (Longenecker et al., 1993))。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。

【0202】 一方面，疫苗包括至少含有 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 中提出的一種肽以及至少另外一種肽，優選為 2 至 50 個、更優選為 2 至 25 個、再優選為 2 至 20 個、最優選為 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18 個肽。肽可能從一個或多個特定 TAA 中衍生，並且可能與 MHC I 類分子結合。

【0203】 另一方面，本發明提出了一種編碼本發明中肽或肽變體的核酸（如多聚核苷酸）。多聚核苷酸可能為，例如，DNA、cDNA、PNA、RNA 或其組合物，它們可為單鏈和/或雙鏈、或多聚核苷酸的原生或穩定形式（如：具有硫代磷酸骨架的多聚核苷酸），並且只要它編碼肽，就可能包含也可能不包含內含子。當然，多聚核苷酸只能編碼加入天然肽鏈並含有天然氨基酸殘基的肽。另一個方面，本發明提出了一種可根據本發明表達多肽的表達載體。

【0204】 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。

【0205】 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。

【0206】 編碼本發明多肽的 DNA 理想修飾方法是使用 Saiki 等人（Saiki et al., 1988）所採用的聚合酶鏈反應方法。此方法可用於將 DNA 引入合適的載體（例如，透過設計合適的酶切位點），也可用於本領域已知的其他有用方法修飾 DNA。如果使用病毒載體，痘病毒載體或腺病毒載體為優選。

【0207】 之後，DNA（或在逆轉錄病毒載體情況下，RNA）可能表達於合適的宿主，從而製成含本發明肽或變體的多肽。因此，可根據已知技術使用編碼本發明肽或變體的 DNA，用本文所述方法適當修飾後，構建表達載體，然後表達載體用於轉化合適宿主細胞，從而表達和產生本發明中的多肽。此類技術包括那些公開於，例如，美國專利 4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、

4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075 和 4,810,648。

【0208】 編碼含本發明化合物多肽的 DNA（或在逆轉錄病毒載體情況下，RNA）可能被加入到其他多種 DNA 序列，從而引入到合適的宿主中。同伴 DNA 將取決於宿主的性質、DNA 引入宿主的方式、以及是否需要保持為游離體還是要相互結合。

【0209】 一般來說，DNA 可以適當的方向和正確的表達閱讀框架附著到一種表達載體（如質粒）中。如有必要，該 DNA 可能與所需宿主所識別的相應轉錄和翻譯調節控制核苷酸序列連接，儘管表達載體中一般存在此類控制功能。然後，該載體透過標準方法被引入宿主。一般來說，並不是所有的宿主都會被載體轉化。因此，有必要選擇轉化過的宿主細胞。選擇方法包括用任何必要的控制元素向表達載體插入一個 DNA 序列，該序列對轉化細胞中的可選擇性屬性（如抗生素耐藥性）進行編碼。

【0210】 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。

【0211】 然後，本發明中的重組 DNA 所轉化的宿主細胞在本文中所述本領域技術人員熟悉的合適條件下培養足夠長的時間，從而表達之後可回收的肽。

【0212】 有許多已知的表達系統，包括細菌（如大腸桿菌和枯草芽孢桿菌）、酵母（如酵母菌）、絲狀真菌（如曲黴菌）、植物細胞、動物細胞及昆蟲細胞。該系統可優選

為哺乳動物細胞，如來自 ATCC 細胞生物學庫 (Cell Biology Collection) 中的 CHO 細胞。

【0213】典型的哺乳動物細胞組成型表達載體質粒包括 CMV 或含一個合適的多聚 A 尾巴的 SV40 啟動子以及抗性標誌物（如新黴素）。一個實例為從 Pharmacia 公司 (Piscataway, 新澤西, 美國) 獲得的 pSVL。一種可誘導型哺乳動物表達載體的例子是 pMSG，也可以從 Pharmacia 公司獲得。有用的酵母質粒載體是 pRS403-406 和 pRS413-416，一般可從 Stratagene Cloning Systems 公司 (La Jolla, CA 92037, 美國) 獲得。質粒 pRS403、pRS404、pRS405 和 pRS406 是酵母整合型質粒 (YIp)，並插入了酵母可選擇性標記物 HIS3、TRP1、LEU2 和 URA3。pRS413-416 質粒為酵母著絲粒質粒 (Ycp)。基於 CMV 啟動子的載體（如，來自於 Sigma-Aldrich 公司）提供了暫態或穩定的表達、胞漿表達或分泌，以及 FLAG、3xFLAG、c-myc 或 MATN 不同組合物中的 N-端或 C-端標記。這些融合蛋白可用於檢測、純化及分析重組蛋白。雙標融合為檢測提供了靈活性。

【0214】強勁的人巨細胞病毒 (CMV) 啟動子調控區使得 COS 細胞中的組成蛋白表達水準高達 1 mg/L。對於較弱的細胞株，蛋白水準一般低於 0.1 mg/L。SV40 複製原點的出現將導致 DNA 在 SV40 複製容納性 COS 細胞中高水準複製。例如，CMV 載體可包含細菌細胞中的

p M B 1 (p B R 3 2 2 的衍生物) 複製原點、細菌中進行氨苄青黴素抗性選育的鈣-內鹼胺酶基因、h G H p o l y A 和 f l 的原點。含前胰島素原引導 (P P T) 序列的載體可使用抗 F L A G 抗體、樹脂和板引導 F L A G 融合蛋白分泌到進行純化的培養基中。其他與各種宿主細胞一起應用的載體和表達系統是本領域熟知眾所周知的。

【0215】 在另一個實施方案中，對本發明的兩個或更多的肽或肽變體進行編碼，因此，以一個連續順序（類似於「一串珠子」的構建體）表達。在達到目標，所述肽或肽變體可能透過連接子氨基酸的延伸處（例如 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 I I 類分子的免疫應答。

【0216】 本發明還涉及一種宿主細胞，其以本發明的多核苷酸載體構建轉化而來。宿主細胞可為原核細胞，也可為真核細胞。在有些情況下，細菌細胞為優選原核宿主細胞，典型為大腸桿菌株，例如，大腸桿菌菌株 D H 5 （從 B e t h e s d a R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s 公司（B e t h e s d a , M D , 美國）獲得）和 R R 1 （從美國菌種保藏中心（A T C C ），R o c k v i l l e , M D , 美國（編號 A T C C 3 1 3 4 3 ）獲得）。首選的真核宿主細胞包括酵母、昆蟲和哺乳動物細胞，優選為脊椎動物細胞，如：小鼠、大鼠、猴子或人成纖維細胞和結腸癌細胞株中的細胞。酵母宿主細胞包括 Y P H 4 9 9 、 Y P H 5 0 0 和 Y P H 5 0 1 ，一般可從 S t r a t a g e n e

Cloning Systems 公司 (La Jolla, CA 92037, 美國) 獲得。首選哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞為 ATCC 中的 CCL61 細胞、NIH 瑞士小鼠胚胎細胞 NIH/3T3 為 ATCC 中的 CRL 1658 細胞、猴腎源性 COS-1 細胞為 ATCC 中的 CRL 1650 細胞以及人胚胎腎細胞的 293 號細胞。首選昆蟲細胞為 Sf9 細胞，可用杆狀病毒表達載體轉染。有關針對表達選擇合適宿主細胞的概要，可從教科書 (Paulina Balbás and Argelia Lorence 《Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols》Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9) 和技術人員知道的其他文獻中查到。

【0217】 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。

【0218】 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。

【0219】 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）可用于表達本發明中的肽，使他們可以加載入相應的 MHC 分子中。因此，本發明提出了含本發明中核酸或表達載體的一種宿主細胞。

【0220】 在一個優選實施方案中，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 HRP C（Rini et al., 2006; Small et al., 2006）。

【0221】 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。

【0222】 在另一個實施方案中，本發明中的肽、核酸或表達載體用於藥物中。例如，肽或其變體可製備為靜脈（i.v.）注射劑、皮下（s.c.）注射劑、皮內（i.d.）注射劑、腹膜內（i.p.）注射劑、肌肉（i.m.）注射劑。肽注射的優選

方法包括 s.c.、i.d.、i.p.、i.m. 和 i.v. 注射。DNA 注射的優選方法為 i.d.、i.m.、s.c.、i.p. 和 i.v. 注射。例如，給予 50 μ g 至 1.5 mg，優選為 125 μ g 至 500 μ g 的肽或 DNA，這取決於具體的肽或 DNA。上述劑量範圍在以前的試驗中成功使用 (Walter et al., 2012)。

【0223】 用於主動免疫接種的多聚核苷酸可為基本純化形式，也可包被於載體或輸送系統。核酸可能為 DNA、cDNA、PNA、RNA，也可能為其組合物。這種核酸的設計和引入方法為本領域所熟知。例如，文獻中有其概述 (Teufel et al., 2005)。多核苷酸疫苗很容易製備，但這些載體誘導免疫反應的作用模式尚未完全瞭解。合適的載體和輸送系統包括病毒 DNA 和/或 RNA，如基於腺病毒、牛痘病毒、逆轉錄病毒、疱疹病毒、腺相關病毒或含一種以上病毒元素的混合病毒的系統。非病毒輸送系統包括陽離子脂質體和陽離子聚合物，是 DNA 輸送所屬領域內熟知的系統。也可使用物理輸送系統，如透過「基因槍」。肽或核酸編碼的肽可以是一種融合蛋白，例如，含刺激 T 細胞進行上述 CDR 的表位。

【0224】 本發明的藥劑也可能包括一種或多種佐劑。佐劑是那些非特異性地增強或加強免疫反應的物質（例如，透過 CD8-陽性 T 細胞和輔助 T (TH) 細胞介導的對一種抗原的免疫應答，因此被視為對本發明的藥劑有用。適合的佐劑包括（但不僅限於）1018ISS、鋁鹽、

AMPLIVAX[®]、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、鞭毛蛋白或鞭毛蛋白衍生的TLR5配體、FLT3配體、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特 (ALDARA[®])、resiquimod、ImuFact IMP321、白細胞介素IL-2、IL-13、IL-21、干擾素 α 或 β ，或其聚乙二醇衍生物、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、JuvImmune[®]、LipoVac、MALP2、MF59、單磷醯脂A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、水包油和油包水乳狀液、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、PepTel[®]載體系統、基於聚丙交酯複合乙交酯[PLG]和右旋糖苷微粒、重組人乳鐵傳遞蛋白SRL172、病毒顆粒和其他病毒樣顆粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys、源自皂角苷、分支桿菌提取物和細菌細胞壁合成模擬物的Aquila公司的QS21刺激子，以及其他專有佐劑，如：Ribi's Detox、Quil或Superfos。優選佐劑如：弗氏佐劑或GM-CSF。前人對一些樹突狀細胞特異性免疫佐劑（如MF59）及其製備方法進行了描述（Allison and Krummel, 1995）。也可能使用細胞因子。一些細胞因子直接影響樹突狀細胞向淋巴組織遷移（如，TNF- γ ），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）。

【0225】 據報告，CpG 免疫刺激寡核苷酸可提高佐劑在疫苗中的作用。如果沒有理論的約束，CpG 寡核苷酸可透過 Toll 樣受體（TLR）（主要為 TLR9）啟動先天（非適應性）免疫系統從而起作用。CpG 引發的 TLR9 活化作用提高了對各種抗原的抗原特異性體液和細胞反應，這些抗原包括肽或蛋白抗原、活病毒或被殺死的病毒、樹突狀細胞疫苗、自體細胞疫苗以及預防性和治療性疫苗中的多糖結合物。更重要的是，它會增強樹突狀細胞的成熟和分化，導致 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、納米粒子、脂肪乳或類似製劑，當抗原相對較弱時，這些對誘發強反應尤為必要。他們還能加速免疫反應，使抗原劑量減少約兩個數量級，在有些實驗中，對不含 CpG 的全劑量疫苗也能產生類似的抗體反應（Krieg, 2006）。美國 6406705 B1 號專利對 CpG 寡核苷酸、非核酸佐劑和抗原結合使用促使抗原特異性免疫反應進行了描述。一種 CpG TLR9 拮抗劑為 Mologen 公司（德國柏林）的 dSLIM（雙幹環免疫調節劑），這是本發明藥物組合物的

優選成分。也可使用其他如 TLR 結合分子，如：RNA 結合 TLR 7、TLR 8 和 / 或 TLR 9。

【0226】 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。

【0227】 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。

【0228】 本發明藥物組合物的一個優選實施方案中，佐劑從含集落刺激因子製劑中選擇，如粒細胞巨噬細胞集落刺激因子（GM-CSF，沙格司亭）、環磷醯胺、咪喹莫特、resiquimod 和干擾素- α 。

【0229】 本發明藥物組合物的一個優選實施方案中，佐劑從含集落刺激因子製劑中選擇，如粒細胞巨噬細胞集落刺激因子（GM-CSF，沙格司亭）、環磷醯胺、咪喹莫特和 resiquimod。在本發明藥物組合物的一個優選實施方案中，佐劑為環磷醯胺、咪喹莫特或 resiquimod。更優選的佐劑是 Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、聚-ICLC（Hiltonol®）和抗CD40 mAb或其組合物。

【0230】 此組合藥物為非腸道注射使用，如皮下、皮內、肌肉注射，也可口服。為此，肽和其他選擇性分子在藥用載體中分解或懸浮，優選為水載體。此外，組合物可包含輔料，如：緩衝劑、結合劑、衝擊劑、稀釋劑、香料、潤滑劑等。這些肽也可與免疫刺激物質合用，如：細胞因子。可用於此類組合物的更多輔料可在從 A. Kibbe 所著的 Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000) 等書中獲知。此組合藥物可用於阻止、預防和/或治療腺瘤或癌性疾病。例如，EP 2112253 中有示例製劑。

【0231】 重要的是要認識到，透過本發明的疫苗引發的免疫應答在不同的細胞階段和開發的不同階段攻擊癌症。而且不同的癌症相關信號通路被攻擊。這相對於其他疫苗的優勢，這些疫苗只針對一個或幾個靶標，這可能會導致腫瘤很容易適應於攻擊（腫瘤逃逸）。此外，並非所有的個體腫瘤都表達相同模式的抗原。因此，幾個腫瘤相關肽的組合確保了每個腫瘤都承擔至少一些靶標。該組合物以這

樣的方式設計，預期每個腫瘤可表達幾種抗原並覆蓋腫瘤生長和維持所需要的幾種獨立的途徑。因此，疫苗可易於「現成的」用於較大患者群體。這意味著，預選擇接受疫苗治療的患者可限制為 H L A 分型，無需抗原表達的任何額外的生物標誌物評估，但仍然確保多個靶標同時被誘導的免疫應答攻擊，這對於療效很重要 (B a n c h e r e a u e t a l . , 2 0 0 1 ; W a l t e r e t a l . , 2 0 1 2) 。

【0232】 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 M H C 的複合體）。在另一項實施例中，支架能夠透過其靶抗原（例如 T 細胞受體複合體抗原）啟動信號通路。支架包括但不限於抗體及其片段，抗體的抗原結合區，其包含抗體重鏈可變區和抗體輕鏈可變區，結合的蛋白包括至少一個錨蛋白重複序列基元和單域抗原結合（S D A B）分子、適體、（可溶）T C R 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。

【0233】 「特定」結合系指，與其他天然肽 - M H C 複合體相比，該支架與感興趣的肽 - M H C 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

- M H C 複合體的另一細胞。如果交叉反應性肽 - M H C 的肽並不是天然的，即，並非來自人 H L A - 多肽組，則結合至其他肽 - M H C 複合體是無關緊要的。評估靶細胞殺傷的測試在本領域中是公知的。它們應該含有未改變的肽 - M H C 呈現的靶細胞（原發細胞或細胞系）或載有肽的細胞進行，以便達到天然肽 - M H C 的水準。

【0234】 各支架可包括一個標記，其透過確定是否存在或不存在標籤所提供的信號可檢測到結合支架。例如，該支架可用螢光染料或任何其他適用的細胞標記分子進行標記。此類標記分子是本領域中公知的。例如，透過螢光染料進行的螢光標記可透過螢光或鐳射掃描顯微術或流式細胞術提供結合適體的視覺化。

【0235】 各支架可與第二個活性分子（例如 I L - 2 1、抗 C D 3、抗 C D 2 8）共軛。

【0236】 關於多肽支架的進一步資訊，可參閱，例如，在 W O 2 0 1 4 / 0 7 1 9 7 8 A 1 背景技術部分，並作為參考文獻引用。

【0237】 本發明還涉及適體。適體（例如，參見 W O 2 0 1 4 / 1 9 1 3 5 9 及其中引用的文獻）是短的單鏈核酸分子，其可以折疊為所定義的三維結構並識別特定的靶標結構。它們似乎是開發靶向治療的合適替代方法。適體已顯示可選擇性與具有高親和力和特異性的複合體靶標相結合。

【0238】 識別細胞表面分子的適體在過去十年內已經確定，並為開發診斷和治療方法提供了手段。由於適體已顯示幾乎無毒性和免疫原性，因此，它們是生物醫學應用中有前景的候選物質。事實上適體，例如攝護腺特異性膜抗原識別適體，已被成功地用於靶向治療並在體內模型的異種移植物中顯示出功能。此外，認識到特定腫瘤細胞系的適體也已確定。

【0239】 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。

【0240】 此外，用流式細胞儀對細胞結合行為的研究顯示，適體在納摩爾範圍內顯示出很好的親和力。

【0241】 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。

【0242】 可選擇適體針對複合體的靶標，如細胞和組織以及包含、優選包括根據任何 SEQ ID NO 1 至 SEQ ID NO 188 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。

【0243】 本發明中的肽可用于生成和開發出針對 MHC / 肽複合物的特定抗體。這些抗體可用於治療，將毒素或放射

性物質靶向病變組織。這些抗體的另一用途是為了成像之目的（如 PET）將放射性核素靶向病變組織。這可有助於檢測小轉移灶或確定病變組織的大小和準確位置。

【0244】 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 類分子對包含表達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。

【0245】 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），其中該抗體優選為多株抗體、單株抗體、雙特異性抗體和/或嵌合抗體。

【0246】 產生這種抗體和單鏈 I 類主要組織相容性複合物的相應方法，以及產生這些抗體的其他工具在 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; Denker et al., 2003）中

進行了披露，為了本發明之目的，所有參考文獻透過引用被完整地併入本文。

【0247】 優選地，該抗體與複合體的結合親和力低於 20 納摩爾，優選為低於 10 納摩爾，這在本發明情況下也被視為具有「特異性」。

【0248】 本發明涉及一種肽，包含選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 組成的組的一個序列或該序列的與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 具有 88% 同源性（優選為相同）的一種變體，或誘導與所述變異肽發生 T 細胞交叉反應的一種變體，其中，所述肽不是基本的全長多肽。

【0249】 本發明進一步涉及一種肽，包含選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 組成的組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 具有至少 88% 同源性（優選為相同）的一種變體，其中所述肽或變體的總長度為 8 至 100 個、優選為 8 至 30 個、最優選為 8 至 14 個氨基酸。

【0250】 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。

【0251】 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:188 的一個氨基酸序列組成。

【0252】 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。

【0253】 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 H L A - D R 抗原相關不變鏈 (I i) 的 N - 端氨基酸，或其中該肽與一種抗體（例如，樹突狀細胞特定抗體）融合。

【0254】 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。

【0255】 本發明進一步涉及一種本發明的核酸，為 D N A 、 c D N A 、 P N A 、 R N A ，也可能為其組合物。

【0256】 本發明進一步涉及一種能表達本發明核酸的表達載體。

【0257】 本發明進一步涉及本發明的一種肽、本發明的一種核酸或本發明的一種藥用表達載體，特別是用於治療 A M L 。

【0258】 本發明進一步涉及含本發明核酸或本發明表達載體的一種宿主細胞。

【0259】 本發明進一步涉及本發明的宿主細胞，其為抗原呈現細胞，優選為樹突細胞。

【0260】 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。

【0261】 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達於合適抗原呈現細胞表面的 I 或 II 類 M H C 分子。

【0262】 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達載體，該載體有能力表達含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:188 的肽或所述變體氨基酸序列。

【0263】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的活化的 T 細胞，其中所述 T 細胞有選擇性地識別一種細胞，該細胞異常表達含一種本發明氨基酸序列的多肽。

【0264】 本發明進一步涉及一種殺傷患者靶細胞的方法，其中患者的靶細胞異常表達含本發明任何氨基酸序列的多肽，該方法包括給予患者本發明的有效量 T 細胞。

【0265】 本發明進一步涉及任何所述肽、本發明的一種核酸、本發明的一種表達載體、本發明的一種細胞、本發明一種作為藥劑或製造藥劑的活化的細胞毒性 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。

【0266】 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。

【0267】 本發明進一步涉及本發明中的用途，其中所述癌細胞為 AML 細胞或其他實體或血液腫瘤細胞，如膽管癌、腦癌、乳腺癌、慢性淋巴細胞性白血病、結腸或直腸癌、食管癌、膽囊癌、肝癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、膀胱癌、子宮癌。

【0268】 本發明進一步涉及一種基於本發明肽的特定標誌物蛋白和生物標誌物，在此成為「靶標」，其可用於診斷和/或判斷 A M L 的預後。本發明還涉及這些供癌症治療使用的新靶點。

【0269】 本文中術語「抗體」為廣義上的定義，既包括多株也包括單株抗體。除了完整或「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，C D R、F v、F a b 和 F c 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，A M L 標誌物（多）肽的特異性結合、將毒素傳遞給癌症標誌物基因表達水準增加時的 A M L 癌細胞和/或抑制 A M L 標誌物多肽的活性）。

【0270】 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 A M L 標誌物多肽或其片段可用于製備本發明的抗體。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 D N A 技術生產。

【0271】 例如，本發明的編碼肽的 c D N A，例如，該肽為根據 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 1 8 8 多肽的肽，或其中一個變體或片段，可在原核細胞中（如：細菌）或真核細胞（如：酵母、昆蟲或哺乳動物細胞）中表達，之後，可純化重組蛋白，並用於產生一種特異性結合用於產生本發明抗體的 A M L 標誌物多肽的單株或多株抗體製劑。

【0272】 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株抗體能最大限度地增加獲得一種含預期用途所需的特異性和親和力（例如，ELISA法、免疫組織化學、體內成像、免疫毒素療法）的抗體的可能性。根據抗體的用途，用已知的方法對其期望活性進行測試（例如，ELISA法、免疫組織化學、免疫治療等；要獲取產生和測試抗體的進一步指導，請參閱，例如，Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)）。例如，該抗體可用ELISA法或免疫印跡法、免疫組織化學染色福馬林固定的癌組織或冰凍的組織切片進行檢測。在初次體外表徵後，用於治療或體內診斷用途的抗體根據已知的臨床測試方法進行檢測。

【0273】 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的片段相同（同質），只要他們表現出預期的拮抗活性（美國4816567號專利，其在此以其整體併入）。

【0274】 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，淋巴細胞可在體外進行免疫。

【0275】 單株抗體也可由 DNA 重組方法制得，如：美國 4 8 1 6 5 6 7 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測序（例如：透過使用能與編碼鼠抗體重鏈和輕鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針）。

【0276】 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 9 4 / 2 9 3 4 8 和美國 4 3 4 2 5 6 6 號專利中有描述。抗體的木瓜蛋白酶消化通常產生兩種相同的抗原結合性片段，稱為 Fab 片段（每個片段都有一個抗原結合點）和殘餘 Fc 片段。胃蛋白酶處理產生一個 F(ab')₂ 片段和一個 pFc' 片段。

【0277】 抗體片段，不論其是否附著於其他序列，均可包括特定區域或特定氨基酸殘基的插入、刪除、替換、或其他選擇性修飾，但前提是，片段的活性與非修飾的抗體或抗體片段相比沒有顯著的改變或損害。這些修飾可提供一些額外的屬性，如：刪除/添加可與二硫鍵結合的氨基酸，以增加其生物壽命、改變其分泌特性等。在任何情況下，抗體片段必須擁有生物活性的特性，如：結合活性、調節結合域的結合力等。抗體的功能性或活性區域可透過蛋白特定區域的基因突變、隨後表達和測試所表達的多肽進行

確定。這些方法為本行業技術人員所熟知，可包括編碼抗體片段的核酸的特定位點基因突變。

【0278】 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。

【0279】 人源化非人抗體的方法為本行業所熟知。一般來說，人源化抗體具有一個或多個從非人源頭引入的氨基酸殘基。這些非人氨基酸殘基往往被稱為「輸入」殘基，通常從「輸入」可變域中獲得。人源化基本上可以透過將齧齒動物 CDR 或 CDR 序列取代為相應的人抗體序列而完

成。因此，這種「人源化」抗體為嵌合抗體（美國 4 8 1 6 5 6 7 號專利），其中大大少於完整的人可變域被來自於非人物種的相應序列取代。在實踐中，人源化抗體通常為人抗體，其中有些 C D R 殘基以及可能的一些 F R 殘基被來自齧齒動物抗體中的類似位點的殘基取代。

【0280】 可使用免疫後在內源性免疫球蛋白產生缺失時能產生完整人抗體的轉基因動物（如：小鼠）。例如，它被描述為，嵌合和種系突變小鼠中的抗體重鏈連接區域基因的純合性缺失導致內源性抗體生成的完全抑制。在此種系變種小鼠中人種系免疫球蛋白基因陣列的轉移在抗原挑戰後將導致人抗體的生成。人抗體也可在噬菌體展示庫中產生。

【0281】 本發明的抗體優選為透過藥用載體的形式給予受試者。通常，在製劑中使用適量的藥用鹽，以使製劑等滲。藥用載體的例子包括生理鹽水、林格氏液和葡萄糖溶液。溶液的 p H 值優選為約 5 至 8，更優選為約 7 至 7.5。此外，載體還包括緩釋製劑，如：含有抗體的固體疏水性聚合物半透性基質，其中基質為有形物品形式，如：薄膜、脂質體或微粒。本行業的技術人員熟知，某些載體可能為更優選，取決於例如，抗體的給藥途徑和濃度。

【0282】 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。局部或靜脈注射為優選。

【0283】 抗體給藥的有效劑量和時間表可根據經驗確定，並且作出此類決定屬本行業的技術範圍內。本行業的技術人員會明白，必須給予的抗體劑量根據以下因素會有所不同，例如：接受抗體的受試者、給藥途徑、使用的抗體以及其他正在使用的藥物的特定類型。單獨使用的抗體的通常日劑量可能為約 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至最多 $100\ \text{mg}/\text{kg}$ 體重或更多，這取決於上述因素。給予抗體，優選為治療 AML 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。

【0284】 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 細胞選殖株中產生，並且它們的親和力可以透過互補決定區靶向誘變而增加。為了 T 細胞受體選擇之目的，可以使用噬菌體展示（美國 2010/0113300，(Liddy et al., 2012)）。為了在噬菌體展示期間以及實際使用為藥物時穩定 T 細胞受體之目的，可透過非天然二硫鍵、其他共價鍵（單鏈 T 細胞受體）或透過二聚化結構域連接 α 和 β 鏈 (Boulter et al.,

2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T 細胞受體可以連接到毒素、藥物、細胞因子（參見 US 2013/0115191）、域招募效應細胞，如抗 CD3 域等，以便對靶細胞執行特定的功能。此外，它可能表達於用於過繼轉移的 T 細胞。進一步的資訊可在 WO 2004/033685A1 和 WO 2004/074322A1 中找到。sTCR 的組合在 WO 2012/056407A1 中進行了描述。WO 2013/057586A1 中公開了製備的進一步的方法。

【0285】 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。

【0286】 該抗體或 TCR 也可用於體內診斷實驗。一般來說，抗體用放射性核素標記（如： ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S ），從而可免疫閃爍掃描法使腫瘤局限化。在一實施方案中，其中的抗體或片段與兩個或兩個以上選自包括上述蛋白的組的蛋白質靶標的細胞外域結合，並且親和力值（Kd）低於 $1 \times 10 \mu\text{M}$ 。

【0287】 診斷用抗體可透過各種影像學方法使用適合檢測的探針進行標記。探針檢測方法包括但不限於，螢光、光、共聚焦和電鏡方法；磁共振成像和光譜學技術；透視、電腦斷層掃描和正電子發射斷層掃描。合適的探針包括但不限於，螢光素、羅丹明、曙紅及其它螢光團、放射性同位素、黃金、釷和其他稀土、順磁鐵、氟-18 和其他正電子發射放射性核素。此外，探針可能是雙功能或多功能的，並且用一種以上的上述方法可進行檢測。這些抗體可用所

述的探針直接或間接進行標記。抗體探針的連接，包括探針的共價連接、將探針融合入抗體、以及螯合化合物的共價連接從而結合探針、以及其他本行業熟知的方法。對於免疫組織化學方法，疾病組織樣本可能是新鮮或冷凍或可能包埋於石蠟中以及用福馬林等防腐劑固定。固定或包埋的切片包括與標記一抗和二抗接觸的樣本，其中該抗體用於檢測原位蛋白的表達。

【0288】 本發明的另一方面包括一種體外製備活化的 T 細胞的方法，該方法包括將 T 細胞與載有抗原的人 MHC 分子進行體外連接，這些分子在合適的抗原呈現細胞表面表達足夠的一段時間從而以抗原特異性方式活化的 T 細胞，其中所述抗原為根據本發明所述的一種肽。優選情況是足夠量的抗原與抗原呈現細胞一同使用。

【0289】 優選情況是，哺乳動物細胞的 TAP 肽轉運載體缺乏或水準下降或功能降低。缺乏 TAP 肽轉運載體的適合細胞包括 T2、RMA-S 和果蠅細胞。TAP 是與抗原加工相關的轉運載體。

【0290】 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）。

【0291】 優選情況是，宿主細胞在轉染前基本上不表達 M H C I 類分子。刺激因子細胞還優選為表達對 T 細胞共刺激信號起到重要作用的分子，如，B 7 . 1、B 7 . 2、I C A M - 1 和 L F A 3 中的任一種分子。大量 M H C I 類分子和共刺激分子的核酸序列可從 G e n B a n k 和 E M B L 資料庫中公開獲得。

【0292】 當 M H C I 類表位用作一種抗原時，T 細胞為 C D 8 陽性 T 細胞。

【0293】 如果抗原呈現細胞受到轉染而表達這種表位，則優選的細胞包括一個表達載體，該載體有能力表達含 S E Q I D N O : 1 至 S E Q I D N O : 1 8 8 的肽或變體氨基酸序列。

【0294】 可使用其他一些方法來體外生成 T 細胞。例如，自體腫瘤浸潤性淋巴細胞可用于生成 C T L。P l e b a n s k i 等人在 (P l e b a n s k i e t a l . , 1 9 9 5) 使用自體外周血淋巴細胞 (P L B) 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 . W a l t e r 等人在 (W a l t e r e t a l . , 2 0 0 3) 中描述了透過使用人工抗原呈現細胞 (a A P C) 體外活化的 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 M H C : 肽複合物耦合到聚苯乙烯顆粒 (微球) 而生成 a A P C。該系統實現了對 a A P C 上的 M H C 密度進

行精確調節，這使得可以在血液樣本中選擇地引發高或低親合力的高效抗原特異性 T 細胞反應。除了 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 的細胞因子。

【0295】 也可用同種異體細胞制得 T 細胞，在 WO 97/26328 中詳細描述了一種方法，以參考文獻方式併入本文。例如，除了果蠅細胞和 T2 細胞，也可用其他細胞來呈現肽，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) 中描述了將豇豆花葉病毒開發為一種呈現外來肽的高產系統。

【0296】 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的 T 細胞。

【0297】 按上述方法製成的活化的 T 細胞將會有選擇性地識別異常表達含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO 188 氨基酸序列的多肽。

【0298】 優選情況是，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 細胞是殺傷患者靶細胞方法中有用的細胞，其靶細胞異常表達含本發明中氨基酸序列的多肽。此類患者給予有效量的活化

的 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，優選情況是該供體為健康人。發明人使用「健康個人」系指一個人一般狀況良好，優選為免疫系統合格，更優選為無任何可很容易測試或檢測到的疾病。

【0299】 根據本發明，CD8-陽性 T 細胞的體內靶細胞可為腫瘤細胞（有時表達 MHC-II 類抗原）和/或腫瘤周圍的基質細胞（腫瘤細胞）（有時也表達 MHC-II 類抗原；(Dengjel et al., 2006)）。

【0300】 本發明所述的 T 細胞可用作治療性組合物中的活性成分。因此，本發明也提出了一種殺傷患者靶細胞的方法，其中患者的靶細胞異常表達含本發明中氨基酸序列的多肽，該方法包括給予患者上述有效量的 T 細胞。

【0301】 發明人所用的「異常表達」的意思還包括，與正常組織表達水準相比，多肽過量表達，或該基因在從腫瘤獲得的組織中未表達而在腫瘤中表達。「過量表達」系指多肽水準至少為正常組織中的 1.2 倍；優選為至少為正常組織中的 2 倍，更優選為至少 5 或 10 倍。

【0302】 T 細胞可用本領域已知的方法制得（如，上述方法）。

【0303】 T 細胞繼轉移方案為本領域所熟知的方案。綜述可發現於：Gattinoni et al. 和 Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006)。

【0304】 本發明的另一個方面包括使用與 M H C 複合的肽，以生成 T 細胞受體，其核酸被選殖並被引入至宿主細胞，優選為 T 細胞。然後，該透過基因工程改變的 T 細胞可轉給患者用於癌症治療。

【0305】 本發明的任一分子（即肽、核酸、抗體、表達載體、細胞，活化的 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。

【0306】 本發明還涉及一種套件，其包括：

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

【0307】 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。

【0308】 本發明中的套件優選包含一種置於合適容器中的凍乾製劑以及重組和 / 或使用說明。適當的容器包括，例如瓶子、西林瓶（如雙室瓶）、注射器（如雙室注射器）和試管。該容器可能由多種材料製成，如玻璃或塑膠。試劑盒

和 / 或容器最好有容器或關於容器的說明書，指明重組和 / 或使用的方向。例如，標籤可能表明凍乾劑型將重組為上述肽濃度。該標籤可進一步表明製劑用於皮下注射。

【0309】 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。

【0310】 稀釋液和凍乾製劑混合後，重組製劑中的肽終濃度優選為至少 0.15 mg/mL/肽 ($=75 \mu\text{g}$)，不超過 3 mg/mL/肽 ($=1500 \mu\text{g}$)。該套件還可包括商業和用戶角度來說可取的其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑，過濾液、針頭、注射器和帶有使用說明書的包裝插頁。

【0311】 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。

【0312】 優選情況是，本發明的套件包括與本發明的一種製劑，包裝後與第二種化合物（如佐劑（例如 GM-CSF）、化療藥物、天然產品、激素或拮抗劑、抗血管生成劑或抑制劑、凋亡誘導劑或螯合劑）或其藥物組合物聯合使用。該套件的成分可進行預絡合或每種成分在給予患者之前可放置於單獨的不同容器。該套件的成分可以是一種或多種溶液，優選為水溶液，更優選為無菌水溶液。該套件的成分也可為固體形式，加入合適的溶劑後轉換為液體，最好放置於另一個不同的容器中。

【0313】 治療套件的容器可能為西林瓶、試管、燒瓶、瓶子、注射器、或任何其他盛裝固體或液體的工具。通常，當成分不只一種時，套件將包含第二個西林瓶或其他容器，使之可以單獨定量。該套件還可能包含另一個裝載藥用液體的容器。優選情況是，治療套件將包含一個設備（如，一個或多個針頭、注射器、滴眼器、吸液管等），使得可注射本發明的藥物（本套件的組合物）。

【0314】 本發明的藥物配方適合以任何可接受的途徑進行肽給藥，如口服（腸道）、鼻內、眼內、皮下、皮內、肌內，靜脈或經皮給藥。優選為皮下給藥，最優選為皮內給藥，也可透過輸液泵給藥。

【0315】 由於本發明的肽從 A M L 中分離而得，因此，本發明的藥劑優選用於治療 A M L 。

【0316】 本發明進一步涉及為個體患者製備個體化藥物的一種方法，其中包括：製造含選自預篩選 T U M A P 存儲庫至少一種肽的藥物組合物，其中藥物組合物中所用的至少一種肽選擇為適合於個體患者。在一項實施方案中，藥物組合物為一種疫苗。該方法也可以改動以產生下游應用的 T 細胞選殖株，如：T C R 隔離物或可溶性抗體和其他治療選擇。

【0317】 「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。

【0318】 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 H L A - A H L A - B 和 H L A - C 等位元基因 A M L 患者的腫瘤組織中高度過度表達。其可能含有包括 M H C I 類和 M H C I I 類肽或拉長的 M H C I 類肽。除了從幾種 A M L 組織中採集的腫瘤相關肽外，存儲庫還可能包含 H L A - A * 0 2 和 H L A - A * 2 4 標記肽。這些肽可對 T U M A P 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 T U M A P 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。

【0319】 存儲庫的 T U M A P 透過使用一種功能基因組學方法進行鑒定，該方法結合了基因表達分析、質譜法和 T 細胞免疫學（X P r e s i d e n t ®）。該方法確保了只選擇真實存在於高百分比腫瘤但在正常組織中不表達或僅很少量表達的 T U M A P 用於進一步分析。對於初始肽的選擇，患者 A M L 樣本和健康供體的血液以循序漸進的方法進行分析：

1. 惡性材料的 H L A 配體用質譜法確定

2. 使用全基因組信使核糖核酸 (mRNA) 表達分析法用於確定惡性腫瘤組織 (AML) 與一系列正常器官和組織相比過度表達的基因。
3. 確定的 HLA 配體與基因表達資料進行比較。腫瘤組織上過度呈現或選擇性呈現的肽，優選為第 2 步中檢測到的選擇性表達或過量表達基因所編碼的考慮為多肽疫苗的合適候選 TUMP。
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
5. 過度表達在 mRNA 水準的相關性由腫瘤組織第 3 步選定的 TUMP 重新檢測而確定，並且在健康組織上缺乏（或不經常）檢測。
6. 為了評估透過選定的肽誘導體內 T 細胞反應是否可行，使用健康供體以及 AML 患者的人 T 細胞進行體外免疫原性測定。

【0320】 一方面，在將所述肽加入存儲庫之前，對其進行篩查以瞭解免疫原性。舉例來說（但不限於此），納入存儲庫的肽的免疫原性的確定方法包括體外 T 細胞活化，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。

【0321】 這種方法優選用於罕見癌症以及有罕見表達譜的患者。與含目前開發為固定組分的多肽雞尾酒相反的是，存儲庫可將腫瘤中抗原的實際表達於疫苗進行更高程度的匹配。在多目標方法中，每名患者將使用幾種「現成」肽

的選定單一肽或組合。理論上來說，基於從 50 抗原肽庫中選擇例如 5 種不同抗原肽的一種方法可提供大約 170 萬種可能的藥物產品 (DP) 組分。

【0322】 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。

【0323】 HLA 表型、轉錄和肽組學資料從患者的腫瘤材料和血液樣本中收集，以確定最合適每名患者且含有「存儲庫」和患者獨特（即突變）TUMAP 的肽。將選擇的那些肽選擇性地或過度表達于患者腫瘤中，並且可能的情況下，如果用患者個體 PBMC 進行檢測，則表現出很強的體外免疫原性。

【0324】 優選的情況是，疫苗所包括的肽的一種確定方法包括：(a) 識別由來自個體患者腫瘤樣本呈現的腫瘤相關肽 (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達資料與所述腫瘤樣本組織類型相對應的正常組織樣本的表達資料相比對，以識別腫瘤組織中過量表達或異常表達的蛋白；以及 (a2) 將表達資料與結合到腫瘤樣本中 I 類 MHC 和/或 II 類分子的 MHC 配體序列想關聯，以確定來源於腫瘤過量表達或異常表達的蛋白質的 MHC 配體。優選情況是，MHC 配體的序列的確定方法是：洗脫來自腫瘤樣本分離的 MHC 分子結合肽，並測序

洗脫配體。優選情況是，腫瘤樣本和正常組織從同一患者獲得。

【0325】 除了使用存儲庫（資料庫）模型選擇肽以外，或作為一種替代方法，TUMAP 可能在新患者中進行鑒定，然後列入疫苗中。作為一種實施例，患者中的候選 TUMAP 可透過以下方法進行鑒定：（a1）將來自腫瘤樣本的表達資料與所述腫瘤樣本組織類型相對應的正常組織樣本的表達資料相比對，以識別腫瘤組織中過量表達或異常表達的蛋白；以及（a2）將表達資料與結合到腫瘤樣本中 I 類 MHC 和 / 或 II 類分子的 MHC 配體序列想關聯，以確定來源於腫瘤過量表達或異常表達的蛋白質的 MHC 配體。作為另一實施例，蛋白的鑒定方法為可包含突變，其對於腫瘤樣本相對於個體患者的相應正常組織是獨特的，並且 TUMAP 可透過特異性靶向作用於變異來鑒定。例如，腫瘤以及相應正常組織的基因組可透過全基因組測序方法進行測序：為了發現基因蛋白質編碼區域的非同義突變，從腫瘤組織中萃取基因組 DNA 和 RNA，從外周血單核細胞（PBMC）中提取正常非突變基因組種系 DNA。運用的 NGS 方法只限于蛋白編碼區的重測序（外顯子組重測序）。為了這一目的，使用供應商提供的靶序列富集試劑盒來捕獲來自人樣本的外顯子 DNA，隨後使用 HiSeq 2000（Illumina 公司）進行測序。此外，對腫瘤的 mRNA 進行測序，以直接定量基因表達，並確認突變基因在患者腫瘤中表達。得到的數以百萬計的序列讀數透

過軟體演算法處理。輸出列表中包含突變和基因表達。腫瘤特異性體突變透過與 P B M C 衍生的種系變化比較來確定，並進行優化。然後，為了存儲庫可能測試新確定的肽瞭解如上所述的免疫原性，並且選擇具有合適免疫原性的候選 T U M A P 用於疫苗。

【0326】 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 (T U M A P)；(b) 將 (a) 中鑒定的肽與進行腫瘤（與相應的正常組織相比）免疫原性和過量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。

【0327】 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 (T U M A P)；以及 (b) 在 (a) 中選擇至少一種新確定的肽，並確認其免疫原性。

【0328】 一旦選定了用於個體化肽疫苗的肽時，則產生疫苗。該疫苗優選為一種液體製劑，包括溶解於 20 - 40 % D M S O 之間，優選為約 30 - 35 % D M S O，例如，約 33 % D M S O 中的個體肽。

【0329】 列入產品的每種肽都溶於 D M S O 中。單個肽溶液濃度的選擇取決於要列入產品中的肽的數量。單肽 - D M S O 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 μm 無菌篩檢程序進行過濾。從而獲得最終本體溶液。

【0330】 最終本體溶液填充到小瓶中，在使用前儲存於 -20℃ 下。一個小瓶包含 700 μL 溶液，其中每種肽含有 0.578 mg。其中的 500 μL（每種肽約 400 μg）將用於皮內注射。

【0331】 本發明的肽除了用於治療癌症，也可用於診斷。由於肽由 AML 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。

【0332】 血液樣本中組織活檢物含請求項的肽，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 AML 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。

【0333】 對病變標本中肽的檢測使得能對免疫系統治療方法的利益進行判斷，特別是如果 T- 淋巴細胞已知或預計與作用機制有關。MHC 表達的缺失是一種機制，充分說明了哪些受感染的惡性細胞逃避了免疫監視。因此，肽的呈現表明，分析過的細胞並沒有利用這種機制。

【0334】 本發明的肽可用於分析淋巴細胞對肽的反應（如 T 細胞反應），或抗體對肽或 MHC 分子絡合的肽發生的反應。這些淋巴細胞反應可以作為預後指標，決定是否採

取進一步的治療。這些反應也可以用作免疫療法中的替代反應指標，旨在以不同方式誘導淋巴細胞反應，如接種蛋白疫苗、核酸、自體材料、淋巴細胞過繼轉移。基因治療中，淋巴細胞對肽發生的反應可以在副作用的評估中考慮。淋巴細胞反應監測也可能成為移植療法隨訪檢查中的一種有價值的工具，如，用於檢測移植物抗宿主和宿主抗移植物疾病。

【0335】 下列描述優選方案的實施例將對本發明進行說明，並參照隨附圖表（但是不僅限於此）。考慮到本發明的目的，文中引用的所有參考文獻透過引用的方式併入在本文中。

【0336】 實施方式

實施例 1

細胞表面呈現的腫瘤相關肽的識別和定量

組織樣本

【0337】 患者的腫瘤組織獲得自：ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA)。Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK)、波恩大學醫院 (Bonn, Germany)、蒂賓根大學醫院 (Tübingen, Germany)。

【0338】 正常組織獲得自 Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK)。Bio-Options Inc. (Brea, CA, USA)、BioServe (Beltsville, MD, USA)、Capital BioScience Inc. (Rockville, MD,

USA)、Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA)、京都府立醫科大學 (KPUM) (Kyoto, Japan)、日內瓦大學醫院 (Geneva, Switzerland)、海德堡大學醫院 (Heidelberg, Germany)、慕尼黑大學醫院 (Munich, Germany)、蒂賓根大學醫院 (Tübingen, Germany)。

【0339】 所有患者在手術或屍檢前都獲得了書面知情同意。切除後組織立即進行冷休克處理，在分離 TUMAP 前儲存於 -70°C 或以下。

從組織樣本中分離 HLA 肽

【0340】 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免疫沉澱法從實體組織中獲得了冷凍組織樣本的 HLA 肽庫。

質譜分析

【0341】 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 x $250\ \text{mm}$)，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 (Pico Tip , New Objective) 用於引入到納升電噴霧源。使用前 5 (TOP 5) 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 = 7500) 。串聯質譜以 SEQUEST 和另一種手動控制器進行解讀。生成的自然肽破碎模式與合成序列相同參考肽的破碎模式進行比較後，確保了被識別的肽序列。

【0342】 無標記相對 LC - MS 定量透過離子計數 (即透過 LC - MS 功能提取和分析) 來進行 (Mueller et al. , 2007) 。該方法假定肽的 LC - MS 信號區域與樣本中其豐度相關。提取的特徵透過充電狀態去卷積和保留時間校準進行進一步處理 (Mueller et al. , 2008 ; Sturm et al. , 2008) 。最後，所有的 LC - MS 特徵與序列鑒定結果交叉引用，以將不同樣本和組織的定量資料與肽呈遞特徵結合。定量資料根據集中資料以兩層方式進行正態化處理，以說明技術和生物學複製變異。因此，每個被識別的肽均可與定量資料相關，從而可得出樣本和組織之間的相對定量。此外，對候選肽獲得的所有定量資料進行手動檢查，以確保資料的一致性，並驗證自動化分析的準確度。

對於每種肽，計算了呈現圖，其顯示樣本平均呈現量以及複製變化。這些特徵使 A M L 樣本與正常組織樣本的基線值並列。示範性過度呈現肽的提呈譜示於圖 1 中。示範性肽的呈現分數見表 8。

表 8：呈現分數。該表列出了與一系列正常組織相比在腫瘤上非常高度過量呈現 (+++)、與一系列正常組織相比在腫瘤上高度過量呈現 (++) 或與一系列正常組織相比在腫瘤上過量呈現 (+) 的 H L A - A * 0 2 肽。被認為與腫瘤比較相關的一系列正常組織組包括：脂肪組織、腎上腺、動脈、血細胞、骨髓、腦、中樞神經、結腸、十二指腸、食道、眼、膽囊、心臟、腎、肝、肺、淋巴結、胰腺、甲狀旁腺、外周神經、腹膜、垂體腺、胸膜、直腸、唾液腺、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、甲狀腺、氣管、輸尿管、膀胱、靜脈。

序列 ID 號	序列	肽呈現
1	LLDSAVYYL	+++
2	VLLKAVAQA	+++
3	ALYDKTKRIFL	+++
4	FLPDAFVTM	+++
5	FLYYEDLVSC	+++
7	LLWGDIMEL	+++
8	LLWPGAALLV	+++
10	VILDPVHSV	+++
11	ILTQIDHIL	+++
12	ALIESNTAL	+++
13	ALVPGVTQV	+++
14	ALWWGTITL	+++
15	FIDEEVEDMYL	+++
16	FLDTQAPSL	+++
17	FLLGLSEQL	+++
18	GIIEENWQL	+++

19	GIVEYLSLV	+++
20	GLDAFLLEL	+++
21	GLFHGTELL	+++
22	GLLQLDTAFV	+++
23	GLLQPPVRIV	+++
24	GLVELLNRV	+++
25	GVEGSLIVEKI	+++
26	NAGVEGSLIVEKI	+++
27	KANPALYVL	+++
28	LLDQMETPL	+++
29	RLGPSVVGL	+++
30	SIISDSSAL	+++
31	SLFVFIPMV	+++
32	SLSDRSWHL	+++
33	TIMNQEKLAKL	+++
35	VLFEHAVGYAL	+++
36	VLGPSPSSV	+++
37	VVAPAPVVEAV	+++
38	AAIASTPTL	+++
39	AIFAGTMQL	+++
40	ALAAGGYDVEKN	+++
41	ALFILPFVSV	+++
42	ALTTYTIEV	+++
43	AMLDFVSSL	+++
44	FAVDNVGNRTL	+++
45	FLFTDVLLM	+++
46	GLDQYLQEV	+++
47	GLIJPVQL	+++
48	IAIEALTQL	+++
49	IIDDNHAIV	+++
50	IIWATSLLL	+++
51	SLLSSSLNV	+++
52	IVDPVDSTL	+++
53	KAFLGELTL	+++
54	KLPEFLVQL	+++
55	KTLDLINKL	+++
56	LANPTTSAL	+++
57	LLDFGSLSNLQV	+++
58	LLLATLQEA	+++
59	LSVPEGAIIVSL	+++
60	NLLNVLEYL	+++
61	FLLPGVLLSEA	+++
62	RLLFNLSEV	+++
63	RLNDTIQLL	+++
64	SLANIKIWW	+++
65	SLEEQLSALTL	+++

66	SLKNEVGGLV	+++
67	SLQDRVIAL	+++
68	TGITTPVASV	+++
69	TIIGLVRVI	+++
70	TLTDSNAQL	+++
71	TLTSSLATV	+++
72	VAFPSGDASSL	+++
73	VAIPDVDPL	+++
74	VANPVL YVL	+++
75	VLAPLGFTL	+++
76	VLLJPVPEL	+++
77	VLNMKPPEI	+++
78	VLSEVECHL	+++
79	YLMDPDTFTF	+++
80	YLTEALQSI	+++
81	YVTEELPQL	+++
82	LLPDNFIAA	++
84	GLLGSVLTI	+++
85	GLVPFGLYL	+++
86	HLLGDPMANV	+
87	ILKPFGNSI	+++
88	LALNFGSTL	+++
89	LLESPVDGWQV	+++
90	LLDVTVTSI	+++
91	RLAHYIDRV	+++
92	RLWDIQHQL	+++
93	SLINDVLAE	+++
94	SLLEFAQYL	+++
95	SVAEINVLI	+++
96	TLLASYVFL	+++
97	TIMTGVIGV	++
98	TQFGFLMEV	+++
99	YLAPFSLSNY	+++
100	AAPAVLGEVDTSLV	+++
101	AINKDPEAPIFQV	+
102	ALAQGAERV	+++
103	ALGDFGIRL	++
104	ALIPETTTL	++
105	GVFALVTAV	+
106	ALLEELERSTL	+
107	ALLGMLPLL	+++
108	ELEMNSDLKAQL	+++
109	GLLAVPLLAA	+++
110	GLTHTAVVPLDLV	+++
111	GVEPAADGKGVVVV	+++
112	ILRDALNQA	++

113	NLQSEVEGV	+++
114	RLAQEAAQV	++
115	SLPDLTTPL	+++
116	TILEILPEL	+++
117	TILPTILFL	++
118	TLLTVLTQA	+++
119	TLTDELAAL	+++
120	VIQDLVVS	+++
121	VLQAGQYGV	+++
122	VLYLEEVLL	+++
123	YTVKINPTL	+++
124	GLPELVIQL	+++
125	GLFGYLVFL	++
126	GLLPQQIQAV	++
127	KIISALPQL	++
128	NLSTKTEAV	+++
129	RMAVLNEQV	+
130	GVLGNALEGV	+
131	SLFSGSLEPV	+
132	SLYPVLNFL	++
133	TVIGTLLFL	+
135	GIIDRIFQA	++
136	GLSSIETLL	+++
137	ILAPLAWDL	+++
139	NLIIFSPSV	+
141	GLLPPLRIPELL	++
142	GLSDGYGFTT	+++
143	YLLPHILVY	+++
144	GLFMGLVLV	+
147	FALPILNAL	+++
148	FLYFEDHGL	++
149	GLAEILVLV	+
151	GLLPFPEVTL	+
152	GLSNHIAAL	++
153	GLYTGQLAL	+++
154	IIADNIIFL	++
155	ILDLIQVFV	+
157	ILTETQQGL	+++
159	LLPLAPAAA	++
161	SLIGIAIAL	+
162	SLLDFLTFA	+
163	SLMIDLIEV	++
164	SLNPQEDVEF	+
165	SLVDRVAAA	+++
166	VLFPNLQL	+
167	VLLDVALGL	+

168	VLLFETALL	+
169	VLQDPIWLL	+++
170	IVTEVAVG	+++
171	KLLKQVDFL	+++
172	KLLWGDIMEL	+++
173	KMQETLVGL	+++
174	NLTENLQYV	+++
175	KMDJFLDMQL	+++
176	HLWTGEEQL	+++
177	KITTVIQHV	+++
178	KLWPLFVKL	+++
179	RLISTLENL	+++
180	ALDQEIEV	+++
181	KLLNHVTQL	+++
183	SVIGVSPAV	+++
184	RMTDQEIQDL	+++
185	RLIPIVLL	+++
186	IILDEAHNV	++
187	MLPPPPLTA	++
188	RLLDFPTLL	+++

實施例 2

編碼本發明肽的基因的表達譜

【0343】 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夠其在免疫治療中有效使用，一些肽為腫瘤特異性的，儘管存在其源蛋白也存在于正常組織中。但是，mRNA 表達譜增加了免疫治療目標肽選擇中其他級別的安全性。特別是對於具有高安全性風險的治療選擇，諸如親和力成熟的TCR，理想的目標肽將來源於對該腫瘤獨一無二且不出現于正常組織中的蛋白。

RNA 來源與製備

【0344】 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。

【0345】 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)

【0346】 用於 RNASeq 實驗來自腫瘤組織的總 RNA 獲得自：Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK)、ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA)、Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK)、波恩大學醫院 (Bonn, Germany)

【0347】 所有 RNA 樣品的質量和數量在 Agilent 2100 生物分析儀 (Agilent, Waldbronn, Germany) 上使用 RNA 6000 Pico LabChip 試劑盒 (Agilent) 評估。

R N A 序 列 實 驗

【0348】 通 過 新 一 代 測 序 技 術 (R N A s e q) 由 C e G a T (T ü b i n g e n , G e r m a n y) 對 腫 瘤 和 正 常 組 織 的 R N A 樣 本 進 行 基 因 表 達 分 析 。 簡 言 之 ， 根 據 供 應 商 的 方 案 (I l l u m i n a 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 測 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 測 序 文 庫 。 從 多 個 樣 本 獲 得 的 文 庫 根 據 製 造 商 的 說 明 等 摩 爾 混 合 並 在 I l l u m i n a H i S e q 2 5 0 0 定 序 器 上 測 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 達 資 料 在 轉 錄 水 準 設 置 為 R P K M (每 百 萬 映 射 讀 數 每 千 城 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 R P K M 值 。 本 發 明 的 代 表 性 源 基 因 在 A M L 中 高 度 過 量 表 達 的 表 達 譜 如 圖 2 所 示 。 進 一 步 代 表 性 基 因 的 表 達 分 數 見 表 9 。

表 9 ： 表 達 分 數 。 該 表 列 出 了 與 一 系 列 正 常 組 織 相 比 在 腫 瘤 上 非 常 高 度 過 量 表 達 (+ + +) 、 與 一 系 列 正 常 組 織 相 比 在 腫 瘤 上 高 度 過 量 表 達 (+ +) 或 與 一 系 列 正 常 組 織 相 比 在 腫 瘤 上 過 量 表 達 (+) 的 基 因 的 肽 。 本 基 線 得 分 根 據 以 下 相 關 正 常 組 織 的 測 量 值 計 算 ： 脂 肪 組 織 、 腎 上 腺 、 動 脈 、 血 細

胞、骨髓、腦、軟骨、結腸、食道、眼、膽囊、心臟、腎、肝、肺、淋巴結、胰腺、周圍神經、垂體腺、直腸、唾液腺、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、甲狀腺、氣管、膀胱、靜脈。如果獲得同一組織類型幾個樣本的表達資料，則使用各樣本的算術平均值進行計算。

序列 ID 號	序列	基因表達
1	LLDSAVYYL	+++
3	ALYDKTKRIFL	+++
4	FLPDAFVTM	+++
5	FLYYEDLVSC	+++
8	LLWPGAALLV	+
12	ALIESNTAL	+++
16	FLDTQAPSL	+++
17	FLLGLSEQL	+
36	VLGPSPSSV	++
41	ALFILPFVSV	++
42	ALTTYTIEV	+
50	IHWATSLLL	++
51	SLLSSSLNV	++
60	NLLNVLEYL	++
61	FLLPGVLLSEA	++
63	RLNDTIQLL	++
64	SLANIKIWV	+++
92	RLWDIQHQL	+
96	TLLASYVFL	+++
97	TIMTGVIGV	+++
102	ALAQGAERV	+++
103	ALGDFGIRL	+++
114	RLAQEAAQV	+
146	ALDTRVVEL	+++
165	SLVDRVAAA	++
175	KMDJFLDMQL	++
176	HLWTGEEQL	++
182	SLSEYDQCL	+++

實施例 3

M H C - I 類呈現肽的體外免疫原性

【0349】 為了獲得關於本發明 TUMAP 的免疫原性資訊，發明人使用體外 T 細胞擴增分析方法進行了研究，其中該分析方法基於使用裝載肽/MHC 複合物和抗 CD28 抗體的人工抗原呈現細胞 (aAPC) 進行反復刺激。用這種方法，發明人可顯示，本發明的 HLA-A*0201 限制 TUMAP 具有免疫原性，這表明這些肽為對抗人 CD8⁺ 前體 T 細胞的 T 細胞表位 (表 10)。

CD8⁺ T 細胞體外活化

【0350】 為了用載有肽-MHC 複合物 (pMHC) 和抗 CD28 抗體的人工抗原呈現細胞進行體外刺激，發明人首先從 University clinics Mannheim, Germany 中獲取健康供體 CD8 微珠 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) 透過積極選擇白細胞清除術後新鮮 HLA-A*02 產物而分離出 CD8⁺ T 細胞。

【0351】 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 。

【0352】 對於 pMHC / 抗 - CD28 塗層珠的生成、T 細胞的刺激和讀出，使用每刺激條件四個不同 pMHC 分子以及每個讀出條件 8 個不同的 pMHC 分子在高度限定的體外系統中進行。

【0353】 純化的共刺激小鼠 IgG2a 抗人 CD28 抗體 9.3 (Jung et al., 1987) 使用製造商 (Perbio 公司 , 波恩 , 德國) 推薦的 N-羥基琥珀醯亞胺生物素進行化學生物素化處理。所用珠為 5.6 μ m 的鏈黴抗生物素蛋白包裹的多聚苯乙烯顆粒 (Bangs Laboratories , 伊利諾州 , 美國) 。

【0354】 用於陽性和陰性對照刺激物的 pMHC 分別為 A*0201/MLA-001 (從 Melan-A/MART-1 中修飾制得的肽 ELAGIGILT V (SEQ ID NO: 199)) 和 A*0201/DDX5-001 (從 DDX5 中獲得的 YLLPAIVHI (SEQ ID NO: 200)) 。

【0355】 800.000 珠 / 200 μ l 包裹於含有 4 x 12.5 ng 不同生物素 - pMHC 的 96 孔板、進行洗滌，隨後加入體積為 200 μ l 的 600 ng 生物素抗 - CD28。在 37 $^{\circ}$ C 下，在含 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) 的 200 μ l TCM 中共培養 1×10^6 CD8+T 細胞與 2×10^5 的清洗塗層珠 3 天，從而啟動刺激。之後，一半培養基與補充 80 U/ml IL-2 的新鮮 TCM 進行交換，並且培養在 37 $^{\circ}$ C 下持續 4 天。這種刺激性週期總共進行 3 次。對於使用每條件 8 種不

同 pMHC 分子的 pMHC 多聚體讀出，二維組合編碼方法如前述使用 (Andersen et al., 2012)，稍作修飾，涵蓋耦合至 5 種不同的螢光染料。最後，用 Live/dead near IR 染料 (Invitrogen 公司，Karlsruhe，德國)、CD8-FITC 抗體選植株 SK1 (BD 公司，Heidelberg，德國) 和螢光 pMHC 多聚體而執行多聚體分析。對於分析，使用了配有合適鐳射儀和篩檢程序的 BD LSR II SORP 細胞儀。肽特異性細胞以占總 CD8+ 細胞的百分比形式進行計算。多聚體分析結果使用 FlowJo 軟體 (Tree Star 公司，Oregon，美國) 進行評估。特定多聚體 + CD8+ 淋巴細胞的體外填裝用與陰性對照刺激組比較而進行檢測。如果健康供體中的至少一個可評價的體外刺激孔在體外刺激後發現含有特異性 CD8+ T 細胞株 (即該孔包含至少 1% 特定多聚體 + CD8+ T 細胞，並且特定多聚體 + 的百分比至少為陰性對照刺激中位數的 10 倍)，則檢測給定抗原的免疫原性。

AML 肽體外免疫原性

【0356】 對於受到測試的 HLA-I 類肽，可透過肽特異性 T 細胞株的生成證明其體外免疫原性。TUMAP 特異性多聚體對本發明的 2 種肽染色後流式細胞儀檢測的典型結果如圖 3 所示，同時也含有相應的陰性對照資訊。本發明 10 種肽的結果匯總於表 10。

表 10：本發明中 H L A I 類肽的體外免疫原性
申請人對本發明的肽所做的體外免疫原性實驗的示例性結果。
< 20 % = + ; 20 % - 49 % = ++ ; 50 % - 69 % = +++ ; > = 70 % = ++++

Seq ID	序列	孔
189	RLFEEVLGV	++
190	SLYKGLLSV	++
191	ALSVLRLAL	++
192	GLAALAVHL	++
193	FLLAEDTKV	++
194	LLWGNLPEI	++
195	FLFVDPELV	+++
196	ILVDWLQV	++
197	VLLNEILEQV	++
198	KIQEILTQV	++

實施例 4

肽的合成

【0357】 所有的肽透過使用 F m o c 策略以標準、廣為接受的固相肽合成法合成。每個肽的身份和純度已使用質譜和 R P - H P L C 分析法確定。用凍乾法（三氟乙酸鹽）獲得白色至類白色的肽，純度為 > 50 %。所有的 T U M A P 優選作為三氟乙酸鹽或乙酸鹽進行給藥，其他藥用鹽形式也可以。

【0358】 參考文獻列表

Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. 11 (2011): 124
Allison, J. P. et al., Science 270 (1995): 932-933
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
- Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., J Immunol 166 (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., Nature 275 (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995): 289-300
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng 16 (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brossart, P. et al., Blood 90 (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004): 29-43
- Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. 53 (2004): 345-357
- Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. 65 (2004): 1211-1223
- 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
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol 171 (2003): 2197-2207
- Falk, K. et al., Nature 351 (1991): 290-296
- 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
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. 2 (1996): 1096-1103

- Gattinoni, L. et al., Nat Rev.Immunol 6 (2006): 383-393
- 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
- Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th (2012)
- Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual 2nd (2014)
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. 179 (2007): 5829-5838
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987): 4611-4615
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients rd (2000)
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. 5 (2006): 471-484
- Liddy, N. et al., Nat Med. 18 (2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. 162 (1985): 1745-1759
- 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)
- Meziere, C. et al., J Immunol 159 (1997): 3230-3237
- 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
- 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
- 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
- Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics 50 (1999): 213-219
- Rini, B. I. et al., Cancer 107 (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., Science 249 (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., Nat Protoc. 1 (2006): 1120-1132
- Saiki, R. K. et al., Science 239 (1988): 487-491
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics 49 (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Silva, L. P. et al., Anal.Chem. 85 (2013): 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. 24 (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. 9 (2008): 163
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. 62 (2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., Science 344 (2014): 641-645
- Walter, S. et al., J Immunol 171 (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. 18 (2012): 1254-1261
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. 8 (1999): 2418-2423
- Z a r e m b a , S . e t a l . , C a n c e r R e s . 5 7 (1 9 9 7) :
4 5 7 0 - 4 5 7 7

【符號說明】

【0359】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊(請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

國外寄存資訊(請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

無

【序列表】

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

<120> 用於 AML 和其他癌症免疫治療的新型肽和肽組合物

<150> GB 1605872.9

<151> 2016-04-06

<150> US 62/319,141

<151> 2016-04-06

<160> 200

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Leu Leu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Leu
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Val Leu Leu Lys Ala Val Ala Gln Ala
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ala Leu Tyr Asp Lys Thr Lys Arg Ile Phe Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Phe Leu Pro Asp Ala Phe Val Thr Met
1 5

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Phe Leu Tyr Tyr Glu Asp Leu Val Ser Cys
1 5 10

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Gly Leu Ala Glu Val Leu Leu Ala Ala
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Leu Leu Trp Gly Asp Ile Met Glu Leu
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9
Ser Leu Leu Ala Tyr Leu Glu Gln Ala
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10
Val Ile Leu Asp Pro Val His Ser Val
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11
Ile Leu Thr Gln Ile Asp His Ile Leu
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
Ala Leu Ile Glu Ser Asn Thr Ala Leu
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13
Ala Leu Val Pro Gly Val Thr Gln Val
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Ala Leu Trp Trp Gly Thr Ile Thr Leu
1 5

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Phe Ile Asp Glu Glu Val Glu Asp Met Tyr Leu
1 5 10

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Phe Leu Asp Thr Gln Ala Pro Ser Leu
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Phe Leu Leu Gly Leu Ser Glu Gln Leu
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Gly Ile Ile Glu Glu Asn Trp Gln Leu
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Gly Ile Val Glu Tyr Leu Ser Leu Val
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Gly Leu Asp Ala Phe Leu Leu Glu Leu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Gly Leu Phe His Gly Thr Glu Leu Leu
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

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

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Gly Leu Leu Gln Pro Pro Val Arg Ile Val
1 5 10

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Gly Leu Val Glu Leu Leu Asn Arg Val

1 5

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

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

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

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

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Lys Ala Asn Pro Ala Leu Tyr Val Leu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Leu Leu Asp Gln Met Glu Thr Pro Leu
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Arg Leu Gly Pro Ser Val Val Gly Leu
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Ser Ile Ile Ser Asp Ser Ser Ala Leu
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Ser Leu Phe Val Phe Ile Pro Met Val
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Ser Leu Ser Asp Arg Ser Trp His Leu
1 5

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Thr Ile Met Asn Gln Glu Lys Leu Ala Lys Leu
1 5 10

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Thr Leu Ser Pro Trp Ser Phe Leu Ile
1 5

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

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

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Val Leu Gly Pro Ser Pro Ser Ser Val
1 5

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Val Val Ala Pro Ala Pro Val Val Glu Ala Val
1 5 10

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Ala Ala Ile Ala Ser Thr Pro Thr Leu
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Ala Ile Phe Ala Gly Thr Met Gln Leu
1 5

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Ala Leu Ala Ala Gly Gly Tyr Asp Val Glu Lys Asn
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

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

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Ala Leu Thr Thr Tyr Thr Ile Glu Val
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Ala Met Leu Asp Phe Val Ser Ser Leu
1 5

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Phe Ala Val Asp Asn Val Gly Asn Arg Thr Leu
1 5 10

<210> 45

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Phe Leu Phe Thr Asp Val Leu Leu Met
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Gly Leu Asp Gln Tyr Leu Gln Glu Val
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

Gly Leu Ile Ser Pro Asn Val Gln Leu
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Ile Ala Ile Glu Ala Leu Thr Gln Leu
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Ile Ile Asp Asp Asn His Ala Ile Val
1 5

<210> 50
<211> 9

<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

Ile Ile Trp Ala Thr Ser Leu Leu Leu
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

Ser Leu Leu Ser Ser Ser Leu Asn Val
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Ile Val Asp Pro Val Asp Ser Thr Leu
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Lys Ala Phe Leu Gly Glu Leu Thr Leu
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Lys Leu Pro Glu Phe Leu Val Gln Leu
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人

<400> 55

Lys Thr Leu Asp Leu Ile Asn Lys Leu
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 56

Leu Ala Asn Pro Thr Thr Ser Ala Leu
1 5

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 57

Leu Leu Asp Phe Gly Ser Leu Ser Asn Leu Gln Val
1 5 10

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Gln Glu Ala
1 5

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 59

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

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 60

Asn Leu Leu Asn Val Leu Glu Tyr Leu
1 5

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Phe Leu Leu Pro Gly Val Leu Leu Ser Glu Ala
1 5 10

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Arg Leu Leu Phe Asn Leu Ser Glu Val
1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Arg Leu Asn Asp Thr Ile Gln Leu Leu
1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Ser Leu Ala Asn Ile Lys Ile Trp Val
1 5

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65
Ser Leu Glu Glu Gln Leu Ser Ala Leu Thr Leu
1 5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66
Ser Leu Lys Asn Glu Val Gly Gly Leu Val
1 5 10

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67
Ser Leu Gln Asp Arg Val Ile Ala Leu
1 5

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68
Thr Gly Ile Thr Thr Pro Val Ala Ser Val
1 5 10

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69
Thr Ile Ile Gly Leu Val Arg Val Ile
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

Thr Leu Thr Asp Ser Asn Ala Gln Leu
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

Thr Leu Thr Ser Ser Leu Ala Thr Val
1 5

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

Val Ala Phe Pro Ser Gly Asp Ala Ser Ser Leu
1 5 10

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Val Ala Ile Pro Asp Val Asp Pro Leu
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74

Val Ala Asn Pro Val Leu Tyr Val Leu
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

Val Leu Ala Pro Leu Gly Phe Thr Leu
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76

Val Leu Leu Ser Pro Val Pro Glu Leu
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77

Val Leu Asn Met Lys Pro Pro Glu Ile
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78

Val Leu Ser Glu Val Glu Cys His Leu
1 5

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79

Tyr Leu Met Asp Pro Asp Thr Phe Thr Phe
1 5 10

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 80

Tyr Leu Thr Glu Ala Leu Gln Ser Ile

1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81

Tyr Val Thr Glu Glu Leu Pro Gln Leu
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 82

Leu Leu Pro Asp Asn Phe Ile Ala Ala
1 5

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83

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

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84

Gly Leu Leu Gly Ser Val Leu Thr Ile
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85

Gly Leu Val Pro Phe Gly Leu Tyr Leu
1 5

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86

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

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87

Ile Leu Lys Pro Phe Gly Asn Ser Ile
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88

Leu Ala Leu Asn Phe Gly Ser Thr Leu
1 5

<210> 89
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 89

Leu Leu Glu Ser Pro Val Asp Gly Trp Gln Val
1 5 10

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 90

Leu Leu Leu Asp Thr Val Thr Ser Ile
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 91

Arg Leu Ala His Tyr Ile Asp Arg Val
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 92

Arg Leu Trp Asp Ile Gln His Gln Leu
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 93

Ser Leu Ile Asn Asp Val Leu Ala Glu
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 94

Ser Leu Leu Glu Phe Ala Gln Tyr Leu
1 5

<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95

Ser Val Ala Glu Ile Asn Val Leu Ile
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 96

Thr Leu Leu Ala Ser Tyr Val Phe Leu
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 97

Thr Ile Met Thr Gly Val Ile Gly Val
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 98

Thr Gln Phe Gly Phe Leu Met Glu Val
1 5

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 99

Tyr Leu Ala Pro Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
1 5 10

<210> 100
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 100

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

<210> 101

<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 101

Ala Ile Asn Lys Asp Pro Glu Ala Pro Ile Phe Gln Val
1 5 10

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102

Ala Leu Ala Gln Gly Ala Glu Arg Val
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Ala Leu Gly Asp Phe Gly Ile Arg Leu
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104

Ala Leu Ile Pro Glu Thr Thr Thr Leu
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105

Gly Val Phe Ala Leu Val Thr Ala Val
1 5

<210> 106
<211> 11

<212> PRT
<213> 智人

<400> 106

Ala Leu Leu Glu Glu Leu Glu Arg Ser Thr Leu
1 5 10

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 107

Ala Leu Leu Gly Met Leu Pro Leu Leu
1 5

<210> 108
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 108

Glu Leu Glu Met Asn Ser Asp Leu Lys Ala Gln Leu
1 5 10

<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 109

Gly Leu Leu Ala Val Pro Leu Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 110
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 110

Gly Leu Thr His Thr Ala Val Val Pro Leu Asp Leu Val
1 5 10

<210> 111
<211> 14
<212> PRT

<213> 智人

<400> 111

Gly Val Glu Pro Ala Ala Asp Gly Lys Gly Val Val Val Val
1 5 10

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 112

Ile Leu Arg Asp Ala Leu Asn Gln Ala
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113

Asn Leu Gln Ser Glu Val Glu Gly Val
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Gln Val
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 115

Ser Leu Pro Asp Leu Thr Thr Pro Leu
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

Thr Ile Leu Glu Ile Leu Pro Glu Leu
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 117

Thr Ile Leu Pro Thr Ile Leu Phe Leu
1 5

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 118

Thr Leu Leu Thr Val Leu Thr Gln Ala
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 119

Thr Leu Thr Asp Glu Leu Ala Ala Leu
1 5

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 120

Val Ile Gln Asp Leu Val Val Ser Val
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121

Val Leu Gln Ala Gly Gln Tyr Gly Val
1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 122

Val Leu Tyr Leu Glu Glu Val Leu Leu
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 123

Tyr Thr Val Lys Ile Asn Pro Thr Leu
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 124

Gly Leu Pro Glu Leu Val Ile Gln Leu
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 125

Gly Leu Phe Gly Tyr Leu Val Phe Leu
1 5

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 126

Gly Leu Leu Pro Gln Gln Ile Gln Ala Val
1 5 10

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 127

Lys Ile Ile Ser Ala Leu Pro Gln Leu
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 128

Asn Leu Ser Thr Lys Thr Glu Ala Val
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 129

Arg Met Ala Val Leu Asn Glu Gln Val
1 5

<210> 130
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130

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

<210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131

Ser Leu Phe Ser Gly Ser Leu Glu Pro Val
1 5 10

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 132

Ser Leu Tyr Pro Val Leu Asn Phe Leu
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 133

Thr Val Ile Gly Thr Leu Leu Phe Leu
1 5

<210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 134

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

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 135

Gly Ile Ile Asp Arg Ile Phe Gln Ala
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 136

Gly Leu Ser Ser Ile Glu Thr Leu Leu

1 5

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 137

Ile Leu Ala Pro Leu Ala Trp Asp Leu
1 5

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 138

Ile Leu Ser Asp Asn Leu Arg Gln Val
1 5

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 139

Asn Leu Ile Ile Phe Ser Pro Ser Val
1 5

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 140

Tyr Ile Pro Asp Phe Leu Thr Leu Leu
1 5

<210> 141
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 141

Gly Leu Leu Pro Pro Leu Arg Ile Pro Glu Leu Leu
1 5 10

<210> 142
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 142

Gly Leu Ser Asp Gly Tyr Gly Phe Thr Thr
1 5 10

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 143

Tyr Leu Leu Pro His Ile Leu Val Tyr
1 5

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 144

Gly Leu Phe Met Gly Leu Val Leu Val
1 5

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 145

Val Leu Leu Pro Leu Ile Phe Thr Ile
1 5

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 146

Ala Leu Asp Thr Arg Val Val Glu Leu
1 5

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 147

Phe Ala Leu Pro Ile Leu Asn Ala Leu
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 148

Phe Leu Tyr Phe Glu Asp His Gly Leu
1 5

<210> 149
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 149

Gly Leu Ala Glu Ile Leu Val Leu Val
1 5

<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 150

Gly Leu Phe Gly Val Leu Asn Glu Ile
1 5

<210> 151
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 151

Gly Leu Leu Pro Phe Pro Glu Val Thr Leu
1 5 10

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 152

Gly Leu Ser Asn His Ile Ala Ala Leu
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 153

Gly Leu Tyr Thr Gly Gln Leu Ala Leu
1 5

<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 154

Ile Ile Ala Asp Asn Ile Ile Phe Leu
1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 155

Ile Leu Asp Leu Ile Gln Val Phe Val
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 156

Ile Leu Met Pro Glu Leu Ala Ser Leu
1 5

<210> 157

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 157

Ile Leu Thr Glu Thr Gln Gln Gly Leu
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 158

Leu Leu Leu Gly Gly Thr Ala Leu Ala
1 5

<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 159

Leu Leu Pro Leu Ala Pro Ala Ala Ala
1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 160

Arg Leu Val Pro Phe Leu Val Phe Val
1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 161

Ser Leu Ile Gly Ile Ala Ile Ala Leu
1 5

<210> 162
<211> 9

<212> PRT
<213> 智人

<400> 162

Ser Leu Leu Asp Phe Leu Thr Phe Ala
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 163

Ser Leu Met Ile Asp Leu Ile Glu Val
1 5

<210> 164
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 164

Ser Leu Asn Pro Gln Glu Asp Val Glu Phe
1 5 10

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 165

Ser Leu Val Asp Arg Val Ala Ala Ala
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 166

Val Leu Phe Pro Leu Asn Leu Gln Leu
1 5

<210> 167
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人

<400> 167

Val Leu Leu Asp Val Ala Leu Gly Leu
1 5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 168

Val Leu Leu Phe Glu Thr Ala Leu Leu
1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 169

Val Leu Gln Asp Pro Ile Trp Leu Leu
1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 170

Ile Val Thr Glu Val Ala Val Gly Val
1 5

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 171

Lys Leu Leu Lys Gln Val Asp Phe Leu
1 5

<210> 172

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 172

Lys Leu Leu Trp Gly Asp Ile Met Glu Leu
1 5 10

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 173

Lys Met Gln Glu Thr Leu Val Gly Leu
1 5

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 174

Asn Leu Thr Glu Asn Leu Gln Tyr Val
1 5

<210> 175
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 175

Lys Met Asp Ser Phe Leu Asp Met Gln Leu
1 5 10

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 176

His Leu Trp Thr Gly Glu Glu Gln Leu
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 177

Lys Ile Thr Thr Val Ile Gln His Val
1 5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 178

Lys Leu Trp Pro Leu Phe Val Lys Leu
1 5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 179

Arg Leu Ile Ser Thr Leu Glu Asn Leu
1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 180

Ala Leu Asp Gln Glu Ile Ile Glu Val
1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 181

Lys Leu Leu Asn His Val Thr Gln Leu
1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 182

Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln Cys Leu
1 5

<210> 183
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 183

Ser Val Ile Gly Val Ser Pro Ala Val
1 5

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 184

Arg Met Thr Asp Gln Glu Ala Ile Gln Asp Leu
1 5 10

<210> 185
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 185

Arg Leu Ile Pro Ile Ile Val Leu Leu
1 5

<210> 186
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 186

Ile Ile Leu Asp Glu Ala His Asn Val
1 5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 187

Met Leu Pro Pro Pro Pro Leu Thr Ala
1 5

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 188

Arg Leu Leu Asp Phe Pro Thr Leu Leu
1 5

<210> 189
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 189

Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val
1 5

<210> 190
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 190

Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val
1 5

<210> 191
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 191

Ala Leu Ser Val Leu Arg Leu Ala Leu
1 5

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 192

Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu

1 5

<210> 193
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 193

Phe Leu Leu Ala Glu Asp Thr Lys Val
1 5

<210> 194
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 194

Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile
1 5

<210> 195
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 195

Phe Leu Phe Val Asp Pro Glu Leu Val
1 5

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 196

Ile Leu Val Asp Trp Leu Val Gln Val
1 5

<210> 197
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 197

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

<210> 198
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 198

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 199
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 199

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

<210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 200

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5

【發明申請專利範圍】

- 【請求項1】 一種肽或其藥用鹽，該肽由 SEQ ID NO: 1 的一氨基酸序列所組成。
- 【請求項2】 如請求項1所述之肽或其藥用鹽，其中所述肽有能力與 MHC-I 或-II 類分子結合，以及其中所述肽與 MHC 結合時能夠被 CD4 和 / 或 CD8 T 細胞識別。
- 【請求項3】 如請求項1或2所述的肽或其藥用鹽，其中所述肽包含非肽鍵。
- 【請求項4】 如請求項1或2所述的肽或其藥用鹽，其中所述肽為融合蛋白的一部分，該融合蛋白包含 HLA-DR 抗原相關不變鏈(Ii)的80個N-端氨基酸。
- 【請求項5】 一種抗體，特異性地識別如請求項1至4中任一項所述的肽。
- 【請求項6】 一種T細胞受體或其片段，與HLA配體反應，其中所述配體是如請求項1至4中任一項所述的肽。
- 【請求項7】 如請求項6所述的T細胞受體或其片段，其中所述T細胞受體係提供作為可溶性分子。
- 【請求項8】 如請求項7所述的T細胞受體或其片段，其中所述T細胞受體具有進一步的免疫刺激域或毒素之效應子功能。
- 【請求項9】 一種核酸，編碼如請求項1至4中任一項所述的肽、如請求項5所述的抗體或如請求項6至8中任一項所述的T細胞受體或其片段。

- 【請求項10】如請求項9所述的核酸，其中所述核酸連接到異源啟動子序列。
- 【請求項11】一種表達載體，能表達如請求項9或10所述的核酸。
- 【請求項12】一種重組宿主細胞，包含如請求項1至4中任一項所述的肽、如請求項5所述的抗體、如請求項6至8中任一項所述的T細胞受體或其片段、如請求項9或10所述的核酸或如請求項11所述的表達載體。
- 【請求項13】如請求項12所述的重組宿主細胞，其中該重組宿主細胞為抗原呈現細胞。
- 【請求項14】如請求項12所述的重組宿主細胞，其中所述宿主細胞為樹突細胞、T細胞或NK細胞。
- 【請求項15】一種體外製備活化T淋巴細胞的方法，該方法包括將T細胞與載有抗原的人I或II類MHC分子進行體外連接足夠的一段時間，從而以抗原特異性方式活化所述T細胞，該等人I或II類MHC分子在合適的抗原呈現細胞表面上或抗原呈現細胞上表達，其中所述抗原為如請求項1至3中任一項所述的肽。
- 【請求項16】一種活化的T淋巴細胞，由請求項15所述的方法製成，該活化的T淋巴細胞有選擇性地識別一細胞，該細胞呈現包含如請求項1至3中任一項所述之氨基酸序列的多肽。
- 【請求項17】一種藥物組合物，包括：至少一活性成分或共軛或標記的活性成分；以及一種藥用載體，該至少一

活性成分選自如請求項 1 至 4 中任一項所述的肽、如請求項 5 所述的抗體、如請求項 6 至 8 中任一項所述的 T 細胞受體或其片段、如請求項 9 或 10 所述的核酸、如請求項 11 所述的表達載體、如請求項 12 至 14 中任一項所述的宿主細胞或如請求項 16 所述的活化的 T 淋巴細胞。

【請求項 18】一種用於體外製備如請求項 1 至 4 中任一項所述的肽、如請求項 5 所述的抗體或如請求項 6 至 8 中任一項所述的 T 細胞受體或其片段的方法，所述方法包括培養如請求項 12 至 14 中任一項所述的重組宿主細胞，以及從所述重組宿主細胞和/或其培養基中分離出所述肽、所述抗體或所述 T 細胞受體或其片段。

【請求項 19】一種如請求項 1 至 4 中任一項所述的肽、如請求項 5 所述的抗體、如請求項 6 至 8 中任一項所述的 T 細胞受體或其片段、如請求項 9 或 10 所述的核酸、如請求項 11 所述的表達載體、如請求項 12 至 14 中任一項所述的重組宿主細胞或如請求項 16 所述的活化的 T 淋巴細胞在藥物中的用途。

【請求項 20】一種如請求項 16 所述的有效量的活化的 T 細胞在製造用於殺滅患者體內靶向細胞的醫藥品的用途，其中靶向細胞呈現一多肽，該多肽包含如請求項 1 至 3 中任一項所述的氨基酸序列。

【請求項 21】一種如請求項 1 至 4 中任一項所述的肽、如請求項 5 所述的抗體、如請求項 6 至 8 中任一項所述的

T 細胞受體或其片段、如請求項 9 或 10 所述的核酸、如請求項 11 所述的表達載體、如請求項 12 至 14 中任一項所述的重組宿主細胞或如請求項 16 所述的活化的 T 淋巴細胞在製造抗癌藥物中的用途。

【請求項 22】如請求項 21 所述的用途，其中所述癌症為選自下列選項所組成的群組：A M L；膽管癌；腦癌；乳腺癌；慢性淋巴細胞性白血病；結腸或直腸癌；食管癌；膽囊癌；肝癌；黑色素瘤；非霍奇金淋巴瘤；非小細胞肺癌；卵巢癌；胰腺癌；攝護腺癌；腎癌；小細胞肺癌；膀胱癌；子宮癌。

【請求項 23】一種套件，包括：

a) 包含一藥物組合物的一容器，所述藥物組合物含有如請求項 1 至 4 中任一項所述的肽、如請求項 5 所述的抗體、如請求項 6 至 8 中任一項所述的 T 細胞受體或其片段、如請求項 9 或 10 所述的核酸、如請求項 11 所述的表達載體、如請求項 12 至 14 中任一項所述的重組宿主細胞或如請求項 16 所述的活化的 T 淋巴細胞的溶液或凍乾形式。

【請求項 24】如請求項 23 所述的套件，進一步包括：

b) 一第二個容器，含有該凍乾粉劑型的一稀釋劑或重組溶液；

c) 至少一種以上的肽，該等肽選自由 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 198 所組成的群組；以及

d) 下列一或多者：(i)使用溶液的說明書、(ii)重組和/或使用凍乾粉劑型的說明書、(iii)緩衝劑、(iv)稀釋劑、(v)過濾液、(vi)針或(vii)注射器。

【發明圖式】

圖 1A

肽：LLDSAVYYL (A*02)

Seq ID NO: 1

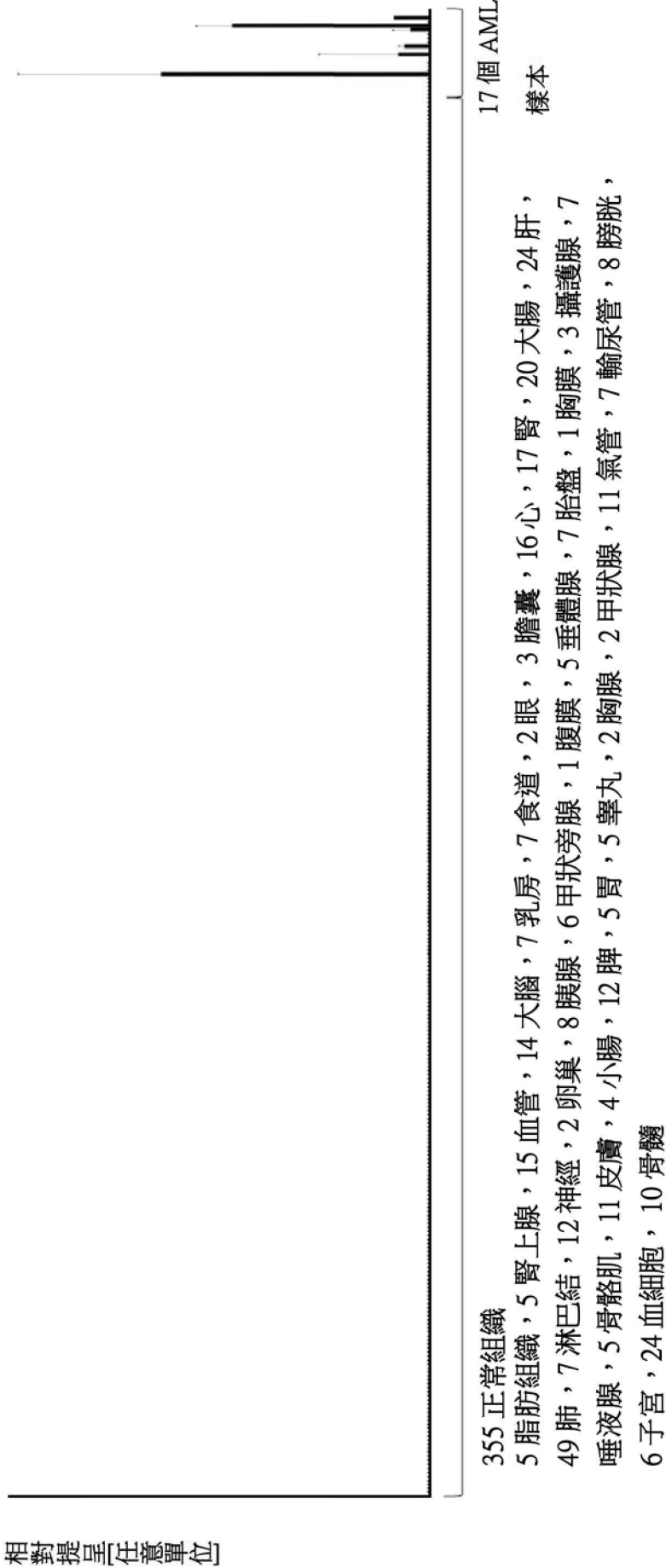
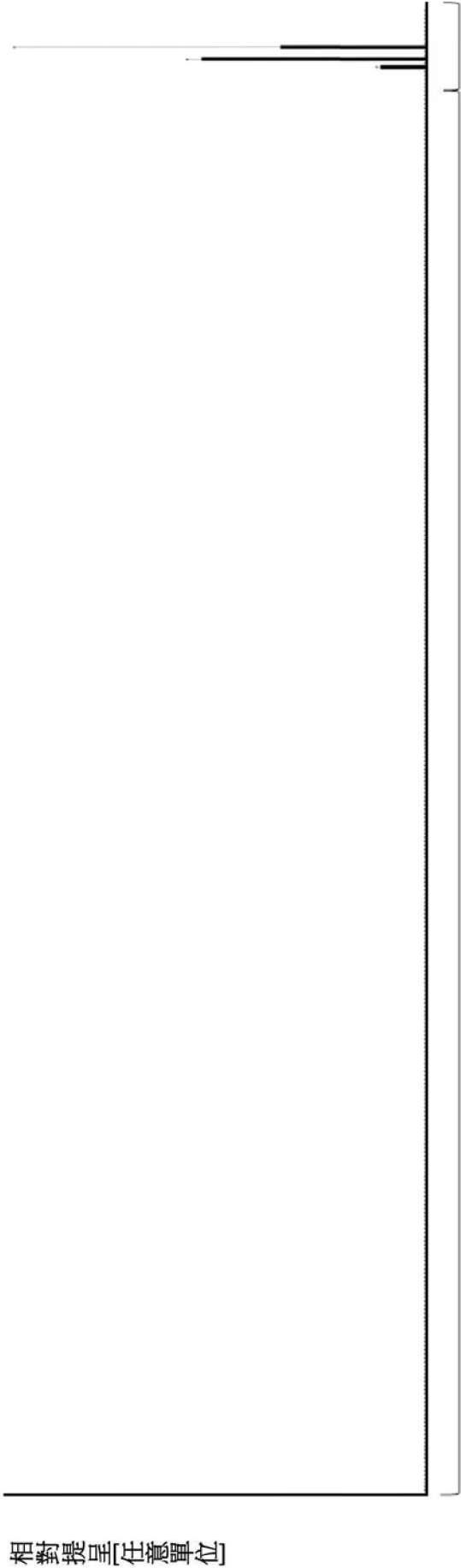


圖 1B

肽：LLWGDIMEL (A*02)

Seq ID NO: 7



355 正常組織
5 脂肪組織，5 腎上腺，15 血管，14 大腦，7 乳房，7 食道，2 眼，3 膽囊，16 心，17 腎，20 大腸，24 肝，
49 肺，7 淋巴結，12 神經，2 卵巢，8 胰腺，6 甲狀旁腺，1 腹膜，5 垂體腺，7 胎盤，1 胸膜，3 攝護腺，7
唾液腺，5 骨骼肌，11 皮膚，4 小腸，12 脾，5 胃，5 睪丸，2 胸腺，2 甲狀腺，11 氣管，7 輸尿管，8 膀
胱，6 子宮，24 血細胞，10 骨髓

圖 1C

肽：VILDPVHSV (A*02)

Seq ID NO: 10

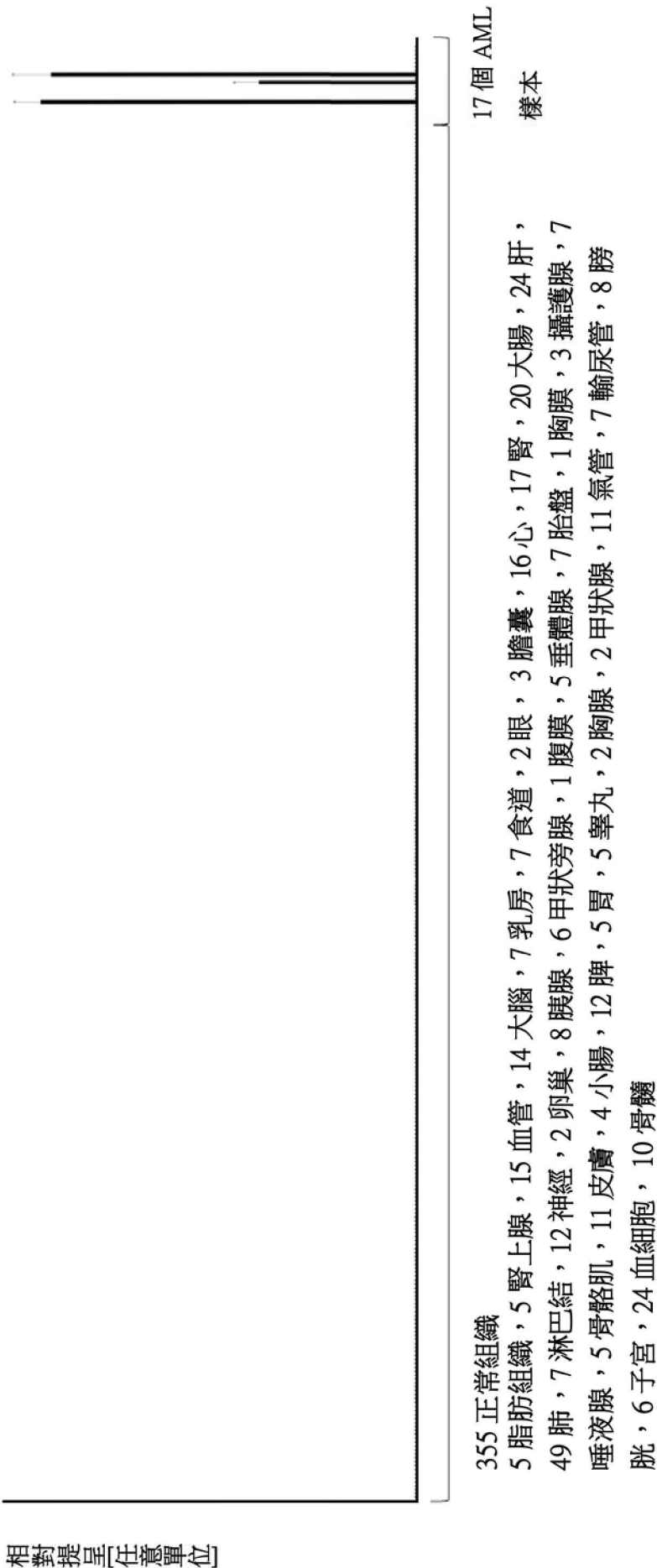
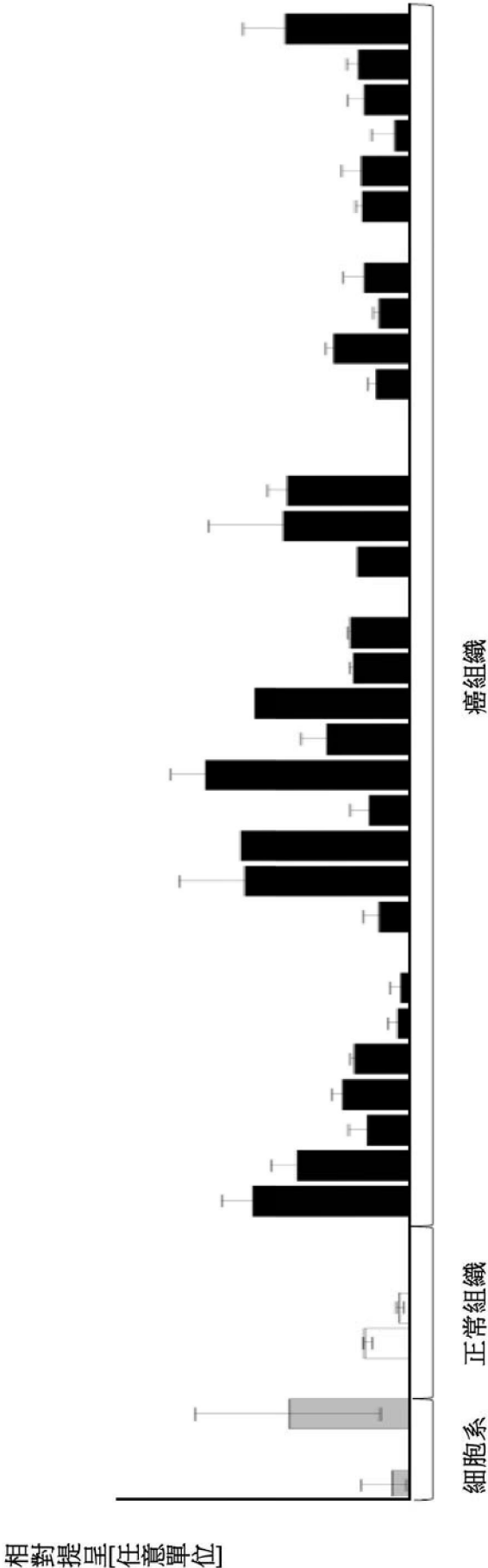


圖 1D

肽 : ILSDNLRQV (A*02)
SEQ ID NO: 138



肽檢測於

2 癌細胞系, 1 原發性癌症培養物, 5 正常組織 (1 腎上腺, 1 骨髓, 1 結腸, 1 腎臟, 1 胃), 34 癌組織 (2 骨髓癌, 2 乳腺癌, 1 食管癌, 1 腎癌, 3 白細胞白血病, 2 肝癌, 8 肺癌, 5 淋巴瘤, 2 骨癌, 2 胰腺癌, 1 直腸癌, 2 皮膚癌, 3 膀胱癌)
(從左到右)

圖 2A

基因：COL24A1
(肽： ALIESNTAL, SEQ ID NO: 12)

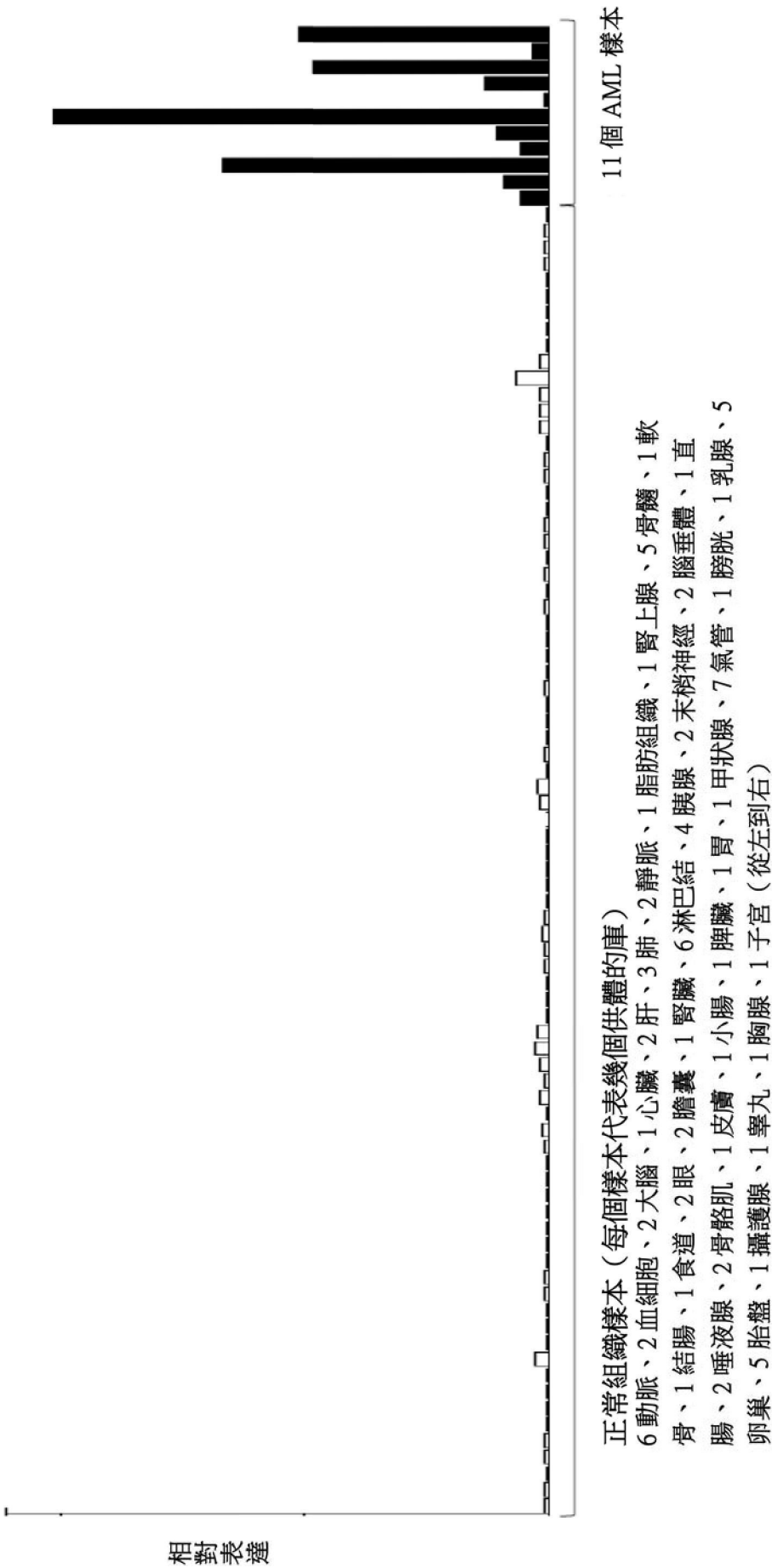


圖 2B

基因：SPNS3
(肽： TLLASYVFL, SEQ ID NO: 96)

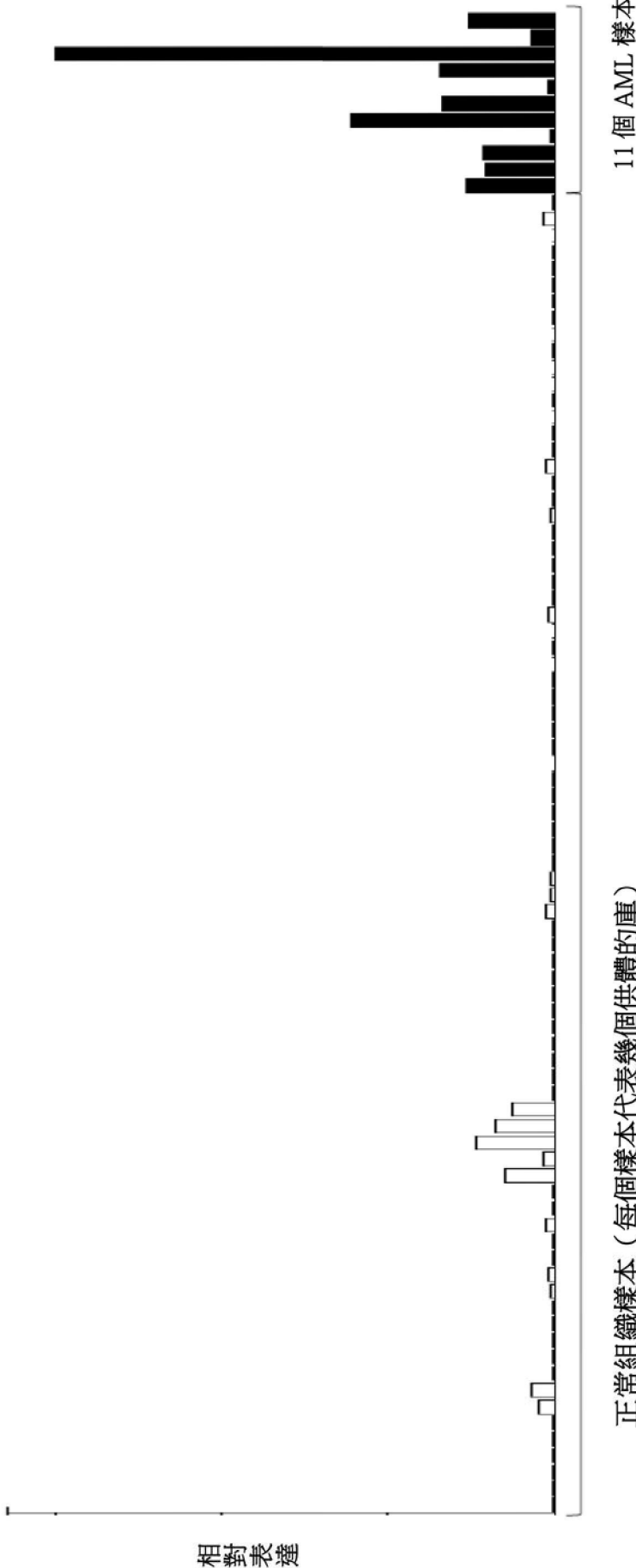


圖 2C

基因：KCNE1L
(肽： ALAQGAERV, SEQ ID NO : 102)

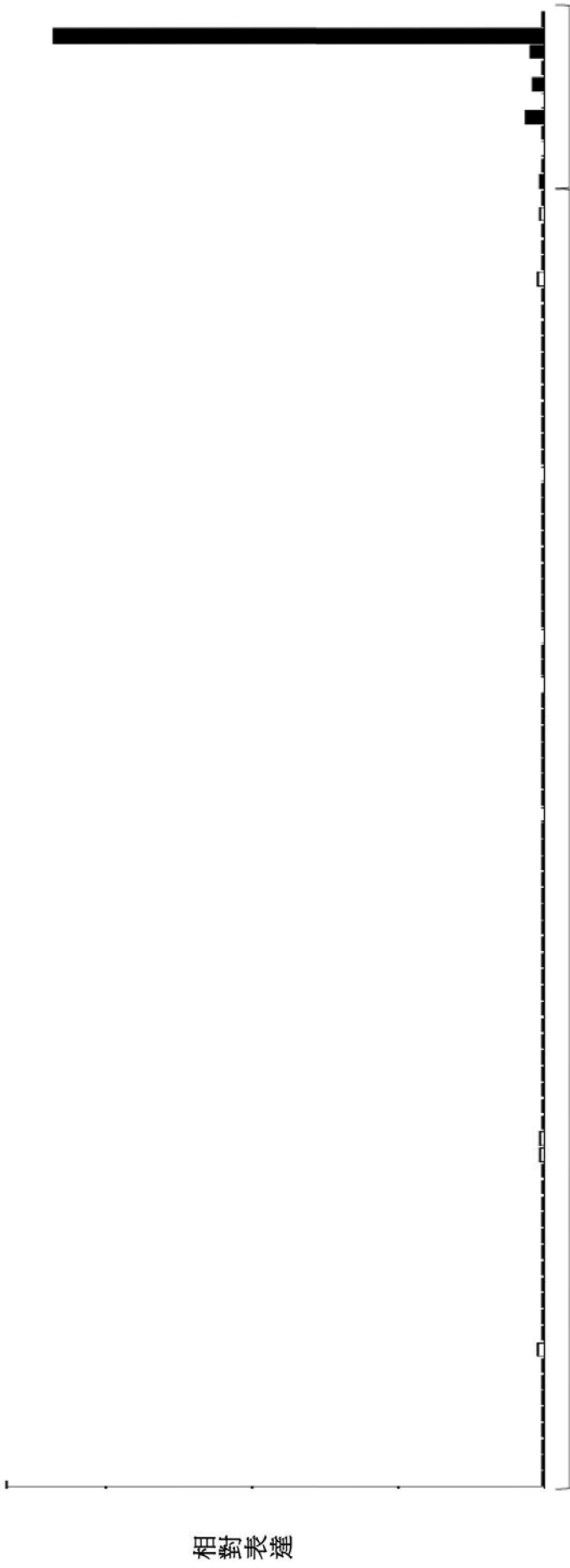
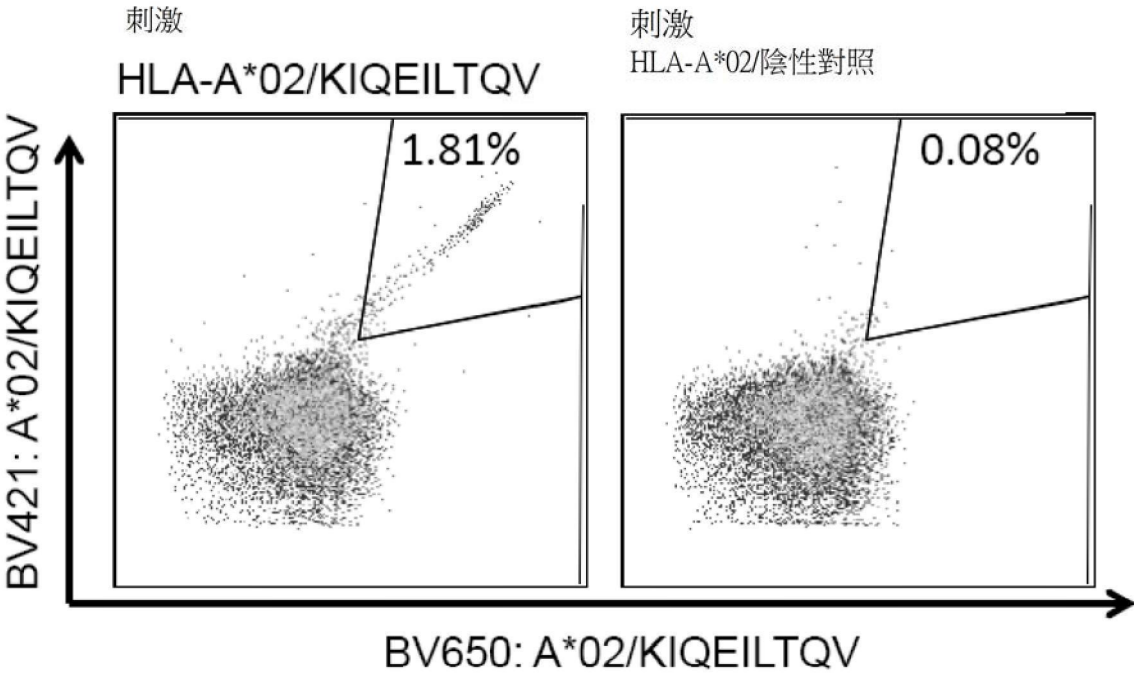


圖 3

A SEQ ID NO : 198



B SEQ ID NO : 190

