



(21) 申請案號：111113655

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 28 日

(51) Int. Cl. :

C07K7/06 (2006.01)

C07K14/725 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

C12N15/12 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

C12N15/115 (2010.01)

A61K39/00 (2006.01)

G16B25/10 (2019.01)

C12P21/02 (2006.01)

(30) 優先權：2015/03/31 美國

62/140,767

2015/03/31 英國

1505585.8

(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)；史古兒 奧利佛 SCHOOR, OLIVER (DE)；弗里切 金斯 FRITSCH, JENS (DE)；辛格 哈皮特 SINGH, HARPREET (DE)；宋 寇雷特 SONG, COLETTE (DE)

(74) 代理人：李世章；彭國洋

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：48 項 圖式數：3 共 249 頁

(54) 名稱

用於腎細胞癌 (RCC) 免疫治療的新型肽和肽組合物和支架

(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 1A

肽 : ALIVSLPYL (A\*02)



1 脂肪組織, 3 腎上腺, 2 動脈, 3 骨髓, 7 腦, 3 乳房, 13 結腸, 1 卵巢, 1 十二指腸, 4 食管, 2 膽囊, 3 心臟, 4 白細胞樣本, 19 肝, 43 肺, 1 淋巴結, 1 卵巢, 6 胰腺癌, 2 周圍神經, 1 腹膜, 1 腦垂體, 3 胸膜, 1 攝護腺, 6 直肌, 3 骨骼肌, 3 皮膚, 2 小腸, 4 脾臟, 5 胃, 1 睪丸, 2 胸腺, 3 甲狀腺, 2 子宮, 2 靜脈, 12 腎

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】用於腎細胞癌 (RCC) 免疫治療的新型肽和肽組合物和支架

【英文發明名稱】NOVEL PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES AND SCAFFOLDS FOR USE IN IMMUNOTHERAPY AGAINST RENAL CELL CARCINOMA (RCC) 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（ 1A ）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】用於腎細胞癌 (RCC) 免疫治療的新型肽和肽組合物和支架

【英文發明名稱】NOVEL PEPTIDES AND COMBINATION OF PEPTIDES AND SCAFFOLDS FOR USE IN IMMUNOTHERAPY AGAINST RENAL CELL CARCINOMA (RCC) 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】腎癌在男性中比在女性中更為常見，2012年，在全球範圍內，是男性（214000例）第9大常見癌症，是

女性（124000例）第14大常見癌症。70%的新發病例發生于人類發展水準較高和很高的國家，34%的估計新發病例在歐洲和19%在北美。2012年估計有143000人死於腎癌（男性91000人，女性52000）；在全球範圍，腎癌是癌症死亡的第16大最常見原因。

【0004】 捷克共和國發病率最高。北歐、東歐、北美和澳大利亞發病率也較高。非洲和東亞大部分地區預計發病率低。病死率在高度發達的國家（總死亡率與發病率之比為0.4）低於人類發展水準較低或中等的國家（0.5）。只有3.1%的確診病例在非洲，但5.7%的死亡病例發生在該地區。發病率和死亡率在人類發展水準不同的許多國家一直在增加（World Cancer Report, 2014）。

【0005】 大多數腎癌為腎細胞癌（RCC），這是腎實質內不同細胞類型產生的異構級腫瘤。大部分是透明細胞腎癌（約占腎癌症病例的70%），其次為乳頭狀（10-15%）、嫌色（約5%）和集合管（<1%）腎細胞癌。每個腎細胞瘤亞型都具有明顯的遺傳特徵（Moch, 2013; World Health Organization Classification of Tumours, 2004）。

【0006】 腎細胞癌（RCC）的特徵在於無早期體征、臨床表現不同以及耐放射和化療。RCC患者中共有25-30%的患者在開始時出現明顯的轉移（Hofmann et al., 2005）。約三分之一的RCC患者會隨著時間推移而患轉移性疾病。因此，在所有RCC患者中，有將近50-60%

的患者最終會出現轉移性疾病 (Bleumer et al., 2003; Hofmann et al., 2005)。在轉移性疾病患者中，約 75% 的患者有肺轉移瘤，36% 的患者有淋巴結及/或軟組織受累，20% 的患者有骨骼受累，18% 的患者有肝臟受累 (Sachdeva et al., 2010)。

**【0007】** 接受基於細胞因數一線全身治療的轉移性疾病的 RCC 患者可分為基於 5 個預後因素預測生存的風險人群 (Motzer et al., 2004)。與較短生存期相關的預治療特點是低 Karnofsky 功能狀態 (<80%)、高血清乳酸脫氫酶 (>1.5 ULN)、低血紅蛋白 (<LLN)、高校正血清鈣 (>10 mg/dL) 和診斷至治療的時間 <1 年。基於這些風險因素，患者被分為三個風險群體。18% 的患者為零危險因素 (有利風險)，其至死亡的中位時間為 30 個月。62% 的患者有一個或兩個危險因素 (中等風險)，這個組的中位生存時間為 14 個月。有 3 個或更多風險因素 (差風險) 的患者占 20%，其中位生存時間為 5 個月。這種 MSKCC 風險組分類方法在臨床實踐中廣泛應用於晚期 RCC。風險分類可用於規劃和解釋臨床試驗結果和指導治療。

**【0008】** RCC 的風險因素是吸煙和肥胖。不同的薈萃分析證實，曾經吸煙與從不吸煙相比，可增加腎癌的風險 (Cho et al., 2011; Hunt et al., 2005)。對於與每天吸煙數量相關的風險，也存在劑量依賴性增加。風險在戒煙後 5 年期間下降。超重尤其是肥胖是對女性和男性的

腎癌危險因素 (Ljungberg et al., 2011)。可歸因於超重和肥胖的腎癌所有病例比例估計在美國約 40%，在歐洲國家最高 40% (Renehan et al., 2008; Renehan et al., 2010)。肥胖影響腎致癌作用的機制尚不清楚。性類固醇激素可能會透過內分泌受體介導的直接影響腎細胞增殖。肥胖與內分泌失調 (如性荷爾蒙結合球蛋白和孕激素水準下降、胰島素抗性) 以及生長因數水準 (例如胰島素樣生長因數 1 (IGF-1)) 下降均可能會導致腎癌。最近，一項病例對照研究報告了透明細胞癌與肥胖存在著更強的關聯 (World Cancer Report, 2014)。

**【0009】** 初始治療最常見是部分或完全切除患病腎臟，仍然是主要的有效治療方法 (Rini et al., 2008)。對於預後得分較差患者的一線治療，數個癌症組織和協會制定的指南推薦受體酪氨酸激酶抑制劑 (TKI) 舒尼替尼 (Sutent®) 和帕唑帕尼 (Votrient®)、單克隆抗體貝伐單抗 (阿瓦斯丁®) 與干擾素  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 和 mTOR 抑制劑 temsirolimus (Torisel®) 組合。根據美國 NCCN 以及歐洲 EAU 和 ESMO 詳細說明的指導，TKI 索拉非尼、帕唑帕尼或最近的阿西替尼被推薦作為之前細胞因數 (IFN- $\alpha$ 、IL-2) 治療失敗的 RCC 患者的二線治療。NCCN 指導還建議舒尼替尼用於此情況 (根據 NCCN 分類 I 的高水準證據)。

**【0010】** 依維莫司和阿西替尼被推薦作為根據現有指導未從 TKI 的 VEGF 靶向療法獲益的患者的二線治療。



【0011】 RCC 的已知免疫原性代表了支持在晚期 RCC 中使用免疫治療和癌症疫苗的基礎。

【0012】 淋巴細胞 PD-1 表達和 RCC 晚期分期、分級和預後以及 RCC 腫瘤細胞選擇性 PD-L1 表達之間的有趣相關性以及其與較差臨床結果的潛在關聯性導致新的抗 PD-1/PD-L1 製劑的開發，單獨使用或與抗血管生成藥物或其他免疫治療方法聯合使用治療 RCC (Massari et al., 2015)。

【0013】 在晚期 RCC 中，一項名為 TRIST 研究的 III 期癌症疫苗試驗評估了 TroVax (使用腫瘤相關抗原 5T4 的疫苗，和痘病毒載體) 加入到一線標準治療後是否延長局部晚期或 mRCC 患者的生存期。兩組均未達到中位生存期，399 名患者 (54%) 繼續參加研究，但是資料分析證實了之前的臨床效果，這表明 TroVax 具有免疫活性，5T4-特異性抗體反應強度與生存期改善存在相關性。另外，有幾項研究使用 RCC 中過度表達的表位尋找肽疫苗。

【0014】 腫瘤疫苗的各種方法已在研究中。採用全腫瘤方法 (包括腫瘤細胞裂解物，與腫瘤細胞的樹突狀細胞融合體或整個腫瘤 RNA) 的研究在 RCC 患者中完成，在一些試驗中報告了腫瘤病灶的緩解 (Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001)。

【0015】 在過去幾年中，在 RCC 中表達並由抗原特異性 CTL 識別的幾種人 TAA 已使用表達克隆、反向免疫

學方法或透過應用 DNA 微陣列技術進行了定義和描述 (Dannenmann et al., 2013; Michael and Pandha, 2003; Minami et al., 2014; Renkvist et al., 2001; Wierecky et al., 2006)。

【0016】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數，尤其是 RCC。通常也有必要確定代表癌症生物標誌物的因數，尤其是 RCC，從而更好地診斷癌症、評估預後和預測治療成功性。

【0017】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。

【0018】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通過打破先前確立的耐受性而引發抗癌反應。這類 TAA 的典型例子為 Her-2/neu、生存素、端粒酶或 WT1。
- d) 腫瘤特異性抗原：這些獨特的 TAA 產生于正常基因（如  $\beta$ -catenin、CDK4 等）的突變。這些分子變化中有一些與致瘤性轉化及/或進展相關。腫瘤特異性抗原一般可在不對正常組織帶來自體免疫反應風險的情況下誘導很強的免疫反應。另一方面，這些 TAA 在多數情況下只與其上確認了有 TAA 的確切腫瘤相關，並且通常在許多個體腫瘤之間並不都共用 TAA。在含有腫瘤特定（相關）同種型蛋白的情況下，如果肽源

自腫瘤（相關）外顯子也可能出現肽腫瘤特異性（或相關性）。

e) 由異常翻譯後修飾產生的 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 16 型病毒蛋白、E 6 和 E 7，它們在宮頸癌中表達。

**【0019】** 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（M H C）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、轉錄因數等，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。

**【0020】** M H C 分子有兩類：M H C I 類和 M H C II 類。M H C I 類分子由一條  $\alpha$  重鏈和  $\beta$ -2-微球蛋白，M H C II

類分子由一條  $\alpha$  和一條  $\beta$  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。

【0021】 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。

【0022】 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。

【0023】 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) 友好的細胞因數環境 (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)。

【0024】 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)。

【0025】 本發明的拉長 (較長) 肽可作為 MHC-II 類活性表位。

【0026】 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  $T_H1$  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。

【0027】 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 細胞也能通過分泌干擾素- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 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數的證據 (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014)。

【0028】 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)。

【0029】 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。

【0030】 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。

【0031】 在 MHC-I 類依賴性免疫反應中，肽不僅能與腫瘤細胞表達的某些 MHC-I 類分子結合，而且它們之後還必須能被 T 細胞負載的特異性 T 細胞受體 (TCR) 識別。

【0032】 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（Singh-Jasuja et al., 2004）。至關重要的是，表位存在於抗原氨基酸序列中，以確保這種來自腫瘤相關抗原的肽（「免疫原性肽」）可導致體外或體內 T 細胞反應。

**【0033】**基本上，任何能與MHC分子結合的肽都可能充當一個T細胞表位。誘導體外或體內T細胞反應的前提是存在具有相應TCR的T細胞並且不存在對該特定表位的免疫耐受性。

**【0034】**因此，TAA是基於T細胞療法（包括但不限於腫瘤疫苗）研發的起點。識別和表徵TAA的方法通常基於對患者或健康受試者T細胞的使用情況，或基於腫瘤與正常組織肽之間差別轉錄特性或差別表達模式的產生。然而，對腫瘤組織或人腫瘤細胞株中過量表達或選擇性表達的基因的識別並不提供在免疫療法中使用這些基因所轉錄抗原的準確資訊。這是因為，有著相應TCR的T細胞必須要存在而且對這個特定表位的免疫耐受性必須不存在或為最低水準，因此，這些抗原的表位只有一部分適合這種應用。



因此，在本發明的一非常優選的實施例中，只選擇那些針對可發現功能性及/或增殖性T細胞情況的過量呈現或選擇性呈現肽，這一點非常重要。這種功能性T細胞被定義為在以特異性抗原刺激後能夠克隆地擴展並能夠執行效應子功能（「效應子T細胞」）的T細胞。

**【0035】** 在通過根據本發明的特定TCR（例如可溶性TCR）和抗體或其他結合分子（支架）靶向作用於肽-MHC的情況下，潛在肽的免疫原性是次要的。在這些情況下，呈現是決定因素。

#### **【發明內容】**

**【0036】** 在本發明的第一方面，本發明涉及一種肽，包含選自包括 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 的組的一個氨基酸序列、或該序列的與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 具有至少 77%，優選至少 88% 同源（優選至少 77% 或至少 88% 相同）的一種變體序列（其中所述變體與 MHC 結合及/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）。

**【0037】** 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:162 優選為 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 的組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 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。

【0038】 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 4A 和 B 中的肽還可用於診斷及/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。

【0039】 表 1：本發明中的肽

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
1	ALIVSLPYL	10786	SLC17A3
2	ILWREVVTL	3299	HSF4
3	RLLGEVQAL	3299	HSF4
4	FLSQDIITV	5972	REN
5	YLYPNLTRL	6540	SLC6A13
6	VLFELSKTV	23250	ATP11A
7	FLLSLIDRL	112399	EGLN3
8	GLASFKSFL	8490	RGS5
9	ILLQKPDSV	8490	RGS5
10	KLLQNNYGL	8490	RGS5
11	FIQTEAPKEV	8490	RGS5
12	ALDPSGNQLI	54437	SEMA5B
13	KIMAQILTV	120892	LRRK2
14	ALLTETIFL	120892	LRRK2
15	ILIKHLVKV	143872	ARHGAP42
16	FMPEELPQL	55258	THNSL2
17	ILAQQVHAL	113220	KIF12

18	YVLDLAAKV	47	ACLY
19	LLDPGSLQL	646658	SYNDIG1L
20	AVANTTFTV	80270	HSD3B7
21	RLIQGDQILSV	10207	INADL
22	FLSPPLPSV	593, 641649	BCKDHA, TMEM91
23	YIQEVVQYI	23236	PLCB1
24	FTLGTTVFL	4717	NDUFC1
25	LLVPAHLVAA	11082	ESM1
26	SLMEILYTL	91949	COG7
27	SLSDLLVSL	23596	OPN3
28	FIADLVVGL	2023, 2026, 2027	ENO1, ENO2, ENO3
29	ILLDLEQAL	9820	CUL7
30	QLFYTKIFL	5351	PLOD1
31	VLFGLDPAVIKV	259217	HSPA12A
32	FLAGGIRGSGA	113730	KLHDC7B
33	FIADVVEKI	5654, 94031	HTRA1, HTRA3
34	ELNNQNFYL	11113	CIT
35	VLHSLQTQL	51129	ANGPTL4
36	SLFGKKYIL	2274	FHL2
37	VLAPVILML	8714	ABCC3
38	VLLDTILQL	11077	HSF2BP
39	YLLNLNHLGL	23471	TRAM1
40	YIQEHLLQI	10625	IVNS1ABP
41	GLLCTLQKL	25932	CLIC4
42	VILDTGTIQL	9027	NAT8
43	YLKDELDEL	23255	SOGA2
44	ALFSFVTAL	80727	TTYH3
45	ALLGIPLTL	3777, 60598	KCNK3, KCNK15
46	GLSEVLVQI	57553	MICAL3
47	TLAEVRAVQEI	56950	SMYD2
48	VVASNIMEV	5209	PFKFB3
49	VLIVEVPGV	111	ADCY5
50	SLSDHIVLL	3675	ITGA3
51	NLWPMILTL	3675	ITGA3
52	SILDAVQRV	137902	PXDNL

53	FLLEIRQTL	23161	SNX13
54	ALVAKGLVQA	10327	AKR1A1
55	YLALILPVL	9122	SLC16A4
56	ILMDFSNSM	3691	ITGB4
57	SLQKEILYL	55102	ATG2B
58	FLVDFEQSHL	1573	CYP2J2
59	SLKNNVSV	7045	TGFBI
60	ILWKDIEYV	143425	SYT9
61	SLMGILLRI	22900	CARD8
62	VLAGPAFLVQL	55244	SLC47A1
63	GLIEDHFDVTV	51752	ERAP1
64	LLAASVALA	4885	NPTX2
65	IYGGSVTGA	7167, 729708	TPI1, TPI1P1
66	TLLKTIKV	57545	CC2D2A
67	LLDVLAPLV	80781	COL18A1
68	YVLTQPPSV	28796, 28815, 28831, 3537, 3538	IGLV3-21, IGLV2-14, IGLJ3, IGLC1, IGLC2
69	ILADLLPSL	25979	DHRS7B
70	SLTALRLL	9920	KBTBD11
71	ALDGHLYAV	9920	KBTBD11
72	YSLEKVFGI	10916	MAGED2
73	GLDGIPFTV	7205	TRIP6
74	GLFHKQVTV	23037	PDZD2
75	FLIKSINLV	143879	KBTBD3
76	VLADDHLIEV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2, PDZK1, PDZK1P1
77	SLIKHKIML	523	ATP6V1A
78	ALLDTVVQA	8911, 8912	CACNA1I, CACNA1H
79	ALADIVWRA	84182	FAM188B
80	KLASMLETL	112464	PRKCDBP
81	SLLPALPKL	4036	LRP2
82	SLLQATDFMSL	7070	THY1
83	IQWSIVPEV	23151	GRAMD4
84	YLMDEGAHL	7358	UGDH
85	FVMSEIRTV	114991	ZNF618

86	GLLQGKLLALL	4835	NQO2
87	LADGVQKV	8542	APOL1
88	TLAELHISL	84166	NLRC5
89	SLLLAVTEV	3714	JAG2
90	FTLEKNFVI	1292	COL6A2
91	MLLSSLVSL	79001	VKORC1
92	FLFRDILEL	29102	DROSHA

【0040】 表2：本發明中的其他肽，之前與癌症無已知的關聯

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
93	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
94	ILHHKVYDL	1528	CYB5A
95	KLTDVGIATL	115701	ALPK2
96	TLAETLVNL	283372, 283373	ANKRD52
97	TLISELVQA	9820	CUL7
98	KIPPVSPSI	57561	ARRDC3
99	GLAPHLEQI	79711	IPO4
100	KLNVAPLAV	653784, 80097	MZT2A, MZT2B
101	HIYDKAFITV	2321	FLT1
102	LLFDVHTTL	65250	C5orf42
103	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
104	ALFEGVVRQI	6236	RRAD
105	ALADLDELLIRA	3339	HSPG2
106	VLMDLKALL	51428	DDX41
107	VLMDLKALLL	51428	DDX41
108	VLISVLQAI	26999	CYFIP2
109	YLWSRVEKL	120892	LRRK2
110	LLDLHSYLL	10299	MARCH6
111	TLLETETMLL	80817	CEP44
112	LLFDHLEPIEL	25780	RASGRP3
113	SLFDWNVKL	134111	UBE2QL1
114	ALAVNISAA	908	CCT6A

【0041】 表3：用於例如個人化癌症療法的其他肽

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
115	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
116	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
117	VLFGELPAL	8701	DNAH11
118	FLNAIETAL	8701	DNAH11
119	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
120	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
121	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
122	SLDPSSPQV	9514	GAL3ST1
123	YVDPVITSI	4233	MET
124	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
125	KLDPTKTTL	10397	NDRG1
126	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
127	VLAPLFVYL	2535, 8321, 8324	FZD2, FZD1, FZD7
128	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
129	VLAPRVLRA	5954	RCN1
130	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
131	VMAGDIYSV	123	PLIN2
132	SVASTITGV	123	PLIN2
133	QLIDYERQL	11072	DUSP14
134	VADKIHSV	11072	DUSP14
135	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
136	YQDPHSTAV	1956	EGFR
137	TLVAIVGV	60681	FKBP10
138	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y
139	ILNVDGLIGV	47	ACLY
140	SLANNVTSV	131566	DCBLD2
141	LLVDDSFLHTV	253982	ASPHD1
142	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
143	ALFVRLALA	7045	TGFBI
144	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1

序列 ID 號	序列	基因 ID	正式基因符號
145	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
146	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1
147	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
148	KLLTEVHAA	101	ADAM8
149	SILTIEDGIFEV	100287551, 3306, 3312	HSPA8P8, HSPA2, HSPA8
150	TLMPNINKL	5169	ENPP3
151	YMYEGPAPRI	5169	ENPP3

【0042】 本發明還一般涉及本發明的肽用於治療增殖性疾病，例如，肺癌、腦癌、胃癌、結腸癌或直腸癌、肝癌、胰腺癌、攝護腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌。

【0043】 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:114 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:63（見表 1）的組，並且其用於 RCC、肺癌、腦癌、胃癌、結腸癌或直腸癌、肝癌、胰腺癌、攝護腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌、優選為 RCC 的免疫治療。

【0044】 如示下麵的表 4 A 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 E 和實例 1。

【0045】 表 4 A：本發明的肽及其在其他增殖性疾病（特別是其他癌性疾病）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。

SEQ ID 號	序列	其他相關器官/疾病
1	ALIVSLPYL	肝臟
2	ILWREVVTL	卵巢
5	YLYPNLTRL	肝臟
8	GLASFKSFL	胰腺
12	ALDPSGNQLI	卵巢
14	ALLTETIFL	白細胞
15	ILIKHLVKV	肝臟
16	FMPEELPQL	胰腺、乳腺、卵巢
21	RLIQGDQILSV	肺、結腸、直腸、肝、卵巢
23	YIQEVVQYI	肝臟
24	FTLGTTVFL	肝、攝護腺、白細胞、食管
26	SLMEILYTL	結腸、直腸、胰腺、攝護腺、卵巢
27	SLSDLLVSL	肺、肝、胰腺、白細胞
28	FIADLVVGL	黑色素瘤
29	ILLDLEQAL	肺、胰腺、攝護腺、乳腺、卵巢
30	QLFYTKIFL	肺、結腸、直腸、卵巢
31	VLFGLDPAVIKV	腦、卵巢
32	FLAGGIRGSGA	胃
33	FIADVVEKI	肺、白細胞、卵巢
34	ELNNQNFYL	黑色素瘤、食管
36	SLFGKKYIL	結腸、直腸
37	VLAPVILML	肺、結腸、直腸、胰腺、卵巢
38	VLLDTILQL	腦、肝、胰腺、黑色素瘤、卵巢
39	YLLNLNHLGL	肺、肝臟、白細胞
44	ALFSFVTAL	肺、黑色素瘤、卵巢
45	ALLGIPLTL	攝護腺、卵巢、食管
46	GLSEVLVQI	結腸、直腸
47	TLAEVRAVQEI	肝臟、黑色素瘤
49	VLIVEVPGV	卵巢
50	SLSDHIVLL	肺



SEQ ID 號	序列	其他相關器官/疾病
51	NLWPMILTL	肺、胰腺、食管
52	SILDAVQRV	肺、腦、胰腺、卵巢
54	ALVAKGLVQA	黑色素瘤、卵巢
55	YLALILPVL	黑色素瘤
56	ILMDFSNSM	胰腺
59	SLKNNVVS	胰腺、卵巢、食管
61	SLMGILLRI	白細胞
63	GLIEDHFDVTV	肺、結腸、直腸、攝護腺、白細胞、黑色素瘤、卵巢
65	IYGGSVTGA	乳腺
66	TLLKTIKV	腦
67	LLDVLAPLV	肺、胃、肝、胰腺、乳腺、食管
68	YVLTQPPSV	肺、胰腺、白細胞、食管
69	ILADLLPSL	肺、腦、胰腺、乳腺、卵巢
72	YSLEKVFGI	肝臟
73	GLDGIPFTV	腦、胰腺、乳腺、黑色素瘤
78	ALLDTVVQA	肝、攝護腺
79	ALADIVWRA	肺、腦、結腸、直腸、肝、胰腺、攝護腺、卵巢、食管
82	SLLQATDFMSL	結腸、直腸、胰腺、食管
84	YLMDEGAHL	肝臟
85	FVMSEIRTV	肝臟
86	GLLQGKLALL	肝臟、黑色素瘤
87	LADGVQKV	乳腺、黑色素瘤
88	TLAELHISL	卵巢
90	FTLEKNFVI	攝護腺
91	MLLSSLVSL	肺、肝臟
93	GVMAGDIYSV	肺、結腸、直腸、肝臟、食管
94	ILHHKVYDL	肝臟
96	TLAETLVNL	肺、胃、結腸、直腸、胰腺、攝護腺、乳腺、卵巢、食管
97	TLISELVQA	肺、結腸、直腸、胰腺、攝護腺、乳腺、黑色素瘤、卵巢、食管

SEQ ID 號	序列	其他相關器官/疾病
98	KIPPVSPSI	肺、肝臟、乳腺
99	GLAPHLEQI	肝、卵巢
100	KLNVAPLAV	肺、腦、結腸、直腸、肝、胰腺、黑色素瘤、卵巢
101	HIYDKAFITV	肝、卵巢
102	LLFDVHTTL	肺、腦
103	KLQDGLLHI	腦、結腸、直腸、肝
104	ALFEGVVRQI	肝臟、黑色素瘤、食管
105	ALADLDELLIRA	胰腺、黑色素瘤
107	VLMDLKALLL	攝護腺、白細胞、卵巢
108	VLISVLQAI	白細胞
109	YLWSRVEKL	胰腺、卵巢
110	LLDLHSYLL	胃、白細胞
111	TLLETEMLL	胰腺、乳腺
112	LLFDHLEPIEL	白細胞
113	SLFDWNVKL	肝、攝護腺
114	ALAVNISAA	肺、腦、肝臟、胰腺、食管
115	LLDPKTIFL	結腸、直腸、肝臟
116	GLVDIMVHL	卵巢
117	VLFGELPAL	肺、胰腺、乳腺、卵巢
119	RLHDENILL	肺、腦、結腸、直腸、肝、胰腺、攝護腺、卵巢、食管
121	ALLRTVVSV	肺、肝、胰腺、乳腺、卵巢
122	SLDPSSPQV	肝臟
123	YVDPVITSI	肺
124	ILSPLSVAL	肝臟、胰腺
125	KLDPTKTTL	攝護腺
126	KIQEILTQV	肺、腦、胃、結腸、直腸、肝臟、胰腺、白細胞、卵巢、食管
127	VLAPLFVYL	肺、胰腺、乳腺、黑色素瘤
128	YLEEDVYQL	肺、胰腺
129	VLAPRVLRA	肺、腦、結腸、直腸、肝、胰腺、卵巢

SEQ ID 號	序列	其他相關器官/疾病
130	ALPTVLVGV	肺、腦、胃、結腸、直腸、肝臟、黑色素瘤、食管
131	VMAGDIYSV	肺、肝、胰腺、食管
132	SVASTITGV	肝臟、乳腺
133	QLIDYERQL	肺、結腸、直腸、肝臟、胰腺、食管
134	VADKIHSV	胃、胰腺、食管
135	VVDEGPTGV	肺、腦、胃、肝、胰腺、白細胞、乳腺、卵巢、食管
136	YQDPHSTAV	腦、肝臟
137	TLVAIVVGV	肺、腦、胃、結腸、直腸、肝臟、胰腺、攝護腺、乳腺、卵巢
138	SLDTLMTYV	肺、腦、結腸、直腸、胰腺、攝護腺、白細胞、食管
139	ILNVDGLIGV	腦、結腸、直腸、肝、攝護腺
140	SLANNVTSV	肺、腦、胰腺、黑色素瘤、卵巢、食管
141	LLVDDSFLHTV	腦、肝、胰腺、黑色素瘤、卵巢、食管
142	SVDVSPPKV	肺、胰腺、黑色素瘤、食管
143	ALFVRLALA	肺、腦、胃、結腸、直腸、肝臟、黑色素瘤、食管
144	RLLDVLAPLV	肝臟
145	SLHFLILYV	肺、腦、結腸、直腸、肝臟、黑色素瘤、卵巢
146	KLIDLSQVMYL	肺、結腸、直腸、胰腺、卵巢
147	ALADKELLPSV	肺、結腸、直腸、肝臟、胰腺、黑色素瘤、卵巢
148	KLLTEVHAA	肺、胃、結腸、直腸、肝、胰腺、乳腺、卵巢、食管
149	SILTIEDGIFEV	肺、腦、結腸、直腸、肝、胰腺、攝護腺、白細胞、乳腺、黑色素瘤、卵巢
150	TLMPNINKL	肝臟

【0046】 表 4B：本發明的肽及其在其他增殖性疾病（特別是其他癌性疾病）中的特定用途。該表（如表 4A）顯示，對於其他腫瘤類型的選定肽，發現它們過量呈現（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，腫瘤樣本中的呈現更高。經測試過度呈現的正常組織有：脂肪組織、腎上腺、血細胞、血管、骨髓、腦、軟骨、食道、眼、膽囊、心臟、腎、大腸、肝、肺、淋巴結、神經、胰腺、甲狀腺、腹膜、垂體、胸膜、唾液腺、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、胸腺、甲狀腺、氣管、輸尿管、膀胱。

SEQ ID 號	序列	其他實體
2	ILWREVVTL	黑色素瘤、NHL
4	FLSQDIITV	子宮癌
6	VLFELSKTV	AML
8	GLASFKSFL	黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
10	KLLQNNYGL	BRCA、膽囊癌、膽管癌
12	ALDPSGNQLI	腦癌
13	KIMAQILTV	CLL、NHL
14	ALLTETIFL	NHL
15	ILIKHLVKV	子宮癌、NHL
17	ILAQQVHAL	子宮癌
18	YVLDLAAKV	SCLC、CLL、BRCA、黑色素瘤、子宮癌、NHL
20	AVANTTFTV	食管癌、膀胱癌、子宮癌
21	RLIQGDQILSV	SCLC、BRCA、食管癌、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌、OC
24	FTLGTTVFL	黑色素瘤、子宮癌、NHL
26	SLMEILYTL	黑色素瘤、膽囊癌、膽管癌、AML、OC、

		SCLC
27	SLSDLLVSL	CRC、黑色素瘤、子宮癌、AML、NHL
28	FIADLVVGL	SCLC、CLL、AML、NHL
29	ILLDLEQAL	黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌、AML、NHL、OC
30	QLFYTKIFL	黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
33	FIADVVEKI	SCLC、BRCA、食管癌
34	ELNNQNFYL	CRC、膀胱癌、AML、NHL
36	SLFGKKYIL	膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
38	VLLDTILQL	NSCLC、SCLC、CLL、BRCA、食管癌、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌、AML、NHL、OC
39	YLLNLNHLGL	NHL
40	YIQEHLQI	黑色素瘤
43	YLKDELDEL	食道癌、膽囊癌、膽管癌、NHL
45	ALLGIPLTL	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、OC
46	GLSEVLVQI	SCLC、HCC、黑色素瘤、膀胱癌、膽囊癌、膽管癌、NHL
48	VVASNIMEV	BRCA、黑色素瘤
49	VLIVEVPGV	膽囊癌、膽管癌、OC
50	SLSDHIVLL	PC、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、膽囊癌、膽管癌
51	NLWPMILTL	黑色素瘤、子宮癌、膽囊癌、膽管癌、食管癌
52	SILDAVQRV	SCLC、BRCA、黑色素瘤、子宮癌
54	ALVAKGLVQA	NHL
55	YLALILPVL	CLL
56	ILMDFSNSM	膀胱癌、膽囊癌、膽管癌
57	SLQKEILYL	黑色素瘤
59	SLKNNVSV	黑色素瘤、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
61	SLMGILLRI	BRCA
62	VLAGPAFLVQL	子宮癌
63	GLIEDHFDVTV	SCLC
64	LLAASVALA	腦癌、AML

65	IHYGGSVTGA	CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌
66	TLLKTIKIV	黑素瘤、膀胱癌
67	LLDVLAPLV	CRC、黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌
68	YVLTQPPSV	BRCA
69	ILADLLPSL	SCLC、黑色素瘤、食管癌、子宮癌、AML、NHL
72	YSLEKVFGI	腦癌、GC、CRC、PrC、BRCA、黑色素瘤、OC、膀胱癌、AML、PC
73	GLDGIPFTV	GC、膀胱癌、子宮癌、AML
75	FLIKSINLV	CLL、黑色素瘤、AML
76	VLADDHLIEV	HCC、膽囊癌、膽管癌
77	SLIKHKIML	CRC、黑色素瘤、子宮癌
78	ALLDTVVQA	BRCA
79	ALADIVWRA	SCLC、BRCA、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌、食管癌、OC
80	KLASMLETL	黑色素瘤
81	SLLPALPKL	BRCA
82	SLLQATDFMSL	NSCLC、腦癌、BRCA、黑色素瘤、子宮癌、NHL、PC
83	IQWSIVPEV	CLL、黑色素瘤、膽囊癌、膽管癌、AML、NHL
84	YLMDEGAHL	膽囊癌、膽管癌
85	FVMSEIRTV	子宮癌、膽囊癌、膽管癌
86	GLLQGKLALL	子宮癌、NHL
88	TLAELHISL	CLL、食管癌
89	SLLAVTEV	SCLC、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌
90	FTLEKNFVI	CRC、BRCA、PC
91	MLLSSLVSL	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、膽囊癌、膽管癌
92	FLFRDILEL	黑色素瘤、AML
93	GVMAGDIYSV	膽囊癌、膽管癌、PC
95	KLTDVGIATL	黑色素瘤、NHL
96	TLAETLVNL	SCLC、HCC、CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌、AML、NHL

97	TLISELVQA	SCLC、GC、HCC、CLL、黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌、NHL
98	KIPPVSPSI	子宮癌、NHL
99	GLAPHLEQI	BRCA、黑色素瘤、AML、NHL
100	KLNVAPLAV	CLL、BRCA、子宮癌、AML、NHL、OC
101	HIYDKAFITV	SCLC、BRCA
102	LLFDVHTTL	SCLC、黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、AML
103	KLQDGLLHI	SCLC、PC、黑色素瘤、OC、NHL
104	ALFEGVVRQI	膀胱癌
105	ALADLDELLIRA	BRCA
106	VLMDLKALL	AML
107	VLMDLKALLL	AML
108	VLISVLQAI	BRCA、AML、NHL
109	YLWSRVEKL	CLL、NHL
110	LLDLHSYLL	子宮癌
111	TLLETEMLL	膀胱癌
112	LLFDHLEPIEL	BRCA、NHL
113	SLFDWNVKL	SCLC、BRCA、食管癌、膽囊癌、膽管癌、AML、NHL
114	ALAVNISAA	GC、CRC、CLL、BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宮癌、膽囊癌、膽管癌、AML、NHL、PC

【0047】 NSCLC = 非小細胞肺癌，SCLC = 小細胞肺癌，RCC = 腎癌，CRC = 結腸或直腸癌，GC = 胃癌，HCC = 肝癌，PC = 胰腺癌，PrC = 攝護腺癌，BRCA = 乳腺癌，MCC = 梅克爾細胞癌，OC = 卵巢癌，NHL = 非霍奇金淋巴瘤，AML = 急性骨髓性白血病，CLL = 慢性淋巴細胞白血病。

【0048】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 21、27、29、30、33、37、39、44、50、51、52、

63、67、68、69、79、91、93、96、97、98、100、102、114、117、119、121、123、126、127、128、129、130、131、165、137、138、140、142、143、145、146、147、148 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療肺癌。

【0049】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 31、38、52、66、69、73、79、100、102、103、114、119、126、129、130、135、136、137、138、139、140、141、143、145 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療腦癌。

【0050】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 32、67、96、110、126、130、134、135、137、143 和 148 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療胃癌。

【0051】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 21、26、30、36、37、46、63、79、82、93、96、97、100、103、115、119、126、129、130、133、137、138、139、143、145、146、147、148 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療結直腸癌。

【0052】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 1、5、15、21、23、24、27、38、39、47、67、72、78、79、84、85、86、91、93、94、98、99、



100、101、103、104、113、114、115、119、121、122、124、126、129、130、131、132、133、135、136、137、139、141、143、144、145、147、148、149 和 150 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療肝癌。

【0053】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 8、16、26、27、29、37、38、51、52、56、59、67、68、69、73、79、82、96、97、100、105、109、111、114、117、119、121、124、126、127、128、129、131、133、134、135、137、138、140、141、142、146、147、148 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療胰腺癌。

【0054】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 24、26、29、45、63、78、79、90、96、97、107、113、119、125、137、138、139 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療攝護腺癌。

【0055】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 14、24、27、33、39、61、63、68、107、108、110、112、126、135、138 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案中的肽聯合用於治療白血病。

【0056】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 16、29、65、67、69、73、87、96、97、98、111、117、121、127、132、135、137、148 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療乳腺癌。

【0057】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 28、34、38、44、47、54、55、63、73、86、87、97、100、104、105、127、130、140、141、142、143、145、147 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療黑色素瘤。

【0058】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 2、12、16、21、26、29、30、31、33、37、38、44、45、49、52、54、59、63、69、79、88、96、97、99、100、101、107、109、116、117、119、121、126、129、135、137、140、141、145、146、147、148 和 149 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療卵巢癌。

【0059】 因此，本發明的另一個方面涉及根據 SEQ ID 號 24、34、45、51、59、67、68、79、82、93、96、97、104、114、119、126、130、131、133、134、135、138、140、141、142、143 和 148 中任一項所述的本發明的至少一種肽與一種優選實施方案的肽聯合用於治療食管癌。

【0060】 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 RCC、肺癌、腦癌、胃癌、結直腸癌、肝癌、胰腺癌、攝護腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食道癌、優選為 RCC 組中的增殖性疾病。

【0061】 優選情況是，本發明涉根據 SEQ ID NO:1 及 / 或 15 的本發明中肽的用途 - 優選聯合用於治療選自 RCC、肺癌、腦癌、胃癌、結直腸癌、肝癌、胰腺癌、攝護腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食管癌組的增殖性疾病，優選為 RCC。

【0062】 本發明還涉及本發明的肽，其具有與主要組織相容性複合體 (MHC) I 或以拉長形式存在的例如長度變化的 - MHC-II 類分子結合的能力。

【0063】 本發明進一步涉及本發明中的肽，其中所述肽 (每種肽) 系由或基本系由根據 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 的一個氨基酸序列組成。

【0064】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中所述肽被修飾及 / 或包含非肽鍵。

【0065】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中所述肽為融合蛋白的一部分，特別是與 HLA-DR 抗原相關不變鏈 (Ii) 的 N-端氨基酸融合，或與抗體 (例如，樹突狀細胞特定抗體) 或抗體的序列融合。

【0066】 本發明進一步涉及一種核酸，其編碼本發明的肽。本發明進一步涉及一種本發明的核酸，為 DNA、cDNA、PNA、RNA，也可能為其組合物。

【0067】 本發明進一步涉及一種能表達及/或表達本發明核酸的表達載體。

【0068】 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。

【0069】 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。

【0070】 本發明進一步涉及本發明的 T 細胞受體（TCR），特別是可溶性 TCR（sTCRs）和加工為自體或異體 T 細胞的克隆 TCR，以及製造這些 TCR 的方法和載有所述 TCR 或所述 TCR 交叉反應的 NK 細胞的製造方法。

【0071】 抗體和 TCR 是根據本發明 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:151 的肽現有免疫治療用途的另外實施方案。

【0072】 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。

【0073】 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。

【0074】 本發明進一步涉及本發明中的所述方法，其中抗原通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。

【0075】 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.114、優選為含 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 63 所述肽的一個表達載體、或一個變體氨基酸序列組成。

【0076】 本發明進一步涉及以本發明方法製造的活化 T 細胞，其中所述 T 細胞有選擇性地識別一種細胞，該細胞表達含一種本發明氨基酸序列的多肽。

【0077】 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。

【0078】 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 T 淋巴細胞、T 細胞受體或抗體或其他肽 - 及 / 或肽 - MHC 結合分子的用途。所述藥劑優選為具有抗癌活性。

【0079】 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。

【0080】 本發明還一般涉及本發明的用途，其中所述癌細胞為 RCC、肺癌、腦癌、胃癌、結腸或直腸癌、肝癌、胰腺癌、攝護腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食管癌組的增殖性疾病，優選為 RCC 細胞。

【0081】 本發明進一步涉及一種基於本發明肽的生物標誌物，在此成為「靶標」，其可用於診斷癌症，優選為 RCC。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 TCR 可用於染色腫瘤切片以檢測是否存在相關肽與 MHC 複合。

【0082】 或者，抗體具有進一步的效應子功能，如免疫刺激域或毒素。

【0083】 本發明還涉及這些癌症治療中新靶點的用途。

【0084】 ABCC3 與肝細胞癌、卵巢癌、直腸癌、骨肉瘤、乳腺癌、非小細胞肺癌、膠質母細胞瘤和胰腺導管腺癌相關 (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013; Molina-Pinelo et al., 2014; Goode et al., 2014; Liu et al., 2014c; Yu et al., 2014; Sedlakova et al., 2015; Zuniga-Garcia et al., 2015; Wang et al., 2014c)。

【0085】 *ACLY* 在各種腫瘤（如乳腺癌、肝癌、結腸癌、肺癌和攝護腺癌）中異常表達，與腫瘤分期和分化負相關（Zu et al., 2012）。

【0086】 胰腺癌中 *ADAM8* 過度表達與胰腺導管腺癌細胞的遷移和侵襲性增加相關（Schlomann et al., 2015）。*ADAM8* 參與肺癌、腎細胞癌和腦癌中腫瘤細胞的遷移和侵襲（Mochizuki and Okada, 2007）。

【0087】 *ADCY5* 基因超甲基化和 mRNA 表達減少發生於急性淋巴細胞性白血病、慢性淋巴細胞性白血病和胰腺癌（Kuang et al., 2008; Tong et al., 2010; Sato et al., 2013a）。

【0088】 *AHNAK2* 是參與腫瘤生長和侵襲的成纖維細胞生長因數 1（*FGF1*）非經典分泌途徑的重要元素（Kirov et al., 2015）。

【0089】 研究表明 *AIFM2* 的表達在大多數人類腫瘤中被下調（Wu et al., 2004; Mei et al., 2006）。*AIFM2* 被確定為與卵巢癌細胞系致瘤性的功能抑制相關的 9 個基因之一（Notaridou et al., 2011）。

【0090】 *AKR1A1* 被證明在乳腺癌中上調，與肺癌和喉癌相關（Penning, 2014; Hlavac et al., 2014; Kim et al., 2012）。

【0091】 *ALPK2* 表達在結直腸腺瘤中下調，在正常結腸隱窩轉向腺瘤過程中可能發揮作用（Yoshida et al.,

2012)。ALPK2 顯示胃癌中拷貝數損失和表達不足之間有很強的關聯 (Junnila et al., 2010)。

【0092】ANGPTL4 顯示在乳腺癌、漿液性卵巢癌中上調，且與成膠質細胞瘤、肝細胞癌、口腔鱗狀細胞癌和肺癌相關 (Ferguson et al., 2013; Tanaka et al., 2015; Ng et al., 2014; Garner et al., 2015; Schumann et al., 2015; Johnson et al., 2015)。

【0093】APOL1 表達在腎細胞癌組織和細胞系中下調 (Hu et al., 2012)。

【0094】ARRDC3 與乳腺癌和攝護腺癌有關 (Wang et al., 2014a; Huang et al., 2012a)。

【0095】ATG2B 移碼突變在高微衛星不穩定性的胃癌和結腸癌中普遍存在 (Kang et al., 2009)。

【0096】ATP11A 顯示在結直腸癌中上調，與淋巴細胞白血病相關，且被認為是結直腸癌轉移的生物標誌物 (Miyoshi et al., 2010; Zhang et al., 2005)。

【0097】ATP2A1 被證明在癌症惡病質中上調 (Fontes-Oliveira et al., 2013)。

【0098】ATP2A2 與皮膚癌、結腸癌和肺癌有關 (Korosec et al., 2006; Hovnanian, 2007)。

【0099】CACNA1H 與醛固酮分泌腺瘤、攝護腺癌和乳腺癌有關 (Felizola et al., 2014; Asaga et al., 2006; Gackiere et al., 2013)。



【0100】 CACNA1I 與結腸癌、乳腺癌和攝護腺癌有關 (Basson et al., 2015)。

【0101】 CARD8 在幾個癌症細胞系 (包括卵巢癌、乳腺癌和肺癌) 以及從結直腸癌、胃癌或乳腺癌患者中獲得的組織中高表達 (Pathan et al., 2001; Yamamoto et al., 2005)。

【0102】 CCT6A 與睪丸生殖細胞腫瘤和惡性黑色素瘤有關 (Tanic et al., 2006; Alagaratnam et al., 2011)。

【0103】 與鄰近非腫瘤組織相比, CIT 經常在肝細胞癌 (HCC) 中上調。RNAi 敲減 CIT 抑制體內 HCC 的致瘤性 (Fu et al., 2011)。

【0104】 CLIC4 在腫瘤細胞中下調和腫瘤基質中上調對於許多人類癌症 (包括腎癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌和皮膚癌) 很常見, 標誌著惡性進展 (Suh et al., 2007a; Okudela et al., 2014; Suh et al., 2007b)。

【0105】 據報告, 膀胱癌、橫紋肌樣腫瘤及卵巢癌和基因內的特定多態性的 COL18A1 差異表達被證明能增加散發性乳房癌的風險 (Fang et al., 2013; Gadd et al., 2010; Lourenco et al., 2006; Peters et al., 2005)。

【0106】 COL6A2 與子宮頸癌、高級別漿液性卵巢癌整體存活差、B-前體急性淋巴細胞白血病、肝細胞癌、原發性和轉移性腦腫瘤、肺鱗狀上皮細胞癌、頭頸部鱗狀細胞

癌相關，且被描述為子宮頸癌的潛在 DNA 甲基化 (Cheon et al., 2014; Chen et al., 2014c; Vachani et al., 2007; Liu et al., 2010b; Seong et al., 2012; Hogan et al., 2011)。

【0107】 CUL7 與胰腺癌和肝細胞癌有關 (Wang et al., 2014b; Paradis et al., 2013)。

【0108】 CYB5A 表達在肝細胞癌下調 (Khan et al., 2013a)。CYB5A 是胰腺導管腺癌的預後因數，透過自噬誘導和 TRAF6 調製發揮其腫瘤抑制功能 (Giovannetti et al., 2014)。CYB5A 編碼一種解毒致癌分子的酶，是胰腺癌的一個預後因素 (Blanke et al., 2014; Giovannetti et al., 2014)。

【0109】 CYFIP2 表達在乳腺癌新形成淋巴結中增加 (Gantsev et al., 2013)。

【0110】 與對照組織相比，CYFIP2 表達在人胃腫瘤樣本中降低 (Cheng et al., 2013)。CYFIP2 是慢性淋巴細胞性白血病甲基化的幾種凋亡相關基因之一 (Halldorsdottir et al., 2012)。

【0111】 CYP2J2 是一種酶，其被證明在多種人類癌症中過量表達，包括食道癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌和結腸癌。CYP2J2 透過促進 EGFR 磷酸化和啟動 PI3K 和 MAPK 信號傳導增加增殖並且抑制癌細胞凋亡，並進一步代謝酪氨酸激酶抑制劑，從而產生對抗癌劑的抗性 (Jiang et al., 2005; Narjoz et al., 2014)。

【0112】 DCBLD2 在膠質母細胞瘤和頭頸部癌症 (HNSC) 中上調，是 EGFR 刺激腫瘤發生所需要的 (Feng et al., 2014)。此外，DCBLD2 在高度轉移性肺癌亞系和組織樣本中上調 (Koshikawa et al., 2002)。與此相反，在胃癌中，DCBLD2 的表達透過其啟動子的甲基化而沉寂 (Kim et al., 2008)。

【0113】 DDX41 與急性骨髓性白血病相關 (Antony-Debre and Steidl, 2015)。

【0114】 DRISHA 是微小 RNA 生物合成中的兩個關鍵酶之一，在許多癌症中過量表達，包括胃腸道腫瘤、乳腺癌和宮頸癌，並且似乎增強增殖、集落形成和腫瘤細胞遷移 (Avery-Kiejda et al., 2014; Havens et al., 2014; Zhou et al., 2013)。

【0115】 DUSP14 基因中的單核苷酸多態性與黑素瘤改變風險相關 (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013)。

【0116】 EGFR 被證明在乳腺癌和唾液腺腺樣癌中上調，與非小細胞肺癌、肝細胞癌和結直腸癌相關 (Dienstmann et al., 2015; Wang et al., 2015b; Steinway et al., 2015; Xiao et al., 2015; Inoue et al., 2015)。

【0117】 EGLN3 表達被證明在非小細胞肺癌和腎細胞癌中上調。此外，EGLN3 與透明細胞腎細胞癌和結直腸

癌相關 (Tanaka et al., 2014; Yang et al., 2014d; Toth et al., 2014; Chu et al., 2014)。

【0118】 ENO1 表達被證明在非小細胞肺癌中上調。此外，ENO1 與子宮內膜癌、胰腺導管腺癌、惡性膠質瘤和鼻咽癌相關 (Yang et al., 2014b; Naryzhnyi et al., 2014; Principe et al., 2015; Fu et al., 2015; Zhao et al., 2015a)。

【0119】 ENO2 與肺癌、實體神經內分泌癌、顆粒細胞瘤和胰腺癌相關 (Sigari et al., 2014; Zizi-Sermpetzoglou et al., 2014; Liu et al., 2014a; Bedir et al., 2015; Wang et al., 2013b)。

【0120】 ENO3 與 B 細胞淋巴瘤、肺泡軟組織肉瘤、橫紋肌肉瘤和神經母細胞瘤相關 (Oka et al., 1989; Mukai et al., 1986; Royds et al., 1985; Ishiguro et al., 1984)。

【0121】 ENPP3 與神經母細胞瘤、II 期結直腸癌、頭頸部鱗狀細胞癌、急性嗜堿細胞白血病和膽管細胞癌相關 (Agesen et al., 2012; Staal-Viliare et al., 2007; Gomez-Villafuertes et al., 2014; Yano et al., 2004; Thiel et al., 2011)。

【0122】 ERAP1 與宮頸癌、腎細胞癌、食管鱗狀細胞癌、黑色素瘤、卵巢癌和神經母細胞瘤相關 (Mehta et al., 2015; Forloni et al., 2010; Liu et al., 2010a;

Kamphausen et al., 2010; Ayshamgul et al., 2011; Stoehr et al., 2013)。

【0123】 ESM1 表達被證明在胃癌中升高，與肝母細胞瘤、鼻咽癌和卵巢癌相關，並且可能是胃癌的潛在生物標誌物 (Yu et al., 2013; Dong et al., 2014; Lv et al., 2014; El Behery et al., 2013)。

【0124】 FHL2 被證明在急性髓細胞白血病、卵巢癌、肺癌、結腸癌、乳腺癌、胰腺導管腺癌和人類惡性黑色素瘤中上調，在攝護腺癌和橫紋肌肉瘤中下調 (Kleiber et al., 2007; Westphal et al., 2015; Qian et al., 2010; Zienert et al., 2015)。

【0125】 FKBP10 被確定為在白血病細胞中參與獲取和維護阿黴素耐藥表型的一種新型基因 (Sun et al., 2014b)。FKBP10 已透過其上調與結直腸癌有關 (Olesen et al., 2005)。與此相反，FKBP10 表達不足是上皮性卵巢癌的特徵 (Quinn et al., 2013)。

【0126】 FLT1 與結腸癌、攝護腺癌、非小細胞肺癌和胰腺癌相關 (Awasthi et al., 2015; Heist et al., 2015; Tsourlakis et al., 2015; Zhang et al., 2015)。

【0127】 FZD1 與食管癌、甲狀腺癌、子宮肉瘤、攝護腺癌、膽囊鱗狀細胞/腺鱗癌和腺癌、結腸癌和乳腺癌相關 (Goksel et al., 2014; Hung et al., 2014; Davidov et al., 2014; Su et al., 2015; Zhang et al., 2012a;

Planutis et al., 2013; Devaney et al., 2013; Li et al., 2014a)。

【0128】 FZD2 被證明在食管癌中上調，與胃腸道間質腫瘤、涎腺腺樣囊性癌和結直腸癌相關 (Wang and Zheng, 2014; Ding et al., 2015; Prakash et al., 2005; Liu et al., 2014b)。

【0129】 FZD7 被證明在卵巢癌中上調，與子宮頸癌、肝細胞癌、結直腸癌、黑素瘤、乳腺癌、胃癌和中樞神經細胞瘤相關 (Anastas et al., 2014; Li et al., 2014c; Gonzalez et al., 2014; Song et al., 2014; Deng et al., 2015; Asad et al., 2014; Vasiljevic et al., 2013; Rocken and Warneke, 2012; Dey et al., 2013)。

【0130】 GAL3ST1 活性在腎細胞癌 (RCC) 組織和 RCC 細胞系 SMKT-R3 中增加 (Honke et al., 1996)。與正常卵巢間質組織和正常卵巢表面上皮細胞相比，GAL3ST1 表達在卵巢上皮癌細胞中上調 (Liu et al., 2010c)。

【0131】 GALNT2 (N-乙醯半乳糖氨基轉移酶 2) 顯示可透過增加胃癌細胞中的 MMP-2 和 TGF-SS1 以及透過抑制肝細胞癌中的 EGF 受體活性 (經常下調) 而發揮抗增殖和抗轉移活性。相反，據報告，在鱗狀細胞癌中，GALNT2 過量表達可透過修改 O-糖基化和 EGFR 的活

性來增強腫瘤細胞的侵襲能力 (Hua et al., 2012; Lin et al., 2014; Wu et al., 2011)。

【0132】GRAMD4 在肝細胞癌 (HCC) 細胞系和肝癌組織中上調，表達增加與 HCC 的臨床病理特徵相關 (Zhang et al., 2013)。

【0133】HAVCR1 被描述為與卵巢透明細胞癌和腎細胞癌相關的新候選生物標誌物 (Bonventre, 2014; Kobayashi et al., 2015)。HAVCR1 被證明可啟動透明細胞腎細胞癌來源細胞系中的 IL-6/STAT-3/HIF-1A 信號通路，並確定腫瘤進展和患者結果 (Cuadros et al., 2014)。HAVCR1 在腎臟中組成型表達被描述為透明細胞腎細胞癌發生的一個潛在的敏感性特徵 (Cuadros et al., 2013)。HAVCR1 被描述為在腎癌、卵巢透明細胞癌和結直腸癌中上調 (Wang et al., 2013c)。HAVCR1 上調被描述為結直腸癌的一個潛在診斷生物標誌物，是手術後較長無病間隔 (可能也涉及結直腸癌轉移級聯) 的預後標記 (Wang et al., 2013c)。HAVCR1 被證明與 T 細胞大顆粒淋巴細胞白血病有關 (Wlodarski et al., 2008)。

【0134】HSF2BP 編碼與 HSF2 相關的 HSF2 結合蛋白，可能參與調節 HSF2 活化 (RefSeq, 2002)。

【0135】HSF4 編碼熱休克轉錄因數 4，其啟動熱或其他應力條件下的熱休克反應基因 (RefSeq, 2002)。

H S F 4 被證明在膠質母細胞瘤中下調 ( M u s t a f a e t a l . , 2 0 1 0 ) 。

【 0 1 3 6 】 不同的研究表明，H S P A 2 在宮頸癌、腎細胞癌和膀胱癌的疾病進展中起著重要作用。基因內多態性與胃癌的發生有關 ( F e r r e r - F e r r e r e t a l . , 2 0 1 3 ; G a r g e t a l . , 2 0 1 0 a ; G a r g e t a l . , 2 0 1 0 b ; S i n g h a n d S u r i , 2 0 1 4 ) 。

【 0 1 3 7 】 H S P A 8 被證明在食管癌細胞中過度表達，H S P A 8 在體外食管鱗狀癌細胞中高水準表達抵消這些細胞的氧化應激誘導的細胞凋亡。此外，H S P A 8 在多發性骨髓瘤和結腸癌中過量表達，H S P A 8 的 B C R - A B L 1 - 誘導表達促進慢性髓性白血病細胞的存活 ( C h a t t e r j e e e t a l . , 2 0 1 3 ; D a d k h a h e t a l . , 2 0 1 3 ; J o s e - E n e r i z e t a l . , 2 0 0 8 ; K u b o t a e t a l . , 2 0 1 0 ; W a n g e t a l . , 2 0 1 3 a ) 。

【 0 1 3 8 】 H S P G 2 與黑色素瘤、口腔鱗狀細胞癌、腎透明細胞癌和攝護腺腫瘤相關，其顯示在肝細胞癌和結腸癌中下調 ( N i k i t o v i c e t a l . , 2 0 1 4 ; W a r r e n e t a l . , 2 0 1 4 ; G b o r m i t t a h e t a l . , 2 0 1 4 ; Z a g h l o u l e t a l . , 2 0 1 5 ; K a w a h a r a e t a l . , 2 0 1 4 ; S u h o v s k i h e t a l . , 2 0 1 5 ; 2 0 1 5 ; E l e w a e t a l . , 2 0 1 5 ; L a i e t a l . , 2 0 1 1 ) 。

【 0 1 3 9 】 H T R A 1 與肝細胞癌、脾邊緣區淋巴瘤、鱗狀細胞癌和神經母細胞瘤相關，並顯示在胃癌、乳腺癌、膽



囊癌和肺腺癌中下調 (Xu et al., 2014; D'Angelo et al., 2014; Fujinaga et al., 2014; Sahasrabudde et al., 2014; Franco et al., 2015; Arribas et al., 2015; Zhao et al., 2015b; Bao et al., 2015)。

【0140】 HTRA3 顯示在口腔鱗狀細胞癌和甲狀腺癌中上調，在卵巢癌、乳腺癌、子宮內膜癌和肺癌中調，並與結直腸癌相關，可能是口腔癌的一個潛在預後生物標誌物 (Karagiannis et al., 2014; Zhao et al., 2014; Moriya et al., 2015; Narkiewicz et al., 2009; Belefond et al., 2010; Zurawa-Janicka et al., 2012; Yin et al., 2013)。

【0141】 IGF2BP3 編碼胰島素樣生長因數 II mRNA 結合蛋白 3，這是一種癌胚蛋白，其壓制胰島素樣生長因數 II 的翻譯 (RefSeq, 2002)。體外研究表明，IGF2BP3 促進腫瘤細胞的增殖、黏附和侵襲。此外，IGF2BP3 已經顯示與侵襲性和晚期癌症相關 (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014)。IGF2BP3 過度表達在許多腫瘤類型中進行了說明，並與預後較差、腫瘤期別高和轉移相關，例如在神經母細胞瘤、結直腸癌、肝內膽管癌、肝細胞癌、攝護腺癌和腎細胞癌中過度表達 (Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013; Yuan et al., 2009)。

【0142】 IGLC1 新獲得的和復發性缺失在 45 名患者中 3 名中檢測到，表明在慢性粒細胞白血病（CML）中存在酪氨酸激酶抑制劑（TKI）抗性（Nowak et al., 2010）。

【0143】 雜合性的 IGLC2 損失已在 50% 的翔實的顱內腦膜瘤病例中得到證明（Kim et al., 1993）。

【0144】 IGLJ3 是普遍用於多毛細胞白血病中優選輕鏈 IG  $\lambda$  組合物的連接基因（Forconi et al., 2008）。

【0145】 與來自正常、自身反應性和腫瘤細胞相比，IGLV2-14 是慢性淋巴細胞性白血病（CLL）中第三常見的 IGLV 基因（Stamatopoulos et al., 2005）。

【0146】 與來自正常、自身反應性和腫瘤細胞相比，IGLV3-21 是慢性淋巴細胞性白血病（CLL）中最常見的 IGLV 基因（Stamatopoulos et al., 2005）。

【0147】 INADL 在對順鉑 - 吉西他濱聯合化療有反應的非小細胞肺癌中下調（Ma et al., 2015）。

【0148】 ITGA3 被證明在結直腸癌中上調，與攝護腺癌、表皮樣癌、早期胃癌和骨肉瘤相關（Yang et al., 2014c; Chong et al., 2014; Lustosa et al., 2014; Ren et al., 2014; Bauer et al., 2014; Mertens-Walker et al., 2015）。

【0149】 ITGB4 與攝護腺癌、胃癌、乳腺癌、口腔鱗狀細胞癌和卵巢癌相關，並且被證明在胰腺導管腺癌中上調（Chen et al., 2014b; Xin et al., 2014; Zubor

et al., 2015; Masugi et al., 2015; Gao et al., 2015b; Kawakami et al., 2015)。ITGB4 (也稱為 CD104) 往往與  $\alpha 6$  亞基關聯，並可能在幾種浸潤性癌症的生物學中發揮重要作用，如食管鱗狀細胞癌、膀胱癌和卵巢癌 (Kwon et al., 2013; Pereira et al., 2014; Chen et al., 2014b)。ITGB4 單核苷酸多態性似乎影響腫瘤的侵襲性和存活，並可能對乳腺癌患者具有預後價值 (Brendle et al., 2008)。

**【0150】** IVNS1ABP 與 BCL1/JH 陽性多發性骨髓瘤相關，並且可能是多發性骨髓瘤的一個潛在預後標誌物 (Ni et al., 2012)。

**【0151】** JAG2 被證明在胰腺導管腺癌、肝細胞癌和視網膜母細胞瘤中上調，與多發性骨髓瘤、子宮內膜癌、攝護腺癌、骨肉瘤、頭頸癌和膀胱尿路上皮癌相關 (Sun et al., 2014a; Li et al., 2014b; Carvalho et al., 2014; Xiao et al., 2014; Zhang et al., 2014a; Sasnauskiene et al., 2014; Lu et al., 2014; Hu et al., 2015; Li et al., 2013)。

**【0152】** KCNK15 基因超甲基化發現於幾個細胞系，包括結腸癌、白血病和膀胱癌 (Shu et al., 2006)。

**【0153】** KIF12 被證明在乳腺癌中過度表達，並與腎腫瘤、子宮癌和胰腺癌相關 (Katoh and Katoh, 2005; Tan et al., 2012)。

【0154】 KLHDC7B 與宮頸鱗狀細胞癌相關，是宮頸鱗狀細胞癌的一個潛在生物標誌物 (Guo et al., 2015)。

【0155】 LRP2 與肝細胞癌、胰腺癌、惡性黑色素瘤、原發性中樞神經系統淋巴瘤和腎透明細胞癌相關 (Fernandez-Banet et al., 2014; Andersen et al., 2015; Pedersen et al., 2010; Schuetz et al., 2005; Anderson et al., 2013)。

【0156】 LRRK2 與激素相關癌、乳腺癌和帕金森氏病患者的伴隨非皮膚癌相關，並且可能與帕金森氏病患者的血液癌症相關 (Ruiz-Martinez et al., 2014; Agalliu et al., 2015; Inzelberg et al., 2012)。

【0157】 MACC1 在許多癌症實體中，包括胃癌、結直腸癌、肺癌和乳腺癌中過度表達，並與癌症的進展、轉移和患者生存期差有關 (Huang et al., 2013; Ma et al., 2013; Stein, 2013; Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015c; Ilm et al., 2015)。MACC1 透過靶向作用於  $\beta$ -連環蛋白和 PI3K/AKT 信號通路促進致癌作用，從而導致增加 c-Met 和  $\beta$ -連環蛋白和其下游靶基因包括 c-Myc、細胞週期蛋白 D1、胱天蛋白酶 9、BAD 和 MMP9 (Zhen et al., 2014; Yao et al., 2015)。

【0158】 MAGED2 過度表達與黑色素瘤、乳腺癌和結腸癌有關 (Li et al., 2004; Strelakova et al., 2015)。

【0159】 MET 被證明在去分化脂肪肉瘤中上調，並且與黑色素細胞瘤、肝細胞癌、非小細胞肺癌、遺傳性乳頭狀腎

癌和胃腺癌相關 (Petrini, 2015; Finocchiaro et al., 2015; Steinway et al., 2015; Bill et al., 2015; Yeh et al., 2015)。

【0160】 NAT8 與淋巴細胞白血病有關 (Mak et al., 2014)。

【0161】 NDRG1 是諸如胰腺癌等癌症中的轉移抑制劑，並且顯示在攝護腺癌和結腸癌中下調，但被證明在肝細胞癌和宮頸腺癌中上調 (Nishio et al., 2008; Cheng et al., 2011; Bae et al., 2013; Richardson et al., 2013)。

【0162】 NLRC5 顯示在淋巴衍生的腫瘤細胞系中下調 (Staepli et al., 2012)。

【0163】 NPTX2 被胰腺癌、尤因肉瘤和成膠質細胞瘤中的啟動子超甲基化下調 (Zhang et al., 2012b; Alholle et al., 2013; Shukla et al., 2013)。

【0164】 NQO2 與子宮內膜癌、乳頭狀甲狀腺微小癌和食管癌相關 (Hevir-Kene and Rizner, 2015; Malik et al., 2012; Lee et al., 2013)。

【0165】 與 5-氟尿嘧啶敏感性 Bel7402 和 HepG2 細胞相比，OPN3 表達在耐 5-氟尿嘧啶肝細胞癌細胞株 Bel7402 和 HepG2 中減少 (Jiao et al., 2012)。

【0166】 PDZD2 與小腸神經內分泌腫瘤和攝護腺癌有關 (Tam et al., 2006; Rehfeld et al., 2014)。

【0167】 PDZK1 過度表達可能在多發性骨髓瘤的藥物抗性中發揮作用 (RefSeq, 2002)。

【0168】 PFKFB3 被證明在胃癌、結腸癌、肺癌、乳腺癌中上調，並與胰腺癌、攝護腺癌和成膠質細胞瘤相關 (Minchenko et al., 2014; Fleischer et al., 2011; Ragnum et al., 2013)。

【0169】 PLCB1 與原發性頭頸部鱗狀細胞癌、髓性白血病和膠質母細胞瘤相關 (Guerrero-Preston et al., 2014; Waugh, 2014; Ramazzotti et al., 2011)。

【0170】 PLIN2 參與脂質存儲，是用於檢測早期結直腸癌的血漿生物標誌物 (Matsubara et al., 2011)。與對照組相比，PLIN2 在透明細胞和乳頭狀腎細胞癌患者中顯著升高。PLIN2 術前尿濃度反映腫瘤大小和分期 (Morrissey et al., 2014)。PLIN2 在肺腺癌標本中的表達顯著高於正常組織和肺鱗狀細胞癌 (Zhang et al., 2014b)。

【0171】 PLOD1 表達與人類乳腺癌進展相關 (Gilkes et al., 2013)。

【0172】 PRKCDBP 顯示在乳腺癌腦轉移癌和原發性乳腺癌中下調。此外，PRKCDBP 與乳腺癌、結直腸癌、子宮內膜癌、肺癌和胃癌有關 (Bai et al., 2012; Moutinho et al., 2014; Li et al., 2015; Tong et al., 2012; Wikman et al., 2012)。

【0173】 RASGRP3 被證明在膠質母細胞瘤、乳腺癌和人黑素瘤中上調，與攝護腺癌、肝細胞癌和口腔癌相關 (Nagy et al., 2014; Sowalsky et al., 2015; Lee et al., 2015; Yang et al., 2011; Bhatnagar et al., 2012; Martinez-Lopez et al., 2012)。

【0174】 RCN1 定位于人內皮細胞和攝護腺癌細胞系中的質膜 (RefSeq, 2002)。RCN1 在乳腺癌中過度表達 (Amatschek et al., 2004)。

【0175】 REN 與腎細胞癌、胰腺癌、促結締組織增生的小圓細胞瘤和腎素瘤相關 (Elouazzani et al., 2014; Lee et al., 2014; Nakai et al., 2015; Araujo et al., 2015)。

【0176】 RGS5 顯示在肺癌中下調，在透明細胞腎細胞癌、肝細胞癌、幾個淋巴瘤亞型和甲狀旁腺腺瘤中上調，並與結直腸癌、神經母細胞瘤、卵巢癌、非小細胞肺癌和胃癌相關 (Volz et al., 2015; Xu et al., 2015; Wang et al., 2010a; Dannenmann et al., 2013; Koh et al., 2011; Huang et al., 2012b; Altman et al., 2012; Kumps et al., 2013; Sethakorn and Dulin, 2013; Hu et al., 2013)。

【0177】 RPGRIP1L 部分透過有絲分裂步驟蛋白 Mad2 抑制錨定非依賴性生長，並且是人肝細胞癌的候選腫瘤抑制基因 (Lin et al., 2009)。

【0178】 RRAD 被證明在肺癌、卵巢癌和鼻咽癌中下調，與多形性膠質母細胞瘤、食管鱗狀細胞癌和肝細胞癌相關 (Wang et al., 2014d; Yeom et al., 2014; Liu et al., 2015; Mo et al., 2012; Lin and Chuang, 2012; Jin et al., 2013)。

【0179】 SEMA5B 在腎細胞癌中上調，但到目前為止，其表達尚未在其他癌症類型或正常組織中發現 (Hirota et al., 2006)。

【0180】 纖溶酶- $\alpha 2$ -纖溶酶抑制劑複合物的血漿水準被證明是非小細胞肺癌生存的預測因數，在攝護腺癌患者的血液中觀察到  $\alpha 2$ -抗纖溶酶活性低 (Taguchi et al., 1996; Zietek et al., 1996)。

【0181】 SLC16A3 表達與肝細胞癌患者較差預後有關，在細胞系實驗中，可增加細胞增殖、遷移和侵襲 (Gao et al., 2015a)。在胰腺癌亞組中，SLC16A3 顯示在腫瘤發生中有功能性參與 (Baek et al., 2014)。

【0182】 SLC16A4 被證明在非小細胞肺癌、腺樣癌、胰腺導管癌、口腔鱗狀細胞癌和胃癌中上調，並與乳腺癌和肝細胞癌相關 (Baek et al., 2014; Gao et al., 2015a; Yan et al., 2014; Jensen et al., 2014; Koo and Yoon, 2015; Granja et al., 2015; Baenke et al., 2015)。

【0183】 有機陰離子轉運子 2 和有機陽離子轉運子 2 的高表達是轉移性結直腸癌接受基於 FOLFOX 化療患者的高



獨立預測因數 (Tashiro et al., 2014)。與非腫瘤胰腺組織相比，SLC22A2、SLC22A11、SLC28A1、SLC28A3 和 SLC29A1 的 mRNA 表達在胰腺腫瘤中下調 (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013a)。SLC22A2 (也稱為 OCT2) 調節近端小管中順鉑的攝取，OCT2 的抑制可防止順鉑誘導的嚴重腎毒性發生 (Sprowl et al., 2013)。

【0184】 SLC47A1 與攝護腺癌有關 (Joerger et al., 2015)。

【0185】 SLC6A13 表達被證明在結腸癌中上調 (Tran et al., 2014b)。

【0186】 SMYD2 被證明在食管鱗狀原發性癌、乳腺癌、肝癌、胃癌和急性淋巴細胞性白血病中上調 (Sakamoto et al., 2014; Komatsu et al., 2015; Nguyen et al., 2015)。

【0187】 SYT9 與子宮頸癌和攝護腺癌相關，並且可能為宮頸癌的潛在生物標誌物 (Chen et al., 2014c; Bao et al., 2011)。

【0188】 TGFBI 表達被證明在膽管癌、肝癌、胃癌、食管癌和腎透明細胞癌中升高。此外，TGFBI 被證明與結直腸癌有關 (Lebdai et al., 2015; Ozawa et al., 2014; Zhu et al., 2015; Han et al., 2015)。

【0189】 THY1 是鼻咽癌抗侵襲活性的候選抑癌基因 (Lung et al., 2010)。

【0190】 TIMP1 蛋白表達與轉移性肝病患者、兒童急性淋巴細胞白血病和乳腺癌預後不良相關 (Bunatova et al., 2012; Scrideli et al., 2010; Sieuwerts et al., 2007)。TIMP1 是檢測胰腺癌的潛在血清標誌物 (Slater et al., 2013)。TIMP1 是一個眾所周知的甲狀腺癌標誌物 (Griffith et al., 2006)。

【0191】 TPI1 顯示在骨肉瘤中下調，與乳腺癌、食管鱗狀細胞癌、膠質母細胞瘤、子宮內膜癌和卵巢癌相關 (Zamani-Ahmadmahmudi et al., 2014; Chen et al., 2014a; Yoshida et al., 2013; Khan et al., 2013b; Gao et al., 2014)。

【0192】 TRIP6 被證明在尤因氏肉瘤、鼻咽癌和膠質母細胞瘤中上調，與乳腺癌相關 (Pavlikova et al., 2015; Lai et al., 2010; Fei et al., 2013; Grunewald et al., 2013)。

【0193】 UBE2QL1 轉錄顯示在腎細胞癌中下調 (Wake et al., 2013)。

【0194】 UGDH 與結直腸癌、攝護腺癌、卵巢漿液性腺癌、乳腺癌和肝細胞癌相關 (Lapointe and Labrie, 1999; Konno, 2001; Fan et al., 2009; Wei et al., 2009; Wang et al., 2010b)。

【0195】 VKORC1 基因多態性可能與罹患攝護腺癌的風險相關 (Nimptsch et al., 2009)。VKORC1 影響 PIVKAI1 (維生素 K 缺乏誘導蛋白) 濃度，這用來篩選肝細胞癌篩查 (Wang et al., 2010c)。

## 【圖式簡單說明】

【0196】 圖 1A 至 1N 顯示多種肽在正常組織及 RCC 之過量呈現。圖 1A) 基因：SLC17A3，肽：ALIVSLPYL (SEQ ID NO.: 1) - 從左至右的組織：1 脂肪組織，3 腎上腺，2 動脈，3 骨髓，7 腦，3 乳房，13 結腸，1 卵巢，1 十二指腸 4 食管，2 膽囊，3 心臟，4 白細胞樣本，19 肝，43 肺，1 淋巴結，1 卵巢，6 胰腺癌，2 周圍神經，1 腹膜，1 腦垂體，3 胸膜，1 前列腺，6 直肌，3 骨骼肌，3 皮膚，2 小腸，4 脾臟，5 胃，1 睪丸，2 胸腺，3 甲狀腺，2 子宮，2 靜脈，12 腎，18 RCC。該肽也在肝癌中發現(未列出)。圖 1B) 基因：SOGA2，肽：YLEEDVYQL (SEQ ID NO.: 128) - 從左至右的組織：1 脂肪組織，3 腎上腺，2 動脈，3 骨髓，7 腦，3 乳房，13 結腸，1 卵巢，1 十二指腸 4 食管，2 膽囊，3 心臟，4 白細胞樣本，19 肝，43 肺，1 淋巴結，1 卵巢，6 胰腺癌，2 周圍神經，1 腹膜，1 腦垂體，3 胸膜，1 前列腺，6 直肌，3 骨骼肌，3 皮膚，2 小腸，4 脾臟，5 胃，1 睪丸，2 胸腺，3 甲狀腺，2 子宮，2 靜脈，12 腎，18 RCC。該肽也在胰腺癌、卵巢癌、胃癌和肺癌中發現(未列出)。圖 1C) 基因：SEMA5B，肽：ALDPSGNQLI (SEQ ID NO.: 12) - 從左至右的組織：1 脂肪組織，3 腎上腺，2 動脈，3 骨髓，7 腦，3 乳房，13 結腸，1 卵巢，1 十二指腸 4 食管，2 膽囊，3 心臟，4 白細胞樣本，19 肝，43 肺，1 淋巴結，1 卵巢，6 胰腺癌，2 周圍神經，1 腹膜，1 腦垂體，3 胸膜，1 前列腺，6 直肌，3 骨骼肌，3 皮膚，2 小腸，4 脾臟，5 胃，1 睪丸，2 胸腺，3 甲狀腺，2 子宮，2 靜脈，

12 腎，18 RCC。該肽也在卵巢癌、腦癌和肺癌中發現（未列出）。圖 1D）基因：RGS5，肽：GLASFKSFL（SEQ ID NO.:8） - 從左至右的組織：1 脂肪組織，3 腎上腺，2 動脈，3 骨髓，7 腦，3 乳房，13 結腸，1 卵巢，1 十二指腸 4 食管，2 膽囊，3 心臟，4 白細胞樣本，19 肝，43 肺，1 淋巴結，1 卵巢，6 胰腺癌，2 周圍神經，1 腹膜，1 腦垂體，3 胸膜，1 前列腺，6 直肌，3 骨骼肌，3 皮膚，2 小腸，4 脾臟，5 胃，1 睪丸，2 胸腺，3 甲狀腺，2 子宮，2 靜脈，12 腎，18 RCC。該肽也在前列腺癌、乳腺癌、結腸癌、肝癌、黑色素瘤、卵巢癌、食管癌、胰腺癌、腦癌、胃癌中發現到（未列出）。圖 1E）基因：SLC16A3，肽：VVDEGPTGV（SEQ ID NO.:135） - 從左至右的組織：1 白細胞細胞系，5 正常組織（3 肺，1 淋巴結，1 脾），77 癌組織（2 腦癌，1 乳腺癌，1 結腸癌，1 食管癌，10 腎癌，1 白血病，1 肝癌，35 肺癌，12 卵巢癌，8 胰腺癌，5 胃癌）。沒有肽呈現的樣本沒有列出。測試的正常（健康）組織系列與圖 1A-D 中相同。圖 1F）基因：ESM1，肽：LLVPAHLVAA（SEQ ID No.:25） - 從左至右的組織：1 脂肪組織，3 腎上腺，2 動脈，3 骨髓，7 腦，3 乳房，13 結腸，1 十二指腸，4 食管，2 膽囊，3 心臟，4 白細胞，19 肝，43 肺，1 淋巴結，1 卵巢，6 胰腺癌，2 周圍神經，1 腹膜，1 腦垂體，3 胸膜，1 前列腺，6 直腸，3 骨骼肌，3 皮膚，2 小腸，4 脾臟，5 胃，1 睪丸，2 胸腺，3 甲狀腺，2 子宮，2 靜脈，12 腎，18 RCC。該肽也在胰腺癌、食管癌、腦癌、肺癌和子宮癌中發現（未列出）。圖 1G）基因：ARHGAP42，肽：ILIKHLVKV

(SEQ ID NO.:15) - 從左至右的組織：1 細胞系 (1 黑色素瘤)，17 癌組織 (1 結腸癌，5 腎癌，1 肝癌，3 肺癌，4 淋巴結癌，1 睪丸癌，2 子宮癌)。圖 1H) 基因：HTR，肽：FIADVVEKI (SEQ ID NO.:33) - 從左至右的組織：16 癌組織 (1 腦癌，1 乳腺癌，1 食管癌，3 腎癌，1 白細胞白血病癌，5 肺癌，1 淋巴結癌，2 卵巢癌，1 胰腺癌)。圖 1I) 基因：HSF2B，肽：VLLDTILQL (SEQ ID NO.:38) - 從左至右的組織：1 良性 (腎癌)，3 細胞系 (1 胰腺，1 胸膜，1 前列腺)，1 其他疾病 (1 皮膚)，9 正常組織 (1 肺，1 淋巴結，2 胎盤，1 小腸，3 脾臟，1 甲狀腺)，67 癌組織 (1 膽管癌，5 腦癌，2 乳腺癌，2 食管癌，2 膽囊癌，4 腎癌，7 白細胞白血病癌症，3 肝癌，16 肺癌，5 淋巴結癌，1 骨髓細胞癌，9 卵巢癌，1 胰腺癌，1 直腸癌，5 皮膚癌，2 尿膀胱癌，1 子宮癌)。圖 1J) 基因：TRAM1，肽：YLLNLNHLGL (SEQ ID NO.:39) - 從左至右的組織：2 細胞系 (1 腎，1 胰)，1 正常組織 (1 肺)，19 癌症組織 (1 乳腺癌，2 腎癌，3 白細胞白血病癌，2 肝癌，7 肺癌，1 淋巴結癌，1 卵巢癌，1 直腸癌，1 膀胱癌)。圖 1K) 基因：PXDNL，肽：SILDAVQRV (SEQ ID NO.:52) - 從左至右的組織：23 癌組織 (3 腦癌，4 乳腺癌，3 腎癌，8 肺癌，2 卵巢癌，1 胰腺癌，1 皮膚癌，1 子宮癌)。圖 1L) 基因：THY1，肽：SLLQATDFMSL (SEQ ID NO.:82) - 從左至右的組織：11 細胞系 (11 胰腺細胞系)，4 正常組織 (1 腎臟，1 淋巴結，1 胎盤，1 氣管)，36 癌症組織 (1 膽管癌，5 腦癌，3 乳腺癌，4 結腸癌，1 食管癌，3 腎癌，1

肝癌，9 肺癌，1 淋巴結癌，1 卵巢癌，2 胰腺癌，1 直腸癌，2 皮膚癌，1 膀胱癌，1 子宮癌)。圖 1M) 基因：ARRDC3，肽：KIPPVSPSI (SEQ ID NO.:98) - 從左至右的組織：2 細胞系 (2 腎臟)，4 正常組織 (1 腎上腺，1 肺，1 淋巴結，1 胎盤)，47 癌症組織 (4 腦癌，1 乳腺癌，1 食管癌，1 膽囊癌，5 腎癌，1 白細胞白血病，5 肝癌，12 肺癌，2 淋巴結癌，4 卵巢癌，3 前列腺癌症，2 皮膚癌，6 子宮癌)。圖 1N) 基因：TIMP1，肽：KLQDGLLHI (SEQ ID NO.:103) - 從左至右的組織：1 細胞系 (1 血細胞)，29 癌症組織 (2 腦癌，5 結腸癌，3 腎癌，1 肝癌，4 肺癌，2 淋巴結癌，3 卵巢癌，1 胰腺癌，1 直腸癌，6 皮膚癌，1 睪丸癌)。

**【0197】** 圖 2A) 至 D) 顯示了本發明的源基因的代表性表達特徵 (與正常腎臟相比的相對表達)，這些基因在一系列正常組織中以及 35 份 RCC 樣本中高度過度表達或專門表達。從左到右的組織：腎上腺、動脈、骨髓、腦 (全部)、乳腺、結腸、食管、心臟、腎 (三份)、白細胞、肝、肺、淋巴結、卵巢、胰腺、胎盤、前列腺、唾液腺、骨骼肌、皮膚、小腸、脾、胃、睪丸、胸腺、甲狀腺、膀胱、宮頸、子宮、靜脈、23 個正常腎臟樣本、35 個 RCC 樣本。圖 2A) GAL3ST1；圖 2B) EGLN3；圖 2C) APOL1；和圖 2D) MET。

**【0198】** 圖 3A-F 顯示了示例性的免疫原性資料：肽特異性多聚體染色後的流式細胞儀結果，作為健康 HLA-A\*02+ 供體的肽特異性體外 CD8+ T 細胞應答的

結果。CD8<sup>+</sup> T 細胞製備的方法為：使用抗 CD28 mAb 和 HLA-A\*02 塗層的人工 APC 分別與 SeqID No 20 肽（C，左圖）、SeqID No 34（D，左圖）、SeqID No 1 肽（E，左圖）或 SeqID No 15 肽（F，左圖）合成。經過 3 個週期的刺激後，用 A\*02/SeqID No 20（C）、A\*02/SeqID No 34（D）、A\*02/SeqID No 1（E）或 A\*02/SeqID No 15（F）的 2D 多聚體染色法對肽反應性細胞進行檢測。右圖（C、D、E 和 F）顯示用不相關 A\*02/肽複合體刺激的細胞對照染色。活單細胞在 CD8<sup>+</sup> 淋巴細胞上得到門控。Boolean 門控幫助排除用不同肽特定的多聚體檢測的假陽性事件。提示了特異性多聚體 + 細胞和 CD8<sup>+</sup> 淋巴細胞的頻率。

### 【實施方式】

【0199】 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。

【0200】 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<sup>+</sup> 能識別通常 8 至 10 個源自蛋白或位於細胞質的

缺損核糖體產物 (DRIP) 的氨基酸殘基的主要組織相容性複合體 (MHC) 所載的肽中所含的 I 類分子。人 MHC 分子也稱為人白細胞-抗原 (HLA)。

【0201】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的靶細胞、分泌細胞因數，優選為肽誘導的干擾素- $\gamma$ ，TNF- $\alpha$  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。

【0202】本文所用「肽」這一術語，系指一系列氨基酸殘基，通常通過相鄰氨基酸的  $\alpha$ -氨基和羰基之間的肽鍵來連接。這些肽的長度優選為 9 個氨基酸，但至短可為 8 個氨基酸長度，至長可為 10、11 或 12 個氨基酸長度或更長，如果為 MHC-II 類肽時（本發明肽的拉長變體），至長可為 13、14、15、16、17、18、19 或 20 個氨基酸長度或更長。

【0203】因此，「肽」這一術語應包括一系列氨基酸殘基的鹽，通常通過相鄰氨基酸的  $\alpha$ -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。

【0204】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，通常通過相鄰氨基酸的  $\alpha$ -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。

**【0205】** 「多肽」這一術語是指一系列氨基酸殘基，通常通過相鄰氨基酸的  $\alpha$ -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。

**【0206】** 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、及/或用於提高特異性抗體或 TCR 抗性的蛋白。

**【0207】** 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  $\alpha$  鏈、 $\beta$ -2-微球蛋白和肽），其可以通過 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。

**【0208】** 在人類中，有三種編碼 MHC I 類分子的不同基因位點（人 MHC 分子也是指定的人白細胞抗原

(HLA)) : HLA-A、HLA-B 和 HLA-C。HLA-A\*01、HLA-A\*02 和 HLA-B\*07 是可從這些基因位點表達的不同 MHC I 類等位元基因的實例。

【0209】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%
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%

等位基因	人群	根據等位元基因頻率算得的顯型
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%

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

【0210】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。

【0211】如果本發明的 A\*02 肽與結合至另一等位基因的肽（如 A\*24）組合，與單獨的 MHC I 類等位基因相比，可治療更高比例的患者群體。雖然在大多數人群中，低於 50% 的患者可由單獨的等位基因來解決問題，但是本發明中一種含 HLA-A\*24 和 HLA-A\*02 表位的疫苗可以治療任何相關人群中至少 60% 的患者。具體來說，各區域中，以下比例的患者這些等位基因中的至少一個有肯定效果：美國 61%、西歐 62%、中國 75%、韓國 77%、日本 86%（根據 [www.allele-frequencies.net](http://www.allele-frequencies.net) 計算）。

【0212】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。

【0213】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。

【0214】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

T C R 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。

【0215】 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。

【0216】 「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。

【0217】 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。

【0218】 「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。

【0219】 「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。

【0220】 「DNA 片段」這一術語是指一種 DNA 聚合物，以單獨的片段形式或一種較大 DNA 結構的組分形式存在，它們從至少分離過一次的 DNA 中以基本純淨的形式獲得，即不含污染性內源性材料，並且獲得的數量或濃度能夠使用標準生化方法，例如使用克隆載體，進行識別、

操縱和回收該片段及其組分核苷酸序列。此類片段以開放閱讀框架（未被內部未翻譯序列打斷）或內含子（通常呈現于真核基因中）的形式存在。未翻譯 DNA 序列可能存在於開放閱讀框架的下游，在那裏其不會干預編碼區的操縱或表達。

【0221】 「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。

【0222】 「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。

【0223】 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及/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。

【0224】 本發明中披露的多核苷酸和重組或免疫原性多肽也可能以「純化」的形式存在。術語「純化」並非要求絕對的純度；它只是一個相對的定義，可以包括高度純化或部分純化的製劑，相關領域技術人員能理解這些術語。例如，各個從已用傳統方法純化為具有電泳同質性的 cDNA 庫中分離出的各種克隆物。明確考慮到將起始材料

或天然物質純化至少一個數量級，優選為兩或三個數量級，更優選為四或五個數量級。此外，明確涵蓋所述多肽的純度優選為 99.999%，或至少為 99.99% 或 99.9%；甚而適宜為以重量計 99% 或更高。

**【0225】** 根據本發明公開的核酸和多肽表達產物，以及包含此類核酸及/或多肽的表達載體可能以「濃縮的形式」存在。本文使用的術語「濃縮」是指材料的濃度至少是其自然濃度的大約 2、5、10、100 或 1000 倍，有優勢的是，按重量計為 0.01%，優選為至少 0.1%。也明確考慮到，按重量計約為 0.5%、1%、5%、10% 和 20% 的濃縮製劑。序列、構型、載體、克隆物以及包含本發明的其他材料可有優勢地以濃縮或分離的形式存在。「活性片段」這一術語是指產生免疫反應的片段（即具有免疫原性活性），通常是一種肽、多肽或核酸序列的片段，不論是單獨或可選地與合適的佐劑一起或在載體中給予一種動物，比如哺乳動物，例如兔子或小鼠，也包括人；這種免疫反應採用的形式是在接受動物（如：人）體內刺激 T 細胞反應。或者，「活性片段」也可用於誘導體外 T 細胞反應。

**【0226】** 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。

**【0227】** 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) 參考序列中每個碱基或氨基酸序列在被對比序列中沒有對應的對準碱基或氨基酸；
- (ii) 參考序列中每個空隙，以及
- (iii) 參考序列中每個對準碱基或氨基酸與被對比序列中對準碱基或氨基酸不同，即構成一個差異以及
- (iv) 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碱基或氨基酸的參考序列中的碱基或氨基酸數目。

**【0228】** 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。

【0229】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:114 群組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 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。

【0230】在本發明中，「同源性」一詞系指兩個氨基酸序列之間的一度（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」是通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。此類序列同源性可通過使用 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。

【0231】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)。

【0232】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通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:114 組成)的肽大致同樣的方式與 HLA 分子結合。例如，一種肽可能被修飾以便至少維持(如沒有提高)其能與 HLA-A\*02 或 -DR 等合適 MHC 分子的結合槽相互作用和結合，以及至少維持(如沒有提高)其與活化 T 細胞的 TCR 結合的能力。

【0233】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通過保持已知的錨殘基來修飾 SEQ ID No: 1 至 SEQ ID NO:114 提出的氨基酸序列，並且能確定這些變體是否保持與 MHC I 或 II 類分子結合的能力。本發明的變體保持與活化 T 細胞的 TCR 結合的能力，隨後，這些 T 細胞可與表達一種包含本發明定義的同源肽的天然氨基酸序列的多肽的細胞發生交叉反應並殺死該等細胞。

【0234】如果無另有說明，那麼本文公開的原始(未修飾)肽可以通過在肽鏈內的不同(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。

**【0235】** 在本文中，保守取代定義為在以下五種基團之一的內部進行交換：基團 1 — 小脂肪族、非極性或略具極性的殘基 (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly)；基團 2 — 極性、帶負電荷的殘基及其醯胺 (Asp, Asn, Glu, Gln)；基團 3 — 極性、帶正電荷的殘基 (His, Arg, Lys)；基團 4 — 大脂肪族非極性殘基 (Met, Leu, Ile, Val, Cys) 以及基團 5 — 大芳香殘基 (Phe, Tyr, Trp)。

**【0236】** 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。

**【0237】** 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。

**【0238】** 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。

**【0239】** 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。

**【0240】** 這些基本不與 T 細胞受體互動的氨基酸殘基可通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）。

【0241】 表 6：根據 SEQ ID NO: 1、4 和 5 的 HLA-A\*02 肽的優選變體和基序

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

		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 4	F	L	S	Q	D	I	I	T	V
變體									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I

		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 5	Y	L	Y	P	N	L	T	R	L
變體									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A



		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

【0242】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。

【0243】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。

【0244】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

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

【0245】 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。

【0246】 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。

【0247】 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 類肽可通過本領域中已知的方法進行測試。

【0248】 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)。

【0249】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。

【0250】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  $\mu$ 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。

【0251】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: 114 所選的氨基酸序列組成。

【0252】基本由「...組成」系指本發明的肽，除了根據 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 114 中的任一序列或其變體組成外，還含有位於其他 N 及/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。

【0253】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。

【0254】此外，該肽或變體可進一步修飾以提高穩定性及/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。

【0255】在反式肽鍵氨基酸中，肽(-CO-NH-)並未連接其殘基，但是其肽鍵是反向的。這種逆向反向模擬肽(retro-inverso peptidomimetics)可通過本領域已知的方法製備，例如：Meziere等人在(Meziere et al., 1997)中所述的方法，以引用的方式併入本文。這種方法涉及製備包含骨架(而並非側鏈)改變的模擬肽。Meziere等人(Meziere et al., 1997)的研究顯示，這些類比肽有利於MHC的結合和輔助性T細胞的反應。以NH-CO鍵替代CO-NH肽鍵的逆向反向肽大大地提高了抗水解性能。

【0256】非肽鍵為-CH<sub>2</sub>-NH、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-、-COCH<sub>2</sub>-、-CH(OH)CH<sub>2</sub>-和-CH<sub>2</sub>SO-等。美國4897445號專利提出了多肽鏈中非肽鍵(-CH<sub>2</sub>-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通過氨基醛和一種含NaCNBH<sub>3</sub>的氨基酸相互作用而合成的非肽鍵。

【0257】 含上述序列的肽可與其氨基及/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、及/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。

【0258】 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、生物利用度及/或結合作用。

【0259】 同樣，本發明中的肽或變體可在合成肽之前或之後通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）通過以下方法修飾：醯基化、脞基化、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、通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。

【0260】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。

【0261】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  $\alpha$ -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通過碘乙醯胺、溴乙胺、氯胺 T 等被修飾。

【0262】 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通過過氧化氫/銅離子完成。

【0263】 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)。

【0264】 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通過氰酸鉀的氨基甲醯化實現。

【0265】 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連接）可使用 Lukas 等人 (Lukas et al., 1981) 以及此處引用的參考文獻所披露的固相肽合成 Fmoc-聚醯胺模式進行合成。芴甲氧羰基 (Fmoc) 團對 N-氨基提供臨時保護。使用 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 二甲基吡啶中對這種高度敏感的保護基團進行重複分裂。由於它們的丁基醚（在絲氨酸蘇氨酸和酪氨酸的情況下）、丁基酯（在谷氨酸和天門冬氨酸的情況下）、叔丁氧羰基衍生物（在賴氨酸和組氨酸的情況下）、三苯甲基衍生物（在半胱氨酸的情況下）及 4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺醯基衍生物（在精氨酸的情況下），側鏈功能可能會受到保護。只要穀氨醯胺和天冬醯胺為 C-末端殘基，側鏈氨基功能保護所使用的是由 4,4'-二甲氧基二苯基團。固相支

撐基於聚二甲基丙烯酸醯胺聚合物，其由三個單體二甲基丙烯酸醯胺（骨架單體）、雙丙烯酸醯乙烯二胺（交聯劑）和 N-丙烯酸醯肌胺酸甲酯（功能劑）構成。使用的肽-樹脂聯劑為酸敏感的 4-羥甲基苯氧乙酸衍生物。所有的氨基酸衍生物均作為其預製對稱酸酐衍生物加入，但是天冬醯胺和穀氨醯胺除外，它們使用被逆轉的 N, N-二環己基碳二亞胺 / 1-羥基苯並三唑介導的耦合程序而加入。所有的耦合和脫保護反應用茚三酮、硝基苯磺酸或 *isotin* 測試程序監測。合成完成後，用濃度為 95% 含 50% 清道夫混合物的三氟醋酸，從伴隨去除側鏈保護基團的樹脂支承物中裂解肽。常用的清道夫混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水，準確的選擇依據合成肽的氨基酸組成。此外，固相和液相方法結合使用對肽進行合成是可能的（例如，請參閱 (Bruckdorfer et al., 2004) 以及本文引用的參考文獻）

【0266】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（水相凍幹後，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。

【0267】純化可通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）。



【0268】 可以使用薄層色譜法、電泳特別是毛細管電泳、固相萃取（CSPE）、反相高效液相色譜法、酸解後的氨基酸分析、快原子轟擊（FAB）質譜分析以及MALDI和ESI-Q-TOF質譜分析進行肽分析。

【0269】 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。可通過計算調節線性混合效應模型（Pinheiro et al., 2015）的 p 值將以上每個特點併入過度呈現分數中，從而通過假髮現率（Benjamini and Hochberg, 1995）調整多項檢驗。

【0270】 對於通過質譜法對HLA配體的識別和相對定量，對來自衝擊冷凍組織樣本的HLA分子進行純化並對HLA相關肽進行分離。分離的肽分開，並通過線上納米-電噴霧-電離（nanoESI）液相色譜-譜（LC-MS）實驗進行鑒定。由此產生的肽序列的驗證方法是，將RCC樣本（N = 18個\*02陽性樣本）中記錄的天然TUMAP的片段模式與相同序列相應合成參考肽的片段模式進行比較。由於這些肽被直接鑒定為原發性腫瘤HLA分子的配體，因此這些結果為獲得自18名RCC患者的原發性癌症組織上確定肽的天然加工和呈現提供了直接證據。

【0271】 發現管道XPRESIDENT® v2.1（例如，參見US2013-0096016，並在此通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。這通過以下方法實現：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。

【0272】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。

【0273】對來自 R C C 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 R C C 樣本的方法進行鑒定，確認其在原發性 R C C 上的呈現。

【0274】在多個 R C C 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。

【0275】此外，發現管道 X P R E S I D E N T ® v 2 可對癌症或其他感染組織上的 M H C - 肽，優選為 H L A 限制性肽進行直接的絕對定量。簡言之，總細胞計數根據被分析的

組織樣本的總 DNA 含量來計算。組織樣本中 TUMAP 的總肽量用 nanoLC-MS/MS 測定為天然 TUMAP 的比率以及 TUMAP 同位素標記版本的已知量，稱為內部標準。TUMAP 分離效率確定方法：把肽：所有選定 TUMAP 的 MHC 在 TUMAP 分離程序儘早的時間點加入組織裂解液，並在肽分離成後完成後通過 nanoLC-MS/MS 檢測。總細胞計數和總肽量根據每份組織樣本三次測量值來計算。所述肽特異性分離效率計算為三次重複測量 10 次加標實驗的平均值（見實施例 6 和表 12）。

**【0276】** 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肺癌。這些肽由質譜分析法直接顯示出，而由 HLA 分子自然呈現于人原發性人 RCC 樣本中。

**【0277】** 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」是健康腎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 RCC 患者的樣本），但不在正常組織中過度呈現（見實施例 1）。

**【0278】** 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 RCC 細胞）。

【0279】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及/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，可用于製備本發明的抗體及/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通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。

【0280】本說明書還涉及包含一個  $\alpha$  鏈和一個  $\beta$  鏈（「 $\alpha/\beta$  TCR」）的 T 細胞受體（TCR）。還提供了由 MHC 分子呈現時可與 TCR 和抗體結合的肽。本說明書還涉及核酸、載體和用於表達 TCR 的宿主細胞和本說明書的肽；以及使用它們的方法。

【0281】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  $\alpha$  多肽鏈（ $\alpha$  鏈）和一個  $\beta$  多肽鏈（ $\beta$  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  $\gamma/\delta$  TCR。

【0282】 在一個實施方案中，該說明書提供了如本文中所述的產生 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。

【0283】 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。

【0284】  $\alpha/\beta$  TCR 的  $\alpha$  和  $\beta$  鏈和  $\gamma/\delta$  TCR 的  $\gamma$  和  $\delta$  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)。  $\beta$  和  $\delta$  鏈還可能包括一個多樣區 (D)。  $\alpha$  和  $\beta$  恒定結構域還可能包括錨定  $\alpha$  和  $\beta$  鏈至細胞膜的 C 末端跨膜 (TM) 結構域。

【0285】 相對於  $\gamma/\delta$  的 TCR，如本文所用的術語「TCR  $\gamma$  可變結構域」是指無前導區 (L) 的 TCR  $\gamma$  V (TRGV) 區與 TCR  $\gamma$  (TRGJ) 區的組合，術語 TCR  $\gamma$  恒定結構域是指細胞外 TRGC 區域，或 C-末端截短 TRGC 序列。同樣地，「TCR  $\delta$  可變結構域」是指無前導區 (L) 的 TCR  $\delta$  V (TRDV) 區與 TCR  $\delta$  D/J (TRDD/TRDJ) 區的組合，術語「TCR  $\delta$  恒定結構域」是指細胞外 TRDC 區域，或 C-末端截短 TRDC 序列。

【0286】本說明書的 TCR 優選結合至肽 HLA 分子複合體，其具有約 100  $\mu$ M 或更小、約 50  $\mu$ M 或更小、約 25  $\mu$ M 或更小或約 10  $\mu$ M 或更小的結合親和力 (KD)。更為優選的情況是具有約 1  $\mu$ 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。

【0287】與本說明書 TCR 相關，本文使用的「特異性結合」及其語法變體用於表示對 100  $\mu$ M 或更小的肽-HLA 分子複合體有結合親和力 (KD) 的 TCR。

【0288】本說明書的  $\alpha/\beta$  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 恒定結構域序列和 TRBC1 或 TRBC2 恒定結構域序列的 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 恒定結構域序列和 TCR 的 TRBC1 或 TRBC2 恒定結構域序列之間的二硫鍵。

【0289】不論具有或不具有上述的引入鏈間鍵，本說明書的  $\alpha/\beta$  雜二聚體 TCR 可能具有一個 TRAC 恒定結構域序列和一個 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。

【0290】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。

【0291】在一個實施方案中，具有在  $\alpha$  鏈中至少一個突變及/或具有在  $\beta$  鏈中至少一個突變的 TCR 與未突變的 TCR 相比，已經修改了糖基化。

【0292】在一個實施方案中，在 TCR  $\alpha$  鏈及/或 TCR  $\beta$  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及/或結合半衰期，其是包含未突變 TCR  $\alpha$  鏈及/或未突變 TCR  $\beta$  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。此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式中在胸腺內被不利選擇，也就是說只有對自身抗原具有低親和力 TCR 的細胞才仍然存在。因此，本說明書的 TCR 或變體對根據本發明肽的親和力可透過本領域熟知的方法來增強。

【0293】本說明書還涉及一種識別和分離本發明 TCR 的一種方法，所述方法包括：用 A2/肽單體從 HLA-A\*02 陰性健康供體孵育 PBMC，用四聚體-藻紅蛋白 (PE) 孵育 PBMC 並透過螢光活化細胞分選 (FACS) 方法 - Calibur 分析分離高親和力 T 細胞。

【0294】本說明書還涉及一種識別和分離本發明 TCR 的一種方法，所述方法包括：獲得含整個人體 TCR $\alpha\beta$  基因位點 (1.1 and 0.7 Mb) 的轉基因小鼠 (其 T 細胞表達多樣化人類 TCR，用於補償小鼠 TCR 缺乏)，用相關肽對小鼠進行免疫處理，用四聚體-藻紅蛋白 (PE) 孵育從轉基因小鼠中獲得的 PBMC，並透過螢光活化細胞分選 (FACS) 方法 - Calibur 分析分離高親和力 T 細胞。

【0295】一方面，為了獲得表達本說明書 TCR 的 T 細胞，編碼本說明書 TCR- $\alpha$  及 / 或 TCR- $\beta$  鏈的核酸被克隆入表達載體，諸如  $\gamma$  反轉錄病毒或慢病毒。重組病毒產生，然後測試功能，如抗原專一性和功能性親合力。然後，最終產品的等分試樣被用於轉導靶 T 細胞群體 (一般純化自患者的 PBMC)，在輸入患者前展開。另一方面，為了獲得表達本說明書 TCR 的 T 細胞，TCR RNA 透過本領域中已知的技術 (例如，體外轉錄系統) 合成。然後，體外



合成的 TCR RNA 透過電穿孔來重新表達腫瘤特異性 TCR- $\alpha$  及 / 或 TCR- $\beta$  鏈被引入獲得自健康供體的初級 CD8+ T 細胞。

【0296】 為了增加表達，編碼本說明書 TCR 的核酸在操作上可連接到強啟動子，例如逆轉錄病毒長末端重複序列 (LTR)、巨細胞病毒 (CMV)、鼠幹細胞病毒 (MSCV) U3、磷酸甘油酸激酶 (PGK)、 $\beta$  肌動蛋白、泛素蛋白和猿猴病毒 40 (SV40)/CD43 複合啟動子、延伸因數 (EF)-1a 和脾臟病灶形成病毒 (SFV) 啟動子。在一優選實施方案中，啟動子與被表達的核酸異源。除了強啟動子外，本說明書的 TCR 表達盒可能含有附加的元素，可提高轉基因表達，包括中樞多聚嘍呤區 (CPPT)，其促進了慢病毒構建體的核易位 (Follenzi et al., 2000)，和土撥鼠肝炎病毒轉錄後調控元素 (WPRE)，其透過提高 RNA 穩定性增加轉基因表達水準 (Zufferey et al., 1999)。

【0297】 本發明 TCR 的  $\alpha$  和  $\beta$  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。

【0298】 實現高水準 TCR 表面表達需要引入 TCR 的 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  鏈高水準轉錄。為了實現它，本說明書的 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  鏈可在單一的載體中被克隆入雙順反子構建體，其已被證明能夠克服這一障礙。使用 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  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- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  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- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  鏈的相等摩爾比。

(Schmitt et al., 2009)。

**【0299】** 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「最佳化」，因為匹配 tRNA 以及其他因數的相對可用性 (Gustafsson et al., 2004)。修改 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  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- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  基因表達 (Scholten et al., 2006)。

**【0300】** 此外，引入的和內源性 TCR 鏈之間的錯配可能會導致獲得特異性，這些特異性對自身免疫構成顯著風險。例如，混合 TCR 二聚體的形成可能會減少可用以形成正確配對 TCR 複合體的 CD3 分子數目，因此，可以顯著降低表達所引入 TCR 的細胞的功能性親合力 (Kuball et al., 2007)。

**【0301】** 為了減少錯配，本說明書引入的 TCR 鏈的 C-末端結構域可以進行修改以促進鏈間親和力，而降低引入鏈與內源 TCR 配對的能力。這些策略可能包括用鼠配對物取代人類 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  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- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  鏈產生 C 末端結構域的第二間二硫鍵

(半胱氨酸修飾)；交換 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  鏈 C 端結構域的相互作用殘基(「柞臼結構」)；直接融合 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  鏈可變結構域至 CD3 $\zeta$ (CD3 $\zeta$  融合)(Schmitt et al. 2009)。

**【0302】** 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  $\alpha/\beta$  TCR 的  $\gamma/\delta$  T 細胞。

**【0303】** 「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。

**【0304】** 藥物組合物包括游離形式或以一種藥用鹽形式存在的肽(也參見上文)。此處使用的「藥用鹽」系指所公開的肽的一種衍生物，其中該肽由制酸或藥劑的城鹽進行改性。例如，用與適合的酸反應的游離城(通常其中的中性藥物有一個中性-NH<sub>2</sub>基團)製備酸式鹽。適合製備酸鹽的酸包括有機酸，如：乙酸、丙酸、羥基酸、丙酮酸、草酸、蘋果酸、丙二酸、丁二酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、甲磺酸、苯磺酸、水楊酸等等、以及無機酸，如：鹽酸、氫溴

酸、硫酸、硝酸和磷酸等。相反，可在一種肽上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。

【0305】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。

【0306】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數（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數聯合使用、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。

【0307】一方面，疫苗包括至少含有 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 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。

【0308】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，它們可為單鏈及/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。

【0309】對於連接多核苷酸，已經開發出多種方法，尤其是針對 DNA，可通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，通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。

【0310】 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通過多種管道購得，其中包括從國際生物技術公司（International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, 美國）購得。

【0311】 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，通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。

【0312】 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。

【0313】 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。

【0314】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，該載體通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。

【0315】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。

【0316】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。

【0317】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。

【0318】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。

**【0319】** 強勁的人巨細胞病毒 (CMV) 啟動子調控區使得 COS 細胞中的組成蛋白表達水準高達 1 mg/L。對於較弱的細胞株, 蛋白水準一般低於 0.1 mg/L。SV40 複製原點的出現將導致 DNA 在 SV40 複製容納性 COS 細胞中高水準複製。例如, CMV 載體可包含細菌細胞中的 pMB1 (pBR322 的衍生物) 複製原點、細菌中進行氨苄青黴素抗性選育的 鈣-內醯胺酶基因、hGH polyA 和 fl 的原點。含前胰島素原引導 (PPT) 序列的載體可使用抗 FLAG 抗體、樹脂和板引導 FLAG 融合蛋白分泌到進行



純化的培養基中。其他與各種宿主細胞一起應用的載體和表達系統是本領域熟知眾所周知的。

【0320】 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通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 II 類分子的免疫應答。

【0321】 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 Bethesda Research Laboratories 公司（Bethesda, MD, 美國）獲得）和 R R 1（從美國菌種保藏中心（ATCC, Rockville, MD, 美國），ATCC 編號 31343 獲得）。首選的真核宿主細胞包括酵母、昆蟲和哺乳動物細胞，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 Stratagene Cloning Systems 公司（La Jolla, CA 92037, 美國）獲得。首選哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢（CHO）細胞為 ATCC 中的 C C L 6 1 細胞、NIH 瑞士小鼠胚胎細胞 NIH/3 T 3 為 ATCC 中的 C R L 1 6 5 8 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) 和本領域技術人員知道的其他文獻中查到。

【0322】 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及/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。

【0323】 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。

【0324】 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。

【0325】 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 HRPC（Rini et al., 2006; Small et al., 2006）。

【0326】 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。

【0327】 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  $\mu\text{g}$  至 1.5 mg，優選為 125  $\mu\text{g}$  至 500  $\mu\text{g}$  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)。

**【0328】** 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 及 / 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，如通過「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。

**【0329】** 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，通過 CD8-陽性 T 細胞和輔助 T (T<sub>H</sub>) 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<sup>®</sup>、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<sup>®</sup>)、resiquimod、ImuFact IMP321、白細胞介素 IL-2、IL-13、IL-21、干擾素  $\alpha$  或  $\beta$ ，或其聚乙二醇衍生物、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、JuvImmune<sup>®</sup>、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<sup>®</sup> 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、 $\beta$ -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）。也可能使用細胞因數。一些細胞因數直接影響樹突狀細胞向淋巴組織遷移（如，TNF-），加速樹突狀細胞成熟為 T 淋巴細胞的有效抗原呈現細胞（如，GM-CSF、IL-1 和 IL-4）（美國 5849589 號專利，特別以其完整引用形式併入本文），並充當免疫佐劑（如 IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ ）（Gabrilovich et al., 1996）。

【0330】 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 寡核苷酸可通過 Toll 樣受體 (TLR) (主要為 TLR9) 活化先天 (非適應性) 免疫系統從而起作用。CpG 引發的 TLR9 活化作用提高了對各種抗原的抗原特異性體液和細胞反應，這些抗原包括肽或蛋白抗原、活病毒或被殺死的病毒、樹突狀細胞疫苗、自體細胞疫苗以及預防性和治療性疫苗中的多糖結合物。更重要的是，它會增強樹突狀細胞的成熟和分化，導致  $T_{H1}$  細胞的活化增強以及細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL) 生成加強，甚至 CD4 T 細胞說明的缺失。甚至有疫苗佐劑的存在也能維持 TLR9 活化作用誘發的  $T_{H1}$  偏移，這些佐劑如：正常促進  $T_{H2}$  偏移的明礬或弗氏不完全佐劑 (IFA)。CpG 寡核苷酸與以下其他佐劑或配方一起製備或聯合給藥時，表現出更強的佐劑活性，如微粒、納米粒子、脂肪乳或類似製劑，當抗原相對較弱時，這些對誘發強反應尤為必要。他們還能加速免疫反應，使抗原劑量減少約兩個數量級，在有些實驗中，對不含 CpG 的全劑量疫苗也能產生類似的抗體反應 (Krieg, 2006)。美國 6406705 B1 號專利對 CpG 寡核苷酸、非核酸佐劑和抗原結合使用促使抗原特異性免疫反應進行了描述。一種 CpG TLR9 拮抗劑為 Mologen 公司 (德國柏林) 的 dSLIM (雙幹環免疫調節劑)，這是本發明藥物組合物的優選成分。也可使用其他如 TLR 結合分子，如：RNA 結合 TLR7、TLR8 及 / 或 TLR9。

【0331】 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-TGFβ、抗-TNFα受體）和 SC58175，這些藥物都可能有治療作用及/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。

【0332】 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。

【0333】 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數製劑中選擇，如粒細胞巨噬細胞集落刺激因數（GM-CSF，沙格司亭）、環磷醯胺、咪喹莫特、resiquimod 和干擾素-α。

【0334】 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數製劑中選擇，如粒細胞巨噬細胞集落

刺激因數 (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。

【0335】 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: 細胞因數。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、預防及/或治療腺瘤或癌性疾病。例如, EP 2112253 中有示例製劑。

【0336】 重要的是要認識到, 通過本發明的疫苗引發的免疫應答在不同的細胞階段和開發的不同階段攻擊癌症。而且不同的癌症相關信號通路被攻擊。這相對於其他疫苗的優勢, 這些疫苗只針對一個或幾個靶標, 這可能會導致腫瘤很容易適應於攻擊 (腫瘤逃逸)。此外, 並非所有的個體腫瘤都表達相同模式的抗原。因此, 幾個腫瘤相關肽的組合確保了每個腫瘤都承擔至少一些靶標。該組合物以這樣的方式設計, 預期每個腫瘤可表達幾種抗原並覆蓋腫瘤生長和維持所需要的幾種獨立的途徑。因此, 疫苗可易



於「現成的」用於較大患者群體。這意味著，預選擇接受疫苗治療的患者可限制為 HLA 分型，無需抗原表達的任何額外的生物標誌物評估，但仍然確保多個靶標同時被誘導的免疫應答攻擊，這對於療效很重要 (Bancheau et al., 2001; Walter et al., 2012)。

**【0337】** 本文所用的「支架」一詞是指與（如抗原）決定因數特異性結合的分子。在一項實施方案中，支架是能夠引導其所連接的實體（例如，（第二）抗原結合部分）至目標靶點，例如，至特定類型的腫瘤細胞或承載抗原決定簇的腫瘤基質（如根據目前申請中肽和 MHC 的複合體）。在另一項實施例中，支架能夠通過其靶抗原（例如 T 細胞受體複合體抗原）活化信號通路。支架包括但不限於抗體及其片段，抗體的抗原結合區，其包含抗體重鏈可變區和抗體輕鏈可變區，結合的蛋白包括至少一個錨蛋白重複序列基元和單域抗原結合 (SDAB) 分子、適體、（可溶）TCR 和（經修飾的）細胞，例如同種異體或自體 T 細胞。為了評估某個分子是否是結合至靶點的支架，可進行結合測定。

**【0338】** 「特定」結合系指，與其他天然肽-MHC 複合體相比，該支架與感興趣的肽-MHC 複合體更好地結合，結合程度為，擁有能夠殺死承載特定靶點細胞的活性分子的支架不能夠殺死無特定靶點但呈現一個或多個其他肽-MHC 複合體的另一細胞。如果交叉反應性肽-MHC 的肽並不是天然的，即，並非來自人 HLA-多肽組，則結合至

其他肽 - 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。

【0339】各支架可包括一個標記，其通過確定是否存在或不存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，通過螢光染料進行的螢光標記可通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。

【0340】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。

【0341】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。

【0342】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。

【0343】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。

【0344】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。

【0345】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。

【0346】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。

【0347】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 114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（通過指數富集的配體系統進化）技術。

【0348】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。

【0349】 因此，本發明的另一方面是提出產生特異性結合至與 H L A 限制性抗原絡合的 I 或 II 類人主要組織相容性複合體 (M H C) 的一種重組抗體的方法，該方法包括：用可溶形式的與 H L A 限制性抗原絡合的 (M H C) I 或 II 類分子對包含表達所述主要組織相容性說複合體 (M H C) I 或 II 類的基因工程非人哺乳動物進行免疫；將 m R N A 分子與產生所述非人哺乳動物細胞的抗體分離；產生一個噬菌體顯示庫，顯示由所述 m R N A 分子編碼的蛋白分子；以及將至少一個噬菌體與所述噬菌體顯示庫分離，所述的至少一個噬菌體顯示所述抗體特異性地結合至與 H L A 限制性抗原絡合的所述人主要組織相容性說複合體 (M H C) I 或 II 類。

【0350】 本發明的另一方面提出一種抗體，其特異性結合至與一種 H L A 限制性抗原絡合的 I 或 II 類人主要組織相容性說複合體 (M H C)，其中該抗體優選為多克隆抗體、單克隆抗體、雙特異性抗體及/或嵌合抗體。

【0351】 產生這種抗體和單鏈 I 類主要組織相容性複合物的相應方法，以及產生這些抗體的其他工具在 W O 03/068201、W O 2004/084798、W O 01/72768、W O 03/070752 以及出版物 (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003) 中進行了披露，為了本發明之目的，所有參考文獻通過引用被完整地併入本文。

【0352】 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」。

【0353】 本發明涉及一種肽，包含選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 的組的一個序列或該序列的與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 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。

【0354】 本發明進一步涉及一種肽，包含選自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 的組的一個序列、或與 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 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。

【0355】 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。

【0356】 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:114 的一個氨基酸序列組成。

【0357】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中該肽（在化學上）被修飾及/或包含非肽鍵。

【0358】 本發明進一步涉及本發明的肽，其中該肽為融合蛋白的一部分，特別包括 HLA-DR 抗原相關不變鏈（Ii）

的 N-端氨基酸，或其中該肽與一種抗體（例如，樹突狀細胞特定抗體）融合。

【0359】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。

【0360】本發明進一步涉及一種本發明的核酸，為 DNA、cDNA、PNA、RNA，也可能為其組合物。

【0361】本發明進一步涉及一種能表達本發明核酸的表達載體。

【0362】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 RCC。

【0363】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。

【0364】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。

【0365】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。

【0366】本發明進一步涉及本發明中的方法，其中抗原通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 MHC 分子。

【0367】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:114 的肽或所述變體氨基酸序列。

【0368】本發明進一步涉及以本發明方法製造的活化 T 細胞，其中所述 T 細胞有選擇性地識別一種細胞，該細胞異常表達含一種本發明氨基酸序列的多肽。

【0369】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。

【0370】本發明進一步涉及任何所述肽、本發明的一種核酸、本發明的一種表達載體、本發明的一種細胞、本發明一種作為藥劑或製造藥劑的活化細胞毒性 T 淋巴細胞的用途。本發明進一步涉及一種本發明的用途，其中藥劑可有效抗癌。

【0371】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。

【0372】本發明還一般涉及本發明的用途，其中所述癌細胞為 RCC 細胞或其他實體或血液腫瘤細胞，如：肺癌、腦癌、胃癌、結腸或直腸癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、攝護腺癌、白血病、乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和食管癌。

【0373】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」，其可用於診斷及/或判斷 RCC 的預後。本發明還涉及這些供癌症治療使用的新靶點。

【0374】本文中術語「抗體」為廣義上的定義，既包括多克隆也包括單克隆抗體。除了完整或「全部」的免疫球蛋白分子，「抗體」這一術語還包括這些免疫球蛋白分子和人源化免疫球蛋白分子的片段（如，CDR、Fv、Fab和Fc片段）或聚合物，只要它們表現出本發明的任何期望屬性（例如，RCC標誌物（多）肽的特異性結合、將毒素傳遞給癌細胞標誌物基因表達水準增加時的RCC細胞及/或抑制RCC標誌物多肽的活性）。

【0375】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RCC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DNA技術生產。

【0376】例如，本發明的編碼肽的cDNA，例如，該肽為根據SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:114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RCC標誌物多肽的單克隆或多克隆抗體製劑。

【0377】本領域的技術人員會認識到，兩種或兩種以上不同集合的單克隆抗體或多克隆抗體能最大限度地增加獲得一種含預期用途所需的特異性和親和力（例如，ELISA法、免疫組織化學、體內成像、免疫毒素療法）的抗體的



可能性。根據抗體的用途，用已知的方法對其期望活性進行測試（例如，ELISA法、免疫組織化學、免疫治療等；要獲取產生和測試抗體的進一步指導，請參閱，例如，Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)）。例如，該抗體可用ELISA法或免疫印跡法、免疫組織化學染色福馬林固定的癌組織或冰凍的組織切片進行檢測。在初次體外表徵後，用於治療或體內診斷用途的抗體根據已知的臨床測試方法進行檢測。

**【0378】** 此處使用的術語「單克隆抗體」系指從大量同質抗體中獲得的一種抗體，即，由相同的抗體組成的抗體群，但可能少量呈現的自然突變除外。此處所述的單克隆抗體具體包括「嵌合」抗體，其中一部分重鏈及/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）。

**【0379】** 本發明的單克隆抗體可能使用雜交瘤方法制得。在雜交瘤方法中，老鼠或其他適當的宿主動物，通常用免疫製劑以引發產生或能產生將特異性結合至免疫製劑的抗體。或者，淋巴細胞可在體外進行免疫。

**【0380】** 單克隆抗體也可由DNA重組方法制得，如：美國4816567號專利所述。編碼本發明單克隆抗體的

DNA 可很容易地使用傳統程序進行分離和定序（例如：通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）。

【0381】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，可以通過使用本領域已知的常規技術完成。例如，可以通過使用木瓜蛋白酶完成消化。木瓜蛋白酶消化的實施例在 WO 94/29348 和美國 4342566 號專利中有描述。抗體的木瓜蛋白酶消化通常產生兩種相同的抗原結合性片段，稱為 Fab 片段（每個片段都有一個抗原結合點）和殘餘 Fc 片段。胃蛋白酶處理產生  $aF(ab')_2$  片段和  $pFc'$  片段。

【0382】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、調節結合域的結合能力等。抗體的功能性或活性區域可通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。

【0383】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。

**【0384】** 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。人源化基本上可以通過將齧齒動物 CDR 或 CDR 序列取代為相應的人抗體序列而完成。因此，這種「人源化」抗體為嵌合抗體（美國 4816567 號專利），其中大大少於完整的人可變域被來自於非人物種的相應序列取代。在實踐中，人源化抗體通常為人抗體，

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

【0385】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。

【0386】本發明的抗體優選為通過藥用載體的形式給予受試者。通常，在製劑中使用適量的藥用鹽，以使製劑等滲。藥用載體的例子包括生理鹽水、林格氏液和葡萄糖溶液。溶液的 pH 值優選為約 5 至 8，更優選為約 7 至 7.5。此外，載體還包括緩釋製劑，如：含有抗體的固體疏水性聚合物半透性基質，其中基質為有形物品形式，如：薄膜、脂質體或微粒。本行業的技術人員熟知，某些載體可能為更優選，取決於例如，抗體的給藥途徑和濃度。

【0387】該抗體可通過注射（如：靜脈內、腹腔內、皮下、肌肉內）或通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。這些抗體也可以通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。

【0388】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 RCC 後，治療抗體的療效可通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、數量及/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、及/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。

**【0389】** 本發明的另一方面提出了製備識別特異性肽-MHC複合物的可溶性 T 細胞受體 (sTCR) 的一種方法。這種可溶性 T 細胞受體可從特異性 T 細胞克隆中產生，並且它們的親和力可以通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，可通過非天然二硫鍵、其他共價鍵 (單鏈 T 細胞受體) 或通過二聚化結構域連接  $\alpha$  和  $\beta$  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、細胞因數 (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 中公開了製備的其它方法。

**【0390】** 本發明的另一方面提出了一種 TCR，例如，識別本文披露的特異性肽-MHC 複合體的可溶性 T 細胞受體 (sTCR)。

**【0391】** 此外，可用本發明的肽及/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。

**【0392】** 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： $^{111}\text{In}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$  或  $^{35}\text{S}$ ），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  $1 \times 10 \mu\text{M}$ 。

**【0393】** 診斷用抗體可通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。

【0394】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 分子進行體外接觸，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 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。

【0395】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。

【0396】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)。

【0397】 優選情況是，宿主細胞在轉染前基本上不表達 MHC I 類分子。刺激因數細胞還優選為表達對 T 細胞共刺激信號起到重要作用的分子，如，B7.1、B7.2、ICAM-1 和 LFA 3 中的任一種分子。大量 MHC I 類分子和共刺激分子的核酸序列可從 GenBank 和 EMBL 資料庫中公開發得。

【0398】 當 MHC I 類表位用作一種抗原時，T 細胞為 CD8 陽性 T 細胞。

【0399】 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 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:114 及/或 SEQ ID NO:115 至 SEQ ID NO:151 的肽或變體氨基酸序列。

【0400】 可使用其他一些方法來體外生成 T 細胞。例如，自體腫瘤浸潤性淋巴細胞可用于生成 CTL。Plebanski 等人在 (Plebanski et al., 1995) 使用自體外周血淋巴細胞 (PLB) 制得 T 細胞。另外，也可能用肽或多肽脈衝處理樹突狀細胞或通過與重組病毒感染而製成自體 T 細胞。此外，B 細胞可用於製備自體 T 細胞。此外，用肽或多肽脈衝處理或用重組病毒感染的巨噬細胞可用於配製自體 T 細胞。S. Walter 等人在 (Walter et al., 2003) 中描述了通過使用人工抗原呈現細胞 (aAPC) 體外活化 T 細胞，這也是生成作用於所選肽的 T 細胞的一種合適方法。在本發明中，根據生物素：鏈黴素生物化學方法通過將預製的 MHC：肽複合物耦合到聚苯乙烯顆粒



(微球)而生成 aAPC。該系統實現了對 aAPC 上的 MHC 密度進行精確調節，這使得可以在血液樣本中選擇地引發高或低親合力的高效抗原特異性 T 細胞反應。除了 MHC：肽複合物外，aAPC 還應攜運含共刺激活性的其他蛋白，如耦合至表面的抗-CD28 抗體。此外，此類基於 aAPC 的系統往往需要加入適當的可溶性因數，例如，諸如白細胞介素-12 的細胞因數。

【0401】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。

【0402】被活化的 T 細胞直接針對本發明中的肽，有助於治療。因此，本發明的另一方面提出了用本發明前述方法制得的活化 T 細胞。

【0403】按上述方法製成的活化 T 細胞將會有選擇性地識別異常表達含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO 114 氨基酸序列的多肽。

【0404】優選情況是，T 細胞通過與其含 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 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。

【0405】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）及/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））。

【0406】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。

【0407】發明人所用的「異常表達」的意思還包括，與正常表達水準相比，多肽過量表達，或該基因在源自腫瘤的組織中未表達，但是在該腫瘤中卻表達。「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。

【0408】T 細胞可用本領域已知的方法制得（如，上述方法）。T 細胞繼轉移方案也為本領域所熟知的方案。綜述可發現於：Gattioni et al. 和 Morgan et al.（Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006）。

【0409】本發明的另一個方面包括使用與 MHC 複合的肽，以生成 T 細胞受體，其核酸被克隆並被引入至宿主細胞，優選為 T 細胞。然後，該通過基因工程改變的 T 細胞可轉給患者用於癌症治療。

【0410】本發明的任一分子（即肽、核酸、抗體、表達載體、細胞，活化 T 細胞、T 細胞受體或編碼核酸）都有益於治療疾病，其特點在於細胞逃避免疫反應的打擊。因此，本發明的任一分子都可用作藥劑或用於製造藥劑。這種分子可單獨使用也可與本發明中的其他分子或已知分子聯合使用。

【0411】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) 重組及 / 或凍乾製劑使用的說明。

【0412】該套件還步包括一個或多個 (iii) 緩衝劑，(iv) 稀釋劑，(v) 過濾器，(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。

【0413】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及 / 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。試劑盒及/或容器最好有容器或關於容器的說明書，指明重組及/或使用的方向。例如，標籤可能表明凍幹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。

**【0414】** 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。

**【0415】** 稀釋液和凍幹製劑混合後，重組製劑中的肽終濃度優選為至少  $0.15 \text{ mg/mL/肽}$  ( $=75 \mu\text{g}$ )，不超過  $3 \text{ mg/mL/肽}$  ( $=1500 \mu\text{g}$ )。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，過濾器、針頭、注射器和帶有使用說明書的包裝插頁。

**【0416】** 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。

**【0417】** 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。

【0418】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）。

【0419】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，也可通過輸液泵給藥。

【0420】由於本發明的肽從 RCC 中分離而得，因此，本發明的藥劑優選用於治療 RCC。

【0421】本發明進一步涉及為個體患者製備個體化藥物的一種方法，其中包括：製造含選自預篩選 TUMAP 存儲庫至少一種肽的藥物組合物，其中藥物組合物中所用的至少一種肽選擇為適合於個體患者。在一項實施方案中，藥物組合物為一種疫苗。該方法也可以改動以產生下游應用的 T 細胞克隆物，如：TCR 隔離物或可溶性抗體和其他治療選擇。

【0422】 「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。

【0423】 如本文所述，「存儲庫」應指已經接受免疫原性預篩查及/或在特定腫瘤類型中過量呈現的一組或一系列肽。「存儲庫」一詞並不暗示，疫苗中包括的特定肽已預先製造並儲存於物理設備中，雖然預期有這種可能性。明確預期所述肽可以用於新製造每種個體化疫苗，也可能被預先製造和儲存。存儲庫（例如，資料庫形式）由腫瘤相關肽組成，其在各種 HLA-A HLA-B 和 HLA-C 等位元基因 RCC 患者的腫瘤組織中高度過度表達。其可能含有包括 MHC I 類和 MHC II 類肽或拉長的 MHC I 類肽。除了從幾種 RCC 組織中採集的腫瘤相關肽外，存儲庫還可能包含 HLA-A\*02 和 HLA-A\*24 標記肽。這些肽可對 TUMAP 誘導的 T 細胞免疫進行量化比較，從而可得出疫苗抗腫瘤反應能力的重要結論。其次，在沒有觀察到來自患者「自身」抗原 TUMAP 的任何疫苗誘導的 T 細胞反應時，它們可作為來自「非自身」抗原的重要陽性對照肽。第三，它還可對患者的免疫功能狀態得出結論。

【0424】 存儲庫的 TUMAP 通過使用一種功能基因組學方法進行鑒定，該方法結合了基因表達分析、質譜法和 T 細胞免疫學 (XPresident®)。該方法確保了只選擇真實存在于高百分比腫瘤但在正常組織中不表達或僅很少量表達的 TUMAP 用於進一步分析。對於初始肽的選擇，患者

的 R C C 樣本和健康供體的血液以循序漸進的方法進行分析：

1. 惡性材料的 H L A 配體用質譜法確定
2. 使用全基因組信使核糖核酸 ( m R N A ) 表達分析法用於確定惡性腫瘤組織 ( R C C ) 與一系列正常器官和組織相比過度表達的基因。
3. 確定的 H L A 配體與基因表達資料進行比較。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 T U M A P 。
4. 文獻檢索以確定更多證據以支持確認為 T U M P 的肽的相關性
5. 過度表達在 m R N A 水準的相關性由腫瘤組織第 3 步選定的 T U M A P 重新檢測而確定，並且在健康組織上缺乏（或不經常）檢測。
6. 為了評估通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 R C C 患者的人 T 細胞進行體外免疫原性測定。

**【 0 4 2 5 】** 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 / M H C 複合物和抗 C D 2 8 抗體的人工抗原呈現細胞反復刺激來自健康供體的 C D 8 + T 細胞。

【0426】 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。

【0427】 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。

【0428】 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。

【0429】 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 及 / 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，並定序洗脫配體。優選情況是，腫瘤樣本和正常組織從同一患者獲得。

【0430】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 可通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 及 / 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 可通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通過全基因組定序方法進行定序：為了發現基因蛋白質編碼區域的非同義突變，從腫瘤組織中萃取基因組 DNA 和 RNA，從外周血單核細胞 (PBMC) 中提取正常非突變基因組種系 DNA。運用的 NGS 方法只限于蛋白編碼區的重定序（外顯子組重定序）。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) 進行定序。此外，對腫瘤的 mRNA 進行定序，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通過軟體演算法處理。輸出列表中包含突變和基因表達。腫瘤特異性體突變通過與 PBMC 衍生的種系變化比較來確定，並進行優化。然後，為了存儲庫可能測試新確定的肽瞭解如上所述的免疫原性，並且選擇具有合適免疫原性的候選 TUMAP 用於疫苗。

**【0431】** 在一個示範實施方案中，疫苗中所含肽通過以下方法確定：(a) 用上述方法識別由來自個體患者腫瘤樣本呈現的腫瘤相關肽 (TUMAP)；(b) 將 (a) 中鑒定的肽與進行腫瘤 (與相應的正常組織相比) 免疫原性和過量呈現預篩查肽的存儲庫進行比對；(c) 從與患者中確定的腫瘤相關肽相關的存儲庫中選擇至少一種肽；及 (d) 可選地在 (a) 中選擇至少一種新確定的肽，確認其免疫原性。

**【0432】** 在一個示範實施方案中，疫苗中所含肽通過以下方法確定：(a) 識別由來自個體患者腫瘤樣本呈現的腫瘤相關肽 (TUMAP)；以及 (b) 在 (a) 中選擇至少一種新確定的肽，並確認其免疫原性。

**【0433】** 一旦選定了用於個體化肽疫苗的肽時，則產生疫苗。該疫苗優選為一種液體製劑，包括溶解於 20-40% DMSO 之間，優選為約 30-35% DMSO，例如，約 33% DMSO 中的個體肽。

【0434】 列入產品的每種肽都溶於 DMSO 中。單個肽溶液濃度的選擇取決於要列入產品中的肽的數量。單肽-DMSO 溶液均等混合，以實現一種溶液中包含所有的肽，且濃度為每肽  $\sim 2.5 \text{ mg/ml}$ 。然後該混合溶液按照 1:3 比例用注射用水進行稀釋，以達到在 33% DMSO 中每肽  $0.826 \text{ mg/ml}$  的濃度。稀釋的溶液通過  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$  無菌篩檢程序進行過濾。從而獲得最終本體溶液。

【0435】 最終本體溶液填充到小瓶中，在使用前儲存於  $-20^\circ\text{C}$  下。一個小瓶包含  $700 \text{ }\mu\text{L}$  溶液，其中每種肽含有  $0.578 \text{ mg}$ 。其中的  $500 \text{ }\mu\text{L}$ （每種肽約  $400 \text{ }\mu\text{g}$ ）將用於皮內注射。

【0436】 本發明的肽除了用於治療癌症，也可用於診斷。由於肽由 RCC 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。

【0437】 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 RCC 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。

【0438】 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。

**【0439】** 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。

**【0440】** 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通過引用的方式併入在本文中。

## 實施例

### 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*

**【0441】** 患者的腫瘤組織獲得自 BioServe (Beltsville, MD, USA)、慕尼黑大學醫院、京都府立醫科大學 (KPUM)、蒂賓根大學醫院。

【0442】 正常（健康）組織獲得自 Bio-Options Inc., CA, USA、BioServe, Beltsville, MD, USA、Capital BioScience Inc., Rockville, MD, USA、Geneticist Inc., Glendale, CA, USA、日內瓦大學醫院、海德堡大學醫院、京都府立醫科大學 (KPUM)、慕尼黑大學醫院、ProteoGenex Inc., Culver City, CA, USA、蒂賓根大學醫院。

【0443】 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  $-70^{\circ}\text{C}$  或以下。

#### 從組織樣本中分離 HLA 肽

【0444】 根據方案 (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) 略加修改，使用 HLA-A\*02 特異性抗體 BB7.2、HLA-A、HLA-B、HLA-C 特異性抗體 W6/32、CNBr 活化的瓊脂糖凝膠、酸處理和超濾方法以固體組織的免疫沉澱法獲得了冷休克組織樣本的 HLA 肽庫。

#### 質譜分析

【0445】 獲得的 HLA 肽庫根據其疏水性用反相色譜 (nanoAcquity UPLC system, Waters) 分離，洗脫肽用裝有電噴霧源的 LTQ-velos 融合雜交質譜 (ThermoElectron) 進行了分析。肽庫被直接載入填充有  $1.7\ \mu\text{m}$  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 mm) , 應用流速為 400 nL 每分鐘。隨後, 使用來自流速為 300 nL 每分鐘、濃度為 10% 至 33% 溶劑 B 中的兩步 180 分鐘二元梯度法對肽進行分離。梯度由溶劑 A (含 0.1% 甲酸的水) 和溶劑 B (含 0.1% 甲酸的乙腈)。金鍍膜玻璃毛細管 (PicoTip, New Objective) 用於引入到納升電噴霧源。使用前 5 (TOP5) 策略在資料依賴模式下操作 LTQ-Orbitrap 質譜儀。簡言之, 首先以高精確品質完全掃描在 orbitrap 開始一個掃描週期 ( $R = 30\,000$ ), 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。

**【0446】** 無標記相對 LC-MS 定量通過離子計數 (即通過 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。提取的特徵通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 RCC 樣本與正常組織樣本的基線值並列。示範性過度呈現肽的呈現譜示於圖 1 中。示範性肽的呈現分數見表 8。

【0447】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 HLA-A\*02 肽。

序列 ID 號	序列	肽呈現
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	+++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	+++
6	VLFEFSKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	+++
9	ILLQKPDSV	+++
10	KLLQNNYGL	+
11	FIQTEAPKEV	+++
12	ALDPSGNQLI	+++

序列 ID 號	序列	肽呈現
13	K I M A Q I L T V	+
14	A L L T E T I F L	++
15	I L I K H L V K V	+++
16	F M P E E L P Q L	+++
17	I L A Q Q V H A L	+++
18	Y V L D L A A K V	+++
19	L L D P G S L Q L	+
20	A V A N T T F T V	+++
21	R L I Q G D Q I L S V	+++
23	Y I Q E V V Q Y I	+++
24	F T L G T T V F L	++
26	S L M E I L Y T L	+++
27	S L S D L L V S L	++
28	F I A D L V V G L	++
29	I L L D L E Q A L	+
30	Q L F Y T K I F L	++
31	V L F G L D P A V I K V	+
32	F L A G G I R G S G A	+++
33	F I A D V V E K I	+++
34	E L N N Q N F Y L	+++
35	V L H S L Q T Q L	+++



序列 ID 號	序列	肽呈現
36	SLFGKKYIL	+++
37	VLAPVILML	+++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHL LQI	++
41	GLLKT LQKL	+
42	VILDTGTIQL	+++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+
45	ALLGIPLTL	++
47	TLAEVRAVQEI	+
48	VVASNIMEV	+++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	+
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	+++
55	YLALILPVL	+++
56	ILMDFSNSM	+
57	SLQKEILYL	+++
58	FLVD FEQSHL	++
60	ILWKDIEYV	+++

序列 ID 號	序列	肽呈現
61	SLMGILLRI	+++
62	VLAGPAFLVQL	+++
66	TLLKTIKIV	++
67	LLDVLAPLV	+
68	YVLTQPPSV	+++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	+
72	YSLEKVFGEI	+
73	GLDGIPFTV	++
74	GLFHKQVTV	+
75	FLIKSINLV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	+
79	ALADIVWRA	+
80	KLASMLETL	+
83	IQWSIVPEV	++
86	GLLQGKLALL	+
88	TLAELHISL	+
89	SLLLAVTEV	+
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	+

序列 ID 號	序列	肽呈現
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++
94	ILHHKVYDL	+
96	TLAETLVNL	+
97	TLISELVQA	+
98	KIPPVSPSI	+++
99	GLAPHLEQI	+
100	KLNVAPLAV	+
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+
103	KLQDGLLHI	+++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	++
106	VLMDLKALL	+
107	VLMDLKALLL	++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	+
110	LLDLHSYLL	+
111	TLLETEMLL	+++
112	LLFDHLEPIEL	+
113	SLFDWNVKL	++

序列 ID 號	序列	肽呈現
114	ALAVNISAA	++
115	LLDPKTIFL	+++
116	GLVDIMVHL	+++
117	VLFGE L PAL	+++
118	FLNAIETAL	+++
119	RLHDENILL	+++
120	GLAGDNIYL	+++
121	ALLRTVVS V	++
122	SLDPSSPQV	++
123	YVDPVITSI	++
124	ILSPLSV AL	+
125	KLDPTKTTL	+++
126	KIQEILTQV	+++
127	VLAPLFVYL	++
128	YLEEDVYQL	+++
129	VLAPRVLRA	++
130	ALPTVLVGV	++
131	VMAGDIYSV	++
132	SVASTITGV	++
133	QLIDYERQL	++
134	VADKIHSV	+++

序列 ID 號	序列	肽呈現
135	V V D E G P T G V	+++
136	Y Q D P H S T A V	++
137	T L V A I V V G V	++
138	S L D T L M T Y V	++
139	I L N V D G L I G V	++
140	S L A N N V T S V	++
141	L L V D D S F L H T V	+++
143	A L F V R L L A L A	++
145	S L H F L I L Y V	+
150	T L M P N I N K L	+++
151	Y M Y E G P A P R I	+++

## 實施例 2

### 編碼本發明肽的基因的表達譜

【0448】 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

【0449】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。

【0450】健康人體組織中的總 RNA 從商業途徑獲得（Ambion 公司，Huntingdon，英國；Clontech 公司，海德堡，德國；Stratagene 公司，阿姆斯特丹，荷蘭；BioChain 公司，Hayward，CA，美國）。混合數個人（2 至 123 個人）的 RNA，從而使每個人的 RNA 得到等加權。

【0451】所有 RNA 樣本的品質和數量都在 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析儀（Agilent 公司，Waldbronn，德國）上使用 RNA 6000 Pico LabChip Kit 試劑盒（Agilent 公司）進行評估。

### 微陣列實驗

【0452】所有腫瘤和正常組織的 RNA 樣本都使用 Affymetrix Human Genome (HG) U133A 或 HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix 寡核苷酸晶片（Affymetrix 公司，Santa Clara，CA，美國）進行基因表達分析。所有步驟都根據 Affymetrix 手冊進行。

簡言之，如手冊中所述，使用 SuperScript RTII (Invitrogen 公司) 以及 oligo-dT-T7 引物 (MWG Biotech 公司, Ebersberg, 德國) 從 5-8 µg RNA 中合成雙鏈 cDNA。用 BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics 公司, Farmingdale, NY, 美國) 進行 U133A 測定或用 GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix 公司) 進行 U133 Plus 2.0 測定，之後用鏈黴親和素-藻紅蛋白和生物素化抗鏈黴素蛋白抗體 (Molecular Probes 公司, Leiden, 荷蘭) 進行破碎、雜交和染色，這樣完成體外轉錄。用 Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) 或 Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0) 對圖像進行掃描，用 GCOS 軟體 (Affymetrix 公司) 在所有參數默認設置情況下對資料進行分析。為了實現標準化，使用了 Affymetrix 公司提供的 100 種管家基因 (housekeeping gene)。相對表達值用軟體給定的 signal log ratio 進行計算，正常腎組織樣本的值任意設置為 1.0。本發明的代表性源基因在 RCC 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。

**【0453】** 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。

序列 ID 號	基因名稱	序列	基因表達
1	SLC17A3	ALIVSLPYL	++
2	HSF4	ILWREVVTL	++
3	HSF4	RLLGEVQAL	++
6	ATP11A	VLFELSKTV	+
7	EGLN3	FLLSLIDRL	++
18	ACLY	YVLDLAAKV	+
28	ENO1,ENO2,ENO3	FIADLVVGL	+
35	ANGPTL4	VLHSLQTQL	++
37	ABCC3	VLAPVILML	+
40	IVNS1ABP	YIQEHLQL	+
50	ITGA3	SLSDHIVLL	+
51	ITGA3	NLWPMILTL	+
55	SLC16A4	YLALILPVL	+
59	TGFBI	SLKNNVVS	+
62	SLC47A1	VLGPAFLVQL	+
63	ERAP1	GLIEDHFDVTV	+
65	TPI1,TPI1P1	IYGGSVTGA	+
76	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1	VLADDHLIEV	++
81	LRP2	SLLPALPKL	+
87	APOL1	LADGVQKV	++
93	PLIN2	GVMAGDIYSV	+



序列 ID 號	基因名稱	序列	基因表達
94	CYB5A	ILHHKVYDL	+
101	FLT1	HIYDKAFITV	++
105	HSPG2	ALADLDELLIRA	+
115	HAVCR1	LLDPKTIFL	+
120	SLC22A2	GLAGDNIYL	+
122	GAL3ST1	SLDPSSPQV	+++
123	MET	YVDPVITSI	++
125	NDRG1	KLDPTKTTL	+
127	FZD2,FZD1,FZD7	VLAPLFVYL	+
131	PLIN2	VMAGDIYSV	+
132	PLIN2	SVASTITGV	+
137	FKBP10	TLVAIVVGV	+
139	ACLY	ILNVDGLIGV	+
143	TGFBI	ALFVRL LALA	+

### 實施例 3

#### *MHC-I* 類呈現肽的體外免疫原性

【0454】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，發明人可顯示出本發明目前為止 22 種 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

【0455】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) 通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。

【0456】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。

【0457】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。

【0458】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  $\mu\text{m}$  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)。

【0459】用於陽性和陰性對照刺激物的 pMHC 分別為 A\*0201/MLA-001 (從 Melan-A/MART-1 中修飾制得的肽 ELAGIGILTV (SEQ ID NO.152)) 和 A\*0201/DDX5-001 (從 DDX5 中獲得的 YLLPAIVHI (SEQ ID NO.153))。

【0460】800.000 珠/200  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  的 600 ng 生物素抗-CD28。在 37 $^{\circ}\text{C}$  下, 在含 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) 的 200  $\mu\text{l}$  TCM 中共培養  $1 \times 10^6$  CD8+T 細胞與  $2 \times 10^5$  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 $^{\circ}\text{C}$  下持續 4 天。這種刺激性週期總共進行 3 次。對於使用每條件 8 種不同 pMHC 分子的 pMHC 多聚體讀出, 二維組合編碼方法如前述使用 (Andersen et al., 2012), 稍作修飾, 涵蓋耦合至 5 種不同的螢光染料。最後, 用 Live/dead

near IR 染料 (Invitrogen 公司, Karlsruhe, 德國)、CD8-FITC 抗體克隆 SK1 (BD 公司, Heidelberg, 德國) 和螢光 pMHC 多聚體而執行多聚體分析。對於分析, 使用了配有合適鐳射儀和篩檢程序的 BD LSRII SORP 細胞儀。肽特異性細胞以占總 CD8+ 細胞的百分比形式進行計算。多聚體分析結果使用 FlowJo 軟體 (Tree Star 公司, Oregon, 美國) 進行評估。特定多聚體 + CD8+ 淋巴細胞的體外填裝用與陰性對照刺激組比較而進行檢測。如果健康供體中的至少一個可評價的體外刺激孔在體外刺激後發現含有特異性 CD8+ T 細胞株 (即該孔包含至少 1% 特定多聚體 + CD8+ T 細胞, 並且特定多聚體 + 的百分比至少為陰性對照刺激中位數的 10 倍), 則檢測給定抗原的免疫原性。

### *RCC 肽體外免疫原性*

【0461】對於受到測試的 HLA-I 類肽, 可通過肽特異性 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 3 種肽的結果匯總於表 10A) 和 B)。

【0462】表 10A: 本發明中 HLA 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。 $< 20\% = +$ ;  $20\% - 49\% = ++$ ;  $50\% - 69\% = +++$ ;  $\geq 70\% = ++++$

序列 ID 號	肽代碼	孔	供體
123	YVDPVITSI	+	++++
127	VLAPLFVYL	++	++++
143	ALFVRLALA	+	+++

**【0463】** 表 10B：本發明中 HLA 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。提示了體外免疫原性實驗的結果。陽性孔和供體（其他可評價）的百分比概括為  $< 20\% = +$ ;  $20\% - 49\% = ++$ ;  $50\% - 69\% = +++$ ;  $\geq 70\% = ++++$

序列 ID 號	序列	陽性孔 [%]
1	ALIVSLPYL	+
2	ILWREVVTL	+
3	RLLGEVQAL	+
6	VLFEFSKTV	+
7	FLLSLIDRL	+
9	ILLQKPDSV	+
15	ILIKHLVKV	+
16	FMPEELPQL	+
18	YVLDLAAKV	++

20	A V A N T T F T V	+
22	F L S P P L P S V	++
29	I L L D L E Q A L	+
34	E L N N Q N F Y L	++
36	S L F G K K Y I L	++
94	I L H H K V Y D L	++
95	K L T D V G I A T L	++++
98	K I P P V S P S I	++++

#### 實施例 4

##### 肽的合成

【0464】 所有的肽通過使用 Fmoc 策略以標準、廣為接受的固相肽合成法合成。每個肽的身份和純度已使用質譜和 RP-HPLC 分析法確定。用凍幹法（三氟乙酸鹽）獲得白色至類白色的肽，純度為 >50%。所有的 TUMAP 優選作為三氟乙酸鹽或乙酸鹽進行給藥，其他鹽形式也可以。

#### 實施例 5

##### MHC 結合測定

【0465】 本發明基於 T 細胞療法的候選肽進一步測試其 MHC 結合能力（親和性）。單個肽-MHC 複合體通過 UV-配體交換產生，其中，紫外線敏感肽經紫外線照射後裂解，與分析的相關肽交換。只有能夠有效地結合並穩定肽接受 MHC 分子的候選肽才能阻止 MHC 複合物的解離。為了確定交換反應的產率，將基於穩定 MHC 複合物輕鏈（ $\beta 2 m$ ）

的檢測結果進行 ELISA 測定。檢測總體上按照 Rodenko 等人在 (Rodenko et al., 2006) 中描述的方法進行。

【0466】 96 孔 Maxisorp 板 (NUNC) 在室溫下在 PBS 中以 2 ug/ml 鏈黴包被過夜，用 4 倍洗滌並在 37°C 下在含封閉緩衝液的 2% BSA 中封閉 1 小時。折疊的 HLA-A\*02:01/MLA-001 單體作為標準品，涵蓋 15-500 ng/ml 的範圍。紫外線交換反應的肽-MHC 單體在封閉緩衝液中稀釋 100 倍。樣本在 37°C 下孵育 1 小時，洗滌四次，在 37°C 下以 2 ug/ml HRP 綴合抗-β2m 溫育 1 小時，再次洗滌，並以 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 封堵的 TMB 溶液進行檢測。在 450 nm 處測量吸收。在生成和產生抗體或其片段時及/或 T 細胞受體或其片段時，通常優選顯示為高交換產率（優選為高於 50%，最優選為高於 75%）的候選肽，這是因為它們對 MHC 分子表現出足夠的親合力，並能防止 MHC 複合物的解離。

【0467】 表 11：MHC-I 類結合分數

HLA-I 類限制肽與 HLA-A\*02:01 的結合根據肽交換產量分類：≥10% = +；≥20% = ++；≥50% = +++；≥75%

= ++++

序列 ID	肽代碼	肽交換
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	++
4	FLSQDIITV	+++

5	YLYPNLTRL	++
6	VLFEFSKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	++
9	ILLQKPDSV	++
10	KLLQNNYGL	++
11	FIQTEAPKEV	++
12	ALDPSGNQLI	++
13	KIMAQILTV	+++
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	++
16	FMPEELPQL	++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	++
20	AVANTTFTV	++
21	RLIQGDQILSV	++
22	FLSPPLPSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	+++
25	LLVPAHLVAA	++
27	SLSDLLVSL	+++
28	FIADLVVGL	++



29	ILLDLEQAL	+++
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+++
33	FIADVVEKI	++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	++
36	SLFGKKYIL	++
37	VLAPVILML	++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLQI	+++
41	GLLKTQLKL	++
42	VILDTGTIQL	++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+++
45	ALLGIPLTL	+++
46	GLSEVLVQI	+++
47	TLAEVRAVQEI	+++
48	VVASNIMEV	++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	++
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	++

53	FLLEIRQTL	++
54	ALVAKGLVQA	++
55	YLALILPVL	++
56	ILMDFSNSM	+++
57	SLQKEILYL	++
58	FLVDFEQSHL	++++
59	SLKNNVVS	+++
60	ILWKDIEYV	+++
61	SLMGILLRI	++
62	VLGPAFLVQL	+++
63	GLIEDHFDVTV	++
64	LLAASVALA	++
65	IYGGSVTGA	++
66	TLLKTIK	++
67	LLDVLAPLV	++
68	YVLTQPPSV	++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	++
71	ALDGHLYAV	+++
72	YSLEKVF	++
73	GLDGIPFTV	+++
74	GLFHKQVTV	+++
75	FLIKSINLV	+++

76	V L A D D H L I E V	++
77	S L I K H K I M L	++
78	A L L D T V V Q A	++
79	A L A D I V W R A	+++
80	K L A S M L E T L	+++
81	S L L P A L P K L	++
82	S L L Q A T D F M S L	+++
83	I Q W S I V P E V	+++
84	Y L M D E G A H L	++
85	F V M S E I R T V	+++
86	G L L Q G K L A L L	++
88	T L A E L H I S L	++
89	S L L L A V T E V	++
90	F T L E K N F V I	++
91	M L L S S L V S L	++
92	F L F R D I L E L	+++
93	G V M A G D I Y S V	++++
94	I L H H K V Y D L	++
95	K L T D V G I A T L	++
96	T L A E T L V N L	+++
97	T L I S E L V Q A	++
98	K I P P V S P S I	++
99	G L A P H L E Q I	++

100	KLNVAPLAV	++
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+++
103	KLQDGLLHI	++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	+++
106	VLMDLKALL	+++
107	VLMDLKALLL	+++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	++++
110	LLDLHSYLL	++
111	TLLETEMLL	++
112	LLFDHLEPIEL	+++
113	SLFDWNVKL	+++
114	ALAVNISAA	+++

## 實施例 6

### 細胞表面呈現的腫瘤相關肽的絕對定量

【0468】黏合劑例如抗體及/或 TCR 的產生是一個費力的過程，其可以僅針對一些選定靶標進行。在腫瘤相關和特異性肽的情況下，選擇標準包括但不限於排除呈現於細胞表面上肽的呈現和濃度。實體腫瘤樣本中每個細胞的 TUMAP 拷貝數定量需要分離 TUMAP 的絕對定量、

TUMAP 分離效率和分析的組織樣本細胞計數。實驗步驟如下所述。

### *Nano LC-MS/MS 肽定量*

【0469】對於通過質譜法對肽的準確定量，使用內標法生成每種肽的校準曲線。內標是每種肽的雙同位素標記的變體，即，TUMAP 合成中納入 2 個同位素標記的氨基酸。它與腫瘤相關肽僅在品質上不同，但在其他的物理化學性質方面無差異 (Anderson et al., 2012)。內標被摻入到每個 MS 樣本，所有 MS 信號均標準化為內標 MS 信號，以平衡 MS 實驗之間潛在的技術差異。校準曲線用至少三種不同的矩陣繪製，即，來自于類似於常規 MS 樣本的天樣本的 HLA 肽洗脫液，並且每個制備品以重複 MS 運行進行測量。對於評價，MS 信號被標準化為內標信號，校準曲線通過 logistic 回歸計算。對於來自組織樣本的腫瘤相關肽的定量，各樣本也摻有內標；MS 信號標準化為內標並使用該肽校正曲線進行定量。

### *肽/MHC 分離的效率*

【0470】對於任何蛋白質純化過程，來自組織樣本蛋白的分離與相關蛋白的一定損失相關聯。為了確定 TUMAP 分離的效率，針對選定為絕對定量的所有 TUMAP 產生了肽/MHC 複合體。為了能夠區別天然肽/MHC 複合體與加樣物，使用了單同位素標記版本的 TUMAP，即 TUMAP

合成期間納入 1 個同位素標記的氨基酸。這些複合物被摻入新製備的組織裂解物中，例如，在 TUMAP 分離過程中最早可能時間點，然後在之後的親和純化中像天然肽/MHC 複合物被獲取。因此，測量單標記 TUMAP 的恢復可得到個體 TUMAP 分離效率相關的結論。分離效率使用少量樣本進行分析，且這些組織樣本可比較。與此相反，個體肽之間的分離效率不同。這表明，分離效率雖然只在有限數量的樣本中進行測定，但可外推至任何其他組織制備品中。但是，由於分離效率不能從一種肽外推至其他肽，因此，有必要單獨分析每個 TUMAP。

#### *固體、冷凍組織中細胞計數的測定*

【0471】為了確定經過絕對肽定量的組織樣本的細胞數，發明人採用了 DNA 含量分析。此方法適用於不同來源的廣泛樣本，最重要的是，冷凍樣本 (Forsey and Chaudhuri, 2009; Alcoser et al., 2011; Silva et al., 2013)。在肽分離方案期間，組織樣本被加工為均勻的裂解物，從中取一小等份裂解物。樣本等分為三份，從中分離 DNA (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, 德國)。每次 DNA 分離的總 DNA 含量至少重複兩次使用基於螢光的 DNA 定量測定法 (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, 德國) 進行定量。

【0472】 為了計算細胞數，生成了來自單個健康血細胞等分試樣的 DNA 標準曲線，使用一系列指定的細胞數。標準曲線用於計算每次 DNA 分離的總 DNA 含量的總細胞含量。用於肽分離的組織樣本的平均總細胞計數，在考慮裂解物等份的已知體積和總裂解物體積的情況下進行推算。

### 每細胞的肽拷貝數

【0473】 使用前述實驗的資料，發明人以總肽量除以樣本總細胞計數計算得出每個細胞的 TUMAP 拷貝數，隨後除以分離效率。選定肽的細胞拷貝數如表 12 所示。

【0474】 表 12：絕對拷貝數。該表列出了 NSCLC 腫瘤樣本中絕對肽定量的結果。針對每種肽，每個細胞的中位元拷貝數表示： $< 100 = +$ ； $\geq 100 = ++$ ； $\geq 1,000 = +++$ ； $\geq 10,000 = ++++$ 。提示樣本數量，其中提供評估的高品質 MS 數據。

序列 ID 號	肽代碼	每細胞拷貝數 (中位數)	樣本數量
1	SLC17A3-001	++	18

### 【0475】 參考文獻列表

PLoS One. **10** (2015): e0119247

Agalliu, I. et al., JAMA Neurol. **72** (2015): 58-65

Agesen, T. H. et al., Gut **61** (2012): 1560-1567

- Alagaratnam, S. et al., *Int.J Androl* **34** (2011):  
e133-e150
- Alcoser, S. Y. et al., *BMC.Biotechnol.* **11**  
(2011): 124
- Alholle, A. et al., *Epigenetics.* **8** (2013):  
1198-1204
- Allison, J. P. et al., *Science* **270** (1995):  
932-933
- Altman, M. K. et al., *Biochem.Res.Int.* **2012**  
(2012): 518437
- Amatschek, S. et al., *Cancer Res* **64** (2004):  
844-856
- Anastas, J. N. et al., *J Clin Invest* **124** (2014):  
2877-2890
- Andersen, R. K. et al., *Pigment Cell Melanoma  
Res.* **28** (2015): 267-280
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012):  
891-902
- Anderson, L. N. et al., *PLoS.One.* **8** (2013):  
e66768
- Anderson, N. L. et al., *J Proteome.Res* **11** (2012):  
1868-1878
- Antony-Debre, I. et al., *Cancer Cell* **27** (2015):  
609-611
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006):  
1805-1814
- Araujo, W. F. et al., *Urol.Oncol* (2015)
- Arribas, A. J. et al., *Blood* **125** (2015):  
1922-1931
- Asad, M. et al., *Cell Death.Dis.* **5** (2014): e1346
- Asaga, S. et al., *Anticancer Res.* **26** (2006):  
35-42
- Avery-Kiejda, K. A. et al., *BMC.Cancer* **14**  
(2014): 253
- Avigan, D. et al., *Clin Cancer Res.* **10** (2004):  
4699-4708



- Awasthi, N. et al., *Cancer Lett.* **358** (2015): 59-66
- Ayshamgul, H. et al., *Chin Med.J (Engl.)* **124** (2011): 341-346
- Bae, D. H. et al., *J Clin Pathol.* **66** (2013): 911-917
- Baek, G. et al., *Cell Rep.* **9** (2014): 2233-2249
- Baenke, F. et al., *J Pathol.* (2015)
- Bai, L. et al., *J Cell Biochem.* **113** (2012): 322-328
- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Bao, B. Y. et al., *Clin Cancer Res.* **17** (2011): 928-936
- Bao, W. et al., *Biomed.Pharmacother.* **70** (2015): 97-102
- Basson, M. D. et al., *Mol.Oncol* **9** (2015): 513-526
- Bauer, K. M. et al., *J Proteome.Res.* **13** (2014): 4910-4918
- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Bedir, R. et al., *Iran J Otorhinolaryngol.* **27** (2015): 69-74
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Beleford, D. et al., *Clin Cancer Res.* **16** (2010): 398-409
- Bell, J. L. et al., *Cell Mol Life Sci.* **70** (2013): 2657-2675
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **Vol.57** (1995): 289-300
- Bhatnagar, R. et al., *Oral Oncol* **48** (2012): 831-835
- Bill, K. L. et al., *Lab Invest* (2015)
- Blanke, K. L. et al., *Cancer Causes Control* **25** (2014): 1513-1521

Bleumer, I. et al., Eur.Urol. **44** (2003): 65-75  
Bonventre, J. V., Trans.Am.Clin  
Climatol.Assoc. **125** (2014): 293-299  
Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003):  
707-711  
Braumuller, H. et al., Nature (2013)  
Brendle, A. et al., Carcinogenesis **29** (2008):  
1394-1399  
Brossart, P. et al., Blood **90** (1997): 1594-1599  
Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol.  
**5** (2004): 29-43  
Bunatova, K. et al., Anticancer Res. **32** (2012):  
4601-4606  
Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother.  
**53** (2004): 345-357  
Carvalho, F. L. et al., Prostate **74** (2014):  
933-945  
Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. **65** (2004):  
1211-1223  
Chatterjee, M. et al., Haematologica **98** (2013):  
1132-1141  
Chen, K. et al., J Cancer Res.Clin Oncol **140**  
(2014a): 1715-1721  
Chen, Q. et al., PLoS.One. **9** (2014b): e88386  
Chen, S. T. et al., Cancer Sci. **102** (2011):  
2191-2198  
Chen, Y. C. et al., Int.J Cancer **135** (2014c):  
117-127  
Chen, Y. L. et al., Int J Surg. **11** (2013): 85-91  
Cheng, A. S. et al., Gastroenterology **144** (2013):  
122-133  
Cheng, J. et al., Cancer Lett. **310** (2011): 35-45  
Cheon, D. J. et al., Clin Cancer Res **20** (2014):  
711-723  
Cho, E. et al., Hematol.Oncol.Clin.North Am.  
**25** (2011): 651-665

- Chong, Y. et al., *Oncol Rep.* **31** (2014):  
2535-2544
- Chu, X. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15**  
(2014): 5819-5823
- 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
- Cuadros, T. et al., *Cancer Res* **74** (2014):  
1416-1428
- Cuadros, T. et al., *Eur.J Cancer* **49** (2013):  
2034-2047
- D'Angelo, V. et al., *J Neurooncol.* **117** (2014):  
287-294
- Dadkhah, E. et al., *Arch.Iran Med.* **16** (2013):  
463-470
- Dannenmann, S. R. et al., *Cancer Immunol.Res.*  
**1** (2013): 288-295
- Davidov, T. et al., *J Surg.Res.* **190** (2014):  
565-574
- Deng, B. et al., *Tumour.Biol.* (2015)
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006):  
4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003):  
2197-2207
- Devaney, J. M. et al., *Prostate Cancer  
Prostatic.Dis.* **16** (2013): 292-300
- Dey, N. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e77425
- Dienstmann, R. et al., *Am.Soc.Clin Oncol  
Educ.Book.* **35** (2015): e149-e156

- Ding, L. C. et al., *Oncol Rep.* (2015)
- Dong, R. et al., *PLoS One.* **9** (2014): e85599
- El Behery, M. M. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **288** (2013): 1371-1376
- Elewa, M. A. et al., *Clin Exp.Metastasis* (2015)
- Elouazzani, H. et al., *J Clin Imaging Sci.* **4** (2014): 33
- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Fan, H. Z. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* **135** (2009): 591-602
- Fang, Z. Q. et al., *Genet.Mol Res* **12** (2013): 1479-1489
- Fei, J. et al., *Tumour.Biol.* **34** (2013): 2329-2335
- Felizola, S. J. et al., *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* **144 Pt B** (2014): 410-416
- Feng, H. et al., *J Clin Invest* **124** (2014): 3741-3756
- Ferguson, B. W. et al., *BMC.Cancer* **13** (2013): 593
- Fernandez-Banet, J. et al., *Genomics* **103** (2014): 189-203
- Ferrer-Ferrer, M. et al., *Arch.Med.Res* **44** (2013): 467-474
- Findeis-Hosey, J. J. et al., *Biotech.Histochem.* **87** (2012): 24-29
- Finocchiaro, G. et al., *Ann.Transl.Med.* **3** (2015): 83
- Fleischer, M. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **50** (2011): 1010-1020
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- Fontes-Oliveira, C. C. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1830** (2013): 2770-2778
- Forconi, F. et al., *Haematologica* **93** (2008): 697-705

- Forloni, M. et al., *Cancer Res.* **70** (2010):  
916-924
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* **31** (2009):  
819-823
- Franco, R. et al., *Histol.Histopathol.* **30** (2015):  
707-714
- Fu, Q. F. et al., *J Hematol.Oncol* **8** (2015): 22
- Fu, Y. et al., *Mol.Biol.Rep.* **38** (2011): 693-702
- Fujinaga, T. et al., *Int.J Oncol* **44** (2014):  
1614-1624
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996):  
1096-1103
- Gackiere, F. et al., *Biol.Open.* **2** (2013):  
941-951
- Gadd, S. et al., *Lab Invest* **90** (2010): 724-738
- Gantsev, S. K. et al., *Biomed.Pharmacother.* **67**  
(2013): 363-366
- Gao, H. et al., *Cancer Lett.* **344** (2014): 54-61
- Gao, H. J. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* **141**  
(2015a): 1151-1162
- Gao, W. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015b): 367
- Garg, M. et al., *Cancer* **116** (2010a): 3785-3796
- Garg, M. et al., *Eur.J Cancer* **46** (2010b):  
207-215
- Garner, J. M. et al., *PLoS.One.* **10** (2015):  
e0125838
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006):  
383-393
- Gbormittah, F. O. et al., *J Proteome.Res.* **13**  
(2014): 4889-4900
- Gilkes, D. M. et al., *Mol Cancer Res* **11** (2013):  
456-466
- Giovannetti, E. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **106**  
(2014): djt346
- 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
- Goksel, G. et al., *J BUON*. **19** (2014): 207-214
- Gomez-Villafuertes, R. et al., *J Neurochem*. **131**  
(2014): 290-302
- Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol*. **21** (2014):  
191-200
- Gonzalez, J. E. et al., *J Am.Acad.Audiol*. **25**  
(2014): 253-260
- Goode, G. et al., *PLoS.One*. **9** (2014): e100103
- Granja, S. et al., *Oncotarget*. **6** (2015):  
6708-6721
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A  
Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory  
Manual* **2nd** (2014)
- Griffith, O. L. et al., *J Clin.Oncol*. **24** (2006):  
5043-5051
- Grunewald, T. G. et al., *Biol.Cell* **105** (2013):  
535-547
- Guerrero-Preston, R. et al., *Epigenetics*. **9**  
(2014): 1031-1046
- Guo, P. et al., *Onco.Targets.Ther*. **8** (2015):  
73-79
- Halldorsdottir, A. M. et al., *Am.J Hematol*. **87**  
(2012): 361-367
- Han, B. et al., *Mol.Cancer* **14** (2015): 64
- Havens, M. A. et al., *PLoS.Genet*. **10** (2014):  
e1004312
- Heist, R. S. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*  
**112** (2015): 1547-1552
- Hevir-Kene, N. et al., *Chem Biol.Interact*. **234**  
(2015): 309-319
- Hirota, E. et al., *Int.J Oncol*. **29** (2006):  
799-827

- Hlavac, V. et al., *Medicine (Baltimore)* **93** (2014): e255
- Hoffmann, N. E. et al., *Cancer* **112** (2008): 1471-1479
- Hofmann, H. S. et al., *Eur.Urol.* **48** (2005): 77-81
- Hogan, L. E. et al., *Blood* **118** (2011): 5218-5226
- Holtl, L. et al., *Clin.Cancer Res.* **8** (2002): 3369-3376
- Honke, K. et al., *J Biochem.* **119** (1996): 421-427
- Hovnanian, A., *Subcell.Biochem.* **45** (2007): 337-363
- Hu, C. A. et al., *FEBS Lett.* **586** (2012): 947-955
- Hu, M. et al., *J Surg.Oncol* **108** (2013): 192-196
- Hu, S. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* **140** (2014): 883-893
- Hu, Y. et al., *Mol.Cancer Ther.* **14** (2015): 289-297
- Hua, D. et al., *Int.J Mol Med.* **30** (2012): 1267-1274
- Huang, C. N. et al., *Ann.Oncol* **23** (2012a): 707-713
- Huang, G. et al., *J Surg.Oncol* **105** (2012b): 420-424
- Huang, Y. et al., *Cell Biosci.* **3** (2013): 16
- Hung, T. H. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol.* **53** (2014): 55-65
- Hunt, J. D. et al., *Int.J Cancer* **114** (2005): 101-108
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Ilm, K. et al., *Mol.Cancer* **14** (2015): 38
- Inoue, Y. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2015)

- Inzelberg, R. et al., *Neurology* **78** (2012): 781-786
- Ishiguro, Y. et al., *Gan* **75** (1984): 53-60
- Jeng, Y. M. et al., *Br.J Surg.* **96** (2009): 66-73
- Jensen, D. H. et al., *J Oral Pathol.Med.* (2014)
- Jiang, J. G. et al., *Cancer Res* **65** (2005): 4707-4715
- Jiao, J. et al., *Cancer Lett.* **320** (2012): 96-103
- Jin, Z. et al., *Anticancer Res.* **33** (2013): 5199-5203
- Joerger, M. et al., *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* **18** (2015): 167-172
- Johnson, R. H. et al., *Oncotarget.* (2015)
- Jose-Eneriz, E. S. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008): 571-582
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
- Junnila, S. et al., *BMC.Cancer* **10** (2010): 73
- Kamphausen, E. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **59** (2010): 1273-1284
- Kang, M. R. et al., *J Pathol.* **217** (2009): 702-706
- Karagiannis, G. S. et al., *Mol.Oncol* **8** (2014): 1240-1252
- Katoh, M. et al., *Oncol Rep.* **13** (2005): 367-370
- Kawahara, R. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e115004
- Kawakami, K. et al., *Int.J Oncol* (2015)
- Khan, R. et al., *Clin.Proteomics.* **10** (2013a): 6
- Khan, Z. et al., *Cancer Invest* **31** (2013b): 404-411
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients rd* (2000)
- Kim, J. H. et al., *J Korean Med.Sci.* **8** (1993): 68-72
- Kim, J. S. et al., *Cancer Biol.Ther.* **13** (2012): 638-646



- Kim, M. et al., *Mol Cancer Res* **6** (2008):  
222-230
- Kirov, A. et al., *J Cell Biochem.* (2015)
- Kleiber, K. et al., *Anticancer Res.* **27** (2007):  
55-61
- Kobayashi, H. et al., *Oncol Lett.* **10** (2015):  
612-618
- Koh, J. et al., *Mol. Endocrinol.* **25** (2011):  
867-876
- Komatsu, S. et al., *Br.J Cancer* **112** (2015):  
357-364
- Konno, R., *Hum. Cell* **14** (2001): 261-266
- Koo, J. S. et al., *Am.J Clin Pathol.* **143** (2015):  
584-592
- Korosec, B. et al., *Cancer Genet. Cytogenet.* **171**  
(2006): 105-111
- Koshikawa, K. et al., *Oncogene* **21** (2002):  
2822-2828
- Krieg, A. M., *Nat Rev. Drug Discov.* **5** (2006):  
471-484
- Kuang, S. Q. et al., *Leukemia* **22** (2008):  
1529-1538
- Kubota, H. et al., *Cell Stress. Chaperones.* **15**  
(2010): 1003-1011
- Kumps, C. et al., *PLoS. One.* **8** (2013): e52321
- Kwon, J. et al., *Int J Oncol* **43** (2013): 1523-1530
- Lai, K. K. et al., *PLoS. Genet.* **7** (2011):  
e1002147
- Lai, Y. J. et al., *Mol. Cell Biol.* **30** (2010):  
5582-5596
- Lapointe, J. et al., *Endocrinology* **140** (1999):  
4486-4493
- Lebdai, S. et al., *Urol. Oncol* **33** (2015): 69-8
- Lee, H. J. et al., *Oncol Lett.* **8** (2014):  
1986-1992

- Lee, H. K. et al., *Oncotarget*. **6** (2015):  
1850-1864
- Lee, J. et al., *Yonsei Med.J* **54** (2013):  
1158-1167
- Li, J. et al., *J Mol.Histol.* **45** (2014a): 47-57
- Li, M. et al., *Int.J Oncol.* **24** (2004): 305-312
- Li, R. et al., *Curr.Cancer Drug Targets.* **14**  
(2014b): 274-285
- Li, W. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **6** (2013):  
2430-2440
- Li, X. X. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014c):  
2729-2736
- Li, Y. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015): 417
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 980-987
- Lin, L. et al., *Oncol Lett.* **6** (2013): 740-744
- Lin, M. C. et al., *Oral Oncol* **50** (2014): 478-484
- Lin, Y. W. et al., *Eur.J Cancer* **45** (2009):  
2041-2049
- Lin, Z. Y. et al., *Biomed.Pharmacother.* **66**  
(2012): 454-458
- Liu, B. et al., *Zhonghua Fu Chan Ke.Za Zhi.* **45**  
(2010a): 41-44
- Liu, F. et al., *World J Surg.Oncol* **12** (2014a):  
333
- Liu, H. et al., *Carcinogenesis* **34** (2013):  
885-892
- Liu, J. et al., *Oncotarget.* (2015)
- Liu, K. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014b):  
995-1002
- Liu, S. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014c):  
9897-9904
- Liu, Y. et al., *J Neurooncol.* **99** (2010b): 13-24
- Liu, Y. et al., *Mol.Cancer* **9** (2010c): 186
- Ljungberg, B. et al., *Eur.Urol.* **60** (2011):  
615-621

- 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
- Lourenco, G. J. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **100** (2006): 335-338
- Lu, Y. Y. et al., *Zhongguo Shi Yan. Xue. Ye. Xue. Za Zhi.* **22** (2014): 1336-1340
- 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)
- Lung, H. L. et al., *Int. J Cancer* **127** (2010): 304-312
- Lustosa, S. A. et al., *Scientific World Journal.* **2014** (2014): 102541
- Lv, Z. et al., *Tumour. Biol.* **35** (2014): 10497-10502
- Ma, G. F. et al., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **19** (2015): 578-585
- Ma, J. et al., *Pathol. Oncol Res* **19** (2013): 821-832
- Mak, A. B. et al., *J Mol. Biol.* **426** (2014): 2175-2182
- Malik, M. A. et al., *Mol. Biol. Rep.* **39** (2012): 9095-9104
- Marten, A. et al., *Cancer Immunol. Immunother.* **51** (2002): 637-644
- Martinez-Lopez, N. et al., *Gastroenterology* **143** (2012): 787-798
- Massari, F. et al., *Cancer Treat. Rev.* **41** (2015): 114-121
- Masugi, Y. et al., *Lab Invest* **95** (2015): 308-319
- Matsubara, J. et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20** (2011): 2195-2203

- Mehta, A. M. et al., *Immunogenetics* **67** (2015): 267-275
- Mei, J. et al., *Oncogene* **25** (2006): 849-856
- Mertens-Walker, I. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015): 164
- Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- Michael, A. et al., *Lancet Oncol.* **4** (2003): 215-223
- Minami, T. et al., *Int.Immunopharmacol.* **20** (2014): 59-65
- Minchenko, O. H. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 13705-13717
- Miyoshi, N. et al., *Oncol Rep.* **23** (2010): 505-510
- Mo, Y. et al., *Cancer Lett.* **323** (2012): 147-154
- Moch, H., *Semin.Cancer Biol.* **23** (2013): 3-9
- Mochizuki, S. et al., *Cancer Sci.* **98** (2007): 621-628
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **72** (2013a): 669-682
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Pancreas* **42** (2013b): 707-716
- Molina-Pinelo, S. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e90524
- Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., *Transplantation* **64** (1997): 1017-1027
- Moriya, Y. et al., *Oral Oncol* **51** (2015): 84-89
- Morrissey, J. J. et al., *Urology* **83** (2014): 256-14
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- Motzer, R. J. et al., *Clin.Cancer Res.* **10** (2004): 6302S-6303S

- Moutinho, C. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **106** (2014): djt322
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* **7** (2007): 3470-3480
- Mukai, M. et al., *Am.J Surg.Pathol.* **10** (1986): 212-218
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
- Mustafa, D. A. et al., *Gene Regul.Syst.Bio* **4** (2010): 103-107
- Nagy, Z. et al., *Mol.Cancer* **13** (2014): 96
- Nakai, Y. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* **141** (2015): 933-939
- Narjoz, C. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e95532
- Narkiewicz, J. et al., *Oncol Rep.* **21** (2009): 1529-1537
- Naryzhnyi, S. N. et al., *Biomed.Khim.* **60** (2014): 308-321
- Ng, K. T. et al., *Mol.Cancer* **13** (2014): 196
- Nguyen, H. et al., *J Biol.Chem* **290** (2015): 13641-13653
- Ni, I. B. et al., *Hematol.Rep.* **4** (2012): e19
- Nikitovic, D. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1840** (2014): 2471-2481
- Nimptsch, K. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **18** (2009): 49-56
- Nishio, S. et al., *Cancer Lett.* **264** (2008): 36-43
- Notaridou, M. et al., *Int.J Cancer* **128** (2011): 2063-2074
- Nowak, D. et al., *Blood* **115** (2010): 1049-1053
- Oka, K. et al., *Lab Invest* **60** (1989): 38-44
- Okudela, K. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e87193
- Olesen, S. H. et al., *Mol Cell Proteomics.* **4** (2005): 534-544

- Ozawa, D. et al., *Ann.Surg.Oncol* (2014)
- Paradis, V. et al., *Gut* **62** (2013): 911-919
- Pathan, N. et al., *J Biol.Chem* **276** (2001): 32220-32229
- Pavlikova, N. et al., *Exp.Cell Res.* **333** (2015): 1-10
- Pedersen, M. O. et al., *Leuk.Lymphoma* **51** (2010): 314-328
- Penning, T. M., *Chem Res.Toxicol.* **27** (2014): 1901-1917
- Pereira, P. M. et al., *Org.Biomol.Chem.* **12** (2014): 1804-1811
- Peters, D. G. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14** (2005): 1717-1723
- Petrini, I., *Ann.Transl.Med.* **3** (2015): 82
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Planutis, K. et al., *J Transl.Med.* **11** (2013): 50
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- Prakash, S. et al., *J Pediatr.Hematol.Oncol* **27** (2005): 179-187
- Principe, M. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 11098-11113
- Qian, Z. et al., *Chem Biol.Interact.* **184** (2010): 50-57
- Quinn, M. C. et al., *Int J Oncol* **42** (2013): 912-920
- Ragnum, H. B. et al., *Int.J Radiat.Oncol Biol.Phys.* **87** (2013): 753-760
- Ramazzotti, G. et al., *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **21** (2011): 291-301

- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002),  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Rehfeld, A. et al., *Front Endocrinol.(Lausanne)* **5** (2014): 46
- Ren, Y. et al., *Mol.Cell Proteomics*. **13** (2014): 3126-3137
- Rehman, A. G. et al., *Int.J Cancer* **126** (2010): 692-702
- Rehman, A. G. et al., *Lancet* **371** (2008): 569-578
- Renkvist, N. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **50** (2001): 3-15
- Richardson, A. et al., *Crit Rev.Oncog.* **18** (2013): 409-434
- Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* **20** (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rocken, C. et al., *Pathologie* **33 Suppl 2** (2012): 235-240
- Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* **1** (2006): 1120-1132
- Royds, J. A. et al., *J Clin Pathol.* **38** (1985): 1258-1260
- Ruiz-Martinez, J. et al., *Mov Disord.* **29** (2014): 750-755
- Sachdeva K et al.,  
<http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview> (2010)
- Sahasrabudde, N. A. et al.,  
*Biochem.Biophys.Res.Commun.* **446** (2014): 863-869

- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Sakamoto, L. H. et al., *Leuk.Res.* **38** (2014): 496-502
- Sasnauskiene, A. et al., *Medicina (Kaunas.)* **50** (2014): 14-18
- Sato, T. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e59444
- Schlomann, U. et al., *Nat Commun.* **6** (2015): 6175
- Schuetz, A. N. et al., *J Mol.Diagn.* **7** (2005): 206-218
- Schumann, T. et al., *Oncotarget.* (2015)
- Scrideli, C. A. et al., *Leuk.Res.* **34** (2010): 32-37
- Sedlakova, I. et al., *Int.J Gynecol.Cancer* **25** (2015): 236-243
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- Seong, J. et al., *Mol.Biol.Rep.* **39** (2012): 3597-3601
- Sethakorn, N. et al., *J Recept.Signal.Transduct.Res.* **33** (2013): 166-171
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Shu, J. et al., *Cancer Res.* **66** (2006): 5077-5084
- Shukla, S. et al., *Cancer Res.* **73** (2013): 6563-6573
- Sieuwert, A. M. et al., *Clin.Chem* **53** (2007): 1280-1288
- Sigari, N. et al., *Clin Lab* **60** (2014): 23-27
- Silva, L. P. et al., *Anal.Chem.* **85** (2013): 9536-9542
- Singh, S. et al., *Tumour.Biol.* (2014)
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 187-195



- Slater, E. P. et al., *Transl.Oncol.* **6** (2013):  
99-103
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006):  
3089-3094
- Song, J. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e110074
- Sowalsky, A. G. et al., *Mol.Cancer Res.* **13**  
(2015): 98-106
- Sprowl, J. A. et al., *Clin Pharmacol.Ther.* **94**  
(2013): 585-592
- Staal-Viliare, A. et al., *Leuk.Lymphoma* **48**  
(2007): 439-441
- Staehli, F. et al., *J Immunol.* **188** (2012):  
3820-3828
- Stamatopoulos, K. et al., *Blood* **106** (2005):  
3575-3583
- Stein, U., *Expert.Opin.Ther.Targets.* **17** (2013):  
1039-1052
- Steinway, S. N. et al., *PLoS.One.* **10** (2015):  
e0128159
- Stoehr, C. G. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **6**  
(2013): 998-1008
- Strekalova, E. et al., *Clin.Cancer Res.* (2015)
- Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* **9** (2008):  
163
- Su, H. et al., *J Transl.Med.* **13** (2015): 104
- Su, Z. et al., *Cancer Res.* **63** (2003): 2127-2133
- Suh, K. S. et al., *Clin.Cancer Res.* **13** (2007a):  
121-131
- Suh, K. S. et al., *Mol.Carcinog.* **46** (2007b):  
599-604
- Suhovskih, A. V. et al., *Cell Tissue Res.* (2015)
- Sun, W. et al., *Cancer Res.* **74** (2014a):  
1091-1104
- Sun, Z. et al., *J Proteome.Res* **13** (2014b):  
1593-1601

- Szarvas, T. et al., *Int J Cancer* **135** (2014):  
1596-1604
- Taguchi, O. et al., *Clin Chim. Acta* **244** (1996):  
69-81
- Tam, C. W. et al., *Endocrinology* **147** (2006):  
5023-5033
- Tan, M. H. et al., *Breast Cancer Res. Treat.* **131**  
(2012): 849-858
- Tanaka, J. et al., *J Oral Pathol. Med.* **44** (2015):  
126-133
- Tanaka, T. et al., *J Cancer Res. Clin Oncol* **140**  
(2014): 503-513
- Tanic, N. et al., *Anticancer Res.* **26** (2006):  
2137-2142
- Tashiro, A. et al., *Am. J Cancer Res.* **4** (2014):  
528-536
- Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005):  
1755-1762
- Thiel, A. et al., *Oncol Rep.* **26** (2011): 615-620
- Tong, S. Y. et al., *Cancer Invest* **30** (2012):  
642-645
- Tong, W. G. et al., *Epigenetics.* **5** (2010):  
499-508
- Toth, K. et al.,  
*Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **22**  
(2014): 642-647
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014a): 641-645
- Tran, T. T. et al., *Photochem. Photobiol.* **90**  
(2014b): 1136-1143
- Tsourlakis, M. C. et al., *Int. J Mol. Sci.* **16**  
(2015): 8591-8606
- Vachani, A. et al., *Clin Cancer Res.* **13** (2007):  
2905-2915
- Vasiljevic, A. et al., *Neuropathology.* **33** (2013):  
149-161

- Volz, N. B. et al., *Pharmacogenomics.J* **15** (2015): 69-76
- Wake, N. C. et al., *Hum.Mutat.* **34** (2013): 1650-1661
- Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wang, B. S. et al., *Cell Stress.Chaperones.* **18** (2013a): 359-366
- Wang, D. et al., *Mol.Cell Biochem.* **396** (2014a): 67-77
- Wang, G. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015a): 1055-1065
- Wang, H. et al., *J Biol.Chem* **289** (2014b): 4009-4017
- Wang, J. H. et al., *World J Gastroenterol.* **16** (2010a): 5642-5646
- Wang, L. H. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014c): 1157-1168
- Wang, R. et al., *Biomed.Res.Int.* **2013** (2013b): 195692
- Wang, T. P. et al., *Exp.Cell Res.* **316** (2010b): 2893-2902
- Wang, W. M. et al., *Mol.Med.Rep.* (2015b)
- Wang, Y. et al., *J Biol.Chem* **289** (2014d): 14225-14238
- Wang, Y. et al., *Clin.Chem Lab Med.* **48** (2010c): 1475-1479
- Wang, Y. et al., *Anticancer Res* **33** (2013c): 207-214
- Wang, Y. et al., *Pathol.Oncol Res.* **20** (2014): 611-618
- Wang, Z. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* **141** (2015c): 1353-1361
- Warren, C. R. et al., *J Cell Biochem.* **115** (2014): 1322-1333

- Waugh, M. G., *Mol.Neurobiol.* (2014)
- Wei, Q. et al., *Cancer Res.* **69** (2009): 2332-2339
- Westphal, P. et al., *Am.J Clin Pathol.* **143** (2015): 248-256
- Wierecky, J. et al., *Cancer Res.* **66** (2006): 5910-5918
- Wikman, H. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e47537
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- Wlodarski, M. W. et al., *J Leukoc.Biol* **83** (2008): 589-601
- World Cancer Report, (2014)
- World Health Organization Classification of Tumours, (2004)
- Wu, M. et al., *Oncogene* **23** (2004): 6815-6819
- Wu, Y. M. et al., *Cancer Res* **71** (2011): 7270-7279
- Xiao, L. et al., *Biochim.Biophys.Acta* (2015)
- Xiao, W. et al., *Mol.Med.Rep.* **10** (2014): 453-458
- Xin, Z. et al., *Virchows Arch.* **465** (2014): 35-47
- Xu, Y. et al., *J Cell Biochem.* **115** (2014): 1112-1121
- Xu, Z. et al., *Oncol Rep.* **33** (2015): 2899-2907
- Yamamoto, M. et al., *Cancer Res.* **65** (2005): 8706-8714
- Yan, P. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 8923-8929
- Yang, C. Y. et al., *J Immunol* **192** (2014a): 1547-1557
- Yang, D. et al., *Oncogene* **30** (2011): 4590-4600
- Yang, J. et al., *J Proteomics.* **109** (2014b): 162-175
- Yang, W. et al., *Med.Oncol* **31** (2014c): 826

- Yang, W. et al., *Tumour Biol.* **35** (2014d):  
8267-8279
- Yano, Y. et al., *Cancer Lett.* **207** (2004):  
139-147
- Yao, Y. et al., *Cell Physiol Biochem.* **35** (2015):  
983-996
- Yeh, I. et al., *Nat. Commun.* **6** (2015): 7174
- Yeom, S. Y. et al., *Mol. Cancer Ther.* **13** (2014):  
3049-3061
- Yin, Y. et al., *Tumour Biol.* **34** (2013):  
3611-3617
- Yoshida, A. et al., *Hum. Cell* **26** (2013): 56-66
- Yoshida, Y. et al., *Anticancer Res.* **32** (2012):  
2301-2308
- Yu, P. H. et al., *PLoS One.* **8** (2013): e82254
- Yu, Z. et al., *Cancer Lett.* **353** (2014): 182-193
- Yuan, R. H. et al., *Ann Surg. Oncol* **16** (2009):  
1711-1719
- Zaghloul, R. A. et al., *Eur. J Pharmacol.* **746**  
(2015): 353-362
- Zamani-Ahmadmahmudi, M. et al.,  
*Electrophoresis* **35** (2014): 901-910
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997):  
4570-4577
- Zhang, B. et al., *Blood* **106** (2005): 1355-1361
- Zhang, H. et al., *Cancer Lett.* **323** (2012a):  
106-113
- Zhang, J. et al., *Mol. Med. Rep.* **10** (2014a):  
749-754
- Zhang, J. et al., *Xi. Bao. Yu*  
*Fen. Zi. Mian. Yi. Xue. Za Zhi.* **29** (2013): 190-193
- Zhang, L. et al., *Dig. Dis. Sci.* **57** (2012b):  
2608-2614
- Zhang, S. D. et al., *Onco. Targets. Ther.* **8** (2015):  
835-843

- Zhang, X. D. et al., *Int.J Clin Exp.Med.* **7** (2014b): 1190-1196
- Zhao, M. et al., *Cancer Invest* **32** (2014): 464-469
- Zhao, M. et al., *Oncotarget.* (2015a)
- Zhao, Z. et al., *Med.Oncol* **32** (2015b): 112
- Zhen, T. et al., *Oncotarget.* **5** (2014): 3756-3769
- Zhou, J. et al., *Oncol Rep.* **30** (2013): 2229-2237
- Zhu, J. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **8** (2015): 702-710
- Zienert, E. et al., *Cancer Lett.* **364** (2015): 17-24
- Zietek, Z. et al., *Pol.Tyg.Lek.* **51** (1996): 86-88
- Zizi-Sermpetzoglou, A. et al., *Eur.J Gynaecol.Oncol* **35** (2014): 325-327
- Zu, X. Y. et al., *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* **7** (2012): 154-167
- Zubor, P. et al., *Mol.Biol.Rep.* **42** (2015): 977-988
- Zuniga-Garcia, V. et al., *Dig.Dis.Sci.* (2015)
- Zurawa-Janicka, D. et al., *Oncol Rep.* **28** (2012): 1838-1844
- Follenzi A, et al. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):217-22.
- Zufferey R, et al. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2886-92.
- Scholten KB, et al. *Clin Immunol.* 2006 May;119(2):135-45.
- Gustafsson C, et al. *Trends Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
- Kuball, J., et al. (2007). *Blood* 109, 2331-2338.
- Schmitt, T. M., et al. (2009). *Hum. Gene Ther.* 20, 1240-1248

【符號說明】

【 0 4 7 6 】

無

【生物材料寄存】

【 0 4 7 7 】 國內寄存資訊 (請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

【 0 4 7 8 】 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(immatix biotechnologies GmbH)

<120> 用於腎細胞癌 (RCC) 免疫治療的新型肽和肽組合物和支架

<150> GB 1505585.8

<151> 2015-03-31

<150> US 62/140,767

<151> 2015-03-31

<160> 153

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Leu Ile Val Ser Leu Pro Tyr Leu

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Leu Trp Arg Glu Val Val Thr Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Leu Leu Gly Glu Val Gln Ala Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 4

Phe Leu Ser Gln Asp Ile Ile Thr Val  
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Leu Tyr Pro Asn Leu Thr Arg Leu  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Leu Phe Glu Leu Ser Lys Thr Val  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Phe Leu Leu Ser Leu Ile Asp Arg Leu  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Leu Ala Ser Phe Lys Ser Phe Leu  
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Leu Leu Gln Lys Pro Asp Ser Val  
1 5

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

<400> 10

Lys Leu Leu Gln Asn Asn Tyr Gly Leu  
1 5

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

<400> 11

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

<210> 12  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile  
1 5 10

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Ile Met Ala Gln Ile Leu Thr Val  
1 5

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

<400> 14

Ala Leu Leu Thr Glu Thr Ile Phe Leu  
1 5

<210> 15  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Leu Ile Lys His Leu Val Lys Val  
1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

Phe Met Pro Glu Glu Leu Pro Gln Leu  
1 5

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

<400> 17

Ile Leu Ala Gln Gln Val His Ala Leu  
1 5

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

<400> 18

Tyr Val Leu Asp Leu Ala Ala Lys Val  
1 5

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

<400> 19

Leu Leu Asp Pro Gly Ser Leu Gln Leu  
1 5

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

<400> 20

Ala Val Ala Asn Thr Thr Phe Thr Val  
1 5

<210> 21  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

<400> 22

Phe Leu Ser Pro Pro Leu Pro Ser Val  
1 5

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

<400> 23

Tyr Ile Gln Glu Val Val Gln Tyr Ile  
1 5

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

<400> 24

Phe Thr Leu Gly Thr Thr Val Phe Leu  
1 5

<210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

<400> 26

Ser Leu Met Glu Ile Leu Tyr Thr Leu  
1 5

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

<400> 27

Ser Leu Ser Asp Leu Leu Val Ser Leu  
1 5

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

<400> 28

Phe Ile Ala Asp Leu Val Val Gly Leu  
1 5

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

<400> 29

Ile Leu Leu Asp Leu Glu Gln Ala Leu  
1 5

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

<400> 30

Gln Leu Phe Tyr Thr Lys Ile Phe Leu  
1 5

<210> 31  
<211> 12  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Leu Phe Gly Leu Asp Pro Ala Val Ile Lys Val  
1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Ile  
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Glu Leu Asn Asn Gln Asn Phe Tyr Leu  
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Leu His Ser Leu Gln Thr Gln Leu  
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Leu Phe Gly Lys Lys Tyr Ile Leu  
1 5

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

<400> 37

Val Leu Ala Pro Val Ile Leu Met Leu  
1 5

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

<400> 38

Val Leu Leu Asp Thr Ile Leu Gln Leu  
1 5

<210> 39  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 39

Tyr Leu Leu Asn Leu Asn His Leu Gly Leu  
1 5 10

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

<400> 40

Tyr Ile Gln Glu His Leu Leu Gln Ile  
1 5

<210> 41  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Leu Leu Lys Thr Leu Gln Lys Leu  
1 5

<210> 42  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

<400> 43

Tyr Leu Lys Asp Glu Leu Asp Glu Leu  
1 5

<210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Leu Phe Ser Phe Val Thr Ala Leu  
1 5

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

<400> 45

Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Thr Leu  
1 5

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

<400> 46

Gly Leu Ser Glu Val Leu Val Gln Ile  
1 5

<210> 47  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens



&lt;400&gt; 47

Thr Leu Ala Glu Val Arg Ala Val Gln Glu Ile  
 1 5 10

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 48

Val Val Ala Ser Asn Ile Met Glu Val  
 1 5

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 49

Val Leu Ile Val Glu Val Pro Gly Val  
 1 5

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 50

Ser Leu Ser Asp His Ile Val Leu Leu  
 1 5

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 51

Asn Leu Trp Pro Met Ile Leu Thr Leu  
 1 5

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 52

Ser Ile Leu Asp Ala Val Gln Arg Val

1 5

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

<400> 53

Phe Leu Leu Glu Ile Arg Gln Thr Leu  
1 5

<210> 54  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Leu Val Ala Lys Gly Leu Val Gln Ala  
1 5 10

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

<400> 55

Tyr Leu Ala Leu Ile Leu Pro Val Leu  
1 5

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

<400> 56

Ile Leu Met Asp Phe Ser Asn Ser Met  
1 5

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

<400> 57

Ser Leu Gln Lys Glu Ile Leu Tyr Leu  
1 5

<210> 58

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

<400> 58

Phe Leu Val Asp Phe Glu Gln Ser His Leu  
1 5 10

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

<400> 59

Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val  
1 5

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

<400> 60

Ile Leu Trp Lys Asp Ile Glu Tyr Val  
1 5

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

<400> 61

Ser Leu Met Gly Ile Leu Leu Arg Ile  
1 5

<210> 62  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

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

<210> 63  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 63

Gly Leu Ile Glu Asp His Phe Asp Val Thr Val  
 1 5 10

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 64

Leu Leu Ala Ala Ser Val Ala Leu Ala  
 1 5

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 65

Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Val Thr Gly Ala  
 1 5 10

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 66

Thr Leu Leu Lys Thr Ile Ile Lys Val  
 1 5

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 67

Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val  
 1 5

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 68

Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val  
 1 5

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

<400> 69

Ile Leu Ala Asp Leu Leu Pro Ser Leu  
1 5

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

<400> 70

Ser Leu Thr Ala Leu Arg Leu Leu Leu  
1 5

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

<400> 71

Ala Leu Asp Gly His Leu Tyr Ala Val  
1 5

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

<400> 72

Tyr Ser Leu Glu Lys Val Phe Gly Ile  
1 5

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

<400> 73

Gly Leu Asp Gly Ile Pro Phe Thr Val  
1 5

<210> 74  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Leu Phe His Lys Gln Val Thr Val  
1 5

<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

Phe Leu Ile Lys Ser Ile Asn Leu Val  
1 5

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

<400> 76

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

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

<400> 77

Ser Leu Ile Lys His Lys Ile Met Leu  
1 5

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

<400> 78

Ala Leu Leu Asp Thr Val Val Gln Ala  
1 5

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

<400> 79

Ala Leu Ala Asp Ile Val Trp Arg Ala  
1 5

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

<400> 80

Lys Leu Ala Ser Met Leu Glu Thr Leu  
1 5

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Lys Leu  
1 5

<210> 82  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 82

Ser Leu Leu Gln Ala Thr Asp Phe Met Ser Leu  
1 5 10

<210> 83  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 83

Ile Gln Trp Ser Ile Val Pro Glu Val  
1 5

<210> 84  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 84

Tyr Leu Met Asp Glu Gly Ala His Leu  
1 5

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

<400> 85

Phe Val Met Ser Glu Ile Arg Thr Val  
1 5

<210> 86  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 86

Gly Leu Leu Gln Gly Lys Leu Ala Leu Leu  
1 5 10

<210> 87  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val  
1 5

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

<400> 88

Thr Leu Ala Glu Leu His Ile Ser Leu  
1 5

<210> 89  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 89

Ser Leu Leu Leu Ala Val Thr Glu Val  
1 5

<210> 90  
<211> 9  
<212> PRT



<213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Thr Leu Glu Lys Asn Phe Val Ile  
1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Met Leu Leu Ser Ser Leu Val Ser Leu  
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Phe Leu Phe Arg Asp Ile Leu Glu Leu  
1 5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gly Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val  
1 5 10

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Ile Leu His His Lys Val Tyr Asp Leu  
1 5

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

<210> 96  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 96

Thr Leu Ala Glu Thr Leu Val Asn Leu  
1 5

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

<400> 97

Thr Leu Ile Ser Glu Leu Val Gln Ala  
1 5

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

<400> 98

Lys Ile Pro Pro Val Ser Pro Ser Ile  
1 5

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

<400> 99

Gly Leu Ala Pro His Leu Glu Gln Ile  
1 5

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

<400> 100

Lys Leu Asn Val Ala Pro Leu Ala Val  
1 5

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

<400> 101

His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val  
1 5 10

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

<400> 102

Leu Leu Phe Asp Val His Thr Thr Leu  
1 5

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

<400> 103

Lys Leu Gln Asp Gly Leu Leu His Ile  
1 5

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

<400> 104

Ala Leu Phe Glu Gly Val Val Arg Gln Ile  
1 5 10

<210> 105  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Leu Ala Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala  
1 5 10

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

<400> 106

Val Leu Met Asp Leu Lys Ala Leu Leu  
1 5

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Val Leu Ile Ser Val Leu Gln Ala Ile  
1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Tyr Leu Trp Ser Arg Val Glu Lys Leu  
1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Leu Leu Asp Leu His Ser Tyr Leu Leu  
1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Thr Leu Leu Glu Thr Glu Met Leu Leu

1 5

<210> 112  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 112

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

<210> 113  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 113

Ser Leu Phe Asp Trp Asn Val Lys Leu  
 1 5

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

<400> 114

Ala Leu Ala Val Asn Ile Ser Ala Ala  
 1 5

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

<400> 115

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu  
 1 5

<210> 116  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 116

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu  
 1 5

<210> 117

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

<400> 117

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu  
1 5

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

<400> 118

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu  
1 5

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

<400> 119

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu  
1 5

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

<400> 120

Gly Leu Ala Gly Asp Asn Ile Tyr Leu  
1 5

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

<400> 121

Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val  
1 5

<210> 122  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 122

Ser Leu Asp Pro Ser Ser Pro Gln Val  
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile  
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Ile Leu Ser Pro Leu Ser Val Ala Leu  
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Lys Leu Asp Pro Thr Lys Thr Thr Leu  
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val  
1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu  
1 5

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

<400> 128

Tyr Leu Glu Glu Asp Val Tyr Gln Leu  
1 5

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

<400> 129

Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala  
1 5

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

<400> 130

Ala Leu Pro Thr Val Leu Val Gly Val  
1 5

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

<400> 131

Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val  
1 5

<210> 132  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 132

Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val  
1 5

<210> 133  
<211> 9



<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 133

Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu  
1 5

<210> 134  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 134

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val  
1 5

<210> 135  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 135

Val Val Asp Glu Gly Pro Thr Gly Val  
1 5

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

<400> 136

Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val  
1 5

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

<400> 137

Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val  
1 5

<210> 138  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 138

PI-23425.5\_SEQ\_LIST

第 26 頁(序列表)

Ser Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val  
1 5

<210> 139  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 139

Ile Leu Asn Val Asp Gly Leu Ile Gly Val  
1 5 10

<210> 140  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 140

Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser Val  
1 5

<210> 141  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 141

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

<210> 142  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 142

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val  
1 5

<210> 143  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 143

Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 144  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 144

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

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

<400> 145

Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val  
1 5

<210> 146  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 146

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

<210> 147  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 147

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

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

<400> 148

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala  
1 5

<210> 149  
<211> 12  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

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

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Thr Leu Met Pro Asn Ile Asn Lys Leu  
1 5

<210> 151

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Arg Ile  
1 5 10

<210> 152

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

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

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

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，其中該肽由 SEQ ID No. 150 之氨基酸序列構成。
- 【請求項 2】 如請求項 1 所述之肽或其藥用鹽，其中該肽有能力與 MHC-I 類分子結合，且其中當該肽與該 MHC 結合時能夠被 CD8 T 細胞識別。
- 【請求項 3】 如請求項 1 或 2 所述之肽或其藥用鹽，其中該肽為融合蛋白的一部分。
- 【請求項 4】 如請求項 1 或 2 所述之肽或其藥用鹽，其中該肽包含 HLA-DR 抗原相關不變鏈(Ii)的 N-端氨基酸。
- 【請求項 5】 一種核酸，該核酸編碼如請求項 1 至 4 中任一項所述之肽。
- 【請求項 6】 如請求項 5 所述之核酸，其中該核酸連接到一異源啟動子序列 (heterologous promoter sequence)。
- 【請求項 7】 一種表達載體，其能表達如請求項 5 或 6 所述之核酸。
- 【請求項 8】 一種重組宿主細胞，其包括如請求項 1 至 4 中任一項所述之肽、如請求項 5 或 6 所述之核酸或如請求項 7 所述之表達載體。
- 【請求項 9】 如請求項 8 所述之重組宿主細胞，其中該重

組宿主細胞為一抗原呈現細胞。

【請求項 10】如請求項 9 所述之重組宿主細胞，其中該抗原呈現細胞係一樹突狀細胞。

【請求項 11】一種如請求項 1 至 4 中任一項所述之肽或其藥用鹽、如請求項 5 或 6 所述之核酸、如請求項 7 所述之表達載體或如請求項 8 至 10 中任一項所述之重組宿主細胞用作藥物之用途。

【請求項 12】一種製備如請求項 1 至 4 中任一項所述之肽或其藥用鹽的方法，該方法包括：培養如請求項 8 至 10 中任一項所述之重組宿主細胞，該重組宿主細胞呈現如請求項 1 至 4 中任一項所述之肽、或表達如請求項 5 或 6 所述之核酸，或載有如請求項 7 所述之表達載體；以及從該重組宿主細胞或其培養基中分離出該肽或其藥用鹽。

【請求項 13】一種體外製備活化的 T 淋巴細胞的方法，該方法包括將 T 細胞與在合適的抗原呈現細胞或摹擬抗原呈現細胞的人造結構的表面上表達之載有抗原的人 I 類 MHC 分子進行體外接觸達足以用抗原特異性方式活化該等 T 細胞之一段時間，從而以，其中該抗原為如請求項 1 至 4 中任一項所述之肽。

【請求項 14】一種活化的 T 淋巴細胞，其藉由如請求項 13 所述之方法製備，其有選擇性地識別呈現一多肽之細

胞，該多肽包含如請求項 1 至 4 中任一項給定之氨基酸序列。

【請求項 15】一種如請求項 14 所述之活化的 T 淋巴細胞用於製造一藥劑之用途，該藥劑用於殺滅患者中之靶向細胞，其中該等靶向細胞呈現一多肽，該多肽包含請求項 1 至 4 中任一項給定的氨基酸序列。

【請求項 16】一種抗體，其特異性地識別如請求項 1 或 2 所述之肽。

【請求項 17】如請求項 16 所述之抗體，其中該抗體係一可溶性抗體或一膜結合性抗體。

【請求項 18】如請求項 16 或 17 所述之抗體，其中如請求項 1 或 2 所述之肽係與一 MHC 分子結合。

【請求項 19】如請求項 16 或 17 所述之抗體，其中該抗體攜帶進一步的效應子功能。

【請求項 20】如請求項 19 所述之抗體，其中該效應子功能係一免疫刺激功能或細胞毒性功能。

【請求項 21】一種如請求項 1 至 4 中任一項所述之肽、如請求項 5 或 6 所述之核酸、如請求項 7 所述之表達載體、如請求項 8 至 10 中任一項所述之重組宿主細胞、如請求項 14 所述之活化的 T 淋巴細胞或如請求項 16 至 20 中任一項所述之抗體用於製造一藥劑之用途，該藥劑能對抗癌症。

【請求項 22】如請求項 21 所述之用途，其中所述癌症係腎細胞癌(renal cell carcinoma; RCC)。

【請求項 23】一種套件，包括：

(a) 一容器，包含一藥物組合物，該藥物組合物含有如請求項 1 至 4 中任一項所述之肽或其藥用鹽、如請求項 5 或 6 所述之核酸、如請求項 7 所述之表達載體、如請求項 8 至 10 中任一項所述之重組宿主細胞、如請求項 14 所述之活化的 T 淋巴細胞或如請求項 16 至 20 中任一項所述之抗體，其中該藥物組合物為溶液或凍乾劑型。

【請求項 24】如請求項 23 所述之套件，其中該藥物組合物為凍乾劑型，且其中該套件進一步包含一第二容器，該第二容器含有用於該藥物組合物之一稀釋劑或重組溶液。

【請求項 25】如請求項 23 或 24 所述之套件，進一步包含至少一額外肽，該額外肽選自由 SEQ ID No. 1 至 SEQ ID No. 149 或 SEQ ID No. 151 至 SEQ ID No. 153 所組成之群組。

【請求項 26】如請求項 23 或 24 所述之套件，進一步包含針對(i)使用該溶液或(ii)重組及/或使用該凍乾粉劑型之一說明書。

【請求項 27】如請求項 23 或 24 所述之套件，進一步包括



以下一或多者：(iii) 緩衝劑、(iv) 稀釋劑、(v) 過濾器、(vi) 針或(vii) 注射器。

【請求項 28】一種 T 細胞受體，其可與一 HLA 配體反應，其中該配體由 SEQ ID No. 150 的氨基酸序列所構成。

【請求項 29】如請求項 28 所述之 T 細胞受體，其中該 T 細胞受體是可溶的或膜結合的 T 細胞受體。

【請求項 30】如請求項 28 或 29 所述之 T 細胞受體，其中該 T 細胞受體作為可溶性分子提供。

【請求項 31】如請求項 28 或 29 所述之 T 細胞受體，其中該 T 細胞受體攜帶進一步的效應子功能。

【請求項 32】如請求項 31 所述之 T 細胞受體，其中該效應子功能係一免疫刺激功能或細胞毒性功能。

【請求項 33】如請求項 28 或 29 所述之 T 細胞受體，其中該 HLA 配體為一肽-MHC 複合體之部分。

【請求項 34】一種核酸，編碼如請求項 28 至 33 中任一項所述之 T 細胞受體。

【請求項 35】如請求項 34 所述之核酸，其中該核酸連接到一異源啟動子序列。

【請求項 36】一種表達載體，其能表達如請求項 34 所述之核酸。

【請求項 37】一種宿主細胞，其包括：如請求項 34 所述之核酸，或編碼如請求項 16 至 20 中任一項所述之抗體

之核酸，或如請求項 36 所述之表達載體。

【請求項 38】如請求項 37 所述之宿主細胞，其中該宿主細胞為 T 細胞或 NK 細胞。

【請求項 39】一種用於生產如請求項 28 至 33 中任一項所述之 T 細胞受體的方法，該方法包括：培養如請求項 37 或 38 所述之宿主細胞，以及從該宿主細胞及/或其培養基中分離出該 T 細胞受體。

【請求項 40】一種藥物組合物，其包括至少一種活性成分，該至少一種活性成分選自以下者組成的群組：

a) SEQ ID No. 150 之一肽；

b) 一 T 細胞受體，可與根據 a) 之肽及/或肽-MHC 複合體反應；

c) 一融合蛋白，包括根據 a) 之肽以及 HLA-DR 抗原相關不變鏈(Ii)的第 1 至 80 個 N-端氨基酸；

d) 一核酸，編碼 a) 至 c) 中任一項，或包含該核酸之一表達載體；

e) 一宿主細胞，包括 d) 之表達載體；

f) 一活化的 T 淋巴細胞，藉由包含以下步驟之方法獲得：將 T 細胞與在合適的抗原呈現細胞表面表達的根據 a) 之肽進行體外接觸達足以用抗原特異性方式活化該 T 細胞之一段時間；

g) 一抗體或可溶性 T 細胞受體，該抗體或可溶性 T

細胞受體可與根據 a) 之肽及 / 或肽 - M H C 複合體及 / 或呈現根據 a) 之肽的細胞反應，其中該抗體或可溶性 T 細胞受體有藉由與免疫啟動域或毒素融合而修飾的潛力；以及

h) 一共軛或標記的根據 a) 之肽，以及

藥用載體、藥用賦形劑及 / 或穩定劑。

**【請求項 41】** 一種用於生產一個人化抗癌疫苗之方法，該方法包括：

a) 識別由來自個體患者之一腫瘤樣本所表現之一腫瘤相關肽 ( t u m o r - a s s o c i a t e d p e p t i d e ; T U M A P ) ；

b) 將 a) 中識別之該肽與一存儲庫的肽進行比較，所述存儲庫的肽已經接受過免疫原性預篩查及 / 或與正常組織相比在腫瘤中過度表現；

c) 選擇與該患者中識別之 T U M A P 匹配之來自該存儲庫中之至少一個肽；以及

d) 根據步驟 c) 製備該個人化疫苗或基於化合物的治療劑或細胞治療劑；

其中該存儲庫包含由 S E Q I D N o . 1 5 0 的氨基酸序列構成之肽。

**【請求項 42】** 如請求項 41 所述之方法，其中藉由以下方式識別該等 T U M A P ：

a 1) 將來自該腫瘤樣本的表達資料與來自與該腫瘤樣

本的組織類型相應之一正常組織樣本的表達資料相比對，以識別在該腫瘤樣本中過量表達或異常表達的蛋白；以及

a 2) 將表達資料與結合至該腫瘤樣本中之 MHC I 類及 / 或 II 類分子之 MHC 配體的序列相關聯，以識別源自該腫瘤過量表達或異常表達的蛋白之 MHC 配體。

【請求項 43】如請求項 41 或 42 所述之方法，其中藉由以下方式識別 MHC 配體之序列：從分離自該腫瘤樣本之 MHC 分子洗脫結合肽，並定序洗脫的配體。

【請求項 44】如請求項 41 至 43 中任一項所述之方法，其中與該腫瘤樣本的組織類型相應之該正常組織獲得自相同患者。

【請求項 45】如請求項 41 至 44 中任一項所述之方法，其中基於以下步驟識別該存儲庫包括之肽：

a a. 藉由高度並行的方法，例如微陣列或基於定序的表達譜，進行全基因組信使核糖核酸 (mRNA) 表達分析，包括：識別相較于一或多個正常組織在一惡性組織中過度表達之基因；

a b. 選擇由步驟 a a 中檢測到之選擇性地表達或過量表達的基因所編碼之肽；以及

a c. 藉由所選擇的肽確定活體內 T 細胞反應之誘導，包括：使用來自健康供體或所述患者之人類 T 細胞之活

體外免疫原性測定；或

b a . 用質譜法從所述腫瘤樣本識別 H L A 配體；

b b . 藉由高度並行的方法，例如微陣列或基於定序的表達譜，進行全基因組信使核糖核酸 ( m R N A ) 表達分析，包括：識別相較于一或多個正常組織在一惡性組織中過度表達之基因；

b c . 比較所識別的 H L A 配體與所述基因表達資料；

b d . 選擇由步驟 b c 中檢測到之選擇性地表達或過量表達的基因所編碼之肽；

b e . 在腫瘤組織上重新檢測來自步驟 b d 且在健康組織上缺乏或不常檢測到之所選擇的 T U M A P ，並確定在 m R N A 水平上之過度表達的相關性；以及

b f . 藉由所選擇的肽確定活體內 T 細胞反應之誘導，包括：使用來自健康供體或所述患者之人類 T 細胞之活體外免疫原性測定。

【請求項 46】如請求項 41 至 45 中任一項所述之方法，其中藉由包括體外免疫原性測定、針對個體 H L A 結合之患者免疫監測、M H C 多聚體染色、E L I S P O T 測定及/或細胞內細胞因子染色之方法來確定該存儲庫中包括之該等肽的免疫原。

【請求項 47】如請求項 41 至 46 中任一項所述之方法，進一步包括：識別相對於來自該個體患者之正常相應組織

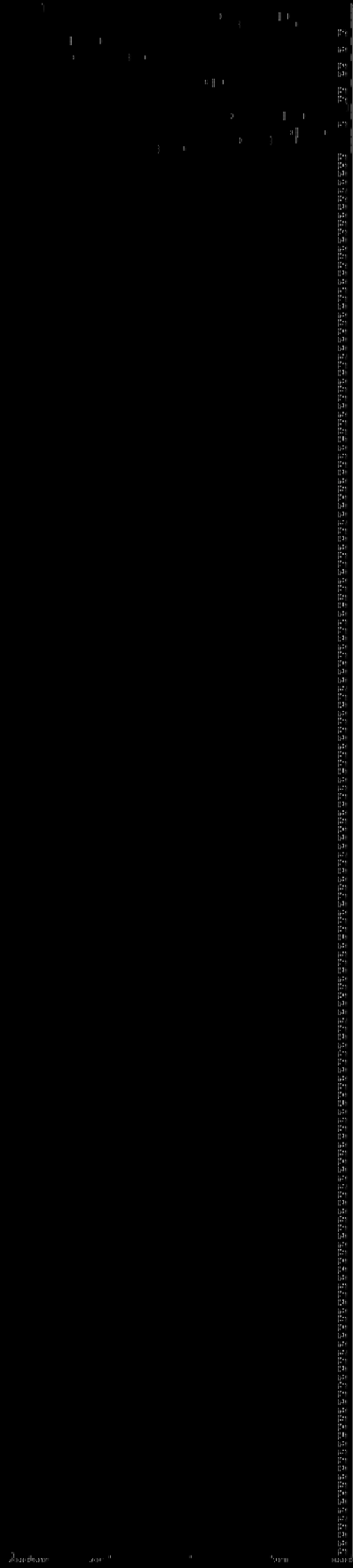
而言對該腫瘤樣本具有獨特性之至少一種突變，以及選擇與該突變相關之肽，以將該肽包含於該疫苗中或將該肽用於產生細胞治療劑。

【請求項 48】如請求項 47 所述之方法，其中藉由全基因組定序來識別該至少一種突變。

121

圖 1A

圖 1A  
A1VS.PV\_ (A\*02)



人體器官示意圖

169 生殖系統

1 腎上腺, 2 腎臟, 3 膀胱, 4 睪丸, 5 陰莖, 6 陰囊, 7 陰道, 8 子宮, 9 陰道, 10 陰道, 11 陰道, 12 陰道

18 RCC

組織

頁 3

頁 3  
: V E E D V Q (A\*02)

有醫提呈在發照發]

\*\*\*\*\*

169 冠三營組織

冠三營組織，3 營二涼，2 動派，3 骨麗，7 澄，3 乳房，13 結湯，1 京巢，1 一三消湯，4 會管，2 澄  
囊，3 心瀾，4 白紅泡樣本，19 汗，43 涼，1 淋三結，1 京巢，6 漢涼派，2 度高結經，1 漢派，1 漢垂  
體，3 商漢，1 漢漢派，6 宣派，3 愛整派，3 皮畫，2 八湯，4 漢派，5 長，1 華丸，2 商涼，3 三狀  
涼，2 子宣，2 樂派，1 2 醫

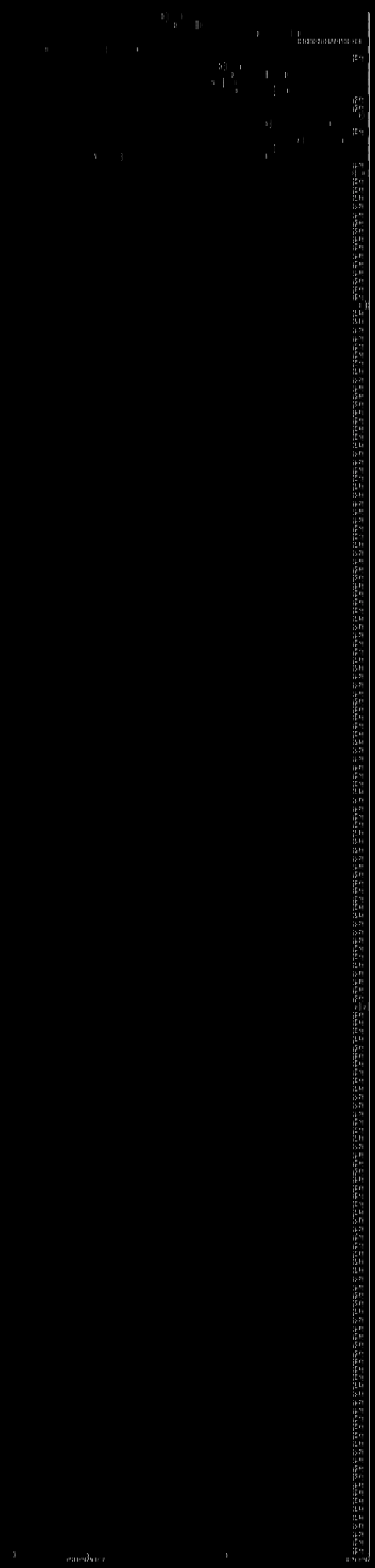
18 RCC  
組織



頁:0

試 1: A12356\Q1 (A\*02)

右圖標註(在該單位)



169/18 胃組織

- 1. 胃組織, 3 腎上腺, 2 動脈, 3 骨髓, 7 溼, 3 乳房, 13 結腸, 1 卵巢, 1 十二指腸, 4 食管, 2 膽囊, 3 心臟, 4 白細胞樣本, 19 汗, 43 淚, 1 泌尿結, 1 卵巢, 6 胰液, 2 胃黏膜, 1 淺表
- 2. 胃組織, 3 腎上腺, 3 胃液, 3 皮膚, 2 胃, 4 腸, 5 胃, 1 胃, 3 胃, 2 胃, 2 胃

18 RCC 組織

50

ACK (A\*02)

【圖表說明(任意單位)】

1.69 冠三堂組織

：冠三堂組織，3 賢二派，2 勳派，3 友禮，7 溪，3 乳房，3 結湯，3 穴巢，3 一二指湯，4 金管，2 渣  
 囊，3 心瀾，4 二紅泡機本，3 肝，43 肺，3 穴巢，6 洩流渣，2 夏夏標經，3 浪溪，3 浪垂  
 道，3 狗溪，3 瀝瀝涼，6 宜筋，3 骨筋筋，3 皮膚，2 心湯，4 連瀾，5 言，3 章丸，2 狗涼，3 三沃  
 派，2 子官，2 靜派，2 賢

1.8 RCC  
組織







8/21

三三

試 : FADWEK (A\*02)

SEQ. D: 33

相對基準(任意單位)

三線

試檢法(左)

1. 3 三線 (從左到右) 2. 3 三線 (從左到右) 3. 3 三線 (從左到右) 4. 3 三線 (從左到右) 5. 3 三線 (從左到右) 6. 3 三線 (從左到右) 7. 3 三線 (從左到右) 8. 3 三線 (從左到右) 9. 3 三線 (從左到右) 10. 3 三線 (從左到右) 11. 3 三線 (從左到右) 12. 3 三線 (從左到右) 13. 3 三線 (從左到右) 14. 3 三線 (從左到右) 15. 3 三線 (從左到右) 16. 3 三線 (從左到右) 17. 3 三線 (從左到右) 18. 3 三線 (從左到右) 19. 3 三線 (從左到右) 20. 3 三線 (從左到右) 21. 3 三線 (從左到右) 22. 3 三線 (從左到右) 23. 3 三線 (從左到右) 24. 3 三線 (從左到右) 25. 3 三線 (從左到右) 26. 3 三線 (從左到右) 27. 3 三線 (從左到右) 28. 3 三線 (從左到右) 29. 3 三線 (從左到右) 30. 3 三線 (從左到右) 31. 3 三線 (從左到右) 32. 3 三線 (從左到右) 33. 3 三線 (從左到右) 34. 3 三線 (從左到右) 35. 3 三線 (從左到右) 36. 3 三線 (從左到右) 37. 3 三線 (從左到右) 38. 3 三線 (從左到右) 39. 3 三線 (從左到右) 40. 3 三線 (從左到右) 41. 3 三線 (從左到右) 42. 3 三線 (從左到右) 43. 3 三線 (從左到右) 44. 3 三線 (從左到右) 45. 3 三線 (從左到右) 46. 3 三線 (從左到右) 47. 3 三線 (從左到右) 48. 3 三線 (從左到右) 49. 3 三線 (從左到右) 50. 3 三線 (從左到右) 51. 3 三線 (從左到右) 52. 3 三線 (從左到右) 53. 3 三線 (從左到右) 54. 3 三線 (從左到右) 55. 3 三線 (從左到右) 56. 3 三線 (從左到右) 57. 3 三線 (從左到右) 58. 3 三線 (從左到右) 59. 3 三線 (從左到右) 60. 3 三線 (從左到右) 61. 3 三線 (從左到右) 62. 3 三線 (從左到右) 63. 3 三線 (從左到右) 64. 3 三線 (從左到右) 65. 3 三線 (從左到右) 66. 3 三線 (從左到右) 67. 3 三線 (從左到右) 68. 3 三線 (從左到右) 69. 3 三線 (從左到右) 70. 3 三線 (從左到右) 71. 3 三線 (從左到右) 72. 3 三線 (從左到右) 73. 3 三線 (從左到右) 74. 3 三線 (從左到右) 75. 3 三線 (從左到右) 76. 3 三線 (從左到右) 77. 3 三線 (從左到右) 78. 3 三線 (從左到右) 79. 3 三線 (從左到右) 80. 3 三線 (從左到右) 81. 3 三線 (從左到右) 82. 3 三線 (從左到右) 83. 3 三線 (從左到右) 84. 3 三線 (從左到右) 85. 3 三線 (從左到右) 86. 3 三線 (從左到右) 87. 3 三線 (從左到右) 88. 3 三線 (從左到右) 89. 3 三線 (從左到右) 90. 3 三線 (從左到右) 91. 3 三線 (從左到右) 92. 3 三線 (從左到右) 93. 3 三線 (從左到右) 94. 3 三線 (從左到右) 95. 3 三線 (從左到右) 96. 3 三線 (從左到右) 97. 3 三線 (從左到右) 98. 3 三線 (從左到右) 99. 3 三線 (從左到右) 100. 3 三線 (從左到右)



SEQ ID: 38

SEQ ID: 38

本圖係示意性圖式

紅泡象三葉紅鐵

試繪原至左

... (A\*02) ... 紅泡象三葉紅鐵 ... 試繪原至左 ...

紅泡象三葉紅鐵

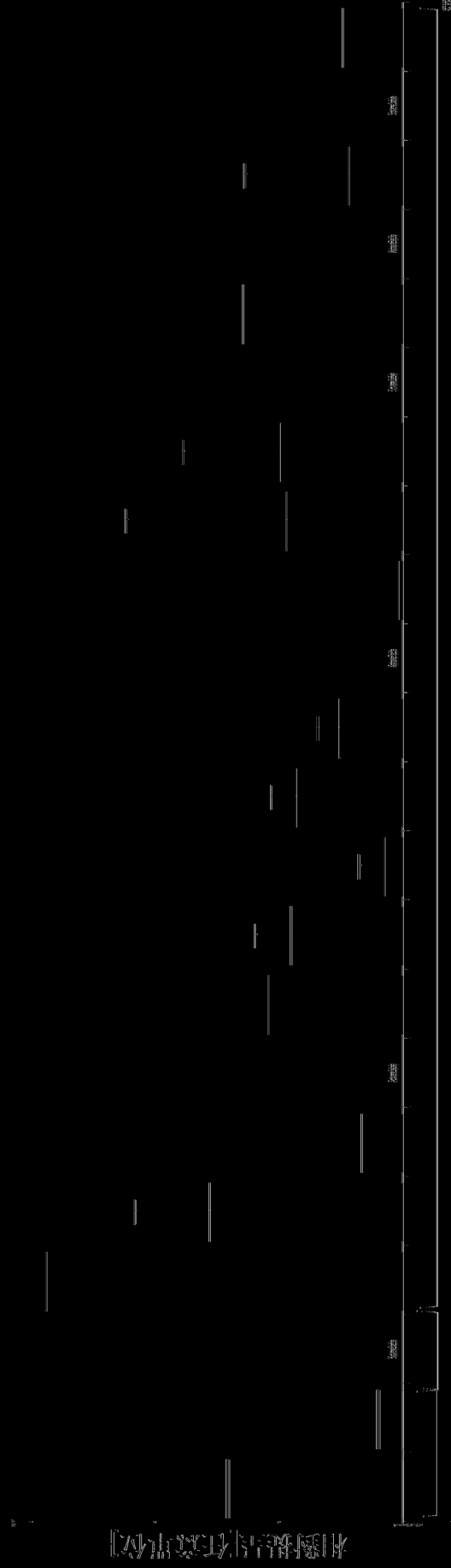
試繪原至左

試繪原至左

... (A\*02) ... 紅泡象三葉紅鐵 ... 試繪原至左 ...

10/2

圖 1  
SEQ. NO: 39  
V...H...G (A\*02)



相對位置任意單位

三層

三層三層

三層三層

2 三層三層

三層三層









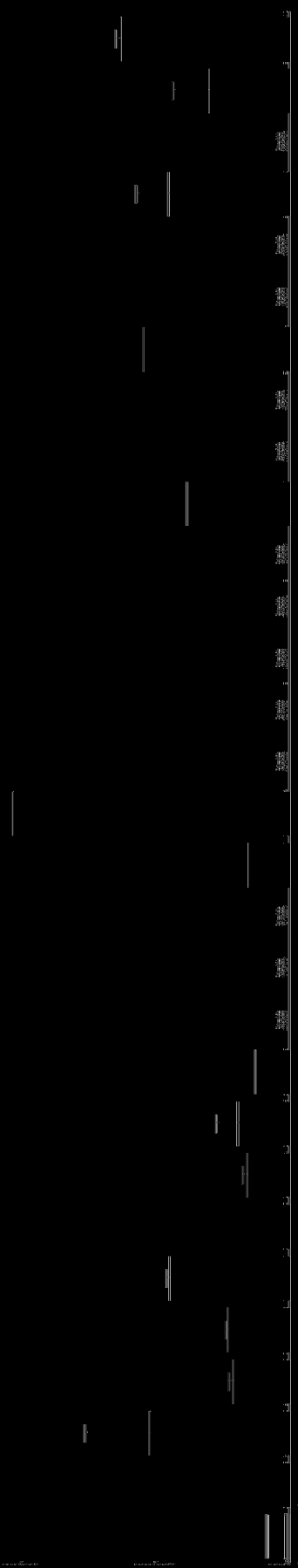
142

頁次

試 : K\_QDGEEN (A\*02)

SEQ ID: 103

相對標單(有意單位)



紅酒系

試檢原皮(左

紅酒系(右紅酒), 29 紅酒(2 紅酒) (從左到右) (從左到右)  
道, 6 皮(第 6 道) (從左到右)

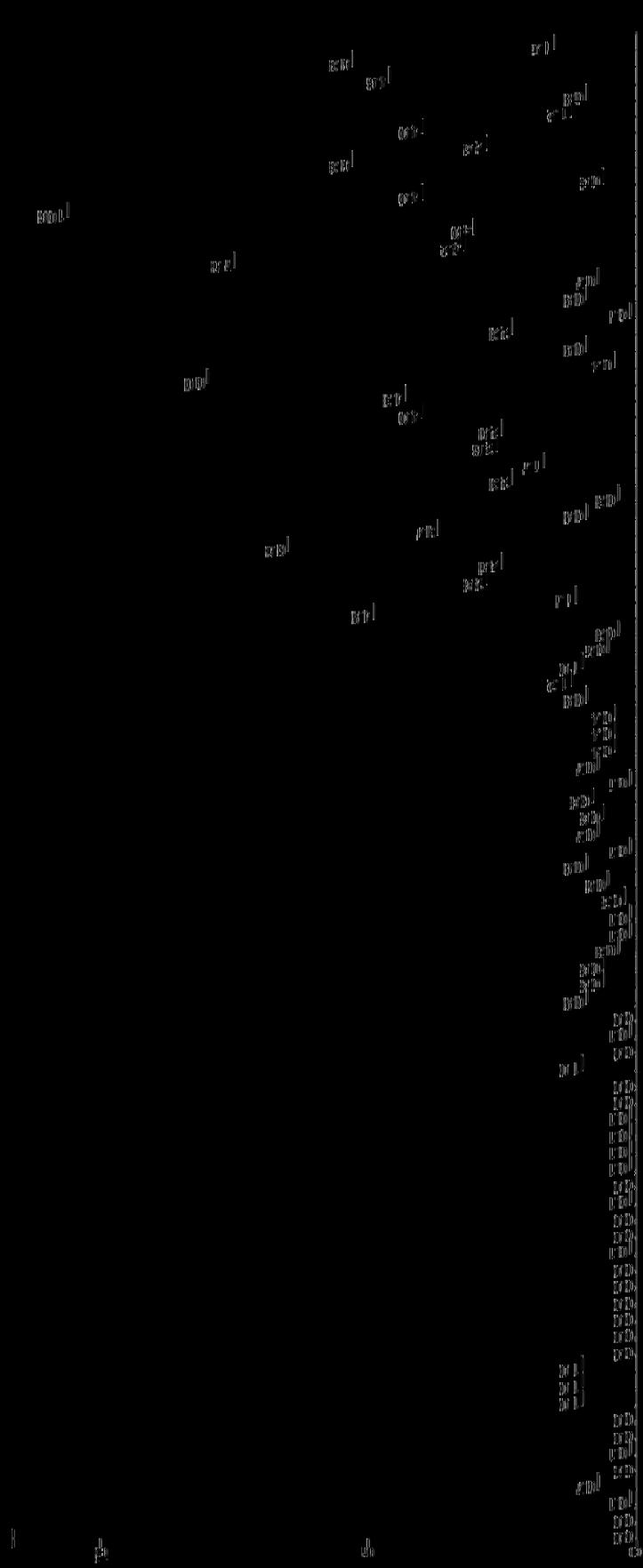
紅酒系

紅酒系(右紅酒), 29 紅酒(2 紅酒) (從左到右) (從左到右)  
道, 6 皮(第 6 道) (從左到右)

15/21

圖 2A

基因: CAL33C



相對數

三帶紅線樣本 (每行樣本代表幾種供體的庫) :

腎三線、動脈、骨髓、澀 (全部)、乳線、結腸、食管、心臟、腎 (三  
分)、白紅泡、肝、脾、淋三結、尿巢、視液、胎盤、燕窩液、血液液  
液、骨髓液、皮膚、小腸、脾、胃、辜丸、膀胱、三狀腺、膀胱、白頭、  
子宮、髌液、23 個三帶腎樣本 (從左到右)

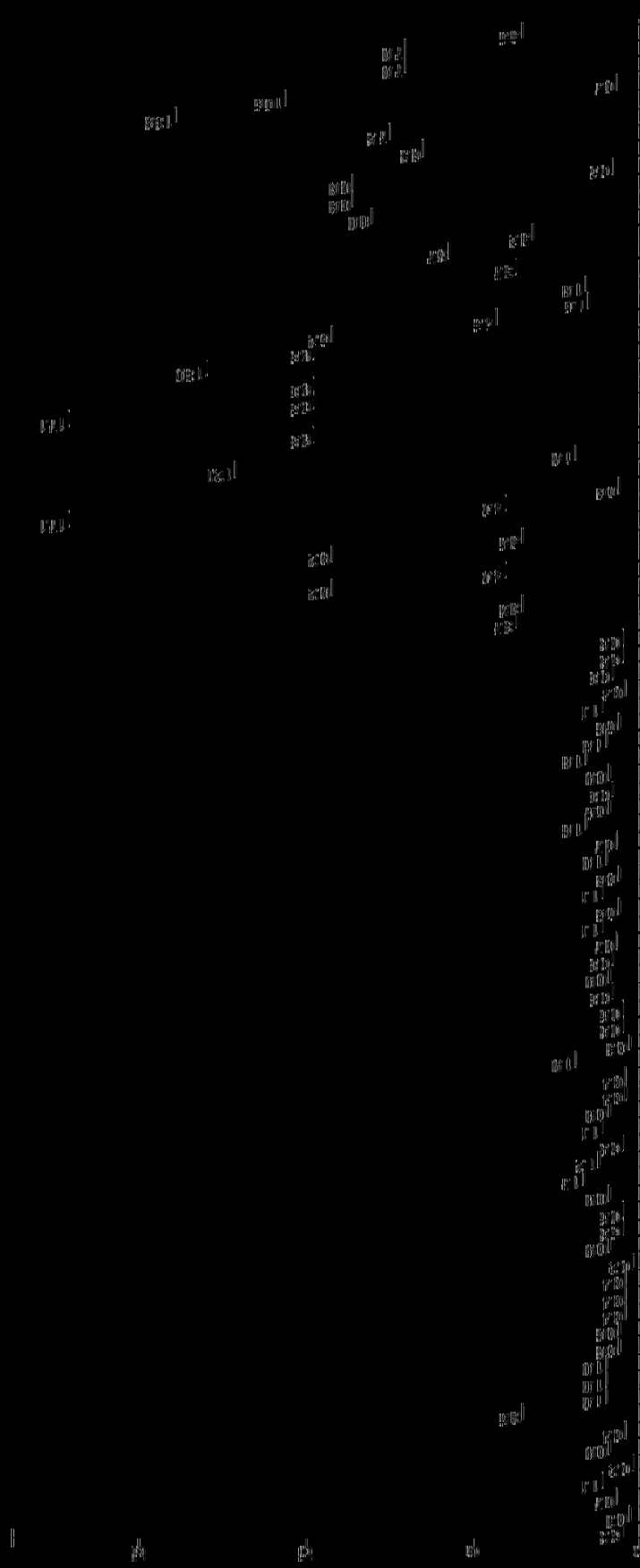
35 個 RCC 樣本

162

頁 23

書區: C173

相對位置



三營組織樣本 (每區樣本代表幾種共選的草):

鬃三涼、動派、骨麗、澤 (全部)、乳涼、結湯、食管、心臟、腎 (三  
 分)、白紅泡、江、誌、淋三結、泉巢、魂涼、治盤、濕纏涼、至液涼  
 涼、骨慈涼、皮膚、八湯、薄、夏、草穴、狗涼、三狀涼、膀胱、空頭、  
 子、鬃派、23 區三營鬃樣本 (從左到右)

35 區 RCC 樣本



18/21

圖 2D

圖 2E: V.E.F.

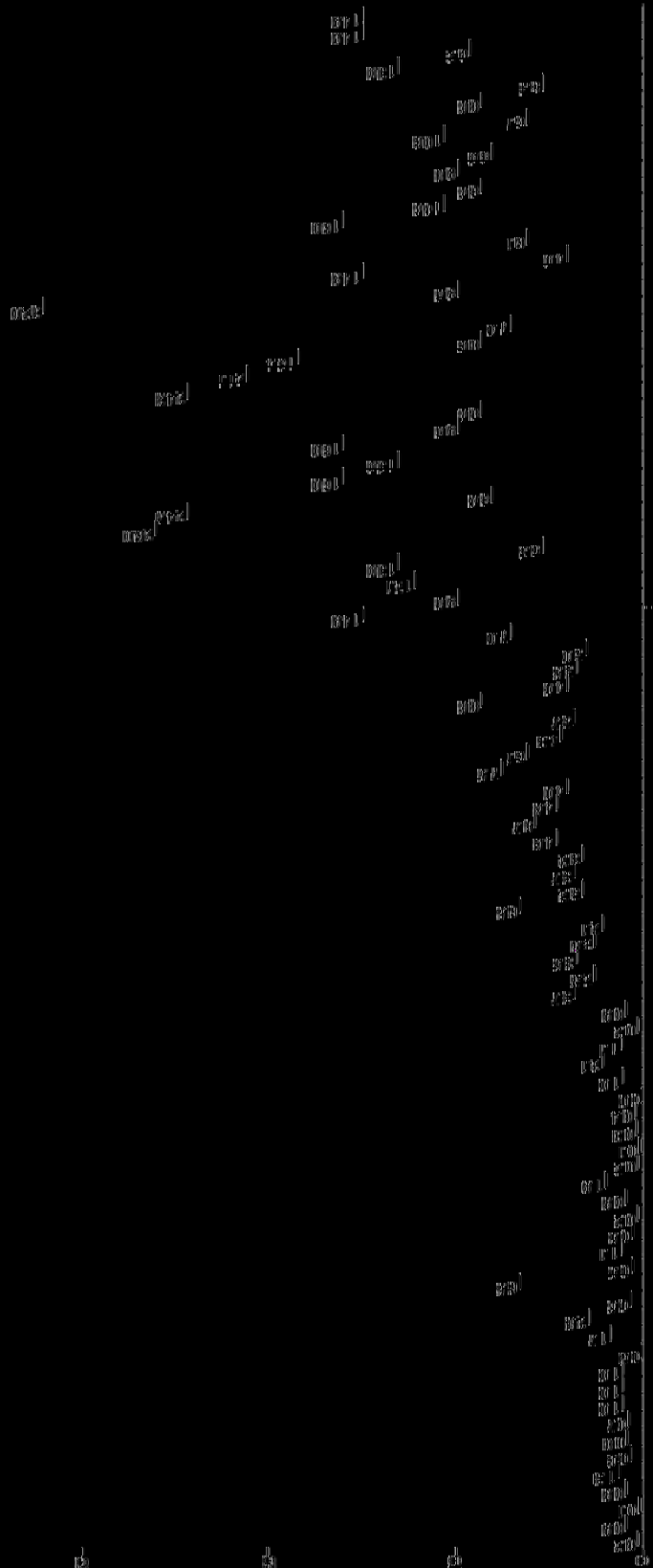
圖 2F

圖 2G

圖 2H

圖 2I

相對錄像



三管組織樣本 (每管樣本代表幾種營養的庫) :

殼二表、動脈、皮囊、乳囊、澱(全型)、食管、心臟、腎(三  
 分)、三紅泡、肝、脾、尿三結、胰液、澱、澱、澱液滾、澱液滾  
 滾、膏液滾、皮囊、小腸、胃、羣丸、胸液、三狀液、澱液、前  
 子、子、轉液、23 在三管管樣本 (從左到右)

35 在三管管樣本



圖 3

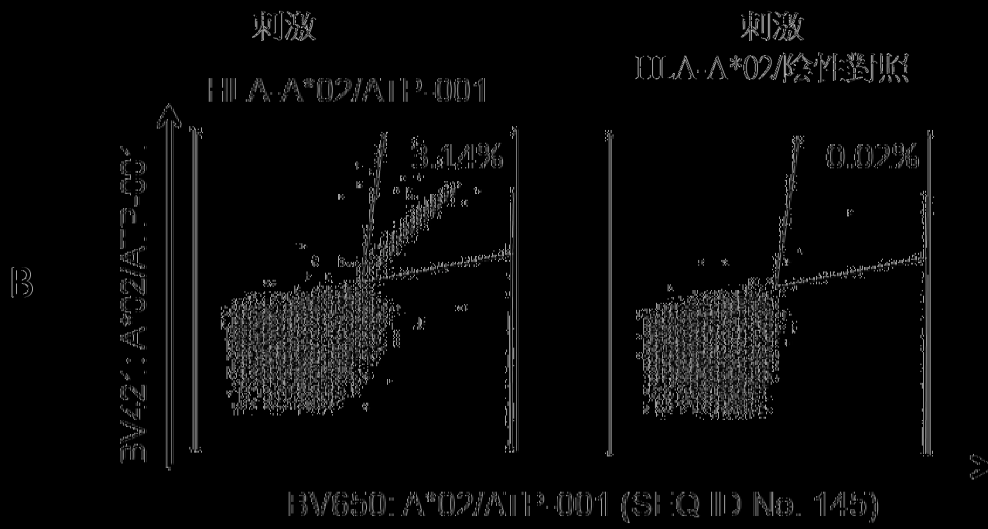
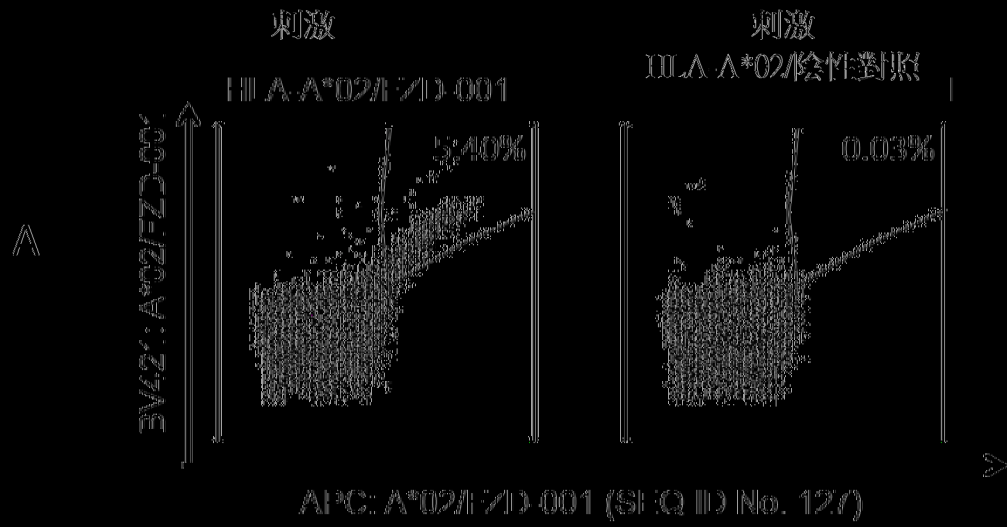


圖3 (續)

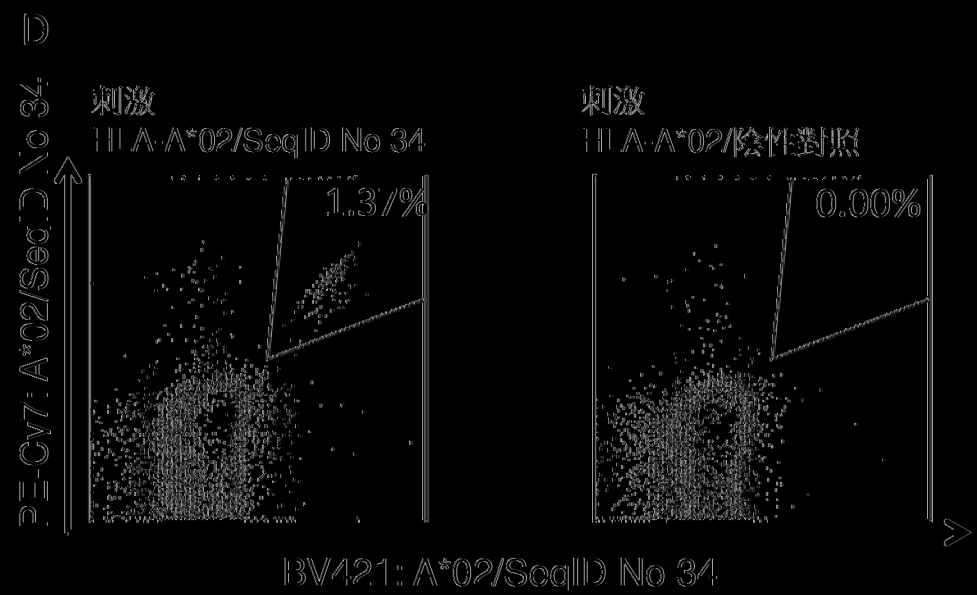
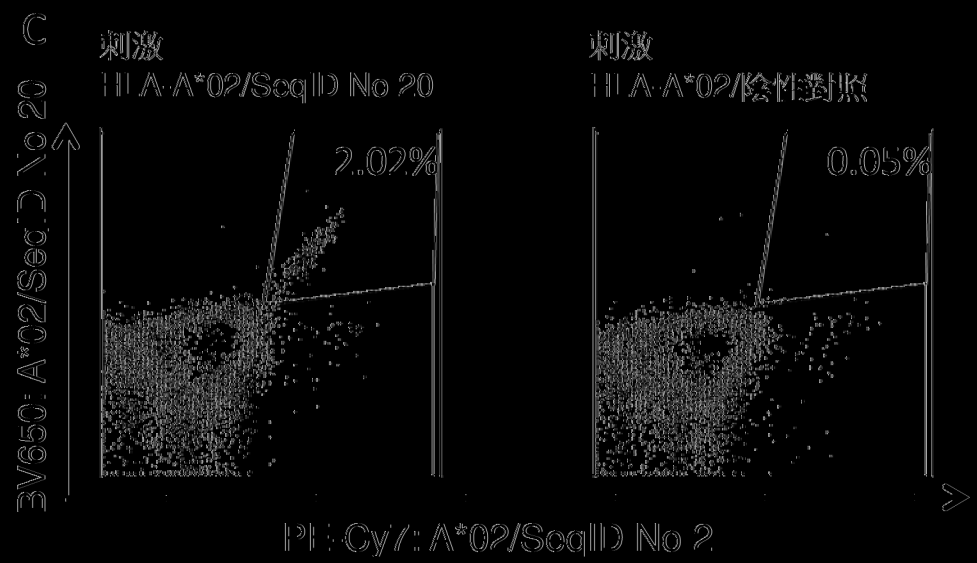


圖3 (續)

