



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201302800 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：101120218

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 06 日

(51)Int. Cl.：

C07K7/06 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

A61K38/08 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/06/10

美國

61/495,819

(71)申請人：腫瘤療法 科學股份有限公司 (日本) ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (JP)

日本

(72)發明人：角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大澤龍司 OSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡邊朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)；中山岳 NAKAYAMA, GAKU (JP)；中村祐輔 NAKAMURA, YUSUKE (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：4 共 160 頁

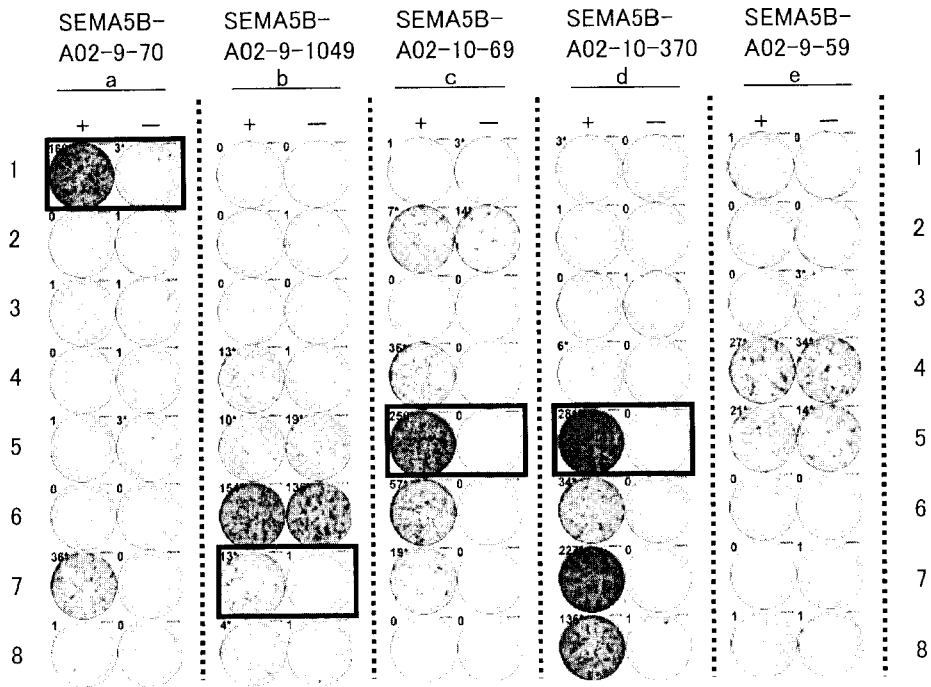
(54)名稱

SEMA5B 胜肽及含其之疫苗

SEMA5B PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

(57)摘要

如於此所詳細討論，來自 SEMA5B 經分離的胜肽與其片段，其與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，且因此適合用於癌症免疫治療，特別是癌症疫苗背景中。本發明胜肽包括上述胺基酸序列與其經修飾之變體，於經修飾之變體中，一、二或數個胺基酸被取代刪除插入或加入，提供維持原始序列必不可缺之人類白血球組織抗原結合及/或細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的該經修飾之胜肽。更提供編碼出任何這些上述胜肽的多核苷酸與包括任何上述胜肽或多核苷酸的藥學試劑或組合物。本發明之胜肽、多核苷酸、藥學試劑或組合物於癌症與腫瘤之治療及/或避免中提供特別的效用，癌症與腫瘤包括，例如，食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞癌(RC)與非小細胞肺癌(SCLC)。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201302800 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：101120218

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 06 日

(51)Int. Cl.：

C07K7/06 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

A61K38/08 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/06/10

美國

61/495,819

(71)申請人：腫瘤療法 科學股份有限公司 (日本) ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (JP)

日本

(72)發明人：角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大澤龍司 OSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡邊朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)；中山岳 NAKAYAMA, GAKU (JP)；中村祐輔 NAKAMURA, YUSUKE (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：4 共 160 頁

(54)名稱

SEMA5B 胜肽及含其之疫苗

SEMA5B PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

(57)摘要

如於此所詳細討論，來自 SEMA5B 經分離的胜肽與其片段，其與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，且因此適合用於癌症免疫治療，特別是癌症疫苗背景中。本發明胜肽包括上述胺基酸序列與其經修飾之變體，於經修飾之變體中，一、二或數個胺基酸被取代刪除插入或加入，提供維持原始序列必不可缺之人類白血球組織抗原結合及/或細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的該經修飾之胜肽。更提供編碼出任何這些上述胜肽的多核苷酸與包括任何上述胜肽或多核苷酸的藥學試劑或組合物。本發明之胜肽、多核苷酸、藥學試劑或組合物於癌症與腫瘤之治療及/或避免中提供特別的效用，癌症與腫瘤包括，例如，食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞癌(RC)與非小細胞肺癌(SCLC)。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：(01120218)

C07K 7/06 (2006.01)

※申請日：(01.6.6)

※IPC 分類：C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

SEMA5B 胜肽及含其之疫苗 / SEMA5B PEPTIDES AND

VACCINES INCLUDING THE SAME

二、中文發明摘要：

如於此所詳細討論，來自 SEMA5B 經分離的胜肽與其片段，其與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，且因此適合用於癌症免疫治療，特別是癌症疫苗背景中。本發明胜肽包括上述胺基酸序列與其經修飾之變體，於經修飾之變體中，一、二或數個胺基酸被取代刪除插入或加入，提供維持原始序列必不可缺之人類白血球組織抗原結合及/或細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的該經修飾之胜肽。更提供編碼出任何這些上述胜肽的多核苷酸與包括任何上述胜肽或多核苷酸的藥學試劑或組合物。本發明之胜肽、多核苷酸、藥學試劑或組合物於癌症與腫瘤之治療及/或避免中提供特別的效用，癌症與腫瘤包括，例如，食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞癌(RC)與非小細胞肺癌(SCLC)。

三、英文發明摘要：

As discussed in detail herein, isolated epitope peptides derived from SEMA5B bind to an HLA antigen and induce cytotoxic T lymphocytes (CTL) and thus are suitable for use in the context of cancer immunotherapy, more particularly cancer vaccines. The inventive peptides encompass both the above mentioned amino acid sequences and modified versions thereof, in which one, two, or several amino acids are substituted, deleted, inserted or added, provided such modified versions retain the requisite HLA binding and/or CTL inducibility of the original sequences. Further provided are polynucleotides encoding any of the aforementioned peptides as well as pharmaceutical agents or compositions that include any of the aforementioned peptides or polynucleotides. The peptides, polynucleotides, pharmaceutical agents or compositions of this invention find particular utility in the treatment and/or prevention of cancers and tumors, including, for example, esophageal cancer, NSCLC, RCC and SCLC.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於生物科學領域，更特別對於癌症治療領域。特別是，本發明係關於新穎之胜肽，其當作癌症疫苗及治療與避免腫瘤兩者或之一之藥物為有效。

【先前技術】

已證實細胞毒殺性 T 淋巴球 (CTLs) 辨認來自建造於主要組織相容性抗原複合體 (major histocompatibility complex, MHC) class I 分子上之腫瘤相關抗原 (tumor-associated antigens, TAAs) 的抗原決定位胜肽，且之後殺死腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原 (melanoma antigen, MAGE) 家族為腫瘤相關抗原之第一個例子，藉由免疫方法，已發現許多其他腫瘤相關抗原 (NPL 1, Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; NPL 2, Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9)。這些腫瘤相關抗原的一些目前正受到臨床發展之過程為免疫治療標的。

合適的腫瘤相關抗原係對於癌症細胞增殖與存活為必須的。使用此類腫瘤相關抗原為免疫治療標的可將廣為敘述之癌細胞免疫逃脫 (immune escape) 的風險最小化，而癌細胞免疫逃脫為治療性驅使免疫篩選的結果，歸因於腫瘤相關抗原的刪除、突變或向下調控。所以，能誘導有效且專一之抗腫瘤免疫反應的新腫瘤相關抗原的辨認成為更進

一步發展的根據；因此對於多種形式癌症之胜肽疫苗接種策略(vaccination strategies)的臨床研究為正進行著(NPL 3, Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; NPL 4, Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; NPL 5, Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; NPL 6, van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; NPL 7, Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; NPL 8, Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; NPL 9, Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; NPL 10, Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94)。迄今已報導，使用這些腫瘤相關抗原衍生胜肽的許多臨床試驗。不幸的是，許多之目前癌症疫苗試驗已顯示低的客觀反應率(objective response rate) (NPL 11, Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; NPL 12, Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; NPL 13, Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15)。因此維持新穎之腫瘤相關抗原做為免疫治療標的需要。

SEMA5B 為臂板蛋白家族(semaphorin protein family)的一員，而臂板蛋白家族為在神經發展期間於軸突引導(axonal guidance)中扮演一重要角色的一蛋白質之家族(NPL 14, O'Connor TP et al., Neural Dev. 2009 May

23;4:18)。最近之研究建議臂板蛋白家族蛋白質之功能不僅與神經系統相關且也與器官發生(organogenesis)、血管新生(angiogenesis)與癌症之發展相關。

在使用由 23,040 個基因所組成之 cDNA 微陣列為工具以使腎細胞癌(renal cell carcinoma, RCC)之分子機制清晰的基因表現圖譜分析(gene-expression profile analyses)的過程中，發現 SEMA5B 於腎細胞癌中被頻繁地向上調控。隨後的北方墨點分析顯示 SEMA5B 轉錄體(transcript)被高度表現於腎細胞癌組織中，但於正常人類組織中，除了胎兒大腦與胎兒腎臟，為幾乎無法偵測。此外，於腎細胞癌細胞株中藉由 siRNA 之 SEMA5B 的剔除已顯示減弱了腎細胞癌細胞的生長。(NPL15, Hirota E. et.al., Int J Oncol. 2006 Oct; 29(4):799-827; PTL1, W02007/013575).

【引用文獻】

專利文獻(Patent Literature)

[PTL1] W02007/013575

非專利文獻(Non Patent Literature)

[NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

[NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55

- [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42
- [NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9
- [NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14
- [NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8
- [NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72
- [NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66
- [NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94
- [NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80
- [NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42
- [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15
- [NPL 14] O'Connor TP et al., Neural Dev. 2009 May 23;4:18

[NPL 15] Hirota E. et.al., Int J Oncol. 2006 Oct; 29(4):799-827

【發明內容】

本發明部分至少基於發現新穎之胜肽其可作為免疫治療之適合標的。由於腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens, TAAs)有時被免疫系統感知為“自身”且因此常不具有免疫抗原性(immunogenicity)，所以適合標的的發現極度重要。如上所提到，SEMA5B(例如由 GenBank 獲得編號 NM_001031702(序列辨識號：48)之基因所編碼出之序列辨識號：49)已確認為在癌症中為向上調控，癌症之例子包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、腎細胞癌與小細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)。因此本發明聚焦於 SEMA5B 為一癌症/腫瘤免疫治療之標的的候選物，更特別是可作為適合之免疫治療標的之新穎 SEMA5B 抗原決定位胜肽。

為此目的，本發明至少部分關於在衍生自 SEMA5B 之胜肽中之具有誘導專一於之 SEMA5B 之細胞毒殺性 T 淋巴球之能力的特定抗原決定位胜肽的確認。更詳細如下所討論，使用與 HLA(人類白血球組織抗原)-A*0201 結合之來自 SEMA5B 的候選胜肽來刺激自健康提供者獲得之周邊血液單核球細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。之後以抗(against)經各候選胜肽脈衝(pulsed)之 HLA-A2 陽性目標細胞的細胞毒性建立細胞毒殺性 T 淋巴

球。此處結果證明這些胜肽為 HLA-A2 限制的抗原決定位胜肽，其可誘導強而專一之抗表現 SEMA5B 之細胞的免疫反應。這些結果更指出 SEMA5B 為強效致免疫性且其抗原決定位為癌症/腫瘤免疫治療之有效目標。

因此，本發明一目的為提供經分離的胜肽，其與 HLA 抗原結合且一包括 SEMA5B（序列辨識號：49）之免疫活性片段。此類胜肽可被預期具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，且因此可被來 *in vitro* 或 *ex vivo* 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球或可被投予一個體以誘導抗癌症的免疫反應，癌症的例子包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。較佳胜肽為九胜肽與十胜肽，更佳為具有擇自序列辨識號：1 至 7 與 9 至 47 中之一胺基酸序列的九胜肽與十胜肽。具有擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之一胺基酸序列的胜肽顯示強的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，且因此被特別的喜好。

本發明也考慮經修飾之胜肽，其具有擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之一胺基酸序列，於其中一、二或多個胺基酸被取代、刪除、插入或加入，只要經修飾之胜肽維持最初未經修飾之胜肽的必不可少的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。為此目的，本發明提供在長度小於 14、13、12、11 或 10 個胺基酸且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列的一經分離的胜肽：

(i) 一胺基酸序列，其擇自由序列辨識號：5 與 7 所組成之群組，於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插

入或添加，提供所產生之經修飾的胜肽與 HLA 抗原結合且誘發一細胞毒殺性 T 淋巴球，與

(ii) (i)之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

本發明也考慮在長度小於 15、14、13、12 或 11 個胺基酸的經修飾的胜肽，其包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i') 一胺基酸序列，其擇自由序列辨識號：27 與 34 所組成之群組，於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入或添加，提供所產生經修飾之胜肽與 HLA 抗原結合且誘發一細胞毒殺性 T 淋巴球，與

(ii') (i')之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

如與此所證明，當這些胜肽與抗原呈現細胞接觸或被引入抗原呈現細胞時，在一抗原呈現細胞中處理此類胜肽以呈現(i)、(ii)、(i')或(ii')的一胜肽於其上。

再者，本發明考慮經修飾之胜肽，其具有在擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之胺基酸序列中之一、二或多個胺基酸取代、刪除、插入及/或加入的一胺基酸序列，只要經修飾之胜肽維持原始胜肽之必不可缺的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。為此目的，本發明提供在長度小於 14、13、12、11 或 10 個胺基酸的一經分離的胜肽，其包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i) 在擇自由序列辨識號：5 與 7 所組成之群組之胺基酸序列中，1、2 或數個胺基酸被取代的胺基酸序列，其中該胜肽與 HLA 抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，與

(ii) (i)之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

此外，本發明也提供在長度小於 15、14、13、12 或 11 個胺基酸的一經分離的胜肽，其包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i') 在擇自由序列辨識號：27 與 34 所組成之群組之胺基酸序列中，1、2 或數個胺基酸被取代的胺基酸序列，其中該胜肽與 HLA 抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，與

(ii') (i')之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

當這些胜肽與一抗原呈現細胞接觸或被引入抗原呈現細胞時，在一抗原呈現細胞中處理這些胜肽以呈現(i)、(ii)、(i')或(ii')的胜肽於其上。

本發明更包括編碼出本發明任何胜肽之經分離之多核苷酸。這些多核苷酸可被用來誘導或製備具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的抗原呈現細胞。如同上述本發明胜肽，此類抗原呈現細胞可被投予至一個體以誘導抗癌之免疫反應。

當投予一個體時，本發明之胜肽被表現於抗原呈現細胞之表面以便誘導將分別之胜肽做為目標之細胞毒殺性 T 淋巴球。因此，本發明一目標為提供誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之試劑或組合物，此種試劑或組合物包括本發明所提供任何胜肽或多核苷酸。此試劑或組合物可用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免，特別是癌症，例如食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。因此，本發明又另一目標為提供用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免的藥學試劑或組合物，此藥物被配製來包括一或多個本發明之胜肽或多核苷酸。除了本發

明之胜肽或多核苷酸外/代替本發明胜肽或多核苷酸，本發明藥學試劑或組合物可包括呈現任何之本發明之胜肽的抗原呈現細胞或外吐小體為活性成分。

本發明之胜肽或多核苷酸可被用來誘導於其表面上呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽的複合物的抗原呈現細胞，例如，藉由將來自一個體之抗原呈現細胞與本發明之胜肽接觸或將編碼出本發明之胜肽的多核苷酸引入抗原呈現細胞。此種抗原呈現細胞具有誘導專一辨認呈現本發明目標胜肽於其表面上之細胞毒殺性 T 淋巴球的能力，且提供用途於癌症免疫治療。因此，本發明包括誘導具細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法與藉由此方法獲得之抗原呈現細胞。此外，本發明也包含用以誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的試劑或組合物，此類試劑或組合物包括本發明之任何胜肽或多核苷酸。

本發明更進一步之一目標為提供誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，此種方法包括將 CD8 陽性 T 細胞與表現本發明胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體共培養之步驟，或引入編碼出 T 細胞受體(TCR)次單元兩者之多核苷酸或編碼出 T 細胞受體(TCR)次單元各個之多核苷酸的步驟，其中此 T 細胞受體可與本發明之胜肽與呈現於細胞表面上之一 HLA 抗原的複合物結合。藉由此種方法獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球可在癌症之治療及/或避免中提供用途，癌症之例子包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。

本發明又另一目標為提供經分離之抗原呈現細胞，其於表面呈現一 HLA 抗原與本發明一胜肽的一複合物。本發明更提供經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以本發明之胜肽為目標。這些抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球可被用於癌症免疫治療。

本發明又另一目標為提供於一需要之個體中誘導抗癌症之免疫反應的方法，此方法包括投予一包含至少一成分擇自 SEMA5B 多胜肽或其免疫活性片段、編碼出其之多核苷酸、呈現其之外吐小體或抗原呈現細胞與辨認於它們表面上呈現其之細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球中之試劑或組合物的步驟。

本發明之應用性擴展至一些關於或起因於 SEMA5B 過度表現的疾病的任一個，例如癌症，癌症的例子包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。

又，本發明提供下列事項：

[1] 一種經分離的胜肽，係由序列辨識號：49 之胺基酸序列或一其免疫活性片段所組成，其中該胜肽與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球。

[2] [1]所述之經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

[3] [1]或[2]所述之經分離的胜肽，其中該胜肽包括一胺基酸序列，係擇自由序列辨識號：5、7、27 與 34 所組成之群組。

[4] 一種經分離的胜肽，係擇自由下列所組成之群組：

(a) 一種經分離的胜肽，其與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球 (CTL)，且其包括由序列辨識號：49 之胺基酸序列所組成之胜肽的一免疫活性片段，

(b) (a) 之該經分離的胜肽，其包括擇自由序列辨識號 5、7、27 與 34 所組成之群組的一胺基酸序列，

(c) 一經分離的胜肽，其 (i) 包括一胺基酸序列於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入及 / 或添加於 (a) 或 (b) 之胜肽的胺基酸序列中、(ii) 與人類白血球組織抗原結合，與 (iii) 維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球的誘發能力，以及

(d) (a)、(b) 或 (c) 之經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

[5] [4] 所述之經分離的胜肽，其中該經分離的胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

[6] [1] 至 [5] 之任一項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽。

[7] 一種經分離之多核苷酸，其編碼出 [1] 至 [6] 之任一項所述的胜肽。

[8] 一種誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之組合物，其中該組合物包括 [1] 至 [6] 之任一項所述之一或多個該胜肽，或

[7]所述之一或多個該多核苷酸。

[9] 一種藥學組合物，其中該組合物包括至少一活性成分其係擇自由下列所組成之群組：

- (a)[1]至[6]之任一項所述之一或多個該胜肽；
- (b)[7]所述之一或多個該多核苷酸；
- (c) 一或多個外吐小體或抗原呈現細胞，其呈現[1]至[6]之任一項所述之胜肽於其表面上；或
- (d) 一或多個細胞毒殺性 T 淋巴球，其辨認表現[1]至[6]之任一項所述之胜肽於其表面上；以及
- (e) 其組合，

其為了擇自由下列所組成之群組的目的而被配製：

- (i) 癌症的治療，
- (ii) 癌症的預防，
- (iii) 其手術後復發的避免，以及
- (iv) 其組合。

[10] [9]所述之藥學組合物，其中該組合物被配製來用於投予一個體，其人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

[11] [9]或[10]所述之藥學組合物，其中該組合物被配製來用於癌症之治療。

[12] 一種誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法，該方法包括擇自由下列所組成之群組的一步驟：

- (a) *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 將一抗原呈現細

胞與[1]至[6]之任一項所述之胜肽接觸；以及

(b) 將編碼出[1]至[6]之任一項所述之胜肽的一多核苷酸引入一抗原呈現細胞。

[13] 一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，該方法包括擇自由下列所組成之群組的一步驟：

(a) 將一 CD8 陽性 T 細胞與一抗原呈現細胞共培養，該抗原呈現細胞表現一人類白血球組織抗原與[1]至[6]之任一項所述之胜肽的一複合物於其表面上；

(b) 將一 CD8 陽性 T 細胞與一外吐小體共培養，該外吐小體表現一人類白血球組織抗原與[1]至[6]之任一項所述之胜肽的一複合物於其表面上；以及

(c) 將一編碼出 T 細胞受體次單元兩者之多核苷酸或一編碼出 T 細胞受體次單元各個之多核苷酸引入一 CD8 陽性 T 細胞，其中該 T 細胞受體次單元可與呈現於一細胞表面上之一人類白血球組織抗原與[1]至[6]之任一項所述的胜肽的一複合物結合。

[14] 一種經分離之抗原呈現細胞，其表現一人類白血球組織抗原與[1]至[6]之任一項所述之胜肽的複合物於其表面上。

[15] [14]所述之抗原呈現細胞，其藉由[12]所述之方法來誘導。

[16] 一種經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以[1]至[6]之任一項所述之胜肽為標的。

[17] [16]所述之細胞毒殺性 T 淋巴球，其中該細胞毒

殺性 T 淋巴球藉由 [13] 所述之方法來誘導。

[18] 一種於一需要個體中誘導一抗癌症之免疫反應的方法，該方法包括投予該個體一組合物的一步驟，該組合物包括 [1] 至 [6] 之任一項所述之胜肽、一其免疫活性片段，或編碼出該胜肽或該片段之一多核苷酸。

[19] 一種抗體或其免疫活性片段，其抗 [1] 至 [6] 之任一項所述之胜肽。

[20] 一種載體，包括編碼出 [1] 至 [6] 之任一項所述之胜肽的一核苷酸序列。

[21] 一種宿主細胞，其被以 [20] 所述之一表現載體所轉形或轉染。

[22] 一種診斷套組，包括 [1] 至 [6] 之任一項所述之胜肽、[7] 所述之多核苷酸或 [19] 所述之抗體。

在另一實施例中，[4] 之經分離的胜肽，可係擇自由下列所組成之群組：

(a) 一經分離之胜肽，其與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球且係由序列辨識號：49 之胺基酸序列或其其免疫活性片段所組成，

(b) (a) 或 (b) 之該經分離的胜肽，其包括一胺基酸序列，擇自由序列辨識號：5、7、27 與 34 所組成之群組，

(c) 一經分離之胜肽，其包括一胺基酸序列，擇自由序列辨識號：5、7、27 與 34 所組成之群組，於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入或添加，提供與一 HLA 抗原結合且維持該原始胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能

力的該經修飾之胜肽，以及

(d) (a)、(b)或(c)之該經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

在另一實施例中，本發明之[4]與[5]可為下列[4']與[5']：

[4'] 一經分離之胜肽，擇自由下列所組成之群組

(a) 一經分離之胜肽，其與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，且其包括由序列辨識號：49 之胺基酸序列所組成之胜肽之一免疫活性片段，

(b) (a)之該經分離的胜肽，其中該免疫活性片段包括一胺基酸序列，其擇自由序列辨識號：5、7、27 與 34 所組成之群組，

(c) 一經分離之胜肽，其(i)包括一胺基酸序列於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或添加於(a)或(b)之胜肽的胺基酸序列中、(ii)與人類白血球組織抗原結合，與(iii)維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球的誘發能力，以及

(d) (a)、(b)或(c)之該經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

[5'] [4]之經分離的胜肽，其中該免疫活性片段係由擇自由序列辨識號：5、7、27 與 34 所組成之群組的一胺基酸序列所組成，且其中該經分離之胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁

胺酸所組成之群組；以及

(b) C端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

當以下詳細說明被閱讀並結合伴隨之圖式與實施例，本發明之目的與特徵會變的更完全地明白。可瞭解的是，上面之本發明內容與以下之詳細說明兩者為示範之實施例，並不限制本發明或本發明其他替代實施例。

特別是，當關於一些特定實施例於此敘述之本發明，可以瞭解的是，敘述為本發明之說明，且並不建構為本發明之限制。各種修飾與應用可被熟悉此技藝人士想到，而無背離本發明精神與範圍，如所附申請專利範圍所述。同樣地，本發明之其他目的、特徵、好處與優點自此內容與下述之特定實施例，為清楚的，且對於熟悉此技藝人士而言可立即明白。此種目的、特徵、好處與優點自上述結合伴隨實施例、資料、圖式與所有要被自其單獨或隨著考慮引入於此之參考文獻而描述的所有合理推論為清楚的。

【實施方式】

雖然於本發明實施例之實施或測試中可使用相似或等同於在此敘述之那些的任何方法與材料，但是現在敘述較佳之方法、元件與材料。然而在敘述本發明材料與方法之前，需瞭解的是，說明書僅為說明，且不意指為限制。需瞭解的是，本發明並不限於敘述於此之特定大小、形狀、尺寸、材料、方法學、步驟等，例如按照慣例實驗法及／

或最佳化可將其變更。此外，於此敘述中使用之專門用語僅是為了敘述特別之變化形式或實施例，且不傾向限制僅會受限於所附上之申請專利範圍的本發明範圍。

於本說明書中提及之各刊物、專利或專利申請的揭露於此以其內容被具體引入為參考文獻。然而，於此並沒有被解釋為承認本發明由於先前發明之效力不被給予先於這些揭露之權力。

除非特別定義，於此使用屬與本發明之所有技術或科學用語為與熟悉此技藝人士所通常瞭解之意義相同。若發生抵觸，本發明說明書，包括定義將會控制。此外，材料方法與實施例為僅為說明性，且不意味為限制。

I. 定義

於此使用之單字“一”與“該”意指“至少一”除非以別的方式明確指出。

使用於與一物質（例如，胜肽、抗體、多核苷酸等）相關之措辭“分離”與“純化”意指此物質其實質上沒有至少一可被另外包含於自然來源中之物質。因此，一經分離或純化之胜肽意指一胜肽其實質上沒有細胞材料，例如碳水化合物、脂質或其他來自胜肽所源自之細胞或組織來源的其他污染蛋白質，或當化學合成時，實質上沒有化學前驅物或其他化學物。措辭“實質上沒有細胞材料”包括，於其中胜肽從細胞之細胞組成被分離之胜肽的製備，而從此細胞其被分離或重組產生。因此，一胜肽其實質上沒有細胞材料，包括具有小於 30%、20%、10% 或 5%（以乾

重)之異源蛋白質(此處也意指為一“污染蛋白質”)的多胜肽的製備。當胜肽被重組產生時,也較佳為實質上沒有培養基,其包括具有少於約20%、10%或5%之胜肽製備體積之培養基的胜肽製備。當胜肽藉由化學合成產生時,較佳為實質上沒有化學前驅物或其他化學物,其包括具有包含於胜肽合成小於約30%、20%、10%或5%(以乾重)之胜肽製備體積的化學前驅物或其他化學物的胜肽製備。可顯示特別之胜肽製備包含一經分離或經純化之胜肽,例如,藉由在蛋白質製備之十二烷基硫酸鈉-聚丙稀醯胺膠體電泳(sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis)與考馬斯亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色後的一單一條帶的出現或膠體的類似物。在較佳實施例中,本發明之胜肽與多核苷酸被分離或純化。

於此可替換使用之用語“多胜肽”、“胜肽”與“蛋白質”意指胺基酸殘基之一聚合物。此用語適用於胺基酸聚合物,於其中一或多個胺基酸殘基為經修飾之殘基或非自然發生之殘基,例如對應自然發生胺基酸之人工化學模仿物,與自然發生胺基酸聚合物。

於本說明書中有時使用之用語“寡胜肽”被用來意指本發明之胜肽,其為20個殘基或更少,一般為15個殘基或更少,且一般為由介於約8與約11個之間的殘基,通常為9或10個的殘基所組成。於此後者分別意指為“九胜肽”或“十胜肽”。

於此使用之用語“胺基酸”意指自然發生與合成之胺基酸，及胺基酸類似物與胺基酸模仿物，其與自然發生之胺基酸起相似作用。胺基酸可為 L-胺基酸或 D-胺基酸。自然發生胺基酸為基因密碼所編碼的那些與於細胞中在轉譯後被修飾的那些（例如羥脯胺酸(hydroxyproline)、 γ -羧基谷胺酸(gamma-carboxyglutamate)與 O-磷絲胺酸(O-phosphoserine)）。措辭“胺基酸類似物”意指具有與自然發生胺基酸相同之基礎化學結構（一 α 碳鍵結至一氫、一羧基、一胺基與一 R 基）的化合物，但具有一或多個經修飾之 R 基或經修飾之骨架（例如，同絲胺酸(homoserine)、降亮胺酸(norleucine)、甲硫胺酸(methionine)、亞砜(sulfoxide)、甲基硫氮鎢(methionine methyl sulfonium)）。措辭“胺基酸模仿物”意指化學化合物其與一般胺基酸具有不同結構，但有相似的功能。

可藉由由 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission 所建議之其一般所知的三字母符號或一字母符號來指出於此處之胺基酸。

於此可替換使用用語“基因”、“多核苷酸”與“核酸”，且除非以別的特別方式指出，相似於胺基酸其以它們一般被接受的單一字母編碼來指出。

於此可替換使用用語“試劑”與“組合物”與意指一產物，其包括於特定量中特定成分，與任何產物其直接或間接來自於特定量之特定成分的組合。此用語當被使用與

修飾詞語“藥學”(如“藥學試劑”與“藥學組合物”)相關時,意指包括一產物,其包括一活性成分與形成載體的情性成分,及任何產物其直接或間接來自任兩個或多個成份之組合、複合或聚集,或來自一或多個成分之解離,或來自一或多個成分之反應或相互作用的其他形式。因此,在本發明內容中,用語“藥學試劑”與“藥學組合物”意指藉由混合本發明分子或化合物與藥學上或生理上可接受之載體所製成的任何產物。

如此處所使用之措辭“藥學上可接受之載體”或“生理上可接受之載體”意指藥學上或生理上可接受之材料、組合物、物質或載劑,包括,但不限於一液體或固體填充料、稀釋劑、賦形劑、溶劑或套膜材料。

本發明之藥學試劑或組合物提供特別用途為疫苗。在本發明內容中,措辭“疫苗(也意指唯一致免疫性組合物)”意指一試劑或一組合物,其藉由接種進入動物具有誘導抗腫瘤免疫力的功能。

於此使用之用語“活性成分”意指在一試劑或一組合物中的物質,其為生物或生理活躍的。特別是,在一藥學試劑或組合物的內容中,用語“活性成分”意指一物質其顯示一目標的之藥學作用。例如,若藥學試劑或組合物用於癌症之治療或避免中,在試劑或組合物中的活性成分可直接或間接引起對癌細胞及/或組織的生物或生理作用。較佳為,此作用可包括減低或抑制癌細胞生長、損傷或殺死癌細胞及/或組織等。一般而言,有效成分的間接作用為誘

導細胞毒殺性 T 細胞辨認或殺死癌細胞。在被配製前，“活性成分”也可意指為“主體(bulk)”、“藥物物質(drug substance)”或“技術產物(technical product)”。

除非以別的方式定義，用語“癌症”意指過度表現 SEMA5B 基因之癌症，其例子包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。

除非以別的方式定義，於此可替換使用且以別的方式特別指出用語“細胞毒殺性 T 淋巴球”、“細胞毒殺性 T 細胞”與“CTL”以意指 T 淋巴球之次族群，且除非以別的方式指出，意指 T 淋巴球之次群組(sub-group)可辨認非自身細胞（例如，腫瘤/癌症細胞、被病毒感染之細胞），且誘導這些細胞死亡。

除非特別定義，用語“HLA-A2”如此處所使用，代表性意指次型，次型之例子包括，但不限於 HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203、HLA-A*0204、HLA-A*0205、HLA-A*0206、HLA-A*0207、HLA-A*0210、HLA-A*0211、HLA-A*0213、HLA-A*0216、HLA-A*0218、HLA-A*0219、HLA-A*0228 與 HLA-A*0250。

除非特別定義，於此使用之用語“套組”被使用於關於試劑與其他材料之組合。與此考慮之套組包括微陣列、晶片、標誌等。並無打算使用語“套組”限制於試劑及/或材料之特定組合。

如於此使用，在一個體或病患的背景中，措辭“個體之（或病患之）HLA 抗原為 HLA-A2”意指此個體或病患同

型結合地(homozygously)或異質結合地(heterozygously)具有 HLA-A2 抗原基因為主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC) Class I 分子，且 HLA-A2 抗原被表現於此個體或病患的細胞中為一 HLA 抗原。

本發明之方法與組合物之範圍提供用途於癌症之“治療”之內容中，一治療被視為“有效”，若其導致臨床優點，例如於個體中癌症之大小、普遍程度(prevalence)或轉移潛力的減少、存活時間、手術後復發的抑制等。當治療為預防性(prophylactically)提供時，“有效”意指減緩或避免癌症形成，或避免或減輕癌症之臨床症狀。有效性被確認於相關之診斷或治療特定腫瘤形式的任何已知方法。

本發明之方法與組合物之範圍提供用途於癌症之“避免”與“預防”之內容中，此類用詞為與此交替使用意指任何活性，其減少死亡率之負載或來自疾病之死亡率。避免與預防可發生於“初期、第二期與第三期避免層級”。初期避免與預防避免了疾病之發展，而第二期與第三期層級之避免與預防包括藉由恢復功能與減少疾病相關併發症，以疾病之發展與症狀之浮現及減少已建立之疾病之負向發展的避免與預防為目的。或者，治療或避免可包括一廣範圍之預防疾病治療，其以減緩特別疾病之嚴重度為目標，例如減少腫瘤之增殖與轉移。

在本發明內容中，癌症之治療及/或預防，或，及/或

其手術後復發的避免包括任何等活動，其導致，例如下列事件，例如癌細胞之手術移除、似癌細胞之生長抑制、腫瘤之衰退或退化、癌發生之減緩與抑制的誘導、腫瘤退化與轉移之減少與抑制、癌症手術後復發的抑制與存活時間的延長。癌症之有效治療及/或預防減少致死率與改善具有癌症之個體的預後、減低癌症標記於血液中的程度與減緩伴隨著癌症之可偵測症狀。例如，症狀之減輕或改善構成有效治療及/或預防，其包括 10%、20%、30%或更加減輕，或穩定疾病。

在本發明內容中，用語“抗體”意指免疫球蛋白與其片段，其專一與選定蛋白質或其胜肽反應。一抗體可包括人類抗體、靈長類抗體、嵌合抗體(chimeric antibody)、雙專一抗體(bispecific antibody)、人源化抗體、與其他蛋白質或放射標誌融合之抗體，與抗體片段。此外，此處之抗體被使用於最大效用且特別包含完整單株抗體、多株抗體、形成自至少兩個完整抗體之多專一抗體(multi-specific antibody)(例如雙專一抗體)與抗體片段，只要其存在所需生物活性。一“抗體”意指所有之種類(例如，IgA、IgD、IgE、IgG與IgM)。

II. 胜肽

於下方詳述之本發明胜肽可意指為“SEMA5B胜肽”或“SEMA5B多胜肽”。

為了證明來自SEMA5B之胜肽作用如一被細胞毒殺性T淋巴球(CTLs)所辨認之抗原，分析來自SEMA5B之胜肽(序

列辨識號：49) 以確定是否其為由一般遇到 HLA 對偶基因 (allele) 之 HLA (人類白血球組織抗原) - A2 所限制之抗原決定位 (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994)。使用其對 HLA-A2 之結合親和力的資訊，確認來自 SEMA5B 之 HLA-A2 結合胜肽的候選物。確認下列候選胜肽：

SEMA5B-A2-9-330 (序列辨識號：1)、
SEMA5B-A2-9-450 (序列辨識號：2)、
SEMA5B-A2-9-69 (序列辨識號：3)、
SEMA5B-A2-9-1045 (序列辨識號：4)、
SEMA5B-A2-9-70 (序列辨識號：5)、
SEMA5B-A2-9-287 (序列辨識號：6)、
SEMA5B-A2-9-1049 (序列辨識號：7)、
SEMA5B-A2-9-447 (序列辨識號：9)、
SEMA5B-A2-9-592 (序列辨識號：10)、
SEMA5B-A2-9-281 (序列辨識號：11)、
SEMA5B-A2-9-52 (序列辨識號：12)、
SEMA5B-A2-9-543 (序列辨識號：13)、
SEMA5B-A2-9-24 (序列辨識號：14)、
SEMA5B-A2-9-35 (序列辨識號：15)、
SEMA5B-A2-9-313 (序列辨識號：16)、
SEMA5B-A2-9-155 (序列辨識號：17)、
SEMA5B-A2-9-648 (序列辨識號：18)、

SEMA5B-A2-9-68 (序列辨識號：19)、
SEMA5B-A2-9- 218 (序列辨識號：20)、
SEMA5B-A2-9- 43 (序列辨識號：21)、
SEMA5B-A2-9- 148 (序列辨識號：22)、
SEMA5B-A2-9- 31 (序列辨識號：23)、
SEMA5B-A2-9- 590 (序列辨識號：24)、
SEMA5B-A2-10- 449 (序列辨識號：25)、
SEMA5B-A2-10- 145 (序列辨識號：26)、
SEMA5B-A2-10- 69 (序列辨識號：27)、
SEMA5B-A2-10- 1045 (序列辨識號：28)、
SEMA5B-A2-10- 58 (序列辨識號：29)、
SEMA5B-A2-10- 533 (序列辨識號：30)、
SEMA5B-A2-10- 42 (序列辨識號：31)、
SEMA5B-A2-10- 68 (序列辨識號：32)、
SEMA5B-A2-10- 508 (序列辨識號：33) 、
SEMA5B-A2-10- 370 (序列辨識號：34)、
SEMA5B-A2-10- 539 (序列辨識號：35)、
SEMA5B-A2-10- 38 (序列辨識號：36)、
SEMA5B-A2-10- 441 (序列辨識號：37)、
SEMA5B-A2-10- 35 (序列辨識號：38)、
SEMA5B-A2-10- 484 (序列辨識號：39)、
SEMA5B-A2-10- 137 (序列辨識號：40)、
SEMA5B-A2-10- 148 (序列辨識號：41)、
SEMA5B-A2-10- 479 (序列辨識號：42)、

SEMA5B-A2-10- 243 (序列辨識號：43)、
SEMA5B-A2-10- 106 (序列辨識號：44)、
SEMA5B-A2-10- 60 (序列辨識號：45)、
SEMA5B-A2-10- 281 (序列辨識號：46)與
SEMA5B-A2-10- 592 (序列辨識號：47)。

此外，*in vitro* 藉由以這些胜肽脈衝（載有）之樹突細胞(dendritic cell, DC)刺激 T 細胞後，藉由以下列各下列胜肽刺激成功建立細胞毒殺性 T 淋巴球：

SEMA5B-A2-9-70 (序列辨識號：5)、
SEMA5B-A2-9-1049 (序列辨識號：7)、
SEMA5B-A2-10- 69 (序列辨識號：27)與
SEMA5B-A2-10- 370 (序列辨識號：34)。

這些被建立的細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強而專一之抗經分別之胜肽脈衝之目標細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。這些結果證明 SEMA5B 為一由細胞毒殺性 T 淋巴球所辨認之抗原，且測試之胜肽為由 HLA-A2 限制之 SEMA5B 的抗原決定位胜肽。

因此，本發明提供來自 SEMA5B 之細胞毒殺性 T 淋巴球辨認抗原決定位的九胜肽(胜肽由九個胺基酸殘基所組成)與十胜肽(胜肽由十個胺基酸殘基所組成)。或者，本發明提供經分離之胜肽，其與 HLA 抗原結合且誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，其中胜肽係由 SEMA5B (序列辨識號：49)之一免疫活性片段所組成。此外，在一些實施例中，本發明提供胜肽，其包括擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之

胺基酸序列。在較佳實施例中，本發明胜肽為係由擇自序列辨識號：5、7、24 與 34 中之胺基酸序列所組成之的胜肽。

通常可使用現今於例如網路可得之軟體程式，例如於 Parker KC *et al.*, J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75 and Nielsen M *et al.*, Protein Sci 2003; 12: 1007-17 中所敘述的那些，來計算 *in silico* 介於各種胜肽與 HLA 抗原間之結合親和力。例如，於概述於例如 Lafuente EM *et al.*, Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220 中 Parker KC *et al.*, J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75, Kuzushima K *et al.*, Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV *et al.* BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31; 8: 424, Buus S *et al.* Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M *et al.*, Protein Sci 2003; 12: 1007-17, 與 Nielsen M *et al.* PLoS ONE 2007; 2: e796 中所述可測量與 HLA 抗原之結合親和力。測量親和力之方法敘述，例如於 Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190 與 Protein Science, 2000, 9: 1838-1846 中。所以熟悉此技藝人士可使用此種軟體程式來選擇來自 SEMA5B 的那些片段，其具有與 HLA 抗原之高結合親和力。因此本發明包括由來自 SEMA5B 之任何片段所組成之胜肽，其藉由此類已知程式可確認與 HLA 抗原之結合。此外，此類胜肽可包括由 SEMA5B 之全長胜肽所組成之胜肽。

本發明胜肽，特別是本發明之九胜肽與十胜肽可於側

面具有額外之胺基酸殘基，只要胜肽維持其細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。位於特定之額外胺基酸殘基可由任何種類之胺基酸所組成，只它們不減少原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。因此，本發明包括具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與對 HLA 抗原之結合親和力之胜肽，特別是，來自 SEMA5B 之胜肽。此種胜肽，例如小於約 40 個胺基酸，時常小於約 20 個胺基酸，通常小於約 15 個胺基酸。

一般而言，已知於一胜肽中一、二、數個或多個胺基酸之修飾，不影響胜肽的功能，或在一些例子中，甚至增強原始胜肽所需之功能。事實上，已知經修飾之胜肽（即，胜肽由藉由取代、插入、刪除及/或加入一二或數個胺基酸殘基至一原始胺基酸序列來修飾之胺基酸序列所組成）維持原始胜肽的生物活性(Mark *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie- McFarland *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。因此，於本發明一實施例中，本發明具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之胜肽可由具有擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之胺基酸序列之胜肽所組成，於其中加入、刪除、插入及/或取代一、二或數個胺基酸。在另一實施例中，本發明胜肽可為包括在擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之胺基酸序列中一、二或數個胺基酸被取代刪除插入及/或加入之胺基酸序列的胜肽，提供維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的經修飾胜肽。

熟悉此技藝人士會認定改變所有胺基酸序列之一單一胺基酸或一小百分比的個別修飾（即，加入、插入、刪除及/或取代）至一胺基酸序列傾向產生保存原始胺基酸支鏈的特性。因此它們被意指為“保守取代(conservative substitutions)”或“保守修飾(conservative modifications)”，其中一蛋白質之改變導致一具有相似功能的蛋白質。提供功能相似胺基酸之保守取代表已為本技術領域所熟知。胺基酸支鏈的特徵的例子為疏水胺基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水胺基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)與具有下列共同官能基或特徵之支鏈：一脂肪族支鏈(G, A, V, L, I, P)；一含羥基支鏈(S, T, Y)；含硫原子支鏈(C, M)；含羧酸與胺基支鏈(D, N, E, Q)；含鹼支鏈(R, K, H)；以及含芳香族支鏈(H, F, Y, W)。此外，下列八個族群各包含為彼此保守取代之胺基酸：

- 1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；
- 2) 天門冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；
- 3) 天門冬醯胺(N)、麩胺醯胺(Q)；
- 4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；
- 5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫丁胺酸(M)、纈胺酸(V)；
- 6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；
- 7) 絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；以及
- 8) 半胱胺酸(C)、甲硫丁胺酸(M)(參見，例如 Creighton, Proteins 1984)。

此種經保守修飾胜肽也被視為本發明之胜肽。然而，本發明之胜肽並不限於此，且可包括非保守修飾，只要經修飾之胜肽維持原始未經修飾之胜肽之必不可少的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。更進一步而言，經修飾之胜肽不排除源自多形變體 (polymorphic variants)、種間同質體 (interspecies homologues) 與 SEMA5B 對偶基因 (alleles) 之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發的胜肽。

胺基酸殘基可被插入、取代、刪除/及或加入至本發明之胜肽，或者胺基酸殘基可被從其刪除以達到一較高之結合親和力。為了維持必須之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，較佳為只修飾（插入、刪除、加入/或取代）一小數目（例如一、二或數個）或小百分比之胺基酸。此處用語“數個”指 5 或更少個胺基酸，例如 4 個或 3 個或更少。被修飾之胺基酸之百分比可為，例如 20% 或更少，較佳為，15% 或更少，更佳為，10% 或更少，甚至更佳為或 1 至 5%。

當使用於文中之癌症免疫治療時，本發明之胜肽可被表現於一細胞或外吐小體之表面上如一伴隨 HLA 抗原之複合物。因此，其較佳為選擇不只誘導細胞毒殺性 T 淋巴球且也具有對於 HLA 抗體之高度親和力的胜肽。為此目的，藉由胺基酸殘基之取代、插入、刪除及/或加入可修飾胜肽已產生具有經改善之結合親和力之經修飾的胜肽。除了自然表現之胜肽外，由於已知藉由結合至 HLA 抗原來表現之胜肽序列的規則 (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155:

4307)，可將基於此規則之修飾引入本發明之致免疫性胜肽。

例如，具有高 HLA-A2 結合親和力之胜肽傾向具有以白胺酸或甲硫丁胺酸取代之來自 N 端的第二個胺基酸。同樣地，於其中 C 端胺基酸被以纈胺酸或白胺酸取代的胜肽也可較喜愛地被使用。因此，具有擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 之胺基酸序列的胜肽，於其中序列辨識號之胺基酸序列之來自 N 端的第二個胺基酸被以白胺酸或甲硫丁胺酸取代，及/或於其中序列辨識號之胺基酸序列之 C 端胺基酸被以纈胺酸或白胺酸取代，為被本發明所考慮。在另一實施例中，本發明包括胜肽，其具有擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之胺基酸序列之來自 N 端的第二個胺基酸被以白胺酸或甲硫丁胺酸取代及/或序列辨識號之胺基酸序列之 C 端胺基酸被以纈胺酸或白胺酸取代的胺基酸序列。在較佳實施例中，本發明胜肽係由於其中擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之胺基酸序列之來自 N 端的第二個胺基酸被以白胺酸或甲硫丁胺酸取代及/或序列辨識號之胺基酸序列之 C 端胺基酸被以纈胺酸或白胺酸取代的胺基酸序列所組成。

在一實施例中，本發明提供具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的胜肽，其中胜肽具有一般公式擇自由如下所示 (55) 至 (58) 所組成之群組：

(55) - 對應至序列辨識號：5-

Leu [X1] Pro Ser Leu Thr Leu Leu [X2]、

(56) -對應至序列辨識號：7-

Gly [X1] Leu Thr Leu Ala Val Tyr [X2],

(57) -對應至序列辨識號：27-

Leu [X1] Leu Pro Ser Leu Thr Leu Leu [X2],

與

(58) -對應至序列辨識號：SEQ ID NO: 34-

Leu [X1] Tyr Gly Val Phe Thr Thr Asn [X2]。

在一般公式(55)-(58)中，[X1]為白胺酸或甲硫丁胺酸，且[X2]為纈胺酸或白胺酸。

此外，本發明也提供以上方所定義之一般式(55)-(58)所表示之經分離之胜肽，對其於其 N 端或 C 端之一或兩者添加一、二或數個胺基酸。或者，本發明更提供以上方所定義之一般式(55)-(58)所表示之經分離之胜肽，對其於其 N 端或 C 端之一或兩者刪除一、二或數個胺基酸殘基。

可將取代引入不止於末端胺基酸，也可於胜肽之潛在 TCR 位的辨認位置。一些研究已證實一具有胺基酸取代之胜肽可具有等於或比原來更好的功能，例如 CAP1、p53 (264-272)、Her-2/neu (369-377) 或 gp100 (209-217) (Zaremba *et al.* Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann *et al.* J Immunol. (2002) Feb 1;168(3):1338-47., S. O. Dionne *et al.* Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 and S. O. Dionne *et al.* Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

本發明也考慮一、二個或數個胺基酸的加入也可被加

至本發明之胜肽的 N 及 / 或 C 端。本發明也包括具有高 HLA 抗原結合親和力且維持細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之此種經修飾的胜肽。

例如，本發明提供在長度小於 14、13、12、11 或 10 個胺基酸的一經分離的胜肽，其與 HLA 抗原結合、具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i) 擇自由序列辨識號：5 與 7 所組成之群組的一胺基酸序列，於其中一、二或數個胺基酸被修飾，與

(ii) (i) 之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為白胺酸或甲硫丁胺酸；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為或被修飾為纈氨酸或白胺酸。

本發明也提供在長度小於 15、14、13、12 或 11 個胺基酸的一經分離的胜肽，其與 HLA 抗原結合、具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i') 擇自由序列辨識號：27 與 34 所組成之群組的一胺基酸序列，於其中一、二或數個胺基酸被修飾，與

(ii' ') (i') 之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為

或被修飾為白胺酸或甲硫丁胺酸；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為或被修飾為纈氨酸或白胺酸。

當這些胜肽被與一抗原呈現細胞接觸或被引入於一抗原呈現細胞中時，這些胜肽可於一抗原細胞中被處理以呈現(i)、(ii)、(i')與(ii')之一胜肽於其上。

然而，當胜肽序列與一具有不同功能之內生或外生蛋白質之胺基酸序列的一部份相同時，可能誘導副作用，例如自體免疫疾病及/或抗特定物質之過敏症候群。因此，可使用可得之資料庫首先執行同源搜尋以避免胜肽之序列符合其他蛋白質之胺基酸序列的情況。當不只存在與目標胜肽具有一或兩個胺基酸不同之胜肽的同源搜尋變得清楚時，為了增加其與 HLA 抗原之結合親和力，及/或增加其細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力而不具副作用之任何危險，可修飾目標胺基酸。

雖然如上述之具有對 HLA 抗原高結合親和力的胜肽被預期為高效能，但根據作為指示之高親和表現而被選擇之候選胜肽，更進一步被測試細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的表現。此處措辭“細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”意指當表現於一抗原呈現細胞上時，一胜肽誘導一細胞毒殺性 T 淋巴球的能力。此外，“細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”包括胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球活化、細胞毒殺性 T 淋巴球增殖、促進藉由細胞毒殺性 T 淋巴球之目標細胞的分解與增加藉由細胞毒殺性 T 淋巴球之 IFN- γ 產生的能力。

藉由誘導攜帶人類 MHC 抗原之抗原呈現細胞（例如 B-淋巴球、巨噬細胞與樹突細胞）或更專一地來自人類周邊血液單核細胞之樹突細胞，並在以測試胜肽之抗原呈現細胞的刺激之後，混合抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞，且之後測量由細胞毒殺性 T 淋巴球產生並釋放之抗目標細胞的 IFN- γ 來達成細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的確定。如此反應系統，可使用已被產生來表現人類 HLA 抗原之基因轉殖動物（例如，於 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC (HLA) class II restricted T(H) response 中的描述）。或者，可以 ^{51}Cr 放射標示目標細胞，且可從自目標細胞釋放出的放射活性計算細胞毒殺性 T 淋巴球之細胞素殺活性。或者，其可在攜帶經固定之胜肽的細胞存在下，藉由測量由細胞毒殺性 T 淋巴球產生並釋放的 IFN- γ ，並使用抗 IFN- γ 單株抗體來使於培養基上之抑制區可見來檢驗。

由於如上述測試胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，發現擇自具有由序列辨識號：5、7、27 與 34 所指出的胺基酸序列之那些胜肽中的九胜肽與十胜肽顯示特別高之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與對 HLA 抗原之高結合親和力。因此這些胜肽被示例為本發明之較佳實施例。

此外，同源分析之結果證明此種胜肽不與來自任何其他已知人類基因產物之胜肽共有顯著之同源性。當用於免疫治療時，此降低了未知或不必要之免疫反應的可能性。因此，也來自此態樣，這些胜肽對於在癌症病患中引起抗 SEMA5B 免疫力為有效的。因此較佳為具有擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之胺基酸序列的胜肽之本發明之胜肽也被本發明所包含。

除了如上所討論之本發明之胜肽的修飾之外，本發明胜肽可連接其他胜肽，只要所產生之經連接的胜肽維持原始胜肽之必不可少之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，且更佳為以維持其必不可少之 HLA 結合。適合之“其他”胜肽的例子包括：本發明胜肽或來自其他腫瘤相關抗原之細胞毒殺性 T 淋巴球誘導胜肽。本發明之胜肽經由一連結器可被直接或間接連結至一“其他”胜肽。胜肽間之連結器為被本技術領域所熟知，例如 AAY (P. M. Daftarian *et al.*, J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK (R. P. M. Sutmuller *et al.*, J Immunol. 2000, 165: 7308-7315)或 K (S. Ota *et al.*, Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura *et al.*, J Immunol. 2002, 168: 5709-5715)。

例如，也可使用來自非 SEMA5B 腫瘤相關抗原之胜肽以增加經由 HLA class I 及/或 class II 之免疫反應。本技術領域已熟知，癌症細胞可表現多於一個腫瘤相關基因。因此，其為在對於熟悉此技藝人士例行實驗之範圍中以確認是否一特定個體表現額外腫瘤相關基因，且之後包括來

自此類基因之表現產物的 HLA class I 及/或 class II 結合胜肽於本發明之 SEMA5B 組合物或疫苗中。

HLA class I 與 HLA class II 結合胜肽之例子對於熟悉此技藝人士而言是已知的（例如，參見 Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995），且可以一如此處所揭露之那些的類似方式被使用來與本發明連結。使用一般分子生物程序，熟悉此技藝人士可製備包括一或多個 SEMA5B 胜肽與一或多個非 SEMA5B 胜肽的多胜肽，或編碼出此類多胜肽的核酸。

上述連結胜肽於此處意指為“多面體(polytope)”即，兩個或多個潛在免疫原性(immunogenic)或免疫反應刺激胜肽的群組，胜肽可互相連接以多種排列（例如，連成一串或部分重疊）。多面體（或編碼出多面體的核酸）可以符合標準免疫步驟被投予，例如至動物，以測試多面體於刺激、增強及/或誘導一免疫反應之功效。

胜肽可被直接連接或經由使用位於側面之序列以形成多面體，且多面體為疫苗之用途為本技術領域所熟知（參見，Thomson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13): 5845-5849, 1995; Gilbert *et al.*, Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson *et al.*, J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn *et al.*, J Exp. Med. 171(1): 299-306, 1990）。製備並含有抗原決定位之不同數目與組合的多面體並為了藉由細胞毒殺性 T 淋巴球的辨認與為了增加免疫反應中之功效將其進行測試。

本發明胜肽可被進一步被連接至其他物質，只要它們維持必不可少之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。此種“其他”物質之說明例子包括，但不限於胜肽、脂質、糖與糖鏈、乙醯基，天然與合成之聚合物等。胜肽可包含修飾，例如醯基化、支鏈氧化或磷酸化，只要修飾不損壞如於此所述胜肽之生物活性。這些種類之修飾可被執行以給予額外之功能（例如，目標功能與傳送功能）或穩定多胜肽。

例如，為了 *in vivo* 增加多胜肽之穩定度，本技術領域已知引入 D-胺基酸、胺基酸模仿物或非天然胺基酸；此內容也適合本發明之多胜肽。可以一些方法分析一多胜肽的穩定度。例如，可使用肽酶與多種生物培養基，例如人類血漿與血清，來測試穩定度（參見，例如 Verhoef *et al.*, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302）。

當本發明胜肽包括一半胱胺酸殘基時，胜肽傾向經由在半胱胺酸之 SH 基之間的雙硫鍵結形成二聚體。因此，本發明胜肽之二聚體也可被包含於本發明胜肽中。

此外，如上所提到，在藉由一、二或數個胺基酸殘基取代、刪除、插入及/或加入之經修飾的胜肽中，可篩選或選擇與原始胜肽相較具有相同或較高之活性的那些。因此本發明也提供一篩選或選擇與原始相較具有相同或較高之活性的經修飾胜肽的方法。例如，方法可包括步驟：

a：將少一個本發明胜肽之胺基酸殘基進行修飾（取代、刪除、插入或添加），

b：確定於步驟(a)修飾之胜肽的活性，與

c：選擇與原始胜肽相較具有相同或較高之活性的胜肽。

此處，活性可包括 MHC 結合活性與抗原呈現細胞或細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。較佳為，胜肽之活性為細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

III. SEMA5B 胜肽之製備

使用熟知之技術可製備本發明之胜肽。例如，藉由重組 DNA 技術或化學合成可以合成方法地製備胜肽。本發明胜肽可單獨合成或為包括兩或多個胜肽之較長多胜肽。可分離此胜肽，即實質上無其他自然發生之宿主細胞蛋白質與其片段或任何其他化學物質地純化或分離。

本發明胜肽可包含修飾，例如糖基化、支鏈氧化或磷酸化，其提供修飾不損壞原始胜肽之生物活性。其他修飾包括可用來，例如增加胜肽之血清半衰期之 D-胺基酸或其他胺基酸模仿物的合併。

藉由根據經選擇之胺基酸序列的化學合成可獲得本發明之胜肽。例如，可被用來合成之一般胜肽合成方法包括：

(i) 胜肽合成 (Peptide Synthesis) Interscience, New York, 1966;

(ii) 蛋白質 (The Proteins), Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

(iii) 胜肽合成 (Peptide Synthesis) (in Japanese), Maruzen Co., 1975;

(iv) 胜肽合成之基礎與實驗 (Basics and Experiment

of Peptide Synthesis) (in Japanese), Maruzen Co., 1985;

(v) 藥學的發展 (Development of Pharmaceuticals) (second volume) (in Japanese), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

(vi) W099/67288; 以及

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118。

或者，藉由適應任何已知產生胜肽之基因工程方法可獲得本發明之胜肽（例如，Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62）。例如，首先製備一適合之載體，其懷有一多核苷酸其編碼出目標胜肽於一可表達的形式中（例如，對應於啟動子序列之調控序列的下游），並將載體轉殖進入適合之宿主細胞。本發明也提供此種載體與宿主細胞。之後培養宿主細胞以產生感興趣之胜肽。使用一 *in vitro* 轉譯系統可 *in vitro* 產生胜肽。

IV. 多核苷酸

本發明提供多核苷酸，其編碼出任何本發明上述之胜肽。本發明之多核苷酸包括來自自然發生之 *SEMA5B* 基因（例如，GenBank Accession No. NM_001031702（序列辨識號：48））的多核苷酸或具有其之保守修飾之核苷酸序

列的那些。此處措辭“保守修飾之核苷酸序列”指序列其編碼出相同或實質上相同之胺基酸序列。由於基因密碼的退化，一大份之功能相同之核酸編碼出任何已知蛋白質。例如，密碼 GCA、GCC、GCG 與 GCU 皆編碼出胺基酸丙胺酸。因此，於藉由一密碼具體指定丙胺酸之每個位置，可改變密碼成為任何上述不會改變編碼出之胜肽的對應密碼。此核酸變化為於本技術領域意指為“沈默變化(silent variation)”，表示保守修飾變體的一種。此處敘述為編碼出一胜肽之每個核酸序列也描述核酸之每種可能的沈默變化。熟悉此技藝人士會立即明白於一核酸中各密碼（除了 AUG，其原本為甲硫胺酸之唯一密碼、與 TGG 其原本為色胺酸之唯一密碼）可被修飾以產生一功能相同分子。因此各所揭露之胜肽編碼核苷酸序列表示與其相關之沈默變化的暗示性揭露。

本發明之多核苷酸可由 DNA、RNA 與其衍生物所組成。如本技術領域所熟知，DNA 分子適合地由鹼基所組成，例如自然發生鹼基 A、T、C 與 G，而 T 於 RNA 中為 U 所取代。熟悉此技藝人士可瞭解非自然發生鹼基也被包含於多核苷酸中。

本發明之多核苷酸可編碼出本發明之多個胜肽，具有或不具有介於中間之胺基酸序列。例如，介於中間之胺基酸序列可提供多核苷酸或經轉譯之胜肽一裂解位（例如，酵素辨認序列）。更進一步而言，本發明之多核苷酸可包括任何額外之序列至編碼出本發明胜肽之編碼序列。例

如，本發明之多核苷酸可為一重組多核苷酸，其包括胜肽表現所需之調控序列，或可為一具有標誌基因與此類之表現載體（質體）。一般而言，可製備此重組多核苷酸，藉由經由使用例如聚合酶與內切酶之一般重組技術的多核苷酸操作。

可使用重組與化學合成技術兩者以產生本發明之多核苷酸。例如，藉由將具有本發明胜肽之編碼序列的多核苷酸插入一適合之載體可產生本發明之多核苷酸，當轉染進入一勝任細胞時，其可被表現。或者，使用 PCR 技術或複製於適合的宿主可將本發明之多核苷酸放大（參見，例如 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989）。或者，使用固態技術如於 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes *et al.*, EMBO J 1984, 3: 801-5 中所敘述，可合成本發明之多核苷酸。

V. 外吐小體(exosomes)

本發明進一步地提供稱為外吐小體的胞間囊泡 (intracellular vesicles)，其呈現形成於本發明之胜肽與人類白血球抗原表面之間的複合物。例如，藉由使用於 Japanese Patent Application Kohyo Publications No. Hei 11-510507 與 W099/03499 所詳述的方法以及使用從接受治療和/或避免之病人所得的抗原表現細胞可製備外吐小體。本發明之外吐小體可如疫苗般地接種，相似於本發明的胜肽。

包括在複合物中的人類白血球抗原形式必須與需要治療及/或預防之個體的人類白血球抗原形式相符。例如，對於日本人而言，HLA-A2，特別是 HLA-A*0201 與 HLA-A*0206 為時常適合的。高度表現於日本人與高加索人之中的 HLA-A2 型之使用有助於獲得有效的結果，且次型，例如 HLA-A*0201 與 HLA-A*0206 提供用途。一般在臨床上，需接受治療之病患的人類白血球抗原形式係進行預先的研究，這可適當地選擇對此抗原具有高度結合親合力的胜肽或經由抗原表現具有細胞毒性 T 淋巴細胞誘發性的胜肽。此外，為了獲得顯示高度結合親合力與細胞毒性 T 淋巴細胞誘發性兩者的胜肽，可以天然產生之 SEMA5B 部分胜肽的胺基酸序列為基礎，執行 1、2 或數個胺基酸的取代、刪除或添加。

當對本發明外吐小體使用 HLA 抗原之 HLA-A2 型時，具有序列辨識號：5、7、27 與 34 之任一個之一胺基酸序列的胜肽具有特別的效用。在一些實施例中，本發明外吐小體表現以 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於它們的表面上。被包含於此類複合物中之 HLA-A2 抗原的典型例子，包括，但不限於 HLA-A*0201 與 HLA-A*0206。

VI. 抗原呈現細胞

本發明也提供抗經分離之原呈現細胞，其表現以 HLA 抗原與本發明胜肽形成的複合物於其表面上。抗原呈現細胞可來自受到治療及/或避免之病患，且藉由其本身或與包括本發明之胜肽、外吐小體或細胞毒殺性 T 淋巴球之其他

藥物結合可被投予如一疫苗。

抗原呈現細胞並不限於特定種類之細胞，且包括樹突細胞、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B細胞與活化之T細胞，已知其表現蛋白質(proteinaceous)抗原於其細胞表面以被淋巴球所辨認。由於樹突細胞為一典型抗原呈現細胞，其於抗原呈現細胞中具最強之細胞毒殺性T淋巴球誘導活性，樹突細胞為適合於本發明之抗原呈現細胞。

例如，藉由誘導來自周邊血液單核細胞之樹突細胞與之後 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 以本發明胜肽接觸（刺激）其可獲得一本發明之抗原呈現細胞。當本發明之胜肽投予至一個體，於個體身體內誘導表現本發明胜肽之抗原呈現細胞。因此，藉由在將本發明胜肽投予至一個體後，自此個體收集抗原呈現細胞可獲得本發明之抗原呈現細胞。或者，藉由將自個體收集之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸可獲得本發明之抗原呈現細胞。

可將本發明之抗原呈現細胞以其本身或結合包括本發明胜肽、外吐小體或細胞毒殺性T淋巴球的其他藥物投予至一個體以誘導於個體中之抗癌免疫反應。例如，*ex vivo* 投予可包括步驟：

a：自一第一個體收集抗原呈現細胞，

b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與本發明之胜肽接觸，以及

c：將步驟 b 之抗原呈現細胞投予一第二個體。

第一個體與第二個體可為相同個體或可為不同個體。自步驟 b 獲得之抗原呈現細胞可被投予一為疫苗，用以治療及/或預防癌症，癌症的例子，包括但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。

本發明也提供製造包括抗原呈現細胞之藥學組合物的方法或製程，其中方法包括將本發明胜肽與藥學上可接受之載體一起混合或配製的步驟。

根據本發明一方面，本發明之抗原呈現細胞具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。在抗原呈現細胞之內容中，用語“具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”意指比起沒有與胜肽接觸之抗原呈現細胞的那些顯示較高之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。藉由包括 *in vitro* 將編碼出本發明胜肽之多核苷酸轉移至抗原呈現細胞的步驟的方法與上述之方法，可製備此種具細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。此經引入之基因可為 DNA 或 RNA 形式。引入方法的例子包括，並無特別限制，各種於此領域一般被執行的方法，可使用例如脂質體轉染(lipofection)、電穿孔法(electroporation)或磷酸鈣方法。更特別地，可執行其如 Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; Published Japanese Translation of International Publication No. 2000-509281 中所述。藉由轉移基因進入抗原呈現細胞，基因遭遇轉錄、轉譯與此類於細胞中，且之後所獲得之蛋白質藉由 MHC Class I 或 Class II 處理，並經由一呈現途

徑進行以與呈現部分胜肽。

在一些實施例中，本發明之抗原呈現細胞為抗原呈現細胞，其表現一 HLA-A2 抗原與本發明之胜肽之複合物於它們的表面上。被包含於此類複合物中之 HLA-A2 抗原的典型例子，包括，但不限於 HLA-A*0201 與 HLA-A*0206。

VII. 細胞毒殺性 T 淋巴球

抗任何本發明胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球增強 *in vivo* 以癌症細胞為標的之免疫反應，且因此可使用為疫苗，相似於胜肽。因此本發明提供經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球其藉由任何之本發明之胜肽專一地被誘導或活化。

可獲得此種細胞毒殺性 T 淋巴球，藉由(1) 將本發明胜肽投予至一個體，(2) 將來自個體之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞或周邊血液單核淋巴球與本發明之胜肽 *in vitro* 接觸（刺激），(3) 將 CD8 陽性細胞或周邊血液單核淋巴球 *in vitro* 與表現 HLA 抗原與胜肽之複合物於它們的表面上之抗原呈現細胞或外吐小體接觸；或(4) 引入編碼出 T 細胞受體(TCR)次單元之兩者的多核苷酸或編碼出 T 細胞受體次單元之各個的多核苷酸，其中 T 細胞受體可與於一細胞表面上之本發明之胜肽與 HLA-A2 抗原的一複合物結合。藉由上述方法可製備要被用於細胞毒殺性 T 淋巴球之製備中的此種抗原呈現細胞或外吐小體。(4)之方法之詳細被敘述於下方“VIII. T 細胞受體(TCR)”的段落中。

本發明細胞毒殺性 T 淋巴球可來自一受到治療及/或

避免之病患，且藉由其身或為了調節作用與包括本發明之胜肽、抗原呈現細胞或外吐小體的其他藥物結合可被投予。所獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球起專一抗目標細胞的作用，而目標細胞其表現本發明胜肽，例如用於誘導之相同胜肽。目標細胞可為細胞其內生性表現 SEMA5B，例如癌細胞，或被以 SEMA5B 基因轉殖之細胞；且由於藉由胜肽刺激表現本發明胜肽於細胞表面之細胞，也可做為經活化之細胞毒殺性 T 淋巴球攻擊的目標。

在一些實施例中，本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球為細胞毒殺性 T 淋巴球其辨認表現 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物的細胞。在細胞毒殺性 T 淋巴球的內容中，措辭“辨認一細胞”意指經由其 TCR 與於細胞表面上之 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物結合，並顯示抗此細胞之特定細胞毒殺性活性。於此“特定細胞毒殺性活性”意指顯示抗表現 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物的細胞，而不對其他細胞。被包含於此類複合物中之 HLA-A2 抗原的典型例子，包括，但不限於 HLA-A*0201 與 HLA-A*0206。

VIII. T 細胞受體 (TCR)

本發明也提供一組合物其包括編碼出 T 細胞受體次單元之兩者的多核苷酸或編碼出 T 細胞受體次單元之各個的多核苷酸，其中 T 細胞受體可與於一細胞表面上之本發明之胜肽與 HLA-A2 抗原的一複合物結合，與其使用方法。此類 T 細胞受體之次單位具有能力形成 T 細胞受體，其授與專一性至抗腫瘤細胞的 T 細胞，腫瘤細胞表現 SEMA5B。

藉由使用本技術領域所知的方法可確認細胞毒殺性 T 淋巴球之 T 細胞受體之 α -與 β -支鏈之各個的多核苷酸，而此細胞毒殺性 T 淋巴球以本發明之胜肽來誘導 W02007/032255 與 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)。例如，喜好以聚合酶鏈鎖反應方法來分析 T 細胞受體次單元。用於分析之聚合酶鏈鎖反應引子可為，例如 5' -R 引子 (5' -gtctaccaggcattcgcttcat-3') 為 5' 端引子 (序列辨識號：50) 與 3-TRa-C 引子 (5' -tcagctggaccacagccgcagcgt-3') 專一於 T 細胞受體 alpha 鏈 C 區 (序列辨識號：51)、3-TRb-C1 引子 (5' -tcagaaatccttttctcttgac-3') 專一於 T 細胞受體 beta 鏈 C1 區 (序列辨識號：52) 或 3-TRbeta-C2 引子 (5' -ctagcctctggaatccttttctctt-3') 專一於 T 細胞受體 beta 鏈 C2 區 (序列辨識號：53) 為 3' 端引子，但不限於其。引出之 T 細胞受體可以高親合力結合表現本發明之胜肽的目標細胞，且視需要 *in vivo* 與 *in vitro* 居中有有效殺死表現本發明之胜肽的目標細胞。

編碼出 T 細胞受體次單元之兩者的多核苷酸或編碼出 T 細胞受體次單元之各個的多核苷酸可合併進入適合之載體，例如反轉錄病毒載體。這些載體為本技術領域所熟知。通常包含其之多核苷酸或載體可被轉移至一 T 細胞 (例如 CD8 陽性 T 細胞)，例如一來自一病患之 T 細胞。有用地，本發明提供一現成 (off-the-shelf) 的組合物允許快速修飾病人所擁有之 T 細胞 (或其他哺乳動物之那些) 以快

速簡單產生具有優秀之癌症細胞殺死特性的經修飾 T 細胞。

抗本發明胜肽之特定的 T 細胞受體為一受體可專一地辨認本發明之胜肽與 HLA 抗原之複合物，當 T 細胞受體於呈現於 T 細胞表面時，給予 T 細胞抗表現本發明之胜肽與 HLA 抗原之複合物之目標細胞的專一活性。藉由任何已知方法可確認上述複合物之專一辨認，而較佳方法包括，例如使用 HLA 分子與本發明胜肽之 HLA 多聚體(multimer)染劑法分析，與 ELISPOT 分析。藉由執行 ELISPOT 分析。藉由執行 ELISPOT 分析，其可確認表現 T 細胞受體於細胞表面上之 T 細胞藉由 T 細胞受體辨認一細胞，且訊息傳送於細胞內。當複合物存在於 T 細胞表面時藉由已知方法也可執行上述複合物可給予一 T 細胞細胞毒性活性的確認。較佳方法包括，例如，抗 HLA 陽性目標細胞之細胞毒性活性測定，例如鉻(chromium)釋放分析。

本發明也提供細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由以編碼出在 HLA-2 存在下與例如序列辨識號：5、7、27 與 34 之 SEMA5B 胜肽結合的 T 細胞受體次單位的核酸轉導來製備。

經轉導之細胞毒殺性 T 淋巴球可 *in vivo* 自引導至癌症細胞，且可藉由熟知的培養方法 *in vitro* 擴張(例如 Kawakami *et al.*, J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。本發明細胞毒殺性 T 淋巴球也可用來形成一免疫組合物，其於一需要治療或保護之病患中之癌症的治療與避免之一或兩者中為有效(W02006/031221)。

IX. 藥學組合物

由於與正常組織相較，SEMA5B 表現於其例子包括食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌之癌症中特別被提高，本發明之胜肽或多核苷酸可用於癌症之治療及/或預防，及/或避免其手術後之復發。因此，本發明提供一藥學試劑或組合物其配製來癌症之治療及/或預防，及/或此類癌症之手術後復發的避免，此類試劑或組合物包括一或多個本發明胜肽或多核苷酸作為活性成分。或者，本發明之胜肽可表現於任何前述外吐小體或細胞表面，例如抗原呈現細胞，以用來作為藥學試劑或組合物。此外，上述細胞毒殺性 T 淋巴球其可辨認可表現本發明胜肽與 HLA 抗原之一複合物，也可用來作為本發明之藥學試劑或組合物的活性成分。因此，本發明提供試劑或組合物，其包括至少一活性成分擇自：

(a) 一或更多之本發明之胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的一或多個多核苷酸；

(c) 一或更多之本發明之抗原呈現細胞或外吐小體；
以及

(d) 一或更多之本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

本發明之藥學試劑與組合物提供使用如一疫苗。在本發明之內容中，措辭“疫苗”（也指一致免疫組合物）意指一組合物，其藉由接種至動物具有改善、增強及/或誘導抗腫瘤免疫力的功能。換句話說，本發明提供用以於一個

體中誘導抗癌免疫反應之藥學試劑或組合物。

本發明之藥學試劑或組合物可用於治療及/或避免癌症，及/或其手術後復發的避免於一個體或病患中，個體或病患包括人類與任何其他哺乳動物，其包括，但不限於小鼠、大鼠、天竺鼠、兔子、貓、狗、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴子、狒狒與黑猩猩，特別是一商業上重要動物或被馴養了的動物。在一些實施例中，本發明之藥學試劑或組合物可被配製來投予至一個體，其 HLA 抗原為 HLA-A2。

在另一實施例中，本發明也提供一活性成分在配製來用於治療或避免癌症之治療及/或避免及/或其手術後之復發之避免的藥學試劑或組合物的製造中的用途，此活性成分擇自：

- (a) 本發明胜肽；
- (b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；
- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；以及
- (d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明更提供一用於治療及/或避免癌症或腫瘤及/或避免其手術後之復發的活性成分，活性成分擇自：

- (a) 本發明胜肽；
- (b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；
- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或

外吐小體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明更提供一製造用以治療及/或避免癌症或腫瘤及/或避免其手術後之復發之藥學組合物或試劑的方法或製程，其中方法或製程包括將一藥學上或生理上可接受之載體與一活性成分一起配製的步驟，活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

在另一實施例中，本發明也提供一製造用以治療及/或避免癌症或腫瘤及/或避免其手術後之復發之藥學組合物或試劑的方法或製程，其中方法或製程包括將一藥學上或生理上可接受之載體與一活性成分一起混合的步驟，其中活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

在另一實施例中，本發明也提供治療及/或避免癌症或

腫瘤及/或避免其手術後之復發的一方法，其中該方法包括投予一個體至少一擇自下列中之活性成分的步驟：

- (a) 本發明胜肽；
- (b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；
- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；以及
- (d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

根據本發明，已發現具有擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之胺基酸序列的胜肽為 HLA-A2 限制之抗原決定位胜肽或候選物，其可於一個體中誘導強而專一之抗表現 HLA-A2 與 SEMA5B 之癌症的免疫反應。因此包括任一具有序列辨識號 5、7、27 與 34 之胺基酸序列之胜肽的藥學試劑或組合物特別適合投予 HLA 抗原為 HLA-A2 之個體。相同的東西提供至包含編碼出任何這些胜肽之多核苷酸（即，本發明之多核苷酸）的藥學試劑或組合物。

由本發明藥學試劑或組合物治療之癌症不限於且包括其中關於 SEMA5B（例如，為過度表現）之任何癌症，其之例子包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。

本發明之藥學試劑或組合物可包括除了上述活性成分外，具有誘導細胞毒殺性 T 淋巴球抗似癌細胞之能力的其他胜肽、編碼出此其他胜肽之其他多核苷酸、其他表現此其他胜肽之細胞或此類。具有誘導細胞毒殺性 T 淋巴球抗

似癌細胞之能力的此類“其他”胜肽的例子，包括，但不限於癌症專一抗原（例如，經確認之腫瘤相關抗原）。

若需要，本發明之藥學試劑或組合物可視需要包括其他治療物質為一活性成分，只要此物質不抑制本發明之活性成分之抗腫瘤功效，活性成分例如本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體、抗原呈現細胞、細胞毒殺性 T 淋巴球。例如，配方可包括抗發炎物質、止痛劑、化學治療與其類似。除了其他治療物質於藥劑其本身中，也可將本發明之藥劑與一或多個其他藥學物質或組合物相繼或同時投予。藥劑與藥學物質或組合物的量依照，例如使用何種藥學物質或組合物、要治療之疾病與投藥的計畫與方式。

熟悉此技藝人士會容易地認可，除了此處特別提及之成分外，本發明之藥學試劑或組合物可包括本技術領域一般之其他試劑、物質或組合物，其具有關於討論中之配方形式（例如，填料(filler)、粘結劑(binder)、稀釋劑(diluent)、賦形劑(excipient)等）。

在本發明一實施例中，本發明之藥學試劑或組合物可被包裝於製造之商品，例如套組，其包含對於要被治療之疾病，例如癌症的病理科況有用之材料。製造之商品可包括具有一標籤之任何本發明藥學試劑或組合物的容器。適合的容器包括瓶、小瓶(vial)與試管。容器可形成自各種材料，例如玻璃或塑膠。於容器上之標籤需指出試劑或組合物為用來治療或避免疾病之一或多個情況。標籤也可指出投藥指示等。

除了上述容器外，套組包括本發明藥學試劑或組合物可視需要更進一步包括一第二容器，其儲藏一藥學上可接受之稀釋液。其可更包括商業或使用者觀點需要之其他材料，包括其他緩衝溶液、稀釋液、濾器、針、注射器與具有使用說明之包裝插入物。

本發明之藥學試劑或組合物若需要可被包裝於一包(pack)或一分配器，其可包含含有活性成分之一或多單位劑量形式。包裝可例如包括金屬或塑膠箔，例如一泡棉箱(blister pack)。包裝或分配器可伴隨著投藥指示。

(1) 藥學組合物包含胜肽作為活性成分

可直接投予本發明胜肽為一藥學試劑或組合物，若需要的話，其已被一般配方方法所配製。在之後的例子，除了本發明胜肽外、若適合可包括載體、賦形劑與原始做為藥物使用之此類而無特別限制。上述載體的例子為滅菌水、生理食鹽水、磷酸緩衝溶液與培養液體(culture fluid)與此類。更進一步而言，若必須，本發明之藥學試劑或組合物可含安定劑、懸液劑、防腐劑、界面活性劑與此類。本發明之藥學試劑或組合物可用來抗癌目的。

可將本發明之胜肽可以組合來製備，其包括兩或更多個本發明之胜肽，以 *in vivo* 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。胜肽組合可為雞尾酒形式或可使用標準技術彼此結合。例如，胜肽可被化學連接或表現如一單一融合多胜肽序列，其可具有一或數個胺基酸為一連結器（例如， Lysine linker: K. S. Kawamura *et al.* J. Immunol. 2002, 168:

5709-5715)。結合之胜肽可為相同或不同。藉由投予本發明之胜肽，藉由 HLA 抗原，高密度呈現胜肽於抗原呈現細胞上，之後對形成於呈現胜肽與 HLA 抗原之間的複合物專一反應的細胞毒殺性 T 淋巴球被誘導。或者，抗原呈現細胞（例如，樹突細胞）可被從一個體移出且之後以本發明胜肽刺激以獲得呈現本發明任何胜肽於其表面上之抗原呈現細胞。可將這些抗原呈現細胞再投予至個體以誘導在個體中之細胞毒殺性 T 淋巴球，且因此可增加了朝向腫瘤相關之內皮細胞的侵犯。

包含一本發明任何胜肽為活性成分之治療及/或避免癌症之藥學試劑或組合物也可包含一佐劑以有效建立細胞免疫力。或者本發明之藥學試劑或組合物可與其他活性成分一起被投予，或以配製成細粒被投予。佐劑指任何化合物、物質或組合物，當與具有免疫活性之蛋白質一起投予（或依次）時，其增強抗蛋白質之免疫反應。可被應用之佐劑，包括於文獻(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)中所描述的那些。示例之佐劑包括磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍亂毒素、沙門氏菌毒素、佛氏不完全佐劑(Incomplete Freund's adjuvant, IFA)、佛氏完全佐劑(Complete Freund's adjuvant, CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W 乳劑與此類，但不限於其。

此外，於微脂體(liposome)配方與細粒配方中，胜肽連結至幾個微米直徑之小珠，且於配方中，可便利地使用連結至胜肽之脂質。

在本發明另一實施例中，本發明胜肽也可以一藥學上可接受之鹽類被投予。鹽類之較佳例子包括具有鹼金屬之鹽、具金屬之鹽、具有機鹼之鹽、具胺之鹽、具有機酸（醋酸、甲酸(formic acid)、丙酸(propionic acid)、富馬酸(fumaric acid)、馬來酸(maleic acid)、琥珀酸(succinic acid)、酒石酸(tartaric acid)、檸檬酸(citric acid)、蘋果酸(malic acid)、草酸(oxalic acid)、苯甲酸(benzoic acid)、甲磺酸(methanesulfonic acid)等）之鹽與具無機酸（鹽酸、磷酸、氫溴酸(hydrobromic acid)、硫酸）之鹽。如此處所使用，“藥學上可接受之鹽類”意指維持化合物生物有效性與特性且其獲自與無機或有機酸或鹼反應。

在一些實施例中，本發明之藥學試劑或組合物包括一成分其啟動細胞毒殺性 T 淋巴球。已定義脂質為可 *in vivo* 啟動抗病毒抗原之細胞毒殺性 T 淋巴球的物質。例如，可將棕櫚酸殘基黏附至離胺酸殘基之 ϵ -與 α -胺基，且之後連結至本發明之一胜肽。之後脂質胜肽可被直接投予於細胞或顆粒中、併入微脂體或乳化於一佐劑中。如脂質啟動細胞毒殺性 T 淋巴球反應之另一例子，*E. coli* 脂蛋白，例如三軟脂酸-S 甘油半胱氨酰-絲氨酰基絲氨酸(tripalmitoyl-S-glycerylcysternyl-seryl-serine) 可使用來啟動細胞毒殺性 T 淋巴球，當共價附加至一合適之胜肽（參見，例如 Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4）。

適合之投藥的方法的例子，包括，但非必須限於，口服、皮膚內、皮下、肌肉注射、骨內(intraosseous)、腹膜(peritoneal)與靜脈內注射或此類，以及全身投藥或局部投藥至標的位置的鄰近區域。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。本發明之胜肽劑量可適合地調整根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法、與此類，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，且可於數天至數個月投藥一次。熟悉此技藝人士可適合地選擇一合適的劑量。

(2) 藥學組合物包含多核苷酸為活性成分

本發明之藥學試劑或組合物也可包含編碼出此處揭露之胜肽的核酸於一可表達之形式中。此處措辭“於一可表達之形式中”意指多核苷酸，當引入一細胞，*in vivo* 會被表現成一誘導抗腫瘤免疫力之多胜肽。在一代表實施例中，感興趣之多核苷酸的核酸序列包括對於表現多核苷酸而言必須之調控要素。可裝配多核苷酸以達到穩定插入目標細胞之基因體（參見，例如敘述 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 for a description of homologous recombination cassette vectors。也參見，例如 Wolff *et al.*, Science 1990, 247: 1465-8; U.S. Patent Nos. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 與 WO 98/04720）。以 DNA 為基礎的輸送技術的例子包括“裸 DNA”、經促進（bupivacaine、聚合物、胜肽居中之）之輸送、陽離子脂

質複合物與顆粒居中之（“基因槍”）或壓力居中之傳送（參見，例如 U.S. Patent No. 5,922,687）。

本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體來表現。表現載體的例子包括減弱病毒宿主，例如牛痘或禽痘。此方法包括使用牛痘病毒，例如為一載體以表現編碼胜肽之核苷酸序列。藉由引入一宿主，此重組之牛痘病毒表現致免疫胜肽且因此引起一免疫反應。於免疫步驟中為有效之牛痘載體與方法敘述於，例如 U.S. Patent No. 4,722,848。另一載體包括 BCG (Bacille Calmette Guerin)。BCG 載體敘述於 Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60 中。對於治療投藥或免疫有用之其他多種載體，例如腺與腺病毒相關之載體、反轉錄病毒載體、傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhi*) 載體、經解毒之炭疽毒素載體與其類似為明顯的。參見，例如 Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85。

輸送多核苷酸進入一病患可為直接，於其例子中，病患直接暴露於一攜帶多核苷酸之載體，或為間接，於其例子中，細胞首先 *in vitro* 以感興趣之多核苷酸轉形，之後將細胞轉殖進入病患。此兩方法分別為已知，為 *in vivo* 與 *ex vivo* 基因治療。

基因治療之方法之大體回顧，參見 Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev

Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215)。應用於本發明之於重組 DNA 技術中一般熟知的方法被於編者 Ausubel *et al.*, in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; 與 Krieger, in Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990 所述。

如胜肽之投藥、多核苷酸之投藥可被執行藉由口服、皮膚內、皮下、靜脈內、肌肉、骨內及/或複膜注射或此類，例如全身投藥或局部投藥至標的位置的鄰近區域提供使用。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。於適合載體中或於以編碼出本發明之胜肽的多核苷酸轉形之細胞中的多核苷酸的劑量可適合地調整，根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法、與此類，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，且可於每數天一次至每數個月一次投藥。熟悉此技藝人士可適合地選擇一合適的劑量。

X. 使用胜肽、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球的方法

可使用本發明之胜肽與多核苷酸來製備或誘導抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球。也可使用本發明之外吐小體與抗原呈現細胞來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。胜肽、多核苷酸、外吐小體與抗原呈現細胞可與任何其他化合物結

合使用，只要額外之化合物不抑制細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。因此，任何上述之本發明藥學試劑或組合物可用來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。除此之外，包括胜肽與多核苷酸的那些也可用來誘導抗原呈現細胞，如下所說明。

(1) 誘導抗原呈現細胞的方法

本發明提供使用本發明之胜肽或多核苷酸來誘導具有高細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法。

本發明之方法包括 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸的步驟。例如，*ex vivo* 將抗原呈現細胞與本發明之胜肽接觸的方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；以及

b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與胜肽接觸。

抗原呈現細胞並不限於特定種類之細胞，且包括樹突細胞、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B 細胞與活化之 T 細胞，已知其表現蛋白質(proteinaceous)抗原於其細胞表面以被淋巴球所辨認。較佳為，可使用樹突細胞，由於它們於抗原呈現細胞中最強的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。本發明任何胜肽可以它們本身或與本發明其他胜肽或源自除了 SEMA5B 之腫瘤相關抗原的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之胜肽結合被使用。

另一方面，當投予本發明胜肽至一個體時，抗原呈現細胞 *in vivo* 與胜肽接觸，且因此於個體之體內誘導具有高細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。因此，本發明之方法包括投予本發明胜肽至一個體以於個體體內

誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的抗原呈現細胞的方法。相似地，當以可表達之形式投予本發明多核苷酸至一個體時，本發明胜肽被表現且 *in vivo* 與抗原呈現細胞接觸，且因此於個體之體內誘導具有高細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。因此，本發明之方法也可包括投予本發明多核苷酸至一個體以於個體體內誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的抗原呈現細胞的方法。措辭“可表達之形式”被描述於上述段落“IX. 藥學組合物，(2) 藥學組合物包含多核苷酸為活性成分”中。

此外，本發明之方法可包括將本發明之多核苷酸引入一抗原呈現細胞以便誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。例如，方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；以及

b：將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入。

可如前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來執行步驟 b。

或者本發明提供一製備一專一誘導抗 SEMA5B 之細胞毒殺性 T 淋巴球活性的抗原呈現細胞的方法，其中該可方法可包括下列步驟之一：

(a) 將抗原呈現細胞與本發明一胜肽 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 接觸；以及

(b) 將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入抗原呈現細胞。

或者，本發明提供誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發

能力之抗原呈現細胞的方法，其中此方法包括擇自下列由下列所組成之步驟：

- (a) 將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸；以及
- (b) 將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入抗原呈現細胞。

本發明方法可於 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 執行。較佳為本發明方法可於 *in vitro* 或 *ex vivo* 執行。用於具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞之誘導的抗原呈現細胞，可較佳為表現 HLA-A2 抗原之抗原呈現細胞。此類抗原呈現細胞可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自其 HLA 抗原為 HLA-A2 之個體獲得的周邊血液單核細胞來製備。藉由本發明所誘導之抗原呈現細胞可為表現本發明胜肽與 HLA 抗原（HLA-A2 抗原）之複合物於它們的表面上之抗原呈現細胞。當藉由本發明方法誘導之抗原呈現細胞被投予至一個體以在此個體中誘發抗癌症免疫反應時，個體較佳為其抗原呈現細胞被取得的同一個。然而，個體可與抗原呈現細胞提供者為不同一個，只要個體具有與抗原呈現細胞提供者相同之 HLA 型。

在另一實施例中，本發明提供用於誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的試劑或組合物，且此類試劑或組合物包括一或多個本發明胜肽或多核苷酸。

在另一實施例中，本發明提供本發明胜肽或編碼出此胜肽之多核苷酸於製造配製來誘導抗原呈現細胞之試劑或組合物中的用途。

或者，本發明更提供本發明胜肽或編碼出此胜肽之多核苷酸對於在誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞中的用途。

(2) 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法

本發明也提供使用本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體或抗原呈現細胞來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法。

本發明也提供使用編碼出 T 細胞受體次單元兩者之一多核苷酸或編碼出 T 細胞受體次單元各個之一多核苷酸來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，其中 T 細胞受體可辨認（結合）呈現於細胞表面上之本發明胜肽與一 HLA 抗原之複合物。較佳為，誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法可包括至少一步驟擇自由下列之中：

a) 將一 CD8 陽性 T 細胞與一抗原呈現細胞及/或一外吐小體接觸，該抗原呈現細胞及/或該外吐小體表現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面，以及

b) 將編碼出 T 細胞受體次單元兩者之一多核苷酸或編碼出 T 細胞受體次單元各個之一多核苷酸引入一 CD8 陽性 T 細胞，其中 T 細胞受體可辨認（結合）呈現於細胞表面上之本發明胜肽與一 HLA 抗原之複合物。

當本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體被投予至一個體時，於個體體內誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且以表現 SEMA5B 之癌細胞為目標之免疫反應的強度增強。因此，本發明之方法可包括將本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體投予至一個體的步驟。

或者，藉由 *ex vivo* 使用它們，也可誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且在誘導細胞毒殺性 T 淋巴球後，經活化之細胞毒殺性 T 淋巴球可返回至個體。例如，方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；

b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與本發明之胜肽接觸；以及

c：將步驟 b 之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞共培養。

於上述步驟 c 中要與 CD8 陽性 T 細胞共培養之抗原呈現細胞也可藉由將一本發明多核苷酸轉移進入抗原呈現細胞，如於前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來製備，然而，本發明並不限於此，且因此包括任何有效表現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於它們之表面上的抗原呈現細胞。

代替上述抗原呈現細胞，可試需要而定使用呈現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上的外吐小體。換句話說，本發明可包括將呈現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面的外吐小體與本發明胜肽共培養之步驟。此種外吐小體可藉由前述於段落“V. 外吐小體”中之方法來製備。

用於細胞毒殺性 T 淋巴球之誘導的抗原呈現細胞或外吐小體可較佳為於它們之表面上呈現本發明胜肽與 HLA-A2 抗原之一複合物。

此外，藉由將編碼出 T 細胞受體次單元兩者之一多核苷酸或編碼出 T 細胞受體次單元各個之一多核苷酸引入 CD8

陽性 T 細胞也可誘導本細胞毒殺性 T 淋巴球，其中 T 細胞受體可與呈現於細胞表面上之本發明胜肽與一 HLA 抗原之一複合物結合。如於前述段落“VIII. T 細胞受體(TCR)”中所述可執行此轉導。

本發明方法可於 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 執行。較佳為本發明方法可於 *in vitro* 或 *ex vivo* 執行。用於細胞毒殺性 T 淋巴球之誘導的 CD8 陽性 T 細胞，可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自一個體獲得的周邊血液單核細胞來製備。在較佳實施例中，CD8 陽性 T 細胞的一提供者可為其 HLA 抗原為 HLA-A2 之個體。藉由本發明方法誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球，其可辨認可表現本發明胜肽與一 HLA 抗原之一複合物於其表面之細胞。當藉由本發明方法誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球被投予至一個體以在此個體中誘發抗癌症免疫反應時，個體較佳為其 CD8 陽性 T 細胞被取得的同一個。然而，個體可與 CD8 陽性 T 細胞提供者為不同一個，只要個體具有與 CD8 陽性 T 細胞提供者相同之 HLA 型。

此外，本發明也提供製造一用以誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之藥學試劑或組合物的方法或製程，其中該方法或製程包括將本發明之胜肽與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。

在另一實施例中，本發明提供用於誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的試劑或組合物，其中試劑或組合物包括本發明一或多個胜肽、本發明一或多個多核苷酸、一或多個抗原呈

現細胞或外吐小體。

在另一實施例中，本發明提供本發明胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體於製造配製來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之試劑或組合物中的用途。

或者，本發明更提供本發明胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體對於在誘導細胞毒殺性 T 淋巴球中的用途。

(3) 誘導免疫反應的方法

又，本發明提供誘導抗 SEMA5B 相關疾病之一免疫反應的方法。適合的疾病包括癌症，其例子包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。

本發明方法可包括投予含任何本發明胜肽或編碼出其之多核苷酸的試劑或組合物的步驟。本發明方法也可包括表現任何之本發明胜肽之外吐小體或抗原呈現細胞的投予。細節參見“IX. 藥學組合物”之項目，特別是敘述本發明試劑與組合物為疫苗之用途的部分。此外，可被使用於本發明誘導免疫反應之方法的本發明外吐小體與抗原呈現細胞，被詳細描述在前之於“V. 外吐小體”、“VI. 抗原呈現細胞”與“X. 使用胜肽、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球的方法”之(1)與(2)的項目。

在較佳實施例中，藉由本發明之方法治療之個體可為一個體，其 HLA 抗原為 HLA-A2。

本發明也提供製造一誘導免疫反應之藥學試劑或組合物的方法或製程，其中該方法可包括將一本發明之胜肽或

多核苷酸與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。

或者，本發明方法可包括投予本發明一疫苗或藥學組合物的步驟，本發明疫苗或藥學組合物包含：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的核酸（多核苷酸）；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；或

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

在本發明內容中，以這些活性成份可治療一過度表現 SEMA5B 之癌症。此類癌症的例子包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。因此，在包括活性成分之疫苗或藥學組合物的投予前，其較佳為確認與相同器官之正常組織相較，SEMA5B 之表現程度於要被治療之細胞或組織中是否被提高。因此，在一實施例中，本發明提供治療（過度）表現 SEMA5B 之癌症的方法，其方法可包括步驟：

i) 測定獲得自具有癌症要治療之個體的細胞或組織中的 SEMA5B 表現程度；

ii) 與正常控制組比較 SEMA5B 表現程度；以及

iii) 投予擇自由上述步驟(a)至(d)所組成之群組的至少一成份至與正常控制組相較具有過度表現 SEMA5B 之癌症的個體。

或者，本發明也提供包含擇自上述(a)至(d)中之群組

的至少一成份的疫苗或藥學組合物，其用於投予至具有過度表現 SEMA5B 之癌症的個體中。換句話說，本發明更提供鑑定要被以本發明 SEMA5B 多胜肽治療之個體的方法，此類方法包括測定來自個體之細胞或組織中的 SEMA5B 表現程度的步驟，其中與基因之正常控制程度相較，此程度增加指出個體具有可以本發明 SEMA5B 多胜肽治療之癌症。本發明鑑定要被治療癌症之個體的方法於以下更詳細敘述。

可將任何源自個體之細胞或組織用於 SEMA5B 表現之測定，只要其包括 SEMA5B 之目標轉錄或轉譯產物。適合樣本的例子包括，但不限於身體組織或液體、例如血液、唾液與尿液。較佳為，生物樣本包含一細胞族群，其包括一上皮細胞，更佳為源自個體之細胞或組織包含一細胞族群，其包括一上皮細胞，更佳為一癌症上皮細胞或一來自被懷疑癌化之組織的上皮細胞。此外，若需要，細胞可自所獲得之身體組織或液體被純化，且之後使用為源自個體之樣本。

要藉由本發明治療之個體較佳為一哺乳類動物。示範之哺乳類動物包括，但不限於，例如，人類、非人類靈長類動物、小鼠、大鼠、狗、貓、馬與牛。

根據本發明，可測定獲得自一個體之細胞或組織中的 SEMA5B 表現程度。使用本技術領域已知方法可於轉錄（核酸）產物程度測定表現程度。例如，藉由雜合方法（例如，北方雜合）使用探針可將 SEMA5B 的 mRNA 定量。可於一晶片、陣列或此類上執行偵測。陣列之使用較佳可為用於偵

測 SEMA5B 表現程度。利用 SEMA5B 的序列資訊，熟悉此技藝人士可製備此種探針。例如，SEMA5B 的 cDNA 可被使用為探針。若需要，可以適合之標誌來標誌探針，例如染劑、螢光物質與同位素，且基因的表現程度可被偵測為雜合標誌的強度。

此外，藉由擴大偵測方法 (amplification-based detection method) (例如，RT-PCR) 使用引子可將 SEMA5B (序列辨識號：49) 的轉錄產物進行定量。根據基因之可獲得序列資訊可製備此種引子。

特別是，用於本方法之探針或引子於嚴厲 (stringent)、適度嚴厲或低嚴厲條件下雜合至 SEMA5B 的 mRNA。如此處使用，措辭“嚴厲 (雜合) 條件”意指在此在條件下探針或引子會雜合至其目標序列，而不是其他序列。嚴厲條件為序列依賴 (sequence-dependent)，且在不同環境下會不同。比起較短之序列，於較高溫度下觀察到較長序列之特定雜合。一般而言，在一定義之離子強度與 pH 下所選擇之嚴格條件的溫度為低於一特定序列之熔點 (T_m) 約 5°C 。 T_m 為溫度 (在一定義之離子強度與 pH 與核酸濃度下)，於其下在平衡下 50% 之與目標序列互補的探針雜合至目標序列。由於目標序列通常存在過量，所以於 T_m ，在平衡下 50% 之探針被佔據。一般而言，嚴苛條件為於其中鹽濃度低於 1.0 M 鈉離子，一般約 0.01 至 1.0 M 鈉離子 (或其他鹽) 於 pH 7.0 至 8.3，且對於短探針或引子 (例如，10 至 50 個核苷酸) 而言溫度為至少約 30°C ，對於較

長探針或引子而言溫度為至少約 60°C。也可以添加去穩定試劑 (destabilizing substances)，例如甲醯胺 (formamide) 來達到嚴苛條件。

本發明之探針或引子一般為一實質上經純化之寡核苷酸。寡核苷酸一般包括核苷酸序列之一區域，其在嚴苛條件下雜合至至少約 2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50 或 25 包括一 SEMA5B 之一核酸之連續意義股 (consecutive sense strand) 核苷酸序列，或包括一 SEMA5B 之一核酸之反意義股 (anti-sense strand) 核苷酸序列，或這些序列之自然發生突變體。特別是，例如，在一較佳實施例中，一於長度具有 5-50 之寡核苷酸可被使用為用來擴大要被偵測之基因的一引子。更佳為，可以於長度具有 15-30b 之一特定大小寡核苷酸探針或引子來偵測 SEMA5B 基因之 mRNA 或 cDNA。大小的範圍始於至少 10 個核苷酸、至少 12 個核苷酸、至少 15 個核苷酸、至少 20 個核苷酸、至少 25 個核苷酸、至少 30 個核苷酸，且探針與引子延伸大小始於 5-10 個核苷酸、10-15 個核苷酸、15-20 個核苷酸、20-25 個核苷酸與 25-30 個核苷酸。在較佳實施例中，寡核苷酸探針或引子的長度可被擇自 15-25。藉由使用此種寡核苷酸探針或引子之用於基因偵測的分析程序、裝置或試劑為本技術領域所熟知（例如，寡核苷酸微陣列或 PCR）。在這些分析中，探針或引子也可包括標籤 (tag) 或連結器 (linker) 序列。此外，可以可偵測之標誌或要被捕捉之親合配體來修飾探針或引子。或者在雜合偵

測程序中，於長度具有少數百的鹼基（例如，約 100-200）至少數千(kilo)（例如，約 1000-2000）之鹼基的多核苷酸可被用於一探針（例如，北方墨點分析或 cDNA 微陣列分析）。

或者，為了本發明之診斷可偵測轉譯產物。例如，可偵測 SEMA5B 蛋白質（序列辨識號：49）或其免疫活性片段之量。測定作為轉譯產物之蛋白質的量的方法包括免疫分析方法，其使用一抗體專一辨認此蛋白質。抗體可為單株或多株。此外，抗體之任何片段或修飾（例如嵌合型抗體(chimeric antibody)、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等）可被用來偵測，只要片段或經修飾之抗體維持對 SEMA5B 蛋白質的結合能力。本發明也提供抗本發明胜肽與其片段的這類抗體。這些用於蛋白質偵測之這些種類的抗體的製備方法為本技術領域所熟知，且任何方法可被使用於本發明中以製備此種抗體與其等同物(equivalent)。

如根據 SEMA5B 基因轉譯產物偵測 SEMA5B 基因之表現程度的另一方法，使用抗 SEMA5B 蛋白質之抗體經由免疫組織化學(immunohistochemical)分析可測量到染色強度。即，於此測量中，強的染色指出經增加之蛋白質的存在/程度，且同時 SEMA5B 基因之高表現程度。

可確認於癌症細胞中，目標基因，例如 SEMA5B 基因的表現程度之為被提升，若從目標基因之控制組程度（例如，於正常細胞中的程度）增加，例如 10%、25%、或 50%，或增加大於 1.1 倍、大於 1.5 倍、大於 2.0 倍、大於 5.0

倍、大於 10.0 倍或更多。

在本發明之內容中，從已知為非癌症一生物樣本測定之一控制程度被意指為“正常控制程度”。另一方面，若從一癌症生物樣本測定之控制程度，其被意指為“癌症控制程度”。可將介於樣本表現程度與控制組程度間的不同標準化至控制核酸的表現程度，例如管家基因(housekeeping gene)，根據細胞之癌症與非癌程度已知其表現程度並無不同。示範之控制基因包括，但不限於 β 肌動蛋白(beta-actin)、甘油醛-3-磷酸去氫酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)與核糖蛋白 P1。

使用先前自一個體/其疾病階段(癌的或非癌的)為已知的個體收集並儲存的樣本控制組之程度可與癌細胞同時測定。此外，獲得自具有癌症要被治療之一器官的非癌區域的正常細胞被使用為正常控制組。或者，根據獲得自分析先前測定之來自其疾病程度已知之個體之樣本中之SEMA5B基因的表現程度的結果，藉由統計方法，可測定控制組之程度。此外，控制組程度可為來自先前測試細胞之表現輪廓的資料庫。並且，根據本發明一方面於一生物樣本中之SEMA5B基因的表現程度，可與多個控制組程度比較，其控制組程度被測定自多個參考樣本。較佳為使用一控制組程度測定自一參考樣本，其來自一組織形式相似於源自個體生物樣本之組織形式。此外，較佳為使用具有已知疾病階段之群組中的SEMA5B基因的表現程度的標準值

(standard value)。標準值可獲得自本技術領域任何已知的方法。例如，平均值 ± 2 標準差或平均值 ± 3 標準差，可被使用為標準值。

本發明之內容中，測定自己知為非癌症之生物樣本的控制組程度被意指為一“正常控制組程度”。另一方面，控制組程度測定自一癌的生物組織，其意指為一“癌的控制組程度”。可將介於樣本表現程度與控制組程度間的不同標準化至控制核酸的表現程度，例如管家基因(housekeeping gene)，根據細胞之癌症與非癌程度已知其表現程度並無不同。示範之控制基因包括，但不限於 β 肌動蛋白(beta-actin)、甘油醛-3-磷酸去氫酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)與核糖蛋白 P1。

當與正常控制組程度相較 SEMA5B 基因的表現程度被增加或相似/等同於癌控制組程度，可診斷個體為具有癌症要被治療。

本發明也提供(i) 診斷是否一懷疑之個體具有要被治療之癌症，及/或(ii) 選擇癌症治療之個體的方法，其方法可包括步驟：

a) 測定在細胞或組織中，SEMA5B 的表現程度，細胞或組織獲得自被懷疑具有要被治療之癌症的個體；

b) 與正常控制組比較 SEMA5B 之表現程度；

c) 若 SEMA5B 之表現程度與正常控制組程度相較被增加，則診斷個體為具有要被治療之癌症；以及

d) 若個體於步驟 c) 中被診斷為具有要被治療之癌症，則選擇要癌症治療之個體。

或者，此種方法可包括步驟：

a) 測定在細胞或組織中，SEMA5B 的表現程度，細胞或組織獲得自被懷疑具有要被治療之癌症的個體；

b) 與癌症控制組比較 SEMA5B 之表現程度；

c) 若 SEMA5B 之表現程度相似或等於癌症控制組程度，則診斷個體為具有要被治療之癌症；以及

d) 若個體於步驟 c) 中被診斷為具有要被治療之癌症，則選擇癌症治療之個體。

本發明也提供一診斷套組以診斷或測定一個體其為或被懷疑為遭受可被以本發明 SEMA5B 多胜肽治療之癌症或於此風險，其也在評估癌症之預後及/或監控癌症免疫治療的能效或應用性中提供效用。較佳為，癌症包括，但不限於食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。更特別的是，套組較佳可包括至少一用以偵測來自個體細胞中之 SEMA5B 基因的表現程度的試劑，此類試劑可被擇自下列群組：

(a) 一試劑用以偵測 SEMA5B 基因的 mRNA；

(b) 一試劑用以偵測 SEMA5B 蛋白質或其免疫活性片段；以及

(c) 一試劑用以偵測 SEMA5B 蛋白質的生物活性。

適合用於 SEMA5B 基因之 mRNA 之偵測的試劑的例子可包括核酸其專一結合或辨認 SEMA5B mRNA，例如，具有對

於 SEMA5B mRNA 之一部分互補的序列的寡核苷酸。這些種類之寡核苷酸以專一於 SEMA5B mRNA 之引子與探針為例。根據本技術領域所熟知的方法可製備這些種類之寡核苷酸。若需要，用以偵測 SEMA5B mRNA 之試劑可被固定於固體基質(matrix)上。此外，大於一個之用以偵測 SEMA5B mRNA 的試劑可被包含於套組中。

另一方面，用於 SEMA5B 蛋白質或其免疫活性片段的偵測之適合試劑的例子可包括對於 SEMA5B 蛋白質或其免疫活性片段的抗體。抗體可為單株或多株。此外，抗體之任何片段或修飾（例如嵌合型抗體(chimeric antibody)、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等）可被用來作為試劑，只要片段或經修飾之抗體維持對 SEMA5B 蛋白質或其免疫活性片段的結合能力。製備用於蛋白質偵測之這些種類之抗體的方法為本技術領域所熟知，且任何方法可被使用於本發明中以製備此種抗體與其等同物(equivalent)。另外，可以訊號產生分子經由直接連接或一間接標誌技術來將抗體進行標誌。標誌與標誌抗體之方法與偵測抗體對其目標的結合為本技術領域所熟知，且任何標誌與方法可被使用於本發明。另外，大於一個之用於偵測 SEMA5B 蛋白質的試劑可被包括於套組中。

套組可包含多於一個之前述試劑。套組更可包括用以結合對於 SEMA5B 基因之探針或對於 SEMA5B 胜肽之抗體的固體基質與試劑、用以培養細胞之培養基與容器、正與負控制組試劑與用以偵測對於 SEMA5B 胜肽之抗體的二次抗

體。例如，獲得自沒有癌症或遭受癌症或否之個體的組織樣本可作為有用的控制組試劑。本發明之套組可更包括商業或使用者角度所需之其他材料，包括緩衝溶液、稀釋液、濾器、注射針、注射器與具有使用之操作指南的包裝插入物（例如，書面、磁帶或 CD-ROM 等）。這些試劑或此類可保持於一具有標誌之容器。適合之容器可包括瓶子、小玻璃瓶(vial)與試驗試管。容器可形成自多樣化之材料，例如玻璃或塑膠。

在本發明一實施例中，當試劑為抗 SEMA5B mRNA 之探針時，試劑可被固定於一固體基質上，例如一多孔條(porous strip)以形成至少一偵測位。多孔條之測量或偵測區可包括複數個位置，各含有一核酸（探針）。一測試條也可含有負及/或正控制組的位置。或者，控制組之位置可位於與測試條分離之一條。視需要而定，不同之偵測位可包含不同量之經固定之核酸，即一較高量於第一偵測位中且一較低含量於隨後之位置中。藉由測試樣本的加入，顯示可偵測訊號之一些位置提供一於樣本中 SEMA5B mRNA 存在之量的定量指示。偵測位可被設置於任何適合之可偵測形狀且一般為在橫跨一測試條之寬度的條狀物或點的形狀中。

本發明之套組可更包括一正控制組樣本或 SEMA5B 標準樣本。藉由收集 SEMA5B 正之樣本可製備本發明之正控制組樣本且之後分析它們的 SEMA5B 程度。或者，可將經純化之 SEMA5B 蛋白質或多核苷酸加至不表現 SEMA5B 之細胞以

形成正樣本(positive sample)或 SEMA5B 標準樣本。於本發明內容中，經純化之 SEMA5B 可為重組蛋白質。正控制組樣本之 SEMA5B 程度為，例如，大於臨界值(cut off value)。

在一實施例中，本發明更提供一診斷套組，包括一蛋白質或其一部份蛋白質，具專一辨認本發明抗體或其片段之能力。

本發明之部分胜肽的例子包括多胜肽，其係由在本發明蛋白質之胺基酸序列中之至少 8 個，較佳 15 個、更佳 20 個連續胺基酸所組成。使用本發明之一蛋白質或一胜肽（多胜肽），藉由偵測於一樣本（例如，血液、組織）中之一抗體可診斷癌症。製備本發明蛋白質與胜肽的方法如上所述。

本發明之診斷癌症之方法，可如上所述藉由測定介於抗 SEMA5B 抗體與其在對應控制組中之的量的差異來被執行。若個體之細胞或組織含有抗基因之表現產物(SEMA5B)抗體且抗 SEMA5B 抗體的量被測定大於在相較於其在正常控制組之程度中的截斷值時，個體被懷疑遭受癌症。

在另一實施例中，本發明之診斷套組可包括本發明之胜肽與結合至其之 HLA 分子。使用抗原胜肽與 HLA 分子偵測抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的方法已被建立（例如，Altman JD *et al.*, Science. 1996, 274(5284): 94-6）。因此，本發明之胜肽與 HLA 分子的複合物可應用至偵測腫瘤抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的偵測方法，藉此使早期偵測癌症之復發及/或轉移為可能。此外，其可被用於適合

包含本發明胜肽為一活性成分之藥物的個體的篩選，或藥物治療功效的評估。

特別是，根據已知方法（參見，例如 Altman JD *et al.*, Science. 1996, 274(5284): 94-6），可製備放射標誌之 HLA 分子與本發明胜肽之寡聚複合物，例如四聚體。伴隨使用複合物，可執行診斷，例如藉由將來自被懷疑遭受癌症之個體的周邊血液淋巴球 (peripheral blood lymphocytes) 中之抗原-胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球進行定量。

本發明更提供藉由使用此處敘述之胜肽抗原決定位，用以評估免疫反應之一方法或診斷試劑。在本發明一實施例中，如上述之 HLA-A2 限制胜肽可被使用為評估或預測一個體之免疫反應的試劑。藉由將免疫抗原 (immunogen) 與免疫活性細胞 (immunocompetent) *in vivo* 或 *in vitro* 接觸可誘導要被評估之免疫反應。在特定實施例中，可導致抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的產生的任何物質或組合物可使用為試劑，而細胞毒殺性 T 淋巴球辨認與結合至胜肽抗原決定位。胜肽試劑可不必須被使用為免疫抗原。用於此類分析之分析系統包括相當新近之技術發展，例如四聚體，對細胞內淋巴激素 (lymphokines) 之染色與干擾素釋放分析或 ELISPOT 分析。在較佳實施例中，用以評估一免疫反應的免疫活性細胞可選擇自周邊血液、周邊血液淋巴球 (PBL)、與周邊血液單核細胞 (PBMC) 中。收集或分離此類免疫活性細胞的方法為本技術領域所熟知。在一替換實施例

中，要被以胜肽試劑接觸之免疫勝任細胞包括抗原呈現細胞，例如樹突細胞。

例如，本發明胜肽可使用於四聚體染色分析以評估為了抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球存在之周邊血液單核細胞，在暴露至腫瘤抗原或一免疫抗原後。HLA 四聚體複合物可被使用來直接顯現抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球（參見，例如 Ogg *et al.*, Science 279: 2103-2106, 1998; 及 Altman *et al.*, Science 174 : 94-96, 1996），並測定於周邊血液單核細胞之樣本中的抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球族群的頻率。使用本發明胜肽之四聚體試劑可如下所述被產生。

在對應之 HLA 重鏈與 $\beta 2$ -微球蛋白存在下重新折疊結合至 HLA 之胜肽，以產生三分子複合物。在複合物中，重鏈之羧端為經生物素化於一預先設計進入蛋白質之位置。之後將卵白素加至複合物以形成由三分子複合物與卵白素 (streptavidin) 所組成之四聚體。藉由以螢光標誌卵白素的方式，可使用四聚體來對抗原呈現細胞染色。之後可鑑定細胞，例如藉由流式細胞技術。此類分析可被用於診斷與預後 (prognostic) 目的。藉由此程序鑑定之細胞也可被用於治療目的。

本發明也提供評估免疫收回反應 (immune recall responses) 之試劑（參見，例如 Bertoni *et al.*, J. Clin. Invest. 100 : 503-513, 1997 與 Penna *et al.*, J Exp. Med. 174 : 1565-1570, 1991），其包括本發明之胜肽。例如，

為了抗原-專一細胞毒殺性 T 淋巴球的存在，使用特定專一胜肽，可分析獲自具有要被治療之癌症之個體的病患 PBMC 樣本。藉由培養 PBMC 與以本發明胜肽刺激細胞可評估含單核細胞之血液樣本。在適合之培養期間後，例如為了細胞毒殺性 T 淋巴球活性，分析經擴張之細胞族群。

胜肽也可使用為評估一疫苗功效之試劑。使用例如上述方法可分析獲自一以一免疫抗原接種之病患的 PBMC。病患為經 HLA 分型，且選擇辨認表現於病患中之對偶基因 (allele) 專一分子的胜肽抗原試劑以分析。藉由於 PBMC 樣本中之抗原決定位-專一細胞毒殺性 T 淋巴球的存在，可指出疫苗之免疫抗原性 (immunogenicity)。本發明之胜肽也用來製造抗體，使用本技術領域已熟知的技術（參見，例如，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; 與 Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989），其可提供使用為診斷、偵測或監測癌症之試劑。此類抗體可包括辨認於 HLA 分子內容中之胜肽的那些，即，結合至胜肽-MHC 複合物的抗體。

本發明胜肽或組合物具有一些額外之用途，其中一些為此處所述。例如，本發明提供診斷或偵測以 SEMA5B 免疫活性胜肽之表現為特徵的一疾病。這些方法包含測定於一生物樣本中之 SEMA5B HLA 結合胜肽的表現或 SEMA5B HLA 結合胜肽之一複合物與 HLA class I 分子。藉由以對於胜肽或複合物之結合作伙伴 (binding partner) 分析可測定或

偵測一胜肽之表現或胜肽與 HLA class I 分子之複合物。在一較佳實施例中，對於胜肽或複合物之結合作伙伴可為一抗體其辨認且專一結合至胜肽。藉由使用 SEMA5B 引子之標準 PCR 放大步驟也可測試於一生物樣本，例如一腫瘤切片中之 SEMA5B 的表現。腫瘤表現之例子於此被呈現且示範之用於 SEMA5B 放大的條件與引子的更進一步揭露可被發現於 W02003/27322 中，其內容藉由提及被合併於此。

較佳為，診斷方法包含將分離自一個體的生物樣本與專一於 SEMA5B HLA 結合胜肽之一試劑接觸以偵測於生物樣本中之 SEMA5B HLA 結合胜肽的存在。如此處所使用“接觸”意指以有效接近試劑方式放置生物樣本且在適合之條件下(例如，濃度、溫度、時間、離子強度)，以允許介於試劑與存在生物樣本中之 SEMA5B HLA 結合胜肽的專一互相作用。一般而言，將試劑接觸生物樣本之條件為熟悉此技藝人士所知之條件以促進介於分子及於生物樣本中之其同類物(cognate)(例如，一蛋白質與其受體同類物、一抗體與其蛋白質抗原同類物、一核酸與其互補序列同類物)之間的專一互相作用。促進介於分子與其同類物之間的專一互相作用的最理想條件敘述於 Low et al 所提出之美國專利號 5,108,921，其內容藉由提及被合併於此。

可在 *in vivo* 或 *in vitro* 之一或兩者執行本發明之診斷方法。因此，在本發明中生物樣本可位於 *in vivo* 或 *in vitro* 中。例如，生物樣本可為一 *in vivo* 組織且專一於 SEMA5B 免疫活性多胜肽的試劑可被用來偵測於組織中此類

分子的存在。或者，可 *in vitro* 收集或分離生物樣本（例如血液樣本、腫瘤切片、組織萃取物）。在一特別較佳實施例中，生物樣本可為一含細胞樣本，更佳為一樣本含有收集自要被診斷或測試之個體的腫瘤細胞。

或者，藉由一方法可執行診斷，此方法藉由以螢光素 (fluorescein) 標誌 HLA 多聚複合物染色允許抗原-專一 T 細胞的直接定量（例如，Altman, J. D. *et al.*, 1996, Science 274 : 94; Altman, J. D. *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 10330）。也已提供細胞內淋巴激素 (lymphokines) 之染色與干擾素釋放分析或 ELISPOT 分析。多聚體染色、細胞內淋巴激素染色與 ELISPOT 分析皆顯露比一般分析靈敏至少多 10 倍 (Murali-Krishna, K. *et al.*, 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. *et al.*, 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. *et al.*, 1998, Curr. Biol. 8: 413)。也可使用五聚體（例如，美國專利公開號 2004- 209295A）、右聚體 (dextramer)（例如，W0 02/072631）、鏈聚體 (streptamer)（例如，Nature medicine 6. 631-637 (2002)）。

因此，在一些實施例中，本發明提供診斷或評估被授予本發明至少一 SEMA5B 胜肽之個體的免疫反應的方法，方法包括步驟：

(a) 在適合誘導專一於免疫原之細胞毒殺性 T 淋巴球的條件下，將免疫原與免疫活性細胞接觸；

(b) 偵測或測定於步驟 (a) 中所誘導之細胞毒殺性 T

淋巴球的誘導程度；以及

(c) 使個體之免疫反應與細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導程度互相關連。

在本發明內容中，免疫原較佳包括(a) 擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中的 SEMA5B 胜肽、(b)具有此種胺基酸序列的胜肽與具有此種胺基酸序列於其中已被以 1、2 或更多胺基酸取代所修飾的胜肽的至少一個。於期間，適合誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球的條件為本技術領域所熟知。例如，可 *in vitro* 培養免疫活性細胞在免疫存在下以誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球。為了誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球，可加入任何刺激因子於細胞培養物中。例如，IL-2 為細胞毒殺性 T 淋巴球誘導之較佳刺激因子。

在一些實施例中，可在治療前、期間及/或後執行監測或評估要被以胜肽癌症治療之個體的免疫反應的步驟。一般而言，在癌症治療的程序中，一再地將免疫原性胜肽投予至要被治療的個體。例如，可每週投予免疫原性胜肽達 3-10 週。因此，在癌症治療程序期間，可評估或監測個體之免疫反應。或者，對於癌症治療之評估或監測的步驟可在治療程序完成時。

根據本發明，當與控制組相較時，經增強之免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導指出要被評估或診斷之個體免疫性地對已被投予之免疫原反應。用以評估免疫反應之適合的控制組包括，例如當免疫活性細胞未與胜肽接觸

或與具有除了任何 SEMA5B 胜肽之胺基酸序列的控制組胜肽（例如，隨機胺基酸序列）接觸時的細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導程度。在一較佳實施例中，藉由將介於投予至個體之各個免疫原間的免疫反應進行比較，以序列專一方式來評估個體之免疫反應。特別是，甚至當將 SEMA5B 胜肽之一些種類的混合物投予至個體時，依據胜肽免疫反應可成多樣化。在此例子中，藉由將介於各個胜肽間的免疫反應進行比較，可確認出對於其個體顯示較高反應之胜肽。

XI. 抗體

本發更提供抗體其結合至本發明胜肽。較佳抗體專一結合至本發明胜肽且不會結合（或微弱結合）至非本發明胜肽。或者抗體結合本發明胜肽與其同源物(homologs)。抗本發明胜肽之抗體可提供用途於癌症診斷與預後分析及成像方法(imaging methodologies)。相似地，對於在癌症病患中也表現或過度表現 SEMA5B 程度而言，此類抗體可提供使用於其他癌症之治療、診斷，及/或預後。此外，細胞內表現之抗體（例如，單鏈抗體）可在治療於其中與 SEMA5B 之表現相關的癌症中提供治療上功效，與 SEMA5B 之表現相關的癌症例子包括，但不限於，食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。

本發明也提供 SEMA5B 蛋白質（序列辨識號：49）或其片段之偵測及/或定量的各種免疫活性分析，SEMA5B 蛋白質（序列辨識號：49）或其片段包括由擇自由序列辨識號：5、7、27 與 34 所組成之群組的多胜肽。此類分析可包括

一或多個具辨認及結合 SEMA5B 蛋白質或其片段之能力之抗 SEMA5B 抗體為適當的。在本發明中，與 SEMA5B 多胜肽結合之抗 SEMA5B 抗體，較佳為辨認一多胜肽，此多胜肽為係由擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中的胺基酸序列所組成。以抑制測試(inhibition test)可確認抗體之結合專一性。其為，在具有擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中的胺基酸序列之任何片段多胜肽存在下，當介於要被分析之抗體與全長之 SEMA5B 胜肽之間的結合被抑制時，其顯示此抗體專一結合至片段。在本發明內容中，在包括，但不限於放射免疫分析(radio-immunoassays)、免疫色層分析技術(immuno-chromatograph technique)、酵素連結免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)、酵素連結免疫螢光分析(enzyme-linked immunofluorescent assays, ELIFA)等之多種本技術領域熟知之免疫分析形式中執行此類免疫分析。

本發明之關於免疫，但非抗體分析也可包括 T 細胞致免疫性分析(immunogenicity assay)(抑制或刺激)與主要組織相容性複合物(major histocompatibility complex, MHC)結合分析。此外，本發明也包括具偵測表現 SEMA5B 之癌症之能力的免疫成像分析，其包括，但不限於使用本發明之經標誌的抗體的放射顯像成像(radio scintigraphic imaging)方法。此類分析在 SEMA5B 表現之癌症偵測、監控與預後中可臨床上提供用途，SEMA5B 表現之癌症的例子，包括，但不限於，食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小

細胞肺癌。

本發明也提供結合至本發明胜肽的抗體。本發明抗體可使用於任何形式中，例如單株或多株抗體，且包括獲得自將動物，例如兔子，以本發明胜肽進行免疫之抗血清、所有類型之多株或單株抗體、人類抗體與由基因重組產生之人源化抗體。

使用為一抗原以獲得一抗體之本發明胜肽可來自任何動物種類，但較佳為來自哺乳動物，例如，人類、老鼠或大鼠，更佳為一人類。人類來源胜肽可獲得自此處揭露之核苷酸或胺基酸序列。

根據本發明，使用為免疫抗原之胜肽可為一完整之蛋白質或部分胜肽之蛋白質。部分胜肽可包括，例如，本發明之一胜肽之胺基(N)端或羧基(C)端片段。

此處，一抗體被定義為一蛋白質其與 SEMA5B 胜肽之全長或片段反應。在一較佳實施例中，本發明之抗體辨認 SEMA5B 片段胜肽，其具有擇自由序列辨識號：5、7、27 與 34 中所組成之群組的胺基酸序列。合成寡胜肽的方法為本技術領域所熟知。在合成後，在使用為免疫抗原(immunogen)前，胜肽可視需要被純化。在本發明中，寡胜肽（例如 9 或 10 員）可與載體結合或連結以增強致免疫性。鑰孔血藍蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin, KLH)被熟知為載體。結合鑰孔血藍蛋白與胜肽的方法為本技術領域所熟知。

或者，可將編碼出本發明一胜肽或其片段的一基因插入一已知的表現載體，其之後被轉形至一宿主細胞，如於

此所敘述。藉由任何標準方法，所需之胜肽或其片段可自宿主細胞之外部或內部被重新獲得，且之後可被使用為一抗原。或者，可將表現胜肽之整個細胞或其細胞萃出物或一化學合成胜肽使用為抗原。

可以抗原將任何哺乳動物進行免疫，但較佳為考慮與用來細胞融合之親代細胞的相容性。一般而言，可使用嚙齒目 (Rodentia)、兔形目 (Lagomorpha) 或靈長目 (Primate)。嚙齒目的動物包括，例如小鼠、大鼠與倉鼠。兔形目的動物包括，例如兔子。靈長目的動物包括，例如狹鼻類 (舊世界猴) 猴子，例如馬來猴 (*Macaca fascicularis*)、獼猴 (rhesus monkey)、聖狒狒 (sacred baboon) 與黑猩猩 (chimpanzees)。

以抗原免疫動物之方法為本技術領域所熟知。抗原之腹腔內注射 (intraperitoneal injection) 或皮下注射 (subcutaneous injection) 為免疫哺乳動物之一標準方法。更特別地，可將抗原稀釋或懸浮於一適合量的磷酸鹽緩衝溶液、生理食鹽水等。若需要，可將抗原懸浮液與適合量之標準佐劑，例如佛氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 混合，製成乳狀液 (emulsion) 並且之後投予至哺乳動物。較佳為其之後投予與適合量之佛氏不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 混合的抗原，每 4 至 21 天。也可使用一適合之載體來免疫。於上述免疫後，藉由為了增加所需之抗體量之標準方法可檢驗血清。

藉由自被檢驗以增加於血清中之所需抗體的經免疫動

物收集血液且藉由以任何一般方法自血液分離血清，可製備抗本發明胜肽之多株抗體。多株抗體可包括含多株抗體的血清，與含自血清分離之多株抗體的部分(fraction)。例如使用與本發明胜肽結合之親合管柱且更進一步使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱純化此部分，可自僅辨認本發明胜肽之部分純化免疫球蛋白 G 或 M。

為了製備單株抗體，如上所述自經以抗原免疫並確認於血清中所需抗體之增加程度的哺乳動物收集免疫細胞且使免疫細胞遭遇細胞融合。用來細胞融合之免疫細胞，較佳為可獲自脾臟。其他要被與上述免疫細胞融合之親代細胞包括，例如，哺乳動物之骨髓瘤(myeloma)，且較佳為具有以藥物篩選之融合細胞之獲得特性的骨髓瘤細胞。

根據已知方法，例如 Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))的方法，可將上述免疫細胞與骨髓瘤細胞融合。

獲自細胞融合之產生的融合瘤，藉由將它們培養於標準篩選培養基，例如 HAT 培養基（含亞黃嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶(thymidine)之培養基），可被篩選。通常持續細胞培養於 HAT 培養基數天至數週，時間為允許除了所需融合瘤外之其他細胞（非融合細胞）死亡。之後，可執行標準限制稀釋以篩選並複製產生所需抗體之融合瘤。

除了於其中為了製備融合瘤、以一抗原免疫一非人類動物的上述方法，可以胜肽、表現胜肽之細胞或其細胞萃

取物 *in vitro* 免疫人類淋巴細胞，例如被 EB 病毒感染的
那些。之後，將經免疫之淋巴細胞與具不明確分裂能力之
來自人類之骨髓瘤，例如 U266 融合，以產生一所需人類抗
體之融合瘤，所需之人類抗體可與可被獲得之胜肽結合（日
本專利公開號 Sho 63-17688）。

將所獲得之融合瘤轉植進入小鼠之腹腔且萃取腹水。
可純化所獲得之單株抗體，藉由例如硫酸銨沉澱、一蛋白
質 A 或蛋白質 G 管柱、DEAE 離子交換色層分析或一與本發
明胜肽結合之親和管柱。本發明抗體不只可被使用來純化
與偵測本發明胜肽，也可作為本發明胜肽之促進劑與拮抗
劑的候選物。

或者，一產生抗體之免疫細胞，例如一經免疫之淋巴
細胞可藉由一致癌基因以永生且被使用來製備單株抗體。

也可使用基因工程技術來重組製備因此獲得之單株抗
體（參見，例如 Borrebaeck and Larrick, Therapeutic
Monoclonal Antibodies, published in the United
Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)）。例如，
一編碼出抗體的 DNA 可自一免疫細胞，例如產生抗體之一
融合瘤或一經免疫的淋巴細胞被複製，插入一適合之載
體，且引入一宿主細胞以製備重組抗體。本發明也提供如
上述製備之重組抗體。

此外，本發明抗體可為一抗體之片段或經修飾之抗
體，只要其結合一或多個本發明之胜肽。例如，抗體片段
可為 Fab、F(ab')₂、Fv 或單鏈 Fv (scFv)，於其中來自重

與輕鏈的 Fv 片段藉由合適的連結器來連接(Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。更特別是，藉由以酵素例如木瓜酵素或胃蛋白酶處理抗體可產生抗體片段。或者，編碼出抗體之基因可被構築、插入一表現載體且表現於一適合的宿主細胞中(參見，例如 Co *et al.*, J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux *et al.*, Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991))。

藉由與各種分子，例如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)結合可修飾抗體。本發明提供此類經修飾之抗體。藉由化學修飾一抗體可獲得經修飾之抗體。這些修飾方法為本技術領域中所常見。

或者，本發明之抗體可被獲得為嵌合抗體，介於來自非人抗體之可變區與來自人類抗體之固定區之間，或為人源化抗體，包括來自非人抗體之互補決定區、架構作用區(frame work region, FR)與來自人類抗體之固定區。根據已知方法可製備此類抗體。藉由齧齒類互補決定區之序列取代人類抗體對應之互補序列可執行人源化(參見，例如 Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988))。因此，此類人源化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整之人類可變區已被來自非人種類之對應序列取代。

也可使用包括除了架構作用區與固定區尚有人類可變區的全人類抗體。使用各種本技術領域所知的技術可產生此類抗體。例如，*in vitro* 方法包括呈現於噬菌體上之人類抗體片段的重組資料庫的使用（例如，Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)）。相似地，藉由將人類免疫球蛋白基因座(*loci*) 引入轉殖動物，例如於其中內生免疫球蛋白基因已被部分或完全去活化的小鼠，可製造人類抗體。此方法被敘述，例如於美國專利號 6,150,584, 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

獲自上述之抗體可被純化至同質(*homogeneity*)。例如，根據用於一般蛋白質的分離與純化方法可執行抗體之分離與純化。例如，藉由合適地選擇與結合管柱色層分析，例如親合管柱、過濾、超過濾、鹽析、透析、對鈉十二烷基的硫酸鹽聚丙烯酰胺凝膠電泳(*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)、等電聚焦法(*isoelectric focusing*)的使用可分開與分離抗體 (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))，但不限於此。蛋白質 A 管柱與蛋白質 G 管柱可被使用為親合管柱。要被使用之示範的蛋白質 A 管柱包括，例如 Hyper D、POROS 與 Sepharose F.F. (*Pharmacia*)。

除了親合，示例之色層分析包括，例如離子交換色層分析、疏水色層分析、膠體過濾、逆向色層分析、吸附色

層分析等 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。藉由液相色層分析，例如 HPLC 與 FPLC 可執行色層分析步驟。

例如，可使用吸收之測量、酵素連結免疫吸附分析 (ELISA)、酵素免疫分析 (EIA)、放射免疫分析 (RIA) 及 / 或免疫螢光以測量本發明抗體之抗原結合活性。在酵素連結免疫吸附分析中，本發明抗體為固定於一培養盤上，提供本發明胜肽至一培養盤，且之後提供含所需抗體之樣本，如，產生抗體之細胞的培養懸浮液或經純化的抗體。之後，提供辨認第一抗體且被標誌酵素，例如鹼性磷酸酶之第二抗體，且之後培養培養盤。接著在清洗後，將酵素受質，例如對硝基苯磷酸 (p-nitrophenyl phosphate)，加至培養盤，並測量吸收以評估樣本之抗原結合活性。胜肽之片段，例如 C 端或 N 端之片段可被使用為抗原以評估抗體結合活性。根據本發明，可使用 BIAcore (Pharmacia) 來評估抗體的活性。

上述方法允許本發明胜肽之偵測或測量，藉由露出本發明抗體至假定含本發明胜肽之樣本並偵測或測量由抗體與胜肽所形成之免疫複合物。

由於根據本發明之胜肽偵測或測量方法可專一偵測或測量胜肽，方法可提供效用於在使用胜肽之各種實驗中。

XII. 載體與宿主細胞

本發明也提供載體與宿主細胞，於其中將編碼出本發明胜肽之核苷酸引入。本發明之載體可提供效用以維持本發明核苷酸，特別是 DNA 於宿主細胞以表現本發明胜肽，或為基因治療來投予本發明核苷酸。

當 *E. coli* 為宿主細胞且載體被放大且大量製造於 *E. coli* (例如，JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1Blue) 中時，載體應具有要被放大於 *E. coli* 中之“ori”與篩選轉形 *E. coli* 之標誌基因 (例如，藉由例如安比西林 (ampicillin)、四環黴素 (tetracycline)、卡那黴素 (kanamycin)、氯黴素 (chloramphenicol) 或類似物之藥物篩選之一抗藥基因)。例如，可使用 M13-系列載體、pUC-系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。此外，pGEM-T、pDIRECT 與 pT7 也可被用來次複製與萃取 cDNA 與上述載體。當載體被用來產生本發明蛋白質時，一表現載體可提供效用。例如，要被表現於 *E. coli* 中之一表現載體應具有上述特徵以被放大於 *E. coli* 中。當使用 *E. coli*，例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1 Blue 為宿主細胞時，載體應具有啟動子 (promoter)，例如 lacZ 啟動子 (Ward *et al.*, Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), araB promoter (Better *et al.*, Science 240: 1041-3 (1988))、T7 啟動子或類似物，其可有效表現所需基因於 *E. coli* 中。基於那方面，可使用，例如 pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen)、pEGFP 與 pET (於此例子，宿主較佳為 BL21，其表現 T7 RNA 聚合

酶)，取代上述載體。另外，載體也可含用於胜肽分泌之訊號序列。一引導要被分泌之胜肽至 *E. coli* 的胞膜間區 (periplasm) 的示範之訊號序列為 *pelB* 訊號序列 (Lei et al., *J Bacteriol* 169: 4379 (1987))。將載體引入目標宿主細胞的方式包括，例如，氯化鈣方法，與電穿孔 (electroporation) 方法。

除了 *E. coli*，例如來自哺乳動物之表現載體（例如 *pcDNA3* (Invitrogen) 與 *pEGF-BOS* (*Nucleic Acids Res* 18(17): 5322 (1990))，*pEF*，*pCDM8*)、來自昆蟲細胞之表現載體（例如，"Bac-to-BAC 桿狀病毒表現系統 (baculovirus expression system)" (GIBCO BRL)、*pBacPAK8*)、來自植物之表現載體（例如，*pMH1*、*pMH2*)、來自動物病毒之表現載體（例如，*pHSV*、*pMV*、*pAdexLcw*)、來自反轉錄病毒之表現載體（例如，*pZIpneo*)、來自酵母菌之表現載體（例如，"Pichia Expression Kit" (Invitrogen)、*pNV11*、*SP-Q01*) 與來自枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 之表現載體（例如，*pPL608*，*pKTH50*) 可被用來產生本發明之多胜肽。

為了在於動物細胞，例如 *CHO*、*COS* 或 *NIH3T3* 細胞中表現載體，載體應攜帶表現於此類細胞中所必須的啟動子，例如 *SV40* 啟動子 (Mulligan et al., *Nature* 277: 108 (1979))、*MMLV-LTR* 啟動子、*EF1 alpha* 啟動子 (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res* 18: 5322 (1990))、*CMV* 啟動子等，與篩選轉形物的標誌基因（例如藉由藥物篩選（例

如，新黴素(neomycin)、G418之抗藥基因)較佳。具有這些載體特徵之已知載體的例子包括，例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV與 pOP13。

於此之後，本發明被詳細描述關於實施例。然而，儘管下述材料方法與例子於製造與使用本發明特定實施例中可用來協助熟悉此技藝人士，然而其僅打算說明本發明之態樣，且因此不限制本發明之範圍。熟悉此技藝人士會容易地認可相似或等同於在此敘述之那些的方法與材料可被使用於本發明之實施或測試中。

【實施例】

材料與方法

細胞株

T2、HLA-A*0201陽性人類B淋巴母細胞株、COS7、非洲綠猴腎細胞株為自ATCC所購得。

來自SEMA5B之胜肽的候選物選擇

使 用 結 合 預 測 軟 體

“NetMHC3.0” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004))預測來自SEMA5B之9員與10員胜肽，其結合至HLA-A*0201分子。這些胜肽係根據一標準固相合成方法由Biosynthesis (Lewisville, Texas)來合成且藉由逆相高效能液體層析

(reversed phase high performance liquid chromatography, HPLC)來純化。分別藉由分析型 HPLC 與質譜分析確認這些胜肽之純度 ($> 90\%$) 與身份 (identity)。將胜肽溶解於二甲基亞砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) 中於 20 mg/ml 且儲存於 -80°C 。

In vitro 細胞毒殺性 T 淋巴球誘導

使用來自單核白血球之樹突細胞做為抗原呈現細胞以誘導抗表現於人類白血球組織抗原 (HLA) 上之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球反應。*In vitro* 產生樹突細胞如別處所述 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。特別地，由 Ficoll-Paque plus (Pharmacia) 溶液分離自一正常自願者 (HLA-A*0201 陽性) 之周邊血液單核細胞，藉由貼附至一塑膠組織培養盤 (Becton Dickinson) 來分離以豐富其如一單核白血球部分。將經豐富單核白血球之族群培養在 1000 U/ml 之人類顆粒-巨噬細胞群落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (R&D System) 與 1000 U/ml 之白細胞介素 (interleukin, IL)-4 (R&D System) 存在下於含 2% 之熱去活性自身取得血清 (autologous serum, AS) 之 AIM-V 培養基 (Invitrogen) 中。培養 7 天後，於 AIM-V 培養基中，於 $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ 之 β -2 微球蛋白 (beta 2-microglobulin) 存在下以 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 之各合成胜肽脈衝 (pulsed) 細胞激素誘導之樹突細胞 3 小時於 37°C 。所產生之細胞顯示表現樹

突細胞相關分子，例如 CD80、CD83、CD86 與 HLA Class II 於其細胞表面（資料未顯示）。之後以 X 光-射線 (20 Gy) 將這些胜肽脈衝之樹突細胞去活性且將其以 1：20 之比例與自身取得 CD8 陽性 T 細胞混合，CD8 陽性 T 細胞藉由以 CD8 Positive Isolation Kit (Dyna1) 正選擇獲得。這些培養物設置於 48 孔盤 (Corning)；各孔含 1.5×10^4 胜肽脈衝之樹突細胞、 3×10^5 CD8 陽性 T 細胞與 10 ng/ml 之 IL-7 (R&D System) 於 0.5 ml 之 AIM-V/2% 自身取得血清培養基中。三天之後，以 IL-2 (CHIRON) 添加至培養物至終濃度為 20 IU/ml。第 7 天與第 14 天更以自身取得胜肽脈衝之樹突細胞進一步刺激 T 細胞。以與上述相同之方法每次製備樹突細胞。於第 21 天，第三輪之胜肽刺激後，將細胞毒殺性 T 淋巴球進行抗胜肽脈衝之 T2 細胞測試 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

細胞毒殺性 T 淋巴球擴張步驟

使用與由 Riddell et al. (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23) 所敘述之相似方法於培養中擴張細胞毒殺性 T 淋巴球。全部 5×10^4 細胞毒殺性

T 淋巴球懸浮於 25 ml 之含有兩種人類 B 類淋巴母細胞株之 AIM-V/5% 自身取得血清培養基，由 MMC 去活化，在 40 ng/ml 之抗-CD3 單株抗體(Pharmlingen)存在下。在開始培養 1 天後，120 IU/ml 之 IL-2 加入培養中。於第 5、8、11 天以新鮮之含 30 IU/ml 之 IL-2 的 AIM-V/5% 自身取得血清培養基提供給培養物(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

細胞毒殺性 T 淋巴球複製(clone)的建立

執行稀釋以具有 0.3、1 與 3 細胞毒殺性 T 淋巴球/孔於 96 圓底(round-bottomed)微效價盤(Nalge Nunc International)中。細胞毒殺性 T 淋巴球與 1×10^4 細胞/孔之兩種人類 B 類淋巴母細胞株、30 ng/ml 之抗-CD3 抗體與 125 U/ml 之 IL-2 於全部 150 μ l /孔之含 5% 自身取得之血清的 AIM-V 培養基中一起培養。10 天後將 50 μ l /孔之 IL-2 加入培養基中以達到 125 U/ml IL-2 之最終濃度。於第 14 天測試細胞毒殺性 T 淋巴球之活性，且使用上述相同方法擴張細胞毒殺性 T 淋巴球複製(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性

為了測試專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，執行 IFN- γ 酵素結合免疫斑點 (ELISPOT) 分析與 IFN- γ 酵素結合免疫吸附 (ELISA) 分析。製備胜肽脈衝之 T2 (1×10^4 /孔) 為刺激細胞 (stimulator cell)。培養之細胞於 48 孔盤中，細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與細胞毒殺性 T 淋巴球複製 (clone) 做為應答細胞 (responder cell)。在製造商步驟下執行 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析與 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析。

強有力地表現目標基因與 HLA-A02 任一或兩者的細胞的建立

藉由 PCR 將編碼出目標基因之開放讀框或 HLA-A*0201 的 cDNA 放大。將 PCR 放大產物選殖進一表現載體。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen)，根據製造商建議步驟將質體轉染進 COS7，其為 HLA-A*0201 無效細胞株。於自轉染後 2 天，以 versene (Invitrogen) 收集經轉染的細胞且使用為細胞毒殺性 T 淋巴球活性分析之刺激細胞 (stimulator cell) (5×10^4 細胞/孔)。

結果

於癌症中增強之 SEMA5B 表現

使用 c-DNA 微陣列獲得自各種癌症之廣泛基因表現概況 (profile) 顯示 SEMA5B (GenBank Accession No. NM_001031702; 序列辨識號: 48) 被提升。當與正常對應組織比較時，食道癌 2 個有 1 個、非小細胞肺癌 1 個有 1

個、腎細胞癌 17 個有 14 個與小細胞肺癌 4 個有 4 個，有根據地提升 SEMA5B 表現（表 1）。

表 1、與正常對應組織比較，於癌症組織中觀察到 SEMA5B 之向上調控之例子的比例

癌症 / 腫瘤	Ratio
食道癌	1 / 2
非小細胞肺癌	1 / 1
腎細胞癌	14 / 17
小細胞肺癌	4 / 4

來自 SEMA5B 之 HLA-A02 結合胜肽的預測

表 2a 與 2b 以高結合親和力之順序顯示 SEMA5B 之 HLA-A02 結合 9 員與 10 員胜肽。總共 47 個具有潛在 HLA-A02 結合能力之胜肽被選擇且將其試驗以確定抗原決定位胜肽。

表 2a、來自 SEMA5B 之 HLA-A02 結合 9 員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
330	FLLEDTWTT	8	1
450	LMSEAVQPV	9	2
69	LLLPSLTLL	13	3
1045	FLGSGLLTL	14	4
70	LLPSLTLLV	17	5
287	FVAAYDIGL	17	6
1049	GLLTLAVYL	18	7
59	MVLAGPLAV	19	8
447	RLFLMSEAV	28	9
592	SLWTQNITA	41	10
281	WLNEPNFVA	86	11
52	RTAEGPIMV	87	12
543	GLRDGVLRV	90	13
24	QQLRCGWTV	91	14

35	WLLSLVRGL	99	15
313	TVYSRVARV	99	16
155	SLLQATEWA	103	17
648	GLDCLGPAI	113	18
68	SLLLPSLTL	154	19
218	RTIEKINGV	165	20
43	LLPCLPPGA	204	21
148	RLSLANVSL	233	22
31	TVGGWLLSL	311	23
590	NMSLWTQNI	373	24

表 2b、來自 SEMA5B 之 HLA-A02 結合 10 員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
449	FLMSEAVQPV	5	25
145	YLFRLSLANV	8	26
69	LLLPSLTLLV	13	27
1045	FLGSGLLTLA	31	28
58	IMVLAGPLAV	38	29
533	ILHSARALFV	47	30
42	GLLPCLPPGA	49	31
68	SLLLPSLTLL	67	32
508	SLHGCYLEEL	75	33
370	LIYGVFTTNV	103	34
539	ALFVGLRDGV	113	35
38	SLVRGLLPCL	144	36
441	SLQDAQRLFL	158	37
35	WLLSLVRGLL	191	38
484	TLYHVLYIGT	353	39
137	QLIVGARNYL	416	40
148	RLSLANVSLL	446	41
479	VQAKDTLYHV	525	42
243	SQGELYAATV	531	43
106	VAFEDLQPWV	614	44
60	VLAGPLAVSL	788	45
281	WLNEPNFVAA	1908	46
592	SLWTQNITAC	7017	47

起始位置指自 SEMA5B 之 N 端的胺基酸殘基數目。

結合分離常數[Kd (nM)]為來自 “NetMHC3.0”。

以 HLA- A* 0201 限制之來自 SEMA5B 之預測胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球

根據如敘述於“材料與方法”中之步驟產生對於那些源自 SEMA5B 之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析來偵測胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（第 1 圖）。其顯示與控制組孔洞相較，以 SEMA5B-A02-9-70（序列辨識號：5）刺激之孔洞編號 #1 (a)、以 SEMA5B-A02-9-1049（序列辨識號：7）刺激之孔洞編號 #7 (b)、以 SEMA5B-A02-10-69（序列辨識號：27）刺激之孔洞編號 #5 (c) 與以 SEMA5B-A02-10-370（序列辨識號：34）刺激之孔洞編號 #5 (d) 顯示強而有力的 IFN- γ 產生。另一方面，藉由以顯示於表 2a 與 2b 中之其他胜肽刺激，沒有偵測到專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，儘管那些胜肽具有與 HLA-A*0201 之可能結合活性。如負資料之一典型例子，其沒有顯示來自以 SEMA5B-A02-9-59（序列辨識號：8）刺激的細胞毒殺性 T 淋巴球的專一 IFN- γ 產生 (e)。結果，其指出，選擇出源自 SEMA5B 之 4 個胜肽為可誘導強而有力之細胞毒殺性 T 淋巴球的胜肽。

抗 SEMA5B 衍生胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與複製的建立

於 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析中顯示胜肽-專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性之於以 SEMA5B-A02-9-70（序列辨識號：5）刺激之孔洞編號 #1 (a)、以 SEMA5B-A02-10-69（序列辨識號：27）刺激之孔洞編號 #5 (b) 與以 SEMA5B-A02-10-370（序列辨識號：34）刺激之孔洞編號 #5 (c) 中的細胞被擴張並建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。藉

由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附來測量這些細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的細胞毒殺性 T 淋巴球活性（第 2 圖）。其顯示與無胜肽脈衝之目標細胞相較，細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強的抗以對應胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生。此外，藉由如於“材料與方法”中所述之來自細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的限制稀釋建立細胞毒殺性 T 淋巴球複製，且藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附測量來自抗經各胜肽脈衝之目標細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的 IFN- γ 產生。從以 SEMA5B-A02-9-70（序列辨識號：5）（a）、SEMA5B-A02-10-69（序列辨識號：27）（b）或 SEMA5B-A02-10-370（序列辨識號：34）（c）刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球複製觀察出強的 IFN- γ 產生（第 3 圖）。抗外生表現 SEMA5B 與 HLA-A*0201 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性

檢驗經提升抗 SEMA5B-A02-10-69（序列辨識號：27）胜肽之所建立的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株其對於辨認表現 SEMA5B 與 HLA-A*0201 分子之目標細胞的能力。以全長之 SEMA5B 與 HLA-A*0201 基因兩者轉染之 COS7 細胞（對於表現 SEMA5B 與 HLA-A*0201 基因之目標細胞的特定模式）被製備為刺激細胞（stimulator cell），而以全長 SEMA5B 或 HLA-A*0201 之一轉染之 COS7 細胞被使用為控制組。於第 4 圖中，以 SEMA5B-A02-10-69（序列辨識號：27）刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強的抗表現 SEMA5B 與 HLA-A*0201 兩者之 COS7 細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球活

性。另一方面，沒有偵測到抗控制組之顯著專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。因此，這些資料清楚證明 SEMA5B-A02-10-69 (序列辨識號：27) 胜肽被內生地處理且表現於具有 HLA-A*0201 分子之目標細胞上且由細胞毒殺性 T 淋巴球所辨認。這些結果指出此源自 *SEMA5B* 之胜肽可為有效的以提供對於具 SEMA5B 表現之腫瘤之病患的癌症疫苗。

抗原胜肽之同源分析

以 SEMA5B-A02-9-70 (序列辨識號：5)、SEMA5B-A02-9-1049 (序列辨識號：7)、SEMA5B-A02-10-69 (序列辨識號：27) 與 SEMA5B-A02-10-370 (序列辨識號：34) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球顯示顯著且專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。此結果可能起因於 SEMA5B-A02-9-70 (序列辨識號：5)、SEMA5B-A02-9-1049 (序列辨識號：7)、SEMA5B-A02-10-69 (序列辨識號：27) 與 SEMA5B-A02-10-370 (序列辨識號：34) 之序列為與源自己知使人類免疫系統敏感之其他分子的胜肽同源的事實。為了排除此可能性，對於使用為關鍵字向 BLAST 演算法 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 查詢之這些胜肽序列執行同源性分析，而 BLAST 演算法顯示沒有序列顯示顯著之同源性。同源性分析之結果指出 SEMA5B-A02-9-70 (序列辨識號：5)、SEMA5B-A02-9-1049 (序列辨識號：7)、SEMA5B-A02-10-69 (序列辨識號：27) 與 SEMA5B-A02-10-370 (序列辨識號：34) 之序列為獨特的，

且因此只有很小可能性，對於我們最佳知識而言，此分子會對於一些非相關分子提高非計畫中之免疫反應。

產業利用性

本發明提供新的腫瘤相關抗原，特別是來自 SEMA5B 的那些，其可誘導強且專一的抗腫瘤免疫反應，且對於癌症形式之廣泛多樣化而言具有應用性。此腫瘤相關抗原可提供用途為抗與 SEMA5B 相關之疾病的胜肽疫苗，與 SEMA5B 相關之疾病，例如癌症，更特別是食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。

當於此詳述本發明與提及其特定實施例時，需瞭解的是，前述敘述本質為示範與解釋且意為說明本發明與其較佳實施例。於例行實驗之中，熟悉此技藝人士可立即瞭解在不脫離本發明之精神下其可實行各種改變與修飾，其邊界與範圍被所附申請專利範圍所定義。

【圖式簡單說明】

第 1 圖由一系列照片(a)至(e)所組成，其顯示在以來自 SEMA5B 之胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球上之 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析(ELISPOT)的結果。分別與控制組相較，以 SEMA5B-A02-9-70 (序列辨識號：5) 刺激之於孔洞編號#1 中(a)、以 SEMA5B-A02-9-1049 (序列辨識號：7) 刺激之於孔洞編號#7 中(b)、以 SEMA5B-A02-10-69 (序列辨識號：27) 刺激之於孔洞編號#5 中(c)與以

SEMA5B-A02-10-370 (序列辨識號：34) 刺激之於孔洞編號 #5 中 (d) 的細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強的 IFN- γ 產生。於這些照片之孔洞上的正方形指出來自對應之孔洞的細胞被擴張來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。相對的，如負資料的典型例子，不顯示從以 SEMA5B-A02-9-59 (序列辨識號：8) (e) 刺激的細胞毒殺性 T 淋巴球之專一的 IFN- γ 產生。於圖中，“+” 指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-” 指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 2 圖由一系列線圖 (a) 至 (c) 所組成，其顯示 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析之結果，IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析之結果顯示 (a) SEMA5B-A02-9-70 (序列辨識號：5)、(b) SEMA5B-A02-10-69 (序列辨識號：27) 與 (c) SEMA5B-A02-10-370 (序列辨識號：34) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的 IFN- γ 產生。藉由 IFN- γ 酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 來測量細胞毒殺性 T 淋巴球產生之 IFN- γ 的量。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強而有力之 IFN- γ 產生。於圖中，“+” 指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-” 指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。R/S 比意指應答細胞 (responder cell) (細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株) 與刺激細胞之數目的比。

第 3 圖由一系列線圖 (a) 至 (c) 所組成，其示藉由來自

以 (a) SEMA5B-A02-9-70 (序列辨識號：5)、(b) SEMA5B-A02-10-69 (序列辨識號：27) 與 (c) SEMA5B-A02-10-370 (序列辨識號：34) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的限制稀釋所建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的 IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激所建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製顯示強而有力之 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以各胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。R/S 比意指應答細胞（細胞毒殺性 T 淋巴球複製(clone)）與刺激細胞之數目的比。

第 4 圖為一線圖，其顯示抗外生表現 SEMA5B 與 HLA-A*0201 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性。將以 HLA-A*0201 或全長之 SEMA5B 基因轉染之 COS7 細胞製備為控制組。以 SEMA5B-A02-10-69 (序列辨識號：27) 建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示抗以 SEMA5B 與 HLA-A*0201 兩者轉染之 COS7 細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（黑色三角形）。另一方面，沒有偵測到顯著專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，其抗表現 HLA-A*0201（白色三角形）或 SEMA5B（白色圓形）任一的目標細胞。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 腫瘤療法. 科學股份有限公司

<120> SEMA5B 胜肽及含其之疫苗

<130> ONC-A1107-TW

<150> US 61/495,819

<151> 2011-06-10

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 1

Phe Leu Leu Glu Asp Thr Trp Thr Thr
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 2

Leu Met Ser Glu Ala Val Gln Pro Val

1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 3

Leu Leu Leu Pro Ser Leu Thr Leu Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 4

Phe Leu Gly Ser Gly Leu Leu Thr Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 5

Leu Leu Pro Ser Leu Thr Leu Leu Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 6

Phe Val Ala Ala Tyr Asp Ile Gly Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 7

Gly Leu Leu Thr Leu Ala Val Tyr Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 8

Met Val Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 9

Arg Leu Phe Leu Met Ser Glu Ala Val
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 10

Ser Leu Trp Thr Gln Asn Ile Thr Ala
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 11

Trp Leu Asn Glu Pro Asn Phe Val Ala
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 12

Arg Thr Ala Glu Gly Pro Ile Met Val
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 13

Gly Leu Arg Asp Gly Val Leu Arg Val
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT



<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 14

Gln Gln Leu Arg Cys Gly Trp Thr Val
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 15

Trp Leu Leu Ser Leu Val Arg Gly Leu
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 16

Thr Val Tyr Ser Arg Val Ala Arg Val
1 5

<210> 17

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 17

Ser Leu Leu Gln Ala Thr Glu Trp Ala
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 18

Gly Leu Asp Cys Leu Gly Pro Ala Ile
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 19

Ser Leu Leu Leu Pro Ser Leu Thr Leu
1 5



<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 20

Arg Thr Ile Glu Lys Ile Asn Gly Val
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 21

Leu Leu Pro Cys Leu Pro Pro Gly Ala
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 22

Arg Leu Ser Leu Ala Asn Val Ser Leu

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 23

Thr Val Gly Gly Trp Leu Leu Ser Leu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 24

Asn Met Ser Leu Trp Thr Gln Asn Ile
1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 25

Phe Leu Met Ser Glu Ala Val Gln Pro Val
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 26

Tyr Leu Phe Arg Leu Ser Leu Ala Asn Val
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 27

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

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 28

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

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 29

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

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 30

Ile Leu His Ser Ala Arg Ala Leu Phe Val
1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列



201302800

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 31

Gly Leu Leu Pro Cys Leu Pro Pro Gly Ala
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 32

Ser Leu Leu Leu Pro Ser Leu Thr Leu Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 33

Ser Leu His Gly Cys Tyr Leu Glu Glu Leu
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 34

Leu Ile Tyr Gly Val Phe Thr Thr Asn Val
1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 35

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

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 36

Ser Leu Val Arg Gly Leu Leu Pro Cys Leu
1 5 10

<210> 37



201302800

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 37

Ser Leu Gln Asp Ala Gln Arg Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 38

Trp Leu Leu Ser Leu Val Arg Gly Leu Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 39

Thr Leu Tyr His Val Leu Tyr Ile Gly Thr
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 40

Gln Leu Ile Val Gly Ala Arg Asn Tyr Leu
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 41

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

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 42

Val Gln Ala Lys Asp Thr Leu Tyr His Val

1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 43

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

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 44

Val Ala Phe Glu Asp Leu Gln Pro Trp Val
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 45

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

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 46

Trp Leu Asn Glu Pro Asn Phe Val Ala Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 47

Ser Leu Trp Thr Gln Asn Ile Thr Ala Cys
1 5 10

<210> 48
<211> 4737
<212> DNA
<213> 人類

<220>



<221> CDS
<222> (305).. (3760)

<400> 48	
agttggagcg cgggggttgg tgccagagcc cagctccgcc gagccgggcg ggtcggcagc	60
gcatccagcg gctgctggga gcccgagcgc agcgggcgcg ggcccgggtg gggactgcac	120
cggagcgcctg agagctggag gccgttcctg cgcggccgcc ccattcccag accggccgcc	180
agcccatctg gttagctccc gccgctccgc gccgcccggg agtcgggagc cgcggggaac	240
cgggcacctg caccgcctc tgggagtgag tggttccagc tggtccttg cctgtgtctc	300
ttgg atg ccc tgt ggc ttc agt ccg tct cct gtt gcc cac cac ctc gtc	349
Met Pro Cys Gly Phe Ser Pro Ser Pro Val Ala His His Leu Val	
1 5 10 15	
cct ggg ccg cct gat acc cca gcc caa cag cta agg tgt gga tgg aca	397
Pro Gly Pro Pro Asp Thr Pro Ala Gln Gln Leu Arg Cys Gly Trp Thr	
20 25 30	
gta ggg ggc tgg ctt ctc tca ctg gtc agg ggt ctt ctc ccc tgt ctg	445
Val Gly Gly Trp Leu Leu Ser Leu Val Arg Gly Leu Leu Pro Cys Leu	
35 40 45	
cct ccc gga gct agg act gca gag ggg cct atc atg gtg ctt gca ggc	493
Pro Pro Gly Ala Arg Thr Ala Glu Gly Pro Ile Met Val Leu Ala Gly	
50 55 60	
ccc ctg gct gtc tcg ctg ttg ctg ccc agc ctc aca ctg ctg gtg tcc	541
Pro Leu Ala Val Ser Leu Leu Leu Pro Ser Leu Thr Leu Leu Val Ser	
65 70 75	
cac ctc tcc agc tcc cag gat gtc tcc agt gag ccc agc agt gag cag	589
His Leu Ser Ser Ser Gln Asp Val Ser Ser Glu Pro Ser Ser Glu Gln	
80 85 90 95	
cag ctg tgc gcc ctt agc aag cac ccc acc gtg gcc ttt gaa gac ctg	637
Gln Leu Cys Ala Leu Ser Lys His Pro Thr Val Ala Phe Glu Asp Leu	

	100		105		110	
cag ccg tgg gtc tct aac ttc acc tac cct gga gcc cgg gat ttc tcc						685
Gln Pro Trp Val Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Ala Arg Asp Phe Ser						
	115		120		125	
cag ctg gct ttg gac ccc tcc ggg aac cag ctc atc gtg gga gcc agg						733
Gln Leu Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile Val Gly Ala Arg						
	130		135		140	
aac tac ctc ttc aga ctc agc ctt gcc aat gtc tct ctt ctt cag gcc						781
Asn Tyr Leu Phe Arg Leu Ser Leu Ala Asn Val Ser Leu Leu Gln Ala						
	145		150		155	
aca gag tgg gcc tcc agt gag gac acg cgc cgc tcc tgc caa agc aaa						829
Thr Glu Trp Ala Ser Ser Glu Asp Thr Arg Arg Ser Cys Gln Ser Lys						
160		165		170		175
ggg aag act gag gag gag tgt cag aac tac gtg cga gtc ctg atc gtc						877
Gly Lys Thr Glu Glu Glu Cys Gln Asn Tyr Val Arg Val Leu Ile Val						
	180		185		190	
gcc ggc cgg aag gtg ttc atg tgt gga acc aat gcc ttt tcc ccc atg						925
Ala Gly Arg Lys Val Phe Met Cys Gly Thr Asn Ala Phe Ser Pro Met						
	195		200		205	
tgc acc agc aga cag gtg ggg aac ctc agc cgg act att gag aag atc						973
Cys Thr Ser Arg Gln Val Gly Asn Leu Ser Arg Thr Ile Glu Lys Ile						
	210		215		220	
aat ggt gtg gcc cgc tgc ccc tat gac cca cgc cac aac tcc aca gct						1021
Asn Gly Val Ala Arg Cys Pro Tyr Asp Pro Arg His Asn Ser Thr Ala						
	225		230		235	
gtc atc tcc tcc cag ggg gag ctc tat gca gcc acg gtc atc gac ttc						1069
Val Ile Ser Ser Gln Gly Glu Leu Tyr Ala Ala Thr Val Ile Asp Phe						
240		245		250		255
tca ggt cgg gac cct gcc atc tac cgc agc ctg ggc agt ggg cca ccg						1117
Ser Gly Arg Asp Pro Ala Ile Tyr Arg Ser Leu Gly Ser Gly Pro Pro						



260	265	270	
ctt cgc act gcc caa tat aac tcc aag tgg ctt aat gag cca aac ttc			1165
Leu Arg Thr Ala Gln Tyr Asn Ser Lys Trp Leu Asn Glu Pro Asn Phe			
275	280	285	
gtg gca gcc tat gat att ggg ctg ttt gca tac ttc ttc ctg cgg gag			1213
Val Ala Ala Tyr Asp Ile Gly Leu Phe Ala Tyr Phe Phe Leu Arg Glu			
290	295	300	
aac gca gtg gag cac gac tgt gga cgc acc gtg tac tct cgc gtg gcc			1261
Asn Ala Val Glu His Asp Cys Gly Arg Thr Val Tyr Ser Arg Val Ala			
305	310	315	
cgc gtg tgc aag aat gac gtg ggg ggc cga ttc ctg ctg gag gac aca			1309
Arg Val Cys Lys Asn Asp Val Gly Gly Arg Phe Leu Leu Glu Asp Thr			
320	325	330	335
tgg acc aca ttc atg aag gcc cgg ctc aac tgc tcc cgc ccg ggc gag			1357
Trp Thr Thr Phe Met Lys Ala Arg Leu Asn Cys Ser Arg Pro Gly Glu			
340	345	350	
gtc ccc ttc tac tat aac gag ctg cag agt gcc ttc cac ttg ccg gag			1405
Val Pro Phe Tyr Tyr Asn Glu Leu Gln Ser Ala Phe His Leu Pro Glu			
355	360	365	
cag gac ctc atc tat gga gtt ttc aca acc aac gta aac agc atc gcg			1453
Gln Asp Leu Ile Tyr Gly Val Phe Thr Thr Asn Val Asn Ser Ile Ala			
370	375	380	
gct tct gct gtc tgc gcc ttc aac ctc agt gct atc tcc cag gct ttc			1501
Ala Ser Ala Val Cys Ala Phe Asn Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ala Phe			
385	390	395	
aat ggc cca ttt cgc tac cag gag aac ccc agg gct gcc tgg ctc ccc			1549
Asn Gly Pro Phe Arg Tyr Gln Glu Asn Pro Arg Ala Ala Trp Leu Pro			
400	405	410	415
ata gcc aac ccc atc ccc aat ttc cag tgt ggc acc ctg cct gag acc			1597
Ile Ala Asn Pro Ile Pro Asn Phe Gln Cys Gly Thr Leu Pro Glu Thr			

	420	425	430	
ggt ccc aac gag aac ctg acg gag cgc agc ctg cag gac gcg cag cgc				1645
Gly Pro Asn Glu Asn Leu Thr Glu Arg Ser Leu Gln Asp Ala Gln Arg				
	435	440	445	
ctc ttc ctg atg agc gag gcc gtg cag ccg gtg aca ccc gag ccc tgt				1693
Leu Phe Leu Met Ser Glu Ala Val Gln Pro Val Thr Pro Glu Pro Cys				
	450	455	460	
gtc acc cag gac agc gtg cgc ttc tca cac ctc gtg gtg gac ctg gtg				1741
Val Thr Gln Asp Ser Val Arg Phe Ser His Leu Val Val Asp Leu Val				
	465	470	475	
cag gct aaa gac acg ctc tac cat gta ctc tac att ggc acc gag tcg				1789
Gln Ala Lys Asp Thr Leu Tyr His Val Leu Tyr Ile Gly Thr Glu Ser				
480	485	490	495	
ggc acc atc ctg aag gcg ctg tcc acg gcg agc cgc agc ctc cac ggc				1837
Gly Thr Ile Leu Lys Ala Leu Ser Thr Ala Ser Arg Ser Leu His Gly				
	500	505	510	
tgc tac ctg gag gag ctg cac gtg ctg ccc ccc ggg cgc cgc gag ccc				1885
Cys Tyr Leu Glu Glu Leu His Val Leu Pro Pro Gly Arg Arg Glu Pro				
	515	520	525	
ctg cgc agc ctg cgc atc ctg cac agc gcc cgc gcg ctc ttc gtg ggg				1933
Leu Arg Ser Leu Arg Ile Leu His Ser Ala Arg Ala Leu Phe Val Gly				
	530	535	540	
ctg aga gac ggc gtc ctg ogg gtc cca ctg gag agg tgc gcc gcc tac				1981
Leu Arg Asp Gly Val Leu Arg Val Pro Leu Glu Arg Cys Ala Ala Tyr				
	545	550	555	
cgc agc cag ggg gca tgc ctg ggg gcc ogg gac ccg tac tgt ggc tgg				2029
Arg Ser Gln Gly Ala Cys Leu Gly Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Gly Trp				
560	565	570	575	
gac ggg aag cag caa cgt tgc agc aca ctc gag gac agc tcc aac atg				2077
Asp Gly Lys Gln Gln Arg Cys Ser Thr Leu Glu Asp Ser Ser Asn Met				

580	585	590	
agc ctc tgg acc cag aac atc acc gcc tgt cct gtg cgg aat gtg aca			2125
Ser Leu Trp Thr Gln Asn Ile Thr Ala Cys Pro Val Arg Asn Val Thr			
595	600	605	
cgg gat ggg ggc ttc ggc cca tgg tca cca tgg caa cca tgt gag cac			2173
Arg Asp Gly Gly Phe Gly Pro Trp Ser Pro Trp Gln Pro Cys Glu His			
610	615	620	
ttg gat ggg gac aac tca ggc tct tgc ctg tgt cga gct cga tcc tgt			2221
Leu Asp Gly Asp Asn Ser Gly Ser Cys Leu Cys Arg Ala Arg Ser Cys			
625	630	635	
gat tcc cct cga ccc cgc tgt ggg ggc ctt gac tgc ctg ggg cca gcc			2269
Asp Ser Pro Arg Pro Arg Cys Gly Gly Leu Asp Cys Leu Gly Pro Ala			
640	645	650	655
atc cac atc gcc aac tgc tcc agg aat ggg gcg tgg acc ccg tgg tca			2317
Ile His Ile Ala Asn Cys Ser Arg Asn Gly Ala Trp Thr Pro Trp Ser			
660	665	670	
tcg tgg gcg ctg tgc agc acg tcc tgt ggc atc ggc ttc cag gtc cgc			2365
Ser Trp Ala Leu Cys Ser Thr Ser Cys Gly Ile Gly Phe Gln Val Arg			
675	680	685	
cag cga agt tgc agc aac cct gct ccc cgc cac ggg ggc cgc atc tgc			2413
Gln Arg Ser Cys Ser Asn Pro Ala Pro Arg His Gly Gly Arg Ile Cys			
690	695	700	
gtg ggc aag agc cgg gag gaa cgg ttc tgt aat gag aac acg cct tgc			2461
Val Gly Lys Ser Arg Glu Glu Arg Phe Cys Asn Glu Asn Thr Pro Cys			
705	710	715	
ccg gtg ccc atc ttc tgg gct tcc tgg ggc tcc tgg agc aag tgc agc			2509
Pro Val Pro Ile Phe Trp Ala Ser Trp Gly Ser Trp Ser Lys Cys Ser			
720	725	730	735
agc aac tgt gga ggg ggc atg cag tcg cgg cgt cgg gcc tgc gag aac			2557
Ser Asn Cys Gly Gly Gly Met Gln Ser Arg Arg Arg Ala Cys Glu Asn			

	740	745	750	
ggc aac tcc tgc ctg ggc tgc ggc gtg gag ttc aag acg tgc aac ccc				2605
Gly Asn Ser Cys Leu Gly Cys Gly Val Glu Phe Lys Thr Cys Asn Pro				
	755	760	765	
gag ggc tgc ccc gaa gtg cgg cgc aac acc ccc tgg acg ccg tgg ctg				2653
Glu Gly Cys Pro Glu Val Arg Arg Asn Thr Pro Trp Thr Pro Trp Leu				
	770	775	780	
ccc gtg aac gtg acg cag ggc ggg gca cgg cag gag cag cgg ttc cgc				2701
Pro Val Asn Val Thr Gln Gly Gly Ala Arg Gln Glu Gln Arg Phe Arg				
	785	790	795	
ttc acc tgc cgc gcg ccc ctt gca gac ccg cac ggc ctg cag ttc ggc				2749
Phe Thr Cys Arg Ala Pro Leu Ala Asp Pro His Gly Leu Gln Phe Gly				
800	805	810	815	
agg aga agg acc gag acg agg acc tgt ccc gcg gac ggc tcc ggc tcc				2797
Arg Arg Arg Thr Glu Thr Arg Thr Cys Pro Ala Asp Gly Ser Gly Ser				
	820	825	830	
tgc gac acc gac gcc ctg gtg gag gtc ctc ctg cgc agc ggg agc acc				2845
Cys Asp Thr Asp Ala Leu Val Glu Val Leu Leu Arg Ser Gly Ser Thr				
	835	840	845	
tcc ccg cac acg gtg agc ggg ggc tgg gcc gcc tgg ggc ccg tgg tcg				2893
Ser Pro His Thr Val Ser Gly Gly Trp Ala Ala Trp Gly Pro Trp Ser				
	850	855	860	
tcc tgc tcc cgg gac tgc gag ctg ggc ttc cgc gtc cgc aag aga acg				2941
Ser Cys Ser Arg Asp Cys Glu Leu Gly Phe Arg Val Arg Lys Arg Thr				
	865	870	875	
tgc act aac ccg gag ccc cgc aac ggg ggc ctg ccc tgc gtg ggc gat				2989
Cys Thr Asn Pro Glu Pro Arg Asn Gly Gly Leu Pro Cys Val Gly Asp				
880	885	890	895	
gct gcc gag tac cag gac tgc aac ccc cag gct tgc cca gtt cgg ggt				3037
Ala Ala Glu Tyr Gln Asp Cys Asn Pro Gln Ala Cys Pro Val Arg Gly				

900	905	910	
gct tgg tcc tgc tgg acc tca tgg tct cca tgc tca gct tcc tgt ggt			3085
Ala Trp Ser Cys Trp Thr Ser Trp Ser Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly			
915	920	925	
ggg ggt cac tat caa cgc acc cgt tcc tgc acc agc ccc gca ccc tcc			3133
Gly Gly His Tyr Gln Arg Thr Arg Ser Cys Thr Ser Pro Ala Pro Ser			
930	935	940	
cca ggt gag gac atc tgt ctc ggg ctg cac acg gag gag gca cta tgt			3181
Pro Gly Glu Asp Ile Cys Leu Gly Leu His Thr Glu Glu Ala Leu Cys			
945	950	955	
gcc aca cag gcc tgc cca gaa ggc tgg tgg ccc tgg tct gag tgg agt			3229
Ala Thr Gln Ala Cys Pro Glu Gly Trp Ser Pro Trp Ser Glu Trp Ser			
960	965	970	975
aag tgc act gac gac gga gcc cag agc cga agc cgg cac tgt gag gag			3277
Lys Cys Thr Asp Asp Gly Ala Gln Ser Arg Ser Arg His Cys Glu Glu			
980	985	990	
ctc ctc cca ggg tcc agc gcc tgt gct gga aac agc agc cag agc cgc			3325
Leu Leu Pro Gly Ser Ser Ala Cys Ala Gly Asn Ser Ser Gln Ser Arg			
995	1000	1005	
ccc tgc ccc tac agc gag att ccc gtc atc ctg cca gcc tcc agc			3370
Pro Cys Pro Tyr Ser Glu Ile Pro Val Ile Leu Pro Ala Ser Ser			
1010	1015	1020	
atg gag gag gcc acc gac tgt gca ggg ttc aat ctc atc cac ttg			3415
Met Glu Glu Ala Thr Asp Cys Ala Gly Phe Asn Leu Ile His Leu			
1025	1030	1035	
gtg gcc acg ggc atc tcc tgc ttc ttg ggc tot ggg ctc ctg acc			3460
Val Ala Thr Gly Ile Ser Cys Phe Leu Gly Ser Gly Leu Leu Thr			
1040	1045	1050	
cta gca gtg tac ctg tct tgc cag cac tgc cag cgt cag tcc cag			3505
Leu Ala Val Tyr Leu Ser Cys Gln His Cys Gln Arg Gln Ser Gln			

1055	1060	1065	
gag tcc aca	ctg gtc cat cct gcc	acc ccc aac cat ttg	cac tac
Glu Ser Thr	Leu Val His Pro Ala	Thr Pro Asn His Leu	His Tyr
1070	1075	1080	
aag ggc gga	ggc acc ccg aag aat	gaa aag tac aca ccc	atg gaa
Lys Gly Gly	Gly Thr Pro Lys Asn	Glu Lys Tyr Thr Pro	Met Glu
1085	1090	1095	
ttc aag acc	ctg aac aag aat aac	ttg atc cct gat gac	aga gcc
Phe Lys Thr	Leu Asn Lys Asn Asn	Leu Ile Pro Asp Asp	Arg Ala
1100	1105	1110	
aac ttc tac	cca ttg cag cag acc	aat gtg tac acg act	act tac
Asn Phe Tyr	Pro Leu Gln Gln Thr	Asn Val Tyr Thr Thr	Thr Tyr
1115	1120	1125	
tac cca agc	ccc ctg aac aaa cac	agc ttc cgg ccc gag	gcc tca
Tyr Pro Ser	Pro Leu Asn Lys His	Ser Phe Arg Pro Glu	Ala Ser
1130	1135	1140	
cct gga caa	cgg tgc ttc ccc aac	agc tga taccgccgtc	ctggggactt
Pro Gly Gln	Arg Cys Phe Pro Asn	Ser	
1145	1150		
gggcttcttg	ccttcataag	gcacagagca	gatggagatg
ggacagtgga	gccagtttgg		
3840			
ttttctccct	ctgcactagg	ccaagaactt	gctgccttgc
ctgtgggggg	tcccatccgg		
3900			
cttcagagag	ctctggctgg	cattgaccat	gggggaaagg
gctggtttca	ggctgacata		
3960			
tggccgcagg	tccagttcag	cccaggtctc	tcatggttat
cttccaaccc	actgtcacgc		
4020			
tgacactatg	ctgcoatgcc	tgggctgtgg	acctactggg
catttgagga	attggagaat		
4080			
ggagatggca	agagggcagg	cttttaagtt	tgggttggag
acaacttcct	gtggccccc		
4140			
caagctgagt	ctggccttct	ccagctggcc	ccaaaaaagg
cctttgctac	atcctgatta		
4200			



tctctgaaag taatcaatca agtggctcca gtagctctgg attttctgcc agggctgggc 4260
cattgtggtg ctgccccagt atgacatggg accaaggcca gcgcaggtta tccacctctg 4320
cctggaagtc tatactctac ccagggcac cctctggtca gaggcagtga gtactgggaa 4380
ctggaggctg acctgtgctt agaagtcctt taatctgggc tggtacaggc ctcagccttg 4440
ccctcaatgc acgaaagggtg gcccaggaga gaggatcaat gccataggag gcagaagtct 4500
ggcctctgtg cctctatgga gactatcttc cagttgctgc tcaacagagt tgttggctga 4560
gacctgottg ggagtctctg ctggcccttc atctgttcag gaacacacac acacacacac 4620
tcacacacgc acacacaatc acaatttgct acagcaacaa aaaagacatt gggctgtggc 4680
attattaatt aaagatgata tccagtcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 4737

<210> 49
<211> 1151
<212> PRT
<213> 人類

<400> 49

Met Pro Cys Gly Phe Ser Pro Ser Pro Val Ala His His Leu Val Pro
1 5 10 15

Gly Pro Pro Asp Thr Pro Ala Gln Gln Leu Arg Cys Gly Trp Thr Val
20 25 30

Gly Gly Trp Leu Leu Ser Leu Val Arg Gly Leu Leu Pro Cys Leu Pro
35 40 45

Pro Gly Ala Arg Thr Ala Glu Gly Pro Ile Met Val Leu Ala Gly Pro
50 55 60

Leu Ala Val Ser Leu Leu Leu Pro Ser Leu Thr Leu Leu Val Ser His
65 70 75 80

Leu Ser Ser Ser Gln Asp Val Ser Ser Glu Pro Ser Ser Glu Gln Gln
85 90 95

Leu Cys Ala Leu Ser Lys His Pro Thr Val Ala Phe Glu Asp Leu Gln
100 105 110

Pro Trp Val Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Ala Arg Asp Phe Ser Gln
115 120 125

Leu Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile Val Gly Ala Arg Asn
130 135 140

Tyr Leu Phe Arg Leu Ser Leu Ala Asn Val Ser Leu Leu Gln Ala Thr
145 150 155 160

Glu Trp Ala Ser Ser Glu Asp Thr Arg Arg Ser Cys Gln Ser Lys Gly
165 170 175

Lys Thr Glu Glu Glu Cys Gln Asn Tyr Val Arg Val Leu Ile Val Ala
180 185 190

Gly Arg Lys Val Phe Met Cys Gly Thr Asn Ala Phe Ser Pro Met Cys
195 200 205

Thr Ser Arg Gln Val Gly Asn Leu Ser Arg Thr Ile Glu Lys Ile Asn
210 215 220



Gly Val Ala Arg Cys Pro Tyr Asp Pro Arg His Asn Ser Thr Ala Val
225 230 235 240

Ile Ser Ser Gln Gly Glu Leu Tyr Ala Ala Thr Val Ile Asp Phe Ser
245 250 255

Gly Arg Asp Pro Ala Ile Tyr Arg Ser Leu Gly Ser Gly Pro Pro Leu
260 265 270

Arg Thr Ala Gln Tyr Asn Ser Lys Trp Leu Asn Glu Pro Asn Phe Val
275 280 285

Ala Ala Tyr Asp Ile Gly Leu Phe Ala Tyr Phe Phe Leu Arg Glu Asn
290 295 300

Ala Val Glu His Asp Cys Gly Arg Thr Val Tyr Ser Arg Val Ala Arg
305 310 315 320

Val Cys Lys Asn Asp Val Gly Gly Arg Phe Leu Leu Glu Asp Thr Trp
325 330 335

Thr Thr Phe Met Lys Ala Arg Leu Asn Cys Ser Arg Pro Gly Glu Val
340 345 350

Pro Phe Tyr Tyr Asn Glu Leu Gln Ser Ala Phe His Leu Pro Glu Gln
355 360 365

Asp Leu Ile Tyr Gly Val Phe Thr Thr Asn Val Asn Ser Ile Ala Ala
370 375 380

Ser Ala Val Cys Ala Phe Asn Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ala Phe Asn
385 390 395 400

Gly Pro Phe Arg Tyr Gln Glu Asn Pro Arg Ala Ala Trp Leu Pro Ile
405 410 415

Ala Asn Pro Ile Pro Asn Phe Gln Cys Gly Thr Leu Pro Glu Thr Gly
420 425 430

Pro Asn Glu Asn Leu Thr Glu Arg Ser Leu Gln Asp Ala Gln Arg Leu
435 440 445

Phe Leu Met Ser Glu Ala Val Gln Pro Val Thr Pro Glu Pro Cys Val
450 455 460

Thr Gln Asp Ser Val Arg Phe Ser His Leu Val Val Asp Leu Val Gln
465 470 475 480

Ala Lys Asp Thr Leu Tyr His Val Leu Tyr Ile Gly Thr Glu Ser Gly
485 490 495

Thr Ile Leu Lys Ala Leu Ser Thr Ala Ser Arg Ser Leu His Gly Cys
500 505 510

Tyr Leu Glu Glu Leu His Val Leu Pro Pro Gly Arg Arg Glu Pro Leu
515 520 525

Arg Ser Leu Arg Ile Leu His Ser Ala Arg Ala Leu Phe Val Gly Leu
530 535 540

Arg Asp Gly Val Leu Arg Val Pro Leu Glu Arg Cys Ala Ala Tyr Arg
545 550 555 560

Ser Gln Gly Ala Cys Leu Gly Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Gly Trp Asp
565 570 575

Gly Lys Gln Gln Arg Cys Ser Thr Leu Glu Asp Ser Ser Asn Met Ser
580 585 590

Leu Trp Thr Gln Asn Ile Thr Ala Cys Pro Val Arg Asn Val Thr Arg
595 600 605

Asp Gly Gly Phe Gly Pro Trp Ser Pro Trp Gln Pro Cys Glu His Leu
610 615 620

Asp Gly Asp Asn Ser Gly Ser Cys Leu Cys Arg Ala Arg Ser Cys Asp
625 630 635 640

Ser Pro Arg Pro Arg Cys Gly Gly Leu Asp Cys Leu Gly Pro Ala Ile
645 650 655

His Ile Ala Asn Cys Ser Arg Asn Gly Ala Trp Thr Pro Trp Ser Ser
660 665 670

Trp Ala Leu Cys Ser Thr Ser Cys Gly Ile Gly Phe Gln Val Arg Gln
675 680 685

Arg Ser Cys Ser Asn Pro Ala Pro Arg His Gly Gly Arg Ile Cys Val
690 695 700

Gly Lys Ser Arg Glu Glu Arg Phe Cys Asn Glu Asn Thr Pro Cys Pro
705 710 715 720

Val Pro Ile Phe Trp Ala Ser Trp Gly Ser Trp Ser Lys Cys Ser Ser
725 730 735

Asn Cys Gly Gly Gly Met Gln Ser Arg Arg Arg Ala Cys Glu Asn Gly
740 745 750

Asn Ser Cys Leu Gly Cys Gly Val Glu Phe Lys Thr Cys Asn Pro Glu
755 760 765

Gly Cys Pro Glu Val Arg Arg Asn Thr Pro Trp Thr Pro Trp Leu Pro
770 775 780

Val Asn Val Thr Gln Gly Gly Ala Arg Gln Glu Gln Arg Phe Arg Phe
785 790 795 800

Thr Cys Arg Ala Pro Leu Ala Asp Pro His Gly Leu Gln Phe Gly Arg
805 810 815

Arg Arg Thr Glu Thr Arg Thr Cys Pro Ala Asp Gly Ser Gly Ser Cys
820 825 830

Asp Thr Asp Ala Leu Val Glu Val Leu Leu Arg Ser Gly Ser Thr Ser
835 840 845

Pro His Thr Val Ser Gly Gly Trp Ala Ala Trp Gly Pro Trp Ser Ser
850 855 860



Cys Ser Arg Asp Cys Glu Leu Gly Phe Arg Val Arg Lys Arg Thr Cys
865 870 875 880

Thr Asn Pro Glu Pro Arg Asn Gly Gly Leu Pro Cys Val Gly Asp Ala
885 890 895

Ala Glu Tyr Gln Asp Cys Asn Pro Gln Ala Cys Pro Val Arg Gly Ala
900 905 910

Trp Ser Cys Trp Thr Ser Trp Ser Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Gly
915 920 925

Gly His Tyr Gln Arg Thr Arg Ser Cys Thr Ser Pro Ala Pro Ser Pro
930 935 940

Gly Glu Asp Ile Cys Leu Gly Leu His Thr Glu Glu Ala Leu Cys Ala
945 950 955 960

Thr Gln Ala Cys Pro Glu Gly Trp Ser Pro Trp Ser Glu Trp Ser Lys
965 970 975

Cys Thr Asp Asp Gly Ala Gln Ser Arg Ser Arg His Cys Glu Glu Leu
980 985 990

Leu Pro Gly Ser Ser Ala Cys Ala Gly Asn Ser Ser Gln Ser Arg Pro
995 1000 1005

Cys Pro Tyr Ser Glu Ile Pro Val Ile Leu Pro Ala Ser Ser Met
1010 1015 1020

Glu Glu Ala Thr Asp Cys Ala Gly Phe Asn Leu Ile His Leu Val
1025 1030 1035

Ala Thr Gly Ile Ser Cys Phe Leu Gly Ser Gly Leu Leu Thr Leu
1040 1045 1050

Ala Val Tyr Leu Ser Cys Gln His Cys Gln Arg Gln Ser Gln Glu
1055 1060 1065

Ser Thr Leu Val His Pro Ala Thr Pro Asn His Leu His Tyr Lys
1070 1075 1080

Gly Gly Gly Thr Pro Lys Asn Glu Lys Tyr Thr Pro Met Glu Phe
1085 1090 1095

Lys Thr Leu Asn Lys Asn Asn Leu Ile Pro Asp Asp Arg Ala Asn
1100 1105 1110

Phe Tyr Pro Leu Gln Gln Thr Asn Val Tyr Thr Thr Thr Tyr Tyr
1115 1120 1125

Pro Ser Pro Leu Asn Lys His Ser Phe Arg Pro Glu Ala Ser Pro
1130 1135 1140

Gly Gln Arg Cys Phe Pro Asn Ser
1145 1150

<210> 50
<211> 22



<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子序列

<400> 50
gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> a primer sequence

<400> 51
tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子序列

<400> 52
tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 引子序列

<400> 53

ctagcctctg gaatcctttc tctt 24



七、申請專利範圍：

1. 一種經分離的胜肽，係由序列辨識號：49 之胺基酸序列或一其免疫活性片段所組成，其中該胜肽與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽包括一胺基酸序列，係擇自由序列辨識號：5、7、27 與 34 所組成之群組。

4. 一種經分離的胜肽，係擇自由下列所組成之群組：

(a) 一種經分離的胜肽，其與一人類白血球組織抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球(CTL)，且其包括由序列辨識號：49 之胺基酸序列所組成之胜肽的一免疫活性片段，

(b) (a)之該經分離的胜肽，其包括擇自由序列辨識號 5、7、27 與 34 所組成之群組的一胺基酸序列，

(c) 一經分離的胜肽，其(i)包括一胺基酸序列於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或添加於(a)或(b)之胜肽的胺基酸序列中、(ii)與人類白血球組織抗原結合，與(iii)維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球的誘發能力，以及

(d) (a)、(b)或(c)之經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

5. 如申請專利範圍第 4 項所述之經分離的胜肽，其中該經分離的胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

6. 如申請專利範圍第 1 至 5 項之任一項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽。

7. 一種經分離之多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述的胜肽。

8. 一種誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之組合物，其中該組合物包括如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之一或多個該胜肽，或如申請專利範圍第 7 項所述之一或多個該多核苷酸。

9. 一種藥學組合物，其中該組合物包括至少一活性成分其係擇自由下列所組成之群組：

(a) 如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之一或多個該胜肽；

(b) 如申請專利範圍第 7 項所述之一或多個該多核苷酸；

(c) 一或多個外吐小體或抗原呈現細胞，其呈現如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽於其表面上；或

(d) 一或多個細胞毒殺性 T 淋巴球，其辨認表現如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽於其表面上；以及

(e) 其組合，

其為了擇自由下列所組成之群組的目的而被配製：

(i) 癌症的治療，

(ii) 癌症的預防，

(iii) 其手術後復發的避免，以及

(iv) 其組合。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之藥學組合物，其中該組合物被配製來用於投予一個體，其人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

11. 如申請專利範圍第 9 或 10 項所述之藥學組合物，其中該組合物被配製來用於癌症之治療。

12. 一種誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法，該方法包括擇自由下列所組成之群組的一步驟：

(a) *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 將一抗原呈現細胞與如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽接觸；以及

(b) 將編碼出如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽的一多核苷酸引入一抗原呈現細胞。

13. 一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，該方法包括擇自由下列所組成之群組的一步驟：

(a) 將一 CD8 陽性 T 細胞與一抗原呈現細胞共培養，該抗原呈現細胞表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽的一複合物於其表面

上；

(b) 將一 CD8 陽性 T 細胞與一外吐小體共培養，該外吐小體表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽的一複合物於其表面上；以及

(c) 將一編碼出 T 細胞受體次單元兩者之多核苷酸或一編碼出 T 細胞受體次單元各個之多核苷酸引入一 CD8 陽性 T 細胞，其中該 T 細胞受體次單元可與呈現於一細胞表面上之一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述的胜肽的一複合物結合。

14. 一種經分離之抗原呈現細胞，其表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽的複合物於其表面上。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述之抗原呈現細胞，其藉由如申請專利範圍第 12 項所述之方法來誘導。

16. 一種經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽為標的。

17. 如申請專利範圍第 16 項所述之細胞毒殺性 T 淋巴球，其中該細胞毒殺性 T 淋巴球藉由如申請專利範圍第 13 項所述之方法來誘導。

18. 一種於一需要個體中誘導一抗癌症之免疫反應的方法，該方法包括投予該個體一組合物的一步驟，該組合物包括如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽、一其免疫活性片段，或編碼出該胜肽或該片段之一多核苷酸。

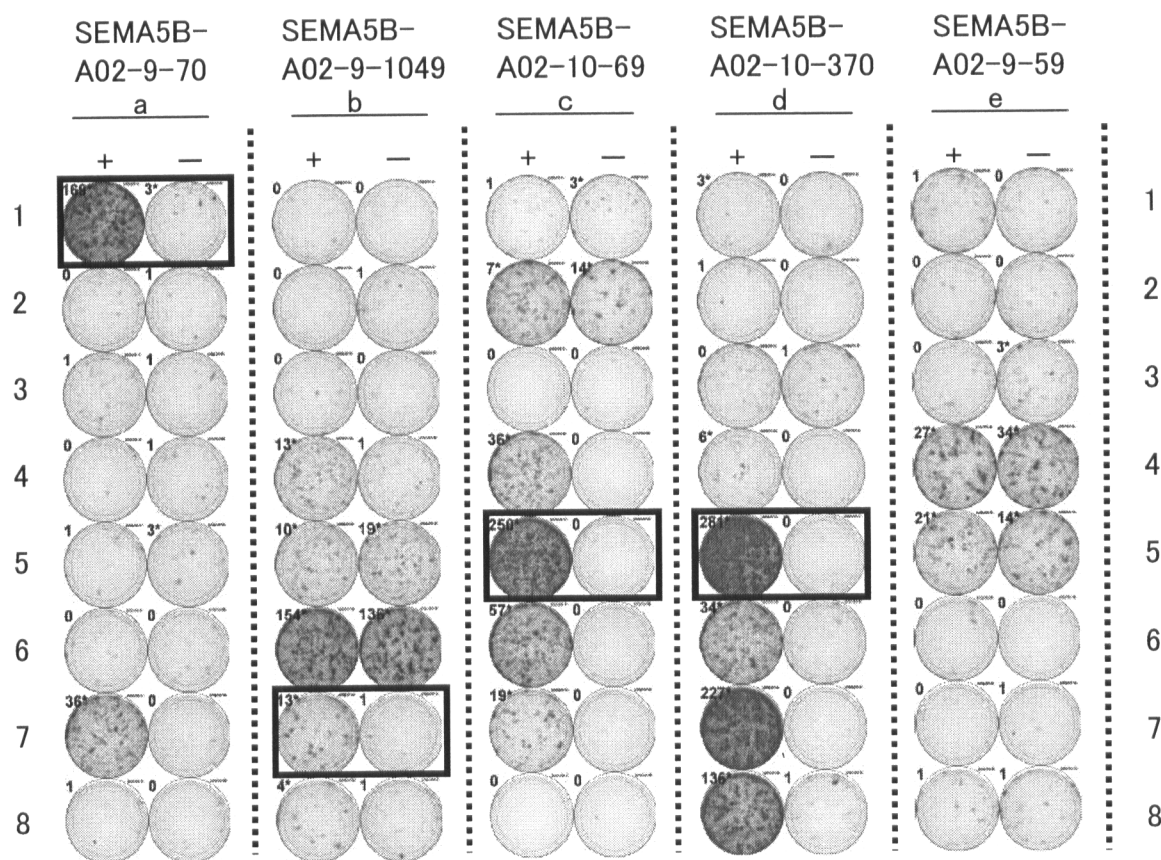
19. 一種抗體或其免疫活性片段，其抗如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽。

20. 一種載體，包括編碼出如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽的一核苷酸序列。

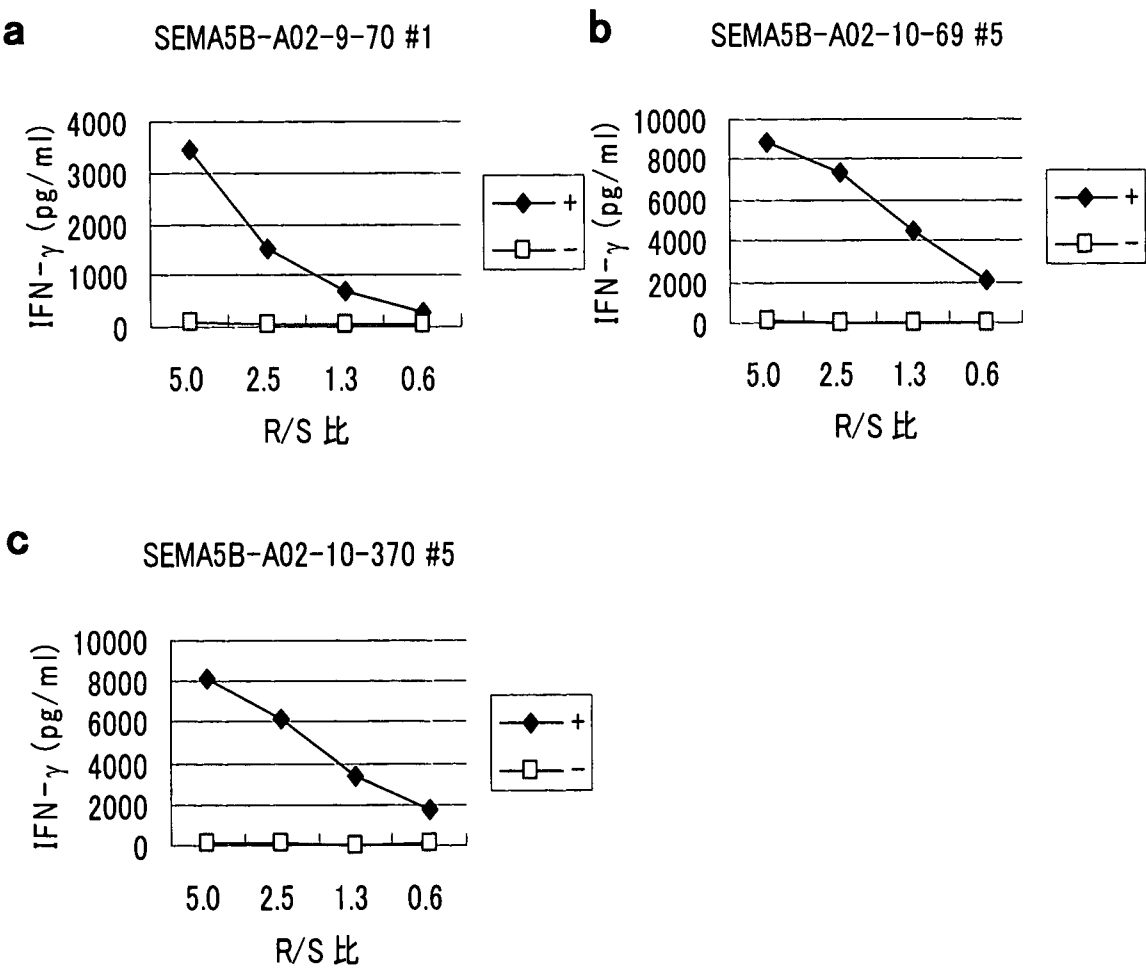
21. 一種宿主細胞，其被以如申請專利範圍第 20 項所述之一表現載體所轉形或轉染。

22. 一種診斷套組，包括如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之胜肽、如申請專利範圍第 7 項所述之多核苷酸或如申請專利範圍第 19 項所述之抗體。

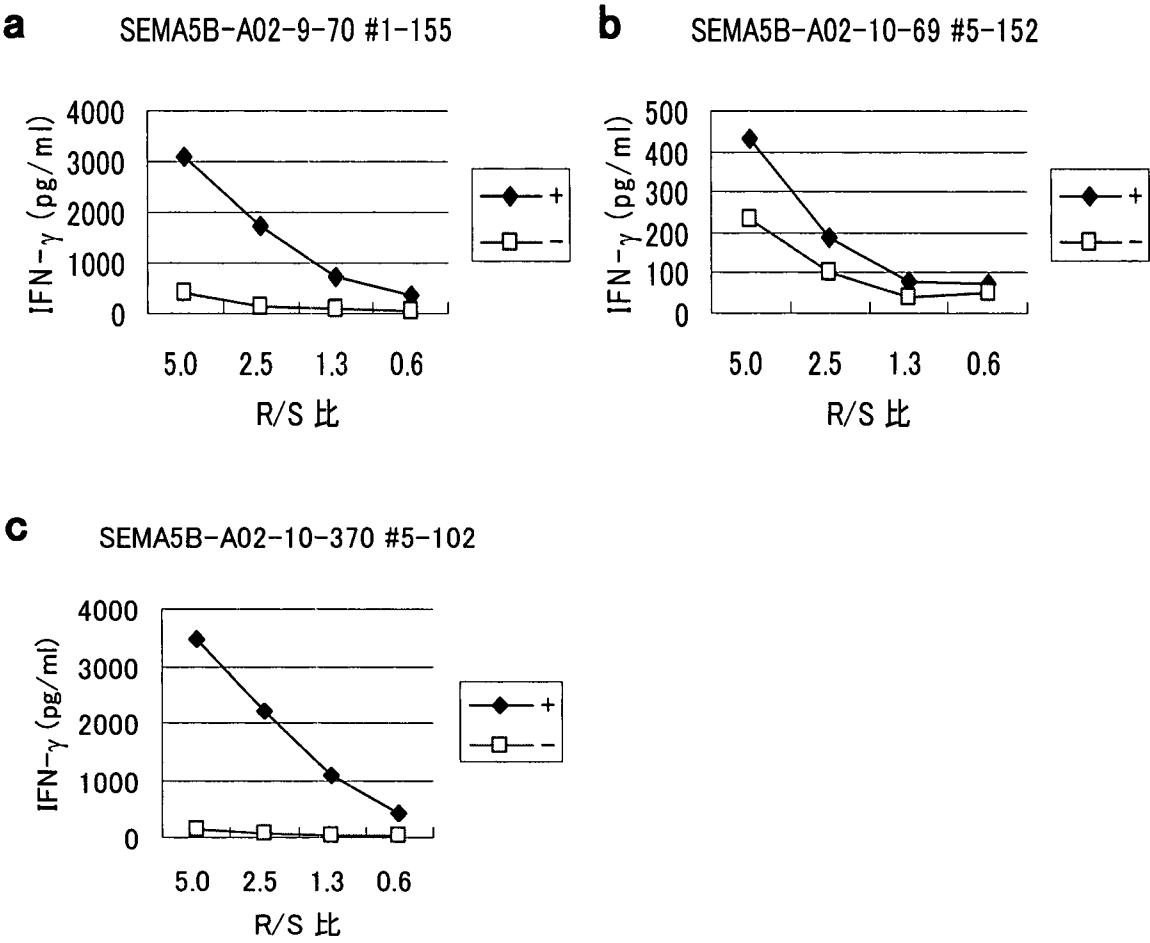
八、圖式：如後所示。



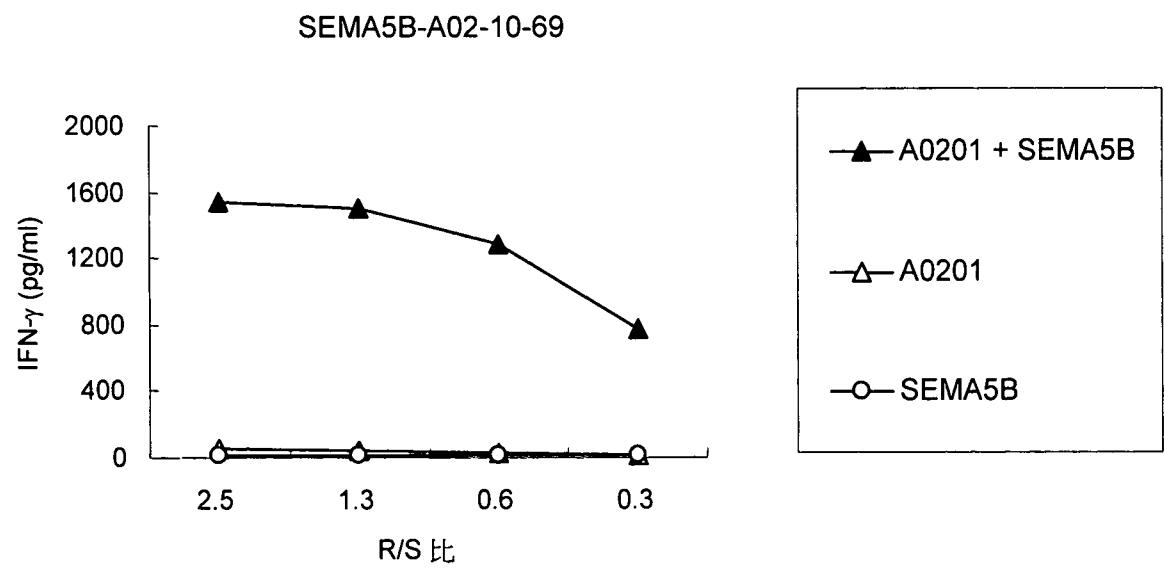
第1圖



第2圖



第3圖



第4圖

再者，本發明考慮經修飾之胜肽，其具有在擇自序列辨識號：5、7、27 與 34 中之胺基酸序列中之一、二或多個胺基酸取代、刪除、插入及/或加入的一胺基酸序列，只要經修飾之胜肽維持原始胜肽之必不可缺的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。為此目的，本發明提供在長度小於 14、13、12、11 或 10 個胺基酸的一經分離的胜肽，其包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i) 在擇自由序列辨識號：5 與 7 所組成之群組之胺基酸序列中，1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入或添加的胺基酸序列，其中該胜肽與 HLA 抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，與

(ii) (i)之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

此外，本發明也提供在長度小於 15、14、13、12 或 11 個胺基酸的一經分離的胜肽，其包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i') 在擇自由序列辨識號：27 與 34 所組成之群組之胺基酸序列中，1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入或添加的胺基酸序列，其中該胜肽與 HLA 抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，與

(ii') (i') 之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

當這些胜肽與一抗原呈現細胞接觸或被引入抗原呈現細胞時，在一抗原呈現細胞中處理這些胜肽以呈現(i)、(ii)、(i') 或(ii') 的胜肽於其上。

本發明更包括編碼出本發明任何胜肽之經分離之多核苷酸。這些多核苷酸可被用來誘導或製備具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的抗原呈現細胞。如同上述本發明胜肽，此類抗原呈現細胞可被投予至一個體以誘導抗癌之免疫反應。

當投予一個體時，本發明之胜肽被表現於抗原呈現細胞之表面以便誘導將分別之胜肽做為目標之細胞毒殺性 T 淋巴球。因此，本發明一目標為提供誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之試劑或組合物，此種試劑或組合物包括本發明所提供任何胜肽或多核苷酸。此試劑或組合物可用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免，特別是癌症，例如食道癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌與小細胞肺癌。因此，本發明又另一目標為提供用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免的藥學試劑或組合物，此藥物被配製來包括一或多個本發明之胜肽或多核苷酸。除了本發