



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I526219 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：098120220

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 06 月 17 日

(51)Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01)

A61K39/385 (2006.01)

(30)優先權：2008/06/19 美國

61/074,062

2008/10/28 美國

61/197,599

(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 OHSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

US 20060216301A1

US 2007/0053922A1

2008 年 04 月 21 日, Cell division cycle associated 1, an ideal lung cancer antigen for immunotherapy, identified using cDNA microarray analysis, Michiko Harao, 熊本大學醫學院, 臨床醫學消化外科, 博士論文,

<http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/immunoge/frame/top.html>

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：4 共 82 頁

(54)名稱

CDCA1 抗原決定位胜肽及含此胜肽的疫苗

CDCA1 EPIOTOPE PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

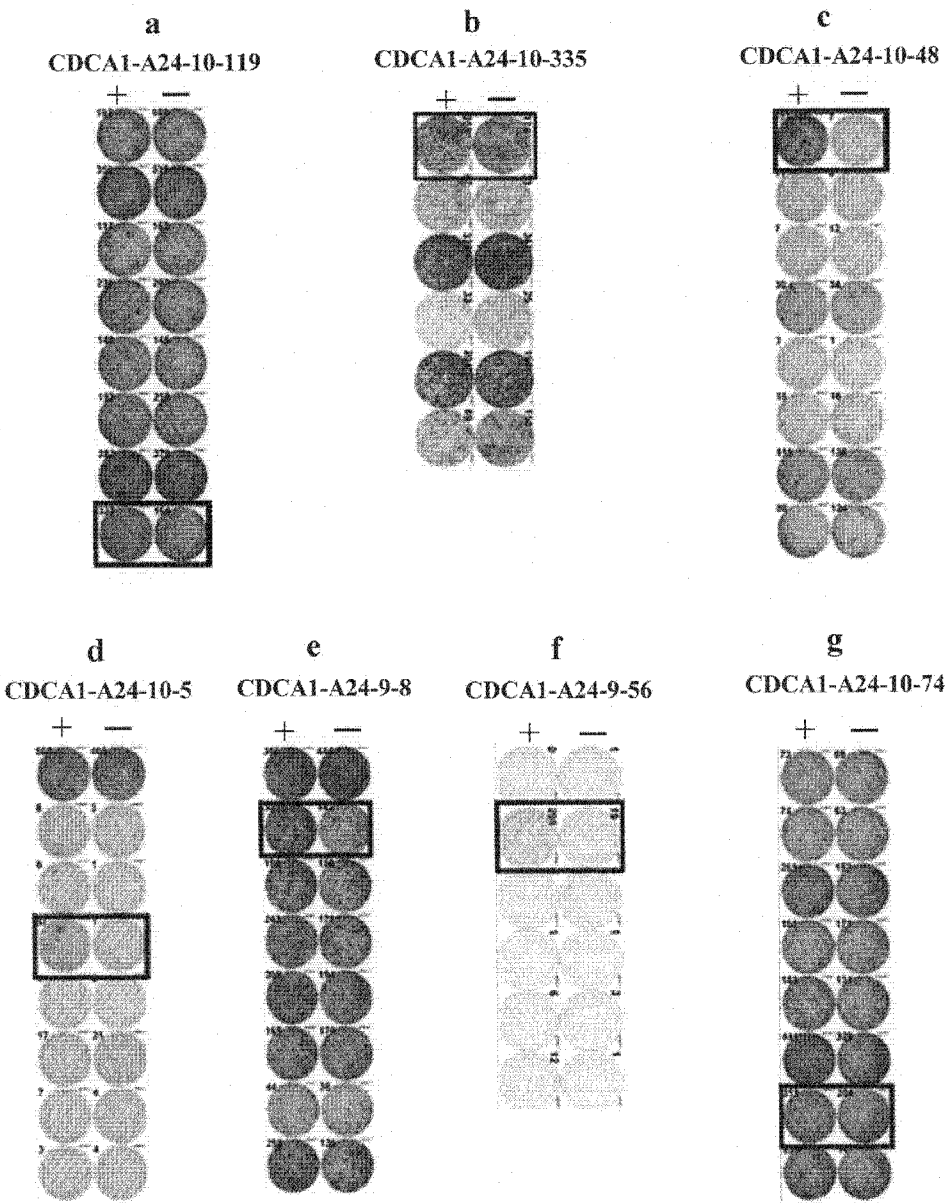
(57)摘要

於此敘述抗癌胜肽疫苗。特別是，本發明敘述衍生自 CDCA1 之抗原決定位胜肽，其誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。本發明也提供經建立之細胞毒殺性 T 淋巴球，其專一地辨認胜肽脈衝之人類白血球組織抗原-24+目標細胞。也提供表現任一該胜肽之抗原呈現細胞與外來體(exosome)，與誘導抗原呈現細胞的方法。本發明更提供藥學試劑，其含有 CDCA1 多胜肽或編碼出其之多核苷酸及外來體與抗原呈現細胞做為活性成分。此外，本發明使用 CDCA1 多胜肽、編碼出該多胜肽之多核苷酸、呈現該多胜肽之外來體或抗原呈現細胞或本發明之藥學試劑來提供治療及/或預防(即避免)癌症(腫瘤)及/或其手術後復發之避免的方法，與誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法、誘導抗腫瘤免疫力之方法。做為標的之癌症包括，但不限於乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)與非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)。

Peptide vaccines against cancer are described herein. In particular, the present invention describes epitope peptides derived from CDCA1 that elicit CTLs. The present invention also provides established CTLs that specifically recognize HLA-A24 positive target cells pulsed with the peptides. Antigen-presenting cells and exosomes that present any of the peptides, as well as methods for inducing antigen-presenting cells are also provided. The present invention further provides pharmaceutical agents containing the CDCA1 polypeptides or polynucleotides encoding thereof, as well as exosomes and antigen-presenting cells as active

ingredients. Furthermore, the present invention provides methods for treating and/or prophylaxis of (i.e., preventing) cancers (tumors), and/or prevention of postoperative recurrence thereof, as well as methods for inducing CTLs, methods for inducing anti-tumor immunity, using the CDCA1 polypeptides, polynucleotides encoding the polypeptides, exosomes or antigen-presenting cells presenting the polypeptides, or the pharmaceutical agents of the present invention. The cancers to be targeted include, but are not limited to, breast cancer, bladder cancer, esophageal cancer, small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC).

指定代表圖：



第1圖

公告本 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： 98120220

※申請日： 98.6.17

※IPC 分類：

A61k³⁸/16 (2006.01)

A61k³⁹/585 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

CDCA1 抗原決定位胜肽及含此胜肽的疫苗 / CDCA1
EPITOPE PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

二、中文發明摘要：

於此敘述抗癌胜肽疫苗。特別是，本發明敘述衍生自 CDCA1 之抗原決定位胜肽，其誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。本發明也提供經建立之細胞毒殺性 T 淋巴球，其專一地辨認胜肽脈衝之人類白血球組織抗原-24+目標細胞。也提供表現任一該胜肽之抗原呈現細胞與外來體(exosome)，與誘導抗原呈現細胞的方法。本發明更提供藥學試劑，其含有 CDCA1 多胜肽或編碼出其之多核苷酸及外來體與抗原呈現細胞做為活性成分。此外，本發明使用 CDCA1 多胜肽、編碼出該多胜肽之多核苷酸、呈現該多胜肽之外來體或抗原呈現細胞或本發明之藥學試劑來提供治療及/或預防(即避免)癌症(腫瘤)及/或其手術後復發之避免的方法，與誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法、誘導抗腫瘤免疫力之方法。做為標的之癌症包括，但不限於乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)與非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。

三、英文發明摘要：

Peptide vaccines against cancer are described herein. In particular, the present invention describes epitope peptides derived from CDCA1 that elicit CTLs. The present invention also provides established CTLs that specifically recognize HLA-A24 positive target cells pulsed with the peptides. Antigen-presenting cells and exosomes that present any of the peptides, as well as methods for inducing antigen-presenting cells are also provided. The present invention further provides pharmaceutical agents containing the CDCA1 polypeptides or polynucleotides encoding thereof, as well as exosomes and antigen-presenting cells as active ingredients. Furthermore, the present invention provides methods for treating and/or prophylaxis of (*i.e.*, preventing) cancers (tumors), and/or prevention of postoperative recurrence thereof, as well as methods for inducing CTLs, methods for inducing anti-tumor immunity, using the CDCA1 polypeptides, polynucleotides encoding the polypeptides, exosomes or antigen-presenting cells presenting the polypeptides, or the pharmaceutical agents of the present invention. The cancers to be targeted include, but are not limited to, breast cancer, bladder cancer, esophageal cancer, small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC).

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1a)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，其當作癌症疫苗與治療與避免腫瘤之藥物為非常有效。

【先前技術】

已證實 CD8+細胞毒殺性 T 淋巴球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，主要藉由免疫方法已發現許多其他腫瘤相關抗原 (Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9)。一些腫瘤相關抗原目前接受臨床發展當作免疫治療標的。

能誘導有效且專一之抗腫瘤免疫反應的新腫瘤相關抗原之辨認成為多種形式癌症之胜肽疫苗接種策略 (vaccination strategies) 之更進一步發展與臨床應用的根據 (Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; van der Burg SH et al., J

Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94)。迄今已有使用這些腫瘤相關抗原衍生之胜肽的臨床試驗的許多報導。不幸地，到目前為止，於這些癌症疫苗試驗中，僅觀察到一低的客觀反應率(objective response rate) (Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15)。

對於癌症細胞增殖與存活而言為必須之腫瘤相關抗原勇敢地為免疫治療標的，由於使用此腫瘤相關抗原可最小化廣為敘述之癌細胞免疫逃脫(immune escape)的風險，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。

CDCA1，細胞分裂週期相關 1(cell division cycle associated 1)被確認為與細胞週期基因共表現之基因之一種(class)的一成員，而細胞週期基因，例如 CDC2、細胞週期素(*cyclin*)、拓撲異構酶(topoisomerase)II 與其他 (Walker et al., Curr Cancer Drug Targets 2001 May;1(1):73-83)。特別地，CDCA1 被發現與有絲分裂 HeLa 細胞的中心粒(centromere)相關，且因此其被視為酵母菌

Nuf2 之功能性同族體(functional homologue)。

此外，經由基因表現分佈分析使用包含 23,040 基因之基因組寬 cDNA 微陣列(Cancer Res 2006 Nov 1; 66(21):10339-48)，也確認 CDCA1 為一於乳癌(W02005/028676)、膀胱癌(W02006/085684)、食道癌(W02007/013671)、小細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)(W02007/013665)與非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)(W02005/089735)中被向上調控之新分子，此揭露之內容引入於此作為參考。CDCA1 之表現被特別向上調控於小細胞肺癌、非小細胞肺癌與腫瘤細胞株，然而除睪丸外於 23 個正常組織中並無偵測到其表現。此外，於 CDCA1 表現之肺癌細胞株中，藉由 siRNA 向下調控 CDCA1 導致細胞生長抑制(W02005/089735)。

綜上所述，此資料建議 CDCA1 為一新、潛在普遍的致癌基因。因此來自 CDCA1 之抗原決定位胜肽可應用於對於癌症寬組合(wide-array)治療之癌症免疫治療。

【發明內容】

本發明部分基於發現適合之抗原決定位胜肽其可當作免疫治療之標的。確認於許多癌症形式中，包括乳癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌，CDCA1 被向上調控，為了更進一步之分析，本發明以此細胞分裂週期相關 1(cell division cycle associated 1)(序列辨識號：35 由 GenBank Accession No. NM_145697 (序列辨識

號：34) 之基因所編碼出) 為標的。特別是，選擇包含抗原決定位胜肽之 CDCA1 基因產物，上述抗原決定位胜肽引出專一於對應分子之細胞毒殺性 T 淋巴球。使用與來自 CDCA1 之候選胜肽結合的 HLA-A*2402 刺激自健康提供者獲得之周邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。建立專一辨認經分別之候選胜肽脈衝(pulsed)之 HLA-A24+目標細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球，且確認可誘導抗 CDCA1 之有效與專一之免疫反應的 HLA-A24 限制抗原決定位胜肽。這些結果證實 CDCA1 具強效致免疫性，且其抗原決定位為癌症免疫治療之有效標的。

因此，提供具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之胜肽與擇自序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23 中之一胺基酸序列為本發明之一目標。本發明考慮經修飾之胜肽，具有序列辨識號：3、4、11、14、22 或 23 之一胺基酸序列，其中取代、合併、刪除或加入一、二或多個胺基酸，只要經修飾之胜肽維持最初之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

當投予一個體時，本發明胜肽被表現於抗原呈現細胞或外來體之表面，且之後誘導細胞毒殺性 T 淋巴球將分別之胜肽做為目標。因此提供表現任一本發明胜肽之抗原呈現細胞與外來體及誘導抗原呈現細胞之方法為本發明之一目標。

藉由投予本發明之 CDCA1 多胜肽或編碼出該多胜肽之多核苷酸及表現 CDCA1 多胜肽之外來體與抗原呈現細胞誘導一抗腫瘤免疫反應。因此，提供一藥學試劑，其包含本

發明之多胜肽或編碼出其之多核苷酸及包含例如其之活性成分的外來體與抗原呈現細胞為本發明之一目標。本發明之藥學試劑提供做為疫苗之特別效用。

提供癌症（腫瘤）之治療及/或預防（即避免）及/或其手術後復發之避免的方法，與誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法、誘導抗腫瘤免疫力的方法為本發明之一目標，其方法包括投予 CDCA1 多胜肽、編碼出 CDCA1 多胜肽之多核苷酸、表現 CDCA1 多胜肽之外來體或抗原呈現細胞或本發明之藥學試劑的步驟。此外，本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球也提供使用如抗癌疫苗。本發明考慮之癌症的例子包括，但不限於乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌與非小細胞肺癌。

如上述之外，當閱讀下列詳細敘述並結合伴隨之圖式與實施例時，本發明之其他目標或特徵將變得更全然明顯。然而，需要瞭解的是，本發明之前述發明內容與下列詳細敘述為做為例子之實施例，並不限制本發明或本發明之其他替代實施例。特別是，當以一些特定實施例敘述本發明於此處，可以瞭解的是，敘述為說明本發明，並不被構築為本發明之限制。熟悉此技藝人士可想到各種修飾與應用，而不違反本發明之精神與範圍，如附上之申請專利為所描述。同樣地，從此發明內容與下述特定實施例，本發明之其他目標、特徵、優勢與優點為明顯的，且對熟悉此技藝人士而言為無困難地明白無誤。自上述結合伴隨之例子、資料、圖式與由其而來被描寫之所有合理的推論，

單獨或考慮此處引入之參考文獻，上述的目標、特徵、優勢與優點為明顯。

【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，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與最佳化可將其變更。也需瞭解的是，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、專利或專利公開之揭露特別地於此處引入參考文獻於其內容中。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。

I. 定義

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瞭解之意義相同。然而，如果發生抵觸。本發明說明書，包括定義，將會控制。

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。

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一經修飾之殘基或非自然發生之殘基，例如一對應自然發生胺基酸與自然發生胺基酸聚合物之人工化學模仿物。

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。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)、甲基硫氫磺(methionine methylsulfonium)）。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”、“核苷酸”與“核酸”，且除非以別的方式指出，以其一般被

接受之單一字母密碼來指出。

除非以別的方式定義，用語“癌症”意指過度表現 *CDCA1* 基因之癌症，包括，例如乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌與非小細胞肺癌。

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，其可辨認非自身細胞（例如，腫瘤細胞、被病毒感染之細胞），且誘導這些細胞死亡。

II. 胜肽

為了證明來自 *CDCA1* 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 *CDCA1* 之胜肽（序列辨識號：35）以確定是否其為由一般遇到 HLA 對偶基因 (allele) 之 HLA-24 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)。確認來自 *CDCA1* 之 HLA-A24 結合胜肽的候選物，基於其對 HLA-A24 之結合親和力。在藉由載有這些胜肽之樹突細胞 (dendritic cell, DC) *in vivo* 刺激 T 細胞之後，使用下列各個胜肽成功建立細胞毒殺性 T 淋巴球：

CDCA1-A24-10-119（序列辨識號：3） 、

CDCA1-A24-10-335（序列辨識號：4） 、

CDCA1-A24-10-48 (序列辨識號：11) 、

CDCA1-A24-10-5 (序列辨識號：14) 、

CDCA1-A24-9-8 (序列辨識號：22) 、

與

CDCA1-A24-9-56 (序列辨識號：23) 。

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。此處這些結果證明 CDCA1 為一由細胞毒殺性 T 淋巴球所辨認之抗原，且這些胜肽為由 HLA-A24 限制之 CDCA1 抗原決定位胜肽。

由於 *CDCA1* 基因於大部分癌症組織中被過度表現，包括，例如乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌與非小細胞肺癌，所以其顯現為一良好之免疫治療標的。因此，本發明提供九胜肽（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）相當於細胞毒殺性 T 淋巴球辨認之 CDCA1 抗原決定位。特別地，本發明九胜肽與十胜肽之較佳實施例包括由擇自序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23 之胺基酸序列所組成之那些胜肽。

通常可使用現今於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 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，如於 Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75；與 Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81 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於，例如於 *Journal of Immunological Methods*, 1995, 185: 181-190 與 *Protein Science*, 2000, 9: 1838-1846 中。因此本發明包括 CDCA1 之胜肽，CDCA1 之胜肽為藉由使用這些已知程式確認來測量與 HLA 結合之親和力。

本發明之九胜肽與十胜肽可視需要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。具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之此種胜肽典型地小於約 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。位於係由擇自序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23 之胺基酸序列所組成之胜肽側面的特別胺基酸序列，不被限制，且可由任何種類胺基酸所組成，只要其不減少原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。因此，本發明也提供胜肽，其具細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與擇自序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23 之胺基酸序列。

一般而言，於一蛋白質中一、二或多個胺基酸之修飾，不會影響蛋白質的功能，且在一些例子中，甚至增強原始蛋白質所需之功能。事實上，已知經修飾之胜肽（即，由胺基酸所組成之胜肽，與原始參考序列相較，於其中一、二或數個胺基酸已被修飾（即，取代、加入、刪除或插入））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，在一實施例中，本發明之胜肽可具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與擇自序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23 之胺基酸序列，其中加入、插入、刪除及/或取代一、二甚至更多個胺基酸。

熟悉此技藝人士認定改變一單一胺基酸或一小百分比之胺基酸之個別的加入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，它們常被意指為“保守取代 (conservative substitutions)”或“保守修飾 (conservative modifications)”，其中一蛋白質之改變形成一具有與原始蛋白質同功之經修飾的蛋白質。保守取代表提供功能相似胺基酸已為本技術領域所熟知。胺基酸支鏈之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彼此為保守取代之胺基酸：

- 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)、缬胺酸 (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 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胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。更進一步而言，經修飾之胜肽不應排除多形變體(polymorphic variant)之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發的胜肽、種間同質體(interspecies homologues)與 CDCA1 對偶基因(alleles)。

為了維持必須之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，可修飾(插入、加入、刪除及/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 3 個或更少。被修飾之胺基酸之百分比佳為 20% 或更少，更佳為 15% 或更少，甚至更佳為 10% 或更少或 1 至 5%。

本發明較佳胜肽 CDCA1-A24-10-119 (序列辨識號：3)、CDCA1-A24-10-335(序列辨識號：4)、CDCA1-A24-10-48 (序列辨識號：11)、CDCA1-A24-10-5 (序列辨識號：14)、CDCA1-A24-9-8(序列辨識號：22) 與 CDCA1-A24-9-56 (序列辨識號：22) 之同源分析(homology analysis)，確認了這些胜肽不與來自任何其他已知人類基因產物具有顯著同源性。因此，當使用這些胜肽於基因治療時，其產生未知

或非期望之免疫反應顯著降低。因此這些胜肽被預期對於引起在癌症病患中之抗 CDCA1 免疫反應為高度有效。

當使用於文中之免疫治療時，本發明之胜肽應被表現於一細胞或外來體之表面上，較佳作為一具有 HLA 抗原之複合物。因此，較佳為選擇不只誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且擁有對 HLA 抗原之高結合親和力之胜肽。為此目的，可藉由胺基酸殘基之取代、插入、刪除及/或加入來修飾胜肽以產生一經修飾之胜肽其具有經改善之結合親和力。除了自然表現之胜肽外，由於藉由結合至 HLA 抗原表現之胜肽序列的規則為已知 (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，為了增加 HLA-A24 之結合親和力，可能需要以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸取代 N 端的第二個胺基酸，及/或以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸取代在 C 端胺基酸。因此，本發明包括胜肽具有一胺基酸序列其係擇序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23，其中上述序列辨識號之胺基酸序列之 N 端的第二個胺基酸被苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸取代，及/或其中上述序列辨識號之胺基酸序列之 C 端胺基酸被苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸取代。可將取代引入不止於末端胺基酸，也可於胜肽之潛在 TCR 辨認位置。一些研究已證實於一胜肽中之胺基酸取代可等於或比原來更好，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)。

本發明也考慮一或兩個胺基酸加至所述胜肽之 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。

然而當胜肽序列與一具有不同功能之外生或內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。因此較佳為，首先使用可得之資料庫執行同源搜尋以避免胜肽之胺基酸序列符合其他蛋白質之胺基酸序列的情況。當由與目標胜肽相較不止存在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”意指當表現於抗原呈現細胞時，胜肽誘導細胞毒殺性 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、促進細胞毒殺性 T 淋巴球分解目標細胞與增加細胞毒殺性 T 淋巴球 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，並在以胜肽刺激之後與 CD8+細胞混合，且之後測量由抗目標細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球產生並釋放之 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 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: dependence on HLA class II restricted T(H) response 中的描述）。例如可以 ^{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活性。或者在攜帶經固定之胜肽之抗原呈現細胞存在下，藉由測量由細胞毒殺性 T 淋巴球產生並釋放的 IFN- γ ，且使用抗 IFN- γ 單株抗體來使於培養基上之抑制區可見來評估細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

由於如上述測試胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，發現具有對 HLA 抗原之高結合親和力之那些並不必然具有高細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。然而，發現被確認

且評估具有擇自序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23 之胺基酸序列的九胜肽或十胜肽具有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。因此以這些胜肽做為例子為本發明之較佳實施例。

除了上述修飾之外，本發明之胜肽也可連接其他物質，只要所產生之經連接的胜肽維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。適合的物質包括，例如胜肽、脂質、糖與糖鏈、乙醯基，天然與合成之聚合物等。胜肽可包括修飾，例如醯基化、支鏈氧化或磷酸化等，所提供之修飾不損壞原始胜肽之生物活性。可執行此修飾以授予額外之功能（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）。

本發明之胜肽也表現於一細胞（例如，抗原呈現細胞）或一外來體的表面與 HLA 抗原結合為一複合物，且之後誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。因此本發明也包括與於細胞或外來體表面上之 HLA 抗原形成複合物之胜肽。例如使用描述於日本專利申請 Kohyo Publications Nos. Hei 11-510507 與 W099/03499 中的方法與使用由一被治療及/或避免之病患得到之抗原呈現細胞可製備此種外來體。表現本發明胜

肽之外來體或細胞可做為疫苗被接種。

包含於上述複合物之 HLA 抗原形式必需符合需要治療及/或避免之個體的 HLA 抗原形式。例如於日本族群中，HLA-A24，特別是 HLA-A2402 為普遍，且因此適合日本病患之治療。對於獲得有效結果而言，較喜愛使用高表現於日本與高加索人中高度表現之 A24 型，而次型，例如 A2402 也發現使用。一般而言，於臨床，事先調查需要治療之病患的 HLA 形式，其可使具有對特定抗原高程度之結合親和力之胜肽或藉由抗原呈現具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之胜肽的選擇合適為可能。

當對外來體或細胞使用 A24 型 HLA 抗原時，較佳為使用具有擇自序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23 之胺基酸序列的胜肽。

此處，本發明之胜肽可被描述為“CDCA1 胜肽”或“CDCA1 多胜肽”。

III. CDCA1 胜肽之製備

使用熟知之技術可製備本發明之胜肽。例如，使用重組 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由兩或多個胜肽所組成之較長多胜肽。之後可分離此胜肽，即純化，以使其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。

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。適合此合成之一般胜肽合成方法的例子包括：

(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，調控序列之下游相當於啟動子序列），並將載體轉殖進入適合之宿主細胞。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

本發明也提供一多核苷酸，其編碼出任何本發明上述之胜肽。這些包括來自自然發生之 *CDCA1* 基因（GenBank Accession No. NM_145697（序列辨識號：34））的核苷酸序列與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“沈默變化(silent variation)”，其為保守修飾變化的一種。此處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。因此編碼出一胜肽之核酸的各沈默變化係為於各所揭露之序列中被暗示性描述。

本發明之多核苷酸可由 DNA、RNA 與其衍生物所組成。DNA 由鹼基，例如 A、T、C、G 所適合地組成，而 T 於 RNA 中為 U 所取代。

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於其之間。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，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，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，藉由經由使用一般重組技術，例如聚合酶與內切酶之多核苷酸操作。

可使用重組與化學合成技術以產生本發明之多核苷酸。例如，藉由插進入一適合之載體可產生一多核苷酸，當轉染進入一勝任細胞時，其可被表現。或者，使用 PCR 技術或表現於適合的宿主可將一多核苷酸放大（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，可合成多核苷酸。

V. 抗原呈現細胞

本發明也提供抗原呈現細胞，其表現形成於 HLA 抗原與本發明胜肽之間的複合物於其表面。藉由接觸本發明胜肽或引入編碼出本發明之胜肽於一合適形式所獲得之抗原呈現細胞可來自受到治療或避免之病患，與藉由其或與包括本發明之胜肽、外來體或細胞毒殺性 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淋巴球誘導作用，樹突細胞供給使用如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。措辭“誘導抗原呈現細胞”包括以本發明之胜肽或編碼出本發明胜肽之核苷酸接觸（刺激）一細胞，以表現形成於HLA抗原與本發明胜肽之間的複合物於細胞表面。或者，在引入本發明胜肽至抗原呈現細胞以允許抗原呈現細胞表現胜肽後，將抗原呈現細胞投予一個體作為一疫苗。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：以胜肽接觸步驟a之抗原呈現細胞；以及
- c：將載有胜肽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。或者，根據本發明，提供本發明胜肽的使用，用以製造一誘導抗原呈現細胞之藥學組合物。此外，本發明提供用以

製造誘導抗原呈現細胞之藥學組合物的方法或製程，其中方法包括以藥學上可接受之載體混合或配製本發明胜肽的步驟。另外，本發明也提供用以誘導抗原呈現細胞之本發明胜肽。自步驟(b)獲得之抗原呈現細胞可投予至一個體做為疫苗。

根據本發明一方面，抗原呈現細胞具高程度細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。在用語“高程度細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”中，高程度相對於藉由抗原呈現細胞沒有與胜肽接觸或與無法誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之胜肽接觸的程度。藉由包括 *in vitro* 將包含編碼出本發明胜肽之多核苷酸的基因轉移至抗原呈現細胞的步驟的方法，可製備此種具高程度細胞毒殺性 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，可使用各種於此領域一般被執行的方法，例如脂質體轉染(lipofection)、電穿孔法(electroporation)與磷酸鈣方法。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，基因遇到轉錄、轉譯與此類於細胞中，且之後藉由 MHC Class I 或 Class II 處理獲得之蛋白質，且經由一呈現途徑來繼續以呈現胜肽。

VI. 細胞毒殺性 T 淋巴球

經誘導抗任何本發明胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球增強 *in vivo* 以癌症細胞為標的之免疫反應，且因此可使用如一疫苗，就其本身而言在一方式中相似於胜肽。因此本發明也提供經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球其藉由任何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，自該個體收集細胞毒殺性 T 淋巴球或(2) 將來自個體之抗原呈現細胞與 CD8+細胞或周邊血液單核淋巴球與本發明之胜肽 *in vivo* 接觸(刺激)且之後分離細胞毒殺性 T 淋巴球。

已藉由表現本發明胜肽之抗原呈現細胞刺激誘導的細胞毒殺性 T 淋巴球可來自一受到治療及/或避免之病患，且藉由其或與包括本發明之胜肽或為了調節作用之外來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 CDCA1，或被以 *CDCA1* 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。

VII. T 細胞受體(TCR)

本發明也提供一組合物其包含編碼出可形成 T 細胞受體之次單位之多胜肽的核酸，與其使用方法。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 CDCA1。藉由使用本技術領域所知的方法可確認 α -與 β -支鏈之核酸，而 α -與 β -支鏈作為以一或多個本發明之胜肽所誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球的 T 細胞受體次單位(WO2007/032255 與 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。引出之 T 細胞受體可以高親合力結合表現 CDCA1 之目標細胞，且視需要 *in vivo* 與 *in vitro* 居中有有效殺死表現 CDCA1 之目標細胞。

編碼出 T 細胞受體次單位的核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。通常包含其之核酸或載體可被轉移至一 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。

本發明也提供細胞毒殺性 T 淋巴球，其在 HLA-24 存在下藉由以編碼出與 CDCA1 胜肽結合之 T 細胞受體次單位多胜肽的核酸轉導來製備，CDCA1 胜肽例如序列辨識號：3、4、11、14、22 與 23。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 vivo* 擴張(例如 Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。本發明之 T 細胞也可用來形成一致免疫組合物，其於一需要治療或保護之病患中治療或避免癌症為有效(WO2006/031221)。

避免與預防包括任何活性，其減少死亡率之負載或來自疾病之死亡率。避免與預防可方生於“初期、第二期與第三期避免層級”。初期避免與預防避免疾病之發展，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、減少血管新生。

治療及/或對癌症之預防，或，及/或其手術後復發的避免包括任何下列步驟，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、腫瘤退化與血管新生抑制的誘導。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，症狀之減少或改善構成有效治療及/或預防包括10%、20%、30%或更減輕或穩定疾病。

VIII. 藥學試劑或組合物

由於與正常組織相較，CDCA1 表現特別上升於一些癌症形式，包括乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌與非小細胞肺癌 (Cancer Res 2006 Nov 1; 66(21):10339-48, W02005/028676, W02005/089735, W02006/085684, W02007/013665, W02007/013671)，本發明之胜肽或編碼出

本發明胜肽之多核苷酸可用來治療或預防癌症或腫瘤，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用來治療及/或預防癌症或腫瘤，及/或避免其手術後之復發，其包括一或多個本發明胜肽或編碼出胜肽之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來體或細胞表面，例如抗原呈現細胞，以用來作為藥學試劑或組合物。此外，上述以本發明任何胜肽為標的之細胞毒殺性 T 淋巴球也可用來作為本發明藥學試劑或組合物之活性成分。

在另一實施例中，本發明也在製造用以治療癌症或腫瘤之藥學組合物或試劑中提供一活性成分的使用，其擇自：

(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核酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外來體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明更提供一用以治療癌症或腫瘤的活性成分擇自：

(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核酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外來體；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癌症或腫瘤之藥學組合物的方法或製程，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核酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外來體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球，
為活性成分。

在另一實施例中，本發明也提供一製造用以治療癌症或腫瘤之藥學組合物的方法或製程，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核酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外來體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明之藥學組合物或試劑可用於癌症或腫瘤之預防與其手術後復發的避免。

本發明之藥學組合物或試劑提供使用如一疫苗。在本發明全文中，措辭“疫苗”（也指一致免疫組合物）意指一物質，其藉由接種至動物具有誘導抗腫瘤免疫力。

本發明之藥學組合物或試劑可用於治療及/或避免癌症或腫瘤，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於任何及他哺乳動物，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。

根據本發明，具有擇自序列辨識號：3、4、11、14、22與23之胺基酸序列的多胜肽已被發現為HLA-A24限制之抗原決定位胜肽或可誘導強而專一之免疫反應的候選物。因此為了投予HLA抗原為HLA-A24之個體特別研究本發明藥學試劑，本發明藥學試劑包括任何具有序列辨識號：3、4、11、14、22與23之胺基酸序列的這些多胜肽。相同的實施至包含編碼出任何這些胜肽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或腫瘤不限於，且包括其中包含CDCA1之所有種類的癌症或腫瘤，包括，例如乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌與非小細胞肺癌。

本發明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。於此，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由癌症專一抗原所例示（例如經定義之腫瘤相關抗原），但不限於此。

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，只要此物質不抑制活性成分之抗腫瘤功效，活性成分例如任何本發明胜肽。例如，配方可包括抗發炎試劑、止痛劑、化學治療與其類似。除了包括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生理試劑相繼或同時投予。藥劑與生理試劑的量依照，例如使用何種生理試劑、要治療之疾病與投藥的計畫與方式。

應瞭解的是，除了此處特別提及之成分外，本發明之藥學試劑與組合物可包括本技術領域一般之其他試劑，其關於討論中之配方形式。

在本發明一實施例中，本發明之藥學試劑或組合物可被包含於製造之商品與套組，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。製造之商品可包含具有一標籤之任何本發明藥學試劑或組成物的容器。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。

藥學試劑或組合物若需要可被呈現於一包或一分配器，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)。包或分配器可伴隨著投藥指示。

(1) 藥學試劑或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，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。

可將本發明之胜肽製備成一組合，由兩或更多個本發明之胜肽所組成以 *in vivo* 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。胜肽組合可以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。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之細胞毒殺性 T 淋巴球被誘導。

或者，表現任何本發明之胜肽於其細胞表面之抗原細胞可被投予一個體，且因此於個體中誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且可增加朝向癌細胞之侵犯，表現任何本發明之胜肽於其細胞表面之抗原細胞可藉由以本發明之胜肽刺激來自一個體之抗原呈現細胞（例如樹突細胞）來獲得。

治療及/或避免癌症或腫瘤之藥學試劑或組合物，其包括本發明之一胜肽為活性成分，也可包含一已知有效建立細胞免疫力之佐劑。或者，藥學試劑或組合物可與其他活性成分一起被投予或可以配製成細粒被投予。佐劑指一化合物，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。此處考慮之佐劑，包括於文獻(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)中所描述的那些。適合之佐劑的例子包括，但不限於磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍亂毒素、沙門氏菌毒素與其類似。

更進一步而言，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。

在一些實施例中，本發明之藥學試劑或組合物可更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 淋巴球的試劑。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微胞或顆粒中、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）。

投藥之方法可為口服、皮膚內、皮下、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 1000 mg，例如 0.001 mg 至 1000 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) 藥學試劑或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括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 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 for a description of homologous recombination cassette vectors）。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; and WO 98/04720。DNA 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。另一載體為 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個體可為直接, 於其例子中, 個體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個體。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)。也可用於本發明之於重組 DNA 技術中一般熟知的方法如於 eds. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; and Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990 中所述。

投藥之方法可為口服、皮膚內、皮下、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 0.001 mg 至 1000 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。

IX. 使用胜肽、外來體、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編碼出此胜肽之多核苷酸來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來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、外來體與抗原呈現細胞可與任何其他化合物結合使用，只要化合物不抑制其細胞毒殺性 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，且除此之外，包括胜肽與多核苷酸的那些也可用來誘導抗原呈現細胞，如下所討論。

(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編碼出此胜肽之多核苷酸來誘導抗原呈現細胞的方法。如前述段落“V. 抗原呈現細胞”中所述執行抗原呈現細胞的誘導。本發明也提供誘導具有高程度細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法，其之誘導也已於先前項目“V. 抗原呈現細胞”下所提及。

(2) 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法

更進一步而言，本發明提供使用本發明胜肽、編碼出此胜肽之多核苷酸、表現此胜肽之外來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一多胜肽之多核苷酸來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，此多胜肽具形成一 T 細胞受體次單位的能力，而此 T 細胞受體次單位辨認一本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。較佳為，誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法包括至少一步驟擇自一由下列所組成之群組：

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

b：將一多核苷酸引入一 CD8+ T 細胞，其中該多核苷酸編碼出一多胜肽，該多胜肽具形成一 T 細胞受體次單位的能力，而該 T 細胞受體次單位辨認一本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。

當本發明胜肽投予一個體時，誘導於個體體內之細胞毒殺性 T 淋巴球，且以癌症細胞為標的之免疫反應強度增強。或者，胜肽或編碼出此胜肽之多核苷酸可使用為一 *ex vivo* 治療方法，於其中來自個體之抗原呈現細胞與 CD8+T 細胞或周邊血液單核淋巴球 *in vitro* 以本發明胜肽接觸（刺激），且在誘導細胞毒殺性 T 淋巴球後，經活化之細胞毒殺性 T 淋巴球回至個體內。例如，方法可包括步驟：

a：自個體收集抗原呈現細胞；

b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與此胜肽接觸；

c：將步驟 b 之抗原呈現細胞與 CD8+T 細胞混合，且共培養以誘導細胞毒殺性 T 淋巴球；以及

d：自步驟 c 之共培養收集 CD8+T 細胞。

或者，根據本發明，提供用以製造誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之藥學試劑或組合物之本發明胜肽的使用。此外，本發明提供製造誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之藥學試劑或組合物的方法或製程，其中方法包括將本發明胜肽與藥學上可接受之載體混合或配製的步驟。更進一步而言，本發明

78年9月18日修(更)正替換頁

也提供用以誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之本發明胜肽。

藉由步驟 d 所獲得之具細胞毒殺性之 CD8+T 細胞可投予至一個體做為疫苗。於上述步驟 c 中要與 CD8+T 細胞混合之抗原呈現細胞也可藉由轉移編碼出本發明胜肽之基因進入抗原呈現細胞來製備，如先前詳述於段落“V. 抗原呈現細胞”中；但不限於此。因此，任何抗原呈現細胞或外來體，其有效表現胜肽至 T 細胞可用於本發明方法。

呈現下列實施例以說明本發明與以協助熟悉此技藝人士製造與使用本發明。實施例並不傾向於在其他方面限制本發明範圍任何方式中。

【實施例】

材料與方法

細胞株

藉由以 Epstein-bar 病毒轉型進入 HLA-A24+人類 B 細胞以建立 A24 類淋巴母細胞株(Lymphoblastoid cell line, A24LCL)。

來自 CDCA1 之胜肽的候選物選擇

使用結合預測軟體“BIMAS”(http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)預測來自 CDCA1 之 9-員與 10 員胜肽，其結合至 HLA-A*2402，其演算法已由 Parker KC *et al.* (J Immunol 1994, 152(1): 163-75) 與 Kuzushima K *et al.* (Blood 2001, 98(6):

1872-81)所敘述。根據一標準固相合成方法且藉由逆相高效能液體層析(reversed phase high performance liquid chromatography, HPLC)之純化由 American Peptide Company Inc. (Sunnyvale, CA)來合成這些胜肽。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 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-Plaque (Pharmacia)溶液分離自一正常自願者(HLA-A*2402+)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 μ g/ml 之 β -2 微球蛋白(beta 2-microglobulin)

存在下以 $20 \mu\text{g/ml}$ 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 Mitomycin C (MMC) ($30 \mu\text{g/ml}$, 30 min) 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+T 細胞混合，CD8+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+ 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 A24LCL 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)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 之含有由 MMC 去活化之兩種人類 B 類淋巴母細胞株之 AIM-V/5% 自身取得血清培養基，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 淋巴球複製的建立

稀釋以使細胞毒殺性 T 淋巴球以 0.3、1 與 3 細胞毒殺性 T 淋巴球/孔的含量於 96 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 2 種兩種人類 B 類淋巴母細胞株、30 ng/ml 之抗-CD 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。特別地，製備胜肽脈衝之 A24LCL (1×10^4 /well) 為刺激細胞。培養之細胞於 48 孔中做為應答細胞。於製造步驟下執行 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或 HLA-A24 或兩者之細胞的建立

藉由 PCR 放大編碼出目標基因或 HLA-A24 之開放讀取框的 cDNA。複製 PCR 放大產物進入 pCAGGS 載體中。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen)，根據廠商建議步驟，將質體轉染進入 COS7 其為無目標基因與 HLA-A24 之細胞株。轉染 2 天後，將經轉染之細胞以維爾烯 (versene)(Invitrogen) 收取，且做為細胞毒殺性 T 淋巴球活性分析之目標細胞 (5×10^4 cells/ well)。

結果

來自 CDCA1 之 HLA-A24 結合胜肽的預測

表 1 以最高之結合親和力顯示 CDCA1 之 HLA-A*2402 結合胜肽。總共選擇 40 個具有潛在 HLA-A*2402 結合能力之胜肽且將其試驗以確定抗原決定位胜肽。

表 1：來自 CDCA1 之 HLA-A24 結合胜肽

起始位置	胺基酸序列	結合分數	序列辨識號
36	LYPNPKPEVL	300	1
74	MYPHLMEGFL	300	2
119	RFLSGIINFI	25.2	3
335	KTEENSFKRL	17.28	4
432	KYHDGIEKAA	16.8	5
181	KQLSDGIQEL	15.84	6
64	FYMMPVNSEV	11.55	7
295	LYQKKIQDLS	10.5	8
309	KLASILKESL	9.6	9
146	KSSADKMQQL	9.6	10
48	IYMRALQIVY	9	11
185	DGIQELQQSL	8.64	12
231	VSLKEIQESL	8.4	13
5	SFPRYNVAEI	8.25	14

✓ 2

✓ 3

✓ 26

✓ 9

394	INQEIQKIKL	7.92	15
322	DQIESDESEL	7.92	16
87	NLVTHLDSFL	7.2	17
368	QYKRTVIEDC	7	18
295	LYQKKIQDL	360	19
278	IYGDSVDCL	240	20
74	MYPHLMEGF	180	21
8	RYNVAEIVI	150	22
56	VYGIRLEHF	100	23
422	IFLNLKTAL	36	24
119	RFLSGIINF	30	25
144	QYKSSADKM	27.5	26
418	KSQEIFLNL	24.192	27
197	DFHQKTIVL	20	28
275	KYEIYGDSV	15	29
432	KYHKGIEKA	13.2	30
387	VYERVTTIN	10.5	31
186	GIQELQQSL	10.368	32
48	IYMRALQIV	9	33

✓ 3
✓ 32

起始位置指自 CDCA1 之 N 端的胺基酸殘基數目。結合分數來自 “BIMAS”。

以 *HLA-A*2402* 限制之來自 *CDCA1* 之預測胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球與經來自 *CDCA1* 之胜肽刺激的細胞毒殺性 T 淋巴球株的建立

根據敘述於“材料與方法”之步驟產生對於那些來自 *CDCA1* 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測定胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（第 1a-f 圖）。其顯示與控制組孔洞相較，*CDCA1-A24-10-119*（序列辨識號：3）、*CDCA1-A24-10-335*（序列辨識號：4）、*CDCA1-A24-10-48*（序列辨識號：11）、*CDCA1-A24-10-5*（序列辨識號：14）、*CDCA1-A24-9-8*（序列辨識號：22）與 *CDCA1-A24-9-56*（序列辨識號：23）顯示強有力之 IFN- γ 產生。此外，經 *CDCA1-A24-10-119*（序列辨識號：3）刺激之於正孔洞編號 #8 中之細胞、經 *CDCA1-A24-10-335*（序列辨識號：4）刺激之於正孔洞編號 #1 中之細胞、經 *CDCA1-A24-10-48*（序列辨識號：11）刺激之於正孔洞編號 #1 中之細胞、經 *CDCA1-A24-10-5*（序列辨識號：14）刺激之於正孔洞編號 #4 中之細胞、經 *CDCA1-A24-9-8*（序列辨識號：22）刺激之於正孔洞編號 #2 中之細胞與經 *CDCA1-A24-9-56* 刺激之於正孔洞編號 #2 中的細胞（序列辨識號：23）被擴張且建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析測試那些細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株之細胞毒殺性 T 淋巴球活性（第 2a-f 圖）。其顯示與無胜肽脈衝之目標細胞相較，所有細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強的抗對應胜肽脈衝之目標

細胞的 IFN- γ 產生。另一方面，藉由其他胜肽刺激無法建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株，除非胜肽具有與 HLA-A*2404 之可能的結合能力。例如，以 CDCA1-A24-10-74（序列辨識號：2）刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球反應之負資料顯示於第 1g 圖與第 2g 圖。此處結果指出來自 CDCA1 之六胜肽具有誘導強的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的能力。

抗 CDCA1 專一胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的建立

藉由自細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株限數稀釋來建立細胞毒殺性 T 淋巴球複製如於“材料與方法”中所述，且以 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析測試來測定來自抗胜肽脈衝之目標細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球複製之 IFN- γ 產生。於第 3 圖，自以序列辨識號：23 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球複製測試到強的 IFN- γ 產生。

抗外生表現 CDCA1 與 HLA-A*2402 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性

測試經提升抗這些胜肽之所建立的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株其對於辨認外生表現 CDCA1 與 HLA-A*2402 分子之目標細胞的能力。使用由對應之胜肽提升的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株做為影響細胞來測試抗 COS7 細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性，而 COS7 細胞經全長之 CDCA1 與 HLA-A*2402 基因轉染（對於外生表現 CDCA1 與 HLA-A*2402 基因之目標細胞的特定模式）。COS7 細胞以全長 CDCA1 或

HLA-A*2402 基因轉染製備為控制組。於第 4 圖中，以序列辨識號：23 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強的抗表現 CDCA1 與 HLA-A*2402 兩者之 COS7 細胞的能力。另一方面，抗控制組沒有偵測到顯著專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。因此，這些資料清楚證明具有序列辨識號：23 之胺基酸序列的胜肽自然表現於具有 HLA-A*2402 分子之目標細胞上，且由細胞毒殺性 T 淋巴球所辨認。這些結果顯示此來自 CDCA1 之胜肽對於癌症免疫治療，特別地是做為給具 CDCA1 過度表現之腫瘤的病患之癌症疫苗為合適的。

抗原胜肽之同源分析

以 CDCA1-A24-10-119 (序列辨識號：3)、以 CDCA1-A24-10-335 (序列辨識號：4)、以 CDCA1-A24-10-48 (序列辨識號：11)、以 CDCA1-A24-10-5 (序列辨識號：14)、以 CDCA1-A24-9-8 (序列辨識號：22) 與以 CDCA1-A24-9-56 (序列辨識號：23) 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 CDCA1-A24-10-119 (序列辨識號：3)、CDCA1-A24-10-335 (序列辨識號：4)、CDCA1-A24-10-48 (序列辨識號：11)、CDCA1-A24-10-5 (序列辨識號：14)、CDCA1-A24-9-8 (序列辨識號：22) 與 CDCA1-A24-9-56 (序列辨識號：23) 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

(<http://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 CDCA1-A24-10-119 (序列辨識號：3)、CDCA1-A24-10-335 (序列辨識號：4)、CDCA1-A24-10-48 (序列辨識號：11)、CDCA1-A24-10-5 (序列辨識號：14)、CDCA1-A24-9-8 (序列辨識號：22) 與 CDCA1-A24-9-56 (序列辨識號：23) 之序列為獨特的，且因此只有很小可能性分子會對於一些非相關分子提高非傾向之免疫反應。

因此，確認新穎之來自 CDCA1 之 HLA-A24 抗原決定位胜肽且證明其適合癌症免疫治療。

產業利用性

本發明敘述新的腫瘤相關抗原，特別是來自 CDCA1 的那些，其誘導強且專一的抗腫瘤免疫反應，且對於癌症形式之寬的範圍而言具有應用性。此腫瘤相關抗原准許更進一步發展為抗 CDCA1 相關疾病之胜肽疫苗，例如癌症，特別是睪丸癌、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。

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，本發明之邊界與範圍為所附之申請專利範圍所界定

【圖式簡單說明】

第 1 圖由一系列照片(a)至(g)所組成，顯示於細胞毒殺性 T 淋巴球上之 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析(ELISPOT)的結果，其中以來自 CDCA1 之胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球。分別與控制組相較，於孔(well)編號#8 中之以 CDCA1-A24-10-119 (序列辨識號：3) (a)、於孔編號#1 中以 CDCA1-A24-10-335 (序列辨識號：4) (b)、於孔編號#1 中以 CDCA1-A24-10-48 (序列辨識號：11) (c)、於孔編號#4 中以 CDCA1-A24-10-5 (序列辨識號：14) (d)、於孔編號#2 中以 CDCA1-A24-9-8 (序列辨識號：22) (e)與於孔編號#2 中以 CDCA1-A24-9-56 (序列辨識號：23) (f)刺激的細胞毒殺性 T 淋巴球，顯示強有力之 IFN- γ 產生。相對地，於以 CDCA1-A24-10-74 (序列辨識號：2) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球中沒有偵測到專一之抗胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生(g)。擴展於孔中以矩形框顯示的細胞以建立細胞毒殺性 T 淋巴球株。於圖中，“+”指出抗胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生，“-”指出抗無胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 2 圖由一系列曲線圖(a)至(g)所組成，代表於上述 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析中，以 CDCA1-A24-10-119 (序列辨識號：3) (a)、以 CDCA1-A24-10-335 (序列辨識號：4) (b)、以 CDCA1-A24-10-48 (序列辨識號：11) (c)、以 CDCA1-A24-10-5 (序列辨識號：14) (d)、以 CDCA1-A24-9-8 (序列辨識號：22) (e)與以 CDCA1-A24-9-56

(序列辨識號：23)(f)建立之細胞毒殺性 T 淋巴球上之 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析的結果。此結果證明與控制組相較，藉由以各胜肽刺激而建立之細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強有力之 IFN- γ 產生。相對地，於以 CDCA1-A24-10-74 (序列辨識號：2) 刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球中無觀察到專一之抗胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生(g)。於圖中，“+”指出抗適合胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生，“-”指出抗無任何胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 3 圖為一曲線圖顯示細胞毒殺性 T 淋巴球複製之 IFN- γ 產生，其中細胞毒殺性 T 淋巴球複製藉由自以序列辨識號：23 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球限數稀釋(limiting dilution)來建立。結果證明與控制組相較，藉由以序列辨識號：23 刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製顯示強有力之 IFN- γ 產生。“+”指出抗序列辨識號：23 脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生，“-”指出抗無任何胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 4 圖為一曲線圖，顯示抗外生性表現 CDCA1 與 HLA-A*2402 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性。以 CDCA1-A24-9-56 (序列辨識號：23) 建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製顯示高的抗 COS7 細胞活性，其中 COS7 細胞以 CDCA1 與 HLA-A*2402 兩者轉染(菱形)。相對地，沒有偵測到抗目標細胞的顯著專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性，而此目標細胞表現 HLA-A*2402(三角形)或 CDCA1(圓形)。

【 主 要 元 件 符 號 說 明 】

無

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 2

Met Tyr Pro His Leu Met Glu Gly Phe Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 3

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

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 e

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 4

Lys Thr Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu
1 5 10

<210> 5

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 5

Lys Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 6

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

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 7

Phe Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val

1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 8

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

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 9

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

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 10

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

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 11

Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 12

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

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 16

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

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 17

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

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 18

Gln Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys
1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 19

Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp 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

Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu
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

Met Tyr Pro His Leu Met Glu Gly Phe
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 e

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 22

Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile
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

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe
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

Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 e

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 25

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 26

Gln Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 27

Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 28

Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu
1 5

<210> 29

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 29

Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 30

Lys Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 31

Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn
1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成胜肽序列

<400> 32

Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln Ser Leu
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成胜肽序列

<400> 33

Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val
 1 5

<210> 34
 <211> 1980
 <212> DNA
 <213> 人類

<220>
 <221> CDS
 <222> (301)..(1695)

<400> 34

gcggaatggg gcgggacttc cagtaggagg cggcaagttt gaaaagtgat gacgggtgac 60

gtttgctgat ttttgacttt gctttagct gctccccgaa ctgccgtct tcctgtcggc 120

ggccggcact gtaggtgagc gcgagaggac ggaggaagga agcctgcaga cagacgcctt 180

ctccatccca aggcgcgggc aggtgccggg acgctggggc tggcgggtgtt ttcgtcgtgc 240

tcagcgggtgg gaggaggcgg aagaaaccag agcctgggag attaacagga aacttccaag 300

atg gaa act ttg tct ttc ccc aga tat aat gta gct gag att gtg att 348

Met Glu Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile

1 5 10 15

cat att cgc aat aag atc tta aca gga gct gat ggt aaa aac ctc acc 396

His Ile Arg Asn Lys Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr

20 25 30

aag aat gat ctt tat cca aat cca aag cct gaa gtc ttg cac atg atc 444

Lys Asn Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile

35 40 45

tac atg aga gcc tta caa ata gta tat gga att cga ctg gaa cat ttt 492

Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe

50 55 60

tac atg atg cca gtg aac tct gaa gtc atg tat cca cat tta atg gaa 540

Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met Tyr Pro His Leu Met Glu

65 70 75 80

ggc ttc tta cca ttc agc aat tta gtt act cat ctg gac tca ttt ttg 588

Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu

85 90 95

cct atc tgc cgg gtg aat gac ttt gag act gct gat att cta tgt cca 636

Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro

100	105	110	
aaa gca aaa cgg aca agt cgg ttt tta agt ggc att atc aac ttt att			684
Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile			
115	120	125	
cac ttc aga gaa gca tgc cgt gaa acg tat atg gaa ttt ctt tgg caa			732
His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln			
130	135	140	
tat aaa tcc tct gcg gac aaa atg caa cag tta aac gcc gca cac cag			780
Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln			
145	150	155	160
gag gca tta atg aaa ctg gag aga ctt gat tct gtt cca gtt gaa gag			828
Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu			
165	170	175	
caa gaa gag ttc aag cag ctt tca gat gga att cag gag cta caa caa			876
Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln			
180	185	190	
tca cta aat cag gat ttt cat caa aaa acg ata gtg ctg caa gag gga			924
Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly			
195	200	205	
aat tcc caa aag aag tca aat att tca gag aaa acc aag cgt ttg aat			972
Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn			
210	215	220	
gaa cta aaa ttg tcg gtg gtt tct ttg aaa gaa ata caa gag agt ttg			1020
Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu			
225	230	235	240
aaa aca aaa att gtg gat tct cca gag aag tta aag aat tat aaa gaa			1068
Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu			
245	250	255	

aaa atg aaa gat acg gtc cag aag ctt aaa aat gcc aga caa gaa gtg	1116
Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val	
260 265 270	
gtg gag aaa tat gaa atc tat gga gac tca gtt gac tgc ctg cct tca	1164
Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser	
275 280 285	
tgt cag ttg gaa gtg cag tta tat caa aag aaa ata cag gac ctt tca	1212
Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser	
290 295 300	
gat aat agg gaa aaa tta gcc agt atc tta aag gag agc ctg aac ttg	1260
Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu	
305 310 315 320	
gag gac caa att gag agt gat gag tca gaa ctg aag aaa ttg aag act	1308
Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr	
325 330 335	
gaa gaa aat tcg ttc aaa aga ctg atg att gtg aag aag gaa aaa ctt	1356
Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu	
340 345 350	
gcc aca gca caa ttc aaa ata aat aag aag cat gaa gat gtt aag caa	1404
Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln	
355 360 365	
tac aaa cgc aca gta att gag gat tgc aat aaa gtt caa gaa aaa aga	1452
Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg	
370 375 380	
ggt gct gtc tat gaa cga gta acc aca att aat caa gaa atc caa aaa	1500
Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys	
385 390 395 400	
att aaa ctt gga att caa caa cta aaa gat gct gct gaa agg gag aaa	1548
Ile Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys	

405	410	415	
ctg aag tcc cag gaa ata ttt cta aac ttg aaa act gct ttg gag aaa			1596
Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys			
420	425	430	
tac cac gac ggt att gaa aag gca gca gag gac tcc tat gct aag ata			1644
Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile			
435	440	445	
gat gag aag aca gct gaa ctg aag agg aag atg ttc aaa atg tca acc			1692
Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr			
450	455	460	
tga ttaacaaaat tacatgtctt tttgtaaatg gcttgccatc ttttaatttt			1745
ctatttagaa agaaaagttg aagcgaatgg aagtatcaga agtaccaaat aatgttggct			1805
tcatcagttt ttatacactc tcataagtag ttaataagat gaatttaatg taggccttta			1865
ttaatattata attaaaataa cttgtgcagc tattcatgtc tctactctgc cccttggtgt			1925
aaatagtttg agtaaaacaa aactagttac ctttgaaata tatatatattt tttct			1980

<210> 35
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Glu Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile			
1	5	10	15

His Ile Arg Asn Lys Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr

20

25

30

Lys Asn Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile
35 40 45

Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe
50 55 60

Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met Tyr Pro His Leu Met Glu
65 70 75 80

Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu
85 90 95

Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro
100 105 110

Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile
115 120 125

His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln
130 135 140

Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln
145 150 155 160

Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu
165 170 175

Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln
 180 185 190

Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly
 195 200 205

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

Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu
 225 230 235 240

Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu
 245 250 255

Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val
 260 265 270

Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser
 275 280 285

Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser
 290 295 300

Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu
 305 310 315 320

Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr

107年1月1日修(更)正替换頁

325

330

335

Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu
340 345 350

Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln
355 360 365

Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg
370 375 380

Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys
385 390 395 400

Ile Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys
405 410 415

Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys
420 425 430

Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile
435 440 445

Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr
450 455 460

公 告 本

七、申請專利範圍：

1. 一種下列(a)或(b)之經分離的胜肽：
 - (a) 一經分離之胜肽，其係由擇自由序列辨識號：23、3、4、11、14 與 22 所組成之群組所組成；
 - (b) 一經分離之胜肽，其係由擇自由序列辨識號：23、3、4、11、14 與 22 所組成之群組所組成，於其中 1 或 2 個胺基酸被取代，其中此胜肽具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之經分離的胜肽，其具下列所述之特徵之一或兩者：
 - (a) 來自序列辨識號：23、3、4、11、14 或 22 之胺基酸序列之 N 端的第二個胺基酸被修飾為一胺基酸，其係擇自一由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸與色胺酸所組成之群組；以及
 - (b) 該序列辨識號：23、3、4、11、14 或 22 之胺基酸序列之 C 端胺基酸被修飾為一胺基酸，其擇自一由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸與甲硫胺酸所組成之群組。
3. 一種經分離的多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽。
4. 一種體外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方法，藉由使用如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽及/或編碼出該胜肽的一多核苷酸。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之方法，其中該方法包

括下列所述之步驟之一或兩者：

(a) 將一抗原呈現細胞與該胜肽接觸，以及

(b) 將該多核苷酸引入一抗原呈現細胞。

6. 一種經分離的抗原呈現細胞，其表現如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽於其表面。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之抗原呈現細胞，其中藉由以使用該胜肽及 / 或編碼出該胜肽之一多核苷酸來誘導具有高度細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之一抗原呈現細胞的一方法來誘導該細胞。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之該抗原呈現細胞，其中該方法包括下列步驟之一或兩者：

(a) 將一抗原呈現細胞與該胜肽接觸，以及

(b) 將該多核苷酸引入一抗原呈現細胞中。

9. 一種體外誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，藉由使用：

(a) 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；

(b) 一多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；

(c) 一抗原呈現細胞及 / 或一外來體(exosome)，其表現如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽於其表面；

(d) 一多核苷酸，其編碼出一多胜肽，該多胜肽具形成一 T 細胞受體次單位的能力，該 T 細胞受體次單位辨認一如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽與一人類白血球組織抗原(human leukocyte antigen, HLA)之複合物；

或

(e) 其組合。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中該方法包括至少一步驟係擇自由下列所組成之群組：

(a) 將一 CD8+ T 細胞與一抗原呈現細胞及/或一外來體接觸，該抗原呈現細胞及/或該外來體表現該胜肽於其表面，以及；

(b) 將一多核苷酸引入一 CD8+ T 細胞，其中該多核苷酸編碼出一多胜肽，該多胜肽具形成一 T 細胞受體次單位的能力，該 T 細胞受體次單位辨認該胜肽與一人類白血球組織抗原的複合物。

11. 一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的組合物，其中該組合物包括一活性成分係擇自由下列所組成之群組：

(a) 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；

(b) 一多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；

(c) 一抗原呈現細胞及/或一外來體，其表現如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽於其表面；以及

(d) 其組合。

12. 一種經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由使用如申請專利範圍第 9 項所述之方法來誘導。

13. 一種經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由使用如申請專利範圍第 10 項所述之方法來誘導。

14. 一種藥學組合物，包括一活性成分結合一藥學上

可接受之載體，該活性成分係擇自由下列所組成之群組：

(a) 至少一個如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽；

(b) 至少一個編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽的多核苷酸；

(c) 一抗原呈現細胞及/或一外來體，其表現至少一個如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽於其表面；

(d) 一經分離的細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由使用以使用下列(1)至(5)之任一個來誘導一細胞毒殺性 T 淋巴球的方法來誘導：(1) 如申請專利範圍第 1 或 2 項之所述之一胜肽；(2) 一多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽；(3) 一抗原呈現細胞及/或一外來體，其表現如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽於其表面；(4) 一多核苷酸，其編碼出具有形成一 T 細胞受體次單元的一多胜肽，該 T 細胞受體次單元辨認如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽與一人類白血球組織抗原的複合物；或(5) 上述(1)至(4)之兩者或更多的組合；以及

(e) 其組合，

而該藥學上可接受之載體係為了一目的而配製，該目的擇自由下列所組成之群組：

(i) 癌症之治療；

(ii) 癌症之預防；

(iii) 癌症之手術後復發的避免；

(iv) 其組合。

15. 一種下列(a)-(e)任一種之用途，其係用於製備於

個體中誘發抗癌之免疫反應的組合物

(a) 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；

(b) 一多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；

(c) 一抗原呈現細胞及/或一外來體，其表現如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽於其表面；

(d) 一經分離的細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由使用以使用下列(1)至(5)之任一個來誘導一細胞毒殺性 T 淋巴球的方法來誘導：(1) 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；(2) 一多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽；(3) 一抗原呈現細胞及/或一外來體，其表現如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽於其表面；(4) 一多核苷酸，其編碼出具有形成一 T 細胞受體次單元的一多胜肽，該 T 細胞受體次單元辨認如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽與一人類白血球組織抗原的複合物；或(5) 上述(1)至(4)之兩者或更多的組合；或

(e) 其組合
的步驟。

16. 一種於個體中誘導抗腫瘤免疫力的疫苗，該疫苗包括一活性成分，其係擇自由下列所組成之群組：

(a) 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；

(b) 一多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；

(c) 一抗原呈現細胞及/或一外來體，其表現如申請專

利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽於其表面；

(d) 一經分離的細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由使用以使用下列(1)至(5)之任一個來誘導一細胞毒殺性 T 淋巴球的方法來誘導：(1) 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽；(2) 一多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽；(3) 一抗原呈現細胞及/或一外來體，其表現如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽於其表面；(4) 一多核苷酸，其編碼出具有形成一 T 細胞受體次單元的一多胜肽，該 T 細胞受體次單元辨認如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一胜肽與一人類白血球組織抗原的複合物；或(5) 上述(1)至(4)之兩者或更多的組合；以及

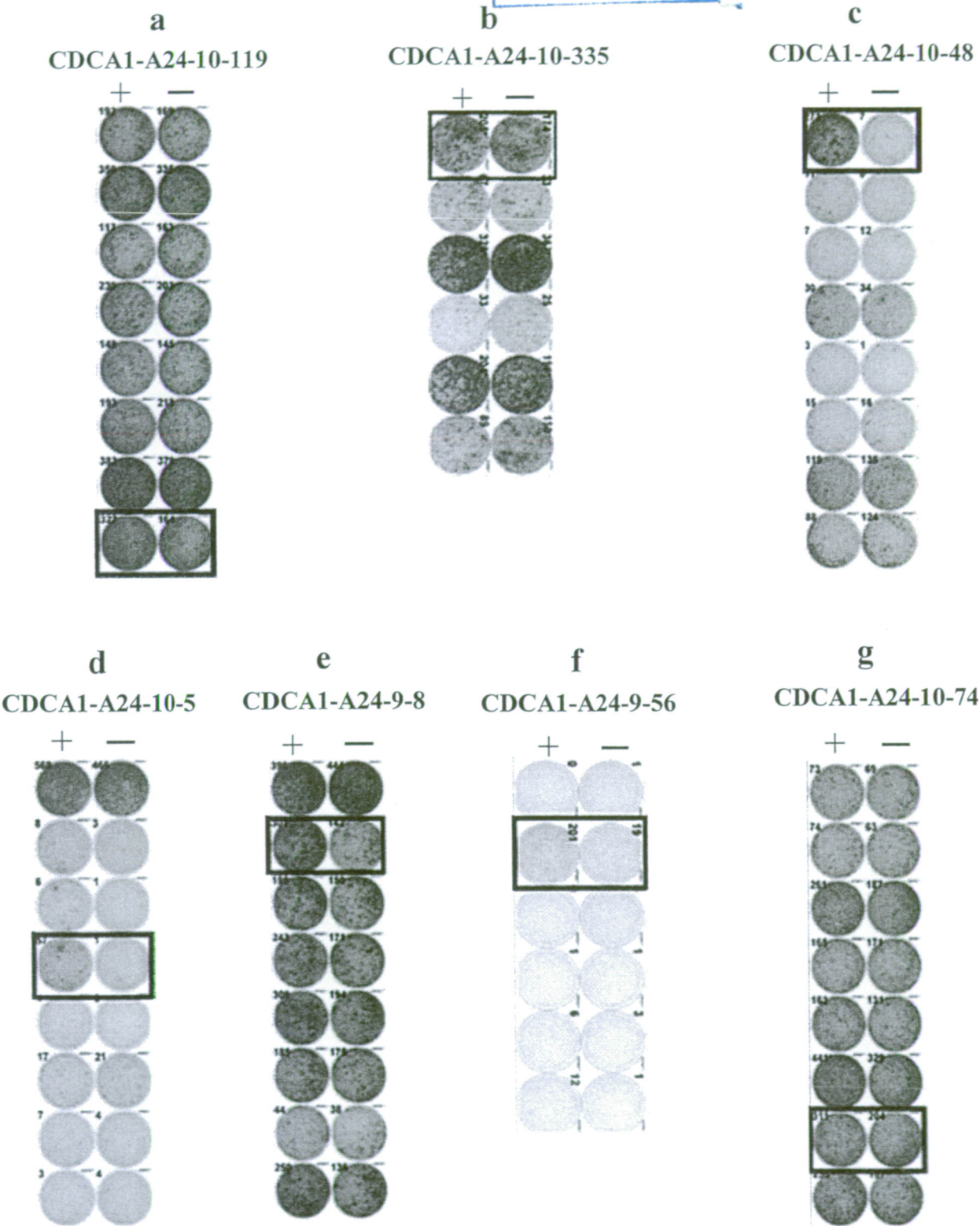
(e) 其組合。

17. 如申請專利範圍第 14 項所述之藥學組合物，配製其以投予一人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-24 的個體。

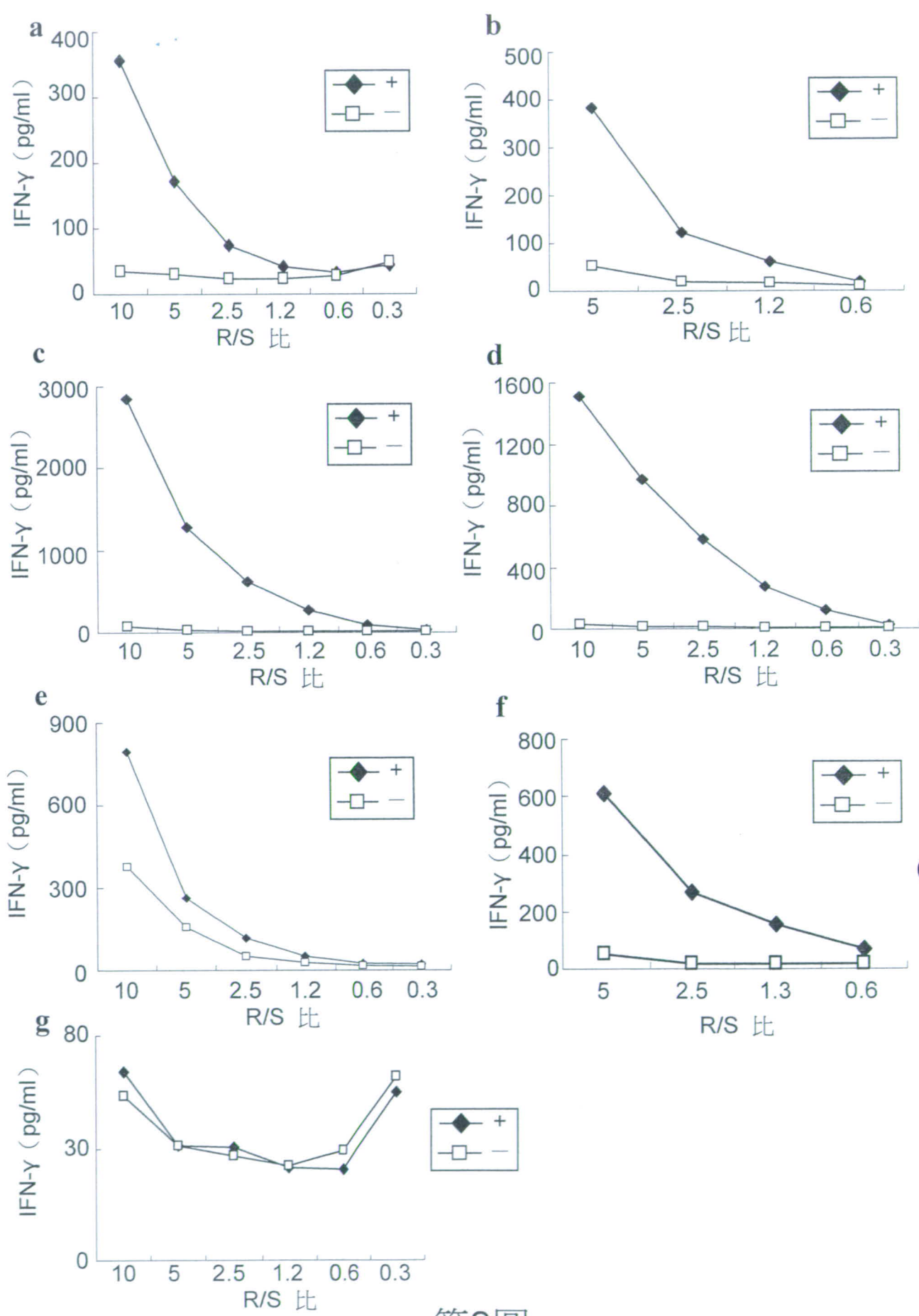
18. 如申請專利範圍第 15 項所述之用途，其中該個體的人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-24。

19. 如申請專利範圍第 16 項所述之疫苗，配製其以投予一人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-24 的個體。

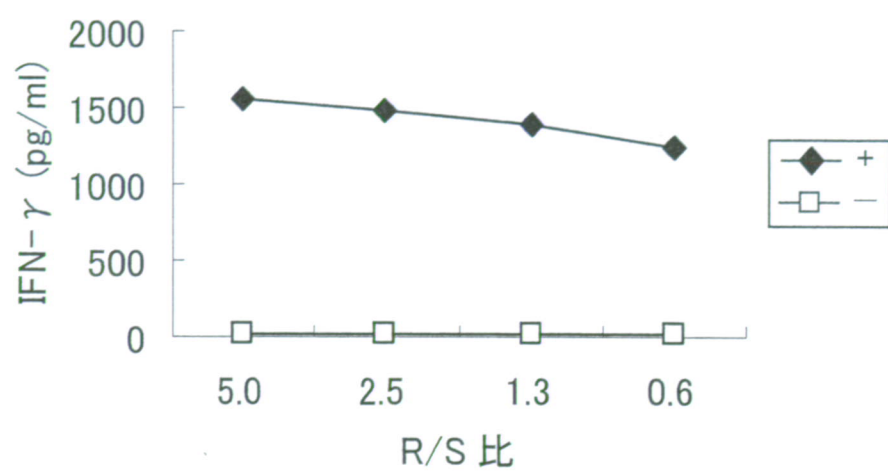
公告本



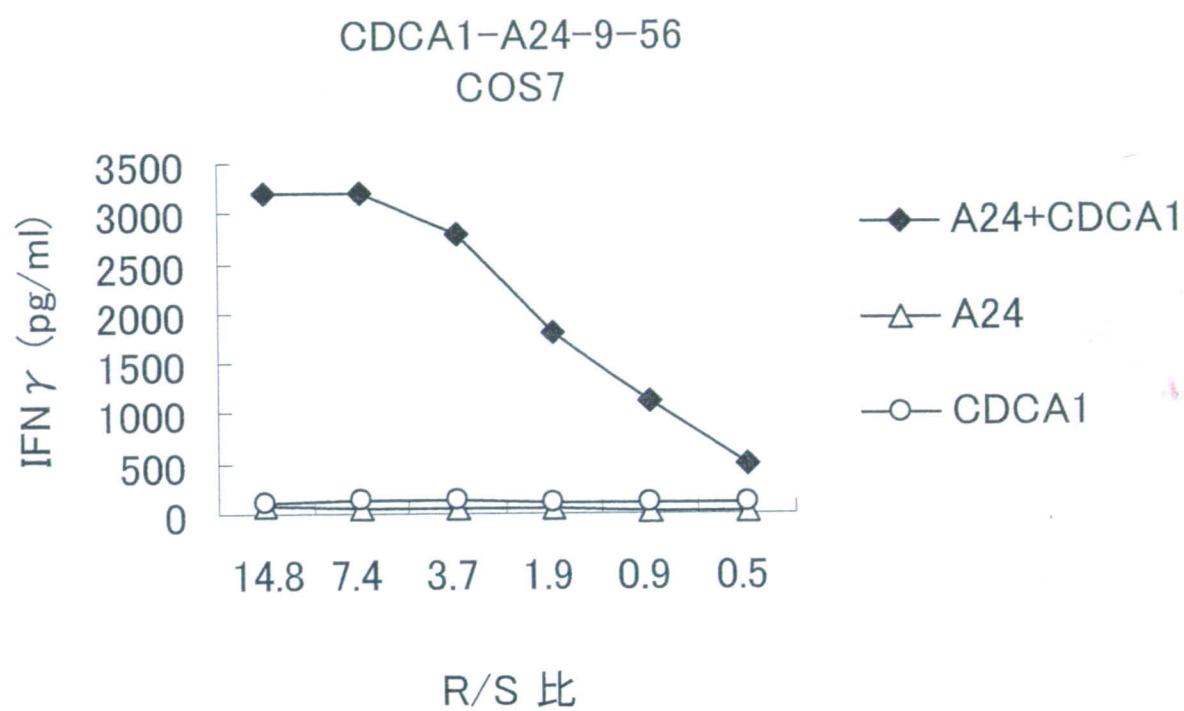
第1圖



第2圖



第3圖



第4圖