



(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 201627003 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：105112382

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 23 日

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

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/04/02 美國

61/320,577

(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：中村祐輔 NAKAMURA, YUSUKE (JP)；角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大澤龍司 OHSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡邊朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：4 共 111 頁

(54)名稱

E C T 2 胜肽及含此胜肽之疫苗

ECT2 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

(57)摘要

在此敘述一種衍生自序列識別號：42 及其片段之單離胜肽，其結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，因此適用於癌症免疫療法，具體為癌症疫苗。本發明胜肽包括上述胺基酸序列及其經修飾者，其中有 1、2 或數個胺基酸序列經取代、刪除、加成或插入，但這些經修飾的胺基酸序列保留該原始序列必要的 HLA 結合及 CTL 誘導能力。又，更提供編碼上述任一胜肽的核酸，及包括或含有上述任一胜肽或核酸的醫藥藥劑、物質及/或組合物。本發明的胜肽、核酸、醫藥藥劑、物質及組合物特別用於治療癌症及腫瘤，包括例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、大腸直腸癌、食道癌、NSCLC、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌及 SCLC。

Isolated peptides derived from SEQ ID NO: 42 and fragments thereof that 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, are described herein. The inventive peptides encompass both the aforementioned 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 nucleic acids encoding any of the aforementioned peptides as well as pharmaceutical agents, substances and/or compositions that include or incorporate any of the aforementioned peptides or nucleic acids. The peptides, nucleic acids, pharmaceutical agents, substances and compositions of this invention find particular utility in the treatment of cancers and tumors, including, for example, bladder cancer, breast cancer, cervical cancer, cholangiocellular carcinoma, CML, colorectal cancer, esophageal cancer, NSCLC, lymphoma, pancreatic cancer, prostate cancer, renal carcinoma and SCLC.

指定代表圖：

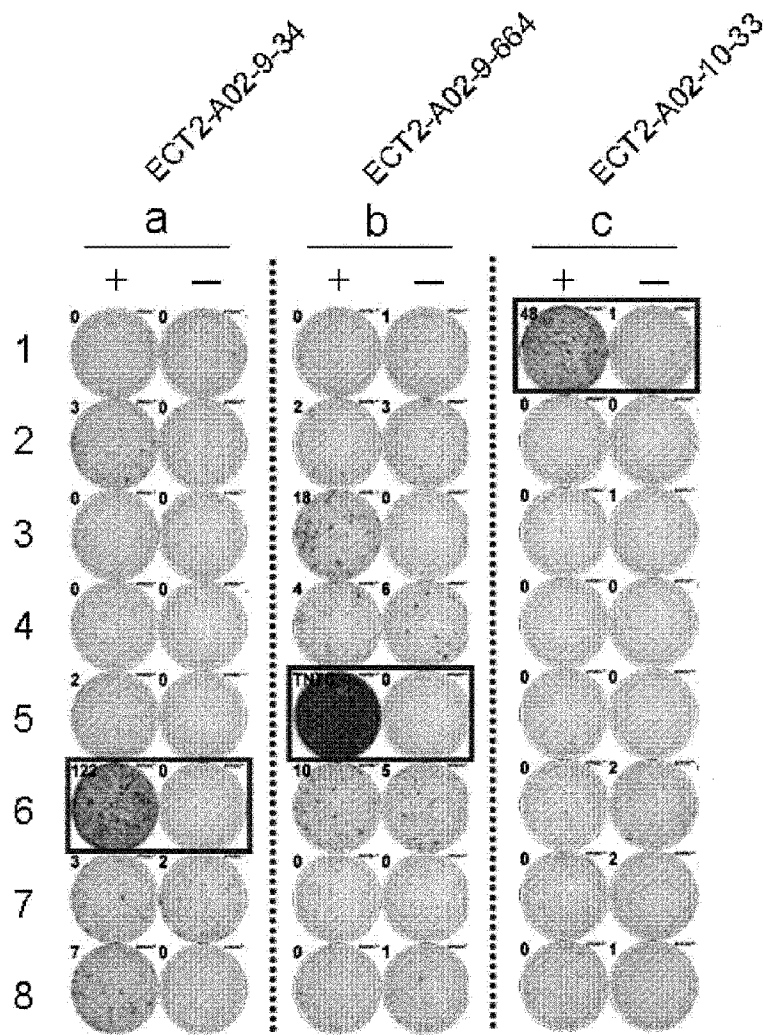


圖 1

201627003

發明摘要

※ 申請案號：105112382 (由 100109936 分割)

※ 申請日：100. 3. 23 ※IPC 分類：A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

ECT2 胜肽及含此胜肽之疫苗/ECT2 PEPTIDES AND
VACCINES INCLUDING THE SAME

【中文】

在此敘述一種衍生自序列識別號：42 及其片段之單離胜肽，其結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，因此適用於癌症免疫療法，具體為癌症疫苗。本發明胜肽包括上述胺基酸序列及其經修飾者，其中有 1、2 或數個胺基酸序列經取代、刪除、加成或插入，但這些經修飾的胺基酸序列保留該原始序列必要的 HLA 結合及 CTL 誘導能力。又，更提供編碼上述任一胜肽的核酸，及包括或含有上述任一胜肽或核酸的醫藥藥劑、物質及/或組合物。本發明的胜肽、核酸、醫藥藥劑、物質及組合物特別用於治療癌症及腫瘤，包括例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、大腸直腸癌、食道癌、NSCLC、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌及 SCLC。

【英文】

Isolated peptides derived from SEQ ID NO: 42 and fragments thereof that 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, are described herein. The inventive peptides encompass both the afore-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 nucleic acids encoding any of the aforementioned peptides as well as pharmaceutical agents, substances and/or compositions that include or incorporate any of the aforementioned peptides or nucleic acids. The peptides, nucleic acids, pharmaceutical agents, substances and compositions of this invention find particular utility in the treatment of cancers and tumors, including, for example, bladder cancer, breast cancer, cervical cancer, cholangiocellular carcinoma, CML, colorectal cancer, esophageal cancer, NSCLC, lymphoma, pancreatic cancer, prostate cancer, renal carcinoma and SCLC.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 1。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 (中文/英文)

ECT2 胜肽及含此胜肽之疫苗/ECT2 PEPTIDES AND
VACCINES INCLUDING THE SAME

【技術領域】

【0001】本發明係關於生命科學的領域，特別是關於癌症治療的領域。尤其，本發明關於有效作為治療及預防腫瘤的癌症疫苗及藥物之新穎胜肽。

[優先權]

【0002】本申請案主張 2010 年 4 月 2 提申的美國臨時申請案號 61/320,577 的優惠，其全文納入於此作為參考。

【先前技術】

【0003】已有人證明 CD8+ CTL 會識別在主要組織相容性複合體(MHC)第 I 類分子發現的腫瘤關聯抗原(TAA)的抗原決定基胜肽，然後殺死該腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原(MAGE)家族為 TAA 的第一例以來，已利用免疫學方法發現了許多其他的 TAA(非專利文獻 1, Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; 非專利文獻 2, Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9)。此等 TAA 當中有些正當做免疫療法的標靶進行臨床開發當中。

【0004】有利的 TAA 係對於癌細胞的增殖與存活不可欠缺者。使用此種 TAA 當做免疫療法標靶能使因為治療所驅使的免疫選擇的結果造成的 TAA 的刪除、突變或下調所造成的癌

細胞的免疫逃脫的已知風險降到最小。因此，正在進行能夠誘導有效及專一性抗腫瘤免疫反應的新 TAA 的鑑定，確保針對許多類型癌症的胜肽疫苗策略的臨床調查能進一步發展(非專利文獻 3, Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; 非專利文獻 4, Butterfield LH *et al.*, Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; 非專利文獻 5, Vissers JL *et al.*, Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; 非專利文獻 6, van der Burg SH *et al.*, J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; 非專利文獻 7, Tanaka F *et al.*, Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; 非專利文獻 8, Fujie T *et al.*, Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; 非專利文獻 9, Kikuchi M *et al.*, Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; 非專利文獻 10, Oiso M *et al.*, Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94)。到目前，已有數個使用衍生自腫瘤關聯抗原的胜肽的臨床試驗的報告。不幸地，許多目前的癌症疫苗試驗已顯示只有低目標反應率(非專利文獻 11, Belli F *et al.*, J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; 非專利文獻 12, Coulie PG *et al.*, Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; 非專利文獻 13, Rosenberg SA *et al.*, Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15)。因此，仍需要新的 TAA 當做免疫治療的標靶。

【0005】上皮細胞轉形序列 2 (ECT2) 致癌基因(GenBank 存取號 AY376439; 例如序列識別號: 41)已從癌症中鑑別為上調的轉錄物中發現。該 ECT2 基因專一性地在許多癌症的腫瘤細胞中上調，包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小

細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)，因此對本發明有特殊性(專利文獻 1, WO2007/013671; 專利文獻 2, WO2008/102557; 專利文獻 3, WO2010/007791)。尤其，從 ECT2 衍生的免疫原性胜肽可能有效於選擇性殺死表現此等抗原的腫瘤。

[引用列表]

[非專利文獻]

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

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

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

[非專利文獻 4] Butterfield LH *et al.*, Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42

[非專利文獻 5] Vissers JL *et al.*, Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

[非專利文獻 6] van der Burg SH *et al.*, J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14

[非專利文獻 7] Tanaka F *et al.*, Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8

[非專利文獻 8] Fujie T *et al.*, Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72

[非專利文獻 9] Kikuchi M *et al.*, Int J Cancer 1999 May 5,

81(3): 459-66

[非專利文獻 10] Oiso M *et al.*, Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94

[非專利文獻 11] Belli F *et al.*, J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80

[非專利文獻 12] Coulie PG *et al.*, Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42

[非專利文獻 13] Rosenberg SA *et al.*, Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15

[專利文獻]

[專利文獻 1] WO2007/013671

[專利文獻 2] WO2008/102557

[專利文獻 3] WO2010/007791

【發明內容】

【0006】本發明至少部分基於對於免疫療法的適當標靶的發現。由於 TAA 一般被免疫系統察知為「本身」，因此通常不具有免疫原性，發現適當的標靶極為重要。基於 ECT2（序列識別號：42，由 GenBank 存取號 AY376439 的基因(例如序列識別號：41)編碼)已在包括但不限於以下的癌症中上調：：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)，本發明著眼於 ECT2 作為癌症/腫瘤免疫療法的標靶候選者，更具體而言，著眼於可作為適當免疫治療標靶的新穎 ECT2 抗原決定基胜肽。

【0007】為此，本發明至少部分係針對在 ECT2 的基因產物當中鑑別具有誘導對 ECT2 專一的 CTL 能力的專一性抗原決定基胜肽。如以下將詳述，來自健康捐出者的周邊血液單核細胞 (PBMC)，使用結合於來自 ECT2 的候選胜肽的 HLA-A*0201 予以刺激。然後，建立對經各候選胜肽脈衝的 HLA-A2-陽性目標細胞具有專一性細胞毒性的 CTL 細胞株。此結果證明此等胜肽為 HLA-A2 限制抗原決定基胜肽，能誘導有效且專一的免疫反應對抗表現 ECT2 的細胞。這些結果進一步證明 ECT2 具有強免疫原性，且其抗原決定基為癌症/腫瘤免疫療法的有效標靶。

【0008】因此，本發明目的為提供一種結合於 HLA 抗原的單離的胜肽，包括 ECT2 (序列識別號：42)及其免疫片段免疫活性片段。此胜肽被期待具有 CTL 誘導能力，因此可用於在生物體之外(*ex vivo*)誘導 CTL 或投予個體以誘導抗癌症的免疫反應，癌症例如包括但不限於：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。較佳的胜肽為九胜肽或十胜肽，更佳為具有選自序列識別號：1 至 40 當中的胺基酸序列的九胜肽或十胜肽。具有選自序列識別號：1、3 及 21 的胺基酸序列的胜肽，顯示強 CTL 誘導能力，因而尤佳。

【0009】本發明亦考慮具有選自序列識別號：1 至 40 的胺基酸序列的經修飾的胜肽，只要該經修飾的胜肽保留必要的原始胜肽的 CTL 誘導能力，其中 1、2 或更多的胺基酸可取代、

- 插入、刪除或加成。

【0010】本發明更包含編碼任一本發明胜肽的單離多核苷酸。這些多核苷酸可用於誘導或製造具有 CTL 誘導能力的 APC，或如同上述本發明之胜肽，投予個體以誘導對抗癌症的免疫反應。

【0011】當投予個體時，本發明之胜肽被呈現於 APC 表面以誘導目標各自胜肽的 CTL。因此，本發明的目的在於提供一種藥劑、組合物及/或物質，包括或包含本發明的任一胜肽或多核苷酸以誘導 CTL。此種藥劑、組合物及/或物質可用於治療及/或預防及/或癌症術後復發，癌症尤其是膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。因此，本發明另一目的在於提供一種醫藥藥劑、組合物及/或物質，用於治療及/或預防及/或預防癌症術後復發，其包括或包含本發明之一或以上的胜肽或多核苷酸。替代或除了該胜肽或多核苷酸以外，本發明的醫藥藥劑、組合物或物質可包括呈現任一本發明胜肽的 APC 或外泌體(exosome)當做活性成分。

【0012】本發明之胜肽或多核苷酸可藉由例如使衍生自個體的 APC 接觸該胜肽或者將編碼本發明胜肽的多核苷酸導入 APC，而誘導在其表面呈現 HLA 抗原與本發明胜肽的複合體的 APC。此種 APC 對於目標胜肽具有高度 CTL 誘導能力，可用於癌症免疫療法。因此本發明包含用於誘導具有 CTL 誘導能力的 APC 的方法，及由此方法獲得的 APC。

【0013】本發明又一目的在於提供一種誘導 CTL 的方法，此方法包括以下步驟：將 CD8+細胞與在表面上呈現本發明胜肽的 APC 或外泌體共同培養，或導入包括編碼結合於本發明胜肽的 T 細胞受體(TCR)次單元多胜肽的多核苷酸之基因。此方法獲得的 CTL 在治療及/或預防癌症有用，癌症例如包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。因此本發明另一目的在於提供由本發明方法獲得的 CTL。

【0014】本發明的又一目的在於提供所需個體中誘導對抗癌症的免疫反應的方法，此方法包括投予包括 ECT2 多胜肽或其免疫活性片段、編碼 ECT2 多胜肽的多核苷酸、呈現 ECT2 多胜肽的外泌體或 APC 的組合物或物質之步驟。

【0015】本發明的應用性擴大至任何相關或起因於 ECT2 過度表現的疾病，疾病例如癌症，包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。

【0016】具體而言，本發明提供：

[1] 一種單離的胜肽，由序列識別號：42 的胺基酸序列或其免疫活性片段所構成，其中該胜肽結合於 HLA 抗原且誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)；

[2] 如[1]之單離的胜肽，其中該 HLA 抗原為 HLA-A2；

[3] 如[1]或[2]之單離的胜肽，其中該胜肽包含選自由序

- 列識別號:1 至 40 構成的群組的胺基酸序列；

[4] 一種單離的胜肽，選自由以下構成的群組：

(a) 一單離的胜肽，其係結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)，且由序列識別號: 42 的胺基酸序列或其免疫活性片段構成；

(b) 如 (a) 之單離的胜肽，其中該 HLA 抗原為 HLA-A2；

(c) 如 (a) 或 (b) 之單離的胜肽，其包含選自由序列識別號: 1 至 40 構成的群組的胺基酸序列；及

(d) 如 (a) 或 (b) 之單離的胜肽，該胜肽由選自由序列識別號: 1 至 40 構成的群組的胺基酸序列所構成，其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入或加成，惟該經修飾的胜肽保留原始胜肽的 CTL 誘導能力；

[5] 如 [4] 之單離的胜肽，其係由選自由序列識別號: 1 至 40 構成的群組的胺基酸序列構成，其中該胜肽具有以下 1 種或兩種特徵：

(a) N 末端起算第 2 個胺基酸選自白胺酸及甲硫胺酸；及

(b) 該 C 末端胺基酸選自纈胺酸及白胺酸；

[6] 如 [1] 至 [5] 中任一項之單離的胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽；

[7] 一種單離的多核苷酸，其係編碼如 [1] 至 [6] 中任一項之胜肽。

[8] 一種用於誘導 CTL 的組合物，其中該組合物包含 1 或以上的如 [1] 至 [6] 中任一項之胜肽，或 1 或以上的如 [7] 之多核苷酸；

[9] 一種醫藥組合物，係用於治療及/或預防癌症及/或防止其術後復發，其中該組合物包含 1 或以上的如[1]至[6]中任一項之胜肽，或 1 或以上的如[7]之多核苷酸；

[10] 如[9]之醫藥組合物，其中該組合物調配用於投予 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體；

[11] 如[9]或[10]之醫藥組合物，其中該組合物調配癌症的治療；

[12] 一種誘導具有 CTL 誘導能力的抗原呈現細胞(APC)的方法，包含選自由以下構成的群組中的步驟：

(a) 使 APC 與如[1]至[6]中任一項之胜肽在體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)接觸；及

(b) 將編碼如[1]至[6]中任一項之胜肽的多核苷酸導入 APC 內；

[13] 一種誘導 CTL 的方法，包含選自由以下構成的群組中的步驟：

(a) 共同培養 CD8+ T 細胞與表面呈現 HLA 抗原與如[1]至[6]中任一項之胜肽的複合體的 APC；

(b) 共同培養 CD8+ T 細胞與表面呈現 HLA 抗原與如[1]至[6]中任一項之胜肽的複合體的外泌體；及

(c) 將包含編碼結合於如[1]至[6]中任一項之胜肽的 T 細胞受體(TCR)次單元多胜肽的多核苷酸之基因導入 T 細胞；

[14] 一種單離的 APC，其表面呈現 HLA 抗原與如[1]至[6]中任一項之胜肽的複合體；

[15] 如[14]之 APC，其係由[12]之方法誘導；

[16] 一種單離的 CTL，其以如[1]至[6]中任一項之胜肽當做目標；

[17] 如[16]之 CTL，其係由[13]之方法誘導；

[18] 一種在所需要個體中誘導對抗癌症的免疫反應的方法，該方法包括對於該個體投予包括如[1]至[6]之胜肽的組合物、其免疫活性片段、或編碼該胜肽或該片段的多核苷酸；

[19] 一種抗體或其免疫活性片段，其係對抗如[1]至[6]中任一項之胜肽；

[20] 一種載體，包含編碼如[1]至[6]中任一項之胜肽的核苷酸序列。

[21] 一種診斷套組，包含如[1]至[6]中任一項之胜肽、如[7]之核苷酸，或如[19]之抗體。

【0017】需瞭解到，本發明的上述發明內容以及以下詳細說明為例示的實施態樣，並不限為本發明或本發明的其他替代實施態樣。

【0018】除此之外，本發明的其他目的及特性將由閱讀以下詳細說明並參照附圖及實施例而更為顯明。然而應瞭解，本發明的上述發明內容以及以下詳述的具體例僅為例示，不限定本發明或本發明的其他替代具體例。尤其，雖然本發明在此參照數個特定具體例說明，但是此等敘述係用於理解本發明，並非限定本發明。在不偏離本發明精神與範疇之下，如同附屬的申請專利範圍，該技術領域中具有通常知識者可做各種修飾及應用。同樣地，本發明的其他目的、特性、益處及優點將由下述內容及特定具體例而顯明，且對於該技術領域中具有通常知

識者非常顯明。此種目的、特性、益處及優點將將由以上以及附帶的實施例、資料、圖式、及所有繪製的單獨或考量為納入於此的參考文獻的所有合理的推論而顯明。

【圖式簡單說明】

【0019】在考量本發明的圖式簡單說明及本發明的詳細敘述以及其較佳實施態樣，本發明的各種態樣與應用對於熟知該技術領域之人士將更為顯明。

圖 1 由一系列照片 (a) –(c)構成，說明對於以衍生自 ECT2 的胜肽誘導的 CTL 進行 IFN-gamma ELISPOT 分析法的結果。於以 ECT2-A02-9-34 (序列識別號：1)刺激的井 #6 (a)、以 ECT2-A02-9-664 (序列識別號：3)刺激的井 #5 (b)、以 ECT2-A02-10-33 (序列識別號：21)刺激的井 #1 (c)，CTL 各比起對照組顯示有效產生 IFN-gamma。這些照片的井上的方形代表來自對應井的細胞擴張以建立 CTL 細胞株。圖中，「+」代表對抗經適當胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 的產生，「-」代表對抗未經任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 的產生。

圖 2 由一系列折線圖 (a)–(c)構成，說明 IFN-gamma ELISA 分析法的結果，證明以 (a) ECT2-A02-9-34 (序列識別號：1)、(b) ECT2-A02-9-664 (序列識別號：3)及 (c) ECT2-A02-10-33 (序列識別號：21)刺激的 CTL 細胞株產生 IFN-gamma。此結果證明以各胜肽刺激建立的 CTL 細胞株比起對照組，顯示有效產生 IFN-gamma。圖中，「+」代表對抗經適當胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 的產生，「-」代表對抗未經任何胜肽脈衝的

- 目標細胞的 IFN-gamma 的產生。

圖 3 由一對折線圖(a)與(b)構成，說明從經(a) ECT2-A02-9-34 (序列識別號: 1) 與 (b) ECT2-A02-9-664 (序列識別號: 3) 刺激的 CTL 細胞株以極限稀釋建立的 CTL 選殖體的 IFN-gamma 的產生。此結果證明藉由以各胜肽刺激建立的 CTL 選殖體，比起對照組，顯示有效產生 IFN-gamma。圖中，「+」代表對抗經各胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 的產生，「-」代表對抗未經任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 的產生。

圖 4 由一對折線圖(a)與(b)構成，說明對抗外源表現 ECT2 與 HLA-A*0201 的目標細胞的專一性 CTL 活性。製備經 HLA-A*0201 轉染或全長 ECT2 基因轉染的 COS7 細胞當做對照組。以 ECT2-A02-9-34 (序列識別號: 1) (a)建立的 CTL 選殖體以及以 ECT2-A02-10-33 (序列識別號: 21) (b)建立的 CTL 細胞株對於以 ECT2 與 HLA-A*0201 兩者轉染的 COS7 細胞(黑色圓形)顯示專一性 CTL 活性。另一方面，對抗表現 HLA-A*0201(三角形)或 ECT2 (白色圓形)的目標細胞未偵測到顯著專一性的 CTL 活性。

【實施方式】

【0020】雖然任何類似於或均等於在此所述的方法或材料可用於實施或測試本發明具體例，以下仍敘述較佳的材料、方法及裝置。然而，敘述該材料及方法前，應瞭解此等敘述僅為供理解而非意欲限制。應瞭解本發明不限於在此敘述的特定大小、形狀、方向、尺寸、材料、方法學、試驗步驟等，因為此等會由於例行的實驗及/或最適化而改變。再者，在敘述中使

用的用語僅係用敘述特定版本或具體例，不意欲限制本發明的範圍，本發明範圍僅由附帶的申請專利範圍限制。

【0021】在本說明書中提到的各出版物、專利或專利申請案的揭示係特別完整納入於此作為參考。但是，不理解為承認本發明不早於此揭示或早先的發明。

【0022】除非特別指明，在此使用的所有技術及科學用語與本發明所屬技術領域中具有通常知識者一般使用的含意相同。若有抵觸，依本說明書，包括定義為準。此外，材料、方法及實施例僅供理解並不意欲限定。

I. 定義

【0023】除非特別指明，此處使用的「一」及「該」意指「至少一」。

【0024】用語「多胜肽」、「胜肽」及「蛋白質」在此係可互換地指胺基酸殘基的聚合物。此用語適用於胺基酸聚合物，其中對應的天然發生的胺基酸，有一個或以上胺基酸殘基可為經修飾的殘基，或非天然發生的殘基，例如對應天然發生的胺基酸的人造化學擬似物。

【0025】有時用在本說明書的「寡胜肽」，係指 20 個殘基或更短的本發明之胜肽，通常為 15 個殘基或更短，通常由約 8 至約 11 個殘基構成，時常為 9 或 10 個殘基。

【0026】用語「胺基酸」在此意指天然發生的及合成的胺基酸，及作用類似天然發生的胺基酸的胺基酸類似物及胺基酸擬似物。胺基酸可為 L-胺基酸或 D-胺基酸。天然發生的胺基酸係由遺傳碼編碼者，以及於細胞中轉譯後經過修飾者(例如

- 經基脯胺酸、gamma-羧基麩胺酸，及 O-磷絲胺酸)。用詞「胺基酸類似物」意指與天然發生胺基酸具有相同基本化學結構(鍵結於氫的 alpha 碳、羧基、胺基及 R 基)，但是具有一個或以上經過修飾的 R 基或經過修飾的骨架(例如高絲胺酸、降白胺酸、甲硫胺酸、亞砷、甲硫胺酸甲基鎔鹽)。用詞「胺基酸擬似物」意指與一般胺基酸具有不同結構但有類似功能的化學化合物。

【0027】胺基酸在此可使用其通用的三字母符號或由 IUPAC-IUB 生化命名協會建議的單字母符號。

【0028】用語「基因」、「多核苷酸」、「核苷酸」及「核酸」在此可互換使用，且如無特別指明，類似胺基酸以其通用的單字母碼所指明者。

【0029】用語「藥劑」、「物質」及「組合物」在此可互換使用，意指以特定量含有特定成分的產品，以及將該特定成分以特定量直接或間接組合得到的任意產品。加上修飾語「醫藥的」係意欲包含含該活性成分及成為載體的任意鈍性成分的產品，及由直接或間接組合、複合或聚集該等成分中任意 2 種或更多而獲得的任意產品，或由該等成分中 2 種或更多的其他類型的反應或交互作用而得到的任意產品。因此本發明本文中，用語「醫藥藥劑」及「醫藥組合物」在此可互換使用，意指藉由混合本發明產品及醫藥上或生理上可接受載體而製作的任意藥劑、物質或組合物。

【0030】用詞「醫藥上可接受的載體」或「生理上可接受的載體」在此意指醫藥上或生理上可接受的材料、組合物、物

質或載具，包括但不限於液體、或固體填料、稀釋劑、賦形劑、溶劑或膠囊化材料，其涉及將個體支架聚藥效團的物體從一器官、或身體部分攜帶或運送到其他器官或身體部分。

【0031】本發明的醫藥藥劑或組合物特別有用於作為疫苗。本發明本文中，用語「疫苗」(也稱為「免疫原性組合物」)係指當對於動物接種時，具有誘導抗腫瘤免疫性功能的物質。

【0032】本發明中，用詞「活性成分」意指在藥劑或組合物當中有生物學活性或生理活性的物質。尤其，於一醫藥藥劑或組合物中，「活性成分」係指顯示目標的藥理作用的物質。例如，當醫藥藥劑或組合物使用在癌症治療或預防時，藥劑或組合物中的活性成分可直接或間接引導至少一種作用在癌細胞及/或組織的生物學或生理學作用。較佳者，該作用可包括減少或抑制癌細胞生長，損害或殺死癌細胞及/或組織等。通常活性成分的間接作用為誘導 CLT 辨識或殺死癌細胞。在調配前，「活性成分」也稱為「散裝物質(bulk)」、「藥物物質」或「技術品」。

【0033】除非另外定義，用語「癌症」意指過度表現 ECT2 基因的癌症，例如包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。

【0034】除非另外定義，用語「細胞毒性 T 淋巴球」、「細胞毒性 T 細胞」及「CTL」，在此可互換使用，且除非特別指明，意指 T 淋巴球的次群組，其能識別非己細胞(例如腫瘤/癌

- 細胞、受病毒感染的細胞)，並誘導此種細胞的死亡。

【0035】除非另外定義，用語「HLA-A2」在此代表性地意指 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 及 HLA-A*0250 的次型，但不限於此。

【0036】除非另外定義，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。於此考慮之套組包括微陣列、晶片、標誌物等。使用語「套組」並不限制於試劑及/或材料之特定組合。

【0037】在此，個體或病患的上下文中，用詞「HLA-A2 陽性」意指該個體或病患以同型合子或異型合子帶有 HLA-A2 抗原基因，且 HLA-A2 抗原在該個體或病患的細胞中表現為 HLA 抗原。

【0038】當本發明的方法與組合物在上下文中指出有用於「治療」癌症，若其造成臨床上的益處，例如在個體中的 ECT2 基因表現降低、癌症的體積減小、流行程度或轉移潛力減低，則治療係視為「有效」。當該治療係以預防性使用時，「有效」意指其延遲或防止癌症形成或預防或減輕癌症的臨床症狀。有效係利用任何已知相關用於診斷或治療特定腫瘤形式的方法決定。

【0039】若本發明的方法與組合物在上下文中指出有效於「防止」及「預防」癌症，此用語係在此可互換地意指任何減

低由於疾病所致死亡率或發病率的活性。防止及預防可發生於「初級、次級及三級防止水平」。初級防止及預防避免發展出疾病，次級及三級防止及預防水平包含目標為防止及預防疾病進展及展現出症狀及藉由回復功能及減少疾病相關併發症以減少已建立的疾病的影響的活性。或者，防止及預防可包括廣泛的療法，其目標其減輕特定病症的嚴重度，例如減少腫瘤的增殖及轉移。

【0040】本發明上下文中，治療及/或預防癌症及/或防止其術後再發，包括以下任何步驟：例如以外科手術移除癌細胞、抑制癌化細胞的生長、腫瘤退化或回復、誘導緩解及抑制腫瘤發生、腫瘤回復，及減少或抑制轉移。有效的治療及/或預防癌症可減少死亡率並改善患癌的個體的預後，減少腫瘤標記物在血液中的水平，並減輕伴隨癌症的可偵測的症狀。例如，減少或改善症狀構成有效治療及/或預防，包括 10%、20%、30% 或以上減少，或穩定的疾病。

【0041】本發明上下文中，用語「抗體」意指對於特定蛋白質或其胜肽專一性反應的免疫球蛋白及其片段。抗體可包括人類抗體、靈長源抗體、嵌合抗體、雙特異性抗體、人類化抗體、融合於其他蛋白質或放射性標記的抗體，及抗體片段。再者抗體在此係以最廣的含意使用，且具體而言涵蓋單株抗體、多株抗體、由至少兩個完整無缺的抗體形成的多專一性抗體（例如雙專一性抗體），及抗體片段，只要能顯現所欲的生物學活性即可。「抗體」代表所有類型（例如 IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM）。

【0042】除非另外定義，在此使用的所有技術及科學用語與本發明所屬技術領域中具有通常知識者一般了解的含意相同。

II. 胜肽

【0043】為了證明來自 ECT2 之胜肽作用如被細胞毒性性 T 淋巴球 (CTL) 所辨認之抗原，分析來自 ECT2 的胜肽 (序列識別號: 42) 以確定是否其為由一般常見的 HLA 對偶基因之 HLA-A2 所限制之抗原決定基 (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)。

【0044】衍生自 ECT2 之 HLA-A2 結合胜肽的候選物，係基於其對 HLA-A2 之結合親和力來鑑別。鑑別出以下候選胜肽：

- ECT2-A2-9-34 (序列識別號: 1),
- ECT2-A2-9-619 (序列識別號: 2)
- ECT2-A2-9-664 (序列識別號: 3)
- ECT2-A2-9-662 (序列識別號: 4)
- ECT2-A2-9-634 (序列識別號: 5)
- ECT2-A2-9-145 (序列識別號: 6)
- ECT2-A2-9-561 (序列識別號: 7)
- ECT2-A2-9-98 (序列識別號: 8)
- ECT2-A2-9-575 (序列識別號: 9)
- ECT2-A2-9-240 (序列識別號: 10)
- ECT2-A2-9-292 (序列識別號: 11)
- ECT2-A2-9-823 (序列識別號: 12)

ECT2-A2-9-220 (序列識別號：13)
 ECT2-A2-9-755 (序列識別號：14)
 ECT2-A2-9-357 (序列識別號：15)
 ECT2-A2-9-438 (序列識別號：16)
 ECT2-A2-9-874 (序列識別號：17)
 ECT2-A2-9-568 (序列識別號：18)
 ECT2-A2-9-166 (序列識別號：19)
 ECT2-A2-9-443 (序列識別號：20)
 ECT2-A2-10-33 (序列識別號：21)
 ECT2-A2-10-633 (序列識別號：22)
 ECT2-A2-10-144 (序列識別號：23)
 ECT2-A2-10-701 (序列識別號：24)
 ECT2-A2-10-754 (序列識別號：25)
 ECT2-A2-10-557 (序列識別號：26)
 ECT2-A2-10-191 (序列識別號：27)
 ECT2-A2-10-774 (序列識別號：28)
 ECT2-A2-10-428 (序列識別號：29)
 ECT2-A2-10-618 (序列識別號：30)
 ECT2-A2-10-97 (序列識別號：31)
 ECT2-A2-10-20 (序列識別號：32)
 ECT2-A2-10-574 (序列識別號：33)
 ECT2-A2-10-461 (序列識別號：34)
 ECT2-A2-10-664 (序列識別號：35)
 ECT2-A2-10-575 (序列識別號：36)

ECT2-A2-10-430 (序列識別號：37)
 ECT2-A2-10-511 (序列識別號：38)
 ECT2-A2-10-471 (序列識別號：39)及
 ECT2-A2-10-87 (序列識別號：40)。

【0045】再者，利用經此等胜肽脈衝(載入)過的樹狀細胞(DC)以體外(*in vitro*)刺激 T-細胞，藉由以下列各胜肽刺激 DC，成功地建立了 CTL：

ECT2-A2-9-34 (序列識別號：1)
 ECT2-A2-9-664 (序列識別號：3) 及
 ECT2-A2-10-33 (序列識別號：21)。

【0046】此等建立的 CTL 對於經各胜肽脈衝的目標細胞顯示有效的專一性的 CTL 活性。此結果證明 ECT2 為 CTL 所識別的抗原，且所測試的胜肽為由 HLA-A2 限制的 ECT2 的抗原決定基胜肽。

【0047】由於該 ECT2 基因在癌細胞中過度表現，該癌症例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、大腸直腸癌、食道癌、NSCLC、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、SCLC，且未表現於大多數的正常器官，其係癌症免疫療法的良好標靶。因此本發明提供來自 ECT2 的 CTL-識別的抗原決定基的九胜肽(由 9 個胺基酸殘基構成的胜肽)及十胜肽(由 10 個胺基酸殘基構成的胜肽)。或者，本發明提供單離的胜肽，其結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，其中該胜肽具有選自序列識別號：42 的胺基酸序列或其免疫活性片段。更具體而言，於一些具體例中，本發明提供具有選自序列識別號：1 至

40 的胺基酸序列的胜肽。

【0048】一般而言，現在例如在網際網路上已有軟體程式例如 Parker KC *et al.*, J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75 及 Nielsen M *et al.*, Protein Sci 2003; 12: 1007-17 所述者可用於以電腦模擬計算各種胜肽與 HLA 抗原的結合親和性。與 HLA 抗原的結合親和性可例如以於 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, and Nielsen M *et al.* PLoS ONE 2007; 2: e796 敘述者測量，其整理於例如 Lafuente EM *et al.*, Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220。決定結合親和性的方法，敘述於例如 Journal of Immunological Methods(1995, 185: 181-190) 及 Protein Science(2000, 9: 1838-1846)。因此，可使用此等軟體程式選擇與 HLA 抗原具有高度結合親和性的衍生自 ECT2 的片段。因此本發明包含由衍生自 ECT2 的任意片段構成的胜肽，其係以此種已知程式決定會與 HLA 抗原結合。再者此胜肽可包括由 ECT2 全長構成的胜肽。

【0049】本發明之胜肽，尤其是本發明之九胜肽與十胜肽，可有額外的胺基酸殘基橫跨於兩側，只要此胜肽保留其 CTL 誘導能力即可。該特定的額外的胺基酸殘基，可由任何種類胺基酸構成，只要其不損及原始胜肽的 CTL 誘導能力即可。因此本發明包含針對 HLA 抗原具有結合親和性的胜肽，包括

從 ECT2 衍生的胜肽。此種胜肽例如少於約 40 個胺基酸，時常少於約 20 個胺基酸，經常少於約 15 個胺基酸。

【0050】一般而言，已知在胜肽中修飾一個或更多胺基酸不會影響該胜肽的功能，或有時甚至會增強原始蛋白質的所望功能。事實上，經修飾的胜肽(即，藉由取代、刪除、插入或加成一、二或數個胺基酸殘基到原始參考序列的修飾所成的胺基酸序列構成的胜肽)已知會保留原始胜肽的生物學活性(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，依照本發明一具體例，本發明之具有 CTL 誘導能力的胜肽可由具有選自序列識別號: 1 至 40 中的胺基酸序列構成，其中一、二個或更多胺基酸經加成、插入、刪除及/或取代。

【0051】該技術領域中具有通常知識者了解對於一胺基酸序列的個別加成、刪除、插入或取代，即改變單一胺基酸或小比例的胺基酸，會保留該原始胺基酸側鏈的性質，因此稱為「保守性取代」或「保守性修飾」，其中蛋白質的改變會得到有類似功能的蛋白質。提供類似功能的胺基酸的保守性取代表，在該技術領域中係為人所熟知。胺基酸側鏈的性質例如疏水性胺基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性胺基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)，及具有以下共通的官能基或特性的側鏈:脂肪族側鏈(G、A、V、L、I、P);含羥基的側鏈(S、T、Y);含硫原子的側鏈(C、M);含羧酸及醯胺的側鏈(D、N、E、

Q);含鹼的側鏈(R, K, H);含芳香族基的側鏈(H、F、Y、W)。此外，以下 8 個群組各包含互為保守性取代的胺基酸：

- 1)丙胺酸(A)、甘胺酸(G);
- 2)天冬胺酸(D)、麩胺酸(E);
- 3)天冬醯胺酸(N)、麩醯胺酸(Q);

4)精胺酸(R)、離胺酸(K);

5)異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(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); 及

8)半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M)(參見例如 Creighton, Proteins 1984)。

【0052】 此種經保守性修飾的胜肽也認為是本發明之胜肽。但是本發明之胜肽不限於此，可包括非保守性修飾，只要獲得的經修飾的胜肽保留原始胜肽的 CTL 誘導能力即可。再者，該經修飾的胜肽不應排除可誘導 CTL 胜肽的多型變異體、種間同源體，及 ECT2 的對偶基因。

【0053】 可對於本發明之胜肽插入、取代或加成胺基酸殘基，或者，可從本發明之胜肽刪除胺基酸殘基以達到更高結合親和性。為了保留必要的 CTL 誘導能力，較佳為僅修飾(插入、刪除、加成及/或取代)小數目(例如 1、2 或數個)或小比例的胺基酸。在此用語「數個」意指 5 個或更少胺基酸，例如 4 個或 3 個或更少。欲修飾的胺基酸比例可為 20%或更少，較佳為 15%或更少，更佳為 10%或更少，又更佳 1 至 5%。

【0054】 當使用在癌症免疫療法，本發明胜肽係與 HLA 抗

原以複合體呈現在細胞或外泌體表面。因此，較佳選擇胜肽為會誘導 CTL 還對於該 HLA 抗原有高度結合親和性者。為此，可利用刪除、取代、插入及/或加成胺基酸殘基對胜肽修飾，以產生具有改良的結合親和性的經修飾的胜肽。此外，對於天然顯示的胜肽，由於結合於 HLA 抗原的胜肽序列的規則性為已知(J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307)，故可將此規則性的修飾導入本發明之免疫原性胜肽。

【0055】例如有高度 HLA-A2 結合親和性的胜肽，傾向於在 N 末端起算的第 2 個胺基酸取代為白胺酸或甲硫胺酸。同樣地，也可有利地使用胜肽的 C 末端胺基酸取代為纈胺酸或白胺酸者。因此，本發明包含具有選自序列識別號：1 至 40 的胺基酸序列的胜肽，其中該序列識別號的胺基酸序列中從 N 末端起算第 2 個胺基酸係取代為白胺酸或甲硫胺酸，及/或該序列識別號的胺基酸序列中的 C 末端取代為纈胺酸或白胺酸。

【0056】取代不僅可導入在末端胺基酸，也可導入到胜肽識別的有潛力的 T 細胞受體(TCR)的位置。已有一些研究證明具有胺基酸取代的胜肽，與原始有同等或更佳的功能，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)。

【0057】本發明也考量將一、二或數個胺基酸加成到該胜肽的 N 及/或 C 末端。該經修飾的具有高度 HLA 抗原結合親和性的胜肽並保留 CTL 誘導能力者，也包括於本發明。例如本發明提供長度短於 14、13、12、11 或 10 個胺基酸的單離的胜肽，包含選自以下構成的群組的胺基酸序列：

(i) 一胺基酸序列，係選自由序列識別號：1 至 20 構成的群組，其中 1、2 或數個胺基酸經取代，其中該胜肽結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球，以及

(ii) 如(i)之胺基酸序列，其中該胺基酸序列有一或二個下列特性：

(a) 從該序列識別號的 N 末端起算的第 2 個胺基酸，選自由白胺酸或甲硫胺酸構成的群組；及

(b) 該序列識別號的 C 末端胺基酸選自由纈胺酸或白胺酸構成的群組。

【0058】再者，本發明亦提供長度短於 15、14、13、12 或 11 個胺基酸的單離的胜肽，包含選自以下構成的群組的胺基酸序列：

(i) 一胺基酸序列，係選自由序列識別號：21 至 40 構成的群組，其中 1、2 或數個胺基酸經取代，其中該胜肽結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球，及

(ii) 如(i)之胺基酸序列，其中該胺基酸序列有一或二個下列特性：

(a) 從該序列識別號的 N 末端起算的第 2 個胺基酸，選自由白胺酸或甲硫胺酸構成的群組；

(b) 該序列識別號的 C 末端胺基酸選自由纈胺酸或白胺酸構成的群組。

【0059】當此等胜肽與 APC 接觸或導入 APC 時，此等胜肽會在 APC 中經處理而在表面呈現(i)、(ii)、(i')及(ii')的胜肽。

【0060】但，當該胜肽序列與具有不同功能的內生或外生蛋白質的胺基酸序列有一部分相同時，可能會引起例如自體免疫病症或對於特定物質的過敏症狀之副作用。因此，可使用可取得的資料庫進行同源性檢索以避免該胜肽的序列與其他蛋白質的胺基酸序列相同的情形。當同源性檢索顯示沒有與目標胜肽有 1 或 2 個胺基酸差異的胜肽時，可將該目標胜肽修飾以增強與 HLA 抗原的結合親和性，及/或增強其 CTL 誘導能力而不會有上述副作用的風險。

【0061】雖然預期上述對 HLA 抗原具有高度結合親和性的胜肽高度有效，但是依照高度結合親和性的存在當做指標的候選胜肽，仍然進一步要檢驗其是否存在 CTL 誘導能力。在此，用詞「CTL 誘導能力」代表胜肽被呈現在抗原呈現細胞(APC)上時的誘導 CTL 的能力。又，「CTL 誘導能力」包括胜肽誘導 CTL 活化、CTL 增殖、促進目標細胞的 CTL 溶解及增加 CTL 產生 IFN-gamma 的能力。

【0062】CTL 誘導能力的確認係由以下方式達成:誘導攜帶人類 MHC 抗原的 APC(例如 B-淋巴球、巨噬體、及樹狀細胞(DC))，或更具體而言，由人類周邊血液單核白血球衍生的 DC，以該胜肽刺激後，與 CD8+ 細胞混合，然後測量對抗該目標細胞的 CTL 產生與釋出的 IFN-gamma。反應系可使用已

生產為表現人類 HLA 抗原的基因轉殖動物(例如 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 isotope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC(HLA) class II restricted T(H) response)。例如可將目標細胞以 ^{51}Cr 等放射性標定，從該目標細胞釋出的放射性活性計算細胞毒性。或者，可測量於攜帶固定化胜肽的 APC 存在下，CTL 所生產及釋出的 IFN-gamma，並使用抗 IFN-gamma 單株抗體使培養基上的抑制區可見化而檢驗。

【0063】如上所述檢驗胜肽的 CTL 誘導能力的結果，發現具有選自由序列識別號：1 至 40 所示的胺基酸序列的胜肽的九胜肽或十胜肽，顯示特高 CTL 誘導能力及對於 HLA 抗原的結合親和性。因此，此等胜肽為本發明較佳具體例。

【0064】再者，同源性分析結果證明此等胜肽與其他任何已知人類基因產物所衍生的胜肽不具顯著同源性。此結果顯示，當使用於免疫療法時，可降低發生未知或不欲的免疫反應的可能性。因此，由此方面此等胜肽有用於癌症病患中誘出對抗 ECT2 的免疫性。因此，本發明之胜肽較佳為具有選自由序列識別號：1 至 40 之胺基酸序列的胜肽。

【0065】除了上述修飾該胜肽以外，本發明之胜肽可連結於其他胜肽，只要得到的結合胜肽保留必要的原始胜肽的 CTL 誘導能力即可，且更佳為，也保留必要的 HLA 結合。「其他」胜肽包括例如：本發明之胜肽，或由其他 TAA 衍生的 CTL 誘導

性胜肽。胜肽的連結子為該技術領域中為人熟知的，例如 AAY(P. M. Daftarian *et al.*, J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK(R. P. M. Suttmuller *et al.*, J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) or K(S. Ota *et al.*, Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura *et al.*, J Immunol. 2002, 168: 5709-5715)。

【0066】例如可實質上同時使用非 ECT2 腫瘤關聯性抗原胜肽，以增強經由 HLA 第 I 類及/或第 II 類的免疫反應。已知癌細胞能表現多於一種腫瘤關聯基因。該技術領域中具有通常知識者在例行實驗中會檢查是否特定個體表現額外的腫瘤關聯基因，然後將衍生自此種基因的表現產物的 HLA 第 I 類及/或 HLA 第 II 類結合胜肽包括於本發明的 ECT2 組合物或疫苗中。

【0067】該技術領域中具通常知識者將知道 HLA 第 I 類及 HLA 第 II 類結合胜肽(例如見 Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995)，且能將其以此處所揭露以同樣方式使用。該技術領域中具通常知識者，可依照標準的分子生物學程序，製備包括一或以上 ECT2 胜肽及一或以上非 ECT2 胜肽的多胜肽，或編碼此多胜肽的核酸。

【0068】上述連結胜肽在此係指為「多胞型(polytope)」，即兩種或更多有潛力產生免疫反應的群組或免疫反應刺激胜肽，可利用各種排列接合在一起(例如連鎖、重疊)。該多胞型(或編碼該多胞型的核酸)，可以標準免疫實驗步驟投予到例如動物，以測試該多胞型在刺激、增強及/或誘起免疫反應的能力。

【0069】該胜肽可以直接接合在一起，或經由使用側面相

接的序列以形成多胞型，且使用多胞型當做疫苗在該技術領域係為人周知(參見例如 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)。可製備含有不同數目抗原決定基及組合的多胞型並測試 CTL 的識別性，並測試在增加免疫反應的效果。

【0070】再者本發明之胜肽可進一步連結於其他物質，只要其保留 CTL 誘導能力即可。此種物質可包括:胜肽、脂質、糖類及糖鏈、乙醯基、天然及合成的聚合物等。該胜肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化，只要此修飾不會損害此處所述的胜肽的生物學活性即可。此等種類可修飾實施以用於提供額外的功能(例如標靶功能，及傳遞功能)，或使該多胜肽穩定化。

【0071】例如為了增加多胜肽的體內穩定性，該技術領域中已知導入 D-胺基酸、胺基酸擬似物或非天然胺基酸;此概念也可採用於本發明的多胜肽。多胜肽的穩定性，可以用多種方式分析。例如可使用胜肽酶及各種生物學介質，例如人類血漿及血清，以測試穩定性(參見例如 Verhoef *et al.*, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302)。

【0072】再者，如上所述，在經取代、插入、刪除或加成一、二或數個胺基酸殘基而成的經修飾的胜肽中，可篩選或選擇具有比起原始胜肽具有相同或更高活性者。因此，本發明也提供篩選或選擇具有比起原始胜肽具有相同或更高活性的經

修飾的胜肽的方法。例如該方法包括以下步驟：

a: 取代、插入、刪除或加成本發明胜肽的至少一個胺基酸殘基

b: 確定該胜肽的活性，及

c: 選擇具有比起原始胜肽具有相同或更高活性的胜肽。

【0073】在此活性可包括 MHC 結合活性、APC 或 CTL 誘導能力及細胞毒性活性。

【0074】在此本發明之胜肽也可敘述為「ECT2 胜肽」或「ECT2 多胜肽」。

III. 製備 ECT2 胜肽

【0075】本發明之胜肽可使用周知的技術製備。例如該胜肽可藉由合成、重組 DNA 技術或化學合成製備。本發明之胜肽可個別合成，或製成包括兩個或以上胜肽的較長多胜肽。該胜肽可單離亦即經純化或單離成實質上不含其他天然發生的寄主細胞蛋白質及其片段，或其他的化學物質。

【0076】本發明之胜肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化，只要此等修飾不損害原始胜肽的生物學活性即可。可使用其他說明的修飾，包括導入 D-胺基酸或其他胺基酸擬似物，例如以增加該胜肽的血清半衰期。

【0077】本發明之胜肽可依據選擇的胺基酸序列由化學合成獲得。例如可採用於合成的習知胜肽合成方法包括：

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

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

(iii) Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co., 1975;

(iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co., 1985;

(v) Development of Pharmaceuticals(second volume)(日文), Vol. 14(Peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

(vi) WO99/67288;及

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

【0078】或者，該胜肽可採用任何已知用於生產胜肽的遺傳工程方法獲得(例如 Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(eds. Wu *et al.*) 1983, 101: 347-62)。例如先製備帶有編碼可表現形式(例如對應於啟動子序列的調節序列的下游)的目標胜肽的多核苷酸的適當載體，並轉形到適當的寄主細胞中。本發明也提供此種載體及寄主細胞。然後將該寄主細胞培養以生產所關注的胜肽。該胜肽也可採用體外(*in vitro*)轉譯系統於體外生產。

IV. 多核苷酸

【0079】本發明提供多核苷酸，其編碼任一前述本發明之胜肽。這些多核苷酸包括從天然發生的 *ECT2* 基因(GenBank 存取號 AY376439 (例如序列識別號: 41))衍生的多核苷酸，及其具有經保守性修飾的核苷酸序列。在此用詞「經保守性修飾的核苷酸序列」係指編碼相同或基本上相同的胺基酸序列的序列。因為遺傳密碼的退化性，有大量的功能上相同的核酸會編碼任意給定的蛋白質。比如，密碼子 GCA、GCC、GCG 及 GCU

都編碼胺基酸丙胺酸。因此，在每個位置當密碼子指明丙胺酸時，該密碼子可改變成任意對應的所述密碼子，而不會改變所編碼的多胜肽。此種核酸變異為「靜默變異」，其為一種經保守性修飾的變異。每個在此敘述的編碼一胜肽的核酸，也敘述所有該核酸可能的靜默變異。該技術領域中具有通常知識者將體認到，一核酸中的各密碼子(除了 AUG 及 TGG 以外，AUG 通常為甲硫胺酸的唯一密碼子，TGG 通常為色胺酸的唯一密碼子)可經修飾以產生功能上同一的分子。因此每一揭示的編碼胜肽的核苷酸表示隱含地揭示其相關的靜默變異。

【0080】本發明之多核苷酸可由 DNA、RNA 及其衍生物構成。如該技術領域中為人所知者，DNA 分子係適當的由鹼基所構成，例如天然發生的鹼基 A、T、C 及 G，在 RNA 中 T 置換為 U。該技術領域中具有通常知識者將體認，非天然發生的鹼基也會包括在多核苷酸中。

【0081】本發明之多核苷酸在有或無插入胺基酸序列下可編碼本發明之多種胜肽。例如，該插入胺基酸序列可提供多核苷酸或經轉譯的胜肽的切斷部位(例如酵素識別序列)。再者該多核苷酸可包括編碼本發明胜肽的編碼序列以外的額外序列。例如該多核苷酸可為一重組多核苷酸，其包括表現該胜肽所需的調節序列，或可為具有標記基因等的表現載體(質體)等。一般而言，此種重組多核苷酸可利用習知的重組技術，使用例如聚合酶及內切核酸酶處理多核苷酸而製備。

【0082】重組及化學合成技術均可使用於生產本發明之多核苷酸。例如多核苷酸可藉由插到適當載體中而生產，該載體

當轉染到勝任細胞內時可表現。或者，多核苷酸可使用 PCR 技術放大，或在適當寄主中表現(參見例如 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者，多核苷酸可使用固相技術合成，如 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes *et al.*, EMBO J 1984, 3: 801-5 所敘述。

V. 外泌體

【0083】本發明更提供胞外的囊泡，稱為外泌體 (exosome)，其表面呈現由本發明之胜肽及 HLA 抗原形成的複合體。外泌體可利用例如在日本專利申請案公表號平 11-510507 及在 WO99/03499 詳述的方法，使用由需治療及/或預防的病患獲得的 APC 製備。本發明的外泌體可當做疫苗接種，類似本發明之胜肽。

【0084】複合體中包括的 HLA 抗原類型必需符合需要治療及/或預防的個體的 HLA 抗原類型。例如於日本族群中，HLA-A2，尤其 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 及 HLA-A*0250 通常是適當的。使用在日本人及白種人中高度表現的 A24 型或 A2 型，有利於獲得有效結果，而 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

及 HLA-A*0250 次型也有用。通常，臨床上，會預先對於需要治療的病患調查 HLA 抗原類型，此調查能適當選擇對於此抗原具有高度親和性的胜肽或藉由抗原呈現而具有 CTL 誘導能力的胜肽。再者為了獲得顯示高度結合親和性及 CTL 誘導能力的胜肽，可基於天然發生的 ECT2 部分胜肽的胺基酸序列實施 1、2 或數個胺基酸取代、插入、刪除或加成。

【0085】當使用 A2 型 HLA 抗原為本發明的外泌體，具有序列識別號：1 至 40 中任一序列的胜肽尤其有用。

VI. 抗原呈現細胞 (APC)

【0086】本發明也提供單離的 APC，其表面上呈現由 HLA 抗原與本發明之胜肽形成的複合體。該 APC 可由受治療及/或預防的病患獲得，且本身可當做疫苗投予，或與其他包括本發明之胜肽、外泌體或 CTL 的藥物組合投予。

【0087】該 APC 不限於特定種類的細胞，且包括樹狀細胞 (DC)、蘭氏 (Langerhans) 細胞、巨噬體、B 細胞及經活化的 T 細胞，此等已知會在表面上呈現蛋白質性抗原，而會被淋巴球所識別。因為 DC 係代表性的 APC，在 APC 中具有最強的 CTL 誘導活性，故 DC 有效作為本發明的 APC。

【0088】例如本發明之 APC 可藉由從周邊血液單核球誘導 DC，然後使其與本發明之胜肽在體外 (*in vitro*)、生物體外 (*ex vivo*) 或體內 (*in vivo*) 接觸 (刺激) 而獲得。當本發明之胜肽投予個體時，在該個體體內會誘導呈現本發明胜肽的 APC。因此，本發明之 APC 可藉由在投予個體本發明之胜肽後，從該個體收集 APC 而獲得。或者本發明的 APC 可藉由使從個體收集到

的 APC 與本發明之胜肽接觸而獲得。

【0089】本發明之 APC 可以單獨投予個體以誘導對抗癌症的免疫反應，或與其他包括本發明之胜肽、外泌體或 CTL 組合投予。例如生物體外(*ex vivo*)投予可包括以下步驟：

- a: 從第一個體收集 APC，
- b: 使步驟 a 的 APC 接觸該胜肽，及
- c: 投予第二個體步驟 b 的 APC。

【0090】該第一個體及第二個體可為同一個體或不同個體。由步驟 b 獲得的 APC 可當做疫苗投予以供治療及/或預防癌症，癌症例如包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。

【0091】本發明也提供製造用於誘導 APC 的醫藥組合物的方法或處理，其中該方法包括將本發明的胜肽與醫藥上可接受的載體混合或調配的步驟。

【0092】依照本發明一態樣，該 APC 具有高水平的 CTL 誘導能力。用語「高水平的 CTL 誘導能力」中，高水平係相對於 APC 與非胜肽或不會誘導 CTL 的胜肽接觸時的水平。此種具有高水平的 CTL 誘導能力的 APC，可由以下方法製備，該方法包括於體外(*in vitro*)將編碼本發明之胜肽的多核苷酸轉移到 APC 的步驟及上述方法。該導入基因可為 DNA 或 RNA。導入的方法無特別限制，可使用各種在該領域中實施的習知方法，例如脂染、電穿孔或磷酸鈣法。更具體而言，可依照 Cancer

Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72;國際公開號 2000-509281 的已公開的日文翻譯所述實施。藉由將該基因轉移到 APC 中，該基因會在細胞中進行轉錄、轉譯等，然後獲得的蛋白質經 MHC 第 I 類或第 II 類處理，並經一呈現路徑以呈現該部分胜肽。

VII. 細胞毒性 T 淋巴球(CTL)

【0093】誘導對抗本發明任一胜肽的 CTL 會在體內強化以癌細胞為目標的免疫反應，因此可類似於該胜肽當做疫苗。因此，本發明提供單離的 CTL，其係由本發明任一胜肽專一性誘導或活化。

【0094】此種 CTL 可獲得自(1)對於一個體投予本發明之胜肽，或(2)使個體衍生的 APC、及 CD8+ 細胞、或周邊血液單核白血球在體外與本發明胜肽接觸(刺激)，或(3)使 CD8+ 細胞或周邊血液單核白血球在體外與表面呈現 HLA 抗原與該胜肽的複合體的 APC 或外泌體接觸，或(4)導入包括編碼結合於本發明之胜肽的 T 細胞受體(TCR)次單元的多核苷酸的基因。此種 APC 或外泌體可藉由上述方法製備，且(4)的方法的細節敘述於「VIII. T 細胞受體(TCR)」項。

【0095】本發明之 CTL 可由受治療及/或處理的病患獲得，且可以本身投予個體以供調節用途，或與其他包括本發明之胜肽、外泌體組合投予。獲得的 CTL 專一性地作用於對抗呈現本發明之胜肽(例如用於誘導的同一胜肽)的目標細胞。該目標細胞可為內生性表現 ECT2 的細胞，例如癌細胞，或是經轉染該 ECT2 基因的細胞;又，由於以該胜肽刺激而在其細胞表面呈

現本發明之胜肽的細胞，也可當成活化的 CTL 攻擊的目標。

VIII. T 細胞受體 (TCR)

【0096】本發明也提供一種組合物，其包含編碼多胜肽的核酸，該多胜肽能形成 T 細胞受體 (TCR) 的次單元；並提供使用其之方法。該 TCR 次單元具有形成 TCR 的能力，其對於 T 細胞提供對抗呈現 ECT2 的腫瘤細胞的專一性。藉由使用該技術領域中的已知方法，可鑑別以一個或以上本發明之胜肽誘導的 CTL 的 TCR 次單元的核酸的 alpha-與 beta- 鏈 (WO2007/032255 與 Morgan *et al.*, J Immunol, 171, 3288(2003))。例如分析 TCR 較佳為使用 PCR 法。供分析的 PCR 引子可為例如 5'-R 引子 (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') 當做 5'側引子 (序列識別號: 43)，及 3-TRa-C 引子 (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3')，其係專一於 TCR alpha 鏈 C 區 (序列識別號: 44)、3-TRb-C1 引子 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3')，其係專一於 TCR beta 鏈 C1 區 (序列識別號: 45)，或 3-TRbeta-C2 引子 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3')，其係專一於 TCR beta 鏈 C2 區 (序列識別號: 46)，當做 3'側引子，但不限於此等。衍生物 TCR 可以高親和力結合顯示 ECT2 胜肽的目標細胞，且選擇性地於體內或體外媒介殺死呈現該 ECT2 胜肽的目標細胞。

【0097】編碼 TCR 次單元的核酸可以導入適當載體內，例如反轉錄病毒載體。這些載體在該技術領域為人所熟知。該核酸或包含該核酸的載體，通常可傳送到 T 細胞內，例如來自病患的 T 細胞。有利地，本發明提供一種現成的組合物，能夠快速修飾病患本身的 T 細胞 (或另一哺乳動物的 T 細胞)，而快速

及簡單產生具有優異的癌細胞殺死性質的經修飾的 T 細胞。

【0098】該專一性 TCR 為一受體，能專一性識別本發明之胜肽與 HLA 分子的複合體，當 TCR 呈現在 T 細胞表面時，提供 T 細胞對抗目標細胞的專一性活性。以上複合體的專一性識別可利用任何已知方法確認，且較佳方法包括，例如使用 HLA 分子與本發明胜肽的 HLA 多聚體染色分析，及 ELISPOT 試驗法。藉由實施 ELISPOT 試驗法，可確認在細胞表面表現 TCR 的 T 細胞會由該 TCR 而識別一細胞，且該訊息會在胞內傳遞。當複合體存在於 T 細胞表面時，上述複合體會造成 T 細胞細胞毒性活性的確認，也可由已知方法進行。較佳方法包括例如確認對 HLA + 目標細胞的細胞毒性活性的方法，例如鉻釋出試驗法。

【0099】本發明也提供 CTL，其係藉由以編碼 TCR 次單元多胜肽的核酸改變形態而製備，該多胜肽結合於該 ECT2 胜肽，例如 HLA-A2 的序列識別號：1 至 40 的胜肽。

【0100】該改變形態的 CTL 能在體內自我導引到癌細胞，且可在體外以周知的培養方法增殖(例如 Kawakami *et al.*, J Immunol., 142, 3452-3461(1989))。本發明之 CTL 可用於形成免疫產生性組合物，其有用於治療或預防需要療法或保護的病患的癌症(WO2006/031221)。

IX. 醫藥物質或組合物

【0101】因為 ECT2 表現比起在正常組織，專一性地在癌症中升高，癌症例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌

(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)，因此本發明的胜肽、多核苷酸可用於治療及/或預防癌症，及/或防止其術後復發。因此本發明提供一種醫藥藥劑、物質或組合物供治療及/或預防癌症及/或預防其術後復發，此種藥劑、物質或組合物含有本發明的胜肽、多核苷酸當中一種或更多當做活性成分。或者該胜肽可表現在上述外泌體或細胞的表面上，例如 APC，以供當作醫藥物質或組合物。此外，上述以任意本發明之胜肽當做目標的 CTL，也可用於當做該醫藥物質或組合物的活性成分。

【0102】該醫藥藥劑或組合物可當做疫苗，本發明中，用詞「疫苗」(也稱為免疫原性組合物)係指當在動物接種時具有誘導抗腫瘤免疫性功能的物質。

【0103】本發明之醫藥藥劑或組合物可用於治療及/或預防癌症，及/或防止其術後復發，個體或病患包括人類及其他哺乳動物，包括但不限於小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、貓、犬、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴、狒狒及黑猩猩，尤其商業上重要的動物或馴養動物。

【0104】於其他具體例，本發明也提供使用活性成分製造供治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或藥劑的用途，該活性成分選自以下：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼此處揭示的胜肽的核酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；及
- (d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

【0105】或者本發明也提供一種活性成分，用於治療癌症或腫瘤，該活性成分選自以下：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼此處揭示的胜肽的核酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；及
- (d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

【0106】或者本發明更提供製造用於治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或物質的方法或處理，其中該方法或處理包括將醫藥上或生理上可接受的載體與選自以下的活性成分配方的步驟：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼此處揭示的胜肽的核酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；及
- (d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

【0107】於其他具體例，本發明更提供製造用於治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或物質的方法或處理，其中該方法或處理包括將活性成分與醫藥上或生理上可接受的載體混合的步驟，其中該活性成分選自以下：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼此處揭示的胜肽的核酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；及
- (d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

【0108】依照本發明，具有選自序列識別號：1 至 40 之胺基酸序列的胜肽已發現為 HLA-A2 限制抗原決定基胜肽或候選者，其可能誘導有效且專一性的免疫反應。因此包括具有序列

識別號：1 至 40 之胺基酸序列的胜肽的該醫藥物質或組合物，尤適於對於 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體投予。同樣適用於包括編碼任一此等胜肽的多核苷酸(即本發明之多核苷酸)的醫藥物質或組合物。

【0109】本發明之醫藥物質或組合物所治療的癌症包括而不限於涉及 ECT2 (例如過度表現)的任何癌症，包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。

【0110】該醫藥物質或組合物除了含有上述活性成分，也可含有其他具有誘導對抗癌細胞的 CTL 的能力的胜肽、編碼其他胜肽的其他多核苷酸、呈現其他胜肽的細胞等。在此，具有誘導對抗癌細胞的 CTL 的能力的其他胜肽，例如癌症專一性抗原(例如，經鑑別的 TAA)，但不限於此等。

【0111】視需要，本發明之醫藥物質或組合物可選擇地包括其他治療物質當作活性成分，只要該物質不會抑制該活性成分的抗腫瘤作用即可，例如任一該胜肽。例如，配方可包括抗發炎物質或組合物、止痛劑、化學療劑等。除了在藥劑本身當中的其他治療物質，本發明的藥劑也可依序或同時投予一種或更多其他藥理物質或組合物。藥劑及藥理物質或組合物的量，取決於例如使用的藥理物質或組合物的形式、欲治的疾病及投予的時程及路徑。

【0112】應瞭解除了此處特別提及的成分以外，本發明之醫藥物質或組合物可包括在該技術領域中關於配方形式使用

的習知的物質或組合物。

【0113】本發明之一具體例中，本發明之醫藥藥劑、物質或組合物可包括在製造品及套組中，該套組含有治療欲治療的疾病例如癌症的致病情形的有用的物質。製造品可包括附有標記的任意該醫藥物質或組合物的容器。適當的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。該試管可由各種材料製作，例如玻璃或塑膠。容器上的標記必需指示該物質或組合物係用於治療或預防該疾病的一種以上的病況。該標記也可顯示投予指示等。

【0114】除了上述容器以外，包含本發明的醫藥藥劑、物質或組合物的套組可以視情形更包括第二容器，其盛裝醫藥上可容許的稀釋劑。從商業及使用者角度，可更包括其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、針筒及使用指示。

【0115】該醫藥組合物視需要，可放在包裝或分配裝置中，其可包含一種或更多含有該活性成分的單位的劑量。該包裝例如包括金屬或塑膠箔，例如泡殼包裝。該包裝或分配裝置可以隨附投予指示。

(1) 含有該胜肽當做活性成分之醫藥物質或組合物

【0116】本發明之胜肽直接當做醫藥藥劑、物質或組合物投予，或視需要以習知配方方法製劑。於後者，除了本發明之胜肽，可適當使用通常使用於藥物的載體、賦形劑等而無特殊限制。此等載體的例子有無菌水、生理鹽液、磷酸鹽緩衝液、培養液等。再者該醫藥物質或組合物視需要可包含安定劑、懸浮劑、保存劑、界面活性劑等。本發明之醫藥藥劑、物質或組合物可用於抗癌症用途。

【0117】本發明之胜肽可組合製備成包括兩種或更多本發明之胜肽，以在體內誘導 CTL。該胜肽可為混合(雞尾酒)或利用標準技術彼此接合。例如該胜肽可以化學連結或表現成單一融合的多胜肽序列，以一或數個胺基酸當做連結子(例如 Lysine linker: K. S. Kawamura *et al.* J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715)。該組合中的胜肽可相同或不同。藉由投予本發明之胜肽，該胜肽藉由該 HLA 抗原在 APC 以高密度呈現，然後誘導對於由該呈現的胜肽與該 HLA 抗原形成的複合體為專一性反應的 CTL。或者從個體移出 APC(例如 DC)，然後以本發明之胜肽刺激以獲得在細胞表面呈現本發明之胜肽的 APC。將這些 APC 再度投予個體以在該個體中誘導 CTL，結果可增加對於腫瘤關聯內皮的侵犯。

【0118】該用於治療及/或預防癌症的醫藥物質或組合物，其包括任意本發明之胜肽當做活性成分，可包括一佐劑以使細胞免疫有效建立，或其可以與其他活性成分一起投予，且可藉由配方為顆粒投予。佐劑意指當與具有免疫學活性的蛋白質一起(或連續)投予時，會增強對於蛋白質的免疫反應的任意化合物、物質或組合物。可適用的佐劑包括文獻中敘述者(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)。例示的佐劑包括磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍亂毒素、沙門毒素、不完全 Freund 佐劑(IFA)、完全 Freund 佐劑(CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W 乳劑等，但不限於此。

【0119】再者，可便利地使用微脂體配方、顆粒配方，其中該胜肽結合於數微米直徑的珠子、及脂質結合於該胜肽的配

方。

【0120】於本發明其他具體例，本發明之胜肽也可以於醫藥上可接受的鹽的形式投予。較佳的鹽例如包括與鹼金屬的鹽、與金屬的鹽、與有機鹼的鹽、與有機酸的鹽及與無機酸的鹽。

【0121】於有些具體例，本發明之醫藥藥劑、物質或組合物包括會啟動 CTL 的成分。脂質已被鑑別為能夠於體內啟動對抗病毒抗原的 CTL 的物質或組合物。例如可將棕櫚酸殘基附著在離胺酸殘基的 epsilon-及 alpha-胺基，然後連結到本發明之胜肽。然後可將該脂質化的胜肽直接以微胞或微粒投予、包入微脂體或於佐劑中乳化而投予。另一例的脂質啟動 CTL 反應，當共價附著於一適當胜肽時，可使用 *E. coli* 脂蛋白，例如三棕櫚醯基-S-甘胺醯基半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸 (P3CSS) 啟動 CTL(參見例如 Deres *et al.*, Nature 1989, 342: 561-4)。

【0122】投予方法可為口服、皮內、真皮下、靜脈內及全身性投予或對於目標部位的鄰近處局部投予。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。本發明之胜肽的劑量可依照欲治療的疾病、病患年紀、體重、投予方法等適當調整，且通常為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，且可數天至數月投予一次。該技術領域中具有通常知識者可適當選擇適合的劑量。

(2) 含有多核苷酸當做活性成分的醫藥物質或組合物

【0123】本發明之醫藥藥劑、物質或組合物也包括可表現

形式之編碼此述胜肽的核酸。在此用詞「可表現的形式」意指當多核苷酸導入細胞中時會在體內表現為誘導抗腫瘤免疫性的多胜肽。於例示的具體例中，關注的多核苷酸的核酸序列包括表現該多核苷酸需要的調節要素。該多核苷酸可經裝備以達到穩定插入目標細胞的基因體中(參見例如 Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 for a description of homologous recombination cassette vectors。亦參見例如 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; 及 WO 98/04720)。DNA-為主的遞送技術包括「裸 DNA」、加速(bupivacaine, 聚合物, 胜肽-媒介的)遞送、陽離子性脂質複合體及微粒媒介的(「基因槍」)或壓力媒介的遞送(參見例如 U.S. Patent No. 5,922,687)。

【0124】本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體表現。表現載體例如減毒病毒寄主，例如牛痘或禽痘。此方法涉及使用牛痘病毒，例如當作載體以表現編碼該胜肽的核苷酸序列。當導入寄主中時，該重組牛痘病毒會表現該免疫原性胜肽，且因而引起免疫反應。有用於免疫實驗步驟的牛痘載體與方法敘述於例如美國專利 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。其他許多有用於治療性投予或免疫的載體例如腺病毒及腺病毒相關的病毒載體、反轉錄病毒載體、傷寒載體、去毒炭疽毒素載體等。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。

【0125】將多核苷酸遞送到病患可直接進行，使病患直接暴露於攜帶多核苷酸的載體，或者間接進行，先將關注的多核苷酸於體外使細胞轉形，然後將該細胞移殖到病患中。此兩種方法已知各為體內(*in vivo*)及生物體外(*ex vivo*)的基因療法。

【0126】針對基因治療的方法的一般評論，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)。可適用於本發明該技術領域中普通已知的的重組 DNA 技術的方法，敘述於 Ausubel *et al.*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; 及 Krieger, in *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990。

【0127】投予方法可為口服、皮內、真皮下、靜脈內注射等，且全身性投予或對於目標部位的鄰近處局部投予係有用。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。於適合載體或經編碼本發明胜肽的多核苷酸轉形的細胞中的多核苷酸的劑量可依照欲治療的疾病、病患年紀、體重、投予方法等適當調整，且通常為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，且可數天至數月投予一次。該技術領域中具有通常知識者可適當選擇適合的劑量。

X. 使用該胜肽、外泌體、APC 及 CTL 的方法

【0128】本發明之胜肽及多核苷酸可用於製備或誘導 APC 及 CTL。本發明之外泌體及 APC 也可用於誘導 CTL。該胜肽、多核苷酸、外泌體及 APC 可與其他任何化合物組合使用，只要該額外的化合物不會抑制 CTL 誘導能力即可。因此任一上述本發明之醫藥物質或組合物可用於誘導 CTL。此外，包括該胜肽及多核苷酸者也可用於誘導 APC 如下說明。

(1) 誘導抗原呈現細胞(APC)的方法

【0129】本發明提供使用本發明之胜肽或多核苷酸誘導有高度 CTL 誘導能力的 APC 的方法。

【0130】本發明的方法包括使 APC 與本發明之胜肽於體外 (*in vitro*)、生物體外 (*ex vivo*) 或體內 (*in vivo*) 接觸的方法。例如使 APC 與該胜肽在生物體外接觸的方法可包括以下步驟：

- a: 從一個體收集 APC，及
- b: 使步驟 a 的 APC 與該胜肽接觸。

【0131】該 APC 不限於特定種類的細胞，包括樹狀細胞 (DC)、蘭氏 (Langerhans) 細胞、巨噬體、B 細胞及經活化的 T 細胞，此等已知會在表面上呈現蛋白質性抗原，而會被淋巴球所識別。因為 DC 在 APC 中具有最強的 CTL 誘導活性，故較佳使用 DC。任何本發明之胜肽可單獨被使用或與其他本發明的胜肽一起使用。

【0132】於另一方面，當本發明之胜肽投予一個體時，該 APC 係於體內與該胜肽接觸，因此在該個體體內誘導具有高度 CTL 誘導能力的 APC。因此本發明包括對一個體投予本發明之

胜肽。同樣地，當本發明之多核苷酸以可表現形式投予一個體時，本發明之胜肽會在體內表現並與 APC 接觸，因此在該個體體內誘導具有高度 CTL 誘導能力的 APC。因此本發明也可包括投予一個體本發明之多核苷酸。「可表現的形式」在上述「IX. 醫藥物質或組合物項中(2)含有多核苷酸當做活性成分的醫藥物質或組合物」已有敘述。

【0133】再者本發明可包括將本發明之多核苷酸導入一 APC 以誘導具有 CTL 誘導能力的 APC。例如該方法可包括以下步驟：

- a: 從一個體收集 APC，及
- b: 導入編碼本發明之胜肽的多核苷酸。

【0134】步驟 b 可如上述「VI. 抗原呈現細胞」項中所述實施。

【0135】或者本發明提供一種製備抗原呈現細胞(APC)的方法，該 APC 專一地誘導對抗 ECT2 的 CTL 活性，其中該方法可包括以下步驟：

- (a) 使 APC 與本發明之胜肽於體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)接觸；及
 - (b) 將編碼本發明之胜肽的多核苷酸導入 APC 中。
- (2) 誘導 CTL 的方法

【0136】本發明也提供使用本發明之胜肽、多核苷酸、外泌體或 APC 誘導 CTL 的方法。

【0137】本發明也提供使用編碼多胜肽的多核苷酸誘導 CTL 的方法，該多胜肽能形成識別本發明之胜肽與 HLA 抗原

的複合體的 T 細胞受體 (TCR) 次單元。較佳者，誘導 CTL 的方法可包括以下至少一步驟：

a) 使 CD8+ T 細胞與抗原呈現細胞及/或外泌體接觸，該抗原呈現細胞及/或外泌體在其表面呈現 HLA 抗原與本發明胜肽的複合體；及

b) 將編碼能夠形成識別本發明之胜肽與 HLA 抗原的複合體的 TCR 次單元的多胜肽的多核苷酸導入 CD8+ 細胞內。

【0138】當投予本發明之胜肽、多核苷酸、APC 或外泌體到個體中時，會在該個體體內誘導 CTL，且促進以該癌細胞為目標的免疫反應強度。因此本發明的方法包括投予一個體本發明的胜肽、多核苷酸、APC 或外泌體之步驟。

【0139】或者 CTL 也可使用上述者在生物體外 (*ex vivo*) 誘導，於誘導 CTL 後，可將已活化的 CTL 置回該個體。例如該方法可包括以下步驟：

a: 從一個體收集 APC；

b: 使步驟 a 的 APC 接觸該胜肽；及

c: 共同培養步驟 b 的 APC 及 CD8+ 細胞。

【0140】在上述步驟 c 中與 CD8+ 細胞共同培養的 APC 也可利用將包含本發明之多核苷酸的基因傳遞到 APC 中而製備，如上述「VI. 抗原呈現細胞」項中所述，但本發明不限於此，包含任何有效在其表面呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽的複合體的 APC。

【0141】除此種 APC 以外，也可使用在表面呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽的複合體的外泌體。亦即，本發明可包括共同

培養在表面呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽的複合體的外泌體的步驟。此種外泌體可藉由上述在「V. 外泌體」項中所述者製備。

【0142】再者，CTL 可藉由將包括編碼結合於本發明之胜肽之 TCR 次單元的多核苷酸的基因導入 CD8⁺ 細胞內而誘導。此種轉換可如上述「VIII. T 細胞受體(TCR)」項中所述者實施。

【0143】此外，本發明提供製造誘導 CTL 的醫藥物質或組合物的方法，其中該方法包括混合或調配本發明胜肽與醫藥上可接受的載體的步驟。

(3) 誘導免疫反應的方法

【0144】又，本發明提供誘導對抗 ECT2 相關疾病的免疫反應的方法。適當的疾病可包括癌症，例如包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。

【0145】本發明之方法可包括投予含有本發明任一胜肽或編碼該胜肽的多核苷酸的物質或組合物的步驟。本發明方法也可投予呈現本發明任一胜肽的外泌體或 APC。關於細節，參見「IX. 醫藥物質或組合物」項，尤其是敘述使用本發明之醫藥物質或組合物當做疫苗的部分。此外，可用於本發明以誘導免疫反應的外泌體與 APC 詳述於「V. 外泌體」、「VI. 抗原呈現細胞(APC)」及「X. 使用該胜肽、外泌體、APC 及 CTL 的方法」的(1)及(2)。

【0146】本發明也提供製造誘導免疫反應的醫藥物質或組合物的方法或處理，其中該方法可包括混合或調配本發明之胜肽與醫藥上可接受的載體的步驟。

【0147】或者本發明之方法可包括投予本發明之疫苗或醫藥組合物的步驟，該疫苗或醫藥組合物包括：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼此處揭示的胜肽的核酸；
- (c) 表面呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；及
- (d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

【0148】本發明上下文中，過度表現 ECT2 的癌症可利用此等活性成分治療。此種癌症例如包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。因此在投予包括該活性成分的疫苗或醫藥組合物之前，宜確認是否欲治療的細胞或組織中的 ECT2 表現水平比起同器官的正常細胞為增強。因此，於一具體例本發明提供治療(過度)表現 ECT2 的癌症的方法，該方法可包括以下步驟：

- i) 確認獲自患有欲治療的癌症個體的細胞或組織中的 ECT2 表現水平；
- ii) 與正常對照組比較 ECT2 表現水平；及
- iii) 對於患有比起正常對照組 ECT2 過度表現的癌症個體，投予至少一種選自上述(a)至(d)的成分。

【0149】或者本發明也提供包括至少一種選自上述(a)至(d)

的成分的疫苗或醫藥組合物，用於投予患有過度表現 ECT2 的癌症個體。換言之，本發明更提供一種用於鑑別欲以本發明 ECT2 胜肽治療的個體的方法，該方法包括確認來自個體的細胞或組織中的 ECT2 表現水平的步驟，其中比起正常對照組水平，該基因的水平增加代表該個體可能患有可以用該本發明之 ECT2 多胜肽治療的癌症。本發明之治療癌症的方法將詳述如下。

【0150】任何由個體衍生的細胞或組織皆可用於確認 ECT2 的表現，只要其包括 ECT2 的目標轉錄或轉譯產物即可。適合的樣本包括，例如但不限於體組織及體液，例如血、唾液及尿。較佳者，衍生自個體的細胞或組織樣本含有包括上皮細胞的細胞族群，更佳為癌化上皮細胞或來自懷疑為癌組織的上皮細胞。又，視需要可從獲得的體組織及體液純化該細胞，然後當做個體衍生的樣本。

【0151】以本發明治療的個體較佳為哺乳動物。哺乳動物包括例如但不限於人、非人類靈長類、小鼠、大鼠、犬、貓、馬及牛。

【0152】依照本發明，可確認由一個體獲得的細胞或組織中的 ECT2 表現水平。該表現水平可使用此技術領域習知方法確認為轉錄(核酸)產物水平。例如 ECT2 的 mRNA 可以藉由雜交法使用探針定量(例如北方雜交法)。此檢測可於晶片上、陣列上等實施。使用陣列對於偵測 ECT2 的表現水平為較佳。該技術領域中具有通常知識者可利用 ECT2 的序列資訊製備此種探針。例如可使用 ECT2 的 cDNA 當做探針。視需要，可將該

探針以適合的標記例如染料、螢光物質及同位素標記，且該基因表現水平可以該雜交的標記的強度檢測。

【0153】再者，ECT2 的轉錄產物(例如序列識別號：42)，可藉由放大為主的檢測方法(例如 RT-PCR)使用引子定量。此種引子可依照該基因可得的序列資訊製備。

【0154】具體而言，將供本發明使用的探針或引子於嚴苛、中度嚴苛或低嚴苛條件下，雜交於 ECT2 之 mRNA。此處使用的用詞「嚴苛(雜交)條件」係指在此條件下，探針或引子會雜交於其目標序列，但不會與其他序列雜交。嚴苛條件為序列依存性，且在不同狀況下會不同。較長序列的特定雜交比起較短的序列會在較高溫觀察到。一般而言，嚴苛條件的溫度係選擇較特定序列在一定義的離子強度及 pH 時的熱熔點(T_m)低約攝氏 5 度的溫度。該 T_m 係指互補於其目標序列的探針 50% 與該目標序列之雜交達到平衡的溫度(於一定義的離子強度、pH 及核酸濃度)。由於該目標序列一般過量存在，於 T_m ，50% 的探針維持平衡。通常嚴苛條件為鹽濃度少於約 1.0 M 鈉離子，通常約 0.01 至 1.0 M 鈉離子(或其他鹽)，於 pH 7.0 至 8.3，對於短的探針或引子(例如 10 至 50 個核苷酸)，溫度至少約攝氏 30 度，對於較長的探針或引子，至少約攝氏 60 度。嚴苛條件也可藉由添加去安定物質例如甲醯胺而達到。

【0155】本發明之探針或引子通常為實質上經純化的寡核苷酸。該寡核苷酸通常包括核苷酸序列的一區域，該區域在嚴苛條件下會雜交於至少約 2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50 或 25 個的包括 ECT2 序列的核酸的

連續意義股的核苷酸序列，或包括 ECT2 序列的核酸的反義股核苷酸序列，或這些序列的天然發生的突變。尤其例如於較佳具體例中，可使用長度為 5-50 的寡核苷酸當做引子以放大欲偵測的基因。更佳者，ECT2 基因的 mRNA 或 cDNA 可以利用特定體積，通常長度為 15- 30b 的寡核苷酸的探針或引子偵測。

【0156】於較佳具體例中，該寡核苷酸探針或引子的長度可選自 15-25。使用此種寡核苷酸探針或引子偵測基因的試驗程序、裝置或試劑為周知(例，寡核苷酸微陣列或 PCR)。於此等試驗中，探針或引子也可包括標籤(tag)或連結子序列。又，可將探針或引子以欲捕捉的可偵測標記或親和性配體修飾。或者於以雜交為主的偵測程序中，可使用長度為數百(例如約 100-200)鹼基至數千(例如約 1000-2000)鹼基的多核苷酸當做探針(例如北方墨點分析或 cDNA 微陣列分析)。

【0157】或者可偵測轉譯產物以診斷本發明。例如可確認 ECT2 蛋白質(序列識別號: 42)或其免疫片段的量。確認轉譯產物的蛋白質的量的方法，包括使用專一性識別該蛋白質的抗體的免疫分析方法。該抗體可為單株抗體或多株抗體。再者可使用該抗體的任一片段或修飾(例如嵌合抗體、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)以供偵測，只要該片段或修飾抗體保留對於該 ECT2 蛋白質的結合能力即可。本發明也提供此種對抗本發明之胜肽的抗體及其片段。製備此種用於偵測蛋白質的抗體的方法在該技術領域中為周知，且可採用任意方法於本發明中以製備此種抗體及其均等物。

【0158】基於轉譯產物偵測 ECT2 基因的表現水平的另一

方法，可使用對抗該 ECT2 蛋白質的抗體，利用免疫組織化學分析測定染色強度。亦即，於該測量中，強染色代表該蛋白質的存在/水平增加，同時，ECT2 基因表現水平高。

【0159】目標基因例如 ECT2 基因於癌細胞中的表現水平，若比起該目標細胞的對照組水平(例如於正常細胞中的水平細胞)增加例如 10%、25%或 50%，或增加超過 1.1 倍、高於 1.5 倍、高於 2.0 倍、高於 5.0 倍、高於 10.0 倍或更多，則確認該目標基因的表現水平為增加。

【0160】該對照水平可與癌細胞同時確認，藉由使用預先從疾病狀態(有罹癌或未罹癌)為已知的個體收集並保存的樣本。此外，從欲治療的癌器官的非癌化區獲得的正常細胞也可當做正常對照。或者該對照水平可依據先前從疾病狀態已知的個體得到的樣本之已確認的 ECT2 基因的表現水平經分析的結果的統計方法而確認。再者，該對照水平可從來自先前測試的細胞的表現樣式的資料庫。又，依照一本發明方面，一生物學樣本中的 ECT2 基因表現水平可以與從多個參考樣本所確認的多個對照水平比較。較佳為使用與該個體衍生的生物學樣本類似的組織類型之參考樣本來決定對照水平。再者，較佳使用在疾病狀態已知的群體中 ECT2 基因的表現水平的標準值。該標準值可由該技術領域中已知的方法獲得。例如平均值 ± 2 S.D. 或平均值 ± 3 S.D. 的範圍可當作該標準值。

【0161】本發明文中，由已知非癌化的生物學樣本所決定的對照水平，稱為「正常對照水平」。另一方面，若該對照水平從癌化的生物學樣本來決定，其稱為「癌化的對照水平」。

樣本表現水平與對照水平之間的差異可經常態化為對照核酸(例如管家基因)的表現水平，對照核酸的表現水平已知不會取決於細胞的癌化或非癌化而不同。對照基因例如包括但不限於 beta-肌動蛋白、甘油醛 3 磷酸去氫酶及核糖體蛋白質 P1。

【0162】當 ECT2 基因的表現水平比起正常對照水平為增加時，或者相似/相等於癌化對照水平時，該個體可診斷為患有欲治療的癌症。

【0163】本發明也提供 (i)診斷個體是否疑似患有欲治療的癌症之方法，及/或(ii) 選擇供癌症治療的個體之方法，此方法可包括以下步驟：

- a) 確認獲自疑似患有欲治療的癌症的個體的細胞或組織中的 ECT2 表現水平；
- b) 比較該 ECT2 表現水平與正常對照水平；
- c) 若 ECT2 的表現水平比起正常對照水平為增加，診斷該個體是患有欲治療的癌症；及
- d) 若步驟 c)中診斷該個體患有欲治療的癌症時，選擇該個體進行癌症治療。

【0164】或者該方法可包括以下步驟：

- a)確認獲自疑似患有欲治療的癌症的個體的細胞或組織中的 ECT2 表現水平；
- b) 比較該 ECT2 表現水平與癌化對照水平；
- c) 若 ECT2 的表現水平相似或相等於癌化對照水平，則診斷該個體是患有欲治療的癌症；及
- d) 若步驟 c)中診斷該個體患有欲治療的癌症時，選擇該

個體進行癌症治療。

【0165】本發明也提供一種診斷套組，係用於診斷或確認患有或疑似患有可利用本發明之 ECT2 多胜肽治療的癌症的個體，也可有用於評估及/或監控癌症免疫療法的效力或適用性。較佳者，該癌症包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。尤其，該套組較佳為可包括偵測個體衍生細胞中的 ECT2 基因表現的至少一種試劑，該試劑可選自以下群組：

- (a) 偵測 ECT2 基因之 mRNA 的試劑；
- (b) 偵測 ECT2 蛋白質或其在免疫學上的片段的試劑；及
- (c) 偵測 ECT2 蛋白質的生物學活性的試劑。

【0166】適合偵測 ECT2 基因之 mRNA 的試劑例如可包括，專一性結合於或鑑別 ECT2 NA 的核酸，例如具有對部分 ECT2 mRNA 的互補序列的寡核苷酸。此種寡核苷酸例如對 ECT2mRNA 專一的引子及探針。此種寡核苷酸可依照該技術領域周知的方法製備。視需要，可將偵測該 ECT2 mRNA 的試劑固定化在固體基質上。又，該套組中可包括多於一種偵測 ECT2 mRNA 的試劑。

【0167】另一方面，適合偵測該 ECT2 蛋白質或其免疫片段的試劑，例如可包括對於 ECT2 蛋白質或其免疫片段的抗體。該抗體可為單株抗體或多株抗體。再者，該抗體的任何片段或修飾(例如嵌合抗體、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)可當做該試

劑，只要該片段或修飾抗體保留對於 ECT2 蛋白質或其免疫片段的結合能力即可。製備此種偵測蛋白質用的抗體的方法，在該技術領域為人周知，且在本發明中可採用任意方法以製備此種抗體及其均等物。再者，該抗體可經由直接連結或間接標定技術以訊號產生分子標記。標記抗體及偵測結合於目標的抗體之標記及方法，在該技術領域係為人周知，且在本發明可使用任意的標記及方法。又，該套組中可包括多於一種偵測 ECT2 蛋白質的試劑。

【0168】該套組可含有多於一種的上述試劑。該套組可更包括一固體基質；一試劑，該試劑用於將探針結合於對抗 ECT2 胜肽的 ECT2 基因或抗體；一介質及容器，用於培養細胞；陽性及陰性對照試劑；及二次抗體，用於偵測對抗 ECT2 胜肽的抗體。例如由沒有癌症或患有癌症的個體獲得的組織樣本，可當做有用的對照試劑。本發明的套組從商業及使用者角度，可更包括其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、針筒及有使用指示的包裝插入物(例如紙、錄音帶、CD-ROM 等)。此等試劑保留在有標籤的容器中。適合的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。此等容器可由各種材料形成，例如玻璃或塑膠。

【0169】本發明之一具體例中，當該試劑為對抗該 ECT2 mRNA 的探針時，該試劑可固定化在固體基質上，例如多孔條，以形成至少一個偵測部位。該多孔條的測量或偵測區可包括多個部位，各含有核酸(探針)。試條也可含有供陰性及/或陽性對照的部位。或者對照部位可位在與試條分開的條片上。視情形，該不同的偵測部位可含有不同量的固定化核酸，亦即在

第一偵測部位為較高量，而在接續的部位為較低量。當添加測試樣本時，顯示可偵測訊號的部位的數目提供存在於該樣本中的 ECT2 mRNA 量的定量指示。該偵測部位可為任何適於偵測的形狀，通常為桿狀或跨越試條寬度方向的點狀。

【0170】本發明的套組可更包含陽性對照樣本或 ECT2 標準樣本。本發明的陽性對照樣本可藉由收集 ECT2 陽性樣本，然後分析其 ECT2 水平而製備。或者可對不表現 ECT2 的細胞添加純化的 ECT2 蛋白質或多核苷酸，以形成該陽性樣本或該 ECT2 標準樣本。本發明中，純化的 ECT2 可為重組蛋白質。該陽性對照樣本的 ECT2 水平例如高於截止值。

【0171】於一具體例中，本發明更提供一種診斷套組，包括能夠專一性識別本發明抗體或其片段的蛋白質或其部分的蛋白質。

【0172】本發明的部分的蛋白質，包括由至少 8 個，較佳為 15 個，更佳為 20 個本發明蛋白質的胺基酸序列中連續胺基酸所構成的多胜肽。癌症可藉由偵測使用本發明蛋白質或胜肽(多胜肽)偵測樣本(例如血液、組織)中的抗體來診斷。製備本發明蛋白質及胜肽的方法敘述如下。

【0173】本發明之診斷癌症的方法，如上所述，可藉由確認抗 ECT2 抗體與對應的對照樣本中的量的差異而實施。若該個體的細胞或組織含有對抗該基因的表現產物(ECT2)的抗體，且該抗 ECT2 抗體的量確認其水平比起正常對照的截止值為高，則該個體懷疑患有癌症。

【0174】於其他具體例，本發明的診斷套組可包括本發明

之胜肽及與其結合的 HLA 分子。使用抗原性胜肽與 HLA 分子偵測抗原專一性 CTL 的方法已經建立(例如 Altman JD *et al.*, *Science*. 1996, 274(5284): 94-6)。因此可使用本發明之胜肽與該 HLA 分子的複合體在該偵測方法中，以偵測腫瘤抗原專一性 CTL，從而能早期偵測癌症、癌症再發及/或轉移。又，其可用於選擇能適用包括本發明之胜肽當做活性成分的醫藥的個體，或評估該醫藥的治療效果。

【0175】尤其，依照已知方法(參見例如 Altman JD *et al.*, *Science*. 1996, 274(5284): 94-6)，可製備放射標定的 HLA 分子與本發明胜肽的寡聚物複合體，例如四聚體。使用該複合體，可利用定量來自懷疑患有癌症的個體的周邊血液淋巴球中的抗原-胜肽專一性 CTL 而進行診斷。

【0176】本發明更提供使用此述的胜肽抗原決定基評估個體中的免疫反應用的方法或診斷藥劑。於本發明一具體例中，可使用此述的 HLA-A02 限制胜肽當做評估或預測個體免疫反應的試劑。欲評估的免疫反應可藉由使免疫原與免疫勝任細胞於體外或體內接觸而誘導。於一些具體例，可採用能產生識別及結合於該胜肽抗原決定基的抗原專一性 CTL 的任意物質或組合物當作該試劑。該胜肽試劑不一定要用作為免疫原。用於此種分析的分析系統包括相當先進的技術發展，例如四聚體、胞內淋巴激素的染色及干擾素釋放分析法，或 ELISPOT 分析法。於較佳具體例中，用於評估免疫反應的免疫勝任細胞可選自周邊血液、周邊血液淋巴球(PBL)及周邊血液單核球(PBMC)。用於收集或單離此種免疫勝任細胞的方法為該技術

領域中周知。於一較佳具體例中，與胜肽試劑接觸的免疫勝任細胞，包括樹狀細胞的抗原呈現細胞。

【0177】例如本發明之胜肽可使用在四聚體染色分析法中，於暴露於腫瘤細胞抗原或免疫原後，以評估周邊血液單核細胞是否存在抗原專一性 CTL。該 HLA 四聚體複合體可直接用於使抗原專一性 CTL 可見化(參見例如 Ogg *et al.*, *Science* 279: 2103-2106, 1998; and Altman *et al.*, *Science* 174 : 94-96, 1996)，並確認周邊血液單核細胞的樣本中的抗原專一性 CTL 群體的頻率。使用本發明胜肽的四聚體試劑，可如下述產生。

【0178】將結合於 HLA 分子的胜肽於對應的 HLA 重鏈及 beta 2-微球蛋白存在下，重新折疊以產生三分子複合體。於該複合體中，重鏈的羧基端於先前基因工程到該蛋白質中的部位形成生物素醯化。然後添加鏈黴親和素(streptavidin)到該複合體以形成由該三分子複合體與鏈黴親和素構成的四聚體。利用螢光標定的鏈黴親和素，該四聚體可用於將抗原專一性細胞染色。然後可利用例如流式細胞儀鑑別該細胞。此種分析可用於診斷或預後用途。由此程序鑑別的細胞也可用於治療用途。

【0179】本發明也提供用於評估免疫召回(recall)反應的試劑(參見例如 Bertoni *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100: 503-513, 1997 and Penna *et al.*, *J Exp. Med.* 174: 1565-1570, 1991)，包括本發明之胜肽。例如可從患有欲治療癌症的個體得到的病患 PBMC 樣本，使用專一性胜肽分析是否存在抗原專一性 CTL。含有單核細胞的血液樣本，可藉由培養 PBMC 並以本發明胜肽刺激該細胞而評估。於適當培養期間之後，可分析增殖的細胞群體的

例如 CTL 活性。

【0180】該胜肽也可當做評估疫苗效力的試劑。從以免疫原接種疫苗的病患獲得的 PBMC 可使用例如以上其中之一所述的方法分析。病患經 HLA 分析分型，並選定識別該病患中存在的對偶基因專一性分子的胜肽抗原決定基試劑，以用於分析。該疫苗的免疫原性可藉由在 PBMC 樣本中存在的抗原決定基專一性 CTL 而被指出。本發明的胜肽也可用於製造抗體，使用該技術領域周知的技術(參見例如 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; and Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)，該抗體可用於當做診斷、偵測或監控癌症的試劑。此種抗體可包括識別在 HLA 分子脈絡下的胜肽，亦即結合於胜肽-MHC 複合體的抗體。

【0181】本發明之胜肽及組合物有數種額外的用途，有些在此敘述。比如，本發明提供診斷或偵測病症的方法，該病症的特徵為表現 ECT2 免疫原性多胜肽。此等方法涉及決定生物樣本中 ECT2 HLA 結合胜肽、或 ECT2 HLA 結合胜肽與 HLA 第 I 類分子的複合體的表現。胜肽或胜肽與 HLA 第 I 類分子的複合體的表現，可藉由分析該胜肽或複合體的結合夥伴而被確認或偵測。於一較佳具體例，該胜肽或複合體的結合夥伴可為識別及專一性結合於該胜肽的抗體。生物樣本例如腫瘤切片中的 ECT2 表現，也可使用 ECT2 引子利用標準 PCR 放大步驟而測試。此述腫瘤表現之一例及例示條件的進一步揭示及 ECT2 放大用的引子的揭示可見 WO2003/27322，此文內容在此

併入作為參考。

【0182】較佳者，該診斷方法涉及使從一個體單離的生物樣本與對於 ECT2 HLA 結合胜肽專一的藥劑接觸，以偵測在該生物樣本中 ECT2 HLA 結合胜肽的存在。此處「接觸」係指將該生物樣本放置於充分接近該藥劑及於適當條件例如濃度、溫度、時間、離子強度下，使該藥劑與生物樣本中存在的 ECT2 HLA 結合胜肽能專一的交互作用。一般而言，使藥劑與生物樣本接觸的條件，為該技術領域中具通常知識者所知加速分子及其在生物樣本中的同源物(例如蛋白質與其受體同族物、抗體及其蛋白質抗原同族物、核酸與其互補序列同族物)間的專一性交互作用。加速分子及其同源物間的專一性交互作用的條件，敘述於 Low 等人的美國專利號 5,108,921。

【0183】本發明的診斷方法可在體內及體外其中之一或兩者實施。因此本發明中，生物樣本可位在體內或體外。例如該生物樣本可為體內的組織，且可使用專一於該 ECT2 免疫產生性多胜肽的藥劑偵測組織中的該種分子的存在。或者可在體外收集或單離該生物樣本(例如血液樣本、腫瘤切片、組織萃取物)。於較佳具體例中，該生物樣本為含細胞的樣本，更佳為含有從欲診斷或治療的個體收集的腫瘤細胞的樣本。

【0184】或者可藉由以螢光素標定的 HLA 多聚複合體染色直接定量抗原專一性 T 細胞的方法進行診斷(例如 Altman, J. D. *et al.*, 1996, *Science* 274 : 94; Altman, J. D. *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 10330)。也已有人提供胞內淋巴激素的染色，及干擾素-gamma 釋出分析法或 ELISPOT 分析法。多

聚體染色、胞內淋巴激素染色及 ELISPOT 分析法均比習知分析法有至少 10 倍以上的靈敏度(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 US 2004-209295A)、Dextramer(例如 WO 02/072631)及 Streptamers(例如 *Nature medicine* 6. 631-637(2002))。

【0185】因此，在一些具體例中，本發明提供診斷及評估已投予至少一種本發明之 ECT2 胜肽的個體的免疫反應的方法，該方法包括以下步驟：

(a) 使免疫原與免疫勝任細胞在適於誘導專一於該免疫原的 CTL 的條件下接觸；

(b) 偵測或確定步驟(a)誘導的 CTL 的誘導水平；及

(c) 使該個體的免疫反應與 CTL 誘導水平產生相關。

【0186】本發明中，該免疫原為 (a) 選自序列識別號：1 至 40 的 ECT2 胜肽及(b)具有此胺基酸序列的胜肽其中有 1、2 個或以上的胺基酸取代的修飾；之至少一種。目前，適於誘導免疫原專一性 CTL 的條件在該技術領域中為周知。例如免疫勝任細胞可於免疫原存在下體外培養，誘導免疫原專一性 CTL。為了誘導免疫原專一性 CTL，可對該細胞培養物添加任何刺激因子。例如 IL-2 為 CTL 誘導用的較佳刺激因子。

【0187】於一些具體例，監控或評估欲以胜肽癌症療法治療的個體的免疫反應的步驟，可在治療前、治療中及/或治療後實施。一般而言，癌症治療的過程中，對於欲治療的個體重複投予免疫原性胜肽。例如可每週投予免疫原性胜肽持續 3-10

週。因此該個體的免疫反應可在癌症治療過程期間受到評估或監控。或者評估或監控對於癌症治療的免疫反應的步驟可於治療過程完成後實施。

【0188】依照本發明，比起對照組，免疫原誘導性 CTL 的誘導增強，代表欲評估或診斷的個體對於已投予的免疫原有免疫反應。評估該免疫反應的適合對照可包括，例如當該免疫勝任細胞不與胜肽接觸時的 CTL 誘導水平，或具有 ECT2 胜肽以外的胺基酸序列的對照胜肽(例如，隨機胺基酸序列)。於一較佳具體例中，個體的免疫反應藉由比較投予個體的各免疫原間的免疫反應，以序列專一性方式評估。尤其，即使投予個體一些種類的 ECT2 胜肽的混合物，免疫反應仍取決於該胜肽而不同。於此情形，藉由比較各胜肽之間的免疫反應，可鑑別使個體顯示較高反應的胜肽。

XI. 抗體

【0189】本發明更提供結合於本發明胜肽的抗體。較佳的抗體係專一性結合於本發明之胜肽的抗體，且不會結合於(或微弱結合於)非本發明之胜肽。或者抗體結合於本發明的胜肽以及其同質物。對抗本發明胜肽的抗體可用於癌症診斷及預後分析法、及造影方法。同樣地，此種抗體可用於其他癌症治療、診斷及/或預後，只要在癌症病患中也有表現或過度表現。又，細胞內表現的抗體(例如單鏈抗體)在治療上有用於治療涉及 ECT2 表現的癌症，癌症包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、

腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。

【0190】本發明也提供偵測及/或定量包括具有選自序列識別號:1至40的胺基酸序列的多胜肽的 ECT2 蛋白質(序列識別號:42)或其片段的各種免疫分析法。此種分析法可包括一種或以上的抗 ECT2 抗體，其能適當識別及結合於 ECT2 蛋白質或片段。本發明中，結合於 ECT2 多胜肽的抗-ECT2 抗體較佳為識別具有選自序列識別號:1至40的胺基酸序列的多胜肽者。抗體的結合專一性，可利用抑制試驗確認。即，當欲分析的抗體與全長 ECT2 多胜肽間的結合，在具有選自序列識別號:1至40的胺基酸序列的片段多胜肽存在下受到抑制，則表示該抗體專一性地結合於該片段。本發明中，此種免疫分析法係以該技術領域中周知的各種免疫分析法格式實施，包括但不限於各種放射免疫分析法、免疫層析技術、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素連結免疫螢光分析法(ELIFA)等。

【0191】本發明的相關免疫分析但非抗體分析法也可包括 T 細胞免疫原性分析法(抑制或刺激)，及 MHC 結合分析法。此外，本發明也提供能偵測表現 ECT2 的癌症的免疫造影法，包括但不限於使用本發明經標記抗體的放射閃爍攝影造影法。此種分析法臨床上有用於偵測、監控及預測 ECT2 表現的癌症，癌症包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)。

【0192】本發明也提供結合於本發明胜肽的抗體。本發明

的抗體可以任意形式使用，例如單株抗體或多株抗體，且包括藉由以本發明胜肽將動物例如兔子免疫所得的抗血清、所有類型的多株及單株抗體、人類抗體與由基因重組產生的人類化抗體。

【0193】本發明的胜肽當做抗原以獲得的抗體，可衍生自任何動物，但較佳為來自哺乳動物例如人、小鼠、大鼠，更佳為人。人類來源的胜肽可由此處所揭露的核苷酸或胺基酸序列獲得。

【0194】依照本發明，當做免疫抗原的胜肽，可為完整蛋白質或該蛋白質的部分胜肽。部分胜肽可包括例如本發明胜肽的胺基(N)末端或羧基(C)末端片段。

【0195】在此，抗體定義為與 ECT2 胜肽的全長或片段反應的蛋白質。於一較佳具體例，本發明抗體可識別具有選自序列識別號:1 至 40 之胺基酸序列的 ECT2 片段胜肽。用於合成寡胜肽的方法在該技術領域為周知。合成後，在使用為免疫原之前可視情形將胜肽純化。本發明中，該寡胜肽(例如 9-或 10mer)可以與載體接合或連結以增進免疫產生性。鑰孔血藍蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin, KLH)為周知的載體。結合 KLH 與胜肽的方法，也是該技術領域中周知的。

【0196】或者可將編碼本發明胜肽或其片段的基因插入已知的表現載體，然後如此述用於轉形寄主細胞。可從該寄主細胞外或內以標準方法回收所欲的胜肽或其片段，接著可當做抗原。或者可將表現該胜肽的整個細胞或其胞解物或化學合成胜肽當做抗原。

【0197】可將任何哺乳動物以該抗原免疫，但較佳為考量與用在細胞融合的母細胞的相容性。一般而言，可使用嚙齒科動物、兔或靈長科動物。嚙齒科的動物包括例如小鼠、大鼠、倉鼠。兔科動物包括例如兔子。靈長科動物例如狹鼻小目 (Catarrhini) 猴 (舊世界猴、例如食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)、獼猴，狒狒、黑猩猩。

【0198】以抗原免疫動物的方法為該技術領域中已知。腹膜內注射或皮下注射抗原為免疫動物的標準方法。具體而言，可將抗原稀釋及懸浮於適當量的磷酸鹽緩衝鹽液 (PBS)、生理鹽液等。視需要，將抗原懸浮液與適量的標準佐劑混合，標準佐劑例如 Freund 完全佐劑，形成乳劑後投予哺乳動物。較佳者，之後每 4 至 21 天數次投予與適量 Freund 不完全佐劑混合的抗原。適當的載體也可用於進行免疫。如上述免疫之後，可藉由標準方法檢驗血清中所欲抗體量的增加。

【0199】對抗本發明胜肽的多株抗體可藉由從檢查血清中所欲抗體增加的免疫哺乳動物中收集血液，並從血液以習知方法分離血清而製備。多株抗體包括含有該多株抗體的血清及可從該血清分離含有該多株抗體的級分。免疫球蛋白 G 或 M 的製備可來自使用例如偶聯本發明胜肽的親和管柱而得的僅識別本發明胜肽的級分，再使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱純化該級分。

【0200】為了製備單株抗體，從以該抗原免疫的哺乳動物收集免疫細胞，並如上述檢查血清中所欲抗體的水平是否增加，之後進行細胞融合。用於細胞融合的免疫細胞較佳為從脾

臟取得。其他較佳的與上述免疫細胞融合的母細胞，包括例如哺乳動物的骨髓瘤細胞，更佳為具有以藥物篩選融合細胞的所需性質的骨髓瘤細胞。

【0201】上述免疫細胞及骨髓瘤細胞可依照已知方法融合，該方法例如 Milstein 等人的方法 (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46(1981))。

【0202】由細胞融合得到的融合瘤可藉由將其在標準選擇培養基例如 HAT 培養基(含次黃嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶的培養基)中培養而選擇。通常該細胞培養物在 HAT 培養基中繼續培養數天至數週，時間足以使除了所欲融合瘤以外的其他細胞(非融合細胞)死亡。然後，可實施標準極限稀釋以篩選並選殖生產所望抗體的融合瘤細胞。

【0203】除了上述方法，其中非人類動物係以抗原免疫以製備融合瘤，可將人類淋巴球例如受 EB 病毒感染者以胜肽、胜肽表現細胞或其胞解物於體外免疫。然後，將經免疫的淋巴球與能無限分裂的人類來源的骨髓瘤細胞例如 U266 融合，以得到生產能結合於該胜肽的所欲人類抗體的融合瘤(未審查的日本公開專利申請案號昭 63-17688)。

【0204】接著將獲得的融合瘤移植到小鼠的腹腔，並抽取腹水。獲得的單株抗體可利用例如硫酸銨沉澱、蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱、DEAE 離子交換層析或偶聯有本發明胜肽的親和性管柱純化。本發明抗體不僅可用於純化及偵測本發明胜肽，也可作為本發明胜肽的協同劑及拮抗劑的候選物。

【0205】或者可將生產抗體的免疫細胞例如經免疫的淋巴

球，以致癌基而不朽化，用於製備單株抗體。

【0206】如此獲得的單株抗體也可使用遺傳工程技術以重組方式製備(參見例如 Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, 於英國由 MacMillan Publishers LTD(1990)出版)。例如編碼抗體的 DNA 可選殖自免疫細胞，例如融合瘤或生產該抗體的經免疫的淋巴球，插入適當載體，及導入寄主細胞以製備重組抗體。本發明也提供如上述製備的重組抗體。

【0207】再者本發明抗體可為抗體片段或經修飾的抗體，只要其結合於一個或以上的本發明胜肽即可。例如，該抗體片段可為 Fab、F(ab')₂、Fv 或單鏈 Fv(scFv)，其中來自 H 及 L 鏈的 Fv 片段以適當連結子連接(Huston *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83(1988))。具體而言，可利用以酵素例如木瓜酵素或胃蛋白酶處理抗體而產生抗體片段。或者可構建編碼該抗體片段的基因，插入表現載體並於適當的寄主中表現(參見例如，Co *et al.*, *J Immunol* 152: 2968-76(1994); Better 與 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))。

【0208】抗體可藉由與各種分子例如聚乙二醇(PEG)接合而修飾。本發明提供此種經修飾的抗體。該經修飾的抗體可藉由將抗體化學修飾而獲得。此等修飾方法在該領域為習知。

【0209】或者本發明抗體可為，來自非人類抗體的可變區與來自人類抗體的恆定區的嵌合抗體，或人類化抗體，其包括來自非人類抗體的互補決定區(CDR)、框架區(FR)及來自人類抗體的恆定區。此種抗體可依照已知技術製備。人類化可藉由將嚙齒類 CDR 或 CDR 序列取代為人類抗體的對應序列而實施(參見例如 Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536(1988))。因此此種人類化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整的人類可變微域已取代成來自非人類種的對應序列。

【0210】也可使用除了人類框架及恆定區外包括人類可變區的完全人類抗體。此種抗體可使用該技術領域已知的各種技術製造。例如體外方法涉及使用呈現在噬菌體的人類抗體片段的重組庫(例如 Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381(1991))。同樣地，可藉由將人類免疫球蛋白基因位導入基因轉殖動物，例如內生免疫球蛋白已部分或全部失活的小鼠，來製備人類抗體。此方法敘述於例如美國專利號 6,150,584、5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

【0211】如上獲得的抗體可純化成同質。例如可依照一般蛋白質使用的分離及純化方法將抗體分離及純化。例如可利用適當選擇及合併使用的管柱層析分離及單離抗體，管柱層析例如親和性層析、過濾、超過濾、鹽析、透析、SDS 聚丙稀醯胺凝膠電泳及等電點集中法(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))，但不限於此等。可使用蛋白質 A 管柱及

蛋白質 G 管柱當做該親和性管柱。可使用的蛋白質 A 管柱包括例如 Hyper D、POROS 及 Sepharose F.F.(Pharmacia)。

【0212】親和性以外的層析，包括例如離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、反相層析、吸附層析等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996))。此層析程序可利用液相層析，例如 HPLC 與 FPLC 實施。

【0213】例如可使用測量吸光度、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素免疫分析法(EIA)、放射免疫分析法(RIA) 及/或免疫螢光以測量本發明抗體的抗原結合活性。ELISA 中，係將本發明抗體固定化在一平板上，塗佈本發明胜肽於該平板，然後塗佈含有所欲抗體的樣本，例如抗體產生細胞的培養上清或純化的抗體。然後，塗佈識別該初級抗體及以酵素例如鹼性磷解酶標記的二次抗體，然後溫育該平板。清洗後，添加酵素受質例如對硝基苯基磷酸酯到該平板，測量吸光度以評估該樣本的抗原結合活性。該胜肽的片段例如 C 末端或 N 末端片段可當做抗原以評估該抗體的結合活性。可使用 BIAcore(Pharmacia)來評估本發明抗體的活性。

【0214】上述方法，藉由使本發明抗體暴露於假定含有本發明胜肽的樣本，並偵測或測量該抗體與該胜肽形成的免疫複合體，能偵測或測量本發明的胜肽。

【0215】由於偵測或測量本發明胜肽的方法能夠專一性偵測或測量一胜肽，故該方法有用於許多使用該胜肽的實驗中。

XII. 載體與寄主細胞

【0216】本發明也提供導入編碼本發明胜肽的核苷酸之載體與寄主細胞。本發明的載體有用於保存本發明核苷酸尤其是DNA於寄主細胞中，以表現本發明之胜肽，或者投予本發明核苷酸供基因治療。

【0217】當寄主細胞為 *E. coli* 且載體在 *E. coli* (例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1Blue)中大量放大及生產時，該載體應具有欲在 *E. coli* 中放大的「ori」以及用於選擇經轉形的 *E. coli* 的標誌基因(例如由安皮西林、四環黴素、嘉那黴素、氯黴素等藥物選擇的抗藥性基因)。例如，可使用 M13 系列載體、pUC 系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。此外，也可使用 pGEM-T、pDIRECT 及 pT7 進行次選殖及萃取 cDNA 及上述載體。當使用載體產生本發明蛋白質時，可使用表現載體。例如欲在 *E. coli* 中表現的載體應具有上述在 *E. coli* 中放大所需要的特性。當使用 *E. coli*，例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1 Blue，當做寄主細胞，該載體應具有啟動子例如 lacZ 啟動子(Ward *et al.*, Nature 341: 544-6(1989); FASEB J 6: 2422-7(1992))、araB 啟動子(Better *et al.*, Science 240: 1041-3(1988))、T7 啟動子等，能有效率地在 *E. coli* 中表現所欲基因。於此方面，可使用例如 pGEX-5X-1 (Pharmacia)、「QIAexpress system」(Qiagen)、pEGFP 及 pET(於此情形，寄主較佳為表現 T7 RNA 聚合酶的 BL21)取代上述載體。此外，該載體也可含有訊號序列以供胜肽分泌。引導該胜肽分泌到 *E. coli* 胞間質的訊號序列之例，為 pelB 訊號

序列(Lei *et al.*, J Bacteriol 169: 4379(1987))。將載體導入目標寄主細胞的方法包括例如氯化鈣法及電穿孔法。

【0218】除了 *E. coli*，例如可使用來自哺乳動物的表現載體(例如 pcDNA3(Invitrogen) 及 pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17): 5322(1990))、pEF、pCDM8)、來自昆蟲細胞的表現載體(例如「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、來自植物的表現載體(例如 pMH1、pMH2)、來自動物病毒的表現載體(例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、來自反轉錄病毒的表現載體(例如 pZIpneo)、來自酵母菌的表現載體(例如「Pichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)，及來自枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)的表現載體(例如 pPL608、pKTH50)，用於生產本發明之多胜肽。

【0219】為了於動物細胞例如 CHO、COS 或 NIH3T3 細胞中表現載體，該載體應帶有對於在此種細胞中表現所需要的啟動子例如 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，較佳為具有用於選擇轉形體的標記基因(例如由藥物(例如新黴素、G418)篩選的抗藥性基因)。具有此等特性的已知載體例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 及 pOP13。

【0220】以下呈現實施例以說明本發明，並協助該技術領域中具有通常知識者製造及使用。此等實施例並未意欲限制本發明範圍。

實施例

材料及方法

細胞株

【0221】 T2(HLA-A2)、人類 B-類淋巴母細胞株、非洲綠猴腎細胞株 COS7，購自 ATCC。

從 ECT2 衍生的胜肽之候選物篩選

【0222】 使用結合預測軟體「BIMAS」 (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker *et al.* (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima *et al.* (Blood 2001, 98(6): 1872-81))，預測結合於 HLA-A*0201 分子的衍生自 ECT2 的九胜肽及十胜肽。這些胜肽依照標準固相合成法以 Biosynthesis(Lewisville, Texas)合成，並經逆相高效能液體層析(HPLC)純化。該胜肽的純度(>90%)及同一性分別利用分析性 HPLC 及質譜分析確認。將胜肽溶於二甲基亞砷(DMSO)使濃度為 20 mg/ml 並保存在攝氏 -80 度。

體外 CTL 誘導

【0223】 使用單核球衍生的樹狀細胞(DC)當做抗原呈現細胞(APC)，以誘導對抗呈現於人類白血球抗原(HLA)上的胜肽的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)反應。DC 係於體外以另外敘述的方法產生 (Nakahara S *et al.*, Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。具體而言，從正常的自願者(HLA-A*0201 陽性)利用 Ficoll-Plaque 溶液 (Pharmacia) 單離周邊血液單核細胞(PBMC)，以黏附於塑膠組織培養皿(Becton Dickinson)而分離，使其富化成單核球級分(fraction)。將該單核球富化的群體培養於存在 1,000 U/ml 顆粒球-巨噬體群落-刺激因子

(GM-CSF)(R&D System) 及 1,000 U/ml 介白質 (IL)-4(R&D System) 的含 2% 熱失活的自體血清(AS)的 AIM-V 培養基 (Invitrogen)中。培養 7 天後，將細胞激素誘導的 DC 於存在 3 micro-g/ml beta 2-微球蛋白的 AIM-V 培養基中，以上述合成 胜肽各 20 micro-g/ml 於攝氏 37 度脈衝 3 小時。該產生的細胞於其細胞表面表現 DC 相關分子，例如 CD80、CD83、CD86 與 HLA 第 II 類(資料未顯示)。然後這些經胜肽脈衝的 DC 以 X-照射 (20 Gy)使失活，並以 1:20 比例與獲自由以 CD8+ Isolation Kit(Dynal)陽性篩選的自體 CD8+ T 細胞混合。這些培養基安置於 48 井盤(Corning); 各井含有 1.5×10^4 胜肽脈衝 DC、 3×10^5 CD8+ T 細胞及 10 ng/ml IL-7(R&D System) 於 0.5 ml AIM-V/2% AS 培養基中。3 天後，這些培養物補充 IL-2(CHIRON)形成最終濃度為 20 IU/ml。第 7 天及第 14 天，再以自體胜肽脈衝過的 DC 刺激這些 T 細胞。該 DC 係每次依照上述同樣方法製備。於第 21 天，在第 3 回合的胜肽刺激後，測試對抗胜肽脈衝過的 T2 細胞的 CTL(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)。

CTL 擴張程序

【0224】使用類似於 Riddell 等人所述方法在培養中擴張 CTL(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)。
將總共 5×10^4 個 CTL 與 2 種人類 B-類淋巴母細胞株懸浮於 25 ml AIM-V/5% AS 培養基，於 40 ng/ml 抗 CD3 單株抗體 (Pharming) 存在下以 Mitomycin C 去活。開始培養 1 天後，對培養物添加 120 IU/ml 的 IL-2。於第 5、8 及 11 天對該培養物饋加新鮮的含 30 IU/ml 的 IL-2 之 AIM-V/5% AS 培養基 (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)。

建立 CTL 選殖體

【0225】在 96 圓底微滴定盤 (Nalge Nunc International) 中，稀釋成有 0.3、1 及 3 個 CTL/井。將 CTL 與 1×10^4 細胞/井的 2 種人類 B-類母淋巴球細胞株、30ng/ml 抗 CD3 抗體及 125 U/ml 的 IL-2 於總共 150 micro-l/井的含 5%ASA AIM-V 培養基中培養。10 天後對該培養基加入 50 μ l /井 IL-2，達到最終濃度 125 U/ml 的 IL-2。於第 14 天測試 CTL 活性，如上述同樣方法將 CTL 選殖體擴張 (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)。

專一性 CTL 活性

【0226】為了檢查專一性 CTL 活性，實施干擾素

(IFN)-gamma 酵素連結免疫墨點 (ELISPOT) 分析法及 IFN-gamma 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)。具體而言，製備胜肽-脈衝的 T2 (1×10^4 細胞 / well) 當做刺激細胞。於 48 井培養的細胞當做回應細胞。IFN-gamma ELISPOT 分析法及 IFN-gamma ELISA 分析法依製造商流程實施。

建立強力表現目標基因或 HLA-A02 或兩者的細胞

【0227】將編碼目標基因的開放讀取框或 HLA-A*0201 的 cDNA 以 PCR 放大。將 PCR 放大的產物選殖到一載體。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照製造商建議的程序將該質體轉染到 COS7 中，COS7 為目標基因及 HLA-A*0201-欠缺細胞株。轉染後 2 天，以 versene (Invitrogen) 收獲經轉染的細胞，並作為目標細胞 (5×10^4 細胞 / well) 供 CTL 活性分析。

結果

癌症中增強的 ECT2 表現

【0228】從各種癌症使用 cDNA 微陣列得到的全球基因表現概況資料顯示 ECT2 (GenBank 存取號 AY376439; 例如序列識別號: 41) 表現提高。ECT2 的表現在 19 例膀胱癌有 17 例、12 例乳癌有 5 例、14 例子宮頸癌有 14 例、13 例膽管細胞癌有 13 例、5 例 CML 有 5 例、8 例大腸直腸癌有 7 例、16 例食道癌有 12 例、16 例 NSCLC 有 6 例、10 例淋巴癌有 8 例、1 例胰臟癌有 1 例、13 例前列腺癌有 10 例、6 例腎癌有 3 例、13 例 SCLC 有 12 例，比起對應的正常組織有根據地提高(表 1)。

表 1 比起正常的對應組織，癌化組織中觀察到的 ECT2 上調的案例比例

膀胱癌	17/19
乳癌	5/12
子宮頸癌	14/14
膽管細胞癌	13/13
CML	5/5
大腸直腸癌	7/8
食道癌	12/16
NSCLC	6/16
淋巴癌	8/10
胰臟癌	1/1
前列腺癌	10/13
腎癌	3/6
SCLC	12/13

預測衍生自 ECT2 的 HLA-A02 結合胜肽

【0229】表 2a 與 2b 顯示依照高親和性排列的該 HLA-A02 結合的 ECT2 的九胜肽及十胜肽。總共選出有 HLA-A02 結合潛力的 40 個胜肽，並檢查以確認該抗原決定基胜肽。

表 2a 衍生自 ECT2 的 HLA-A02 結合的九胜肽

序列識別號	起始位置	胺基酸序列	分數
1	34	LLIGSTSYV	650.311
2	619	QIFDVVYEV	333.677
3	664	FLFNDCLEI	177.566
4	662	TLFLFNDCL	147.174
5	634	LLSSHRSLV	118.238
6	145	MMNLVLCFT	115.74
7	561	LLIRPVQRL	83.527
8	98	VVTDFQDSV	78.982
9	575	LLNDLKKHT	51.94
10	240	FQDCILSFL	50.414
11	292	FEPSKKLYV	34.216
12	823	ALMTSHGSV	33.455
13	220	NEQDFYAAV	31.606
14	755	MLCRHVANT	29.137
15	357	AQLSRETDV	26.092
16	438	NILATIIQL	24.997
17	874	TLSRSTTHL	21.362
18	568	RLPSVALLL	21.362
19	166	TLVHHMGGV	20.796
20	443	IIQLFQVPL	18.975

起始位置代表從 ECT2 的 N 末端起算的胺基酸殘基數
結合分數係衍生自「BIMAS」

表 2b 衍生自 ECT2 的 HLA-A02 結合的十胜肽

序列識別號	起始位置	胺基酸序列	分數
21	33	NLLIgSTSYV	1415.383
22	633	NLLSsHRSLV	257.342
23	144	SMMNIVLCFT	251.905
24	701	LMPLsQIKKV	196.407
25	754	KMLCrHVANT	160.303
26	557	SLVElLIRPV	131.175
27	191	TQGEkFRVAV	109.867
28	774	YTADpESFEV	105.669
29	428	ELYQtESNYV	91.809
30	618	KQIFdVVYEV	56.767
31	97	FVVTdFQDSV	52.126
32	20	SIFDsKVTEI	50.051
33	574	LLLNdLKKHT	46.873
34	461	ILAPeEIKTI	40.792
35	664	FLFNdCLEIA	39.07
36	575	LLNDIKKHTA	34.627
37	430	YQTEsNYVNI	29.924
38	511	DLVKtYPPFV	28.69
39	471	FGSIpDIFDV	27.86
40	87	GLDSpEFENV	25.901

起始位置代表從 ECT2 的 N 末端起算的胺基酸殘基數
結合分數係衍生自「BIMAS」

以來自經 *HLA-A*0201* 限制的 *ECT2* 所預測的胜肽誘導
CTL

【0230】 衍生自 *ECT2* 的胜肽的 CTL 依照如「材料與方法」

敘述的實驗步驟獲得。胜肽專一性 CTL 活性以 IFN-gamma ELISPOT 分析法確認(圖 1a-c)。以 ECT2-A02-9-34 (序列識別號: 1)刺激的井號碼#6 (a)、以 ECT2-A02-9-664 (序列識別號: 3)刺激的井號碼#5(b)、以 ECT2-A02-10-33 (序列識別號: 21)刺激的井號碼#1 (c)，證明相較於對照井，證實有效產生 IFN-gamma。結果顯示，從 ECT2 衍生的 ECT2-A02-9-34 (序列識別號: 1) (a)、ECT2-A02-9-664 (序列識別號: 3) (b)、ECT2-A02-10-33 (序列識別號: 21) (c) 篩選出來為能誘導有效的 CTL 的胜肽。

建立對抗 ECT2 衍生的胜肽的 CTL 細胞株及選殖體

【0231】將以 IFN-gamma ELISPOT 分析法偵測以 ECT2-A02-9-34 (序列識別號: 1)刺激的井號碼#6 及以 ECT2-A02-9-664 (序列識別號: 3)刺激的井號碼#5、以 ECT2-A02-10-33 (序列識別號: 21)刺激的井號碼 1(c)顯示胜肽專一性 CTL 活性的細胞擴張，並利用上述「材料與方法」項所述極限稀釋法建立 CTL 細胞株。這些 CTL 細胞株的 CTL 活性以 IFN-gamma ELISA 分析法確認(圖 2a-c)。比起未有胜肽脈衝的目標細胞，這些 CTL 細胞株證明有效產生 IFN-gamma 對抗以對應胜肽脈衝的目標細胞。再者，CTL 選殖體由上述「材料與方法」項所述從 CTL 細胞株以極限稀釋法建立，CTL 選殖體產生 IFN-gamma 對抗目標細胞脈衝的胜肽，以 IFN-gamma ELISA 分析法確認。有效的 IFN-gamma 產生從以 ECT2-A02-9-34 (序列識別號: 1) (a) 與 ECT2-A02-9-664 (序列識別號: 3) (b)刺激的 CTL 選殖體確認，如圖 3 所示。

對抗外源表現 *ECT2* 與 *HLA-A*0201* 的目標細胞之專一性 CTL 活性

【0232】對抗這些胜肽所建立的 CTL 細胞株及選殖體，檢驗其識別外源表現 *ECT2* 與 *HLA-A*0201* 分子的目標細胞之能力。對抗以全長 *ECT2* 與 *HLA-A*0201* 分子轉染的 COS7 細胞(一種外源表現 *ECT2* 與 *HLA-A*0201* 基因的目標細胞的特定模式)的專一性 CTL 活性，使用以對應胜肽誘導的 CTL 細胞株及選殖體當做效應子細胞，進行測試。製備以全長 *ECT2* 基因或 *HLA-A*0201* 其中之一轉染的 COS7 細胞當做對照。於圖 4，以 *ECT2*-A02-9-34 (序列識別號: 1) (a)刺激的 CTL 選殖體與以 *ECT2*-A02-10-33 (序列識別號: 21) (b)刺激的 CTL 細胞株，顯示對於表現 *ECT2* 與 *HLA-A*0201* 兩者的 COS7 細胞具有有效的 CTL 活性。另一方面，對照組未偵測到顯著的專一性 CTL 活性。因此，此等資料明確證明 *ECT2*-A02-9-34 (序列識別號: 1) (a)、*ECT2*-A02-10-33 (序列識別號: 21) (b)係自然表現在帶有 *HLA-A*0201* 分子的目標細胞上，並由 CTL 識別。此結果表示，從 *ECT2* 衍生的 *ECT2*-A02-9-34 (序列識別號: 1) (a)及 *ECT2*-A02-10-33 (序列識別號: 21) (b)，適於當做癌症疫苗治療患有 *ECT2* 表現腫瘤的病患。

抗原胜肽的同源性分析

【0233】以 *ECT2*-A02-9-34 (序列識別號: 1)、*ECT2*-A02-9-664 (序列識別號: 3) 及 *ECT2*-A02-10-33 (序列識別號: 21)刺激的 CTL 顯示顯著且專一的 CTL 活性。此結果可能由於 *ECT2*-A02-9-34 (序列識別號: 1)、*ECT2*-A02-9-664 (序列識別

號：3) 及 ECT2-A02-10-33 (序列識別號：21)的序列與衍生自已知會敏化人類免疫系統的其他分子的胜肽為同源。為了排除此可能性，使用 BLAST 演算法(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)對這些胜肽序列進行同源性分析，顯示無序列具有顯著的同源性。同源性分析的結果顯示，ECT2-A02-9-34 (序列識別號：1)、 ECT2-A02-9-664 (序列識別號：3)及 ECT2-A02-10-33 (序列識別號：21)的序列為唯一，因此在吾人最佳知識下，這些分子幾乎不可能對某些無關的分子引起不欲免疫反應。

【0234】總言之，鑑別出衍生自 ECT2 的新穎的 HLA-A2 抗原決定基胜肽。再者，在此的結果證明 ECT2 的抗原決定基胜肽可適於用在癌症免疫療法。

產業利用性

【0235】本發明提供新穎 TAA，尤其衍生自 ECT2 者，會誘導有效且專一的抗腫瘤免疫反應，可應用於廣泛的癌症類型。此種 TAA 可作為胜肽疫苗對抗與 ECT2 有關的疾病，例如癌症，具體而言，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、大腸直腸癌、食道癌、NSCLC、淋巴癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、及 SCLC。

【0236】雖本發明在此已詳述並參照特定的實施例，應了解以上的敘述為例示及說明的用意，且意欲使人理解本發明及其較佳具體例。經由例行的實驗，該技術領域中具有通常知識者當能輕易理解可在不偏離本發明精神及範圍之下進行各種改變及修飾，本發明的邊界與界線定義於附帶的申請專利範圍。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 腫瘤療法科學股份有限公司
<120> ECT2 胜肽及含此胜肽之疫苗
<130> ONC-A1010-TW
<150> US 61/320, 577
<151> 2010-04-02

<160> 46
<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

Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val
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

Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr Glu 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

Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile
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

Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asp Cys 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 Ser Ser His Arg Ser 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

Met Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr
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

Leu Leu Ile Arg Pro Val Gln Arg Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

•

Ala Leu Met Thr Ser His Gly Ser 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

Asn Glu Gln Asp Phe Tyr Ala Ala 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

Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr
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

Ala Gln Leu Ser Arg Glu Thr Asp Val
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

Asn Ile Leu Ala Thr Ile Ile Gln Leu
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

Thr Leu Ser Arg Ser Thr Thr His Leu
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

Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Leu Leu
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

Thr Leu Val His His Met Gly Gly Val
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 Ile Gln Leu Phe Gln Val Pro Leu
1 5

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 21

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

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 22

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

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 23

Ser Met Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 24

Leu Met Pro Leu Ser Gln Ile Lys Lys Val
1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 25

•

• Lys Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr
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

Ser Leu Val Glu Leu Leu Ile Arg Pro 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

Thr Gln Gly Glu Lys Phe Arg Val Ala 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

Tyr Thr Ala Asp Pro Glu Ser Phe Glu Val
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELYQtESNYV

<400> 29

Glu Leu Tyr Gln Thr Glu Ser Asn Tyr 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

Lys Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr Glu Val
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 31

Phe Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val
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 Ile Phe Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile
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

Leu Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr
1 5 10

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

2.

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 34

Ile Leu Ala Pro Glu Glu Ile Lys Thr Ile
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

Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile Ala
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

Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 37

Tyr Gln Thr Glu Ser Asn Tyr Val Asn Ile
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

Asp Leu Val Lys Thr Tyr Pro Pro Phe Val
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

Phe Gly Ser Ile Pro Asp Ile Phe Asp Val
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

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

<210> 41
<211> 4349
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 41
tttttgaatc ggttgtggcg gccgcggcga ggaatggcgg tatttgtgag aggagtcggc 60
gtttgaagag gtggaactoc tagggctttt ttgagagtga cggagtctac ctcttgttac 120
ctagactgga gtgcagtggc acgatctcgg ctactgcaa cctctgcctc ccgggttcaa 180
gcgattctcc tgcctcagcc tcctgagtag ctgggattac aggtgcctgc caccaagccc 240
agctaatttt tgtattttta gtagagatgg ggtttcattg tgttggccag gctggtctcg 300
aactcctgac ctctgatcc gccgccttg gcctcccaaa gtgctaggat tacaagtgtg 360
agccaccgcg tccggccttt caaatggtat ttttgatttt cctcttocag tccttaaagc 420
agctgattta gaagaataca aatcatggct gaaaatagtg tattaacatc cactactggg 480
aggactagct tggcagactc ttccattttt gattctaaag ttactgagat ttocaaggaa 540
aacttactta ttggatctac ttcatatgta gaagagatgc ctgagattga aacaagagtg 600

.

.

atattggttc aagaagctgg aaaacaagaa gaacttataa aagccttaaa ggacattaaa	660
gtgggctttg taaagatgga gtcagtggaa gaatttgaag gtttggattc tccggaattt	720
gaaaatgtat ttgtagtcac ggactttcag gattctgtct ttaatgacct ctacaaggct	780
gattgtagag ttattggacc accagttgta ttaaattggt cacaaaaagg agagcctttg	840
ccattttcat gtcgcccgtt gtattgtaca agtatgatga atctagtact atgctttact	900
ggatttagga aaaaagaaga actagtcagg ttggtgacat tggatccatca catgggtgga	960
gttattcgaa aagactttaa ttcaaaagtt acacatttgg tggcaaattg tacacaagga	1020
gaaaaattca gggttgctgt gagtctaggt actccaatta tgaagccaga atggatttat	1080
aaagcttggg aaaggcggaa tgaacaggat ttctatgcag cagttgatga ctttagaaat	1140
gaatttaaag ttcctccatt tcaagattgt attttaagtt tcctgggatt ttcagatgaa	1200
gagaaaacca atatggaaga aatgactgaa atgcaaggag gtaaataatt accgcttgga	1260
gatgaaagat gcactcacct tgtagttgaa gagaatatag taaaagatct tccctttgaa	1320
ccttcaaaga aactttatgt tgtcaagcaa gagtggttct ggggaagcat tcaaatggat	1380
gcccgagctg gagaaactat gtattttatat gaaaaggcaa atactcctga gctcaagaaa	1440
tcagtgtaa tgctttctct aaatacccct aacagcaatc gcaaacgacg tcgtttaaaa	1500
gaaacacttg ctcagctttc aagagagaca gacgtgtcac catttocacc ccgtaagcgc	1560
ccatcagctg agcattccct ttccataggg tcaactcctag atatctcaa cacaccagag	1620
tctagcatta actatggaga cccccaaag tcttgtaact agtcttctaa aagctccact	1680
ccagttcctt caaagcagtc agcaaggtgg caagttgcaa aagagcttta tcaaactgaa	1740
agtaattatg ttaatatatt ggcaacaatt attcagttat ttcaagtacc attggaagag	1800
gaaggacaac gtggtggacc tatccttgca ccagaggaga ttaagactat ttttggtagc	1860
atcccagata tctttgatgt acacactaag ataaaggatg atcttgaaga cttatagtt	1920
aattgggatg agagcaaaag cattggtgac atttttctga aatattcaaa agatttggtg	1980
aaaacctacc ctccctttgt aaacttcttt gaaatgagca aggaacaat tattaatgt	2040
gaaaaacaga aaccaagatt tcatgctttt ctcaagataa accaagcaaa accagaatgt	2100
ggacggcaga gccttggtga acttcttctc cgaccagtac agaggttacc cagtgttgca	2160
ttacttttaa atgatcttaa gaagcataca gctgatgaaa atccagacaa aagcacttta	2220
gaaaaagcta ttgatcact gaaggaagta atgacgcata ttaatgagga taagagaaaa	2280
acagaagctc aaaagcaaat ttttgatgtt gtttatgaag tagatggatg cccagcta	2340
cttttatctt ctcaccgaag cttagtacag cgggttgaaa caatttctct aggtgagcac	2400

ccctgtgaca gaggagaaca agtaactctc ttctctttca atgattgcct agagatagca	2460
agaaaacggc acaaggttat tggcactttt aggagtcctc atggccaaac ccgaccccca	2520
gcttctctta agcatattca cctaatgcct ctttctcaga ttaagaaggt attggacata	2580
agagagacag aagattgcc a taatgctttt gccttgcttg tgaggccacc aacagagcag	2640
gcaaatgtgc tactcagttt ccagatgaca tcagatgaac ttccaaaaga aaactggcta	2700
aagatgctgt gtcgacatgt agctaacacc atttgtaaag cagatgctga gaatcttatt	2760
tatactgctg atccagaatc ctttgaagta aatacaaaag atatggacag tacattgagt	2820
agagcatcaa gagcaataaa aaagacttca aaaaaggtta caagagcatt ctctttctcc	2880
aaaactocaa aaagagctct togaagggt cttatgacat cccacggctc agtggaggga	2940
agaagtctt ccagcaatga taagcatgta atgagtcgtc tttctagcac atcatcatta	3000
gcaggtatcc cttctccctc ccttgtcagc cttccttctt tctttgaaag gagaagtcatt	3060
acgttaagta gatctacaac tcatttgata tgaagcgtta ccaaaatctt aaattataga	3120
aatgtataga cacctcatac tcaaataaga aactgactta aatggtaact gtaattagca	3180
cgttggtgaa agctggaagg aagataaata aactaaact atgctatttg atttttcttc	3240
ttgaaagagt aaggtttacc tgttacattt tcaagttaat tcatgtaaaa aatgatagtg	3300
atttgatgt aatttatctc ttgtttgaat ctgtcattca aaggccaata atttaagttg	3360
ctatcagctg atattagtag ctttgcaacc ctgatagagt aaataaattt tatgggtggg	3420
tgccaaatac tgctgtgaat ctatttgtat agtatccatg aatgaattta tggaaataga	3480
tatttgtgca gctcaattta tgcagagatt aatgacatc ataatactgg atgaaaactt	3540
gcatagaatt ctgattaaat agtgggtctg tttcacatgt gcagtttgaa gtatttaaat	3600
aaccactcct ttcacagttt attttcttct caagcgtttt caagatctag catgtggatt	3660
ttaaaagatt tgccctcatt aacaagaata acatttaaag gagattgttt caaaatattt	3720
ttgcaaattg agataaggac agaaagattg agaaacattg tatattttgc aaaaacaaga	3780
tgttttagc tgtttcagag agagtacggg atatttatgg taattttatc cactagcaaa	3840
tcttgattta gtttgatagt cgtcgtcgga attttatttt gaaggataag accatgggaa	3900
aattgtggta aagactgttt gtacccttca tgaaataatt ctgaagttgc catcagtttt	3960
actaatcttc tgtgaaatgc atagatatgc gcatgttcaa ctttttattg tggctttata	4020
attaaatgta aaattgaaaa ttcatttgct gtttcaaagt gtgatattct tcacaatagc	4080
ctttttatag tcagtaattc agaataatca agttcatatg gataaatgca tttttatttc	4140
ctatttcttt agggagtgct acaaatgttt gtcacttaaa tttcaagttt ctgttttaat	4200

.

agttaactga ctatagattg ttttctatgc catgtatgtg ccacttctga gagtagtaaa 4260
tgactctttg ctacatttta aaagcaattg tattagtaag aactttgtaa ataaatacct 4320
aaaacccaag tgtaaaaaaa aaaaaaaaaa 4349

<210> 42
<211> 882
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ala Glu Asn Ser Val Leu Thr Ser Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ser Ser Ile Phe Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile Ser Lys Glu
20 25 30

Asn Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val Glu Glu Met Pro Gln Ile
35 40 45

Glu Thr Arg Val Ile Leu Val Gln Glu Ala Gly Lys Gln Glu Glu Leu
50 55 60

Ile Lys Ala Leu Lys Asp Ile Lys Val Gly Phe Val Lys Met Glu Ser
65 70 75 80

Val Glu Glu Phe Glu Gly Leu Asp Ser Pro Glu Phe Glu Asn Val Phe
85 90 95

Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val Phe Asn Asp Leu Tyr Lys Ala
100 105 110

Asp Cys Arg Val Ile Gly Pro Pro Val Val Leu Asn Cys Ser Gln Lys
115 120 125

Gly Glu Pro Leu Pro Phe Ser Cys Arg Pro Leu Tyr Cys Thr Ser Met
130 135 140

Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr Gly Phe Arg Lys Lys Glu Glu Leu
145 150 155 160

Val Arg Leu Val Thr Leu Val His His Met Gly Gly Val Ile Arg Lys
165 170 175

Asp Phe Asn Ser Lys Val Thr His Leu Val Ala Asn Cys Thr Gln Gly

180					185					190						
Glu	Lys	Phe	Arg	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Thr	Pro	Ile	Met	Lys	Pro	
195					200					205						
Glu	Trp	Ile	Tyr	Lys	Ala	Trp	Glu	Arg	Arg	Asn	Glu	Gln	Asp	Phe	Tyr	
210					215					220						
Ala	Ala	Val	Asp	Asp	Phe	Arg	Asn	Glu	Phe	Lys	Val	Pro	Pro	Phe	Gln	
225					230					235					240	
Asp	Cys	Ile	Leu	Ser	Phe	Leu	Gly	Phe	Ser	Asp	Glu	Glu	Lys	Thr	Asn	
245					250					255						
Met	Glu	Glu	Met	Thr	Glu	Met	Gln	Gly	Gly	Lys	Tyr	Leu	Pro	Leu	Gly	
260					265					270						
Asp	Glu	Arg	Cys	Thr	His	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Asn	Ile	Val	Lys	Asp	
275					280					285						
Leu	Pro	Phe	Glu	Pro	Ser	Lys	Lys	Leu	Tyr	Val	Val	Lys	Gln	Glu	Trp	
290					295					300						
Phe	Trp	Gly	Ser	Ile	Gln	Met	Asp	Ala	Arg	Ala	Gly	Glu	Thr	Met	Tyr	
305					310					315					320	
Leu	Tyr	Glu	Lys	Ala	Asn	Thr	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Ser	Val	Ser	Met	
325					330					335						
Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Asn	Ser	Asn	Arg	Lys	Arg	Arg	Arg	Leu	Lys	
340					345					350						
Glu	Thr	Leu	Ala	Gln	Leu	Ser	Arg	Glu	Thr	Asp	Val	Ser	Pro	Phe	Pro	
355					360					365						
Pro	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser	Ala	Glu	His	Ser	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Leu	
370					375					380						
Leu	Asp	Ile	Ser	Asn	Thr	Pro	Glu	Ser	Ser	Ile	Asn	Tyr	Gly	Asp	Thr	
385					390					395					400	
Pro	Lys	Ser	Cys	Thr	Lys	Ser	Ser	Lys	Ser	Ser	Thr	Pro	Val	Pro	Ser	
405					410					415						
Lys	Gln	Ser	Ala	Arg	Trp	Gln	Val	Ala	Lys	Glu	Leu	Tyr	Gln	Thr	Glu	

420 425 430

Ser Asn Tyr Val Asn Ile Leu Ala Thr Ile Ile Gln Leu Phe Gln Val
435 440 445

Pro Leu Glu Glu Glu Gly Gln Arg Gly Gly Pro Ile Leu Ala Pro Glu
450 455 460

Glu Ile Lys Thr Ile Phe Gly Ser Ile Pro Asp Ile Phe Asp Val His
465 470 475 480

Thr Lys Ile Lys Asp Asp Leu Glu Asp Leu Ile Val Asn Trp Asp Glu
485 490 495

Ser Lys Ser Ile Gly Asp Ile Phe Leu Lys Tyr Ser Lys Asp Leu Val
500 505 510

Lys Thr Tyr Pro Pro Phe Val Asn Phe Phe Glu Met Ser Lys Glu Thr
515 520 525

Ile Ile Lys Cys Glu Lys Gln Lys Pro Arg Phe His Ala Phe Leu Lys
530 535 540

Ile Asn Gln Ala Lys Pro Glu Cys Gly Arg Gln Ser Leu Val Glu Leu
545 550 555 560

Leu Ile Arg Pro Val Gln Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Leu Leu Asn
565 570 575

Asp Leu Lys Lys His Thr Ala Asp Glu Asn Pro Asp Lys Ser Thr Leu
580 585 590

Glu Lys Ala Ile Gly Ser Leu Lys Glu Val Met Thr His Ile Asn Glu
595 600 605

Asp Lys Arg Lys Thr Glu Ala Gln Lys Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr
610 615 620

Glu Val Asp Gly Cys Pro Ala Asn Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu
625 630 635 640

Val Gln Arg Val Glu Thr Ile Ser Leu Gly Glu His Pro Cys Asp Arg
645 650 655

Gly Glu Gln Val Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile Ala

660	665	670
Arg Lys Arg His Lys Val Ile Gly Thr Phe Arg Ser Pro His Gly Gln		
675	680	685
Thr Arg Pro Pro Ala Ser Leu Lys His Ile His Leu Met Pro Leu Ser		
690	695	700
Gln Ile Lys Lys Val Leu Asp Ile Arg Glu Thr Glu Asp Cys His Asn		
705	710	715
720		
Ala Phe Ala Leu Leu Val Arg Pro Pro Thr Glu Gln Ala Asn Val Leu		
725	730	735
Leu Ser Phe Gln Met Thr Ser Asp Glu Leu Pro Lys Glu Asn Trp Leu		
740	745	750
Lys Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr Ile Cys Lys Ala Asp Ala		
755	760	765
Glu Asn Leu Ile Tyr Thr Ala Asp Pro Glu Ser Phe Glu Val Asn Thr		
770	775	780
Lys Asp Met Asp Ser Thr Leu Ser Arg Ala Ser Arg Ala Ile Lys Lys		
785	790	795
800		
Thr Ser Lys Lys Val Thr Arg Ala Phe Ser Phe Ser Lys Thr Pro Lys		
805	810	815
Arg Ala Leu Arg Arg Ala Leu Met Thr Ser His Gly Ser Val Glu Gly		
820	825	830
Arg Ser Pro Ser Ser Asn Asp Lys His Val Met Ser Arg Leu Ser Ser		
835	840	845
Thr Ser Ser Leu Ala Gly Ile Pro Ser Pro Ser Leu Val Ser Leu Pro		
850	855	860
Ser Phe Phe Glu Arg Arg Ser His Thr Leu Ser Arg Ser Thr Thr His		
865	870	875
880		
Leu Ile		

、

•

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	43	
gtctaccagg cattcgcttc at		22
<210>	44	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	44	
tcagctggac cacagcogca gcgt		24
<210>	45	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	45	
tcagaaatcc tttctcttga c		21
<210>	46	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	46	
ctagcctctg gaatcctttc tctt		24

申請專利範圍

1. 一種單離的胜肽，該胜肽由一胺基酸序列所組成，其選自由序列識別號：1、3、及 21 構成的群組的胺基酸序列。
2. 一種單離的胜肽，該胜肽由一胺基酸序列所組成，其選自由序列識別號：1、3、及 21 構成的群組的胺基酸序列，該胺基酸序列中的 1 或 2 個胺基酸被取代，其中該取代為下述一或二者：
 - (a)序列識別號：1、3、或 21 的胺基酸序列的 N 末端起算第 2 個胺基酸被取代為甲硫胺酸；及
 - (b)序列識別號：1、3、或 21 的胺基酸序列的 C 末端胺基酸被取代為選自由纈胺酸及白胺酸構成的群組的胺基酸。
3. 一種單離的多核苷酸，其係編碼如申請專利範圍第 1 至 2 項所述之胜肽。
4. 一種用於誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的組合物，其中該組合物包含 1 種或以上如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽，或包含 1 種或以上如申請專利範圍第 3 項所述之多核苷酸。
5. 一種醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含 1 種或以上如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽，或包含 1 種或以上如申請專利範圍第 3 項所述之多核苷酸。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係用於投予 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體。
7. 一種體外誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力的抗原呈現細胞(APC)之方法，該方法包含使抗原呈現細胞(APC)

與如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽在體外接觸的步驟。

8. 一種體外誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的方法，該方法包含選自由以下構成的群組中的步驟：

(a)使 CD8+ T 細胞與表面呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽的複合體之抗原呈現細胞(APC)共同培養；及

(b)使 CD8+ T 細胞與表面呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽的複合體之外泌體共同培養。

9. 一種單離的抗原呈現細胞(APC)，其係由申請專利範圍第 7 項之方法誘導。

10. 一種單離的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，其係由申請專利範圍第 8 項之方法誘導。

11. 一種抗體或其免疫活性片段，其係對抗如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽。

12. 一種載體，包含編碼如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽的核苷酸序列。

13. 一種診斷套組，包含如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽、如申請專利範圍第 3 項所述之多核苷酸、或如申請專利範圍第 11 項所述之抗體。

14. 一種如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽在製備誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導活性的抗原呈現細胞(APC)之組合物的用途。

15. 一種下列(a)或(b)在製備誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)之組

合物的用途：

(a)如申請專利範圍第 1 或 2 項之胜肽；

或

(b)在表面上呈現由 HLA 抗原與申請專利範圍第 1 或 2 項之胜肽所形成的複合體之抗原呈現細胞(APC)。

圖式

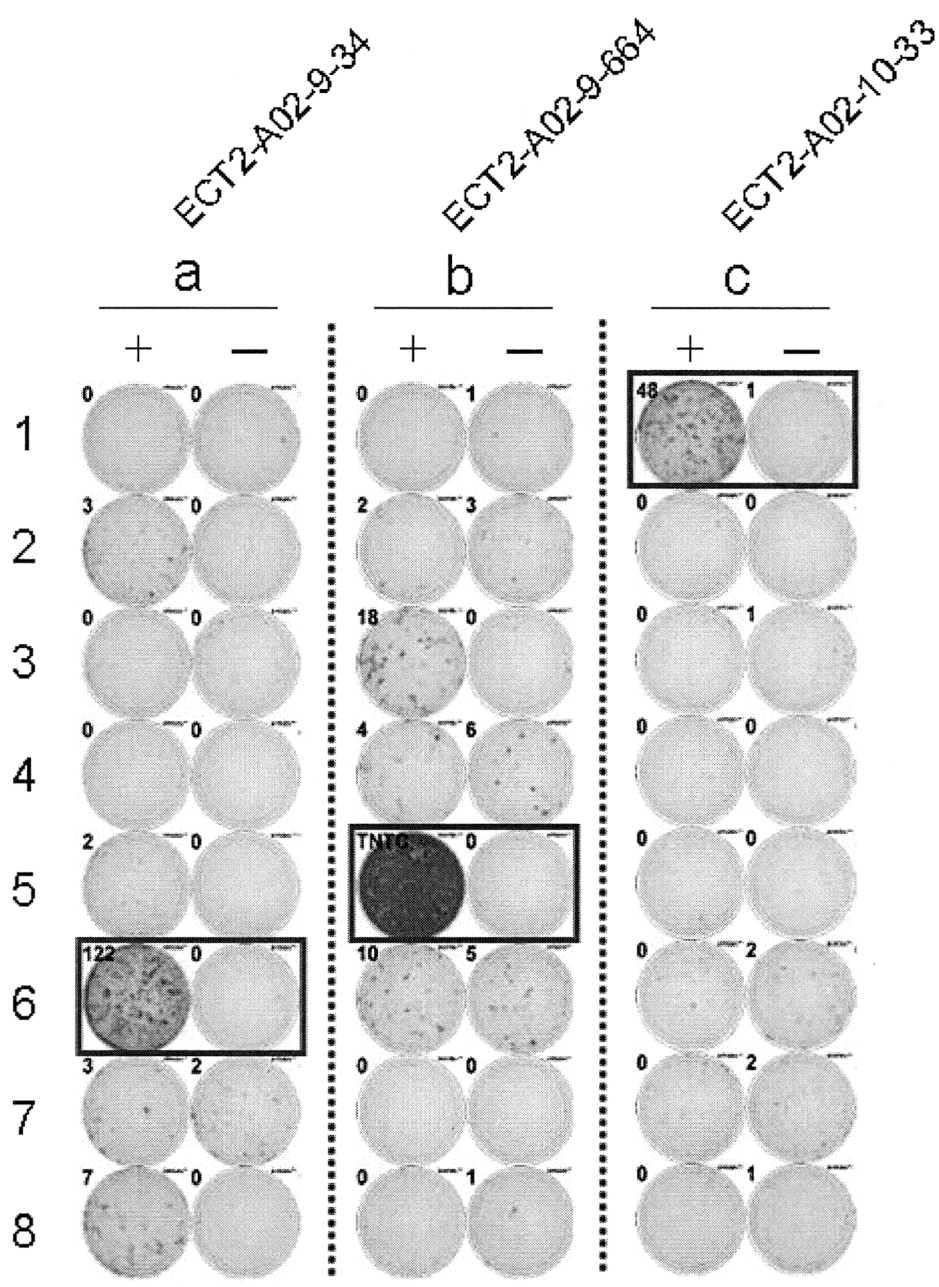


圖1

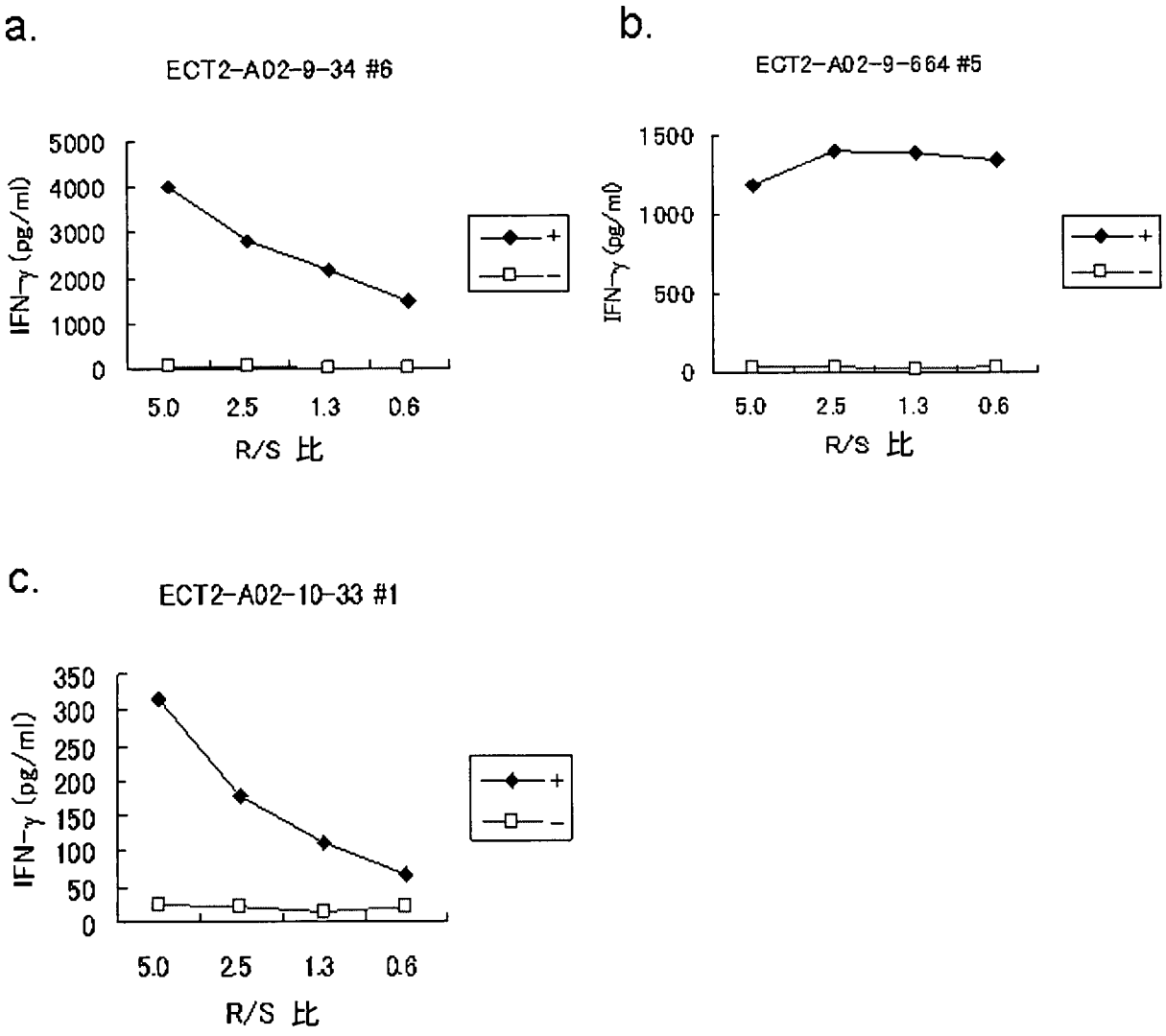


圖2

•
•
•

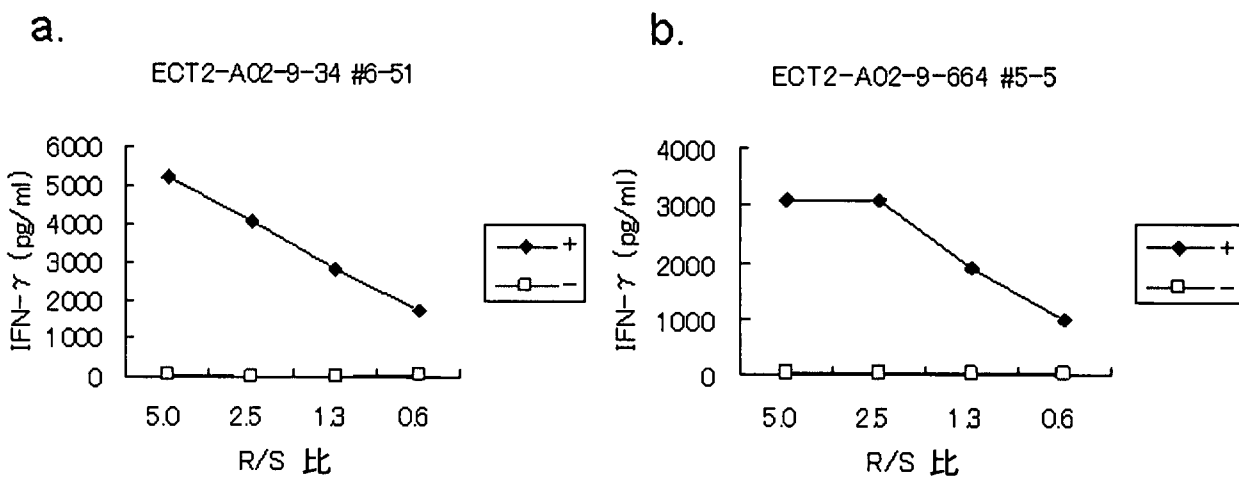


圖3

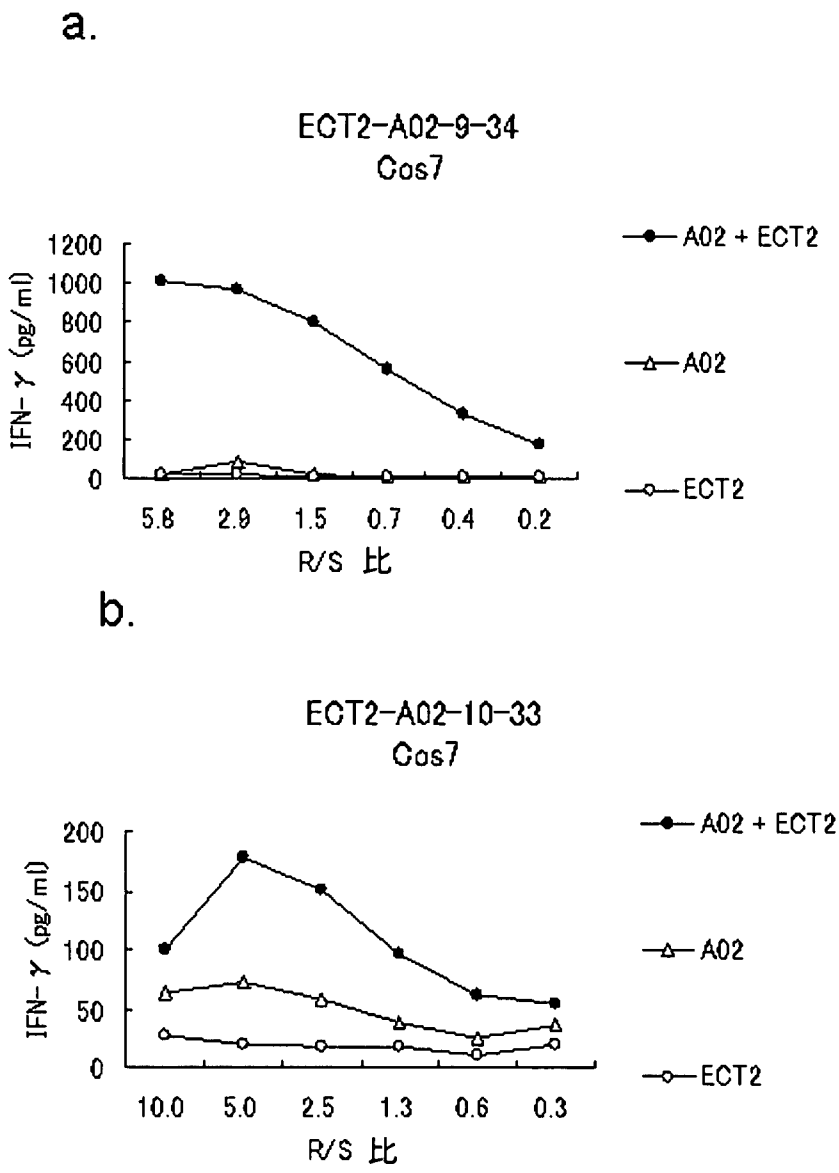


圖4