



(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 201345544 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：102124491

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 12 月 25 日

(51)Int. Cl. : A61K38/08 (2006.01)

A61K38/10 (2006.01)

C07K7/06 (2006.01)

C07K7/08 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2006/12/28 日本

2006-355356

(71)申請人：癌免疫研究所股份有限公司 (日本) INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER  
IMMUNOLOGY, INC. (JP)

日本

(72)發明人：杉山治夫 SUGIYAMA, HARUO (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：14 共 55 頁

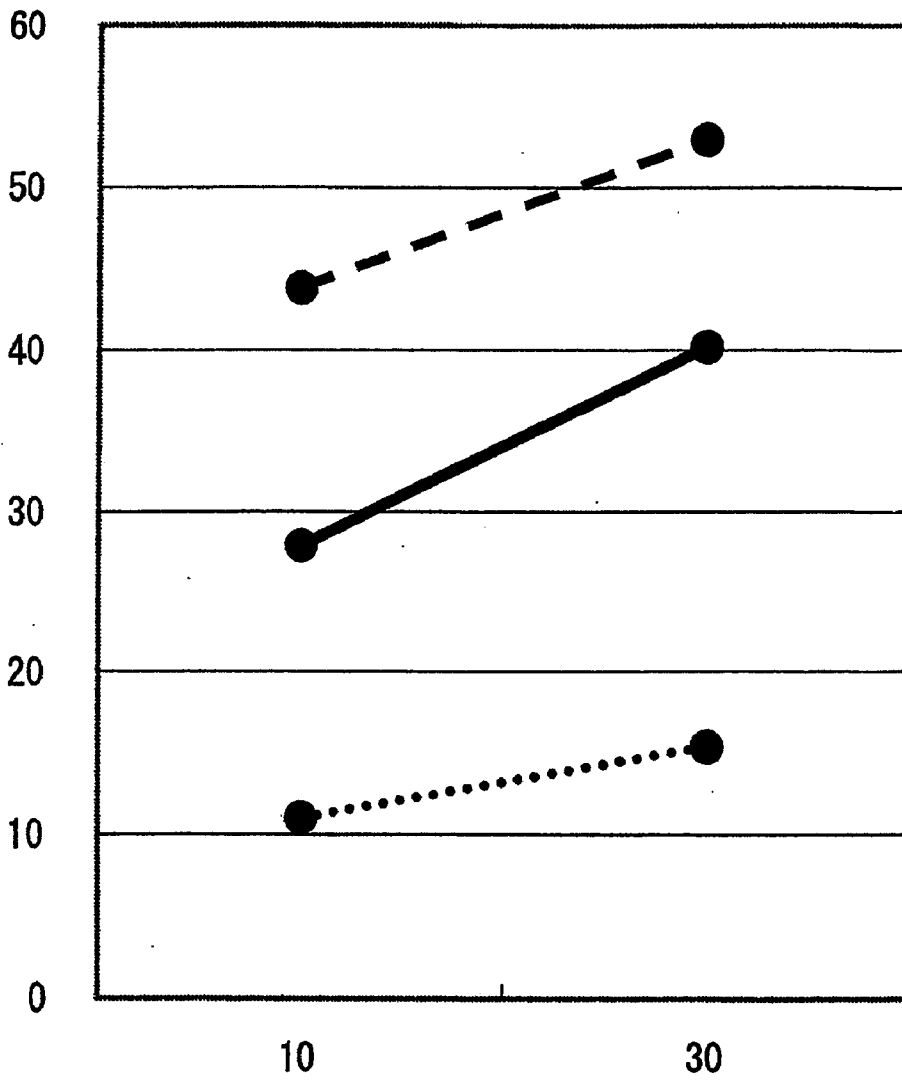
(54)名稱

HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽之用途

USE OF HLA-A\*1101-RESTRICTED WT1 PEPTIDE

(57)摘要

本發明係有關 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽，詳細而言，係有關一種含有由源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的胜肽，該胜肽具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力；以及有關一種以含有至少具有 1 個半胱胺酸殘基之源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的 2 個胜肽單體經由二硫鍵而互相結合的胜肽二聚物，該胜肽二聚物具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力；本發明又有關編碼該胜肽之聚核苷酸、包含該等之癌症治療及/或預防用醫藥組成物等。



第1圖



(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 201345544 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：102124491

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 12 月 25 日

(51)Int. Cl. : *A61K38/08 (2006.01)*

*A61K38/10 (2006.01)*

*C07K7/06 (2006.01)*

*C07K7/08 (2006.01)*

*A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2006/12/28 日本

2006-355356

(71)申請人：癌免疫研究所股份有限公司 (日本) INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER  
IMMUNOLOGY, INC. (JP)

日本

(72)發明人：杉山治夫 SUGIYAMA, HARUO (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：14 共 55 頁

(54)名稱

HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽之用途

USE OF HLA-A\*1101-RESTRICTED WT1 PEPTIDE

(57)摘要

本發明係有關 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽，詳細而言，係有關一種含有由源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的胜肽，該胜肽具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力；以及有關一種以含有至少具有 1 個半胱胺酸殘基之源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的 2 個胜肽單體經由二硫鍵而互相結合的胜肽二聚物，該胜肽二聚物具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力；本發明又有關編碼該胜肽之聚核苷酸、包含該等之癌症治療及/或預防用醫藥組成物等。

## 發明摘要

※申請案號：102124491 (由96149840分割)

※申請日：96.12.25

※IPC分類：A61K 38/08

A61K 38/10

C07K 7/06

C07K 7/08

A61P 35/00

(2008) 01  
(2008) 1  
(2008) 1  
(2008) 1  
(2008) 1  
(2008) 1

【發明名稱】(中文/英文)

HLA-A\* 1101 限制性 WT1 胜肽之用途

USE OF HLA-A\*1101-RESTRICTED WT1 PEPTIDE

【中文】

本發明係有關 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽，詳細而言，係有關一種含有由源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的胜肽，該胜肽具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力；以及有關一種以含有至少具有 1 個半胱胺酸殘基之源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的 2 個胜肽單體經由二硫鍵而互相結合的胜肽二聚物，該胜肽二聚物具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力；本發明又有關編碼該胜肽之聚核苷酸、包含該等之癌症治療及/或預防用醫藥組成物等。

## 【英文】

The present invention relates to a HLA-A\*1101-restricted WT1 peptide, and more particularly, to a peptide containing an amino acid sequence composed of nine contiguous amino acids derived from a WT1 protein, which has a binding ability to HLA-A\*1101 molecule and has a CTL-inducing ability; and to a peptide dimer formed by combining two peptide monomers containing an amino acid sequence composed of nine contiguous amino acids derived from a WT1 protein with at least one cysteine residue via a disulfide bond, which has a binding ability to HLA-A\*1101 molecule and has a CTL-inducing ability. The present invention further relates to a polynucleotide encoding the peptide and a pharmaceutical composition comprising the same for the treatment and/or prophylaxis of cancers.



**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 1 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

該代表圖無元件符號及其所代表之意義。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

本案無化學式。

# 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)

HLA-A\* 1101 限制性 WT1 胜肽之用途

USE OF HLA-A\*1101-RESTRICTED WT1 PEPTIDE

## 【技術領域】

【0001】 本發明係有關 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽，詳細而言，係有關一種含有由源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的胜肽，並且該胜肽具有與 HLA-A\* 1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力；以及有關一種以含有至少 1 個半胱胺酸殘基且含有由源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的 2 個胜肽單體經由二硫鍵而互相結合的胜肽二聚物，並且該胜肽二聚物具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力。更進一步，本發明係有關將該胜肽予以編碼之聚核苷酸、包含該等之癌症治療及/或預防用醫藥組成物等。

## 【先前技術】

【0002】 WT1 基因(Wilm's tumor 1 gene)係經鑑定為小兒腎癌之威爾姆斯腫瘤之致病基因的基因(非專利文獻 1 及 2)，且為具有鋅指(zinc finger)結構之轉錄因子。當初，雖然將 WT1 基因視為癌抑制基因，但依據其後之研究(非專利文獻 3、4、5 及 6)，卻顯示該基因在造血器官腫瘤或固態癌中具有作為致癌基因之作用。

【0003】 由於 WT1 基因在多數惡性腫瘤中會高度表現，故將屬於無突變之自身蛋白質的 WT1 基因產物予以檢驗在活體內是否具有免疫原性(immunogenicity)。結果得知於腫瘤細胞高度表現之源自 WT1 基因之蛋白質係藉由細胞內處理(Intracellular processing)而被斷裂化，所產生之胜肽係與 MHC class I 分子形成複合物而呈現於細胞表面，並得知可識別該複合物之 CTL 可藉由接種 WT1 胜肽而被誘導(非專利文獻 7、8 及 9)。再者，藉 WT1 胜肽或 WT1 cDNA 使免疫之小鼠，顯示以高機率排斥所移植之 WT1 基因表現腫瘤細胞(非專利文獻 7 及 10)，亦顯示出生理性表現 WT1 基因之正常組織不會被經誘導之 CTL 傷害(非專利文獻 7)。在使用人類細胞之體外實驗中，若使用人類 MHC class I 分子之一之 HLA-A\*0201 分子高結合性 Db126 胜肽及 WH187 胜肽(序列編號：1 中之胺基酸 187-195，SLGEQQYSV)來刺激具有 HLA-A\*0201 之人類末梢血單核球，則 WT1 特異性 CTL(WT1-specific CTL)會被誘導，經誘導之 CTL 對於高度表現 WT1 基因之腫瘤細胞係內因地具有特異之毒殺活性(cytotoxic activity)，並且該 CTL 之毒殺活性係 HLA-A2 限制性(非專利文獻 11)。於 HLA-A 對偶基因之中，在使用日本人最多之 HLA-A\*2402 適合之 WT1 胜肽(WT1235；序列編號：1 中之胺基酸 235-243，CMTWNQMNL)的人類細胞之體外實驗中，WT1 特異性 CTL(TAK-1)會被誘導(非專利文獻 12)，經誘導之 CTL 不會將生理性表現一部分 WT1 基因之正常造血幹細胞的群落形成能力予以抑制

(非專利文獻 12 及 13)。從此等報告中，係強烈暗示不僅是小鼠即使是人類，WT1 特異性 CTL 之誘導亦為可能，且雖然該 CTL 對於高度表現 WT1 基因之腫瘤細胞具有毒殺活性，但對於生理性表現 WT1 基因之正常細胞則不具有毒殺活性(非專利文獻 7、10、11、12 及 13)。

【0004】 WT1 基因產物係作為核內蛋白質存在，在細胞質內經由蛋白酶體(proteasome)處理而斷裂成胜肽。經斷裂之胜肽係經由 TAP(transporter associated with antigen processing，抗原處理相關轉運因子)分子而導入內質網內腔中，與 MHC class I 分子形成複合物，並呈現於細胞表面。CTL 前驅細胞係介由 TCR 而認知 WT1 胜肽-MHC class I 分子複合物，藉此而使 WT1 特異性 CTL 被誘導，介由 MHC class I 分子而對於呈現 WT1 基因產物之腫瘤細胞發揮傷害作用(非專利文獻 7、8 及 9)。如此一來，在將 WT1 基因產物作為目標物之癌症免疫療法中所使用之 WT1 胜肽，至少必須是在活體內形成與 MHC class I 分子結合之型態。然而，MHC class I 分子有多樣性，由於與各種 MHC class I 分子結合之 WT1 胜肽之胺基酸序列不同，故必須準備適合 MHC class I 之類型的胜肽。但是，現今所知之 HLA 分子限制性之 WT1 胜肽，僅為 HLA-A\*2402 分子、HLA-A\*0201 分子、HLA-A\*2601 分子、HLA-A\*3303 分子限制性者(各自參照專利文獻 1、非專利文獻 11、專利文獻 2、及專利文獻 3)。因此，有必要發現 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽。

【0005】

[專利文獻 1] 國際公開 2003/106682 號公報

[專利文獻 2] 國際公開 2005/095598 號公報

[專利文獻 3] 日本特願 2006-45287

[非專利文獻 1] Daniel A. Haber et al., *Cell*. 1990 Jun 29 ; 61(7) : 1257-69.

[非專利文獻 2] Call KM et al., *Cell*. 1990 Feb 9 ; 60(3) : 509-20.

[非專利文獻 3] Menke AL et al., *Int Rev Cytol*. 1998 ; 181 : 151-212. Review.

[非專利文獻 4] Yamagami T et al., *Blood*. 1996 Apr 1 ; 87(7) : 2878-84.

[非專利文獻 5] Inoue K et al., *Blood*. 1998 Apr 15 ; 91(8) : 2969-76.

[非專利文獻 6] Tsuboi A et al., *Leuk Res*. 1999 May ; 23(5) : 499-505.

[非專利文獻 7] Oka Y et al., *J Immunol*. 2000 Feb 15 ; 164(4) : 1873-80.

[非專利文獻 8] Melief CJ et al., *Immunol Rev*. 1995 Jun ; 145 : 167-77.

[非專利文獻 9] Ritz J, *J Clin Oncol*. 1994 Feb ; 12(2) : 237-8.

[非專利文獻 10] Tsuboi A et al., *J Clin Immunol*. 2000 May ; 20(3) : 195-202.

[非專利文獻 11] Oka Y et al., *Immunogenetics*. 2000 Feb ; 51(2) : 99-107.

[非專利文獻 12] Ohminami H et al., Blood. 2000 Jan 1 ; 95(1) : 286-93.

[非專利文獻 13] Gao L et al., Blood. 2000 Apr 1 ; 95(7) : 2198-203.

**【發明內容】**

(發明欲解決之課題)

**【0006】** 本發明欲解決之課題，係提供一種為 HLA-A\*1101 分子限制性且含有源自 WT1 蛋白質之胺基酸序列的胜肽、編碼該胜肽的聚核苷酸、以及含有該等之癌症治療及/或預防用醫藥組成物。

(解決課題之方法)

**【0007】** 本案發明者鑑於上述情況而不斷精心研究，結果發現在含有由源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的胜肽中，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力之胜肽可以高機率誘導 WT1 特異性 CTL，因而完成本發明。

**【0008】** 亦即，本發明係提供下述者：

一種胜肽的用途，該胜肽係含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)者，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力，其中該胜肽係用於製造治療癌症用之醫藥組成物。

一種胜肽二聚物的用途，該胜肽二聚物係含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu

Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)的 2 個胜肽單體經由二硫鍵互相結合者，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力，其中該胜肽二聚物係用於製造治療癌症用之醫藥組成物。

一種聚核苷酸的用途，該聚核苷酸係編碼胜肽，該胜肽係含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)者，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力，其中該聚核苷酸係用於製造治療癌症用之醫藥組成物。

一種包含聚核苷酸之表現載體的用途，該聚核苷酸係編碼胜肽，該胜肽係含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)者，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力，其中該表現載體係用於製造治療癌症用之醫藥組成物。

一種 WT1 特異性 CTL 之誘導方法，其係：於含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)之具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力之胜肽的存在下培養末梢血單核球，並從該末梢血單核球中誘導 WT1 特異性 CTL。

一種 WT1 特異性 CTL 之誘導方法，其係：於含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)的 2 個胜肽單體經由二硫鍵互相結合之具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有

CTL 誘導能力之胜肽二聚物的存在下培養末梢血單核球，並從該末梢血單核球中誘導 WT1 特異性 CTL。

一種誘導呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞的方法，其係：於含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)之具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力之胜肽的存在下培養未成熟之抗原呈現細胞，並從該未成熟之抗原呈現細胞中誘導該呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞。

一種誘導呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞的方法，其係：於含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)的 2 個胜肽單體經由二硫鍵互相結合之具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力之胜肽二聚物的存在下培養未成熟之抗原呈現細胞，並從該未成熟之抗原呈現細胞中誘導該呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞。

(發明之效果)

【0009】 依據本發明，因為可獲得 HLA-A\*1101 限制性且含有由源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的胜肽、編碼該胜肽的聚核苷酸、以及含有該等之癌症治療及/或預防用醫藥組成物等，故可對具有 HLA-A\*1101 之對象在體內及體外誘導 WT1 特異性 CTL。由於日本人之 HLA-A\* 1101 陽性率高達約 17.9%，故可在廣泛範圍之對象中誘導 WT1 特異性 CTL。

【圖式簡單說明】

【0010】

第 1 圖係顯示使用 WT1<sub>251</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性 (cytotoxic activity)。

第 2 圖係顯示使用 WT1<sub>279</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性。

第 3 圖係顯示使用 WT1<sub>312</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性。

第 4 圖係顯示使用 WT1<sub>313</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性。

第 5 圖係顯示使用 WT1<sub>338</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性。

第 6 圖係顯示使用 WT1<sub>378</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性。

第 7 圖係顯示使用 WT1<sub>386</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性。

第 8 圖係顯示使用 WT1<sub>415</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性。

第 9 圖係顯示使用 WT1<sub>436</sub> 誘導之 CTL 的細胞毒殺活性。

第 10 圖 (a) 至 (c) 係顯示使用 WT1<sub>378</sub> 胜肽誘導之 CTL 的細胞毒殺活性 (a、b、c 分別表示使用源自 HLA-A\*1101 陽性健康常人捐贈者 1、2、3 之 PBMC 時的細胞毒殺活性)。

第 11 圖 (a) 及 (b) 係顯示使用 WT1<sub>378</sub> 胜肽二聚物誘導之 CTL 的細胞毒殺活性 (a 及 b 分別表示使用源自 HLA-A\*1101

陽性健康常人捐贈者 1 及 2 之 PBMC 時的細胞毒殺活性)。

第 12 圖(a)至(c)係顯示使用變異 WT1<sub>378</sub> 胜肽(G→I)誘導之 CTL 的細胞毒殺活性(a、b、c 分別表示使用源自 HLA-A\*1101 陽性健康常人捐贈者 1、2、3 之 PBMC 時的細胞毒殺活性)。

第 13 圖(a)至(c)係顯示使用變異 WT1<sub>378</sub> 胜肽(G→V)誘導之 CTL 的細胞毒殺活性(a、b、c 分別表示使用源自 HLA-A\*1101 陽性健康常人捐贈者 1、2、3 之 PBMC 時的細胞毒殺活性)。

第 14 圖(a)至(c)係顯示使用 WT1<sub>379</sub> 胜肽誘導之 CTL 的細胞毒殺活性(a、b、c 分別表示使用源自 HLA-A\*1101 陽性健康常人捐贈者 1、2、3 之 PBMC 時的細胞毒殺活性)。

### 【實施方式】

【0011】 本發明之一種型態，係有關一種含有由源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的胜肽，該胜肽具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力(於本說明書中，該胜肽亦稱為「WT1 胜肽」)。將人類 WT1 蛋白質之胺基酸序列示為序列編號：1。本發明之胜肽，係含有由該序列編號：1 所示之胺基酸序列中之連續 9 個胺基酸所構成之胺基酸序列者。當本發明之胜肽包含如後述之序列編號 3、7、8 及 9 之胺基酸序列等含有半胱胺酸之胺基酸序列時，可藉由將該胺基酸序列中之半胱胺酸以其他胺基酸等別種物質(例如絲胺酸、丙胺酸、 $\alpha$ -胺基丁酸)取代，或是藉由將半胱胺酸之 SH 基以該技術領域中習知之保護基(例如羧甲基、吡啶基乙基)進行修飾，而使安定性上升。本發明之胜肽係一種癌抗原胜肽，

其係在細胞內經處理並使該經處理之胜肽藉由抗原呈現細胞而呈現，藉此而可誘導 CTL。

【0012】 如上所述，本發明之目的係獲得具有 HLA-A\*1101 限制性之胜肽。因此，本發明之胜肽係具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力者。結合能力係可依據該技術領域中習知之方法而檢測。就該方法而言，有 Rankpep、BIMAS、SYFPEITHI 等以電腦為基礎之方法，或是與具有 HLA-A\*1101 分子結合能力之習知胜肽的競爭性結合試驗等。例如，將所檢測之結合能力與習知之 HLA-A\*1101 限制性胜肽之結合能力予以比較，即可判斷本發明之胜肽是否具有結合能力。本發明中具有結合能力之胜肽之例，係依據本案說明書之實施例 1 所記載之方法而獲得的對於 HLA-A\*1101 分子之親和性點數為 4 以上者，較佳為 5 以上者，更佳為 6 以上者。

【0013】 本發明之胜肽係具有 CTL 誘導能者。由於 WT1 基因會在例如白血病、骨髓形成異常症候群 (Myelodysplastic Syndrome)、多發性骨髓瘤、惡性淋巴瘤等造血器官腫瘤、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、生殖細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前列腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巢癌等固形癌中以天然型態高度表現，故本發明之胜肽對於患有該相關疾病之對象可以高機率進行誘導 CTL。CTL 誘導能力，係指可在體內或體外誘導 CTL 之能力。該誘導能力係可依據一般之方法而檢測，例如使用鉻游離分析法調查 CTL 之細胞毒殺活性，藉此而檢測該誘導能力。

【0014】 本發明之胜肽，可為胺基酸序列之第 9 個胺基酸為 Lys 或 Arg 者。推測因為具有該胺基酸，故胜肽與 HLA-A\*1101 分子的結合能力會變高。

【0015】 本發明之胜肽所含有的由 9 個胺基酸所構成之胺基酸序列中，較佳者為 Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (序列編號：2)、Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (序列編號：3)、Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys (序列編號：4)、Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg (序列編號：5)、Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys (序列編號：6)、Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (序列編號：7)、Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (序列編號：8)、Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (序列編號：9)、或 Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys (序列編號：10)；最佳者為 Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (序列編號：7)。更進一步，亦可為序列編號：2 至 10 中任一者之 9 個胺基酸中有 1 至數個、較佳為 1 至 5 個胺基酸經其他胺基酸取代者。另外，亦可為該 9 個胺基酸及經取代為其他胺基酸者中之任一者經適當修飾者。惟，無論是在哪一種情形，皆以本發明之胜肽與 HLA-A\*1101 分子可保持結合能力作為條件。

【0016】 如上所述，本發明之胜肽係源自 WT1 蛋白質，只要含有由上述 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列即可。因此，本發明之胜肽係例如可為由序列編號：2 至 10 所示之胺基酸序列所構成的胜肽本身，亦可為含有序列編號：2 至 10 所示之胺基酸序列的 WT1 蛋白質或其之一

部分。本發明之胜肽所含有之胺基酸數並無特別限制，例如為 9 至 500 個、9 至 300 個、9 至 200 個、9 至 100 個、9 至 50 個、9 至 30 個、9 至 12 個等。本發明之胜肽又可在上述由 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列之 N 末端及 / 或 C 末端結合各種物質。例如，可結合胺基酸、胜肽、該等之類似物等。當本發明之胜肽結合有此等物質時，此等物質係藉由例如活體內酵素等、或藉由細胞內處理等過程而受處理，最後會產生由上述 9 個胺基酸所構成之胺基酸序列，並以成爲與 HLA-A\*1101 分子之複合物之形式呈現於細胞表面，藉此而可得到 CTL 誘導效果。此等物質係可爲將本發明之胜肽之溶解性予以調節者，亦可爲使耐蛋白酶作用等安定性提升者，另外，亦可爲例如將本發明之胜肽特異性地傳送至預定之組織、器官者，或亦可爲具有使抗原呈現細胞之吸收效率增強的作用者。此等物質亦可爲使 CTL 誘導能力增大者，例如可爲協助性胜肽 (Helper peptide) 等。

【0017】 本發明之胜肽可使用該技術領域中通常所用之方法或該等之變異方法合成。相關之合成方法係記載於例如 Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; 胜肽合成，丸善股份公司，1975; 胜肽合成之基礎與實驗，丸善股份公司，1985; 醫藥品之開發 續 第 14 卷·胜肽合成，廣川書店，1991 等。

【0018】 另外，本發明之胜肽亦可爲基於編碼本發明

之胜肽之核苷酸序列資料，使用基因工程性手法製造者。  
該基因工程性手法係該業者所周知者。

【0019】 本發明之另一種型態，係有關一種以含有至少 1 個半胱胺酸殘基之源自 WT1 蛋白質之 9 個連續胺基酸所構成之胺基酸序列的 2 個胜肽單體經由二硫鍵互相結合、具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力的胜肽二聚物(於本說明書中，該胜肽二聚物亦稱為「WT1 胜肽二聚物」)。本發明之胜肽二聚物之安定性，由於其為二聚物型態，故相較於胜肽單體更為增高。本發明之胜肽二聚物係一種在細胞內經處理並使該經處理之胜肽藉由抗原呈現細胞呈現，藉此而可誘導 CTL 之癌抗原胜肽二聚物。

【0020】 本發明之 WT1 胜肽二聚物，係使 2 個胜肽單體介由單體上所存在之半胱胺酸殘基間之二硫鍵結合而形成。因此，本發明之 WT1 胜肽二聚物所含有之胜肽單體係上述之 WT1 胜肽，且為含有至少 1 個半胱胺酸殘基者。本發明之 WT1 胜肽二聚物可為同源二聚物(homodimer)，亦可為異源二聚物(heterodimer)。

【0021】 本發明之 WT1 胜肽二聚物中，胜肽單體含有之胺基酸序列中較佳者為 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (序列編號：3)、Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (序列編號：7)、Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (序列編號：8)、或 Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (序列編號：9)；最佳者為 Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (序列編

號：7)。

【0022】本發明之 WT1 胜肽二聚物可使用該技術領域中習知之方法製造。例如，當胜肽單體含有 1 對半胱胺酸殘基時，本發明之 WT1 胜肽二聚物可經由下述製程而製造：將包含半胱胺酸側鏈上之保護基的全部保護基予以去除，其次，將所得之單體溶液在鹼性條件下作為空氣氧化之對象、或是在鹼或酸性條件下添加氧化劑，藉此形成二硫鍵而製得。就氧化劑而言，可列舉例如碘、二甲基亞砷(DMSO)、鐵氰化鉀(potassium ferricyanide)等。

【0023】當胜肽單體含有 2 個以上半胱胺酸殘基時，本發明之 WT1 胜肽二聚物亦可依據上述方法合成。此時，因為由不同類型之二硫鍵結合而成，會得到異源體。或者是，本發明之 WT1 胜肽二聚物可藉由選擇半胱胺酸側鏈之保護基之組合而製造。就保護基之組合而言，可列舉例如 MeBzl 基(甲基苯基)與 AcM 基(乙醯胺基甲基)、Trt 基(三苯甲基)與 AcM 基、Npys 基(3-硝基-2-吡啶基硫基)與 AcM 基、S-Bu-t 基(S-第三丁基)與 AcM 基之組合等。例如，為 MeBzl 基與 AcM 基之組合時，WT1 胜肽二聚物可經由下述製程而製造：將 MeBzl 基以外之保護基及半胱胺酸側鏈上之保護基以外的保護基予以去除，再將所得之單體溶液作為空氣氧化之對象，在經保護之半胱胺酸殘基間形成二硫鍵，其次藉由碘進行脫保護及氧化，在原來由 AcM 保護之半胱胺酸殘基間形成二硫鍵而製得。

【0024】本發明之再另一種型態，係有關一種用於治

療或預防癌症之醫藥組成物，其含有上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物。由於 WT1 基因會在各種癌症或腫瘤，例如白血病、骨髓形成異常症候群、多發性骨髓瘤、惡性淋巴瘤等造血器官腫瘤，或是胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、生殖細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前列腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巢癌等固形癌中高度表現，故本發明之醫藥組成物可使用於癌症之治療或預防。若本發明之醫藥組成物係投予至 HLA-A\*1101 陽性對象，則藉由該醫藥組成物所含有之 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽或 WT1 胜肽二聚物，而使 WT1 特異性 CTL 被誘導，並藉該 CTL 去傷害對象中之癌細胞。

【0025】本發明之醫藥組成物，除了含有上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物作為有效成分以外，亦可含有例如擔體(carrier)、賦形劑等。本發明之醫藥組成物所包含之 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽或 WT1 胜肽二聚物係誘導 WT1 特異性 CTL，故為了使該誘導效率增強，本發明之醫藥組成物可含有適當之佐劑(adjuvant)，或可與適當之佐劑一起投予。就較佳之佐劑而言，可列舉如完全或不完全之傅氏佐劑(Freund's adjuvant)、氫氧化鋁等，但不受此等限制。

【0026】本發明之醫藥組成物之投予方法，可因應疾病之種類、對象之狀態、目標部位等條件而適當選擇。該方法可列舉如皮內投予、皮下投予、肌肉內投予、靜脈內投予、經鼻投予、經口投予等，但不受此等限制。本發明

之醫藥組成物所包含之胜肽或胜肽二聚物之量、醫藥組成物之劑型、投予次數等，可因應疾病之種類、對象之狀態、目標部位等條件而適當選擇，但每一次之胜肽投予量通常為 0.0001mg 至 1000mg，較佳為 0.001mg 至 1000mg。

【0027】 本發明之其他型態，係有關一種用於治療或預防癌症之方法，其特徵為：將有效量之上述 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物投予至 HLA-A\*1101 陽性對象。治療或預防之癌症可為任一種，例如可包括白血病、骨髓形成異常症候群、多發性骨髓瘤、惡性淋巴瘤等造血器官腫瘤，或是胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚胎細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前列腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巢癌等固形癌。

【0028】 本發明之另一其他型態，係有關一種決定 HLA-A\*1101 陽性對象中 WT1 特異性 CTL 之存在或量的方法，該方法包含下述步驟：

(a)使 WT1 胜肽與 HLA-A\*1101 分子之複合物，與源自該對象之試料進行反應；其次，

(b)檢測認知該試料所包含之該複合物的 CTL 的存在或量。源自該對象之試料，可為有包含淋巴球之可能性之任一種物質，可列舉例如血液、淋巴液等體液、組織等。WT1 胜肽與 HLA-A\*1101 分子之複合物，係使用例如生物素-鏈黴親和素(biotin-streptavidin)等該業者習知之方法，亦可製成例如四聚物、五聚物等型態。認知該複合物的 CTL 的存在或量，可依據該業者習知之方法測定。在本發明之此型態

中，上述複合物亦可為經標示者。就標示而言，可使用螢光標示、放射性標示等公知者。藉由標示，可容易且迅速地決定 CTL 之存在或量。

【0029】因此，本發明又提供一種用於決定 HLA-A\*1101 陽性對象中之 WT1 特異性 CTL 之存在或量的組成物，其含有 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽。

【0030】更進一步，本發明提供一種用於決定 HLA-A\*1101 陽性對象中之 WT1 特異性 CTL 之存在或量的工具組，其含有 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽。

【0031】本發明之再一其他型態，係有關一種使用 WT1 胜肽與 HLA-A\*1101 分子之複合物以生成 WT1 特異性 CTL 的方法，該方法包含下述步驟：

- (a)使試料與該複合物進行反應，
- (b)獲得認知該試料所含之複合物的 CTL。

關於 WT1 胜肽與 HLA-A\*1101 分子之複合物係如上述。試料係只要有包含淋巴球之可能性者即可，可為任一種物質，可列舉例如源自血液等對象之試料、細胞培養液等。可使用 FACS、MACS 等該業者習知的方法，來取得用以認知複合物的 CTL。培養所得之 WT1 特異性 CTL，亦可使用於各種癌症之治療或預防。

【0032】所以，本發明又有關一種 WT1 特異性 CTL，其係可藉由使用 WT1 胜肽與 HLA-A\*1101 分子之複合物並依據生成 WT1 特異性 CTL 之方法而獲得。

【0033】本發明之另一其他型態，係有關一種編碼上

述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽的聚核苷酸。本發明之聚核苷酸可為 DNA，亦可為 RNA。本發明之聚核苷酸之鹼基序列，係基於上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽之胺基酸序列而決定。該聚核苷酸可依據例如化學合成法等公知之 DNA 或 RNA 合成方法、PCR 法等而製造。

【0034】 本發明之另一其他型態，係有關一種含有上述聚核苷酸的表現載體(expression vector)。表現載體之種類、上述聚核苷酸序列以外所含有之序列等，可因應導入該表現載體之宿主種類、目的等而適當選擇。藉由將本發明之表現載體投予至 HLA-A\*1101 陽性對象，在活體內產生 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽，並誘導 WT1 特異性 CTL 而傷害對象中之造血器官腫瘤細胞、固形癌細胞等，可進行該造血器官腫瘤、固形癌之治療或預防。

【0035】 本發明之再一其他型態，係有關一種用於治療或預防癌症之醫藥組成物，其含有上述聚核苷酸或上述表現載體。本發明之此型態之醫藥組成物的組成、投予方法等係如上述。

【0036】 本發明之另一其他型態，係有關一種用於治療或預防癌症之方法，其特徵為：將有效量之上述聚核苷酸或表現載體投予至 HLA-A\*1101 陽性對象。治療或預防之癌症可包括白血病、骨髓形成異常症候群、多發性骨髓瘤、惡性淋巴瘤等造血器官腫瘤，或是胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、生殖細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前列腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巢癌等固形癌。

【0037】 本發明之另一其他型態，係有關一種含有上述表現載體的細胞。本發明之細胞，係可藉由使用上述表現載體對例如大腸桿菌、酵母、昆蟲細胞、動物細胞等宿主細胞進行形質轉換而製造。將表現載體導入宿主細胞之方法，可適當選擇各種方法而使用。亦可藉由培養經形質轉換之細胞，並將產生之 WT1 胜肽回收，精製，而製造本發明之胜肽。

【0038】 本發明之另一其他型態，係有關一種 WT1 特異性 CTL，其係藉由上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物而被誘導。本發明之 CTL，會認知 WT1 胜肽與 HLA-A\*1101 分子之複合物。因此，使用本發明之 CTL，可特異性地傷害 HLA-A\*1101 陽性且高度表現 WT1 之腫瘤細胞。

【0039】 本發明之另一其他型態，係有關一種用於治療或預防癌症之方法，其特徵為：將 WT1 特異性 CTL 投予至 HLA-A\*1101 陽性對象。WT1 特異性 CTL 之投予方法，係可因應疾病之種類、對象之狀態、目標部位等條件而適當選擇。該方法可列舉如靜脈內投予、皮內投予、皮下投予、肌肉內投予、經鼻投予、經口投予等，但不受此等限制。

【0040】 本發明之另一其他型態，係有關一種 WT1 特異性 CTL 之誘導方法，其特徵為：於上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物的存在下培養末梢血單核球，從該末梢血單核球誘導 WT1 特異性 CTL。末梢

血單核球之來源對象，可為 HLA-A\*1101 陽性之任一者。藉由於 HLA-A\* 1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物的存在下進行培養末梢血單核球，即可從未梢血單核球之 CTL 前驅細胞中使 WT1 特異性 CTL 被誘導。將依據本發明而得到之 WT1 特異性 CTL 投予至 HLA-A\*1101 陽性對象，即可治療或預防該對象之造血器官腫瘤、固形癌。

【0041】 本發明之另一其他型態，係有關一種用於誘導 WT1 特異性 CTL 之工具組，其含有 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物作為必須構成成分。該工具組係以可使用於上述 WT1 特異性 CTL 之誘導方法為較佳。本發明之工具組，除了上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物以外，亦可含有例如末梢血單核球之取得方法、佐劑、反應容器等。一般而言，工具組係附有使用說明書。使用本發明之工具組，可有效率地誘導 WT1 特異性 CTL。

【0042】 本發明之另一其他型態，係有關一種介由 HLA-A\*1101 分子而呈現 WT1 胜肽的抗原呈現細胞(如樹狀細胞等)，其係藉由上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物而被誘導。經由使用本發明之抗原呈現細胞，即可有效地使上述 WT1 特異性 CTL 被誘導。

【0043】 本發明之再一其他型態，係有關一種用於治療或預防癌症之方法，其特徵為：將上述介由 HLA-A\*1101 分子而呈現 WT1 胜肽的抗原呈現細胞投予至 HLA-A\*1101 陽性對象。抗原呈現細胞之投予方法，係可因應疾病之種

類、對象之狀態、目標部位等條件而適當選擇。該方法可列舉如靜脈內投予、皮內投予、皮下投予、肌肉內投予、經鼻投予、經口投予等，但不受此等限制。

【0044】本發明之再一其他型態，係有關一種介由 HLA-A\*1101 分子而呈現 WT1 胜肽的抗原呈現細胞的誘導方法，其特徵為：於上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物存在下培養未成熟之抗原呈現細胞，並從該未成熟之抗原呈現細胞中，將介由 HLA-A\*1101 分子而呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞予以誘導。未成熟之抗原呈現細胞，係指如未成熟之樹狀細胞等可成熟而成為抗原呈現細胞之細胞。未成熟之抗原呈現細胞的來源對象，可為 HLA-A\*1101 陽性之任一者。由於未成熟之抗原呈現細胞係包含於末梢血單核球等之中，故亦可在上述 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物的存在下培養該細胞。

【0045】本發明之另一其他型態，係有關一種用於誘導介由 HLA-A\*1101 分子而呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞的工具組，其含有上述 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽及/或 WT1 胜肽二聚物作為必須構成成分。該工具組係以可使用於上述抗原呈現細胞之誘導方法為較佳。本發明之工具組中所包含之其他構成成分係如上述。使用本發明之工具組，可有效率地誘導介由 HLA-A\*1101 分子而呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞。

【0046】本發明之另一其他型態，係有關一種對於 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽或編碼該胜肽之聚核苷酸的

抗體。本發明之抗體可為多株抗體、單株抗體中之任一種。

【0047】 本發明之再一其他型態，係有關一種癌症之診斷方法，其特徵為使用上述 WT1 特異性 CTL、介由 HLA-A\*1101 分子而呈現 WT1 胜肽的抗原呈現細胞、或是對於 HLA-A\* 1101 限制性 WT1 胜肽或編碼該胜肽之聚核苷酸的抗體者。該 WT1 特異性 CTL 係以可使用於本發明之診斷方法為較佳。例如，將上述 CTL、抗原呈現細胞或抗體，與源自 HLA-A\*1101 陽性對象之試料進行培養或是投予至 HLA-A\* 1101 陽性對象，其次藉由決定該 CTL、抗原呈現細胞或抗體之例如位置、部位、量等，而可診斷癌症。上述 CTL、抗原呈現細胞或抗體可為經標示者。藉由進行該標示，可有效地進行本發明之診斷方法。

(實施例)

【0048】 以下揭示實施例以具體且詳細地說明本發明，但實施例並未限定本發明。

[實施例 1]

WT1 胜肽之選擇

【0049】 使用 RANKPEP(<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>)，從源自 WT1 蛋白質(序列編號：1)之胜肽中，選出與 HLA-A\*1101 分子結合能高之 WT1<sub>251</sub>、WT1<sub>279</sub>、WT1<sub>312</sub>、WT1<sub>313</sub>、WT1<sub>338</sub>、WT1<sub>378</sub>、WT1<sub>386</sub>、WT1<sub>415</sub>、WT1<sub>436</sub>。此等胜肽之胺基酸序列、序列編號：1 中之胺基酸編號、對於 HLA-A\*1101 分子之親和性點數係示於表 1。

【0050】

[表 1]

| 胜肽                              | 胺基酸編號     | 胺基酸序列     | 親和性點數 |
|---------------------------------|-----------|-----------|-------|
| WT1 <sub>251</sub><br>(序列編號：2)  | 251 至 259 | AAGSSSSVK | 15.18 |
| WT1 <sub>279</sub><br>(序列編號：3)  | 279 至 287 | PILCGAQYR | 11.47 |
| WT1 <sub>312</sub><br>(序列編號：4)  | 312 至 320 | RSASETSEK | 14.96 |
| WT1 <sub>313</sub><br>(序列編號：5)  | 313 至 321 | SASETSEKR | 6.87  |
| WT1 <sub>338</sub><br>(序列編號：6)  | 338 至 346 | SHLQMHSRK | 13.72 |
| WT1 <sub>378</sub><br>(序列編號：7)  | 378 至 386 | TGVKPFQCK | 11.33 |
| WT1 <sub>386</sub><br>(序列編號：8)  | 386 至 394 | KTCQRKFSR | 13.82 |
| WT1 <sub>415</sub><br>(序列編號：9)  | 415 至 423 | SCRWPSCQK | 10.29 |
| WT1 <sub>436</sub><br>(序列編號：10) | 436 至 444 | NMHQRNMTK | 14.19 |

## B-LCL 細胞之調製

【0051】 從由 HLA-A\*1101 陽性健康常人捐贈者所採取之末梢血中，依據 Ficoll-Hypaque 密度梯度離心法

(gradient density centrifugation)而分離出末梢血單核球 (PBMC)。其次，於 24 孔細胞培養用盤在含有 10% FCS 之 RPMI1640 培養基中將 PBMC 以  $1 \times 10^7$  個之密度接種，並添加 B95-8 細胞(EB 病毒產生細胞)之培養上澄液，於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  中培養約一個月。藉由 EB 病毒(Epstein-Barr virus)而被形質轉換，即得到為 B 細胞系腫瘤細胞之 B-LCL 細胞。確認所得之 B-LCL 細胞未表現 WT1 基因。藉由將 B-LCL 細胞與  $20 \mu\text{g/ml}$  之 WT1<sub>251</sub>、WT1<sub>279</sub>、WT1<sub>312</sub>、WT1<sub>313</sub>、WT1<sub>338</sub>、WT1<sub>378</sub>、WT1<sub>386</sub>、WT1<sub>415</sub>、或 WT1<sub>436</sub> 一起培養 2 小時而進行脈衝(pulse)處理，其次，照射放射線 80Gy。將所得之 B-LCL 細胞(以下，稱為藉 WT1 胜肽而經脈衝處理之 B-LCL 細胞)作為抗原呈現細胞，使用於以下之實驗。

#### WT1 特異性 CTL 之誘導

【0052】於 24 孔細胞培養用盤在含有  $20 \mu\text{g/ml}$  之 WT1<sub>251</sub>、WT1<sub>279</sub>、WT1<sub>312</sub>、WT1<sub>313</sub>、WT1<sub>338</sub>、WT1<sub>378</sub>、WT1<sub>386</sub>、WT1<sub>415</sub>、或 WT1<sub>436</sub> 的完全培養基(45% RPMI、45% AMI-V 培養基、以及 10% 人類 AB 血清)中，將  $3 \times 10^6$  個自體之 PBMC 在 37%、5%  $\text{CO}_2$  中培養一週，便得到響應細胞(responsive cell)。將所得之響應細胞  $2 \times 10^6$  個、與藉相同之 WT1 胜肽而經脈衝處理之 B-LCL 細胞  $1 \times 10^6$  個在完全培養基中共同培養一週(第 1 次刺激)。將 PBMC 與藉 WT1 胜肽而經脈衝處理之 B-LCL 細胞再進行共同培養 3 次(第 2 至 4 次刺激)，此時，將 20IU/ml(最終濃度)之 IL2 以下述條件添加：第 2 次刺激係從開始刺激之 3 天後起每隔一天，共添加 2 次；

第 3 次及第 4 次刺激係從開始刺激之隔天起每隔一天，共添加 3 次。使用負向選擇管柱重力供給工具組 (Negative Selection Columns Gravity Feed Kit(StemSp)) 以使 CD8 陽性 T 細胞成爲約 80% 之方式進行濃縮，其次，與藉 WT1 胜肽而經脈衝處理之 B-LCL 細胞進行共同培養(第 5 次刺激)。最終刺激之 5 天後的 CD8 陽性 T 細胞(CTL)，係用於測定細胞毒殺活性。

#### CTL 之細胞毒殺活性

【0053】 使用  $^{51}\text{Cr}$  游離試驗測定 CTL 之細胞毒殺活性。將 CTL 細胞(以下，亦稱爲作用細胞(effector cell))與事先經攝入  $^{51}\text{Cr}$  之目標細胞，以成爲 1:1 至 30:1 之比率 (E/T 比)的方式調製培養基 200  $\mu\text{l}$ ，並在 96 孔細胞培養用盤中，以 37°C、5%  $\text{CO}_2$  培養 4 小時。就目標細胞而言，係使用藉由與 CTL 誘導所使用之 WT1 胜肽相同之胜肽而經脈衝處理的 B-LCL 細胞(BLCL-P)、以及未將 WT1 胜肽予以脈衝處理的 B-LCL 細胞(BLCL-NP)。培養後，經離心並回收上澄液，使用液體閃爍計數器測定於上澄液中游離之  $^{51}\text{Cr}$  量。將細胞毒殺活性(%)使用下式來決定：

$$\frac{(\text{試料上澄液中之 } ^{51}\text{Cr 游離量} - \text{自然產生之 } ^{51}\text{Cr 游離量})}{(\text{最大 } ^{51}\text{Cr 游離量} - \text{自然產生之 } ^{51}\text{Cr 游離量})} \times 100$$

(自然產生之  $^{51}\text{Cr}$  游離量係指僅將經攝入  $^{51}\text{Cr}$  之目標細胞以同樣條件培養時的  $^{51}\text{Cr}$  游離量；最大  $^{51}\text{Cr}$  游離量係指將經攝入  $^{51}\text{Cr}$  之目標細胞以 Triton X-100 使全細胞溶解時的  $^{51}\text{Cr}$  游離量)

結果示於第 1 圖至第 9 圖。圖中，縱軸係表示特異性溶解(%)，橫軸係表示 E/T 比。另外，以實線表示 BLCL-P、以點線表示 BLCL-NP。使用 WT1<sub>251</sub>、WT1<sub>279</sub>、WT1<sub>312</sub>、WT1<sub>313</sub>、WT1<sub>338</sub>、WT1<sub>378</sub>、WT1<sub>386</sub>、WT1<sub>415</sub>、及 WT1<sub>436</sub> 誘導之 CTL，相較於 BLCL-NP 細胞，可確認到前者能對 BLCL-P 細胞進行特異性傷害，該 BLCL-P 細胞係將 WT1 胜肽以作為與 HLA-A\*1101 分子之複合物而呈現該 WT1 胜肽。以下，針對使用 WT1<sub>251</sub>、WT1<sub>279</sub>、WT1<sub>313</sub>、WT1<sub>338</sub>、及 WT1<sub>386</sub> 誘導之 CTL，再進行實驗。

CTL 對於內因性 WT1 基因表現細胞的細胞毒殺活性

【0054】 使用 WT1<sub>251</sub>、WT1<sub>279</sub>、WT1<sub>313</sub>、WT1<sub>338</sub>、及 WT1<sub>386</sub> 誘導之 CTL 對於 WT1 表現 B-LCL 的細胞毒殺活性，係使用上述方法決定。WT1 表現細胞，係指經導入人類 WT1 基因的 B-LCL 細胞，是在細胞內表現 WT1 蛋白質並經處理而將由約 9 個胺基酸所構成之胜肽表現在 HLA-A\*1101 分子上的細胞。結果示於第 1 圖、第 2 圖、第 4 圖、第 5 圖、及第 7 圖。圖中，以虛線表示 WT1 表現 B-LCL。可確認到使用 WT1<sub>251</sub>、WT1<sub>279</sub>、WT1<sub>313</sub>、WT1<sub>338</sub>、及 WT1<sub>386</sub> 誘導之 CTL，即使對於內因性表現 WT1 基因的細胞亦具有毒殺活性。

WT1 胜肽二聚物之製造

【0055】 藉由將 WT1 胜肽單體 227.5mg、N-甲基還原葡糖胺(N-methylglucamine，亦即 NMG)227.5 mg 及水 23ml 的混合物於室溫攪拌約 2 天，而進行空氣氧化。將已溶解

有醋酸鈉 2g 於水 5ml 的水溶液加入所得之混合液中，在室溫下攪拌約 20 分鐘。添加水 200ml 與乙腈約 200ml，以桐山漏斗(濾紙 No.5C)過濾，以水(約 50ml×3 次)洗淨。於殘渣中添加水約 200ml，進行凍結乾燥，而得到粗 WT1<sub>378</sub> 胜肽二聚物 158mg。

#### 粗 WT1 胜肽二聚物之精製

【0056】 將粗 WT1<sub>378</sub> 胜肽二聚物 158mg 溶解於 9ml 之 DMSO，再設置於 HPLC(島津製作所製 LC8AD 型)，使用 HPLC 泵注入以 1 液(H<sub>2</sub>O/1% AcOH)平衡化之 ODS C<sub>18</sub> 管柱(5mmΦ×50cm L，YMC 公司製)中。使管柱保持此狀態約 30 分鐘，再以 0% 至 40% 濃度梯度之 2 液(CH<sub>3</sub>CN/1% AcOH)耗費 360 分鐘進行溶析。一邊監控 220nm 之 UV 吸收，一邊使用自動分液收集裝置回收含 WT1 胜肽二聚物之分液。合併所回收之分液，設置於 HPLC(日立製 L-4000 型)，注入以 17% 之 2 液平衡化之 ODS C<sub>18</sub> 管柱(4.6mmΦ×25cm L，YMC 公司製)中，再以 0% 至 47% 濃度梯度之 2 液耗費 30 分鐘進行溶析，而得到保持時間 20.51 分鐘之精製 WT1<sub>378</sub> 胜肽二聚物 46.6mg。

FAB. MS 2365.0(理論值 2342.70)Na<sup>+</sup> F=0.25%

#### 因 WT1 胜肽二聚物而導致之 CTL 誘導

【0057】 將所得之 WT1<sub>378</sub> 胜肽二聚物、WT1<sub>378</sub> 胜肽、變異 WT1<sub>378</sub> 胜肽(G→I)(序列編號：11)、以及變異 WT1<sub>378</sub> 胜肽(G→V)(序列編號：12)、WT1<sub>379</sub> 胜肽(序列編號：13，國際公開第 2002/28414 中揭示)的 CTL 誘導能力，依據上

述方法使用源自 HLA-A\*1101 陽性健康常人捐贈者 1 至 3 之 PBMC 來檢測。結果示於第 10 圖至第 14 圖。圖中，縱軸係表示特異性溶解(%)，橫軸係表示 E/T 比。另外，以實線表示 BLCL-P、以點線表示 BLCL-NP。可確認到 WT1<sub>378</sub> 胜肽二聚物具有 CTL 誘導能力。此外，在 WT1 蛋白質之胺基酸序列中，與 WT1<sub>378</sub> 胜肽有 1 個胺基酸不同的 WT1<sub>379</sub> 胜肽的 CTL 誘導能力，與 WT1<sub>378</sub> 胜肽相比為極低，故可知本發明之 WT1 胜肽與既知之 WT1 胜肽相比係具有特別顯著的 CTL 誘導能力。

(產業上之可利用性)

**【0058】** 依據本發明，可提供一種 HLA-A\*1101 限制性 WT1 胜肽、編碼該胜肽之聚核苷酸、以及包含該等之醫藥組成物等，故可利用於醫藥品等領域，例如高度表現 WT1 基因之各種造血器官腫瘤、固形癌之預防藥或治療藥之開發、製造領域。

**【符號說明】**

**【0059】**

無。

## 序列表

<110> 癌免疫研究所股份有限公司

<120> HLA-A\* 1101 限制性 WT1 胜肽及含有該限制性胜肽之醫藥組成物

<130> 667985

<150> JP 2006-355356

<151> 2006-12-28

<160> 13

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1                               5                               10                               15
Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
                20                25                30
Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
                35                40                45
Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50                55                60
Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65                70                75                80
Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
                85                90                95
Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
                100                105                110
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
                115                120                125
Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130                135                140
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145                150                155                160
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
                165                170                175
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
                180                185                190
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195                200                205

```

201345544

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu  
260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro  
290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala  
435 440 445

Leu

<210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys  
1 5

<210> 3

201345544

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

<400> 3

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg  
1 5

<210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
1 5

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg

1 5

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

<400> 9

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys  
 1 5

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

<400> 10

Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys  
 1 5

<210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Modified WT1 peptide

<400> 11

Thr Ile Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys  
 1 5

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Modified WT1 peptide

<400> 12

Thr Val Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys  
 1 5

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

<400> 13

Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr  
 1 5

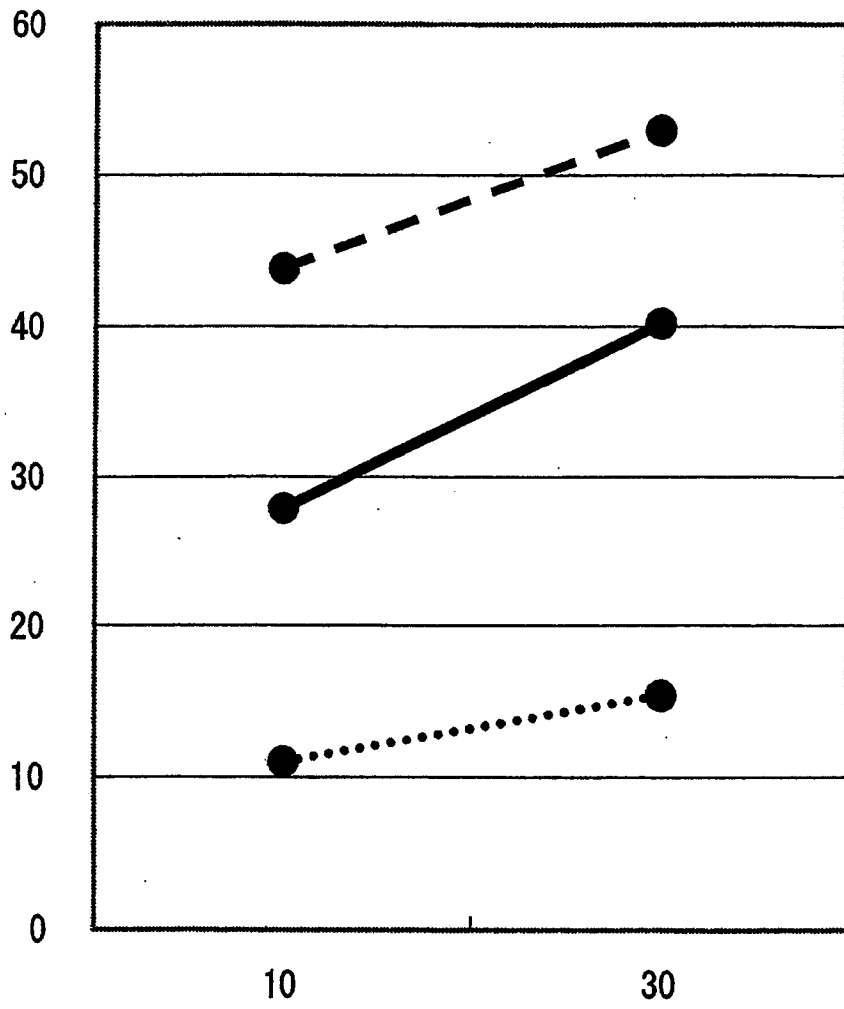
## 申請專利範圍

1. 一種胜肽的用途，該胜肽係含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)者，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力，其中該胜肽係用於製造治療癌症用之醫藥組成物。
2. 一種胜肽二聚物的用途，該胜肽二聚物係含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)的 2 個胜肽單體經由二硫鍵互相結合者，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力，其中該胜肽二聚物係用於製造治療癌症用之醫藥組成物。
3. 一種聚核苷酸的用途，該聚核苷酸係編碼胜肽，該胜肽係含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)者，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力，其中該聚核苷酸係用於製造治療癌症用之醫藥組成物。
4. 一種包含聚核苷酸之表現載體的用途，該聚核苷酸係編碼胜肽，該胜肽係含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)者，具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力，其中該表現載體係用於製造治療癌症用之醫藥組成物。

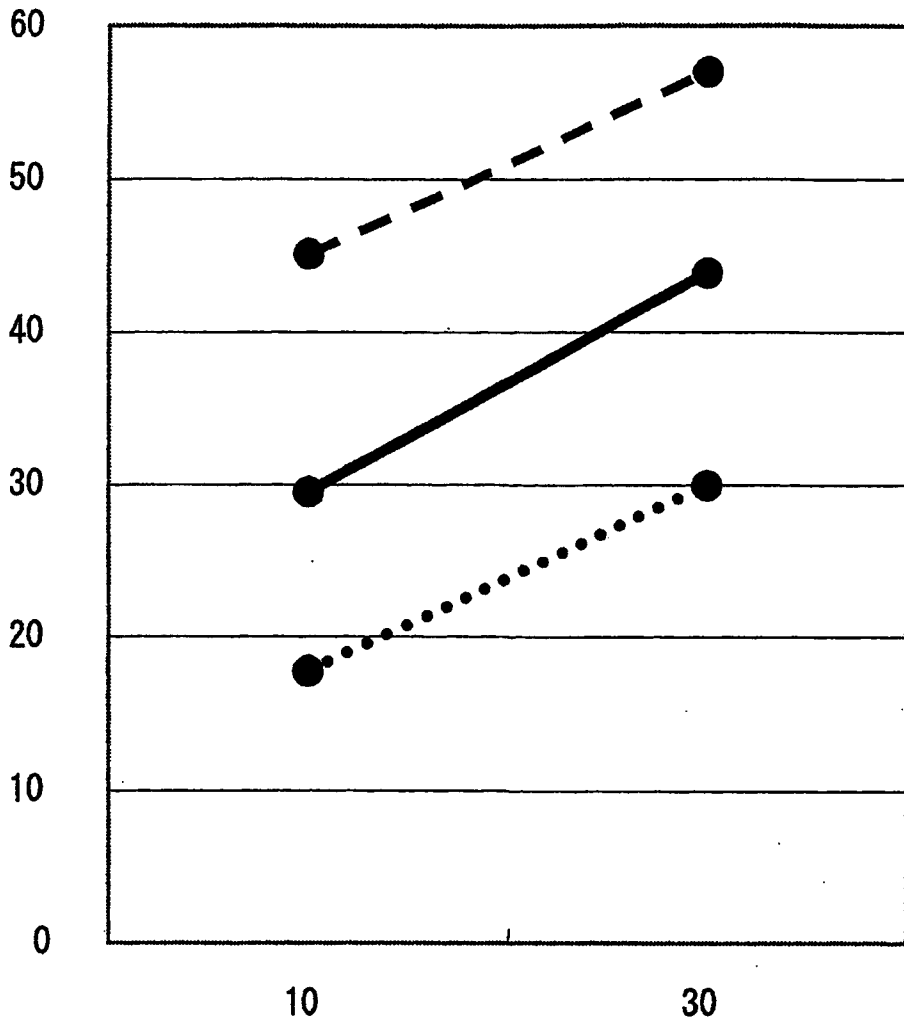
5. 一種 WT1 特異性 CTL 之誘導方法，其係：於含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)之具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力之胜肽的存在下培養末梢血單核球，並從該末梢血單核球中誘導 WT1 特異性 CTL。
6. 一種 WT1 特異性 CTL 之誘導方法，其係：於含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)的 2 個胜肽單體經由二硫鍵互相結合之具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力之胜肽二聚物的存在下培養末梢血單核球，並從該末梢血單核球中誘導 WT1 特異性 CTL。
7. 一種誘導呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞的方法，其係：於含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)之具有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力之胜肽的存在下培養未成熟之抗原呈現細胞，並從該未成熟之抗原呈現細胞中誘導該呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞。
8. 一種誘導呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞的方法，其係：於含有 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(序列編號：3)及/或 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(序列編號：5)的 2 個胜肽單體經由二硫鍵互相結合之具

有與 HLA-A\*1101 分子結合能力、且具有 CTL 誘導能力之胜肽二聚物的存在下培養未成熟之抗原呈現細胞，並從該未成熟之抗原呈現細胞中誘導該呈現 WT1 胜肽之抗原呈現細胞。

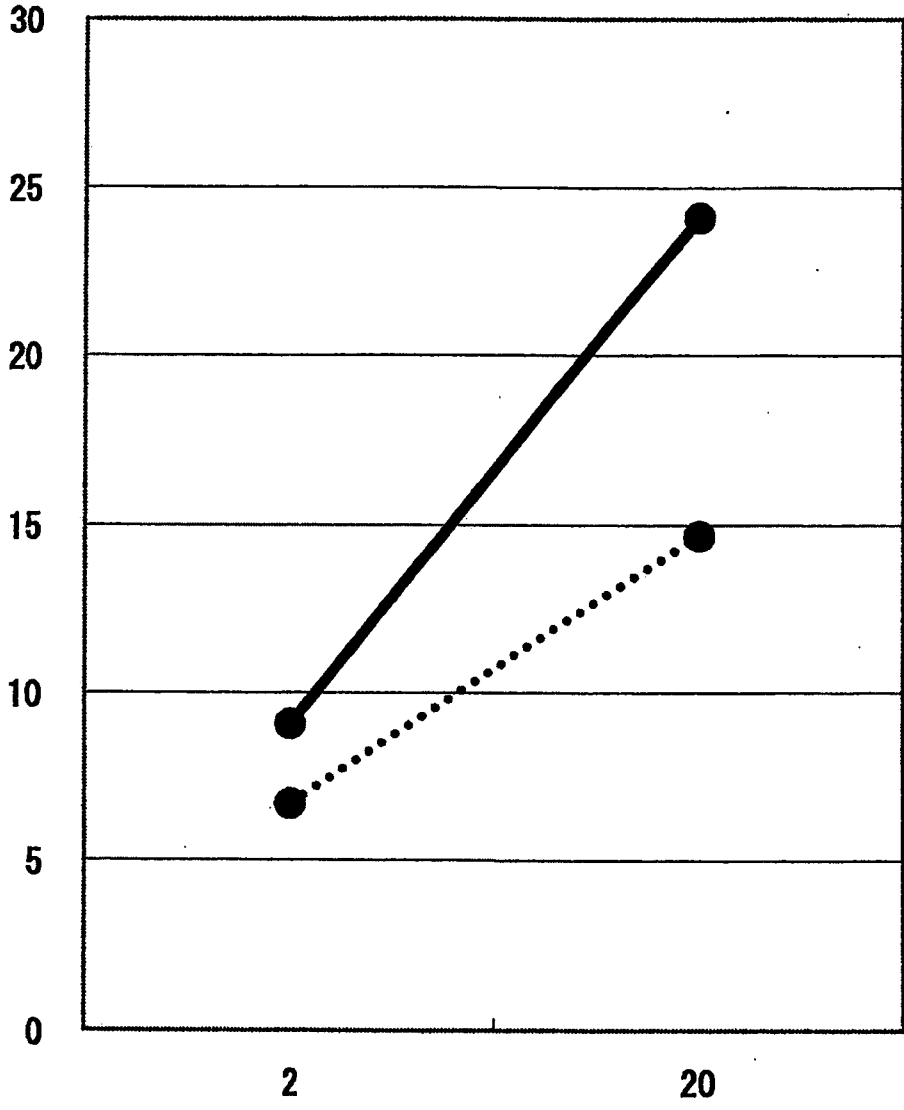
圖式



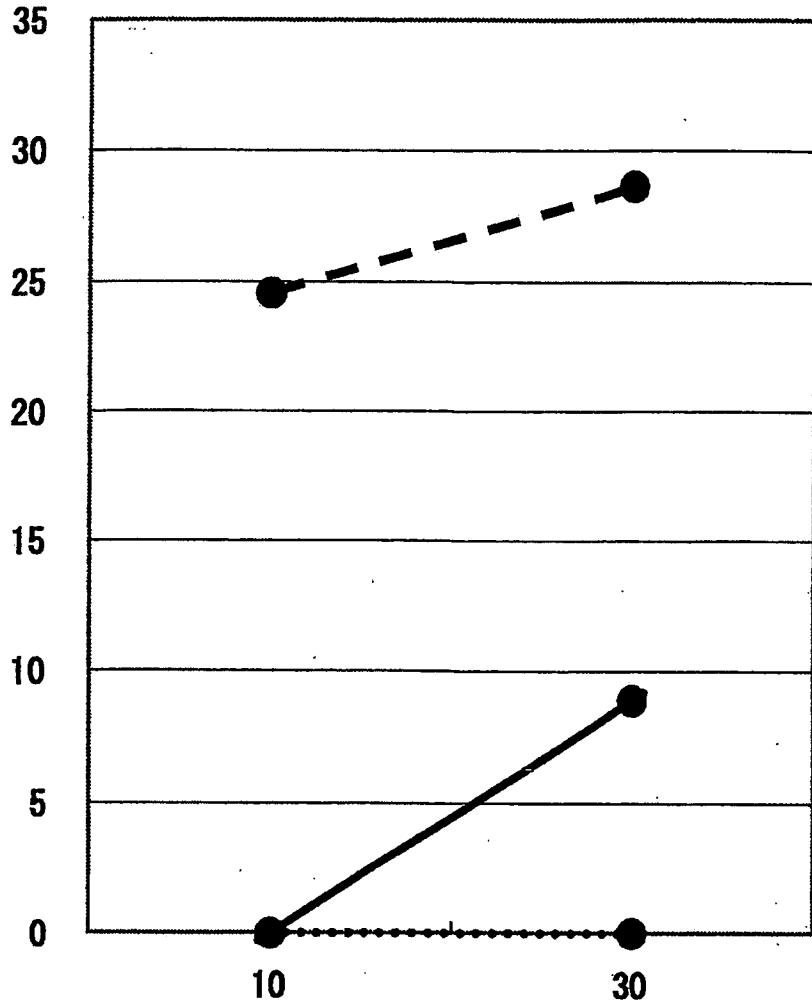
第1圖



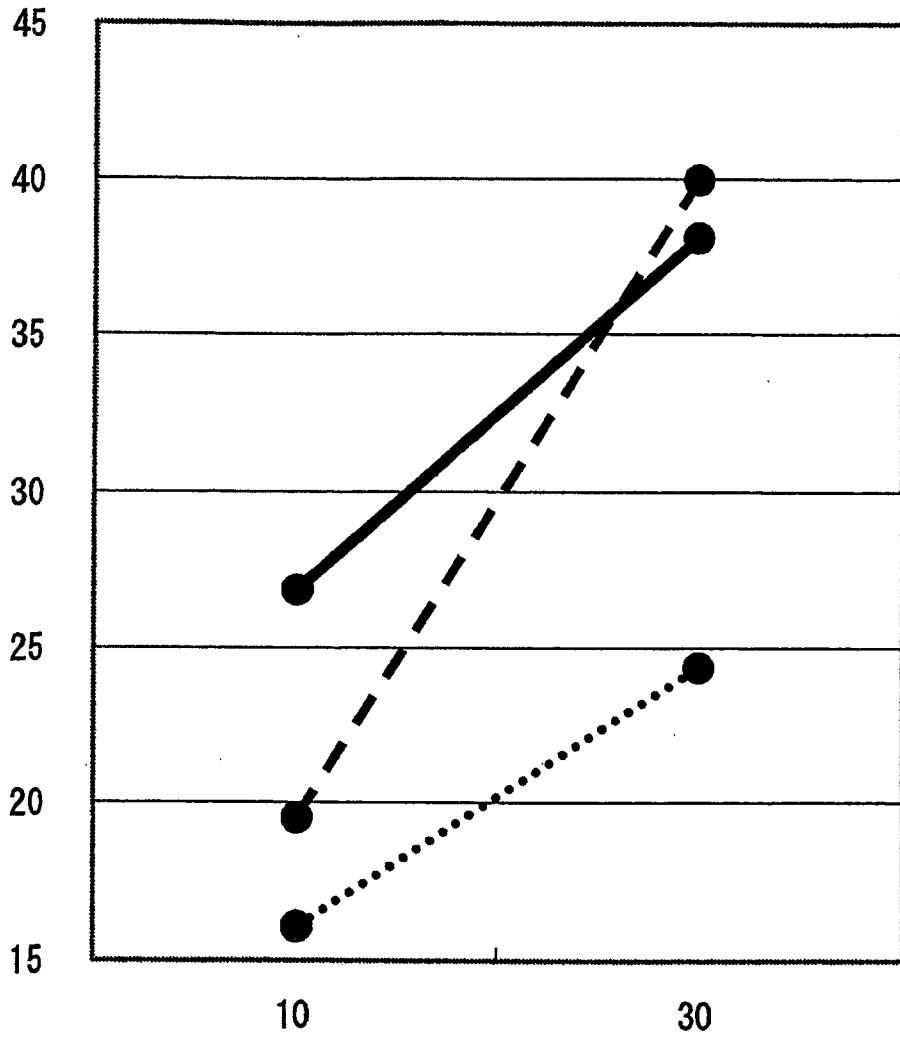
第2圖



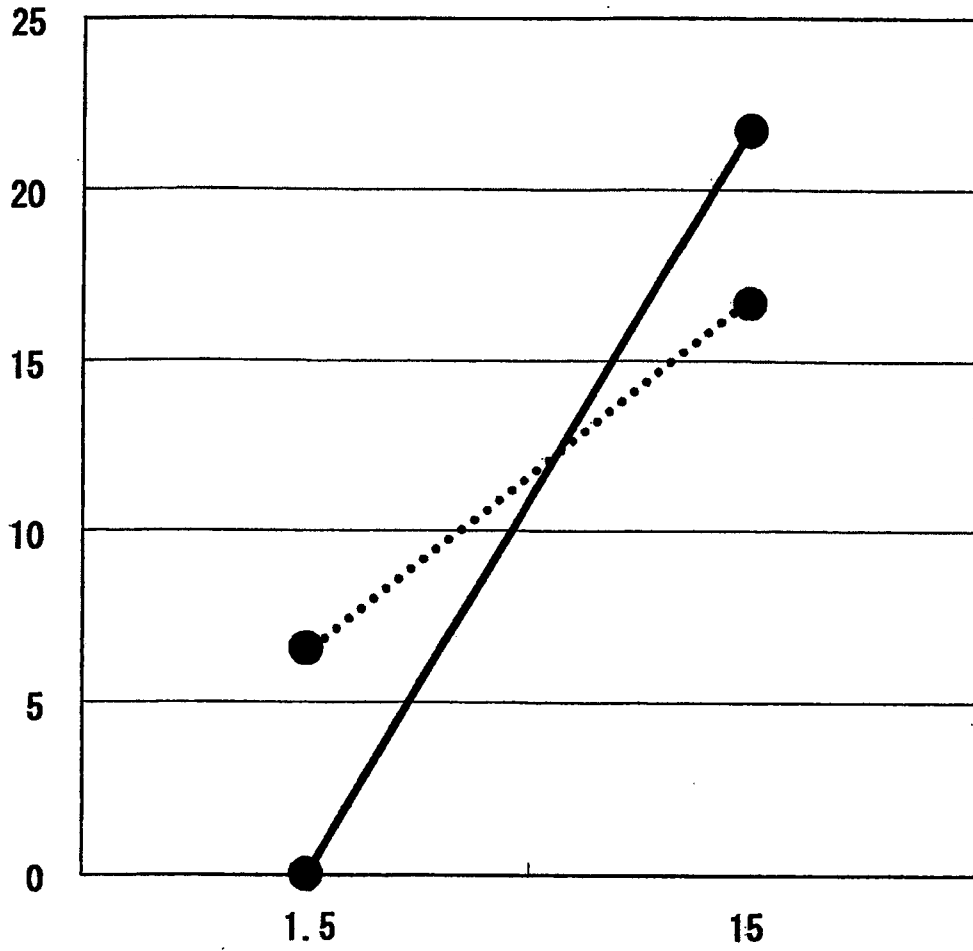
第3圖



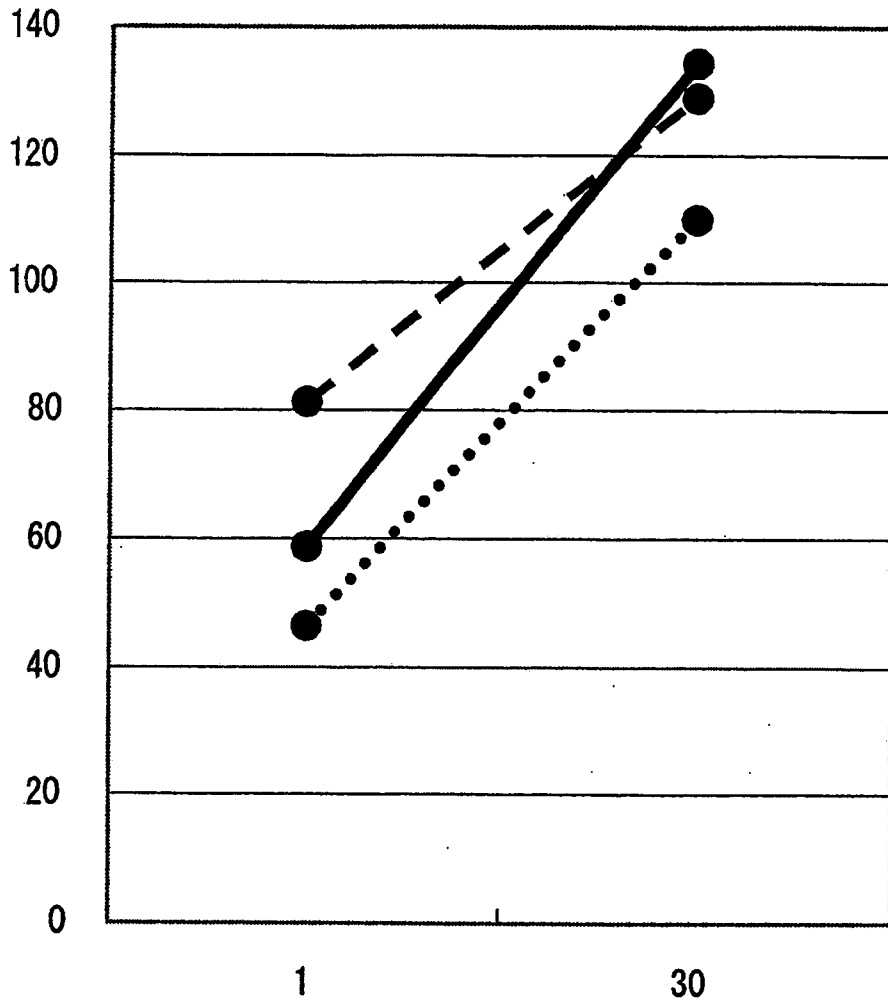
第4圖



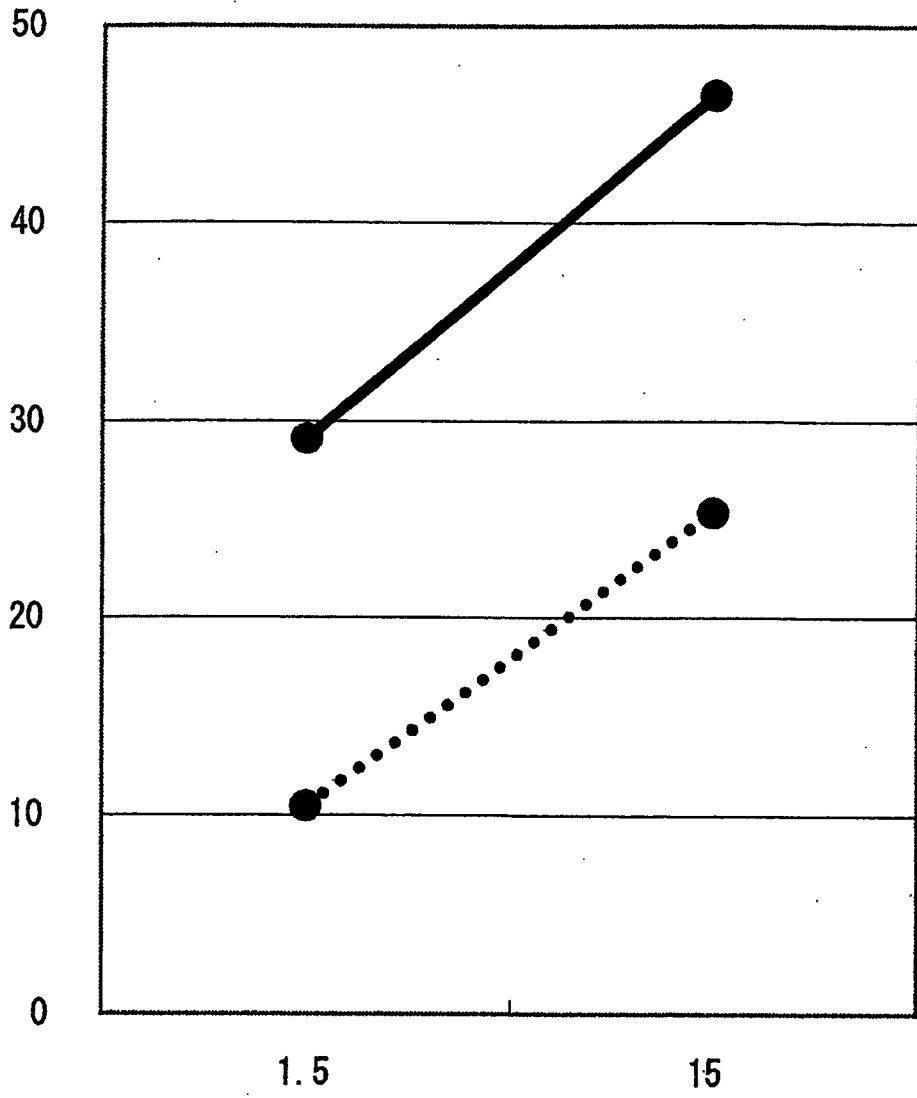
第5圖



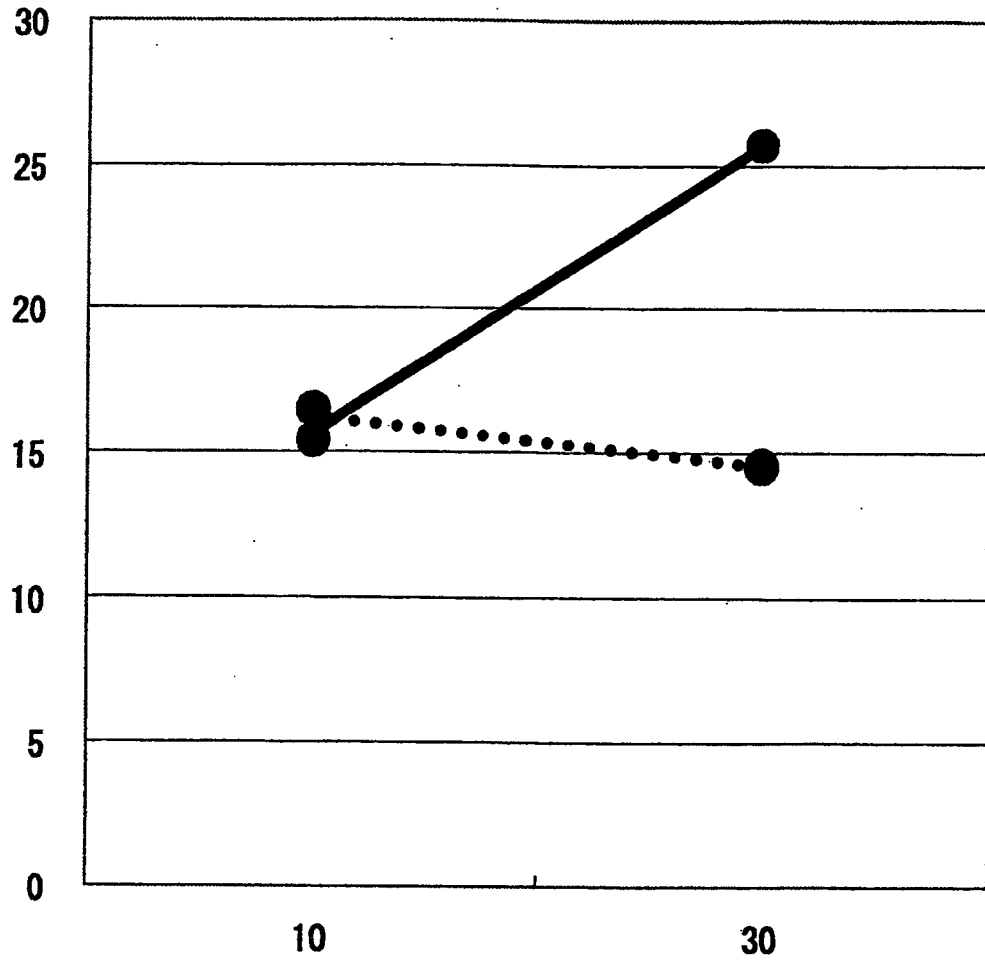
第6圖



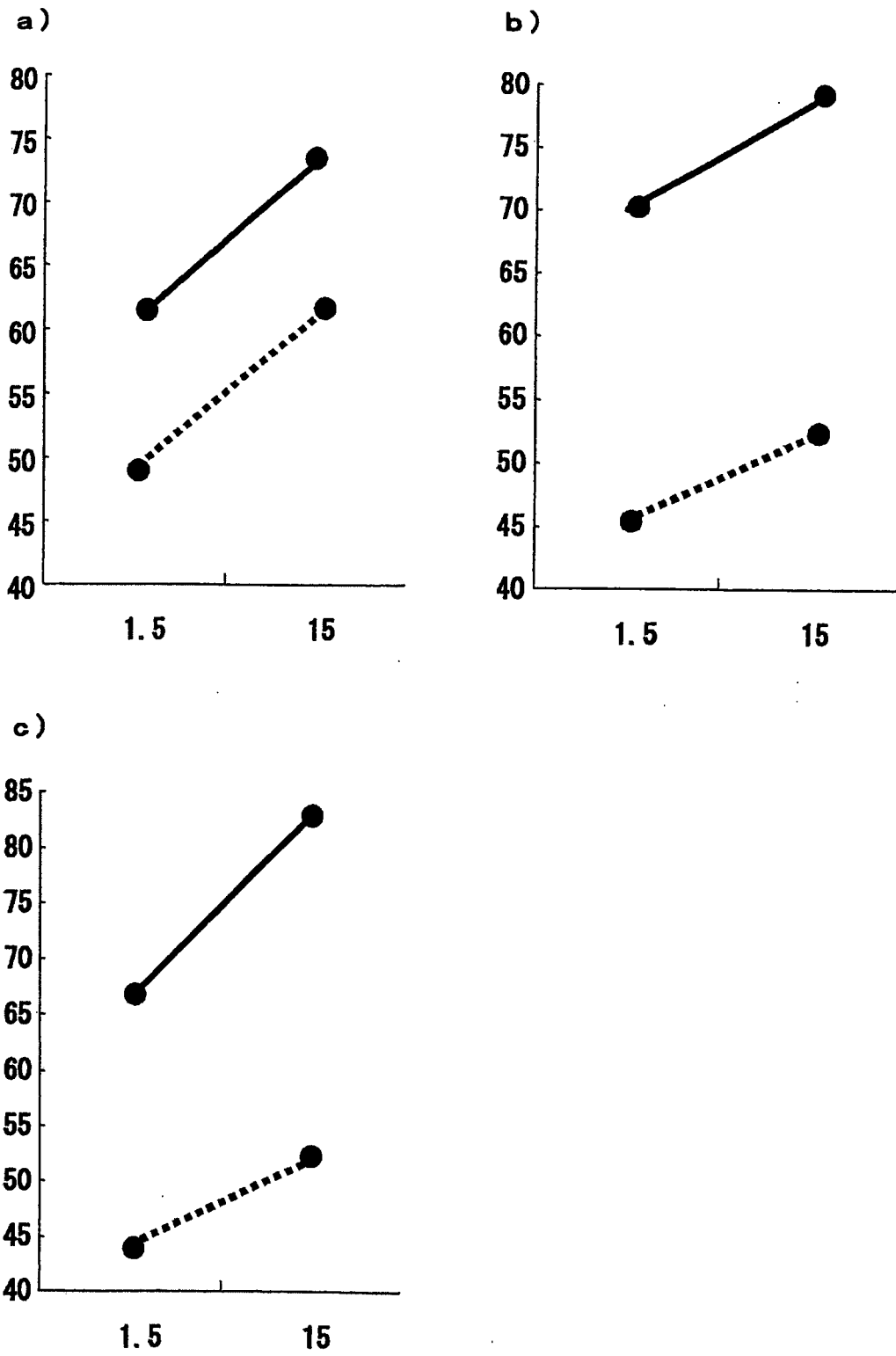
第7圖



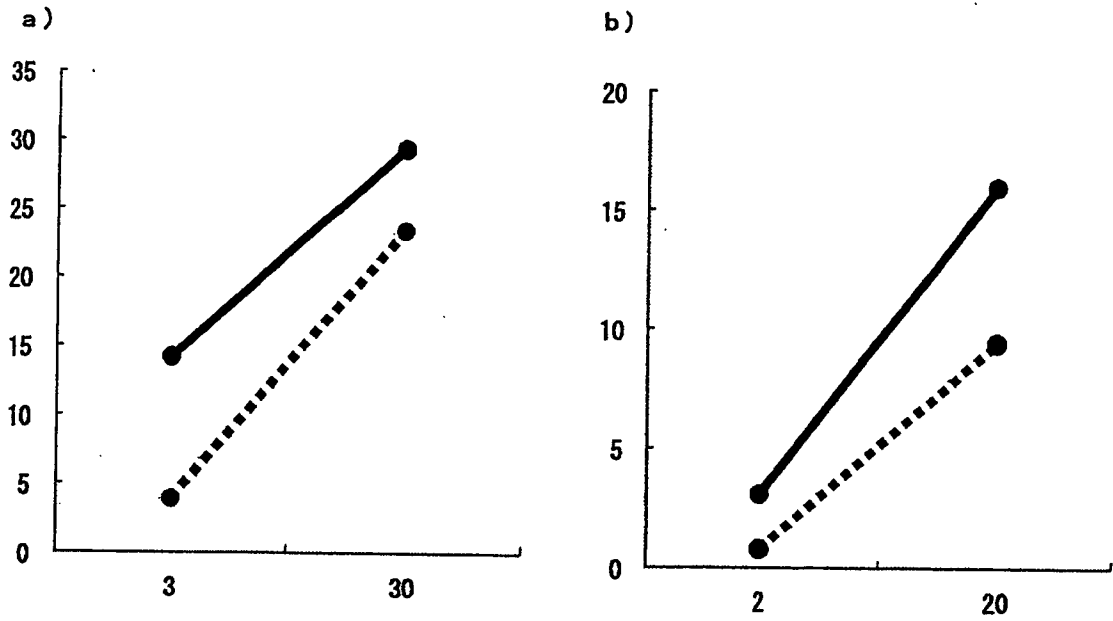
第8圖



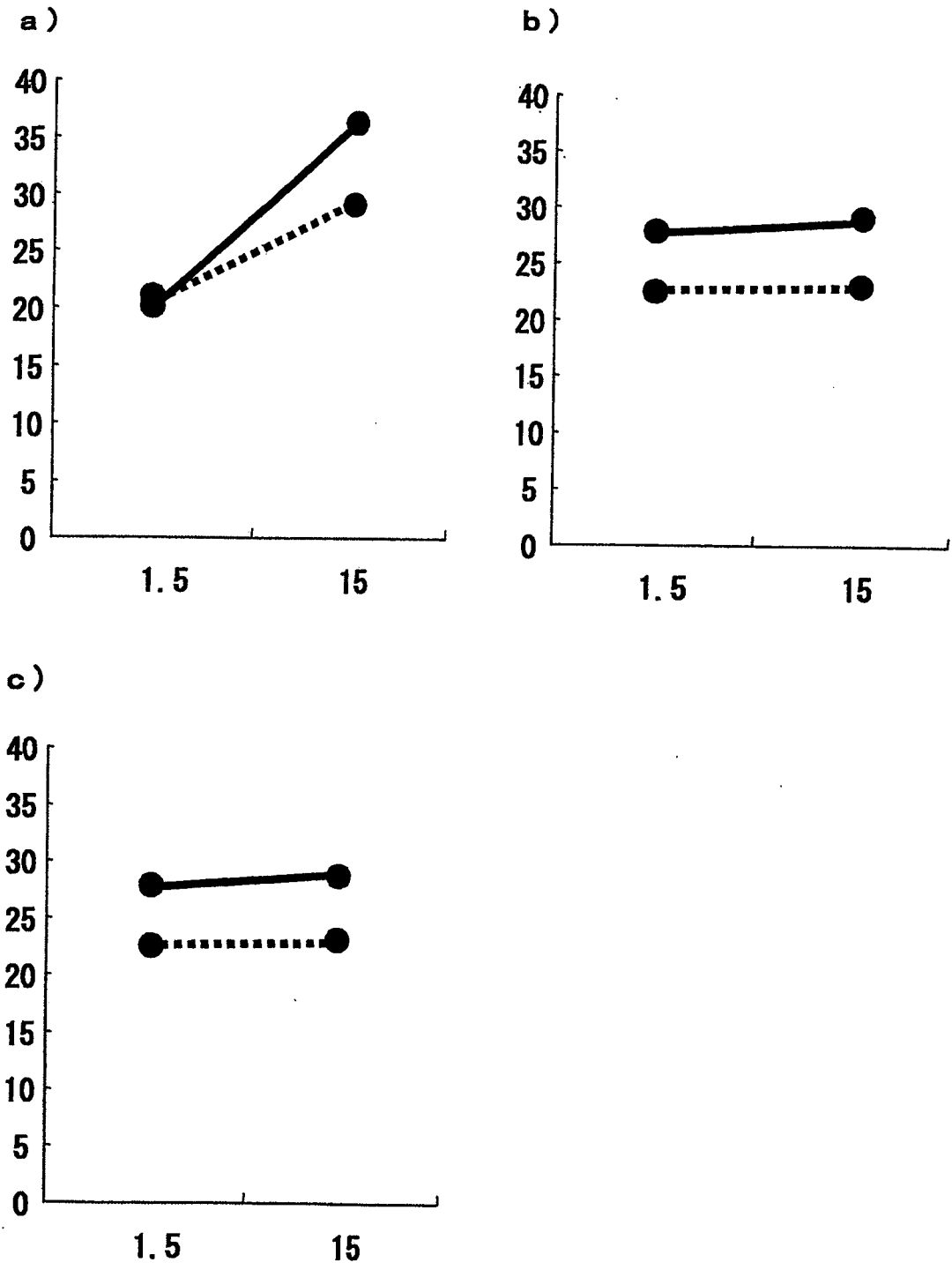
第9圖



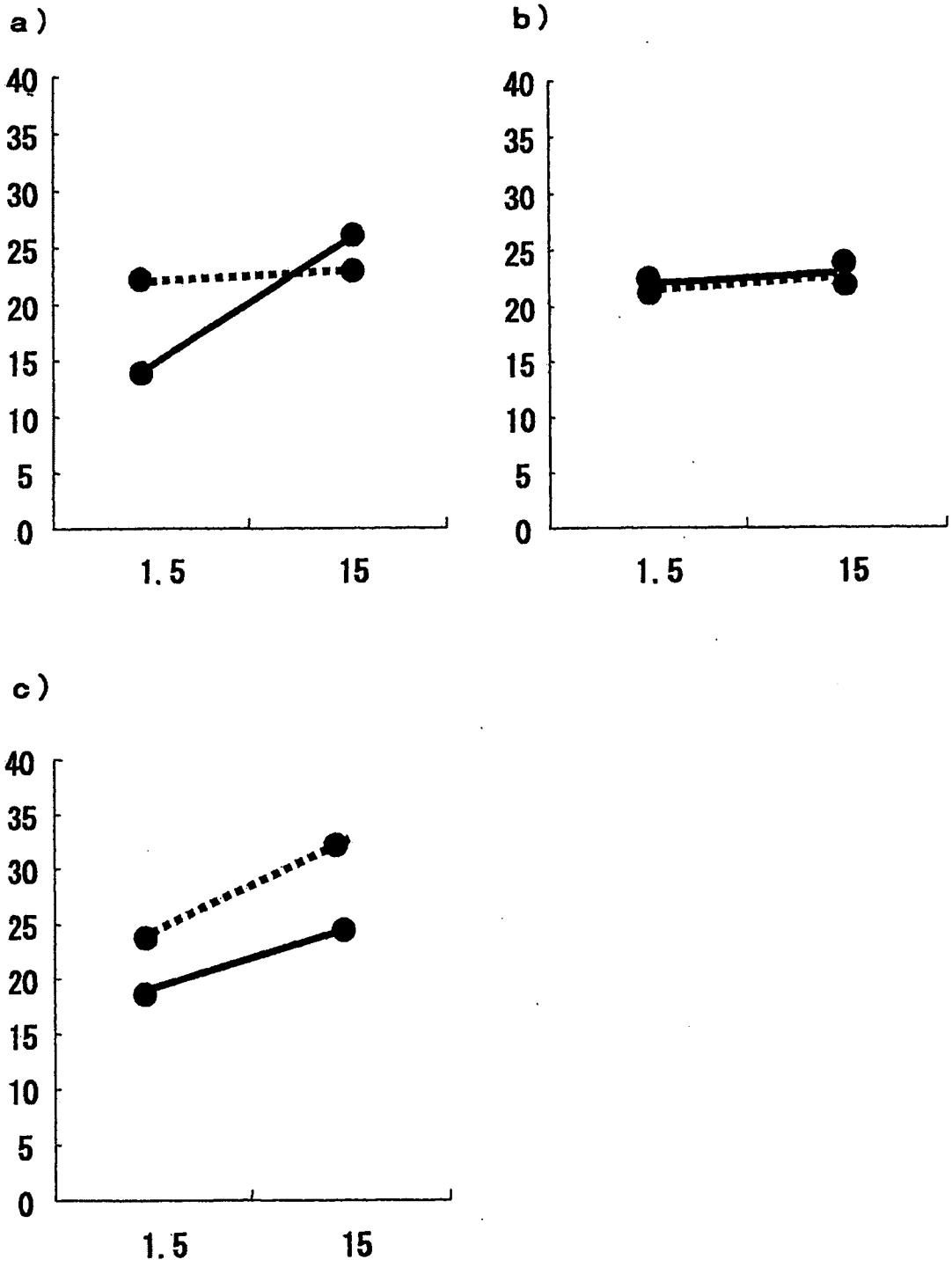
第10圖



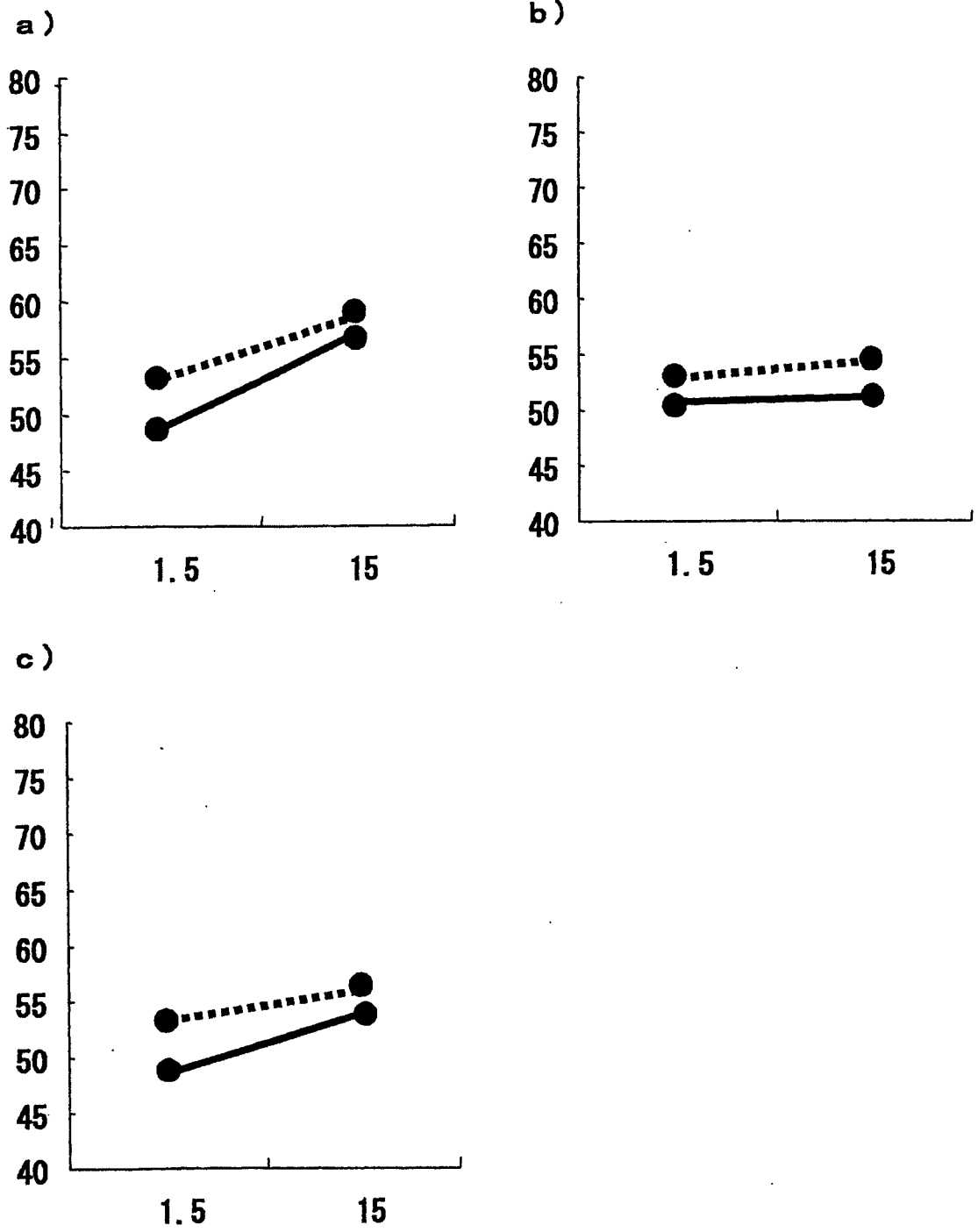
第11圖



第12圖



第13圖



第14圖