



(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 201414752 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：102132531

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl.：

C07K7/06 (2006.01)

C12N9/00 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2012/09/11 美國

61/699,550

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

(72)發明人：角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大沢龍司 OSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子
YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡辺朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：8 共 159 頁

(54)名稱

U B E 2 T 胜肽與含此之疫苗

UBE2T PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57)摘要

本發明敘述對抗癌症的胜肽疫苗。尤其，提供會誘出細胞毒殺性 T 淋巴球的來自 UBE2T 的抗原決定位胜肽。也提供有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力的單離的抗原呈現細胞，及導向此種胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球，以及用於誘導此抗原呈現細胞或細胞毒殺性 T 淋巴球的方法。本發明也提供一種藥學組合物，其包含此種來自 UBE2T 之抗原結合位胜肽或編碼為此多胜肽之多核苷酸作為有效成分。又，本發明提供治療及/或預防(即防止)癌症(腫瘤)，及/或防止其術後再復發的方法，及誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之方法、誘導抗腫瘤免疫性之方法，係使用來自 UBE2T 之抗原決定位胜肽、編碼為此胜肽之多核苷酸、或呈現此胜肽之抗原呈現細胞、或本發明之藥學組合物。

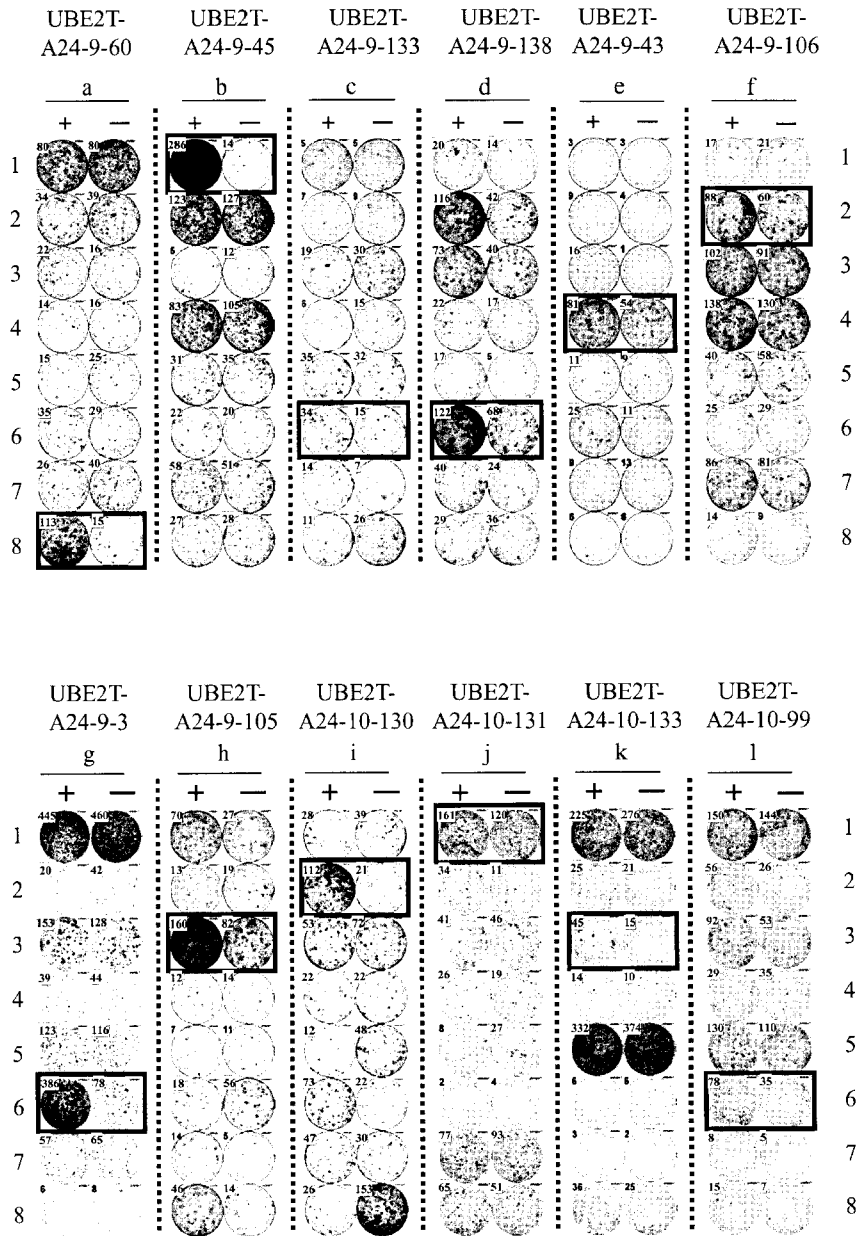


圖 1-1

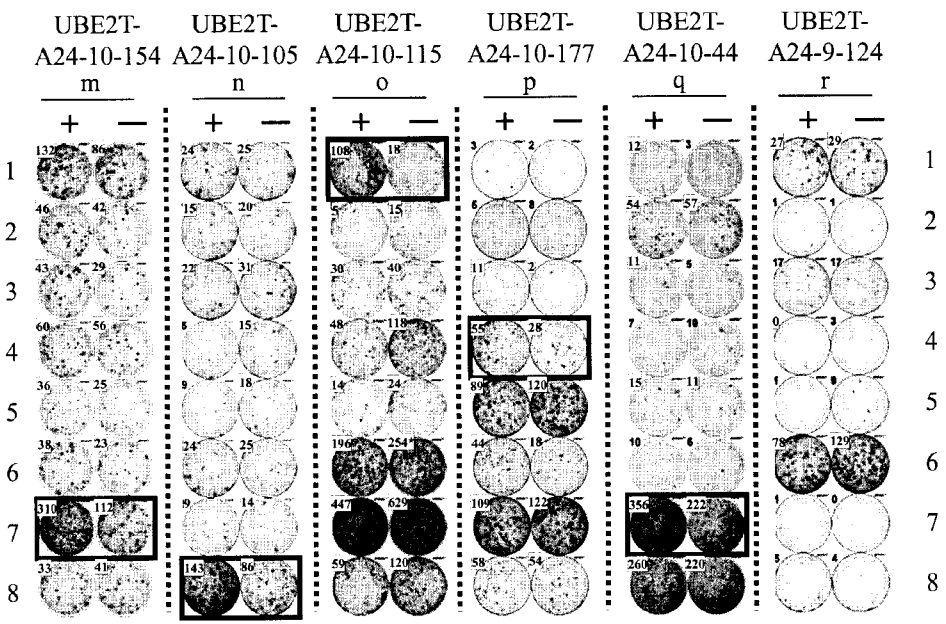


圖1-2



(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 201414752 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：102132531

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl.：

C07K7/06 (2006.01)

C12N9/00 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2012/09/11 美國

61/699,550

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

(72)發明人：角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大沢龍司 OSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子
YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡辺朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：8 共 159 頁

(54)名稱

U B E 2 T 胜肽與含此之疫苗

UBE2T PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57)摘要

本發明敘述對抗癌症的胜肽疫苗。尤其，提供會誘出細胞毒殺性 T 淋巴球的來自 UBE2T 的抗原決定位胜肽。也提供有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力的單離的抗原呈現細胞，及導向此種胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球，以及用於誘導此抗原呈現細胞或細胞毒殺性 T 淋巴球的方法。本發明也提供一種藥學組合物，其包含此種來自 UBE2T 之抗原結合位胜肽或編碼為此多胜肽之多核苷酸作為有效成分。又，本發明提供治療及/或預防(即防止)癌症(腫瘤)，及/或防止其術後再復發的方法，及誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之方法、誘導抗腫瘤免疫性之方法，係使用來自 UBE2T 之抗原決定位胜肽、編碼為此胜肽之多核苷酸、或呈現此胜肽之抗原呈現細胞、或本發明之藥學組合物。

發明摘要

※ 申請案號：102172531

※ 申請日：102. 9 10

※IPC 分類：

C07K1/6 (2006.01)

C12N9/00 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

UBE2T 胜肽與含此之疫苗 / UBE2T PEPTIDES AND VACCINES
CONTAINING THE SAME

【中文】

本發明敘述對抗癌症的胜肽疫苗。尤其，提供會誘出細胞毒殺性 T 淋巴球的來自 UBE2T 的抗原決定位胜肽。也提供有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力的單離的抗原呈現細胞，及導向此種胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球，以及用於誘導此抗原呈現細胞或細胞毒殺性 T 淋巴球的方法。本發明也提供一種藥學組合物，其包含此種來自 UBE2T 之抗原結合位胜肽或編碼為此多胜肽之多核苷酸作為有效成分。又，本發明提供治療及/或預防(即防止)癌症(腫瘤)，及/或防止其術後再復發的方法，及誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之方法、誘導抗腫瘤免疫性之方法，係使用來自 UBE2T 之抗原決定位胜肽、編碼為此胜肽之多核苷酸、或呈現此胜肽之抗原呈現細胞、或本發明之藥學組合物。

【英文】

Peptide vaccines against cancer are described herein. In particular, epitope peptides derived from the UBE2T that elicit CTLs are provided. Isolated antigen-presenting cells with CTL inducibility and CTLs that target such peptides, as well as methods for inducing the antigen-presenting cell, or CTL are also provided. The present invention further provides pharmaceutical compositions containing such epitope peptides derived from UBE2T or polynucleotides encoding the polypeptides as active ingredients. Furthermore, the present invention provides methods for the treatment and/or prophylaxis of (i.e., preventing) cancers (tumors), and/or the prevention of a postoperative recurrence thereof, as well as methods for inducing CTLs, methods for inducing anti-tumor immunity, using the epitope peptides derived from UBE2T, polynucleotides encoding the peptides, or antigen-presenting cells presenting the peptides, or the pharmaceutical compositions of the present invention.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【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)

UBE2T 胜肽與含此之疫苗/UBE2T PEPTIDES AND
VACCINES CONTAINING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本發明係關於生物科學領域，更特別對於癌症治療領域。特別是，本發明係關於新穎之胜肽，其當作癌症疫苗及治療與避免腫瘤之藥物為有效的。

【0002】 優先權

本發明主張 2012 年 9 月 11 日提申的美國臨時申請案號 61/699,550 之優惠，其完整內容引入於此作為參照。

【先前技術】

【0003】 已證實 CD8 陽性細胞毒殺性 T 淋巴球(CTLs)認識來自於主要組織相容性抗原複合體(major histocompatibility complex, MHC) class I 分子上之腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens, TAAs)的抗原決定位胜肽，且之後殺死腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原(melanoma antigen, MAGE)家族為第一個腫瘤相關抗原的例子，藉由免疫方法，已發現許多其他腫瘤相關抗原(非專利文獻 1-2)，且腫瘤相關抗原的一些目前正在進行臨床開發作為免疫治療標的。

【0004】 合適的腫瘤相關抗原係對於癌症細胞增殖與存活為必須的。使用此類腫瘤相關抗原為免疫治療標的可將廣為敘述之癌細胞免疫逃脫(immune escape)的風險最小化，而癌細胞

免疫逃脫為治療性驅使免疫篩選的結果，歸因於腫瘤相關抗原的刪除、突變或向下調控。所以，能誘導有效且專一之抗腫瘤免疫反應的新腫瘤相關抗原的認識成為更進一步發展的根據，且因此對於多種形式癌症之胜肽疫苗接種策略(vaccination strategies)的臨床研究為正進行著(非專利文獻 3-10)。迄今已報導，使用這些腫瘤相關抗原衍生胜肽的一些臨床試驗。不幸的是，這些癌症疫苗試驗已僅顯示低的客觀反應率(objective response rate)(非專利文獻 11-13)。因此維持新的做為免疫治療標的之腫瘤相關抗原於本技術領域中的需要。

【0005】 UBE2T (泛素接合酶(ubiquitin-conjugating enzyme) E2T: 一種序列識別號: 65 所示的典型胺基酸序列; 一種序列識別號: 64 (GenBank 存取號 NM_014176)所示的典型的核苷酸序列)，係一種泛素接合酶(ubiquitin-conjugating enzymes) (E2)。據報告 UBE2T 為在血漿刺激下會於人類纖維母細胞中向上調控的基因之一(非專利文獻 14)。於範可尼貧血(Fanconi anemia)路徑，UBE2T 結合於 FANCL，且對 DNA 損傷誘導性之 FANCD2 之單泛素化(monoubiquitination)為必要(非專利文獻 15-16)。最近的研究中，已發現 UBE2T 時常於乳癌中向上調控，且與 BRCA1/BRCA1 關聯性 RING 分域蛋白質 (BARD1)複合體交互作用並且一起出現(專利文獻 1, 非專利文獻 17)。在此等研究中之北方墨點法分析顯示 UBE2T 轉錄物於乳癌細胞株以非常高水平被偵測到，但於重要器官鮮少偵測到。再者，以 siRNA 將癌細胞株中的內生 UBE2T 擊倒顯示了會顯著抑制此等細胞株的生長 (專利文獻 1-2, 非專

利文獻 17)。

[專利文獻]

【0006】

[專利文獻 1] WO2005/029067

[專利文獻 2] WO2009/001562

[非專利文獻]

【0007】

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

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

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

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

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

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

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

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

[非專利文獻 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81(3):
459-66

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

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

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

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

[非專利文獻 14] Iyer VR et al., Science 1999, 283: 83-7

[非專利文獻 15] Machida YJ et al., Mol Cell 2006, 23: 589-96

[非專利文獻 16] Alpi A et al., Mol Cell Biol 2007, 27: 8421-30

[非專利文獻 17] Ueki T et.al., Cancer Res. 2009, 69: 8752-60

【發明內容】

【0008】本發明至少部分基於發現新穎之胜肽，其可做為免疫治療之適合標的。由於腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens, TAAs)有時被免疫系統感知為“自身”且因此常不具有天生之免疫抗原性(immunogenicity)，所以適合標的的發現仍重要。

為此，本發明至少係針對於鑑別專一性的抗原決定位胜肽，其具有於從 UBE2T 衍生之胜肽中尤其是 UBE2T 為專一的細胞毒殺性 T 淋巴球的能力。

【0009】在此揭示的結果證明鑑別的胜肽係受 HLA-A24 或 HLA-A2 限制的抗原決定位胜肽，且能對於抗表現 UBE2T 之細胞誘導強大且專一的免應反應。

【0010】因此，本發明之一目的在於提供一種 UBE2T 衍生的胜肽，其能用於在體內、生物體外或體內誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，或對於對象投予以供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、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。較佳胜肽為 9 員胜肽及 10 員胜肽，更佳為係 9 員胜肽及 10 員胜肽且有選自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中之胺基酸序列。其中，特佳為有選自序列識別號 1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中之胺基酸序列的胜肽。

【0011】本發明也考慮具有選自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 之胺基酸序列的修飾胜肽，其有 1 個、2 或更多個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加成，只要獲得之修飾胜肽仍保留原始未修飾胜肽必要之細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力即可。於一實施例，當原始胜肽為 9 員胜肽(序列識別號：1、2、4、6、11、12、

13、15、29、30、32、36、38 及 41)，修飾胜肽的大小較佳為 9 至 40 個胺基酸的範圍，比如 9 至 20 個胺基酸的範圍，比如 9 至 15 個胺基酸的範圍。同樣，若原始胜肽為 10 員胜肽(序列識別號：17, 19、20、21、22、23、24、25、27、48、49、51、52、53、55、56 及 58)，則修飾胜肽的大小較佳為 10 至 40 個胺基酸的範圍，比如 10 至 20 個胺基酸，比如 10 至 15 個胺基酸的範圍。

【0012】本發明更包含編碼為本發明任一胜肽的單離多核苷酸。此等多核苷酸可用於誘導或製備有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力的抗原呈現細胞(APC)。如同本發明胜肽，此種抗原呈現細胞可對於對象投予以誘導抗癌症的免疫反應。

【0013】當投予一對象時，本發明之胜肽可呈現於抗原呈現細胞之表面以便誘導將分別之胜肽做為目標的細胞毒殺性 T 淋巴球。因此，本發明一目標為提供用於誘導一細胞毒殺性 T 淋巴球之試劑或組合物，此類組合物或試劑包括一或多個本發明之胜肽或一或多個編碼出此類胜肽之多核苷酸。此類試劑或組合物可用於誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。此類試劑或組合物可被用於癌症之治療及/或預防、及其轉移或其手術後復發預防。本發明所考慮之目標癌症的例子包括，但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、胃癌、瀰漫型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤、及睪丸腫瘤。

【0014】本發明更考慮藥學組合物或試劑，其包括本發明一或多個胜肽或一或多個多核苷酸，較佳為被配製來用於癌症

之治療及/或預防、及其轉移或其手術後復發預防。代替本發明胜肽或多核苷酸或除了本發明胜肽或多核苷酸外，本發明藥學試劑或組合物可包括呈現任何之本發明胜肽的抗原呈現細胞及/或外吐小體為有效成分。

【0015】本發明之胜肽或多核苷酸可被用來誘導於表面上呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之一複合物的抗原呈現細胞，例如，藉由將來自一對象之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸或將編碼出本發明胜肽的一多核苷酸引入抗原呈現細胞。此種抗原呈現細胞有能力誘導專一性地認識於細胞表面呈現標的胜肽之細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球，且可用於癌症免疫治療。因此，本發明包括誘導具細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法與藉由此方法獲得之抗原呈現細胞。

此外，本發明也包含用於誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力之抗原呈現細胞的試劑或組合物，此等試劑或組合物包括本發明之任意胜肽或多核苷酸。

【0016】本發明更進一步之一目標為提供誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，此類方法包括將 CD8 陽性 T 細胞與於其表面上呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之一複合物之抗原呈現細胞共培養的步驟，將 CD8 陽性 T 細胞與於其表面上表現 HLA 抗原與本發明胜肽之一複合物之外吐小體共培養的步驟，或引入編碼出兩者的 T 細胞受體(T cell receptor, TCR)次單元或編碼為各 T 細胞受體之次單元之多核苷酸的步驟，其中此 T 細胞受體可與本發明胜肽之複合體結合並且在細胞表面上呈現一 HLA 抗原。藉由此種方法獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球提供效用於癌

症，包括但不限於例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤之治療及/或預防。因此，本發明包括由上述方法獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0017】本發明又另一目標為提供經分離之抗原呈現細胞，其呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之一複合物於表面上。本發明更提供經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以本發明胜肽為目標。此等細胞毒殺性 T 淋巴球可定義為能夠認識(或結合於)在細胞表面上的本發明胜肽與 HLA 抗原的複合體的一類細胞毒殺性 T 淋巴球。這些抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球可被用於癌症免疫治療。

【0018】本發明又另一目標為提供於一需要之對象中誘導抗癌症之免疫反應的方法，此類方法包括投予一對象一試劑或組合物的步驟，此試劑或組合物包含擇自本發明胜肽、編碼出此類胜肽之一多核苷酸，呈現此類胜肽之抗原呈現細胞或外吐小體與可認識呈現本發明胜肽於其表面上之細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球中的至少一成分。

【0019】本發明之一態樣係關於將本發明之胜肽或包含本發明胜肽之組合物用為藥劑。

本發明的應用性擴展到任意數目的相關於或起因於 UBE2T 過度表現的疾病，其例子包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前

列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。

【0020】更具體而言，本發明提供下述事項：

[1]一種單離胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球(CTL)誘導能力，其中，該胜肽包含下述(a)或(b)之胺基酸序列：

(a) UBE2T 之免疫學上有活性之片段的胺基酸序列；

(b) UBE2T 之免疫學上有活性之片段的胺基酸序列，其中 1、2 或數個胺基酸序列被取代、刪除、插入及/或加成；

其中由此胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球對於呈現來自 UBE2T 之片段的細胞有專一性細胞毒殺活性。

[2]如[1]之單離胜肽，其中，該胜肽包含下述胺基酸序列(a)或(b)：

(a) 選自由下述序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組之胺基酸序列；

(b) 選自由下述序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組之胺基酸序列，其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加成；該經修飾之胜肽的大小為 9 至 40 個胺基酸的範圍，比如 9 至 20 個胺基酸，例如 9 至 15 個胺基酸。

[3] 如[2]之單離胜肽，其中，該胜肽係下述的寡胜肽(i)或(ii)：

(i) 有下述一或兩種特性之胜肽：

(a) 序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 之胺基酸序列自 N 末端算起的第 2 個胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸；

(b) 序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 之胺基酸序列的 C 末端胺基酸取代為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸；

(ii) 有下述一或兩種特性之胜肽：

(a) 序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之胺基酸序列自 N 末端算起的第 2 個胺基酸取代為白胺酸或甲硫胺酸；及

(b) 序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之 C 末端胺基酸取代為纈胺酸或白胺酸。

[4] 如[1]或[3]中任一項之單離胜肽，其中，該胜肽為 9 員胜肽或 10 員胜肽。

[5] 如[4]之單離胜肽，其中，該胜肽由選自於序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組中之胺基酸序列組成。

[6] 一種單離多核苷酸，係編碼為如[1]至[5]項中任一項之單離胜肽。

[7]一種供誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之組合物，其中，該組合物包含至少 1 種選自由下述構成之群組中的有效成分：

(a) 如[1]至[5]中任一項之單離胜肽；

(b) 如[6]之單離多核苷酸；

(c) 一抗原呈現細胞(APC)，其呈現如[1]至[5]中任一項之單離胜肽於其表面;及

(d) 一外吐小體，其呈現如[1]至[5]中任一項之單離胜肽於其表面。

[8]一種藥學組合物，係供治療及/或預防癌症，及/或防止其術後再復發，其中，該組合物包含至少 1 種選自由下述構成之群組中的有效成分：

(a) 如[1]至[5]中任一項之單離胜肽；

(b) 如[6]之單離多核苷酸；

(c) 一抗原呈現細胞(APC)，其呈現如[1]至[5]中任一項之單離胜肽於其表面;及

(d) 一外吐小體，其呈現如[1]至[5]中任一項之單離胜肽於其表面。

(e) 一細胞毒殺性 T 淋巴球，其能認識呈現如[1]至[5]中任一項之單離胜肽的細胞。

[9]如[8]之藥學組合物，其中，該藥學組合物係配方為對於 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2 之對象投予。

[10].一種誘導有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力之抗原呈現細胞的方法，其中，該方法包含選自於由下述構成之群組中之步驟：

(a) 使抗原呈現細胞與如[1]至[5]中任一項之單離胜肽接觸，及

(b) 將編碼為如[1]至[5]中任一項之單離胜肽的多核苷酸導入一抗原呈現細胞。

[11]一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之方法，其中，該方法包含選自於由下述構成之群組中之步驟：

(a) 共同培養 CD8 陽性 T 細胞及一抗原呈現細胞，該抗原呈現細胞在其表面上呈現 HLA 抗原與如[1]至[5]中任一項之單離胜肽的複合體；

(b) 共同培養 CD8 陽性 T 細胞及一外吐小體，該外吐小體在其表面上呈現 HLA 抗原與如[1]至[5]中任一項之單離胜肽的複合體；及

(c) 對於 CD8 陽性 T 細胞導入編碼為兩個 T 細胞受體(TCR)次單元之一多核苷酸或編碼為各 TCR 次單元之多個多核苷酸，其中由該次單元形成的 TCR 能結合於在細胞表面上的如[1]至[5]中任一項之單離胜肽與 HLA 抗原之複合體。

[12]一種單離抗原呈現細胞，其在表面上呈現 HLA 抗原與如[1]至[5]中任一項之單離胜肽之複合體。

[13]如[12]之抗原呈現細胞，其係由如[10]之誘導有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力之抗原呈現細胞的方法所誘導。

[14]一種單離細胞毒殺性 T 淋巴球，其標靶於與如[1]至[5]中任一項之單離胜肽。

[15]如[14]之細胞毒殺性 T 淋巴球，其係由如[11]之誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之方法所誘導。

[16]一種誘導對象中抗癌之免疫反應的方法，其中，該方法包含對於對象投予包含如[1]至[5]中任一項之單離胜肽、或編碼為該胜肽之多核苷酸的組合物的步驟。

[17]一種抗體或其在免疫學上有活性的片段，係對抗如[1]

至[5]中任一項之單離胜肽。

[18]一種載體，包含編碼為如[1]至[5]中任一項之單離胜肽的核苷酸序列。較佳為，此載體適應為表現此胜肽(稱為表現載體)，例如該編碼核苷酸序列係插入於載體中啟動子的下游，並以可操作地連結於該啟動子序列。用語"可操作地連結"意指該核苷酸序列連結於該啟動子序列(調控序列)，使得允許在體外或已導入該載體之宿主細胞內表現該核苷酸序列。

[19] 一種宿主細胞，係經如[18]之載體轉形或轉染。

[20] 一種診斷套組，包含如[1]至[5]中任一項之單離胜肽、如[6]之單離多核苷酸，或如[17]之抗體或其在免疫學上有活性的片段。

[21] 一種篩選有能力誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之胜肽的方法，該細胞毒殺性 T 淋巴球對於呈現來自 UBE2T 之片段的細胞有專一性的細胞毒殺活性，其中，該方法包含下述步驟：

(i) 提供一候選序列，此序列係由對於一原始胺基酸序列施以取代、刪除、插入及或加成 1、2 或數個胺基酸殘基以修飾而得之胺基酸序列組成，其中，該原始胺基酸序列選自於由序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組；

(ii) 選擇一候選序列，此序列與從 UBE2T 以外的任意已知人類基因產物而來的胜肽沒有實質上顯著的同源性(或序列相同性)；

(iii) 使步驟(ii)選出的候選序列組成的胜肽與一抗原呈現

細胞接觸；

(iv) 使步驟(iii)之此抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞接觸；及

(v) 鑑別此胜肽其細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力是相同或高於由原始胺基酸序列組成的胜肽。

[22] 一種藥學組合物，包含如[1]至[5]中任一項之單離胜肽。

[23] 一種如[1]至[5]中任一項之單離胜肽之用途，係用於作為藥劑。

[24] 一種如[6]之多核苷酸或如[18]之載體之用途，係用於作為藥劑。

【0021】除了上述以外，當下述詳細說明被閱讀並結合併隨之圖式與實施例，本發明之目的與特徵會變得更完全地明白。然而應瞭解上面之本發明內容與下述之詳細說明兩者為示範之實施例，並不限制本發明或本發明其他替代實施例。

【0022】特別是，當關於一些特定實施例於此敘述之本發明，可以瞭解的是，敘述為本發明之說明，且並不建構為本發明之限制。各種修飾與應用可被熟悉此技藝人士想到，而無背離本發明精神與範圍，如所附申請專利範圍所述。同樣地，本發明之其他目的、特徵、好處與優點自此內容與下述之特定實施例，為清楚的，且對於熟悉此技藝人士而言可立即明白。此種目的、特徵、好處與優點自上述結合併隨實施例、資料、圖式與所有要被自其單獨或隨著考慮引入於此之參考文獻而描述的所有合理推論為清楚的。

【圖式簡單說明】

【0023】對於該技術領域中具有通常知識者而言，本發明之各種態樣與應用將在考量下述的圖式簡單敘述及本發明詳細敘述及其較佳實施例而顯明。

圖 1 由一系列照片(a)-(r)所組成，其顯示在以源自 UBE2T 之胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球上之干擾素(IFN)- γ 酵素結合免疫斑點分析(ELISPOT)的結果。分別與控制組相較，於以 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號：1)刺激之井號碼 #8 (a)、以 UBE2T-A24-9-45 (序列識別號：2)刺激之井號碼 #1 (b)、以 UBE2T-A24-9-133 (序列識別號：4)刺激之井號碼 #6 (c)、以 UBE2T-A24-9-138 (序列識別號：6)刺激之井號碼 #6 (d)、以 UBE2T-A24-9-43 (序列識別號：11)刺激之井號碼 #4 (e)、以 UBE2T-A24-9-106 (序列識別號：12)刺激之井號碼 #2 (f)、以 UBE2T-A24-9-3 (序列識別號：13)刺激之井號碼 #6 (g)、以 UBE2T-A24-9-105 (序列識別號：15)刺激之井號碼 #3 (h)、以 UBE2T-A24-10-130 (序列識別號：17)刺激之井號碼 #2 (i)、以 UBE2T-A24-10-131 (序列識別號：19) 刺激之井號碼 #1 (j), 以 UBE2T-A24-10-133 (序列識別號：20)刺激之井號碼 #3 (k)、以 UBE2T-A24-10-99 (序列識別號：21) 刺激之井號碼 #6 (l)、以 UBE2T-A24-10-154 (序列識別號：22) 刺激之井號碼 #7 (m)、以 UBE2T-A24-10-105 (序列識別號：23)刺激之井號碼 #8 (n)、以 UBE2T-A24-10-115 (序列識別號：24)刺激之井號碼 #1 (o)、以 UBE2T-A24-10-177 (序列識別號：25) 刺激之井號碼 #4 (p)，及以 UBE2T-A24-10-44 (序列識別號：27)刺激之井號碼 #7

(q)中的細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強的 IFN- γ 產生。於這些照片之井上的正方形指出來自對應之井的細胞被擴張來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。相對的，做為負資料的典型，從以 UBE2T-A24-9-124 (序列識別號: 3) (r)刺激的細胞毒殺性 T 淋巴球並未觀察到專一的 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以合適之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

圖 2 由一系列照片(a)-(o)所組成，其顯示在以源自 UBE2T 之胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球上之干擾素(IFN)- γ 酵素結合免疫斑點分析(ELISPOT)的結果。分別與控制組相較，於以 UBE2T-A02-9-107 (序列識別號: 29)刺激之井號碼 #4 (a)、以 UBE2T-A02-9-30 (序列識別號: 30)刺激之井號碼 #5 (b)、以 UBE2T-A02-9-106 (序列識別號: 32)刺激之井號碼 #7 (c)、以 UBE2T-A02-9-49 (序列識別號: 36)刺激之井號碼 #5 (d)、以 UBE2T-A02-9-13 (序列識別號: 38) 刺激之井號碼 #3 (e)、以 UBE2T-A02-9-132 (序列識別號: 41)刺激之井號碼 #4 (f)、以 UBE2T-A02-10-70 (序列識別號: 48)刺激之井號碼 #6 (g)、以 UBE2T-A02-10-6 (序列識別號: 49)刺激之井號碼 #7 (h)、以 UBE2T-A02-10-106 (序列識別號: 51)刺激之井號碼 #8 (i)、以 UBE2T-A02-10-102 (序列識別號: 52)刺激之井號碼 #2 (j)、以 UBE2T-A02-10-30 (序列識別號: 53)刺激之井號碼 #1 (k)、以 UBE2T-A02-10-101 (序列識別號: 55)刺激之井號碼 #8 (l)、以 UBE2T-A02-10-29 (序列識別號: 56)刺激之井號碼 #5 (m)，及以 UBE2T-A02-10-38 (序列識別號: 58) 刺激之井號碼 #3 (n)中

的細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強的 IFN- γ 產生。於這些照片之井上的正方形指出來自對應之井的細胞被擴張來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。相對的，做為負資料的典型，從以 UBE2T-A02-9-161 (序列識別號: 28) (o) 刺激的細胞毒殺性 T 淋巴球並未觀察到專一的 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

圖 3 由一系列線圖(a)-(d)所組成，顯示以 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號: 1) (a)、 UBE2T-A24-9-45 (序列識別號: 2) (b)、 UBE2T-A24-9-3 (序列識別號: 13) (c) 及 UBE2T-A24-10-44 (序列識別號: 27) (d) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的 IFN- γ 產生。細胞毒殺性 T 淋巴球產生之 IFN- γ 的量藉由 IFN- γ 酵素連結免疫吸附分析(ELISA)來測量。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強而有力之 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。R/S 比指出反應細胞(responder cell) (細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株) 與刺激細胞(stimulator cell) 之數目的比。

圖 4 由一系列線圖(a)-(c)所組成，顯示藉由來自以 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號: 1) (a)、 UBE2T-A24-9-45 (序列識別號: 2) (b) 及 UBE2T-A24-9-3 (序列識別號: 13) (c) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株之限制稀釋所建立的細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體的 IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉

由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體顯示強而有力之 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。R/S 比指出反應細胞（細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體）與刺激細胞之數目的比。

圖 5 由一系列線圖 (a)-(e) 所組成，顯示以 UBE2T-A02-9-107 (序列識別號：29) (a)、UBE2T-A02-9-13 (序列識別號：38) (b)、UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48) (c)、UBE2T-A02-10-102 (序列識別號：52) (d) 及 UBE2T-A02-10-101 (序列識別號：55) (e) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的 IFN- γ 產生。細胞毒殺性 T 淋巴球產生之 IFN- γ 的量藉由 IFN- γ 酵素連結免疫吸附分析(ELISA)來測量。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強而有力之 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。R/S 比指出反應細胞（細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株）與刺激細胞之數目的比。

圖 6 由一系列線圖 (a)-(e) 所組成，顯示以 UBE2T-A02-9-107 (序列識別號：29) (a)、UBE2T-A02-9-13 (序列識別號：38) (b)、UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48) (c)、UBE2T-A02-10-102 (序列識別號：52) (d) 及 UBE2T-A02-10-101 (序列識別號：55) (e) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體的 IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體顯示強而有力

之 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。R/S 比指出反應細胞（細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體）與刺激細胞之數目的比。

圖 7 為一線圖，其顯示抗表現 UBE2T 及 HLA-A*2402 之目標細胞之專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性。將以 HLA-A*2402 或全長之 UBE2T 基因轉染之 COS7 細胞製備為控制組。以 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號：1) 建立之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體顯示抗以 UBE2T 與 HLA-A*2402 兩者轉染之 COS7 細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（黑菱形）。另一方面，沒有偵測到對抗表現 HLA-A*2402（三角形）或 UBE2T（圓形）之任一的目標細胞的顯著專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。

圖 8 為一線圖，其顯示抗表現 UBE2T 及 HLA-A*0201 之目標細胞之專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性。將以 HLA-A*0201 或全長之 UBE2T 基因轉染之 COS7 細胞製備為控制組。以 UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48) 建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示抗以 UBE2T 與 HLA-A*0201 兩者轉染之 COS7 細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（黑菱形）。另一方面，沒有偵測到對抗表現 HLA-A*0201（三角形）或 UBE2T（圓形）之任一的目標細胞的顯著專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。

【實施方式】

【0024】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實施例，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實施例，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。

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。

【0025】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、方法與實施例僅為解釋說明意指為限制。

【0026】I. 定義

除非特別指明，此處使用的「一」及「該」意指「至少一」。

與物質(例如，胜肽、抗體、多核苷酸等)關連使用的用語「經單離」及「經純化」，係指該物質實質上不含有可能會包括在天然來源的至少一種物質。因此，一經單離或經純化的胜肽係指實質上不含細胞材料例如碳水化合物、脂質或其他衍生自細胞該胜肽所從衍生的組織來源的污染蛋白質的胜肽，或當係化學合成時實質上不含化學前驅體或其他化學物質。用語「實質上不含細胞材料」，包括製備一胜肽，其中該胜肽係從其單離細胞的細胞成分分離，或重組產生。因此，實質上不含細胞材料的胜肽，包括多胜肽之製備物其具有少於約 30%、20%、10%或 5% (以乾重計)的異質蛋白質(在此也稱為「污染

蛋白質」)。當該胜肽係以重組產生時，其亦較佳為實質上不含培養基，其包括胜肽之製備物且具有該胜肽製備物的少於約 20%、10%、或 5% 體積的培養基。當該胜肽係以化學合成生產時，較佳為實質上不含化學前驅體或其他化學物質，其包括胜肽之製備物且涉及合成該胜肽的化學前驅體或其他化學物質為該胜肽製備物的少於約 30%、20%、10%、5% (以乾重計)。含有經單離或經純化的胜肽的特定胜肽，例如可藉由將該蛋白質製備物進行十二烷基硫酸鈉(SDS)聚丙烯醯胺凝膠電泳並將該凝膠以考馬西亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色等出現單一譜帶而顯示。於一較佳實施例，本發明之胜肽及多核苷酸係經單離或經純化。

【0027】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，其中一個或更多胺基酸殘基可為經修飾的殘基，或非天然發生的殘基，例如對應的天然發生的胺基酸及對應的天然發生的胺基酸聚合物的人造化學擬似物。

【0028】此處使用的用語「寡胜肽」係指一胜肽，其由 20 個或更少胺基酸殘基組成，一般為 15 個胺基酸殘基或更少。此處使用的用語「9 員胜肽(nonapeptide)」係指由 9 個胺基酸殘基組成的胜肽，用語「10 員胜肽(nonapeptide)」係指由 10 個胺基酸殘基組成的胜肽。

【0029】用語「胺基酸」在此意指天然發生的及合成的胺基酸，及胺基酸類似物及與天然發生的胺基酸的作用類似的胺基酸擬似物。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(例如羥基脯胺酸、 γ -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 α 碳、羧基、胺基及 R 基)但是具有一個以上經過修飾的 R 基或經過修飾的骨架(例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸、亞砷、甲硫胺酸甲基銻鹽)。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。

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指明。

【0030】用語「多核苷酸」、「寡核苷酸」及「核酸」在此可互換使用，且如無特別指明，係類似於胺基酸以其通用的單字母碼所指明者。

【0031】用語「式劑」、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「藥學上的」(如於「藥學試劑」或「藥學組合物」)，係意欲包含含該有效成分及成為擔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「藥學試劑」及「藥學組合物」意指藉由混合本發明化合物或物質及藥學上或生理上可接受擔體而製作的任意組合物。

【0032】用詞「有效成分」意指在組合物當中有生物學活性或生理活性的物質。尤其，於一藥學組合物的上下文中，「有

效成分」係指顯示目標的藥理作用的物質。例如，當藥學試劑或組合物使用在癌症治療或預防時，組合物中的有效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，有效成分的間接作用係誘導能認識或殺死癌細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球。在配方前，「有效成分」也稱為「散裝物質(bulk)」、「藥物物質」或「技術品」。

【0033】此處使用之用語「藥學上可接受之擔體」或「生理上可接受之擔體」，係指藥學上或生理上可接受之材料、組合物、物質、化合物或載體，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。

【0034】於一些實施例，本發明之藥學試劑或組合物作為疫苗特別有用。於本發明上下文，用語「疫苗」(也稱為「免疫組合物」)係指當對於動物體接種後，有改善、增強及/或誘導抗腫瘤免疫性之功能的藥劑或組合物。

【0035】若未另外定義，用語「癌症」代表過度表現 UBE2T 基因的癌或腫瘤，包括但不限於：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。

【0036】除非另外定義，用語「細胞毒殺性 T 淋巴球」、「細胞毒殺性 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，其能認識非己細胞(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。

【0037】除非另外定義，用語「HLA-A24」在此意指 HLA-A24 亞型的型，亞型例如包括但不限於 HLA-A*2401、HLA-A*2402、HLA-A*2403、HLA-A*2404、HLA-A*2407、HLA-A*2408、HLA-A*2420、HLA-A*2425 及 HLA-A*248。

【0038】除非另外定義，用語「HLA-A2」在此意指亞型，亞型例如包括但不限於 HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203、HLA-A*0204、HLA-A*0205、HLA-A*0206、HLA-A*0207、HLA-A*0210、HLA-A*0211、HLA-A*0213、HLA-A*0216、HLA-A*0218、HLA-A*0219、HLA-A*0228 及 HLA-A*0250。

【0039】除非另有定義，在此使用之用語「套組」，係參照試劑及其他材料的組合來使用。在此體認到此套組可包括微陣列、晶片、標記等。此用語「套組」不意欲限制在特定的試劑及/或材料的組合。

【0040】當在對象(subject)或病患的上下文使用時，詞語「對象的(或病患的) HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2」，係指該對象或病患帶有同型合子或異型合子的 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原基因，且 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原在此對象或病患的細胞中表現作為 HLA 抗原。

【0041】當本發明的方法與組合物在上下文中指出「治療」癌症有用，若其造成臨床上的益處，例如癌症的大小減小、流程度或轉移潛力減低、存活期延長、術後復發受抑制等，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。

【0042】若本發明的方法與組合物在上下文中指出「防止」及「預防」癌症有用，此等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負擔。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，其目標係減輕特定病症的嚴重度，例如減少腫瘤的增殖及轉移。

【0043】本發明上下文中，治療及/或預防癌症及/或防止其術後再發，包括下述任何步驟：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對象的預後，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。

【0044】本發明上下文中，用語「抗體」意指專一性地對於特定蛋白質或其胜肽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、雙專一性抗體、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，且具體而言含蓋完整的單株抗體、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，該抗體片段只要能顯現所望的生物學活性即可。「抗體」代表所有類型者(例如 IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM)。

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。

【0045】 II. 胜肽

以下詳述之本發明之胜肽，可指稱為「UBE2T 胜肽」或「UBE2T 多胜肽」。

【0046】爲了證明衍生自 UBE2T 之胜肽作用如細胞毒殺性 T 淋巴球所認識之抗原，分析衍生自 UBE2T 之胜肽(序列識別號: 65)以確定是否其爲由一般遇到的 HLA 對偶基因 HLA-A24 或 HLA-A2 所限制之抗原決定位(antigen epitopes) (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)。

【0047】衍生自 UBE2T 之混雜的 HLA-A24 結合胜肽的候選物，基於其對 HLA-A24 之結合親和力確認。鑑別出下述的候選胜肽：序列識別號：1、2 及 4 至 27。

在藉由脈衝(載有)這些胜肽之樹突細胞(dendritic 細胞, DC)以體外刺激 T 細胞後，使用下列各個胜肽成功建立細胞毒殺性 T 淋巴球：

UBE2T-A24-9-60 (序列識別號：1)、UBE2T-A24-9-45 (序

列識別號：2)、UBE2T-A24-9-133 (序列識別號：4)、
 UBE2T-A24-9-138 (序列識別號：6)、UBE2T-A24-9-43 (序列識別號：11)、
 UBE2T-A24-9-106 (序列識別號：12)、
 UBE2T-A24-9-3 (序列識別號：13)、UBE2T-A24-9-105 (序列識別號：15)、
 UBE2T-A24-10-130 (序列識別號：17)、
 UBE2T-A24-10-131 (序列識別號：19)、UBE2T-A24-10-133 (序列識別號：20)、
 UBE2T-A24-10-99 (序列識別號：21)、
 UBE2T-A24-10-154 (序列識別號：22)、UBE2T-A24-10-105 (序列識別號：23)、
 UBE2T-A24-10-115 (序列識別號：24)、
 UBE2T-A24-10-177 (序列識別號：25)及 UBE2T-A24-10-44 (序列識別號：27)。

【0048】衍生自 UBE2T 之混雜的 HLA-A2 結合胜肽的候選物，基於其對 HLA-A2 之結合親和力確認。鑑別出下述的候選胜肽：序列識別號：29 至 63。

在藉由脈衝(載有)這些胜肽之樹突細胞(dendritic 細胞，DC)以體外刺激 T 細胞後，使用下列各個胜肽成功建立細胞毒殺性 T 淋巴球：

UBE2T-A02-9-107 (序列識別號：29)、UBE2T-A02-9-30 (序列識別號：30)、
 UBE2T-A02-9-106 (序列識別號：32)、
 UBE2T-A02-9-49 (序列識別號：36)、UBE2T-A02-9-13 (序列識別號：38)、
 UBE2T-A02-9-132 (序列識別號：41)、
 UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48)、UBE2T-A02-10-6 (序列識別號：49)、
 UBE2T-A02-10-106 (序列識別號：51)、
 UBE2T-A02-10-102 (序列識別號：52)、UBE2T-A02-10-30 (序

列識別號：53)、UBE2T-A02-10-101 (序列識別號：55)、
UBE2T-A02-10-29 (序列識別號：56)及 UBE2T-A02-10-38 (序
列識別號：58)。

【0049】此等被建立的細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強而專一
之抗經分別之胜肽脈衝之目標細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球活
性。這些結果證明 UBE2T 爲一由細胞毒殺性 T 淋巴球所認識
之抗原，且這些胜肽爲由 HLA-A24 或 HLA-A2 限制之 UBE2T
抗原決定位胜肽。

【0050】因此，於較佳實施例，具有下述序列識別號：1、
2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、
25 或 27 之胺基酸序列的胜肽可用於在誘導前已鑑別有
HLA-A24 之對象中誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。同樣地，具有
下述序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、
53、55、56 或 58 之胺基酸序列的胜肽可用於在誘導前已鑑別
有 HLA-A2 之對象中誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0051】由於 UBE2T 基因於包括，例如膀胱癌、乳癌、子
宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰
散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列
腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤之那些的癌症細胞與組
織中被過度表現，且不在大部分正常器官中被表現，所以其表
示一良好之免疫治療標的。因此，本發明提供對應於來自
UBE2T 之細胞毒殺性 T 淋巴球認識抗原決定位的 9 員胜肽(胜
肽由九個胺基酸殘基所組成)與 10 員胜肽(胜肽由十個胺基
酸殘基所組成)。或者本發明提供能誘導細胞毒殺性 T 淋巴球

的單離胜肽，此胜肽由 UBE2T 之免疫學上為有活性的片段構成。於一些實施例，本發明提供包括選自於下述序列識別號之胺基酸序列的胜肽：序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58。於較佳實施例，本發明之胜肽係 9 員胜肽或 10 員胜肽，包括選自於下述序列識別號之胺基酸序列，序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58。本發明胜肽之較佳例包括由下述序列識別號選出之胺基酸序列組成的胜肽，序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58。

【0052】 本發明之胜肽，特別是 9 員胜肽及 10 員胜肽可選擇性地有額外的胺基酸殘基位在側面，條件是獲得之胜肽保留細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力即可。此特別的額外的胺基酸殘基可由任何種類的胺基酸構成，條件是不會損害原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力即可。因此本發明包含有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力的胜肽，特別是來自 UBE2T 之胜肽(例如有下述序列識別號之胺基酸序列的胜肽，序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58)。此等胜肽例如少於約 40 個胺基酸，常少於約 20 胺基酸，通常少於約 15 個胺基酸。更具體而言，此胜肽的大小

較佳在 10 至 40 個胺基酸的範圍，例如 10 至 20 個胺基酸的範圍，例如 10 至 15 個胺基酸的範圍。

【0053】一般已知於一胜肽中一、二或數個胺基酸之修飾，不影響胜肽的功能，且在一些例子中，甚至增強原始蛋白質所需之功能。事實上，已知經修飾之胜肽（即，與一原始參考序列相較，由於其中 1、2 或數個胺基酸殘基被修飾（即，取代、加入、刪除及/或插入）之胺基酸序列所組成的胜肽）維持原始胜肽的生物活性(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。因此，於一實施例中，本發明胜肽具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與於其中加入、刪除、插入及/或取代一、二或甚至更多個胺基酸之擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中的胺基酸序列兩者。換言之，本發明之胜肽具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與於其中取代、刪除、插入及/或加入一、二或甚至更多個胺基酸之擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 之胺基酸序列兩者，此經修飾之胜肽維持原始胜肽細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

【0054】熟悉此技藝人士會了解改變一單一胺基酸或整個胺基酸序列之一小百分比的個別修飾（即，刪除、插入、加入

及/或取代)至一胺基酸序列傾向產生保存原始胺基酸支鏈的特性。因此它們常被意指為“保守取代(conservative substitution)”或“保守修飾(conservative modification)”，其中一蛋白質之改變導致一具有同功於原始蛋白質的經修飾蛋白質。提供功能相似胺基酸之保守取代表已為本技術領域所熟知。保守所需之胺基酸支鏈特徵包括，例如為疏水胺基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水胺基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)與具有下列共同官能基或特徵之支鏈：一脂肪族支鏈(G, A, V, L, I, P)；一含羥基支鏈(S, T, Y)；含硫原子支鏈(C, M)；含羧酸與胺基支鏈(D, N, E, Q)；含鹼支鏈(R, K, H)；以及含芳香族支鏈(H, F, Y, W)。此外，下列八個族群各包含於本技術領域中可接受為彼此保守取代之胺基酸：

- 1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；
- 2) 天門冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；
- 3) 天門冬醯胺酸(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)；以及
- 8) 半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M) (參見，例如Creighton, Proteins 1984)。

【0055】此種經保守修飾胜肽也被視為本發明之胜肽。然而，本發明之胜肽並不限於此，且可包括非保守修飾，只要經修飾之胜肽維持原始未修飾胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發

能力。更進一步而言，經修飾之胜肽應不排除源自 UBE2T 之多形變體 (polymorphic variant)、種間同質體 (interspecies homologues) 與對偶基因 (alleles) 的可誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的胜肽。

【0056】 胺基酸殘基可被插入、取代、刪除/及或加入至本發明之胜肽，或者胺基酸殘基可被從其刪除以達到一較高之結合親和力。爲了維持必須之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，較佳爲只修飾（即，刪除、插入、加入及/或取代）一小數目（例如 1、2 或數個）或小百分比之胺基酸。此處用語“數個”指 5 或更少個胺基酸，例如 4 或 3 個或更少。被修飾之胺基酸之百分比較佳爲 20% 或更少，更佳爲 15% 或更少，甚至更佳爲，10% 或更少，例如 1 至 5%。

【0057】 當使用於免疫治療之背景中時，本發明胜肽應以與 HLA 抗原之複合物的形式表現於一細胞或外吐小體之表面上。因此，較佳爲選擇胜肽，其不僅誘導細胞毒殺性 T 淋巴球且也擁有對 HLA 抗原之高結合親合力。爲達成此目的，胜肽可藉由胺基酸殘基之取代、插入、刪除及/或加入來修飾以產生一具有經改善之結合親合力的經修飾胜肽。除了自然表現之胜肽外，由於藉由結合至 HLA 抗原來表現之胜肽序列的規則 (Kubo RT et al., J Immunol 1994, 152: 3913-24; Rammensee HG et al., Immunogenetics 1995, 41: 178-228; Kondo et al., J Immunol 1994, 155: 4307-12; Falk K, et al., Nature. 1991 May 23;351(6324):290-6.) 爲已知，可將基於此規則之修飾引入本發明之致免疫性胜肽。

【0058】例如，具有高 HLA-A24 結合親和力之胜肽傾向具有以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸取代之來自 N 端的第二個胺基酸。同樣地，於其中 C 端胺基酸被以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸取代的胜肽傾向具有高的 HLA-A24 結合親和力。所以，值得嚮往的是，以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸取代來自 N 端之第二個胺基酸，及/或以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸取代於 C 端之胺基酸，以爲了增加 HLA-A24 結合親和力。因此，具有擇自序列識別號：序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 及 27 中之胺基酸序列的胜肽，於其中來自序列識別號之胺基酸序列之 N 端之第二個胺基酸被以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸取代，及/或於其中序列識別號之胺基酸序列之於 C 端之胺基酸被以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸取代，也被包含於本發明中。又，本發明包括胜肽，其包含一胺基酸序列，於其中一、二或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加入於擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 及 27 之中之胺基酸序列，此類胜肽具有下列(a) 來自 N 端的第二個胺基酸爲苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸與(b) C 端之胺基酸爲苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸之特徵之任一或兩者。在較佳實施例中，本發明胜肽包括一胺基酸序列，於其中，在擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 及 27 中之胺基酸序列中，來自之

N 端之第二個胺基酸被以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸取代，及/或於 C 端之胺基酸被以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸取代。

【0059】同樣地，顯示高 HLA-A2 結合親和力之胜肽傾向具有以白胺酸或甲硫胺酸取代之來自 N 端的第二個胺基酸，及/或以纈胺酸與白胺酸取代 C 端胺基酸。值得嚮往的是，以白胺酸或甲硫胺酸取代來自 N 端之第二個胺基酸，及/或以纈胺酸與白胺酸取代於 C 端之胺基酸，以爲了增加 HLA-A2 結合親和力。因此，具有擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中之胺基酸序列的胜肽，於其中來自序列識別號之胺基酸序列之 N 端之第二個胺基酸被以白胺酸或甲硫胺酸取代，及/或於其中序列識別號之胺基酸序列之於 C 端之胺基酸被以纈胺酸與白胺酸取代，也被包含於本發明中。又，本發明包括胜肽，其包含一胺基酸序列，於其中一、二或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加入於擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中胺基酸序列，此類胜肽具有下列(a) 來自 N 端的第二個胺基酸爲白胺酸或甲硫胺酸與(b) C 端之胺基酸爲纈胺酸與白胺酸之特徵之任一或兩者。在較佳實施例中，本發明胜肽包括一胺基酸序列，於其中，在擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中之胺基酸序列中，來自之 N 端之第二個胺基酸被以爲白胺酸或甲硫胺酸取代，及/或於 C 端之胺基酸被以纈胺酸與白胺酸取代。

【0060】可將取代引入不止於末端胺基酸，也可於胜肽之潛在 T 細胞受體 (TCR) 認識的位置。一些研究已證實一具有胺基酸取代之胜肽可等於或比原來更好，例如 CAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎，Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ 或 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, Hoffmann TK et al. J Immunol. (2002);168(3):1338-47., Dionne SO et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 and Dionne SO et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

【0061】本發明也考慮一、二個或數個胺基酸的加入也可加入至本發明胜肽之 N 及/或 C 端。此種具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之經修飾的胜肽也包括於本發明中。

【0062】例如，本發明提供在長度小於 15、14、13、12、11 或 10 個胺基酸的一經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i) 一胺基酸序列，其中 1、2 或數個胺基酸被修飾於擇自由序列識別號：1、2、4、6、11、12、13 及 15 所組成之群組的胺基酸序列中，

(ii) 如 (i) 之胺基酸序列，其中該胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列識別號之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸與色胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 此序列識別號之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸與甲硫胺酸所組成之群組的

一胺基酸。

(iii) 一胺基酸序列，其中1、2或數個胺基酸被修飾於擇自由序列識別號：29、30、32、36、38及41所組成之群組的胺基酸序列中，

(iv) 如(iii)之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列識別號之N端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由白胺酸與甲硫胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 此序列識別號之C端胺基酸為或被修飾為擇自由纈胺酸與白胺酸所組成之群組的一胺基酸。

【0063】此外，本發明也提供在長度小於 15、14、13、12或 11 個胺基酸的一經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i') 一胺基酸序列，其中1、2或數個胺基酸被修飾於擇自由序列識別號：17、19、20、21、22、23、24、25及27所組成之群組的胺基酸序列中，

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

(a) 來自此序列識別號之N端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸與色胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 此序列識別號之C端胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸與甲硫胺酸所組成之群組的一胺基酸。

(iii') 一胺基酸序列，其中1、2或數個胺基酸被修飾於擇自由序列識別號：48、49、51、52、53、55、56及58所組成之群組的胺基酸序列中，

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

(a) 來自此序列識別號之N端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由白胺酸與甲硫胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 此序列識別號之C端胺基酸為或被修飾為擇自由纈胺酸與白胺酸所組成之群組的一胺基酸。

於此等胜肽接觸或導入於抗原呈現細胞時，此等胜肽在抗原呈現細胞中被處理以呈現選自由(i)至(iv)及(i')至(iv')構成之群組中之胜肽於其上。

【0064】然而，當胜肽序列與一具有不同功能之內生或外生蛋白質之胺基酸序列的一部份相同時，可能誘導負面副作用，例如自體免疫疾病及/或抗特定物質之過敏症候群。因此，可值得嚮往的是，首先可使用可得之資料庫執行同源搜尋以避免胜肽之序列符合其他蛋白質之胺基酸序列的情況。當相較於目標胜肽，於自然沒有相同於或具有1或2個胺基酸不同的胜肽存在的同源搜尋變得清楚時，為了增加其與HLA抗原之結合親和力，及/或增加其細胞毒殺性T淋巴球誘發能力而不具副作用之任何危險，可修飾目標胺基酸。

【0065】雖然如上述之具有對HLA抗原高結合親和力的胜肽被預期為高效能，但根據作為指示之高親和表現而被選擇之候選胜肽，更進一步被測試細胞毒殺性T淋巴球誘發能力的表

現。此處措辭“細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”意指當表現於抗原呈現細胞上時，胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的能力。此外，“細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”包括胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球活化、細胞毒殺性 T 淋巴球增殖、促進藉由細胞毒殺性 T 淋巴球之目標細胞溶解與增加藉由細胞毒殺性 T 淋巴球之 IFN- γ 產生的能力。

【0066】藉由誘導攜帶人類 MHC 抗原之抗原呈現細胞（例如 B-淋巴球、巨噬細胞與樹突細胞）或更專一地來自人類周邊血液單核細胞之樹突細胞，並在以刺激胜肽之抗原呈現細胞刺激之後，將抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞混合以誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且之後測量由抗目標細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球產生並釋放之 IFN- γ 可達成細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的確定。如此反應系統，可使用已被產生來表現人類 HLA 之抗原基因轉殖動物（例如，於 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auyeung C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 , 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response 中的描述）。或者可以 ^{51}Cr 放射標示目標細胞，且可從自目標細胞釋放出的放射活性計算細胞毒殺性 T 淋巴球之細胞毒殺活性。或者，細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力可在攜帶經固定之胜肽之抗原呈現細胞存在下，藉由測量由細胞毒殺性 T 淋巴球產生並釋放的 IFN- γ ，並使用抗 IFN- γ 單株抗體來使於培養基上之抑制區為可見來評估。

【0067】除了上述修飾之外，本發明胜肽也可連接其他胜肽，只要所產生之連結胜肽維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，且更佳為也維持必不可少之 HLA 結合能力。適合之“其他”胜肽的例子包括：本發明胜肽或來自其他腫瘤相關抗原之細胞毒殺性 T 淋巴球誘導胜肽。本發明胜肽可直接或間接經由一連結器連結“其他”胜肽。適合之胜肽內連結器為被本技術領域所熟知，且包括，例如 AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK (R. P. M. Suttmüller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315)或 K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715)。

【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(或編碼為該多胞型的核酸)，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

試細胞毒殺性 T 淋巴球的識別性，並測試在增加免疫反應的效果。

【0070】本發明之胜肽可進一步連結於其他適當的物質，只要其保留原始胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力即可。此種適當物質可包括：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。此等種類修飾可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】例如爲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；此概念也可採用於該多胜肽。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、刪除、插入或加成一、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。例如該方法包括下述步驟：

a: 取代、刪除、插入或加成本發明之胜肽的至少一個胺基酸殘基

b: 決定於步驟 a 中修飾的該胜肽的活性

c: 篩選或選擇具有比起原始胜肽具有相同或更高活性的

胜肽。

分析之胜肽活性宜為細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力。

【0073】於較佳實施例中，本發明提供一種篩選具有誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之能力的胜肽的方法，該細胞毒殺性 T 淋巴球具有抗呈現源自 UBE2T 之一片段的細胞的專一細胞毒性，其中該方法包括下列步驟：

(i) 提供一候選序列，其由藉由取代、刪除、插入及/或加入一、二或數個胺基酸至一原始胺基酸序列來修飾的一胺基酸序列所組成，其中該原始胺基酸序列係擇自由序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56及58所組成之群組；

(ii) 選擇一候選序列，其除了UBE2T不與源自任何已知之人類基因產物具有實質顯著的同源性(或序列相同一性)；

(iii) 將由於步驟(ii)中所選擇之該候選序列所組成的一胜肽與一抗原呈現細胞接觸；

(iv) 將步驟(iii)之抗原呈現細胞與一CD8陽性T細胞接觸；以及

(v) 鑑定出其細胞毒殺性T淋巴球誘發能力相同或高於由該原始胺基酸序列所組成之一胜肽的胜肽。

【0074】 III. 製備 UBE2T 胜肽

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，或製成包括兩個或更多胜肽的較長的多胜肽。該胜肽可

單離成亦即經精製或單離成實質上不含其他天然發生的宿主蛋白質及其片段，或其他任意的化學物質。

【0075】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。其他可使用的說明性的修飾，包括引入 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。

【0076】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 (in Japanese), Maruzen Co., 1975;

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

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

(vi) WO99/67288; and

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

【0077】或者，該胜肽可採用任何已知用於生產胜肽的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)。例如先製備底護有編碼為可表現形式(例如對應於起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，並轉形到適當的宿主細胞中。本發明也提供此種載體及宿主細胞。然後將該宿主細胞培養以生產關注的胜肽。該胜肽也可採用體外轉譯系統於體外生產。

【0078】 IV. 多核苷酸

本發明提供多核苷酸，其編碼為前述本發明胜肽當中任意者。包括從天然發生的 *UBE2T* 基因(例如，序列識別號：64(GenBank 存取號 NM_014176)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」係指編碼為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為任意給定的蛋白質。比如，密碼子 GCA、GCC、GCG 及 GCU 都編碼為胺基酸丙胺酸。因此，當密碼子在每個位置指明丙胺酸時，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為一胜肽的核酸，也敘述所有該核酸的可能的靜默變異。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。因此編碼為一胜肽的核酸的各靜默變異係暗示敘述在各揭露的序列中。

【0079】 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 分子係適當的由鹼例如天然發生的鹼 A、T、C 及 G 構成，在 RNA 中 T 係置換為 U。該技術領域中具有通常知識者將體認非天然發生的鹼也會包

括在多核苷酸中。

【0080】本發明之多核苷酸可編碼為有或沒有中介胺基酸序列的多種本發明之胜肽。例如，該中介胺基酸序列可提供該多核苷酸或該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對於編碼為本發明之胜肽的編碼序列的任何額外的序列。例如該多核苷酸可為一重組多核苷酸，其包括對表現該胜肽所需的調節序列，或可為具有標記基因的表現載體(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操作多核苷酸而製備。

【0081】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，或在適當宿主中表現(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。

【0082】V. 外吐小體(exosomes)

本發明進一步地提供稱為外吐小體的胞間囊泡(intracellular vesicles)，其呈現形成於本發明之胜肽與人類白血球抗原表面之間的複合物。例如，藉由使用於日本專利公開號平 11-510507 與 WO99/03499 所詳述的方法以及使用從接受治療和/或避免之病人所得的抗原表現細胞可製備外吐小體。本

發明之外吐小體可以相似於本發明的胜肽之方式如疫苗般地接種。

【0083】包括在複合物中的 HLA 抗原形式必須與需要治療及/或預防之對象的 HLA 抗原形式相符。例如，在日本人族群中，HLA-A24 與 HLA-A2，特別是 HLA-A*2402 與 HLA-A*0201 與 HLA-A*0206 為普遍的，因此為適合用於日本人病患之治療。高度表現於日本人與高加索人之中的 HLA-A24 或 HLA-A2 型之使用有助於獲得有效的結果，且次型，例如 HLA-A*2402、HLA-A*0201 與 HLA-A*0206 也提供用途。一般在臨床上，需接受治療之病患的 HLA 抗原形式係進行預先調查，這可適當地選擇對此特別抗原具有高度結合親合力的胜肽或經由抗原表現具有細胞毒殺性 T 淋巴細胞誘發性的胜肽。此外，為了獲得具有高度結合親合力與細胞毒殺性 T 淋巴細胞誘發性兩者的胜肽，可以天然產生之 UBE2T 部分胜肽的胺基酸序列為基礎，執行 1、2 或數個胺基酸的取代、插入、刪除及/或添加。

當本發明之外吐小體擁有 HLA-A24 型為 HLA 抗原時，包括擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 及 27 中胺基酸序列的胜肽具有特別的效用。

【0084】或者，當本發明之外吐小體擁有 HLA-A2 型之 HLA 抗原時，包括擇自序列識別號 29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中胺基酸序列的胜肽具有特別的效用。

【0085】在一些實施例中，本發明之外吐小體為呈現本發明胜肽與 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原之一複合物於其表面上之

外吐小體。在一些典型實施例中，本發明之外吐小體呈現具有序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)與 HLA-A24 之一複合物於其表面上。在其他實施例中，本發明之外吐小體呈現具有序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)與 HLA-A2 之一複合物於其表面上。

【0086】 VI. 抗原呈現細胞(APCs)

本發明也提供經分離之抗原呈現細胞，其表現形成於HLA抗原與本發明胜肽之間的複合物於其表面上。抗原呈現細胞可來自受到治療及/或預防之病患，且藉由其本身或與包括本發明之胜肽、外吐小體或細胞毒殺性T淋巴球之其他藥物結合可被投予如一疫苗。

【0087】 抗原呈現細胞並不限於特定種類之細胞。抗原呈現細胞的例子包括，但不限於樹突細胞、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B細胞與活化之T細胞，已知其表現蛋白質(proteinaceous)抗原於其細胞表面以被淋巴球所認識。由於樹突細胞為一典型抗原呈現細胞，其於抗原呈現細胞中具最強之細胞毒殺性T淋巴球誘導活性，所以樹突細胞可被較佳地使用為本發明之抗原呈現細胞。

【0088】 例如，藉由誘導來自周邊血液單核細胞之樹突細胞與之後體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)與本發明胜肽接觸(刺激)其可獲得一抗原呈現細胞。當本發明之胜肽投予至一對象，於對象身體內誘導表現本發明胜肽之抗原

呈現細胞。因此藉由在將本發明一或多個胜肽投予至一對象後，自此對象收集抗原呈現細胞可獲得本發明之抗原呈現細胞。或者，藉由將已自對象收集之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸可獲得本發明之抗原呈現細胞。

【0089】可將本發明之抗原呈現細胞以其本身或結合包括本發明胜肽、外吐小體或細胞毒殺性 T 淋巴球的其他藥物投予至一對象以誘導於對象中之抗癌免疫反應。例如，於生物體外 (*ex vivo*) 投予可包括下述步驟：

- a：自一第一對象收集抗原呈現細胞，
- b：使步驟 a 之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸，以及
- c：將步驟 b 之抗原呈現細胞投予一第二對象。

【0090】第一對象與第二對象可為相同對象或可為不同對象。自步驟 b 獲得之抗原呈現細胞可被配製且投予疫苗，以治療及/或預防癌症，例如，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤，但不限於此。

【0091】在本發明內容中，可使用本發明一或多個胜肽以製造用以誘導一抗原呈現細胞之藥學組合物。於此提供用於製造用以誘導一抗原呈現細胞之藥學組合物的一方法或製程，且較佳為包括將本發明胜肽與一藥學上可接受之載體一起混合或配製的步驟。本發明也提供使用本發明胜肽以誘導抗原呈現細胞之用途。

【0092】根據本發明一態樣，本發明之抗原呈現細胞具有

細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。在抗原呈現細胞之內容中，措辭“細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”意指當與一 CD8 陽性 T 細胞接觸時，一抗原呈現細胞誘導一細胞毒殺性 T 淋巴球。再者，“細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”包括一抗原呈現細胞誘導細胞毒殺性 T 淋巴球活化、細胞毒殺性 T 淋巴球增生、促進目標細胞藉由細胞毒殺性 T 淋巴球之裂解與增加藉由細胞毒殺性 T 淋巴球之 IFN- γ 產生的能力。特別是，本發明之抗原呈現細胞具有誘導專一於 UBE2T 之細胞毒殺性 T 淋巴球的能力。藉由包括於體外(in vitro)將編碼出本發明胜肽之多核苷酸轉移至抗原呈現細胞的步驟的方法與上述之方法，可製備此種具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。此經引入之多核苷酸可為 DNA 或 RNA 形式。引入方法的例子包括，並無特別限制，各種於此領域一般被執行的方法，可使用例如脂質體轉染(lipofection)、電穿孔法(electroporation)與磷酸鈣方法。更特別地，可執行其如 Reeves ME et al., Cancer Res 1996, 56: 5672-7; Butterfield LH et al., J Immunol 1998, 161: 5607-13; Boczkowski D et al., J Exp Med 1996, 184: 465-72;日本專利公開號.JP2000-509281.中所述。藉由轉移編碼出本發明胜肽之基因進入抗原呈現細胞，基因於細胞中經歷轉錄、轉譯等，且之後所獲得之蛋白質藉由 MHC Class I 或 Class II 處理，並經由一呈現途徑進行以呈現部分胜肽。

【0093】 在一些實施例中，本發明之抗原呈現細胞為表現 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原與本發明胜肽與之複合物於其表面上之抗原呈現細胞。在一些典型實施例中，本發明之抗原呈現

細胞呈現具有序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)與 HLA-A24 之一複合物於其表面上。在其他實施例中，本發明之抗原呈現細胞呈現具有序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)與 HLA-A2 之一複合物於其表面上。

【0094】 VII. 細胞毒殺性 T 淋巴球(CTLs)

抗任何本發明胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球增強於體內(in vivo)以癌症細胞為標的之免疫反應，且因此就其本身而言，可以相似於胜肽本身之方式使用為疫苗。因此本發明提供經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球其藉由任一本發明之胜肽專一地被誘導或活化。

【0095】 此種細胞毒殺性 T 淋巴球可藉由下述方式獲得：(1) 將本發明胜肽投予至一對象；(2) 將來自對象之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞或周邊血液單核淋巴球與本發明之胜肽於體外(in vitro)接觸（刺激）；(3) 將 CD8 陽性 T 細胞或周邊血液單核淋巴球於體外(in vitro)與表現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體接觸；或(4) 引入編碼出 T 細胞受體兩者之次單元的多核苷酸或編碼為各 T 細胞受體次單元之多核苷酸，T 細胞受體次單元可形成一 T 細胞受體，其具有與於一細胞表面上之一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物結合的能力。藉由上述方法可製備此種抗原呈現細胞或外吐小體。(4)之方法之詳細被敘述於下方“VIII. T 細胞受

體(TCR)”的段落中。

【0096】本發明細胞毒殺性 T 淋巴球可來自一受到治療及/或預防之病患，且藉由其本身或與包括爲了調節作用之胜肽、抗原呈現細胞或外吐小體的其他藥物結合可被投予。所獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球起專一抗呈現本發明胜肽之目標細胞的作用，例如用於誘導之相同胜肽。目標細胞可爲細胞其內生性表現 UBE2T，例如癌細胞，或被以 UBE2T 基因轉染之細胞；及由於藉由胜肽刺激而呈現本發明胜肽於細胞表面之細胞，也可做爲經活化之細胞毒殺性 T 淋巴球攻擊的目標。

【0097】在一些實施例中，本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球可認識呈現一 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上的細胞。在細胞毒殺性 T 淋巴球的內容中，措辭“認識一細胞”意指經由其 TCR 與於細胞表面上之一 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物結合，並顯示抗此細胞之特定細胞毒殺性 T 淋巴球活性。於此“特定細胞毒殺性 T 淋巴球活性”意指顯示抗表現一 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物的細胞，而不對其他細胞。因此，本發明包括顯示專一抗呈現本發明胜肽之細胞的細胞毒性的細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0098】在一些典型實施例中，本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球可經由 HLA-A24 認識一細胞，其呈現具有序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)。在較佳實施例中，本發明之此類細胞毒殺性 T 淋巴球可認識表現 UBE2T

與一 HLA-A24 之細胞(例如，HLA-A24 陽性癌細胞)，並且對於此細胞顯示細胞毒性。

【0099】在其他實施例中，本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球可經由 HLA-A2 認識一細胞，其呈現具有序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)。在較佳實施例中，本發明之此類細胞毒殺性 T 淋巴球可認識表現 UBE2T 與一 HLA-A2 之細胞(例如，HLA-A2 陽性癌細胞)，並對此細胞顯示細胞毒性。

【0100】 VIII. T 細胞受體(TCR)

本發明也提供一組合物，其包括編碼為兩者 T 細胞受體次單元之多核苷酸或編碼為各 T 細胞受體次單元之多核苷酸，其中此等次單元形成的 T 細胞受體能形成 HLA 抗原與本發明胜肽之複合體於細胞表面上；並提供其使用方法。T 細胞受體之次單元具有能力形成 T 細胞受體，其授與專一性至抗腫瘤細胞的 T 細胞，腫瘤細胞表現 UBE2T。藉由使用本技術領域所知的方法可確認編碼出為細胞毒殺性 T 淋巴球之 T 細胞受體次單元之 α -與 β -支鏈之各個的多核苷酸，而細胞毒殺性 T 淋巴球以本發明之胜肽所誘導(WO2007/032255 與 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如，喜好以聚合酶連鎖反應方法來分析 T 細胞受體次單元。用於分析之聚合酶連鎖反應引子可為，例如 (5'-gtctaccaggcattcgcttcac-3') 作為 5' 側引子 (序列識別號：66)，及專一於 TCR alpha 鏈 C 區之 3-TRa-C 引子 (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (序列識別號：67)、專一於 TCR

beta 鏈 C1 區之 3-TRb-C1 引子 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (序列識別號: 68)、或專一於 TCR beta 鏈 C2 區之 3-TRbeta-C2 引子 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (序列識別號: 69) 作為 3' 側引子，但不限定於此。引出之 T 細胞受體可以高親合力結合呈現本發明胜肽之目標細胞，且視需要於體內 (*in vivo*) 與體外 (*in vitro*) 居中有有效殺死表現本發明胜肽之目標細胞。

【0101】編碼出 T 細胞受體次單元之兩者的多核苷酸或編碼出 T 細胞受體次單元之各個的多核苷酸可併入適合之載體，例如反轉錄病毒載體。這些載體為本技術領域所熟知。通常多核苷酸或包含其之載體可被轉移至一 T 細胞（例如，CD8 陽性 T 細胞），例如一來自一病患之 T 細胞。有用地，本發明提供一現成 (*off-the-shelf*) 的組合物允許快速修飾病人所擁有之 T 細胞（或其他哺乳動物之那些）以快速簡單產生具有優秀之癌症細胞殺死特性的經修飾 T 細胞。

【0102】抗本發明胜肽之特定的 T 細胞受體具有專一地認識本發明之一胜肽與一 HLA 分子之複合物的能力，當 T 細胞受體被表現於 T 細胞表面時，給予 T 細胞抗表現本發明胜肽與 HLA 抗原之一複合物的目標細胞之專一活性。藉由任何已知的方法可確認必不可少的活性，其藉由引入編碼出此類 T 細胞受體次單元的多核苷酸所製備的細胞毒殺性 T 淋巴球可專一地認識此種目標細胞。此類方法之較佳的例子包括，例如使用 HLA 分子與本發明胜肽之 HLA 多元體染色分析，與 ELISPOT 分析。藉由 ELISPOT 分析，可確認藉由上述方法所製備之細胞毒殺性 T 淋巴球可專一地認識目標細胞，且藉由細胞內傳送

由此認識所產生的訊號。此外，藉由一已知方法也可確認如上述方法所製備之細胞毒殺性 T 淋巴球具有抗目標細胞之專一細胞毒性活性。此類方法之理想例子，例如決定對於目標細胞之細胞毒性活性，例如鉻(chromium)釋放分析。

【0103】本發明並提供細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由以編碼出 T 細胞受體次單元之兩者的多核苷酸或編碼出 T 細胞受體次單元之各個的多核苷酸轉導所製備，其中，藉由此類 T 細胞受體次單元所形成之 T 細胞受體可與於細胞表面上具有擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 中之胺基酸序列的 UBE2T 胜肽與 HLA-A24 抗原的複合物結合，且可與於細胞表面上具有擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 中之胺基酸序列的 UBE2T 胜肽與 HLA-A2 抗原的複合物結合。

【0104】經轉導之細胞毒殺性 T 淋巴球可於體內(*in vivo*)自引導至癌細胞，且可藉由熟知的培養方法於體外(*in vitro*)擴增(例如 Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。本發明細胞毒殺性 T 淋巴球也可用來形成一致免疫組合物，其於一需要治療或保護之病患中治療與預防癌症之一或兩者為有效(參見 WO2006/031221，其內容被引入做為參考)。

【0105】IX. 藥學試劑或組合物

本發明也提供藥學試劑或組合物，其包含選自下述至少 1 種有效成分：

(a) 本發明之胜肽；

- (b) 以可表現形式編碼爲本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 本發明之抗原呈現細胞；
- (d) 本發明之外吐小體；及
- (e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0106】由於與正常組織相較，UBE2T 表現於癌症中特別被提高，其例子包括，但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤，本發明之胜肽或多核苷酸可用於誘導抗癌症免疫反應且因此適合治療及/或預防癌症，及/或避免轉移或其手術後之復發。因此，本發明提供一藥學組合物或試劑配製成供癌症之治療及/或預防，及/或此類癌症之手術後復發的避免，此類組合物或試劑包括一或多個本發明胜肽或多核苷酸爲有效成分。或者，本發明之胜肽可表現於任何前述外吐小體或細胞表面，例如抗原呈現細胞，以用來作爲藥學組合物或試劑。此外，上述以本發明任一胜肽爲標的之細胞毒殺性T淋巴球也可用來作爲本發明藥學組合物或試劑之有效成分。

【0107】因此，本發明提供試劑或組合物，包括至少一擇自下列中之有效成分：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼爲本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 本發明之抗原呈現細胞；
- (d) 本發明之外吐小體；及
- (e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

於此藥學試劑或組合物中，此有效成分係以治療上或藥學上有效的量存在。

【0108】本發明之藥學組合物或試劑也提供使用如一疫苗。在本發明內容中，措辭“疫苗”（也意指為一“致免疫組合物”）意指一試劑或組合物，其藉由接種至一動物具有改善、增強及/或誘導抗腫瘤免疫力的功能。換言之，本發明提供用以誘導於一抗體中之一抗癌免疫反應之藥學試劑或組合物。此藥劑或組合物之量可為對於顯著增強或刺激罹患表現 UBE2T 之癌的對象中的免疫應答為有效的量。

【0109】本發明之藥學組合物後試劑可用於一對象或病患中之癌症治療及/或預防，及/或避免其手術後或轉移復發。此類對象之例子包括人類與任何其他哺乳動物，其包括，但不限於小鼠、大鼠、天竺鼠、兔子、貓、狗、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴子、狒狒與黑猩猩，特別是一商業上重要動物或被馴養的動物。在一些實施例中，本發明之藥學試劑或組合物可被配製用來投予至一對象，其 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2。

【0110】在另一實施例中，本發明也提供一有效成分用於治療及/或避免癌症或腫瘤，及/或避免其手術後復發的藥學組合物或試劑的製造中的用途，此有效成分擇自：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼為本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；
- (d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及
- (e) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0111】或者，本發明更提供一用於癌症或腫瘤之治療及避免，及/或其手術後復發之避免的有效成分之一或兩者，有效成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；

(d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及

(e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0112】或者，本發明更提供一用於用以治療及/或避免癌症或腫瘤，及/或其手術後復發之避免的藥學組合物或試劑之製造的方法或製程，其中方法或製程包括將一藥學上或生理上可接受之載體與一有效成分一起配製的步驟，有效成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；

(d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及

(e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0113】在另一實施例中，本發明更提供一用於用以治療及/或避免癌症或腫瘤，及/或其手術後復發之避免的藥學組合物或試劑之製造的方法或製程，其中方法或製程包括將一藥學上或生理上可接受之載體與一有效成分一起混合的步驟，其中有效成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；

(d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及

(e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0114】在另一實施例中，本發明也提供一製造用以治療及/或避免癌症或腫瘤，及/或避免其手術後復發的的方法，其中方法包括投予一對象至少一有效成分的步驟，有效成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；

(d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及

(e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0115】根據本發明，具有擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25及27中之胺基酸序列的胜肽已發現係 HLA-A24 限制之抗原決定位胜肽，可於一對象中可有效地誘導強有力且專一之抗表現 HLA-A24 與 UBE2T 之細胞的免疫反應。同樣地，具有擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56及58中之胺基酸序列的胜肽據發現係為 HLA-A2 限制之抗原決定位胜肽，於一對象中可有效地誘導強有力且專一之

抗表現 HLA-A2 與 UBE2T 之細胞的免疫反應。因此包括任何具有擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 及 27 中之胺基酸序列之胜肽與其經修飾之胜肽的本發明藥學組合物或試劑特別適合投予其 HLA 抗原為 HLA-A24 之對象。同樣地，包括任何具有擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中之胺基酸序列之胜肽與其經修飾之胜肽的本發明藥學組合物或試劑特別適合投予其 HLA 抗原為 HLA-A2 之對象。此情事也同樣適用於包含編碼出任何這些胜肽之多核苷酸（即，本發明之多核苷酸）的藥學組合物或試劑。

【0116】由本發明藥學組合物或試劑治療及/或預防之癌症包括涉及 UBE2T 之任何之癌症，包括但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。

【0117】本發明藥學組合物或試劑可包括除了上述有效成分外，具有誘導細胞毒殺性 T 淋巴球抗癌化細胞之能力的其他胜肽、編碼出此其他胜肽之其他多核苷酸、其他呈現此其他胜肽之細胞等。具有誘導細胞毒殺性 T 淋巴球抗似癌細胞之能力的此類“其他”胜肽之例子，包括，但不限於癌症專一抗原（例如，經確認之腫瘤相關抗原）。

【0118】若需要，本發明之藥學組合物或試劑可視需要包括其他治療物質為一額外之有效成分，只要此物質不抑制有效成分之抗腫瘤功效，有效成分例如任何本發明胜肽、多核苷

酸、外吐小體、抗原呈現細胞、細胞毒殺性 T 淋巴球。例如，配方可包括抗發炎物質、止痛劑、化學治療等。除了包括其他治療物質於藥劑其本身中，也可將本發明之藥劑與一或多個其他藥學組合物相繼或同時投予。藥劑與藥學組合物的量取決於例如使用何種藥學組合物、要治療之疾病與投藥的計畫與方式。

【0119】熟悉此技藝人士應瞭解，除了此處特別提及之成分外，本發明之藥學組合物或試劑可包括有關於討論中之配方形式的本技術領域一般之其他物質。

【0120】在本發明一實施例中，本發明之藥學組合物或試劑可被包含於製造之商品與套組，其包含對於要被治療之疾病，例如癌症的病理科況有用之材料。製造之商品可包括具有一標籤之任何本發明藥學組合物或試劑的容器。適合的容器包括瓶、小瓶(vial)與試管。容器可形成自各種材料，例如玻璃或塑膠。於容器上之標籤需指出組合物或試劑為用來治療或避免疾病之一或多個情況。標籤也可指出投藥指示等。

【0121】除了上述容器外，套組包括本發明藥學組合物或試劑可視需要更進一步包括一第二容器，其儲藏一藥學上可接受之稀釋液。其可更包括商業或使用者觀點需要之其他材料，包括其他緩衝溶液、稀釋液、濾器、針、注射器與具有使用說明之包裝插入物。

【0122】藥學組合物或試劑若需要可被包裝於一包(pack)或一分配器，其可包含含有有效成分之一或多單位劑量形式。包裝可例如包括金屬或塑膠箔，例如一泡棉箱(blister pack)。

包或分配器可伴隨著投藥指示。

【0123】 (1) 藥學試劑或組合物包含胜肽作為有效成分

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

【0124】 本發明之胜肽可組合製備，其包括兩個或更多個本發明之胜肽，以於體內(in vivo)誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。胜肽組合可採雞尾酒形式或可使用標準技術彼此結合。例如，胜肽可被化學連接或表現如一單一融合多胜肽序列。結合之胜肽可為相同或不同。藉由投予本發明之胜肽，經由 HLA 抗原，高密度呈現胜肽於抗原呈現細胞上，之後對形成於呈現胜肽與 HLA 抗原之間的複合物專一反應的細胞毒殺性 T 淋巴球被誘導。或者，抗原呈現細胞（例如，樹突細胞）被從對象移出且之後以本發明胜肽刺激以獲得呈現本發明任何胜肽於其表面上之抗原呈現細胞。將這些抗原呈現細胞再投予至對象以誘導在對象中之細胞毒殺性 T 淋巴球，且因此可增加了朝向腫瘤相關之內皮細胞的侵犯。

【0125】 包含本發明任何胜肽為有效成分之治療及/或預防癌症之藥學組合物或試劑可也包含一已知有效建立細胞免疫

力之佐劑。或者，藥學組合物或試劑可與其他有效成分一起被投予，或可被以配製成細粒被投予。佐劑指一化合物，當與具有免疫活性之蛋白質一起投予（或依次）時，其增強抗蛋白質之免疫反應。於此考慮之佐劑，包括於文獻(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)中所描述的那些。適合之佐劑的例子包括，但不限於包括磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍亂毒素、沙門氏菌毒素、IFA(佛氏不完全佐劑 (Incomplete Freund's adjuvant))、CFA (佛氏完全佐劑 (Complete Freund's adjuvant))、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W 乳劑等。

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

【0126】在本發明另一實施例中，本發明胜肽也可以一藥學上可接受之鹽類被投予。鹽類之較佳例子包括具有鹼金屬之鹽、具金屬之鹽、具有機鹼之鹽、具有機酸之鹽（例如，醋酸、甲酸(formic acid)、丙酸(propionic acid)、富馬酸(fumaric acid)、馬來酸(maleic acid)、琥珀酸(succinic acid)、酒石酸(tartaric acid)、檸檬酸(citric acid)、蘋果酸(malic acid)、草酸(oxalic acid)、苯甲酸(benzoic acid)、甲磺酸(methanesulfonic acid)等）與具無機酸之鹽（例如，鹽酸、磷酸、氫溴酸(hydrobromic acid)、硫酸等）。如此處所使用，措辭“藥學上可接受之鹽類”意指維持化合物生物有效性與特性及獲得自與無機酸或鹼，例如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲基磺酸(methanesulfonic acid)、乙基磺酸(ethanesulfonic acid)、對

， 甲苯磺酸(p-toluenesulfonic acid)、水楊酸(salicylic acid)與其類似物反應的那些鹽。

【0127】 在一些實施例中，本發明之藥學組合物或試劑包括一成分其啟動細胞毒殺性 T 淋巴球。已定義脂質為可 in vivo 啟動抗病毒抗原之細胞毒殺性 T 淋巴球的物質。例如，可將棕櫚酸殘基黏附至離胺酸殘基之 ϵ -與 α -胺基，且之後連結至本發明之一胜肽。之後脂質胜肽可被直接投予於微胞或顆粒中、併入微脂體或乳化於一佐劑中。如脂質啟動細胞毒殺性 T 淋巴球反應之另一例子，E. coli 脂蛋白，例如三軟脂酸-S 甘油半胱氨酰-絲氨酰基絲氨酸(tripalmitoyl-S-glycerylcysteiny-l-serine,P3CSS)可使用來啟動細胞毒殺性 T 淋巴球，當共價附加至一合適之胜肽（參見，例如 Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4）。

【0128】 投藥之適合方法的例子包括，但不限於口服、皮膚內、皮下、肌肉內、骨內、腹膜、靜脈內注射或此類，以及全身投藥或局部投藥至標的位置的鄰近區域。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。本發明胜肽之藥學上或治療上有效之量，可對於須治療表現 UBE2T 之癌的對象投予。或者，可將足以增強或刺激由細胞毒殺性 T 淋巴球媒介的免疫應答，及/或誘導對抗表現 UBE2T 之癌或腫瘤的細胞毒殺性 T 淋巴球的本發明胜肽之量對於罹有表現 UBE2T 之對象投予。本發明之胜肽劑量可適合地調整根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法、與此類，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，例

如 0.5 mg 至 5 mg，且可於數天至數個月投藥一次。熟悉此技藝人士可適合地選擇一合適的劑量。

【0129】 (2) 包含多核苷酸為有效成分之藥學試劑或組合物

本發明之藥學試劑或組合物也可包含於一可表達之形式編碼出本發明之胜肽的核酸。此處措辭“於一可表達之形式”意指多核苷酸，當引入一細胞，會於體內(*in vivo*)被表現成一誘導抗腫瘤免疫力之多胜肽。在一說明實施例中，感興趣之多核苷酸的核酸序列包括對於表現多核苷酸而言必須之調控要素。可裝配多核苷酸以達到穩定插入目標細胞之基因體（參見，例如敘述 Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12, 對於同源重組卡匣載體之敘述。參見，例如 Wolff et al., *Science* 1990, 247: 1465-8; 美國專利號 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 與 WO 98/04720。DNA輸送技術的例子包括“裸DNA”、經促進（bupivacaine、聚合物、胜肽居中之）之輸送、陽離子脂質複合物與顆粒居中之（“基因槍”）或壓力居中之傳送（參見，例如美國專利號 5,922,687）。

【0130】 本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體來表現。表現載體的例子包括減弱病毒宿主，例如牛痘或禽痘。此方法包括使用牛痘病毒，例如為一載體以表現編碼胜肽之核苷酸序列。藉由引入一宿主，此重組之牛痘病毒表現致免疫胜肽且因此引起一免疫反應。於免疫步驟中為有效之牛痘載體與方法敘述於，例如美國專利號 4,722,848。另一載體為 BCG (Bacille

Calmette Guerin)。BCG 載體敘述於 Stover et al., *Nature* 1991, 351: 456-60 中。對於治療投藥或免疫有用之其他多種載體，例如腺與腺病毒相關之載體、反轉錄病毒載體、傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhi*) 載體、經解毒之炭疽毒素載體與其類似為明顯的。參見，例如 Shata et al., *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; Hipp et al., *In Vivo* 2000, 14: 571-85。

【0131】輸送多核苷酸進入一病患可為直接，於其例子中，對象直接暴露於一攜帶多核苷酸之載體，或為間接，於其例子中，細胞首先於體外 (*in vitro*) 以感興趣之多核苷酸轉形，之後將細胞轉殖進入病患。此兩方法分別為已知，為體內 (*in vivo*) 與生物體外 (*ex vivo*) 基因治療。

【0132】基因治療之方法之大體回顧，參見 Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; *Trends in Biotechnology* 1993, 11(5): 155-215)。應用於本發明之於重組 DNA 技術中一般熟知的方法被於編者 Ausubel et al., in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; 與 Krieger, in *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990 所述。

【0133】投藥可被執行為口服、皮膚內、皮下、靜脈內、肌肉內、骨內、即/或腹膜注射或此類，且經由全身投藥或局

部投藥至標的位置的鄰近區域發現係有用。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。本發明多核苷酸之藥學上或治療上有效之量，可對於須治療表現 UBE2T 之癌的對象投予。或者，可將足以增強或刺激由細胞毒殺性 T 淋巴球媒介的免疫應答之多核苷酸之量，及/或誘導對抗表現 UBE2T 之癌或腫瘤的細胞毒殺性 T 淋巴球的本發明多核苷酸之量對於罹有表現 UBE2T 之對象投予。於適合載體中或於以編碼出本發明之胜肽的多核苷酸轉形之細胞中的多核苷酸的劑量可適合地調整，根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法與此類，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，例如 0.5 mg 至 5 mg，且可於每數天一次至每數個月一次投藥。熟悉此技藝人士可立即確認一合適與最理想之劑量。

【0134】 X. 使用胜肽、多核苷酸、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球的方法

可使用本發明之胜肽與多核苷酸來製備或誘導抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球。也可使用本發明之外吐小體與抗原呈現細胞來製備或誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。胜肽、多核苷酸、外吐小體與抗原呈現細胞可與任何其他化合物組合使用，只要額外之化合物不抑制胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。因此，任何上述之本發明藥學組合物或試劑可用來製備或誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。除此之外，包括胜肽或多核苷酸的那些也可用來製備誘導抗原呈現細胞，茲說明如下。

【0135】 (1) 誘導抗原呈現細胞的方法

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

本發明之方法包括於體外、生物體外或於體內將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸的步驟。例如，生物體外誘導抗原呈現細胞的方法可包括下述步驟：

a：自一對象收集抗原呈現細胞；以及

b：將步驟a之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸。

【0136】抗原呈現細胞並不限於特定種類之細胞，抗原呈現細胞的例子包括但不限於樹突細胞、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B細胞與活化之T細胞，已知其表現蛋白質(proteinaceous)抗原於其細胞表面以被淋巴球所認識。較佳為，可使用樹突細胞，由於它們於抗原呈現細胞中最強的細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。本發明任一胜肽可以其本身或與本發明其他胜肽及/或一或多種源自除了UBE2T外之腫瘤相關抗原的細胞毒殺性T淋巴球誘發胜肽組合使用。

【0137】另一方面，當投予本發明胜肽至一對象時，抗原呈現細胞於體內與胜肽接觸，且因此於對象之體內誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。因此，本發明之方法可包括投予本發明胜肽至一對象以於對象體內誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。相似地，當以可表達之形式投予本發明多核苷酸至一對象時，本發明胜肽被表現且於體內與抗原呈現細胞接觸，且因此於對象之體內誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。因此，本發明之方法可包括投予本發明多核苷酸至一對象

以於對象體內誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。“可表達之形式”被描述於上述段落“IX. 藥學試劑或組合物，(2) 含有多核苷酸為有效成分之藥學試劑或組合物”中。

【0138】或者，本發明之方法可包括將本發明一多核苷酸引入一抗原呈現細胞以誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。例如，方法可包括下述步驟：

a：自一對象收集抗原呈現細胞；以及

b：將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入步驟a之抗原呈現細胞。

【0139】可如前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來執行步驟 b。

或者本發明方法可包括製備一可專一誘導抗 UBE2T 之細胞毒殺性 T 淋巴球活性的抗原呈現細胞的步驟，包含下述步驟之一：

(a) 將抗原呈現細胞與本發明一胜肽於體外、生物體外或於體內接觸；以及

(b) 將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入抗原呈現細胞。

【0140】或者，本發明可用於誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之一抗原呈現細胞，此類方法包括擇自下列步驟中之一步驟：

(a) 將一抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸；

(b) 將一編碼出本發明胜肽的多核苷酸導入一抗原呈現

細胞。

【0141】在一較佳實施例中，本發明提供誘導或製備具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之一抗原呈現細胞的方法，此類方法包括下列步驟之一：

(a) 將表現 HLA-A24 之一抗原呈現細胞與具有擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 及 27 中之一胺基酸序列的胜肽或其經修飾之胜肽於體外、生物體外或於體內接觸；以及

(b) 將一編碼出具有擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 及 27 中之一胺基酸序列的胜肽或其經修飾之胜肽的多核苷酸導入表現 HLA-A24 之一抗原呈現細胞。

【0142】藉由上述方法誘導之抗原呈現細胞經由 HLA-A24 呈現此類胜肽於其表面上，且可誘導具有抗表現 HLA-A24 與 UBE2T 之細胞的專一細胞毒性活性的細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0143】在另一實施例中，本發明提供誘導或製備具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之一抗原呈現細胞的方法，此類方法包括下列步驟之一：

(a) 將表現 HLA-A2 之一抗原呈現細胞與具有擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中之一胺基酸序列的胜肽或其經修飾之胜肽於體外、生物體外或於體內接觸；以及

(b) 將一編碼出具有擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中之一胺基酸序列

的胜肽或其經修飾之胜肽的多核苷酸導入表現HLA-A2之一抗原呈現細胞。

【0144】藉由上述方法誘導之抗原呈現細胞經由 HLA-A2 呈現此類胜肽於其表面上，且可誘導具有抗表現 HLA-A2 與 UBE2T 之細胞的專一細胞毒性活性的細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0145】本發明方法可於於體外、生物體外或於體內實施。較佳為本發明方法可於於體外或生物體外實施。用於具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞之誘導的抗原呈現細胞，可較佳為表現 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原之抗原呈現細胞。此類抗原呈現細胞可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自其 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2 之對象獲得的周邊血液單核細胞來製備。藉由本發明所誘導之抗原呈現細胞可為表現本發明胜肽與 HLA 抗原（HLA-A24 或 HLA-A2 抗原）之複合物於其表面中之抗原呈現細胞。當藉由本發明方法誘導之抗原呈現細胞被投予至一對象以在此對象中誘發抗癌症免疫反應時，對象較佳為其抗原呈現細胞被取得的同一個。然而，對象可與抗原呈現細胞提供者為不同一個，只要對象具有與抗原呈現細胞提供者相同之 HLA 型即可。

【0146】在另一實施例中，本發明提供用於誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的試劑或組合物，且此類試劑或組合物包括一或多個本發明胜肽或多核苷酸。

【0147】在另一實施例中，本發明提供本發明胜肽或編碼出此胜肽之多核苷酸於製造配製來誘導抗原呈現細胞之試劑或組合物中的用途。

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

【0148】 (2) 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法

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

本發明也提供使用編碼出兩者之T細胞受體次單元之多核苷酸或編碼為各T細胞受體次單元之多核苷酸來誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法，此次單元形成之T細胞受體有認識(結合於)在細胞表面上之本發明胜肽與一HLA抗原之複合物的能力。較佳為，誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法包括選自下述步驟中至少一步驟：

a：將一CD8陽性T細胞與一抗原呈現細胞接觸，該抗原呈現細胞表現一HLA抗原與本發明胜肽之複合物於其表面；

b：將一CD8陽性T細胞與一外吐小體接觸，該外吐小體表現一HLA抗原與本發明胜肽之複合物於其表面；以及

c：將編碼為T細胞受體之兩者次單元之一多核苷酸或編碼為各T細胞受體次單元之一多核苷酸引入一CD8陽性T細胞，其中由此等次單元形成的T細胞受體能夠認識(結合於)細胞表面上之本發明胜肽與HLA抗原之複合物。

【0149】 當本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體被投予至一對象時，於對象體內誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且以表現 UBE2T 癌細胞為目標之免疫反應的強度增強。因此，代替前述步驟，本發明之方法可包括將本發明之胜肽、

多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體投予至一對象的步驟。

【0150】或者，藉由於生物體外或於體內使用它們，也可誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且在誘導細胞毒殺性 T 淋巴球後，經活化之細胞毒殺性 T 淋巴球可返回至對象。例如，方法可包括步驟：

- a：自一對象收集抗原呈現細胞；
- b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸；以及
- c：將步驟 b 之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞共培養。

【0151】於上述步驟 c 中要與 CD8 陽性 T 細胞共培養之抗原呈現細胞也可藉由將一本發明多核苷酸轉移進入抗原呈現細胞，如於前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來製備，然而，本發明並不限於此，且因此包括任何有效呈現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於表面上之表現物的抗原呈現細胞。

【0152】代替上述抗原呈現細胞，可視需要而定使用呈現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上的外吐小體。換句話說，本發明可包括將呈現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面的外吐小體與本發明胜肽共培養之步驟。此種外吐小體可藉由前述於段落“V. 外吐小體”中之方法來製備。

適合本發明方法之抗原呈現細胞與外吐小體呈現本發明胜肽與 HLA-A24 或 HLA-A2 之一複合物於其表面上。

【0153】例如，一抗原呈現細胞或外吐小體，其呈現一 HLA-A24 與具有擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 及 27 中之胺基酸序列的胜肽（或其經修飾之胜肽）的複合物於其表面上，可較佳地

利用於誘導具有抗表現 HLA-A24 與 UBE2T 之細胞的專一細胞毒性活性。同樣地，一抗原呈現細胞或外吐小體，其呈現一 HLA-A2 與具有擇自序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 中之胺基酸序列的胜肽（或其經修飾之胜肽）的複合物於其表面上，可較佳地利用於誘導具有抗表現 HLA-A2 與 UBE2T 之細胞的專一細胞毒性活性。

【0154】此外，藉由將一編碼為兩者之 T 細胞受體次單元的多核苷酸或編碼為各 T 細胞受體次單元的多核苷酸引入 CD8 陽性 T 細胞也可誘導本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球，其中由此類次單元所形成之 T 細胞受體能結合於於細胞表面上之本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。此轉導可如於前述段落“VIII. T 細胞受體(TCR)”中所述實施。

【0155】本發明方法可於於體外、生物體外或於體內實施。較佳為本發明方法可於體外或生物體外執行。用於細胞毒殺性 T 淋巴球之誘導的 CD8 陽性 T 細胞，可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自一對象獲得的周邊血液單核細胞來製備。在較佳實施例中，CD8 陽性 T 細胞的提供者可為其 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2 之對象。藉由本發明所誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球，其可認識可為表現本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物於其表面之細胞。此類細胞毒殺性 T 淋巴球可表現抗呈現本發明胜肽於其表面上之細胞的專一細胞毒性活性，且因此顯示抗表現 UBE2T 之細胞（例如，癌細胞）的專一細胞毒性活性。當藉由本發明方法誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球被投予至一對象以在此對象中誘發抗癌症免疫反應時，對象較佳為

其 CD8 陽性 T 細胞被取得的同一個。然而，對象可與 CD8 陽性 T 細胞提供者為不同一個，只要對象具有與 CD8 陽性 T 細胞提供者相同之 HLA 型。

【0156】此外，本發明也提供製造一誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之藥學組合物或試劑的方法或製程，其中該方法包括將本發明之胜肽與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。

【0157】在另一實施例中，本發明提供用於誘導一細胞毒殺性 T 淋巴球的試劑或組合物，其中試劑或組合物包括本發明一或多個胜肽、本發明一或多個多核苷酸、一或多個抗原呈現細胞、及/或一或多個外吐小體。

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

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

【0158】XI.誘導免疫反應的方法

又，本發明提供誘導抗 UBE2T 相關疾病之免疫反應的方法。所考慮的疾病包括癌症，其例子包括，但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。

【0159】本發明方法包括投予含任何本發明胜肽或編碼出其之多核苷酸的試劑或組合物的步驟。或者。本發明方法可包括投予表現任何本發明胜肽之外吐小體或抗原呈現細胞的步

驟。細節參見“IX. 藥學試劑或組合物”之項目，特別是敘述本發明試劑或組合物為疫苗之用途的部分。此外，可被使用於本發明誘導免疫反應之方法的本發明外吐小體與抗原呈現細胞，被詳細描述在前之於“V. 外吐小體”、“VI. 抗原呈現細胞”與“X. 使用胜肽、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球的方法”之(1)與(2)的項目。

【0160】本發明也提供製造一誘導免疫反應之藥學試劑或組合物的方法或製程，其中該方法可包括將本發明之胜肽與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。

【0161】或者，本發明方法可包括投予本發明一疫苗或藥學組合物或試劑的步驟，本發明疫苗或藥學組合物包含：

- (a) 本發明胜肽；
- (b) 於一可表現之形式，編碼出本發明胜肽的多核苷酸；
- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞
- (d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；或
- (e) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0162】在本發明內容中，以這些活性成份可治療過度表現 UBE2T 之癌症。此類癌症的例子包括，但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。因此，在包括上述有效成分之疫苗或藥學組合物或試劑的投予前，其較佳為確認 UBE2T 之表現程度於從待治療之對象收集的癌化細胞或組織中是否相較於從相同對象之正常細胞或組織收集者有

所提高。因此，在一實施例中，本發明提供治療於一需要之對象中之（過度）表現 UBE2T 之癌症的方法，此種方法包括步驟：

i) 測定獲得自具有癌症要治療之對象的生物樣本中的 UBE2T 表現程度；

ii) 與正常控制組比較 UBE2T 表現程度；以及

iii) 投予擇自由上述 (a) 至 (d) 所組成之群組的至少一成份至與正常控制組相較具有過度表現 UBE2T 之癌症的對象。

【0163】或者，本發明也可提供包含擇自上述 (a) 至 (e) 中之群組的至少一成份的疫苗或藥學組合物，要被投予至具有過度表現 UBE2T 之癌症的對象中。換句話說，本發明更提供鑑定要被以本發明 UBE2T 多胜肽治療之對象的方法，此類方法包括測定來自對象之生物樣本中的 UBE2T 表現程度的步驟，其中與基因之正常控制程度相較，此程度增加指出對象可能具有可以本發明 UBE2T 多胜肽治療之癌症。本發明治療癌症的方法將於以下更詳細敘述。

【0164】再者，於較佳實施例，對象的 HLA 形式可在投予本發明胜肽前先鑑定。例如具有下述序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 之胺基酸序列之胜肽較佳為對於鑑別為有 HLA-A24 之對象投予。或者，有下述序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之胺基酸序列的胜肽較佳為對於有 HLA-A2 之對象投予。

【0165】可將任何源自對象之細胞或組織用於 UBE2T 表現

之測定，只要其包括 UBE2T 之目標轉錄或轉譯產物。適合樣本的例子包括，但不限於身體組織或液體、例如血液、唾液與尿液。較佳為，生物樣本包含一細胞族群，其包括一上皮細胞，更佳為源自對象之細胞或組織包含一細胞族群，其包括一上皮細胞，更佳為一癌症上皮細胞或一來自被懷疑癌化之組織的上皮細胞。此外，若需要，細胞可自所獲得之身體組織或液體被純化，且之後使用為源自對象之樣本。

【0166】根據本發明，可測定獲得自一對象之生物樣本中的 UBE2T 表現程度。使用本技術領域已知方法可於轉錄（核酸）產物程度測定 UBE2T 表現程度。例如，藉由雜交方法（例如，北方雜交）使用探針可將 UBE2T 的 mRNA 定量。可於一晶片或陣列上執行偵測。陣列之使用較佳可為用於偵測 UBE2T 表現程度。利用 UBE2T 的序列資訊，熟悉此技藝人士可製備此種探針。例如，UBE2T 的 cDNA 可被使用為探針。若需要，可以適合之標誌來標誌探針，例如染劑、螢光物質與同位素，且基因的表現程度可被偵測為雜交標誌的強度。

【0167】此外，藉由擴大偵測方法 (amplification-based detection method)（例如，RT-PCR）使用引子可將 UBE2T 的轉錄產物進行定量。根據基因之可獲得 UBE2T 之序列資訊可製備此種引子。

特別是，用於本方法之探針或引子於嚴厲 (stringent)、適度嚴厲、低嚴厲條件下雜合至 UBE2T 的 mRNA。如此處使用，措辭“嚴厲（雜合）條件”意指在此在條件下探針或引子會雜合至其目標序列，而不是其他序列。嚴厲條件為序列依賴

(sequence-dependent)，且在不同環境下會不同。比起較短之序列，於較高溫度下觀察到較長序列之特定雜合。一般而言，在一定義之離子強度與 pH 下所選擇之嚴格條件的溫度為低於一特定序列之熔點 (T_m) 約 5°C 。 T_m 為溫度（在一定義之離子強度與 pH 與核酸濃度下），於其下在平衡下 50% 之與目標序列互補的探針雜合至目標序列。由於目標序列通常存在過量，所以於 T_m ，在平衡下 50% 之探針被佔據。一般而言，嚴苛條件為於其中鹽濃度低於 1.0 M 鈉離子，一般約 0.01 至 1.0 M 鈉離子（或其他鹽）於 pH 7.0 至 8.3，且對於短探針或引子（例如，10 至 50 個核苷酸）而言溫度為至少約 30°C ，對於較長探針或引子而言溫度為至少約 60°C 。也可以添加去穩定試劑 (destabilizing substances)，例如甲醯胺 (formamide) 來達到嚴苛條件。

【0168】本發明之探針或引子一般為一實質上經純化之寡核苷酸。寡核苷酸一般包括核苷酸序列之一區域，其在嚴苛條件下雜合至至少約 2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50 或 25 包括一 UBE2T 序列之一核酸之連續意義股 (consecutive sense strand) 核苷酸序列，或包括一 UBE2T 序列之一核酸之反意義股 (anti-sense strand) 核苷酸序列，或這些序列之自然發生突變體。特別是，例如，在一較佳實施例中，一於長度具有 5-50 之寡核苷酸可被使用為用來擴大要被偵測之基因的一引子。更佳為，可以於長度具有 15-30b 之寡核苷酸探針或引子來偵測 UBE2T 基因之 mRNA 或 cDNA。大小的範圍始於至少 10 個核苷酸、至少 12 個核苷酸、至少 15 個核苷酸、至少 20 個核苷酸、至少 25 個核苷酸、至少 30 個

核苷酸，且探針與引子延伸大小始於 5-10 個核苷酸、10-15 個核苷酸、15-20 個核苷酸、20-25 個核苷酸與 25-30 個核苷酸。在較佳實施例中，寡核苷酸探針或引子的長度可被擇自 15-25 個核苷酸。藉由使用此種寡核苷酸探針或引子之用於基因偵測的分析程序、裝置或試劑為本技術領域所熟知（例如，寡核苷酸陣列或 PCR）。在這些分析中，探針或引子也可包括標籤(tag)或連結器(linker)序列。此外，可以可偵測之標誌或要被捕捉之親合配體來修飾探針或引子。或者在雜合偵測程序中，於長度具有少數百的鹼基（例如，約 100-200）至少數千(kilo)（例如，約 1000-2000）之鹼基的多核苷酸可被用於一探針（例如，北方墨點分析或 cDNA 微陣列分析）。

【0169】或者，為了鑑別本發明方法所治療之對象，可偵測轉譯產物。例如，可偵測 UBE2T 蛋白質(序列識別號: 65)之量。測定作為轉錄產物之 UBE2T 蛋白質的量的方法包括免疫分析方法，其使用一抗體專一認識此 UBE2T 蛋白質。抗體可為單株或多株。此外，抗體之任何片段或修飾（例如嵌合型抗體(chimeric antibody)、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等）可被用來偵測，只要片段或經修飾之抗體維持對 UBE2T 蛋白質的結合能力。本發明也提供抗本發明胜肽與其片段的這類抗體。這些用於蛋白質偵測之這些種類的抗體的製備方法為本技術領域所熟知，且任何方法可被使用於本發明中以製備此種抗體與其等同物(equivalent)。

【0170】如根據 UBE2T 基因轉譯產物偵測 UBE2T 基因之表現程度的另一方法，使用抗 UBE2T 蛋白質之抗體經由免疫

組織化學(immunohistochemical)分析可測量到染色強度。即，於此測量中，強的染色指出經增加之蛋白質的存在/程度，且同時 UBE2T 基因之高表現程度。

【0171】可確認於來自對象之樣本中，目標基因例如 UBE2T 基因的表現程度之為被提升，若從目標基因之控制組程度（例如，於正常細胞中的程度）增加，例如 10%、25%、或 50%，或增加大於 1.1 倍、大於 1.5 倍、大於 2.0 倍、大於 5.0 倍、大於 10.0 倍或更多。

【0172】使用先前自一或多健康對象為已知的對象收集並儲存的樣本控制組之程度可與癌細胞同時測定。此外，獲得自具有癌症要被治療之一器官的非癌區域的正常細胞被使用為正常控制組。或者，根據獲得自分析先前測定之來自其疾病程度已知之對象之樣本中之 UBE2T 基因的表現程度的結果，藉由統計方法，可測定控制組之程度。此外，控制組程度可為來自先前測試細胞之表現輪廓的資料庫。並且，根據本發明一方面於一生物樣本中之 UBE2T 基因的表現程度，可與多個控制組程度比較，控制組程度被測定自多個參考樣本。較佳為使用一控制組程度測定自一參考樣本，其來自一組織形式相似於源自對象生物樣本之組織形式。此外，較佳為使用具有已知疾病階段之群組中的 UBE2T 基因的表現程度的標準值(standard value)。標準值可獲得自本技術領域任何已知的方法。例如，平均值 $\pm$ 2 標準差或平均值 $\pm$ 3 標準差，可被使用為標準值。

【0173】可將介於樣本表現程度與控制組程度間的不同標準化至控制核酸的表現程度，例如管家基因(housekeeping

gene)，根據細胞之癌症與非癌程度已知其表現程度並無不同。示範之控制基因包括，但不限於 β 肌動蛋白(beta-actin)、甘油醛-3-磷酸去氫酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)與核糖蛋白 P1。

當與正常控制組程度相較，UBE2T基因的表現程度有所增加，可診斷對象為患有待以本發明之藥學組合物或藥劑投予而治療的癌症。

【0174】 本發明也提供選擇供使用前述本發明藥學組合物或藥劑治療癌症之對象的方法，此方法包括下述步驟：

- a) 決定從罹患癌症的對象獲得之生物學樣本中的 UBE2T 表現程度；
- b) 比較於步驟 a)決定之 UBE2T 表現水平與正常對照水平；及
- c) 若 UBE2T 之表現水平相較於正常對照水平係增加，選擇供使用前述本發明藥學組合物或藥劑治療癌症之對象。

【0175】 於一些實施例中，此方法可包含在步驟 a)-c)前或後鑑別具有選自 HLA-A24 與 HLA-A2 構成之群組之 HLA 的對象。依本發明之癌症療法較佳係針對罹患過度表現 UBE2T 且具有 HLA-A24 或 HLA-A2 之對象。HLA 分型之方法於此技術領域係為人熟知。例如，將 HLA 對偶基因分型之 PCR 主體的方法係為人熟知。針對各 HLA 分子為專一的抗體也是鑑別一對象之 HLA 的適當工具。

【0176】 於一實施例，本發明更提供一種包括本發明胜肽中一或多種的診斷套組。

癌症可藉由使用本發明胜肽來偵測對抗對象來源之樣本(例如血液)中之本發明胜肽的抗體來診斷。若對象來源的樣本(例血液樣本)含有對抗本發明胜肽的抗體且此等抗體之量被決定係多於對照水平之截止值，對象係被懷疑患有癌症。

【0177】在另一實施例中，本發明之診斷套組可包括本發明之胜肽與結合至其之 HLA 分子。使用抗原胜肽與 HLA 分子偵測抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的方法已被建立（例如，Altman JD et al., *Science*. 1996, 274(5284): 94-6）。因此，本發明之胜肽與 HLA 分子的複合物可應用至偵測腫瘤抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的偵測方法，藉此使早期偵測癌症之復發及/或轉移為可能。此外，其可被用於適合包含本發明胜肽為一有效成分之藥學組合物或藥劑的對象的篩選，或此藥學組合物或藥劑之治療功效的評估。

【0178】特別是，根據已知方法（參見，例如 Altman JD et al., *Science*. 1996, 274(5284): 94-6），可製備放射標誌之 HLA 分子與本發明胜肽之寡聚複合物，例如四聚體。伴隨使用複合物，可執行診斷，例如藉由將來自被懷疑罹癌之對象的周邊血液淋巴球(peripheral blood lymphocytes)中之抗原-胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球進行定量。

【0179】本發明更提供藉由使用此處敘述之胜肽抗原決定位，用以評估免疫反應之方法與診斷試劑。在本發明一實施例中，本發明之胜肽被使用為評估或預測一對象之免疫反應的試劑。藉由將免疫抗原(immunogen)與免疫活性細胞(immunocompetent)於體內或於體外接觸，可誘導要被評估之免

疫反應。在較佳實施例中，用以評估一免疫反應的免疫活性細胞可選擇自周邊血液、周邊血液淋巴球(PBL)、與周邊血液單核細胞(PBMC)。用於此類分析之分析系統包括相當新近之技術發展，例如四聚體染色分析，對細胞內淋巴激素(lymphokines)之染色與干擾素釋放分析或 ELISPOT 分析。在較佳實施例中，要被以胜肽試劑接觸之免疫勝任細胞可為抗原呈現細胞，其包括樹突細胞。

【0180】例如，本發明胜肽可使用於四聚體染色分析以評估為了抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球存在之周邊血液單核細胞，在暴露至腫瘤抗原或一免疫抗原後。HLA 四聚體複合物可被使用來直接顯現抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球（參見，例如 Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; 及 Altman et al, Science 174 : 94-96, 1996），並測定於周邊血液單核細胞之樣本中的抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球族群的頻率。使用本發明胜肽之四聚體試劑可如下敘述被產生：

【0181】在對應之 HLA 重鏈與 β 2-微球蛋白存在下重新折疊結合至 HLA 之胜肽，以產生三分子複合物。在複合物中，重鏈之羧端為經生物素化於一預先設計進入蛋白質之位置。之後將卵白素加至複合物以形成由三分子複合物與卵白素(streptavidin)所組成之四聚體。藉由以螢光標誌卵白素的方式，可使用四聚體來對抗原呈現細胞染色。之後可鑑定細胞，例如藉由流式細胞技術。此類分析可被用於診斷與預後(prognostic)目的。藉由此程序鑑定之細胞也可被用於治療目的。

【0182】本發明胜肽也可用於使用此領域周知的技術(參見例如 CURRENT PROTOCOLS IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY ; and Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)製作抗體，此抗體作為診斷或偵測癌症之試劑為有用。此種抗體可包括認識於HLA 分子內容中之胜肽的那些，即，結合至胜肽-MHC 複合物的抗體。

【0183】本發明胜肽及組合物具有一些其他額外的用途，有些在此敘述。比如，本發明提供診斷或偵測由表現 UBE2T 多胜肽所定性的疾患的方法。

【0184】例如，診斷可藉由以螢光素(fluorescein)標誌 HLA 多聚複合物染色以允許抗原-專一 T 細胞的直接定量（例如，Altman, J. D. et al., 1996, Science 274 : 94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 10330）的方法來實施。也已提供細胞內淋巴激素(lymphokines)之染色與干擾素釋放分析或 ELISPOT 分析。四聚體染色、細胞內淋巴激素染色與 ELISPOT 分析皆顯露比一般分析靈敏至少多 10 倍 (Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8: 413)。也可使用五聚體（例如，美國專利公開號 2004- 209295A）、右聚體(dextramer)(例如，WO 02/072631)、鏈聚體(streptamer)（例如，Nature medicine 6. 631-637 (2002)）。

【0185】例如，在一些實施例中，本發明提供診斷或評估

被投予本發明至少一 UBE2T 胜肽之對象的免疫反應的方法，方法包括步驟：

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

(b) 偵測或測定於步驟(a)中所誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導程度；以及

(c) 使對象之免疫反應與細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導程度互相關連。

【0186】在本發明內容中，免疫原較佳包括(a) 擇自序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之胺基酸序列中的 UBE2T 胜肽、具有此種胺基酸序列的胜肽與具有此種胺基酸序列於其中已被以 1、2 或更多胺基酸取代所修飾的胜肽的至少一個。於期間，適合誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球的條件為本技術領域所熟知。例如，可於體外培養免疫活性細胞在免疫存在下以誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球。為了誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球，可加入任何刺激因子於細胞培養物中。例如，IL-2 為細胞毒殺性 T 淋巴球誘導之較佳刺激因子。

【0187】在一些實施例中，可在治療前、期間及/或後執行監測或評估要被以胜肽癌症治療之對象的免疫反應的步驟。一般而言，在癌症治療的程序中，一再地將免疫原性胜肽投予至要被治療的對象。例如，可每週投予免疫原性胜肽達 3-10 週。因此，在癌症治療程序期間，可評估或監測對象之免疫反應。

或者，對於癌症治療之評估或監測的步驟可在治療程序完成時。

【0188】根據本發明，當與控制組相較時，經增強之免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導指出要被評估或診斷之對象免疫性地對已被投予之免疫原反應。用以評估免疫反應之適合的控制組包括，例如當免疫活性細胞未與胜肽接觸或與具有除了任何 UBE2T 胜肽之胺基酸序列的控制組胜肽（例如，隨機胺基酸序列）接觸時的細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導程度。。

【0189】 XII. 抗體

本發明更提供結合至本發明胜肽之抗體。較佳抗體專一結合至本發明胜肽且不會結合（或微弱結合）至其他胜肽。

【0190】抗本發明胜肽之抗體可提供用途於癌症診斷與預後分析。相似地，對於在癌症病患中也表現或過度表現 UBE2T 程度而言，此類抗體可提供使用於其他癌症之治療、診斷，及/或預後。此外，細胞內表現之抗體（例如，單鏈抗體）可治療地提供效用於在其中與 UBE2T 之表現相關的癌症，與 UBE2T 之表現相關的癌症例子包括，但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。

【0191】本發明也提供 UBE2T 蛋白質（序列識別號：65）或其片段之偵測及/或定量的各種免疫活性分析，UBE2T 蛋白質（序列識別號：65）或其片段包括由擇自由序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、

25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 所組成之群組的胺基酸序列所組成的多胜肽。於本發明之內容，結合於 UBE2T 之多胜肽較佳為認識由選自下述序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組之胺基酸序列之胜肽。以抑制測試(inhibition test)之方式可確認抗體之結合專一性。其為，在具有序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 的胺基酸序列之任何片段多胜肽存在下，當介於要被分析之抗體與全長之 UBE2T 胜肽之間的結合被抑制時，其被視為專一結合片段。在本發明內容中，在包括，但不限於放射免疫分析(radio-immunoassays)、免疫色層分析技術(immuno-chromatograph technique)、酵素連結免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)、酵素連結免疫螢光分析(enzyme-linked immunofluorescent assays, ELIFA)等之多種本技術領域熟知之免疫分析形式中執行此類免疫分析。

【0192】本發明之關於免疫，但非抗體分析也可包括 T 細胞致免疫性分析(immunogenicity assay)（抑制或刺激）與主要組織相容性複合物(major histocompatibility complex, MHC)結合分析。此外，本發明也考慮具偵測表現 UBE2T 之癌症之能力的免疫成像分析，其例子包括，但不限於使用本發明之經標誌的抗體的放射顯像成像(radio scintigraphic imaging)方法。

此類分析提供臨床用途在 UBE2T 表現之癌症偵測、監控與預後中，UBE2T 表現之癌症的例子，包括，但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。

【0193】本發明也提供結合至本發明胜肽的抗體。本發明抗體可使用於任何形式中，例如單株或多株抗體，且可更包括獲得自將動物，例如兔子，以本發明胜肽進行免疫之抗血清、所有類型之多株或單株抗體、人類抗體與由基因重組產生之人源化抗體。

【0194】本發明之抗體可認識有選自下述序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組之胺基酸序列之胜肽。合成寡胜肽之方法在此領域為周知。合成後，可在作為免疫原前，選擇性地將胜肽純化。於本發明內文中，可將此寡胜肽(例如 9 員胜肽或 10 員胜肽)和載體接合或連結以增強免疫原性。鑰孔血藍蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin, KLH)被熟知為載體。接合鑰孔血藍蛋白與胜肽的方法為本技術領域所熟知。

【0195】或者，可將編碼出本發明一胜肽或其片段的一基因插入一已知的表現載體，其之後轉形至一宿主細胞，如於此所敘述。藉由任何標準方法，所需之胜肽或其片段可自宿主細胞之外部或內部被重新獲得，且之後可被使用為一抗原。或者，可將表現胜肽之整個細胞或其細胞萃出物或一化學合成胜

肽使用為抗原。

【0196】可以抗原將任何哺乳動物進行免疫，但較佳為考慮與用來細胞融合之親代細胞的相容性。一般而言可使用嚙齒目(Rodentia)、兔形目(Lagomorpha)或靈長目(Primate)。嚙齒目家族的動物包括，例如小鼠、大鼠與倉鼠。兔形目家族的動物包括，例如兔子。靈長目家族的動物包括，例如狹鼻類（舊世界猴）猴子，例如馬來猴(*Macaca fascicularis*)、獼猴(rhesus monkey)、聖狒狒(sacred baboon)與黑猩猩(chimpanzees)。

【0197】以抗原免疫動物之方法為本技術領域所熟知。抗原之腹腔內注射(intraperitoneal injection)或皮下注射(subcutaneous injection)為免疫哺乳動物之一標準方法。更具體地，可將抗原稀釋或懸浮於一適合量的磷酸鹽緩衝溶液、生理食鹽水等。若需要，可將抗原懸浮液與適合量之標準佐劑，例如佛氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)混合，製成乳狀液(emulsion)並且之後投予至哺乳動物。較佳為其之後投予與適合量之佛氏不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant)混合的抗原，每 4 至 21 天。也可使用一適合之載體來免疫。於上述免疫後，針對所需之抗體量增加，可以用標準方法檢驗血清。

【0198】藉由自被檢驗以增加於血清中之所需抗體的經免疫動物收集血液且藉由以任何一般方法自血液分離血清，可製備抗本發明胜肽之多株抗體。多株抗體可包括含多株抗體的血清，與含自血清分離之多株抗體的部分(fraction)。例如使用與本發明胜肽結合之親合管柱且更進一步使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱純化此部分，可自僅認識本發明胜肽之部分純化免疫

球蛋白 G 或 M。

【0199】爲了製備單株抗體，如上所述自經以抗原免疫並確認於血清中所需抗體之增加程度的哺乳動物收集免疫細胞且使免疫細胞遭遇細胞融合。用來細胞融合之免疫細胞，可較佳爲獲自脾臟。其他要被與上述免疫細胞融合之親代細胞包括，例如，哺乳動物之骨髓瘤(myeloma)，且較佳爲具有以藥物篩選之融合細胞之獲得特性的骨髓瘤細胞。

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

【0200】獲自細胞融合之產生的融合瘤，藉由將它們培養於標準篩選培養基，例如 HAT 培養基（含亞黃嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶(thymidine)之培養基），可被篩選。通常持續細胞培養於 HAT 培養基數天至數週，時間爲允許除了所需融合瘤外之其他細胞（非融合細胞）死亡。之後，可執行標準限制稀釋以篩選並複製產生所需抗體之融合瘤。

【0201】除了爲了製備融合瘤、以一抗原免疫一非人類動物的上述方法，可以胜肽、表現胜肽之細胞或其細胞萃取物於體外免疫人類淋巴細胞，例如被 EB 病毒感染的那些。之後，可將經免疫之淋巴細胞與具不明確分裂能力之來自人類之骨髓瘤，例如 U266 融合，以產生一所需人類抗體之融合瘤，所需之人類抗體可與可被獲得之胜肽結合(未審查之日本專利公開號 S 63-17688)。

【0202】將所獲得之融合瘤之後接著移植入小鼠之腹腔且萃取腹水。可純化所獲得之單株抗體，藉由例如硫酸銨沉澱、一蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱、DEAE 離子交換色層分析或一與本發明胜肽結合之親和管柱。本發明之一抗體不只可被使用來純化與偵測本發明胜肽，也可作為本發明胜肽之促進劑與拮抗劑的候選物。

【0203】也可使用基因工程技術來重組製備因此獲得之單株抗體（參見，例如 Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, published in the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)）。例如，一編碼出抗體的 DNA 可自一免疫細胞，例如產生抗體之一融合瘤或一經免疫的淋巴細胞被複製，插入一適合之載體，且引入一宿主細胞以製備重組抗體。本發明也提供如上述製備之重組抗體。

【0204】本發明抗體可為一抗體之片段或經修飾之抗體，只要其結合本發明之胜肽。例如，抗體片段可為 Fab、F(ab')₂、Fv 或單鏈 Fv (scFv)，於其中來自重與輕鏈的 Fv 片段藉由合適的連結器來連接(Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83 (1988))。更特別是，藉由以酵素例如木瓜酵素或胃蛋白酶處理抗體可產生抗體片段。或者，編碼出抗體之基因可被構築、插入一表現載體且表現於一適合的宿主細胞中（參見，例如 Co et al., *J Immunol* 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al.,

Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991))。

【0205】藉由與各種分子，例如聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 結合可修飾抗體。本發明提供此類經修飾之抗體。藉由化學修飾一抗體可獲得經修飾之抗體。這些修飾方法為本技術領域中所習知。

【0206】或者，本發明之抗體可被獲得為嵌合抗體，介於來自非人抗體之可變區與來自人類抗體之固定區之間，或為人源化抗體，包括來自非人抗體之互補決定區、架構作用區 (framework region, FR) 與來自人類抗體之固定區。根據已知方法可製備此類抗體。藉由齧齒類互補決定區之序列取代人類抗體對應之互補序列可執行人源化 (參見，例如 Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988))。因此，此類人源化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整之人類可變區已被來自非人種類之對應序列取代。

【0207】也可使用包括除了架構作用區與固定區尚有人類可變區的全人類抗體。使用各種本技術領域所知的技術可產生此類抗體。例如，體外方法包括呈現於噬菌體上之人類抗體片段的重組資料庫的使用 (例如，Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991))。相似地，藉由將人類免疫球蛋白基因座 (loci) 引入轉殖動物，例如於其中內生免疫球蛋白基因已被部分或完全去活化的小鼠，可製造人類抗體。此方法被敘述，例如於美國專利號 6,150,584, 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

【0208】獲自上述之抗體可被純化至同質(homogeneity)。例如，根據用於一般蛋白質的分離與純化方法可執行抗體之分離與純化。例如，藉由合適地選擇與結合管柱色層分析，例如親合管柱、過濾、超過濾、鹽析、透析、對鈉十二烷基的硫酸鹽聚丙稀酰胺凝膠電泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis)、等電聚焦法(isoelectric focusing)的使用可分開與分離抗體 (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))，但不限於此。蛋白質 A 管柱與蛋白質 G 管柱可被使用為親合管柱。要被使用之示範的蛋白質 A 管柱包括，例如 Hyper D、POROS 與 Sepharose F.F. (Pharmacia)。

【0209】除了親合色層分析(chromatography)，適合之色層分析技術的例子包括，例如離子交換色層分析、疏水色層分析、膠體過濾、逆向色層分析、吸附色層分析等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。藉由液相色層分析，例如 HPLC 與 FPLC 可執行色層分析步驟。

【0210】例如，可使用吸收之測量、酵素連結免疫吸附分析(ELISA)、酵素免疫分析(EIA)、放射免疫分析(RIA)及/或免疫螢光以測量本發明抗體之抗原結合活性。在酵素連結免疫吸附分析中，本發明抗體為固定於一培養盤上，提供本發明胜肽至一培養盤，且之後提供含所需抗體之樣本，如，產生抗體之細胞的培養懸浮液或經純化的抗體。之後，提供認識第一抗體

且被標誌酵素例如鹼性磷酸酶之第二抗體，且之後培養培養盤。接著在清洗後，將酵素受質，例如對硝基苯磷酸(p-nitrophenyl phosphate)，加至培養盤，並測量吸收以評估樣本之抗原結合活性。根據本發明，可使用 BIAcore (Pharmacia) 來評估抗體的活性。

【0211】 XII. 載體與宿主細胞

本發明也提供載體與宿主細胞，於其中將編碼出本發明胜肽之核苷酸引入。本發明之載體提供效用為保持核苷酸，特別是DNA於宿主細胞中以表現本發明胜肽，或為基因治療來投予本發明核苷酸而言為有效的。

【0212】 當 *E. coli* 被選擇為宿主細胞且載體被放大且大量製造於 *E. coli* (例如，JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1Blue) 中時，載體應具有適合於 *E. coli* 中放大之“ori”與適合篩選轉形 *E. coli* 之標誌基因 (例如，藉由例如安比西林(ampicillin)、四環黴素(tetracycline)、卡那黴素(kanamycin)、氯黴素(chloramphenicol)或類似物之藥物篩選之一抗藥基因)。例如，可使用 M13-系列載體、pUC-系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。此外，pGEM-T、pDIRECT 與 pT7 也可被用來次選殖與萃取 cDNA 與上述載體。當載體被用來產生本發明胜肽時，一表現載體可提供效用。例如，要被表現於 *E. coli* 中之一表現載體應具有上述特徵以被放大於 *E. coli* 中。當使用 *E. coli*，例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1 Blue 為宿主細胞時，載體應具有啟動子(promoter)，例如 lacZ 啟動子(Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)),

araB promoter (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988))、T7 啓動子或類似物，其可有效表現所需基因於 *E. coli* 中。基於那方面，可使用，例如 pGEX- 5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen)、pEGFP 與 pET(於此例子，宿主較佳爲 BL21，其表現 T7 RNA 聚合酶)，取代上述載體。另外，載體也可含用於胜肽分泌之訊號序列。一引導要被分泌之胜肽至 *E. coli* 的胞膜間區(periplasm)的示範之訊號序列爲 pelB 訊號序列(Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987))。將載體引入目標宿主細胞的方式包括，例如，氯化鈣方法，與電穿孔(electroporation)方法。

【0213】除了 *E. coli*，例如來自哺乳動物之表現載體（例如 pcDNA3 (Invitrogen)與 pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8)、來自昆蟲細胞之表現載體（例如，"Bac-to-BAC 桿狀病毒表現系統 (baculovirus expression system)" (GIBCO BRL)、pBacPAK8）、來自植物之表現載體（例如，pMH1、pMH2）、來自動物病毒之表現載體（例如，pHSV、pMV、pAdexLcw）、來自反轉錄病毒之表現載體（例如，pZIpneo）、來自酵母菌之表現載體（例如，"Pichia Expression Kit" (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01）與來自枯草桿菌(*Bacillus subtilis*) 之表現載體（例如，pPL608, pKTH50）可被用來生產本發明之多胜肽。

【0214】爲了在於動物細胞，例如 CHO、COS 或 NIH3T3 細胞中表現載體，載體應具有表現於此類細胞中所必須的啓動子，例如 SV40 啓動子(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，且較佳有篩選轉形物的標誌基因（例如藉由藥物篩選（例如，新黴素(neomycin)、G418 之抗藥基因）。具有這些載體特徵之已知載體的例子包括，例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 與 pOP13。

【0215】雖然與在此所述者為類似或等同的方法與材料可用於實踐或測試本發明，但仍將敘述適合的方法與材料。所有的出版品、專利申請案、專利及其他提及的參考文獻完整引入作為參考。當有抵觸時，以本發明，包括定義為準。此外，材料、方法及實施例係僅供理解用，並非限制性的。

[實施例]

【0216】實施例 1

材料與方法

細胞株

TISI、HLA-A*2402 陽性 B-淋巴母細胞株係向 IHWG Cell and Gene Bank (Seattle, WA)購買。T2、HLA-A*0201 陽性 B-淋巴母細胞株、及 COS7、非洲綠猴腎細胞株係向 ATCC 購買。

【0217】來自 UBE2T 之胜肽的候選物選擇

使用“NetMHC3.2”結合預測伺服器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al., Tissue Antigen. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12;20(9):1388-97)及“BIMAS” (http://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)來預測結合於 HLA-A*2402 或 HLA-A*0201 分子的來自 UBE2T 的 9 員及 10 員胜肽。此等胜肽依標準固相合成法利用生合成(Biosynthesis) (Lewisville, Texas)合成，並以逆向高效液體層析(HPLC)純化。分別藉由分析型 HPLC 與質譜分析確認這些胜肽之純度(> 90%) 與身份(identity)。將胜肽溶解於二甲基亞砜(dimethylsulfoxide, DMSO)中於 20 mg/ml 且儲存於-80℃。

【0218】於體外誘導細胞毒殺性 T 淋巴球

使用來自單核白血球之樹突細胞做為抗原呈現細胞以誘導抗表現於人類白血球組織抗原(HLA)上之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球反應。如他處所述，於體外產生樹突細胞 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。特別地，由 Ficoll-Plaque (Pharmacia)溶液分離自一正常自願者(HLA-A*2402或HLA-A*0201陽性)之周邊血液單核細胞，藉由貼附至一塑膠組織培養盤(Becton Dickinson)來分離以豐富其如一單核白血球部分。將經豐富單核白血球之族群培養在1000 U/ml之人類顆粒-巨噬細胞群落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (R&D System)與1000 U/ml之白細胞介素(interleukin, IL)-4 (R&D System)存在下於含2%之熱去活性自身取得血清(autologous serum, AS)之AIM-V培養基(Invitrogen)中。培養7天後，於37℃於AIM-V培養基中，於3 µg /ml之β-2微球蛋白(beta 2-microglobulin)存在下以20 µg/ml之各合成胜肽脈衝(pulsed)細胞激素誘導之樹突細胞3小時。所

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

【0219】細胞毒殺性 T 淋巴球擴張步驟

使用與由Riddell et al. (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23)所敘述之相似方法於培養中擴張細胞毒殺性T淋巴球。全部 5×10^4 細胞毒殺性T淋巴球懸浮於25 ml之含有兩種人類B類淋巴母細胞株之AIM-V/5% 自身取得血清培養基，由MMC去活化，在40 ng/ml之抗-CD3單株抗體(Pharmingen)

存在下。在開始培養1天後，120 IU/ml之IL-2加入培養中。於第5、8、11天以新鮮之含30 IU/ml之IL-2的AIM-V/5%自身取得血清培養基提供給培養物(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

【0220】細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體(clone)的建立

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

【0221】專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性

爲了測試專一之細胞毒殺性T淋巴球活性，執行IFN- γ 酵素結合免疫斑點(ELISPOT)分析與IFN- γ 酵素結合免疫吸附(ELISA)分析。製備胜肽脈衝之TISI細胞或T2(1×10^4 /井)爲刺激細胞(stimulator cell)。於48孔中培養之細胞做爲應答細胞

(responder cell)。依製造商步驟執行IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析與IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析。

【0222】強有力地表現目標基因與 HLA-A24 或 HLA-A02 任一或兩者的細胞的建立

藉由PCR將編碼出UBE2T之開放讀框、HLA-A*2402或HLA-A*0201的cDNA放大。將PCR放大產物選殖進一表現載體。使用lipofectamine 2000 (Invitrogen)，根據製造步驟將質體轉染進COS7，其為一UBE2T-無效、HLA-A*0201-無效與HLA-A*2402-無效的細胞株。於轉染後2天，以versene (Invitrogen)收集經轉染的細胞且使用為細胞毒殺性T淋巴球活性分析之目標細胞(5×10^4 細胞/井)。

【0223】結果

於癌症中增強之UBE2T表現

使用 c-DNA 微陣列獲得自各種癌症之廣泛基因表現概況(profile)顯示 UBE2T (GenBank Accession No. NM_014176 (序列識別號: 64))的表現提升。UBE2T 的表現，在與正常對應組織比較時，24 名膀胱癌中的 24 名、50 名乳癌中的 44 名、15 名子宮頸癌中的 14 名、12 名膽管細胞癌中的 12 名、16 名 CML 中的 9 名、9 名結腸直腸癌中的 9 名、47 名食道癌中的 31 名、8 名胃癌中的 5 名、2 名瀰散型胃癌中的 2 名、27 名 NSCLC 中的 23 名、3 名淋巴癌中的 3 名、16 名骨肉瘤中的 9 名、7 名卵巢癌中的 3 名、3 名胰臟癌中的 3 名、23 名前列腺癌中的 21 名、12 名 SCLC 中的 12 名、26 名軟組織腫瘤中的 11 名，及 9 名睪丸腫瘤中的 7 名，有根據地提升表現(表 1)。

【0224】

表 1.與正常對應組織比較，於癌化組織中觀察到 UBE2T 之
向上調控之例子的比例

癌/腫瘤	比例
膀胱癌	24/24
乳癌	44/50
子宮頸癌	14/15
膽管細胞癌	12/12
CML	9/16
結腸直腸癌	9/9
食道癌	31/47
胃癌	5/8
瀰散型胃癌	2/2
NSCLC	23/27
淋巴癌	3/3
骨肉瘤	9/16
卵巢癌	3/7
胰臟癌	3/3
前列腺癌	21/23
SCLC	12/12
軟組織腫瘤	11/26
睪丸腫瘤	7/9

來自 UBE2T 之 HLA-A24 結合胜肽的預測

表 2a 與 2b 以高結合親和力之順序顯示 UBE2T 之 HLA-A24 結合的 9 員與 10 員胜肽。總共 27 個具有潛在 HLA-A24 結合能力之胜肽被選擇且將其試驗以確定抗原決定位胜肽。

【0225】

表 2a. 來自 UBE2T 之 HLA-A24 結合的 9 員胜肽

序列識別號	起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)
1	60	RYPFEPPQI	25
2	45	PYEKGVFKL	752
3	124	LMADISSEF	1463
4	133	KYNKPAFLK	2283
5	55	VIIPERYPF	3082
6	138	AFLKNARQW	3317
7	6	RLKRELHML	3711
8	71	LTPIYHPNI	4077
9	131	EFKYNKPAF	4692
10	62	PFEPPQIRF	7647
11	43	NTPYEKGVF	9498
12	106	TVLTSIQLL	9831
序列識別號	起始位置	胺基酸序列	結合分數
13	3	RASRLKREL	10.56
14	84	RICLDVLKL	8.8
15	105	ATVLTSIQL	6
16	74	IYHPNIDSA	6

表 2b. 來自 UBE2T 之 HLA-A24 結合的 10 員胜肽

序列識別號	起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)
17	130	SEFKYNKPAF	776
18	123	PLMADISSEF	5392
19	131	EFKYNKPAFL	7050
序列識別號	起始位置	胺基酸序列	結合分數
20	133	KYNKPAFLKN	19.8
21	99	RPSLNIA TVL	11.2
22	154	KQKADEE EML	8
23	105	ATVLTSIQLL	7.2
24	115	MSEPNPDDPL	7.2
25	177	STQKRKASQL	6
26	30	QMDDLRAQIL	5.76
27	44	TPYEKGVFKL	5.28

起始位置指自UBE2T之N端起算之胺基酸殘基的數目。
結合分數及分離常數[Kd (nM)]各來自“BIMAS”及“NetMHC3. 2”。

來自 UBE2T 之 HLA-A02 結合胜肽的預測

表 3a 與 3b 以高結合親和力之順序顯示 UBE2T 之 HLA-A02 結合的 9 員與 10 員胜肽。總共 36 個具有潛在 HLA-A02 結合能力之胜肽被選擇且將其試驗以確定抗原決定位胜肽。

【0226】

表 3a. 來自 UBE2T 之 HLA-A02 結合的 9 員胜肽

序列識別號	起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)
28	161	EMLDNLPEA	76
29	107	VLTSIQLLM	385
30	30	QMDDLRAQI	473
31	103	NIATVLTSI	668
32	106	TVLTSIQLL	1048
33	124	LMADISSEF	1595
34	6	RLKRELHML	1653
35	101	SLNIATVLT	3347
36	49	GVFKLEVII	5114
37	70	FLTPIYHPN	5950
38	13	MLATEPPPG	6039
39	84	RICLDVLKL	6284
40	66	PQIRFLTPI	6587
41	132	FKYNKPAFL	6642
42	96	GAWRPSLNI	8188
43	81	SAGRICLDV	8938
44	14	LATEPPPGI	9511
45	105	ATVLTSIQL	9872
序列識別號	起始位置	胺基酸序列	結合分數
46	139	FLKNARQWT	6.599

表 3b. 來自 UBE2T 之 HLA-A02 結合的 10 員胜肽

序列識別號	起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)
47	13	MLATEPPPGI	43
48	70	FLTPIYHPNI	49
49	6	RLKRELHMLA	1415
50	165	NLPEAGDSRV	1902
51	106	TVLTSIQLLM	2648
52	102	LNIATVLTSI	3011
53	30	QMDDLRAQIL	4035
54	12	HMLATEPPPG	4153
55	101	SLNIATVLT	4622
56	29	DQMDDLRAQI	5029
57	105	ATVLTSIQLL	5128
58	38	ILGGANTPYE	6464
59	107	VLTSIQLLMS	7911
60	161	EMLDNLPEAG	9002
61	113	LLMSEPNPDD	9132
62	104	IATVLTSIQL	9157
序列識別號	起始位置	胺基酸序列	結合分數
63	44	TPYEKGVFKL	24.406

起始位置指自UBE2T之N端起算之胺基酸殘基的數目。
結合分數及分離常數[Kd (nM)]各來自“BIMAS”及“NetMHC3. 2”。

【0227】以 HLA-A*2402 限制之來自 UBE2T 之預測胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球

根據敘述於“材料與方法”之步驟產生對於那些來自 UBE2T 之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（圖 1）。與控制組并相較，經 UBE2T-A24-9-60（序列識別號：1）刺激之并編號 #8（a）、經 UBE2T-A24-9-45（序列識別號：2）刺激之 #1（b）、經 UBE2T-A24-9-133（序列識別號：4）刺激之 #6（c）、經 UBE2T-A24-9-138（序列識別號：6）刺激之 #6（d）、經 UBE2T-A24-9-43（序列識別號：11）刺激之 #4（e）、經 UBE2T-A24-9-106（序列識別號：12）刺激之 #2（f）、經 UBE2T-A24-9-3（序列識別號：13）刺激之 #6（g）、經 UBE2T-A24-9-105（序列識別號：15）刺激之 #3（h）、經 UBE2T-A24-10-130（序列識別號：17）刺激之 #2（i）、經 UBE2T-A24-10-131（序列識別號：19）刺激之 #1（j）、經 UBE2T-A24-10-133（序列識別號：20）刺激之 #3（k）、經 UBE2T-A24-10-99（序列識別號：21）刺激之 #6（l）、經 UBE2T-A24-10-154（序列識別號：22）刺激之 #7（m）、經 UBE2T-A24-10-105（序列識別號：23）刺激之 #8（n）、經 UBE2T-A24-10-115（序列識別號：24）刺激之 #1（o）、經 UBE2T-A24-10-177（序列識別號：25）刺激之 #4（p）及經 UBE2T-A24-10-44（序列識別號：27）刺激之 #7（q），證實有強力的 IFN- γ 生產。另一方面，藉由已顯示於表 2a 與 2b 中之其他胜肽刺激，沒有偵測到專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，儘管

那些胜肽具有與HLA-A*2402之可能結合活性。作為負資料之一典型，從以UBE2T-A24-9-124（序列識別號：3）(r)刺激之細胞毒殺性T淋巴球沒有觀察到專一的IFN- γ 產生。總而言之，這些結果建議來自UBE2T之17個選出的胜肽可誘導強有力之細胞毒殺性T淋巴球。

【0228】以 HLA-A*0201 限制之來自 UBE2T 之預測胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球

針對來自UBE2T之胜肽的細胞毒殺性T淋巴球，係依”材料及方法”所述之實驗流程產生。藉由IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測胜肽專一細胞毒殺性T淋巴球活性（圖2）。與控制組并相較，經UBE2T-A02-9-107（序列識別號：29）刺激之并編號#4（a）、經UBE2T-A02-9-30（序列識別號：30）刺激之#5（b）、經UBE2T-A02-9-106（序列識別號：32）刺激之#7（c）、經UBE2T-A02-9-49（序列識別號：36）刺激之#5（d）、經UBE2T-A02-9-13（序列識別號：38）刺激之#3（e）、經UBE2T-A02-9-132（序列識別號：41）刺激之#4（f）、經UBE2T-A02-10-70（序列識別號：48）刺激之#6（g）、經UBE2T-A02-10-6（序列識別號：49）刺激之#7（h）、經UBE2T-A02-10-106（序列識別號：51）刺激之#8（i）、經UBE2T-A02-10-102（序列識別號：52）刺激之#2（j）、經UBE2T-A02-10-30（序列識別號：53）刺激之#1（k）、經UBE2T-A02-10-101（序列識別號：55）刺激之#8（l）、經UBE2T-A02-10-29（序列識別號：56）刺激之#5（m），及經UBE2T-A02-10-38（序列識別號：58）刺激之#3（n），證實有力的

IFN- γ 生產。另一方面，藉由已顯示於表3a與3b中之其他胜肽刺激，沒有偵測到專一之細胞毒殺性T淋巴球活性，儘管那些胜肽具有與HLA-A*0201之可能結合活性。作為負資料之典型，從以UBE2T-A02-9-161 (序列識別號: 28) (o)刺激之細胞毒殺性T淋巴球沒有觀察到專一的IFN- γ 產生。總而言之，這些結果建議來自UBE2T之14個選出的胜肽可誘導強有力之細胞毒殺性T淋巴球。

【0229】抗 UBE2T 衍生胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與選殖體的建立

藉由IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測，將顯示胜肽專一細胞毒殺性T淋巴球活性的經UBE2T-A24-9-60 (序列識別號: 1) 刺激之井編號#8(a)中、經UBE2T-A24-9-45 (序列識別號: 2)刺激之#1中 (b)、經UBE2T-A24-9-3 (序列識別號: 13)刺激之 #6中 (c)及經UBE2T-A24-10-44 (序列識別號: 27)刺激之#7中的細胞擴張並建立細胞毒殺性T淋巴球細胞株。藉由IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析來測量這些細胞毒殺性T淋巴球細胞株的細胞毒殺性T淋巴球活性 (圖3)。與無胜肽脈衝之目標細胞相較，細胞毒殺性T淋巴球細胞株顯示強的抗以對應胜肽脈衝之目標細胞的IFN- γ 產生。此外，如“材料與方法”段落中所述，藉由來自細胞毒殺性T淋巴球細胞株的限制稀釋建立細胞毒殺性T淋巴球選殖體，且藉由IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析測量來自抗經對應胜肽脈衝之TISI細胞之細胞毒殺性T淋巴球選殖體的IFN- γ 產生。經以UBE2T-A24-9-60 (序列識別號: 1) (a)、UBE2T-A24-9-45 (序列識別號: 2) (b)與UBE2T-A24-9-3 (序列

識別號：13) (c) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體觀察到強的 IFN- γ 產生（圖 4）。

【0230】藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測，將顯示胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性的經 UBE2T-A02-9-107 (序列識別號：29) 刺激之井編號 #4 中 (a)、經 UBE2T-A02-9-13 (序列識別號：38) 刺激之 #3 中 (b)、經 UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48) 刺激之 #6 中 (c)、經 UBE2T-A02-10-102 (序列識別號：52) 刺激之 #2 中 (d) 及經 UBE2T-A02-10-101 (序列識別號：55) 刺激之 #8 中 (e) 之細胞擴張並建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析來測量這些細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的細胞毒殺性 T 淋巴球活性（圖 5）。與無胜肽脈衝之目標細胞相較，細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強的抗以對應胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生。此外，如“材料與方法”段落中所述，藉由來自細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的限制稀釋建立細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體，且藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析測量來自抗經對應胜肽脈衝之 T2 細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體的 IFN- γ 產生。經 UBE2T-A02-9-107 (序列識別號：29) (a)、UBE2T-A02-9-13 (序列識別號：38) (b)、UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48) (c)、UBE2T-A02-10-102 (序列識別號：52) (d) 及 UBE2T-A02-10-101 (序列識別號：55) (e) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體觀察到強的 IFN- γ 產生（圖 6）。

【0231】抗表現 UBE2T 與 HLA-A*2402 或 HLA-A*0201 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性

檢驗經建立的抗 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號: 1) 胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體對於認識表現 UBE2T 與 HLA-A* 2402 分子之目標細胞的能力。經全長之 UBE2T 與 HLA-A* 2402 基因兩者轉染 (對於表現 UBE2T 與 HLA-A* 2402 基因之目標細胞的特定模式) 的 COS7 細胞被製備為刺激細胞, 且以全長之 UBE2T 與 HLA-A* 2402 基因之任一轉染的 COS7 細胞被使用為控制組。於圖 7 中, 以 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號: 1) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體顯示強的抗表現 UBE2T 與 HLA-A* 2402 兩者之 COS7 細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。另一方面, 沒有偵測到抗控制組之顯著專一的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。因此, 此資料清楚證明 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號: 1) 胜肽被內生地處理且表現於具有 HLA-A* 2402 分子之目標細胞上且由細胞毒殺性 T 淋巴球所認識。這些結果指出此來自 UBE2T 之胜肽為可用以提供對於具 UBE2T 表現之腫瘤之病患的癌症疫苗。

【0232】檢驗經建立的抗 UBE2T-A02-10-70 (序列識別號: 48) 胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體對於認識表現 UBE2T 與 HLA-A*0201 分子之目標細胞的能力。經全長之 UBE2T 與 HLA-A*0201 基因兩者轉染 (對於表現 UBE2T 與 HLA-A*0201 基因之目標細胞的特定模式) 的 COS7 細胞被製備為刺激細胞, 且以全長之 UBE2T 與 HLA-A*0201 基因之任一轉染的 COS7 細胞被使用為控制組。於圖 8 中, 以 UBE2T-A02-10-70 (序列識別號: 48) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球選殖體顯示強的抗表現 UBE2T 與 HLA-A*0201 兩者之 COS7 細胞的細胞毒殺性

T 淋巴球活性。另一方面，沒有偵測到抗控制組之顯著專一的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。因此，此資料清楚證明 UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48) 胜肽被內生地處理且表現於具有 HLA-A*0201 分子之目標細胞上且由細胞毒殺性 T 淋巴球所認識。這些結果指出此來自 UBE2T 之胜肽為可用以提供對於具 UBE2T 表現之腫瘤之病患的癌症疫苗。

【0233】 抗原胜肽之同源分析

經 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號：1)、UBE2T-A24-9-45 (序列識別號：2)、UBE2T-A24-9-133 (序列識別號：4)、UBE2T-A24-9-138 (序列識別號：6)、UBE2T-A24-9-43 (序列識別號：11)、UBE2T-A24-9-106 (序列識別號：12)、UBE2T-A24-9-3 (序列識別號：13)、UBE2T-A24-9-105 (序列識別號：15)、UBE2T-A24-10-130 (序列識別號：17)、UBE2T-A24-10-131 (序列識別號：19)、UBE2T-A24-10-133 (序列識別號：20)、UBE2T-A24-10-99 (序列識別號：21)、UBE2T-A24-10-154 (序列識別號：22)、UBE2T-A24-10-105 (序列識別號：23)、UBE2T-A24-10-115 (序列識別號：24)、UBE2T-A24-10-177 (序列識別號：25)、UBE2T-A24-10-44 (序列識別號：27)、UBE2T-A02-9-107 (序列識別號：29)、UBE2T-A02-9-30 (序列識別號：30)、UBE2T-A02-9-106 (序列識別號：32)、UBE2T-A02-9-49 (序列識別號：36)、UBE2T-A02-9-13 (序列識別號：38)、UBE2T-A02-9-132 (序列識別號：41)、UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48)、UBE2T-A02-10-6 (序列識別號：49)、UBE2T-A02-10-106 (序列

識別號：51)、UBE2T-A02-10-102 (序列識別號：52)、
UBE2T-A02-10-30 (序列識別號：53)、UBE2T-A02-10-101 (序
列識別號：55)、UBE2T-A02-10-29 (序列識別號：56)及
UBE2T-A02-10-38 (序列識別號：58) 刺激之細胞毒殺性 T 淋
巴球顯示顯著且專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。此結果可能
起因於 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號：1)、UBE2T-A24-9-45
(序列識別號：2)、UBE2T-A24-9-133 (序列識別號：4)、
UBE2T-A24-9-138 (序列識別號：6)、UBE2T-A24-9-43 (序列識
別號：11)、UBE2T-A24-9-106 (序列識別號：12)、
UBE2T-A24-9-3 (序列識別號：13)、UBE2T-A24-9-105 (序列識
別號：15)、UBE2T-A24-10-130 (序列識別號：17)、
UBE2T-A24-10-131 (序列識別號：19)、UBE2T-A24-10-133 (序
列識別號：20)、UBE2T-A24-10-99 (序列識別號：21)、
UBE2T-A24-10-154 (序列識別號：22)、UBE2T-A24-10-105 (序
列識別號：23)、UBE2T-A24-10-115 (序列識別號：24)、
UBE2T-A24-10-177 (序列識別號：25)、UBE2T-A24-10-44 (序
列識別號：27)、UBE2T-A02-9-107 (序列識別號：29)、
UBE2T-A02-9-30 (序列識別號：30)、UBE2T-A02-9-106 (序列
識別號：32)、UBE2T-A02-9-49 (序列識別號：36)、
UBE2T-A02-9-13 (序列識別號：38)、UBE2T-A02-9-132 (序列
識別號：41)、UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48)、
UBE2T-A02-10-6 (序列識別號：49)、UBE2T-A02-10-106 (序列
識別號：51)、UBE2T-A02-10-102 (序列識別號：52)、
UBE2T-A02-10-30 (序列識別號：53)、UBE2T-A02-10-101 (序

列識別號：55)、UBE2T-A02-10-29 (序列識別號：56) 與 UBE2T-A02-10-38 (序列識別號：58) 之序列為與源自己知使人類免疫系統敏感之其他分子的胜肽同源的事實。爲了排除此可能性，對於使用爲關鍵字向 BLAST 演算法(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)查詢之這些胜肽序列執行同源性分析，而 BLAST 演算法顯示沒有序列顯示顯著之同源性。同源性分析之結果指出 UBE2T-A24-9-60 (序列識別號：1)、UBE2T-A24-9-45 (序列識別號：2)、UBE2T-A24-9-133 (序列識別號：4)、UBE2T-A24-9-138 (序列識別號：6)、UBE2T-A24-9-43 (序列識別號：11)、UBE2T-A24-9-106 (序列識別號：12)、UBE2T-A24-9-3 (序列識別號：13)、UBE2T-A24-9-105 (序列識別號：15)、UBE2T-A24-10-130 (序列識別號：17)、UBE2T-A24-10-131 (序列識別號：19)、UBE2T-A24-10-133 (序列識別號：20)、UBE2T-A24-10-99 (序列識別號：21)、UBE2T-A24-10-154 (序列識別號：22)、UBE2T-A24-10-105 (序列識別號：23)、UBE2T-A24-10-115 (序列識別號：24)、UBE2T-A24-10-177 (序列識別號：25)、UBE2T-A24-10-44 (序列識別號：27)、UBE2T-A02-9-107 (序列識別號：29)、UBE2T-A02-9-30 (序列識別號：30)、UBE2T-A02-9-106 (序列識別號：32)、UBE2T-A02-9-49 (序列識別號：36)、UBE2T-A02-9-13 (序列識別號：38)、UBE2T-A02-9-132 (序列識別號：41)、UBE2T-A02-10-70 (序列識別號：48)、UBE2T-A02-10-6 (序列識別號：49)、UBE2T-A02-10-106 (序列識別號：51)、UBE2T-A02-10-102 (序列識別號：52)、

UBE2T-A02-10-30 (序列識別號: 53)、UBE2T-A02-10-101 (序列識別號: 55)、UBE2T-A02-10-29 (序列識別號: 56) 及 UBE2T-A02-10-38 (序列識別號: 58) 之序列為獨特的，且因此只有很小可能性，對於我們最佳知識而言，這些分子會對於一些非相關分子提高非計畫中之免疫反應。因此，於此確認之新穎之來自 UBE2T 的 HLA-A*2402 或 HLA-A*0201 抗原決定位胜肽可應用於癌症免疫治療之領域中。

[產業利用性]

【0234】本發明提供新的來自 UBE2T 的抗原決定位胜肽，其可誘導強且專一的抗腫瘤免疫反應，且因此對於癌症形式之廣泛多樣化而言具有應用性。此胜肽作為抗與 UBE2T 相關之疾病的胜肽疫苗為有效的，與 UBE2T 相關之疾病，例如癌症，尤其是膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰散型胃癌、NSCLC、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、SCLC、軟組織腫瘤及睪丸腫瘤。

【0235】雖已於此詳述本發明與提及其特定實施例，但需瞭解前述敘述本質為示範與解釋且意為說明本發明與其較佳實施例。於例行實驗之中，熟悉此技藝人士可立即瞭解在不脫離本發明之精神下其可實行各種改變與修飾，其邊界與範圍被所附申請專利範圍所定義。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 腫瘤療法・科學股份有限公司(ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.)

<120> UBE2T 胜肽與含此之疫苗

<130> ONC-A1213-TW

<150> US 61/699,550

<151> 2012-09-11

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 1

Arg Tyr Pro Phe Glu Pro Pro Gln Ile
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 2

Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 3

Leu Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 4

Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu Lys
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 5

Val Ile Ile Pro Glu Arg Tyr Pro Phe
1 5

<210> 6
<211> 9

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 6

Ala Phe Leu Lys Asn Ala Arg Gln Trp
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 7

Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 8

Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 9

Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 10

Pro Phe Glu Pro Pro Gln Ile Arg Phe
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 11

Asn Thr Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 12

Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 13

Arg Ala Ser Arg Leu Lys Arg Glu Leu
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 14

Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 15

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 16

Ile Tyr His Pro Asn Ile Asp Ser Ala
1 5

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 17

Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 18

2

2

<213> 人造序列

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

1

<213> 人造序列

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

I

<213> 人造序列

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

5

Arg Pro Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 22

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

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 23

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 24

Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp Pro Leu
1 5 10



<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 25

Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 26

Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 27

Thr Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 28

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 29

Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 30

Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile
1 5

<210> 31
<211> 9

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 31

Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 32

Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 33

Leu Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 34

Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 35

Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 36

Gly Val Phe Lys Leu Glu Val Ile Ile
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>



<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 37

Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 38

Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 39

Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 40

Pro Gln Ile Arg Phe Leu Thr Pro Ile
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 41

Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 42

Gly Ala Trp Arg Pro Ser Leu Asn Ile
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 43

Ser Ala Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 44

Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly Ile
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 45

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 46

Phe Leu Lys Asn Ala Arg Gln Trp Thr
1 5

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 47

Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly Ile
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 48

Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 49

Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu Ala
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 50

Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser Arg Val
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 51

Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 52

Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile
1 5 10

<210> 53

<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 53

Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu
1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 54

His Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly
1 5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 55

Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 56

Asp Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile
1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 57

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 58

Ile Leu Gly Gly Ala Asn Thr Pro Tyr Glu
1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 59

Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met Ser
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 60

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly
1 5 10

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 61

Leu Leu Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp
1 5 10

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 62

Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu
1 5 10

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 UBE2T 之胜肽

<400> 63

Thr Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu
1 5 10

<210> 64
<211> 935
<212> DNA
<213> 人類(Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (137)..(730)

<400> 64
agtcagaggt cgcgcaggcg ctggtacccc gttgggtccgc gcgttgctgc gttgtgaggg 60

gtgtcagctc agtgcacccc aggcagctct tagtgtggag cagtgaactg tgtgtggttc 120

cttctacttg gggatc atg cag aga gct tca cgt ctg aag aga gag ctg cac 172
Met Gln Arg Ala Ser Arg Leu Lys Arg Glu Leu His
1 5 10

atg tta gcc aca gag cca ccc cca ggc atc aca tgt tgg caa gat aaa 220
Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly Ile Thr Cys Trp Gln Asp Lys
15 20 25

gac caa atg gat gac ctg cga gct caa ata tta ggt gga gcc aac aca Asp Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu Gly Gly Ala Asn Thr 30 35 40	268
cct tat gag aaa ggt gtt ttt aag cta gaa gtt atc att cct gag agg Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu Glu Val Ile Ile Pro Glu Arg 45 50 55 60	316
tac cca ttt gaa cct cct cag atc cga ttt ctc act cca att tat cat Tyr Pro Phe Glu Pro Pro Gln Ile Arg Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His 65 70 75	364
cca aac att gat tct gct gga agg att tgt ctg gat gtt ctc aaa ttg Pro Asn Ile Asp Ser Ala Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu 80 85 90	412
cca cca aaa ggt gct tgg aga cca tcc ctc aac atc gca act gtg ttg Pro Pro Lys Gly Ala Trp Arg Pro Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu 95 100 105	460
acc tct att cag ctg ctc atg tca gaa ccc aac cct gat gac ccg ctc Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp Pro Leu 110 115 120	508
atg gct gac ata tcc tca gaa ttt aaa tat aat aag cca gcc ttc ctc Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu 125 130 135 140	556
aag aat gcc aga cag tgg aca gag aag cat gca aga cag aaa caa aag Lys Asn Ala Arg Gln Trp Thr Glu Lys His Ala Arg Gln Lys Gln Lys 145 150 155	604
gct gat gag gaa gag atg ctt gat aat cta cca gag gct ggt gac tcc Ala Asp Glu Glu Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser 160 165 170	652
aga gta cac aac tca aca cag aaa agg aag gcc agt cag cta gta ggc Arg Val His Asn Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu Val Gly 175 180 185	700
ata gaa aag aaa ttt cat cct gat gtt tag gggacttgtc ctggttcac Ile Glu Lys Lys Phe His Pro Asp Val 190 195	750

ttagttaatg tgttctttgc caaggtgatc taagttgcct accttgaatt tttttttaa 810
tatatttgat gacataatgt ttgtgtagtt tttttatctt gtacatatgt attttgaaat 870
cttttaaacc tgaaaaataa atagtcattt aatgttgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 930
aaaaa 935

<210> 65
<211> 197
<212> PRT
<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 65

Met Gln Arg Ala Ser Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu Ala Thr
1 5 10 15

Glu Pro Pro Pro Gly Ile Thr Cys Trp Gln Asp Lys Asp Gln Met Asp
20 25 30

Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu Gly Gly Ala Asn Thr Pro Tyr Glu Lys
35 40 45

Gly Val Phe Lys Leu Glu Val Ile Ile Pro Glu Arg Tyr Pro Phe Glu
50 55 60

Pro Pro Gln Ile Arg Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile Asp
65 70 75 80

Ser Ala Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu Pro Pro Lys Gly
85 90 95

Ala Trp Arg Pro Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln
100 105 110

Leu Leu Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp Pro Leu Met Ala Asp Ile
115 120 125

Ser Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu Lys Asn Ala Arg
130 135 140

Gln Trp Thr Glu Lys His Ala Arg Gln Lys Gln Lys Ala Asp Glu Glu
145 150 155 160

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser Arg Val His Asn
165 170 175

Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu Val Gly Ile Glu Lys Lys
180 185 190

Phe His Pro Asp Val
195

<210> 66
<211> 22
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> TCR 分析用之 PCR 引子

<400> 66
gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> TCR 分析用之 PCR 引子

<400> 67	
tcagctggac cacagccgca gcgt	24
<210> 68	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> TCR 分析用之 PCR 引子	
<400> 68	
tcagaaatcc tttctcttga c	21
<210> 69	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> TCR 分析用之 PCR 引子	
<400> 69	
ctagcctctg gaatcctttc tctt	24

申請專利範圍

1. 一種單離胜肽，具有細胞毒殺性 T 淋巴球(CTL)誘導能力，其中，該胜肽包含下述的胺基酸序列(a)或(b):
 - (a) 選自由下述序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組之胺基酸序列；
 - (b) 選自由下述序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組之胺基酸序列，其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加成。
2. 如申請專利範圍第 1 項之單離胜肽，其中，該胜肽係下述的寡胜肽(i)或(ii):
 - (i) 有下述一或兩種特性之胜肽：
 - (a) 序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 之胺基酸序列自 N 末端算起的第 2 個胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸；
 - (b) 序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25 或 27 之胺基酸序列的 C 末端胺基酸取代為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸；
 - (ii) 有下述一或兩種特性之胜肽：

- (a) 序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之胺基酸序列自 N 末端算起的第 2 個胺基酸取代為白胺酸或甲硫胺酸；及
- (b) 序列識別號：29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 或 58 之 C 末端胺基酸取代為纈胺酸或白胺酸。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之單離胜肽，其中，該胜肽為 9 員胜肽或 10 員胜肽。
4. 如申請專利範圍第 3 項之單離胜肽，其中，該胜肽由選自於序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組中之胺基酸序列組成。
5. 一種單離多核苷酸，係編碼為如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽。
6. 一種供誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之組合物，其中，該組合物包含至少 1 種選自由下述構成之群組中的有效成分：
- (a) 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽；
- (b) 如申請專利範圍第 5 項之單離多核苷酸；
- (c) 一抗原呈現細胞(APC)，其呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽於其表面；及
- (d) 一外吐小體，其呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽於其表面。
7. 一種藥學組合物，係供治療及/或預防癌症，及/或防止其術

後再復發，其中，該組合物包含至少 1 種選自由下述構成之群組中的有效成分：

- (a) 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽；
- (b) 如申請專利範圍第 5 項之單離多核苷酸；
- (c) 一抗原呈現細胞(APC)，其呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽於其表面；
- (d) 一外吐小體，其呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽於其表面；及
- (e) 一細胞毒殺性 T 淋巴球，其能認識呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽的細胞。

8. 如申請專利範圍第 7 項之藥學組合物，其中，該藥學組合物係配方為對於 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2 之對象投予。

9. 一種誘導有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力之抗原呈現細胞的方法，其中，該方法包含選自於由下述構成之群組中之步驟：

- (a) 使抗原呈現細胞與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽接觸，及
- (b) 將編碼為如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽的多核苷酸導入一抗原呈現細胞。

10. 一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之方法，其中，該方法包含選自於由下述構成之群組中之步驟：

- (a) 共同培養 CD8 陽性 T 細胞及一抗原呈現細胞，該抗原呈現細胞在其表面上呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1

至 4 項中任一項之單離胜肽的複合體；

(b) 共同培養 CD8 陽性 T 細胞及一外吐小體，該外吐小體在其表面上呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽的複合體；及

(c) 對於 CD8 陽性 T 細胞導入編碼為兩個 T 細胞受體 (TCR) 次單元之一多核苷酸或編碼為各 TCR 次單元之多個多核苷酸，其中由該次單元形成的 TCR 能結合於在細胞表面上的如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽與 HLA 抗原之複合體。

11. 一種單離抗原呈現細胞，其在表面上呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽之複合體。
12. 如申請專利範圍第 11 項之抗原呈現細胞，其係由如申請專利範圍第 9 項之誘導有細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力之抗原呈現細胞的方法所誘導。
13. 一種單離細胞毒殺性 T 淋巴球，其標靶於與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽。
14. 如申請專利範圍第 13 項之細胞毒殺性 T 淋巴球，其係由如申請專利範圍第 10 項之誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之方法所誘導。
15. 一種誘導對象中抗癌之免疫反應的方法，其中，該方法包含對於對象投予包含如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽、或編碼為該胜肽之多核苷酸的組合物的步驟。
16. 一種抗體或其在免疫學上有活性的片段，係對抗如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽。

- 17.一種載體，包含編碼為如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽的核苷酸序列。
- 18.一種宿主細胞，係經如申請專利範圍第 17 項之載體轉形或轉染。
- 19.一種診斷套組，包含如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之單離胜肽、如申請專利範圍第 5 項之單離多核苷酸，或如申請專利範圍第 16 項之抗體或其在免疫學上有活性的片段。
- 20.一種篩選有能力誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之胜肽的方法，該細胞毒殺性 T 淋巴球對於呈現來自 UBE2T 之片段的細胞有專一性的細胞毒殺活性，其中，該方法包含下述步驟：
 - (i) 提供一候選序列，此序列係由對於一原始胺基酸序列施以取代、刪除、插入及或加成 1、2 或數個胺基酸殘基以修飾而得之胺基酸序列組成，其中，該原始胺基酸序列選自於由序列識別號：1、2、4、6、11、12、13、15、17、19、20、21、22、23、24、25、27、29、30、32、36、38、41、48、49、51、52、53、55、56 及 58 構成之群組；
 - (ii) 選擇一候選序列，此序列與從 UBE2T 以外的任意已知人類基因產物而來的胜肽沒有實質上顯著的同源性；
 - (iii) 使步驟(ii)選出的候選序列組成的胜肽與一抗原呈現細胞接觸；
 - (iv) 使步驟(iii)之此抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞接觸；及
 - (v) 鑑別此胜肽其細胞毒殺性 T 淋巴球誘導能力是相同或

高於由原始胺基酸序列組成的胜肽。

圖式

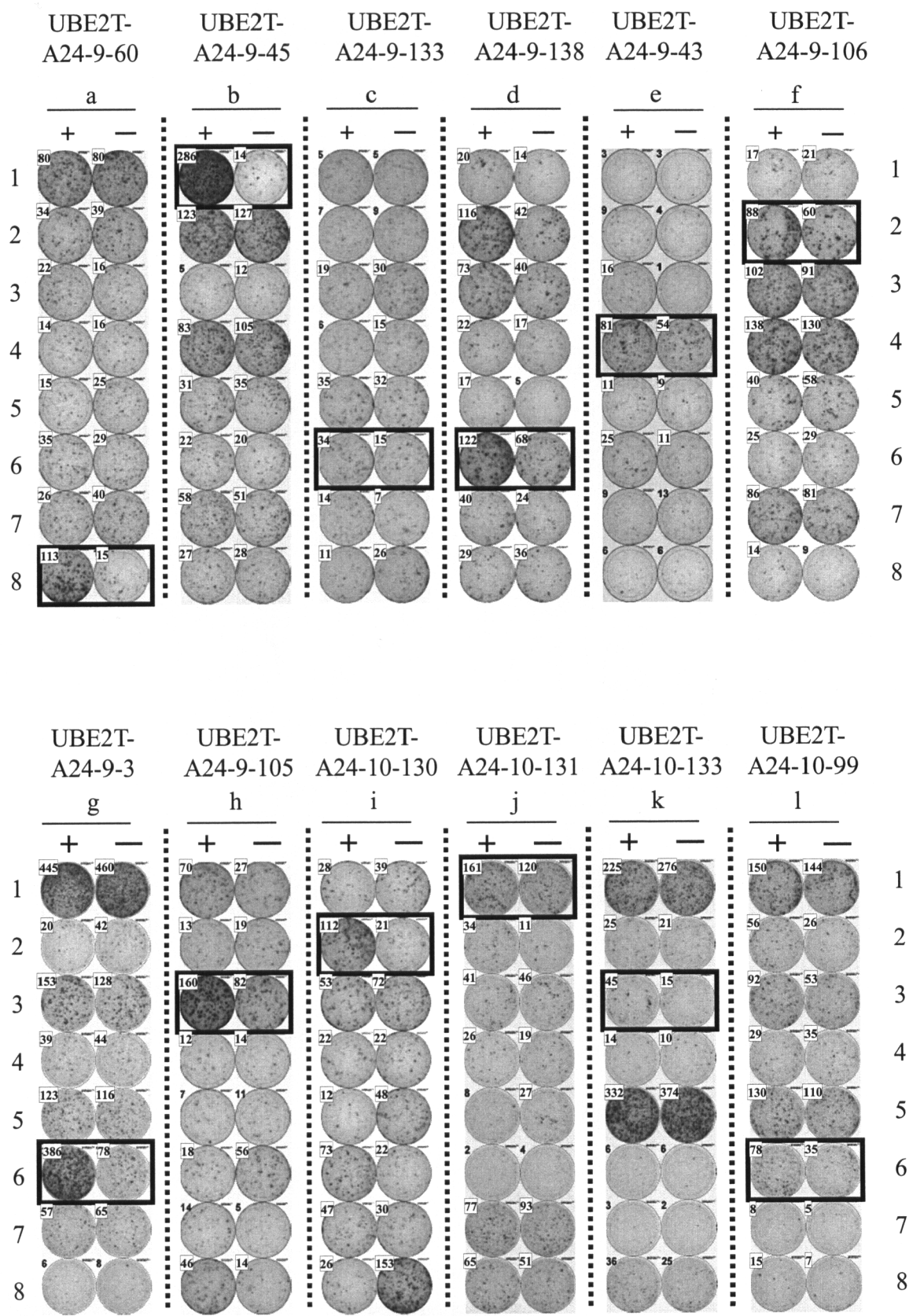


圖 1-1

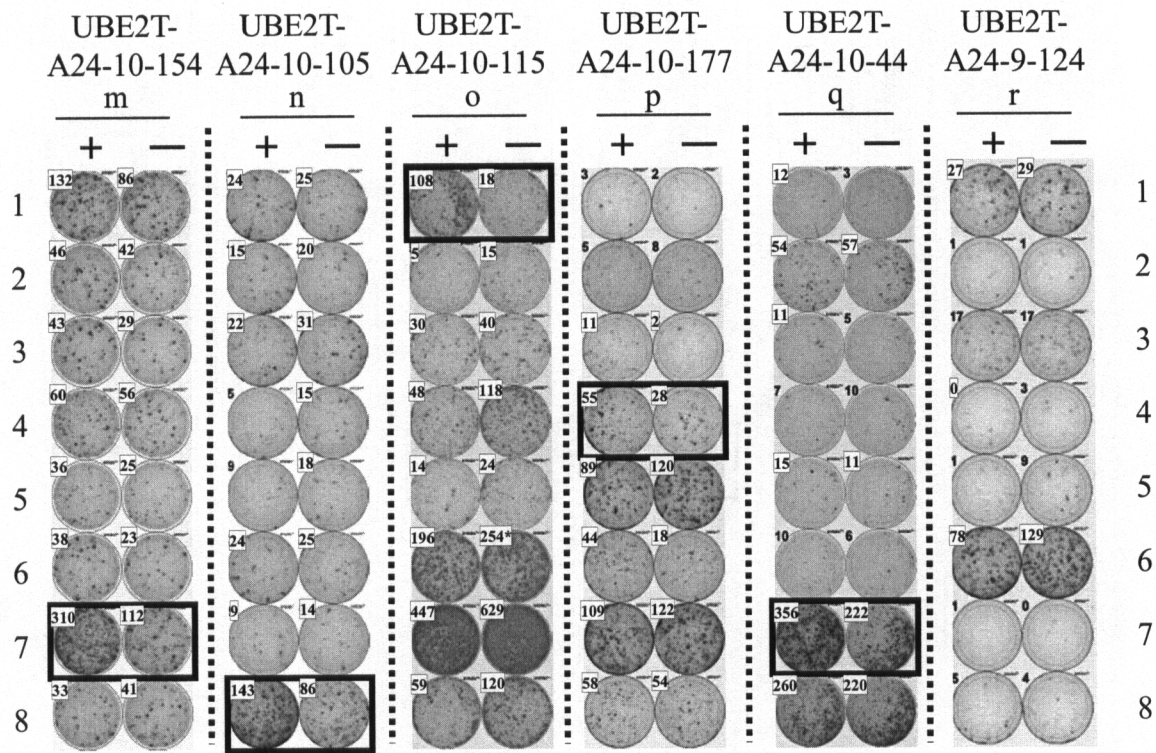


圖 1-2

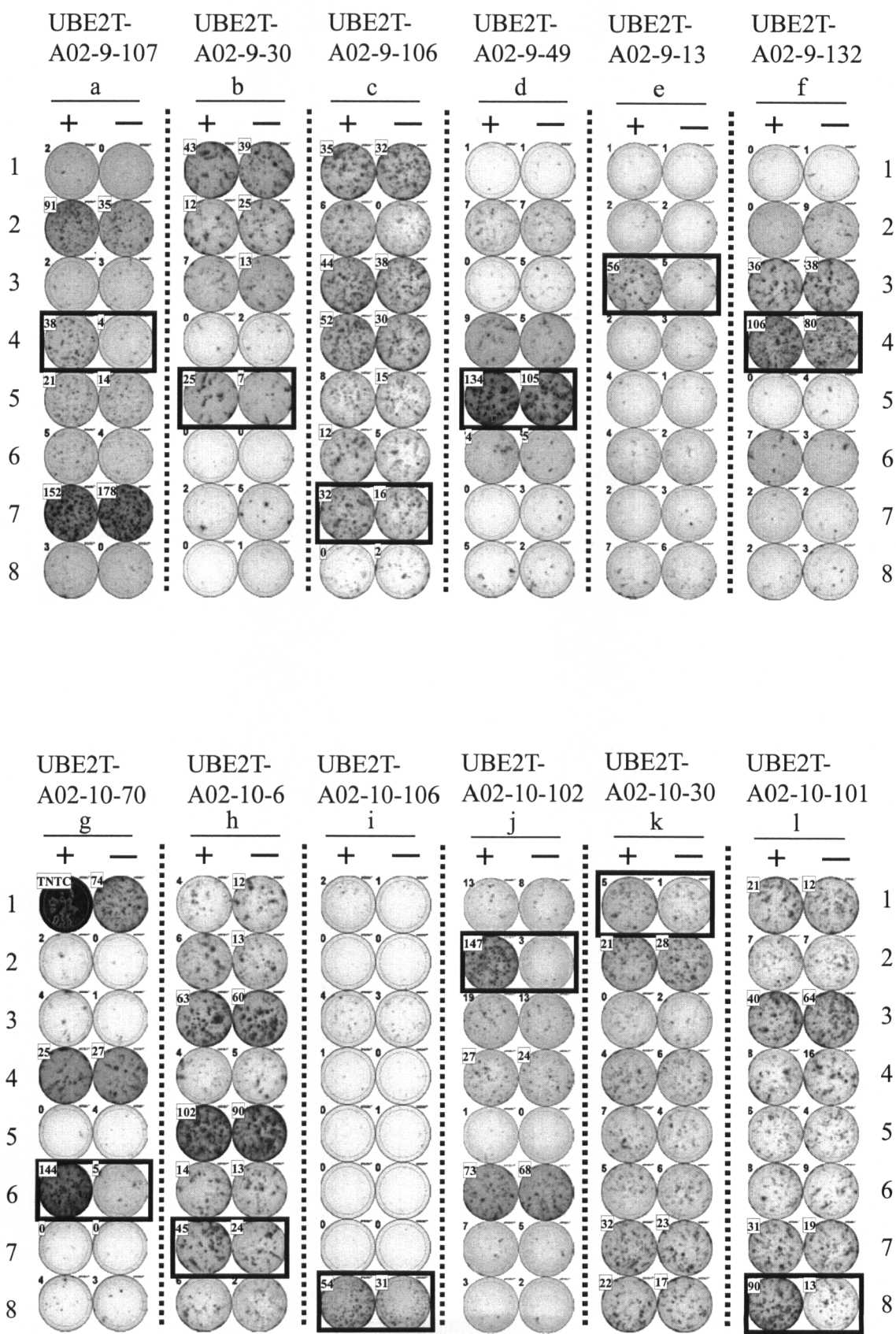


圖2-1

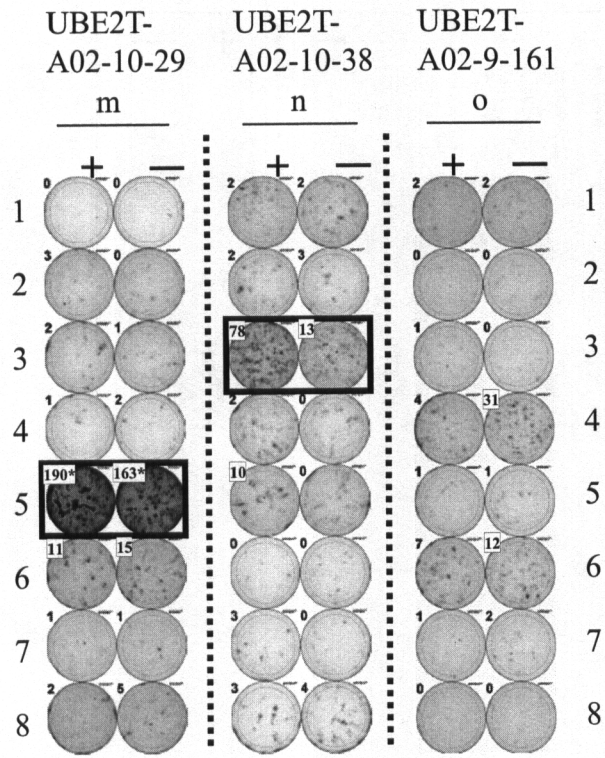


圖2-2

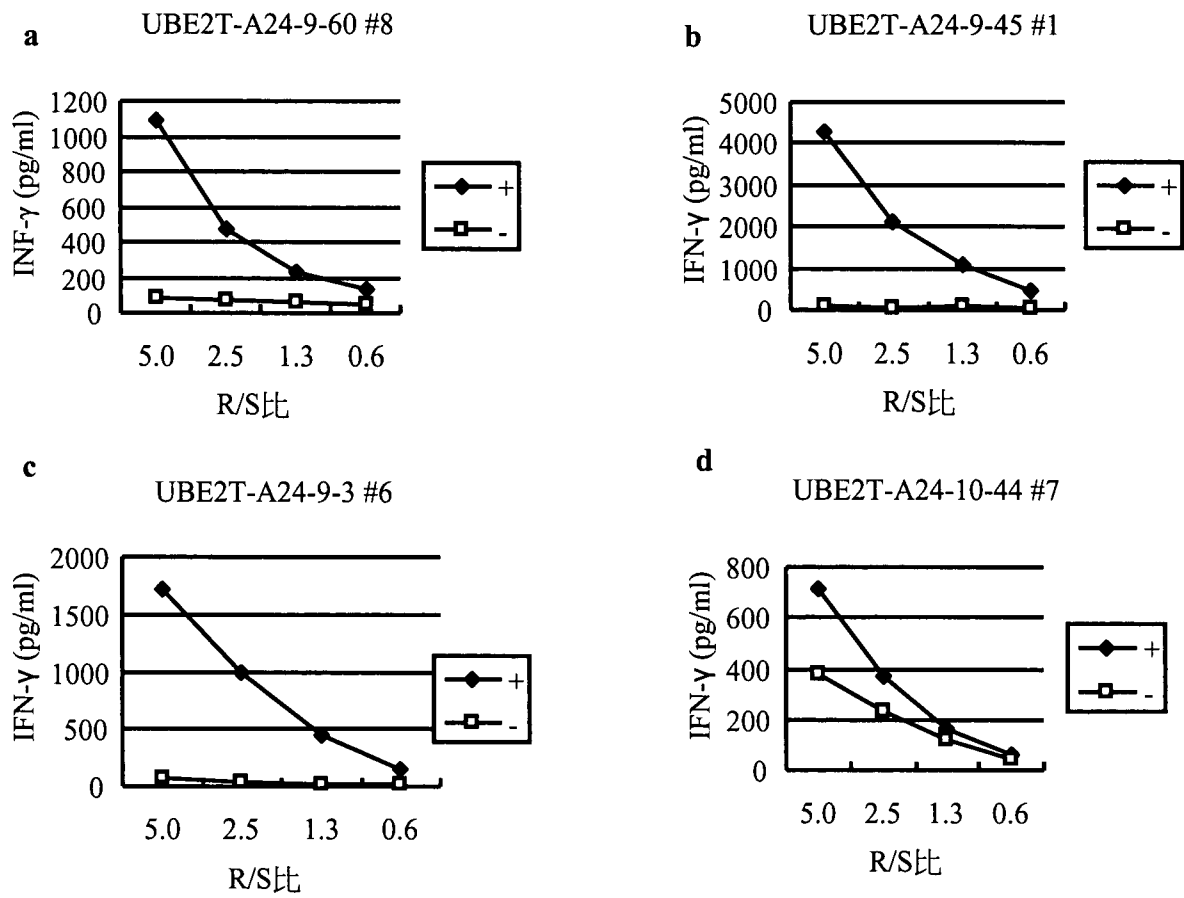


圖3

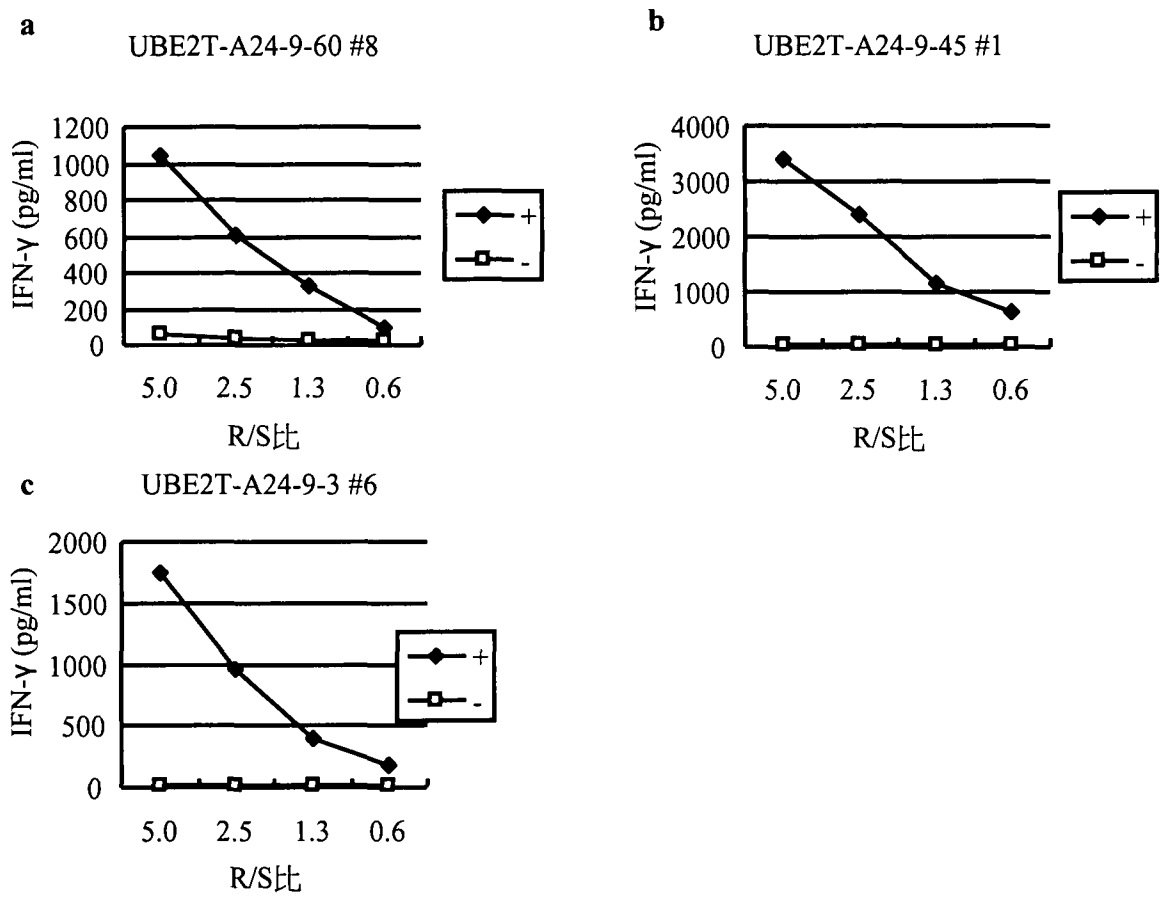


圖4

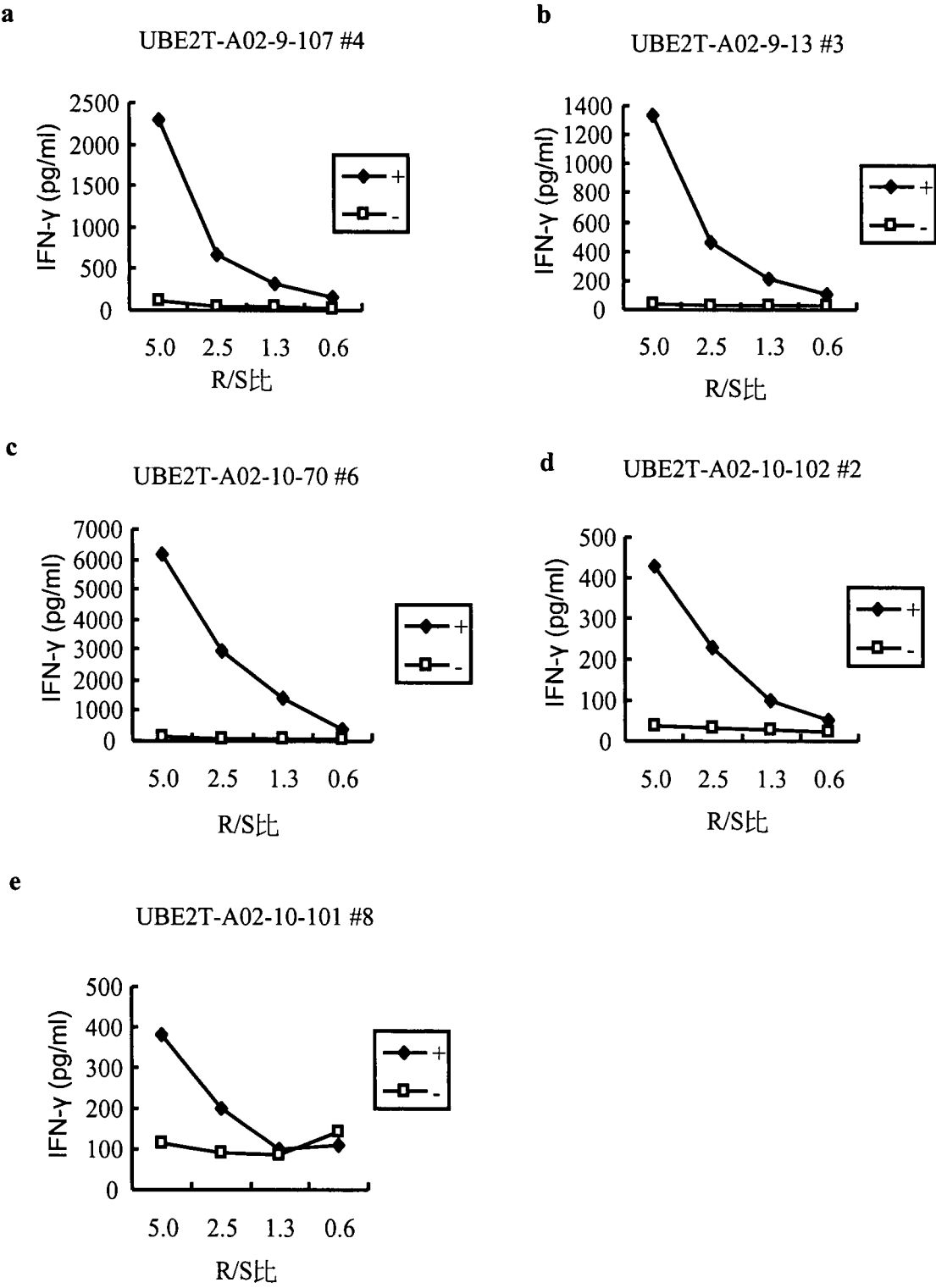


圖5

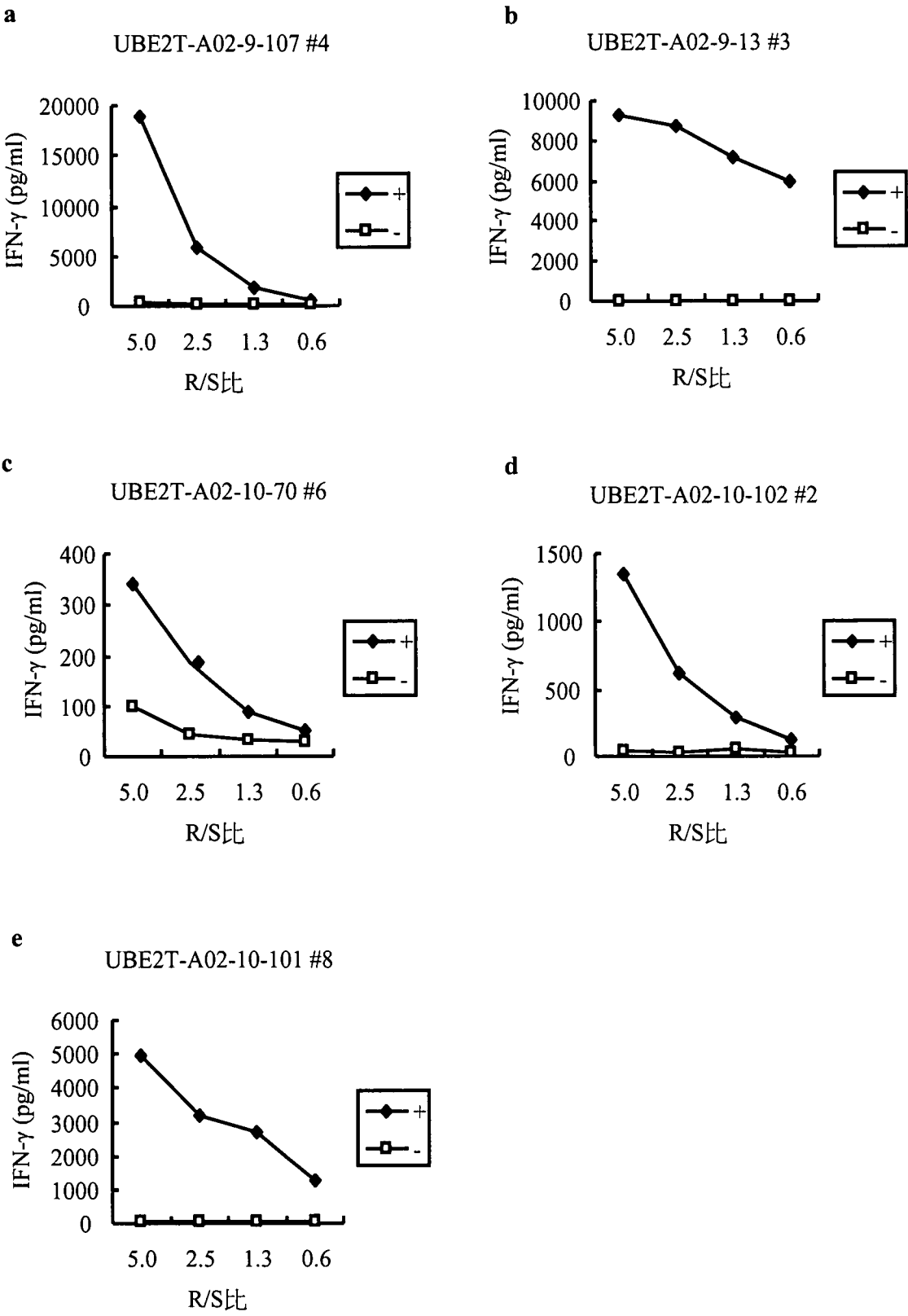


圖6

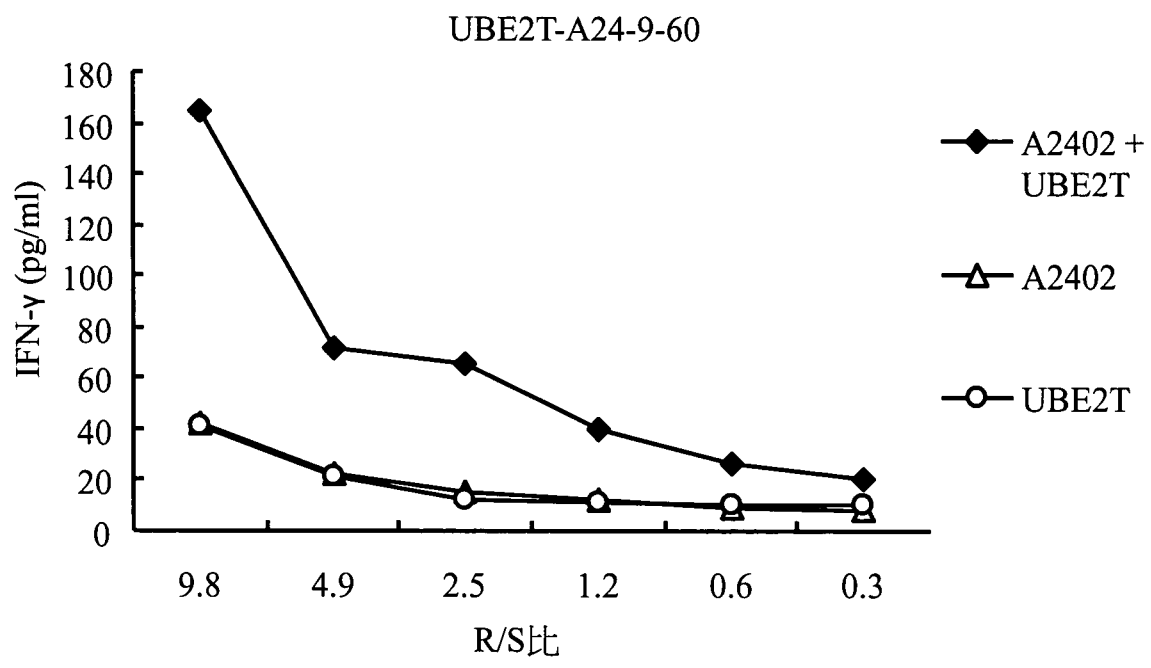


圖7

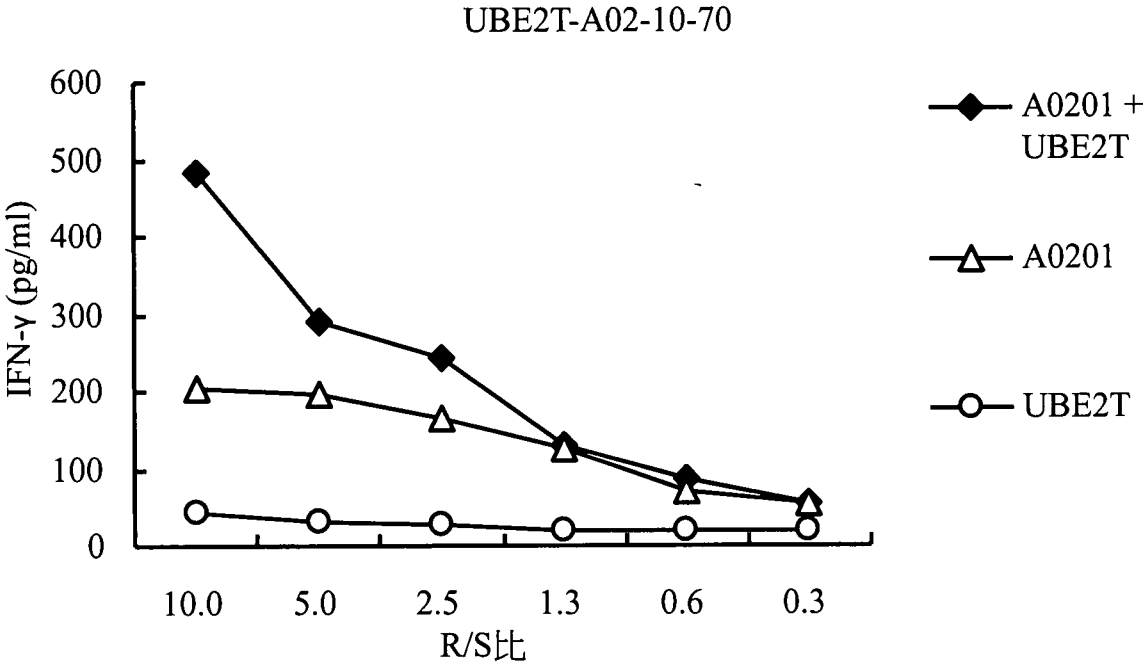


圖8