



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I728952 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：104125178

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 04 日

(51)Int. Cl. : **C07K7/06 (2006.01)**
C07K16/18 (2006.01)
C12N5/0783 (2010.01)
A61K31/7088(2006.01)
A61K39/00 (2006.01)

C07K7/08 (2006.01)
C12N15/11 (2006.01)
C12N5/10 (2006.01)
A61K38/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/08/04 日本

2014-158925

(71)申請人：日商腫瘤療法 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)；山下祥子 YAMASHITA, SACHIKO (JP)；渡辺朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)；引地哲郎 HIKICHI, TETSURO (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

WO 2008102557A1

WO 2006/090810A2

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：8 共 133 頁

(54)名稱

來自 URLC10 的胜肽及含其之疫苗

(57)摘要

本發明提供具有細胞傷害性 T 細胞誘導能力之來自 URLC10 的抗原決定位胜肽。本發明並提供編碼為該胜肽之多核苷酸、呈現該胜肽之抗原呈現細胞及誘導以該胜肽為標靶之細胞傷害性 T 細胞、及該抗原呈現細胞或該 CTL 之方法。本發明更包含以該等作為有效成分之組合物及藥學組合物。本發明更提供使用本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞、細胞傷害性 T 細胞、或本發明之藥學組合物來治療及/或預防癌，及/或預發術後之癌再發之方法。又，提供誘導對於癌之免疫應答之方法。

I728952

發明摘要

※ 申請案號：104125178

※ 申請日：104年8月4日

※IPC 分類：

C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

來自 URLC10 的胜肽及含其之疫苗

【中文】

本發明提供具有細胞傷害性 T 細胞誘導能力之來自 URLC10 的抗原決定位胜肽。本發明並提供編碼為該胜肽之多核苷酸、呈現該胜肽之抗原呈現細胞及誘導以該胜肽為標靶之細胞傷害性 T 細胞、及該抗原呈現細胞或該 CTL 之方法。本發明更包含以該等作為有效成分之組合物及藥學組合物。本發明更提供使用本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞、細胞傷害性 T 細胞、或本發明之藥學組合物來治療及/或預防癌，及/或預發術後之癌再發之方法。又，提供誘導對於癌之免疫應答之方法。

【英文】

無。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【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)

來自 URLC10 的胜肽及含其之疫苗

【技術領域】

【0001】本發明係關於生物科學領域，更具體而言係關於癌療法之領域。尤其，本發明係關於作為癌疫苗非常有效之新穎胜肽、使用該胜肽之腫瘤之治療及預防中任一者或兩者之方法、及含有該胜肽之醫藥組合物。

【0002】本申請案係基於 2014 年 8 月 4 日提申之日本特願 2014-158925 主張優惠，其全部內容納入本說明書作為參考。

【先前技術】

【0003】細胞傷害性 T 淋巴球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) 會認識在主要組織適合複合體 (MHC) 第 I 類分子上找到的來自腫瘤關連抗原 (tumor-associated antigen: TAA) 之抗原決定位胜肽，然後殺傷腫瘤細胞。自發現了黑色素瘤抗原 (MAGE) 家族以來，已有許多其他的 TAA 利用免疫學的方法被發現 (非專利文獻 1: Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2):177-80; 非專利文獻 2: Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3):725-9)。此等 TAA 中的一些作為免疫療法的標靶現已處於臨床開發的過程。

【0004】該等 TAA 中的一些已鑑別係能被 CTL 認識之抗原決定位胜肽，期待應用於針對各種癌之免疫療法 (非專利文獻 3: Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20):1442-55;

非專利文獻 4：Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13):3134-42；非專利文獻 5：Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21):5554-9；非專利文獻 6：van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9):3308-14；非專利文獻 7：Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20):4465-8；非專利文獻 8：Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2):169-72；非專利文獻 9：Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):439-66；非專利文獻 10：Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):387-94)。直到現在，已有一些使用了來自該等 TAA 之 CTL 抗原決定位胜肽之臨床試驗被報告。但遺憾地，這些臨床試驗許多只顯示低的客觀功效(非專利文獻 11：Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20):4169-80；非專利文獻 12：Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188:33-42；非專利文獻 13：Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9):909-15)。因此，仍須要能鑑定可使用在癌免疫療法之新穎 CTL 抗原決定位。

【0005】URLC10(淋巴球抗原 6 複合體、基因座 K(lymphocyte antigen 6 complex, locus K)：也記載為 LY6K。；GeneBank 存取編號 BC117142(序列編號：36))，已利用使用包括 27,648 個基因之基因體之 cDNA 微陣列之基因表現輪廓解析，鑑別為在肺癌及食道癌被向上調控之基因(非專利文獻 14：Ishikawa N et al., Cancer Res. 2007 Dec 15;67(24):11601-11；專利文獻 1：WO2004/031413；專利文獻 2：WO2009/016691)。URLC10 之表現據觀察在肺癌與食道癌患者之 80%以上之腫瘤

細胞係特別向上調控，但在睪丸以外的其他正常重要器官並不表現。再者，藉由 siRNA 所致之 URLC10 表現之向下調控，顯示會抑制肺癌細胞株及食道癌細胞株之細胞增殖(非專利文獻 14；專利文獻 2)。

【0006】最近，已鑑別出來自 URLC10 的 HLA-A24 拘束性 CTL 抗原決定位胜肽(非專利文獻 15：Suda T et al., Cancer Sci. 2007 Sep 2;98(11):1803-08；專利文獻 3：WO2006/090810)及 HLA-A2 拘束性 CTL 抗原決定位胜肽(專利文獻 4：WO2008/102557)。該等胜肽在具有 HLA-A24 型或 HLA-A2 型之癌患者為有效，但對於不具該等 HLA 型之癌患者無法期待效果。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0007】[專利文獻 1] WO2004/031413

[專利文獻 2] WO2009/016691

[專利文獻 3] WO2006/090810

[專利文獻 4] WO2008/102557

[非專利文獻]

【0008】[非專利文獻 1] Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2):177-80

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

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

[非專利文獻 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1,

59(13):3134-42

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

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

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

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

[非專利文獻 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5,
81(3):459-66

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

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

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

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

[非專利文獻 14] Ishikawa N et al., Cancer Res. 2007 Dec
15;67(24):11601-11

[非專利文獻 15] Suda T et al., Cancer Sci. 2007 Sep 2;98
(11):1803-08

【發明內容】

【0009】本發明係關於一種胜肽，能誘導針對表現 URLC10 之細胞為專一之 CTL。該等胜肽若利用人白血球抗原(human leukocyte antigen：HLA)在抗原提示細胞(antigen-presenting cell：APC)上提示，會誘導呈現針對 URLC10 表現細胞為專一之細胞傷害活性之 CTL。至今所鑑別之來自 URLC10 的具有 CTL 誘導能力之胜肽為 HLA-A2 拘束性或 HLA-A24 拘束性之胜肽，對於未表現該等 HLA 之細胞無法誘導 CTL。所以，當於不具該等 HLA 之對象進行免疫療法時，習知之胜肽不適合。HLA-A11 為亞洲人種常見的對偶基因(Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50:201-12)，HLA-A03 為白人常見的對偶基因(Cao et al., Hum Immunol. 2001;62(9):1009-30)。對於 HLA-A11 陽性之對象宜投予 HLA-A11 拘束性之胜肽，對於 HLA-A03 陽性之對象宜投予 HLA-A03 拘束性之胜肽，所以，本發明係關於 HLA-A11 或 HLA-A03 拘束性之來自 URLC10 之胜肽且係關於具有 CTL 誘導能力之胜肽。由本說明書揭示之結果可印證：本發明之胜肽為能誘導針對表現 URLC10 及 HLA-A11 或 HLA-A03 之細胞之強力且專一性免疫應答的抗原決定位胜肽。

【0010】因此，本發明一目的為提供能以 HLA-A11 或 HLA-A03 拘束性之樣式誘導 CTL 之來自 URLC10 的胜肽。該等胜肽能用於在試管內(in vitro)、離體(ex vivo)或活體內(in vivo)內誘導 CTL，或用於為了誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫應答而對於對象投予。理想的胜肽為包括選自序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31

之中的胺基酸序列者，更佳為九胜肽、十胜肽或十一胜肽，更佳為由選自於序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31中之胺基酸序列構成的胜肽。

【0011】本發明之胜肽只要結果產生之改變胜肽能保持原本胜肽之 CTL 誘導能力即可，也包括 1 個、2 個、或更多胺基酸取代、缺失、插入及/或加成之胜肽。本發明也提供編碼為本發明之任一胜肽之經單離的多核苷酸。該等多核苷酸和本發明之胜肽同樣，可用以誘導具有 CTL 誘導能力之 APC，且可為了誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫應答而投予對象。

【0012】本發明更提供包含本發明之一或多種胜肽、編碼為本發明之一或多種胜肽之一或多種多核苷酸、本發明之 APC、提示本發明之胜肽之外吐小體、及/或本發明之 CTL 之組合物。本發明之組合物較佳為藥學組合物。本發明之藥學組合物可用於癌治療及/或預防、及預防術後之癌再發。又，可用於誘導對於癌之免疫應答。對於對象投予時，本發明之胜肽係提示於 APC 之表面上，藉此誘導將該胜肽作為標靶之 CTL。因此本發明之另一目的為提供用以誘導 CTL 之組合物，且係包含本發明之一或多種胜肽、編碼為本發明之一或多種胜肽之一或多種多核苷酸、本發明之 APC、及/或提示本發明之胜肽之外吐小體(exosome)之組合物。

【0013】本發明之另一目的為提供誘導具 CTL 誘導能力之 APC 之方法，且係包括以下步驟：使 APC 和本發明之一或多種胜肽接觸，或使編碼為本發明之任一胜肽之多核苷酸導入到 APC。

【0014】本發明更提供誘導 CTL 之方法，包括以下步驟：

將 CD8 陽性 T 細胞和於自身表面上提示 HLA 抗原與本發明胜肽之複合體之 APC 進行共培養、將 CD8 陽性 T 細胞與於自身表面上提示 HLA 抗原與本發明胜肽之複合體之外吐小體進行共培養、或將包括編碼為能結合於在細胞表面上由 HLA 抗原提示之本發明之胜肽的 T 細胞受體(T cell receptor: TCR)之各次單元之多核苷酸之載體導入到 CD8 陽性 T 細胞。本發明中，理想之 HLA 抗原為 HLA-A11 或 HLA-A03。

【0015】本發明又另一目的為提供於自身表面上提示 HLA 抗原與本發明胜肽之複合體之經單離之 APC。本發明更提供將本發明之胜肽作為標靶之已單離之 CTL。該等 APC 及 CTL 可用在對付表現 URLC10 之癌之免疫療法。本發明中，作為免疫療法之對象之癌，例如以同型或異型具有 HLA-A11 或 HLA-A03 之患者之癌。亦即本發明提供表現 URLC10 以及選自 HLA-A11 及 HLA-A03 中之至少一種 HLA 抗原之癌之免疫療法。

【0016】本發明另一目的為提供誘導對象中之對於癌之免疫應答之方法，包括以下步驟：將本發明之胜肽、編碼為該胜肽之多核苷酸、本發明之 APC、提示本發明胜肽之外吐小體、及/或本發明之 CTL 對於該對象投予。本發明之另一目的為提供治療及/或預防對象中之癌及預防其術後之癌再發之方法，包括以下步驟：將本發明之胜肽、編碼為該胜肽之多核苷酸、本發明之 APC、提示本發明胜肽之外吐小體、及/或本發明之 CTL 對於該對象投予。

【0017】如上述所述，此外，本發明之其他目的及特徵將合併附帶的圖表及實施例於以下詳細說明，而能被充分明瞭。

但前述發明內容及以下之詳細說明均爲例示態樣，應理解爲不限定爲本發明或本發明之其他替代態樣。尤其，本發明將參照一些特定態樣於本說明書說明，但此說明係例證本發明，應理解爲不作爲限定本發明構成。該技術領域中有通常知識者可在不脫離附帶之申請專利範圍記載之本發明之精神及範圍而想到各種變更及適用。同樣，本發明之其他目的、特徵、利益、及優點將由本概要及以下記載之特定態樣而明白，對於該技術領域中有通常知識者而言，可輕易地明白。如此的目的、特徵、利益、及優點可和附帶實施例、資料、圖表、及由此引出的各種妥當推論一起，而考慮上述單獨或納入本說明書之參考文獻而明白。

【圖式簡單說明】

【0018】

[第 1 圖] 顯示使用來自 URLC10 的胜肽誘導之 CTL 之 IFN- γ 酵素連結免疫點(ELISPOT)分析結果，包括照片(a)~(d)。使用 URLC10-A11-9-98(序列編號：1)之井編號#5(a)、使用 URLC10-A11-9-18(序列編號：9)之井編號#4(b)及使用 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)之井編號#3(c)之 CTL，和對照比較顯示較強力之 IFN- γ 產生。該等照片之井上之四個角代表爲了建立 CTL 株，使來自對應井之細胞增殖。對照地，作爲未顯示專一性 IFN- γ 產生的典型的陰性數據的例子，顯示 URLC10-A11-10-63(序列編號：12)(d)。圖中，「+」代表以適切胜肽衝擊(pulse)的標靶細胞對應的 IFN- γ 產生，「-」未經任一胜肽衝擊之標靶細胞之 IFN- γ 產生。

[第 2 圖] 顯示實證以 URLC10-A11-10-132(序列編號：13) 刺激之 CTL 株之 IFN- γ 產生之 IFN- γ 酵素連結免疫吸附測定法(ELISA)之結果之折線圖。該等結果實際驗證:經各胜肽衝擊所建立之 CTL 株和對照比較,顯示較強力之 IFN- γ 產生。圖中,「+」代表經適切胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生,「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生。R/S 比,代表:為應答細胞(Responder cells)之 CTL 株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

[第 3 圖] 顯示從經 URLC10-A11-10-132(序列編號：13) 刺激之 CTL 株利用極限稀釋建立之 CTL 選殖體之 IFN- γ 產生之折線圖。該等結果實際驗證:利用各胜肽衝擊而建立之 CTL 選殖體,和對照比較,顯示較強力之 IFN- γ 產生。圖中,「+」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生,「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生。R/S 比代表為應答細胞(Responder cells)之 CTL 株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

[第 4 圖] 顯示針對表現 URLC10 及 HLA-A*1101 兩者之標靶細胞之專一性 CTL 活性之折線圖。製備轉染 HLA-A*1101 或全長 URLC10 基因中任一者而得之 COS7 細胞作為對照。使用 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)建立之 CTL 選殖體,對於已轉染 URLC10 及 HLA-A*1101 兩者而得之 COS7 細胞顯示專一性 CTL 活性(黑菱形)。另一方面,對於轉染 HLA-A*1101(白三角)或 URLC10 (白圓)中任一者而得之標靶細胞未顯示顯著的專一性 CTL 活性。

[第 5-1 圖] 第 5 圖顯示使用來自 URLC10 的胜肽誘導的 CTL 的 IFN- γ ELISPOT 分析結果，包括照片(a)~(o)。使用 URLC10-A03-9-64(序列編號：5)之井編號#2(a)、使用 URLC10-A03-9-98(序列編號：1)之井編號#5(b)、使用 URLC10-A03-9-131(序列編號：6)之井編號#3(c)、使用 URLC10-A03-9-127(序列編號：3)之井編號#1(d)、使用 URLC10-A03-10-63(序列編號：12)之井編號#6(e)、使用 URLC10-A03-10-166(序列編號：22)之井編號#3(f)、使用 URLC10-A03-10-126(序列編號：14)之井編號#5(g)、使用 URLC10-A03-10-149(序列編號：16)之井編號#1(h)、使用 URLC10-A03-10-161(序列編號：18)之井編號#1(i)、使用 URLC10-A03-10-143(序列編號：15)之井編號#1(j)、使用 URLC10-A03-10-204(序列編號：27)之井編號#2(k)、使用 URLC10-A03-10-183(序列編號：17)之井編號#2(l)、使用 URLC10-A03-10-209(序列編號：30)之井編號#1(m)及使用 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)之井編號#5(n)之 CTL，和對照比較顯示較強力之 IFN- γ 產生。該等照片之井上之四角顯示爲了建立 CTL 株，來自對應井之細胞增殖。對照地，顯示 URLC10-A03-9-7(序列編號：8)(o)作爲未呈專一性 IFN- γ 產生的典型的陰性數據之例。圖中，「+」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生。

[第 5-2 圖] 接續第 5-1 圖。

[第 6 圖] 係顯示由經 URLC10-A03-10-166(序列編號：22)(a)及 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)(b)刺激之 CTL 株利

用極限稀釋建立之 CTL 株之 IFN- γ 產生，包括一連串折線圖 (a)~(b)。該等結果實際驗證：利用各胜肽衝擊而建立之 CTL 選殖體，和對照比較，顯示較強力之 IFN- γ 產生。圖中，「+」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生。R/S 比代表為應答細胞(Responder cells)之 CTL 株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

[第 7 圖] 係顯示由經 URLC10-A03-10-166(序列編號：22) (a)及 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)(b)刺激之 CTL 株利用極限稀釋建立之 CTL 選殖體之 IFN- γ 產生，包括一連串折線圖 (a)~(b)。該等結果實際驗證：利用各胜肽衝擊而建立之 CTL 選殖體，和對照比較，顯示較強力之 IFN- γ 產生。圖中，「+」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之 IFN- γ 產生。R/S 比代表為應答細胞(Responder cells)之 CTL 選殖體之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

[第 8 圖] 顯示針對表現 URLC10 及 HLA-A*0301 兩者之標靶細胞之專一性 CTL 活性之折線圖。製備轉染 HLA-A*0301 或全長 URLC10 基因中任一者而得之 COS7 細胞作為對照。使用 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)建立之 CTL 選殖體，對於已轉染 URLC10 及 HLA-A*0301 兩者而得之 COS7 細胞顯示專一性 CTL 活性(黑菱形)。另一方面，對於轉染 HLA-A*0301(白三角)或 URLC10 (白圓)中任一者而得之標靶細胞未顯示顯著的專一性 CTL 活性。

【實施方式】**【0019】 態樣之說明**

當實驗或試驗本發明之態樣時，可使用和本說明書記載之方法及材料為類似或同等任意之方法及材料，但在此記載較理想的方法、裝置、及材料。但是記載本發明之材料及方法前，應了解：本說明書記載之特定大小、形狀、尺寸、材料、方法論、實驗步驟等可因應慣例的實驗法及最適化變更，所以，本發明不限於此等記載。本記載使用之專門用語是只是為了說明特定的類型或態樣，應理解不意欲限定只由附帶之申請專利範圍限定之本發明之範圍。

【0020】 1. 定義

本說明書使用之「1 個(a)」、「個(an)」及「該(the)」之用語，若無特別記載，係指「至少 1 個」。

關於物質(例如：胜肽、抗體、多核苷酸等)使用之「經單離之」及「經精製之」的用語，若該物質並非如此，則指實質上不含天然源中可能含有之至少 1 種物質。因此經單離或精製之胜肽，係指實質上不含此胜肽來源之細胞或組織源而來的其他細胞材料，例如糖質、脂質及其他混入蛋白質之胜肽。又，胜肽係以化學合成時，經單離或精製之胜肽係指實質上不含前驅體物質或其他化學物質之胜肽。「實質不含細胞材料」之用語，係指包括從其單離之細胞或重組產生之細胞之細胞成分已分離出胜肽之胜肽之製備物。因此實質不含細胞材料之胜肽，包括含有未達約 30%、20%、或 10%、5%、3%、2%或 1%(乾燥重量基準)之其他細胞材料之胜肽之製備物。將胜肽重組時，

經單離或精製之胜肽實質不含培養培養基，實質不含培養培養基之胜肽以胜肽製備物容量之未達約 20%、10%、或 5%、3%、2%或 1%(乾燥重量基準)含有包括培養培養基之胜肽之製備物。將胜肽化學合成時，經單離或精製之胜肽實質不含前驅體物質及其他化學物質，實質不含前驅體物質及其他化學物質之胜肽，包括以胜肽製備物容量之未達約 30%、20%、10%、5%、3%、2%或 1%(乾燥重量基準)含有前驅體物質及其他化學物質之胜肽製備物。特定胜肽製備物是否為經單離或精製之胜肽，例如可以利用十二基硫酸鈉(SDS)-聚丙烯醯胺凝膠電泳及凝膠之考馬思亮藍染色等後出現單一帶以確認。理想態樣中，本發明之胜肽及多核苷酸係經單離或精製。

【0021】「多胜肽」、「胜肽」、及「蛋白質」之用語在本說明書可互換地使用，係指胺基酸殘基之聚合物。本用語除了適用天然型胺基酸聚合物，也適用包括 1 個或多個非天然型胺基酸殘基之非天然型胺基酸聚合物。非天然型胺基酸包括胺基酸類似體及胺基酸模倣體等。

【0022】本說明書使用之「胺基酸」之用語係指天然胺基酸、及和天然胺基酸同樣地作用的胺基酸類似體及胺基酸模倣體。天然胺基酸係指以基因密碼子編碼的胺基酸、及於細胞內進行轉譯後修飾而得之胺基酸(例如:羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸、及 O-磷絲胺酸等)。「胺基酸類似體」之用語，係指和天然胺基酸有相同的基本化學結構(氫、羧基、胺基、及鍵結於 R 基之 α 碳)但具有經修飾之 R 基或經修飾之骨架之化合物(例如:高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砷、及甲硫胺酸甲基銻等)。

「胺基酸模倣體」之用語係始和一般的胺基酸有相異之結構，但有同樣機能之化合物。胺基酸可為 L-胺基酸或 D-胺基酸中任一者，但本發明之胜肽宜為 L-胺基酸之聚合物較佳。

【0023】 「多核苷酸」、「寡核苷酸」及「核酸」之用語在本說明書中可互換地使用，係指核苷酸之聚合物。

【0024】 本說明書使用之「組合物」之用語意欲包括含有特定量特定成分之生成物、及由特定量特定成分之組合直接或間接產生之任意產物。組合物為藥學組合物時，組合物之用語意欲包括：含有有效成分及鈍性成分之產物、及任意 2 種或更多成分之組合、複合體形成、或因凝集、因 1 或多數成分解離、或因 1 或多數成分之其他種類之反應或相互作用而直接的或間接的產生的任意產物。因此本發明之藥學組合物，包括利用將本發明之化合物或細胞與藥學的或生理學上可容許之載體混合而製作之任意組合物。本說明書使用之「藥學上可容許之載體」或「生理學上可容許之載體」之用語包括液體或固體之增量劑、稀釋劑、賦形劑、溶劑及密封材料，但不限於此等，意指藥學的或生理學上可容許之材料、組合物、物質、或介質。

【0025】 若無特殊記載，「癌」之用語係指過度表現 URLC10 基因之癌，其例可列舉：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤等，但不限於此等。又，於例示的態樣，「癌」係表現 URLC10 以及 HLA-A11 及/或 HLA-A03 之癌。

【0026】 若無特別指明，「細胞傷害性 T 淋巴球」、「細

胞傷害性 T 細胞」、及「CTL」之用語在本說明書中可互換地使用，若無特殊限定，係指認識非自我細胞(例如：腫瘤/癌細胞、病毒感染細胞)且可誘導如此之細胞之死滅之 T 淋巴球之亞群。

【0027】若無特別指明，「HLA-A11」之用語係指包括 HLA-A*1101、HLA-A*1102、HLA-A*1103、HLA-A*1104 等次型之 HLA-A11 型。

【0028】若無特別指明，「HLA-A03」之用語係指包括 HLA-A*0301、HLA-A*0302、HLA-A*0305 等次型之 HLA-A03 型。

【0029】於和對象或患者之關連，本說明書使用之「對象之(或患者之)HLA 抗原為 HLA-A11」之表達，係指對象或患者以同質接合的或異質接合的保有作為 MHC(主要組織適合複合體)第 I 類分子之 HLA-A11 抗原基因，且 HLA-A11 抗原在對象或患者之細胞表現為 HLA 抗原。同樣地，本說明書使用之「對象之(或患者之)HLA 抗原為 HLA-A03」之表達，係指各對象或患者以同質接合的或異質接合的保有作為 MHC(主要組織適合複合體)第 I 類分子之 HLA-A03 抗原基因且 HLA-A03 抗原在對象或患者之細胞表現作為 HLA 抗原。

【0030】本發明之方法及組合物只要是在和癌之「治療」之關連為有用，則治療會帶來臨床的益處，例如對象之癌之大小、廣度、或轉移能力減少、癌之進行延遲、癌之臨床症狀之緩和、生存期間之延長、術後之癌再發之抑制等時，視為治療「有效」。當治療係預防性地適用時，「有效」係指由於治療而使癌形成延遲或受妨礙，或癌之臨床症狀受妨礙或緩和。有

效性係相關於診斷或治療特定腫瘤之種類之任意公知方法而決定。

【0031】本發明之方法及組合物只要是在癌「預防」之關連方面為有用即可，「預防」之用語在本說明書包括因癌導致之死亡率或罹患率之負荷減輕之任意作用。預防可於「第一次、第二次、及第三次之預防層級」實施。第一次之預防係避免發生疾病，第二次及第三次層級之預防係指預防疾病進行及症狀出現，此外，包括使機能回復，且使疾病關連之合併症減少，藉此使現有疾病之不利影響減少為目的之作用。或預防可包括緩和特定機能損害之重症度緩和，例如為了使腫瘤之增殖及轉移減少之廣範圍之預防性治療。

【0032】和本發明之關連方面，癌治療及/或預防、及/或術後之其再發之預防，包括癌細胞之增殖阻礙、腫瘤之退化或退縮、舒解之誘導及癌發生之抑制、腫瘤退縮、及轉移減少或阻礙、癌術後之癌再發抑制、及生存期間之延長等事例中之任一者。癌之有效治療及/或預防，係使死亡率減少，改善有癌之個體之預後，並使血中之腫瘤標記之水平降低，且緩和能隨癌檢測之症狀。例如：症狀之減輕或改善構成有效的治療及/或預防，且包括 10%、20%、30%、或更多之減輕或症狀安定之狀態。

【0033】於和本發明之關連中，「抗體」之用語係指會和指定蛋白質或其胜肽專一性地反應之免疫球蛋白及其片段。抗體可包括人抗體、靈長類化抗體、嵌合抗體、雙專一性抗體、人化抗體、其與其他蛋白質或和放射標識融合成之抗體、及抗體片段。再者，本說明書中，「抗體」係廣義地使用，具體而

言，包括完整的單株抗體、多株抗體、由 2 種以上之完整抗體形成之多重專一性抗體(例如:雙專一性抗體)，並且只要顯示所望之生物活性即可，包括抗體片段。「抗體」可為任一類別(例如:IgA、IgD、IgE、IgG、及 IgM)的抗體。

【0034】若無特別指明，本說明書使用之技術用語及科學用語皆具有和本發明所屬之發明所屬之技術領域之人士共通理解之用語為相同之含意。

【0035】 II. 胜肽

HLA-A11 是亞洲人種之中常見之對偶基因 (Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50:201-12)，HLA-A03 是白人之中常見的對偶基因 (Cao et al., Hum Immunol 2001;6182(9):1009-30)。所以，藉由提供由 HLA-A11 或 HLA-A03 拘束之來自 URLC10 的 CTL 誘導性胜肽，可對於眾多亞洲人或白人提供表現 URLC10 之癌之有效治療方法。因此，本發明提供能以 HLA-A11 或 HLA-A03 拘束性之樣式誘導 CTL 之來自 URLC10 的胜肽。

【0036】本發明之胜肽係能以 HLA-A11 或 HLA-A03 拘束性之樣式誘導 CTL 之來自 URLC10 的胜肽。作為能以 HLA-A11 拘束性之樣式誘導 CTL 之胜肽可列舉具有選自序列編號：1、9 及 13 之胺基酸序列之胜肽。同樣地，作為能以 HLA-A03 拘束性之樣式誘導 CTL 之胜肽，可列舉具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽。

【0037】藉由以經該等胜肽衝擊之樹狀細胞(dendritic cell;

DC)所爲之 T 細胞之試管內之刺激，可建立對於該等胜肽有專一性細胞傷害活性之 CTL。建立之 CTL 對於經各胜肽衝擊之標靶細胞顯示專一性細胞傷害活性。

【0038】 URLC10 基因在癌細胞，例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤等癌細胞過度表現，但在大部分正常器官不表現，故係用於免疫療法之優良標靶。因此，本發明之胜肽適合用在癌免疫療法。理想胜肽爲九胜肽(由 9 個胺基酸殘基構成之胜肽)、十胜肽(由 10 個胺基酸殘基構成的胜肽)或十一胜肽(由 11 個胺基酸殘基構成之胜肽)，由選自序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列構成之胜肽更理想。例如：有序列編號：13 記載之胺基酸序列之胜肽，適合誘導針對表現 HLA-A11 與 URLC10 之細胞呈專一性細胞傷害活性之 CTL，適合用在 HLA-A11 陽性患者之癌之免疫療法。又，例如具有序列編號：31 之胺基酸序列之胜肽，適合誘導針對表現 HLA-A03 與 URLC10 之細胞呈專一性細胞傷害活性之 CTL，適合用在 HLA-A03 陽性患者之癌之免疫療法。於更理想的態樣，本發明之胜肽係包括選自序列編號：13 及 31 中之胺基酸序列的胜肽。

【0039】本發明之胜肽，只要結果生成成之胜肽保持原有胜肽 CTL 誘導能力即可，本發明之胜肽之胺基酸序列可以和附加的胺基酸殘基相鄰。附加的胺基酸殘基只要是無損原本胜肽之 CTL 誘導能力即可，可由任意種類之胺基酸構成。所以，

本發明之胜肽包括選自序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31中之胺基酸序列之具CTL誘導能力之胜肽。如此之胜肽例如未達約40個胺基酸，時常未達約20個胺基酸，通常未達約15個胺基酸。因此本發明之胜肽若原本胜肽為九胜肽，包括於使該胜肽和附加胺基酸相鄰而成之10個胺基酸長、或11~40個胺基酸長之胜肽。又，若原本胜肽為十胜肽及十一胜肽，則包括分別使該胜肽和附加的胺基酸相鄰而成之11~40個胺基酸長及12~40個胺基酸長之胜肽。如此之胜肽例如為11~20個胺基酸長之胜肽，可為11~15個胺基酸長之胜肽。附加的胺基酸殘基的理想例，為URLC10之全長胺基酸序列(例如：序列編號：37)中之和本發明之胜肽之胺基酸序列相鄰之胺基酸殘基。因此本發明之胜肽包括係含有選自序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31中之胺基酸序列之URLC10之胜肽片段且有CTL誘導能力之胜肽。

【0040】一般，在某胜肽中之1個、2個、或更多胺基酸之改變不會影響該胜肽之機能，視情形反而可能使原本胜肽之所望機能增強。實際上，和改變胜肽(亦即，和原本之參照序列比較，有1個、2個、或數個胺基酸殘基改變(亦即，取代、缺失、插入及/或加成)之胺基酸序列構成之胜肽)已知會保持原本胜肽之生物活性(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)。因此一態樣中，本發明之胜肽包括對於選

自序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列有 1 個、2 個、或數個胺基酸取代、缺失、插入及/或加成而得之胺基酸序列，且為可能有 CTL 誘導能力之胜肽。

【0041】該技術領域中有通常知識者可認識有保存原本胺基酸側鏈特性之傾向之單一胺基酸或只變更少許比例之胺基酸之對於胺基酸序列之各個取代。此等常稱為「保守性取代」或「保守性改變」，利用「保守性取代」或「保守性改變」所致之蛋白質之改變，可能產生和原本蛋白質有類似機能之改變蛋白質。揭示機能類似之胺基酸之保守性取代之表，在該發明所屬之技術領域中為周知。機能上類似之胺基酸側鏈之特性之例，例如包括疏水性胺基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性胺基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、及共通有以下之官能基或特徵之側鏈：脂肪族側鏈(G、A、V、L、I、P)；含羥基之側鏈(S、T、Y)；含硫原子之側鏈(C、M)；含羧酸及醯胺之側鏈(D、N、E、Q)；含鹼之側鏈(R、K、H)；及含芳香族之側鏈(H、F、Y、W)。此外，以下 8 個群包括該發明所屬技術領域認知的彼此為保守性取代的胺基酸：

- 1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；
- 2) 天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；
- 3) 天冬醯胺酸(N)、麩醯胺酸(Q)；
- 4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；
- 5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；
- 6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；

7) 絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；及

8) 半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M)(例如可參照 Creighton, Proteins 1984)。

【0042】如此的保守性改變胜肽也包括在本發明之胜肽。但是本發明之胜肽不限定於此等，只要改變胜肽保持原本胜肽之 CTL 誘導能力，即包括在非保守性改變。且，改變胜肽不排除來自 URLC10 之多型變異體、種間相同體、及對立基因之可誘導 CTL 之胜肽。

【0043】只要能保持原本胜肽之 CTL 誘導能力即可，可改變少數(例如:1 個、2 個、或數個)或少比例之胺基酸(亦即，取代、缺失、插入及/或加成)。本說明書中，「數個」之用語係指 5 個或更少胺基酸，例如 4 個或 3 個或更少。改變之胺基酸之比例，較佳為 20%或更少，更佳為 15%或更少，又更佳為 10%或更少，或 1~5%。

【0044】於和免疫療法關連使用時，本發明之胜肽較佳為應以和 HLA 抗原之複合體的形式於細胞或外吐小體之表面上提示。故本發明之胜肽宜對於 HLA 抗原有高結合親和性較佳。所以，也可利用胺基酸殘基之取代、缺失、插入及/或加成而改變胜肽，而獲得結合親和性有所改善之改變胜肽。利用向 HLA 抗原之結合而提示之胜肽之序列之規則性為已知(Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9; Takiguchi, et al., Tissue Antigens 2000: 55: 296-302.)，可將基於如此之規則性之改變導入到本發明之胜肽。

【0045】例如對於 HLA 第 I 類有結合性之胜肽，一般從 N 末端起第 2 號胺基酸及 C 末端之胺基酸常是涉及向 HLA 第 I 類之結合之錨定殘基(Rammensee HG, et al., Immunogenetics. 1995;41(4):178-228.)。例如:HLA-A11 中，已知:N 末端起第 2 號胺基酸為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸及酪胺酸，C 末端之胺基酸為離胺酸及精胺酸，為對於 HLA-A11 之結合親和性高之錨定殘基 (Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9)。再者，HLA-A11 中，自 N 末端起第 3 號及 7 號位置具有輔助的錨定殘基，且自 N 末端第 3 號胺基酸宜為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸、及丙胺酸，自 N 末端第 7 號胺基酸已知白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸及苯丙胺酸為較佳 (Falk, et al23., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9)。所以，為了使 HLA-A11 結合親和性維持或增大，將 N 末端起第 2 號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸，及/或將 C 末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸有可能為理想。再者，將 N 末端起第 3 號胺基酸取代為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸、或丙胺酸、及/或將 N 末端起第 7 號胺基酸取代為白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸有可能亦為理想。因此包括選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列中，N 末端起第 2 號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸、N 末端起第 3 號之胺基酸取代為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸、丙胺酸、N 末端起第

7 號之胺基酸取代為白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸、及/或 C 末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸之胺基酸序列之有 CTL 誘導能力之胜肽，包括在本發明之胜肽。理想態樣中，本發明之胜肽可為選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列中，由 N 末端起第 2 號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸、N 末端起第 3 號之胺基酸取代為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸或丙胺酸、N 末端起第 7 號之胺基酸取代為白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸、及/或 C 末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸之胺基酸序列構成的有 CTL 誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽包括對於選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列實施以下(a)~(d)之中選出之 1 個以上之取代而得之胺基酸序列之具 CTL 誘導能力之胜肽：(a)N 末端起第 2 號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸；(b)N 末端起第 3 號之胺基酸取代為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸或丙胺酸；(c)N 末端起第 7 號之胺基酸取代為白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸；及(d)C 末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸。

【0046】於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列進行上述(a)~(d)之中選出之 1 個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有 CTL 誘導能力之胜肽。本發明中，理想取代之數為選自上述(a)~(d)之 1 個、2 個、3 個或 4 個取代。

【0047】又，本發明之胜肽可為包括選自序列編號：1、9

及 13 中之胺基酸序列中，N 末端起第 2 號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸、及/或 C 末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸之胺基酸序列之有 CTL 誘導能力之胜肽。較佳為本發明之胜肽可為由選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列中，N 末端起第 2 號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸、及/或 C 末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸之胺基酸序列構成之有 CTL 誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽可為包括於選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列有以下(a)及(b)之中選出之 1 個以上之取代而得之胺基酸序列之有 CTL 誘導能力之胜肽：

(a) N 末端起第 2 號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸；及

(b) C 末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸。

【0048】於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列實施從上述(a)~(b)中選出之 1 個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有 CTL 誘導能力之胜肽。於理想態樣，N 末端起第 2 號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸或白胺酸。

【0049】HLA-A03 中，已知作為 N 末端起第 2 號胺基酸之白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、及蘇胺酸、作為 C 末端之胺基酸之精胺酸、離胺酸、酪胺酸、及苯丙胺酸，為對於 HLA-A03 之結合親和性高之錨定殘基(Kubo RT.et al., J Immunol. 1994 Apr 15;152(8):3913-24; Sidney J et

al., Hum Immunol. 1996 Feb;45(2):79-93; Gambacorti-Passerini C et al., Clin Cancer Res. 1997 May;3(5):675-83)。故爲了使 HLA-A03 結合親和性維持或增大，N 末端起第 2 號胺基酸取代爲白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸、及/或 C 末端之胺基酸取代爲精胺酸、離胺酸、酪胺酸、或苯丙胺酸有可能較理想。故包括選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列中，N 末端起第 2 號胺基酸取代爲白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸、及/或 C 末端之胺基酸取代爲精胺酸、離胺酸、酪胺酸、或苯丙胺酸之胺基酸序列之有 CTL 誘導能力之胜肽包括在本發明之胜肽。於理想態樣，本發明之胜肽可爲由選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列中，N 末端起第 2 號胺基酸取代爲白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸、及/或 C 末端之胺基酸取代爲精胺酸、離胺酸、酪胺酸、或苯丙胺酸之胺基酸序列構成之有 CTL 誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽包含具有對於選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列實施以下(a)及(b)之中選出之 1 個以上之取代而得之胺基酸序列之有 CTL 誘導能力之胜肽：

(a) N 末端起第 2 號胺基酸取代爲白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸；及

(b) C 末端之胺基酸取代爲精胺酸、離胺酸、酪胺酸、或苯丙胺酸。

【0050】於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31中之胺基酸序列實施從上述(a)及(b)中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。本發明中，理想取代之數為選自上述(a)及(b)之1個或2個取代。

【0051】於更理想態樣，N末端起第2號胺基酸取代為白胺酸、甲硫胺酸、或纈胺酸。

【0052】不只可對於錨定部位之胺基酸導入取代，也可對於胜肽的潛在的T細胞受體(TCR)認識部位導入取代。在一些研究，已實證例如CAP1、p53(264-272)、Her-2/neu(369-377)、或gp100(209-217)有胺基酸取代之胜肽和原本胜肽有同等活性或有更良好的活性(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997、T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb1;168(3): 1338-47.、S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206、及 S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-14)。

【0053】本發明企圖能對於本發明之胜肽(例如：由選序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31中之胺基酸序列構成之胜肽)之N末端及/或C末端附加1個、2個、或數個胺基酸。保持CTL誘導能力之如此之改變胜肽也包括在本發明。例如：對於由序列編號：13或31之胺基酸序列構成之胜肽之N末端及/或C末端附加1個、2個、或數個胺基酸而得之胜肽，若和APC接觸，會被帶入APC內並經處理，成為由序列編號：13或31之胺基酸序列構成之

胜肽。之後經過抗原提示路徑而在 APC 之細胞表面提示，可誘導 CTL。亦即本發明之胜肽可為在 N 末端及 C 末端中任一者或兩者附加了 1 個、2 個、或數個胺基酸之胜肽。

【0054】但是胜肽之胺基酸序列和有不同機能之內因性或外因性蛋白質之胺基酸序列之一部分相同時，有可能誘發自體免疫損害及/或對特定物質之過敏症狀等副作用。因此為了避免胜肽之胺基酸序列和其他蛋白質之胺基酸序列為一致之狀況，宜使用可利用之資料庫實施相同性檢索較佳。從相同性檢索得知和對象胜肽比較，連 1 個或 2 個胺基酸不同之胜肽也不存在時，為了消除如此之副作用之危險，為了使 HLA 抗原和其之結合親和性增大，及/或為了使其之 CTL 誘導能力增大，可以改變該對象胜肽。

【0055】本發明之胜肽之 1 個、2 個、或數個胺基酸經改變之胜肽可預測能保持原本胜肽之 CTL 誘導能力，但宜關於改變胜肽確認 CTL 誘導能力較佳。本說明書中，「有 CTL 誘導能力之胜肽」係指利用經此胜肽刺激之 APC 誘導 CTL 之胜肽。「CTL 之誘導」包括：向 CTL 之分化誘導、CTL 活化之誘導、CTL 增殖之誘導、CTL 之細胞傷害活性之誘導、CTL 所致標靶細胞溶解之誘導、及 CTL 之 IFN- γ 產生增加之誘導。

【0056】CTL 誘導能力之確認可藉由誘導保有 HLA 抗原之 APC(例如：B 淋巴球、巨噬體、及樹狀細胞)，以胜肽刺激後和 CD8 陽性 T 細胞混合，之後測定由 CTL 釋放之針對標靶細胞之 IFN- γ 以進行。APC 較佳為使用來自人末梢血單核白血球之樹狀細胞。反應系也可使用以表現 HLA 抗原之方式製得之基

因轉殖動物。又，例如：也可以將標靶細胞以 ^{51}Cr 等進行放射標定，從標靶細胞放出之放射活性算出經胜肽誘導之 CTL 之細胞傷害活性。或於經胜肽刺激之 APC 存在下，測定由 CTL 產生及放出之 IFN- γ ，並使用抗 IFN- γ 單株抗體將培養基上之抑制區 (inhibition zone) 予以可見化以評價 CTL 誘導能力。

【0057】除了上述改變，本發明之胜肽只要是結果生成之連結胜肽可保持 CTL 誘導能力即可，也可以和其他胜肽連結。作為和本發明之胜肽連結之適當胜肽，例如來自腫瘤關連抗原 TAA 之 CTL 誘導性胜肽。又，也可以使本發明之胜肽彼此連結。在胜肽間之連結能使用之適當連結子在該發明所屬之技術領域為公知，例如可使用如 AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK (序列編號：38) (R. P. M. Suttmüller et al., J Immunol. 332000, 165: 7308-15)、或 K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-6、K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-15) 之連結子。胜肽能以各種配置 (例如：連鎖狀、重複等) 連結，也可連接 3 個以上的胜肽。

【0058】本發明之胜肽只要結果生成之連結胜肽保持 CTL 誘導能力即可，可以和其他物質連結。能和本發明之胜肽連結之適當物質，例如：胜肽、脂質、糖或糖鏈、乙醯基、及天然或合成之聚合物等。本發明之胜肽只要無損 CTL 誘導能力，亦可進行糖鏈附加、側鏈氧化、或磷酸化等修飾。利用實施如此的種類的修飾，能給予附加的機能 (例如：標靶化機能及送達機能) 或使胜肽安定化。

【0059】例如在本發明所屬之技術領域中，為了使胜肽之

活體內安定性提高，導入 D-胺基酸、胺基酸模倣體、或非天然胺基酸為公知，此概念也可套用在本發明之胜肽。胜肽之安定性能以一些方法分析。例如可使用肽酶、及人血漿及血清等各種活體介質測試安定性(例如參照 Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302)。

【0060】再者，如上述，從 1 個、2 個、或數個胺基酸殘基被取代、缺失、插入及/或附加而得之改變胜肽中，可篩選或選擇和原本胜肽比較為有相同或更高活性者。故本發明也提供篩選或選擇和原本比較為有相同或更高活性之改變胜肽之方法。具體而言，本發明提供篩選有 CTL 誘導能力之胜肽之方法，包括以下步驟：

(a) 製作對於由選自序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列構成之原本胺基酸序列有 1 個、2 個、或數個胺基酸殘基經取代、缺失、插入、及/或附加之胺基酸序列構成之候選序列；

(b) 於(a)製作之候選序列中之選擇和 URLC10 以外之任意公知人基因產物均無顯著相同性(序列同一性)之候選序列；

(c) 使由(b)選擇之候選序列構成之胜肽和 APC 接觸；

(d) 使(c)之 APC 和 CD8 陽性 T 細胞接觸；及

(e) 選擇和由原本胺基酸序列構成之胜肽有同等或更高 CTL 誘導能力之胜肽。

【0061】本說明書中，本發明之胜肽也記載為「URLC10 胜肽」或 URLC10 多胜肽」。

【0062】III.本發明之胜肽之製備

使用周知技術可製備本發明之胜肽。例如可使用重組 DNA 技術或化學合成製備本發明之胜肽。本發明之胜肽可合成爲分別或含有 2 個或更多胜肽之較長多胜肽。使用重組 DNA 技術於寄主細胞內產生後、或化學合成後，從寄主細胞或合成反應物將本發明之胜肽單離亦可。亦即，能以實質上不含其他寄主細胞蛋白質及此等之片段、或其他任意化學物質之方式，將本發明之胜肽予以精製或單離。

【0063】本發明之胜肽只要不因修飾而損及原本胜肽之生物活性即可，可包括糖鏈附加、側鏈氧化、或磷酸化等修飾。其他例示的修飾，例如包括納入爲了使該胜肽之血清半衰期延長可使用之 D-胺基酸或其他胺基酸模倣體。

【0064】可利用基於選擇之胺基酸序列之化學合成獲得本發明之胜肽。適於該合成之習知之胜肽合成法，例如包括如以下文獻記載之方法：

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966；
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976；
- (iii) 「胜肽合成」(日文)，丸善，1975；
- (iv) 「胜肽合成之基礎與實驗」(日本語)，丸善，1985；
- (v) 「醫藥品之開發」(日文)，續第 14 卷(胜肽合成)，廣川書店，1991；
- (vi) WO99/67288；及
- (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, Solid Phase Peptide Synthesis, Academic Press, New York, 1980, 100-18。

【0065】或也可套用爲了產生胜肽之任意之公知之基因工程方法，獲得本發明之胜肽（例如：Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51；Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (Wu et al.) 1983, 101: 347-62)。例如：首先，製備包括編碼爲能表現本發明之胜肽之形態（例如：相當於啓動子序列之調節序列之下游）之多核苷酸之適當載體，對於適當寄主細胞進行轉形。其次培養該寄主細胞，使其產生發明之胜肽。或也可使用試管內轉譯系於試管內製作本發明之胜肽。

【0066】IV.多核苷酸

本發明也提供編碼爲本發明中任一胜肽之多核苷酸。此等包括來自天然 URLC10 基因（例如：GenBank 存取編號 BC_117142(序列編號：36))之多核苷酸、及具其保守性改變之核苷酸序列之多核苷酸。本說明書中，「經保守性改變之核苷酸序列」之用語，係指編碼爲相同或本質相同之胺基酸序列之序列。由於基因密碼之冗餘(redundancy)，相同核酸會編碼爲任意特定之蛋白質。例如：密碼子 GCA、GCC、GCG、及 GCU 皆編碼爲胺基酸之丙胺酸。因此於利用某密碼子指定丙胺酸之任意位置，能不使所編碼之多胜肽改變而將該密碼子變更爲前述對應之任一密碼子。如此之核酸之變異爲「靜默變異」，屬於一種保守性改變之變異。編碼爲胜肽之本說明書中各種核酸序列也代表該核酸之各種可能的靜默變異。將核酸中之各密碼子(排除通常對於甲硫胺酸爲唯一之密碼子 AUG、及通常對於色胺酸爲唯一之密碼子 TGG)改變而獲得機能上相同分子的這一點，應爲該技術領域中有通常知識者所認知的。因此編碼爲

胜肽之核酸之各靜默變異在揭示之各序列中非明示地記載。

【0067】本發明之多核苷酸可以由 DNA、RNA、及此等之衍生物構成。DNA 由 A、T、C、及 G 等鹼基適當地構成，RNA 係將 T 替換為 U。

【0068】本發明之多核苷酸，能藉由在其間介隔或未介隔之胺基酸序列而編碼為本發明之多數胜肽。例如：介隔之胺基酸序列可提供多核苷酸或經轉譯之胜肽之切斷部位(例如酵素認識序列)。再者，多核苷酸可含有對於編碼為本發明之胜肽之編碼序列之任意附加序列。例如：多核苷酸可為包括對於胜肽之表現為必要之調節序列之重組多核苷酸，或可為有標記基因等之表現載體(例如：質體)。一般，可藉由使用例如聚合酶及內核酸酶之習知重組技術操作多核苷酸，以製備出如此的重組多核苷酸。

【0069】也可使用重組技術及化學合成技術中之任一者製作本發明之多核苷酸。例如可藉由插入到適當載體以製作多核苷酸，其當轉染到勝任細胞時可表現。或使用 PCR 技術或於適當寄主內之表現也可使多核苷酸放大(例如參照 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或也可使用 Beaucage SL & Iyer RP, *Tetrahedron* 1992, 48: 2223-311；Matthes et al., *EMBO J* 1984, 3: 801-5 記載之固相技術來合成多核苷酸。

【0070】V.外吐小體

本發明更提供在自身表面上呈現本發明之胜肽與 HLA 抗原之間形成之複合體的稱為外吐小體之細胞內小胞。外吐小體

例如可使用日本特表平 11-510507 號及 WO99/03499 詳述之方法製備，可使用從成為治療及/或預防之對象之患者獲得之 APC 製備。本發明之外吐小體能以和本發明之胜肽同樣之樣式以疫苗的形式接種。

【0071】前述複合體中所含之 HLA 抗原之型必須和必須治療及/或預防之對象的型一致。例如亞洲人族群中，HLA-A11(例如:HLA-A*1101)是亞洲人族群廣泛一般常見的對偶基因，適合亞洲人患者之治療。又，HLA-A03(例如:HLA-A*0301)是白人族群廣泛一般常見之對偶基因，適合白人患者之治療。典型上，可藉由於臨床預先檢查須治療之患者之 HLA 抗原之型，適當選擇對於特定 HLA 抗原有高水平之結合親和性、或介隔特定 HLA 抗原之抗原呈現所獲致之有 CTL 誘導能力之胜肽。

【0072】本發明之外吐小體係於其表面上呈現本發明之胜肽與 HLA-A11 或 HLA-A03 之複合體。和本發明之胜肽形成複合體之 HLA 為 HLA-A11 時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列構成之胜肽或其改變胜肽更佳。又，當和本發明之胜肽形成複合體之 HLA 為 HLA-A03 時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列構成之胜肽或其改變胜肽更佳。

【0073】VI.抗原呈現細胞(APC)

本發明也提供於自身表面上呈現在 HLA 抗原與本發明之胜肽之間形成之複合體的 APC。或本發明提供於其細胞表面上具有在 HLA 抗原與本發明之胜肽之間之複合體的 APC。本發明之 APC 可為經單離之 APC。關於細胞(APC、CTL 等)使用時，「經單離」之用語是指將該細胞從其他種類之細胞分離。本發明之 APC，可為從來自成為治療及/或預防對象之患者之 APC 誘導者，且可單獨地或和包括本發明之胜肽、外吐小體、或 CTL 之其他藥物併用而以疫苗形式投予。

【0074】本發明之 APC 不限特定種類之細胞，包括已知以能被淋巴球認識之方式在自身之細胞表面上呈現蛋白質性抗原之細胞，例如樹狀細胞(dendritic cell：DC)、朗格罕細胞(Langerhans cell)、巨噬體、B 細胞、及活化 T 細胞。DC 為 APC 中之有最強力之 CTL 誘導作用之代表性 APC，故 DC 宜作為本發明之 APC 理想地使用。本發明中，理想之 DC 為來自人之經單離之 DC。又，本發明之 APC 也可為有抗原呈現機能之多種細胞之混合物，也可為呈現各不同之本發明之胜肽之 APC 之混合物。

【0075】例如：可藉由從末梢血單核球將 DC 單離，然後將此等於試管內利用本發明之胜肽予以刺激，而獲得本發明之 APC。本發明之胜肽對於對象投予時，呈現本發明之胜肽之 APC 會在該對象之體內被誘導。因此本發明之 APC 可藉由將本發明之胜肽對於對象投予後，從該對象將 APC 回收以獲得。或本發明之 APC，可藉由使從對象回收之 APC 接觸本發明之胜肽而獲得。

【0076】爲了誘導對象中針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫應答，可將本發明之 APC 單獨，或和包括本發明之胜肽、外吐小體、或 CTL 之其他藥劑而對於對象投予。例如：離體投予可包括以下步驟：

- (a) 從第 1 對象回收 APC、
- (b) 使步驟(a)之 APC 和胜肽接觸、及
- (c) 將步驟(b)之 APC 對於第 2 對象投予。

【0077】第 1 對象與第 2 對象可以爲同一個體或爲不同個體。第 1 對象與第 2 對象不同個體時，第 1 對象與第 2 對象之 HLA 爲同一型較佳。利用上述步驟(b)獲得之 APC 能成爲用以治療及/或預防癌之疫苗。

【0078】利用如上述方法獲得之本發明之 APC 具有 CTL 誘導能力。關於 APC 使用之「CTL 誘導能力」之用語，係指 APC 當和 CD8 陽性 T 細胞接觸能夠誘導 CTL 之能力。再者，「CTL 誘導能力」包括：APC 誘導 CTL 活化之能力、APC 誘導 CTL 增殖之能力、APC 促進 CTL 所致標靶細胞溶解之能力、及 APC 使 CTL 所致 IFN- γ 產生增加之能力。由本發明之 APC 誘導之 CTL 爲針對 URLC10 爲專一性之 CTL，對於 URLC10 表現細胞呈現專一性細胞傷害活性。

【0079】本發明之 APC 除了利用上述方法，也可利用將編碼爲本發明胜肽之多核苷酸於試管內導入到 APC 以製備。導入之多核苷酸可爲 DNA 或 RNA 之形態。導入方法之例無特殊限定，包括脂質轉染法、電穿孔法、及磷酸鈣法等該技術領域中以往實施之各種各樣方法。更具體而言，可使用如 Cancer Res

1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 日本公表專利公報第 2000-509281 號記載之方法。藉由將編碼爲本發明胜肽之多核苷酸導入到 APC，該多核苷酸會在細胞內轉錄、轉譯等，然後生成之胜肽經 MHC 第 I 類處理，經過呈現路徑而在 APC 細胞表面呈現本發明之胜肽。

【0080】於理想態樣，本發明之 APC 在自身之細胞表面上呈現形成於 HLA-A11(更佳爲 HLA-A*1101)或 HLA-A03(更佳爲 HLA-A*0301)與本發明之胜肽之間之複合體。和本發明之胜肽形成複合體之 HLA 爲 HLA-A11 時，本發明之胜肽宜爲具有選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列構成之胜肽更理想。和本發明之胜肽形成複合體之 HLA 爲 HLA-A03 時，本發明之胜肽宜爲具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較理想，由選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列構成之胜肽更佳。

【0081】又，本發明之 APC 較佳爲利用包括以下(a)或(b)記載之步驟之方法誘導之 APC：

(a) 使表現選自 HLA-A11(更佳爲 HLA-A*1101)及 HLA-A03(更佳爲 HLA-A*0301)中之至少 1 種 HLA 之 APC 接觸本發明之胜肽；

(b) 對於表現選自於 HLA-A11(更佳爲 HLA-A*1101)及 HLA-A03(更佳爲 HLA-A*0301)中之至少 1 種 HLA 之 APC 導入

編碼爲本發明胜肽之多核苷酸。

【0082】和表現 HLA-A11 之 APC 接觸之本發明之胜肽宜爲具有選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列構成之胜肽更佳。

【0083】和表現 HLA-A03 之 APC 接觸之本發明之胜肽宜爲具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列構成之胜肽更佳。

【0084】又，依照本發明，提供本發明之胜肽之用途，係用以製造誘導具 CTL 誘導能力之 APC 之藥學組合物。此外本發明提供用以製造誘導具 CTL 誘導能力之 APC 之藥學組合物之方法或步驟。再者，本發明提供用以誘導具 CTL 誘導能力之 APC 之本發明之胜肽。

【0085】VII.細胞傷害性 T 淋巴球(CTL)

由本發明之胜肽誘導之 CTL，爲了增強活體內將表現 URLC10 之癌細胞作爲標靶之免疫應答，可以和本發明之胜肽同樣地作爲疫苗使用。故本發明提供由本發明之胜肽誘導或活化之 CTL。本發明之 CTL 係將本發明之胜肽作爲標靶之 CTL，係能和本發明之胜肽與 HLA 抗原之複合體結合之 CTL。CTL 向該複合體之結合，可介隔於 CTL 之細胞表面上存在之 T 細胞受體(TCR)實施。本發明之 CTL 可以爲經單離之 CTL。理想之 CTL 爲來自人之經單離之 CTL。又，本發明之 CTL 也可以

為將各自不同之本發明之胜肽作為標靶之 CTL 之混合物。

【0086】本發明之 CTL 可藉由以下步驟獲得：(1)將本發明之胜肽對於對象投予、或(2)於試管內以本發明之胜肽刺激來自對象之 APC 及 CD8 陽性 T 細胞、或末梢血單核球(peripheral blood mononuclear cell：PBMC)、或(3)使 CD8 陽性 T 細胞或 PBMC 試管內接觸在自身表面上呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽之複合體之 APC 或外吐小體、或(4)將包括編碼為和於細胞表面上利用 HLA 抗原呈現之本發明之胜肽結合之 T 細胞受體(TCR)之各次單元之多核苷酸之載體導入到 CD8 陽性 T 細胞。上述(2)或(3)之方法使用之外吐小體及 APC 各可利用「V.外吐小體」及「VI.抗原呈現細胞(APC)」之章節記載之方法製備，上述(4)之方法之詳情記載於「VIII.T 細胞受體(TCR)」之章節。

【0087】本發明之 CTL，可以對於成為治療及/或預防對象之患者單獨投予，或可為了調節效果而和包括本發明之胜肽、APC 或外吐小體之其他藥物併用投予。又，本發明之 CTL 可以為從來自成為該 CTL 之投予對象之患者之 CD8 陽性 T 細胞誘導之 CTL。本發明之 CTL 對於呈現和本發明之胜肽，例如本發明之 CTL 之誘導使用者為相同胜肽之標靶細胞專一性作用。標靶細胞可為如癌細胞般之內生地表現 URLC10 之細胞、或已轉染 URLC10 基因之細胞。本發明之胜肽所為之刺激而在細胞表面上呈現該胜肽之細胞也可成為本發明之 CTL 之攻擊標靶。又，本發明之 CTL 之標靶細胞較佳為 HLA-A11(更佳為 HLA-A*1101)及 HLA-A03(更佳為 HLA-A*0301)中之至少 1 者為陽性之細胞。

【0088】於理想態樣，本發明之 CTL 針對表現選自 HLA-A11(更佳為 HLA-A*1101)及 HLA-A03(更佳為 HLA-A*0301)中之至少一者之 HLA 與 URLC10 兩者之細胞專一地靶向。本發明中，CTL 所靶向之細胞可為以同型或異型地具有 HLA-A11 及 HLA-A03 對偶基因中之任一者的細胞。

【0089】本說明書中，CTL 對於細胞「靶向(targeting)」，是指 CTL 認識在細胞表面呈現 HLA 與本發明之胜肽之複合體之細胞，而對於該細胞呈現細胞傷害活性。又，「專一性靶向」，係指 CTL 對於該細胞呈現細胞傷害活性，但對於其他細胞則不呈現傷害活性。又，於和 CTL 之關連，「認識細胞」之用語係指介隔其 TCR 介而結合於在細胞表面呈現之 HLA 與本發明之胜肽之複合體，並對於該細胞呈專一性細胞傷害活性。因此本發明之 CTL 較佳為能介隔 TCR 而結合於細胞表面上所呈現之形成在 HLA-A11(更佳為 HLA-A*1101)或 HLA-A03(更佳為 HLA-A*0301)與本發明之胜肽之間之複合體的 CTL。

【0090】又，本發明之 CTL 較佳為利用包括以下(a)或(b)記載之步驟的方法誘導之 CTL：

(a) 使 CD8 陽性 T 細胞於試管內接觸在自身表面上呈現 HLA-A11(更佳為 HLA-A*1101)或 HLA-A03(更佳為 HLA-A*0301)與本發明之胜肽之複合體之 APC 或外吐小體；

(b) 對於 CD8 陽性 T 細胞導入編碼為能結合於在細胞表面上由 HLA-A11(更佳為 HLA-A*1101)或 HLA-A03(更佳為 HLA-A*0301)呈現之本發明之胜肽之 TCR 之各次單元之多核苷酸。

【0091】VIII.T 細胞受體(TCR)

本發明又提供包括編碼爲能結合於在細胞表面上由 HLA 抗原呈現之本發明之胜肽之 TCR 之各次單元之多核苷酸之組合物、及使用其之方法。該多核苷酸藉由表現能結合於利用 HLA 抗原而於細胞表面上呈現之本發明之胜肽之 TCR，能對於 CD8 陽性 T 細胞給予針對表現 URLC10 之癌細胞之專一性。可利用該發明所屬之技術領域公知之方法鑑別編碼爲作爲以本發明之胜肽誘導的 CTL 之 TCR 次單元之 α 鏈及 β 鏈之多核苷酸 (WO2007/032255、及 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如：爲了分析 TCR，PCR 法爲較佳。用於分析之 PCR 引子，例如可以於以下的 5'側引子組合以下之 3'側引子而成放大用引子組，但不限定於此。

5'側引子：

5'-R 引子 (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (序列編號：32)

3'側引子：

對於 TCR α 鏈 C 區爲專一性：

3-TR α -C 引子 (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (序列編號：33)

對於 TCR β 鏈 C1 區爲專一性：

463-TR β -C1 引子 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (序列編號：34)、

或對於 TCR β 鏈 C2 區爲專一性：

3-TR β -C2 引子 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (序列編號：35)

藉由將已鑑別之多核苷酸導入到 CD8 陽性 T 細胞而形成

之 TCR，能和呈現本發明胜肽之標靶細胞以高結合力結合，且能於活體內及試管內媒介呈現本發明之胜肽之標靶細胞之有效率的殺傷。

【0092】編碼為 TCR 之各次單元之多核苷酸可納入到適當載體，例如反轉錄病毒載體。該等載體為該發明所屬之技術領域周知。可以將該多核苷酸或以可表現此等之形態包括該該多核苷酸之載體導入到 CD8 陽性 T 細胞，例如來自患者之 CD8 陽性 T 細胞。本發明藉由快速改變患者本身之 T 細胞(或來自其他對象之 T 細胞)，能提供可快速且輕易地製作有優良之癌細胞殺傷特性之改變 T 細胞之既成之組合物。

【0093】本說明書中，專一性 TCR 係指當該 TCR 存在於 CD8 陽性 T 細胞表面上時，會專一地認識在標靶細胞表面上呈現之本發明之胜肽與 HLA 抗原之複合體，而給予對於標靶細胞之專一細胞傷害活性之 TCR。上述複合體之專一認識可利用任意之公知方法確認，其理想例包括使用 HLA 分子及本發明之胜肽之 HLA 多聚體染色分析、及 ELISPOT 分析法。藉由實施 ELISPOT 分析，可以確認：導入有上述多核苷酸之 T 細胞可利用 TCR 而專一地認識標靶細胞、及信號已傳達到細胞內。上述 TCR 係於 CD8 陽性 T 細胞表面上存在時，可依公知方法確認：該 TCR 對於 CD8 陽性 T 細胞可給予標靶細胞專一性細胞傷害活性。理想方法包括例如：利用鉻釋出分析法等測定對於標靶細胞之細胞傷害活性。

【0094】本發明於和 HLA-A11 之關連，提供利用對於 CD8 陽性 T 細胞將編碼為結合在具例如選自序列編號：1、9 及 13

中之胺基酸序列之胜肽的 TCR 的各次單元的多核苷酸進行轉導(transduction)以製備的 CTL。

【0095】 又，本發明，於和 HLA-A03 之關連，提供藉由對於、CD8 陽性 T 細胞將編碼為會和具有例如選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽結合之 TCR 之各次單元之多核苷酸進行轉導以製備之 CTL。

【0096】 經轉導之 CTL 能於活體內復位(homing)，且可利用周知之試管內培養法使其增殖（例如：Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-61 (1989)）。本發明之 CTL 可用於形成對於須治療或預防之患者之疾病之治療或預防有用之免疫原性組合物(參照 WO2006/031221，其內容利用參照納入本說明書)。

【0097】 IX. 藥學組合物

本發明並提供包括選自以下中之至少 1 種有效成分之組合物或藥學組合物：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以能表現本發明之胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 本發明之 APC；
- (d) 本發明之外吐小體；
- (e) 本發明之 CTL。

【0098】 本發明之藥學組合物除了上述有效成分，可不特別限制地視需要包括醫藥品通常使用之載體、賦形劑等。可用於本發明之藥學組合物的載體，例如滅菌水、生理食鹽水、磷酸緩衝液、培養液等。因此本發明提供包括選自以下(a)~(e)中

之至少 1 種有效成分與藥學上可容許之載體之藥學組合物：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以能表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 本發明之 APC；
- (d) 本發明之外吐小體；
- (e) 本發明之 CTL。

【0099】再者，本發明之藥學組合物視需要可包括安定劑、懸浮液、保存劑、界面活性劑、溶解輔助劑、pH 調整劑、凝聚抑制劑等。URLC10 之表現，和正常組織比較，在癌細胞顯著上昇。故本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸可用於癌之治療及/或預防、及/或預防術後之癌再發。故本發明提供用於癌治療及/或預防、及/或預防術後之癌再發之藥學組合物且包含本發明之胜肽或多核苷酸之一或多種作為有效成分之組合物。或可為了作為藥學組合物，而將本發明之胜肽呈現於外吐小體或 APC 之表面上。此外，將本發明之任一胜肽作為標靶之本發明之 CTL 也可以作為本發明之藥學組合物之有效成分。本發明之藥學組合物可含有治療的有效量或藥學的有效量的上述有效成分。

【0100】本發明之藥學組合物也可作為疫苗使用。在和本發明之關連中，「疫苗」(也稱為「免疫原性組合物」)之用語，係指對於動物接種時具有誘導帶來抗腫瘤作用之免疫應答之機能之組合物。因此本發明之藥學組合物可用於誘導帶來抗腫瘤作用之免疫應答。利用本發明之胜肽、多核苷酸、APC、CTL 及藥學組合物誘導免疫應答只要是可帶來抗腫瘤作用之免疫

應答即可，不特別限定，例示地包括對於癌細胞為專一性 CTL 之誘導、及對於癌細胞為專一性細胞傷害活性之誘導。本發明之藥學組合物可用於人對象或患者中之癌治療及/或預防、及/或預防術後之癌再發。

本發明之藥學組合物宜對於選自 HLA-A11 及 HLA-A03 中之至少 1 種 HLA 為陽性之對象使用。又，本發明之藥學組合物宜使用在表現選自 HLA-A11 及 HLA-A03 中之至少 1 種 HLA 及 URLC10 之癌之治療及/或預防、及/或預防術後之癌再發。

【0101】於其他態樣，本發明更提供選自以下之有效成分之用途，係用於製造癌治療或預防之藥學組合物：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0102】或本發明更提供用於癌治療或預防之選自以下之有效成分：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0103】或本發明更提供用以製造治療或預防癌之藥學組合物之方法或步驟，包括將選自以下中之至少 1 種有效成分與

藥學的或生理學上可容許之載體加以製劑化之步驟：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0104】於另一態樣，本發明更提供用以製造治療或預防癌之藥學組合物之方法或步驟，包括以下步驟：將選自以下之有效成分和藥學上或生理學上可容許之載體混合之步驟：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0105】於另一態樣，本發明提供用以治療或預防癌之方法，包括將選自以下之至少 1 種有效成分對於對象投予之步驟：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0106】本發明中發現：具有選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列之胜肽係能誘導強力且專一性免疫應答的 HLA-A11 拘束性抗原決定位胜肽。因此包括具選自序列編號：

1、9 及 13 中之胺基酸序列之至少一種胜肽之本發明之藥學組合物，特別適合對於具有 HLA-A11(例如:HLA-A*1101)作為 HLA 抗原之對象投予。同樣現象也可套用在包括編碼為該等任一胜肽之多核苷酸(亦即，本發明之多核苷酸)、呈現該等胜肽之 APC 或外吐小體(亦即本發明之 APC 或外吐小體)、及將該等胜肽作為標靶之 CTL(亦即，本發明之 CTL)之藥學組合物。亦即包含和具有選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列之胜肽相關連之有效成分之藥學組合物，適於向具有 HLA-A11 之對象(亦即，HLA-A11 陽性之對象)投予。於更理想態樣，本發明之藥學組合物係包括具序列編號：13 之胺基酸序列之胜肽之藥學組合物。

【0107】同樣地，本發明發現：具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽，係作為能誘導強力且專一性之免疫應答之 HLA-A03 拘束性抗原決定位胜肽。因此包含具選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之至少一種胜肽之本發明之藥學組合物，特別適合向具有 HLA-A03(例如:HLA-A*0301)作為 HLA 抗原之對象投予。同樣現象也可套用在包含編碼為該等之任一胜肽之多核苷酸(亦即，本發明之多核苷酸)、呈現該等胜肽之 APC 或外吐小體(亦即本發明之 APC 或外吐小體)、及將該等胜肽作為標靶之 CTL(亦即，本發明之 CTL)之藥學組合物。亦即，包含和具選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽相關連之有效成分之藥學組合

物，適於向具有 HLA-A03 之對象(亦即，HLA-A03 陽性之對象)投予。於更理想的態樣，本發明之藥學組合物係包括序列編號：31 之胺基酸序列之胜肽之藥學組合物。

【0108】利用本發明之藥學組合物治療及/或預防之癌只要是表現 URLC10 之癌即可，不特別限定，包括膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤等。又，本發明之藥學組合物宜對於以同型或異型具有選自 HLA-A11 及 HLA-A03 中之 HLA 對偶基因之對象使用較佳。

【0109】本發明之藥學組合物除了含有前述有效成分，也可含有具有誘導針對癌細胞之 CTL 之能力之其他胜肽(例如來自其他 TAA 之 CTL 誘導性胜肽)、編碼為該其他胜肽之其他多核苷酸、呈現該其他胜肽之其他細胞等。

【0110】本發明之藥學組合物只要不妨礙本發明之胜肽等上述有效成分的抗腫瘤效果，也可任意含有其他治療物質作為有效成分。例如：本發明之藥學組合物可任意地含有抗發炎組合物、鎮痛劑、化學療法藥等。本發明之藥學組合物本身含有其他治療物質，除此以外也可將本發明之藥學組合物和一或多種其他藥學組合物連續或同時投予。本發明之藥學組合物及其他藥學組合物的投予量依存於例如：使用之藥學組合物之種類、治療之疾病、及投予之時程及路徑。

【0111】本說明書中，應理解：除了具體言及的成分以外，本發明之藥學組合物也可含有考慮製劑之種類而該發明所屬之技術領域中慣例的其他成分。

【0112】 本發明也提供包含本發明藥學組合物之製品或套組。本發明之製品或套組可包括容納本發明藥學組合物之容器。適當容器，例如瓶、小玻璃瓶、及試驗管，但不限定於此。容器可由玻璃或塑膠等各種材料形成。容器可貼標，標籤可記載應使用本發明之藥學組合物之疾病或疾病狀態。標籤也可顯示關於投予等的指示。

【0113】 本發明之製品或套組除了容納本發明藥學組合物之容器以外，也可任意地含有容納藥學上可容許之稀釋劑之第2容器。本發明之製品或套組可更包含其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、注射針、針筒、及記載了使用說明的附帶文書等從商業上之觀點及使用之觀點為理想的其他材料。

【0114】 視需要也可利用能含有包括有效成分之 1 或多數單位劑形之袋或分配器裝置來提供本發明之藥學組合物。該袋例如可包括如泡罩袋之金屬箔或塑膠箔。袋或分配器裝置可以附帶關於投予之說明書。

【0115】 (1) 含有胜肽作為有效成分之藥學組合物

含有本發明胜肽之藥學組合物，若有必要可依習知製劑化法予以製劑化。本發明之藥學組合物，除了本發明之胜肽，可無特別限制地因應須要含有醫藥品通常使用之載體、賦形劑等。本發明之藥學組合物能使用之載體，例如滅菌水(例如：注射用水)、生理食鹽水、磷酸緩衝液、磷酸緩衝生理食鹽水、Tris-緩衝生理食鹽水、0.3%甘胺酸、培養液等。又，本發明之藥學組合物視需要可含有安定劑、懸浮液、保存劑、界面活性劑、溶解輔助劑、pH 調整劑、凝聚抑制劑等。本發明之藥學

組合物，因為能誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之專一性免疫，故可用在癌治療或預防之目的。

【0116】 例如：本發明之藥學組合物可溶解於滅菌水(例如：注射用水)、生理食鹽水、磷酸緩衝液、磷酸緩衝生理食鹽水、Tris-緩衝生理食鹽水等藥學的或生理學上可容許之水溶性之載體，視需要添加安定劑、懸浮液、保存劑、界面活性劑、溶解輔助劑、pH 調整劑、凝聚抑制劑等後，將該胜肽溶液予以滅菌以製備。胜肽溶液之滅菌方法不特別限定，宜利用過濾滅菌進行較佳。過濾滅菌例如可使用孔徑 $0.22\mu\text{m}$ 以下之過濾滅菌濾器進行。過濾滅菌後之胜肽溶液不限於此，例如能以注射劑形式對於對象投予。又，本發明之藥學組合物也可利用將上述胜肽溶液冷凍乾燥以製備成冷凍乾燥製劑。冷凍乾燥製劑可藉由將依上述方式製備之胜肽溶液填充於安瓿、小玻璃瓶、或塑膠容器等適當容器後進行冷凍乾燥，復壓後以經滅菌洗滌之橡膠蓋等將容器密封以製備。冷凍乾燥製劑，可於投予前再度溶解於滅菌水(例如：注射用水)、生理食鹽水、磷酸緩衝液、磷酸緩衝生理食鹽水、Tris 緩衝生理食鹽水等藥學的或生理學上可容許之水溶性之載體後，對於對象投予。本發明之藥學組合物之理想例中，包括如此過濾滅菌之胜肽溶液之注射劑、及將該胜肽溶液予以冷凍乾燥而得之冷凍乾燥製劑。再者，包括如此之冷凍乾燥製劑與再溶解液之套組也含於本發明中。又，包括容納有為本發明之藥學組合物之冷凍乾燥製劑之容器及容納其再溶解液之容器的套組也含於本發明。

【0117】 本發明之藥學組合物，也可包括本發明胜肽之 2

種或更多種類之組合。胜肽之組合可採取混合胜肽之雞尾酒形態，或也可使用標準技術使胜肽彼此結合。例如：胜肽可化學結合、或表現成單一之融合多胜肽序列。藉由投予本發明之胜肽，該胜肽可利用 HLA 抗原而在 APC 上以高密度呈現，然後誘導出對於形成在呈現之胜肽與該 HLA 抗原之間的複合體會專一反應之 CTL。或從對象將 APC(例如：DC)取出，然後利用本發明之胜肽刺激，獲得在自身的細胞表面上呈現本發明之任一胜肽之 APC。將該等 APC 對於對象再度投予，於該對象中誘導 CTL，結果能使針對表現 U937 之癌細胞之攻擊性增大。

【0118】本發明之藥學組合物也可包括已知有效率地確立細胞性免疫之佐劑。佐劑係指當和有免疫學活性之抗原一起(或連續)投予時，會增強對於該抗原之免疫應答之化合物。佐劑可使用例如 Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89 等文獻記載之公知品。適當之佐劑，例如鋁鹽(磷酸鋁、氫氧化鋁、氧基氫氧化鋁等)、明礬、霍亂毒素、沙門氏菌毒素、不完全佛洛依德佐劑(IFA)、完全佛洛依德佐劑(CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF 其他免疫刺激性細胞介素、含有 CpG 模體之寡去氧核苷酸(CpG7909 等)、水中油型乳劑、皂素或其衍生物(QS21 等)、脂質 A 或其衍生物等脂多糖(MPL、RC529、GLA、E6020 等)、脂胜肽、乳鐵蛋白、鞭毛蛋白、雙鏈 RNA 或其衍生物(聚 IC 等)、細菌 DNA、咪唑并喹啉(咪喹莫特 (Imiquimod)、R848 等)、C 型凝集蛋白配體(海藻糖二(二十二酸)酯(trehalose-6,6'-dibehenate：TDB)等)、CD1d 配體(α -半乳糖苷基神經醯胺等)、角鯊烯乳劑(MF59、AS03、AF03 等)、PLGA

等，但不限定於此。佐劑在包括本發明藥學組合物之套組中，也可容納在和含有本發明胜肽之藥學組合物為不同的容器。此時，該佐劑與該藥學組合物可以連續對於對象投予，也可以在即將向對象投予前混合。本發明也提供如此之包含包括本發明胜肽之藥學組合物與佐劑之套組。本發明之藥學組合物為冷凍乾燥製劑時，該套組可更包括再溶解液。又，本發明提供包括容納本發明之藥學組合物之容器，及容納佐劑之容器的套組。該套組視需要可更包括容納再溶解液之容器。

【0119】使用油性佐劑作為佐劑時，本發明之藥學組合物也可製備成乳劑。乳劑例如可利用將以如上述方式製備而得之胜肽溶液與油性佐劑予以混合，攪拌以製備。胜肽溶液可為冷凍乾燥後再溶解者。乳劑可以為 W/O 型乳劑及 O/W 型乳劑中之任一者，但為了獲得高免疫應答增強效果，宜為 W/O 型乳劑較佳。油性佐劑宜使用 IFA，但不限於此。乳劑之製備可以於極將對於對象前進行，此時，本發明之藥學組合物也可以作為包括本發明之胜肽溶液及油性佐劑之套組的形式提供。本發明之藥學組合物為冷凍乾燥製劑時，該套組可更包括再溶解液。

【0120】再者，本發明之藥學組合物也可為封入有本發明胜肽之脂質體製劑、直徑數微米的珠粒有胜肽結合之顆粒製劑、或胜肽有脂質結合之製劑。

【0121】於本發明之另一態樣，本發明之胜肽也可以藥學上可容許之鹽之形態投予。鹽之理想例，包括和鹼金屬(鋰、鉀、鈉等)之鹽、和鹼土類金屬之鹽(鈣、鎂等)、和其他金屬(銅、鐵、鋅、錳等)之鹽、和有機鹼之鹽、和胺之鹽、和有機酸(乙酸、甲

酸、丙酸、富馬酸、馬來酸、琥珀酸、酒石酸、檸檬酸、蘋果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸等)之鹽、及和無機酸(鹽酸、磷酸、氫溴酸、硫酸、硝酸等)之鹽。本說明書使用之「藥學上可容許之鹽」之用語，係指保持此化合物之生物學的、生理學的藥理學的或藥學的有效性及其特性之鹽。故，包括本發明胜肽之藥學上可容許之鹽之藥學組合物也包括在本發明。又，「本發明之胜肽」除了包括游離體之胜肽，也包括其藥學上可容許之鹽。

【0122】於一些態樣中，本發明之藥學組合物可更包括刺激 CTL 之成分。脂質已鑑別係能在活體內刺激對於病毒抗原之 CTL 的物質。例如：可以使棕櫚酸殘基附著於離胺酸殘基之 ϵ 胺基及 α 胺基，然後連結於本發明之胜肽。其次，可將已附加脂質之胜肽以微胞或粒子狀態直接投予、納入脂質體中而投予、或在佐劑中乳化而投予。作為利用 CTL 應答之脂質刺激之另一例，當共價鍵結於適當胜肽時，可使用三棕櫚醯基-S-甘油基半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸(P3CSS)等大腸菌(E.coli)脂蛋白質刺激 CTL(可參照例如:Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4)。

【0123】本發明之胜肽或藥學組合物之適當之投予方法，包括例如經口、皮內、皮下、肌肉內、骨內、腹膜及靜脈內注射等、及全身投予或向標靶部位之附近局部投予，但不限定於此。理想之投予方法可列舉向腋窩或鼠蹊部等淋巴節附近進行皮下注射。投予可利用單次投予進行，也可利用多次投予以追加。本發明之胜肽可以用為了治療癌之治療的或藥學的有效量或對於誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫(更具體而言，為 CTL)之治療的或藥學的有效量對於對象投予。本發明之胜

肽之用量可因應治療之疾病、患者年紀、體重、投予方法等適當調整，關於各本發明之胜肽，通常為 0.001mg~1000mg 如 0.01mg~100mg，例如 0.1mg~30mg，例如 0.1mg~10mg，例如 0.5mg~5mg。又，投予間隔可以為數日~數個月 1 次，例如能以每週 1 次的間隔投予。該技術領域中有通常知識者可以適當選擇適當的投予量(用量)。

【0124】 於理想態樣，本發明之藥學組合物包括治療有效量之本發明之胜肽及藥學的或生理學上可容許之載體。於另一態樣，本發明之藥學組合物包括治療有效量之本發明之胜肽、藥學的或生理學上可容許之載體、及佐劑。本發明之藥學組合物可含有本發明之胜肽 0.001mg~1000mg，較佳為 0.01mg~100mg，更佳為 0.1mg~30mg，更佳為 0.1mg~10mg，例如 0.5mg~5mg。又，本發明之藥學組合物為注射劑時，本發明之胜肽能以 0.001mg/ml~1000mg/ml，較佳為 0.01mg/ml~100mg/ml，更佳為 0.1mg/ml~30mg/ml，又更佳為 0.1mg/ml~10mg/ml，例如 0.5mg/ml~5mg/ml 之濃度含有。此時，可將例如：0.1~5ml，較佳為 0.5ml~2ml 之本發明之藥學組合物利用注射對於對象投予。

【0125】 或本發明提供用以治療及/或預防癌、及/或用以預防癌之術後再發之方法，包括以下步驟：將治療有效量之本發明之胜肽或本發明之藥學組合物對於對象投予。本發明之胜肽如上述，通常可於 1 次投予對於對象投予 0.001mg~1000mg，例如 0.01mg~100mg，例如 0.1mg~30mg，例如 0.1mg~10mg，例如 0.5mg~5mg。於理想態樣，本發明之胜肽係和佐劑同時對

於對象投予。又，投予間隔為數日~數個月 1 次，較佳為數日~1 個月 1 次的間隔，例如：可為每週 1 次或 2 週 1 次的間隔。

【0126】 (2) 含有多核苷酸作為有效成分之藥學組合物

本發明之藥學組合物也可包括以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸。本說明書中，「以可表現表現之形態」之用語，係指多核苷酸導入到細胞時，表現本發明之胜肽之意。例示的態樣中，本發明之多核苷酸之序列包括對於表現本發明胜肽為必要之調節要素。本發明之多核苷酸可以具備對於使向標靶細胞之基因體達成安定插入為必要之序列(關於相同重組匣載體之說明，參照例如 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12)。參照例如：Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8；美國專利第 5,580,859 號；第 5,589,466 號；第 5,804,566 號；第 5,739,118 號；第 5,736,524 號；第 5,679,647 號；及 WO98/04720。基於 DNA 之遞送技術，例如「裸 DNA」、經促進之(bupivacaine、聚合物、胜肽媒介性)遞送、陽離子性脂質複合體、及粒子媒介性(「基因槍」)或壓力媒介性之遞送(參照例如：美國專利第 5,922,687 號)。

【0127】 也可以利用病毒載體或細菌載體使本發明之胜肽表現。表現載體，例如包括牛痘病毒或雞痘病毒等弱毒化病毒寄主。例如：作為為了使本發明之胜肽表現之載體，可使用牛痘病毒。若導入到寄主，重組牛痘病毒會表現免疫原性胜肽並藉此誘發免疫應答。對於免疫化方案有用之牛痘載體及方法記載於例如美國專利第 4,722,848 號。其他載體為 BCG(Bacillus Calmette-Guérin)。BCG 載體記載於 Stover et al., Nature 1991,

351: 456-60。對於治療性投予或免疫化有用之多種多樣的其他載體，例如腺病毒載體及腺病毒伴隨載體、反轉錄病毒載體、傷寒菌 (*Salmonella typhi*) 載體、無毒化炭疽毒素載體等為顯明。參照例如: 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。

【0128】本發明之多核苷酸向患者內之遞送可為直接的，此時可以使患者直接暴露於保有本發明之多核苷酸之載體。或也可為間接的，此時先於試管內將細胞以保有本發明之多核苷酸之載體轉形，然後將該細胞移植到患者內。此等 2 種方法分別作為活體內及離體之基因治療而公知。

【0129】基因治療之方法之一般的綜合說明，參照 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。本發明也可使用之重組 DNA 技術之領域中之一般公知之方法記載於 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; 及 Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990。

【0130】和胜肽之投予同樣地，多核苷酸之投予有經口、皮內、皮下、靜脈內、肌內、骨內及/或腹膜注射等進行的情形。又，多核苷酸之投予可為全身投予或向標靶部位附近之局

部投予。投予可利用單次投予進行，也可利用多次投予追加。本發明之多核苷酸可以用為了治療癌之治療的或藥學的有效量或為了誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫(更具體而言為 CTL)之治療的或藥學的有效量對於對象投予。適當載體中之多核苷酸之用量、或經編碼為本發明之胜肽之多核苷酸轉形之細胞中之多核苷酸之用量，可因應治療之疾病、患者年紀、體重、投予方法等而適當調整，此用量通常為 0.001mg~1000mg，例如 0.01mg~100mg，例如 :0.1mg~30mg，例如 0.1mg~10mg，例如 0.5mg~5mg。投予間隔可以為數日 1 次~數個月 1 次，例如每週 1 次的間隔投予。該技術領域中有通常知識者可以適當選擇適當的投予量(用量)。

【0131】 X.使用胜肽、外吐小體、APC、及 CTL 之方法

可使用本發明之胜肽及多核苷酸誘導 APC 及 CTL。也可使用本發明之外吐小體及 APC 誘導 CTL。本發明之胜肽、多核苷酸、外吐小體、及 APC 只要是不妨礙此等之 CTL 誘導能力，也可以和任意之其他化合物組合使用。因此可使用包含本發明之胜肽、多核苷酸、APC 及外吐小體中之任一者之藥學組合物而誘導本發明之 CTL。又，可使用包含本發明之胜肽或多核苷酸之藥學組合物誘導本發明之 APC。

【0132】 (1) 誘導 APC 之方法

本發明提供使用本發明之胜肽或多核苷酸誘導具有 CTL 誘導能力之 APC 之方法。

【0133】 本發明之方法包括使 APC 在試管內、離體、或活體內接觸本發明之胜肽之步驟。例如:使 APC 於離體接觸該胜

肽之方法可包括以下步驟：

(a) 從對象回收 APC 之步驟；及

(b) 使步驟(a)之 APC 接觸本發明之胜肽之步驟。

前述 APC 不限於特定種類之細胞，可使用已知係在自身之細胞表面上呈現蛋白質性抗原使淋巴球能認識之細胞，例如 DC、朗格罕細胞、巨噬體、B 細胞、及活化 T 細胞。DC 於 APC 中之有最強 CTL 誘導能力，較佳為使用 DC。本發明之任意胜肽可以單獨使用、或和本發明之其他胜肽一起用用。又，本發明之胜肽可以和其他 CTL 誘導性胜肽(例如:來自其他 TAA 之 CTL 誘導性胜肽)組合使用。

【0134】另一方面，當本發明之胜肽對於對象投予時，APC 會於活體內接觸該胜肽，結果可在該對象體內誘導具有高 CTL 誘導能力之 APC。故本發明之方法可包括將本發明之胜肽對於對象投予之步驟。同樣地，將本發明之多核苷酸以可表現之形態對於對象投予時，本發明之胜肽會於活體內表現且和 APC 於活體內接觸，結果可於該對象體內誘導具有高 CTL 誘導能力之 APC。故本發明可包括將本發明之多核苷酸對於對象投予之步驟。

【0135】本發明為了誘導具 CTL 誘導能力之 APC，可包括將本發明之多核苷酸導入到 APC 之步驟。例如:本方法可包括以下步驟：

(a) 從對象將 APC 回收；

及(b) 將編碼為本發明胜肽之多核苷酸導入到步驟(a)之 APC。

步驟(b)可依「VI.抗原呈現細胞(APC)」之章節所述實施。

【0136】因此一態樣中，本發明提供包括以下(a)或(b)之步驟之誘導具 CTL 誘導能力之 APC 之方法：

(a) 使 APC 接觸本發明胜肽；

(b) 將編碼爲本發明胜肽之多核苷酸導入到 APC。

【0137】又，本發明提供包括以下(a)或(b)之步驟製備具 CTL 誘導能力之 APC 之方法：

(a) 使 APC 接觸本發明胜肽；

(b) 將編碼爲本發明胜肽之多核苷酸導入到 APC。

【0138】上述方法於試管內、離體、或活體內任一者均可進行，但於試管內或離體進行較佳。上述方法使用之 APC 可來自於預定投予已誘導之 APC 之對象，也可來自不同對象。當使用來自和預定投予之對象爲不同之對象(捐出者)之 APC 時，投予對象者與捐出者之 HLA 型必須相同。本發明之方法中，當使用具有選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽以作爲本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之 HLA 型均爲 HLA-A11(更佳爲 HLA-A*1101)較佳。或上述方法使用之 APC 宜爲表現 HLA-A11(更佳爲 HLA-A*1101)之 APC。同樣地，當使用具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作爲本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之 HLA 型均爲 HLA-A03(更佳爲 HLA-A*0301)較佳。或上述方法使用之 APC 宜爲表現 HLA-A03(更佳爲 HLA-A*0301)之 APC 較佳。APC 可從捐出者採樣之血液利用比重離心分離法等分離

PBMC 後，從該 PBMC 使用公知方法製備。

【0139】 於另一態樣，本發明更提供包括本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸之用於誘導有 CTL 誘導能力之 APC 之藥學組合物。

【0140】 或本發明更提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸之用途，係使用在製造誘導具有 CTL 誘導能力之 APC 之藥學組合物。

【0141】 或本發明更提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸，用於誘導具 CTL 誘導能力之 APC。

【0142】 或本發明更提供用以製造誘導 APC 之藥學組合物之方法或步驟，包括使本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸與藥學上或生理學上可容許之載體予以製劑化之步驟。

【0143】 於另一態樣，本發明更提供用以製造誘導具 CTL 誘導能力之 APC 之藥學組合物之方法或步驟，包括使本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸和藥學的或生理學上可容許之載體混合之步驟。

依本發明之方法誘導之 APC，能誘導對於 URLC10 為專一性之 CTL(亦即本發明之 CTL)。

【0144】 (2) 誘導 CTL 之方法

本發明更提供使用本發明之胜肽、多核苷酸、外吐小體、或 APC 誘導 CTL 之方法。本發明更提供使用編碼為形成可認識本發明之胜肽與 HLA 抗原之複合體之 T 細胞受體(TCR)之多胜肽(亦即，TCR 次單元)之一或多數多核苷酸來誘導 CTL 之方法。較佳為誘導 CTL 之方法包括選自以下之至少 1 種步驟：

(a) 使 CD8 陽性 T 細胞接觸在自身表面上呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽之複合體之抗原呈現細胞；

(b) 使 CD8 陽性 T 細胞接觸在自身表面上呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽之複合體之外吐小體；及

(c) 將編碼為能形成可認識本發明之胜肽與 HLA 抗原之複合體之 TCR 之多胜肽的一或多數多核苷酸導入到 CD8 陽性 T 細胞。

【0145】本發明之胜肽、多核苷酸、外吐小體、或 APC 若對於對象投予，會在該對象之體內誘導 CTL，增強將表現 URLC10 之癌細胞作為標靶之免疫應答之強度。故本發明之方法可更包括將本發明之胜肽、多核苷酸、APC、或外吐小體對於對象投予之步驟。

【0146】或也可將此等於試管內或離體使用以誘導 CTL。例如：本發明之方法可包括以下步驟：

- (a) 從對象回收 APC、
- (b) 使步驟(a)之 APC 和本發明之胜肽接觸、及
- (c) 將步驟(b)之 APC 和 CD8 陽性 T 細胞進行共培養。已誘導之 CTL 之後也可返回對象。

【0147】上述步驟(c)中，和 CD8 陽性 T 細胞一起共培養之 APC，也可藉由如「VI.抗原呈現細胞(APC)」之章節所述，利用將編碼為本發明胜肽之多核苷酸導入到 APC 以製備。但本發明之方法使用之 APC 不限於此，可使用於自身表面呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽之複合體的任意 APC。

【0148】本發明之方法也可將如此的 APC 改為使用在自身

表面上呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽之複合體之外吐小體。亦即，本發明之方法可包括將於自身表面上呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽之複合體之外吐小體進行共培養之步驟。如此的外吐小體可利用「V.外吐小體」之章節所述方法製備。

【0149】再者，也可藉由包括編碼為能和細胞表面上由 HLA 抗原呈現之本發明胜肽之 TCR 之各次單元之多核苷酸之載體導入到 CD8 陽性 T 細胞，以誘導 CTL。如此的轉導可利用「VIII.T 細胞受體(TCR)」之章節所述實施。

【0150】因此一態樣中，本發明提供包括選自以下之步驟之誘導 CTL 之方法：

(a) 將 CD8 陽性 T 細胞和於自身表面上呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合體之 APC 進行共培養；

(b) 將 CD8 陽性 T 細胞和於自身表面上呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合體的外吐小體進行共培養；及

(c) 將包括編碼為能結合於在細胞表面上由 HLA 抗原呈現之本發明之胜肽之 TCR 之各次單元的多核苷酸的載體導入到 CD8 陽性 T 細胞。

【0151】上述方法於試管內、離體、或活體內任一者均可進行，但於試管內或離體進行較佳。上述方法使用之 APC 或外吐小體、及 CD8 陽性 T 細胞可來自預定投予誘導之 CTL 之對象，也可來自不同對象。使用來自和預定投予之對象為不同之對象(捐出者)之 APC 或外吐小體、及 CD8 陽性 T 細胞時，投予對象者與捐出者之 HLA 型必須相同。例如：使用具選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作為

本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之 HLA 型均為 HLA-A11(更佳為 HLA-A*1101)較佳。或上述方法使用之 APC 或外吐小體宜為在自身表面上呈現 HLA-A11(更佳為 HLA-A*1101)與本發明胜肽(具有選自序列編號：1、9 及 13 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽)之複合體之 APC 或外吐小體較佳。此時誘導之 CTL 對於呈現 HLA-A11 與本發明胜肽之複合體之細胞(例如：表現 U937 之 HLA-A11 陽性細胞)呈專一性細胞傷害活性。又例如：當使用具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之 HLA 型均為 HLA-A03(更佳為 HLA-A*0301)較佳。或上述方法使用之 APC 或外吐小體宜為在自身表面上呈現 HLA-A03(更佳為 HLA-A*0301)與本發明胜肽(具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽)之複合體之 APC 或外吐小體較佳。此時誘導之 CTL 對於呈現 HLA-A03 與本發明胜肽之複合體之細胞(例如：表現 U937 之 HLA-A03 陽性細胞)呈專一性細胞傷害活性。

【0152】於另一態樣，本發明更提供包括選自以下中之至少 1 種有效成分之用以誘導 CTL 之組合物或藥學組合物：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；及
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0153】 於另一態樣，本發明更提供選自以下之有效成分之用途，係用在製造誘導 CTL 之組合物或藥學組合物：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；及
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0154】 或本發明更提供選自以下之有效成分，係用於誘導 CTL：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；及
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0155】 或本發明更提供製造用以誘導 CTL 之組合物或藥學組合物之方法或步驟，包括將選自以下之有效成分與藥學的或生理學上可容許之載體予以製劑化之步驟：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；及
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0156】 於另一態樣，本發明更提供用以製造誘導 CTL 之組合物或藥學組合物之方法或步驟，包括將選自以下之有效成分和藥學的或生理學上可容許之載體混合之步驟：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；及
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0157】 XI.誘導免疫應答之方法

本發明提供誘導針對表現 URLC10 之癌之免疫應答之方法。能適用之癌包括膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤等，但不限定於此。又，癌宜表現選自 HLA-A11 及 HLA-A03 中之至少 1 種 HLA 較佳。

【0158】 本發明提供誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫應答之方法。URLC10 據認為在如上述各種癌係過度表現。故若誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫應答，其結果會妨礙癌細胞增殖。故本發明也提供妨礙表現 URLC10 之癌細胞之增殖之方法。本發明之方法特別適於阻礙表現選自於 URLC10 與 HLA-A11 及 HLA-A03 中之至少 1 種 HLA 之癌細胞之增殖。

【0159】 本發明之方法可包括將包括本發明之任一胜肽或編碼為此等胜肽的多核苷酸的組合物進行投予之步驟。本發明之方法也意欲投予呈現本發明之任一胜肽之外吐小體或 APC。關於詳情，參考「IX.藥學組合物」之項目，尤其針對本發明之藥學組合物以疫苗形式使用之相關記載部分。此外，爲了誘導免疫應答，本發明之方法能使用之外吐小體及 APC 在前述「V.外吐小體」、「VI.抗原呈現細胞(APC)」、及「X.使用胜肽、外吐小體、APC、及 CTL 之方法」之(1)及(2)之項目中已詳述。

【0160】 於另一態樣，本發明提供藥學組合物或疫苗，用

以誘導針對表現 URLC10 之癌之免疫應答，包括選自以下之有效成分：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0161】或本發明更提供藥學組合物或疫苗，係用以誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫應答，包括選自以下之有效成分：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0162】或本發明提供藥學組合物或疫苗，係用以妨礙表現 URLC10 之癌細胞之增殖，包含選自以下之有效成分：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0163】於另一態樣，本發明提供選自以下之有效成分之用途，係用在製造用以誘導針對表現 URLC10 之癌之免疫應答

之藥學組合物或疫苗：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0164】或本發明提供選自以下之有效成分之用途，係用在製造用以誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫應答之藥學組合物或疫苗：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0165】或本發明提供選自以下之有效成分之用途，係用於製造用以妨礙表現 URLC10 之癌細胞之增殖之藥學組合物或疫苗：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0166】本發明提供製造用以誘導針對表現 URLC10 之癌之免疫應答之藥學組合物之方法或步驟，包括將本發明之胜肽

或多核苷酸和藥學上可容許之載體一起混合或製劑化之步驟。

【0167】 或本發明提供用以妨礙表現 URLC10 之癌細胞之增殖之方法、或誘導針對表現 URLC10 之癌之免疫應答之方法，包括將含有選自以下之有效成分之疫苗或藥學組合物對於對象投予之步驟：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；
- (c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之 APC；
- (d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及
- (e) 本發明之 CTL。

【0168】 在和本發明之關連中，可藉由投予本發明之胜肽、多核苷酸、APC、外吐小體及/或 CTL 以治療表現 URLC10 之癌。或可藉由投予本發明之胜肽、多核苷酸、APC、外吐小體及/或 CTL，以誘導針對表現 URLC10 之癌之免疫應答。如此之癌，例如包括膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤等等，但不限定於此。又，藉由投予本發明之胜肽、多核苷酸、APC、外吐小體及/或 CTL，可誘導針對表現 URLC10 之癌細胞之免疫應答。故宜於投予包括上述有效成分之疫苗或藥學組合物前，確認治療對象之疾病部位之 URLC10 之表現水平是否增強。

【0169】 故一態樣中，本發明提供治療須治療表現 URLC10 之癌之患者中之該癌之方法，如此之方法包括以下步驟：

- i) 測定從罹癌對象之疾病部位採樣之活體試樣中之

URLC10 之表現水平；

ii) 依據於 i)測定之 URLC10 之表現水平，指定出具有表現 URLC10 之癌之對象；及

iii) 將選自由上述(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種成分對於有表現 URLC10 之癌之對象投予。

【0170】或本發明提供一種疫苗或藥學組合物，包括用以對於有表現 URLC10 之癌之對象投予之選自於由上述(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種有效成分。本發明更提供以選自於由上述(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種有效成分來指定或選擇治療對象之方法，如此之方法包括以下步驟：

i) 測定從有癌之對象之疾病部位採樣之活體試樣中之 URLC10 之表現水平；

ii) 依據 i)測得之 URLC10 之表現水平指定有表現 URLC10 之癌之對象；及

iii) 指定或選擇於 ii)指定之對象作為能以選自於上述(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種有效成分治療之對象。

【0171】上述方法中，為了測定 URLC10 之表現水平而從對象採樣之活體試樣不特別限定，例如宜使用利用切片等採樣的含有癌細胞之組織試樣。活體試樣中之 URLC10 之表現水平可利用公知方法測定，例如：可使用利用探針或 PCR 法檢測 URLC10 基因之轉錄產物之方法(例如：cDNA 微陣列法、北方墨點法、RT-PCR 法等)、利用抗體檢測 URLC10 基因之轉譯產物之方法(例如：西方墨點法、免疫染色法等)等。又，活體試樣也可以為血液試樣，此時，可測定對抗 URLC10 或其片段之抗體

之血中水平，基於該血中水平評價疾病部位之 URLC10 之表現水平。測定對抗 URLC10 之抗體之血中水平可使用公知方法，例如可使用將 URLC10 蛋白質、本發明胜肽作為抗原之酵素免疫測定法(EIA)、酵素連結免疫吸附測定法(ELISA)、及放射免疫測定法(RIA)等。

【0172】通常未表現 URLC10 之組織及細胞中幾乎檢測不到 URLC10 之轉錄產物及轉譯產物。因此當從對象採樣之癌細胞或包括癌細胞之組織試樣中檢測到 URLC10 之轉錄產物或轉譯產物時，可判斷該對象之癌表現 URLC10。又，在不具有表現 URLC10 之癌之對象之血液試樣幾乎檢測不到對抗 URLC10 或其片段之抗體。因此從對象採樣的血液試樣檢測到有對抗 URLC10 或其片段之抗體時，可判斷該對象之癌係表現 URLC10。又，對象罹患之癌是否表現 URLC10 之判斷，可利用比較從該對象之非癌性部位採樣之同種活體材料或從未罹癌之對象採樣之同種活體材料(正常對照試樣)之測定結果以進行。亦即，當比起正常對照試樣之測定對象物之水平(正常對照水平)，試驗對象之活體試樣之該水平上昇時，可判斷該對象之癌係表現 URLC10。例如若比起正常對照水平，測定對象物之檢測量增大至少 10%以上時，可判斷該對象之癌係表現 URLC10。較佳為比起正常對照水平，測定對象物之檢測量增大 25%以上，更佳為 50%以上。又，URLC10 之轉錄產物或轉譯產物之檢測量也可常態化 β -肌動蛋白、甘油醛 3 磷酸脫氫酵素及核糖體蛋白質 P1 等公知之內務基因(housekeeping gene)之檢出量而評價。

【0173】於理想態樣，當投予選自於由上述(a)~(e)構成之群組中之至少1種有效成分前，宜確認對象之HLA型較佳。例如：就和具有選自序列編號：1、9及13中之胺基酸序列之胜肽關連之有效成分之投予對象而言，宜選擇HLA-A11陽性之對象。又，就和具有選自序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31中之胺基酸序列之胜肽關連之有效成分之投予對象而言，宜選擇HLA-A03陽性之對象較佳。

【0174】本發明更提供本發明胜肽與HLA之複合體。前述本發明之複合體可為單體也可為多元體。本發明之複合體為多元體時，聚合數不特別限定，可為任意聚合數之多元體。例如四元體、五元體、六元體等，但不限定於此。又，多元體(dextramer) (WO2002/072631)、streptamer (Knabel M et al., Nat Med. 2002 Jun;8(6):631-7.)也包括在本發明之多元體。本發明胜肽與HLA之複合體可依公知方法製備(例如：Altman JD et al., Science.1996,274(5284):94-6、WO2002/072631、WO2009/003492、Knabel M et al., Nat Med. 2002 Jun;8(6):631-7.等)。本發明之複合體例如可用於定量對於本發明胜肽為專一性CTL。例如：從已投予本發明之藥學組合物之採樣血液試樣，分離PBMC後製備CD4陰性細胞，使已結合螢光色素之本發明之複合體接觸該CD4陰性細胞。之後，利用流式細胞術解析，可測定對於本發明之胜肽為專一性CTL的比例。例如：在投予本發明之藥學組合物前、投予中，及/或投予後，藉由測定對於本發明胜肽為專一性CTL，可監測本發明之藥學組合物獲致之免疫應答誘導效果。

【0175】 XII. 抗體

本發明更提供和本發明之胜肽結合之抗體。理想之抗體會專一地結合於本發明之胜肽，且不結合於非本發明之胜肽者(或弱結合)。於另一態樣，如此的抗體可包括以和 HLA 分子之關連認識胜肽之抗體，亦即結合於胜肽-MHC 複合體之抗體。抗體之結合專一性能以阻礙試驗確認。亦即，分析之抗體與全長 URLC10 多胜肽之間之結合於本發明胜肽存在下受阻礙時，代表此抗體對於本發明之胜肽係專一性結合。對抗本發明之胜肽之抗體可使用在疾病之診斷及預後診斷之分析、及本發明之藥學組合物之投予對象之選擇及本發明之藥學組合物之監測。

【0176】 本發明更提供用以檢測及/或定量本發明之胜肽或其片段之各種免疫學的分析法。如此的免疫學的分析法包括放射免疫測定法、免疫層析法、酵素連結免疫吸附測定法(ELISA)、酵素連結免疫螢光測定法(ELIFA)等，但不限於此等，能於該發明所屬之技術領域周知之各種免疫學的分析形式之範圍內進行。

【0177】 本發明之抗體可使用在能檢測表現 URLC10 之癌之免疫學的圖像化法，其例包括使用本發明之標記抗體之放射性閃爍圖術(scintigraphy)圖像化法，但不限於此。如此的分析法臨床使用在表現 URLC10 之癌之檢測、監測、及預後診斷中，如此的癌，例如包括膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤等，但不限定於此。

【0178】 本發明之抗體能以例如單株抗體或多株抗體等任

意形態使用，更包括以本發明之胜肽對於兔等動物進行免疫而得之抗血清、所有類別的多株抗體及單株抗體、人抗體、及利用基因重組製得之嵌合抗體及人化抗體。

【0179】 作為為了獲得抗體的抗原使用之本發明之胜肽或其片段，可基於本說明書揭示之胺基酸序列，利用化學合成或基因工程的方法獲得。

【0180】 作為免疫抗原使用之胜肽可為本發明之胜肽或本發明之胜肽之片段。又，為了提高免疫原性，可以將胜肽和載體結合或連結。就載體而言，鑰孔血藍素 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 為周知。使 KLH 和胜肽結合之方法亦為該發明所屬之技術領域中周知。

【0181】 任意哺乳動物可以用前述抗原免疫，但製作單株抗體時，宜考慮和細胞融合使用之母細胞間之適合性較佳。一般可使用嚙齒目 (Rodentia)、兔目 (Lagomorpha)、或靈長目 (Primate) 之動物。嚙齒目科的動物包括例如小鼠、大鼠、及倉鼠。兔目科之動物例如包括兔。靈長目科之動物包括例如食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)、獼猴、阿拉伯狒 (*Papio hamadryas*)、及黑猩猩等狹鼻小目 (Catarrhini) (舊世界猴) 之猴類。

【0182】 以抗原對於動物免疫之方法，在該發明所屬之技術領域為公知。抗原之腹腔內注射或皮下注射係對於哺乳動物免疫之標準方法。更具體而言，將抗原以適量磷酸緩衝食鹽水 (PBS)、生理食鹽水等稀釋，並使其懸浮。視需要，可將抗原懸浮液和佛洛依德完全佐劑等適量之標準佐劑混合並乳化後，對於哺乳動物投予。之後宜將和適量佛洛依德不完全佐劑

混合之抗原每隔 4~21 日投予，投予數次較佳。免疫化也可使用適當載體。如上述方式免疫後，血清關於所望的抗體量之增加可以用標準方法檢查。

【0183】 對抗本發明胜肽之多株抗體，可以藉由已確認免疫後血清中之所望抗體水平之上昇的哺乳動物回收血液，利用任意之習知法從血液分離出血清以製備。多株抗體可為包括多株抗體之血清，也可將包括多株抗體之級分從該血清單離。免疫球蛋白 G 或 M 可以從只認室本發明胜肽之級分使用例如已結合本發明胜肽之親和性管柱，將此級分使用 Protein A 或 Protein G 管柱進一步精製而製備。

【0184】 為了製備單株抗體，係於免疫後確認血清中之所望抗體水平已上昇後，從哺乳動物回收免疫細胞並供細胞融合。細胞融合使用之免疫細胞較佳為能從脾臟獲得。和上述免疫細胞融合之另一者的母細胞，可使用例如：哺乳動物之骨髓瘤細胞，較佳已獲得利用藥物選擇融合細胞之特性之骨髓瘤細胞。

【0185】 可依公知方法，例如：Milstein et al.(Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))之方法使上述免疫細胞與骨髓瘤細胞融合。

【0186】 由細胞融合得到的融合瘤可藉由將其在標準選擇培養基例如 HAT 培養基(含次黃嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶的培養基)中培養而選擇。細胞培養一般係在 HAT 培養基中繼續充分期間(例如培養數天至數週)，使除了所望融合瘤以外的其他細胞(非融合細胞)死亡。然後，可實施標準極限稀釋以篩選

並選殖生產所望抗體的融合瘤細胞。

【0187】爲了製備融合瘤，除了將非人類動物係以抗原免疫之上述方法，尚可將人淋巴球例如受 EB 病毒感染者的勝肽、勝肽表現細胞或其溶解物於試管內免疫。然後，將經免疫的淋巴球與能無限分裂的人來源的骨髓瘤細胞例如 U266 融合，以得到生產能結合於該勝肽的所望人類抗體的融合瘤(日本特開昭 63-17688)。

【0188】接著將獲得的融合瘤移植到小鼠的腹腔，並抽取腹水。獲得的單株抗體可利用例如硫酸銨沉澱、蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱、DEAE 離子交換層析或結合有本發明勝肽的親和性管柱精製。

【0189】或者可將經免疫的淋巴球等生產抗體之免疫細胞利用致癌基因使不死化並用於製備單株抗體。

【0190】如此獲得的單株抗體也可使用基因操作技術以重組方式製備(參見例如 Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, 於英國由 MacMillan Publishers LTD(1990)出版)。例如可從免疫細胞例如生產該抗體的融合瘤或經免疫的淋巴球選擇編碼爲抗體的 DNA，插入適當載體，並導入寄主細胞以製備重組抗體。本發明也提供如上述製備的重組抗體。

【0191】再者本發明抗體可爲抗體片段或經修飾的抗體，條件是只要其結合於本發明的勝肽即可。例如：抗體片段宜包括抗體的抗原結合部位。具體而言，抗體片段可爲 Fab、F(ab')₂、Fv、或衍生自 H 及 L 鏈的 Fv 片段以適當連結子連接

而得之單鏈 Fv(scFv) (Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83(1988))。更具體而言，可利用以木瓜酵素或胃蛋白酶等處理抗體而製作抗體片段。或者可構建編碼為該抗體片段的基因，插入表現載體並於適當的寄主中表現(參見例如:Co *et al.*, J Immunol 152: 2968-8276 (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))。

【0192】抗體可藉由與各種分子例如聚乙二醇(PEG)結合而修飾。本發明提供此種經修飾的抗體。經修飾的抗體可藉由將抗體化學修飾而獲得。此等修飾方法在該領域為習知。

【0193】或者本發明抗體可為:來自非人類抗體的可變區與衍生自人抗體的不變區的嵌合抗體，或人化抗體，其包括來自非人抗體的互補決定區(CDR)、來自人抗體之框架區(FR)及不變區。此種抗體可依照已知技術製備。人化可藉由以非人抗體之 CDR 序列取代人抗體之對應序列以實施(參見例如 Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536(1988))。因此此種人化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整的人類可變微域已取代成來自非人種的對應序列。

【0194】也可使用除了人框架區及不變區外包括人可變區的完全人抗體。此種抗體可使用該技術領域已知的各種技術製造。例如試管內之方法涉及使用呈現在噬菌體的人抗體片段的重組庫(例如 Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381

(1991)。同樣地，可藉由將人免疫球蛋白基因位導入基因轉殖動物例如內生免疫球蛋白已部分或全部失活的小鼠中，而製備人抗體。此方法敘述於例如美國專利第 6,150,584 號、第 5,545,807 號；第 5,545,838 號；第 5,569,825 號；第 5,625,126 號；第 5,633,425 號；第 5,661,016 號。

【0195】如上獲得的抗體可純化成同質。例如可依照一般蛋白質使用的分離及純化方法將抗體分離及純化。例如可利用適當選擇及合併使用的管柱層析分離及單離抗體，管柱層析例如親和性層析等管柱層析、過濾、超過濾、鹽析、透析、SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳及等電點電泳(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))，但不限於此等。可使用蛋白質 A 管柱及蛋白質 G 管柱當做該親和性管柱。可使用的蛋白質 A 管柱包括例如 Hyper D、POROS 及 Sepharose F.F.(Pharmacia)。

【0196】親和性層析以外的層析，包括例如離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、反相層析、吸附層析等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996))。該等層析程序可利用液相層析，例如 HPLC 與 FPLC 實施。

【0197】例如可使用測量吸光度、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素免疫分析法(EIA)、放射免疫分析法(RIA)及/或免疫螢光以測量本發明抗體的抗原結合活性。ELISA 中，係將本發明抗體固定化在一平板上，添加本發明胜肽於該平

板，然後添加含有所望抗體的樣本，例如抗體產生細胞的培養上清或純化的抗體。然後，添加認識該初級抗體且經鹼性磷酸酶等酵素標記的二次抗體，然後溫育該平板。清洗後，添加酵素受質例如對硝基苯基磷酸到該平板，測量吸光度以評估該樣本的抗原結合活性。可使用該胜肽的片段例如 C 末端或 N 末端片段當做抗原以評估該抗體的結合活性。可使用 BIAcore(Pharmacia)來評估本發明抗體的活性。

【0198】上述方法，藉由使本發明抗體暴露於假定含有本發明胜肽的樣本，並偵測或測量該抗體與該胜肽形成的免疫複合體，能偵測或測量本發明的胜肽。例如：本發明之抗體也可使用在檢測存在於對象之血液試樣(例如血清試樣)中之本發明胜肽之用途。或反之，可使用本發明胜肽檢測對象血液試樣(例如血清試樣)中存在之本發明之抗體。測定對象之血液試樣中之本發明之胜肽或本發明之抗體之結果，對於選擇本發明之藥學組合物之投予對象、或監測本發明之藥學組合物之效果方面有用。此外，具有對抗以例如疫苗形式投予之胜肽之抗體之患者，據報告有時對於疫苗之應答性高。因此本發明之胜肽可利用於作為當投予該胜肽作為疫苗時，用以將高應答性之患者的抗體作為指標進行選擇之免疫分析用抗原。

【0199】 XIII.載體及寄主細胞

本發明也提供含有編碼為本發明胜肽的多核苷酸的載體與導入有該載體之寄主細胞。本發明的載體可使用於在寄主細胞中保持本發明之多核苷酸、使寄主細胞表現本發明之胜肽，或投予本發明多核苷酸供基因治療。

【0200】大腸菌為寄主細胞且載體在大腸菌(例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1Blue)中放大及大量生產時，該載體應具有欲在大腸菌內放大的「複製起點」以及用於選擇經轉形的大腸菌的標記基因(例如由安皮西林、四環黴素、嘉那黴素、氯黴素等藥物選擇的抗藥性基因)。例如，可使用 M13 系列載體、pUC 系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。此外，也可將 pGEM-T、pDIRECT 及 pT7 和上述載體同樣地用於選殖。當使用載體產生本發明胜肽時，可使用表現載體。例如欲在大腸菌中表現的載體應具有上述欲在大腸菌中放大需要的特性。當使用大腸菌例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1 Blue 當做寄主細胞，該載體應具有能在大腸菌內有效率地表現所望基因之啟動子，例如 lacZ 啟動子(Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1989))、araB 啟動子(Better et al., Science 240: 1041-3(1988))、T7 啟動子等。於此方面，可使用 pGEX-5X-1(Pharmacia)、「QIAexpress system」(Qiagen)、pEGFP 及 pET(於此情形，寄主較佳為表現 T7 RNA 聚合酶的 BL21)取代上述載體。此外，該載體也可含有信號序列以供胜肽分泌。引導該胜肽分泌到 *E. coli* 胞間質的信號序列之例，為 pelB 信號序列(Lei et al., J Bacteriol 169: 4379(1987))。將該等載體導入目標寄主細胞的方法包括例如氯化鈣法及電穿孔法。

【0201】除了大腸菌，例如可使用來自哺乳動物的表現載體(例如 pcDNA3(Invitrogen) 及 pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17): 5322(1990))、pEF、pCDM8)、來自昆蟲細胞的表現載

體(例如「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、來自植物的表現載體(例如 pMH1、pMH2)、來自動物組織的表現載體(例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、來自反轉錄病毒的表現載體(例如 pZIpneo)、來自酵母菌的表現載體(例如「Pichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)、及來自枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)的表現載體(例如 pPL608、pKTH50)，用於生產本發明之多胜肽。

【0202】爲了於動物細胞例如 CHO、COS 或 NIH3T3 細胞中表現載體，該載體應具有對於在此種細胞中表現所需要的啓動子例如 SV40 啓動子 (Mulligan *et al.*, Nature 277: 108(1979))、MMLV-LTR 啓動子、EF1 alpha 啓動子 (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res 18: 5322(1990))、CMV 啓動子等，較佳爲具有用於選擇轉形體的標記基因(例如由藥物(例如新黴素、G418)選擇的抗藥性基因)。具有此等特性的已知載體例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 及 pOP13。

【0203】基於上述說明之本發明之態樣列舉如下，但本發明不限於此等。

[1] 一種胜肽，其係具有細胞傷害性 T 細胞(CTL)誘導能力之未達 15 個胺基酸之胜肽，包含選自以下群組之胺基酸序列：

(a) 選自於由序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 構成之群組之胺基酸序列；及

(b) 相對於選自於由序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31構成之群組之胺基酸序列有1個、2個、或多個胺基酸取代、缺失、插入及/或加成之胺基酸序列。

[2] 如[1]之胜肽，其選自於由以下(i)~(ii)構成之群組：

(i) 包括對於選自於由序列編號：1、9及13構成之群組之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(d)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列：

(a) N末端起第2號胺基酸取代為選自於由蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸及酪胺酸構成之群組之胺基酸；

(b) N末端起第3號之胺基酸取代為選自於由白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸及丙胺酸構成之群組之胺基酸；

(c) N末端起第7號之胺基酸取代為選自於由白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸及苯丙胺酸構成之群組之胺基酸；及

(d) C末端之胺基酸取代為選自於由離胺酸及精胺酸構成之群組之胺基酸；

(ii) 包括對於選自於由序列編號：5、1、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(b)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列：

(a) N末端起第2號胺基酸取代為選自於由白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸及蘇胺酸構成之群組之胺基酸；及

(b) C末端之胺基酸取代為選自於由精胺酸、離胺酸、酪

胺酸及苯丙胺酸構成之群組之胺基酸。

[3] 如[1]之胜肽，其由選自於由序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30及31構成之群組之胺基酸序列構成。

[4] 一種多核苷酸，編碼為如[1]至[3]中任一項之胜肽。

[5] 一種組合物，包含：藥學上可容許之載體，以及選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如[1]至[3]中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 於自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；

(d) 於自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

[6] 如[5]之組合物，係用於誘導CTL之組合物，其中，該成分係選自於由以下(a)~(d)構成之群組中之至少1種成分：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如[1]至[3]中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 於自身之細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；及

(d) 於自身之細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽

與 HLA 抗原之複合體之外吐小體。

[7] 如[5]之組合物，其係藥學組合物。

[8] 如[7]之組合物，係用於選自於由(i)癌之治療、(ii)癌之預防、及(iii)預防癌之術後再發所構成之群組中之 1 種以上之用途之藥學組成物。

[9] 如[7]之組合物，係用於誘導針對癌之免疫應答。

[10] 如[8]或[9]之組合物，其中，癌係選自於由膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤構成之群組。

[11] 如[5]至[10]中任一項之組合物，其係用於向選自於由 HLA-A11 及 HLA-A03 構成之群組中之至少 1 種 HLA 為陽性之對象投予而製劑化。

[12] 一種誘導具有 CTL 誘導能力之 APC 之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：

(a) 使 APC 在試管內(in vitro)、離體(ex vivo)或活體內(in vivo)接觸如[1]至[3]中任一項之胜肽;及

(b) 將編碼為如[1]至[3]中任一項之胜肽之多核苷酸導入到 APC。

[13] 一種誘導 CTL 之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：

(a) 將 CD8 陽性 T 細胞和在自身表面上呈現 HLA 抗原與如[1]至[3]中任一項之胜肽之複合體之 APC 進行共培養;

(b) 將 CD8 陽性 T 細胞和在自身表面上呈現 HLA 抗原與

- 如[1]至[3]中任一項之胜肽之複合體之外吐小體進行共培養；及

(c) 將編碼為能結合於在細胞表面上由 HLA 抗原呈現之如[1]至[3]中任一項之胜肽之 T 細胞受體(TCR)之各次單元之多核苷酸導入到 CD8 陽性 T 細胞。

[14] 一種 APC，係於自身表面上呈現 HLA 抗原與如[1]至[3]中任一項之胜肽之複合體。

[15] 如[14]之 APC，係利用如[12]之誘導具有 CTL 誘導能力之 APC 之方法誘導。

[16] 一種 CTL，係將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶。

[17] 如[16]之 CTL，係由如[13]之誘導 CTL 之方法誘導。

[18] 一種誘導針對癌之免疫應答之方法，包括將選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種成分投予對象之步驟：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如[1]至[3]中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 於自身之細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之 APC；

(d) 於自身之細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

[19] 一種治療及/或預防癌、及/或預防癌之術後再發之方法，包括將選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種成分投予對象之步驟：

- (a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；
- (b) 以可表現如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；
- (c) 於自身之細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之 APC；
- (d) 於自身之細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之外吐小體；及
- (e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

[20] 一種抗體，係結合於如[1]至[3]中任一項之胜肽。

[21] 一種篩選有 CTL 誘導能力之胜肽之方法，包括以下步驟：

(a) 製作由對於選自於由序列編號：1、9、13、5、6、3、12、22、14、16、18、15、27、17、30 及 31 構成之群組之胺基酸序列構成之原本胺基酸序列有 1 個、2 個、或數個胺基酸殘基取代、缺失、插入、及/或加成之胺基酸序列構成之候選序列；

(b) 從(a)製作之候選序列中選擇和 URLC10 以外之任意公知之人基因產物均沒有顯著相同性(序列同一性)之候選序列；

(c)使由(b)所選擇之候選序列構成之胜肽接觸 APC；

(d) 使(c)之 APC 接觸 CD8 陽性 T 細胞；及

(e) 選擇比起由原本胺基酸序列構成之胜肽有同等或更高之 CTL 誘導能力之胜肽。

[22] 一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種

成分之用途，係用於製造用於誘導針對癌之免疫應答之組合物：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如[1]至[3]中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；

(d) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA 抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

[23] 一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種有效成分之用途，係用於製造用於癌治療及/或預防、及/或預防癌之術後再發之藥學組合物：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如[1]至[3]中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；

(d) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA 抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

[24] 一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種有效成分之用途，係用於誘導針對癌之免疫應答：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如[1]至[3]中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；

(d) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA 抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

[25] 一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種成分之用途，係用於治療及/或預防癌、及/或預防癌之術後再發：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如[1]至[3]中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；

(d) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與HLA 抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

[26] 一種誘導針對表現 URLC10 之細胞之細胞傷害活性之方法，包括對於對象投予選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種成分之步驟：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如[1]至[3]中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；

(d) 在自身細胞表面上呈現如[1]至[3]中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

[27] 一種冷凍乾燥製劑，包括如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽。

[28] 一種藥學組合物，係以包括將如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽溶於水溶性之載體並過濾滅菌之步驟的方法製備。

[29] 一種經過過濾滅菌之水溶液，包括如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽與水溶性之載體。

[30] 一種乳劑，包含如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽、水溶性之載體、及油性佐劑。

[31] 一種套組，包含：容納如[5]至[11]中任一項之組合物之容器、及容納佐劑之容器。

[32] 一種套組，包含：容納包括如[1]至[3]中任一項之胜肽之冷凍乾燥製劑之容器、容納佐劑之容器、及容納用於冷凍乾燥製劑之再溶解液之容器。

【0204】 本發明書關於本發明就其特定態樣詳細說明，但前述說明事實上係例示說明，應理解係意圖說明本發明及理想態樣。該技術領域中有通常知識者可理解：依日常實驗可在不脫離本發明精神及範圍而輕易進行各種變更及修正。故本發明並非受限於上述說明，而意欲由附帶的申請專利範圍及此等之

均等物所限定。

【0205】以下參考具體的實施例對於本發明更詳細敘述。然而，以下材料、方法及實施例係可協助該技術領域中具有通常知識者製造及使用本發明特定具體例，此等僅是意欲來解說本發明態樣，因此並不限制本發明的範圍。該技術領域中具有通常知識者當可輕易理解到，與在此所述者類似或等同之方法及材料可用於實施或測試本發明。又，本說明書中引用之所有先前技術文獻納入本發明作為參照。

[實施例]

【0206】實施例 1

材料及方法

細胞株

為 HLA-A 及 HLA-B 陰性人 B 淋巴芽球樣細胞株之 C1R、及為非洲綠猴腎細胞株之 COS7 係向 ATCC 購買。

【0207】安定表現 HLA-A*1101 之刺激細胞之製作

將安定表現 HLA-A*1101 之 C1R(C1R-A11)作為刺激細胞使用。將編碼為 HLA-A*1101 之開放讀框之 cDNA 以 PCR 放大，選殖到表現載體。將 C1R 細胞以表現載體轉形，之後使用 G418(Invitrogen)進行 2 週選擇。將 G418 選擇細胞接種到包含已添加 G418 之培養基之 96 井板之井，再培養 30 日。以流式細胞術解析確認 C1R 細胞有外來性 HLA-A*1101 之表現。

【0208】來自 URLC10 的胜肽之候選選擇

使用結合預測伺服器「NetMHC 3.2」(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov,

, 62(5):378-84; Nielsen et al., ProteinSci. 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12:20(9):1388-97)預測結合於 HLA-A*1101 分子之來自 URLC10 的 9mer 及 10mer 之胜肽。

【0209】胜肽之合成

胜肽利用 Biosynthesis(Lewisville,Texas)依標準的固相合成法合成，並利用逆相高速液體層析(HPLC)精製。該胜肽之純度(>90%)及同一性分別利用分析用 HPLC 及質量分析分析。胜肽以 20mg/ml 溶於二甲基亞砷並於 -80°C 保存。

【0210】於試管內之 CTL 誘導

使用來自單核球之樹狀細胞(DC)作為抗原呈現細胞，誘導針對在人白血球抗原(HLA)上呈現之胜肽之細胞傷害性 T 淋巴球(CTL)應答。依於其他處記載之方式，於試管內製作 DC(Nakahara S et al.,Cancer Res 2003,63(14):4112-8)。具體而言，使利用 Ficoll-Paque plus (Pharmacia)溶液從健常的自願者(HLA-A*1101 陽性)單離而得的末梢血單核細胞附著於塑膠製組織培養皿(Becton Dickinson)以分離，將此等濃縮作為單核球級分。於包括 2%之已加熱失活化之自體血清(AS)之 AIM-V 培養基(Invitrogen)中，於存在 1000 IU/ml 之顆粒球巨噬體群落刺激因子(R&D System)及 1000 IU/ml 之介白素(IL)-4(R&D System)之狀態培養已濃縮單核球之族群。經 7 日培養後，於 AIM-V 培養基中於 37°C 在 3μg/ml 之 β2-微球蛋白存在下，以 20μg/ml 之各合成胜肽衝擊經細胞介素誘導之 DC 3 小時。製得之細胞於自身細胞表面上表現 CD80、CD83、CD86、及 HLA

第 II 類等 DC 關連分子(數據未顯示)。其次，使將經胜肽衝擊之該等 DC 利用 X 射線照射(20Gy)失活，與利用使用 CD8 陽性單離套組(Dyna1)之陽性選擇獲得之自體 CD8⁺ T 細胞以 1：20 之比率混合。將該等之培養物接種於 48 井板(Corning)中。各井於 0.5ml 之 AIM-V/2%AS 培養基中含有 1.5×10^4 個經胜肽衝擊之 DC、 3×10^5 個 CD8⁺ T 細胞及 10ng/ml 之 IL-7(R&D System)。3 日後於該等培養物添加 IL-2(CHIRON)直到最終濃度為 20IU/ml。於第 7 日及第 14 日，再利用經胜肽衝擊之自體 DC 刺激 T 細胞。每次以和上述相同方法製備 DC。於第 21 日，經第 3 次胜肽刺激後，以人干擾素(IFN)- γ 酵素連結免疫點(ELISPOT)分析測試針對經胜肽衝擊之 C1R-A11 之 CTL(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)。

【0211】 CTL 增殖程序

使用和 Riddell 等人(Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-23)記載之方法為類似的方法，使 CTL 於培養下增殖。將 CTL 和 5×10^6 個細胞/燒瓶之經絲裂黴素 C(mitomycin C)處理之 2 種人 B 淋巴芽球樣細胞株、及 40ng/ml 的抗 CD3 抗體一起於總量 25ml 之含有 5%AS 之 AIM-V(AIM-V/5%AS)培養基中進行共培養。培養開始 1 日後，將 120IU/ml 之 IL-2 添加到該培養物。

，於第 5、8 及 11 日，將含有 30IU/ml 之 IL-2 之新鮮的 AIM-V/5%AS 培養基添加到該培養物 (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)。

【0212】CTL 選殖體之建立

於 96 圓底微滴定平板 (Nalge Nunc International) 進行稀釋使成為 CTL 0.3 個、1 個、及 3 個細胞/井。將 CTL 和 1×10^4 個細胞/井之經絲裂黴素 C 處理之 2 種人 B 淋巴芽球樣細胞株、30ng/ml 的抗 CD3 抗體、及 125IU/ml 的 IL-2 一起於總量 150 μ l/井之 AIM-V/5%AS 培養基中培養。10 日後，將 50 μ l/井之 IL-2 添加到該培養基使 IL-2 之最終濃度到達 125IU/ml。於第 14 日進行 CTL 活性試驗，使用和上述相同方法使 CTL 選殖體增殖 (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)。

【0213】專一性 CTL 活性

爲了檢查專一性 CTL 活性，實施 IFN- γ ELISPOT 分析及 IFN- γ 酵素連結免疫吸附分析 (ELISA)。具體而言，製備經胜肽衝擊之 C1R-A11 (1×10^4 個細胞/井) 作為刺激細胞。將已誘導之 CTL，亦即 CTL 株及 CTL 選殖體作為應答細胞。IFN- γ ELISPOT 分析及 IFN- γ ELISA 依製造商之程序實施。

【0214】強制表現標靶基因及 HLA-A*1101 之標靶細胞之

建立

將標靶基因或編碼為 HLA-A*1101 之開放讀框之 cDNA 利用 PCR 放大。將 PCR 放大產物選殖到表現載體。依製造商建議的程序使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen)，對於標靶基因及 HLA 之陰性細胞株 COS7 轉染標靶基因之表現載體及 HLA-A*1101 之表現載體中之任一者或兩者。轉染 2 日後，使用 Versene(Invitrogen)回收已轉染之細胞，作為用於 CTL 活性分析之標靶細胞(5 x 10⁴ 個細胞/井)。

【0215】 結果

來自 URLC10 的 HLA-A*1101 結合胜肽之預測

表 1a 及表 1b 以結合親和性高至低之順序顯示來自 URLC10 的 9mer 胜肽及 10mer 胜肽向 HLA-A*1101 之結合預測結果。為了決定抗原決定位胜肽，選擇並檢查可能有 HLA-A*1101 結合能力之合計 24 種胜肽。

【0216】 【表 1a】

來自 URLC10 的 HLA-A11 結合 9mer 胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
98	RVWCHVCER	269	1
164	EPMPFFYLK	382	2
127	IAAVKIFPR	391	3
108	NTFECQNPR	531	4
64	LLLVVALPR	789	5
131	KIFPRFFMV	857	6
144	SAGCAAMER	1492	7
7	RQAPAGGRR	8338	8
18	RGGRGSPYR	8884	9
167	PFFYLKCKK	9856	10
74	WTDANLTAR	10324	11

【0217】 【表 1b】

來自 URLC10 的 HLA-A11 結合 10mer 胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
63	ALLLVVALPR	78	12
132	IFPRFFMVAK	346	13
126	VIAAVKIFPR	361	14
143	CSAGCAAMER	538	15
149	AMERPKPEEK	543	16
183	GPPINSSVFK	1426	17
161	LLEEPMPFFY	1708	18
32	GARRLRRFQK	1877	19
108	NTFECQNPRR	2051	20
22	GSPYRPDPGR	2829	21
166	MPFFYLKCK	3858	22
163	EEPMPFFYLK	4898	23
185	PINSSVFKEY	9286	24

開始位置代表自 URLC10 之 N 端起的胺基酸殘基數。
解離常數 [Kd(nm)]係由「NetMHC3.2」導出。

【0218】 HLA-A*1101 拘束性之來自 URLC10 之預測胜肽所為之 CTL 之誘導

依「材料及方法」記載之實驗步驟製作針對來自 URLC10 之胜肽的 CTL。依 IFN- γ ELISPOT 分析測定胜肽專一性 CTL 活性(第 1 圖)。使用 URLC10-A11-9-98(序列編號：1)之井編號 #5(a)、使用 URLC10-A11-9-18(序列編號：9)之井編號 #4(b)及使用 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)之井編號 #3(c)之 CTL，和對照比較顯示較強力之 IFN- γ 產生。另一方面，表 1a 及表 1b 所示之其他胜肽，雖有可能具有和 HLA-A*1101 之結合活性，但利用此等之胜肽之刺激未測到專一性 CTL 活性。

雖是典型的陰性數據之例，由觀測到經 URLC10-A11-10-63(序列編號：12)刺激之 CTL 未有專一性 IFN- γ 產生(d)。結果選擇來自 URLC10 之 3 種胜肽作為能強力誘導 CTL 之胜肽。

【0219】 針對 HLA-A*1101 拘束性之來自 URLC10 之胜肽之 CTL 株及選殖體之建立

使於使用以 IFN- γ ELISPOT 分析顯示胜肽專一性 CTL 活性之使用 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)之井編號#3 之 CTL 增殖並建立 CTL 株。利用 IFN- γ ELISA 測定此等 CTL 株之 CTL 活性(第 2 圖)。該等 CTL 株對於經對應胜肽衝擊之標靶細胞比起未經胜肽衝擊的標靶細胞顯示較強力之 IFN- γ 產生。再者，依上述「材料及方法」之章節記載，利用極限稀釋從 CTL 株建立 CTL 選殖體，利用 IFN- γ ELISA 測定從對於經胜肽衝擊之 C1R-A11 之 CTL 選殖體產生的 IFN- γ 。觀察到經 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)刺激之 CTL 選殖體有強力的 IFN- γ 產生(第 3 圖)。

【0220】 針對表現 URLC10 及 HLA-A*1101 之標靶細胞之專一性 CTL 活性

就針對 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)建立之 CTL 選殖體認識表現 URLC10 及 HLA-A*1101 分子之標靶細胞之能力進行檢查。製備已轉染全長 URLC10 及 HLA-A*1101 基因兩者之 COS7 細胞(表現 URLC10 及 HLA-A*1101 基因之標靶細胞之專一性模型)作為標靶細胞。製備已轉染全長 URLC10 或 HLA-A*1101 中任一者之 COS7 細胞作為對照。經 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)刺激之 CTL 選殖體針對表

現 URLC10 及 HLA-A*1101 兩者之 COS7 細胞顯示強力的 CTL 活性(第 4 圖)。另一方面，未檢測到針對對照細胞有顯著專一性 CTL 活性。依該等數據，明確證實：URLC10-A11-10-132(序列編號：13) 胜肽係由 URLC10 之內在的處理而產生的胜肽，且和 HLA-A*1101 分子一起在標靶細胞上呈現而被 CTL 認識。該等結果顯示：URLC10-A11-10-132(序列編號：13)可能適合作為針對罹患表現 URLC10 之癌之患者的癌疫苗。

【0221】 抗原胜肽之相同性解析

經 URLC10-A11-9-98(序列編號：1)、URLC10-A11-9-18(序列編號：9)及 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)刺激之 CTL 顯示顯著且專一性 CTL 活性。此結果可能的原因是：URLC10-A11-9-98(序列編號：1)、URLC10-A11-9-18(序列編號：9)及 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)之序列和已知會感作人免疫系之來自其他分子之胜肽為相同的事實。為了排除此可能性，使用 BLAST 演算法(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)，將該等胜肽之序列作為查詢條件，實施相同性解析。其結果，未查到針對 URLC10-A11-9-98(序列編號：1)、URLC10-A11-9-18(序列編號：9)及 URLC10-A11-10-132(序列編號：13)之序列有顯著相同性之序列。因此據本案發明人等所知，該等胜肽據認為幾乎不會針對其他無關連的分子引起不欲之免疫應答。就結論而言，可鑑別來自 URLC10 之新穎 HLA-A11 拘束性抗原決定位胜肽。又，顯示來自 URLC10 的抗原決定位胜肽可以適用於癌免疫療法。

【0222】 實施例 2

材料及方法

細胞株

為細胞株 HLA-A 及 HLA-B 陰性人 B 淋巴芽球樣細胞株之 C1R、及為非洲綠猴腎細胞株之 COS7 係向 ATCC 購買。

【0223】安定表現 HLA-A*0301 之刺激細胞之製作

將安定表現 HLA-A*0301 之 C1R(C1R-A03)作為刺激細胞使用。將編碼為 HLA-A*0301 之開放讀框之 cDNA 以 PCR 放大，選殖到表現載體。將 C1R 細胞以表現載體轉形，之後使用 G418(Invitrogen)進行 2 週選擇。將 G418 選擇細胞接種到包含已添加 G418 之培養基之 96 井板之井，再培養 30 日。以流式細胞術解析確認 C1R 細胞有外來性 HLA-A*0301 之表現。

【0224】來自 URLC10 的胜肽之候選選擇

使用結合預測伺服器「NetMHC 3.2」(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., ProteinSci. 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12:20(9):1388-97)預測結合於 HLA-A*0301 分子之來自 URLC10 的 9mer 及 10mer 之胜肽。使用結合預測伺服器「NetMHC3.4」(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al., Tissue Antigens. 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)預測結合於 HLA-A*0301 分子之來自 URLC10 的 11mer 之胜肽。胜肽利用 American Peptide Company (Sunnyvale, CA)依標準的固相合成法合成，並利用逆相高速液體層析(HPLC)精製。該胜

肽之純度(>90%)及同一性分別利用分析用 HPLC 及質量分析分析。胜肽以 20mg/ml 溶於二甲基亞砷並於 -80℃ 保存。

【0225】於試管內(in vitro)之 CTL 誘導

使用來自單核球之樹狀細胞(DC)作為抗原呈現細胞，誘導針對在人白血球抗原(HLA)上呈現之胜肽之細胞傷害性 T 淋巴球(CTL)應答。依於其他處記載之方式，於試管內製作 DC(Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63(14):4112-8)。具體而言，使利用 Ficoll-Paque plus (Pharmacia)溶液從健常的自願者(HLA-A*0301 陽性)單離而得的末梢血單核細胞附著於塑膠製組織培養皿(Becton Dickinson)以分離，將此等濃縮作為單核球級分。於包括 2%之已加熱失活化之自體血清(AS)之 AIM-V 培養基(Invitrogen)中，於存在 1000 IU/ml 之顆粒球巨噬體群落刺激因子(R&D System)及 1000 IU/ml 之介白素(IL)-4(R&D System)之狀態培養已濃縮單核球之族群。經 7 日培養後，於 AIM-V 培養基中於 37℃ 在 3μg/ml 之 β2-微球蛋白存在下，以 20μg/ml 之各合成胜肽衝擊經細胞介素誘導之 DC 3 小時。製得之細胞於自身細胞表面上表現 CD80、CD83、CD86、及 HLA 第 II 類等 DC 關連分子(數據未顯示)。其次，使將經胜肽衝擊之該等 DC 利用 X 射線照射(20Gy)失活，與利用使用 CD8 陽性單離套組(Dynal)之陽性選擇獲得之自體 CD8⁺T 細胞以 1:20 之比率混合。將該等之培養物接種於 48 井板(Corning)中。各井於 0.5ml 之 AIM-V/2%AS 培養基中含有 1.5×10^4 個經胜肽衝擊之 DC、 3×10^5 個 CD8⁺T 細胞及 10ng/ml 之 IL-7(R&D System)。3 日後於該等培養物添加 IL-2(CHIRON)直到最終濃度為 20IU/ml。於第 7 日及第 14 日，再利用經胜肽衝

擊之自體 DC 刺激 T 細胞。每次以和上述相同方法製備 DC。於第 21 日，經第 3 次胜肽刺激後，以人干擾素(IFN)- γ 酵素連結免疫點 (ELISPOT) 分析測試針對經胜肽衝擊之 C1R-A03 之 CTL(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)。

【0226】 CTL 增殖程序

使用 Riddell 等人(Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-23)記載之方法為類似的方法，使 CTL 於培養下增殖。將 CTL 和 5×10^6 個細胞/燒瓶之經絲裂黴素 C(mitomycin C)處理之 2 種人 B 淋巴芽球樣細胞株、及 40ng/ml 的抗 CD3 抗體一起於總量 25ml 之含有 5%AS 之 AIM-V(AIM-V/5%AS)培養基中進行共培養。培養開始 1 日後，將 120IU/ml 之 IL-2 添加到該培養物。於第 5、8 及 11 日，將含有 30IU/ml 之 IL-2 之新鮮的 AIM-V/5%AS 培養基添加到該培養物(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)。

【0227】 CTL 選殖體之建立

於 96 圓底微滴定平板(Nalge Nunc International)進行稀釋使成為 CTL 1 個或 10 個細胞/井。將 CTL 和 1×10^4 個細胞/井之經絲裂黴素 C 處理之 2 種人 B 淋巴芽球樣細胞株、30ng/ml

的抗 CD3 抗體、及 125IU/ml 的 IL-2 一起於總量 150 μ l/井之含 5%AS 之 AIM-V (AIM-V/5%AS)培養基中培養。10 日後，將 50 μ l/井之 IL-2 添加到該培養基使 IL-2 之最終濃度到達 125IU/ml。於第 14 日進行 CTL 活性試驗，使用和上述相同方法使 CTL 選殖體增殖 (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda Tet al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci2005, 96(8)): 498-506)。

【0228】專一性 CTL 活性

爲了檢查專一性 CTL 活性，實施 IFN- γ ELISPOT 分析及 IFN- γ 酵素連結免疫吸附分析(ELISA)。具體而言，製備經胜肽衝擊之 C1R-A03 (1×10^4 個細胞/井)作爲刺激細胞。將已誘導之 CTL，亦即 CTL 株及 CTL 選殖體作爲應答細胞。IFN- γ ELISPOT 分析及 IFN- γ ELISA 依製造商之程序實施。

【0229】強制表現標靶基因及 HLA-A*0301 之標靶細胞之建立

將標靶基因或編碼爲 HLA-A*0301 之開放讀框之 cDNA 利用 PCR 放大。將 PCR 放大產物選殖到表現載體。依製造商建議的程序使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen)，對於標靶基因及 HLA 之陰性細胞株 COS7 轉染標靶基因之表現載體及 HLA-A*0301 之表現載體中之任一者或兩者。轉染 2 日後，使用 Versene(Invitrogen)回收已轉染之細胞，作爲用於 CTL 活性分析之標靶細胞(5×10^4 個細胞/井)。

【0230】結果

來自 URLC10 的 HLA-A*0301 結合胜肽之預測

表 2a、表 2b 及表 2c 以結合親和性高至低之順序顯示來自

URLC10 的 9mer 胜肽、10mer 胜肽及 11mer 胜肽向 HLA-A*0301 之結合預測結果。爲了決定抗原決定位胜肽，選擇並檢查可能有 HLA-A*0301 結合能力之合計 22 種胜肽。

【0231】 【表 2a】

來自 URLC10 之 HLA-A3 結合 9mer 胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
64	LLLVVALPR	399	5
98	RVWCHVCER	456	1
131	KIFPRFFMV	1257	6
170	YLKCKIRY	3954	25
7	RQAPAGGRR	4267	8
127	IAAVKIFPR	5768	3
18	RGGRGSPYR	6629	9

【0232】 【表 2b】

來自 URLC10 之 HLA-A3 結合 10mer 胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
63	ALLLVVALPR	114	12
132	IFPRFFMVAK	369	13
166	MPFFYLKCK	1042	22
126	VIAAVKIFPR	1081	14
149	AMERPKPEEK	1184	16
161	LLEPMPPFY	1752	18
32	GARRLRRFQK	1847	19
143	CSAGCAAMER	2167	15
131	KIFPRFFMVA	2463	26
204	GLWLAILLLL	3495	27
183	GPPINSSVFK	3956	17
58	TMALLALLV	4549	28
57	GTMALLALLL	5698	29
209	ILLLLASIAA	6128	30

【0233】 【表 2c】

來自 URLC10 之 HLA-A3 結合 11mer 胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
131	KIFPRFFMVAK	75	31

開始位置代表自 URLC10 之 N 端起的胺基酸殘基數。

解離常數 [Kd(nm)]係由「NetMHC3.2」(9mer 及 10mer 胜肽)或「NetMHC3.4」(11mer 胜肽)導出。

【0234】 HLA-A*0301 拘束性之來自 URLC10 之預測胜肽所為之 CTL 之誘導

依「材料及方法」記載之實驗步驟製作針對來自 URLC10 之胜肽的 CTL。依 IFN- γ ELISPOT 分析測定胜肽專一性 CTL 活性(第 5 圖)。使用 URLC10-A03-9-64(序列編號：5)之井編號 #2(a)、使用 URLC10-A03-9-98(序列編號：1)之井編號 #5(b)、使用 URLC10-A03-9-131(序列編號：6)之井編號 #3(c)、使用 URLC10-A03-9-127(序列編號：3)之井編號 #1(d)、使用 URLC10-A03-10-63(序列編號：12)之井編號 #6(e)、使用 URLC10-A03-10-166(序列編號：22)之井編號 #3(f)、使用 URLC10-A03-10-126(序列編號：14)之井編號 #5(g)、使用 URLC10-A03-10-149(序列編號：16)之井編號 #1(h)、使用 URLC10-A03-10-161(序列編號：18)之井編號 #1(i)、使用 URLC10-A03-10-143(序列編號：15)之井編號 #1(j)、使用 URLC10-A03-10-204(序列編號：27)之井編號 #2(k)、使用 URLC10-A03-10-183(序列編號：17)之井編號 #2(l)、使用 URLC10-A03-10-209(序列編號：30)之井編號 #1(m)及使用

URLC10-A03-11-131(序列編號：31)之井編號#5(n)之 CTL，和對照比較顯示較強力之 IFN- γ 產生。另一方面，表 2a、表 2b 及表 2c 所示之其他胜肽，雖有可能具有和 HLA-A*0301 之結合活性，但利用此等之胜肽之刺激未測到專一性 CTL 活性。雖是典型的陰性數據之例，由經 URLC10-A03-9-7(序列編號：8)刺激之 CTL 未觀測到有專一性 IFN- γ 產生(o)。結果選擇來自 URLC10 之 14 種胜肽作為能強力誘導 CTL 之胜肽。

【0235】 針對來自 HLA-A*0301 拘束性之 URLC10 之胜肽之 CTL 株及選殖體之建立

使於使用以 IFN- γ ELISPOT 分析顯示胜肽專一性 CTL 活性之使用 URLC10-A03-10-166(序列編號：22)之井編號#3 及使用 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)之井編號#5 之 CTL 增殖並建立 CTL 株。利用 IFN- γ ELISA 測定此等 CTL 株之 CTL 活性(第 6 圖)。該等 CTL 株對於經對應胜肽衝擊之標靶細胞比起未經胜肽衝擊的標靶細胞顯示較強力之 IFN- γ 產生。再者，依上述「材料及方法」之章節記載，利用極限稀釋從 CTL 株建立 CTL 選殖體，利用 IFN- γ ELISA 測定從對於經胜肽衝擊之 C1R-A03 之 CTL 選殖體產生的 IFN- γ 。觀察到經 URLC10-A03-10-166(序列編號：22) 及 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)刺激之 CTL 選殖體有強力的 IFN- γ 產生(第 7 圖)。

【0236】 針對表現 URLC10 及 HLA-A*0301 之標靶細胞之專一性 CTL 活性

就針對 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)建立之 CTL 選

殖體認識表現 URLC10 及 HLA-A*0301 分子之標靶細胞之能力進行檢查。製備已轉染全長 URLC10 及 HLA-A*0301 基因基因兩者之 COS7 細胞(表現 URLC10 及 HLA-A*0301 基因之標靶細胞之專一性模型)作為標靶細胞，並製備已轉染全長 URLC10 或 HLA-A*0301 中任一者之 COS7 細胞作為對照。經 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)刺激之 CTL 選殖體針對表現 URLC10 及 HLA-A*0301 兩者之 COS7 細胞顯示強力的 CTL 活性(第 8 圖)。另一方面，未檢測到針對對照細胞有顯著專一性 CTL 活性。依該等數據，明確證實：URLC10-A03-11-131(序列編號：31)係由 URLC10 之內在的處理而產生的胜肽，且和 HLA-A*0301 分子一起在標靶細胞上呈現而被 CTL 認識。該等結果顯示：URLC10-A03-11-131(序列編號：31)可能適合作為針對罹患表現 URLC10 之癌之患者的癌疫苗。

【0237】 抗原胜肽之相同性解析

經 URLC10-A03-9-64(序列編號：5)、URLC10-A03-9-98(序列編號：1)、URLC10-A03-9-131(序列編號：6)、URLC10-A03-9-127(序列編號：3)、URLC10-A03-10-63(序列編號：12)、URLC10-A03-10-166(序列編號：22)、URLC10-A03-10-126(序列編號：14)、URLC10-A03-10-149(序列編號：16)、URLC10-A03-10-161(序列編號：18)、URLC10-A03-10-143(序列編號：15)、URLC10-A03-10-204(序列編號：27)、URLC10-A03-10-183(序列編號：17)、URLC10-A03-10-209(序列編號：30)及 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)刺激之 CTL 顯示顯著且專一性 CTL 活性。此結果可能的原因是：URLC10-A03-9-64(序列編號：5)、

URLC10-A03-9-98(序列編號：1)、URLC10-A03-9-131(序列編號：6)、URLC10-A03-9-127(序列編號：3)、URLC10-A03-10-63(序列編號：12)、URLC10-A03-10-166(序列編號：22)、URLC10-A03-10-126(序列編號：14)、URLC10-A03-10-149(序列編號：16)、URLC10-A03-10-161(序列編號：18)、URLC10-A03-10-143(序列編號：15)、URLC10-A03-10-204(序列編號：27)、URLC10-A03-10-183(序列編號：17)、URLC10-A03-10-209(序列編號：30)及 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)之序列和已知會感作人免疫系之來自其他分子之胜肽為相同的事實。為了排除此可能性，使用 BLAST 演算法(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)，將該等胜肽之序列作為查詢條件，實施相同性解析。其結果，未查到針對 URLC10-A03-9-64(序列編號：5)、URLC10-A03-9-98(序列編號：1)、URLC10-A03-9-131(序列編號：6)、URLC10-A03-9-127(序列編號：3)、URLC10-A03-10-63(序列編號：12)、URLC10-A03-10-166(序列編號：22)、URLC10-A03-10-126(序列編號：14)、URLC10-A03-10-149(序列編號：16)、URLC10-A03-10-161(序列編號：18)、URLC10-A03-10-143(序列編號：15)、URLC10-A03-10-204(序列編號：27)、URLC10-A03-10-183(序列編號：17)、URLC10-A03-10-209(序列編號：30)及 URLC10-A03-11-131(序列編號：31)之序列有顯著相同性之序列。因此據本案發明人等所知，該等胜肽據認為幾乎不會針對其他無關連的分子引起不欲之免疫應答。就結論而言，可鑑別來自 URLC10 之新穎 HLA-A03 拘束性抗原決定位胜肽。又，顯示來自 URLC10 的抗原決定位胜肽可以適用於癌免疫療法。

【0238】 實施例 3**乳劑製劑之製備**

將胜肽溶於注射用水或滅菌生理食鹽水使成爲 1.0~10.0mg/ml，收集到針筒內。將其以連接器和已填充注射用水或生理食鹽水爲等量 IFA 之針筒連結，交替按壓已連結之 2 支針筒之針筒活塞以進行攪拌。數分鐘攪拌後，利用墜落測試法評價乳劑之完成。墜落測試法可藉由將 1 滴已攪拌之樣本滴加到水面上以進行。滴加到水面上之樣本未立即擴散到水中時評爲乳劑完成，立即擴散到水中評爲乳劑未完成。評爲乳劑未完成時，進一步攪拌使乳劑完成。完成的乳劑可利用皮下注射對於癌患者投予。投予對象之癌患者可以選擇罹患膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、或軟部組織腫瘤等之患者。

【0239】 冷凍乾燥製劑之製備

將胜肽溶於注射用水使成爲 1.0~10.0mg/ml，並進行過濾滅菌。將其填充在滅菌小玻璃瓶，並將已滅菌之橡膠蓋輕輕插入。將此小玻璃瓶冷凍乾燥後，進行全封蓋及鋁蓋的捲封，製成冷凍乾燥製劑。使用時，於小玻璃瓶注入注射用水或滅菌生理食鹽水，將冷凍乾燥粉末予以再溶解。使用針筒抽取小玻璃瓶中之再溶解液，以連接器和已填充抽取之再溶解液爲等量之 IFA 的針筒連結。將已連結之 2 支針筒之針筒活塞交替地按壓以攪拌。數分鐘攪拌後，利用墜落測試法評價乳劑之完成。已完成之乳劑可利用皮下注射對於癌患者投予。投予對象之癌患

者可選擇罹患膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、或軟部組織腫瘤等之患者。

[產業利用性]

【0240】本發明提供能誘導強力且專一之抗腫瘤免疫應答，故對於廣泛癌之種類有適用性之來自 URLC10 的新穎 HLA-A11 及 HLA-A03 拘束性抗原決定位胜肽。本發明之胜肽、組合物、APC、及 CTL，可作為針對表現 URLC10 之癌，例如：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤之胜肽疫苗使用。

【0241】本說明書係將本發明就其特定態樣詳細說明，但前述說明的本質係例示說明，應理解為係用以說明本發明及其理想態樣。該技術領域中有通常知識者可輕易地得知：透過慣常的實驗，能不脫離附帶有交界值及極限之專利請求之範圍定義之本發明之精神及範圍而進行各種變更及改變。

【符號說明】

無。

序列表

- <110> 腫瘤療法・科學股份有限公司
- <120> 來自 URLC10 的胜肽及含其之疫苗
- <150> JP 2014-158925
- <151> 2014-08-04
- <160> 38
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> 人造序列
- <220>
- <223> 來自 URLC10 的胜肽
- <400> 1
- Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg
- 1 5
- <210> 2
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> 人造序列
- <220>
- <223> 來自 URLC10 的胜肽
- <400> 2
- Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys
- 1 5
- <210> 3
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 3

Ile Ala Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 4

Asn Thr Phe Glu Cys Gln Asn Pro Arg
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 5

Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 6

Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val

1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 7

Ser Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 8

Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 9

Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 10

Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 11

Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr Ala Arg
1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 12

Ala Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 13

.

Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 14

Val Ile Ala Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 15

Cys Ser Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 16

Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys
1 5 10

<210> 17

<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 17

Gly	Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	Ser	Val	Phe	Lys
1				5					10

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

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 18

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

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 19

Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Arg	Arg	Phe	Gln	Lys
1				5					10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 20

Asn Thr Phe Glu Cys Gln Asn Pro Arg Arg
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 21

Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 22

Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 23

Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 24

Pro	Ile	Asn	Ser	Ser	Val	Phe	Lys	Glu	Tyr
1				5					10

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 25

Tyr	Leu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ile	Arg	Tyr
1				5				

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

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 26

Lys	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Phe	Met	Val	Ala
1				5					10

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

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 27

Gly Leu Trp Leu Ala Ile Leu Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 28

Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu Val
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 29

Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 30

Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala

1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 URLC10 的胜肽

<400> 31

Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys
1 5 10

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 供 TCR 分析之 PCR 引子

<400> 32
gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 供 TCR 分析之 PCR 引子

<400> 33
tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 供 TCR 分析之 PCR 引子

<400> 34
tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 供 TCR 分析之 PCR 引子

<400> 35
ctagcctctg gaatcctttc tctt 24

<210> 36
<211> 765
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (57).. (728)

<400> 36
acaaggcggg actcagaacc ggcgttcagg gccgccagcg gccgcgaggc cctgag atg 59
Met
1

agg ctc caa aga ccc cga cag gcc ccg gcg ggt ggg agg cgc gcg ccc 107
Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala Pro
5 10 15

cgg ggc ggg cgg ggc tcc ccc tac cgg cca gac ccg ggg aga ggc gcg 155
Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly Ala
20 25 30

cgg agg ctg cga agg ttc cag aag ggc ggg gag ggg gcg ccg cgc gct 203
Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg Ala
35 40 45

gac cct ccc tgg gca ccg ctg ggg acg atg gcg ctg ctc gcc ttg ctg 251
Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu Leu
50 55 60 65

ctg gtc gtg gcc cta ccg cgg gtg tgg aca gac gcc aac ctg act gcg Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr Ala 70 75 80	299
aga caa cga gat cca gag gac tcc cag cga acg gac gag ggt gac aat Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp Asn 85 90 95	347
aga gtg tgg tgt cat gtt tgt gag aga gaa aac act ttc gag tgc cag Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys Gln 100 105 110	395
aac cca agg agg tgc aaa tgg aca gag cca tac tgc gtt ata gcg gcc Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala Ala 115 120 125	443
gtg aaa ata ttt cca cgt ttt ttc atg gtt gcg aag cag tgc tcc gct Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser Ala 130 135 140 145	491
ggt tgt gca gcg atg gag aga ccc aag cca gag gag aag cgg ttt ctc Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe Leu 150 155 160	539
ctg gaa gag ccc atg ccc ttc ttt tac ctc aag tgt tgt aaa att cgc Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile Arg 165 170 175	587
tac tgc aat tta gag ggg cca cct atc aac tca tca gtg ttc aaa gaa Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys Glu 180 185 190	635
tat gct ggg agc atg ggt gag agc tgt ggt ggg ctg tgg ctg gcc atc Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala Ile 195 200 205	683
ctc ctg ctg ctg gcc tcc att gca gcc ggc ctc agc ctg tct tga Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser 210 215 220	728
gccacgggac tgccacagac tgagccttcc ggagcat	765

<210> 37
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala
1 5 10 15

Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly
20 25 30

Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg
35 40 45

Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ala Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp
85 90 95

Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys
100 105 110

Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala
115 120 125

Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser
130 135 140

Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe
145 150 155 160

Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile
165 170 175

Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys
180 185 190

Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala
195 200 205

Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser
210 215 220

<210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 連結子胜肽

<400> 38

Asn Lys Arg Lys
1

申請專利範圍

1. 一種胜肽，其係具有細胞傷害性 T 細胞(CTL)誘導能力之未達 15 個胺基酸之胜肽，包含選自以下群組之胺基酸序列：
 - (a) 選自於由序列編號：13 及 31 構成之群組之胺基酸序列；
 - (b) 對於序列編號：13 之胺基酸序列實施了選自於由以下(i)至(iv)構成之群組之 1 個、2 個、3 個或 4 個之取代之胺基酸序列：
 - (i) N 末端起第 2 號胺基酸取代為選自於由蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸及酪胺酸構成之群組之胺基酸；
 - (ii) N 末端起第 3 號之胺基酸取代為選自於由白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸及丙胺酸構成之群組之胺基酸；
 - (iii) N 末端起第 7 號之胺基酸取代為選自於由白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸及苯丙胺酸構成之群組之胺基酸；及
 - (iv) C 末端之胺基酸取代為精胺酸；及
 - (c) 對於序列編號：31 之胺基酸序列實施了選自於由以下(i)至(ii)構成之群組之 1 個或 2 個之取代之胺基酸序列：
 - (i) N 末端起第 2 號胺基酸取代為選自於由白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、絲胺酸及蘇胺酸構成之群組之胺基酸；及
 - (ii) C 末端之胺基酸取代為選自於由精胺酸、酪胺酸及苯丙胺酸構成之群組之胺基酸。
2. 如申請專利範圍第 1 項之胜肽，其由選自於由序列編號：

13 及 31 構成之群組之胺基酸序列構成。

3. 一種多核苷酸，編碼為如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽。

4. 一種組合物，包含：藥學上可容許之載體，以及選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種成分：

(a) 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 於自身細胞表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；

(d) 於自身細胞表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

5. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，係用於誘導 CTL 之組合物，其中，該成分係選自於由以下(a)~(d)構成之群組中之至少 1 種成分：

(a) 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 於自身之細胞表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；及

(d) 於自身之細胞表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 2 項中

任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之外吐小體。

6. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其係藥學組合物。
7. 如申請專利範圍第 6 項之組合物，係用於癌之治療。
8. 如申請專利範圍第 6 項之組合物，係用於誘導針對癌之免疫應答。
9. 如申請專利範圍第 7 項之組合物，其中，癌係選自於由膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、食道癌、胃癌、肺癌、骨肉瘤、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌、腎癌、頭頸部癌、及軟部組織腫瘤構成之群組。
10. 如申請專利範圍第 4 至 9 項中任一項之組合物，其係用於向選自於由 HLA-A11 及 HLA-A03 構成之群組中之至少 1 種 HLA 為陽性之對象投予而製劑化。
11. 一種在試管內(in vitro)或離體(ex vivo)誘導具有 CTL 誘導能力之 APC 之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：
 - (a) 使 APC 在試管內、或離體接觸如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽；及
 - (b) 將編碼為如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之多核苷酸導入到 APC。
12. 一種在試管內誘導 CTL 之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：
 - (a) 將 CD8 陽性 T 細胞和在自身表面上呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之複合體之 APC 進行共培養；
 - (b) 將 CD8 陽性 T 細胞和在自身表面上呈現 HLA 抗原與如

申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之複合體之外吐小體進行共培養；及

(c) 將編碼為能結合於在細胞表面上由 HLA 抗原呈現之如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之 T 細胞受體 (TCR) 之各次單元之多核苷酸導入到 CD8 陽性 T 細胞。

13. 一種 APC，係於自身表面上呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之複合體。

14. 如申請專利範圍第 13 項之 APC，係利用如申請專利範圍第 11 項之誘導具有 CTL 誘導能力之 APC 之方法誘導。

15. 一種 CTL，係將如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽作為標靶。

16. 如申請專利範圍第 15 項之 CTL，係由如申請專利範圍第 12 項之誘導 CTL 之方法誘導。

17. 一種選自於由以下 (a)~(e) 構成之群組中之至少 1 種成分在製備用於誘導針對癌之免疫應答之藥物的用途：

(a) 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

(c) 於自身之細胞表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞 (APC)；

(d) 於自身之細胞表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之外吐小體；及

(e) 將如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

18.一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少 1 種成分在製備用於治療癌之藥物的用途：

- (a) 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之一或多種胜肽；
- (b) 以可表現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；
- (c) 於自身之細胞表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之抗原呈現細胞(APC)；
- (d) 於自身之細胞表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽與 HLA 抗原之複合體之外吐小體；及
- (e) 將如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽作為標靶之 CTL。

19.一種抗體，係結合於如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽。

20.一種篩選有 CTL 誘導能力之胜肽之方法，包括以下步驟：

- (a) 製作由對於選自於由序列編號：13 及 31 構成之群組之胺基酸序列構成之原本胺基酸序列有 1 個、2 個、3 個或 4 個胺基酸殘基取代、缺失、插入、及/或加成之胺基酸序列構成之候選序列；
- (b) 從(a)製作之候選序列中選擇和 URLC10 以外之任意公知之人基因產物均沒有顯著相同性(序列同一性)之候選序列；
- (c) 使由(b)所選擇之候選序列構成之胜肽接觸 APC；
- (d) 使(c)之 APC 接觸 CD8 陽性 T 細胞；及
- (e) 選擇比起由原本胺基酸序列構成之胜肽有同等或更高

之 CTL 誘導能力之胜肽。

21.一種乳劑，包含如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之一或多種胜肽、水溶性之載體、及油性佐劑。

22.一種套組，包含：容納如申請專利範圍第 4 至 10 項中任一項之組合物之容器、及容納佐劑之容器。

23.一種以下 (a) 或 (b) 在製備用於誘導具有 CTL 誘導能力之 APC(s) 之組成物的用途：

(a) 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽；或

(b) 編碼為如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之多核苷酸。

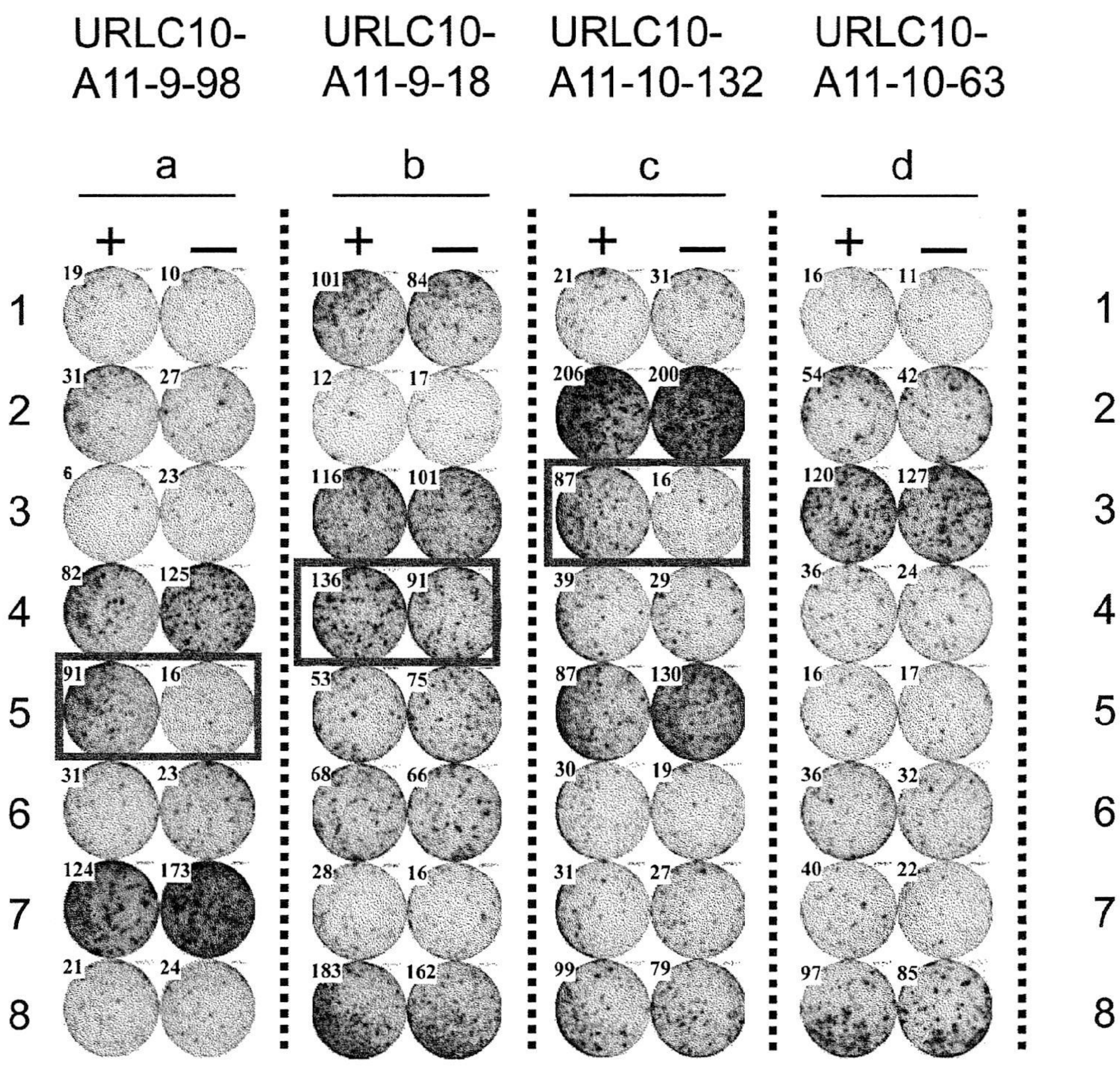
24.一種以下 (a) 至 (c) 中之任一種在製備用於誘導 CTL(s) 之組成物的用途：

(a) 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽；

(b) 編碼為如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之多核苷酸；及

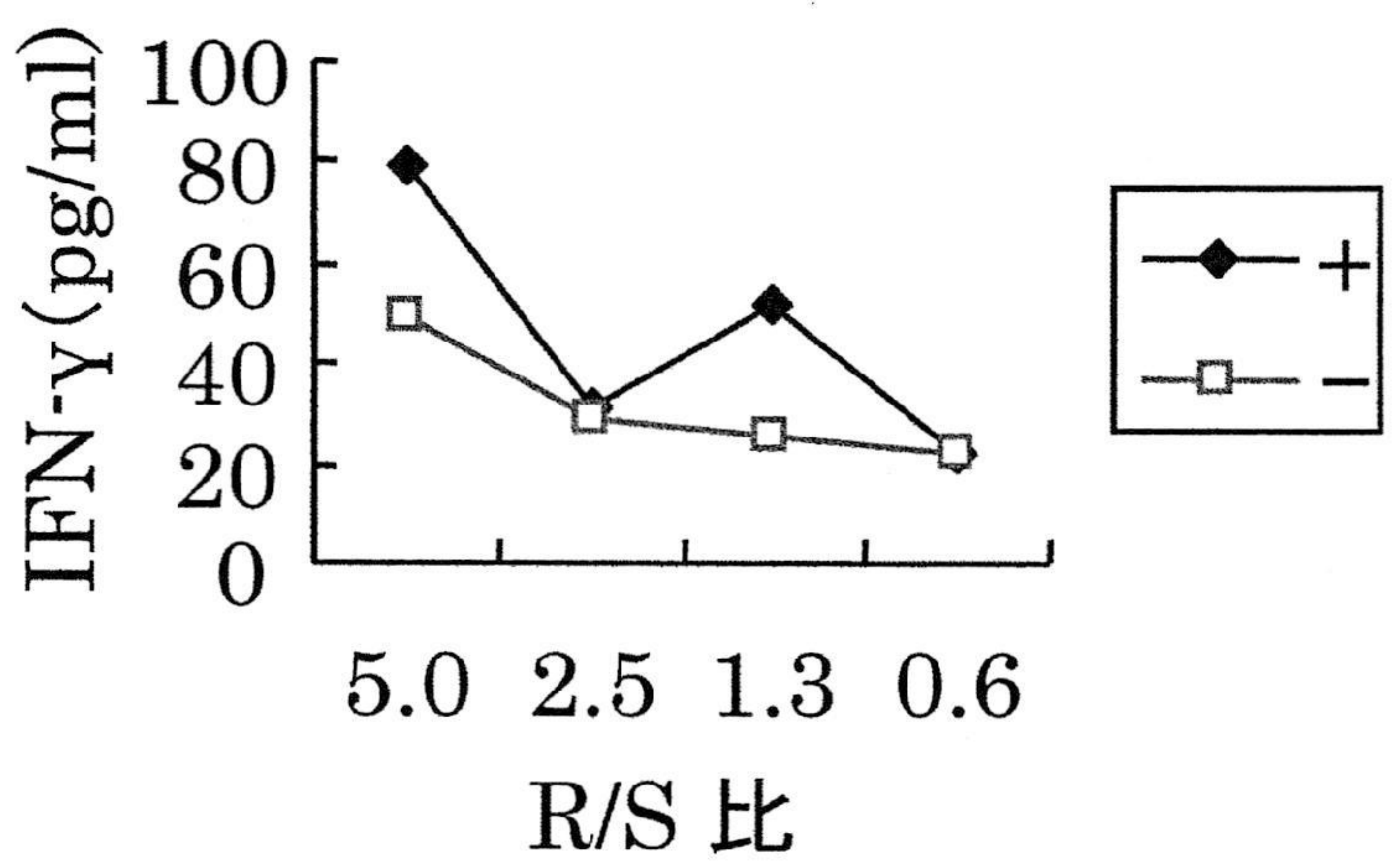
(c) 於自身之細胞表面上呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之胜肽之複合體之 APC(s)。

圖式



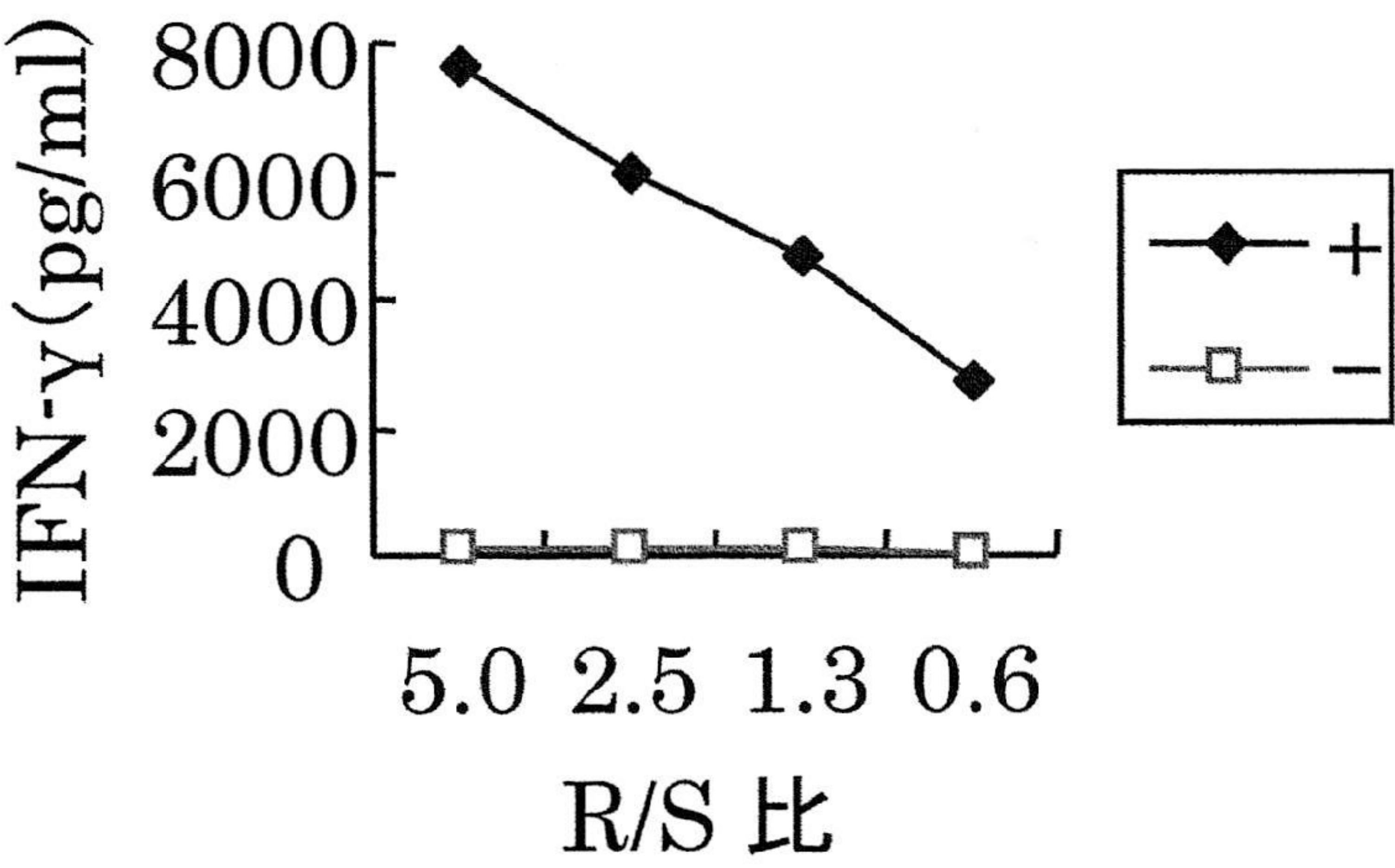
第 1 圖

URLC10-A11-10-132 #3

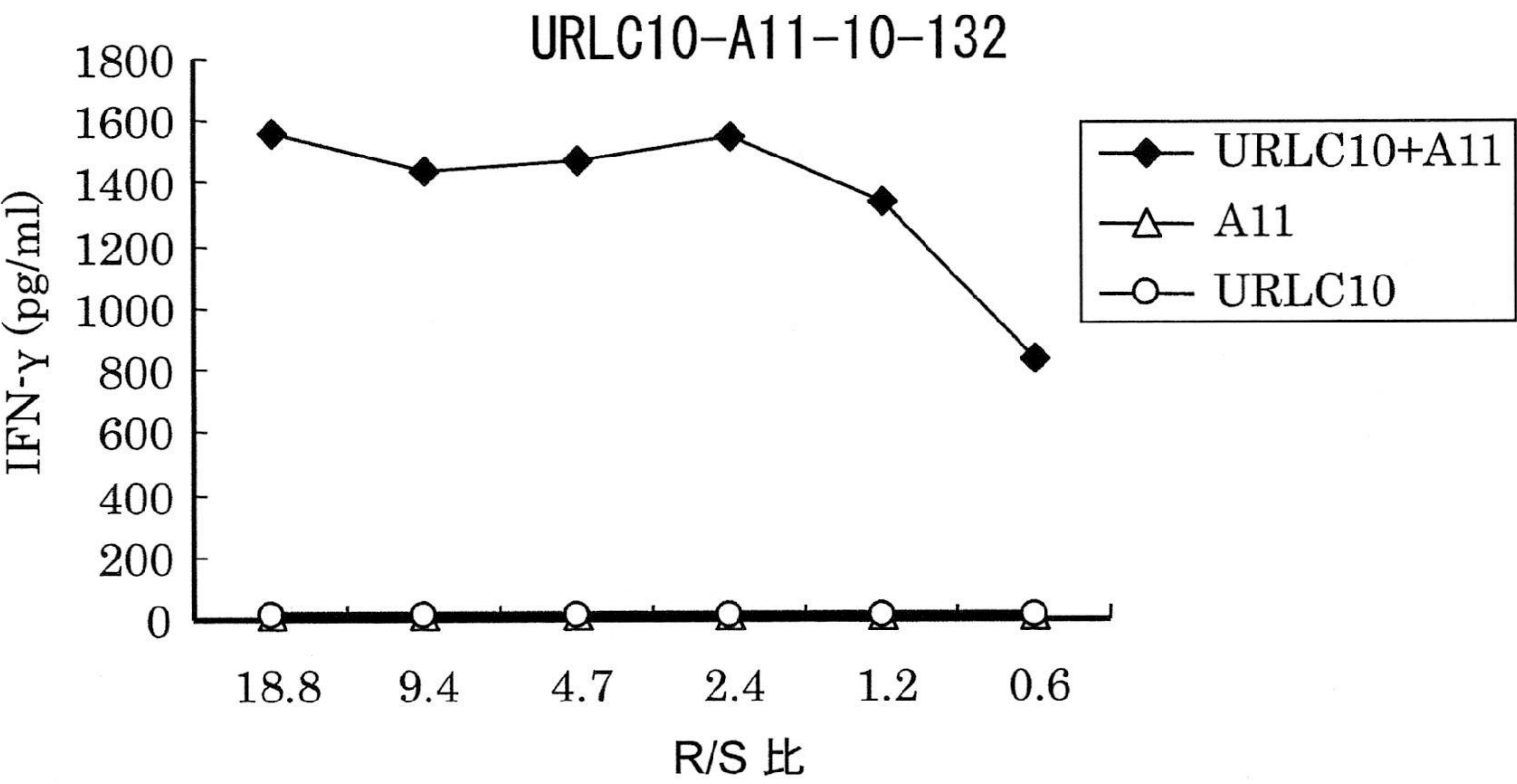


第 2 圖

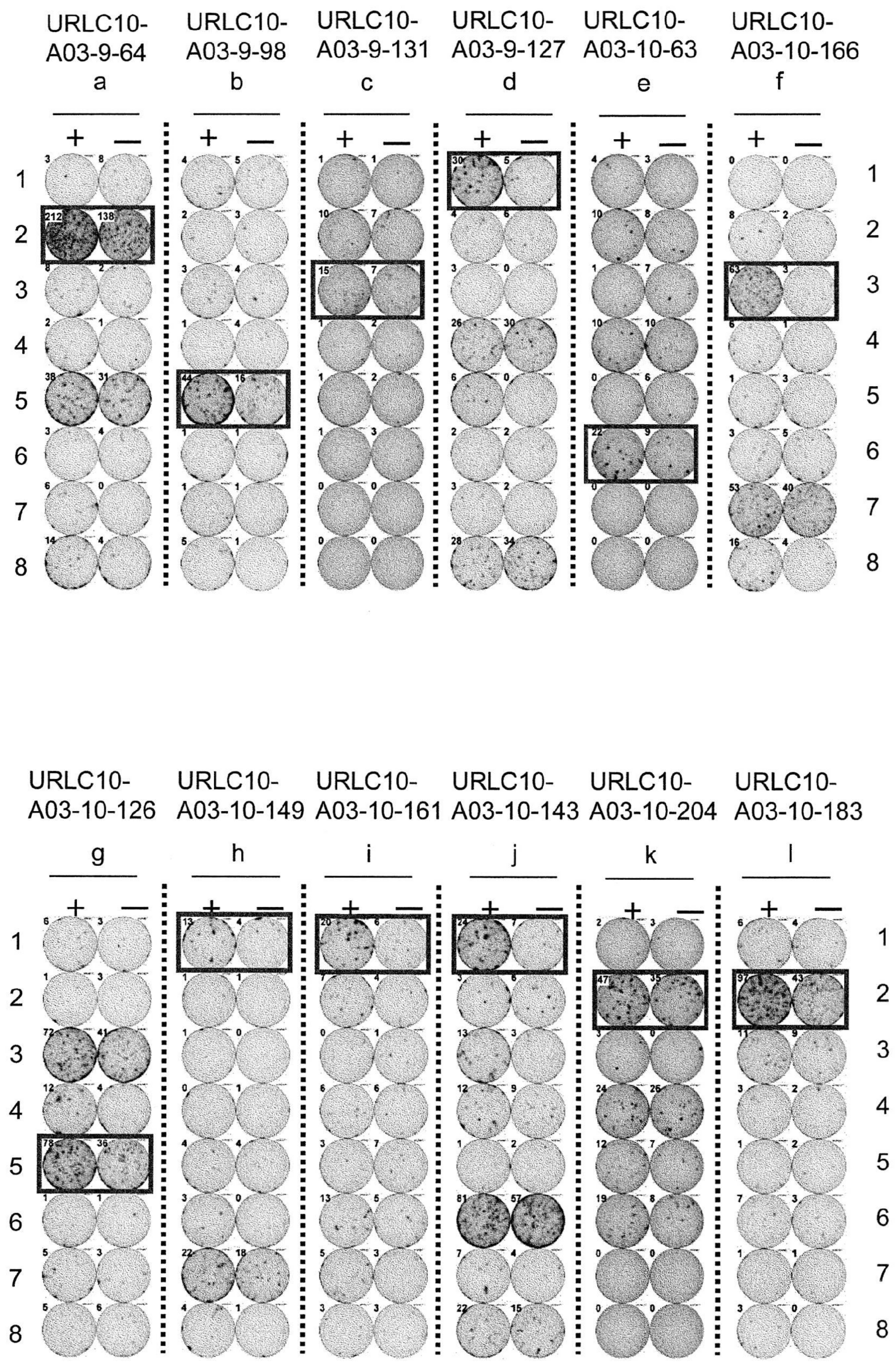
URLC10-A11-10-132 #3



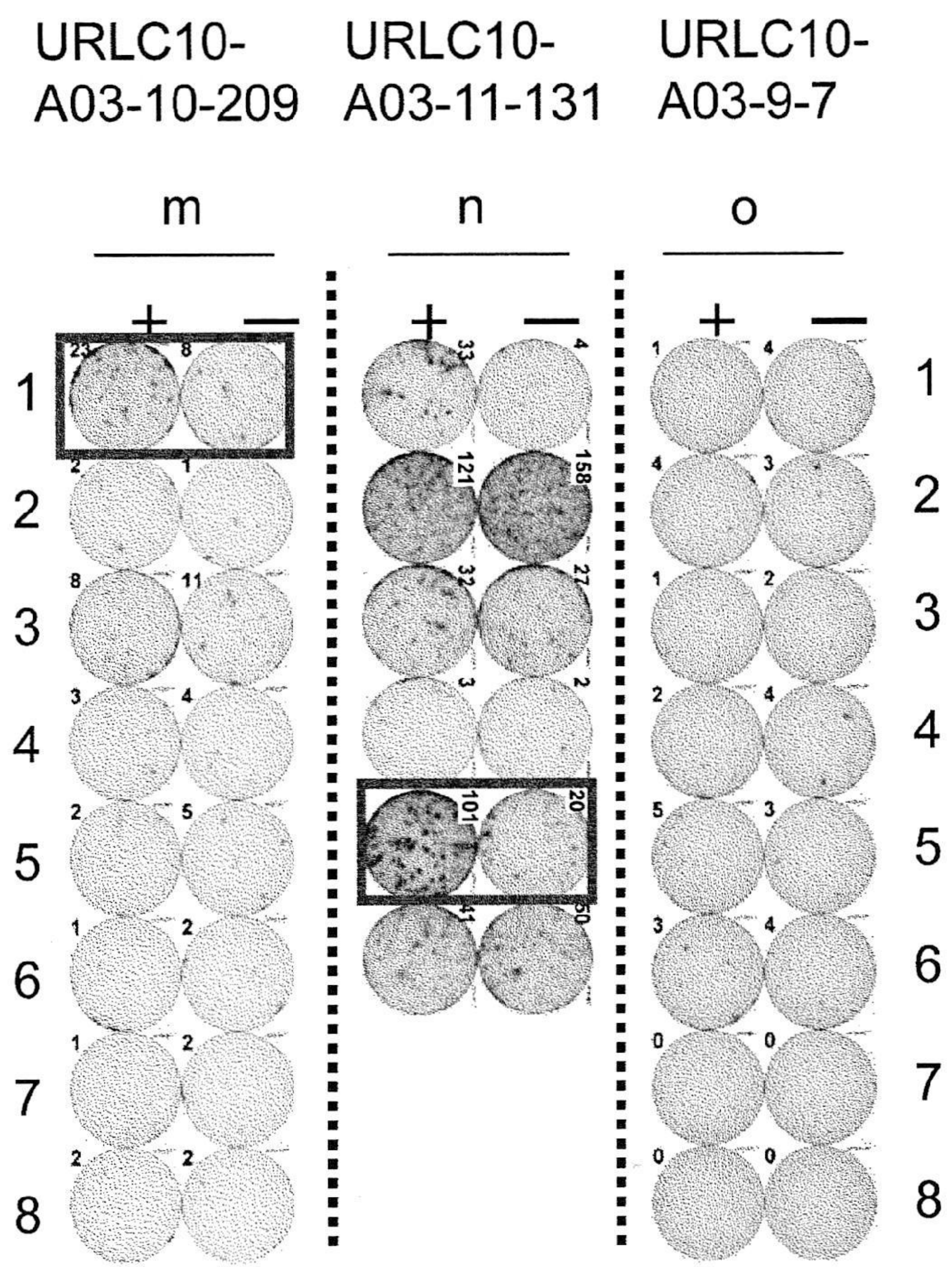
第 3 圖



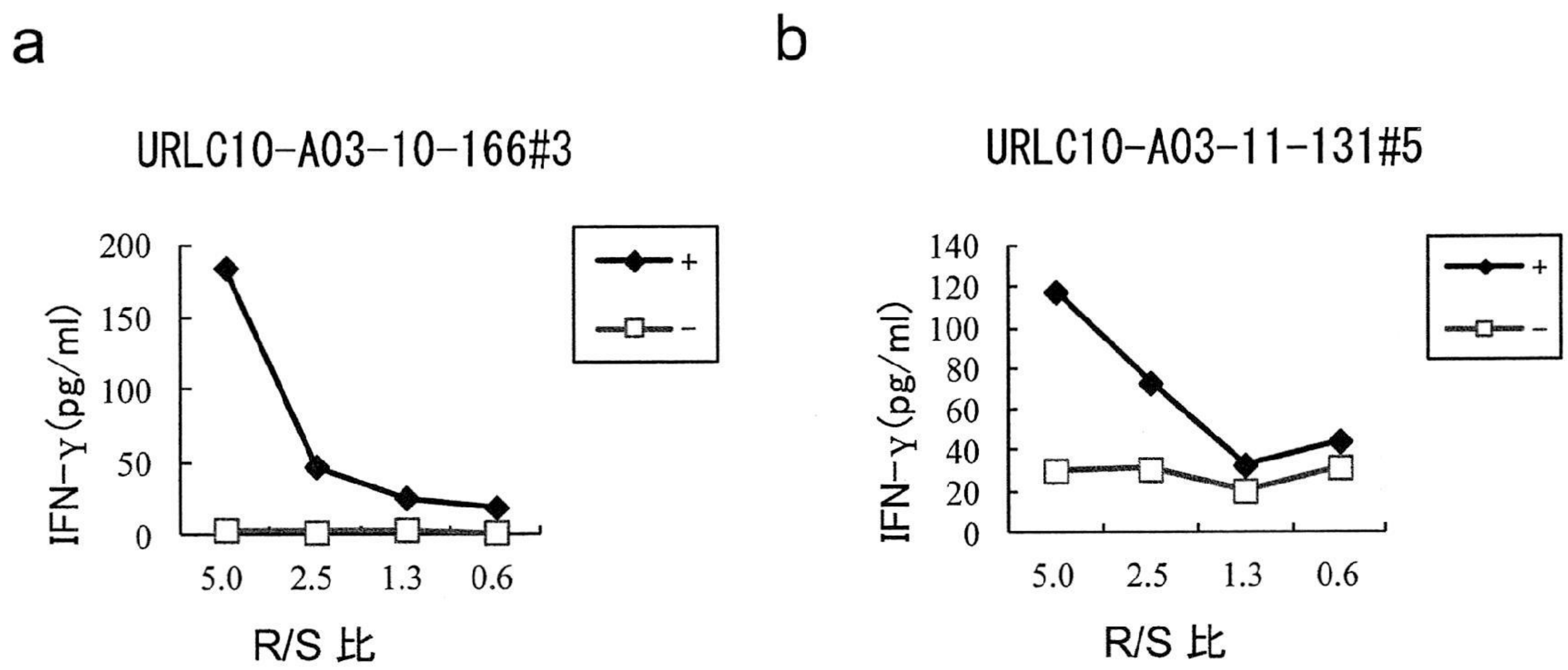
第 4 圖



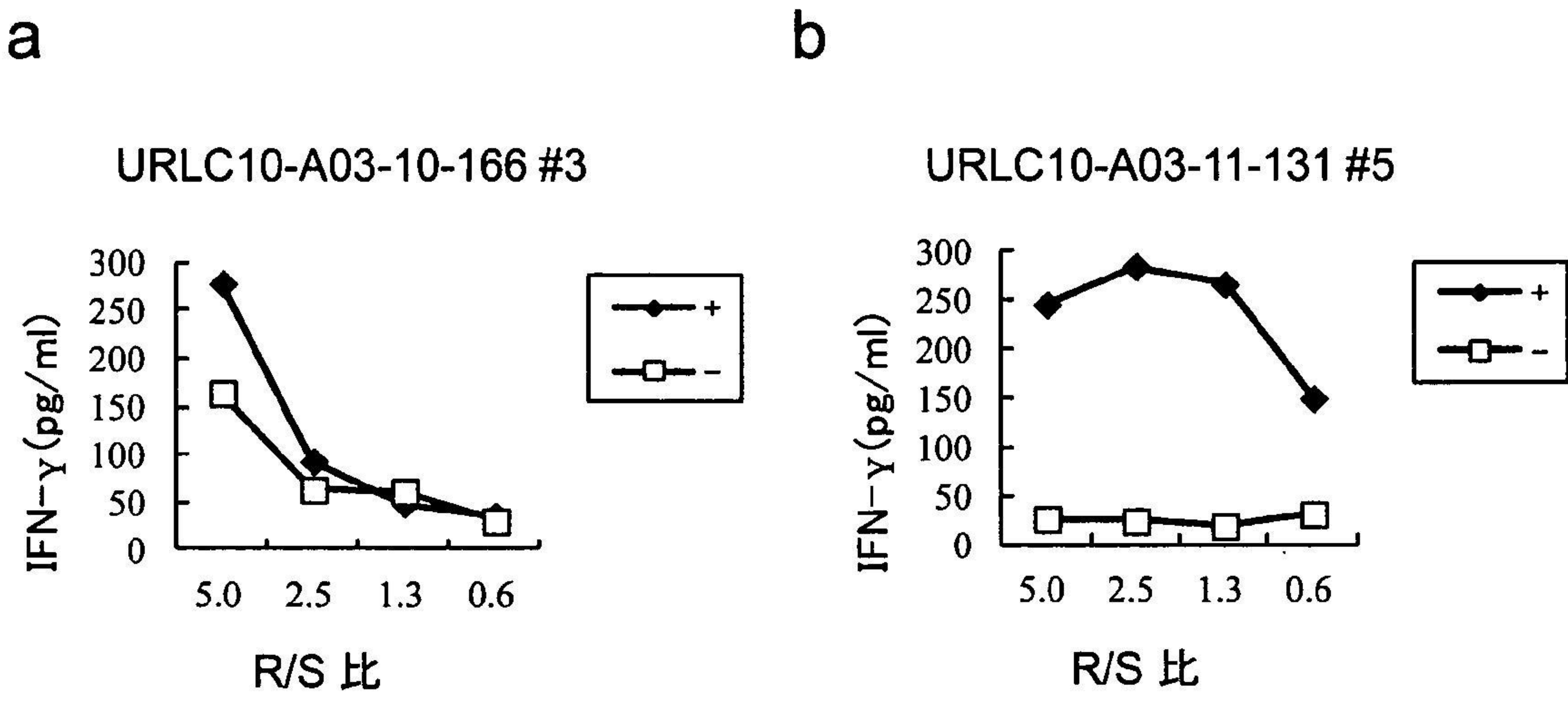
第 5-1 圖



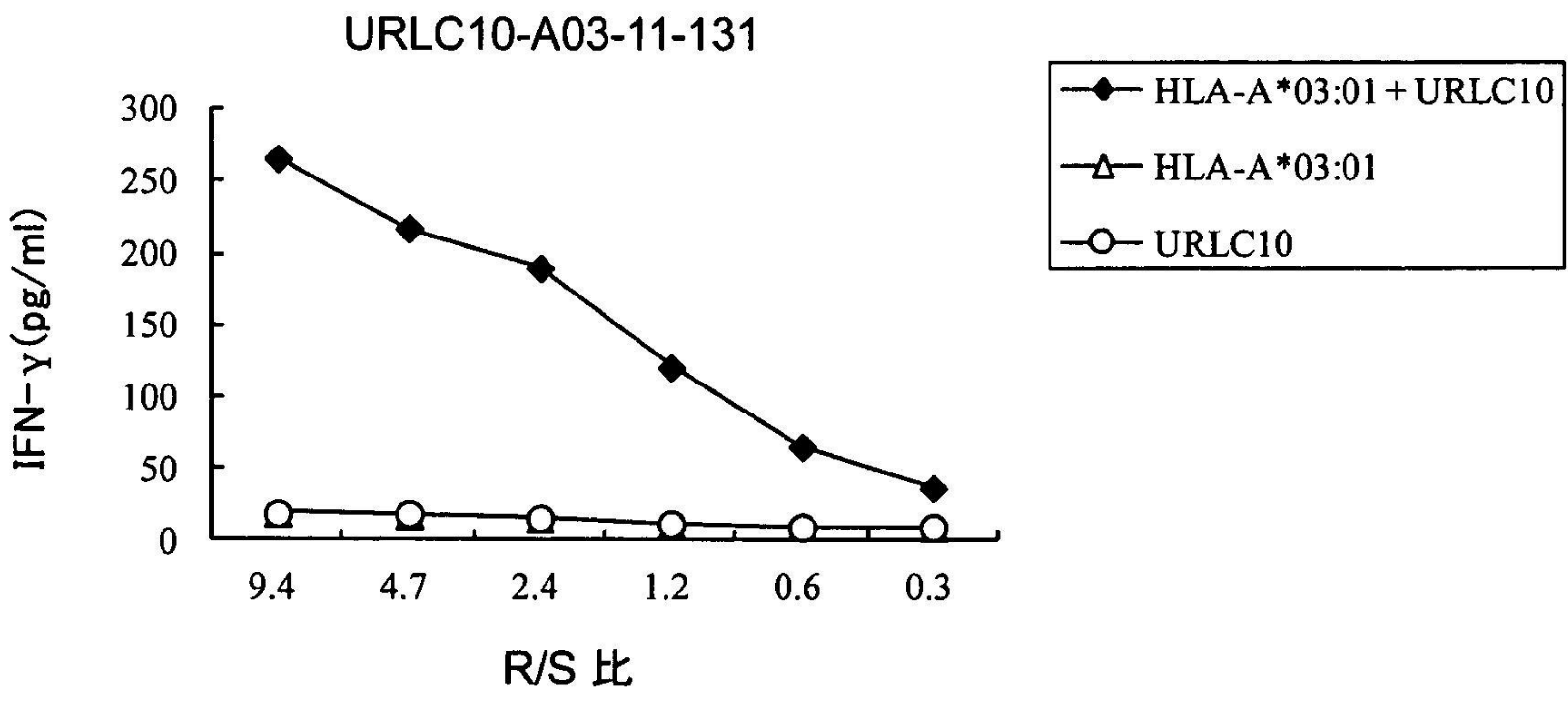
第 5-2 圖



第 6 圖



第 7 圖



第 8 圖