

(21)申請案號：100143251

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 25 日

(51)Int. Cl. :

A61K38/08 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/12/02

美國

61/419,181

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

日本

(72)發明人：中村祐輔 NAKAMURA, YUSUKE (JP)；角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大

澤龍司 OSAWA, RYUJI (JP) ; 吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP) ; 渡邊朝

久 WATANABE, TOMOHISA (JP) ; 中山岳 NAKAYAMA, GAKU (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：4 共 125 頁

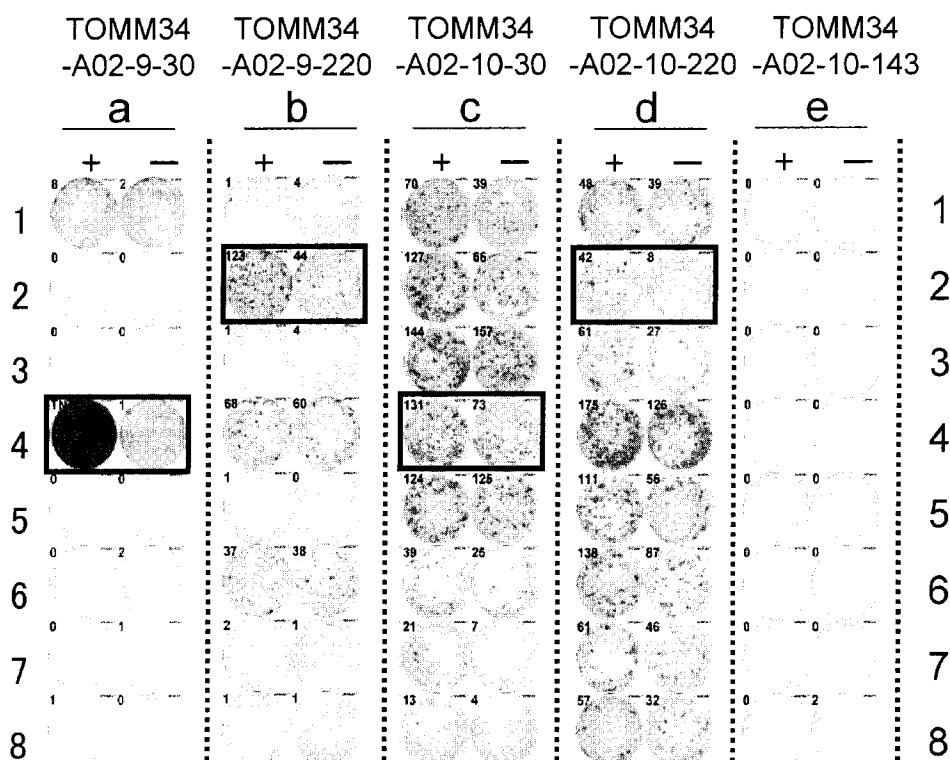
(54)名稱

TOMM3 4 胜肽與含此胜肽之疫苗

TOMM34 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

(57)摘要

本發明揭示一種衍生自序列識別號：42 或其片段之單離胜肽，其結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。本發明的胜肽可包括上述胺基酸序列有 1、2 或數個胺基酸序列經取代、刪除或加成的胺基酸序列的其中之一。本發明更提供包括這些胜肽的醫藥組合物。本發明之胜肽可用於治療癌症。



(21)申請案號：100143251

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 25 日

(51)Int. Cl. :

A61K38/08 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/12/02

美國

61/419,181

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

(72)發明人：中村祐輔 NAKAMURA, YUSUKE (JP) ； 角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP) ； 大澤龍司 OSAWA, RYUJI (JP) ； 吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP) ； 渡邊朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP) ； 中山岳 NAKAYAMA, GAKU (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：4 共 125 頁

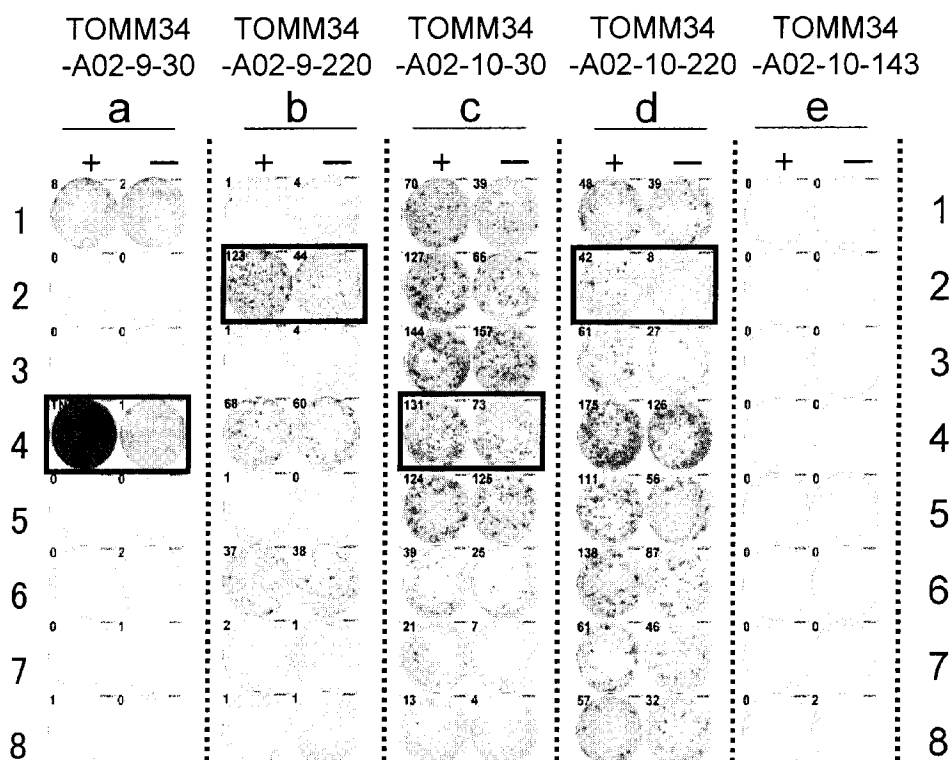
(54)名稱

TOMM3 4 胜肽與含此胜肽之疫苗

TOMM34 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

(57)摘要

本發明揭示一種衍生自序列識別號：42 或其片段之單離胜肽，其結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。本發明的胜肽可包括上述胺基酸序列有 1、2 或數個胺基酸序列經取代、刪除或加成的胺基酸序列的其中之一。本發明更提供包括這些胜肽的醫藥組合物。本發明之胜肽可用於治療癌症。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於生物科學的領域，更具體而言，係關於癌症治療的領域。尤其，本發明係關於新穎的胜肽，其當作治療及預防腫瘤的癌症疫苗及藥物極為有用。

[優先權]

本申請案基於2010年12月2日提申的美國臨時申請案號61/419,181主張優惠，其完整納入於此作為參考。

【先前技術】

已有人證明 CD8+ CTL 會識別在主要組織相容性複合體 (MHC) 第 I 類分子上的腫瘤關聯抗原 (TAA) 衍生的抗原決定基胜肽然後殺死該腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原 (MAGE) 家族為 TAA 的第一例以來，已利用免疫學方法發現了許多其他的 TAA (非專利文獻 1、2)。此等 TAA 當中有些正當做免疫療法的標靶進行臨床開發當中。

有利的 TAA 係對於癌細胞的增殖與存活不可欠缺者，使用此種 TAA 當做免疫療法標靶能降低在治療所驅使的免疫選擇當中由於 TAA 的刪除、突變或下調所造成的癌細胞的免疫逃脫的風險到最小。因此，有人正在進行鑑別能夠誘導有效及專一性抗腫瘤免疫反應的新 TAA，其能確保針對許多類型癌症的胜肽疫苗策略的臨床調查能進一步發展 (非專利文獻 3~10)。到目前，已有數個使用 TAA 衍生胜肽的臨床試驗的報告。不幸地，許多目前的癌症疫苗試驗已顯示只有低目標反應率 (非專利文獻 11 至 13)。因此，仍

需要新的 TAA 當做免疫治療的標靶。

TOMM34 基因 (GenBank Accession No. NM_006809)，係粒腺體 34 外膜的移位酶 (translocase)，已從人類 EST 與 cDNA 資料庫鑑別並據預測會編碼為包含退化的三十四肽重複 (TPR) 模體的蛋白質 (非專利文獻 14)。由該基因所編碼的蛋白質涉及將前驅體蛋白質輸入粒腺體。此蛋白質具有類似帶位子 (chaperone) 的活性，結合於未折疊蛋白質的成熟部分，並協助將其運入粒腺體 (非專利文獻 15)。

於最近的研究，使用包括 23040 個基因構成的 cDNA 微陣列的基因表現概況分析指出 TOMM34 時常在大腸直腸癌受到上調。再者，以 siRNA 將大腸癌細胞株中的 TOMM34 擊倒 (knockdown) 會減弱大腸癌細胞株的生長 (非專利文獻 16)。

[引用列表]

[專利文獻]

[專利文獻 1] PCT/JP2006/314947

[非專利文獻]

[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] Nuttal SD et al., DNA Cell Biol. 1997 Sep;16(9):1067-74
- [非專利文獻 15] Mukhopadhyay A et al., Arch Biochem Biophys. 2002 Apr 1;400(1):97-104
- [非專利文獻 16] Shimokawa et al., Int J Oncol. 2006 Aug;29(2):381-6

【發明內容】

本發明至少部分係基於發現可當做免疫療法的適當標靶的新穎胜肽。由於 TAA 一般被免疫系統察知為「本身」，因此時常沒有免疫原性，發現適當的標靶極為重要。基於以上，TOMM34（例如序列識別號：41 及 42，也以 GenBank 存取號 NM_006809 表示）已鑑別為係在包括但不限於以下的癌症中上調：急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、小細胞肺癌（SCLC）、非小細胞肺癌（NSCLC）、及軟組織腫瘤。因此，本發明著眼於 TOMM34 當成適當的癌症標記，及免疫療法的標靶候選者。

本發明中，鑑別 TOMM34 的基因產物當中具有誘導對 TOMM34 為專一的 CTL 的能力的專一性抗原決定基胜肽。如下將詳述，由健康捐出者獲得的周邊血液單核細胞（PBMC）係使用結合於來自 TOMM34 的候選胜肽的 HLA-A*0201 予以刺激。然後，建立具有專一性細胞毒性的 CTL 細胞株，其係針對經各候選胜肽脈衝的 HLA-A2-陽性目標細胞。在此結果證明此等胜肽為 HLA-A2 限制抗原決定基胜肽，能對於表現 TOMM34 的細胞誘導有效且專一的免疫反應。此等結果進一步證明 TOMM34 具有強免疫產生性，且其抗原決定基為腫瘤免疫療法的有效標靶。

因此，本發明的目的為提供一種結合於 HLA 抗原的單離的胜肽，其係包括 TOMM34 之胺基酸序列（序列識別號：42）或其在免疫學上有活性的片段。此等胜肽預期具有 CTL 誘

導能力，因此可用於在體外(*in vitro*)或生物體之外(*ex vivo*)誘導 CTL 或對於個體投予以供誘導對於癌症的免疫反應，癌症例如包括但不限於：AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。較佳的胜肽為九胜肽或十胜肽，更佳為具有選自序列識別號：1 至 20 及 22 至 40 當中的胺基酸序列的九胜肽或十胜肽。其中，具有選自序列識別號：1、5、31 及 32 的胺基酸序列的胜肽，顯示強 CTL 誘導能力，因而尤佳。

本發明亦考慮具有 TOMM34 之免疫學上有活性的胺基酸序列的經修飾的胜肽，只要該經修飾的胜肽保留必要的原始胜肽的 CTL 誘導能力，其中 1、2 或更多的胺基酸可取代、刪除、插入或加成。其中，具有序列識別號 1、5、31 或 32 的胺基酸序列的胜肽，其中，1、2 或更多的胺基酸可取代、刪除、插入或加成者為尤佳。

本發明更包含編碼為本發明任意胜肽的單離的多核苷酸。此等多核苷酸可用於誘導或製造具有 CTL 誘導能力的 APC。如同上述本發明之胜肽，可對於個體投予以如此的 APC 以供誘導對抗癌症的免疫反應。

當對於個體投予時，該胜肽係呈現於 APC 表面以誘導導向於各自的胜肽的 CTL。因此，本發明的目的在於提供一種組合物、藥劑，其包括本發明的任意胜肽或多核苷酸以誘導 CTL。此種包括任意胜肽或多核苷酸的組合物、藥劑可用於治療及/或預防及/或防止癌症術後復發，癌症例

如包括但不限於：AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、及軟組織腫瘤。

本發明又另一目的在於提供一種醫藥藥劑或組合物，係配方為治療及/或預防癌症，尤其是初期癌症，及/或防止癌症術後復發，其包括或包含本發明之一或更多胜肽或多核苷酸。替代或除了該胜肽或多核苷酸以外，本發明的醫藥藥劑或組合物可包括呈現該胜肽當中任一者的 APC 或外泌體當做有效成分。

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

本發明又一目的在於提供一種誘導 CTL 的方法，此方法包括以下步驟：將 CD8+ 的細胞與在表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體共同培養，或導入一多核苷酸或多個多核苷酸的步驟，該一多核苷酸或多個多核苷酸編碼為 T 細胞受體 (TCR) 次單元多胜肽，其中，由此種次單元多胜肽形成的 TCR 能夠結合於細胞表面上的 HLA 抗原與該胜肽的複合體。此方法獲得的 CTL 在治療及預防癌症有用，癌症例如包括但不限於：AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、

大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、及軟組織腫瘤。

本發明之又一目的在於提供單離的 APC，其係於表面上呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合體。本發明更提供單離的 CTL，其標靶於本發明之胜肽。此等 APC 與 CTL 可用於癌症免疫療法。

本發明的又一目的在於提供用於在需要的個體中誘導對抗癌症的免疫反應的方法，此方法包括以下步驟：投予包括本發明之一或多個胜肽的組合物或藥劑、編碼為本發明之胜肽的多核苷酸、或呈現本發明之胜肽的外泌體或 APC。

本發明的應用性擴大至任何相關於或由於 TOMM34 過度表現的疾病，疾病例如癌症，包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、及軟組織腫瘤。

具體而言，本發明提供以下[1]至[20]：

[1] 一種以下(a)或(b)之單離的胜肽：

(a) 一單離之胜肽，包含選自於由序列識別號 1、5、31 及 32 構成的群組的胺基酸序列；

(b) 一單離的胜肽，其中該胜肽包含一胺基酸序列，其係對於選自於由序列識別號：1、5、31 及 32 構成的群組的胺基酸序列中的 1、2 或更多的胺基酸取代、刪除或插入或加成而產生保留結合於 HLA 抗原之能力以及毒性 T 淋巴球 (CTL) 誘導能力的經修飾的胜肽。

[2] 如 [1] 之單離胜肽，其中該 HLA 抗原為 HLA-A2。

[3] 如 [1] 或 [2] 之單離胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽。

[4] 如 [1] 至 [3] 中任一項之單離胜肽，其中具有選自於以下構成的群組中的至少一取代：

(a) N 末端起的第 2 個胺基酸為或修飾成選自於由白胺酸及甲硫胺酸構成的群組的胺基酸，且

(b) C 末端胺基酸為或修飾成選自於由纈胺酸及白胺酸構成的群組的胺基酸。

[5] 一種單離之多核苷酸，其係編碼為如 [1] 至 [4] 中任一項之胜肽。

[6] 一種用於誘導 CTL 之組合物，其中該組合物包含如 [1] 至 [4] 中任一項之胜肽中 1 種或更多，或如 [5] 之多核苷酸 1 種或更多。

[7] 一種醫藥組合物，其係包含：

(a) 如 [1] 至 [4] 中任一項的胜肽當中 1 種或更多，

(b) 如 [5] 之多核苷酸當中 1 種或更多。

(c) 一或更多 APC 或外泌體，其在表面上呈現如 [1] 至 [4] 中任一項之胜肽及 HLA 抗原的複合體，或

(d) 一或更多 CTL，其識別在表面上呈現如 [1] 至 [4] 中任一項之胜肽及 HLA 抗原的複合體的細胞

，組合醫藥上可接受之載體，係配方為選自於以下構成的群組的用途：

(i) 治療已有的癌症

(ii) 預防癌症

(iii) 防止癌症術後復發，及

(vi) 其組合。

[8] 如[7]之醫藥組合物，其係配方為對於 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體投予。

[9] 一種誘導具有 CTL 誘導能力的抗原呈現細胞(APC)的方法，包含選自於以下構成之群組的步驟：

(a) 使 APC 於體外、生物體外(ex vivo)或體內接觸如[1]至[4]中任一胜肽，及

(b) 將編碼為如[1]至[4]中任一項之胜肽的多核苷酸導入 APC。

[10]一種用於誘導 CTL 之方法，包含選自於以下構成之群組的步驟：

(a) 共同培養 CD8+T 細胞以及在表面上呈現 HLA 抗原與如[1]至[4]中任一胜肽之複合體的 APC，

(b) 共同培養 CD8+T 細胞以及在表面上呈現 HLA 抗原與如[1]至[4]中任一胜肽之複合體的外泌體，及

(c) 將編碼為 T 細胞受體(TCR)次單元多胜肽的一多核苷酸/多個多核苷酸導入 T 細胞，其中由該 TCR 次單元多核苷酸形成的 TCR 能在細胞表面結合於 HLA 抗原與如[1]至[4]中任一胜肽之複合體；

[11]一種單離的 APC，其在表面上呈現 HLA 抗原與如[1]至[4]中任一胜肽之複合體。

[12]如[11]之 APC，其係由誘導具有 CTL 誘導能力的抗原呈現細胞(APC)的方法所誘導，其中，該方法包含選自由以

下構成的群組的步驟：

(a) 使 APC 於體外、生物體外(ex vivo)或體內接觸如 [1]至[4]中任一胜肽，及

(b) 將編碼為如 [1]至[4]中任一項之胜肽的多核苷酸導入 APC。

[13]一種單離之 CTL，其係標靶於如 [1]至[4]中任一項之胜肽。

[14] 如 [13]之 CTL，其係由誘導 CTL 之方法所誘導，其中該方法包含選自由以下構成的群組的步驟：

(a) 共同培養 CD8+T 細胞與 APC，該 APC 於其表面呈現 HLA 抗原與如 [1]至[4]中任一項之胜肽的複合體，

(b) 共同培養 CD8+ T 細胞與外泌體，該外泌體於其表面呈現 HLA 抗原與如 [1]至[4]中任一項之胜肽的複合體，及

(c) 導入一多核苷酸或多個多核苷酸到 T 細胞中，該多核苷酸或多個多核苷酸編碼為 T 細胞受體(TCR)次單元多胜肽，其中，由該 TCR 次單元多胜肽形成的 TCR 能在細胞表面結合於 HLA 抗原與如 [1]至[4]中任一項之胜肽的複合體。

[15] 一種在個體中誘導對抗癌症的免疫反應的方法，該方法包括以下步驟：對於該個體投予包括如 [1]至[4]之胜肽、其在免疫學上有活性的片段、或編碼為該胜肽或片段的核苷酸。

[16] 一種載體，包含編碼為如 [1]至[4]中任一項之胜肽的

核苷酸序列。

[17] 一種寄主細胞，係經如[16]之表現載體轉形或轉染。

[18] 一種外泌體，其係呈現包含如[1]至[4]中任一項之胜肽與 HLA 抗原的複合體。

[19] 一種抗體，其係對抗如[1]至[4]中任一項之胜肽或其在免疫學上有活性的片段。

[20] 一種診斷套組，包含如[1]至[4]中任一項之胜肽、如[5]之多核苷酸，或如[19]之抗體或免疫學上有活性的片段。

本發明的其他目的及特性將由閱讀以下詳細敘述並參照附圖及實施例而更為顯明。應瞭解本發明的上述發明內容以及以下詳述的具體例僅為例示，不限定本發明或本發明的其他替代具體例。尤其，雖然本發明在此參照數個特定具體例說明，但是此等敘述係用於理解本發明，並非限定本發明。在不偏離本發明精神與範疇之下，如同附屬的申請專利範圍，該技術領域中具有通常知識者可做各種修飾及應用。同樣地，本發明的其他目的、特性、益處及優點將由下述內容及特定具體例而顯明，且對於該技術領域中具有通常知識者非常顯明。此種目的、特性、益處及優點將將由以上以及附帶的實施例、資料、圖式、及所有繪製的單獨或考量為納入於此的參考文獻的所有合理的推論而顯明。

【實施方式】

雖然任何類似於或均等於在此所述的方法或材料可用

於實施或測試本發明具體例，以下仍敘述較佳的材料、方法及裝置。然而，敘述該材料及方法前，應瞭解此等敘述僅為供理解而非意欲限制。應瞭解本發明不限於在此敘述的特定大小、形狀、方向、尺寸、材料、方法學、試驗步驟等，因為此等會由於例行的實驗及/或最適化而改變。再者，在敘述中使用的用語僅係用敘述特定版本或具體例，不意欲限制本發明的範圍，本發明範圍僅由附帶的申請專利範圍限制。

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。

I. 定義

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

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、脂質或其他來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 Coomassie Brilliant Blue 染色等出現單一譜帶而顯示。於一較佳具體例，本發明之胜肽及多核苷酸係經單離或經純化。

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。

有時用在本說明書的「寡胜肽」，係指本發明之胜肽其長為 20 個殘基或更短，通常為 15 個殘基或更短，且通常由約 8 至約 11 個殘基構成，時常為 9 或 10 個殘基。

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、gamma-羧基麩胺酸，及 O-磷絲胺酸）。用語「胺基酸類似物」意指與天然發生胺基酸具有相同基本化學結構（鍵結於氫的 alpha 碳、羧基、胺基及 R 基）但是具有一個以上經過修飾的 R 基或經過修釋的骨架（例如高絲胺酸、降白胺酸、甲硫胺酸、亞磺、甲硫胺酸甲基鹽）。用語「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。

用語「基因」、「多核苷酸」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。

用語「組合物」意指以特定量含有特定成分的產品，以及將該特定成分以特定量直接或間接組合得到的任意產品。加上修飾語「醫藥的」係意欲包含含該有效成分及成為載體的任意鈍性成分的產品，及由直接或間接組合、複合或聚集該等成分中任意 2 種或更多而獲得的任意產品，或由該等成分中 2 種或更多的其他類型的反應或交互作用而得到的任意產品。因此本發明本文中，用語「醫藥組合物」意指藉由混合本發明化合物或物質及醫藥上或生理上

可接受載體而製作的任意組合物。此處使用之用語「醫藥上可接受之載體」或「生理上可接受之載體」，係指醫藥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。

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，於一醫藥組合物的上下文中，「有效成分」係指顯示目標的藥理作用的物質。例如，當醫藥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 CTL 識別或殺死癌細胞。在配方前，「有效成分」也稱為「散裝物質(bulk)」、「藥物物質」或「技術品」。

除非另外定義，用語「癌症」意指過度表現 TOMM34 基因的癌症，例如包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、及軟組織腫瘤。

除非另外定義，用語「細胞毒性 T 淋巴球」、「細胞毒性 T 細胞」及「CTL」，在此可互換使用，且除非特別指明，意指 T 淋巴球的次群組，其能識別非己細胞（例如腫瘤細胞、受病毒感染的細胞），並誘導此種細胞的死亡。

除非另外定義，用語「HLA-A2」在此意指次型，次型

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。

除非另外定義，於此使用之用語「套組」被使用於關於試劑與其他材料之組合。於此考慮之套組包括微陣列、晶片、標誌物等。並無打算使用語「套組」限制於試劑及/或材料之特定組合。

在此，個體或病患的上下文中，用詞「個體(或病患)之 HLA 抗原為 HLA-A2」意指該個體或病患以同型合子或異型合子帶有 HLA-A2 抗原基因為其 MHC (主要組織相容性複合體)第 I 類分子，且 HLA-A2 抗原在該個體或病患的細胞中表現當做 HLA 抗原。

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，例如在該個體中的 TOMM34 基因表現減低、癌症的大小減小、流行程度或轉移潛力減低，則治療係視為「有效」。當該治療係以預防性使用時，「有效」意指其延遲或防止癌症形成或預防或減輕癌症的臨床症狀。有效係利用任何已知相關用於診斷或治療特定腫瘤形式的方法決定。

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活性。防止及預防可發生於「初級、次級及三級防止水平」。初級防止及預防避

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

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

本發明上下文中，用語「抗體」意指專一性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、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。

II. 胜肽

以下詳述的本發明的胜肽，可稱為 TOMM34 胜肽。

為了證明來自 TOMM34 之胜肽作用如被細胞毒性性 T 淋巴球 (CTL) 所辨認之抗原，分析來自 TOMM34 的胜肽 (序列識別號: 42) 以確定是否其為由一般遇到 HLA 對偶基因 (allele) 之 HLA (人類白血球組織抗原)-A2 所限制之抗原決定基 (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994)。衍生自 TOMM34 之 HLA-A2 結合胜肽的候選物，係使用關於其對 HLA-A2 之結合親和力的資訊鑑別。鑑別出以下候選胜肽：

TOMM34-A02-9-30 (序列識別號: 1)

TOMM34-A02-9-77 (序列識別號: 2)

TOMM34-A02-9-52 (序列識別號: 3)

TOMM34-A02-9-110 (序列識別號: 4)

TOMM34-A02-9-220 (序列識別號: 5)

TOMM34-A02-9-230 (序列識別號: 6)

TOMM34-A02-9-103 (序列識別號: 7)

TOMM34-A02-9-80 (序列識別號: 8)

TOMM34-A02-9-255 (序列識別號: 9)

TOMM34-A02-9-23 (序列識別號: 10)

TOMM34-A02-9-195 (序列識別號: 11)

TOMM34-A02-9-111 (序列識別號: 12)
TOMM34-A02-9-238 (序列識別號: 13)
TOMM34-A02-9-1 (序列識別號: 14)
TOMM34-A02-9-113 (序列識別號: 15)
TOMM34-A02-9-253 (序列識別號: 16)
TOMM34-A02-9-239 (序列識別號: 17)
TOMM34-A02-9-144 (序列識別號: 18)
TOMM34-A02-9-142 (序列識別號: 19)
TOMM34-A02-9-279 (序列識別號: 20)
TOMM34-A02-10-143 (序列識別號: 21)
TOMM34-A02-10-97 (序列識別號: 22)
TOMM34-A02-10-79 (序列識別號: 23)
TOMM34-A02-10-237 (序列識別號: 24)
TOMM34-A02-10-135 (序列識別號: 25)
TOMM34-A02-10-219 (序列識別號: 26)
TOMM34-A02-10-238 (序列識別號: 27)
TOMM34-A02-10-127 (序列識別號: 28)
TOMM34-A02-10-113 (序列識別號: 29)
TOMM34-A02-10-241 (序列識別號: 30)
TOMM34-A02-10-30 (序列識別號: 31)
TOMM34-A02-10-220 (序列識別號: 32)
TOMM34-A02-10-195 (序列識別號: 33)
TOMM34-A02-10-112 (序列識別號: 34)
TOMM34-A02-10-194 (序列識別號: 35)

TOMM34-A02-10-299 (序列識別號: 36)

TOMM34-A02-10-141 (序列識別號: 37)

TOMM34-A02-10-160 (序列識別號: 38)

TOMM34-A02-10-175 (序列識別號: 39), 及

TOMM34-A02-10-186 (序列識別號: 40)

再者, 利用經此等胜肽載入過的樹狀細胞(DC)以體外刺激 T-細胞, 藉由以下列各胜肽刺激 DC, 成功地建立了 CTL:

TOMM34-A02-9-30 (序列識別號: 1)

TOMM34-A02-9-220 (序列識別號: 5)

TOMM34-A02-10-30 (序列識別號: 31) 及

TOMM34-A02-10-220 (序列識別號: 32)

此等建立的 CTL 對於經各胜肽脈衝的目標細胞顯示有效的專一性的 CTL 活性。此結果證明 TOMM34 為 CTL 所識別的抗原, 且所測試的胜肽為由 HLA-A2 限制的 TOMM34 的抗原決定基胜肽。

由於該 TOMM34 基因在癌細胞及組織中過度表現, 包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、及軟組織腫瘤, 且未表現於大多數的正常器官, 其係癌症免疫療法的良好標靶。因此本發明提供來自 TOMM34 的 CTL-識別的抗原決定基的九胜肽(由 9 個胺基酸殘基構成的胜肽)及十胜肽(由 10 個胺基酸殘基構成的胜肽)。或者, 本發明提供單離的胜肽, 其結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性

T 淋巴球 (CTL)，其中該胜肽具有選自序列識別號：42 的胺基酸序列或其在免疫學上有活性的片段。具體而言，本發明提供包含選自序列識別號：1、5、31 及 32 的胺基酸序列的胜肽。更具體而言，於一些具體例中，本發明提供具有由選自序列識別號：1、5、31 及 32 的胺基酸序列群組所構成的的胜肽。

一般而言，現在例如在網際網路上已有軟體程式例如 Parker KC *et al.*, J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75 所述者可用於以電腦模擬計算各種胜肽與 HLA 抗原的結合親和性。與 HLA 抗原的結合親和性可例如以於 Parker KC *et al.*, J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75, Kuzushima K *et al.*, Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV *et al.* BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31; 8: 424 及 Buus S *et al.* Tissue antigens., 62:378-84, 2003 敘述者測量。決定結合親和性的方法，敘述於例如 Journal of Immunological Methods(1995, 185: 181-190)及 Protein Science(2000, 9: 1838-1846)。因此，可使用此等軟體程式選擇與 HLA 抗原具有高度結合親和性的衍生自 TOMM34 的片段。因此本發明包含由衍生自 TOMM34 的任意片段構成的胜肽，其係以此種已知程式決定會與 HLA 抗原結合。再者此胜肽可包括由 TOMM34 全長構成的胜肽(序列識別號：42)。

本發明之胜肽，尤其是本發明之九胜肽與十胜肽，可有額外的胺基酸殘基在其側面，只要此胜肽保留其 CTL 誘

導能力即可。該特定的額外的胺基酸殘基，可由任何種類胺基酸構成，只要其不損及原始胜肽的 CTL 誘導能力即可。因此本發明包含針對 HLA 抗原具有結合親和性的胜肽，尤其包括從 TOMM34 衍生的胜肽。此種胜肽例如少於約 40 個胺基酸，時常少於約 20 個胺基酸，經常少於約 15、14、13、12、11 或 10 個胺基酸。

一般而言，已知在胜肽中修飾一個或更多胺基酸不會影響該胜肽的功能，或有時甚至會增強原始蛋白質的所望功能。事實上，經修飾的胜肽(即，藉由取代、刪除、插入或加成一、二或數個胺基酸殘基到原始參考序列的修飾所成的胺基酸序列構成的胜肽)已知會保留原始胜肽的生物學活性(Mark *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。因此，依照本發明一具體例，本發明之具有 CTL 誘導能力的胜肽可由具有選自序列識別號：1、5、31 及 32 中的胺基酸序列構成，其中一、二或更多胺基酸經加成、刪除、插入及/或取代。

該技術領域中具有通常知識者了解對於一胺基酸序列的個別加成、刪除、插入或取代，即改變單一胺基酸或小比例的胺基酸，會保守該原始胺基酸側鏈的性質，因此稱為「保守性取代」或「保守性修飾」，其中改變蛋白質會得到有類似功能的蛋白質。提供類似功能的胺基酸的保守性取代表，在該技術領域中係為人所熟知。胺基酸側鏈的

性質例如疏水性胺基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、疏水性胺基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)，及具有以下共通的官能基或特性的側鏈：脂肪族側鏈(G、A、V、L、I、P)；含羥基的側鏈(S、T、Y)；含硫原子的側鏈(C、M)；含羧酸及醯胺的側鏈(D、N、E、Q)；含鹼的側鏈(R、K、H)；含芳香族基的側鏈(H、F、Y、W)。此外，以下 8 個群組各包含互為保守性取代的胺基酸：

- 1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；
- 2) 天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；
- 3) 天冬醯胺酸(N)、麩醯胺酸(Q)；
- 4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；
- 5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；
- 6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；
- 7) 絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；及
- 8) 半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M)(參見例如 Creighton, Proteins 1984)。

此種經保守性修飾的胜肽也認為是本發明之胜肽。但是本發明之胜肽不限於此，可包括非保守性修飾，只要獲得的經修飾的胜肽保留原始胜肽的 CTL 誘導能力即可。再者，該經修飾的胜肽不應排除可誘導 CTL 胜肽的多型變異體、種間同源體，及 TOMM34 的對偶基因。

可對於本發明之胜肽插入、取代或加成胺基酸殘基，或者，可從本發明之胜肽刪除胺基酸殘基以達到更高結合

親和性。為了保留必要的 CTL 誘導能力，較佳為僅修飾（亦即，刪除、插入、加成或取代）小數目（例如 1、2 或數個）或小比例的胺基酸。在此用語「數個」意指 5 個或更少胺基酸，例如 3 個或更少。欲修飾的胺基酸比例可為 20% 或更少，例 15% 或更少，又更佳為 10% 或更少，例如 1 至 5%。

再者，該胜肽可以由如此的胺基酸殘基取代或加成，以達成較高的結合親和性。當使用於免疫療法時，本發明之胜肽係與 HLA 抗原以複合體形式呈現於細胞或外泌體的表面上。除了天然呈現的胜肽，由於已知結合於 HLA 抗原的序列的規則性（J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307），故可將基於此種規則性的修飾導入到本發明的免疫原性胜肽中。

例如，有高度 HLA-A2 結合親和性的胜肽傾向為 N 末端起算的第 2 個胺基酸取代為白胺酸或甲硫胺酸。同樣地，C 末端取代為纈胺酸或白胺酸的胜肽亦可有利地使用。因此，本發明包括具有選自於序列識別號：1、5、31 及 32 的胺基酸序列的胜肽，其中該序列識別號之胺基酸序列的 N 末端的取代為白胺酸甲硫胺酸，及/或該序列識別號之胺基酸序列的 C 末端取代為纈胺酸或白胺酸。取代不僅可導入末端胺基酸，也可導入胜肽的有潛力的 T 細胞受體（TCR）識別部位。已有數個研究證明具有胺基酸取代的胜肽係與原始者同等或更好，例如 CAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎、Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ 或 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎（Zaremba et al. Cancer Res. 57,

4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002);168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 and S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

本發明也考量加成一、二或數個胺基酸到該胜肽的 N 及 / 或 C 末端。該經修飾的具有高度 HLA 抗原結合親和性的胜肽並保留 CTL 誘導能力者，也包括於本發明。

例如本發明提供長度短於 14、13、12、11 或 10 個胺基酸的單離的胜肽，其結合於 HLA 抗原且具有 CTL 誘導能力，且包含選自以下的胺基酸序列：

- (i) 選自於序列識別號：1 及 5 之胺基酸序列；
- (ii) 一胺基酸序列，其係將選自由序列識別號：1 及 5 的胺基酸序列中 1、2 或數個胺基酸取代，及
- (iii) 如 (ii) 之胺基酸序列，其中，該胺基酸序列具有以下特徵其中之一或兩者：

- (a) 該序列識別號的 N 末端起算第 2 個胺基酸係選自白胺酸及甲硫胺酸；及

- (b) 該序列識別號的 C 末端的胺基酸係選自纈胺酸及白胺酸。

再者，本發明亦提供長度短於 15、14、13、12 或 11 個胺基酸的單離的胜肽，其結合於 HLA 抗原且具有 CTL 誘導能力，且包含選自以下的胺基酸序列：

- (i') 選自於序列識別號：31 及 32 之胺基酸序列；

(ii') 一胺基酸序列，其係將選自由序列識別號：31 及 32 的胺基酸序列中 1、2 或數個胺基酸取代，及

(iii') 如(ii')之胺基酸序列，其中，該胺基酸序列具有以下特徵其中之一或兩者：

(a) 該序列識別號的 N 末端起算第 2 個胺基酸係選自白胺酸及甲硫胺酸；及

(b) 該序列識別號的 C 末端的胺基酸係選自纈胺酸及白胺酸。

當此等胜肽與 APC 接觸時，此等胜肽會在 APC 中與 HLA 抗原結合並以與 HLA 抗原成為複合體的形式呈現在 APC。或者，此等胜肽係導入於 APC，並且於 APC 中加工成由選自(i)-(iii) 及(i')-(iii')構成的胺基酸序列的片段，以與 HLA 抗原成為複合體的形式呈現在 APC 上。結果，誘導出專一於此等胜肽的 CTL。

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

雖然上述對於該 HLA 抗原具有高度結合親和性的胜肽，預期為高度有效，但是依照存在高度結合親和性當做

指標的候選胜肽，仍然進一步要檢驗其是否存在 CTL 誘導能力。在此，用詞「CTL 誘導能力」代表胜肽當呈現在抗原呈現細胞(APC)上時，誘導 CTL 的能力。又，「CTL 誘導能力」包括胜肽誘導 CTL 活化、CTL 增殖、CTL 溶解目標細胞及增加 CTL 生產 IFN-gamma 的能力。

CTL 誘導能力的確認係由以下方式達成：誘導攜帶人類 MHC 抗原的 APC(例如 B-淋巴球、巨噬體、及樹狀細胞(DC))，或更具體而言，由人類周邊血液單核白血球衍生的 DC，以該胜肽刺激後，與 CD8+ 細胞混合，然後測量對抗該目標細胞的 CTL 生產與釋出的 IFN-gamma。反應系可使用已生產為表現人類 HLA 抗原的基因轉殖動物(例如 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auyeung C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal isotope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC(HLA) class II restricted T(H) response)。例如可將目標細胞以 ^{51}Cr 等放射性標定，從該目標細胞釋出的放射性活性計算細胞毒性。或者，可測量於攜帶固定化胜肽的 APC 存在下，CTL 所生產及釋出的 IFN-gamma，並使用抗 IFN-gamma 單株抗體使培養基上的抑制區可見化而檢驗。

如上所述檢驗胜肽的 CTL 誘導能力的結果，發現具有選自由序列識別號：1、5、31 及 32 所示的胺基酸序列的胜肽的九胜肽或十胜肽，顯示特高 CTL 誘導能力及對於 HLA

抗原的結合親和性。因此，此等胜肽為本發明較佳具體例。

再者，同源性分析結果證明此等胜肽與其他任何已知人類基因產物所衍生的胜肽不具顯著同源性。此結果顯示，當使用於免疫療法時，可降低發生未知或不欲的免疫反應的可能性。因此，由此方面此等胜肽對於誘出癌症病患中對抗 TOMM34 的免疫性有用。因此，本發明之胜肽較佳為具有選自由序列識別號：1、5、31 及 32 之胺基酸序列構成的群組的胜肽。

除了上述修飾該胜肽以外，本發明之胜肽可連結於其他胜肽，只要得到的結合胜肽保留必要的原始胜肽的 CTL 誘導能力即可，且更佳為，也保留必要的 HLA 結合。「其他」胜肽包括例如：本發明之胜肽，或由其他 TAA 衍生的 CTL 誘導性胜肽。胜肽的連結子為該技術領域中為人熟知的，例如 AAY(P. M. Daftarian *et al.*, J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK(R. P. M. Sutmuller *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)。

例如可實質上同時使用非 TOMM34 腫瘤關聯性抗原胜肽，以增強經由 HLA 第 I 類及/或第 II 類的免疫反應。早已知癌細胞能表現多於一種腫瘤關聯基因。該技術領域中具有通常知識者在例行實驗中會檢查是否特定個體表現額外的腫瘤關聯基因，然後將衍生自此種基因的表現產物的 HLA 第 I 類及/或 HLA 第 II 類結合胜肽包括於本發明的

TOMM34 組合物或疫苗中。

該技術領域中具通常知識者將知道 HLA 第 I 類及 HLA 第 II 類結合胜肽(例如見 Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995), 且能將其以此處所揭露以同樣方式使用。該技術領域中具通常知識者, 可依照標準的分子生物學程序, 製備包括一或更多 TOMM34 胜肽及一或更多非 TOMM34 胜肽的多胜肽, 或編碼為此多胜肽的核酸。

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。

該胜肽可以直接接合在一起, 或經由使用側面相接的序列以形成多胞型, 且使用多胞型當做疫苗在該技術領域係為人周知(參見例如 Thomson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert *et al.*, Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson *et al.*, J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn *et al.*, J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990)。可製備含有不同數目抗原決定基及組合的多胞型並測試 CTL 的識別性, 並測試在增加免疫反應的效果。

再者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 CTL 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。

例如為了增加多胜肽的體內穩定性，該技術領域中已知導入 D-胺基酸、胺基酸擬似物或非天然胺基酸；此概念也可採用於該多胜肽。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）。

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。例如該方法包括以下步驟：

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。

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

當本發明之胜肽包括半胱胺酸殘基時，該胜肽傾向於

在該半胱胺酸殘基的 SH 基之間經由雙硫鍵而形成二元體。因此，本發明之胜肽之二元體也包含於本發明之胜肽。

III. 製備 TOMM34 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寄主蛋白質及其片段，或其他任意的化學物質。

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。

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) W099/67288; 及

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

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)。例如先製備庇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，並轉形到適當的寄主細胞中。本發明也提供此種載體及寄主細胞。然後將該寄主細胞培養以生產關注的胜肽。該胜肽也可採用體外轉譯系統於體外生產。

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 TOMM34 基因（例如，序列識別號：42(GenBank 存取號 NM_006809)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 通常為甲硫氨酸的唯一密碼子，TGG 通常為色氨酸的唯一密碼子)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。

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。

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。

重組及化學合成技術均可使用於生產本發明之多核苷酸。例如多核苷酸可藉由插到適當載體中而生產，該載體當轉染到勝任細胞內時可表現。或者，多核苷酸可使用 PCR

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

V. 外泌體

本發明更提供胞外的囊泡，稱為外泌體，其會在其表面呈現由本發明之胜肽及 HLA 抗原形成的複合體。外泌體可利用例如使用在日本專利申請案公表號平 11-510507 及在 W099/03499 詳述的方法，使用由需治療及/或預防的病患獲得的 APC 製備。本發明的外泌體可當做疫苗接種，如同本發明之胜肽。

複合體中包括的 HLA 抗原類型必需符合需要治療及/或預防的個體的 HLA 抗原類型。例如於日本族群中，HLA-A2，尤其 HLA-A*0201 及 HLA-A*0206 相當盛行，因此適於治療日本患者。使用在日本及白種人族群中高度表現的 HLA-A2 型對於獲得有效結果為有利，且次型例如 HLA-A*0201 及 HLA-A*0206 為有用。通常，臨床上，會預先對於需要治療的病患調查 HLA 抗原類型，此調查能適當選擇對於此抗原具有高度親和性的胜肽或藉由抗原呈現而具有 CTL 誘導能力的胜肽。再者為了獲得顯示高度結合親和性及 CTL 誘導能力的胜肽，可依據天然發生的 TOMM34 部分胜肽的胺基酸序列實施 1、2 或數個胺基酸取代、刪除、

插入或加成。

當本發明的外泌體具有 HLA-A2 型為 HLA 抗原，包括選自於具有序列識別號：1、5、31 及 32 中的胺基酸序列的胜肽尤其有用。

VI. 抗原呈現細胞 (APC)

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

該 APC 不限於特定種類的細胞。例如包括但不限於樹狀細胞 (DC)、蘭氏 (Langerhans) 細胞、巨噬體、B 細胞及經活化的 T 細胞，此等已知會在表面上呈現蛋白質性抗原，而會被淋巴球所識別。因為 DC 係代表性的 APC，其在 APC 中具有最強的 CTL 誘導活性，故 DC 當成本發明的 APC 有用。

例如本發明之 APC 可藉由從周邊血液單核球誘導 DC，然後使其與本發明之胜肽在體外、生物體外或體內接觸 (刺激) 而獲得。當本發明之胜肽對於該個體投予時，在該個體的體內會誘導呈現本發明之胜肽的 APC。用語「誘導一 APC」，包括以本發明之胜肽接觸 (刺激) 一細胞，或對於一細胞導入編碼為本發明胜肽的多核苷酸以將由 HLA 抗原與本發明之胜肽形成的複合體呈現於細胞表面上。因此，本發明之 APC 可藉由在對該個體投予本發明之胜肽後，從該個體收集 APC 而獲得。或者本發明的 APC 可藉由使從個體

收集到的 APC 與本發明之胜肽接觸而獲得。

本發明之 APC 可以本身對於個體投予以誘導對抗癌症的免疫反應，或與其他包括本發明之胜肽、外泌體或 CTL 組合投予。例如生物體外投予可包括以下步驟：

- a: 從第一個體收集 APC，
- b: 使步驟 a 的 APC 接觸該胜肽，
- c: 對於第二個體投予步驟 b 的 APC。

該第一個體及第二個體可為同一個體或不同個體。由步驟 b 獲得的 APC 可當做疫苗投予以供治療及/或預防癌症，癌症例如包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。

於本發明上下文中，可利用本發明之胜肽製備能誘導抗原呈現細胞的醫藥組合物或藥劑。在此提供製造用於誘導抗原呈現細胞的醫藥組合物或藥劑的方法或處理，較佳為包括將本發明之胜肽與醫藥上可接受的載體混合或配方的步驟。

本發明也提供使用本發明之胜肽於誘導抗原呈現細胞的用途。

依照本發明一態樣，該 APC 具有高水平的 CTL 誘導能力。用語「高水平的 CTL 誘導能力」中，高水平係相關於 APC 與非胜肽或不會誘導 CTL 的胜肽接觸時的水平。此種具有高水平的 CTL 誘導能力的 APC，可由以下方法製備，該方法包括以下步驟：於體外傳遞編碼為本發明之胜肽的

多核苷酸到 APC 及上述方法。該導入基因可為 DNA 或 RNA。導入的方法無特別限制，可使用各種在該領域中實施的習知方法，例如脂染、電穿孔或磷酸鈣法。更具體而言，可依照 Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 國際公開號 2000-509281 的已公開的日文翻譯所述實施。藉由將該基因傳遞到 APC 中，該基因會在細胞中進行轉錄、轉譯等，然後獲得的蛋白質會由 MHC 第 I 類或第 II 類處理，並經一呈現路徑以呈現本發明之該胜肽。

或者，本發明之 APC 可藉由以包括使 APC 接觸本發明胜肽之步驟的方法製備。

於一些具體例，本發明之 APC 會在其表面呈現 HLA-A2 抗原與本發明胜肽的複合體。

VII. 細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)

所誘導的對抗任意本發明之胜肽的 CTL，或會在體內強化以癌細胞為目標的免疫反應，且可類似於該胜肽當做疫苗。因此，本發明提供單離的 CTL，其係由本發明任一胜肽專一性誘導或活化。

此種 CTL 可藉由以下獲得(1)對於一個體投予本發明之胜肽，或(2)使個體衍生的 APC 及 CD8+ 細胞、或周邊血液單核白血球在體外與本發明胜肽接觸(刺激)，或(3)使 CD8+ 細胞或周邊血液單核白血球在體外接觸呈現 HLA 抗原與該胜肽的複合體於其表面的 APC 或外泌體，或(4)導入一多核苷酸/多個多核苷酸，該一多核苷酸/多個多核苷酸

編碼為 T 細胞受體 (TCR) 次單元，其中，由該 TCR 次單元形成的 TCR 能結合於 HLA 抗原與本發明之胜肽於細胞表面形成的複合體。方法 (3) 之此種 APC 或外泌體可藉由上述方法製備，且 (4) 的方法的細節敘述於「VIII. T 細胞受體 (TCR)」項。

本發明之 CTL 可由受治療及 / 或處理的病患獲得，且可以本身對於個體投予以供調節用途，或與其他包括本發明之胜肽、外泌體組合投予。獲得的 CTL 專一性地作用於對抗呈現本發明之胜肽的例如用於誘導的同一胜肽的目標細胞。該目標細胞可為內生性表現 TOMM34 的細胞，例癌細胞或是經轉染該 TOMM34 基因的細胞；又，由於以該胜肽刺激而在其細胞表面呈現本發明之胜肽的細胞，也可當成活化的 CTL 攻擊的目標。

於一些具體例，本發明之 CTL 係識別呈現 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合體於其表面的細胞。於該 CTL 之上下文，用詞「識別一細胞」，係指經由其 TCR 在該細胞表面結合於 HLA-A2 抗原與本發明胜肽的複合體，並顯示對抗該細胞的專一性細胞毒性活性。在此，「專一性細胞毒性活性」，係指對於呈現 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合體的細胞顯示細胞毒性活性而不對其他細胞顯示者。

VIII. T 細胞受體 (TCR)

本發明也提供一種組合物，其包含編碼為多胜肽的一多核苷酸 / 多個多核苷酸，該多胜肽能形成 T 細胞受體 (TCR) 的次單元；並提供使用其之方法。該 TCR 次單元具有形成

TCR 的能力，其對於 T 細胞提供對抗呈現 TOMM34 的腫瘤細胞的專一性。藉由使用該技術領域中的已知方法，可鑑別以一或更多本發明之胜肽誘導的 CTL 的 TCR 次單元的 alpha- 與 beta- 鏈的一多核苷酸 / 多個多核苷酸 (W02007/032255 與 Morgan *et al.*, J Immunol, 171, 3288(2003))。例如分析 TCR 較佳為使用 PCR 法。供分析的 PCR 引子可為例如 5'-R 引子 (5' -gtctaccaggcattcgcttcat-3') 當做 5' 側引子 (序列識別號 : 43) , 及 3-TRa-C 引子 (5' -tcagctggaccacagccgcagcgt-3') , 其係專一於 TCR alpha 鏈 C 區 (序列識別號 : 44) 、 3-TRb-C1 引子 (5' -tcagaaatccttttctcttgac-3') , 其係專一於 TCR beta 鏈 C1 區 (序列識別號 : 45) , 或 3-TRbeta-C2 引子 (5' -ctagcctctggaatccttttctctt-3') , 其係專一於 TCR beta 鏈 C2 區 (序列識別號 : 46) , 當做 3' 側引子 , 但不限於此等。衍生物 TCR 可能以高親和力結合於顯示該 TOMM34 胜肽的目標細胞 , 且視情形媒介體內或體外殺死呈現該 TOMM34 胜肽的目標細胞。

編碼為 TCR 次單元的一多核苷酸 / 多個多核苷酸 (亦即 , 編碼為 TCR 次單元兩者的多核苷酸 , 或編碼為各 TCR 次單元的多核苷酸) 可以包含到適當載體內 , 例如反轉錄病毒載體。此等載體在該技術領域為人所熟知。該核酸或包含該核酸的載體 , 通常可傳送到 T 細胞內 (例 CD8+ T 細胞) , 例如來自病患的 T 細胞。有利地 , 本發明提供一種現

成的組合物，能夠快速修飾病患本身的 T 細胞（或另一哺乳動物的 T 細胞），而快速及簡單產生具有優異的癌細胞殺死性質的經修飾的 T 細胞。

對抗本發明胜肽之該專一性 TCR 為一受體，能專一性識別本發明之胜肽與 HLA 分子的複合體，當 TCR 呈現在 T 細胞表面時，提供 T 細胞對抗目標細胞的專一性活性。藉由導入編碼為此種 TCR 次單元之多核苷酸而製備的 CTL 會專一性識別此種標靶細胞可利用任何已知方法確認。較佳方法包括例如：使用 HLA 分子與本發明之胜肽的 HLA 四聚體染色分析，及 ELISPOT 試驗法。藉由實施 ELISPOT 試驗法，可確認上述方法製備之 CTL 會專一性識別標靶細胞，且由於此種識別而產生的訊號會在胞內傳遞。再者，也可由已知方法確認由上述方法製備的 CTL 對於標靶細胞有專一性的細胞毒性活性。此種方法例如使用表現 HLA-A2 及 TOMM34 兩者的細胞的鉻釋出試驗法。

於一態樣，本發明提供 CTL，其係藉由將編碼為 TCR 次單元的多核苷酸（亦即，編碼為 TCR 次單元兩者的多核苷酸，或編碼為各 TCR 次單元的多核苷酸）進行性狀引入而製備，其中由此種 TCR 次單元形成的 TCR，能結合在其表面於具有選自序列識別號：1、5、31 及 32 之胺基酸序列的 TOMM34 胜肽與 HLA-A2 抗原的複合體者。

該經性狀引入的 CTL 能夠在體內自導引到癌細胞，且能使用周知的培養方法於體外擴展（例如，Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)）。本發明之

CTL，可使用於形成免疫原性組合物，而有用於治療及/或預防需要治療或保護的病患的癌症（W02006/031221）。

IX. 醫藥物質或組合物

因為 TOMM34 表現比起在正常組織，專一性地在癌症中升高，癌症包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤，因此本發明的胜肽或多核苷酸可用於治療及/或預防癌症，及/或防止其術後復發。因此本發明提供一種醫藥藥劑、物質或組合物供治療及/或預防癌症及/或預防其術後復發。因此，本發明提供一種醫藥藥劑或組合物，其配方為治療及/或預防癌症及/或預防其術後復發，此種組合物含有本發明的胜肽或多核苷酸當中一種或更多當做有效成分。或者該胜肽可表現在上述外泌體或細胞例如 APC 的表面上，以供當作醫藥藥劑或組合物。此外，上述以任意本發明之胜肽當做目標的 CTL，也可用於當做該醫藥藥劑或組合物的有效成分。

本發明之醫藥組合物可當做疫苗。本發明中，用詞「疫苗」（也稱為免疫產生性組合物）係指當在動物接種時具有改進、增強及/或誘導抗腫瘤免疫性的功能者。

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

上重要的動物或馴養動物。

於其他具體例，本發明也提供使用有效成分製造供治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或藥劑的用途，該有效成分選自以下：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼為此處揭示的胜肽的核酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；

及

- (d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

或者本發明也提供一種有效成分，用於治療及/或預防癌症或腫瘤，該有效成分選自以下：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼為此處揭示的胜肽的核酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；

及

- (d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

或者本發明更提供製造用於治療或預防癌症或腫瘤的醫藥組合物或藥劑的方法或處理，其中該方法或處理包括將醫藥上或生理上可接受的載體與選自以下的有效成分配方的步驟：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼為此處揭示的胜肽的核酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；

及

(d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

於其他具體例，本發明更提供製造用於治療或預防癌症或腫瘤的醫藥組合物或藥劑的方法或處理，其中該方法或處理包括將有效成分與醫藥上或生理上可接受的載體混合的步驟，其中該有效成分選自以下：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現形式編碼為此處揭示的胜肽的核酸；

(c) 在其表面上呈現本發明之胜肽的 APC 或外泌體；
及

(d) 本發明之細胞毒性 T 細胞。

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

依照本發明，具有選自序列識別號：1、5、31 及 32 之胺基酸序列的胜肽已發現為 HLA-A2 限制抗原決定基胜肽或候選者，其可能誘導有效且專一性的免疫反應。因此包括具有序列識別號：1、5、31 及 32 之胺基酸序列的胜肽的該醫藥藥劑或組合物，尤適於對於 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體投予。同樣適用於包括編碼為此等胜肽中任一者的多核苷酸（即本發明之多核苷酸）的醫藥藥劑或組合物。

本發明之醫藥物質或組合物所治療的癌症包括而不限於涉及 TOMM34（例如過度表現）的任何癌症，包括但不限

於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。

本發明之醫藥藥劑或組合物除了含有上述有效成分，也可含有其他具有誘導對抗癌細胞的 CTL 的能力的胜肽、編碼為該其他胜肽的其他多核苷酸、呈現該其他胜肽的細胞等。在此，該其他具有誘導對抗癌細胞的 CTL 的能力的胜肽，例如癌症專一性抗原(例如，經鑑別的 TAA)，但不限於此等。

視需要，本發明之醫藥藥劑或組合物可視情形包括其他治療物質當作有效成分，只要該物質不會抑制該有效成分的抗腫瘤作用即可，例如該胜肽中任一者。例如，配方可包括抗發炎物質或組合物、止痛劑、化學療劑等。除了在藥劑本身當中的其他治療物質，本發明的藥劑也可依序或同時投予一種或更多其他藥理物質或組合物。藥劑及藥理組合物的量，取決於例如使用的藥理物組合物的形式、欲治的疾病及投予的時程及路徑。

該技術領域中具有通常知識者應瞭解除了此處特別提及的成分以外，本發明之醫藥藥劑或組合物可包括在該技術領域中關於配方形式使用的習知的物質(例如，填料、黏結劑、稀釋劑者)。

本發明之一具體例中，該醫藥藥劑或組合物可包裝在製造品例如套組中，該套組含有治療欲治療的疾病例如癌症的致病情形的有用的物質。製造品可包括附有標記的任

意該醫藥藥劑或組合物的容器。適當的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。該試管可由各種材料製作，例如玻璃或塑膠。容器上的標記必需指示該物質或組合物係用於治療或預防該疾病的一種以上的病況。該標記也可顯示投予指示等。

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

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

(1) 含有該胜肽當做有效成分之醫藥藥劑或組合物

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

本發明之胜肽可組合製備成包括兩種或更多本發明之胜肽，以在體內誘導CTL。該胜肽可為混合(雞尾酒)或利用標準技術彼此接合。例如該胜肽可以化學連結或表現成單一融合的多胜肽序列，以一或數個胺基酸當做連結子(例如

Lysine linker: K. S. Kawamura *et al.* J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715)。該組合中的胜肽可相同或不同。藉由投予本發明之胜肽，該胜肽藉由該HLA抗原在APC以高密度呈現，然後誘導對於由該呈現的胜肽與該HLA抗原形成的複合體為專一性反應的CTL。或者從個體移出APC(例如DC)然後以本發明之胜肽刺激以獲得在其細胞表面呈現本發明之胜肽的APC。此等APC再度對該個體投予以在該個體中誘導CTL，結果可增加對於腫瘤關聯內皮的侵犯。

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

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

於本發明其他具體例，本發明之胜肽也可以於醫藥上可接受的鹽的形式投予。較佳的鹽例如包括與鹼金屬的鹽、與金屬的鹽、與有機鹼的鹽、與有機酸的鹽及與無機酸的鹽。在此使用之用語「醫藥上可接受之鹽」係指保留

該化合物之生物學效力以及性質且可藉由與無機酸或鹼例如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、對甲苯磺酸、水楊酸等反應而獲得之鹽。

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

適當的投予方法可為口服、皮內、真皮下、肌肉內、髓內、腹膜、靜脈內注射等，及全身性投予或對於目標部位的鄰近處局部投予。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。本發明之胜肽的劑量可依照欲治療的疾病、病患年紀、體重、投予方法等適當調整，且通常為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，例如 0.5 mg 至 5 mg，且可數天至數月投予一次。該技術領域中具有通常知識者可適當選擇適合的劑量。

(2) 含有多核苷酸當做有效成分的醫藥藥劑或組合物

本發明之醫藥藥劑或組合物也可以可表現形式包括編碼為在此揭露的胜肽的核酸。在此用詞「於可表現的形式」

意指當多核苷酸導入細胞中時，會在體內表現為誘導抗腫瘤免疫性的多胜肽。於例示的具體例中，關注的多核苷酸的核酸序列包括表現該多核苷酸需要的調節要素。該多核苷酸可裝備為可達到在目標細胞的基因體中穩定插入(參見例如 Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 for a description of homologous recombination cassette vectors。亦參見例如 Wolff *et al.*, *Science* 1990, 247: 1465-8; 美國專利號碼 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; and WO 98/04720), DNA-為主的運送技術包括「裸 DNA」、經促進的(bupivacaine、聚合物、胜肽-媒介的)運送、陽離子性脂質複合體及微粒媒介的(「基因槍」)或壓力媒介的運送(參見例如美國專利號碼 5,922,687)。

本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體表現。表現載體例如減毒病毒寄主，例如牛痘或禽痘。此方法涉及使用牛痘病毒，例如當作載體以表現編碼為該胜肽的核苷酸序列。當導入寄主中時，該重組牛痘病毒會表現該免疫產生性胜肽，且因而引起免疫反應。有用於免疫實驗步驟的牛痘載體與方法敘述於例如美國專利號碼 4,722,848。另一載體為 BCG(Bacille Calmette Guerin)。BCG 載體敘述於 Stover *et al.*, *Nature* 1991, 351: 456-60。其他許多有用於治療性投予或免疫的載體例如腺病毒及腺病毒相關的病毒載體、反轉錄病毒載體、傷寒載體、去毒炭疽毒素載體等。參見例如 Shata *et al.*, *Mol Med Today* 2000, 6:

66-71; Shedlock *et al.*, J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp *et al.*, *In Vivo* 2000, 14: 571-85。

將多核苷酸運送到病患可為直接進行，於此情形使病患直接暴露於攜帶多核苷酸的載體，或間接進行，於此情形先使細胞以關注的多核苷酸於體外轉形，然後將該細胞移植到病患中。此兩種方法各已知為體內及生物體外基因療法。

針對基因治療的方法的一般評論，參見 Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215)。可適用於本發明該技術領域中普通已知的重組 DNA 技術的方法，敘述於 Ausubel *et al.*, in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; 及 Krieger, in Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990。

如同胜肽的投予，多核苷酸的投予方法可為口服、皮內、真皮下、髓內、腹腔的及/或靜脈內注射等，且全身性投予或對於目標部位的鄰近處局部投予係有用。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。於適合載體或經編碼為本發明胜肽的多核苷酸轉形的細胞中的多核苷酸的劑

量可依照欲治療的疾病、病患年紀、體重、投予方法等適當調整，且通常為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，例如，0.5 mg 至 5 mg，且可數天至數月投予一次。該技術領域中具有通常知識者可適當選擇適合的劑量。

X. 使用該胜肽、外泌體、APC 及 CTL 的方法

本發明之胜肽及多核苷酸可用於製備或誘導 APC 及 CTL。本發明之外泌體及 APC 也可用於誘導 CTL。該胜肽、多核苷酸、外泌體及 APC 可與其他任何化合物組合使用，只要該額外的化合物不會抑制 CTL 誘導能力即可。因此任意上述本發明之醫藥藥劑或組合物可用於誘導 CTL。此外，可用於誘導 APC 的包括該胜肽及多核苷酸說明如下。

(1) 誘導抗原呈現細胞(APC)的方法

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

本發明的方法包括使 APC 與本發明之胜肽於體外、生物體外或體內接觸的方法。例如使 APC 與該胜肽在生物體外接觸的方法可包括以下步驟：

a: 從一個體收集 APC，

b: 使步驟 a 的 APC 與該胜肽接觸

該 APC 不限於特定種類的細胞，例子包括但不限於樹狀細胞(DC)、蘭氏(Langerhans)細胞、巨噬體、B 細胞及經活化的 T 細胞，此等已知會在表面上呈現蛋白質性抗原，而會被淋巴球所識別。因為 DC 在 APC 中具有最強的

CTL 誘導活性，故較佳為使用 DC。任何本發明之胜肽本身可使用或與其他本發明的胜肽一起使用。

於另一方面，當本發明之胜肽對一個體投予時，該 APC 係於體內與該胜肽接觸，因此在該個體體內誘導具有高度 CTL 誘導能力的 APC。因此本發明包括對於一個體投予本發明之胜肽。同樣地，當本發明之多核苷酸係以可表現形式對於一個體投予時，本發明之胜肽會在體內表現並與 APC 接觸，因此在該個體體內誘導具有高度 CTL 誘導能力的 APC。因此，替代上述步驟，本發明之方法也可包括對於一個體投予本發明之多核苷酸。「可表現的形式」在上述「IX. 醫藥藥劑或組合物項中(2) 含有多核苷酸當做有效成分的醫藥藥劑或組合物」已有敘述。

或者，本發明之方法可包括將本發明之多核苷酸導入一 APC 以誘導具有 CTL 誘導能力的 APC。例如該方法可包括以下步驟：

a: 從一個體收集 APC，

b: 導入編碼為本發明之胜肽的多核苷酸

步驟 b 可如上述「VI. 抗原呈現細胞」項中所述實施。

或者本發明提供一種製備抗原呈現細胞(APC)的方法，該 APC 專一地誘導對抗 TOMM34 的 CTL 活性，其中該方法可包括以下步驟其中之一：

(a) 使 APC 與本發明之胜肽於體內、生物體外或體內接觸；

(b) 導入編碼為本發明之胜肽的多核苷酸到 APC

中。

或者，本發明提供誘導具有 CTL 誘導能力的 APC 的方法，其中該方法包括選自由以下構成的群組的步驟：

(a) 使 APC 接觸本發明之胜肽，及

(b) 導入編碼為本發明胜肽的多核苷酸至 APC 中。

本發明之方法可於體外、生物體外或體內實施。較佳為，本發明之方法可於體外或生物體外實施。用於誘導具有 CTL 誘導能力之 APC 的 APC，較佳為表現 HLA-A2 抗原之 APC。此種 APC 可藉由該技術領域中周知的技術，從 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體所獲得之周邊血液單核細胞(PBMCs)製備。本發明之方法所誘導之 APC 可為在其表面上呈現本發明之胜肽與 HLA 抗原 (HLA-A2 抗原)之複合體的 APC。當投予本發明之方法所誘導之 APC 到一個體以誘導於該個體中對抗癌症之免疫反應時，該個體較佳為與 APC 的來源為同一者。然而，該個體也可與 APC 捐出者為不同者，只要該個體與 APC 捐出者具有相同 HLA 類型即可。

於另一具體例，本發明提供用於誘導具有 CTL 誘導能力的 APC 的藥劑或組合物，且此種藥劑或組合物包括本發明之胜肽或多核苷酸中 1 或更多種。

於另一具體例，本發明提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽的多核苷酸之用途，其係用於製造藥劑或組合物以供誘導 APC。

或者，本發明更提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽的多核苷酸之用途，係用於誘導具有 CTL 誘導能力之 APC。

(2) 誘導 CTL 的方法

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

本發明也提供使用編碼為多胜肽(即，TCR 次單元)的一多核苷酸/多個多核苷酸誘導 CTL 的方法，該多胜肽能形成識別本發明之胜肽與 HLA 抗原的複合體的 T 細胞受體(TCR)。較佳者，誘導 CTL 的方法包括選自以下步驟至少其中之一：

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

b) 導入編碼為能夠形成識別本發明之胜肽與 HLA 抗原的複合體的 TCR 的多胜肽的一多核苷酸/多個多核苷酸到 CD8+細胞內。

當投予本發明之胜肽、多核苷酸、APC 或外泌體到個體中時，會在該個體體內誘導 CTL，且以該癌細胞為目標的免疫反應強度增強。因此，替代上述步驟，本發明的方法可包括對於一個體投予本發明的胜肽、多核苷酸、APC 或外泌體的步驟。

或者 CTL 也可使用生物體外誘導，於誘導 CTL 後，可使得已活化的 CTL 回到該個體。例如該方法可包括以下步驟：

a: 從一個體收集 APC;

b: 使步驟 a 的 APC 接觸本發明之該胜肽;

c: 共同培養步驟 b 的 APC 及 CD8+ 細胞

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

替代此種 APC，也可使用在其表面呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽的複合體的外泌體。亦即，本發明可包括共同培養在其表面呈現 HLA 抗原與本發明之胜肽的複合體的外泌體的步驟。此種外泌體可藉由上述在「V. 外泌體」項中所述者製備。

再者，CTL 可藉由導入包括編碼為結合於本發明之胜肽之 TCR 次單元的一多核苷酸/多個多核苷酸到 CD8+ 細胞內而誘導，其中由此種 TCR 次單元形成的 TCR 能結合於細胞上的 HLA 抗原與本發明之胜肽的複合體。此種轉換可如上述「VIII. T 細胞受體 (TCR)」項中所述者實施。

本發明之方法可於體外、生物體外或體內實施。較佳者，本發明之方法可於體外或生物體外實施。用於誘導 CTL 的 CD8+ T 細胞可藉由該技術領域周知的方法從個體獲得之 PBMC 製備。於較佳具體例，CD8+ T 細胞的捐出者可為 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體。由本發明之方法誘導的 CTL，可為能識別在其表面呈現本發明胜肽與 HLA 抗原之複合體的細胞者。當本發明方法所誘導之 CTL 對於一個體投予以誘導該個體中對抗癌症之免疫反應時，該個體較佳為與

CD8+ T 細胞之來源為同一個體。但，該個體也可與 CD8+ T 細胞之來源為不同個體，只要該個體與 CD8+ T 細胞之捐出者有相同 HLA 類型即可。

此外，本發明提供一種製造誘導 CTL 的醫藥組合物的方法或處理，其中，該方法包括將本發明胜肽與醫藥上可接受之載體混合或配方之步驟。

於另一具體例，本發明提供用於誘導 CTL 的藥劑或組合物，其中該藥劑或組合物包含本發明之胜肽中 1 或更多種、多核苷酸中 1 或更多種，或 APC 或外泌體中 1 或更多種。

於另一具體例，本發明提供本發明之胜肽、多核苷酸、或 APC 或外泌體之用途，係用於製造配方為誘導 CTL 的藥劑或組合物。

或者，本發明更提供本發明之胜肽、多核苷酸、或 APC 或外泌體之用途，係用於誘導 CTL。

(3) 誘導免疫反應的方法

又，本發明提供誘導對抗關於 TOMM34 的疾病的免疫反應的方法。適當的疾病可包括癌症，例如包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。

本發明之方法可包括投予含有任意本發明之胜肽的藥劑或組合物或編碼為該等的多核苷酸的步驟。或者，本發明之方法也可包括投予呈現任意本發明之胜肽的外泌體或

APC 的步驟。關於細節，參見「IX. 醫藥藥劑或組合物」項，尤其是敘述使用本發明之醫藥物質或組合物當做疫苗的部分。此外，在本發明可採用於誘導免疫反應的外泌體與 APC 詳述於「V. 外泌體」、「VI. 抗原呈現細胞(APC)」及「X. 使用該胜肽、外泌體、APC 及 CTL 的方法」的(1)及(2)。

本發明也提供製造誘導免疫反應的醫藥藥劑或組合物的方法或處理，其中該方法包括混合或配方本發明之胜肽與醫藥上可接受的載體的步驟。

或者本發明之方法可包括投予本發明之疫苗或醫藥組合物之步驟，其包括：

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

本發明上下文中，過度表現 TOMM34 的癌症可利用此等有效成分治療。此種癌症例如包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。因此在投予包括該有效成分的疫苗或醫藥組合物之前，宜確認是否欲治療的生物樣本中的 TOMM34 表現水平比起同器官的正常細胞為增強。因此，於一具體例本發明提供治療表現(過度) TOMM34 的癌症的方法，該方法

可包括以下步驟：

i) 決定患有欲治療的癌症的個體所獲得的細胞或組織中的 TOMM34 表現水平；

ii) 與正常對照組比較 TOMM34 表現水平；

iii) 對於患有比起正常對照組的 TOMM34 過度表現的癌症的個體，投予至少一種選自上述(a)至(d)的成分。

或者本發明也提供包括至少一種選自上述(a)至(d)的成分的疫苗或醫藥組合物，用於對於患有過度表現 TOMM34 的癌症的個體投予。換言之，本發明更提供一種用於鑑別欲以本發明 TOMM34 胜肽治療的個體的方法，該方法包括決定從個體取得的細胞或組織中的 TOMM34 表現水平的步驟，其中該基因比起正常對照組水平的水平增加，代表該個體患有可以用該本發明之 TOMM34 多胜肽治療的癌症。治療本發明癌症的方法，將詳述如下。

可使用任何由個體而來的細胞或組織決定 TOMM34 表現，只要其包括 TOMM34 的目標轉錄或轉譯產物即可。適合的樣本例如包括但不限於體組織及體液，例如血、唾液及尿。較佳者，由個體而來的細胞或組織樣本含有包括上皮細胞的細胞族群，更佳為癌上皮細胞或由懷疑為癌的組織所衍生的上皮細胞。又，視需要可從獲得的體組織及體液純化該細胞然後使用當做個體衍生的樣本。

以本發明治療的個體較佳為哺乳動物。哺乳動物例如包括但不限於例如人、非人類靈長類、小鼠、大鼠、犬、貓、馬及牛。

依照本發明，可決定由一個體獲得的細胞或組織中的 TOMM34 表現水平。該表現水平可於轉錄(核酸)產物層級，使用該技術領域已知的方法決定。例如 TOMM34 的 mRNA 可以藉由雜交法使用探針定量(例如北方雜交法)。該檢測可於晶片上、陣列上等實施。使用陣列對於偵測 TOMM34 的表現水平為較佳。該技術領域中具有通常知識者可利用 TOMM34 的序列資訊製備此種探針。例如可使用 TOMM34 的 cDNA 當做探針。視需要，可將該探針以適合的標記例如染料、螢光物質及同位素標記，且該基因的表現水平可以該雜交的標記的強度檢測。

再者，TOMM34 的轉錄產物，可藉由放大為主的檢測方法(例如 RT-PCR)使用引子定量。此種引子可依照該基因可得的序列資訊製備。

具體而言，將供本發明使用的探針或引子於嚴苛、中度嚴苛或低嚴苛條件下，雜交於 TOMM34 之 mRNA。此處使用的用詞「嚴苛(雜交)條件」係指在此條件下，探針或引子會雜交於其目標序列但不會與其他序列雜交。嚴苛條件為序列依存性，且在不同狀況下會不同。較長序列的特定雜交比起較短的序列會在較高溫觀察到。一般而言，嚴苛條件的溫度係選自比起特定序列在一定義的離子強度及 pH 時的熱熔點(T_m)低約攝氏 5 度的溫度。該 T_m 係指 50% 互補於其目標序列的探針與該目標序列之雜交達到平衡的溫度(於一定義的離子強度、pH 及核酸濃度)。由於該目標序列一般係過量呈現，於 T_m ，50% 的探針會以平衡佔據。通

常嚴苛條件為鹽濃度少於約 1.0 M 鈉離子，通常約 0.01 至 1.0 M 鈉離子（或其他鹽）、pH 7.0 至 8.3，且對於短的探針或引子（例如 10 至 50 個核苷酸），溫度至少約攝氏 30 度，對於較長的探針或引子，至少約攝氏 60 度。嚴苛條件可藉由添加去安定物質例如甲醯胺而達到。

本發明之探針或引子通常為實質上經純化的寡核苷酸。該寡核苷酸通常包括核苷酸序列的一部分，其在嚴苛條件下會雜交於至少約 2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50 或 25 個核苷酸的包括 TOMM34 序列的相連續的有義股核苷酸序列，或包括 TOMM34 序列的核苷酸的反義股核苷酸序列，或此等序列的天然發生的突變。尤其例如於較佳具體例中，可使用長度為 5-50 的寡核苷酸當做放大欲偵測的基因用的引子。更佳者，TOMM34 的基因的 mRNA 或 cDNA 可以利用有特定大小，通常長度為 15-30b 的寡核苷酸探針或引子偵測。該大小之範圍可為至少 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，且探針及引子大小的範圍可為 5-10 個核苷酸，10-15 個核苷酸，15-20 個核苷酸，20-25 個核苷酸，及 25-30 個核苷酸。於較佳具體例中，可從 15-25 選擇寡核苷酸探針或引子的長度。使用此種寡核苷酸探針或引子偵測基因的試驗程序、裝置或試劑為周知（例，寡核苷酸微陣列或 PCR）。於此等試驗中，探針或引子也可包括標籤（tag）或連結子序列。又，可將探針或引子以欲捕捉的可偵測標記或親和性配體修飾。或者於以雜交為

主的偵測程序中，可使用長度為數百（例如約100-200）鹼基至數千（例如約1000-2000）鹼基的多核苷酸當做探針（例如北方墨點分析或cDNA微陣列分析）。

或者可偵測轉譯產物以診斷本發明。例如可決定 TOMM34 蛋白質（序列識別號：42）的量或其免疫學片段的量。決定為轉譯產物的蛋白質量的方法，包括使用專一性識別該蛋白質的抗體的免疫分析方法。該抗體可為單株抗體或多株抗體。再者可使用抗體的任何片段或修飾（例如嵌合抗體、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等）以供偵測，只要該片段或修飾抗體保留對於該 TOMM34 蛋白質的結合能力即可。本發明也提供此種對抗本發明之胜肽的抗體及其片段。製備此種用於偵測蛋白質的抗體的方法在該技術領域中為周知，且可採用任意方法於本發明中以製備此種抗體及其均等物。

就基於轉譯產物偵測 TOMM34 基因的表現水平的另一方法而言，染色強度可使用對抗該 TOMM34 蛋白質的抗體，利用免疫組織化學分析測定。亦即，於該測量中，強染色代表該蛋白質的存在/水平增加，且同時，TOMM34 基因表現水平高。

目標基因例如 TOMM34 基因於癌細胞中的表現水平，若水平比起該目標細胞的對照組水平（例如於正常細胞中的水平細胞）增加例如 10%、25%或 50%；或增加超過 1.1 倍、高於 1.5 倍、高於 2.0 倍、高於 5.0 倍、高於 10.0 倍或更多，則決定為增加。

本發明文中，由已知非癌化的生物學樣本決定的對照水平，稱為「正常對照水平」。另一方面，若該對照水平係從癌化的生物學樣本決定，其稱為「癌化的對照水平」。樣本表現水平與對照水平之間的差異可常態化為對照核酸例如管家基因的表現水平，其表現水平已知不會取決於細胞的癌化或非癌化而不同。對照基因例如包括但不限於 beta-肌動蛋白、甘油醛 3 磷酸去氫酶及核糖體蛋白質 P1。

該對照水平可與癌細胞同時決定，係藉由使用預先從個體收集並保存的樣本實施，該個體的疾病狀態（有罹癌或未罹癌）為已知。此外，從具有欲治療的癌的一器官的非癌化區獲得的細胞可當做正常對照。或者該對照水平可依據先前對於從疾病狀態已知的個體得到的樣本中 TOMM34 基因的表現水平決定的結果分析的統計方法決定。再者，該對照水平可從來自先前測試的細胞的表現樣式的資料庫衍生。又，依照本發明一態樣，於一生物學樣本中的 TOMM34 基因表現水平可以與從多個參考樣本決定的多個對照水平比較。較佳為使用從衍生自與該個體得到的生物學樣本類似的組織類型的參考樣本所決定的對照水平。再者，較佳為使用疾病狀態已知的群體當中的 TOMM34 基因的表現水平的標準值。該標準值可由該技術領域中已知的任意方法獲得。例如，平均值 ± 2 S.D. 或平均值 ± 3 S.D. 的範圍可當作該標準值。

本發明文中，由已知非癌化的生物學樣本決定的對照

水平，稱為「正常對照水平」。另一方面，若該對照水平係從癌化的生物學樣本決定，其稱為「癌化的對照水平」。

當 TOMM34 基因的表現水平比起正常對照水平為增加時，或者相近/均等於癌化對照水平時，該個體可診斷為患有欲治療的癌症。

本發明也提供一種方法，係(i)診斷是否一個體懷疑患有欲治療的癌症及/或(ii)選擇供癌症治療的個體，該方法可包括以下步驟：

a) 決定由懷疑患有欲治療的癌症的個體獲得的細胞或組織中的 TOMM34 表現水平；

b) 比較其 TOMM34 表現水平與正常對照水平；

c) 若 TOMM34 的表現水平比起正常對照水平為增加，則診斷該個體是患有欲治療的癌症；

d) 若步驟 c)中診斷該個體患有欲治療的癌症時，則選擇供癌症治療的個體

或者該方法可包括以下步驟：

a) 決定由懷疑患有欲治療的癌症的個體獲得的細胞或組織樣本中的 TOMM34 表現水平；

b) 比較其 TOMM34 表現水平與癌化對照水平；

c) 若 TOMM34 的表現水平比起癌化對照水平為增加，則診斷該個體是患有欲治療的癌症；

d) 若步驟 c)中診斷該個體患有欲治療的癌症時，則選擇供癌症治療的個體

本發明也提供一種診斷套組，係用於診斷或決定患有

或懷疑患有可利用本發明之 TOMM34 多胜肽治療的癌症的個體，其有用於評估及/或監控癌症免疫療法的效力或適用性。較佳者，該癌症包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。尤其，該套組較佳為可包括偵測個體衍生的細胞中的該 TOMM34 基因的表現的至少一種試劑，該試劑可選自以下群組：

(a) 偵測該 TOMM34 基因之 mRNA 的試劑；

(b) 偵測該 TOMM34 蛋白質或其在免疫學上的片段的試劑；及

(c) 偵測該 TOMM34 蛋白質的生物學活性的試劑。

適合偵測該 TOMM34 基因之 mRNA 的試劑例如可包括專一性結合於該 TOMM34 基因之 mRNA 或鑑別該 TOMM34 基因之 mRNA 的核酸，例如具有互補於該該 TOMM34 基因之 mRNA 的序列的寡核苷酸。此等種類的寡核苷酸例如專一於該 TOMM34 基因之 mRNA 的引子及探針。此等種類的寡核苷酸可依照該技術領域周知的方法製備。視需要，可將偵測該 TOMM34 基因之 mRNA 的試劑固定化在固體基質上。又，該套組中可包括多於一種偵測該 TOMM34 mRNA 的試劑。

另一方面，適合偵測該 TOMM34 蛋白質或其在免疫學上的片段的試劑，例如可包括對於該 TOMM34 蛋白質或其在免疫學上的片段的抗體。該抗體可為單株抗體或多株抗體。再者，可使用抗體的任何片段或修飾（例如嵌合抗體、

scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)當做該試劑，只要該片段或修飾抗體保留對於該 TOMM34 蛋白質或其在免疫學上的片段的結合能力即可。製備此等種類的偵測蛋白質的抗體的方法，在該技術領域為人周知，且可在本發明中採用任意方法以製備此種抗體及其均等物。再者，該抗體可經由直接連結或間接標定技術而以訊號產生分子標記。標記抗體及偵測該抗體結合於其目標的標記及方法，在該技術領域係為人周知，且在本發明可使用任意標記及方法。又，該套組中可包括多於一種偵測該 TOMM34 蛋白質的試劑。

該套組可含有多於一種的上述試劑。該套組可更包括一固體基質；一試劑，該試劑用於將探針結合於對抗 TOMM34 胜肽的 TOMM34 基因或抗體；一介質；及一容器，用於培養細胞；陽性及陰性對照試劑；二次抗體，用於偵測對抗 TOMM34 胜肽的抗體。例如由沒有癌症或患有癌症的個體獲得的組織樣本，可當做有用的對照試劑。本發明的套組從商業及使用者角度，可更包括其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、針筒及有使用指示的包裝插入物(例如紙、錄音帶、CD-ROM 等)。此等試劑保留在有標籤的容器中。適合的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。此等容器可由各種材料形成，例如玻璃或塑膠。

本發明之一具體例中，當該試劑為對抗該 TOMM34 mRNA 的探針時，該試劑可固定化在固體基質上，例如多孔條，以形成至少一個偵測部位。該多孔條的測量或偵測區可包括多個部位，各含有核酸(探針)。試條也可含有供陰性及/

或陽性對照的部位。或者對照部位可位在與試條分開的條片上。視情形，該不同的偵測部位可含有不同量的固定化核酸，亦即在第一偵測部位為較高量，而在接續的部位為較低量。當添加測試樣本時，顯示可偵測訊號的部位的數目提供存在於該樣本中的 TOMM34 mRNA 量的定量指示。該偵測部位可為任何適於偵測的形狀，通常為或跨越試條寬度方向的桿狀或點狀。

本發明的套組可更包含陽性對照樣本或 TOMM34 標準樣本。本發明的陽性對照樣本可藉由收集 TOMM34 陽性樣本，然後分析其 TOMM34 水平而製備。或者可對不表現 TOMM34 的細胞添加純化的 TOMM34 蛋白質或多核苷酸，以形成該陽性樣本或該 TOMM34 標準樣本。本發明中，純化的 TOMM34 可為重組蛋白質。該陽性對照樣本的 TOMM34 水平例如高於截止值。

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

本發明的蛋白質或其部分的蛋白質，包括由至少 8 個，較佳為 15 個，更佳為 20 個本發明蛋白質的胺基酸序列中的連續的胺基酸構成的多胜肽。癌症可藉由偵測使用本發明的蛋白質或胜肽(多胜肽)偵測樣本(例如血液、組織)中的抗體而診斷。該製備本發明蛋白質及胜肽的方法敘述如下。

本發明之診斷癌症的方法，如上所述，可藉由決定抗

TOMM34 抗體與對應的對照樣本中的量的差異而實施。若該個體的生物樣本含有對抗該基因的表現產物(TOMM34)的抗體且該抗 TOMM34 抗體的量據決定為其水平比起正常對照的截止值為高，則懷疑該個體患有癌症。

於其他具體例，本發明的診斷套組可包括本發明之胜肽及與其結合的 HLA 分子。用於使用抗原性胜肽與 HLA 分子偵測抗原專一性 CTL 的方法已經建立(例如 Altman JD *et al.*, Science. 1996, 274(5284): 94-6)。因此可使用本發明之胜肽與該 HLA 分子的複合體在偵測方法以偵測腫瘤抗原專一性 CTL，從而能早期偵測到癌症、其再發及/或轉移。又，其可採用於選擇能適用包括本發明之胜肽當做有效成分的醫藥的個體，或評估該醫藥的治療效果。

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

本發明更提供使用在此敘述的胜肽抗原決定基評估個體中的免疫反應用的方法或診斷藥劑。於本發明一具體例中，可使用在此敘述的 HLA-A2 限制胜肽當做評估或預測個體中的免疫反應的試劑。欲評估的免疫反應可藉由使免疫原與免疫勝任細胞於體外或體內接觸而誘導。於較佳具體例中，用於評估免疫反應的免疫勝任細胞可從周邊血液、周邊血液淋巴球(PBL)及周邊血液單核球(PBMC)中選擇。用

於收集或單離此種免疫勝任細胞的方法為該技術領域中周知。於有些具體例，可採用能產生識別及結合於該胜肽抗原決定基的抗原專一性 CTL 的任意物質或組合物當作該試劑。該胜肽試劑不一定要用為免疫原。用於此種分析的分析系統包括相當先進的技術發展，例如四聚體、用於染色胞內淋巴激素及干擾素釋放分析法，或 ELISPOT 分析法。於一較佳具體例中，與胜肽試劑接觸的免疫勝任細胞，可為包括樹狀細胞的抗原呈現細胞。

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

將結合於 HLA 分子的胜肽於存在對應的 HLA 重鏈及 beta 2-微球蛋白下重新折疊以產生三分子複合體。於該複合體中，重鏈的羧基端係以生物素醯化於先前加工到蛋白質中的部位。然後添加鏈黴親和素(streptavidin)到該複合體以形成由該三分子複合體與鏈黴親和素構成的四聚體。利用螢光標定的鏈黴親和素，該四聚體可用於將抗原專一性細胞染色。然後可將該細胞利用例如流式細胞儀鑑別。此種分析可用於診斷及預後用途。由此程序鑑別的細

胞也可用於治療用途。

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

該胜肽也可當做評估疫苗效力的試劑。從以免疫原接種疫苗的病患獲得的 PBMC 可使用例如以上其中之一所述的方法分析。係分析病患的 HLA, 並選定識別該病患中存在的對偶基因專一性分子的胜肽抗原決定基試劑用於分析。該疫苗的免疫產生性可利用在 PBMC 樣本中存在抗原決定基專一性 CTL 而指示。

本發明的胜肽也可用於使用該技術領域周知的技術製作抗體(參見例如 CURRENTPROTOCOLSINIMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; and Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 其可用於當做診斷或監控癌症的試劑。此種抗體可包括識別在 HLA 分子脈絡下的胜肽, 亦即結合於胜肽-MHC 複合體的抗體。

本發明之胜肽及組合物有一些額外的用途, 有些在此敘述。比如, 本發明提供診斷或偵測病症的方法, 該病症

的特徵為表現或呈現 TOMM34 免疫產生性多胜肽。此等方法包括以下步驟：決定在生物學樣本中，本發明之胜肽，或本發明之胜肽與 HLA 第 I 類分子的複合體的表現水平。胜肽或胜肽與 HLA 第 I 類分子的複合體的表現，可利用分析該胜肽或複合體的結合夥伴而決定或偵測。於一較佳具體例，該胜肽或複合體的結合夥伴可為識別及專一性結合於該胜肽或該複合體的抗體。生物學樣本例如腫瘤切片中的 TOMM34 表現，也可使用 TOMM34 引子利用標準 PCR 放大實驗步驟決定。在此敘述腫瘤表現之一例，進一步條件及 TOMM34 放大用引子的揭示可見 W02003/27322。

較佳者，該診斷方法涉及使從一個體單離的生物學樣本與對於本發明之胜肽專一的藥劑接觸，以偵測在該生物學樣本中之本發明之胜肽。此處使用的「接觸」，係指將該生物學樣本放置於充分接近該藥劑及於適當條件例如濃度、溫度、時間、離子強度下，使該藥劑與生物學樣本中存在的本發明之胜肽能專一的交互作用。一般而言，使藥劑與生物學樣本接觸的條件，為該技術領域中具通常知識者所知促進分子及其在生物學樣本中的同源物（例如蛋白質與其受體、抗體及其蛋白質抗原、核酸與其互補股）間的專一性交互作用。促進分子及其同源物間的專一性交互作用的最適條件，敘述於 Low 等人的美國專利號 5,108,921。

本發明的診斷方法可在體內及體外其中之一或兩者實施。因此本發明中，生物學樣本可位在體內或體外。例如該生物學樣本可為體內的組織，且可使用專一於該 TOMM34

免疫產生性多胜肽的藥劑偵測組織中的該種分子的存在。或者可收集該生物學樣本或在體外單離(例如血液樣本、腫瘤切片、組織萃取物)。於較佳具體例中，該生物學樣本可為含細胞樣本，更佳為含有從欲診斷或治療的個體收集的腫瘤細胞的樣本。

或者診斷可藉由以螢光素標定的 HLA 多聚複合體能直接定量抗原專一性 T 細胞的方法實施(例如 Altman, J. D. *et al.*, 1996, Science 274 : 94; Altman, J. D. *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 10330)。也已有提供染色胞內淋巴激素、及干擾素-gamma 釋出分析法或 ELISPOT 分析法。多聚體染色、胞內淋巴激素染色及 ELISPOT 分析法均比習知分析法有至少 10 倍以上的靈敏度(Murali-Krishna, K. *et al.*, 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. *et al.*, 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. *et al.*, 1998, Curr. Biol. 8: 413)。也可使用五聚體(例如 US 2004-209295A)、dextramer(例如 WO 02/072631)及 streptamer (例如 Nature medicine 6. 631-637(2002))。

例如，有些具體例中，本發明提供診斷及評估已投予至少一種本發明之 TOMM34 胜肽於個體中的免疫反應的方法，該方法包括以下步驟：

- (a) 使免疫原與免疫勝任細胞在適於誘導專一於該免疫原的 CTL 的條件下接觸；
- (b) 偵測或決定步驟(a)誘導的 CTL 的誘導水平；

(c) 使該個體的免疫反應與 CTL 誘導水平產生相關。

本發明中，該免疫原為以下至少其中之一(a) 例如具有選自序列識別號：1、5、31 及 32 的胺基酸序列的 TOMM34 胜肽、其修飾胜肽(具有此種胺基酸序列)，及具有此胺基酸序列之胜肽且其中有 1、2 或更多胺基酸取代的修飾。目前，適於誘導免疫原專一性 CTL 的條件在該技術領域中為人周知。例如可將免疫勝任細胞於體外於存在免疫原的狀態培養以誘導免疫原專一性 CTL。為了誘導免疫原專一性 CTL，可對該細胞培養物添加任何刺激。因此例如 IL-2 為對 CTL 誘導用的較佳的刺激因子。於有些具體例，監控或評估欲以胜肽癌症療法治療的個體的免疫反應的步驟，可在治療前、期間及/或後實施。一般而言，癌症治療的實驗步驟，係對於欲治療的個體重複投予免疫產生性胜肽。例如可每週投予免疫產生性胜肽持續 3-10 週。因此該個體的免疫反應可在癌症治療實驗步驟期間受評估或監控。或評估或監控對於癌症治療的免疫反應的步驟可於治療步驟完成後實施。依照本發明，比起對照組有免疫原誘導性 CTL 的誘導增強，代表欲評估或診斷的個體對於已投予的免疫原在免疫上有反應。評估該免疫反應的適合對照可包括例如：當該免疫勝任細胞與非胜肽接觸時的 CTL 誘導水平，或具有任何 TOMM34 胜肽以外的胺基酸序列的對照胜肽(例如，隨機胺基酸序列)。於一較佳具體例中，該個體的免疫反應係藉由比較對於該個體投予的各免疫原間的免疫反應，以序列專一性方式評估。尤其，即便一些種類的 TOMM34

胜肽的混合物對於該個體投予，免疫反應仍取決於該胜肽而不同。於此情形，藉由比較各胜肽之間的免疫反應，可鑑別個體顯示較高反應的胜肽。

XI. 抗體

本發明更提供結合於本發明之胜肽的抗體。較佳的抗體係專一性結合於本發明之胜肽的抗體且不會(或微弱結合於)非本發明之胜肽。或者結合於本發明的胜肽的抗體，以及其同系物。

對抗本發明胜肽的抗體於癌症診斷及預後分析法、及造影方法中 useful。同樣地，此種抗體在其他癌症治療、診斷及/或預後方面有用，只要 TOMM34 在癌症病患中也有表現或過度表現。又，細胞內表現的抗體(例如單鏈抗體)在治療上用於治療涉及 TOMM34 表現的癌症為有用，癌症包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。。

本發明也提供偵測及/或定量包括本發明胜肽之 TOMM34 蛋白質(序列識別號: 42)或其片段的各種免疫分析法。此種分析法可包括一種或更多抗 TOMM34 抗體，其能適當識別及結合於 TOMM34 蛋白質或片段。本發明中，結合於 TOMM34 多胜肽的抗-TOMM34 抗體較佳為識別本發明之胜肽者。抗體的結合專一性，可利用抑制試驗確認。即，當欲分析的抗體與全長 TOMM34 多胜肽間的結合在存在本發明之胜肽時受抑制，則表示該抗體專一性地結合於該片

段。本發明中，此種免疫分析法係以該技術領域中周知的各種免疫分析法格式實施，包括但不限於各種放射免疫分析法、免疫層析技術、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素連結免疫螢光分析法(ELIFA)等。

相關的本發明的免疫學但非抗體分析法可包括 T 細胞免疫產生性分析法(抑制性或刺激性)，及 MHC 結合分析法。此外，本發明也提供能偵測表現 TOMM34 的癌症的免疫造影法，包括但不限於使用本發明經標記抗體的放射閃爍攝影造影法。此種分析法在臨床上於偵測、監控及預測 TOMM34 表現的癌症為有用，癌症包括但不限於 AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。

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

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

依照本發明，當做免疫抗原的該胜肽，可為完整蛋白質或該蛋白質的部分胜肽。部分胜肽可包括例如本發明胜

肽的胺基(N)末端或羧基(C)末端片段。

在此，抗體定義為與 TOMM34 胜肽的全長或片段反應的蛋白質。於一較佳具體例，本發明抗體可識別具有選自序列識別號：1、5、31 及 32 之胺基酸序列的 TOMM34 片段胜肽。用於合成寡胜肽的方法在該技術領域為周知。合成後，在使用為免疫原之前可視情形將胜肽純化。本發明中，該寡胜肽（例如 9-或 10mer）可以與載體接合或連結以增進免疫產生性。鑰孔血藍蛋白（Keyhole-limpet hemocyanin，KLH）為周知的載體。結合 KLH 與胜肽的方法，也是該技術領域中周知的。

或者可將編碼為本發明胜肽或其片段的基因插入已知的表現載體，然後用於轉形在此敘述的寄主細胞。可從該寄主細胞的外面或裡面以標準方法回收所望的胜肽或其片段，且接著可當做抗原。或者可將表現該胜肽的整個細胞或其溶解物或化學合成的胜肽當做抗原。

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

以抗原免疫動物的方法為該技術領域中已知。腹膜內注射或皮下注射抗原為免疫動物的標準方法。具體而言，可將抗原稀釋及懸浮於適當量的磷酸鹽緩衝鹽液（PBS）、生

理鹽液等。視所望，可將抗原懸浮液與適量的標準佐劑混合，標準佐劑例如 Freund 完全佐劑，而形成乳劑後對於哺乳動物投予。較佳者，每 4 至 21 天數次投予與適量 Freund 不完全佐劑混合的抗原。適當的載體也可用於進行免疫。如上免疫進行後，可藉由標準方法檢驗血清中所望抗體量的增加。

對抗本發明胜肽的多株抗體可藉由從檢查血清中所望抗體增加的受免疫哺乳動物收集血液，並從血液以習知方法分離血清而製備。多株抗體包括含有該多株抗體的血清且可從該血清分離含有該多株抗體的級分。免疫球蛋白 G 或 M 可使用偶聯於本發明胜肽的親和管柱，再使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱純化該級分，而製備僅識別本發明胜肽的級分。

為了製備單株抗體，從以該抗原免疫的哺乳動物收集免疫細胞，並如上述檢查血清中所望抗體的水平是否增加，之後進行細胞融合。用於細胞融合的免疫細胞較佳為從脾臟取得。其他較佳的與上述免疫細胞融合的母細胞，包括例如哺乳動物的骨髓瘤細胞，更佳為具有以藥物選擇融合細胞的所需性質的骨髓瘤細胞。

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

由細胞融合得到的融合瘤可藉由將其在標準選擇培養基例如 HAT 培養基(含次黃嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶的

培養基)中培養而選擇。通常該細胞培養物係在該 HAT 培養基中繼續培養數天至數週，時間足以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。

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

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

或者可將免疫細胞例如經免疫的淋巴球、生產抗體利用致癌基因使不死化並用於製備單株抗體。

獲得的單株抗體也可使用遺傳工程技術以重組方式製備(參見例如 Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, 於英國由 MacMillan Publishers LTD(1990)出版)。例如可從免疫細胞例如融合瘤或經免疫的生產該抗體的淋巴球選擇編碼為抗體的 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。

再者本發明抗體可為抗體片段或經修飾的抗體，只要其結合於一個或更多本發明的胜肽即可。例如，該抗體片段可為 Fab、F(ab')₂、Fv 或單鏈 Fv(scFv)，其中來自 H 及 L 鏈的 Fv 片段以適當連結子連接(Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83(1988))。具體而言，可利用以酵素例如木瓜酵素或胃蛋白酶處理抗體而產生抗體片段。或者可構建編碼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: 2968-76(1994); Better 與 Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515(1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63(1986); Rousseaux *et al.*, Methods Enzymol 121: 663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7(1991))。

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

或者本發明抗體可為：來自非人類抗體的可變區與來自人類抗體的不變區的嵌合抗體，或人類化抗體，其包括來自非人類抗體的互補決定區(CDR)、框架區(FR)及來自人類抗體的不變區。此種抗體可依照已知技術製備。人類化可藉由取代啮齒類 CDR 或 CDR 序列為人類抗體的對應序列而實施(參見例如 Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536(1988))。因此此種人類化抗體為嵌合抗

體，其中實質上少於完整的人類可變微域已取代成來自非人類種的對應序列。

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

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

親和以外的層析，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。

例如可使用測量吸光度、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素免疫分析法(EIA)、放射免疫分析法(RIA) 及/或免疫螢光以測量本發明抗體的抗原結合活性。ELISA 中，係將本發明抗體固定化在一平板上，塗佈本發明胜肽於該平板，然後塗佈含有所望抗體的樣本，例如抗體產生細胞的培養上清或純化的抗體。然後，將識別該初級抗體的二次抗體以酵素例如鹼性磷酸酶標記，然後溫育該平板。清洗後，添加酵素受質例如對硝基苯基磷酸酯到該平板，測量吸光度以評估該樣本的抗原結合活性。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。

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。

由於偵測或測量本發明胜肽的方法能夠專一性偵測或測量一胜肽，故該方法有用於使用該胜肽的許多實驗中。

XII. 載體與寄主細胞

本發明也提供導入有編碼為本發明胜肽的核苷酸的載體與寄主細胞。本發明的載體在攜帶核苷酸尤其是本發明 DNA 到寄主細胞以表現本發明之胜肽，或投予本發明核苷

酸供基因治療為有用。

當寄主細胞為 *E. coli* 且載體在 *E. coli* (例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1Blue) 中大量放大及生產時，該載體應具有欲在 *E. coli* 中放大的「ori」以及用於選擇經轉形的 *E. coli* 的標誌基因(例如由安皮西林、四環黴素、嘉那黴素、氯黴素等藥物選擇的抗藥性基因)。例如，可使用 M13 系列載體、pUC 系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。此外，也可使用 pGEM-T、pDIRECT 及 pT7 次選殖及萃取 cDNA 及上述載體。當使用載體產生本發明蛋白質時，表現載體為有用。例如欲在 *E. coli* 中表現的載體應具有上述欲在 *E. coli* 中放大需要的特性。當使用 *E. coli* 例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1 Blue 當做寄主細胞，該載體應具有啟動子例如 lacZ 啟動子(Ward *et al.*, Nature 341: 544-6(1989); FASEB J 6: 2422-7(1992))、araB 啟動子(Better *et al.*, Science 240: 1041-3(1988))、T7 啟動子等。其能有效率地在 *E. coli* 中表現所望的基因。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，該載體也可含有訊號序列以供胜肽分泌。引導該胜肽分泌到 *E. coli* 胞間質的訊號序列之例，為 pelB 訊號序列(Lei *et al.*, J Bacteriol 169: 4379(1987))。將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。

除了 *E. coli*，例如可使用來自哺乳動物的表現載體（例如 pcDNA3(Invitrogen) 及 pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17): 5322(1990))、pEF、pCDM8)、來自昆蟲細胞的表現載體（例如「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、來自植物的表現載體（例如 pMH1、pMH2)、來自動物組織的表現載體（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。

為了於動物細胞例如 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啟動子例如 SV40 啟動子(Mulligan *et al.*, Nature 277: 108(1979))、MMLV-LTR 啟動子、EF1 alpha 啟動子(Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res 18: 5322(1990))、CMV 啟動子等，較佳為具有用於選擇轉形體的標記基因（例如由藥物（例如新黴素、G418)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。

雖可使用類似或等同於在此所述之方法及材料以實施或測試本發明，將敘述適當的方法及材料。所有在此提及的出版品、專利申請案、專利及其他參考文獻，完整納入於此當做參照。有抵觸時，依本說明書，包括定義。此外，

材料、方法及實施例係供理解並非意欲用於限制。

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

[實施例]

材料與方法

細胞株

T2、HLA-A*0201-B-類淋巴母細胞株、COS7、非洲綠猴腎細胞株，係從ATCC購買。

從 *TOMM34* 衍生的胜肽的候選者選擇

使用結合預測軟體「BIMAS」(www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker *et al.* (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima *et al.* (Blood 2001, 98(6): 1872-81)) 預測結合於HLA-A*0201分子的衍生自 *TOMM34* 的 9-mer 及 10-mer 胜肽。此等胜肽係依照標準固相合成法以生物合成 (Lewisville, Texas)，並經反相高效能液體層析 (HPLC) 純化。該胜肽的純度 (>90%) 及同一性係分別利用分析性 HPLC 及質量分光分析確認。將胜肽溶於二甲基亞砷 (DMSO) 使濃度為 20 mg/ml 並保存在攝氏 -80 度。

體外 CTL 誘導

使用單核球衍生的樹狀細胞 (DC) 當做抗原呈現細胞 (APC) 以誘導對抗呈現於人類白血球抗原 (HLA) 上的胜肽的細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 反應。DC 係於體外以另外敘述的

方法產生(Nakahara S *et al.*, Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。具體而言，從正常的自願者(HLA-A*0201陽性)利用 Ficoll-Plaque 溶液(Pharmacia)單離周邊血液單核細胞(PBMC)，以黏附於塑膠組織培養皿(Becton Dickinson)而分離，以將其富化成單核球級分。將該單核球富化的群體於存在 1,000 U/ml 的顆粒球-巨噬體群落-刺激因子(GM-CSF)(R&D System) 及 1,000 U/ml 介白質(IL)-4(R&D System) 下，於含 2% 熱失活的自體血清(AS)的 AIM-V 培養基(Invitrogen)中培養。培養 7 天後，將細胞激素誘導的 DC 於存在 3 micro-g/ml 的 beta 2-微球蛋白下，以合成胜肽各 20 micro-g/ml 於 AIM-V 培養基中於攝氏 37 度脈衝 3 小時。該產生的細胞於其表面上會表現 DC 相關分子，例如 CD80、CD83、CD86 與 HLA 第 II 類(資料未顯示)。然後將此等經胜肽脈衝的 DC 以 X-照射(20 Gy)使失活，並以 1:20 比例與由以 CD8+ Isolation Kit(Dynal)陽性選擇獲得的自體 CD8+ T 細胞混合。將該等培養基安置於 48 井盤(Corning); 各井於 0.5 ml AIM-V/2% AS 培養基中含有 1.5×10^4 胜肽脈衝 DC、 3×10^5 CD8+ T 細胞及 10 ng/ml IL-7(R&D System)。3 天後，對此等培養物補充 IL-2(CHIRON)成最終濃度為 20 IU/ml。第 7 天及第 14 天，再將該 T 細胞以自體胜肽脈衝過的 DC 刺激。該 DC 係每次依照上述同樣方法製備。於第 21 天，在第 3 回合的胜肽刺激後，測試對抗胜肽脈衝過的 T2 細胞的 CTL(Tanaka H *et al.*, Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano

Y *et al.*, Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N *et al.*, Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T *et al.*, Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T *et al.*, Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

CTL 擴張程序

使用類似於 Riddell 等人所述方法在培養中擴張 CTL(Walter EA *et al.*, N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR *et al.*, Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23)。將總共 5×10^4 CTL 與 2 種人類 B-類淋巴母細胞株懸浮於 25 ml AIM-V/5% AS 培養基，於存在 40 ng/ml 抗 CD3 單株抗體(PharMingen)下以 Mitomycin C 去活。開始培養 1 天後，對培養物添加 120 IU/ml IL-2。於第 5、8 及 11 天對該培養物饋加新鮮的含 30 IU/ml IL-2 的 AIM-V/5% AS 培養基 (Tanaka H *et al.*, Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y *et al.*, Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N *et al.*, Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T *et al.*, Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T *et al.*, Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

建立 CTL 選殖體

在 96 圓底微滴定盤(Nalge Nunc International)中，稀釋成有 0.3、1 及 3 CTL/井。將 CTL 與 1×10^4 細胞/井的 2 種人類 B-類母淋巴球細胞株、30ng/ml 抗 CD3 抗體及

125 U/ml IL-2 於總共 150 micro-l/井的含 5%ASAIM-V 培養基中培養。10 天後對該培養基加入 50 micro-l /井 IL-2，以達最終濃度 125 U/ml IL-2。於第 14 天測試 CTL 活性，如上述同樣方法將 CTL 選殖體擴張(Uchida *et al.*, Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T *et al.*, Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T *et al.*, Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

專一性 CTL 活性

為了檢查專一性 CTL 活性，實施干擾素 (IFN)-gamma 酵素連結免疫墨點 (ELISPOT) 分析法及 IFN-gamma 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)。具體而言，製備胜肽-脈衝的 T2 (1×10^4 細胞 / well) 當做刺激細胞。於 48 井培養的細胞當做回應細胞。IFN-gamma ELISPOT 分析法及 IFN-gamma ELISA 分析法係依製造商流程實施。

建立強力表現目標基因與 HLA-A02 其中之一或兩者的細胞

將編碼為目標基因或 HLA-A*0201 的的開放讀取框的 cDNA 以 PCR 放大。將 PCR 放大過的產物選殖到表現載體。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照製造商建議的程序將該質體轉染到 COS7 中，COS7 為目標基因及 HLA-A*0201- 欠缺細胞株。轉染後 2 天，以 versene (Invitrogen) 收獲經轉染的細胞，並當成目標細胞 (5×10^4 細胞 / well) 供 CTL 活性分析。

結果 1

於癌症中增強的 TOMM34 表現

從各種癌症使用 cDNA 微陣列得到的全基因表現概況資料顯示 TOMM34 (GenBank 存取號 NM_006809; 例如序列識別號: 42) 表現提高。TOMM34 表現在 28 例 AML 中有 4 例、14 例 CML 中有 4 例、11 例膀胱癌有 8 例、4 例乳癌有 1 例、5 例子宮頸癌有 1 例、12 例大腸直腸癌有 2 例、17 例食道癌有 5 例、6 例肝癌中有 6 例、10 例骨肉瘤中有 1 例、26 例前列腺癌有 1 例、19 例腎癌有 1 例、14 例 SCLC 有 2 例、20 例 NSCLC 有 5 例，及 51 例軟組織腫瘤有 10 例，比起對應的正常組織有效地提高(表 1)。

[表 1] 比起正常的對應組織，於癌化組織中觀察到的 TOMM34 上調的案例比例

癌症	比例
AML	4/28
CML	4/14
膀胱癌	8/11
乳癌	1/4
子宮頸癌	1/5
大腸直腸癌	12/12
食道癌	5/17
肝癌	6/6
骨肉瘤	1/10
前列腺癌	1/26
腎癌	1/19
SCLC	2/14
NSCLC	5/20
軟組織腫瘤	10/51

結果 2

預測衍生自 TOMM34 的 HLA-A02 結合胜肽

表 2a 與 2b 顯示依照高親和性排列的該 HLA-A02 結合的 9mer 及 10mer 的 TOMM34 的胜肽。總共選出有 HLA-A02 結合潛力的 40 個胜肽，並檢查以決定該抗原決定基胜肽。

表 2a 衍生自 TOMM34 的 HLA-A02 結合 9mer 胜肽

起始位置	胺基酸序列	分數	序列識別號
30	ALYGRALRV	222.566	1
77	ALALVPFSI	60.51	2
52	VLYSNRAAC	27.026	3
110	TVLQIDDNV	11.034	4
220	LLCSNLESA	9.518	5
230	YSNRALCYL	8.115	6
103	MAYVDYKTV	7.883	7
80	LVPFSIKPL	7.309	8
255	KLDGKNVKA	6.955	9
23	GQYAEASAL	6.931	10
195	VLKEEGNEL	5.211	11
111	VLQIDDNVT	5.194	12
238	LVLKQYTEA	4.101	13
1	MAPKFPDSV	3.058	14
113	QIDDNVTSA	2.577	15
253	ALKLDGKNV	2.434	16
239	VLKQYTEAV	2.028	17
144	LPSIPLVPV	1.775	18
142	LKLPSIPLV	1.398	19
279	SSFADISNL	1.187	20

表 2b 衍生自 TOMM34 的 HLA-A02 結合 10mer 胜肽

起始位置	胺基酸序列	分數	序列識別號
143	KLPSiPLVPV	559.894	21
97	ALEKyPMAYV	56.309	22
79	ALVPfSIKPL	49.134	23
237	YLVlkQYTEA	34.279	24
135	SLGPeWRLKL	21.362	25
219	SLLCsNLESA	20.716	26
238	LVLKqYTEAV	18.757	27
127	RMTRaLMDSL	17.388	28
113	QIDDnVTSaV	15.684	29
241	KQYTeAVKDC	12.975	30
30	ALYGrALRVL	12.893	31
220	LLCSnLESAT	12.668	32
195	VLKEeGNELV	8.314	33
112	LQIDdNVTSA	8.075	34
194	RVLKeEGNEL	6.916	35
299	KLRQeVKQNL	5.682	36
141	RLKLpSIPLV	5.599	37
160	SLPSeNHKEM	4.968	38
175	KETTATKNRV	4.733	39
186	SAGDvEKARV	3.961	40

起始位置代表從 TOMM34 的 N 末端起算的胺基酸殘基數
結合分數係衍生自「BIMAS」

以預測的來自 TOMM34 的經 HLA-A*0201 限制的胜肽誘導 CTL

針對衍生自 TOMM34 的胜肽的 CTL，係依照如「材料與方法」敘述的實驗步驟獲得。胜肽專一性 CTL 活性，係以 IFN-gamma ELISPOT 分析法決定(圖 1a-d)。以下井編號證

明比起控制組井為有效的 IFN-gamma 生產：以 TOMM34-A02-9-30（序列識別號：1）刺激的井號碼#4（a）、以 TOMM34-A02-9-220（序列識別號：5）刺激的井號碼#2（b）、以 TOMM34-A02-10-30（序列識別號：31）刺激的井號碼#4（c），及以 TOMM34-A02-10-220（序列識別號：32）刺激的井號碼#2（d）。另一方面，由表 2a 及 2b 中的其他胜肽刺激未偵測到專一性的 CTL 活性，即使此等胜肽與 HLA-A*0201 可能有結合活性。當做負面數據的典型案例，以 TOMM34-A02-10-143（序列識別號：21）（e）刺激的 CTL 未觀察到專一性的 IFN-gamma 生產。結果顯示，從 TOMM34 衍生的 4 個胜肽被選為能誘導有效 CTL 的胜肽。

建立對抗 TOMM34 衍生胜肽的 CTL 細胞株及選殖體

將由 IFN-gamma ELISPOT 分析法在以 TOMM34-A02-9-30（序列識別號：1）刺激的井號碼#4 偵測到胜肽專一性 CTL 活性者擴張，並利用上述「材料與方法」項所述擴張程序建立 CTL 細胞株。此等 CTL 細胞株的 CTL 活性，以 IFN-gamma ELISA 分析法決定（圖 2a）。該等 CTL 細胞株證明比起未有胜肽脈衝的目標細胞，有對抗以對應胜肽脈衝的目標細胞的有效 IFN-gamma 生產。再者，從 CTL 細胞株如「材料與方法」所述以極限稀釋建立 CTL 選殖體，且 CTL 選殖體之對抗目標細胞脈衝的胜肽的 IFN-gamma 生產以 IFN-gamma ELISA 分析法決定。有效的 IFN-gamma 生產，係從以 TOMM34-A02-9-30（序列識別號：1）刺激的 CTL 選殖體觀察到，如圖 3。

對抗表現 *TOMM34* 與 *HLA-A*0201* 的目標細胞的專一性 CTL 活性

對於對抗 *TOMM34*-A02-9-30 (序列識別號: 1) 胜肽建立的 CTL 細胞株, 檢驗其識別表現 *TOMM34* 與 *HLA-A*0201* 分子的能力。對抗以全長 *TOMM34* 與 *HLA-A*0201* 分子轉染的 COS7 細胞(一種目標細胞的特殊模型, 其表現 *TOMM34* 與 *HLA-A*0201* 基因)的專一性 CTL 活性, 係使用以對應胜肽誘導的 CTL 細胞株當做效應子細胞。製備以全長 *TOMM34* 基因或 *HLA-A* 0201* 其中之一轉染的 COS7 細胞當做對照。於圖 4, 以 *TOMM34*-A02-9-30 (序列識別號: 1) 刺激的 CTL 選殖體顯示對於表現 *TOMM34* a 與 *HLA-A* 0201* 兩者的 COS7 細胞具有有效的 CTL 活性。另一方面, 對照組未偵測到顯著的專一性 CTL 活性。因此, 此等資料明確證明 *TOMM34*-A02-9-30 (序列識別號: 1) 的胜肽係內生性處理並呈現在帶有 *HLA-A*0201* 分子的目标細胞上, 並由 CTL 識別。此結果代表從 *TOMM34* 衍生的胜肽, 適於當做癌症疫苗治療患有 *TOMM34* 表現腫瘤的病患。

抗原胜肽的同源性分析

以 *TOMM34*-A02-9-30 (序列識別號: 1)、*TOMM34*-A02-9-220 (序列識別號: 5)、*TOMM34*-A02-10-30 (序列識別號: 31)、*TOMM34*-A02-10-220 (序列識別號: 32) 刺激的 CTL 顯示顯著且專一的 CTL 活性。此結果可能由於 *TOMM34*-A02-9-30 (序列識別號: 1)、*TOMM34*-A02-9-220 (序列識別號: 5)、

TOMM34-A02-10-30 (序列識別號：31)、TOMM34-A02-10-220 (序列識別號：32)的序列與從已知會敏化人類免疫系統的其他分子衍生的胜肽為同源。為了排除此可能性，對此等胜肽序列使用 BLAST 演算法 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)進行同源性分析，詢問條件是無序列有顯著的同源性。同源性分析的結果顯示 TOMM34-A02-9-30(序列識別號：1)、TOMM34-A02-9-220(序列識別號：5)、TOMM34-A02-10-30 (序列識別號：31)、TOMM34-A02-10-220 (序列識別號：32)為唯一，因此吾人最佳知識下，此等分子只有很少可能性會引起對於有些無關分子的不欲免疫反應。

總言之，吾人鑑別出衍生自 TOMM34 的新穎的 HLA-A*0201 抗原決定基胜肽。再者，在此的結果證明 TOMM34 的抗原決定基胜肽適於用在癌症免疫療法。

[產業利用性]

本發明提供新穎的 TAA，尤其衍生自 TOMM34 者會誘導有效且專一的抗腫瘤免疫反應，對於廣泛的癌症類型有用。此種 TAA 可當成對抗與 TOMM34 有關的疾病的胜肽疫苗，該疾病例如癌症，具體而言，AML、CML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、腎癌、SCLC、非小細胞肺癌 NSCLC、及軟組織腫瘤。

雖本發明在此已詳述並參照特定的實施例，應了解以上的敘述為例示及說明的用意，且意欲使人理解本發明及

其較佳具體例。經由例行的實驗，該技術領域中具有通常知識者當能輕易理解可在不偏離本發明精神及範圍之下進行各種改變及修飾，本發明的邊界與界線定義於附帶的申請專利範圍。

【圖式簡單說明】

本發明之各種態樣及應用將會於該技術領域中具有通常知識者在考慮圖式之簡單說明以及本發明之詳細敘述及上述較佳實施例後顯明。

圖 1 由一系列照片(a)-(e)構成，顯示對於衍生自 TOMM34 之胜肽誘導的 CTL 進行干擾素 (IFN)-gamma 酵素連結免疫墨點 (ELISPOT) 分析的結果。於井 #4 以 TOMM34-A02-9-30 (序列識別號：1) (a)、於 #2 以 TOMM34-A02-9-220 (序列識別號：5) (b)、於 #4 以 TOMM34-A02-10-30 (序列識別號：31) (c)及於 #2 以 TOMM34-A02-10-220 (序列識別號：32) (d)刺激的 CTL，相較於對照組，各顯示有效的 IFN-gamma 生產。照片的井上的方形代表來自對應井的細胞係擴展以建立 CTL 細胞株。相對地，當做負面數據的典型案例，以 TOMM34-A02-10-143 (序列識別號：21) (e) 刺激的 CTL 未顯示專一性 IFN-gamma 生產。圖式中，「+」代表對抗以適當胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 生產，「-」代表對抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 生產。

圖 2 為折線圖，繪示以 TOMM34-A02-9-30 (序列識別號：1)刺激過的 CTL 的 IFN-gamma 生產。CTL 生產的

IFN-gamma 量，係以 IFN-gamma 酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA) 分析。結果證明此胜肽刺激而建立的 CTL 細胞株，比起對照組，顯示有效的 IFN-gamma 生產。圖式中，「+」代表對抗以適當胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 生產，「-」代表對抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 生產。

圖 3 為折線圖，繪示從以 TOMM34-A02-9-30 (序列識別號:1) 刺激的 CTL 細胞株以極限稀釋建立的 CTL 選殖體的 IFN-gamma 生產。結果證明，以此胜肽刺激而建立的 CTL 選殖體，比起對照組，顯示有效的 IFN-gamma 生產。圖式中，「+」代表對抗以適當胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 生產，「-」代表對抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN-gamma 生產。

圖 4 為折線圖，繪示對於表現 TOMM34 與 HLA-A*0201 之目標細胞的專一性 CTL 活性。製備經 HLA-A*0201 或全長 TOMM34 基因轉染的 COS7 細胞當成對照組。以 TOMM34-A02-9-30 (序列識別號:1) 建立的 CTL 細胞株，對於經 TOMM34 與 HLA-A*0201 兩者轉染的 COS7 細胞顯示專一性 CTL 活性 (黑色菱形)。另一方面，對於表現 HLA-A*0201 (三角形) 或 TOMM34 (圓形) 其中之一之目標細胞未檢測到顯著的專一性 CTL 活性。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 腫瘤療法·科學股份有限公司

<120> TOMM34 胜肽與含此胜肽之疫苗

<130> ONC-A1035-TW

<150> US 61/419,181

<151> 2010-12-02

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 1

Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 2

Ala Leu Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 3

Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 4

Thr Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

- <400> 5

Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 6

Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 7

Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 8

Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 9

Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 10

Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 11

Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 12

Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 13

Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala
1 5

<210> 14
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 14

Met Ala Pro Lys Phe Pro Asp Ser Val
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 15

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 16

Ala Leu Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val
1 5

- <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 17

Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 18

Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 19

Leu Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 20

Ser Ser Phe Ala Asp Ile Ser Asn Leu
1 5

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 21

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

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 22

Ala Leu Glu Lys Tyr Pro Met Ala Tyr Val
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 23

Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 24

Tyr Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 25

Ser Leu Gly Pro Glu Trp Arg Leu Lys Leu
1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 26

Ser Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 27

Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

- <223> 人工合成胜肽序列

<400> 28

Arg Met Thr Arg Ala Leu Met Asp Ser Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 29

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala Val
1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 30

Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val Lys Asp Cys
1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 31

Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 32

Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala Thr
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 33

Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu Val
1 5 10

<210> 34

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 34

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

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 35

Arg Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
1 5 10

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 36

Lys Leu Arg Gln Glu Val Lys Gln Asn Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 37

Arg Leu Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 38

Ser Leu Pro Ser Glu Asn His Lys Glu Met
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 39

Lys Glu Thr Thr Ala Thr Lys Asn Arg Val

1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 40

Ser Ala Gly Asp Val Glu Lys Ala Arg Val
1 5 10

<210> 41
<211> 2066
<212> DNA
<213> 人類

<400> 41
aggctctcgca ggccccgccc cctcgccgcg ggttcgctgt tgggcggaga tattcgccgc 60

cggcgcttgc gcccggaagg tgtgccgcac cacacggggg aggaaggaag gagctcccaa 120

ctcgccggcc tggccacggg atggcccca aattcccaga ctctgtggag gagctccgcg 180

ccgcccggcaa tgagagtttc cgcaacggcc agtacgccga ggcctccgcg ctctacggcc 240

gcgcgctgcg ggtgctgcag gcgcaagggt cttcagacct agaagaaga agtggttctct 300

actccaaccg agcagcatgt cacttgaagg atggaaactg cagagactgc atcaaagatt 360

gcacttcagc actggccttg gtcccttca gcattaagcc cctgctgcgg cgagcatctg 420

cttatgaggc tctggagaag taccctatgg cctatgttga ctataagact gtgctgcaga 480

ttgatgataa tgtgacgtca gccgtagaag gcatcaacag aatgaccaga gctctcatgg 540

actcgcttgg gcctgagtgg cgcctgaagc tgccttcaat ccccttgggtg cctgttttcag 600
 ctacagaagag gtggaattcc ttgccttcgg agaaccacaa agagatggct aaaagcaaat 660
 ccaaagaaac cacagctaca aagaacagag tgccttctgc tggggatgtg gagaaagcca 720
 gagttctgaa ggaagaaggc aatgagcttg taaagaaggg aaaccataag aaagctattg 780
 agaagtacag tgaaagcctc ttgtgtagta acctggaatc tgccacgtac agcaacagag 840
 cactctgcta tttggtcctg aagcagtaca cagaagcagt gaaggactgc acagaagccc 900
 tcaagctgga tggaagaac gtgaaggcat tctacagacg ggctcaagcc cacaagcac 960
 tcaaggacta taaatccagc tttgcagaca tcagcaacct cctacagatt gagcctagga 1020
 atggctcctg acagaagttg cggcaggaag tgaagcagaa cctacactaa aaaccaaca 1080
 gggcaactgg aacctctgcc tgaccttacc cagagaagcc atggggccacc tgctctgtgc 1140
 ccgctcctga aacctcagcat gcccgaagtg agctctgaag cccctctctc aatcccttga 1200
 tggcctccca ccctgtaaga ggctttgctt gttcaaatta aactcagtgt agtcaaacac 1260
 agacatggtt gttgcaccag aaaggctccc actagagcta agcgtgaagc tgaagctctg 1320
 tccctattcc ccagcccag ctagctgac acaccaacag atcctcatca gcaaagcatt 1380
 tggctttgtc ctgccaagt gggctgcaga ctgagtgtg ccttgtagc ttccccagac 1440
 cccaactcac tgcagttcat ctgaacaacc tgagctcctg ggccgggggtg gaaggagggg 1500
 gataaaccta aggccctgat ccaaagcagc ctgttgagct ggttctccag ggctgcagtc 1560
 tctccaggtg tacagctgct gtccctgccc tgtcctgtcc ttgcacagtc tcctatgtct 1620
 gagccccagt gccttctgtt cgggccctcc tttgggtggga aggcagagcc ctgaccttg 1680

• aatggttgtc cttgactctg tgctgctgcc ttctgcagag aggcacctaa gctgttttaa 1740
gagcccagtg attgtggctg ctccctcctag aggtgggagg gggcaagagg cctccttgg 1800
cagtgtccat gctttctggg cagggacttg gttttttgtt ccaacagtgg ccttctccgg 1860
gcttcatagt tctttgtaat atgttgaagt taatttgaat tgactgattt tgttgaactg 1920
tgtgtttaag ctgttgcat aaaaagcttt cttctacatc aatatctgct gtgccttcat 1980
ttatgccttt tcagctttgc acctggaact ctgtagtaat aataaaagtt attgcttatt 2040
gggcattcaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2066

<210> 42
<211> 309
<212> PRT
<213> 人類

<400> 42

Met Ala Pro Lys Phe Pro Asp Ser Val Glu Glu Leu Arg Ala Ala Gly
1 5 10 15
Asn Glu Ser Phe Arg Asn Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu Tyr
20 25 30
Gly Arg Ala Leu Arg Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Ser Asp Pro Glu
35 40 45
Glu Glu Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys His Leu Lys Asp
50 55 60
Gly Asn Cys Arg Asp Cys Ile Lys Asp Cys Thr Ser Ala Leu Ala Leu
65 70 75 80
Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu Leu Arg Arg Ala Ser Ala Tyr Glu
85 90 95

Ala Leu Glu Lys Tyr Pro Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val Leu
100 105 110

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala Val Glu Gly Ile Asn Arg Met
115 120 125

Thr Arg Ala Leu Met Asp Ser Leu Gly Pro Glu Trp Arg Leu Lys Leu
130 135 140

Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val Ser Ala Gln Lys Arg Trp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Pro Ser Glu Asn His Lys Glu Met Ala Lys Ser Lys Ser Lys Glu
165 170 175

Thr Thr Ala Thr Lys Asn Arg Val Pro Ser Ala Gly Asp Val Glu Lys
180 185 190

Ala Arg Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu Val Lys Lys Gly Asn
195 200 205

His Lys Lys Ala Ile Glu Lys Tyr Ser Glu Ser Leu Leu Cys Ser Asn
210 215 220

Leu Glu Ser Ala Thr Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu Val Leu
225 230 235 240

Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val Lys Asp Cys Thr Glu Ala Leu Lys Leu
245 250 255

Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala Phe Tyr Arg Arg Ala Gln Ala His Lys
260 265 270

Ala Leu Lys Asp Tyr Lys Ser Ser Phe Ala Asp Ile Ser Asn Leu Leu
275 280 285

Gln Ile Glu Pro Arg Asn Gly Pro Ala Gln Lys Leu Arg Gln Glu Val
290 295 300

Lys Gln Asn Leu His

305		
<210>	43	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	43	
	gtctaccagg cattcgcttc at	22
<210>	44	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	44	
	tcagctggac cacagccgca gcgt	24
<210>	45	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	45	
	tcagaaatcc tttctcttga c	21
<210>	46	

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 46
ctagcctctg gaatcctttc tctt 24

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100143251

A61K 38/08 (2006.01)

※申請日：100.11.25

※IPC 分類：C12N 15/09 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

TOMM34 胜肽與含此胜肽之疫苗 / TOMM34 PEPTIDES AND
VACCINES INCLUDING THE SAME

二、中文發明摘要：

本發明揭示一種衍生自序列識別號：42 或其片段之單離胜肽，其結合於 HLA 抗原並誘導細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)。本發明的胜肽可包括上述胺基酸序列有 1、2 或數個胺基酸序列經取代、刪除或加成的胺基酸序列的其中之一。本發明更提供包括這些胜肽的醫藥組合物。本發明之胜肽可用於治療癌症。

三、英文發明摘要：

The present invention provides isolated peptides or the fragments derived from SEQ ID NO: 42, which bind to an HLA antigen and induce cytotoxic T lymphocytes (CTL). The peptides may include one of the above mentioned amino acid sequences with substitution, deletion, or addition of one, two, or several amino acids sequences. The present invention also provides pharmaceutical compositions including these peptides. The peptides of this invention can be used for treating cancer.

七、申請專利範圍：

1. 一種單離的胜肽，其為下述(a)或(b)：

(a) 一單離的胜肽，包含一胺基酸序列選自由序列識別號 1、5、31 及 32 所構成的群組；

(b) 一單離的胜肽，其中該胜肽包含選自由序列識別號 1、5、31 及 32 所構成的群組中的一胺基酸序列，其中的 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入或加成，以產生經修飾的胜肽，該經修飾的胜肽保留結合於 HLA 抗原的能力以及毒性 T 淋巴球(CTL)的誘導能力。

2. 如申請專利範圍第 1 項之單離的胜肽，其中該 HLA 抗原為 HLA-A2。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之單離的胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之單離的胜肽，其中該單離的胜肽具有至少一個取代選自由以下構成的群組：

(a) N 末端起的第 2 個胺基酸為或修飾為選自由白胺酸及甲硫胺酸的胺基酸，且

(b) C 末端胺基酸為或修飾為選自由纈胺酸及白胺酸的胺基酸。

5. 一種單離的多核苷酸，其編碼如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽。

6. 一種用於誘導 CTL 的組合物，其中該組合物包含一種或以上如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽，或

包含一種或以上如申請專利範圍第 5 項之多核苷酸。

7. 一種醫藥組合物，包含：

(a) 一種或以上如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽，

(b) 一種或以上如申請專利範圍第 5 項之多核苷酸，

(c) 一種或以上的 APC 或外泌體，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽及 HLA 抗原的複合體，或

(d) 一種或以上的 CTL，其識別表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽及 HLA 抗原的複合體的細胞，

以及醫藥上可接受之載體，

該醫藥組合物係調製用於下列所構成的群組：

(i) 治療已有的癌症，

(ii) 預防癌症，

(iii) 防止癌症術後復發，及

(vi) 上述之組合。

8. 如申請專利範圍第 7 項之醫藥組合物，其係調製以投予 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體。

9. 一種誘導具有 CTL 誘導能力的抗原呈現細胞 (APC) 的方法，包含選自由以下構成之群組的步驟：

(a) 使 APC 於體外、生物體外 (ex vivo) 或體內與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽接觸，及

(b) 將編碼如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜

肽的多核苷酸導入 APC。

10. 一種誘導 CTL 之方法，包含選自由以下構成之群組的步驟：

(a) 共同培養 CD8+T 細胞與 APC，該 APC 於其表面呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽的複合體，

(b) 共同培養 CD8+ T 細胞與外泌體，該外泌體於其表面呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽的複合體，及

(c) 將編碼 T 細胞受體(TCR)次單元多胜肽的一或多個多核苷酸導入 T 細胞，其中由該 TCR 次單元多胜肽形成的 TCR 能在細胞表面結合於 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽的複合體；

11. 一種單離的 APC，其在表面上呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽之複合體。

12. 如申請專利範圍第 11 項之 APC，其係由誘導具有 CTL 誘導能力的抗原呈現細胞(APC)的方法所誘導，其中，該方法包含選自由以下構成的群組的步驟：

(a) 使 APC 於體外、生物體外(ex vivo)或體內與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽接觸，及

(b) 將編碼如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽的多核苷酸導入 APC。

13. 一種單離的 CTL，其係標靶於如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽。

14. 如申請專利範圍第 13 項之 CTL，其係由誘導 CTL 之方法所誘導，其中，該方法包含選自由以下構成的群組的步驟：

(a) 共同培養 CD8+T 細胞與 APC，該 APC 於其表面呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽的複合體，

(b) 共同培養 CD8+ T 細胞與外泌體，該外泌體於其表面呈現 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽的複合體，及

(c) 將編碼 T 細胞受體(TCR)次單元多胜肽的一或多個多核苷酸導入 T 細胞，其中由該 TCR 次單元多胜肽形成的 TCR 能在細胞表面結合於 HLA 抗原與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽的複合體。

15. 一種在個體中誘導抗癌症的免疫反應的方法，該方法包括以下步驟：投予該個體包括如申請專利範圍第 1 至 4 項任一項之胜肽、其免疫活性片段、或編碼該胜肽或該片段的多核苷酸。

16. 一種載體，包含編碼如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽的核苷酸序列。

17. 一種寄主細胞，係經如申請專利範圍第 16 項之表現載體轉形或轉染。

18. 一種外泌體，其係呈現包含如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽與 HLA 抗原的複合體。

19. 一種抗體，其係對抗如申請專利範圍第 1 至 4 項

中任一項之胜肽或其免疫活性片段。

20. 一種診斷套組，包含如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽、如申請專利範圍第 5 項之多核苷酸，或如申請專利範圍第 19 項之抗體或免疫活性片段。

八、圖式：如後所示。

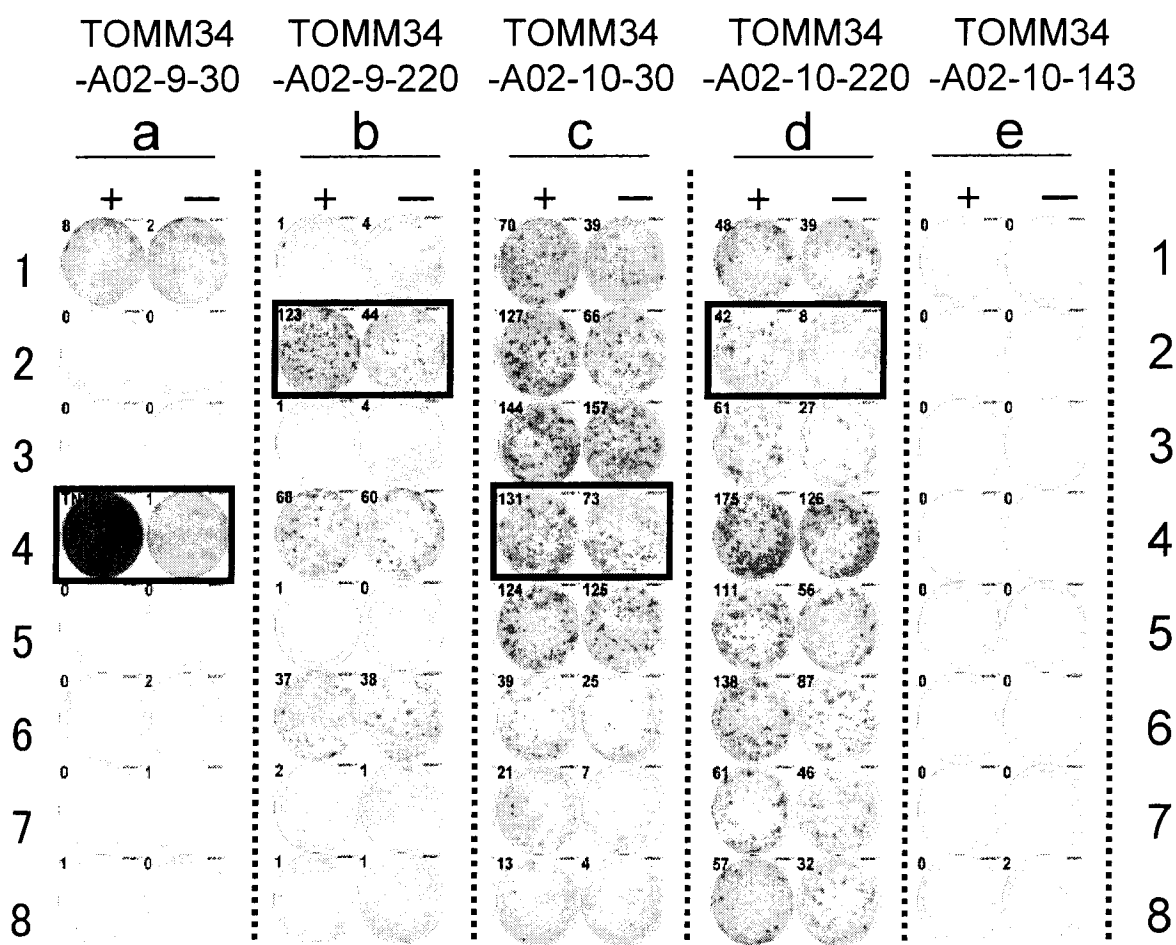


圖1

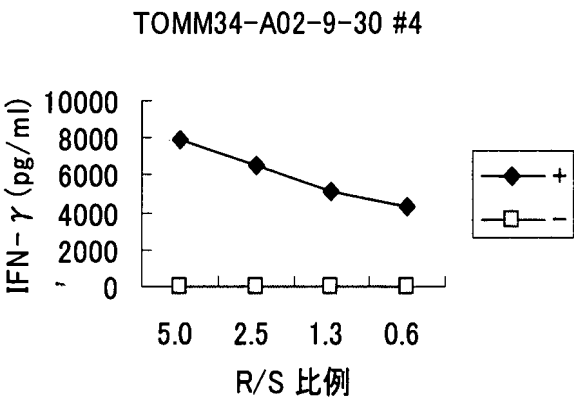


圖2

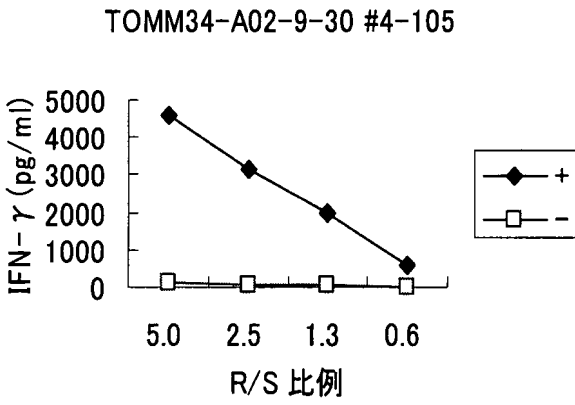


圖3

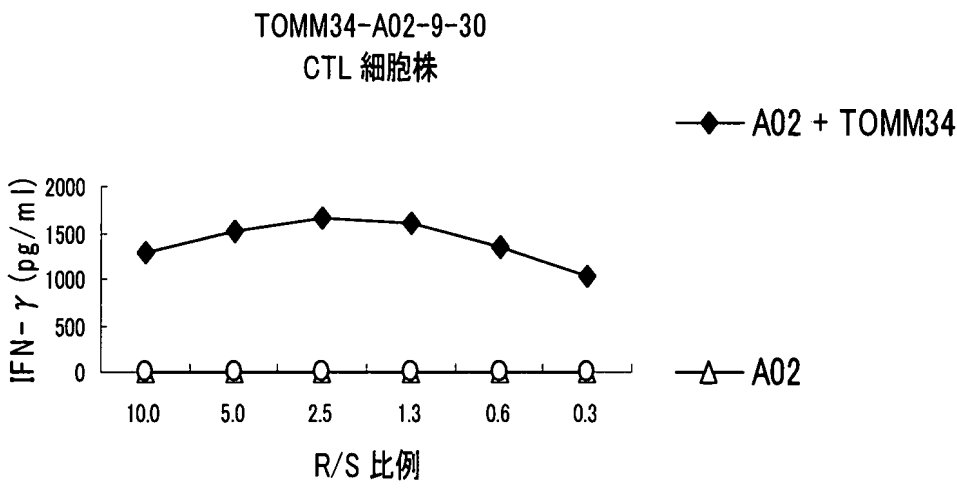


圖4

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(圖 1)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無