



(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 I659043 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：107126293

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 10 日

(51)Int. Cl.：

*C07K7/06 (2006.01)**C07K7/08 (2006.01)**C07K14/00 (2006.01)**C07K14/47 (2006.01)**C12N5/0783 (2010.01)**C12N15/12 (2006.01)**A61K35/17 (2015.01)**A61K38/00 (2006.01)**A61K39/00 (2006.01)*

(30)優先權：2012/07/10

美國

61/669,999

(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：西村泰治 NISHIMURA, YASU HARU (JP)；富田雄介 TOMITA, YUSUKE (JP)；大
沢龍司 OSAWA, RYUJI (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

WO 2010/047062A1

Melief, Cornelis JM, and Sjoerd H. Van Der Burg. "Immunotherapy of established (pre) malignant disease by synthetic long peptide vaccines." *Nature Reviews Cancer* 8.5 (2008): 351-360.Naylor PH. et al., "Peptide Based Vaccine Approaches for Cancer-A Novel Approach Using a WT-1 Synthetic Long Peptide and the IRX-2 Immunomodulatory Regimen." *Cancers (Basel)*., 2011 Oct 25, 3(4), 3991-4009.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：8 共 130 頁

(54)名稱

對於 TH1 細胞之 KIF20A 抗原決定位胜肽及含此之疫苗

KIF20A EPI TOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57)摘要

於此揭示具有 Th1 細胞誘導能力之單離的自 KIF20A 衍生的抗原決定位胜肽。此種胜肽可藉由 MHC 第 II 類分子辨識並誘導 Th1 細胞。於較佳實施例中，此種本發明之胜肽可混雜地 (promiscuously) 結合於 MHC 第 II 類分子並且除了誘導 Th1 細胞更誘導 KIF20A 專一性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)。因此此種胜肽適用於增強一對象中之免疫反應，因而於癌免疫療法中，特別是作為癌疫苗提供效用。於此也揭示編碼為任意上述胜肽的聚核苷酸、由此種胜肽所誘導的 APC 與 Th1 細胞，及與其相關的誘導方法。包含任意上述成分作為有效成分的醫藥組合物，提供效用於癌症或腫瘤之治療及/或預防，此癌症或腫瘤包括例如膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 及頭頸惡性腫瘤 (head-and-neck malignant tumor, HNMT)。

Isolated KIF20A-derived epitope peptides having Th1 cell inducibility are disclosed herein. Such peptides can be recognized by MHC class II molecules and induce Th1 cells. In preferred embodiments, such a peptide of the present invention can promiscuously bind to MHC class II molecules and induce KIF20A-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in addition to Th1 cells. Such peptides are thus suitable for use in enhancing immune response in a subject, and accordingly find use in cancer immunotherapy, in particular, as cancer vaccines. Also disclosed herein are polynucleotides that encode any of the aforementioned peptides, APCs and Th1 cells induced by such peptides and methods of induction associated therewith. Pharmaceutical compositions that comprise any of the aforementioned components as active ingredients find use in the treatment and/or prevention of cancers or tumors including, for example, bladder cancer, breast cancer, cholangiocellular carcinoma, esophageal cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC), pancreatic cancer, prostate cancer, renal carcinoma, small cell lung cancer (SCLC) and head-and-neck malignant tumor (HNMT).

【發明說明書】

【中文發明名稱】 對於TH1細胞之KIF20A抗原決定位胜肽及含此之疫苗

【英文發明名稱】 KIF20A EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND
VACCINES CONTAINING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本發明係關於生物科學領域，更具體而言，係關於癌症治療的領域。尤其，本發明係關於新穎的胜肽，其作為癌症疫苗與治療或預防腫瘤、或治療及預防腫瘤的藥物極為有效。

優先權

本申請案基於2012年7月10日提申的美國臨時申請案號61/669,999主張優惠，其完整內容引入於此作為參考。

【先前技術】

【0002】 已有人證明CD8陽性細胞毒性T淋巴球(CTL)會辨識在主要組織相容性複合體(MHC)第I類分子上發現之衍生自腫瘤關聯抗原(TAA)的抗原決定基胜肽，且之後殺死該腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原(MAGE)家族為TAA的第一例以來，已主要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。

【0003】 對於癌細胞的增殖與存活不可欠缺之TAA對於做為免疫療法之標靶是有利的，由於使用此種TAA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，能夠誘導有效及專一性抗腫瘤免疫反應的新TAA之鑑別確保進一步的發展。所以對於許多類型癌症的胜肽疫苗策略的臨床應用正在進行著(非專利文獻 3~10)。

到目前，已有數個使用這些TAA相關抗原衍生胜肽的臨床試驗的報告。不幸地，到目前為止，這些癌症疫苗試驗僅產生目前已於這些癌症疫苗試驗被觀察到的低目標反應率(非專利文獻11至13)。因此，於本技術領域中，仍需要適合作為免疫治療的標靶之新的TAA。

【0004】 KIF20A基因(RAB6KIFL)最初被鑑別為藉由與Rab6 小GTP酶直接交互作用而參與高基氏體的動態(非專利文獻14)。KIF20A屬於運動蛋白的驅動蛋白(kinesin)超級家族，在分子及胞器的交通具有關鍵功能(非專利文獻15、非專利文獻16、非專利文獻17)。最近，Taniuchi K等人報告KIF20A於胰臟癌組織有過度表現(非專利文獻18)。他們並已發現KIF20A於胰臟癌致癌中之關鍵角色的證據。

【0005】 藉由使用含有23,040個基因的基因體寬的cDNA 微陣列的基因表現概況分析，最近已找出KIF20A在數種癌症中被上升調控，比如膀胱癌(專利文獻1)、小細胞肺癌 (SCLC) (專利文獻2)及荷爾蒙-難治性前列腺癌 (HRPC) (專利文獻3)，此揭示引入於此作為參考。再者，也鑑別出KIF20A基因產物的一些抗原決定位胜肽(專利文獻4)。

【0006】 綜上所述，此資料建議KIF20A為一新、潛在普遍的致癌抗原(oncoantigen)。因此衍生自KIF20A之抗原決定位胜肽可應用於對於癌症寬組合(wide-array)治療之癌症免疫治療。

最近，已鑑別出能夠從健康自願者的PBMC誘導腫瘤反應性及HLA-A2 (A*02:01)-限制CTL的高免疫原性KIF20A衍生細胞毒性T淋巴球(CTL)-抗原決定位(非專利文獻19, 專利文獻5)。又，也已鑑別出KIF20A衍生之HLA-A24限制CTL抗原決定位(專利文獻6)。所以，KIF20A仍維持為可應用於癌症免疫療法的一具吸引力的標靶分子。

【0007】 腫瘤專一性CD4⁺ 輔助T (Th)細胞，特別是T-輔助1型(Th1)細胞，

在有效率地誘導CTL媒介之抗腫瘤免疫性方面扮演關鍵性角色(非專利文獻20)。主要由Th1細胞產生的IFN- γ ，對於誘導及維持長期CTL反應係關鍵性的，其介由對於保持免疫記憶為關鍵性之多重交互作用提供幫助(非專利文獻21, 22)。Th1細胞所分泌的IFN- γ ，也媒介直接的抗腫瘤或抗血管生成作用(非專利文獻23)。又，據顯示Th細胞必須鋪路以供CTL進入腫瘤部位(非專利文獻24)。所以，能夠活化專一性Th1細胞的腫瘤關連抗原(TAA)衍生的Th細胞抗原決定位的鑑別，對於在罹患腫瘤的主體誘導有效的腫瘤免疫是重要;理想上，設計有效的疫苗應包括多個抗原決定位，以刺激CTL與Th1細胞兩者(非專利文獻25)。但是，目前尚未鑑別出衍生自KIF20A的此種抗原決定位。

[引用列表]

[專利文獻]

【0008】

[專利文獻1] WO2006/085684

[專利文獻2] WO2007/013665

[專利文獻3] WO2008/102906

[專利文獻4] WO2008/102557

[專利文獻5] WO2010/047062

[專利文獻6] WO2008/102557

[非專利文獻]

【0009】

[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 and 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] Echard A, et al. Science 1998;279:580-5.
- [非專利文獻15] Echard A, et al. Science 1998;279:580-5.
- [非專利文獻16] Hirokawa N, et al. Curr Opin Cell Biol 1998;10:60-73.
- [非專利文獻17] Allan VJ, and Schroer TA. Curr Opin Cell Biol 1999;11:476-82.
- [非專利文獻18] Taniuchi K, et al. Cancer Res 2005;65:105-12.
- [非專利文獻19] Imai K, *et al.* Br J Cancer;104: 300-7.
- [非專利文獻20] Chamoto K *et al.* Cancer Res 2004;64: 386-90.
- [非專利文獻21] Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004;4: 595-602.
- [非專利文獻22] Shedlock DJ and Shen H. Science 2003;300: 337-9.
- [非專利文獻23] Street SE et al. Blood 2001;97: 192-7.
- [非專利文獻24] Bos R, and Sherman LA. Cancer Res;70: 8368-77.
- [非專利文獻25] Melief CJ et al. Nat Rev Cancer 2008;8: 351-60.

【發明內容】

【0010】 於本發明之上下文，本案發明人考慮一種理想的供癌免疫療法的胜肽疫苗係包括針對CTL與Th1細胞兩者的抗原決定位的單一胜肽，此兩者的抗原決定位在天然上係彼此靠近(Kenter GG et al. N Engl J Med 2009;361: 1838-47.)。

為此，本案發明人設計一策略以鑑別一新穎的KIF20A衍生的Th1細胞的抗原決定位，其係由混雜的HLA第II類分子之背景中辨識且含有CTL抗原決定位，並假設所辨識之抗原決定位會誘導更有效率之經T細胞媒介之腫瘤免疫性。使用了預測HLA 第II類結合胜肽與已知由經HLA-A24 (A*24:02)或A2限制之CTL辨識之CTL抗原決定位序列的電腦演算法，來選擇候選的含有CTL抗原決定位之混雜的HLA-第II類限制Th1細胞抗原決定位。

【0011】 本發明至少部分係基於發現作為誘導Th1細胞反應之免疫療法的標靶的適合抗原決定位胜肽。體認到KIF20A基因在一些癌症類型中係向上調控，包括膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC) 及頭頸惡性腫瘤(HNMT)，本發明目標為進一步分析此kinesin family member 20A (KIF20A)基因之基因產物，特別是由GenBank 存取編號NM_005733 (序列識別號: 10)之基因編碼之陳列於序列識別號: 11中的多胜肽。在進一步的研究中特別選擇含有會誘導專一於對應分子之Th1細胞的抗原決定位胜肽的KIF20A基因產物。例如，將從健康捐贈者或HNMT病患獲得之周邊血液單核細胞(PBMC)使用衍生自人類KIF20A的混雜的HLA-DR及/或DP結合胜肽予以刺激。建立辨識經以各別的候選胜肽脈衝的HLA-DR或DP陽性目標細胞的Th1細胞，並且鑑別可誘導對抗KIF20A之有效及專一性免疫反應之經HLA-DR及/或DP限制之抗原決定位胜肽。此等結果證明KIF20A有強力的免疫原性，且其抗原決定位對於經由Th1細胞反應媒介的腫瘤免疫療法有效。更進一步的研究顯示含有至少一種CTL抗原決定位之混雜的HLA-DR及/或DP結合胜肽也會在同一捐贈者以KIF20A專一性的方式刺激CTL

反應。此等結果確認KIF20A係強力免疫原性，且含有Th1細胞與CTL抗原決定位兩者之其抗原決定位，對於經由Th1細胞與CTL反應媒介之腫瘤免疫療法係有效。

【0012】 因此本發明之一目的係提供具有Th1細胞誘導能力及選自序列識別號: 1、2、3及4之胺基酸序列的胜肽。本發明思考修飾之胜肽，即具有Th1誘導能力且長度至多30個胺基酸且具有選自序列識別號: 11 (KIF20A)之胺基酸序列之連續胺基酸序列的胜肽，及其功能上均等物。或者，本發明提供一具有Th1細胞CTL兩者的誘導能力的胜肽。於一些具體例，本發明之胜肽回應於序列識別號: 1、2、3或4之胺基酸序列或其經修飾的版本，其中，有2個或更多的胺基酸被取代、刪除、插入及/或加成而仍維持誘導Th1細胞的能力。

【0013】 當本胜肽對於一對象投予時，本發明胜肽較佳係呈現在一或多種抗原呈現細胞的表面上，而誘導Th1細胞。當本發明之胜肽更含有至少一CTL抗原決定位，此APC也會處理此胜肽以呈現從此胜肽產生之CTL抗原決定位，因而誘導靶向於各胜肽之CTL。因此，本發明之另一目的為提供呈現任一本發明之胜肽或其片段的抗原呈現細胞，並提供誘導抗原呈現細胞之方法。

【0014】 投予一或更多本發明之胜肽或編碼為此種胜肽之聚核苷酸，或呈現此種胜肽或其片段之抗原呈現細胞，會因而誘導強力的抗腫瘤免疫反應。因此本發明之又另一目的為提供一種醫藥藥劑或組合物，其包含作為有效成分如下成分中之一或更多種:(a)一或多種本發明之胜肽、(b)一或多種編碼為此種胜肽之聚核苷酸，及(c)一或多種本發明之抗原呈現細胞。如此之本發明之醫藥藥劑或組合物，特別作為疫苗有用。

【0015】 本發明另一目的為提供癌症(即腫瘤)之治療及/或預防(亦即(避免)及/或避免其術後再復發之方法。也考慮用於誘導Th1細胞或用於誘導抗腫瘤免疫性之方法，包括投予一或多種本發明之胜肽、聚核苷酸、抗原呈現細胞、

或醫藥藥劑或組合物的步驟。再者，本發明之Th1細胞，也發現有用於作為對抗癌症之疫苗，例子包括但不限於膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC) 及頭頸惡性腫瘤(HNMT)。

【0016】 本發明特別考慮之目的的例子包括以下各項：

[1] 一種單離的胜肽，其長度為10-30個胺基酸且包含序列識別號: 11的一部分胺基酸序列，其中該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列：

(a) 一連續的胺基酸序列，其具有選自於序列識別號: 1、2、3或4之胺基酸序列中的長於9個胺基酸；及

(b) 一胺基酸序列，其中於(a)之胺基酸序列中有一個、二個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加，該胜肽有誘導T輔助1型(Th1)細胞的能力。

[2] 如[1]之單離的胜肽，其中，該胜肽或其片段有結合於至少2種MHC第II類分子的能力。

[3] 如[2]之單離的胜肽，其中，該MHC第II類分子選自於由HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2構成之群組。

[4] 如[1]至[3]中任一項之單離的胜肽，其中，該胜肽包含具有KIF20A專一性細胞毒性T淋巴球(CTL)誘導能力之胜肽的胺基酸序列。

[5] 如[4]之單離的胜肽，其中，該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列：

(a) 一胺基酸序列，其選自於序列識別號: 1、2、3及4構成之群組；及

(b) 一胺基酸序列，其中於(a)之胺基酸序列中有一個、二個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加。

[6] 一種單離的聚核苷酸，其編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽。

[7] 一種組合物，係用於誘導選自於由以下構成之群組中至少一種細胞：

(i) Th1細胞

(ii) CTL

(iii)有能力誘導Th1細胞之抗原呈現細胞(APC)，及

(iv) 有能力誘導CTL之APC;

其中該組合物包含一或多種如[1]至[5]中任一項之胜肽，或一或多種編碼為此等胜肽的聚核苷酸。

[8] 一種醫藥組合物，包含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分:

(a) 一或多種如[1]至[5]中任一項之胜肽;

(b) 一或多種如[6]之聚核苷酸;

(c) 一或多種APC，其在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段;

(d) 一或多種Th1細胞，其辨識在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之APC;及

(e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合;

且此組合物被配製為供選自於由下列構成之群組中之用途:

(i) 癌治療

(ii) 癌預防

(iii) 預防癌之術後再復發，及

(iv) 上述(i)至(iii)中任意兩或更多種的組合。

[9] 如[8]之醫藥組合物，其中該組合物被配製為供對於具有選自於由HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2構成之群組中至少一種作為MHC第II類分子之對象投予。

[10] 如[8]或[9]之醫藥組合物，其中該組合物更包含有CTL誘導能力之一或多種胜肽。

[11] 一種組合物，係供增強由MHC第II類分子媒介之免疫反應，該組合物包

含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分:

- (a) 一或多種如[1]至[5]中任一項之胜肽;
- (b) 一或多種如[6]之聚核苷酸;
- (c) 一或多種APC，其在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段;
- (d) 一或多種Th1細胞，其辨識在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之APC;及
- (e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。

[12] 一種誘導APC之方法，該APC有能力誘導Th1細胞，該方法包含使APC於體外、生物體外或體內與如[1]至[5]中任一項之胜肽接觸的步驟。

[13] 一種誘導APC之方法，該APC有能力誘導CTL，該方法包含選自於由以下構成之群組中之步驟:

- (a) 使APC於體外、生物體外或體內與如[1]至[5]中任一項之胜肽接觸;及
- (b) 將編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽的聚核苷酸導入APC。

[14] 一種誘導Th1細胞之方法，包含選自於由以下構成之群組中之步驟:

- (a) 共同培養CD4陽性T細胞，及在表面呈現MHC第II類分子與如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之複合體的APC;及
- (b) 將編碼為兩種T細胞受體(TCR)次單元之聚核苷酸、或編碼為各TCR次單元之聚核苷酸導入CD4陽性T細胞內，其中該TCR能結合於在細胞表面上呈現的MHC第II類分子與如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之複合體。

[15] 一種誘導CTL細胞之方法，該方法包含選自於由以下構成之群組中之步驟:

- (a) 共同培養CD4陽性T細胞與CD8陽性T細胞兩者，及已接觸如[4]或[5]之胜肽的APC;及
- (b) 共同培養CD8陽性T細胞，及已接觸如[4]或[5]之胜肽的APC。

[16] 一種增強由MHC第II類分子媒介之免疫反應的方法，該方法包含對於對象投予選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分的步驟：

- (a) 一或多種如[1]至[5]中任一項之胜肽；
- (b) 一或多種如[6]之聚核苷酸；
- (c) 一或多種APC，其在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段；
- (d) 一或多種Th1細胞，其辨識在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之APC；及
- (e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。

[17] 一種單離的APC，其在表面上呈現MHC第II類分子與如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之複合體。

[18] 一種APC，係由如[12]或[13]之方法所誘導。

[19] 一種單離的Th1細胞，其辨識在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之APC。

[20] 一種Th1細胞，係由如[14]之方法所誘導。

[21] 一種誘導在有須要的對象中對抗癌之免疫反應的方法，該方法包含對於該對象投予包含選自於由以下構成之群組中至少一種有效成分的組合物的步驟：

- (a) 一或多種如[1]至[5]中任一項之胜肽；
- (b) 一或多種如[6]之聚核苷酸；
- (c) 一或多種APC，其在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段；
- (d) 一或多種Th1細胞，其辨識在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之APC；及
- (e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。

[22] 一種抗體或其在免疫上有活性的片段，係對抗如[1]至[5]中任一項之胜肽。

[23] 一種載體，包含編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽的核苷酸序列。

[24] 一種宿主細胞，其經過以如[23]之表現載體轉形或轉染。

[25] 一種診斷套組，包含如[1]至[5]中任一項之胜肽、如[6]之聚核苷酸或如[22]之抗體。

【0017】 如上述之外，當閱讀下列詳細敘述並結合伴隨之圖式與實施例時，本發明之其他目標或特徵將變得更全然明顯。然而，需要瞭解的是，本發明之前述發明內容與下列詳細敘述為做為例子之實施例，並不限制本發明或本發明之其他替代實施例。特別是，當以一些特定實施例敘述本發明於此處，可以瞭解的是，敘述為說明本發明，並不被構築為本發明之限制。熟悉此技藝人士可想到各種修飾與應用，而不違反本發明之精神與範圍，如附上之申請專利為所描述。同樣地，從此發明內容與下述特定實施例，本發明之其他目標、特徵、優勢與優點為明顯的，且對熟悉此技藝人士而言為無困難地明白無誤。自上述結合伴隨之例子、資料、圖式與由其而來被描寫之所有合理的推論，單獨或考慮此處引入之參考文獻，上述的目標、特徵、優勢與優點為明顯。

【圖式簡單說明】

【0018】 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顯示混雜之HLA 第II類結合KIF20A衍生胜肽，其包括由電腦演算法預測的CTL抗原決定位(一致性方法)。A部分繪示使用電腦演算法(IEBD analysis resource，一致性方法，http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html) 實施之人類KIF20A蛋白質之胺基酸序列的分析結果。水平軸之數字代表KIF20A衍生之15員胜肽之N-端的胺基酸殘基位置。小數字的一致性百分等級(percentile rank)代表對

於HLA第II類分子的親合性強。B部分繪示選出的4個長胜肽(KIF20A (60-84), 25員; KIF20A (494-517), 24員; KIF20A (809-833), 25員; KIF20A (843-863), 22員), 其對於多種HLA-第II類對偶基因產物(DRB1*04:05、DRB1*15:02、及DRB4*01:03)具有重疊的高一致性百分等級(A, 1至4號之黑條)。KIF20A (60-84)與KIF20A (809-833)包括由CTL在HLA-A24或-A2之背景中辨識之10員或9員胜肽。

圖2顯示以長胜肽刺激以誘導KIF20A專一性CD4⁺ T細胞, 及鑑別限制HLA-第II類分子。CD4⁺ T細胞株係由對於帶有各種HLA-第II類基因型之2名健康捐贈者至少經過3回合KIF20A (60-84) 或KIF20A (809-833)刺激後所產生, 且IFN- γ 產生CD4⁺ T細胞之數目係以ELISPOT分析法分析。於A部分, 顯示針對3名健康捐贈者對抗經KIF20A (60-84)或KIF20A (809-833)脈衝之自體PBMC反應的反應。此等CD4⁺ T細胞被以單獨的自體PBMC(-)、經KIF20A (60-84)或KIF20A (809-833) (10 micro-g/ml)脈衝之PBMC, 或經KIF20A (60-84) 或 KIF20A (809-833)脈衝之PBMC在專一於HLA-DR、HLA-DP或HLA-DQ之5 micro-g/ml mAb存在下進行刺激。B部分中, 來自捐贈者HDK1之受HLA-DP限制且為KIF20A (60-84)專一之CD4⁺ T細胞和經或未經KIF20A (60-84)脈衝之異體PBMC, 或從HLA-DP2陽性或陰性的4名捐贈者分離且經KIF20A (60-84)脈衝之異體PBMC, 一起於抗HLA-DR或抗HLA-DP阻斷mAb (上分格)存在下共同培養。將從HLA-DR15陽性健康捐贈者建立之HDK2A KIF20A (60-84)專一性散裝CD4⁺ T細胞株, 與經或未經以KIF20A (60-84)脈衝之L-DR15、或經KIF20A (60-84)脈衝之L-DR15在抗HLA-DR或抗HLA第I類阻斷mAb存在下、或經或未經以KIF20A (60-84)脈衝之L-DR8, 進行共同培養。IFN- γ 產生Th細胞之數目以ELISPOT分析法分析(下分格)。於C部分, 將從HLA-DR53陽性捐贈者HDK1而來的KIF20A (809-833)專一性CD4⁺ T細胞株, 與經或未經KIF20A (809-833)脈衝之L-DR53、或經KIF20A (809-833)脈

衝之L-DR53在抗HLA-DR或抗HLA第I類阻斷 mAb存在下、或經或未經以KIF20A (809-833)脈衝之L-DR4共同培養(左分格)。將從HLA-DR15陽性捐贈者HDK2而來之KIF20A (809-833)專一性CD4⁺ T細胞株，與經或未經以KIF20A (809-833)脈衝之L-DR15、經以KIF20A (809-833)脈衝之L-DR15於抗HLA-DR或抗HLA第I類阻斷 mAb存在下、或經或未經以KIF20A (809-833)脈衝之L-DR8共同培養(右分格)。此等捐贈者的HLA類型顯示在各分格的頂端。資料以二重複或三重複分析之平均值 $\pm$ SD代表。顯示有類似結果的至少3次獨立實驗的代表性資料。於D部分，針對HLA-DR4陽性健康捐贈者，顯示抗經KIF20A (494-517)脈衝之自體PBMC之反應。此 CD4⁺ T細胞，以PBMC單獨 (-)、經KIF20A (494-517)脈衝之PBMC (10 micro-g/ml)、或經KIF20A (494-517)脈衝之PBMC於專一於HLA-DR或HLA-DP 之5 micro-g/ml mAb存在下，進行刺激(上分格)。將從HLA-DR4-陽性健康捐贈者HDK1建立之KIF20A (494-517)專一性CD4⁺ T細胞株，與經或未經以KIF20A (494-517)脈衝之L-DR4、經WT1胜肽脈衝之 L-DR4、經KIF20A (494-517) 脈衝之L-DR4在抗HLA-DR或抗HLA第I類阻斷mAb存在下、或經或未經KIF20A (494-517)脈衝之L-DR53進行共同培養。IFN- γ 產生Th細胞之數目以ELISPOT分析進行(下分格)。於E部分，針對HLA-DR4-與DR53陽性健康捐贈者，顯示抗經KIF20A (843-863)脈衝之自體PBMC的反應。此 CD4⁺ T細胞，以PBMC單獨 (-)、經KIF20A (843-863)脈衝之PBMC (10 micro g/ml)，或經KIF20A (843-863) 脈衝之PBMC於對HLA-DR或HLA-DP 為專一之5 micro-g/ml mAb存在下刺激。

圖3顯示散裝(bulk) KIF20A專一性CD4⁺ Th細胞株的功能定性。於A部分，在將T細胞(1×10^4)，和經 KIF20A (60-84)脈衝之自體 PBMC (3×10^4)或經 KIF20A (809-833)脈衝之L-DR53 (5×10^4)共同培養20小時後，收集培養基並使用Bio-Plex分析系統測量細胞激素(IFN- γ 、TNF-alpha、GM-CSF、MIP1-beta、IL-2、IL-4、

IL-7)的濃度。資料以三重複分析的平均 $\pm$ SD表示。於B部分，繪示在抗原刺激後，暴露於CD4⁺ T細胞的細胞表面上之CD107a的偵測。將細胞以KIF20A (60-84)、KIF20A (809-833)或無關的胜肽再度刺激。在圖中的數字代表有此象限特性的細胞群體的百分比 (CD4⁺ CD107a⁺ T細胞)。

圖4顯示辨識載有此KIF20A蛋白質之自體DC的KIF20A (60-84)與KIF20A (809-833)專一性Th選殖體。於A部分，將從HDK2 (左分格)建立之該受HLA-DR15限制之KIF20A (60-84)專一性Th選殖體或從HDK1 (2×10^4 /井)建立之該受HLA-DR53限制之KIF20A (809-833)專一性Th選殖體 (2×10^4 /井)(右分格)，與載有重組KIF20A蛋白質(50 micro-g/ml)之自體DC(5×10^3 /井)於抗-HLA-DR或抗-HLA第I類阻斷mAb存在下、對照蛋白質、或未載入之DC一起共同培養。IFN- γ 產生Th選殖體之數目，以ELISPOT分析法分析。資料以二重複之平均 $\pm$ SD表示。顯示來自有類似結果的3次獨立實驗的代表性資料。於B部分，從捐贈者HDK1建立之受HLA-DP2限制之KIF20A (60-84)專一性Th選殖體(2×10^4 /井)，與載有此重組KIF20A蛋白質 (50 micro-g/ml)之自體DC(5×10^3 /井) 於抗HLA-DP或抗HLA第I類阻斷 mAb存在下、對照蛋白質共同培養。IFN- γ 產生Th選殖體之數目以ELISPOT分析法分析。資料以二重複之平均 $\pm$ SD表示。顯示有類似結果的2次獨立實驗的代表性資料。

圖5顯示誘導KIF20A-A24 (66-75)專一性CD8⁺ T細胞體外擴增之KIF20A (60-84) LP。於A部分，將PBMC (2×10^6 /井)與KIF20A (60-84) LP (7 micro-M)或KIF20A-A24 (66-75) SP (7 micro-M)一起培養2週，而不添加任何細胞激素。於第0及7天，加入KIF20A衍生之LP與SP，然後於以胜肽進行體外刺激的第14天，收集細胞，以經PE標定之HLA-A*24:02/KIF20A-A24 (66-75)胜肽複合體之四元體與經FITC標定之抗人類CD8 mAb組合染色，並以細胞流式計數器分析。於右上象限的點代表CD8⁺ 四元體⁺ T細胞。顯示的事件針對CD8⁺ T細胞閘控。在圖中的

數字代表有右上象限特性的細胞群體的百分比($CD8^+$ 四元體 $^+$ T細胞)。資料為從2名HLA-A24陽性健康捐贈者得到之有類似結果的許多獨立實驗中之代表者。於B部分，顯示在從一名HLA-A24-陽性健康捐贈者HDK5 (2名HLA-A24陽性健康捐贈者中之1名)而來之PBMC中之個別的培養井中的 $CD8^+$ 四元體 $^+$ 細胞之絕對數目(各點代表在一培養井中之KIF20A-A24 (66-75)專一性CTL之絕對數目)。在各組圖中的線，代表中值，“n.s.”代表以無參數之曼-惠特尼(Mann-Whitney)U檢定分析結果為統計上“不顯著”。於C部分，於以胜肽進行體外刺激的第14天，收集細胞並且以IFN- γ ELISPOT分析法評量。棒代表當細胞(1×10^5 /井)經以載有KIF20A (66-75)或無關之HIV-A24 胜肽之C1R2402細胞(2×10^4 /井)再刺激時，IFN- γ 點的數目。顯示有類似結果的4次獨立實驗的代表性資料。資料以二重複之平均 $\pm$ SD表示。統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)以星號表示。

圖6顯示在體外刺激KIF20A-A2 (809-817)專一性 $CD8^+$ T細胞的KIF20A (809-833) LP。於A部分，從捐贈者HDK6產生之CTL細胞株中專一於KIF20A-A2 (809-817) SP的 $CD8^+$ T細胞頻率，以IFN- γ ELISPOT分析法檢驗。計算於KIF20A-A2 (809-817) SP或經無關的SP脈衝的T2細胞刺激後， IFN- γ 產生之KIF20A-A2 (809-817) SP專一性散裝 CTL的數目。於B部分，於載入或未載入KIF20A (809-833) LP之DC、載入無關LP之DC、載入KIF20A (809-833) LP之DC於抗HLA-DR或抗HLA第I類阻斷mAb存在下之刺激後之IFN- γ 產生之KIF20A-A2 (809-817) SP專一性散裝 CTL的數目，以ELISPOT分析法計數。資料以2重複分析的平均值 $\pm$ SD代表。統計學上顯著的不同($p < 0.05$)，以星號表示。於C部分，於經KIF20A (60-84) LP免疫之小鼠中誘導KIF20A-A24 (66-75)SP專一性CTL。將HLA-A24 Tgm以KIF20A (60-84) LP免疫。於以KIF20A (60-84) LP進行第3次接種後，將在鼠蹊部淋巴結的小鼠 $CD8^+$ T細胞以經KIF20A-A24 (66-75) SP 脈衝之BM-DC刺激。產生IFN- γ 之鼠 $CD8^+$ T細胞，利用生物體外ELISPOT分析法分析。

顯示有類似結果的5次獨立實驗的代表性資料。

圖7顯示利用KIF20A- LP專一性CD4⁺ T細胞之KIF20A-SP專一性CTL之經增強的誘導。於A部分，將來自產生受HLA-DR53限制之KIF20A (809-833) LP專一性Th選殖體之HLA-A2⁺/DR53⁺ 健康捐贈者(HDK1)的PBMC，與KIF20A-A2 (809-817) SP (SP)、KIF20A (809-833) LP (LP)、KIF20A-A2 (809-817) SP + KIF20A (809-833) LP (SP + LP)、KIF20A (809-833) LP + KIF20A (809-833) LP專一性Th選殖體 (LP + Th選殖體)或SP + LP + KIF20A (809-833) LP專一性Th選殖體 (SP + LP + Th選殖體)一起培養11天。於第11天，將細胞以KIF20A-A2 (809-817) SP專一性四元體及抗人類CD8 mAb染色，並以流式細胞計數器分析。於B部分，顯示從有類似結果的3次獨立實驗獲得的代表性KIF20A-A2 (809-817) SP專一性四元體獲得之染色(於CD8⁺ T細胞閘控)。於C部分，KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CD8⁺ T細胞之CD107a表現，由於活化的KIF20A (809-833) LP專一性Th細胞而擴增。來自HLA-A24⁺/DR15⁺ (HDK5)之KIF20A (809-833) LP專一性散裝 CD4⁺ T細胞與KIF20A-A24 (66-75) SP專一性散裝 CD8⁺ T細胞，被與自體DC一起在KIF20A-A24 (66-75) SP (SP單獨)、KIF20A-A24 (66-75) SP + 對照LP (對照LP + SP)或KIF20A-A24 (66-75) SP + KIF20A (809-833) LP (KIF20A (809-833)-LP + SP)存在下培養，而不添加任何細胞激素。在與肽進行1週體外培養後，該培養的細胞被以經PE標定之HLA-A*24:02/KIF20A-A24 (67-75)複合體的四元體及以PerCP標定之抗人類CD8 mAb染色。資料以3重複實驗的平均± SD代表。顯示有類似結果的3次獨立實驗的代表性資料。於D部分，與肽一起在體外培養1週後，將培養的細胞以KIF20A-A24 (66-75) SP 再度刺激，並以經PE標定之HLA-A*24:02/KIF20A- A24 (67-75) 複合體的四元體與經FITC標定之抗人類CD107a mAb及PerCP標定之抗人類CD8 mAb染色。顯示以KIF20A-A24 (66-75) SP再度刺激後，於細胞表面上表現CD107a之KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CTL

之絕對數目。資料以三重複之平均 $\pm$ SD表示。顯示有類似結果的3次獨立實驗的代表性資料。

圖8顯示從患有HNMT且已接受以TAA衍生之CTL抗原決定位胜肽進行之免疫療法的病患分離的PBMC中之KIF20A-LP專一性Th細胞之存在。於A部分，於利用體外以KIF20A (60-84) LP與KIF20A (809-833) LP的混合物刺激PBMC達1週後，以IFN- γ ELISPOT分析法偵測個別的KIF20A-LP專一性T細胞的頻率。於B部分，評估16名患有HNMT之已接受免疫療法的病患中及9名健康捐贈者中之KIF20A-LP專一性Th1細胞反應。此等結果係代表減去背景值之專一性IFN- γ 點。各點代表一名個別的捐贈者。水平線代表中值， p 值代表從無參數曼-惠特尼U檢定獲得的統計結果。於C部分，顯示HNMT31 與 HNMT43中之IFN- γ 產生之KIF20A (809-833) LP專一性Th細胞之HLA第II類限制。將已用LP刺激1週的周邊血液單核球細胞再度以KIF20A (809-833) LP，於專一於HLA-DR、-DP、-DQ或HLA第I類之mAb存在下進行刺激。於D部分，於免疫療法的療程中偵測於患有HNMT之病患中的KIF20A-LP專一性Th1細胞反應。於E部分，顯示於癌組織及骨肉瘤中之KIF20A蛋白質之免疫組織化學分析(原始放大倍數 $\times$ 400)。顯示在HNMT31之腺樣囊性癌及HNMT108之骨肉瘤的組織切片上的陽性KIF20A 免疫組織學染色。也顯示於HNMT102之鱗狀細胞癌及HNMT107之骨肉瘤的組織切片上的陰性KIF20A免疫組織學染色。針對KIF20A為陽性的惡性細胞，顯示均質的細胞質染色。HNMT組織中之KIF20A表現，與罹患HNMT之病患中的KIF20A-LP專一性Th1細胞反應有關聯性。於F部分，顯示HNMT病患之臨床特性。以如材料與方法項目所述之IFN- γ ELISPOT分析測量KIF20A專一性T細胞反應。正及負反應以(+)及(-)分別表示。畫底線的HLA第II類對偶基因因為在健康捐贈者中編碼將KIF20A-LP對於Th細胞呈現之HLA第II類分子(圖2; HLA-DRB1*15:02、DR53、及DPB1*02:01), IHC, 免疫組織化學; CTR, 臨床實驗註冊; HNMT, 頭頸惡

性腫瘤; M/F, 男/女; LP, 長胜肽; n.t., 未檢測; DR53, DRB4*01:03。

【實施方式】

【0019】 [實施例]

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。

【0020】 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。

【0021】 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瞭解的含意相同。然而，若有抵觸，依本說明書，包括定義為準。

除非特別指明，此處使用的單字「一」(“a”, “an”)及「該」意指「至少一」。

【0022】 與物質(例如，胜肽、抗體、聚核苷酸等)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，一經單離的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、脂質或來自該胜肽從其衍生出之細胞或組織來源的其他污染蛋白質，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的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少於約該胜肽製備物的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少於約該胜肽製備物的30%、20%、10%、5% (以乾重計)之涉及合成該胜肽的化學前驅體或其他化學物質為。含有經單離的或經純化的胜肽的特定胜肽，例如可藉由在該蛋白質製備物之十二烷基硫酸鈉(SDS)聚丙烯醯胺凝膠電泳與考馬西亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色或類似之膠體後之單一譜帶的出現而顯示。於一較佳具體例，本發明之胜肽及聚核苷酸係經單離的或經純化。

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，於其中一個或更多胺基酸殘基為經修飾的殘基，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。

【0023】 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。天然發生的胺基酸係由遺傳碼編碼者，以及於細胞中轉譯後經過修飾者(例如羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸，及O-磷絲胺酸)。用詞「胺基酸類似物」意指與天然發生胺基酸具有相同基本化學結構(鍵結於氫的alpha碳、羧基、胺基及R基)但是具有經過修飾的R基或經過修飾的骨架(例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸、亞砷、甲硫胺酸甲基銻鹽)。用詞「胺基酸擬似物」意指與一般胺基酸具有不同結構但有類似功能的化學化合物。

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

【0024】 用語「基因」、「聚核苷酸」及「核酸」在此可互換使用，且如無特別指明，係以其通用可接受的單字母碼所指明者。

用語「劑」、及「組合物」在此可互換使用，意指以特定量含有特定成分的產品，以及將該特定成分以特定量直接或間接組合得到的任意產品。關於醫藥組合物之此種用語係意欲包含含該有效成分及成為擔體的任意鈍性成分的產品，及由直接或間接組合、複合或聚集該等成分中任意2種或更多而獲得的任意產品，或由該等成分中2種或更多解離而得到的任意產品，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。因此本發明之醫藥組合物包括藉由混合本發明化合物及醫藥上或生理上可接受擔體而製作的任意組合物。

【0025】 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，於一醫藥組合物的背景中，「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MHC Class II 分子媒介的免疫反應。在被配製(formulated)前，「有效成分」也稱為「散裝物質(bulk)」、「藥物物質」或「技術品」。

此處使用之用語「醫藥上可接受之擔體」或「生理上可接受之擔體」，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。

【0026】 除非另外定義，用語「癌症」意指過度表現KIF20A基因的癌症，

例如包括膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC) 及頭頸惡性腫瘤(HNMT)。

除非另外定義，用語「T淋巴球」及「T細胞」在此可以互換使用。

【0027】 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，其能辨識非己細胞(例如腫瘤細胞、受病毒感染的細胞)，並誘導此種細胞的死亡。CTL係從CD8⁺ T淋巴球分化，且能辨識由MHC第I類分子呈現的胜肽。

除非另外定義，用語「HLA-A24」在此意指包含亞型HLA-A24的型，亞型的例子包括但不限於HLA-A*2401、HLA-A*2402、HLA-A*2403、HLA-A*2404、HLA-A*2407、HLA-A*2408、HLA-A*2420、HLA-A*2425及HLA-A*2488。

除非另外定義，用語「HLA-A2」在此代表性意指亞型，亞型的例子包括但不限於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。

【0028】 除非另外定義，用語「T輔助1型細胞」及「Th1細胞」，在此係可互換使用，且除非特別指明，係指能夠辨識由MHC第II類分子呈現的胜肽且關連於細胞免疫的CD4⁺ T淋巴球次群組。除非另有定義，用語「Th細胞」、「CD4⁺ T細胞」及「CD4⁺ 輔助T細胞」，在此亦可互換使用。Th1細胞分泌多種細胞激素(例如IFN- γ 、IL-2、TNF-beta、GM-CSF、TNF-alpha等)來幫忙活化及/或刺激其他關於細胞免疫的免疫細胞(例如CTL、巨噬體)。

【0029】 除非另有定義，用語「HLA-DR4」係指亞型，其例子包括但不限於 HLA-DRB1*04:01、HLA-DRB1*04:02、HLA-DRB1*04:03、HLA-DRB1*04:04、HLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*04:06、HLA-DRB1*04:07、HLA-DRB1*04:08、HLA-DRB1*04:09、HLA-DRB1*04:10及HLA-DRB1*04:11。

除非另有定義，用語「HLA-DR9」，係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*09:02、HLA-DRB1*09:03、LA-DRB1*09:04、HLA-DRB1*09:05、HLA-DRB1*09:06、HLA-DRB1*09:07、HLA-DRB1*09:08及HLA-DRB1*09:09。

除非另有定義，用語「HLA-DR15」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB1*15:01、HLA-DRB1*15:02、HLA-DRB1*15:03、LA-DRB1*15:04、HLA-DRB1*15:05、HLA-DRB1*15:06、HLA-DRB1*15:07、HLA-DRB1*15:08、HLA-DRB1*15:09、HLA-DRB1*15:10及HLA-DRB1*15:11。

除非另有定義，用語「HLA-DR53」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB4*01:01及HLA-DRB4*01:03。

除非另有定義，用語「HLA-DP2」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DPB1*02:01及HLA-DPB1*02:02。

【0030】 除非另有定義，詞語「經由MHC第II類分子媒介的免疫反應」，係指由於MHC第II類分子呈現胜肽所誘導之免疫反應。在此「由MHC第II類抗原媒介之免疫反應」，包括由CD4⁺ T細胞，特別是Th1細胞誘導的免疫反應。此種免疫反應的例子包括但不限於生產細胞激素(例如IFN- γ 、IL-2、TNF-beta、GM-CSF、TNF-alpha等)，及活化及/或刺激其他免疫細胞(例如CTL、巨噬體等)。

除非另有定義，詞語「專一於KIF20A之Th1細胞」，係指由呈現衍生自KIF20A之胜肽的抗原呈現細胞所專一性活化，而不被其他抗原呈現細胞活化的Th1細胞。

【0031】 除非另有定義，詞語「KIF20A專一性CTL」，係指對抗表現KIF20A之目標細胞專一性顯示細胞毒殺性的CTL。

除非另有定義，當使用在胜肽上下文，詞語「CTL誘導能力」，係指一胜肽當被呈現於抗原呈現細胞上時，誘導CTL的能力。

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

本發明上下文中，用語「抗體」意指專一性地對於指定蛋白質或其胜肽反應的免疫球蛋白及其片段。抗體可包括人類抗體、靈長源抗體、嵌合抗體、雙專一抗體、人類化抗體、融合於其他蛋白質或放射性標記的抗體，及抗體片段。再者，抗體在此係以最廣的含意使用，且具體而言含蓋完整無缺的單株抗體、多株抗體、由至少兩個完整無缺的抗體形成的多專一性抗體(例如雙專一性抗體)，及抗體片段，該抗體片段只要能顯現所望的生物學活性即可。「抗體」代表所有類型者(例如IgA、IgD、IgE、IgG及IgM)。

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

【0032】 II.胜肽

以下詳述之本發明之胜肽，可指稱為「KIF20A胜肽」或「KIF20A多胜肽」。

為了證明衍生自KIF20A之胜肽作用如一被T輔助1型(Th1)細胞所辨認之抗原，分析衍生自KIF20A之胜肽(序列識別號: 11)以確定是否其為由MHC第II類分子混雜地限制之抗原決定位。衍生自KIF20A之混雜的MHC第II類結合胜肽的候選物，基於其對HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2之結合親和力確認。在藉由載有這些胜肽之樹突細胞(dendritic 細胞, DC)以體外刺激CD4⁺T細胞後，使用下列各個胜肽成功建立Th1細胞：

KIF20A (60-84)/ DSMEKVKVYLRVRPLLPELERQED (序列識別號: 1)，

KIF20A (809-833)/ CIAEQYHTVLKLQGQVSAKKRLGTN (序列識別號: 2)，

KIF20A (494-517)/ TLHVAKFSAIASQLVHAPPMQLGF (序列識別號: 3)，及

KIF20A (843-863)/ PPGKKPFLRNLLPRTPTCQSS (序列識別號: 4)。

【0033】 此等上述提及的已建立的Th1細胞，顯示回應於經各別的胜肽脈衝之抗原呈現細胞的刺激，顯示強的專一性的Th1細胞活性。再者，上述胜肽可以刺激由數種日本群體常見的HLA-DR及HLA-DP分子（例如HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2）限制的Th1細胞。此等結果證明KIF20A係由Th1細胞辨識的抗原，且此胜肽係受數種HLA-第II類分子（例如HLA-DR4、HLA-DR53、HLA-DR15，及HLA-DP2）混雜的限制的KIF20A的抗原決定位胜肽；因此，此種胜肽作為CTL的細胞毒性的標靶抗原為有效。

【0034】 上述鑑別的胜肽更包括一CTL抗原決定位之胺基酸序列，其有誘導專一於KIF20A之CTL的能力，且如同此處證明，此胜肽可誘導專一於KIF20A之CTL及Th1細胞。因此，此等胜肽可為用於誘導對抗表現KIF20A之癌的免疫反應之適合的胜肽。因為KIF20A基因在大多數癌組織係過度表現，包括例如膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC) 及頭頸惡性腫瘤(HNMT)，代表其係免疫療法的一個良好標的。

【0035】 因此，本發明提供有誘導專一於KIF20A之Th1細胞之能力的胜肽。本發明之胜肽可結合於至少一MHC第II類分子，並被呈現在抗原呈現細胞上。或本發明之胜肽之片段可結合於至少一MHC第II類分子，並被呈現在抗原呈現細胞上。此胜肽之片段，可藉由在抗原呈現細胞處理而產生。於較佳具體例，本發明之胜肽或其片段有能力結合2或更多種MHC第II類分子(例如HLA-DR4及HLA-DR15、HLA-DR4及HLA-DP2、HLA-DR15及HLA-DP2、HLA-DR4、HLA-DR15及HLA-DP2、HLA-DR15、HLA-DR53、HLA-DP2及HLA-DR53、或HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2)。換言之，本發明之胜肽有能力誘導受2或更多種MHC第II類分子限制之Th1細胞。於另一具體例，本發明之胜肽包括有KIF20A專一性CTL誘導能力之胜肽之胺基酸序列。此種具KIF20A

專一性CTL誘導能力的胜肽的典型例，包括有序列識別號: 5或6之胺基酸序列的胜肽。

【0036】 由於MHC第II類分子中之結合溝係在兩端開放，所以可容MHC第II類結合胜肽於長度有靈活性。MHC第II類分子的核心模體由9個胺基酸殘基組成，且MHC第II類結合胜肽一般在此核心結合模體的側面有其他的胺基酸殘基。側面胺基酸殘基之數目不限。因此，並非序列識別號: 1、2、3或4之所有胺基酸殘基對結合MHC第II類分子為必要。因此本發明之胜肽可為有能力誘導Th1細胞之胜肽，此種胜肽包括選自於由以下構成之群組之胺基酸序列:

(a) 一連續的胺基酸序列，其具有選自於序列識別號: 1、2、3或4之胺基酸序列中的長於9個胺基酸;及

(b) 如(a)之胺基酸序列，其中胺基酸序列有1個、2個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加。

【0037】 MHC第II類結合胜肽通常為10-30個胺基酸。當序列識別號: 1、2、3及4之胺基酸序列係由KIF20A (序列識別號: 11)之部分胺基酸序列構成，本發明之胜肽可為以下[1]至[5]之胜肽:

[1] 一種單離的胜肽，其長度為10-30個胺基酸且包含序列識別號: 11的一部分胺基酸序列，其中該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列:

(a) 一連續的胺基酸序列，其具有選自於序列識別號: 1、2、3或4之胺基酸序列中的長於9個胺基酸;及

(b) 一胺基酸序列，其中(a)之胺基酸序列有1個、2個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加，該胜肽有誘導T輔助1型(Th1)細胞的能力。

[2] 如[1]之單離的胜肽，其中，該胜肽或其片段有結合於至少2種MHC第II類分子的能力。

[3] 如[2]之單離的胜肽，其中，該MHC第II類分子選自於由HLA-DR4、

DR15、DR53及DP2構成之群組。

[4] 如[1]至[3]中任一項之單離的胜肽，其中，該胜肽包含具有KIF20A專一性細胞毒性T淋巴球(CTL)誘導能力之胜肽的胺基酸序列。

[5] 如[4]之單離的胜肽，其中，該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列：

(a) 一胺基酸序列，其選自於序列識別號：1、2、3及4構成之群組；及

(b) 一胺基酸序列，其中(a)之胺基酸序列有1個、2個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加。

【0038】 本發明之胜肽誘導之Th1細胞對於KIF20A係專一。

因此於一些具體例，本發明提供長度少於30個胺基酸之胜肽，其由序列識別號：11的胺基酸序列的一部分胺基酸序列所構成，其中該胜肽包含序列識別號1、2、3或4之胺基酸序列。

【0039】 一般而言，現在例如在網際網路上已有軟體程式例如Wang P et al. 2008. *PLoS Comput Biol*.4(4):e1000048. 11:568; 及 Wang P et al. 2010. *BMC Bioinformatics*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例如Nielsen M and Lund O. 2009. *BMC Bioinformatics*. 10:296.; Nielsen M et al. 2007. *BMC Bioinformatics*. 8:238. Bui HH, et al. 2005. *Immunogenetics*. 57:304-314. Sturniolo T et al. 1999. *Nat Biotechnol*. 17(6):555-561 and Nielsen M et al. 2008. *PLoS Comput Biol*. 4(7)e1000107敘述者測量。因此本發明包含KIF20A的胜肽，其係以此種已知程式決定會與鑑別的HLA抗原結合。

【0040】 如上述，MHC第II類結合胜肽在其長度有靈活性，序列識別號：1、2、3或4之胺基酸序列可選擇性地有額外的胺基酸殘基位在側面，條件是獲得之胜肽保留必要的Th1細胞誘導能力即可。此種有Th1細胞誘導能力的胜肽一

般少約於30個胺基酸，常少於約29個胺基酸，經常少於約28或27個胺基酸。位在選自序列識別號: 1、2、3及4中之胺基酸序列側面的特定胺基酸序列，不特別限制，且可包括任意種類胺基酸，條件是只要此側面胺基酸序列不要減弱原始胜肽之Th1細胞誘導能力即可。於典型的具體例，此種側面胺基酸序列可選自於鄰近於序列識別號: 1、2、3及4之胺基酸序列的序列識別號: 11之胺基酸序列;但本發明不限於此。如上，本發明也包括有Th1細胞誘導能力的胜肽，及選自序列識別號: 1、2、3及4之胺基酸序列。

【0041】 另一方面，由於MHC第II類分子之核心結合模體由9個胺基酸殘基組成，所以序列識別號: 1、2、3或4之胺基酸序列全長對於結合MHC第II類分子及誘導Th1細胞並非為必要。因此，本發明胜肽之形式可為有序列識別號: 1、2、3或4之超過9個連續胺基酸的胺基酸，前提是此胜肽保留必要的Th1細胞誘導能力。有Th1細胞誘導能力之胜肽，一般長於約10個胺基酸，時常超過11或12個胺基酸，經常長於13或14個胺基酸。因此本發明之胜肽可為有Th1細胞誘導能力之胜肽，且為有來自序列識別號1、2、3或4之胺基酸序列之長於9、10、11、12、13或14個連續胺基酸之胺基酸序列。

【0042】 一般而言，已知在蛋白質中修飾一個或更多胺基酸不會影響該蛋白質的功能，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，相較於原始參考序列，由在其中一、二或數個胺基酸殘基已被修飾(即，取代、刪除、插入或加成)之胺酸序列所構成的胜肽)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，於本發明一具體例中，本發明之胜肽可具有Th1細胞誘導能力與其中一、二或更多胺基酸經加成、插入、刪除及/或取代之選自序列識別號: 1、2、3及4中的胺基酸序列兩者。或者，本發明之胜肽可具有Th1

細胞誘導能力，及具有一胺基酸序列於其中一、二或更多胺基酸加成、插入、刪除及/或取代於序列識別號1、2、3或4中。

【0043】 熟悉此技藝人士會認定改變單一胺基酸或一小百分比之胺基酸之對於一胺基酸序列的個別的添加或取代傾向產生保存原始胺基酸支鏈的特性。因此它們常被意指為「保守取代(*conservative substitutions*)」或「保守修飾(*conservative modifications*)」，其中一蛋白質之改變導致對原始蛋白質而言一具有功能相似的蛋白質。提供功能相似胺基酸之保守取代表已為本技術領域所熟知。胺基酸支鏈的特徵的例子為疏水胺基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水胺基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)與具有下列共同官能基或特徵之支鏈：一脂肪族支鏈(G, A, V, L, I, P)；一含羥基支鏈(S, T, Y)；含硫原子支鏈(C, M)；含羧酸與胺基支鏈(D, N, E, Q)；含鹼支鏈(R, K, H)；以及含芳香族支鏈(H, F, Y, W)。此外，下列八個群體各包含為彼此保守取代之胺基酸：

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

【0044】 此種經保守修飾胜肽也被視為本發明之胜肽。然而，本發明之胜肽並不限於此，且可包括非保守修飾，只要經修飾之胜肽維持原始胜肽的Th1細胞誘導能力。更進一步而言，經修飾之胜肽不排除多形變體(*polymorphic variants*)、種間同質體(*interspecies homologues*)與KIF20A對偶基因(*alleles*)之可誘

導Th1細胞的胜肽。

【0045】 為了維持Th1細胞誘導能力，可修飾（插入、加入、刪除及/或取代）一小數目（例如一、二或數個）或小百分比之胺基酸。此處用語「數個」指5或更少個胺基酸，例如4個或3個或更少。被修飾之胺基酸之百分比可為，較佳20%或更少，更較佳為，15%或更少，甚至更佳為，10%或8%，少或1至5%。

【0046】 本發明之較佳胜肽，即序列識別號: 1、2、3及4 (KIF20A 60-84、809-833、494-517、843-863)之同源性分析結果確認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。所以，當使用於免疫療法時，可顯著降低這些胜肽產生未知或不欲的免疫反應的可能性。因此，此等胜肽被預期對於在癌症病患中誘出對抗KIF20A的免疫性高度有用。

【0047】 當使用於免疫療法之背景中，本發明之胜肽或其片段應呈現在抗原呈現細胞的表面，較佳為以與HLA 第II類抗原之複合體的形式呈現。因此宜選擇不僅會誘導Th1細胞，而且對於HLA 第II類抗原擁有高結合親和性的胜肽。為此，可將胜肽利用取代、插入、刪除及/或加成胺基酸殘基進行修飾，以產生結合親和性有所改善的修飾胜肽。

【0048】 本發明也考量附加一、二或數個胺基酸到該胜肽的N及/或C端。此種經修飾的具有高度HLA抗原結合親和性的胜肽並保留Th1細胞誘導能力者，也包括於本發明。例如本發明提供長度短於31、30、29、28、27或26個胺基酸的單離的胜肽，其結合於HLA 第II類抗原且具有Th1細胞誘導能力，且包含選自於序列識別號: 1、2、3及4構成的群組中的胺基酸序列中有1、2或數個胺基酸經修飾的胺基酸序列。

當此等胜肽與APC接觸，或被導入APC，會在APC中被處理而在APC上以經處理的片段呈現。例如，本發明之胜肽可被處理成通常由11-26 個(普通為15-25 個)胺基酸殘基構成的片段，以呈現在APC表面。

【0049】 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，例如自體免疫病症或對於特定物質之過敏症狀。因此，可使用可得的資料庫一開始進行同源性檢索，以避免該胜肽的序列符合其他蛋白質的胺基酸序列的情況。當與自然存在之目標胜肽相較，同源性檢索顯示沒有相同或與目標胜肽有1、2、3或4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Th1細胞及/或CTL誘導能力而不會有此種副作用的危險。

【0050】 雖然上述對於該HLA第II類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Th1細胞誘導能力的存在性。在此，用詞「Th1細胞誘導能力」代表當胜肽與抗原呈現細胞(APC)接觸於上時，授予誘導Th1細胞的能力。又，「Th1細胞誘導能力」包括胜肽誘導Th1細胞活化及/或Th1細胞增殖、促進Th1細胞媒介細胞激素產生，其包括IFN- γ 產生，以幫助及/或刺激其他的細胞(例如CTL、巨噬體)。

【0051】 Th1細胞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，與以該胜肽刺激後，與CD4-陽性T細胞(CD4⁺ T細胞)混合，然後測量該CD4⁺ T細胞生產與釋出的IFN- γ 。或者，該胜肽的Th1細胞誘導能力，可藉由Th1細胞對於CTL之活化來評估。比如，將CD4⁺ T細胞與由測試胜肽刺激的DC一起培養，然後跟CTL及針對CTL之標靶細胞混合。可將目標細胞以⁵¹Cr等放射性標定，從該Th1細胞釋出的細胞激素所活化的CTL的細胞毒殺活性，可藉由計算從該標靶細胞釋出的放射性活性計算。或者，Th1細胞誘導活性，可藉由測量於經測試胜肽刺激的抗原呈現細胞(APC)存在下，Th1細胞所生產及釋出的IFN- γ ，並使用抗IFN- γ 單株抗體使培養基上的抑制區可見化來

評估。

【0052】 除了上述修飾，本發明之胜肽可進一步連結於其他物質，只要所產生之經連結的胜肽保留原始胜肽的Th1細胞誘導能力即可。適當物質的例子包括，例如：胜肽、脂質、糖類及糖鏈、乙醯基、天然及合成的聚合物等。本發明之胜肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化等，所提供之修飾不會損害該原始胜肽的生物學活性。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)，或使該胜肽穩定化。

【0053】 例如，為了增加一胜肽的體內穩定性，該技術領域中已知導入D-胺基酸、胺基酸擬似物或非天然胺基酸；此概念也可採用於本發明之胜肽。一胜肽的穩定性，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)。

【0054】 本發明之胜肽，可以與HLA 第II類抗原一起以複合體形式呈現於APC之表面，然後誘導Th1細胞。因此本發明也包括與HLA 第II類抗原形成複合體在APC表面上的胜肽。呈現本發明胜肽之APC，可作為疫苗接種。

【0055】 包括在上述複合體中之HLA抗原之形式必須匹配於須治療及/或預防之對象之HLA抗原之形式。例如，日本群體中，HLA-DR4、DR53、DR15及DP2係盛行，故適於治療日本病患。一般而言，臨床上會預先檢查須治療之病患的HLA抗原類型，以能夠適當選擇具有對於特定HLA 第II類抗原結合之能力的胜肽。於較佳具體例，本發明之胜肽可以混雜的方式誘導Th1細胞。在此，當胜肽可誘導由至少2種不同的MHC第II類分子限制之Th1細胞時，則此胜肽之Th1細胞誘導能力係「混雜的(promiscuous)」。換言之，當一胜肽被至少2種不同的MHC第II類分子辨識，則此抗原辨識被視為「混雜的」。當使用於胜肽之上下文，詞彙「由至少2種不同之MHC第II類分子辨識」，係指此胜肽或其片段

可結合於至少2種不同的MHC第II類分子。例如，KIF20A (60-84) (序列識別號: 1) 被HLA-DR15、DP2及 DR4或DR53辨識，而KIF20A (809-833) (序列識別號: 2) 被，和HLA-DR15與 DR53辨識。因此此等胜肽係「混雜的」抗原決定位的典型例。

【0056】 當使用HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53或HLA-DP2陽性APC，宜使用具有序列識別號: 1之胺基酸序列的胜肽。當使用HLA-DR15或HLA-DR53陽性APC，宜使用具有序列識別號: 2之胺基酸序列的胜肽。當使用HLA-DR4陽性APC，宜使用具有序列識別號: 3之胺基酸序列的胜肽。另一方面，當使用HLA-DR4或DR53陽性APC，較佳胜肽係具有序列識別號: 4之胺基酸序列的胜肽。

因此於較佳具體例，可使用具有胜肽的序列識別號: 1之胺基酸序列，於在誘導前已鑑別具有HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53或HLA-DP2之對象中誘導Th1細胞。同樣地可使用具有胜肽的序列識別號: 2之胺基酸序列，於在誘導前已鑑別具有HLA-DR15或HLA-DR53之對象中誘導Th1細胞。相似地，可使用具有胜肽的序列識別號: 3之胺基酸序列，於在誘導前已鑑別具有HLA-DR4之對象中誘導Th1細胞。可使用具有胜肽的序列識別號: 4之胺基酸序列，於在誘導前已鑑別具有HLA-DR4或HLA-DR53之對象中誘導Th1細胞。

【0057】 III. KIF20A胜肽之製備

本發明之胜肽可使用周知的技術製備。例如本發明胜肽可藉由使用重組DNA技術或化學合成被合成製備。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。本發明胜肽可之後單離成亦即經精製或單離的成實質上不含其他天然發生的宿主蛋白質及其片段，或其他任意的化學物質。本發明之胜肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化;所提供之修飾不損害原始參考胜肽的生物學活性。可使用其他說明性的修飾，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。

【0058】 本發明之胜肽可依據選擇的胺基酸序列由化學合成獲得。例如可採用於合成的習知胜肽合成方法包括：

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

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

(iii) Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1975;

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

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

(vi) WO99/67288; 及

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

【0059】 或者，本發明之胜肽可採用任何已知用於生產胜肽的的遺傳工程方法獲得(例如Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu *et al.*) 1983, 101: 347-62)。例如，先製備底護有編碼為可表現形式(例如對應於啟動子序列的調節序列的下游)的目標胜肽的聚核苷酸的適當載體，並轉形到適當的宿主細胞中。然後將該宿主細胞培養以生產關注的胜肽。本發明之胜肽也可採用體外轉譯系統於體外生產。

【0060】 IV. 聚核苷酸

本發明提供聚核苷酸，其編碼為前述本發明胜肽當中任意者。此包括從天然發生的KIF20A基因(GenBank 存取號NM_005733(序列識別號:10))衍生的聚核苷酸，及其具有經保守性修飾的核苷酸序列的那些。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以外，AUG通常為甲硫胺酸的唯一密碼子，T而GG通常為色胺酸的唯一密碼子)可經修飾以產生功能上同一的分子。因此，編碼為一胜肽的核酸的各靜默變異係暗示敘述在各揭露的序列中。

【0061】 本發明之聚核苷酸可由DNA、RNA及其衍生物構成。如該技術領域中為人所知者，DNA分子係適當的由鹼基例如A、T、C及G構成，而在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基也會包括在聚核苷酸中。

【0062】 本發明之聚核苷酸可編碼為有或沒有中介(intervening)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聚核苷酸或該經轉譯的胜肽的切斷部位(例如，酵素辨識序列)。再者該聚核苷酸可包括對於編碼為本發明胜肽的編碼序列的任何額外的序列。例如該聚核苷酸可為一重組聚核苷酸，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，此種重組聚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聚核苷酸而製備。

【0063】 重組及化學合成技術均可使用於生產本發明之聚核苷酸。例如聚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，聚核苷酸可使用PCR技術放大，或在適當宿主中表現(參見例如Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New

York, 1989)。或者，聚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。

【0064】 V.抗原呈現細胞(APC)

本發明也提供抗原呈現細胞(APC)，其在表面上呈現於HLA第II類抗原與本發明之胜肽或其片段之間形成的複合體。藉由與本發明胜肽接觸而獲得之該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、Th1細胞或CTL的藥物組合投予。

【0065】 該APC不限於特定種類的細胞，且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，而會被淋巴球所辨識。因為DC係代表性的APC，其在APC中具有最強的Th1細胞誘導活性，故DC當成本發明的APC有用。

【0066】 再者，於較佳具體例，本發明之胜肽也會誘導經由MHC第I類抗原調節之CTL反應及Th1(第II類)。一般，已周知MHC第I類抗原辨識的抗原定位的長度較短(例如8-10個胺基酸殘基)於MHC第II類(15個或更長)。因此，本發明之胜肽之經處理產物造成誘導CTL。事實上，由 KIF20A胜肽((60-84); 序列識別號: 1)誘導的CTL會辨識已鑑別為CTL辨識抗原決定位之此片段(KVYLRVRPLL: 序列識別號: 6)。同樣地 KIF20A (809-833) (序列識別號: 2)在其胺基酸序列中也包含CTL辨識抗原決定位序列 CIAEQYHTV (序列識別號: 5)。因此本發明之胜肽不僅會誘導Th1，也會在APC中將其處理後誘導CTL。換言之，與本發明之胜肽接觸過的APC會將此等處理以將此等片段與MHC第I類抗原一起呈現，且同時將此等的整體與MHC-第II類抗原一起呈現。結果，使用本發明之胜肽，可以誘導Th1，其辨識與MHC第II類抗原一起呈現於APC之本發明胜肽，並誘導經由該胜肽之已處理片段誘導的CTL。

【0067】 例如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對象投予時，在該對象的體內會誘導呈現本發明之胜肽或其片段的APC。用語「誘導一APC」，包括以本發明之胜肽接觸(刺激)一細胞以將於HLA 第II類抗原與本發明之胜肽或其片段之間形成的複合體呈現於細胞表面上。或者，於將本發明之胜肽導入於APC使APC呈現此胜肽或其片段後，此等APC可以作為疫苗對於該對象投予。例如生物體外投予可包括以下步驟：

- a: 從第一對象收集APC，
- b: 使步驟a的APC接觸本發明之胜肽，
- c: 對於第二對象投予該已載入胜肽的APC。

【0068】 該第一對象及第二對象可為同一個體或不同個體。或者，依本發明，提供使用本發明之胜肽製造用於誘導抗原呈現細胞的醫藥組合物的用途。此外，本發明提供製造用於誘導抗原呈現細胞的醫藥組合物的方法或處理，其中此方法包括將本發明之胜肽與醫藥上可接受的擔體混合或配製的步驟。又，本發明也提供用以誘導抗原呈現細胞的本發明之胜肽。由步驟(b)獲得的APC可作為疫苗對於該對象投予。

【0069】 本發明一態樣中，本發明之APC有高水平的Th1細胞誘導能力。在此，用語「高水平的Th1細胞誘導能力」中，高水平係相對於APC沒有與胜肽或與不會誘導Th1細胞的胜肽接觸時的水平。在此，使用於APC的上下文時，用語「Th1細胞誘導能力」，係指APC當與CD4⁺ T細胞接觸時誘導Th1細胞的能力。如此之具有高水平之Th1細胞誘導能力的APC可藉由包括於體外將含有編碼為本發明胜肽的聚核苷酸的基因轉移到APC的步驟的方法來製備。該導入的基因可為DNA或RNA形式。導入的方法的例子包括，而無特別限制，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，並經一呈現路徑進行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。

【0070】 於較佳具體例，本發明之APC，可為呈現選自於由HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2中之群組之MHC第II類分子與本發明之胜肽(包括選自序列識別號: 1之胺基酸序列)之複合體於其表面上的APC。於另一具體例，本發明之APC可為呈現選自於由HLA-DR53與 HLA-DR15中之群組之MHC第II類分子與本發明之胜肽(包括選自序列識別號: 2之胺基酸序列)之複合體於其表面上的APC。於另一具體例，本發明之APC可為呈現HLA-DR4與本發明之胜肽(包括選自序列識別號: 3之胺基酸序列)之複合體於其表面上的APC。於另一具體例，本發明之APC可為呈現選自於HLA-DR4與 HLA-DR53中之群組之MHC第II類分子與本發明之胜肽(包括選自序列識別號: 4之胺基酸序列)之複合體於其表面上的APC。較佳者，HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2可各為HLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*15:02、DRB4*01:03及HLA-DPB1*02:01。

【0071】 VI. T輔助1型細胞 (Th1細胞)

對抗任意本發明之胜肽所誘導之Th1細胞，會強化任意效應子細胞之免疫反應，此任意效應子細胞包括於體內標靶於癌細胞之CTL，且可以與此胜肽本身以類似方式作為疫苗。因此本發明也提供單離的Th1細胞，其係由任意本發明之胜肽所專一性誘導或活化。

【0072】 此種Th1細胞，可藉由(1)對於一對象投予一或多種本發明之胜肽，從此對象收集Th1細胞，(2)於體外以本發明之胜肽接觸(刺激)APC及CD4⁺ T細胞或周邊血液單核白血球，然後單離的Th1細胞，(3)於體外使CD4⁺ T細胞或周邊血液單核白血球與本發明之APC接觸，或(4)導入編碼為T細胞受體(TCR)次單

元兩者之聚核苷酸或編碼為各TCR次單元之聚核苷酸到CD4⁺ T細胞中，其中此TCR可結合於MHC第II類分子與本發明之胜肽之複合體。如(3)之方法之APC，可藉由上述方法製備。方法(4)的細節將於以下於項目「VII. T細胞受體(TCR)」詳述。

【0073】 藉由以本發明APC刺激而誘導之Th1細胞，可衍生自待治療及/或預防之病患，且其本身可供投予，或與包括本發明胜肽之其他藥物組合投予，以調節效應之用途。此獲得之Th1細胞可活化及/或刺激負責細胞免疫之免疫細胞(例如CTL、巨噬體)。可由本發明之Th1細胞活化的此種免疫細胞，包括對於目標細胞例如癌細胞顯示細胞毒性的CTL。例如針對此CTL之目標細胞，可為內源性表現KIF20A之細胞(例如癌細胞)，或經以KIF20A基因轉染的細胞。於較佳具體例，本發明之胜肽可包括至少一CTL抗原決定位胜肽之胺基酸序列，且除了誘導Th1細胞，也誘導對抗表現KIF20A之細胞例如癌細胞之CTL。於此情形本發明之胜肽，可於體外同時或依序誘導Th1細胞及CTL，且此誘導的Th1細胞可有效活化已誘導的CTL。因此此包括至少一CTL抗原決定位胜肽之胺基酸序列的胜肽，為適於癌症免疫療法的胜肽。

【0074】 再者，本發明之Th1細胞分泌各種細胞激素(例如IFN- γ)，其能以抗原獨立的方式，活化及/或刺激對抗其他目標細胞的CTL。因此本發明之Th1細胞，也有助於增強標靶於表現腫瘤關連抗原(TAA)而非KIF20A之細胞的CTL活性。因此，本發明之Th1細胞不僅對於表現KIF20A之腫瘤的免疫療法有效，對於表現其他TAA，及本發明之胜肽與APC之腫瘤也有效。

【0075】 於一些具體例，本發明之Th1細胞辨識呈現HLA-DR或HLA-DP抗原與本發明之胜肽之複合體的細胞。於Th1細胞之上下文，詞彙「辨識一細胞」，係指經由其TCR結合於細胞表面上的MHC第II類分子與本發明之胜肽的複合體，及被以抗原專一性方式活化。在此，詞彙「被以抗原專一性方式活化」，

係指回應於特定MHC第II類分子及胜肽而活化，且誘導從此活化的Th1細胞的細胞激素生產。於較佳具體例，HLA-DR可選自於由HLA-DR4、HLA-DR53與HLA-DR15構成之群組。較佳者，HLA-DR4、HLA-DR53與HLA-DR15可分別為HLA-DRB1*04:05、HLA-DRB4*0103與HLA-DRB1*15:02。另一方面，HLA-DP2為HLA-DP抗原之較佳例。又更佳者，HLA-DP2為HLA-DPB1*02:01。

【0076】 VII. T細胞受體(TCR)

本發明也提供一種組合物，其包含編碼為一或多個多胜肽的一或多個聚核苷酸，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CD4⁺ T細胞提供對抗呈現KIF20A胜肽的APC的專一性。藉由使用該技術領域中的已知方法，可鑑別以本發明之胜肽誘導的Th1細胞的TCR次單元的alpha-與beta- 鏈的核酸 (WO2007/032255與Morgan *et al.*, J Immunol, 171, 3288(2003))。衍生物TCR可能以高親和力結合於顯示該KIF20A胜肽的APC，且視情形媒介有效率的細胞激素生產。

【0077】 編碼為TCR次單元的一聚核苷酸/多個聚核苷酸(亦即，編碼為TCR次單元兩者的單一聚核苷酸，或編碼為分開之TCR次單元的多個聚核苷酸)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。該聚核苷酸或包含該聚核苷酸的載體，通常可傳送到CD4⁺T細胞內，例如來自病患的CD4⁺ T細胞。有利地，本發明提供一種現成(off-the-shelf)的組合物，能夠快速修飾病患所擁有的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。

【0078】 本發明更提供Th1細胞，其係藉由將編碼為TCR次單元兩者的聚核苷酸，或編碼為各TCR次單元的聚核苷酸進行性狀引入(transduction)而製備，其中此種TCR次單元能結合於KIF20A胜肽(例如序列識別號: 1，於HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53或HLA-DP2背景;及或序列識別號: 2，於HLA-DR53或

HLA-DR15背景;於序列識別號: 3, 於HLA-DR4背景, 及序列識別號: 4, 於HLA-DR4或HLA-DR53背景)。該經性狀引入的Th1細胞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增(例如, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。上述製備之Th1細胞, 可使用於形成免疫原性組合物, 而有用於需要治療或保護的病患中之癌症的治療或避免。

【0079】 VIII. 醫藥藥劑或組合物

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, 例如在該對象中的KIF20A基因表現減低、癌症的大小減小、流行情度或轉移潛力減低, 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防止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。

【0080】 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之死亡率或發病率之負擔的活性。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, 其目標係減輕特定病症的嚴重度, 例如減少腫瘤的增殖及轉移、減少血管新生。

【0081】 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。

【0082】 如上所述，本發明胜肽誘導的Th1細胞能幫助負責細胞免疫之免疫細胞。此種免疫細胞不僅包括對抗表現KIF20A癌細胞的CTL，也包括對抗表現其他TAA之癌細胞的CTL，由於由Th1細胞分泌的細胞激素能以抗原獨立的方式影響CTL。因此本發明提供一種醫藥試劑或組合物，其包含本發明之胜肽中至少一種。於此醫藥試劑或組合物，此胜肽之量係存在治療上或醫藥上有效量。本發明之醫藥試劑或組合物在幫助、刺激及/或增強任何負責細胞免疫之免疫細胞(例如CTL、巨噬體)為有用，由於本發明之藥劑或組合物誘導的Th1細胞能分泌影響任何負責細胞免疫之免疫細胞的細胞激素。因此，本發明之試劑或組合物對於任何將由包括CTL之此種免疫細胞媒介的免疫反應予以增強或促進的用途有用。例如因為本發明之試劑或組合物能增強或促進對抗由此等免疫細胞媒介的癌或腫瘤的免疫反應，本發明提供包含至少一種本發明之胜肽的試劑或組合物，以用治療及/或預防癌。此種試劑或組合物中的此胜肽量，可為對於罹有表現KIF20A之癌的對象中顯著增強或刺激免疫反應為有效的量。

又，如於圖5及6中所示，在本發明內容中鑑別的KIF20A衍生之胜肽，已確認會比起僅以CTL抗原決定位刺激，更增強CTL誘導。因此本發明也提供一種試劑或組合物，供增強或刺激由MHC第I類抗原，例如HLA-A2及HLA-A24媒介的免疫反應。於另一具體例，本發明更提供本發明胜肽之用途，以供製造用於增強或刺激由MHC第I類抗原媒介的免疫反應的試劑或組合物。

【0083】 於較佳具體例，在本發明內容中鑑別的KIF20A衍生之胜肽可誘導Th1細胞，及對抗KIF20A表現細胞之CTL。因此本發明也提供包含至少一種本發明胜肽之試劑或組合物，以供用於誘導對抗表現KIF20A之癌或腫瘤的CTL。又，包含至少一種本發明胜肽之試劑或組合物，可用於增強或促進由MHC第II類分子媒介的免疫反應。

【0084】 因為KIF20A表現在一些癌類型中，包括膀胱癌、乳癌、膽管細

胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌及小細胞肺癌 (SCLC)，相較於在正常組織中為專一性的提高 (WO2006/085684, WO2007/013665, WO2008/102906, WO2008/102557, WO2010/047062, WO2008/102557)，本發明之胜肽或編碼為此胜肽之聚核苷酸，可用於癌或腫瘤之治療及/或預防，及/或用於防止其術後再復發。因此，本發明提供一種醫藥試劑或組合物，供癌或腫瘤之治療及/或供預防，及/或防止其術後再復發，其包含一或多種本發明之胜肽、或編碼為此胜肽之聚核苷酸，作為有效成分。或者，本發明之胜肽可以被表現在任意前述細胞的表面上，例如APC，以用於作為醫藥試劑或組合物。此外上述Th1細胞也可用於作為本發明之醫藥試劑或組合物的有效成分。

【0085】 於另一具體例，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此種胜肽的聚核苷酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽或其片段的APC；及
- (d) 本發明之Th1細胞。

【0086】 或者本發明更提供一種有效成分，使用於治療癌症或腫瘤，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此種胜肽的聚核苷酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽或其片段的APC；及
- (d) 本發明之Th1細胞。

【0087】 或者本發明更提供製造用於治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或試劑的方法或處理，其中該方法或處理包括將醫藥上或生理上可接受的擔體與選

自以下的有效成分配製的步驟:

- (a) 本發明之胜肽;
- (b) 以可表現形式編碼為此處揭示的此種胜肽的聚核核酸;
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽或其片段的APC;及
- (d) 本發明之Th1細胞。

【0088】 於另一具體例,本發明也提供製造用於治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或試劑的方法或處理,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擔體混合的步驟,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此種胜肽的聚核核酸;
- (c) 在其表面上呈現本發明之胜肽或其片段的APC;及
- (d) 本發明之Th1細胞。

【0089】 或者,本發明之醫藥組合物或此種劑可用於預防癌症或腫瘤及預防其術後再發中之一者或兩者。

【0090】 本發明之醫藥試劑或組合物作為疫苗有用。本發明上下文中,詞彙「疫苗」(也稱為免疫原性組合物),係指經由對動物接種,有誘導抗腫瘤免疫性的功能的組合物。

【0091】 本發明之醫藥藥劑或組合物可用於治療及/或預防癌症或腫瘤,及/或預防其在對象或病患中之術後復發或轉移復發。此等對象的例子包括人及其他哺乳動物,包括但不限於小鼠、大鼠、豚鼠、兔、貓、狗、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴、狒狒及黑猩猩,尤其是商業上為重要的動物或家畜。

【0092】 本發明中,具有選自序列識別號: 1、2、3及4中之胺基酸序列的胜肽,已發現係由數種HLA-DR 及/或 HLA-DP分子(即HLA-DR4、HLA-DR53、HLA-DR15、HLA-DP2)限制的混雜的Th1細胞抗原決定位,且可作為能誘導有效

且專一性的對抗由於MHC第II類分子媒介的免疫反應之癌症的免疫反應的候選者。因此包括具有序列識別號: 1、2、3或4之胺基酸序列的此等胜肽中的任一者的本發明的醫藥試劑或組合物，特別適於對於至少具有選自HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2中作為MHC第II類分子的對象來投予。對於包含編碼為此等胜肽中任一者的聚核苷酸的醫藥試劑或組合物也同樣適用。

或者於較佳具體例，本發明鑑別之胜肽，當施用到具有HLA-A2或HLA-A24之對象時，也可誘導對於KIF20A專一之CTL。因此藉由投予本發明之胜肽，可更預期除了Th1細胞誘導外，可誘導對抗表現KIF20A之癌的CTL反應。又，本發明之胜肽不僅經由將其處理而誘導對抗KIF20A表現細胞之CTL反應，也藉由因其為媒介之Th1細胞誘導而增強之。因此為了達成在同一對象中誘導Th1細胞及KIF20A專一性CTL兩者，當投予具有序列識別號: 1之胺基酸序列之胜肽時，例如欲治療的對象宜具有選自HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2中至少一者作為MHC第II類分子及HLA-A24作為MHC第I類分子。同樣地，藉由對於具有HLA-DR53及/或DR15作為MHC第II類分子及HLA-A2作為MHC第I類分子之對象投予具有序列識別號: 2之胺基酸序列的胜肽時，可達成該對象中Th1細胞與KIF20A專一性CTL兩者之誘導。

【0093】 於另一具體例，本發明提供依存於Th1細胞誘導之癌免疫療法。本發明提供之此治療策略可應用且有用於任何獨立於KIF20A表現之癌，只要由Th1細胞分泌的細胞激素所活化的免疫細胞係以對象癌細胞為目標。本發明之醫藥試劑或組合物欲治療的癌或腫瘤包括但不限於，且此等癌之較佳例包括表現KIF20A之任何種類之癌症或腫瘤，包括，例如膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌及小細胞肺癌 (SCLC)、及頭頸惡性腫瘤(HNMT)。

【0094】 本發明之醫藥試劑或組合物，除了含有上述有效成分，也可含有

其他有能力誘導Th1細胞或CTL之胜肽、其他編碼為其他胜肽之聚核苷酸、呈現其他胜肽或其片段之其他細胞等。此種具有誘導Th1細胞或CTL之能力的「其他」胜肽的例子，包括但不限於源自癌專一性抗原(例如已鑑別之TAA)的胜肽，但不限於此。

【0095】 若需要，本發明之醫藥試劑或組合物可視情形包括其他治療物質當作額外之有效成分，只要該物質不會抑制該有效成分例如本發明胜肽中任一者的抗腫瘤作用即可。例如，配方可包括抗發炎試劑、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試劑。藥劑及藥理組合物的量，取決於例如使用的藥理試劑的形式、欲治的疾病及投予的時程及路徑。

【0096】 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，本發明之醫藥試劑或組合物可包括在該技術領域中常見關於配方形式使用的其他試劑(例如，填料、黏結劑、稀釋劑、賦形劑者)。

【0097】 本發明之一具體例中，該醫藥試劑或組合物可包裝在製造品與套組中，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試劑或組合物的容器。適當的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。該容器可由各種材料形成，例如玻璃或塑膠。容器上的標記必需指示該試劑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。

【0098】 除了上述容器以外，包含本發明的醫藥試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。從商業及使用者所需角度，可更包括其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、針筒及使用指示之包裝插入物。

【0099】 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。

【0100】 (1) 含有該胜肽當做有效成分之醫藥試劑或組合物

本發明之胜肽可直接當做醫藥試劑或組合物投予，或若需要以習知配製方法配製。於後者，除了本發明之胜肽，可適當使用通常使用於藥物的擔體、賦形劑等而無特殊限制。此等擔體的例子包括，但不限於無菌水、生理鹽液、磷酸鹽緩衝液、培養液等。再者，該醫藥試劑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。本發明之醫藥藥劑或組合物可用於抗癌症用途。

【0101】 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Th1細胞。該胜肽組合可採混合(雞尾酒)形式或使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。該組合中的胜肽可相同或不同。

【0102】 藉由投予本發明之胜肽，該胜肽或其片段藉由該HLA 第II類抗原在APC以高密度呈現，然後誘導對於由該呈現的胜肽與該HLA 第II類抗原之間形成的複合體為專一性反應的Th1細胞。或者從對象移出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任何本發明之胜肽或其片段的APC。此等APC再度對該對象投予以在該對象中誘導Th1細胞，結果可增加對於腫瘤關聯內皮的侵犯。

【0103】 包括本發明之胜肽當做有效成分之該用於癌症或腫瘤之治療及/或預防的醫藥試劑或組合物，也可包括已知使細胞免疫有效建立之佐劑。或此醫藥試劑或組合物可以與其他有效成分一起投予，且可藉由配製為顆粒投予。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一化合物。於此考慮的佐劑包括文獻中敘述者(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)。適合之佐劑的例子包括但不限於磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍

亂毒素、沙門毒素、不完全的佛氏佐劑(Incomplete Freund's adjuvant, IFA)、完全的佛氏佐劑(Complete Freund's adjuvant, CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W乳劑等。

【0104】 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粒、及脂質結合於該胜肽的配方。

於本發明另一具體例，本發明之胜肽也可以於醫藥上可接受的鹽的形式投予。較佳的鹽的例子包括與鹼金屬的鹽、與金屬的鹽、與有機鹼的鹽、與有機酸(例如乙酸、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、甲烷磺酸等)的鹽及與無機酸(例如鹽酸、磷酸、氫溴酸、硫酸等)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。

【0105】 於有些具體例，本發明之醫藥試劑或組合物可更包括會啟動Th1細胞，且選擇性啟動CTL的成分。脂質已鑑別係能夠於體內啟動對抗病毒抗原的Th1細胞，選擇性啟動CTL的試劑。例如可將棕櫚酸殘基附著在離胺酸殘基的epsilon-及alpha-胺基然後連結到本發明之胜肽。然後可將該脂質化的胜肽直接以微胞或微粒投予、包入微脂體或於佐劑中乳化而投予。另一例的脂質啟動Th1細胞且選擇性地啟動CTL反應，當共價附著於一適當胜肽時，可使用*E. coli* 脂蛋白，例如三棕櫚醯基-S-甘胺醯基半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸(P3CSS)可啟動Th1細胞且選擇性啟動CTL(參見例如Deres *et al.*, Nature 1989, 342: 561-4)。

【0106】 適當的投予方法的例子可包括，但不限於口服、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(即直接注射)。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。可將醫藥上或治療上有效量之此胜肽對於須要治療表現KIF20A之癌症的對象投予。或

者可將足以增強或刺激由Th1細胞媒介之免疫反應及/或誘導對抗表達KIF20A之癌症或腫瘤之CTL的本發明胜肽，對於罹患表現KIF20A之癌症的對象投予。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容易地選擇適當且最適的劑量。

【0107】 (2) 含有聚核苷酸當做有效成分的醫藥試劑或組合物

本發明之醫藥試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聚核核酸。在此用詞「於可表現的形式」意指當聚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。於說明的具體例中，關注的聚核苷酸的核酸序列包括表現該聚核苷酸需要的調節要素。該聚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-為主的運送技術的例子包括「裸DNA」、經促進的(普寧卡因(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)。

【0108】 本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體表現。表現載體的例子包括減毒病毒宿主，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。藉由導入宿主中，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。廣泛種類之其他

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是顯而易見。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。

【0109】 將聚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聚核苷酸的載體，或間接進行，於此情形先使細胞以關注的聚核苷酸於體外轉形，然後將該細胞移植到對象中。此兩種方法各已知為體內及生物體外基因療法。

【0110】 針對基因治療的方法的一般評論，參見Goldspiel *et al.*, *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215)。可適用於本發明該技術領域中普通已知的的重組DNA技術的方法，敘述於Ausubel *et al.*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; 及Krieger, in *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990。

【0111】 如同胜肽的投予，聚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。可將醫藥上或治療上有效量之此聚核苷酸對於須要治療表現KIF20A之癌症的對象投予。或者可將足以增強或刺激由Th1細胞中介之免疫反應及/或誘導對抗表達KIF20A之癌症或腫瘤之CTL的本發明聚核苷酸，對於罹患表現KIF20A之癌症的對象投予。於適合擔體或經編碼為本發明胜肽的聚核苷酸轉形的細胞中的聚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輕易選擇適當及最適的劑量。

【0112】 IX. 使用該胜肽、APC或Th1細胞的方法

本發明之胜肽及編碼為此胜肽之聚核苷酸可用於誘導本發明之APC及Th1細胞。本發明之APC也可用於誘導本發明之Th1細胞。該胜肽、聚核苷酸及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Th1細胞誘導能力即可。因此任意上述本發明之醫藥試劑或組合物可用於誘導Th1細胞，此外，可用於誘導APC的包括該胜肽及聚核苷酸說明如下。

【0113】 (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編碼為此胜肽之聚核苷酸誘導APC的方法。誘導APC可如上述項目「VI. 抗原呈現細胞」般實施。本發明也提供一種誘導具有Th1細胞誘導能力之APC之方法，此誘導也已在上述項目「VI. 抗原呈現細胞」中提及過。

【0114】 或者本發明提供提供製備具有誘導Th1細胞之能力的抗原呈現細胞(APC)之方法，其中此方法可包括以下步驟之一：

- (a) 使本發明胜肽於體外、生物體外或體內與APC接觸；及
- (b) 將編碼為本發明胜肽之聚核苷酸導入到APC中。

或者本發明提供誘導具有Th1細胞誘導能力之APC之方法，其中此方法包括選自以下群組中之步驟：

- (a) 使本發明之胜肽與一APC接觸，
- (b) 將編碼為本發明胜肽之聚核苷酸導入一APC中。

【0115】 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。在較佳具體例中，用於誘導具有Th1細胞誘導

能力之APC的APC，較佳為表現擇自HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2中之至少1種作為MHC第II類分子之APC。此種APC可藉由該技術領域中周知的技術，從具有擇自HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2中之至少1種作為MHC第II類分子的對象所獲得之周邊血液單核細胞(PBMC)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或其片段與HLA第II類抗原(例如HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53、HLA-DP2)之複合體的APC。當投予本發明之方法所誘導之APC到一對象以誘導於該對象中對抗癌症之免疫反應時，該對象較佳為與APC的來源為同一者。然而，該對象也可與APC捐贈者為不同者，只要該對象與APC捐贈者具有相同HLA類型即可。

【0116】 於另一具體例，本發明提供用於誘導具有Th1細胞誘導能力的APC的試劑或組合物，且此種試劑或組合物包括本發明之胜肽或聚核苷酸中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聚核苷酸之用途，其係用於製造試劑或組合物以配製供誘導APC。

【0117】 或者，本發明更提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽的聚核苷酸之用途，係用於誘導具有Th1細胞誘導能力之APC。

於較佳具體例，本發明之胜肽不僅可誘導Th1反應，還可於將其處理後誘導CTL反應。因此於較佳具體例，本發明之方法製備的APC對於誘導對抗表現KIF20A之細胞的CTL，包括誘導對抗癌細胞之CTL亦有用。例如當由含有序列識別號: 5之胺基酸序列的胜肽誘導時，表現HLA-A2之APC係適於誘導KIF20A專一性CTL。或者當由含有序列識別號: 6之胺基酸序列的胜肽誘導時，表現HLA-A24之APC係適於誘導KIF20A專一性CTL。

【0118】 (2) 誘導Th1細胞的方法

此外，本發明也提供使用本發明之胜肽、編碼為此胜肽之聚核苷酸、或呈

現本發明之胜肽或其片段之APC誘導Th1細胞的方法。本發明也提供使用編碼為多胜肽(即，TCR次單元)的一聚核苷酸誘導Th1細胞的方法，該多胜肽能形成辨識本發明之胜肽與HLA 第II類抗原的複合體的T細胞受體(TCR)。較佳者，誘導Th1細胞的方法包括選自以下步驟至少其中之一：

a: 使CD4⁺ T細胞與抗原呈現細胞接觸，該抗原呈現細胞在其表面呈現HLA 第II類抗原與本發明胜肽或其片段的複合體；

b: 導入編碼TCR次單元兩者之聚核苷酸或編碼TCR次單元之各個的聚核苷酸到CD4⁺細胞內，其中TCR能夠辨識或結合本發明之胜肽或其片段與HLA 第II類抗原的複合體。

【0119】 當投予本發明之胜肽到對象中時，會在該對象體內誘導Th1細胞，且由MHC第II類分子媒介的(例如以該癌細胞為目標的之免疫反應)免疫反應強度增強。或者，該胜肽及編碼為該胜肽之聚核苷酸可用於一生物體外的治療法，其中，該對象來源的APC、CD4陽性細胞或周邊血液單核白血球和本發明胜肽在體外接觸(刺激)，誘導出Th1細胞後，已活化的Th1細胞回到該對象。例如該方法可包括以下步驟：

a: 從該對象收集APC；

b: 使步驟a的APC接觸本發明之該胜肽；

c: 將步驟b之APC與CD4⁺ T細胞混合並共同培養，以誘導Th1細胞，及

d: 從步驟c之共同培養物收集CD4⁺ T細胞。

再者，可藉由導入編碼為TCR次單元兩者之一聚核苷酸或編碼為各TCR次單元之多個聚核苷酸到CD4陽性T細胞內來誘導Th1細胞，其中，該TCR能夠結合於本發明之胜肽或其片段與HLA 第II類抗原的複合體。此種的轉導可如項目「VII.T細胞受體(TCR)」所述般實施。

【0120】 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Th1細胞的CD4陽性T細胞可藉由該技術領域周知的方法從對象獲得之PBMC製備。於較佳具體例，CD4陽性T細胞的捐贈者可為具有至少一選自HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2中作為MHC第II類分子的對象。由本發明之方法誘導的Th1細胞，可為能辨識在其表面呈現本發明胜肽或其片段與HLA第II類抗原之複合體的APC者。當本發明方法所誘導之Th1細胞對於一對象投予以誘導該對象中對抗癌症之免疫反應(或由MHC第I類分子媒介之免疫反應)時，該對象較佳為與CD4陽性T細胞之來源為同一對象。但，該對象也可與CD4陽性T細胞之來源為不同對象，只要該對象與CD4+ T細胞之捐贈者有相同HLA類型即可。

【0121】 於較佳具體例，本發明之胜肽可誘導對抗表現KIF20A之細胞的CTL，及誘導Th1細胞。因此本發明更提供用於誘導CTL之方法，其包含選自以下構成之群組的至少一步驟：

a: 將CD4陽性T細胞與CD8陽性T細胞兩者與已接觸本發明胜肽之APC共同培養;及

b: 將CD8陽性T細胞與已接觸本發明胜肽之APC共同培養。

於此種誘導CTL之方法，本發明之胜肽在APC中被處理以產生CTL抗原決定位胜肽，且產生之CTL抗原決定位胜肽被呈現在APC的表面。

【0122】 或者依本發明，提供本發明之胜肽之用途，係供製造誘導Th1細胞之醫藥試劑或組合物。此外本發明提供一種用於製造誘導Th1細胞之醫藥試劑或組合物之方法或處理，其中此方法包含將本發明之胜肽與醫藥上可接受之擔體混合或配製之步驟。又，本發明也提供用於誘導Th1細胞之本發明之胜肽。

【0123】 由本發明方法誘導之CD4⁺ T細胞，可對於一對象投予以作為疫苗。

本發明上下文中，過度表現KIF20A之癌症可以此等有效成分治療。此種癌

的例子，包括但不限於：膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC) 及頭頸惡性腫瘤 (HNMT)。因此在投予包含此有效成分之疫苗或醫藥組合物前，宜先確認是否在欲治療之癌細胞或組織中，比起相同器官的正常細胞，KIF20A的表現水平有所增加。因此於一具體例，本發明提供一種用於治療(過度)表現KIF20A之癌症之方法，此方法可包括以下步驟：

- i) 測定在欲治療癌症的對象獲得的癌細胞或組織當中的KIF20A表現水平；
- ii) 將此KIF20A表現水平與正常的對照組比較；及
- iii) 投予由上述(a)至(d)構成之群組中至少一成分至患有比起正常對照組而言有過度表現KIF20A之癌症的對象。

【0124】 或者本發明可提供疫苗或醫藥組合物以供對罹患過度表現KIF20A之癌的對象投予，其包括選自由上述(a)至(d)構成之群組中至少一種成分。換言之本發明更提供鑑別欲以本發明KIF20A多胜肽治療之對象的方法，此方法包括決定衍生自對象之癌細胞或組織中的KIF20A表現水平的步驟，其中，相較於該基因之正常對照為增加的水平代表此對象具有可用本發明之KIF20A多胜肽治療的癌症。本發明之癌症治療方法將於以下更詳細敘述。

【0125】 再者，於較佳具體例，可於投予本發明胜肽前先鑑別一對象之HLA型。例如宜對於鑑別為具有HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53或HLA-DP2之對象投予具有序列識別號: 1之胺基酸序列的胜肽。或者，宜對於鑑別為具有HLA-DR15或HLA-DR53之對象投予具有序列識別號: 2之胺基酸序列的胜肽。於另一具體例，宜對於鑑別為具有HLA-DR4之對象投予具有序列識別號: 3之胺基酸序列的胜肽。於一些具體例，宜對於鑑別為具有HLA-DR4或DR53之對象投予具有序列識別號: 4之胺基酸序列的胜肽。

【0126】 可使用任何由對象而來的細胞或組織決定KIF20A表現，只要其

包括KIF20A的目標轉錄或轉譯產物即可。適合的樣本的例子包括但不限於體組織及體液，例如血、唾液及尿。較佳者，由對象而來的細胞或組織樣本含有包括上皮細胞的細胞群體，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對象衍生的樣本。

以本發明方法治療的對象較佳為哺乳動物。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。

【0127】 依照本發明，可決定由一對象獲得的癌細胞或組織中的KIF20A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KIF20A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KIF20A的表現水平為較佳。該技術領域中具有通常知識者可利用KIF20A的序列資訊製備此種探針。例如可使用KIF20A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。

【0128】 再者，KIF20A的轉錄產物(例如序列識別號: 10)，可藉由擴增為主的檢測方法(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KIF20A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。嚴苛條件也可藉由添加去安定物質例如甲醯胺而達到。

【0129】 或者可偵測轉譯產物以診斷本發明。例如可決定KIF20A蛋白質(序列識別號: 11)的量。確認轉譯產物的蛋白質量的方法，包括使用專一性辨識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KIF20A蛋白質的結合能力即可。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。

【0130】 就基於轉譯產物偵測KIF20A基因的表現水平的另一方法而言，染色強度可使用對抗該KIF20A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，KIF20A基因表現水平高。

目標基因例如KIF20A基因於癌細胞中的表現水平，若水平比起該目標基因的對照組水平(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。

【0131】 該對照水平可與癌細胞同時決定，係藉由使用預先從對象收集並保存的樣本實施，該對象的疾病狀態(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對象得到的樣本中KIF20A基因的表現水平決定

的結果分析的統計方法決定。再者，該對照水平可從衍生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KIF20A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對象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KIF20A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。

【0132】 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。示例之對照基因包括但不限於beta-肌動蛋白、甘油醛3 磷酸去氫酶及核糖體蛋白質 P1。

當KIF20A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，該對象可診斷為患有欲治療的癌症。

【0133】 更具體而言，本發明提供一種方法，係(i)診斷是否一對象患有欲治療的癌症及/或(ii) 選擇供癌症治療的對象，該方法包括以下步驟：

a) 測定由懷疑患有欲治療的癌症的對象獲得的癌細胞或組織中的KIF20A表現水平；

b) 比較其KIF20A表現水平與正常對照水平；

c) 若KIF20A的表現水平比起正常對照水平為增加，則診斷該對象是患有欲治療的癌症；

d) 若步驟c)中診斷該對象患有欲治療的癌症時，則選擇供癌症治療的對象。

【0134】 或者該方法可包括以下步驟：

- a) 測定由懷疑患有欲治療的癌症的對象獲得的癌細胞或組織樣本中的KIF20A表現水平;
- b) 比較其KIF20A表現水平與癌化對照水平;
- c) 若KIF20A的表現水平相似於或等同於癌化對照水平，則診斷該對象是患有欲治療的癌症;及
- d) 若步驟c)中診斷該對象患有欲治療的癌症時，則選擇供癌症治療的對象

【0135】 於一些具體例，此方法在上述定義的a)-d)步驟後，可更包含鑑別具有選自於由HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2構成之群組之HLA的對象的步驟。依本發明之癌症療法較佳係針對罹患過度表現KIF20A之癌且具有HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2中之任一者的對象。HLA分型的方法係該技術領域中為人熟知者。例如針對將HLA對偶基因分型的以PCR為主的方法係為人熟知。專一於各HLA分子的抗體，在鑑別一對象之HLA型時亦為適當的工具。

【0136】 本發明也提供一種套組，係用於確認患有可利用本發明之KIF20A多胜肽治療的癌症的對象，其也對於評估及/或監控特定癌症療法，更特別是癌症免疫療法的效力或適用性是有用的。適合之癌症的說明性例子包括但不限於膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC) 及頭頸惡性腫瘤(HNMT)。尤其，該套組較佳為包括偵測對象衍生的癌細胞中的該KIF20A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KIF20A基因之mRNA的試劑;
- (b) 偵測該KIF20A蛋白質的試劑;及
- (c) 偵測該KIF20A蛋白質的生物學活性的試劑。

【0137】 適合偵測該KIF20A基因之mRNA的試劑的例子，可包括專一性

結合於該KIF20A mRNA或鑑別該KIF20A基 mRNA的核酸，例如具有互補於該KIF20A mRNA之部分的序列的寡核苷酸。此等種類的寡核苷酸例如專一於該KIF20A 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。若需要，可將偵測該KIF20A 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KIF20A mRNA的試劑。

【0138】 另一方面，適合偵測該KIF20A蛋白質的試劑的例子，包括對於該KIF20A蛋白質的抗體。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KIF20A蛋白質的結合能力即可。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KIF20A蛋白質的試劑。

【0139】 該套組可含有多於一種的上述試劑。例如由沒有癌症或患有癌症的對象獲得的組織樣本，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所需，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。

【0140】 本發明之一具體例中，當該試劑為對抗該KIF20A 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。藉由添加測試樣本，顯示可偵測訊號的部位的數目提供存在於該樣本中的KIF20A 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。

【0141】 本發明的套組可更包含陽性對照樣本或KIF20A標準樣本。本發明的陽性對照樣本可藉由收集KIF20A陽性樣本，然後分析其KIF20A水平而製備。或者可對不表現KIF20A的細胞添加純化的KIF20A蛋白質或聚核苷酸，以形成該陽性樣本或該KIF20A標準樣本。本發明中，純化的KIF20A可為重組蛋白質。該陽性對照樣本的KIF20A水平例如高於截斷值。

【0142】 X. 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KIF20A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KIF20A表現的癌症為有用，癌症的例子包括但不限於膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC) 及頭頸惡性腫瘤(HNMT)。

【0143】 本發明也提供偵測及/或定量包括由選自序列識別號: 1、2、3及4中之胺基酸序列構成之多胜肽之KIF20A蛋白質(序列識別號: 11)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KIF20A抗體，其能適當辨識及結合於KIF20A蛋白質或片段。本發明中，結合於KIF20A 多胜肽的抗KIF20A抗體較佳為辨識由選自序列識別號: 1、2、3及4中之胺基酸序列構成之多胜肽者，更佳為排除其他的胜肽。抗體的結合專一性，可利用抑制試驗確認。即，當欲

分析的抗體與全長之KIF20A多胜肽間的結合在存在具有選自序列識別號: 1、2、3及4中之胺基酸序列之多胜肽時受抑制，則視為該抗體「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。

【0144】 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KIF20A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。此種分析法可在臨床上於偵測、監控及預測KIF20A表現的癌症提供效用，癌症包括但不限於膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及頭頸惡性腫瘤(HNMT)。

【0145】 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。

【0146】 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，但較佳為衍生自哺乳動物例如人、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，作為免疫抗原的該胜肽，可為本發明多胜肽之完整胜肽或部分胜肽。適合之部分胜肽的例子可包括例如本發明胜肽的胺基(N)末端或羧基(C)末端片段。

【0147】 在此，抗體定義為與KIF20A胜肽的全長或片段反應的蛋白質。於一較佳具體例，本發明抗體可辨識具有選自序列識別號: 1、2、3及4中之胺基

酸序列的KIF20A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21員、24員或25員)可以與擔體接合或連結以增強免疫產生性。鑰孔血藍蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin, KLH)為周知的擔體。結合KLH與胜肽的方法，也是該技術領域中周知的。

【0148】 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宿主細胞。可從該宿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。

【0149】 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。

【0150】 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。更具體而言，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。若需要，可將抗原懸浮液與適量的標準佐劑混合，標準佐劑例如佛洛依德(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天數次投予與適量佛洛依德(Freund)不完全佐劑混合的抗原。適當的擔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。

【0151】 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

(fraction)。免疫球蛋白G或M從來製備，藉由使用例如偶聯於本發明胜肽的親和管柱，與進一步使用蛋白質A或蛋白質G管柱純化該級分。

【0152】 為了製備單株抗體用於本發明之，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))。

【0153】 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。

【0154】 除了上述方法，其中非人類動物係以抗原免疫以製備融合瘤，可將人類淋巴球例如受EB病毒感染者以胜肽、胜肽表現細胞或其溶解物於體外免疫。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)。

【0155】 接著將獲得的融合瘤移植到小鼠的腹腔，並抽取腹水。獲得的單株抗體可利用例如硫酸銨沉澱、蛋白質A或蛋白質G管柱、DEAE離子交換層析或偶聯有本發明胜肽的親和性管柱純化。本發明抗體不僅可用於純化及偵測本發明胜肽，也可當成本發明胜肽的增效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。

【0156】 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殖編碼為抗體的DNA，插入適當載體，並導入宿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。

【0157】 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))。更具體而言，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宿主中表現(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))。

【0158】 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。

【0159】 或者本發明抗體可獲得為衍生自非人類抗體的可變區與衍生自人類抗體的不變區的嵌合抗體，或人類化抗體，其包括衍生自非人類抗體的互補決定區(CDR)、框架區(FR)及衍生自人類抗體的不變區。此種抗體可依照已知技術製備。人類化可藉由取代嚙齒類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區域已取代成衍生自非人類種的對應序列。

【0160】 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。

【0161】 如上獲得的抗體可純化成同質。例如可依照一般蛋白質使用的分離及純化方法將抗體分離及純化。例如可利用適當選擇及合併使用的管柱層析分離及單離抗體，管柱層析例如親和性層析、過濾、超過濾、鹽析、透析、SDS聚丙稀醯胺凝膠電泳及等電點集中法(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))，但不限於此等。可使用蛋白質 A 管柱及蛋白質 G管柱當做該親和性管柱。示例之可使用的蛋白質 A管柱包括例如Hyper D、POROS及 Sepharose F.F.(Pharmacia)。

【0162】 親和層析以外的適合之層析技術的例子，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。

【0163】 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，將辨識該初級抗體的二次抗體以酵素例如鹼性磷解酶標記，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。

【0164】 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。

由於根據本發明之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。

【0165】 XI. 載體與宿主細胞

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宿主細胞。本發明的載體在攜帶核苷酸尤其是本發明DNA到宿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。

【0166】 當選用宿主細胞為*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* 中擴增需要的特性。當使用 *E. coli*例如JM109、DH5 alpha、HB101 或XL1 Blue當做宿主細胞，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，宿主較佳為表現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* 胞間質之示例的訊號序列，為*pelB*訊號序列(Lei *et al.*, J Bacteriol 169: 4379(1987))。將該等載體導入目標宿主細胞的方法包括例如氯化鈣法及電穿孔法。

【0167】 除了 *E. coli*，例如可使用衍生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)、衍生自昆蟲細胞的表現載體(例如「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、衍生自植物的表現載體(例如pMH1、pMH2)、衍生自動物病毒織的表現載體(例如pHSV、pMV、pAdexLcw)、衍生自反轉錄病毒的表現載體(例如pZipneo)、衍生自酵母菌的表現載體(例如「Pichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)，及衍生自枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)的表現載體(例如pPL608、pKTH50)，用於生產本發明之多胜肽。

【0168】 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的例子包括，例如pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 及pOP13。

【0169】 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。

[實施例]

【0170】 材料與方法

細胞株及抗體

TAP缺損及HLA-A2陽性細胞株 T2係從Riken Cell Bank購買。C1R-A2402細胞，係表現微量固有HLA第I類分子之人類B類淋巴母細胞株C1R之HLA-A24轉染體(Karaki S, et al. Immunogenetics 1993;37: 139-42.)，係受贈於Masafumi Takiguchi(Kumamoto University, Kumamoto, Japan)。作為抗原呈現細胞(APC)，係使用小鼠纖維母細胞株、L-細胞，其已經過基因改造以表現DR4 (DRB1*04:05); L-DR4, DR8 (DRB1*08:03); L-DR8, DR15 (DRB1*15:02); L-DR15 或 DR53 (DRB4*01:03); L-DR53中之一。

【0171】 以演算法預測HLA 第II類結合胜肽

為了預測有潛力的混雜的 HLA-DR結合人類KIF20A衍生的胜肽，將該人類KIF20A蛋白質之胺基酸序列使用電腦演算法(IEBD analysis resource, consensus method, http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html) (Wang P *et al.* BMC Bioinformatics;11: 568., Wang P *et al.* PLoS Comput Biol 2008; 4: e1000048.)來分析。該程式分析對完成完整之蛋白質的15個胺基酸長的序列偏移量(offset)進行分析。選擇並合成25個胺基酸長的胜肽，其對於由DRB1*04:05、DRB1*15:02或DRB4*01:03對偶基因編碼之多個HLA-第II類分子具有重疊的高一致性百分等級而且係天然地包括KIF20A衍生之9或10員CTL抗原決定位，以鑑別含有CTL抗原決定位之混雜之輔助T細胞抗原決定位(Imai K, *et al.* Br J Cancer;104: 300-7.)。也合成其他2個不包括CTL 抗原決定位之KIF20A衍生LP。

【0172】 合成胜肽及重組蛋白質

合成2種KIF20A衍生短胜肽 (SP), 即 KIF20A-A2 (809-817), CIAEQYHTV (序列識別號: 5) 及KIF20A-A24 (66-75), KVYLRVRPLL (序列識別號: 6) (純度>95 %, Biomatik, Canada), 由於發明人已發表此兩種胜肽能分別誘導腫瘤反應性與受 HLA-A2(A*0201)-或HLA-A24(A*2403)限制之人類CTL。合成4種LP, 即KIF20A (60-84), DSMEKVKVYLRVRPLLPELERQED (序列識別號: 1); KIF20A (494-517) TLHVAKFSAIASQLVHAPPMQLGF (序列識別號: 3); KIF20A (809-833), CIAEQYHTVLKLQGQVSAKKRLGTN (序列識別號: 2); KIF20A (843-863), PPGKKPFLRNLLPRTPTCQSS (序列識別號: 4) (純度>90%), 並測試其於體外刺激KIF20A專一性人類CD4⁺ T細胞的能力。使用2種據報告會結合於HLA-A24 (HIV-A24, RYLRDQQLL) (序列識別號: 7)與 HLA-A2 (HIV-A2, SLYNTYATL) (序列識別號: 8)之HIV胜肽當作負對照SP (Tomita Y, et al., Cancer Sci;102: 697-705.; Tomita Y, et al., Cancer Sci;102: 71-8.)。使用能誘導受HLA-DR4 (DRB1*0405) 限制之 Th1 細胞之 LP, 即 WT1 衍生之胜肽 (KRYFKLSHLQMHSRKH) (序列識別號: 9) (Fujiki F, et al., J Immunother 2007;30: 282-93.), 作為負對照LP。將胜肽溶於二甲基亞砷, 濃度為10 micro-g/micro-L或 20 micro-g/micro-L。

將帶有6His標籤的重組全長KIF20A蛋白質, 及CDCA1蛋白質由帶有各自之cDNA片段的pET28a載體(Novagen)的大腸桿菌*E.coli* BL21品系表現。使用該CDCA1蛋白質作為對照蛋白質。將各重組蛋白質使用HisTrap FF管柱(GE Healthcare)依廠商指示進行純化。蛋白質的純度以SDS-PAGE檢驗。

【0173】 TAA專一性CD4⁺ T細胞株及選殖體(clone)的產生

收集與使用衍生自健康捐贈者之周邊血液單核細胞(PBMC)的研究計畫經過熊本大學人體試驗委員會(Institutional Review Board of Kumamoto University)

核可。從6名健康的捐贈者在收到他們的知情同意書(written informed consents)後獲得血液樣本。本研究中調查的健康捐贈者的 $HLA-A$ 、 $DRB1$ 及 $DPB1$ 對偶基因，係藉由使用聚合酶連鎖反應及對偶基因專一性探針雜交之HLA對偶基因的DNA分型(DNA typing)來決定，且如表1所描述。將從健康自願者取得之PBMC如前述般單離(Inoue M, *et al.* Int J Cancer;127: 1393-403.)。藉由使用偶聯了抗CD4單株抗體的磁性微珠以陽性篩選來從PBMC純化CD4⁺ T細胞(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)。經由如前述方式之體外培養從CD14⁺細胞生產單核球來源的樹狀細胞(DC) (Harao M, *et al.* Int J Cancer 2008; 123: 2616-25.)，並將其作為抗原呈現細胞(APC)以誘導TAA專一性CD4⁺ T細胞。將DC (1×10^4 /井)以10 micro g/ml LP施以脈衝(pulse)3小時並照射輻射(45 Gy)，然後與自體CD4⁺ T細胞 (3×10^4 /井)，在96井平底培養盤之各井中混合，各井有200 micro-L之補充5%人類無補體血漿(decomplemented plasma)的AIM-V。7天後，從各培養物移除半數培養基，然後添加新鮮培養基(100 micro-L/井)至培養物，新鮮培養基含有以胜肽(10 micro-g/ml)脈衝的經放射照射的(50 Gy)的自體PBMC(1×10^5)及5 ng/ml人類重組(hr) IL-7。於第2次以胜肽刺激後2天，對於各井添加hr IL-2，使終濃度為10 IU/ml。一週後，將各井中的經刺激的CD4⁺ T細胞在干擾素(IFN)- γ 酵素連結之免疫點(ELISPOT)分析中分析它們的胜肽專一性。將顯示對於同源(cognate)胜肽有專一性反應的T細胞移到24井盤，並且以週的間隔，對其使用於補充10 IU/ml hr IL-2與5 ng/ml hr IL-7之培養基中以該胜肽(10 micro-g/ml)脈衝的經放射照射的自體PBMC(1×10^6 /井)進行再刺激。有些情形，會利用極限稀釋(limiting dilution)將T細胞選殖，以供前述進一步的研究(Tabata H *et al.* Hum Immunol 1998; 59: 549-60.)。

【0174】 表1 健康捐贈者的HLA-A-DR及DP基因型

	HLA-A 基因型	HLA-DRB1 基因型	HLA-DPB1 基因型
捐贈者HDK1	A*02:01 /	DRB1*04:05 / 09:01 / DRB4*01:03	DPB1*02:01 / DPB1*04:02
捐贈者HDK2	A*11:01 / 31:01	DRB1*08:03 / 15:02	DPB1*02:01 / 09:01
捐贈者HDK3	A*02:06 / 31:01	DRB1*04:01 / 09:01 / DRB4*01:03	DPB1*02:01/
捐贈者HDK4	A*02:01 / 24:02	DRB1*04:05 / DRB4*01:03	DPB1*05:01/
捐贈者HDK5	A*24:02 /	DRB1*08:02 / 15:02	DPB1*05:01 / 09:01
捐贈者HDK6	A*02:01 / 24:02	DRB1*09:01 / 12:01/ DRB4*01:03	DPB1*03:01 / 06:01
捐贈者HDK7	n.t.	DRB1*04:06 /08:03 /DRB4*01:03	DPB1*02:01 / 04:02
捐贈者HDK8	A*24:02 / 31:01	DRB1*08:03 / 14:05	DPB1*02:02 / 05:01
捐贈者HDK9	A*26:01 / 33:03	DRB1*04:05 / 13:02 /DRB4*01:03	DPB1*04:01 / 09:01
捐贈者HDK10	A*26:01 / -	DRB1*04:10 / 08:02 /DRB4*01:03	DPB1*02:01 / 05:01
捐贈者HDK11	A*31:01 / 33:03	DRB1*09:01 / 13:02 /DRB4*01:03	DPB1*03:01 / 04:01

於圖8B 中使用來自健康捐贈者(HDK1、HDK2、HDK4、HDK5、HDK7、HDK8、HDK9、HDK10 及HDK11)的PBMC作為對照。

HLA:人類白血球抗原; n.t:未測定到。

【0175】 病患

從16位患有頭頸惡性腫瘤 (HNMT)之病患收集血液樣本。調查對於KIF20A-LP有反應性之Th細胞的免疫反應。此等病患曾接受以TAA衍生之CTL抗原決定位胜肽進行的免疫療法，且報名2個胜肽疫苗實驗。此等癌免疫療法之階段I/II臨床試驗採用衍生自3種癌睪丸抗原之3種HLA-A24結合SP(臨床級9-10 胺基酸長胜肽)，即LY6K (LY6K-A24 (177-186))、IMP-3 (IMP-3-A24(508-516))及 CDCA1 (CDCA1-A24(56-64))，已經過日本熊本的熊本大學人體試驗委員會(Institutional Review Board of Kumamoto University, Kumamoto, Japan)的審核及核可(Kono K et al. J Transl Med 2012;10:141., Suda T et al. Cancer Sci 2007;10:1803–8., Harao M et al. Int J Cancer 2008;123:2616–25.)。此混合疫苗(vaccine cocktail)不包括KIF20A衍生之SP。所有患有HNMT的病患係於提供知情同意書後基於HLA-A24擁有性來選擇。罹患無法手術後期之帶有再復發或轉移性腫瘤且對於標準療法有抗藥

性的晚期的HNMT的病患;報名University Hospital Medical Information Network Clinical Trials Registry (UMIN-CTR) 000008379 號(CTR-8379)實驗。經過放射性切除的病患報名UMIN-CTR 000008380號(CTR-8380)的實驗。後者的實驗，將病患以術後勝肽疫苗組合S-1、異環磷醯胺(ifosfamide)或阿黴素(doxorubicin)進行治療。此等臨床實驗及分析正在進行。

【0176】 T細胞對於勝肽及蛋白質的反應的評估

使用IFN- γ ELISPOT(人類IFN- γ ELISPOT kit, BD Biosciences)，如前述(Tomita Y *et al.* Cancer Sci;102: 697-705.)評估Th細胞對於經過勝肽及蛋白質脈衝之APC的反應。簡言之，係分析每 3×10^4 個散裝CD4⁺ T細胞在以有經過勝肽脈衝之PBMC(3×10^4 /井)刺激時，或每 1×10^4 個散裝CD4⁺ T細胞在以有經過勝肽脈衝之表現HLA-DR的L細胞(5×10^4 /井)刺激時，產生干擾素(IFN)- γ 之勝肽專一性CD4⁺ T細胞的頻率。也分析在以有經過勝肽脈衝的T2細胞(2×10^4 /井)或C1R-A2402細胞(2×10^4 /井)刺激時，每 1×10^5 個CTL中的產生干擾素(IFN)- γ 的細胞的頻率。或者，將 5×10^3 已載有蛋白質之DC和 2×10^4 個CD4⁺ T細胞選殖體/井共同培養。該已載有蛋白質之成熟的DC係如前述，從陽性的單離的CD14⁺細胞(第0天)製備(Harao M, *et al.* Int J Cancer 2008; 123: 2616-25.)。於第5天，將DC於重組KIF20A (50 micro g/ml)及OK432存在下培養。於第7天收集該等已載有蛋白質之成熟的DC，洗滌，並作為IFN- γ ELISPOT分析中的刺激劑。為了決定涉及抗原呈現的限制HLA分子，藉由添加抗HLA-DR mAb (L243, Biolegend)、抗HLA-DP mAb (B7/21, abcam)、抗人類HLA-DQ mAb (SPV-L3, abcam)或抗HLA第I類mAb (W6/32, abcam)，來檢查抗原誘導之IFN- γ 生產之阻斷性。所有的mAb以最終濃度為5 micro g/ml來使用。所有的IFN- γ ELISPOT分析的評估被實施兩重複或三重複，且結果係平均值。

【0177】 免疫組織化學檢驗

如先前所述(Imai K et al. Br J Cancer 2011;104:300-7. Yamashita J et al. Acta Derm Venereol 2012;92:593-7. Yoshitake Y, et al. Clin Cancer Res 2004;10:6437-48.)方式，使用兔抗KIF20A之多株抗體實施免疫組織化學染色(A300-879A, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)。

【0178】 細胞激素分析

將T細胞(1×10^4 /井)與自體PBMC (3×10^4 /井)一起在KIF20A (60-84)存在下，或與L-DR53 (5×10^4)一起在KIF20A (809-833)存在下，於96井培養盤培養。20小時後，收集培養浮層，並使用Bio-Plex 系統(Bio-Rad)依廠商指示測量細胞激素的水平(IFN- γ 、TNF-alpha、GM-CSF、MIP1beta、IL-2、IL-4與IL-17)。

【0179】 CD107a 移動性分析

為了鑑別經此胜肽刺激的脫顆粒CD4⁺ T淋巴球，使用細胞流式計數儀分析暴露於細胞表面的CD107a(Rubio V et al. Nat Med 2003; 9: 1377-82., Betts MR, et al. J Immunol Methods 2003; 281: 65-78.)。簡言之，以如前述方式實施CD107a移動性分析(Tomita Y et al. Cancer Sci. 2011 Jan; 102(1): 71-8.)。添加KIF20A衍生的胜肽或對照胜肽(1 micro-/ml)作為刺激物，並且對各井加入經FITC標定的抗人類CD107a mAb或經FITC標定的構造同型(isotype)對照小鼠IgG1及monensin。將細胞於攝氏37度培養5小時。培養後，將此經胜肽刺激的Th細胞，用有PE結合的抗人類CD4抗體(eBioscience, San Diego, CA)染色，並以細胞流式計數儀分析(FACScan; BD Biosciences)。

【0180】 KIF20A-LP在誘導KIF20A專一性CTL之相乘效果(synergistic effect)

將從產生KIF20A (60-84) LP或KIF20A (809-833) LP專一性Th選殖體之HLA-A2⁺/DR53⁺/DP2⁺捐贈者(HD1)而來的PBMC，放入24井盤 (3×10^6 /井)。培養7天後，進行下列添加: 重組人類(rh) IL-2 (20 U/mL)及SP單獨 (KIF20A-A2

(809-817) SP、20 micro g/mL)、或SP + LP (KIF20A (60-84) LP或KIF20A (809-833) LP、20 micro g/mL)、或SP + LP + Th選殖體 (5×10^5 細胞/井)，最終體積2 mL。第9天時添加重組人類IL-15 (5 ng/mL)。第11天時，將細胞以經PE標定之HLA-A*02:01/ KIF20A-A2 (809-817)-複合體的四元體與經FITC標定的抗人類CD8 mAb 染色。資料取得係於FACSCalibur (BD Biosciences)實施，且資料檔案以FlowJo軟體分析 (Tree Star, Ashland, OR)。

【0181】 以KIF20A長胜肽刺激PBMC

為了評估藉由KIF20A (60-84) LP體外刺激之來自HLA-A24陽性捐贈者之KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CTL的誘導，將PBMC (2×10^6 /井，24井盤)和KIF20A衍生之LP (7 micro-M)一起培養2週，而不加入任何細胞激素。於第0及7天，添加KIF20A衍生之LP (7 micro-M)，然後於以LP進行體外刺激的第14天，收集細胞，以經PE標定之HLA-A*24:02/KIF20A-A24 (66-75)胜肽複合體之四元體與經FITC標定之抗人類CD8 mAb組合染色，並以細胞流式計數計分析。

【0182】 以KIF20A (809-833) LP之KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL的體外刺激

為了評估以KIF20A (809-833) LP 之KIF20A-A2 (809-817) SP反應性CTL於體外的刺激，將於體外以KIF20A (809-833) LP或載有無關胜肽之單離自HLA-A2陽性捐贈者之DC刺激後之IFN- γ 生產KIF20A-A2 (809-817) SP專一性散裝 CTL的數目以ELISPOT分析計數。體外誘導KIF20A-A2 (809-817) SP反應性人類CTL體外之實驗係依如以前報告者實施(Tomita Y, et al. Cancer Sci;102: 71-8.)。載有LP之成熟DC係由經陽性分離的CD14⁺細胞(第0天)製備。將CD14⁺細胞於hr IL4 (10ng/ml)與GM-CSF (100ng/ml)存在下培養。於第5天添加KIF20A (809-833) LP (50 micro-g/ml) and OK432。於第7天收集載有LP之成熟DC，洗滌並作為ELISPOT分析中之APC。

【0183】 於罹患HNMT之病患中之KIF20A-LP專一性CD4⁺ T細胞反應的評估

將來自罹患HNMT之病患或健康捐贈者的新鮮PBMC，與KIF20A (60-84) LP與KIF20A (809-833) LP (各10 micro g/mL) 之混合物一起培養於最終體積2 ml AIM-V，其補充了5% 人類無補體血漿，37度 C (2×10^6 細胞/井, 24井平板); 於第0天及第2天添加rhIL-2與rhIL-7兩者。細胞培養1 週後，收集PBMC，洗滌，並且與KIF20A(60-84) LP、 KIF20A (809-833) LP 或對照LP一起培養於ELISPOT盤 (1×10^5 細胞/井) 18小時。於減去對照值(背景)後，計算以點形成細胞/ 10^5 細胞的形式表達的KIF20A-LP專一性Th細胞的數目。若IFN- γ 點之平均數多於15且多於背景的2倍，則反應評為陽性。由於可得細胞數有限，針對病患細胞之ELISPOT分析係於單一井、雙井或三井實施。

此研究係在依循探索性研究原則(exploratory research principles)下操作的實驗室進行，並係使用調查性的實驗步驟實施。本案發明人感謝報告針對人類T細胞分析框架的Minimal Information About T-cell Assay (MIATA)的建議(Britten CM et al., *Immunity* 2012;37:1-2.)。

【0184】 統計分析

使用雙尾學生t (Student *t*)檢定(條狀圖)、或無參數曼-惠特尼(Mann-Whitney) *U*檢定(散點圖)進行資料比較。所有的試驗中，*P*值小於0.05，被認為是統計上顯著。

【0185】 結果

含有KIF20A之CTL抗原決定位之有潛力之混雜的HLA第II類結合胜肽的預測及選擇

為了鑑別KIF20A之有潛力之混雜的HLA-第II類結合之Th細胞抗原決定位，本案發明人首先使用圖1A 與表2所示之電腦演算法檢驗KIF20A的胺基酸序

列(Wang P, *et al.* BMC Bioinformatics; 11: 568., Wang P, *et al.* PLoS Comput Biol 2008;4: e1000048.)。有趣地，發現KIF20A蛋白質序列的兩區(KIF20A (60-84) 與 KIF20A (809-833))被此電腦演算法預測為有潛力的混雜的HLA 第II類結合胜肽的，且它們兩者非常接近該CTL抗原決定位 (圖1B)。因此，發明人選擇並且合成2個候選LP (KIF20A (60-84)及KIF20A (809-833))，其係與多個及常見之HLA-第II類分子 HLA-DR4、HLA-DR15與 HLA-DR53有高一致性百分等級重疊，且包括由經HLA-A2-或-A24限制之CTL辨識的天然9員或10員胜肽用於後續之分析。也合成不包括CTL 抗原決定位但針對多種HLA 第II類分子有重疊的高一致性百分等級的其他2個LP，即KIF20A (494-517)與KIF20A (843-863)，並且評估是否此等LP能夠產生KIF20A專一性Th細胞。

【0186】 表2，衍生自KIF20A之長胜肽的演算法分數

胺基酸殘基位置	一致性百分等級		
	HLA-DR4	HLA-DR15	HLA-DR53
	(DRB1*04:05)	(DRB1*15:02)	(DRB4*01:03)
60-74	14.9	1.8	12.8
61-75	14.9	1.8	6.4
62-76	4.2	1.8	2.9
63-77	4.2	1.1	1.2
64-78	4.2	1.1	0.8
65-79	2.3	1.1	0.5
66-80	2.4	1.1	0.7
67-81	5.7	1.1	2.1
68-82	5.7	1.1	4.6
69-83	9.5	1.1	21.3
70-84	19.4	3.3	42.6
809-823	13.8	6.7	16
810-824	13.8	6.7	10.8
811-825	11.2	6.7	3.2
812-826	11.2	6.7	1.6
813-827	13.5	6.7	1.4
814-828	12.1	6.7	1.2
815-829	16.8	15.1	1.4
816-830	21.3	15.1	2.2
817-831	21.9	15.1	3.7
818-832	25.4	12.6	11.6
819-833	46.1	12.6	36.1

針對指出之HLA-第II類基因型的胜肽結合演算法分數，係針對KIF20A胜肽(60-84)與KIF20A (809-833)之各15個胺基酸序列表示。

天然上包括CTL 抗原決定位之KIF20A衍生且混雜的 HLA第II類結合Th細胞抗原決定位的鑑別

【0187】 本案發明人評估是否此等4種選出的合成LP能產生KIF20A專一性Th細胞。將從3名健康捐贈者之PBMC分離的CD4⁺ T細胞以週的間隔利用自體DC及經KIF20A (60-84)胜肽脈衝之PBMC刺激。至少3次刺激後，以IFN- γ ELISPOT檢驗培養的CD4⁺ Th細胞的KIF20A (60-84)專一性反應。於HLA-DP2 (DP*02:01)陽性健康捐贈者，產生的Th細胞株回應於KIF20A (60-84)生產了顯著量的IFN- γ (圖2A)。為了解明此等Th細胞株之HLA限制性，發明人使用對抗HLA-DR或HLA-DP之mAb。Th細胞株對抗KIF20A (60-84)之IFN- γ 生產，當添加HLA-DP專一性mAb時顯著減少，但HLA-DR專一性mAb無效果。

【0188】 為了進一步分析HLA限制性，利用將來自捐贈者HDK1之受DP限制之散裝CD4⁺ Th細胞株進行極限稀釋以獲得KIF20A (60-84)專一性選殖體。發明人使用從4名不同捐贈者獲得之異體PBMC作為APC，以於IFN- γ ELISPOT分析中確認共享之限制性之HLA-DP分子。結果，KIF20A (60-84)專一性選殖體，於IFN- γ ELISPOT分析，僅於表現DP2之異體PBMC存在時對KIF20A (60-84)胜肽顯示專一性反應，且IFN- γ 生產由於添加抗HLA-DP mAb受顯著抑制但非HLA-DR專一性mAb。此等結果啟示來自捐贈者HDK1之受DP限制之Th細胞株係由HLA-DP2限制(圖2B)。

【0189】 為了調查KIF20A (60-84)是否能結合於其他HLA第II類分子並且誘導Th細胞反應。將來自其他2名健康捐贈者之CD4⁺ T細胞，以經KIF20A (60-84)脈衝之自體DC及PBMC刺激。從HLA-DR15陽性捐贈者產生的Th細胞株回應於經KIF20A (60-84)脈衝之PBMC及L-DR15細胞，專一性地產生顯著量的IFN- γ ，

但不回應未經胜肽脈衝之PBMC或經KIF20A (60-84)脈衝之L-DR8細胞。Th細胞株對抗PBMC或經KIF20A (60-84) LP 脈衝之L-DR15細胞的IFN- γ 生產，由於添加抗HLA-DR mAb而被顯著抑制，但添加HLA-DP-或HLA-第I類專一性mAb則不會(圖2A與B)。此等結果明確指出KIF20A (60-84)在此T細胞株係由HLA-DR15與HLA-DP2呈現。發明人也嘗試從HLA-DP2與HLA-DR15兩者為陰性的捐贈者誘導KIF20A (60-84)專一性Th細胞。結果，本案發明人能誘導KIF20A (60-84)專一性且受HLA-DR限制之Th細胞。因此，KIF20A (60-84)有能力結合於HLA-DP2及2種不同HLA-DR分子啟示KIF20A (60-84)係由混雜的且在日本族群常見的HLA第II類分子呈現的Th細胞抗原決定位。

【0190】 接著，發明人評估是否另一胜肽，即KIF20A (809-833)能產生專一性的Th1 細胞。將來自3名健康捐贈者之PBMC 獲得之CD4⁺ T細胞，以週為間隔以自體DC及經KIF20A (809-833)脈衝之PBMC刺激，並且以IFN- γ ELISPOT檢驗培養的CD4⁺ Th細胞的KIF20A (809-833)專一性反應。於HLA-DR53-陽性健康捐贈者HDK1中，產生的Th細胞株回應於經KIF20A (809-833)脈衝之PBMC 專一性地產生顯著量的IFN- γ (圖2A)，且此反應當添加HLA-DR專一性mAb時顯著降低，而HLA-DP專一性mAb無此效果。為了進一步分析HLA限制性，發明人檢測Th細胞對抗經胜肽脈衝之L-DR4或L-DR53細胞的反應性。從DR53-陽性健康捐贈者產生之散裝Th細胞株專一性地辨識經KIF20A (809-833)脈衝之L-DR53細胞，而非L-DR53細胞、 L-DR4細胞或經KIF20A (809-833)胜肽脈衝之L-DR4細胞。Th細胞株對抗經KIF20A (809-833)脈衝之L-DR53細胞的 IFN- γ 生產，由於添加抗HLA-DR mAb受顯著抑制，但非受抗HLA第I類mAb抑制(圖2C)。此等結果明確指明KIF20A (809-833) 由HLA-DR53呈現。

【0191】 為了調查KIF20A (809-833)能結合於另一HLA第II類分子並誘導Th細胞反應，將來自2名HLA-DR4陰性及HLA-DR15-陽性健康捐贈者之CD4⁺ T

細胞以經 KIF20A (809-833)脈衝之自體 DC 及 PBMC 刺激。由於以 KIF20A (809-833)刺激而產生的 Th 細胞，回應於經 KIF20A (809-833)脈衝之 PBMC 及 L-DR15細胞，專一性地產生了顯著量的 IFN- γ ，但非回應於未經脈衝之 PBMC 及經 KIF20A (809-833)胜肽脈衝之 L-DR8細胞(圖2A 與C)。Th細胞株之 IFN- γ 生產由於添加抗 HLA-DR mAb 而顯著受抑制，但未受抗 HLA-DP、抗 HLA-DQ 或抗 HLA 第 I 類 mAb 抑制。此等結果指明此 Th 細胞係受 HLA-DR15 限制。

【0192】 綜上，此等結果於此明確證明含有 CTL 抗原決定位之 2 個 LP，即 KIF20A (60-84)與 KIF20A (809-833)，有能力刺激受 HLA-DR15、-DR53 及 -DP2 之 Th 細胞，啟示此等 LP 可藉由混雜的 HLA 第 II 類分子對 Th 細胞呈現，且可供許多病患的癌免疫療法使用。

本案發明人也評估是否其他 2 種不含 CTL 抗原決定位之選擇合成之 LP，即 KIF20A (494-517) 及 KIF20A (843-863)能產生 KIF20A 專一性 Th 細胞。此 2 種 LP 可以從 2 名健康捐贈者誘導受 HLA-DR 限制且為胜肽專一性之 Th 細胞(圖2D、E)。

【0193】 KIF20A (60-84)與 KIF20A (809-833)胜肽刺激 Th1 型 CD4⁺ T 細胞
為了進一步將 KIF20A 胜肽誘導的 Th 細胞定性，發明人以 Bio-Plex 系統測量回應於以同源胜肽刺激 KIF20A 專一性散裝 CD4⁺ Th 細胞株的數種細胞激素。來自捐贈者 HDK1 的 2 種 KIF20A 專一性散裝 Th 細胞株，由於以經同源胜肽脈衝之 PBMC (KIF20A (60-84))或 L-DR53 (KIF20A (809-833))再度刺激，生產大量 IFN- γ 、TNF-alpha、GM-CSF、MIP-1beta 及 IL-2，但生產較少 IL-4 及 IL-17，指明 Th1 有偏向的特性(圖3A)。

有趣地，細胞毒性標記 CD107a 也能於經同源胜肽(圖3B)刺激的 KIF20A 專一性散裝 Th 細胞株上檢測到，如同針對抗病毒 CD4⁺ 效應子及腫瘤浸潤淋巴球所顯示(Casazza JP, et al. J Exp Med 2006;203: 2865-77. Attig S, et al. Cancer Res 2009;69: 8412-9. Widenmeyer M, et al. Int J Cancer;131: 140-9.)。綜上，此等資料啟示 KIF20A

專一性Th細胞能發揮輔助功能及直接細胞毒性活性，兩者均對於癌免疫療方式有利。

【0194】 KIF20A (60-84)與KIF20A (809-833)係天然處理的抗原決定位

發明人進行評估是否自體DC會攝入並處理KIF20A蛋白質以刺激KIF20A衍生之胜肽專一性Th1細胞選殖體。製備載有KIF20A (60-84) LP之成熟DC，並於IFN- γ ELISPOT分析中作為APC。如於圖4A中所示，受HLA-DR15限制之KIF20A (60-84)反應性Th細胞選殖體有效率地辨識載有KIF20A蛋白質之DC且專一性地生產IFN- γ ，但不辨識載有對照蛋白質之DC或未載有蛋白質之DC。此外，此Th細胞選殖體辨識由DC呈現之經天然處理之KIF20A抗原的能力有效地被抗HLA-DR抗體阻斷，而不是對照抗HLA第I類抗體，確認了此抗原決定位係經由HLA-DR15分子呈現。使用受HLA-DP2限制且係KIF20A (60-84)反應性的Th細胞選殖體進行了一項類似分析。此Th細胞選殖體專一性地辨識載有KIF20A蛋白質之DC，且此Th細胞選殖體之IFN- γ 生產受添加抗HLA-DP mAb顯著抑制，而非抗HLA第I類mAb，啟示此受HLA-DP2限制之Th細胞抗原決定位也是於DC中由KIF20A蛋白質天然的處理(圖4B)。

【0195】 此受HLA-DR53限制之KIF20A (809-833)反應性Th細胞選殖體專一性地對載有KIF20A蛋白質之DC反應，而非載有對照蛋白質之DC。此外，此Th細胞之反應有效地由抗HLA-DR抗體阻斷，而非對照抗HLA第I類抗體，確認此抗原決定位係經由HLA-DR53分子呈現。

總之，整體的結果指出此Th細胞抗原決定位，KIF20A (60-84)與KIF20A (809-833)係由DC從KIF20A蛋白質天然地處理，且由HLA第II類分子呈現在DC的細胞表面。

【0196】 KIF20A (60-84) LP刺激KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CD8⁺ T細胞體外的擴增

然後檢驗KIF20A (60-84) LP刺激KIF20A-A24 (66-75)專一性CD8⁺ T細胞擴增的能力。2次以7 micro-M KIF20A (60-84) LP刺激PBMC誘導出受 HLA-A24限制之KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CD8⁺ T細胞的擴增，如同在大部分培養井中以7micro-M KIF20A-A24 (66-75) SP 刺激PBMC後由四元體標定所量得者(圖5A)。CD8⁺ 四元體⁺細胞之絕對數目也由於以KIF20A (60-84) LP刺激PBMC及以KIF20A-A24 (66-75) SP刺激PBMC而顯著增加(圖5B)。重要地，偵測到以KIF20A (60-84) LP刺激PBMC後，培養井中之KIF20A-A24 (66-75) SP專一性IFN- γ 生產(圖5C)。

【0197】 經由KIF20A專一性CD4⁺ T細胞之KIF20A專一性CTL之經增強的誘導

發明人也檢測是否KIF20A-LP能增強KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL的誘導。當來自 HLA-A2⁺/DP2⁺/DR53⁺ 捐贈者 (HDK1) 之 PBMC 被單獨以 KIF20A-A2 (809-817) SP (SP)刺激時， KIF20A-A2 (809-817) SP專一性四元體⁺細胞之頻率為0.24% 的CD8⁺ T細胞 (資料未顯示)。添加KIF20A (60-84) LP 到SP培養物(SP + LP)誘導四元體⁺細胞頻率些微增加。反觀，當將PBMC以KIF20A-A2 (809-817) SP、 KIF20A (60-84) LP及KIF20A (60-84) LP專一性Th選殖體 (SP + LP + Th選殖體)共同刺激時， KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL的頻率顯著增加到0.87% (資料未顯示)。

如於圖7A-B中所示，包含KIF20A-A2 (809-817) SP 之KIF20A (809-833) LP單獨 (LP)，或添加KIF20A (809-833) LP 到SP培養物(SP + LP)，誘導了KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL頻率些微增加。另一方面，當LP與Th選殖體兩者添加到PBMC而非KIF20A-A2 (809-817) SP (LP + Th選殖體)， KIF20A (809-833) LP專一性Th選殖體回應於KIF20A (809-833) LP快速增加，且之後未偵測到KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL 頻率增加。本案發明人也觀察到以KIF20A-A2 (809-817)

SP、KIF20A (809-833) LP及 KIF20A (809-833) LP專一性Th選殖體 (SP + LP + Th選殖體)刺激PBMC最能強力增進KIF20A-A2 (809-817) SP專一性四元體⁺ T細胞之誘導。此等結果指出此被活化的Th1細胞於KIF20A-A2 (809-817) SP存在下增進KIF20A專一性CTL之誘導。

【0198】 接著，發明人檢驗於經以相關LP刺激之KIF20A (809-833) LP專一性Th細胞存在下培養1週後之KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CTL的CD107a表現，以評估由於已活化之KIF20A專一性Th細胞擴增之KIF20A專一性CTL的功能。將來自HLA-A24⁺ 與HLA-DR15⁺ (HDK5) 之KIF20A (809-833) LP專一性散裝CD4⁺ T細胞與KIF20A-A24 (66-75) SP專一性散裝CD8⁺ T細胞，和自體DC一起於KIF20A-A24 (66-75) SP (SP 單獨)、KIF20A-A24 (66-75) SP + 對照LP (對照LP + SP)或KIF20A-A24 (66-75) SP + KIF20A (809-833) LP (KIF20A (809-833)-LP + SP)存在下培養，不添加任何細胞激素。於與胜肽體外培養1週後，將培養的細胞，如材料與方法項目所述，以HLA-A*24:02/KIF20A-A24 (67-75) 複合體之四元體及抗人類CD107a mAb與抗人類CD8 mAb染色。如圖7C中所示，添加KIF20A-A24 (66-75) SP + KIF20A (809-833)LP (KIF20A (809-833)LP + SP)，相較於添加KIF20A-A24 (66-75) SP單獨(SP)或KIF20A-A24 (66-75) SP + 對照LP (對照LP + SP)，顯著增加KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CD8⁺ T細胞之絕對數目。經由添加KIF20A-A24 (66-75) SP + KIF20A (809-833)LP (KIF20A (809-833)LP + SP; 圖7D)，以KIF20A-A24 (66-75) SP 再刺激後，在細胞表面表現CD107a 之KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CTL的絕對數目顯著增加。此等結果啟示已活化的KIF20A-LP專一性Th細胞增強表現CD107a之KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CTL的誘導。

【0199】 載有KIF20A (809-833) LP之DC 能於體外及體內刺激KIF20A-A2 (809-817)專一性CD8⁺ T細胞

接著，發明人評估是否KIF20A (809-833) LP能於體外以載有LP之DC刺激KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL。為了確認，發明人依前述(Tomita Y, et al. Cancer Sci;102: 71-8.)藉由KIF20A-A2 (809-817) SP的刺激從來自HLA-A2陽性捐贈者之周邊血液CD8⁺ T細胞而產生KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL。以IFN- γ ELISPOT分析法檢驗在產生之CTL細胞株中專一於KIF20A-A2 (809-817) SP之CD8⁺ T細胞之頻率(圖6A)。

【0200】 由載有 KIF20A-A2 (809-833) LP 之自體 DC 刺激 KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL之能力，係藉由KIF20A-A2 (809-817) SP專一性散裝 CTL 之IFN- γ 生產來評估。如圖6B中所示， KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CTL回應於以載有KIF20A (809-833) LP之DC再刺激而專一性生產IFN- γ ，而非回應載有無關LP之DC或未載有LP之DC。此專一性IFN- γ 生產由於添加抗HLA第I類mAb而受顯著抑制，而非抗HLA-DR mAb，因此指明發明人成功刺激KIF20A-A2 (809-817) SP專一性CD8⁺ T細胞係可能藉由於體外DC交叉呈現LP。

KIF20A (60-84) LP於體內起動KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CTL之能力，於生物體外以IFN- γ ELISPOT分析檢驗。將HLA-A24 Tgm以KIF20A (60-84) LP免疫3次。已接種KIF20A (60-84) LP之HLA-A24 Tgm 的CD8⁺ T細胞回應於以經KIF20A-A24 (66-75) SP脈衝之BM-DC之刺激，而生產IFN- γ (圖6C)。此等結果啟示在攝入KIF20A (60-84) LP後，APC於體外與體內交叉起動KIF20A-A24 (66-75) SP專一性CTL。

【0201】 於已接受TAA衍生之CTL抗原決定位胜肽之免疫療法的HNMT病患中之KIF20A專一性Th1細胞之存在

目前所知並無研究檢驗於HNMT中之KIF20A表現。對於56例的HNMT (39例鱗狀細胞癌、14例腺樣囊性癌、2例骨肉瘤，及1例血管肉瘤組織樣本)實施KIF20A表現之免疫組織化學研究。39例中有26例之頭頸鱗狀細胞癌 (67%)、14

例中有4例腺樣囊性癌(29%)，2例中有1例骨肉瘤 (50%) 顯示KIF20A之陽性表現。在良性的腫瘤樣本無檢測到染色。

【0202】 於癌免疫療法的範圍，有強大的證據啟示使用受限制之抗原決定位的疫苗能對於未存在於疫苗中的抗原造成廣泛的CD8⁺ T細胞反應(Corbière V et al. Cancer Res 2011;71:1253–62., Ribas A et al. Trends Immunol 2003;24:58–61. Hunder NN et al. N Engl J Med 2008;358:2698–703.)。因此本案發明人考慮KIF20A專一性Th細胞反應或許可藉由接種TAA衍生之CTL抗原決定位胜肽而誘導，此TAA衍生之CTL抗原決定位胜肽並不包括KIF20A衍生之SP。本案發明人評估來自16名病患之周邊血液中針對KIF20A之T細胞反應，此等病患正接受治療HNMT之免疫療法。捐贈者特性整理於圖8F中。於以KIF20A-LP體外刺激PBMC 1週後，以IFN- γ ELISPOT分析法偵測個別的KIF20A-LP專一性T細胞的頻率(圖8A)。使用從9名健康自願者分離的PBMC當作對照。當IFN- γ 分泌細胞之數目為負對照的至少2倍以上時，則視反應為陽性。KIF20A專一性Th細胞反應在16名中之8名病患觀察到(KIF20A (60-84) LP，16中之2, 13%; KIF20A (809-833) LP, 16中之7, 44%)，但於9名健康捐贈者未偵測到對於KIF20A-LP 之專一性免疫反應(圖8F)。本案發明人也發現到於病患中對抗KIF20A (60-84) LP與KIF20A (809-833) LP之專一性之點的數目顯著多於健康捐贈者(圖8B)。經由HNMT31與HNMT43中之T細胞的KIF20A (809-833) LP專一性IFN- γ 生產，由於添加抗HLA-DR mAb受顯著抑制，但非抗HLA第I類mAb (圖8C)。有趣地，於免疫療法的療程中，對於KIF20A (809-833) LP之專一性反應在某些病患增強(HNMT31及42)，或於HNMT43誘導(圖8D)。如圖8E中所示，KIF20A抗原係於偵測到KIF20A專一性Th1細胞反應之HNMT病患中表現(圖8F, HNMT31及HNMT108)，但不表現於未偵測到KIF20A專一性Th1細胞反應之病患中(圖8F， HNMT102 與107)。此等觀測結果啟示APC收集並處理來自表現KIF20A之腫瘤細胞的KIF20A抗原，然後於體內活化

KIF20A專一性Th1細胞。

【0203】 討論

據認為最有吸引力的疫苗化合物，係反應對應於能誘導治療性CD4⁺與CD8⁺反應之TAA序列的合成LP（Kenter GG, et al. N Engl J Med 2009;361: 1838-47. Melief CJ and van der Burg SH. Nat Rev Cancer 2008;8: 351-60.）。在注射此等LP後，病患的DC會攝入LP，對其處理並在各種HLA第I類與HLA第II類分別呈現所有可能的CTL抗原決定位及Th抗原決定位。因此，本案發明人認為癌免疫療法的理想胜肽疫苗應為能誘導由於族群中常見HLA限制之CTL與Th1細胞兩者的單一多胜肽。於本研究，本案發明人鑑別包括被受混雜的HLA-第II類限制的Th1細胞辨識的CTL抗原決定位的2種KIF20A衍生LP，此等於樹狀細胞(DC)存在下回應於重組KIF20A蛋白質由LP誘導的Th1細胞，指出此Th1細胞抗原決定位能於DC中被天然地處理。有趣地，此等包含Th1 抗原決定位之CTL抗原決定位能夠刺激KIF20A專一性CTL，啟示此等包含CTL抗原決定位之LP在體外人類培養系統係對於KIF20A專一性CTL交叉呈現。

【0204】 此等結果指出使用共同使用KIF20A專一性Th 抗原決定位與CTL抗原決定位，會對於免疫療法帶來有潛力的相乘效果。綜上，組合KIF20A衍生之Th 抗原決定位及 CTL抗原決定位啟示可用在各種癌病患的免疫療法。

結論是，本案發明人首先鑑別包括CTL抗原決定位之KIF20A衍生之輔助胜肽，其不僅成為使KIF20A專一性Th1細胞增殖及活化的良好工具，也是使KIF20A專一性CTL增殖及活化的良好工具。此等發現有助於未來各種類型病患中之KIF20A胜肽為基礎的免疫療法的臨床試驗。

[產業利用性]

【0205】 本發明敘述能誘導有效抗腫瘤免疫反應之衍生自KIF20A的Th1細胞抗原決定位胜肽，且因此對於廣範圍的癌症類型有用。此種胜肽擔保作為

抗癌之胜肽疫苗的進一步發展，尤其對抗表現KIF20A之癌症。本發明之胜肽可誘導Th1細胞反應，且因而由Th1細胞分泌的細胞激素可幫助或活化任何以抗原獨立方式擔任細胞免疫的免疫細胞。因此本發明提供的免疫治療策略可適用於包括癌的任意疾病，只要此疾病可藉由由MHC第II類分子媒介之免疫反應而改善。具體而言，本發明之Th1細胞能改善由CTL引起的免疫反應。因此本發明之胜肽對於增強對象中包括癌之疾病的CTL反應有助益。

又，於較佳具體例，本發明之胜肽也誘導對抗表現KIF20A之細胞的CTL及Th1細胞。本發明之如此的胜肽，對於治療相關於KIF20A之疾病，例如癌症，具體而言，膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC) 及頭頸惡性腫瘤(HNMT)亦為有效。

【0206】 雖已對於本發明參照特定具體例詳盡敘述，但應了解上述敘述的本質係示範性及解說性，係用來供理解本發明及其較佳具體例。該技術領域中具有通常知識者可輕易理解經由例行實驗可在不偏離本發明精神及範圍之下進行各種改變及潤飾，本發明的邊界和界限由附帶的申請專利範圍界定。

【符號說明】

無。

Ser Ala Lys Lys Arg Leu Gly Thr Asn
20 25

<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽

<400> 3

Thr Leu His Val Ala Lys Phe Ser Ala Ile Ala Ser Gln Leu Val His
1 5 10 15

Ala Pro Pro Met Gln Leu Gly Phe
20

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽

<400> 4

Pro Pro Gly Lys Lys Pro Phe Leu Arg Asn Leu Leu Pro Arg Thr Pro
1 5 10 15

Thr Cys Gln Ser Ser
20

<210> 5
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽

<400> 5

Cys Ile Ala Glu Gln Tyr His Thr Val
1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽

<400> 6

Lys Val Tyr Leu Arg Val Arg Pro Leu Leu
1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽

<400> 7

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽

<400> 8

Ser Leu Tyr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu
1 5

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽

<400> 9

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His
1 5 10 15

<210> 10
<211> 3471
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (497)..(3169)

<400> 10
tttttcccct taagacaaag caagcacctt aaaccagtta ccctgtgcac tcctgttaag 60

attgttgcta aggaaggaca ggagttggct gctgaagcct caagatttcc tttaggctct 120

taggtaagaa atgtctaagg ttcaaggaaa aaggttaagt tggaagaatc ccaggcaaaa 180

taagtgcgaa tccacgacag ttggttaacc ggaccacat tagaactcag aggtcaagca 240

gaagcgaacg actggaattc cagtcaggcc cgcccccttt ccttacgcgg attggtagct 300

gcaggcttcc ctatctgatt ggccgaacga acgcagcgcg taattttaaaa tattgtatct	360
gtaacaaagc tgcacctcgt gggcggagtt gtgctctgcg gctgcgaaag tccagcttcg	420
gcgactaggt gtgagtaagc cagtatccca ggaggagcaa gtggcacgtc ttcggacctc	480
ggctgccccct gccgtc atg tgc caa ggg atc ctt tct ccg cca gcg ggc ttg	532
Met Ser Gln Gly Ile Leu Ser Pro Pro Ala Gly Leu	
1 5 10	
ctg tcc gat gac gat gtc gta gtt tct ccc atg ttt gag tcc aca gct	580
Leu Ser Asp Asp Asp Val Val Val Ser Pro Met Phe Glu Ser Thr Ala	
15 20 25	
gca gat ttg ggg tct gtg gta cgc aag aac ctg cta tca gac tgc tct	628
Ala Asp Leu Gly Ser Val Val Arg Lys Asn Leu Leu Ser Asp Cys Ser	
30 35 40	
gtc gtc tct acc tcc cta gag gac aag cag cag gtt cca tct gag gac	676
Val Val Ser Thr Ser Leu Glu Asp Lys Gln Gln Val Pro Ser Glu Asp	
45 50 55 60	
agt atg gag aag gtg aaa gta tac ttg agg gtt agg ccc ttg tta cct	724
Ser Met Glu Lys Val Lys Val Tyr Leu Arg Val Arg Pro Leu Leu Pro	
65 70 75	
tca gag ttg gaa cga cag gaa gat cag ggt tgt gtc cgt att gag aat	772
Ser Glu Leu Glu Arg Gln Glu Asp Gln Gly Cys Val Arg Ile Glu Asn	
80 85 90	
gtg gag acc ctt gtt cta caa gca ccc aag gac tct ttt gcc ctg aag	820
Val Glu Thr Leu Val Leu Gln Ala Pro Lys Asp Ser Phe Ala Leu Lys	
95 100 105	
agc aat gaa cgg gga att ggc caa gcc aca cac agg ttc acc ttt tcc	868
Ser Asn Glu Arg Gly Ile Gly Gln Ala Thr His Arg Phe Thr Phe Ser	
110 115 120	
cag atc ttt ggg cca gaa gtg gga cag gca tcc ttc ttc aac cta act	916
Gln Ile Phe Gly Pro Glu Val Gly Gln Ala Ser Phe Phe Asn Leu Thr	
125 130 135 140	
gtg aag gag atg gta aag gat gta ctc aaa ggg cag aac tgg ctc atc	964

Val	Lys	Glu	Met	Val	Lys	Asp	Val	Leu	Lys	Gly	Gln	Asn	Trp	Leu	Ile	
			145						150					155		
tat	aca	tat	gga	gtc	act	aac	tca	ggg	aaa	acc	cac	acg	att	caa	ggt	1012
Tyr	Thr	Tyr	Gly	Val	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Thr	His	Thr	Ile	Gln	Gly	
			160					165					170			
acc	atc	aag	gat	gga	ggg	att	ctc	ccc	cgg	tcc	ctg	gcg	ctg	atc	ttc	1060
Thr	Ile	Lys	Asp	Gly	Gly	Ile	Leu	Pro	Arg	Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	
		175					180					185				
aat	agc	ctc	caa	ggc	caa	ctt	cat	cca	aca	cct	gat	ctg	aag	ccc	ttg	1108
Asn	Ser	Leu	Gln	Gly	Gln	Leu	His	Pro	Thr	Pro	Asp	Leu	Lys	Pro	Leu	
	190					195				200						
ctc	tcc	aat	gag	gta	atc	tgg	cta	gac	agc	aag	cag	atc	cga	cag	gag	1156
Leu	Ser	Asn	Glu	Val	Ile	Trp	Leu	Asp	Ser	Lys	Gln	Ile	Arg	Gln	Glu	
205					210					215					220	
gaa	atg	aag	aag	ctg	tcc	ctg	cta	aat	gga	ggc	ctc	caa	gag	gag	gag	1204
Glu	Met	Lys	Lys	Leu	Ser	Leu	Leu	Asn	Gly	Gly	Leu	Gln	Glu	Glu	Glu	
			225					230				235				
ctg	tcc	act	tcc	ttg	aag	agg	agt	gtc	tac	atc	gaa	agt	cgg	ata	ggt	1252
Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys	Arg	Ser	Val	Tyr	Ile	Glu	Ser	Arg	Ile	Gly	
			240					245					250			
acc	agc	acc	agc	ttc	gac	agt	ggc	att	gct	ggg	ctc	tct	tct	atc	agt	1300
Thr	Ser	Thr	Ser	Phe	Asp	Ser	Gly	Ile	Ala	Gly	Leu	Ser	Ser	Ile	Ser	
		255					260					265				
cag	tgt	acc	agc	agt	agc	cag	ctg	gat	gaa	aca	agt	cat	cga	tgg	gca	1348
Gln	Cys	Thr	Ser	Ser	Ser	Gln	Leu	Asp	Glu	Thr	Ser	His	Arg	Trp	Ala	
	270					275					280					
cag	cca	gac	act	gcc	cca	cta	cct	gtc	ccg	gca	aac	att	cgc	ttc	tcc	1396
Gln	Pro	Asp	Thr	Ala	Pro	Leu	Pro	Val	Pro	Ala	Asn	Ile	Arg	Phe	Ser	
285					290					295					300	
atc	tgg	atc	tca	ttc	ttt	gag	atc	tac	aac	gaa	ctg	ctt	tat	gac	cta	1444
Ile	Trp	Ile	Ser	Phe	Phe	Glu	Ile	Tyr	Asn	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Leu	
			305					310					315			
tta	gaa	ccg	cct	agc	caa	cag	cgc	aag	agg	cag	act	ttg	cgg	cta	tgc	1492

Leu	Glu	Pro	Pro	Ser	Gln	Gln	Arg	Lys	Arg	Gln	Thr	Leu	Arg	Leu	Cys	
			320					325					330			
gag	gat	caa	aat	ggc	aat	ccc	tat	gtg	aaa	gat	ctc	aac	tgg	att	cat	1540
Glu	Asp	Gln	Asn	Gly	Asn	Pro	Tyr	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Trp	Ile	His	
		335					340					345				
gtg	caa	gat	gct	gag	gag	gcc	tgg	aag	ctc	cta	aaa	gtg	ggg	cgt	aag	1588
Val	Gln	Asp	Ala	Glu	Glu	Ala	Trp	Lys	Leu	Leu	Lys	Val	Gly	Arg	Lys	
		350				355					360					
aac	cag	agc	ttt	gcc	agc	acc	cac	ctc	aac	cag	aac	tcc	agc	cgc	agt	1636
Asn	Gln	Ser	Phe	Ala	Ser	Thr	His	Leu	Asn	Gln	Asn	Ser	Ser	Arg	Ser	
365					370				375					380		
cac	agc	atc	ttc	tca	atc	agg	atc	cta	cac	ctt	cag	ggg	gaa	gga	gat	1684
His	Ser	Ile	Phe	Ser	Ile	Arg	Ile	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Glu	Gly	Asp	
			385					390						395		
ata	gtc	ccc	aag	atc	agc	gag	ctg	tca	ctc	tgt	gat	ctg	gct	ggc	tca	1732
Ile	Val	Pro	Lys	Ile	Ser	Glu	Leu	Ser	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Gly	Ser	
		400					405						410			
gag	cgc	tgc	aaa	gat	cag	aag	agt	ggg	gaa	cgg	ttg	aag	gaa	gca	gga	1780
Glu	Arg	Cys	Lys	Asp	Gln	Lys	Ser	Gly	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	
		415					420					425				
aac	att	aac	acc	tct	cta	cac	acc	ctg	ggc	cgc	tgt	att	gct	gcc	ctt	1828
Asn	Ile	Asn	Thr	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Gly	Arg	Cys	Ile	Ala	Ala	Leu	
		430				435					440					
cgt	caa	aac	cag	cag	aac	cgg	tca	aag	cag	aac	ctg	gtt	ccc	ttc	cgt	1876
Arg	Gln	Asn	Gln	Gln	Asn	Arg	Ser	Lys	Gln	Asn	Leu	Val	Pro	Phe	Arg	
445					450					455				460		
gac	agc	aag	ttg	act	cga	gtg	ttc	caa	ggg	ttc	ttc	aca	ggc	cga	ggc	1924
Asp	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Val	Phe	Gln	Gly	Phe	Phe	Thr	Gly	Arg	Gly	
			465					470					475			
cgt	tcc	tgc	atg	att	gtc	aat	gtg	aat	ccc	tgt	gca	tct	acc	tat	gat	1972
Arg	Ser	Cys	Met	Ile	Val	Asn	Val	Asn	Pro	Cys	Ala	Ser	Thr	Tyr	Asp	
			480					485					490			
gaa	act	ctt	cat	gtg	gcc	aag	ttc	tca	gcc	att	gct	agc	cag	ctt	gtg	2020

Glu Thr Leu His Val Ala Lys Phe Ser Ala Ile Ala Ser Gln Leu Val	
495500505	
cat gcc cca cct atg caa ctg gga ttc cca tcc ctg cac tgc ttc atc	2068
His Ala Pro Pro Met Gln Leu Gly Phe Pro Ser Leu His Ser Phe Ile	
510515520	
aag gaa cat agt ctt cag gta tcc ccc agc tta gag aaa ggg gct aag	2116
Lys Glu His Ser Leu Gln Val Ser Pro Ser Leu Glu Lys Gly Ala Lys	
525530535540	
gca gac aca ggc ctt gat gat gat att gaa aat gaa gct gac atc tcc	2164
Ala Asp Thr Gly Leu Asp Asp Asp Ile Glu Asn Glu Ala Asp Ile Ser	
545550555	
atg tat ggc aaa gag gag ctc cta caa gtt gtg gaa gcc atg aag aca	2212
Met Tyr Gly Lys Glu Glu Leu Leu Gln Val Val Glu Ala Met Lys Thr	
560565570	
ctg ctt ttg aag gaa cga cag gaa aag cta cag ctg gag atg cat ctc	2260
Leu Leu Leu Lys Glu Arg Gln Glu Lys Leu Gln Leu Glu Met His Leu	
575580585	
cga gat gaa att tgc aat gag atg gta gaa cag atg caa cag cgg gaa	2308
Arg Asp Glu Ile Cys Asn Glu Met Val Glu Gln Met Gln Gln Arg Glu	
590595600	
cag tgg tgc agt gaa cat ttg gac acc caa aag gaa cta ttg gag gaa	2356
Gln Trp Cys Ser Glu His Leu Asp Thr Gln Lys Glu Leu Leu Glu Glu	
605610615620	
atg tat gaa gaa aaa cta aat atc ctc aag gag tca ctg aca agt ttt	2404
Met Tyr Glu Glu Lys Leu Asn Ile Leu Lys Glu Ser Leu Thr Ser Phe	
625630635	
tac caa gaa gag att cag gag cgg gat gaa aag att gaa gag cta gaa	2452
Tyr Gln Glu Glu Ile Gln Glu Arg Asp Glu Lys Ile Glu Glu Leu Glu	
640645650	
gct ctc ttg cag gaa gcc aga caa cag tca gtg gcc cat cag caa tca	2500
Ala Leu Leu Gln Glu Ala Arg Gln Gln Ser Val Ala His Gln Gln Ser	
655660665	
ggg tct gaa ttg gcc cta cgg cgg tca caa agg ttg gca gct tct gcc	2548

Gly	Ser	Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	Arg	Ser	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Ser	Ala	
670						675					680					
tcc	acc	cag	cag	ctt	cag	gag	gtt	aaa	gct	aaa	tta	cag	cag	tgc	aaa	2596
Ser	Thr	Gln	Gln	Leu	Gln	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Leu	Gln	Gln	Cys	Lys	
685					690				695					700		
gca	gag	cta	aac	tct	acc	act	gaa	gag	ttg	cat	aag	tat	cag	aaa	atg	2644
Ala	Glu	Leu	Asn	Ser	Thr	Thr	Glu	Glu	Leu	His	Lys	Tyr	Gln	Lys	Met	
			705						710					715		
tta	gaa	cca	cca	ccc	tca	gcc	aag	ccc	ttc	acc	att	gat	gtg	gac	aag	2692
Leu	Glu	Pro	Pro	Pro	Ser	Ala	Lys	Pro	Phe	Thr	Ile	Asp	Val	Asp	Lys	
		720						725					730			
aag	tta	gaa	gag	ggc	cag	aag	aat	ata	agg	ctg	ttg	cgg	aca	gag	ctt	2740
Lys	Leu	Glu	Glu	Gly	Gln	Lys	Asn	Ile	Arg	Leu	Leu	Arg	Thr	Glu	Leu	
		735					740					745				
cag	aaa	ctt	ggt	gag	tct	ctc	caa	tca	gca	gag	aga	gct	tgt	tgc	cac	2788
Gln	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Leu	Gln	Ser	Ala	Glu	Arg	Ala	Cys	Cys	His	
	750					755					760					
agc	act	ggg	gca	gga	aaa	ctt	cgt	caa	gcc	ttg	acc	act	tgt	gat	gac	2836
Ser	Thr	Gly	Ala	Gly	Lys	Leu	Arg	Gln	Ala	Leu	Thr	Thr	Cys	Asp	Asp	
765					770				775					780		
atc	tta	atc	aaa	cag	gac	cag	act	ctg	gct	gaa	ctg	cag	aac	aac	atg	2884
Ile	Leu	Ile	Lys	Gln	Asp	Gln	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Asn	Asn	Met	
			785					790					795			
gtg	cta	gtg	aaa	ctg	gac	ctt	cgg	aag	aag	gca	gca	tgt	att	gct	gag	2932
Val	Leu	Val	Lys	Leu	Asp	Leu	Arg	Lys	Lys	Ala	Ala	Cys	Ile	Ala	Glu	
			800					805					810			
cag	tat	cat	act	gtg	ttg	aaa	ctc	caa	ggc	cag	gtt	tct	gcc	aaa	aag	2980
Gln	Tyr	His	Thr	Val	Leu	Lys	Leu	Gln	Gly	Gln	Val	Ser	Ala	Lys	Lys	
		815					820				825					
cgc	ctt	ggt	acc	aac	cag	gaa	aat	cag	caa	cca	aac	caa	caa	cca	cca	3028
Arg	Leu	Gly	Thr	Asn	Gln	Glu	Asn	Gln	Gln	Pro	Asn	Gln	Gln	Pro	Pro	
	830					835				840						

ggg aag aaa cca ttc ctt cga aat tta ctt ccc cga aca cca acc tgc 3076
Gly Lys Lys Pro Phe Leu Arg Asn Leu Leu Pro Arg Thr Pro Thr Cys
845 850 855 860

caa agc tca aca gac tgc agc cct tat gcc cgg atc cta cgc tca cgg 3124
Gln Ser Ser Thr Asp Cys Ser Pro Tyr Ala Arg Ile Leu Arg Ser Arg
865 870 875

cgt tcc cct tta ctc aaa tct ggg cct ttt ggc aaa aag tac taa 3169
Arg Ser Pro Leu Leu Lys Ser Gly Pro Phe Gly Lys Lys Tyr
880 885 890

ggctgtgggg aaagagaaga gcagtcattg ccctgaggtg ggtcagctac tctcctgaag 3229

aaataggtct cttttatgct ttacatata tcaggaatta tatccaggat gcaataactca 3289

gacactagct tttttctcac ttttgtatta taaccaccta tgtaattctca tgttgttgtt 3349

tttttttatt tacttatatg atttctatgc acacaaaaac agttatatta aagatattat 3409

tggtcacatt ttttattgaa ttccaaatgt agcaaaatca ttaaaacaaa ttataaaagg 3469

ga 3471

<210> 11
<211> 890
<212> PRT
<213> 人

<400> 11

Met Ser Gln Gly Ile Leu Ser Pro Pro Ala Gly Leu Leu Ser Asp Asp
1 5 10 15

Asp Val Val Val Ser Pro Met Phe Glu Ser Thr Ala Ala Asp Leu Gly
20 25 30

Ser Val Val Arg Lys Asn Leu Leu Ser Asp Cys Ser Val Val Ser Thr
35 40 45

Ser Leu Glu Asp Lys Gln Gln Val Pro Ser Glu Asp Ser Met Glu Lys
50 55 60

Val Lys Val Tyr Leu Arg Val Arg Pro Leu Leu Pro Ser Glu Leu Glu
65 70 75 80

Arg Gln Glu Asp Gln Gly Cys Val Arg Ile Glu Asn Val Glu Thr Leu
85 90 95

Val Leu Gln Ala Pro Lys Asp Ser Phe Ala Leu Lys Ser Asn Glu Arg
100 105 110

Gly Ile Gly Gln Ala Thr His Arg Phe Thr Phe Ser Gln Ile Phe Gly
115 120 125

Pro Glu Val Gly Gln Ala Ser Phe Phe Asn Leu Thr Val Lys Glu Met
130 135 140

Val Lys Asp Val Leu Lys Gly Gln Asn Trp Leu Ile Tyr Thr Tyr Gly
145 150 155 160

Val Thr Asn Ser Gly Lys Thr His Thr Ile Gln Gly Thr Ile Lys Asp
165 170 175

Gly Gly Ile Leu Pro Arg Ser Leu Ala Leu Ile Phe Asn Ser Leu Gln
180 185 190

Gly Gln Leu His Pro Thr Pro Asp Leu Lys Pro Leu Leu Ser Asn Glu
195 200 205

Val Ile Trp Leu Asp Ser Lys Gln Ile Arg Gln Glu Glu Met Lys Lys
210 215 220

Leu Ser Leu Leu Asn Gly Gly Leu Gln Glu Glu Glu Leu Ser Thr Ser
225 230 235 240

Leu Lys Arg Ser Val Tyr Ile Glu Ser Arg Ile Gly Thr Ser Thr Ser
245 250 255

Phe Asp Ser Gly Ile Ala Gly Leu Ser Ser Ile Ser Gln Cys Thr Ser
260 265 270

Ser Ser Gln Leu Asp Glu Thr Ser His Arg Trp Ala Gln Pro Asp Thr
275 280 285

Ala Pro Leu Pro Val Pro Ala Asn Ile Arg Phe Ser Ile Trp Ile Ser
290 295 300

Phe Phe Glu Ile Tyr Asn Glu Leu Leu Tyr Asp Leu Leu Glu Pro Pro
305 310 315 320

Ser Gln Gln Arg Lys Arg Gln Thr Leu Arg Leu Cys Glu Asp Gln Asn
325 330 335

Gly Asn Pro Tyr Val Lys Asp Leu Asn Trp Ile His Val Gln Asp Ala
340 345 350

Glu Glu Ala Trp Lys Leu Leu Lys Val Gly Arg Lys Asn Gln Ser Phe
355 360 365

Ala Ser Thr His Leu Asn Gln Asn Ser Ser Arg Ser His Ser Ile Phe
370 375 380

Ser Ile Arg Ile Leu His Leu Gln Gly Glu Gly Asp Ile Val Pro Lys
385 390 395 400

Ile Ser Glu Leu Ser Leu Cys Asp Leu Ala Gly Ser Glu Arg Cys Lys
405 410 415

Asp Gln Lys Ser Gly Glu Arg Leu Lys Glu Ala Gly Asn Ile Asn Thr
420 425 430

Ser Leu His Thr Leu Gly Arg Cys Ile Ala Ala Leu Arg Gln Asn Gln
435 440 445

Gln Asn Arg Ser Lys Gln Asn Leu Val Pro Phe Arg Asp Ser Lys Leu
450 455 460

Thr Arg Val Phe Gln Gly Phe Phe Thr Gly Arg Gly Arg Ser Cys Met
465 470 475 480

Ile Val Asn Val Asn Pro Cys Ala Ser Thr Tyr Asp Glu Thr Leu His
485 490 495

Val Ala Lys Phe Ser Ala Ile Ala Ser Gln Leu Val His Ala Pro Pro
500 505 510

Met Gln Leu Gly Phe Pro Ser Leu His Ser Phe Ile Lys Glu His Ser
515 520 525

Leu Gln Val Ser Pro Ser Leu Glu Lys Gly Ala Lys Ala Asp Thr Gly
530 535 540

Leu Asp Asp Asp Ile Glu Asn Glu Ala Asp Ile Ser Met Tyr Gly Lys
545 550 555 560

Glu Glu Leu Leu Gln Val Val Glu Ala Met Lys Thr Leu Leu Leu Lys
565 570 575

Glu Arg Gln Glu Lys Leu Gln Leu Glu Met His Leu Arg Asp Glu Ile
580 585 590

Cys Asn Glu Met Val Glu Gln Met Gln Gln Arg Glu Gln Trp Cys Ser
595 600 605

Glu His Leu Asp Thr Gln Lys Glu Leu Leu Glu Glu Met Tyr Glu Glu
610 615 620

Lys Leu Asn Ile Leu Lys Glu Ser Leu Thr Ser Phe Tyr Gln Glu Glu
625 630 635 640

Ile Gln Glu Arg Asp Glu Lys Ile Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Gln
645 650 655

Glu Ala Arg Gln Gln Ser Val Ala His Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu
660 665 670

Ala Leu Arg Arg Ser Gln Arg Leu Ala Ala Ser Ala Ser Thr Gln Gln
675 680 685

Leu Gln Glu Val Lys Ala Lys Leu Gln Gln Cys Lys Ala Glu Leu Asn
690 695 700

Ser Thr Thr Glu Glu Leu His Lys Tyr Gln Lys Met Leu Glu Pro Pro
705 710 715 720

Pro Ser Ala Lys Pro Phe Thr Ile Asp Val Asp Lys Lys Leu Glu Glu
725 730 735

Gly Gln Lys Asn Ile Arg Leu Leu Arg Thr Glu Leu Gln Lys Leu Gly
740 745 750

Glu Ser Leu Gln Ser Ala Glu Arg Ala Cys Cys His Ser Thr Gly Ala
755 760 765

Gly Lys Leu Arg Gln Ala Leu Thr Thr Cys Asp Asp Ile Leu Ile Lys
770 775 780

Gln Asp Gln Thr Leu Ala Glu Leu Gln Asn Asn Met Val Leu Val Lys
785 790 795 800

Leu Asp Leu Arg Lys Lys Ala Ala Cys Ile Ala Glu Gln Tyr His Thr
805 810 815

Val Leu Lys Leu Gln Gly Gln Val Ser Ala Lys Lys Arg Leu Gly Thr
820 825 830

Asn Gln Glu Asn Gln Gln Pro Asn Gln Gln Pro Pro Gly Lys Lys Pro
835 840 845

Phe Leu Arg Asn Leu Leu Pro Arg Thr Pro Thr Cys Gln Ser Ser Thr
850 855 860

Asp Cys Ser Pro Tyr Ala Arg Ile Leu Arg Ser Arg Arg Ser Pro Leu
865 870 875 880

Leu Lys Ser Gly Pro Phe Gly Lys Lys Tyr
885 890



I659043

【發明摘要】

【中文發明名稱】 對於TH1細胞之KIF20A抗原決定位胜肽及含此之疫苗

【英文發明名稱】 KIF20A EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND
VACCINES CONTAINING THE SAME

【中文】

於此揭示具有Th1細胞誘導能力之單離的自KIF20A衍生的抗原決定位胜肽。此種胜肽可藉由MHC第II類分子辨識並誘導Th1細胞。於較佳實施例中，此種本發明之胜肽可混雜地(promiscuously)結合於MHC第II類分子並且除了誘導Th1細胞更誘導KIF20A專一性細胞毒性T淋巴球(CTL)。因此此種胜肽適用於增強一對象中之免疫反應，因而於癌免疫療法中，特別是作為癌疫苗提供效用。於此也揭示編碼為任意上述胜肽的聚核苷酸、由此種胜肽所誘導的APC與Th1細胞，及與其相關的誘導方法。包含任意上述成分作為有效成分的醫藥組合物，提供效用於癌症或腫瘤之治療及/或預防，此癌症或腫瘤包括例如膀胱癌、乳癌、膽管細胞癌、食道癌、非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 及頭頸惡性腫瘤 (head-and-neck malignant tumor, HNMT)。

【英文】

Isolated KIF20A-derived epitope peptides having Th1 cell inducibility are disclosed herein. Such peptides can be recognized by MHC class II molecules and induce Th1 cells. In preferred embodiments, such a peptide of the present invention can promiscuously bind to MHC class II molecules and induce KIF20A-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in addition to Th1 cells. Such peptides are thus suitable for use

in enhancing immune response in a subject, and accordingly find use in cancer immunotherapy, in particular, as cancer vaccines. Also disclosed herein are polynucleotides that encode any of the aforementioned peptides, APCs and Th1 cells induced by such peptides and methods of induction associated therewith. Pharmaceutical compositions that comprise any of the aforementioned components as active ingredients find use in the treatment and/or prevention of cancers or tumors including, for example, bladder cancer, breast cancer, cholangiocellular carcinoma, esophageal cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC), pancreatic cancer, prostate cancer, renal carcinoma, small cell lung cancer (SCLC) and head-and-neck malignant tumor (HNMT).

【指定代表圖】 無。

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種單離的胜肽，其由選自由以下構成之群組的胺基酸序列所組成：

(a) 序列識別號: 3之胺基酸序列;及

(b) 一胺基酸序列，其中於(a)之胺基酸序列中有一個或二個胺基酸係經附加，該胜肽有誘導T輔助1型(Th1)細胞的能力。

【第2項】如申請專利範圍第1項之單離的胜肽，其中，該胜肽有結合於至少2種MHC第II類分子的能力。

【第3項】如申請專利範圍第2項之單離的胜肽，其中，該MHC第II類分子選自於由HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2構成之群組。

【第4項】一種單離的聚核苷酸，其編碼為如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽。

【第5項】一種組合物，包含一或多種如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽，或一或多種編碼為該胜肽的聚核苷酸。

【第6項】一種醫藥組合物，其係用於癌治療，包含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分：

(a) 一或多種如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽;

(b) 一或多種如申請專利範圍第4項之聚核苷酸;

(c) 一或多種APC，其在表面上呈現MHC第II類分子與如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽或其片段的複合體;

(d) 一或多種Th1細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽或其片段之APC;及

(e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。

【第7項】如申請專利範圍第6項之醫藥組合物，其中該組合物被配製為供

對於具有選自於由HLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR53及HLA-DP2構成之群組中至少一種作為MHC第II類分子之對象投予。

【第8項】 如申請專利範圍第6或7項之醫藥組合物，其中該組合物更包含有CTL誘導能力之一或多種胜肽。

【第9項】 一種體外誘導APC之方法，該APC有能力誘導Th1細胞，該方法包含使APC與如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽接觸的步驟。

【第10項】 一種體外誘導Th1細胞之方法，包含選自於由以下構成之群組中之步驟：

(a) 共同培養CD4陽性T細胞，及在表面呈現MHC第II類分子與如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽或其片段之複合體的APC；及

(b) 將編碼為兩種T細胞受體(TCR)次單元之聚核苷酸、或編碼為各TCR次單元之聚核苷酸導入CD4陽性T細胞內，其中該TCR能結合於在細胞表面上呈現的MHC第II類分子與如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽或其片段之複合體。

【第11項】 一種單離的APC，其在表面上呈現MHC第II類分子與如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽或其片段之複合體。

【第12項】 一種APC，係由如申請專利範圍第9項之方法所誘導。

【第13項】 一種單離的Th1細胞，其辨識呈現在一APC的表面上之如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽或其片段。

【第14項】 一種Th1細胞，係由如申請專利範圍第10項之方法所誘導。

【第15項】 至少一種有效成分用於製造一組合物之用途，該組合物用於在一對象中誘導對抗癌之免疫反應，該至少一種有效成分選自於由以下構成之群組：

(a) 一或多種如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽；

(b) 一或多種如申請專利範圍第4項之聚核苷酸;

(c) 一或多種APC，其在表面上呈現MHC第II類分子與如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽或其片段的複合體;

(d) 一或多種Th1細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第1至3項中任一項之胜肽或其片段之APC;及

(e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。