



(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 I624475 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：102124658

(51)Int. Cl. : C07K14/47 (2006.01)  
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/07/10 美國

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

(72)發明人：西村泰治 NISHIMURA, YASUHARU (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：

US 2011/0152199A1

WO 2009/153992A1

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：11 共 182 頁

(54)名稱

對於 T H 1 細胞之 C D C A 1 抗原決定位勝肽及含此之疫苗

CDCA1 EPITOPE 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的自 CDCA1 衍生的抗原決定位勝肽。此種勝肽可藉由 MHC 第 II 類分子辨識並誘導 Th1 細胞。於較佳具體例中，此種本發明之勝肽可混雜地 (promiscuously) 結合於 MHC 第 II 類分子並且除了誘導 Th1 細胞更誘導 CDCA1 專一性細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。因此此種勝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勝肽的聚核苷酸、由此種勝肽所誘導的 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乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC)、非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 及頭頸癌 (HNC)。

Isolated CDCA1-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 CDCA1-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, breast cancer, bladder cancer, esophageal cancer, small cell lung cancer (SCLC), non-small cell lung cancer (NSCLC) and head-and-neck cancer (HNC).

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】（中文/英文）

對於 TH1 細胞之 CDCA1 抗原決定位勝肽及含此之疫苗  
/CDCA1 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勝肽，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 61/669,971 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)的抗原決定基勝肽，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】 CDCA1，也已知為細胞分裂週期相關 1 (cell division cycle associated 1)，被確認為與細胞週期基因共表現之基因之一種(class)的一成員，而細胞週期基因，例如 CDC2、細胞週期素(cyclin)、拓樸異構酶(topoisomerase)II 與其他(非專利文獻 14)。特別地，CDCA1 被發現與有絲分裂之 HeLa 細胞的中心粒(centromere)相關，且因此其被視為酵母菌 Nuf2 之功能性同系物(functional homologue) (非專利文獻 15)。

【0005】此外，經由基因表現分佈分析使用包含 23,040 基因之基因組寬 cDNA 微陣列(非專利文獻 16)，也確認 CDCA1 為一於乳癌(專利文獻 1)、膀胱癌(專利文獻 2)、食道癌(專利文獻 3)、小細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)與非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) (專利文獻 4)中被向上調控之新分子，此揭露之內容引入於此作為參考。CDCA1 之表現被特別向上調控於小細胞肺癌、非小細胞肺癌與腫瘤細胞株，然而除睪丸外於 23 個正常組織中並無偵測到其表現。

此外，於 CDCA1 表現之肺癌細胞株中，藉由 siRNA 向下調控 CDCA1 已顯示導致細胞生長抑制(專利文獻 4)。

【0006】綜上所述，這些資料建議 CDCA1 為一新、潛在普遍的致癌抗原(oncoantigen)。因此衍生自 CDCA1 之抗原決定位勝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，已鑑別出能夠從肺癌病患的 PBMC 誘導腫瘤反應性及 HLA-A2 (*A\*02:01*)-限制 CTL 的高免疫原性 CDCA1-衍生細胞毒性 T 淋巴球(CTL)-抗原決定位(非專利文獻 17, 專利文獻 6)。又，也已鑑別出 CDCA1-衍生之 HLA-A24-限制 CTL-抗原決定位(專利文獻 7)。所以，CDCA1 維持為可應用於癌症免疫療法的一具吸引力的標靶分子。

腫瘤專一性 CD4<sup>+</sup> 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 18)。主要由 Th1 細胞產生的 IFN- $\gamma$ ，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 19, 20)。Th1 細胞所分泌的 IFN- $\gamma$ ，也媒介直接的抗腫瘤或抗血管生成作用(非專利文獻 21)。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 22)。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 23)。但是，目前尚未鑑別出衍生

自 CDCA1 的此種抗原決定位。

[引用列表]

【0007】

[專利文獻]

[專利文獻 1] WO2005/028676

[專利文獻 2] WO2006/085684

[專利文獻 3] WO2007/013671

[專利文獻 4] WO2007/013665

[專利文獻 5] WO2005/089735

[專利文獻 6] WO2009/025117

[專利文獻 7] WO2009/153992

【0008】

[非專利文獻]

[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] Walker et al., Curr Cancer Drug Targets 2001 May;1(1):73-83

[非專利文獻 15] J Cell Biol 2001 Jan 22; 152(2):349-60

[非專利文獻 16] Cancer Res 2006 Nov 1; 66(21):10339-48

[非專利文獻 17] Harao M et al. Int J Cancer 2008;123: 2616-25.

[非專利文獻 18] Chamoto K et al. Cancer Res 2004;64: 386-90.

[非專利文獻 19] Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004;4:

595-602.

[非專利文獻 20] Shedlock DJ and Shen H。Science 2003;300: 337-9.

[非專利文獻 21] Street SE et al. Blood 2001;97: 192-7.

[非專利文獻 22] Bos R, and Sherman LA。Cancer Res 2010;70: 8368-77.

[非專利文獻 23] Melief CJ et al. Nat Rev Cancer 2008;8: 351-60.

### 【發明內容】

【0009】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CDCA1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。

【0010】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 CDCA1 基因在一些癌症類型中係向上調控，包括乳癌、膀胱癌、非小

細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、食道癌及頭頸癌(HNC)，本發明目標為進一步分析此細胞分裂周期關聯蛋白1(CDCA1)基因之基因產物，特別是由 GenBank 存取編號 NM\_145697 (序列識別號：9)之基因編碼陳列於之序列識別號：10 中的多勝肽。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 細胞的抗原決定位勝肽的 CDCA1 基因產物。例如，將從健康捐贈者獲得之周邊血液單核細胞(PBMC)使用衍生自人類 CDCA1 的混雜的 HLA-DR 及/或 DP 結合勝肽予以刺激。建立辨識經以各別的候選勝肽脈衝的 HLA-DR 或 DP 陽性目標細胞的 Th1 細胞，並且鑑別可誘導對抗 CDCA1 之有效及專一性免疫反應之經 HLA-DR 及/或 DP 限制之抗原決定位勝肽。此等結果證明 CDCA1 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 結合勝肽也會在同一捐贈者以 CDCA1 專一性的方式刺激 CTL 反應。此等結果確認 CDCA1 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。

【0011】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 與 2 之胺基酸序列的勝肽。本發明思考修飾之勝肽，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：10 (CDCA1)之胺基酸序列之連續胺基酸序列的勝肽，及其功能上均等物。或者，本發明提供一具有 Th1 細胞 CTL 兩者的誘導能力的勝肽。於一些具體例，本發明

之胜肽回應於序列識別號:1或2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。

【0012】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。

【0013】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以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。

【0014】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，例子包括但不限於乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)。

【0015】本發明特別考慮之目的的例子包括以下各項：

[1] 一種單離的勝肽，其長度為 10-30 個胺基酸且包含序列識別號：10 的一部分胺基酸序列，其中該勝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 或 2 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，該勝肽有誘導 T 輔助 1 型(Th1)細胞的能力。

[2] 如[1]之單離的勝肽，其中，該勝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]之單離的勝肽，其中，該 MHC 第 II 類分子選自於由 HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15 及 HLA-DP2 構成之群組。

[4] 如[1]至[3]中任一項之單離的勝肽，其中，該勝肽包含具有 CDCA1 專一性細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力之勝肽的胺基酸序列。

[5] 如[4]之單離的勝肽，其中，該勝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 及 2 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-DR9、HLA-DR15 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勝肽。

[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]中任一項之勝肽；
- (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]中任一項之勝肽或其片段；
- (d) 一或多種 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之勝肽或其片段之 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]中任一項之勝肽接觸的步驟。

[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]中任一項之勝肽接觸；及
- (b) 將編碼為如[1]至[5]中任一項之勝肽的聚核苷酸導入 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]中任一項之勝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]中任一項之勝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]之勝肽的 APC；及

(b) 共同培養 CD8 陽性 T 細胞，及已接觸如[4]或[5]之勝肽的 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]中任一項之勝肽；

(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]中任一項之勝肽或其片段；

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

【0016】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】

【0017】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 顯示混雜的 HLA 第 II 類結合 CDCA1 衍生勝肽，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](http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html))實施之人類 CDCA1 蛋白質之胺基酸序列的分析結果。水平軸之數字代表 CDCA1 衍生之 15 貢勝肽之 N 端的胺基酸殘基

位置。越高的一致性百分等級 (percentile rank) 代表對於 HLA 第 II 類分子的結合親合性越強。B 部分繪示兩個重疊的 26 員及 24 員的長勝肽 (CDCA1(39-64) 與 CDCA1(55-78))，其對於多種 HLA-第 II 類對偶基因產物 (DRB1\*04:05、DRB1\*15:02 及 DPB1\*02:01) 具有重疊的高一致性百分等級且其包括由 CTL 在 HLA-A24 或 -A2 之背景中辨識之 9 員勝肽被選擇 (A，黑條) 並合成以鑑別含有 CTL 抗原決定位之混雜的 HLA 第 II 類限制 Th 細胞抗原決定位。

圖 2 顯示以長勝肽刺激以誘導 CDCA1 專一性 CD4<sup>+</sup> T 細胞，及鑑別限制 HLA-第 II 類分子。CD4<sup>+</sup> T 細胞株係由對於帶有各種 HLA-第 II 類基因型之 3 名健康捐贈者至少經過 3 回合 CDCA1(55-78) 與 CDCA1(39-64) 刺激後所產生，且 IFN- $\gamma$  產生 CD4<sup>+</sup> 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 CDCA1(55-78) 之反應。此等 CD4<sup>+</sup> T 細胞被以單獨的自體 PBMC(-)、經 CDCA1(55-78) (10 micro-g/ml) 脈衝之 PBMC，或經 CDCA1(55-78) 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，顯示 2 名健康捐贈者對抗 CDCA1(55-78) 之反應。此等 CD4<sup>+</sup> T 細胞，被以單獨的自體 PBMC(-)、經 CDCA1(55-78) (10 micro-g/ml) 脈衝之 PBMC，或經 CDCA1(55-78) 脈衝之 PBMC 在專一於 HLA-DR 或 HLA-DP 之 5 micro-g/ml mAb 存在下進行刺激。於 C 部分，顯示 2 名健康捐贈者對抗 CDCA1(39-64) 之反應。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 +/-

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。

圖 3 顯示藉由經各種 HLA 第 II 類分子限制之 Th 細胞對 CDCA1(55-78)與 CDCA1(39-64)勝肽之辨識。於 A 部分，將從健康捐贈者 HD1 建立的 CDCA1(55-78)專一性 CD4<sup>+</sup> T 細胞株，與經或未經 CDCA1(55-78)脈衝之 L-DR4 於抗 HLA-DR 或抗 HLA 第 I 類阻斷 mAb 存在下、經 WT1 勝肽脈衝之 L-DR4 或經或未經 CDCA1(55-78)脈衝之 L-DR53 進行共同培養。IFN- $\gamma$  產生 Th 細胞之數目係以 ELISPOT 分析法分析(上分格)。將來自健康捐贈者 HD-2 之 CDCA1(55-78)專一性 CD4<sup>+</sup> T 細胞株，和經或未經 CDCA1(55-78)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 CDCA1(55-78)脈衝之 L-DR8 進行共同培養(下分格)。於 B 部分，將從捐贈者 HD3 而來之受 HLA-DP 限制且 CDCA1(55-78)專一性之 CD4<sup>+</sup> T 選殖體，與經或未經 CDCA1(55-78)脈衝之來自 5 名 HLA-DP2 陽性或陰性捐贈者之異體 PBMC 在抗 HLA-DR 或抗 HLA-DP 阻斷 mAb 存在下共同培養。C 部分繪示受 HLA-DR4 限制之 Th 細胞對於 CDCA1(55-78)勝肽之辨識。將衍生自健康捐贈者 HD4 與健康捐贈者 HD5 之 CDCA1(55-78)專一性 CD4<sup>+</sup> T 細胞，和經或未經 CDCA1(55-78)脈衝之 L-DR4 於抗 HLA-DR 或抗 HLA 第 I 類阻斷 mAb 存在下、經 WT1 勝肽脈衝之 L-DR4、經 CDCA1(55-78)脈衝之 L-DR1 或經 CDCA1(55-78)脈衝之 L-DR53 共同培養。IFN- $\gamma$  產生 Th 細胞之數目以 ELISPOT 分析法分析。此等捐贈者之 HLA 類型顯示在分格上。資料以二重複或三重複分析之平均值 +/- SD 顯示。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，將來自捐贈者 HD1 之 CDCA1(39-64)專一性 CD4<sup>+</sup> T 細胞選殖體，和衍生自 2 名 HLA-DP9 陽性或陰性之捐贈者之經或未經 CDCA1(39-64)脈衝之異體 PBMC，一起在抗 HLA-DR 或抗 HLA-DP 阻斷 mAb 存在下進行共同培養(上分格)。將衍生自捐贈者 HD3 之 CDCA1(39-64)專一性 CD4<sup>+</sup> T 細胞株，和經或未經 CDCA1(39-64)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 CDCA1(39-64)脈衝之 L-DR8 進行共同培養(下分格)。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 +/- 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。

圖 4 顯示散裝(bulk)CDCA1(55-78)專一性 CD4<sup>+</sup> Th 細胞株的功能定性。於 A-D 部分，在將 T 細胞，和經 CDCA1(55-78)或無關之胜肽(WT1-0405 或 HIV-LP)脈衝之 L-DR4(A 部分及 D 部分)或自體 PBMC (B 與 C 部分共同培養 20 小時後，收集培養基並使用 Bio-Plex 分析系統測量細胞素(IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、TNF-alpha、MIP1-beta、IL-4、IL-7)的濃度。資料以三重複分析的平均 +/- SD 表示。E-H 部分繪示在抗原刺激後，CD4<sup>+</sup> T 細胞的細胞表面上暴露的 CD107a 的偵測。顯示之事件係針對 CD4<sup>+</sup> T 細胞閘控(gated on)。將細胞以 CDCA1(55-78)或無關的胜肽再度刺激(例如 WT1-0405)。在圖中的數字代表有此象限特性的細胞群體的百分比 (CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> T 細胞)。

圖 5 顯示從辨識載有此 CDCA1 蛋白質之自體 DC 之捐贈者 HD1 建立的 CDCA1(55-78)與 CDCA1(39-64)專一性 Th 選殖

體。於 A 部分，該受 HLA-DR4 限制之 CDCA1(55-78)專一性 Th 選殖體或該受 HLA-DR9 限制之 CDCA1(39-64)專一性 Th 選殖體 ( $2 \times 10^4$ /井)，係與載有重組 CDCA1 蛋白質(50 micro-g/ml)之自體 DC( $5 \times 10^3$ /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- $\gamma$  產生 Th 選殖體之數目，以 ELISPOT 分析法分析。於 B 部分，從捐贈者 HD3 建立之受 HLA-DP2 限制之 CDCA1(55-78)專一性 Th 細胞選殖體，辨識載有該 CDCA1 蛋白質之自體 DC。將受 HLA-DP2 限制之 CDCA1(55-78)專一性 Th 細胞選殖體，與經 CDCA1 蛋白質負載之自體 DC 共同培養，且將 IFN- $\gamma$  產生 Th 細胞選殖體之數目以 ELISPOT 分析法分析。資料以二重複之平均 +/- SD 表示。顯示至少顯示有類似結果的至少 3 次獨立實驗的代表性資料。

圖 6 表示於體外及體內誘導有效的 CTL 交叉起動的 CDCA1-LP。於 A 部分，將從 HLA-2 陽性及 HLA-DR4 陽性捐贈者分離之 HD1CD8<sup>+</sup> T 細胞以經以 CDCA1(55-78) LP 負載之 DC 刺激。3 次刺激後，將產生的 CTL 細胞株，與經 CDCA1-A2 (65-73) SP 脈衝之 T2 細胞在抗 HLA 第 I 類或抗-HLA-DR 阻斷 mAb 存在下、或無關勝肽(HIV-A2)脈衝之 T2 細胞共同培養，且 IFN- $\gamma$  產生 CTL 之數目以 ELISPOT 分析法分析。顯示使用 2 名 HLA-2 陽性及 HLA-DR4 陽性之健康捐贈者之 PBMC 獲得之有類似結果之 3 次獨立的實驗的代表性資料。於 B 部分，將經 CDCA1(55-78) LP 免疫之小鼠中之 CDCA1(65-73) SP 專一性 CTL 擴增物，於 IFA 中乳化。將 HLA-A2 Tgm 以乳化於 IFA

中之 CDCA1(55-78) LP 對於尾基部免疫。第 2 或第 3 次接種 CDCA1(55-78) LP 後的 7 天，將鼠蹊部附近之淋巴結的 CD8<sup>+</sup> T 細胞進行陽性分離，並且與經 CDCA1-A2 (65-73) SP 或無關的勝肽脈衝之 BM-DC 一起培養，並利用生物體外 ELISPOT 分析法分析 IFN- $\gamma$  產生 CD8<sup>+</sup> T 細胞的數目。顯示有類似結果的 7 個獨立實驗而來的代表性資料。於 C 部分，於 HLA-A24<sup>+</sup>/A2<sup>+</sup>/DR4<sup>+</sup> HD5，CDCA1(55-78)LP 誘導 CDCA1 專一性 CTL 之有效交叉起動。將從 HD5 分離的純 CD8<sup>+</sup> T 細胞，以負載了 CDCA1(55-78)LP 之自體 DC 刺激。3 回合刺激後，將產生的 CTL 以經 CDCA1-A2 (65-73)SP 脈衝之 T2 細胞、經 CDCA1-A24 (56-64)SP 脈衝之 C1R-A2402 細胞，或經對照 SP 脈衝之目標細胞再度刺激。IFN- $\gamma$  產生 CTL 之數目，以 ELISPOT 分析法分析。顯示從有類似結果的 3 次獨立實驗而來的代表性資料。

於 D 部分，HLA-A24 Tgm 被以 CDCA1(55-78)LP(左分格)或 CDCA1(39-64)LP(右分格)免疫。於第 2 次以 CDCA1-LP 接種後，將鼠蹊部附近之淋巴結的鼠 CD8<sup>+</sup> T 細胞，以經 CDCA1-A24 (56-64) SP 或 HIV-A24 SP 脈衝之 BM-DC 或 C1R-A2402 刺激。於 E 部分，以 CDCA1-LP 疫苗優越地誘導 CDCA1 專一性 CTL。將 HLA-A24 Tgm 以 CDCA1(55-78)LP、CDCA1(39-64)LP 或 CDCA1-A24 (56-64) (300 nmol/小鼠) 免疫。第 2 次接種 CDCA1 衍生勝肽後，將鼠蹊部附近之淋巴結中的鼠 CD8<sup>+</sup> T 細胞，以經 CDCA1-A24 (56-64) SP 或 HIV-A24 SP (背景) 脈衝之 BM-DC 刺激。結果代表減去背景值後的專一

性 IFN- $\gamma$  點。資料以三重複分析之平均值 +/- 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。

圖 7 顯示由於以 CDCA1(55-78) LP 及 CDCA1(55-78) LP 專一性 CD4 $^{+}$  Th 細胞選殖體刺激所致之誘導 CDCA1-A2 (65-73)、CDCA1-A2 (351-359) 或 CDCA1-A24(56-64) 專一性 CTL 之增強。於 A 部分，將產生 HLA-DR4 限制之 CDCA1(55-78) 專一性 CD4 $^{+}$  Th 細胞選殖體之來自 HLA-A2 與 DR4 陽性健康捐贈者 HD1 之 PBMC，與 CDCA1-A2 (65-73) 及 CDCA1-A2 (351-359) (混合 SP，各 20 micro g/ml) 之混合物、混合 SP + CDCA1(55-78) (LP, 20 micro-g/ml)、混合 SP + CDCA1(55-78) 專一性 CD4 $^{+}$  T 細胞選殖體 (Th 選殖體,  $5 \times 10^5$ /井) 或混合 SP + LP + Th 選殖體之混合物，一起培養 11 天。培養此培養物 7 天後，添加此等勝肽 (與前述的濃度相同) 與 IL-2 (20 U/ml) (第 2 次刺激)，然後於第 9 天添加 IL-15 (5 ng/ml)。於培養 11 天時，將細胞以經 PE 標定之 HLA-A\*02:01/ CDCA1-A2 (65-73) 胜肽複合體或 HLA-A\*02:01/ CDCA1-A2 (351-359) 胜肽複合體的四元體與經 FITC 標定之抗人類 CD8 mAb 之組合染色，並以細胞流式計數器分析。在右上象限內的點代表 CD8 $^{+}$  四元體 $^{+}$  T 細胞。顯示的事件係針對 CD8 $^{+}$  T 細胞閘控。在圖中的數字代表此有右上象限特性的細胞群體的百分比 (CD8 $^{+}$  四元體 $^{+}$  T 細胞)。資料代表 3 次有類似結果的獨立實驗的代表。於 B 部分，顯示於 CD8 $^{+}$  四元體 $^{+}$  細胞中之增加值 (增加倍數)。於 C 部分，在培養第 14 天時，添加此等勝肽 (與前述濃度相同) 與 IL-2 (20 U/ml) (第 3 次刺激)，然後於第 16 天添加 IL-15 (5 ng/ml)。於

培養第 18 天時，將此細胞以經 PE 標定之四元體與經 FITC 標定之抗人類 CD8 mAb 之組合染色(上分格)。於第 18 天實施 CDCA1-A2 反應性 T 細胞之 IFN- $\gamma$ -ELISPOT 分析。條代表當產生之細胞株再度以負載了 CDCA1-A2 (65-73)、CDCA1-A2 (351-359)或無關 HIV-A2 胜肽之 T2 細胞刺激時，IFN- $\gamma$  點之數目(封閉條)。資料以三重複之平均 +/- SD 表示。統計上顯著差異( $p < 0.05$ )，以星號表示(下部分格)。於 D 部分，於抗原刺激後，檢測於 CD8 $^{+}$  T 細胞之細胞表面上暴露之 CD107a。顯示之事件係針對 CD8 $^{+}$  T 細胞閘控。將細胞以 CDCA1-A2 (65-73)、CDCA1-A2 (351-359)或無關的 HIV-A2 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 (CD8 $^{+}$  CD107a $^{+}$  T 細胞)。於 E 部分，藉由已活化的 CDCA1(55-78) LP 專一性 CD4 $^{+}$  T 細胞之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 之增強的誘導。將衍生自 HLA-A24+/DR15+ HD2 之 CDCA1(55-78) LP 專一性散裝 CD4 $^{+}$  T 細胞及 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性散裝 CD8 $^{+}$  T 細胞，與自體 DC 一起在 CDCA1-A24 (56-64) SP (SP 單獨)、CDCA1-A24 (56-64) SP + 對照 LP(對照 + LP)或 CDCA1-A24 (56-64) SP + CDCA1(55-78) LP (CDCA1(55-78) LP + SP) 存在下一起培養，而不添加任何細胞激素。與勝肽在體外培養 1 週後，將培養的細胞以經 PE 標定之 HLA-A\*24:02/ CDCA1-A24 (56-64)複合體的四元體與經 FITC 標定之抗人類 CD8 mAb 染色。也顯示在無任何勝肽下培養細胞之結果(無勝肽)。預刺激之柱(column)顯示在此實驗中使用之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性散裝 CD8 $^{+}$  T 細胞之四

元體 + CD8+T 細胞/井的絕對數目。代表性的 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性四元體染色被顯示 (在 CD8<sup>+</sup> T 細胞閘控，點圖)。資料以三重複之平均 +/- SD 表示。顯示至少顯示有類似結果的至少 3 次獨立實驗的代表性資料。

圖 8 代表從健康捐贈者誘導 CDCA1 專一性 Th 細胞。於 A 部分，由於以 CDCA1(55-78)LP 刺激，從 DR4<sup>+</sup> 健康捐贈者 (HD1) 產生 CDCA1 專一性 Th 細胞。對此產生的 Th 細胞以經 CDCA1(55-78)LP 脈衝之自體 PBMC 或 L 細胞再度刺激。使用 WT1 胜肽作為對照勝肽。IFN- $\gamma$  產生 Th 細胞之數目以 ELISPOT 分析法分析。顯示從 HD1 獲得之至少 3 次有類似結果之獨立實驗的代表性資料。從 2 名 DR4<sup>+</sup> 捐贈者得到了類似結果 (表 1; HD4 與 HD5)。在分格上顯示捐贈者 HD1 之 HLA 第 II 類基因型。畫底線之 HLA-第 II 類對偶基因編碼將此勝肽對於 Th 細胞呈現之 HLA-第 II 類分子。在 HD1 未測試 HLA-DQ mAb 之阻斷作用。於 B 部分，利用以 CDCA1(55-78)LP 刺激，從 DR4 陰性、DR15 陽性健康捐贈者 (HD2) 產生 CDCA1 專一性 Th 細胞。顯示有類似結果的至少 5 次獨立實驗的代表性資料。於 C 部分，從 HD3 建立了受 HLA-DP2 限制及 CDCA1(55-78)LP 專一性散裝 Th 細胞株 (C-1) 或 Th 細胞選殖體 (C-2)。將受 HLA-DP 限制之 Th 選殖體，與經或未經 CDCA1(55-78)LP 脈衝之衍生自 HLA-DP2-陽性或陰性捐贈者的異體 PBMC 共同培養。於 D 部分，藉由以 CDCA1(39-64)LP 刺激，從 DR15<sup>+</sup> 健康捐贈者 (HD3) 產生 CDCA1(39-64)LP 專一性 Th 細胞。於 E 部分，從 HD1 建立此受 HLA-DR9 限制之 CDCA1(39-64)LP 專

一性散裝 Th 細胞(左分格)或 Th 細胞選殖體(右分格)。將受 HLA-DR 限制之 Th 選殖體，與經或未經 CDCA1(39-64)LP 脈衝之衍生自 HLA-DR9-陽性或陰性捐贈者的異體 PBMC 共同培養。此從 HD1 產生的受 HLA-DR 限制之 Th 細胞選殖體，對於 CDCA1(39-64)LP 脈衝之 L-DR4 細胞未顯示反應(資料未顯示)。IFN- $\gamma$  產生 Th 細胞之數目以 ELISPOT 分析法分析。資料以三重複之平均 $+$ / $-$  SD 表示。顯示有類似結果的至少 3 次獨立實驗的代表性資料。在分格上顯示捐贈者之 HLA 第 II 類基因型。畫底線之 HLA-第 II 類對偶基因編碼將此勝肽對於 Th 細胞呈現之 HLA-第 II 類分子。

圖 9 顯示 CDCA1-LP 於體外有效率誘導 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CD8 $^{+}$  T 細胞擴增。於 A 部分，從 HD2 (HLA-A24 $^{+}$  and DR15 $^{+}$ )建立之 CDCA1-A24 (56-64) 專一性散裝 CTL，在體外以經 CDCA1(55-78)LP (封閉圓)或無關 LP (開放圓)脈衝之自體 DC 刺激。於 LP 刺激前(第 0 天)及刺激後第 5、7、8 及 10 天，將一小部分培養的細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞) CD8 $^{+}$  T 細胞，以 CDCA1-A24 (56-64) 專一性四元體與抗人類 CD8 mAb 之組合染色。顯示從 3 次獨立實驗而來的在第 0 及 10 天的代表性資料(右分格)。事件係針對 CD8 $^{+}$  T 細胞閘控。CD8 $^{+}$  T 細胞中之四元體 $^{+}$ 細胞之百分比，以線繪示(左分格)。於 B 部分，CDCA1(55-78)LP 於體外誘導 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CD8 $^{+}$  T 細胞有效率擴增。將從 HD5 (HLA-A24 $^{+}$ 與 DR4 $^{+}$ )建立之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性散裝 CTL，於體外以經 CDCA1(55-78)LP (右條)或對照 LP (中條)脈衝之自體 DC 刺

激。於 LP 刺激前 (LP 預刺激, 第 0 天; 左條), 及刺激後第 7 天(中及右條), 以 ELISPOT 分析法計數以經 CDCA1-A24 (56-64) SP 脈衝之或經 HIV-A24 SP (背景) 脈衝之 C1R-A2402 細胞 ( $2 \times 10^4$ /井) 刺激時之 IFN- $\gamma$  產生  $CD8^+$  T 細胞 ( $1 \times 10^5$ /井) 之數目。顯示從 3 次獨立實驗而來之代表性資料。資料以三重複分析之平均值 +/- SD 代表。於 C 部分, 將從已接種 CDCA1-A24 (56-64) SP 之 HNC 病患 (HNC29) 而來的 PBMC, 與 CDCA1(55-78)LP 與 CDCA1(39-64)LP 之混合物一起培養。於第 0 天(生物體外)及第 7 天(於體外以 CDCA1-LP 刺激後), 將此等 PBMC 以四元體 HLA-A\*24:02/CDCA1-A24 (56-64) 複合體或對照四元體染色。(在  $CD8^+$  T 細胞閘控)。於第 7 天, 也以 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析法檢測 CDCA1-A24 (56-64)-SP 專一性 CTL 的頻率(右方分格, 條形圖)。資料以三重複之平均 +/- SD 表示。於 D-G 部分, 將從已接種 CDCA1-A24 (56-64) SP 之 HNC 病患 (HNC26、31、39 及 109) 而來的 PBMC, 與 CDCA1(55-78)LP 與 CDCA1(39-64)LP 之混合物一起培養。於第 0 天(生物體外)與第 7 天(於體外以 CDCA1-LP 刺激後), 將細胞以四元體 HLA-A\*24:02/CDCA1-A24 (56-64) 複合體或對照四元體(於  $CD8^+$  T 細胞閘控)染色。

圖 10 顯示經由 DC 之 CDCA1-LP 的交叉呈現。於 A 部分, 係由 DC 攝入並交叉呈現 CDCA1(55-78)LP。將未固定或已固定的 DC 以 CDCA1(55-78)LP 或 CDCA1-A24 (56-64) SP 脈衝 3 小時。將此散裝 CDCA1-A24 (56-64) 專一性 CTL 共同培養 6 小時, 並以 IFN- $\gamma$  標定測量回應。事件針對  $CD8^+$  四元體  $+$  T

細胞閘控，且圖內的數字代表  $\text{IFN-}\gamma^+$  T 細胞的百分比。於 B 部分，係顯示經由 DC 之 CDCA1(39-64)LP 的交叉呈現。將未固定或已固定之 DC，以 CDCA1(39-64)LP 或 CDCA1-A24 (56-64) SP 脈衝 3 小時。將此散裝 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 共同培養 6 小時，並以  $\text{IFN-}\gamma$  標定測量反應。事件於  $\text{CD8}^+$  四元體<sup>+</sup> T 細胞閘控且圖內的數字代表  $\text{IFN-}\gamma^+$  T 細胞的百分比。

圖 11 顯示從已接種 CDCA1-A24 (56-64) SP 之 HNC 病患分離之 PBMC 中，CDCA1-LP 專一性 Th 細胞的存在。於 A 部分，於體外以 CDCA1(39-64)LP 與 CDCA1(55-78)LP 之混合物刺激 PBMC 1 週以後，以  $\text{IFN-}\gamma$  ELISPOT 分析檢測個別之 CDCA1-LP 專一性 T 細胞之頻率。於 B 部分，證明相較於正常健康個體，HNC 病患顯示升高的 CDCA1 專一性  $\text{CD4}^+$  T 細胞免疫性。柱狀圖顯示回應於 CDCA1-LP 之健康捐贈者(對照)與 HNC 病患之比例。 $p$  值代表從費雪正確性檢定(Fisher's exact test)得到的統計結果。於 C 部分，評估已接種 CDCA1-A24 (56-64) SP (接種後)之 16 名 HNC 病患、7 名未接種之病患(接種前)及 10 名健康捐贈者中之 CDCA1 專一性 Th 細胞反應。結果代表減去背景值後之專一性  $\text{IFN-}\gamma$  點。各點代表個別的捐贈者。水平線代表中值， $p$  值代表從無參數曼-惠特尼(Mann-Whitney)  $U$  檢定獲得之統計結果。於單一井中，實施 19 名 HNC 病患中 7 名(HNC10、26、34、37、38、40 及 103)的實驗。於 D 部分，顯示  $\text{IFN-}\gamma$  產生 T 細胞之 HLA 第 II 類限制。將已被 LP 刺激 1 個月的 PBMC，以各 CDCA1-LP，於存

在對 HLA-DR、-DP、-DQ 或 HLA 第 I 類專一的 mAb 再度刺激。顯示獲自具有類似結果之 12 名 HNC 病患(HNC26、29、31、34、35、39、40、42、103、105、107 及 108)之 20 個條形圖中的 6 個。12 名 HNC 病患中有 6 名的實驗(HNC26、34、40、103 及 107)係於單一井中實施。CDCA1<sub>39-64</sub>-LP; 從 10 名 HNC 病患(HNC26、29、31、34、39、40、42、103、107 及 108)而來之代表性的 3 個條形圖。CDCA1(55-78)LP; 從 10 名 HNC 病患(HNC26、29、31、34、35、39、40、103、105 及 108)而來之代表性的 3 個條形圖。於 E 部分，重複接種 CTL 抗原決定位疫苗誘導 (HNC39、40、42 及 109)或增強(HNC107 與 108)CDCA1 專一性 Th 細胞反應(CDCA1(39-64)LP, 白色條; CDCA1(55-78)-LP, 黑色條)。6 名 HNC 病患中有 3 名(HNC40、108 及 109)之實驗係於單一井實施。於 F 部分，顯示 HNC 病患之臨床特性。如材料與方法項目所述，藉由 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析測量 CDCA1 專一性 T 細胞反應。19 名 HNC 病患中有 7 名(HNC10、26、34、37、38、40 與 103)之實驗係於單一井實施。接種數為「0」，代表未接種前之病患。(+)與(-)代表陽性及陰性反應。畫底線的 HLA-第 II 類對偶基因，編碼在健康捐贈者中呈現 CDCA1-LP 細胞之 HLA-第 II 類分子(圖 8; *HLA-DRB1\*04:05* 、 *DRB1\*09:01* 、 *DRB1\*15:02* 、 及 *DPB1\*02:01*)。No., 數目; CTR, 臨床試驗登記號; vac., 接種; HNC, 頭頸癌; M/F, 女/男; LP, 長勝肽; n.t., 未測試。

## 【實施方式】

### 【0018】[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。

**【0019】**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。

### **【0020】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" or "an")及「該」意指「至少一」。

**【0021】**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。含有經單離的或經純化的胜肽的特定胜肽，例如可藉由將該在蛋白質製備物進行之十二烷基硫酸鈉(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。

【0022】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、 $\gamma$ -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、亞礦、甲硫胺酸甲基銨鹽)。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。

【0024】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。

【0025】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。

【0026】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。

【0027】除非另外定義，用語「癌症」意指過度表現 CDCA1 基因的癌症，例如包括乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌 (SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)。

除非另外定義，用語「T 淋巴球」及「T 細胞」在此可以互換使用。

【0028】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<sup>+</sup> T 淋巴球分化，且能辨識由 MHC 第 I 類分子呈現的勝肽。

【0029】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。

【0030】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 類分子呈現的勝肽且關連於細胞免疫的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴球次群組。除非另有定義，用語「Th 細胞」、「CD4<sup>+</sup> T 細胞」及「CD4<sup>+</sup> 輔助 T 細胞」，在此亦可互換使用。Th1 細胞分泌多種細胞素(例如 IFN- $\gamma$ 、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)。

【0031】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、LA-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、HLA-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-DP2」係指亞型，其例子包括但不限於 HLA-DPB1\*0201 及 HLA-DPB1\*02:02。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 類分子呈現勝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<sup>+</sup> 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素(例如 IFN- $\gamma$ 、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)。

【0032】除非另有定義，詞語「專一於 CDCA1 之 Th1 細胞」，係指由呈現衍生自 CDCA1 之勝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。

除非另有定義，詞語「CDCA1 專一性 CTL」，係指對抗表現 CDCA1 之目標細胞專一性顯示細胞毒殺性的 CTL。

除非另有定義，當使用在勝肽上下文，詞語「CTL 誘導能力」，係指一勝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。

【0033】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勝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。

#### 【0034】II. 胜肽

以下詳述之本發明之勝肽，可指稱為「CDCA1 胜肽」或「CDCA1 多勝肽」。

為了證明衍生自 CDCA1 之勝肽作用如一被 T 輔助 1 型 (Th1)細胞所辨認之抗原，分析衍生自 CDCA1 之勝肽(序列識別號：10)以確定是否其為由一 MHC 第 II 類分子混雜地限制之抗原決定位。

衍生自 CDCA1 之混雜的 MHC 第 II 類結合勝肽的候選物，基於其對 HLA-DR4、HLA-DR15 及 HLA-DP2 之結合親和力確認。在藉由載有這些勝肽之樹突細胞(dendritic cell, DC)以體外刺激 CD 4<sup>+</sup> T 細胞後，使用下列各個勝肽成功建立 Th1 細胞：

CDCA1/ IVYGIRLEHFYMMPVNSEVMYPHL (55-78; 序列

識別號: 1)及

CDCA1/ NPKPEVLHMIYMRALQIVYGIRLEHF (39-64; 序列識別號: 2)。

【0035】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-DR9 及 HLA-DP2) 限制的 Th1 細胞。此等結果證明 CDCA1 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-DR9、HLA-DR15，及 HLA-DP2) 混雜的限制的 CDCA1 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。

【0036】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 CDCA1 之 CTL 的能力，且如同此處證明，此胜肽可誘導專一於 CDCA1 之 CTL 及 Th1 細胞。因此此等胜肽作可用於誘導對抗表現 CDCA1 之癌的免疫反應之適合的胜肽。因為 CDCA1 基因在大多數癌組織係過度表現，包括例如乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)及非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)，代表其係免疫療法的一個良好標的。

因此本發明提供有誘導專一於 CDCA1 之 Th1 細胞之能力的胜肽，。

【0037】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。或本發明之勝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。此勝肽之片段，可藉由在抗原呈現細胞處理而產生。於較佳具體例，本發明之勝肽或其片段有能力結合 2 或更多種 MHC 第 II 類分子（例如 HLA-DR9 及 HLA-DR15、HLA-DR4 及 HLA-DR15、HLA-DR4 及 HLA-DP2、HLA-DR15 及 HLA-DP2、或 HLA-DR4、HLA-DR15 及 HLA-DP2）。換言之，本發明之勝肽有能力誘導受 2 或更多種 MHC 第 II 類分子限制之 Th1 細胞。於另一具體例，本發明之勝肽包括有 CDCA1 專一性 CTL 誘導能力之勝肽之胺基酸序列。此種具 CDCA1 專一性 CTL 誘導能力的勝肽的典型例，包括有序列識別號：3 或 5 之胺基酸序列的勝肽。

【0038】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 類結合勝肽於長度有靈活性。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 類結合勝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 或 2 之所有胺基酸殘基對結合 MHC 第 II 類分子為必要。

因此本發明之勝肽可為有能力誘導 Th1 細胞之勝肽，此種勝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 或 2 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。

【0039】MHC 第 II 類結合勝肽通常為 10-30 個胺基酸。當序列識別號：1 與 2 之胺基酸序列係由 CDCA1(序列識別號：10)之部分胺基酸序列構成，本發明之勝肽可為以下[1]至[5]之勝肽：

[1] 一種單離的勝肽，其長度為 10-30 個胺基酸且包含序列識別號：10 的一部分胺基酸序列，其中該勝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 或 2 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，該勝肽有誘導 T 輔助 1 型(Th1)細胞的能力。

[2] 如[1]之單離的勝肽，其中，該勝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]之單離的勝肽，其中，該 MHC 第 II 類分子選自於由 HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15 及 HLA-DP2 構成之群組。

[4] 如[1]至[3]中任一項之單離的勝肽，其中，該勝肽包含具有 CDCA1 專一性細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力之勝肽的胺基酸序列。

[5] 如[4]之單離的勝肽，其中，該勝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 及 2 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。

【0040】本發明之胜肽誘導之 Th1 細胞對於 CDCA1 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: 10 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 或 2 之胺基酸序列。

【0041】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 CDCA1 的胜肽，其係以此種已知程式決定會與鑑別的 HLA 抗原結合。

【0042】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 或 2 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 與 2 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 或 2 之胺基酸序列的序列識別號 10 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 與 2 之胺基酸序列。

【0043】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 或 2 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超過序列識別號 1 或 2 之 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 或 2 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。

【0044】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 及 2 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 或 2 中。

【0045】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) 莽丙胺酸(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）。

【0046】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 CDCA1 對偶基因(*alleles*)可誘導 Th1 細胞的胜肽。

【0047】為了維持 Th1 細胞誘導能力，可修飾（插入、加入、刪除/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，甚至更佳為為，10% 或 8%，少或 1 至 5%。

【0048】本發明之較佳胜肽，即序列識別號: 1 與 2 (CDCA1 55-78, 39-64)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 CDCA1 的免疫性高度有用。

【0049】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勝肽。為此，可將勝肽利用取代、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勝肽。

【0050】本發明也考量附加一、二或數個胺基酸到該勝肽的 N 及/或 C 端。此種經修飾的具有高度 HLA 抗原結合親和性的勝肽並保留 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 個胺基酸的單離的勝肽，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 與 2 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。

當此等勝肽與 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，本發明之勝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。

【0051】但，當該勝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，以避免該勝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勝肽相較，同源性檢索顯示沒有相同或與目標勝肽有 1 或 2 個胺基酸差異的勝肽時，可將該目標勝肽修飾以增強與 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。

【0052】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，仍然進一步要檢驗其 Th1 細胞誘導能力的存在性。在此，用詞「Th1 細胞誘導能力」代表當與抗原呈現細胞(APC)接觸時，胜肽經由抗原呈現細胞(APC)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- $\gamma$  產生，以幫助及/或刺激其他的細胞(例如 CTL、巨噬體)。

【0053】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- $\gamma$ 。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  $^{51}\text{Cr}$  等放射性標定，從該 Th1 細胞釋出的細胞素所活化的 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- $\gamma$ ，並使用抗 IFN- $\gamma$  單株抗體使培養基上的抑制區可見化來評估。

【0054】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勝肽保留原始勝肽的 Th1 細胞誘導能力即可。適當物質的例子包括，例如：勝肽、脂質、糖類及糖鏈、乙醯基、天然及合成的聚合物等。本發明之勝肽可包含修飾，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勝肽的生物學活性。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)，或使該勝肽穩定化。

【0055】例如，為了增加一勝肽的體內穩定性，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勝肽。一勝肽的穩定性，可以用多種方式分析。例如可使用勝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)。

【0056】本發明之勝肽，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 表面上的勝肽。呈現本發明勝肽之 APC，可作為疫苗接種。

【0057】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、DR9、DR15 及 DP2 係盛行，故適於治療日本病患。一般而言，臨牀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勝肽。於較佳具體例，本發明之勝肽可以混雜的方式誘導 Th1 細胞。在此，當勝肽可誘導由至少 2 種不同的 MHC

第 II 類分子限制之 Th1 細胞時，則此勝肽之 Th1 細胞誘導能力係「混雜的 (promiscuous) 」。換言之，當一勝肽被至少 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」。當使用於勝肽之上下文，詞彙「由至少 2 種不同之 MHC 第 II 類分子辨識」，係指此勝肽或其片段可結合於至少 2 種不同的 MHC 第 II 類分子。例如，CDCA1 勝肽 (55-78；序列識別號 1) 及 CDCA1 勝肽 (39-64；序列識別號 2) 分別被 HLA-DR4、DR15 及 DP2，和 HLA-DR9 及 DR15 辨識。因此此等勝肽係「混雜的」抗原決定位的典型例。

【0058】當使用 HLA-DR4、HLA-DR15 或 HLA-ADP2 陽性 APC，宜使用具有序列識別號：1 之胺基酸序列的勝肽。另一方面，當使用 HLA-DR9 或 DR15 陽性 APC，較佳勝肽係具有序列識別號：2 之胺基酸序列的勝肽。

因此於較佳具體例，可使用具有勝肽的序列識別號：1 之胺基酸序列，於在誘導前已鑑別具有 HLA-DR4、HLA-DR15 或 HLA-DP2 之對象中誘導 Th1 細胞。同樣地可使用具有勝肽的序列識別號：2 之胺基酸序列，於在誘導前已鑑別具有 HLA-DR9 或 DR15 之對象中誘導 Th1 細胞。

### 【0059】III. 製備 CDCA1 勝肽

本發明之勝肽可使用周知的技術製備。例如本發明勝肽可藉由使用重組 DNA 技術或化學合成被合成製備。本發明之勝肽可個別合成，或製成包括兩個或更多勝肽的較長的多勝肽。本發明勝肽可之後單離成亦即經精製或單離成實質上不含其他天然發生的宿主蛋白質及其片段，或其他任意的化學物質。

【0060】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，例如包括引入 D-胺基酸或其他胺基酸擬似物，以增加該胜肽的血清半衰期。

【0061】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., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

【0062】或者，本發明之胜肽可採用任何已知用於生產胜肽的遺傳工程方法獲得(例如Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu *et al.*) 1983, 101: 347-62)。例如，先製備庇護有編碼為可表現形式(例如對應於啓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。

【0063】IV. 聚核苷酸

本發明提供聚核苷酸，其編碼為前述本發明勝肽當中任意者。此包括從天然發生的 CDCA1 基因 (GenBank 存取號 NM\_145697 (序列識別號: 9)) 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勝肽。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勝肽的核酸，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，而 TGG 通常為色胺酸的唯一密碼子)可經修飾以產生功能上同一的分子。因此，編碼為一勝肽的核酸的各靜默變異係暗示敘述在各揭露的序列中。

【0064】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。

【0065】本發明之聚核苷酸可編碼為有或沒有中介

(intervening) 肽基酸序列的多種本發明之勝肽。例如，該中介肽基酸序列可提供該聚核苷酸或該經轉譯的勝肽的切斷部位(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勝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，其包括對表現該勝肽所需的調節序列，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。

【0066】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。

#### 【0067】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 類抗原與本發明之勝肽或其片段之間形成的複合體。藉由與本發明勝肽接觸而獲得之該 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勝肽、Th1 細胞或 CTL 的藥物組合投予。

【0068】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。

【0069】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 類抗原辨識的抗原決定位的長度較短(例如 8-10 個胺基酸殘基)於 MHC 第 II 類 (15 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 CDCA1 胜肽(55-78；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(YMMPVNSEV)。同樣地 CDCA1 胜肽(39-64；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 VYGIRLEHF。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。

【0070】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。

【0071】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。

【0072】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。

【0073】於較佳具體例，本發明之 APC，可為呈現選自於由 HLA-DR4、HLA-DR15 及 HLA-DP2 構成之群組中之 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-DR9 及 HLA-DR15 構成之群組中之 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。較佳者，HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15 及 HLA-DP2 可各為 HLA-DRB1\*04:05、HLA-DRB1\*09:01、HLA-DRB1\*15:02 及 HLA-DPB1\*02:01。

#### 【0074】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。

#### 【0075】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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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。

【0076】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 CDCA1 之細胞 (例如癌細胞)，或經以 CDCA1 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 CDCA1 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。

【0077】再者，本發明之 Th1 細胞分泌各種細胞激素(例如

IFN- $\gamma$ ），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 CDCA1 之細胞的 CTL 活性。因此，本發明之 Th1 細胞不僅對於表現 CDCA1 之腫瘤的免疫療法有效，對於表現其他 TAA，及本發明之勝肽與 APC 之腫瘤也有效。

【0078】於一些具體例，本發明之 Th1 細胞辨識呈現 HLA-DR 或 HLA-DP 抗原與本發明之勝肽之複合體的細胞。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 類分子與本發明之勝肽的複合體，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 類分子及勝肽而活化，且誘導從此活化的 Th1 細胞的細胞素生產。於較佳具體例，HLA-DR 可選自於 HLA-DR4、HLA-DR9 及 HLA-DR15 構成之群組。較佳者，HLA-DR4、HLA-DR9 及 HLA-DR15 可為 HLA-DRB1\*04:05、HLA-DRB1\*09:01 及 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 可為 HLA-DPB1\*02:01。

【0079】VII. 細胞毒性 T 細胞(細胞毒性 T 淋巴球或 CTL)所誘導的對抗任意本發明之勝肽的片段的細胞毒性 T 細胞會在體內強化以癌細胞為目標的免疫反應，且可類似於該勝肽當做疫苗。因此，本發明也提供單離的細胞毒性 T 細胞，其係由本發明任一勝肽專一性誘導或活化。

【0080】此種細胞毒性 T 細胞可藉由以下獲得(1)對於一對

象投予本發明之一或多種胜肽，從該對象收集細胞毒性 T 細胞，或(2)使對象衍生的 APC 及 CD8+ 細胞、或周邊血液單核白血球在體外與本發明胜肽接觸(刺激)，然後單離的細胞毒性 T 細胞。

【0081】藉由以呈現本發明胜肽之 APC 而誘導的細胞毒性 T 細胞，可衍生自欲治療及/或預防之病患，且可將其本身投予或與其他包括本發明胜肽之藥物組合，以用於調整效應。獲得之細胞毒性 T 細胞，專一性對抗呈現本發明胜肽，例如與用在誘導為相同之胜肽之目標細胞。此等目標細胞例如內源性表現 CDCA1 之細胞，或經以 CDCA1 基因轉染的細胞；及由於以此胜肽刺激而在其細胞表面呈現本發明胜肽之細胞，也可作為已活化的 CTL 攻擊的目標。

【0082】於一些具體例，本發明之 CTL，辨識呈現 HLA-A2 或 A24 抗原與本發明之胜肽的複合體的細胞。於 CTL 之上下文，詞彙「辨識一細胞」，係指經由其 TCR 而結合於細胞表面上之 HLA-A2 或 A24 抗原與本發明之胜肽之複合體，並顯示對抗該細胞之專一性細胞毒性活性。在此，「專一性的細胞毒性活性」，係指對於呈現 HLA-A2 或 A24 抗原與本發明之胜肽之複合體的細胞顯示細胞毒性活性，而非其他細胞。例如序列識別號:1 與 2 包含 HLA-A2 辨識抗原決定位之胺基酸序列。因此，從包含序列識別號:1 或 2 之胜肽，會產生針對 HLA-A2 之理想片段。

### 【0083】VIII. T 細胞受體 (TCR)

本發明也提供一種組合物，其包含編碼一或多個為多胜肽

的一或多個聚核苷酸，該多勝肽能形成 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 CDCA1 胜肽的 APC 的專一性。藉由使用該技術領域中的已知方法，可鑑別以本發明之勝肽誘導的 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呈現該 CDCA1 胜肽的 APC，且視情形媒介有效率的細胞素生產。

**【0084】** 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。

**【0085】** 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 CDCA1 胜肽 (例如序列識別號：1，於 HLA-DR4、HLA-DR15 或 HLA-DP2 背景；及或序列識別號：2，於 HLA-DR9 或 HLA-DR15 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。

#### 【0086】IX. 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 CDAC1 基因表現減低、癌症的大小減小、流行程度或轉移潛力減低，則治療係視為「有效」。當該治療係以預防性使用時，「有效」意指其延遲或防止癌症形成或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。

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。

【0087】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。

【0088】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 CDCA1 之癌細胞的 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。

【0089】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，由於本發明之藥試劑或組合物誘導的 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 CDCA1 之癌的對象中顯著增強或刺激免疫反應為有效的量。

【0090】又，如於圖 6 中所示，在本發明內容中鑑別的 CDCA1 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勝肽之用途，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。

【0091】於較佳具體例，在本發明內容中鑑別的 CDCA1 衍生之勝肽可誘導 Th1 細胞，及對抗 CDCA1 表現細胞之 CTL。因此本發明也提供包含至少一種本發明勝肽之試劑或組合物，以供用於誘導對抗表現 CDCA1 之癌或腫瘤的 CTL。

又，包含至少一種本發明勝肽之試劑或組合物，可用於增強或促進由 MHC 第 II 類分子媒介的免疫反應。

【0092】因為 CDCA1 表現在一些癌類型中，包括乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)及非小細胞肺癌(NSCLC)，相較於在正常組織中係專一性的提高(Cancer Res 2006 Nov 1; 66(21):10339-48, WO2005/028676, WO2005/089735, WO2006/085684, WO2007/013665, WO2007/013671)，本發明之勝肽或編碼為此勝肽之聚核苷酸，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勝肽、或編碼為此勝肽之聚核苷酸，作為有效成分。或者，本發明之勝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癌或腫瘤之劑或組合物的有效成分。

【0093】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。

【0094】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。

【0095】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。

【0096】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) 本發明之勝肽；
- (b) 以可表現形式編碼為此處揭示的此種勝肽的聚核核酸；
- (c) 在其表面上呈現本發明之勝肽或其片段的 APC；及
- (d) 本發明之 Th1 細胞。

【0097】或者，本發明之醫藥組合物或此種試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。

【0098】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。

【0099】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。

【0100】本發明中，具有選自序列識別號：1 與 2 中之胺基酸序列的勝肽，已發現係由數種 HLA-DR 及/或 HLA-DP 分子(即 HLA-DR4、HLA-DR9、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 或 2 之胺基酸序列的此等勝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-DR9、HLA-DR15 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勝肽中任一者的聚核苷酸的醫藥藥劑或組合物也同樣適用。

【0101】或者於較佳具體例，本發明鑑別之勝肽，當施用到具有 HLA-A2 或 HLA-A24 之對象時，也可誘導對於 CDCA1 專一之 CTL。因此藉由投予本發明之勝肽，可更預期除了 Th1 細胞誘導外，可誘導對抗表現 CDCA1 之癌的 CTL 反應。又，本發明之勝肽不僅經由將其處理而誘導對抗 CDCA1 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 CDCA1 專一性 CTL 兩者，當投予具有序列識別號：1 之胺基酸序列之勝肽時，例如欲治療的對象宜具有選自 HLA-DR4、HLA-DR15 及 HLA-DP2 中至少一者作為 MHC 第 II 類分子及 HLA-A2 或 HLA-A24 作為 MHC 第 I 類分子。同樣地，藉由對於具有 HLA-DR9 及 / 或 DR15 作為 MHC 第 II 類分子及 HLA-A24 作為 MHC 第 I 類分子之對象投予具有序列識別號：2 之胺基酸序列的勝肽時，可達成該對象中 Th1 細胞與 CDCA1 專一性 CTL 兩者之誘導。

【0102】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 CDCA1 表現之癌，只要由 Th1 細胞分泌的細胞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 CDCA1 之任何種類之癌症

或腫瘤，包括，例如乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)。

【0103】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。

【0104】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。

【0105】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)。

【0106】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。

【0107】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。

【0108】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。

【0109】(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。

【0110】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。

【0111】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。

【0112】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。

【0113】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。

【0114】於有些具體例，本發明之醫藥試劑或組合物可更包括會啓動 Th1 細胞，且選擇性啓動 CTL 的成分。脂質已鑑別係能夠於體內啓動對抗病毒抗原的 Th1 細胞，選擇性啓動 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- 肽基然後連結到本發明之勝肽。然後可將該脂質化的勝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。另一例的脂質啓動 Th1 細胞且選擇性地起動 CTL 反應，當共價附著於一適當勝肽時，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) 可啓動 Th1 細胞且選擇性起動 CTL (參見例如 Deres *et al.*, *Nature* 1989, 342: 561-4)。

【0115】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勝肽對於須要治療表現 CDCA1 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 CDCA1 之癌症或腫瘤之 CTL 的本發明勝肽，對於罹患表現 CDCA1 之癌症的對象投予。本發明之勝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。

【0116】(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勝肽的聚核核酸。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勝肽。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、勝肽-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)。

【0117】本發明之勝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勝肽的核苷酸序列。藉由導入宿主中，該重組牛痘病毒會表現該免疫產生性勝肽，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。

【0118】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。

【0119】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。

【0120】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 CDCA1 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 CDCA1 之癌症或腫瘤之 CTL 的本發明聚核苷酸，對於罹患表現 CDCA1 之癌症的對象投予。於適合擔體或經編碼為本發明勝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。

#### 【0121】X. 使用該勝肽、APC 或 Th1 細胞的方法

本發明之勝肽及編碼為此勝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。該勝肽、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 的包括該勝肽及聚核苷酸說明如下。

【0122】(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。

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。

【0123】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-DR9、HLA-DR15 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-DR9、HLA-DR15 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-DR9、HLA-DR15、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。

【0124】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勝肽或聚核苷酸中 1 或更多種。

於另一具體例，本發明提供本發明之勝肽或編碼為該勝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。

【0125】或者，本發明更提供本發明之勝肽或編碼為該勝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，本發明之勝肽不僅可誘導 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 CDCA1 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：3 之胺基酸序列的勝肽誘導時，表現 HLA-A2 之 APC 係適於誘導 CDCA1 專一性 CTL。或者當由含有序列識別號 5：之胺基酸序列的勝肽誘導時，表現 HLA-A24 之 APC 係適於誘導 CDCA1 專一性 CTL。

【0126】(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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>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。

【0127】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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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「VIII.T 細胞受體(TCR)」所述般實施。

【0128】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-DR9、HLA-DR15 及 HLA-DP2 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勝肽或其片段與 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。

【0129】於較佳具體例，本發明之勝肽可誘導對抗表現 CDCA1 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勝肽之 APC 共同培養；及

b: 將 CD8 陽性 T 細胞與與已接觸本發明勝肽之 APC 共同培養。

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

【0130】或者依本發明，提供本發明之勝肽之用途，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勝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 細胞之本發明之勝肽。

【0131】由本發明方法誘導之 CD4<sup>+</sup> T 細胞，可對於一對象投予以作為疫苗。

【0132】本發明上下文中，過度表現 CDCA1 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：乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)。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，CDCA1 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 CDCA1 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 CDCA1 表現水平；
- ii) 將此 CDCA1 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 CDCA1 之癌症的對象。

【0133】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 CDCA1 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 CDCA1 多勝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 CDCA1 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 CDCA1 多勝肽治療的癌症。本發明之癌症治療方法將於以下更詳細敘述。

再者，於較佳具體例，可於投予本發明勝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 或 HLA-DP2 之對象投予具有序列識別號：1 之胺基酸序列的勝肽。或者，宜對於鑑別為具有 HLA-DR9 或 HLA-DR15 之對象投予具有序列識別號：2 之胺基酸序列的勝肽。

【0134】可使用任何由對象而來的細胞或組織決定 CDCA1 表現，只要其包括 CDCA1 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。

【0135】依照本發明，可決定由一對象獲得的癌細胞或組織中的 CDCA1 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 CDCA1 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 CDCA1 的表現水平為較佳。該技術領域中具有通常知識者可利用 CDCA1 的序列資訊製備此種探針。例如可使用 CDCA1 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。

【0136】再者，CDCA1 的轉錄產物(例如序列識別號：9)，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 CDCA1 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。

【0137】或者可偵測轉譯產物以診斷本發明。例如可決定 CDCA1 蛋白質(序列識別號：10) 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')<sub>2</sub>、Fv 等)以供偵測，只要該片段或修飾抗體保留對於該 CDCA1 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。

就基於轉譯產物偵測 CDCA1 基因的表現水平的另一方法而言，染色強度可使用對抗該 CDCA1 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，CDCA1 基因表現水平高。

目標基因例如 CDCA1 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。

【0138】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 CDCA1 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 CDCA1 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 CDCA1 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。

【0139】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。

【0140】當 CDCA1 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。

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 CDCA1 表現水平；
- b) 比較其 CDCA1 表現水平與正常對照水平；
- c) 若 CDCA1 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。

【0141】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 CDCA1 表現水平；
- b) 比較其 CDCA1 表現水平與癌化對照水平；
- c) 若 CDCA1 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

【0142】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-DR9、HLA-DR15 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 CDCA1 之癌且具有 HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15 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。

【0143】本發明也提供一種套組，係用於確認患有可利用本發明之 CDCA1 多勝肽治療的癌症的對象，其也對於評估及/或特定癌症療法，更特別是監控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乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)。尤其，該套組較佳為包括偵測對象衍生的癌細胞中的該 CDCA1 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 CDCA1 基因之 mRNA 的試劑；
- (b) 偵測該 CDCA1 蛋白質的試劑；及
- (c) 偵測該 CDCA1 蛋白質的生物學活性的試劑。

【0144】適合偵測該 CDCA1 基因之 mRNA 的試劑的例子，可包括專一性結合於該 CDCA1 mRNA 或鑑別該 CDCA1 mRNA 的核酸，例如具有互補於該 CDCA1 mRNA 的序列的寡核苷酸。此等種類的寡核苷酸例如專一於該 CDCA1 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 CDCA1 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 CDCA1 mRNA 的試劑。

【0145】另一方面，適合偵測該 CDCA1 蛋白質的試劑的例子，包括對於該 CDCA1 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')<sub>2</sub>、Fv 等)當做該試劑，只要該片段或

修飾抗體保留對於該 CDCA1 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 CDCA1 蛋白質的試劑。

【0146】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。

【0147】本發明之一具體例中，當該試劑為對抗該 CDCA1 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 CDCA1 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。

【0148】本發明的套組可更包含陽性對照樣本或 CDCA1 標準樣本。本發明的陽性對照樣本可藉由收集 CDCA1 陽性樣本，然後分析其 CDCA1 水平而製備。或者可對不表現 CDCA1 的細胞添加純化的 CDCA1 蛋白質或聚核苷酸，以形成該陽性樣本或該 CDCA1 標準樣本。本發明中，純化的 CDCA1 可為重組蛋白質。該陽性對照樣本的 CDCA1 水平例如高於截斷值。

#### 【0149】XI. 抗體

本發明更提供結合於本發明之勝肽的抗體。較佳的抗體係專一性結合於本發明之勝肽的抗體且不會(或微弱結合於)非本發明之勝肽。或者結合於本發明的勝肽的抗體，以及其同系物。對抗本發明勝肽的抗體於癌症診斷及預後分析法、及造影方法中有用。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 CDCA1 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 CDCA1 表現的癌症為有用，癌症的例子包括但不限於乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)。

【0150】本發明也提供偵測及/或定量包括由選自序列識別號:1 與 2 中之胺基酸序列構成之多勝肽之 CDCA1 蛋白質(序列識別號:10)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 CDCA1 抗體，其能適當辨識及結合於 CDCA1 蛋白質或片段。本發明中，結合於 CDCA1 多勝肽的抗-CDCA1 抗體較佳為辨識由選自序列識別號:1 與 2 之胺基酸序列構成之多勝肽者，更佳為排除其他的勝肽。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 CDCA1 多勝肽間的結合在存在具有選自序列識別號:1 與 2 中之胺基酸序列之多勝肽時受抑制，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。

【0151】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 CDCA1 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 CDCA1 表現的癌症為提供效用，癌症包括但不限於乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)。

【0152】本發明也提供結合於本發明勝肽的抗體。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勝肽將動物例如兔子免疫所得的抗血清、所有類型的多株及及單株抗體、人類抗體與由基因重組產生的人類化抗體。

【0153】本發明的勝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。人類來源的勝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，作為免疫抗原的該勝肽，可為本發明多勝肽之完整勝肽或部分勝肽。適合之部分勝肽的例子可包括例如本發明勝肽的氨基(N)末端或羧基(C)末端片段。

【0154】在此，抗體定義為與 CDCA1 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 及 2 中之胺基酸序列的 CDCA1 片段勝肽。用於合成寡勝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勝肽純化。本發明中，該寡勝肽(例如 24 葡或 26 葡)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 與勝肽的方法，也是該技術領域中周知的。

【0155】或者可將編碼為本發明勝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勝肽或其片段，且接著可當做抗原。或者可將表現該勝肽的整個細胞或其溶解物或化學合成的勝肽當做抗原。

【0156】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，可使用齧齒科動物、兔或靈長科動物。齧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。

【0157】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。

【0158】對抗本發明勝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勝肽的親和管柱，與進一步使用蛋白質A或蛋白質G管柱純化該級分。

【0159】為了製備單株抗體用於本發明之內容，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))。

【0160】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。

【0161】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 病毒感染者以勝肽、勝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勝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)。

【0162】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勝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勝肽，也可當成本發明勝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。

【0163】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。

【0164】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勝肽即可。例如，該抗體片段可為 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、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))。

【0165】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。

【0166】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。人類化可藉由取代齶齒類 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。

【0167】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。

【0168】如上獲得的抗體可純化成同質。例如可依照一般蛋白質使用的分離及純化方法將抗體分離及純化。例如可利用適當選擇及合併使用的管柱層析分離及單離抗體，管柱層析例如親和性層析、過濾、超過濾、鹽析、透析、SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳及等電點集中法(*Antibodies: A Laboratory Manual.* Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))，但不限於此等。可使用蛋白質 A 管柱及蛋白質 G 管柱當做該親和性管柱。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)。

【0169】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。

【0170】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，塗佈本發明勝肽於該平板，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酸酶標記，然後溫育該平板。清洗後，添加酵素受質例如對硝基苯基磷酸酯到該平板，測量吸光度以評估該樣本的抗原結合活性。可使用該勝肽的片段例如 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。

【0171】上述方法，藉由使本發明抗體暴露於假定含有本發明勝肽的樣本，並偵測或測量該抗體與該勝肽形成的免疫複合體，能偵測或測量本發明的勝肽。

由於根據本發明之偵測或測量本發明勝肽的方法能夠專一性偵測或測量一勝肽，故該方法有用於使用該勝肽的許多實驗中。

## 【0172】XII. 載體與宿主細胞

本發明也提供導入有編碼為本發明勝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勝肽，或投予本發明核苷酸供基因治療為有用。

【0173】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，該載體應具有啓動子例如 lacZ 啓動子(Ward *et al.*, Nature 341: 544-6(1989); FASEB J 6: 2422-7(1992))、araB 啓動子(Better *et al.*, Science 240: 1041-3(1988))、T7 啓動子等。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勝肽分泌。引導該勝肽分泌到 *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。

【0174】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勝肽。

【0175】爲了於動物細胞例如CHO、COS或NIH3T3細胞中表現載體，該載體應具有對於在此種細胞中表現所需要的啓動子例如SV40啓動子(Mulligan *et al.*, *Nature* 277: 108(1979))、MMLV-LTR啓動子、EF1 alpha啓動子(Mizushima *et al.*, *Nucleic Acids Res* 18: 5322(1990))、CMV啓動子等，較佳爲具有用於選擇轉形體的標記基因(例如由藥物(例如新黴素、G418)選擇的抗藥性基因)。具有此等特性的已知載體的例子包括，例如pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV及pOP13。

【0176】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]

#### 【0177】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。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 DR1 (*DRB1\*01:01*)；L-DR1、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。該 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 的 HLA-A24 轉染體，係受贈於 Masafumi Takiguchi(Kumamoto University, Kumamoto, Japan)。T2 細胞及 C1R-A2402 細胞使用為標靶細胞。此等細胞於體外維持於在補充 10% FCS 之 DMEM (L-細胞) 或 RPMI 1640 (T2 及 C1R-A24 細胞) 中，於 CO<sub>2</sub> 環境在 37 度中。

### 【0178】病患

從 19 位報名 2 個勝肽疫苗實驗的 HNC 病患收集血液樣本，並調查對於 CDCA1-LP 有反應性的 Th 細胞的免疫反應。此等癌免疫療法之階段 I/II 臨床試驗採用衍生自癌睪丸抗原之 3 種 HLA-A24 結合 SP(臨床級 9-10 氨基酸長勝肽)，即 CDCA1(CDCA1-A24 (56-64)，在此研究中報告，圖 1)、IMP-3 (IMP-3-A24(508-516))，及 LY6K (LY6K-A24(177-186)) (Suda T, et al. *Cancer Sci* 2007;10:1803-8.)，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。將勝肽 (各抗原 1 mg) 在 500 micro L Montanide ISA51 中乳化，並於第 0、7、14、28、42、56、63 及 70 日以皮下注射(s.c.)，之後每月注射直到觀察到腫瘤進展或毒性。所有的 HNC 病患係於提

供知情同意書後基於 HLA-A24 擁有性來選擇。罹患無法手術的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 HNC 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 HNC 痘患報名 UMIN-CTR 000008380 號 (CTR-8380) 的實驗。後者的實驗, 將 HNC 痘患以術後胜肽疫苗免疫療法, 其係組合 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。

#### 【0179】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 或 -DP 結合人類 CDCA1 衍生的胜肽, 將該人類 CDCA1 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](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: e1000043.) 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 24 及 26 個胺基酸長的胜肽, 其對於由 *DRB1\*04:05*、*DRB1\*15:02* 或 *DPB1\*02:01* 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 CDCA1 衍生之 9 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 (Harao M, *et al.* Int J Cancer 2008; 123: 2616-25.)。

#### 【0180】合成胜肽及重組蛋白質

合成 3 種 人類 CDCA1 衍生 短 胜 肽 (SP) , 此 等 係 結 合 於 HLA-A2 、 CDCA1-A2 (65-73) 、 YMMPVNSEV (序 列 識 別 號 : 3) ; CDCA1-A2 (351-359) 、 KLATAQFKI (序 列 識 別 號 : 4) , 並 結 合 於 HLA-A24 、 CDCA1-A24 (56-64) 、 VYGIRLEHF (序 列 識 別 號 : 5) (純 度 >95 %, Biomatik, Canada) 。 合 成 2 種 重 疊 的 長 胜 肽 (LP) , 即 CDCA1(55-78) , IVYGIRLEHF YMMPVNSEVMYPHL (序 列 識 別 號 : 1) ; CDCA1(39-64) NPKPEVLHMIYMRALQIVYGIRLEHF (序 列 識 別 號 : 2) , (純 度 >90 %) , 並 檢 驗 其 於 體 外 刺 激 CDCA1 專 一 性 人 類 CD4<sup>+</sup> T 細 胞 的 能 力 。 使 用 2 種 結 合 於 HLA-A24 (HIV-A24, RYLRDQQLL (序 列 識 別 號 6: )) 及 HLA-A2 (HIV-A2, SLYNTYATL (序 列 識 別 號 : 7)) 之 HIV 胜 肽 , 作 為 負 對 照 SP (Tomita Y, *et al.* Cancer Sci; 102: 697-705., Tomita Y *et al.* Cancer Sci; 102: 71-8.) 。 使 用 LP , 係 結 合 於 DR4 之 WT1 來 源 胜 肽 、 WT1 胜 肽 (KRYFKLSHLQMHSRKH (序 列 識 別 號 : 8)) , 作 為 負 對 照 LP (Fujiki F *et al.* J Immunother 2007; 30: 282-93.) 。 將 胜 肽 以 10 micro g/micro L 或 20 micro g/micro L 的 濃 度 溶 於 二 甲 基 亞 碲 , 並 保 存 在 摄 氏 -80 度 。

將 帶 有 6His 標 籤 的 重 組 全 長 CDCA1 蛋 白 質 , 及 缺 少 CDCA1(55-78) 與 CDCA1(39-64) 專 一 性 Th 細 胞 辨 識 之 CDCA1 衍 生 的 Th 抗 原 決 定 位 兩 者 的 截 短 的 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 截 短 的 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。

【0181】 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。本案發明人從 12 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，係以具有聚合酶連鎖反應及對偶基因專一性探針雜交之 HLA 基因變異的 DNA 分型(DNA TYPING)來決定，且如表 1 中所述。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 ( $1 \times 10^4$ /井) 以  $10 \text{ micro g/ml}$  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 ( $3 \times 10^4$ /井)，在 96 井平底培養盤之各井中混合，各井有  $200 \text{ micro l}$  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，然後培養物被添加新鮮培養基( $100 \text{ micro l}$ /井)，其含有以勝肽( $10 \text{ micro g/ml}$ )脈衝的經放射照射的(50 Gy)的自體 PBMC( $1 \times 10^5$ )及  $5 \text{ ng/ml}$  人類重組(hr) IL-7。於第 2 次以勝肽刺激後 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<sup>+</sup> T細胞在酵素連結之免疫點(ELISPOT)分析中分析專一性。將顯示對於同源(cognate)勝肽有專一性反應的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之培養基中以該勝肽(10 micro g/ml)脈衝的經放射照射的自體 PBMC( $1 \times 10^6$ /井)進行再刺激。有些情形，會利用極限稀釋將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.)。

【0182】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 HD1	A*02:01 / 02:06	DRB1*04:05 / 09:01 / DR53	DPB1*02:01 / DPB1*04:02
捐贈者 HD2	A*24:02 / -	DRB1*08:02 / 15:02	DPB1*05:01 / 09:01
捐贈者 HD3	A*11:01 / A31:01	DRB1*08:03 / 15:02	DPB1*02:01 / 09:01
捐贈者 HD4	n.t.	DRB1*01:01 / 04:05 / DR53	DPB1*05:01 / 09:01
捐贈者 HD5	A*24:02 / A02:01	DRB1*04:05 / DR53	DPB1*05:01 / -
捐贈者 HD6	A*02:06 / A31:01	DRB1*04:01 / 09:01 / DR53	DPB1*02:01 / -
捐贈者 HD7	n.t.	DRB1*04:06 / DR*08:03	DPB1*02:01 / 04:02
捐贈者 HD8	A*24:02 / 31:01	DRB1*08:03 / 14:05	DPB1*02:02 / 05:01
捐贈者 HD9	A*26:01 / 33:03	DRB1*04:05 / 13:02	DPB1*04:01 / 09:01
捐贈者 HD10	A*26:01 / -	DRB1*04:10 / 08:02	DPB1*02:01 / 05:01
捐贈者 HD11	A*31:01 / 33:03	DRB1*09:01 / 13:02	DPB1*03:01 / 04:01
捐贈者 HD12	A*01:01 / 68:01	DRB1*07:01 / 13:02	DPB1*02:01 / 04:01

HLA:人類白血球抗原; n.t:未檢測

【0183】T 細胞對於勝肽及蛋白質的反應的評估

使用 IFN- $\gamma$  ELISPOT(Human IFN- $\gamma$  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的 APC 之反應。簡言之，係分析每  $3 \times 10^4$  個散裝 CD4<sup>+</sup> T 細胞在以有經過勝肽脈衝之 PBMC( $3 \times 10^4$ /井)刺激時，或每  $1 \times 10^4$  個散裝 CD4<sup>+</sup> T 細胞在以有經過勝肽脈衝之 HLA-DR-表現的 L 細胞( $5 \times 10^4$ /井)刺激時，產生干擾素(IFN)- $\gamma$  之勝肽專一性 CD4<sup>+</sup> T 細胞的頻率。也分析在以有經過勝肽脈衝的 T2 細胞( $2 \times 10^4$ /井)刺激時，每  $1 \times 10^5$  個散裝

CTL中的產生干擾素(IFN)- $\gamma$  的細胞的頻率。或者，將 $5 \times 10^3$  已載有蛋白質之 DC 和  $2 \times 10^4$  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 CDCA1(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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  ELISPOT 分析的評估被實施兩重複或三重複，且結果係平均值。

【0184】 T 細胞對於 PBMC、L 細胞及經勝肽 (10 micro g/mL) 脈衝之鼠 BM-DC 或載有 CDCA1 蛋白質之人 DC(50 micro g/mL) 的免疫反應，係利用 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析 (BD Biosciences, San Jose, CA) 依廠商指示及如前述來評估 (Zarour HM et al., Cancer Res 2000;60:4946-52.)。簡言之，將經勝肽脈衝之 PBMC ( $3 \times 10^4$ /井)、L 細胞 ( $5 \times 10^4$ /井)、T2 細胞 ( $2 \times 10^4$ /井)、C1R-A24 細胞 ( $2 \times 10^4$ /井)、骨髓衍生之 DC (BM-DCs,  $2 \times 10^4$ /井)，或已載有蛋白質之 DC ( $5 \times 10^3$ /井)，以兩重複或三重複接種於 ELISPOT 盤作為 APC 或標靶細胞。為了確認涉及抗原呈現之 HLA 分子，在接種 APC 或標靶細胞後，將抗原誘導之 IFN- $\gamma$  生產藉由添加抗 HLA-DR 單株抗體

(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)予以阻斷。所有的 mAb 以終濃度 5 micro g/mL 來使用。將此等 APC 或標靶細胞與 mAb 一起於室溫溫育 1 小時。然後，收集反應 T 細胞，洗滌，並移到圖中指示號碼的 ELISPOT 盤。溫育 18 小時後，計算點的數目。使用 HIV-A2、HIV-A24 或 WT1 衍生的 LP 作為負對照勝肽。於一些實驗中，使用未經脈衝的 PBMC 或 L 細胞作為負對照。使用與 PMA (100 ng/ml; Sigma-Aldrich) 與離子黴素 (ionomycin) (500 ng/ml; Sigma-Aldrich)一起培養的細胞作為所有 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析中的正對照。結果以平均值 +/- SD 表示。

【0185】針對 HNC 病患之 ELISPOT 分析中，於和 CDCA1-LP 一起進行細胞培養 1 週後，收集此細胞，洗滌，並且於 ELISPOT 盤 ( $1 \times 10^5$ /井) 中與 CDCA1(55-78)-LP、CDCA1(39-64)-LP 或對照 LP (HIV-LP) 一起培養 18 小時。減去對照值 (背景) 後，計算表現為點形成細胞/ $10^5$  細胞的 CDCA1-LP 專一性 Th 細胞的數目。當計數的 IFN- $\gamma$  點的平均數超過 15 且超過背景 2 倍時，評定反應為陽性。由於可得細胞數目有限，針於 HNC 病患之細胞的 ELISPOT 分析係於單一、二、或三個井實施，。

【0186】。

藉由以 CDCA1(55-78)-LP 刺激，在健康捐贈者中之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 的增殖

A: 以如上述 (Tomita Y, et al. *Cancer Sci* 2011;102:71-8.,

Imai K, et al. *Clin Cancer Res* 2003;14:6487-95.) 實施藉由以 CDCA1-A24 (56-64) SP 刺激經純化的 CD8<sup>+</sup> T 細胞以誘導 CDCA1-A24 (56-64) SP-反應性 CTL。為了評估藉由經 CDCA1(55-78)-LP 脈衝之 DC 刺激，CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 的擴增能力，將獲自 HLA-A24<sup>+</sup> 捐贈者之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性散裝 CTL (HD2;  $2 \times 10^6$ /井，24 井盤，HD5;  $2 \times 10^5$ /井，48 井盤) 以 16 micro M CDCA1(55-78)-LP 或經對照 LP 脈衝的自體 DC (HD2;  $2 \times 10^5$ /井，HD5;  $5 \times 10^4$ /井) 刺激。將此經 LP 脈衝的成熟 DC (3 小時) 照射放射線並洗滌，然後作為抗原呈現細胞 (APC)。於第 1 及 7 天，添加 rh IL2 (20 IU/mL) 與 rhIL-7 (5 ng/mL)。於從 HD2 與 HD5 建立了 CTL 後，分別以下列實驗步驟 (B) 及 (C) 來評估其辨識專一性及細胞毒殺活性。

【0187】 B(HD2); 在 LP 刺激 (第 0 天) 前及刺激後第 5、7、8 及 10 日後，將一些培養細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞) 以經 PE 標定之 HLA-A\*24:02/CDCA1-A24 (56-64)-複合體的四元體 (MBL, Nagoya, Japan) 及帶有經 FITC 標定之抗人類 CD8 mAb (選殖體 T8, Beckman Coulter, Brea, CA) 染色。使用經 PE 標定之 HLA-A24 (A\*24:02)/HIV-A24 (RYLRDQQQL) 複合體的四元體作為負對照。

【0188】 C(HD5); 細胞培養 1 週後，收集細胞、洗滌，並於 ELISPOT 盤 ( $1 \times 10^5$ /井) 培養 18 小時。以 ELISPOT 分析 (Dobrzanski MJ. et al. *Frontiers in oncology* 2013;3:63) 來計數經以 CDCA1-A24<sub>56-64</sub> SP-脈衝或 HIV-A24 SP (背景)-脈衝之

C1R-A2402 細胞( $2 \times 10^4$ /井)刺激之下的 IFN- $\gamma$  產生 CD8 $^+$  T 細胞的數目。減去對照值(背景)後，計數表現為點形成細胞/ $10^5$  細胞的 CDCA1-A24<sub>56-64</sub> SP 專一性 CD8 $^+$  T 細胞的數目。使用 HIV-A24 SP 作為負對照 SP。

【0189】藉由以 CDCA1(55-78)-LP 刺激，在已接種 CDCA1-A24 (56-64) SP 疫苗的 HNC 病患中之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 的增殖

將來自接種了 CDCA1-A24 (56-64) SP 疫苗的 5 名 HNC 病患 (HNC26、29、31、39、109) 的 PBMC，與 CDCA1(55-78)-LP 與 CDCA1(39-64)-LP (各 10 micro g/mL) 的混合物一起在 24 井盤 ( $2 \times 10^6$ /井) 中培養；於第 0 及 2 天添加 rhIL-2 與 rhIL-7。第 0 天 (生物體外) 及第 7 天，將此等 PBMC 用 CDCA1-A24 (56-64) 專一性 四元體染色。

【0190】細胞激素分析

將 T 細胞 ( $1 \times 10^4$ /井) 與 L-DR4 ( $5 \times 10^4$ /井) 一起在 CDCA1(55-78) 存在下，於 96 井培養盤培養。20 小時後，收集培養懸浮層，並使用 Bio-Plex 系統 (Bio-Rad) 依廠商指示測量細胞激素的水平 (IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、TNF-alpha、MIP1beta、IL-4、IL-17)。

【0191】CD107a 移動性分析

為了鑑別經此勝肽刺激的脫顆粒 CD8 $^+$  或 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CDCA1衍生的胜肽或對照胜肽(1 micro g/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細胞或CTL，用有PE結合的抗人類CD4抗體(eBioscience, San Diego, CA)及有PE結合的抗人類CD8抗體(Biolegend)分別染色，並以細胞流式計數儀分析(FACScan; BD Biosciences)。

#### 【0192】體外交叉呈現分析及人類CTL反應分析

將HLA-A24<sup>+</sup>捐贈者(HD2)衍生的DC保持存活或在0.1%戊二醛(Sigma-Aldrich)中固定3分鐘，以胜肽(16 micro M)脈衝3小時，並洗滌3次。於此胜肽脈衝期間及之後加入OK432(0.1 KE/mL, Chugai Pharmaceutical Co, Tokyo, Japan)以誘導DC成熟。於含10 micro g/mL brefeldin A(Sigma-Aldrich)之培養基中，以2:1的比例加入CDCA1-A24(56-64)反應性散裝CTL，持續6小時。於刺激期間，加入brefeldin A以抑制蛋白質分泌。利用胞內標定，來測量藉由CDCA1-A24(56-64)專一性CTL之IFN-γ生產。將此細胞，以經FITC標定之抗人類IFN-γ mAb(BioLegend)組合組合經PerCP標定之抗人類CD8 mAb(BioLegend)及經PE標定之CDCA1-A24(56-64)專一性四元體染色。資料取得係於FACSCalibur(BD Biosciences)實施，並以FlowJo軟體(Tree Star, Ashland, OR)分析資料檔案。

#### 【0193】為了評估於體外利用交叉呈現CDCA1(55-78)LP之CDCA1-A2(65-73)SP或CDCA1-A24(56-64)SP反應性CTL

的誘導，使用從 HLA-A2 或 A24-陽性捐贈者單離之經載入 CDCA1(55-78) LP 之 DC 作為 APC。單離 CD14<sup>+</sup>細胞（第 0 天），並於 hr IL4 (10ng/ml) 與 GM-CSF (100ng/ml) 存在下培養。第 5 天添加 CDCA1(55-78) (10 micro g/ml) 與 OK432。第 7 天收集經載入 LP 之成熟 DC，洗滌，並使用為 APC。如前述般 (Imai K, et al. Br J Cancer; 104: 300-7.) 實施以來自 HLA-A2 陽性健康捐贈者之經載入 LP 之 DC 的人類 CD8<sup>+</sup> T 的刺激。在 3 次以經載入 CDCA1(55-78) LP 之 DC 刺激 CD8<sup>+</sup> T 細胞後，以 ELISPOT 分析計數以 CDCA1-A2 (65-73)、經 HIV-A2 胜肽脈衝之 T2 或經 CDCA1-A24 (56-64) SP 脈衝之 C1R-A2402 細胞刺激之下，IFN- $\gamma$  生產 CD8<sup>+</sup> T 細胞之數目。

#### 【0194】體內交叉呈現分析

HLA-A2 (HHD) 與 HLA-A24 (HHH) 基因轉殖小鼠 (Tgm) 係由 F.A. Lemonnier 博士好心提供。 (Firat H, et al. Eur J Immunol 1999;29: 3112-21., Jung KO, et al. J Virol 2012 ;86:7616-24.)。以 7 天為間隔，對於小鼠尾根部以真皮內注射 (intradermally) 在不完全佛洛依德佐劑 (IFA) 中乳化之 CDCA1-LP 溶液 (HLA-A2 Tgm, 50 micro g/每隻小鼠； HLA-A24 Tgm 100 micro g/每隻小鼠)。接種 CDCA1 衍生之 LP 疫苗第 2 或第 3 次的 7 天後，利用以磁性小珠 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) 進行陽性篩選，從鼠蹊部附近的淋巴結單離 CD8<sup>+</sup> T 細胞。以生物體外 ELISPOT 分析法計數回應於以經 SP 脈衝之 BM-DC 或 C1R-A2402 細胞之刺激的 IFN- $\gamma$  產生 CD8<sup>+</sup> T 細胞。

【0195】CDCA1(55-78)-LP 在誘導 CDCA1 專一性 CTL 之  
相乘效果 (synergistic effect)

將從產生 CDCA1(55-78)-LP 專一性 Th 細胞選殖體 (Th 選殖體) 之 HLA-A2<sup>+</sup>/DR4<sup>+</sup> HD1 獲得的 PBMC，放入 24 井盤 ( $3 \times 10^6$ /井)，再單獨添加 SP (CDCA1-A2(351-359), 20 micro g/mL)、添加 SP + LP (CDCA1(55-78)-LP, 20 micro g/mL)、添加 SP + Th 選殖體 ( $5 \times 10^5$ /井) 或添加 SP + LP + Th 選殖體，最終體積為 2 mL。培養 7 天後，添加此等勝肽與 IL-2 (20 U/mL)，然後在第 9 天加入 IL-15 (5 ng/mL)。第 11 天時，將細胞以經 PE 標定之 HLA-A\*02:01/CDCA1-A2(351-359)-複合體的四元體與經 FITC 標定的抗人類 CD8 mAb 染色。以標準鉻釋放分析法測試溶解活性。(Inoue M et al., *Immunol Lett* 2009;126:67-72., Monji M et al., *Clin Cancer Res* 2004;10:6047-57.)。

【0196】將衍生自 HD2 的 CDCA1(55-78)LP 專一性散裝 CD4<sup>+</sup> T 細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞/井，48 井盤) 與 CDCA1-A24(56-64)SP 專一性散裝 CD8<sup>+</sup> T 細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞/井)，和自體 DC ( $2 \times 10^4$  細胞/井) 一起於單獨存在 CDCA1-A24(56-64)SP (10  $\mu$ g/mL; SP)、存在 CDCA1-A24<sub>56-64</sub> SP + 對照 LP (各 10  $\mu$ g/mL; 對照 LP + SP) 或存在 CDCA1-A24(56-64)SP + CDCA1(55-78)LP (各 10  $\mu$ g/mL; CDCA1(55-78)LP + SP) 的狀況培養，而不添加任何細胞激素。以如前述般 (Shedlock DJ, Shen H. *Science* 2003;300:337-9.) 實施藉由以 CDCA1-A24(56-64)SP 刺激，自 HLA-A24<sup>+</sup>/DR15<sup>+</sup> 捐贈者 (HD2) CDCA1-A24(56-64)SP 專一性散裝 CTL 的誘導。於體外和勝肽一起培養 1 週後，將此培養

細胞以經 PE 標定之 HLA-A\*24:02/ CDCA1-A24<sub>56-64</sub> 複合體 (MBL, Nagoya, Japan)的四元體與經 FITC 標定的抗人類 CD8 mAb (BioLegend)染色。

【0197】於經 CDCA1-A24 (56-64) SP 免疫之 HNC 病患中之 CDCA1-LP 專一性 CD4<sup>+</sup> T-細胞反應的評估

利用 Ficoll-Conray 密度梯度離心之方式來單離來自 HNC 病患之經肝素處理的血液 (heparinized blood) 的 PBMC。將來自 HNC 病患或健康捐贈者的新鮮 PBMC，與 CDCA1(39-64)-LP 與 CDCA1(55-78)-LP (各 10 micro g/mL) 之混合物，於 37°C，以最終體積 2 ml，在補充 5% 人類去補體血漿 (human decomplemented plasma) 之 AIM-V 培養基中一起培養 ( $2 \times 10^6$ /井，24 井盤)；在第 0 及 2 天加入 IL-2 與 IL-7。細胞培養 1 週之後，以 ELISPOT 分析法 計數抗原專一性 IFN- $\gamma$  產生 T 細胞的數目。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。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.)。

【0198】對於已誘導之 TAA 專一性 CTL 的四元體分析

將從產生 CDCA1(55-78) 專一性 Th 細胞選殖體之來自 HLA-A2 與 DR4 陽性健康捐贈者 HD1 的 PBMC 以  $3 \times 10^6$ /井 的濃度 置於 24 井盤後，添加混合的單獨之 SP (CDCA1-A2 (65-73) + CDCA1-A2 (351-359), 20 micro g/ml respectively)、添加混合的 SP + CDCA1(55-78) LP (20 micro g/ml)、混合的 SP + Th 選殖體 ( $5 \times 10^5$ /井)、或添加混合的 SP + CDCA1(55-78) LP + Th 選殖體

於此細胞培養物，最終體積為 2 ml。培養 7 天後，添加這些等勝肽及 hr IL-2 (20 U/ml)，然後於第 9 天添加 hr IL-15 (5 ng/ml)。於培養第 11 天，收集此細胞，以經 PE 標定之 HLA-A\*02:01/ CDCA1-A2 (65-73) 胜肽複合體或 HLA-A\*02:01/ CDCA1-A2 (351-359) 胜肽複合體的四元體 (MBL, Nagoya, Japan) 組合經 FITC 標定的抗人類 CD8 mAb (選殖體 T8, Beckman Coulter, Brea, CA) 進行染色，並以流式細胞計數儀分析。根據同上述程序，對於來自自產生 CDCA1(55-78) 專一性 Th 細胞選殖體之另一捐贈者也進行測試。

### 【0199】統計分析

使用雙尾學生  $t$  (Student  $t$ ) 檢定 (條狀圖)、費雪正確性 (Fisher's exact) 檢定或無參數曼-惠特尼 (Mann-Whitney)  $U$  檢定 (散點圖) 以評估 ELISPOT 資料在統計學上的顯著差異。 $P$  值小於 0.05，被認為是統計上顯著。以市售的統計套裝軟體來實施統計分析 (StatView 5.0, Abacus Concepts, Calabasas, CA)。

### 【0200】結果

含有 CDCA1 之 CTL 抗原決定位的 HLA 第 II 類結合勝肽的預測及選擇

為了鑑別 CDCA1 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電腦演算法檢驗 CDCA1 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，發明人發現以此電腦演算法預測為有潛力的混雜的 HLA 第 II 類結合勝肽的 CDCA1 蛋白質序列中的其中一區

(CDCA1(39-78))，非常接近該 CTL 抗原決定位 (圖 1)。因此，發明人選擇並且合成 2 個 LP (CDCA1(39-64) 及 CDCA1(55-78))，其係與多個 HLA-第 II 類分子 HLA-DR4、HLA-DR15 及 HLA-DP2 (*DPB1\*02:01*) 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 腸勝肽用於後續之分析 (圖 1A 及表 2)。

【0201】表 2，衍生自 CDCA1 之長勝肽的演算法分數

胺基酸 殘基位置	演算法分數		
	HLA-DR4 ( <i>DRB1*04:05</i> )	HLA-DR15 ( <i>DRB1*15:02</i> )	HLA-DP2 ( <i>DPB1*02:01</i> )
39-53	7.0	1.7	29.5
40-54	6.9	1.7	13.0
41-55	2.7	0.5	10.2
42-56	2.6	0.5	10.2
43-57	2.2	0.5	10.2
44-58	2.3	0.5	10.2
45-59	2.3	0.5	10.2
46-60	3.8	0.5	10.2
47-61	3.0	0.5	10.2
48-62	6.0	0.5	11.1
49-63	6.2	0.5	10.2
50-64	8.2	0.5	4.5
51-65	8.2	0.5	4.1
52-66	13.8	0.5	4.2
53-67	14.0	0.5	3.8
54-68	24.4	1.1	4.5
55-69	8.9	1.0	6.0
56-70	8.9	1.0	8.1
57-71	8.9	1.0	11.1
58-72	0.1	1.0	11.4
59-73	0.06	1.0	10.4
60-74	0.04	1.0	12.6
61-75	0.03	1.0	14.7
62-76	0.06	1.4	35.4
63-77	0.1	1.4	30.9
64-78	0.4	1.4	35.3

針對指出之 HLA-第 II 類基因型的勝肽結合演算法分數，

係針對 CDCA1 胜肽(39-78)之各 15 個胺基酸序列表示。

【0202】天然上包括 CTL 抗原決定位之 CDCA1 衍生且混雜的 HLA 第 II 類結合 Th 細胞抗原決定位的鑑別

本案發明人評估是否此兩者選出的合成 LP 能產生 CDCA1 專一性 Th 細胞。將衍生自 5 名健康捐贈者的 PBMC 的 CD4<sup>+</sup> T 細胞，以每週為間隔以自體 DC 及經 CDCA1(55-78) 胜肽脈衝的 PBMC 進行刺激。於至少 3 次刺激後，以 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析檢查此培養的 CD4<sup>+</sup> Th 細胞的 CDCA1(55-78) 專一性反應。在 3 名 HLA-DR4 陽性健康捐贈者中，產生的 Th 細胞株回應 CDCA1(55-78) 產生顯著量的 IFN- $\gamma$  (圖 2A 及 B)。為了說明此等 Th 細胞株之 HLA-限制性，使用對抗 HLA-DR 或 HLA-DP 的 mAb。當添加 HLA-DR 專一性 mAb 時，抗 CDCA1(55-78) 之 Th 細胞株的 IFN- $\gamma$  產生顯著減少，而 HLA-DP 專一性 mAb 未顯示效果 (圖 2A 及 B)。

【0203】為了進一步分析 HLA 限制性，測試 Th 細胞對於經勝肽脈衝的 L-DR4、L-DR53 或 L-DR1 細胞的反應性。從 3 名 DR4 陽性健康捐贈者產生的散裝 Th 細胞株，會專一性辨識經 CDCA1(55-78) 脈衝的 L-DR4 細胞，而不是 L-DR4 細胞、經無關的勝肽 (WT1-peptide) 脈衝的 L-DR4 細胞、經 CDCA1(55-78) 胜肽脈衝的 L-DR53 細胞或經 CDCA1(55-78) 脈衝的 L-DR1 細胞。對抗經 CDCA1(55-78) 脈衝之 L-DR0405 細胞的 Th 細胞株之 IFN- $\gamma$  產生，顯著受添加抗 HLA-DR mAb (L243) 抑制，但未受添加抗 HLA 第 I 類 mAb (W6/32) 抑制 (圖 3A、B 及 C)。此等結果明顯指出在這些 Th 細胞株中，CDCA1(55-78) 由

HLA-DR4 所呈現。

【0204】為了調查是否 CDCA1(55-78)能結合其他 HLA 第 II 類分子並且誘導 Th 細胞反應，將來自 HLA-DR4 陰性的 2 名健康捐贈者的 CD4<sup>+</sup> T 細胞以經 CDCA1(55-78)脈衝之自體 DC 與 PBMC 進行刺激。從 HLA-DR15-陽性捐贈者 HD2 產生的 Th 細胞株，回應於經 CDCA1(55-78)脈衝之 PBMC 與 L-DR15 細胞而專一性地生產顯著量的 IFN- $\gamma$ ，但非回應於經 CDCA1(55-78)脈衝之 L-DR8 細胞。對抗經 CDCA1(55-78)脈衝之 PBMC 或 L-DR15 細胞的 Th 細胞株之產生 IFN- $\gamma$ ，顯著受添加抗 HLA-DR mAb 抑制，但未受添加 HLA-DP-、HLA-DQ-或 HLA 第 I 類專一性 mAb 抑制(圖 2A 與圖 3A、B)。這些結果明顯指出在此 T 細胞株中，CDCA1(55-78)由 HLA-DR15 所呈現。

【0205】從經 CDCA1(55-78)刺激之 HLA-DP2 陽性捐贈者 HD3 產生的該 Th 細胞株回應於 CDCA1(55-78)也專一性的生產顯著量的 IFN- $\gamma$ ，且此反應由於添加抗 HLA-DP mAb 顯著受抑制，而不是 HLA-DR 專一性 mAb (圖 2A)。因發明人沒有經 HLA-DP2 與 HLA-DR9 基因轉導的 L 細胞，故使用從 5 名不同的捐贈者得到的異體(allogeneic)PBMC 作為 APC，以決定 HLA-DP 分子的共享限制性。CDCA1(55-78)專一性選殖體，藉由來自捐贈者 HD3 之經 DP 限制之散裝 CD4<sup>+</sup> Th 細胞株的極限稀釋而獲得。結果，此 CDCA1(55-78)專一性選殖體，於 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析中僅在表現 DP2 之異體 PBMC 存在下，顯示對於 CDCA1(55-78)勝肽之專一性反應，且此 IFN- $\gamma$  生產顯著受添加抗 HLA-DP mAb 抑制，而非 HLA-DR 專一性 mAb。此等

結果啓示來自捐贈者 HD3 的經 DP 限制之 Th 細胞株，受 HLA-DP2 限制(圖 3A、B)。

【0206】因此 CDCA1(55-78) 有結合於 HLA-DR4、HLA-DR15 及 HLA-DP2 的能力啓示 CDCA1(55-78)是由在日本群體中混雜的且常見的 HLA 第 II 類分子呈現的 Th 細胞抗原決定位。

【0207】其次，本案發明人評估是否另一他胜肽 CDCA1(39-64)能產生專一性的 Th1 細胞。將來自 2 名健康捐贈者之 PBMC 之  $CD4^+$  T 細胞以經 CDCA1(39-64)脈衝的自體 DC 與 PBMC 以週的間隔刺激。培養的  $CD4^+$  Th 細胞之 CDCA1(39-64)專一性反應係以 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析。於 HLA-DR4-、HLA-DR9、HLA-DR53 陽性健康捐贈者 HD1 中，產生的 Th 細胞株回應於 CDCA1(39-64)產生顯著量的 IFN- $\gamma$ (圖 2C)，且此反應當添加 HLA-DR 專一性 mAb 時顯著下降，而 HLA-DP 專一性 mAb 未顯示效果。為了進一步分析 HLA 限制性，檢測 Th 細胞對於經胜肽脈衝之 L-DR4 與 L-DR53 的反應性，但從此名捐贈者產生的經 DR 限制之散裝  $CD4^+$  Th 細胞不辨識經 CDCA1(39-64)脈衝的 L-DR4 與 L-DR53 細胞(資料未顯示)。因此本案發明人認為此  $CD4^+$  Th 細胞株為經 HLA-DR9 限制之 Th 細胞。為了確認，利用此經 DR 限制之散裝  $CD4^+$  Th 細胞株的極限稀釋來獲得 CDCA1(39-64)專一性選殖體。結果，此 Th 選殖體於 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析中僅在表現 DR9 之異體 PBMC 的存在下，對於 CDCA1(39-64)顯示專一性反應，且 IFN- $\gamma$  生產由於添加抗 HLA-DR mAb 顯著抑制，而非抗 HLA-DP

mAb。這些結果指出此 Th 選殖體係受 DR9 限制(圖 3D)。

【0208】為了調查 CDCA1(39-64)是否能結合另一 HLA 第 II 類分子並誘導 Th 細胞反應，將來自 HLA-DR9 陰性之健康捐贈者的 CD4<sup>+</sup> T 細胞以經 CDCA1(39-64)脈衝之自體 DC 與 PBMC 刺激。經 CDCA1(39-64)刺激產生之 Th 細胞回應經 CDCA1(39-64)脈衝之 PBMC 與 L-DR15 細胞而專一性地生產顯著量的 IFN- $\gamma$ ，而非經 CDCA1(39-64)勝肽脈衝之 L-DR8 細胞。此 Th 細胞株之 IFN- $\gamma$  生產由於添加抗 HLA-DR mAb 顯著受抑制，而非添加抗 HLA-DP、抗 HLA-DQ 或抗 HLA 第 I 類 mAb (圖 2C 與圖 3D)。這些結果指出 Th 細胞受 HLA-DR15 限制。

【0209】綜上，呈現於此之這些結果明確證明兩個重疊的勝肽，即 CDCA1(39-64)與 CDCA1(55-78)有能力刺激經 HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15 與 HLA-DP2 限制之 Th 細胞啓示了這些勝肽能藉由混雜的 HLA 第 II 類分子對於 Th 細胞呈現，且可能可用於許多病患的癌症免疫療法。

為了確認 CDCA1(39-64)與 CDCA1(55-78)刺激受 HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15 及 HLA-DP2-限制之 Th 細胞的能力，本案研究者，對於受 HLA 第 II 類分子限制之 Th 細胞誘導，使用無關的勝肽作為對照來進行實驗。

【0210】將從健康捐贈者之 PBMC 單離的 CD4<sup>+</sup> T 細胞以週的間隔以經 CDCA1(55-78)-LP 脈衝的自體 DC 與 PBMC 刺激。在至少 3 回合刺激後，藉由 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析檢驗培養之 CD4<sup>+</sup> T 細胞的 CDCA1(55-78)-LP 專一性反應。於一名 HLA-DR4 陽性健康捐贈者 (HD1)中，產生的 Th 細胞回應於經

CDCA1(55-78)-LP 脍衝的 PBMC，以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- $\gamma$ 。該散裝 Th 細胞，以 HLA-DR 依存方式，專一性的辨識經 CDCA1(55-78)-LP 脍衝的 L-DR4 細胞，而不是經無關的胜肽脈衝之 L-DR4 細胞或經 CDCA1(55-78)-LP 脍衝的 L-DR53 細胞(圖 8A)。從其他 2 名 DR4 $^+$ 捐贈者也獲得類似的結果(表 1；HD4 與 HD5)。這些結果啓示 CDCA1(55-78)-LP 擁有受 HLA-DR4 限制之 Th 細胞抗原決定位。

【0211】為了調查是否 CDCA1(55-78)-LP 會誘導於受其他 HLA 第 II 類分子限制之 Th 細胞中的反應，測試來自 HLA-DR4 陰性之健康捐贈者的 CD4 $^+$  T 細胞。本案發明人確認 CDCA1(55-78)-LP 產生受 HLA-DR15 限制之 Th 細胞(圖 8B)。CDCA1(55-78)-LP 也產生受 HLA-DP2 限制之 Th 細胞(圖 8C)。並無獲得經 HLA-DP2 轉導的 L 細胞；因此建立 CDCA1(55-78)-LP 反應性之 Th 細胞選殖體(Th 選殖體)，並使用來自 5 名不同捐贈者的異體 PBMC 作為 APC 以確認共享的 HLA-DP 分子的限制性。因此 CDCA1(55-78)-LP 結合於 HLA-DR4、HLA-DR15 及 HLA-DP2 啓示 CDCA1(55-78)-LP 擁有在由日本/太平洋亞洲群體(Saito S et al., *Tissue Antigens* 2000;56:522-9., Mack SJ et al., *Tissue Antigens* 2000;55:383-400) 中常見的 HLA 第 II 類分子所呈現的 Th 細胞抗原決定位。

【0212】接著，發明人使用上述方法評估並確認 CDCA1(39-64)-LP 能產生受 HLA-DR9 與 HLA-DR15 限制的 Th 細胞(圖 8D 與 E)。綜上，這些結果明確證明這些重疊的 LP 能

刺激受 HLA-DR4、-DR9、-DR15 及 -DP2 限制的 Th 細胞。於此研究中，從健康捐贈者產生的 CDCA1-LP 專一性 Th 細胞不對嵌於 CDCA1-LP 中的 CDCA1-A24(56-64)SP 反應(圖 8A、B、D、E)。

這些結果也顯示 CDCA1(39-64)與 CDCA1(55-78)有能力誘導受 HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15 及 HLA-DP2 限制的 Th 細胞。

#### 【0213】CDCA1(55-78)胜肽刺激 Th1-型 CD4<sup>+</sup> T 細胞

為了進一步定性經 CDCA1 胜肽誘導的 Th 細胞，本案發明人藉由 Bio-Plex 系統測量回應於帶有同源勝肽之 CDCA1(55-78)專一性散裝 CD4<sup>+</sup> Th 細胞株之刺激的數種細胞激素。來自捐贈者的以經同源勝肽脈衝之 L-DR0405 再刺激之 CDCA1(55-78)專一性散裝 HTL 細胞株產生大量 IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、TNF-alpha 及 MIP-1 $\beta$  但較少 IL-4 與 IL-7，顯示偏向的 Th1 特徵(圖 4A-D)。有趣地，細胞毒性標記 CD107a 也能於經同源勝肽(圖 4E-H)刺激的 CDCA1(55-78)專一性散裝 Th 細胞株上檢測到。因此於此培養條件中，CDCA1(55-78)勝肽專一性 Th1 細胞被優勢地活化。

#### 【0214】CDCA1(55-78)與 CDCA1(39-64)係經天然處理的抗原決定位

本案發明人著手評估是否自體 DC 能攝入並處理 CDCA1 蛋白質以刺激 CDCA1 胜肽專一性 Th1 細胞選殖體。製備該已載入 CDCA1(55-78) LP 之成熟 DC，並使用於 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析作為 APC。如於圖 5A 中所示，受 HLA-DR4-限制之 CDCA1(55-78)反應性 Th 細胞選殖體有效率地辨識載有 CDCA1 蛋白質之 DC，

並專一性地產生IFN- $\gamma$ ，而不辨識載有對照蛋白質之DC或未載入蛋白質之DC。此外此Th細胞選殖體辨識由DC呈現之經天然處理之CDCA1抗原的能力，由於抗HLA-DR抗體而有效被阻斷，但未受對照抗HLA第I類抗體阻斷，確認此抗原決定位係經由HLA-DR4分子呈現。使用了受HLA-DP2限制及CDCA1(55-78)反應性的Th細胞選殖體實施類似分析。此Th細胞選殖體有效率地辨識載有CDCA1蛋白質的DC並產生IFN- $\gamma$ ，但不辨識載有對照蛋白質之DC，啓示受HLA-DP2限制之Th細胞抗原決定位也在DC中由由CDCA1蛋白質被天然地處理(圖5B)。

【0215】該受HLA-DR9限制之CDCA1(39-64)反應性Th細胞選殖體對於載有CDCA1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，被抗HLA-DR抗體有效阻斷，而非對照抗HLA第I類抗體，確認此抗原決定位係經由HLA-DR9分子呈現。

總之，整個結果指出此Th細胞抗原決定位，即CDCA1(55-78)與CDCA1(39-64)係從CDCA1蛋白質被DC天然地處理，且藉由HLA-第II類分子在DC的細胞表面上呈現。

【0216】CDCA1(55-78)LP在體外及體內誘導有效率的原始CDCA1-A2(65-73)SP專一性CD8 $^{+}$ T細胞的交叉起動(cross-priming)

本案發明人評估是否CDCA1(55-78)LP能藉由於體外由DC交叉呈現LP而誘導CDCA1-A2(65-73)SP專一性CTL。為了確認，發明人欲藉由以經載入CDCA1(55-78)LP之DC刺激，在

從來自2名產生HLA-A2-陽性捐贈者的周邊血液CD8<sup>+</sup> T細胞產生CDCA1-A2 (65-73) SP專一性CTL。在3次以經載入LP之DC刺激後，以IFN- $\gamma$  ELISPO分析來檢驗在獲得之CTL細胞株中專一於CDCA1-A2 (65-73) SP的CD8<sup>+</sup> T細胞的頻率。如圖6A中所示，藉由經載入CDCA1(55-78)LP之DC刺激產生的CTL，會回應於再度以經CDCA1-A2 (65-73) SP脈衝之T2細胞而專一地產生IFN- $\gamma$ ，而不是經無關勝肽脈衝之T2細胞。此IFN- $\gamma$ 生產由於添加抗HLA第I類 mAb受顯著抑制，而非抗HLA-DR mAb，因此指出本案發明人藉由於體外由DC交叉呈現LP而成功地刺激CDCA1-A2 (65-73) SP專一性CD8<sup>+</sup> T細胞。

【0217】其次，檢測 CDCA1(55-78) LP 於體內刺激 CDCA1-A2 (65-73) SP 專一性細胞的能力。以 7 天間隔對於 HLA-A2 Tgm 的尾根部以乳化於 IFA 的 CDCA1(55-78) LP 實施免疫 2 或 3 次。第 2 或 3 次 CDCA1(55-78) LP 疫苗接種後 7 天，藉由生物體外 ELISPO 分析法確認鼠蹊部附近之淋巴結中的 IFN- $\gamma$  分泌 CD8<sup>+</sup> T 細胞數。如圖 6B 中所示，2 次以 CDCA1(55-78) LP 免疫的 HLA-A2 Tgm 所產生的 CTL 回應於再度以經 CDCA1-A2 (65-73) SP 脈衝之 BM-DC 刺激而專一性生產 IFN- $\gamma$ ，而非經無關的 HIV-A2 胜肽脈衝的 BM-DC。此外於第 3 次接種後，專一性 IFN- $\gamma$  生產 T 細胞的數目增加。

綜上，這些結果指出在藉由於體外人類DC及於體內在 HLA-A2 Tgm以BM-DC交叉呈現後，CDCA1(55-78) LP均誘導顯著比例的IFN- $\gamma$ 生產CDCA1-A2 (65-73) SP專一性CTL。

【0218】藉由 CDCA1(55-78) LP 之 CDCA1 專一性及受 HLA

## 限制之 CTL 之誘導的增強

接著，本案發明人測試是否 CDCA1(55-78) LP 能增強 CDCA1 專一性及受 HLA-A2 限制之 CTL 的誘導。當來自 HLA-A2 陽性與 DR4-陽性捐贈者之 PBMC 單獨被 CDCA1-A2 (65-73) SP 及 CDCA1-A2 (351-359) SP 之混合物刺激時，此等兩種 SP 專一性四元體<sup>+</sup>細胞的頻率，各為 CD8<sup>+</sup> T 細胞的 0.01% 與 0.05% (圖 7A)。當此等 PBMC 被兩種 SP 與 CDCA1(55-78) LP 共同刺激，此等 SP 專一性四元體-陽性細胞的頻率各增為 0.03% 與 0.12% (相較於單獨以 SP 刺激，頻率各增為 3 倍及 2.4 倍) (圖 7A 及 B)。四元體<sup>+</sup>細胞的絕對數目，相較於單獨以 SP 刺激的那些，藉由僅添加 CDCA1(55-78) 而顯著增加 (資料未顯示)。當 PBMC 被此兩種 SP 與 CDCA1(55-78) 專一性 Th 選殖體共同刺激，SP 專一性四元體<sup>+</sup>細胞的頻率各增為 0.05% 與 0.19% (各增加 5 倍及 3.8 倍)。再者，當 PBMC 被 SP、CDCA1(55-78) 及 CDCA1(55-78) 專一性 Th 選殖體共同刺激，SP 專一性四元體<sup>+</sup>細胞之頻率顯著各增加至 0.1% 及 0.6% (各增 10 倍與 12 倍)。就四元體<sup>+</sup>細胞頻率而言，添加 CDCA1(55-78) 輔助胜肽或 Th 選殖體到培養物中，誘導頻率分別些微增加，而添加它們兩者 (CDCA1(55-78) + Th 選殖體)，明顯增加專一性 CTL 之頻率。這些結果於本案發明人使用不同的 CDCA1(55-78) 專一性 Th 選殖體，可有再現性地觀察到 (資料未顯示)。

【0219】將此藉由以 SP、CDCA1(55-78) LP 與 CDCA1(55-78) 專一性 Th 選殖體混合物刺激而成功誘導之 CDCA1 專一性 CTL 細胞株，於第 14 天以 SP 與 CDCA1(55-78) LP 再度刺激 (第 3

次刺激)，並將 CDCA1 專一性及受 HLA-A2 限制之 CTL 擴增。四元體<sup>+</sup>細胞的頻率顯著各增加到 0.1% 與 5.4%，尤其於 CDCA1-A2 (351-359) 專一性四元體<sup>+</sup>細胞(圖 7C、D)。重要地，勝肽專一性 IFN- $\gamma$  生產及細胞毒性標記 CD107a 均能於此經同源勝肽刺激的 CDCA1 專一性 CTL 細胞株上檢測到(圖 7C、D)。

【0220】此等結果明確證明藉由在培養物中由 CDCA1(55-78) Th 細胞抗原決定位勝肽或 CDCA1(55-78) 專一性 Th 選殖體刺激而活化的 CD4<sup>+</sup> T 細胞，能增強 CDCA1-A2 (65-73) SP 與 CDCA1-A2 (351-359) SP 專一性 CTL 兩者之誘導，且此增強在 CDCA1(55-78) LP 與 Th 細胞選殖體兩者存在下最大。

【0221】於誘導 CDCA1-A24 專一性 CTL 之相乘效果，也使用 CDCA1-A24 (56-64) 專一性四元體於 HLA-A24<sup>+</sup>/DR15<sup>+</sup> HD2 中測試。將 CDCA1(55-78)-LP 專一性散裝 CD4<sup>+</sup> T 細胞與 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性散裝 CD8<sup>+</sup> T 細胞，和自體 DC 一起於單獨存在 CDCA1-A24 (56-64) SP (SP)、存在 CDCA1-A24 (56-64) SP + 對照 LP (對照 LP + SP) 或 CDCA1-A24 (56-64) SP + CDCA1(55-78)-LP (CDCA1(55-78)-LP + SP) 之下培養，而不添加任何細胞激素。於和勝肽一起於體外培養 1 週後，將培養的細胞如於材料與方法項目中敘述，以 HLA-A24 (A\*24:02)/CDCA1-A24 (56-64) 複合體的四元體及抗人類 CD8 mAb 染色。如圖 7E 中所示，添加 CDCA1-A24 (56-64) SP + CDCA1(55-78)-LP (CDCA1(55-78)-LP + SP)，相較於單獨添加 SP 或添加對照 LP

+ SP，顯著增加了 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CD8<sup>+</sup> T 細胞的絕對數目。此等結果啓示已活化的 CDCA1 專一性 Th 細胞能增強誘導 CDCA1-A24 專一性 CTL。

綜上，這些結果明確證明 CDCA1(55-78) LP 及由以 CDCA1(55-78)LP 刺激而活化的 CDCA1 專一性 CD4<sup>+</sup> T 細胞，能個別或合作增強 CDCA1 專一性及受 HLA 限制之 CTL 的誘導。

**【0222】CDCA1-LP 誘導 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 之有效擴增**

接著，評估 CDCA1-LP 可誘導 CDCA1 專一性散裝 CTL 擴增的可能性。將從 HD2 (HLA-A24<sup>+</sup>/DR15<sup>+</sup>) 之純化的 CD8<sup>+</sup> T 細胞產生的 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性散裝 CTL，與經 CDCA1(55-78)LP 脈衝之自體 DC 一起培養 1 週。如於圖 9A 中所示，藉由經 CDCA1(55-78)LP 脈衝之 DC 刺激使 CDCA1-A24 (56-64)-四元體<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 細胞之群體擴增，但當散裝 CTL 以經對照 LP 脈衝之 DC 刺激時群體減少。於 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析中，從 HLA-A24<sup>+</sup>/DR4<sup>+</sup> HD5 獲得類似結果 (圖 9B)。本實驗的詳細方法提供於材料與方法項目中。

**【0223】本案發明人也測試是否 CDCA1-LP 能於體外誘導經接種 CDCA1-A24 (56-64) SP 之 HNC 病患之 PBMC 中之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 擴增。將來自經接種疫苗的 HNC 病患的 PBMC，和 CDCA1(55-78)LP 與 CDCA1(39-64)LP 的混合物一起培養。當將從 HNC29 分離的新鮮 PBMC 以 CDCA1-A24 (56-64) 專一性四元體在體外培養 (生物體外) 前染色時，四元體<sup>+</sup> 細胞之頻率僅為 CD8<sup>+</sup> T 細胞的**

0.09%。有趣地，藉由 1 週於體外以 CDCA1(55-78)LP 與 CDCA(139-64)LP 的混合物刺激 PBMC 後，來自 HNC29 中之 PBMC 之四元體<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞顯著擴增。CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 之頻率增加至 CD8<sup>+</sup> T 細胞的 3.07%(圖 9C；第 7 天)。當將培養細胞以 CDCA1-A24 (56-64) SP 刺激時，也可檢測到 T 細胞之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 IFN- $\gamma$  生產(圖 9C；條狀圖，第 7 天)。此類似結果也可於 HNC26、31、39 及 109 獲得(圖 9D-G)。這些結果啓示 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 之擴增可能藉由以 DC 交叉呈現 CDCA1-LP 而誘導。

**【0224】** CDCA1-LP 的交叉呈現有效率地在體外及體內起動(prime)CDCA1 專一性 CD8<sup>+</sup> T 細胞

由 DC 之 CDCA1-LP 的交叉呈現，係在 CDCA1-A24 (56-64) 專一性四元體<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞之 IFN- $\gamma$  反應的背景中評估。不能交叉呈現但能如活 DC 一樣有效率地呈現 CDCA1-A24 (56-64) SP 的已固定的 DC(圖 10A，固定的 DC + SP)，被使用於排除或評估 T 細胞反應中 LP 降解產物之外來性呈現的貢獻。CDCA1(55-78)LP (圖 10A) 與 CDCA1(39-64)LP (圖 10B) 僅於未固定的 DC(DC + LP) 交叉呈現時才誘導顯著比例的 IFN- $\gamma$  分泌性四元體<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞。經 CDCA1-LP 脈衝的固定 DC 不能刺激 CDCA1-A24 (56-64) 專一性 CTL，經無關之 LP 脈衝之未固定 DC(固定 DC + LP 及 DC + 無關之 LP) 亦是如此。

**【0225】** 為了調查 CDCA1 專一性 CTL 之交叉起動，發明人檢驗是否 CDCA1(55-78)LP 能起動 CDCA1-A24 專一性 CTL。經 CDCA1-LP 脈衝之固定 DC 不能刺激 CDCA1-A24 (56-64) 專

一性 CTL，經無關之 LP 脈衝之未固定 DC(經固定之 DC + LP 及 DC + 無關的 LP)亦同。經載入 CDCA1(55-78)LP 之 DC 也能於 HLA-A24<sup>+</sup>/A2<sup>+</sup>/DR4<sup>+</sup>捐贈者起動 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性 CTL 與 CDCA1-A2 (65-73) SP 專一性 CTL (HD5; 圖 6C)。

【0226】經接種 CDCA1(55-78)LP 之 HLA-A24 Tgm 之 CD8<sup>+</sup> T 細胞也能回應於經 CDCA1-A24 (56-64) SP 脈衝的 BM-DC 與 C1R-A2402 細胞之刺激而專一性生產 IFN- $\gamma$ (圖 6D，左分格)。當 HLA-A24 Tgm 接種了 CDCA1(39-64)LP 時也獲得類似結果(圖 6D，右分格)。對於 HLA-A24 Tgm 以 2 倍量 CDCA1-LP 進行免疫，原因為 HLA-A24 Tgm 之 CDCA1-A24 (56-64) SP 專一性點的數目比 HLA-A2 Tgm 少。再者，接種 CDCA1-LP 比 CDCA1-A24 (56-64) SP 在誘導 SP 專一性 CTL 方面較優良(圖 6E)。這些結果證明攝入 CDCA1-LP 後，APC 能在體外及體內交叉起動 CDCA1 專一性 CTL。

【0227】於經接種 CDCA1-A24 (56-64) SP 之 HNC 病患中之 CDCA1 專一性 Th 細胞之存在

於癌免疫療法範疇，有強力證據啓示使用受限制之抗原決定位的疫苗可造成對於未存在於疫苗中的抗原的廣泛的 CD8<sup>+</sup> 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.)。所以本案發明人考慮 CDCA1 專一性 Th 細胞反應可能藉由以 CDCA1 衍生的 CTL 抗原決定位胜肽之接種而被有效率地誘導。為了檢測病患中的

CDCA1 專一性 Th 細胞反應，收集從已接種 CDCA1-A24 (56-64) 之 16 名 HNC 病患及接種前之 7 名 HNC 病患分離的 PBMC。捐贈者特性整理在圖 11F 的表。進行 1 週之以 CDCA1-LP 刺激 PBMC 後，以 IFN- $\gamma$  ELISPO 分析法來偵測各 CDCA1-LP 專一性 T 細胞之頻率(圖 11A)。使用從 10 名健康自願者分離的 PBMC 作為對照。當 IFN- $\gamma$  分泌細胞至少在負對照的 2 倍以上，反應視為陽性。

在 HNC 病患觀察到顯著之 CDCA1-LP 專一性免疫反應的頻率(CDCA1(39-64)LP，19 中之 14，4%; CDCA1(55-78)LP，19 中之 13，68%; 圖 11B 與 F)，但於 10 名健康捐贈者中，未偵測到對於 CDCA1-LP 之專一性 IFN- $\gamma$  反應。於一些接種前的病患，可偵測到 CDCA1-LP 專一性 Th 細胞反應(CDCA1(39-64)LP，7 中之 2，29%; CDCA1(55-78)LP，7 中之 2，29%; 圖 11F)。另一方面，在接種 CDCA1-A24 (56-64) SP 後的許多 HNC 病患，檢測到 CDCA1-LP 專一性 Th 細胞反應(CDCA1(39-64)LP，16 中之 12，75%; CDCA1(55-78)LP，16 中之 12，75%; 圖 11F)。於接種後之病患中之 CDCA1-LP 專一性 IFN- $\gamma$  生產細胞的數目，顯著多於在接種前之病患及健康捐贈者中者(圖 11C)。T 細胞之 IFN- $\gamma$  生產，由於添加抗 HLA-第 II 類 mAb 受顯著抑制，而非抗 HLA 第 I 類 mAb (圖 11D)。這些結果指出 CDCA1-LP 專一性 IFN- $\gamma$  生產係源自 CDCA1-LPs 專一性 CD4 $^{+}$  T 細胞。有趣地，在一些 HNC 病患中，對於 CDCA1-LP 之專一性反應會由於重複接種疫苗而誘導或增強(圖 11E)。此等觀察現象啓示 APC 收集並處理衍生自被疫苗誘導的 CTL 殺死的

腫瘤細胞的 CDCA1 抗原，然後於體內活化 CDCA1 專一性 Th 細胞。

**【0228】討論**

據認為最有吸引力的疫苗化合物，係反應於能誘導治療性 CD4<sup>+</sup> 與 CD8<sup>+</sup> 反應之 TAA 序列的合成 LP (Melief CJ and van der Burg SH。 Nat Rev Cancer 2008; 8: 351-60., Kenter GG, Welters MJ, et al. N Engl J Med 2009; 361: 1838-47.)。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，發明人認為癌免疫療法的理想勝肽疫苗應為能誘導由最常見 HLA 限制之 CTL 與 Th1 細胞兩者的單一多勝肽。

**【0229】**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 CDCA1 衍生 LP。

結論為是，本案發明人首先鑑別出包括 CTL- 抗原決定位之衍生自 CDCA1 之輔助勝肽，其不僅為增殖及活化 CDCA1 專一性 Th1 細胞的良好工具，而且可由交叉呈現增殖及活化 CDCA1 專一性 CTL。這些發現有助於未來對於各種類型的癌症進行 CDCA1 胜肽為基礎的免疫療法的臨床試驗。

**[產業利用性]**

**【0230】**本發明敘述能誘導有效抗腫瘤免疫反應之衍生自 CDCA1 的 Th1 細胞抗原決定位勝肽，且因此對於廣範圍的癌症類型有用。此種勝肽擔保作為抗癌之勝肽疫苗的進一步發展，尤其對抗表現 CDCA1 之癌症。本發明之勝肽可誘導 Th1

細胞反應，且因而由 Th1 細胞分泌的細胞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 CDCA1 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 CDCA1 之疾病，例如癌症，更具體而言，乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)及頭頸癌(HNC)亦為有效。

**【0231】**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。

## 序列表

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

<120> 對於 TH1 細胞之 CDCA1 抗原決定位勝肽及含此之疫苗

<130> ONC-A1210-TW

<150> US 61/669,971

<151> 2012-07-10

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽

<400> 1

Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe Tyr Met Met Pro Val Asn  
1 5 10 15

Ser Glu Val Met Tyr Pro His Leu

20

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽

<400> 2

Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln

I624475

: 1 5 10 15

:

Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe  
20 25

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽

<400> 3

Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val  
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽

<400> 4

Lys Leu Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile  
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HLA-A24 抗原決定位胜肽

<400> 5

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成胜肽

<400> 6

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成胜肽

<400> 7

Ser Leu Tyr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu  
1 5

<210> 8  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成胜肽

<400> 8

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His

I624475

: 1 5 10 15

:  
  
<210> 9  
<211> 1989  
<212> DNA  
<213> 人  
  
<220>  
<221> CDS  
<222> (301)..(1695)  
  
<400> 9  
gcggaatggg gcgggacitc cagtaggagg cggcaagttt gaaaagtgat gacggttgac 60  
gtttgctgat ttttgacttt gcttgtagct gctcccgaa ctgcggctt tcctgtcgcc 120  
ggccggcact gtaggtgagc gcgagaggac ggaggaagga agcctgcaga cagacgcctt 180  
ctccatccca aggcgcgggc aggtgcccgg acgctgggcc tggcggtgtt ttcgtcgtgc 240  
tcagcggtgg gaggaggcgg aagaaaccag agcctgggag attaacagga aacttccaag 300  
atg gaa act ttg tct ttc ccc aga tat aat gta gct gag att gtg att 348  
Met Glu Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile  
1 5 10 15  
  
cat att cgc aat aag atc tta aca gga gct gat ggt aaa aac ctc acc 396  
His Ile Arg Asn Lys Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr  
20 25 30  
  
aag aat gat ctt tat cca aat cca aag cct gaa gtc ttg cac atg atc 444  
Lys Asn Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile  
35 40 45  
  
tac atg aga gcc tta caa ata gta tat gga att cga ctg gaa cat ttt 492  
Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe  
50 55 60  
  
tac atg atg cca gtg aac tct gaa gtc atg tat cca cat tta atg gaa 540  
Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met Tyr Pro His Leu Met Glu  
65 70 75 80

ggc ttc tta cca ttc agc aat tta gtt act cat ctg gac tca ttt ttg			588
Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu			
85	90	95	
cct atc tgc cgg gtg aat gac ttt gag act gct gat att cta tgt cca			636
Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro			
100	105	110	
aaa gca aaa cgg aca agt cgg ttt tta agt ggc att atc aac ttt att			684
Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile			
115	120	125	
cac ttc aga gaa gca tgc cgt gaa acg tat atg gaa ttt ctt tgg caa			732
His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln			
130	135	140	
tat aaa tcc tct gcg gac aaa atg caa cag tta aac gcc gca cac cag			780
Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln			
145	150	155	160
gag gca tta atg aaa ctg gag aga ctt gat tct gtt cca gtt gaa gag			828
Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu			
165	170	175	
caa gaa gag ttc aag cag ctt tca gat gga att cag gag cta caa caa			876
Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln			
180	185	190	
tca cta aat cag gat ttt cat caa aaa acg ata gtg ctg caa gag gga			924
Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly			
195	200	205	
aat tcc caa aag aag tca aat att tca gag aaa acc aag cgt ttg aat			972
Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn			
210	215	220	
gaa cta aaa ttg tcg gtg gtt tct ttg aaa gaa ata caa gag agt ttg			1020
Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu			
225	230	235	240
aaa aca aaa att gtg gat tct cca gag aag tta aag aat tat aaa gaa			1068
Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu			
245	250	255	

aaa atg aaa gat acg gtc cag aag ctt aaa aat gcc aga caa gaa gtg	260	265	270	1116
Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val				
gtg gag aaa tat gaa atc tat gga gac tca gtt gac tgc ctg cct tca	275	280	285	1164
Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser				
tgt cag ttg gaa gtg cag tta tat caa aag aaa ata cag gac ctt tca	290	295	300	1212
Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser				
gat aat agg gaa aaa tta gcc agt atc tta aag gag agc ctg aac ttg	305	310	315	1260
Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu				
gag gac caa att gag agt gat gag tca gaa ctg aag aaa ttg aag act	325	330	335	1308
Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr				
gaa gaa aat tcg ttc aaa aga ctg atg att gtg aag aag gaa aaa ctt	340	345	350	1356
Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu				
gcc aca gca caa ttc aaa ata aat aag aag cat gaa gat gtt aag caa	355	360	365	1404
Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln				
tac aaa cgc aca gta att gag gat tgc aat aaa gtt caa gaa aaa aga	370	375	380	1452
Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg				
ggt gct gtc tat gaa cga gta acc aca att aat caa gaa atc caa aaa	385	390	395	1500
Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys				
att aaa ctt gga att caa caa cta aaa gat gct gct gaa agg gag aaa	405	410	415	1548
Ile Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys				
ctg aag tcc cag gaa ata ttt cta aac ttg aaa act gct ttg gag aaa	420	425	430	1596
Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys				

I624475

tac cac gac ggt att gaa aag gca gca gag gac tcc tat gct aag ata	1644	
Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile		
435	440	445
gat gag aag aca gct gaa ctg aag agg aag atg ttc aaa atg tca acc	1692	
Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr		
450	455	460
tga ttaacaaaat tacatgtctt ttgttaaatg gcttgccatc ttttaatttt	1745	
ctatttagaa agaaaagttt aagcgaatgg aagtatcaga agtaccaaataatgttggct	1805	
tcatcagttt ttatacactc tcataagtag ttaataagat gaatttaatg taggctttta	1865	
ttaatttata attaaaataa cttgtgcagc tattcatgtc tctactctgc cccttgggtt	1925	
aaatagtttgg agtaaaacaa aactagttac ctttgaataataatatttttttctgttac	1985	
tatc	1989	

<210> 10

<211> 464

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Met Glu Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile			
1	5	10	15

His Ile Arg Asn Lys Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr		
20	25	30

Lys Asn Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile		
35	40	45

Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe		
50	55	60

Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met Tyr Pro His Leu Met Glu  
 65 70 75 80

Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu  
 85 90 95

Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro  
 100 105 110

Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile  
 115 120 125

His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln  
 130 135 140

Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln  
 145 150 155 160

Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu  
 165 170 175

Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln  
 180 185 190

Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly  
 195 200 205

Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn  
 210 215 220

Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu  
 225 230 235 240

Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu  
245 250 255

Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val  
260 265 270

Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser  
275 280 285

Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser  
290 295 300

Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu  
305 310 315 320

Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr  
325 330 335

Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu  
340 345 350

Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln  
355 360 365

Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg  
370 375 380

Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys  
385 390 395 400

Ile Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys  
405 410 415

## 發明摘要

※ 申請案號：102124658

※ 申請日：102/07/10

※ I P C 分類：  
C07K 14/47 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 37/04 (2006.01)

## 【發明名稱】（中文/英文）

對於 TH1 細胞之 CDCA1 抗原決定位勝肽及含此之疫苗  
 /CDCA1 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的自 CDCA1 衍生的抗原決定位勝肽。此種勝肽可藉由 MHC 第 II 類分子辨識並誘導 Th1 細胞。於較佳具體例中，此種本發明之勝肽可混雜地(promiscuously)結合於 MHC 第 II 類分子並且除了誘導 Th1 細胞更誘導 CDCA1 專一性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)。因此此種勝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勝肽的聚核苷酸、由此種勝肽所誘導的 APC 與 Th1 細胞，及其相關的誘導方法。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乳癌、膀胱癌、食道癌、小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC)、非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 及頭頸癌 (HNC)。

## 【英文】

Isolated CDCA1-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 CDCA1-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, breast cancer, bladder cancer, esophageal cancer, small cell lung cancer (SCLC), non-small cell lung cancer (NSCLC) and head-and-neck cancer (HNC).

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

Y

Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys  
420 425 430

Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile  
435 440 445

Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr  
450 455 460

## 申請專利範圍

1. 一種單離的勝肽，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：1 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，該勝肽有誘導 T-輔助 1 型 (Th1) 細胞的能力。
2. 如申請專利範圍第 1 項之單離的勝肽，其中，該勝肽有結合於至少 2 種 MHC 第 II 類分子的能力。
3. 如申請專利範圍第 2 項之單離的勝肽，其中，該 MHC 第 II 類分子選自於由 HLA-DR4、HLA-DR15 及 HLA-DP2 構成之群組。
4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之單離的勝肽，其中，該勝肽包含具有 CDCA1 專一性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 誘導能力之勝肽的胺基酸序列。
5. 一種單離的聚核苷酸，其編碼為如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之勝肽。
6. 一種組合物，包含一或多種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之勝肽，或一或多種編碼該勝肽的聚核苷酸。
7. 一種用於癌症治療之醫藥組合物，其中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) 一或多種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之勝肽；
  - (b) 一或多種如申請專利範圍第 5 項之聚核苷酸；
  - (c) 一或多種 APC，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1

至 4 項中任一項之胜肽；

(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 4 項中任一項之胜肽之 APC；及

(e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。

8. 如申請專利範圍第 7 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 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。

9. 如申請專利範圍第 7 或 8 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。

10. 一種 *in vitro* 誘導 APC 之方法，該 APC 有能力誘導 Th1 細胞或 CTL，該方法包含使 APC 與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽接觸的步驟。

11. 一種 *in vitro* 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 4 項中任一項之胜肽之複合體的 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 4 項中任一項之胜肽之複合體。

12. 一種 *in vitro* 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，及已接觸如申請專利範圍第 4 項之胜肽的 APC;及
- (b) 共同培養 CD8 陽性 T 細胞，及已接觸如申請專利範圍第 4 項之胜肽的 APC。

13. 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 4 項中任一項之胜肽之複合體。

14. 一種 APC，係由如申請專利範圍第 10 項之方法所誘導。

15. 一種單離的 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽之 APC。

16. 一種 Th1 細胞，係由如申請專利範圍第 11 項之方法所誘導。

17. 一種選自於由以下構成之群組中至少一種有效成分用於製造誘導在對象中對抗癌之免疫反應的組合物的用途：

- (a) 一或多種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽；
- (b) 一或多種如申請專利範圍第 5 項之聚核苷酸；
- (c) 一或多種 APC，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽；
- (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 4 項中任一項之胜肽之 APC;及
- (e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。