202219059

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202219059 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：110149598 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 08 月 04 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/47 (2006.01)* *C07K14/435 (2006.01)*
A61K39/00 (2006.01) *C12N15/12 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/08/04 日本 2014-158919
2014/08/04 日本 2014-158920
2014/08/04 日本 2014-158921

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

(72)發明人：角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP) ；大沢龍司 OSAWA, RYUJI (JP) ；山下祥子 YAMASHITA, SACHIKO (JP) ；渡辺朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP) ；引地哲郎 HIKICHI, TETSURO (JP)

(74)代理人：洪澄文；洪茂

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：16 共 171 頁

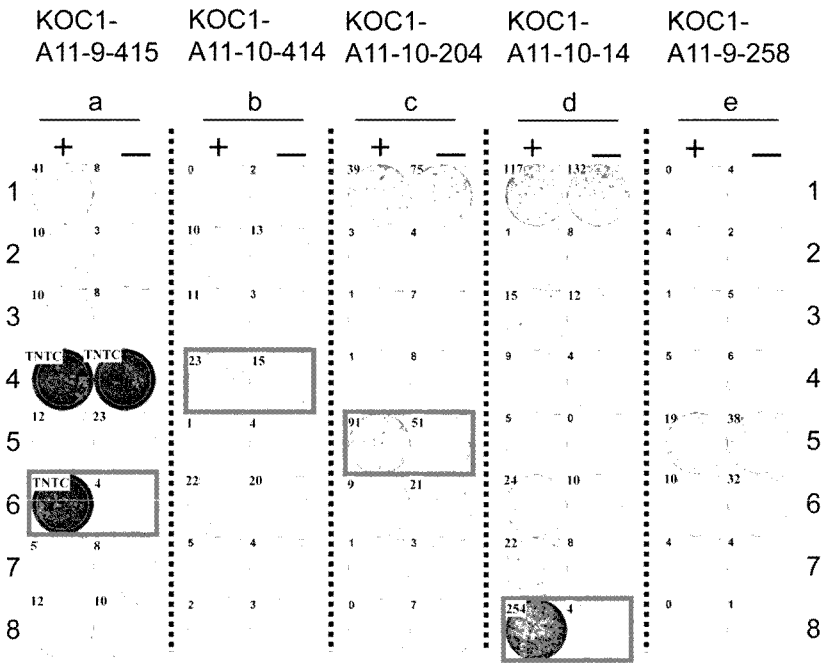
(54)名稱

來自 KOC1 的胜肽及含其之疫苗

(57)摘要

本發明提供具有細胞傷害性 T 細胞誘導能力之來自 KOC1 的抗原決定位胜肽。本發明並提供編碼為該胜肽之多核苷酸、呈現該胜肽之抗原呈現細胞及誘導以該胜肽為標靶之細胞傷害性 T 細胞、及該抗原呈現細胞或該 CTL 之方法。本發明更包含以該等作為有效成分之組合物及藥學組合物。本發明更提供使用本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞、細胞傷害性 T 細胞、或本發明之藥學組合物來治療及/或預防癌，及/或預發術後之癌再發之方法。又，提供誘導對於癌之免疫應答之方法。

指定代表圖：


KOC1-A11-9-415
KOC1-A11-10-414
KOC1-A11-10-204
KOC1-A11-10-14
KOC1-A11-9-258
a
b
c
d
e
+
—
1
2
3
4
5
6
7
8
TNTC
TNTC
TNTC

第 1 圖

【發明摘要】

【中文發明名稱】　來自KOC1的胜肽及含其之疫苗

【中文】

本發明提供具有細胞傷害性T細胞誘導能力之來自KOC1的抗原決定位胜肽。本發明並提供編碼為該胜肽之多核苷酸、呈現該胜肽之抗原呈現細胞及誘導以該胜肽為標靶之細胞傷害性T細胞、及該抗原呈現細胞或該CTL之方法。本發明更包含以該等作為有效成分之組合物及藥學組合物。本發明更提供使用本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞、細胞傷害性T細胞、或本發明之藥學組合物來治療及/或預防癌，及/或預發術後之癌再發之方法。又，提供誘導對於癌之免疫應答之方法。

【指定代表圖】　第1圖

【代表圖之符號簡單說明】　無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　來自KOC1的胜肽及含其之疫苗

【技術領域】

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

【0002】　本申請案係基於2014年8月4日提申之日本專利申請案(日本特願2014-158919、日本特願2014-158920、及日本特願2014-158921)主張優惠，其全部內容納入本說明書作為參考。

【先前技術】

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

【0004】　該等TAA中的一些已鑑別係能被CTL認識之抗原決定位胜肽，期待應用於針對各種癌之免疫療法(非專利文獻3：Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20):1442-55；非專利文獻4：Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul1, 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 19196 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 Cancer1999 May 5, 81(3):439-66；非專利文獻10：Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):387-94)。直到現在，已有一些使用了來自該等TAA之CTL抗原決定位胜肽之臨床試驗被報告。但遺憾地，這些臨床試驗許多只顯示低的客觀功效(非專利文獻11：Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20):4169-80；非專利文獻12：Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188:33-42；非專利文獻13：Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9):909-15)。因此，仍須要能鑑定可使用在癌免疫療法之新穎CTL抗原決定位。

【0005】 KOC1(類胰島素成長因子II mRNA結合蛋白質3(insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3)：也記載為IGF2BP3或IMP-3；參照序列：GeneBank存取編號NM_006547.2(序列編號：109))，已利用使用包括23,040個基因之基因體之cDNA微陣列之基因表現輪廓解析，鑑別為在肺癌被向上調控之基因(非專利文獻14：Kikuchi T et al., Oncogene. 2003 Apr 10; 22(14): 2192-205；專利文獻1：WO2004/031413)。KOC1之表現據觀察在超過肺癌患者之90%係於腫瘤細胞專一地向上調控，但在睪丸及胎盤以外的其他正常重要器官並不表現。再者，藉由RNA干涉法所致之KOC1表現之向下調控，顯示會抑制表現KOC1之癌細胞株之細胞增殖。

【0006】 最近，已鑑別出來自KOC1的HLA-A24拘束性CTL抗原決定位胜肽(專利文獻2：WO2006/090810、非專利文獻15：Suda T et al., Cancer Sci. 2007 Nov;98(11):1803-8)及HLA-A2拘束性CTL抗原決定位胜肽(專利文獻3：WO2011/067920；非專利文獻16：Tomita Y et al., Cancer Sci. 2011 Jan;102(1):71-8)。該等胜肽在具有HLA-A24型或HLA-A2型之癌患者為有效，但對於不具該等HLA型之癌患者無法期待效果。

先前技術文獻

專利文獻

【0007】 專利文獻1：WO2004/031413

專利文獻2：WO2006/090810

專利文獻3：WO2011/067920

非專利文獻

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

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

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

非專利文獻4：Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13):3134-42

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

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

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

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

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

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

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

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

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

非專利文獻14：Kikuchi T et al., Oncogene. 2003 Apr 10; 22(14): 2192-2053

非專利文獻15：Suda T et al., Cancer Sci. 2007 Nov;98 (11):1803-8

非專利文獻16：Tomita Y et al., Cancer Sci. 2011 Jan; 102(1):71-8

【發明內容】

【0009】 本發明係關於一種胜肽，能誘導針對表現KOC1之細胞為專一之CTL。該等胜肽若利用人白血球抗原(human leukocyte antigen：HLA)在抗原呈現細胞(antigen-presenting cell：APC)上呈現，會誘導呈現針對KOC1表現細胞為專一之細胞傷害活性之CTL。至今所鑑別之來自KOC1的具有CTL誘導能力之胜肽為HLA-A2拘束性或HLA-A24拘束性之胜肽，對於未表現該等HLA之細胞無法誘導CTL。所以，當於不具該等HLA之對象進行免疫療法時，習知之胜肽不適合。HLA-A11、及HLA-A33為亞洲人種常見的對偶基因(Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50:201-12)，HLA-A03及HLA-A01為白人常見的對偶基因(Cao et al.,Hum Immunol 2001;62(9):1009-30)。對於HLA-A11陽性之對象宜投予HLA-A11拘束性之胜肽，對於HLA-A33陽性之對象宜投予HLA-A33拘束性之胜肽，對於HLA-A03陽性之對象宜投予HLA-A03拘束性之胜肽，對於HLA-A01陽性之對象宜投予HLA-A01拘束性之胜肽。所以，本發明係關於HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03或HLA-A01拘束性之來自KOC1之胜肽且係關於具有CTL誘導能力之胜肽。由本說明書揭示之結果可印證：本發明之胜肽為能誘導針對表現KOC1及HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03或HLA-A01之細胞之強力且專一性免疫應答的抗原決定位胜肽。

【0010】 因此，本發明一目的為提供能以HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03或HLA-A01拘束性之樣式誘導CTL之來自KOC1的胜肽。該等胜肽能用於在試管內(in vitro)、離體(ex vivo)或活體內(in vivo)內誘導CTL，或用於為了誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫應答而對於對象投予。理想的胜肽為包括選自序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41之中的胺基酸序列者，更佳為九胜肽或十胜肽，更佳為由選自於序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、

80、85、27、86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列構成的胜肽。

【0011】 本發明之胜肽只要結果產生之改變胜肽能保持原本胜肽之CTL誘導能力即可，也包括1個、2個、或更多胺基酸取代、缺失、插入及/或加成之胜肽。本發明也提供編碼為本發明之任一胜肽之經單離的多核苷酸。該等多核苷酸和本發明之胜肽同樣，可用以誘導具有CTL誘導能力之APC，且可為了誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫應答而對於對象投予。

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

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

【0014】 本發明更提供誘導CTL之方法，包括以下步驟：將CD8陽性T細胞和於自身表面上呈現HLA抗原與本發明胜肽之複合體之APC進行共培養、將CD8陽性T細胞與於自身表面上呈現HLA抗原與本發明胜肽之複合體之外吐小體進行共培養、或將包括編碼為能結合於在細胞表面上由HLA抗原呈現之本發明之胜肽的T細胞受體(T cell receptor：TCR)之各次單元之多核苷酸之載體導入到CD8陽性T細胞。本發明中，理想之HLA抗原為HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03

或HLA-A01。

【0015】 本發明又另一目的為提供於自身表面上呈現HLA抗原與本發明胜肽之複合體之經單離之APC。本發明更提供將本發明之胜肽作為標靶之已單離之CTL。該等APC及CTL可用在對付表現KOC1之癌之免疫療法。本發明中，作為免疫療法之對象之癌，例如以同型或異型具有HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03或HLA-A01之患者之癌。亦即本發明提供表現KOC1以及選自HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01中之至少一種HLA抗原之癌之免疫療法。

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

【0017】 如上述所述，此外，本發明之其他目的及特徵將合併附帶的圖表及實施例於以下詳細說明，而能被充分明瞭。但前述發明內容及以下之詳細說明均為例示態樣，應理解為不限定為本發明或本發明之其他替代態樣。尤其，本發明將參照一些特定態樣於本說明書說明，但此說明係例證本發明，應理解為不作為限定本發明構成。該技術領域中有通常知識者可在不脫離附帶之申請專利範圍記載之本發明之精神及範圍而想到各種變更及適用。同樣，本發明之其他目的、特徵、利益、及優點將由本概要及以下記載之特定態樣而明白，對於該技術領域中有通常知識者而言，可輕易地明白。如此的目的、特徵、利益、及優點可和附帶實施例、資料、圖表、及由此引出的各種妥當推論一起，而考慮上述單獨或納入本說明書之參考文獻而明白。

【圖式簡單說明】

【0018】

第1圖顯示使用來自KOC1的胜肽誘導之CTL之IFN-γ酵素連結免疫點(ELISPOT)分析結果，包括照片(a)~(e)。使用KOC1-A11-9-415(序列編號：5)之井編號#6(a)、使用KOC1-A11- 10-414(序列編號：28)之井編號#4(b)、使用KOC1-A11-10-204 (序列編號：30)之井編號#5(c)及使用KOC1-A11-10-14(序列編號：32)之井編號#8(d)之CTL，和對照比較顯示較強力之IFN-γ產生。該等照片之井上之四個角代表為了建立CTL株，使來自對應井之細胞增殖。對照地，作為未顯示專一性IFN-γ產生的典型的陰性數據的例子，顯示KOC1-A11-9-258(序列編號：1)(e)。圖中，「＋」代表以適切胜肽衝擊(pulse)的標靶細胞對應的IFN-γ產生，「-」未經任一胜肽衝擊之標靶細胞之IFN-γ產生。

第2圖顯示實證以KOC1-A11-9-415(序列編號：5)(a)、KOC1-A11-10-204(序列編號：30)(b)或KOC1-A11-10-14(序列編號：32)(c)衝擊之CTL株之IFN-γ產生之IFN-γ酵素連結免疫吸附測定法(ELISA)之結果，包括一連串折線圖(a)~(c)。該等結果實際驗證：經各胜肽衝擊所建立之CTL株和對照比較，顯示較強力之IFN-γ產生。圖中，「＋」代表經適切胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。R/S比，代表：為應答細胞(Responder cells)之CTL株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

第3圖顯示從經KOC1-A11-9-415(序列編號：5)或KOC1- A11-10-14(序列編號：32)衝擊之CTL株利用極限稀釋建立之CTL選殖體之IFN-γ產生，包括折線圖(a)及(b)。該等結果實際驗證：利用各胜肽衝擊而建立之CTL選殖體，和對照比較，顯示較強力之IFN-γ產生。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應

之IFN-γ產生、「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。R/S比代表為應答細胞(Responder cells)之CTL株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

第4圖顯示針對表現KOC1及HLA-A*1101兩者之標靶細胞之專一性CTL活性之折線圖。製備轉染HLA-A*1101或全長KOC1基因中任一者而得之COS7細胞作為對照。使用KOC1-A11-10-14(序列編號：32)建立之CTL選殖體，對於已轉染KOC1及HLA-A*1101兩者而得之COS7細胞顯示專一性CTL活性(黑菱形)。另一方面，對於轉染HLA-A*1101(白三角)或KOC1(白圓)中任一者而得之標靶細胞未顯示顯著的專一性CTL活性。

第5圖顯示使用來自KOC1的胜肽誘導的CTL的IFN-γ ELISP8OT分析結果，包括照片(a)~(l)。使用KOC1-A33-9-543（序列編號：61)之井編號#1(a)、使用KOC1-A33-9-282(序列編號：62)之井編號#2(b)、使用KOC1-A33-9-317(序列編號：63)之井編號#3(c)、使用KOC1-A33-9-485(序列編號：64)之井編號#8(d)、使用KOC1-A33-9-286(序列編號：67)之井編號#3(e)、使用KOC1-A33-9-34(序列編號：74)之井編號#8(f)、使用KOC1- A33-10-542(序列編號：77)之井編號#4(g)、使用KOC1-A33-10- 281(序列編號：52)之井編號#3(h)、使用KOC1-A33-10-543(序列編號：79)之井編號#6(i)、使用KOC1-A33-10-424(序列編號：80)之井編號#1(j)及使用KOC1-A33-10-285(序列編號：85)之井編號#5(k)之CTL，和對照比較顯示較強力之IFN-γ產生。該等照片之井上之四角顯示為了建立CTL株，來自對應井之細胞增殖。對照地，顯示KOC1-A33-9-517(序列編號：4)(l)作為未呈專一性IFN-γ產生的典型的陰性數據之例。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。

第6圖係顯示經KOC1-A33-9-543(序列編號：61)(a)、KOC1-A33-9-282(序列編號：62)(b)、KOC1-A33-9-485(序列編號：64)(c)、KOC1-A33-9-286(序列編號：67)(d)、

KOC1-A33-10- 542(序列編號：77)(e)或KOC1-A33-10-281(序列編號：52)(f)衝擊之CTL株之IFN-γ產生之IFN-γ ELISA之結果，包括一連折線圖(a)~(f)。該等結果實際驗證：利用各胜肽衝擊而建立之CTL株，和對照比較，顯示較強力之IFN-γ產生。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。R/S比代表為應答細胞(Responder cells)之CTL株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

第7圖係顯示由經KOC1-A33-9-543(序列編號：61)(a)、KOC1-A33-9-282(序列編號：62)(b)、KOC1-A33-9-485(序列編號：64)(c)、KOC1-A33-9-286(序列編號：67)(d)、KOC1-A33-10- 542(序列編號：77)(e)或KOC1-A33-10-281(序列編號：52)(f)衝擊之CTL株利用極限稀釋建立之CTL選殖體之IFN-γ產生，包括一連串折線圖(a)~(f)。該等結果實際驗證：利用各胜肽衝擊而建立之CTL選殖體，和對照比較，顯示較強力之IFN-γ產生。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。R/S比代表為應答細胞(Responder cells)之CTL株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

第8圖顯示針對表現KOC1及HLA-A*3303兩者之標靶細胞之專一性CTL活性，包括一連串折線圖(a)~(c)。製備轉染了HLA-A*3303或全長KOC1基因中任一者的COS7細胞作為對照。使用KOC1-A33-9-485(序列編號：64)(a)、KOC1-A33-9-286(序列編號：67(b)及KOC1-A33-10-542(序列編號：77)(c)建立之CTL選殖體，對於經KOC1及HLA-A*3303兩者轉染的COS7細胞顯示專一性CTL活性(黑菱形)。另一方面，對於已轉染HLA-A*3303(白三角)或KOC1(白圓)中任一者的標靶細胞未顯示顯著專一性CTL活性。

第9圖顯示使用來自KOC1的胜肽誘導而得之CTL之IFN-γ ELISPOT分析結果，包

括照片(a)~(d)。使用KOC1-A03- 10-120(序列編號：27)之井編號#5(a)、使用KOC1-A03-10-204 (序列編號：30)之井編號#3(b)及使用KOC1-A03-10-281(序列編號：52)之井編號#5(c)之CTL，和對照比較顯示較強力之IFN-γ產生。該等照片之井上之四個角，顯示為了建立CTL株使來自對應井之細胞增殖。對照地，顯示KOC1-A03-10-414(序列編號：28)(d)作為未顯示專一性IFN-10γ產生的典型的陰性數據的例子。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。

第10圖顯示實際驗證經KOC1-A03-10-120(序列編號：27)衝擊之CTL株之IFN-γ產生之IFN-γ ELISA之結果，包括一連串折線圖。此等結果實際驗證由於各胜肽所致衝擊而建立之CTL株比起對照顯示較強力之IFN-γ產生。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。R/S比代表為應答細胞(Responder cells)之CTL株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

第11圖顯示從經KOC1-A03-10-120(序列編號：27)衝擊之CTL株利用極限稀釋建立之CTL選殖體之IFN-γ產生之折線圖。該等結果實際顯示：由各胜肽所致衝擊而建立之CTL選殖體，和對照比較顯示較強力之IFN-γ產生。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。R/S比代表為應答細胞(Responder cells)之CTL選殖體之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

第12圖顯示針對表現KOC1及HLA-A*0301兩者之標靶細胞之專一性CTL活性之折線圖。製備已轉染HLA-A*0301或全長KOC1基因中任一者之COS7細胞作為對照。使用KOC1-A03-10-120(序列編號：27)建立之CTL選殖體對於已轉染KOC1及HLA-A*0301兩者之COS7細胞顯示專一性CTL活性(黑菱形)。另一方面，對於已轉染HLA-A*0301(白三角)或KOC1(白圓)中任一者之標靶細胞未顯示顯著專

一性CTL活性。

第13圖顯示使用來自KOC1的胜肽誘導之CTL之IFN-γ ELISPOT分析結果，包括照片(a)~(h)。使用KOC1-A01-9-96(序列編號：86)之井編號#2(a)、使用KOC1-A01-9-118(序列編號：87)之井編號#4(b)、使用KOC1-A01-9-404(序列編號：90)之井編號#3(c)、使用KOC1-A01-9-402(序列編號：92)之井編號#4(d)、使用KOC1-A01-10-312(序列編號：46)之井編號#7(e)、使用KOC1-A01-10-402(序列編號：95)之井編號#1(f)及使用KOC1-A01-10-535(序列編號：41)之井編號#1(g)中之CTL，和對照比較顯示較強力之IFN-γ產生。該等照片之井上之四個角顯示為了建立CTL株，使來自對應井之細胞增殖。對照地，顯示KOC1-A01-9-536(序列編號:13)(h)作為未顯示專一性IFN-γ產生之典型的陰性數據的例子。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。

第14圖顯示實際驗證經KOC1-A01-9-96(序列編號：86)(a)或KOC1-A01-9-118(序列編號：87)(b)衝擊之CTL株之IFN-γ產生之IFN-γ ELISA之結果，包括一連串折線圖(a)及(b)。此等結果實際驗證利用各胜肽所致衝擊建立之CTL株和對照比較，顯示較強力的IFN-γ產生。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生，「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。R/S比代表為應答細胞(Responder cells)之CTL株之細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

第15圖顯示由經KOC1-A01-9-96(序列編號：86)衝擊之CTL株利用極限稀釋建立之CTL選殖體之IFN-γ產生之折線圖。此結果實際驗證：利用各胜肽所致衝擊建立之CTL選殖體，相比於對照顯示較強力之IFN-γ產生。圖中，「＋」代表經適當胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生、「-」代表未經任一胜肽衝擊之標靶細胞所對應之IFN-γ產生。R/S比代表為應答細胞(Responder cells)之CTL選殖體之

細胞數與為刺激細胞(Stimulator cells)之標靶細胞之細胞數之比。

第16圖顯示針對表現KOC1及HLA-A*0101兩者之標靶細胞之專一性CTL活性之折線圖。製備已轉染HLA-A*0101或全長KOC1基因中任一者之COS7細胞作為對照。使用KOC1-A01-9-96(序列編號：86)建立之CTL選殖體，對於已轉染KOC1及HLA-A*0101兩者之COS7細胞顯示專一性CTL活性(黑菱形)。另一方面，對於已轉染HLA-A*0101(白三角)或KOC1(白圓)中任一者之標靶細胞，未顯示顯著專一性CTL活性。

【實施方式】

【0019】 態樣之說明

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

【0020】 I.定義

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

關於物質(例如：胜肽、抗體、多核苷酸等)使用之「經單離之」及「經精製之」的用語，若該物質並非如此，則指實質上不含天然源中可能含有之至少1種物質。因此經單離或精製之胜肽，係指實質上不含此胜肽來源之細胞或組織源而來的其他細胞材料，例如糖質、脂質及其他混入蛋白質之胜肽。又，胜肽係以化學合成時，經單離或精製之胜肽係指實質上不含前驅體物質或其他化學物

質之胜肽。「實質不含細胞材料」之用語，係指包括從其單離之細胞或重組產生之細胞之細胞成分已分離出胜肽之胜肽之製備物。因此實質不含細胞材料之胜肽，包括含有未達約30%、20%、10%、5%、3%、2%或1%(乾燥重量基準)之其他細胞材料之胜肽之製備物。將胜肽重組時，經單離或精製之胜肽實質不含培養培養基，實質不含培養培養基之胜肽以胜肽製備物容量之未達約20%、10%、或5%、3%、2%或1%(乾燥重量基準)含有包括培養培養基之胜肽之製備物。將胜肽化學合成時，經單離或精製之胜肽實質不含前驅體物質及其他化學物質，實質不含前驅體物質及其他化學物質之胜肽，包括以胜肽製備物容量之未達約30%、20%、10%、5%、3%、2%或1%(乾燥重量基準)含有前驅體物質及其他化學物質之胜肽製備物。特定胜肽製備物是否為經單離或精製之胜肽，例如可以利用十二基硫酸鈉(SDS)-聚丙烯醯胺凝膠電泳及凝膠之考馬思亮藍染色等後出現單一帶以確認。理想態樣中，本發明之胜肽及多核苷酸係經單離或精製。

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

【0022】 本說明書使用之「胺基酸」之用語係指天然胺基酸、及和天然胺基酸同樣地作用的胺基酸類似體及胺基酸模倣體。天然胺基酸係指以基因密碼子編碼的胺基酸、及於細胞內進行轉譯後修飾而得之胺基酸(例如：羥基脯胺酸、γ-羧基麩胺酸、及O-磷絲胺酸等)。「胺基酸類似體」之用語，係指和天然胺基酸有相同的基本化學結構(氫、羧基、胺基、及鍵結於R基之α碳)但具有經修飾之R基或經修飾之骨架之化合物(例如：高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞碸、及甲硫胺酸甲基銃等)。「胺基酸模倣體」之用語係始和一般的胺基酸有相異之結構，但和胺基酸有同樣機能之化合物。胺基酸可為L-胺基酸或D-胺基酸中任一

者，但本發明之胜肽宜為L-胺基酸之聚合物較佳。

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

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

【0025】 若無特殊記載，「癌」之用語係指過度表現KOC1基因之癌，其例可列舉：膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤及睪丸癌等，但不限於此等。又，於例示的態樣，「癌」係表現KOC1以及HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及/或HLA-A01之癌。

【0026】 若無特別指明，「細胞傷害性T淋巴球」、「細胞傷害性T細胞」、及「CTL」之用語在本說明書中可互換地使用，若無特殊限定，係指認識非自我細胞(例如：腫瘤/癌細胞、病毒感染細胞)且可誘導如此之細胞之死滅之T淋巴球之亞群。

【0027】 若無特別指明，「HLA-A11」之用語係指包括HLA-A*1101、

HLA-A*1102、HLA-A*1103、HLA-A*1104等次型之HLA-A11型。

【0028】 若無特別指明，「HLA-A33」之用語係指包括HLA- A*3303、HLA-A*3301、HLA-A*3304等次型之HLA-A33型。

【0029】 若無特別指明，「HLA-A03」之用語係指包括HLA- A*0301、HLA-A*0302、HLA-A*0305等次型之HLA-A03型。

【0030】 若無特別指明，「HLA-A01」之用語係指包括HLA-A*0101、HLA-A*0102、HLA-A*0103、HLA-A*0104等次型之HLA-A01型。

【0031】 於和對象或患者之關連，本說明書使用之「對象之(或患者之)HLA抗原為HLA-A11」之表達，係指對象或患者以同質接合的或異質接合的保有作為MHC(主要組織適合複合體)第I類分子之HLA-A11抗原基因，且HLA-A11抗原在對象或患者之細胞表現為HLA抗原。同樣地，本說明書使用之「對象之(或患者之)HLA抗原為HLA-A33」、「對象之(或患者之)HLA抗原為HLA-A03」及「對象之(或患者之)HLA抗原為HLA-A01」之表達，係指各對象或患者以同質接合的或異質接合的保有作為MHC(主要組織適合複合體)第I類分子之HLA-A33抗原基因，且HLA-A33抗原在對象或患者之細胞表現作為HLA抗原，對象或患者同質接合的或異質接合的保有作為MHC(主要組織適合複合體)第I類分子之HLA-A03抗原基因且HLA-A03抗原在對象或患者之細胞表現作為HLA抗原，及對象或患者同質接合的或異質接合的保有作為MHC(主要組織適合複合體)第I類分子之HLA-A01抗原基因且HLA-A01抗原在對象或患者之細胞表現作為HLA抗原。

【0032】 本發明之方法及組合物只要是在和癌之「治療」之關連為有用，則治療會帶來臨床的益處，例如對象之癌之大小、廣度、或轉移能力減少、癌之進行延遲、癌之臨床症狀之緩和、生存期間之延長、術後之癌再發之抑制等時，視為治療「有效」。當治療係預防性地適用時，「有效」係指由於治療而

使癌形成延遲或受妨礙，或癌之臨床症狀受妨礙或緩和。有效性係相關於診斷或治療特定腫瘤之種類之任意公知方法而決定。

【0033】 本發明之方法及組合物只要是在癌「預防」之關連方面為有用即可，「預防」之用語在本說明書包括因癌導致之死亡率或罹患率之負荷減輕之任意作用。預防可於「第一次、第二次、及第三次之預防層級」實施。第一次之預防係避免發生疾病，第二次及第三次層級之預防係指預防疾病進行及症狀出現，此外，包括使機能回復，且使疾病關連之合併症減少，藉此使現有疾病之不利影響減少為目的之作用。或預防可包括緩和特定機能損害之重症度緩和，例如為了使腫瘤之增殖及轉移減少之廣範圍之預防性治療。

【0034】 和本發明之關連方面，癌治療及/或預防、及/或術後之其再發之預防，包括癌細胞之增殖阻礙、腫瘤之退化或退縮、舒解之誘導及癌發生之抑制、腫瘤退縮、及轉移減少或阻礙、癌術後之癌再發抑制、及生存期間之延長等事例中之任一者。癌之有效治療及/或預防，係使死亡率減少，改善有癌之個體之預後，並使血中之腫瘤標記之水平降低，且緩和能隨癌檢測之症狀。例如：症狀之減輕或改善構成有效的治療及/或預防，且包括10%、20%、30%、或更多之減輕或症狀安定之狀態。

【0035】 於和本發明之關連中，「抗體」之用語係指會和指定蛋白質或其胜肽專一性地反應之免疫球蛋白及其片段。抗體可包括人抗體、靈長類化抗體、嵌合抗體、雙專一性抗體、人化抗體、其與其他蛋白質或和放射標識融合成之抗體、及抗體片段。再者，本說明書中，「抗體」係廣義地使用，具體而言，包括完整的單株抗體、多株抗體、由2種以上之完整抗體形成之多重專一性抗體(例如：雙專一性抗體)，並且只要顯示所望之生物活性即可，包括抗體片段。「抗體」可為任一類別(例如：IgA、IgD、IgE、IgG、及IgM)的抗體。

【0036】 若無特別指明，本說明書使用之技術用語及科學用語皆具有和本

發明所屬之發明所屬之技術領域之人士共通理解之用語為相同之含意。

【0037】 II.胜肽

HLA-A11及HLA-A33是亞洲人種之中常見之對偶基因(Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50:201-12)，HLA-A03及HLA-A01是白人之中常見的對偶基因(Cao et al.,Hum Immunol 2001;6182(9):1009-30)。所以，藉由提供由HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03或HLA-A01拘束之來自KOC1的CTL誘導性胜肽，可對於眾多亞洲人或白人提供表現KOC1之癌之有效治療方法。因此，本發明提供能以HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03或HLA-A01拘束性之樣式誘導CTL之來自KOC1的胜肽。

【0038】 本發明之胜肽係能以HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03或HLA-A01拘束性之樣式誘導CTL之來自KOC1的胜肽。作為能以HLA-A11拘束性之樣式誘導CTL之胜肽可列舉具有選自序列編號：5、28、30及32之胺基酸序列之胜肽。同樣地，作為能以HLA-A33拘束性之樣式誘導CTL之胜肽，可列舉具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽。同樣地，作為能以HLA-A03拘束性之樣式誘導CTL之胜肽，可列舉具選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽。同樣地，作為能以HLA-A01拘束性之樣式誘導CTL之胜肽，可列舉具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41中之胺基酸序列之胜肽。

【0039】 藉由以經該等胜肽衝擊之樹狀細胞(dendritic cell; DC)所為之T細胞之試管內之刺激，可建立對於該等胜肽有專一性細胞傷害活性之CTL。建立之CTL對於經各胜肽衝擊之標靶細胞顯示專一性細胞傷害活性。

【0040】 KOC1基因在癌細胞，例如膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤及睪

丸癌等癌細胞過度表現，但在大部分正常器官不表現，故係用於免疫療法之優良標靶。因此，本發明之胜肽適合用在癌免疫療法。理想胜肽為九胜肽(由9個胺基酸殘基構成之胜肽)或十胜肽(由10個胺基酸殘基構成的胜肽)，由選自序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列構成之胜肽更理想。例如：有序列編號：32記載之胺基酸序列之胜肽，適合誘導針對表現HLA-A11與KOC1之細胞呈專一性細胞傷害活性之CTL，適合用在HLA-A11陽性患者之癌之免疫療法。又，例如具有選自序列編號：64、67及77中之胺基酸序列之胜肽，適合誘導針對表現HLA-A33與KOC1之細胞呈專一性細胞傷害活性之CTL，適合用在HLA-A33陽性患者之癌之免疫療法。又例如：具序列編號：27記載之胺基酸序列之胜肽，適合誘導針對表現HLA-A03與KOC1之細胞呈專一性細胞傷害活性之CTL，可理想地使用在HLA-A03陽性患者之癌之免疫療法。又例如：具序列編號：86記載之胺基酸序列之胜肽，適合誘導針對表現HLA-A01與KOC1之細胞呈專一性細胞傷害活性之CTL，可理想地使用在HLA-A01陽性患者之癌之免疫療法。於更理想的態樣，本發明之胜肽係包括選自序列編號：32、64、67、77、27及86中之胺基酸序列的胜肽。

【0041】 本發明之胜肽，只要結果生成成之胜肽保持原有胜肽CTL誘導能力即可，本發明之胜肽之胺基酸序列可以和附加的胺基酸殘基相鄰。附加的胺基酸殘基只要是無損原本胜肽之CTL誘導能力即可，可由任意種類之胺基酸構成。所以，本發明之胜肽包括選自序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41中之胺基酸序列之具CTL誘導能力之胜肽。如此之胜肽例如未達約40個胺基酸，時常未達約20個胺基酸，通常未達約15個胺基酸。因此本發明之胜肽若原本胜肽為九胜肽，包括於使該胜肽和20個附加胺基酸相鄰而成之10個胺基酸長、或11~40個胺基酸

長之胜肽。又，若原本胜肽為十胜肽，則包括使該胜肽和附加的胺基酸相鄰而成之11~40個胺基酸長之胜肽。如此之胜肽例如為11~20個胺基酸長之胜肽，可為11~15個胺基酸長之胜肽。附加的胺基酸殘基的理想例，為KOC1之全長胺基酸序列(例如：序列編號：110)中之和本發明之胜肽之胺基酸序列相鄰之胺基酸殘基。因此本發明之胜肽包括係含有選自序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41中之胺基酸序列之KOC1之胜肽片段且有CTL誘導能力之胜肽。

【0042】 一般，在某胜肽中之1個、2個、或更多胺基酸之改變不會影響該胜肽之機能，視情形反而可能使原本胜肽之所望機能增強。實際上，和改變胜肽(亦即，和原本之參照序列比較，有1個、2個、或數個胺基酸殘基改變(亦即，取代、缺失、插入及/或加成)之胺基酸序列構成之胜肽)已知會保持原本胜肽之生物活性(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6；Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500；Dalbadie-McFarland etal., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。因此一態樣中，本發明之胜肽包括對於選自序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41中之胺基酸序列有1個、2個、或數個胺基酸取代、缺失、插入及/或加成而得之胺基酸序列，且為可能有CTL誘導能力之胜肽。

【0043】 該技術領域中有通常知識者可認識有保存原本胺基酸側鏈特性之傾向之單一胺基酸或只變更少許比例之胺基酸之對於胺基酸序列之各個取代。此等常稱為「保守性取代」或「保守性改變」，利用「保守性取代」或「保守性改變」所致之蛋白質之改變，可能產生和原本蛋白質有類似機能之改變蛋白質。揭示機能類似之胺基酸之保守性取代之表，在該發明所屬之技術領域中為周知。機能上類似之胺基酸側鏈之特性之例，例如包括疏水性胺基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性胺基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、

T)、及共通有以下之官能基或特徵之側鏈：脂肪族側鏈(G、A、V、L、I、P)；含羥基之側鏈(S、T、Y)；含硫原子之側鏈(C、M)；含羧酸及醯胺之側鏈(D、N、E、Q)；含鹼之側鏈(R、K、H)；及含芳香族之側鏈(H、F、Y、W)。此外，以下8個群包括該發明所屬技術領域認知的彼此為保守性取代的胺基酸：

1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；

2) 天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；

3) 天冬醯胺酸(N)、麩醯胺酸(Q)；

4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；

5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；

6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；

7) 絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；及

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

【0044】 如此的保守性改變胜肽也包括在本發明之胜肽。但是本發明之胜肽不限定於此等，只要改變胜肽保持原本胜肽之CTL誘導能力，即包括在非保守性改變。且，改變胜肽不排除來自KOC1之多型變異體、種間相同體、及對立基因之可誘導CTL之胜肽。

【0045】 只要能保持原本胜肽之CTL誘導能力即可，可改變少數(例如：1個、2個、或數個)或少比例之胺基酸(亦即，取代、缺失、插入及/或加成)。本說明書中，「數個」之用語係指5個或更少胺基酸，例如4個或3個或更少。改變之胺基酸之比例，較佳為20%或更少，更佳為15%或更少，又更佳為10%或更少，或1~5%。

【0046】 於和免疫療法關連使用時，本發明之胜肽較佳為以和HLA抗原之複合體的形式於細胞或外吐小體之表面上呈現。故本發明之胜肽宜對於HLA抗原有高結合親和性較佳。所以，也可利用胺基酸殘基之取代、缺失、插入及/或

加成而改變胜肽，而獲得結合親和性有所改善之改變胜肽。利用向HLA抗原之結合而呈現之胜肽之序列之規則性為已知(Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9; Takiguchi, et al., Tissue Antigens 2000: 55: 296-302.)，可將基於如此之規則性之改變導入到本發明之胜肽。

【0047】 例如對於HLA第I類有結合性之胜肽，一般從N末端起第2號胺基酸及C末端之胺基酸常是涉及向HLA第I類之結合之錨定殘基(Rammensee HG, et al., Immunogenetics. 1995;41(4):178-228.)。例如：HLA-A11中，已知：N末端起第2號胺基酸為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸及酪胺酸，C末端之胺基酸為離胺酸及精胺酸，為對於HLA- A11之結合親和性高之錨定殘基(Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9)。再者，HLA-A11中，自N末端起第3號及7號位置具有輔助的錨定殘基，且自N末端第3號胺基酸宜為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸、及丙胺酸，自N末端第7號胺基酸已知白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸及苯丙胺酸為較佳(Falk, et al23., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9)。所以，為了使HLA-A11結合親和性維持或增大，將N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸，及/或將C末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸有可能為理想。再者，將N末端起第3號胺基酸取代為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸、或丙胺酸、及/或將N末端起第7號胺基酸取代為白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸有可能亦為理想。因此包括選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸、N末端起第3號之胺基酸取代為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸、丙胺酸、N末端起第7號之胺基酸取代為白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈

胺酸或苯丙胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽，包括在本發明之胜肽。理想態樣中，本發明之胜肽可為選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列中，由N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸、N末端起第3號之胺基酸取代為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸或丙胺酸、N末端起第7號之胺基酸取代為白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸之胺基酸序列構成的有CTL誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽包括對於選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列實施以下(a)~(d)之中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列之具CTL誘導能力之胜肽：(a)N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸；(b)N末端起第3號之胺基酸取代為白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸或丙胺酸；(c)N末端起第7號之胺基酸取代為白胺酸、異白胺酸、酪胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸；及(d)C末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸。

【0048】 於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列進行上述(a)~(d)之中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。本發明中，理想取代之數為選自上述(a)~(d)之1個、2個、3個或4個取代。

【0049】 又，本發明之胜肽可為包括選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽。較佳為本發明之胜肽可為由選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽可為包

括對於選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列實施以下(a)及(b)之中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽：

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

(b)C末端之胺基酸取代為離胺酸或精胺酸。

【0050】 於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列實施從上述(a)~(b)中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。於理想態樣，N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸或白胺酸。

【0051】 HLA-A33中，作為N末端起第2號胺基酸之苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸及纈胺酸、作為C末端之胺基酸之精胺酸及離胺酸，已知是對於HLA-A33之結合親和性高之錨定殘基(Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41;Takiguchi, et al., Tissue Antigens 2000: 55: 296-302.)。再者，HLA-A33中，已知N末端起第1號之胺基酸殘基已知作為錨定殘基之機能，N末端起第1號之胺基酸已知天冬胺酸及麩胺酸為較佳(Falk, et al., Immunogenetics1994 40 232-41; Takiguchi, et al., Tissue Antigens 2000: 55: 296-302.)。故為了使HLA-A33結合親和性維持或增大，N末端起第1號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸、N末端起第2號胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸或纈胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸有可能較理想。因此包括選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列中，N末端起第1號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸、N末端起第2號胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸或纈胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽包括在本發明之胜肽。於理想態樣，本發明之胜肽可為由選自

序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列中，N末端起第1號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸、N末端起第2號胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸或纈胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽包括具有對於選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列實施從以下(a)~(c)之中選出之1個以上之取代之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽：(a)N末端起第1號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸；(b)N末端起第2號胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸或纈胺酸；及(c)C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸。

【0052】 於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列實施從上述(a)~(c)之中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。本發明中，理想取代之數為選自上述(a)~(c)中之1個、2個、或3個取代。

【0053】 又，本發明之胜肽可為包括選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸或纈胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸、胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽。較佳為本發明之胜肽可為由選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸或纈胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。亦即本發明之胜肽可為包括對於選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列實施以下(a)及(b)之中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽：(a)N末端起第2號胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸

或纈胺酸；及(b)C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸。

【0054】 於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列實施從上述(a)及(b)中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。於更理想態樣，N末端起第2號胺基酸取代為苯丙胺酸或酪胺酸。

【0055】 HLA-A03中，已知作為N末端起第2號胺基酸之白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、及蘇胺酸、作為C末端之胺基酸之精胺酸、離胺酸、酪胺酸、及苯丙胺酸，為對於HLA-A03之結合親和性高之錨定殘基(Kubo RT.et al., J Immunol. 1994 Apr 15;152(8):3913-24; Sidney J et al., Hum Immunol. 1996 Feb;45(2):79-93; Gambacorti-Passerini C et al., Clin Cancer Res. 1997 May;3(5):675-83)。故為了使HLA-A03結合親和性維持或增大，N末端起第2號胺基酸取代為白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為精胺酸、離胺酸、酪胺酸、或苯丙胺酸有可能較理想。故包括選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為精胺酸、離胺酸、酪胺酸、或苯丙胺酸之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽包括在本發明之胜肽。於理想態樣，本發明之胜肽可為由選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為精胺酸、離胺酸、酪胺酸、或苯丙胺酸之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽包含具有對於選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列實施以下(a)及(b)之中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽：

(a) N末端起第2號胺基酸取代為白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸、丙胺酸、異白

胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸；及

(b) C末端之胺基酸取代為精胺酸、離胺酸、酪胺酸、或苯丙胺酸。

【0056】 於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列實施從上述(a)及(b)中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。於更理想態樣，N末端起第2號胺基酸取代為白胺酸、甲硫胺酸、或纈胺酸。本發明中，理想取代之數為選自上述(a)及(b)之1個或2個取代。

【0057】 HLA-A01中，作為N末端起第3號之胺基酸之天冬胺酸或麩胺酸、作為C末端之胺基酸之酪胺酸已知是對於HLA-A01之結合親和性高之錨定殘基。再者，於HLA-A01，已知N末端起第2號位置有輔助的錨定殘基且作為N末端起第2號胺基酸為蘇胺酸或絲胺酸較佳(Kubo,R.T Journal of Immunology 1994;152:3913、Gambacorti-Passerini,C.Clinical Cancer Research 1997;3:675-83、Falk,K.Immunogenetics 1994; 40:238-41)。故為了使HLA-A01結合親和性維持或增大，將N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為酪胺酸可能為理想。再者，N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸或絲胺酸可能為理想。因此包含選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸或絲胺酸、N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為酪胺酸之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽包括在本發明之胜肽。於理想態樣，本發明之胜肽可為由選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列中，N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸或絲胺酸、N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為酪胺酸之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽包括具有對於選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列實施從以下(a)~(c)之中選出之1個以上之取代而得

之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽：(a)N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸或絲胺酸；(b)N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸；及(c)C末端之胺基酸取代為酪胺酸。

【0058】 於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列實施從上述(a)~(c)之中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。本發明中，理想取代之數係選自上述(a)~(c)之1個、2個或3個取代。

【0059】 又，本發明之胜肽可為包括選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列中，N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為酪胺酸之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽。較佳為本發明之胜肽可為由選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列中，N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸、及/或C末端之胺基酸取代為酪胺酸之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。亦即，本發明之胜肽可為包括對於選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列實施以下(a)及(b)之中選出之1個以上之取代而得之胺基酸序列之有CTL誘導能力之胜肽：(a)N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸；及(b)C末端之胺基酸取代為酪胺酸。

【0060】 於理想態樣，本發明之胜肽可為由對於選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列實施實施從上述(a)~(b)之中選出之1個以上之取代之胺基酸序列構成之有CTL誘導能力之胜肽。

【0061】 不只可對於錨定部位之胺基酸導入取代，也可對於胜肽的潛在的T細胞受體(TCR)認識部位導入取代。在一些研究，已實證例如CAP1、p53(264-272)、Her-2/neu(369-377)、或gp100(209-217)有胺基酸取代之胜肽和原本胜肽有同等活性或有更良好的活性(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-7,

1997、T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb1;168(3): 1338-47.、S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206、及S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-14)。

【0062】 本發明企圖能對於本發明之胜肽(例如：由選自序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41中之胺基酸序列構成之胜肽)之N末端及/或C末端附加1個、2個、或數個胺基酸。保持CTL誘導能力之如此之改變胜肽也包括在本發明。例如：對於由選自序列編號：32、64、67、77、27及86中之胺基酸序列構成之胜肽之N末端及/或C末端附加1個、2個、或數個胺基酸而得之胜肽，若和APC接觸，會被帶入APC內並經處理，成為由序列編號：32、64、67、77、27及86中選擇之胺基酸序列構成之胜肽。之後經過抗原呈現路徑而在APC之細胞表面呈現，可誘導CTL。亦即本發明之胜肽可為在N末端及C末端中任一者或兩者附加了1個、2個、或數個胺基酸之胜肽。

【0063】 但是胜肽之胺基酸序列和有不同機能之內因性或外因性蛋白質之胺基酸序列之一部分相同時，有可能誘發自體免疫損害及/或對特定物質之過敏症狀等副作用。因此為了避免胜肽之胺基酸序列和其他蛋白質之胺基酸序列為一致之狀況，宜使用可利用之資料庫實施相同性檢索較佳。從相同性檢索得知和對象胜肽比較，連1個或2個胺基酸不同之胜肽也不存在時，為了消除如此之副作用之危險，為了使HLA抗原和其之結合親和性增大，及/或為了使其之CTL誘導能力增大，可以改變該對象胜肽。

【0064】 本發明之胜肽之1個、2個、或數個胺基酸經改變之胜肽可預測能保持原本胜肽之CTL誘導能力，但宜關於改變胜肽確認CTL誘導能力較佳。本說明書中，「有CTL誘導能力之胜肽」係指利用經此胜肽刺激之APC誘導CTL之胜肽。「CTL之誘導」包括：向CTL之分化誘導、CTL活化之誘導、CTL增殖之誘

導、CTL之細胞傷害活性之誘導、CTL所致標靶細胞溶解之誘導、及CTL之IFN-γ產生增加之誘導。

【0065】 CTL誘導能力之確認可藉由誘導保有HLA抗原之APC(例如：B淋巴球、巨噬體、及樹狀細胞)，以胜肽刺激後和CD8陽性T細胞混合，之後測定由CTL釋放之針對標靶細胞之IFN-γ以進行。APC較佳為使用來自人末梢血單核白血球之樹狀細胞。反應系也可使用以表現HLA抗原之方式製得之基因轉殖動物。又，例如：也可以將標靶細胞以^{51}Cr等進行放射標定，從標靶細胞放出之放射活性算出經胜肽誘導之CTL之細胞傷害活性。或於經胜肽刺激之APC存在下，測定由CTL產生及放出之IFN-γ，並使用抗IFN-γ單株抗體將培養基上之抑制區(inhibition zone)予以可見化以評價CTL誘導能力。

【0066】 除了上述改變，本發明之胜肽只要是結果生成之連結胜肽可保持CTL誘導能力即可，也可以和其他胜肽連結。作為和本發明之胜肽連結之適當胜肽，例如來自TAA之CTL誘導性胜肽。又，也可以使本發明之胜肽彼此連結。在胜肽間之連結能使用之適當連結子在該發明所屬之技術領域為公知，例如可使用如AAY(P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK(序列編號：111)(R. P. M. Sutmuller et al., J Immunol.332000, 165: 7308-15)、或K(S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-6、K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-15)之連結子。胜肽能以各種配置(例如：連鎖狀、重複等)連結，也可連接3個以上的胜肽。

【0067】 本發明之胜肽只要結果生成之連結胜肽保持CTL誘導能力即可，可以和其他物質連結。能和本發明之胜肽連結之適當物質，例如：胜肽、脂質、糖或糖鏈、乙醯基、及天然或合成之聚合物等。本發明之胜肽只要無損CTL誘導能力，亦可進行糖鏈附加、側鏈氧化、或磷酸化等修飾。利用實施如此的種類的修飾，能給予附加的機能(例如：標靶化機能及送達機能)或使胜肽安定

化。

【0068】 例如在本發明所屬之技術領域中，為了使胜肽之活體內安定性提高，導入D-胺基酸、胺基酸模倣體、或非天然胺基酸為公知，此概念也可套用在本發明之胜肽。胜肽之安定性能以一些方法分析。例如可使用肽酶、及人血漿及血清等各種活體介質測試安定性(例如參照Verhoef et al., Eur J Drug MetabPharmacokin 1986, 11: 291-302)。

【0069】 再者，如上述，從1個、2個、或數個胺基酸殘基被取代、缺失、插入及/或附加而得之改變胜肽中，可篩選或選擇和原本胜肽比較為有相同或更高活性者。故本發明也提供篩選或選擇和原本比較為有相同或更高活性之改變胜肽之方法。具體而言，本發明提供篩選有CTL誘導能力之胜肽之方法，包括以下步驟：

(a) 製作對於由選自序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41中之胺基酸序列構成之原本胺基酸序列有1個、2個、或數個胺基酸殘基經取代、缺失、插入、及/或附加之胺基酸序列構成之候選序列；

(b) 於(a)製作之候選序列中之選擇和KOC1以外之任意公知人基因產物均無顯著相同性(序列同一性)之候選序列；

(c) 使由(b)選擇之候選序列構成之胜肽和APC接觸；

(d) 使(c)之APC和CD8陽性T細胞接觸；及

(e) 選擇和由原本胺基酸序列構成之胜肽有同等或更高CTL誘導能力之胜肽。

【0070】 本說明書中，本發明之胜肽也記載為「KOC1胜肽」或「KOC1多胜肽」。

【0071】 III.本發明之胜肽之製備

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

【0072】 本發明之胜肽只要不因修飾而損及原本胜肽之生物活性即可，可包括糖鏈附加、側鏈氧化、或磷酸化等修飾。其他例示的修飾，例如包括納入為了使該胜肽之血清半衰期延長可使用之D-胺基酸或其他胺基酸模倣體。

【0073】 可利用基於選擇之胺基酸序列之化學合成獲得本發明之胜肽。適於該合成之習知之胜肽合成法，例如包括如以下文獻記載之方法：

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

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

(iii)「胜肽合成」(日文), 丸善, 1975；

(iv)「胜肽合成之基礎與實驗」(日本語), 丸善, 1985；

(v)「醫藥品之開發」(日文), 續第14卷(胜肽合成), 廣川書店, 1991；

(vi) WO99/67288；及

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

【0074】 或也可套用為了產生胜肽之任意之公知之基因工程方法，獲得本發明之胜肽(例如：Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51；Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (Wu et al.) 1983, 101: 347-62)。例如：首先，製備包括編碼為能表現本發明之胜肽之形態(例如：相當於啟動子序列之調節序列之下游)之多核苷酸之適當載體，對於適當寄主細胞進行轉形。其次培養該寄主細

胞，使其產生發明之胜肽。或也可使用試管內轉譯系於試管內製作本發明之胜肽。

【0075】 IV.多核苷酸

本發明也提供編碼為本發明中任一胜肽之多核苷酸。此等包括來自天然KOC1基因(例如：GenBank存取編號NM_006547(序列編號：109))之多核苷酸、及具其保守性改變之核苷酸序列之多核苷酸。本說明書中，「經保守性改變之核苷酸序列」之用語，係指編碼為相同或本質相同之胺基酸序列之序列。由於基因密碼之冗餘(redundancy)，相同核酸會編碼為任意特定之蛋白質。例如：密碼子GCA、GCC、GCG、及GCU皆編碼為胺基酸之丙胺酸。因此於利用某密碼子指定丙胺酸之任意位置，能不使所編碼之多胜肽改變而將該密碼子變更為前述對應之任一密碼子。如此之核酸之變異為「靜默變異」，屬於一種保守性改變之變異。編碼為胜肽之本說明書中各種核酸序列也代表該核酸之各種可能的靜默變異。將核酸中之各密碼子(排除通常對於甲硫胺酸為唯一之密碼子AUG、及通常對於色胺酸為唯一之密碼子TGG)改變而獲得機能上相同分子的這一點，應為該技術領域中有通常知識者所認知的。因此編碼為胜肽之核酸之各靜默變異在揭示之各序列中非明示地記載。

【0076】 本發明之多核苷酸可以由DNA、RNA、及此等之衍生物構成。DNA由A、T、C、及G等鹼基適當地構成，RNA係將T替換為U。

【0077】 本發明之多核苷酸，能藉由在其間介隔或未介隔之胺基酸序列而編碼為本發明之多數胜肽。例如：介隔之胺基酸序列可提供多核苷酸或經轉譯之胜肽之切斷部位(例如酵素認識序列)。再者，多核苷酸可含有對於編碼為本發明之胜肽之編碼序列之任意附加序列。例如：多核苷酸可為包括對於胜肽之表現為必要之調節序列之重組多核苷酸，或可為有標記基因等之表現載體(例如：質體)。一般，可藉由使用例如聚合酶及內核酸酶之習知重組技術操作多核苷酸，

以製備出如此的重組多核苷酸。

【0078】 也可使用重組技術及化學合成技術中之任一者製作本發明之多核苷酸。例如可藉由插入到適當載體以製作多核苷酸，其當轉染到勝任細胞時可表現。或使用PCR技術或於適當寄主內之表現也可使多核苷酸放大(例如參照Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或也可使用Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311；Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5記載之固相技術來合成多核苷酸。

【0079】 V.外吐小體

本發明更提供在自身表面上呈現本發明之胜肽與HLA抗原之間形成之複合體的稱為外吐小體之細胞內小胞。外吐小體例如可使用日本特表平11-510507號及WO99/03499詳述之方法製備，可使用從成為治療及/或預防之對象之患者獲得之APC製備。本發明之外吐小體能以和本發明之胜肽同樣之樣式以疫苗的形式接種。

【0080】 前述複合體中所含之HLA抗原之型必須和必須治療及/或預防之對象的型一致。例如亞洲人族群中，HLA-A11(例如：HLA-A*1101)及HLA-A33(例如：HLA-A*3303)是亞洲人族群廣泛一般常見的對偶基因，據認為該等HLA抗原之型適合亞洲人患者之治療。又，HLA-A03(例如：HLA-A*0301)及HLA-A01(例如HLA-A*0101)是白人族群廣泛一般常見之對偶基因，據認為該等HLA抗原之型適合白人患者之治療。典型上，可藉由於臨床預先檢查須治療之患者之HLA抗原之型，適當選擇對於特定HLA抗原有高水平之結合親和性、或介隔特定HLA抗原之抗原呈現所獲致之有CTL誘導能力之胜肽。

【0081】 本發明之外吐小體係於其表面上呈現本發明之胜肽與HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03或HLA-A01之複合體。和本發明之胜肽形成複

合體之HLA為HLA-A11時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列構成之胜肽或其改變胜肽更佳。又，於和本發明之胜肽形成複合體之HLA為HLA-A33時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列構成之胜肽或其改變胜肽更佳。又，當和本發明之胜肽形成複合體之HLA為HLA-A03時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列構成之胜肽或其改變胜肽更佳。又，當和本發明之胜肽形成複合體之HLA為HLA-A01時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列構成之胜肽或其改變胜肽更佳。

【0082】 VI.抗原呈現細胞(APC)

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

【0083】 本發明之APC不限特定種類之細胞，包括已知以能被淋巴球認識之方式在自身之細胞表面上呈現蛋白質性抗原之細胞，例如樹狀細胞(dendritic cell：DC)、朗格罕細胞(Langerhans cell)、巨噬體、B細胞、及活化T細胞。DC為APC中之有最強力之CTL誘導作用之代表性APC，故DC宜作為本發明之APC

理想地使用。本發明中，理想之DC為來自人之經單離之DC。又，本發明之APC不須為均質者，也可為有抗原呈現機能之多種細胞之混合物，也可為呈現各不同之本發明之胜肽之APC之混合物。

【0084】 例如：可藉由從末梢血單核球將DC單離，然後將此等於試管內利用本發明之胜肽予以刺激，而獲得本發明之APC。本發明之胜肽對於對象投予時，呈現本發明之胜肽之APC會在該對象之體內被誘導。因此本發明之APC可藉由將本發明之胜肽對於對象投予後，從該對象將APC回收以獲得。或本發明之APC，可藉由使從對象回收之APC接觸本發明之胜肽而獲得。

【0085】 為了誘導對象中針對表現KOC1之癌細胞之免疫應答，可將本發明之APC單獨，或和包括本發明之胜肽、外吐小體、或CTL之其他藥劑而對於對象投予。例如：離體投予可包括以下步驟：

(a) 從第1對象回收APC、

(b) 使步驟(a)之APC和胜肽接觸、及

(c) 將步驟(b)之APC對於第2對象投予。

【0086】 第1對象與第2對象可以為同一個體或為不同個體。第1對象與第2對象不同個體時，第1對象與第2對象之HLA為同一型較佳。利用上述步驟(b)獲得之APC能成為用以治療及/或預防癌之疫苗。

【0087】 利用如上述方法獲得之本發明之APC具有CTL誘導能力。關於APC使用之「CTL誘導能力」之用語，係指APC當和CD8陽性T細胞接觸能夠誘導CTL之能力。再者，「CTL誘導能力」包括：APC誘導CTL活化之之能力、APC誘導CTL增殖之能力、APC促進CTL所致標靶細胞溶解之能力、及APC使CTL所致IFN-γ產生增加之能力。由本發明之APC誘導之CTL為針對KOC1為專一性之CTL，對於KOC1表現細胞呈現專一性細胞傷害活性。

【0088】 本發明之APC除了利用上述方法，也可利用將編碼為本發明胜肽

之多核苷酸於試管內導入到APC以製備。導入之多核苷酸可為DNA或RNA之形態。導入方法之例無特殊限定，包括脂質轉染法、電穿孔法、及磷酸鈣法等該技術領域中以往實施之各種各樣方法。更具體而言，可使用如Cancer Res 1996, 56: 5672-7；J Immunol 1998, 161: 5607-13;J Exp Med 1996, 184: 465-72；日本公表專利公報第2000-509281號記載之方法。藉由將編碼為本發明胜肽之多核苷酸導入到APC，該多核苷酸會在細胞內轉錄、轉譯等，然後生成之胜肽經MHC第I類處理，經過呈現路徑而在APC細胞表面呈現本發明之胜肽。

【0089】 於理想態樣，本發明之APC在自身之細胞表面上呈現形成於HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)、HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)、HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)或HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)與本發明之胜肽之間之複合體。和本發明之胜肽形成複合體之HLA為HLA-A11時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列構成之胜肽更理想。和本發明之胜肽形成複合體之HLA為HLA-A33時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列構成之胜肽更佳。和本發明之胜肽形成複合體之HLA為HLA-A03時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較理想，由選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列構成之胜肽更佳。和本發明之胜肽形成複合體之HLA為HLA-A01時，本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列構成之胜肽更理想。

【0090】 又，本發明之APC較佳為利用包括以下(a)或(b)記載之步驟之方

法誘導之APC：

(a) 使表現選自HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)、HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)、HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)及HLA-A01(更宜為HLA-A*0101)中之至少1種HLA之APC接觸本發明之胜肽；

(b) 對於表現選自於HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)、HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)、HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)及HLA-A01(更宜為HLA-A*0101)中之至少1種HLA之APC導入編碼為本發明胜肽之多核苷酸。

【0091】 和表現HLA-A11之APC接觸之本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列構成之胜肽更佳。

【0092】 和表現HLA-A33之APC接觸之本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基序列構成之胜肽更佳。

【0093】 和表現HLA-A03之APC接觸之本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列構成之胜肽更佳。

【0094】 和表現HLA-A01之APC接觸之本發明之胜肽宜為具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽較佳，由選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列構成之胜肽更佳。

【0095】 又，依照本發明，提供本發明之胜肽之用途，係用以製造誘導具CTL誘導能力之APC之藥學組合物。此外本發明提供用以製造誘導具CTL誘導能力之APC之藥學組合物之方法或步驟。再者，本發明提供用以誘導具CTL誘導能

力之APC之本發明之胜肽。

【0096】 VII.細胞傷害性T淋巴球(CTL)

由本發明之胜肽誘導之CTL，為了增強活體內將表現KOC1之癌細胞作為標靶之免疫應答，可以和本發明之胜肽同樣地作為疫苗使用。故本發明提供由本發明之胜肽誘導或活化之CTL。本發明之CTL係將本發明之胜肽作為標靶之CTL，係能和本發明之胜肽與HLA抗原之複合體結合之CTL。CTL向該複合體之結合，可介隔於CTL之細胞表面上存在之T細胞受體(TCR)實施。本發明之CTL可以為經單離之CTL。理想之CTL為來自人之經單離之CTL。又，本發明之CTL不須為均質，也可以為將各自不同之本發明之胜肽作為標靶之CTL之混合物。

【0097】 本發明之CTL可藉由以下步驟獲得：(1)將本發明之胜肽對於對象投予、或(2)於試管內以本發明之胜肽刺激來自對象之APC及CD8陽性T細胞、或末梢血單核球(peripheral blood mononuclear cell：PBMC)、或(3)使CD8陽性T細胞或PBMC試管內接觸在自身表面上呈現HLA抗原與本發明之胜肽之複合體之APC或外吐小體、或(4)將包括編碼為和於細胞表面上利用HLA抗原呈現之本發明之胜肽結合之T細胞受體(TCR)之各次單元之多核苷酸之載體導入到CD8陽性T細胞。上述(2)或(3)之方法使用之外吐小體及APC各可利用「V.外吐小體」及「VI.抗原呈現細胞(APC)」之章節記載之方法製備，上述(4)之方法之詳情記載於「VIII.T細胞受體(TCR)」之章節。

【0098】 本發明之CTL，可以對於成為治療及/或預防對象之患者單獨投予，或可為了調節效果而和包括本發明之胜肽、APC或外吐小體之其他藥物併用投予。又，本發明之CTL可以為從來自成為該CTL之投予對象之患者之CD8陽性T細胞誘導之CTL。本發明之CTL對於呈現和本發明之胜肽，例如本發明之CTL之誘導使用者為相同胜肽之標靶細胞專一性作用。標靶細胞可為如癌細胞般之內生地表現KOC1之細胞、或已轉染KOC1基因之細胞。本發明之胜肽所為之刺

激而在細胞表面上呈現該胜肽之細胞也可成為本發明之CTL之攻擊標靶。又，本發明之CTL之標靶細胞較佳為HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)、HLA-A33(更宜為HLA-A*3303)、HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)或HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)中之至少1者為陽性之細胞。

【0099】 於理想態樣，本發明之CTL針對表現選自HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)、HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)、HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)或HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)中之至少一者之HLA與KOC1兩者之細胞專一地靶向。本發明中，CTL所靶向之細胞可為以同型或異型地具有HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01對偶基因中之任一者的細胞。

【0100】 本說明書中，CTL對於細胞「靶向(targeting)」，是指CTL認識在細胞表面呈現HLA與本發明之胜肽之複合體之細胞，而對於該細胞呈現細胞傷害活性。又，「專一性靶向」，係指CTL對於該細胞呈現細胞傷害活性，但對於其他細胞則不呈現傷害活性。又，於和CTL之關連，「認識細胞」之用語係指介隔其TCR介而結合於在細胞表面呈現之HLA與本發明之胜肽之複合體，並對於該細胞呈專一性細胞傷害活性。因此本發明之CTL較佳為能介隔TCR而結合於細胞表面上所呈現之形成在HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)、HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)、HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)或HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)與本發明之胜肽之間之複合體的CTL。

【0101】 又，本發明之CTL較佳為利用包括以下(a)或(b)記載之步驟的方法誘導之CTL：

(a) 使CD8陽性T細胞於試管內接觸在自身表面上呈現HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)、HLA-A33(更佳為HLA- A*3303)、HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)或HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)與本發明之胜肽之複合體之APC或外吐小體；

(b) 對於CD8陽性T細胞導入編碼為能結合於在細胞表面上由HLA-A11(更佳

為 HLA-A*1101) 、 HLA-A33(更 佳 為 HLA-A*3303) 、 HLA-A03(更 佳 為 HLA-A*0301)或HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)呈現之本發明之胜肽之TCR之各次單元之多核苷酸。

【0102】 VIII.T細胞受體(TCR)

本發明又提供包括編碼為能結合於在細胞表面上由HLA抗原呈現之本發明之胜肽之TCR之各次單元之多核苷酸之組合物、及使用其之方法。該多核苷酸藉由表現能結合於利用HLA抗原而於細胞表面上呈現之本發明之胜肽之TCR，能對於CD8陽性T細胞給予針對表現KOC1之癌細胞之專一性。可利用該發明所屬之技術領域公知之方法鑑別編碼為作為以本發明之胜肽誘導的CTL之TCR次單元之α鏈及β鏈之多核苷酸(WO2007/032255、及Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如：為了分析TCR，PCR法為較佳。用於分析之PCR引子，例如可以於以下的5'側引子組合以下之3'側引子而成放大用引子組，但不限定於此。

5'側引子：

5'-R引子(5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3')(序列編號：105)

3'側引子：

對於TCRα鏈C區為專一性：

3-TRa-C引子(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3')(序列編號：106)

對於TCRβ鏈C1區為專一性：

463-TRb-C1引子(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3')(序列編號：107)、

或對於TCRβ鏈C2區為專一性：

3-TRβ-C2引子(5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3')(序列編號：108)

藉由將已鑑別之多核苷酸導入到CD8陽性T細胞而形成之TCR，能和呈現本發明胜肽之標靶細胞以高結合力結合，且能於活體內及試管內媒介呈現本發明之胜肽之標靶細胞之有效率的殺傷。

【0103】 編碼為TCR之各次單元之多核苷酸可納入到適當載體，例如反轉錄病毒載體。該等載體為該發明所屬之技術領域周知。可以將該多核苷酸或以可表現此等之形態包括該該多核苷酸之載體導入到CD8陽性T細胞，例如來自患者之CD8陽性T細胞。本發明藉由快速改變患者本身之T細胞(或來自其他對象之T細胞)，能提供可快速且輕易地製作有優良之癌細胞殺傷特性之改變T細胞之既成之組合物。

【0104】 本說明書中，專一性TCR係指當該TCR存在於CD8陽性T細胞表面上時，會專一地認識在標靶細胞表面上呈現之本發明之胜肽與HLA抗原之複合體，而給予對於標靶細胞之專一細胞傷害活性之TCR。上述複合體之專一認識可利用任意之公知方法確認，其理想例包括使用HLA分子及本發明之胜肽之HLA多聚體染色分析、及ELISPOT分析法。藉由實施ELISPOT分析，可以確認：導入有上述多核苷酸之T細胞可利用TCR而專一地認識標靶細胞、及信號已傳達到細胞內。上述TCR係於CD8陽性T細胞表面上存在時，可依公知方法確認：該TCR對於CD8陽性T細胞可給予標靶細胞專一性細胞傷害活性。理想方法包括例如：利用鉻釋出分析法等測定對於標靶細胞之細胞傷害活性。

【0105】 本發明於和HLA-A11之關連，提供利用對於CD8陽性T細胞將編碼為結合在具例如選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽的TCR的各次單元的多核苷酸進行轉導(transduction)以製備的CTL。

【0106】 本發明於和HLA-A33之關連，提供藉由對於CD8陽性T細胞將編碼為會和具例如選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽結合之TCR之各次單元的多核苷酸進行轉導以製備之CTL。

【0107】 又，本發明，於和HLA-A03之關連，提供藉由對於、CD8陽性T細胞將編碼為會和具有例如選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽

結合之TCR之各次單元之多核苷酸進行轉導以製備之CTL。

【0108】 又，本發明，於和HLA-A01之關連，提供藉由對於CD8陽性T細胞將編碼為和具有例如選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之胜肽結合之TCR之各次單元之多核苷酸進行轉導而製備之CTL。

【0109】 經轉導之CTL能於活體內復位(homing)，且可利用周知之試管內培養法使其增殖(例如：Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-61 (1989))。本發明之CTL可用於形成對於須治療或預防之患者之疾病之治療或預防有用之免疫原性組合物(參照WO2006/031221，其內容利用參照納入本說明書)。

【0110】 IX.藥學組合物

本發明並提供包括選自以下中之至少1種有效成分之組合物或藥學組合物：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以能表現本發明之胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 本發明之APC；

(d) 本發明之外吐小體；

(e) 本發明之CTL。

【0111】 本發明之藥學組合物除了上述有效成分，可不特別限制地視需要包括醫藥品通常使用之擔體、賦形劑等。可用於本發明之藥學組合物的擔體，例如滅菌水、生理食鹽水、磷酸緩衝液、培養液等。因此本發明提供包括選自以下(a)~(e)中之至少1種有效成分與藥學上可容許之擔體之藥學組合物：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以能表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 本發明之APC；

(d) 本發明之外吐小體；

(e) 本發明之CTL。

【0112】 再者，本發明之藥學組合物視需要可包括安定劑、懸浮液、保存劑、界面活性劑、溶解輔助劑、pH調整劑、凝聚抑制劑等。KOC1之表現，和正常組織比較，在癌細胞顯著上昇。故本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸可用於癌之治療及/或預防、及/或預防術後之癌再發。故本發明提供用於癌治療及/或預防、及/或預防術後之癌再發之藥學組合物且包含本發明之胜肽或多核苷酸之一或多種作為有效成分之組合物。或可為了作為藥學組合物，而將本發明之胜肽呈現於外吐小體或APC之表面上。此外，將本發明之任一胜肽作為標靶之本發明之CTL也可以作為本發明之藥學組合物之有效成分。本發明之藥學組合物可含有治療的有效量或藥學的有效量的上述有效成分。

【0113】 本發明之藥學組合物也可作為疫苗使用。在和本發明之關連中，「疫苗」(也稱為「免疫原性組合物」)之用語，係指對於動物接種時具有誘導帶來抗腫瘤作用之免疫應答之機能之組合物。因此本發明之藥學組合物可用於誘導帶來抗腫瘤作用之免疫應答。利用本發明之胜肽、多核苷酸、APC、CTL及藥學組合物誘導免疫應答只要是可帶來抗腫瘤作用之免疫應答即可，不特別限定，例示地包括對於癌細胞為專一性CTL之誘導、及對於癌細胞為專一性細胞傷害活性之誘導。

本發明之藥學組合物可用於人對象或患者中之癌治療及/或預防、及/或預防術後之癌再發。本發明之藥學組合物宜對於選自HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01中之至少1種HLA為陽性之對象使用。又，本發明之藥學組合物宜使用在表現選自HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01中之至少1種HLA及KOC1之癌之治療及/或預防、及/或預防術後之癌再發。

【0114】 於其他態樣，本發明更提供選自以下之有效成分之用途，係用於製造癌治療或預防之藥學組合物：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0115】 或本發明更提供用於癌治療或預防之選自以下之有效成分：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0116】 或本發明更提供用以製造治療或預防癌之藥學組合物之方法或步驟，包括將選自以下中之至少1種有效成分與藥學的或生理學上可容許之擔體加以製劑化之步驟：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0117】 於另一態樣，本發明更提供用以製造治療或預防癌之藥學組合物之方法或步驟，包括以下步驟：將選自以下之有效成分和藥學上或生理學上可容許之擔體混合之步驟：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0118】 於另一態樣，本發明提供用以治療或預防癌之方法，包括將選自以下之至少1種有效成分對於對象投予之步驟：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0119】 本發明中發現：具有選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽係能誘導強力且專一性免疫應答的HLA-A11拘束性抗原決定位胜肽。因此包括具選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之至少一種胜肽之本發明之藥學組合物，特別適合對於具有HLA-A11(例如：HLA-A*1101)作為HLA抗原之對象投予。同樣現象也可套用在包括編碼為該等任一胜肽之多核苷酸(亦即，本發明之多核苷酸)、呈現該等胜肽之APC或外吐小體(亦即本發明之APC或外吐小體)、及將該等胜肽作為標靶之CTL(亦即，本發明之CTL)之藥學組合物。亦即包含和具有選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽相關連之有效成分之藥學組合物，適於向具有HLA-A11之對象(亦即，HLA-A11陽性之對象)投予。於更理想態樣，本發明之藥學組合物係包括具序列編號：32之胺基酸序列之胜肽之藥學組合物。

【0120】 同樣地，本發明中發現：具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之之胺基酸序列之胜肽可作為能誘導強力且專一性免疫應答的HLA-A33拘束性抗原決定位胜肽。因此包括具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之至少一

種胜肽之本發明之藥學組合物，特別適合向具有HLA-A33(例如：HLA-A*3303)作為HLA抗原之對象投予。同樣現象也可套用在包含編碼為該等之任一胜肽之多核苷酸(亦即，本發明之多核苷酸)、呈現該等胜肽之APC或外吐小體(亦即本發明之APC或外吐小體)、及將該等胜肽作為標靶之CTL(亦即，本發明之CTL)之藥學組合物。亦即，包括和具選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽關連之有效成分之藥學組合物，適合向具有HLA-A33之對象(亦即，HLA-A33陽性之對象)投予。於更理想之態樣，本發明之藥學組合物係含有具有選自序列編號：64、67及77中之胺基酸序列之至少一種胜肽之藥學組合物。

【0121】 同樣地，本發明發現：具有選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽，係作為能誘導強力且專一性之免疫應答之HLA-A03拘束性抗原決定位胜肽。因此包含具選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之至少一種胜肽之本發明之藥學組合物，特別適合向具有HLA-A03(例如：HLA-A*0301)作為HLA抗原之對象投予。同樣現象也可套用在包含編碼為該等之任一胜肽之多核苷酸(亦即，本發明之多核苷酸)、呈現該等胜肽之APC或外吐小體(亦即本發明之APC或外吐小體)、及將該等胜肽作為標靶之CTL(亦即，本發明之CTL)之藥學組合物。亦即，包含和具選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽關連之有效成分之藥學組合物，適於向具有HLA-A03之對象(亦即，HLA-A03陽性之對象)投予。於更理想的態樣，本發明之藥學組合物係包括序列編號：27之胺基酸序列之胜肽之藥學組合物。

【0122】 同樣地，本發明發現：具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41中之之胺基酸序列之胜肽係作為能誘導強力且專一性免疫應答之HLA-A01拘束性抗原決定位胜肽。故包括具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之至少一種胜肽之之本發明之藥學組合物，特別

適合向具有HLA-A01(例如：HLA-A*0101)作為HLA抗原之對象投予。同樣的現象也套用在包含編碼為該等之任一胜肽之多核苷酸(亦即，本發明之多核苷酸)、呈現該等胜肽之APC或外吐小體(亦即，本發明之APC或外吐小體)、及將該等胜肽作為標靶之CTL(亦即，本發明之CTL)之藥學組合物。亦即，包含和具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之胜肽關連之有效成分之藥學組合物，適於向具有HLA-A01之對象(亦即，HLA-A01陽性之對象)投予。於更理想之態樣，本發明之藥學組合物係包含具有序列編號：86之胺基酸序列之胜肽之藥學組合物。

【0123】 利用本發明之藥學組合物治療及/或預防之癌只要是表現KOC1之癌即可，不特別限定，包括膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤及睪丸癌等。又，本發明之藥學組合物宜對於以同型或異型具有選自HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01中之HLA對偶基因之對象使用較佳。

【0124】 本發明之藥學組合物除了含有前述有效成分，也可含有具有誘導針對癌細胞之CTL之能力之其他胜肽(例如來自其他TAA之CTL誘導性胜肽)、編碼為該其他胜肽之其他多核苷酸、呈現該其他胜肽之其他細胞等。

【0125】 本發明之藥學組合物只要不妨礙本發明之胜肽等上述有效成分的抗腫瘤效果，也可任意含有其他治療物質作為有效成分。例如：本發明之藥學組合物可任意地含有抗發炎組合物、鎮痛劑、化學療法藥等。本發明之藥學組合物本身含有其他治療物質，除此以外也可將本發明之藥學組合物和一或多種其他藥學組合物連續或同時投予。本發明之藥學組合物及其他藥學組合物的投予量依存於例如：使用之藥學組合物之種類、治療之疾病、及投予之時程及路徑。

【0126】 本說明書中，應理解：除了具體言及的成分以外，本發明之藥學組合物也可含有考慮製劑之種類而該發明所屬之技術領域中慣例的其他成分。

【0127】 本發明也提供包含本發明藥學組合物之製品或套組。本發明之製品或套組可包括容納本發明藥學組合物之容器。適當容器，例如瓶、小玻璃瓶、及試驗管，但不限定於此。容器可由玻璃或塑膠等各種材料形成。容器可貼標，標籤可記載應使用本發明之藥學組合物之疾病或疾病狀態。標籤也可顯示關於投予等的指示。

【0128】 本發明之製品或套組除了容納本發明藥學組合物之容器以外，也可任意地含有容納藥學上可容許之稀釋劑之第2容器。本發明之製品或套組可更包含其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、注射針、針筒、及記載了使用說明的附帶文書等從商業上之觀點及使用者之觀點為理想的其他材料。

【0129】 視需要也可利用能含有包括有效成分之1或多數單位劑形之袋或分配器裝置來提供本發明之藥學組合物。該袋例如可包括如泡罩袋之金屬箔或塑膠箔。袋或分配器裝置可以附帶關於投予之說明書。

【0130】 (1)含有胜肽作為有效成分之藥學組合物

含有本發明胜肽之藥學組合物，若有必要可依習知製劑化法予以製劑化。本發明之藥學組合物，除了本發明之胜肽，可無特別限制地因應須要含有醫藥品通常使用之擔體、賦形劑等。本發明之藥學組合物能使用之擔體，例如滅菌水(例如：注射用水)、生理食鹽水、磷酸緩衝液、磷酸緩衝生理食鹽水、Tris-緩衝生理食鹽水、0.3%甘胺酸、培養液等。又，本發明之藥學組合物視需要可含有安定劑、懸浮液、保存劑、界面活性劑、溶解輔助劑、pH調整劑、凝聚抑制劑等。本發明之藥學組合物，因為能誘導針對表現KOC1之癌細胞之專一性免疫，故可用在癌治療或預防之目的。

【0131】 例如：本發明之藥學組合物可溶解於滅菌水(例如：注射用水)、

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

【0132】 本發明之藥學組合物，也可包括本發明胜肽之2種或更多種類之組合。胜肽之組合可採取混合胜肽之雞尾酒形態，或也可使用標準技術使胜肽彼此結合。例如：胜肽可化學結合、或表現成單一之融合多胜肽序列。藉由投予本發明之胜肽，該胜肽可利用HLA抗原而在APC上以高密度呈現，然後誘導出對於形成在呈現之胜肽與該HLA抗原之間的複合體會專一反應之CTL。或從對象將APC(例如：DC)取出，然後利用本發明之胜肽刺激，獲得在自身的細胞表面上呈現本發明之任一胜肽之APC。將該等APC對於對象再度投予，於該對象中誘導CTL，結果能使針對表現KOC1之癌細胞之攻擊性增大。

【0133】 本發明之藥學組合物也可包括已知有效率地確立細胞性免疫之佐劑。佐劑係指當和有免疫學活性之抗原一起(或連續)投予時，會增強對於該抗原之免疫應答之化合物。佐劑可使用例如Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89等文獻記載之公知品。適當之佐劑，例如鋁鹽(磷酸鋁、氫氧化鋁、氧基氫氧化鋁等)、明礬、霍亂毒素、沙門氏菌毒素、不完全佛洛依德佐劑(IFA)、完全佛洛依德佐劑(CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF其他免疫刺激性細胞介素、含有CpG模體之寡去氧核苷酸(CpG7909等)、水中油型乳劑、皂素或其衍生物(QS21等)、脂質A或其衍生物等脂多糖(MPL、RC529、GLA、E6020等)、脂胜肽、乳鐵蛋白、鞭毛蛋白、雙鏈RNA或其衍生物(聚IC等)、細菌DNA、咪唑并喹啉(咪喹莫特(Imiquimod)、R848等)、C型凝集蛋白配體(海藻糖二(二十二酸)酯(trehalose-6,6'-dibehenate：TDB)等)、CD1d配體(α-半乳糖苷基神經醯胺等)、角鯊烯乳劑(MF59、AS03、AF03等)、PLGA等，但不限定於此。佐劑在包括本發明藥學組合物之套組中，也可容納在和含有本發明胜肽之藥學組合物為不同的容器。此時，該佐劑與該藥學組合物可以連續對於對象投予，也可以在即將向對象投予前混合。本發明也提供如此之包含包括本發明胜肽之藥學組合物與佐劑之套組。本發明之藥學組合物為冷凍乾燥製劑時，該套組可更包括再溶解液。又，本發明提供包括容納本發明之藥學組合物之容器，及容納佐劑之容器的套組。該套組視需要可更包括容納再溶解液之容器。

【0134】 使用油性佐劑作為佐劑時，本發明之藥學組合物也可製備成乳劑。乳劑例如可利用將以如上述方式製備而得之胜肽溶液與油性佐劑予以混合・攪拌以製備。胜肽溶液可為冷凍乾燥後再溶解者。乳劑可以為W/O型乳劑及O/W型乳劑中之任一者，但為了獲得高免疫應答增強效果，宜為W/O型乳劑較佳。油性佐劑宜使用IFA，但不限於此。乳劑之製備可以於極將對於對象前進行，此時，本發明之藥學組合物也可以作為包括本發明之胜肽溶液及油性佐劑之套

組的形式提供。本發明之藥學組合物為冷凍乾燥製劑時，該套組可更包括再溶解液。

【0135】 再者，本發明之藥學組合物也可為封入有本發明胜肽之脂質體製劑、直徑數微米的珠粒有胜肽結合之顆粒製劑、或胜肽有脂質結合之製劑。

【0136】 於本發明之另一態樣，本發明之胜肽也可以藥學上可容許之鹽之形態投予。鹽之理想例，包括和鹼金屬(鋰、鉀、鈉等)之鹽、和鹼土類金屬之鹽(鈣、鎂等)、和其他金屬(銅、鐵、鋅、錳等)之鹽、和有機鹼之鹽、和胺之鹽、和有機酸(乙酸、甲酸、丙酸、富馬酸、馬來酸、琥珀酸、酒石酸、檸檬酸、蘋果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸等)之鹽、及和無機酸(鹽酸、磷酸、氫溴酸、硫酸、硝酸等)之鹽。本說明書使用之「藥學上可容許之鹽」之用語，係指保持此化合物之生物學的、生理學的藥理學的或藥學的有效性及特性之鹽。故，包括本發明胜肽之藥學上可容許之鹽之藥學組合物也包括在本發明。又，「本發明之胜肽」除了包括游離體之胜肽，也包括其藥學上可容許之鹽。

【0137】 於一些態樣中，本發明之藥學組合物可更包括刺激CTL之成分。脂質已鑑別係能在活體內刺激對於病毒抗原之CTL的物質。例如：可以使棕櫚酸殘基附著於離胺酸殘基之ε胺基及α胺基，然後連結於本發明之胜肽。其次，可將已附加脂質之胜肽以微胞或粒子狀態直接投予、納入脂質體中而投予、或在佐劑中乳化而投予。作為利用CTL應答之脂質刺激之另一例，當共價鍵結於適當胜肽時，可使用三棕櫚醯基-S-甘油基半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸(P3CSS)等大腸菌(E.coli)脂蛋白質刺激CTL(可參照例如：Deres et al., Natu59re 1989, 342: 561-4)。

【0138】 本發明之胜肽或藥學組合物之適當之投予方法，包括例如經口、皮內、皮下、肌肉內、骨內、腹膜及靜脈內注射等、及全身投予或向標靶部位之附近局部投予，但不限定於此。理想之投予方法可列舉向腋窩或鼠蹊部等淋

巴節附近進行皮下注射。投予可利用單次投予進行，也可利用多次投予以追加。本發明之胜肽可以用為了治療癌之治療的或藥學的有效量或對於誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫(更具體而言，為CTL)之治療的或藥學的有效量對於對象投予。本發明之胜肽之用量可因應治療之疾病、患者年紀、體重、投予方法等適當調整，關於各本發明之胜肽，通常為0.001mg~1000mg如0.01mg~100mg，例如0.1mg~30mg，例如0.1mg~10mg，例如0.5mg~5mg。又，投予間隔可以為數日~數個月1次，例如能以每週1次的間隔投予。該技術領域中有通常知識者可以適當選擇適當的投予量(用量)。

【0139】 於理想態樣，本發明之藥學組合物包括治療有效量之本發明之胜肽及藥學的或生理學上可容許之擔體。於另一態樣，本發明之藥學組合物包括治療有效量之本發明之胜肽、藥學的或生理學上可容許之擔體、及佐劑。本發明之藥學組合物可含有本發明之胜肽0.001mg~1000mg，較佳為0.01mg~100mg，更佳為0.1mg~30mg，更佳為0.1mg~10mg，例如0.5mg~5mg。又，本發明之藥學組合物為注射劑時，本發明之胜肽能以0.001mg/ml~1000mg/ml，較佳為0.01mg/ml~100mg/ml，更佳為0.1mg/ml~30mg/ml，又更佳為0.1mg/ml~10mg/ml，例如0.5mg/ml~5mg/ml之濃度含有。此時，可將例如：0.1~5ml，較佳為0.5ml~2ml之本發明之藥學組合物利用注射對於對象投予。

【0140】 或本發明提供用以治療及/或預防癌、及/或用以預防癌之術後再發之方法，包括以下步驟：將治療有效量之本發明之胜肽或本發明之藥學組合物對於對象投予。本發明之胜肽如上述，通常可於1次投予對於對象投予0.001mg~1000mg，例如0.01mg~100mg，例如0.1mg~30mg，例如0.1mg~10mg，例如0.5mg~5mg。於理想態樣，本發明之胜肽係和佐劑同時對於對象投予。又，投予間隔為數日~數個月1次，較佳為數日~1個月1次的間隔，例如：可為每週1次或2週1次的間隔。

【0141】 (2)含有多核苷酸作為有效成分之藥學組合物

本發明之藥學組合物也可包括以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸。本說明書中，「以可表現表現之形態」之用語，係指多核苷酸導入到細胞時，表現本發明之胜肽之意。例示的態樣中，本發明之多核苷酸之序列包括對於表現本發明胜肽為必要之調節要素。本發明之多核苷酸可以具備對於使向標靶細胞之基因體達成安定插入為必要之序列(關於相同重組匣載體之說明，參照例如Thomas KR & Capecchi MR, Cell1987, 51: 503-12)。參照例如：Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8；美國專利第5,580,859號；第5,589,466號；第5,804,566號；第5,739,118號；第5,736,524號；第5,679,647號；及WO98/04720。基於DNA之遞送技術，例如「裸DNA」、經促進之(bupivacaine、聚合物、胜肽媒介性)遞送、陽離子性脂質複合體、及粒子媒介性(「基因槍」)或壓力媒介性之遞送(參照例如：美國專利第5,922,687號)。

【0142】 也可以利用病毒載體或細菌載體使本發明之胜肽表現。表現載體，例如包括牛痘病毒或雞痘病毒等弱毒化病毒寄主。例如：作為為了使本發明之胜肽表現之載體，可使用牛痘病毒。若導入到寄主，重組牛痘病毒會表現免疫原性胜肽並藉此誘發免疫應答。對於免疫化方案有用之牛痘載體及方法記載於例如美國專利第4,722,848號。其他載體為BCG(Bacillus Calmette-Guérin)。BCG載體記載於Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60。對於治療性投予或免疫化有用之多種多樣的其他載體，例如腺病毒載體及腺病毒伴隨載體、反轉錄病毒載體、傷寒菌(Salmonella typhi)載體、無毒化碳疽毒素載體等為顯明。參照例如：Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71；Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806；Hipp et al., In Vivo2000, 14: 571-85。

【0143】 本發明之多核苷酸向患者內之遞送可為直接的，此時可以使患者直接暴露於保有本發明之多核苷酸之載體。或也可為間接的，此時先於試管內

將細胞以保有本發明之多核苷酸之載體轉形，然後將該細胞移植到患者內。此等2種方法分別作為活體內及離體之基因治療而公知。

【0144】 基因治療之方法之一般的綜合說明，參照Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505；Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95；Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96；Mulligan, Science 1993, 260: 926-32；Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217；Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215。本發明也可使用之重組DNA技術之領域中之一般公知之方法記載於Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, JohnWiley & Sons, NY, 1993；及Krieger, Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990。

【0145】 和胜肽之投予同樣地，多核苷酸之投予有經口、皮內、皮下、靜脈內、肌肉內、骨內及/或腹膜注射等進行的情形。又，多核苷酸之投予可為全身投予或向標靶部位附近之局部投予。投予可利用單次投予進行，也可利用多次投予追加。本發明之多核苷酸可以用為了治療癌之治療的或藥學的有效量或為了誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫(更具體而言為CTL)之治療的或藥學的有效量對於對象投予。適當擔體中之多核苷酸之用量、或經編碼為本發明之胜肽之多核苷酸轉形之細胞中之多核苷酸之用量，可因應治療之疾病、患者年紀、體重、投予方法等而適當調整，此用量通常為0.001mg~ 1000mg，例如0.01mg~100mg，例如：0.1mg~30mg，例如0.1mg~ 10mg，例如0.5mg~5mg。投予間隔可以為數日1次~數個月1次，例如每週1次的間隔投予。該技術領域中有通常知識者可以適當選擇適當的投予量(用量)。

【0146】 X.使用胜肽、外吐小體、APC、及CTL之方法

可使用本發明之胜肽及多核苷酸誘導APC及CTL。也可使用本發明之外吐小體及APC誘導CTL。本發明之胜肽、多核苷酸、外吐小體、及APC只要是不妨礙

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

【0147】 (1)誘導APC之方法

本發明提供使用本發明之胜肽或多核苷酸誘導具有CTL誘導能力之APC之方法。

【0148】 本發明之方法包括使APC在試管內、離體、或活體內接觸本發明之胜肽之步驟。例如：使APC於離體接觸該胜肽之方法可包括以下步驟：

(a) 從對象回收APC之步驟；及

(b) 使步驟(a)之APC接觸本發明之胜肽之步驟。

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

【0149】 另一方面，當本發明之胜肽對於對象投予時，APC會於活體內接觸該胜肽，結果可在該對象體內誘導具有高CTL誘導能力之APC。故本發明之方法可包括將本發明之胜肽對於對象投予之步驟。同樣地，將本發明之多核苷酸以可表現之形態對於對象投予時，本發明之胜肽會於活體內表現且和APC於活體內接觸，結果可於該對象體內誘導具有高CTL誘導能力之APC。故本發明可包括將本發明之多核苷酸對於對象投予之步驟。

【0150】 本發明為了誘導具CTL誘導能力之APC，可包括將本發明之多核

苷酸導入到APC之步驟。例如：本方法可包括以下步驟：

(a) 從對象將APC回收；及

(b) 將編碼為本發明胜肽之多核苷酸導入到步驟(a)之APC。

步驟(b)可依「VI.抗原呈現細胞(APC)」之章節所述實施。

【0151】 因此一態樣中，本發明提供包括以下(a)或(b)之步驟之誘導具CTL誘導能力之APC之方法：

(a) 使APC接觸本發明胜肽；

(b) 將編碼為本發明胜肽之多核苷酸導入到APC。

【0152】 又，本發明提供包括以下(a)或(b)之步驟製備具CTL誘導能力之APC之方法：

(a) 使APC接觸本發明胜肽；

(b) 將編碼為本發明胜肽之多核苷酸導入到APC。

【0153】 上述方法於試管內、離體、或活體內任一者均可進行，但於試管內或離體進行較佳。上述方法使用之APC可來自於預定投予已誘導之APC之對象，也可來自不同對象。當使用來自和預定投予之對象為不同之對象(捐出者)之APC時，投予對象者與捐出者之HLA型必須相同。本發明之方法中，當使用具有選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽以作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之HLA型均為HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)較佳。或上述方法使用之APC宜為表現HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)之APC。同樣地，當使用具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之HLA均為HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)較佳。或上述方法使用之APC宜為表現HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)之APC較佳。同樣地，當使用具有選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜

肽作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之HLA型均為HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)較佳。或上述方法使用之APC宜為表現HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)之APC較佳。同樣地，使用具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之HLA型均為HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)較佳。或上述方法使用之APC宜為表現HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)之APC較佳。APC可從捐出者採樣之血液利用比重離心分離法等分離PBMC後，從該PBMC使用公知方法製備。

【0154】 於另一態樣，本發明更提供包括本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸之用於誘導有CTL誘導能力之APC之藥學組合物。

【0155】 或本發明更提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸之用途，係使用在製造誘導具有CTL誘導能力之APC之藥學組合物。

【0156】 或本發明更提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸，用於誘導具CTL誘導能力之APC。

【0157】 或本發明更提供用以製造誘導APC之藥學組合物之方法或步驟，包括使本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸與藥學上或生理學上可容許之擔體予以製劑化之步驟。

【0158】 於另一態樣，本發明更提供用以製造誘導具CTL誘導能力之APC之藥學組合物之方法或步驟，包括使本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸和藥學的或生理學上可容許之擔體混合之步驟。

依本發明之方法誘導之APC，能誘導對於KOC1為專一性之CTL(亦即本發明之CTL)。

【0159】 (2)誘導CTL之方法

本發明更提供使用本發明之胜肽、多核苷酸、外吐小體、或APC誘導CTL

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

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

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

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

【0160】 本發明之胜肽、多核苷酸、外吐小體、或APC若對於對象投予，會在該對象之體內誘導CTL，增強將表現KOC1之癌細胞作為標靶之免疫應答之強度。故本發明之方法可更包括將本發明之胜肽、多核苷酸、APC、或外吐小體對於對象投予之步驟。

【0161】 或也可將此等於試管內或離體使用以誘導CTL。例如：本發明之方法可包括以下步驟：

(a) 從對象回收APC、

(b) 使步驟(a)之APC和本發明之胜肽接觸、及

(c) 將步驟(b)之APC和CD8陽性T細胞進行共培養。已誘導之CTL之後也可返回對象。

【0162】 上述步驟(c)中，和CD8陽性T細胞一起共培養之APC，也可藉由如「VI.抗原呈現細胞(APC)」之章節所述，利用將編碼為本發明胜肽之多核苷酸導入到APC以製備。但本發明之方法使用之APC不限於此，可使用於自身表面呈現HLA抗原與本發明之胜肽之複合體的任意APC。

【0163】 本發明之方法也可將如此的APC改為使用在自身表面上呈現

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

【0164】 再者，也可藉由包括編碼為能和細胞表面上由HLA抗原呈現之本發明胜肽之TCR之各次單元之多核苷酸之載體導入到CD8陽性T細胞，以誘導CTL。如此的轉導可利用「VIII.T細胞受體(TCR)」之章節所述實施。

【0165】 因此一態樣中，本發明提供包括選自以下之步驟之誘導CTL之方法：

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

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

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

【0166】 上述方法於試管內、離體、或活體內任一者均可進行，但於試管內或離體進行較佳。上述方法使用之APC或外吐小體、及CD8陽性T細胞可來自預定投予誘導之CTL之對象，也可來自不同對象。使用來自和預定投予之對象為不同之對象(捐出者)之APC或外吐小體、及CD8陽性T細胞時，投予對象者與捐出者之HLA型必須相同。例如：使用具選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之HLA型均為HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)較佳。或上述方法使用之APC或外吐小體宜為在自身表面上呈現HLA-A11(更佳為HLA-A*1101)與本發明胜肽(具有選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽)之複合體之APC或外吐小體較佳。此時誘導之CTL對於呈現HLA-A11與本發明胜肽之複合體之

細胞(例如：表現KOC1之HLA-A11陽性細胞)呈專一性細胞傷害活性。又例如：當使用具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之HLA均為HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)較佳。或上述方法使用之APC或外吐小體宜為在自身表面上呈現HLA-A33(更佳為HLA-A*3303)與本發明之胜肽(具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽)之複合體的APC或外吐小體。此時誘導之CTL對於呈現HLA-A33與本發明胜肽之複合體之細胞(例如：表現KOC1之HLA-A33陽性細胞)呈專一性細胞傷害活性。又例如：當使用具有選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之HLA型均為HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)較佳。或上述方法使用之APC或外吐小體宜為在自身表面上呈現HLA-A03(更佳為HLA-A*0301)與本發明胜肽(具有選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽)之複合體之APC或外吐小體較佳。此時誘導之CTL對於呈現HLA-A03與本發明胜肽之複合體之細胞(例如：表現KOC1之HLA-A03陽性細胞)呈專一性細胞傷害活性。又例如：使用具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽作為本發明之胜肽時，投予對象者與捐出者之HLA型均為HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)較佳。或上述方法使用之APC或外吐小體宜為在自身表面上呈現HLA-A01(更佳為HLA-A*0101)與本發明之胜肽(具選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序列之胜肽或其改變胜肽)之複合體之APC或外吐小體。此時誘導之CTL對於呈現HLA-A01與本發明胜肽之複合體之細胞(例如：表現KOC1之HLA-A01陽性細胞)呈專一性細胞傷害活性。

【0167】 於另一態樣，本發明更提供包括選自以下中之至少1種有效成分之用以誘導CTL之組合物或藥學組合物：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；及

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0168】 於另一態樣，本發明更提供選自以下之有效成分之用途，係用在製造誘導CTL之組合物或藥學組合物：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；及

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0169】 或本發明更提供選自以下之有效成分，係用於誘導CTL：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；及

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0170】 或本發明更提供製造用以誘導CTL之組合物或藥學組合物之方法或步驟，包括將選自以下之有效成分與藥學的或生理學上可容許之擔體予以製劑化之步驟：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；及

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0171】 於另一態樣，本發明更提供用以製造誘導CTL之組合物或藥學組合物之方法或步驟，包括將選自以下之有效成分和藥學的或生理學上可容許之

擔體混合之步驟：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；及

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體。

【0172】 XI.誘導免疫應答之方法

本發明提供誘導針對表現KOC1之癌之免疫應答之方法。能適用之癌包括膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、及睪丸癌等，但不限定於此。又，癌宜表現選自HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01中之至少1種HLA較佳。

【0173】 本發明提供誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫應答之方法。KOC1據認為在如上述各種癌係過度表現。故若誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫應答，其結果會妨礙癌細胞增殖。故本發明也提供妨礙表現KOC1之癌細胞之增殖之方法。本發明之方法特別適於阻礙表現選自於KOC1與HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01中之至少1種HLA之癌細胞之增殖。

【0174】 本發明之方法可包括將包括本發明之任一胜肽或編碼為此等胜肽的多核苷酸的組合物進行投予之步驟。本發明之方法也意欲投予呈現本發明之任一胜肽之外吐小體或APC。關於詳情，參考「IX.藥學組合物」之項目，尤其針對本發明之藥學組合物以疫苗形式使用之相關記載部分。此外，為了誘導免疫應答，本發明之方法能使用之外吐小體及APC在前述「V.外吐小體」、「VI.抗原呈現細胞(APC)」、及「X.使用胜肽、外吐小體、APC、及CTL之方法」之(1)及(2)之項目中已詳述。

【0175】 於另一態樣，本發明提供藥學組合物或疫苗，用以誘導針對表現

KOC1之癌之免疫應答，包括選自以下之有效成分：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0176】 或本發明更提供藥學組合物或疫苗，係用以誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫應答，包括選自以下之有效成分：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0177】 或本發明提供藥學組合物或疫苗，係用以妨礙表現KOC1之癌細胞之增殖，包含選自以下之有效成分：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0178】 於另一態樣，本發明提供選自以下之有效成分之用途，係用在製造用以誘導針對表現KOC1之癌之免疫應答之藥學組合物或疫苗：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0179】 或本發明提供選自以下之有效成分之用途，係用在製造用以誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫應答之藥學組合物或疫苗：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0180】 或本發明提供選自以下之有效成分之用途，係用於製造用以妨礙表現KOC1之癌細胞之增殖之藥學組合物或疫苗：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0181】 本發明提供製造用以誘導針對表現KOC1之癌之免疫應答之藥學組合物之方法或步驟，包括將本發明之胜肽或多核苷酸和藥學上可容許之擔體一起混合或製劑化之步驟。

【0182】 或本發明提供用以妨礙表現KOC1之癌細胞之增殖之方法、或誘導針對表現KOC1之癌之免疫應答之方法，包括將含有選自以下之有效成分之疫苗或藥學組合物對於對象投予之步驟：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現本發明胜肽之形態編碼之多核苷酸；

(c) 於自身表現上呈現本發明胜肽之APC；

(d) 於自身表面上呈現本發明胜肽之外吐小體；及

(e) 本發明之CTL。

【0183】 在和本發明之關連中，可藉由投予本發明之胜肽、多核苷酸、APC、外吐小體及/或CTL以治療表現KOC1之癌。或可藉由投予本發明之胜肽、多核苷酸、APC、外吐小體及/或CTL，以誘導針對表現KOC1之癌之免疫應答。如此之癌，例如包括膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、及睪丸癌等，但不限定於此。又，藉由投予本發明之胜肽、多核苷酸、APC、外吐小體及/或CTL，可誘導針對表現KOC1之癌細胞之免疫應答。故宜於投予包括上述有效成分之疫苗或藥學組合物前，確認治療對象之疾病部位之KOC1之表現水平是否增強。

【0184】 故一態樣中，本發明提供治療須治療表現KOC1之癌之患者中之該癌之方法，如此之方法包括以下步驟：

i) 測定從罹癌對象之疾病部位採樣之活體試樣中之KOC1之表現水平；

ii) 依據於i)測定之KOC1之表現水平，指定出具有表現KOC1之癌之對象；及

iii) 將選自由上述(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分對於有表現KOC1之癌之對象投予。

【0185】 或本發明提供一種疫苗或藥學組合物，包括用以對於有表現KOC1之癌之對象投予之選自於由上述(a)~(e)構成之群組中之至少1種有效成分。本發明更提供以選自於由上述(a)~(e)構成之群組中之至少1種有效成分來指定或選擇治療對象之方法，如此之方法包括以下步驟：

i) 測定從有癌之對象之疾病部位採樣之活體試樣中之KOC1之表現水平；

ii) 依據i)測得之KOC1之表現水平指定有表現KOC1之癌之對象；及

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

【0186】 上述方法中，為了測定KOC1之表現水平而從對象採樣之活體試樣不特別限定，例如宜使用利用切片等採樣的含有癌細胞之組織試樣。活體試樣中之KOC1之表現水平可利用公知方法測定，例如：可使用利用探針或PCR法檢測KOC1基因之轉錄產物之方法(例如：cDNA微陣列法、北方墨點法、RT-PCR法等)、利用抗體檢測KOC1基因之轉譯產物之方法(例如：西方墨點法、免疫染色法等)等。又，活體試樣也可以為血液試樣，此時，可測定對抗KOC1之抗體之血中水平，基於該血中水平評價疾病部位之KOC1之表現水平。測定對抗KOC1或其片段之抗體之血中水平可使用公知方法，例如可使用將KOC1蛋白質、本發明胜肽作為抗原之酵素免疫測定法(EIA)、酵素連結免疫吸附測定法(ELISA)、及放射免疫測定法(RIA)等。

【0187】 通常未表現KOC1之組織及細胞中幾乎檢測不到KOC1之轉錄產物及轉譯產物。因此當從對象採樣之癌細胞或包括癌細胞之組織試樣中檢測到KOC1之轉錄產物或轉譯產物時，可判斷該對象之癌表現KOC1。又，在不具有表現KOC1之癌之對象之血液試樣幾乎檢測不到對抗KOC1或其片段之抗體。因此從對象採樣的血液試樣檢測到有對抗KOC1或其片段之抗體時，可判斷該對象之癌係表現KOC1。又，對象罹患之癌是否表現KOC1之判斷，可利用比較從該對象之非癌性部位採樣之同種活體材料或從未罹癌之對象採樣之同種活體材料(正常對照試樣)之測定結果以進行。亦即，當比起正常對照試樣之測定對象物之水平(正常對照水平)，試驗對象之活體試樣之該水平上昇時，可判斷該對象之癌係表現KOC1。例如若比起正常對照水平，測定對象物之檢測量增大至少10%以

上時，可判斷該對象之癌係表現KOC1。較佳為比起正常對照水平，測定對象物之檢測量增大25%以上，更佳為50%以上。又，KOC1之轉錄產物或轉譯產物之檢測量也可常態化β-肌動蛋白、甘油醛3磷酸脫氫酵素及核糖體蛋白質P1等公知之內務基因(housekeeping gene)之檢出量而評價。

【0188】 於理想態樣，當投予選自於由上述(a)~(e)構成之群組中之至少1種有效成分前，宜確認對象之HLA型較佳。例如：就和具有選自序列編號：5、28、30及32中之胺基酸序列之胜肽關連之有效成分之投予對象而言，宜選擇HLA-A11陽性之對象。又，就和具有選自序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85中之胺基酸序列之胜肽關連之有效成分之投予對象而言，宜選擇HLA-A33陽性之對象較理想。又，就和具有選自序列編號：27、30及52中之胺基酸序列之胜肽關連之有效成分之投予對象而言，宜選擇HLA-A03陽性之對象較佳。又，就和具有選自序列編號：86、87、90、92、46、95及41之中之胺基酸序之胜肽關連之有效成分之投予對象而言，宜選擇HLA-A01陽性之對象較佳。

【0189】 本發明更提供本發明胜肽與HLA之複合體。前述本發明之複合體可為單體也可為多元體。本發明之複合體為多元體時，聚合數不特別限定，可為任意聚合數之多元體。例如四元體、五元體、六元體等，但不限定於此。又，多元體(dextramer)(WO2002/072631)、streptamer(Knabel M et al., Nat Med. 2002 Jun;8(6):631-7.)也包括在本發明之多元體。本發明胜肽與HLA之複合體可依公知方法製備(例如：Altman JD et al., Science.1996,274(5284):94-6、WO2002/072631、WO2009/003492、Knabel M et al., Nat Med. 2002 Jun;8(6):631-7.等)。本發明之複合體例如可用於定量對於本發明胜肽為專一性CTL。例如：從已投予本發明之藥學組合物之採樣血液試樣，分離PBMC後製備CD4陰性細胞，使已結合螢光色素之本發明之複合體接觸該CD4陰性細胞。之後，利用流式細胞術解析，可測定對

於本發明之胜肽為專一性CTL的比例。例如：在投予本發明之藥學組合物前、投予中，及/或投予後，藉由測定對於本發明胜肽為專一性CTL，可監測本發明之藥學組合物獲致之免疫應答誘導效果。

【0190】 XII.抗體

本發明更提供和本發明之胜肽結合之抗體。理想之抗體會專一地結合於本發明之胜肽，且不結合於非本發明之胜肽者(或弱結合)。於另一態樣，如此的抗體可包括以和HLA分子之關連認識胜肽之抗體，亦即結合於胜肽-MHC複合體之抗體。抗體之結合專一性能以阻礙試驗確認。亦即，分析之抗體與全長KOC1多胜肽之間之結合於本發明胜肽存在下受阻礙時，代表此抗體對於本發明之胜肽係專一性結合。對抗本發明之胜肽之抗體可使用在疾病之診斷及預後診斷之分析、及本發明之藥學組合物之投予對象之選擇及本發明之藥學組合物之監測。

【0191】 本發明更提供用以檢測及/或定量本發明之胜肽或其片段之各種免疫學的分析法。如此的免疫學的分析法包括放射免疫測定法、免疫層析法、酵素連結免疫吸附測定法(ELISA)、酵素連結免疫螢光測定法(ELIFA)等，但不限於此等，能於該發明所屬之技術領域周知之各種免疫學的分析形式之範圍內進行。

【0192】 本發明之抗體可使用在能檢測表現KOC1之癌之免疫學的圖像化法，其例包括使用本發明之標記抗體之放射性閃爍圖術(scintigraphy)圖像化法，但不限於此。如此的分析法臨床使用在表現KOC1之癌之檢測、監測、及預後診斷中，如此的癌，例如包括膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、及睪丸癌等，但不限定於此。

【0193】 本發明之抗體能以例如單株抗體或多株抗體等任意形態使用，更

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

【0194】 作為為了獲得抗體的抗原使用之本發明之胜肽或其片段，可基於本說明書揭示之胺基酸序列，利用化學合成或基因工程的方法獲得。

【0195】 作為免疫抗原使用之胜肽可為本發明之胜肽或本發明之胜肽之片段。又，為了提高免疫原性，可以將胜肽和擔體結合或連結。就擔體而言，鑰孔血藍素(keyhole limpet hemocyanin，KLH)為周知。使KLH和胜肽結合之方法亦為該發明所屬之技術領域中周知。

【0196】 任意哺乳動物可以用前述抗原免疫，但製作單株抗體時，宜考慮和細胞融合使用之母細胞間之適合性較佳。一般可使用嚙齒目(Rodentia)、兔目(Lagomorpha)、或靈長目(Primate)之動物。嚙齒目科的動物包括例如小鼠、大鼠、及倉鼠。兔目科之動物例如包括兔。靈長目科之動物包括例如食蟹猴(Macaca fascicularis)、獼猴、阿拉伯狒(Papio hamadryas)、及黑猩猩等狹鼻小目(Catarrhini)(舊世界猴)之猴類。

【0197】 以抗原對於動物免疫之方法，在該發明所屬之技術領域為公知。抗原之腹腔內注射或皮下注射係對於哺乳動物免疫之標準方法。更具體而言，將抗原以適量磷酸緩衝食鹽水(PBS)、生理食鹽水等稀釋，並使其懸浮。視需要，可將抗原懸浮液和佛洛依德完全佐劑等適量之標準佐劑混合並乳化後，對於哺乳動物投予。之後宜將和適量佛洛依德不完全佐劑混合之抗原每隔4~21日投予，投予數次較佳。免疫化也可使用適當擔體。如上述方式免疫後，血清關於所望的抗體量之增加可以用標準方法檢查。

【0198】 對抗本發明胜肽之多株抗體，可以藉由已確認免疫後血清中之所望抗體水平之上昇的哺乳動物回收血液，利用任意之習知法從血液分離出血清以製備。多株抗體可為包括多株抗體之血清，也可將包括多株抗體之級分從該

血清單離。免疫球蛋白G或M可以從只認識本發明胜肽之級分使用例如已結合本發明胜肽之親和性管柱，將此級分使用Protein A或Protein G管柱進一步精製而製備。

【0199】 為了製備單株抗體，係於免疫後確認血清中之所望抗體水平已上昇後，從哺乳動物回收免疫細胞並供細胞融合。細胞融合使用之免疫細胞較佳為能從脾臟獲得。和上述免疫細胞融合之另一者的母細胞，可使用例如：哺乳動物之骨髓瘤細胞，較佳已獲得利用藥物選擇融合細胞之特性之骨髓瘤細胞。

【0200】 可依公知方法，例如：Milstein et al.(Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))之方法使上述免疫細胞與骨髓瘤細胞融合。

【0201】 由細胞融合得到的融合瘤可藉由將其在標準選擇培養基例如HAT培養基(含次黃嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶的培養基)中培養而選擇。細胞培養係在HAT培養基中繼續充分期間(例如培養數天至數週)，使除了所望融合瘤以外的其他細胞(非融合細胞)死亡。然後，可實施標準極限稀釋以篩選並選殖生產所望抗體的融合瘤細胞。

【0202】 為了製備融合瘤，除了將非人類動物係以抗原免疫之上述方法，尚可將人淋巴球例如受EB病毒感染者以胜肽、胜肽表現細胞或其溶解物於試管內免疫。然後，將經免疫的淋巴球與能無限分裂的人來源的骨髓瘤細胞例如U266融合，以得到生產能結合於該胜肽的所望人類抗體的融合瘤(日本特開昭63-17688)。

【0203】 接著將獲得的融合瘤移殖到小鼠的腹腔，並抽取腹水。獲得的單株抗體可利用例如硫酸銨沉澱、蛋白質A或蛋白質G管柱、DEAE離子交換層析或結合有本發明胜肽的親和性管柱精製。

【0204】 或者可將經免疫的淋巴球等生產抗體之免疫細胞利用致癌基因使不死化並用於製備單株抗體。

【0205】 如此獲得的單株抗體也可使用基因操作技術以重組方式製備(參見例如Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, 於英國由MacMillan Publishers LTD(1990)出版)。例如可從免疫細胞例如生產該抗體的融合瘤或經免疫的淋巴球選擇編碼為抗體的DNA，插入適當載體，並導入寄主細胞以製備重組抗體。本發明也提供如上述製備的重組抗體。

【0206】 再者本發明抗體可為抗體片段或經修飾的抗體，條件是只要其結合於本發明的胜肽即可。例如：抗體片段宜包括抗體的抗原結合部位。具體而言，抗體片段可為Fab、$F(ab')_2$、Fv、或衍生自H及L鏈的Fv片段以適當連結子連接而得之單鏈Fv(scFv)(Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83(1988))。更具體而言，可利用以木瓜酵素或胃蛋白酶等處理抗體而製作抗體片段。或者可構建編碼為該抗體片段的基因，插入表現載體並於適當的寄主中表現(參見例如：Co et al., J Immunol 152: 2968-8276 (1994)；Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989)；Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989)；Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986)；Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986)；Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991))。

【0207】 抗體可藉由與各種分子例如聚乙二醇(PEG)結合而修飾。本發明提供此種經修飾的抗體。經修飾的抗體可藉由將抗體化學修飾而獲得。此等修飾方法在該領域為習知。

【0208】 或者本發明抗體可為：來自非人類抗體的可變區與衍生自人抗體的不變區的嵌合抗體，或人化抗體，其包括來自非人抗體的互補決定區(CDR)、來自人抗體之框架區(FR)及不變區。此種抗體可依照已知技術製備。人化可藉由以非人抗體之CDR序列取代人抗體之對應序列以實施(參見例如Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536(1988))。因此此種人化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整的人類可變微域已取代成來自非人種的對應序列。

【0209】 也可使用除了人框架區及不變區外包括人可變區的完全人抗體。此種抗體可使用該技術領域已知的各種技術製造。例如試管內之方法涉及使用呈現在噬菌體的人抗體片段的重組庫(*例如*Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)。同樣地，可藉由將人免疫球蛋白基因位導入基因轉殖動物例如內生免疫球蛋白已部分或全部失活的小鼠中，而製備人抗體。此方法敘述於例如美國專利第6,150,584號、第5,545,807號；第5,54583,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,661,016號。

【0210】 如上獲得的抗體可純化成同質。例如可依照一般蛋白質使用的分離及純化方法將抗體分離及純化。例如可利用適當選擇及合併使用的管柱層析分離及單離抗體，管柱層析例如親和性層析等管柱層析、過濾、超過濾、鹽析、透析、SDS聚丙烯醯胺凝膠電泳及等電點電泳(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))，但不限於此等。可使用蛋白質A管柱及蛋白質G管柱當做該親和性管柱。可使用的蛋白質A管柱包括例如Hyper D、POROS及Sepharose F.F.(Pharmacia)。

【0211】 親和性層析以外的層析，包括例如離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、反相層析、吸附層析等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996))。該等層析程序可利用液相層析，例如HPLC與FPLC實施。

【0212】 例如可使用測量吸光度、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素免疫分析法(EIA)、放射免疫分析法(RIA)及/或免疫螢光以測量本發明抗體的抗原結合活性。ELISA中，係將本發明抗體固定化在一平板上，添加本發明胜肽於該平板，然後添加含有所望抗體的樣本，例如抗體產生細胞的培養上清或純化的抗體。然後，添加認識該初級抗體且經鹼性磷解酶等酵素標記的二次抗體，

然後溫育該平板。清洗後，添加酵素受質例如對硝基苯基磷酸到該平板，測量吸光度以評估該樣本的抗原結合活性。可使用該胜肽的片段例如C末端或N末端片段當做抗原以評估該抗體的結合活性。可使用BIAcore (Pharmacia)來評估本發明抗體的活性。

【0213】 上述方法，藉由使本發明抗體暴露於假定含有本發明胜肽的樣本，並偵測或測量該抗體與該胜肽形成的免疫複合體，能偵測或測量本發明的胜肽。例如：本發明之抗體也可使用在檢測存在於對象之血液試樣(例如血清試樣)中之本發明胜肽之用途。或反之，可使用本發明胜肽檢測對象血液試樣(例如血清試樣)中存在之本發明之抗體。測定對象之血液試樣中之本發明之胜肽或本發明之抗體之結果，對於選擇本發明之藥學組合物之投予對象、或監測本發明之藥學組合物之效果方面有用。此外，具有對抗以例如疫苗形式投予之胜肽之抗體之患者，據報告有時對於疫苗之應答性高。因此本發明之胜肽可利用於作為當投予該胜肽作為疫苗時，用以將高應答性之患者的抗體作為指標進行選擇之免疫分析用抗原。

【0214】 XIII.載體及寄主細胞

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

【0215】 大腸菌為寄主細胞且載體在大腸菌(*例如*JM109、DH5 alpha、HB101或XL1Blue)中放大及大量生產時，該載體應具有欲在大腸菌內放大的「複製起點」以及用於選擇經轉形的大腸菌的標記基因(*例如*由安皮西林、四環黴素、嘉那黴素、氯黴素等藥物選擇的抗藥性基因)。例如，可使用M13系列載體、pUC系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script等。此外，也可將pGEM-T、pDIRECT及pT7和上述載體同樣地用於選殖。當使用載體產生本發明胜肽時，可使用表現

載體。例如欲在大腸菌中表現的載體應具有上述欲在大腸菌中放大需要的特性。當使用大腸菌例如JM109、DH5 alpha、HB101或XL1 Blue當做寄主細胞，該載體應具有能在大腸菌內有效率地表現所望基因之啟動子，例如lacZ啟動子(Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989)；FASEB J 6: 2422-7 (1989))、araB啟動子(Better *et al.*, Science 240: 1041-3(1988))、T7啟動子等。於此方面，可使用pGEX-5X-1(Pharmacia)、「QIAexpress system」(Qiagen)、pEGFP及pET(於此情形，寄主較佳為表現T7 RNA聚合酶的BL21)取代上述載體。此外，該載體也可含有信號序列以供胜肽分泌。引導該胜肽分泌到*E. coli*胞間質的信號序列之例，為pelB信號序列(Lei *et al.*, J Bacteriol 169: 4379 (1987))。將該等載體導入目標寄主細胞的方法包括例如氯化鈣法及電穿孔法。

【0216】 除了大腸菌，例如可使用來自哺乳動物的表現載體(例如pcDNA3(Invitrogen)及pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17): 5322(1990))、pEF、pCDM8)、來自昆蟲細胞的表現載體(例如「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、來自植物的表現載體(*例如*pMH1、pMH2)、來自動物組織的表現載體(*例如*pHSV、pMV、pAdexLcw)、來自反轉錄病毒的表現載體(*例如*pZIpneo)、來自酵母菌的表現載體(*例如*「Pichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)，及來自枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)的表現載體(*例如*pPL608、pKTH50)，用於生產本發明之多胜肽。

【0217】 為了於動物細胞例如CHO、COS或NIH3T3細胞中表現載體，該載體應具有對於在此種細胞中表現所需要的啟動子例如SV40啟動子(Mulligan *et al.*, Nature 277: 108(1979))、MMLV-LTR啟動子、EF1 alpha啟動子(Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res 18: 5322(1990))、CMV啟動子等，較佳為具有用於選擇轉形體的標記基因(例如由藥物(*例如*新黴素、G418)選擇的抗藥性基因)。具有此等特性的已知載體例如pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV及pOP13。

【0218】 基於上述說明之本發明之態樣列舉如下，但本發明不限於此等。

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

(a) 選自於由序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列；及

(b) 相對於選自於由序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列有1個、2個、或多個胺基酸取代、缺失、插入及/或加成之胺基酸序列。

[2] 如[1]之胜肽，其選自於由以下(i)~(iv)構成之群組：

(i) 包括對於選自於由序列編號：5、28、30及32構成之群組之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(d)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列：

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

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

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

(d) C末端之胺基酸取代為選自於由離胺酸及精胺酸構成之群組之胺基酸；

(ii) 包括對於選自於由序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(c)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列：

(a) N末端起第1號之胺基酸取代為選自於由天冬胺酸及麩胺酸構成之群組之胺基酸；

(b) N末端起第2號胺基酸取代為選自於由苯丙胺酸、酪胺酸、丙胺酸、異白

胺酸、白胺酸及纈胺酸構成之群組之胺基酸；及

(c) C末端之胺基酸取代為選自於由精胺酸及離胺酸構成之群組之胺基酸；

(iii) 包括對於序列編號：27、30及52選自於由構成之群組之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(b)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列：

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

(b) C末端之胺基酸取代為選自於由精胺酸、離胺酸、酪胺酸及苯丙胺酸構成之群組之胺基酸；

(iv) 包括對於選自於由序列編號：86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列實施選自於由以下(a)~(c)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列：

(a) N末端起第2號胺基酸取代為選自於由蘇胺酸及絲胺酸構成之群組之胺基酸；

(b) N末端起第3號之胺基酸取代為選自於由天冬胺酸及麩胺酸構成之群組之胺基酸；及

(c) C末端之胺基酸取代為酪胺酸。

[3] 如[1]之胜肽，其由選自於由序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列構成。

[4] 一種多核苷酸，編碼為如[1]至[3]中任一項之胜肽。

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

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

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

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

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

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

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

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

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

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

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

[7] 如[5]之組合物，其係藥學組合物。

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

[9] 如[7]之組合物，係用於誘導針對癌之免疫應答。

[10] 如[8]或[9]之組合物，其中，癌係選自於由膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、及睪丸癌構成之群組。

[11] 如[5]至[10]中任一項之組合物，其係製劑化以成為向選自於由HLA-A11、HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01構成之群組中之至少1種HLA為陽性之對象投予。

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

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

(b) 將編碼為如[1]至[3]中任一項之胜肽之多核苷酸導入到APC。

[13] 一種誘導CTL之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：

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

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

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

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

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

[16] 一種CTL，係將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶。

[17] 如[16]之CTL，係由如[13]之誘導CTL之方法誘導。

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

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

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

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

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

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

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

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

[20] 一種抗體，係結合於如[1]至[3]中任一項之胜肽。

[21] 一種篩選有CTL誘導能力之胜肽之方法，包括以下步驟：

(a) 製作由對於選自於由序列編號：5、28、30、32、61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列構成之原本胺基酸序列有1個、2個、或數個胺基酸殘基取代、缺失、插入、及/或加成之胺基酸序列構成之候選序列；

(b) 從(a)製作之候選序列中選擇和KOC1以外之任意公知之人基因產物均沒有顯著相同性(序列同一性)之候選序列；

(c) 使由於(b)選擇之候選序列構成之胜肽接觸APC；

(d) 使(c)之APC接觸CD8陽性T細胞；及

(e) 選擇比起由原本胺基酸序列構成之胜肽有同等或更高之CTL誘導能力之

胜肽。

[22] 一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分之用途，係用於製造用於誘導針對癌之免疫應答之組合物：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

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

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

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

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

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

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

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

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

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

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

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

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

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

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

之抗原呈現細胞(APC)；

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

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

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

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

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

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

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

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

[26] 一種誘導針對表現KOC1之細胞之細胞傷害活性之方法，包括對於對象投予選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分之步驟：

(a) 如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽；

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

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

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

(e) 將如[1]至[3]中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

[27] 一種冷凍乾燥製劑，包括如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽。

[28] 一種藥學組合物，係以包括將如[1]至[3]中任一項之一或多種胜肽溶於

水溶性之擔體並過濾滅菌之步驟的方法製備。

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

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

[31] 一種套組，包含：容納如[7]至[11]中任一項之藥學組合物之容器、及容納佐劑之容器。

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

【0219】 本發明書關於本發明就其特定態樣詳細說明，但前述說明事實上係例示說明，應理解係意圖說明本發明及理想態樣。該技術領域中有通常知識者可理解：依日常實驗可在不脫離本發明精神及範圍而輕易進行各種變更及修正。故本發明並非受限於上述說明，而意欲由附帶的申請專利範圍及此等之均等物所限定。

【0220】 以下參考具體的實施例對於本發明更詳細敘述。然而，以下材料、方法及實施例係可協助該技術領域中具有通常知識者製造及使用本發明特定具體例，此等僅是意欲來解說本發明態樣，因此並不限制本發明的範圍。該技術領域中具有通常知識者當可輕易理解到，與在此所述者類似或等同之方法及材料可用於實施或測試本發明。又，本說明書中引用之所有先前技術文獻納入本發明作為參照。

實施例

【0221】 實施例1

材料及方法

細胞株

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

【0222】 安定表現HLA-A*1101之刺激細胞之製作

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

【0223】 來自KOC1的胜肽之候選選擇

使用結合預測伺服器「NetMHC 3.2」(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus etal., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., ProteinSci. 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12:20(9):1388-97)預測結合於HLA-A*1101分子之來自KOC1的9mer及10mer之胜肽。

【0224】 胜肽之合成

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

【0225】 於試管內之CTL誘導

使用來自單核球之樹狀細胞(DC)作為抗原呈現細胞，誘導針對在人白血球抗原(HLA)上呈現之胜肽之細胞傷害性T淋巴球(CTL)應答。依於其他處記載之方式，於試管內製作DC (Nakahara S et al.,Cancer Res 2003,63(14):4112-8)。具體而言，使利用Ficoll-Paque plus (Pharmacia)溶液從健常的自願者(HLA-A*1101陽性)單離而得的末梢血單核細胞附著於塑膠製組織培養皿(Becton Dickinson)以分離，將此等濃縮作為單核球級分。於包括2%之已加熱失活化之自體血清(AS)之

AIM-V培養基(Invitrogen)中，於存在1000 IU/ml之顆粒球巨噬體群落刺激因子(R&D System)及1000 IU/ml之介白素(IL)-4(R&D System)之狀態培養已濃縮單核球之族群。經7日培養後，於AIM-V培養基中於37°C在3μg/ml之β2-微球蛋白存在下，以20μg/ml之各合成胜肽衝擊經細胞介素誘導之DC 3小時。製得之細胞於自身細胞表面上表現CD80、CD83、CD86、及HLA第II類等DC關連分子(數據未顯示)。其次，使將經胜肽衝擊之該等DC利用X射線照射(20Gy)失活，與利用使用CD8陽性單離套組(Dynal)之陽性選擇獲得之自體CD8+T細胞以1：20之比率混合。將該等之培養物接種於48井板(Corning)中。各井於0.5ml之AIM-V/2%AS培養基中含有1.5 x 10^4個經胜肽衝擊之DC、3 x 10^5個CD8+T細胞及10ng/ml之IL-7(R&D System)。3日後於該等培養物添加IL-2(CHIRON)直到最終濃度為20IU/ml。於第7日及第14日，再利用經胜肽衝擊之自體DC刺激T細胞。每次以和上述相同方法製備DC。於第21日，經第3次胜肽刺激後，以人干擾素(IFN)-γ酵素連結免疫點(ELISPOT)分析測試針對經胜肽衝擊之C1R-A11之CTL(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al.,Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

【0226】 CTL增殖程序

使用和Riddell等人(Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-23)記載之方法為類似的方法，使CTL於培養下增殖。將CTL和5 x 10^6個細胞/燒瓶之經絲裂黴素C(mitomycin C)處理之2種人B淋巴芽球樣細胞株、及40ng/ml的抗CD3抗體一起於總量25ml之含有5%AS之AIM-V(AIM-V/5%AS)培養基中進行共培養。培養開始1日後，將120IU/ml之IL-2添加到該培養物。於第5、8及11日，將含有30IU/ml之IL-2之新鮮的AIM-V/5%AS培養基添加到該培養物(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001,84(1):

94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7, UchidaN et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9, Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

【0227】 CTL選殖體之建立

於96圓底微滴定平板(Nalge Nunc International)進行稀釋使成為CTL 0.3個、1個、及3個細胞/井。將CTL和1 x 10^4個細胞/井之經絲裂黴素C處理之2種人B淋巴芽球樣細胞株、30ng/ml的抗CD3抗體、及125IU/ml的IL-2一起於總量150μl/井之AIM-V/5%AS培養基中培養。10日後，將50μl/井之IL-2添加到該培養基使IL-2之最終濃度到達125IU/ml。於第14日進行CTL活性試驗，使用和上述相同方法使CTL選殖體增殖(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda Tet al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci2005, 96(8)): 498-506)。

【0228】 專一性CTL活性

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

【0229】 強制表現標靶基因及HLA-A*1101之標靶細胞之建立

將標靶基因或編碼為HLA-A*1101之開放讀框之cDNA利用PCR放大。將PCR放大產物選殖到表現載體。依製造商建議的程序使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)，對於標靶基因及HLA之陰性細胞株COS7轉染標靶基因之表現載體及HLA-A*1101之表現載體中之任一者或兩者。轉染2日後，使用Versene(Invitrogen)回收已轉染之細胞，作為用於CTL活性分析之標靶細胞(5 x 10^4個細胞/井)。

【0230】 結果

來自KOC1的HLA-A*1101結合胜肽之預測

表1a及表1b以結合親和性高至低之順序顯示來自KOC1的9mer胜肽及10mer胜肽向HLA-A*1101之結合預測結果。為了決定抗原決定位胜肽，選擇並檢查可能有HLA-A*1101結合能力之合計60種胜肽。

[0231] [表1a]

來自KOC1的HLA-A11結合9mer胜肽

開始位置	胜肽鏈序列	Kd (nM)	序列編號
258	KSILEIMHK	16	1
121	VVNVTYSSK	18	2
465	KAQGRIYGK	32	3
517	SSAEVVVPR	45	4
415	LSVGAIIGK	76	5
28	PVSGPFLVK	85	6
52	KAIEALSGK	92	7
142	FQLENFTLK	150	8
215	GATIRNITK	293	9
338	KAEEEIMKK	297	10
497	FAAGRVIGK	405	11
15	PSDLESIFK	451	12
536	VVKITGHFY	757	13
479	FVSPKEEVK	791	14
493	RVPSFAAGR	1100	15
272	KFTEEIPLK	1108	16
226	QSKIDVHRK	1125	17
330	KGNVETCAK	1835	18
544	YACQVAQRK	1841	19
220	NITKQTQSK	2617	20
301	KIEQDTDTK	2631	21
553	IQEILTQVK	3008	22
182	QGSFGSVSK	3293	23
559	QVKQHQQQK	3313	24
58	SGKIELHGK	4377	25
205	QFVGAIIGK	4472	26

【0232】 [表1b]

來自KOC1的HLA-A11結合10mer胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
120	AVVNVTYSSK	13	27
414	ALSVGAIIGK	33	28
456	ITGPPEAQFK	73	29
204	TQFVGAIIGK	86	30
73	SVPKRQRIRK	103	31
14	APSDLESIFK	152	32
183	GSPGSVSKQK	165	33
496	SFAAGRVIGK	168	34
516	LSSAEVVVPR	169	35
552	KIQEILTQVK	214	36
431	LSRFAGASIK	342	37
181	RQGSPGSVSK	368	38
124	VTYSSKDQAR	437	39
225	TQSKIDVHRK	478	40
535	VVVKITGHFY	678	41
224	QTQSKIDVHR	711	42
57	LSGKIELHGK	904	43
141	GFQLENFTLK	911	44
568	ALQSGPPQSR	1065	45
312	ISPLQELTLY	1262	46
441	IAPAEAPDAK	1570	47
27	IPVSGPFLVK	1622	48
570	QSGPPQSRRK	1777	49
95	EVLDSLLVQY	2124	50
336	CAKAEEEIMK	2194	51
281	ILAHNNFVGR	2264	52
466	AQGRIYGKIK	2595	53
160	AQQNPLQQPR	2689	54
420	IIGKQGQHIK	2763	55
558	TQVKQHQQQK	2862	56
257	CKSILEIMHK	3467	57
291	LIGKEGRNLK	3795	58
263	IMHKEAQDIK	4083	59
569	LQSGPPQSRR	4107	60

開始位置代表自KOC1之N端起的胺基酸殘基數。

解離常數[Kd(nm)]係由「NetMHC3.2」導出。

【0233】 HLA-A*1101拘束性之來自KOC1之預測胜肽所為之CTL之誘導

依「材料及方法」記載之實驗步驟製作針對來自KOC1之胜肽的CTL。依IFN-γ ELISPOT分析測定胜肽專一性CTL活性(第1圖)。使用KOC1-A11-9-415(序列編號：5)之井編號#6(a)、使用KOC1-A11-10-414(序列編號：28)之井編號#4(b)、使用KOC1-A11-10-204(序列編號：30)之井編號#5(c)及使用KOC1-A11-10-14(序列編號：32)之井編號#8(d)之CTL，和對照比較顯示較強力之IFN-γ產生。另一方面，表1a及表1b所示之其他胜肽，雖有可能具有和HLA-A*1101之結合活性，但利用此等之胜肽之刺激未測到專一性CTL活性。雖是典型的陰性數據之例，由觀測到經KOC1-A11-9-258(序列編號：1)刺激之CTL未有專一性IFN-γ產生(e)。結果選擇來自KOC1之4種胜肽作為能強力誘導CTL之胜肽。

【0234】 針對HLA-A*1101拘束性之來自KOC1之胜肽之CTL株及選殖體之建立

使於使用以IFN-γ ELISPOT分析顯示胜肽專一性CTL活性之KOC1-A11-9-415(序列編號：5)之井編號#6(a)、使用KOC1-A11-10-204(序列編號：30)之井編號#5(b)及使用KOC1- A11-10-14(序列編號：32)之井編號#8(c)之CTL增殖並建立CTL株。利用IFN-γ ELISA測定此等CTL株之CTL活性(第2圖)。該等CTL株對於經對應胜肽衝擊之標靶細胞比起未經胜肽衝擊的標靶細胞顯示較強力之IFN-γ產生。再者，依上述「材料及方法」之章節記載，利用極限稀釋從CTL株建立CTL選殖體，利用IFN-γ ELISA測定從對於經胜肽衝擊之C1R-A11之CTL選殖體產生的IFN-γ。觀察到經KOC1-A11-9-415(序列編號：5)(a)及KOC1-A11-10-14(序列編號：32)(b)刺激之CTL選殖體有強力的IFN-γ產生(第3圖)。

【0235】 針對表現KOC1及HLA-A*1101之標靶細胞之專一性CTL活性

就針對KOC1-A11-10-14(序列編號：32)建立之CTL選殖體認識表現KOC1及HLA-A*1101分子之標靶細胞之能力進行檢查。製備已轉染全長KOC1及

HLA-A*1101基因兩者之COS7細胞(表現KOC1及HLA-A*1101基因之標靶細胞之專一性模型)作為標靶細胞。製備已轉染全長KOC1或HLA-A*1101中任一者之COS7細胞作為對照。經KOC1-A11-10-14(序列編號:32)刺激之CTL選殖體針對表現KOC1及HLA-A*1101兩者之COS7細胞顯示強力的CTL活性(第4圖)。另一方面,未檢測到針對對照細胞有顯著專一性CTL活性。依該等數據,明確證實:KOC1-A11-10-14 (序列編號:32)係由KOC1之內在的處理而產生的胜肽,且和HLA-A*1101分子一起在標靶細胞上呈現而被CTL認識。該等結果顯示:KOC1-A11-10-14(序列編號:32)可能適合作為針對罹患表現KOC1之癌之患者的癌疫苗。

【0236】 抗原胜肽之相同性解析

經KOC1-A11-9-415(序列編號:5)、KOC1-A11-10-414(序列編號:28)、KOC1-A11-10-204(序列編號:30)及KOC1-A11-10- 14(序列編號:32)刺激之CTL顯示顯著且專一性CTL活性。此結果可能的原因是:KOC1-A11-9-415(序列編號:5)、KOC1-A11-10-414(序列編號:28)、KOC1-A11-10-204(序列編號:30)及KOC1-A11-10-14(序列編號:32)之序列和已知會感作人免疫系之來自其他分子之胜肽為相同的事實。為了排除此可能性,使用BLAST演算法(blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi),將該等胜肽之序列作為查詢條件,實施相同性解析。其結果,未查到針對KOC1-A11-9-415(序列編號:5)、KOC1-A11-10-414(序列編號:28)、KOC1-A11-10-204(序列編號:30)及KOC1-A11-10-14(序列編號:32)之序列有顯著相同性之序列。另一方面,KOC1-A11-10-204(序列編號:30)和在其他IMP家族IMP-2中找到的胜肽序列相同。在以前曾有人報告IMP-2在睪丸與胎兒肝臟以外的正常器官不表現(Hammer NA et al, Reproduction. 2005;130(2):203-12)。且涉及神經膠母細胞瘤癌幹細胞之增殖(Janiszewska M et al., Genes Dev. 2012;26(17):1926-44)。故IMP-2為有前景的癌免疫療法的標靶抗原。因此據本案發明人等所知,該等胜肽據認為幾乎不會針對其他無關連的分

子引起不欲之免疫應答。就結論而言，可鑑別來自KOC1之新穎HLA-A11拘束性抗原決定位胜肽。又，顯示來自KOC1的抗原決定位胜肽可以適用於癌免疫療法。

【0237】 實施例2

材料及方法

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

【0238】 安定表現HLA-A*3303之刺激細胞之製作

使用安定表現HLA-A*3303之C1R(C1R-A33)作為刺激細胞。將編碼為HLA-A*3303之開放讀框之cDNA以PCR放大，選殖到表現載體。將C1R細胞以表現載體轉形，之後使用G418(Invitrogen)選擇2週。將G418選擇細胞接種到包括已添加G418之培養基之96井板之井，再培養30日。外來性HLA-A*3303之C1R細胞之表現以流式細胞術解析確認。

【0239】 來自KOC1的胜肽的候選選擇

使用結合預測伺服器「NetMHCpan2.8」(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/)(Nielsen et al., PLoS One. 2007;29;2(8): e796; Hoof et al., Immunogenetics. 2009; 61(1):1-13)預測結合於HLA-A*3303分子之來自KOC1的9mer及10mer的胜肽。

【0240】 胜肽之合成

利用Biosynthesis(Lewisville,Texas)依標準的固相合成法合成該等胜肽，並以逆相高速液體層析(HPLC)精製。該胜肽之純度(>90%)及同一性分別利用分析用HPLC及質量分析分析。胜肽以20mg/ml溶解於二甲基亞碸並於-80℃保存。

【0241】 於試管內之CTL誘導

使用來自單核球之樹狀細胞(DC)作為抗原呈現細胞，誘導針對在人白血球抗原(HLA)上呈現之胜肽之細胞傷害性T淋巴球(CTL)應答。如其他處所記載，在試管內製作DC(Nakahara S et al.,Cancer Res 2003,63(14):4112-8)。具體而言，使

利用Ficoll-Paque plus(Pharmacia)溶液從健常自願者(HLA-A*3303陽性)單離之末梢血單核細胞附著於塑膠製組織培養皿(Becton Dickinson)以分離，並將此等濃縮作為單核球級分。於含有2%之加熱失活之自體血清(AS)之AIM-V培養基(Invitrogen)中，於1000 IU/ml之顆粒球巨噬體群落刺激因子(R&D System)及1000 IU/ml之介白素(IL)-4(R&D System)存在下，培養已濃縮單核球之族群。7日培養後，於AIM-V培養基中於37°C在3μg/ml之β2-微球蛋白存在下將20μg/ml之各合成胜肽衝擊經細胞介素誘導之DC 3小時。製得之細胞在自身細胞表面上表現CD80、CD83、CD86、及HLA第II類等DC關連分子(數據未顯示)。其次，使經胜肽衝擊之該等DC以X射線照射(20Gy)失活，與使用CD8陽性單離套組(Dynal)之陽性選擇獲得之自體CD8+T細胞以1：20之比率混合。將該等培養物接種於48井板(Corning)。各井係於0.5ml之AIM-V/2%AS培養基中含有1.5 x 10^4個經胜肽衝擊之DC、3 x 10^5個CD8+T細胞及10ng/ml之IL-7(R&D System)。3日後於該等培養物添加IL-2(CHIRON)直到最終濃度為20IU/ml。於第7日及第14日，以經胜肽衝擊之自體DC再刺激T細胞。DC係以和上述為相同之方法每次製備。於第21日，第3次胜肽刺激後以人干擾素(IFN)-γ酵素連結免疫點(ELISPOT)分析測試針對經胜肽衝擊之C1R-A33細胞的CTL(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T etal., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

【0242】 CTL增殖程序

使用和Riddell(Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-23)記載之方法為類似之方法使CTL於培養下增殖。將CTL和5 x 10^6個細胞/燒瓶之經絲裂黴素C處理之2種人B淋巴芽球樣細胞株、及40ng/ml的抗CD3抗體一起於總量25ml之含5%AS之AIM-V(AIM-V/5%AS)

培養基中進行共培養。培養開始1日後，將120IU/ml之IL-2添加到該培養物。於第5、8及11日，將含有30IU/ml之IL-2之新鮮的AIM-V/5%AS培養基添加到該培養物(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7, Uchida N etal., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9, Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

【0243】 CTL選殖體之建立

於96圓底微滴定平板(Nalge Nunc International)中，將CTL稀釋成0.3個、1個、及3個細胞/井。將CTL和1 x 10^4個細胞/井之經絲裂黴素C處理之2種人B淋巴芽球樣細胞株、30ng/ml的抗CD3抗體、及125IU/ml之IL-2一起於總量150μl/井之AIM-V/5%AS培養基中進行培養。10日後，將50μl/井之IL-2添加到該培養基使IL-2之最終濃度到達125IU/ml。於第14日測試CTL活性，使用和上述為相同之方法使CTL選殖體增殖(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda Tet al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci2005, 96(8)): 498-506)。

【0244】 專一性CTL活性

為了檢查專一性CTL活性，實施IFN-γ ELISPOT分析及IFN-γ酵素連結免疫吸附分析(ELISA)。具體而言，製備經胜肽衝擊之C1R-A33(1 x 10^4個細胞/井)作為刺激細胞。將已誘導之CTL，亦即CTL株及CTL選殖體作為應答細胞。IFN-γ ELISPOT分析及IFN-γ ELISA依製造商之程序實施。

【0245】 強制表現標靶基因及HLA-A*3303之標靶細胞之建立

將編碼為標靶基因或HLA-A*3303之開放讀框之cDNA以PCR放大。將PCR放大產物選殖到表現載體。依製造商建議的程序使用Lipofectamine2000 (Invitrogen)，對於標靶基因及HLA之陰性細胞株COS7轉染標靶基因之表現載體及HLA-A*3303之表現載體中任一者或兩者。轉染起2日後，使用Versene(Invitrogen)回收轉染之細胞，作為用於CTL活性分析之標靶細胞(5 x 10^4個細胞/井)。

【0246】 結果

來自KOC1的HLA-A*3303結合胜肽之預測表2a及表2b中，將預測向HLA-A*3303之結合之來自KOC1的9mer胜肽及10mer胜肽以結合親和性由高至低的順序顯示。為了決定抗原決定位胜肽，選擇可能有HLA-A*3303結合能力之合計37個胜肽並檢驗。

【0247】 [表2a]

來自KOC1之HLA-A33結合9mer胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
543	FYACQVAQR	98	61
517	SSAEVVVPR	105	4
282	LAHNNFVGR	140	62
493	RVPSFAAGR	182	15
317	ELTLYNPER	260	63
485	EVKLEAHIR	278	64
125	TYSSKDQAR	467	65
461	EAQFKAQGR	555	66
286	NFVGRLIGK	933	67
225	TQSKIDVHR	1039	68
69	EVEHSVPKR	1453	69
161	QQNPLQQPR	1485	70
406	ETVHLFIPA	2340	71
73	SVPKRQRIR	2969	72
570	QSGPPQSRR	3001	73
121	VVNVTYSSK	3272	2
465	KAQGRIYGK	3308	3
142	FQLENFTLK	4063	8
34	LVKTGYAFV	4107	74
211	IGKEGATIR	4197	75
307	DTKITISPL	4676	76

【0248】 [表2b]

來自KOC1之HLA-A33結合10mer胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
542	HFYACQVAQR	16	77
124	VTYSSKDQAR	201	39
224	QTQSKIDVHR	296	42
281	ILAHNNFVGR	320	52
72	HSVPKRQRIR	428	78
516	LSSAEVVVPR	467	35
496	SFAAGRVIGK	1710	34
543	FYACQVAQRK	2635	79
424	QGQHIKQLSR	2752	80
190	KQKPCDLPLR	3492	81
431	LSRFAGASIK	3726	37
568	ALQSGPPQSR	4478	45
210	IIGKEGATIR	4831	82
478	NFVSPKEEVK	4831	83
77	RQRIRKLQIR	4883	84
285	NNFVGRLIGK	4883	85

開始位置代表自KOC1之N端起的胺基酸殘基數。

解離常數[Kd(nm)]係由「NetMHCpan2.8」導出。

【0249】 HLA-A*3303拘束性之來自KOC1之預測胜肽所為之CTL之誘導

依「材料及方法」記載之實驗步驟製作針對來自KOC1的胜肽的CTL。利用IFN-γ ELISPOT分析測定胜肽專一性CTL活性(第5圖)。使用KOC1-A33-9-543(序列編號：61)之井編號#1(a)、使用KOC1-A33-9-282(序列編號：62)之井編號#2(b)、使用KOC1-A33-9-317(序列編號：63)之井編號#3(c)、使用KOC1-A33-9-485(序列編號：64)之井編號#8(d)、使用KOC1- A33-9-286(序列編號：67)之井編號#3(e)、使用KOC1-A33-9-34 (序列編號：74)之井編號#8(f)、使用KOC1-A33-10-542(序列

編號：77)之井編號#4(g)、使用KOC1-A33-10-281(序列編號：52)之井編號#3(h)、使用KOC1-A33-10-543(序列編號：79)之井編號#6(i)、使用KOC1091-A33-10-424(序列編號：80)之井編號#1(j)、使用KOC1-A33-10-285(序列編號：85)之井編號#5(k)之CTL，和對象比較，顯示較強力之IFN-γ產生。另一方面，表2a及表2b所示之其他胜肽，儘管有可能具有和HLA-A*3303之結合活性，但經此等之胜肽之刺激未測定到專一性CTL活性。雖為典型的陰性數據的例子，但未觀察到經KOC1-A33-9-517(序列編號：4)刺激之CTL有專一性IFN-γ產生(l)。結果選擇來自KOC1之11種胜肽作為能強力誘導CTL之胜肽。

【0250】 針對HLA-A*3303拘束性之來自KOC1之胜肽之CTL株及選殖體之建立

IFN-γ ELISPOT分析中，使顯示胜肽專一性CTL活性之使用KOC1-A33-9-543(序列編號：61)之井編號#1(a)、使用KOC1- A33-9-282(序列編號：62)之井編號#2(b)、使用KOC1-A33-9- 485(序列編號：64)之井編號#8(c)、使用KOC1-A33-9-286(序列編號：67)之井編號#3(d)、使用KOC1-A33-10-542(序列編號：77)之井編號#4(e)及使用KOC1-A33-10-281(序列編號：52)之井編號#3(f)之CTL增殖，並建立CTL株。利用IFN-γ ELISA測定該等CTL株之CTL活性(第6圖)。該等CTL株，相較於未經胜肽衝擊之標靶細胞，對於對應之經胜肽衝擊之標靶細胞顯示較強力之IFN-γ產生。再者，依上述「材料及方法」之章節記載，利用極限稀釋從CTL株建立CTL選殖體，利用IFN-γ ELISA測定從針對經胜肽衝擊之C1R-A33之CTL選殖體的IFN-γ產生。於經KOC1-A33-9-543(序列編號：61)(a)、KOC1-A33-9-282(序列編號：62)(b)、KOC1-A33-9-485(序列編號：64)(c)、KOC1-A33-9-286(序列編號：67)(d)、KOC1-A33-10-542 (序列編號：77)(e)及KOC1-A33-10-281(序列編號：52)(f)刺激之CTL選殖體觀測到強力的IFN-γ產生(第7圖)。

【0251】 針對表現KOC1及HLA-A*3303之標靶細胞之專一性CTL活性

將針對KOC1-A33-9-485(序列編號：64)(a)、KOC1-A33-9- 286(序列編號：67)(b)及KOC1-A33-10-542(序列編號：77)(c)建立之CTL株及CTL選殖體就認識表現KOC1及HLA-A*3303分子之標靶細胞之能力調查。製備轉染全長KOC1及HLA-A*3303基因兩者之COS7細胞(表現KOC1及HLA-A*3303基因之標靶細胞之專一性模型)作為標靶細胞。製備已轉染全長KOC1或HLA-A*3303中之任一者之COS7細胞作為對照。經KOC1-A33-9-485(序列編號：64)(a)、KOC1-A33-9-286 (序列編號:67)(b)及KOC1-A33-10-542(序列編號:77)(c)刺激之CTL選殖體針對表現KOC1及HLA-A*3303兩者之COS7細胞顯示強力之CTL活性(第8圖)。另一方面，對於對照細胞未檢測到顯著專一性CTL活性。由該等數據明確地實證：KOC1-A33-9-485(序列編號：64)、KOC1-A33-9-286(序列編號：67)及KOC1- A33-10-542(序列編號：77)係因為KOC1之內在的處理而產生的胜肽，且和HLA-A*3303分子一起在標靶細胞上被呈現而由CTL認識。該等結果顯示KOC1-A33-9-485(序列編號：64)、KOC1-A33-9-286(序列編號：67)及KOC1-A33-10-542(序列編號：77)可能適於作為針對罹患表現KOC1之癌之患者之癌疫苗。

【0252】 抗原胜肽之相同性解析

經KOC1-A33-9-543(序列編號：61)、KOC1-A33-9-282(序列編號：62)、KOC1-A33-9-317(序列編號:63)、KOC1-A33-9-485 (序列編號:64)、KOC1-A33-9-286 (序列編號：67)、KOC1-A33-9- 34(序列編號：74)、KOC1-A33-10-542(序列編號：77)、KOC1- A33-10-281(序列編號：52)、KOC1-A33-10-543(序列編號：79)、KOC1-A33-10-424(序列編號：80)及KOC1-A33-10-285(序列編號：85)刺激之CTL顯示顯著且專一性的CTL活性。此等結果有可能起因於KOC1-A33-9-543(序列編號：61)、KOC1-A33-9- 282(序列編號：62)、KOC1-A33-9-317(序列編號：63)、KOC1- A33-9-485(序列編號:64)、KOC1-A33-9-286(序列編號:67)、KOC1-A33-9-34 (序列編號：74)、KO111C1-A33-10-542(序列編號：77)、KOC1-A33-10-281(序列

編號：52)、KOC1-A33-10-543 (序列編號：79)、KOC1-A33-10-424(序列編號：80)及KOC1-A33- 10-285(序列編號：85)之序列和已知會感作人免疫系之來自其他分子之胜肽為相同之事實。為了排除此可能性，使用BLAST演算法(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)，將該等胜肽之序列作為查詢條件，實施相同性解析。其結果，得知KOC1-A33-9-543 (序列編號：61)、KOC1-A33-9-317(序列編號：63)、KOC1-A33-9- 485(序列編號：64)、KOC1-A33-9-34(序列編號：74)、KOC1-A33-10-542(序列編號：77)、KOC1-A33-10-543(序列編號：79)及KOC1-A33-10-424(序列編號：80)之序列為固有序列。另一方面，KOC1-A33-9-282(序列編號：62)、KOC1-A33-9-286(序列編號：67)、KOC1-A33-10-281(序列編號：52)及KOC1-A33-10-285(序列編號：85)和在其他IMP家族IMP-1中找到的胜肽序列相同。又，KOC1-A33-9-485(序列編號：64)和IMP-2中找到的胜肽序列相同。IMP-1於以前有人報告在睪丸、胎兒肝臟及胎盤以外的正常器官不表現(Hammer NA et al, Reproduction. 2005;130(2):203-12)。且有人報告和肺癌患者之腫瘤之進行相關連(Kato T et al., Clin Cancer Res. 2007;13:434-42)。在以前曾有人報告IMP-2在睪丸與胎兒肝臟以外的正常器官不表現(Hammer NA et al, Reproduction. 2005;130(2):203-12)。且涉及神經膠母細胞瘤癌幹細胞之增殖(Janiszewska M et al., Genes Dev. 2012;26(17):1926-44)。故IMP-1及IMP-2為有前景的癌免疫療法的標靶抗原。因此據本案發明人等所知，該等胜肽據認為幾乎不會針對其他無關連的分子引起不欲之免疫應答。就結論而言，可鑑別來自KOC1之新穎HLA-A33拘束性抗原決定位胜肽。又，顯示來自KOC1的抗原決定位胜肽可以適用於癌免疫療法。

【0253】 實施例3

材料及方法

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

【0254】 安定表現HLA-A*0301之刺激細胞之製作

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

【0255】 來自KOC1的胜肽之候選選擇

使用結合預測伺服器「NetMHC 3.2」(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus etal., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., ProteinSci. 2003 May, 12(5):1007- 17, Bioinformatics. 2004 Jun 12:20(9):1388-97)預測結合於HLA-A*0301分子分子之來自KOC1的9mer及10mer之胜肽。

【0256】 胜肽之合成

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

【0257】 於試管內之CTL誘導

使用來自單核球之樹狀細胞(DC)作為抗原呈現細胞，誘導針對在人白血球抗原(HLA)上呈現之胜肽之細胞傷害性T淋巴球(CTL)應答。依於其他處記載之方式，於試管內製作DC (Nakahara S et al.,Cancer Res 2003,63(14):4112-8)。具體而言，使利用Ficoll-Paque plus(Pharmacia)溶液從健常的自願者(HLA-A*0301陽性)單離而得的末梢血單核細胞附著於塑膠製組織培養皿(Becton Dickinson)以分離，將此等濃縮作為單核球級分。於包括2%之已加熱失活化之自體血清(AS)之AIM-V培養基(Invitrogen)中，於存在1000 IU/ml之顆粒球巨噬體群落刺激因子(R&D System)及1000 IU/ml之介白素(IL)-4(R&D System)之狀態培養已濃縮單核

球之族群。經7日培養後，於AIM-V培養基中於37°C在3μg/ml之β2-微球蛋白存在下，以20μg/ml之各合成胜肽衝擊經細胞介素誘導之DC 3小時。製得之細胞於自身細胞表面上表現CD80、CD83、CD86、及HLA第II類等DC關連分子(數據未顯示)。其次，使將經胜肽衝擊之該等DC利用X射線照射(20Gy)失活，與利用使用CD8陽性單離套組(Dynal)之陽性選擇獲得之自體CD8+T細胞以1：20之比率混合。將該等之培養物接種於48井板(Corning)中。各井於0.5ml之AIM-V/2%AS培養基中含有1.5 x 10^4個經胜肽衝擊之DC、3 x 10^5個CD8+T細胞及10ng/ml之IL-7(R&D System)。3日後於該等培養物添加IL-2(CHIRON)直到最終濃度為20IU/ml。於第7日及第14日，再利用經胜肽衝擊之自體DC刺激T細胞。每次以和上述相同方法製備DC。於第21日，經第3次胜肽刺激後，以人干擾素(IFN)-γ酵素連結免疫點(ELISPOT)分析測試針對經胜肽衝擊之C1R-A03之CTL(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al.,Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

【0258】 CTL增殖程序

使用和Riddell等人(Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-23)記載之方法為類似的方法，使CTL於培養下增殖。將CTL和5 x 10^6個細胞/燒瓶之經絲裂黴素C(mitomycin C)處理之2種人B淋巴芽球樣細胞株、及40ng/ml的抗CD3抗體一起於總量25ml之含有5%AS之AIM-V(AIM-V/5%AS)培養基中進行共培養。培養開始1日後，將120IU/ml之IL-2添加到該培養物。於第5、8及11日，將含有30IU/ml之IL-2之新鮮的AIM-V/5%AS培養基添加到該培養物(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001,84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7, UchidaN et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9, Watanabe T

et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

【0259】 CTL選殖體之建立

於96圓底微滴定平板(Nalge Nunc International)進行稀釋使成為CTL 0.3個、1個、及3個細胞/井。將CTL和1 x 10^4個細胞/井之經絲裂黴素C處理之2種人B淋巴芽球樣細胞株、30ng/ml的抗CD3抗體、及125IU/ml的IL-2一起於總量150μl/井之AIM-V/5%AS培養基中培養。10日後，將50μl/井之IL-2添加到該培養基使IL-2之最終濃度到達125IU/ml。於第14日進行CTL活性試驗，使用和上述相同方法使CTL選殖體增殖(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda Tet al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci2005, 96(8)): 498-506)。

【0260】 專一性CTL活性

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

【0261】 強制表現標靶基因及HLA-A*0301之標靶細胞之建立

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

【0262】 結果

來自KOC1的HLA-A*0301結合胜肽之預測

表3a及表3b以結合親和性高至低之順序顯示來自KOC1的9mer胜肽及10mer胜肽向HLA-A*0301之結合預測結果。為了決定抗原決定位胜肽，選擇並檢查可

能夠HLA-A*0301結合能力之合計23種胜肽。

[(02.63)] [表3a]

來自KOC1之HLA-A3結合9mer胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
121	VVNVTYSSK	84	2
258	KSHEEMEHK	124	1
52	KAIEALSGK	496	7
28	PVSGPFLVK	613	6
465	KAQGRIYGK	630	3
142	FQLENFTLK	752	8
415	LSVGAIGK	764	5
497	EAAGRVIGK	927	11
559	QVKQHQQQK	1152	24

[(02.64)] [表3b]

來自KOC1之HLA-A3結合10mer胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
120	AVVNVTYSSK	17	27
414	ALSVGAIGK	37	28
431	LSRFAGASIK	69	37
181	RQGSPGSVSK	104	38
456	ITGPPEAQFK	211	29
204	TQFVGAIGK	211	30
496	SEAAGRVIGK	215	34
552	KIQEILTQVK	365	36
281	ILAHNNFVGR	459	52
73	SVPKRQRIRK	521	31
535	VVVKITGHFY	682	41
420	EGKQGQHIK	858	55
141	GFQLENFTLK	1112	44
14	APSDLESIFK	1275	32

開始位置代表自KOC1之N端起的胺基酸殘基數。

解離常數[Kd(nm)]係由「NetMHC3.2」導出。

【0265】 HLA-A*0301拘束性之來自KOC1之預測胜肽所為之CTL之誘導

依「材料及方法」記載之實驗步驟製作針對來自KOC1的胜肽的CTL。利用IFN-γ ELISPOT分析測定胜肽專一性CTL活性(第9圖)。使用KOC1-A03-10-120(序列編號：27)之井編號#5(a)、使用KOC1-A03-10-204(序列編號：30)之井編號#3(b)及使用KOC1-A03-10-281(序列編號：52)之井編號#5(c)之CTL，和對象比較，顯示較強力之IFN-γ產生。另一方面，表3a及表3b所示之其他胜肽，儘管有可能具有和HLA-A*0301之結合活性，但經此等之胜肽之刺激未測定到專一性CTL活性。雖為典型的陰性數據的例子，但未觀察到經KOC1-A03-10- 414(序列編號：28)刺激之CTL有專一性IFN-γ產生(d)。結果選擇來自KOC1之3種胜肽作為能強力誘導CTL之胜肽。

【0266】 針對HLA-A*0301拘束性之來自KOC1之胜肽之CTL株及選殖體之建立

IFN-γ ELISPOT分析中，使顯示胜肽專一性CTL活性之使用KOC1-A03-10-120(序列編號：27)之井編號#5之CTL增殖，並建立CTL株。利用IFN-γ ELISA測定該等CTL株之CTL活性(第10圖)。該等CTL株，相較於未經胜肽衝擊之標靶細胞，對於對應之經胜肽衝擊之標靶細胞顯示較強力之IFN-γ產生。再者，依上述「材料及方法」之章節記載，利用極限稀釋從CTL株建立CTL選殖體，利用IFN-γ ELISA測定從針對經胜肽衝擊之C1R-A03之CTL選殖體的IFN-γ產生。於經KOC1-A03-10-120(序列編號：27)刺激之CTL選殖體觀測到強力的IFN-γ產生(第11圖)。

【0267】 針對表現KOC1及HLA-A*0301之標靶細胞之專一性CTL活性

將針對KOC1-A03-10-120(序列編號：27)建立之CTL株及CTL選殖體就認識

表現KOC1及HLA-A*0301之標靶細胞之能力調查。製備轉染全長KOC1及HLA-A*0301基因兩者之COS7細胞(表現KOC1及HLA-A*0301基因之標靶細胞之專一性模型)作為標靶細胞。製備已轉染全長KOC1或HLA-A*0301中之任一者之COS7細胞作為對照。經KOC1-A03-10-120(序列編號：27)刺激之CTL選殖體針對表現KOC1及HLA-A*0301兩者之COS7細胞顯示強力之CTL活性(第12圖)。另一方面，對於對照細胞未檢測到顯著專一性CTL活性。由該等數據明確地實證：KOC1-A03-10-120(序列編號：27)係因為KOC1之內在的處理而產生的胜肽，且和HLA-A*0301分子一起在標靶細胞上被呈現而由CTL認識。該等結果顯示KOC1-A03-10-120 (序列編號：27)可能適於作為針對罹患表現KOC1之癌之患者之癌疫苗。

【0268】 抗原胜肽之相同性解析

經KOC1-A03-10-120(序列編號：27)、KOC1-A03-10-204(序列編號：30)及KOC1-A03-10-281(序列編號：52)刺激之CTL顯示顯著且專一性的CTL活性。此等結果有可能起因於KOC1-A03-10-120(序列編號：27)、KOC1-A03-10-204(序列編號：30)及KOC1-A03-10-281(序列編號：52)之序列和已知會感作人免疫系之來自其他分子之胜肽為相同之事實。為了排除此可能性，使用BLAST演算法(blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi)，將該等胜肽之序列作為查詢條件，實施相同性解析。其結果，得知針對KOC1-A03-10-120(序列編號：27)無有顯著相同性之序列。又，KOC1-A03-10-204(序列編號：30)和在其他IMP家族即IMP-2中找到的胜肽序列相同。KOC1-A03- 10-281(序列編號：52)和在其他IMP家族即IMP-1中找到的胜肽序列相同。IMP-1於以前有人報告在睪丸、胎兒肝臟及胎盤以外的正常器官不表現(Hammer NA et al, Reproduction. 2005;130(2):203-12)。且有人報告和肺癌患者之腫瘤之進行相關連(Kato T et al., Clin Cancer Res. 2007;13:434-42)。在以前曾有人報告IMP-2在睪丸與胎兒肝臟以外的正常器官不表現(Hammer NA et

al, Reproduction. 2005;130(2):203-12)。且涉及神經膠母細胞瘤癌幹細胞之增殖(Janiszewska M et al., Genes Dev. 2012;26(17):1926-44)。故IMP-1及IMP-2為有前景的癌免疫療法的標靶抗原。因此據本案發明人等所知，該等胜肽據認為幾乎不會針對其他無關連的分子引起不欲之免疫應答。就結論而言，可鑑別來自KOC1之新穎HLA-A03拘束性抗原決定位胜肽。又，顯示來自KOC1的抗原決定位胜肽可以適用於癌免疫療法。

【0269】 實施例4

材料及方法

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

【0270】 安定表現HLA-A*0101之刺激細胞之製作

將安定表現HLA-A*0101之C1R(C1R-A01)作為刺激細胞使用。將編碼為HLA-A*0101之開放讀框之cDNA以PCR放大，選殖到表現載體。將C1R細胞以表現載體轉形，之後使用G418(Invitrogen)進行2週選擇。將G418選擇細胞接種到包含已添加G418之培養基之96井板之井，再培養30日。以流式細胞術解析確認C1R細胞有外來性HLA-A*0101之表現。

【0271】 來自KOC1的胜肽之候選選擇

使用結合預測伺服器「NetMHC 3.2」(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/)(Buus etal., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., ProteinSci. 2003 May, 12(5):1007- 17, Bioinformatics. 2004 Jun 12:20(9):1388-97)預測結合於HLA-A*0101分子之來自KOC1的9mer及10mer之胜肽。

【0272】 胜肽之合成

胜肽利用American Peptide Company(Sunnyvale, CA)依標準的固相合成法合成，並利用逆相高速液體層析(HPLC)精製。該胜肽之純度(>90%)及同一性分別利

用分析用HPLC及質量分析分析。胜肽以20mg/ml溶於二甲基亞碸並於-80°C保存。

【0273】 試管內之CTL誘導

使用來自單核球之樹狀細胞(DC)作為抗原呈現細胞，誘導針對在人白血球抗原(HLA)上呈現之胜肽之細胞傷害性T淋巴球(CTL)應答。依於其他處記載之方式，於試管內製作DC (Nakahara S et al.,Cancer Res 2003,63(14):4112-8)。具體而言，使利用Ficoll-Paque plus(Pharmacia)溶液從健常的自願者(HLA-A*0101陽性)單離而得的末梢血單核細胞附著於塑膠製組織培養皿(Becton Dickinson)以分離，將此等濃縮作為單核球級分。於包括2%之已加熱失活化之自體血清(AS)之AIM-V培養基(Invitrogen)中，於存在1000 IU/ml之顆粒球巨噬體群落刺激因子(R&D System)及1000 IU/ml之介白素(IL)-4(R&D System)之狀態培養已濃縮單核球之族群。經7日培養後，於AIM-V培養基中於37°C在3μg/ml之β2-微球蛋白存在下，以20μg/ml之各合成胜肽衝擊經細胞介素誘導之DC 3小時。製得之細胞於自身細胞表面上表現CD80、CD83、CD86、及HLA第II類等DC關連分子(數據未顯示)。其次，使將經胜肽衝擊之該等DC利用X射線照射(20Gy)失活，與利用使用CD8陽性單離套組(Dynal)之陽性選擇獲得之自體CD8+T細胞以1：20之比率混合。將該等之培養物接種於48井板(Corning)中。各井於0.5ml之AIM-V/2%AS培養基中含有1.5 x 10^4個經胜肽衝擊之DC、3 x 10^5個CD8+T細胞及10ng/ml之IL-7(R&D System)。3日後於該等培養物添加IL-2(CHIRON)直到最終濃度為20IU/ml。於第7日及第14日，再利用經胜肽衝擊之自體DC刺激T細胞。每次以和上述相同方法製備DC。於第21日，經第3次胜肽刺激後，以人干擾素(IFN)-γ酵素連結免疫點(ELISPOT)分析測試針對經胜肽衝擊之C1R-A01之CTL活性(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; WatanabeT et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

【0274】 CTL增殖程序

使用和Riddell等人(Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-23)記載之方法為類似的方法，使CTL於培養下增殖。將CTL和5 x 10^6個細胞/燒瓶之經絲裂黴素C(mitomycin C)處理之2種人B淋巴芽球樣細胞株、及40ng/ml的抗CD3抗體一起於總量25ml之含有5%AS之AIM-V(AIM-V/5%AS)培養基中進行共培養。培養開始1日後，將120IU/ml之IL-2添加到該培養物。於第5、8及11日，將含有30IU/ml之IL-2之新鮮的AIM-V/5%AS培養基添加到該培養物(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al.,Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7, Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9, Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

【0275】 CTL選殖體之建立

於96圓底微滴定平板(Nalge Nunc International)接種CTL使成為1個或10個細胞/井。將CTL和1 x 10^4個細胞/井之經絲裂黴素C處理之2種人B淋巴芽球樣細胞株、30ng/ml的抗CD3抗體、及125IU/ml的IL-2一起於總量150μl/井之AIM-V/5%AS培養基中培養。10日後，將50μl/井之IL-2添加到該培養基使IL-2之最終濃度到達125IU/ml。於第14日進行CTL活性試驗，使用和上述相同方法使CTL選殖體增殖(Uchida N et al., ClinCancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8)): 498-506)。

【0276】 專一性CTL活性

為了檢查專一性CTL活性，實施IFN-γ ELISPOT分析及IFN-γ酵素連結免疫吸附分析(ELISA)。具體而言，製備經胜肽衝擊之C1R-A01(1 x 10^4個細胞/井)作為刺激細胞。將已誘導之CTL，亦即CTL株及CTL選殖體作為應答細胞。IFN-γ ELISPOT分析及IFN-γ ELISA依製造商之程序實施。

【0277】 強制表現標靶基因及HLA-A*0101之標靶細胞之建立

將標靶基因或編碼為HLA-A*0101之開放讀框之cDNA利用PCR放大。將PCR放大產物選殖到表現載體。依製造商建議的程序使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)，將表現載體轉染。轉染2日後，使用Versene(Invitrogen)回收已轉染之細胞，作為用於CTL活性分析之標靶細胞(5 x 10^4個細胞/井)。

【0278】 結果

來自KOC1的HLA-A*0101結合胜肽之預測

表4a及表4b以結合親和性高至低之順序顯示來自KOC1的9mer胜肽及10mer胜肽向HLA-A*0101之結合預測結果。為了決定抗原決定位胜肽，選擇並檢查可能有HLA-A*0101結合能力之合計27種胜肽。

【0279】 [表4a]

來自KOC1之HLA-A1結合9mer胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
96	VLDSLLVQY	56	86
118	ETAVVNVTY	57	87
114	NTDSETAVV	453	88
273	FTEEIPLKI	528	89
404	ETETVHLFI	1528	90
536	VVKITGHFY	5589	13
15	PSDLESIFK	5882	12
143	QLENFTLKV	11578	91
402	QSETETVHL	13101	92
305	DTDTKITIS	13406	93
313	SPLQELTLY	21305	94
338	KAEEEIMKK	23866	10
301	KIEQDTDTK	24016	21
69	EVEHSVPKR	24734	69

【0280】 [表4b]

來自KOC1之HLA-A1結合10mer胜肽

開始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列編號
312	ISPLQELTLY	146	46
95	EVLDSLLVQY	498	50
402	QSETETVHLF	1737	95
9	LSENAAPSDL	2164	96
535	VVVKITGHFY	3359	41
273	FTEEIPLKIL	4478	97
462	AQFKAQGRIY	6263	98
342	EIMKKIRESY	7665	99
252	GTSAACKSIL	9689	100
30	SGPFLVKTGY	17794	101
114	NTDSETAVVN	22411	102
305	DTDTKITISP	29728	103
17	DLESIFKDAK	35078	104

開始位置代表自KOC1之N端起的胺基酸殘基數。

解離常數[Kd(nm)]係由「NetMHC3.2」導出。

【0281】 HLA-A*0101拘束性之來自KOC1之預測胜肽所為之CTL之誘導

依「材料及方法」記載之實驗步驟製作針對來自KOC1之胜肽的CTL。依IFN-γ ELISPOT分析測定胜肽專一性CTL活性(第13圖)。使用KOC1-A01-9-96(序列編號：86)之井編號#2(a)、使用KOC1-A01-9-118(序列編號：87)之井編號#4(b)、使用KOC1- A01-9-404(序列編號：90)之井編號#3(c)、使用KOC1-A01-9-402 (序列編號：92)之井編號#4(d)、使用KOC1- A01-10-312(序列編號：46)之井編號#7(e)、使用KOC1-A01-10- 402(序列編號:95)之井編號#1(f)及使用KOC1-A01-10-535(序列編號：41)之井編號#1(g)之CTL，和對照比較顯示較強力之IFN-γ產生。另一方面，表4a及表4b所示之其他胜肽，雖有可能具有和HLA-A*0101之結合活性，但

利用此等之胜肽之刺激未測到專一性CTL活性。雖是典型的陰性數據之例，由經KOC1-A01-9-536(序列編號：13)刺激之CTL未觀測到有專一性IFN-γ產生(h)。結果選擇來自KOC1之7種胜肽作為能強力誘導CTL之胜肽。

【0282】 針對來自KOC1之胜肽之CTL株及選殖體之建立

使於使用以IFN-γ ELISPOT分析顯示胜肽專一性CTL活性之KOC1-A01-9-96(序列編號：86)之井編號#2(a)及使用KOC1-A01-9-118(序列編號：87)之井編號#4(b)之CTL增殖並建立CTL株。利用IFN-γ ELISA測定此等CTL株之CTL活性(第14圖)。該等CTL株對於經對應胜肽衝擊之標靶細胞比起未經胜肽衝擊的標靶細胞顯示較強力之IFN-γ產生。再者，依上述「材料及方法」之章節記載，利用極限稀釋從CTL株建立CTL選殖體，利用IFN-γ ELISA測定從對於經胜肽衝擊之C1R-A01之CTL選殖體產生的IFN-γ。觀察到經KOC1-A01-9- 96(序列編號：86)刺激之CTL選殖體有強力的IFN-γ產生(第15圖)。

【0283】 針對表現KOC1及HLA-A＊0101之標靶細胞之專一性CTL活性

就針對KOC1-A01-9-96(序列編號：86)建立之CTL選殖體認識表現KOC1及HLA-A＊0101分子之標靶細胞之能力進行檢查。製備已轉染全長KOC1及HLA-A＊0101基因兩者之COS7細胞(表現KOC1及HLA-A*0101基因之標靶細胞之專一性模型)作為標靶細胞，並製備已轉染全長KOC1或HLA-A＊0101中任一者之COS7細胞作為對照。經KOC1-A01-9-96(序列編號：86)刺激之CTL選殖體針對表現KOC1及HLA-A＊0101兩者之COS7細胞顯示強力的CTL活性(第16圖)。另一方面，未檢測到針對對照細胞有顯著專一性CTL活性。依該等數據，明確證實：KOC1-A01-9-96(序列編號：86)係由KOC1之內在的處理而產生的胜肽，且和HLA-A＊0101分子一起在標靶細胞上呈現而被CTL認識。該等結果顯示：KOC1-A01-9-96(序列編號：86)可能適合作為針對罹患表現KOC1之癌之患者的癌疫苗。

【0284】 抗原胜肽之相同性解析

經KOC1-A01-9-96(序列編號：86)、KOC1-A01-9-118(序列編號：87)、KOC1-A01-9-404(序列編號：90)、KOC1-A01-9-402 (序列編號：92)、KOC1-A01-10-312(序列編號：46)、KOC1-A01- 10-402(序列編號：95)及KOC1-A01-10-535(序列編號：41)刺激之CTL顯示顯著且專一性CTL活性。此結果可能的原因是：KOC1-A01-9-96(序列編號：86)、KOC1-A01-9-118(序列編號：87)、KOC1-A01-9-404(序列編號：90)、KOC1-A01-9-402(序列編號：92)、KOC1-A01-10-312(序列編號：46)、KOC1-A01-10-402 (序列編號：95)及KOC1-A01-10-535(序列編號：41)之序列和已知會感作人免疫系之來自其他分子之胜肽為相同的事實。為了排除此可能性，使用BLAST演算法(blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi)，將該等胜肽之序列作為查詢條件，實施相同性解析。其結果，未查到針對KOC1-A01-9-96(序列編號：86)、KOC1-A01-9-118(序列編號：87)、KOC1-A01-9-404(序列編號：90)、KOC1-A01-9-402(序列編號：92)、KOC1-A01-10-312(序列編號：46)、KOC1-A01-10-402(序列編號：95)及KOC1-A01-10- 535(序列編號：41)之序列有顯著相同性之序列。另一方面，KOC1-A01-9-118(序列編號：87)和在其他IMP家族即IMP-1及IMP-2中找到的胜肽序列相同。在以前曾有人報告IMP-1在睪丸與胎兒肝臟及胎盤以外的正常器官不表現(Hammer NAet. al, Reproduction.2005;130(2):203-12)。且和肺癌患者之腫瘤進展有關連(Kato T et. al., Clin Cancer Res.2007;13: 434-42)。曾有人報告IMP-2在睪丸與胎兒肝臟以外的正常器官不表現(Hammer NA et al, Reproduction.2005;130(2): 203-12)。且涉及神經膠母細胞瘤癌幹細胞之增殖(Janiszewska M et al., Genes Dev. 2012;26(17):1926-44)。故IMP-1及IMP-2為有前景的癌免疫療法的標靶抗原。因此據本案發明人等所知，該等胜肽據認為幾乎不會針對其他無關連的分子引起不欲之免疫應答。就結論而言，可鑑別來自

KOC1之新穎HLA-A01拘束性抗原決定位胜肽。又，顯示來自KOC1的抗原決定位胜肽可以適用於癌免疫療法。

【0285】 實施例5

乳劑製劑之製備

將胜肽溶於注射用水或滅菌生理食鹽水使成為1.0~10.0 mg/ml，收集到針筒內。將其以連接器和已填充注射用水或生理食鹽水為等量IFA之針筒連結，交替按壓已連結之2支針筒之針筒活塞以進行攪拌。數分鐘攪拌後，利用墜落測試法評價乳劑之完成。墜落測試法可藉由將1滴已攪拌之樣本滴加到水面上以進行。滴加到水面上之樣本未立即擴散到水中時評為乳劑完成，立即擴散到水中評為乳劑未完成。評為乳劑未完成時，進一步攪拌使乳劑完成。完成的乳劑可利用皮下注射對於癌患者投予。投予對象之癌患者可以選擇罹患膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、或睪丸癌等之患者。

【0286】 冷凍乾燥製劑之製備

將胜肽溶於注射用水使成為1.0~10.0mg/ml，並進行過濾滅菌。將其填充在滅菌小玻璃瓶，並將已滅菌之橡膠蓋輕輕插入。將此小玻璃瓶冷凍乾燥後，進行全封蓋及鋁蓋的捲封，製成冷凍乾燥製劑。使用時，於小玻璃瓶注入注射用水或滅菌生理食鹽水，將冷凍乾燥粉末予以再溶解。使用針筒抽取小玻璃瓶中之再溶解液，以連接器和已填充抽取之再溶解液為等量之IFA的針筒連結。將已連結之2支針筒之針筒活塞交替地按壓以攪拌。數分鐘攪拌後，利用墜落測試法評價乳劑之完成。已完成之乳劑可利用皮下注射對於癌患者投予。投予對象之癌患者可選擇罹患膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、

骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、或睪丸癌等之患者。

[產業利用性]

【0287】 本發明提供能誘導強力且專一之抗腫瘤免疫應答，故對於廣泛癌之種類有適用性之來自KOC1的新穎HLA-A11拘束性、HLA-A33拘束性、HLA-A03拘束性、及HLA-A01拘束性抗原決定位胜肽。本發明之胜肽、組合物、APC、及CTL，可作為針對表現KOC1之癌，例如：膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、及睪丸癌之胜肽疫苗使用。

【0288】 本說明書係將本發明就其特定態樣詳細說明，但前述說明的本質係例示說明，應理解為係用以說明本發明及其理想態樣。該技術領域中有通常知識者可輕易地得知：透過慣常的實驗，能不脫離附帶有交界值及極限之專利請求之範圍定義之本發明之精神及範圍而進行各種變更及改變。

【符號說明】

無。

序列表

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

<120> 來自 KOC1 的胜肽及含其之疫苗

<150> JP 2014-158919
<151> 2014-08-04

<150> JP 2014-158920
<151> 2014-08-04

<150> JP 2014-158921
<151> 2014-08-04

<160> 111

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 1

Lys Ser Ile Leu Glu Ile Met His Lys
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 2

Val Val Asn Val Thr Tyr Ser Ser Lys
1 5

〈210〉 3
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 3

Lys Ala Gln Gly Arg Ile Tyr Gly Lys
1 5

〈210〉 4
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 4

Ser Ser Ala Glu Val Val Val Pro Arg
1 5

〈210〉 5
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 5

Leu Ser Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys
1 5

〈210〉 6
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 6

Pro Val Ser Gly Pro Phe Leu Val Lys
1 5

〈210〉 7
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 7

Lys Ala Ile Glu Ala Leu Ser Gly Lys
1 5

〈210〉 8
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 8

Phe Gln Leu Glu Asn Phe Thr Leu Lys
1 5

〈210〉 9
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 9

Gly Ala Thr Ile Arg Asn Ile Thr Lys

1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 10

Lys Ala Glu Glu Glu Ile Met Lys Lys
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 11

Phe Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 12

Pro Ser Asp Leu Glu Ser Ile Phe Lys
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT

〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 13

Val Val Lys Ile Thr Gly His Phe Tyr
1 5

〈210〉 14
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 14

Phe Val Ser Pro Lys Glu Glu Val Lys
1 5

〈210〉 15
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 15

Arg Val Pro Ser Phe Ala Ala Gly Arg
1 5

〈210〉 16
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 16

Lys Phe Thr Glu Glu Ile Pro Leu Lys
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 17

Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg Lys
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 18

Lys Gly Asn Val Glu Thr Cys Ala Lys
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 19

Tyr Ala Cys Gln Val Ala Gln Arg Lys
1 5

<210> 20

〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 20

Asn Ile Thr Lys Gln Thr Gln Ser Lys
1 5

〈210〉 21
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 21

Lys Ile Glu Gln Asp Thr Asp Thr Lys
1 5

〈210〉 22
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 22

Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val Lys
1 5

〈210〉 23
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

<400> 23

Gln Gly Ser Pro Gly Ser Val Ser Lys
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 24

Gln Val Lys Gln His Gln Gln Gln Lys
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> SGKIELHGK

<400> 25

Ser Gly Lys Ile Glu Leu His Gly Lys
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 26

Gln Phe Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys
1 5

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 27

Ala Val Val Asn Val Thr Tyr Ser Ser Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 28

Ala Leu Ser Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 29

Ile Thr Gly Pro Pro Glu Ala Gln Phe Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 30

Thr Gln Phe Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 31

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

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 32

Ala Pro Ser Asp Leu Glu Ser Ile Phe Lys
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 33

Gly Ser Pro Gly Ser Val Ser Lys Gln Lys

1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 34

Ser Phe Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 35

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

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 36

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val Lys
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT

〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 37

Leu Ser Arg Phe Ala Gly Ala Ser Ile Lys
1 5 10

〈210〉 38
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 38

Arg Gln Gly Ser Pro Gly Ser Val Ser Lys
1 5 10

〈210〉 39
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 39

Val Thr Tyr Ser Ser Lys Asp Gln Ala Arg
1 5 10

〈210〉 40
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 40

Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg Lys
1 5 10

〈210〉 41
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 41

Val Val Val Lys Ile Thr Gly His Phe Tyr
1 5 10

〈210〉 42
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 42

Gln Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg
1 5 10

〈210〉 43
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 43

Leu Ser Gly Lys Ile Glu Leu His Gly Lys
1 5 10

〈210〉 44

〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 44

Gly Phe Gln Leu Glu Asn Phe Thr Leu Lys
1 5 10

〈210〉 45
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 45

Ala Leu Gln Ser Gly Pro Pro Gln Ser Arg
1 5 10

〈210〉 46
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 46

Ile Ser Pro Leu Gln Glu Leu Thr Leu Tyr
1 5 10

〈210〉 47
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

<400> 47

Ile Ala Pro Ala Glu Ala Pro Asp Ala Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 48

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

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 49

Gln Ser Gly Pro Pro Gln Ser Arg Arg Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 50

Glu Val Leu Asp Ser Leu Leu Val Gln Tyr
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 51

Cys Ala Lys Ala Glu Glu Glu Ile Met Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 52

Ile Leu Ala His Asn Asn Phe Val Gly Arg
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 53

Ala Gln Gly Arg Ile Tyr Gly Lys Ile Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 54

Ala Gln Gln Asn Pro Leu Gln Gln Pro Arg
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 55

Ile Ile Gly Lys Gln Gly Gln His Ile Lys
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 56

Thr Gln Val Lys Gln His Gln Gln Gln Lys
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 57

Cys Lys Ser Ile Leu Glu Ile Met His Lys

1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 58

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

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 59

Ile Met His Lys Glu Ala Gln Asp Ile Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 60

Leu Gln Ser Gly Pro Pro Gln Ser Arg Arg
1 5 10

<210> 61
<211> 9
<212> PRT

〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 61

Phe Tyr Ala Cys Gln Val Ala Gln Arg
1 5

〈210〉 62
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 62

Leu Ala His Asn Asn Phe Val Gly Arg
1 5

〈210〉 63
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 63

Glu Leu Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg
1 5

〈210〉 64
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 64

Glu Val Lys Leu Glu Ala His Ile Arg
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 65

Thr Tyr Ser Ser Lys Asp Gln Ala Arg
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 66

Glu Ala Gln Phe Lys Ala Gln Gly Arg
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 67

Asn Phe Val Gly Arg Leu Ile Gly Lys
1 5

<210> 68

〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 68

Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg
1 5

〈210〉 69
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 69

Glu Val Glu His Ser Val Pro Lys Arg
1 5

〈210〉 70
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 70

Gln Gln Asn Pro Leu Gln Gln Pro Arg
1 5

〈210〉 71
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

<400> 71

Glu Thr Val His Leu Phe Ile Pro Ala
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 72

Ser Val Pro Lys Arg Gln Arg Ile Arg
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 73

Gln Ser Gly Pro Pro Gln Ser Arg Arg
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 74

Leu Val Lys Thr Gly Tyr Ala Phe Val
1 5

〈210〉 75
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 75

Ile Gly Lys Glu Gly Ala Thr Ile Arg
1 5

〈210〉 76
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 76

Asp Thr Lys Ile Thr Ile Ser Pro Leu
1 5

〈210〉 77
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 77

His Phe Tyr Ala Cys Gln Val Ala Gln Arg
1 5 10

〈210〉 78
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 78

His Ser Val Pro Lys Arg Gln Arg Ile Arg
1 5 10

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 79

Phe Tyr Ala Cys Gln Val Ala Gln Arg Lys
1 5 10

<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 80

Gln Gly Gln His Ile Lys Gln Leu Ser Arg
1 5 10

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 81

Lys Gln Lys Pro Cys Asp Leu Pro Leu Arg

1 5 10

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 82

Ile Ile Gly Lys Glu Gly Ala Thr Ile Arg
1 5 10

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 83

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

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 84

Arg Gln Arg Ile Arg Lys Leu Gln Ile Arg
1 5 10

<210> 85
<211> 10
<212> PRT

〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 85

Asn Asn Phe Val Gly Arg Leu Ile Gly Lys
1 5 10

〈210〉 86
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 86

Val Leu Asp Ser Leu Leu Val Gln Tyr
1 5

〈210〉 87
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 87

Glu Thr Ala Val Val Asn Val Thr Tyr
1 5

〈210〉 88
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 88

Asn Thr Asp Ser Glu Thr Ala Val Val
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 89

Phe Thr Glu Glu Ile Pro Leu Lys Ile
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 90

Glu Thr Glu Thr Val His Leu Phe Ile
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 91

Gln Leu Glu Asn Phe Thr Leu Lys Val
1 5

<210> 92

〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 92

Gln Ser Glu Thr Glu Thr Val His Leu
1 5

〈210〉 93
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 93

Asp Thr Asp Thr Lys Ile Thr Ile Ser
1 5

〈210〉 94
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 94

Ser Pro Leu Gln Glu Leu Thr Leu Tyr
1 5

〈210〉 95
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 95

Gln Ser Glu Thr Glu Thr Val His Leu Phe
1 5 10

〈210〉 96
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 96

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

〈210〉 97
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 97

Phe Thr Glu Glu Ile Pro Leu Lys Ile Leu
1 5 10

〈210〉 98
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 來自 KOC1 的胜肽

〈400〉 98

Ala Gln Phe Lys Ala Gln Gly Arg Ile Tyr
1 5 10

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 99

Glu Ile Met Lys Lys Ile Arg Glu Ser Tyr
1 5 10

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 100

Gly Thr Ser Ala Ala Cys Lys Ser Ile Leu
1 5 10

<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 101

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

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 102

Asn Thr Asp Ser Glu Thr Ala Val Val Asn
1 5 10

<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 103

Asp Thr Asp Thr Lys Ile Thr Ile Ser Pro
1 5 10

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 來自 KOC1 的胜肽

<400> 104

Asp Leu Glu Ser Ile Phe Lys Asp Ala Lys
1 5 10

<210> 105
<211> 22
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> a PCR primer for the TCR analysis

<400> 105
gtctaccagg cattcgcttc at 22

〈210〉 106
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 a PCR primer for the TCR analysis

〈400〉 106
tcagctggac cacagccgca gcgt 24

〈210〉 107
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 a PCR primer for the TCR analysis

〈400〉 107
tcagaaatcc tttctcttga c 21

〈210〉 108
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 a PCR primer for the TCR analysis

〈400〉 108
ctagcctctg gaatcctttc tctt 24

〈210〉 109
〈211〉 4168
〈212〉 DNA
〈213〉 Homo sapiens

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (267)..(2006)

〈400〉 109

aagacttagg aagactggtg gatgcgtttg ggttgtagct aggctttttc ttttctttct 60

cttttaaaac acatctagac aaggaaaaaa caagcctcgg atctgatttt tcactcctcg 120

ttcttgtgct tggttcttac tgtgtttgtg tattttaaag gcgagaagac gaggggaaca 180

aaaccagctg gatccatcca tcaccgtggg tggttttaat ttttcgtttt ttctcgttat 240

tttttttaa acaaccactc ttcaca atg aac aaa ctg tat atc gga aac ctc 293
Met Asn Lys Leu Tyr Ile Gly Asn Leu
1 5

agc gag aac gcc gcc ccc tcg gac cta gaa agt atc ttc aag gac gcc 341
Ser Glu Asn Ala Ala Pro Ser Asp Leu Glu Ser Ile Phe Lys Asp Ala
10 15 20 25

aag atc ccg gtg tcg gga ccc ttc ctg gtg aag act ggc tac gcg ttc 389
Lys Ile Pro Val Ser Gly Pro Phe Leu Val Lys Thr Gly Tyr Ala Phe
30 35 40

gtg gac tgc ccg gac gag agc tgg gcc ctc aag gcc atc gag gcg ctt 437
Val Asp Cys Pro Asp Glu Ser Trp Ala Leu Lys Ala Ile Glu Ala Leu
45 50 55

tca ggt aaa ata gaa ctg cac ggg aaa ccc ata gaa gtt gag cac tcg 485
Ser Gly Lys Ile Glu Leu His Gly Lys Pro Ile Glu Val Glu His Ser
60 65 70

gtc cca aaa agg caa agg att cgg aaa ctt cag ata cga aat atc ccg 533
Val Pro Lys Arg Gln Arg Ile Arg Lys Leu Gln Ile Arg Asn Ile Pro
75 80 85

cct cat tta cag tgg gag gtg ctg gat agt tta cta gtc cag tat gga 581
Pro His Leu Gln Trp Glu Val Leu Asp Ser Leu Leu Val Gln Tyr Gly
90 95 100 105

```
gtg gtg gag agc tgt gag caa gtg aac act gac tcg gaa act gca gtt      629
Val Val Glu Ser Cys Glu Gln Val Asn Thr Asp Ser Glu Thr Ala Val

                110                 115                 120

gta aat gta acc tat tcc agt aag gac caa gct aga caa gca cta gac      677
Val Asn Val Thr Tyr Ser Ser Lys Asp Gln Ala Arg Gln Ala Leu Asp

            125                 130                 135

aaa ctg aat gga ttt cag tta gag aat ttc acc ttg aaa gta gcc tat      725
Lys Leu Asn Gly Phe Gln Leu Glu Asn Phe Thr Leu Lys Val Ala Tyr

        140                 145                 150

atc cct gat gaa atg gcc gcc cag caa aac ccc ttg cag cag ccc cga      773
Ile Pro Asp Glu Met Ala Ala Gln Gln Asn Pro Leu Gln Gln Pro Arg

    155                 160                 165

ggt cgc cgg ggg ctt ggg cag agg ggc tcc tca agg cag ggg tct cca      821
Gly Arg Arg Gly Leu Gly Gln Arg Gly Ser Ser Arg Gln Gly Ser Pro

170                 175                 180                 185

gga tcc gta tcc aag cag aaa cca tgt gat ttg cct ctg cgc ctg ctg      869
Gly Ser Val Ser Lys Gln Lys Pro Cys Asp Leu Pro Leu Arg Leu Leu

                190                 195                 200

gtt ccc acc caa ttt gtt gga gcc atc ata gga aaa gaa ggt gcc acc      917
Val Pro Thr Gln Phe Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Glu Gly Ala Thr

            205                 210                 215

att cgg aac atc acc aaa cag acc cag tct aaa atc gat gtc cac cgt      965
Ile Arg Asn Ile Thr Lys Gln Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg

        220                 225                 230
```

```
aaa gaa aat gcg ggg gct gct gag aag tcg att act atc ctc tct act     1013
Lys Glu Asn Ala Gly Ala Ala Glu Lys Ser Ile Thr Ile Leu Ser Thr

    235                 240                 245

cct gaa ggc acc tct gcg gct tgt aag tct att ctg gag att atg cat     1061
Pro Glu Gly Thr Ser Ala Ala Cys Lys Ser Ile Leu Glu Ile Met His

250                 255                 260                 265

aag gaa gct caa gat ata aaa ttc aca gaa gag atc ccc ttg aag att     1109
Lys Glu Ala Gln Asp Ile Lys Phe Thr Glu Glu Ile Pro Leu Lys Ile

                270                 275                 280

tta gct cat aat aac ttt gtt gga cgt ctt att ggt aaa gaa gga aga     1157
Leu Ala His Asn Asn Phe Val Gly Arg Leu Ile Gly Lys Glu Gly Arg

            285                 290                 295

aat ctt aaa aaa att gag caa gac aca gac act aaa atc acg ata tct     1205
Asn Leu Lys Lys Ile Glu Gln Asp Thr Asp Thr Lys Ile Thr Ile Ser

        300                 305                 310

cca ttg cag gaa ttg acg ctg tat aat cca gaa cgc act att aca gtt     1253
Pro Leu Gln Glu Leu Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val

    315                 320                 325

aaa ggc aat gtt gag aca tgt gcc aaa gct gag gag gag atc atg aag     1301
Lys Gly Asn Val Glu Thr Cys Ala Lys Ala Glu Glu Glu Ile Met Lys

330                 335                 340                 345

aaa atc agg gag tct tat gaa aat gat att gct tct atg aat ctt caa     1349
Lys Ile Arg Glu Ser Tyr Glu Asn Asp Ile Ala Ser Met Asn Leu Gln

                350                 355                 360
```

```
gca cat tta att cct gga tta aat ctg aac gcc ttg ggt ctg ttc cca     1397
Ala His Leu Ile Pro Gly Leu Asn Leu Asn Ala Leu Gly Leu Phe Pro

            365                 370                 375

ccc act tca ggg atg cca cct ccc acc tca ggg ccc cct tca gcc atg     1445
Pro Thr Ser Gly Met Pro Pro Pro Thr Ser Gly Pro Pro Ser Ala Met

        380                 385                 390

act cct ccc tac ccg cag ttt gag caa tca gaa acg gag act gtt cat     1493
Thr Pro Pro Tyr Pro Gln Phe Glu Gln Ser Glu Thr Glu Thr Val His

    395                 400                 405

ctg ttt atc cca gct cta tca gtc ggt gcc atc atc ggc aag cag ggc     1541
Leu Phe Ile Pro Ala Leu Ser Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Gln Gly

410                 415                 420                 425

cag cac atc aag cag ctt tct cgc ttt gct gga gct tca att aag att     1589
Gln His Ile Lys Gln Leu Ser Arg Phe Ala Gly Ala Ser Ile Lys Ile

                430                 435                 440

gct cca gcg gaa gca cca gat gct aaa gtg agg atg gtg att atc act     1637
Ala Pro Ala Glu Ala Pro Asp Ala Lys Val Arg Met Val Ile Ile Thr

            445                 450                 455

gga cca cca gag gct cag ttc aag gct cag gga aga att tat gga aaa     1685
Gly Pro Pro Glu Ala Gln Phe Lys Ala Gln Gly Arg Ile Tyr Gly Lys

        460                 465                 470

att aaa gaa gaa aac ttt gtt agt cct aaa gaa gag gtg aaa ctt gaa     1733
Ile Lys Glu Glu Asn Phe Val Ser Pro Lys Glu Glu Val Lys Leu Glu

    475                 480                 485
```

```
gct cat atc aga gtg cca tcc ttt gct gct ggc aga gtt att gga aaa     1781
Ala His Ile Arg Val Pro Ser Phe Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys

490                 495                 500                 505


gga ggc aaa acg gtg aat gaa ctt cag aat ttg tca agt gca gaa gtt     1829
Gly Gly Lys Thr Val Asn Glu Leu Gln Asn Leu Ser Ser Ala Glu Val

                510                 515                 520


gtt gtc cct cgt gac cag aca cct gat gag aat gac caa gtg gtt gtc     1877
Val Val Pro Arg Asp Gln Thr Pro Asp Glu Asn Asp Gln Val Val Val

            525                 530                 535


aaa ata act ggt cac ttc tat gct tgc cag gtt gcc cag aga aaa att     1925
Lys Ile Thr Gly His Phe Tyr Ala Cys Gln Val Ala Gln Arg Lys Ile

        540                 545                 550


cag gaa att ctg act cag gta aag cag cac caa caa cag aag gct ctg     1973
Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val Lys Gln His Gln Gln Gln Lys Ala Leu

    555                 560                 565


caa agt gga cca cct cag tca aga cgg aag taa aggctcagga aacagcccac   2026
Gln Ser Gly Pro Pro Gln Ser Arg Arg Lys

570                 575


cacagaggca gatgccaaac caaagacaga ttgcttaacc aacagatggg cgctgacccc   2086

ctatccagaa tcacatgcac aagtttttac ctagccagtt gtttctgagg accaggcaac   2146

ttttgaactc ctgtctctgt gagaatgtat actttatgct ctctgaaatg tatgacaccc   2206

agctttaaaa caaacaaaca aacaaacaaa aaaagggtgg gggagggagg gaaagagaag   2266

agctctgcac ttccctttgt tgtagtctca cagtataaca gatattctaa ttcttcttaa   2326
```

tattccccca taatgccaga aattggctta atgatgcttt cactaaattc atcaaataga 2386

ttgctcctaa atccaattgt taaaattgga tcagaataat tatcacagga acttaaatgt 2446

taagccatta gcatagaaaa actgttctca gttttatttt tacctaacac taacatgagt 2506

aacctaaggg aagtgctgaa tggtgttggc aggggtatta aacgtgcatt tttactcaac 2566

tacctcaggt attcagtaat acaatgaaaa gcaaaattgt tccttttttt tgaaaatttt 2626

atatacttta taatgataga agtccaaccg ttttttaaaa aataaattta aaatttaaca 2686

gcaatcagct aacaggcaaa ttaagatttt tacttctggc tggtgacagt aaagctggaa 2746

aattaatttc agggtttttt gaggcttttg acacagttat tagttaaatc aaatgttcaa 2806

aaatacggag cagtgcctag tatctggaga gcagcactac catttattct ttcatttata 2866

gttgggaaag tttttgacgg tactaacaaa gtggtcgcag gagattttgg aacggctggt 2926

ttaaatggct tcaggagact tcagtttttt gtttagctac atgattgaat gcataataaa 2986

tgctttgtgc ttctgactat caatacctaa agaaagtgca tcagtgaaga gatgcaagac 3046

tttcaactga ctggcaaaaa gcaagcttta gcttgtctta taggatgctt agtttgccac 3106

tacacttcag accaatggga cagtcataga tggtgtgaca gtgtttaaac gcaacaaaag 3166

gctacatttc catggggcca gcactgtcat gagcctcact aagctatttt gaagattttt 3226

aagcactgat aaattaaaaa aaaaaaatta gactccacct taagtagtaa agtataacag 3286

gatttctgta tactgtgcaa tcagttcttt gaaaaaaaag tcaaaagata gagaatacaa 3346

gaaaagtttt tgggatataa tttgaatgac tgtgaaaaca tatgaccttt gataacgaac 3406

tcatttgctc actccttgac agcaaagccc agtacgtaca attgtgttgg gtgtgggtgg 3466

tctccaaggc cacgctgctc tctgaattga ttttttgagt tttgtttgta agatgatcac 3526

agtcatgtta cactgatcta aaggacatat atataaccct ttaaaaaaaa aatcactgcc 3586

tcattcttat ttcaagatga atttctatac agactagatg tttttctgaa gatcaattag 3646

acattttgaa aatgatttaa agtgttttcc ttaatgttct ctgaaaacaa gtttcttttg 3706

tagttttaac caaaaaagtg ccctttttgt cactggattc tcctagcatt catgattttt 3766

ttttcataca atgaattaaa attgctaaaa tcatggactg gctttctggt tggatttcag 3826

gtaagatgtg tttaaggcca gagcttttct cagtatttga ttttttcccc caatatttga 3886

ttttttaaaa atatacacat aggtgctgca tttatatctg ctggtttaaa ttctgtcata 3946

tttcacttct agccttttag tatggcaaat catattttac ttttacttaa gcatttgtaa 4006

tttggagtat ctggtactag ctaagaaata attctataat tgagttttgt actcaccata 4066

tatggatcat tcctcatgta taatgtgccc caaatgcagc ttcattttcc agataccttg 4126

acgcagaata aatttttca tcatttaggt gcaaaaaaaa aa 4168

<210> 110
<211> 579
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110

Met Asn Lys Leu Tyr Ile Gly Asn Leu Ser Glu Asn Ala Ala Pro Ser
1 5 10 15

Asp Leu Glu Ser Ile Phe Lys Asp Ala Lys Ile Pro Val Ser Gly Pro
20 25 30

Phe Leu Val Lys Thr Gly Tyr Ala Phe Val Asp Cys Pro Asp Glu Ser
35 40 45

Trp Ala Leu Lys Ala Ile Glu Ala Leu Ser Gly Lys Ile Glu Leu His
50 55 60

Gly Lys Pro Ile Glu Val Glu His Ser Val Pro Lys Arg Gln Arg Ile
65 70 75 80

Arg Lys Leu Gln Ile Arg Asn Ile Pro Pro His Leu Gln Trp Glu Val
85 90 95

Leu Asp Ser Leu Leu Val Gln Tyr Gly Val Val Glu Ser Cys Glu Gln
100 105 110

Val Asn Thr Asp Ser Glu Thr Ala Val Val Asn Val Thr Tyr Ser Ser
115 120 125

Lys Asp Gln Ala Arg Gln Ala Leu Asp Lys Leu Asn Gly Phe Gln Leu
130 135 140

Glu Asn Phe Thr Leu Lys Val Ala Tyr Ile Pro Asp Glu Met Ala Ala
145 150 155 160

Gln Gln Asn Pro Leu Gln Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gly Leu Gly Gln
165 170 175

Arg Gly Ser Ser Arg Gln Gly Ser Pro Gly Ser Val Ser Lys Gln Lys
180 185 190

Pro Cys Asp Leu Pro Leu Arg Leu Leu Val Pro Thr Gln Phe Val Gly
195 200 205

Ala Ile Ile Gly Lys Glu Gly Ala Thr Ile Arg Asn Ile Thr Lys Gln
210 215 220

Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg Lys Glu Asn Ala Gly Ala Ala
225 230 235 240

Glu Lys Ser Ile Thr Ile Leu Ser Thr Pro Glu Gly Thr Ser Ala Ala
245 250 255

Cys Lys Ser Ile Leu Glu Ile Met His Lys Glu Ala Gln Asp Ile Lys
260 265 270

Phe Thr Glu Glu Ile Pro Leu Lys Ile Leu Ala His Asn Asn Phe Val
275 280 285

Gly Arg Leu Ile Gly Lys Glu Gly Arg Asn Leu Lys Lys Ile Glu Gln
290 295 300

Asp Thr Asp Thr Lys Ile Thr Ile Ser Pro Leu Gln Glu Leu Thr Leu
305 310 315 320

Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val Lys Gly Asn Val Glu Thr Cys
325 330 335

Ala Lys Ala Glu Glu Glu Ile Met Lys Lys Ile Arg Glu Ser Tyr Glu
340 345 350

Asn Asp Ile Ala Ser Met Asn Leu Gln Ala His Leu Ile Pro Gly Leu
355 360 365

Asn Leu Asn Ala Leu Gly Leu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Met Pro Pro
370 375 380

Pro Thr Ser Gly Pro Pro Ser Ala Met Thr Pro Pro Tyr Pro Gln Phe
385 390 395 400

Glu Gln Ser Glu Thr Glu Thr Val His Leu Phe Ile Pro Ala Leu Ser
405 410 415

Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Gln Gly Gln His Ile Lys Gln Leu Ser
420 425 430

Arg Phe Ala Gly Ala Ser Ile Lys Ile Ala Pro Ala Glu Ala Pro Asp
435 440 445

Ala Lys Val Arg Met Val Ile Ile Thr Gly Pro Pro Glu Ala Gln Phe
450 455 460

Lys Ala Gln Gly Arg Ile Tyr Gly Lys Ile Lys Glu Glu Asn Phe Val
465 470 475 480

Ser Pro Lys Glu Glu Val Lys Leu Glu Ala His Ile Arg Val Pro Ser
485 490 495

Phe Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys Gly Gly Lys Thr Val Asn Glu
500 505 510

Leu Gln Asn Leu Ser Ser Ala Glu Val Val Val Pro Arg Asp Gln Thr
515 520 525

Pro Asp Glu Asn Asp Gln Val Val Val Lys Ile Thr Gly His Phe Tyr
530 535 540

Ala Cys Gln Val Ala Gln Arg Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
545 550 555 560

Lys Gln His Gln Gln Gln Lys Ala Leu Gln Ser Gly Pro Pro Gln Ser
565 570 575

Arg Arg Lys

〈210〉 111
〈211〉 4
〈212〉 PRT
〈213〉 人造序列

〈220〉
〈223〉 連結胜肽

〈400〉 111

Asn Lys Arg Lys
1

【發明申請專利範圍】

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

(a) 選自於由序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列；及

(b) 相對於選自於由序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列有1個、2個、或多個胺基酸取代、缺失、插入及/或加成之胺基酸序列。

【請求項2】 如請求項1之胜肽，其選自於由以下(i)~(iii)構成之群組：

(i) 包括對於選自於由序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80及85之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(c)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列之胜肽：

(a) N末端起第1號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸；

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

(c) C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸；

(ii) 包括對於選自於由序列編號：27、30及52構成之群組之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(b)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列之胜肽：

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

(b) C末端之胺基酸取代為選自於由精胺酸、離胺酸、酪胺酸及苯丙胺酸構成之群組之胺基酸；

(iii) 包括對於選自於由序列編號：86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列實施選自於由以下(a)~(c)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列之胜肽：

(a) N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸或絲胺酸；

(b) N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸；及

(c) C末端之胺基酸取代為酪胺酸。

【請求項3】 如請求項1之胜肽，其由選自於由序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列構成。

【請求項4】 一種多核苷酸，編碼為如請求項1至3中任一項之胜肽。

【請求項5】 一種組合物，包含：藥學上可容許之擔體，以及選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分：

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

(e) 將如請求項1至3中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

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

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

【請求項7】 如請求項5之組合物，其係藥學組合物。

【請求項8】 如請求項7之組合物，係用於選自於由(i)癌之治療、(ii)癌之預防、及(iii)預防癌之術後再發構成之群組中之1種以上之用途。

【請求項9】 如請求項7之組合物，係用於誘導針對癌之免疫應答。

【請求項10】如請求項8之組合物，其中，癌係選自於由膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、及睪丸癌構成之群組。

【請求項11】如請求項5至10中任一項之組合物，其係製劑化以成為向選自於由HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01構成之群組中之至少1種HLA為陽性之對象投予。

【請求項12】一種在試管內或離體誘導具有CTL誘導能力之APC之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：

(a) 使APC在試管內(in vitro)、或離體(ex vivo)接觸如請求項1至3中任一項之胜肽；及

(b) 將編碼為如請求項1至3中任一項之胜肽之多核苷酸導入到APC。

【請求項13】一種在試管內誘導CTL之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：

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

(b) 將CD8陽性T細胞和在自身表面上呈現HLA抗原與如請求項1至3中任一項之胜肽之複合體之外吐小體進行共培養；及

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

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

【請求項15】如請求項14之APC，係利用如請求項12之誘導具有CTL誘導能力之APC之方法誘導。

【請求項16】一種CTL，係將如請求項1至3中任一項之胜肽作為標靶。

【請求項17】如請求項16之CTL，係由如請求項13之誘導CTL之方法誘導。

【請求項18】一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分在用於誘導針對癌之免疫應答之藥物之製備中的用途：

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

(e) 將如請求項1至3中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

【請求項19】一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分在用於治療及/或預防癌、及/或預防癌之術後再發之藥物之製備中的用途：

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

(e) 將如請求項1至3中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

【請求項20】一種抗體，係結合於如請求項1至3中任一項之胜肽。

【請求項21】一種篩選有CTL誘導能力之胜肽之方法，包括以下步驟：

(a) 製作由對於選自於由序列編號：61、62、63、64、67、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列構成之原本胺基酸序列有1個、2個、或數個胺基酸殘基取代、缺失、插入、及/或加成之胺基酸序列構成之候選序列；

(b) 從(a)製作之候選序列中選擇和KOC1以外之任意公知之人基因產物均沒有顯著相同性(序列同一性)之候選序列；

(c) 使由於(b)選擇之候選序列構成之胜肽接觸APC；

(d) 使(c)之APC接觸CD8陽性T細胞；及

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

【請求項22】一種乳劑，包含如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽、水溶性之擔體、及油性佐劑。

【請求項23】一種套組，包含：容納如請求項5至11中任一項之組合物之容器、及容納佐劑之容器。

【請求項24】一種以下(a)或(b)在用於誘導具有CTL誘導能力之APC之組成物之製備中的用途：

(a) 如請求項1至3中任一項之胜肽；或

(b) 編碼為如請求項1至3中任一項之胜肽之多核苷酸。

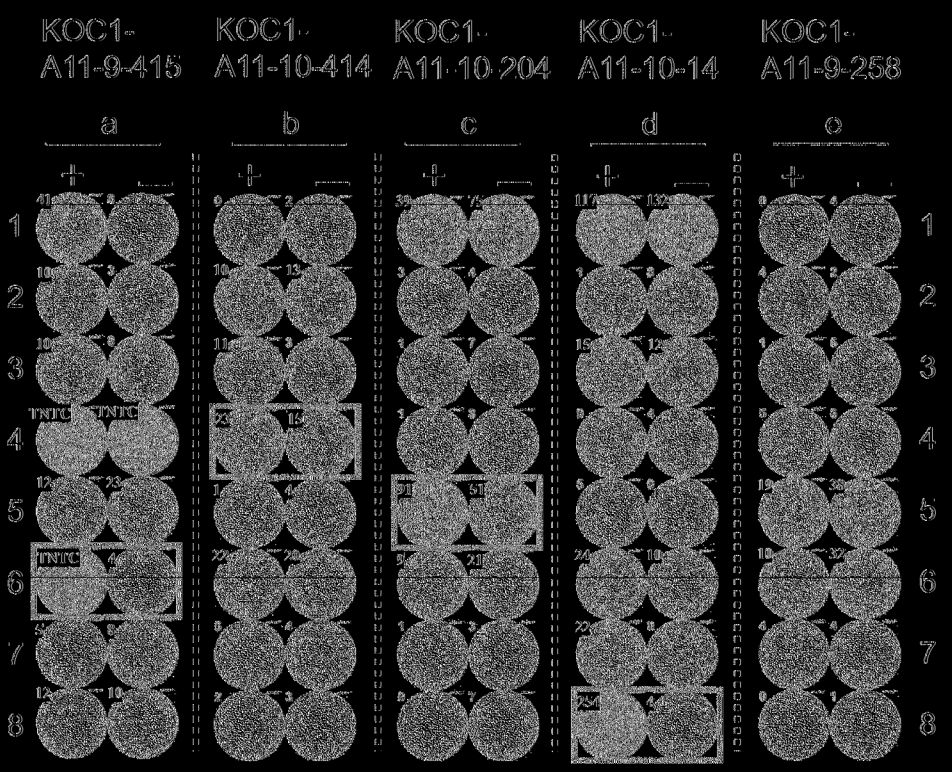
【請求項25】一種以下(a)至(c)中任一項在用於誘導CTL之組成物之製備中的用途：

(a) 如請求項1至3中任一項之胜肽；

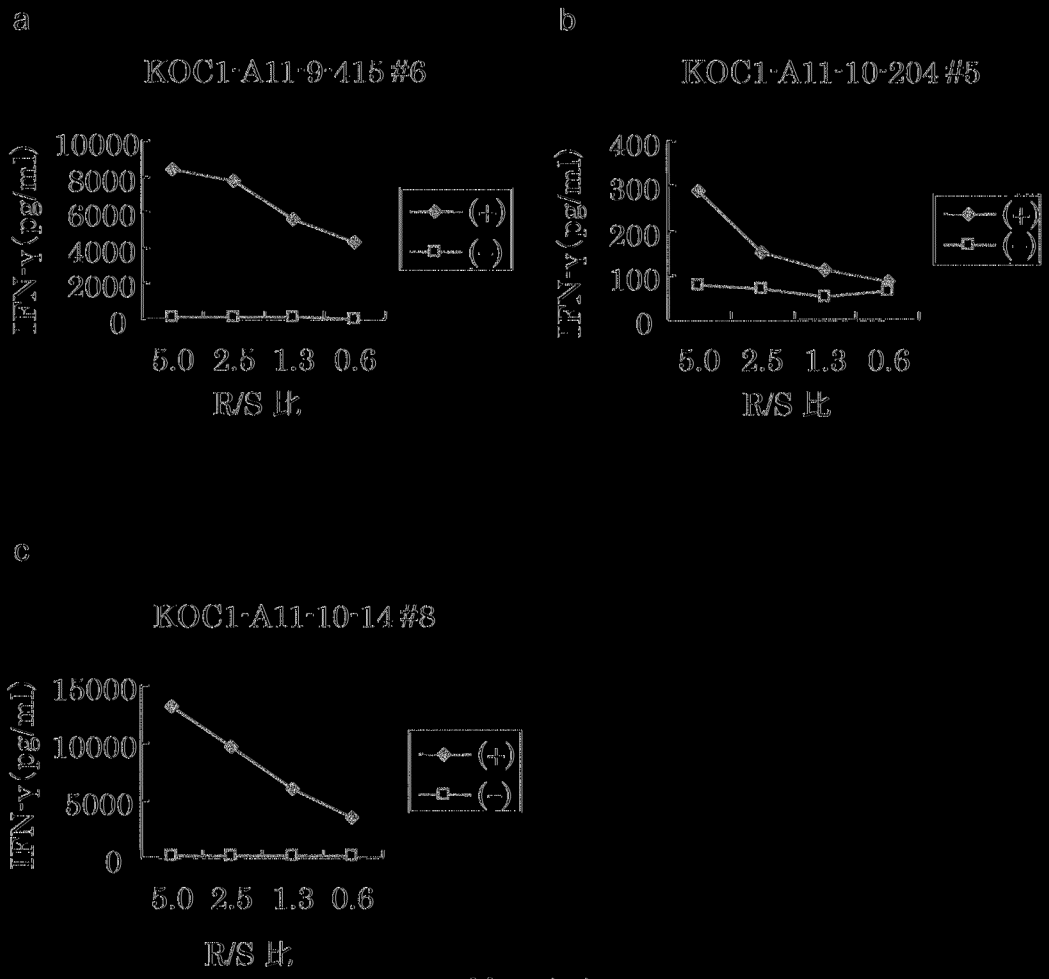
(b) 編碼為如請求項1至3中任一項之胜肽之多核苷酸；及

(c) 於自身之細胞表面上呈現HLA抗原與如請求項1至3中任一項之胜肽之複合體之APC。

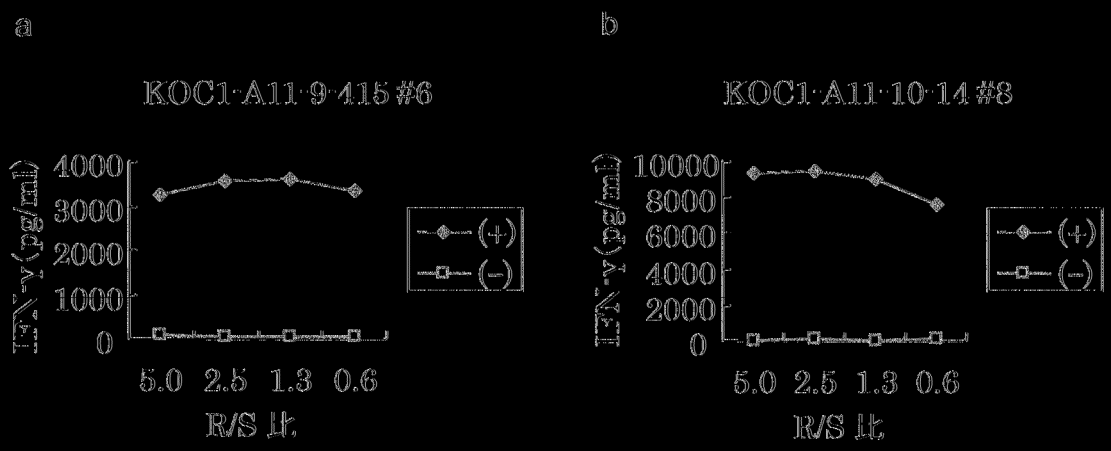
(發明圖式)


KOC1-A11-9-415
KOC1-A11-10-414
KOC1-A11-10-204
KOC1-A11-10-14
KOC1-A11-9-258
a
b
c
d
e
+
−
1
2
3
4
5
6
7
8
TNTC

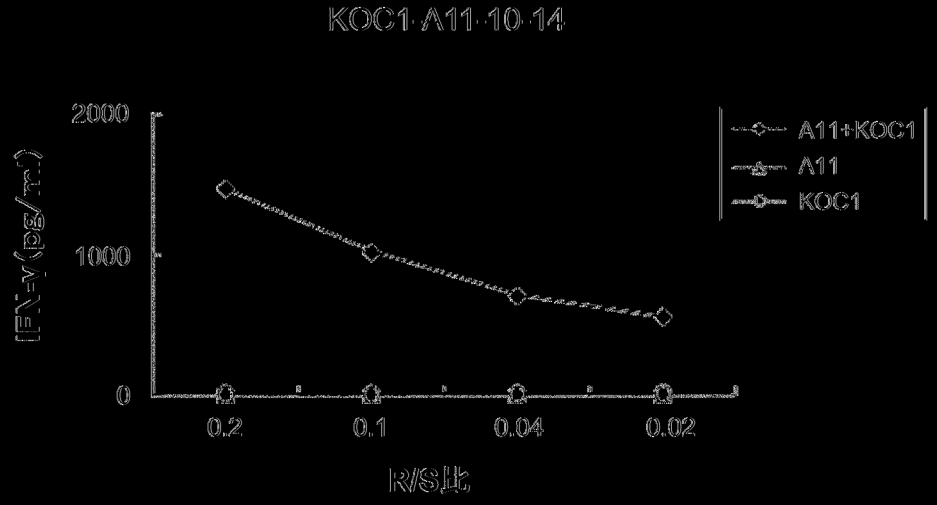
第 1 圖


a
KOC1-A11-9-415 #6
IFN-γ (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(−)
b
KOC1-A11-10-204 #5
IFN-γ (pg/ml)
400
300
200
100
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(−)
c
KOC1-A11-10-14 #8
IFN-γ (pg/ml)
15000
10000
5000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(−)

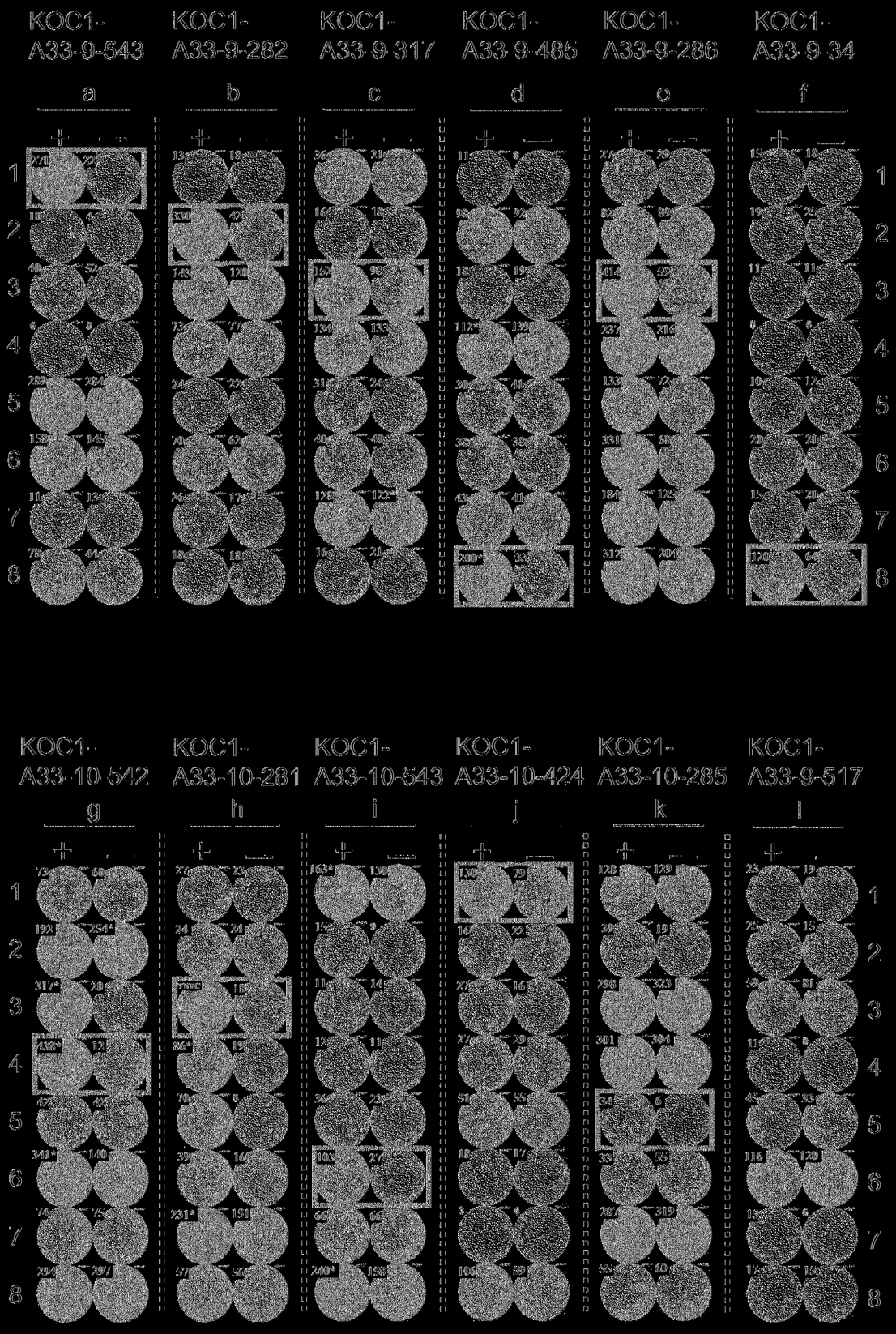
第 2 圖


a
KOC1-A11-9-415 #6
IFN-γ (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(−)
b
KOC1-A11-10-14 #8
IFN-γ (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(−)

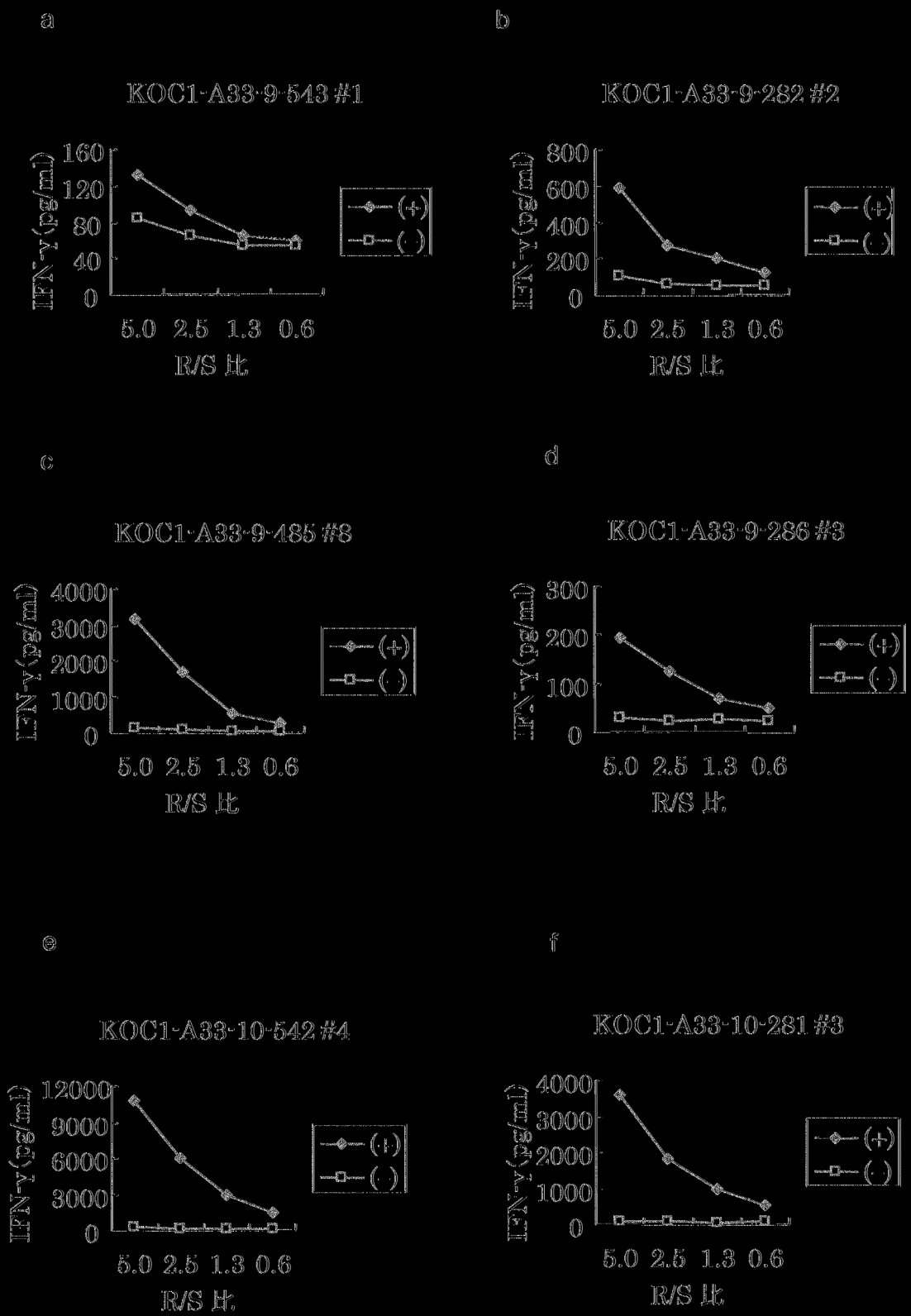
第 3 圖


KOC1-A11-10-14
IFN-γ (pg/ml)
2000
1000
0
0.2
0.1
0.04
0.02
R/S比
A11+KOC1
A11
KOC1

第 4 圖

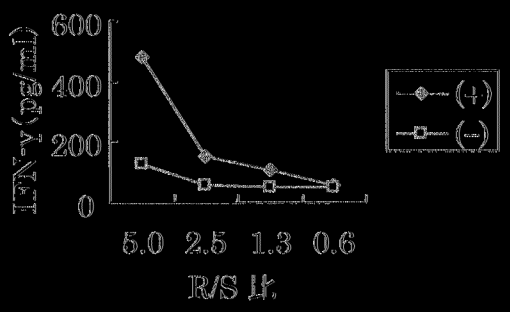

KOC1-A33-9-543
a
KOC1-A33-9-282
b
KOC1-A33-9-317
c
KOC1-A33-9-485
d
KOC1-A33-9-286
e
KOC1-A33-9-34
f
KOC1-A33-10-542
g
KOC1-A33-10-281
h
KOC1-A33-10-543
i
KOC1-A33-10-424
j
KOC1-A33-10-285
k
KOC1-A33-9-517
l

第5圖

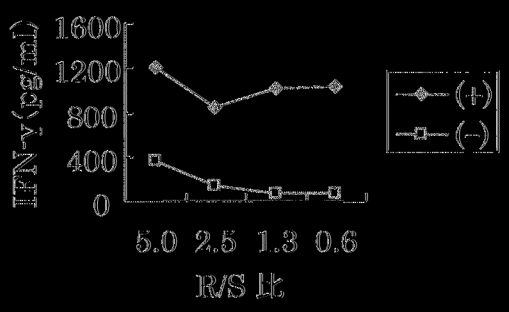

a
KOC1-A33-9-543 #1
IFN-γ (pg/ml)
160
120
80
40
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)
b
KOC1-A33-9-282 #2
IFN-γ (pg/ml)
800
600
400
200
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)
c
KOC1-A33-9-485 #8
IFN-γ (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)
d
KOC1-A33-9-286 #3
IFN-γ (pg/ml)
300
200
100
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)
e
KOC1-A33-10-542 #4
IFN-γ (pg/ml)
12000
9000
6000
3000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)
f
KOC1-A33-10-281 #3
IFN-γ (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)

第 6 圖

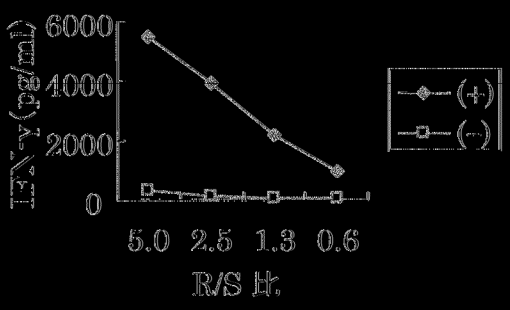
a


KOC1-A33-9-543 #1
IFN-γ (pg/ml)
600
400
200
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)

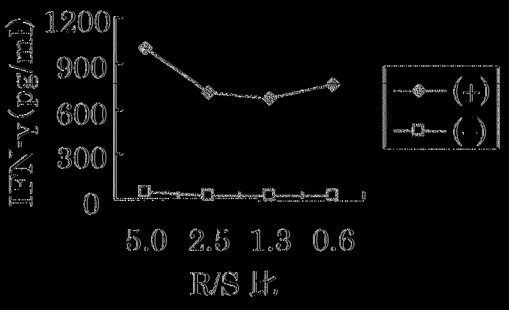
b


KOC1-A33-9-282 #2
IFN-γ (pg/ml)
1600
1200
800
400
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)

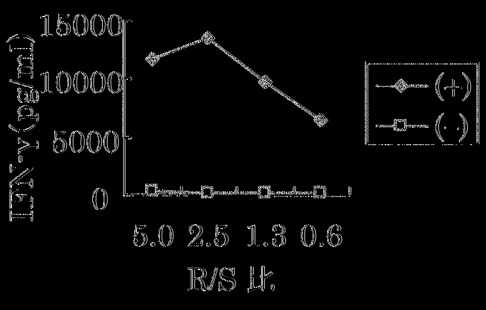
c


KOC1-A33-9-485 #8
IFN-γ (pg/ml)
6000
4000
2000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)

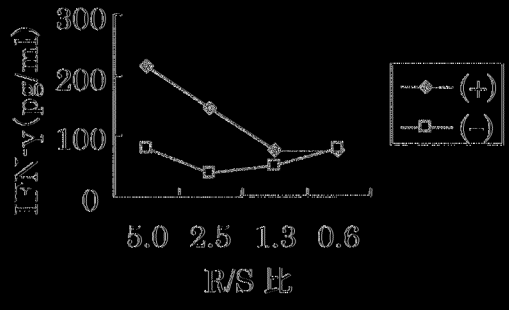
d


KOC1-A33-9-286 #3
IFN-γ (pg/ml)
1200
900
600
300
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)

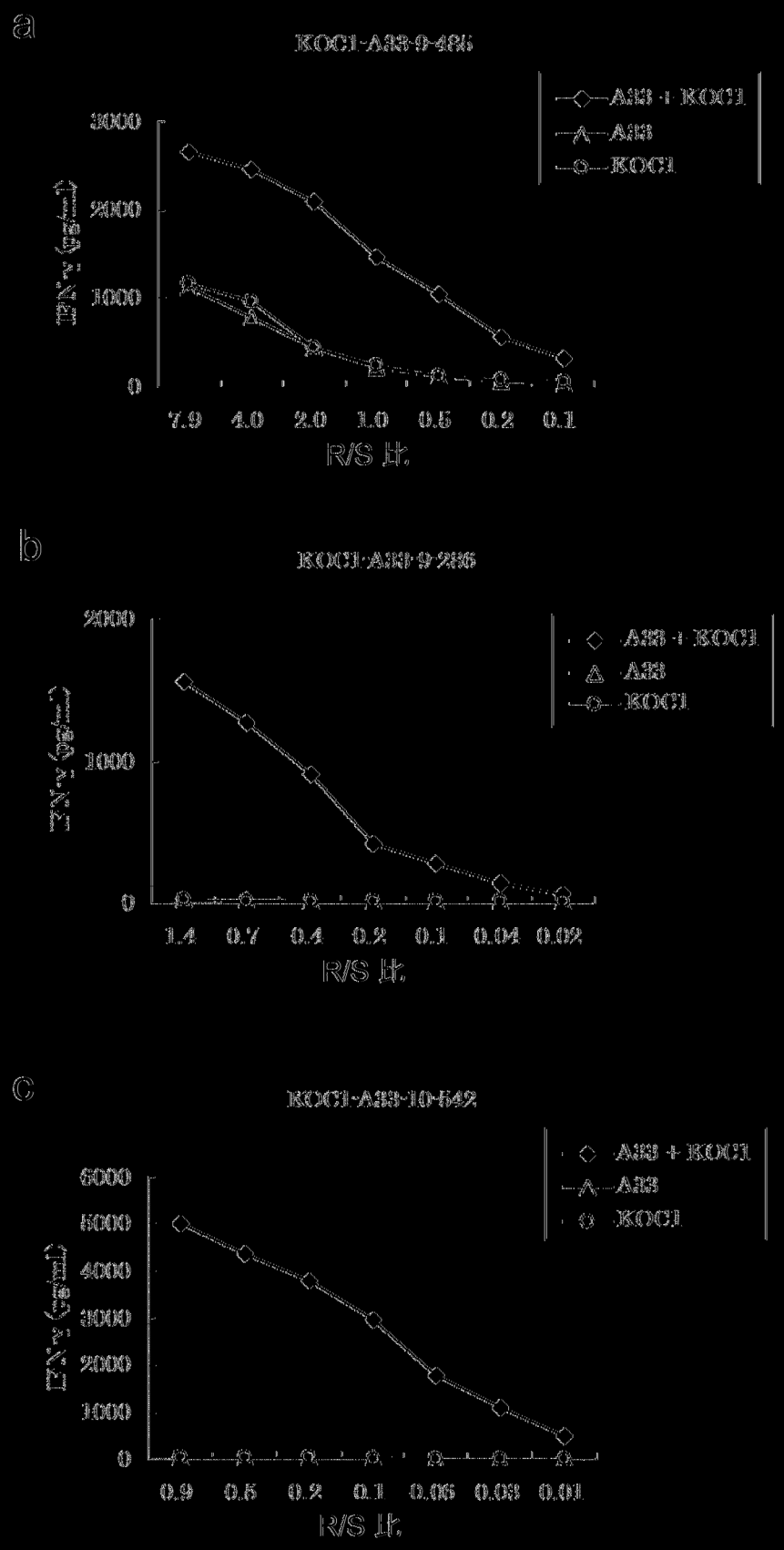
e


KOC1-A33-10-542 #4
IFN-γ (pg/ml)
15000
10000
5000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)

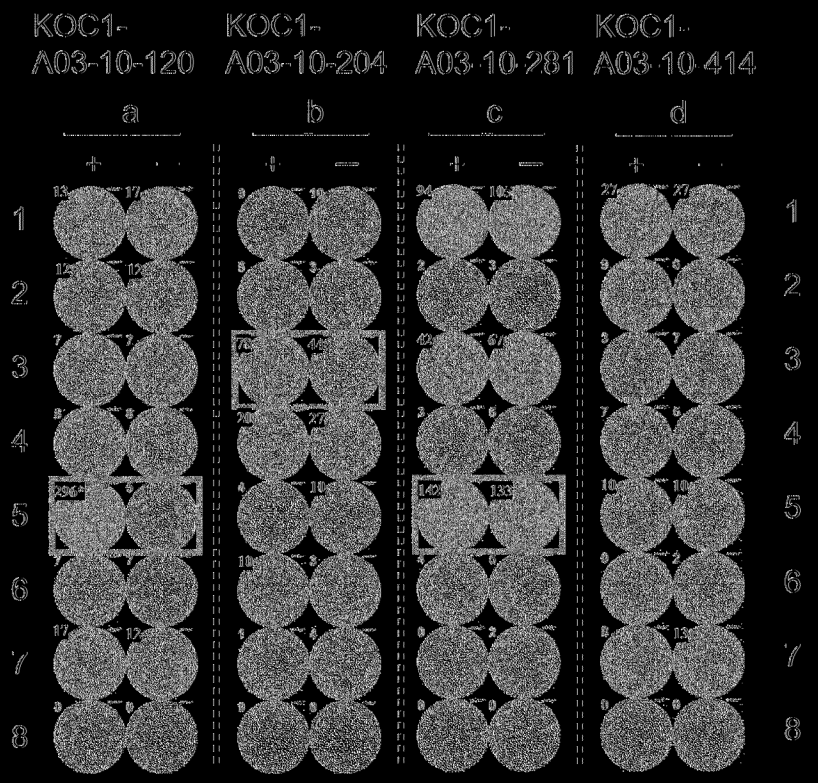
f


KOC1-A33-10-281 #3
IFN-γ (pg/ml)
300
200
100
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S 比
(+)
(-)

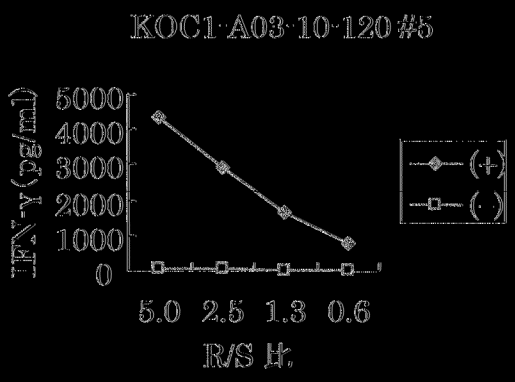
第 7 圖


a
KOC1-A33-9-485
A33 + KOC1
A33
KOC1
3000
2000
1000
0
7.9
4.0
2.0
1.0
0.5
0.2
0.1
R/S 比
b
KOC1-A33-9-286
A33 + KOC1
A33
KOC1
2000
1000
0
1.4
0.7
0.4
0.2
0.1
0.04
0.02
R/S 比
c
KOC1-A33-10-542
A33 + KOC1
A33
KOC1
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.9
0.5
0.2
0.1
0.06
0.03
0.01
R/S 比

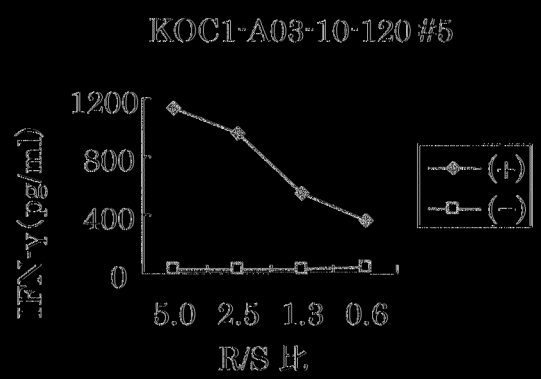
第 8 圖



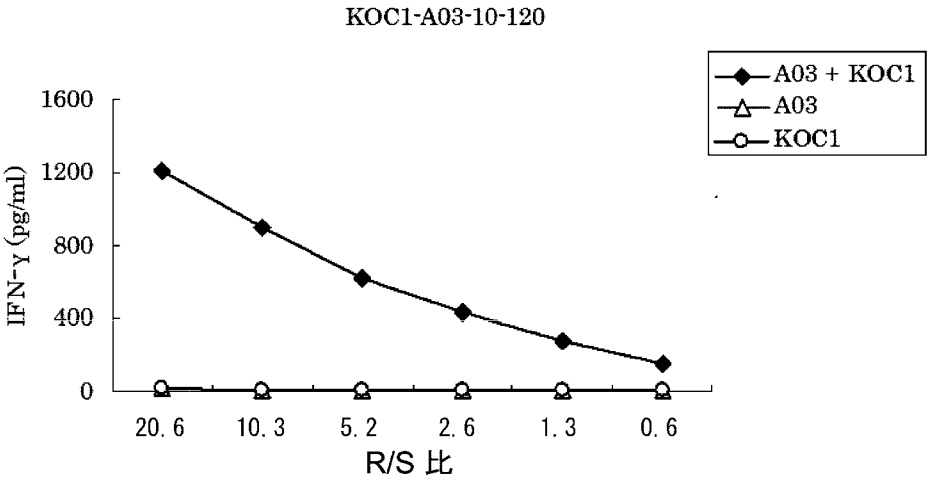
第 9 圖



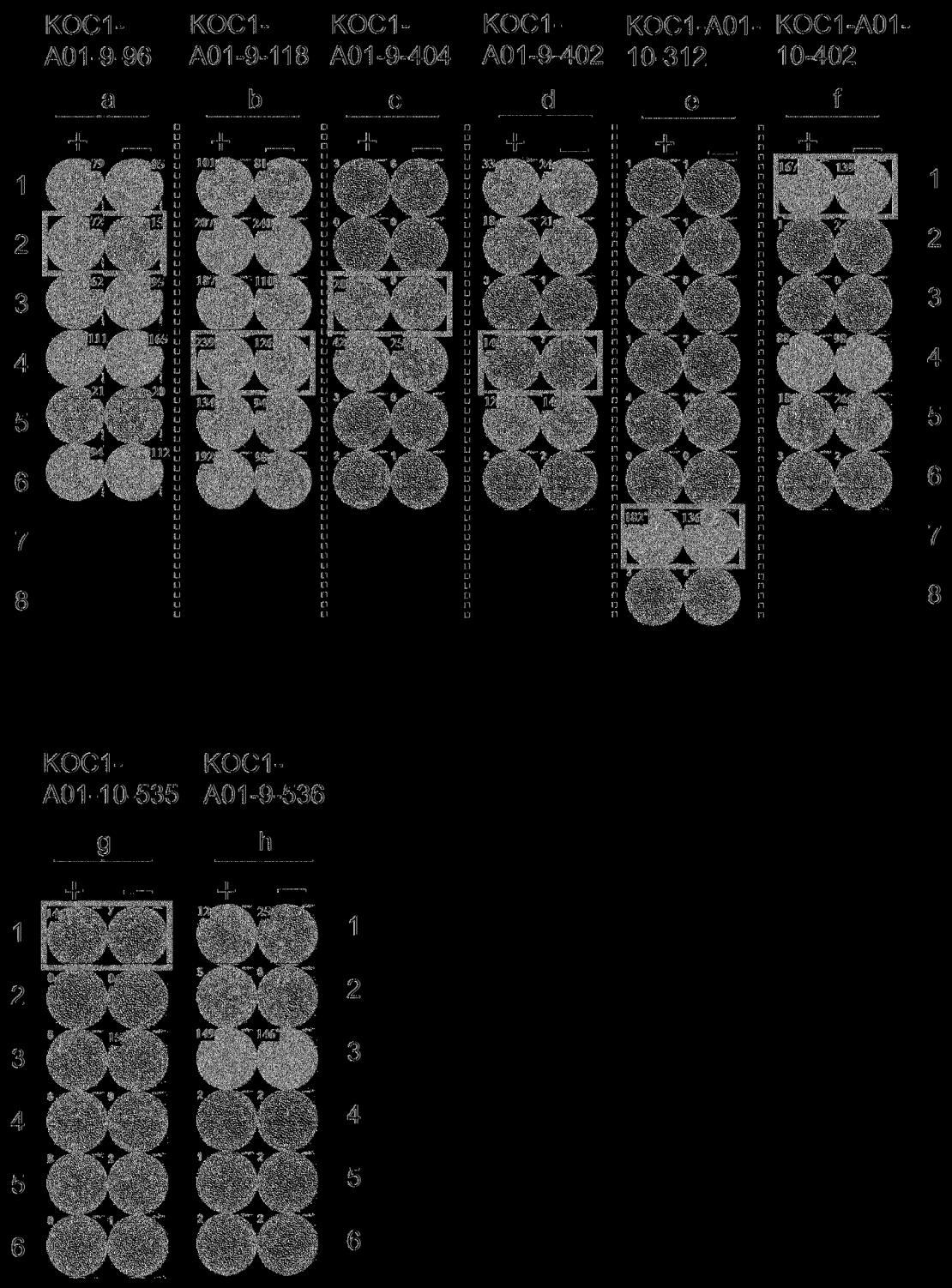
第 10 圖



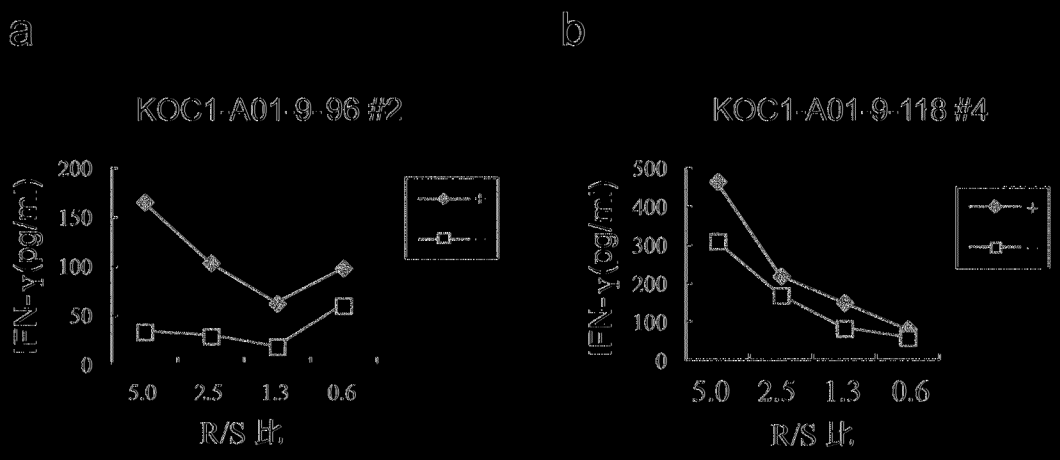
第 11 圖


KOC1-A03-10-120
A03 + KOC1
A03
KOC1
IFN-γ (pg/ml)
1600
1200
800
400
0
20.6
10.3
5.2
2.6
1.3
0.6
R/S 比

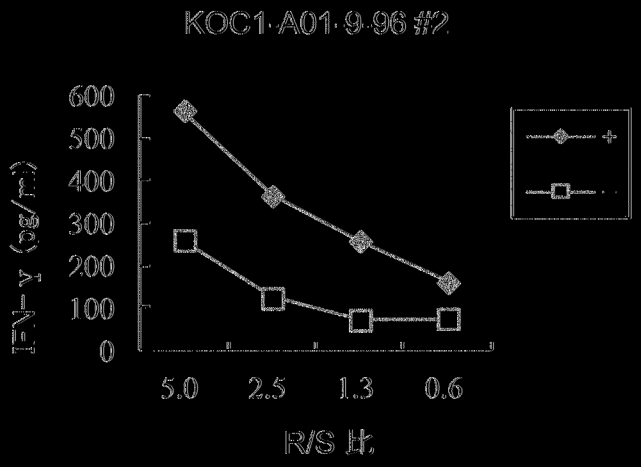
第 12 圖


KOC1-A01-9-96
KOC1-A01-9-118
KOC1-A01-9-404
KOC1-A01-9-402
KOC1-A01-10-312
KOC1-A01-10-402
a
b
c
d
e
f
KOC1-A01-10-535
KOC1-A01-9-536
g
h
1
2
3
4
5
6
7
8

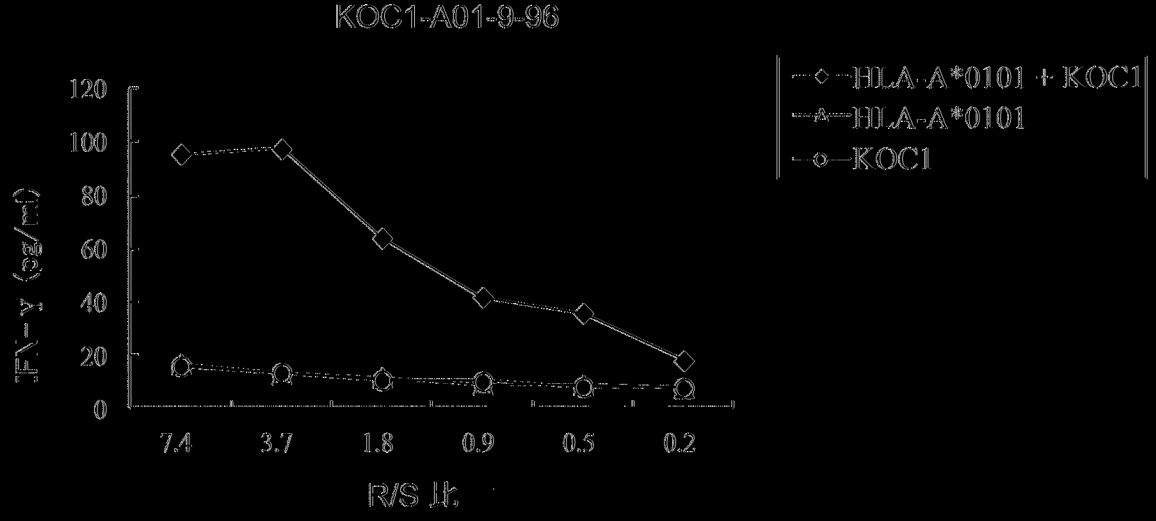
第 13 圖



第 14 圖



第 15 圖



第 16 圖

【發明申請專利範圍】

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

(a) 選自於由序列編號：67、61、62、63、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列；及

(b) 相對於選自於由序列編號：67、61、62、63、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列有1個、2個、或多個胺基酸取代、缺失、插入及/或加成之胺基酸序列。

【請求項2】 如請求項1之胜肽，其選自於由以下(i)~(iii)構成之群組：

(i) 包括對於選自於由序列編號：67、61、62、63、74、77、52、79、80及85之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(c)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列之胜肽：

(a) N末端起第1號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸；

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

(c) C末端之胺基酸取代為精胺酸或離胺酸；

(ii) 包括對於選自於由序列編號：27、30及52構成之群組之胺基酸序列實施了選自於由以下(a)~(b)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列之胜肽：

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

(b) C末端之胺基酸取代為選自於由精胺酸、離胺酸、酪胺酸及苯丙胺酸構成之群組之胺基酸；

(iii) 包括對於選自於由序列編號：86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列實施選自於由以下(a)~(c)構成之群組之1個以上之取代之胺基酸序列之胜肽：

(a) N末端起第2號胺基酸取代為蘇胺酸或絲胺酸；

(b) N末端起第3號之胺基酸取代為天冬胺酸或麩胺酸；及

(c) C末端之胺基酸取代為酪胺酸。

【請求項3】 如請求項1之胜肽，其由選自於由序列編號：67、61、62、63、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列構成。

【請求項4】 一種多核苷酸，編碼為如請求項1至3中任一項之胜肽。

【請求項5】 一種組合物，包含：藥學上可容許之擔體，以及選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分：

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

(e) 將如請求項1至3中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

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

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

【請求項7】 如請求項5之組合物，其係藥學組合物。

【請求項8】 如請求項7之組合物，係用於選自於由(i)癌之治療、(ii)癌之預防、及(iii)預防癌之術後再發構成之群組中之1種以上之用途。

【請求項9】 如請求項7之組合物，係用於誘導針對癌之免疫應答。

【請求項10】如請求項8之組合物，其中，癌係選自於由膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病(CML)、大腸癌、直腸癌、食道癌、瀰漫性胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎癌、頭頸部癌、軟部組織腫瘤、及睪丸癌構成之群組。

【請求項11】如請求項5至10中任一項之組合物，其係製劑化以成為向選自於由HLA-A33、HLA-A03及HLA-A01構成之群組中之至少1種HLA為陽性之對象投予。

【請求項12】一種在試管內或離體誘導具有CTL誘導能力之APC之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：

(a) 使APC在試管內(in vitro)、或離體(ex vivo)接觸如請求項1至3中任一項之胜肽；及

(b) 將編碼為如請求項1至3中任一項之胜肽之多核苷酸導入到APC。

【請求項13】一種在試管內誘導CTL之方法，包含選自於由以下構成之群組之步驟：

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

(b) 將CD8陽性T細胞和在自身表面上呈現HLA抗原與如請求項1至3中任一項之胜肽之複合體之外吐小體進行共培養；及

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

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

【請求項15】如請求項14之APC，係利用如請求項12之誘導具有CTL誘導能力之APC之方法誘導。

【請求項16】一種CTL，係將如請求項1至3中任一項之胜肽作為標靶。

【請求項17】如請求項16之CTL，係由如請求項13之誘導CTL之方法誘導。

【請求項18】一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分在用於誘導針對癌之免疫應答之藥物之製備中的用途：

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

(e) 將如請求項1至3中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

【請求項19】一種選自於由以下(a)~(e)構成之群組中之至少1種成分在用於治療及/或預防癌、及/或預防癌之術後再發之藥物之製備中的用途：

(a) 如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽；

(b) 以可表現如請求項1至3中任一項之胜肽之形態編碼之一或多種多核苷酸；

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

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

(e) 將如請求項1至3中任一項之胜肽作為標靶之CTL。

【請求項20】一種抗體，係結合於如請求項1至3中任一項之胜肽。

【請求項21】一種篩選有CTL誘導能力之胜肽之方法，包括以下步驟：

(a) 製作由對於選自於由序列編號：67、61、62、63、74、77、52、79、80、85、27、86、87、90、92、46、95及41構成之群組之胺基酸序列構成之原本胺基酸序列有1個、2個、或數個胺基酸殘基取代、缺失、插入、及/或加成之胺基酸序列構成之候選序列；

(b) 從(a)製作之候選序列中選擇和KOC1以外之任意公知之人基因產物均沒有顯著相同性(序列同一性)之候選序列；

(c) 使由於(b)選擇之候選序列構成之胜肽接觸APC；

(d) 使(c)之APC接觸CD8陽性T細胞；及

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

【請求項22】一種乳劑，包含如請求項1至3中任一項之一或多種胜肽、水溶性之擔體、及油性佐劑。

【請求項23】一種套組，包含：容納如請求項5至11中任一項之組合物之容器、及容納佐劑之容器。

【請求項24】一種以下(a)或(b)在用於誘導具有CTL誘導能力之APC之組成物之製備中的用途：

(a) 如請求項1至3中任一項之胜肽；或

(b) 編碼為如請求項1至3中任一項之胜肽之多核苷酸。

【請求項25】一種以下(a)至(c)中任一項在用於誘導CTL之組成物之製備中的用途：

(a) 如請求項1至3中任一項之胜肽；

(b) 編碼為如請求項1至3中任一項之胜肽之多核苷酸；及

(c) 於自身之細胞表面上呈現HLA抗原與如請求項1至3中任一項之胜肽之複合體之APC。