



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I758238 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：104141334

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 09 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/30 (2006.01)** **C07K7/06 (2006.01)**
 C12N15/09 (2006.01) **A61K39/00 (2006.01)**
 A61K48/00 (2006.01) **A61P35/00 (2006.01)**
 C12Q1/68 (2018.01) **G01N33/50 (2006.01)**
 G01N33/574 (2006.01)

(30)優先權：2014/12/09 日本 2014-249169

(71)申請人：北海道公立大學法人札幌醫科大學 (日本) SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY (JP)

日本

日商大日本住友製藥股份有限公司 (日本) SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：佐藤昇志 SATO, NORIYUKI (JP)；鳥越俊彥 TORIGOE, TOSHIHIKO (JP)；廣橋良彥 HIROHASHI, YOSHIHIKO (JP)；金關貴幸 KANASEKI, TAKAYUKI (JP)；宮本昇 MIYAMOTO, SHO (JP)；可慶維塔利 KOCHIN, VITALY (RU)；後藤正志 GOTO, MASASHI (JP)

(74)代理人：李世章；彭國洋

(56)參考文獻：

US 2011/0262358A1 WO 2008/054597A2

WO 2013/143504A1

Au V et al., "Expression of ankyrin repeat and SOCS box containing 4 (ASB4) confers migration and invasion properties of hepatocellular carcinoma cells", BioScience Trends, 8(2):101-110, 2014/04

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：45 共 150 頁

(54)名稱

源自 ASB4 蛋白質的胜肽

(57)摘要

本發明之目的在於提供：一種檢測劑，其用以特異性地檢測癌幹細胞；一種腫瘤抗原胜肽，其被特異性地呈現在癌幹細胞；一種含有此胜肽來作為有效成分之醫藥組成物，其有益於癌症的預防及/或治療；及，一種篩選該腫瘤抗原胜肽的方法等。

為了達成上述目的，本發明是藉由提供下述來解決問題：一種胜肽，其是以 Y₀-X₀-Z₀ 表示；一種聚抗原決定基胜肽，其為複數的抗原決定基胜肽所連結而成，並且包含前述胜肽的至少一種來作為抗原決定基胜肽的一種；一種聚核苷酸，其編碼出前述胜肽或聚抗原決定基胜肽的至少一種；

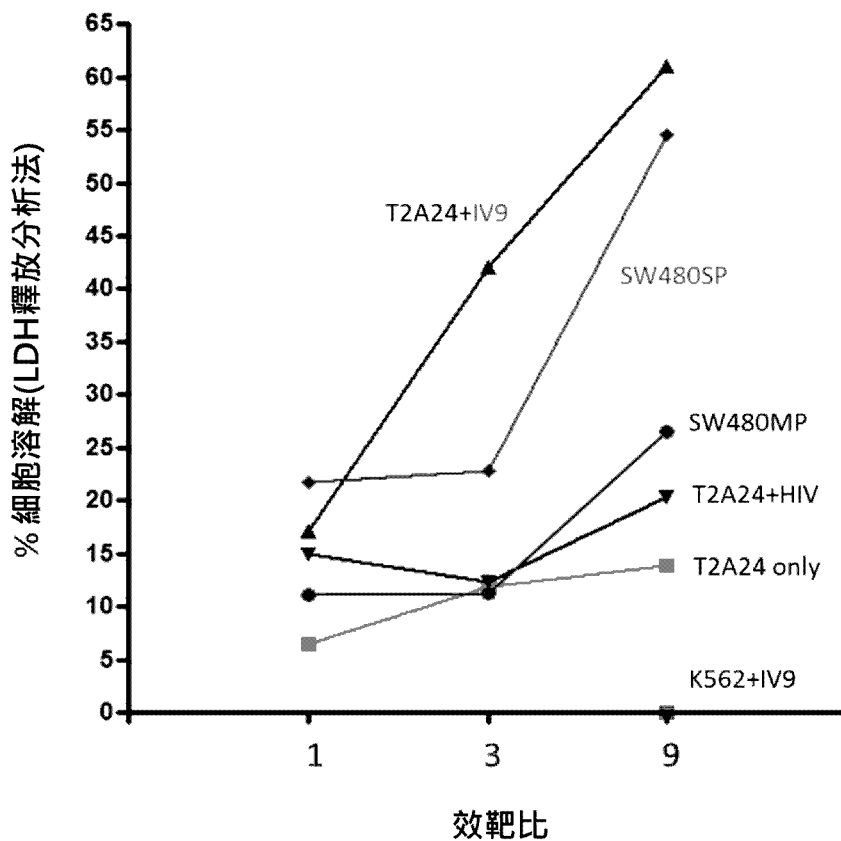
及，一種醫藥組成物，其含有該等胜肽/聚核苷酸來作為有效成分；一種癌症的預防及/或治療劑等，其特徵在於會誘導出細胞毒性 T 細胞(CTL)。

The purpose of the present invention is directed to providing: a detection agent used for specifically detecting a cancer stem cell; a tumor antigenic peptide specifically expressed in a cancer stem cell; a pharmaceutical composition containing the peptide as an active ingredient, which is beneficial for preventing and/or treating a cancer; and a method for screening the tumor antigenic peptide, and the like.

In order to achieve the aforementioned purpose, the present invention addresses problems by providing the followings: a peptide represented as $Y_0-X_0-Z_0$; an antigenic determinant polypeptide which is formed by connecting a plurality of antigenic determinant peptides and includes at least one of the aforementioned peptides as one of the antigenic determinant peptides; a polynucleotide encoding at least one of the aforementioned peptides or antigenic determinant polypeptide; and a pharmaceutical composition containing the peptides/polynucleotide as an active ingredient; a cancer preventing and/or treating agent and the like, which is characterized in that it induces a cytotoxic T cell (CTL).

指定代表圖：

圖10





公告本

申請日：2015年12月09日

IPC分類：C07K 16/30 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2018.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

I758238

【發明摘要】

【中文發明名稱】源自ASB4蛋白質的胜肽

【英文發明名稱】 PEPTIDES DERIVED FROM ASB4 PROTEIN

【中文】

本發明之目的在於提供：一種檢測劑，其用以特異性地檢測癌幹細胞；一種腫瘤抗原胜肽，其被特異性地呈現在癌幹細胞；一種含有此胜肽來作為有效成分之醫藥組成物，其有益於癌症的預防及/或治療；及，一種篩選該腫瘤抗原胜肽的方法等。

為了達成上述目的，本發明是藉由提供下述來解決問題：一種胜肽，其是以 $Y_0 - X_0 - Z_0$ 表示；一種聚抗原決定基胜肽，其為複數的抗原決定基胜肽所連結而成，並且包含前述胜肽的至少一種來作為抗原決定基胜肽的一種；一種聚核苷酸，其編碼出前述胜肽或聚抗原決定基胜肽的至少一種；及，一種醫藥組成物，其含有該等胜肽/聚核苷酸來作為有效成分；一種癌症的預防及/或治療劑等，其特徵在於會誘導出細胞毒性T細胞(CTL)。

【英文】

The purpose of the present invention is directed to providing: a detection agent used for specifically detecting a cancer stem cell; a tumor antigenic peptide specifically expressed in a cancer stem cell; a pharmaceutical composition containing the peptide as an active ingredient, which is beneficial for preventing

and/or treating a cancer; and a method for screening the tumor antigenic peptide, and the like.

In order to achieve the aforementioned purpose, the present invention addresses problems by providing the followings: a peptide represented as $Y_0-X_0-Z_0$; an antigenic determinant polypeptide which is formed by connecting a plurality of antigenic determinant peptides and includes at least one of the aforementioned peptides as one of the antigenic determinant peptides; a polynucleotide encoding at least one of the aforementioned peptides or antigenic determinant polypeptide; and a pharmaceutical composition containing the peptides/polynucleotide as an active ingredient; a cancer preventing and/or treating agent and the like, which is characterized in that it induces a cytotoxic T cell (CTL).

【指定代表圖】圖10。

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 源自ASB4蛋白質的胜肽

【英文發明名稱】 PEPTIDES DERIVED FROM ASB4 PROTEIN

【技術領域】

【0001】 本發明是關於一種用以檢測癌幹細胞的檢測劑，該檢測劑利用了癌幹細胞中會特異性地表現的基因；及，關於一種源自該基因的腫瘤抗原胜肽，其作為癌症的預防及/或治療劑是有用的；和該等的利用。並且本發明是關於一種篩選該腫瘤抗原胜肽的方法。

【先前技術】

【0002】 至今所開發的抗癌劑的治療效果並不充分，能夠根治癌症的機率極低。作為其原因，可舉出是以往的治療劑未能將形成癌組織的根源之細胞選擇性地標靶化。到了近年，作為該「形成癌組織的根源之細胞」，癌幹細胞的存在被報導出來。癌幹細胞，認為是涉及到癌的產生、復發及轉移的原因細胞，因此若能將癌幹細胞進行標靶化，可期待有較高的可能性能夠有效地抑制癌的增殖、復發及轉移。亦即，癌幹細胞的檢測技術與將癌幹細胞視為標靶之新穎治療劑的開發，對於癌症醫療成了重要的課題。

【0003】 另一方面，在源自生物體的腫瘤細胞或病毒感染細胞等的排除方面，是細胞性免疫，尤其是細胞毒

性T細胞（CTL：Cytotoxic T Lymphocyte）負責重要的工作。例如在腫瘤細胞之排除時，CTL辨識出腫瘤細胞上的抗原胜肽（腫瘤抗原胜肽）與主要組織相容性複合體（MHC：Major Histocompatibility Complex）第I型抗原（在人類的的情況下稱為HLA（人類白血球抗原，Human Leukocyte Antigen）第I型抗原）之複合體，而攻擊、破壞腫瘤細胞。換句話說，腫瘤抗原胜肽是藉由以下方式生成：腫瘤中特有的蛋白質，亦即腫瘤抗原蛋白質在細胞內被合成後，被蛋白分解酶在細胞內分解。然後所生成的腫瘤抗原胜肽，在內質網內與MHC第I型抗原（HLA第I型抗原）結合而形成複合體，並被運送到細胞表面上進行抗原呈現。腫瘤特異性的CTL辨識出涉及此抗原呈現的複合體，藉由細胞毒殺作用或淋巴素的產生來顯示出抗腫瘤效果。隨著如此一連串作用的闡明，藉由將腫瘤抗原蛋白質或腫瘤抗原胜肽作為所謂的癌免疫療法劑（癌疫苗）來運用，使癌症患者體內的癌特異性CTL增強的治療法正在持續開發。

其中特別備受期望的是，可免疫性地排除癌幹細胞的新型癌疫苗的開發（例如專利文獻1）。

【0004】 ASB4（錨蛋白重複序列和SOCS盒蛋白4；Ankyrin repeat and SOCS box-containing 4）原本是在印記基因（imprinting gene）篩選的過程中被鑑定出來的基因之一，但在近年，作為涉及到重新編

程(reprogramming)的基因也有被鑑定出來，已知在人類的正常組織中，除了特定的分化階段之睪丸外不會看到有表現。作為ASB4與癌相關的現象，至今有報導指出，於肝癌細胞中會表現、或ASB4基因的表現與腫瘤的浸潤性有正相關等（例如非專利文獻1~4）。

[先前技術文獻]

(專利文獻)

【0005】

專利文獻1：國際公開第2010/050268號冊子

(非專利文獻)

【0006】

非專利文獻1：Mizuno Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Feb 8;290(5):1499-505.

非專利文獻2：Yang CS, et al. Cell Rep. 2014 Jul 24;8(2):327-37.

非專利文獻3：Kim SK, et al. Mol Cells. 2008 Apr 30;25(2):317-21.

非專利文獻4：Au V, et al. Biosci Trends. 2014 Apr;8(2):101-10.

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0007】 本發明之目的是在於提供一種檢測劑，其用以特異性地檢測癌幹細胞；一種腫瘤抗原胜肽，其被特異性地呈現在癌幹細胞；一種含有此胜肽來作為有效成分之醫藥組成物，其有益於癌症的預防及/或治療；及，一種篩選該腫瘤抗原胜肽的方法等。

[解決問題之技術手段]

【0008】 在探索會在腫瘤細胞，尤其是在癌幹細胞中特異性地受到抗原呈現的胜肽之中，於癌幹細胞特異性表現的蛋白質之序列中，預測會與HLA結合的抗原決定基領域即使存在有複數個，要鑑定出該蛋白質的哪一個部分是實際上在活體內與HLA結合而能在細胞表面受到抗原呈現並不容易。於是，本案發明人為了解決該問題，開發出直接鑑定實際在癌幹細胞中受到抗原呈現的胜肽（天然胜肽）之方法，鑑定出了數個天然胜肽。然後發現，在該胜肽之中，僅在癌幹細胞特異性地受到抗原呈現的胜肽是源自ASB4蛋白質的胜肽，並且繼續深入研究，終至完成本發明。

【0009】 亦即，本發明是關於下列所揭示者：

〔1〕一種癌幹細胞特異性抗原胜肽，其是以 $Y_0-X_0-Z_0$ 表示，

其中， X_0 為以下之（1）～（4）中的任一種：

（1）是ASB4蛋白質的部分胜肽，其由該蛋白質之胺基酸序列中的連續8～14個胺基酸所構成，自N端起

第2個胺基酸為白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸，及/或C端的胺基酸為纈胺酸、白胺酸或異白胺酸；

(2) 於(1)的部分胜肽中，自N端起第2個胺基酸被白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被纈胺酸、白胺酸或是異白胺酸所取代的胜肽；

(3) 是ASB4蛋白質的部分胜肽，其由該蛋白質之胺基酸序列中的連續8~14個胺基酸所構成，自N端起第2個胺基酸為酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸，及/或C端的胺基酸為白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸；或者，

(4) 於(3)的部分胜肽中，自N端起第2個胺基酸被酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸所取代的胜肽；

並且， Y_0 及 Z_0 為互相獨立由0個到數個胺基酸所構成之胜肽。

【0010】

[2] 如[1]之抗原胜肽，其中， X_0 為以下之(1')~(4')中的任一種：

(1') 是ASB4蛋白質的部分胜肽，其由該蛋白質之胺基酸序列中的連續8~11個胺基酸所構成，自N端起第2個胺基酸為白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸，及/或C端的胺基酸為纈胺酸、白胺酸或異白胺酸；

(2') 於 (1') 的部分胜肽中，自 N 端起第 2 個胺基酸被白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸所取代，及 / 或 C 端的胺基酸被纈胺酸、白胺酸或是異白胺酸所取代的胜肽；

(3') 是 A S B 4 蛋白質的部分胜肽，其由該蛋白質之胺基酸序列中的連續 8 ~ 11 個胺基酸所構成，自 N 端起第 2 個胺基酸為酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸，及 / 或 C 端的胺基酸為白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸；或者，

(4') 於 (3') 的部分胜肽中，自 N 端起第 2 個胺基酸被酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸所取代，及 / 或 C 端的胺基酸被白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸所取代的胜肽；

並且， Y_0 及 Z_0 為互相獨立的 0 個或 1 個胺基酸；或是由 0 ~ 3 個胺基酸所構成之胜肽，此處， $Y_0 - X_0 - Z_0$ 成爲整體 9 ~ 14 個胺基酸長的 A S B 4 蛋白質之部分胜肽或是該 X_0 同系物。

【0011】

[3] 如 [1] 或 [2] 之抗原胜肽，其中， X_0 是由以序列編號 3 ~ 7、9 ~ 19、21 ~ 28、30 ~ 46 中的任一種所表示之胺基酸序列所構成。

[4] 如 [1] 或 [2] 之抗原胜肽，其中， X_0 是由以序列編號 3 ~ 7、9 ~ 19、21 ~ 28、30 ~ 46 中的任一種所表示之胺基酸序列所構成，且 Y_0 及 Z_0 不存在。

[5] 如 [1] 或 [2] 之抗原胜肽，其中， X_0 是在以序列編號 3 ~ 7、9 ~ 11、13 ~ 19、21 ~ 23 及 26 ~ 28、30 ~ 46 中的任一種所表示之胺基酸序列中，自 N 端起第 2 個胺基酸被甲硫胺酸、白胺酸或是異白胺酸所取代，及 / 或 C 端的胺基酸被白胺酸、纈胺酸或異白胺酸所取代的胺基酸序列所構成，且 Y_0 及 Z_0 不存在。

【 0 0 1 2 】

[6] 如 [1] 或 [2] 之抗原胜肽，其中， X_0 是於以序列編號 3、5 ~ 7、9 ~ 14、16、19、21 ~ 26、28、30 ~ 32、34 ~ 37 及 39 ~ 46 中的任一種所表示之胺基酸序列中，自 N 端起第 2 個胺基酸被甲硫胺酸或酪胺酸所取代，及 / 或 C 端的胺基酸被白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸所取代的胺基酸序列所構成，且 Y_0 及 Z_0 不存在。

[7] 如 [1] 或 [2] 之抗原胜肽，其中， X_0 為如 [4] ~ [6] 之 X_0 ，且 Y_0 或 Z_0 任一方為 1 個胺基酸，另一方則不存在。

[8] 如 [1] ~ [3] 之抗原胜肽，其中，以 $Y_0 - X_0 - Z_0$ 表示之胜肽是由以序列編號 4、6、7、10、14、15、17 ~ 19、21 ~ 23、26、28、31、33、36、39、41、42、45 及 46 中的任一種表示之胺基酸序列所構成。

[9] 如 [1] ~ [3] 之抗原胜肽，其中，以 $Y_0 - X_0 - Z_0$ 表示之胜肽是由以序列編號 9、21、25、30、32、35 及 37 中的任一種表示之胺基酸序列所構成。

[10] 如 [1] ~ [3] 之抗原胜肽，其中，以 $Y_0 - X_0 - Z_0$

表示之胜肽是由以序列編號 4 ~ 12 及 15 ~ 23 中的任一
種表示之胺基酸序列所構成。

[11] 如 [1] ~ [3] 之抗原胜肽，其中，以 $Y_0 - X_0 - Z_0$
表示之胜肽是由以序列編號 3 ~ 9、13、14、25、26 及
28 ~ 30 中的任一種表示之胺基酸序列所構成。

[12] 如 [1] ~ [3] 之抗原胜肽，其中，以 $Y_0 - X_0 - Z_0$
表示之胜肽是由以序列編號 4 ~ 9 中的任一種表示之胺
基酸序列所構成。

[13] 一種聚抗原決定基胜肽，其為複數的抗原決定基
胜肽所連結而成，其中，作為該抗原決定基胜肽，至少
包含一種如 [1] ~ [12] 之抗原胜肽。

【 0013 】

[14] 一種癌幹細胞檢測劑，其包含用以檢測 ASB4 基
因之表現產物的 ASB4 檢測劑。

[15] 如 [14] 之癌幹細胞檢測劑，其用以在包含細胞
之細胞集團中檢測癌幹細胞，該細胞是源自選自由心
臟、腦、胎盤、肺、肝臟、骨骼肌、腎臟、胰臟、脾臟、
胸腺、前列腺、睪丸、卵巢、小腸、大腸及血液所組成
之群組中的 1 種或 2 種以上的生物樣品。

[16] 如 [14] 或 [15] 之癌幹細胞檢測劑，其中，
ASB4 基因的表現產物是 mRNA 及 / 或內生性聚胜肽。

[17] 如 [14] ~ [16] 之癌幹細胞檢測劑，其中，
包含 ASB4 基因的表現產物是 mRNA，且藉由 RT-PCR
法來檢測。

[18] 如 [14] ~ [16] 之癌幹細胞檢測劑，其中，包含 A S B 4 基因的表現產物是內生性聚胜肽，且藉由與該內生性聚胜肽會特異性反應的 A S B 4 檢測劑來檢測。

[19] 如 [18] 之癌幹細胞檢測劑，其中，A S B 4 檢測劑是抗體。

[20] 如 [14] ~ [17] 之癌幹細胞檢測劑，其中，A S B 4 檢測劑為探針及 / 或引子，該探針及 / 或引子所具有的鹼基序列，是用以檢測 A S B 4 基因的表現產物亦即 m R N A 的前述基因互補鹼基序列。

【 0 0 1 4 】

[21] 一種方法，是使用 [14] ~ [20] 之癌幹細胞檢測劑，於檢查對象中檢測癌幹細胞。

[22] 一種癌症治療藥的篩選方法，其包含以下步驟：

(i) 在將癌症治療藥的候選化合物投予給對象之前，測定在該對象中 A S B 4 基因的表現產物的檢測量 A 的步驟；

(i i) 在將前述候選化合物投予給前述對象細胞集團之後，測定在該對象中 A S B 4 基因的表現產物的檢測量 B 的步驟；及，

(i i i) 比較前述檢測量 A 與 B ，在該檢測量 A 顯著大於 B 的情況，將前述候選化合物判定為候選癌症治療藥的步驟，該候選癌症治療藥的特徵在於將癌幹細胞視為標的。

〔 23 〕 一種聚核苷酸，其編碼出如〔 1 〕～〔 12 〕之抗原胜肽、或如〔 13 〕之聚抗原決定基胜肽的至少一種。

〔 24 〕 一種表現載體，其包含如〔 23 〕之聚核苷酸。

〔 25 〕 一種基因導入用組成物，其包含如〔 24 〕之表現載體。

【 0015 】

〔 26 〕 一種醫藥組成物，其包含以下之（ a ）～（ d ）的任一種作為有效成分：

（ a ） 如〔 1 〕～〔 12 〕之抗原胜肽、或如〔 13 〕之聚抗原決定基胜肽；

（ b ） 如〔 23 〕之聚核苷酸；

（ c ） 如〔 24 〕之表現載體；

（ d ） A S B 4 蛋白質、編碼出 A S B 4 蛋白質的聚核苷酸或包含該聚核苷酸的表現載體。

〔 27 〕 如〔 26 〕之醫藥組成物，其包含如〔 1 〕～〔 12 〕之抗原胜肽、及/或如〔 13 〕之聚抗原決定基胜肽作為有效成分。

〔 28 〕 如〔 26 〕或〔 27 〕之醫藥組成物，其進一步包含佐劑。

〔 29 〕 如〔 26 〕～〔 28 〕之醫藥組成物，其為癌症的預防及/或治療劑。

〔 30 〕 如〔 26 〕～〔 29 〕之醫藥組成物，其為癌症的預防及/或治療用疫苗。

【 0016 】

[3 1] 一種細胞毒性 T 細胞的誘導劑，其包含以下之 (a) ~ (d) 的任一種作為有效成分：

(a) 如 [1] ~ [1 2] 之抗原胜肽、或如 [1 3] 之聚抗原決定基胜肽；

(b) 如 [2 3] 之聚核苷酸；

(c) 如 [2 4] 之表現載體；

(d) A S B 4 蛋白質、編碼出 A S B 4 蛋白質的聚核苷酸或包含該聚核苷酸的表現載體。

[3 2] 一種抗原呈現細胞的製造方法，其包含使以下之 (A) 或 (B) 與具有抗原呈現能力的細胞在試管內 (*in vitro*) 接觸：

(A) 如 [1] ~ [1 2] 之抗原胜肽、或如 [1 3] 之聚抗原決定基胜肽；

(B) 聚核苷酸，其編碼出前述 (A) 的胜肽及 / 或聚抗原決定基胜肽的至少一種。

【 0 0 1 7 】

[3 3] 一種細胞毒性 T 細胞的誘導方法，其包含使以下之 (A) 或 (B) 與週邊血液淋巴球在試管內 (*in vitro*) 接觸：

(A) 如 [1] ~ [1 2] 之抗原胜肽、或如 [1 3] 之聚抗原決定基胜肽；

(B) 聚核苷酸，其編碼出前述 (A) 的胜肽及 / 或聚抗原決定基胜肽的至少一種。

[3 4] 一種 H L A 多聚體，其包含如 [1] ~ [1 2] 之抗原胜肽與 H L A 。

[3 5] 一種診斷藥，其包含如 [3 4] 之 H L A 多聚體。

[3 6] 一種抗體，其會辨識出如 [1] ~ [1 2] 之抗原胜肽。

[3 7] 一種類 T 細胞受體抗體，其會辨識出如 [1] ~ [1 2] 之抗原胜肽與 H L A 的複合體。

【 0 0 1 8 】

[3 8] 一種腫瘤檢測劑，其含有如 [3 6] 之抗體及 / 或如 [3 7] 之類 T 細胞受體抗體。

[3 9] 一種嵌合抗原受體，其會辨識出如 [1] ~ [1 2] 之抗原胜肽與 H L A 的複合體。

[4 0] 一種人工細胞毒性 T 細胞 (C T L)，其包含 T 細胞受體，該 T 細胞受體會辨識出如 [1] ~ [1 2] 之抗原胜肽與 H L A 的複合體。

[4 1] 一種診斷藥，其用以選擇治療對象患者，該治療對象患者對於使用了如 [2 6] ~ [3 0] 之醫藥組成物的癌症處置方法為有效；並且，該診斷藥包含：如 [1 4] ~ [2 0] 之癌幹細胞檢測劑、如 [3 4] 之 H L A 多聚體、如 [3 6] 之抗體及 / 或如 [3 7] 之類 T 細胞受體抗體。

[4 2] 一種癌幹細胞特異性抗原胜肽，其是由以序列編號 3 ~ 3 0 中的任一種表示之胺基酸序列所構成。

[發明之功效]

【0019】 根據本發明，可提供一種腫瘤抗原胜肽，其作為會特異性攻擊癌幹細胞的CTL之誘導劑是有用的；及提供一種含有此胜肽來作為有效成分之醫藥組成物等，其有益於癌症的預防及/或治療。

【圖式簡單說明】

【0020】

圖1是表示，經赫斯特(Hoechst)33342/PI染色的人類大腸癌細胞株(SW480)藉由維拉帕米(Verapamil)之有無所實行的流式細胞分析的結果。

圖2-1是表示，培養分別從SW480-SP殖株細胞株及SW480-MP殖株細胞株所單離出的1個細胞，並經赫斯特33342/PI染色的流式細胞分析的結果。

圖2-2是表示，SW480-SP殖株細胞株及SW480-MP殖株細胞株各自的共焦點顯微鏡影像。

圖3是表示，分別將SW480-SP殖株細胞株及SW480-MP殖株細胞株移植到小鼠，並評估所形成的腫瘤的結果。

圖4是表示，分別從SW480-SP殖株細胞株及SW480-MP殖株細胞株的溶解產物，使用抗HLA-A24抗體將HLA與胜肽的複合體進行免疫沈澱，接著將單離出來的胜肽，使用質譜儀進行序列分析的結果。

圖5是表示，分別萃取出SW480-SP及SW480-MP的mRNA，並進行藉由RT-PCR所實行的基因表現之探

討時的電泳照片。作為SW480-SP殖株細胞株中特異性的基因，ASB4基因受到確認。

圖6是表示，使用源自人類成人正常組織的ASB4的mRNA所進行的RT-PCR的結果。

圖7是表示，使用源自各種癌細胞株的ASB4的mRNA所進行的RT-PCR的結果。

圖8是表示，ASB4胜肽(IV9；序列編號3)對HLA-A24的結合能力。將IV9及HIV(序列編號51)、GK12(序列編號52)等各種合成胜肽沖擊T2-A24細胞，使用流式細胞分析來評估HLA-A24表現量。

圖9是表示，經各種胜肽沖擊之T2-A24細胞的ELISPOT分析法的結果，該分析法是使用將IFN- γ 固著而成的ELISPOT盤。

圖10是表示，由PBMC誘導成的效應細胞(CTL)之對於經各種胜肽沖擊之T2-A24細胞及未經沖擊之SW480-SP細胞的細胞毒殺活性評估結果。效應細胞是使用，經藉由以序列編號3表示之ASB4胜肽IV9誘導而成者。使用MHC第I型表現缺失的K562細胞來作為負控制。

圖11是表示，以序列編號4表示之胜肽(As80_9)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸是表示一定之平均播種細胞數的斑點數。A是表示利用了HLA-A*02:01基因導入小鼠，B是表示利用

了HLA-A*24:02基因導入小鼠的各自試驗結果。又，黑棒（「w/peptide」）及白棒（「w/o」）是分別表示將源自胜肽投予小鼠的脾細胞在投予胜肽的存在下及不存在下進行再刺激培養的結果。亦即，黑棒與白棒的數值差異，是表示藉由各胜肽的投予在小鼠生體內被誘導出來的胜肽特異性CTL的數量。

圖12是表示，以序列編號5表示之胜肽(As82_10)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖11相同者。

圖13是表示，以序列編號6表示之胜肽(As124_10)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖11相同者。

圖14是表示，以序列編號7表示之胜肽(As125_9)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖11相同者。

圖15是表示，以序列編號8表示之胜肽(As184_12)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖11相同者。

圖 16 是表示，以序列編號 9 表示之胜肽 (As135_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 17 是表示，以序列編號 10 表示之胜肽 (As83_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 18 是表示，以序列編號 11 表示之胜肽 (As87_9) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 19 是表示，以序列編號 12 表示之胜肽 (As307_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 20 是表示，以序列編號 13 表示之胜肽 (As301_11) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 21 是表示，以序列編號 14 表示之胜肽 (As405_9) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、A、B、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 22 是表示，以序列編號 3 表示之胜肽 IV9 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由實行干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、B、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 23 是表示，以序列編號 15 表示之胜肽 (As35_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 24 是表示，以序列編號 16 表示之胜肽 (As92_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 25 是表示，以序列編號 17 表示之胜肽 (As152_9) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 26 是表示，以序列編號 18 表示之胜肽 (As186_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 27 是表示，以序列編號 19 表示之胜肽 (As236_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 28 是表示，以序列編號 20 表示之胜肽 (As265_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 29 是表示，以序列編號 21 表示之胜肽 (As280_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 30 是表示，以序列編號 22 表示之胜肽 (As383_10_5L) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A*

02 : 01 基因導入小鼠所之實行干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 31 是表示，以序列編號 23 表示之胜肽 (As416₋₁₀) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A * 02 : 01 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 32 是表示，以序列編號 24 表示之胜肽 (As76₋₁₀) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A * 24 : 02 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 33 是表示，以序列編號 25 表示之胜肽 (As192₋₁₀) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A * 24 : 02 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 34 是表示，以序列編號 26 表示之胜肽 (As211₋₁₀) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了 HLA-A * 24 : 02 基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 11 相同者。

圖 35 是表示，以序列編號 27 表示之胜肽 (As289₋₁₀) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力

的評估結果，該評估結果是藉由利用了HLA-A*24:02基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖11相同者。

圖36是表示，以序列編號28表示之胜肽(As318_10)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了HLA-A*24:02基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖11相同者。

圖37是表示，以序列編號29表示之胜肽(As365_12)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了HLA-A*24:02基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖11相同者。

圖38是表示，以序列編號30表示之胜肽(As365_9)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由利用了HLA-A*24:02基因導入小鼠所實行之干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖11相同者。

圖39是表示，以序列編號4表示之胜肽(As80_9)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由使用了源自HLA-A*02:01陽性的正常人之週邊血液單核細胞所實行之干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸是表示平均播種細胞數(約 1×10^5 個)的斑點數。黑棒(「w/peptide」)及白棒(「w/o」)

是分別表示在胜肽的存在下及不存在下進行刺激培養的結果。亦即，黑棒與白棒的數值差異，是表示藉由各胜肽的添加而被誘導出來的胜肽特異性CTL的數量。

圖40是表示，以序列編號5表示之胜肽(As82_10)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由使用了源自HLA-A*02:01陽性的正常人之週邊血液單核細胞所實行之干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖39相同者。

圖41是表示，以序列編號6表示之胜肽(As124_10)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由使用了源自HLA-A*02:01陽性的正常人之週邊血液單核細胞所實行之干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖39相同者。

圖42是表示，以序列編號8表示之胜肽(As184_12)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由使用了源自HLA-A*02:01陽性的正常人之週邊血液單核細胞所實行之干擾素 γ ELISPOT分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖39相同者。

圖43是表示，以序列編號9表示之胜肽(As135_10)的活體中(in vivo)的CTL誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由使用了源自HLA-A*02:01陽性的正常人之週邊血液單核細胞所實行之干擾

素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 39 相同者。

圖 44 是表示，以序列編號 5 表示之胜肽 (As82_10) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由使用了源自 HLA-A*24:02 陽性的正常人之週邊血液單核細胞所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 39 相同者。

圖 45 是表示，以序列編號 8 表示之胜肽 (As184_12) 的活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估結果，該評估結果是藉由使用了源自 HLA-A*24:02 陽性的正常人之週邊血液單核細胞所實行之干擾素 γ ELISPOT 分析法而得。縱軸、黑棒及白棒分別表示與圖 39 相同者。

【實施方式】

【0021】 以下針對本發明詳細地說明。

本發明中所謂的「抗原決定基胜肽」，是意味著與 MHC (在人類中是 HLA) 結合，並在細胞表面上受到抗原呈現，且具有抗原性 (可被 T 細胞辨識) 的胜肽。在抗原決定基胜肽中，包含了 CTL 抗原決定基胜肽，其與 MHC 第 I 型結合並受到抗原呈現，而被 CD8 陽性 T 細胞所辨識；及包含了輔助細胞抗原決定基胜肽，其與 MHC 第 II 型結合並受到抗原呈現，而被 CD4 陽性 T 細胞所辨識。

【0022】 抗原決定基胜肽之中，將腫瘤細胞中源自特異性或者過剩地表現的蛋白質之胜肽，特別稱為腫瘤抗原胜肽。所謂的抗原呈現，是指存在於細胞內的胜肽與MHC結合，此MHC/抗原胜肽複合體在細胞表面上進行局部化的現象。如同上述，已知經呈現在細胞表面的抗原藉由T細胞等辨識後，會活化細胞性免疫或體液性免疫，由於受到MHC第I型所呈現的抗原，隨著活化細胞性免疫，並被初始T細胞的T細胞受體所辨識，而將初始T細胞誘導成具有細胞毒殺活性的CTL，故作為用於免疫療法的腫瘤抗原胜肽，較佳是與MHC第I型結合，並受到抗原呈現的胜肽。

【0023】 本發明中，「腫瘤(tumor)」包含良性腫瘤及惡性腫瘤(癌症、惡性贅生物(malignant neoplasm))。癌症(cancer)包含造血器官的腫瘤、上皮性的惡性腫瘤(癌，carcinoma)與非上皮性的惡性腫瘤(肉瘤，sarcoma)。本發明中所謂的「癌幹細胞」，是指存在於癌組織中的細胞之中，顯示出類幹細胞的性質之細胞，被認為是涉及到癌的產生、復發及轉移的原因細胞的細胞。一般而言，由於「癌幹細胞」在癌組織中僅少少地存在，故要與其他的細胞區別是有困難的，但在該技術領域中，已知將癌幹細胞進行單離/濃縮的方法，例如可舉出SP劃分法等。因此本發明中「癌幹細胞」，可意味著藉由公知的癌幹細胞單離/濃縮法所單離/濃縮出的細胞集團。

【0024】 在本發明中，藉由使用下述的方法，其能夠將實際上在細胞表面受到抗原呈現的天然胜肽進行單離/鑑定，將本發明之天然胜肽單離/鑑定出來。另外，本發明中，「天然胜肽」是指實際上在細胞表面受到抗原呈現的胜肽。又「天然抗原胜肽」，是指天然胜肽之中抗原性已經確認者。藉由將此天然抗原胜肽從癌細胞單離出來，決定序列及其由來，可獲得對於使用了CTL的癌之標的治療有益的見解。

【0025】 在本發明使用之天然胜肽的單離/鑑定方法中，包含：將呈現著天然胜肽的癌幹細胞溶解，從其溶解物（溶解產物）單離出MHC與天然胜肽的複合體的步驟；將已單離之複合體分離為MHC分子與天然胜肽，且單離出天然胜肽的步驟；及，鑑定已單離之天然胜肽的步驟。

在MHC與天然胜肽的複合體的單離中，採用了胜肽/MHC複合體的萃取法，其是根據使用了針對MHC的特異抗體的免疫沈澱法。

作為適切的抗MHC抗體，使用了抗HLA-A02抗體、抗HLA-A24抗體等針對HLA第I型的抗體。

【0026】 在將複合體分離為MHC分子與天然胜肽的步驟裡，進行了使用弱酸的胜肽單離。

並且，將上述單離天然胜肽之序列使用組合了液相層析法(liquid chromatography)與串聯質譜法(tandem mass spectrometry)的胜肽序列分析法進

行分析，鑑定出實際上在細胞表面受到抗原呈現的天然胜肽。

作為確認根據上述單離後的天然胜肽的抗原性的方法，採用了細胞毒性試驗、ELISPOT分析法、使用了類TCR抗體的分析法等。

【0027】 本案發明人，根據上述方法，分析了在人類癌幹細胞中受到抗原呈現的天然抗原胜肽。其結果，作為在癌幹細胞中受到抗原呈現的天然抗原胜肽，鑑定出源自ASB4蛋白質的胜肽（序列編號3）。基於該見解更進一步研究的結果，發現ASB4基因會在癌幹細胞中特異性地高度表現，是針對癌幹細胞之分子標的治療有益的候選基因。ASB4是腫瘤抗原，並且源自ASB4的胜肽會在腫瘤細胞表面與HLA第I型抗原結合而形成複合體，並被運送到細胞表面進行抗原呈現，是至今完全未知的全新見解。

【0028】

< 1 > 本發明之胜肽

本發明中，「人類ASB4蛋白質」是意味著被報導在 Mizuno Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 8;290(5):1499-505和 Yang CS, et al. *Cell Rep.* 2014 Jul 24;8(2):327-37 的公知的蛋白質，具體而言，是指以序列編號2中記載的胺基酸序列（Genbank Accession No: NP_057200; ASB4 isoform a）表示之蛋白質、其

同型異構物、及其同系物。作為該同型異構物，例如可舉出剪接變異體、基於個體差異之SNP(單一核苷酸多型性；single nucleotide polymorphism)等變異體等。具體而言，可舉出(1)序列編號2中記載的胺基酸序列中，由具有90%以上，較佳是95%以上，更佳是98%以上的相同性的胺基酸序列所構成之蛋白質；(2)序列編號2中記載的胺基酸序列中，由1或複數，較佳是1~數個，更佳是1~10個、1~5個、1~3個、1或2個胺基酸被取代、缺失、加成或插入的胺基酸序列所構成之蛋白質。作為這樣的變異體，能例示出ASB4 isoform a的剪接變異體也就是以Genbank Accession No.: NP_665879登錄的同型異構物(ASB4 isoform b)、或第17個胺基酸由纈胺酸(V)被取代成白胺酸(L)的dbSNP RefSNP No.: rs35047380之SNP等。本說明書中單以「ASB4蛋白質」稱呼的情況，只要沒有另外特別的記載，就是意味著以序列編號2中記載的胺基酸序列表示之人類ASB4蛋白質。

【0029】作為人類ASB4蛋白質，較佳是能夠舉出包含序列編號2中記載的胺基酸序列之蛋白質，或由在前述蛋白質中，1~3個，較佳是1或2個胺基酸被取代的胺基酸序列所構成之蛋白質。更佳是能夠舉出由序列編號2中記載的胺基酸序列所構成之蛋白質。

本發明之胜肽，於一態樣中，是人類ASB4蛋白質的部分胜肽，其包含與MHC，特別是與HLA結合的胜

肽；較佳是藉由MHC，特別是藉由HLA受到抗原呈現的胜肽；更佳是藉由MHC，特別是藉由HLA受到抗原呈現且能誘導CTL的胜肽。HLA中雖然存在有數種型，但本發明之胜肽，較佳是能結合於HLA第I型，更佳是能結合於HLA-A02或HLA-A24，再更佳是能結合於HLA-A02及HLA-A24兩者（亦即雙重結合性）。本發明之胜肽，亦可在結合於MHC之前經過加工等處理，該等處理之結果會生成抗原決定基胜肽的胜肽亦包含在本發明之胜肽中。因此，本發明之胜肽，只要是包含抗原決定基胜肽之胺基酸序列的序列，胺基酸長就沒有特別限定。然而，本發明之胜肽本身較佳為抗原決定基胜肽，因此胺基酸長較佳為約8~14個胺基酸左右，更佳為約8~11個胺基酸左右，特佳為約9~約11個胺基酸左右。

【0030】 與人類的MHC第I型亦即HLA第I型結合的抗原決定基胜肽，已知約8~14個胺基酸長，較佳為約9~11個胺基酸長，且該序列中具有結合之HLA特有的結合模體(motif)。例如與HLA-A02結合的胜肽，具有從N端起第2個胺基酸為白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸，及/或C端的胺基酸為纈胺酸、白胺酸或異白胺酸這樣的結合模體；與HLA-A24結合的胜肽，具有從N端起第2個胺基酸為酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸，及/或C端的胺基酸為白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸這樣的結合模體。

【0031】 因此本發明之胜肽，在較佳的一態樣中，是ASB4蛋白質的部分胜肽，其由該蛋白質之胺基酸序列中的連續8~14個胺基酸所構成，並包含抗原決定基胜肽，該抗原決定基胜肽是自N端起第2個胺基酸為白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸，及/或C端的胺基酸為纈胺酸、白胺酸或異白胺酸；更佳的是該抗原決定基胜肽本身。在其中特佳的是，由以序列編號4、6、7、10、14、15、17~19、21~23、26、28、31、33、36、39、41、42、45及46中的任一種表示之胺基酸序列所構成之抗原決定基胜肽。

【0032】 又，在其他較佳的一態樣中，是於前述部分胜肽中，包含抗原決定基胜肽，該抗原決定基胜肽是自N端起第2個胺基酸被白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被纈胺酸、白胺酸或異白胺酸所取代的胜肽；更佳的是該抗原決定基胜肽本身。在其中特佳的是，在由以序列編號4、6、7、10、14、15、17~19、21~23、26、28、31、33、36、39、41、42、45及46中的任一種表示之胺基酸序列所構成之胜肽中，自N端起第2個胺基酸被白胺酸、異白胺酸或是甲硫胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被纈胺酸、白胺酸或異白胺酸所取代的抗原決定基胜肽。

【0033】 本發明之胜肽，在其他較佳的一態樣中，是ASB4蛋白質的部分胜肽，其由該蛋白質之胺基酸序列中的連續8~14個胺基酸所構成，並包含抗原決定基胜

肽，該抗原決定基胜肽是自N端起第2個胺基酸為酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸，及/或C端的胺基酸為白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸；更佳的是該抗原決定基胜肽本身。在其中特佳的是，由以序列編號9、21、25、30、32、35及37中的任一種表示之胺基酸序列所構成之抗原決定基胜肽。

【0034】 又，在其他較佳的一態樣中，是於前述部分胜肽中，包含抗原決定基胜肽，該抗原決定基胜肽是自N端起第2個胺基酸被酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸所取代的胜肽；更佳的是該抗原決定基胜肽本身。在其中特佳的是，在由以序列編號9、21、25、30、32、35及37中的任一種表示之胺基酸序列所構成之胜肽中，自N端起第2個胺基酸被酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸所取代的抗原決定基胜肽。

【0035】 本發明之胜肽，在其他較佳的一態樣中，是於上述之部分胜肽或經取代之部分胜肽中，進一步在N端及/或C端加成了1個到數個胺基酸的胜肽。

在其中特佳的是，由以序列編號4、6、7、10、14、15、17~19、21~23、26、28、31、33、36、39、41、42、45及46中的任一種表示之胺基酸序列所構成之胜肽；該胜肽中自N端起第2個胺基酸被白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被纈胺酸、

白胺酸或是異白胺酸所取代的胜肽；由以序列編號 9、21、25、30、32、35 及 37 中的任一種表示之胺基酸序列所構成之胜肽；或者，該胜肽中自 N 端起第 2 個胺基酸被酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸所取代，及 / 或 C 端的胺基酸被白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸所取代的胜肽中，進一步在 N 端及 / 或 C 端加成了 1 個到數個胺基酸的胜肽。

【0036】 因此，本發明之胜肽是在一態樣中，能以 $Y_0 - X_0 - Z_0$ 表示。此處， X_0 、 Y_0 及 Z_0 都是胜肽。

該態樣中， X_0 為選自由以下之 (1) ~ (4) 的胜肽：

(1) 是 ASB4 蛋白質的部分胜肽，其由該蛋白質之胺基酸序列中的連續 8 ~ 14 個胺基酸，較佳為 8 ~ 11 個胺基酸所構成，自 N 端起第 2 個胺基酸為白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸，及 / 或 C 端的胺基酸為纈胺酸、白胺酸或異白胺酸；

(2) 於 (1) 的部分胜肽中，自 N 端起第 2 個胺基酸被白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸所取代，及 / 或 C 端的胺基酸被纈胺酸、白胺酸或是異白胺酸所取代的胜肽；

(3) 是 ASB4 蛋白質的部分胜肽，其由該蛋白質之胺基酸序列中的連續 8 ~ 14 個胺基酸，較佳為 8 ~ 11 個胺基酸所構成，自 N 端起第 2 個胺基酸為酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸，及 / 或 C 端的胺基酸為白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸；或者，

(4) 於(3)的部分胜肽中，自N端起第2個胺基酸被酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸所取代的胜肽。

此處，由於(2)是(1)的取代同系物，且(4)是(3)的取代同系物，故將一種 $Y_0-X_0-Z_0$ ，其 X_0 為(2)或(4)的胜肽，特別稱為「 X_0 同系物」。

【0037】 又， Y_0 及 Z_0 為互相獨立，由0到數個胺基酸所構成之任意的胜肽。此處，「0到數個胺基酸」，具體而言是意味著0~5個胺基酸，例如可舉出0個、1個、2個、3個、4個或者5個胺基酸，更佳的是可舉出0個、1個、2個或是3個胺基酸，特佳的是0個或是1個。本發明中， Y_0 及/或 Z_0 為「不存在」這樣的情況，是意味著 Y_0 及/或 Z_0 是由0個胺基酸所構成之胜肽的情況。

此處，對於構成 Y_0 及/或 Z_0 的胺基酸沒有特別限定，雖然可舉出構成蛋白質的天然胺基酸20種類之任意者，但較佳的是能夠舉出，藉由在活體內存在的酵素切割而得之胺基酸。又，ASB4蛋白質的胺基酸序列中，相當於前述部分胜肽的N端側及/或C端側的胺基酸序列的胺基酸序列為佳。

【0038】 因此，在其中更特佳的是， X_0 是由以序列編號4、6、7、10、14、15、17~19、21~23、26、28、31、33、36、39、41、42、45及46中的任一種表示之胺基酸序列所構成之胜肽；該胜肽中自N端起第2

個胺基酸被白胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被纈胺酸、白胺酸或是異白胺酸所取代的胜肽；由以序列編號9、21、25、30、32、35及37中的任一種表示之胺基酸序列所構成之胜肽；或者，該胜肽中自N端起第2個胺基酸被酪胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸或色胺酸所取代，及/或C端的胺基酸被白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸所取代的胜肽中的任一種，並且是 Y_0 及/或 Z_0 為1個胺基酸的情況，更佳的是， Y_0 或 Z_0 的任一者為1個胺基酸，另一者則不存在的情況。

【0039】 又，在其他較佳的一態樣中，可舉出 X_0 是由8~11個胺基酸所構成之上述(1)~(4)中的任一種， Y_0 及/或 Z_0 是互相獨立由0~3個胺基酸所構成之胜肽， $Y_0-X_0-Z_0$ 為構成整體9~14個胺基酸長的ASB4蛋白質之部分胜肽或其 X_0 同系物的情況。該態樣，雖然並不限定於此，但例如可舉出 X_0 是具有以序列編號3~7及9~19、21~28、30~46中的任一種表示之胺基酸序列的胜肽，且在該 X_0 的N端側及/或C端側加成有由0~3個胺基酸所構成之胜肽 Y_0 及/或 Z_0 ，該 $Y_0-X_0-Z_0$ 也成為ASB4蛋白質的部分胜肽的情況。

【0040】 本發明之胜肽，在較佳的一態樣中， X_0 包含由與序列編號3~7、9~28及30中任一種所記載的胺基酸序列相同之胺基酸序列所構成的胜肽。在此態樣中，更佳的是，本發明之胜肽（亦即 $Y_0-X_0-Z_0$ ）都成為上述ASB4蛋白質的部分胜肽。在該更佳的態樣中，例如

本發明之胜肽，是由與序列編號3～30中的任一種所記載的胺基酸序列相同之胺基酸序列所構成的胜肽。

【0041】 以序列編號3～30表示之胜肽，分別是由對應上述ASB4之胺基酸的位置在第319個～第327個的9個胺基酸（序列編號3）、對應第80個～第88個的9個胺基酸（序列編號4）、第82～91個的10個胺基酸（序列編號5）、第124～133個的10個胺基酸（序列編號6）、第125～133個的9個胺基酸（序列編號7）、第184～195個的12個胺基酸（序列編號8）、第135～144個的10個胺基酸（序列編號9）、第83～92個的10個胺基酸（序列編號10）、第87～95個的9個胺基酸（序列編號11）、第307～316個的10個胺基酸（序列編號12）、第301～311個的11個胺基酸（序列編號13）及第405～413個的9個胺基酸（序列編號14）、第35～44個的10個胺基酸（序列編號15）、第92～101個的10個胺基酸（序列編號16）、第152～160個的9個胺基酸（序列編號17）、第186～195個的10個胺基酸（序列編號18）、第236～245個的10個胺基酸（序列編號19）、第265～274個的10個胺基酸（序列編號20）、第280～289個的10個胺基酸（序列編號21）、第383～392個的10個胺基酸（序列編號22）、第416～425個的10個胺基酸（序列編號23）、第76～85個的10個胺基酸（序列編號24）、第192～201個的10個胺基酸（序列編號25）、第211～220個的10個胺基酸（序列

編號 26)、第 289 ~ 298 個的 10 個胺基酸 (序列編號 27)、第 318 ~ 327 個的 10 個胺基酸 (序列編號 28)、第 365 ~ 376 個的 12 個胺基酸 (序列編號 29)、第 365 ~ 373 個的 9 個胺基酸 (序列編號 30) 所構成之胜肽，任一個胜肽都能與 HLA - A 02 及 / 或 HLA - A 24 結合是由本案發明人所發現。其中，以序列編號 3 ~ 23、25、26、及 28 ~ 30 表示之胜肽，還更具有 CTL 誘導能力是由本案發明人所發現。

● **【0042】** 在更佳的一態樣中， X_0 包含由與序列編號 4 ~ 7、9 ~ 12 及 15 ~ 19 及 21 ~ 23 中的任一種所記載之胺基酸序列相同的胺基酸序列所構成之胜肽。此態樣中，更佳的是，本發明之胜肽 (亦即 $Y_0 - X_0 - Z_0$) 都成爲上述 ASB4 蛋白質的部分胜肽。在該更佳的態樣中，例如本發明之胜肽，是由與序列編號 4 ~ 12 及 15 ~ 23 中的任一種所記載的胺基酸序列相同之胺基酸序列所構成之胜肽。

● **【0043】** 以序列編號 4 ~ 12 及 15 ~ 23 表示之任一種胜肽，亦能與 HLA - A 02 結合，且具有 CTL 誘導能力是由本案發明人所發現。

【0044】 在其他更佳的一態樣中， X_0 包含由與序列編號 3 ~ 7、9、13、14、18、24 ~ 28 及 30 中任一種所記載之胺基酸序列相同的胺基酸序列所構成之胜肽。此態樣中，更佳的是，本發明之胜肽 (亦即 $Y_0 - X_0 - Z_0$) 都成爲上述 ASB4 蛋白質的部分胜肽。在該更佳的態樣

中，例如本發明之胜肽，是由與序列編號3～9、13、14、25、26及28～30所記載之胺基酸序列相同的胺基酸序列所構成之胜肽。

【0045】 以序列編號3～9、13、14、25、26及28～30表示之任一種胜肽，亦能與HLA-A024結合，且具有CTL誘導能力是由本案發明人所發現。

【0046】 又，在其他較佳的一態樣中， X_0 包含由與序列編號4～7、9及18中任一種所記載之胺基酸序列相同的胺基酸序列所構成之胜肽。此態樣中，更佳的是，本發明之胜肽（亦即 $Y_0-X_0-Z_0$ ）都成爲上述ASB4蛋白質的部分胜肽。在該更佳的態樣中，例如本發明之胜肽，是由與序列編號4～9所記載之胺基酸序列相同的胺基酸序列所構成之胜肽。

【0047】 以序列編號4～9表示之任一種胜肽，亦能與HLA-A02及HLA-A24兩者結合，且具有CTL誘導能力是由本案發明人所發現。其中，特別是以序列編號4～6、8及9表示之胜肽爲佳，以序列編號5及8表示之胜肽爲最佳。

【0048】 本發明之胜肽，其N端及/或C端亦可受到修飾。作爲該修飾，具體而言可舉出，N-烷醯基化（例如，乙醯基化）、N-烷基化（例如，甲基化）、C端烷基酯（例如，乙酯）、及C端醯胺（例如羧醯胺）等。

關於本發明之胜肽的合成，能夠依照在一般的胜肽化學中所使用之已知的方法來進行。作爲該已知的方法

可舉出文獻 (Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976 ; 胜肽合成, 丸善 (股), 1975 ; 胜肽合成的基礎與實驗, 丸善 (股), 1985 ; 醫藥品的開發續第 14 卷・胜肽合成, 廣川書店, 1991 ; 這些文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份) 等所記載之方法。

【0049】本發明之胜肽，能夠藉由提供給後述的 CTL 誘導方法、或使用了人類模式動物的分析法 (WO 02/47474 號公報，Int J. Cancer:100,565-570 (2002)) 等，來確認在活體內 (in vivo) 的活性。

【0050】本發明之胜肽，在其他的一態樣中，包含結合於 HLA-A02 及 / 或 HLA-A24 的胜肽。具體而言，雖然並不限定於此，但例如可舉出由以序列編號 3 ~ 30 中的任一種表示之胺基酸序列所構成之胜肽。此等胜肽，雖然未必具有 HLA-A02 或 HLA-A24 之結合模體，但由本案發明人確認過是實際結合於 HLA-A02 及 / 或 HLA-A24 的胜肽。其中尤其是由以序列編號 3 ~ 23、25、26 及 28 ~ 30 中的任一種表示之胺基酸序列所構成之胜肽，確認到更具有 CTL 誘導能力而較佳。

【0051】本發明之胜肽中，更也包含了連結有複數的抗原決定基胜肽的胜肽 (聚抗原決定基胜肽)，該複數的抗原決定基胜肽至少包含 1 種前述本發明之胜肽。因

此，身為該聚抗原決定基胜肽且具有CTL誘導活性的胜肽亦能夠例示作為本發明之胜肽的具體例。

本發明之聚抗原決定基胜肽，具體而言，是：

(i) 直接、或透過適當間隔物(spacer)連結本發明之胜肽(抗原決定基胜肽)及任意的本發明之胜肽以外的1或2個以上的CTL抗原決定基胜肽而成的胜肽；

(ii) 直接、或透過適當間隔物連結本發明之胜肽及任意的1或2個以上的輔助細胞抗原決定基胜肽而成的胜肽；或是，

(iii) 於上述(i)所記載之聚抗原決定基胜肽，進一步直接、或透過適當間隔物連結1或2個以上輔助細胞抗原決定基胜肽而成的胜肽；

且在抗原呈現細胞內接受加工處理，生成的抗原決定基胜肽被呈現在抗原呈現細胞上，可定義為引導CTL誘導活性的胜肽。

【0052】 此處，作為在(i)中的本發明之胜肽以外的CTL抗原決定基胜肽雖然並沒有特別限定，但具體而言，例如可舉出本發明中未包含的其他源自人類ASB4的抗原決定基胜肽、或源自人類OR7C1、人類DNAJB8的抗原決定基胜肽(例如，國際公開第2010/050190號所記載的胜肽)、源自人類FAM83B的抗原決定基胜肽(國際申請案第PCT/JP2014/076625號)等。

作為間隔物，只要不會對在抗原呈現細胞內的加工處理造成不良影響則沒有特別限定，較佳的是以胜肽鍵

與各自的抗原決定基胜肽連結的連接子，例如可舉出數個胺基酸所連結而成的胜肽連接子、或在兩端具有胺基及羧基的連接子等。具體而言可舉出甘胺酸連接子或 PEG（聚乙二醇）連接子等，作為甘胺酸連接子可舉出聚甘胺酸（例如由 6 個甘胺酸構成之胜肽；Cancer Sci, vol. 103, p 150-153），作為 PEG 連接子可舉出，源自在 PEG 的兩端具有胺基及羧基的化合物的連接子（例如， $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ ；Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 7551-7556）。

【0053】本發明之聚抗原決定基胜肽所包含的本發明之抗原決定基胜肽，亦可選擇 1 種或 2 種以上。亦即，亦可相同的抗原決定基胜肽連結複數個，亦可複數的不同抗原決定基胜肽連結而成。當然，即使是在選擇 2 種以上的抗原決定基胜肽的情況，被選擇的抗原決定基胜肽之中的 1 種或 2 種以上亦可連結複數個。即使是針對本發明之胜肽以外的抗原決定基胜肽，同樣地亦可連結複數種及 / 或複數個的抗原決定基胜肽。本發明之聚抗原決定基胜肽，亦可為 2 ~ 12 個的抗原決定基胜肽所連結而成，較佳為連結 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個的抗原決定基胜肽，最佳為連結 2 個的抗原決定基胜肽。

此處，連結於本發明之胜肽的抗原決定基胜肽為輔助細胞抗原決定基胜肽時，作為使用的輔助細胞抗原決定基胜肽，例如可舉出源自 B 型肝炎病毒的

HBVc128-140或源自破傷風毒素的TT947-967等。又作為該輔助細胞抗原決定基胜肽的長度，可舉出為13~30個胺基酸左右，較佳為13~17個胺基酸左右。

【0054】使這樣的複數抗原決定基胜肽連結而成的胜肽（聚抗原決定基胜肽），也能夠如前述藉由一般的胜肽合成法來製造。又基於編碼出使這些複數的抗原決定基胜肽連結而成的聚抗原決定基胜肽之聚核苷酸的序列資訊，亦能夠使用通常的DNA合成及基因工程學的手法來製造。

亦即，能夠藉由以下手法來製造，將該聚核苷酸插入周知的表現載體，用獲得之重組表現載體將宿主細胞進行形質轉換，並培養製作成的形質轉換體，從培養物回收目標之使複數的抗原決定基連結而成的聚抗原決定基胜肽。這些手法，能夠如前述，依照文獻（Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory(1983), DNA Cloning, D.M. Glover, IRL PRESS(1985)）所記載的方法等來實行。

【0055】能夠藉由將如以上般進行而製造出來的使複數的抗原決定基胜肽連結而成的聚抗原決定基胜肽，提供給前述的試管內分析(in vitro assay)、或國際公開第02/47474號及Int J. Cancer:100,565-570(2002)（這些文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份）中記述的使用了人類模式動物的活體內分析(in vivo assay)等來確認CTL誘導活性。

本發明之胜肽（包含聚抗原決定基胜肽），如同本說明書中記載，有益於癌症的預防及/或治療等，能夠作為醫藥組成物的有效成分。又，本發明之胜肽，亦可為用於癌症的預防及/或治療者。並且，本發明亦關於在用以癌症的預防及/或治療之醫藥的製造上本發明之胜肽的使用。

【0056】

< 2 > 本發明之聚核苷酸

本發明之聚核苷酸，是包含編碼出前述本發明之胜肽的至少1種的聚核苷酸。本發明之聚核苷酸，可以是cDNA和mRNA、cRNA、或合成DNA中的任一種。又可以是單股、雙股的任一種形態。具體而言，雖然並不限定於此，但例如可舉出，由編碼出使用身為MHC與胜肽的鍵結預測程式的BIMAS

(http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)、SYFPEITHI

(<http://www.syfpeithi.de/>)及IEDB (MHC-I processing predictions;

<http://www.iedb.org/>)等而預測之胺基酸序列的核苷酸序列所構成之聚核苷酸等，更具體而言可舉出，由編碼出序列編號3~46中記載的胺基酸序列的核苷酸序列所構成之聚核苷酸；及以能分別表現的方式，由編碼出選自序列編號3~46的任意2種以上的胜肽、或使選自序列編號3~46的胜肽及輔助細胞抗原決定基連結而成

的聚抗原決定基胜肽的核苷酸序列所構成之聚核苷酸等。

【0057】 本發明之聚核苷酸，能取得單股及雙股的任一種形態。本發明之聚核苷酸為雙股的情況，藉由將前述本發明之聚核苷酸插入表現載體裡，能夠製作出用以表現本發明之胜肽的重組表現載體。亦即在本發明之聚核苷酸的範疇內，亦包含將本發明之雙股型聚核苷酸插入表現載體裡而製作成的重組表現載體。

本發明之聚核苷酸，如同本說明書中記載，有益於癌症的預防及/或治療等，能夠作為醫藥組成物的有效成分。又，本發明之聚核苷酸，亦可為用於癌症的預防及/或治療者。並且，本發明亦關於在用以癌症的預防及/或治療之醫藥的製造上本發明之聚核苷酸的使用。

【0058】 在本發明所使用的表現載體，能夠取決於使用的宿主或目的等來使用各式各樣的載體，若是發明所屬技術領域中具有通常知識者則能夠適當選擇。作為在本發明所能使用的表現載體，例如可舉出質體、噬菌體載體、病毒載體等。例如，宿主是大腸桿菌的情況，作為載體可舉出pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等質體載體；λZAPII、λgt11等噬菌體載體。宿主是酵母的情況，作為載體可舉出pYES2、pYEUra3等。在宿主是昆蟲細胞的情況，可舉出pAcSGHisNT-A等。在宿主是動物細胞的情況，可舉出pCEP4、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMV

等質體載體或反轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體等病毒載體。

【0059】 前述載體，亦可適當具有可誘導表現的啟動子、編碼出信號序列的基因、篩選用標記基因、終止子等因子。又，爲了容易單離精製，亦可加成有作爲與硫醇氧化還原蛋白、組胺酸標籤(His-tag)、或者GST(穀胱甘肽硫轉移酶)等的融合蛋白質表現的序列。這種情況，能夠使用具有在宿主細胞內運作之適當的啟動子(lac、tac、trc、trp、CMV、SV40早期啟動子等)的GST融合蛋白質載體(pGEX4T等)、或具有Myc、His等標籤序列的載體(pcDNA3.1/Myc-His等)，還有表現硫醇氧化還原蛋白及組胺酸標籤之融合蛋白質的載體(pET32a)等。

【0060】 藉由透過在前述製作成的表現載體將宿主進行形質轉換，能夠製作出含有該表現載體的形質轉換細胞。因此，在本發明中，包含了含有前述表現載體的基因導入用組成物。

作爲用於形質轉換的宿主，在不損及本發明之聚胜肽所具有的機能的範圍內可以使用任何的細胞，例如可舉出大腸桿菌、酵母、昆蟲細胞、動物細胞等。作爲大腸桿菌，可舉出E.coli K-12系統之HB101株、C600株、JM109株、DH5 α 株、AD494(DE3)株等。又作爲酵母，可舉出Saccharomyces cerevisiae等。作爲動物細胞，可舉出L929細胞、BALB/c3T3細胞、

C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、HeLa細胞、293-EBNA細胞等。作為昆蟲細胞可舉出sf9等。

作為導入表現載體給宿主細胞的方法，只要使用適合前述宿主細胞之一般的導入方法即可。具體而言可舉出磷酸鈣法、DEAE-葡聚糖法、電穿孔法、使用基因導入用脂質（Lipofectamine，Lipofectin；Gibco-BRL公司）之方法等。導入後，藉由在包含篩選標記的一般培養基進行培養，能夠篩選出前述表現載體被導入宿主細胞中的形質轉換細胞。

【0061】藉由在適當的條件下持續培養如以上所述進行而獲得之形質轉換細胞，能夠製造出本發明之胜肽。獲得之胜肽，可藉由一般生化學上的精製手段，進一步進行單離、精製。在此作為精製手段，可舉出鹽析、離子交換層析法、吸附層析法、親和性層析法、膠體過濾層析法等。又使本發明之胜肽，作為與前述之硫醇氧化還原蛋白或組胺酸標籤、GST等融合蛋白質來表現時，可藉由利用這些融合蛋白質或標籤之性質的精製法來進行單離、精製。

編碼出本發明之胜肽的聚核苷酸，可以是DNA的形態亦可以是RNA的形態。這些本發明之聚核苷酸，根據本發明之胜肽的胺基酸序列資訊及藉此而被編碼出來的DNA序列資訊，能夠使用該技術領域中習知的通常方法而輕易地製造出來。具體而言，能夠藉由一般的DNA合成或藉由PCR所實行的增幅等來製造。

編碼出本發明之胜肽的聚核苷酸，包含了編碼出前述抗原決定基胜肽的聚核苷酸。

【0062】

< 3 > 將本發明之胜肽作為有效成分的CTL誘導劑/醫藥組成物

本發明之胜肽具有CTL誘導活性，作為腫瘤抗原胜肽，可成為CTL誘導劑。又如同上述，由本案發明人首次發現ASB4蛋白質是腫瘤抗原；源自ASB4蛋白質的胜肽在腫瘤細胞表面與HLA第I型抗原結合而形成複合體，並被運送到細胞表面進行抗原呈現。因此，ASB4蛋白質本身也能成為CTL誘導劑。

亦即，藉由從HLA-A02抗原或HLA-A24抗原為陽性的人類單離出週邊血液淋巴球，在試管中(*in vitro*)添加本發明之胜肽及/或ASB4蛋白質進行刺激，能夠誘導出會特異性辨識經該胜肽沖擊(*pulse*)之HLA-A02抗原陽性細胞、或HLA-A24抗原陽性細胞的CTL (*J. Immunol.*, 154, p2257, 1995)。此處，CTL之誘導的有無，例如能夠藉由下述方法來確認，透過例如ELISA法等來測定CTL所生產的各種細胞介素（例如IFN- γ ）的量，該CTL是對抗原胜肽提示細胞產生反應。又亦能藉由測定CTL對經使用 ^{51}Cr 來標記之抗原胜肽呈現細胞的毒殺性的方法（ ^{51}Cr 釋放分析法，*Int. J. Cancer*, 58:p317, 1994）來確認。

又，根據 *Int. J. Cancer*, 39, 390-396, 1987, *N. Eng. J. Med*, 333, 1038-1044, 1995 等中記載之方法，也能夠建立 CTL 殖株。

【0063】藉由本發明之胜肽及/或 ASB4 蛋白質而被誘導出來的 CTL，具有對於將本發明之胜肽及/或其他源自 ASB4 蛋白質的抗原決定基胜肽作為抗原來呈現之細胞的毒殺作用或淋巴素的生產能力。由於本發明之胜肽如同上述是腫瘤抗原胜肽，且 ASB4 蛋白質是在細胞內被分解而生成腫瘤抗原胜肽，故透過該等功能可發揮抗腫瘤作用，較佳為發揮抗癌作用。因此本發明之胜肽及/或 ASB4 蛋白質和藉此被誘導出來的 CTL，能夠作為用以癌症的預防及/或治療之醫藥或醫藥組成物的有效成分。

若將含有本發明之胜肽及/或 ASB4 蛋白質來作為有效成分之 CTL 誘導劑投予給癌症患者，在抗原呈現細胞的 HLA-A02 抗原或 HLA-A24 抗原上呈現了本發明之胜肽及/或源自 ASB4 蛋白質的抗原決定基胜肽，對 HLA-A02 抗原或 HLA-A24 抗原與被呈現之胜肽的結合複合體具特異性的 CTL 進行增殖而能夠破壞癌細胞，其結果，能夠預防及/或治療癌症。因此，將本發明之胜肽及/或 ASB4 蛋白質作為有效成分之 CTL 誘導劑，較佳是能夠對於是 HLA-A02 抗原或 HLA-A24 抗原陽性之對象且罹患了 ASB4 陽性的癌症之對象來使用。作為 ASB4 陽性的癌症，例如可舉出大腸癌、肺癌、

乳癌、口腔癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、睪丸腫瘤、卵巢癌等癌（腫瘤）等，本發明之CTL誘導劑，能夠爲了這些癌症的預防及/或治療而使用。

【0064】 在此癌症的「預防」中，不只是預防患者罹患癌症，還包含了在已透過手術切除原發病灶之腫瘤的患者的復發預防、及防止藉由手術、放射線療法或是藥物療法等之癌症治療未完全去除之腫瘤的轉移等。又，在癌症的「治療」中，不只是使癌縮小的癌症治癒、症狀改善，還包含了抑制癌細胞之增殖、腫瘤的擴大或是來自原發病灶的癌細胞轉移的預防進展等。

【0065】 將本發明之胜肽及/或ASB4蛋白質作爲有效成分的CTL誘導劑，對於例如罹患了序列編號2所記載之ASB4陽性的癌症，且HLA-A02或HLA-A24陽性的癌症患者特別有效。具體而言，能夠爲了例如大腸癌、肺癌、卵巢癌等癌（腫瘤）的預防或治療而使用。因此，包含本發明之胜肽及/或ASB4蛋白質作爲有效成分的醫藥組成物，亦包含在本發明中。該醫藥組成物，較佳是癌症的預防及/或治療用的組成物，亦即是癌症的預防及/或治療劑。又，本發明之醫藥組成物，由於是藉由誘導對癌細胞（較佳是癌幹細胞）具特異性的CTL，亦即將癌細胞特異性的細胞性免疫進行活性化來預防及/或治療癌症者，故較佳是癌症的預防及/或治療用疫苗。

【0066】 將本發明之胜肽作爲有效成分的醫藥組成物，亦可爲將單一的CTL抗原決定基（本發明之胜肽）

作為有效成分者，又亦可為將聚抗原決定基胜肽作為有效成分者，該聚抗原決定基胜肽是與其他胜肽（CTL抗原決定基或輔助細胞抗原決定基）連結而成。近年，將複數的CTL抗原決定基（抗原胜肽）連結而成的聚抗原決定基胜肽，在活體內(*in vivo*)顯示出具有有效率地CTL誘導活性。例如在 *Journal of Immunology* 1998, 161: 3186-3194（本文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份）中，記載了將源自癌抗原蛋白質PSA的HLA-A2、-A3、-A11、-B53限制性CTL抗原決定基（抗原胜肽）連結而成的約30mer之聚抗原決定基胜肽，在活體內(*in vivo*)誘導出了對各自的CTL抗原決定基具特異性的CTL。又藉由使CTL抗原決定基與輔助細胞抗原決定基連結而成的聚抗原決定基胜肽，也顯示出有效地誘導出CTL。以如此之聚抗原決定基胜肽的形態投予時，聚抗原決定基胜肽被攝取至抗原呈現細胞內，之後，受到細胞內分解所生成的各個抗原胜肽與HLA抗原結合而形成複合體，該複合體在抗原呈現細胞表面受到高密度地呈現，對此複合體特異性的CTL在體內有效率地進行增殖，破壞癌細胞。如此一來促進了癌症的治療或預防。

【0067】 將本發明之胜肽及/或ASB4蛋白質作為有效成分的醫藥組成物，為了使細胞性免疫有效地成立，能夠與作為醫藥可被容許的攜帶體(*carrier*)，例如適當的佐劑混合來投予，或併用來投予。

【0068】 作為佐劑，可應用文獻（例如，*Clin Infect Dis.*:S266-70, 2000）所記載者等、該技術領域中習知的佐劑，具體而言，例如，作為凝膠式可舉出氫氧化鋁、磷酸鋁及磷酸鈣等；作為菌體式可舉出CpG、單磷醯脂質A（monophosphoryl lipid A；MPL）、霍亂毒素、大腸桿菌不耐熱腸毒素、百日咳毒素及胞壁醯二肽（Muramyl dipeptide；MDP）等；作為油乳化液式（乳化製劑）可舉出弗氏不完全佐劑、MF59及SAF等；作為高分子奈米粒子式可舉出免疫刺激複合體（Immunostimulatory complex；ISCOMs）、微脂粒、生物分解性微球體（Biodegradable microsphere）及源自皂素的QS-21等；作為合成式可舉出非離子性嵌段共聚物、胞壁醯肽類似物（Muramyl peptide analogue）、聚磷腈及合成聚核苷酸等；作為細胞介素形式可舉出IFN- γ 、IL-2及IL-12等。

又，作為將本發明之胜肽及/或ASB4蛋白質作為有效成分的CTL誘導劑/醫藥組成物的劑型，雖然沒有特別限定，但可舉出油乳化液（乳化製劑）、高分子奈米粒子、微脂粒製劑、結合於直徑為數 μm 之微珠的粒子狀製劑、使脂質結合的製劑、微球體製劑、微膠囊製劑等。

【0069】 作為投予方法，可舉出皮內投予、皮下投予、肌肉內投予、靜脈內投予等習知的任意投予方法。製劑中的本發明之胜肽的投予量，可依照治療目的之疾病、

患者的年齡、體重等來適當調整，但通常為0.0001mg ~ 1000mg，較佳為0.001mg ~ 1000mg，更佳為0.1mg ~ 10mg，將此量在數日至數月內投予1次為佳。

作為將本發明之胜肽實際作為醫藥來發揮作用的手法，除了將該胜肽直接導入體內的活體內(in vivo)法之外，還有採集來自人類的某種細胞在體外使本發明之胜肽作用，再將該細胞返回體內的活體外(ex vivo)法（日經 Science, 1994年4月號, 20-45頁；月刊藥事, 36(1), 23-48(1994)；實驗醫學增刊, 12(15), (1994)；及該等文獻的引用文獻等，這些文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份），只要是發明所屬技術領域中具有通常知識者，能夠對該手法選擇適當的細胞、投予方法、投予形態及投予量。

【0070】

< 4 > 將本發明之聚核苷酸作為有效成分的CTL誘導劑 / 醫藥組成物

使編碼出本發明之聚核苷酸及 / 或 A S B 4 蛋白質的聚核苷酸表現出來的細胞，由於變成了將本發明之胜肽及 / 或其他源自 A S B 4 蛋白質的抗原決定基胜肽作為抗原來呈現的細胞，故具有透過 T 細胞受體而被 T 細胞辨識出來這樣的特徵。因此，編碼出本發明之聚核苷酸及 / 或 A S B 4 蛋白質的聚核苷酸亦可成為 CTL 的誘導劑。被誘導出來的 CTL，和藉由本發明之胜肽及 / 或 A S B 4 蛋白質而被誘導出來的 CTL 相同，能發揮細胞毒殺作用或透

過淋巴素的產生來發揮抗腫瘤作用，較佳為抗癌作用。因此編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸，能夠作為用以癌症的治療或預防的醫藥或醫藥組成物的有效成分。含有編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸作為有效成分的CTL誘導劑，例如，藉由將編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸投予至癌症患者並使之表現，能治療及/或預防癌症。

【0071】 例如若藉由以下的方法將被插入於表現載體中的編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸投予至癌症患者，在抗原呈現細胞內腫瘤抗原胜肽會大量表現。之後，生成的腫瘤抗原胜肽與HLA-A02抗原或HLA-A24抗原結合而形成複合體，藉由該複合體在抗原呈現細胞表面受到高密度地呈現，癌特異性CTL在體內有效率地進行增殖，破壞癌細胞。如以上所述般進行，可達成癌症的治療或預防。因此，包含編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸的醫藥組成物，亦包含在本發明中。該醫藥組成物，較佳為癌症的預防及/或治療用的組成物，亦即癌症的預防及/或治療劑。又，本發明之醫藥組成物，由於是藉由誘導對癌細胞（較佳是癌幹細胞）具特異性的CTL，亦即將癌細胞特異性的細胞性免疫進行活性化來預防及/或治療癌症者，故較佳是癌症的預防及/或治療用疫苗。

【0072】 將本發明之聚核苷酸作為有效成分的CTL誘導劑/醫藥組成物，較佳的是，能夠對是HLA-A02抗原或HLA-A24抗原陽性的對象，且罹患了ASB4陽性癌的對象來使用。作為ASB4陽性癌，例如可舉出大腸癌、肺癌、乳癌、口腔癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、睪丸腫瘤、卵巢癌等癌（腫瘤）等，本發明之CTL誘導劑，能夠為了這些癌症的預防或治療而使用。

作為投予編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸並導入至細胞內的方法，亦能夠應用藉由病毒載體而實施的方法及其他之方法（日經Science, 1994年4月號, 20-45頁；月刊藥事, 36（1）, 23-48（1994）；實驗醫學增刊, 12（15）,（1994）；及該等文獻的引用文獻等，這些文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份）的任一種方法。因此，本發明之醫藥組成物的一態樣中，是含有包含編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸之載體作為有效成分。

【0073】 作為藉由病毒載體而實施的方法，例如可舉出在反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、痘病毒、小兒麻痺病毒、辛德畢斯病毒(sindbis virus)等之DNA病毒或RNA病毒中插入本發明之DNA來導入的方法。在此之中，特佳為使用了反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、牛痘病毒等的方法。

作為其他的方法，可舉出將表現質體直接投予至肌肉內的方法（DNA疫苗法）、微脂粒法、陽離子脂質體（lipofectin）法、顯微注射法、磷酸鈣法、電穿孔法等，特佳為DNA疫苗法、微脂粒法。

【0074】在將編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸實際作為醫藥使之作用中，有著將該聚核苷酸直接導入體內的活體內（*in vivo*）法、及採集來自人類的某種細胞在體外將本發明之聚核苷酸導入至該細胞裡，再將該細胞返回體內的活體外（*ex vivo*）法（日經 *Science*, 1994年4月號, 20-45頁；月刊藥事, 36(1), 23-48(1994)；實驗醫學增刊, 12(15), (1994)；及該等文獻的引用文獻等，這些文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份）。活體內（*in vivo*）法更佳。

在將編碼出本發明之聚核苷酸及/或ASB4蛋白質的聚核苷酸藉由活體內法進行投予時，可適當選擇依照治療目的之疾病、症狀等之適當的投予途徑及投予形態來進行投予。例如，能夠以可注射到靜脈、動脈、皮下、皮內、肌肉內等的形態來進行投予。藉由活體內法來實行投予時，例如，可採取液劑等之製劑形態，但一般而言可作為含有有效成分亦即本發明之聚核苷酸的注射劑等，視其必要，亦可添加醫藥上可容許的攜帶體（擔體）。又，在含有本發明之聚核苷酸的微脂粒或膜融合微脂粒

(仙台病毒 (H V J) - 微脂粒等) 中 , 能夠作為懸浮劑、冷凍劑、離心分離濃縮冷凍劑等之微脂粒製劑的形態。

【 0 0 7 5 】 製劑中本發明之聚核苷酸的含量 , 能夠依照治療目的之疾病、患者的年齡、體重等來適當調整 , 但通常 , 作為聚核苷酸的含量是將 $0.0001\text{ mg} \sim 100\text{ mg}$, 較佳為 $0.001\text{ mg} \sim 10\text{ mg}$ 的本發明之聚核苷酸 , 在數日至數月內投予 1 次為佳。

只要是發明所屬技術領域中具有通常知識者 , 就能適當選擇出合適的細胞、載體、投予方法、投予形態及投予量。

【 0 0 7 6 】 又近年 , 編碼出將複數的 CTL 抗原決定基 (腫瘤抗原胜肽) 連結而成的聚抗原決定基胜肽的聚核苷酸、或者是編碼出使 CTL 抗原決定基與輔助細胞抗原決定基連結而成的聚抗原決定基胜肽的聚核苷酸 , 在活體內顯示出具有有效率地 CTL 誘導活性。例如在 *Journal of Immunology* 1999, 162: 3915-3925 (本文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份) 中 , 記載了編碼出將源自 HBV 的 HLA-A2 限制性抗原胜肽 6 種類、HLA-A11 限制性抗原胜肽 3 種類、及輔助細胞抗原決定基連結而成的抗原決定基胜肽的 DNA (袖珍基因 (minigene)) , 在活體內有效地誘導出針對各自的抗原決定基的 CTL。

因此 , 藉由使編碼出本發明之胜肽的聚核苷酸連結 1 種或 2 種以上 , 或依情況亦藉由連結編碼出其他胜肽的聚

核苷酸而製作出的聚核苷酸，藉由將此聚核苷酸插入適當的表現載體，而能夠作為CTL誘導劑的有效成分。這樣的CTL誘導劑，亦能夠採取與前述相同的投予方法及投予形態。

【0077】

< 5 > 本發明之抗原呈現細胞

前述的本發明之胜肽以及聚核苷酸，例如，能夠如以下所述在試管內(*in vitro*)利用。亦即藉由使本發明之胜肽及聚核苷酸的任一種與具有抗原呈現能力的細胞在試管內(*in vitro*)接觸，就能夠製作出抗原呈現細胞。因此在本發明之一態樣中，是提供抗原呈現細胞、及其製造方法，該抗原呈現細胞是在細胞表面呈現HLA-A02抗原或HLA-A24抗原與本發明之胜肽的複合體。如同上述，本發明之胜肽及聚核苷酸能為了預防及/或治療癌症而利用。因此本態樣之抗原呈現細胞或其製造方法，較佳是利用源自癌症患者之經單離的細胞者。具體而言，藉由使源自癌症患者之經單離的具有抗原呈現能力的細胞，與本發明之胜肽或聚核苷酸的任一種在試管內(*in vitro*)接觸，來製造出抗原呈現細胞，該抗原呈現細胞會在該細胞的細胞表面呈現HLA-A02抗原或HLA-A24抗原與本發明之胜肽的複合體。

【0078】 在此所謂的「具有抗原呈現能力的細胞」，只要是將能呈現本發明之胜肽的MHC，較佳為HLA，更佳為HLA-A02抗原或HLA-A24抗原表現在細胞表

面上的細胞則沒有特別限定，但此等之中，較佳為專職的抗原提示細胞，特別是被視為抗原呈現能力高的樹狀細胞更佳。

又，作為為了從前述具有抗原呈現能力的細胞來製備本發明之抗原呈現細胞而添加的物質，亦可為本發明之胜肽或聚核苷酸的任一種。

本發明之抗原呈現細胞，例如，藉由從癌症患者單離出具有抗原呈現能力的細胞，將本發明之胜肽對該細胞在試管內(*in vitro*)進行沖擊，使HLA-A02抗原或HLA-A24抗原與本發明之胜肽的複合體被呈現出來而獲得(*Cancer*

Immunol. Immunother., 46:82, 1998 ;

J. Immunol., 158, p1796, 1997 ; *Cancer*

Res., 59, p1184, 1999)。使用樹狀細胞時，例如，藉由從癌症患者的週邊血液利用聚蔗糖(*ficoll*)法分離出淋巴球，之後去除非貼附型細胞，將貼附型細胞在GM-CSF及IL-4存在下進行培養來誘導樹狀細胞，將該樹狀細胞與本發明之胜肽一起培養並進行沖擊等，而能夠製備出本發明之抗原呈現細胞。

【0079】 又，藉由將本發明之聚核苷酸導入至前述具有抗原呈現能力的細胞裡，來製備本發明之抗原呈現細胞時，該聚核苷酸，可以是DNA的形態，亦可以是RNA的形態。具體而言，是DNA的情況能夠參考*Cancer Res.*, 56: p5672, 1996或*J. Immunol.*, 161:

p 5 6 0 7, 1 9 9 8 (這些文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份) 等來實行 , 又 , 是 R N A 的情況能夠參考

J . E x p . M e d . , 1 8 4 : p 4 6 5 , 1 9 9 6 (本文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份) 等來實行 。

【 0 0 8 0 】 前述抗原呈現細胞能夠作為 CTL 誘導劑的有效成分。含有該抗原呈現細胞作為有效成分的 CTL 誘導劑 , 為了穩定地維持抗原呈現細胞 , 較佳為包含生理食鹽水、磷酸緩衝生理食鹽水 (P B S) 、培養基等。作為投予方法 , 可舉出靜脈內投予、皮下投予、皮內投予等。藉由將含有這樣的抗原呈現細胞作為有效成分而成的 CTL 誘導劑返回患者的體內 , 在罹患了 A S B 4 陽性癌的患者的體內 , 對於將本發明之胜肽進行抗原呈現的癌細胞具特異性的 CTL 受到有效率地誘導 , 其結果是能夠治療將本發明之胜肽進行抗原呈現的 A S B 4 陽性癌 。

【 0 0 8 1 】

< 6 > 本發明之細胞毒性 T 細胞 (C T L)

本發明之胜肽及聚核苷酸 , 例如能夠如以下所述在試管內 (i n v i t r o) 來使用。亦即藉由使本發明之胜肽及聚核苷酸的任一種與週邊血液淋巴球在試管內 (i n v i t r o) 接觸 , 能夠誘導出 CTL。因此在本發明之一態樣中 , 是提供 CTL 及其誘導方法 , 該 CTL 是會特異性地毒殺將本發明之胜肽進行抗原呈現的細胞。如同上述 , 本發明之胜肽及聚核苷酸能為了預防及 / 或治療癌症而利用。因此本態樣之 CTL 及其誘導方法中 , 較佳是利用源

自癌患者的週邊血液淋巴球者。具體而言，藉由使源自癌症患者的週邊血液淋巴球，與本發明之胜肽或聚核苷酸的任一種在試管內(*in vitro*)接觸，來誘導出CTL，該CTL會特異性地毒殺將本發明之胜肽進行抗原呈現的細胞。

【0082】 例如在黑色素瘤中，對於將患者本人的腫瘤內浸潤T細胞在體外進行大量培養，再將此細胞返回患者的間接免疫治療法可看到治療效果(J.Natl.Cancer.Inst., 86:1159, 1994)。又在小鼠的黑色素瘤中，藉由將脾細胞在試管內(*in vitro*)經由腫瘤抗原胜肽TRP-2進行刺激，使對腫瘤抗原胜肽具特異性的CTL進行增殖，再將該CTL投予至黑色素瘤移植小鼠裡，可看到轉移抑制(J.Exp.Med., 185:453, 1997)。這是基於，使得會特異性辨識抗原呈現細胞之MHC與腫瘤抗原胜肽的複合體的CTL在試管內(*in vitro*)進行增殖的結果。因此，使用本發明之胜肽或聚核苷酸，在試管內(*in vitro*)刺激患者週邊血液淋巴球來增加腫瘤特異性CTL後，將此CTL返回患者的治療法認為是有用的。

【0083】 該CTL能夠作為癌症的治療劑或預防劑的有效成分。該治療劑或預防劑，為了穩定地維持CTL，較佳為包含生理食鹽水、磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)、培養基等。作為投予方法，可舉出靜脈內投予、皮下投予、皮內投予等。藉由將含有這樣的CTL作為有效成分

而成的癌症的治療或預防劑返回患者的體內，在罹患了本發明之ASB4陽性癌的患者體內，藉由CTL所實行的癌細胞的毒殺作用受到促進，並破壞癌細胞，而能夠治療癌症。

【0084】本發明之CTL，能夠將腫瘤細胞上受到抗原呈現的本發明之胜肽與HLA的複合體作為標的而發揮細胞毒殺活性。亦即本發明之CTL的T細胞受體(TCR)，會辨識本發明之胜肽與HLA的複合體。近年，設計出一種間接免疫治療法，其是選殖出表現在CTL上並會辨識特定的胜肽-HLA複合體的TCR基因，將該TCR基因對從癌症患者採集到的CD8⁺T細胞進行基因導入，製作成人工的CTL，在經大量培養後，返回患者體內（例如Ochi et al., Blood. 2011 Aug 11;118(6):1495-503等）。本發明中，提到「人工CTL」時，是意味著如同前述將編碼出會辨識胜肽與HLA的複合體的TCR的基因，對T細胞進行基因導入而製作成的CTL，此CTL亦與上述之天然的CTL同樣地能夠用於癌症的治療。因此該人工CTL，也包含在本發明之CTL。在該態樣中，在人工CTL受到基因導入的TCR，該TCR會辨識本發明之胜肽與HLA的複合體，為了提高對該複合體的結合親和性和細胞毒殺活性，亦可適當改變。因此，在「人工CTL」中亦包含，將編碼出會辨識本發明之胜肽與HLA的複合體的TCR的基因，在適當改變基因後，對源自患者的T細胞進行基因

導入而製作而成的CTL。人工CTL的製作中，能夠使用該技術領域中已知的方法。

【0085】

< 7 > 使用了本發明之胜肽的腫瘤特異性CTL檢測劑

本發明之胜肽，由於能被腫瘤特異性CTL所辨識，故作為腫瘤特異性CTL檢測劑的成分是有用的。因此，本發明又關於一種腫瘤特異性CTL檢測劑，其包含本發明之胜肽。一態樣中，本發明之腫瘤特異性CTL檢測劑，包含HLA多聚體（單體、二聚體、四聚體、五聚體及葡聚糖聚體（dextramer）），該HLA多聚體含有本發明之胜肽與HLA-A02或HLA-A24。

【0086】 例如，所謂的HLA四聚體，是指藉由使HLA的 α 鏈和 β 2微球蛋白與胜肽（抗原決定基胜肽）締合而成的複合體（HLA單體），將此複合體進行生物素化，並使之結合於卵白素而成為四聚體化者（*Science* 279: 2103-2106(1998)，*Science* 274: 94-96(1996)）。於現在，含有各種抗原胜肽之HLA四聚體正在販售中（例如從醫學生物學研究所（股）），能夠輕易製作出含有本發明之胜肽與HLA-A02或HLA-A24之HLA四聚體。又，HLA二聚體及HLA五聚體亦基於同樣的原理，在此等中，前述HLA單體分別受到二聚體化及五聚體化。因此，含有本發明之胜肽與HLA-A02或HLA-A24之HLA多聚體也是本發明之一態樣。

【0087】 具體而言，例如可舉出含有由序列編號3～14中的任一種所記載的胺基酸序列所構成的胜肽與HLA-A02或HLA-A24的HLA四聚體。該HLA四聚體，爲了能夠利用流式細胞分析、螢光顯微鏡等習知的檢測手段而輕易地選別或檢測出經結合之CTL，較佳爲接受螢光標記。具體而言，例如可舉出藉由藻紅素(PE)、螢光異硫氰酸鹽(FITC)、甲藻黃-素葉綠素-蛋白質(PerCP)等而被標記的HLA四聚體。

【0088】 作爲HLA四聚體的製法例，例如可舉出在Science 279: 2103-2106(1998)，Science 274: 94-96(1996)等文獻中記載者，若要簡單敘述就如同以下所述。

首先在可表現蛋白質的大腸桿菌或哺乳動物細胞中，導入HLA-A24或者HLA-A02的 α 鏈表現載體及 β 2微球蛋白表現載體予以表現。此處，較佳爲使用大腸桿菌(例如BL21)。將獲得之單體HLA-A24或HLA-A02複合體與本發明之胜肽混合，形成可溶性的HLA-胜肽複合體。其次藉由BirA酵素將HLA-胜肽複合體中的HLA-A02或HLA-A24的 α 鏈的C端部位的序列進行生物素化。藉由此經生物素化的HLA-胜肽複合體與經螢光標記的卵白素以4:1的莫耳比混合，能夠製備出HLA四聚體。另外，在前述各階段中，較佳爲進行藉由膠體過濾等所實行的蛋白精製。

【0089】

< 8 > 癌幹細胞檢測劑

如同上述，本案發明人首次發現 A S B 4 在癌幹細胞中會特異性的高度表現。亦即經由本案發明人，首次闡明 A S B 4 是在不包含癌幹細胞的癌細胞和一般的體細胞中未看到表現，但在癌幹細胞中會高度表現的基因。由該見解，發現 A S B 4 可利用來作為用以識別癌細胞，特別是識別癌幹細胞的標記。因此本發明在另一方面，是關於一種癌幹細胞檢測劑，其包含用以檢測 A S B 4 的表現產物的 A S B 4 檢測劑。

【0090】本發明中，單以 A S B 4 稱呼時，只要沒有另外的記載則是意味著 A S B 4 基因。較佳的是人類 A S B 4 基因，但亦可為其同系物。

本發明中所謂的「基因的表現」，是指將該基因的轉錄當作起點的一連串生體反應，所謂的「表現產物」，是指例如 m R N A 或內生性聚胜肽等，藉由這一連串生體反應而生成的分子。基因的表現產物也就是內生性聚胜肽，較佳是藉由該基因的表現而在最終生產出來的蛋白質。

本發明中所謂的「A S B 4 檢測劑」，是意味著用來定性地及 / 或定量地檢測 A S B 4 基因或其表現產物的藥劑。

【0091】本發明之癌幹細胞檢測劑，包含用以檢測 A S B 4 的表現產物的 A S B 4 檢測劑。在檢測對象中，檢測到 A S B 4 的表現產物時，能夠確定檢測對象具有癌幹

細胞，亦即檢測出癌幹細胞。本發明之癌幹細胞檢測劑，雖然可在活體內(*in vivo*)或在試管內(*in vitro*)使用，但較佳為針對源自從生物個體(檢查對象)採集到的生物樣品的細胞集團(檢測對象)在試管內(*in vitro*)使用。此時，在檢測對象也就是源自生物樣品的細胞集團中檢測出癌幹細胞，是意味著亦即在檢查對象也就是生物樣品所採集到的生物個體中也檢測出癌幹細胞，亦即該生物個體具有癌幹細胞。因此，就如後述，使用本發明之癌幹細胞檢測劑，在檢查對象中檢測癌幹細胞的方法亦包含在本發明中。

檢查對象也就是生物個體，只要是可具有腫瘤的生物個體什麼樣的生物個體皆可，但較佳為人類及非人類的哺乳動物(例如，小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠等之嚙齒類；黑猩猩等之靈長類；牛、山羊、綿羊等之偶蹄目；馬等之奇蹄目；兔、犬、貓等)的個體，更佳為人類的個體。

檢測對象的細胞集團，可針對源自從上述檢查對象獲得之任意的生物樣品的細胞集團來使用，但較佳為源自從人類獲得之生物樣品的細胞集團，更佳為在組織的細胞中確認ASB4幾乎不會表現的細胞集團，該細胞集團包含源自選自由心臟、腦、胎盤、肺、肝臟、骨骼肌、腎臟、胰臟、脾臟、胸腺、前列腺、睪丸、卵巢、小腸、大腸及血液所組成之群組的1種或2種以上的生物樣品的細胞。

【0092】本發明之癌幹細胞檢測劑中包含的ASB4檢測劑，能依據檢測的表現產物來變化，只要是發明所屬技術領域中具有通常知識者則能選擇出適當的最適者。具體而言，例如表現產物為mRNA時，能夠使用該技術領域中公知的任意mRNA檢測法，雖然並不限定於此，但例如可舉出RT-PCR法、原位雜合法、北方點墨法、即時定量RT-PCR等，在其中從檢測靈敏度的強度、實驗技巧的簡便度等而言，較佳為RT-PCR法。例如表現產物是內生性聚胜肽（較佳為ASB4蛋白質）時，雖然並不限定於此，但例如可舉出西方點墨法、免疫組織染色法等。使用的ASB4檢測劑，能依據檢測的表現產物和採用的檢測法來變化，發明所屬技術領域中具有通常知識者能選擇出適當的最適者。具體而言，例如檢測內生性聚胜肽時可舉出ASB4特異抗體（較佳為單株抗體）等，檢測mRNA時可舉出一種探針及/或引子等，其具有與序列編號1所記載之鹼基序列（Genbank Accession No: NM_016116.2的第72~1352號）的一部分互補的鹼基序列，但並不限定於此。又檢測的表現產物，亦可為單一的表現產物亦可組合複數的表現產物來使用。

【0093】

< 9 > 辨識本發明之胜肽的抗體

如同上述，本發明之胜肽，是透過癌細胞，特別是透過癌幹細胞被呈現作為CTL抗原決定基胜肽。此時，

與MHC形成複合體並呈現在細胞表面。因此藉由使用本發明之胜肽、和會特異性辨識前述複合體的抗體，能夠將本發明之胜肽作為腫瘤標記或抗體醫藥的標的來利用。作為這樣的抗體，例如能夠舉出：與本發明之胜肽特異性結合的抗體（較佳為單株抗體）、會辨識本發明之胜肽與HLA的複合體，較佳為與HLA-A24或是HLA-A02的複合體的類TCR（T細胞抗原受體）抗體。因此，本發明亦關於會辨識本發明之胜肽的抗體及會辨識該胜肽與MHC的複合體的類T細胞抗原受體抗體。

本發明中提到「抗體」的情況，不只是免疫球蛋白分子，也包含了Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、dsFv、Diabody及sc(Fv)₂等之抗體的機能性片段。又，這些機能性片段的多聚體（例如，二聚體、三聚體、四聚體、多聚體）也包含在本發明之抗體中。

本發明中，「類TCR抗體」是對於經片段化的源自抗原的胜肽與主要組織適合性抗原複合體（MHC）分子的複合體（pMHC）具有類TCR的結合力（抗原辨識能力）之分子。例如，就像在Eur J Immunol. 2004; 34:2919-29等所報導的，會辨識源自腫瘤抗原的胜肽與MHC的複合體的類TCR抗體，能夠辨識出呈現著CTL會當作標靶的腫瘤抗原胜肽之癌細胞、吞噬癌細胞並在MHC第I型上呈現腫瘤抗原胜肽之樹狀細胞等。

【0094】 又，會辨識源自病毒等的胜肽與MHC的複合體的前述類TCR抗體，能夠定量地、歷時性地分析經呈現的抗原在感染細胞上顯示什麼樣的呈現動態及CTL反應等。

前述類TCR抗體，能夠使用在Eur J Immunol. 2004;34:2919-29等所記載的方法來製作。例如，藉由將MHC與胜肽複合體對小鼠等動物進行免疫，能夠取得複合體特異性的抗體。又，也能利用噬菌體展示法來取得複合體特異性抗體。

【0095】 如同上述，藉由辨識本發明之胜肽、或呈現該胜肽的MHC複合體，能檢測出將該MHC複合體呈現在細胞表面的腫瘤細胞。因此本發明亦關於包含上述抗體或類TCR抗體的腫瘤檢測劑。又由於本發明之胜肽，除了在腫瘤細胞之外，也同樣地被呈現在抗原呈現細胞，特別是樹狀細胞等之專職抗原呈現細胞，故上述抗體，在檢測呈現本發明之胜肽的抗原呈現細胞等也是有用的。

又如同上述，本發明之胜肽，由於透過癌細胞，特別是癌幹細胞被呈現作為CTL抗原決定基胜肽，故會辨識本發明之胜肽、或該胜肽與HLA的複合體，較佳為與HLA-A24或是HLA-A02的複合體的抗體或類TCR抗體，作為對象中的癌症的預防及/或治療劑也是有用的。因此，本發明亦關於一種癌症的預防及/或治療劑，其包含本發明之抗體及/或類TCR抗體。

【0096】 本發明之胜肽，由於透過腫瘤細胞被呈現作為CTL抗原決定基胜肽，會辨識本發明之胜肽、或該胜肽與HLA的複合體，較佳為與HLA-A24的複合體的抗體及/或類TCR抗體，在對象中能夠與存在於細胞表面的前述胜肽及/或前述複合體結合。若抗體結合於腫瘤細胞表面，該抗體的Fc部位上會結合巨噬細胞或NK細胞（自然殺手細胞；natural killer cell）等之效應細胞的Fc受體，該效應細胞因為產生了攻擊腫瘤細胞的抗體依賴性細胞毒殺（ADCC；antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）活性而能夠處置腫瘤。因此上述抗體及/或類TCR抗體，能夠作為癌症的預防及/或治療劑的有效成分來使用。

【0097】 又在近年，開發出一種雙特異性抗體，其擁有2個不同的抗原結合部位，為了分別與不同的抗原結合所改造而成。在一邊的抗原結合部位辨識受到抗原呈現的胜肽或MHC-抗原胜肽複合體等的癌細胞表面抗原，在另一邊的抗原結合部位則辨識CD3等的淋巴球表面抗原之雙特異性抗體，變得可在癌細胞的旁邊束縛、集聚化CTL或效應細胞等具有淋巴球表面抗原的細胞。被束縛在癌細胞旁邊的淋巴球，本身不僅顯示出ADCC活性等的抗腫瘤活性，並藉由透過分泌細胞介素等發揮了旁觀者的效果，其活化癌細胞周圍的初始免疫細胞的抗腫瘤性，而能夠攻擊癌細胞。

【0098】 因此本發明亦包含一種雙特異性抗體，其會特異性地辨識本發明之胜肽及/或該胜肽與HLA的複合體、和淋巴球表面抗原。被特異性地辨識的淋巴球表面抗原，只要是在淋巴球的表面上會特異性地表現的抗原則沒有特別限定，但較佳可舉出CD3、CD16、CD64等。尤其CD3是涉及了誘導CTL的細胞毒殺活性的細胞表面抗原，CD3上若結合了抗體，則由於能夠不經辨識HLA-癌抗原複合體且非HLA束縛性地活化CTL，可期待發揮強力的細胞毒殺活性故較佳。

【0099】 並且，近年構思了一種新的免疫細胞治療法，該免疫細胞治療法是將一種嵌合抗原受體（CAR）進行基因導入至源自患者的T細胞，該嵌合抗原受體是對腫瘤抗原具特異性的單株抗體的一部分加以基因操作所改造而成，並將此基因改造T細胞在體外進行增殖培養後注入到患者（Nat Rev Immunol. 2012; 12:269-81）。具體而言，藉由在抗CD3抗體與IL-2等的存在下培養從患者採集到的週邊血液單核細胞來活化T細胞後，再藉由使用反轉錄病毒載體或慢病毒載體等的形質轉換用載體，將編碼出CAR的基因導入T細胞，來製作出基因改造T細胞。

本發明中，「嵌合抗原受體」，是一種嵌合蛋白分子，其是設計成在N端側擁有單鏈抗體（scFv），在C端側擁有CD3 ζ 鏈，該scFv是會辨識存在於癌細胞的細胞表面的分子的抗體，並使該抗體的抗體可變區域的輕

鏈與重鏈以串聯式結合而成，而該CD3 ζ 鏈是在構成T細胞受體（TCR）/CD3複合體的分子內。此嵌合抗原受體，若在scFv區域辨識到特定的抗原，則透過CD3 ζ 鏈發生了T細胞的活性化。爲了增強T細胞的活性化，亦可在scFv與 ζ 鏈之間嵌入1個或2個以上的共刺激分子（例如CD28、4-1BB、ICOS等）。本發明中，能夠使用本態樣的類TCR抗體（包含從類TCR抗體設計而得的抗體分子或其片段）作爲scFv來製作出CAR。會辨識源自腫瘤抗原的胜肽與MHC的複合體的CAR，由於能夠辨識出呈現著CTL會當作標靶的腫瘤抗原胜肽之癌細胞、吞噬癌細胞並在MHC第I型上呈現腫瘤抗原胜肽之樹狀細胞等，故經導入前述CAR的基因改造T細胞，與人工CTL相同，作爲對前述腫瘤抗原具特異性的癌症的預防及/或治療劑是有用的。因此，本發明亦關於一種癌症的預防及/或治療劑，其包含基因改造T細胞或人工CTL，該基因改造T細胞經導入了會辨識本發明之源自腫瘤抗原的胜肽與MHC的複合體的CAR。

【0100】

<10> 腫瘤的檢測方法（檢查方法、診斷方法）

本發明提供利用了前述的本發明之CTL檢測劑、或者癌幹細胞檢測劑或腫瘤檢測劑的腫瘤的檢測方法（檢查方法、診斷方法）。

使用本發明之CTL檢測劑的本發明之檢測方法（診斷方法），在典型上，是藉由採集受試者的血液，或是

利用活體組織切片等來採集疑似腫瘤的受試組織的一部分，並透過本發明之CTL檢測劑來檢測、測定於該檢體所包含的CTL的量，該CTL會辨識源自ASB4的腫瘤抗原胜肽與HLA抗原的複合體，來檢測、檢查或診斷出是否罹患大腸癌、肺癌、腎癌、乳癌、口腔癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、睪丸腫瘤、卵巢癌等之ASB4陽性癌（腫瘤）或其程度。

【0101】 使用本發明之癌幹細胞檢測劑的本發明之檢測方法（檢查方法、診斷方法），在典型上，是藉由採集受試者的血液，或是利用活體組織切片等來採集疑似腫瘤的受試組織的一部分，並透過本發明之癌幹細胞檢測劑來檢測、測定於該檢體所包含的ASB4表現產物的量，來檢測、檢查或診斷出是否罹患大腸癌、肺癌、乳癌、口腔癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、睪丸腫瘤、卵巢癌等之ASB4陽性癌（腫瘤）或其程度。

使用本發明之腫瘤檢測劑的本發明之檢測方法（檢查方法、診斷方法），在典型的上，是藉由採集受試者的血液，或是利用活體組織切片等來採集疑似腫瘤的受試組織的一部分，並透過本發明之本發明之腫瘤檢測劑來檢測、測定於該檢體所包含的細胞的量，該細胞會呈現源自ASB4的腫瘤抗原胜肽與HLA抗原的複合體，來檢測、檢查或診斷出是否罹患大腸癌、肺癌、乳癌、口腔癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、睪丸腫瘤、卵巢癌等之ASB4陽性癌（腫瘤）或其程度。

【0102】本發明之檢測（檢查、診斷）方法，例如在具有腫瘤的患者中，爲了改善該腫瘤而投予治療藥的情況時，亦能夠檢測（檢查、診斷）該腫瘤有無改善或其程度。並且本發明之檢測（檢查、診斷）方法，亦能利用在治療對象患者的選擇、或者由該醫藥所致的治療效果的預測和判定等，該治療對象患者能夠有效地應用將本發明之胜肽或聚核苷酸作爲有效成分的醫藥。又，在使用本發明之腫瘤檢測劑的態樣中，藉由投予將本發明之胜肽作爲有效成分的癌疫苗，能檢測呈現著腫瘤抗原胜肽的癌細胞，在患者生體內被誘導出來的CTL實際上會將該癌細胞當作標的。

【0103】使用本發明之CTL檢測劑的本發明之檢測（檢查）方法的特定態樣，包含下述之（a）和（b）、及任意包含（c）的步驟：

（a）讓得自受試者的生物樣品與本發明之CTL檢測劑接觸的步驟；

（b）將上述CTL檢測劑所結合的細胞量作爲指標來測定CTL量的步驟，該CTL會辨識源自該生物樣品中的ASB4的腫瘤抗原胜肽與HLA抗原的複合體；

（c）基於（b）的結果，來判斷癌的罹患的步驟。

使用本發明之CTL檢測劑的本發明之診斷方法的特定態樣，包含上述（a）、（b）及（c）的步驟。

【0104】 使用本發明之癌幹細胞檢測劑的本發明之檢測（檢查）方法的特定態樣，包含下述的（d）和（e）、及任意包含（f）的步驟：

（d）讓得自受試者的生物樣品與本發明之癌幹細胞檢測劑接觸的步驟；

（e）測定該生物樣品中ASB4表現產物的量的步驟；

（f）基於（e）的結果，來判斷癌的罹患的步驟。

使用本發明之癌幹細胞檢測劑的本發明之診斷方法的特定態樣，包含上述（d）、（e）及（f）的步驟。

使用本發明之癌幹細胞檢測劑的檢測癌幹細胞的方法的態樣，包含上述（d）、（e）的步驟及包含下述（f'）的步驟來取代（f）：

（f'）基於（e）的結果，決定生物樣品中的癌幹細胞的存在或不存在的步驟。

作為在此使用的生物樣品，能夠舉出由受試者的生體組織（疑似癌細胞存在的組織及其周邊組織、或血液等）所製備的樣品。具體而言，能夠舉出包含採集自該組織的組織細胞的樣品等。

【0105】 使用本發明之腫瘤檢測劑的本發明之檢測（檢查）方法的特定態樣，包含下述的（g）和（h）、及任意包含（i）的步驟：

（g）讓得自受試者的生物樣品與本發明之腫瘤檢測劑接觸的步驟；

(h)將上述腫瘤檢測劑所結合的細胞量作為指標來測定細胞量的步驟，該細胞會呈現該生物樣品中源自ASB4的腫瘤抗原胜肽與HLA抗原的複合體；

(i)基於(h)的結果，來判斷癌的罹患的步驟。

使用本發明之腫瘤檢測劑的本發明之診斷方法的特定態樣，包含上述(g)、(h)及(i)的步驟。

作為在此使用的生物樣品，能夠舉出由受試者的生體組織（疑似癌細胞存在的組織及其周邊組織、或血液等）所製備的樣品。具體而言，能夠舉出包含採集自該組織的組織細胞的樣品等。

【0106】使用本發明之CTL檢測劑的本發明之檢測方法（檢查方法、診斷方法）的一態樣，是藉由檢測生物樣品中具本發明之胜肽特異性的CTL，並測定其量來實施。具體而言，能夠藉由下述來實行，依照文獻（Science, 274:p94, 1996，本文獻是藉由引用來構成本申請案的一部份）中記載的方法，製作經螢光標識的HLA抗原與本發明之胜肽的複合體之四聚體（HLA四聚體），使用此四聚體並利用流式細胞分析儀來定量疑似罹癌患者的週邊血液淋巴球中的抗原胜肽特異性CTL。

【0107】有無腫瘤的預測、判定、判斷或診斷，例如，能夠藉由測定受試者的血液或疑似腫瘤的受試組織中的本發明之胜肽特異性CTL的量、或是測定呈現本發明之胜肽的細胞的量來實行。屆時，根據情況，能夠藉由下

述來實行，將正常的對應組織中 A S B 4 基因表現水準、本發明之胜肽水準或 C T L 水準等作為基準值，並比較該基準值與獲得自受試者的樣品中的前述水準，來判定兩者的不同。

此處，比較受試者的受試組織與正常的對應組織的前述水準，是透過並行將受試者的生物樣品與正常者的生物樣品作為對象的測定來實行而能實施。在未實行並行的情況，能夠將使用複數（至少 2 個，較佳為 3 個以上，更佳為 5 個以上）的正常組織並以相等的測定條件來測定所獲得的本發明之胜肽特異性 C T L 的量或呈現本發明之胜肽的細胞的量的平均值或統計上的中間值，作為正常者的值亦即基準值，而用來比較。

【0108】判斷受試者是否有罹患癌症，例如能夠比較該受試者的組織中本發明之胜肽特異性 C T L 的量、或呈現本發明之胜肽的細胞，與正常者的該等細胞的水準，並例如將多 2 倍以上，較佳為多 3 倍以上的情況作為指標來實行。

又，在受到投予本發明之胜肽或聚核苷酸的受試者中，藉由測定本發明之胜肽特異性 C T L 的量，也能判定實際上 C T L 是否有被誘導出來。例如，比較該受試者的組織中的本發明之胜肽特異性 C T L 的量，與正常者的該等細胞的水準，並例如將多 2 倍以上，較佳為多 3 倍以上的情況作為指標，而能夠判定藉由本發明之胜肽或聚核苷酸所實施的治療是有效的。

【0109】**< 11 > 癌症的預防及/或治療方法**

本發明又關於一種預防及/或治療對象中的癌的方法，該方法包含將選自由本發明之胜肽、聚核苷酸、CTL、抗原呈現細胞、抗體及/或類TCR抗體、人工CTL、基因改造T細胞所組成之群組的有效成分的有效量，投予到視該有效成分為必要之對象的步驟。

本發明中的「對象」，只要是會罹患癌症的生物個體則怎樣的生物個體皆可，但較佳為人類及非人類哺乳動物（例如，小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠等之啮齒類；黑猩猩等之靈長類；牛、山羊、綿羊等之偶蹄目；馬等之奇蹄目；兔、犬、貓等）的個體，更佳為人類的個體。本發明中，雖然對象可以是健康的，也可以是罹患了某些疾病，但在謀求癌症的預防及/或治療的情況下，在典型上是意味著罹患了癌症，或是有罹患的風險的對象。在本發明之一態樣中，對象是HLA-A02陽性或HLA-A24陽性。在本發明之一態樣中，對象是罹患了ASB4陽性的癌症，或有罹患的風險。在本發明之一態樣中，對象是HLA-A02陽性或HLA-A24陽性，且罹患了ASB4陽性的癌症，或有罹患的風險。

【0110】 作為用於本發明之預防/治療方法的本發明之胜肽、聚核苷酸、CTL、抗原呈現細胞、抗體及/或類TCR抗體、人工CTL、及基因改造T細胞，可舉出本說明書所記載的任意者。所謂本發明中的有效量，是例如

減輕癌症的症狀、或者延遲或停止其發展的量，較佳為抑制癌症，或治癒癌症的量。又，較佳為不會產生不良影響的量，該不良影響會超過因投予所帶來的利益。該量能夠藉由使用了培養細胞等的試管內(in vitro)試驗，或是在小鼠、大鼠等模式動物中的試驗來適當決定，這樣的試驗法是發明所屬技術領域中具有通常知識者所熟知。有效成分的具體用量，可考慮到關於視該有效成分為必要的對象的種種條件，例如症狀的嚴重度、對象的一般健康狀態、年齡、體重、對象的性別、進食、投予的時機及頻率、併用的醫藥、對治療的反應性、劑型、及對治療的順從性等來決定。

【0111】 作為具體用量，例如，在本發明之胜肽的情況，通常為 $0.0001\text{ mg} \sim 1000\text{ mg}$ ，較佳為 $0.001\text{ mg} \sim 1000\text{ mg}$ ，更佳為 $0.1\text{ mg} \sim 10\text{ mg}$ ，將此胜肽在數日至數月內投予1次為佳。又，在本發明之聚核苷酸的情況，通常為 $0.0001\text{ mg} \sim 100\text{ mg}$ ，較佳為 $0.001\text{ mg} \sim 10\text{ mg}$ ，將此聚核苷酸在數日至數月內投予1次為佳。又，在本發明之抗體及/或類TCR抗體的情況，通常為 $0.0001\text{ mg} \sim 2000\text{ mg}$ ，較佳為 $0.001\text{ mg} \sim 2000\text{ mg}$ ，將此抗體在1週內 \sim 4週內投予1次為佳。在本發明之基因改造T細胞或人工CTL的情況，通常為 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ ，較佳為 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ ，將此細胞在1日 \sim 4週內投予1次為佳。又，作為投予方法，能夠使用皮內投予、皮下投予、肌肉內投予、靜脈內投予等習知的任意適當

的投予方法。又，除了將本發明之胜肽或核苷酸直接投予到體內的活體內(*in vivo*)法之外，亦可使用採集來自人類的某種細胞，在體外使用本發明之胜肽或聚核苷酸並誘導出CTL或抗原呈現細胞後，再將該等細胞返回體內的活體外(*ex vivo*)法。

【0112】 本發明之預防/治療方法的一態樣，是在進行投予的步驟之前，進一步包含篩選出HLA-A02陽性或HLA-A24陽性的對象來作為預防/治療的對象的步驟。本發明之此態樣，亦可在上述進行篩選的步驟之前，進一步包含決定對象的HLA型的步驟。對象的HLA型的決定，能藉由習知的任意手法來實行。又，本發明之預防/治療方法的一態樣，是在進行投予的步驟之前，進一步包含篩選出具有ASB4陽性之癌症的對象來作為預防/治療的對象的步驟。本發明之此態樣，亦可在上述進行篩選的步驟之前，進一步包含檢測對象中的ASB4陽性之癌症的步驟。對象中的ASB4陽性之癌症的檢測，能夠使用上述<9>所記載的腫瘤的檢測方法。本發明之預防/治療方法的一態樣，是在進行投予的步驟之前，進一步篩選出HLA-A02陽性或HLA-A24陽性，且具有ASB4陽性之癌症的對象來作為預防/治療的對象的步驟。本發明之此態樣，亦可在上述進行篩選的步驟之前，進一步包含決定對象的HLA型的步驟及檢測對象中的ASB4陽性之癌症的步驟。

【0113】

< 12 > 視癌幹細胞為標的之癌症治療藥的篩選方法

在使用本發明之癌幹細胞檢測劑的態樣中，認為檢測對象中的ASB4表現產物的表現量，與檢測對象中的癌幹細胞的量有相關。因此，對於檢測對象在投予癌症治療藥的候選化合物的前後，藉由比較其ASB4表現產物的表現量，能夠判定經投予的候選化合物作為視癌幹細胞為標的之癌症治療藥是否有用。

【0114】本發明之篩選方法，包含以下的步驟（I）、（II）及任意包含（III）：

（I）在將癌症治療藥的候選化合物投予給對象之前，測定該對象中ASB4基因的表現產物的檢測量A的步驟；

（II）在將前述候選化合物投予給前述對象細胞集團之後，測定該對象中ASB4基因的表現產物的檢測量B的步驟；及

（III）比較前述檢測量A與B，在該檢測量A顯著大於B的情況，將前述候選化合物判定為候選癌症治療藥的步驟，該選癌症治療藥的特徵在於將癌幹細胞視為標的。

本發明之篩選方法的特定態樣，包含上述步驟（I）～（III）。此處，測定步驟（I）及（II）的檢測量的步驟，分別包含上述檢測（檢查、診斷）方法中的步驟（d）及（e）。

【0115】 在本說明書中所提及的全部專利、專利申請案及其他出版物，是藉由參照其整體而引用到本說明書。

以下，藉由實施例來具體說明本發明，但本發明並不限定於此等實施例。

[實施例]

【0116】

實驗例1：人類大腸癌細胞的SP分割的檢測與次選殖

(a) 試劑的製備

製備5%之胎牛血清(FCS (HyClone Laboratories公司))補充DMEM (Sigma-Aldrich公司)培養基作為培養基，並溫熱至37°C。維拉帕米 (Sigma-Aldrich公司)調整到50 mM，用5% FCS補充DMEM培養基稀釋到5 mM。赫斯特33342 (Lonza公司)是用5% FCS補充DMEM培養基調整到250 μ g/mL。Dnase I (Qiagen公司)是用DDW調整到1 mg/mL，並用0.2 μ m的過濾器進行過濾滅菌。

【0117】

(b) 流式細胞分析(FACS)用之細胞的調整

將人類大腸癌細胞株(SW480 (ATCC))用4 mL的5% FCS補充DMEM培養基來懸浮，並計算其細胞數。接著添加5% FCS補充DMEM培養基將細胞濃度調整至 10×10^6 個/mL，獲得檢體。使用一部分的檢體進行注液，在主檢體中不添加維拉帕米(維拉帕米(-)樣品)，在副檢體中以最終濃度成為75 μ M的方式添加維

拉帕米（維拉帕米（+）檢體）。之後，在維拉帕米（+）檢體及維拉帕米（-）檢體中，以赫斯特33342的最終濃度成爲 $5.0\ \mu\text{M}$ 的方式添加赫斯特33342溶液。

將兩檢體於 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振盪培養90分鐘後，在冰上冷卻。以 1500 rpm 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 離心分離5分鐘，並去除上清液。用5%FCS補充 $1\times\text{PBS}$ 懸浮，移到事先冰冷過的FACS管。再次以 1500 rpm 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 離心分離5分鐘去除上清液，用5%FCS補充 $1\times\text{PBS}$ 懸浮。重複一次同樣的洗淨後，用加入 2 mM 的EDTA之2%FCS補充 $1\times\text{PBS}$ 2 mL懸浮。添加Dnase I液 $2\ \mu\text{L}$ ，混和後，在FACS用過濾器（Becton, Dickinson (BD) 公司）除去細胞團塊。添加 1 mg/mL 的碘化丙啶（PI）（Sigma-Aldrich公司） $2\ \mu\text{L}$ 後，使用BD FACS Aria II special edition（註冊商標）（BD公司）作爲流式細胞分析儀，以流動速度 $1000\sim 2000$ 個/秒來分析。

【0118】

（c）流式細胞分析（FACS）

FACS的操作是依照使用說明書來實行。

首先，分析維拉帕米（-）檢體的細胞，與成爲主體的細胞群（main population (MP)）比較，檢測出發光強度低的細胞群（side population (SP)）細胞（圖1）。爲了確認SP細胞是ABC運輸蛋白特異性的赫斯特33342色素低染色性，故以相同條件分析維拉帕米（+）檢體，而確認到SP細胞消失了（圖1）。

將SP細胞單離，將細胞以4℃、1500rpm離心分離15分鐘，去除上清液後，用100~200μL的1×PBS懸浮。

【0119】

(d) 在單一細胞層次的次選殖

將源自SW480的SP細胞在前述(c)進行檢測，分別將其SP及MP細胞分劃在96孔盤中以成為1細胞/1孔的方式實行單細胞分選(圖2-1)。在各孔中預先加入添加1%青黴素-鏈黴素之10%FCS補充DMEM培養基。

培養2~3週後，將在各孔中增殖的細胞株各自作為SW480-SP殖株細胞株、SW480-MP殖株細胞株。

「SW480-SP-X」或「SW480-MP-Y」的X及Y是作為各自的殖株編號。

用共焦點顯微鏡觀察其形態時，MP殖株細胞株主要是以單層在增殖，各細胞顯示為紡錘形。另一方面，SP殖株細胞株則顯示出多層化傾向，各細胞顯示為圓形~類圓形。獲得之代表性的SP殖株及MP殖株的顯微鏡影像顯示於圖2-2。

【0120】

實驗例2：腫瘤形成能實驗

為了確認實驗例1獲得之SW480-SP及SW480-MP殖株細胞株各自在活體內(in vivo)中的致腫瘤能力，使用SP殖株及MP殖株各自代表性的3個殖

株，移植到NOD/SCID免疫不全小鼠（東方酵母工業公司）。

具體而言，將同數量的SP及MP殖株細胞各自在冰上用100 μ L的1×PBS懸浮，並與100 μ L的基質膠（matrigel）（BD公司）混和。將100 μ L的細胞基質膠混合液接種到NOD/SCID小鼠（東方酵母工業公司）的背部皮下，並將SP及MP殖株細胞分別以100個、1000個、10000個，各組5隻進行接種，來觀察腫瘤形成。測量腫瘤長徑、短徑的長度，將腫瘤體積用（體積＝長徑×短徑²/2）的計算式算出來。經移植10000個的小鼠腫瘤增大曲線如圖3所示。

【0121】 其結果，於10000個細胞移植群中，在細胞接種後8週的SW480-MP殖株移植群中完全看不到有腫瘤形成。另一方面，在SW480-SP殖株移植群中全部的小鼠都有觀察到腫瘤形成，製造出的腫瘤的體積與SW480-MP殖株群相比較是顯著性地高（圖3）。這與癌幹細胞是腫瘤形成的重大主要原因，且SP殖株細胞中癌幹細胞受到濃縮的見解（Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 20:781-786, 2004）一致。

【0122】

實驗例 3：人類大腸癌 SP 細胞的 HLA-A24 結合天然胜肽的鑑定

透過以下的次序，實行 HLA-A24 結合天然胜肽的溶出與序列分析，該胜肽僅在人類大腸癌細胞株 SW480 的 SP 分割細胞中被特異性呈現。

(a) 細胞株

源自前述大腸癌細胞株之殖株亦即 SW480-MP 及 SW480-SP 系統，是在添加了 10% FCS 及 1% 青黴素-鏈黴素 (Gibco 公司製造) 的 DMEM 培養基中培養，分別將細胞數設定在 $1.5 \times 10^9 \sim 1.8 \times 10^9$ 個的範圍。

【0123】

(b) 抗體

生產出抗 HLA-A24 抗體 (C7709A2) 的融合瘤細胞，是由 P. G. Coulie 博士 (de Duvé Institute, Brussel) 所供應。將融合瘤細胞，培養在添加了 10% FCS、1% 青黴素-鏈黴素、 $55 \mu\text{M}$ 之 2-巯基乙醇 (Gibco 公司製造)、 1mM 之丙酮酸鈉 (Gibco 公司製造)、 2mM 之 L-麩醯胺酸 (Sigma-Aldrich 公司製造) 及 20mM 之 HEPES (Gibco 公司製造) 的 RPMI-1640 (Sigma-Aldrich 公司製造) 培養基，從培養上清液並藉由使用了纖維素管與聚乙二醇 (PEG-20000) 的逆浸透法獲得濃縮抗體。濃縮抗體添加 0.03% 疊氮化鈉與蛋白分解酶抑制劑混合物 (Roche Diagnostics 公司)，並保存於 4°C 。

【0124】**(c) 抗體與微珠的結合**

將 30 ~ 40 mL 的濃縮抗體，與 3 mL 之 Protein A-Sepharose beads (蛋白 A-瓊脂糖微珠) (GE Healthcare 公司製造) 於 4 °C 攪拌一晚使之結合，之後用 0.1 M 之硼酸與 0.2 M 之三乙醇胺緩衝液 (pH 8.2) 洗淨。抗體與微珠是在 20 mM 之含庚二醯亞胺酸二甲酯二鹽酸鹽之三乙醇胺緩衝液 (pH 8.3) 於室溫攪拌 60 ~ 90 分鐘使之共價鍵結。

(d) HLA-A24 結合胜肽的免疫沈澱

使用包含了 0.5% NP-40、50 mM Tris 鹽酸緩衝液 (pH 8)、150 mM 氯化鈉以及蛋白分解酶抑制劑的緩衝液，分別將實驗例 3 (a) 的細胞 (SW480-SP 以及 SW480-MP) 溶解。細胞溶解液是階段性地實行離心分離 (以 2000 g 離心 10 分鐘，以 38000 g 離心 30 分鐘，以 100000 g 離心 90 分鐘)，並回收上清液。使經回收之上清液通過 0.5 mL 的 Protein A-Sepharose 懸浮液管柱，去除與 Protein A-Sepharose 非特異性結合的成分後，與在實驗例 3 (c) 製作成的抗體結合 Protein A-Sepharose beads 混合，並且於 4 °C 緩慢地攪拌一晚，使天然胜肽與 HLA-A24 分子的複合體結合到抗體微珠上。

【0125】 之後，抗體微珠是使用 4 種緩衝液 ([1]) 0.005% 之 NP-40、50 mM 之 Tris 鹽酸緩衝液

(pH 8.0) 、 150 mM 之 氯化鈉 、 5 mM 之 EDTA 及 蛋白
分解酶抑制劑；〔 2 〕 50 mM 之 Tris 鹽酸緩衝液 (pH 8.0)
及 150 mM 之 氯化鈉；〔 3 〕 50 mM 之 Tris 鹽酸緩衝液
(pH 8.0) 及 450 mM 之 氯化鈉；和〔 4 〕 50 mM 之 Tris
鹽酸緩衝液 (pH 8.0)) 階段性地洗淨後，將結合在抗
體上的胜肽及 HLA - A 24 分子經由 10 % 醋酸處理使之溶
出。接著，藉由 3 kDa 截留濾膜 (cut-off filter)
(Millipore 公司) 僅將視為目的之胜肽萃取出來。將
含此胜肽之萃取液進行濃縮乾燥，以 0.1 % 甲酸作為溶劑
進行再溶解，作成樣品。

【 0126 】

(e) 溶出胜肽的序列分析

將在實驗例 3 (d) 所獲得之樣品，利用奈流
(nanoflow) HPLC (Kya Technologies
Corporation 公司) 進行分劃，對 MALDI 基質進行斑
點化後，利用質譜儀 (Applied Biosystems 公司；
MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF) 分析。在
質譜儀分析及胜肽序列分析中，使用了 Applied
Biosystems 4000 Series Explorer software
(ver. 3.5.3) 、 ProteinPilot 3.0 軟體 (Applied
Biosystems 公司) 、及 ipi.HUMAN FASTA 蛋白
質資料庫 (ver. 3.71) 。將獲得之胜肽序列之中，對
SW480-SP 特異性者之中，在實驗例 4 以後所後述之源
自 ASB4 基因之胜肽的序列及分析頻譜顯示於圖 4 。

【 0 1 2 7 】**(f) 考 察**

經由組合了藉由抗 H L A - A 2 4 抗體所實行的免疫沈澱與質譜儀分析的手法，可鑑定 H L A - A 2 4 結合胜肽。認為這些就是呈現在大腸癌細胞的表面的天然胜肽。又，藉由在 M P 分劃細胞中也使用同樣的手法進行分析，並比較兩者，而鑑定出具有以序列編號 3 表示之胺基酸序列的天然胜肽等，作為在 S P 分劃細胞被特異性地進行抗原呈現的天然胜肽。

【 0 1 2 8 】

實驗例 4：編碼出 H L A - A 2 4 結合天然胜肽之基因的表現

(a) S P 特異性的基因表現

在實驗例 3 (e) 中鑑定出複數的對 S P 分劃細胞特異性之 H L A - A 2 4 結合天然胜肽。認為此胜肽可分類成兩大群組。亦即，編碼出胜肽的基因是 S P 分劃細胞特異性表現的群組；與編碼出胜肽的基因雖然在 S P 分劃細胞、M P 分劃細胞都會表現，但由於蛋白質表現水準或胜肽加工處理的差異，在 M P 作為天然胜肽因為 H L A - A 2 4 而沒有受到抗原呈現的群組。

為了在此分類目的中分類出在上述被鑑定出來的天然胜肽，分別萃取了 S W 4 8 0 - S P 及 S W 4 8 0 - M P 的 m R N A，實行了透過 R T - P C R 的基因表現之探討後，作為 S P 分劃細胞特異性表現之基因之一，確認到 A S B 4 基因。基因表現分析的結果顯示於圖 5。關於 m R N A 萃取

與反轉錄是分別依照產品附加文件來使用 TRIzol (Invitrogen 公司) 及 SuperScript (註冊商標) III Reverse Transcriptase (Invitrogen 公司) 。 RT-PCR 中使用的引子及熱循環儀的條件顯示於下表。 RT-PCR 產物是使用 1.5% 瓊脂糖凝膠，以 100V 實行 25 分鐘的電泳。

【 0 1 2 9 】

[表 1]

表 1 : RT-PCR 中使用的引子

引子資訊	
G3PDH	fw : 5'-accacagtccatgccatcac-3' (序列編號 53) rv : 5'-tccaccaccctgttgctgta-3' (序列編號 54) (所預測之增幅產物的大小 : 450bp)
Asb4	fw : 5'-ctgtcttgtttggccatgtg-3' (序列編號 55) rv : 5'-gcgtctcctcatcttggttg-3' (序列編號 56) (所預測之增幅產物的大小 : 288bp)

[表 2]

表 2 : RT-PCR 的條件

DreamTaq	0.1 μ l
10 \times buffer	2 μ l
2mM dNTPs	2 μ l
引子fw	1.2 μ l
引子rv	1.2 μ l
模板	1 μ l
H ₂ O	12.5 μ l
合計	20 μ l

[表 3]

表 3：熱循環儀的條件

94°C	2 min	
94°C	15 sec	} 35 cycles
63°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	2 min	
4°C	∞	

【 0 1 3 0 】

(b) 在正常細胞的 A S B 4 基因表現

針對在實驗例 4 (a) 被確認的 A S B 4 ， 調查了在人類成人正常細胞中的表現。從 Clontech 公司取得源自人類成人正常組織之 m R N A 面板，使用此面板來實行 R T - P C R 。 m R N A 面板上，包含有源自心臟、腦、胎盤、肺、肝臟、骨骼肌、腎臟、胰臟、脾臟、胸腺、前列腺、睪丸、卵巢、小腸、大腸、週邊血液單核細胞的各成人正常細胞及組織的 m R N A 。

首先，使用 SuperScript (註冊商標) III 反轉錄酵素 (Invitrogen 公司製造) ， 依照套組的實驗規程由 m R N A 合成了 c D N A 。 對經合成的 c D N A ， 使用順向 (F w) 引子及反向 (R v) 引子 (表 1) ， 藉由 R T - P C R 將 A S B 4 的 c D N A 進行了增幅。且作為控制組，以同樣的方法將 G A P D H 的 c D N A 進行了增幅。P C R 條件顯示於表 2 、 3 。 對經增幅的增幅物使用 1.5 % 瓊脂糖凝膠，以 100 V 實行 25 分鐘的電泳。結果顯示於圖 6 。

【 0 1 3 1 】

(c) 癌細胞株中的ASB4基因表現

藉由與實驗例4(b)同樣的手法來確認大腸癌細胞株3種類(SW480、SW620、HTC116)、肺癌細胞株4種類(A549、LHK2、LK79、86-9)、腎細胞癌2種(Caki 1、ACHN)、乳癌細胞株2種類(MDAMB468、MCF7)、卵巢癌2種(ES2、Tov21G)、子宮頸癌細胞株1種類(HeLa)、膀胱癌細胞株1種類(UMUC3)、骨肉瘤1種類(U205)、口腔癌細胞株2種類(OSC70、HSC2)中的ASB4基因表現。結果顯示於圖7。

【0132】

(d) 考察

經確認到ASB4蛋白的基因表現(圖5)，該ASB4蛋白是在大腸癌細胞的幹細胞也就是SW480SP受到特異性地HLA-A24胜肽呈現。同基因在死亡者數是日本國內及世界上較多的大腸癌以及肺癌這種上皮性惡性腫瘤細胞株中確認到表現，而另一方面，在各種臟器中的正常細胞中看不到表現(圖6及圖7)。亦即，ASB4基因及為其產物的胜肽，認為作為癌症的治療標的是具有理想的資質。

【0133】

實驗例5：胜肽結合分析

驗證了在質譜儀分析獲得之源自ASB4蛋白的胜肽(IV9：序列編號3)的HLA-A24結合能力。首先將

T2-A24 細胞在 24 °C 培養一晚，於隔日，在如圖 8 所示之濃度範圍（0.3 μ M、1 μ M、3.3 μ M 及 10 μ M）將胜肽進行沖擊並維持相同溫度 3 小時，接著在 37 °C 培養 2.5 小時。使用 HIV₅₈₄₋₅₉₄ 胜肽（胺基酸序列：RYLRDQQLLGI；序列編號 51）作為正控制，使用 GK12 胜肽（胺基酸序列：GYISPYFINTSK；序列編號 52）作為負控制。進行離心分離（15000 rpm，5 分鐘）移除上清液，將單離出來的細胞成分用 HLA-A24 抗體（C7709A2.6）進行處理（4 °C，培養 1 小時）。之後用 PBS 洗淨，進行離心分離除去上清液後，用二次抗體（Goat anti-Mouse IgG，FITC）進行處理（4 °C，培養 30 分鐘）。之後，將細胞用 PBS 洗淨，添加 1% 多聚甲醛之磷酸緩衝液，將細胞固定住。使用流式細胞分析儀（FACScan）測量 FITC 螢光強度，將表現於細胞表面的合成胜肽與 HLA-A24 的複合體的量進行定量。將結果顯示於圖 8。如同圖 8 所示，可知源自 ASB4 蛋白的胜肽 IV9 具有對 HLA-A24 的結合活性。

【0134】

實驗例 6：細胞毒性 T 細胞（CTL）的誘導

（a）人類週邊血液單核細胞（PBMC）的分離

將獲得知情同意的 HLA-A24 陽性大腸癌患者或 HLA-A24 陽性正常者的週邊血液以添加肝素的 50 mL 注射器進行採血。將全血在經添加了 Lymphoprep（Nycomed 公司）13 mL 的 50 mL 管（Falcon 公司）

中多層化，以 2000 rpm 離心分離 30 分鐘。將沈澱在 Lymphoprep 層上的 PBMC 層用移液器回收，並用 PBS 洗淨 3 次，作為人類 PBMC。

【0135】

(b) CD8 陽性細胞 (CD8⁺) 及 CD8 陰性細胞 (CD8⁻) 的分離

將如同前述經分離之 PBMC 懸浮在 10 mL 的 AIM-V 培養液 (Life Technologies 公司) 中後，在 10 cm 塑膠培養皿於 37°C 培養約 2 小時。將 10 cm 培養皿緩緩地振盪，並將浮游細胞與 AIM-V 培養液一起回收，在 15 mL 管以 1500 rpm 離心分離 5 分鐘。對獲得之離心沈澱物 (pellet)，懸浮於 160 μ L 的經添加 2 mM 的 EDTA 之 0.1% BSA 補充 PBS，並添加 40 μ L 的 CD8 微珠 (Miltenyi Biotec 公司)，混和後，於 4°C 培養 15 分鐘，並利用經添加 2 mM 的 EDTA 之 0.1% BSA 補充 PBS 5 mL 洗淨，以 1500 rpm 離心分離 5 分鐘。對離心沈澱物，添加 1 mL 的經添加 2 mM 的 EDTA 之 0.1% BSA 補充 PBS 並混和，且添加到裝有磁石的管柱中，藉由經添加 2 mM 的 EDTA 之 0.1% BSA 補充 PBS 洗淨 5 次後，將管柱從磁石卸載下來回收 CD8⁺ 細胞。將未附著於管柱上的細胞當作 CD8⁻ 細胞。

【0136】

(c) 藉由合成胜肽實行的 CD8⁺ 細胞刺激

將 $CD8^-$ 細胞及 $CD8^+$ 細胞，培養在添加 10% 人類 AB 血清 (HS) 的 AIM-V 培養液。對一部分的 $CD8^-$ 細胞，添加 1 mg/mL 的植物血球凝集素 (PHA) (WAKO chemicals 公司) 及 100 U/mL 的介白素 2 (IL-2) (武田藥品工業公司)，培養 7 日，製作出 PHA-blast 細胞。對 PHA-blast 細胞，添加 20 μ g/mL 的在實驗例 3e) 受到鑑定的具有源自 ASB4 的胺基酸序列之合成胜肽 IV9 (序列編號 3)，於室溫培養 1 小時。將胜肽沖擊 PHA-blast 細胞利用放射線照射機 (Softex 公司) 照射 100 Gy，添加 10 mL 的 PBS 後，以 1500 rpm 離心分離 5 分鐘。將離心沈澱物懸浮在 1 mL 的經添加 10% HS 之 AIM-V 中，並計算細胞濃度。將 4×10^5 個的 PHA-blast 細胞，添加到 2×10^6 個的 $CD8^+$ 細胞中，在 1 mL 的經添加 10% HS 之 AIM-V 中於 37 °C 培養 1 週。於第 7 日，同樣地以 100 Gy 的放射線照射經胜肽沖擊之 PHA-blast 細胞，添加到 $CD8^+$ 細胞中。第 8 日，添加 20 U/mL 的 IL-2 到 $CD8^+$ 細胞。在第 14 日進行相同之藉由 PHA-blast 細胞所實行的刺激。

【0137】

實驗例 7：干擾素 (IFN) - γ ELISPOT 分析法

(a) ELISPOT 盤的製作

實驗是使用 Human IFN γ ELISPOT set (BD 公司) 來實行。在 ELISPOT 盤中，將經稀釋 200 倍的抗 IFN γ 抗體於 4 °C 靜置一晚進行固著 (coating)。以

10% FCS 補充 RPMI (Sigma-Aldrich 公司) 將該盤於室溫培養 2 小時，並進行阻斷 (blocking)，作成 ELISPOT 盤。

【0138】

(b) 細胞培養

以 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度將各胜肽於室溫對 T2-A24 細胞 (由愛知縣癌症中心的葛島老師提供) 沖擊 1 小時，該 T2-A24 細胞是在類人類淋巴母細胞 T2 細胞中導入 HLA-A2402 基因並使之表現的細胞株。胜肽沖擊群分為 [1] 無胜肽沖擊、[2] HIV 胜肽沖擊、[3] ASB4 胜肽沖擊之 3 群。胜肽沖擊後添加 PBS，以 1500rpm 離心分離 5 分鐘。將細胞離心沈澱物以成為 5×10^5 個 / mL 的方式懸浮，並在 ELISPOT 盤中在各孔播種 5×10^4 個。將 CTL 在各孔播種 5×10^4 個，於 37°C 培養一晚。

【0139】

(c) 斑點的檢測

從經培養一晚之 ELISPOT 盤去除培養液及細胞後，用 Milli Q 水洗淨 2 次，用 wash buffer 洗淨 3 次。在各孔中添加經稀釋 250 倍的生物素化檢測抗體，於室溫培養 2 小時。用 Wash buffer 洗淨 3 次後，將經稀釋 100 倍的 HRP 標識鏈黴卵白素添加到各孔中，於室溫培養 1 小時。用 Wash buffer 洗淨 3 次及用 PBS 洗淨 2 次後，將發色試劑添加到各孔中，於室溫進行發色反應 15 ~ 30 分鐘。確認形成充分的可視斑點後，用 Milli Q 水

洗淨，終止反應。將硝化纖維素膜乾燥後，用 K S ELISPOT (Z E I S S 公司) 檢測、並攝影。如在圖 9 中所見，在 A S B 4 胜肽沖擊群中檢測到 I F N γ 斑點。

【 0 1 4 0 】

實驗例 8：細胞毒殺試驗

將 T 2 - A 2 4 細胞、 S W 4 8 0 - S P、 S W 4 8 0 - M P 及 H L A - c l a s s I 缺失的白血病細胞 K 5 6 2 (由 A T C C 取得) 以 1×10^6 個 / m L 的細胞濃度，懸浮於 1 0 % F B S 補充 R P M I 中。用 1 0 m L 的 1 0 % F B S 補充 R P M I 洗淨 3 次。

對 T 2 - A 2 4 細胞，以 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 的濃度於室溫沖擊 I V 9 胜肽及作為 T 2 - A 2 4 細胞結合正控制而沖擊 H I V _{5 8 4 - 5 9 4} 胜肽 1 小時。作為負控制，是使用無胜肽沖擊之群組。T 2 - A 2 4 細胞的實驗群，分為〔 1 〕無胜肽沖擊、〔 2 〕 H I V _{5 8 4 - 5 9 4} 胜肽沖擊、〔 3 〕 I V 9 胜肽沖擊之 3 群。又，對 K 5 6 2 也以同樣的條件沖擊 I V 9 胜肽。 S W 4 8 0 - S P 及 S W 4 8 0 - M P 的兩群，是使用無胜肽沖擊。胜肽沖擊後，用 P B S 洗淨 2 次。將各群細胞以 1×10^5 個 / 1 0 0 μL 播種到各孔中。

將效應細胞 (C T L) 以效靶比 (E / T r a t i o) 為 1、3、9 的方式，將各個數量的 C T L 播種到各孔中。播種效應細胞 (C T L) 作為自發性釋出 (s p o n t a n e o u s r e l e a s e) 之孔。在最大釋出 (m a x i m u m r e l e a s e) 之孔，對靶細胞是以最終濃度成為 2 % 的方式，添加經添加 4 % 的 N P - 4 0 之 P B S。於 3 7 $^{\circ}\text{C}$ 培養 6 小時後，離心並將

上清液的 $100 \mu\text{l}$ 移到新盤中，在各孔中加入 LDH Cytotoxicity Detection Kit 反應液 (Takara Bio 股份有限公司) $100 \mu\text{l}$ 。10 分鐘後，用 Terascan 測定各孔的螢光強度。細胞毒殺活性是以下述算式來計算。

$$\text{細胞毒殺活性} = (\text{實驗群的釋出量} - \text{實驗群的自發性釋出量}) / (\text{實驗群的最大釋出量} - \text{實驗群的自發性釋出量}) \times 100$$

如圖 10 所示，與 [1] 無胜肽沖擊群、[2] HIV 胜肽沖擊群、IV9 胜肽沖擊 K562 群比較後，CTL 顯示出對 [3] IV9 胜肽沖擊群有較高的細胞毒殺活性。這暗示出，CTL 顯示對 ASB4 胜肽有特異性的細胞毒殺活性。又，SW480-SP 群即使無胜肽沖擊也顯示出與 [3] IV9 胜肽沖擊群同等的細胞毒殺活性，在另一方面，SW480-MP 群則只顯示出與 [1] 無胜肽沖擊群及 [2] HIV 胜肽沖擊群相同程度的細胞毒殺活性。這暗示出，SW480 細胞株僅在 SP 分割細胞中將 IV9 胜肽在細胞表面上進行抗原呈現。

【0141】

實驗例 9：具有 HLA-A*02:01 及 HLA-A*24:02 結合模體的源自 ASB4 之胜肽

使用 MHC 與胜肽的結合預測程式亦即 BIMAS

(http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)、SYFPEITHI

(<http://www.syfpeithi.de/>) 及 IEDB (MHC-I

processing predictions ;

<http://www.iedb.org/>) 等，並萃取出預測會與 HLA-A*02:01 及 / 或 HLA-A*24:02 結合的源自 ASB4 之胜肽 (以序列編號 4 ~ 46 表示之胜肽)。將這些胜肽以 Fmoc 法進行化學合成。經合成之胜肽顯示於以下之表 4 中。Start 是表示，經合成之胜肽的 N 端胺基酸在 ASB4 (序列編號 2) 中的胺基酸位置，End 是表示經合成之胜肽的 C 端胺基酸在 ASB4 (序列編號 2) 中的胺基酸位置。Length 是表示合成之胜肽的胺基酸數。

【 0 1 4 2 】

[表 4]

表 4：經合成之胜肽

序列編號	名稱	Start	End	Length	胜肽序列
4	As80_9	80	88	9	HLSVLFQHV
5	As82_10	82	91	10	SVLFGHVECL
6	As124_10	124	133	10	KILCDRGAKL
7	As125_9	125	133	9	ILCDRGAKL
8	As184_12	184	195	12	HFGLSELVAFYV
9	As135_10	135	144	10	CYSLSGHTAL
10	As83_10	83	92	10	VLFQHVVECLL
11	As87_9	87	95	9	HVECLLVLL
12	As307_10	307	316	10	CYQLLNHGA
13	As301_11	301	311	11	AAQPEICYQLL
14	As405_9	405	413	9	PLLSPLSL
15	As35_10	35	44	10	AILIQRQIDV
16	As92_10	92	101	10	LVLLDHNATI
17	As152_9	152	160	9	SILCAKQLV
18	As186_10	186	195	10	GLSELVAFYV
19	As236_10	236	245	10	RMLLDYKAEV
20	As265_10	265	274	10	HVLMHMMLEA
21	As280_10	280	289	10	LMDINGCAAI
22	As383_10_5L	383	392	10	TLMHLSRCAI
23	As416_10	416	425	10	YLLLEPEGII
24	As76_10	76	85	10	ATGLHLSVLF
25	As192_10	192	201	10	AFYVEHGAIF
26	As211_10	211	220	10	PLAIAAYWAL
27	As289_10	289	298	10	IQYVLKVTSV
28	As318_10	318	327	10	RIYPPQFHKV
3	IV9	319	327	9	IYPPQFHKV
29	As365_12	365	376	12	KYWDFYHSLFTV
30	As365_9	365	373	9	KYWDFYHSL
31	As15_11	15	25	11	KLVKRNFLAAL
32	As29_9	29	37	9	DFGKLLKAIL
33	As41_10	41	50	10	QIDVDTVFEV
34	As48_10	48	57	10	FEVEDENMVL
35	As63_9	63	71	9	GYWLPSYKL
36	As70_10	70	79	10	KLKSSWATGL
37	As145_10	145	154	10	HFCTTPSSIL
38	As157_10	157	166	10	KQLVWRGANV
39	As271_10	271	280	10	MLEAGAEANL
40	As290_9	290	298	9	QYVLKVTSV
41	As310_10	310	319	10	LLLNHGAARI
42	As311_9	311	319	9	LLNHGAARI
43	As340_9	340	348	9	VVNAYEHI
44	As368_9	368	376	9	DFYHSLFTV
45	As403_9	403	411	9	AIPLLSLPL
46	As408_10	408	417	10	SLPLSLKKYL

【 0 1 4 3 】

實驗例 10：源自 ASB4 之胜肽的 HLA-A*02:01 或 HLA-A*24:02 結合性評估

對源自 ASB4 之胜肽的各 HLA 分子的結合性評估是藉由 MHC 第 I 型表現安定化試驗來實施。在該試驗是利用了類人類淋巴母細胞株 (lymphoblastoid cell line) 亦即 T2-A24 細胞。T2 細胞欠缺了抗原加工相關性傳遞蛋白 (TAP; transporter associated with antigen processing)，而該蛋白涉及到胜肽從細胞質往內質網的運輸。已知 MHC 第 I 型分子 (HLA-A*02:01 及 HLA-A*24:02) 在胜肽未結合的狀態 (empty MHC class I) 下，結構並不安定。通常，T2 細胞只能在細胞表面表現低水準的 empty MHC class I 分子。但是，若添加了可結合到 MHC 第 I 型分子的胜肽，則 empty MHC class I 分子與該胜肽結合而能夠在細胞表面安定化存在。因此，細胞表面 MHC 第 I 型表現水準變成是取決於胜肽的 MHC 第 I 型結合親和性。

【0144】 T2-A24 細胞在 37°C、5% CO₂ 下進行繼代培養。胜肽是以 100 μg/mL 的濃度，並分別使用源自 ASB4 之胜肽 (表 4 中記載的胜肽)、使用 Melan A A27L 胜肽 (胺基酸序列: ELAGIGILTV; 序列編號 47) 作為 HLA-A02 正控制、使用 HIV₅₈₄₋₅₉₂ 胜肽 (胺基酸序列: RYL RDQQLL; 序列編號 48) 作為 HLA-A24 正控制、使用 MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ 胜肽 (胺基酸序列: EADPTGHSY; 序列編號 49) 作為 HLA-A02 負控制、使用 VSV₅₂₋₅₉ 胜肽 (胺基酸序列:

R G Y V Y Q G L ; 序 列 編 號 5 0) 作 為 H L A - A 2 4 負 控 制 來 評 估 結 合 性 。 這 些 胜 肽 是 溶 解 於 D M S O 中 ， 接 著 ， 用 R P M I 1 6 0 培 養 基 稀 釋 到 2 0 0 倍 。 將 細 胞 懸 浮 液 與 胜 肽 溶 液 混 合 ， 在 5 % C O ₂ 、 2 6 ° C 的 條 件 下 培 養 1 6 ~ 1 8 小 時 。 將 溫 度 設 在 3 7 ° C ， 再 進 行 共 培 養 3 小 時 後 ， 離 心 分 離 並 去 除 上 清 液 ， 將 細 胞 單 離 出 來 。 將 單 離 出 來 的 細 胞 ， 用 含 3 % F B S 的 P B S 洗 淨 ， 加 入 經 以 F I T C 進 行 螢 光 標 識 的 抗 H L A - A 0 2 抗 體 (c l o n e : B B 7 . 2 ; 醫 學 生 物 學 研 究 所) 或 抗 H L A - A 2 4 抗 體 (c l o n e : 1 7 A 1 0 ; 醫 學 生 物 學 研 究 所) ， 於 室 溫 靜 置 3 0 分 鐘 。 之 後 ， 藉 由 將 細 胞 用 含 3 % F B S 的 P B S 洗 淨 ， 並 加 入 4 % 多 聚 甲 醛 磷 酸 緩 衝 液 ， 於 室 溫 靜 置 1 0 分 鐘 來 固 定 細 胞 。 經 固 定 之 細 胞 ， 利 用 流 式 細 胞 分 析 儀 (F A C S c a n) 測 量 出 F I T C 螢 光 強 度 。 算 出 平 均 螢 光 強 度 (m e a n f l u o r e s c e n c e i n t e n s i t y ; M F I) 的 溶 劑 比 。

【 0 1 4 5 】 H L A 結 合 試 驗 的 結 果 顯 示 於 表 5 。 如 同 表 5 所 示 ， 對 於 以 序 列 編 號 4 ~ 2 3 表 示 之 胜 肽 的 H L A - A * 0 2 : 0 1 的 M F I 顯 示 在 1 . 5 以 上 ， 對 於 以 序 列 編 號 3 ~ 1 4 及 2 4 ~ 3 0 表 示 之 胜 肽 的 H L A - A * 2 4 : 0 2 的 M F I 顯 示 在 1 . 5 以 上 ， 對 於 以 序 列 編 號 4 ~ 1 4 表 示 之 胜 肽 的 H L A - A * 0 2 : 0 1 及 H L A - A * 2 4 : 0 2 雙 方 的 M F I 顯 示 在 1 . 5 以 上 。

【 0 1 4 6 】

[表 5]

表 5 : HLA 結合試驗的結果

序列 編號	HLA-A*02:01		HLA-A*24:02		MFI	
	陽性對照	陰性對照	陽性對照	陰性對照	HLA-A02	HLA-A24
4	3.3	1.0	3.3	1.0	1.6	2.1
5	3.3	1.0	3.3	1.0	3.3	2.7
6	3.3	1.0	3.3	1.0	1.6	2.2
7	3.5	1.0	2.6	1.0	1.9	1.8
8	3.9	1.0	3.3	1.0	3.1	3.2
9	3.5	1.0	2.6	1.0	1.6	2.4
10	3.5	1.0	2.6	1.0	3.6	2.8
11	3.3	1.0	3.3	1.0	1.5	1.6
12	3.3	1.0	3.3	1.0	2.5	1.9
13	3.3	1.0	3.3	1.0	2.6	2.0
14	3.3	1.0	3.3	1.0	2.2	2.8
15	3.3	1.0	3.3	1.0	3.4	1.1
16	3.3	1.0	3.3	1.0	2.6	1.1
17	3.3	1.0	3.3	1.0	1.8	1.3
18	3.3	1.0	3.3	1.0	2.6	1.1
19	3.3	1.0	3.3	1.0	3.3	1.0
20	3.3	1.0	3.3	1.0	2.0	1.3
21	3.3	1.0	3.3	1.0	3.1	1.2
22	3.5	1.0	2.6	1.0	2.4	1.0
23	3.3	1.0	3.3	1.0	2.8	1.4
24	3.3	1.0	2.8	1.0	0.9	2.1
25	3.5	1.0	2.6	1.0	1.1	2.2
26	3.3	1.0	3.3	1.0	1.1	2.1
27	3.3	1.0	2.8	1.0	1.2	1.5
28	3.3	1.0	3.3	1.0	1.4	3.6
3	3.3	1.0	2.8	1.0	0.9	3.3
29	3.3	1.0	2.8	1.0	1.0	2.4
30	3.3	1.0	3.3	1.0	1.1	2.5
31	3.3	1.0	3.3	1.0	1.0	1.0
32	3.5	1.0	2.6	1.0	1.0	1.0
33	3.3	1.0	3.3	1.0	1.2	1.1
34	3.3	1.0	3.3	1.0	1.0	1.4
35	3.5	1.0	2.6	1.0	1.1	1.2
36	3.3	1.0	3.3	1.0	1.1	1.0
37	3.5	1.0	2.6	1.0	1.0	1.2
38	3.3	1.0	3.3	1.0	1.2	1.0
39	3.3	1.0	2.8	1.0	1.0	1.2
40	3.5	1.0	2.6	1.0	1.0	1.3
41	3.3	1.0	3.3	1.0	1.3	1.2
42	3.5	1.0	2.6	1.0	0.9	0.9
43	3.5	1.0	2.6	1.0	0.9	1.0
44	3.5	1.0	2.6	1.0	1.0	1.1
45	3.3	1.0	2.8	1.0	0.9	1.1
46	3.3	1.0	3.3	1.0	1.0	1.0

【 0 1 4 7 】

實驗例 11：使用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠及 HLA-A*24:02 基因導入小鼠之活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導能力的評估

針對在實驗例 10 中，對於 HLA-A*02:01 及 / 或 HLA-A*24:02 的 MFI 在 1.5 以上的源自 ASB4 之胜肽，藉由使用了 HLA-A*02:01 基因導入小鼠及 / 或 HLA-A*24:02 基因導入小鼠之活體中 (in vivo) 的 CTL 誘導試驗來評估其 CTL 誘導能力。

HLA-A*02:01 基因導入小鼠 (C57BL/6CrHLA-A2.1DR1)，是欠缺了小鼠的 MHC，而會表現人類的 MHC 也就是 HLA-A*02:01 及 HLA-DRB1*01:01 的小鼠，藉由使用該小鼠，可選擇出在人類能誘導出 CTL 的胜肽。又，HLA-A*24:02 基因導入小鼠是會表現人類的 MHC 也就是 HLA-A*24:02 的小鼠，藉由使用該小鼠，可選擇出在人類能誘導出 CTL 的胜肽。於是，各胜肽是否具有 CTL 誘導活性，是以藉由對上述小鼠投予胜肽，是否有誘導出能對投予胜肽反應的 T 細胞來判斷。

【0148】具體而言，是如同下述來實行。首先，用二甲基亞砷將胜肽溶解為 80 mg/mL 後用注射用水稀釋，與等量的弗氏不完全佐劑 (ISA51VG) 混合，使之乳化。經乳化的胜肽，在小鼠的尾根部皮內以 250 μ g/處 的用量投予 2 處。在 1 週後，用 CO₂ 氣體將小鼠安樂死後摘出脾臟，製備成脾細胞。在 IFN γ 生成的測定中，是

使用 IFN γ ELISPOT 分析套組 (Becton, Dickinson 公司製造)。在脾細胞製備的前一天，用抗 IFN γ 抗體處理 ELISPOT 盤，在當天用含 10% FBS 之 RPMI 1640 培養基進行阻斷。將製備好的脾細胞以 $0.25 \sim 1.0 \times 10^6$ 個 / 孔，播種到經阻斷的 ELISPOT 盤中。將經投予的源自 ASB4 之胜肽，用 DMSO 溶解為 40 mg / mL，再用 10% RPMI 1640 培養基稀釋成 20 μ g / mL。將經稀釋的胜肽，以 50 μ L / 孔添加到脾細胞中，該脾細胞是源自經投予該胜肽的動物。將添加了胜肽的脾細胞，藉由在 16 ~ 18 小時、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培養，給予在試管中 (*in vitro*) 的胜肽再刺激。培養後去除上清液，將 ELISPOT 盤依照附加的實驗規程使之發色。經發色的斑點數，是藉由 KS-ELISPOT 來測定。

【0149】 IFN γ ELISPOT 分析法的結果顯示於圖 11 ~ 38。

本試驗的結果，藉由在源自 HLA-A * 02 : 01 基因導入小鼠的脾細胞中，確認到有產生胜肽特異性的 IFN γ ，可知以序列編號 4 ~ 12 及 15 ~ 23 表示之源自 ASB4 的各胜肽具有 CTL 誘導能力。又，藉由在源自 HLA-A * 24 : 02 基因導入小鼠的脾細胞中，確認到有產生胜肽特異性的 IFN γ ，可知以序列編號 4 ~ 9、13、14、25、26 及 28 ~ 30 表示之源自 ASB4 的胜肽具有 CTL 誘導能力。因此，以序列編號 4 ~ 9 表示之源自

ASB4 的各胜肽，顯示出在 HLA-A02 型及 HLA-A24 型雙方的對象中具有 CTL 誘導能力。

【0150】

實驗例 12：使用了人類週邊血液單核細胞的 CTL 誘導能力的評估

針對在實驗例 11 中，確認到 HLA-A02 型及 HLA-A24 型雙方的對象中具有 CTL 誘導能力的以序列編號 4~9 表示之 6 種類的胜肽，評估藉由該胜肽的刺激，能否從源自正常人之週邊血液單核細胞誘導出胜肽特異性 T 細胞。

具體而言，將源自 HLA-A*02:01 陽性或 HLA-A*24:02 陽性之正常人的週邊血液單核細胞 (Cellular Technology Limited 公司製造) 用含有 10% 源自人類的血清之 AIM-V 培養基懸浮後，在 96 孔 U 底盤的各孔中播種約 1×10^5 個，在 37°C、5% CO₂ 下培養。此時，以 100 U/mL 添加人類 IL-2 及以 20 μg/mL 添加胜肽。每 3 日或 4 日更換培養基，並在約 2 週後實施 IFN γ ELISPOT 分析法。在分析的前一天，用抗 IFN γ 抗體處理 ELISPOT 盤，在當天用含 10% 源自胎牛的血清之 RPMI1640 培養基於室溫約 2 小時進行阻斷。將培養中的人類週邊血液單核細胞用含有 10% 源自人類的血清之 AIM-V 培養基洗淨，播種到經阻斷之 ELISPOT 盤的各孔中。在 37°C、5% CO₂ 下培養，16~18 小時後去除上清液，將 ELISPOT 盤

依照附加的實驗規程使之發色。經發色的斑點數，是用 Cellular Technology Limited 公司製造的 ELISPOT 分析儀來測定。

利用 HLA-A*02:01 陽性 PBMC，針對序列編號 4、5、6、8 及 9 進行評估的結果顯示於圖 39、40、41、42 及 43；利用 HLA-A*24:02 陽性 PBMC，針對序列編號 5 及 8 進行評估的結果顯示於圖 44 及 45。縱軸是表示在各孔被識別的斑點數，橫軸是表示陽性的孔編號。又，黑棒是表示在胜肽刺激條件下所檢測出的斑點數，白棒是表示在胜肽非沖擊條件下所檢測出的斑點（控制組）數。亦即，黑棒與白棒的差異表示是胜肽特異性的斑點。

本試驗的結果，明白了以序列編號 4、5、6、8 及 9 表示之胜肽，從源自 HLA-A*02:01 陽性或 HLA-A*24:02 陽性的正常人之週邊血液單核細胞，誘導出該等胜肽特異性的 CTL。

又，以序列編號 5 及 8 表示之源自 ASB4 的各胜肽，顯示出在 HLA-A02 型及 HLA-A24 型雙方的對象中具有 CTL 誘導能力。

[產業利用性]

【0151】本發明，由於鑑定出在癌幹細胞中實際受到抗原呈現的源自 ASB4 之天然胜肽，且藉由胜肽疫苗所誘導出的 CTL 確實會殺傷癌細胞，有助於開發出效果高的癌疫苗。再者，由於從被鑑定出的癌幹細胞特異性天

然胜肽，能夠特定出在癌幹細胞中 A S B 4 會特異性地表現，故可將 A S B 4 作為標記來特定出癌幹細胞。並且，源自同基因的天然抗原胜肽，有益於作為即使少量也具有莫大效果之癌症的預防及 / 或治療劑。又，藉由本發明，可提供具有 CTL 誘導活性的源自 A S B 4 的腫瘤抗原胜肽等。本發明之胜肽，有益於作為癌症的預防及 / 或治療劑。

● **【符號說明】**

無

【生物材料寄存】

【 0 1 5 2 】 國內寄存資訊 (請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

【 0 1 5 3 】 國外寄存資訊 (請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

● 無

【序列表】

序列表

<110> 北海道公立大學法人札幌醫科大學 (Sapporo Medical University)
日商大日本住友製藥股份有限公司 (Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.)

<120> 胜肽

<150> JP 2014-249169
<151> 2014-12-09

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1281
<212> DNA
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1
atggacggca ccaactgcccc tgtcactaaa tctggagctg ccaagttagt taagagaaat 60
ttccttgagg cgctaaagtc caatgacttc ggaaaattga aggctatddd gatccaaagg 120
caaatagatg tggacactgt ttttgaagtc gaagatgaga atatggtdtt ggcatcttat 180
aaacaaggtt actggttgcc tagctataaa ttgaagtctt cctggggccac aggcctccat 240
ctctctgtct tgtdttggcca tgtggaatgt cttctggtgc tactggacca caatgctaca 300
atcaactgta gacccaatgg gaaaaccctt cttcacgtgg cttgtgaaat ggccaatgtg 360
gatttgtgta agatcctctg tgatcgtggg gcaaagctca attgctactc ctttaagtga 420
cacacagctt tgcacttdttg tacaactcca agttccattc tctgtgcca gcaattggtt 480
tggagagggg cgaatgtgaa catgaagacc aacaaccaag atgaggagac gcccttgcac 540
acggctgccc acttccgctt ttcggagctg gtggccttct acgtggaaca cggggccata 600
gtggacagcg tgaatgcca catggagacc cccctggcca tcgccgccta ctgggcccctc 660
cgctttaagg agcaggagta cagcacggag caccacctgg tctgccgcat gctgcttgac 720
taciaagccg aagtcaatgc ccgagatgac gacttdaaat ctcccctcca caaggcagcc 780
tggaaactgtg accacgtgct catgcacatg atgctggaag ctggcgccga agccaatctc 840
atggatatca acggctgtgc tgccatccag tacgtgctga aggtcacctc cgtgcccctt 900
gctgccagc ctgagatctg ctaccagctc ctgtdgaacc atggggctgc ccgaatatac 960
cctccacagt tcataaagg gatacaggcc tgccattctt gtccataaagc aattgaagtt 1020
gtagtcaatg cctatgaaca catcagatgg aacacaaaag ggagaagagc tatccccgat 1080
gatgacttgg agaaatactg ggattdttac cactctctct ttactgtgtg ctgtaactct 1140
ccaaggactc tcatgcactt atcgagatgt gccattagaa gaacattaca caacagatgc 1200
catagagcaa ttccttdtct ttcctccca ttgtcattga aaaagtactt gcttdtagag 1260
ccagagggaa ttattdatta a 1281

<210> 2

<211> 426
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Asp Gly Thr Thr Ala Pro Val Thr Lys Ser Gly Ala Ala Lys Leu
 1 5 10 15

Val Lys Arg Asn Phe Leu Glu Ala Leu Lys Ser Asn Asp Phe Gly Lys
 20 25 30

Leu Lys Ala Ile Leu Ile Gln Arg Gln Ile Asp Val Asp Thr Val Phe
 35 40 45

Glu Val Glu Asp Glu Asn Met Val Leu Ala Ser Tyr Lys Gln Gly Tyr
 50 55 60

Trp Leu Pro Ser Tyr Lys Leu Lys Ser Ser Trp Ala Thr Gly Leu His
 65 70 75 80

Leu Ser Val Leu Phe Gly His Val Glu Cys Leu Leu Val Leu Leu Asp
 85 90 95

His Asn Ala Thr Ile Asn Cys Arg Pro Asn Gly Lys Thr Pro Leu His
 100 105 110

Val Ala Cys Glu Met Ala Asn Val Asp Cys Val Lys Ile Leu Cys Asp
 115 120 125

Arg Gly Ala Lys Leu Asn Cys Tyr Ser Leu Ser Gly His Thr Ala Leu
 130 135 140

His Phe Cys Thr Thr Pro Ser Ser Ile Leu Cys Ala Lys Gln Leu Val
 145 150 155 160

Trp Arg Gly Ala Asn Val Asn Met Lys Thr Asn Asn Gln Asp Glu Glu
 165 170 175

Thr Pro Leu His Thr Ala Ala His Phe Gly Leu Ser Glu Leu Val Ala
 180 185 190

Phe Tyr Val Glu His Gly Ala Ile Val Asp Ser Val Asn Ala His Met
 195 200 205

Glu Thr Pro Leu Ala Ile Ala Ala Tyr Trp Ala Leu Arg Phe Lys Glu
 210 215 220

Gln Glu Tyr Ser Thr Glu His His Leu Val Cys Arg Met Leu Leu Asp
 225 230 235 240

Tyr Lys Ala Glu Val Asn Ala Arg Asp Asp Asp Phe Lys Ser Pro Leu
 245 250 255

His Lys Ala Ala Trp Asn Cys Asp His Val Leu Met His Met Met Leu

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 5

Ser Val Leu Phe Gly His Val Glu Cys Leu
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 6

Lys Ile Leu Cys Asp Arg Gly Ala Lys Leu
 1 5 10

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

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 7

Ile Leu Cys Asp Arg Gly Ala Lys Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 8

His Phe Gly Leu Ser Glu Leu Val Ala Phe Tyr Val
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 9

Cys Tyr Ser Leu Ser Gly His Thr Ala Leu
 1 5 10

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

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 10

Val Leu Phe Gly His Val Glu Cys Leu Leu
 1 5 10

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 11

His Val Glu Cys Leu Leu Val Leu Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 12

Cys Tyr Gln Leu Leu Leu Asn His Gly Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 13

Ala Ala Gln Pro Glu Ile Cys Tyr Gln Leu Leu
 1 5 10

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 14

Pro Leu Leu Ser Leu Pro Leu Ser Leu

1 5

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 15

Ala Ile Leu Ile Gln Arg Gln Ile Asp Val
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 16

Leu Val Leu Leu Asp His Asn Ala Thr Ile
 1 5 10

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

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 17

Ser Ile Leu Cys Ala Lys Gln Leu Val
 1 5

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 18

Gly Leu Ser Glu Leu Val Ala Phe Tyr Val
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

<400> 19

Arg Met Leu Leu Asp Tyr Lys Ala Glu Val
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 20

His Val Leu Met His Met Met Leu Glu Ala
1 5 10

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

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 21

Leu Met Asp Ile Asn Gly Cys Ala Ala Ile
1 5 10

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

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 22

Thr Leu Met His Leu Ser Arg Cys Ala Ile
1 5 10

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

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 23

Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Glu Gly Ile Ile
1 5 10

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

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 24

Ala Thr Gly Leu His Leu Ser Val Leu Phe
1 5 10

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

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 25

Ala Phe Tyr Val Glu His Gly Ala Ile Phe
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 26

Pro Leu Ala Ile Ala Ala Tyr Trp Ala Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 27

Ile Gln Tyr Val Leu Lys Val Thr Ser Val
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 28

Arg Ile Tyr Pro Pro Gln Phe His Lys Val
1 5 10

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 29

Lys Tyr Trp Asp Phe Tyr His Ser Leu Phe Thr Val
1 5 10

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 30

Lys Tyr Trp Asp Phe Tyr His Ser Leu
1 5

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 31

Lys Leu Val Lys Arg Asn Phe Leu Glu Ala Leu
1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 32

Asp Phe Gly Lys Leu Lys Ala Ile Leu
1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 33

Gln Ile Asp Val Asp Thr Val Phe Glu Val
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 34

Phe Glu Val Glu Asp Glu Asn Met Val Leu
1 5 10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 35

Gly Tyr Trp Leu Pro Ser Tyr Lys Leu
1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 36

Lys Leu Lys Ser Ser Trp Ala Thr Gly Leu
1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 37

His Phe Cys Thr Thr Pro Ser Ser Ile Leu
1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 38

Lys Gln Leu Val Trp Arg Gly Ala Asn Val
1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 39

Met Leu Glu Ala Gly Ala Glu Ala Asn Leu
1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 40

Gln Tyr Val Leu Lys Val Thr Ser Val
1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 41

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

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 42

Leu Leu Asn His Gly Ala Ala Arg Ile
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 43

Val Val Val Asn Ala Tyr Glu His Ile
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 44

Asp Phe Tyr His Ser Leu Phe Thr Val
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 45

Ala Ile Pro Leu Leu Ser Leu Pro Leu
1 5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 46

Ser Leu Pro Leu Ser Leu Lys Lys Tyr Leu
1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 47

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 48

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 49

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr
1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 50

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 51

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
1 5 10

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 52

Gly Tyr Ile Ser Pro Tyr Phe Ile Asn Thr Ser Lys
1 5 10

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成胜肽

<400> 53

accacagtcc atgccatcac

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
 <223> 合成胜肽

 <400> 54
 tccaccaccc tgttgctgta 20

 <210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成胜肽

 <400> 55
 ctgtcttggt tggccatgtg 20

 <210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成胜肽

 <400> 56
 gcgtctcctc atcttggtg 20

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種胜肽，其是由以序列編號 3 及 28 中的任一種所表示之胺基酸序列所構成。

【第2項】 如請求項 1 所述之胜肽，其是由以序列編號 3 所表示之胺基酸序列所構成。

【第3項】 一種聚抗原決定基胜肽，其為複數的抗原決定基胜肽所連結而成，其中，作為該抗原決定基胜肽，至少包含一種如請求項 1 或 2 所述之胜肽。

【第4項】 一種聚核苷酸，其編碼出如請求項 1 或 2 所述之胜肽、或如請求項 3 所述之聚抗原決定基胜肽的至少一種。

【第5項】 一種表現載體，其包含如請求項 4 所述之聚核苷酸。

【第6項】 一種基因導入用組成物，其包含如請求項 5 所述之表現載體。

【第7項】 一種醫藥組成物，其包含以下之 (a) ~ (c) 的任一種作為有效成分：

(a) 如請求項 1 或 2 所述之胜肽、或如請求項 3 所述之聚抗原決定基胜肽；

(b) 如請求項 4 所述之聚核苷酸；

(c) 如請求項 5 所述之表現載體。

【第8項】 如請求項 7 所述之醫藥組成物，其包含如請

求項 1 或 2 所述之胜肽、及/或如請求項 3 所述之聚抗原決定基胜肽作為有效成分。

【第9項】 如請求項 7 或 8 所述之醫藥組成物，其進一步包含佐劑。

【第10項】 如請求項 7 或 8 所述之醫藥組成物，其為癌症的復發預防、轉移防止及/或治療劑。

【第11項】 如請求項 7 或 8 所述之醫藥組成物，其為癌症的復發預防、轉移防止及/或治療用疫苗。

【第12項】 一種細胞毒性 T 細胞的誘導劑，其包含以下之 (a) ~ (c) 的任一種作為有效成分：

(a) 如請求項 1 或 2 所述之胜肽、或如請求項 3 所述之聚抗原決定基胜肽；

(b) 如請求項 4 所述之聚核苷酸；

(c) 如請求項 5 所述之表現載體。

【第13項】 一種抗原呈現細胞之製造方法，其包含使以下之 (A) 或 (B) 與具有抗原呈現能力的細胞在試管內 (*in vitro*) 接觸：

(A) 如請求項 1 或 2 所述之胜肽、或如請求項 3 所述之聚抗原決定基胜肽；

(B) 聚核苷酸，其編碼出前述 (A) 的胜肽及/或聚抗原決定基胜肽的至少一種。

【第14項】 一種細胞毒性 T 細胞之誘導方法，其包含

使以下之 (A) 或 (B) 與週邊血液淋巴球在試管內 (*in vitro*) 接觸：

(A) 如請求項 1 或 2 所述之胜肽、或如請求項 3 所述之聚抗原決定基胜肽；

(B) 聚核苷酸，其編碼出前述 (A) 的抗原胜肽及 / 或聚抗原決定基胜肽的至少一種。

【第 15 項】 一種 H L A 多聚體，其包含如請求項 1 或 2 所述之胜肽與 H L A 。

【第 16 項】 一種診斷藥，其包含如請求項 15 所述之 H L A 多聚體。

【第 17 項】 一種抗體，其會辨識出如請求項 1 或 2 所述之胜肽。

【第 18 項】 一種類 T 細胞受體抗體，其會辨識出如請求項 1 或 2 所述之胜肽與 H L A 的複合體。

【第 19 項】 一種腫瘤檢測劑，其含有如請求項 17 所述之抗體及 / 或如請求項 18 所述之類 T 細胞受體抗體。

【第 20 項】 一種嵌合抗原受體，其會辨識出如請求項 1 或 2 所述之胜肽與 H L A 的複合體。

【第 21 項】 一種人工細胞毒性 T 細胞，其包含 T 細胞受體，該 T 細胞受體會辨識出如請求項 1 或 2 所述之胜肽與 H L A 的複合體。

【第 22 項】 一種診斷藥，其係用以選擇對於使用如請

求項 7 ~ 11 中的任一項所述之醫藥組成物的癌症處置方法為有效的治療對象患者，該診斷藥包含：如請求項 15 所述之 H L A 多聚體、如請求項 17 所述之抗體及 / 或如請求項 18 所述之類 T 細胞受體抗體。

圖式

圖1

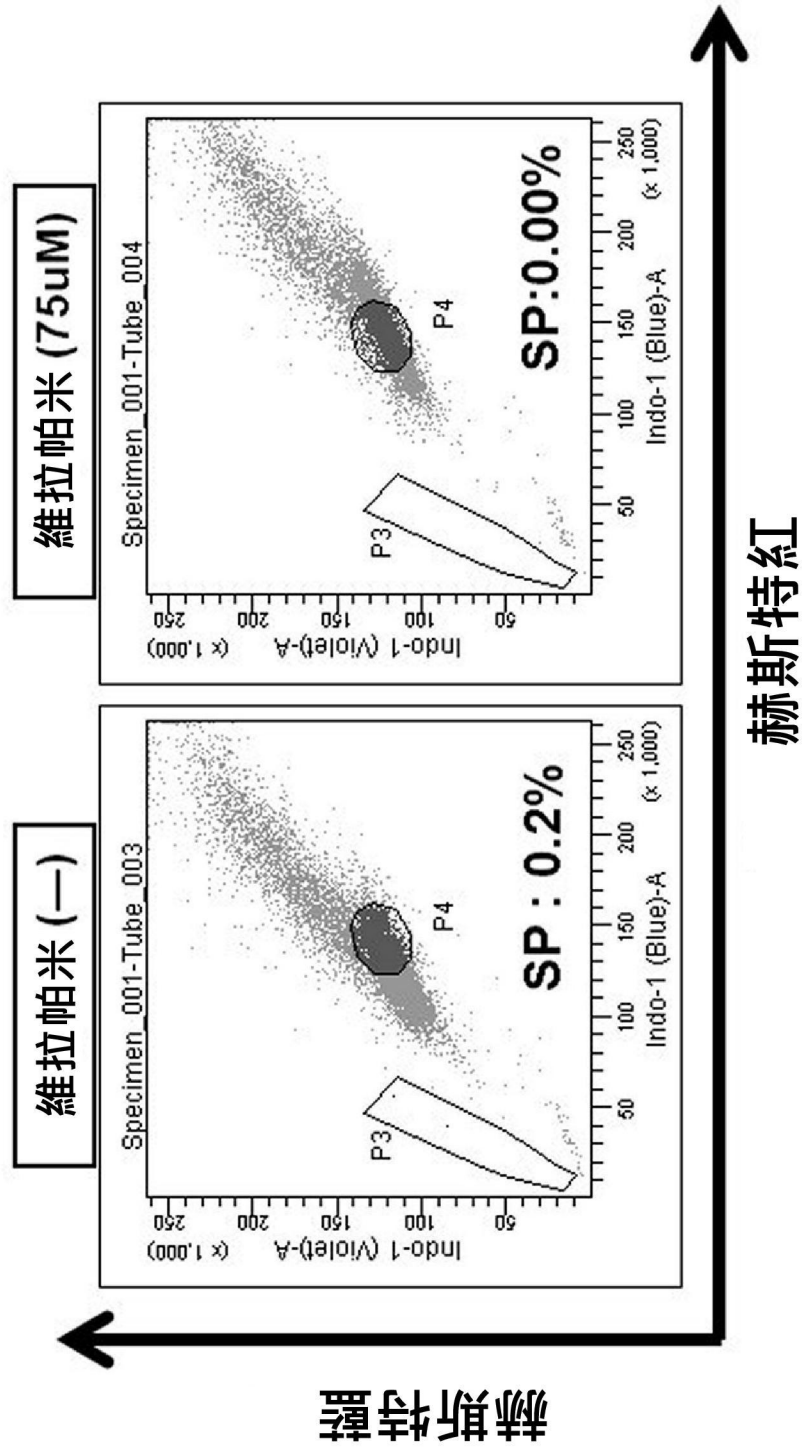


圖2-1

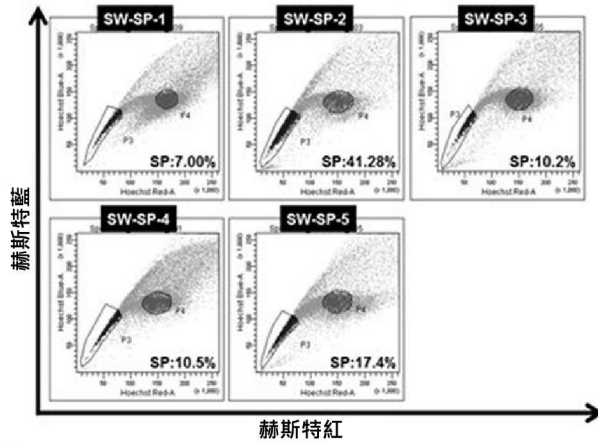
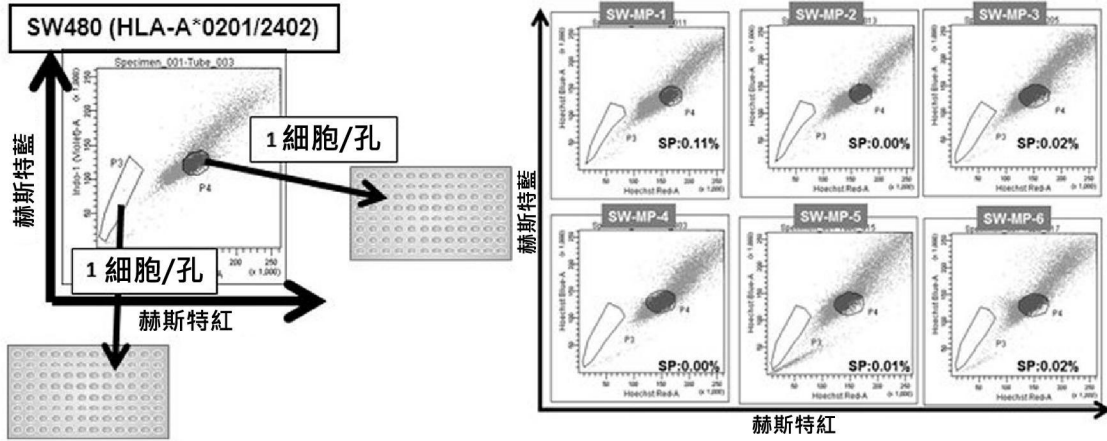


圖2-2

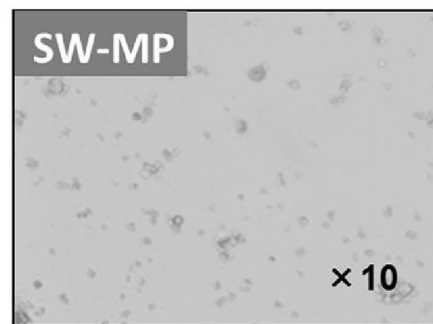
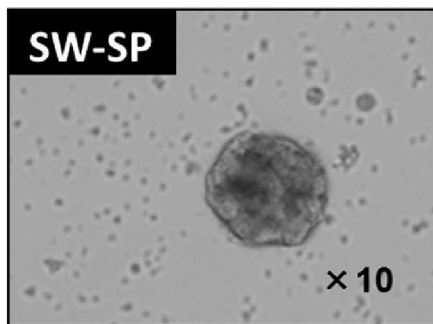


圖3

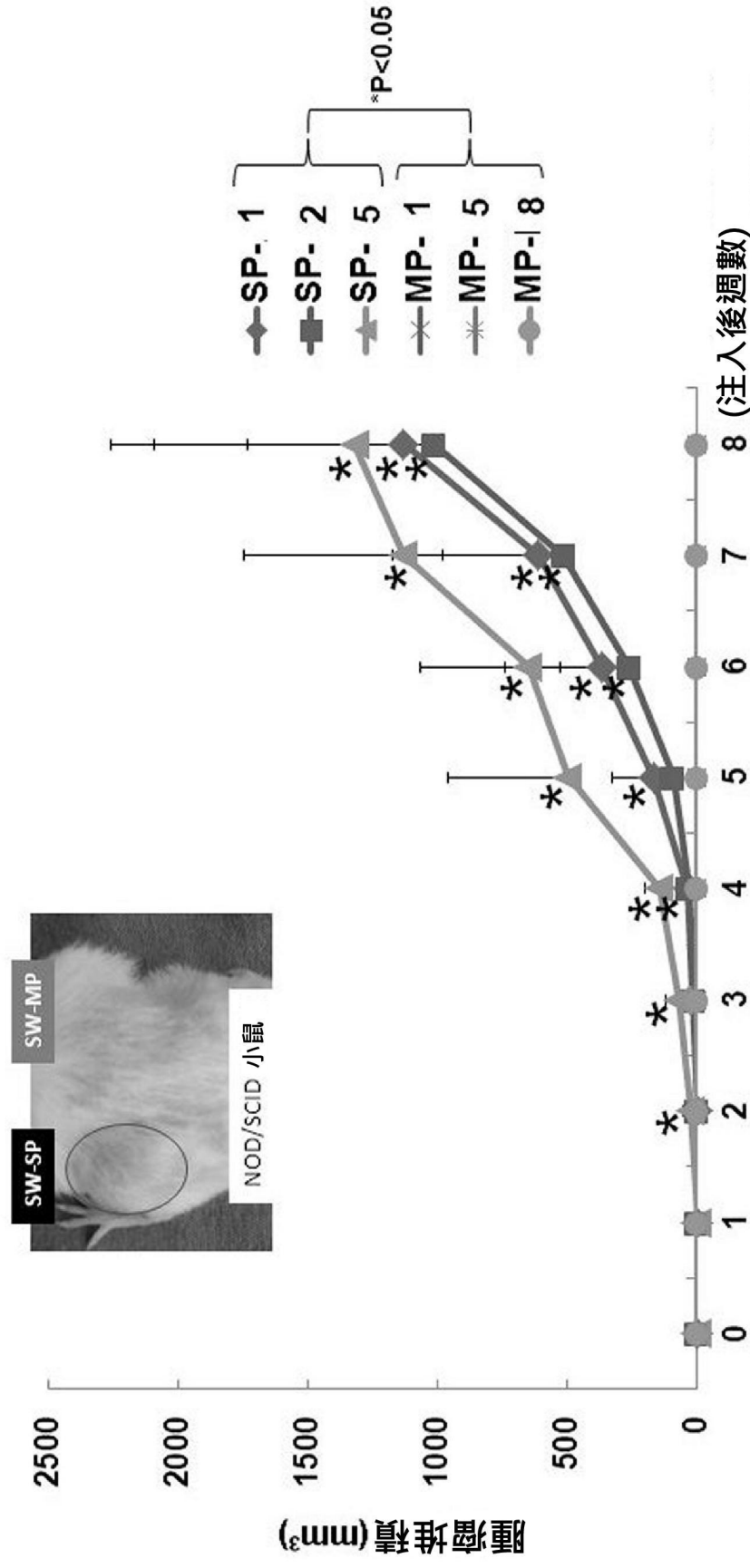


圖4

MDGTTAPVTKSGAAKLVKRNFLKSNDFGKLIKAILIQRQIDVDTVFEVEDENMVLASYKQGYWLP
 SYK LKSSWATGLHLSVLFVGHVECLLVLLDHNATINCRPNGKTPLVHACEMANVDCVKILCDRGAKLNCYSLG
 HTALHFCTTPSSILCAKQLVWRGANVNMKTNNQDEETPLHTAAHFGLSELVAFYVEHGAIVDSVNAHMET
 PLAIAAYWALRFKEQEYSTEHHLCRMLLDYKAEVNARDDDFKSPLHKAAWNCDHVLMMHMMLEAGAEANL
 MDINGCAAIQYVLKVTSVRPAAQPEICYQLLLNHGAARIYPPQFHKVIQACHSCPKAIEVVVNAYEHIRW
 NTKWRRRAIPDDDLKDYWDFYHSLFTVCCNSPRTLMLHLSRCAIRRTLHNRCHRAIPLLSLPLSKKYLLLE
 PEGIIY

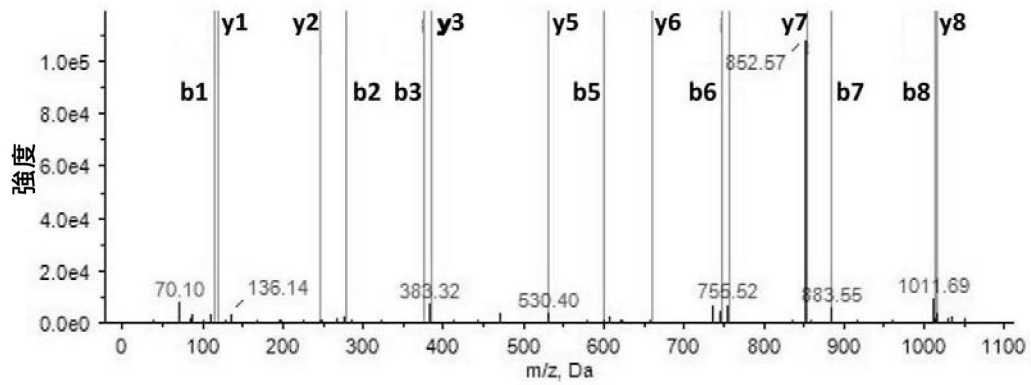


圖5

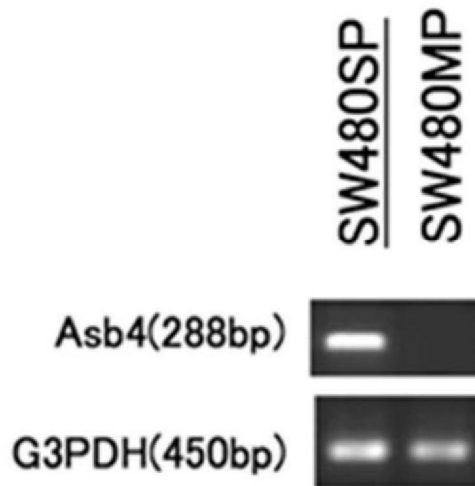


圖6

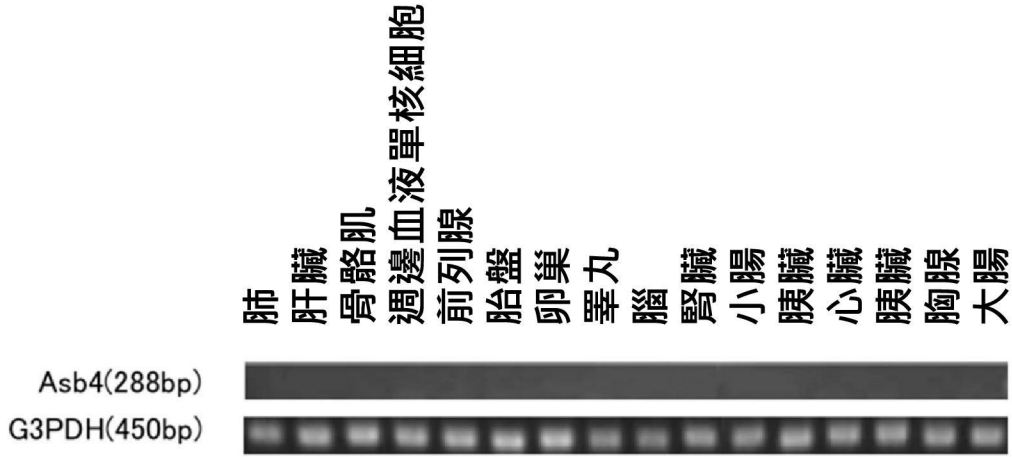


圖7

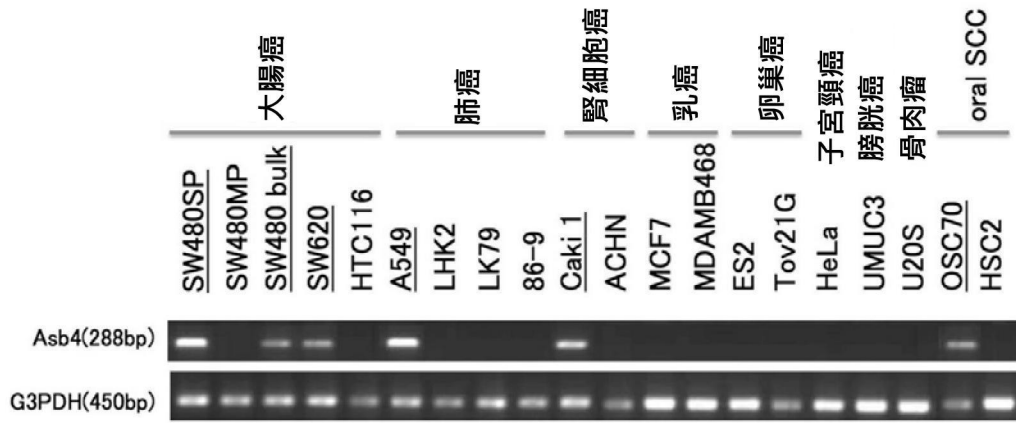


圖8

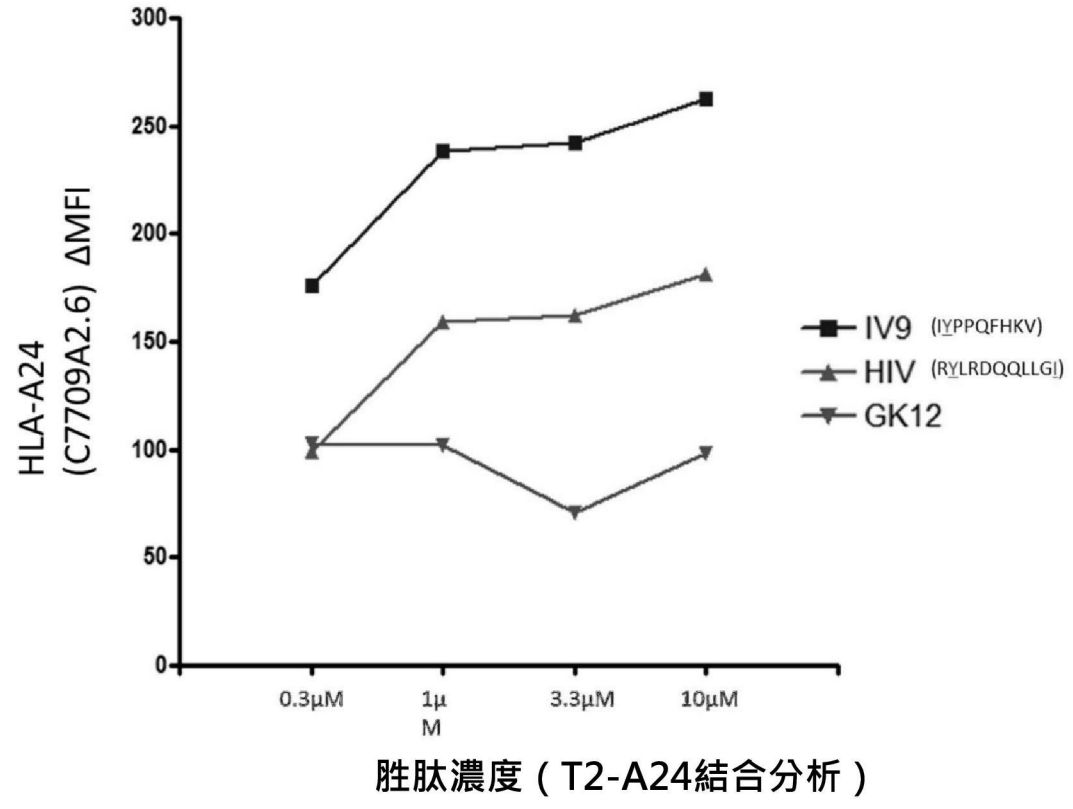


圖9

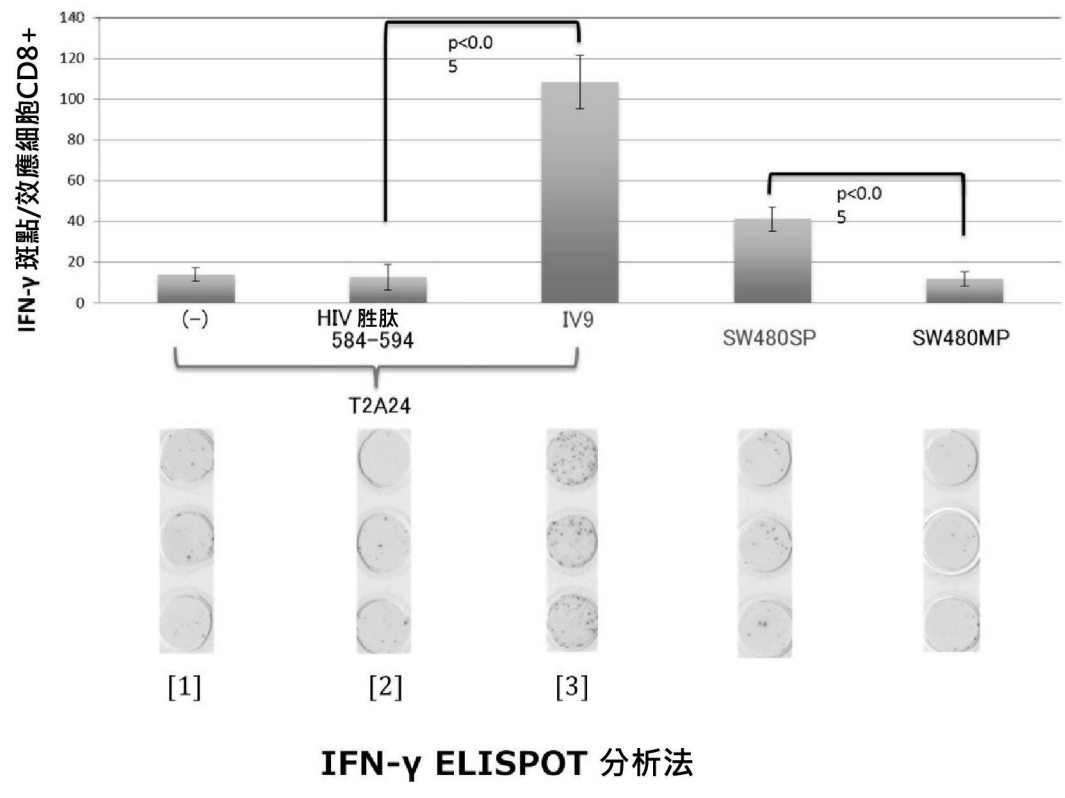


圖10

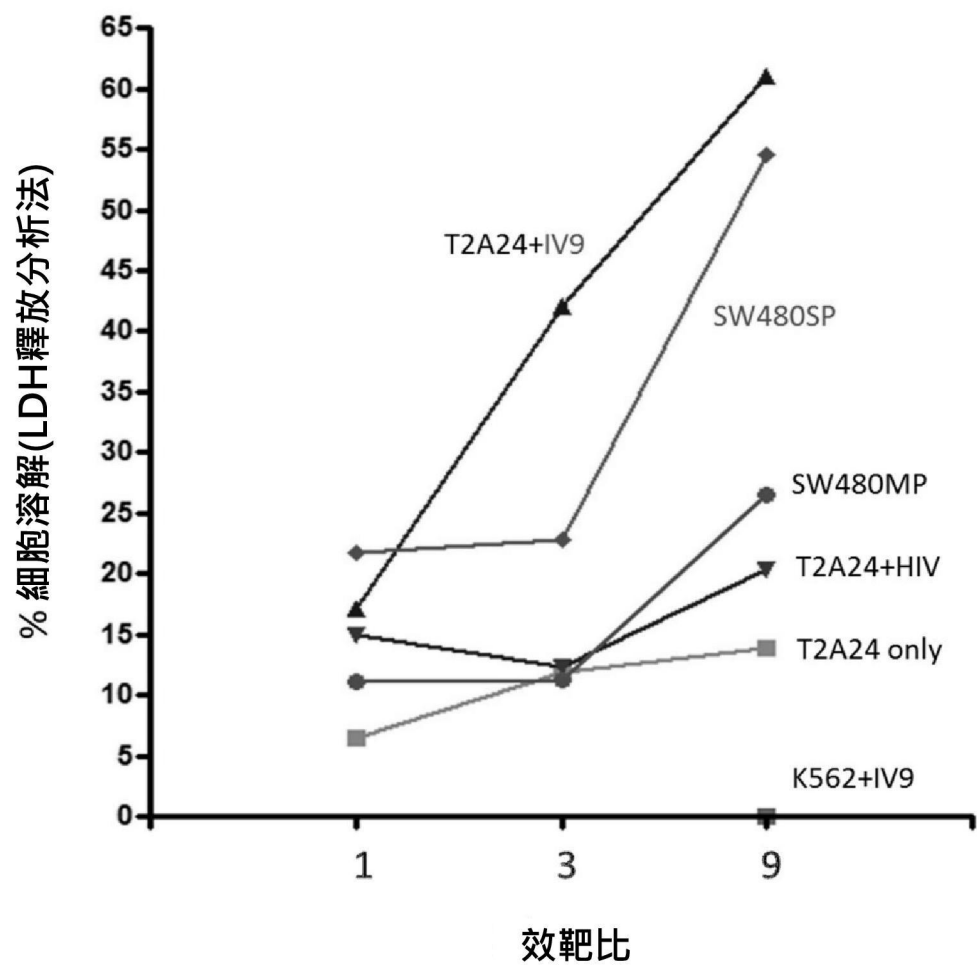


圖11

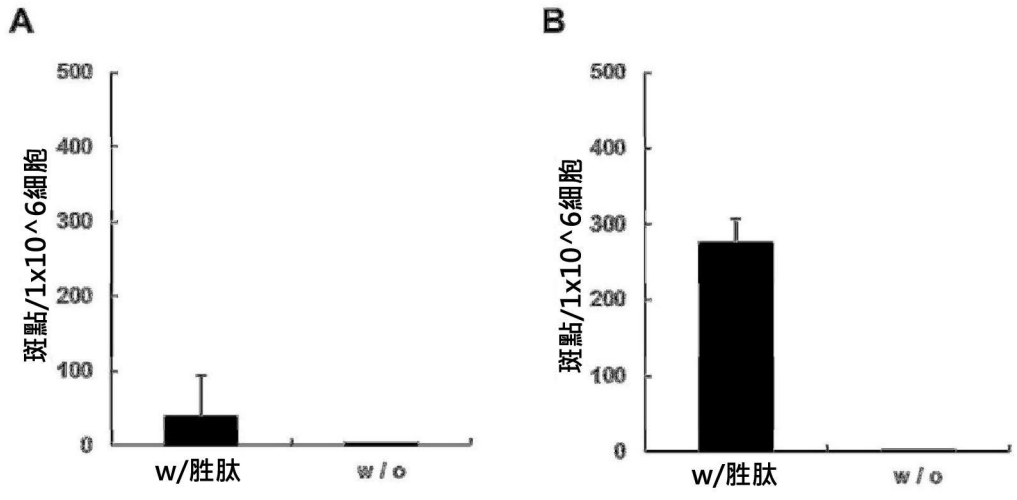


圖12

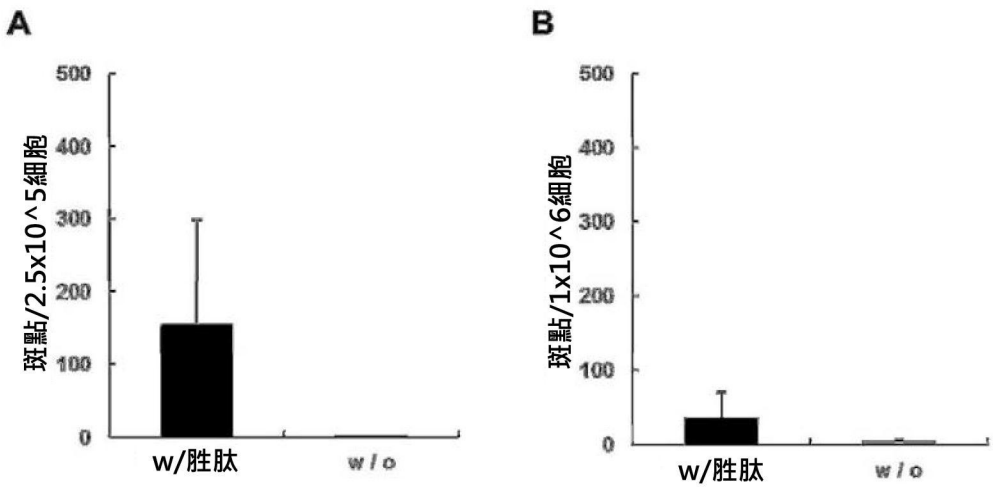


圖13

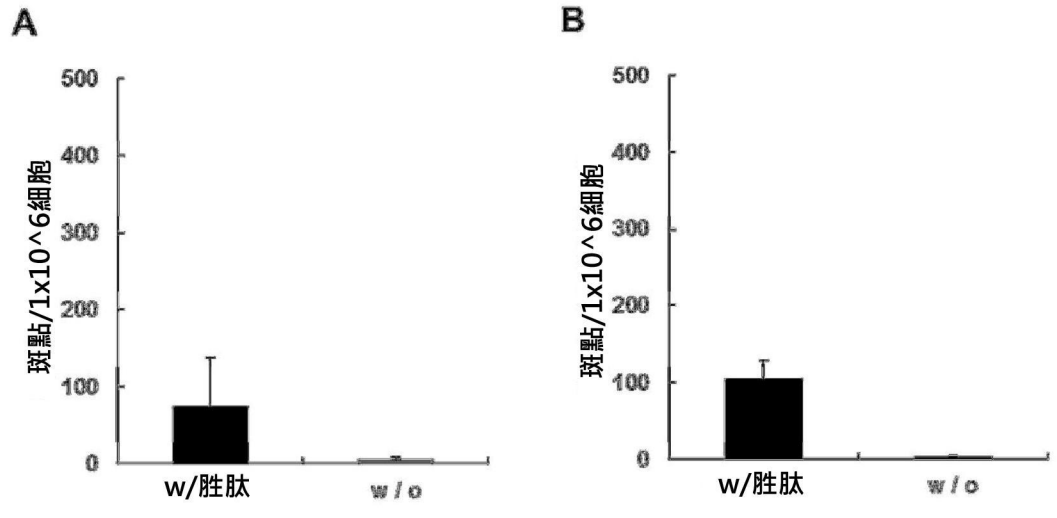


圖14

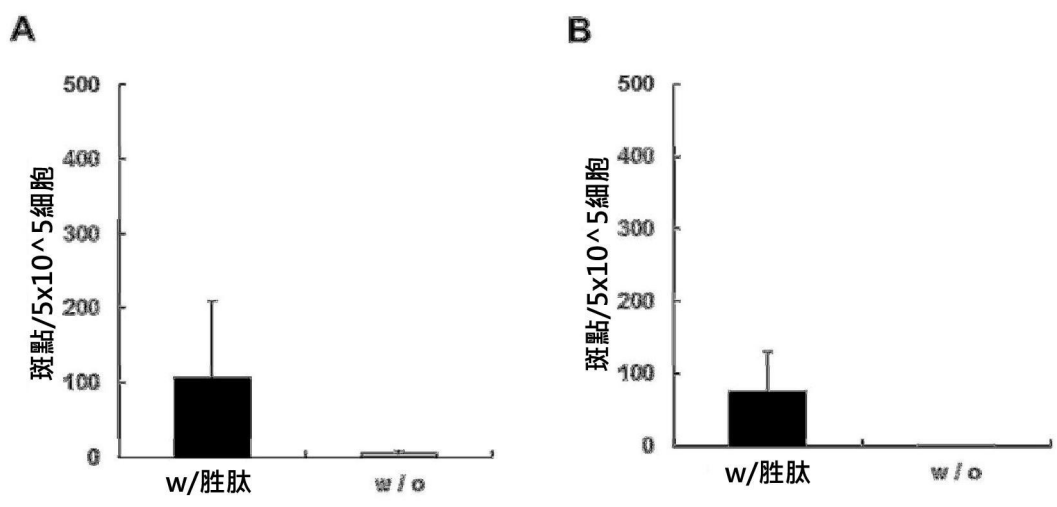


圖15

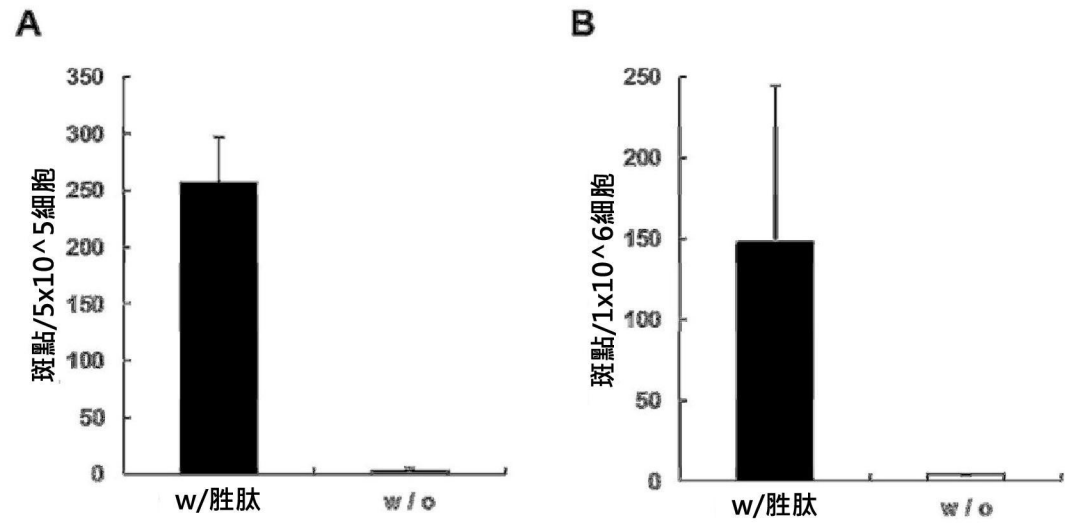


圖16

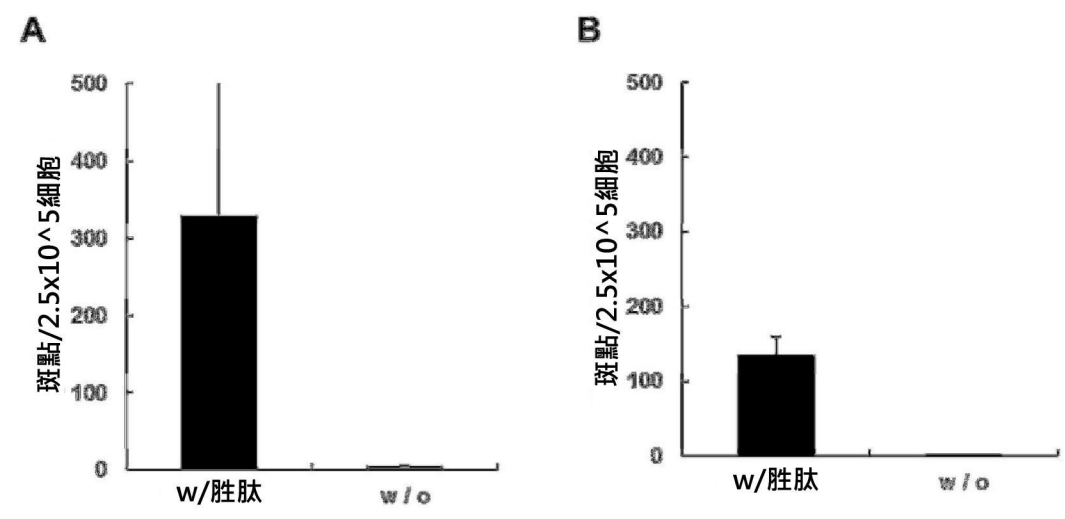


圖17

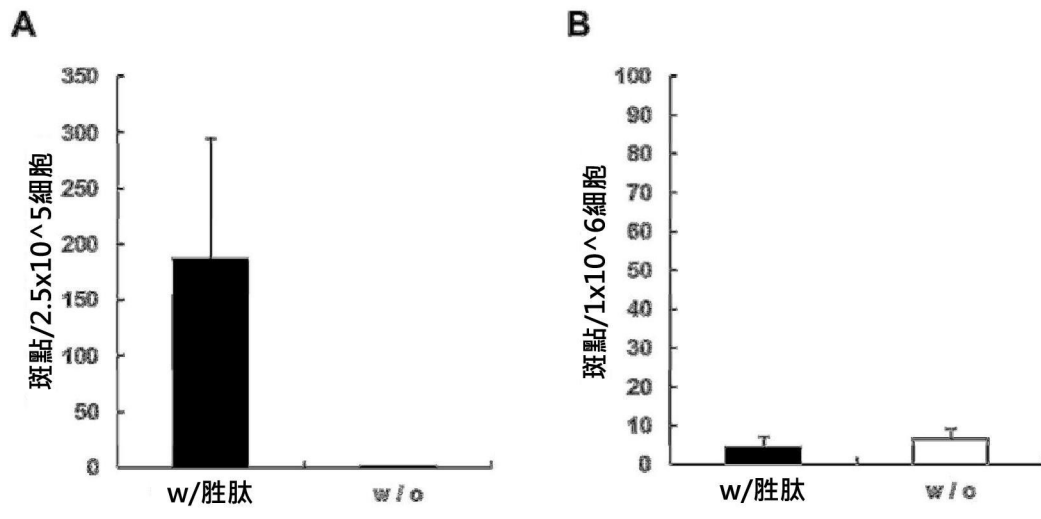


圖18

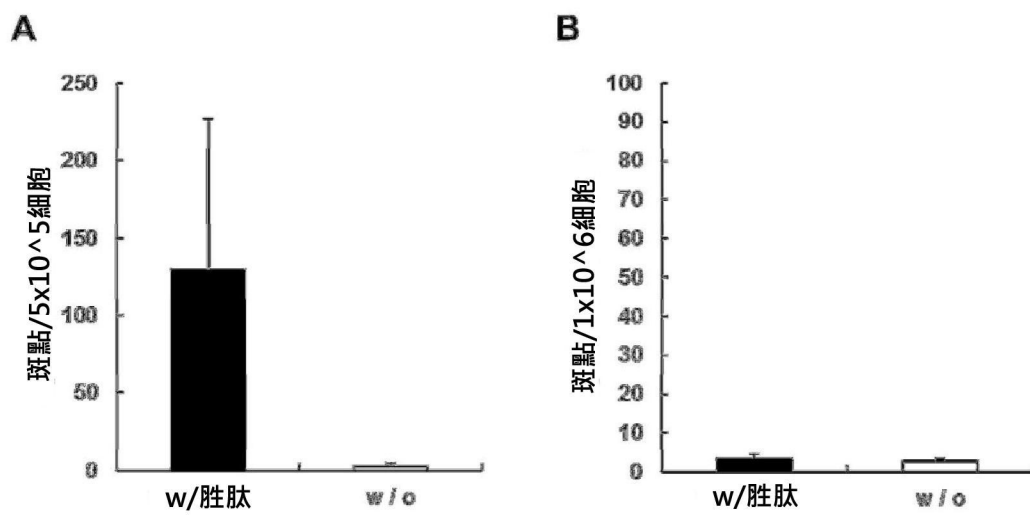


圖19

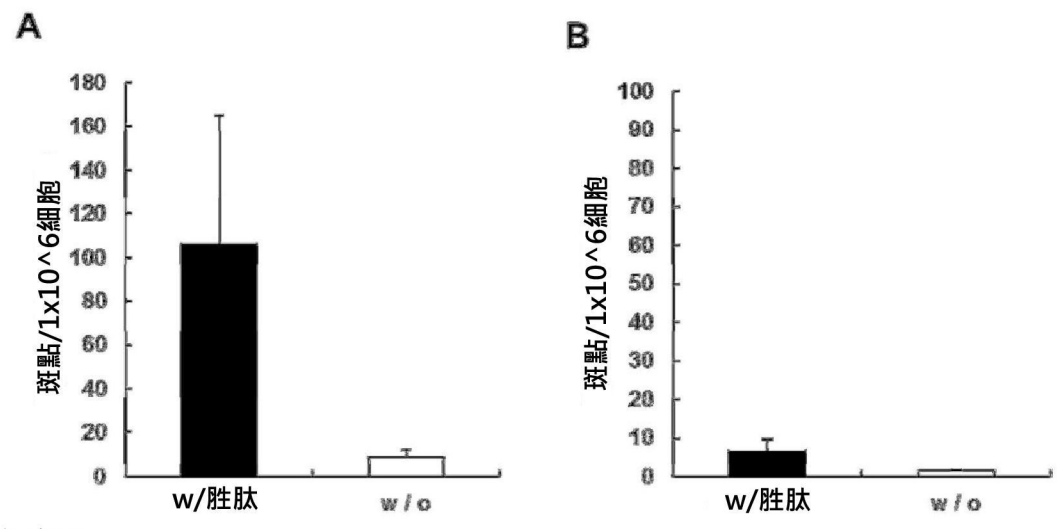


圖20

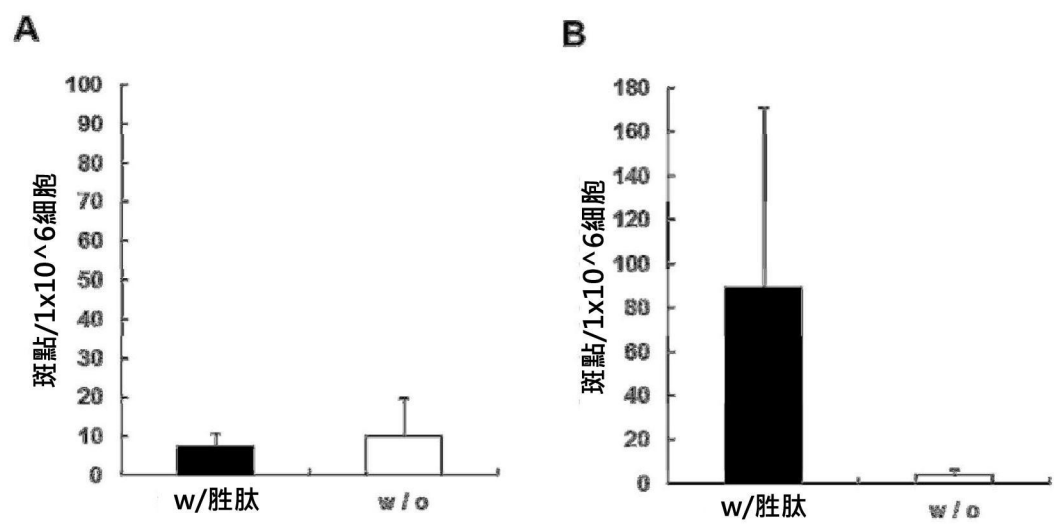


圖21

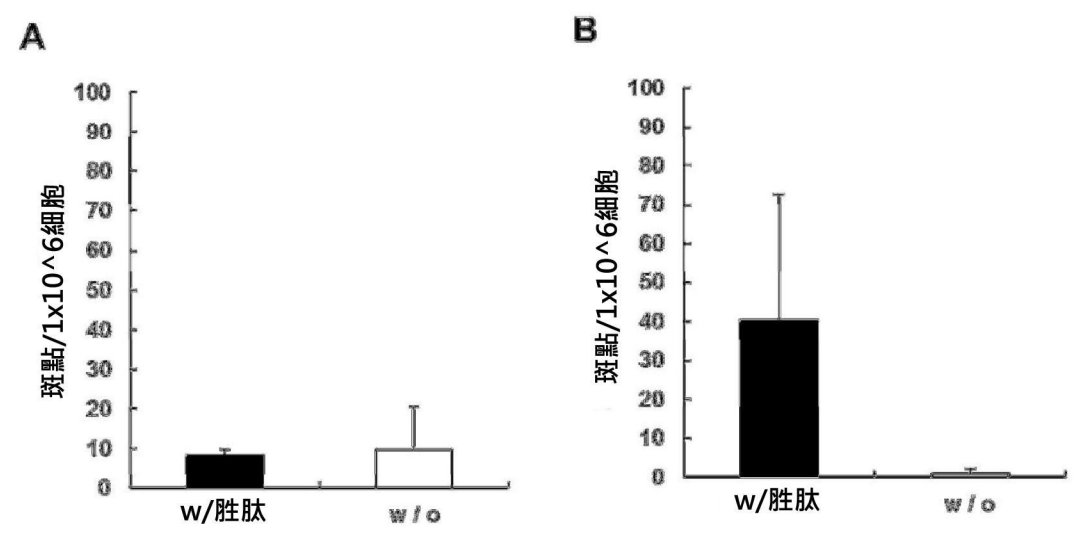


圖22

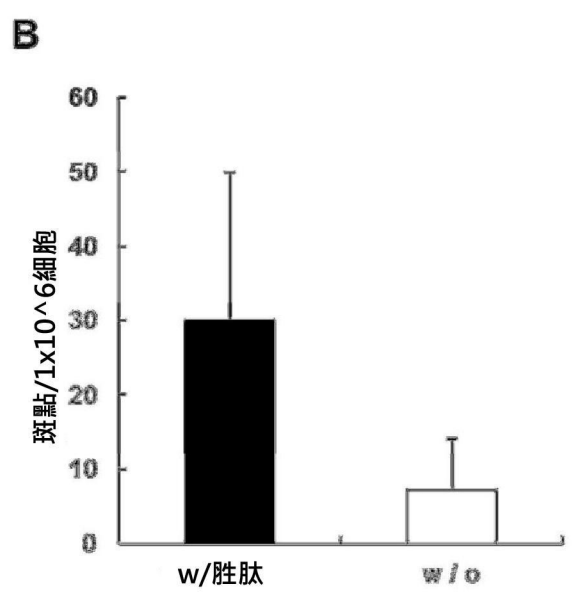


圖23

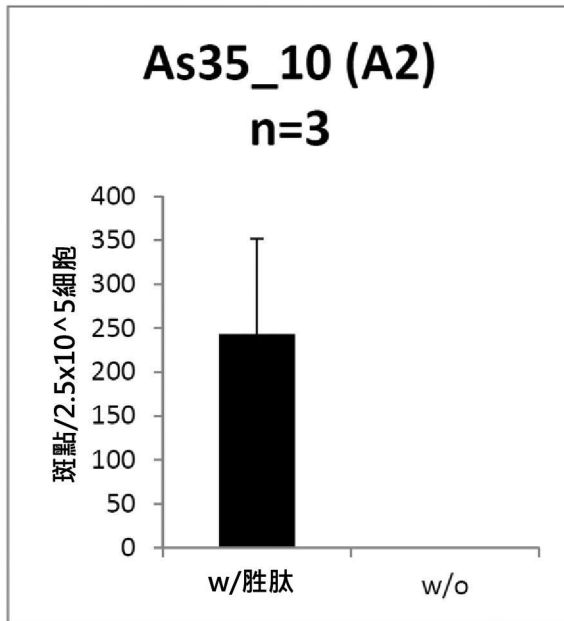


圖24

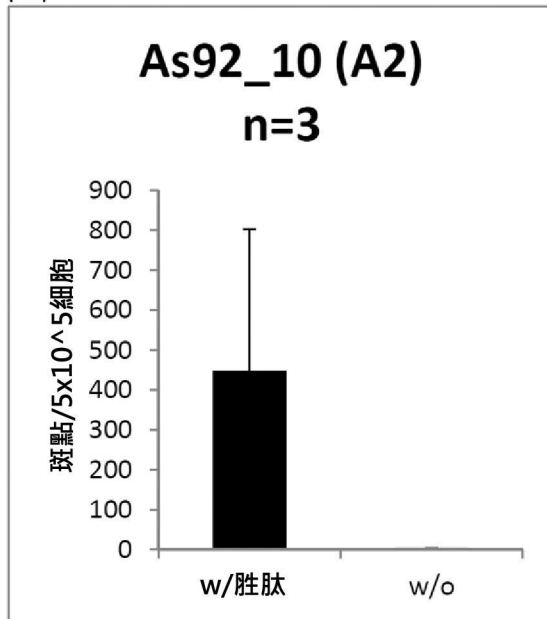


圖25

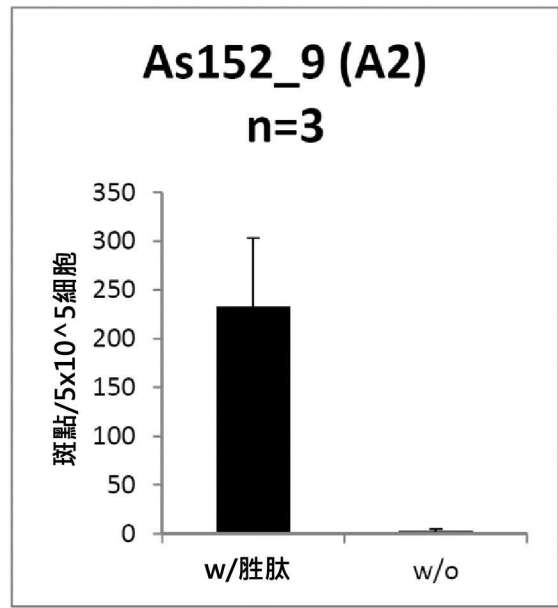


圖26

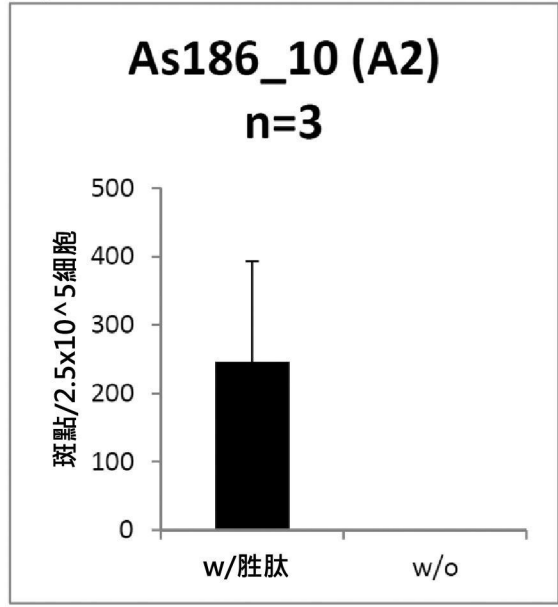


圖27

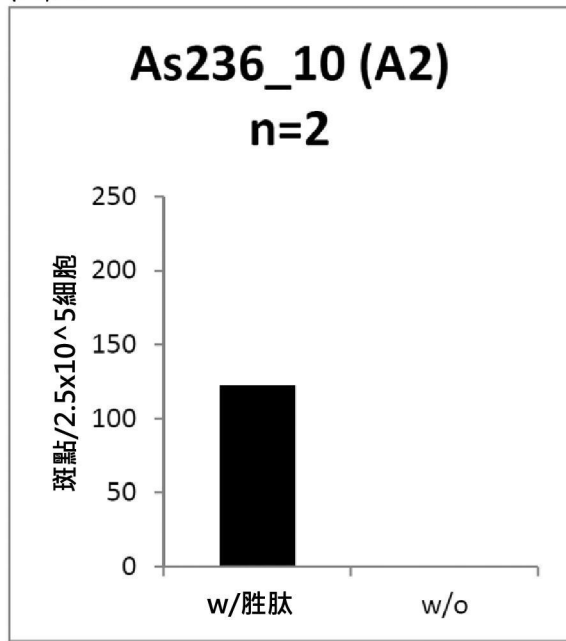


圖28

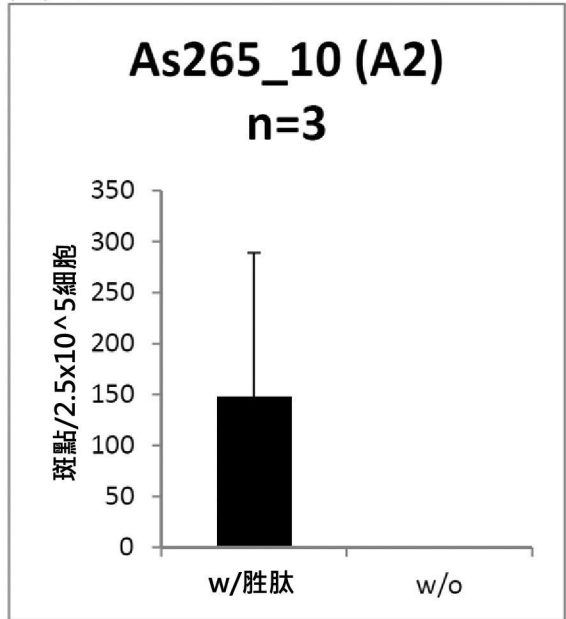


圖29

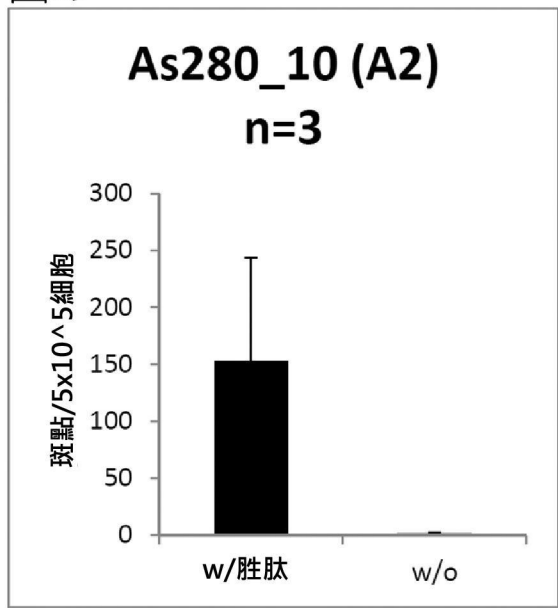


圖30

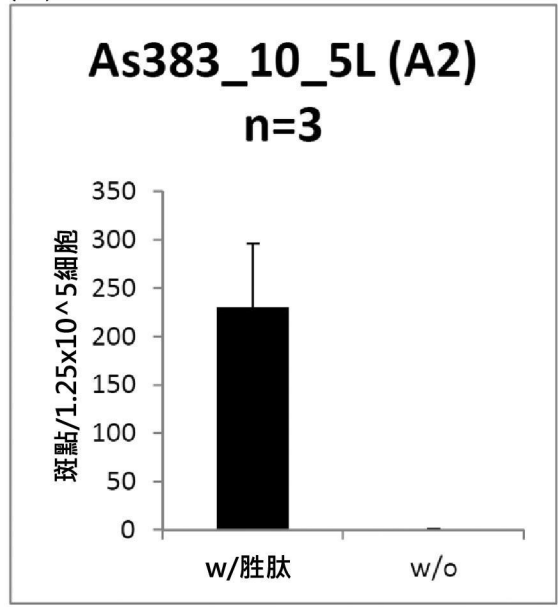


圖31

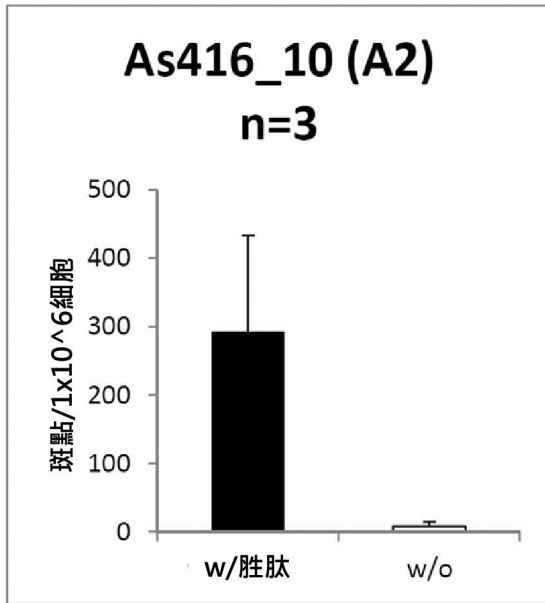


圖32

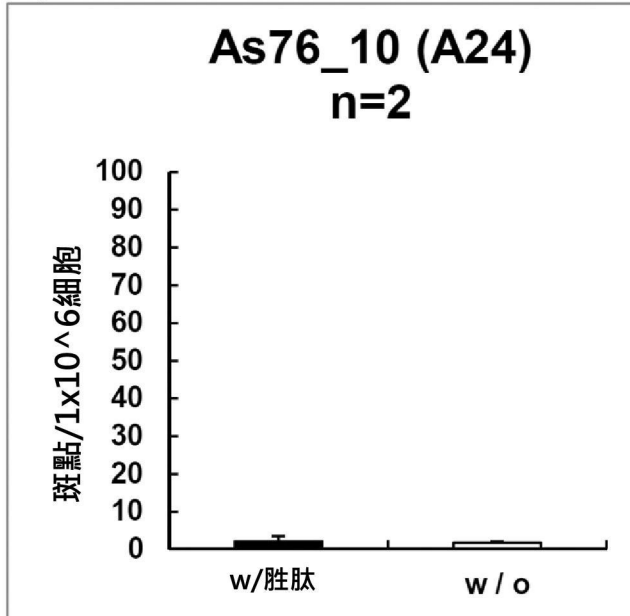


圖33

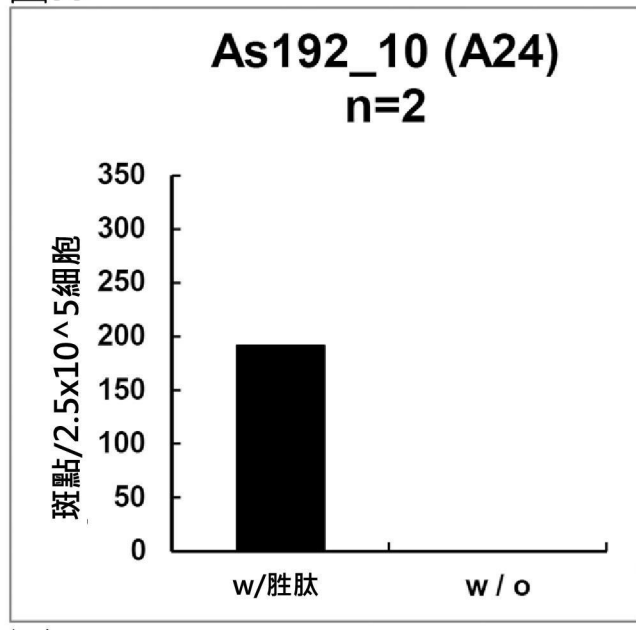


圖34

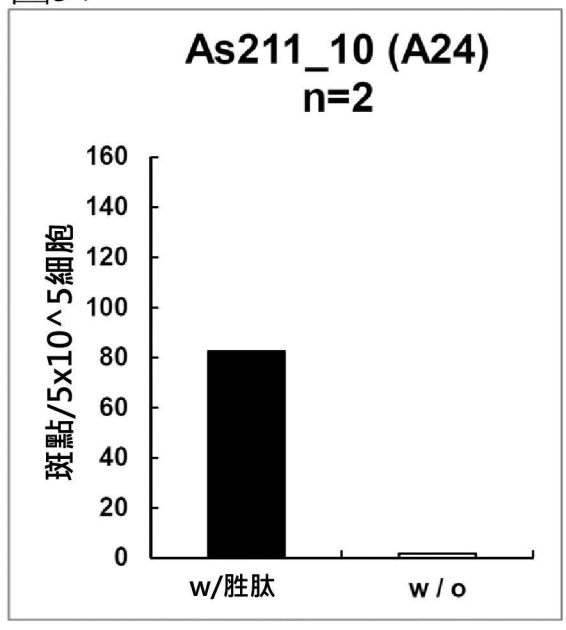


圖35

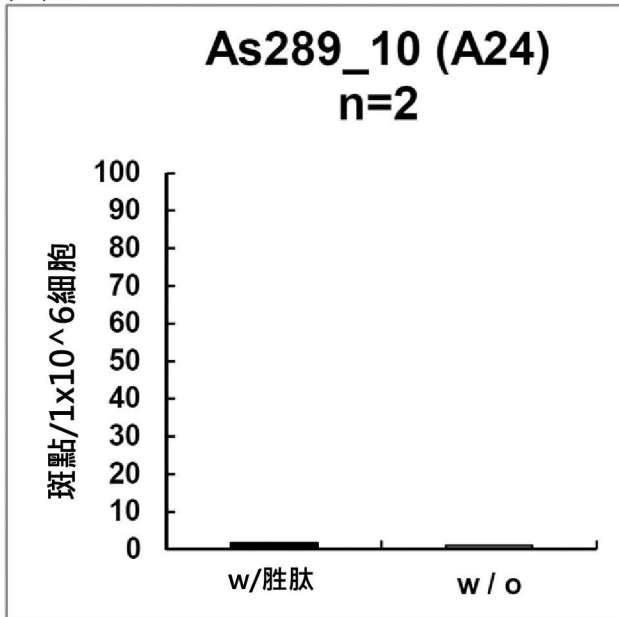


圖36

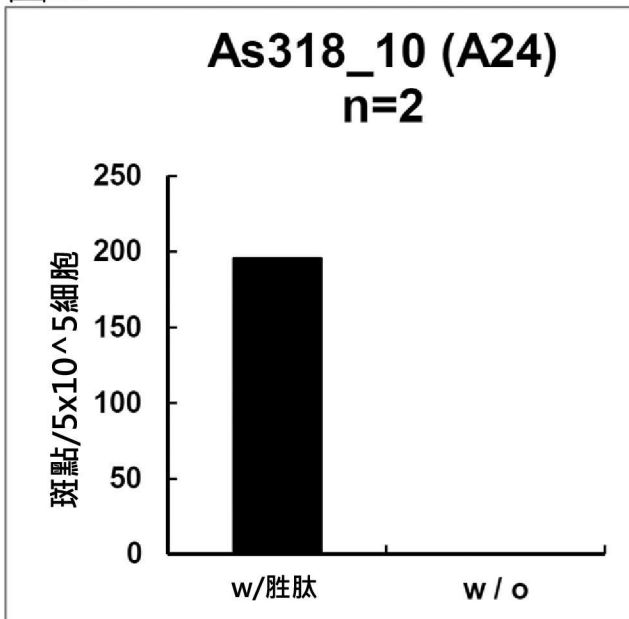


圖37

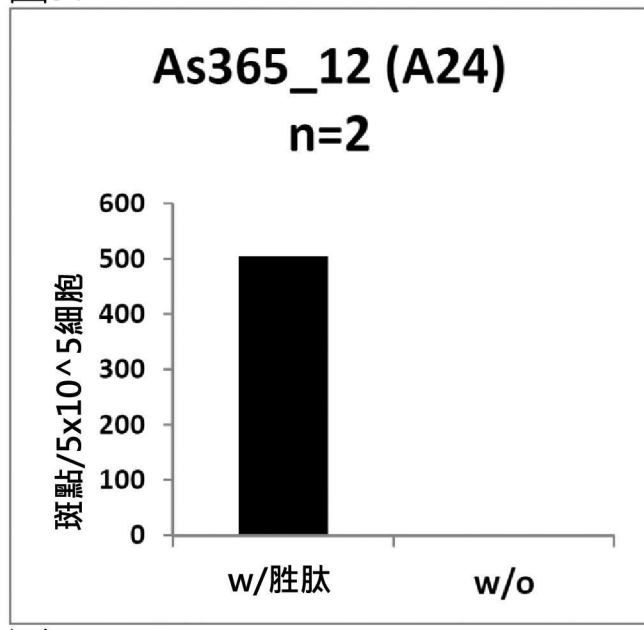


圖38

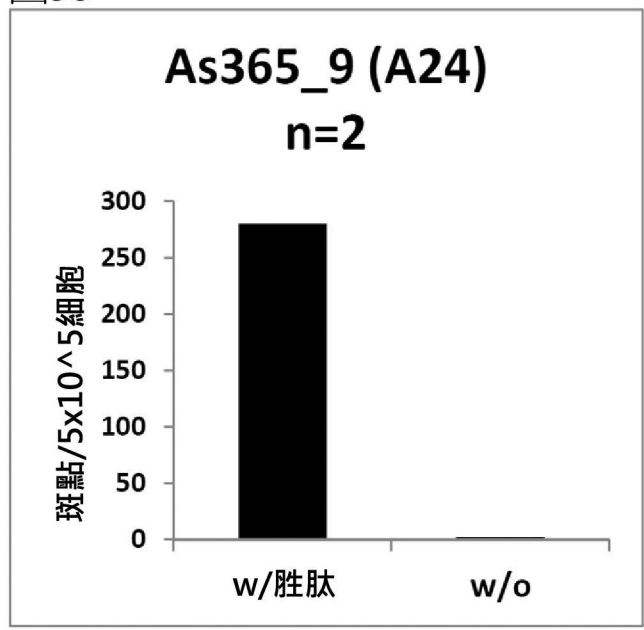


圖39

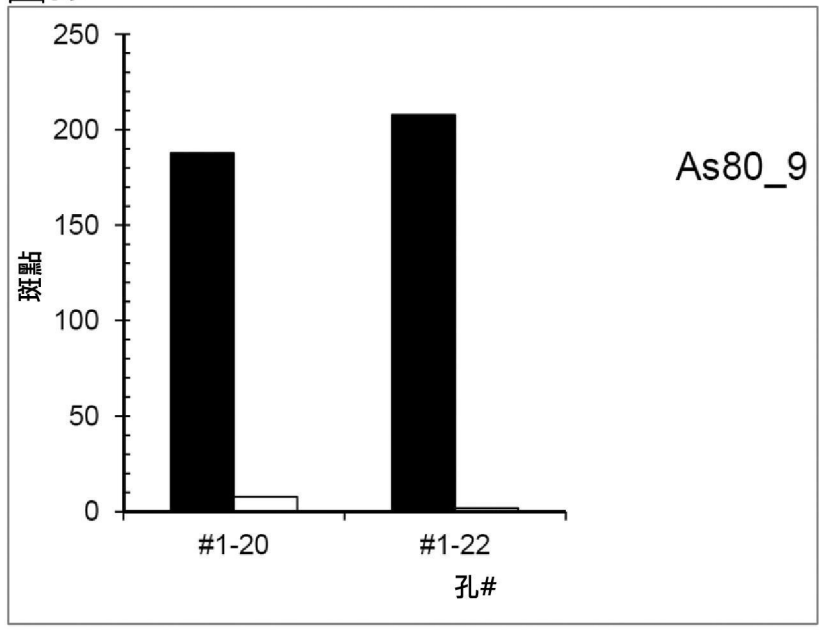


圖40

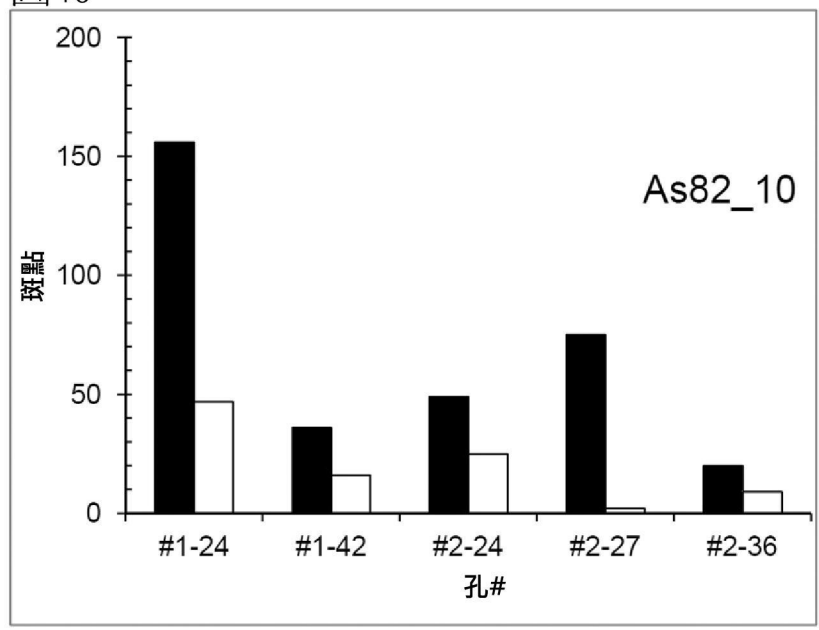


圖41

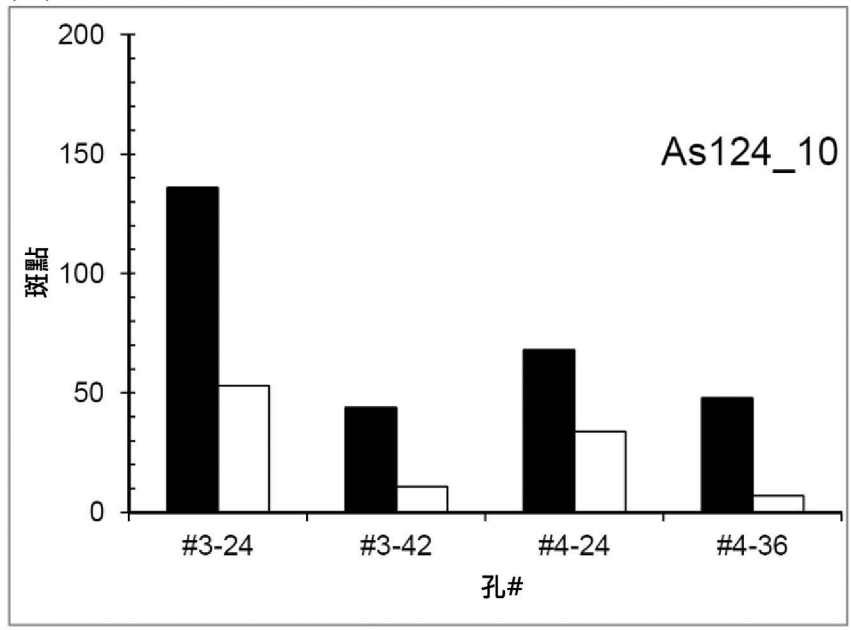


圖42

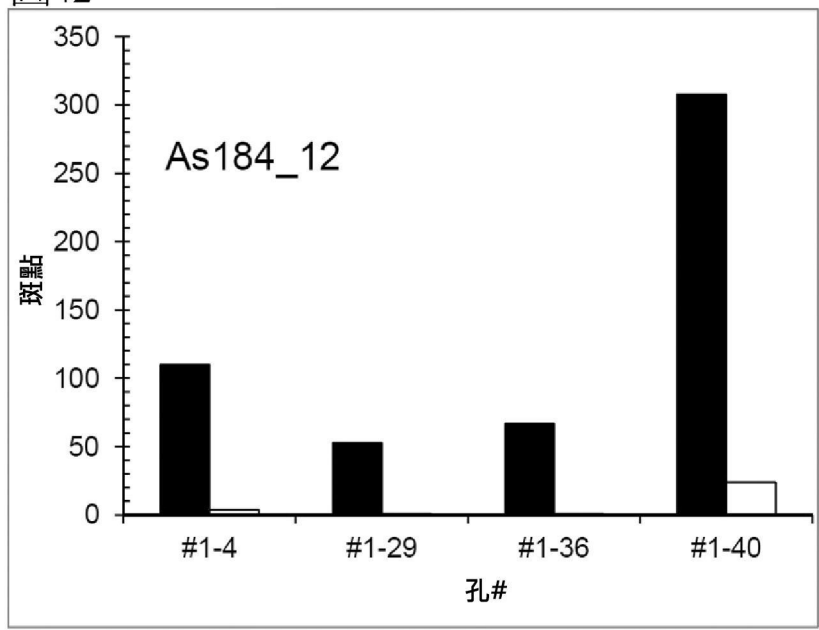


圖43

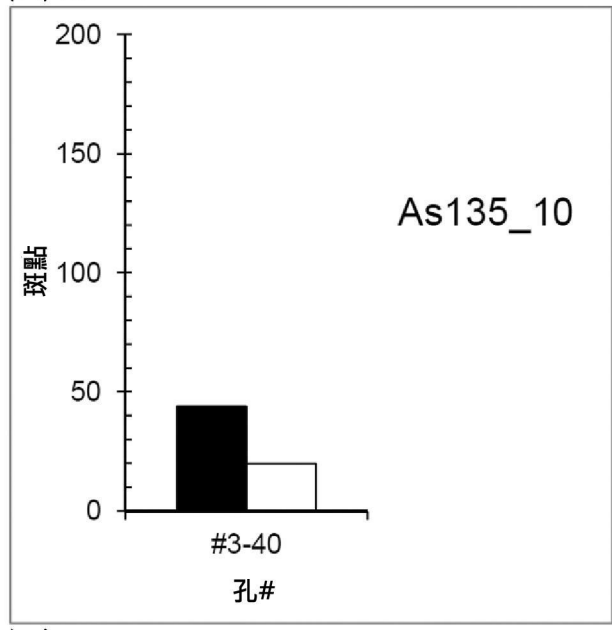


圖44

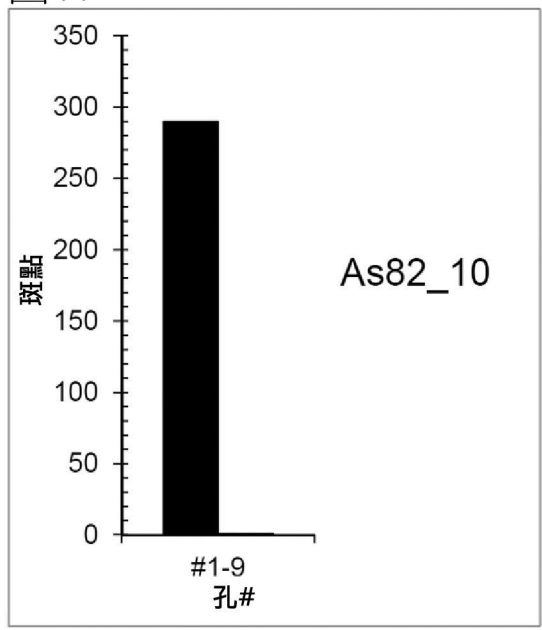


圖45

