



(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 201636358 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 16 日

(21) 申請案號：104140060

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 01 日

(51) Int. Cl. :

*C07K7/06 (2006.01)**C07K7/08 (2006.01)**C07K14/725 (2006.01)**C12N5/10 (2006.01)**C12N15/19 (2006.01)**A61K38/08 (2006.01)**A61K38/10 (2006.01)**A61K38/16 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**G01N33/50 (2006.01)**G01N33/68 (2006.01)*

(30) 優先權：2014/12/09 日本

2014-248759

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

(72) 發明人：西村泰治 NISHIMURA, YASUHARU (JP) ; 富田雄介 TOMITA, YUSUKE (JP) ; 大沢龍司 OSAWA, RYUJI (JP)

(74) 代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：10 共 166 頁

(54) 名稱

對於 T H 1 細胞之 G P C 3 抗原決定位勝肽及含此之疫苗

GPC3 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57) 摘要

於此揭示具有 Th1 細胞誘導能力之單離的的自 GPC3-衍生的抗原決定位勝肽。此種勝肽可藉由 MHC 第 II 類分子辨識並誘導 Th1 細胞。於較佳具體例中，此種本發明之勝肽可混雜地 (promiscuously) 結合於 MHC 第 II 類分子並且除了誘導 Th1 細胞更誘導 GPC3-專一性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)。因此此種勝肽適用於增強一對象中之免疫反應，因而於癌免疫療法中，特別是作為癌疫苗提供效用。於此也揭示編碼為任意上述勝肽的聚核苷酸、由此種勝肽所誘導的 APC 與 Th1 細胞，及與其相關的誘導方法。包含任意上述成分作為有效成分的醫藥組合物，提供效用於癌症或腫瘤之治療及/或預防，此癌症或腫瘤包括例如肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) 及黑色素瘤 (melanoma)。

Isolated GPC3-derived epitope peptides having Th1 cell inducibility are disclosed herein. Such peptides can be recognized by MHC class II molecules and induce Th1 cells. In preferred embodiments, such a peptide of the present invention can promiscuously bind to MHC class II molecules and induce GPC3-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in addition to Th1 cells. Such peptides are thus suitable for use in enhancing immune response in a subject, and accordingly find use in cancer immunotherapy, in particular, as cancer vaccines. Also disclosed herein are polynucleotides that encode any of the aforementioned peptides, APCs and Th1 cells induced by such peptides and methods of induction associated therewith. Pharmaceutical compositions that comprise any of the aforementioned components as active ingredients find use in the treatment and/or prevention of cancers or tumors including, for example, hepatocellular carcinoma and melanoma.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

對於 TH1細胞之 GPC3抗原決定位胜肽及含此之疫苗 / GPC3
EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES
CONTAINING THE SAME

【技術領域】

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

【先前技術】

優先權

【0002】 本申請案基於 2014 年 12 月 9 日提申的日本專利申請案號 JP2014-248759 主張優惠，其完整內容引入於此作為參考。

【0003】 已有人證明 CD8 陽性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 會辨識在主要組織相容性複合體 (MHC) 第 I 類分子上發現之衍生自腫瘤關聯抗原 (TAA) 的抗原決定基胜肽，且之後殺死該腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原 (MAGE) 家族為 TAA 的第一例以來，已主要利用免疫學方法發現了許多其他的 TAA (非專利文獻 1、2)。此等 TAA 當中有些正當做免疫療法的標靶進行臨床開發當中。

【0004】 對於癌細胞的增殖與存活不可欠缺之 TAA 對於做

為免疫療法之標靶是有利的，由於使用此種 TAA 能降低在治療所驅使的免疫選擇當中由於 TAA 的刪除、突變或下調所造成的癌細胞的免疫逃脫的風險到最小。因此，能夠誘導有效及專一性抗腫瘤免疫反應的新 TAA 之鑑別確保進一步的發展。目前，對於許多類型癌症的勝肽疫苗策略的臨床應用正在進行著(非專利文獻 3~10)。到目前，已有數個使用這些 TAA 相關抗原衍生勝肽的臨床試驗的報告。不幸地，到目前為止，這些癌症疫苗試驗僅產生低目標反應率(非專利文獻 11 至 13)。因此，於本技術領域中，仍需要適合作為免疫治療的標靶之新的 TAA。

【0005】 最近，本案發明人利用基因組寬 cDNA 微陣列分析鑑別出一種癌胚抗原，磷脂肌醇聚糖-3 (GPC3)，其經常於肝細胞癌 (HCC)、黑色素瘤 (melanoma) 及各種其他的惡性腫瘤中過度表現(非專利文獻 14, 17)。本案發明人也鑑別出能夠從肝細胞癌 (HCC) 病患的周邊血液單核細胞 (PBMC) 誘導經 HLA-A2(A*02:01) 限制之 CTL 及經 HLA-A24(A*24:02) 限制之 CTL 之高免疫原性 GPC3-衍生短勝肽 (SPs)(專利文獻 1, 2)。對晚期肝細胞癌 (advanced HCC) 使用這種 GPC3-衍生短勝肽 (SPs) 之癌症免疫療法階段 I 臨床試驗顯示這些勝肽疫苗具有良好耐受性，且誘發可測量的免疫反應及一些抗腫瘤效果(非專利文獻 18-20)。它們也顯示高 GPC3-專一性 CTL 的頻率與接受 GPC3-SP 疫苗的晚期癌症病患延長的整體存活率相關。對接受使用上述兩個 GPC3-SP 進行手術治療的肝細胞癌 (HCC) 病患的輔助癌症免疫療法階段 II 正在進行著(非專利文獻 20)。

【0006】 腫瘤專一性 CD4⁺ 輔助 T (Th) 細胞，特別是 T-輔助 1

型(Th1)細胞，在有效率地誘導CTL媒介之抗腫瘤免疫性方面扮演關鍵性角色(非專利文獻21)。主要由Th1細胞產生的IFN- γ ，對於誘導及維持長期CTL反應係關鍵性的，其介由對於保持免疫記憶為關鍵性之多重交互作用提供幫助(非專利文獻22,23)。Th1細胞所分泌的IFN- γ ，也媒介直接的抗腫瘤或抗血管生成作用(非專利文獻24)。又，據顯示Th細胞必須鋪路以供CTL進入腫瘤部位(非專利文獻25)。所以，能夠活化專一性Th1細胞的腫瘤關連抗原(TAA)-衍生的Th細胞抗原決定位的鑑別，對於在罹患腫瘤的主體誘導有效的腫瘤免疫是重要；理想上，設計有效的疫苗應包括多個抗原決定位，以刺激CTL與Th1細胞兩者(非專利文獻26)。但是，目前尚未鑑別出衍生自GPC3的此種抗原決定位。

[引用列表]

[專利文獻]

【0007】

[專利文獻1] WO2004/018667

[專利文獻2] WO2007/018199

[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 and van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

[非專利文獻3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16,

88(20): 1442-55

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[非專利文獻 14] Okabe H, et al., *Cancer Res* 2001; 61:2129-37

[非專利文獻 15] Sung YK, et al., *Cancer Sci* 2003;

94:259-62

[非專利文獻 16] Nakatsura T, et al., Biochem Biophys Res Commun 2003; 306:16-25

[非專利文獻 17] Midorikawa Y, Int J Cancer 2003; 103:455-65

[非專利文獻 18] Nakatsura T, et al., Clin Cancer Res 2004; 10:8630-40

[非專利文獻 19] Komori H, et al. Clin Cancer Res 2006; 12:2689-97

[非專利文獻 20] Sawada Y, et al. Clin Cancer Res 2012; 18:3686-96

[非專利文獻 21] Chamoto K et al. Cancer Res 2004;64: 386-90

[非專利文獻 22] Bevan MJ。 Nat Rev Immunol 2004;4: 595-602

[非專利文獻 23] Shedlock DJ and Shen H。 Science 2003;300: 337-9

[非專利文獻 24] Street SE et al. Blood 2001;97: 192-7

[非專利文獻 25] Bos R, and Sherman LA。 Cancer Res;70: 8368-77

[非專利文獻 26] Melief CJ et al. Nat Rev Cancer 2008;8: 351-60

【發明內容】

【0009】 於本發明之上下文，本案發明人考慮一種理想的

供癌免疫療法的胜肽疫苗係包括針對CTL與Th1細胞兩者的抗原決定位的單一胜肽，此兩者的抗原決定位在天然上係彼此靠近(Kenter GG et al. N Engl J Med 2009;361: 1838-47.)。

【0010】 為此，本案發明人設計一策略以鑑別一新穎的GPC3衍生的Th1細胞的抗原決定位，其係可於混雜的HLA第II類分子之背景中被辨識且含有CTL抗原決定位，並假設所辨識之抗原決定位會誘導更有效率之經T細胞媒介之腫瘤免疫性。使用了預測HLA第II類結合胜肽與已知由經HLA-A24(A*24:02)或HLA-A2(A*02:01)限制之CTL辨識之CTL抗原決定位序列的電腦演算法，來選擇候選的含有CTL抗原決定位之混雜的HLA-第II類限制Th1細胞抗原決定位。

【0011】 本發明至少部分係基於發現作為誘導Th1細胞反應之免疫療法的標靶的適合抗原決定位胜肽。體認到GPC3基因在一些癌症類型中係向上調控，包括肝細胞癌(HCC)及黑色素瘤(melanoma)，本發明目標為進一步分析此GPC3基因之基因產物，特別是由GenBank存取如編號NM_001164617.1(序列識別號：9)或由GenBank存取如編號NM_004484.3(序列識別號：11)所示之基因編碼陳列於之序列識別號：8或10中的多胜肽。在進一步的研究中特別選擇含有會誘導專一於對應分子之Th1細胞的抗原決定位胜肽的GPC3基因產物。例如，將從健康捐贈者獲得之周邊血液單核細胞(PBMC)使用衍生自人類GPC3的混雜的HLA-DR及/或DP結合胜肽予以刺激。建立辨識經以各別的候選胜肽脈衝的HLA-DR或DP陽性目標細胞的Th1細胞，並且鑑別可誘導對抗GPC3之有效及專一性免疫反應之經

HLA-DR及/或DP限制之抗原決定位胜肽。此等結果證明GPC3有強力的免疫原性，且其抗原決定位對於經由Th1細胞反應媒介的腫瘤免疫療法有效。更進一步的研究顯示含有至少一種CTL抗原決定位之混雜的HLA-DR及/或DP結合胜肽也會在同一捐贈者以GPC3專一性的方式刺激CTL反應。此等結果確認GPC3係強力免疫原性，且GPC3-衍生胜肽含有Th1細胞與CTL抗原決定位兩者，對於經由Th1細胞與CTL反應媒介之腫瘤免疫療法係有效。

【0012】因此本發明之一目的係提供具有Th1細胞誘導能力及選自序列識別號：1至5之胺基酸序列的胜肽。本發明思考修飾之胜肽，即具有Th1誘導能力且長度至多30個胺基酸且具有選自序列識別號：6 (GPC3)之胺基酸序列之連續胺基酸序列的胜肽，及其功能上均等物。或者，本發明提供一具有Th1細胞誘導能力和CTL誘導能力的胜肽。於一些具體例，本發明之胜肽回應於序列識別號：1至5之胺基酸序列或其經修飾的版本，其中，有2個或更多的胺基酸被取代、刪除、插入及/或加成而仍維持誘導Th1細胞的能力。

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

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

【0015】本發明另一目的為提供癌症(即腫瘤)之治療及/或預防(亦即(避免)及/或避免其術後再復發之方法。也考慮用於誘導Th1細胞或用於誘導抗腫瘤免疫性之方法，包括投予一或多種本發明之胜肽、聚核苷酸、抗原呈現細胞、或醫藥藥劑或組合物的步驟。再者，本發明之Th1細胞，也發現有用於作為對癌症之疫苗，例子包括但不限於肝細胞癌(HCC)及黑色素瘤(melanoma)。

【0016】本發明特別考慮之目的的例子包括以下各項：

[1] 一種單離的胜肽，其長度為10-30個胺基酸且包含序列識別號: 9或11的一部分胺基酸序列，其中該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列：

(a) 一連續的胺基酸序列，其具有選自於序列識別號：1、2、3、4或5之胺基酸序列中的長於9個胺基酸；及

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

[2] 如[1]之單離的胜肽，其中，該胜肽或其片段有結合於

至少2種MHC第II類分子的能力。

[3] 如[2]之單離的胜肽，其中，該MHC第II類分子選自於由HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5構成之群組。

[4] 如[1]至[3]中任一項之單離的胜肽，其中，該胜肽包含具有GPC3-專一性細胞毒性T淋巴球(CTL)誘導能力之胜肽的胺基酸序列。

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

(a) 一胺基酸序列，其選自於序列識別號：1至5構成之群組；及

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

[6] 一種單離的聚核苷酸，其編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽。

[7] 一種組合物，係用於誘導選自於由以下構成之群組中至少一種細胞：

(i) Th1細胞

(ii) CTL

(iii)有能力誘導Th1細胞之抗原呈現細胞(APC)，及

(iv) 有能力誘導CTL之APC；

其中該組合物包含一或多種如[1]至[5]中任一項之胜肽，或一或多種編碼為此等胜肽的聚核苷酸，或一種組合物，係用於誘導選自於由以下構成之群組中至少一類型的細胞：

(i) Th1細胞

(ii) CTL

(iii) 有能力誘導 Th1細胞之抗原呈現細胞 (APC)，及

(iv) 有能力誘導 CTL 之 APC，

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

[8] 一種醫藥組合物，包含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分：

(a) 一或多種如 [1] 至 [5] 中任一項之胜肽；

(b) 一或多種如 [6] 之聚核苷酸；

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

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

(e) 以上 (a) 至 (d) 中任意兩或更多種的組合；

且此組合物被配製為供選自於由下列構成之群組中之用途：

(i) 癌治療

(ii) 癌預防

(iii) 預防癌之術後再復發，及

(iv) 上述 (i) 至 (iii) 中任意兩或更多種的組合。

[9] 如 [8] 之醫藥組合物，其中該組合物被配製為投予至以選自於由 HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2 及 HLA-DP5 構成之群組中至

少一種作為MHC第II類分子之對象，或如[8]之醫藥組合物，其中該組合物被配製為投予至具有至少一種MHC第II類分子係選自於由HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14及HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5構成之群組之對象。

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

[11] 一種組合物，係供增強由MHC第II類分子媒介之免疫反應，該組合物包含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分：

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

[12] 一種誘導APC之方法，該APC有能力誘導Th1細胞，該方法包含使APC於體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)與如[1]至[5]中任一項之勝肽接觸的步驟。

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

- (a) 使APC於體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)與如[1]至[5]中任一項之勝肽接觸；及

(b) 將編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽的聚核苷酸導入APC。

[14] 一種誘導Th1細胞之方法，包含選自於由以下構成之群組中之步驟：

(a) 共同培養CD4+ T細胞，及在表面呈現MHC第II類分子與如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之複合體的APC；及

(b) 將編碼為兩種T細胞受體(TCR)次單元之聚核苷酸、或編碼為各TCR次單元之聚核苷酸導入CD4+ T細胞內，其中該TCR能結合於在細胞表面上呈現的MHC第II類分子與如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之複合體，或一種誘導Th1細胞之方法，包含選自於由以下構成之群組中之步驟：

(a) 共同培養CD4+ T細胞，及在表面呈現MHC第II類分子與如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之複合體的APC；及

(b) 將編碼為兩種T細胞受體(TCR)次單元之聚核苷酸、或編碼為各TCR次單元之多重(multiple)聚核苷酸導入CD4+ T細胞內，其中該TCR能結合於在若為APC之一細胞表面上呈現的MHC第II類分子與如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之複合體。

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

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

(b) 共同培養CD8+ T細胞，及已接觸如[4]或[5]之胜肽的APC。

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

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

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

[18] 一種APC，係由如[12]或[13]之方法所誘導。

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

[20] 一種Th1細胞，係由如[14]之方法所誘導。

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

- (a) 一或多種如[1]至[5]中任一項之勝肽；
- (b) 一或多種如[6]之聚核苷酸；
- (c) 一或多種APC，其在表面上呈現如[1]至[5]中任一項之勝肽或其片段；
- (d) 一或多種Th1細胞，其辨識在表面上呈現如[1]至[5]中

任一項之胜肽或其片段之APC;及

(e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。

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

[23] 一種載體，包含編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽的核苷酸序列。

[24] 一種宿主細胞，其經過以如[23]之表現載體轉形或轉染。

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

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

【圖式簡單說明】

【0018】本發明之各種態樣及應用將會於該技術領域中具有通常知識者在考慮圖式之簡單說明以及本發明之詳細敘述及上述較佳實施例後顯明。

【0019】

[第 1A 圖]

第 1 圖顯示從健康捐贈者誘導 GPC3-LP 專一性輔助 T 細胞。由於以所述之 GPC3-LP 刺激單離的 CD4⁺ T 細胞，從健康捐贈者(HDs)產生 GPC3 專一性輔助(Th)細胞。對此產生的 Th 細胞以經 GPC3-LP 脈衝之自體 PBMC 再度刺激。IFN- γ 產生 Th 細胞之數目以 ELISPOT 分析法分析。顯示至少 3 次有類似結果之獨立實驗的代表性資料。在分格頂端顯示捐贈者之 HLA 第 II 類基因型。畫底線之 HLA 第 II 類對偶基因編碼將此勝肽對於採用自第 2 圖之 Th 細胞呈現之 HLA 第 II 類分子。(A) 從 HLA-DRB1*07:01/13:02 陽性健康捐贈者(HD10，分格左側)的 PBMC 以及 HLA-DRB1*04:05/09:01 陽性健康捐贈者(HD5，分格右側)的 PBMC 產生經 HLA-DR 限制之 GPC3-LP1 專一性 Th 細胞。

[第 1B 圖]

(B)從 HD10(分格上左側)、HLA-DRB1*08:03/14:05 陽性健康捐贈者(HD4，分格下左側)及 HLA-DRB1*09:01/14:54 陽性健康捐贈者(HD11，分格下右側)的 PBMC 產生經 HLA-DR 限制之 GPC3-LP2 專一性 Th 細胞。從 HLA-DPB1*02:01/04:02 陽性健康捐贈者(HD5，分格上右側)的 PBMC 產生經 HLA-DP 限制之 GPC3-LP2 專一性 Th 細胞。

[第 1C 圖]

(C)從 HD10(分格左側)及 HD5(分格右側)的 PBMC 產生經 HLA-DR 限制之 GPC3-LP3 專一性 Th 細胞。

[第 1D 圖]

(D)從 HLA-DPB1*08:02/15:02 陽性健康捐贈者 (HD3, 分格左側) 及 HD10(分格右側)的 PBMC 產生經 HLA-DR 限制之 GPC3-LP4 專一性 Th 細胞。

[第 1E 圖]

(E)從 HD10(分格左側)及 HD5(分格右側)的 PBMC 產生經 HLA-DR 限制之 GPC3-LP5 專一性 Th 細胞。

[第 2A 圖]

第 2 圖顯示 GPC3 專一性 Th 細胞的限制 HLA 第 II 類分子精確的 (exact) 辨識。利用如第 1 圖所示的 GPC3-LP 對以磁性小珠單離的 $CD4^+$ T 細胞進行刺激而從健康捐贈者 (HD) 產生 GPC3 專一性輔助 (Th) 細胞。從 HD 產生的 Th 細胞接著以自體 PBMC 或同種異體的 PBMC (allogeneic-PBMC) 或經個別的 GPC3-LP 脈衝之 L 細胞再次刺激。以 ELISPOT 分析法分析 IFN- γ 產生 Th 細胞的數目。顯示有類似結果的至少 2 次獨立實驗的代表性資料。捐贈者的 HLA 第 II 類基因型顯示於分格頂端。畫底線之 HLA 第 II 類對偶基因編碼將此勝肽對於 Th 細胞呈現之 HLA 第 II 類分子。(A)從 HD10(分格左側)及 HD5(分格右側)的 PBMC 產生經 HLA-DR52b 及 DR9 限制之 GPC3-LP1 專一性 Th 細胞。

[第 2B 圖]

(B) 從 HD10(分格左側)及 HD5(分格右側)的 PBMC 產生經 HLA-DR52b 及 DP2 限制之 GPC3-LP2 專一性 Th 細胞。

[第 2C 圖]

(C) 從 HD10(分格上側)及 HD5(分格下側)的 PBMC 產生經 HLA-DR7/53 及 DR9 限制之 GPC3-LP3 專一性 Th 細胞。

[第 2D 圖]

(D) 從 HD3(分格上側)及 HD10(分格下側)的 PBMC 產生經 HLA-DR15/51 及 DR13 限制之 GPC3-LP4 專一性 Th 細胞。

[第 2E 圖]

(E) 從 HD10(分格上側)及 HD5(分格下側)的 PBMC 產生經 HLA-DR13 及 DR9 限制之 GPC3-LP5 專一性 Th 細胞。

[第 3A 圖]

第 3 圖顯示

由 GPC3-LP1、2 及 4 專一性 T 細胞選殖體所產生的細胞激素曲線(profile)。將 Th 細胞和經同源勝肽脈衝之自體 PBMC 共同培養 24 小時後，收集培養懸浮層並使用 Bio-Plex 分析系統測量細胞激素(IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、GM-CSF 及 MIP1- β) 的濃度。資料以二重複之平均+/- SD 表示。

[第 3B 圖]

第 3 圖(繼續)

[第 3C 圖]

第 3 圖(繼續)

[第 4 圖]

第 4 圖顯示由載有重組人類 GPC3 蛋白質之 DC 呈現之經

天然處理的 GPC3-LP。 (A)由捐贈者 HD10 建立之經 HLA-DR52b(HLA-DRB3*02:02)限制及 GPC3-LP2 專一性之 Th 選殖體辨認出載有重組人類 GPC3 蛋白質的自體 DC。顯示有類似結果的 2 次二重複獨立實驗的代表性資料。(B)由捐贈者 HD10 建立之經 HLA-DR52b 限制之 GPC3-LP1 專一性 Th 選殖體辨認出載有重組人類 GPC3 蛋白質的自體 DC。(C)由捐贈者 HD10 建立之經 HLA-DR13 限制及 GPC3-LP4 專一性之 Th 選殖體辨認出載有重組人類 GPC3 蛋白質的自體 DC。顯示有類似結果的 3 次二重複獨立實驗的代表性資料。(D)由捐贈者 HD10 建立之經 HLA-DR13 限制及 GPC3-LP5 專一性之 Th 選殖體辨認出載有重組人類 GPC3 蛋白質的自體 DC。

[第 5A 圖]

第 5 圖顯示 DC 於體外 (*in vitro*) 對 A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂-SP 專一性及經 HLA-A2 限制之 CTL 誘導有效的 GPC3-LP2 交叉呈現 (cross-presentation)，並於 HLA-A2 Tgm 體內 (*in vivo*) 誘導有效的交叉起動 (cross-priming)。(A)由健康捐贈者 HD5(HLA-A2 陽性及 HLA-DP2 陽性)建立之 A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂-SP 專一性 CTL，於體外 (*in vitro*) 以經包覆在 (encapsulated) 脂質體中的 GPC3-LP2(Lip-GPC3-LP2)、包覆在 脂質體 中 的 IMP3₅₀₇₋₅₂₇-LP(Lip- 對照 LP)、脂質體 和 可溶的 GPC3-LP2(Lip+GPC3-LP2)、或單獨的脂質體 (Lip) 脈衝之自體 DC 進行刺激。顯示有類似結果的 3 次獨立實驗的代表性資料。(B-D)，以乳化於 IFA 中之 A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂-SP (SP-IFA-PBS)、GPC3-LP2(LP2-IFA-PBS)、或乳化於 IFA 中之 PBS(IFAPBS)

對 HLA-A2 Tgm 小鼠實施免疫。在第 2 次實施免疫的 7 天後，從鼠蹊部淋巴結中單離出小鼠 CD4⁺/CD8⁺ T 細胞，並於生物體外 (*ex vivo*) 以 經 GPC3-LP2 或 GPC3-LP5(對 照 LP) 及 A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂-SP 、 A2-CDCA1-SP 或 A2-HIV-SP 脍衝的 BMDC 進行刺激。以生物體外 (*ex vivo*) ELISPOT 分析法分析 IFN- γ 產生小鼠 CD4⁺/CD8⁺ T 細胞的數目。顯示有類似結果的至少 2-4 次二重複或三重複之獨立實驗(每個組別 2-3 隻小鼠)的代表性資料。

[第 5B 圖]

(B) 使用等量的 SP 及 LP 分子以實施免疫接種 (immunization)。

[第 5C 圖]

(C) 當使用等莫耳劑量的胜肽時，比起體內 (*in vivo*) 的 GPC3-A2-SP 免疫接種 (immunization) ， GPC3-LP2 免疫接種誘導增強的 SP 專一性 CTL 反應。

[第 5D 圖]

(D) GPC3-LP2 專一性 CD4⁺ Th 細胞反應單離自從相同匯集處 (pooled) 之鼠蹊部淋巴結。

[第 6A 圖]

第 6 圖顯示經接種 GPC3-SP 疫苗後之肝細胞癌 (HCC) 病患的 PBMC 中存在 GPC3-LP 專一性 Th 細胞。(A-C)。於體外 (*in vitro*) 以 GPC3-LP1 、 2 、 3 、 4 及 5 加上 IL-2 及 IL-7 的混合物對衍生自經接種 GPC3-SP 疫苗 (表 3) 之肝細胞癌 (HCC) 病患的冷凍周邊血液單核細胞 (PBMC) 進行刺激。7 天之後，利用

IFN- γ (ELISPOT)分析法探測個別的 GPC3-LP 專一性 T 細胞的頻率，如(A)總結。在 18 位受測的肝細胞癌(HCC)病患中，有 11 位觀察到 Th 細胞反應。利用對 HLA-DR、DQ 或 DP 具有專一性的單株抗體以阻斷分析法(blocking assay)確認 GPC3-LP 專一性 Th 細胞的 HLA 第 II 類限制分子。

[第 6B 圖]

GPC3-LP2 專一性 Th 細胞反應。

[第 6C 圖]

GPC3-LP3 專一性 Th 細胞反應。

[第 6D 圖]

GPC3-LP4 專一性 Th 細胞反應。

[第 6E 圖]

GPC3-LP5 專一性 Th 細胞反應。

[第 7A 圖]

第 7 圖顯示利用電腦演算法預測包含(encompassing)GPC3 衍生及混雜的(promiscuous)HLA 第 II 類結合勝肽的 CTL 抗原決定位。(A)於第 7A 圖中，箭頭顯示天冬醯胺酸(asparagine)或絲胺酸(serine)上糖基化(glycosylation)有潛力之位置，其胺基酸位置為 124、241、418、495 及 509。

[第 7B 圖]

使用演算法(<http://tools.immuneepitope.org/mhcii/>)分析人類 GPC3 蛋白質之胺基酸序列，水平軸上的數字代表在 GPC3 衍生之 15 員勝肽 N 端上的胺基酸位置。小數字的百分等級(percentile rank)代表對於 HLA 第 II 類分子的高結合親和性。

避免將在天門冬胺酸(asparagine)及絲胺酸(serine)上具有醣基化潛在位置的區域作為候選勝肽的選擇(<http://www.uniprot.org/uniprot/P51654>)。(B)對於多種 HLA 第 II 類對偶基因(DRB1*09:01、DRB1*04:05、DRB1*07:01、DRB1*13:02、DRB1*15:02、DPB1*02:01 及 DRB1*05:01)產物具有高一致性百分等級的 LP、 $GPC3-LP1; GPC3_{92-116}$ (25員)、 $GPC3-LP2; GPC3_{137-161}$ (25員)、 $GPC3-LP3; GPC3_{289-313}$ (25員)、 $GPC3-LP4; GPC3_{386-412}$ (27員)及 $GPC3_{556-576}$ (21員)以及經 HLA-A2 或 -A2 限制之 CTL 辨識之 9員勝肽(A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂、A24-GPC3₂₉₈₋₃₀₆)分別以長條(A)以及畫底線之粗體字母(B)顯示。

[第 8A 圖]

第 8 圖顯示從健康捐贈者誘導 GPC3-LP 專一性 Th 細胞。以 GPC3-LP 刺激從健康捐贈者的 PBMC 產生 GPC3-LP 專一性 Th 細胞。以經 GPC3-LP 脈衝的自體 PBMC 或同種異體的 PBMC(allogeneic-PBMC)對此產生的 Th 細胞進行再刺激。以 ELISPOT 分析法分析 IFN- γ 產生 Th 細胞的數目。顯示有類似結果之至少 3 次獨立實驗的代表性資料。捐贈者之 HLA 第 II 類基因型顯示在分格頂端。畫底線之 HLA 第 II 類分子編碼將此勝肽對於 Th 細胞呈現之 HLA 第 II 類分子。(A)從 HLA-DR9/14 陽性健康捐贈者(HD11)產生經 HLA-DR 限制之 GPC3-LP1 專一性 Th 細胞(與第 1 圖相關)。

[第 8B 圖]

(B)從 HLA-DR7/13 陽性健康捐贈者(HD10)的 PBMC 產生

經 HLA-DR13/52b 限制之 GPC3 專一性 Th 細胞。HD10 之後使用 L 細胞被證實為 HLA-DR52b。

[第 8C 圖]

(C) 從 HLA-DP2 陽性健康捐贈者(HD5) 的 PBMC 產生經 HLA-DR2 限制之 GPC3-LP2 專一性 Th 細胞。

[第 8D 圖]

(D) 從 HLA-DRB1*08:03/14:05 陽性健康捐贈者(HD4)產生經 HLA-DR8 限制之 GPC3-LP2 專一性 Th 細胞(B-D 與第 2 圖相關)。

[第 8E 圖]

(E) 從 HLA-DRB1*08:03/14:05 陽性健康捐贈者(HD4)產生經 HLA-DR8 限制之 GPC3-LP2 專一性 Th 細胞。

[第 9 圖]

第 9 圖顯示使用等莫耳劑量的勝肽時，於體內(*in vivo*)免疫接種(immunization)GPC3-LP2 誘導之增加的 SP 專一性 CTL 反應與免疫接種 A2-GPC3-SP 的比較。以 7 天為間隔對 HLA-A2/(I-A^b)Tgm (3 隻小鼠/組)接種兩次等莫耳劑量的 A2-GPC3-SP(SP-IFA-PBS, 50 micro-g)、 GPC3-LP2(LP2-IFA-PBS, 132.5 micro-g)或單獨的乳化於 IFA 中之 PBS(IFP-PBS)。(A)在第 2 次免疫接種的 7 天後，小鼠 CD8⁺ T 細胞係利用磁性小珠(陽性篩選)從 3 隻小鼠的鼠蹊部淋巴結單離，並於生物體外(*ex vivo*)以經 A2-GPC3-SP 或 A2-CDCA1-SP 脍衝之 BMDC 進行刺激。(B)以經 GPC3-LP2 或 GPC3-LP5(對照 LP)脈衝之 BMDC 對單離字相同來源的鼠蹊部

淋巴結的 CD4⁺ T 細胞進行刺激。以生物體外(*ex vivo*)ELISPOT 分析法分析 IFN- γ 產生小鼠 CD8⁺或 CD4⁺Th 細胞的數目。顯示有類似結果之三重複的 2 次獨立實驗(3 隻小鼠/組)的代表性資料。

[第 10A-1 圖]

第 10 圖顯示經接種 GPC3-SP 疫苗的 HCC 病患的 PBMC 中存在 GPC3-LP 專一性 Th 細胞。(A-C)。於體外(*in vitro*)以 GPC3-LP1、2、3、4 及 5 加上 IL-2 及 IL-7 的混合物對衍生自經接種 GPC3-SP 疫苗(表 3)之 HCC 病患的冷凍周邊血液單核細胞(PBMC)進行刺激。7 天之後，以 IFN- γ ELISPOT 分析法檢測個別的 GPC3-LP 專一性 T 細胞的頻率。觀察 HCC 病患中的 GPC3-LP2 專一性(A)、LP3 專一性(B)、LP4 專一性(C)、LP5 專一性(D)之 Th 細胞反應。利用對 HLA-DR、DQ 或 DP 具有專一性的單株抗體以阻斷分析法(blocking assay)確認 HLA 第 II 類限制之 GPC3-LP 專一性 Th 細胞。

[第 10A-2 圖]

第 10A 圖(繼續)

[第 10B 圖]

GPC3-LP3 專一性 Th 細胞反應

[第 10C 圖]

GPC3-LP4 專一性 Th 細胞反應

[第 10D 圖]

GPC3-LP5 專一性 Th 細胞反應

【實施方式】

【0020】 雖然任何類似於或均等於在此所述的方法或材料可用於實施或測試本發明具體例，以下仍敘述較佳的材料、方法及裝置。然而，敘述該材料及方法前，應瞭解此等敘述僅為供理解而非意欲限制。應瞭解本發明不限於在此敘述的特定大小、形狀、方向、尺寸、材料、方法學、試驗步驟等，因為此等會由於例行的實驗及/或最適化而改變。再者，在敘述中使用的用語僅係用敘述特定版本或具體例，不意欲限制本發明的範圍，本發明範圍僅由附帶的申請專利範圍限制。

【0021】 在本說明書中提到的各出版物、專利或專利申請案的揭示係特別完整納入於此作為參考。但是，不理解為承認本發明不早於此揭示或早先的發明。

【0022】 I. 定義

除非特別指明，在此使用的所有技術及科學用語與本發明所屬技術領域中具有通常知識者一般瞭解的含意相同。然而，若有抵觸，依本說明書，包括定義為準。

【0023】 除非特別指明，此處使用的單字「一」("a" or "an")及「該」意指「至少一」。

【0024】 與物質(例如，胜肽、抗體、聚核苷酸等)關連使用的用語「經單離」及「經純化」，係指該物質實質上不含有可能會包括在天然來源的至少一種物質。因此，一經單離或經純化的胜肽係指實質上不含細胞材料例如碳水化合物、脂質或來自該胜肽從其衍生出之細胞或組織來源的其他污染蛋白質，或當係化學合成時實質上不含化學前驅體或其他化學物質。

【0025】 用語「實質上不含細胞材料」，包括製備一胜肽，

其中該胜肽係從其單離的細胞的細胞成分分離，或重組產生。因此，實質上不含細胞材料的胜肽，包括多胜肽之製備物其具有少於約30%、20%、10%或5% (以乾重計)的異質蛋白質(在此也稱為「污染蛋白質」)。當該胜肽係以重組產生時，其亦較佳為實質上不含培養基，其包括胜肽之製備物且具有少於約該胜肽製備物的20%、10%、或5%體積的培養基。當該胜肽係以化學合成生產時，較佳為實質上不含化學前驅體或其他化學物質，其包括胜肽之製備物且少於約該胜肽製備物的30%、20%、10%、5% (以乾重計)之涉及合成該胜肽的化學前驅體或其他化學物質。含有經單離的或經純化的胜肽的特定胜肽，例如可藉由將該在蛋白質製備物進行之十二烷基硫酸鈉(SDS)聚丙烯醯胺凝膠電泳與考馬西亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色或類似之膠體後之單一譜帶的出現而顯示。於一較佳具體例，本發明之胜肽及聚核苷酸係經單離的或經純化。

【0026】 用語「多胜肽」、「胜肽」及「蛋白質」在此係可互換地指胺基酸殘基的聚合物。此用語適用於胺基酸聚合物，於其中一個或更多胺基酸殘基為經修飾的殘基，或非天然發生的殘基，例如對應的天然發生的胺基酸及對應的天然發生的胺基酸聚合物的人造化學擬似物。

【0027】 用語「胺基酸」在此意指天然發生的及合成的胺基酸，及胺基酸類似物及與天然發生的胺基酸的作用類似的胺基酸擬似物。天然發生的胺基酸係由遺傳碼編碼者，以及於細胞中轉譯後經過修飾者(例如羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸，及O-磷絲胺酸)。用詞「胺基酸類似物」意指與天然發生胺基酸

具有相同基本化學結構(鍵結於氫的 α -碳、羧基、胺基及 R 基)但是具有經過修飾的 R 基或經過修飾的骨架(例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸、亞礦、甲硫胺酸甲基銨鹽)。用詞「胺基酸擬似物」意指與一般胺基酸具有不同結構但有類似功能的化學化合物。

【0028】 胺基酸在此可使用其通用的三字母符號或由 IUPAC-IUB 生化命名協會建議的單字母符號指明。

【0029】 用語「基因」、「聚核苷酸」及「核酸」在此可互換使用，且如無特別指明，係以其通用可接受的單字母碼所指明者。

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

【0030】 用詞「有效成分」意指在組合物當中有生物學活性或生理活性的物質。尤其，於一醫藥組合物的背景中，「有效成分」係指顯示目標的藥理作用的物質。例如，當醫藥組合物使用在癌症治療或預防時，組合物中的有效成分可直接或間

接引導至少一種作用在癌細胞及/或組織的生物學或生理學作用。較佳者，該作用包括減少或抑制癌細胞生長，損害或殺死癌細胞及/或組織等。通常，有效成分的間接作用係誘導MHC第II類分子媒介的免疫反應。在被配製(formulated)前，「有效成分」也稱為「散裝物質(bulk)」、「藥物物質」或「技術品」。此處使用之用語「醫藥上可接受之擔體」或「生理上可接受之擔體」，係指醫藥上或生理上可接受之材料、組合物、物質、化合物或載體，包括但不限於液體或固體填料、稀釋劑、賦形劑、溶劑或膠囊化材料。

【0031】 除非另外定義，用語「癌症」意指表現GPC3基因的癌症，例如包括 肝細胞癌(HCC)及黑色素瘤(melanoma)。表現GPC3基因之癌症也被稱作表現GPC3之癌，或表現編碼GPC3基因之癌。

【0032】 除非另外定義，用語「T淋巴球」及「T細胞」在此可以互換使用。

【0033】 除非另外定義，用語「細胞毒性T淋巴球」、「細胞毒性T細胞」及「CTL」，在此可互換使用，且除非特別指明，意指T淋巴球的次群組，其能辨識非己細胞(例如腫瘤細胞、受病毒感染的細胞)，並誘導此種細胞的死亡。CTL係從CD8⁺ T淋巴球分化，且能辨識由MHC第I類分子呈現的勝肽。

【0034】 除非另外定義，用語「HLA-A24」在此意指包含亞型HLA-A24的型，亞型的例子包括但不限於HLA-A*24:01、HLA-A*24:02、HLA-A*24:03、HLA-A*24:04、HLA-A*24:07、HLA-A*24:08、HLA-A*24:20、HLA-A*24:25及HLA-A*24:88。

【0035】除非另外定義，用語「HLA-A2」在此代表性意指亞型，亞型的例子包括但不限於HLA-A*02:01、HLA-A*02:02、HLA-A*02:03、HLA-A*02:04、HLA-A*02:05、HLA-A*02:06、HLA-A*02:07、HLA-A*02:10、HLA-A*02:11、HLA-A*02:13、HLA-A*02:16、HLA-A*02:18、HLA-A*02:19、HLA-A*02:28及HLA-A*02:50。

【0036】除非另外定義，用語「T輔助1型細胞」及「Th1細胞」，在此係可互換使用，且除非特別指明，係指能夠辨識由MHC第II類分子呈現的勝肽且關連於細胞免疫的CD4⁺ T淋巴球次群組。除非另有定義，用語「Th細胞」、「CD4⁺ T細胞」及「CD4⁺ 輔助T細胞」，在此亦可互換使用。Th1細胞分泌多種細胞素(例如IFN- γ 、IL-2、TNF- β 、GM-CSF、TNF- α 等)來幫忙活化及/或刺激其他關於細胞免疫的免疫細胞(例如CTL、巨噬體)。

【0037】除非另有定義，用語「HLA-DR8」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB1*08:01、HLA-DRB1*08:02、HLA-DRB1*08:03、HLA-DRB1*08:04、HLA-DRB1*08:05、HLA-DRB1*08:06、HLA-DRB1*08:07、HLA-DRB1*08:10、HLA-DRB1*08:11及HLA-DRB1*08:12。

【0038】除非另有定義，用語「HLA-DR9」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*09:02、HLA-DRB1*09:03、HLA-DRB1*09:04、HLA-DRB1*09:05、HLA-DRB1*09:06、HLA-DRB1*09:07、HLA-DRB1*09:08及HLA-DRB1*09:09。

【0039】除非另有定義，用語「HLA-DR13」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB1*13:01至HLA-DRB1*13:08及HLA-DRB1*13:10。

【0040】除非另有定義，用語「HLA-DR14」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB1*14:01、HLA-DRB1*14:02、HLA-DRB1*14:03、HLA-DRB1*14:04、HLA-DRB1*14:05、HLA-DRB1*14:06、HLA-DRB1*14:07、HLA-DRB1*14:08及HLA-DRB1*14:10。

【0041】除非另有定義，用語「HLA-DR52b」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB3*02:02。

【0042】除非另有定義，用語「HLA-DR8」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB1*08:01、HLA-DRB1*08:02、HLA-DRB1*08:03、HLA-DRB1*08:04、HLA-DRB1*08:05、HLA-DRB1*08:06、HLA-DRB1*08:07、HLA-DRB1*08:10、HLA-DRB1*08:11及HLA-DRB1*08:12。

【0043】除非另有定義，用語「HLA-DR15」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DRB1*15:01、HLA-DRB1*15:02、HLA-DRB1*15:03、HLA-DRB1*15:04、HLA-DRB1*15:05、HLA-DRB1*15:06、HLA-DRB1*15:07、HLA-DRB1*15:08、HLA-DRB1*15:09、HLA-DRB1*15:10及HLA-DRB1*15:11。

【0044】除非另有定義，用語「HLA-DP2」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DPB1*02:01及HLA-DPB1*02:02。

【0045】除非另有定義，用語「HLA-DP5」係指亞型，其例子包括但不限於HLA-DPB1*05:01。

【0046】除非另有定義，詞語「經由MHC第II類分子媒介的免疫反應」，係指由於MHC第II類分子呈現勝肽所誘導之免疫反應。在此「由MHC第II類抗原媒介之免疫反應」，包括由CD4⁺ T細胞，特別是Th1細胞誘導的免疫反應。此種免疫反應的例子包括但不限於生產細胞素(例如IFN- γ 、IL-2、TNF- β 、GM-CSF、TNF- α 等)，及活化及/或刺激其他免疫細胞(例如CTL、巨噬體等)。

【0047】除非另有定義，詞語「專一於GPC3之Th1細胞」，係指由呈現衍生自GPC3之勝肽的抗原呈現細胞所專一性活化，而不被其他抗原呈現細胞活化的Th1細胞。

【0048】除非另有定義，詞語「GPC3-專一性CTL」，係指對抗表現GPC3之目標細胞專一性顯示細胞毒殺性的CTL。

【0049】除非另有定義，當使用在勝肽上下文，詞語「CTL誘導能力」，係指一勝肽當被呈現於抗原呈現細胞上時，誘導CTL的能力。

【0050】除非另有定義，在此使用之用語「套組」，係參照試劑及其他材料的組合來使用。在此考慮到此套組可包括微陣列、晶片、標記等。此用語「套組」不意欲限制在特定的試劑及/或材料的組合。

【0051】本發明上下文中，用語「抗體」意指專一地對於指定蛋白質或其勝肽反應的免疫球蛋白及其片段。抗體的例子可包括人類抗體、靈長源抗體、嵌合抗體、雙專一抗體、人類化抗體、融合於其他蛋白質或放射性標記的抗體，及抗體片段。再者，抗體在此係以最廣的含意使用，且具體而言含蓋完

整無缺的單株抗體、多株抗體、多專一性抗體(例如雙專一性抗體)，及抗體片段，該抗體片段只要能顯現所望的生物學活性即可。「抗體」代表所有類型者(例如 IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM)。

【0052】 除非另外定義，在此使用的所有技術及科學用語與本發明所屬技術領域中具有通常知識者一般了解的含意相同。

【0053】 II. 胜肽

以下詳述之本發明之胜肽，可指稱為「GPC3胜肽」或「GPC3多胜肽」。

為了證明衍生自 GPC3之胜肽作用如一被 T輔助 1型 (Th1) 細胞所辨認之抗原，分析衍生自 GPC3之胜肽(序列識別號：9或11)以確定是否其為由一 MHC 第 II 類分子混雜地限制之抗原決定位。衍生自 GPC3之混雜的 MHC 第 II 類結合胜肽的候選物，基於其對 HLA-DR8 、 HLA-DR52b 、 HLA-DR14 、 HLA-DR9 、 HLA-DR13 、 HLA-DR15 、 HLA-DP2 及 HLA-DP5 之結合親和力確認。在藉由載有這些胜肽之樹突細胞 (dendritic cell, DC) 以體外刺激 CD 4⁺ T細胞後，使用下列各個胜肽成功建立 Th1細胞： GPC3₉₂₋₁₁₆-LP / LLQSASMELKFLIIQNAAVFQEAFE (序列識別號：1) 、 GPC3₁₃₇₋₁₆₁-LP / LTPQAFEFVGEFFTDVSLYILGSDI (序列識別號：2) 、 GPC3₂₈₉₋₃₁₃-LP / VVEIDKYWREYILSLEELVNGMYRI (序列識別號：3) 、 GPC3₃₈₆₋₄₁₂-LP / SRRRELIQKLKSFISFY SALPGYICSH (序列識別號：4) 及 GPC3₅₅₆₋₅₇₆-LP / GNVHSPLKLLTSMAISVVCF (序列識別號：5)。

識別號：5)。

【0054】此等上述提及的已建立的Th1細胞，顯示回應於經各別的胜肽脈衝之抗原呈現細胞的刺激，顯示強的專一性的Th1細胞活性。再者，上述胜肽可以刺激由數種日本群體常見的HLA-DR及HLA-DP分子（例如HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5）限制的Th1細胞。此等結果證明GPC3係由Th1細胞辨識的抗原，且此胜肽係受數種HLA-第II類分子（例如HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5）混雜地限制的GPC3的抗原決定位胜肽。

【0055】上述鑑別的一些胜肽更包括一CTL抗原決定位之胺基酸序列，其有誘導專一於GPC3之CTL的能力，且如同此處證明，此胜肽可誘導專一於GPC3之CTL及Th1細胞。因此此等胜肽作可用於誘導對抗表現GPC3之癌的免疫反應之適合的胜肽。因為GPC3基因在大多數癌組織係過度表現，包括例如肝細胞癌(HCC)及黑色素瘤(melanoma)，代表其係免疫療法的一個良好標的。

【0056】因此本發明提供有誘導專一於GPC3之Th1細胞之能力的胜肽。本發明之胜肽可結合於至少一MHC第II類分子，並被呈現在抗原呈現細胞上。或本發明之胜肽之片段可結合於至少一MHC第II類分子，並被呈現在抗原呈現細胞上。此胜肽之片段，可藉由在抗原呈現細胞處理而產生。於較佳具體例，本發明之胜肽或其片段有能力結合於2或更多種MHC第II

類分子(例如HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5)。換言之，本發明之胜肽有能力誘導受2或更多種MHC第II類分子限制之Th1細胞。於另一具體例，本發明之胜肽包括有GPC3-專一性CTL誘導能力之胜肽之胺基酸序列。此種具GPC3-專一性CTL誘導能力的胜肽的典型例，包括有序列識別號：6或7之胺基酸序列的胜肽。

【0057】由於MHC第II類分子中之結合溝係在兩端開放，所以可容MHC第II類結合胜肽於長度有靈活性。MHC第II類分子的核心模體由9個胺基酸殘基組成，且MHC第II類結合胜肽一般在此核心結合模體的側面有其他的胺基酸殘基。側面胺基酸殘基之數目不限。因此，並非序列識別號1、2、3、4或5之所有胺基酸殘基對結合於MHC第II類分子為必要。因此本發明之胜肽可為有能力誘導Th1細胞之胜肽，此種胜肽包括選自於由以下構成之群組之胺基酸序列：

- (a) 一連續的胺基酸序列，其具有選自於序列識別號：1、2、3、4或5之胺基酸序列中的長於9個胺基酸；及
- (b) 如(a)之胺基酸序列，其中胺基酸序列有1個、2個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加。

MHC第II類結合胜肽通常為10-30個胺基酸。當序列識別號：1至5之胺基酸序列係由GPC3(序列識別號：9或11)之部分胺基酸序列構成，本發明之胜肽可為以下[1]至[5]之胜肽：

[1] 一種單離的胜肽，其長度為10-30個胺基酸且包含序列識別號：9或11的一部分胺基酸序列，其中該胜肽包含選自由以

下構成之群組的胺基酸序列：

- (a) 一連續的胺基酸序列，其具有選自於序列識別號：1、2、3、4或5之胺基酸序列中的長於9個胺基酸；及
- (b) 一胺基酸序列，其中(a)之胺基酸序列有1個、2個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加，該勝肽有誘導T輔助1型(Th1)細胞的能力。

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

[3] 如[2]之單離的勝肽，其中，該MHC第II類分子選自於由HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5構成之群組。

[4] 如[1]至[3]中任一項之單離的勝肽，其中，該勝肽包含具有GPC3-專一性細胞毒性T淋巴球(CTL)誘導能力之勝肽的胺基酸序列。

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

(a) 一胺基酸序列，其選自於序列識別號：1至5構成之群組；及

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

【0058】 本發明之勝肽誘導之Th1細胞對於GPC3係專一。因此於一些具體例，本發明提供長度少於30個胺基酸之勝肽，其由序列識別號：9或11的胺基酸序列的一部分胺基酸序列所構成，其中該勝肽包含序列識別號1、2、3、4或5之胺基酸序列。

【0059】一般而言，現在例如在網際網路上已有軟體程式例如 Wang P et al. 2008. *PLoS Comput Biol*。4(4):e1000048. 11:568;及 Wang P et al. 2010. *BMC Bioinformatics*所述者可用於以電腦模擬計算各種勝肽與HLA抗原的結合親和性。與HLA抗原的結合親和性可例如以於例如 Nielsen M and Lund O. 2009. *BMC Bioinformatics*. 10:296.; Nielsen M et al. 2007. *BMC Bioinformatics*. 8:238. Bui HH, et al. 2005. *Immunogenetics*. 57:304-14. Sturniolo T et al. 1999. *Nat Biotechnol*. 17(6):555-61 and Nielsen M et al. 2008. *PLoS Comput Biol*. 4(7)e1000107所述者測量。因此本發明包含GPC3的勝肽片段，其係以此種已知程式預測會與鑑別的HLA抗原結合。

【0060】如上述，MHC第II類結合勝肽在其長度有靈活性，序列識別號1、2、3、4或5之胺基酸序列可選擇性地有額外的胺基酸殘基位在側面，條件是獲得之勝肽保留必要的Th1細胞誘導能力即可。此種有Th1細胞誘導能力的勝肽一般少約於30個胺基酸，常少於約29個胺基酸，經常少於約28或27個胺基酸。位在選自序列識別號：1至5中之胺基酸序列側面的胺基酸序列，不特別限制，且可包括任意種類胺基酸，條件是只要此側面胺基酸序列不要減弱原始勝肽之Th1細胞誘導能力即可。於典型的具體例，此種側面胺基酸序列可選自於鄰近於序列識別號：1、2、3、4或5之胺基酸序列的序列識別號：9或11之胺基酸序列；但本發明不限於此。如上，本發明也包括有Th1細胞誘導能力的勝肽，及選自序列識別號：1至5之胺基酸序列。

【0061】另一方面，由於MHC第II類分子之核心結合模體由

9個胺基酸殘基組成，所以序列識別號：1、2、3、4或5之胺基酸序列全長對於結合於MHC第II類分子及誘導Th1細胞並非為必要。因此，本發明勝肽之形式可為有超過來自序列識別號1、2、3、4或5之胺基酸序列之9個連續胺基酸的勝肽，前提是此勝肽保留必要的Th1細胞誘導能力。有Th1細胞誘導能力之勝肽，一般長於約10個胺基酸，時常超過11或12個胺基酸，經常長於13或14個胺基酸。因此本發明之勝肽可為有Th1細胞誘導能力之勝肽，且為有來自序列識別號：1、2、3、4或5之胺基酸序列之長於9、10、11、12、13或14個連續胺基酸之胺基酸序列。

【0062】一般而言，已知在蛋白質中修飾一個或更多胺基酸不會影響該蛋白質的功能，或有時甚至會增強原始蛋白質的所望功能。事實上，經修飾的勝肽(即，相較於原始參考序列，由在其中一、二或數個胺基酸殘基已被修飾(即，取代、刪除、插入或加成)之胺酸序列所構成的勝肽)已知會保留原始勝肽的生物學活性(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。因此，於本發明一具體例中，本發明之勝肽可具有Th1細胞誘導能力與其中一、二或更多胺基酸經加成、插入、刪除及/或取代之選自序列識別號：1至5中的胺基酸序列兩者。或者，本發明之勝肽可具有Th1細胞誘導能力，及具有一胺基酸序列於其中一、二或更多胺基酸加成、插入、刪除及/或取代於序列識別號：1、2、3、4或5中。亦即，在一些

具體例中，本發明的胜肽可具有Th1細胞誘導能力及一胺基酸序列，於其中對胺基酸序列識別號：1、2、3、4或5中進行一、二或選自於下列所構成之族群：加成、插入、刪除及取代之數個修飾。

【0063】熟悉此技藝人士會認定改變單一胺基酸或一小百分比之胺基酸之對於一胺基酸序列的個別的添加或取代傾向產生保存原始胺基酸支鏈的特性。因此它們常被意指為「保守取代(conservative substitutions)」或「保守修飾(conservative modifications)」，其中一蛋白質之改變導致對原始蛋白質而言一具有功能相似的蛋白質。提供功能相似胺基酸之保守取代表已為本技術領域所熟知。胺基酸支鏈的特徵的例子為疏水胺基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水胺基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)與具有下列共同官能基或特徵之支鏈：一脂肪族支鏈(G, A, V, L, I, P)；一含羥基支鏈(S, T, Y)；含硫原子支鏈(C, M)；含羧酸與胺基支鏈(D, N, E, Q)；含鹼支鏈(R, K, H)；以及含芳香族支鏈(H, F, Y, W)。此外，下列八個群體各包含為彼此保守取代之胺基酸：

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

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

【0064】此種經保守修飾胜肽也被視為本發明之胜肽。然而，本發明之胜肽並不限於此，且可包括非保守修飾，只要經修飾之胜肽維持原始胜肽的 Th1 細胞誘導能力。更進一步而言，經修飾之胜肽不排除多形變體 (polymorphic variants)、種間同質體 (interspecies homologues) 與 GPC3 對偶基因 (alleles) 可誘導 Th1 細胞的胜肽。

【0065】為了維持 Th1 細胞誘導能力，可修飾 (插入、加入、刪除 / 或取代)一小數目 (例如一、二或數個) 或小百分比之胺基酸。此處用語「數個」指 5 或更少個胺基酸，例如 4 個或 3 個或更少。被修飾之胺基酸之百分比可為，較佳 20% 或更少，更較佳為，15% 或更少，甚至更佳為為，10% 或 8%，少或 1 至 5%。

【0066】本發明之較佳胜肽，即序列識別號：1 至 5 (GPC3₉₂₋₁₁₆-LP、GPC3₁₃₇₋₁₆₁-LP、GPC3₂₈₉₋₃₁₃-LP、GPC3₃₈₆₋₄₁₂-LP 及 GPC3₅₅₆₋₅₇₆-LP) 之同源性分析結果確認此等胜肽與其他任何已知人類基因產物所衍生的胜肽不具顯著同源性。所以，當使用於免疫療法時，可顯著降低這些胜肽產生未知或不欲的免疫反應的可能性。因此，此等胜肽被預期對於在癌症病患中誘出對抗 GPC3 的免疫性高度有用。

【0067】當使用於免疫療法之背景中，本發明之胜肽或其片段應呈現在抗原呈現細胞的表面，較佳為以與 HLA 第 II 類抗原之複合體的形式呈現。因此宜選擇不僅會誘導 Th1 細胞，而且對於 HLA 第 II 類抗原擁有高結合親和性的胜肽。為此，可將

胜肽利用取代、插入、刪除及/或加成胺基酸殘基進行修飾，以產生結合親和性有所改善的修飾胜肽。

【0068】 本發明也考量附加一、二或數個胺基酸到該胜肽的N及C端之一或兩者。此種經修飾的具有高度HLA抗原結合親和性的胜肽並保留Th1細胞誘導能力者，也包括於本發明。

【0069】 例如本發明提供長度短於31、30、29、28、27或26個胺基酸的單離的胜肽，其結合於HLA第II類抗原且具有Th1細胞誘導能力，且包含選自於序列識別號：1至5構成的群組中的胺基酸序列中有1、2或數個胺基酸經修飾的胺基酸序列。

【0070】 當此等胜肽與APC接觸，或被導入APC，會在APC中被處理而在APC上以經處理的片段被呈現。例如，本發明之胜肽可被處理成通常由11-26個(普通為15-25個)胺基酸殘基構成的片段，以呈現在APC表面。

【0071】 但，當該胜肽序列與具有不同功能的內生或外生蛋白質的胺基酸序列有一部分相同時，可能會引起副作用，例如自體免疫病症或對於特定物質之過敏症狀。因此，可使用可得的資料庫一開始進行同源性檢索，以避免該胜肽的序列符合其他蛋白質的胺基酸序列的情況。當與自然存在之目標胜肽相較，同源性檢索顯示沒有相同或與目標胜肽有1或2個胺基酸差異的胜肽時，可將該目標胜肽修飾以增強與HLA抗原的結合親和性，及/或增強其Th1細胞誘導能力及/或CTL誘導能力而不會有此種副作用的危險。

【0072】 雖然上述對於該HLA第II類抗原具有高度結合親和性的胜肽，預期為高度有效，但是依照存在高度結合親和性

當做指標的候選勝肽，仍然進一步要檢驗其Th1細胞誘導能力的存在性。在此，用詞「Th1細胞誘導能力」代表當與抗原呈現細胞(APC)接觸時，勝肽經由抗原呈現細胞(APC)授予誘導Th1細胞的能力。又，「Th1細胞誘導能力」包括勝肽誘導Th1細胞活化及/或Th1細胞增殖、促進Th1細胞媒介細胞激素產生，其包括IFN- γ 產生，以幫助及/或刺激其他的細胞(例如CTL、巨噬體)。

【0073】 Th1細胞誘導能力的確認係由以下方式達成：誘導攜帶人類MHC抗原的APC(例如B-淋巴球、巨噬體、及樹狀細胞(DC))，較佳由人類周邊血液單核白血球衍生的DC，與以該勝肽刺激後，與CD4-陽性T細胞(CD4 $^{+}$ T細胞)混合，然後測量該CD4 $^{+}$ T細胞生產與釋出的IFN- γ 。或者，該勝肽的Th1細胞誘導能力，可藉由Th1細胞對於CTL之活化來評估。比如，將CD4 $^{+}$ T細胞與由測試勝肽刺激的DC一起培養，然後跟CTL及針對CTL之標靶細胞混合。可將目標細胞以 ^{51}Cr 等放射性標定，從該Th1細胞釋出的細胞素所活化的CTL的細胞毒殺活性，可藉由計算從該標靶細胞釋出的放射性活性計算。或者，Th1細胞誘導活性，可藉由測量於經測試勝肽刺激的抗原呈現細胞(APC)存在下，Th1細胞所生產及釋出的IFN- γ ，並使用抗IFN- γ 單株抗體使培養基上的抑制區可見化來評估。

【0074】 除了上述修飾，本發明之勝肽可進一步連結於其他物質，只要所產生之經連結的勝肽保留原始勝肽的Th1細胞誘導能力即可。適當物質的例子包括，例如：勝肽、脂質、糖類及糖鏈、乙醯基、天然及合成的聚合物等。本發明之勝肽可

包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化等，所提供之修飾不會損害該原始胜肽的生物學活性。此等種類修飾可實施以用於提供額外的功能(例如標靶功能，及傳遞功能)，或使該胜肽穩定化。

【0075】 例如，為了增加一胜肽的體內穩定性，該技術領域中已知導入D-胺基酸、胺基酸擬似物或非天然胺基酸；此概念也可採用於本發明之胜肽。一胜肽的穩定性，可以用多種方式分析。例如可使用胜肽酶及各種生物學介質，例如人類血漿及血清，以測試穩定性(參見例如Verhoef *et al.*, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302)。

【0076】 本發明之胜肽，可以與HLA第II類抗原一起以複合體形式呈現於APC之表面，然後誘導Th1細胞。因此本發明也包括與HLA第II類抗原形成複合體在APC表面上的胜肽。呈現本發明胜肽之APC，可作為疫苗接種。

【0077】 包括在上述複合體中之HLA抗原之形式必須匹配於須治療及/或預防之對象之HLA抗原之形式。例如，日本群體中，HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5係盛行，故適於治療日本病患。一般而言，臨床上會預先檢查須治療之病患的HLA抗原類型，以能夠適當選擇具有對於特定HLA 第II類抗原結合之能力的胜肽。於較佳具體例，本發明之胜肽可以混雜的方式誘導Th1細胞。在此，當胜肽可誘導由至少2種不同的MHC第II類分子限制之Th1細胞時，則此胜肽之Th1細胞誘導能力係稱為是「混雜的(promiscuous)」。換言之，當一胜肽被至少2

種不同的MHC第II類分子辨識，則此抗原辨識被視為「混雜的」。當使用於勝肽之上下文，詞彙「由至少2種不同之MHC第II類分子辨識」，係指此勝肽或其片段可結合於至少2種不同的MHC第II類分子。例如， $GPC3_{92-116}-LP$ (序列識別號：1)係被HLA-DR52b及HLA-DR9辨識， $GPC3_{137-161}-LP$ (序列識別號：2)係被HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、HLA-DR15及HLA-DP5辨識， $GPC3_{289-313}-LP$ (序列識別號：3)係被HLA-DR9辨識， $GPC3_{386-412}-LP$ (序列識別號：4)係被HLA-DR13辨識，而 $GPC3_{556-576}-LP$ (序列識別號：5)係被HLA-DR13及HLA-DR9辨識。因此此等勝肽係「混雜的」抗原決定位的典型例。

【0078】當使用HLA-DR52b或HLA-DR9陽性APC，宜使用具有序列識別號：1之胺基酸序列的勝肽。當使用HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、HLA-DR15或HLA-DP5陽性APC，較佳使用具有序列識別號：2之胺基酸序列的勝肽。當使用HLA-DR9陽性APC，宜使用具有序列識別號：3之胺基酸序列的勝肽。當使用HLA-DR13陽性APC，較佳使用具有序列識別號：4之胺基酸序列的勝肽。當使用HLA-DR13或HLA-DR9陽性APC，較佳使用具有序列識別號：5之胺基酸序列的勝肽。

【0079】因此於較佳具體例，可使用具有序列識別號：1之胺基酸序列的勝肽，於在誘導前已鑑別具有HLA-DR52b或HLA-DR9之對象中誘導Th1細胞。同樣地可使用具有序列識別號：2之胺基酸序列的勝肽，於在誘導前已鑑別具有

HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、HLA-DR15或HLA-DP5之對象中誘導Th1細胞。同樣地可使用具有序列識別號：3之胺基酸序列的勝肽，於在誘導前已鑑別具有HLA-DR9之對象中誘導Th1細胞。同樣地可使用具有序列識別號：4之胺基酸序列的勝肽，於在誘導前已鑑別具有HLA-DR13之對象中誘導Th1細胞。同樣地可使用具有序列識別號：5之胺基酸序列的勝肽，於在誘導前已鑑別具有HLA-DR13或HLA-DR9之對象中誘導Th1細胞。

【0080】 III. 製備 GPC3勝肽

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

【0081】 本發明之勝肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化；所提供之修飾不損害原始參考勝肽的生物學活性。其他說明性的修飾包括引入D-胺基酸或其他胺基酸擬似物。可使用這些修飾以增加該勝肽的血清半衰期。

【0082】 本發明之勝肽可依據選擇的胺基酸序列由化學合成獲得。例如可採用於合成的習知勝肽合成方法包括：

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1975;
- (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (in

Japanese), Maruzen Co., 1985;

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

(vi) WO99/67288; 及

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

【0083】或者，本發明之胜肽可採用任何已知用於生產胜肽的遺傳工程方法獲得(例如Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu *et al.*) 1983, 101: 347-62)。例如，先製備庇護有編碼為可表現形式(例如對應於啟動子序列的調節序列的下游)的目標胜肽的聚核苷酸的適當載體，並轉形到適當的宿主細胞中。然後將該宿主細胞培養以生產關注的胜肽。本發明之胜肽也可採用體外轉譯系統於體外生產。

【0084】IV. 聚核苷酸

本發明提供聚核苷酸，其編碼為前述本發明胜肽當中任意者。此包括從天然發生的 GPC3 基因 (GenBank 存取號 NM_001164617.1 (序列識別號: 8)或 NM_004484.3 (序列識別號: 10))衍生的聚核苷酸，及其具有經保守性修飾的核苷酸序列的那些。在此用詞「經保守性修飾的核苷酸序列」係指編碼為相同或基本上相同的胺基酸序列的序列。因為遺傳密碼的退化性，有大量的功能上相同的核酸會編碼為任意給定的蛋白質。比如，密碼子 GCA、GCC、GCG 及 GCU 都編碼為胺基酸丙

胺酸。因此，當密碼子在每個位置指明丙胺酸時，該密碼子可改變成任意對應的所述密碼子，而不會改變所編碼的多勝肽。此種核酸變異為「靜默變異」，其為一種經保守性修飾的變異。每個在此敘述的編碼為一勝肽的核酸，也敘述所有該核酸的可能的靜默變異。該技術領域中具有通常知識者將體認到一核酸中的各密碼子(除了AUG以外，AUG通常為甲硫胺酸的唯一密碼子，而TGG通常為色胺酸的唯一密碼子)可經修飾以產生功能上同一的分子。因此，編碼為一勝肽的核酸的各靜默變異係暗示敘述在各揭露的序列中。

【0085】 本發明之聚核苷酸可由DNA、RNA及其衍生物構成。如該技術領域中為人所知者，DNA分子係適當的由鹼基例如A、T、C及G構成，而在RNA中T係置換為U。該技術領域中具有通常知識者將體認非天然發生的鹼基也會包括在聚核苷酸中。

【0086】 本發明之聚核苷酸可編碼為有或沒有中介(intervening)胺基酸序列的多種本發明之勝肽。例如，該中介胺基酸序列可提供該聚核苷酸或該經轉譯的勝肽的切斷部位(例如，酵素辨識序列)。再者該聚核苷酸可包括對於編碼為本發明勝肽的編碼序列的任何額外的序列。例如該聚核苷酸可為一重組聚核苷酸，其包括對表現該勝肽所需的調節序列，或可為具有標記基因的表現載體(質體)等。一般而言，此種重組聚核苷酸可利用習知的重組技術，使用例如聚合酶及內切核酸酶操作聚核苷酸而製備。

【0087】 重組及化學合成技術均可使用於生產本發明之聚

核苷酸。例如聚核苷酸可藉由插到適當載體中而生產，該載體當轉染到勝任細胞內時可表現。或者，聚核苷酸可使用PCR技術放大，或在適當宿主中表現(參見例如 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者，聚核苷酸可使用固相技術合成，如 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes *et al.*, EMBO J 1984, 3: 801-5所敘述。

【0088】 V. 抗原呈現細胞(APC)

本發明也提供抗原呈現細胞(APC)，其在表面上呈現於HLA第II類抗原與本發明之胜肽或其片段之間形成的複合體。藉由與本發明胜肽接觸而獲得之該APC可由受治療及/或預防的病患獲得，且本身可當做疫苗投予，或與其他包括本發明之胜肽、Th1細胞或CTL的藥物組合投予。

【0089】 該APC不限於特定種類的細胞，且包括但不限於樹狀細胞(DC)、蘭氏(Langerhans)細胞、巨噬體、B細胞及經活化的T細胞，此等已知會在表面上呈現蛋白質性抗原，而會被淋巴球所辨識。因為DC係代表性的APC，其在APC中具有最強的Th1細胞誘導活性，故DC當成本發明的APC有用。

【0090】 再者，於較佳具體例，本發明之胜肽也會誘導經由MHC第I類抗原調節之CTL反應及由MHC第II類抗原媒介之Th1細胞反應。一般，已周知MHC第I類抗原辨識的抗原決定位的長度較短(例如8-10個胺基酸殘基)於MHC第II類(15或更長)。因此，本發明之些胜肽之經處理產物可造成誘導CTL。事實上，GPC3₁₃₇₋₁₆₁-LP (序列識別號：2)可誘導會辨識片段

(FVGEEFTD: 序列識別號: 6)的 CTL 及 GPC₃₂₈₉₋₃₁₃-LP (序列識別號: 3)可誘導會辨識片段(EYILSLEEL: 序列識別號: 7)的 CTL。因此，本發明之此等胜肽不僅可誘導 Th1 細胞，也可在 APC 中將其處理後誘導 CTL。換言之，與本發明之上述胜肽接觸過的 APC 會將此等胜肽與 MHC 第 II 類抗原一起呈現並同時將此等處理以將此等片段與 MHC 第 I 類抗原一起呈現。結果，使用本發明之上述胜肽，可以誘導 Th1 細胞 和 CTL。

【0091】 例如 APC 可藉由從周邊血液單核細胞誘導 DC，然後使其與本發明之胜肽在體外、生物體外或體內接觸(刺激)而獲得。當本發明之胜肽對於該對象投予時，在該對象的體內會誘導呈現本發明之胜肽或其片段的 APC。用語「誘導一 APC」，包括以本發明之胜肽接觸(刺激)一細胞以將於 HLA 第 II 類抗原與本發明之胜肽或其片段之間形成的複合體呈現於細胞表面上。或者，於將本發明之胜肽導入於 APC 使 APC 呈現此胜肽或其片段後，此等 APC 可以作為疫苗對於該對象投予。例如生物體外投予可包括以下步驟：

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

【0092】 該第一對象及第二對象可為同一個體或不同個體。或者，依本發明，提供使用本發明之胜肽製造用於誘導抗原呈現細胞的醫藥組合物的用途。此外，本發明提供製造用於誘導抗原呈現細胞的醫藥組合物的方法或處理，其中此方法包括將本發明之胜肽與醫藥上可接受的擔體混合或配製的步

驟。又，本發明也提供用以誘導抗原呈現細胞的本發明之胜肽。由步驟(b)獲得的APC可作為疫苗對於該對象投予。

【0093】 本發明一態樣中，本發明之APC有高水平的Th1細胞誘導能力。在此，用語「高水平的Th1細胞誘導能力」中，高水平係相對於APC沒有與胜肽接觸或與不會誘導Th1細胞的胜肽接觸時的水平。在此，使用於APC的上下文時，用語「Th1細胞誘導能力」，係指APC當與CD4⁺ T細胞接觸時誘導Th1細胞的能力。如此之具有高水平之Th1細胞誘導能力的APC也可藉由包括於體外將編碼為本發明胜肽的聚核苷酸轉移到APC的步驟的方法來製備。該將被導入的聚核苷酸可為DNA或RNA形式。導入的方法的例子包括，而無特別限制，各種在該領域中實施的習知方法，例如脂染、電穿孔或磷酸鈣法。更具體而言，可依照Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 國際公開號2000-509281的已公開的日文翻譯所述實施。藉由將該基因傳遞到APC中，該基因會在細胞中進行轉錄、轉譯等，然後獲得的蛋白質會由MHC第I類或第II類處理，並經一呈現路徑進行以呈現本發明之該胜肽。或者，本發明之APC可藉由以包括使APC接觸本發明胜肽之步驟的方法製備。

【0094】 於較佳具體例，本發明之APC，可為呈現選自於HLA-DR52b及HLA-DR9之MHC第II類分子與本發明之胜肽(包括序列識別號：1之胺基酸序列)之複合體於其表面上的APC。於另一具體例，本發明之APC可為呈現於選自於HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、

HLA-DR15 及 HLA-DP5 中之 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽 (包括序列識別號：2之胺基酸序列)之複合體於其表面上的 APC。於另一具體例，本發明之 APC 可為呈現 HLA-DR9 之 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽 (包括序列識別號：3之胺基酸序列) 之複合體於其表面上的 APC。於另一具體例，本發明之 APC 可為呈現 HLA-DR13 之 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽 (包括序列識別號：4之胺基酸序列) 之複合體於其表面上的 APC。於另一具體例，本發明之 APC 可為呈現選自於 HLA-DR13 及 HLA-DR9 之 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽 (包括序列識別號：5之胺基酸序列) 之複合體於其表面上的 APC。較佳者，HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR14、HLA-DR15、HLA-DP2 及 HLA-DP5 可各為 HLA-DRB1*08:03、HLA-DRB3*02:02、HLA-DR1*09:01、HLA-DR1*13:02、HLA-DR1*14:05、HLA-DR1*15:02、HLA-DPB1*02:01 及 HLA-DPB1*05:01。

【0095】 VI. T輔助1型細胞 (Th1細胞)

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

【0096】此種 Th1 細胞，可藉由(1)對於一對象投予一或多種本發明之胜肽，接著從此對象收集 Th1 細胞，(2)於體外以本發明之胜肽接觸(刺激)APC 及 $CD4^+$ T 細胞或周邊血液單核細胞，

然後單離的 Th1 細胞，(3)於體外使 $CD4^+$ T 細胞或周邊血液單核細胞與本發明之 APC 接觸，或(4)導入編碼為 T 細胞受體 (TCR) 次單元兩者之聚核苷酸或編碼為各 TCR 次單元之聚核苷酸到 $CD4^+$ T 細胞中，其中此 TCR 可結合於 MHC 第 II 類分子與本發明之勝肽之複合體。如(3)之方法之 APC，可藉由上述方法製備。方法(4)的細節將於以下於項目「VII. T 細胞受體 (TCR)」詳述。

【0097】 藉由以本發明 APC 刺激而誘導之 Th1 細胞，可衍生自待治療及/或預防之病患，且其本身可供投予，或與包括本發明勝肽之其他藥物組合投予，以調節效應之用途。此獲得之 Th1 細胞可活化及/或刺激負責細胞免疫之免疫細胞 (例如 CTL、巨噬體)。可由本發明之 Th1 細胞活化的此種免疫細胞，包括：對於目標細胞例如癌細胞顯示細胞毒性的 CTL。例如針對此 CTL 之目標細胞，可為內源性表現 GPC3 之細胞 (例如癌細胞)，或經以 GPC3 基因轉染的細胞。於較佳具體例，本發明之勝肽可包括至少一 CTL 抗原決定位勝肽之胺基酸序列，且除了誘導 Th1 細胞，也誘導對抗表現 GPC3 之細胞例如癌細胞之 CTL。於此情形本發明之勝肽，可於體外同時或依序誘導 Th1 細胞及 CTL，且此誘導的 Th1 細胞可有效活化已誘導的 CTL。因此此包括至少一 CTL 抗原決定位勝肽之胺基酸序列的勝肽，為適於癌症免疫療法的勝肽。

【0098】 再者，本發明之 Th1 細胞分泌各種細胞激素 (例如 IFN- γ)，其能以抗原獨立的方式，活化及/或刺激對抗其他目標細胞的 CTL。因此本發明之 Th1 細胞，也有助於增強標靶於表現腫瘤關連抗原 (TAA) 而非 GPC3 之細胞的 CTL 活性。因此，本

發明之 Th1 細胞不僅對於表現 GPC3 之腫瘤的免疫療法有效，對於表現其他 TAA，及本發明之胜肽與 APC 之腫瘤也有效。

【0099】 於一些具體例，本發明之 Th1 細胞辨識呈現 HLA-DR 或 HLA-DP 抗原與本發明之胜肽之複合體的細胞。於 Th1 細胞之上下文，詞彙「辨識一細胞」，係指經由其 TCR 結合於細胞表面上的 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽的複合體，及被以抗原專一性方式活化。在此，詞彙「被以抗原專一性方式活化」，係指回應於特定 MHC 第 II 類分子及胜肽而活化，且誘導從此活化的 Th1 細胞的細胞素生產。於較佳具體例，HLA-DR 及 HLA-DP 可選自於 HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2 及 HLA-DP5 構成之群組。

【0100】 VII. T 細胞受體 (TCR)

本發明也提供一種組合物，其包含編碼一或多個為多胜肽的一或多個聚核苷酸，該多胜肽能形成 T 細胞受體 (TCR) 的次單元；並提供使用其之方法。該 TCR 次單元具有形成 TCR 的能力，其對於 $CD4^+$ T 細胞提供 GPC3 專一性給對抗呈現 GPC3 胜肽的 APC。藉由使用該技術領域中的已知方法，可鑑別以本發明之胜肽誘導的 Th1 細胞的 TCR 次單元的 α - 與 β - 鏈的核酸 (WO2007/032255 與 Morgan *et al.*, J Immunol, 171, 3288(2003))。衍生物 TCR 可能以高親和力結合於呈現該 GPC3 胜肽的 APC，且視情形媒介有效率的細胞素生產。

【0101】 編碼為 TCR 次單元的一聚核苷酸/多個聚核苷酸 (亦即，編碼為 TCR 次單元兩者的單一聚核苷酸，或編碼為分開

之TCR次單元的多個聚核苷酸)可以包含到適當載體內，例如反轉錄病毒載體。此等載體在該技術領域為人所熟知。該聚核苷酸或包含該聚核苷酸的載體，通常可傳送到CD4⁺T細胞內，例如來自病患的CD4⁺T細胞。有利地，本發明提供一種現成(off-the-shelf)的組合物，能夠快速修飾病患所擁有的T細胞(或另一對象的T細胞)，而快速及簡單產生具有優異的癌細胞殺死性質的經修飾的T細胞。

【0102】 本發明更提供Th1細胞，其係藉由將編碼為TCR次單元兩者的聚核苷酸，或編碼為各TCR次單元的聚核苷酸進行性狀引入(transduction)而製備，其中此種TCR次單元能結合於GPC3勝肽(例如序列識別號：1，於HLA-DR52b或HLA-DR9背景；序列識別號：2，於HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、HLA-DR15或HLA-DP5背景；序列識別號：3，於HLA-DR9背景；序列識別號：4，於HLA-DR13背景；序列識別號：5，於HLA-DR13或HLA-DR9背景)。該經性狀引入的Th1細胞能夠在體內自導引到癌細胞，且能使用周知的培養方法於體外擴增(例如，Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。上述製備之Th1細胞，可使用於形成免疫原性組合物，而有用於需要治療或保護的病患中之癌症的治療或避免。

【0103】 VIII. 醫藥藥劑或組合物

當本發明的方法與組合物在上下文中指出「治療」癌症有用，若其造成臨床上的益處，例如在該對象中的GPC3基因表現減低、癌症的大小減小、流行程度或轉移潛力減低，則治療

係視為「有效」。當該治療係以預防性使用時，「有效」意指其延遲或防止癌症形成或防止或減輕癌症的臨床症狀。有效係利用任何已知相關用於診斷或治療特定腫瘤形式的方法決定。

若本發明的方法與組合物在上下文中指出「防止」及「預防」癌症有用，此等用語係在此可互換地意指任何減低由於疾病所致之死亡率或發病率之負擔的活性。防止及預防可發生於「初級、次級及三級防止水平」。初級防止及預防避免發展出疾病，次級及三級防止及預防水準包含目標為防止及預防疾病進展及展現出症狀及藉由回復功能及減少疾病相關併發症以減少已建立的疾病的影響的活性。或者，防止及預防可包括廣泛的療法，其目標係減輕特定病症的嚴重度，例如減少腫瘤的增殖及轉移、減少血管新生。

【0104】 本發明上下文中，治療及/或預防癌症及/或防止其術後再發，包括以下任何步驟，例如以外科手術移除癌細胞、抑制癌化細胞的生長、腫瘤退化或回復、誘導緩解及抑制腫瘤發生、腫瘤回復，及減少或抑制轉移。有效的治療及/或預防癌症減少死亡率並改善患癌的個體的預後，減少腫瘤標記物在血液中的水平，並減輕伴隨癌症的可偵測的症狀。例如，減少或改善症狀構成有效治療及/或預防，包括10%、20%、30%或以上減少，或穩定的疾病。

【0105】 如上所述，本發明勝肽誘導的Th1細胞能幫助負責細胞免疫之免疫細胞。此種免疫細胞不僅包括對抗表現GPC3之癌細胞的CTL，也包括對抗表現其他TAA之癌細胞的CTL，由於由Th1細胞分泌的細胞素能以抗原獨立的方式影響CTL。

因此本發明提供一種醫藥試劑或組合物，其包含本發明之胜肽中至少一種。於此醫藥試劑或組合物，此胜肽之量係存在治療上或醫藥上有效量。

【0106】 本發明之醫藥試劑或組合物在幫助、刺激及/或增強任何負責細胞免疫之免疫細胞(例如CTL、巨噬體)為有用，由於本發明之藥試劑或組合物誘導的Th1細胞能分泌影響任何負責細胞免疫之免疫細胞的細胞素。因此，本發明之試劑或組合物對於任何將由包括CTL之此種免疫細胞媒介的免疫反應予以增強或促進的用途有用。例如因為本發明之試劑或組合物能增強或促進對抗由此等免疫細胞媒介的癌或腫瘤的免疫反應，本發明提供包含至少一種本發明之胜肽的試劑或組合物，以用治療及/或預防癌。此種試劑或組合物中的此胜肽量，可為對於罹有表現GPC3之癌的對象中顯著增強或刺激免疫反應為有效的量。

【0107】 本發明也提供一種試劑或組合物，供增強或刺激由MHC第I類抗原，例如HLA-A2及HLA-A24媒介的免疫反應。於另一具體例，本發明更提供本發明胜肽之用途，以供製造用於增強或刺激由MHC第I類抗原媒介的免疫反應的試劑或組合物。

【0108】 於較佳具體例，在本發明內容中鑑別的GPC3衍生之胜肽可誘導Th1細胞，及對抗GPC3-表現細胞之CTL。因此本發明也提供包含至少一種本發明胜肽之試劑或組合物，以供用於誘導對抗表現GPC3之癌或腫瘤的CTL。

【0109】 又，包含至少一種本發明胜肽之試劑或組合物，

可用於增強或促進由MHC第II類分子媒介的免疫反應。

【0110】因為GPC3表現在一些癌類型中，包括肝細胞癌(HCC)及黑色素瘤(melanoma)，相較於在正常組織中係專一性的提高(WO2004/031413, WO2007/013665, WO2007/013671, Tomita Y, et al., *Cancer Sci* 2011;102:71-8,及本案微陣列分析之數據)(未顯示))，本發明之胜肽或編碼為此胜肽之聚核苷酸，可用於癌或腫瘤之治療及/或預防，及/或用於防止其術後再復發。因此，本發明提供一種醫藥試劑或組合物，供癌或腫瘤之治療及/或供預防，及/或防止其術後再復發，其包含一或多種本發明之胜肽、或編碼為此胜肽之聚核苷酸，作為有效成分。或者，本發明之胜肽可以被表現在任意前述細胞的表面上，例如APC，以用於作為醫藥試劑或組合物。此外上述Th1細胞也可用於作為本發明之醫藥癌或腫瘤之劑或組合物的有效成分。

【0111】於另一具體例，本發明也提供使用有效成分製造供治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或藥劑的用途，該有效成分選自以下：

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

【0112】或者本發明更提供一種有效成分，使用於治療癌症或腫瘤，該有效成分選自以下：

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

【0113】或者本發明更提供製造用於治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或試劑的方法或處理，其中該方法或處理包括將醫藥上或生理上可接受的擔體與選自以下的有效成分配製的步驟：

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

【0114】於另一具體例，本發明也提供製造用於治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或試劑的方法或處理，其中該方法或處理包括將有效成分與醫藥上或生理上可接受的擔體混合的步驟，其中該有效成分選自以下：

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

【0115】或者，本發明之醫藥組合物或此種試劑可用於預防癌症或腫瘤及預防其術後再發中之一者或兩者。

【0116】本發明之醫藥試劑或組合物作為疫苗有用。本發明上下文中，詞彙「疫苗」(也稱為免疫原性組合物)，係指經由對動物接種，有誘導抗腫瘤免疫性的功能的組合物。

【0117】本發明之醫藥藥劑或組合物可用於治療及/或預防癌症或腫瘤，及/或預防其在對象或病患中之術後復發或轉移復發。此等對象的例子包括人及其他哺乳動物，包括但不限於小鼠、大鼠、豚鼠、兔、貓、狗、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴、狒狒及黑猩猩，尤其是商業上為重要的動物或家畜。

【0118】本發明中，具有選自序列識別號：1至5中之胺基酸序列的勝肽，已發現係由數種HLA-DR及/或HLA-DP分子(例如HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2、及HLA-DP5)限制的混雜的Th1細胞抗原決定位，且可作為能誘導有效且專一性的對抗由於MHC第II類分子媒介的免疫反應之癌症的免疫反應的候選者。因此包括具有序列識別號：1至5之胺基酸序列的此等勝肽中的任一者的本發明的醫藥試劑或組合物，特別適於對於至少具有選自HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5中作為MHC第II類分子的對象來投予。對於包含編碼為此等勝肽中任一者的聚核苷酸的醫藥藥劑或組合物也同樣適用。

【0119】或者於較佳具體例，本發明鑑別之勝肽，當施用到具有HLA-A2或HLA-A24之對象時，也可誘導對於GPC3專一之CTL。因此藉由投予本發明之勝肽，可更預期除了Th1細胞誘導外，可誘導對抗表現GPC3之癌的CTL反應。又，本發明之

胜肽不僅經由將其處理而誘導對抗 GPC3-表現細胞之 CTL 反應，也藉由因其為媒介之 Th1 細胞誘導而增強之。因此為了達成在同一對象中誘導 Th1 細胞及 GPC3-專一性 CTL 兩者，當投予具有序列識別號：2 之胺基酸序列之胜肽時，例如欲治療的對象宜具有 HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、HLA-DR15 及 HLA-DP5 作為 MHC 第 II 類分子及 HLA-A2 作為 MHC 第 I 類分子。為了達成在同一對象中誘導 Th1 細胞及 GPC3-專一性 CTL 兩者，例如：當投予具有序列辨識號：3 之胺基酸序列的胜肽時，欲治療的對象宜具有 HLA-DR9 作為 MHC 第 II 類分子及 HLA-A24 作為 MHC 第 I 類分子。

【0120】 在本發明中，已證實本發明的胜肽會促進由 MHC 第 II 類抗原媒介的免疫反應，特別是在以如下所示 HLA 類型限制之方法組合中：

GPC3-LP1：HLA-DR52b 及 HLA-DR9

GPC3-LP2：HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9/14 及 HLA-DR8/15

GPC3-LP3：HLA-DR9

GPC3-LP4：HLA-DR13 及 HLA-DR51

GPC3-LP5：HLA-DR13 及 HLA-DR9

【0121】 因此，GPC3-LP1、-LP2、-LP3、-LP4 及 -LP5 及包含序列辨識號：1-5 之任何一胺基酸序列之胜肽有利於治療在病患身上表現 GPC3 的癌症，該病患具有至少一 HLA 對偶基因選自於該胜肽相應的 HLA 亞型，其顯示於上述組合中。或者，

本發明提供用以治療在病患身上表現 GPC3 的癌症之醫藥組合物，其中該組合物包括選自於由本發明的勝肽構成的群組中任何一種勝肽，且其中該病患具有至少一 HLA 對偶基因選自於該勝肽相應的 HLA 亞型，其顯示於上述組合中。

【0122】 此外，本發明也提供一種勝肽的用途，該勝肽選自於由本發明之勝肽構成之群組，其係製造用以治療在病患身上表現 GPC3 之癌症的組合物，該病患具有至少一 HLA 對偶基因選自於該勝肽相應的 HLA 亞型，其顯示於上述組合中。此外，於一些具體例，本發明提供一種勝肽，其係選自於由本發明之勝肽構成之群組，用以治療在病患身上表現 GPC3 之癌症，該病患具有至少一 HLA 對偶基因選自於該勝肽相應的 HLA 亞型，其顯示於上述組合中。於其他具體例，本發明提供一種治療在病患身上表現 GPC3 之癌症的方法，包括對該病患投予選自於由本發明之勝肽構成的群組中之一勝肽的步驟，其中該病患具有至少一 HLA 對偶基因選自於上述組合中該勝肽相應的 HLA 亞型。

【0123】 此外，於一些具體例，本發明提供一種製造或配製醫藥組合物的方法，用以治療在病患身上表現 GPC3 之癌症，其中該組合物包括選自於由本發明之勝肽構成的群組中之任何一勝肽，且其中該病患具有至少一 HLA 對偶基因選自於該勝肽相應的 HLA 亞型，其顯示於上述組合中。本發明的方法，例如，可包括混合(admixing)或配製選自於由本發明之勝肽構成的群組中之任何一勝肽，及醫藥上可接受的擔體。

【0124】 如上述討論的，已知 Th1 細胞對於在具有腫瘤

(tumor-bearing)的宿主誘導有效的腫瘤免疫性是重要的。本發明之胜肽依HLA限制之方式具有Th1細胞的誘導能力，本發明每一個胜肽的專一性HLA限制模式(restriction pattern)顯示如上。所以，本發明提供一種組合物以在表現GPC3之癌症的病患身上促進或增強Th1細胞反應，其中該組合物包括選自於由本發明之胜肽構成的群組中之任何一胜肽，且其中該病患具有至少一HLA對偶基因選自於該胜肽相應的HLA亞型，顯示如上。

【0125】此外，本發明也提供一種胜肽的用途，該胜肽選自於由本發明之胜肽構成的群組，其係用以製造一組合物以在表現GPC3之癌症的病患身上促進或增強Th1細胞反應，該病患具有至少一HLA對偶基因選自於該胜肽相應的HLA亞型，顯示於上述組合中。此外，於一些具體例，本發明提供一胜肽選自於由本發明之胜肽構成的群組，其係用以在表現GPC3之癌症的病患身上促進或增強Th1細胞反應，該病患具有至少一HLA對偶基因選自於該胜肽相應的HLA亞型，顯示於上述組合中。於其他具體例，本發明提供一種在表現GPC3之癌症的病患身上促進或增強Th1細胞反應的方法，該方法包括對該病患投予選自於由本發明之胜肽構成的群組中之一胜肽，其中該病患具有至少一HLA對偶基因選自於上述組合中該胜肽相應的HLA亞型。

【0126】此外，於一些具體例，本發明提供一種製造或配製在表現GPC3之癌症的病患身上促進或增強Th1細胞反應的醫藥組合物的方法，其中該組合物包括選自於由本發明之胜肽

構成的群組中之任何一胜肽，且其中該病患具有至少一HLA對偶基因選自於該胜肽相應的HLA亞型，顯示於上述組合中。本發明的方法，例如，可包括混合(admixing)或配製選自於由本發明之胜肽構成的群組中之任何一胜肽，及醫藥上可接受的擔體。

【0127】 於另一具體例，本發明提供依存於Th1細胞誘導之癌免疫療法。本發明提供之此治療策略可應用且有用於任何獨立於GPC3表現之癌，只要由Th1細胞分泌的細胞素所活化的免疫細胞係以對象癌細胞為目標。

【0128】 本發明之醫藥試劑或組合物欲治療的癌或腫瘤包括表現GPC3之任何種類之癌症或腫瘤，包括但不限於，例如肝細胞癌(HCC)及黑色素瘤(melanoma)。

【0129】 本發明之醫藥試劑或組合物，除了含有上述有效成分，也可含有其他有能力誘導Th1細胞或CTL之胜肽、其他編碼為其他胜肽之聚核苷酸、呈現其他胜肽或其片段之其他細胞等。此種具有誘導Th1細胞或CTL之能力的「其他」胜肽的例子，包括但不限於源自癌專一性抗原(例如已鑑別之TAA)的胜肽。

【0130】 若需要，本發明之醫藥試劑或組合物可視情形包括其他治療物質當作額外之有效成分，只要該物質不會抑制該有效成分例如本發明胜肽中任一者的抗腫瘤作用即可。例如，配方可包括抗發炎試劑、止痛劑、化學療劑等。除了在藥劑本身當中的其他治療物質，本發明的藥劑也可依序或同時投予一種或更多其他藥理試劑。藥劑及藥理組合物的量，取決於例如

使用的藥理試劑的形式、欲治的疾病及投予的時程及路徑。

【0131】 該技術領域中具有通常知識者應瞭解除了此處特別提及的成分以外，本發明之醫藥試劑或組合物可包括在該技術領域中常見關於配方形式使用的其他試劑(例如，填料、黏結劑、稀釋劑、賦形劑者)。

【0132】 本發明之一具體例中，該醫藥試劑或組合物可包裝在製造品與套組中，該套組含有治療欲治療的疾病例如癌症的致病情形的有用的物質。製造品可包括附有標記的任意該醫藥試劑或組合物的容器。適當的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。該容器可由各種材料形成，例如玻璃或塑膠。容器上的標記必需指示該試劑係用於治療或預防該疾病的一種以上的病況。該標記也可顯示投予指示等。

【0133】 除了上述容器以外，包含本發明的醫藥試劑或組合物的套組可以視情形更包括第二容器，其盛裝醫藥上可容許的稀釋劑。從商業及使用者所需角度，可更包括其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、針筒及使用指示之包裝插入物。

【0134】 該醫藥組合物視需要，可放在包裝或分配裝置中，其可包含一種或更多含有該有效成分的單位的劑量。該包裝例如包括金屬或塑膠箔，例如泡殼包裝。該包裝或分配裝置可以隨附投予指示。

【0135】 (1) 含有該胜肽當做有效成分之醫藥試劑或組合物：

本發明之胜肽可直接當做醫藥試劑或組合物投予，或若需

要以習知配製方法配製。於後者，除了本發明之胜肽，可適當使用通常使用於藥物的擔體、賦形劑等而無特殊限制。此等擔體的例子包括，但不限於無菌水、生理鹽液、磷酸鹽緩衝液、培養液等。再者該醫藥試劑或組合物視需要可包含安定劑、懸浮劑、保存劑、界面活性劑等。本發明之醫藥藥劑或組合物可用於抗癌症用途。

【0136】 本發明之胜肽可組合製備成包括兩種或更多本發明之胜肽，以在體內誘導Th1細胞。該胜肽組合可採混合(雞尾酒)形式或使用標準技術彼此接合。例如，該胜肽可以化學連結或表現成單一融合的多胜肽序列。該組合中的胜肽可相同或不同。

【0137】 藉由投予本發明之胜肽，該胜肽或其片段藉由該HLA 第II類抗原在APC以高密度呈現，然後誘導對於由該呈現的胜肽與該HLA第II類抗原之間形成的複合體為專一性反應的Th1細胞。或者從對象移出APC(例如DC)然後以本發明之胜肽刺激以獲得在其細胞表面呈現任何本發明之胜肽或其片段的APC。此等APC再度對該對象投予以在該對象中誘導Th1細胞，結果可增加對於腫瘤關聯內皮的侵犯。

【0138】 包括本發明之胜肽當做有效成分之該用於癌症或腫瘤之治療及/或預防的醫藥試劑或組合物，也可包括已知使細胞免疫有效建立之佐劑。或此醫藥試劑或組合物可以與其他有效成分一起投予，且可藉由配製為顆粒投予。佐劑意指當與具有免疫學活性的蛋白質一起(或連續)投予時，會增強對於蛋白質的免疫反應的一化合物。於此考慮的佐劑包括文獻中敘述

者(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)。適合之佐劑的例子包括但不限於磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍亂毒素、沙門毒素、不完全的佛氏佐劑(Incomplete Freund's adjuvant, IFA)、完全的佛氏佐劑(Complete Freund's adjuvant, CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W 乳劑、或其類似物。

【0139】再者，可便利地使用微脂體配方、顆粒配方其中該胜肽結合於數微米直徑的珠粒、及脂質結合於該胜肽的配方。

【0140】於本發明另一具體例，本發明之胜肽也可以於醫藥上可接受的鹽的形式投予。較佳的鹽的例子包括與鹼金屬的鹽、與金屬的鹽、與有機鹼的鹽、與有機酸(例如乙酸、甲酸、丙酸、富馬酸、馬來酸、琥珀酸、酒石酸、檸檬酸、蘋果酸、草酸、苯甲酸、甲烷磺酸等)的鹽及與無機酸(例如鹽酸、磷酸、氫溴酸、硫酸等)的鹽。在此使用之用語「醫藥上可接受之鹽」係指保留該化合物之生物學效力以及性質且可藉由與無機酸或鹼例如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、對甲苯磺酸、水楊酸等反應而獲得之鹽。

【0141】於一些實施例，本發明之醫藥試劑或組合物可更包括會起動(primes)Th1細胞，且選擇性起動CTL的成分。脂質已鑑別係能夠於體內起動對抗病毒抗原的Th1細胞，選擇性起動CTL的試劑。例如可將棕櫚酸殘基附著在離胺酸殘基的 ε -及 α -氨基然後連結到本發明之胜肽。然後可將該脂質化的胜肽直接以微胞或微粒投予、包入微脂體或於佐劑中乳化而投予。另一例的脂質起動Th1細胞且選擇性地起動CTL反應，當

共價附著於一適當勝肽時，可使用 *E. coli* 脂蛋白，例如三棕櫚醯基-S-甘胺醯基半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸(P3CSS)可起動(prime)Th1細胞且選擇性起動CTL(參見例如 Deres *et al.*, Nature 1989, 342: 561-4)。

【0142】 適當的投予方法的例子可包括，但不限於口服、皮內、真皮下、肌肉內、髓內、腹膜、靜脈內注射等，及全身性投予或對於目標部位的鄰近處局部投予(即直接注射)。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。可將醫藥上或治療上有效量之本發明之此勝肽對於須要治療表現GPC3之癌症的對象投予。或者可將足以增強或刺激由Th1細胞媒介之免疫反應及/或誘導對抗表達GPC3之癌症或腫瘤之CTL的本發明勝肽，對於罹患表現GPC3之癌症的對象投予。本發明之勝肽的劑量可取決於欲治療的疾病、病患年紀及體重、投予方法等適當調整。勝肽的劑量通常可為0.001 mg至1,000 mg，例如0.01 mg至100 mg，例如0.1 mg至10 mg，例如0.5 mg至5 mg，且可數天至數月投予一次該勝肽。該技術領域中具有通常知識者可容易地選擇適當且最適的劑量。

【0143】 (2) 含有聚核苷酸當做有效成分的醫藥試劑或組合物：

本發明之醫藥試劑或組合物也可以可表現形式包括編碼為在此揭露的勝肽的聚核核酸。在此用詞「於可表現的形式」意指當聚核苷酸導入細胞中時，會在體內表現為誘導抗腫瘤免疫性的多勝肽。於說明的具體例中，關注的聚核苷酸的核酸序列包括表現該聚核苷酸需要的調節要素。該聚核苷酸可裝備有

助於達到在目標細胞的基因體中穩定插入的序列(參見例如 Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 for a description of homologous recombination cassette vectors。亦參見例如 Wolff *et al.*, *Science* 1990, 247: 1465-8; 美國專利號碼 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; and WO 98/04720)，DNA-為主的運送技術的例子包括「裸DNA」、經促進的(普寧卡因(bupivacaine)、聚合物、胜肽-媒介的)運送、陽離子性脂質複合體及微粒媒介的(「基因槍」)或壓力媒介的運送(參見例如美國專利號碼 5,922,687)。

【0144】 本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體表現。表現載體的例子包括減毒病毒宿主，例如牛痘或禽痘。此方法涉及使用牛痘病毒，例如當作載體以表現編碼為該胜肽的核苷酸序列。藉由導入宿主中，該重組牛痘病毒會表現該免疫產生性胜肽，且因而引起免疫反應。有用於免疫實驗步驟的牛痘載體與方法敘述於例如美國專利號碼 4,722,848。另一載體為BCG(Bacille Calmette Guerin)。BCG載體敘述於 Stover *et al.*, *Nature* 1991, 351: 456-60。廣泛種類之其他有用於治療性投予或免疫的載體例如腺病毒及腺病毒相關的病毒載體、反轉錄病毒載體、傷寒載體、去毒炭疽毒素載體等是顯而易見。參見例如Shata *et al.*, *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock *et al.*, *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; Hipp *et al.*, *In Vivo* 2000, 14: 571-85。

【0145】 將聚核苷酸運送到病患可為直接進行，於此情形使病患直接暴露於攜帶聚核苷酸的載體，或間接進行，於此情

形先使細胞以關注的聚核苷酸於體外轉形，然後將該細胞移植到對象中。此兩種方法各已知為體內及生物體外基因療法。

【0146】針對基因治療的方法的一般評論，參見 Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215。可適用於本發明該技術領域中普通已知的的重組DNA技術的方法，敘述於 Ausubel *et al.*, in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; 及 Krieger, in Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990。

【0147】如同胜肽的投予，聚核苷酸的投予方法可為口服、皮內、真皮下、髓內、腹腔的及/或靜脈內注射等，且全身性投予或對於目標部位的鄰近處局部投予係有用。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。可將醫藥上或治療上有效量之本發明之此聚核苷酸對於須要治療表現GPC3之癌症的對象投予。或者可將足以增強或刺激由Th1細胞中介之免疫反應及/或誘導對抗表達GPC3之癌症或腫瘤之CTL的本發明聚核苷酸，對於罹患表現GPC3之癌症的對象投予。於適合擔體或經編碼為本發明胜肽的聚核苷酸轉形的細胞中的聚核苷酸的劑量可取決於欲治療的疾病、病患年紀及體重、投予方法等適當調整。胜肽的劑量通常可為0.001 mg至1,000 mg，例如0.01 mg至100 mg，例如0.1 mg至10 mg，例如，0.5 mg至5 mg，且

可數天至數月投予一次該胜肽。該技術領域中具有通常知識者可輕易選擇適當及最適的劑量。

【0148】 IX. 使用該胜肽、APC或Th1細胞的方法

本發明之胜肽及編碼為此胜肽之聚核苷酸可用於誘導本發明之APC及Th1細胞。本發明之APC也可用於誘導本發明之Th1細胞。該胜肽、聚核苷酸及APC可與其他任何化合物組合使用，只要該額外的化合物不會抑制Th1細胞誘導能力即可。因此任意上述本發明之醫藥試劑或組合物可用於誘導Th1細胞，此外，可用於誘導APC的包括本發明之該胜肽或聚核苷酸說明如下。

【0149】 (1) 誘導抗原呈現細胞(APC)的方法：

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

【0150】 或者，本發明提供提供製備具有誘導Th1細胞之能力的抗原呈現細胞(APC)之方法，其中此方法可包括以下步驟之一：

(a) 使本發明胜肽於體外、生物體外或體內與APC接觸；及

(b) 將編碼為本發明胜肽之聚核苷酸導入到APC中。

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

(a) 使本發明之胜肽與一APC接觸，

(b) 將編碼為本發明勝肽之聚核苷酸導入一APC中。

【0151】 本發明之方法可於體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)實施。較佳為，本發明之方法可於體外(*in vitro*)或生物體外(*ex vivo*)實施。在較佳具體例中，用於誘導具有Th1細胞誘導能力之APC的APC，較佳為表現擇自HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5中之至少1種作為MHC第II類分子之APC。此種APC可藉由該技術領域中周知的技術，從具有擇自HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5中之至少1種作為MHC第II類分子的對象所獲得之周邊血液單核細胞(PBMC)製備。本發明之方法所誘導之APC可為在其表面上呈現本發明之勝肽或其片段與HLA第II類抗原(例如HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5)之複合體的APC。當投予本發明之方法所誘導之APC到一對象以誘導於該對象中對抗癌症之免疫反應時，該對象較佳為與APC的來源為同一者。然而，該對象也可與APC捐贈者為不同者，只要該對象與APC捐贈者具有相同HLA類型即可。

【0152】 於另一具體例，本發明提供用於誘導具有Th1細胞誘導能力的APC的試劑或組合物，且此種試劑或組合物包括本發明之勝肽或聚核苷酸中1或更多種。

【0153】 於另一具體例，本發明提供本發明之勝肽或編碼為該勝肽的聚核苷酸之用途，其係用於製造試劑或組合物以配

製供誘導APC。

【0154】或者，本發明更提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽的聚核苷酸之用途，係用於誘導具有Th1細胞誘導能力之APC。

【0155】於較佳具體例，本發明之胜肽不僅可誘導Th1反應，還可於APC中經處理後誘導CTL反應。因此於較佳具體例，本發明之方法製備的APC對於誘導對抗表現GPC3之細胞的CTL，包括誘導對抗癌細胞之CTL亦有用。例如當由含有序列辨識號：6之胺基酸序列的胜肽誘導時，表現HLA-A2的APC適於誘導GPC3-專一性CTL。或者，當由含有序列識別號：7之胺基酸序列的胜肽誘導時，表現HLA-A24之APC係適於誘導GPC3-專一性CTL。

【0156】(2) 誘導Th1細胞的方法：

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

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

(b) 導入編碼TCR次單元兩者之聚核苷酸或編碼TCR次單元之各個的聚核苷酸到CD4⁺ T細胞內，其中TCR能夠辨識或結

合本發明之胜肽或其片段與HLA 第II類抗原的複合體。

【0157】 當投予本發明之胜肽到對象中時，會在該對象體內誘導Th1細胞，且由MHC第II類分子媒介的(例如以該癌細胞為目標的之免疫反應)免疫反應強度增強。或者，該胜肽及編碼為該胜肽之聚核苷酸可用於一生物體外的治療法，其中，該對象來源的APC、CD4陽性細胞或周邊血液單核白血球和本發明胜肽在體外接觸(刺激)，誘導出Th1細胞後，已活化的Th1細胞回到該對象。例如該方法可包括以下步驟：

- (a) 從該對象收集APC；
- (b) 使步驟(a)的APC接觸本發明之該胜肽；
- (c) 將步驟(b)之APC與CD4⁺ T細胞混合並共同培養，以誘導Th1細胞，及
- (d) 從步驟(c)之共同培養物收集CD4⁺ T細胞。

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

【0158】 本發明之方法可於體外、生物體外或體內實施。較佳者，本發明之方法可於體外或生物體外實施。用於誘導Th1細胞的CD4⁺ T細胞可藉由該技術領域周知的方法從對象獲得之PBMC製備。於較佳具體例，CD4⁺ T細胞的捐贈者可為具有至少一選自HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5作為MHC第II

類分子的對象。由本發明之方法誘導的Th1細胞，可為能辨識在其表面呈現本發明勝肽或其片段與HLA第II類抗原之複合體的APC者。當本發明方法所誘導之Th1細胞對於一對象投予以誘導該對象中對抗癌症之免疫反應(或由MHC第I類分子媒介之免疫反應)時，該對象較佳為與CD4+ T細胞之來源為同一對象。但，該對象也可與CD4+ T細胞之來源為不同對象，只要該對象與CD4+ T細胞之捐贈者有相同HLA類型即可。

【0159】於較佳具體例，本發明之勝肽可誘導對抗表現GPC3之細胞的CTL，及誘導Th1細胞。因此本發明更提供用於誘導CTL之方法，其包含選自以下構成之群組的至少一步驟：

- (a) 將CD4+ T細胞與CD8+ T細胞兩者與已接觸本發明勝肽之APC共同培養；及
- (b) 將CD8+ T細胞與與已接觸本發明勝肽之APC共同培養。

【0160】於此種誘導CTL之方法，本發明之勝肽在APC中被處理以產生CTL抗原決定位勝肽，且產生之CTL抗原決定位勝肽被呈現在APC的表面。

【0161】或者依本發明，提供本發明之勝肽之用途，係供製造誘導Th1細胞之醫藥試劑或組合物。此外本發明提供一種用於製造誘導Th1細胞之醫藥試劑或組合物之方法或處理，其中此方法包含將本發明之勝肽與醫藥上可接受之擔體混合或配製之步驟。又，本發明也提供用於誘導Th1細胞之本發明之勝肽。

【0162】由本發明方法誘導之CD4+ T細胞，可對於一對象

投予以作為疫苗。

【0163】 本發明上下文中，過度表現 GPC3 之癌症可以此等有效成分治療。此種癌的例子，包括但不限於肝細胞癌 (HCC) 及黑色素瘤 (melanoma)。因此在投予包含此有效成分之疫苗或醫藥組合物前，宜先確認是否在欲治療之癌細胞或組織中，比起相同器官的正常細胞，GPC3 的表現水平有所增加。因此於一具體例，本發明提供一種用於治療 (過度) 表現 GPC3 之癌症之方法，此方法可包括以下步驟：

- (i) 測定在欲治療癌症的對象獲得的癌細胞或組織當中的 GPC3 表現水平；
- (ii) 將此 GPC3 表現水平與正常的對照組比較；及
- (iii) 投予由上述 (a) 至 (d) 構成之群組中至少一成分至患有比起正常對照組而言有過度表現 GPC3 之癌症的對象。

【0164】 或者本發明可提供疫苗或醫藥組合物以供對罹患過度表現 GPC3 之癌的對象投予，其包括選自由上述 (a) 至 (d) 構成之群組中至少一種成分。換言之本發明更提供鑑別欲以本發明 GPC3 多勝肽治療之對象的方法，此方法包括決定衍生自對象之癌細胞或組織中的 GPC3 表現水平的步驟，其中，相較於該基因之正常對照為增加的水平代表此對象具有可用本發明之 GPC3 多勝肽治療的癌症。本發明之癌症治療方法將於以下更詳細敘述。

【0165】 再者，於較佳具體例，可於投予本發明勝肽前先鑑別一對象之 HLA 型。例如宜對於鑑別為具有 HLA-DR52b 或 HLA-DR9 之對象投予具有序列識別號：1 之胺基酸序列的勝

肽。或者，宜對於鑑別為具有 HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、HLA-DR15 或 HLA-DP5 之對象投予具有序列識別號：2 之胺基酸序列的勝肽。或者，宜對於鑑別為具有 HLA-DR9 之對象投予具有序列識別號：3 之胺基酸序列的勝肽。或者，宜對於鑑別為具有 HLA-DR13 之對象投予具有序列識別號：4 之胺基酸序列的勝肽。或者，宜對於鑑別為具有 HLA-DR13 及 HLA-DR9 之對象投予具有序列識別號：5 之胺基酸序列的勝肽。

【0166】可使用任何由對象而來的細胞或組織決定 GPC3-表現，只要其包括 GPC3 的目標轉錄或轉譯產物即可。適合的樣本的例子包括但不限於體組織及體液，例如血、唾液及尿。較佳者，由對象而來的細胞或組織樣本含有包括上皮細胞的細胞群體，更佳為癌上皮細胞或由懷疑為癌的組織所衍生的上皮細胞。又，視需要可從獲得的體組織及體液純化該細胞然後使用當做對象衍生的樣本。

【0167】以本發明方法治療的對象較佳為哺乳動物。哺乳動物例如包括但不限於例如人、非人類靈長類、小鼠、大鼠、犬、貓、馬及牛。

【0168】依照本發明，可決定由一對象獲得的癌細胞或組織中的 GPC3 表現水平。該表現水平可於轉錄(核酸)產物層級，使用該技術領域已知的方法決定。例如 GPC3 的 mRNA 可以藉由雜交法使用探針定量(例如北方雜交法)。該檢測可於晶片上、陣列上等實施。使用陣列對於偵測 GPC3 的表現水平為較佳。該技術領域中具有通常知識者可利用 GPC3 的序列資訊製備此

種探針。例如可使用 GPC3 的 cDNA 當做探針。視需要，可將該探針以適合的標記例如染料、螢光物質及同位素標記，且該基因的表現水平可以該雜交的標記的強度檢測。

【0169】再者，GPC3 的轉錄產物(例如序列識別號：8或10)，可藉由擴增為主的檢測方法(例如 RT-PCR)使用引子定量。此種引子可依照該基因可得的序列資訊製備。

【0170】具體而言，將供本發明使用的探針或引子於嚴苛、中度嚴苛或低嚴苛條件下，雜交於 GPC3 之 mRNA。此處使用的用詞「嚴苛(雜交)條件」係指在此條件下，探針或引子會雜交於其目標序列但不會與其他序列雜交。嚴苛條件為序列依存性，且在不同狀況下會不同。較長序列的特定雜交比起較短的序列會在較高溫觀察到。一般而言，嚴苛條件的溫度係選自比起特定序列在一定義的離子強度及 pH 時的熱熔點(T_m)低約攝氏 5 度的溫度。該 T_m 係指 50% 互補於其目標序列的探針與該目標序列之雜交達到平衡的溫度(於一定義的離子強度、pH 及核酸濃度)。由於該目標序列一般係過量呈現，於 T_m ，50% 的探針會以平衡佔據。通常嚴苛條件為鹽濃度少於約 1.0 M 鈉離子，通常約 0.01 至 1.0 M 鈉離子(或其他鹽)、pH 7.0 至 8.3，且對於短的探針或引子(例如 10 至 50 個核苷酸)，溫度至少約攝氏 30 度，對於較長的探針或引子，至少約攝氏 60 度。嚴苛條件也可藉由添加去安定物質例如甲醯胺而達到。

【0171】或者可偵測轉譯產物以診斷本發明。例如可決定 GPC3 蛋白質(序列識別號：9 或 11) 的量。確認轉譯產物的蛋白質量的方法，包括使用專一性辨識該蛋白質的抗體的免疫分析

方法。該抗體可為單株抗體或多株抗體。再者可使用抗體的任何片段或修飾(例如嵌合抗體、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv等)以供偵測，只要該片段或修飾抗體保留對於該GPC3蛋白質的結合能力即可。製備此種用於偵測蛋白質的抗體的方法在該技術領域中為周知，且可採用任意方法於本發明中以製備此種抗體及其均等物。

【0172】就基於轉譯產物偵測GPC3基因的表現水平的另一方法而言，染色強度可使用對抗該GPC3蛋白質的抗體，利用免疫組織化學分析測定。亦即，於該測量中，強染色代表該蛋白質的存在/水平增加，且同時，GPC3基因表現水平高。

【0173】目標基因例如GPC3基因於癌細胞中的表現水平，若水平比起該目標基因的對照組水平(例如於正常細胞中的水平細胞)增加例如10%、25%或50%;或增加超過1.1倍、高於1.5倍、高於2.0倍、高於5.0倍、高於10.0倍或更多，則決定為增加。

【0174】該對照水平可與癌細胞同時決定，係藉由使用預先從對象收集並保存的樣本實施，該對象的疾病狀態(有罹癌或未罹癌)為已知。此外，從具有欲治療的癌的一器官的非癌化區獲得的細胞可當做正常對照。或者該對照水平可依據先前對於從疾病狀態已知的對象得到的樣本中GPC3基因的表現水平決定的結果分析的統計方法決定。再者，該對照水平可從衍生自先前測試的細胞的表現樣式的資料庫衍生。又，依照本發明一態樣，於一生物學樣本中的GPC3基因表現水平可以與從多個參考樣本決定的多個對照水平比較。較佳為使用從衍生自

與該對象得到的生物學樣本類似的組織類型的參考樣本所決定的對照水平。再者，較佳為使用疾病狀態已知的群體當中的 GPC3 基因的表現水平的標準值。該標準值可由該技術領域中已知的任意方法獲得。例如，平均值 $+/- 2$ S.D. 或平均值 $+/- 3$ S.D. 的範圍可當作該標準值。

【0175】 本發明文中，由已知非癌化的生物學樣本決定的對照水平，稱為「正常對照水平」。另一方面，若該對照水平係從癌化的生物學樣本決定，其稱為「癌化的對照水平」。樣本表現水平與對照水平之間的差異可常態化為對照核酸例如管家基因的表現水平，其表現水平已知不會取決於細胞的癌化或非癌化而不同。示例之對照基因包括但不限於 β -肌動蛋白、甘油醛 3 磷酸去氫酶及核糖體蛋白質 P1。

【0176】 當 GPC3 基因的表現水平比起正常對照水平為增加時，或者相近/均等於癌化對照水平時，該對象可診斷為患有欲治療的癌症。

【0177】 更具體而言，本發明提供一種方法，係(i)診斷是否一對象患有欲治療的癌症及/或(ii)選擇供癌症治療的對象，該方法包括以下步驟：

- (a) 測定由懷疑患有欲治療的癌症的對象獲得的癌細胞或組織中的 GPC3 表現水平；
- (b) 比較其 GPC3 表現水平與正常對照水平；
- (c) 若 GPC3 的表現水平比起正常對照水平為增加，則診斷該對象是患有欲治療的癌症；
- (d) 若步驟(c)中診斷該對象患有欲治療的癌症時，則選擇

供癌症治療的對象。

【0178】或者該方法可包括以下步驟：

- (a) 測定由懷疑患有欲治療的癌症的對象獲得的癌細胞或組織樣本中的GPC3表現水平；
- (b) 比較其GPC3表現水平與癌化對照水平；
- (c) 若GPC3的表現水平相似於或等同於癌化對照水平，則診斷該對象是患有欲治療的癌症；及
- (d) 若步驟(c)中診斷該對象患有欲治療的癌症時，則選擇供癌症治療的對象。

【0179】於一些具體例，此方法在上述定義的(a)-(d)步驟後，可更包含鑑別具有選自於由HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5構成之群組之HLA的對象的步驟。依本發明之癌症療法較佳係針對罹患過度表現GPC3之癌且具有HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2及HLA-DP5中之任一者的對象。HLA分型的方法係該技術領域中為人熟知者。例如針對將HLA對偶基因分型的以PCR為主的方法係為人熟知。專一於各HLA分子的抗體，在鑑別一對象之HLA型時亦為適當的工具。

【0180】本發明也提供一種套組，係用於確認患有可利用本發明之GPC3多勝肽治療的癌症的對象，其也對於評估及/或特定癌症療法，更特別是監控癌症免疫療法的效力或適用性是有用的。適合之癌症的例子包括但不限於肝細胞癌(HCC)及黑色素瘤(melanoma)。尤其，該套組較佳為包括偵測對象衍生的

癌細胞中的該 GPC3 基因的表現的至少一種試劑，該試劑可選自以下群組：

- (a) 偵測該 GPC3 基因之 mRNA 的試劑；
- (b) 偵測該 GPC3 蛋白質的試劑；及
- (c) 偵測該 GPC3 蛋白質的生物學活性的試劑。

【0181】適合偵測該 GPC3 基因之 mRNA 的試劑的例子，可包括專一性結合於該 GPC3 mRNA 或鑑別該 GPC3 mRNA 的核酸，例如具有互補於該 GPC3 mRNA 的序列的寡核苷酸。此等種類的寡核苷酸例如專一於該 GPC3 mRNA 的引子及探針。此等種類的寡核苷酸可依照該技術領域周知的方法製備。若需要，可將偵測該 GPC3 mRNA 的試劑固定化在固體基質上。又，該套組中可包括多於一種偵測該 GPC3 mRNA 的試劑。

【0182】另一方面，適合偵測該 GPC3 蛋白質的試劑的例子，包括對於該 GPC3 蛋白質的抗體。該抗體可為單株抗體或多株抗體。再者，可使用抗體的任何片段或修飾(例如嵌合抗體、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)當做該試劑，只要該片段或修飾抗體保留對於該 GPC3 蛋白質的結合能力即可。製備此等種類的偵測蛋白質的抗體的方法，在該技術領域為人周知，且可在本發明中採用任意方法以製備此種抗體及其均等物。再者，該抗體可經由直接連結或間接標定技術而以訊號產生分子標記。標記抗體及偵測該抗體結合於其目標的標記及方法，在該技術領域為人周知，且在本發明可使用任意標記及方法。又，該套組中可包括多於一種偵測該 GPC3 蛋白質的試劑。

【0183】該套組可含有多於一種的上述試劑。例如由沒有

癌症或患有癌症的對象獲得的組織樣本，可當做有用的對照試劑。本發明的套組從商業及使用者角度所需，可更包括其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、針筒及有使用指示的包裝插入物(例如紙、錄音帶、CD-ROM等)。此等試劑保留在有標籤的容器中。適合的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。此等容器可由各種材料形成，例如玻璃或塑膠。

【0184】本發明之一具體例中，當該試劑為對抗該GPC3 mRNA的探針時，該試劑可固定化在固體基質上，例如多孔條，以形成至少一個偵測部位。該多孔條的測量或偵測區可包括多個部位，各含有核酸(探針)。試條也可含有供陰性及/或陽性對照的部位。或者對照部位可位在與試條分開的條片上。視情形，該不同的偵測部位可含有不同量的固定化核酸，亦即在一偵測部位為較高量，而在接續的部位為較低量。藉由添加測試樣本，顯示可偵測訊號的部位的數目提供存在於該樣本中的GPC3 mRNA量的定量指示。該偵測部位可為任何適於偵測的形狀，通常為或跨越試條寬度方向的桿狀或點狀。

【0185】本發明的套組可更包含陽性對照樣本或GPC3標準樣本。本發明的陽性對照樣本可藉由收集GPC3陽性樣本，然後分析其GPC3水平而製備。或者可對不表現GPC3的細胞添加純化的GPC3蛋白質或聚核苷酸，以形成該陽性樣本或該GPC3標準樣本。本發明中，純化的GPC3可為重組蛋白質。該陽性對照樣本的GPC3水平例如高於截斷值。

【0186】X. 抗體

本發明更提供結合於本發明之勝肽的抗體。較佳的抗體係

專一性結合於本發明之胜肽的抗體且不會(或微弱結合於)非本發明之胜肽。或者結合於本發明的胜肽的抗體，以及其同系物。對抗本發明胜肽的抗體於癌症診斷及預後分析法、及造影方法中有用。同樣地，此種抗體在其他癌症治療、診斷及/或預後方面有用，只要 GPC3在癌症病患中也有表現或過度表現。又，細胞內表現的抗體(例如單鏈抗體)在治療上用於治療涉及 GPC3表現的癌症為有用，癌症的例子包括但不限於肝細胞癌(HCC)及黑色素瘤(melanoma)。

【0187】 本發明也提供偵測及/或定量包括由選自序列識別號:1與2中之胺基酸序列構成之多胜肽之 GPC3蛋白質(序列識別號: 9或11)或其片段的各種免疫分析法。此種分析法可包括一種或更多抗 GPC3抗體，其能適當辨識及結合於 GPC3蛋白質或片段。本發明中，結合於 GPC3多胜肽的抗 GPC3抗體較佳為辨識由選自序列識別號: 1至 5之胺基酸序列構成之多胜肽者，更佳為排除其他的胜肽。抗體的結合專一性，可利用抑制試驗確認。即，當欲分析的抗體與全長之 GPC3多胜肽間的結合在存在具有選自序列識別號:1至 5中之胺基酸序列之多胜肽時受抑制，則視為該抗體「專一性地結合」於該片段。本發明中，此種免疫分析法係以該技術領域中周知的各種免疫分析法格式實施，包括但不限於各種放射免疫分析法、免疫層析技術、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素連結免疫螢光分析法(ELIFA)等。

【0188】 相關的本發明的免疫學但非抗體分析法可包括 T 細胞免疫產生性分析法(抑制性或刺激性)，及 MHC結合分析

法。此外，本發明也提供能偵測表現 GPC3 的癌症的免疫造影法，包括但不限於使用本發明經標記抗體的放射閃爍攝影造影法。此種分析法可在臨床上於偵測、監控及預測 GPC3 表現的癌症為提供效用，癌症包括但不限於肝細胞癌 (HCC) 及黑色素瘤 (melanoma)。

【0189】 本發明也提供結合於本發明勝肽的抗體。本發明的抗體可以任意形式使用，例如單株抗體或多株抗體，且包括藉由以本發明勝肽將動物例如兔子免疫所得的抗血清、所有類型的多株及及單株抗體、人類抗體與由基因重組產生的人類化抗體。

【0190】 本發明的勝肽當做抗原以獲得的抗體，可由任意動物種衍生，但較佳為衍生自哺乳動物例如人、小鼠、大鼠，更佳為人。人類來源的勝肽可由此處所揭露的核苷酸或胺基酸序列獲得。

依照本發明，作為免疫抗原的該勝肽，可為本發明多勝肽之完整勝肽或部分勝肽。適合之部分勝肽的例子可包括例如本發明勝肽的胺基 (N) 末端或羧基 (C) 末端片段。

【0191】 在此，抗體定義為與 GPC3 勝肽的全長或片段反應的蛋白質。於一較佳具體例，本發明抗體可辨識具有選自序列識別號：1至5中之胺基酸序列的 GPC3 片段勝肽。用於合成寡勝肽的方法在該技術領域為周知。合成後，在使用為免疫原之前可視情形將勝肽純化。本發明中，該寡勝肽(例如 24員或 26員)可以與擔體接合或連結以增強免疫產生性。鑰孔血藍蛋白 (Keyhole-limpet hemocyanin, KLH)為周知的擔體。結合 KLH

與胜肽的方法，也是該技術領域中周知的。

【0192】或者，可將編碼為本發明胜肽或其片段的基因插入已知的表現載體，然後用於轉形在此敘述的宿主細胞。可從該宿主細胞的外面或裡面以標準方法回收所望的胜肽或其片段，且接著可當做抗原。或者可將表現該胜肽的整個細胞或其溶解物或化學合成的胜肽當做抗原。

【0193】可將任何哺乳動物以該抗原免疫，但較佳為考量與用在細胞融合的母細胞的相容性。一般而言，可使用嚙齒科動物、兔或靈長科動物。嚙齒科的動物包括例如小鼠、大鼠、倉鼠。兔科動物包括例如兔子。靈長科動物例如狹鼻小目(Catarrhini)猴(舊世界猴)，例如食蟹猴(*Macaca fascicularis*)、獮猴，狒狒、黑猩猩。

【0194】以抗原免疫動物的方法為該技術領域中已知。腹膜內注射或皮下注射抗原為免疫動物的標準方法。更具體而言，可將抗原稀釋及懸浮於適當量的磷酸鹽緩衝鹽液(PBS)、生理鹽液等。若需要，可將抗原懸浮液與適量的標準佐劑混合，標準佐劑例如佛洛依德(Freund)完全佐劑，而形成乳劑後對於哺乳動物投予。較佳者，每4至21天數次投予與適量佛洛依德(Freund)不完全佐劑混合的抗原。適當的擔體也可用於進行免疫。如上免疫進行後，可藉由標準方法檢驗血清中所望抗體量的增加。

【0195】對抗本發明胜肽的多株抗體可藉由從檢查血清中所望抗體增加的受免疫哺乳動物收集血液，並從血液以習知方法分離血清而製備。多株抗體包括含有該多株抗體的血清且可

從該血清分離含有該多株抗體的級分(fraction)。免疫球蛋白G或M從來製備，藉由使用例如偶聯於本發明勝肽的親和管柱，與進一步使用蛋白質A或蛋白質G管柱純化該級分。

【0196】 為了製備單株抗體用於本發明之內容，從以該抗原免疫的哺乳動物收集免疫細胞，並如上述檢查血清中所望抗體的水平是否增加，之後進行細胞融合。用於細胞融合的免疫細胞較佳為從脾臟取得。其他較佳的與上述免疫細胞融合的母細胞，包括例如哺乳動物的骨髓瘤細胞，更佳為具有以藥物選擇融合細胞的所需性質的骨髓瘤細胞。

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

【0197】 由細胞融合得到的融合瘤可藉由將其在標準選擇培養基例如HAT 培養基(含次黃嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶的培養基)中培養而選擇。通常該細胞培養物係在該HAT培養基中繼續培養數天至數週，時間足以使除了所望融合瘤以外的其他細胞(非融合細胞)死亡。然後，可實施標準極限稀釋以篩選並選殖生產所望抗體的融合瘤細胞。

【0198】 除了上述方法，其中非人類動物係以抗原免疫以製備融合瘤，可將人類淋巴球例如受EB病毒感染者以勝肽、勝肽表現細胞或其溶解物於體外免疫。然後，將經免疫的淋巴球與能無限分裂的人類來源的骨髓瘤細胞例如U266融合，以得到生產能結合於該勝肽的所望人類抗體的融合瘤(未審查的日本公開專利申請案號昭63-17688)。

【0199】接著將獲得的融合瘤移植到小鼠的腹腔，並抽取腹水。獲得的單株抗體可利用例如硫酸銨沉澱、蛋白質A或蛋白質G管柱、DEAE離子交換層析或偶聯有本發明勝肽的親和性管柱純化。本發明抗體不僅可用於純化及偵測本發明勝肽，也可當成本發明勝肽的增效劑及拮抗劑的候選者。

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

【0200】獲得的單株抗體也可使用遺傳工程技術以重組方式製備（參見例如 Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, 於英國由 MacMillan Publishers LTD(1990)出版）。例如可從免疫細胞例如融合瘤或經免疫的生產該抗體的淋巴球選殖編碼為抗體的DNA，插入適當載體，並導入宿主細胞以製備重組抗體。本發明也提供如上述製備的重組抗體。

【0201】再者本發明抗體可為抗體片段或經修飾的抗體，只要其結合於一個或更多本發明的勝肽即可。例如，該抗體片段可為Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv或單鏈Fv(scFv)，其中來自H及L鏈的Fv片段以適當連結子連接(Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83(1988))。更具體而言，可利用以酵素例如木瓜酵素或胃蛋白酶處理抗體而產生抗體片段。或者可構建編碼為該抗體片段的基因，插入表現載體並於適當的宿主中表現（參見例如，Co *et al.*, J Immunol 152: 2968-76(1994); Better與Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515(1989); Lamoyi, Methods

Enzymol 121: 652-63(1986); Rousseaux *et al.*, Methods Enzymol 121: 663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7(1991))。

【0202】抗體可藉由與各種分子例如聚乙二醇(PEG)接合而修飾。本發明提供此種經修飾的抗體。該經修飾的抗體可藉由將抗體化學修飾而獲得。此等修飾方法在該領域為習知。

【0203】或者，本發明抗體可獲得為衍生自非人類抗體的可變區與衍生自人類抗體的不變區的嵌合抗體，或人類化抗體，其包括衍生自非人類抗體的互補決定區(CDR)、框架區(FR)及衍生自人類抗體的不變區。此種抗體可依照已知技術製備。人類化可藉由取代齧齒類CDR或CDR序列為人類抗體的對應序列而實施(參見例如Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536(1988))。因此此種人類化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整的人類可變區域已取代成衍生自非人類種的對應序列。

【0204】也可使用除了人類框架及不變區外包括人類可變區的完全人類抗體。此種抗體可使用該技術領域已知的各種技術製造。例如體外方法涉及使用呈現在噬菌體的人類抗體片段的重組庫(例如Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381(1991))。同樣地，可藉由將人類免疫球蛋白基因位導入基因轉殖動物例如內生免疫球蛋白已部分或全部失活的小鼠中，而製備人類抗體。此方法敘述於例如美國專利號6,150,584; 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

【0205】如上獲得的抗體可純化成同質。例如可依照一般

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

【0206】親和層析以外的適合之層析技術的例子，包括例如離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、反相層析、吸附層析等(*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996))。該等層析程序可利用液相層析，例如 HPLC 與 FPLC 實施。

【0207】例如可使用測量吸光度、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素免疫分析法(EIA)、放射免疫分析法(RIA) 及/或免疫螢光以測量本發明抗體的抗原結合活性。ELISA 中，係將本發明抗體固定化在一平板上，塗佈本發明勝肽於該平板，然後塗佈含有希望抗體的樣本，例如抗體產生細胞的培養上清或純化的抗體。然後，將辨識該初級抗體的二次抗體以酵素例如鹼性磷酸酶標記，然後溫育該平板。清洗後，添加酵素受質例如對硝基苯基磷酸酯到該平板，測量吸光度以評估該樣本的抗原結合活性。可使用該勝肽的片段例如 C 末端或 N 端片段當做抗原以評估該抗體的結合活性。可使用 BIACore(Pharmacia)

來評估本發明抗體的活性。

【0208】 上述方法，藉由使本發明抗體暴露於假定含有本發明胜肽的樣本，並偵測或測量該抗體與該胜肽形成的免疫複合體，能偵測或測量本發明的胜肽。

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

舉例來說，當從病患獲得的癌細胞或組織中偵測到本發明之胜肽時，將預期對抗它們的Th1細胞(或CTL細胞)可做為癌症免疫療法的有效工具。

【0209】 XI. 載體與宿主細胞

本發明也提供導入有編碼為本發明胜肽的核苷酸的載體與宿主細胞。本發明的載體在攜帶核苷酸尤其是本發明DNA到宿主細胞以表現本發明之胜肽，或投予本發明核苷酸供基因治療為有用。

【0210】 當選用宿主細胞為*E. coli*且載體在*E. coli* (例如JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue)中大量放大及生產時，該載體應具有欲在*E. coli*中放大的「ori」以及用於選擇經轉形的*E. coli*的標誌基因(例如由安皮西林、四環黴素、嘉那黴素、氯黴素等藥物選擇的抗藥性基因)。例如，可使用M13系列載體、pUC系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script等。此外，也可使用pGEM-T、pDIRECT及pT7次選殖及萃取cDNA及上述載體。當使用載體產生本發明蛋白質時，表現載體為有用。例如欲在*E. coli* 中表現的載體應具有上述欲在*E. coli* 中擴增需

要的特性。當使用 *E. coli* 例如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1 Blue 當做宿主細胞，該載體應具有啟動子例如 lacZ 啟動子 (Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-6(1989); *FASEB J* 6: 2422-7(1992))、araB 啟動子 (Better *et al.*, *Science* 240: 1041-3(1988))、T7 啟動子等。其能有效率地在 *E. coli* 中表現所希望的基因。於此方面，可使用 pGEX-5X-1(Pharmacia)、「QIAexpress system」(Qiagen)、pEGFP 及 pET(於此情形，宿主較佳為表現 T7 RNA 聚合酶的 BL21)取代上述載體。此外，該載體也可含有訊號序列以供勝肽分泌。引導該勝肽分泌到 *E. coli* 胞間質之示例的訊號序列，為 pelB 訊號序列 (Lei *et al.*, *J Bacteriol* 169: 4379(1987))。將該等載體導入目標宿主細胞的方法包括例如氯化鈣法及電穿孔法。

【0211】除了 *E. coli*，例如可使用衍生自哺乳動物的表現載體 (例如 pcDNA3(Invitrogen) 及 pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17): 5322(1990)))、pEF、pCDM8)、衍生自昆蟲細胞的表現載體 (例如「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、衍生自植物的表現載體 (例如 pMH1、pMH2)、衍生自動物病毒的表現載體 (例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、衍生自反轉錄病毒的表現載體 (例如 pZIpneo)、衍生自酵母菌的表現載體 (例如「Pichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)，及衍生自枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*) 的表現載體 (例如 pPL608、pKTH50)，用於生產本發明之多勝肽。

【0212】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 α 啟動子 (Mizushima *et al.*, *Nucleic Acids Res* 18: 5322(1990))、CMV 啟動子等，較佳為具有用於選擇轉形體的標記基因(例如由藥物(例如新黴素、G418)選擇的抗藥性基因)。具有此等特性的已知載體的例子包括，例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV及pOP13。

【0213】 以下參考具體的實施例對於本發明更詳細敘述。然而，以下材料、方法及實施例係可協助該技術領域中具有通常知識者製造及使用本發明特定具體例，此等僅是意欲來解說本發明態樣，因此並不限制本發明的範圍。該技術領域中具有通常知識者當可輕易理解到，與在此所述者類似或等同之方法及材料可用於實施或測試本發明。

[實施例]

【0214】材料與方法

細胞株

小鼠纖維母細胞株(L-細胞)，其經過基因改造以表現 DR4 (DRB1*04:05), L-DR4; DR8 (DRB1*08:03), L-DR8; DR13 (DRB1*13:02), L-DR13或DR15 (DRB1*15:02), L-DR15;及 DP5 (DPA1*02:02/DPB1*05:01), L-DP5 使用為抗原呈現細胞 (APC)。這些 L 細胞於體外 (*in vitro*) 保存在添加 10%FCS 的 DMEM 中。表現 DR7 (DRB1*07:01), L-DR7; DR13 (DRB1*13:01), L-DR13; DR52a (DRB3*01:01), L-DR52a; DR52b (DRB3*02:02), RM3-DR52b; DR15 (DRB1*15:01),

L-DR15; DP2 (DPA1*01:03/DPB1*02:01), L-DP-2的L細胞及表現DP4 (DPA1*01:03/DPB1*04:01)的RM3細胞株是由La Jolla Institute for Allergy and Immunology, California, USA的Alessandro Sette博士好心提供(McKinney DM, et al., Immunogenetics 2013; 65:357-70)。來自La Jolla Institute之轉染細胞株培養於添加2mM麩胺酸(glutamine)、1% (v/v)非必需胺基酸、1% (v/v)丙酮酸鈉、青黴素(50 U/mL)、鏈黴素(50 micro-g/mL)(皆來自Life Technologies)的RPMI 1640培養液中，及具有最終濃度為200 micro-g/ml G-418硫酸鹽(wako)的10%熱滅活胎牛血清(R10)中。RM3轉染株培養於具有最終濃度為700 micro-g/ml G-418硫酸鹽及12 micro-g/ml Blasticidin (Sigma)的R10中(McKinney DM, et al., Immunogenetics 2013; 65:357-70)。

【0215】預測HLA第II類結合勝肽

為了預測有潛力的混雜的HLA第II類結合人類GPC3-衍生的勝肽，將該人類GPC3蛋白質之胺基酸序列使用最近發展的電腦演算法(IEDB analysis resource, IEDB recommended method, resource, IEDB recommended method, tools.immuneepitope.org/mhcii/) (Wang P, et al. BMC Bioinformatics 2010; 11:568; Wang P, et al., PLoS Comput Biol 2008;4:e1000048)來分析。該程式分析15個胺基酸長的序列偏移量(offset)以包括完整之蛋白質。5個GPC3-LPs，GPC3₉₂₋₁₁₆ (LP1)、GPC3₁₃₇₋₁₆₁ (LP2)、GPC3₂₈₉₋₃₁₃ (LP3)、GPC3₃₈₆₋₄₁₂ (LP4)、GPC3₅₅₆₋₅₇₆ (LP5)其對於由DRB1*05:01、DRB1*07:01、

DRB1*08:03、DRB1*09:01、DRB1*13:02或DRB1*15:02對偶基因編碼之多個HLA第II類分子具有重疊的高一致性百分等級被選擇(第7圖及表1)。

【0216】 [表1]

使用 IEDB 推薦的一致性 (consensus) 方法獲得 GPC3 衍生胜肽的 HLA 第 II 類結合等級分數

氨基酸殘基	GPC3-LP1	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR7 (DRB1*07:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR13 (DRB1*13:02)	HLA-DR14 (DRB1*14:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)	HLA-DP5 (DPB1*05:01)
92-106	23.48	1.1	56	5.4	17.81	45.49	3.6	0.54	6.79	
93-107	17.71	49.19	43.84	33.73	71.13	39.91	20.99	0.55	6.62	
94-108	5.31	64.58	27.59	32.75	57.12	25.81	9.96	0.53	6.02	
95-109	5.04	40.87	13.78	32.75	57.47	12.79	9.96	0.61	6.02	
96-110	0.78	2.72	5.42	1.17	3.36	4.03	0.71	2.09	7.09	
97-111	0.56	2.89	4.12	1.11	1.02	2.43	0.71	8.08	9.29	
98-112	0.65	3.41	3.76	1.09	0.89	1.55	0.71	14.69	10.11	
99-113	0.84	4.9	4.56	1.12	0.88	1.73	0.71	15.63	13.64	
100-114	1.23	5.87	4.94	1.15	0.95	1.83	0.71	16.84	17.36	
101-115	4.27	7.28	6.24	4.43	1.02	2.14	0.71	14.79	22.79	
102-116	4.44	7.39	16.66	4.92	1.09	6.96	0.71	15.7	21.13	
一致性百分等級										
氨基酸殘基	GPC3-LP2	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR7 (DRB1*07:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR13 (DRB1*13:02)	HLA-DR14 (DRB1*14:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)	HLA-DP5 (DPB1*05:01)
137-151	36.54	34.58	84.97	56.04	80.98	87.13	8.84	3.11	2.32	
138-152	17.16	33.04	81.65	33.39	80.03	82.62	5.83	0.02	2.81	
139-153	16.19	37.04	81.46	28.03	80.17	81.13	5.83	0.01	2.78	
140-154	16.03	26.04	81.25	20.75	75.65	81.60	5.83	0.01	3.27	
141-155	16.61	27.73	76.57	32.05	71.65	74.17	5.83	0.01	3.75	
142-156	6.74	5.39	41.58	8.44	11.92	44.70	1.37	0.02	4.73	
143-157	6.74	4.96	34.55	8.33	11.92	33.74	1.37	0.16	5.07	
144-158	6.74	7.71	32.16	10.35	11.92	27.57	1.37	1.24	4.72	
145-159	6.74	10.48	30.49	19.99	11.92	23.67	1.37	4.47	4.38	
146-160	6.74	13.07	32.86	24.24	11.92	28.53	1.37	4.56	4.57	
147-161	6.74	10.95	32.80	33.31	11.92	32.84	1.37	4.56	7.62	

針對指出之 HLA-第 II 類分子的胜肽結合演算分數，係以 15 個 GPC3 衍生之重複胜肽表示。

使用 IEDB 推薦的一致性(consensus)方法獲得 GPC3 衍生勝肽的 HLA 第 II 類結合等級分數

GPC3-LP3 胺基酸殘基	一致性百分等級						一致性百分等級					
	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR7 (DRB1*07:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR13 (DRB1*13:02)	HLA-DR14 (DRB1*14:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DR2 (DPB1*02:01)	HLA-DR2 (DPB1*05:01)	HLA-DR5 (DPB1*05:01)		
289-303	14.24	11.46	19.34	40.53	32.56	20.63	3.9	2.14	6.03			
290-304	5.32	11.69	24.49	25.27	33.05	31.16	3.9	2.08	6.81			
291-305	5.19	11.65	31.28	23.93	47.64	35.77	3.9	2.14	5.2			
292-306	5.19	11	35.34	23.31	47.63	36.27	3.9	2.18	4.63			
293-307	2.44	9.46	44.42	4.16	15.47	35.01	3.9	2.46	4.55			
294-308	2.29	9.46	45.22	3.83	15.47	30.77	3.9	2.84	4.84			
295-309	3.26	9.46	53.89	4.31	15.72	32.22	3.9	4.92	12.15			
296-310	3.75	42.56	56.47	4.6	15.49	28.19	5.03	12.92	12.15			
297-311	6.69	42.49	57.31	6.06	18.14	30.23	14.56	13.3	12.15			
298-312	11.11	49.12	60.21	8.43	28.19	38.61	14.56	15.98	18.5			
299-313	12.64	48.59	55.91	14.48	25.13	39.02	14.56	13.64	24.32			
GPC3-LP4 胺基酸殘基	一致性百分等級						一致性百分等級					
	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR7 (DRB1*07:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR13 (DRB1*13:02)	HLA-DR14 (DRB1*14:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DR2 (DPB1*02:01)	HLA-DR2 (DPB1*05:01)	HLA-DR5 (DPB1*05:01)		
386-400	4.51	11.33	1.2	3.91	26.62	1.73	3.92	33.14	2.66			
387-401	4.44	11.03	0.75	3.76	26.46	0.68	3.92	32.19	1.53			
388-402	4.33	10.65	0.6	3.76	26.06	0.37	3.92	26.2	6.41			
389-403	1.38	7.81	0.6	0.87	26.14	0.48	0.5	14.3	0.9			
390-404	1.38	8.84	1.25	0.89	37.94	1.44	0.5	14.3	0.89			
391-405	1.38	4.14	1.98	0.89	39.07	2.24	0.5	7.51	0.93			
392-406	0.3	4.14	3.94	0.07	43.64	5.4	0.5	6.33	1.06			
393-407	0.36	4.14	4.93	8.11	30.8	6.72	0.5	7.07	1.14			
394-408	0.38	4.14	5.58	7.99	30.69	5.86	0.5	6.63	4.18			
395-409	0.39	0.5	3.95	0.48	12.65	4.27	0.5	6.53	5.71			
396-410	0.62	0.59	6.63	0.03	12.45	5.45	2.03	7.24	14.61			
397-411	1.49	0.74	10.07	0.1	14.11	7.26	2.03	8.62	21.78			
398-412	2.2	1.06	15.69	0.11	16.03	10.3	2.03	9.28	25.47			

針對指出之 HLA-第 II 類分子的勝肽結合演算法分數，係以 15 個 GPC3 衍生之重複勝肽表示。

使用 IEDB 推薦的一致性(consensus)方法獲得 GPC3 衍生胜肽的 HLA 第 II 類結合等級分數

GPC3-LP5 胺基酸殘基	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR7 (DRB1*07:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR13 (DRB1*13:02)	HLA-DR14 (DRB1*14:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)	HLA-DP5 (DPB1*05:01)
556-570	1.25	0.56	4.85	1.21	6.63	5.19	0.4	38.86	33.92
557-571	1.23	0.68	3.6	1.07	6.6	3.51	0.4	12.73	23.87
558-572	1.13	0.68	2.32	0.86	3.42	2.73	0.4	12.73	23.87
559-573	0.99	0.76	2.93	0.94	3.42	2.58	0.4	12.73	23.87
560-574	1.02	1.2	5.78	1.38	3.42	5.38	0.4	12.73	23.87
561-575	2.36	1.26	9.94	2.47	3.42	9.79	0.4	13.87	23.87
562-576	2.43	1.26	23.43	4.64	3.42	29.45	0.4	12.73	23.87

針對指出之 HLA-第 II 類分子的胜肽結合演算法分數，係以 15 個 GPC3 衍生之重複胜肽表示。

【0217】 合成胜肽及重組蛋白質

合成 2 種由 HLA-A2 (A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂; A2-GPC3-SP) 或 HLA-A24 (A24-GPC3₂₉₈₋₃₀₆; A24-GPC3-SP)、及 5 個 GPC3-LPs (GPC3₉₂₋₁₁₆; 137-161; 289-313; 386-412; 556-576) 所呈現的人類 GPC3 衍生 SPs (MBL, Nagoya, Japan; 純度 >95%; 第 7B 圖)。使用結合於 HLA-A2 之人類免疫缺乏病毒 (HIV) SPs (A2-HIV) 及 CDCA1 衍生 SP (A2-CDCA1)，作為負對照 SPs (Tomita Y, et al. *Cancer Sci* 2011; 102:71-8; Tomita Y, et al. *Cancer Sci* 2011; 102:697-705)。有時使用 IMP3₅₀₇₋₅₂₇-LP 作為對照 LP。將勝肽以 10 mg/mL 的濃度溶於二甲基亞礦，並保存在攝氏 -80 度。重組的全長 GPC3 蛋白質是從 R&D Systems (Minneapolis, USA; 純度 >90%) 購買，並重配成 1 mg/mL 於包含 0.2% FCS 的無菌 PBS 中。重組的 CDCA1 蛋白做為如前述之對照 (Tomita Y, et al. *Cancer Sci* 2011; 102:697-705)。裝載有 GPC3-LP2: GPC3₁₃₇₋₁₆₁ 的脂質體及做為對照的 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 如前述產生 (Yuba E, et al., *Biomaterials* 2013; 34:3042-52;)。

【0218】 自健康捐贈者產生抗原專一性 CD4⁺ T 細胞

分離與使用衍生自健康捐贈者之 PBMC 的研究計畫經過熊本大學人體試驗委員會 (Institutional Review Board of Kumamoto University) 核可。從 11 名具有知情同意書 (written informed consents) 的健康捐贈者獲得 PBMC 樣本。本研究中調查的健康捐贈者的 HLA-A、DRB1 及 DPB1 對偶基因，係以具有聚合酶連鎖反應及對偶基因專一性探針雜交之 HLA 基因變異的 DNA 分型 (DNA TYPING) 來決定，且如表 1 中所述。HLA-A、

DRB1及DPB1對偶基因的基因型鑑定(genotyping)是在HLA實驗室中實施(Kyoto, Japan)(表2)。將前述方式進行一些修飾，實施抗原專一性CD4⁺ T細胞的誘導(Zarour HM, et al. *Cancer Res* 2000;60:4946-52)。藉由磁性微珠以陽性篩選來從PBMC純化CD4⁺ T細胞(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)(Inoue M, et al. *Int J Cancer* 2010;127:1393-403)。經由如前述方式之體外培養從CD14⁺細胞生產單核球來源的樹狀細胞(DC) (Harao M, et al. *Int J Cancer* 2008; 123:2616-25)，並將其作為抗原呈現細胞(APC)以誘導如前述之抗原專一性CD4⁺ T細胞(Tomita Y, et al. *Clin Cancer Res* 2013; 19:4508-20)。有些情形，會利用極限稀釋將T細胞選殖，以供前述進一步的研究(Tabata H, et al. *Hum Immunol* 1998;59:549-60)。

【0219】 [表2]

健康捐贈者的 HLA-A、-DR 及-DP 基因型

捐贈者	ID ^a	HLA-A 基因型	HLA-DRB1 基因型	HLA-DPB1 基因型
HD1			DRB1*04:05 / DR53	DPB1*05:01 / -
HD2		A*02:01 / 24:02	DRB1*08:03 / 15:02	DPB1*02:01 / 09:01
HD3		A*11:01 / 31:01	DRB1*08:02 / 15:02	DPB1*05:01 / 09:01
HD4		A*24:02 / -	DRB1*08:03 / 14:05	DPB1*02:02 / 05:01
HD5		A*24:02 / 31:01	DRB1*04:05 / 09:01/DR53 ^c	DPB1*02:01 / 04:02
HD6		A*02:01 / 02:06	DRB1*04:06 / 08:03/DR53	DPB1*02:01 / 04:02
HD7		n.t. ^b	DRB1*04:05 / 13:02/DR53	DPB1*04:01 / 09:01
HD8		A*26:01 / 33:03	DRB1*04:10 / 08:02/DR53	DPB1*02:01 / 05:01
HD9		A*26:01 / -	DRB1*09:01 / 13:02/DR53	DPB1*03:01 / 04:01
HD10		A*31:01 / 33:03	DRB1*07:01 / 13:02/DR53/DR52b ^d	DPB1*02:01 / 04:01
HD11		A*01:01 / 68:01	DRB1*09:01 / 14:54/DR53	DPB1*04:02 / 05:01
		A*02:06 / 24:02		

使用^aPBMCs 衍生自健康捐贈者(HD1-HD11)於誘導分析法並作為同種異體的 APC; ^bn.t:未檢測; ^cDR53 的基因型為 DRB4*01:03, 且^dDR52b 的基因型為 DRB3*02:02。

【0220】 T細胞對於胜肽及蛋白質的反應的評估

使 用 IFN- γ 酵 素 連 結 免 疫 點 (ELISPOT)(BD Biosciences) , 如 前 述 (Tomita Y, et al. Cancer Sci 2011;102:697-705)評估 Th細胞對於經過胜肽(10 micro-g/ml)或蛋白質(10 micro-g/ml)脈衝的抗原呈現細胞(APC)之反應。簡言之，係如前述(Tosolini M, et al. Cancer Res 2011; 71:1263-71)分析每 3×10^4 個散裝CD4 $^{+}$ T細胞在以有經過胜肽脈衝之PBMC(3×10^4 個細胞/井)刺激時，或有經過胜肽脈衝之每 1×10^4 個散裝CD4 $^{+}$ T細胞及 HLA-DR-表現的L細胞(5×10^4 /井)或RM3 (5×10^4 /井)刺激時，產生(IFN- γ 之胜肽專一性CD4 $^{+}$ T細胞的頻率。

【0221】 細胞激素分析

將 GPC3-LPs專一性散裝Th細胞或Th細胞選殖體(3×10^4 /井)在經同源胜肽脈衝的自體PBMCs存在的情況下下，於96井培養盤培養。24小時後，收集培養懸浮層，並使用 Bio-Plex系統(Bio-Rad)依廠商指示測量細胞激素的水平(IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、GM-CSF及 MIP β)。

【0222】 體外交叉起動(cross-priming)分析

Yuba et al. (Yuba E, et al., Biomaterials 2013; 34:3042-52)發展出包含腫瘤抗原的pH敏感修飾的脂質體以提升DC中交叉啟動(cross-priming)的效率。為了評估 GPC3-LP2: GPC3₁₃₇₋₁₆₁的交叉呈現(cross-presentation)，使用的經包覆在脂質體中的LP脈衝的DC。如前述準備脂質體(Yuba E, et al., Biomaterials 2013; 34:3042-52)。簡言之，將溶於N, N-二甲基甲醯胺(N, N-dimethylformamide)或去離子水(5 mg/mL)的胜肽(0.22

micro-mol)加入乾燥薄膜 EYPC/CHexPG-PE (97/3, mol/mol; 6.25 micro-mol)，接著在真空下移除溶劑超過3小時。獲得的脂質和胜肽混合物分散在 PBS(500 micro-L)，利用浸浴式(bath-type)超音波振盪器進行2分鐘超音波振盪，得到胜肽結合的脂質體懸浮液。藉由冷凍和解凍將脂質體懸浮液進一步水合，並透過具有孔徑100 nm的聚碳酸酯膜進行擠出。脂質體懸浮液在4°C以55,000 rpm離心1.5小時兩次以從脂質體移除自由胺基酸。分別藉由磷脂質C (Wako)及微量 BCA蛋白質分析 (Thermo Scientific)測定脂質和胜肽的濃度。

【0223】自陽性單離的CD14⁺(第0天)製備未成熟的DC。於IL-4 (10 ng/ml)和GM-CSF (100 ng/ml)的存在下培養CD14⁺細胞。於第5天收集未成熟的DC，並利用包覆在脂質體中的LP (與20 micro-g/mL的LP等量)對未成熟的DC進行脈衝4小時。藉由ELISPOT分析法計數對載有包覆在脂質體中的GPC3-LP2產生反應之IFN- γ 產生之A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂-SP專一性散裝CTL的數量。將經SP脈衝的DC做為陽性對照，將未經脈衝的DC、經脂質體單獨脈衝的DC、與可溶的GPC3-LP2混合的脂質體、及經包覆在脂質體中的IMP3₅₀₂₋₅₂₇-LP脈衝的DC做為陰性對照。

【0224】體外交叉起動(cross-priming)及誘導LP專一性小鼠CD4⁺ T細胞

HLA-A2 (HHD)基因轉殖小鼠(Tgm)係由F.A. Lemonnier博士好心提供(Pascolo S, et al., J Exp Med 1997; 185:2043-51)。以7天為間隔，對於小鼠尾根部以皮下注射(subcutaneously)在不完全佛洛依德佐劑(IFA)中乳化之GPC3-LP2溶液或

A2-GPC3-SP溶液(HLA-A2 Tgm, 50 micro-g/每隻小鼠, 或0.5 mM/100 micro-L)。等莫耳的(0.5 mM/100 micro-L)劑量的SP和LP2用來比較他們的免疫原性(immunogenicity)。IFA-PBS用來做為陰性對照且由前述之方法進行分析(Tomita Y, et al. Clin Cancer Res 2013; 19:4508-20; Tosolini M, et al. Cancer Res 2011; 71:1263-71; Tomita Y, et al., Oncoimmunology 2014; 3:e28100-15)。

【0225】評估經A2或A24-GPC3-SP進行免疫的病患中GPC3-LP專一性CD4⁺ T細胞反應

將冷凍的單離自HCC病患的PBMC解凍後，在37°C以最終體積為2 ml之添加5%未經補充之(decomplemented)人類血清之AIM-V的5種GPC3-LP(每一種10 micro-g/mL)的混合物培養細胞(2 × 10⁶/井，24-孔盤)；IL-2和IL-7在第0天和第2天時加入。細胞培養一個星期後，將細胞收集、清洗、並與單獨的(individual)GPC3-LP或做為對照的LP培養於ELISPOT盤中(1 × 10⁵/井)18小時。如前述計數GPC3-LP專一性Th細胞的數量(Tomita Y, et al., Int J Cancer 2014; 134:352-66)。

【0226】統計分析

本案使用雙尾學生t (Student *t*)檢定(條狀圖)或無參數曼-惠特尼(Mann-Whitney)U檢定(散點圖)比較數據。在所有測試中，P值差異小於0.05被認為是統計上顯著。

【0227】結果

可能之混雜的HLA第II類結合GPC3-LPs的預測及選擇

為了鑑別GPC3之有潛力之混雜的HLA-第II類結合之Th細

胞抗原決定位，首先使用最近發展的電腦演算法檢驗 GPC3 的胺基酸序列(第 7A 圖及表 1)(Wang P, et al. BMC Bioinformatics 2010;11:568; Wang P, et al., PLoS Comput Biol 2008;4:e1000048)。有兩區(GPC3-LP2: GPC3₁₃₇₋₁₆₁及 GPC3-LP3: GPC3₂₈₉₋₃₁₃)被此電腦演算法預測為有潛力的混雜的 HLA 第 II 類結合勝肽被辨識為接近已知的 9 肅或 10 肣的 CTL-抗原決定位序列，其由經 HLA-A2 或 A24 限制之 CTLs 所辨識(第 7B 圖)。也有三個 LPs (GPC3-LP1: GPC3₉₂₋₁₁₆、GPC3-LP4: GPC3₃₈₆₋₄₁₂、及 GPC3-LP5: GPC3₅₅₆₋₅₇₆)被預測為有潛力的混雜的 HLA 第 II 類結合勝肽，其不包含已知的 CTL-抗原決定位序列。合成所有 5 個勝肽用於後續之分析。

【0228】辨識混雜的 GPC3 衍生 Th 細胞抗原決定位

將從健康捐贈者之 PBMC 單離的 CD4⁺ T 細胞以週的間隔以經 GPC3-LPs 脈衝的自體 DC 與 PBMC 刺激。在至少 3 回合刺激後，藉由 IFN- γ ELISPOT 分析檢驗培養之 CD4⁺ T 細胞的 GPC3-LP 專一性反應。GPC3-LP1; GPC3₉₂₋₁₁₆可以依存 HLA-DR 的方式從健康捐贈者(HD10)DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 產生抗原專一性的 Th 細胞(第 1A 圖)。GPC3-LP1 也可以依存 HLA-DR 的方式從 HD5: DRB1*04:05/09:01/DR53 產生抗原專一性的 Th 細胞(第 1A 圖)。

【0229】衍生自 HD10: DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 之經 GPC3-LP2; GPC3₁₃₇₋₁₆₁誘導的 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於經 GPC3-LP2 脈衝的 PBMC。(第 1B 圖)。為了探究 GPC3-LP2 是否會誘導由其他 HLA 第 II 類分子限

制之 Th 細胞的反應，測試來自 HLA-DR13 陰性健康捐贈者的 CD4⁺ T 細胞。從 HD5: DPB1*02:01/ 04:02 產生的 Th 細胞以依存 HLA-DP 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於經 GPC3-LP2 脍衝之 PBMC(第 1B 圖)。同時也觀察到 GPC3-LP2 以依存 HLA-DR 的方式從健康捐贈者 HD4: DRB1*08:03/14:05(第 1B 圖) 和 HD11: DRB1*09:01/14:54/DR53(第 1B 圖) 產生專一性 Th 細胞。也偵測到來自 HD3: DRB1*08:02/15:02 的 PBMC 的勝肽專一性反應(未顯示數據)。

【0230】接著，我們評估 GPC3-LP3; GPC3₂₈₉₋₃₁₃ 是否能產生勝肽-專一性 Th 細胞。從 HD10: DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 產生的 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於 經 GPC3-LP3 脍衝之 PBMC(第 1C 圖)。從 HD5: DRB1*04:05/09:01/DR53 產生的 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於 經 GPC3-LP3 脍衝之 PBMC(第 1C 圖)。從健康捐贈者 HD11: DRB1*09:01/14:54/DR53 產生的 Th 細胞也以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於 經 GPC3-LP3 脍衝之 PBMC(第 8A 圖)。

【0231】也評估 GPC3-LP4; GPC3₃₈₆₋₄₁₂ 產生抗原-專一性 Th 細胞的能力。從 HD3: DRB1*08:02/15:02 產生的 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於 經 GPC3-LP4 脍衝之 PBMC(第 1D 圖)。從 HD10: DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 產生的 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於 經 GPC3-LP4 脍衝之 PBMC(第 1D 圖)。

【0232】隨後，評估 GPC3-LP5; GPC3₅₅₆₋₅₇₆ 產生抗原-專一

性 Th 細胞的能力。從 HD10: DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 產生的 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於經 GPC3-LP5 脈衝之 PBMC(第 1E 圖)。從 HD5: DRB1*04:05/09:01/DR53 產生的 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 回應於經 GPC3-LP5 脈衝之 PBMC(第 1E 圖)。

【0233】 確切辨識 GPC3 專一性 Th 細胞之限制 HLA 第 II 類分子

衍生自 HD10: DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 之散裝 GPC3-LP1 專一性 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式專一性地辨認經 GPC3-LP1 脈衝的 RM3-DR52b 細胞(第 2A 圖)(數據未顯示)，但不辨認經 GPC3-LP1 脈衝之 L-DR7, L-DR13, L-DR53, L-DR52a。衍生自 HD5: DRB1*04:05/09:01/DR53 之其他散裝 GPC3-LP1 專一性 Th 細胞以依存 HLA-DR 的方式專一性地辨認經 GPC3-LP1 脈衝的 L-DR9 細胞，但不辨認經 GPC3-LP1 脈衝之 L-DR8 或 L-DR53(第 2A 圖)。這些結果顯示 GPC3-LP1 至少由 HLA-DR52b 和 HLA-DR9 呈現。

【0234】 為了辨識從 HD10: DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 產生之散裝 GPC3-LP2 專一性 T 細胞的限制 HLA 第 II 類分子，生產 Th 細胞選植體(Th-選植體)。Th-選植體細胞專一性地辨認經 GPC3-LP2 脈衝之 HLA-DR52b (HLA-DRB3*02:02) 轉染 RM3 細胞株及來自兩個 HLA-DR13 $^+$ DR7 $^-$ 健康捐贈者的異體 PBMC(allo-PBMC)(第 2B 圖、第 8B 圖)。這些結果顯示 GPC3-LP2 由 HLA-DR52b 呈現。來自從 HD5: DPB1*02:01/04:02 產生之

GPC3-LP2 專一性 T 細胞的 Th 選植體可專一性地辨認經 GPC3-LP2 脈衝之 L-DP 細胞、及具有共享的 HLA-DP2 分子的同種異體 (allogeneic) PBMC，但不辨認經 GPC3 脈衝的 RM3-DP4 細胞或不具有 HLA-DP2 的同種異體 PBMC。經證實，GPC3-LP2 會誘導經 HLA-DP2 限制之 Th 細胞 (第 2B 圖、第 8C 圖)。GPC3-LP2 會產生經 HLA-DR8-(DRB1*08:03) 限制之 Th 細胞，其經同種異體 PBMC 和 L 細胞轉染子證實為 APC (第 8D 圖、第 8E 圖)。因此，GPC3-LP2 結合於 HLA-DR52b, HLA-DP2, HLADR8, HLA-DR9/14 及 HLA-DR8/15 (數據未顯示)，暗示 GPC3-LP2 為由數個片段的 HLA 第 II 類分子呈現的混雜的 Th 細胞抗原決定位 (Saito S, et al., *Tissue Antigens* 2000; 56:522-9; Mack SJ, et al. *Tissue Antigens* 2000; 55:383-400)。

【0235】由於從 HD10: DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 產生之 GPC3-LP3 專一性散裝 Th 細胞不能從兩個 HLA-DR13 陽性捐贈者 (HD7, HD9) 辨認出同種異體 PBMC，得到的結論是，GPC3-LP3 會產生經 HLA-DR7- 或 DR53 限制之 Th 細胞 (第 2C 圖)。來自 HD5: DRB1*04:05/09:01/DR53 之 GPC3-LP3 專一性散裝 Th 細胞以 HLA-DR 依存的方式專一性地辨認經 GPC3-LP3 脈衝之 L-DR9 細胞，但不辨認經 GPC3-LP3 脈衝之 L-DR4 或 L-DR53 細胞 (第 2C 圖)。這些結果顯示 GPC3-LP3 是由 HLA-DR9 呈現。

【0236】GPC3-LP4 反應性 Th- 選植體是由 HD3: DRB1*08:02/15:02 產生的散裝 Th 細胞所建立。接著使用同種異體 PBMC 做為 APC 藉由共享的 HLA-DR 分子決定限制性。經證實，GPC3-LP4 產生經 HLA-DR15 或 DR51 限制之 Th 細胞 (第 2D

圖）。GPC3-LP4反應性Th-選植體也是由HD10:DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52所建立。GPC3-LP4反應性Th-選植體專一地辨認經GPC3-LP4脈衝之L-DR13，但不辨認經GPC3-LP4脈衝之L-DR7。得到的結論是，GPC3-LP4產生經HLA-DR13限制之Th細胞(第2D圖)。

【0237】來自HD10:DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52的GPC3-LP5反應性Th-選植體可辨認L-DR13(第2E圖)，但不能辨認經GPC3-LP5脈衝之L-DR7，L-DR53，L-DR52a或RM3-DR52b細胞。另一個來自HD5:DRB1*04:05/09:01/DR53之GPC3-LP5反應性Th-選植體可辨認經GPC3-LP5脈衝之L-DR9但不辨認經GPC3-LP5脈衝之L-DR-4或L-DR53細胞。因此，得到結論是，GPC3-LP5產生經HLA-DR13-和HLA-DR9-限制之Th細胞(第2E圖)。

【0238】GPC3-LP刺激Th1類型CD4⁺ T細胞

對於Th細胞對GPC3-LP反應的特性，測量回應於經同源胜肽脈衝之自體PBMC刺激而由Th細胞分泌至培養液中的細胞激素水平。從HD10產生之GPC3-LP1, LP2, LP4-專一性T細胞選植體以同源胜肽再度刺激後，產生大量的IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、GM-CSF及MIP1 β ，顯示Th-1的極化特性(第3圖)。

【0239】可能經天然處理且由DC呈現之GPC3-LPs

評估DC是否攝入並處理GPC3蛋白質以刺激經由LP的刺激而產生的GPC3-LP專一性Th細胞。製備載有重組GPC3蛋白質之DC，並使用於IFN- γ ELISPOT分析法做為APC (Tomita Y, et al. Cancer Sci 2011; 102:71-8; Harao M, et al., Int J Cancer

2008; 123:2616-25)。從 HD10: DRB1*07:01/13:02/DR53/DR52 產生之四個 GPC3-LPs(GPC3-LP1, 3, 4 及 5)反應性 Th 細胞有效地辨認載有 GPC3 蛋白質之 DC，但不辨認載有對照蛋白質之 DC，顯示此抗原決定位可能係從 GPC3 蛋白質經天然處理(第 4 圖)。這些結果暗示 GPC3-LP1, 3, 4 及 5 係從 GPC3 蛋白質經天然處理且係由 DC 呈現。

【0240】利用人類 DC 於體外(*in vitro*)進行交叉呈現分析

評估具有 GPC3-LP2 之 CTL 抗原決定位是否能夠刺激 A2-GPC3-SP 專一性 CTL。如材料與方法部分所述，藉由 IFN- γ ELISPOT 分析法檢驗 GPC3-LP2 刺激 A2-GPC3-SP 專一性 CTL 的能力。如第 5A 圖所示，衍生自 HLA-A2 陽性捐贈者的 A2-GPC3-SP 專一性散裝 CTL 專一性地產生 IFN- γ 回應於包覆於脂質體中載有 GPC3-LP2 之 DC 的刺激，但不回應於包覆於脂質體中載有對照 LP 之 DC 的刺激。專一性 IFN- γ 的生產專一性地被抗 HLA 第 I 類 mAb 的添加所抑制，但不會被抗 HLA-DR mAb 的添加所抑制，因此暗示 A2-GPC3-SP 反應性 CTL 係經由體外(*in vitro*)DC 進行的 GPC3-LP2 交叉呈現所刺激。

【0241】利用 HLA-A2 轉基因小鼠於體內(*in vivo*)進行交叉起動(cross priming)分析

藉由生物體外(*ex vivo*)IFN- γ ELISPOT 分析法檢驗 GPC3-LP2 起動(prime)A2-GPC3-SP 專一性 CTL 的能力。以乳化於 IFA 的 GPC3-LP2 對 HLA-A2 Tgm 實施兩次免疫。經接種 GPC3-LP2 之 HLA-A2 Tgm 的 CD8 $^{+}$ T 細胞專一性地產生 IFN- γ 回應於經 A2-GPC3-SP 脈衝之 BM-DC 的刺激(第 5B 圖)。這些結果

暗示在攝入 GPC3-LP2 之後，APC 可於 HLA-A2 Tgm 體內交叉起動 A2-GPC3-SP 專一性 CTL。

【0242】 GPC3-LP2 和 CD4⁺ T 細胞誘導造成體內 CTL 的擴增 (augmentation)

如上述，當等莫耳劑量的 A2-GPC3-SP 和 GPC3-LP2 被用來對小鼠實施免疫時，經實驗發現，在單離的 CD8⁺ 細胞中，由 IFN- γ ELISPOT 分析法所測量的 A2-GPC3-SP 專一性 CTL 數量在經過 GPC3-LP2 實施免疫的小鼠中相較於在經過 A2-GPC3-SP 實施免疫的小鼠中增加 (第 5C 圖)。在生物體外 (*ex vivo*) 藉由 IFN- γ ELISPOT 分析法檢測 GPC3-LP2 起動 GPC3-LP2 專一性 Th 細胞的能力。利用磁性微珠從經過 GPC3-LP2 實施免疫的 HLA-A2 Tgm 單離 CD4⁺ T 細胞。這些 CD4⁺ T 細胞產生 IFN- γ 專一性回應於經 GPC3-LP2 脈衝之小鼠 BMDC 的刺激 (第 5D 圖)，但不回應於經對照的 GPC3-LP5 脈衝之小鼠 BMDC 的刺激。這些結果暗示 GPC3-LP2 也可於 HLA-A2 Tgm 體內起動 GPC3-LP2 專一性且可能啟動經 I-A^b 限制之 Th 細胞。

【0243】 在接種 A2-GPC3-SP 或 A24-GPC3-SP 的 HCC 病患中呈現 GPC3 專一性 CD4⁺ Th 細胞

在接種經限制之抗原決定位的癌症病患中，常常產生不呈現在疫苗中的 T 細胞反應 (Corbiere V, et al. Cancer Res 2011; 71:1253-62; Ribas A, et al., Trends Immunol 2003; 24:58-61; Hunder NN, et al. N Engl J Med 2008; 358:2698-703)。為了偵測癌症病患中 GPC3-LP 專一性 Th 細胞反應，收集從接種 A2-GPC3-SP 或 A24-GPC3-SP 的 HCC 病患單離的 PBMC。捐贈者

的特性總結於表3。於體外(*in vitro*)以 GPC3-LP 對 PBMC 進行刺激 7 天之後，利用 IFN- γ ELISPOT 分析法偵測個別的 GPC3-LP 專一性 T 細胞的頻率(第 6A-E 圖)。當 IFN- γ 分泌的細胞數量比起陰性對照組增加為至少 2 倍以上時，則反應視為陽性。在 18 位經接種的病患中，觀察到 11 位產生 GPC3-LP 專一性免疫反應(第 6 圖及表 3)。由 T 細胞產生的 GPC3-LP 專一性 IFN- γ 顯著地被抗 HLA 第 II 類 mAb 的添加所抑制(第 6 圖、第 10 圖)，但不會被抗 HLA 第 I 類 mAb 的添加所抑制(數據未顯示)。這些結果清楚地顯示 GPC3-LP 專一性 IFN- γ 的產生是衍生自抗原專一性 CD4 $^{+}$ T 細胞。

【0244】 [表 3]

從經接種 A2-GPC3-SP 或 A24-GPC3-SP 的 HCC 病患單離之 PBMC 的 GPC3-LP 專一性反應以及病患之 HLA 基因型

病患 ID	GPC3-LPs 的專一性	HLA-class II 限制性	接種的 No.	HLA-A*	HLA-DRB1*	HLA-DPB1*
Ph-I-16	GPC3-LP2	DP	7	02:01	04:05 16:02	02:01 05:01
Ph-I-20	(-)	-	5	24:02	04:07 15:02	02:01 09:01
Ph-I-24	GPC3-LP2	DP	5	02:07	04:05 08:03	05:01 -
Ph-I-25	GPC3-LP2	DR	5	02:06	08:02 14:54	02:02 04:02
Ph-II-6	GPC3-LP3	DR	3	24:02	15:02 16:02	05:01 09:01
Ph-II-7	GPC3-LP2	DR	3	24:02	14:54 15:01	03:01 05:01
Ph-II-12	(-)	-	3	24:02	04:05 13:02	04:01 04:02
Ph-II-20	(-)	-	3	24:02	04:05 09:01	02:01 03:01
Ph-II-26	GPC3-LP2, LP4, LP5	DR	3	24:02	04:03 09:01	02:01 05:01
Ph-II-30	GPC3-LP2, LP4, LP5	DR	3	02:07	08:03 11:01	02:02 14:01
Ph-II-36	GPC3-LP2	DP	3	02:01/24:02	01:01 04:05	02:01 04:02
Ph-II-42	GPC3-LP2	DP	3	02:06/24:02	14:54 15:01	02:01 02:02
Ph-II-45	(-)	-	3	24:02	15:02 -	02:01 09:01
Ph-II-47	(-)	-	3	02:01	04:05 14:03	05:01 -
Ph-II-48	(-)	-	3	24:02	04:05 09:01	02:01 -
Ph-II-49	(-)	-	3	24:02	04:01 04:05	02:01 05:01
Ph-II-52	GPC3-LP2	DP	3	02:06	04:05 04:06	02:01 04:02
Ph-II-53	GPC3-LP3	DR	3	24:02	04:05 08:02	04:02 05:01
Ph-II-55			3	24:02	09:01 15:02	05:01 09:01
Ph-II-56			3	02:06	08:02 09:01	03:01 05:01

(-)，陰性反應；No.，數目；Ph-1，第一期臨床試驗；Ph-2，第二期臨床試驗。



【0245】 對衍生自參與 GPC3-SP-基癌症免疫療法的臨床試驗 (Yu Sawada, et al, 2012) 中 20 位病患的 $CD4^+$ Th 細胞的 GPC3-LP 專一性免疫反應之檢測如下。利用 IFN- γ ELISPOT 分析法測量 GPC3-LP 專一性 Th 細胞反應。簡言之，衍生自病患的 PBMC 經所示的 GPC3-LP 所刺激。當 IFN- γ 點 (spots) 的平均數量超過 15 且大於背景 2 倍以上，則反應被評定為陽性。

【0246】 討論

GPC3 衍生的 SP 能夠在晚期 HCC 病患中誘發 SP 專一性 CTL (Sawada Y, et al. Clin Cancer Res 2012; 18:3686-96)。這些記憶 CTL 的誘導和維持可藉由引進腫瘤專一性 $CD4^+$ Th 細胞的幫助而改良。因此，本研究著重在辨識衍生自人類 GPC3 蛋白質的 $CD4^+$ Th 細胞抗原決定位。

【0247】 本發明的關鍵發現如下。1) 辨識出 5 個混雜的免疫原性 GPC3-LP，其能夠誘發 LP 專一性 Th1 型 $CD4^+$ Th 細胞反應，且啟示其中 4 個可於體外 (*in vitro*) 由 DC 呈現的 GPC3 蛋白質天然地處理，且啟示其中 1 個可於體內 (*in vivo*) 天然地處理。2) 具有天然的經 HLA-A2 限制之 CTL 抗原決定位的 GPC3-LP2 被包覆在脂質體中時，交叉呈現良好。當實施免疫於 HLA-A2 Tgm 時，乳化於 IFA 的這種勝肽也有效地於體內 (*in vivo*) 交叉起動。3) 以包含乳化於 IFA 中的 A2-GPC3-SP 的 GPC3-LP2 對 HLA-A2 Tgm 實施的免疫比起以乳化於 IFA 中的 A2-GPC3-SP 對 HLA-A2 Tgm 實施的免疫較佳地誘導 SP 專一性 CTL。4) 一部分這種增強的反應可歸功於 $CD4^+$ T 的幫助，因為在經實施免疫的 HLA-A2 Tgm 中觀察到 GPC3-LP2 專一性 $CD4^+$ Th 反應。以及 6) 在接種

GPC3-SP的癌症病患中觀察到GPC3-LP專一性CD4⁺ Th細胞反應的存在。

【0248】 MHC第II類蛋白質是高度多態的(polymeric)。因此對於勝肽或雞尾酒勝肽來說，在天然中為混雜的是很重要的，這樣它才可以用於大量的人口(population)。本研究發現5個勝肽都可誘導至少兩個不同的HLA第II類經限制之CD4⁺ Th細胞(表4、第2圖)。雖然我們檢視有限數量的健康捐贈者的免疫原性，但5個勝肽在日本群體中是常見的。這5個勝肽可誘導至少7個不同的HLA第II類經限制之Th細胞(表4)，其在日本群體中佔有超過70% (表5)(Fumiaki Nakajima JN, et al., MHC 2001; 8:1-32)。此外，有一些常見的HLA-DR型存在，其共享了很大程度重疊的勝肽(Southwood S, et al. J Immunol 1998; 160:3363-73)。可以依據重疊的同源(cognate)勝肽將他們分為三個族群。第一族群：DRB1*01:01, DR5*01:01, DRB1*15:01, DRB1*04:01, DRB1*13:02, DRB1*07:01, DRB1*09:01，第二族群：DRB1*04:05, DRB1*08:02, DRB1*13:02，第三族群：DRB1*12:01及DRB1*03:01。上述資料顯示只有三個勝肽可涵蓋(cover)世界上群體中存在的大多數HLA第II類對偶基因。顧及長勝肽的性質，可得到結論是本研究所探究的5個勝肽具有涵蓋大量群體的潛力以誘導具有抗腫瘤特質的勝肽專一性Th1細胞。

【0249】 [表4]

【0250】 [表 5]

包含在日本群體中 5 個 GPC3-LP 之 HLA 第 II 類分子的頻率
(<http://www/hla.or.jp/>)

HLA 類型	抗原頻率	頻率等級	呈現之勝肽
DR9	26.6%	3	GPC3-LP1, LP3, LP5
DR15	33.3%	2	GPC3-LP4
DR8	23.5%	4	GPC3-LP2
DR13	12.6%	6	GPC3-LP4, LP5
DRB3 02:02 ^a	25.4%	3	GPC3-LP1, LP2
DP2	42.4%	2	GPC3-LP2
DP5	62.1%	1	GPC3-LP2

^a Nakajima et al. MHC 2001; 8:1-32.

【0251】 經報導，Th1細胞強烈滲入癌組織的癌症病患藉由維持長期的 CTL 反應 (Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004; 4:595-602) 表現出較長的無病生存期 (Tosolini M, et al., Cancer Res 2011; 71:1263-71)。我們的實驗數據顯示 GPC3-LP 具有誘導 Th1 類似細胞 (第 3 圖) 的潛力且這可能有助於提高由勝肽 - 基癌症免疫療法所誘導的抗腫瘤免疫。

【0252】 也發現 5 個勝肽專一性 T 細胞株中有 4 個會分泌 IFN- γ 回應於經重組 GPC3 蛋白質脈衝的 DC。這些觀察暗示這些經由 LP 刺激產生的 Th 細胞可辨識由 DC 呈現從 GPC3 蛋白質天然地處理的勝肽 (第 3 圖)。於體外 (*in vitro*) 以這個勝肽對 PBMC 進行刺激的一個星期後，在單離自 HCC 病患的 PBMC 中觀察到 GPC3-LP3 專一性 CD4 $^{+}$ T 細胞反應 (第 6C 圖)。由於是在以勝肽對 PBMC 進行刺激的一個星期後觀察到這個反應，它最有可能是次級免疫反應 (secondary immune response)。因此，暗示病患的 CD4 $^{+}$ T 細胞於體內 (*in vivo*) 被從 HCC 細胞釋放出來的

GPC3蛋白質天然地處理的DC敏化(sensitized)以在上下文中的HLA第II類分子中呈現GPC3-LP。

【0253】 經報導，抗腫瘤免疫的誘導與增強的CTL誘導相關可能是因較長的DC-聚焦的抗原呈現(Bijker MS, et al., Eur J Immunol 2008; 38:1033-42)。為了評估GPC3-LP2於體外(*in vitro*)的交叉呈現能力，利用包覆在脂質體中的LP，因為經GPC3-LP2脈衝的DC不能於體外(*in vitro*)研究中交叉呈現CTL抗原決定位。pH敏感性脂質體係藉由具有3-甲基戊二醯(3-methylglutaryl)殘基(MGlu-Dex)的pH敏感性葡聚糖衍生物對卵黃卵磷脂脂質體進行表面修飾所產生。經MGlu-Dex修飾的脂質體被樹突狀細胞有效地攝入並被報導會傳遞包埋的(entrapped)卵白蛋白(OVA)分子到細胞質中(Yuba E, et al., Biomaterials 2013; 34:3042-52)。當包覆在這個脂質體中時，GPC3-LP2良好地被交叉呈現。也發現到當以GPC3-LP2和IFA對HLA-A2 Tgm實施免疫時(第5A、B圖)，會有效地於體內(*in vivo*)交叉起動GPC3-SP專一性CTL。接著，評估等莫耳劑量之包含SP; A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂的GPC3-LP2或GPC3-LP2是否對於誘導免疫反應具有任何較佳的效果。GPC3-LP2; GPC3₁₃₇₋₁₆₁的胺基酸序列在老鼠和人類之間完全地保留(conserved)。經實驗發現，比起經單獨SP實施免疫的小鼠，SP專一性CTL在經GPC3-LP2實施免疫的小鼠中增加(第5C圖)。一部分這種增強的反應可歸功於CD4⁺ T細胞反應的幫助，因為GPC3-LP2於體內(*in vivo*)刺激GPC3-LP2專一性小鼠CD4⁺ T細胞反應(第5D圖)。因為HLA-A2 Tgm只表現一種MHC第II類分子，I-A^b，其

強烈地暗示 GPC3-LP2 係由 I-A^b 分子呈現至小鼠 CD4⁺ T 細胞。

【0254】 在接種經限制之抗原決定位的癌症病患中，對於不包括在疫苗中的胜肽常常產生 T 細胞反應 (Corbiere V, et al., Cancer Res 2011; 71:1253-62; Ribas A, et al., Trends Immunol 2003; 24:58-61)。檢查 GPC3-LP 專一性 CD4⁺ Th 細胞反應的存在來表達 (address) 經預測的 GPC3-LP 表位擴散 (epitope spreading) 和天然存在的可能。有趣地，在受測的 18 位病患中，於 11 位病患中發現有 GPC3-LP 專一性反應。且大部分的病患表現出對抗 GPC3-LP2 的反應 (第 6 圖、第 10 圖)。此暗示著 GPC3-LP2 可被用來做為誘導 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 細胞兩者中混雜的 (promiscuous) 反應的單一胜肽。癌症病患中的 GPC3-LP 專一性反應顯示利用 LP 做為疫苗可改良 GPC3-SP-基癌症免疫療法的效果。使用 LP 比起使用極小的 CTL 抗原決定位胜肽具有一些優點 (Srinivasan M, et al., Eur J Immunol 1993; 23:1011-6; Zwaveling S, et al. J Immunol 2002; 169:350-8; Janssen EM, et al. Nature 2005; 434:88-93; Kenter GG, et al. N Engl J Med 2009; 361:1838-47)。使用 A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂ SP 和 A24-GPC3₂₉₈₋₃₀₆ SP 的第一期臨床試驗結果顯示 GPC3 胜肽專一性 CTL 存在於周邊血液 (Sawada Y, et al., Clin Cancer Res 2012; 18:3686-96)。當使用 GPC3-SP 做為晚期 HCC 的單獨療法時，沒有觀察到完整的反應，即使在經接種 GPC3-SP 後表現出強烈專一性 CTL 反應的病人中觀察到顯著的抗腫瘤效果 (Sawada Y, et al. Hum Vaccin Immunother 2013; 9)。此暗示著使用具有 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 細胞抗原決定位或 GPC3-SP 及 LP 疫苗組合的 GPC3-LP 都可改

善 GPC3 胜肽 - 基癌症免疫療法。

【0255】 產業利用性

本發明敘述能誘導有效抗腫瘤免疫反應之衍生自 GPC3 的 Th1 細胞抗原決定位胜肽，且因此對於廣範圍的癌症類型有用。此種胜肽擔保作為抗癌之胜肽疫苗的進一步發展，尤其對抗表現 GPC3 之癌症。本發明之胜肽可誘導 Th1 細胞反應，且因而由 Th1 細胞分泌的細胞素可幫助或活化任何以抗原獨立方式擔任細胞免疫的免疫細胞。因此本發明提供的免疫治療策略可適用於包括癌的任意疾病，只要此疾病可藉由由 MHC 第 II 類分子媒介之免疫反應而改善。具體而言，本發明之 Th1 細胞能改善由 CTL 引起的免疫反應。因此本發明之胜肽對於增強對象中包括癌之疾病的 CTL 反應有助益。

【0256】 又，於較佳具體例，本發明之胜肽也誘導對抗表現 GPC3 之細胞的 CTL 及 Th1 細胞。本發明之如此的胜肽，對於治療相關於 GPC3 之疾病，例如表現 GPC3 之癌症，更具體而言，肝細胞癌 (HCC) 及黑色素瘤 (melanoma) 亦為有效。

【0257】 雖已對於本發明參照特定具體例詳盡敘述，但應了解上述敘述的本質係示範性及解說性，係用來供理解本發明及其較佳具體例。該技術領域中具有通常知識者可輕易理解經由例行實驗可在不偏離本發明精神及範圍之下進行各種改變及潤飾，本發明的邊界和界限由附帶的申請專利範圍界定。

【符號說明】

無。

序列表

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

<120> 對於 TH1 細胞之 GPC3 抗原決定位勝肽及含此之疫苗

<130> ONC-A1504-TW

<150> JP 2014-248759

<151> 2014-12-09

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Th1 抗原決定位勝肽

<400> 1

Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn
 1 5 10 15

Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu
 20 25

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Th1 抗原決定位勝肽

<400> 2

Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val
 1 5 10 15

Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile
 20 25

<210> 3
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Th1 抗原决定位胜肽

<400> 3

Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile
 20 25

<210> 4
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Th1 抗原决定位胜肽

<400> 4

Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe
 1 5 10 15

Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His
 20 25

<210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Th1 抗原决定位胜肽

<400> 5

Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser
 1 5 10 15

Val Val Cys Phe Phe
 20

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CTL 抗原决定位胜肽

<400> 6

Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp
 1 5

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

<220>
 <223> CTL 抗原决定位胜肽

<400> 7

Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 2398
 <212> DNA
 <213> 人類 (Homo sapiens)

<400> 8						
agcccccggcc	tgcccccgcgc	cgccaagcgg	ttcccgccct	cgcccagcgc	ccaggttagct	60
gcgaggaaac	tttgcagcg	gctgggttagc	agcacgtctc	ttgctcctca	gggccactgc	120
caggcttgcc	gagtcctggg	actgctctcg	ctccggctgc	cactctcccg	cgcttcctta	180
gctccctgcg	aagcaggatg	gccgggaccg	tgcgcaccgc	gtgcttggtg	gtggcgatgc	240
tgctcagctt	ggacttcccg	ggacaggcgc	agccccggcc	gccgcccgcgc	gacgcccacct	300
gtcaccaagt	ccgctccttc	ttccagagac	tgcagccgg	actcaagtgg	gtgccagaaa	360
ctcccggtgcc	aggatcagat	ttgcaagtat	gtctccctaa	gggccccaca	tgctgctcaa	420
gaaagatgga	agaaaaatac	caactaacag	cacgattgaa	catggaacag	ctgcttcagt	480

ctgcaagtat ggagctcaag ttcttaatta ttcaagaatgc tgcggtttc caagaggcct	540
ttgaaattgt tggcgccat gccaagaact acaccaatgc catgttcaag aacaactacc	600
caagcctgac tccacaagct tttagatgg tgggtgaatt tttcacagat gtgtctct	660
acatcttggg ttctgacatc aatgttagatg acatggtcaa tgaattgttt gacagcctgt	720
ttccagtcat ctatacccg ctaatgaacc caggcctgcc tgattcagcc ttggacatca	780
atgagtgccct ccgaggagca agacgtgacc tgaaagtatt tggaatttc cccaagctt	840
ttatgaccca ggtttccaag tcactgcaag tcactaggat cttcccttcag gctctgaatc	900
ttggaattga agtcatcaac acaactgatc acctgaagtt cagtaaggac tgtggccgaa	960
tgctcaccag aatgtggtac tgctcttact gccagggact gatgtgggtt aaaccctgt	1020
gcggttactg caatgtggtc atgcaaggct gtatggcagg tgtggggag attgacaagt	1080
actggagaga atacattctg tcccttgaag aacttgtgaa tggcatgtac agaatctatg	1140
acatggagaa cgtactgctt ggtcttttt caacaatcca tgattctatc cagtagtcc	1200
agaagaatgc aggaaagctg accaccactg aaactgagaa gaaaatatgg cacttcaaatt	1260
atcctatctt cttccctgtt atagggctag acttacagat tggcaagttt tgtgcccatt	1320
ctcaacaacg ccaatataga tctgcttatt atcctgaaga tctctttatt gacaagaaag	1380
tattaaaagt tgctcatgta gaacatgaag aaaccttatac cagccgaaga aggaaactaa	1440
ttcagaagtt gaagtcttc atcagcttct atagtgcctt gcctggctac atctgcagcc	1500
atagccctgt ggccggaaaac gacacccttt gctggatgg acaagaactc gtggagagat	1560
acagccaaaa ggcagcaagg aatggaatga aaaaccagtt caatctccat gagctgaaaa	1620
tgaagggccc tgagccagt gtcagtcaaa ttattgacaa actgaagcac attaaccagc	1680
tcctgagaac catgtctatg cccaaaggta gagttctgga taaaaacctg gatgaggaag	1740
ggtttgaag tggagactgc ggtgtatgt aagatgagtg cattggaggc tctggatgt	1800
gaatgataaa agtgaagaat cagctccgct tccttgcaga actggcctat gatctggatg	1860
tggatgtgc gcctggaaaac agtcagcagg caactccgaa ggacaacgag ataaggacact	1920
ttcacaacct cgggaacgtt cattccccgc tgaagcttct caccagcatg gccatctcg	1980
tggtgatgtt cttccctgt gtgcactgac tgcctggatgc ccagcacatg tgctgcccta	2040

cagcacccctg tggcttcct cgataaaggg aaccacttc ttatTTTT ctatTTTT 2100
 tttttgtta tcctgtatac ctccctccagc catgaagtag aggactaacc atgtgtatg 2160
 tttcgaaaa tcaaatggta tctttggag gaagatacat ttttagtggta gcatatagat 2220
 tgtccTTTG caaagaaaga aaaaaaacca tcaagttgtg ccaaattatt ctcctatgtt 2280
 tggctgctag aacatggta ccatgtctt ctctctact ccctccctt ctatgttct 2340
 ctcttgcat ggattcttt gaaaaaaaaat aaattgctca aataaaaaaaaaaaaaaaa 2398

<210> 9
 <211> 603
 <212> PRT
 <213> 人類 (Homo sapiens)

<400> 9

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Asp
 20 25 30

Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
 35 40 45

Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
 50 55 60

Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
 65 70 75 80

Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
 85 90 95

Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
 100 105 110

Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
 115 120 125

Met	Phe	Lys	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Leu	Thr	Pro	Gln	Ala	Phe	Glu	Phe
130															140
Val	Gly	Glu	Phe	Phe	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp
145															160
Ile	Asn	Val	Asp	Asp	Met	Val	Asn	Glu	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Pro
															165
															170
															175
Val	Ile	Tyr	Thr	Gln	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu
															180
															185
															190
Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Leu	Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Phe
															195
															200
															205
Gly	Asn	Phe	Pro	Lys	Leu	Ile	Met	Thr	Gln	Val	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln
															210
															215
															220
Val	Thr	Arg	Ile	Phe	Leu	Gln	Ala	Leu	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Val	Ile
															225
															230
															235
															240
Asn	Thr	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Phe	Ser	Lys	Asp	Cys	Gly	Arg	Met	Leu
															245
															250
															255
Thr	Arg	Met	Trp	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Cys	Gln	Gly	Leu	Met	Met	Val	Lys
															260
															265
															270
Pro	Cys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Asn	Val	Val	Met	Gln	Gly	Cys	Met	Ala	Gly
															275
															280
															285
Val	Val	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Trp	Arg	Glu	Tyr	Ile	Leu	Ser	Leu	Glu
															290
															295
															300
Glu	Leu	Val	Asn	Gly	Met	Tyr	Arg	Ile	Tyr	Asp	Met	Glu	Asn	Val	Leu
															305
															310
															315
															320
Leu	Gly	Leu	Phe	Ser	Thr	Ile	His	Asp	Ser	Ile	Gln	Tyr	Val	Gln	Lys
															325
															330
															335

Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Glu Thr Glu Lys Lys Ile Trp His
 340 345 350

Phe Lys Tyr Pro Ile Phe Phe Leu Cys Ile Gly Leu Asp Leu Gln Ile
 355 360 365

Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr
 370 375 380

Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His
 385 390 395 400

Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln
 405 410 415

Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile
 420 425 430

Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly
 435 440 445

Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met
 450 455 460

Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro
 465 470 475 480

Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu
 485 490 495

Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp
 500 505 510

Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys
 515 520 525

Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg
 530 535 540

Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly
 545 550 555 560

Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His
 565 570 575

Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala
 580 585 590

Ile Ser Val Val Cys Phe Phe Phe Leu Val His
 595 600

<210> 10

<211> 2329

<212> DNA

<213> 人類 (Homo sapiens)

<400> 10

agcccccggcc tgcccccgcgc cgccaaaggcg ttcccgccct cgcccaaggcgcc ccaggtagct 60

gcgaggaaac ttttgcagcg gctgggttagc agcacgtctc ttgctcctca gggccactgc 120

caggcgttgcc gagtcctggg actgctctcg ctccggctgc cactctcccg cgctctccct 180

gctccctgcg aagcaggatg gccgggaccg tgcgcacccgc gtgcttggtg gtggcgatgc 240

tgctcagctt ggacttcccg ggacaggcgcc agccccggcc gccgcccggcc gacgcccacct 300

gtcaccaagt ccgctccttc ttccagagac tgcagcccg actcaagtgg gtgccagaaa 360

ctcccggtgcc aggtcagat ttgcaagtat gtctccctaa gggcccaaca tgctgctcaa 420

gaaagatgga agaaaaatac caactaacag cacgattgaa catggaacag ctgcttca 480

ctgcaagtat ggagctcaag ttcttaatta ttcagaatgc tgcggttttc caagaggcct 540

ttgaaattgt tttcgccat gccaagaact acaccaatgc catgttcaag aacaactacc 600

caagcctgac tccacaagct tttgagtttg tgggtgaatt tttcacagat gtgtctctct 660

acatcttggg ttctgacatc aatgttagatg acatggtcaa tgaattgttt gacagcctgt 720

ttccagtcat ctatacccg ctaatgaacc caggcctgccc tgattcagcc ttggacatca 780

atgagtgccct ccgaggagca agacgtgacc tgaaagtatt tggaaatttc cccaagctta 840

ttatgaccca gtttccaag tcactgcaag tcactaggat cttccttcag gctctgaatc 900

ttggaattga agtgatcaac acaactgatc acctgaagtt cagtaaggac tgtggccgaa	960
tgctcaccag aatgtggtac tgctcttact gccagggact gatgtggtt aaaccctgtg	1020
gcggttactg caatgtggtc atgcaaggct gatggcagg tgggtggag attgacaagt	1080
actggagaga atacattctg tcccttgaag aacttgtgaa tggcatgtac agaatctatg	1140
acatggagaa cgtactgctt ggtctttt caacaatcca tgattctatc cagtagtcc	1200
agaagaatgc aggaaagctg accaccacta ttggcaagtt atgtgcccatt tctcaacaac	1260
gccaatatacg atctgcttat tattccttgaag atctctttat tgacaagaaa gtattaaaag	1320
ttgctcatgt agaacatgaa gaaaccttat ccagccgaag aagggacta attcagaagt	1380
tgaagtcttt catcagcttc tatagtgctt tgcctggcta catctgcagc catagccctg	1440
tggcggaaaaa cgacaccctt tgctggaatg gacaagaact cgtggagaga tacagccaaa	1500
aggcagcaag gaatggaatg aaaaaccagt tcaatctcca tgagctgaaa atgaaggcc	1560
ctgagccagt ggtcagtcaa attattgaca aactgaagca cattaaccag ctcctgagaa	1620
ccatgtctat gcccaaaggt agagttctgg ataaaaacct ggatgaggaa gggttgaaa	1680
gtggagactg cggtgatgat gaagatgagt gcattggagg ctctggatgat ggaatgataa	1740
aagtgaagaa tcagctccgc ttcccttgcag aactggccta tgatctggat gtggatgatg	1800
cgcctggaaa cagtcagcag gcaactccga aggacaacga gataagcacc tttcacaacc	1860
tcgggaacgt tcattccccg ctgaagcttc tcaccagcat ggcacatctcg gtgggtgtct	1920
tcttcttcct ggtgcactga ctgcctggtg cccagcacat gtgctgcccct acagcacccct	1980
gtggctttcc tcgataaagg gaaccacttt cttattttt tctattttt tttttttgtt	2040
atcctgtata cctcctccag ccatgaagta gaggactaacatgtgttat gtttcgaaa	2100
atcaaatggt atcttttggaa ggaagataca ttttagtggt agcatataga ttgtccttt	2160
gcaaagaaag aaaaaaaaaacc atcaagttgt gccaaattat tctcctatgt ttggctgcta	2220
gaacatggtt accatgtctt tctctctcac tccctccctt tctatcgatc tctctttgca	2280
tggatttctt tgaaaaaaaaaa taaattgctc aaataaaaaaa aaaaaaaaaaa	2329

<210> 11

<211> 580

<212> PRT

<213> 人類 (Homo sapiens)

<400> 11

Met	Ala	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Ala	Cys	Leu	Val	Val	Ala	Met	Leu	Leu
1				5					10				15		

Ser	Leu	Asp	Phe	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp
									25				30	

Ala	Thr	Cys	His	Gln	Val	Arg	Ser	Phe	Phe	Gln	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly
											45				
35					40										

Leu	Lys	Trp	Val	Pro	Glu	Thr	Pro	Val	Pro	Gly	Ser	Asp	Leu	Gln	Val
50				55									60		

Cys	Leu	Pro	Lys	Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Ser	Arg	Lys	Met	Glu	Glu	Lys
65			70					75				80			

Tyr	Gln	Leu	Thr	Ala	Arg	Leu	Asn	Met	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Ser	Ala
85					90								95		

Ser	Met	Glu	Leu	Lys	Phe	Leu	Ile	Ile	Gln	Asn	Ala	Ala	Val	Phe	Gln
100					105								110		

Glu	Ala	Phe	Glu	Ile	Val	Val	Arg	His	Ala	Lys	Asn	Tyr	Thr	Asn	Ala
115					120							125			

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

Val	Gly	Glu	Phe	Phe	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp
145				150					155			160			

Ile	Asn	Val	Asp	Asp	Met	Val	Asn	Glu	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Pro
165					170							175			

Val	Ile	Tyr	Thr	Gln	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu
180					185							190			

Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Leu	Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Phe
195					200						205				
Gly	Asn	Phe	Pro	Lys	Leu	Ile	Met	Thr	Gln	Val	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln
210					215					220					
Val	Thr	Arg	Ile	Phe	Leu	Gln	Ala	Leu	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Val	Ile
225					230				235			240			
Asn	Thr	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Phe	Ser	Lys	Asp	Cys	Gly	Arg	Met	Leu
245								250					255		
Thr	Arg	Met	Trp	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Cys	Gln	Gly	Leu	Met	Met	Val	Lys
260							265					270			
Pro	Cys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Asn	Val	Val	Met	Gln	Gly	Cys	Met	Ala	Gly
275						280					285				
Val	Val	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Trp	Arg	Glu	Tyr	Ile	Leu	Ser	Leu	Glu
290					295					300					
Glu	Leu	Val	Asn	Gly	Met	Tyr	Arg	Ile	Tyr	Asp	Met	Glu	Asn	Val	Leu
305					310				315			320			
Leu	Gly	Leu	Phe	Ser	Thr	Ile	His	Asp	Ser	Ile	Gln	Tyr	Val	Gln	Lys
325								330				335			
Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Lys	Leu	Cys	Ala	His	Ser	
340							345					350			
Gln	Gln	Arg	Gln	Tyr	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Asp	Leu	Phe	Ile
355							360					365			
Asp	Lys	Lys	Val	Leu	Lys	Val	Ala	His	Val	Glu	His	Glu	Glu	Thr	Leu
370						375					380				
Ser	Ser	Arg	Arg	Arg	Glu	Leu	Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Ser	Phe	Ile	Ser
385						390				395			400		

Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
405 410 415

Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
420 425 430

Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
435 440 445

Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
450 455 460

Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
465 470 475 480

Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
485 490 495

Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
500 505 510

Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
515 520 525

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

Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser
545 550 555 560

Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe
565 570 575

Phe Leu Val His
580

201636358

發明摘要

※ 申請案號：104140060

C07K 7/66, 7/68, 14/25 (2006.01)

※ 申請日：104 12 1

※ IPC 分類：C12N 5/10, 5/19 (2006.01)

A61K 38/38, 38/38, 38/38 (2006.01)

A61P 35/60 (2006.01)

G01N 33/60, 33/68 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

對於 TH1 細胞之 GPC3 抗原決定位勝肽及含此之疫苗 / GPC3
 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES
 CONTAINING THE SAME

【中文】

於此揭示具有 Th1 細胞誘導能力之單離的自 GPC3-衍生的抗原決定位勝肽。此種勝肽可藉由 MHC 第 II 類分子辨識並誘導 Th1 細胞。於較佳具體例中，此種本發明之勝肽可混雜地 (promiscuously) 結合於 MHC 第 II 類分子並且除了誘導 Th1 細胞更誘導 GPC3-專一性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)。因此此種勝肽適用於增強一對象中之免疫反應，因而於癌免疫療法中，特別是作為癌疫苗提供效用。於此也揭示編碼為任意上述勝肽的聚核苷酸、由此種勝肽所誘導的 APC 與 Th1 細胞，及與其相關的誘導方法。包含任意上述成分作為有效成分的醫藥組合物，提供效用於癌症或腫瘤之治療及/或預防，此癌症或腫瘤包括例如肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) 及黑色素瘤 (melanoma)。

【英文】

Isolated GPC3-derived epitope peptides having Th1 cell inducibility are disclosed herein. Such peptides can be recognized by MHC class II molecules and induce Th1 cells. In preferred embodiments, such a peptide of the present invention can promiscuously bind to MHC class II molecules and induce GPC3-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in addition to Th1 cells. Such peptides are thus suitable for use in enhancing immune response in a subject, and accordingly find use in cancer immunotherapy, in particular, as cancer vaccines. Also disclosed herein are polynucleotides that encode any of the aforementioned peptides, APCs and Th1 cells induced by such peptides and methods of induction associated therewith. Pharmaceutical compositions that comprise any of the aforementioned components as active ingredients find use in the treatment and/or prevention of cancers or tumors including, for example, hepatocellular carcinoma and melanoma.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

申請專利範圍

1. 一種單離的胜肽，其長度為 10-30 個胺基酸且包含序列識別號：9 或 11 的一部分胺基酸序列，其中該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列：
 - (a) 一連續的胺基酸序列，其具有選自於序列識別號：1、2、3、4 或 5 之胺基酸序列中的長於 9 個胺基酸；及
 - (b) 一胺基酸序列，其中於(a)之胺基酸序列中有一個、二個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加，該胜肽有誘導 T 輔助 1 型 (Th1) 細胞的能力。
2. 如申請專利範圍第 1 項之單離的胜肽，其中，該胜肽或其片段有結合於至少 2 種 MHC 第 II 類分子的能力。
3. 如申請專利範圍第 2 項之單離的胜肽，其中，該 MHC 第 II 類分子選自於由 HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2 及 HLA-DP5 構成之群組。
4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之單離的胜肽，其中，該胜肽包含具有 GPC3 專一性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 誘導能力之胜肽的胺基酸序列。
5. 如申請專利範圍第 4 項之單離的胜肽，其中，該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列：
 - (a) 一胺基酸序列，其選自於序列識別號：1 至 5 構成之群組；及
 - (b) 一胺基酸序列，其中於(a)之胺基酸序列中有一個、二個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加。



6. 一種單離的聚核苷酸，其編碼為如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽。
7. 一種組合物，係用於誘導選自於由以下構成之群組中至少一種細胞：
 - (i) Th1 細胞；
 - (ii) CTL；
 - (iii) 有能力誘導 Th1 細胞之抗原呈現細胞(APC)；及
 - (iv) 有能力誘導 CTL 之 APC；

其中該組合物包含一或多種如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽，或一或多種編碼為此等胜肽的聚核苷酸。
8. 一種醫藥組合物，包含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分：
 - (a) 一或多種如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽；
 - (b) 一或多種如申請專利範圍第 6 項之聚核苷酸；
 - (c) 一或多種 APC，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段；
 - (d) 一或多種 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段之 APC；及
 - (e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合；

且此組合物被配製為供選自於由下列構成之群組中之用途：

 - (i) 癌治療；
 - (ii) 癌預防；
 - (iii) 預防癌之術後再復發；及
 - (iv) 上述(i)至(iii)中任意兩或更多種的組合。

9. 如申請專利範圍第 8 項之醫藥組合物，其中該組合物被配製為供對於具有選自於由 HLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2 及 HLA-DP5 構成之群組中至少一種作為 MHC 第 II 類分子之對象投予。
10. 如申請專利範圍第 8 或 9 項之醫藥組合物，其中該組合物更包含有 CTL 誘導能力之一或多種勝肽。
11. 一種組合物，係供增強由 MHC 第 II 類分子媒介之免疫反應，該組合物包含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分：
- (a) 一或多種如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之勝肽；
 - (b) 一或多種如申請專利範圍第 6 項之聚核苷酸；
 - (c) 一或多種 APC，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之勝肽或其片段；
 - (d) 一或多種 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之勝肽或其片段之 APC；及
 - (e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。
12. 一種誘導 APC 之方法，該 APC 有能力誘導 Th1 細胞，該方法包含使 APC 於體外、生物體外或體內與如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之勝肽接觸的步驟。
13. 一種誘導 APC 之方法，該 APC 有能力誘導 CTL，該方法包含選自於由以下構成之群組中之步驟：
- (a) 使 APC 於體外、生物體外或體內與如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之勝肽接觸；及

(b) 將編碼為如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽的聚核苷酸導入 APC。

14. 一種誘導 Th1 細胞之方法，包含選自於由以下構成之群組中之步驟：

(a) 共同培養 $CD4^+$ T 細胞，及在表面呈現 MHC 第 II 類分子與如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段之複合體的 APC；及

(b) 將編碼為兩種 T 細胞受體 (TCR) 次單元之聚核苷酸、或編碼為各 TCR 次單元之聚核苷酸導入 $CD4^+$ T 細胞內，其中該 TCR 能結合於在細胞表面上呈現的 MHC 第 II 類分子與如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段之複合體。

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

(a) 共同培養 $CD4^+$ T 細胞與 $CD8^+$ T 細胞兩者，及已接觸如申請專利範圍第 4 或 5 項之胜肽的 APC；及

(b) 共同培養 $CD8^+$ T 細胞，及已接觸如申請專利範圍第 4 或 5 項之胜肽的 APC。

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

(a) 一或多種如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽；

(b) 一或多種如申請專利範圍第 6 項之聚核苷酸；

(c) 一或多種 APC，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1

- 至 5 項中任一項之胜肽或其片段；
- (d) 一或多種 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段之 APC；及
- (e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。
17. 一種單離的 APC，其在表面上呈現 MHC 第 II 類分子與如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段之複合體。
18. 一種 APC，係由如申請專利範圍第 12 或 13 項之方法所誘導。
19. 一種單離的 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段之 APC。
20. 一種 Th1 細胞，係由如申請專利範圍第 14 項之方法所誘導。
21. 一種誘導在有需要的對象中對抗癌之免疫反應的方法，該方法包含對於該對象投予包含選自於由以下構成之群組中至少一種有效成分的組合物的步驟：
- (a) 一或多種如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽；
- (b) 一或多種如申請專利範圍第 6 項之聚核苷酸；
- (c) 一或多種 APC，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段；
- (d) 一或多種 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽或其片段之 APC；及
- (e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。
22. 一種抗體或其在免疫上有活性的片段，係對抗如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽。

23. 一種載體，包含編碼為如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽的核苷酸序列。
24. 一種宿主細胞，其經過以如申請專利範圍第 23 項之表現載體轉形或轉染。
25. 一種診斷套組，包含如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽、如申請專利範圍第 6 項之聚核苷酸或如申請專利範圍第 22 項之抗體。

