



(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 201210608 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：100132041

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

(30)優先權：2010/09/07 美國

61/380,611

(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：中村祐輔 NAKAMURA, YUSUKE (JP)；角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大
澤龍司 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：24 項 圖式數：8 共 169 頁

(54)名稱

T T L L 4 胜肽與含此胜肽之疫苗

TTLL4 PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57)摘要

於此敘述抗癌之胜肽疫苗。特別是，提供引起細胞毒殺性 T 淋巴球之來自 TTLL4 基因之抗原決定位胜肽。也提供以此類胜肽為目標之抗原呈現細胞與經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，及誘導原呈現細胞或細胞毒殺性 T 淋巴球的方法。本發明更提供包含來自 TTLL4 之胜肽或編碼出此多胜肽之多核苷酸為活性成分之藥學組合物。此外，藉由使用本發明來自 TTLL4 之胜肽、編碼出此胜肽之多核苷酸或呈現此胜肽的抗原呈現細胞或藥學組合物，本發明提供癌症（腫瘤）之治療及/或預防（即，避免）及/或其手術後復發的避免的方法，及誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，或誘導抗腫瘤免疫力的方法。



(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 201210608 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：100132041

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

(30)優先權：2010/09/07 美國

61/380,611

(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：中村祐輔 NAKAMURA, YUSUKE (JP)；角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大
澤龍司 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：24 項 圖式數：8 共 169 頁

(54)名稱

T T L L 4 胜肽與含此胜肽之疫苗

TTLL4 PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57)摘要

於此敘述抗癌之胜肽疫苗。特別是，提供引起細胞毒殺性 T 淋巴球之來自 TTLL4 基因之抗原決定位胜肽。也提供以此類胜肽為目標之抗原呈現細胞與經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，及誘導原呈現細胞或細胞毒殺性 T 淋巴球的方法。本發明更提供包含來自 TTLL4 之胜肽或編碼出此多胜肽之多核苷酸為活性成分之藥學組合物。此外，藉由使用本發明來自 TTLL4 之胜肽、編碼出此胜肽之多核苷酸或呈現此胜肽的抗原呈現細胞或藥學組合物，本發明提供癌症（腫瘤）之治療及/或預防（即，避免）及/或其手術後復發的避免的方法，及誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，或誘導抗腫瘤免疫力的方法。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於生物科學領域，更特別對於癌症治療領域。特別是，本發明係關於當作癌症疫苗、治療與避免腫瘤之藥物為有效的新穎之胜肽，及診斷腫瘤的方法。

【先前技術】

已證實 CD8 陽性細胞毒殺性 T 淋巴球 (CTL) 辨認來自建造於主要組織相容性抗原複合體 (major histocompatibility complex, MHC) class I 分子上之腫瘤相關抗原 (tumor-associated antigens, TAAs) 的抗原決定位胜肽，且之後殺死腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原 (melanoma antigen, MAGE) 家族為腫瘤相關抗原之第一個例子，藉由免疫方法，已發現許多其他腫瘤相關抗原 (NPLs 1; 2)。這些腫瘤相關抗原的一些為在目前經歷臨床發展中當作免疫治療標的。

合適的腫瘤相關抗原係對於癌症細胞增殖與存活為必須的。使用此類腫瘤相關抗原為免疫治療標的可將廣為敘述之癌細胞免疫逃脫 (immune escape) 的風險最小化，而癌細胞免疫逃脫為治療性驅使免疫篩選的結果，歸因於腫瘤相關抗原的刪除、突變或向下調控。因此，能誘導有效且專一之抗腫瘤免疫反應的新腫瘤相關抗原的辨認成為更進一步發展的根據與因此對於多種形式癌症之胜肽疫苗接種策略 (vaccination strategies) 之臨床應用為正進行著

(NPL 3; NPL 4; NPL 5; NPL 6; NPL 7; NPL 8; NPL 9; NPL 10)。迄今，已具有使用這些腫瘤相關抗原衍生胜肽之臨床試驗許多報導。不幸的是，在這些癌症疫苗試驗中僅有低的客觀反應率(objective response rate)已被觀察到(NPL 11; NPL 12; NPL 13)。因此維持新穎之腫瘤相關抗原做為免疫治療標的需要。

TTLL4 (GenBank 獲得編號：NP_055455)，類微管蛋白酪氨酸連接酶家族成員 4(tubulin tyrosine ligase-like family member 4)，為一多醣素。其在許多微管功能中扮演一重要角色。多麩胺醯胺化(Polyglutamylation)為一藉由麩胺酸之連續共價附著至目標蛋白質之一內部麩胺醯胺殘基所產生的可逆修飾(NPL 14)。其生物重要性並未被熟知。多麩胺醯胺化的僅知目標為 α -與 β -微管蛋白、微管之結構單元(NPL 15)、與核體聚合蛋白(nucleosome assembly proteins)，NAP1 與 NAP2 (NPL 16)。

胰臟管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)細胞之基因體範圍基因表現圖譜分析指出，在胰臟管腺癌中 TTLL4 為過度表現。此外，在胰臟管腺癌中藉由 siRNA 之 TTLL4 減除減少了胰臟管腺癌的生長且 TTLL4 之外生引入增強了細胞生長(NPL 17)。北方墨點分析證明了 TTLL4 並不表現於正常器官中，除了睪丸。

總而言之，這些資料建議 TTLL4 可為用於癌症免疫治療成程序之一適合的標的，特別是對於具有 TTLL4 表現之腫瘤的病患而言。

【引用文献】

非專利文献(Non Patent Literature)

[NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993, 54(2): 177-80

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996,
183(3): 725-9

[NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88(20):
1442-55

[NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999,
59(13): 3134-42

[NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999, 59(21):
5554-9

[NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996,
156(9): 3308-14

[NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997, 57(20):
4465-8

[NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999, 80(2):
169-72

[NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81(3):
459-66

[NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999, 81(3):
387-94

[NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002, 20(20):
4169-80

[NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002, 188:

33-42

[NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10(9):
909-15

[NPL 14] Edde B. et al., Science. 1990;247(4938):
83-5

[NPL 15] Rudiger M. et al., FEBS Lett. 1992;308(1):
101-5

[NPL 16] Regnard C., J Biol Chem. 2000; 275(21):
15969-76

[NPL 17] Kotoe K., Cancer Res. 2010; 70(10):4024-
33

【發明內容】

本發明至少部分基於發現免疫治療之適合標的。由於腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens, TAAs)有時被免疫系統感知為“自身”且因此常不具有天生免疫抗原性(immunogenicity)，所以適合標的的發現為極度重要。在本發明中，認定 TTLL4 (由 GenBank 獲得編號之基因 NM_014640 (序列辨識號：79) 所編碼之序列辨識號：80) 已被證實為在癌症細胞中，特別是，特別是在膀胱癌、膽管細胞癌(cholangiocellular carcinoma)、慢性骨髓性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML)、結腸與直腸癌(colon and rectum cancer)、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌(renal carcinoma)、小細胞肺癌

(small cell lung cancer, SCLC)、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、軟組織腫瘤與骨肉瘤中，但不限於此。為特別過度表現，本發明聚焦於 TTLL4 為一適合之癌症標誌與免疫治療標的的候選物，更特別為新穎之 TTLL4 抗原決定位胜肽，其可做為適合之免疫治療標的。

本發明更關於在具有誘導專一於 TTLL4 之細胞毒殺性 T 淋巴球之能力之 TTLL4 的基因產物中之特定抗原決定位胜肽的確認。詳細如下所討論，使用與 HLA (人類白血球組織抗原) *2402 或 *0201 結合之來自 TTLL4 的候選胜肽來刺激自健康提供者獲得之周邊血液單核球細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。之後建立細胞毒殺性 T 淋巴球，其具有抗(against)經各候選胜肽脈衝(pulsed)之 HLA-A24 或 HLA-A2 陽性目標細胞的細胞毒性。此處這些結果證明這些胜肽為 HLA-A24 或 HLA-A2 限制的抗原決定位胜肽，其可誘導強而專一之抗表現 TTLL4 之細胞的免疫反應。這些結果更指出 TTLL4 為強效致免疫性且其抗原決定位為腫瘤免疫治療之有效目標。

因此，本發明一目的為提供經分離的胜肽，其與 HLA 抗原結合且包括 TTLL4 序列(序列辨識號：80)或一其免疫原性片段。這些胜肽被預期具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，且因此可被用來 in vitro、ex vivo 或 in vivo 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球或可被投予一個體以誘導抗癌症的免疫反應，癌症的例子包括，但不限於膀胱癌、膽管細

胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。較佳胜肽為九胜肽與十胜肽，更佳為九胜肽與十胜肽具有擇自序列辨識號：1、3至37與38至73中之胺基酸序列。來自這些，胜肽具有擇自序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44與59中之胺基酸序列為最受喜愛。

本發明也考慮經修飾之胜肽，其具有擇自序列辨識號：1、3至37與38至73中之胺基酸序列，於其中一、二或多個胺基酸被取代、刪除、插入或加入，只要所產生經修飾之胜肽維持最初未修飾胜肽之必不可少的細胞毒殺性T淋巴球誘發能力與HLA結合能力。

本發明更包括編碼出任一本發明胜肽之經分離的多核苷酸。這些多核苷酸可用以誘導或製備具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。如同前述本發明胜肽，此類抗原呈現細胞可被投予至一個體以誘導抗癌之免疫反應。

當投予一個體時，本發明胜肽較佳被表現於抗原呈現細胞之表面以便誘導將分別之胜肽做為目標之細胞毒殺性T淋巴球。因此，本發明一目標為提供試劑及/或組合物，其誘導細胞毒殺性T淋巴球，此類組合物或試劑包括一或多個本發明之胜肽或編碼出此類胜肽的多核苷酸。此類試劑、物質及/或組合物可被用來原發癌(primary cancer)、轉移或其手術後復發的治療及/或預防。本發明所考慮之癌

症例子，包括，但不限於膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。

本發明更考慮藥學組合物或試劑其包括或合併配製來用於原發癌或轉移或其手術後復發的治療及/或預防的任何本發明之胜肽或多核苷酸。除了本發明胜肽或多核苷酸外或代替本發明胜肽或多核苷酸，本發明藥學試劑及/或組合物可包括呈現任何之本發明胜肽的抗原呈現細胞或外吐小體為活性成分。

本發明之胜肽或多核苷酸可被用來誘導於其表面上呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物的抗原呈現細胞，例如，藉由將來自一個體之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸或將編碼出本發明一胜肽的多核苷酸引入抗原呈現細胞。此種抗原呈現細胞具有高的抗目標胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力且因此對於癌症免疫治療為有效的。因此，本發明包括誘導具細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法與藉由此方法獲得之抗原呈現細胞。

本發明更進一步之一目標為提供誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，此類方法包括將 CD8 陽性 T 細胞與表現 HLA 抗原與一或多個本發明胜肽之複合物於其表面上之抗原呈現細胞共培養的步驟、將 CD8 陽性 T 細胞與表現 HLA 抗原與一或多個本發明胜肽之複合物於其表面上之外吐小體共培養的步驟，或引入包括編碼出與本發明一胜肽結合之 T

細胞受體(T cell receptor, TCR)次單元多胜肽之一或多個多核苷酸的基因的步驟。藉由此種方法獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球可在癌症，更特別是膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤之治療及/或避免中提供效用。因此，本發明又另一目標為提供細胞毒殺性 T 淋巴球。

本發明又另一目標為提供經分離之抗原呈現細胞，其表現 HLA 抗原與一本發明胜肽之複合物於表面上。本發明更提供經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以本發明胜肽為目標。這些抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球可被用於癌症免疫治療。

本發明又另一目標為提供於一需要之個體中誘導抗癌症之免疫反應的方法，此方法包含投予一個體包含本發明胜肽或編碼出此類胜肽之多核苷酸之組合物的步驟。

本發明之應用性擴展至一些關於或起因於 TLL4 過度表現的疾病的任一個，其例子包括，但不限於膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。除了上述，當以下詳細說明被閱讀並結合伴隨之圖式與實施例，本發明之其他目的與特徵會變得更完全地明白。然而，可瞭解的是，上面之本發明內容與以下之詳細說明兩者為示範之實施例，並不限制本發明或本發明其他替代實施例。特別是，

當關於一些特定實施例於此敘述之本發明，可以瞭解的是，敘述為本發明之說明，且並不建構為本發明之限制。各種修飾與應用可被熟悉此技藝人士想到，而無背離本發明精神與範圍，如所附申請專利範圍所述。同樣地，本發明之其他目的、特徵、好處與優點自此內容與下述之特定實施例，為清楚的，且對於熟悉此技藝人士而言可立即明白。此種目的、特徵、好處與優點自上述結合伴隨實施例、資料、圖式與所有要被自其單獨或隨著考慮引入於此之參考文獻而描述的所有合理推論為清楚的。

【實施方式】

對上方概述更進一步而言，本發明之一目標為提供：

[1] 一種經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，其中該胜肽係由 TTLL4 之胺基酸序列或一其免疫活性片段所組成。

[2] 如 [1] 所述之經分離的胜肽，其中該胜肽包括一胺基酸序列，係擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 與 59 所組成之群組。

[3] 一種經分離的胜肽，包括一胺基酸序列，於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加入於擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 與 59 所組成之群組的胺基酸序列，且其中該胜肽具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

[4] 如[1]至[3]之任一項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽與人類白血球組織抗原結合。

[5] 如[4]所述之經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A24或人類白血球組織抗原-A2。

[6] 如[5]所述之胜肽，其中該胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 從擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32與37所組成之群組之胺基酸序列的N端的第二個胺基酸為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸所組成之群組；以及

(b) 擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32與37所組成之群組之胺基酸序列的C端胺基酸為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸所組成之群組。

[7] 如[5]所述之胜肽，其中該胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 從擇自由序列辨識號：38、39、44與59所組成之群組之胺基酸序列的N端的第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) 擇自由序列辨識號：38、39、44與59所組成之群組之胺基酸序列的C端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

[8] 如[1]至[7]之任一項所述之經分離的胜肽，其中

該胜肽為九胜肽或十胜肽。

[9] 一種經分離之多核苷酸，其編碼出如[1]至[8]之任一項所述的經分離胜肽。

[10] 一種誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之組合物，其中該組合物包括一或多個如[1]至[8]之任一項所述之該胜肽，或一或多個如[9]所述之該多核苷酸。

[11] 一種藥學組合物，用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免，其中該組合物包括一或多個如[1]至[8]之任一項所述之該胜肽，或一或多個如[9]所述之該多核苷酸。

[12] 如[11]所述之藥學組合物，其中該組合物被配製來用於投予一個體，其人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A24 或 A2。

[13] 一種誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法，包括擇自由下列所組成之群組的步驟：

(a) *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 將一抗原呈現細胞與如[1]至[8]之任一項所述之胜肽接觸，以及

(b) 將編碼出如[1]至[8]之任一項所述之胜肽的一多核苷酸引入一抗原呈現細胞。

[14] 一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，包括擇自由下列所組成之群組的一步驟：

(a) 將 CD8 陽性 T 細胞與抗原呈現細胞共培養，抗原呈現細胞表現一人類白血球組織抗原與如[1]至[8]之任一

項所述之胜肽的複合物於表面上；

(b) 將 CD8 陽性 T 細胞與外吐小體共培養，外吐小體表現一人類白血球組織抗原與如 [1] 至 [8] 之任一項所述之胜肽的複合物於表面上，以及

(c) 將一包括編碼出一 T 細胞受體次單元多胜肽之多核苷酸的基因引入一 T 細胞，該 T 細胞受體次單元多胜肽與如 [1] 至 [8] 之任一項所述的胜肽結合。

[15] 一種經分離之抗原呈現細胞，其表現一人類白血球組織抗原與如 [1] 至 [8] 之任一項所述之胜肽的複合物於其表面上。

[16] 如 [15] 所述之抗原呈現細胞，其藉由如 [13] 所述之方法來誘導。

[17] 一種經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以如 [1] 至 [8] 之任一項所述之胜肽為標的。

[18] 如 [17] 所述之細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由如 [14] 所述之方法來誘導。

[19] 一種於一需要個體中誘導一抗癌症之免疫反應的方法，該方法包括投予該個體一組合物的步驟，該組合物包括如 [1] 至 [8] 之任一項所述之胜肽、一其免疫活性片段，或編碼出該胜肽或該片段之一多核苷酸。

[20] 一種抗體或其免疫活性片段，其抗如 [1] 至 [8] 之任一項所述之胜肽。

[21] 一種載體，包括編碼出如 [1] 至 [8] 之任一項所述之胜肽的一核苷酸序列。

[22] 一種宿主細胞，其被以如[21]所述之一表現載體所轉形或轉染。

[23] 一種診斷套組，包括如[1]至[8]之任一項所述之胜肽、如[9]所述之核苷酸或如[20]所述之抗體。

[24] 如[1]至[8]之任一項所述之經分離的胜肽，其係擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44與59所組成之群組。

或者，在另一實施例中，本發明也提供下列胜肽與其用途。

[1] 一種經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，其中該胜肽係由 TTLL4 之胺基酸序列或一其免疫活性片段所組成，或一經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，其中該胜肽包括由序列辨識號：80 之胺基酸序列所組成之胜肽之免疫活性片段的胺基酸序列或係由該免疫活性片段的胺基酸序列所組成。

[2] 如[1]所述之經分離的胜肽，其中該胜肽包括一胺基酸序列，係擇自由序列辨識號：1、3至37與38至73所組成之群組。

[3] 如[1]或[2]所述之經分離的胜肽，於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、插入、刪除或加入以產生一經修飾之胜肽，其維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

[4] 如[1]至[3]所述之經分離的胜肽，其中該胜肽與人類白血球組織抗原結合。

[5] 如[4]所述之經分離的胜肽，其中該人類白血球組

織抗原為人類白血球組織抗原-A24 或人類白血球組織抗原-A2。

[6] 如[3]至[5]所述之經分離的胜肽，其中，於人類白血球組織抗原-A24 背景中，該胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 從 N 端的第二個胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸所組成之群組的胺基酸；以及

(b) C 端胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸所組成之群組的胺基酸。

[7] 如[3]至[5]所述之經分離的胜肽，其中，於人類白血球組織抗原-A2 背景中，該胜肽具有擇自由下列所組成之群組的至少一取代：

(a) 從 N 端的第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

[8] 如[1]至[7]之任一項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽。

雖然於本發明實施例之實施或測試中可使用相似或等同於在此敘述之那些的任何方法與材料，但是現在敘述較佳之方法、元件與材料。然而在敘述本發明材料與方法之前，需瞭解的是，此說明書僅為說明並不被意圖來限制。

需注意的是，本發明並不限於敘述於此之特定大小、形狀、尺寸、材料、方法學、步驟等，例如於此敘述，這些可按照慣例實驗法及/或最佳化可將其變更。此外，於此敘述中使用之專門用語僅是為了敘述特別之變化形式或實施例，且不意圖限制僅會受限於所附上之申請專利範圍的本發明範圍。

於本說明書中提及之各刊物、專利或專利申請於此以其內容被具體引入為參考文獻。然而，於此並沒有被解釋為承認本發明由於先前發明之效力不被給予先於這些揭露之權力。

除非特別定義，與此使用之所有技術與科學用語具有如在本發明所屬之領域中技術人士之一所通常瞭解的相同意義。若發生抵觸，本說明書，包括定義，會控制。此外，材料、方法與實施例僅為說明性，不意圖為限制。

I. 定義

於此使用之單字“一”與“該”意指“至少一”除非以別的方式明確指出。

使用於與一物質（例如，胜肽、抗體、多核苷酸等）相關之措辭“分離”與“純化”意指此物質其實質上沒有至少一可被另外包含於自然來源中之物質。因此，一經分離或純化之胜肽意指胜肽其實質上沒有細胞材料，例如碳水化合物、脂質或其他來自胜肽所源自之細胞或組織來源的其他污染蛋白質，或當化學合成時，實質上沒有化學前驅物或其他化學物。措辭“實質上沒有細胞材料”包括，

於其中胜肽從細胞之細胞組成被分離之胜肽的製備，而從此細胞其被分離或重組產生。因此，一胜肽其實質上沒有細胞材料，包括具有小於 30%、20%、10% 或 5%（以乾重）之異源蛋白質（此處也意指為一“污染蛋白質”）的多胜肽的製備。當胜肽被重組產生時，也較佳為實質上沒有培養基，其包括具有少於約 20%、10% 或 5% 之胜肽製備體積之培養基的胜肽製備。當胜肽藉由化學合成產生時，較佳為實質上沒有化學前驅物或其他化學物，其包括具有包含於胜肽合成小於約 30%、20%、10% 或 5%（以乾重）之胜肽製備體積的化學前驅物或其他化學物的胜肽製備。可顯示特別之胜肽製備包含一經分離或經純化之胜肽，例如，藉由在蛋白質製備之十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳(sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis)與考馬斯亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色後的一單一條帶的出現或膠體的類似物。在較佳實施例中，本發明之胜肽與多核苷酸被分離或純化。

於此可替換使用之用語“多胜肽”、“胜肽”與“蛋白質”意指胺基酸殘基之一聚合物。此用語適用於胺基酸聚合物，於其中一或多個胺基酸殘基為經修飾之殘基或非自然發生之殘基，例如對應自然發生胺基酸之人工化學模仿物，與自然發生胺基酸聚合物。

於本說明書中有時使用之用語“寡胜肽”被用來意指本發明之胜肽，其為 20 個殘基或更少，一般為 15 個殘基或更少，且一般為由介於約 8 與約 11 個之間的殘基，通常

為 9 或 10 個的殘基所組成。於此，後方分別意指為“九胜肽”與“十胜肽”。

於此使用之用語“胺基酸”意指自然發生與合成之胺基酸，及胺基酸類似物與胺基酸模仿物，其與自然發生之胺基酸起相似作用。自然發生胺基酸為基因密碼所編碼的那些與於細胞中在轉譯後被修飾的那些（例如羥脯胺酸(hydroxyproline)、 γ -羧基谷胺酸(γ -carboxyglutamate)與 O-磷絲胺酸(O-phosphoserine))。措辭“胺基酸類似物”意指具有與自然發生胺基酸相同之基礎化學結構（一 α 碳鍵結至一氫、一羧基、一胺基與一 R 基）的化合物，但具有一經修飾之 R 基或經修飾之骨架（例如，同絲胺酸(homoserine)、降亮胺酸(norleucine)、甲硫胺酸(methionine)、亞砜(sulfoxide)、甲基硫氨磺(methionine methyl sulfonium))。措辭“胺基酸模仿物”意指化學化合物其與一般胺基酸具有不同結構，但有相似的功能。

可藉由由 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission 所建議之其一般所知的三字母符號或一字母符號來指出於此處之胺基酸。

於此可替換使用用語“基因”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核苷酸”與“核酸”，且除非以別的特別方式指出，相似於胺基酸其以它們一般被接受的單一字母編碼來指出。

於此可替換使用用語“試劑”與“組合物”與意指一產物，其包括於特定量中特定成分，與任何產物其直接或

間接來自於特定量之特定成分的組合。此用語關於藥學組合物，意圖包括一產物，其包括一活性成分與形成載體的惰性成分，及任何產物其直接或間接來自任兩個或多個成份之組合、複合或聚集，或來自一或多個成分之解離，或來自一或多個成分之反應或相互作用的其他形式。因此，本發明藥學組合物包括藉由混合本發明化合物與藥學上或生理上可接受之載體所製成的任何組合物。

於此使用之用語“活性成分”意指在一試劑或一組合物中的物質，其為生物或生理活躍的。特別是，在一藥學試劑或組合物的內容中，用語“活性成分”意指一物質其顯示一目標的之藥學作用。例如，若藥學試劑或組合物用於癌症之治療或避免中，在試劑或組合物中的活性成分可直接或間接引起對癌細胞及/或組織的生物或生理作用。較佳為，此作用可包括減低或抑制癌細胞生長、損傷或殺死癌細胞及/或組織等。一般而言，有效成分的間接作用為誘導細胞毒殺性 T 細胞辨認或殺死癌細胞。在被配製前，“活性成分”也可意指為“主體(bulk)”、“藥物物質(drug substance)”或“技術產物(technical product)”。

如此處所使用之措辭“藥學上可接受之載體”或“生理上可接受之載體”意指藥學上或生理上可接受之材料、組合物、物質或載劑，包括，但不限於一液體或固體填充料、稀釋劑、賦形劑、溶劑或套膜材料。

本發明之一些藥學試劑或組合物提供特別用途為疫苗。在本發明內容中，措辭“疫苗（也意指為一致免疫性

組合物)”意指一試劑或組合物，其藉由接種進入動物具有改善、增強及/或誘導抗腫瘤免疫力的功能。

除非以別的方式定義，用語“癌症”意指過度表現 TLL4 基因之癌症或腫瘤，其例子包括，但不限於膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。

除非以別的方式定義，於此可替換使用且除非以別的方式特別指出用語“細胞毒殺性 T 淋巴球”、“細胞毒殺性 T 細胞”與“CTL”以意指 T 淋巴球之次族群，且除非以別的方式指出，意指 T 淋巴球之次群組(sub-group)可辨認非自身細胞(例如，腫瘤/癌症細胞、被病毒感染之細胞)，且誘導這些細胞死亡。

除非特別定義，用語“HLA-A24”，意指 HLA-A24 型，其包含次型，次型之例子包括，但不限於 HLA-A*2401、HLA-A*2402、HLA-A*2403、HLA-A*2404、HLA-A*2407、HLA-A*2408、HLA-A*2420、HLA-A*2425 與 HLA-A*2488。

除非特別定義，如於此所使用之用語“HLA-A2”，代表性地意指次型，次型之例子包括，但不限於 HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203、HLA-A*0204、HLA-A*0205、HLA-A*0206、HLA-A*0207、HLA-A*0210、HLA-A*0211、HLA-A*0213、HLA-A*0216、HLA-A*0218、HLA-A*0219、HLA-A*0228 與 HLA-A*0250。

除非特別定義，於此使用之用語“套組”被使用於關

於試劑與其他材料之組合。與此考慮之套組包括微陣列、晶片、標誌等。並無打算使用語“套組”限制於試劑及/或材料之特定組合。

如於此使用，在一個體或病患的背景中，措辭“個體之（或病患之）HLA 抗原為 HLA A24 或 HLA-A2”意指此個體或病患同型結合地 (homozygously) 或異質結合地 (heterozygously) 具有 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原基因做為主要組織相容性抗原複合體 (major histocompatibility complex, MHC) class I 分子，且 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原被表現於此個體或病患的細胞中為一 HLA 抗原。

本發明之方法與組合物之範圍提供用途於癌症之“治療”之內容中，一治療被視為“有效”，若其導致臨床優點，例如於 TTLL4 基因之表現中的減少、或於個體中癌症之大小、普遍程度 (prevalence) 或轉移潛力的減少。當治療為預防性 (prophylactically) 提供時，“有效”意指減緩或避免癌症形成，或避免或減輕癌症之臨床症狀。有效性被確認於相關之診斷或治療特定腫瘤形式的任何已知方法。

本發明之方法與組合物之範圍提供用途於癌症之“避免”與“預防”之內容中，此類用詞為與此交替使用意指任何活性，其減少死亡率之負載或來自疾病之死亡率。避免與預防可發生於“初期、第二期與第三期避免層級”。初期避免與預防避免了疾病之發展，而第二期與第三期層級之避免與預防包括藉由恢復功能與減少疾病相關併發

症，以疾病之發展與症狀之浮現及減少已建立之疾病之負向發展的避免與預防為目的。或者，治療或避免可包括一廣範圍之預防疾病治療，其以減緩特別疾病之嚴重度為目標，例如減少腫瘤之增殖與轉移。

在本發明內容中，癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免包括任何下列步驟，例如癌細胞之手術移除、似癌細胞之生長抑制、腫瘤之衰退或退化、癌發生之減緩與抑制的誘導、腫瘤退化與轉移之減少與抑制。癌症之有效治療及/或預防減少致死率與改善具有癌症之個體的預後、減低癌症標記於血液中的程度與減緩伴隨著癌症之可偵測症狀。例如，症狀之減輕或改善構成有效治療及/或預防，其包括 10%、20%、30% 或更加減輕，或穩定疾病。

在本發明內容中，用語“抗體”意指免疫球蛋白與其片段，其專一與選定蛋白質或其胜肽反應。一抗體可包括人類抗體、靈長類抗體、嵌合抗體(chimeric antibody)、雙專一抗體(bispecific antibody)、人源化抗體、與其他蛋白質或放射標誌融合之抗體，與抗體片段。此外，此處之抗體被使用於最大效用且特別包含完整單株抗體、多株抗體、形成自至少兩個完整抗體之多專一抗體(multispecific antibody) (例如雙專一抗體) 與抗體片段，只要其存在所需生物活性。一“抗體”意指所有之種類 (例如，IgA、IgD、IgE、IgG 與 IgM)。

除非特別定義，於此使用之所有技術與科學用語為與

熟悉此技藝人士所通常瞭解之意義相同。

II. 胜肽

於下方詳細描述之本發明胜肽可意指為“TTLL4 胜肽”或“TTLL4 多胜肽”。

為了證明來自 TTLL4 之胜肽作用如一被細胞毒殺性 T 淋巴球(CTLs)所辨認之抗原，分析來自 TTLL4 之胜肽（序列辨識號：80）以確定是否其為由一般遇到 HLA 對偶基因(allele)之 HLA（人類白血球組織抗原）- A24 或 A2 所限制之抗原決定位(Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994)。

根據其對 HLA-A24 之結合親和力，確認來自 TTLL4 之 HLA-A24 結合胜肽的候選物。確認下列候選胜肽：

TTLL4-A24-9-750(序列辨識號：1)、TTLL4-A24-9-994(序列辨識號：3)、TTLL4-A24-9-769(序列辨識號：4)、TTLL4-A24-9-755(序列辨識號：5)、TTLL4-A24-9-79(序列辨識號：6)、TTLL4-A24-9-684(序列辨識號：7)、TTLL4-A24-9-689(序列辨識號：8)、TTLL4-A24-9-779(序列辨識號：9)、TTLL4-A24-9-304(序列辨識號：10)、TTLL4-A24-9-793(序列辨識號：11)、TTLL4-A24-9-691(序列辨識號：12)、TTLL4-A24-9-41(序列辨識號：13)、TTLL4-A24-9-1086(序列辨識號：14)、TTLL4-A24-9-1186(序列辨識號：15)、TTLL4-A24-9-103(序列辨識號：16)、TTLL4-A24-9-362(序列辨識號：17)、TTLL4-A24-9-1037

(序列辨識號：18)、TTLL4-A24-9-773(序列辨識號：19)、
 TTLL4-A24-10-103(序列辨識號：20)、TTLL4-A24-10-773
 (序列辨識號：21)、TTLL4-A24-10-883(序列辨識號：
 22)、TTLL4-A24-10-127(序列辨識號：23)、TTLL4-A24-10-
 684(序列辨識號：24)、TTLL4-A24-10-1043(序列辨識
 號：25)、TTLL4-A24-10-223(序列辨識號：26)、TTLL4-A24-
 10-122(序列辨識號：27)、TTLL4-A24-10-1186(序列
 辨識號：28)、TTLL4-A24-10-1022(序列辨識號：29)、
 TTLL4-A24-10-689(序列辨識號：30)、TTLL4-A24-10-804
 (序列辨識號：31)、TTLL4-A24-10-994(序列辨識號：
 32)、TTLL4-A24-10-993(序列辨識號：33)、TTLL4-A24-
 10-1105(序列辨識號：34)、TTLL4-A24-10-696(序列辨
 識號：35)、TTLL4-A24-10-665(序列辨識號：36)、TTLL4-
 A24-10-891(序列辨識號：37)、TTLL4-A24-10-254(序
 列辨識號：38)與 TTLL4-A24-10-194(序列辨識號：39)。

此外，*in vitro* 藉由載有這些胜肽之樹突細胞
 (dendritic cell, DC)刺激 T 細胞後，使用各下列胜肽成
 功建立細胞毒殺性 T 淋巴球：

TTLL4-A24-9-750(序列辨識號：1)、TTLL4-A24-9-79
 (序列辨識號：6)、TTLL4-A24-9-793(序列辨識號：11)、
 TTLL4-A24-9-691(序列辨識號：12)、TTLL4-A24-9-103
 (序列辨識號：16)、TTLL4-A24-10-103(序列辨識號：
 20)、TTLL4-A24-10-773(序列辨識號：21)、TTLL4-A24-
 10-883(序列辨識號：22)、TTLL4-A24-10-1186(序列辨

識號：28)、TTLL4-A24-10-1022(序列辨識號：29)、TTLL4-A24-10-994(序列辨識號：32)與 TTLL4-A24-10-891(序列辨識號：37)。

根據其對 HLA-A2 之結合親和力，確認來自 TTLL4 之 HLA-A2 結合胜肽的候選物。下列胜肽被視為用於免疫治療之候選胜肽：

TTLL4-A2-9-222(序列辨識號：38)、TTLL4-A2-9-805(序列辨識號：39)、TTLL4-A2-9-610(序列辨識號：40)、TTLL4-A2-9-1163(序列辨識號：41)、TTLL4-A2-9-575(序列辨識號：42)、TTLL4-A2-9-1189(序列辨識號：43)、TTLL4-A2-9-66(序列辨識號：44)、TTLL4-A2-9-864(序列辨識號：45)、TTLL4-A2-9-899(序列辨識號：46)、TTLL4-A2-9-147(序列辨識號：47)、TTLL4-A2-9-578(序列辨識號：48)、TTLL4-A2-9-697(序列辨識號：49)、TTLL4-A2-9-1088(序列辨識號：50)、TTLL4-A2-9-988(序列辨識號：51)、TTLL4-A2-9-423(序列辨識號：52)、TTLL4-A2-9-852(序列辨識號：53)、TTLL4-A2-9-128(序列辨識號：54)、TTLL4-A2-9-107(序列辨識號：55)、TTLL4-A2-9-605(序列辨識號：56)、TTLL4-A2-9-356(序列辨識號：57)、TTLL4-A2-10-363(序列辨識號：58)、TTLL4-A2-10-574(序列辨識號：59)、TTLL4-A2-10-895(序列辨識號：60)、TTLL4-A2-10-605(序列辨識號：61)、TTLL4-A2-10-578(序列辨識號：62)、TTLL4-A2-10-756(序列辨識號：63)、TTLL4-A2-10-550(序列辨識號：64)、TTLL4-A2-10-

610 (序列辨識號：65)、TTLL4-A2-10-107 (序列辨識號：66)、TTLL4-A2-10-933 (序列辨識號：67)、TTLL4-A2-10-1163 (序列辨識號：68)、TTLL4-A2-10-871 (序列辨識號：69)、TTLL4-A2-10-863 (序列辨識號：70)、TTLL4-A2-10-852 (序列辨識號：71)、TTLL4-A2-10-62 (序列辨識號：72)、TTLL4-A2-10-804 (序列辨識號：73)、TTLL4-A2-10-70 (序列辨識號：74)、TTLL4-A2-10-1092 (序列辨識號：75)、TTLL4-A2-10-1113 (序列辨識號：76)、TTLL4-A2-10-778 (序列辨識號：77) 與 TTLL4-A2-10-86 (序列辨識號：78)。

此外，*in vitro* 藉由以這些胜肽脈衝（載有）之樹突細胞 (dendritic cell, DC) 刺激 T 細胞後，使用各下列胜肽成功建立細胞毒殺性 T 淋巴球：

TTLL4-A02-9-222 (序列辨識號：38)、TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39)、TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：44) 與 TTLL4-A02-10-574 (序列辨識號：59)。

這些被建立的細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強而專一之抗經分別之胜肽脈衝之目標細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。這些結果於此證明 TTLL4 為一由細胞毒殺性 T 淋巴球所辨認之抗原，且測試之胜肽為由 HLA-A24 或 HLA-A2 限制之 TTLL4 的抗原決定位胜肽。

由於 TTLL4 基因於，包括例如膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺

癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤的癌症細胞與組織中被過度表現，且不在大部分正常器官中，所以其表現一良好之癌症免疫治療標的。因此，本發明提供對應於來自 TTLL4 之細胞毒殺性 T 淋巴球辨認抗原決定位的九胜肽（胜肽由九個胺基酸殘基所組成）與十胜肽（胜肽由十個胺基酸殘基所組成）。本發明九胜肽與十胜肽之特別較佳例子，包括具有擇自序列辨識號：1、3 至 37 與 38 至 73 中的胺基酸序列的那些胜肽。

通常可使用現今於例如網路可得之軟體程式，例如於 Parker KC *et al.*, J Immunol 1994, 152(1): 163-75 與 Nielsen M *et al.*, Protein Sci 2003; 12: 1007-17 中所敘述的那些，來計算 *in silico* 介於各種胜肽與 HLA 抗原間之結合親和力。例如，於 Lafuente EM *et al.*, Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220 中概述之 Parker KC *et al.*, J Immunol 1994, 152(1): 163-75, 與 Kuzushima K *et al.*, Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV *et al.* BMC Bioinformatics. 2007; 8: 424, 與 Buus S *et al.* Tissue Antigens., 62:378-84, 2003、Nielsen M *et al.*, Protein Sci 2003; 12: 1007-17 與 Nielsen M *et al.* PLoS ONE 2007; 2: e796 中所述，可測量與 HLA 抗原之結合親和力。測量親和力之方法敘述，例如於 Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190 與 Protein Science, 2000, 9: 1838-1846 中。所以可立即利用此種軟體程式來選擇來自 TTLL4 的那些片段，其藉由使用此類

軟體程式具有與 HLA 抗原之高結合親和力。因此本發明包括由來自 TTLL4 之任何片段所組成之胜肽，其藉由此類已知程式可確認與 HLA 結合。此外，此類胜肽可包括由全長之 TTLL4 序列所組成之胜肽。

本發明胜肽，特別是本發明之九胜肽與十胜肽可於側面具有額外之胺基酸殘基，只要所產生之胜肽維持其細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。特定之額外胺基酸殘基可由任何種類之胺基酸所組成，只要它們不減少原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。因此，本發明包括具有對 HLA 抗原之結合親和力之胜肽，其包括來自 TTLL4 之胜肽。此種胜肽，例如小於約 40 個胺基酸，時常小於約 20 個胺基酸，通常小於約 15 個胺基酸。

一般而言，於一胜肽中一、二或多個胺基酸之修飾，不影響胜肽的功能，及在一些例子中，會甚至增強原始蛋白質所需之功能。事實上，已知經修飾之胜肽（即，與一原始參考序列相較，由一胺基酸序列所組成之胜肽，於其中一、二或數個胺基酸殘基已被修飾（即，取代、加入、刪除或插入））維持原始胜肽的生物活性(Mark *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。因此，在本發明一實施例中，本發明胜肽具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力及於其中加入及/或取代一、二或甚至更多個胺基酸之擇自序列辨識號：1、3 至

37 與 38 至 73 中的胺基酸序列兩者。

熟悉此技藝人士會認定改變一單一胺基酸或整個胺基酸序列之一小百分比的個別修飾，即刪除、插入、加入及/或取代至一胺基酸序列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 substitution)”或“保守修飾(conservative modification)”，其中一蛋白質之改變導致一經修飾之蛋白質，其具有與原始蛋白質同功的一功能。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。胺基酸支鏈的例子以令人滿意之保守為特徵，包括，例如：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，下列八個族群各包含於本技術領域中接受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(N)、麩胺醯胺(Q)；
- 4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；
- 5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫丁胺酸(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)、甲硫丁胺酸(M)(參見，例如 Creighton, Proteins 1984)。

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未修飾胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。更進一步而言，經修飾之胜肽不排除來自多形變體(polymorphic variant)、種間同質體(interspecies homologues)與 TTL4 對偶基因(alleles)之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發的胜肽。

胺基酸殘基可被插入、取代、刪除或加入至本發明之胜肽，或者胺基酸殘基可被從其刪除以達到一較高之結合親和力。為了維持必須之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，較佳為只修飾(即，刪除、插入、加入/或取代)一小數目(例如 1、2 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較佳為，20% 或更少，更佳為，15% 或更少，與甚至更佳為 10% 或更少，例如 1 至 5%。

當使用於免疫治療之背景中時，本發明胜肽應被表現於一細胞或外吐小體之表面上，較佳如一伴隨 HLA 抗原之複合物。因此，其較佳為選擇不只誘導細胞毒殺性 T 淋巴球且也具有對於 HLA 抗體之高度親和力的胜肽。為此目的，藉由胺基酸殘基之取代、插入、刪除及/或加入可修飾胜肽已產生具有經改善之結合親和力之經修飾的胜肽。除

了自然表現之胜肽外，由於藉由結合至 HLA 抗原來表現之胜肽序列的規則 (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307) 為已知，可將基於此規則之修飾引入本發明之致免疫性胜肽。

例如，具有高 HLA-A24 結合親和力之胜肽傾向具有以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸取代之來自 N 端的第二個胺基酸。同樣地，胜肽於其中 C 端胺基酸被以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸取代。因此，為了增加 HLA-A24 結合親和力，以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸取代來自 N 端的第二個胺基酸及/或以白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸取代 C 端胺基酸可為令人滿意的。因此，具有擇自序列辨識號：1、3 至 37 之胺基酸序列的胜肽，其中序列辨識號之胺基酸序列之來自 N 端的第二個胺基酸被以白胺酸或甲硫丁胺酸取代，或其中序列辨識號之胺基酸序列之 C 端胺基酸被以纈胺酸或白胺酸取代，被包含於本發明中。

同樣地，顯示高 HLA-A2 結合親和力之胜肽傾向具有以白胺酸或甲硫丁胺酸取代之來自 N 端的第二個胺基酸及/或以纈胺酸或白胺酸取代之在 C 端之胺基酸。或者，為了增加 HLA-A2 結合親和力，其可需要取代來自 N 端的第二個胺基酸以白胺酸或甲硫丁胺酸，及/或在 C 端之胺基酸以纈胺酸或白胺酸。因此，具有擇自序列辨識號：38 至 73 中之胺基酸序列的胜肽，其中序列辨識號之來自 N 端的第二

個胺基酸以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸取代，及/或其中序列辨識號之 C 端之胺基酸以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸取代，被本發明所包含。

可將取代引入不止於末端胺基酸，也可於胜肽之潛在 TCR 位的辨認。一些研究已證實一具有胺基酸取代之胜肽可等於或比原來更好，例如 CAP1、p53⁽²⁶⁴⁻²⁷²⁾、Her-2/neu⁽³⁶⁹⁻³⁷⁷⁾或 gp100⁽²⁰⁹⁻²¹⁷⁾ (Zaremba *et al.* Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann *et al.* J Immunol. (2002);168(3):1338-47., S. O. Dionne *et al.* Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 及 S. O. Dionne *et al.* Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

本發明也考慮 1、2 或數個胺基酸的加入也可被添加至本發明胜肽之 N 及/或 C 端。本發明也包括具有高 HLA 抗原結合親和力且維持細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之此種經修飾的胜肽。

例如，本發明提供在長度小於 14、13、12、11 或 10 個胺基酸的一經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i) 一胺基酸序列，其中 1、2 或數個胺基酸被修飾於擇自由序列辨識號：1 至 19 與 38-57 所組成之群組的胺基酸序列中，其中該胜肽與 HLA 抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，

(ii) (i)之胺基酸序列，其中，在 HLA-A24 的背景中，此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸與色胺酸所組成之群組的胺基酸；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的胺基酸，與

(iii) (i)之胺基酸序列，其中，在 HLA-A2 的背景中，此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的胺基酸；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組的胺基酸。

此外，本發明也提供在長度小於 15、14、13、12 或 11 個胺基酸的一經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i') 一胺基酸序列，其中 1、2 或數個胺基酸被修飾於擇自由序列辨識號：20 至 37 與 58-78 所組成之群組的胺酸序列中，其中該胜肽與 HLA 抗原結合且誘發細胞毒殺性 T 淋巴球，與

(ii') (i')之胺基酸序列，其中，在 HLA-A24 的背

景中，此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸與色胺酸所組成之群組的胺基酸；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的胺基酸，與

(iii') (I') 之胺基酸序列，其中，在 HLA-A2 的背景中，此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的胺基酸；以及

(b) 此序列辨識號之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組的胺基酸。

當這些胜肽與抗原呈現細胞接觸或被引入抗原呈現細胞時，在抗原呈現細胞中處理這些胜肽以呈現(i)、(ii)、(iii)、(i')、(ii')與(iii')的胜肽於其上。

然而，當胜肽序列與一具有不同功能之內生或外生蛋白質之胺基酸序列的一部份相同時，可能誘導副作用，例如自體免疫疾病及/或抗特定物質之過敏症候群。因此，較佳為使用可得之資料庫首先執行同源搜尋以避免胜肽之序列符合其他蛋白質之胺基酸序列的情況。當從與目標胜肽相較不只存在具有一或兩個胺基酸不同之胜肽的同源搜尋變得清楚時，為了增加其與 HLA 抗原之結合親和力，及/

或增加其細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力而不具副作用之任何危險，可修飾目標胺基酸。

雖然如上述之具有對 HLA 抗原高結合親和力的胜肽被預期為高效能，但根據作為指示之高親和表現而被選擇之候選胜肽，更進一步被測試細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的表現。此處措辭“細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”意指當表現於抗原呈現細胞上時，胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的能力。此外，“細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”包括胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球活化、細胞毒殺性 T 淋巴球增殖、促進藉由細胞毒殺性 T 淋巴球之目標細胞的分解與增加藉由細胞毒殺性 T 淋巴球之 IFN- γ 產生的能力。

藉由誘導攜帶人類 MHC 抗原之抗原呈現細胞（例如 B-淋巴球、巨噬細胞與樹突細胞）或更專一地來自人類周邊血液單核細胞之樹突細胞，並在以一測試胜肽刺激抗原呈現細胞之後，將抗原呈現細胞與 CD8 陽性細胞混合以誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且之後測量由抗目標細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球產生並釋放之 IFN- γ 來達成細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的確定。如此反應系統，可使用已被產生來表現人類 HLA 之抗原基因轉殖動物（例如，於 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II

restricted T(H) response 中的描述)。或者，可以 ^{51}Cr 放射標示目標細胞，且可從自目標細胞釋放出的放射活性計算細胞毒殺性 T 淋巴球之細胞毒殺活性。或者，細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力可在攜帶經固定之胜肽之抗原呈現細胞存在下，藉由測量由細胞毒殺性 T 淋巴球產生並釋放的 $\text{IFN-}\gamma$ ，並使用抗 $\text{IFN-}\gamma$ 單株抗體來使於培養基上之抑制區可見來評估。

由於如上述測試胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，發現擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 與 59 所提出的胺基酸序列中的九胜肽或十胜肽顯示特別高之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與對 HLA 抗原之高結合親和力。因此這些胜肽被示例為本發明之較佳實施例。

此外，同源分析之結果證明此種胜肽不與來自任何其他已知人類基因產物之胜肽具有顯著之同源性。因此，當用於免疫治療時，降低了未知或不需之免疫反應提升的可能性。因此，也來自此態樣，這些胜肽對於在癌症病患中引起抗 TTLL4 免疫力為有效的。因此，本發明較佳胜肽，較佳為具有擇自序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 與 59 中的胺基酸序列的胜肽被本發明所包含。

除了上述所需修飾之外，本發明胜肽也可連接其他胜肽，只要所產生之經連接的胜肽維持原始胜肽之必不可少之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，且更佳為以維持必不可少

少之 HLA 結合。適合之“其他”胜肽的例子包括：本發明胜肽或來自其他腫瘤相關抗原之細胞毒殺性 T 淋巴球誘導胜肽。本發明之胜肽可直接或間接經由一連結器連接“其他”胜肽。適合之胜肽間(inter-peptide)連結器為被本技術領域所熟知，且包括，例如 AAY (P. M. Daftarian *et al.*, J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK (R. P. M. Suttmüller *et al.*, J Immunol. 2000, 165: 7308-7315)或 K (S. Ota *et al.*, Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura *et al.*, J Immunol. 2002, 168: 5709-5715)。

例如，也可實質同時使用非 TTLL4 腫瘤相關抗原胜肽以增加經由 HLA class I 及/或 class II 之免疫反應。其已相當確認，癌症細胞可表現多於一個腫瘤相關基因。因此，其為在對於熟悉此技藝人士例行實驗之範圍中以確認是否一特定個體表現額外腫瘤相關基因，且之後包括來自此類基因之表現產物的 HLA class I 及/或 class II 結合胜肽於根據本發明之 TTLL4 組合物或疫苗中。

HLA class I 與 HLA class II 結合胜肽之例子對於熟悉此技藝人士而言是已知的（例如，參見 Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995），且可以被用於本發明中，以如此處所揭露之那些的類似方式。因此，使用分子生物之標準程序，熟悉此技藝人士可製備包括一或多個 TTLL4 胜肽與一或多個非 TTLL4 胜肽的多胜肽，或編碼出此類多胜肽的核酸。

上述此類連結胜肽於此處意指為“多面體

(polytope)”。即，兩個或多個潛在免疫原性(immunogenic)或免疫反應刺激胜肽的群組，胜肽可互相連接以多種排列（例如，連成一串或部分重疊）。多面體（或編碼出多面體的核酸）可以符合標準免疫步驟被投予，例如至動物，以測試多面體於刺激、增強及/或誘導一免疫反應之功效。

胜肽可被直接連接或經由使用位於側面之序列以形成多面體，且多面體為疫苗之用途為本技術領域所熟知（參見，Thomson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13): 5845-5849, 1995; Gilbert *et al.*, Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson *et al.*, J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn *et al.*, J Exp. Med. 171(1): 299-306, 1990）。製備並含有抗原決定位之不同數目與組合的多面體並為了藉由細胞毒殺性 T 淋巴球的辨認與為了於增加免疫反應中之功效將其進行測試。

本發明胜肽也可被被連接至其他物質，只要所產生之連接胜肽維持原始胜肽之必不可少的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。適合物質的例子包括，例如：胜肽、脂質、糖與糖鏈、乙醯基，天然與合成之聚合物等。胜肽可包含修飾，例如醣基化、支鏈氧化或磷酸化等，所提供之修飾不損壞原始胜肽之生物活性。這些種類之修飾可被執行以授予額外之功能（例如，目標功能與傳送功能）或穩定胜肽。

例如，為了 *in vivo* 增加胜肽之穩定度，本技術領域已知引入 D-胺基酸、胺基酸模仿物或非天然胺基酸；此內容也適合本發明之胜肽。可以一些方法分析一胜肽的穩定

度。例如，可使用肽酶與多種生物培養基，例如人類血漿與血清，來測試穩定度（參見，例如 Verhoef *et al.*, *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 1986, 11: 291-302）。

此外，如上所提到，在藉由 1、2 或數個胺基酸殘基取代、刪除、插入或加入之經修飾的胜肽中，可篩選或選擇與原始胜肽相較具有相同或較高之活性的那些。因此本發明也提供一篩選或選擇與原始相較具有相同或較高之活性的經修飾胜肽的方法。一說明性之方法包括步驟：

a：將至少一個本發明胜肽之胺基酸殘基取代、刪除、插入或加入；

b：確定胜肽的活性；

c：選擇與原始相較具有相同或較高之活性的胜肽。

此處，要被評估之活性可包括 MHC 結合活性、抗原呈現細胞或細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與細胞毒性活性。

III. TTLL4 胜肽之製備

使用熟知之技術可製備本發明之胜肽。例如，使用重組 DNA 技術或化學合成可以合成方法製備胜肽。本發明胜肽可單獨合成或為包括兩或多個胜肽之較長多胜肽。之後可分離此胜肽，即，純化或分離，以便實質上無其他自然發生之宿主細胞蛋白質與其片段或任何其他化學物質。

本發明胜肽可包含修飾，例如醣基化、支鏈氧化或磷酸化，其提供修飾不損壞原始胜肽之生物活性。其他修飾包括可用來，例如增加胜肽之血清半衰期之 D-胺基酸或其他胺基酸模仿物的合併。

藉由根據經選擇之胺基酸序列的化學合成可獲得本發明之胜肽。適合此合成之一般胜肽合成方法的例子包括：

(i) 胜肽合成 (Peptide Synthesis) Interscience, New York, 1966;

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

(iii) 胜肽合成 (Peptide Synthesis) (日文), Maruzen Co., 1975;

(iv) 胜肽合成之基礎與實驗 (Basics and Experiment of Peptide Synthesis) (日文), Maruzen Co., 1985;

(v) 藥學的發展 (Development of Pharmaceuticals) (second volume) (日文), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

(vi) W099/67288 ; 以及

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

或者，藉由適合任何已知產生胜肽之基因工程方法可獲得本發明之胜肽（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，首先製備一適合之載體，其懷有一多核苷酸其編碼出目標胜肽於一可表達的形式中（例如，對應於啟動子序列之調控序列的下游），並將載體轉殖進入適合之宿主細

胞。之後培養宿主細胞以產生感興趣之胜肽。使用一 *in vitro* 轉譯系統可 *in vitro* 產生胜肽。

IV. 多核苷酸

本發明提供多核苷酸，其編碼出任何本發明上述之胜肽。這些包括來自自然發生之 TTL4 基因（GenBank Accession No. NM_014640（序列辨識號：79））的多核苷酸與具有其之保守修飾之核苷酸序列的那些。此處措辭

“保守修飾之核苷酸序列”指序列其編碼出相同或實質上相同之胺基酸序列。由於基因密碼的退化，一大數量之功能相同之核酸編碼出任何已知蛋白質。例如，密碼 GCA、GCC、GCG 與 GCU 皆編碼出胺基酸丙胺酸。因此，於藉由一密碼具體指定丙胺酸之每個位置，可改變密碼成為任何上述不會改變編碼出之胜肽的對應密碼。此核酸變化為“沈默變化(silent variation)”，其為保守修飾變化的一種。此處敘述編碼出一胜肽之每個核酸序列也描述核酸之每種可能的沈默變化。熟悉此技藝人士會明白於一核酸中各密碼（除了 AUG，其原本為甲硫胺酸之唯一密碼、與 TGG 其原本為色胺酸之唯一密碼）可被修飾以產生一功能相同分子。因此，編碼出一胜肽之核酸各沈默變化，被暗示性揭露於各揭露序列中。

本發明之多核苷酸可由 DNA、RNA 與其衍生物所組成。如本技術領域所熟知，DNA 適合地由鹼基所組成，例如 A、T、C 與 G，而 T 於 RNA 中為 U 所取代。熟悉此技藝人士可瞭解非自然發生鹼基也被包含於多核苷酸中。

本發明之多核苷酸可編碼出本發明之多個胜肽，於其間具有或不具有介於中間之胺基酸序列。例如，介於中間之胺基酸序列可提供多核苷酸或經轉譯之胜肽一裂解位（例如酵素辨認序列）。更進一步而言，多核苷酸可包括任何額外之序列至編碼出本發明胜肽之編碼序列。例如，多核苷酸可為一重組多核苷酸，其包括胜肽表現所需之調控序列，或可為一具有標誌基因與此類之表現載體（質體）。一般而言，可製備此重組多核苷酸，藉由經由使用例如聚合酶與內切酶之一般重組技術的多核苷酸操作。

可使用重組與化學合成技術兩者以產生本發明之多核苷酸。例如，藉由插進入一適合之載體可產生一多核苷酸，當轉染進入一勝任細胞時，其可被表現。或者，使用 PCR 技術或表現於適合的宿主可將一多核苷酸放大（參見，例如 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989）。或者，使用固態技術如於 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes *et al.*, EMBO J 1984, 3: 801-5 中所敘述，可合成多核苷酸。

V. 外吐小體(exosomes)

本發明進一步地提供稱為外吐小體的胞間囊泡 (intracellular vesicles)，其呈現形成於本發明之胜肽與人類白血球抗原表面之間的複合物。例如，藉由使用於日本專利公開號：Hei 11-510507 與 W099/03499 所詳述的方法以及使用從接受治療和/或避免之病人所得的抗原表

現細胞可製備外吐小體。本發明之外吐小體可如疫苗般地接種，以相似於本發明胜肽之方式。

包括在複合物中的人類白血球抗原形式必須與需要治療及/或預防之個體的人類白血球抗原形式相符。例如，在日本人族群中，HLA-A24 與 HLA-A2，特別是 HLA-A*2402 與 HLA-A*0201 與 HLA-A*0206 為普遍的且因此對於治療日本人病患而言是適合的。高度表現於日本人與高加索人之中的 A24 型之使用有助於獲得有效的結果，且次型，例如 A*2402、A*0201 與 A*0206 也提供用途。一般在臨床上，需接受治療之病患的人類白血球抗原形式係進行預先的研究，這可適當地選擇對此特別抗原具有高度結合親合力的胜肽或經由抗原表現具有細胞毒性 T 淋巴細胞誘發性的胜肽。此外，為了獲得具有高度結合親合力與細胞毒性 T 淋巴細胞誘發性兩者的胜肽，可以天然產生之 TTLL4 部分胜肽的胺基酸序列為基礎，執行 1、2 或數個胺基酸的取代、插入、刪除及/或添加。

當對於本發明外吐小體使用 A24 型 HLA 抗原之時，具有擇自序列辨識號：1 與 3 至 37 之序列中的胜肽具有特別的效用。

或者，當對於本發明外吐小體使用 A2 型 HLA 抗原之時，具有擇自序列辨識號：38 至 73 之序列中的胜肽具有特別的效用。

在一些實施例中，本發明之外吐小體，為外吐小體表現本發明胜肽與 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原之複合物於其表面

上。

VI. 抗原呈現細胞 (APCs)

本發明也提供經分離之抗原呈現細胞，其表現形成於 HLA 抗原與本發明胜肽之間的複合物於其表面上。抗原呈現細胞可來自受到治療及/或避免之病患，且藉由其本身或與包括本發明之胜肽、外吐小體或細胞毒殺性 T 淋巴球之其他藥物結合可被投予如一疫苗。

抗原呈現細胞並不限於特定種類之細胞，且包括樹突細胞、蘭格罕細胞 (Langerhans cell)、巨嗜細胞、B 細胞與活化之 T 細胞，已知其表現蛋白質 (proteinaceous) 抗原於其細胞表面以被淋巴球所辨認。由於樹突細胞為一典型抗原呈現細胞，其於抗原呈現細胞中具最強之細胞毒殺性 T 淋巴球誘導作用，樹突細胞供給使用如本發明之抗原呈現細胞。

例如，藉由誘導來自周邊血液單核細胞之樹突細胞與之後 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 與本發明胜肽接觸（刺激）其可獲得一抗原呈現細胞。當本發明之胜肽投予至一個體，於個體身體內誘導表現本發明胜肽之抗原呈現細胞。措辭“誘導抗原呈現細胞”包括以本發明之胜肽、編碼出本發明胜肽之核苷酸來接觸（刺激）一細胞，以呈現形成於 HLA 抗原與本發明胜肽之間的複合物於細胞之表面上。因此，藉由在將本發明胜肽投予至一個體後，自此個體收集抗原呈現細胞可獲得本發明之抗原呈現細胞。或者，藉由將自個體收集之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸

可獲得本發明之抗原呈現細胞。

可將本發明之抗原呈現細胞以其本身或結合包括本發明胜肽、外吐小體或細胞毒殺性 T 淋巴球的其他藥物投予至一個體以誘導於個體中之抗癌免疫反應。例如，*ex vivo* 投予可包括步驟：

a：自一第一個體收集抗原呈現細胞，

b：以胜肽接觸步驟 a 之抗原呈現細胞，以及

c：將步驟 b 之抗原呈現細胞投予一第二個體。

第一個體與第二個體可為相同個體或可為不同個體。

在本發明內容中，可使用本發明胜肽以製造具誘導抗原呈現細胞能力之藥學組合物。於此提供用於製造用以誘導抗原呈現細胞之藥學組合物的一方法或製程，且較佳為包括將本發明胜肽與一藥學上可接受之載體一起混合或配製的步驟。

本發明也提供用於誘導抗原呈現細胞之本發明胜肽的用途。藉由步驟 b 獲得之抗原呈現細胞可被配製或投予一為疫苗，用以治療及/或預防癌症，例如膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤，但不限於此。

根據本發明一方面，本發明之抗原呈現細胞具高程度細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。在用語“高程度細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力”中，高程度相對於藉由抗原呈現細胞沒有與胜肽接觸或與無法誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之胜

肽接觸的程度。藉由包括 *in vitro* 將編碼出本發明胜肽之多核苷酸轉移至抗原呈現細胞的步驟的方法與上述之方法，可製備此種具高程度細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。此經引入之基因可為 DNA 或 RNA 形式。引入方法的例子包括，並無特別限制，各種於此領域一般被執行的方法，可使用例如脂質體轉染(lipofection)、電穿孔法(electroporation)與磷酸鈣方法。更特別地，可執行其如 Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 日本專利公開號：2000-509281 中所述。藉由轉移基因進入抗原呈現細胞，基因遭遇轉錄、轉譯與此類於細胞中，且之後所獲得之蛋白質藉由 MHC Class I 或 Class II 處理，並經由一呈現途徑進行以與呈現部分胜肽。

在一些實施例中，本發明之抗原呈現細胞，抗原呈現細胞表現本發明胜肽與 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原之複合物於其表面上。

VII. 細胞毒殺性 T 淋巴球 (CTLs)

抗任一本發明胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球增強 *in vivo* 以癌症細胞為標的之免疫反應，且因此就其本身而言，可使用為疫苗，以相似於胜肽之方式。因此本發明提供經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球其藉由任一本發明之胜肽專一地被誘導或活化。

可獲得此種細胞毒殺性 T 淋巴球，藉由(1) 將本發明胜肽投予至一個體；或(2) 將來自個體之抗原呈現細胞與

CD8 陽性細胞或周邊血液單核淋巴球與本發明之胜肽 *in vitro* 接觸（刺激）；或（3）將 CD8 陽性 T 細胞或周邊血液單核淋巴球 *in vitro* 與表現 HLA 抗原與胜肽之複合物於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體接觸；或（4）引入包括編碼出與與本發明胜肽結合之 T 細胞受體次單元多胜肽的多核苷酸的基因。藉由上述方法可製備此種抗原呈現細胞或外吐小體，且（4）之方法之詳細被敘述於下方 “VIII. T 細胞受體 (TCR)” 的段落中。

本發明細胞毒殺性 T 淋巴球可來自一受到治療及/或避免之病患，且藉由其身或與包括本發明之胜肽或為了調節作用之外吐小體的其他藥物結合可被投予。所獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球起專一抗目標細胞的作用，而目標細胞其表現本發明胜肽，例如用於誘導之相同胜肽。目標細胞可為細胞其內生性表現 TTLL4，例如癌細胞，或被以 TTLL4 基因轉殖之細胞；且由於藉由胜肽刺激表現本發明胜肽於細胞表面之細胞，也可做為經活化之細胞毒殺性 T 淋巴球攻擊的目標。

在一些實施例中，本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球為細胞毒殺性 T 淋巴球其辨認表現 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物的細胞。在細胞毒殺性 T 淋巴球的內容中，措辭“辨認一細胞”意指經由其 TCR 與於細胞表面之 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物結合，並顯示抗此細胞之特定細胞毒殺性 T 淋巴球活性。於此“特定細胞毒殺性 T 淋巴球活性”意指顯示抗表現 HLA-A24 或

HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物的細胞，而不對其他細胞。

VIII. T 細胞受體 (TCR)

本發明也提供一組合物其包括由編碼出可形成 T 細胞受體之次單位之多胜肽的核酸，與其使用方法。T 細胞受體之次單位具有能力形成 T 細胞受體，其授與專一性至抗腫瘤細胞的 T 細胞，腫瘤細胞表現 TTLL4。藉由使用本技術領域所知的方法可確認作為細胞毒殺性 T 淋巴球之 T 細胞受體次單元之 α -與 β -支鏈的核酸，而細胞毒殺性 T 淋巴球以一或多個本發明之胜肽所誘導 (W02007/032255 與 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如，喜好以聚合酶鏈鎖反應方法來分析 T 細胞受體次單元。用於分析之聚合酶鏈鎖反應引子可為，例如 5' -R 引子 (5' -gtctaccaggcattcgcttcat-3') 為 5' 端引子 (序列辨識號：81) 與 3-TRa-C 引子 (5' -tcagctggaccacagccgcagcgt-3') 專一於 T 細胞受體 alpha 鏈 C 區 (序列辨識號：82)、3-TRb-C1 引子 (5' -tcagaaatcctttctcttgac-3') 專一於 T 細胞受體 beta 鏈 C1 區 (序列辨識號：83) 或 3-TRbeta-C2 引子 (5' -ctagcctctggaatcctttctctt-3') 專一於 T 細胞受體 beta 鏈 C2 區 (序列辨識號：84) 為 3' 端引子，但不限於其。引出之 T 細胞受體可以高親合力結合表現 TTLL4 胜肽之目標細胞，且視需要 *in vivo* 與 *in vitro* 居中有有效殺死表現 TTLL4 之目標細胞。

編碼出 T 細胞受體次單位的核酸序列可合併進入適合之載體，例如反轉錄病毒載體。這些載體為本技術領域所熟知。通常包含其之核酸或載體可被轉移至一 T 細胞，例如一來自一病患之 T 細胞。有用地，本發明提供一現成 (off-the-shelf) 的組合物允許快速修飾病人所擁有之 T 細胞（或其他哺乳動物之那些）以快速簡單產生具有優秀之癌症細胞殺死特性的經修飾 T 細胞。

特定之 T 細胞受體可專一地辨認本發明之一胜肽與 HLA 分子之複合物，當 T 細胞受體被呈現於 T 細胞表面時，給予 T 細胞抗目標細胞之專一活性。藉由任何已知方法可確認上述複合物之專一辨認，其較佳例子包括，使用 HLA 分子與本發明胜肽之 HLA 多聚體分析，與 ELISPOT 分析。藉由執行 ELISPOT 分析，其可確認表現 T 細胞受體於細胞表面上之 T 細胞藉由 T 細胞受體辨認一細胞，且訊息傳送於細胞內。當複合物存在於 T 細胞表面時藉由已知方法也可執行上述複合物可給予一 T 細胞細胞毒性活性的確認。較佳方法包括，例如，抗 HLA 陽性目標細胞之細胞毒性活性測定，例如鉻 (chromium) 釋放分析。

本發明也提供細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由，例如以編碼出在 HLA-A24 之背景中與序列辨識號：1 與 3 至 37 之 TTLL4 胜肽結合及編碼出在 HLA-2 之背景中與序列辨識號：38 至 73 之 TTLL4 胜肽結合的 T 細胞受體次單位多胜肽的核酸轉導來製備。

經轉導之細胞毒殺性 T 淋巴球可 *in vivo* 自引導至癌

症細胞，且可藉由熟知的培養方法 *in vitro* 擴張（例如 Kawakami *et al.*, J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)）。本發明細胞毒殺性 T 淋巴球也可用來形成一致免疫組合物，其於一需要治療或保護之病患中治療或避免癌症為有效（參見，W02006/031221，其內容於此被併入為參考）。

IX. 藥學組合物

由於與正常組織相較，TTLL4 表現於癌症中特別被提高，癌症之例子包括，但不限於膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤，本發明之胜肽或多核苷酸可用於癌症之治療及/或預防，及/或用於避免其手術後之復發。因此，本發明提供一藥學組合物或試劑配製來癌症之治療及/或預防，及/或此類癌症之手術後復發的避免，此類組合物或試劑包括為活性成分之一或多個本發明胜肽或多核苷酸作為活性成分。或者，本發明之胜肽可表現於任何前述外吐小體或細胞表面，例如抗原呈現細胞，以用來作為藥學組合物。此外，上述以本發明任何胜肽為標的之細胞毒殺性 T 淋巴球也可用來作為本發明藥學組合物之活性成分。

因此，本發明提供試劑或組合物包括至少一活性成分，擇自：

(a) 一或多個本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，一或多個編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 一或多個本發明之抗原呈現細胞或外吐小體；以及

(d) 一或多個本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球

本發明之藥學與組合物或試劑也提供使用如一疫苗。在本發明內容中，措辭“疫苗”（也意指為一致免疫組合物）意指一試劑或組合物，其藉由接種至動物具有改善、增強即/或誘導抗腫瘤免疫力的功能。換句話說，本發明提供本發明之藥學試劑或組合物，用以誘導於一個體中之抗癌症免疫反應。

本發明之藥學組合物可用於治療及/或避免癌症，及/或其手術後復發的避免於一個體或病患中，個體或病患包括人類與任何其他哺乳動物，其包括，但不限於小鼠、大鼠、天竺鼠、兔子、貓、狗、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴子、狒狒與黑猩猩，特別是一商業上重要動物或被馴養的動物。在一些實施例中，本發明之藥學試劑或組合物可被配製來投予一個體，其 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2。

在另一實施例中，本發明也提供一活性成分用於治療癌症或腫瘤的藥學組合物或試劑的製造中的用途，此活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明更提供一用於治療或避免癌症或腫瘤的活性成分，活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明更提供一製造用以治療或避免癌症或腫瘤之藥學組合物或物質的方法或製程，其中方法或製程包括將一藥學上或生理上可接受之載體與一活性成分一起配製的步驟，活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

在另一實施例中，本發明也提供一製造用以治療或避免癌症或腫瘤之藥學組合物或試劑的方法或製程，其中方法或製程包括將一藥學上或生理上可接受之載體與一活性成分一起混合的步驟，其中活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

根據本發明，已發現具有擇自序列辨識號：1 與 3 至 37 中之胺基酸序列的胜肽為 HLA-A24 限制之抗原決定位胜肽或候選物，且也已發現具有擇自序列辨識號：38 至 73 中之胺基酸序列的胜肽為 HLA-A2 限制之抗原決定位胜肽或候選物，其可於一個體中誘導強而專一之抗表現 HLA-A24 或 HLA-A2 與 TTLL4 之癌症的免疫反應。因此包括任一具有序列辨識號 1、3 至 37 與 38 至 73 之胺基酸序列之胜肽的本發明藥學組合物或試劑特別適合投予 HLA 抗原分別為 HLA-A24 與 HLA-A2 之個體。相同的東西提供至包含編碼出任何這些胜肽之多核苷酸（即，本發明之多核苷酸）的藥學組合物或試劑。

由本發明藥學組合物或試劑治療之癌症不限於且包括其中關於 TTLL4 之所有種類癌症，包括，但不限於膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。

本發明藥學組合物或試劑可包括除了上述活性成分外，具有誘導細胞毒殺性 T 淋巴球抗似癌細胞之能力的其他胜肽、編碼出此其他胜肽之其他多核苷酸、其他表現此

其他胜肽之細胞或此類。於此，具有誘導細胞毒殺性 T 淋巴球抗似癌細胞之能力的其他胜肽由癌症專一抗原所例示（例如，經確認之腫瘤相關抗原），但不限於此。

若需要，本發明之藥學組合物或試劑可視需要包括其他治療物質為一活性成分，只要此物質不抑制活性成分之抗腫瘤功效，活性成分例如任何本發明胜肽。例如，配方可包括抗發炎組合物、止痛劑、化學治療與其類似物。除了包括其他治療物質於藥劑其本身中，也可將本發明之藥劑與一或多個其他藥學組合物相繼或同時投予。藥劑與藥學組合物的量依照，例如使用何種藥學組合物、要治療之疾病與投藥的計畫與方式。

應瞭解的是，除了此處特別提及之成分外，本發明之藥學組合物或試劑可包括本技術領域一般之其他組合物，其具有關於討論中之配方形式。

在本發明一實施例中，本發明之藥學組合物或試劑可被包含於製造之商品與套組，其包含對於要被治療之疾病，例如癌症的病理科況有用之材料。製造之商品可包括具有一標籤之任何本發明藥學組合物或試劑的容器。適合的容器包括瓶、小瓶(vial)與試管。容器可形成自各種材料，例如玻璃或塑膠。於容器上之標籤需指出組合物或試劑為用來治療或避免疾病之一或多個情況。標籤也可指出投藥指示等。

除了上述容器外，套組包括本發明藥學組合物或試劑可視需要更進一步包括一第二容器，其儲藏一藥學上可接

受之稀釋液。其可更包括商業或使用者觀點需要之其他材料，包括其他緩衝溶液、稀釋液、濾器、針、注射器與具有使用說明之包裝插入物。

藥學組合物或試劑若需要可被呈現於一包(pack)或一分配器，其可包含含有活性成分之一或多單位劑量形式。包裝可例如包括金屬或塑膠箔，例如一泡棉箱(blister pack)。包或分配器可伴隨著投藥指示。

(1) 藥學組合物包含胜肽作為活性成分

可直接投予本發明胜肽為一藥學組合物或試劑，若需要的話，其已被一般配方方法所配製。在之後的例子，除了本發明胜肽外，若適合可包括載體、賦形劑與原始做為藥物使用之此類而無特別限制。上述載體的例子為滅菌水、生理食鹽水、磷酸緩衝溶液與培養液體(culture fluid)與此類。更進一步而言，若必須，藥學組合物或物質可含安定劑、懸液劑、防腐劑、界面活性劑與此類。本發明之藥學組合物或試劑可用來抗癌目的。

可將本發明之胜肽組合來製備，其係由兩個或更多個本發明之胜肽所組成，以 *in vivo* 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。胜肽組合可為雞尾酒形式或可使用標準技術彼此結合。例如，胜肽可被化學連接或表現如一單一融合多胜肽序列。結合之胜肽可為相同或不同。藉由投予本發明之胜肽，藉由 HLA 抗原，高密度呈現胜肽於抗原呈現細胞上，之後對形成於呈現胜肽與 HLA 抗原之間的複合物專一反應的細胞毒殺性 T 淋巴球被誘導。或者，抗原呈現細胞（例

如，樹突細胞）被從個體移出且之後以本發明胜肽刺激以獲得呈現本發明任何胜肽於其表面上之抗原呈現細胞。將這些抗原呈現細胞再投予至個體以誘導在個體中之細胞毒殺性 T 淋巴球，且因此可增加了朝向腫瘤相關之內皮細胞的侵犯。

包含一本發明任何胜肽為活性成分之治療及/或避免癌症之藥學組合物或試劑也可包含一已知有效建立細胞免疫力的佐劑。或者藥學組合物或試劑可與其他活性成分一起被投予，或可被以配製成細粒被投予。佐劑指一化合物，當與具有免疫活性之蛋白質一起投予（或依次）時，其增強抗蛋白質之免疫反應。於此考慮之佐劑，包括於文獻 (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89) 中所描述的那些。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、沙門氏菌毒素、佛氏不完全佐劑 (Incomplete Freund's adjuvant, IFA)、佛氏完全佐劑 (Complete Freund's adjuvant, CFA) 與此類，但不限於其。

此外，於微脂體 (liposome) 配方與細粒配方中，胜肽連結至幾個微米直徑之小珠，且於配方中，可便利地使用連結至胜肽之脂質。

在本發明另一實施例中，本發明胜肽也可以一藥學上可接受之鹽類被投予。較佳之鹽類的例子包括具有鹼金屬之鹽、具金屬之鹽、具有機鹼之鹽、具有機酸之鹽與具無機酸之鹽。如此處所使用，“藥學上可接受之鹽類”意指維持化合物生物有效性與特性及獲得自與無機酸或鹼，例

如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲基磺酸(methanesulfonic acid)、乙基磺酸(ethanesulfonic acid)、對甲苯磺酸(*p*-toluenesulfonic acid)、水楊酸(salicylic acid)與其類似物反應的那些鹽。

在一些實施例中，本發明之藥學組合物或試劑更包括一成分其啟動細胞毒殺性 T 淋巴球。已定義脂質為可 *in vivo* 啟動抗病毒抗原之細胞毒殺性 T 淋巴球的成分。例如，可將棕櫚酸殘基黏附至離胺酸殘基之 ϵ -與 α -胺基，且之後連結至本發明之一胜肽。之後脂質胜肽可被直接投予於微胞或顆粒中、併入微脂體或乳化於一佐劑中。如脂質啟動細胞毒殺性 T 淋巴球反應之另一例子，*E. coli* 脂蛋白，例如三軟脂酸-S 甘油半胱氨酰-絲氨酰基絲氨酸(tripalmitoyl-S-glycerylcysteiny-l-seryl-serine, P3C SS)可使用來啟動細胞毒殺性 T 淋巴球，當共價附加至一合適之胜肽（參見，例如 Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4）。

投藥之方法可為口服、皮膚內、皮下、靜脈內注射或此類，以及全身投藥或局部投藥至標的位置的鄰近區域。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。本發明之胜肽劑量可適合地調整根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法、與此類，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，且可於數天至數個月投藥一次。熟悉此技藝人士可適合地選擇一合適的劑量。

(2) 藥學組合物包含多核苷酸為活性成分

本發明之藥學組合物或試劑也可包含編碼出此處揭露之胜肽的核酸於一可表達之形式中。此處措辭“於一可表達之形式中”意指多核苷酸，當引入一細胞，*in vivo* 會被表現成一誘導抗腫瘤免疫力之多胜肽。在一代表實施例中，感興趣之多核苷酸的核酸序列包括對於表現多核苷酸而言必須之調控要素。可裝配多核苷酸以達到穩定插入目標細胞之基因體（參見，例如敘述 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12, 對於同源重組卡匣載體之敘述。也參見，例如 Wolff *et al.*, Science 1990, 247: 1465-8; 美國專利號：5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 與 WO 98/04720）。DNA 輸送技術的例子包括“裸 DNA”、經促進（bupivacaine、聚合物、胜肽居中之）之輸送、陽離子脂質複合物與顆粒居中之（“基因槍”）或壓力居中之傳送（參見，例如美國專利號：5,922,687）。

本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體來表現。表現載體的例子包括減弱病毒宿主，例如牛痘或禽痘。此方法包括使用牛痘病毒，例如為一載體以表現編碼胜肽之核苷酸序列。藉由引入一宿主，此重組之牛痘病毒表現致免疫胜肽且因此引起一免疫反應。於免疫步驟中為有效之牛痘載體與方法敘述於，例如美國專利號：4,722,848。另一載體包括 BCG (Bacille Calmette Guerin)。BCG 載體敘述於 Stover *et al.*, Nature 1991, 351: 456-60 中。對於治

療投藥或免疫有用之其他多種載體，例如腺與腺病毒相關之載體、反轉錄病毒載體、傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhi*) 載體、經解毒之炭疽毒素載體與其類似為明顯的。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。

輸送多核苷酸進入一病患可為直接，於其例子中，個體直接暴露於一攜帶多核苷酸之載體，或為間接，於其例子中，細胞首先 *in vitro* 以感興趣之多核苷酸轉形，之後將細胞轉殖進入病患。此兩方法分別為已知，為 *in vivo* 與 *ex vivo* 基因治療。

基因治療之方法之大體回顧，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)。應用於本發明之於重組 DNA 技術中一般熟知的方法被於編者 Ausubel *et al.*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; 與 Krieger, in *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual* (Stockton Press, NY, 1990) 所述。

投藥之方法可為口服、皮膚內、皮下、靜脈內注射或此類，以及全身投藥或局部投藥至標的位置的鄰近區域提

供使用。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。於適合載體中或於以編碼出本發明之胜肽的多核苷酸轉形之細胞中的多核苷酸的劑量可適合地調整，根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法、與此類，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，且可於每數天一次至每數個月一次投藥。熟悉此技藝人士可適合地選擇一合適的劑量。

X. 使用胜肽、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球的方法

可使用本發明之胜肽與多核苷酸來誘導抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球。也可使用本發明之外吐小體與抗原呈現細胞來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。胜肽、多核苷酸、外吐小體與抗原呈現細胞可與任何其他化合物結合使用，只要額外之化合物不抑制細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。因此，任何上述之本發明藥學組合物或試劑可用來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。除此之外，包括胜肽與多核苷酸的那些也可用來誘導抗原呈現細胞，如下所討論。

(1) 誘導抗原呈現細胞的方法

本發明提供使用本發明之胜肽或多核苷酸來誘導具有高細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法。

本發明之方法包括 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸的步驟。例如，*ex vivo* 將抗原呈現細胞與胜肽接觸的方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；以及

b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與胜肽接觸。

抗原呈現細胞並不限於特定種類之細胞，且包括樹突細胞、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B細胞與活化之 T 細胞，已知其表現蛋白質(proteinaceous)抗原於其細胞表面以被淋巴球所辨認。較佳為，可使用樹突細胞，由於它們於抗原呈現細胞中最強的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。本發明任一胜肽可以它們本身或與本發明其他胜肽或來自除了 TTLL4 之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發胜肽一起被使用。

另一方面，當投予本發明胜肽至一個體時，抗原呈現細胞 *in vivo* 與胜肽接觸，因此於個體之體內誘導具有高細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。因此，本發明方法包括投予本發明胜肽至一個體以於一個體之體內誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。相似地，當以可表達之形式投予本發明多核苷酸至一個體時，本發明胜肽被表現且 *in vivo* 與抗原呈現細胞接觸，因此於個體之體內誘導具有高細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。因此，本發明包括投予本發明多核苷酸至一個體以於個體之體內誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。措辭“可表達之形式”被描述於上述段落“IX. 藥學組合物，(2) 藥學組合物包含多核苷酸為活性成分”中。

本發明也可包括將本發明一多核苷酸引入一抗原呈現細胞以便誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈

現細胞的步驟。例如，方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；以及

b：將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入。

可如前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來執行步驟 b。

或者本發明提供一製備一專一誘導抗 TTLL4 之細胞毒殺性 T 淋巴球活性的抗原呈現細胞的方法，其中該方法可包括下列步驟之一：

(a) 將抗原呈現細胞與本發明一胜肽 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 接觸；以及

(b) 將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入抗原呈現細胞。

或者，本發明提供誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法，其中此方法包括擇自下列中之步驟：

(a) 將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸；以及

(b) 將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入抗原呈現細胞。

本發明方法可於 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 執行。較佳為本發明方法可於 *in vitro* 或 *ex vivo* 執行。用於具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞之誘導的抗原呈現細胞，可較佳為表現 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原之抗原呈現細胞。此類抗原呈現細胞可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自其 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2 之個體獲

得的周邊血液單核細胞來製備。藉由本發明所誘導之抗原呈現細胞可為表現本發明胜肽與 HLA 抗原（HLA-A24 或 HLA-A2 抗原）之複合物於其表面之抗原呈現細胞。當藉由本發明方法誘導之抗原呈現細胞被投予至一個體以在此個體中誘發抗癌症免疫反應時，個體較佳為其抗原呈現細胞被取得的同一個。然而，個體可與抗原呈現細胞提供者為不同一個，只要個體具有與抗原呈現細胞提供者相同之 HLA 型。

在另一實施例中，本發明提供用於誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的試劑或組合物，且此類試劑或組合物包括一或多個本發明胜肽或多核苷酸。

在另一實施例中，本發明提供本發明胜肽或編碼出此胜肽之多核苷酸於製造配製來誘導抗原呈現細胞之試劑或組合物中的用途。

或者，本發明更提供本發明胜肽或編碼出此胜肽之多核苷酸對於在誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞中的用途。

(2) 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法

本發明也提供使用本發明胜肽、多核苷酸或外吐小體或抗原呈現細胞來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法。

本發明也提供使用編碼出一多胜肽之多核苷酸來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，此多胜肽具形成一 T 細胞受體次單位的能力，而此 T 細胞受體次單位辨認一本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。較佳為，誘導細胞毒殺性 T 淋巴

球的方法包括至少一步驟擇自由下列之中：

a：將一 CD8 陽性 T 細胞與一抗原呈現細胞及/或一外吐小體接觸，該抗原呈現細胞及/或該外吐小體表現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面，以及

b：將一多核苷酸引入一 CD8 陽性 T 細胞，其中該多核苷酸編碼出一多胜肽，該多胜肽具形成一 T 細胞受體次單位的能力，而該 T 細胞受體次單位辨認一本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。

當本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體被投予至一個體時，於個體體內誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且以表現 TTLL4 之癌細胞為目標之免疫反應的強度增強。因此，本發明之方法包括將本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體投予至一個體的步驟。

或者，藉由 *ex vivo* 或 *in vivo* 使用它們，也可誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且在誘導細胞毒殺性 T 淋巴球後，經活化之細胞毒殺性 T 淋巴球可返回至個體。例如，方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；

b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與胜肽接觸；以及

c：將步驟 b 之抗原呈現細胞與 CD8 陽性細胞共培養。

於上述步驟 c 中要與 CD8 陽性 T 細胞共培養之抗原呈現細胞也可藉由將一包括本發明多核苷酸之基因轉移進入抗原呈現細胞，如於前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來製備，然而，本發明並不限於此，且因此包括任何有

效表現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於表面的抗原呈現細胞。

代替此種抗原呈現細胞，也可使用呈現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上的外吐小體。換句話說，本發明可包括將呈現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面的外吐小體與本發明胜肽共培養之步驟。此種外吐小體可藉由前述於段落“V. 外吐小體”中之方法來製備。

此外，藉由將一包括編碼出與本發明一胜肽結合之 T 細胞受體次單元的多核苷酸的基因引入 CD8 陽性 T 細胞也可誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。如於前述段落“VIII. T 細胞受體(TCR)”中所述可執行此轉導。

本發明方法可於 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 執行。較佳為本發明方法可於 *in vitro* 或 *ex vivo* 執行。用於細胞毒殺性 T 淋巴球之誘導的 CD8 陽性 T 細胞，可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自一個體獲得的周邊血液單核細胞來製備。在較佳實施例中，CD8 陽性 T 細胞的提供者可為其 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A2 之個體。藉由本發明所誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球，其可辨認可為表現本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物於其表面之細胞。當藉由本發明方法誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球被投予至一個體以在此個體中誘發抗癌症免疫反應時，個體較佳為其 CD8 陽性 T 細胞被取得的同一個。然而，個體可與 CD8 陽性 T 細胞提供者為不同一個，只要個體具有與 CD8 陽性 T 細胞提供者相同之 HLA 型。

此外，本發明也提供製造一誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之藥學組合物或試劑的方法或製程，其中該方法包括將本發明之胜肽與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。

在另一實施例中，本發明提供用於誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的試劑或組合物，其中試劑或組合物包括本發明一或多個胜肽、本發明一或多個多核苷酸、一或多個抗原呈現細胞或外吐小體。

在另一實施例中，本發明提供本發明胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體於製造配製來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之試劑或組合物中的用途。

或者，本發明更提供本發明胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體對於在誘導細胞毒殺性 T 淋巴球中的用途。

XI. 誘導免疫反應的方法

又，本發明提供誘導抗 TTLL4 相關疾病之免疫反應的方法。適合的疾病包括癌症，其例子包括，但不限於膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。

本發明方法包括投予含任何本發明胜肽或編碼出其之多核苷酸的物質或組合物的步驟。本發明方法也考慮投予表現任何本發明胜肽之外吐小體或抗原呈現細胞。細節參見“IX. 藥學組合物”之項目，特別是敘述本發明組合物為疫苗之用途的部分。此外，可被使用於本發明誘導免疫

反應之方法的本發明外吐小體與抗原呈現細胞，被詳細描述在前之於“V. 外吐小體”、“VI. 抗原呈現細胞”與“X. 使用胜肽、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球的方法”之(1)與(2)的項目。

本發明也提供製造一誘導免疫反應之藥學組合物或物質的方法或製程，其中該方法可包括將本發明之胜肽與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。

或者，本發明方法可包括投予本發明一疫苗或藥學組合物或物質的步驟，本發明疫苗或藥學組合物包含：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出如此處揭露之此種胜肽的核酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體；或

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

在本發明內容中，以這些活性成份可治療過度表現 TTLL4 之癌症。此類癌症的例子包括，但不限於膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。因此，在包括活性成分之疫苗或藥學組合物或物質的投予前，其較佳為確認於要被治療之個體中 TTLL4 之表現程度是否被提高。因此，在一實施例中，本發明提供治療於一需要之病患中（過度）表現 TTLL4 之癌症的方法，此類方法包括步驟：

i) 測定獲得自具有癌症要治療之個體的生物樣本中的 TTLL4 表現程度；

ii) 與正常控制組比較 TTLL4 表現程度；以及

iii) 投予擇自由上述 (a)至(d)所組成之群組的至少一成份至與正常控制組相較具有過度表現 TTLL4 之癌症的個體。

或者，本發明也可提供包含擇自上述(a)至(d)中之群組的至少一成份的疫苗或藥學組合物，其要被投予至具有過度表現 TTLL4 之癌症的個體中。換句話說，本發明更提供鑑定要被以本發明 TTLL4 多胜肽治療之個體的方法，此類方法包括測定來自個體之生物樣本中的 TTLL4 表現程度的步驟，其中與基因之正常控制程度相較，此程度增加指出個體可具有可以本發明 TTLL4 多胜肽治療之癌症。本發明治療癌症的方法於以下更詳細敘述。

可將任何源自個體之細胞或組織用於 TTLL4 表現之測定，只要其包括 TTLL4 之目標轉錄或轉譯產物。適合樣本的例子包括，但不限於身體組織或液體、例如血液、唾液與尿液。較佳為，生物樣本包含一細胞族群，其包括一上皮細胞，更佳為源自個體之細胞或組織包含一細胞族群，其包括一上皮細胞，更佳為一癌症上皮細胞或一來自被懷疑癌化之組織的上皮細胞。此外，若需要，細胞可自所獲得之身體組織或液體被純化，且之後使用為源自個體之樣本。

要藉由本發明治療之個體較佳為一哺乳類動物。示範

之哺乳類動物包括，但不限於，例如，人類、非人類靈長類動物、小鼠、大鼠、狗、貓、馬與牛。

根據本發明，可測定獲得自一個體之生物樣本中的 TTLL4 表現程度。使用本技術領域已知方法可於轉錄（核酸）產物程度測定表現程度。例如，藉由雜合方法（例如，北方雜合）使用探針可將 TTLL4 的 mRNA 定量。可於一晶片或陣列上執行偵測。陣列之使用較佳可為用於偵測 TTLL4 表現程度。利用 TTLL4 的序列資訊，熟悉此技藝人士可製備此種探針。例如，TTLL4 的 cDNA 可被使用為探針。若需要，可以適合之標誌來標誌探針，例如染劑、螢光物質與同位素，且基因的表現程度可被偵測為雜合標誌的強度。

此外，藉由擴大偵測方法（amplification-based detection method）（例如，RT-PCR）使用引子可將 TTLL4 的轉錄產物進行定量。根據基因之可獲得序列資訊可製備此種引子。

特別是，用於本方法之探針或引子於嚴厲（stringent）、適度嚴厲、低嚴厲條件下雜合至 TTLL4 的 mRNA。如此處使用，措辭“嚴厲（雜合）條件”意指在此在條件下探針或引子會雜合至其目標序列，而不是其他序列。嚴厲條件為序列依賴（sequence-dependent），且在不同環境下會不同。比起較短之序列，於較高溫度下觀察到較長序列之特定雜合。一般而言，在一定義之離子強度與 pH 下所選擇之嚴格條件的溫度為低於一特定序列之熔點（ T_m ）約 5°C。 T_m 為溫度（在一定義之離子強度與 pH 與核酸

濃度下)，於其下在平衡下 50% 之與目標序列互補的探針雜合至目標序列。由於目標序列通常存在過量，所以於 T_m ，在平衡下 50% 之探針被佔據。一般而言，嚴苛條件為於其中鹽濃度低於 1.0 M 鈉離子，一般約 0.01 至 1.0 M 鈉離子（或其他鹽）於 pH 7.0 至 8.3，且對於短探針或引子（例如，10 至 50 個核苷酸）而言溫度為至少約 30°C，對於較長探針或引子而言溫度為至少約 60°C。也可以添加去穩定試劑（destabilizing substances），例如甲醯胺（formamide）來達到嚴苛條件。

本發明之探針或引子一般為一實質上經純化之寡核苷酸。寡核苷酸一般包括核苷酸序列之一區域，其在嚴苛條件下雜合至至少約 2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50 或 25 包括一 TTTL4 序列之一核酸之連續意義股（consecutive sense strand）核苷酸序列，或包括一 TTTL4 序列之一核酸之反意義股（anti-sense strand）核苷酸序列，或這些序列之自然發生突變體。特別是，例如，在一較佳實施例中，一於長度具有 5-50 之寡核苷酸可被使用為用來擴大要被偵測之基因的一引子。更佳為，可以於長度具有 15-30b 之寡核苷酸探針或引子來偵測 TTTL4 基因之 mRNA 或 cDNA。大小的範圍始於至少 10 個核苷酸、至少 12 個核苷酸、至少 15 個核苷酸、至少 20 個核苷酸、至少 25 個核苷酸、至少 30 個核苷酸，且探針與引子延伸大小始於 5-10 個核苷酸、10-15 個核苷酸、15-20 個核苷酸、20-25 個核苷酸與 25-30 個核苷酸。在較佳實施例中，

寡核苷酸探針或引子的長度可被擇自 15-25。藉由使用此種寡核苷酸探針或引子之用於基因偵測的分析程序、裝置或試劑為本技術領域所熟知(例如,寡核苷酸陣列或 PCR)。在這些分析中,探針或引子也可包括標籤(tag)或連結器(linker)序列。此外,可以可偵測之標誌或要被捕捉之親合配體來修飾探針或引子。或者在雜合偵測程序中,於長度具有少數百的鹼基(例如,約 100-200)至少數千(kilo)(例如,約 1000-2000)之鹼基的多核苷酸可被用於一探針(例如,北方墨點分析或 cDNA 微陣列分析)。

或者,為了本發明之診斷可偵測轉譯產物。例如,可偵測 TTLL4 蛋白質(序列辨識號:80)或其免疫活性片段之量。測定作為轉錄產物之蛋白質的量的方法包括免疫分析方法,其使用一抗體專一辨認此蛋白質。抗體可為單株或多株。此外,抗體之任何片段或修飾(例如嵌合型抗體(chimeric antibody)、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)可被用來偵測,只要片段或經修飾之抗體維持對 TTLL4 蛋白質的結合能力。本發明也提供抗本發明胜肽與其片段的這類抗體。這些用於蛋白質偵測之這些種類的抗體的製備方法為本技術領域所熟知,且任何方法可被使用於本發明中以製備此種抗體與其等同物(equivalent)。

如根據 TTLL4 基因轉譯產物偵測 TTLL4 基因之表現程度的另一方法,使用抗 TTLL4 蛋白質之抗體經由免疫組織化學(immunohistochemical)分析可測量到染色強度。即,於此測量中,強的染色指出經增加之蛋白質的存在/程度,

且同時 TTLL4 基因之高表現程度。

可確認於癌症細胞中，目標基因，例如 TTLL4 基因的表現程度之為被提升，若從目標基因之控制組程度（例如，於正常細胞中的程度）增加，例如 10%、25%、或 50%，或增加大於 1.1 倍、大於 1.5 倍、大於 2.0 倍、大於 5.0 倍、大於 10.0 倍或更多。

使用先前自一個體/其疾病階段（癌的或非癌的）為已知的個體收集並儲存的樣本控制組之程度可與癌細胞同時測定。此外，獲得自具有癌症要被治療之一器官的非癌區域的正常細胞被使用為正常控制組。或者，根據獲得自分析先前測定之來自其疾病程度已知之個體之樣本中之 TTLL4 基因的表現程度的結果，藉由統計方法，可測定控制組之程度。此外，控制組程度可為來自先前測試細胞之表現輪廓的資料庫。並且，根據本發明一方面於一生物樣本中之 TTLL4 基因的表現程度，可與多個控制組程度比較，其控制組程度被測定自多個參考樣本。較佳為使用一控制組程度測定自一參考樣本，其來自一組織形式相似於源自個體生物樣本之組織形式。此外，較佳為使用具有已知疾病階段之群組中的 TTLL4 基因的表現程度的標準值（standard value）。標準值可獲得自本技術領域任何已知的方法。例如，平均值 \pm 2 標準差或平均值 \pm 3 標準差，可被使用為標準值。

本發明之內容中，測定自己知為非癌症之生物樣本的控制組程度被意指為一“正常控制組程度”。另一方面，

控制組程度測定自一癌的生物組織，其意指為一“癌的控制組程度”。可將介於樣本表現程度與控制組程度間的不同標準化至控制核酸的表現程度，例如管家基因(housekeeping gene)，根據細胞之癌症與非癌程度已知其表現程度並無不同。示範之控制基因包括，但不限於 β 肌動蛋白(beta-actin)、甘油醛-3-磷酸去氫酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)與核糖蛋白 P1。

當與正常控制組程度相較 TTLL4 基因的表現程度被增加或相似/等同於癌控制組程度，可診斷個體為具有癌症要被治療。

本發明也提供(i) 診斷是否一個體被懷疑具有要被治療之癌症，及/或(ii) 選擇癌症治療之個體的方法，此種方法包括步驟：

a) 測定在生物樣本中，TTLL4 的表現程度，生物樣本獲得自被懷疑具有要被治療之癌症的個體；

b) 與正常控制組比較 TTLL4 之表現程度；

c) 若 TTLL4 之表現程度與正常控制組程度相較被增加，則診斷個體為具有要被治療之癌症；以及

d) 若個體於步驟 c) 中被診斷為具有要被治療之癌症，則選擇要癌症治療之個體。

或者，此種方法可包括步驟：

a) 測定在生物樣本中，TTLL4 的表現程度，生物樣本獲得自被懷疑具有要被治療之癌症的個體；

- b) 與癌症控制組比較 TTLL4 之表現程度；
- c) 若 TTLL4 之表現程度相似或等於癌症控制組程度，則診斷個體為具有要被治療之癌症；以及
- d) 若個體於步驟 c) 中被診斷為具有要被治療之癌症，則選擇癌症治療之個體。

本發明也提供一診斷套組以診斷或測定一個體其為或被懷疑為遭受可被以本發明 TTLL4 多胜肽治療之癌症，其也在評估及/或監控癌症免疫治療的能效或應用性中為有用的。較佳為，癌症包括，但不限於膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。更特別的是，套組較佳包括至少一用以偵測來自個體細胞中之 TTLL4 基因的表現程度的試劑，其試劑可被擇自下列群組：

- (a) 一試劑用以偵測 TTLL4 基因的 mRNA；
- (b) 一試劑用以偵測 TTLL4 蛋白質或其免疫活性片段；以及
- (c) 一試劑用以偵測 TTLL4 蛋白質的生物活性。

適合用於 TTLL4 基因之 mRNA 之偵測的試劑的例子可包括核酸其專一結合或辨認 TTLL4 mRNA，例如，具有對於 TTLL4 mRNA 之一部分互補的序列的寡核苷酸。這些種類之寡核苷酸以專一於 TTLL4 mRNA 之引子與探針為例子。根據本技術領域所熟知的方法可製備這些種類之寡核苷酸。若需要，用以偵測 TTLL4 mRNA 之試劑可被固定於固體基質

(matrix)上。此外，大於一個之用以偵測 TTLL4 mRNA 的試劑可被包含於套組中。

另一方面，用以偵測 TTLL4 蛋白質或其免疫活性片段之適合試劑的例子可包括對於 TTLL4 蛋白質或其免疫活性片段的抗體。抗體可為單株或多株。此外，抗體之任何片段或修飾（例如嵌合型抗體(chimeric antibody)、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等）可被用來作為試劑，只要片段或經修飾之抗體維持對 TTLL4 蛋白質或其免疫活性片段的結合能力。製備用於蛋白質偵測之這些種類之抗體的方法為本技術領域所熟知，且任何方法可被使用於本發明中以製備此種抗體與其等同物(equivalent)。另外，可以訊號產生分子經由直接連接或一間接標誌技術來將抗體進行標誌。標誌與標誌抗體之方法與偵測抗體對其目標的結合為本技術領域所熟知，且任何標誌與方法可被使用於本發明。另外，大於一個之用於偵測 TTLL4 蛋白質的試劑可被包括於套組中。

套組可包含多於一個之前述試劑。套組可更包括用以結合對於 TTLL4 基因之探針或對於 TTLL4 胜肽之抗體的固體基質與試劑、用以培養細胞之培養基與容器、正與負控制組試劑與用以偵測對於 TTLL4 胜肽之抗體的二次抗體。例如，獲得自沒有癌症或遭受癌症或否之個體的組織樣本可作為有用的控制組試劑。本發明之套組可更包括商業或使用者角度所需之其他材料，包括緩衝溶液、稀釋液、濾器、注射針、注射器與具有使用之操作指南的包裝插入物

(例如，書面、磁帶或 CD-ROM 等)。這些試劑或此類可保持於一具有標誌之容器。適合之容器包括瓶子、小玻璃瓶(vial)與試驗試管。容器可形成自多樣化之材料，例如玻璃或塑膠。

在本發明一實施例中，當試劑為抗 TTLL4 mRNA 之探針時，試劑可被固定於一固體基質上，例如一多孔條(porous strip)以形成至少一偵測位。多孔條之測量或偵測區可包括複數個位置，各含有一核酸(探針)。一測試條也可含有負及/或正控制組的位置。或者，控制組之位置可位於與測試條分離之一條。視需要而定，不同之偵測位可包含不同量之經固定之核酸，即一較高量於第一偵測位中且一較低含量於隨後之位置中。藉由測試樣本的加入，顯示可偵測訊號之一些位置提供一於樣本中 TTLL4 mRNA 存在之量的定量指示。偵測位可被設置於任何適合之可偵測形狀且一般為在橫跨一測試條之寬度的條狀物或點的形狀中。

本發明之套組可更包括一正控制組樣本或 TTLL4 標準樣本。藉由收集 TTLL4 正之樣本可製備本發明之正控制組樣本且之後分析它們的 TTLL4 程度。或者，可將經純化之 TTLL4 蛋白質或多核苷酸加至不表現 TTLL4 之細胞以形成正樣本(positive sample)或 TTLL4 標準樣本。於本發明中，經純化之 TTLL4 可為重組蛋白質。正控制組樣本之 TTLL4 程度為，例如，大於臨界值(cut off value)。

在一實施例中，本發明更提供一診斷套組，包括一蛋白質或其一部份蛋白質，具專一辨認本發明抗體或其片段

之能力。

本發明之部分胜肽的例子包括多胜肽，其係由在本發明蛋白質之胺基酸序列中之至少 8 個，較佳 15 個、更佳 20 個連續胺基酸所組成。使用本發明之一蛋白質或一胜肽（多胜肽），藉由偵測於一樣本（例如，血液、組織）中之一抗體可診斷癌症。製備本發明蛋白質與胜肽的方法如上所述。

如上所述，藉由測定介於抗 TTLL4 抗體與其在對應控制組中之的量的差異可執行本發明診斷癌症之方法。若個體之細胞或組織含有抗基因之表現產物(TTLL4)抗體且抗 TTLL4 抗體的量被測定大於在相較於其在正常控制組之程度中的截斷值時，個體被懷疑遭受癌症。

在另一實施例中，本發明之診斷套組可包括本發明之胜肽與結合至其之 HLA 分子。使用抗原胜肽與 HLA 分子偵測抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的方法已被建立（例如，Altman JD *et al.*, Science. 1996, 274(5284): 94-6）。因此，本發明之胜肽與 HLA 分子的複合物可應用至偵測腫瘤抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的偵測方法，藉此使早期偵測癌症之復發及/或轉移為可能。此外，其可被用於適合包含本發明胜肽為一活性成分之藥物的個體的篩選，或藥物治療功效的評估。

特別是，根據已知方法（參見，例如 Altman JD *et al.*, Science. 1996, 274(5284): 94-6），可製備放射標誌之 HLA 分子與本發明胜肽之寡聚複合物，例如四聚體。伴隨

使用複合物，可執行診斷，例如藉由將來自被懷疑遭受癌症之個體的周邊血液淋巴球(peripheral blood lymphocytes)中之抗原-胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球進行定量。

本發明更提供藉由使用此處敘述之胜肽抗原決定位，用以評估免疫反應之診斷試劑。在本發明一實施例中，如上述之 HLA-A24 或 HLA-A24 限制胜肽被使用為評估或預測一個體之免疫反應的試劑。藉由將免疫抗原(immunogen)與免疫活性細胞(immunocompetent)*in vivo* 或 *in vitro* 接觸可誘導要被評估之免疫反應。在較佳實施例中，用以評估一免疫反應的免疫活性細胞可選擇自周邊血液、周邊血液淋巴球(PBL)、與周邊血液單核細胞(PBMC)中。收集或分離此類免疫活性細胞的方法為本技術領域所熟知。在一些實施例中，可導致抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的產生的任何試劑可使用為試劑，而細胞毒殺性 T 淋巴球辨認與結合至胜肽抗原決定位。胜肽試劑可必須不被使用為免疫抗原。用於此類分析之分析系統包括相當新近之技術發展，例如四聚體，對細胞內淋巴激素(lymphokines)之染色與干擾素釋放分析或 ELISPOT 分析。在較佳實施例中，要被以胜肽試劑接觸之免疫勝任細胞可為抗原呈現細胞，其包括樹突細胞。

例如，本發明胜肽可使用於四聚體染色分析以評估為了抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球存在之周邊血液單核細胞，在暴露至腫瘤抗原或一免疫抗原後。HLA 四聚體複合

物可被使用來直接顯現抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球（參見，例如 Ogg *et al.*, Science 279: 2103-2106, 1998; 及 Altman *et al.*, Science 174 : 94-96, 1996），並測定於周邊血液單核細胞之樣本中的抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球族群的頻率。使用本發明胜肽之四聚體試劑可如下被產生。

在對應之 HLA 重鏈與 $\beta 2$ -微球蛋白存在下重新折疊結合至 HLA 之胜肽，以產生三分子複合物。在複合物中，重鏈之羧端為經生物素化於一預先設計進入蛋白質之位置。之後將卵白素加至複合物以形成由三分子複合物與卵白素 (streptavidin) 所組成之四聚體。藉由以螢光標誌卵白素的方式，可使用四聚體來對抗原呈現細胞染色。之後可鑑定細胞，例如藉由流式細胞技術。此類分析可被用於診斷與預後 (prognostic) 目的。藉由此程序鑑定之細胞也可被用於治療目的。

本發明也提供評估免疫收回反應 (immune recall responses) 之試劑（參見，例如 Bertoni *et al.*, J. Clin. Invest. 100 : 503-513, 1997 與 Penna *et al.*, J Exp. Med. 174 : 1565-1570, 1991），其包括本發明之胜肽。例如，為了抗原-專一細胞毒殺性 T 淋巴球的存在，使用特定專一胜肽，可分析來自具有要被治療之癌症之個體的病患 PBMC 樣本。藉由培養 PBMC 與以本發明胜肽刺激細胞可評估含單核細胞之血液樣本。在適合之培養期間後，例如為了細胞毒殺性 T 淋巴球活性，分析經擴張之細胞族群。

胜肽也可使用為評估一疫苗功效之試劑。使用例如上述方法可分析獲自一以免疫抗原接種之病患的 PBMC。病患為經 HLA 分型，且選擇辨認表現於病患中之對偶基因 (allele) 專一分子的胜肽抗原試劑以分析。藉由於 PBMC 樣本中之抗原決定位-專一細胞毒殺性 T 淋巴球的存在，可指出疫苗之免疫抗原性 (immunogenicity)。

本發明之胜肽也用來製造抗體，使用本技術領域已熟知的技術（參見，例如，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; 與 Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989），其可有效作為診斷或監測癌症之試劑。此類抗體可包括辨認於 HLA 分子內容中之胜肽的那些，即，結合至胜肽-MHC 複合物的抗體。

本發明胜肽或組合物具有一些額外之用途，其之一一些為此處所述。例如，本發明提供診斷或偵測以 TTLL4 免疫活性胜肽之表現為特徵的一疾病。這些方法包含測定於一生物樣本中之 TTLL4 HLA 結合胜肽的表現或 TTLL4HLA 結合胜肽之一複合物與 HLA class I 分子。藉由以對於胜肽或複合物之結合作伙伴 (binding partner) 分析可測定或偵測一胜肽之表現或胜肽與 HLA class I 分子之複合物。在一較佳實施例中，對於胜肽或複合物之結合作伙伴為一抗體其辨認且專一結合至胜肽。藉由使用 TTLL4 引子之標準 PCR 放大步驟也可測試於一生物樣本，例如一腫瘤切片中之 TTLL4 的表現。腫瘤表現之例子於此被呈現且示範之用於

TTLL4 放大的條件與引子的更進一步揭露可被發現於 W02003/27322 中。

較佳為，診斷方法包含將分離自一個體的生物樣本與專一於 TTLL4 HLA 結合胜肽之一試劑接觸以偵測於生物樣本中之 TTLL4 HLA 結合胜肽的存在。如此處所使用“接觸”意指以有效接近試劑方式放置生物樣本且在適合之條件下（例如，濃度、溫度、時間、離子強度），以允許介於試劑與存在生物樣本中之 TTLL4 HLA 結合胜肽的專一互相作用。一般而言，將試劑接觸生物樣本之條件為熟悉此技藝人士所知之條件以促進介於分子及於生物樣本中之其同類物(cognate)（例如，一蛋白質與其受體同類物、一抗體與其蛋白質抗原同類物、一核酸與其互補序列同類物）之間的專一互相作用。促進介於分子與其同類物之間的專一互相作用的示範條件敘述於 Low et al 所提出之美國專利號：5,108,921。

可在 *in vivo* 或 *in vitro* 之一或兩者執行本發明之診斷方法。因此，在本發明中生物樣本可位於 *in vivo* 或 *in vitro* 中。例如，生物樣本可為一 *in vivo* 組織且專一於 TTLL4 免疫活性多胜肽的試劑可被用來偵測於組織中此類分子的存在。或者，可 *in vitro* 收集或分離生物樣本（例如血液樣本、腫瘤切片、組織萃取物）。在一特別較佳實施例中，生物樣本可為一含細胞樣本，更佳為一樣本含有收集自要被診斷或測試之個體的腫瘤細胞。

或者，藉由一方法可執行診斷，此方法藉由以螢光素

(fluorescein)標誌 HLA 多聚複合物染色允許抗原-專一 T 細胞的直接定量 (例如, Altman, J. D. *et al.*, 1996, Science 274 : 94; Altman, J. D. *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 10330)。也已提供細胞內淋巴激素(lymphokines)之染色與干擾素釋放分析或 ELISPOT 分析。四聚體染色、細胞內淋巴激素染色與 ELISPOT 分析皆顯露比一般分析靈敏至少多 10 倍(Murali-Krishna, K. *et al.*, 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. *et al.*, 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. *et al.*, 1998, Curr. Biol. 8: 413)。也可使用五聚體 (例如, US 2004-209295A)、右聚體(dextramer)(例如, WO 02/072631)、鏈聚體(streptamer)(例如, Nature medicine 6. 631-637 (2002))。

例如, 在一些實施例中, 本發明提供診斷或評估被投予本發明至少一 TTLL4 胜肽之個體的免疫反應的方法, 方法包括步驟:

(a) 在適合誘導專一於免疫原之細胞毒殺性 T 淋巴球的條件下, 將免疫原與免疫活性細胞接觸;

(b) 偵測或測定於步驟(a)中所誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導程度; 以及

(c) 使個體之免疫反應與細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導程度互相關連。

在本發明中, 免疫原為(a) 擇自序列辨識號: 1、3 至 37 與 38 至 73 之胺基酸序列中的 TTLL4 胜肽、具有此種胺

基酸序列的胜肽與具有此種胺基酸序列於其中已被以 1、2 或更多胺基酸取代所修飾的胜肽的至少一個。於期間，適合誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球的條件為本技術領域所熟知。例如，可 *in vitro* 培養免疫活性細胞在免疫存在下以誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球。為了誘導免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球，可加入任何刺激因子於細胞培養物中。例如，IL-2 為細胞毒殺性 T 淋巴球誘導之較佳刺激因子。

在一些實施例中，可在治療前、期間及/或後執行監測或評估要被以胜肽癌症治療之個體的免疫反應的步驟。一般而言，在癌症治療的程序中，一再地將免疫原性胜肽投予至要被治療的個體。例如，可每週投予免疫原性胜肽達 3-10 週。因此，在癌症治療程序期間，可評估或監測個體之免疫反應。或者，對於癌症治療之評估或監測的步驟可在治療程序完成時。

根據本發明，當與控制組相較時，經增強之免疫原專一之細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導指出要被評估或診斷之個體免疫性地對已被投予之免疫原反應。用以評估免疫反應之適合的控制組包括，例如當免疫活性細胞未與胜肽接觸或與具有除了任何 TTLL4 胜肽之胺基酸序列的控制組胜肽（例如，隨機胺基酸序列）接觸時的細胞毒殺性 T 淋巴球的誘導程度。在一較佳實施例中，藉由將介於投予至個體之各個免疫原間的免疫反應進行比較，以序列專一方式來評估個體之免疫反應。特別是，甚至當將 TTLL4 胜肽之一

些種類的混合物投予至個體時，依據胜肽免疫反應可成多樣化。在此例子中，藉由將介於各個胜肽間的免疫反應進行比較，可確認出對於其個體顯示較高反應之胜肽。

XII. 抗體

本發明更提供抗體其結合至本發明胜肽。較佳抗體專一結合至本發明胜肽且不會結合（或微弱結合）至非本發明胜肽。或者抗體結合本發明胜肽與其同源物（homologs）。抗本發明胜肽之抗體可提供用途於癌症診斷與預後分析及成像方法（imaging methodologies）。相似地，對於在癌症病患中也表現或過度表現 TTLL4 程度而言，此類抗體可提供使用於其他癌症之治療、診斷，及/或預後。此外，細胞內表現之抗體（例如，單鏈抗體）可治療地提供效用於其中與 TTLL4 之表現相關的癌症中，與 TTLL4 之表現相關的癌症例子包括，但不限於，膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。

本發明也提供 TTLL4 蛋白質（序列辨識號：80）或其片段之偵測及/或定量的各種免疫活性分析，TTLL4 蛋白質（例如，序列辨識號：80）或其片段包括由擇自由序列辨識號：1、3 至 37 與 38 至 73 所組成之群組的胺基酸序列所組成的多胜肽。此類分析可包括一或多個具辨認及結合 TTLL4 蛋白質或其片段之能力之抗 TTLL4 抗體為適當的。在本發明內容中，與 TTLL4 多胜肽結合之抗 TTLL4 抗體，

較佳為辨認一多胜肽，此多胜肽係由擇自由序列辨識號：1、3 至 37 與 38 至 73 所組成之群組的胺基酸序列所組成。以抑制測試 (inhibition test) 可確認抗體之結合專一性。其為，在由序列辨識號：1、3 至 37 與 38 至 73 的胺基酸序列所組成之任何片段多胜肽存在下，當介於要被分析之抗體與全長之 TTLL4 胜肽之間的結合被抑制時，其顯示此抗體專一結合至片段。在本發明內容中，在包括，但不限於放射免疫分析 (radio-immunoassays)、免疫色層分析技術 (immuno-chromatograph technique)、酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)、酵素連結免疫螢光分析 (enzyme-linked immunofluorescent assays, ELIFA) 等之多種本技術領域熟知之免疫分析形式中執行此類免疫分析。

本發明之關於免疫，但非抗體分析也可包括 T 細胞致免疫性分析 (immunogenicity assay) (抑制或刺激) 與主要組織相容性複合物 (major histocompatibility complex, MHC) 結合分析。此外，本發明考慮具偵測表現 TTLL4 之癌症之能力的免疫成像分析，其例子包括，但不限於使用本發明之經標誌的抗體的放射顯像成像 (radio scintigraphic imaging) 方法。此類分析提供臨床較用於 TTLL4 表現之癌症偵測、監控與預後中，TTLL4 表現之癌症的例子，包括，但不限於，膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟

組織腫瘤與骨肉瘤。

本發明也提供結合至本發明胜肽的抗體。本發明抗體可使用於任何形式中，例如單株或多株抗體，且可更包括獲得自將動物，例如兔子，以本發明胜肽進行免疫之抗血清、所有類型之多株或單株抗體、人類抗體與由基因重組產生之人源化抗體。

使用為一抗原以獲得一抗體之本發明胜肽可來自任何動物種類，但較佳為來自哺乳動物，例如，人類、老鼠或大鼠，更佳為一人類。人類來源胜肽可獲得自此處揭露之核苷酸或胺基酸序列。

根據本發明，使用為免疫抗原之胜肽可為一完整之蛋白質或部分胜肽之蛋白質。部分胜肽可包括，例如，本發明之一胜肽之胺基(N)端或羧基(C)端片段。

此處，一抗體被定義為一蛋白質其與 TTLL4 胜肽之全長或片段反應。在一較佳實施例中，本發明之抗體可辨認 TTLL4 片段胜肽，其具有擇自由序列辨識號：1、3 至 37 與 38 至 73 所組成之群組的胺基酸序列。合成寡胜肽的方法為本技術領域所熟知。在合成後，在使用為免疫抗原(immunogen)前，胜肽可視需要被純化。在本發明內容中，寡胜肽（例如 9 或 10 員）可與載體結合或連結以增強致免疫性。鑰孔血藍蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin, KLH)被熟知為載體。結合鑰孔血藍蛋白與胜肽的方法為本技術領域所熟知。

或者，可將編碼出本發明一胜肽或其片段的一基因插

入一已知的表現載體，其之後被轉形至一宿主細胞，如於此所敘述。藉由任何標準方法，所需之胜肽或其片段可自宿主細胞之外部或內部被重新獲得，且之後可被使用為一抗原。或者，可將表現胜肽之整個細胞或其細胞萃出物或一化學合成胜肽使用為抗原。

可以抗原將任何哺乳動物進行免疫，但較佳為考慮與用來細胞融合之親代細胞的相容性。一般而言，使用嚙齒目(Rodentia)、兔形目(Lagomorpha)或靈長目(Primate)。嚙齒目的動物包括，例如小鼠、大鼠與倉鼠。兔形目的動物包括，例如兔子。靈長目的動物包括，例如狹鼻類(舊世界猴)猴子，例如馬來猴(*Macaca fascicularis*)、獼猴(rhesus monkey)、聖狒狒(sacred baboon)與黑猩猩(chimpanzees)。

以抗原免疫動物之方法為本技術領域所熟知。抗原之腹腔內注射(intraperitoneal injection)或皮下注射(subcutaneous injection)為免疫哺乳動物之一標準方法。更特別地，可將抗原稀釋或懸浮於一適合量的磷酸鹽緩衝溶液、生理食鹽水等。若需要，可將抗原懸浮液與適合量之標準佐劑，例如佛氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)混合，製成乳狀液(emulsion)並且之後投予至哺乳動物。較佳為其之後於每4至21天投予與適合量之佛氏不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant)混合的抗原。也可使用一適合之載體來免疫。於上述免疫後，藉由為了增加所需之抗體量，以標準方法可檢驗血清。

藉由自被檢驗以增加於血清中之所需抗體的經免疫動物收集血液且藉由以任何一般方法自血液分離血清，可製備抗本發明胜肽之多株抗體。多株抗體可包括含多株抗體的血清，與含自血清分離之多株抗體的部分(fraction)。例如使用與本發明胜肽結合之親合管柱且更進一步使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱純化此部分，可自僅辨認本發明胜肽之部分純化免疫球蛋白 G 或 M。

為了製備單株抗體，如上所述自經以抗原免疫並確認於血清中所需抗體之增加程度的哺乳動物收集免疫細胞且使免疫細胞遭遇細胞融合。用來細胞融合之免疫細胞，可較佳為獲自脾臟。其他要被與上述免疫細胞融合之親代細胞包括，例如，哺乳動物之骨髓瘤(myeloma)，且較佳為具有以藥物篩選之融合細胞之獲得特性的骨髓瘤細胞。

根據已知方法，例如 Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))的方法，可將上述免疫細胞與骨髓瘤細胞融合。

獲自細胞融合之產生的融合瘤，藉由將它們培養於標準篩選培養基，例如 HAT 培養基（含亞黃嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶(thymidine)之培養基），可被篩選。通常持續細胞培養於 HAT 培養基數天至數週，時間為允許除了所需融合瘤外之其他細胞（非融合細胞）死亡。之後，執行標準限制稀釋以篩選並複製產生所需抗體之融合瘤。

除了於其中為了製備融合瘤、以一抗原免疫一非人類

動物的上述方法，可以胜肽、表現胜肽之細胞或其細胞萃取物 *in vitro* 免疫人類淋巴細胞，例如被 EB 病毒感染的那些。之後，將經免疫之淋巴細胞與具不明確分裂能力之來自人類之骨髓瘤，例如 U266 融合，以產生一所需人類抗體之融合瘤，所需之人類抗體可與可被獲得之胜肽結合（日本專利公開號：Sho 63-17688（尚未進行審查））。

將所獲得之融合瘤轉植進入小鼠之腹腔且萃取腹水。可純化所獲得之單株抗體，藉由例如硫酸銨沉澱、一蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱、DEAE 離子交換色層分析或一與本發明胜肽結合之親和管柱。本發明抗體不只可被使用來純化與偵測本發明胜肽，也可作為本發明胜肽之促進劑與拮抗劑的候選物。

或者，一產生抗體之免疫細胞，例如一經免疫之淋巴細胞可藉由一致癌基因以永生且被使用來製備單株抗體。

也可使用基因工程技術來重組製備因此獲得之單株抗體（參見，例如 Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, published in the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)）。例如，一編碼出抗體的 DNA 可自一免疫細胞，例如產生抗體之一融合瘤或一經免疫的淋巴細胞被複製，插入一適合之載體，且引入一宿主細胞以製備重組抗體。本發明也提供如上述製備之重組抗體。

此外，本發明抗體可為一抗體之片段或經修飾之抗體，只要其結合一或多個本發明之胜肽。例如，抗體片段

可為 Fab、F(ab')₂、Fv 或單鏈 Fv (scFv)，於其中來自重與輕鏈的 Fv 片段藉由合適的連結器來連接(Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。更特別是，藉由以酵素例如木瓜酵素或胃蛋白酶處理抗體可產生抗體片段。或者，編碼出抗體之基因可被構築、插入一表現載體且表現於一適合的宿主細胞中(參見，例如 Co *et al.*, J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux *et al.*, Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991))。

藉由與各種分子，例如聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 結合可修飾抗體。本發明提供此類經修飾之抗體。藉由化學修飾一抗體可獲得經修飾之抗體。這些修飾方法為本技術領域中所常見。

或者，本發明之抗體可被獲得為嵌合抗體，介於來自非人抗體之可變區與來自人類抗體之固定區之間，或為人源化抗體，包括來自非人抗體之互補決定區、架構作用區 (frame work region, FR) 與來自人類抗體之固定區。根據已知方法可製備此類抗體。藉由齧齒類互補決定區之序列取代人類抗體對應之互補序列可執行人源化 (參見，例如 Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988))。因此，此類人源化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整

之人類可變區已被來自非人種類之對應序列取代。

也可使用包括除了架構作用區與固定區尚有人類可變區的全人類抗體。使用各種本技術領域所知的技術可產生此類抗體。例如，*in vitro* 方法包括呈現於噬菌體上之人類抗體片段的重組資料庫的使用（例如，Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)）。相似地，藉由將人類免疫球蛋白基因座 (*loci*) 引入轉殖動物，例如於其中內生免疫球蛋白基因已被部分或完全去活化的小鼠，可製造人類抗體。此方法被敘述，例如於美國專利號：6,150,584, 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

獲自上述之抗體可被純化至同質 (*homogeneity*)。例如，根據用於一般蛋白質的分離與純化方法可執行抗體之分離與純化。例如，藉由合適地選擇與結合管柱色層分析，例如親合管柱、過濾、超過濾、鹽析、透析、對鈉十二烷基的硫酸鹽聚丙烯酰胺凝膠電泳 (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)、等電聚焦法 (*isoelectric focusing*) 的使用可分開與分離抗體 (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))，但不限於此。蛋白質 A 管柱與蛋白質 G 管柱可被使用為親合管柱。要被使用之示範的蛋白質 A 管柱包括，例如 Hyper D、POROS 與 Sepharose F.F. (Pharmacia)。

除了親合，示範之色層分析包括，例如離子交換色層

分析、疏水色層分析、膠體過濾、逆向色層分析、吸附色層分析等 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。藉由液相色層分析，例如 HPLC 與 FPLC 可執行色層分析步驟。

例如，可使用吸收之測量、酵素連結免疫吸附分析 (ELISA)、酵素免疫分析 (EIA)、放射免疫分析及/或免疫螢光以測量本發明抗體之抗原結合活性。在酵素連結免疫吸附分析中，本發明抗體為固定於一培養盤上，提供本發明胜肽至一培養盤，且之後提供含所需抗體之樣本，如，產生抗體之細胞的培養懸浮液或經純化的抗體。之後，提供辨認第一抗體且被標誌酵素，例如鹼性磷酸酶之第二抗體，且之後培養培養盤。接著在清洗後，將酵素受質，例如對硝基苯磷酸 (p-nitrophenyl phosphate)，加至培養盤，並測量吸收以評估樣本之抗原結合活性。胜肽之片段，例如 C 端或 N 端之片段可被使用為抗原以評估抗體結合活性。根據本發明，可使用 BIAcore (Pharmacia) 來評估抗體的活性。

上述方法允許本發明胜肽之偵測或測量，藉由露出本發明抗體至假定含本發明胜肽之樣本並偵測或測量由抗體與胜肽所形成之免疫複合物。

由於根據本發明之胜肽偵測或測量方法可專一偵測或測量胜肽，方法提供效用於使用胜肽之各種實驗中。

XIII. 載體與宿主細胞

本發明也提供載體與宿主細胞，於其中將編碼出本發明胜肽之核苷酸引入。本發明之載體可被用來維持本發明核苷酸，特別是 DNA 於宿主細胞中以表現本發明一胜肽，或用來投予本發明本發明核苷酸用以基因治療。

當 *E. coli* 為宿主細胞且載體被放大且大量製造於 *E. coli* (例如，JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1Blue) 中時，載體應具有要被放大於 *E. coli* 中之“ori”與篩選轉形 *E. coli* 之標誌基因 (例如，藉由例如安比西林 (ampicillin)、四環黴素 (tetracycline)、卡那黴素 (kanamycin)、氯黴素 (chloramphenicol) 或類似物之藥物篩選之一抗藥基因)。例如，可使用 M13-系列載體、pUC-系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。此外，pGEM-T、pDIRECT 與 pT7 也可被用來複製與萃取 cDNA 與上述載體。當載體被用來產生本發明蛋白質時，一表現載體可提供效用。例如，要被表現於 *E. coli* 中之一表現載體應具有上述特徵以被放大於 *E. coli* 中。當使用 *E. coli*，例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1Blue 為宿主細胞時，載體應具有啟動子 (promoter)，例如 lacZ 啟動子 (Ward *et al.*, Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), araB promoter (Better *et al.*, Science 240: 1041-3 (1988))、T7 啟動子或類似物，其可有效表現所需基因於 *E. coli* 中。基於那方面，可使用，例如 pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen)、pEGFP

與 pET (於此例子，宿主較佳為 BL21，其表現 T7 RNA 聚合酶)，取代上述載體。另外，載體也可含用於胜肽分泌之訊號序列。一引導要被分泌之胜肽至 *E. coli* 的胞膜間區 (periplasm) 的示範之訊號序列為 pelB 訊號序列 (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987))。將載體引入目標宿主細胞的方式包括，例如，氯化鈣方法，與電穿孔 (electroporation) 方法。

除了 *E. coli*，例如來自哺乳動物之表現載體 (例如 pcDNA3 (Invitrogen) 與 pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8)、來自昆蟲細胞之表現載體 (例如、"Bac-to-BAC 桿狀病毒表現系統 (baculovirus expression system)" (GIBCO BRL)、pBacPAK8)、來自植物之表現載體 (例如，pMH1、pMH2)、來自動物病毒之表現載體 (例如、pHSV、pMV、pAdexLcw)、來自反轉錄病毒之表現載體 (例如，pZIpneo)、來自酵母菌之表現載體 (例如，"Pichia Expression Kit" (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01) 與來自枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 之表現載體 (例如，pPL608, pKTH50) 可被用來產生本發明之多胜肽。

為了在於動物細胞，例如 CHO、COS 或 NIH3T3 細胞中表現載體，載體應具有表現於此類細胞中所必須的啟動子，例如 SV40 啟動子 (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979))、MMLV-LTR 啟動子、EF1 alpha 啟動子 (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990))、CMV 啟

動子等，與篩選轉形物的標誌基因（例如藉由藥物篩選（例如，新黴素(neomycin)、G418之抗藥基因）較佳。具有這些載體特徵之已知載體的例子包括，例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 與 pOP13。

雖然可於本發明實施或測試中可使用相似或等同於在此敘述之那些的方法與材料，但是敘述適合之方法與材料。於本說明書中提及之各刊物、專利或專利申請於此以其內容被具體引入為參考文獻。如果發生抵觸，包括定義之本發明說明書會控制。此外，材料、方法與實施例僅為說明性，並不意圖為限制。

【實施例】

實施例 1

材料與方法

細胞株

TISI、HLA-A*2402 陽性人類 B 淋巴母細胞株為自 IHWG Cell and Gene Bank (Seattle, WA) 所購得。COS7、非洲綠猴腎細胞株為自 ATCC 所購得。

來自 TTLL4 之胜肽的候選物選擇

使用 “NetMHC3.0” 結合預測伺服器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004)) 預測來自 TTLL4 之 9 員與 10 員胜肽，其結合至 HLA-A*2402 分子。這些胜肽係根據一標準固相合成方法由

Biosynthesis (Lewisville, TX)來合成且藉由逆相高效能液體層析 (reversed phase high performance liquid chromatography, HPLC)來純化。分別藉由分析型 HPLC 與質譜分析確認這些胜肽之純度(> 90%)與身份(identity)。將胜肽溶解於二甲基亞砜(dimethylsulfoxide, DMSO)中於 20 mg/ml 且儲存於-80°C。

In vitro 細胞毒殺性 T 淋巴球誘導

使用來自單核白血球之樹突細胞做為抗原呈現細胞以誘導抗表現於人類白血球組織抗原(HLA)上之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球反應。*In vitro*產生樹突細胞如別處所述(Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63(14): 4112-8)。特別地，由 Ficoll-Plaque (Pharmacia)溶液分離自一正常自願者(HLA-A* 2402 陽性)之周邊血液單核細胞，藉由貼附至一塑膠組織培養盤(Becton Dickinson)來分離以豐富其如一單核白血球部分。將經豐富單核白血球之族群培養在 1000 U/ml 之人類顆粒-巨噬細胞群落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (R&D System)與 1000 U/ml 之白細胞介素(interleukin, IL)-4 (R&D System)存在下於含 2%之熱去活性自身取得血清(autologous serum, AS)之 AIM-V 培養基(Invitrogen)中。培養 7 天後，於 AIM-V 培養基中，於 3 μ g/ml 之 β -2 微球蛋白(beta 2-microglobulin)存在下以 20 μ g/ml 之各合成胜肽脈衝(pulsed)細胞激素誘導之樹突細胞 3 小時於 37°C。所產生之細胞顯示表現樹突細

胞相關分子，例如 CD80、CD83、CD86 與 HLA Class II 於其細胞表面（資料未顯示）。之後以 X-射線 (20 Gy) 將這些胜肽脈衝之樹突細胞去活性且將其以 1:20 之比例與自身取得 CD8 陽性 T 細胞混合，CD8 陽性 T 細胞藉由以 CD8 Positive Isolation Kit (Dyna) 正選擇獲得。這些培養物設置於 48 孔盤 (Corning)；各孔含 1.5×10^4 胜肽脈衝之樹突細胞、 3×10^5 CD8 陽性 T 細胞與 10 ng/ml 之 IL-7 (R&D System) 於 0.5 ml 之 AIM-V/2% 自身取得血清培養基中。三天之後，以 IL-2 (CHIRON) 添加至培養物至終濃度為 20 IU/ml。第 7 天與第 14 天更以自身取得胜肽脈衝之樹突細胞進一步刺激 T 細胞。以與上述相同之方法每次製備樹突細胞。於第 21 天，第三輪之胜肽刺激後，將細胞毒殺性 T 淋巴球進行抗胜肽脈衝之 TISI 細胞測試 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

細胞毒殺性 T 淋巴球擴張步驟

使用與由 Riddell et al. (Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-23) 所敘述之相似方法於培養中擴張細胞毒殺性 T 淋巴球。全部 5×10^4 細胞毒殺性 T 淋巴球懸浮於 25 ml 之含有兩種人類 B 類淋巴母細胞株之

AIM-V/5% 自身取得血清培養基，由 MMC 去活化，在 40 ng/ml 之抗-CD3 單株抗體(Pharmlingen)存在下。在開始培養 1 天後，120 IU/ml 之 IL-2 加入培養中。於第 5、8、11 天以新鮮之含 30 IU/ml 之 IL-2 的 AIM-V/5% 自身取得血清培養基提供給培養物(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

細胞毒殺性 T 淋巴球複製(clone)的建立

執行稀釋以具有 0.3、1 與 3 細胞毒殺性 T 淋巴球/孔於 96 圓底(round-bottomed)微效價盤(Nalge Nunc International)中。細胞毒殺性 T 淋巴球與 1×10^4 細胞/孔之 2 種兩種人類 B 類淋巴母細胞株、30 ng/ml 之抗-CD3 抗體與 125 U/ml 之 IL-2 於全部 150 μ l /孔之含 5% 自身取得之血清的 AIM-V 培養基中一起培養。10 天後將 50 μ l /孔之 IL-2 加入培養基中以達到 125 U/ml IL-2 之最終濃度。於第 14 天測試細胞毒殺性 T 淋巴球之活性，且使用上述相同方法擴張細胞毒殺性 T 淋巴球複製(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性

為了測試專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，執行 IFN- γ 酵素結合免疫斑點 (ELISPOT) 分析與 IFN- γ 酵素結合免疫吸附 (ELISA) 分析。特別地，製備胜肽脈衝之 TISI (1×10^4 /孔) 為刺激細胞 (stimulator cell)。培養之細胞於 48 孔中做為應答細胞 (responder cell)。在製造商步驟下執行 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析與 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析。

強有力地表現目標基因與 HLA-A24 任一或兩者的細胞的建立

藉由 PCR 將編碼出目標基因之開放讀框或 HLA-A*2402 的 cDNA 放大。將 PCR 放大產物選殖進一表現載體。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen)，根據製造商建議步驟將質體轉染進 COS7，其為一目標基因與 HLA-A*2402 無效細胞株。於自轉染後 2 天，以 versene (Invitrogen) 收集經轉染的細胞且使用為細胞毒殺性 T 淋巴球活性分析之目標細胞 (5×10^4 細胞/孔)。

結果

來自 TTLL4 之 HLA-A24 結合胜肽的預測

表 1a 與 1b 以高結合親和力之順序顯示 TTLL4 之 HLA-A24 結合的 9 員與 10 員胜肽。總共 37 個具有潛在 HLA-A24 結合能力之胜肽被選擇且將其試驗以確定抗原決定位胜肽。

表 1a

表 1a、來自 TTLL4 之 HLA-A24 結合的 9 員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
------	-------	---------	-------

750	RYLHKPYLI	5	1
579	LFPNVPPTI	21	2
994	FYASVLDVL	24	3
769	VYVTSYDPL	37	4
755	PYLISGSKF	43	5
79	AYFFCPSTL	54	6
684	RFGKKEFSF	68	7
689	EFSFFPQSF	77	8
779	IYLFSDGLV	119	9
304	WYNRNNLAM	229	10
793	KYSPSMKSL	284	11
691	SFFPQSFIL	325	12
41	VWPQAHQQV	387	13
1086	VWSLPTSLL	399	14
1186	TFQSISDSL	473	15
103	CYLHSLPDL	492	16
362	SFLNPSFQW	754	17
1037	RFFEQPRYF	800	18
773	SYDPLRIYL	1501	19

表 1b

表 1b、來自 TTLL4 之 HLA-A24 結合的 10 員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
103	CYLHSLPDLF	11	20
773	SYDPLRIYLF	21	21
883	PYSCHELFGE	47	22
127	PYQQLESFCL	67	23
684	RFGKKEFSFF	70	24
1043	RYFNILTTQW	148	25
223	MWPNSTPVPL	181	26
122	SYRQKPYQQL	210	27
1186	TFQSISDSL	323	28
1022	QFERIFPSHI	561	29
689	EFSFFPQSFI	584	30
804	KFMHLTNYSV	836	31
994	FYASVLDVLT	860	32
993	DFYASVLDVL	3998	33

1105	AFSKSETSKL	5879	34
696	SFILPQDAKL	7815	35
665	SFQIGRKDRL	18177	36
891	GFDIMLDENL	24816	37

起始位置指自 TTLL4 之 N 端的胺基酸殘基數目。

解離常數[Kd (nM)]為來自 “NetMHC3.0”。

以 HLA-A*2402 限制之來自 TTLL4 之預測胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球

根據敘述於“材料與方法”之步驟產生對於那些來自 TTLL4 之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析測定胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（第 1a-1 圖）。其顯示，與控制組孔洞相較，以 TTLL4-A24-9-750（序列辨識號：1）刺激之孔洞編號#7（a）、以 TTLL4-A24-9-79（序列辨識號：6）刺激之孔洞編號#8（b）、以 TTLL4-A24-9-793（序列辨識號：11）刺激之孔洞編號#8（c）、以 TTLL4-A24-9-691（序列辨識號：12）刺激之孔洞編號#5（d）、以 TTLL4-A24-9-103（序列辨識號：16）刺激之孔洞編號#1（e）、以 TTLL4-A24-10-103（序列辨識號：20）刺激之孔洞編號#3（f）、以 TTLL4-A24-10-773（序列辨識號：21）刺激之孔洞編號#3（g）、以 TTLL4-A24-10-883（序列辨識號：22）刺激之孔洞編號#8（h）、以 TTLL4-A24-10-1186（序列辨識號：28）刺激之孔洞編號#2（i）、以 TTLL4-A24-10-1022（序列辨識號：29）刺激之孔洞編號#3（j）、以 TTLL4-A24-10-994（序列辨識號：32）刺激之孔洞編號#1（k）與以 TTLL4-A24-10-891（序列辨識號：37）刺激之孔洞編號#6（l）顯示強而有力的 IFN- γ 產生。另一

方面，藉由已顯示於表 1a 與 1b 中之其他胜肽刺激，沒有測定到專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性，儘管那些胜肽具有與 HLA-A*2402 之可能結合活性。如負資料之一典型例子，從以 TTLL4-A24-9-579（序列辨識號：2）(m)刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球未顯示專一的 IFN- γ 產生。結果，其指出來自 TTLL4 之 12 個胜肽被篩選為具有誘導強有力之細胞毒殺性 T 淋巴球的潛力。

抗 TTLL4 衍生胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與複製的建立

藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測，於以 TTLL4-A24-9-750（序列辨識號：1）刺激之孔洞編號 #7 (a)、以 TTLL4-A24-9-79（序列辨識號：6）刺激之孔洞編號 #8 (b)、以 TTLL4-A24-9-691（序列辨識號：12）刺激之孔洞編號 #5 (c)、以 TTLL4-A24-9-103（序列辨識號：16）刺激之孔洞編號 #1 (d)、以 TTLL4-A24-10-103（序列辨識號：20）刺激之孔洞編號 #3 (e)、以 TTLL4-A24-10-773（序列辨識號：21）刺激之孔洞編號 #3 (f) 中顯示胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性的細胞被擴張，並如上方之“材料與方法”段落中所述來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析來測定那些細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的細胞毒殺性 T 淋巴球活性（第 2a-f 圖）。與無胜肽脈衝之目標細胞相較，細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強的抗以對應胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生。此外，藉由來自細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的限制稀

釋建立細胞毒殺性 T 淋巴球複製，且藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析測定來自抗經胜肽脈衝之目標細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的 IFN- γ 產生。從以 TTLL4-A24-9-750 (序列辨識號：1) (a)、TTLL4-A24-9-79 (序列辨識號：6) (b)、TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號：20) (c) 與 TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號：21) (d) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球複製測定出強的 IFN- γ 產生 (第 3a-d 圖)。抗表現 TTLL4 與 HLA-A*2402 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性

檢驗經提升抗各胜肽之所建立的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與複製對於辨認表現 TTLL4 與 HLA-A*2402 分子之目標細胞的能力。使用由對應之胜肽提升的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與複製為刺激細胞來測試抗 COS7 細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性，而 COS7 細胞經全長之 TTLL4 與 HLA-A*2402 基因兩者轉染(對於表現 TTLL4 與 HLA-A*2402 基因之反應細胞的特定模式)。COS7 細胞以全長 TTLL4 或 HLA-A*2402 基因轉染被製備為控制組。於第 4 圖中，以 TTLL4-A24-9-103 (序列辨識號：16) (a) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與以 TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號：20) (b) 與 TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號：21) (c) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞複製顯示強的抗表現 TTLL4 與 HLA-A*2402 兩者之 COS7 細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。另一方面，沒有偵測到抗控制組之顯著專一的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。因此，這些資料清楚證明 TTLL4-A24-9-

103 (序列辨識號: 16)(a)、TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號: 20)(b)與 TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號: 21)(c)被內生地處理且表現於具有 HLA-A*2402 分子之目標細胞上且由細胞毒殺性 T 淋巴球所辨認。這些結果指出此來自 TTLL4 之胜肽為可適合作為具 TTLL4 表現之腫瘤病患之治療的癌症疫苗。

抗原胜肽之同源分析

以 TTLL4-A24-9-750(序列辨識號:1)、TTLL4-A24-9-79 (序列辨識號: 6)、TTLL4-A24-9-793 (序列辨識號: 11)、TTLL4-A24-9-691(序列辨識號:12)、TTLL4-A24-9-103 (序列辨識號: 16)、TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號: 20)、TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號: 21)、TTLL4-A24-10-883 (序列辨識號: 22)、TTLL4-A24-10-1186 (序列辨識號: 28)、TTLL4-A24-10-1022(序列辨識號:29)、TTLL4-A24-10-994(序列辨識號: 32)與 TTLL4-A24-10-891(序列辨識號: 37)刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球顯示顯著且專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。此結果可能起因於 TTLL4-A24-9-750 (序列辨識號: 1)、TTLL4-A24-9-79 (序列辨識號: 6)、TTLL4-A24-9-793 (序列辨識號: 11)、TTLL4-A24-9-691 (序列辨識號: 12)、TTLL4-A24-9-103 (序列辨識號: 16)、TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號: 20)、TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號: 21)、TTLL4-A24-10-883(序列辨識號: 22)、TTLL4-A24-10-1186(序列辨識號: 28)、TTLL4-A24-10-1022 (序列辨識號: 29)、TTLL4-A24-10-994(序列辨識號: 32)

與 TTLL4-A24-10-891 (序列辨識號：37)之序列為與源自已知使人類免疫系統敏感之其他分子的胜肽同源的事實。為了排除此可能性，對於使用為關鍵字向 BLAST 演算法 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)查詢之這些胜肽序列執行同源性分析，而 BLAST 演算法顯示沒有序列顯示顯著之同源性。同源性分析之結果指出 TTLL4-A24-9-750 (序列辨識號：1)、TTLL4-A24-9-79 (序列辨識號：6)、TTLL4-A24-9-793 (序列辨識號：11)、TTLL4-A24-9-691 (序列辨識號：12)、TTLL4-A24-9-103 (序列辨識號：16)、TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號：20)、TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號：21)、TTLL4-A24-10-883 (序列辨識號：22)、TTLL4-A24-10-1186 (序列辨識號：28)、TTLL4-A24-10-1022 (序列辨識號：29)、TTLL4-A24-10-994 (序列辨識號：32)與 TTLL4-A24-10-891 (序列辨識號：37)之序列為獨特的，且因此只有很小可能性，對於我們最佳知識而言，這些分子會對於一些非相關分子提高非計畫中之免疫反應。

因此，確認新穎之來自 TTLL4 之 HLA-A*2402 抗原決定位胜肽，且證明其適合癌症免疫治療。

實施例 2

材料與方法

細胞株

T2、HLA-A*0201 陽性人類 B 淋巴母細胞株與 COS7、非洲綠猴腎細胞株為自 ATCC 所購得。

來自 TTLL4 之胜肽的候選物選擇

使用“NetMHC3.0”結合預測伺服器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>)(Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004))預測來自 TTLL4 之 9 員與 10 員胜肽，其結合至 HLA-A*0201 分子。這些胜肽係根據一標準固相合成方法由 Biosynthesis (Lewisville, TX) 來合成且藉由逆相高效能液體層析 (reversed phase high performance liquid chromatography, HPLC) 來純化。分別藉由分析型 HPLC 與質譜分析確認這些胜肽之純度 (> 90%) 與身份 (identity)。將胜肽溶解於二甲基亞砷 (dimethylsulfoxide, DMSO) 中於 20 mg/ml 且儲存於 -80°C。

In vitro 細胞毒殺性 T 淋巴球誘導

使用來自單核白血球之樹突細胞做為抗原呈現細胞以誘導抗表現於人類白血球組織抗原 (HLA) 上之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球反應。*In vitro* 產生樹突細胞如別處所述 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63(14): 4112-8)。特別地，由 Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液分離自一正常自願者 (HLA-A*0201 陽性) 之周邊血液單核細胞，藉由貼附至一塑膠組織培養盤 (Becton Dickinson) 來分離以豐富其如一單核白血球部分。將經豐富單核白血球之族群培養在 1000 U/ml 之人類顆粒-巨噬細胞群落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (R&D System) 與 1000 U/ml 之白細胞介素

(interleukin, IL)-4 (R&D System)存在下於含 2%之熱去活性自身取得血清 (autologous serum, AS) 之 AIM-V 培養基 (Invitrogen) 中。培養 7 天後，於 AIM-V 培養基中，於 $3 \mu\text{g/ml}$ 之 β -2 微球蛋白 (beta 2-microglobulin) 存在下以 $20 \mu\text{g/ml}$ 之各合成胜肽脈衝 (pulsed) 細胞激素誘導之樹突細胞 3 小時於 37°C 。所產生之細胞顯示表現樹突細胞相關分子，例如 CD80、CD83、CD86 與 HLA Class II 於其細胞表面 (資料未顯示)。之後以 X-射線 (20 Gy) 將這些胜肽脈衝之樹突細胞去活性且將其以 1:20 之比例與自身取得 CD8 陽性 T 細胞混合，CD8 陽性 T 細胞藉由以 CD8 Positive Isolation Kit (Dyna) 正選擇獲得。這些培養物設置於 48 孔盤 (Corning)；各孔含 1.5×10^4 胜肽脈衝之樹突細胞、 3×10^5 CD8 陽性 T 細胞與 10 ng/ml 之 IL-7 (R&D System) 於 0.5 ml 之 AIM-V/2% 自身取得血清培養基中。三天之後，以 IL-2 (CHIRON) 添加至培養物至終濃度為 20 IU/ml 。第 7 天與第 14 天更以自身取得胜肽脈衝之樹突細胞進一步刺激 T 細胞。以與上述相同之方法每次製備樹突細胞。於第 21 天，第三輪之胜肽刺激後，將細胞毒殺性 T 淋巴球進行抗胜肽脈衝之 T2 細胞測試 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

細胞毒殺性 T 淋巴球擴張步驟

使用與由 Riddell et al. (Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23) 所敘述之相似方法於培養中擴張細胞毒殺性 T 淋巴球。全部 5×10^4 細胞毒殺性 T 淋巴球懸浮於 25 ml 之含有兩種人類 B 類淋巴母細胞株之 AIM-V/5% 自身取得血清培養基，由 MMC 去活化，在 40 ng/ml 之抗-CD3 單株抗體 (Pharmlingen) 存在下。在開始培養 1 天後，120 IU/ml 之 IL-2 加入培養中。於第 5、8、11 天以新鮮之含 30 IU/ml 之 IL-2 的 AIM-V/5% 自身取得血清培養基提供給培養物 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

細胞毒殺性 T 淋巴球複製 (clone) 的建立

執行稀釋以具有 0.3、1 與 3 細胞毒殺性 T 淋巴球/孔於 96 圓底 (round-bottomed) 微效價盤 (Nalge Nunc International) 中。細胞毒殺性 T 淋巴球與 1×10^4 細胞/孔之 2 種兩種人類 B 類淋巴母細胞株、30 ng/ml 之抗-CD3 抗體與 125 U/ml 之 IL-2 於全部 150 μ l/孔之含 5% 自身取得之血清的 AIM-V 培養基中一起培養。10 天後將 50 μ l/孔之 IL-2 加入培養基中以達到 125 U/ml IL-2 之最終濃度。於第 14 天測試細胞毒殺性 T 淋巴球之活性，且使用上

述相同方法擴張細胞毒殺性 T 淋巴球複製 (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性

為了測試專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，執行 IFN- γ 酵素結合免疫斑點 (ELISPOT) 分析與 IFN- γ 酵素結合免疫吸附 (ELISA) 分析。特別地，製備胜肽脈衝之 T2 (1×10^4 / 孔) 為刺激細胞 (stimulator cell)。培養之細胞於 48 孔中做為應答細胞 (responder cell)。在製造商步驟下執行 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析與 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析。

強有力地表現目標基因與 HLA-A02 任一或兩者的細胞的建立

藉由 PCR 將編碼出目標基因之開放讀框或 HLA-A*0201 的 cDNA 放大。將 PCR 放大產物選殖進一表現載體。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen)，根據製造商建議步驟將質體轉染進 COS7，其為一目標基因與 HLA-A*0201 無效細胞株。於自轉染後 2 天，以 versene (Invitrogen) 收集經轉染的細胞且使用為細胞毒殺性 T 淋巴球活性分析之目標細胞 (5×10^4 細胞 / 孔)。

結果

來自 TTLL4 之 HLA-A02 結合胜肽的預測

表 2a 與 2b 以高結合親和力之順序顯示 TTLL4 之

HLA-A02 結合的 9 員與 10 員胜肽。總共 41 個具有潛在 HLA-A02 結合能力之胜肽被選擇且將其試驗以確定抗原決定位胜肽。

表 2a

表 2a、來自 TTLL4 之 HLA-A02 結合的 9 員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
222	FMWPNSTPV	2	38
805	FMHLTNYSV	6	39
610	KMSTVTPNI	7	40
1163	SLSTQTLPV	10	41
575	LIYSLFPNV	15	42
1189	SISDSLLAV	16	43
66	GLGPGLLG	32	44
864	TIISSEPYV	37	45
899	NLKPWLEV	48	46
147	SLPQKSLPV	49	47
578	SLFPNVPPT	51	48
697	FILPQDAKL	52	49
1088	SLPTSLLTI	70	50
988	KIPDQDFYA	79	51
423	LLASHASGL	163	52
852	SIWEKIKDV	200	53
128	YQQLESFCL	265	54
107	SLPDLFNST	278	55
605	KLLRWKMST	325	56
356	CQLEQSSFL	1503	57

表 2b

表 2b、來自 TTLL4 之 HLA-A02 結合的 10 員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
363	FLNPSFQWNV	3	58
574	ALIYSLFPNV	4	59
895	MLDENLKPWV	10	60
605	KLLRWKMSTV	16	61
578	SLFPNVPPTI	19	62

756	YLISGSKFDL	37	63
550	AMISRSCMEI	39	64
610	KMSTVTPNIV	42	65
107	SLPDLFNSTL	46	66
933	NLAGFVLPNA	56	67
1163	SLSTQTLPI	59	68
871	YVTSLLKMYV	94	69
863	KTIISSEPYV	118	70
852	SIWEKIKDVV	150	71
62	TLSAGLGPGL	188	72
804	KFMHLTNYSV	192	73
70	GLLGVPPQPA	230	74
1092	SLLTISKDDV	292	75
1113	KLKGQSSCEV	324	76
778	RIYLFSDGLV	358	77
86	TLCSSGTTAV	421	78

起始位置指自 TTLL4 之 N 端的胺基酸殘基數目。

解離常數[Kd (nM)]為來自 “NetMHC3.0”。

以 HLA-A*0201 限制之來自 TTLL4 之預測胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球

根據敘述於“材料與方法”之步驟產生對於那些來自 TTLL4 之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析測定胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（第 5a-d 圖）。與控制組孔洞相較，以 TTLL4-A02-9-222（序列辨識號：38）刺激之孔洞編號#3（a）、以 TTLL4-A02-9-805（序列辨識號：39）刺激之孔洞編號#7（b）、以 TTLL4-A02-9-66（序列辨識號：44）刺激之孔洞編號#8（c）與以 TTLL4-A02-10-574（序列辨識號：59）刺激之孔洞編號#7（d）顯示強而有力的 IFN- γ 產生。另一方面，藉由已顯示於表 2a 與 2b 中之其他胜肽刺激，沒有測定到專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性，儘管那些胜肽具有與 HLA-A*0201 之可能結合

活性。結果指出來自 TTLL4 之 4 個胜肽被篩選為具有誘導強有力之細胞毒殺性 T 淋巴球的潛力。

抗 TTLL4 衍生胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與複製的建立

藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測，於以 TTLL4-A02-9-222 (序列辨識號：38) 刺激之孔洞編號 #3 (a)、以 TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39) 刺激之孔洞編號 #7 (b)、以 TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：44) 刺激之孔洞編號 #8 (c) 與以 TTLL4-A02-10-574 (序列辨識號：59) 刺激之孔洞編號 #7 (d) 中顯示胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性的細胞被擴張，並藉由如上方之“材料與方法”段落中所述之限制稀釋來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析來測定那些細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的細胞毒殺性 T 淋巴球活性 (第 6a-d 圖)。與無胜肽脈衝之目標細胞相較，細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強的抗以對應胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生。此外，藉由來自細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的限制稀釋建立細胞毒殺性 T 淋巴球複製，且藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析測定來自抗經胜肽脈衝之目標細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的 IFN- γ 產生。從以 TTLL4-A02-9-222 (序列辨識號：38) (a)、TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39) (b) 與 TTLL4-A02-10-574 (序列辨識號：59) (c) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球複製測定出強的 IFN- γ 產生 (第 7a-c 圖)。

抗表現 TTLL4 與 HLA-A*0201 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性

檢驗經提升抗各胜肽之所建立的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與複製對於辨認表現 TTLL4 與 HLA-A*0201 分子之目標細胞的能力。使用由對應之胜肽提升的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與複製為刺激細胞來測試抗 COS7 細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性，而 COS7 細胞經全長之 TTLL4 與 HLA-A*0201 基因兩者轉染(對於表現 TTLL4 與 HLA-A*0201 基因之反應細胞的特定模式)。COS7 細胞以全長 TTLL4 或 HLA-A*0201 基因轉染被製備為控制組。於第 8 圖中，以 TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39)(a)刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球複製與以 TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：44)(b)刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強的抗表現 TTLL4 與 HLA-A*0201 兩者之 COS7 細胞的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。另一方面，沒有偵測到抗控制組之顯著專一的細胞毒殺性 T 淋巴球活性。因此，這些資料清楚證明 TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39)(a)與 TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：44)(b)被內生地處理且表現於具有 HLA-A*0201 分子之目標細胞上且由細胞毒殺性 T 淋巴球所辨認。這些結果指出此來自 TTLL4 之這些胜肽為可適合作為具 TTLL4 表現之腫瘤病患之治療的癌症疫苗。

抗原胜肽之同源分析

以 TTLL4-A02-9-222(序列辨識號：38), TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39)、TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：

44)與 TTLL4-A02-10-574 (序列辨識號：59)刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球顯示顯著且專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。此結果可能起因於 TTLL4-A02-9-222 (序列辨識號：38)、TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39)、TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：44)與 TTLL4-A02-10-574 (序列辨識號：59)之序列為與源自己知使人類免疫系統敏感之其他分子的胜肽同源的事實。為了排除此可能性，對於使用為關鍵字向 BLAST 演算法(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)查詢之這些胜肽序列執行同源性分析，而 BLAST 演算法顯示沒有序列顯示顯著之同源性。同源性分析之結果指出 TTLL4-A02-9-222 (序列辨識號：38)、TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：44)與 TTLL4-A02-10-574 (序列辨識號：59)之序列為獨特的，且因此只有很小可能性，對於我們最佳知識而言，這些分子會對於一些非相關分子提高非計畫中之免疫反應。雖然 TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39)之序列為與 TTLL5 同源，但在我們之微陣列資料中 TTLL5 的表現圖譜指出 TTLL5 表現在正常組織中是低的，且此胜肽被應用於癌症治療。

因此，確認新穎之來自 TTLL4 之 HLA-A*0201 抗原決定位胜肽，且證明其適合癌症免疫治療。

產業利用性

本發明提供新的腫瘤相關抗原，特別是來自 TTLL4 的那些，其可誘導強且專一的抗腫瘤免疫反應，且對於癌症

形式之廣泛多樣化而言具有應用性。此腫瘤相關抗原可提供效用為抗與 TTLL4 相關之疾病的胜肽疫苗，與 TTLL4 相關之疾病，例如癌症，更特別是膀胱癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸與直腸癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰臟癌、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、軟組織腫瘤與骨肉瘤。

當於此詳述本發明與提及其特定實施例時，需瞭解的是，前述敘述本質為示範與解釋且意為說明本發明與其較佳實施例。於例行實驗之中，熟悉此技藝人士可立即瞭解在不脫離本發明之精神下其可實行各種改變與修飾，其邊界與範圍被所附申請專利範圍所定義。

【圖式簡單說明】

第 1 圖由一系列照片(a)至(m)所組成，其顯示在以來自 TTLL4 之胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球上之 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析(ELISPOT)的結果。分別與控制組相較，以 TTLL4-A24-9-750 (序列辨識號：1)刺激之於孔洞編號#7 中(a)、以 TTLL4-A24-9-79 (序列辨識號：6) 刺激之於孔洞編號#8 中(b)、以 TTLL4-A24-9-793 (序列辨識號：11)刺激之於孔洞編號#8 中(c)、以 TTLL4-A24-9-691 (序列辨識號：12)刺激之於孔洞編號#5 中(d)、以 TTLL4-A24-9-103 (序列辨識號：16)刺激之於孔洞編號#1 中(e)、以 TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號：20)刺激之於孔洞編號#3 中(f)、以 TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號：

21) 中刺激之於孔洞編號#3 (g)、以 TTLL4-A24-10-883 (序列辨識號：22) 刺激之於孔洞編號#8 中 (h)、以 TTLL4-A24-10-1186 (序列辨識號：28) 刺激之於孔洞編號#2 中 (i)、以 TTLL4-A24-10-1022 (序列辨識號：29) 刺激之於孔洞編號#3 中 (j)、以 TTLL4-A24-10-994 (序列辨識號：32) 刺激之於孔洞編號#1 中 (k) 與以 TTLL4-A24-10-891 (序列辨識號：37) 刺激之於孔洞編號#6 中 (l) 的細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強的 IFN- γ 產生。於這些照片之孔洞上的正方形指出來自對應之孔洞的細胞被擴張來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。相對的，做為負資料的典型例子，其並未從以 TTLL4-A24-9-579 (序列辨識號：2) 刺激的細胞毒殺性 T 淋巴球偵測到專一的 IFN- γ 產生 (m)。於圖中，“+” 指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-” 指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 2 圖由一系列線圖 (a) 與 (f) 所組成，顯示 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析之結果，其結果依次顯示以 TTLL4-A24-9-750 (序列辨識號：1) (a)、TTLL4-A24-9-79 (序列辨識號：6) (b)、TTLL4-A24-9-691 (序列辨識號：12) (c)、TTLL4-A24-9-103 (序列辨識號：16) (d)、TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號：20) (e) 與 TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號：21) (f) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的 IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強而有力之

IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 3 圖由一系列線圖(a)-(d)所組成，其示藉由來自以 TTLL4-A24-9-750 (序列辨識號：1)(a)、TTLL4-A24-9-79 (序列辨識號：6)(b)、TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號：20)(c)與 TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號：21)(d)刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的限制稀釋所建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的 IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激所建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製顯示強而有力之 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 4 圖為由一系列線圖(a)-(c)所組成，其顯示抗外生表現 TTLL4 與 HLA-A*2402 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性。將以 HLA-A*2402 或全長之 TTLL4 基因轉染之 COS7 細胞製備為控制組。以 TTLL4-A24-9-103 (序列辨識號：16)(a)建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與以 TTLL4-A24-10-103 (序列辨識號：20)(b)與 TTLL4-A24-10-773 (序列辨識號：21)(c)建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製顯示抗以 TTLL4 與 HLA-A*2402 兩者轉染之 COS7 細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（黑色菱形）。另一方面，沒有偵測到顯著專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，其抗表現 HLA-A*2402（三角形）或 TTLL4（圓形）任一的目標細胞。

第 5 圖由一系列照片(a)至(d)所組成，其顯示在以來自 TTLL4 之胜肽誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球上之 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析(ELISPOT)的結果。分別與控制組相較，以 TTLL4-A02-9-222 (序列辨識號：38)刺激之於孔洞編號#3 中(a)、以 TTLL4-A02-9-805 (序列辨識號：39)刺激之於孔洞編號#7 中(b)、以 TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：44)刺激之於孔洞編號#8 中(c)與以 TTLL4-A02-10-574 (序列辨識號：59)刺激之於孔洞編號#7 中(d)的細胞毒殺性 T 淋巴球顯示強的 IFN- γ 產生。於這些照片之孔洞上的正方形指出來自對應之孔洞的細胞被擴張來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 6 圖由一系列線圖(a)與(d)所組成，顯示 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析之結果，其結果依次顯示藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析所偵測的 TTLL4-A02-9-222 (序列辨識號：38)(a)、TTLL4-A02-9-805(序列辨識號：39)(b)、TTLL4-A02-9-66 (序列辨識號：44)(c)與 TTLL4-A02-10-574 (序列辨識號：59)(d)刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的 IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強而有力之 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 7 圖由一系列線圖(a)-(c)所組成，顯示 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析之結果，其結果依次顯示藉由來自以 TTLL4-A02-9-222(序列辨識號：38)(a)、TTLL4-A02-9-805(序列辨識號：39)(b)與 TTLL4-A02-10-574(序列辨識號：59)(c)刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的限制稀釋所建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的 IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激所建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製顯示強而有力之 IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的 IFN- γ 產生。

第 8 圖為由一系列線圖所組成，其顯示抗外生表現 TTLL4 與 HLA-A*0201 之目標細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性。將以 HLA-A*0201 或全長之 TTLL4 基因轉染之 COS7 細胞製備為控制組。以 TTLL4-A02-9-805(序列辨識號：39)(a)建立之細胞毒殺性 T 淋巴球複製與以 TTLL4-A02-9-66(序列辨識號：44)(b)建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示抗以 TTLL4 與 HLA-A*2402 兩者轉染之 COS7 細胞的專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（黑色菱形）。另一方面，沒有偵測到顯著專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，其抗表現 HLA-A*0201（三角形）或 TTLL4（圓形）任一的目標細胞。

【主要元件符號說明】

無。

序列表

<110> 腫瘤療法 科學股份有限公司

<120> TTLL4 胜肽與含此胜肽之疫苗

<130> ONC-A1031-TW

<150> US 61/380, 611

<151> 2010-09-07

<160> 84

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 1

Arg Tyr Leu His Lys Pro Tyr Leu Ile
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 2

Leu Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr Ile
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 3

Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu
1 5

<210> 4

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 4

Val Tyr Val Thr Ser Tyr Asp Pro Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 5

Pro Tyr Leu Ile Ser Gly Ser Lys Phe
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 6

Ala Tyr Phe Phe Cys Pro Ser Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 7

Arg Phe Gly Lys Lys Glu Phe Ser Phe
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 8

Glu Phe Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 9

Ile Tyr Leu Phe Ser Asp Gly Leu Val
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 10

Trp Tyr Asn Arg Asn Asn Leu Ala Met
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 11

Lys Tyr Ser Pro Ser Met Lys Ser Leu
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 12

Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe Ile Leu
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 13

Val Trp Pro Gln Ala His Gln Gln Val
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 14

Val Trp Ser Leu Pro Thr Ser Leu Leu
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 15

Thr Phe Gln Ser Ile Ser Asp Ser Leu
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 16

Cys Tyr Leu His Ser Leu Pro Asp Leu
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 17

Ser Phe Leu Asn Pro Ser Phe Gln Trp
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 18

Arg Phe Phe Glu Gln Pro Arg Tyr Phe
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 19

Ser Tyr Asp Pro Leu Arg Ile Tyr Leu
1 5

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 20

Cys Tyr Leu His Ser Leu Pro Asp Leu Phe
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 21

Ser Tyr Asp Pro Leu Arg Ile Tyr Leu Phe
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 22

Pro Tyr Ser Cys His Glu Leu Phe Gly Phe
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 23

Pro Tyr Gln Gln Leu Glu Ser Phe Cys Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 24

Arg Phe Gly Lys Lys Glu Phe Ser Phe Phe

1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 25

Arg Tyr Phe Asn Ile Leu Thr Thr Gln Trp
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 26

Met Trp Pro Asn Ser Thr Pro Val Pro Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 27

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

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

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 28

Thr Phe Gln Ser Ile Ser Asp Ser Leu Leu
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 29

Gln Phe Glu Arg Ile Phe Pro Ser His Ile
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 30

Glu Phe Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe Ile
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 31

Lys Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 32

Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu Thr
1 5 10

<210> 33

201210608

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 33

Asp Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 34

Ala Phe Ser Lys Ser Glu Thr Ser Lys Leu
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 35

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

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 36

Ser Phe Gln Ile Gly Arg Lys Asp Arg Leu
1 5 10

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

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 37

Gly Phe Asp Ile Met Leu Asp Glu Asn Leu
1 5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 38

Phe Met Trp Pro Asn Ser Thr Pro Val
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 39

Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 40

Lys Met Ser Thr Val Thr Pro Asn Ile
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

·

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 41

Ser Leu Ser Thr Gln Thr Leu Pro Val
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 42

Leu Ile Tyr Ser Leu Phe Pro Asn Val
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 43

Ser Ile Ser Asp Ser Leu Leu Ala Val
1 5

○

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 44

Gly Leu Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 45

Thr Ile Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Val
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 46

Asn Leu Lys Pro Trp Val Leu Glu Val
1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 47

Ser Leu Pro Gln Lys Ser Leu Pro Val
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 48

Ser Leu Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 49

• Phe Ile Leu Pro Gln Asp Ala Lys Leu
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 50

Ser Leu Pro Thr Ser Leu Leu Thr Ile
1 5

○ <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 51

Lys Ile Pro Asp Gln Asp Phe Tyr Ala
1 5

○ <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 52

Leu Leu Ala Ser His Ala Ser Gly Leu
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 53

Ser Ile Trp Glu Lys Ile Lys Asp Val

1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 54

Tyr Gln Gln Leu Glu Ser Phe Cys Leu
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 55

Ser Leu Pro Asp Leu Phe Asn Ser Thr
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 56

Lys Leu Leu Arg Trp Lys Met Ser Thr
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 57

Cys Gln Leu Glu Gln Ser Ser Phe Leu
1 5

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 58

Phe Leu Asn Pro Ser Phe Gln Trp Asn Val
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 59

Ala Leu Ile Tyr Ser Leu Phe Pro Asn Val
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 60

Met Leu Asp Glu Asn Leu Lys Pro Trp Val
1 5 10

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 61

Lys Leu Leu Arg Trp Lys Met Ser Thr Val
1 5 10

<210> 62

201210608

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 62

Ser	Leu	Phe	Pro	Asn	Val	Pro	Pro	Thr	Ile
1				5					10

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 63

Tyr	Leu	Ile	Ser	Gly	Ser	Lys	Phe	Asp	Leu
1				5					10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 64

Ala	Met	Ile	Ser	Arg	Ser	Cys	Met	Glu	Ile
1				5					10

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 65

Lys	Met	Ser	Thr	Val	Thr	Pro	Asn	Ile	Val
1				5					10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 66

Ser Leu Pro Asp Leu Phe Asn Ser Thr Leu
1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 67

Asn Leu Ala Gly Phe Val Leu Pro Asn Ala
1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 68

Ser Leu Ser Thr Gln Thr Leu Pro Val Ile
1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 69

Tyr Val Thr Ser Leu Leu Lys Met Tyr Val
1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 70

Lys	Thr	Ile	Ile	Ser	Ser	Glu	Pro	Tyr	Val
1				5					10

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 71

Ser	Ile	Trp	Glu	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Val
1				5					10

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 72

Thr	Leu	Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Pro	Gly	Leu
1				5					10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 73

Lys	Phe	Met	His	Leu	Thr	Asn	Tyr	Ser	Val
1				5					10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

• <400> 74

Gly Leu Leu Gly Val Pro Pro Gln Pro Ala
1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 75

Ser Leu Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asp Val
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 76

Lys Leu Gly Lys Gln Ser Ser Cys Glu Val
1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 77

Arg Ile Tyr Leu Phe Ser Asp Gly Leu Val
1 5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 78

Thr Leu Cys Ser Ser Gly Thr Thr Ala Val
1 5 10

<210> 79
<211> 4997
<212> DNA
<213> 人類

<220>
<221> CDS
<222> (371).. (3970)

<400> 79
agactctcgg tctgtccgct gggggcgcgc gcggtgtgtg gcaggcggca gcggcgctgg 60
cgcccgagtg cgcttgtcac gcgtggcggt gcgtggttgc tagggggccc tgaggctgcc 120
gggtagccca gcaggccgag ggaggaagta gcgtggagcc ggtgccgagc cggggcgaag 180
ctggatcccc tagatagact gtcttcaagc tcaactgatat ttctctctgc ttgatccatt 240
gtgctgttga gagcctctag taaatttttc agactgacag acttcaagga tgcagctgct 300
actaccggag gtgtgtggca ccttacctca gcaaggccat gagaccgtgt ggccatgatg 360
tgggccctc atg gcc tca gca gga aca cag cac tat agt att ggc ctc 409
Met Ala Ser Ala Gly Thr Gln His Tyr Ser Ile Gly Leu
1 5 10
cgc cag aaa aac agc ttc aag cag agt ggt ccc tca ggc aca gta cct 457
Arg Gln Lys Asn Ser Phe Lys Gln Ser Gly Pro Ser Gly Thr Val Pro
15 20 25
gcc acg cca cct gag aaa ccc tcg gag ggc aga gtc tgg cct cag gcc 505
Ala Thr Pro Pro Glu Lys Pro Ser Glu Gly Arg Val Trp Pro Gln Ala
30 35 40 45
cat cag caa gtg aag cca atc tgg aag ctg gaa aag aag caa gtg gag 553
His Gln Gln Val Lys Pro Ile Trp Lys Leu Glu Lys Lys Gln Val Glu
50 55 60
aca ctg tca gca ggg ttg ggc cca ggc ctc ttg ggc gtc cca ccc cag 601
Thr Leu Ser Ala Gly Leu Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Pro Pro Gln
65 70 75
cca gca tat ttc ttt tgc ccc agc act tta tgt agc tct ggg acc acg 649
Pro Ala Tyr Phe Phe Cys Pro Ser Thr Leu Cys Ser Ser Gly Thr Thr
80 85 90
gct gtc att gca ggc cac agc agt tcc tgt tac cta cac tct ctc ccg 697
Ala Val Ile Ala Gly His Ser Ser Ser Cys Tyr Leu His Ser Leu Pro
95 100 105
gac ttg ttc aac agc acc ctg cta tac cgc cgc tcc agc tat agg caa 745
Asp Leu Phe Asn Ser Thr Leu Leu Tyr Arg Arg Ser Ser Tyr Arg Gln

110	115	120	125	
aaa ccg tac cag caa ctg gag tct ttc tgc ttg cgt tcg agc ccg tca Lys Pro Tyr Gln Gln Leu Glu Ser Phe Cys Leu Arg Ser Ser Pro Ser	130	135	140	793
gaa aaa agc cct ttt tct ctc cct caa aag agc ctc cct gtc agt ctc Glu Lys Ser Pro Phe Ser Leu Pro Gln Lys Ser Leu Pro Val Ser Leu	145	150	155	841
act gcc aac aag gcc act tct tcc atg gtc ttc tcc atg gcc cag ccc Thr Ala Asn Lys Ala Thr Ser Ser Met Val Phe Ser Met Ala Gln Pro	160	165	170	889
atg gcc tcc tca tcc aca gaa cca tac ctc tgc ttg gca gcg gct ggg Met Ala Ser Ser Ser Thr Glu Pro Tyr Leu Cys Leu Ala Ala Ala Gly	175	180	185	937
gaa aac cct tca ggg aag agc ctg gcc tct gcc atc tca ggg aag atc Glu Asn Pro Ser Gly Lys Ser Leu Ala Ser Ala Ile Ser Gly Lys Ile	190	195	200	985
cca tct cca ctc tct tcc tcc tat aag ccc atg ctg aat aat aat tcc Pro Ser Pro Leu Ser Ser Ser Tyr Lys Pro Met Leu Asn Asn Asn Ser	210	215	220	1033
ttc atg tgg cca aat agc acg cca gtg cct tta ttg cag acc aca cag Phe Met Trp Pro Asn Ser Thr Pro Val Pro Leu Leu Gln Thr Thr Gln	225	230	235	1081
ggc ctg aag cca gta tcg cca ccc aag atc cag cct gtc tcc tgg cat Gly Leu Lys Pro Val Ser Pro Pro Lys Ile Gln Pro Val Ser Trp His	240	245	250	1129
cat tca ggg ggt act gga gac tgt gca ccg cag cct gtt gac cat aag His Ser Gly Gly Thr Gly Asp Cys Ala Pro Gln Pro Val Asp His Lys	255	260	265	1177
gtg ccc aaa agc att ggc act gtc cca gct gat gcc agt gcc cat atc Val Pro Lys Ser Ile Gly Thr Val Pro Ala Asp Ala Ser Ala His Ile	270	275	280	1225
gcc ttg tct acc gct agc tcc cac gac aca tcc acc acc agt gtt gcc Ala Leu Ser Thr Ala Ser Ser His Asp Thr Ser Thr Thr Ser Val Ala	290	295	300	1273
tct tcc tgg tat aac cgg aat aac tta gcc atg agg gca gag cca ctt Ser Ser Trp Tyr Asn Arg Asn Asn Leu Ala Met Arg Ala Glu Pro Leu	305	310	315	1321
tcc tgt gct ctg gat gac agc tct gat tcc cag gat cca act aag gag Ser Cys Ala Leu Asp Asp Ser Ser Asp Ser Gln Asp Pro Thr Lys Glu	320	325	330	1369
att cgg ttc act gag gcc gtg agg aaa ttg acc gca aga ggc ttt gag Ile Arg Phe Thr Glu Ala Val Arg Lys Leu Thr Ala Arg Gly Phe Glu	335	340	345	1417

aag atg ccg agg caa ggc tgc cag ctt gaa cag tct agt ttc ctg aac Lys Met Pro Arg Gln Gly Cys Gln Leu Glu Gln Ser Ser Phe Leu Asn 350 355 360 365	1465
ccc agc ttc cag tgg aat gtc ctc aac agg agc agg cgg tgg aaa cct Pro Ser Phe Gln Trp Asn Val Leu Asn Arg Ser Arg Arg Trp Lys Pro 370 375 380	1513
cct gcg gta aat cag cag ttt cct cag gag gat gct gga tog gtc agg Pro Ala Val Asn Gln Gln Phe Pro Gln Glu Asp Ala Gly Ser Val Arg 385 390 395	1561
cgg gtc ctc cct ggt gcc tca gat acc ttg ggg ttg gac aat aca gtc Arg Val Leu Pro Gly Ala Ser Asp Thr Leu Gly Leu Asp Asn Thr Val 400 405 410	1609
ttc tgt acc aag cgt atc agc att cac ctc ctt gcc tca cat gcc agt Phe Cys Thr Lys Arg Ile Ser Ile His Leu Leu Ala Ser His Ala Ser 415 420 425	1657
ggg ctc aat cac aac cct gcc tgt gaa tot gta att gac tcc tca gca Gly Leu Asn His Asn Pro Ala Cys Glu Ser Val Ile Asp Ser Ser Ala 430 435 440 445	1705
ttt gga gaa ggc aaa gct cca ggt ccc cct ttt cct caa act ctt ggc Phe Gly Glu Gly Lys Ala Pro Gly Pro Pro Phe Pro Gln Thr Leu Gly 450 455 460	1753
ata gcc aac gtg gcc acc cgc ctc tct tcc atc cag ctg ggc cag tct Ile Ala Asn Val Ala Thr Arg Leu Ser Ser Ile Gln Leu Gly Gln Ser 465 470 475	1801
gag aag gag aga cct gag gag gcc agg gag ctg gac tca tct gat agg Glu Lys Glu Arg Pro Glu Glu Ala Arg Glu Leu Asp Ser Ser Asp Arg 480 485 490	1849
gat att agt tca gct act gac ctc cag cca gat cag gct gag act gaa Asp Ile Ser Ser Ala Thr Asp Leu Gln Pro Asp Gln Ala Glu Thr Glu 495 500 505	1897
gat aca gaa gaa gaa cta gta gat ggt ttg gaa gac tgt tgt agc cgt Asp Thr Glu Glu Glu Leu Val Asp Gly Leu Glu Asp Cys Cys Ser Arg 510 515 520 525	1945
gat gag aat gaa gag gag gag gga gac tca gag tgc tcc tca tta agt Asp Glu Asn Glu Glu Glu Glu Gly Asp Ser Glu Cys Ser Ser Leu Ser 530 535 540	1993
gct gtc tcc ccc agc gaa tcg gtg gcc atg atc tct aga agc tgt atg Ala Val Ser Pro Ser Glu Ser Val Ala Met Ile Ser Arg Ser Cys Met 545 550 555	2041
gaa att ctg acc aaa ccc ctt tcc aat cat gag aaa gtt gtc cga cca Glu Ile Leu Thr Lys Pro Leu Ser Asn His Glu Lys Val Val Arg Pro 560 565 570	2089
gcc ctc atc tac agt ctc ttt ccc aac gtt ccc cct acc atc tat ttt Ala Leu Ile Tyr Ser Leu Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr Ile Tyr Phe	2137

575	580	585	
ggc act cgg gat gag aga gtg gag aaa ott ccc tgg gaa cag agg aag Gly Thr Arg Asp Glu Arg Val Glu Lys Leu Pro Trp Glu Gln Arg Lys 590 595 600 605			2185
ttg ctc cga tgg aag atg agc aca gtg acc ccc aac att gtc aag cag Leu Leu Arg Trp Lys Met Ser Thr Val Thr Pro Asn Ile Val Lys Gln 610 615 620			2233
acc att gga cgg tcc cac ttc aaa atc agc aaa aga aac gat gac tgg Thr Ile Gly Arg Ser His Phe Lys Ile Ser Lys Arg Asn Asp Asp Trp 625 630 635			2281
ctg ggc tgc tgg ggt cac cac atg aag tct cct agt ttc cga tcc att Leu Gly Cys Trp Gly His His Met Lys Ser Pro Ser Phe Arg Ser Ile 640 645 650			2329
cga gag cat cag aag cta aac cat ttc cca ggc tca ttc cag att ggg Arg Glu His Gln Lys Leu Asn His Phe Pro Gly Ser Phe Gln Ile Gly 655 660 665			2377
agg aag gac cgg cta tgg cgg aac ctg tca cgt atg cag agc cgc ttt Arg Lys Asp Arg Leu Trp Arg Asn Leu Ser Arg Met Gln Ser Arg Phe 670 675 680 685			2425
ggc aag aag gag ttc agt ttc ttc ccc cag tcc ttt atc ctg ccc cag Gly Lys Lys Glu Phe Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe Ile Leu Pro Gln 690 695 700			2473
gac gcc aag ctc ctg cgc aaa gcg tgg gag agc agc agc cgc caa aag Asp Ala Lys Leu Leu Arg Lys Ala Trp Glu Ser Ser Ser Arg Gln Lys 705 710 715			2521
tgg att gtg aag cca cca gca tca gct cga ggc att ggc atc cag gtt Trp Ile Val Lys Pro Pro Ala Ser Ala Arg Gly Ile Gly Ile Gln Val 720 725 730			2569
att cac aag tgg agt cag ctc ccc aag cga agg ccc ctc ctg gta cag Ile His Lys Trp Ser Gln Leu Pro Lys Arg Arg Pro Leu Leu Val Gln 735 740 745			2617
agg tat cta cac aaa ccc tac ctc atc agc ggc agc aag ttt gac ctg Arg Tyr Leu His Lys Pro Tyr Leu Ile Ser Gly Ser Lys Phe Asp Leu 750 755 760 765			2665
cgg atc tat gtt tat gtc act tcc tac gat cct ctg cgg att tac ctc Arg Ile Tyr Val Tyr Val Thr Ser Tyr Asp Pro Leu Arg Ile Tyr Leu 770 775 780			2713
ttt tca gat gga ctg gtc cgc ttt gcc agt tgc aag tat tcg cct tcc Phe Ser Asp Gly Leu Val Arg Phe Ala Ser Cys Lys Tyr Ser Pro Ser 785 790 795			2761
atg aag agc ott ggc aat aag ttc atg cac ctg acc aac tac agt gtc Met Lys Ser Leu Gly Asn Lys Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val 800 805 810			2809

aat aaa aag aat gcc gag tac cag gcc aat gca gat gaa atg gct tgc Asn Lys Lys Asn Ala Glu Tyr Gln Ala Asn Ala Asp Glu Met Ala Cys 815 820 825	2857
cag ggc cac aaa tgg gca ctg aag gct ttg tgg aac tac ctg agc cag Gln Gly His Lys Trp Ala Leu Lys Ala Leu Trp Asn Tyr Leu Ser Gln 830 835 840 845	2905
aag gga gtc aat agc gac gcc atc tgg gag aag ata aag gat gtt gtt Lys Gly Val Asn Ser Asp Ala Ile Trp Glu Lys Ile Lys Asp Val Val 850 855 860	2953
gtc aaa act atc atc tgc tca gag ccc tat gtg acc agc ctg ctc aag Val Lys Thr Ile Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Val Thr Ser Leu Leu Lys 865 870 875	3001
atg tat gtg cga cgg ccc tat agc tgc cat gaa ctc ttt ggt ttt gac Met Tyr Val Arg Arg Pro Tyr Ser Cys His Glu Leu Phe Gly Phe Asp 880 885 890	3049
atc atg cta gac gaa aac ctc aag ccc tgg gtc ctg gaa gtc aac att Ile Met Leu Asp Glu Asn Leu Lys Pro Trp Val Leu Glu Val Asn Ile 895 900 905	3097
tcc cca agc ctc cac tcc agc tct cca ctg gat atc agc atc aaa ggc Ser Pro Ser Leu His Ser Ser Ser Pro Leu Asp Ile Ser Ile Lys Gly 910 915 920 925	3145
cag atg att cgt gac ctt ctg aat ctg gca ggt ttt gtc ctg ccc aat Gln Met Ile Arg Asp Leu Leu Asn Leu Ala Gly Phe Val Leu Pro Asn 930 935 940	3193
gca gag gat atc att tcc agc ccc agc agc tgc agc agc tcc acc acc Ala Glu Asp Ile Ile Ser Ser Pro Ser Ser Cys Ser Ser Ser Thr Thr 945 950 955	3241
agc ctg ccc acc tcc cct ggg gac aaa tgt cga atg gct cca gag cat Ser Leu Pro Thr Ser Pro Gly Asp Lys Cys Arg Met Ala Pro Glu His 960 965 970	3289
gtc act gca cag aag atg aag aaa gcc tat tat ctg acc cag aaa att Val Thr Ala Gln Lys Met Lys Lys Ala Tyr Tyr Leu Thr Gln Lys Ile 975 980 985	3337
cct gat cag gac ttc tat gca tct gtg ctg gat gtc ctg aca cca gat Pro Asp Gln Asp Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu Thr Pro Asp 990 995 1000 1005	3385
gat gtt cgg att ctg gtt gag atg gaa gat gag ttt tct cgc cgt Asp Val Arg Ile Leu Val Glu Met Glu Asp Glu Phe Ser Arg Arg 1010 1015 1020	3430
ggt cag ttt gaa cga att ttt cct tct cat atc tcc tct cgc tat Gly Gln Phe Glu Arg Ile Phe Pro Ser His Ile Ser Ser Arg Tyr 1025 1030 1035	3475
ctc cgc ttt ttt gag cag cca cga tat ttc aac att ctc acc acc Leu Arg Phe Phe Glu Gln Pro Arg Tyr Phe Asn Ile Leu Thr Thr 3520	3520

1040	1045	1050	
caa tgg gaa cag aaa tac cat ggc aac aag ctt aaa gga gta gat			3565
Gln Trp Glu Gln Lys Tyr His Gly Asn Lys Leu Lys Gly Val Asp			
1055	1060	1065	
ctg ctc cgg agt tgg tgc tac aaa ggg ttc cac atg gga gtt gtc			3610
Leu Leu Arg Ser Trp Cys Tyr Lys Gly Phe His Met Gly Val Val			
1070	1075	1080	
tct gat tct gct cca gtg tgg tct ctc ccg aca tca ctt ctg act			3655
Ser Asp Ser Ala Pro Val Trp Ser Leu Pro Thr Ser Leu Leu Thr			
1085	1090	1095	
atc tca aag gat gac gtg ata ctc aat gcc ttc agc aaa tca gag			3700
Ile Ser Lys Asp Asp Val Ile Leu Asn Ala Phe Ser Lys Ser Glu			
1100	1105	1110	
act agc aag ctg gga aaa caa agc tcc tgt gag gtt agc cta cta			3745
Thr Ser Lys Leu Gly Lys Gln Ser Ser Cys Glu Val Ser Leu Leu			
1115	1120	1125	
ctc tct gaa gac ggg acc acg ccc aaa tcc aag aag act caa gct			3790
Leu Ser Glu Asp Gly Thr Thr Pro Lys Ser Lys Lys Thr Gln Ala			
1130	1135	1140	
ggc ctt tcc cct tat ccc cag aaa ccc agt tcc tca aag gac agt			3835
Gly Leu Ser Pro Tyr Pro Gln Lys Pro Ser Ser Ser Lys Asp Ser			
1145	1150	1155	
gag gac acc agc aaa gag ccc agc ctt tct acc cag acg tta cct			3880
Glu Asp Thr Ser Lys Glu Pro Ser Leu Ser Thr Gln Thr Leu Pro			
1160	1165	1170	
gtg atc aag tgc tct ggg cag act tca aga ctt tct gct tcc tcc			3925
Val Ile Lys Cys Ser Gly Gln Thr Ser Arg Leu Ser Ala Ser Ser			
1175	1180	1185	
act ttc cag tca atc agt gac tcc ctc ctg gct gtg agc cca taa			3970
Thr Phe Gln Ser Ile Ser Asp Ser Leu Leu Ala Val Ser Pro			
1190	1195		
ctggcctctc tccaaaagcc tctgcccagg agcatgggca tcagctacct cacgggaacc			4030
agcctgctgt tcagaccagt ctgacccctt acccctttca cctgtccct cctcagagta			4090
ttttttgaag tggttgcatt atagagatgg gtattttagt ggccggaggg atggtagtga			4150
tggggagaag gtgaggaagg gtcaccctct gtcacctgtc tgcctggctg gcacctcata			4210
tctcagcaga gaagccagtg gtggccacgc agccttataa agcaggtttt ggtttctacc			4270
ttaagtgagc catgtgtggt ttgtctgggg gccctggtgt ggttgctgag ttgtagctca			4330
agaggagaaa acatacagaa catatttgga cggaaatcc tttgttctga atttgagggg			4390
gtottctgag gtccttactt ccttaggtct ttocctaccc ctctcccacc gctgtcctga			4450

```

ggagaaaccc ttgaacttcc tcagtagaca ggoggagagg ccacaacatg ccgaacccat 4510
ttcctgtcat cctagtcttg ggtcttcacc gcctccttcc aaatacccac cctgccagca 4570
gccctaggtc ttcctgttct gaccccccat cactgctcgt tcagccttct agatgtctct 4630
ctcgtggaca tctgttcttt agctgttggc tttctctgag gtgtgagagg gtctatgaac 4690
tttgtgaatt tcccatggcc ccagtgaagg agcccagata atcccagtag ctgttacctg 4750
tctccatgta tcaaaggaca cagtccaggg ggagggtgga aggagatgtg gtttctctat 4810
agtgaacaa acatggtttc tcaatgttct gctgtgcagc aagcagggtc tggcggcttg 4870
gtaggtgggt ttcaggagca gtcactattg taggatgggc ttccaatcaa acctcagact 4930
aaactcttgt actgaactga ttctacctcc ctctctaga ctcagtaaac agtgactatt 4990
caataaa 4997

```

<210> 80
 <211> 1199
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 80

```

Met Ala Ser Ala Gly Thr Gln His Tyr Ser Ile Gly Leu Arg Gln Lys
1           5           10           15

```

```

Asn Ser Phe Lys Gln Ser Gly Pro Ser Gly Thr Val Pro Ala Thr Pro
          20           25           30

```

```

Pro Glu Lys Pro Ser Glu Gly Arg Val Trp Pro Gln Ala His Gln Gln
          35           40           45

```

```

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

```

```

Ala Gly Leu Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Pro Pro Gln Pro Ala Tyr
65           70           75           80

```

```

Phe Phe Cys Pro Ser Thr Leu Cys Ser Ser Gly Thr Thr Ala Val Ile
          85           90           95

```

```

Ala Gly His Ser Ser Ser Cys Tyr Leu His Ser Leu Pro Asp Leu Phe
          100          105          110

```

```

Asn Ser Thr Leu Leu Tyr Arg Arg Ser Ser Tyr Arg Gln Lys Pro Tyr
          115          120          125

```

Gln Gln Leu Glu Ser Phe Cys Leu Arg Ser Ser Pro Ser Glu Lys Ser
130 135 140

Pro Phe Ser Leu Pro Gln Lys Ser Leu Pro Val Ser Leu Thr Ala Asn
145 150 155 160

Lys Ala Thr Ser Ser Met Val Phe Ser Met Ala Gln Pro Met Ala Ser
165 170 175

Ser Ser Thr Glu Pro Tyr Leu Cys Leu Ala Ala Ala Gly Glu Asn Pro
180 185 190

Ser Gly Lys Ser Leu Ala Ser Ala Ile Ser Gly Lys Ile Pro Ser Pro
195 200 205

Leu Ser Ser Ser Tyr Lys Pro Met Leu Asn Asn Asn Ser Phe Met Trp
210 215 220

Pro Asn Ser Thr Pro Val Pro Leu Leu Gln Thr Thr Gln Gly Leu Lys
225 230 235 240

Pro Val Ser Pro Pro Lys Ile Gln Pro Val Ser Trp His His Ser Gly
245 250 255

Gly Thr Gly Asp Cys Ala Pro Gln Pro Val Asp His Lys Val Pro Lys
260 265 270

Ser Ile Gly Thr Val Pro Ala Asp Ala Ser Ala His Ile Ala Leu Ser
275 280 285

Thr Ala Ser Ser His Asp Thr Ser Thr Thr Ser Val Ala Ser Ser Trp
290 295 300

Tyr Asn Arg Asn Asn Leu Ala Met Arg Ala Glu Pro Leu Ser Cys Ala
305 310 315 320

Leu Asp Asp Ser Ser Asp Ser Gln Asp Pro Thr Lys Glu Ile Arg Phe
325 330 335

Thr Glu Ala Val Arg Lys Leu Thr Ala Arg Gly Phe Glu Lys Met Pro
340 345 350

Arg Gln Gly Cys Gln Leu Glu Gln Ser Ser Phe Leu Asn Pro Ser Phe
 355 360 365

Gln Trp Asn Val Leu Asn Arg Ser Arg Arg Trp Lys Pro Pro Ala Val
 370 375 380

Asn Gln Gln Phe Pro Gln Glu Asp Ala Gly Ser Val Arg Arg Val Leu
 385 390 395 400

Pro Gly Ala Ser Asp Thr Leu Gly Leu Asp Asn Thr Val Phe Cys Thr
 405 410 415

Lys Arg Ile Ser Ile His Leu Leu Ala Ser His Ala Ser Gly Leu Asn
 420 425 430

His Asn Pro Ala Cys Glu Ser Val Ile Asp Ser Ser Ala Phe Gly Glu
 435 440 445

Gly Lys Ala Pro Gly Pro Pro Phe Pro Gln Thr Leu Gly Ile Ala Asn
 450 455 460

Val Ala Thr Arg Leu Ser Ser Ile Gln Leu Gly Gln Ser Glu Lys Glu
 465 470 475 480

Arg Pro Glu Glu Ala Arg Glu Leu Asp Ser Ser Asp Arg Asp Ile Ser
 485 490 495

Ser Ala Thr Asp Leu Gln Pro Asp Gln Ala Glu Thr Glu Asp Thr Glu
 500 505 510

Glu Glu Leu Val Asp Gly Leu Glu Asp Cys Cys Ser Arg Asp Glu Asn
 515 520 525

Glu Glu Glu Glu Gly Asp Ser Glu Cys Ser Ser Leu Ser Ala Val Ser
 530 535 540

Pro Ser Glu Ser Val Ala Met Ile Ser Arg Ser Cys Met Glu Ile Leu
 545 550 555 560

Thr Lys Pro Leu Ser Asn His Glu Lys Val Val Arg Pro Ala Leu Ile
 565 570 575

Tyr Ser Leu Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr Ile Tyr Phe Gly Thr Arg
 580 585 590

Asp Glu Arg Val Glu Lys Leu Pro Trp Glu Gln Arg Lys Leu Leu Arg
595 600 605

Trp Lys Met Ser Thr Val Thr Pro Asn Ile Val Lys Gln Thr Ile Gly
610 615 620

Arg Ser His Phe Lys Ile Ser Lys Arg Asn Asp Asp Trp Leu Gly Cys
625 630 635 640

Trp Gly His His Met Lys Ser Pro Ser Phe Arg Ser Ile Arg Glu His
645 650 655

Gln Lys Leu Asn His Phe Pro Gly Ser Phe Gln Ile Gly Arg Lys Asp
660 665 670

Arg Leu Trp Arg Asn Leu Ser Arg Met Gln Ser Arg Phe Gly Lys Lys
675 680 685

Glu Phe Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe Ile Leu Pro Gln Asp Ala Lys
690 695 700

Leu Leu Arg Lys Ala Trp Glu Ser Ser Ser Arg Gln Lys Trp Ile Val
705 710 715 720

Lys Pro Pro Ala Ser Ala Arg Gly Ile Gly Ile Gln Val Ile His Lys
725 730 735

Trp Ser Gln Leu Pro Lys Arg Arg Pro Leu Leu Val Gln Arg Tyr Leu
740 745 750

His Lys Pro Tyr Leu Ile Ser Gly Ser Lys Phe Asp Leu Arg Ile Tyr
755 760 765

Val Tyr Val Thr Ser Tyr Asp Pro Leu Arg Ile Tyr Leu Phe Ser Asp
770 775 780

Gly Leu Val Arg Phe Ala Ser Cys Lys Tyr Ser Pro Ser Met Lys Ser
785 790 795 800

Leu Gly Asn Lys Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val Asn Lys Lys
805 810 815

Asn Ala Glu Tyr Gln Ala Asn Ala Asp Glu Met Ala Cys Gln Gly His
820 825 830

Lys Trp Ala Leu Lys Ala Leu Trp Asn Tyr Leu Ser Gln Lys Gly Val
835 840 845

Asn Ser Asp Ala Ile Trp Glu Lys Ile Lys Asp Val Val Val Lys Thr
850 855 860

Ile Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Val Thr Ser Leu Leu Lys Met Tyr Val
865 870 875 880

Arg Arg Pro Tyr Ser Cys His Glu Leu Phe Gly Phe Asp Ile Met Leu
885 890 895

Asp Glu Asn Leu Lys Pro Trp Val Leu Glu Val Asn Ile Ser Pro Ser
900 905 910

Leu His Ser Ser Ser Pro Leu Asp Ile Ser Ile Lys Gly Gln Met Ile
915 920 925

Arg Asp Leu Leu Asn Leu Ala Gly Phe Val Leu Pro Asn Ala Glu Asp
930 935 940

Ile Ile Ser Ser Pro Ser Ser Cys Ser Ser Ser Thr Thr Ser Leu Pro
945 950 955 960

Thr Ser Pro Gly Asp Lys Cys Arg Met Ala Pro Glu His Val Thr Ala
965 970 975

Gln Lys Met Lys Lys Ala Tyr Tyr Leu Thr Gln Lys Ile Pro Asp Gln
980 985 990

Asp Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu Thr Pro Asp Asp Val Arg
995 1000 1005

Ile Leu Val Glu Met Glu Asp Glu Phe Ser Arg Arg Gly Gln Phe
1010 1015 1020

Glu Arg Ile Phe Pro Ser His Ile Ser Ser Arg Tyr Leu Arg Phe
1025 1030 1035

Phe Glu Gln Pro Arg Tyr Phe Asn Ile Leu Thr Thr Gln Trp Glu
1040 1045 1050

Gln Lys Tyr His Gly Asn Lys Leu Lys Gly Val Asp Leu Leu Arg
1055 1060 1065

Ser Trp Cys Tyr Lys Gly Phe His Met Gly Val Val Ser Asp Ser
1070 1075 1080

Ala Pro Val Trp Ser Leu Pro Thr Ser Leu Leu Thr Ile Ser Lys
1085 1090 1095

Asp Asp Val Ile Leu Asn Ala Phe Ser Lys Ser Glu Thr Ser Lys
1100 1105 1110

Leu Gly Lys Gln Ser Ser Cys Glu Val Ser Leu Leu Leu Ser Glu
1115 1120 1125

Asp Gly Thr Thr Pro Lys Ser Lys Lys Thr Gln Ala Gly Leu Ser
1130 1135 1140

Pro Tyr Pro Gln Lys Pro Ser Ser Ser Lys Asp Ser Glu Asp Thr
1145 1150 1155

Ser Lys Glu Pro Ser Leu Ser Thr Gln Thr Leu Pro Val Ile Lys
1160 1165 1170

Cys Ser Gly Gln Thr Ser Arg Leu Ser Ala Ser Ser Thr Phe Gln
1175 1180 1185

Ser Ile Ser Asp Ser Leu Leu Ala Val Ser Pro
1190 1195

<210> 81
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 81
gtctaccagg cattcgcttc at

<210> 82
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>		
<223>	人工序列	
<400>	82	
tcagctggac cacagccgca gcgt		24
<210>	83	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	83	
tcagaaatcc tttctcttga c		21
<210>	84	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	84	
ctagcctctg gaatcctttc tctt		24

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100132041

※申請日：100.9.6

※IPC 分類：

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C02N 15/09 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

TTLL4 胜肽與含此胜肽之疫苗 / TTLL4 PEPTIDES AND
VACCINES CONTAINING THE SAME

二、中文發明摘要：

於此敘述抗癌之胜肽疫苗。特別是，提供引起細胞毒殺性 T 淋巴球之來自 TTLL4 基因之抗原決定位胜肽。也提供以此類胜肽為目標之抗原呈現細胞與經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，及誘導原呈現細胞或細胞毒殺性 T 淋巴球的方法。本發明更提供包含來自 TTLL4 之胜肽或編碼出此多胜肽之多核苷酸為活性成分之藥學組合物。此外，藉由使用本發明來自 TTLL4 之胜肽、編碼出此胜肽之多核苷酸或呈現此胜肽的抗原呈現細胞或藥學組合物，本發明提供癌症（腫瘤）之治療及/或預防（即，避免）及/或其手術後復發的避免的方法，及誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，或誘導抗腫瘤免疫力的方法。

三、英文發明摘要：

Peptide vaccines against cancer are described herein. In particular, epitope peptides derived from

the TTLL4 gene that elicit CTLs are provided. Antigen-presenting cells and isolated CTLs that target such peptides, as well as methods for inducing the antigen-presenting cell, or CTL are also provided. The present invention further provides pharmaceutical compositions containing peptides derived from TTLL4 or polynucleotides encoding the polypeptides as active ingredients. Furthermore, the present invention provides methods for the treatment and/or prophylaxis of (i.e., preventing) cancers (tumors), and/or the prevention of a postoperative recurrence thereof, as well as methods for inducing CTLs, methods for inducing anti-tumor immunity, using the peptides derived from TTLL4, polynucleotides encoding the peptides, or antigen-presenting cells presenting the peptides, or the pharmaceutical compositions of the present invention.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

七、申請專利範圍：

1. 一種經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，其中該胜肽係由 TTLL4 之胺基酸序列或一其免疫活性片段所組成。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽包括一胺基酸序列，係擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 與 59 所組成之群組。

3. 一種經分離的胜肽，包括一胺基酸序列，於其中 1、2 或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加入於擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 與 59 所組成之群組的胺基酸序列，且其中該胜肽具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項之任一項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽與人類白血球組織抗原結合。

5. 如申請專利範圍第 4 項所述之經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A24 或人類白血球組織抗原-A2。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之胜肽，其中該胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 從擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32 與 37 所組成之群組之胺基酸序列的 N 端的第二個胺基酸為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸所組成之群組；以及

(b) 擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32 與 37 所組成之群組之胺基酸序列的 C 端胺基酸為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸所組成之群組。

7. 如申請專利範圍第 5 項所述之胜肽，其中該胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 從擇自由序列辨識號：38、39、44 與 59 所組成之群組之胺基酸序列的 N 端的第二個胺基酸為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組；以及

(b) 擇自由序列辨識號：38、39、44 與 59 所組成之群組之胺基酸序列的 C 端胺基酸為擇自由纈氨酸與白胺酸所組成之群組。

8. 如申請專利範圍第 1 至 7 項之任一項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽。

9. 一種經分離之多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述的經分離胜肽。

10. 一種誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之組合物，其中該組合物包括一或多個如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之該胜肽，或一或多個如申請專利範圍第 9 項所述之該多核苷酸。

11. 一種藥學組合物，用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免，其中該組合物包括一或多個如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之該胜肽，或一或多個如申請專利範圍第 9 項所述之該多核苷酸。

12. 如申請專利範圍第 11 項所述之藥學組合物，其中該組合物被配製來用於投予一個體，其人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A24 或 A2。

13. 一種誘導具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法，包括擇自由下列所組成之群組的步驟：

(a) *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 將一抗原呈現細胞與如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽接觸，以及

(b) 將編碼出如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽的一多核苷酸引入一抗原呈現細胞。

14. 一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，包括擇自由下列所組成之群組的一步驟：

(a) 將 CD8 陽性 T 細胞與抗原呈現細胞共培養，抗原呈現細胞表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽的複合物於表面上；

(b) 將 CD8 陽性 T 細胞與外吐小體共培養，外吐小體表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽的複合物於表面上，以及

(c) 將一包括編碼出一 T 細胞受體次單元多胜肽之多核苷酸的基因引入一 T 細胞，該 T 細胞受體次單元多胜肽與如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述的胜肽結合。

15. 一種經分離之抗原呈現細胞，其表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽的複合物於其表面上。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之抗原呈現細胞，其藉由如申請專利範圍第 13 項所述之方法來誘導。

17. 一種經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽為標的。

18. 如申請專利範圍第 17 項所述之細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由如申請專利範圍第 14 項所述之方法來誘導。

19. 一種於一需要個體中誘導一抗癌症之免疫反應的方法，該方法包括投予該個體一組合物的步驟，該組合物包括如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽、一其免疫活性片段，或編碼出該胜肽或該片段之一多核苷酸。

20. 一種抗體或其免疫活性片段，其抗如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽。

21. 一種載體，包括編碼出如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽的一核苷酸序列。

22. 一種宿主細胞，其被以如申請專利範圍第 21 項所述之一表現載體所轉形或轉染。

23. 一種診斷套組，包括如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之胜肽、如申請專利範圍第 9 項所述之核苷酸或如申請專利範圍第 20 項所述之抗體。

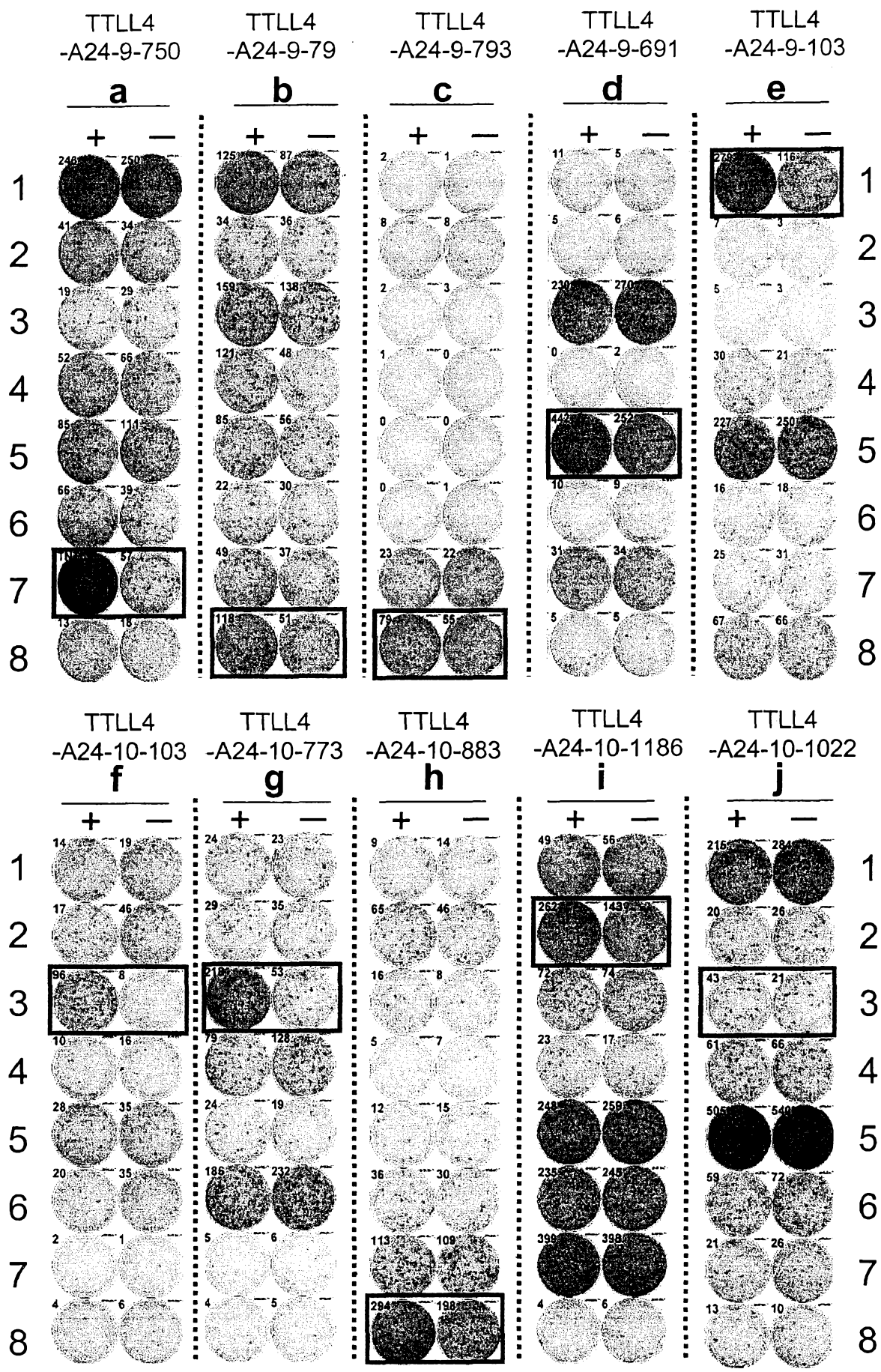
24. 如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之經分離的胜肽，其係擇自由序列辨識號：1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 與 59 所組成之群組。

201210608

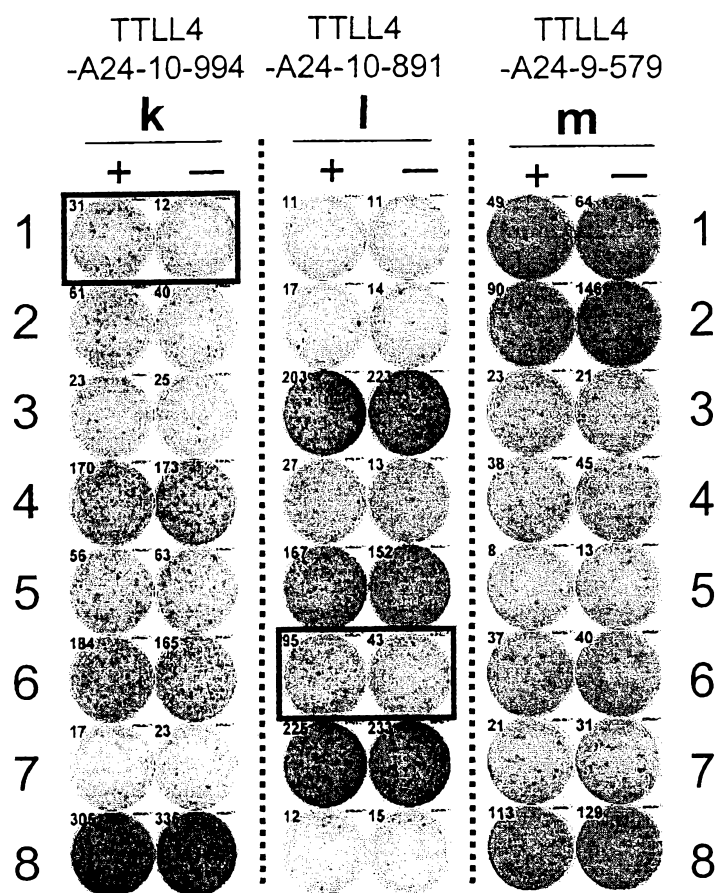
八、圖式：如後所示。

○

○

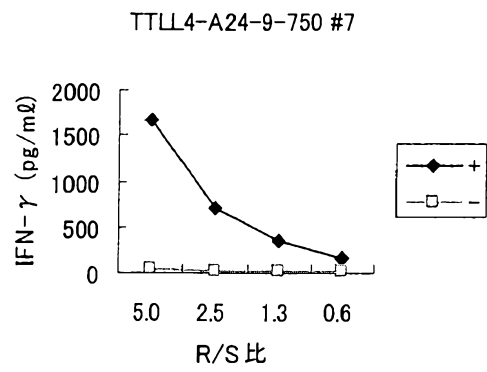


第1圖

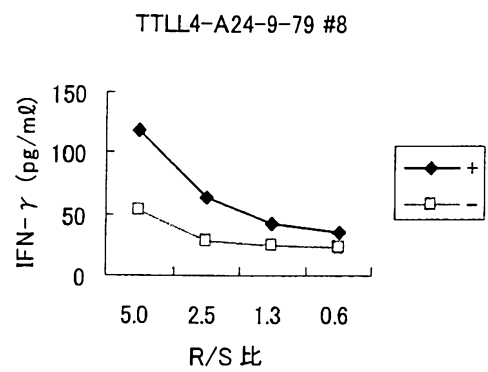


第1圖(續)

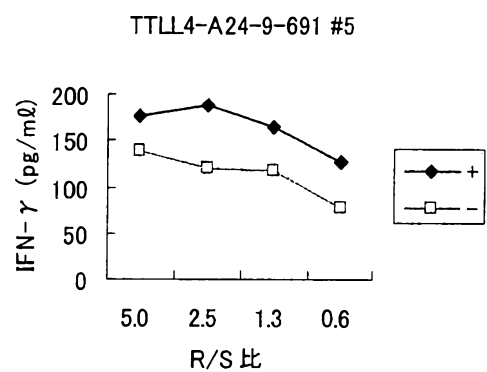
a



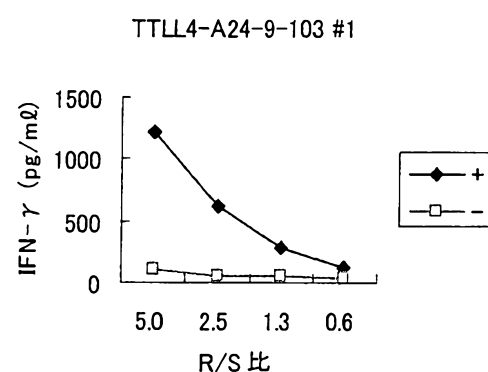
b



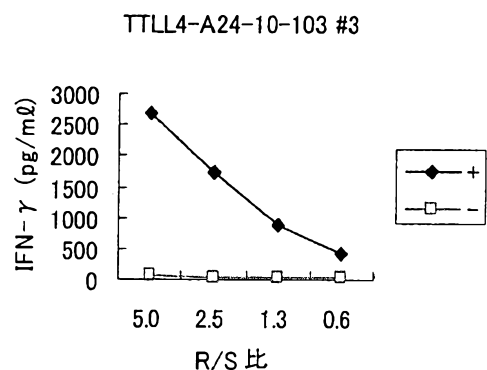
c



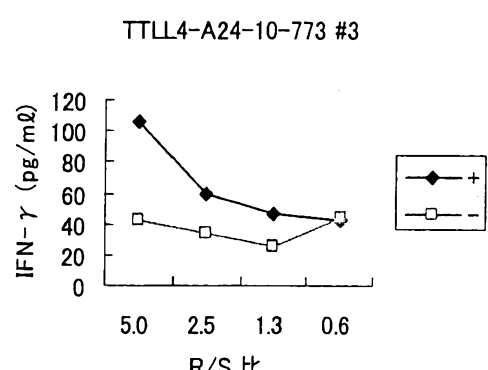
d



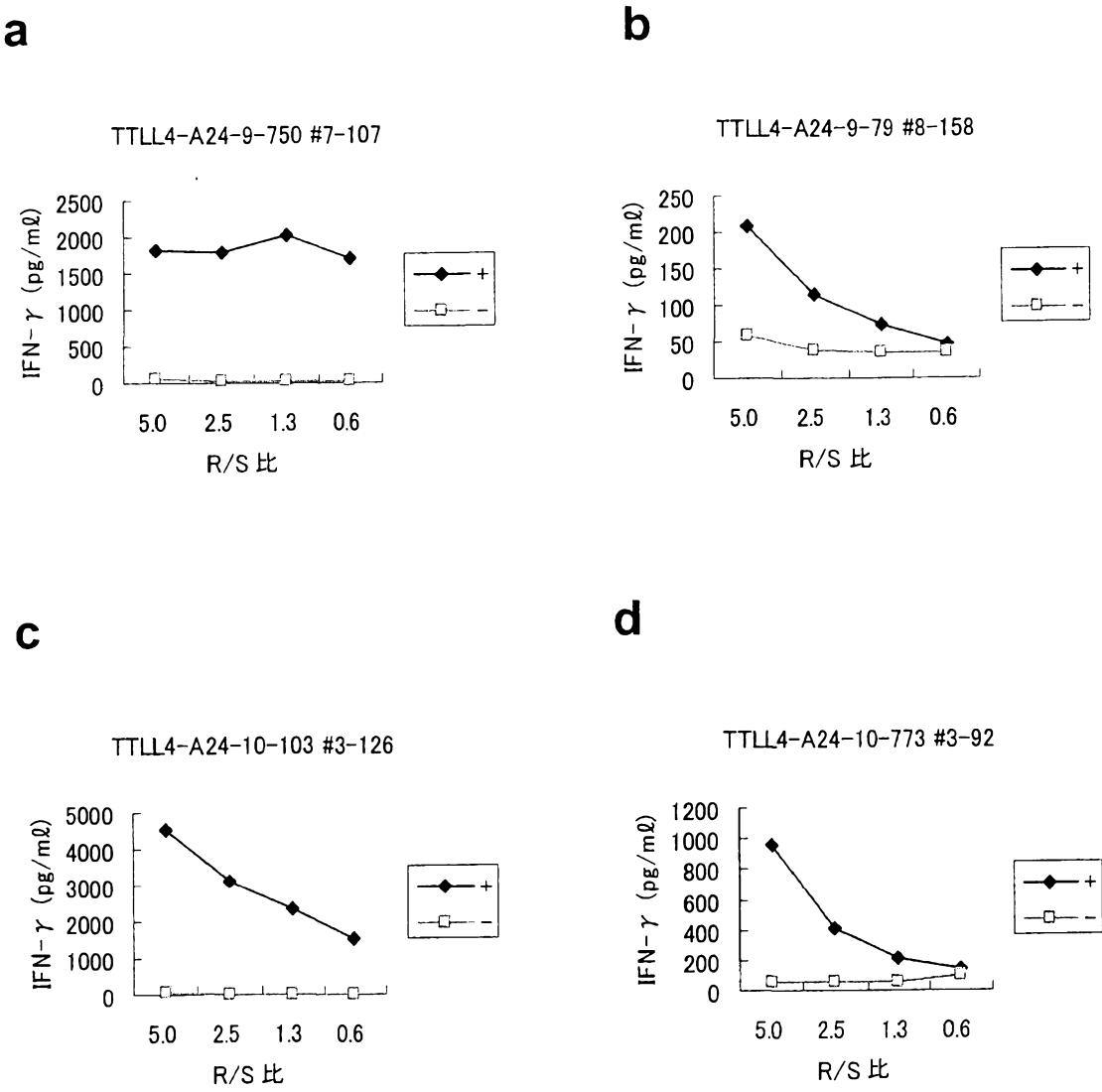
e



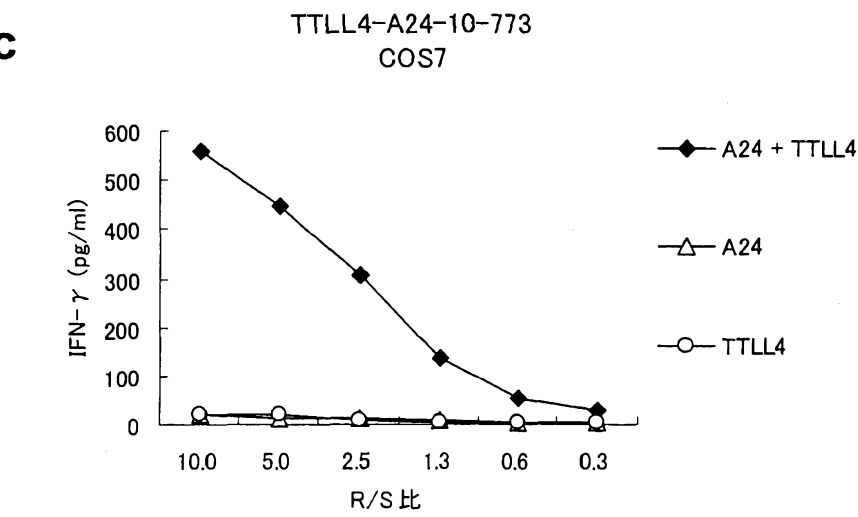
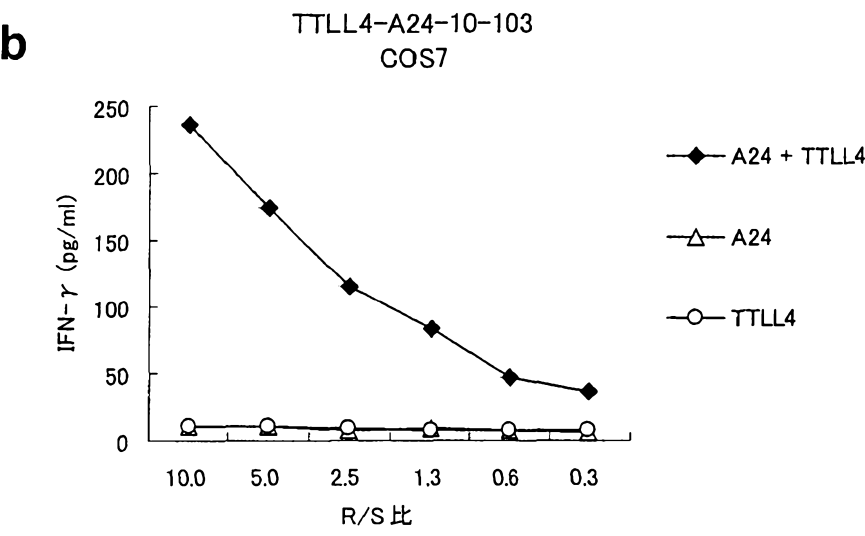
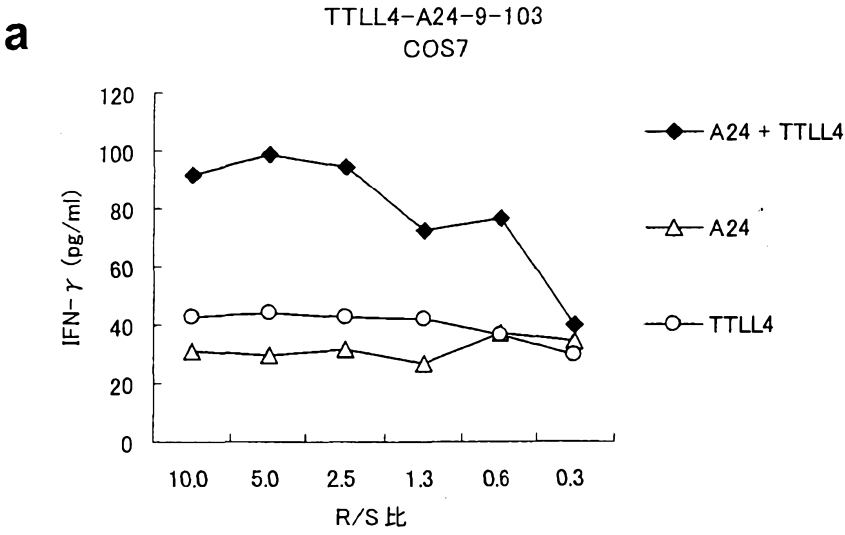
f



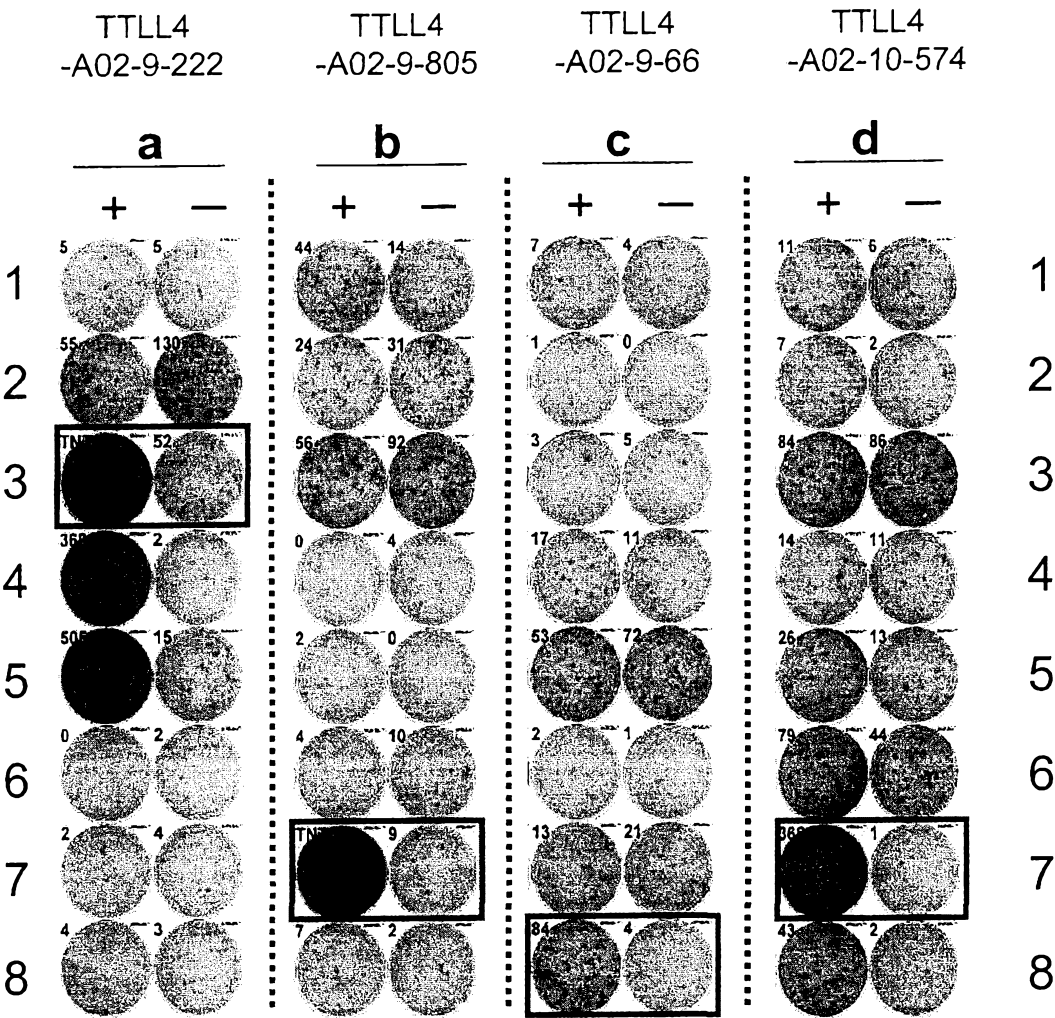
第2圖



第3圖

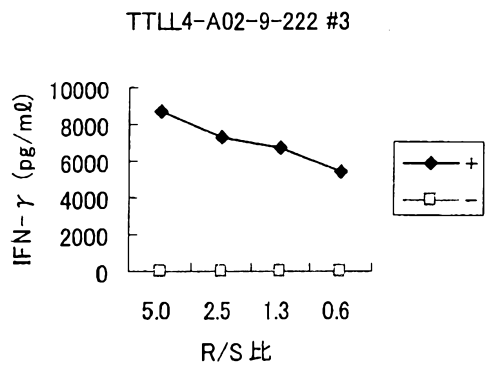


第4圖

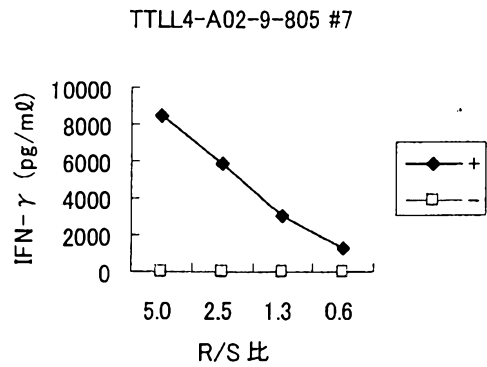


第5圖

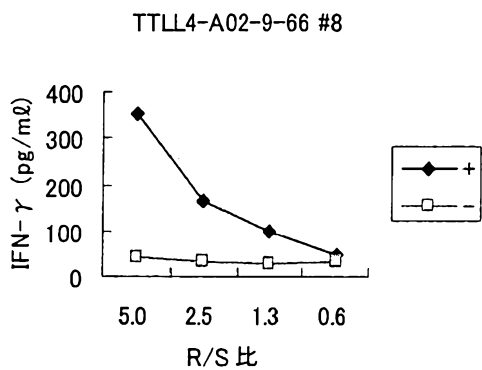
a



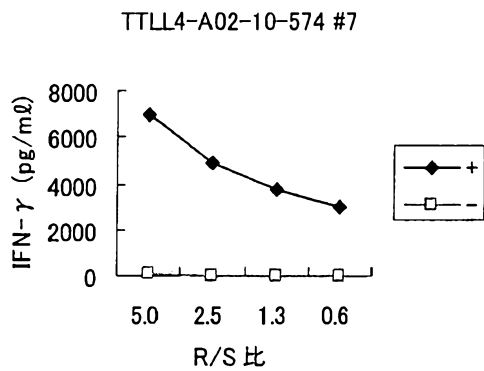
b



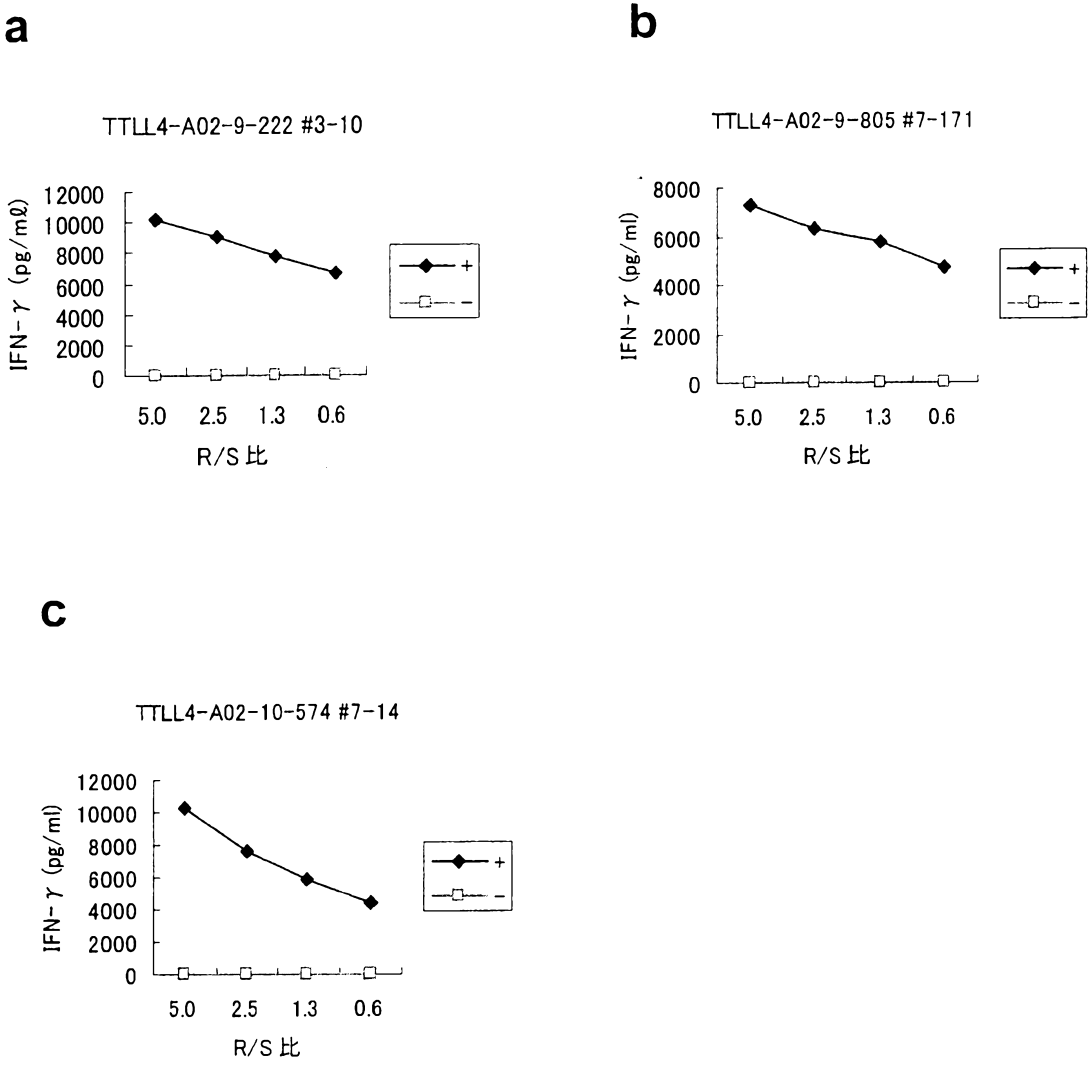
c



d

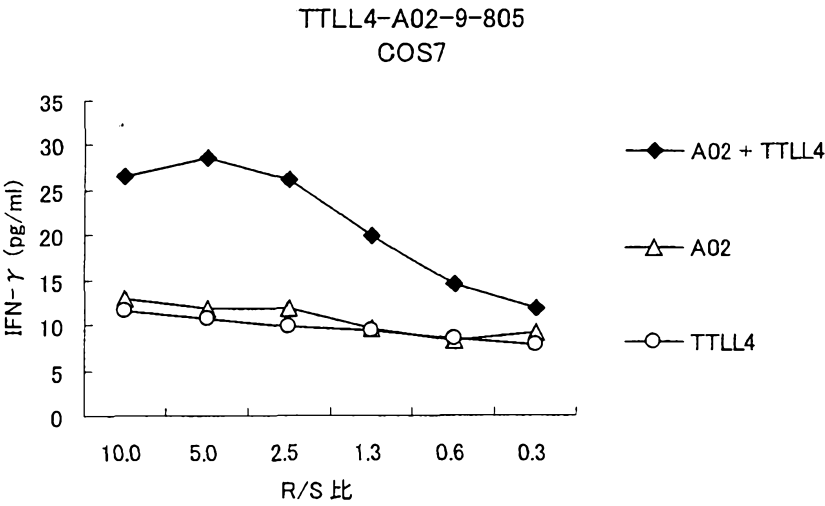


第6圖

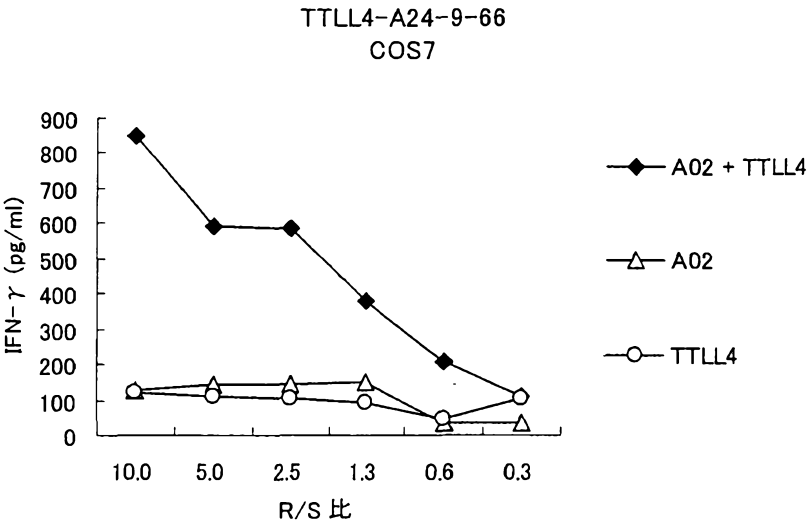


第7圖

a



b



第8圖

the TTLL4 gene that elicit CTLs are provided. Antigen-presenting cells and isolated CTLs that target such peptides, as well as methods for inducing the antigen-presenting cell, or CTL are also provided. The present invention further provides pharmaceutical compositions containing peptides derived from TTLL4 or polynucleotides encoding the polypeptides as active ingredients. Furthermore, the present invention provides methods for the treatment and/or prophylaxis of (i.e., preventing) cancers (tumors), and/or the prevention of a postoperative recurrence thereof, as well as methods for inducing CTLs, methods for inducing anti-tumor immunity, using the peptides derived from TTLL4, polynucleotides encoding the peptides, or antigen-presenting cells presenting the peptides, or the pharmaceutical compositions of the present invention.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

濃度下)，於其下在平衡下 50% 之與目標序列互補的探針雜合至目標序列。由於目標序列通常存在過量，所以於 T_m ，在平衡下 50% 之探針被佔據。一般而言，嚴苛條件為於其中鹽濃度低於 1.0 M 鈉離子，一般約 0.01 至 1.0 M 鈉離子（或其他鹽）於 pH 7.0 至 8.3，且對於短探針或引子（例如，10 至 50 個核苷酸）而言溫度為至少約 30°C，對於較長探針或引子而言溫度為至少約 60°C。也可以添加去穩定試劑（destabilizing substances），例如甲醯胺（formamide）來達到嚴苛條件。

本發明之探針或引子一般為一實質上經純化之寡核苷酸。寡核苷酸一般包括核苷酸序列之一區域，其在嚴苛條件下雜合至至少約 2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50 或 25 包括一 TTLL4 序列之一核酸之連續意義股（consecutive sense strand）核苷酸序列，或包括一 TTLL4 序列之一核酸之反意義股（anti-sense strand）核苷酸序列，或這些序列之自然發生突變體。特別是，例如，在一較佳實施例中，一於長度具有 5-50 之寡核苷酸可被使用為用來擴大要被偵測之基因的一引子。更佳為，可以於長度具有 15-30b 之寡核苷酸探針或引子來偵測 TTLL4 基因之 mRNA 或 cDNA。大小的範圍始於至少 10 個核苷酸、至少 12 個核苷酸、至少 15 個核苷酸、至少 20 個核苷酸、至少 25 個核苷酸、至少 30 個核苷酸，且探針與引子延伸大小始於 5-10 個核苷酸、10-15 個核苷酸、15-20 個核苷酸、20-25 個核苷酸與 25-30 個核苷酸。在較佳實施例中，

寡核苷酸探針或引子的長度可被擇自 15-25。藉由使用此種寡核苷酸探針或引子之用於基因偵測的分析程序、裝置或試劑為本技術領域所熟知(例如,寡核苷酸陣列或 PCR)。在這些分析中,探針或引子也可包括標籤(tag)或連結器(linker)序列。此外,可以可偵測之標誌或要被捕捉之親合配體來修飾探針或引子。或者在雜合偵測程序中,於長度具有少數百的鹼基(例如,約 100-200)至少數千(kilo)(例如,約 1000-2000)之鹼基的多核苷酸可被用於一探針(例如,北方墨點分析或 cDNA 微陣列分析)。

或者,為了本發明之診斷可偵測轉譯產物。例如,可偵測 TTLL4 蛋白質(序列辨識號:80)或其免疫活性片段之量。測定作為轉錄產物之蛋白質的量的方法包括免疫分析方法,其使用一抗體專一辨認此蛋白質。抗體可為單株或多株。此外,抗體之任何片段或修飾(例如嵌合型抗體(chimeric antibody)、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)可被用來偵測,只要片段或經修飾之抗體維持對 TTLL4 蛋白質的結合能力。本發明也提供抗本發明胜肽與其片段的這類抗體。這些用於蛋白質偵測之這些種類的抗體的製備方法為本技術領域所熟知,且任何方法可被使用於本發明中以製備此種抗體與其等同物(equivalent)。

如根據 TTLL4 基因轉譯產物偵測 TTLL4 基因之表現程度的另一方法,使用抗 TTLL4 蛋白質之抗體經由免疫組織化學(immunohistochemical)分析可測量到染色強度。即,於此測量中,強的染色指出經增加之蛋白質的存在/程度,

使用複合物，可執行診斷，例如藉由將來自被懷疑遭受癌症之個體的周邊血液淋巴球(peripheral blood lymphocytes)中之抗原-肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球進行定量。

本發明更提供藉由使用此處敘述之肽抗原決定位，用以評估免疫反應之診斷試劑。在本發明一實施例中，如上述之 HLA-A24 或 HLA-A2 限制肽被使用為評估或預測一個體之免疫反應的試劑。藉由將免疫抗原(immunogen)與免疫活性細胞(immunocompetent) *in vivo* 或 *in vitro* 接觸可誘導要被評估之免疫反應。在較佳實施例中，用以評估一免疫反應的免疫活性細胞可選擇自周邊血液、周邊血液淋巴球(PBL)、與周邊血液單核細胞(PBMC)中。收集或分離此類免疫活性細胞的方法為本技術領域所熟知。在一些實施例中，可導致抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球的產生的任何試劑可使用為試劑，而細胞毒殺性 T 淋巴球辨認與結合至肽抗原決定位。肽試劑可必須不被使用為免疫抗原。用於此類分析之分析系統包括相當新近之技術發展，例如四聚體，對細胞內淋巴激素(lymphokines)之染色與干擾素釋放分析或 ELISPOT 分析。在較佳實施例中，要被以肽試劑接觸之免疫勝任細胞可為抗原呈現細胞，其包括樹突細胞。

例如，本發明肽可使用於四聚體染色分析以評估為了抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球存在之周邊血液單核細胞，在暴露至腫瘤抗原或一免疫抗原後。HLA 四聚體複合

物可被使用來直接顯現抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球（參見，例如 Ogg *et al.*, Science 279: 2103-2106, 1998; 及 Altman *et al.*, Science 174 : 94-96, 1996），並測定於周邊血液單核細胞之樣本中的抗原專一細胞毒殺性 T 淋巴球族群的頻率。使用本發明胜肽之四聚體試劑可如下被產生。

在對應之 HLA 重鏈與 $\beta 2$ -微球蛋白存在下重新折疊結合至 HLA 之胜肽，以產生三分子複合物。在複合物中，重鏈之羧端為經生物素化於一預先設計進入蛋白質之位置。之後將卵白素加至複合物以形成由三分子複合物與卵白素 (streptavidin) 所組成之四聚體。藉由以螢光標誌卵白素的方式，可使用四聚體來對抗原呈現細胞染色。之後可鑑定細胞，例如藉由流式細胞技術。此類分析可被用於診斷與預後 (prognostic) 目的。藉由此程序鑑定之細胞也可被用於治療目的。

本發明也提供評估免疫收回反應 (immune recall responses) 之試劑（參見，例如 Bertoni *et al.*, J. Clin. Invest. 100 : 503-513, 1997 與 Penna *et al.*, J Exp. Med. 174 : 1565-1570, 1991），其包括本發明之胜肽。例如，為了抗原-專一細胞毒殺性 T 淋巴球的存在，使用特定專一胜肽，可分析來自具有要被治療之癌症之個體的病患 PBMC 樣本。藉由培養 PBMC 與以本發明胜肽刺激細胞可評估含單核細胞之血液樣本。在適合之培養期間後，例如為了細胞毒殺性 T 淋巴球活性，分析經擴張之細胞族群。