



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I627182 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：103117728

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 05 月 21 日

(51)Int. Cl. : C07K14/435 (2006.01)

C12N5/0783 (2010.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

(30)優先權：2013/05/24 日本

2013-109567

(71)申請人：腫瘤療法 科學股份有限公司 (日本) ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (JP)
日本(72)發明人：西村泰治 NISHIMURA, YASUHARU (JP)；冨田雄介 TOMITA, YUSUKE (JP)；平
山真敏 HIRAYAMA, MASATOSHI (JP)；大沢龍司 OSAWA, RYUJI (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

WO 2011/067920A1

Melief, Cornelis JM, and Sjoerd H. Van Der Burg. "Immunotherapy of established (pre) malignant disease by synthetic long peptide vaccines." Nature Reviews Cancer 8.5 (2008): 351-360.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：5 共 116 頁

(54)名稱

對於 TH 1 細胞之 IMP-3 抗原決定位胜肽及含此之疫苗

IMP-3 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57)摘要

於此揭示具有 Th1 細胞誘導能力之單離的的自 IMP-3 衍生的抗原決定位胜肽。此種胜肽可藉由 MHC 第 II 類分子辨識並誘導 Th1 細胞。於較佳具體例中，此種本發明之胜肽可混雜地 (promiscuously) 結合於 MHC 第 II 類分子並且除了誘導 Th1 細胞更誘導 IMP-3 專一性細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。因此此種胜肽適用於增強一對象中之免疫反應，因而於癌免疫療法中，特別是作為癌疫苗提供效用。於此也揭示編碼為任意上述胜肽的聚核苷酸、由此種胜肽所誘導的 APC 與 Th1 細胞，及與其相關的誘導方法。包含任意上述成分作為有效成分的醫藥組合物，提供效用於癌症或腫瘤之治療及/或預防，此癌症或腫瘤包括例如膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)。

Isolated IMP-3-derived epitope peptides having Th1 cell inducibility are disclosed herein. Such peptides can be recognized by MHC class II molecules and induce Th1 cells. In preferred embodiments, such a peptide of the present invention can promiscuously bind to MHC class II molecules and induce IMP-3-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in addition to Th1 cells. Such peptides are thus suitable for use in enhancing immune response in a subject, and accordingly find use in cancer immunotherapy, in particular, as cancer

vaccines. Also disclosed herein are polynucleotides that encode any of the aforementioned peptides, APCs and Th1 cells induced by such peptides and methods of induction associated therewith. Pharmaceutical compositions that comprise any of the aforementioned components as active ingredients find use in the treatment and/or prevention of cancers or tumors including, for example, bladder cancer, cervical cancer, cholangiocellular carcinoma, chronic myelocytic leukemia, colon cancer, rectum cancer, esophageal cancer, gastric diffuse-type cancer, non-small-cell lung cancer (NSCLC), small-cell lung cancer (SCLC), lymphoma, osteosarcoma, ovarian cancer, renal carcinoma, soft tissue tumor, testicular tumor, and HNC.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 (中文/英文)

對於 TH1 細胞之 IMP-3 抗原決定位胜肽及含此之疫苗 /
IMP-3 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES
CONTAINING THE SAME

【技術領域】

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

【0002】

優先權

本申請案基於 2013 年 5 月 24 日提申的日本專利申請案號 JP2013-109567 主張優惠，其完整內容引入於此作為參考。

【先前技術】

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

【0004】對於癌細胞的增殖與存活不可欠缺之 TAA 對於做

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

【0005】最近，本案發明人利用基因組寬 cDNA 微陣列分析鑑別出一種癌胚抗原，類胰島素生長因子 II mRNA 結合蛋白 3 (IMP-3)，其經常於肺癌、頭頸癌(HNC)、食道癌及各種其他的惡性腫瘤中過度表現(非專利文獻 14，專利文獻 1-3)。

【0006】本案發明人也鑑別出能夠從肺癌病患的周邊血液單核細胞(PBMC)誘導經 HLA-A2(A*02:01)限制之 CTL 及經 HLA-A24(A*24:02)限制之 CTL 之高免疫原性 IMP-3-衍生短胜肽(SPs)(非專利文獻 14, 15，專利文獻 2, 3)。所以，IMP-3 維持為癌症免疫療法的一具吸引力的標靶分子。使用 IMP-3 衍生 CTL 抗原決定位對肺癌、頭頸癌(HNC)、食道癌、及大腸直腸癌之癌症免疫療法階段 I/II 臨床試驗正在進行著(非專利文獻 14-18)。腫瘤專一性 CD4⁺ 輔助 T (Th) 細胞，特別是 T-輔助 1 型 (Th1) 細胞，在有效率地誘導 CTL 媒介之抗腫瘤免疫性方面扮演關鍵性角色(非專利文獻 19)。主要由 Th1 細胞產生的 IFN- γ ，對

於誘導及維持長期CTL反應係關鍵性的，其介由對於保持免疫記憶為關鍵性之多重交互作用提供幫助（非專利文獻20, 21）。Th1細胞所分泌的IFN- γ ，也媒介直接的抗腫瘤或抗血管生成作用(非專利文獻22)。又，據顯示Th細胞必須鋪路以供CTL進入腫瘤部位(非專利文獻23)。所以，能夠活化專一性Th1細胞的腫瘤關連抗原(TAA)-衍生的Th細胞抗原決定位的鑑別，對於在罹患腫瘤的主體誘導有效的腫瘤免疫是重要；理想上，設計有效的疫苗應包括多個抗原決定位，以刺激CTL與Th1細胞兩者(非專利文獻24)。但是，目前尚未鑑別出衍生自IMP-3IMP-3的此種抗原決定位。

[引用列表]

[專利文獻]

【0007】

[專利文獻 1] WO2004/031413

[專利文獻 2] WO2007/013665

[專利文獻 3] WO2007/013671

[專利文獻 4] WO2006/090810

[專利文獻 5] WO2011/067920

[非專利文獻]

【0008】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[非專利文獻 14] Tomita Y, et al., Cancer Sci
2011;102:71-8

[非專利文獻 15] Suda T, et al., Cancer Sci 2007;98:1803-8

[非專利文獻 16] Mizukami Y, et al., Cancer Sci 2008;99:1448-54

[非專利文獻 17] Kono K, *et al.*, Cancer Sci 2009;100:1502-9

[非專利文獻 18] Kono K, et al., J Transl Med 2012;10:141

[非專利文獻 19] Chamoto K *et al.* Cancer Res 2004;64: 386-90

[非專利文獻 20] Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004;4: 595-602

[非專利文獻 21] Shedlock DJ and Shen H. Science 2003;300: 337-9

[非專利文獻 22] Street SE et al. Blood 2001;97: 192-7

[非專利文獻 23] Bos R, and Sherman LA. Cancer Res;70: 8368-77

[非專利文獻 24] Melief CJ et al. Nat Rev Cancer 2008;8: 351-60

【發明內容】

【0009】於本發明之上下文，本案發明人考慮一種理想的供癌免疫療法的胜肽疫苗係包括針對 CTL 與 Th1 細胞兩者的抗原決定位的單一胜肽，此兩者的抗原決定位在天然上係彼此靠近(Kenter GG et al. N Engl J Med 2009;361: 1838-47.)。

【0010】為此，本案發明人設計一策略以鑑別一新穎的 IMP-3 衍生的 Th1 細胞的抗原決定位，其係由混雜的 HLA 第

II 類分子之背景中辨識且含有 CTL 抗原決定位，並假設所辨識之抗原決定位會誘導更有效率之經 T 細胞媒介之腫瘤免疫性。使用了預測 HLA 第 II 類結合胜肽與已知由經 HLA-A24 (A*24:02)或 HLA-A2(A*0201)限制之 CTL 辨識之 CTL 抗原決定位序列的電腦演算法，來選擇候選的含有 CTL 抗原決定位之混雜的 HLA-第 II 類限制 Th1 細胞抗原決定位。

【0011】本發明至少部分係基於發現作為誘導 Th1 細胞反應之免疫療法的標靶的適合抗原決定位胜肽。體認到 IMP-3 基因在一些癌症類型中係向上調控，包括膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病 (chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、小細胞肺癌 (SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌 (HNC)，本發明目標為進一步分析此 IMP-3 基因之基因產物，特別是由 GenBank 存取如編號 NM_006547.2 (序列識別號：5)所示之基因編碼陳列於之序列識別號：6 中的多胜肽。在進一步的研究中特別選擇含有會誘導專一於對應分子之 Th1 細胞的抗原決定位胜肽的 IMP-3 基因產物。例如，將從健康捐贈者獲得之周邊血液單核細胞 (PBMC)使用衍生自人類 IMP-3 的混雜的 HLA-DR 及/或 DP 結合胜肽予以刺激。建立辨識經以各別的候選胜肽脈衝的 HLA-DR 或 DP 陽性目標細胞的 Th1 細胞，並且鑑別可誘導對抗 IMP-3 之有效及專一性免疫反應之經 HLA-DR 及/或 DP 限制之抗原決定位胜肽。此等結果證明 IMP-3 有強力的免疫原性，且其抗原決定位對於經由 Th1 細胞反應媒介的腫

瘤免疫療法有效。更進一步的研究顯示含有至少一種 CTL 抗原決定位之混雜的 HLA-DR 及/或 DP 結合胜肽也會在同一捐贈者以 IMP-3 專一性的方式刺激 CTL 反應。此等結果確認 IMP-3 係強力免疫原性，且含有 Th1 細胞與 CTL 抗原決定位兩者之其抗原決定位，對於經由 Th1 細胞與 CTL 反應媒介之腫瘤免疫療法係有效。

【0012】因此本發明之一目的係提供具有 Th1 細胞誘導能力及選自序列識別號：1 與 2 之胺基酸序列的胜肽。本發明思考修飾之胜肽，即具有 Th1 誘導能力且長度至多 30 個胺基酸且具有選自序列識別號：6 (IMP-3)之胺基酸序列之連續胺基酸序列的胜肽，及其功能上均等物。或者，本發明提供一具有 Th1 細胞 CTL 兩者的誘導能力的胜肽。於一些具體例，本發明之胜肽回應於序列識別號：1 或 2 之胺基酸序列或其經修飾的版本，其中，有 2 個或更多的胺基酸被取代、刪除、插入及/或加成而仍維持誘導 Th1 細胞的能力。

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

【0014】投予一或更多本發明之胜肽或編碼為此種胜肽之聚核苷酸，或呈現此種胜肽或其片段之抗原呈現細胞，會因而

誘導強力的抗腫瘤免疫反應。因此本發明之又一目的為提供一種醫藥藥劑或組合物，其包含作為有效成分如以下成分中之一或更多種：(a)一或多種本發明之胜肽、(b)一或多種編碼為此種胜肽之聚核苷酸，及(c)一或多種本發明之抗原呈現細胞。如此之本發明之醫藥藥劑或組合物，特別作為疫苗有用。

【0015】本發明另一目的為提供癌症(即腫瘤)之治療及/或預防(亦即(避免)及/或避免其術後再復發之方法。也考慮用於誘導 Th1 細胞或用於誘導抗腫瘤免疫性之方法，包括投予一或多種本發明之胜肽、聚核苷酸、抗原呈現細胞、或醫藥藥劑或組合物的步驟。再者，本發明之 Th1 細胞，也發現有用於作為對抗癌症之疫苗，例子包括但不限於膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)。

【0016】本發明特別考慮之目的的例子包括以下各項：

[1] 一種單離的胜肽，其長度為 10-30 個胺基酸且包含序列識別號：6 的一部分胺基酸序列，其中該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列：

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

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

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

[3] 如[2]之單離的胜肽，其中，該 MHC 第 II 類分子選自於由 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 構成之群組。

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

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

(a) 一胺基酸序列，其選自於序列識別號：1 及 2 構成之群組；及

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

[6] 一種單離的聚核苷酸，其編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽。

[7] 一種組合物，係用於誘導選自於由以下構成之群組中至少一種細胞：

(i) Th1 細胞

(ii) CTL

(iii)有能力誘導 Th1 細胞之抗原呈現細胞(APC)，及

(iv) 有能力誘導 CTL 之 APC；

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

[8] 一種醫藥組合物，包含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分：

(a) 一或多種如[1]至[5]中任一項之胜肽；

(b) 一或多種如[6]之聚核苷酸；

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

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

(e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合；

且此組合物被配製為供選自於由下列構成之群組中之用途：

(i) 癌治療

(ii) 癌預防

(iii) 預防癌之術後再復發，及

(iv) 上述(i)至(iii)中任意兩或更多種的組合。

[9] 如[8]之醫藥組合物，其中該組合物被配製為投予至以選自於由 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 構成之群組中至少一種作為 MHC 第 II 類分子之對象，或如[8]之醫藥組合物，其中該組合物被配製為投予至具有至少一種 MHC 第 II 類分子係選自於由 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 構成之群組之對象。

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

[11] 一種組合物，係供增強由 MHC 第 II 類分子媒介之免

疫反應，該組合物包含選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分：

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

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

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

- (a) 使 APC 於體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)與如[1]至[5]中任一項之胜肽接觸;及
- (b) 將編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽的聚核苷酸導入 APC。

[14] 一種誘導 Th1 細胞之方法，包含選自於由以下構成之群組中之步驟：

- (a) 共同培養 CD4⁺ T 細胞，及在表面呈現 MHC 第 II 類分子與如[1]至[5]中任一項之胜肽或其片段之複合體的 APC;及
- (b) 將編碼為兩種 T 細胞受體(TCR)次單元之聚核苷酸、或編碼為各 TCR 次單元之聚核苷酸導入 CD4⁺ T 細胞內，其中

該 TCR 能結合於在細胞表面上呈現的 MHC 第 II 類分子與如 [1] 至 [5] 中任一項之胜肽或其片段之複合體。

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

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

(b) 共同培養 $CD8^+$ T 細胞，及已接觸如 [4] 或 [5] 之胜肽的 APC。

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

(a) 一或多種如 [1] 至 [5] 中任一項之胜肽；

(b) 一或多種如 [6] 之聚核苷酸；

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

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

(e) 以上 (a) 至 (d) 中任意兩或更多種的組合。

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

[18] 一種 APC，係由如 [12] 或 [13] 之方法所誘導。

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

[20] 一種 Th1 細胞，係由如 [14] 之方法所誘導。

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

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

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

[23] 一種載體，包含編碼為如[1]至[5]中任一項之胜肽的核苷酸序列。

[24] 一種宿主細胞，其經過以如[23]之表現載體轉形或轉染。

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

【0017】 如上述之外，當閱讀下列詳細敘述並結合伴隨之圖式與實施例時，本發明之其他目標或特徵將變得更全然明顯。然而，需要瞭解的是，本發明之前述發明內容與下列詳細敘述為做為例子之實施例，並不限制本發明或本發明之其他替代實施例。特別是，當以一些特定實施例敘述本發明於此處，可以瞭解的是，敘述為說明本發明，並不被構築為本發明之限

制。熟悉此技藝人士可想到各種修飾與應用，而不違反本發明之精神與範圍，如附上之申請專利為所描述。同樣地，從此發明內容與下述特定實施例，本發明之其他目標、特徵、優勢與優點為明顯的，且對熟悉此技藝人士而言為無困難地明白無誤。自上述結合併隨之例子、資料、圖式與由其而來被描寫之所有合理的推論，單獨或考慮此處引入之參考文獻，上述的目標、特徵、優勢與優點為明顯。

【圖式簡單說明】

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

【0019】

[第 1 圖]

第 1 圖顯示 IMP-3 衍生及混雜的 HLA 第 II 類結合 IMP-3 胜肽，其包括由最近發展的電腦演算法預測的 CTL 抗原決定位。於 A 部分，使用一演算法 (IEDB analysis resource，一致性
方 法：
tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html) 分析人類 IMP-3 蛋白質之胺基酸序列。水平軸上之數字代表 IMP-3 衍生之 15 員胜肽在 N 端的胺基酸位置。越高的一致性百分等級(percentile rank)代表對於 HLA 第 II 類分子的結合親合性越強。於 B 部分，合成重疊的 22 員及 21 員的長胜肽 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 及 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP，其對於多種 HLA 第 II 類對偶基因 (DRB1*09:01、DRB1*04:05 及 DRB1*15:02) 產物具有高

一致性百分等級，以及合成由 HLA-A24 (IMP-3-A24₅₀₈₋₅₁₆)或經-A2 (IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃)限制之 CTL 辨識之 9 員胜肽(A, 黑條)。

[第 2A-B 圖]

第 2 圖代表從健康捐贈者誘導 IMP-3 專一性 Th 細胞。於 A 部分，由於以 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 刺激，從 DR53⁺ 健康捐贈者 (HD1)產生 IMP-3 專一性 Th 細胞。對此產生的 Th 細胞以經 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 脈衝之自體 PBMC 或 L 細胞再度刺激。使用 WT1 胜肽作為對照胜肽。IFN- γ 產生 Th 細胞之數目以 ELISPOT 分析法分析。顯示從 HD1 獲得之至少 3 次有類似結果之獨立實驗的代表性資料。在分格頂端顯示捐贈者 HD1 之 HLA 第 II 類基因型。畫底線之 HLA 第 II 類對偶基因編碼將此胜肽對於 Th 細胞呈現之 HLA 第 II 類分子。於 B 部分，利用 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 刺激，從 DR53 陰性、DR8 陽性健康捐贈者 (HD2) 產生 IMP-3 專一性 Th 細胞。

[第 2C-E 圖]

於 C 部分，藉由以 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 刺激，從健康捐贈者 (HD3)產生經 HLA-DR 限制之 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 專一性 Th 細胞。於 D 部分，藉由以 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 刺激，從健康捐贈者 (HD3) 產生經 HLA-DR 限制之 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 專一性 Th 細胞。於 E 部分，藉由以 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 刺激，從健康捐贈者 (HD4)產生經 HLA-DR9 限制之 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 專一性 Th 細胞。

[第 3 圖]

第 3 圖顯示由 DC 呈現之經天然處理的 IMP-3-LPs。於 A 部分，由捐贈者 HD4 所建立之經 HLA-DR9 限制之

IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 專一性 Th 選殖體辨認出載有重組 IMP-3 蛋白質的自體 DC。顯示有類似結果的至少 2 次獨立實驗的代表性資料。於 B 部分，由捐贈者 HD4 所建立之經 HLA-DR53 限制之 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 專一性 Th 選殖體辨認出裝載有重組 IMP-3 蛋白質的自體 DC。

[第 4A 圖]

第 4 圖顯示由 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 專一性散裝 Th 細胞所產生的細胞激素曲線(profile)。於 A 部分，在 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 存在下，將 Th 細胞和自體 PBMC 共同培養 24 小時後，收集培養懸浮層並使用 Bio-Plex 分析系統測量細胞激素(IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、GM-CSF、IL-4、及 IL-7)的濃度。資料以三重複之平均 $\pm$ SD 表示。

[第 4B 圖]

於 B 部分，在抗原性刺激後，偵測散裝 IMP-3 專一性 CD4⁺ T 細胞表面曝露的 CD107a。以 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP、IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP、或無關的胜肽再度刺激細胞。顯示之事件係針對 CD4⁺ T 細胞閘控(gated on)。在圖中的數字代表有此象限特性的細胞群體的百分比(CD4⁺ CD107a⁺ T 細胞)。

[第 5 圖]

第 5 圖顯示 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 於體外(*in vitro*)和體內(*in vivo*)誘導有效率的 CTL 交叉起動(cross-priming)。於 A 部分，將從健康捐贈者之 PBMC 單離的 CD8⁺ T 細胞以週的間隔以經 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 脈衝的自體 DC 進行刺激。在至少 3 回合刺激後，於體外(*in vitro*)藉由 IFN- γ ELISPOT 分析檢驗 IFN- γ 產生

的 CD8⁺ T 細胞數量。於 B 部分，將 HLA-A2 Tgm 以乳化於不完全佛洛依德佐劑(IFA)中之 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 實施免疫。第 2 次接種 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 疫苗後，以經 IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃ 短胜肽或 HIV-A2 短胜肽脈衝的 BM-DC 刺激鼠蹊部淋巴結中的小鼠 CD8⁺ T 細胞。於生物體外(*ex vivo*)藉由 ELISPOT 分析檢驗 IFN- γ 產生的小鼠 CD8⁺ T 細胞數量。顯示至少 3 次有類似結果之獨立實驗的代表性資料。

【實施方式】

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

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

【0022】I. 定義

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

【0023】

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

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

【0025】 用語「實質上不含細胞材料」，包括製備一胜肽，其中該胜肽係從其單離的細胞的細胞成分分離，或重組產生。因此，實質上不含細胞材料的胜肽，包括多胜肽之製備物其具有少於約 30%、20%、10%或 5% (以乾重計)的異質蛋白質(在此也稱為「污染蛋白質」)。當該胜肽係以重組產生時，其亦較佳為實質上不含培養基，其包括胜肽之製備物且具有少於約該胜肽製備物的 20%、10%、或 5%體積的培養基。當該胜肽係以化學合成生產時，較佳為實質上不含化學前驅體或其他化學物質，其包括胜肽之製備物且少於約該胜肽製備物的 30%、20%、10%、5% (以乾重計)之涉及合成該胜肽的化學前驅體或其他化學物質。含有經單離的或經純化的胜肽的特定胜肽，例如可藉由將該在蛋白質製備物進行之十二烷基硫酸鈉(SDS)聚丙烯醯胺凝膠電泳與考馬西亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色或類似之膠體後之單一譜帶的出現而顯示。於一較佳具體例，本發明之胜肽及聚核苷酸係經單離的或經純化。

【0026】 用語「多胜肽」、「胜肽」及「蛋白質」在此係

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

【0027】用語「胺基酸」在此意指天然發生的及合成的胺基酸，及胺基酸類似物及與天然發生的胺基酸的作用類似的胺基酸擬似物。天然發生的胺基酸係由遺傳碼編碼者，以及於細胞中轉譯後經過修飾者(例如羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸，及 *O*-磷絲胺酸)。用詞「胺基酸類似物」意指與天然發生胺基酸具有相同基本化學結構(鍵結於氫的 α -碳、羧基、胺基及 R 基)但是具有經過修飾的 R 基或經過修飾的骨架(例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸、亞砷、甲硫胺酸甲基銻鹽)。用詞「胺基酸擬似物」意指與一般胺基酸具有不同結構但有類似功能的化學化合物。

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

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

用語「劑」、及「組合物」在此可互換使用，意指以特定量含有特定成分的產品，以及將該特定成分以特定量直接或間接組合得到的任意產品。關於醫藥組合物之此種用語係意欲包含含該有效成分及成為擔體的任意鈍性成分的產品，及由直接或間接組合、複合或聚集該等成分中任意 2 種或更多而獲得的

任意產品，或由該等成分中 2 種或更多解離而得到的任意產品，或由該等成分中 2 種或更多的其他類型的反應或交互作用而得到的任意產品。因此本發明之醫藥組合物包括藉由混合本發明化合物及醫藥上或生理上可接受擔體而製作的任意組合物。

【0030】用詞「有效成分」意指在組合物當中有生物學活性或生理活性的物質。尤其，於一醫藥組合物的背景中，「有效成分」係指顯示目標的藥理作用的物質。例如，當醫藥組合物使用在癌症治療或預防時，組合物中的有效成分可直接或間接引導至少一種作用在癌細胞及/或組織的生物學或生理學作用。較佳者，該作用包括減少或抑制癌細胞生長，損害或殺死癌細胞及/或組織等。通常，有效成分的間接作用係誘導 MHC 第 II 類分子媒介的免疫反應。在被配製(formulated)前，「有效成分」也稱為「散裝物質(bulk)」、「藥物物質」或「技術品」。此處使用之用語「醫藥上可接受之擔體」或「生理上可接受之擔體」，係指醫藥上或生理上可接受之材料、組合物、物質、化合物或載體，包括但不限於液體或固體填料、稀釋劑、賦形劑、溶劑或膠囊化材料。

【0031】除非另外定義，用語「癌症」意指表現 IMP-3 基因的癌症，例如包括膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)。表現 IMP-3 基因之癌症也被稱作

表現 IMP-3 之癌，或表現編碼 IMP-3 基因之癌。

【0032】除非另外定義，用語「T 淋巴球」及「T 細胞」在此可以互換使用。

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

【0034】除非另外定義，用語「HLA-A24」在此意指包含亞型 HLA-A24 的型，亞型的例子包括但不限於 HLA-A*2401、HLA-A*2402、HLA-A*2403、HLA-A*2404、HLA-A*2407、HLA-A*2408、HLA-A*2420、HLA-A*2425 及 HLA-A*2488。

【0035】除非另外定義，用語「HLA-A2」在此代表性意指亞型，亞型的例子包括但不限於 HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203、HLA-A*0204、HLA-A*0205、HLA-A*0206、HLA-A*0207、HLA-A*0210、HLA-A*0211、HLA-A*0213、HLA-A*0216、HLA-A*0218、HLA-A*0219、HLA-A*0228 及 HLA-A*0250。

【0036】除非另外定義，用語「T 輔助 1 型細胞」及「Th1 細胞」，在此係可互換使用，且除非特別指明，係指能夠辨識由 MHC 第 II 類分子呈現的胜肽且關連於細胞免疫的 $CD4^+$ T 淋巴球次群組。除非另有定義，用語「Th 細胞」、「 $CD4^+$ T 細胞」及「 $CD4^+$ 輔助 T 細胞」，在此亦可互換使用。Th1 細胞分泌多種細胞素(例如 $IFN-\gamma$ 、IL-2、TNF- β 、GM-CSF、TNF-

α 等)來幫忙活化及/或刺激其他關於細胞免疫的免疫細胞(例如 CTL、巨噬體)。

【0037】除非另有定義，用語「HLA-DR9」，係指亞型，其例子包括但不限於 HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*09:02、HLA-DRB1*09:03、HLA-DRB1*09:04、HLA-DRB1*09:05、HLA-DRB1*09:06、HLA-DRB1*09:07、HLA-DRB1*09:08 及 HLA-DRB1*09:09。

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

【0038】除非另有定義，用語「HLA-DR53」係指亞型，其例子包括但不限於 HLA-DRB4*01:01 及 HLA-DRB4*01:03。

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

【0039】除非另有定義，詞語「經由 MHC 第 II 類分子媒介的免疫反應」，係指由於 MHC 第 II 類分子呈現胜肽所誘導之免疫反應。在此「由 MHC 第 II 類抗原媒介之免疫反應」，包括由 CD4⁺ T 細胞，特別是 Th1 細胞誘導的免疫反應。此種免疫反應的例子包括但不限於生產細胞素(例如 IFN- γ 、IL-2、

TNF- β 、GM-CSF、TNF- α 等)，及活化及/或刺激其他免疫細胞(例如 CTL、巨噬體等)。

【0040】 除非另有定義，詞語「專一於 IMP-3 之 Th1 細胞」，係指由呈現衍生自 IMP-3 之胜肽的抗原呈現細胞所專一性活化，而不被其他抗原呈現細胞活化的 Th1 細胞。

【0041】 除非另有定義，詞語「IMP-3 專一性 CTL」，係指對抗表現 IMP-3 之目標細胞專一性顯示細胞毒殺性的 CTL。

除非另有定義，當使用在胜肽上下文，詞語「CTL 誘導能力」，係指一胜肽當被呈現於抗原呈現細胞上時，誘導 CTL 的能力。

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

【0042】 本發明上下文中，用語「抗體」意指專一性地對於指定蛋白質或其胜肽反應的免疫球蛋白及其片段。抗體可包括人類抗體、靈長源抗體、嵌合抗體、雙專一抗體、人類化抗體、融合於其他蛋白質或放射性標記的抗體，及抗體片段。再者，抗體在此係以最廣的含意使用，且具體而言含蓋完整無缺的單株抗體、多株抗體、由至少兩個完整無缺的抗體形成的多專一性抗體(例如雙專一性抗體)，及抗體片段，該抗體片段只要能顯現所望的生物學活性即可。「抗體」代表所有類型者(例如 IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM)。

除非另外定義，在此使用的所有技術及科學用語與本發明

所屬技術領域中具有通常知識者一般了解的含意相同。

【0043】 II. 胜肽

以下詳述之本發明之胜肽，可指稱為「IMP-3 胜肽」或「IMP-3 多胜肽」。

爲了證明衍生自 IMP-3 之胜肽作用如一被 T 輔助 1 型 (Th1) 細胞所辨認之抗原，分析衍生自 IMP-3 之胜肽 (序列識別號: 6) 以確定是否其爲由一 MHC 第 II 類分子混雜地限制之抗原決定位。衍生自 IMP-3 之混雜的 MHC 第 II 類結合胜肽的候選物，基於其對 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 之結合親和力確認。在藉由載有這些胜肽之樹突細胞 (dendritic cell, DC) 以體外刺激 CD 4⁺ T 細胞後，使用下列各個胜肽成功建立 Th1 細胞: IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP / QSETETVHLFIPALSVGAIIGK (序列識別號: 1) 及 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP / GKTVNELQNLSSAEVVVPRDQ (序列識別號: 2)。

【0044】 此等上述提及的已建立的 Th1 細胞，顯示回應於經各別的胜肽脈衝之抗原呈現細胞的刺激，顯示強的專一性的 Th1 細胞活性。再者，上述胜肽可以刺激由數種日本群體常見的 HLA-DR 及 HLA-DP 分子 (例如 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9) 限制的 Th1 細胞。此等結果證明 IMP-3 係由 Th1 細胞辨識的抗原，且此胜肽係受數種 HLA-第 II 類分子 (例如 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9) 混雜地限制的 IMP-3 的抗原決定位胜肽。

【0045】 上述鑑別的胜肽更包括一 CTL 抗原決定位之胺基酸序列，其有誘導專一於 IMP-3 之 CTL 的能力，且如同此處

證明，此胜肽可誘導專一於 IMP-3 之 CTL 及 Th1 細胞。因此此等胜肽作可用於誘導對抗表現 IMP-3 之癌的免疫反應之適合的胜肽。因為 IMP-3 基因在大多數癌組織係過度表現，包括例如膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病 (chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、小細胞肺癌 (SCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌 (HNC)，代表其係免疫療法的一個良好標的。

【0046】因此本發明提供有誘導專一於 IMP-3 之 Th1 細胞之能力的胜肽。本發明之胜肽可結合於至少一 MHC 第 II 類分子，並被呈現在抗原呈現細胞上。或本發明之胜肽之片段可結合於至少一 MHC 第 II 類分子，並被呈現在抗原呈現細胞上。此胜肽之片段，可藉由在抗原呈現細胞處理而產生。於較佳具體例，本發明之胜肽或其片段有能力結合 2 或更多種 MHC 第 II 類分子 (例如 HLA-DR53、HLA-DR8、HLA-DR14 及 HLA-DR9)。換言之，本發明之胜肽有能力誘導受 2 或更多種 MHC 第 II 類分子限制之 Th1 細胞。於另一具體例，本發明之胜肽包括有 IMP-3 專一性 CTL 誘導能力之胜肽之胺基酸序列。此種具 IMP-3 專一性 CTL 誘導能力的胜肽的典型例，包括有序列識別號：3 或 4 之胺基酸序列的胜肽。

【0047】由於 MHC 第 II 類分子中之結合溝係在兩端開放，所以可容 MHC 第 II 類結合胜肽於長度有靈活性。MHC 第 II 類分子的核心模體由 9 個胺基酸殘基組成，且 MHC 第 II 類結合胜肽一般在此核心結合模體的側面有其他的胺基酸殘基。側

面胺基酸殘基之數目不限。因此，並非序列識別號 1 或 2 之所有胺基酸殘基對結合 MHC 第 II 類分子為必要。因此本發明之胜肽可為有能力誘導 Th1 細胞之胜肽，此種胜肽包括選自於由以下構成之群組之胺基酸序列：

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

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

MHC 第 II 類結合胜肽通常為 10-30 個胺基酸。當序列識別號：1 與 2 之胺基酸序列係由 IMP-3 (序列識別號：6)之部分胺基酸序列構成，本發明之胜肽可為以下[1]至[5]之胜肽：

[1] 一種單離的胜肽，其長度為 10-30 個胺基酸且包含序列識別號：6 的一部分胺基酸序列，其中該胜肽包含選自由以下構成之群組的胺基酸序列：

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

(b) 一胺基酸序列，其中(a)之胺基酸序列有 1 個、2 個或數個胺基酸係經取代、刪除、插入及/或附加，該胜肽有誘導 T 輔助 1 型(Th1)細胞的能力。

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

[3] 如[2]之單離的胜肽，其中，該 MHC 第 II 類分子選自於由 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 構成之群組。

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

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

(a) 一胺基酸序列，其選自於序列識別號：1 及 2 構成之群組；及

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

【0048】本發明之胜肽誘導之 Th1 細胞對於 IMP-3 係專一。因此於一些具體例，本發明提供長度少於 30 個胺基酸之胜肽，其由序列識別號：6 的胺基酸序列的一部分胺基酸序列所構成，其中該胜肽包含序列識別號 1 或 2 之胺基酸序列。

【0049】一般而言，現在例如在網際網路上已有軟體程式例如 Wang P et al. 2008. *PLoS Comput Biol*. 4(4):e1000048. 11:568;及 Wang P et al. 2010. *BMC Bioinformatics* 所述者可用於以電腦模擬計算各種胜肽與 HLA 抗原的結合親和性。與 HLA 抗原的結合親和性可例如以於例如 Nielsen M and Lund O. 2009. *BMC Bioinformatics*. 10:296.; Nielsen M et al. 2007. *BMC Bioinformatics*. 8:238. Bui HH, et al. 2005. *Immunogenetics*. 57:304-314. Sturniolo T et al. 1999. *Nat Biotechnol*. 17(6):555-561 and Nielsen M et al. 2008. *PLoS Comput Biol*. 4(7)e1000107 敘述者測量。因此本發明包含 IMP-3 的胜肽，其係以此種已知程式決定會與鑑別的 HLA 抗原結合。

【0050】如上述，MHC 第 II 類結合胜肽在其長度有靈活性，序列識別號 1 或 2 之胺基酸序列可選擇性地有額外的胺基酸殘基位在側面，條件是獲得之胜肽保留必要的 Th1 細胞誘導能力即可。此種有 Th1 細胞誘導能力的胜肽一般少約於 30 個胺基酸，常少於約 29 個胺基酸，經常少於約 28 或 27 個胺基酸。位在選自序列識別號：1 與 2 中之胺基酸序列側面的特定胺基酸序列，不特別限制，且可包括任意種類胺基酸，條件是只要此側面胺基酸序列不要減弱原始胜肽之 Th1 細胞誘導能力即可。於典型的具體例，此種側面胺基酸序列可選自於鄰近於序列識別號：1 或 2 之胺基酸序列的序列識別號：6 之胺基酸序列；但本發明不限於此。如上，本發明也包括有 Th1 細胞誘導能力的胜肽，及選自序列識別號：1 與 2 之胺基酸序列。

【0051】另一方面，由於 MHC 第 II 類分子之核心結合模體由 9 個胺基酸殘基組成，所以序列識別號：1 或 2 之胺基酸序列全長對於結合 MHC 第 II 類分子及誘導 Th1 細胞並非為必要。因此，本發明胜肽之形式可為有超過來自序列識別號 1 或 2 之胺基酸序列之 9 個連續胺基酸的胜肽，前提是此胜肽保留必要的 Th1 細胞誘導能力。有 Th1 細胞誘導能力之胜肽，一般長於約 10 個胺基酸，時常超過 11 或 12 個胺基酸，經常長於 13 或 14 個胺基酸。因此本發明之胜肽可為有 Th1 細胞誘導能力之胜肽，且為有來自序列識別號：1 或 2 之胺基酸序列之長於 9、10、11、12、13 或 14 個連續胺基酸之胺基酸序列。

【0052】一般而言，已知在蛋白質中修飾一個或更多胺基酸不會影響該蛋白質的功能，或有時甚至會增強原始蛋白質的

所望功能。事實上，經修飾的胜肽(即，相較於原始參考序列，由在其中一、二或數個胺基酸殘基已被修飾(即，取代、刪除、插入或加成)之胺酸序列所構成的胜肽)已知會保留原始胜肽的生物學活性(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。因此，於本發明一具體例中，本發明之胜肽可具有 Th1 細胞誘導能力與其中一、二或更多胺基酸經加成、插入、刪除及/或取代之選自序列識別號：1 及 2 中的胺基酸序列兩者。或者，本發明之胜肽可具有 Th1 細胞誘導能力，及具有一胺基酸序列於其中一、二或更多胺基酸加成、插入、刪除及/或取代於序列識別號：1 或 2 中。

【0053】熟悉此技藝人士會認定改變單一胺基酸或一小百分比之胺基酸之對於一胺基酸序列的個別的添加或取代傾向產生保存原始胺基酸支鏈的特性。因此它們常被意指為「保守取代(conservative substitutions)」或「保守修飾(conservative modifications)」，其中一蛋白質之改變導致對原始蛋白質而言一具有功能相似的蛋白質。提供功能相似胺基酸之保守取代表已為本技術領域所熟知。胺基酸支鏈的特徵的例子為疏水胺基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水胺基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)與具有下列共同官能基或特徵之支鏈：一脂肪族支鏈(G, A, V, L, I, P)；一含羥基支鏈(S, T, Y)；含硫原子支鏈(C, M)；含羧酸與胺基支鏈(D, N, E, Q)；含鹼支鏈(R, K, H)；以及含芳香族支鏈(H, F, Y, W)。此外，下列八個群體各包含為

彼此保守取代之胺基酸：

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

Proteins 1984)。

【0054】此種經保守修飾胜肽也被視為本發明之胜肽。然而，本發明之胜肽並不限於此，且可包括非保守修飾，只要經修飾之胜肽維持原始胜肽的 Th1 細胞誘導能力。更進一步而言，經修飾之胜肽不排除多形變體(polymorphic variants)、種間同質體(interspecies homologues)與 IMP-3 對偶基因(alleles)可誘導 Th1 細胞的胜肽。

【0055】爲了維持 Th1 細胞誘導能力，可修飾(插入、加入、刪除/或取代)一小數目(例如一、二或數個)或小百分比之胺基酸。此處用語「數個」指 5 或更少個胺基酸，例如 4 個或 3 個或更少。被修飾之胺基酸之百分比可爲，較佳 20%或更少，更較佳爲，15%或更少，甚至更佳爲爲，10%或 8%，少或 1 至 5%。

【0056】本發明之較佳胜肽，即序列識別號：1 與 2 (IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP、IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP)之同源性分析結果確認此等

胜肽與其他任何已知人類基因產物所衍生的胜肽不具顯著同源性。所以，當使用於免疫療法時，可顯著降低這些胜肽產生未知或不欲的免疫反應的可能性。因此，此等胜肽被預期對於在癌症病患中誘出對抗 IMP-3 的免疫性高度有用。

【0057】 當使用於免疫療法之背景中，本發明之胜肽或其片段應呈現在抗原呈現細胞的表面，較佳為以與 HLA 第 II 類抗原之複合體的形式呈現。因此宜選擇不僅會誘導 Th1 細胞，而且對於 HLA 第 II 類抗原擁有高結合親和性的胜肽。為此，可將胜肽利用取代、插入、刪除及/或加成胺基酸殘基進行修飾，以產生結合親和性有所改善的修飾胜肽。

【0058】 本發明也考量附加一、二或數個胺基酸到該胜肽的 N 及/或 C 端。此種經修飾的具有高度 HLA 抗原結合親和性的胜肽並保留 Th1 細胞誘導能力者，也包括於本發明。

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

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

【0059】 但，當該胜肽序列與具有不同功能的內生或外生蛋白質的胺基酸序列有一部分相同時，可能會引起副作用，例如自體免疫病症或對於特定物質之過敏症狀。因此，可使用可

得的資料庫一開始進行同源性檢索，以避免該胜肽的序列符合其他蛋白質的胺基酸序列的情況。當與自然存在之目標胜肽相較，同源性檢索顯示沒有相同或與目標胜肽有 1 或 2 個胺基酸差異的胜肽時，可將該目標胜肽修飾以增強與 HLA 抗原的結合親和性，及/或增強其 Th1 細胞及/或 CTL 誘導能力而不會有此種副作用的危險。

【0060】 雖然上述對於該 HLA 第 II 類抗原具有高度結合親和性的胜肽，預期為高度有效，但是依照存在高度結合親和性當做指標的候選胜肽，仍然進一步要檢驗其 Th1 細胞誘導能力的存在性。在此，用詞「Th1 細胞誘導能力」代表當與抗原呈現細胞(APC)接觸時，胜肽經由抗原呈現細胞(APC)授予誘導 Th1 細胞的能力。又，「Th1 細胞誘導能力」包括胜肽誘導 Th1 細胞活化及/或 Th1 細胞增殖、促進 Th1 細胞媒介細胞激素產生，其包括 IFN- γ 產生，以幫助及/或刺激其他的細胞(例如 CTL、巨噬體)。

【0061】 Th1 細胞誘導能力的確認係由以下方式達成：誘導攜帶人類 MHC 抗原的 APC (例如 B-淋巴球、巨噬體、及樹狀細胞(DC))，或更具體而言，由人類周邊血液單核白血球衍生的 DC，與以該胜肽刺激後，與 CD4-陽性 T 細胞(CD4⁺ T 細胞)混合，然後測量該 CD4⁺ T 細胞生產與釋出的 IFN- γ 。或者，該胜肽的 Th1 細胞誘導能力，可藉由 Th1 細胞對於 CTL 之活化來評估。比如，將 CD4⁺ T 細胞與由測試胜肽刺激的 DC 一起培養，然後跟 CTL 及針對 CTL 之標靶細胞混合。可將目標細胞以 ⁵¹Cr 等放射性標定，從該 Th1 細胞釋出的細胞素所活化

的 CTL 的細胞毒殺活性，可藉由計算從該標靶細胞釋出的放射性活性計算。或者，Th1 細胞誘導活性，可藉由測量於經測試胜肽刺激的抗原呈現細胞(APC)存在下，Th1 細胞所生產及釋出的 IFN- γ ，並使用抗 IFN- γ 單株抗體使培養基上的抑制區可見化來評估。

【0062】除了上述修飾，本發明之胜肽可進一步連結於其他物質，只要所產生之經連結的胜肽保留原始胜肽的 Th1 細胞誘導能力即可。適當物質的例子包括，例如：胜肽、脂質、糖類及糖鏈、乙醯基、天然及合成的聚合物等。本發明之胜肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化等，所提供之修飾不會損害該原始胜肽的生物學活性。此等種類修飾可實施以用於提供額外的功能(例如標靶功能，及傳遞功能)，或使該胜肽穩定化。

【0063】例如，爲了增加一胜肽的體內穩定性，該技術領域中已知導入 D-胺基酸、胺基酸擬似物或非天然胺基酸；此概念也可採用於本發明之胜肽。一胜肽的穩定性，可以用多種方式分析。例如可使用胜肽酶及各種生物學介質，例如人類血漿及血清，以測試穩定性(參見例如 Verhoef *et al.*, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302)。

【0064】本發明之胜肽，可以與 HLA 第 II 類抗原一起以複合體形式呈現於 APC 之表面，然後誘導 Th1 細胞。因此本發明也包括與 HLA 第 II 類抗原形成複合體在 APC 表面上的胜肽。呈現本發明胜肽之 APC，可作爲疫苗接種。

【0065】包括在上述複合體中之 HLA 抗原之形式必須匹配

於須治療及/或預防之對象之 HLA 抗原之形式。例如，日本群體中，HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 係盛行，故適於治療日本病患。一般而言，臨床上會預先檢查須治療之病患的 HLA 抗原類型，以能夠適當選擇具有對於特定 HLA 第 II 類抗原結合之能力的胜肽。於較佳具體例，本發明之胜肽可以混雜的方式誘導 Th1 細胞。在此，當胜肽可誘導由至少 2 種不同的 MHC 第 II 類分子限制之 Th1 細胞時，則此胜肽之 Th1 細胞誘導能力係「混雜的(promiscuous)」。換言之，當一胜肽被至少 2 種不同的 MHC 第 II 類分子辨識，則此抗原辨識被視為「混雜的」。當使用於胜肽之上下文，詞彙「由至少 2 種不同之 MHC 第 II 類分子辨識」，係指此胜肽或其片段可結合於至少 2 種不同的 MHC 第 II 類分子。例如，IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP (序列識別號: 1)係被 HLA-DR8、HLA-DR14 及 HLA-DR53 辨識，而 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP(序列識別號: 2)係被 HLA-DR9 及 HLA-DR14 辨識。因此此等胜肽係「混雜的」抗原決定位的典型例。

【0066】 當使用 HLA-DR8、HLA-DR14 或 HLA-DR53 陽性 APC，宜使用具有序列識別號: 1 之胺基酸序列的胜肽。當使用 HLA-DR9 或 HLA-DR14 陽性 APC，較佳使用具有序列識別號: 2 之胺基酸序列的胜肽。

因此於較佳具體例，可使用具有胜肽的序列識別號: 1 之胺基酸序列，於在誘導前已鑑別具有 HLA-DR8、HLA-DR14 或 HLA-DR53 之對象中誘導 Th1 細胞。同樣地可使用具有胜肽的序列識別號: 2 之胺基酸序列，於在誘導前已鑑別具有 HLA-DR9 或 HLA-DR14 之對象中誘導 Th1 細胞。

【0067】 III. 製備 IMP-3 胜肽

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

【0068】 本發明之胜肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化；所提供之修飾不損害原始參考胜肽的生物學活性。可使用其他說明性的修飾，例如包括引入 D-胺基酸或其他胺基酸擬似物，以增加該胜肽的血清半衰期。

【0069】 本發明之胜肽可依據選擇的胺基酸序列由化學合成獲得。例如可採用於合成的習知胜肽合成方法包括：

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1975;
- (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1985;
- (v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (in Japanese), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;
- (vi) WO99/67288; 及
- (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

【0070】 或者，本發明之胜肽可採用任何已知用於生產胜

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

【0071】 IV. 聚核苷酸

本發明提供聚核苷酸，其編碼為前述本發明胜肽當中任意者。此包括從天然發生的 IMP-3 基因 (GenBank 存取號 NM_006547.2 (序列識別號: 5))衍生的聚核苷酸，及其具有經保守性修飾的核苷酸序列的那些。在此用詞「經保守性修飾的核苷酸序列」係指編碼為相同或基本上相同的胺基酸序列的序列。因為遺傳密碼的退化性，有大量的功能上相同的核酸會編碼為任意給定的蛋白質。比如，密碼子 GCA、GCC、GCG 及 GCU 都編碼為胺基酸丙胺酸。因此，當密碼子在每個位置指明丙胺酸時，該密碼子可改變成任意對應的所述密碼子，而不會改變所編碼的多胜肽。此種核酸變異為「靜默變異」，其為一種經保守性修飾的變異。每個在此敘述的編碼為一胜肽的核酸，也敘述所有該核酸的可能的靜默變異。該技術領域中具有通常知識者將體認到一核酸中的各密碼子(除了 AUG 以外，AUG 通常為甲硫胺酸的唯一密碼子，而 TGG 通常為色胺酸的唯一密碼子)可經修飾以產生功能上同一的分子。因此，編碼為一胜肽的核酸的各靜默變異係暗示敘述在各揭露的序列中。

【0072】本發明之聚核苷酸可由 DNA、RNA 及其衍生物構成。如該技術領域中爲人所知者，DNA 分子係適當的由鹼基例如 A、T、C 及 G 構成，而在 RNA 中 T 係置換爲 U。該技術領域中具有通常知識者將體認非天然發生的鹼基也會包括在聚核苷酸中。

【0073】本發明之聚核苷酸可編碼爲有或沒有中介(intervening)胺基酸序列的多種本發明之胜肽。例如，該中介胺基酸序列可提供該聚核苷酸或該經轉譯的胜肽的切斷部位(例如，酵素辨識序列)。再者該聚核苷酸可包括對於編碼爲本發明胜肽的編碼序列的任何額外的序列。例如該聚核苷酸可爲一重組聚核苷酸，其包括對表現該胜肽所需的調節序列，或可爲具有標記基因的表現載體(質體)等。一般而言，此種重組聚核苷酸可利用習知的重組技術，使用例如聚合酶及內切核酸酶操作聚核苷酸而製備。

【0074】重組及化學合成技術均可使用於生產本發明之聚核苷酸。例如聚核苷酸可藉由插到適當載體中而生產，該載體當轉染到勝任細胞內時可表現。或者，聚核苷酸可使用 PCR 技術放大，或在適當宿主中表現(參見例如 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者，聚核苷酸可使用固相技術合成，如 Beaucage SL & Iyer RP, *Tetrahedron* 1992, 48: 2223-311; Matthes *et al.*, *EMBO J* 1984, 3: 801-5 所敘述。

【0075】V. 抗原呈現細胞(APC)

本發明也提供抗原呈現細胞(APC)，其在表面上呈現於

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

【0076】該 APC 不限於特定種類的細胞，且包括但不限於樹狀細胞(DC)、蘭氏(Langerhans)細胞、巨噬體、B 細胞及經活化的 T 細胞，此等已知會在表面上呈現蛋白質性抗原，而會被淋巴球所辨識。因為 DC 係代表性的 APC，其在 APC 中具有最強的 Th1 細胞誘導活性，故 DC 當成本發明的 APC 有用。

【0077】再者，於較佳具體例，本發明之胜肽也會誘導經由 MHC 第 I 類抗原調節之 CTL 反應及 Th1(第 II 類)。一般，已周知 MHC 第 I 類抗原辨識的抗原決定位的長度較短(例如 8-10 個胺基酸殘基)於 MHC 第 II 類(15 或更長)。因此，本發明之胜肽之經處理產物造成誘導 CTL。事實上，由 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP (序列識別號：2)誘導的 CTL 會辨識已鑑別為 CTL 辨識抗原決定位之此片段(KTVNELQNL：序列識別號：3)及片段(NLSSAEVVV：序列識別號：4)。因此本發明之胜肽不僅會誘導 Th1，也會在 APC 中將其處理後誘導 CTL。換言之，與本發明之胜肽接觸過的 APC 會將此等處理以將此等片段與 MHC 第 I 類抗原一起呈現，且同時將此等的整體與 MHC-第 II 類抗原一起呈現。結果，使用本發明之胜肽，可以誘導 Th1，其辨識與 MHC-第 II 類抗原一起呈現於 APC 之本發明胜肽，並誘導經由該胜肽之已處理片段誘導的 CTL。

【0078】例如 APC 可藉由從周邊血液單核球誘導 DC，然後

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

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

【0079】該第一對象及第二對象可為同一個體或不同個體。或者，依本發明，提供使用本發明之胜肽製造用於誘導抗原呈現細胞的醫藥組合物的用途。此外，本發明提供製造用於誘導抗原呈現細胞的醫藥組合物的方法或處理，其中此方法包括將本發明之胜肽與醫藥上可接受的擔體混合或配製的步驟。又，本發明也提供用以誘導抗原呈現細胞的本發明之胜肽。由步驟(b)獲得的 APC 可作為疫苗對於該對象投予。

【0080】本發明一態樣中，本發明之 APC 有高水平的 Th1 細胞誘導能力。在此，用語「高水平的 Th1 細胞誘導能力」中，高水平係相對於 APC 沒有與胜肽或與不會誘導 Th1 細胞的胜肽接觸時的水平。在此，使用於 APC 的上下文時，用語「Th1 細胞誘導能力」，係指 APC 當與 CD4⁺ T 細胞接觸時誘導 Th1 細胞的能力。如此之具有高水平之 Th1 細胞誘導能力的 APC

可藉由包括於體外將含有編碼爲本發明胜肽的聚核苷酸的基因轉移到 APC 的步驟的方法來製備。該導入的基因可爲 DNA 或 RNA 形式。導入的方法的例子包括，而無特別限制，可使用各種在該領域中實施的習知方法，例如脂染、電穿孔或磷酸鈣法。更具體而言，可依照 *Cancer Res* 1996, 56: 5672-7; *J Immunol* 1998, 161: 5607-13; *J Exp Med* 1996, 184: 465-72; 國際公開號 2000-509281 的已公開的日文翻譯所述實施。藉由將該基因傳遞到 APC 中，該基因會在細胞中進行轉錄、轉譯等，然後獲得的蛋白質會由 MHC 第 I 類或第 II 類處理，並經一呈現路徑進行以呈現本發明之該胜肽。或者，本發明之 APC 可藉由以包括使 APC 接觸本發明胜肽之步驟的方法製備。

【0081】於較佳具體例，本發明之 APC，可爲呈現選自於由 HLA-DR8、HLA-DR14 及 HLA-DR53 構成之群組中之 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽(包括序列識別號: 1 之胺基酸序列)之複合體於其表面上的 APC。於另一具體例，本發明之 APC 可爲呈現於 HLA-DR9 及 HLA-DR14 中之 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽(包括序列識別號: 2 之胺基酸序列)之複合體於其表面上的 APC。較佳者，HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 可各爲 HLA-DRB1*0803、HLA-DRB4*0103、HLA-DRB*14:05 及 HLA-DRB1*0901。

【0082】 VI. T 輔助 1 型細胞 (Th1 細胞)

對抗任意本發明之胜肽所誘導之 Th1 細胞，會強化任意效應子細胞之免疫反應，此任意效應子細胞包括於體內標靶於癌細胞之 CTL，且可以與此胜肽本身以類似方式作爲疫苗。因此

本發明也提供單離的 Th1 細胞，其係由任意本發明之胜肽所專一性誘導或活化。

【0083】此種 Th1 細胞，可藉由(1)對於一對象投予一或多種本發明之胜肽，從此對象收集 Th1 細胞，(2)於體外以本發明之胜肽接觸(刺激)APC 及 $CD4^{+}$ T 細胞或周邊血液單核白血球，然後單離的 Th1 細胞，(3)於體外使 $CD4^{+}$ T 細胞或周邊血液單核白血球與本發明之 APC 接觸，或(4)導入編碼為 T 細胞受體(TCR)次單元兩者之聚核苷酸或編碼為各 TCR 次單元之聚核苷酸到 $CD4^{+}$ T 細胞中，其中此 TCR 可結合於 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽之複合體。如(3)之方法之 APC，可藉由上述方法製備。方法(4)的細節將於以下於項目「VII. T 細胞受體(TCR)」詳述。

【0084】藉由以本發明 APC 刺激而誘導之 Th1 細胞，可衍生自待治療及/或預防之病患，且其本身可供投予，或與包括本發明胜肽之其他藥物組合投予，以調節效應之用途。此獲得之 Th1 細胞可活化及/或刺激負責細胞免疫之免疫細胞(例如 CTL、巨噬體)。可由本發明之 Th1 細胞活化的此種免疫細胞，包括：對於目標細胞例如癌細胞顯示細胞毒性的 CTL。例如針對此 CTL 之目標細胞，可為內源性表現 IMP-3 之細胞(例如癌細胞)，或經以 IMP-3 基因轉染的細胞。於較佳具體例，本發明之胜肽可包括至少一 CTL 抗原決定位胜肽之胺基酸序列，且除了誘導 Th1 細胞，也誘導對抗表現 IMP-3 之細胞例如癌細胞之 CTL。於此情形本發明之胜肽，可於體外同時或依序誘導 Th1 細胞及 CTL，且此誘導的 Th1 細胞可有效活化已誘導

的 CTL。因此此包括至少一 CTL 抗原決定位胜肽之胺基酸序列的胜肽，為適於癌症免疫療法的胜肽。

【0085】再者，本發明之 Th1 細胞分泌各種細胞激素(例如 IFN- γ)，其能以抗原獨立的方式，活化及/或刺激對抗其他目標細胞的 CTL。因此本發明之 Th1 細胞，也有助於增強標靶於表現腫瘤關連抗原(TAA)而非 IMP-3 之細胞的 CTL 活性。因此，本發明之 Th1 細胞不僅對於表現 IMP-3 之腫瘤的免疫療法有效，對於表現其他 TAA，及本發明之胜肽與 APC 之腫瘤也有效。

【0086】於一些具體例，本發明之 Th1 細胞辨識呈現 HLA-DR 或 HLA-DP 抗原與本發明之胜肽之複合體的細胞。於 Th1 細胞之上下文，詞彙「辨識一細胞」，係指經由其 TCR 結合於細胞表面上的 MHC 第 II 類分子與本發明之胜肽的複合體，及被以抗原專一性方式活化。在此，詞彙「被以抗原專一性方式活化」，係指回應於特定 MHC 第 II 類分子及胜肽而活化，且誘導從此活化的 Th1 細胞的細胞素生產。於較佳具體例，HLA-DR 可選自於 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 構成之群組。較佳者，HLA-DR8、HLA-DR53 及 HLA-DR9 可各為 HLA-DRB1*0803、HLA-DRB4*0103、HLA-DRB*14:05 及 HLA-DRB1*0901。

【0087】VII. T 細胞受體(TCR)

本發明也提供一種組合物，其包含編碼一或多個為多胜肽的一或多個聚核苷酸，該多胜肽能形成 T 細胞受體(TCR)的次單元;並提供使用其之方法。該 TCR 次單元具有形成 TCR 的能

力，其對於 $CD4^+$ T 細胞提供對抗呈現 IMP-3 胜肽的 APC 的專一性。藉由使用該技術領域中的已知方法，可鑑別以本發明之胜肽誘導的 Th1 細胞的 TCR 次單元的 α -與 β -鏈的核酸 (WO2007/032255 與 Morgan *et al.*, J Immunol, 171, 3288(2003))。衍生物 TCR 可能以高親和力結合於呈現該 IMP-3 胜肽的 APC，且視情形媒介有效率的細胞素生產。

【0088】編碼為 TCR 次單元的一聚核苷酸/多個聚核苷酸 (亦即，編碼為 TCR 次單元兩者的單一聚核苷酸，或編碼為分開之 TCR 次單元的多個聚核苷酸)可以包含到適當載體內，例如反轉錄病毒載體。此等載體在該技術領域為人所熟知。該聚核苷酸或包含該聚核苷酸的載體，通常可傳送到 $CD4^+$ T 細胞內，例如來自病患的 $CD4^+$ T 細胞。有利地，本發明提供一種現成(off-the-shelf)的組合物，能夠快速修飾病患所擁有的 T 細胞(或另一哺乳動物的 T 細胞)，而快速及簡單產生具有優異的癌細胞殺死性質的經修飾的 T 細胞。

【0089】本發明更提供 Th1 細胞，其係藉由將編碼為 TCR 次單元兩者的聚核苷酸，或編碼為各 TCR 次單元的聚核苷酸進行性狀引入(transduction)而製備，其中此種 TCR 次單元能結合於 IMP-3 胜肽(例如序列識別號：1，於 HLA-DR8、HLA-DR14 或 HLA-DR53 背景；序列識別號：2，於 HLA-DR9 或 HLA-DR14 背景)。該經性狀引入的 Th1 細胞能夠在體內自導引到癌細胞，且能使用周知的培養方法於體外擴增(例如，Kawakami *et al.*, J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。上述製備之 Th1 細胞，可使用於形成免疫原性組合物，而有用於需要治療或保護的病患

中之癌症的治療或避免。

【0090】 VIII. 醫藥藥劑或組合物

當本發明的方法與組合物在上下文中指出「治療」癌症有用，若其造成臨床上的益處，例如在該對象中的IMP-3基因表現減低、癌症的大小減小、流行程度或轉移潛力減低，則治療係視為「有效」。當該治療係以預防性使用時，「有效」意指其延遲或防止癌症形成或防止或減輕癌症的臨床症狀。有效係利用任何已知相關用於診斷或治療特定腫瘤形式的方法決定。

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

【0091】 本發明上下文中，治療及/或預防癌症及/或防止其術後再發，包括以下任何步驟，例如以外科手術移除癌細胞、抑制癌化細胞的生長、腫瘤退化或回復、誘導緩解及抑制腫瘤發生、腫瘤回復，及減少或抑制轉移。有效的治療及/或預防癌症減少死亡率並改善患癌的個體的預後，減少腫瘤標記物在血液中的水平，並減輕伴隨癌症的可偵測的症狀。例如，減少或改善症狀構成有效治療及/或預防，包括 10%、20%、30%或

以上減少，或穩定的疾病。

【0092】 如上所述，本發明胜肽誘導的 Th1 細胞能幫助負責細胞免疫之免疫細胞。此種免疫細胞不僅包括對抗表現 IMP-3 之癌細胞的 CTL，也包括對抗表現其他 TAA 之癌細胞的 CTL，由於由 Th1 細胞分泌的細胞素能以抗原獨立的方式影響 CTL。因此本發明提供一種醫藥試劑或組合物，其包含本發明之胜肽中至少一種。於此醫藥試劑或組合物，此胜肽之量係存在治療上或醫藥上有效量。

【0093】 本發明之醫藥試劑或組合物在幫助、刺激及/或增強任何負責細胞免疫之免疫細胞(例如 CTL、巨噬體)為有用，由於本發明之藥試劑或組合物誘導的 Th1 細胞能分泌影響任何負責細胞免疫之免疫細胞的細胞素。因此，本發明之試劑或組合物對於任何將由包括 CTL 之此種免疫細胞媒介的免疫反應予以增強或促進的用途有用。例如因為本發明之試劑或組合物能增強或促進對抗由此等免疫細胞媒介的癌或腫瘤的免疫反應，本發明提供包含至少一種本發明之胜肽的試劑或組合物，以用治療及/或預防癌。此種試劑或組合物中的此胜肽量，可為對於罹有表現 IMP-3 之癌的對象中顯著增強或刺激免疫反應為有效的量。

【0094】 本發明也提供一種試劑或組合物，供增強或刺激由 MHC 第 I 類抗原，例如 HLA-A2 及 HLA-A24 媒介的免疫反應。於另一具體例，本發明更提供本發明胜肽之用途，以供製造用於增強或刺激由 MHC 第 I 類抗原媒介的免疫反應的試劑或組合物。

【0095】於較佳具體例，在本發明內容中鑑別的 IMP-3 衍生之胜肽可誘導 Th1 細胞，及對抗 IMP-3 表現細胞之 CTL。因此本發明也提供包含至少一種本發明胜肽之試劑或組合物，以供用於誘導對抗表現 IMP-3 之癌或腫瘤的 CTL。

【0096】又，包含至少一種本發明胜肽之試劑或組合物，可用於增強或促進由 MHC 第 II 類分子媒介的免疫反應。

【0097】因為 IMP-3 表現在一些癌類型中，包括膀胱癌子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)，相較於在正常組織中係專一性的提高(WO2004/031413, WO2007/013665, WO2007/013671, Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011;102:71-8,及本案微陣列分析之數據)(未顯示))，本發明之胜肽或編碼為此胜肽之聚核苷酸，可用於癌或腫瘤之治療及/或預防，及/或用於防止其術後再復發。因此，本發明提供一種醫藥試劑或組合物，供癌或腫瘤之治療及/或供預防，及/或防止其術後再復發，其包含一或多種本發明之胜肽、或編碼為此胜肽之聚核苷酸，作為有效成分。或者，本發明之胜肽可以被表現在任意前述細胞的表面上，例如 APC，以用於作為醫藥試劑或組合物。此外上述 Th1 細胞也可用於作為本發明之醫藥癌或腫瘤之劑或組合物的有效成分。

【0098】於另一具體例，本發明也提供使用有效成分製造供治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或藥劑的用途，該有效成分選

自以下：

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

【0099】或者本發明更提供一種有效成分，使用於治療癌症或腫瘤，該有效成分選自以下：

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

【0100】或者本發明更提供製造用於治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或試劑的方法或處理，其中該方法或處理包括將醫藥上或生理上可接受的擔體與選自以下的有效成分配製的步驟：

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

【0101】於另一具體例，本發明也提供製造用於治療癌症或腫瘤的醫藥組合物或試劑的方法或處理，其中該方法或處理包括將有效成分與醫藥上或生理上可接受的擔體混合的步

驟，其中該有效成分選自以下：

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

【0102】或者，本發明之醫藥組合物或此種試劑可用於預防癌症或腫瘤及預防其術後再發中之一者或兩者。

【0103】本發明之醫藥試劑或組合物作爲疫苗有用。本發明上下文中，詞彙「疫苗」(也稱爲免疫原性組合物)，係指經由對動物接種，有誘導抗腫瘤免疫性的功能的組合物。

【0104】本發明之醫藥藥劑或組合物可用於治療及/或預防癌症或腫瘤，及/或預防其在對象或病患中之術後復發或轉移復發。此等對象的例子包括人及其他哺乳動物，包括但不限於小鼠、大鼠、豚鼠、兔、貓、狗、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴、狒狒及黑猩猩，尤其是商業上爲重要的動物或家畜。

【0105】本發明中，具有選自序列識別號：1 與 2 中之胺基酸序列的胜肽，已發現係由數種 HLA-DR 及/或 HLA-DP 分子(例如 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR9、HLA-DR14)限制的混雜的 Th1 細胞抗原決定位，且可作爲能誘導有效且專一性的對抗由於 MHC 第 II 類分子媒介的免疫反應之癌症的免疫反應的候選者。因此包括具有序列識別號：1 或 2 之胺基酸序列的此等胜肽中的任一者的本發明的醫藥試劑或組合物，特別適於對於至少具有選自 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及

HLA-DR9 中作為 MHC 第 II 類分子的對象來投予。對於包含編碼為此等胜肽中任一者的聚核苷酸的醫藥藥劑或組合物也同樣適用。

【0106】或者於較佳具體例，本發明鑑別之胜肽，當施用到具有 HLA-A2 或 HLA-A24 之對象時，也可誘導對於 IMP-3 專一之 CTL。因此藉由投予本發明之胜肽，可更預期除了 Th1 細胞誘導外，可誘導對抗表現 IMP-3 之癌的 CTL 反應。又，本發明之胜肽不僅經由將其處理而誘導對抗 IMP-3 表現細胞之 CTL 反應，也藉由因其為媒介之 Th1 細胞誘導而增強之。因此為了達成在同一對象中誘導 Th1 細胞及 IMP-3 專一性 CTL 兩者，當投予具有序列識別號：2 之胺基酸序列之胜肽時，例如欲治療的對象宜具有 HLA-DR9 或 HLA-DR14 作為 MHC 第 II 類分子及 HLA-A24 或 HLA-A2 作為 MHC 第 I 類分子。

【0107】於另一具體例，本發明提供依存於 Th1 細胞誘導之癌免疫療法。本發明提供之此治療策略可應用且有用於任何獨立於 IMP-3 表現之癌，只要由 Th1 細胞分泌的細胞素所活化的免疫細胞係以對象癌細胞為目標。

【0108】本發明之醫藥試劑或組合物欲治療的癌或腫瘤包括表現 IMP-3 之任何種類之癌症或腫瘤，包括但不限於，例如膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)。

【0109】本發明之醫藥試劑或組合物，除了含有上述有效

成分，也可含有其他有能力誘導 Th1 細胞或 CTL 之胜肽、其他編碼為其他胜肽之聚核苷酸、呈現其他胜肽或其片段之其他細胞等。此種具有誘導 Th1 細胞或 CTL 之能力的「其他」胜肽的例子，包括但不限於源自癌專一性抗原(例如已鑑別之 TAA)的胜肽，但不限於此。

【0110】若需要，本發明之醫藥試劑或組合物可視情形包括其他治療物質當作額外之有效成分，只要該物質不會抑制該有效成分例如本發明胜肽中任一者的抗腫瘤作用即可。例如，配方可包括抗發炎試劑、止痛劑、化學療劑等。除了在藥劑本身當中的其他治療物質，本發明的藥劑也可依序或同時投予一種或更多其他藥理試劑。藥劑及藥理組合物的量，取決於例如使用的藥理試劑的形式、欲治的疾病及投予的時程及路徑。

【0111】該技術領域中具有通常知識者應瞭解除了此處特別提及的成分以外，本發明之醫藥試劑或組合物可包括在該技術領域中常見關於配方形式使用的其他試劑(例如，填料、黏結劑、稀釋劑、賦形劑者)。

【0112】本發明之一具體例中，該醫藥試劑或組合物可包裝在製造品與套組中，該套組含有治療欲治療的疾病例如癌症的致病情形的有用的物質。製造品可包括附有標記的任意該醫藥試劑或組合物的容器。適當的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。該容器可由各種材料形成，例如玻璃或塑膠。容器上的標記必需指示該試劑係用於治療或預防該疾病的一種以上的病況。該標記也可顯示投予指示等。

【0113】除了上述容器以外，包含本發明的醫藥試劑或組

合物的套組可以視情形更包括第二容器，其盛裝醫藥上可容許的稀釋劑。從商業及使用者所需角度，可更包括其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、針筒及使用指示之包裝插入物。

【0114】該醫藥組合物視需要，可放在包裝或分配裝置中，其可包含一種或更多含有該有效成分的單位的劑量。該包裝例如包括金屬或塑膠箔，例如泡殼包裝。該包裝或分配裝置可以隨附投予指示。

【0115】(1) 含有該胜肽當做有效成分之醫藥試劑或組合物：

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

【0116】本發明之胜肽可組合製備成包括兩種或更多本發明之胜肽，以在體內誘導 Th1 細胞。該胜肽組合可採混合(雞尾酒)形式或使用標準技術彼此接合。例如，該胜肽可以化學連結或表現成單一融合的多胜肽序列。該組合中的胜肽可相同或不同。

【0117】藉由投予本發明之胜肽，該胜肽或其片段藉由該 HLA 第 II 類抗原在 APC 以高密度呈現，然後誘導對於由該呈

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

【0118】包括本發明之胜肽當做有效成分之該用於癌症或腫瘤之治療及/或預防的醫藥試劑或組合物，也可包括已知使細胞免疫有效建立之佐劑。或此醫藥試劑或組合物可以與其他有效成分一起投予，且可藉由配製為顆粒投予。佐劑意指當與具有免疫學活性的蛋白質一起(或連續)投予時，會增強對於蛋白質的免疫反應的一化合物。於此考慮的佐劑包括文獻中敘述者(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)。適合之佐劑的例子包括但不限於磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍亂毒素、沙門毒素、不完全的佛氏佐劑(Incomplete Freund's adjuvant, IFA)、完全的佛氏佐劑(Complete Freund's adjuvant, CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W 乳劑、或其類似物。

【0119】再者，可便利地使用微脂體配方、顆粒配方其中該胜肽結合於數微米直徑的珠粒、及脂質結合於該胜肽的配方。

於本發明另一具體例，本發明之胜肽也可以於醫藥上可接受的鹽的形式投予。較佳的鹽的例子包括與鹼金屬的鹽、與金屬的鹽、與有機鹼的鹽、與有機酸(例如乙酸、甲酸、丙酸、富馬酸、馬來酸、琥珀酸、酒石酸、檸檬酸、蘋果酸、草酸、苯甲酸、甲烷磺酸等)的鹽及與無機酸(例如鹽酸、磷酸、氫溴

酸、硫酸等)的鹽。在此使用之用語「醫藥上可接受之鹽」係指保留該化合物之生物學效力以及性質且可藉由與無機酸或鹼例如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、對甲苯磺酸、水楊酸等反應而獲得之鹽。

【0120】於一些實施例，本發明之醫藥試劑或組合物可更包括會起動(primes)Th1 細胞，且選擇性起動 CTL 的成分。脂質已鑑別係能夠於體內起動對抗病毒抗原的 Th1 細胞，選擇性起動 CTL 的試劑。例如可將棕櫚酸殘基附著在離胺酸殘基的 ϵ -及 α -胺基然後連結到本發明之胜肽。然後可將該脂質化的胜肽直接以微胞或微粒投予、包入微脂體或於佐劑中乳化而投予。另一例的脂質起動 Th1 細胞且選擇性地起動 CTL 反應，當共價附著於一適當胜肽時，可使用 *E. coli* 脂蛋白，例如三棕櫚醯基-S-甘胺醯基半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸(P3CSS)可起動(prime)Th1 細胞且選擇性起動 CTL(參見例如 Deres *et al.*, Nature 1989, 342: 561-4)。

【0121】適當的投予方法的例子可包括，但不限於口服、皮內、真皮下、肌肉內、髓內、腹膜、靜脈內注射等，及全身性投予或對於目標部位的鄰近處局部投予(即直接注射)。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。可將醫藥上或治療上有效量之本發明之此胜肽對於須要治療表現 IMP-3 之癌症的對象投予。或者可將足以增強或刺激由 Th1 細胞媒介之免疫反應及/或誘導對抗表達 IMP-3 之癌症或腫瘤之 CTL 的本發明胜肽，對於罹患表現 IMP-3 之癌症的對象投予。本發明之胜肽的劑量可依照欲治療的疾病、病患年紀、體重、投予方法等適

當調整，且通常為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，例如 0.5 mg 至 5 mg，且可數天至數月投予一次。該技術領域中具有通常知識者可容易地選擇適當且最適的劑量。

【0122】 (2) 含有聚核苷酸當做有效成分的醫藥試劑或組合物：

本發明之醫藥試劑或組合物也可以可表現形式包括編碼為在此揭露的胜肽的聚核核酸。在此用詞「於可表現的形式」意指當聚核苷酸導入細胞中時，會在體內表現為誘導抗腫瘤免疫性的多胜肽。於說明的具體例中，關注的聚核苷酸的核酸序列包括表現該聚核苷酸需要的調節要素。該聚核苷酸可裝備為可達到在目標細胞的基因體中穩定插入(參見例如 Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 for a description of homologous recombination cassette vectors。亦參見例如 Wolff *et al.*, *Science* 1990, 247: 1465-8; 美國專利號碼 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; and WO 98/04720)，DNA-為主的運送技術的例子包括「裸 DNA」、經促進的(普寧卡因(bupivacaine)、聚合物、胜肽-媒介的)運送、陽離子性脂質複合體及微粒媒介的(「基因槍」)或壓力媒介的運送(參見例如美國專利號碼 5,922,687)。

【0123】 本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體表現。表現載體的例子包括減毒病毒宿主，例如牛痘或禽痘。此方法涉及使用牛痘病毒，例如當作載體以表現編碼為該胜肽的核苷酸序列。藉由導入宿主中，該重組牛痘病毒會表現該免疫產生性

胜肽，且因而引起免疫反應。有用於免疫實驗步驟的牛痘載體與方法敘述於例如美國專利號碼 4,722,848。另一載體為 BCG(Bacille Calmette Guerin)。BCG 載體敘述於 Stover *et al.*, *Nature* 1991, 351: 456-60。廣泛種類之其他有用於治療性投予或免疫的載體例如腺病毒及腺病毒相關的病毒載體、反轉錄病毒載體、傷寒載體、去毒炭疽毒素載體等是顯而易見。參見例如 Shata *et al.*, *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock *et al.*, *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; Hipp *et al.*, *In Vivo* 2000, 14: 571-85。

【0124】將聚核苷酸運送到病患可為直接進行，於此情形使病患直接暴露於攜帶聚核苷酸的載體，或間接進行，於此情形先使細胞以關注的聚核苷酸於體外轉形，然後將該細胞移植到對象中。此兩種方法各已知為體內及生物體外基因療法。

【0125】針對基因治療的方法的一般評論，參見 Goldspiel *et al.*, *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; *Trends in Biotechnology* 1993, 11(5): 155-215)。可適用於本發明該技術領域中普通已知的重組 DNA 技術的方法，敘述於 Ausubel *et al.*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; 及 Krieger, in *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990。

【0126】如同胜肽的投予，聚核苷酸的投予方法可為口

服、皮內、真皮下、髓內、腹腔的及/或靜脈內注射等，且全身性投予或對於目標部位的鄰近處局部投予係有用。該投予可藉由單一投予或以多次投予追加實施。可將醫藥上或治療上有效量之本發明之此聚核苷酸對於須要治療表現 IMP-3 之癌症的對象投予。或者可將足以增強或刺激由 Th1 細胞中介之免疫反應及/或誘導對抗表達 IMP-3 之癌症或腫瘤之 CTL 的本發明聚核苷酸，對於罹患表現 IMP-3 之癌症的對象投予。於適合擔體或經編碼為本發明胜肽的聚核苷酸轉形的細胞中的聚核苷酸的劑量可依照欲治療的疾病、病患年紀、體重、投予方法等適當調整，且通常為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，例如，0.5 mg 至 5 mg，且可數天至數月投予一次。該技術領域中具有通常知識者可輕易選擇適當及最適的劑量。

【0127】 IX. 使用該胜肽、APC 或 Th1 細胞的方法

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

【0128】 (1) 誘導抗原呈現細胞(APC)的方法：

本發明提供使用本發明之胜肽或編碼為此胜肽之聚核苷酸誘導 APC 的方法。誘導 APC 可如上述項目「V. 抗原呈現細

胞」般實施。本發明也提供一種誘導具有 Th1 細胞誘導能力之 APC 之方法，此誘導也已在上述項目「V. 抗原呈現細胞」中提及過。

【0129】 或者，本發明提供提供製備具有誘導 Th1 細胞之能力的抗原呈現細胞(APC)之方法，其中此方法可包括以下步驟之一：

(a) 使本發明胜肽於體外、生物體外或體內與 APC 接觸；
及

(b) 將編碼為本發明胜肽之聚核苷酸導入到 APC 中。

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

(a) 使本發明之胜肽與一 APC 接觸，

(b) 將編碼為本發明胜肽之聚核苷酸導入一 APC 中。

【0130】 本發明之方法可於體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)實施。較佳為，本發明之方法可於體外(*in vitro*)或生物體外(*ex vivo*)實施。在較佳具體例中，用於誘導具有 Th1 細胞誘導能力之 APC 的 APC，較佳為表現擇自 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 中之至少 1 種作為 MHC 第 II 類分子之 APC。此種 APC 可藉由該技術領域中周知的技術，從具有擇自 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 中之至少 1 種作為 MHC 第 II 類分子的對象所獲得之周邊血液單核細胞(PBMC)製備。本發明之方法所誘導之 APC 可為在其表面上呈現本發明之胜肽或其片段與 HLA 第 II 類抗原(例如 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR9、

HLA-DR14)之複合體的 APC。當投予本發明之方法所誘導之 APC 到一對象以誘導於該對象中對抗癌症之免疫反應時，該對象較佳為與 APC 的來源為同一者。然而，該對象也可與 APC 捐贈者為不同者，只要該對象與 APC 捐贈者具有相同 HLA 類型即可。

【0131】於另一具體例，本發明提供用於誘導具有 Th1 細胞誘導能力的 APC 的試劑或組合物，且此種試劑或組合物包括本發明之胜肽或聚核苷酸中 1 或更多種。

【0132】於另一具體例，本發明提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽的聚核苷酸之用途，其係用於製造試劑或組合物以配製供誘導 APC。

【0133】或者，本發明更提供本發明之胜肽或編碼為該胜肽的聚核苷酸之用途，係用於誘導具有 Th1 細胞誘導能力之 APC。

【0134】於較佳具體例，本發明之胜肽不僅可誘導 Th1 反應，還可於將其處理後誘導 CTL 反應。因此於較佳具體例，本發明之方法製備的 APC 對於誘導對抗表現 IMP-3 之細胞的 CTL，包括誘導對抗癌細胞之 CTL 亦有用。例如當由含有序列辨識號：4 之胺基酸序列的胜肽誘導時，表現 HLA-A2 的 APC 適於誘導 IMP-3 專一性 CTL。或者，當由含有序列識別號：3 之胺基酸序列的胜肽誘導時，表現 HLA-A24 之 APC 係適於誘導 IMP-3 專一性 CTL。

【0135】(2) 誘導 Th1 細胞的方法：

此外，本發明也提供使用本發明之胜肽、編碼為此胜肽之

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

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

b: 導入編碼 TCR 次單元兩者之聚核苷酸或編碼 TCR 次單元之各個的聚核苷酸到 $CD4^+$ T 細胞內，其中 TCR 能夠辨識或結合本發明之胜肽或其片段與 HLA 第 II 類抗原的複合體。

【0136】當投予本發明之胜肽到對象中時，會在該對象體內誘導 Th1 細胞，且由 MHC 第 II 類分子媒介的(例如以該癌細胞為目標的之免疫反應)免疫反應強度增強。或者，該胜肽及編碼為該胜肽之聚核苷酸可用於一生物體外的治療法，其中，該對象來源的 APC、 $CD4$ 陽性細胞或周邊血液單核白血球和本發明胜肽在體外接觸(刺激)，誘導出 Th1 細胞後，已活化的 Th1 細胞回到該對象。例如該方法可包括以下步驟：

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

再者，可藉由導入編碼為 TCR 次單元兩者之一聚核苷酸

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

【0137】本發明之方法可於體外、生物體外或體內實施。較佳者，本發明之方法可於體外或生物體外實施。用於誘導 Th1 細胞的 $CD4^+$ T 細胞可藉由該技術領域周知的方法從對象獲得之 PBMC 製備。於較佳具體例， $CD4^+$ T 細胞的捐贈者可為具有至少一選自 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 作為 MHC 第 II 類分子的對象。由本發明之方法誘導的 Th1 細胞，可為能辨識在其表面呈現本發明胜肽或其片段與 HLA 第 II 類抗原之複合體的 APC 者。當本發明方法所誘導之 Th1 細胞對於一對象投予以誘導該對象中對抗癌症之免疫反應(或由 MHC 第 I 類分子媒介之免疫反應)時，該對象較佳為與 $CD4^+$ T 細胞之來源為同一對象。但，該對象也可與 $CD4^+$ T 細胞之來源為不同對象，只要該對象與 $CD4^+$ T 細胞之捐贈者有相同 HLA 類型即可。

【0138】於較佳具體例，本發明之胜肽可誘導對抗表現 IMP-3 之細胞的 CTL，及誘導 Th1 細胞。因此本發明更提供用於誘導 CTL 之方法，其包含選自以下構成之群組的至少一步驟：

a: 將 $CD4^+$ T 細胞與 $CD8^+$ T 細胞兩者與已接觸本發明胜肽之 APC 共同培養;及

b: 將 $CD8^+$ T 細胞與與已接觸本發明胜肽之 APC 共同培

養。

【0139】於此種誘導 CTL 之方法，本發明之胜肽在 APC 中被處理以產生 CTL 抗原決定位胜肽，且產生之 CTL 抗原決定位胜肽被呈現在 APC 的表面。

【0140】或者依本發明，提供本發明之胜肽之用途，係供製造誘導 Th1 細胞之醫藥試劑或組合物。此外本發明提供一種用於製造誘導 Th1 細胞之醫藥試劑或組合物之方法或處理，其中此方法包含將本發明之胜肽與醫藥上可接受之擔體混合或配製之步驟。又，本發明也提供用於誘導 Th1 細胞之本發明之胜肽。

【0141】由本發明方法誘導之 $CD4^+$ T 細胞，可對於一對象投予以作為疫苗。

【0142】本發明上下文中，過度表現 IMP-3 之癌症可以此等有效成分治療。此種癌的例子，包括但不限於：膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)。因此在投予包含此有效成分之疫苗或醫藥組合物前，宜先確認是否在欲治療之癌細胞或組織中，比起相同器官的正常細胞，IMP-3 的表現水平有所增加。因此於一具體例，本發明提供一種用於治療(過度)表現 IMP-3 之癌症之方法，此方法可包括以下步驟：

i) 測定在欲治療癌症的對象獲得的癌細胞或組織當中的 IMP-3 表現水平；

ii) 將此 IMP-3 表現水平與正常的對照組比較;及

iii) 投予由上述(a)至(d)構成之群組中至少一成分至患有比起正常對照組而言有過度表現 IMP-3 之癌症的對象。

【0143】或者本發明可提供疫苗或醫藥組合物以供對罹患過度表現 IMP-3 之癌的對象投予，其包括選自由上述(a)至(d)構成之群組中至少一種成分。換言之本發明更提供鑑別欲以本發明 IMP-3 多胜肽治療之對象的方法，此方法包括決定衍生自對象之癌細胞或組織中的 IMP-3 表現水平的步驟，其中，相較於該基因之正常對照為增加的水平代表此對象具有可用本發明之 IMP-3 多胜肽治療的癌症。本發明之癌症治療方法將於以下更詳細敘述。

【0144】再者，於較佳具體例，可於投予本發明胜肽前先鑑別一對象之 HLA 型。例如宜對於鑑別為具有 HLA-DR8、HLA-DR14 或 HLA-DR53 之對象投予具有序列識別號：1 之胺基酸序列的胜肽。或者，宜對於鑑別為具有 HLA-DR9 或 HLA-DR14 之對象投予具有序列識別號：2 之胺基酸序列的胜肽。

【0145】可使用任何由對象而來的細胞或組織決定 IMP-3 表現，只要其包括 IMP-3 的目標轉錄或轉譯產物即可。適合的樣本的例子包括但不限於體組織及體液，例如血、唾液及尿。較佳者，由對象而來的細胞或組織樣本含有包括上皮細胞的細胞群體，更佳為癌上皮細胞或由懷疑為癌的組織所衍生的上皮細胞。又，視需要可從獲得的體組織及體液純化該細胞然後使用當做對象衍生的樣本。

【0146】以本發明方法治療的對象較佳為哺乳動物。哺乳動物例如包括但不限於例如人、非人類靈長類、小鼠、大鼠、犬、貓、馬及牛。

【0147】依照本發明，可決定由一對象獲得的癌細胞或組織中的 IMP-3 表現水平。該表現水平可於轉錄(核酸)產物層級，使用該技術領域已知的方法決定。例如 IMP-3 的 mRNA 可以藉由雜交法使用探針定量(例如北方雜交法)。該檢測可於晶片上、陣列上等實施。使用陣列對於偵測 IMP-3 的表現水平為較佳。該技術領域中具有通常知識者可利用 IMP-3 的序列資訊製備此種探針。例如可使用 IMP-3 的 cDNA 當做探針。視需要，可將該探針以適合的標記例如染料、螢光物質及同位素標記，且該基因的表現水平可以該雜交的標記的強度檢測。

【0148】再者，IMP-3 的轉錄產物(例如序列識別號: 5)，可藉由擴增為主的檢測方法(例如 RT-PCR)使用引子定量。此種引子可依照該基因可得的序列資訊製備。

【0149】具體而言，將供本發明使用的探針或引子於嚴苛、中度嚴苛或低嚴苛條件下，雜交於 IMP-3 之 mRNA。此處使用的用詞「嚴苛(雜交)條件」係指在此條件下，探針或引子會雜交於其目標序列但不會與其他序列雜交。嚴苛條件為序列依存性，且在不同狀況下會不同。較長序列的特定雜交比起較短的序列會在較高溫觀察到。一般而言，嚴苛條件的溫度係選自比起特定序列在一定義的離子強度及 pH 時的熱熔點(T_m)低約攝氏 5 度的溫度。該 T_m 係指 50% 互補於其目標序列的探針與該目標序列之雜交達到平衡的溫度(於一定義的離子強

度、pH 及核酸濃度)。由於該目標序列一般係過量呈現，於 T_m ，50%的探針會以平衡佔據。通常嚴苛條件為鹽濃度少於約 1.0 M 鈉離子，通常約 0.01 至 1.0 M 鈉離子(或其他鹽)、pH 7.0 至 8.3，且對於短的探針或引子(例如 10 至 50 個核苷酸)，溫度至少約攝氏 30 度，對於較長的探針或引子，至少約攝氏 60 度。嚴苛條件也可藉由添加去安定物質例如甲醯胺而達到。

【0150】或者可偵測轉譯產物以診斷本發明。例如可決定 IMP-3 蛋白質(序列識別號：6) 的量。確認轉譯產物的蛋白質量的方法，包括使用專一性辨識該蛋白質的抗體的免疫分析方法。該抗體可為單株抗體或多株抗體。再者可使用抗體的任何片段或修飾(例如嵌合抗體、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)以供偵測，只要該片段或修飾抗體保留對於該 IMP-3 蛋白質的結合能力即可。製備此種用於偵測蛋白質的抗體的方法在該技術領域中為周知，且可採用任意方法於本發明中以製備此種抗體及其均等物。

就基於轉譯產物偵測 IMP-3 基因的表現水平的另一方法而言，染色強度可使用對抗該 IMP-3 蛋白質的抗體，利用免疫組織化學分析測定。亦即，於該測量中，強染色代表該蛋白質的存在/水平增加，且同時，IMP-3 基因表現水平高。

【0151】目標基因例如 IMP-3 基因於癌細胞中的表現水平，若水平比起該目標基因的對照組水平(例如於正常細胞中的水平細胞)增加例如 10%、25%或 50%;或增加超過 1.1 倍、高於 1.5 倍、高於 2.0 倍、高於 5.0 倍、高於 10.0 倍或更多，則決定為增加。

【0152】該對照水平可與癌細胞同時決定，係藉由使用預先從對象收集並保存的樣本實施，該對象的疾病狀態(有罹癌或未罹癌)為已知。此外，從具有欲治療的癌的一器官的非癌化區獲得的細胞可當做正常對照。或者該對照水平可依據先前對於從疾病狀態已知的對象得到的樣本中 IMP-3 基因的表現水平決定的結果分析的統計方法決定。再者，該對照水平可從衍生自先前測試的細胞的表現樣式的資料庫衍生。又，依照本發明一態樣，於一生物學樣本中的 IMP-3 基因表現水平可以與從多個參考樣本決定的多個對照水平比較。較佳為使用從衍生自與該對象得到的生物學樣本類似的組織類型的參考樣本所決定的對照水平。再者，較佳為使用疾病狀態已知的群體當中的 IMP-3 基因的表現水平的標準值。該標準值可由該技術領域中已知的任意方法獲得。例如，平均值 ± 2 S.D. 或平均值 ± 3 S.D. 的範圍可當作該標準值。

【0153】本發明文中，由已知非癌化的生物學樣本決定的對照水平，稱為「正常對照水平」。另一方面，若該對照水平係從癌化的生物學樣本決定，其稱為「癌化的對照水平」。樣本表現水平與對照水平之間的差異可常態化為對照核酸例如管家基因的表現水平，其表現水平已知不會取決於細胞的癌化或非癌化而不同。示例之對照基因包括但不限於 β -肌動蛋白、甘油醛 3 磷酸去氫酶及核糖體蛋白質 P1。

【0154】當 IMP-3 基因的表現水平比起正常對照水平為增加時，或者相近/均等於癌化對照水平時，該對象可診斷為患有欲治療的癌症。

【0155】更具體而言，本發明提供一種方法，係(i)診斷是否一對象患有欲治療的癌症及/或(ii)選擇供癌症治療的對象，該方法包括以下步驟：

- a) 測定由懷疑患有欲治療的癌症的對象獲得的癌細胞或組織中的 IMP-3 表現水平；
- b) 比較其 IMP-3 表現水平與正常對照水平；
- c) 若 IMP-3 的表現水平比起正常對照水平為增加，則診斷該對象是患有欲治療的癌症；
- d) 若步驟 c)中診斷該對象患有欲治療的癌症時，則選擇供癌症治療的對象。

【0156】或者該方法可包括以下步驟：

- a) 測定由懷疑患有欲治療的癌症的對象獲得的癌細胞或組織樣本中的 IMP-3 表現水平；
- b) 比較其 IMP-3 表現水平與癌化對照水平；
- c) 若 IMP-3 的表現水平相似於或等同於癌化對照水平，則診斷該對象是患有欲治療的癌症；及
- d) 若步驟 c)中診斷該對象患有欲治療的癌症時，則選擇供癌症治療的對象

【0157】於一些具體例，此方法在上述定義的 a)-d)步驟後，可更包含鑑別具有選自於由 HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14 及 HLA-DR53 構成之群組之 HLA 的對象的步驟。依本發明之癌症療法較佳係針對罹患過度表現 IMP-3 之癌且具有 HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14 及 HLA-DR53 中之任一者的對象。HLA 分型的方法係該技術領域中為人熟知者。例

如針對將 HLA 對偶基因分型的以 PCR 爲主的方法係爲人熟知。專一於各 HLA 分子的抗體，在鑑別一對象之 HLA 型時亦爲適當的工具。

【0158】 本發明也提供一種套組，係用於確認患有可利用本發明之 IMP-3 多胜肽治療的癌症的對象，其也對於評估及/或特定癌症療法，更特別是監控癌症免疫療法的效力或適用性是有用的。適合之癌症的說明性例子包括但不限於膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)。尤其，該套組較佳爲包括偵測對象衍生的癌細胞中的該 IMP-3 基因的表現的至少一種試劑，該試劑可選自以下群組：

- (a) 偵測該 IMP-3 基因之 mRNA 的試劑；
- (b) 偵測該 IMP-3 蛋白質的試劑；及
- (c) 偵測該 IMP-3 蛋白質的生物學活性的試劑。

【0159】 適合偵測該 IMP-3 基因之 mRNA 的試劑的例子，可包括專一性結合於該 IMP-3 mRNA 或鑑別該 IMP-3 mRNA 的核酸，例如具有互補於該 IMP-3 mRNA 的序列的寡核苷酸。此等種類的寡核苷酸例如專一於該 IMP-3 mRNA 的引子及探針。此等種類的寡核苷酸可依照該技術領域周知的方法製備。若需要，可將偵測該 IMP-3 mRNA 的試劑固定化在固體基質上。又，該套組中可包括多於一種偵測該 IMP-3 mRNA 的試劑。

【0160】 另一方面，適合偵測該 IMP-3 蛋白質的試劑的例

子，包括對於該 IMP-3 蛋白質的抗體。該抗體可為單株抗體或多株抗體。再者，可使用抗體的任何片段或修飾(例如嵌合抗體、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)當做該試劑，只要該片段或修飾抗體保留對於該 IMP-3 蛋白質的結合能力即可。製備此等種類的偵測蛋白質的抗體的方法，在該技術領域為人周知，且可在本發明中採用任意方法以製備此種抗體及其均等物。再者，該抗體可經由直接連結或間接標定技術而以訊號產生分子標記。標記抗體及偵測該抗體結合於其目標的標記及方法，在該技術領域係為人周知，且在本發明可使用任意標記及方法。又，該套組中可包括多於一種偵測該 IMP-3 蛋白質的試劑。

【0161】該套組可含有多於一種的上述試劑。例如由沒有癌症或患有癌症的對象獲得的組織樣本，可當做有用的對照試劑。本發明的套組從商業及使用者角度所需，可更包括其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、針筒及有使用指示的包裝插入物(例如紙、錄音帶、CD-ROM 等)。此等試劑保留在有標籤的容器中。適合的容器包括瓶、小玻璃瓶及試管。此等容器可由各種材料形成，例如玻璃或塑膠。

【0162】本發明之一具體例中，當該試劑為對抗該 IMP-3 mRNA 的探針時，該試劑可固定化在固體基質上，例如多孔條，以形成至少一個偵測部位。該多孔條的測量或偵測區可包括多個部位，各含有核酸(探針)。試條也可含有供陰性及/或陽性對照的部位。或者對照部位可位在與試條分開的條片上。視情形，該不同的偵測部位可含有不同量的固定化核酸，亦即在第一偵測部位為較高量，而在接續的部位為較低量。藉由添加

測試樣本，顯示可偵測訊號的部位數目提供存在於該樣本中的 IMP-3 mRNA 量的定量指示。該偵測部位可為任何適於偵測的形狀，通常為或跨越試條寬度方向的桿狀或點狀。

【0163】 本發明的套組可更包含陽性對照樣本或 IMP-3 標準樣本。本發明的陽性對照樣本可藉由收集 IMP-3 陽性樣本，然後分析其 IMP-3 水平而製備。或者可對不表現 IMP-3 的細胞添加純化的 IMP-3 蛋白質或聚核苷酸，以形成該陽性樣本或該 IMP-3 標準樣本。本發明中，純化的 IMP-3 可為重組蛋白質。該陽性對照樣本的 IMP-3 水平例如高於截斷值。

【0164】 X. 抗體

本發明更提供結合於本發明之胜肽的抗體。較佳的抗體係專一性結合於本發明之胜肽的抗體且不會(或微弱結合於)非本發明之胜肽。或者結合於本發明的胜肽的抗體，以及其同系物。對抗本發明胜肽的抗體於癌症診斷及預後分析法、及造影方法中 useful。同樣地，此種抗體在其他癌症治療、診斷及/或預後方面有用，只要 IMP-3 在癌症病患中也有表現或過度表現。又，細胞內表現的抗體(例如單鏈抗體)在治療上用於治療涉及 IMP-3 表現的癌症為有用，癌症的例子包括但不限於膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)。

【0165】 本發明也提供偵測及/或定量包括由選自序列識別號:1 與 2 中之胺基酸序列構成之多胜肽之 IMP-3 蛋白質(序列

識別號：6)或其片段的各種免疫分析法。此種分析法可包括一種或更多抗 IMP-3 抗體，其能適當辨識及結合於 IMP-3 蛋白質或片段。本發明中，結合於 IMP-3 多胜肽的抗 IMP-3 抗體較佳為辨識由選自序列識別號：1 與 2 之胺基酸序列構成之多胜肽者，更佳為排除其他的胜肽。抗體的結合專一性，可利用抑制試驗確認。即，當欲分析的抗體與全長之 IMP-3 多胜肽間的結合在存在具有選自序列識別號：1 與 2 中之胺基酸序列之多胜肽時受抑制，則視為該抗體「專一性地結合」於該片段。本發明中，此種免疫分析法係以該技術領域中周知的各種免疫分析格式實施，包括但不限於各種放射免疫分析法、免疫層析技術、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素連結免疫螢光分析法(ELIFA)等。

【0166】相關的本發明的免疫學但非抗體分析法可包括 T 細胞免疫產生性分析法(抑制性或刺激性)，及 MHC 結合分析法。此外，本發明也提供能偵測表現 IMP-3 的癌症的免疫造影法，包括但不限於使用本發明經標記抗體的放射閃爍攝影造影法。此種分析法可在臨床上於偵測、監控及預測 IMP-3 表現的癌症為提供效用，癌症包括但不限於膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)。

【0167】本發明也提供結合於本發明胜肽的抗體。本發明的抗體可以任意形式使用，例如單株抗體或多株抗體，且包括

藉由以本發明胜肽將動物例如兔子免疫所得的抗血清、所有類型的多株及單株抗體、人類抗體與由基因重組產生的人類化抗體。

【0168】 本發明的胜肽當做抗原以獲得的抗體，可由任意動物種衍生，但較佳為衍生自哺乳動物例如人、小鼠、大鼠，更佳為人。人類來源的胜肽可由此處所揭露的核苷酸或胺基酸序列獲得。

依照本發明，作為免疫抗原的該胜肽，可為本發明多胜肽之完整胜肽或部分胜肽。適合之部分胜肽的例子可包括例如本發明胜肽的胺基(N)末端或羧基(C)末端片段。

【0169】 在此，抗體定義為與 IMP-3 胜肽的全長或片段反應的蛋白質。於一較佳具體例，本發明抗體可辨識具有選自序列識別號：1 及 2 中之胺基酸序列的 IMP-3 片段胜肽。用於合成寡胜肽的方法在該技術領域為周知。合成後，在使用為免疫原之前可視情形將胜肽純化。本發明中，該寡胜肽(例如 24 員或 26 員)可以與擔體接合或連結以增強免疫產生性。鑰孔血藍蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin, KLH)為周知的擔體。結合 KLH 與胜肽的方法，也是該技術領域中周知的。

【0170】 或者，可將編碼為本發明胜肽或其片段的基因插入已知的表現載體，然後用於轉形在此敘述的宿主細胞。可從該宿主細胞的外面或裡面以標準方法回收所望的胜肽或其片段，且接著可當做抗原。或者可將表現該胜肽的整個細胞或其溶解物或化學合成的胜肽當做抗原。

【0171】 可將任何哺乳動物以該抗原免疫，但較佳為考量

與用在細胞融合的母細胞的相容性。一般而言，可使用嚙齒科動物、兔或靈長科動物。嚙齒科的動物包括例如小鼠、大鼠、倉鼠。兔科動物包括例如兔子。靈長科動物例如狹鼻小目(Catarrhini)猴(舊世界猴)，例如食蟹猴(*Macaca fascicularis*)、獼猴，狒狒、黑猩猩。

【0172】以抗原免疫動物的方法為該技術領域中已知。腹膜內注射或皮下注射抗原為免疫動物的標準方法。更具體而言，可將抗原稀釋及懸浮於適當量的磷酸鹽緩衝鹽液(PBS)、生理鹽液等。若需要，可將抗原懸浮液與適量的標準佐劑混合，標準佐劑例如佛洛依德(Freund)完全佐劑，而形成乳劑後對於哺乳動物投予。較佳者，每 4 至 21 天數次投予與適量佛洛依德(Freund)不完全佐劑混合的抗原。適當的擔體也可用於進行免疫。如上免疫進行後，可藉由標準方法檢驗血清中所望抗體量的增加。

【0173】對抗本發明胜肽的多株抗體可藉由從檢查血清中所望抗體增加的受免疫哺乳動物收集血液，並從血液以習知方法分離血清而製備。多株抗體包括含有該多株抗體的血清且可從該血清分離含有該多株抗體的級分(fraction)。免疫球蛋白 G 或 M 從來製備，藉由使用例如偶聯於本發明胜肽的親和管柱，與進一步使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱純化該級分。

【0174】為了製備單株抗體用於本發明之內容，從以該抗原免疫的哺乳動物收集免疫細胞，並如上述檢查血清中所望抗體的水平是否增加，之後進行細胞融合。用於細胞融合的免疫細胞較佳為從脾臟取得。其他較佳的與上述免疫細胞融合的母

細胞，包括例如哺乳動物的骨髓瘤細胞，更佳為具有以藥物選擇融合細胞的所需性質的骨髓瘤細胞。

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

【0175】 由細胞融合得到的融合瘤可藉由將其在標準選擇培養基例如 HAT 培養基(含次黃嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶的培養基)中培養而選擇。通常該細胞培養物係在該 HAT 培養基中繼續培養數天至數週，時間足以使除了所望融合瘤以外的其他細胞(非融合細胞)死亡。然後，可實施標準極限稀釋以篩選並選殖生產所望抗體的融合瘤細胞。

【0176】 除了上述方法，其中非人類動物係以抗原免疫以製備融合瘤，可將人類淋巴球例如受 EB 病毒感染者以胜肽、胜肽表現細胞或其溶解物於體外免疫。然後，將經免疫的淋巴球與能無限分裂的人類來源的骨髓瘤細胞例如 U266 融合，以得到生產能結合於該胜肽的所望人類抗體的融合瘤(未審查的日本公開專利申請案號昭 63-17688)。

【0177】 接著將獲得的融合瘤移殖到小鼠的腹腔，並抽取腹水。獲得的單株抗體可利用例如硫酸銨沉澱、蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱、DEAE 離子交換層析或偶聯有本發明胜肽的親和性管柱純化。本發明抗體不僅可用於純化及偵測本發明胜肽，也可當成本發明胜肽的增效劑及拮抗劑的候選者。

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

【0178】獲得的單株抗體也可使用遺傳工程技術以重組方式製備(參見例如 Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, 於英國由 MacMillan Publishers LTD(1990)出版)。例如可從免疫細胞例如融合瘤或經免疫的生產該抗體的淋巴球選殖編碼為抗體的 DNA, 插入適當載體, 並導入宿主細胞以製備重組抗體。本發明也提供如上述製備的重組抗體。

【0179】再者本發明抗體可為抗體片段或經修飾的抗體, 只要其結合於一個或更多本發明的胜肽即可。例如, 該抗體片段可為 Fab、F(ab')₂、Fv 或單鏈 Fv(scFv), 其中來自 H 及 L 鏈的 Fv 片段以適當連結子連接(Huston *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83(1988))。更具體而言, 可利用以酵素例如木瓜酵素或胃蛋白酶處理抗體而產生抗體片段。或者可構建編碼為該抗體片段的基因, 插入表現載體並於適當的宿主中表現(參見例如, Co *et al.*, *J Immunol* 152: 2968-76(1994); Better 與 Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96(1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515(1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63(1986); Rousseaux *et al.*, *Methods Enzymol* 121: 663-9(1986); Bird and Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7(1991))。

【0180】抗體可藉由與各種分子例如聚乙二醇(PEG)接合而修飾。本發明提供此種經修飾的抗體。該經修飾的抗體可藉由將抗體化學修飾而獲得。此等修飾方法在該領域為習知。

【0181】或者, 本發明抗體可獲得為衍生自非人類抗體的

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

【0182】也可使用除了人類框架及不變區外包括人類可變區的完全人類抗體。此種抗體可使用該技術領域已知的各種技術製造。例如體外方法涉及使用呈現在噬菌體的人類抗體片段的重組庫(例如 Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991))。同樣地，可藉由將人類免疫球蛋白基因位導入基因轉殖動物例如內生免疫球蛋白已部分或全部失活的小鼠中，而製備人類抗體。此方法敘述於例如美國專利號 6,150,584; 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

【0183】如上獲得的抗體可純化成同質。例如可依照一般蛋白質使用的分離及純化方法將抗體分離及純化。例如可利用適當選擇及合併使用的管柱層析分離及單離抗體，管柱層析例如親和性層析、過濾、超過濾、鹽析、透析、SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳及等電點集中法(*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))，但不限於此等。可使用蛋白質 A 管柱及蛋白質 G 管柱當做該親和性管柱。示例之可使用的蛋白質 A

管柱包括例如 Hyper D、POROS 及 Sepharose F.F.(Pharmacia)。

【0184】親和層析以外的適合之層析技術的例子，包括例如離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、反相層析、吸附層析等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996))。該等層析程序可利用液相層析，例如 HPLC 與 FPLC 實施。

【0185】例如可使用測量吸光度、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)、酵素免疫分析法(EIA)、放射免疫分析法(RIA) 及/或免疫螢光以測量本發明抗體的抗原結合活性。ELISA 中，係將本發明抗體固定化在一平板上，塗佈本發明胜肽於該平板，然後塗佈含有所望抗體的樣本，例如抗體產生細胞的培養上清或純化的抗體。然後，將辨識該初級抗體的二次抗體以酵素例如鹼性磷酸酶標記，然後溫育該平板。清洗後，添加酵素受質例如對硝基苯基磷酸酯到該平板，測量吸光度以評估該樣本的抗原結合活性。可使用該胜肽的片段例如 C 末端或 N 端片段當做抗原以評估該抗體的結合活性。可使用 BIAcore(Pharmacia)來評估本發明抗體的活性。

【0186】上述方法，藉由使本發明抗體暴露於假定含有本發明胜肽的樣本，並偵測或測量該抗體與該胜肽形成的免疫複合體，能偵測或測量本發明的胜肽。

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

【0187】 XI. 載體與宿主細胞

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

【0188】 當選用宿主細胞爲 *E. coli* 且載體在 *E. coli* (例如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue)中大量放大及生產時，該載體應具有欲在 *E. coli* 中放大的「ori」以及用於選擇經轉形的 *E. coli* 的標誌基因(例如由安皮西林、四環黴素、嘉那黴素、氯黴素等藥物選擇的抗藥性基因)。例如，可使用 M13 系列載體、pUC 系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。此外，也可使用 pGEM-T、pDIRECT 及 pT7 次選殖及萃取 cDNA 及上述載體。當使用載體產生本發明蛋白質時，表現載體爲有用。例如欲在 *E. coli* 中表現的載體應具有上述欲在 *E. coli* 中擴增需要的特性。當使用 *E. coli* 例如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1 Blue 當做宿主細胞，該載體應具有啓動子例如 lacZ 啓動子 (Ward *et al.*, Nature 341: 544-6(1989); FASEB J 6: 2422-7(1992))、araB 啓動子 (Better *et al.*, Science 240: 1041-3(1988))、T7 啓動子等。其能有效率地在 *E. coli* 中表現所望的基因。於此方面，可使用 pGEX-5X-1(Pharmacia)、「QIAexpress system」(Qiagen)、pEGFP 及 pET(於此情形，宿主較佳爲表現 T7 RNA 聚合酶的 BL21)取代上述載體。此外，該載體也可含有訊號序列以供胜肽分泌。引導該胜肽分泌到 *E. coli* 胞間質之示例的訊號序列，爲 pelB 訊號序列 (Lei *et al.*,

J Bacteriol 169: 4379(1987))。將該等載體導入目標宿主細胞的方法包括例如氯化鈣法及電穿孔法。

【0189】除了 *E. coli*，例如可使用衍生自哺乳動物的表現載體(例如 pcDNA3(Invitrogen)及 pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17): 5322(1990))、pEF、pCDM8)、衍生自昆蟲細胞的表現載體(例如「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、衍生自植物的表現載體(例如 pMH1、pMH2)、衍生自動物病毒的表現載體(例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、衍生自反轉錄病毒的表現載體(例如 pZipneo)、衍生自酵母菌的表現載體(例如「Pichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)，及衍生自枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)的表現載體(例如 pPL608、pKTH50)，用於生產本發明之多胜肽。

【0190】爲了於動物細胞例如 CHO、COS 或 NIH3T3 細胞中表現載體，該載體應具有對於在此種細胞中表現所需要的啓動子例如 SV40 啓動子(Mulligan *et al.*, Nature 277: 108(1979))、MMLV-LTR 啓動子、EF1 α 啓動子(Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res 18: 5322(1990))、CMV 啓動子等，較佳爲具有用於選擇轉形體的標記基因(例如由藥物(例如新黴素、G418)選擇的抗藥性基因)。具有此等特性的已知載體的例子包括，例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 及 pOP13。

【0191】以下參考具體的實施例對於本發明更詳細敘述。然而，以下材料、方法及實施例係可協助該技術領域中具有通

常知識者製造及使用本發明特定具體例，此等僅是意欲來解說本發明態樣，因此並不限制本發明的範圍。該技術領域中具有通常知識者當可輕易理解到，與在此所述者類似或等同之方法及材料可用於實施或測試本發明。

[實施例]

【0192】材料與方法

細胞株

小鼠纖維母細胞株(L-細胞)，其經過基因改造以表現DR4 (DRB1*04:05), L-DR4; DR8 (DRB1*08:03), L-DR8; DR9 (DRB1*09:01), L-DR9; DR15 (DRB1*15:02), L-DR15; DR53 (DRB4*01:03), L-DR53; 或DP5 (DPB1*05:01), L-DP5使用為抗原呈現細胞(APC)。抗原加工相關性傳遞蛋白(TAP)缺損及HLA-A2陽性細胞株T2是從Riken Cell Bank購買(Tsukuba, 日本)。

【0193】預測 HLA 第 II 類結合胜肽

為了預測有潛力的混雜的HLA第II類結合人類IMP-3衍生的胜肽，將該人類IMP-3蛋白質之胺基酸序列使用最近發展的電腦演算法 (IEDB analysis resource, consensus method, tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html) (Wang P, et al., BMC Bioinformatics 2010; 11:568.; Wang P, et al., PLoS Comput Biol 2008;4:e1000048.)來分析。該程式分析15個胺基酸長的序列偏移量(offset)以包括完整之IMP-3蛋白質。22及21個胺基酸長的胜肽，IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP (LP) (QSETETVHLFIPALSVGAIIGK: 序列辨識號: 1) 及

(Inoue M, et al., Int J Cancer 2010;127:1393-403.)。經由如前述方式之體外培養從CD14⁺細胞生產單核球來源的樹狀細胞(DC)(Harao M, et al., Int J Cancer 2008;123:2616-25.)，並將其作為抗原呈現細胞(APC)以誘導抗原專一性CD4⁺T細胞。將DC(1×10⁴個細胞/井)以10 micro-g/mL長胜肽施以脈衝(pulse)3小時並照射輻射(45 Gy)，然後與CD4⁺T細胞(3×10⁴個細胞/井)，在96井平底培養盤之各井中混合，各井有200 micro-L之補充5%人類無補體血漿(decomplemented plasma)的AIM-V。7天後，從各培養物移除半數培養基，然後添加新鮮培養基(100 micro-L/井)，其含有以胜肽(10 micro-g/mL)脈衝的經放射照射的(50 Gy)的自體PBMC(1×10⁵個細胞/井)及5 ng/mL重組人類介白素7(rhIL-7)。於第2次以胜肽刺激後2天，對於各井添加rhIL-2(10 IU/mL)。一週後，將各井中的經刺激的CD4⁺T細胞在INF-γ ELISPOT分析中分析專一性。將顯示對於同源(cognate)胜肽有專一性反應的T細胞移到24井盤，並且以週的間隔，對其使用於補充 rhIL-2 (20 IU/mL)與rhIL-7 (5 ng/mL)之培養基中以該胜肽脈衝的經放射照射的自體PBMC (1×10⁶個細胞/井)進行再刺激。有些情形，會利用極限稀釋將T細胞選殖，以供前述進一步的研究 (Tabata H, et al., Hum Immunol 1998;59:549-60.)。

【0197】

[表 2] 健康捐贈者的 HLA-A、-DR 及 -DP 基因型

捐贈者 ID	HLA-A 基因型	HLA-DRB1 基因型	HLA-DPB1 基因型
HD1	A*02:01/24:02	DRB1*04:05/-	DPB1*05:01/-
HD2	A*11:01/31:01	DRB1*08:03/15:02	DPB1*02:01/09:01

HD3	<i>A*24:02/31:01</i>	<i>DRB1*08:03/14:05</i>	<i>DPB1*02:02/05:01</i>
HD4	<i>A*02:01/02:06</i>	<i>DRB1*09:01/04:05</i>	<i>DPB1*02:01/04:02</i>

HLA: 人類組織相容性白血球抗原; n.t:未檢測

【0198】 T 細胞對於胜肽及蛋白質的反應的評估

使用 IFN- γ 酵素連結免疫點 (ELISPOT)(BD Biosciences) , 如前述 (Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011;102:697-705.)評估 Th細胞對於經過胜肽及蛋白質脈衝的抗原呈現細胞(APC)之反應。簡言之, 係分析每 3×10^4 個散裝 CD4⁺ T細胞在以有經過胜肽脈衝之 PBMC (3×10^4 個細胞/井)刺激時, 或每 1×10^4 個散裝 CD4⁺ T細胞在以有經過胜肽脈衝之 HLA-DR-表現的 L細胞 (5×10^4 個細胞/井)刺激時, 產生 (IFN- γ 之胜肽專一性 CD4⁺ T細胞的頻率。爲了決定涉及抗原呈現的 HLA分子的限制, 藉由添加抗 HLA-DR單株抗體 (mAb) (L243, BioLegend)、抗 HLA-DP mAb, (B7/21, Abcam)、抗人類 HLA-DQ mAb (SPV-L3, Abcam)或抗 HLA第 I類 mAb, (W6/32, Abcam), 來檢查抗原誘導之 IFN- γ 生產之阻斷性。所有的 mAb 以最終濃度爲 5 micro-g/mL 來使用。所有的 IFN- γ ELISPOT 分析的評估被實施三重複或兩重複, 且結果以平均值 $\pm$ SD 表示。

【0199】 細胞激素分析

將受 HLA-DR 限制的 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 專一性散裝 Th細胞及 Th細胞選殖體 (Th-選殖體, 1×10^4 個細胞/井) 與自體 PBMCs (3×10^4 個細胞/井) 一起在同源胜肽存在下, 於 96 井培養盤培養。24 小時後, 收集培養懸浮層, 並使用 Bio-Plex 系統 (Bio-Rad) 依廠商指示測量細胞激素的水平 (IL-2、IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 、IL-4 及 IL-17)。

【0200】 CD107a 移動性分析

爲了鑑別經此胜肽刺激的脫顆粒CD4⁺ T淋巴球，使用細胞流式計數儀分析細胞表面的CD107a (Rubio V, et al., Nat Med 2003;9:1377-82.; Betts MR, et al., J Immunol Methods 2003;281:65-78.)。簡言之，以如前述方式實施CD107a移動性分析 (Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011;102:71-8.)。添加同源長胜肽(LP)或對照長胜肽(LP)(1 micro-g/mL)作爲刺激物，並且對各井加入經FITC標定的抗人類CD107a mAb或經FITC標定的構造同型(isotype)對照小鼠IgG1及monensin。將細胞於攝氏37度培養5小時。培養後，將此經胜肽刺激的Th細胞，用有PE結合的抗人類CD4抗體(eBioscience, San Diego, CA)染色，並於FACScan (BD Bioscience, Bedford, MA)分析。

【0201】 體外交叉起動(cross-priming)分析

經由前述方式產生周邊單核細胞衍生樹突狀細胞(DC)。以20 micro-g/mL 的 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 對樹突狀細胞(DC)脈衝 3 小時。接著對細胞進行照射(45Gy)並在第 0 天將其與單離的 CD8⁺ T 細胞一起培養。於第 7 天和第 14 天以載有胜肽自體 DC 進行兩次額外的刺激。最後一次刺激的 6 天後，以 ELISPOT 分析計數以經 IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃ 短胜肽脈衝之 T2 (2 × 10⁴ 個細胞/井) 刺激下，IFN- γ 生產 CD8⁺ T 細胞(1×10⁵ 個細胞/井)之數目。

【0202】 體內交叉起動(cross-priming)分析

HLA-A2 (HHD)基因轉殖小鼠(Tgm)係由F.A. Lemonnier博士好心提供(Firat H, et al., Eur J Immunol 1999;29:3112-21.; Jung KO, et al., J Virol 2012;86:7616-24.)。以7天爲間隔，對於小鼠

尾根部以真皮內注射 (intradermally) 在不完全佛洛依德佐劑 (IFA) 中乳 化 之 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 溶 液 (HLA-A2 Tgm, 100 micro-g/每隻小鼠)。接種IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP疫苗第2次的7天後，利用以磁性小珠 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) 進行陽性篩選，從鼠蹊部附近的淋巴結單離 CD8⁺ T細胞。以生物體外 (*ex vivo*) ELISPOT 分析法計數以經 IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃ 短胜肽脈衝之骨髓衍生之 DC (BM-DC, 2×10^4 個細胞/井細胞之刺激的 IFN- γ 產生 CD8⁺ T細胞 (1×10^5 個細胞/井) (Harao M, et al., Int J Cancer 2008;123:2616-25.; Inoue M, et al., Immunol Lett 2009;126:67-72.)。

【0203】統計分析

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

【0204】結果

含有 CTL 抗原決定位的 HLA 第 II 類結合 IMP-3 長胜肽的預測及選擇

為了鑑別 IMP-3 之有潛力之混雜的 HLA-第 II 類結合之 Th 細胞抗原決定位，本案發明人首先使用最近發展的電腦演算法檢驗 IMP-3 的胺基酸序列 (第 1 圖及表 1) (Wang P, et al., BMC Bioinformatics 2010;11:568.; Wang P, et al., PLoS Comput Biol 2008;4:e1000048.)。有一區 (IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP-胜肽) 被此電腦演算法預測為有潛力的混雜的 HLA 第 II 類結合胜肽，儘管其不包括已知的 CTL-抗原決定位之序列。另一區 (IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP) 被

此電腦演算法預測為有潛力的混雜的HLA第II類結合胜肽，接近CTL抗原決定位，其由經HLA-A2或A24限制之CTL所辨識(第1B圖)。因此，本案發明人合成2個候選的LP (IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP及IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP)，其被預測與日本群體中常見的HLA第II類分子具有強大的結合親和力，HLA-DR9、HLA-DR4及HLA-DR15、及其中之一包括由經HLA-A2-或-A24限制之CTL辨識的天然9員胜肽用於後續之分析。

【0205】 辨識混雜的 IMP-3 衍生 Th 細胞

將從健康捐贈者之 PBMC 單離的 CD4⁺ T 細胞以週的間隔以經 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 脈衝的自體 DC 與 PBMC 刺激。在至少 3 回合刺激後，藉由 IFN- γ ELISPOT 分析檢驗培養之 CD4⁺ T 細胞的 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 專一性反應。於一名 HLA-DR53 陽性健康捐贈者(HD1)中，產生的 Th 細胞回應於經 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 脈衝的 PBMC，以依存 HLA-DR 的方式產生顯著量的 IFN- γ 。該散裝 Th 細胞，以 HLA-DR 依存方式，專一性的辨識經 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 脈衝的 L-DR53 細胞，而不是經未經脈衝之 L-DR53 細胞或經 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 脈衝的 L-DR4 細胞(第 2A 圖)。這些結果啓示 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 是由 HLA-DR53 呈現。為調查是否 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 會誘導於受其他 HLA 第 II 類分子限制之 Th 細胞中的反應，測試來自其他健康捐贈者的 CD4⁺ T 細胞。本案發明人確認 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 產生受 HLA-DR8 (DRB1*08:03)限制之 Th 細胞及受 HLA-DR (DRB1*08:03 或 14:05)限制之散裝 Th 細胞(第 2B 及 2C 圖)。因此 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 結合於 HLA-DR53、HLA-DR8 及其他 HLA-DR

分子啓示 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 爲常見的 HLA 第 II 類分子所呈現的混雜的 Th 細胞抗原決定位 (Saito S, et al., Tissue Antigens 2000;56:522-9.; Mack SJ, et al., Tissue Antigens 2000;55:383-400)。

【0206】接著，本發明人評估具有已知的 CTL 抗原決定位的 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 是否可以產生 Th 細胞。在 HLA-DR8 和 DR14 陽性的健康捐贈者 (HD3) 中，產生的 Th 細胞回應於經 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 脈衝的 PBMC，以 HLA-DR 依存的方式產生顯著性量的 IFN- γ (第 2D 圖)。爲了探討 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 是否可再藉由其他 HLA 第 II 類分子所限制的 Th 細胞中誘導反應，對來自於 HLA-DR8 和 DR14 陰性的健康捐贈者 (HD4) 的 CD4⁺ T 細胞進行測試。本案發明人確認 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 可在這種捐贈者中產生受 HLA-DR9 限制的散裝 Th 細胞 (第 2E 圖)。這些結果顯示 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 也是一種混雜的 Th 細胞抗原決定位。

【0207】IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 係經天然處理且係由 DC 呈現

本案發明人著手評估 DC 是否攝入並處理 IMP-3 蛋白質以刺激 IMP-3 專一性 Th 選殖體。製備載有重組 IMP-3 蛋白質之 DC，並使用於 IFN- γ ELISPOT 分析作爲 APC (Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011;102:71-8.; Harao M, et al., Int J Cancer 2008;123:2616-25.)。受 HLA-DR9-限制之 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 反應性 Th 選殖體有效率地辨識載有 IMP-3 蛋白質之 DC，而不辨識載有對照蛋白質之 DC，啓示此抗原決定位係經天然處理且係由 HLA-DR9 分子呈現 (第 3A 圖)。受 HLA-DR53 限制的 IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 反應性 Th 選殖體以 HLA-DR 依存的方式有效率

地辨識載有IMP-3蛋白質的DC並產生IFN- γ ，但不辨識載有對照蛋白質之DC，啓示此抗原決定位也是經天然處理且係由HLA-DR53分子呈現（第3B圖）。總之，結果指出此IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP及IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP係從IMP-3蛋白質經天然地處理，且藉由DC呈現。

【0208】IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 刺激 Th1 型 CD4⁺ T 細胞

爲了進一步探討IMP-3-LP反應性Th細胞的特性，本案發明人使用Bio-Plex系統來測量數種回應於同源胜肽的刺激而釋放的細胞素之水平。在以同源胜肽再度刺激後，來自HD3的IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP專一性散裝Th細胞產生大量的IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、及GM-CSF，但產生較少的IL-4及IL-17，顯示了Th1極化的特性（第4A圖）。在經同源胜肽刺激的IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP專一性及IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP專一性散裝Th細胞上也偵測到細胞毒素指標CD107a（第4B圖），一如先前所示抗病毒CD4⁺效應子(effector)T細胞及腫瘤-滲透(tumor-infiltrating) CD4⁺淋巴球(Casazza JP, et al., J Exp Med 2006;203:2865-77.; Attig S, et al., Cancer Res 2009;69:8412-9.; Widenmeyer M, et al., Int J Cancer 2012;131:140-9.; Martorelli D, et al., Int Rev Immunol 2010;29:371-402.)。這些數據暗示IMP-3專一性Th細胞不只提供輔助的功能，也直接指出細胞毒性活性，兩者對於癌症免疫療法來說都是有利的。

【0209】於體外(*in vitro*)及體內(*in vivo*)交叉呈現IMP-3-LP有效地起動(primes)IMP-3專一性CD8⁺T細胞

爲了評估IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP於體外(*in vitro*)誘導

IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃專一性CTL的能力，將從健康捐贈者之PBMC單離的CD4⁺ T細胞以週的間隔以經IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP脈衝的自體DC進行刺激。在至少3回合刺激後，CD8⁺ T細胞回應於HLA-A2陽性健康捐贈者(HD1及HD4)中經IMP-3₅₁₅₋₅₂₃-SP脈衝的T2細胞，產生更大量的IFN- γ (第5A圖)。

藉由生物體外 (*ex vivo*) IFN- γ ELISPO分析法檢測IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP起動(prime) IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃專一性細胞CTL的能力。對於HLA-A2 Tgm以乳化於IFA的IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP實施免疫2次。以IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP接種的HLA-A2 Tgm的CD8⁺ T細胞回應於以經IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃SP脈衝之BM-DC的刺激，專一性地產生IFN- γ (第5B圖)。

【0210】討論

使用IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃SP及IMP-3-A24₅₀₈₋₅₁₆SP對抗不同類型的腫瘤的數種階段I/II臨床試驗正在進行(Mizukami Y, et al., Cancer Sci 2008;99:1448-54.; Kono K, et al., Cancer Sci 2009;100:1502-9.; Kono K, et al., J Transl Med 2012;10:141)。這些試驗結果對於一些晚期的癌症患者是有用的。因此，本案發明人嘗試辨識可同時誘導抗原專一性Th細胞及CTL的LP以進一步發展胜肽疫苗免疫療法。

本案發明人辨識出兩個混雜的IMP-3衍生Th細胞抗原決定位胜肽。其中之一包括受HLA-A2及-A24限制的CTL抗原決定位。本案發明人確認IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP及IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP係經天然處理且係由上下文中的HLA第II類分子呈現。本案發明人也顯示IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP專一性CD4⁺ T細胞具有Th1極化(polarized)特

性，暗示由IMP-3-LP誘導的CD4⁺ T細胞對於癌症免疫療法具有有利的特性。

【0211】 IMP-3-LP 誘導受 HLA-DR9、DR8、及 DR53 限制的 Th 細胞。此外，IMP-3-LP 被暗示可能誘導受 HLA-DR14 限制的 Th 細胞。HLA-DR9、DR8、DR14 及 DR53 對偶基因(alleles)是日本及太平洋/亞洲群體中非常常見的 HLA 第 II 類分子，並且在這些群體中也高頻率地觀察到 HLA-A2 及 A24 對偶基因。此外，IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 於體內(*in vitro*)及體外(*in vivo*)誘導 IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃ 專一性 CTL 之起動(priming)及擴增，暗示具有 IMP-3-LP 的 IMP-3-SP 抗原決定位可誘導 IMP-3 專一性 Th 細胞及 CTL。因此，本案發明人相信這些免疫原性的 IMP-3-LP 可具有誘導更強的抗腫瘤反應的潛力。

最近 LP 的研究顯示，由於 LP 長時間持續的交叉呈現，包括天然 CTL 抗原決定位的疫苗在誘導抗腫瘤 CTL 免疫性上優於由最小的 CTL 抗原決定位組成的疫苗(Melief CJ, et al., Nat Rev Cancer 2008;8:351-60.; Bijker MS, et al., Eur J Immunol 2008;38:1033-42.; Chauvin JM, et al., J Immunol 2012;188:2102-10.)。本案發明人至今尚未比較 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP 及 IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃-SP 之間誘導 IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃ 專一性 CTL 的能力。這將會在未來的研究中進行評估。

【0212】 結論為是，本案發明人鑑別出兩種可誘導 Th 細胞的免疫原性 IMP-3-LP。其中之一包括 IMP-3-A2 及 IMP-3-A24 抗原決定位。我們的結果暗示 IMP-3-LP 對 IMP-3 專一性 Th 細胞及 CTL 的增殖提供有用的工具。這些發現支持對各種類

型的癌症進行以 IMP-3 胜肽為基礎的免疫療法的可能臨床試驗。

[產業利用性]

【0213】本發明敘述能誘導有效抗腫瘤免疫反應之衍生自 IMP-3 的 Th1 細胞抗原決定位胜肽，且因此對於廣範圍的癌症類型有用。此種胜肽擔保作為抗癌之胜肽疫苗的進一步發展，尤其對抗表現 IMP-3 之癌症。本發明之胜肽可誘導 Th1 細胞反應，且因而由 Th1 細胞分泌的細胞素可幫助或活化任何以抗原獨立方式擔任細胞免疫的免疫細胞。因此本發明提供的免疫治療策略可適用於包括癌的任意疾病，只要此疾病可藉由由 MHC 第 II 類分子媒介之免疫反應而改善。具體而言，本發明之 Th1 細胞能改善由 CTL 引起的免疫反應。因此本發明之胜肽對於增強對象中包括癌之疾病的 CTL 反應有助益。

【0214】又，於較佳具體例，本發明之胜肽也誘導對抗表現 IMP-3 之細胞的 CTL 及 Th1 細胞。本發明之如此的胜肽，對於治療相關於 IMP-3 之疾病，例如癌症，更具體而言，膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病(chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌(HNC)亦為有效。

【0215】雖已對於本發明參照特定具體例詳盡敘述，但應了解上述敘述的本質係示範性及解說性，係用來供理解本發明及其較佳具體例。該技術領域中具有通常知識者可輕易理解經

由例行實驗可在不偏離本發明精神及範圍之下進行各種改變及潤飾，本發明的邊界和界限由附帶的申請專利範圍界定。

【符號說明】

無。

1

1 5 10 15

Val Pro Arg Asp Gln
20

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTL 抗原決定位胜肽

<400> 3

Lys Thr Val Asn Glu Leu Gln Asn Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTL 抗原決定位胜肽

<400> 4

Asn Leu Ser Ser Ala Glu Val Val Val
1 5

<210> 5
<211> 4168
<212> DNA
<213> 人類 (Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (267)..(2006)

<400> 5	
aagacttagg aagactggtg gatgcgtttg ggttgtagct aggctttttc tttctttct	60
cttttaaaac acatctagac aaggaaaaaa caagcctcgg atctgatttt tcactcctcg	120
ttcttgtgct tggttcttac tgtgtttgtg tatttttaaag gcgagaagac gaggggaaca	180
aaaccagctg gatccatcca tcaccgtggg tggttttaat ttttcgtttt ttctcgttat	240
ttttttttaa acaaccactc ttcaca atg aac aaa ctg tat atc gga aac ctc	293
Met Asn Lys Leu Tyr Ile Gly Asn Leu	
1 5	
agc gag aac gcc gcc ccc tcg gac cta gaa agt atc ttc aag gac gcc	341
Ser Glu Asn Ala Ala Pro Ser Asp Leu Glu Ser Ile Phe Lys Asp Ala	
10 15 20 25	
aag atc ccg gtg tcg gga ccc ttc ctg gtg aag act ggc tac gcg ttc	389
Lys Ile Pro Val Ser Gly Pro Phe Leu Val Lys Thr Gly Tyr Ala Phe	
30 35 40	
gtg gac tgc ccg gac gag agc tgg gcc ctc aag gcc atc gag gcg ctt	437
Val Asp Cys Pro Asp Glu Ser Trp Ala Leu Lys Ala Ile Glu Ala Leu	
45 50 55	
tca ggt aaa ata gaa ctg cac ggg aaa ccc ata gaa gtt gag cac tcg	485
Ser Gly Lys Ile Glu Leu His Gly Lys Pro Ile Glu Val Glu His Ser	
60 65 70	
gtc cca aaa agg caa agg att cgg aaa ctt cag ata cga aat atc ccg	533
Val Pro Lys Arg Gln Arg Ile Arg Lys Leu Gln Ile Arg Asn Ile Pro	
75 80 85	
cct cat tta cag tgg gag gtg ctg gat agt tta cta gtc cag tat gga	581
Pro His Leu Gln Trp Glu Val Leu Asp Ser Leu Leu Val Gln Tyr Gly	
90 95 100 105	
gtg gtg gag agc tgt gag caa gtg aac act gac tcg gaa act gca gtt	629
Val Val Glu Ser Cys Glu Gln Val Asn Thr Asp Ser Glu Thr Ala Val	
110 115 120	
gta aat gta acc tat tcc agt aag gac caa gct aga caa gca cta gac	677
Val Asn Val Thr Tyr Ser Ser Lys Asp Gln Ala Arg Gln Ala Leu Asp	



	125	130	135	
aaa ctg aat gga ttt cag tta gag aat ttc acc ttg aaa gta gcc tat				725
Lys Leu Asn Gly Phe Gln Leu Glu Asn Phe Thr Leu Lys Val Ala Tyr				
	140	145	150	
atc cct gat gaa atg gcc gcc cag caa aac ccc ttg cag cag ccc cga				773
Ile Pro Asp Glu Met Ala Ala Gln Gln Asn Pro Leu Gln Gln Pro Arg				
	155	160	165	
ggt cgc cgg ggg ctt ggg cag agg ggc tcc tca agg cag ggg tct cca				821
Gly Arg Arg Gly Leu Gly Gln Arg Gly Ser Ser Arg Gln Gly Ser Pro				
	170	175	180	185
gga tcc gta tcc aag cag aaa cca tgt gat ttg cct ctg cgc ctg ctg				869
Gly Ser Val Ser Lys Gln Lys Pro Cys Asp Leu Pro Leu Arg Leu Leu				
	190	195	200	
gtt ccc acc caa ttt gtt gga gcc atc ata gga aaa gaa ggt gcc acc				917
Val Pro Thr Gln Phe Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Glu Gly Ala Thr				
	205	210	215	
att cgg aac atc acc aaa cag acc cag tct aaa atc gat gtc cac cgt				965
Ile Arg Asn Ile Thr Lys Gln Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg				
	220	225	230	
aaa gaa aat gcg ggg gct gct gag aag tcg att act atc ctc tct act				1013
Lys Glu Asn Ala Gly Ala Ala Glu Lys Ser Ile Thr Ile Leu Ser Thr				
	235	240	245	
cct gaa ggc acc tct gcg gct tgt aag tct att ctg gag att atg cat				1061
Pro Glu Gly Thr Ser Ala Ala Cys Lys Ser Ile Leu Glu Ile Met His				
	250	255	260	265
aag gaa gct caa gat ata aaa ttc aca gaa gag atc ccc ttg aag att				1109
Lys Glu Ala Gln Asp Ile Lys Phe Thr Glu Glu Ile Pro Leu Lys Ile				
	270	275	280	
tta gct cat aat aac ttt gtt gga cgt ctt att ggt aaa gaa gga aga				1157
Leu Ala His Asn Asn Phe Val Gly Arg Leu Ile Gly Lys Glu Gly Arg				
	285	290	295	
aat ctt aaa aaa att gag caa gac aca gac act aaa atc acg ata tct				1205
Asn Leu Lys Lys Ile Glu Gln Asp Thr Asp Thr Lys Ile Thr Ile Ser				

300	305	310	
cca ttg cag gaa ttg acg ctg tat aat cca gaa cgc act att aca gtt			1253
Pro Leu Gln Glu Leu Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val			
315	320	325	
aaa ggc aat gtt gag aca tgt gcc aaa gct gag gag gag atc atg aag			1301
Lys Gly Asn Val Glu Thr Cys Ala Lys Ala Glu Glu Glu Ile Met Lys			
330	335	340	345
aaa atc agg gag tct tat gaa aat gat att gct tct atg aat ctt caa			1349
Lys Ile Arg Glu Ser Tyr Glu Asn Asp Ile Ala Ser Met Asn Leu Gln			
350	355	360	
gca cat tta att cct gga tta aat ctg aac gcc ttg ggt ctg ttc cca			1397
Ala His Leu Ile Pro Gly Leu Asn Leu Asn Ala Leu Gly Leu Phe Pro			
365	370	375	
ccc act tca ggg atg cca cct ccc acc tca ggg ccc cct tca gcc atg			1445
Pro Thr Ser Gly Met Pro Pro Pro Thr Ser Gly Pro Pro Ser Ala Met			
380	385	390	
act cct ccc tac ccg cag ttt gag caa tca gaa acg gag act gtt cat			1493
Thr Pro Pro Tyr Pro Gln Phe Glu Gln Ser Glu Thr Glu Thr Val His			
395	400	405	
ctg ttt atc cca gct cta tca gtc ggt gcc atc atc ggc aag cag ggc			1541
Leu Phe Ile Pro Ala Leu Ser Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Gln Gly			
410	415	420	425
cag cac atc aag cag ctt tct cgc ttt gct gga gct tca att aag att			1589
Gln His Ile Lys Gln Leu Ser Arg Phe Ala Gly Ala Ser Ile Lys Ile			
430	435	440	
gct cca gcg gaa gca cca gat gct aaa gtg agg atg gtg att atc act			1637
Ala Pro Ala Glu Ala Pro Asp Ala Lys Val Arg Met Val Ile Ile Thr			
445	450	455	
gga cca cca gag gct cag ttc aag gct cag gga aga att tat gga aaa			1685
Gly Pro Pro Glu Ala Gln Phe Lys Ala Gln Gly Arg Ile Tyr Gly Lys			
460	465	470	
att aaa gaa gaa aac ttt gtt agt cct aaa gaa gag gtg aaa ctt gaa			1733
Ile Lys Glu Glu Asn Phe Val Ser Pro Lys Glu Glu Val Lys Leu Glu			

475	480	485	
gct cat atc aga gtg cca tcc ttt gct gct ggc aga gtt att gga aaa			1781
Ala His Ile Arg Val Pro Ser Phe Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys			
490	495	500	505
gga ggc aaa acg gtg aat gaa ctt cag aat ttg tca agt gca gaa gtt			1829
Gly Gly Lys Thr Val Asn Glu Leu Gln Asn Leu Ser Ser Ala Glu Val			
	510	515	520
gtt gtc cct cgt gac cag aca cct gat gag aat gac caa gtg gtt gtc			1877
Val Val Pro Arg Asp Gln Thr Pro Asp Glu Asn Asp Gln Val Val Val			
	525	530	535
aaa ata act ggt cac ttc tat gct tgc cag gtt gcc cag aga aaa att			1925
Lys Ile Thr Gly His Phe Tyr Ala Cys Gln Val Ala Gln Arg Lys Ile			
	540	545	550
cag gaa att ctg act cag gta aag cag cac caa caa cag aag gct ctg			1973
Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val Lys Gln His Gln Gln Gln Lys Ala Leu			
	555	560	565
caa agt gga cca cct cag tca aga cgg aag taa aggctcagga aacagcccac			2026
Gln Ser Gly Pro Pro Gln Ser Arg Arg Lys			
570	575		
cacagaggca gatgccaac caaagacaga ttgcttaacc aacagatggg cgctgacccc			2086
ctatccagaa tcacatgcac aagtttttac ctagccagtt gtttctgagg accaggcaac			2146
ttttgaactc ctgtctctgt gagaatgtat actttatgct ctctgaaatg tatgacaccc			2206
agcttttaaaa caaacaacaa aacaaacaaa aaaagggtgg gggaggagg gaaagagaag			2266
agctctgcac ttccctttgt tgtagtctca cagtataaca gatattctaa ttcttcttaa			2326
tattccccca taatgccaga aattggctta atgatgcttt cactaaattc atcaaataga			2386
ttgctcctaa atccaattgt taaaattgga tcagaataat taccacagga acttaaatgt			2446
taagccatta gcatagaaaa actgttctca gttttatfff tacctaacac taacatgagt			2506
aacctaaggg aagtgcigaa tgggtgtggc aggggtatta aacgtgcatt ttactcaac			2566

tacctcaggt attcagtaat acaatgaaaa gcaaaattgt tccttttttt tgaaaatttt	2626
atatacttta taatgataga agtccaaccg ttttttaaaa aataaattta aaatttaaca	2686
gcaatcagct aacaggcaaa ttaagatfff tacttctggc tggtgacagt aaagctggaa	2746
aattaatttc agggtttttt gaggcfffft acacagttat tagttaaatc aaatgttcaa	2806
aaatacggag cagtgccatg tatctggaga gcagcactac catttattct ttcatttata	2866
gttgggaaag tttttgacgg tactaacaaa gtggtcgcag gagatttttg aacggctggt	2926
ttaaatggct tcaggagact tcagtttttt gtttagctac atgattgaat gcataataaa	2986
tgctttgtgc ttctgactat caatacctaa agaaagtgca tcagtgaaga gatgcaagac	3046
tttcaactga ctggcaaaaa gcaagcttta gcttgtctta taggatgctt agtttgccac	3106
tacacttcag accaatggga cagtcataga tgggtgtgaca gtgtttaaac gcaacaaaag	3166
gctacatttc catggggcca gcactgtcat gagcctcact aagctatfff gaagattfff	3226
aagcactgat aaattaaaaa aaaaaaatta gactccacct taagtagtaa agtataacag	3286
gatttctgta tactgtgcaa tcagttcttt gaaaaaaaag tcaaaagata gagaatacaa	3346
gaaaagtttt tgggatataa tttgaatgac tgtgaaaaca tatgaccttt gataacgaac	3406
tcatttgctc actccttgac agcaaagccc agtacgtaca attgtgttgg gtgtgggtgg	3466
tctccaaggc cacgctgctc tctgaattga ttttttgagt tttgtttgta agatgatcac	3526
agtcattgta cactgatcta aaggacatat atataaccct ttaaaaaaaaa aatcactgcc	3586
tcattcttat ttcaagatga atttctatac agactagatg tttttctgaa gatcaattag	3646
acattttgaa aatgatttaa agtgttttcc ttaatgttct ctgaaaacaa gtttcttttg	3706
tagttttaac caaaaaagtg ccctttttgt cactggattc tcctagcatt catgattttt	3766
ttttcataca atgaattaaa attgctaaaa tcatggactg gctttctggt tggatttcag	3826
gtaagatgtg ttttaaggcca gagcttttct cagtatttga tttttttccc caatatttga	3886

ttttttaaaa atatacacat aggtgctgca tttatatctg ctggtttaaa ttctgtcata 3946
tttcacttct agccttttag tatggcaaat catattttac ttttacttaa gcatttgtaa 4006
tttggagtat ctggtactag ctaagaaata attctataat tgagttttgt actcaccata 4066
tatggatcat tcctcatgta taatgtgccc caaatgcagc ttcattttcc agataccttg 4126
acgcagaata aattttttca tcatttaggt gcaaaaaaaaa aa 4168

<210> 6
<211> 579
<212> PRT
<213> 人類 (Homo sapiens)

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Lys

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

對於 TH1 細胞之 IMP-3 抗原決定位胜肽及含此之疫苗 / IMP-3
EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES
CONTAINING THE SAME

【中文】

於此揭示具有 Th1 細胞誘導能力之單離的的自 IMP-3 衍生的抗原決定位胜肽。此種胜肽可藉由 MHC 第 II 類分子辨識並誘導 Th1 細胞。於較佳具體例中，此種本發明之胜肽可混雜地 (promiscuously) 結合於 MHC 第 II 類分子並且除了誘導 Th1 細胞更誘導 IMP-3 專一性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)。因此此種胜肽適用於增強一對象中之免疫反應，因而於癌免疫療法中，特別是作為癌疫苗提供效用。於此也揭示編碼為任意上述胜肽的聚核苷酸、由此種胜肽所誘導的 APC 與 Th1 細胞，及與其相關的誘導方法。包含任意上述成分作為有效成分的醫藥組合物，提供效用於癌症或腫瘤之治療及/或預防，此癌症或腫瘤包括例如膀胱癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性髓細胞性白血病 (chronic myelocytic leukemia)、結腸癌、直腸癌、食道癌、胃瀰漫型癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、小細胞肺癌 (SCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腎細胞癌、軟組織腫瘤、睪丸腫瘤、及頭頸癌 (HNC)。

【英文】

Isolated IMP-3-derived epitope peptides having Th1 cell inducibility are disclosed herein. Such peptides can be recognized by MHC class II molecules and induce Th1 cells. In preferred embodiments, such a peptide of the present invention can promiscuously bind to MHC class II molecules and induce IMP-3-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in addition to Th1 cells. Such peptides are thus suitable for use in enhancing immune response in a subject, and accordingly find use in cancer immunotherapy, in particular, as cancer vaccines. Also disclosed herein are polynucleotides that encode any of the aforementioned peptides, APCs and Th1 cells induced by such peptides and methods of induction associated therewith. Pharmaceutical compositions that comprise any of the aforementioned components as active ingredients find use in the treatment and/or prevention of cancers or tumors including, for example, bladder cancer, cervical cancer, cholangiocellular carcinoma, chronic myelocytic leukemia, colon cancer, rectum cancer, esophageal cancer, gastric diffuse-type cancer, non-small-cell lung cancer (NSCLC), small-cell lung cancer (SCLC), lymphoma, osteosarcoma, ovarian cancer, renal carcinoma, soft tissue tumor, testicular tumor, and HNC.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無。

IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP (GKTVNELQNLSSAEVVVPRDQ: 序列辨識號: 2), 其對於由 DRB1*09:01、DRB1*04:05 或 DRB1*15:02 對偶基因編碼之多個 HLA-第 II 類分子具有重疊的高一致性百分等級而且包括 IMP-3 衍生之 9 員 CTL 抗原決定位 (IMP-3-A24₅₀₈₋₅₁₆ 及 IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃), 被選擇並合成 (第 1 圖及表 1)。

【0194】

[表 1] HLA 第 II 類分子之 IMP-3 衍生胜肽的結合演算法分數

胺基酸 殘基位置	百分等級		
	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR15 (DPB1*15:02)
IMP-3 ₄₀₂₋₄₂₃ -LP			
402-416	26.4	2.0	3.0
403-417	22.7	2.0	3.0
404-418	22.2	2.0	3.0
405-419	3.8	2.0	3.0
406-420	2.8	2.0	3.0
407-421	2.1	2.9	3.0
408-422	2.2	3.0	3.0
409-423	3.2	5.3	4.3
IMP-3 ₅₀₇₋₅₂₇ -LP			
507-521	2.6	4.3	5.4
508-522	1.1	4.2	5.4
509-523	0.5	6.0	5.4
510-524	0.3	6.2	5.4
511-525	0.6	7.9	5.4
512-526	1.2	15.4	5.4
513-527	2.9	16.0	5.4

針對指出之 HLA-第 II 類分子的胜肽結合演算法分數，係以 15 員 IMP-3 衍生之重複胜肽表示。

【0195】合成胜肽及重組蛋白質

合成由 HLA-A2 (IMP-3-A2₅₁₅₋₅₂₃) (Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011;102:71-8.) 或 HLA-A24 (IMP-3-A24₅₀₈₋₅₁₆) (Suda T, et

al., *Cancer Sci* 2007;98:1803-8.)所呈現的2個人類IMP-3衍生短胜肽 (SP) 、 及 2 個 長 胜 肽 (IMP-3₄₀₂₋₄₂₃-LP 及 IMP-3₅₀₇₋₅₂₇-LP)(MBL, Nagoya, Japan; 純度 >95 %; 第 1B 圖)。使用結合於HLA-A2 (HIV-A2)之人類免疫缺乏病毒(HIV)短胜肽，作為負對照 SP (Tomita Y, et al., *Cancer Sci* 2011;102:71-8.; Tomita Y, et al., *Cancer Sci* 2011;102:697-705.)將胜肽以 10 micro-g/micro-L的濃度溶於二甲基亞砷，並保存在攝氏 -80度。重組的全長IMP-3蛋白質是從ProSci Incorporated購買(California, USA; 純度 >90%)。重組的全長IMP-3蛋白質是由帶有pET28a載體(Novagen)的大腸桿菌*E.coli* BL21品系表現並且以純化的重組人類IMP-3蛋白做為對照。

【0196】 自健康捐贈者產生抗原專一性 CD4⁺ T 細胞

收集與使用衍生自健康捐贈者之PBMC的研究計畫經過熊本大學人體試驗委員會 (Institutional Review Board of Kumamoto University)核可。本案發明人從4名具有知情同意書 (written informed consents)的健康捐贈者PBMC樣本。本研究中調查的健康捐贈者的HLA-A、DRB1及DPB1對偶基因，係以具有聚合酶連鎖反應及對偶基因專一性探針雜交之HLA基因變異的DNA分型(DNA TYPING)來決定，且如表1中所述。HLA-A、DRB1及DPB1對偶基因的基因型鑑定(genotyping)是在HLA實驗室中實施(Kyoto, Japan)(表2)。將前述方式進行一些修飾，實施抗原專一性CD4⁺ T細胞的誘導(Zarour HM, et al., *Cancer Res* 2000;60:4946-52.)。藉由磁性微珠以陽性篩選來從PBMC純化CD4⁺ T細胞(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)

申請專利範圍

1. 一種單離的胜肽，其由選自由以下構成之群組的胺基酸序列所組成：
 - (a) 序列識別號：2 之一胺基酸序列；及
 - (b) 一胺基酸序列，其中於 (a) 之胺基酸序列中有一個或二個胺基酸係經附加，該胜肽有誘導 T 輔助 1 型 (Th1) 細胞的能力。
2. 如申請專利範圍第 1 項之單離的胜肽，其中，該胜肽或其片段有結合於至少 2 種 MHC 第 II 類分子的能力。
3. 如申請專利範圍第 2 項之單離的胜肽，其中，該 MHC 第 II 類分子選自於由 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 構成之群組。
4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之單離的胜肽，其中，該胜肽包含具有 IMP-3 專一性細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 誘導能力之胜肽的胺基酸序列。
5. 一種單離的聚核苷酸，其編碼為如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽。
6. 一種組合物，包含一或多種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽，或一或多種編碼為此等胜肽的聚核苷酸。
7. 一種選自於由以下構成之群組中之至少一種有效成分之用途，其係用於製備治療癌之組合物：
 - (a) 一或多種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽；
 - (b) 一或多種如申請專利範圍第 5 項之聚核苷酸；
 - (c) 一或多種 APC，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1

至 4 項中任一項之胜肽或其片段；

(d) 一或多種 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽或其片段之 APC；及

(e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。

8. 如申請專利範圍第 7 項之用途，其中該組合物被配製為供對於具有選自於由 HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14 及 HLA-DR9 構成之群組中至少一種作為 MHC 第 II 類分子之對象投予。

9. 如申請專利範圍第 7 或 8 項之用途，其中該組合物更包含有 CTL 誘導能力之一或多種胜肽。

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

11. 一種於體外誘導 Th1 細胞之方法，包含選自於由以下構成之群組中之步驟：

(a) 共同培養 $CD4^{+}$ T 細胞，及在表面呈現 MHC 第 II 類分子與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽或其片段之複合體的 APC；及

(b) 將編碼為兩種 T 細胞受體(TCR)次單元之聚核苷酸、或編碼為各 TCR 次單元之聚核苷酸導入 $CD4^{+}$ T 細胞內，其中該 TCR 能結合於在細胞表面上呈現的 MHC 第 II 類分子與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽或其片段之複合體。

12. 一種於體外誘導 CTL 細胞之方法，該方法包含選自於由以

下構成之群組中之步驟：

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

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

13.一種單離的 APC，其在表面上呈現 MHC 第 II 類分子與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽或其片段之複合體。

14.一種 APC，係由如申請專利範圍第 10 項之方法所誘導。

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

16.一種 Th1 細胞，係由如申請專利範圍第 11 項之方法所誘導。

17.一種選自於由以下構成之群組中至少一種有效成分之用途，其係用於製備誘導在有須要的對象中對抗癌之免疫反應的組合物：

(a) 一或多種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽；

(b) 一或多種如申請專利範圍第 5 項之聚核苷酸；

(c) 一或多種 APC，其在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽或其片段；

(d) 一或多種 Th1 細胞，其辨識在表面上呈現如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之胜肽或其片段之 APC;及

(e) 以上(a)至(d)中任意兩或更多種的組合。