



(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 201200525 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：099141433

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 30 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/47 (2006.01)

C07K14/82 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/12/04

美國

61/266,871

(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 OHSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡邊朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：4 共 107 頁

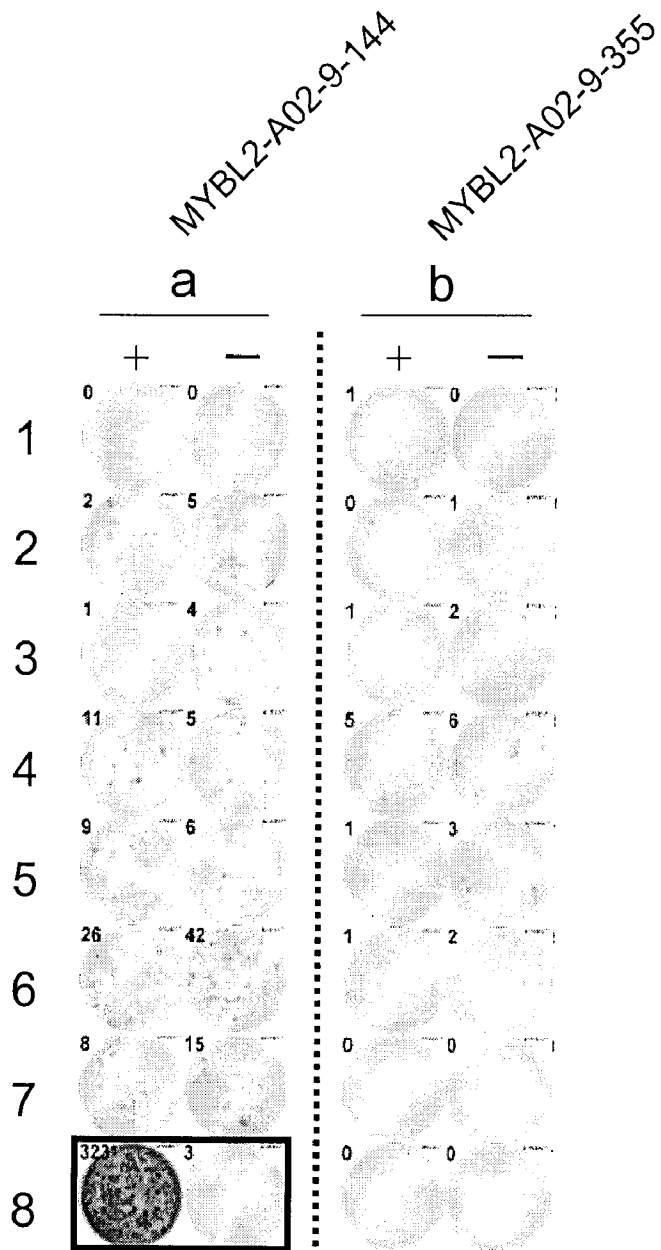
(54)名稱

MYBL2 胜肽及含此胜肽之疫苗

MYBL2 PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57)摘要

此處敘述抗癌胜肽疫苗。特別是，提供來自 MYBL2 基因之抗原決定位胜肽，其與 HLA 抗原結合且具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，更特別是胜肽具有序列辨識號：5 之胺基酸序列與其片段。本發明更擴展至提供包括一、二或數個胺基酸插入、取代或添加至上述胜肽或片段的胜肽，它們維持細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。也提供編碼出任何上述胜肽的核酸、抗原呈現細胞與以此類胜肽為目標之經分離的細胞毒殺性 T 淋巴球，及包括任何上述胜肽、核酸與抗原呈現細胞為活性成分。本發明之成分具有與癌症(腫瘤)之治療及/或預防(即，避免)，及/或其手術後復發的避免相關之特別效用。





(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 201200525 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：099141433

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 30 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/47 (2006.01)

C07K14/82 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/12/04

美國

61/266,871

(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 OHSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡邊朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：4 共 107 頁

(54)名稱

MYBL2 胜肽及含此胜肽之疫苗

MYBL2 PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57)摘要

此處敘述抗癌胜肽疫苗。特別是，提供來自 MYBL2 基因之抗原決定位胜肽，其與 HLA 抗原結合且具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，更特別是胜肽具有序列辨識號：5 之胺基酸序列與其片段。本發明更擴展至提供包括一、二或數個胺基酸插入、取代或添加至上述胜肽或片段的胜肽，它們維持細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。也提供編碼出任何上述胜肽的核酸、抗原呈現細胞與以此類胜肽為目標之經分離的細胞毒殺性 T 淋巴球，及包括任何上述胜肽、核酸與抗原呈現細胞為活性成分。本發明之成分具有與癌症(腫瘤)之治療及/或預防(即，避免)，及/或其手術後復發的避免相關之特別效用。

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。

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，本發明係關於新穎之胜肽，其當作癌症疫苗及治療與避免腫瘤之藥物為非常有效。

【先前技術】

已證實 CD8 陽性細胞毒殺性 T 淋巴球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 (NPL 1, Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; NPL 2, Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9)，且這些腫瘤相關抗原的一些目前在臨床發展的過程中作為免疫治療標的。

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於多種形式癌症中之胜肽疫苗接種策略 (vaccination strategies) 之更進一步發展與臨床研究的

根據為正進行著(NPL 3, Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; NPL 4, Butterfield LH *et al.*, Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; NPL 5, Vissers JL *et al.*, Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; NPL 6, van der Burg SH *et al.*, J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; NPL 7, Tanaka F *et al.*, Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; NPL 8, Fujie T *et al.*, Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; NPL 9, Kikuchi M *et al.*, Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; NPL 10, Oiso M *et al.*, Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94)。迄今已報導許多使用這些腫瘤相關抗原衍生胜肽的臨床試驗。不幸地，許多目前癌症疫苗試驗已顯示一低的客觀反應率(objective response rate) (NPL 11, Belli F *et al.*, J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; NPL 12, Coulie PG *et al.*, Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; NPL 13, Rosenberg SA *et al.*, Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15)。因此，仍然需要新穎之腫瘤相關抗原作為免疫治療標的。

以 c-myb 原致癌基因探針藉由 cDNA 資料庫的篩選，已鑑定出 MYBL2 (GenBank Accession No: NM_002466，編碼出序列辨識：6 的序列辨識號：5)，類 v-myb 骨髓胚細胞過多症病毒致癌同系物 2 (v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2)，為轉錄因子基因之 MYB 家族的一員(NPL 14, Nomura N *et al.*, Nucleic Acids

Res. 1988 Dec 9, 16(23): 11075 - 11089)。MYBL2 已知為控制細胞週期進展，與藉由 CDK2-細胞週期素 A(CDK2-cyclin A)與 CDK2-細胞週期素 E(CDK2-cyclin E)複合物之細胞週期素驅動磷酸化(NPL 15, Robinson C *et al.*, Oncogene 1996 May 2; 12(9):1855-64, NPL 16, Lane *et al.*, Oncogene 1997 May 22; 14(20):2445-53, NPL 17, Sala *et al.*, Proc Natl Acad Sci 1997 Jan 21; 94(2): 532 - 536, NPL 18, Johnson K *et al.*, J Biol Chem 1999 Dec 17; 274(51):36741-9)。近來報導已顯示 Mip/LIN-9 控制 MYBL2 的表現且兩者蛋白質經由 S 與 M 相細胞週期素的控制在細胞週期進展的促進中扮演一關鍵的角色(NPL 19, Pilkinton M *et al.*, J Biol Chem 2007 Jan 5; 282(1):168-75)。此外，藉由使用含有 23,040 個基因之基因體寬度 cDNA 微陣列之基因表現輪廓的分析，已鑑定出 MYBL2 為在許多癌症中，包括，例如睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌被向上調控的一新穎分子(PTL 1, US 60/937,616, PTL 2, WO 2004/031410)。MYBL2 被視為是一新穎的致癌抗原(oncoantigen)，且來自 MYBL2 的抗原決定位胜肽可被應用至具有數種形式腫瘤之病患的癌症免疫治療。

【引用文獻】

專利文獻(Patent Literature)

[PTL 1] US 60/937,616

[PTL 2] WO 2004/031410

非專利文獻(Non Patent Literature)

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

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996
Mar 1, 183(3): 725-9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

188: 33-42

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

[NPL 14] Nomura N et al., Nucleic Acids Res. 1988 Dec 9, 16(23): 11075 - 11089

[NPL 15] Robinson C et al., Oncogene 1996 May 2; 12(9):1855-64

[NPL 16] Lane et al., Oncogene 1997 May 22; 14(20): 2445-53

[NPL 17] Sala et al., Proc Natl Acad Sci 1997 Jan 21; 94(2): 532 - 536

[NPL 18] Johnson K et al., J Biol Chem 1999 Dec 17;274(51):36741-9

[NPL 19] Pilkinton M et al., J Biol Chem 2007 Jan 5;282(1):168-75

【發明內容】

本發明部分基於發現免疫治療之適合的標的。由於腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens, TAAs)有時被免疫系統感知為“自身”且因此常不具有免疫抗原性(immunogenicity)，所以適合標的的發現極度重要。如上所提到，已確認 MYBL2 (由 GenBank 獲得編號 NM_002466 (序列辨識號：5) 之基因所編碼出的序列辨識號：6) 在癌症，例如睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、

小細胞肺癌與食道癌之組織中為向上調控。因此，MYBL2 為一癌症/腫瘤免疫治療之候選標的。

本發明至少部份基於具有誘導專一於 MYBL2 之細胞毒殺性 T 淋巴球之能力的 MYBL2 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) -A2 結合之來自 MYBL2 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)。之後建立具有抗(against)經各候選胜肽脈衝(pulsed)之 HLA-A2 陽性之目標細胞的專一細胞毒性的細胞毒殺性 T 淋巴球。因此，這些結果證明這些胜肽為 HLA-A2 限制的抗原決定位胜肽，其可誘導強而專一之抗表現 MYBL2 之細胞的免疫反應。因此，這些結果顯示 MYBL2 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與 HLA 抗原結合之經分離的胜肽，其為 MYBL2 (序列辨識號：6) 或其片段。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於 *ex vivo* 誘導細胞毒殺性 T 淋巴球或可被投予至一個體以誘導抗癌症的免疫反應，癌症的例子包括，但不限於睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。較佳為，這些胜肽為九胜肽或十胜肽，且更佳為具有擇自序列辨識號：2 至 4 中之胺基酸序列，特別是顯示於此之序列辨識號：3 之胺基酸序列的九胜肽或十胜肽以具有特別強的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

本發明胜肽考慮經修飾的胜肽，其具有序列辨識號：2至4之一胺基酸序列，其中一、二或多個胺基酸被取代或加入，只要經修飾之胜肽維持最初之細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。

此外，本發明提供編碼出任何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具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞，或如本發明胜肽可被投予至一個體以誘導抗癌症之免疫反應。

當投予至一個體時，本發明胜肽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包括本發明任何之胜肽或多核苷酸的試劑用以誘導細胞毒殺性T淋巴球。此外，包括本發明任何之胜肽或多核苷酸的試劑、物質或組合物可被用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免，此類癌症包括，但不限於睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。因此，本發明又另一目標為提供用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免的藥學試劑，此類試劑包括本發明任何的胜肽或多核苷酸。代替本發明胜肽或多核苷酸/除了本發明胜肽或多核苷酸外，本發明試劑或藥學試劑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表面呈現HLA抗原與一本發明胜肽之一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此胜肽接觸或將編碼出本發明胜肽的一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用的。因此，本發明另一目標為提供誘導具細胞毒殺性 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。

本發明更進一步之目標為提供誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，方法包括將 CD8 陽性細胞與表現一本發明胜肽於其表面之抗原呈現細胞或外吐小體共培養之步驟，或引入包括編碼出與本發明胜肽結合之 T 細胞受體 (T cell receptor, TCR) 次單元之多核苷酸的基因的步驟。藉由此種方法可獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球也在癌症之治療及/或避免中提供用途，癌症之例子包括，但不限於睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。因此，本發明另一目標為提供藉由本發明方法可獲得之細胞毒殺性 T 淋巴球。

本發明又另一目標提供於一需要之個體中誘導抗癌症之免疫反應的方法，此方法包括投予包含 MYBL2 或其片段、編碼出 MYBL2 或其片段之多核苷酸，與呈現 MYBL2 或其片段之外吐小體或抗原呈現細胞之試劑或組合物的步驟。

本發明之應用性擴展至關於或起因於 MYBL2 過度表現的一些疾病的任一個，包括癌症，其例子包括，但不限於睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌

與食道癌。

更具體地，本發明提供下列事物：

[1] 一種經分離的寡胜肽，包括一胺基酸序列，其係擇自由序列辨識號：2 至 4 所組成之群組，其中該寡胜肽與一人類白血球組織抗原結合且具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

[2] 一種經分離的寡胜肽，其中該寡胜肽與一人類白血球組織抗原結合且具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，其中該寡胜肽係由擇自序列辨識號：2 至 4 中之一胺基酸序列所組成，其中 1、2 或數個胺基酸被插入、取代、刪除或加入

[3] [2]之寡胜肽，其中該寡胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自 N 端之第二個胺基酸係擇自白胺酸與甲硫丁胺酸中；以及

(b) C 端胺基酸係擇自纈氨酸與白胺酸中。

[4] [1]至[3]之經分離的寡胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2

[5] [1]至[4]之經分離的寡胜肽，其中該寡胜肽為九胜肽或十胜肽。

[6] 一種經分離之多核苷酸，其編碼出[1]至[5]之任一項的寡胜肽。

[7] 一種誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之試劑，其中該試劑包括在[1]至[5]中之任一項所述之一或多個該寡胜肽，

或在[6]中所述之一或多個該多核苷酸。

[8] 一種藥學試劑，用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免，其中該試劑包括在[1]至[5]中之任一項所述之一或多個該寡胜肽，或在[6]中所述之一或多個該多核苷酸。

[9] [8]之藥學試劑，被配製來用以投予一個體，其人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

[10] [8]或[9]之藥學試劑，其被配製來用於治療癌症。

[11] 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，其中該方法包括下列步驟之一：

(a) *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 將一抗原呈現細胞與[1]至[5]之任一項之寡胜肽接觸；或

(b) 將編碼出[1]至[5]之任一項之寡胜肽的一多核苷酸引入一抗原呈現細胞。

[12] 一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，藉由任何之包括下列步驟之至少一個的方法：

(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[1]至[5]之任一項之寡胜肽的一複合物於其表面上；

(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[1]至[5]之任一項之寡胜肽的一複合物於其表面上；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 [1] 至 [5] 之任一項的寡胜肽結合。

[13] 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 [1] 至 [5] 之任一項之寡胜肽的一複合物於其表面上。

[14] [13] 之抗原呈現細胞，其藉由 [11] 之方法來誘導。

[15] 一種經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以 [1] 至 [5] 之任一項之胜肽為標的。

[16] [15] 之細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由 [12] 之方法來誘導。

[17] 一種於一個體中誘導抗癌症之免疫反應的方法，其包括下列步驟：投予該個體一試劑，該試劑包括 [1] 至 [5] 之任一項之寡胜肽、一其免疫活性片段，或一編碼出該寡胜肽或免疫活性片段之一多核苷酸。

需瞭解的是，本發明前述發明概要與下列詳細敘述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。

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的更完全地明白。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併隨實施例、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】

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，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，例如按照慣例實驗法及/或最佳化可將其變更。也需瞭解的是，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，且不傾向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、專利或專利申請的揭露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。

如果發生抵觸，本發明說明書，包括定義，將會控制。

此外，材料、方法與實施例僅為說明性，不意指被限制。

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。

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 0-磷絲胺酸(0-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”、“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。

此處可替換使用之用語“試劑”與“組合物”意指一產物，其包括於特定量中之特定成分，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。此用語當使用於與“藥學試劑”與“藥學組合物”相關，意指包括一產物，其包括一活性成分與任何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，在本發明內容中，用語“藥學試劑”與“藥學組合物”意指藉由混合本發明分子或化合物與藥學上或生理上可接受之載體所製成的任何產物。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，其與自一器官或身體之一部分攜帶或運輸受支配之支架藥效團(scaffolded polypharmacophores)至另一器官或身體之一部分相關。

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

試劑或組合物中“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。在配製前，“活性成分”也意指為“主體(bulk)”、“藥物物質(drug substance)”或“技術產物(technical product)”。

除非以別的方式定義，用語“癌症”意指過度表現MYBL2基因之癌症，其例子包括，但不限於睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。

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之用語“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，意指T淋巴球之次群組(sub-group)，其可辨認非自身細胞（例如，腫瘤細胞、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-A02”意指包含次型，例如HLA-A*-0201或HLA-A*-0206之HLA-A2。

對於本發明之方法與組合物之範圍提供用途於癌症之“治療”之內容而言，一治療被視為“有效”，若其導致臨床優點，例如於MYBL2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。

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“HLA-A2陽性”意指此個體或病患同型結合地(homozygously)或異質結合地(heterozygously)具有 HLA-A2 抗原基因，且 HLA-A2 抗原被表現於此個體或病患的細胞中為一 HLA 抗原。

對於本發明之物質與方法之範圍提供用途於癌症之“避免”與“預防”之內容而言，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，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。

除非特別定義，於此使用之所有技術或科學用語為與屬與本發明之熟悉此技藝人士所通常瞭解之意義相同。

II. 胜肽

為了證明來自 MYBL2 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 MYBL2 之胜肽（序列辨識號：6）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）- 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)。確認來自 MYBL2 之 HLA-A2 結合胜肽的候選物，根據其對 HLA-A2 之結合親和力。下列胜肽被認為是候選胜肽：

MYBL2-A02-9-597（序列辨識號：2）、

MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）與

MYBL2-A02-10-596（序列辨識號：4）。

in vitro 藉由載有這些胜肽之樹突細胞 (dendritic cell, DC) 刺激 T 細胞後，使用下列胜肽成功建立細胞毒殺

性 T 淋巴球：

MYBL2-A02-9-144 （序列辨識號：3）

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。此處這些結果證明 MYBL2 為一由細胞毒殺性 T 淋巴球所辨認之抗原，且胜肽為由 HLA-A2 限制之 MYBL2 的抗原決定位胜肽。

由於 MYBL2 基因於癌症細胞與組織，包括，但不限於例如睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌的那些之中被過度表現，且不被表現於大部分正常器官中，所以其構成良好之免疫治療標的。因此，本發明提供對應於 MYBL2 之細胞毒殺性 T 淋巴球辨認的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較佳實施例包括具有擇自於序列辨識號：2 至 4 中，特別是 3 之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 Jan 1, 152(1): 163-75 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，參照 Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75; 與 Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81 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。所以使用此種軟體程式可選擇來自 MYBL2 的片段，其具有與 HLA 抗原之高結合親和力。因此本發明包括由來自 MYBL2 之任何片段所組成之胜肽，其藉由使用此類已知程式確認與 HLA 結合。本發明胜肽可由全長之 MYBL2 所組成。

本發明胜肽，較佳為本發明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它們的細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。位於本發明胜肽側面之胺基酸殘基可由任何種類之胺基酸所組成，只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，本發明包含胜肽，其包括來自 MYBL2 之胜肽且具有對 HLA 抗原之結合親和力。此種胜肽，一般小於約 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，不會影響胜肽的功能，且在一些例子中，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，胜肽包括當與原始參考序列比較時於其中一、二或多個胺基酸殘基已被修飾（即，取代、刪除、加入或插入）的胺基酸序列）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，於一實施例中，本發明胜肽具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力與擇自序列辨識號：2 至 4 中，特

別是 3 之胺基酸序列兩者，其中加入、插入、刪除及 / 或取代一、二甚至更多個胺基酸。

熟悉此技藝人士認定改變一單一胺基酸或一小百分比之胺基酸之個別加入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 substitutions)”或“保守修飾 (conservative modifications)”，其中一蛋白質之改變導致一具有類似原始蛋白質之功能的經修飾蛋白質。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。所需保守之胺基酸支鏈的特徵的例子包括，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被接受為保守取代之胺基酸：

- 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，只要所產生經修飾之胜肽維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。更進一步而言，經修飾之胜肽不排除多形變體 (polymorphic variant)、種間同質體 (interspecies homologues) 與 MYBL2 對偶基因 (alleles) 之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發的胜肽。

為了維持必須之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，可修飾 (插入、刪除、加入及/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、3 個或更少。要被修飾之胺基酸之百分比佳為 20% 或更少，更佳為 15% 或更少，且甚至更佳為，10% 或更少，或 1 至 5%。

此外，本發明胜肽可被以胺基酸殘基插入、取代或加入或胺基酸殘基可被刪除以達到一較高之親和力。當使用於文中之免疫治療時，本發明之胜肽應被表現於一細胞或外吐小體之表面上，較佳作為一具有 HLA 抗原之複合物。因此，較佳為選擇胜肽其不止誘導細胞毒殺性 T 淋巴球也具有對 HLA 抗原之高親和力。為達此目的，胜肽可藉由胺基酸殘基之取代、插入及/或加入來修飾以產生具經改善之結合親和力的經修飾之胜肽。除了自然表現之胜肽外，由

於已知藉由結合至 HLA 抗原表現之胜肽序列的規則 (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), 因此可將基於此規則之修飾引入本發明之致免疫性胜肽。

具有高 HLA-A2 結合親和力之胜肽傾向具有白胺酸或甲硫丁胺酸殘基為從 N 端的第二個胺基酸, 與纈胺酸或白胺酸殘基為 C 端胺基酸。因此, 本發明也包括具有序列辨識號: 2 至 4 之胺基酸序列的胜肽, 其中所述序列辨識號之胺基酸序列之 N 端的第二個胺基酸被白胺酸或甲硫丁胺酸取代, 及/或其中所述序列辨識號之胺基酸序列之 C 端胺基酸被纈胺酸或白胺酸取代。可將取代引入不止於末端胺基酸, 也可於胜肽之潛在 T 細胞受器 (TCR) 辨認位置。一些研究已證實於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) Feb 1;168(3): 1338-47., S. O. Dionne *et al.* Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 and S. O. Dionne *et al.* Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

本發明也考慮一、二個或數個胺基酸對所需胜肽之 N 及/或 C 端的加入。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。

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胺基酸序列符合其他蛋白質之胺基酸序列的情況。當其由與目標胜肽比較時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、促進細胞毒殺性 T 淋巴球分解目標細胞與增加細胞毒殺性 T 淋巴球 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(DCs)）或更專一地來自人類周邊血液單核細胞之樹突細胞，並在以胜肽刺激之後與 CD8 陽性細胞混合，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 Aug, 61(8): 764-79 中的描述）。例如可以 ^{51}Cr 與此類放射標示目標細胞，且可從自目標細胞釋放出的放射活性計算細胞毒殺活性。或者在攜帶經固定之胜肽的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 $\text{IFN-}\gamma$ ，且使用抗 $\text{IFN-}\gamma$ 單株抗體來使於培養基上之 $\text{IFN-}\gamma$ 可看見來分析細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

由於如上述測試胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，發現於此顯示之擇自由序列辨識號：2 至 4，特別是 3 所指出的胺基酸序列中之九胜肽或十胜肽，具有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。因此這些胜肽為本發明之較佳實施例。

此外，同源分析之結果顯示那些胜肽不與來自任何其他已知人類基因產物之胜肽有顯著之同源性。當用於免疫治療時，其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，這些胜肽提供在癌症病患中引起抗 MYBL2 免疫反應的用途。因此本發明之胜肽較佳為具有擇自由序列辨識號：2 至 4 中，特別是 3 之胺基酸序列的胜肽。

除了上述本發明胜肽之修飾外，所需胜肽可被進一步連接至其他物質，只要它們維持原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，且更佳為維持必不可少之 HLA 結合。示

例之物質包括：胜肽、脂質、糖與糖鏈、乙醯基，天然與合成之聚合物等。本發明胜肽可額外包含修飾，例如醣基化、支鏈氧化及/或磷酸化，只要修飾不損壞原始胜肽之生物活性。此類修飾可授予額外之功能（例如，目標功能與傳送功能）及/或或穩定胜肽。

例如，為了 *in vivo* 增加多胜肽之穩定度，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多胜肽。可以一些方法分析一多胜肽的穩定度。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，在藉由一、二或數個胺基酸殘基取代、刪除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。說明之方法包括下列步驟：

a：將至少一個本發明胜肽之胺基酸殘基取代、刪除或加入，

b：確定胜肽的活性，與

c：選擇與原始相較具有相同或較高之活性的胜肽。

此處，要被分析之活性可包括 HLA 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。

此處，本發明之胜肽也可被描述為“MYBL2 胜肽”或“MYBL2 多胜肽”。

III. MYBL2 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地製備胜肽。本發明胜肽可單獨合成或為由兩或多個胜肽所組成之較長多胜肽。之後可分離此胜肽，即純化或分離以使其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-胺氨酸或其他胺氨酸模仿物的合併。

藉由根據經選擇之胺氨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，但不限於：

(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) (in Japanese), Maruzen Co., 1975;

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

(v) 藥學的發展 (Development of Pharmaceuticals)

(second volume) (in Japanese), 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，藉由使用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，其懷有編碼出在一可表達的形式中之目標胜肽的一多核苷酸（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

本發明也提供一多核苷酸，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 *MYBL2* 基因（GenBank Accession No. NM_002466（序列辨識號：5））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，一大份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的各沈默變化係為於各所揭露之序列中被暗示性描述。

本發明之多核苷酸可由 DNA、RNA 與其衍生物所組成。DNA 適合地由鹼基所組成，例如鹼基 A、T、C 與 G，而 T 於 RNA 中為 U 所取代。

本發明之多核苷酸可編碼出本發明之多個胜肽，在其之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之間的複合物於其表面上。利用例如 Japanese Patent Application Kohyo Publications Nos. Hei 11-510507 與 W099/03499 所詳述的方法以及從接受治療和/或預防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，以類似於本發明的胜肽之方式。

包含在複合物中的人類白血球抗原形式必須與需要治療和/或預防之個體的人類白血球抗原形式相符。例如，於日本族群中，HLA-A2，（特別是 A*0201 與 A*0206）為普遍且因此對於日本人病患的治療而言為適合的。高度表現於日本人與高加索人之中的 A2 型之使用有助於獲得有效的結果。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，這可適當地選擇對特定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 MYBL2 部分胜肽的胺基酸序列為基礎，然後進行 1、2 或數個胺基酸的取代、插入及/或添加。

當對本發明外吐小體使用 A2 型 HLA 抗原時，具有序列辨識號：2 至 4 之任一，特別是 3 之序列的胜肽提供用途。

VI. 抗原呈現細胞

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。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* 以本發明胜肽接觸（刺激）其可獲得本發明抗原呈現細胞。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。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單獨或結合包括本發明胜肽、外吐小體或細胞毒殺性 T 淋巴球的其他藥物來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。自步驟 b 獲得之抗原呈現細胞可作為疫苗被投予以治療及/或預防癌症，癌症包括睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。

本發明也提供製造包括抗原呈現細胞之藥學組合物的方法或製程，其中方法包括將本發明胜肽與藥學上可接受之載體一起混合或配製的步驟。

根據本發明一方面，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，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; Published Japanese Translation of International Publication No. 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，且之後處理所獲得之蛋白質，並經由一呈現途徑來進行以與呈現本發明胜肽。

VII. 細胞毒殺性 T 淋巴球

抗任何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，可被使用為疫苗以相似於胜肽之方式。因此本發明也提供經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球其藉由任何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，從此個體收集細胞毒殺性 T 淋巴球；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 vivo* 接觸 (刺激) 且之後分離細胞毒殺性 T 淋巴球；或(3) 將 CD8 陽性細胞或周邊血液單核淋巴球與表現 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 *in vivo* 接觸且之後分離細胞毒殺性 T 淋巴球；或(4) 引入包括編碼出與與本發明胜肽結合之 T 細胞受體次單元的多核苷酸的基因。藉由

上述方法可製備上述抗原呈現細胞或外吐小體，且(4)之方法被詳細敘述於下方 “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，且可藉由其本身或為了調節作用而與包括本發明之胜肽或之外吐小體的其他藥物結合來被投予。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 MYBL2，例如癌細胞，或被以 MYBL2 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。

VIII. T 細胞受體(TCR)

本發明也提供一組合物其包含由編碼出可形成 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 MYBL2。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 : 7) 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 : 8) 、 3-TRb-C1 引 子 (5' -tcagaaatccttttctcttgac-3') 專 一 於 T 細 胞 受 體 beta 鏈 C1 區 (序 列 辨 識 號 : 9) 或 3-TRbeta-C2 引 子 (5' -ctagcctctggaatccttttctctt-3') 專 一 於 T 細 胞 受 體 beta 鏈 C2 區 (序 列 辨 識 號 : 10) 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 MYBL2 胜 肽 之 目 標 細 胞 , 且 視 需 要 *in vivo* 與 *in vitro* 居 中 有 效 殺 死 表 現 MYBL2 胜 肽 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 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 , 而 較 佳 方 法 包 括 , 例 如 使 用 HLA 分 子 與 本 發 明 胜 肽 之 四 聚 體 (tetramer) 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，其藉由以編碼出在 HLA-2 存在下與例如序列辨識號：2 至 4，特別是 3 之 MYBL2 胜肽結合的 T 細胞受體次單位多胜肽的核酸來轉導來製備。經轉導之細胞毒殺性 T 淋巴球可 *in vivo* 引導至癌症細胞，且可藉由熟知的 *in vivo* 培養方法擴張（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(W02006/031221)。

IX. 藥學試劑或組合物

由於與正常組織相較，MYBL2 表現於癌症中特別被提高，癌症包括睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌，本發明之胜肽或編碼出此類胜肽之多核苷酸可用於癌症或腫瘤之治療及/或預防，及/或避免其手術後之復發。因此，本發明提供一藥學試劑或組合物用來治療及/或預防癌症或腫瘤，及/或避免其手術後之復發，此類試劑或組合物包括一或多個本發明胜肽或編碼出此胜肽之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，以用來作為藥學試劑或組合物。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試劑或組合物之活性成分。

在另一實施例中，本發明也在製造用以治療癌症或腫瘤之藥學組合物或試劑中提供一活性成分的使用，其擇自：

(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；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明更提供一用以治療腫瘤之癌症的活性成分擇自：

(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；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；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球，
為活性成分。

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活性成分與一藥學上或生理上可接受之載體一起混合的步驟，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；以及

(d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明藥學組合物或試劑可被用於癌症或腫瘤之預防與其手術後之復發的避免之任一或兩者。

本發明之藥學試劑或組合物提供使用如一疫苗。在本發明內文中，措辭“疫苗”（也指一致免疫組合物）意指一物質，其藉由接種至動物具有誘導抗腫瘤免疫力的功能。

本發明之藥學試劑或組合物可用於治療及/或避免癌症或腫瘤，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了的動物。

根據本發明，已發現具有序列辨識號：2 至 4 之任一個，特別是 3 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，其可誘導強而專一之免疫反應。因此包括任一具有序列辨識號：2 至 4，特別是 3 之胺基酸序列之這些胜肽的本發明藥學試劑或組合物特別適合投予 HLA 抗原為 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）的藥學試劑或組合物。

由本發明藥學試劑或組合物治療之癌症或腫瘤不限於且包括其中關於 MYBL2（例如，為過度表現）之所有種類之癌症或腫瘤，包括，例如睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。

本發明藥學試劑或組合物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，經定義之腫瘤相關抗原），但不限於此。

若需要，本發明之藥學試劑或組合物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，配方可包括抗發炎試劑、止痛劑、化學治療與其類似。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可與一或多個其他藥學試劑相繼或同時投予。藥劑與藥學試劑的量依照，例如使用何種藥學試劑、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，本發明之藥學試劑或組合物可包括本技術領域一般之其他試劑，其具有關於討論中之配方形式。

在本發明一實施例中，本發明之藥學試劑或組合物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試劑或組合物的容器。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試劑或組合物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。

藥學試劑或組合物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) 藥學試劑或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試劑或組合物，若需要的話，其可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，藥學試劑或組合物可含安定劑、懸液劑、防腐劑、界面活性劑與此類。本發明之藥學試劑或組合物可用來抗癌目的。

可將本發明之胜肽製備為一組合，其由兩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。胜肽組合可以雞尾酒形式執行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，之後誘導對形成於呈現胜肽與 HLA 抗原之間的複合物專一反應之細胞毒殺性 T 淋巴球。或者，抗原呈現細胞（例如，樹突細胞）自一個體移出且之後以本發明胜肽刺激以獲得表現任何本發明之胜肽於其細胞表面上之抗原呈現細胞。將這些抗原呈現細胞再投予至該個體以於該個體中誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且因此可增加朝向腫瘤相關內皮的侵犯。

治療及/或避免癌症或腫瘤之藥學試劑或組合物，其包括一本發明之胜肽為活性成分，也可包含一已知為有效建

立細胞免疫力之佐劑。或者藥學試劑或組合物可與其他活性成分一起被投予，或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)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W 乳劑與此類，但不限於此。

此外，可便利地使用於其中胜肽連結至幾個微米直徑之小珠的微脂體(liposome)配方與細粒配方中，與於其中脂質連結至胜肽的配方中。

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的形式被投予。鹽類之較佳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，措辭“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。較佳鹽類之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。

在一些實施例中，本發明之藥學試劑或組合物可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 淋巴球的試劑。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-glycerylcysternyl-seryl-serine, P3CSS) 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。本發明之胜肽劑量根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法、與此類可適合地調整，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1000 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) 藥學試劑或組合物包含多核苷酸為活性成分

本發明之藥學試劑或組合物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，例如敘述同源重組盒式載體（cassette vector）的 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12）。參見，例如 Wolff *et al.*, Science 1990, 247: 1465-8; U.S. Patent Nos. 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 U.S. Patent No. 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 U.S. Patent No. 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 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個體可為直接，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個體。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)。於重組 DNA 技術中一般熟知的方法其也可用於本發明，敘述於編者 Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; and Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990。

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根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法、與此類可適合地調整，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1000 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當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製備或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，只要化合物不抑制其細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。因此，任何上述之本發明藥學試劑或組合物可用來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球，且除此之外，包括胜肽與多核苷酸的那些也可用來誘導抗原呈現細胞，如於下所討論。

(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。可較佳使用樹突細胞，

由於它們於抗原呈現細胞中之最強之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。本發明任何胜肽可被使用為步驟 b 之胜肽以它們本身或與本發明其他胜肽一起。

或者，可投予本發明胜肽至一個體以使抗原呈現細胞 *in vivo* 與胜肽接觸。因此可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，本發明也考慮投予本發明胜肽至一個體以 *in vivo* 誘導抗原呈現細胞的方法。也可能投予編碼出本發明胜肽之多核苷酸至一個體於一可表達之形式中，以便本發明胜肽被表現且 *in vivo* 與抗原呈現細胞接觸，以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，本發明也考慮投予本發明多核苷酸至一個體以 *in vivo* 誘導抗原呈現細胞的方法。措辭“可表達之形式”被定義於上述段落“IX. 藥學試劑或組合物 (2) 藥學試劑包含多核苷酸為活性成分”中。

此外，本發明可包括將本發明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。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。

(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、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上，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，且以癌細胞為目標之免疫反應的強度增強。因此，本發明也考慮一方法，其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以誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的步驟。

或者，藉由它們的 *ex vivo* 使用，也可誘導細胞毒殺性 T 淋巴球。於此類例子中，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，誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之本發明方法可包括步驟：

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，且包括任何有效表現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上的抗原呈現細胞。

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，本發明也考慮一方法，其中將呈現一 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上的外吐小體與 CD8 陽性細胞共培養。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 陽性細胞可誘導細胞毒殺性 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。

此外，本發明也提供製造一誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之藥學試劑或組合物的方法或製程，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。

(3) 誘導免疫反應的方法

又，本發明提供誘導抗 MYBL2 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，但不限於睪丸

腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。

本發明方法可包括投予含任何本發明胜肽或編碼出其之多核苷酸的試劑或組合物的步驟。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. 藥學試劑或組合物”之項目，特別是敘述本發明試劑或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外吐小體與抗原呈現細胞，被詳細描述在前之“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。

本發明更提供在一個體中誘導抗癌症，例如睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌之免疫反應的方法。為此目的，本發明包括製造一用於誘導免疫反應之藥學試劑、物質或組合物的方法，其中該方法包括將本發明之胜肽或多核苷酸與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。或者，用於誘導免疫反應的方法包括配製並投予本發明一疫苗的步驟，此類疫苗包括：

(a) 一或多個本發明抗原決定位胜肽，或一其免疫活性片段；

(b) 一或多個編碼出(a)之抗原決定位胜肽或免疫活性片段之多核苷酸；

(c) 一或多個之本發明經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球；或

(d) 一或多個之本發明經分離之抗原呈現細胞。

在本發明內容中，以這些活性成份可治療過度表現 MYBL2 之癌症。此類癌症的例子包括，但不限於睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。因此，在包括活性成分之疫苗或藥學組合物的投予前，其較佳為確認與相同器官之正常組織相較，MYBL2 之表現程度於要被治療之癌細胞或組織中是否被提高。因此，在一實施例中，本發明提供治療（過度）表現 MYBL2 之癌症的方法，其方法可包括步驟：

i) 測定獲得自具有癌症要治療之個體的癌細胞或組織中的 MYBL2 表現程度；

ii) 與正常控制組比較 MYBL2 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 MYBL2 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，其用於投予至具有過度表現 MYBL2 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 MYBL2 多胜肽治療之個體的方法，此類方法包括測定來自個體之癌細胞或組織中的 MYBL2 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具有可以本發明 MYBL2 多胜肽治療之癌症。本發明之治療癌症的方法於以下更詳細敘述。

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，測定獲得自一個體之癌症細胞或組織中的 MYBL2 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 MYBL2 的 mRNA 定量。可於一晶片或一陣列上執行偵測。陣列之使用較佳為用於偵測 MYBL2 表現程度。利用 MYBL2 的序列資訊，熟悉此技藝人士可製備此種探針。例如，MYBL2 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。

可將任何源自個體之細胞或組織用於 MYBL2 表現之測定，只要其包括 MYBL2 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，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。藉由擴大偵測方法（amplification-base detection method）（例如，RT-PCR）使用引子可將 MYBL2 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 MYBL2 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% 之與互補目標序列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 agent)，例如甲醯胺(formamide)來達到嚴苛條件。

探針或引子可為特定大小。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。

或者，為了本發明之診斷可偵測轉譯產物。例如，可測定 MYBL2 蛋白質 (序列辨識號：6) 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 MYBL2 蛋白質的結合能力。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 MYBL2 基因轉譯產物偵測 MYBL2 基因之表現程度的另一方法，使用抗 MYBL2 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，強的染色指出增加之蛋白質存在/程度，且同時 MYBL2 基因之高表現程度。

可確認於癌症細胞中，例如 MYBL2 基因之目標基因的表現程度為被提升，若其相較於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。

藉由使用先前自一個體/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 MYBL2 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 MYBL2 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 MYBL2 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 ± 2 標準差或平均值 ± 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，若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 MYBL2 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) 診斷或確認是否一個體被懷疑具有要被治療之癌症，及/或(ii) 選擇要癌症治療之個體的方法，其方法包括步驟：

a) 測定在癌症細胞或組織中，MYBL2 的表現程度，癌症細胞或組織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 MYBL2 之表現程度；

c) 若 MYBL2 之表現程度與正常控制組程度相較為被增加，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，則選擇或確認要癌症治療之個體。

或者，此種方法可包括步驟：

a) 測定在癌症細胞或組織中，MYBL2 的表現程度，癌症細胞或組織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 MYBL2 之表現程度；

c) 若 MYBL2 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，則選擇或確認要癌症治療之個體。

本發明也提供一套組以測定一個體遭受可被以本發明 MYBL2 多胜肽治療之癌症，其也在評估及/或監控癌症免疫治療的功效中為有用的。較佳為，癌症包括，但不限於睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。更特別的是，套組較佳包括至少一用以偵測來自個體癌細胞中之 MYBL2 基因的表現程度的試劑，其試劑可被擇自群組：

(a) 一試劑用以偵測 MYBL2 基因的 mRNA；

(b) 一試劑用以偵測 MYBL2 蛋白質；以及

(c) 一試劑用以偵測 MYBL2 蛋白質的生物活性。

適合用以偵測 MYBL2 基因之 mRNA 之試劑的例子可包括核酸其專一結合或辨認 MYBL2 mRNA，例如，具有對於 MYBL2 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 MYBL2 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 MYBL2 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 MYBL2 mRNA 的試劑可被包含於套組中。

另一方面，適合用以偵測 MYBL2 蛋白質之試劑的例子包括對於 MYBL2 蛋白質的抗體。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 MYBL2 蛋白質的結合能力。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)。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 MYBL2 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。例如，獲得自沒有癌症或遭受癌症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 MYBL2 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 MYBL2 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 MYBL2 標準樣本。藉由收集 MYBL2 陽性之樣本且之後分析它們的 MYBL2 程度可製備本發明之正控制組樣本。或者，可將經純化之 MYBL2 蛋白質或多核苷酸加至不表現 MYBL2 之細胞以形成正樣本(positive sample)或 MYBL2 標準樣本。於本發明中，經純化之 MYBL2 可為重組蛋白質。正控制組樣本之 MYBL2 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，具有專一辨認本發明抗體或其片段之能力。

本發明之蛋白質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 MYBL2 抗體的量與其在對應控制組中的量之間的差異可執行癌症之診斷方法。若個體之細胞或組織含有抗基因之表現產物(MYBL2)之抗體且抗 MYBL2 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多聚(oligomermultimer)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之用以評估個體之免疫反應的診斷方法或試劑。在本發明一實施例中, 如上述之 HLA-A-2 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, 要與胜肽試劑接觸之免疫活性細胞可為包括樹突細胞之抗原呈現細胞。

例如, 本發明胜肽可使用於四聚體染色分析中以評估

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; 與 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。四聚體多聚體試劑，例如使用本發明胜肽之四聚體試劑可如下被產生，如下所述。

在對應之 HLA 重鏈與 β 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 and 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。使用例如任一上述方法可分析獲自一以一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 (allelespecific) 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)。

本發明之胜肽也可用來製造抗體，使用本技術領域已熟知的技術（參見，例如，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY ; and 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 分子背景中之胜肽的那些，即，結合至胜肽-MHC 複合物的抗體。

或者，本發明也提供一些用途，其之一些為此處所述。例如，本發明提供診斷或偵測以 MYBL2 免疫活性多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 MYBL2 HLA 結合胜肽的表現或 MYBL2 HLA 結合胜肽與 HLA class I 分子之一複合物。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 MYBL2 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 MYBL2 的表現。腫瘤表現之例子於此被呈現且示範之用於 MYBL2 放大的條件與引子的更進一步揭露可被發現於 WO2003/27322 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 MYBL2 HLA 結合胜肽之一試劑接觸以偵測於生物樣本中之 MYBL2 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例如，濃度、溫度、時間、離子強度條件下，以允許介於試劑與存在生物樣本中之 MYBL2 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 U. S. Patent No. 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 MYBL2 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 γ 釋放分析或 ELISPOT 分析。四聚體多聚體染色、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 MYBL2 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：2至4之胺基酸序列中的 MYBL2 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原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，對於癌症治療之免疫反應的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可包括，例如當免疫活性細胞未與胜肽接觸或與具有除了任何 MYBL2 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，即使當將 MYBL2 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。

XI. 抗體

本發明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）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 MYBL2 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）在治療與 MYBL2 之表現相關的癌症中為治療性有效的，與 MYBL2 之表現相關的癌症例子包括，但不限於，乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰漫型胃癌、淋巴瘤、神經母細胞瘤、胰臟癌。

本發明也提供 MYBL2 蛋白質（序列辨識號：6）或其片段之偵測及/或定量的各種免疫活性分析，MYBL2 蛋白質（序列辨識號：6）或其片段包括具有擇自序列辨識號：2 至 4 中之胺基酸序列之多胜肽。此類分析可包括一或多個具辨認及結合 MYBL2 蛋白質或其片段之能力之抗 MYBL2 抗體為

適當的。在本發明內容中，與 MYBL2 多胜肽結合之抗 MYBL2 抗體，較佳為辨認一多胜肽，此多胜肽為具有擇自序列辨識號：2 至 4 中的胺基酸序列。以抑制測試(inhibition test)可確認抗體之結合專一性。其為，在具有擇自序列辨識號：2 至 4 中之胺基酸序列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 MYBL2 多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(radioimmunoassays)、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)等之多種形式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)結合分析。此外，本發明也提供具偵測表現 MYBL2 之癌症之能力的免疫成像分析，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。此類分析在 MYBL2 表現之癌症的偵測、監控與預後的為臨床有效的，MYBL2 表現之癌症，其例子包括，但不限於，乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、食道癌、胃癌、瀰漫型胃癌、淋巴瘤、神經母細胞瘤、胰臟癌。

本發明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、小鼠或大鼠，更佳為來自一人類。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蛋白質之部分胜肽。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 MYBL2 胜肽之全長或片段反應。在一較佳實施例中，本發明之抗體辨認 MYBL2 片段胜肽，其具有擇自序列辨識號：2 至 4 中的胺基酸序列。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 (Primates)。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。較佳為其之後投予與適合量之佛氏不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 混合的抗原，每 4 至 21 天。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，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，以產生一產生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 (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Sho 63-17688)。

將所獲得之融合瘤之後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以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 U.S. Patent Nos. 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 A 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，方法在使用胜肽之各種實驗中為有用的。

XII. 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。本發明之載體對維持本發明核苷酸，特別是 DNA 於宿主細胞中以表現本發明胜肽，或對於用於基因治療來投予本發明本發明核苷酸為有效的。

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 也可被用來次複製與萃取 cDNA 與上述載體。當載體被用來產生本發明蛋白質時，一表現載體為特別有用。

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 啟動子 (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。具有這些特徵之已知載體的例子包括，例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 與 pOP13。

呈現下列實施例以說明本發明與以協助熟悉此技藝人士製造與使用本發明。實施例並不意味於在其他方面限制本發明範圍任何方式中。

【實施例】

材料與方法

細胞株

T2(HLA-A2)、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 MYBL2 之胜肽的候選物選擇

使用 “NetMHC 3.0” 結合預測伺服器(binding prediction server) (<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 MYBL2 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)中以 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 Jul 15, 63(14): 4112-8)。特別地，由 Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液將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 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，而 CD8 陽性 T 細胞藉由以

CD8 Positive Isolation Kit (Dyna1)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。於第 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 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y *et al.*, Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N *et al.*, Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 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 淋巴球擴張步驟

使用與由 Riddell *et al.* (Walter EA *et al.*, N Engl J Med 1995 Oct 19, 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(Pharmlngen)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 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y *et al.*, Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N *et al.*, Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 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-CD 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 Dec 15, 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)。

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

$\times 10^4/\text{well}$)為刺激細胞。培養之細胞於 48 孔中做為應答細胞。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-A*0201 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 之 cDNA 放大。將 PCR 放大產物複製進一表現載體。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 淋巴球活性分析之刺激細胞 ($5 \times 10^4/\text{well}$)。

結果

來自 MYBL2 之 HLA-A02 結合胜肽的預測

表 1a 與 1b 以高之結合親和力之順序顯示 MYBL2 之 HLA-A02 結合 9 員與 10 員胜肽。總共 4 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 1a、來自 MYBL2 之 HLA-A02 結合 9 員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
355	VLPPRQPSA	213	1
597	LMMSTLPKS	285	2
144	RIICEAHKV	493	3

表 1b、來自 MYBL2 之 HLA-A02 結合 10 員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
596	KLMMSTLPKS	226	4

起始位置指自 MYBL2 之 N 端的胺基酸殘基數目。結合分數與分離常數(dissociation constant)[Kd (nM)]來自“BIMAS”與“NetMHC3.0”。

以 HLA-A*0201 限制之來自 MYBL2 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 MYBL2 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 1 圖)。與控制組孔洞相較，以 MYBL2-A02-9-144 (序列辨識號：3) 刺激之孔洞編號 #8 (a) 顯示強而有力的 IFN- γ 產生。另一方面，藉由以顯示於表 1 中之其他胜肽刺激沒有測定出專一之細胞毒殺性 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。如負資料的典型例子，從以 MYBL2-A02-9-355 (序列辨識號：1)(b) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球，並無觀察到專一的 IFN- γ 產生。因此，其指出篩選出來自 MYBL2 之 MYBL2-A02-9-144 (序列辨識號：3) 為可誘導強而有力之細胞毒殺性 T 淋巴球的胜肽。

抗 MYBL2 特定胜肽之細胞毒殺性 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 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）刺激之孔洞編號#8 中顯示胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性的細胞被擴張，並藉由擴張程序來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株，於上方段落“材料與方法”中所述。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 2 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，如於“材料與方法”所述，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目標細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的 IFN- γ 產生。從以 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球複製測定出強的 IFN- γ 產生（第 3 圖）。

抗外生表現 MYBL2 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 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）之所建立的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株其對於辨認表現 MYBL2 與 HLA-A*0201 分子之目標細胞的能力。使用由 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）提升的細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株複製為應答細胞來測試抗 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 MYBL2 與 HLA-A*0201 分子基因兩者轉染（對於表現 MYBL2 與 HLA-A*0201 基因之目標細胞的特定模式）。COS7 細胞以全長 MYBL2 或 HLA-A*0201 轉染製備為控制組。於第 4 圖中，以 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球複製顯示強的抗表現 MYBL2 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之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。因此，這些資料清楚證明 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）被自然表現於具有 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。這些結果顯示來自 MYBL2 之 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）為可適合為具 MYBL2 表現之腫瘤之病患之治療的癌症疫苗。

抗原胜肽之同源分析

以 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）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 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）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 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)查詢之此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 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）之序列為獨特的，且因此對於我們最大知識而言只有很小可能性分子會

對於一些非相關分子提高不想要之免疫反應。

因此，確認 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）為新穎之來自 MYBL2 之 HLA-A*0201 抗原決定位胜肽。此處結果證明 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）對使用於癌症免疫治療中而言可為適合的。

產業利用性

本發明提供新的腫瘤相關抗原，特別是來自 MYBL2 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種類而言具有應用性。此腫瘤相關抗原更成為發展抗與 MYBL2 相關之疾病的胜肽疫苗的根據，與 MYBL2 相關之疾病，例如癌症，更特別是睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。

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。因此本發明不被前述所定義，而被下列申請專利範圍與其等同物所定義。

【圖式簡單說明】

第 1 圖由一系列照片，(a)至(b)所組成，其顯示在以來自 MYBL2 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。與控制組相較，

於孔洞編號#8中以 MYBL2-A02-9-144 (序列辨識號: 3) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球 (a) 顯示強的 IFN- γ 產生。於這些圖片之孔洞上之正方形指出於來自對應孔洞之細胞被擴張來建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。相對的，如負資料的典型例子，從以 MYBL2-A02-9-355 (序列辨識號: 1) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球 (b) 沒有偵測到專一的 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 2 圖為一線圖，顯示 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析偵測的結果，其顯示以 MYBL2-A02-9-144 (序列辨識號: 3) 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，藉由以此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 圖為一線圖，顯示藉由來自以 MYBL2-A02-9-144 (序列辨識號: 3) 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，藉由以此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 圖為一線圖，其顯示抗表現 MYBL2 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 MYBL2 基因轉染之 COS7 細胞製備為控制組。以 MYBL2-A02-9-144（序列辨識號：3）建立之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞複製顯示抗以 MYBL2 與 HLA-A*0201 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，對於表現 HLA-A*0201（三角形）或 MYBL2（圓形）之任一的目標細胞，沒有偵測到顯著專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性。

【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> MYBL2 胜肽及含此胜肽之疫苗

<130> ONC-A0922-TW

<150> US 61/266,871

<151> 2009-12-04

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 1

Val Leu Pro Pro Arg Gln Pro Ser Ala
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成胜肽序列

<400> 2

Leu Met Met Ser Thr Leu Pro Lys Ser
1 5

<210> 3

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 3

Arg Ile Ile Cys Glu Ala His Lys Val
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 4

Lys Leu Met Met Ser Thr Leu Pro Lys Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 2731
<212> DNA
<213> 人類

<400> 5
gcgcttggcg ggagatagaa aagtgcttca acccgcgccg gcggcgactg cagttcctgc 60
gagcgaggag cgcgggacct gctgacacgc tgacgccttc gagcgcggcc cggggcccgg 120
agcggccgga gcagcccggg tcctgacccc ggcccggctc ccgctccggg ctotgcoggc 180
gggcgggcga gcgcggcgcg gtccggggccg gggggatgtc tcggcgagac cgctgcgagg 240
atctggatga gctgcactac caggacacag attcagatgt gccggagcag agggatagca 300
agtgcaaggt caaatggacc catgaggagg acgagcagct gagggccctg gtgaggcagt 360



ttggacagca ggactggaag ttcttgcca gccacttccc taaccgcact gaccagcaat 420
 gccagtacag gtggctgaga gttttgaatc cagaccttgt caaggggcca tggaccaaag 480
 aggaagacca aaaagtcac gagctgggta agaagtatgg cacaagcag tggacactga 540
 ttgccaagca cctgaagggc cggctgggga agcagtgccg tgaacgctgg cacaaccacc 600
 tcaaccctga ggtgaagaag tcttgctgga ccgaggagga ggaccgcac atctgcgagg 660
 cccacaaggt gctgggcaac cgctgggccc agatcgccaa gatgttgcca gggaggacag 720
 acaatgctgt gaagaatcac tggaactcta ccatcaaaag gaaggtggac acaggaggct 780
 tcttgagcga gtccaaagac tgcaagcccc cagtgtactt gctgctggag ctgaggaca 840
 aggacggcct ccagagtgcc cagcccacgg aaggccaggg aagtcttctg accaactggc 900
 cctccgtccc tctaccata aaggaggagg aaaacagtga ggaggaactt gcagcagcca 960
 ccacatcgaa ggaacaggag cccatcggtta cagatctgga cgcagtgcga acaccagagc 1020
 ccttgaggga attcccgaag cgtgaggacc aggaaggctc cccaccagaa acgagcctgc 1080
 cttacaagtg ggtggtggag gcagctaacc tctcatccc cgctgtgggt tctagcctct 1140
 ctgaagccct ggacttgatc gagtcggacc ctgatgcttg gtgtgacctg agtaaatttg 1200
 acctccctga ggaaccatct gcagaggaca gtatcaacaa cagcctagtg cagctgcaag 1260
 cgtcacatca gcagcaagtc ctgccacccc gccagccttc cgccctggtg cccagtgtga 1320
 ccgagtaccg cctggatggc cacaccatct cagacctgag ccggagcagc cggggcgagc 1380
 tgatcccat ctccccagc actgaagtcg ggggctctgg cattggcaca ccgcoctctg 1440
 tgctcaagcg gcagaggaag aggcgtgtgg ctctgtcccc tgtcactgag aatagcacca 1500
 gtctgtcctt cctggattcc tgtaacagcc tcacgcccac gagcacacct gttaagacc 1560
 tgcccttctc gccctcccag tttctgaact tctggaacaa acaggacaca ttggagctgg 1620
 agagcccctc gctgacatcc accccagtgt gcagccagaa ggtggtggtc accacaccac 1680

tgcaccggga caagacaccc ctgcaccaga aacatgctgc gtttgtaacc ccagatcaga	1740
agtactccat ggacaacact cccacacgc caaccccggt caagaacgcc ctggagaagt	1800
acggacccct gaagcccctg ccacagaccc cgcacctgga ggaggacttg aaggaggtgc	1860
tgcgttctga ggctggcatc gaactcatca tcgaggacga catcaggccc gagaagcaga	1920
agaggaagcc tgggctgcgg cggagcccca tcaagaaagt ccggaagtct ctggctcttg	1980
acattgtgga tgaggatgtg aagctgatga tgtccacact gcccaagtct ctatccttgc	2040
cgacaactgc cccttcaaac tcttccagcc tcacctgtc aggtatcaaa gaagacaaca	2100
gcttgctcaa ccagggcttc ttgcaggcca agcccgagaa ggcagcagtg gcccagaagc	2160
cccgaagcca cttcacgaca cctgccccta tgtccagtgc ctggaagacg gtggcctgcg	2220
gggggaccag ggaccagctt ttcattgcagg agaaagcccg gcagctcctg ggccgcctga	2280
agcccagcca cacatctcgg accctcatct tgtcctgagg tgttgagggt gtcacgagcc	2340
cattctcatg tttaacagggg ttgtgggggc agagggggtc tgtgaatctg agagtcattc	2400
aggtgacctc ctgcagggag ctttctgcc aagccccctc ccagactct caggtggagg	2460
caacagggcc atgtgctgcc ctgttgccga gccagctgt gggcggctcc tggtgctaac	2520
aacaaagttc cacttccagg tctgcctggt tccctcccca aggccacagg gagctccgtc	2580
agcttctccc aagcccacgt caggcctggc ctcatctcag accctgctta ggatggggga	2640
tgtggccagg ggtgctcctg tgctcaccct ctcttggtgc attttttttg aagaataaaa	2700
ttgcctctct cttaaaaaaa aaaaaaaaaa a	2731

- <210> 6
- <211> 700
- <212> PRT
- <213> 人類

- <400> 6



Met Ser Arg Arg Thr Arg Cys Glu Asp Leu Asp Glu Leu His Tyr Gln
1 5 10 15

Asp Thr Asp Ser Asp Val Pro Glu Gln Arg Asp Ser Lys Cys Lys Val
20 25 30

Lys Trp Thr His Glu Glu Asp Glu Gln Leu Arg Ala Leu Val Arg Gln
35 40 45

Phe Gly Gln Gln Asp Trp Lys Phe Leu Ala Ser His Phe Pro Asn Arg
50 55 60

Thr Asp Gln Gln Cys Gln Tyr Arg Trp Leu Arg Val Leu Asn Pro Asp
65 70 75 80

Leu Val Lys Gly Pro Trp Thr Lys Glu Glu Asp Gln Lys Val Ile Glu
85 90 95

Leu Val Lys Lys Tyr Gly Thr Lys Gln Trp Thr Leu Ile Ala Lys His
100 105 110

Leu Lys Gly Arg Leu Gly Lys Gln Cys Arg Glu Arg Trp His Asn His
115 120 125

Leu Asn Pro Glu Val Lys Lys Ser Cys Trp Thr Glu Glu Glu Asp Arg
130 135 140

Ile Ile Cys Glu Ala His Lys Val Leu Gly Asn Arg Trp Ala Glu Ile
145 150 155 160

Ala Lys Met Leu Pro Gly Arg Thr Asp Asn Ala Val Lys Asn His Trp
165 170 175

Asn Ser Thr Ile Lys Arg Lys Val Asp Thr Gly Gly Phe Leu Ser Glu
180 185 190

Ser Lys Asp Cys Lys Pro Pro Val Tyr Leu Leu Leu Glu Leu Glu Asp
195 200 205

Lys Asp Gly Leu Gln Ser Ala Gln Pro Thr Glu Gly Gln Gly Ser Leu
210 215 220

Leu Thr Asn Trp Pro Ser Val Pro Pro Thr Ile Lys Glu Glu Glu Asn
225 230 235 240

Ser Glu Glu Glu Leu Ala Ala Ala Thr Thr Ser Lys Glu Gln Glu Pro
245 250 255

Ile Gly Thr Asp Leu Asp Ala Val Arg Thr Pro Glu Pro Leu Glu Glu
260 265 270

Phe Pro Lys Arg Glu Asp Gln Glu Gly Ser Pro Pro Glu Thr Ser Leu
275 280 285

Pro Tyr Lys Trp Val Val Glu Ala Ala Asn Leu Leu Ile Pro Ala Val
290 295 300

Gly Ser Ser Leu Ser Glu Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ser Asp Pro Asp
305 310 315 320

Ala Trp Cys Asp Leu Ser Lys Phe Asp Leu Pro Glu Glu Pro Ser Ala
325 330 335

Glu Asp Ser Ile Asn Asn Ser Leu Val Gln Leu Gln Ala Ser His Gln
340 345 350



Gln Gln Val Leu Pro Pro Arg Gln Pro Ser Ala Leu Val Pro Ser Val
355 360 365

Thr Glu Tyr Arg Leu Asp Gly His Thr Ile Ser Asp Leu Ser Arg Ser
370 375 380

Ser Arg Gly Glu Leu Ile Pro Ile Ser Pro Ser Thr Glu Val Gly Gly
385 390 395 400

Ser Gly Ile Gly Thr Pro Pro Ser Val Leu Lys Arg Gln Arg Lys Arg
405 410 415

Arg Val Ala Leu Ser Pro Val Thr Glu Asn Ser Thr Ser Leu Ser Phe
420 425 430

Leu Asp Ser Cys Asn Ser Leu Thr Pro Lys Ser Thr Pro Val Lys Thr
435 440 445

Leu Pro Phe Ser Pro Ser Gln Phe Leu Asn Phe Trp Asn Lys Gln Asp
450 455 460

Thr Leu Glu Leu Glu Ser Pro Ser Leu Thr Ser Thr Pro Val Cys Ser
465 470 475 480

Gln Lys Val Val Val Thr Thr Pro Leu His Arg Asp Lys Thr Pro Leu
485 490 495

His Gln Lys His Ala Ala Phe Val Thr Pro Asp Gln Lys Tyr Ser Met
500 505 510

Asp Asn Thr Pro His Thr Pro Thr Pro Phe Lys Asn Ala Leu Glu Lys
515 520 525

Tyr Gly Pro Leu Lys Pro Leu Pro Gln Thr Pro His Leu Glu Glu Asp
530 535 540

Leu Lys Glu Val Leu Arg Ser Glu Ala Gly Ile Glu Leu Ile Ile Glu
545 550 555 560

Asp Asp Ile Arg Pro Glu Lys Gln Lys Arg Lys Pro Gly Leu Arg Arg
565 570 575

Ser Pro Ile Lys Lys Val Arg Lys Ser Leu Ala Leu Asp Ile Val Asp
580 585 590

Glu Asp Val Lys Leu Met Met Ser Thr Leu Pro Lys Ser Leu Ser Leu
595 600 605

Pro Thr Thr Ala Pro Ser Asn Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gly Ile
610 615 620

Lys Glu Asp Asn Ser Leu Leu Asn Gln Gly Phe Leu Gln Ala Lys Pro
625 630 635 640

Glu Lys Ala Ala Val Ala Gln Lys Pro Arg Ser His Phe Thr Thr Pro
645 650 655

Ala Pro Met Ser Ser Ala Trp Lys Thr Val Ala Cys Gly Gly Thr Arg
660 665 670

Asp Gln Leu Phe Met Gln Glu Lys Ala Arg Gln Leu Leu Gly Arg Leu
675 680 685

Lys Pro Ser His Thr Ser Arg Thr Leu Ile Leu Ser
690 695 700



<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	7	
	gtctaccagg cattcgcttc at	22
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	8	
	tcagctggac cacagccgca gcgt	24
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	9	
	tcagaaatcc tttctcttga c	21
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	人工序列	

<400> 10
ctagcctctg gaatcctttc tctt



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： 99141433

C07K14/47 (2006.01)

※申請日： 99.11.30

※IPC 分類：

C07K14/82 (2006.01)

A61K39/00

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P35/00 (2006.01)
(2006.01)

MYBL2 胜肽及含此胜肽之疫苗 / MYBL2 PEPTIDES AND
VACCINES CONTAINING THE SAME

二、中文發明摘要：

此處敘述抗癌胜肽疫苗。特別是，提供來自 MYBL2 基因之抗原決定位胜肽，其與 HLA 抗原結合且具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，更特別是胜肽具有序列辨識號：5 之胺基酸序列與其片段。本發明更擴展至提供包括一、二或數個胺基酸插入、取代或添加至上述胜肽或片段的胜肽，它們維持細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。也提供編碼出任何上述胜肽的核酸、抗原呈現細胞與以此類胜肽為目標之經分離的細胞毒殺性 T 淋巴球，及包括任何上述胜肽、核酸與抗原呈現細胞為活性成分。本發明之成分具有與癌症（腫瘤）之治療及/或預防（即，避免），及/或其手術後復發的避免相關之特別效用。

三、英文發明摘要：

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

the MYBL2 gene that bind to HLA antigen and have cytotoxic T lymphocyte (CTL) inducibility, more particularly peptides having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 and fragments thereof, are provided. The present invention further extends to peptides that include one, two, or several amino acid insertions, substitutions or additions to the aforementioned peptides or fragments, provided they retain cytotoxic T cell inducibility. Also provided as nucleic acids encoding any of the aforementioned peptides, antigen-presenting cells and isolated CTLs that target such peptides, and pharmaceutical agents and compositions including any of the aforementioned peptides, nucleic acids, and APCs as active ingredients. The components of the present invention have particular utility in connection with the treatment and/or prophylaxis (*i.e.*, prevention) of cancers (tumors), and/or the prevention of a postoperative recurrence thereof.

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。

七、申請專利範圍：

1. 一種經分離的寡胜肽，包括一胺基酸序列，其係擇自由序列辨識號：2 至 4 所組成之群組，其中該寡胜肽與一人類白血球組織抗原結合且具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。

2. 一種經分離的寡胜肽，其中該寡胜肽與一人類白血球組織抗原結合且具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力，其中該寡胜肽係由擇自序列辨識號：2 至 4 中之一胺基酸序列所組成，其中 1、2 或數個胺基酸被插入、取代、刪除或加入。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之寡胜肽，其中該寡胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 來自 N 端之第二個胺基酸係擇自白胺酸與甲硫丁胺酸中；以及

(b) C 端胺基酸係擇自纈氨酸與白胺酸中。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項所述之經分離的寡胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項所述之經分離的寡胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽。

6. 一種經分離之多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 至 5 項之任一項所述的寡胜肽。

7. 一種誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之試劑，其中該試劑包括如申請專利範圍第 1 至 5 項之任一項所述之一或多個

該寡胜肽，或如申請專利範圍第 6 項所述之一或多個該多核苷酸。

8. 一種藥學試劑，用於癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免，其中該試劑包括如申請專利範圍第 1 至 5 項之任一項所述之一或多個該寡胜肽，或如申請專利範圍第 6 項所述之一或多個該多核苷酸。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之藥學試劑，被配製來用以投予一個體，其人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A2。

10. 如申請專利範圍第 8 或 9 項所述之藥學試劑，其被配製來用於治療癌症。

11. 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，其中該方法包括下列步驟之一：

(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 5 項之任一項所述之寡胜肽接觸；或

(b) 將編碼出如申請專利範圍第 1 至 5 項之任一項所述之寡胜肽的一多核苷酸引入一抗原呈現細胞。

12. 一種誘導細胞毒殺性 T 淋巴球的方法，藉由任何之包括下列步驟之至少一個的方法：

(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 5 項之任一項所述之寡胜肽的一複合物於其表面上；

(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 5 項之任一項所述之寡胜肽的一複合物於其表面上；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 5 項之任一項所述的寡胜肽結合。

13. 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 5 項之任一項所述之寡胜肽的一複合物於其表面上。

14. 如申請專利範圍第 13 項所述之抗原呈現細胞，其藉由如申請專利範圍第 11 項所述之方法來誘導。

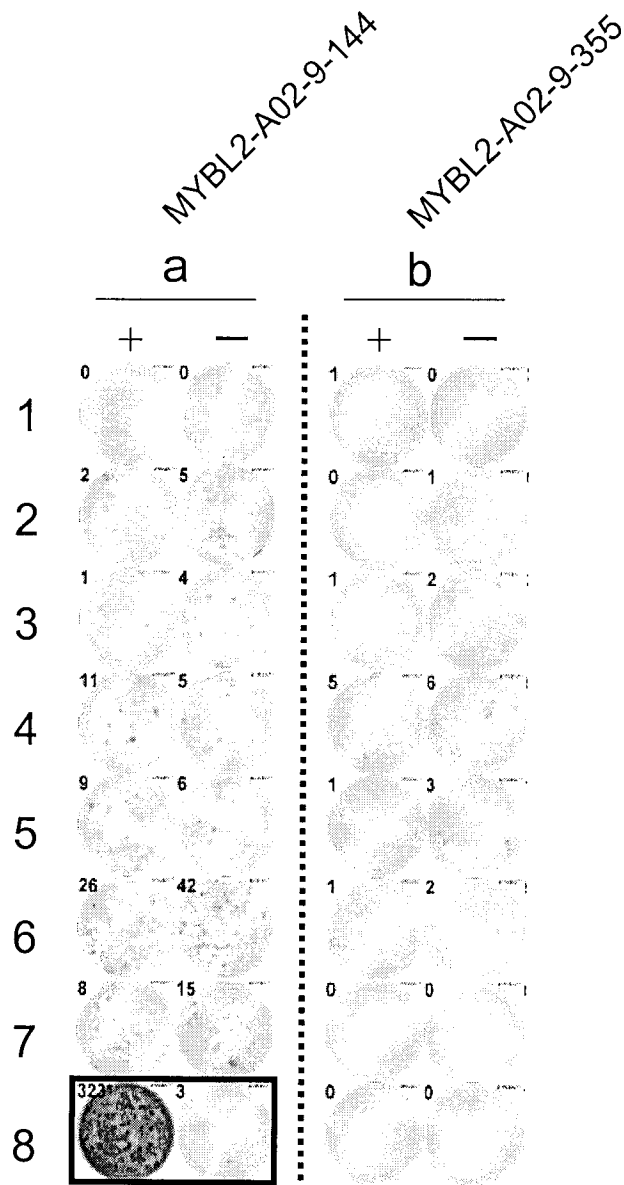
15. 一種經分離之細胞毒殺性 T 淋巴球，其以如申請專利範圍第 1 至 5 項之任一項所述之胜肽為標的。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由如申請專利範圍第 12 項所述之方法來誘導。

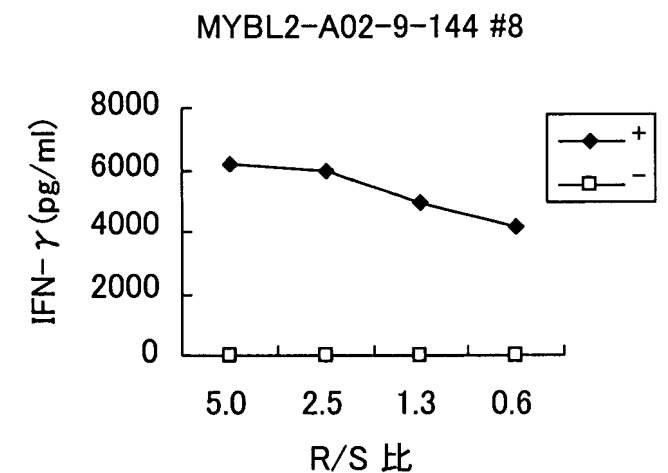
17. 一種於一個體中誘導抗癌症之免疫反應的方法，其包括下列步驟：投予該個體一試劑，該試劑包括如申請專利範圍第 1 至 5 項之任一項所述之寡胜肽、一其免疫活性片段，或一編碼出該寡胜肽或免疫活性片段之一多核苷酸。

八、圖式：如後所示。

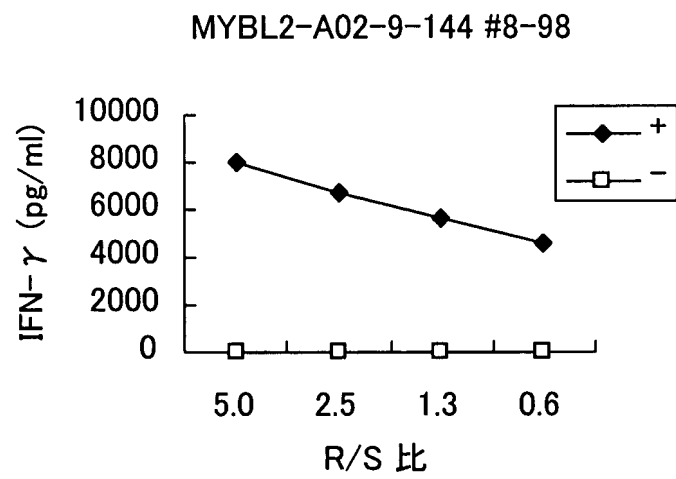
,



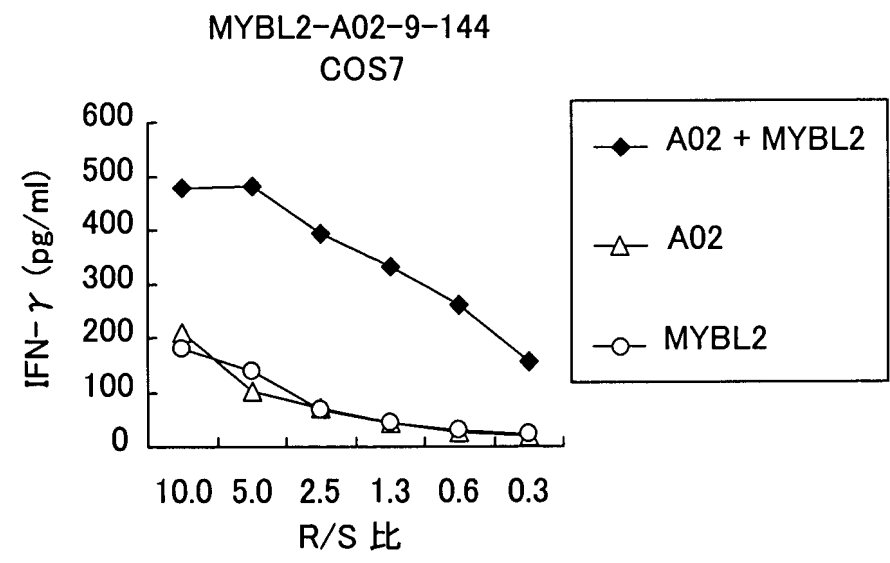
第1圖



第2圖



第3圖



第4圖

the MYBL2 gene that bind to HLA antigen and have cytotoxic T lymphocyte (CTL) inducibility, more particularly peptides having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 and fragments thereof, are provided. The present invention further extends to peptides that include one, two, or several amino acid insertions, substitutions or additions to the aforementioned peptides or fragments, provided they retain cytotoxic T cell inducibility. Also provided as nucleic acids encoding any of the aforementioned peptides, antigen-presenting cells and isolated CTLs that target such peptides, and pharmaceutical agents and compositions including any of the aforementioned peptides, nucleic acids, and APCs as active ingredients. The components of the present invention have particular utility in connection with the treatment and/or prophylaxis (*i.e.*, prevention) of cancers (tumors), and/or the prevention of a postoperative recurrence thereof.

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。

六、發明說明：

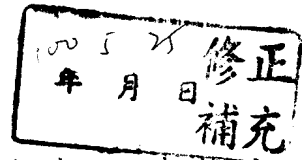
【發明所屬之技術領域】

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，本發明係關於新穎之胜肽，其當作癌症疫苗及治療與避免腫瘤之藥物為非常有效。

【先前技術】

已證實 CD8 陽性細胞毒殺性 T 淋巴球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 (NPL 1, Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; NPL 2, Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9)，且這些腫瘤相關抗原的一些目前在臨床發展的過程中作為免疫治療標的。

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於多種形式癌症中之胜肽疫苗接種策略 (vaccination strategies) 之更進一步發展與臨床研究的



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，其藉由以編碼出在 HLA-2 存在下與例如序列辨識號：2 至 4，特別是 3 之 MYBL2 胜肽結合的 T 細胞受體次單位多胜肽的核酸來轉導來製備。經轉導之細胞毒殺性 T 淋巴球可 *in vivo* 引導至癌症細胞，且可藉由熟知的 *in vivo* 培養方法擴張（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(W02006/031221)。

IX. 藥學試劑或組合物

由於與正常組織相較，MYBL2 表現於癌症中特別被提高，癌症包括睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌，本發明之胜肽或編碼出此類胜肽之多核苷酸可用於癌症或腫瘤之治療及/或預防，及/或避免其手術後之復發。因此，本發明提供一藥學試劑或組合物用來治療及/或預防癌症或腫瘤，及/或避免其手術後之復發，此類試劑或組合物包括一或多個本發明胜肽或編碼出此胜肽之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，以用來作為藥學試劑或組合物。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試劑或組合物之活性成分。

在另一實施例中，本發明也在製造用以治療癌症或腫瘤之藥學組合物或試劑中提供一活性成分的使用，其擇自：

- (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；以及
- (d) 本發明之細胞毒殺性 T 淋巴球。

或者，本發明更提供一用以治療癌症或腫瘤的活性成分擇自：

- (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；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

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，即使當將 MYBL2 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。

XI. 抗體

本發明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）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 MYBL2 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）在治療與 MYBL2 之表現相關的癌症中為治療性有效的，與 MYBL2 之表現相關的癌症例子包括，但不限於，睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。

本發明也提供 MYBL2 蛋白質（序列辨識號：6）或其片段之偵測及/或定量的各種免疫活性分析，MYBL2 蛋白質（序列辨識號：6）或其片段包括具有擇自序列辨識號：2 至 4 中之胺基酸序列之多胜肽。此類分析可包括一或多個具辨認及結合 MYBL2 蛋白質或其片段之能力之抗 MYBL2 抗體為適當的。在本發明內容中，與 MYBL2 多胜肽結合之抗

MYBL2 抗體，較佳為辨認一多胜肽，此多胜肽為具有擇自序列辨識號：2 至 4 中的胺基酸序列。以抑制測試 (inhibition test) 可確認抗體之結合專一性。其為，在具有擇自序列辨識號：2 至 4 中之胺基酸序列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 MYBL2 多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 (radioimmunoassays)、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) 等之多種形式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) 結合分析。此外，本發明也提供具偵測表現 MYBL2 之癌症之能力的免疫成像分析，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。此類分析在 MYBL2 表現之癌症的偵測、監控與預後的為臨床有效的，MYBL2 表現之癌症，其例子包括，但不限於，睪丸腫瘤、胰臟癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌與食道癌。

本發明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、小鼠或大鼠，更佳為來自一人類。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蛋白質之部分胜肽。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 MYBL2 胜肽之全長或片段反應。在一較佳實施例中，本發明之抗體辨認 MYBL2 片段胜肽，其具有擇自序列辨識號：2 至 4 中的胺基酸序列。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 (Primates)。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。較佳為其之後投予與適合量之佛氏不完全佐劑 (*Freund's incomplete adjuvant*) 混合的抗原，每 4 至 21 天。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