



(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 I658049 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：103107588

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 06 日

(51)Int. Cl. : **C07K14/47 (2006.01)** **A61K38/17 (2006.01)**
A61P35/00 (2006.01) **A61P37/04 (2006.01)**
G01N33/68 (2006.01) **C40B30/06 (2006.01)**

(30)優先權：2013/03/12 美國 61/777,334

(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：角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大沢龍司 OSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子
YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡辺朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

TW 200844111A

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：4 共 145 頁

(54)名稱

K N T C 2 胜肽及含此胜肽之疫苗

KNTC2 PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

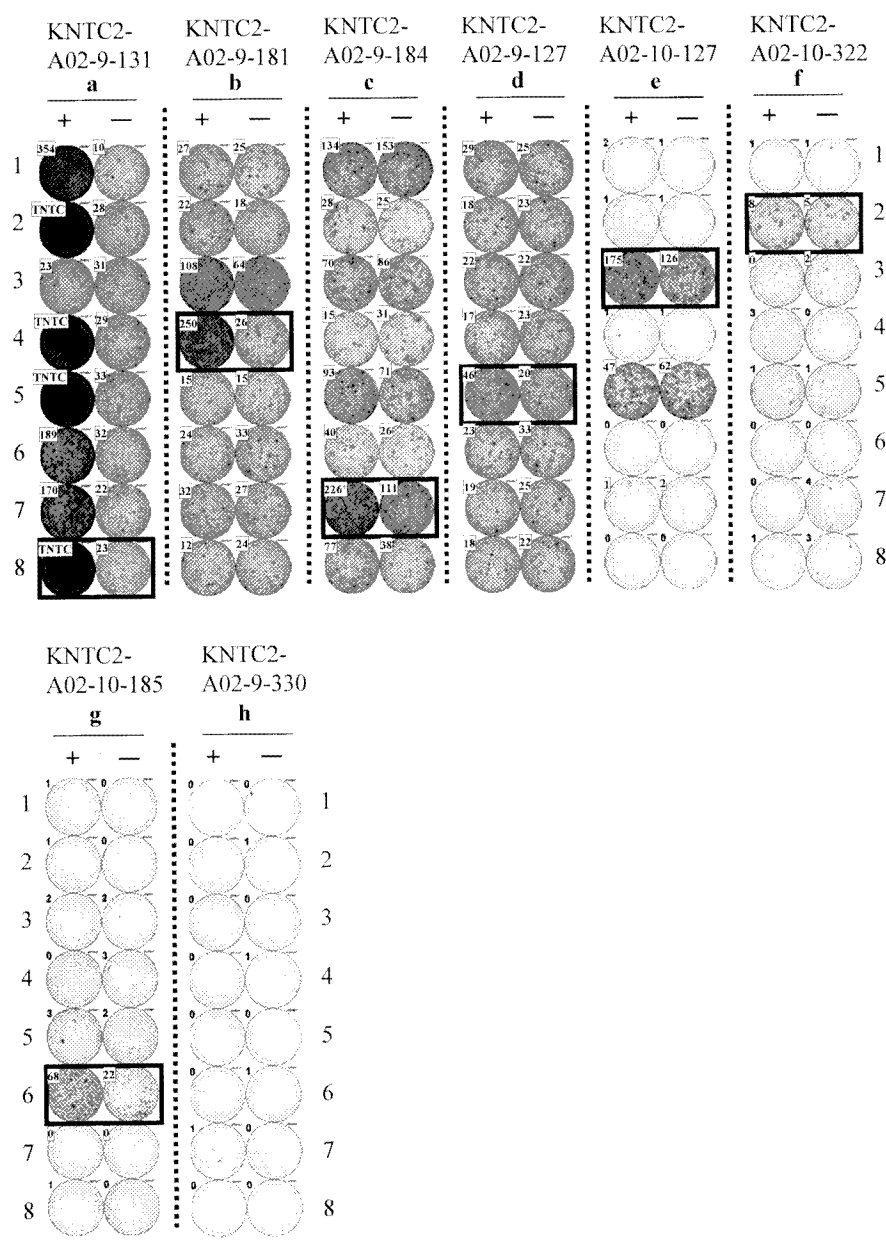
(57)摘要

本案揭示抗癌的胜肽疫苗。特別是，本案提供誘發 CTLs 之衍生自 KNTC2 基因的單離的抗原決定位胜肽，因此適合用於癌症免疫治療的內容。本發明之胜肽包含衍生自 KNTC2 的胜肽及其有一、二或數個胺基酸被取代、缺失、插入或增加的修飾型態，前提為該修飾型態保留原始序列的 CTL 誘導活性的要求。本案更提供編碼此胜肽的多核苷酸及包含上述胜肽或多核苷酸為活性劑的醫藥組成物。本案更提供標靶上述胜肽的抗原呈現細胞及單離的 CTLs，以及誘導該抗原呈現細胞或 CTL 的方法。而且，本案提供使用衍生自本發明之 KNTC2 之胜肽、編碼此胜肽之多核苷酸、或呈現此胜肽之抗原呈現細胞、或醫藥組成物，治療及/或預防(如預防)癌症(腫瘤)、及/或預防轉移的或術後的復發之方法，以及誘導 CTLs 的方法、誘導抗腫瘤免疫性的方法。

Peptide vaccines against cancer are described herein. In particular, isolated epitope peptides derived from the KNTC2 gene that elicit CTLs and thus are suitable for use in the context of cancer immunotherapy are provided. The inventive peptides encompass both KNTC2 -derived peptides and modified versions thereof, in which one, two, or several amino acids are substituted, deleted, inserted or added, provided such modified versions retain the requisite CTL inducibility of the original sequences. Further provided are polynucleotides encoding such peptides as well as pharmaceutical compositions that include any such peptides or polynucleotides as active agents. Antigen-presenting cells and isolated CTLs that target such peptides, as well as methods for inducing the antigen-presenting cell, or CTL are also provided. Furthermore, the present invention provides methods for the treatment and/or prophylaxis (i.e., prevention) of cancers (tumors), and/or the prevention of a metastatic- or post-operative recurrence thereof, as well as methods for inducing CTLs, methods for inducing anti-tumor immunity, using the peptides derived from KNTC2,

polynucleotides encoding the peptides, or antigen-presenting cells presenting the peptides, or the pharmaceutical compositions of the present invention.

指定代表圖：



第1圖

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)

KNTC2 胜肽及含此胜肽之疫苗/KNTC2 PEPTIDES AND
VACCINES CONTAINING THE SAME

【技術領域】

【0001】 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，其有效作為癌症疫苗及治療及/或預防腫瘤之藥物。

【0002】 優先權

本發明主張 2013 年 3 月 12 日提申的美國臨時申請案號 61/777,334 之優惠，其完整內容引入於此作為參照。

【先前技術】

【0003】 已證實 CD8 陽性細胞毒性 T 淋巴球(CTLs)辨識來自第一型主要組織相容性抗原複合體(major histocompatibility complex, MHC)分子上之腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens, TAAs)的抗原決定位胜肽，之後殺死腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原(melanoma antigen, MAGE)家族為第一個腫瘤相關抗原的例子，藉由免疫方法，已發現許多其他腫瘤相關抗原(非專利文獻 1-2)。這些腫瘤相關抗原有部分目前正在進行臨床開發作為免疫治療標的。

合適的腫瘤相關抗原(TAAs)對於癌症細胞增殖與存活為必須的。使用此類腫瘤相關抗原為免疫治療標的可將廣為敘述

之癌細胞免疫逃脫(immune escape)的風險最小化，癌細胞免疫逃脫歸因於腫瘤相關抗原(TAAs)的刪除、突變或向下調控，結果治療性驅使免疫篩選。所以，能誘導有效且專一之抗腫瘤免疫反應的新腫瘤相關抗原(TAAs)的辨識成為更進一步發展的根據。因此對於多種形式癌症之胜肽疫苗接種策略(vaccination strategies)的臨床研究正進行著(非專利文獻 3-10)。迄今已報導，使用這些腫瘤相關抗原衍生胜肽的一些臨床試驗。不幸的是，這些癌症疫苗試驗僅顯示低的客觀反應率(objective response rate)(非專利文獻 11-13)。因此仍需要作為免疫治療標的之新穎腫瘤相關抗原(TAAs)。

【0004】 KNTC2 又稱為「著絲點相關蛋白 2」(kinetochore associated 2)、HEC1 或 NDC 80，是 Ndc80 複合物的其中一員，Ndc80 複合物由兩個 Ndc80(KNTC2)-Nuf2(CDCA1) 及 Spc24-Spc25 次複合物所組成(非專利文獻 14)。於著絲點外側板內的 CDCA1-KNTC2 複合物的連結位對染色體運動產生微管依賴性力量(microtubule dependent forces)並調節聚集在著絲點的紡錘體監控蛋白(spindle checkpoint protein)(非專利文獻 15)。

【0005】 在使用含 27,648 個基因之 cDNA 微陣列的全基因體表現輪廓分析法確認在非小細胞肺炎(NSCLC)的分子機制的過程中，發現 KNTC2 常過度表現於 NSCLC(非專利文獻 16、17、18、19、20)。北方點漬分析法顯示此基因的轉錄本高度表現於肺癌組織中，除了睪丸外，未在正常組織中表現。而且

後續以 siRNA 敲除 KNTC2 表現顯示顯著地抑制 NSCLC 細胞的生長(非專利文獻 21、專利文獻 1)。

【0006】 已有文獻報導 KNTC2 在癌組織中向上調節，例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤(專利文獻 2)。

【0007】 而且，本發明人已確定出 KNTC2 胜肽可結合至 HLA-A24 及誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTLs)，可有效用於標靶 HLA-A24 陽性患者之免疫治療(專利文獻 2)。然而，雖然這些胜肽適合 HLA-A24 亞型患者，仍有需要發展對於表現其他 HLA 抗原型之患者誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTLs)的胜肽。

【先前技術文獻】

【專利文獻】

專利文獻 1：WO2009/028581

專利文獻 2：WO2011/125334

【非專利文獻】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

非專利文獻 14 : Ciferri C, et al. J Biol Chem 2005; 280:
29088-95

非專利文獻 15 : Wigge P.A, et al. J Cell Biol. 2001; 152:
349-60

非專利文獻 16 : Kikuchi T, et al., Oncogene. 2003;
22:2192-205

非專利文獻 17 : Suzuki C, et al., Cancer Res. 2003;
63:7038-41

非專利文獻 18 : Kakiuchi S, et al., Mol Cancer Res. 2003;
1:485-99

非專利文獻 19 : Zembutsu H, et al., Int J. Oncol. 2003;
23:29-39

非專利文獻 20 : Kakiuchi S, et al., Hum Mol Genet. 2004;
13:3029-43

非專利文獻 21 : Hayama S, et al. Cancer Res. 2006 Nov
1;66(21):10339-48

【發明內容】

【0008】 本發明基於、或至少部分基於可作為免疫療法適當目標之新穎胜肽的發現。由於 TAAs 一般被免疫系統視為自身物質，所以通常沒有先天的致免疫原性，故發現適當目標仍非常重要。在本發明中，KNTC2 (典型的胺基酸序列如 SEQ ID NO: 79，典型的核苷酸序列如 SEQ ID NO:77(GenBank Accession No. NM_006101) 或 SEQ ID NO:78(GenBank Accession No. AF017790))被證實在癌症特異性過度表現，例如但不限於，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。因此，本發明著重在 KNTC2 為癌症/腫瘤免疫療法之候選標靶。

【0009】 本發明關於，或至少一部份關於，確認在源自

KNTC2 的胜肽中，具有誘導對 KNTC2 特異性的細胞毒性 T 淋巴球(CTLs)的能力之特定抗原決定位胜肽。

【0010】 本述之結果證實所確認的胜肽為 HLA-A2-限制性的抗原決定位胜肽，其可誘導有效及特異的免疫反應，以對抗表現 KNTC2 的細胞。

【0011】 因此，本發明一目的提供衍生自 KNTC2 的胜肽，其可以 HLA-A2 限制型態，體外(*in vitro*)、生體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTLs)，或者可直接投予個體以體內誘導抗癌的免疫反應，例如，但不限於，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。

【0012】 本發明胜肽通常小於 15、14、13、12、11 或 10 個胺基酸的長度。較佳胜肽為九胜肽及十胜肽。特別較佳為具有擇自 SEQ ID NO:2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列的九胜肽及十胜肽。

【0013】 本發明也關注修飾胜肽，其具有擇自 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列中具有一、二或多個胺基酸經取代、刪除、插入及/或增加之胺基酸序列，但所得的修飾胜肽仍維持原始未修飾胜肽的 CTL 誘導活性的要求。

【0014】 在一實施例中，當原始胜肽為九胜肽時(如，SEQ ID NO: 2、3、7 及 17 其中之一)，修飾胜肽的長度較佳為 9 至 40 個胺基酸，如 9 至 20 個胺基酸，如 9 至 15 個胺基酸。同樣

地，當原始胜肽爲十胜肽時(如，SEQ ID NO:41、53 及 68 其中之一)，修飾胜肽的長度較佳爲 10 至 40 個胺基酸，如 10 至 20 個胺基酸，如 10 至 15 個胺基酸。

【0015】 本發明更包含編碼本發明任一胜肽的單離多核苷酸。此等多核苷酸可用於誘導或製備具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘發能力的抗原呈現細胞(APC)。如本發明胜肽，可投予個體此種抗原呈現細胞以誘導抗癌症的免疫反應。

【0016】 當投予一個體時，本發明之胜肽可呈現於抗原呈現細胞(APC)之表面以便誘導標靶個別胜肽的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。因此，本發明一目的爲提供包括一或多個本發明之胜肽或一或多個編碼此胜肽之多核苷酸的藥劑或組成物。本發明之組成物可用於誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，因此有效於癌症之治療及/或預防、及其轉移或其術後復發的預防。本發明所包含之目標癌症的例子包括，但不限於，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。

【0017】 本發明更關注包含本發明一或多個胜肽或多核苷酸之醫藥組成物。此醫藥組成物或藥劑較佳被配製用於癌症之治療及/或預防，特別是原發癌，及/或其轉移或術後的復發之預防。除了本發明胜肽或多核苷酸外，本發明醫藥組成物可包括呈現本發明之任何胜肽的抗原呈現細胞(APCs)或外吐小體爲活性成分。

【0018】 本發明之胜肽或多核苷酸可被用來誘導表面上呈現人類白血球抗原(HLA)與本發明胜肽之複合物的抗原呈現細胞(APC)，例如，使來自一個體之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸或將編碼本發明胜肽的多核苷酸導入抗原呈現細胞(APC)。此種抗原呈現細胞(APC)有能力誘導專一性地辨識於表面呈現標靶胜肽之細胞的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，因此可用於癌症免疫療法。因此，本發明包括誘導具細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘發能力之抗原呈現細胞(APS)的方法以及藉由此方法獲得之抗原呈現細胞(APS)。

【0019】 此外，本發明也包含用於誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘發能力之抗原呈現細胞(APC)的醫藥組成物，此組成物包括本發明任一胜肽或多核苷酸。

【0020】 本發明之再一目的為提供誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的方法，此方法包括將 CD8 陽性 T 細胞與表面上呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物的抗原呈現細胞(APC)共同培養的步驟，或將 CD8 陽性 T 細胞與表面上呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物的外吐小體共同培養的步驟，或導入編碼 T 細胞受體(T cell receptor, TCR)二次單元或編碼 T 細胞受體各次單元的多核苷酸的步驟，其中此 T 細胞受體(TCR)可與本發明胜肽及呈現在細胞表面上的 HLA 抗原之複合體結合。藉由此方法獲得之細胞毒性 T 淋巴球(CTL)可有效於癌症之治療及/或預防，包括但不限於，例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、

前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。因此，本發明包括誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的方法以及以此方法獲得之細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。

【0021】 本發明又另一目的為提供單離的抗原呈現細胞(APC)，其於表面呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物。本發明更提供標靶本發明胜肽之單離的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。此細胞毒性 T 淋巴球(CTL)也可被定義為能夠辨識(或結合於)細胞表面上本發明胜肽與 HLA 抗原的複合體之細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。這些抗原呈現細胞(APC)與細胞毒性 T 淋巴球(CTL)可被用於癌症免疫治療。

【0022】 本發明又另一目的為提供於所需個體中誘導抗癌免疫反應之方法，此方法包括投予該個體包含擇自下列之至少一種組成之組成物：(a)本發明胜肽或編碼該胜肽之多核苷酸，(b)呈現該胜肽之抗原呈現細胞或外吐小體，以及(c)可辨識於表面呈現本發明胜肽之細胞的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。

【0023】 本發明之一態樣關於本發明之胜肽、包含該胜肽之藥劑或組成物作為醫藥劑使用。

【0024】 本發明的利用性擴展到多數關於或起因於 KNTC2 過度表現的疾病，例如癌症，包括如但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。

【0025】 更特別是，本發明提供下列內容：

[1] 一種單離胜肽，其具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力，其中該胜肽包括下列胺基酸序列(a)或(b)：

(a) KNTC2 免疫活性片段的胺基酸序列；

(b) KNTC2 免疫活性片段的胺基酸序列，其中有 1、2 或數個胺基酸經取代、刪除、插入及/或增加之胺基酸序列，

其中該胜肽所誘導的 CTL 對於呈現衍生自 KNTC2 片段之細胞具有特異性細胞毒性；

【0026】 [2]如[1]的胜肽，其中該胜肽包括下列胺基酸序列(a)或(b)：

(a)擇自於 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列；

(b)擇自於 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列中有 1、2 或數個胺基酸經取代、刪除、插入及/或增加之胺基酸序列；

【0027】 [3]如[2]的胜肽，其中該胜肽具有下列一或二個特徵：

(a) N 端第 2 個胺基酸被置換為白胺酸或甲硫胺酸；以及

(b) C 端胺基酸被置換為纈胺酸或白胺酸；

【0028】 [4]如[1]至[3]任一胜肽，其中此胜肽為九胜肽或十胜肽；

【0029】 [5]如[4]的胜肽，其中該胜肽由擇自 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列所組成；

【0030】 [6]一種編碼[1]至[5]任一胜肽的多核苷酸；

【0031】 [7] 一種誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的組成物，

其中該組成物包括擇自於下列所組成之族群之至少一種活性成分：

(a) [1]至[5]任一種之胜肽；

(b) [6]之多核苷酸；

(c) 表面上呈現[1]至[5]任一胜肽之抗原呈現細胞(APC)；以及

(d) 表面上呈現有[1]至[5]任一胜肽之外吐小體；

【0032】 [8] 一種治療及/或預防癌症、及/或預防其術後復發的醫藥組成物，其中該醫藥組成物包括擇自於下列所組成之族群之至少一種活性成分：

(a)[1]至[5]任一胜肽；

(b)[6]的多核苷酸；

(c)表面上呈現[1]至[5]任一胜肽之抗原呈現細胞(APC)；

(d)表面上呈現有[1]至[5]任一胜肽之外吐小體；以及

(e)可辨識呈現[1]至[5]任一胜肽的細胞之細胞毒性 T 淋巴球(CTL)；

【0033】 [9]如[8]的醫藥組成物，其中該醫藥組成物被配製以投藥至 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體；

[10] 一種誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力之抗原呈現細胞(APC)之方法，其中該方法包括擇自於下列所組成之族群中之步驟：

(a) 使抗原呈現細胞(APC)接觸[1]至[5]任一胜肽，以及

(b) 將編碼[1]至[5]任一胜肽的多核苷酸導入抗原呈現細胞(APC)；

【0034】 [11]一種誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)之方法，其中該方法包括擇自於下列所組成之族群中之步驟：

(a) 將 CD8 陽性 T 細胞與表面呈現 HLA 抗原與[1]至[5]任一胜肽之複合物的抗原呈現細胞(APC)共同培養；

(b) 將 CD8 陽性 T 細胞與表面呈現 HLA 抗原與[1]至[5]任一胜肽之複合物的外吐小體共同培養；以及

(c) 將編碼 T 細胞受體(TCR)二次單元之多核苷酸、或編碼 TCR 各次單元之多核苷酸導入至 CD8 陽性 T 細胞中，其中由該次單元所形成的 TCR 可在細胞表面與[1]至[5]任一胜肽和 HLA 抗原的複合物結合；

【0035】 [12]一種單離的抗原呈現細胞(APC)，其表面呈現 HLA 抗原與[1]至[5]任一胜肽之複合物；

【0036】 [13]如[12]的抗原呈現細胞(APC)，該抗原呈現細胞(APC)以[10]的方法所誘導；

【0037】 [14] 一種單離的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，其標靶[1]至[5]任一胜肽；

【0038】 [15]如[14]的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，該細胞毒性 T 淋巴球(CTL)以[11]的方法所誘導；

【0039】 [16]一種誘導個體中抗癌免疫反應之方法，其中該方法包括投予該個體包括[1]至[5]任一胜肽或編碼該胜肽之多核苷酸的組成物之步驟；

【0040】 [17]一種抗[1]至[5]任一胜肽之抗體或其免疫活性片段；

【0041】 [18]一種載體，包括編碼[1]至[5]任一胜肽的核苷

酸序列；

【0042】 [19]一種以[18]之載體轉形或轉染的宿主細胞；

【0043】 [20]一種診斷套組，其包括[1]至[5]任一胜肽、[6]的多核苷酸、或[17]的抗體或免疫活性片段；

【0044】 [21]一種篩選胜肽之方法，該胜肽具有誘導特異細胞毒性對抗呈現衍生自 KNTC2 之片段的細胞之細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的能力，其中該方法包括：

(i)提供候選序列，該候選序列由原始胺基酸被一、二或數個胺基酸殘基取代、刪除、插入及/或增加修飾之胺基酸序列所組成，其中此原始胺基酸序列擇自於 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組；

(ii)選擇候選序列，該候選序列，除與 KNTC2 以外，與源自任何已知人類基因產品之胜肽不具有實質上顯著同源性(或序列相似性)；

(iii)將步驟(ii)所選之候選序列所形成的胜肽與抗原呈現細胞接觸；

(iv)將步驟(iii)之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞接觸，以及

(v)確認具有與該原始胺基酸序列所組成之胜肽相同或較高的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力之胜肽；

【0045】 [22]一種醫藥組成物，包括[1]至[5]任一胜肽；

【0046】 [23]一種[1]至[5]任一胜肽作為藥物的使用；以及

【0047】 [24]一種[6]之多核苷酸或[18]之載體作為藥物的使用。

【0048】 或者，本發明亦提供下列實施態樣：

[1]一種具細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力的單離胜肽，其中由該胜肽誘導之細胞毒性 T 淋巴球(CTL)對呈現衍生自 KNTC2 之片段的細胞具有特異的細胞毒性，而且其中該胜肽包括下列胺基酸序列(a)或(b)：

(a) KNTC2 免疫活性片段的胺基酸序列；

(b) KNTC2 免疫活性片段的胺基酸序列，其中有 1、2 或數個胺基酸經取代、刪除、插入及/或增加之胺基酸序列，

【0049】 [2]如[1]的胜肽，其中該胜肽具有下列胺基酸序列(a)或(b)：

(a)擇自於 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列；

(b)擇自於 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列中有 1、2 或數個胺基酸經取代、刪除、插入及/或增加之胺基酸序列；

【0050】 [3]如[2]的胜肽，其中該胜肽具有下列一或二個特徵：

(a) N 端第 2 個胺基酸被置換為白胺酸或甲硫胺酸；以及

(b) C 端胺基酸被置換為纈胺酸或白胺酸；

【0051】 [4]如[1]至[3]任一胜肽，其中此胜肽為九胜肽或十胜肽；

【0052】 [5]一種編碼[1]至[4]任一胜肽的多核苷酸；

【0053】 [6] 一種誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的組成物，其中該組成物包括擇自於下列所組成之族群之至少一種活性

成分：

(a) [1]至[4]任一種之胜肽；

(b) [5]之多核苷酸；

(c) 表面上呈現[1]至[4]任一胜肽之抗原呈現細胞 (APC)；以及

(d) 表面上呈現有[1]至[4]任一胜肽之外吐小體；

【0054】 [7] 一種治療及/或預防癌症、及/或預防其術後復發的醫藥組成物，其中該醫藥組成物包括擇自於下列所組成之族群之至少一種活性成分：

(a)[1]至[4]任一胜肽；

(b)[5]的多核苷酸；

(c)表面上呈現[1]至[4]任一胜肽之抗原呈現細胞 (APC)；

(d)表面上呈現有[1]至[4]任一胜肽之外吐小體；以及

(e)可辨識呈現[1]至[4]任一胜肽的細胞之細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)；

【0055】 [8]如[7]的醫藥組成物，其中該醫藥組成物被配製以投藥至 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體；

【0056】 [9] 一種誘導具有細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)誘導能力之抗原呈現細胞 (APC)之方法，其中該方法包括擇自於下列所組成之族群中之步驟：

(a) 使抗原呈現細胞 (APC)接觸[1]至[4]任一胜肽，以及

(b) 將編碼[1]至[4]任一胜肽的多核苷酸導入抗原呈現細胞 (APC)；

【0057】 [10]一種誘導細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)之方法，其

中該方法包括擇自於下列所組成之族群中之步驟：

(a) 將 CD8 陽性 T 細胞與表面呈現 HLA 抗原與[1]至[4]任一胜肽之複合物的抗原呈現細胞(APC)共同培養；

(b) 將 CD8 陽性 T 細胞與表面呈現 HLA 抗原與[1]至[4]任一胜肽之複合物的外吐小體共同培養；以及

(c) 將編碼 T 細胞受體(TCR)二次單元之多核苷酸、或編碼 TCR 各次單元之多核苷酸導入至 CD8 陽性 T 細胞中，其中由該次單元所形成的 TCR 可在細胞表面與[1]至[4]任一胜肽和 HLA 抗原的複合物結合；

【0058】 [11]一種單離的抗原呈現細胞(APC)，其表面呈現 HLA 抗原與[1]至[4]任一胜肽之複合物；

【0059】 [12]如[11]的抗原呈現細胞(APC)，該抗原呈現細胞(APC)以[9]的方法所誘導；

【0060】 [13] 一種單離的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，其標靶[1]至[4]任一胜肽；

【0061】 [14]如[14]的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，該細胞毒性 T 淋巴球(CTL)以[10]的方法所誘導；

【0062】 [15]一種誘導個體中抗癌免疫反應之方法，其中該方法包括投予該個體包括[1]至[4]任一胜肽或編碼該胜肽之多核苷酸的組成物之步驟；

【0063】 [16]一種抗[1]至[4]任一胜肽之抗體或其免疫活性片段；

【0064】 [17]一種載體，包括編碼[1]至[4]任一胜肽的核苷酸序列；

【0065】 [18]一種以[17]之載體轉形或轉染的宿主細胞；

【0066】 [19]一種診斷套組，其包括[1]至[4]任一胜肽、[5]的多核苷酸、或[16]的抗體或免疫活性片段；

【0067】 [20]一種篩選胜肽之方法，該胜肽具有誘導特異細胞毒性對抗呈現衍生自 KNTC2 之片段的細胞之細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的能力，其中該方法包括：

(i)提供候選序列，該候選序列由原始胺基酸被一、二或數個胺基酸殘基取代、刪除、插入及/或增加修飾之胺基酸序列所組成，其中此原始胺基酸序列擇自於 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組；

(ii)選擇候選序列，該候選序列，除與 KNTC2 以外，與源自任何已知人類基因產品之胜肽不具有實質上顯著同源性(或序列相似性)；

(iii)將步驟(ii)所選之候選序列所形成的胜肽與抗原呈現細胞接觸；

(iv)將步驟(iii)之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞接觸，以及

(v)確認具有與該原始胺基酸序列所組成之胜肽相同或較高的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力之胜肽；

【0068】 [21]一種醫藥組成物，包括[1]至[4]任一胜肽；

【0069】 [22]一種[1]至[4]任一胜肽作為藥物的使用；以及

【0070】 [23]一種[5]之多核苷酸或[17]之載體作為藥物的使用。

【0071】 當下述詳細說明被閱讀並結合伴隨之圖式與實施

例，本發明之目的與特徵會變得更完全地明白。然而應瞭解上面之本發明內容與下述之詳細說明兩者為例示之實施態樣，並不限制本發明或本發明其他替代實施態樣。

【0072】 特別是，當關於一些特定實施態樣於此敘述之本發明，可以瞭解的是，敘述為本發明之說明，且並不構成本發明之限制。熟悉此技藝人士可想到各種修飾與應用，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、益處與優點顯見於此內容與下述特定實施態樣，而且輕易地顯見於熟悉此技藝人士。此目的、特徵、益處與優點顯見於上述內容結合所伴隨實施例、數據、圖式與所有合理引用之參考文獻、於此併入之文獻單獨或一併考慮。

【圖式簡單說明】

【0073】 對於該技術領域中具有通常知識者而言，本發明之各種態樣與應用將在考量下述的圖式簡單敘述及本發明詳細敘述及其較佳實施例而顯明。

第 1 圖為一系列照片，包括(a)至(h)圖，顯示以衍生自 KNTC2 胜肽所誘導的 CTLs 在 IFN- γ 酵素連結免疫斑點分析 (ELISPOT) 分析的結果。孔編號 #8 中的 CTLs 以 KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) 誘導 (a)，編號 #4 以 KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) 誘導 (b)，編號 #7 以 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) 誘導 (c)，編號 #5 以 KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17) 誘導 (d)，編號 #3 以 KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41) 誘導 (e)，編號 #2 以 KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) 誘導 (f)，編號 #6 以

KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68)誘導(g)，與對照組相比，分別顯示有效的 IFN- γ 的產生。以方框標示的孔表示對應的細胞擴展而建立 CTL 細胞株。相反地，在以 KNTC2-A02-9-330 (SEQ ID NO: 1)(h)刺激的 CTL 中沒有觀察到特異性 IFN- γ 產生，為典型的陰性數據。在圖中，“+”表示對抗以適當胜肽脈衝之標靶細胞的 IFN- γ 的產生，“-”表示對抗未以任何胜肽脈衝之標靶細胞的 IFN- γ 的產生。

第 2 圖為一系列的線圖，包括(a)至(c)圖，顯示 CTL 細胞株經 KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a)、KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b)及 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c)刺激的 IFN- γ 的產生。以 IFN- γ 酵素連結免疫吸附分析(ELISA)量測 CTL 產生之 IFN- γ 的量。此結果證實，相較於控制組，經各胜肽刺激所建立的 CTL 細胞株顯示出有效地生產 IFN- γ 。在圖中，“+”表示對抗以適當胜肽脈衝之標靶細胞的 IFN- γ 的產生，“-”表示對抗未以任何胜肽脈衝之標靶細胞的 IFN- γ 的產生。R/S 比表示應答細胞(CTL 細胞株)與刺激細胞的數目比例。

第 3 圖顯示以 KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a)、KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b)及 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c)刺激之 CTL 細胞株經限制性稀釋所建立之 CTL 選殖株的 IFN- γ 的產生。此結果證實，相較於控制組，經各胜肽刺激所建立之 CTL 選殖株顯示有效地生產 IFN- γ 。在圖中，“+”表示對抗以適當胜肽脈衝之標靶細胞的 IFN- γ 的產生，且“-”表示對抗未以任何胜肽脈衝之標靶細胞的 IFN- γ 的產生。R/S 比表示應答細胞(CTL 細胞株)與刺激細胞的數目比例。

第 4 圖為曲線圖，顯示抗表現 KNTC2 與 HLA-A*0201 之標靶細胞的 CTL 選殖株的特異性 CTL 活性。以轉染 HLA-A*0201 或全長 KNTC2 基因之 COS7 細胞作為控制組。以 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7)所建立之 CTL 細胞株顯示抗轉染 KNTC2 與 HLA-A*0201(黑菱形)兩者之 COS7 細胞的特異性 CTL 活性。另一方面，抗表現 HLA-A*0201 (三角形)或 KNTC2 (圓形)之標靶細胞未偵測到顯著特異性 CTL 活性。

【實施方式】

【0074】 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實施例，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實施例，不意欲限制本發明的範圍，本發明範圍僅限於後附申請專利範圍。

【0075】 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。

【0076】 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使用的含意相同。若有抵觸，依本說明書，包括定義為準。此外，材料、方法與實施例僅為解釋說明意指為限制。

I. 定義

【0077】 除非特別指明，此處使用的「一」及「該」意指「至少一」。

【0078】 與物質(例如，胜肽、抗體、多核苷酸等)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、脂質或其他衍生自細胞該胜肽所從衍生的組織來源的污染蛋白質的胜肽，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。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該胜肽製備物的少於約 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涉及合成該胜肽的化學前驅體或其他化學物質為該胜肽製備物的少於約 30%、20%、10%、5% (以乾重計)。含有經單離或經純化的胜肽的特定胜肽，例如可藉由將該蛋白質製備物進行十二烷基硫酸鈉(SDS)聚丙烯醯胺凝膠電泳並將該凝膠以考馬西亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色等出現單一譜帶而顯示。於一較佳實施例，本發明之胜肽及多核苷酸係經單離或經純化。

【0079】 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，其中一個或更多胺基酸殘基可為經修飾的殘基，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。

【0080】 此處使用的用語「寡胜肽」係指一胜肽，其由 20 個或更少胺基酸殘基組成，一般為 15 個胺基酸殘基或更少。此處使用的用語「九胜肽(nonapeptide)」係指由 9 個胺基酸殘基組成的胜肽，用語「十胜肽(nonapeptide)」係指由 10 個胺基酸殘基組成的胜肽。

【0081】 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。胺基酸可為 L-胺基酸或 D-胺基酸。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)但是具有一個以上經過修飾的 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。

【0082】 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。

【0083】 用語「多核苷酸」、「寡核苷酸」及「核酸」在此可互換使用，且如無特別指明，係類似於胺基酸以其通用的單字母碼所指明者。

【0084】 用語「藥劑」、及「組成物」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。加上修飾語「醫藥上的」（如於「醫藥劑」或「醫藥組成物」），係意欲包含含該活性成分及成為載體的任意惰性成分的產品，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。因此本發明本文中，用語「醫藥劑」及「醫藥組成物」意指藉由混合本發明化合物或物質及藥學上或生理上可接受載體而製作的任意組成物。

【0085】 用詞「活性成分」意指在組成物當中有生物學活性或生理活性的物質。尤其，於一醫學組成物的上下文中，「活性成分」係指顯示目標的藥理作用的物質。例如，當醫藥劑或組成物使用在癌症治療或預防時，組成物中的活性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，活性成分的間接作用係誘導能辨識或殺死癌細胞的細胞毒性 T 淋巴球。在配方前，「活性成分」也稱為「原料(bulk)」、「藥物物質」或「技術品」。

【0086】 此處使用之用語「藥學上可接受之載體」或「生理上可接受之載體」，係指藥學上或生理上可接受之材料、組成物、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。

【0087】 於一些實施例，本發明之醫藥劑或組成物作為疫

苗特別有用。於本發明上下文，用語「疫苗」(也稱為「免疫組成物」)係指當對於動物體接種後，有改善、增強及/或誘導抗腫瘤免疫性之功能的藥劑或組成物。

【0088】 若未另外定義，用語「癌症」代表過度表現 KNTC2 基因的癌或腫瘤，包括但不限於：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。

【0089】 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/癌細胞、受病毒感染的細胞)，並誘導此種細胞的死亡。

【0090】 除非另外定義，用語「HLA-A2」在此意指亞型例如包括但不限於 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。

【0091】 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。在此體認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。

【0092】 此述個體或病患中，詞語「個體的(或病患的) HLA 抗原為 HLA-A2」，係指該個體或病患帶有同型合子或異型合子的 HLA-A2 抗原基因，且 HLA-A2 抗原在此個體或病患的細

胞中表現作為 HLA 抗原。

【0093】本文中，所述本發明的方法與組成物有用於「治療」癌症，如果該治療造成臨床上的益處，例如癌症的大小減小、流行程度或轉移潛力減低、存活期延長、轉移或術後復發受抑制等，則該治療被視為「有效」。當該治療係以預防性施予時，「有效」意指其延遲或防止癌症形成或預防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。

【0094】本文中，所述本發明的方法與組成物有用於「防止」及「預防」癌症，此等用語在此可互換地意指任何減低由於疾病所致死亡率或發病率的負擔。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。

【0095】本文中，治療及/或預防癌症及/或預防其轉移或術後復發，包括下述任何步驟：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/或預防癌症可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。

【0096】 本文中，用語「抗體」意指專一性地對於特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、雙專一性抗體、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)。

【0097】 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。

II. 胜肽

【0098】 以下詳述之本發明之胜肽，可指稱為「KNTC2 胜肽」或「KNTC2 多胜肽」。

【0099】 爲了證明衍生自 KNTC2 之胜肽作用如細胞毒性 T 淋巴球所辨識之抗原，分析衍生自 KNTC2 之胜肽(SEQ ID NO: 79)以確定是否其爲一般常見的 HLA 對偶基因 HLA-A2 所限制之抗原決定位(antigen epitopes) (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)。

【0100】 衍生自 KNTC2 之 HLA-A2 結合胜肽的候選物，基於其對 HLA-A2 之結合親和力確認。鑑別出下述的候選胜肽：

SEQ ID NO: 2 至 76。

【0101】 如上述，以下列胜肽脈衝樹狀細胞(DCs)以而體外(*in vitro*)刺激 T-細胞後，成功地建立 CTL 之胜肽：

【0102】 KNTC2-HLA-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2)、KNTC2-HLA-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3)、KNTC2-HLA-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7)、KNTC2-HLA-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17)、KNTC2-HLA-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41)、KNTC2-HLA-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53)及 KNTC2-HLA-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68)。

【0103】 上述所建立的 CTL 顯示出對抗以各胜肽脈衝之標靶細胞的有效特異性 CTL 能力。此結果證實 KNTC2 為可被 CTL 辨識的抗原，且上述胜肽為限於 HLA-A2 的 KNTC2 抗原決定位胜肽，因此，對於 HLA-A2 陽性患者，此胜肽經由 CTL 誘導細胞毒性而有效於癌症免疫治療。

【0104】 由於 KNTC2 基因在癌細胞及組織中過度表現，包括，例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤，且幾乎在正常器官不表現，表現良好的免疫治療標的。因此，本發明提供對應於衍生自 KNTC2 之 CTL 識別抗原決定位的九胜肽(9 個胺基酸所組成的胜肽)及十胜肽(10 個胺基酸所組成的胜肽)。又，本發明提供可誘導 CTL 之單離的胜肽，其中此胜肽由 KNTC2 的免疫活性片段所組成。在某些實施態樣中，本發明提供具有擇自

SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列的胜肽。在較佳實施態樣中，本發明之胜肽為包括 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列的九胜肽或十胜肽。本發明胜肽之較佳實施例包括由 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列所組成的胜肽。

【0105】 本發明之胜肽，特別是本發明之九胜肽及十胜肽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其細胞毒性 T 淋巴球誘發能力。此特別的額外的胺基酸殘基可由任何種類的胺基酸構成，條件是不會損害原始胜肽之細胞毒性 T 淋巴球誘發能力。因此本發明包含有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力的胜肽，特別是來自 KNTC2 之胜肽。此胜肽例如少於約 40 個胺基酸，常少於約 20 個 胺基酸，通常少於約 15 個胺基酸。

【0106】 一般已知於一胜肽中一、二或數個胺基酸之修飾，不影響胜肽的功能，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，與一原始參考序列相較，由於其中 1、2 或數個胺基酸殘基被修飾（即，取代、加入、刪除及/或插入）之胺基酸序列所組成的胜肽）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，於一實施態樣中，本發明胜肽具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力與於其中加入、刪除、插入及/或取代一、二或甚至更多個胺基酸之擇自 SEQ ID NO: 2、3、7、

17、41、53 及 68 中的胺基酸序列兩者。換言之，本發明之胜肽具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力與於其中取代、刪除、插入及/或加入一、二或甚至更多個胺基酸之擇自 SEQ ID NO：2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列兩者，條件是此經修飾之胜肽維持原始胜肽的細胞毒性 T 淋巴球誘發能力。

【0107】 熟悉此技藝人士會了解改變單一胺基酸或整個胺基酸序列之小百分比的個別修飾（即，刪除、插入、加入及/或取代）至一胺基酸序列傾向產生保存原始胺基酸支鏈的特性。因此它們常被意指為“保守取代(conservative substitution)”或“保守修飾(conservative modification)”，其中蛋白質之改變形成具有同功於原始蛋白質的經修飾蛋白質。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。保守所需之胺基酸支鏈特徵包括，例如為疏水胺基酸(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：脂肪族支鏈(G, A, V, L, I, P)；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可接受為彼此保守取代之胺基酸：

- 1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；
- 2) 天門冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；
- 3) 天門冬醯胺酸(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)。

【0108】 此種經保守修飾胜肽也被視為本發明之胜肽。然而，本發明之胜肽並不限於此，且可包括非保守修飾，只要經修飾之胜肽維持原始未修飾胜肽的細胞毒性 T 淋巴球誘發能力。更進一步而言，經修飾之胜肽應不排除衍生自 KNTC2 之多形變體 (polymorphic variant)、種間同質體 (interspecies homologues) 與對偶基因 (alleles) 的可誘導細胞毒性 T 淋巴球的胜肽。

【0109】 胺基酸殘基可被插入、取代、刪除/及或加入至本發明之胜肽，或者胺基酸殘基可被從其刪除以達到一較高之結合親和力。為了維持必須之細胞毒性 T 淋巴球誘發能力，較佳為只修飾（即，刪除、插入、加入及/或取代）一小數目（例如 1、2 或數個）或小百分比之胺基酸。此處用語“數個”指 5 或更少個胺基酸，例如 4 或 3 個或更少。被修飾之胺基酸之百分例如 30% 或更少，較佳為 20% 或更少，更佳為 15% 或更少，甚至更佳為，10% 或更少，例如 1 至 5%。

【0110】 當使用於癌症免疫治療中，本發明胜肽應以與 HLA 抗原之複合物的形式表現於一細胞或外吐小體之表面上。因此，較佳為選擇不僅誘導細胞毒性 T 淋巴球且也擁有對 HLA 抗原之高結合親和力之胜肽。為達成此目的，胜肽可藉由胺基酸殘基之取代、插入、刪除及/或加入來修飾以產生具有

經改善結合親和力的經修飾胜肽。除了自然表現之胜肽外，由於藉由結合至 HLA 抗原來表現之胜肽序列的規則(Kubo RT et al., J Immunol 1994, 152: 3913-24; Rammensee HG et al., Immunogenetics 1995, 41: 178-228; Kondo et al., J Immunol 1994, 155: 4307-12)爲已知，可將基於此規則之修飾引入本發明之致免疫原性胜肽。

【0111】 例如，具有高 HLA-A2 結合親和力之胜肽傾向具有以白胺酸或甲硫胺酸取代之來自 N 端的第二個胺基酸及/或以纈胺酸或白胺酸取代 C 端胺基酸的胜肽。所以，希望是白胺酸或甲硫胺酸取代之來自 N 端的第二個胺基酸及/或以纈胺酸或白胺酸取代 C 端胺基酸，以增加 HLA-A2 結合親和力。因此，具有擇自 SEQ ID NO：2、3、7、17、41、53 及 68 中之胺基酸序列的胜肽，其中該 SEQ ID NO 之胺基酸序列之 N 端的第二個胺基酸以白胺酸或甲硫胺酸所取代，及/或其中該 SEQ ID NO 之胺基酸序列之 C 端之胺基酸以纈胺酸或白胺酸所取代，也包含於本發明中。又，本發明包括擇自 SEQ ID NO：2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列之胜肽，其中一、二或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加入，此胜肽具有下列一或二個特徵：(a)N 端的第二個胺基酸爲白胺酸或甲硫胺酸；及(b) C 端之胺基酸爲纈胺酸或白胺酸。在較佳實施態樣中，本發明胜肽包括擇自 SEQ ID NO：2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列中，N 端之第二個胺基酸被以白胺酸或甲硫胺酸取代，及/或 C 端之胺基酸被以纈胺酸或白胺酸取代之胺基酸序列。

【0112】 取代不只發生在末端胺基酸，也發生在胜肽的潛在 T 細胞受體(TCR)辨識的位置。一些研究已證實具有胺基酸取代之胜肽具有相等於或優於原始胜肽之功能，例如 CAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎，Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎或 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T.K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002);168(3):1338-47., S.O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 and S.O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

【0113】 本發明也關注一、二個或數個胺基酸的加入也可加入至本發明胜肽之 N 及/或 C 端。此保有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力之修飾胜肽也包括於本發明中。

【0114】 例如，本發明提供在長度小於 15、14、13、12、11 或 10 個胺基酸的單離的胜肽，其具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力及擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i)擇自於 SEQ ID NO：2、3、7 及 17 所組成之群組的胺基酸序列，其中有 1、2 或數個胺基酸被修飾之胺基酸序列，

(ii)如(i)之胺基酸序列，其中該胺基酸序列具有下列一或二個特徵：

(a) 該 SEQ ID NO 之 N 端的第二個胺基酸為或被修飾為擇自由白胺酸及甲硫胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 該 SEQ ID NO 之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由纈胺酸及白胺酸所組成之群組的一胺基酸。

【0115】 而且，本發明也提供在長度小於 15、14、13、12 或 11 個胺基酸的單離的胜肽，其具有細胞毒性 T 淋巴球誘發

能力及擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i')擇自由 SEQ ID NO: 41、53 及 68 所組成之群組的胺基酸序列，其中有 1、2 或數個胺基酸被修飾之胺基酸序列，

(ii') 如(i')之胺基酸序列，其中此胺基酸序列具有下列一或二個特徵：

(a) 該 SEQ ID NO 之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由白胺酸及甲硫胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 該 SEQ ID NO 之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由纈胺酸及白胺酸所組成之群組的一胺基酸。

當這些胜肽接觸或導入抗原呈現細胞(APC)時，這些胜肽在抗原呈現細胞(APC)中被處理於其表面呈現選自由(i)至(ii)及(i')至(ii')構成之群組中之胜肽。

【0116】 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，可能誘導如自體免疫疾病及/或抗特定物質的過敏症狀之副作用。因此，希望先使用可獲取之資料庫執行同源搜尋以避免胜肽之序列與其他蛋白質之胺基酸序列相同的情況。當自同源性搜尋清楚知道相較於原始目標胜肽沒有相同或僅具有 1 或 2 個胺基酸不同的胜肽存在時，該目標胜肽可被修飾以增加其與 HLA 抗原之結合親和力，及/或增加其細胞毒性 T 淋巴球誘發能力而不具副作用之任何危險。

【0117】 雖然具有對 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性 T 淋巴球誘發能力的表現。此述

“細胞毒性 T 淋巴球誘發能力”意指當表現於抗原呈現細胞上時，胜肽誘導細胞毒性 T 淋巴球的能力。而且，“細胞毒性 T 淋巴球誘發能力”包括誘導細胞毒性 T 淋巴球活化、細胞毒性 T 淋巴球增殖、以細胞毒性 T 淋巴球促進目標細胞胞解、與增加藉由細胞毒性 T 淋巴球之 IFN- γ 產生的胜肽能力。

【0118】 藉由誘導攜帶人類 MHC 抗原之抗原呈現細胞（例如 B-淋巴球、巨噬細胞與樹突細胞）或更專一地來自人類周邊血液單核細胞之樹突細胞，並在以測試胜肽刺激抗原呈現細胞之後，將抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞混合以誘導細胞毒性 T 淋巴球，之後測量由抗目標細胞之細胞毒性 T 淋巴球產生並釋放之 IFN- γ ，可達成細胞毒性 T 淋巴球誘發能力的確定。此反應系統，可使用已被產生來表現人類 HLA 之抗原基因轉殖動物（例如，於 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 , 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response 中的描述）。或者可以 ^{51}Cr 放射標記目標細胞，且可從自目標細胞釋放出的放射活性計算細胞毒性 T 淋巴球之細胞毒殺活性。或者，細胞毒性 T 淋巴球誘發能力可在攜帶經固定之胜肽之抗原呈現細胞存在下，藉由測量由細胞毒性 T 淋巴球產生並釋放的 IFN- γ ，並使用抗 IFN- γ 單株抗體來使於培養基上之抑制區為可見來評估。

【0119】 除了上述修飾之外，本發明胜肽也可連接其他胜

肽，只要所產生之連結胜肽維持原始胜肽之細胞毒性 T 淋巴球誘發能力，且更佳地也可維持其必要的 HLA 結合能力。適合的“其他”胜肽的例子包括：本發明胜肽或來自其他腫瘤相關抗原(TAAs)之細胞毒性 T 淋巴球(CLT)誘導胜肽。本發明胜肽可直接或間接經由連結物(linker)連結一或多個“其他”胜肽。適合之胜肽內連結物為本技術領域所熟知，包括例如 AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (SEQ ID NO: 37) (R. P. M. Suttmuller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315)或 K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715)。

【0120】 上述連結胜肽表示「多胞型(polytope)」，即兩種或更多有潛力產生免疫反應的群組或免疫反應刺激胜肽可利用各種排列接合在一起(例如連鎖、重疊)。該多胞型(或編碼為該多胞型的核酸)，可以標準免疫實驗步驟投予到例如動物，以測試該多胞型在刺激、增強及/或誘起免疫反應的能力。

【0121】 該胜肽可以直接接合在一起，或經由使用側面相接的序列以形成多胞型，且使用多胞型當做疫苗在該技術領域係為人周知(參見例如 Thomson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert *et al.*, Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson *et al.*, J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn *et al.*, J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990)。可製備含有不同數目抗原決定基及組合的多胞型，並測試細胞毒性 T 淋巴球的識別性及在增加免疫反應的效果。

【0122】 本發明之胜肽可進一步連結於其他適當的物質，

只要其保留原始胜肽的細胞毒性 T 淋巴球誘發能力即可。此種適當物質可包括:胜肽、脂質、糖類及糖鏈、乙醯基、天然及合成的聚合物等。該胜肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化;只要此修飾不會損害此處所述的胜肽的生物學活性即可。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)，或使該多胜肽穩定化。

【0123】 例如，爲了增加多胜肽的體內穩定性，該技術領域已知導入右旋胺基酸、胺基酸擬似物或非天然胺基酸;本發明之胜肽也可採用此概念。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)。

【0124】 再者，如上所述，在經取代、刪除、插入或加成一、二或數個胺基酸殘基而成的修飾胜肽之中，可篩選或選擇具有與原始胜肽相同或更高活性者。因此，本發明也提供篩選或選擇具有與原始胜肽相同或更高活性的修飾胜肽之方法。例如該方法包括下述步驟：

- a: 修飾(取代、刪除、插入及/或增加)本發明胜肽之至少一個胺基酸殘基
- b: 決定於步驟 a 中修飾的該胜肽的活性
- c: 篩選或選擇具有與原始胜肽相同或更高活性的胜肽。

【0125】 分析的活性可包含 MHC 結合活性、APC 或 CTL 的誘導能力及細胞毒性。分析該胜肽的活性較佳爲 CTL 誘導能力。

【0126】 於較佳實施態樣中，本發明提供一種篩選具有誘導細胞毒性 T 淋巴球能力之胜肽的方法，該細胞毒性 T 淋巴球具有抗呈現衍生自 KNTC2 之片段的細胞之特異細胞毒性，其中該方法包括下列步驟：

(i) 提供候選序列，該候選序列由原始胺基酸被一、二或數個胺基酸殘基取代、刪除、插入及/或增加所修飾之胺基酸序列所組成，其中該原始胺基酸序列係擇自由 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組；

(ii) 選擇候選序列，該候選序列，除與 KNTC2 以外，與衍生自任何已知之人類基因產物不具有實質顯著的同源性(或序列相同一性)；

(iii) 將步驟(ii)中所選擇之候選序列所形成的胜肽與抗原呈現細胞接觸；

(iv) 將步驟(iii)之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞接觸；以及

(v) 確認該胜肽之細胞毒性 T 淋巴球誘發能力相同或高於由該原始胺基酸序列所構成之胜肽。

【0127】 當本發明胜肽包含半胱胺酸殘基(如 SEQ ID NO:7)，該胜肽傾向透過半胱胺酸殘基的 SH 基之間的雙硫鍵而形成二聚體(dimer)。因此，本發明擴展至具有誘導 CTL 能力之胜肽二聚體。本發明之胜肽二聚體可透過存在 KNTC2 胜肽單體中或被加入的半胱胺酸殘基的雙硫鍵連結兩個 KNTC2 胜肽單體而形成。當各胜肽的氨基酸序列包含半胱胺酸殘基(Cys)時，雙硫鍵可形成於該半胱胺酸殘基之間而形成本發明之寡聚

胜肽。或者，如果胺基酸序列本身沒有含半胱胺酸，雙硫鍵可形成於被加入該胺基酸序列中的半胱胺酸殘基之間。例如半胱胺酸殘基可被導入各胜肽的 C 端及/或 N 端以形成雙硫鍵。而且也可以在每個胜肽的胺基酸序列中插入一或多個半胱胺酸殘基。

III. 製備 KNTC2 胜肽

【0128】 本發明之胜肽可使用周知的技術製備。例如該胜肽可藉由合成、重組 DNA 技術或化學合成製備。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。該胜肽可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。

【0129】 本發明之胜肽可包含修飾，例如糖化、側鏈氧化或磷酸化，前提為此修飾不損害原始胜肽的生物學活性。其他修飾包括導入右旋胺基酸或其他可使用的胺基酸擬似物，例如以增加該胜肽的血清半衰期。

【0130】 本發明之胜肽可基於所選擇的胺基酸序列經化學合成而獲得。例如可採用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。

【0131】 或者，本發明胜肽可採用任何已知用於生產胜肽的的遺傳工程方法來獲得(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，先製備攜帶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)的目標胜肽之多核苷酸的適當載體，轉形到適當的宿主細胞中。本發明也提供此種載體及宿主細胞。然後將該宿主細胞培養以生產關注的胜肽。該胜肽也可採用體外轉譯系統於體外生產。

【0132】 當本發明胜肽為胜肽二聚體時，該二聚體可使用習知方法製造。例如，假如該胜肽單體包含一對半胱胺酸殘基，可透過例如移除所有包含在半胱胺酸側鏈的保護基，之後將所得的單體溶液在鹼條件下進行氣體氧化或者在鹼或酸條件下加入氧化物，以形成雙硫鍵來製備胜肽二聚體。氧化物的例子包括碘、二甲基亞砷(DMSO)及鐵氰化鉀。

【0133】 包含二或多個半胱胺酸殘基之該胜肽單體也可經上述方法製備。在此情形可獲得具有不同雙硫鍵型態的異構物。另一方面，雙硫鍵形成於特定半胱胺酸殘基之間的胜肽二聚體可經由篩選半胱胺酸側鏈的保護基之組合來製備。保護基之組合的例子包括 MeBzl(甲基苄基)基和 Acn(乙醯胺基甲基)基的組合、Tri(三苯甲基)和 Acn 基的組合、Npys(3-硝基-2-吡

啖巰基)基和 Acm 基的組合、及 S-Bu-t(S-第三丁基)基和 Acm 基的組合。例如，在 MeBzl 基和 Acm 基的組合的情形，胜肽二聚體的製備可經由移除 MeBzl 基和除了該半胱胺酸側鏈上的其他保護基，將所得的單體溶液進行氣體氧化，在該脫保護的半胱胺酸殘基之間形成雙硫鍵，然後使用碘脫保護和氧化，在先前 Acm 保護的半胱胺酸殘基之間形成雙硫鍵。

IV. 多核苷酸

【0134】 本發明提供多核苷酸，其編碼前述任一本發明胜肽。該多核苷酸包括衍生自天然 KNTC2 基因(例如，GenBank 存取號 NM_006101(SEQ ID NO:77)或 AF017790(SEQ ID NO:78))的多核苷酸及具有其保守性修飾的核苷酸序列。此述「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為丙胺酸時，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」，為一種保守性修飾的變異。在此每一編碼胜肽的核酸序列也說明該核酸所有可能的靜默變異。該技術領域中具有通常知識者將了解核酸中的各密碼子(除了 AUG 及 TGG 以外，AUG 通常為甲硫胺酸的唯一密碼子，TGG 通常為色胺酸的唯一密碼子)可經修飾以產生功能上相同的分子。因此編碼胜肽的每個核酸靜默變異隱含於各揭露的序列中。

【0135】 本發明之多核苷酸可由 DNA、RNA 及其衍生物構

成。如此技術領域所知，DNA 分子適當地由鹼基例如 A、T、C 及 G 構成，在 RNA 中 T 被置換為 U。此技術領域之述人士將了解非天然發生的鹼基也會包含在多核苷酸中。

【0136】 本發明之多核苷酸可編碼具有或不具有中介胺基酸序列(intervening amino acid sequence)的本發明之多種胜肽。例如，該中介胺基酸序列可提供該多核苷酸或轉譯的胜肽的切斷部位(例如酵素識別序列)。再者，本發明之多核苷酸可包含對編碼本發明胜肽之編碼序列的任何額外序列。例如本發明之多核苷酸可為包含表現該胜肽所需的調節序列之重組多核苷酸，或者可為具有標記基因的表現載體(質體)等。一般而言，此種重組多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多核苷酸而製備。

【0137】 重組及化學合成技術均可使用於生產本發明之多核苷酸。例如本發明之多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，本發明之多核苷酸可使用 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，多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。

V. 外吐小體(exosomes)

【0138】 本發明進一步地提供稱為外吐小體的胞間囊泡(intracellular vesicles)，其於表面呈現形成於本發明之胜肽與

HLA 抗原之間的複合物。外吐小體可由，例如，使用於日本專利申請案公開號 H11-510507 與 WO99/03499 所詳述的方法而製備，以及可由使用從接受治療和/或避免之病人所得的抗原呈現細胞(APCs)而製備。本發明之外吐小體可與相似於本發明的胜肽之方式，如疫苗般接種。

【0139】 包括在該複合物中的 HLA 抗原形式必須與需要治療及/或預防之個體的 HLA 抗原形式相符。例如，在日本人族群中，HLA-A2，特別是 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206 為普遍的，因此適合用於日本人病患之治療。高度表現於日本人與高加索人之中的 HLA-A2 型之使用有助於獲得有效的結果，且次型，例如 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206 也提供用途。一般在臨床上，預先調查需接受治療之病患的 HLA 抗原型，這可適當地選擇對此特別抗原具有高度結合親和力的胜肽或經由抗原呈現具有細胞毒性 T 淋巴細胞誘發性的胜肽。而且，爲了獲得具有高度結合親和力與細胞毒性 T 淋巴細胞誘導性兩者的胜肽，可基於天然產生之 KNTC2 的部分胜肽的胺基酸序列，進行 1、2 或數個胺基酸的取代、插入、刪除及/或添加。

【0140】 當對本發明之外吐小體使用 HLA-A2 型之 HLA 抗原時，具有擇自 SEQ ID NO：2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列的胜肽具有特別的效用。

【0141】 在一些實施例中，本發明之外吐小體爲於表面呈現本發明胜肽與 HLA-A2 抗原之複合物之外吐小體。

VI. 抗原呈現細胞(APCs)

【0142】 本發明也提供單離的抗原呈現細胞，其於表面呈

現形成於 HLA 抗原與本發明胜肽之間的複合物。抗原呈現細胞可來自受到治療及/或預防之病患，且可單獨或與包含本發明之胜肽、外吐小體或細胞毒性 T 淋巴球之其他藥物結合而以疫苗般被投予。

【0143】 抗原呈現細胞並不限於特定種類之細胞，可包括但不限於樹突細胞(DC)、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B 細胞與活化的 T 細胞，已知其於表面呈現蛋白質(proteinaceous)抗原因而被淋巴球所辨識。由於樹突細胞為具最強之細胞毒性 T 淋巴球誘導活性的代表性抗原呈現細胞，所以樹突細胞適合作為本發明之抗原呈現細胞。

【0144】 例如，本發明之抗原呈現細胞可獲自由誘導來自周邊血液單核細胞之樹突細胞(DC)，之後與本發明胜肽體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)接觸（刺激）。當本發明之胜肽投予至個體時，該個體身體內被誘導呈現本發明胜肽之抗原呈現細胞。因此，本發明之抗原呈現細胞可獲自在將本發明一或多個胜肽投予個體後，自此個體收集抗原呈現細胞。或者，本發明之抗原呈現細胞可獲自由個體收集之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸。

【0145】 本發明之抗原呈現細胞可以其本身或結合包括本發明胜肽、外吐小體或細胞毒性 T 淋巴球的其他藥物投予至個體以誘導個體中之抗癌免疫反應。例如，於生物體外(*ex vivo*)投予可包括下述步驟：

a：自第一個體收集抗原呈現細胞(APC)，

b：使步驟 a 之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸，以及

c：將步驟 b 之抗原呈現細胞投予第二個體。

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被配製且投予如疫苗，以治療及/或預防癌症，例如，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤，但不限於此。

【0146】 在本發明內容中，可使用本發明一或多個胜肽以製造可誘導抗原呈現細胞之醫藥組成物。本發明亦提供用於製造誘導抗原呈現細胞之醫藥組成物的方法或製程，其中此方法包含將本發明胜肽與藥學上可接受之載體混合或配製的步驟。

本發明也提供使用本發明胜肽以誘導抗原呈現細胞之用途。

【0147】 根據本發明之一態樣，本發明之抗原呈現細胞(APC)具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘發能力。在抗原呈現細胞之內容中，所述“細胞毒性 T 淋巴球誘發能力”意指當與 CD8 陽性 T 細胞接觸時，抗原呈現細胞誘導細胞毒性 T 淋巴球之能力。再者，“細胞毒性 T 淋巴球誘發能力”包括抗原呈現細胞誘導細胞毒性 T 淋巴球活化、細胞毒性 T 淋巴球增生、以細胞毒性 T 淋巴球促進目標細胞胞解、與藉由細胞毒性 T 淋巴球提高 IFN- γ 產生的能力。特別是，本發明之抗原呈現細胞具有誘導專一於 KNTC2 之細胞毒性 T 淋巴球的能力。具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力的抗原呈現細胞可藉由包括於體外(*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來製備。導入的基因可為 DNA 或 RNA 形式。導入方法的例子包括，並無特別限制，各種於此領域一般進行的方法，例如脂質體轉染(lipofection)、電穿孔法(electroporation)與磷酸鈣方法。更特別地，可進行如 Reeves ME et al., Cancer Res 1996, 56: 5672-7; Butterfield LH et al., J Immunol 1998, 161: 5607-13; Boczkowski D et al., J Exp Med 1996, 184: 465-72;日本專利公開號 JP2000-509281 中所述。藉由轉移該基因進入抗原呈現細胞，該基因於細胞中進行轉錄、轉譯等，之後所獲得之蛋白質經由第 I 型或第 II 型 MHC 處理，並經由一呈現途徑處理以呈現部分胜肽。或者，本發明之抗原呈現細胞(APC)可由含有單純使 APC 與本發明胜肽接觸的步驟之方法來製備。

在一些實施態樣中，本發明之抗原呈現細胞於其表面呈現 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物。

VII. 細胞毒性 T 淋巴球(CTLs)

【0148】 抗任何本發明胜肽所誘導之細胞毒性 T 淋巴球於體內(*in vivo*)增強以癌症細胞為標的之免疫反應，因此就其相似於胜肽而言，可使用作為疫苗。因此本發明提供單離的細胞毒性 T 淋巴球，其由本發明之任一胜肽被特異地誘導或活化。

【0149】 此細胞毒性 T 淋巴球可藉由下述方式獲得：(1) 將本發明胜肽投予至一個體；(2) 將來自個體之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞或周邊血液單核淋巴球與本發明之胜肽於體外(*in vitro*)接觸（刺激）；(3) 將 CD8 陽性 T 細胞或周邊血液單核淋巴球於體外(*in vitro*)與表面呈現 HLA 抗原與本發明胜肽

之複合物之抗原呈現細胞或外吐小體接觸；或(4)將 CD8 陽性 T 細胞導入編碼 T 細胞受體二次單元的多核苷酸或編碼 T 細胞受體各次單元之多核苷酸，其中由該次單元所形成的 T 細胞受體可結合細胞表面上之本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。此抗原呈現細胞或外吐小體可由上述方法製備。(4)之方法詳細被敘述於下方“VIII. T 細胞受體(TCR)”的段落中。

【0150】 本發明之細胞毒性 T 淋巴球可來自受到治療及/或預防之病患，可單獨或與因調節作用而包含胜肽、抗原呈現細胞或外吐小體的其他藥物結合投予。所獲得之細胞毒性 T 淋巴球對呈現本發明胜肽之目標細胞特異性地作用，例如用於誘導的相同胜肽。標靶細胞可為內生性表現 KNTC2 之細胞，例如癌細胞，或被以 KNTC2 基因轉染之細胞；及由於受到該胜肽刺激而於表面呈現本發明胜肽之細胞也可做為活化的細胞毒性 T 淋巴球攻擊的目標。

【0151】 在一些實施例中，本發明之細胞毒性 T 淋巴球可辨識於其表面上呈現 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物的細胞。在細胞毒性 T 淋巴球的內容中，所述“辨識細胞”意指經由其 TCR 而與呈現於該細胞表面之 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物結合，並顯示抗此細胞之特異性細胞毒性。於此“特異性細胞毒性”意指顯示抗呈現 HLA-A2 抗原與本發明胜肽之複合物的細胞之細胞毒性，但不抗其他細胞。因此，顯示抗呈現本發明胜肽之細胞的特異性細胞毒性之細胞毒性 T 淋巴球也包含於本發明中。具體地說，本發明之細胞毒性 T 淋巴球可辨識表現 KNTC2 與 HLA-A2 之細胞(例如，HLA-A2 陽性癌細

胞)，並且顯示抗此細胞之細胞毒性。

VIII. T 細胞受體(TCR)

【0152】 本發明也提供一組成物，其包括一或多個編碼 T 細胞受體二次單元之多核苷酸或編碼 T 細胞受體各次單元之多核苷酸，其中由此次單元所形成的 T 細胞受體能連接於形成於細胞表面之 HLA 抗原與本發明胜肽之複合體。使用其的方法也被關注。該 T 細胞受體次單元具有能力形成授與 T 細胞專一性對抗表現 KNTC2 之腫瘤細胞的 T 細胞受體。藉由使用本技術領域所知的方法，可確認編碼以本發明一或多個胜肽誘導之 CTLs 之 T 細胞受體次單元的 α -與 β -鏈的多核苷酸 (WO2007/032255 與 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如，較佳以 PCR 方法來分析 T 細胞受體(TCR)。用於分析之 PCR 引子可為，例如 5'-R 引子 (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') 為 5'側引子 (SEQ ID NO: 80)，及專一於 TCR α 鏈 C 區之 3-TRa-C 引子 (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO: 81)、專一於 TCR β 鏈 C1 區之 3-TRb-C1 引子 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO: 82)、或專一於 TCR β 鏈 C2 區之 3-TRbeta-C2 引子 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ ID NO: 83) 作為 3'側引子，但不限定於此。衍生的 T 細胞受體可以高親和力結合呈現本發明胜肽之目標細胞，且視需要於體內(*in vivo*)與體外(*in vitro*)媒介有效殺死表現本發明胜肽之目標細胞。

【0153】 編碼 T 細胞受體二次單元的多核苷酸或編碼 T 細胞受體各次單元的多核苷酸可併入適合之載體，例如反轉錄病

毒載體。這些載體為本技術領域所熟知。通常多核苷酸或包含其之載體可被轉移至 T 細胞（例如，CD8 陽性 T 細胞），例如來自病患之 T 細胞。本發明有利地提供現成(off-the-shelf)的組成物允許快速修飾病人所擁有之 T 細胞（或其他哺乳動物之 T 細胞）以快速簡單產生具有優秀之癌症細胞殺死特性的修飾 T 細胞。

【0154】 抗本發明胜肽之特定 T 細胞受體具有專一地辨識本發明一胜肽與一 HLA 分子之複合物的能力，當 T 細胞受體被呈現於 T 細胞表面時，給予 T 細胞抗呈現本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物的目標細胞之專一活性。上述複合物之特異性辨識可由任何已知的方法確認，較佳例子包含，使用 HLA 分子與本發明胜肽之 HLA 多元體染色分析、及 ELISPOT 分析。藉由 ELISPOT 分析，可確認藉由上述方法所製備之細胞毒性 T 淋巴球可專一地辨識目標細胞及細胞內傳遞此訊號。上述 TCR 可在該 TCR 存在該 T 細胞表面時提供 T 細胞毒性之確認也可以席之方法進行。較佳方法包括，例如抗 HLA 陽性目標細胞之細胞毒性活性之確認，例如鉻(chromium)釋放分析。

【0155】 本發明亦提供細胞毒性 T 淋巴球(CTL)，藉由以編碼 T 細胞受體二次單元的多核苷酸或編碼 T 細胞受體各次單元的多核苷酸轉導而製備，其中，由此 T 細胞受體次單元所形成之 T 細胞受體可與 HLA-A2 中例如 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 之 KNTC2 胜肽結合。

【0156】 經轉導之細胞毒性 T 淋巴球可於體內(*in vivo*)導向癌細胞，且可以習知培養方法於體外(*in vitro*)延展(例如

Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。本發明細胞毒性 T 淋巴球也可用來形成致免疫原組成物，有效於需要治療或保護之病患的癌症之治療及 / 或預防 (參見 WO2006/031221，其內容被引入做為參考)。

IX. 醫藥組成物

【0157】 由於 KNTC2 的表現，相對於正常組織中，在癌症中特異地升高，例如膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤，本發明之胜肽或多核苷酸可用於誘導抗癌或抗腫瘤細胞之免疫反應，因此用於癌症之治療及 / 或預防、及 / 或其轉移或術後復發之預防。因此，本發明提供醫藥組成物或醫藥劑，調配用於症之治療及 / 或預防、及 / 或其轉移或術後復發之預防，包含本發明至少一種胜肽或多核苷酸之該組合物或藥劑為活性成分。或者，本發明之胜肽可被表現於任何上述外吐小體或細胞表面，例如抗原呈現細胞(APC)，以作為醫藥組成物或醫藥劑。再者，標靶本發明任何一胜肽之上述細胞毒性 T 淋巴球(CTL)也可使用做為本發明之醫藥組成物或醫藥劑之活性成分。

【0158】 因此，本發明提供藥劑或組成物，包括至少一擇自下列中之活性成分：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼為本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 本發明之抗原呈現細胞；

(d) 本發明之外吐小體;及

(e) 本發明之細胞毒性 T 淋巴球。

【0159】 於此醫藥組成物或藥劑中，此胜肽、多胜肽、抗原呈現細胞及細胞毒性 T 淋巴球係以治療上或藥學上有效量存在。

本發明之醫藥組成物或藥劑也可使用如疫苗。在本發明內容中，所述“疫苗”（也意指為“致免疫原組成物”）意指一藥劑或組成物，藉由接種至動物而具有改善、增強及/或誘導抗腫瘤免疫力的能力。換言之，本發明提供用以誘導個體中抗癌之免疫反應的醫藥劑或組成物。

【0160】 本發明之醫藥組成物或藥劑可用於治療及/或抑制包括個體或患者的癌症，及/或預防其轉移或術後的復發，個體或患者包括人類及任何其它哺乳動物，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、狒狒及黑猩猩，特別是商業上的重要動物或家畜。在某些實施態樣中，本發明之醫藥劑或組成物可配製以投予 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體。

【0161】 在其它實施態樣中，本發明更提供一活性成分用於製備治療及/或預防癌症或腫瘤疾病、及/或預防其轉移或術後復發之醫藥組成物或藥劑之使用，此活性成分擇自於：

(a) 本發明之胜肽；

(b) 以可表現形式編碼為本發明胜肽之多核苷酸；

(c) 在表面呈現本發明胜肽之抗原呈現細胞或外吐小體；

以及

(d) 本發明之細胞毒性 T 淋巴球。

【0162】 或者，本發明更提供一活性成分用於治療及/或預防癌症或腫瘤、及/或預防其轉移或術後復發之使用，該活性成分擇自於：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼為本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 在表面呈現本發明胜肽之抗原呈現細胞；
- (d) 在表面呈現本發明胜肽之外吐小體；以及
- (e) 本發明之細胞毒性 T 淋巴球。

【0163】 或者，本發明更提供一種製備用於治療及/或預防癌症或腫瘤、及/或預防其轉移或術後復發之醫藥組成物或藥劑的方法或製程，其中此方法或製程包括配製一醫藥上或生理上可接受之載體與一活性成分，此活性成分擇自於：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼為本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 在表面呈現本發明胜肽之抗原呈現細胞；
- (d) 在表面呈現本發明胜肽之外吐小體；以及
- (e) 本發明之細胞毒性 T 淋巴球。

【0164】 在其它實施態樣中，本發明更提供一種製備用於治療及/或預防癌症或腫瘤、及/或預防其轉移或術後復發之醫藥組成物或藥劑的方法或製程，其中此方法或製程包括混合活性成分及醫藥上或生理上可接受之載體，其中活性成分擇自於：

- (a) 本發明之胜肽；

- (b) 以可表現形式編碼爲本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 在表面呈現本發明胜肽之抗原呈現細胞；
- (d) 在表面呈現本發明胜肽之外吐小體；以及
- (e) 本發明之細胞毒性 T 淋巴球。

【0165】 在其它實施態樣中，本發明也提供一種治療及/或預防癌症或腫瘤、及/或預防其轉移或術後復發的方法，其中該方法包括給予一個體擇自下列之至少一種活性成分：

- (a) 本發明之胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼爲本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 在表面呈現本發明胜肽之抗原呈現細胞；
- (d) 在表面呈現本發明胜肽之外吐小體；以及
- (e) 本發明之細胞毒性 T 淋巴球。

【0166】 根據本發明，具有擇自 SEQ ID NO：2、3、7、17、41、53 及 68 之胜肽被發現爲 HLA-A2 限制性抗原決定位胜肽，因此做爲可在一個體中誘導抗表現 HLA-A2 與 KNTC2 之癌症的有效及特異之免疫反應的候選物。因此，包含擇自 SEQ ID NO：2、3、7、17、41、53 及 68 之胺基酸序列的任一胜肽之醫藥組成物或藥劑特別適合投予 HLA 抗原爲 HLA-A2 的個體。此種藥劑或組成物中的胜肽含量可爲有效顯著誘導患有表現 KNTC2 之癌症患者體內之有效及特異的免疫反應的量。含有編碼任何此胜肽之多核苷酸(如，本發明之多核苷酸)的醫藥組成物或藥劑也同樣適用。

【0167】 本發明之醫藥組成物或藥劑所治療及/或預防的癌症包括任何與 KNTC2 相關的癌症，例如，包括，但不限於，

膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤，較佳為表現 HLA-A2 之癌症(即 HLA-A2 陽性癌症)。

【0168】除了上述活性成分之外，本發明之醫藥組成物或藥劑可含有其它具有可誘導抗癌症細胞之細胞毒性 T 淋巴球能力的胜肽、其它編碼其它胜肽的多核苷酸、其它呈現其它胜肽的細胞、及其類似物。此述具誘導抗癌細胞之細胞毒性 T 淋巴球能力的“其它”胜肽包括，但不限於，衍生自癌症特異性抗原的胜肽(如，已確定的 TAAs)。

【0169】若需要，本發明之醫藥組成物或藥劑可視需要包括其他治療物質為額外之活性成分，只要此物質不抑制本發明之活性成分例如任何本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體、抗原呈現細胞、細胞毒性 T 淋巴球的抗腫瘤功效。例如，配方可包括抗發炎物質、止痛劑、化療劑等。除了在藥劑本身包括其他治療物質外，也可將本發明之藥劑與一或多個其他醫藥組成物相繼或同時投予。藥劑與醫藥組成物的量取決於例如使用的醫藥組成物的形式、要治療之疾病與投藥計畫與路徑。

【0170】熟悉此技藝人士應瞭解，除了此處特別提及之成分外，本發明之醫藥組成物或藥劑可包括本技術領域中討論的配方形式所慣用的其他物質。

【0171】在本發明一實施態樣中，本發明之醫藥組成物或藥劑可被包裝於製造之商品與套組，該商品與套組包含有用於

被治療之疾病，例如癌症，的病理情況之材料。製造之商品可包括具有標籤之任何本發明之醫藥組成物或藥劑的容器。適合的容器包括瓶、小瓶(vials)與試管。容器可形成自各種材料，例如玻璃或塑膠。於容器上之標籤需指出組成物或藥劑為用來治療或預防疾病之一或多個情況。標籤也可標示投藥指示等。

【0172】 除了上述容器外，包括本發明之醫藥組成物或藥劑之套組可視需要更包括第二容器，其儲藏醫藥上可接受之稀釋液。可更包括從商業或使用者觀點所需要之其他材料，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仿單。

【0173】 本發明之醫藥組成物或藥劑可視需要被包裝於可包含有活性成分之一或多單位劑量形式之包裝或分配裝置。該包裝可例如包括金屬或塑膠箔，例如泡棉箱(blister pack)。該包裝或分配器可含有投藥指示。

(1)包含該胜肽之醫藥組成物

【0174】 本發明之胜肽可直接以醫藥組成物或藥劑投予，或者視需要以習知配方方法配製。在下述的例子，除了本發明胜肽外，可適當包含一般用於製藥的載體、賦形劑等無特別限制。載體的例子包括，但不限於，滅菌水、生理食鹽水、磷酸緩衝溶液與培養液體(culture fluid)等。而且，本發明之醫藥組成物或藥劑可包含安定劑、懸液劑、防腐劑、界面活性劑等。本發明之醫藥組成物或藥劑以抗癌目的使用。

【0175】 本發明之胜肽可組合製備，其包括兩個或更多個本發明之胜肽，以於體內(*in vivo*)誘導細胞毒性 T 淋巴球。胜

肽組合可採雞尾酒形式或可使用標準技術彼此共軛結合。例如，可化學連接或表現該胜肽如一單一融合多胜肽。結合之胜肽可為相同或不同。藉由投予本發明之胜肽，經由 HLA 抗原而高密度呈現胜肽於抗原呈現細胞上，之後誘導對形成於該呈現胜肽與 HLA 抗原之間的複合物專一反應的細胞毒性 T 淋巴球。或者，抗原呈現細胞（例如，樹突細胞）從個體移出且之後以本發明胜肽刺激以獲得於細胞表面呈現本發明任何胜肽之抗原呈現細胞。這些抗原呈現細胞可再投予至個體以誘導個體中之細胞毒性 T 淋巴球，因此可增加對腫瘤相關內皮細胞的侵犯。

【0176】 包含本發明任何胜肽為活性成分之治療及/或預防癌症之醫藥組成物或藥劑也可包含佐劑以有效建立細胞免疫力。或者，醫藥組成物或藥劑可與其他活性成分一起投予，或可被配製成顆粒而投予。佐劑指任何化合物、物質或組成物，當與具有免疫活性之蛋白質一起（或依次）投予時，增強抗該蛋白質之免疫反應。於此考慮之佐劑，包括於文獻(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)中所描述的那些。適合之佐劑的例子包括，但不限於，磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍亂毒素、沙門氏菌毒素、IFA(佛氏不完全佐劑 (Incomplete Freund's adjuvant))、CFA (佛氏完全佐劑 (Complete Freund's adjuvant))、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W 乳劑等。

【0177】 再者，該胜肽連結至數微米直徑小珠之微脂體 (liposome) 配方、顆粒配方，以及脂質連結至該胜肽之配製可通常使用。

【0178】 在另一實施態樣中，本發明胜肽也可以醫藥上可接受之鹽類形式被投予。鹽類之較佳例子包括鹼金屬鹽、金屬鹽、有機鹼鹽、有機酸鹽（例如，醋酸、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）與無機酸鹽（例如，鹽酸、磷酸、氫溴酸、硫酸等）。如此處所使用，“醫藥上可接受之鹽類”意指維持該化合物的生物有效性與特性且獲得自與無機酸或鹼，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、水楊酸等反應的鹽類。

【0179】 在一些實施態樣中，本發明之醫藥組成物或藥劑可更包括誘發細胞毒性 T 淋巴球的成分。脂質被定義為可體內誘發抗病毒抗原之細胞毒性 T 淋巴球的成分。例如，可將棕櫚酸殘基黏附至離胺酸殘基之 ϵ -與 α -胺基，之後連結至本發明之胜肽。脂質化胜肽可被直接投予於微胞或顆粒中、併入微脂體或乳化於佐劑中。脂質之另一例，大腸桿菌(*E. coli*)脂蛋白，例如三軟脂酸-S 甘油半胱胺醯醯-絲胺醯醯基絲胺酸 (tripalmitoyl-S-glycerylcysteiny-l-seryl-serine, P3CSS)，當共價附加至合適之胜肽時可用於誘發細胞毒性 T 淋巴球（參見，例如 Deres et al., *Nature* 1989, 342: 561-4）。

【0180】 投藥之適合方法的例子包括，但不限於口服、皮膚內、皮下、肌肉內、骨內、腹膜、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(如，直接注射)。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。本發明胜肽之醫藥上或治療上之有效量可投予須治療表現 KNTC2 之癌之個體。或

者，可將足以增強或誘導由細胞毒性 T 淋巴球媒介的免疫反應、及/或誘導對抗表現 KNTC2 之癌或腫瘤的細胞毒性 T 淋巴球的本發明胜肽之量投予患有表現 KNTC2 之癌的個體。本發明之胜肽劑量可根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法等適當投予，一般為 0.001 mg 至 1,000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 30 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，例如 0.5 mg 至 5 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合適的劑量。

(2)包含該多核苷酸之醫藥組成物

【0181】 本發明之醫藥組成物或藥劑也可包含以可表現形式編碼為本發明胜肽之核酸。此處，“可表現之形式”意指多核苷酸，當導入一細胞，會於體內(*in vivo*)表現成誘導抗腫瘤免疫之多胜肽。在一說明實施態樣中，感興趣之多核苷酸的核酸序列包括表現該多核苷酸所必須之調控要件。可裝配多核苷酸以達到穩定插入目標細胞之基因體（參見，例如敘述 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12, 對於同源重組卡匣載體之敘述。參見，例如 Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; 美國專利號 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647;與 WO 98/04720。DNA 輸送技術的例子包括“裸 DNA”、加速 (bupivacaine、聚合物、胜肽媒介) 遞送、陽離子脂質複合物與顆粒媒介 (“基因槍”) 或壓力媒介之遞送 (參見，例如美國專利號 5,922,687)。

【0182】 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，例如以一載體以表現編碼胜肽之核苷酸序列。藉由引入宿主，此重組之牛痘病毒表現致免疫原胜肽且因此引起免疫反應。免疫步驟中有效之牛痘載體與方法敘述於，例如美國專利號 4,722,848。另一載體為 BCG (Bacille Calmette Guerin)。BCG 載體敘述於 Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60 中。對於有效於治療投藥或免疫之其他多種載體，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。

【0183】 對患者遞送多核苷酸可直接，此例子中，可使該患者直接暴露於攜帶多核苷酸之載體，或者間接，於其例子中先於體外 (*in vitro*) 以感興趣之多核苷酸轉形於細胞，之後將該細胞移植於病患。此兩方法分別為已知，為體內 (*in vivo*) 與生物體外 (*ex vivo*) 之基因治療。

【0184】 基因治療之方法之大體回顧，參見 Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215)。應用於本發明之重組 DNA 技術中一般熟知的方法被於編者 Ausubel et al., in Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY,

1993; 與 Krieger, in *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990)所述。

【0185】 如同胜肽的投予，多核苷酸的投予可為口服、皮膚內、皮下、靜脈內、肌肉內、骨內、即/或腹膜注射等，且經由全身投藥或局部投藥至標的位置的鄰近區域(如，直接注射)。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。本發明多核苷酸之藥學上或治療上有效之量，可對於須治療表現 KNTC2 之癌的個體投予。或者，可將足以增強或刺激由細胞毒性 T 淋巴球媒介的免疫反應之多核苷酸的量，及/或誘導對抗表現 KNTC2 之癌或腫瘤的細胞毒性 T 淋巴球的本發明多核苷酸之量，對於罹有表現 KNTC2 之癌或腫瘤之個體投予。於適合載體中或於以編碼出本發明之胜肽的多核苷酸轉形之細胞中的多核苷酸的劑量可適合地調整，根據治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法等，本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.1 mg 至 30 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，可於每數天投藥一次至每數個月投藥一次。熟悉此技藝人士可輕易地確認合適且理想之劑量。

X. 使用胜肽、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒性 T 淋巴球的方法

【0186】 本發明之胜肽與多核苷酸可使用於製備或誘導抗原呈現細胞(APC)與細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。本發明之外吐小體與抗原呈現細胞(APC)也可用來製備或誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。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組合使用，只要添加的化合物不抑制胞毒性 T 淋

巴球(CTL)誘發能力。因此，任何上述之本發明醫藥組成物或藥劑可用來製備或誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。除此之外，包括胜肽或多核苷酸的醫藥組成物或藥劑也可用來製備誘導抗原呈現細胞，茲說明如下。

(1) 誘導抗原呈現細胞(APC)的方法

【0187】 本發明提供使用本發明之胜肽或多核苷酸來誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘發能力之抗原呈現細胞(APC)的方法。

【0188】 本發明之方法包括於體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或於體內(*in vivo*)將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸的步驟。例如，生物體外(*ex vivo*)誘導抗原呈現細胞的方法可包括下述步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；以及

b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸。

抗原呈現細胞並不限於特定種類之細胞，抗原呈現細胞的例子包括但不限於樹突細胞(DC)、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B 細胞與活化的 T 細胞，已知其於細胞表面表現蛋白質(proteinaceous)抗原以被淋巴球所辨識。較佳可使用樹突細胞，因為其為抗原呈現細胞中具有最強的細胞毒性 T 淋巴球誘發能力者。本發明任一胜肽可直接或與本發明之一或多種其他胜肽及/或一或多種衍生自 KNTC2 以外之腫瘤相關抗原(TAAs)的細胞毒性 T 淋巴球誘發胜肽組合使用。

【0189】 另一方面，當投予本發明胜肽至一個體時，抗原呈現細胞於體內與胜肽接觸，因此於個體之體內誘導具有細胞

毒性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。因此，本發明之方法可包括投予本發明胜肽至一個體以於個體體內誘導具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。相似地，當以可表現之形式投予本發明多核苷酸至一個體時，本發明胜肽被表現且於體內與抗原呈現細胞接觸，因此於個體之體內誘導具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。因此，本發明之方法可包括投予本發明多核苷酸至一個體以於個體體內誘導具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。

“可表現之形式”被描述於上述段落“IX. 藥劑或組成物”。

【0190】 本發明之方法可更包括將本發明多核苷酸導入抗原呈現細胞以誘導具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。例如，該方法可包括下述步驟：

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多核苷酸導入步驟 a 之抗原呈現細胞。

可如前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來執行步驟 b。

【0191】 或者，本發明方法可包括製備可專一誘導顯示抗 KNTC2 之細胞毒性 T 淋巴球的抗原呈現細胞(APC)的步驟，包含下述步驟之一：

(a) 將抗原呈現細胞與本發明胜肽於體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或於體內(*in vivo*)接觸；以及

(b) 將編碼出本發明胜肽之多核苷酸導入抗原呈現細胞。

【0192】 或者，本發明之方法可包含誘導具有細胞毒性 T 淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞(APC)之步驟，此方法包括擇

自下列步驟中之一步驟：

- (a) 將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸；及
- (b) 將編碼出本發明胜肽的多核苷酸導入抗原呈現細胞。

【0193】 本發明之方法可在體外(*in vitro*)、生物體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)進行。較佳為，本發明之方法在體外(*in vitro*)或生物體外(*ex vivo*)進行。用於誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘發能力之抗原呈現細胞(APC)的抗原呈現細胞，較佳可為表現 HLA-A2 抗原(即 HLA-A2 陽性 APCs)之抗原呈現細胞。此抗原呈現細胞(APC)可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自 HLA 抗原為 HLA-A2 之個體獲得的周邊血液單核細胞(PBMCs)來製備。以本發明方法所誘導之抗原呈現細胞可為於其表面呈現本發明胜肽與 HLA 抗原(HLA-A2 抗原)之複合物之抗原呈現細胞。當以本發明方法誘導之抗原呈現細胞被投予至一個體以誘導該個體中的抗癌免疫反應時，該個體較佳為取得抗原呈現細胞的同一個體。然而，該個體也可以是非該抗原呈現細胞提供者，只要該個體具有與抗原呈現細胞提供者相同之 HLA 型即可。

【0194】 在另一實施態樣中，本發明提供用於誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘發能力之抗原呈現細胞(APC)的藥劑或組成物，此藥劑或組成物包括一或多個本發明胜肽或多核苷酸。

【0195】 在另一實施態樣中，本發明提供本發明胜肽或編碼此胜肽之多核苷酸用於製造配製來誘導抗原呈現細胞之組成物中的用途。

【0196】 或者，本發明更提供本發明胜肽或編碼此胜肽之多核苷酸用於誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘發能力之抗原呈現細胞(APC)的用途。

【0197】 (2) 誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)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性 T 淋巴球的方法。

本發明也提供使用編碼 T 細胞受體二次單元之多核苷酸或編碼 T 細胞受體各次單元之多核苷酸來誘導細胞毒性 T 淋巴球的方法，以次單元形成之 T 細胞受體可辨識(結合於)在細胞表面上之本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。誘導細胞毒性 T 淋巴球的方法較佳包括選自下述步驟中至少一步驟：

a：將 CD8 陽性 T 細胞與抗原呈現細胞接觸，該抗原呈現細胞於表面呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物；

b：將 CD8 陽性 T 細胞與外吐小體接觸，該外吐小體於表面呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物；以及

c：將編碼 T 細胞受體二次單元之多核苷酸或編碼 T 細胞受體各次單元之多核苷酸導入 CD8 陽性 T 細胞，其中由該次單元形成的 T 細胞受體能夠辨識(結合於)細胞表面上之本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。

【0198】 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，個體體內的細胞毒性 T 淋巴球被誘導，且以表現 KNTC2 癌細胞為目標之免疫反應的強度被促進。因此，本發明之方法可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個體的步驟。

或者，藉由於生物體外(*ex vivo*)或於體外(*in vitro*)使用細胞毒性 T 淋巴球，也可誘導細胞毒性 T 淋巴球，且在誘導細胞毒性 T 淋巴球後，可將經活化之細胞毒性 T 淋巴球加回該個體。例如，該方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；

b：將步驟 a 之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸；以及

c：將步驟 b 之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞共同培養。

【0199】 於上述步驟 c 中與 CD8 陽性 T 細胞共同培養之抗原呈現細胞也可藉由將本發明之多核苷酸轉移入如前述段落“VI. 抗原呈現細胞(APC)”所述之抗原呈現細胞來製備，然而，本發明並不限於此，因而包括任何於表面有效呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物的抗原呈現細胞。

【0200】 此技術領域之人士可視需要使用於表面呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物的外吐小體來代替上述之抗原呈現細胞。亦即，本發明可包括於表面呈現 HLA 抗原與本發明胜肽之複合物的外吐小體與本發明胜肽共同培養之步驟。此種外吐小體可藉由前述於段落“V. 外吐小體”中之方法來製備。適用於本發明方法之抗原呈現細胞與外吐小體於表面呈現本發明胜肽與 HLA-A2 之複合物。

【0201】 而且，藉由將編碼 T 細胞受體二次單元的多核苷酸或編碼 T 細胞受體各次單元的多核苷酸導入 CD8 陽性 T 細胞也可誘導細胞毒性 T 淋巴球，其中由此次單元所形成之 T 細胞受體能於細胞表面結合於本發明胜肽與 HLA 抗原之複合物。此轉導可如前述段落“VIII. T 細胞受體(TCR)”中所述實施。

【0202】 本發明方法可於體外(*in vitro*)、生體外(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)實施。較佳為，本發明方法可於體外(*in vitro*)或生物體外(*ex vivo*)執行。用於誘導細胞毒性 T 淋巴球之 CD8 陽性 T 細胞可從獲得個體的周邊血液單核細胞以本技術領域熟知方法來製備。在較佳實施態樣中，CD8 陽性 T 細胞的提供者可為 HLA 抗原為 HLA-A2 之個體。由本發明方法所誘導之細胞毒性 T 淋巴球可辨識於表面呈現本發明胜肽與 HLA 抗原(如 HLA-A2)之複合物之細胞。此細胞毒性 T 淋巴球對於表面呈現本發明胜肽之細胞可顯示特異的細胞毒性，因此對表現 KNTC2 之細胞(例如，癌細胞)可顯示特異的細胞毒性。當以本發明方法誘導之細胞毒性 T 淋巴球被投予至一個體以誘導該個體中的抗癌免疫反應時，該個體較佳為與取得 CD8 陽性 T 細胞之個體相同者。然而，該個體也可以不同於 CD8 陽性 T 細胞提供者，只要該個體具有與 CD8 陽性 T 細胞提供者相同之 HLA 型即可。

【0203】 而且，本發明提供製造用於誘導細胞毒性 T 淋巴球之醫藥組成物之方法或製程，其中該方法或製程包括將本發明之胜肽與醫藥上接受之載體混合或配製的步驟。

【0204】 在另一實施態樣中，本發明提供誘導細胞毒性 T 淋巴球之組成物，其中該藥劑或組成物包括本發明之一或多個胜肽、一或多個多核苷酸、一或多個抗原呈現細胞、及/或一或多個外吐小體。

【0205】 在另一實施態樣中，本發明提供本發明胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體於製造配製誘導細胞毒性 T

淋巴球之組成物的用途。

或者，本發明更提供本發明胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體在誘導細胞毒性 T 淋巴球的用途。

XI. 誘導免疫反應的方法

【0206】 而且，本發明提供誘導抗 KNTC2 相關疾病之免疫反應的方法。所關注的疾病包括癌症，其例子包括，但不限於，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。較佳為，表現 HLA-A2 之癌症(即 HLA-A2 陽性癌症)。

【0207】 本發明方法可包括投予含有任何本發明胜肽或編碼其之多核苷酸的藥劑或組成物的步驟。本發明方法也關注呈現任何本發明胜肽之外吐小體或抗原呈現細胞的投予。細節參見“IX. 醫藥劑或組成物”之段落，特別是敘述本發明醫藥組成物作為疫苗用途的部分。而且，可使用於本發明之方法以誘導免疫反應的外吐小體與抗原呈現細胞，被詳細描述在前述“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性 T 淋巴球的方法”之(1)與(2)的段落。

【0208】 本發明也提供製造誘導抗癌免疫反應之醫藥組成物或藥劑之方法或製程，其中該方法或製程可包括將本發明之胜肽與醫藥上接受之載體混合或配製的步驟。

【0209】 或者，本發明方法可包括投予包含下列之本發明疫苗或醫藥組成物或藥劑的步驟：

- (a) 本發明胜肽；
- (b) 以可表現形式編碼爲本發明胜肽之多核苷酸；
- (c) 在表面呈現本發明胜肽之抗原呈現細胞；
- (d) 在表面呈現本發明胜肽之外吐小體；或
- (e) 本發明之細胞毒性 T 淋巴球。

【0210】 在本發明內容中，這些活性成份可治療過度表現 KNTC2 之癌症。此類癌症的例子包括，但不限於，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。

【0211】 因此，在投予包括上述活性成分之疫苗、醫藥組成物或藥劑之前，較佳確認從欲治療之個體中所收集的癌細胞或組織中 KNTC2 的表現程度，相較於從相同個體收集之正常細胞或組織，是否增加。因此，在一實施態樣中，本發明提供治療所需患者 KNTC2(過度)表現之癌症的方法，此方法包括下列步驟：

- i) 測定獲得自欲治療之癌症個體的生物樣本中 KNTC2 的表現程度；
- ii) 與正常控制組的 KNTC2 表現程度相比；以及
- iii) 投予患有相較於正常控制組 KNTC2 過度表現之癌症之個體擇自由上述(a)至(e)之至少一組成分。

【0212】 或者，本發明也可提供包含擇自上述(a)至(e)之至少一組成分之疫苗或醫藥組成物，被投予至患有過度表現

KNTC2 之癌症的個體中。換句話說，本發明更提供確認以本發明之多胜肽治療之個體的方法，此方法包括測定來自個體之生物樣本中的 KNTC2 表現程度的步驟，其中與 KNTC2 基因之正常控制程度相比，表現程度的增加表示該個體可能患有可以本發明胜肽治療之癌症。

【0213】 而且，在一較佳實施態樣中，個體的 HLA 型可在投予本發明之胜肽前被確認。HLA-A2 陽性個體被較佳選擇於本發明疫苗或醫藥組成物的投予。

【0214】 任何源自個體之細胞或組織皆可用於測定 KNTC2 的表現程度，只要其包括 KNTC2 轉錄或轉譯產物。合適的樣本例子包括，但不限於，身體組織及液體，例如血液、唾液與尿液。較佳為，來自個體之細胞或組織樣本包含細胞族群，其包括上皮細胞，更佳為癌化上皮細胞或源自癌組織之上皮細胞。而且，若需要，可自所獲得之身體組織或液體中純化細胞，之後作為源自個體之樣本使用。

【0215】 根據本發明，可測定獲得自一個體之生物樣本中的 KNTC2 表現程度。使用本技術領域已知方法可檢測 KNTC2 在轉錄（核酸）產物程度的表現程度。例如，藉由雜交方法（例如，北方雜交）使用探針可將 KNTC2 的 mRNA 定量。上述偵測可於一晶片或陣列上執行。陣列較佳使用在偵測 KNTC2 表現程度。利用 KNTC2 的序列資訊，熟悉此技藝人士可製備此探針。例如，KNTC2 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交標誌的強度。

【0216】 而且，藉由擴增的偵測方法(amplification-based detection method)（例如，RT-PCR），使用引子可將 KNTC2 的轉錄產物進行定量。此引子可根據 KNTC2 可獲得之序列資訊而製備。

【0217】 具體地為，本方法所使用之探針或引子於嚴厲條件、中度嚴厲條件、低度嚴厲條件下雜合至 KNTC2 的 mRNA。此述“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，較長序列之特定雜合在較高溫度下觀察到。一般而言，在一定義之離子強度與 pH 下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 50%與目標序列互補的探針雜合至目標序列而形成平衡的溫度（在一定義之離子強度與 pH 與核酸濃度下）。由於目標序列通常過量存在，所以在 T_m ，50%之探針被佔據而形成平衡。一般而言，嚴苛條件為於 pH 7.0 至 8.3 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），且對於短探針或引子（例如，10 至 50 個核苷酸），溫度至少約 30°C ，對於較長探針或引子，溫度至少約 60°C 。也可以添加去穩定試劑(destabilizing substances)，例如甲醯胺(formamide)，來達到嚴苛條件。

【0218】 本發明之探針或引子一般為實質上經純化的寡核苷酸。寡核苷酸一般包括核苷酸序列之一區域，該區域在嚴苛條件下雜合至包括 KNTC2 序列之核酸之連續意義股(consecutive sense strand) 核苷酸序列、或包括 KNTC2 序列之

核酸之反意義股(anti-sense strand) 核苷酸序列、或這些序列之自然發生突變體之至少約 2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50 或 25 鹼基。特別是，例如，在一較佳實施態樣中，具有 5-50 鹼基長度之寡核苷酸被使用為擴增被偵測基因的引子。更佳為，使用具有特定長度的寡核苷酸探針或引子，一般為 15-30 鹼基長度，來偵測 KNTC2 基因之 mRNA 或 cDNA。該長度可為至少 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，且探針與引子的長度可為 5-10 個核苷酸、10-15 個核苷酸、15-20 個核苷酸、20-25 個核苷酸與 25-30 個核苷酸。在較佳實施態樣中，寡核苷酸探針或引子的長度可擇自 15-25 個核苷酸。使用此寡核苷酸探針或引子之基因偵測的分析程序、裝置或試劑為本技術領域所熟知（例如，寡核苷酸微陣列或 PCR）。在這些分析中，探針或引子也可包括標籤(tag)或連結序列(linker sequence)。而且，可以可偵測之標誌或可被捕捉之親和配體來修飾探針或引子。或者，在雜合的偵測程序中，也可使用具有數百個鹼基（例如，約 100-200）至數千個（例如，約 1000-2000）鹼基長度的多核苷酸作為探針（例如，北方墨點分析或 cDNA 微陣列分析）。

【0219】 或者，可偵測 KNTC2 的轉譯產物以確認以本發明方法所治療之個體。例如，可偵測 KNTC2 蛋白質(SEQ ID NO: 79)之量。測定轉錄產物之 KNTC2 蛋白質量的方法包括免疫分析方法，使用專一辨識此 KNTC2 蛋白質之抗體。該抗體可為單株或多株。而且，該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，只要該片段或經修飾之抗體維持對 KNTC2 蛋白質的結合能力。這些抗體的製備方法為本技術領域所熟知，且任何方法皆可被使用於製備此種抗體與其等同物(equivalent)。

【0220】基於 KNTC2 基因轉譯產物而偵測 KNTC2 基因表現程度的另一方法，可使用抗 KNTC2 蛋白質之抗體經由免疫組織化學分析法測量染色強度。亦即，於此測量中，強的染色表示 KNTC2 蛋白質的存在/程度增加，同時表示 KNTC2 基因之高表現程度。

【0221】來自個體樣本的 KNTC2 基因的表現程度，若該表現程度高於 KNTC2 基因的控制程度（例如，於正常細胞中的表現程度），則可確認為增加，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。

【0222】該控制程度可在確認該癌細胞的同時，使用先前自一或多個健康個體所收集或儲存之樣本測定。而且，獲得自患有需治療之癌症的器官的非癌區域之正常細胞可被使用為正常控制。或者，該控制程度可根據疾病程度已知之個體之樣本中所偵測之 KNTC2 基因的表現程度的結果，藉由統計方法測定。而且，控制程度可來自先前已測試的細胞之表現輪廓的資料庫。而且，根據本發明一方面，生物樣本中之 KNTC2 基因的表現程度，可與從複數個參考樣本所確認之複數個控制程度作比較。較佳使用經來自該個體之生物樣本相似之組織型態的參考樣本所測定之控制程度。而且，較佳使用具有已知疾病

階段之群組中的 KNTC2 基因的表現程度的標準值(standard value)。該標準值可以本技術領域任何已知方法獲得。例如，平均值 ± 2 S.D.或平均值 ± 3 S.D.可使用為標準值。

【0223】 在本發明說明書中，已知為非癌化生物樣本所測定的控制程度可稱為“正常控制組程度”。另一方面，若自癌化生物樣本測定控制程度，則稱為“癌化控制程度”。

【0224】 樣本表現程度與控制程度之間的差異可被標準化至控制的核酸，例如管家基因(housekeeping gene)，的表現程度，該控制的核酸之表現程度已知在細胞的癌化與非癌化狀態間沒有不同。控制基因例如，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。

【0225】 當與正常控制程度相比，KNTC2 的表現程度增加，該個體可被確認為患有以本發明之醫藥組成物或藥劑投予而治療的癌症。

【0226】 本發明也提供選擇供使用前述本發明醫藥組成物或藥劑做為癌症治療之個體的方法，此方法包括下述步驟：

- a) 確認獲自患有癌症之個體之生物樣本中的 KNTC2 表現程度；
- b) 比較步驟 a)中所確認之 KNTC2 表現程度與正常對照程度；及
- c) 當 KNTC2 之表現程度相較於正常對照程度為增加時，選擇該個體為以本發明之醫藥組成物或藥劑進行癌症治療之個體。

【0227】 於一些實施態樣中，上述方法可進一步在上述步驟 a)-c)之前或之後包含確認具有選自 HLA-A2 之個體(即 HLA-A2 陽性個體)。HLA 分型(HLA typing)之方法為此技術領域所熟知。例如，以 PCR 為主之方法將 HLA 對偶基因分型為此領域所熟知。抗 HLA-A2 的抗體也是用於確認個體 HLA 型的適當工具。

【0228】 於一實施態樣中，本發明更提供包含本發明一或多個胜肽之診斷套組。

【0229】 癌症可藉由使用本發明胜肽來偵測對抗來自個體之樣本(例如血液、組織)中之本發明一或多個胜肽的抗體來診斷。

【0230】 若來自個體的樣本(例如血液樣本)含有抗本發明胜肽的抗體且此抗體被確認超過對照程度的截留值(cutoff value)，該個體被懷疑患有癌症。

【0231】 在另一實施態樣中，本發明之診斷套組可包括本發明之胜肽及與其結合之 HLA 分子。使用抗原胜肽與 HLA 分子偵測抗原專一細胞毒性 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特異性的細胞毒性 T 淋巴球之偵測方法，藉此可早期偵測癌症之復發及/或轉移。而且，該診斷套組可被用於適合以包含本發明胜肽為活性成分之醫藥組成物的個體篩選，或被用於醫藥組成物之治療功效的評估。

【0232】 特別是，根據已知方法(參見，例如 Altman JD et

al., Science. 1996, 274(5284): 94-6) , 可製備放射標誌之 HLA 分子與本發明胜肽之寡聚複合物, 例如四聚體。藉由使用複合物可進行診斷, 例如藉由將來自懷疑罹癌之個體的周邊血液淋巴球(peripheral blood lymphocytes)中之抗原-胜肽特異性細胞毒性 T 淋巴球進行定量。

【0233】 本發明更提供藉由使用此述之胜肽抗原決定位用以評估個體免疫反應之診斷試劑與方法。在本發明一實施態樣中, 本發明之胜肽被使用為評估或預測個體免疫反應的試劑。此評估的免疫反應藉由將免疫抗原(immunogen)(即本發明之胜肽)與免疫勝任(immunocompetent)細胞於體外(*in vitro*)或於體內(*in vivo*)接觸而誘導。在較佳實施態樣中, 用於評估免疫反應的免疫勝任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)。收集或分離該免疫勝任細胞的方法為此領域所周知。在某些實施態樣中, 可使用任何可導致可辨識並結合至胜肽抗原決定位的抗原特異性 CTL 產生的試劑。此胜肽試劑不須作為致免疫原。用於此類分析之分析系統包括相當新進之技術發展, 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。在較佳實施態樣中, 與胜肽試劑接觸之免疫勝任細胞可為抗原呈現細胞, 包括樹突細胞。

【0234】 例如, 本發明胜肽可使用於四聚體染色分析以評估因為暴露於腫瘤細胞抗原或免疫原後的抗原特異性細胞毒性 T 淋巴球的存在之周邊血液單核細胞。HLA 四聚體複合物可被使用來直接顯現抗原專一細胞毒性 T 淋巴球(參見, 例如

Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; 及 Altman et al, Science 174 : 94-96, 1996) , 並測定於周邊血液單核細胞之樣本中的抗原專一細胞毒性 T 淋巴球族群的頻率。使用本發明胜肽之四聚體試劑可如下敘述被產生。

【0235】 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 分子之胜肽，以產生三分子複合物。此複合物中，重鏈之羧基端於預先設計進入蛋白質之位置生物素化。之後加入卵白素(streptavidin)至該複合物以形成由三分子複合物與卵白素所組成之四聚體。藉由以螢光標誌卵白素的方式，該四聚體可用來染色抗原特異性細胞。之後可使用例如流式細胞技術來鑑定細胞。此類分析可被用於診斷與預後(prognostic)目的。以此流程鑑定之細胞也可用於治療目的。

【0236】 本發明之胜肽也可用於製造抗體，使用此領域習知技術（見 CURRENT PROTOCOLS IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; and Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) , 其有效作為診斷或監測癌症之試劑。此抗體可包括辨識 HLA 分子中的胜肽，即結合至胜肽-MHC 複合物之抗體。

【0237】 本發明胜肽與組成物具有多種額外的使用，部分已記載如本文。例如，本發明提供一種診斷或偵測以 KNTC2 多胜肽之表現為特徵的疾病。

【0238】 例如，可使用螢光素(fluorescein)標誌 HLA 多聚複合物染色，以允許抗原特異性 T 細胞直接定量的方法進行診斷（例如，Altman, J. D. et al., 1996, Science 274 : 94; Altman,

J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 10330) 。細胞內淋巴激素 (lymphokines) 之染色與干擾素 - γ 釋放分析或 ELISPOT 分析也已被提出。四聚體染色、細胞內淋巴激素染色與 ELISPOT 分析皆顯然比一般分析靈敏至少 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, 美國專利公開號 2004- 209295A) 、右聚體 (dextramer) (例如, WO 02/072631) 、鏈聚體 (streptamer) (例如, Nature medicine 6. 631-637 (2002)) 。

【0239】 例如, 在一些實施態樣中, 本發明提供診斷或評估投予本發明至少一種 KNTC2 胜肽之個體的免疫反應之方法, 該方法包括下列步驟:

(a) 在適合誘導對致免疫原特異性的細胞毒性 T 淋巴球的條件下, 使致免疫原與免疫勝任細胞接觸;

(b) 偵測或測定步驟 (a) 中所誘導之細胞毒性 T 淋巴球的誘發程度; 以及

(c) 使個體之免疫反應與細胞毒性 T 淋巴球的誘發程度形成關連。

【0240】 在本發明內容中, 致免疫原較佳包括至少一個 (a) 具有 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 或 68 之胺基酸序列的 KNTC2 胜肽、及具有該胺基酸序列的胜肽具有 1、2 或多個胺基酸取代所修飾之胜肽。此時, 適合誘導致免疫原特異性之細胞毒性 T 淋巴球的條件為本技術領域所熟知。例如, 可在致

免疫原存在下，於體外培養免疫勝任細胞以誘導致免疫原特異性之細胞毒性 T 淋巴球。爲了誘導致免疫原特異性之細胞毒性 T 淋巴球，可在細胞培養物中加入任何刺激因子。例如，IL-2 爲細胞毒性 T 淋巴球誘導之較佳刺激因子。

【0241】 在一些實施態樣中，可在治療前、期間及/或後，執行監測或評估欲以胜肽癌症療法治療之個體的免疫反應之步驟。一般而言，在癌症療法的方法中，重複地投予個體致免疫原性胜肽。例如，可每週投予致免疫原性胜肽達 3-10 週。因此，在癌症療法的方法中，可評估或監測個體之免疫反應。或者，對於癌症治療之評估或監測的步驟可在治療完成時。

【0242】 根據本發明，致免疫原特異性細胞毒性 T 淋巴球的促進誘導相較於控制組表示被評估或診斷之個體免疫性地對已投予之致免疫原反應。用以評估免疫反應之適合的控制組包括，例如當免疫勝任細胞未與任何胜肽接觸或與具有除了 KNTC2 胜肽以外的胺基酸序列(如任意的胺基酸序列)之控制胜肽接觸時的細胞毒性 T 淋巴球的誘導程度。

XII. 抗體

【0243】 本發明更提供結合至本發明胜肽之抗體。較佳抗體特異性結合至本發明胜肽且不會結合（或微弱結合）至其他胜肽。抗本發明胜肽之抗體可提供用於癌症診斷及預後分析。相似地，此抗體可用於癌症之治療、診斷、及/或預後。而且，細胞內表現之抗體（例如，單鏈抗體）可治療性用於治療涉及 KNTC2 表現的癌症，例如，但不限於膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、

食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。

【0244】 本發明也提供偵測及/或定量 KNTC2 蛋白質(SEQ ID NO: 79)或其片段之各種免疫分析，包括由擇自由 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組的胺基酸序列所組成的多胜肽。於本發明之內容，結合於 KNTC2 多胜肽之抗-KNTC2 抗體較佳為辨識由選自下述 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列所構成之胜肽。抗體的結合特異性可以抑制測試(inhibition test)確認。即為，由擇自 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 的胺基酸序列所構成之任何多胜肽片段的在下，欲分析之抗體與 KNTC2 全長多胜肽之間的結合被抑制時，被視為是特異性結合至該片段。在本發明內容中，此免疫分析以此領域所熟知之多種免疫分析程式中進行，包括，但不限於，各種放射免疫分析(radio-immunoassays)、免疫色層分析技術(immuno-chromatograph technique)、酵素連結免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)、酵素連結免疫螢光分析(enzyme-linked immunofluorescent assays, ELIFA)等。

【0245】 相關的免疫但為非抗體的分析也可包括 T 細胞致免疫原性分析(immunogenicity assay)(抑制或刺激)以及主要組織相容性複合物(major histocompatibility complex, MHC)結合分析。而且，本發明也關注可偵測表現 KNTC2 之癌症的免

疫顯影分析，其例子包括，但不限於，使用本發明之經標誌的抗體之放射顯像成像(radio scintigraphic imaging)法。此類分析提供臨床用途在 KNTC2 表現之癌症的偵測、監控與預後中，例如但不限於，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。

【0246】 本發明抗體可使用於任何形式中，例如單株或多株抗體，且可更包括獲得自將動物，例如兔子，以本發明胜肽進行免疫之抗血清、所有類型之多株或單株抗體、人類抗體與由基因重組產生之人源化抗體。

【0247】 本發明之抗體可辨識具有選自下述 SEQ ID NO: 2、3、7、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列的胜肽。合成寡胜肽之方法為此領域所周知。合成後，可在作為致免疫原前，選擇性地將胜肽純化。於本發明內文中，可將此寡胜肽(例如九胜肽或十胜肽)和載體接合或連結以增強致免疫原性。鑰孔血藍蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin, KLH)為熟知的載體。接合鑰孔血藍蛋白與胜肽的方法為本技術領域所熟知。

【0248】 或者，可將編碼出本發明胜肽或其片段的基因插入已知的表現載體，之後轉形至此述之宿主細胞。藉由任何標準方法，所需之胜肽可自宿主細胞之外部或內部重新獲得，之後可被使用作為抗原。或者，可使用表現胜肽之整個細胞或其細胞萃出物或化學合成胜肽作為抗原。

【0249】 任何哺乳動物皆可以該抗原免疫，但是較佳考慮

用於細胞融合之親代細胞的相容性。一般而言，可使用嚙齒目(Rodentia)、兔形目(Lagomorpha)或靈長目(Primate)。嚙齒目家族的動物包括，例如小鼠、大鼠與倉鼠。兔形目家族的動物包括，例如兔子。靈長目家族的動物包括，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)。

【0250】 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。更具體地，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。也可使用適合之載體來免疫。於上述免疫後，針對所需之抗體量增加，可以用標準方法檢驗血清。

【0251】 抗本發明胜肽之多株抗體的製備可藉由自被檢驗以增加血清中所需抗體的經免疫動物收集血液且以任何習知方法自血液分離血清。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和管柱，更進一步使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱純化此部分，可自僅辨識本發明胜肽之部分純化免疫球蛋白 G 或 M。

【0252】 為了製備用於本發明之單株抗體，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進行細胞融合。用於細胞融合之免疫細胞，可較佳為獲自脾臟。其他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)細胞，且較佳為具有以藥物篩選之融合細胞獲得特性的骨髓瘤細胞。

【0253】 可根據已知方法，例如 Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))的方法，將上述免疫細胞與骨髓瘤細胞融合。

【0254】 獲自細胞融合的融合瘤，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），而被篩選。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，可執行標準限制稀釋以篩選並複製產生所需抗體之融合瘤。

【0255】 除了為了製備融合瘤、以一抗原免疫之非人類動物的上述方法外，可以胜肽、表現胜肽之細胞或其細胞萃取物於體外免疫人類淋巴細胞，例如被 EB 病毒感染的人類淋巴細胞。之後，可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，以產生所需的人類抗體之融合瘤，所需之人類抗體可與被獲得之胜肽結合(未審查而公開的日本專利 JPS 63-17688)。

【0256】 將所獲得之融合瘤之後移植入小鼠之腹腔且萃取腹水。所獲得之單株抗體可藉由例如硫酸銨沉澱、蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱、DEAE 離子交換色層分析或與本發明胜肽結合

之親和管柱而純化。本發明之抗體不只可被使用於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。

【0257】 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，編碼抗體的 DNA 可自免疫細胞，例如產生抗體之融合瘤或經免疫的淋巴細胞被選殖，插入適合之載體，且導入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。

【0258】 本發明抗體可為抗體之片段或經修飾之抗體，只要其結合至一或多個本發明胜肽。例如，抗體片段可為 Fab、F(ab')₂、Fv 或單鏈 Fv (scFv)，其中來自重鏈與輕鏈的 Fv 片段藉由合適的连接序列來連接 (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，可構築編碼出抗體之基因、插入表現載體且表現於適合的宿主細胞中（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)）。

【0259】 抗體可藉由與各種分子，例如聚乙二醇

(polyethylene glycol, PEG)結合而修飾。本發明提供此述經修飾之抗體。藉由化學修飾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習知。

【0260】 或者，本發明之抗體可獲得為嵌合抗體，介於來自非人抗體之可變區與來自人類抗體之固定區，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(CDR)序列取代人類抗體對應之序列可執行人源化（參見，例如 Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)）。因此，此類人源化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整之人類可變區已被來自非人種類之對應序列取代。

【0261】 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，體外方法包括呈現於噬菌體上之人類抗體片段的重組資料庫的使用（例如，Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)）。相似地，藉由將人類免疫球蛋白基因座(loci) 引入轉殖動物，例如於其中內生免疫球蛋白基因已被部分或完全去活化的小鼠，可製造人類抗體。此方法被敘述，例如於美國專利號 6,150,584, 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

【0262】 獲自上述之抗體可被純化為同質(homogeneity)。例如，根據用於一般蛋白質的分離與純化的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

如親和管柱、過濾、超過濾、鹽析、透析、對鈉十二烷基的硫酸鹽聚丙稀醯胺凝膠電泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis)、等電聚焦法(isoelectric focusing)的使用可分開與分離抗體 (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))，但不限於此。蛋白質 A 管柱與蛋白質 G 管柱可被使用為親和管柱。使用之蛋白質 A 管柱包括，例如 Hyper D、POROS 與 Sepharose F.F. (Pharmacia)。

【0263】 除了親和色層分析外，適合的色層分析技術的例子包括，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。

【0264】 例如，可使用吸光度之測量、酵素連結免疫吸附分析(ELISA)、酵素免疫分析(EIA)、放射免疫分析(RIA)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(ELISA)中，本發明抗體固定於一培養盤上，將本發明胜肽置於該培養盤，之後提供含有所需抗體之樣本，例如，產生抗體之細胞的培養懸浮液或經純化的抗體。之後，提供辨識第一抗體且被標誌的酵素，例如鹼性磷酸酶之第二抗體，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。可使用胜肽片段，例如，C-端或 N-端片段，作為抗原，以評估抗體的結合性。根據本發明，可使用 BIAcore (Pharmacia)來評估抗體的活性。

XII. 載體與宿主細胞

【0265】 本發明也提供載體與宿主細胞，於其導入編碼本發明胜肽之核苷酸。本發明之載體有用於作為宿主細胞中本發明多核苷酸，特別是 DNA，之載體，以表現本發明胜肽，或為基因治療而投予本發明核苷酸。

【0266】 當選擇 *E. coli* 為宿主細胞且載體被擴增且大量製造於 *E. coli*（例如，JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1Blue）中時，載體應具有適合於 *E. coli* 中擴增之“ori”與適合篩選轉形 *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抗藥基因）。例如，可使用 M13-系列載體、pUC-系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。而且，pGEM-T、pDIRECT 與 pT7 也可被用來次選殖與萃取 cDNA 與上述載體。當載體被用來產生本發明胜肽時，表現載體可為有用。例如，要被表現於 *E. coli* 中的表現載體應具有上述特徵以被擴增於 *E. coli* 中。當使用 *E. coli*，例如 JM109、DH5 alpha、HB101 或 XL1 Blue 為宿主細胞時，載體應具有啟動子(promoter)，例如 lacZ 啟動子(Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), araB promoter (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988))、T7 啟動子或類似物，其可有效表現所需基因於 *E. coli* 中。在那方面，

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。而且，載體也可含用於胜肽分泌之訊號序列。引導被分泌之胜肽至 *E. coli* 的胞膜間區 (periplasm) 的訊號序列例如 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。

【0267】 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，pZIpcneo)、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) 可被用來生產本發明之多胜肽。

【0268】 爲了在動物細胞，例如 CHO、COS 或 NIH3T3 細胞中表現載體，該載體應具有表現於此類細胞中所必須的啓動子，例如 SV40 啓動子 (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979))、MMLV-LTR 啓動子、EF1 alpha 啓動子 (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990))、CMV 啓動子等，且較佳有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)。具有這些載體特徵之已知載體的例子包括,例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 與 pOP13。

【0269】 以下,參照實施例詳細說明本發明。然而,下列物質、方法及實施例可有助於本技術領域人士製造及使用本發明之實施例,實施例僅限於描述本發明之範疇,不可用於限制本發明之範圍。由於本技術領域人士可輕易地了解,所以可使用類似或相等於本發明說明書所示之方法及物質來完成或測試本發明。

【實施例】

【0270】 實施例 1

材料與方法

細胞株

C1R、HLA-A、B 陰性突變淋巴母細胞樣細胞株及 COS7、非洲綠猴腎細胞株向 ATCC 購買。

穩定表現 HLA-A*0201 之刺激細胞的產生

【0271】 使用表現 HLA-A*0201 之 C1R 穩定細胞株(C1R-A02)作為刺激細胞(stimulator cell)。為了產生穩定的細胞株,以 Neon 轉染系統(Invitrogen)進行 1350V、20ms 脈衝三次的電穿孔。將 HLA-A*0201 構築體以帶有抗新黴素(neomycin)基因之 pcDNA3.1 載體(Invitrogen)轉染。為了篩選穩定轉染的細胞,在轉染後第 2 天開始 G418(Invitrogen)的篩選。培養後二星期,將細胞置於添加 G418 的培養基之一 96 孔盤。30 天後,以 FACS (BD Biosciences)分析增殖細胞的 HLA-A*0201

表現。

衍生自 KNTC2 之胜肽的候選物篩選

【0272】

使用 “NetMHC3.2” 結合預測伺服器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12;20(9):1388-97)來預測結合於 HLA-A*0201 分子的衍生自 KNTC2 的九胜肽及十胜肽。此等胜肽依標準固相合成法利用生合成(Biosynthesis) (Lewisville, Texas)合成，並以逆向高效液體層析(HPLC)純化。分別藉由分析 HPLC 與質譜分析法確認這些胜肽之純度(> 90%)與身份(identity)。將胜肽溶解於二甲基亞砜(dimethylsulfoxide, DMSO)中於 20 mg/ml 且儲存於-80 °C。

體外(*in vitro*)誘導細胞毒性 T 淋巴球

【0273】

使用來自單核白血球之樹突細胞(DC)做為抗原呈現細胞以誘導抗呈現於人類白血球組織抗原(HLA)上之胜肽的細胞毒性 T 淋巴球反應。樹突細胞如先前文獻所述，產生於體外 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。特別地，以 Ficoll-Plaque (Pharmacia)溶液自一正常自願者(HLA-A*0201 陽性)分離周邊血液單核細胞，經由貼附至一塑膠組織培養盤(Becton Dickinson)而分離，因此使該細胞豐富如單核白血球部分。將富含單核白血球群培養在 1000 U/ml 之顆粒-巨噬細胞群落刺激因子(granulocyte-macrophage

colony-stimulating factor, GM-CSF) (R&D System)及 1000 U/ml 之介白素(interleukin, IL)-4 (R&D System)存在下之含 2%熱去活性自體血清 (autologous serum, AS)之 AIM-V 培養基 (Invitrogen)中。培養 7 天後，於 37°C 於 AIM-V 培養基中，在 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 β -2 微球蛋白(beta 2-microglobulin)存在下，以 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之各合成胜肽脈衝(pulsed)細胞激素誘導之樹突細胞 3 小時。所產生之細胞顯示在細胞表面表現樹突細胞相關分子，例如 CD80、CD83、CD86 與 HLA Class II (資料未顯示)。之後以 X-射線(20 Gy)使這些經胜肽脈衝之樹突細胞去活性，並將其以 1 : 20 之比例與自體 CD8 陽性 T 細胞混合，CD8 陽性 T 細胞藉由 CD8 陽性分離套組 (Dynal)之陽性篩選而獲得。將這些培養物設置於 48 孔盤(Corning)；各孔含 1.5×10^4 個經胜肽脈衝之樹突細胞、 3×10^5 個 CD8 陽性 T 細胞與 10 ng/ml 之 IL-7 (R&D System) 於 0.5 ml 之 AIM-V/2%自體血清培養基中。三天之後，以 IL-2 (CHIRON)添加至培養物至終濃度為 20 IU/ml。第 7 天與第 14 天更以經自胜肽脈衝之樹突細胞進一步刺激 T 細胞。以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，將細胞毒性 T 淋巴球進行抗經胜肽脈衝之 C1R-A02 細胞(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)。

細胞毒性 T 淋巴球擴張步驟

【0274】 使用與 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性 T 淋巴球。將全部 5×10^4 個細胞毒性 T 淋巴球(CTL)懸浮於 25 ml 之含有兩種人類 B 類淋巴母細胞株之 AIM-V/5% 自體血清培養基，在 40 ng/ml 之抗-CD3 單株抗體(Pharmingen)存在下，以 MMC(Mitomycin C)去活化。在開始培養 1 天後，將 120 IU/ml 之 IL-2 加入培養基中。於第 5、8、11 天，以新鮮之含 30 IU/ml 之 IL-2 的 AIM-V/5%自體血清培養基供給培養基(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)。

細胞毒性 T 淋巴球選殖株(clone)的建立

【0275】 — 96 圓底(round-bottomed)微效價盤(Nalge Nunc International)稀釋為每孔具有 0.3、1 與 3 個細胞毒性 T 淋巴球孔。細胞毒性 T 淋巴球與每孔 1×10^4 個細胞孔之兩種人類 B 類淋巴母細胞樣細胞株、30 ng/ml 之抗-CD3 抗體及 125 IU/ml 之 IL-2 於全部為每孔 150 μ l 之含 5%自體血清的 AIM-V 培養基中一起培養。10 天後，於培養基中加入 50 μ l/孔之 IL-2 以達到 125 IU/ml IL-2 之最終濃度。於第 14 天測試細胞毒性 T 淋巴球之活性，使用上述相同方法擴張細胞毒性 T 淋巴球選殖株(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)。

特異性細胞毒性 T 淋巴球(CTL)活性

【0276】 爲了測試特異性細胞毒性 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。製備經胜肽脈衝之 C1R-A02 細胞(1×10^4 /孔)作爲刺激細胞。培養於一 48 孔盤之細胞，CTL 細胞株和 CTL 選殖株做爲應答細胞(responder cell)。依製造商步驟執行 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。

強力表現目標基因及/或 HLA-A*0201 之細胞的建立

【0277】 藉由 PCR 將編碼目標基因之開放讀框、HLA-A*0201 的 cDNA 擴增。將 PCR 放大產物選殖進入表現載體。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen)，根據製造步驟將質體轉染進 COS7，其爲目標基因和 HLA-A*0201-無效的細胞株。於轉染後 2 天，以 versene (Invitrogen)收集經轉染的細胞且使用爲細胞毒性 T 淋巴球活性分析之目標細胞(5×10^4 細胞/孔)。

結果

衍生自 KNTC2 之 HLA-A*0201 結合胜肽的預測

【0278】 表 1a 與 1b 顯示以高結合親和力排序的 HLA-A02 結合 KNTC2 之九胜肽及十胜肽。篩選並分析總共 76 種具有 HLA-A02 結合活性的胜肽，以確定抗原決定位胜肽。

表 1a、結合衍生自 KNTC2 之九胜肽的 HLA-A*0201

起始位置	胺基酸序列	Kd(nM)	SEQ ID NO
330	GLNEEIARV	14	1
131	FLYGFLCPS	19	2
181	IVAALVWLI	21	3
274	ALNEQIARL	25	4
549	GLSEAMNEL	30	5
327	KLNGLNEEI	59	6
184	ALVWLIDCI	98	7
588	MVATHVGSV	124	8
464	LLNETEEEI	126	9
599	HLEEQIAKV	127	10
323	ILDQKLNGL	162	11
581	NLQRLLEMV	182	12
355	IIDNQKYSV	289	13
91	FIQQCIRQL	325	14
449	CLVKYRAQV	356	15
176	HTWPHIVAA	451	16
127	KIFTFLYGF	454	17
481	GLEDTLEQL	458	18
180	HIVAALVWL	478	19
417	KLARKLKLI	550	20
218	GIMHNKLFL	831	21
163	ALSKSSMYT	1032	22
585	LLEMVATHV	1060	23
72	GIFSSSEKI	1498	24
411	QLAEYHKLA	1592	25
129	FTFLYGFLC	1659	26
410	TQLAEYHKL	1725	27
560	VQREYQLVV	1938	28
564	YQLVVQTTT	2253	29
492	MITESKRSV	3246	30
502	TLKEEVQKL	3280	31
534	SLEKHKHLL	3460	32
485	TLEQLNAMI	3546	33
316	NLESHSAIL	4545	34
361	YSVADIERI	4545	35

【0279】

表 1b、結合衍生自 KNTC2 之十胜肽的 HLA-A*0201

起始位置	胺基酸序列	Kd(nM)	SEQ ID NO
584	RLLEMVATHV	24	36
131	FLYGFLCPSY	37	37
313	YMSNLESHA	51	38
393	KLWNEELKYA	55	39
163	ALSKSSMYTV	56	40
127	KIFTFLYGFL	135	41
125	FLKIFTFLYG	164	42
354	NIIDNQKYSV	245	43
113	SMKSLQAPSV	305	44
491	AMITESKRSV	410	45
463	ELLNETEEEI	532	46
180	HIVAALVWLI	564	47
187	WLIDCIKHT	586	48
162	FALSKSSMYT	668	49
614	CMSEDLSENI	879	50
256	DLFNVDFAKL	1047	51
509	KLDDLYQQKI	1133	52
322	AILDQKLNGL	1184	53
15	SMQELRSQDV	1270	54
183	AALVWLIDCI	1330	55
541	LLESTVNQGL	1339	56
133	YGFLCPSYEL	1489	57
223	KLFLDYTIKC	1616	58
273	RALNEQIARL	1618	59
225	FLDYTIKCYE	1778	60
587	EMVATHVGSV	1815	61
135	FLCPSYELPD	1826	62
228	YTIKCYESFM	2153	63
253	KLKDLFNVDA	2196	64
129	FTFLYGFLCP	2494	65
581	NLQRLLEMVA	2681	66
168	SMYTVGAPHT	2717	67
185	LVWLIDCIKI	2778	68
176	HTWPHIVAAL	3257	69
155	FKDLGYPFAL	3439	70

259	NVDAFKLESL	3792	71
236	FMSGADSFDE	4152	72
219	IMHNKLFLDY	4307	73
327	KLNGLNEEIA	4308	74
298	KLKASLQGDV	4873	75
580	NNLQRLLEMV	4935	76

起始位置為由 KNTC2 的 N 端開始的胺基酸的數目。
解離常數[Kd (nM)]來自 “NetMHC3.2”。

以衍生自 HLA-A*0201 限制之 KNTC2 的推定胜肽的 CTL 的誘導

【0280】 依據“材料與方法”中所述之步驟，產生對於衍生自 KNTC2 胜肽的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。利用 IFN- γ ELISPOT 分析(第 1 圖)偵測胜肽特異性 CTL 活性。孔編號#8 以 KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2)誘導(a)，編號#4 以 KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3)誘導(b)，編號#7 以 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)誘導(c)，編號#5 以 KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO:17)誘導(d)，編號#3 以 KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO:41)誘導(e)，編號#2 以 KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO:53)誘導(f)，編號#6 以 KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO:68)誘導(g)，證實相較於控制組顯示有效的 IFN- γ 的產生。另一方面，僅管此胜肽具有與 HLA-A*0201 結合的潛力，以表 1a 及表 1b 所示之其它胜肽刺激，未偵測到特異性 CTL 活性。關於陰性數據，在 KNTC2-A02-9-330 (SEQ ID NO: 1)誘導 CTL (h)中沒有觀察到特異性 IFN- γ 的產生。綜上所述，此結果推測由這 7 個衍生自 KNTC2 的篩選胜肽可誘導有效的 CTLs。

建立抗 KNTC2 衍生胜肽的 CTL 細胞株及選殖株

【0281】 以 IFN- γ ELISPOT 分析偵測含 KNTC2-A02-9-131(SEQ ID NO:2)之孔編號#8(a)、含 KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3)之孔編號#4(b)、含 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)之孔編號#7(c)中顯示胜肽特異性 CTL 活性之細胞擴張且建立細胞株。這些 CTL 細胞株的 CTL 活性可利用 IFN- γ ELISA 進行檢測(第 2 圖)。這些細胞毒性 T 淋巴球(CTL)細胞株證實，相對於未以胜肽脈衝之目標細胞，對以對應的胜肽脈衝的目標細胞顯示有效的 IFN- γ 的產生。而且細胞毒性 T 淋巴球(CTL)選殖株係以”材料與方法”中之 CTL 細胞株經限制性稀釋而建立，對抗以對應的胜肽脈衝的 C1R-A02 細胞之 CTL 選殖株的 IFN- γ 的產生，以 IFN- γ ELISA 分析。有效的 IFN- γ 的產生在以 KNTC2-A02-9-131(SEQ ID NO:2)(a)、以 KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3)(b)、以 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)(c)刺激之 CTL 選殖株中觀察到(第 3 圖)。

抗表現 KNTC2 與 HLA-A*0201 之目標細胞的特異性 CTL 活性

【0282】 檢測因抗 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)胜肽所建立之 CTL 細胞株產生辨識表現 KNTC2 與 HLA-A*0201 分子之目標細胞的能力。將轉染全長 KNTC2 與 HLA-A*0201 兩基因的 COS7 細胞 (表現 KNTC2 與 HLA-A*0201 基因之目標細胞的特定模式)作為刺激細胞(stimulator cells)，且以轉染 KNTC2 或 HLA-A*0201 其中一者的細胞作為控制組。如第 4 圖所示，以 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)胜肽刺激的 CTL

細胞株顯示有效的抗表現 KNTC2 及 HLA- A*0201 的 COS7 細胞之 CTL 活性。另一方面，控制組則未發現顯著的特異性 CTL 活性。因此，此數據結果清楚證實 KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7) 胜肽為內源性處理及表現於具 HLA-A*0201 分子的目標細胞，且可被 CTL 辨識。此結果表示此衍生自 KNTC2 的胜肽可作為癌症疫苗，應用於患有表現 KNTC2 腫瘤的患者。

抗原胜肽的同源性分析

【0283】 以 KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2)、KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3)、KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)、KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO:17)、KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO:41)、KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO:53)、及 KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO:68) 刺激的細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 與衍生自其它已知對免疫系統有致敏性之分子胜肽同源。為了排除這種可能，這些胜肽的同源性分析可使用 BLAST 演算法 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 進行分析，顯示序列間無顯著同源性。同源性分析的結果顯示 KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2)、KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO:3)、KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO:7)、KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO:17)、KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO:41)、KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO:53)、及 KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO:68) 序列為獨一無二，因此，就我們所知，這些分子幾乎不可能會對某些不相關的分子產生非預期的免疫反應。

綜上所述，衍生自 KNTC2 的新穎 HLA-A*0201 抗原決定

位胜肽可應用於癌症免疫療法領域。

【產業利用性】

【0284】 本發明提供提供新穎的抗原決定位，可誘導有效且特異的抗-腫瘤免疫反應且可應用於廣泛的各種癌症。此胜肽可作為與 KNTC2 相關疾病的胜肽疫苗，例如，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性粒細胞性白血病(CML)、結腸直腸癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)及軟組織腫瘤。

【0285】 雖已於此詳述本發明與提及其特定實施例，但需瞭解前述敘述本質為示範與解釋且意為說明本發明與其較佳實施例。於例行實驗之中，熟悉此技藝人士可立即瞭解在不脫離本發明之精神下其可實行各種改變與修飾，其邊界與範圍被所附申請專利範圍所定義。

【符號說明】

無。

序列表

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

<120> KNTC2 胜肽及含此胜肽之疫苗

<130> ONC-A1304

<150> US 61/777,334

<151> 2013-03-12

<160> 84

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 1

Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 2

Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser

1 5

<210> 3

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 3

Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 4

Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 5

Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu
1 5

<210> 6

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 6

Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 7

Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 8

Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
1 5

<210> 9

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 9

Leu Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 10

His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 11

Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu
1 5

<210> 12

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 12

Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 13

Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 14

Phe Ile Gln Gln Cys Ile Arg Gln Leu
1 5

<210> 15

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 15

Cys Leu Val Lys Tyr Arg Ala Gln Val
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 16

His Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 17

Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe
1 5

<210> 18

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 18

Gly Leu Glu Asp Thr Leu Glu Gln Leu
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 19

His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 20

Lys Leu Ala Arg Lys Leu Lys Leu Ile
1 5

<210> 21

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 21

Gly Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 22

Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 23

Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val
1 5

<210> 24

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 24

Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 25

Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu Ala
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 26

Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys
1 5

<210> 27

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 27

Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 28

Val Gln Arg Glu Tyr Gln Leu Val Val
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 29

Tyr Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr
1 5

<210> 30

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 30

Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 31

Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 32

Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu
1 5

<210> 33

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 33

Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 34

Asn Leu Glu Ser His Ser Ala Ile Leu
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 35

Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg Ile
1 5

<210> 36

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 36

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

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 37

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

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 38

Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His Ser Ala
1 5 10

<210> 39

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 39

Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys Tyr Ala
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 40

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

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 41

Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu
1 5 10

<210> 42

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 42

Phe Leu Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 43

Asn Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 44

Ser Met Lys Ser Leu Gln Ala Pro Ser Val
1 5 10

<210> 45

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 45

Ala Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 46

Glu Leu Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 47

His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile
1 5 10

<210> 48

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 48

Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile His Thr
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 49

Phe Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 50

Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile
1 5 10

<210> 51

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 51

Asp Leu Phe Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 52

Lys Leu Asp Asp Leu Tyr Gln Gln Lys Ile
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 53

Ala Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu
1 5 10

<210> 54

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 54

Ser Met Gln Glu Leu Arg Ser Gln Asp Val
1 5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 55

Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 56

Leu Leu Glu Ser Thr Val Asn Gln Gly Leu
1 5 10

<210> 57

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 57

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

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 58

Lys Leu Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 59

Arg Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu
1 5 10

<210> 60

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 60

Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 61

Glu Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
1 5 10

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 62

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

<210> 63

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 63

Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 64

Lys Leu Lys Asp Leu Phe Asn Val Asp Ala
1 5 10

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

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 65

Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro
1 5 10

<210> 66

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 66

Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 67

Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His Thr
1 5 10

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 68

Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 69

* <211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 69

His Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala Leu
1 5 10

● <210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 70

Phe Lys Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Ala Leu
1 5 10

● <210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 71

Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu
1 5 10

<210> 72

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 72

Phe Met Ser Gly Ala Asp Ser Phe Asp Glu
1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 73

Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 74

Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala
1 5 10

<210> 75

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 75

Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln Gly Asp Val
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 衍生自 KNTC2 之胜肽

<400> 76

Asn Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val
1 5 10

<210> 77
<211> 2209
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 77
actgcgcgcg tcgtgcgtaa tgacgtcage gccggcggag aatttcaaat tcgaacggct 60

ttggcggggcc gaggaaggac ctggtgtttt gatgaccgct gtctgttcta gcagatactt 120

gcacggtttta cagaaattcg gtccctgggt cgtgtcagga aactggaaaa aaggtcataa 180

gcatgaagcg cagttcagtt tccagecgtg gtgctggccg cctctccatg caggagttaa 240

gatcccagga tgtaaataaa caaggcctct atacccctca aaccaaagag aaaccaacct 300

ttggaaagtt gagtataaac aaaccgacat ctgaaagaaa agtctcgcta tttggcaaaa	360
gaactagtgg acatggatcc cggaatagtc aacttggtat attttccagt tctgagaaaa	420
tcaaggaccc gagaccactt aatgacaaag cattcattca gcagtgtatt cgacaactct	480
gtgagtttct tacagaaaat ggttatgcac ataatgtgtc catgaaatct ctacaagctc	540
cctctgttaa agacttctg aagatcttca cttttcttta tggttctctg tgccccctcat	600
acgaacttcc tgacacaaag tttgaagaag aggttccaag aatcttttaa gaccttgggt	660
atccttttgc actatccaaa agctccatgt acacagtggg ggctcctcat acatggcctc	720
acattgtggc agccttagtt tggctaatag actgcatcaa gatacatact gccatgaaag	780
aaagctcacc tttatttgat gatgggcagc cttggggaga agaaactgaa gatggaatta	840
tgcataataa gttgtttttg gactacacca taaaatgcta tgagagtttt atgagtgggtg	900
ccgacagctt tgatgagatg aatgcagagc tgcagtcaaa actgaaggat ttattttaatg	960
tggatgcttt taagctggaa tcattagaag caaaaaacag agcattgaat gaacagattg	1020
caagatttga acaagaaaga gaaaaagaac cgaatcgtct agagtcgttg agaaaactga	1080
aggcttcctt acaaggagat gttcaaaagt atcaggcata catgagcaat ttggagtctc	1140
attcagccat tcttgaccag aaattaaatg gtctcaatga ggaaattgct agagtagaac	1200
tagaatgtga aacaataaaa caggagaaca ctcgactaca gaatatcatt gacaaccaga	1260
agtactcagt tgcagacatt gagcgaataa atcatgaaag aaatgaattg cagcagacta	1320
ttaataaatt aaccaaggac ctggaagctg aacaacagaa gttgtggaat gaggagttaa	1380
aatatgccag aggcaaagaa gcgattgaaa cacaattagc agagtatcac aaattggcta	1440
gaaaattaaa acttattcct aaaggtgctg agaattccaa aggttatgac tttgaaatta	1500
agtttaatcc cgaggctggg gccaaactgcc ttgtcaaata cagggtcaa gtttatgtac	1560

ctcttaagga actcctgaat gaaactgaag aagaaattaa taaagcccta aataaaaaaa 1620

tgggttttga ggatacttta gaacaattga atgcaatgat aacagaaagc aagagaagtg 1680

tgagaactct gaaagaagaa gttcaaaagc tggatgatct ttaccaacaa aaaattaagg 1740

aagcagagga agaggatgaa aaatgtgcca gtgagcttga gtccttggag aaacacaagc 1800

acctgctaga aagtactgtt aaccaggggc tcagtgaagc tatgaatgaa ttagatgctg 1860

ttcagcggga ataccaacta gttgtgcaaa ccacgactga agaaagacga aaagtgggaa 1920

ataacttgca acgtctgtta gagatggttg ctacacatgt tgggtctgta gagaaacatc 1980

ttgaggagca gattgctaaa gttgatagag aatatgaaga atgcatgtca gaagatctct 2040

cggaaaatat taaagagatt agagataagt atgagaagaa agctactcta attaagtctt 2100

ctgaagaatg aagataaaat gttgatcatg tatatatatc catagtgaat aaaattgtct 2160

cagtaaagtg taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2209

<210> 78

<211> 2150

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (105).. (2033)

<400> 78

ctcgagccac gaaggccccg ctgtcctgtc tagcagatac ttgcacggtt tacagaaatt 60

cggtecctgg gtcgtgtcag gaaactggaa aaaaggtcat aagc atg aag cgc agt 116

Met Lys Arg Ser

1

tca gtt tcc agc ggt ggt gct ggc cgc ctc tcc atg cag gag tta aga 164

Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Ser Met Gln Glu Leu Arg	
5 10 15 20	
tcc cag gat gta aat aaa caa ggc ctc tat acc cct caa acc aaa gag	212
Ser Gln Asp Val Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Thr Pro Gln Thr Lys Glu	
25 30 35	
aaa cca acc ttt gga aag ttg agt ata aac aaa ccg aca tct gaa aga	260
Lys Pro Thr Phe Gly Lys Leu Ser Ile Asn Lys Pro Thr Ser Glu Arg	
40 45 50	
aaa gtc tcg cta ttt ggc aaa aga act agt gga cat gga tcc cgg aat	308
Lys Val Ser Leu Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gly His Gly Ser Arg Asn	
55 60 65	
agt caa ctt ggt ata ttt tcc agt tct gag aaa atc aag gac ccg aga	356
Ser Gln Leu Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile Lys Asp Pro Arg	
70 75 80	
cca ctt aat gac aaa gca ttc att cag cag tgt att cga caa ctc tgt	404
Pro Leu Asn Asp Lys Ala Phe Ile Gln Gln Cys Ile Arg Gln Leu Cys	
85 90 95 100	
gag ttt ctt aca gaa aat ggt tat gca cat aat gtg tcc atg aaa tct	452
Glu Phe Leu Thr Glu Asn Gly Tyr Ala His Asn Val Ser Met Lys Ser	
105 110 115	
cta caa gct ccc tct gtt aaa gac ttc ctg aag atc ttc aca ttt ctt	500
Leu Gln Ala Pro Ser Val Lys Asp Phe Leu Lys Ile Phe Thr Phe Leu	
120 125 130	
tat ggc ttc ctg tgc ccc tca tac gaa ctt cct gac aca aag ttt gaa	548
Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Thr Lys Phe Glu	
135 140 145	
gaa gag gtt cca aga atc ttt aaa gac ctt ggg tat cct ttt gca cta	596
Glu Glu Val Pro Arg Ile Phe Lys Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Ala Leu	
150 155 160	
tcc aaa agc tcc atg tac aca gtg ggg gct cct cat aca tgg cct cac	644
Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His Thr Trp Pro His	
165 170 175 180	

att gtg gca gcc tta gtt tgg cta ata gac tgc atc aag ata cat act	692
Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile His Thr	
185 190 195	
gcc atg aaa gaa agc tca cct tta ttt gat gat ggg cag cct tgg gga	740
Ala Met Lys Glu Ser Ser Pro Leu Phe Asp Asp Gly Gln Pro Trp Gly	
200 205 210	
gaa gaa act gaa gat gga att atg cat aat aag ttg ttt ttg gac tac	788
Glu Glu Thr Glu Asp Gly Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu Asp Tyr	
215 220 225	
acc ata aaa tgc tat gag agt ttt atg agt ggt gcc gac agc ttt gat	836
Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met Ser Gly Ala Asp Ser Phe Asp	
230 235 240	
gag atg aat gca gag ctg cag tca aaa ctg aag gat tta ttt aat gtg	884
Glu Met Asn Ala Glu Leu Gln Ser Lys Leu Lys Asp Leu Phe Asn Val	
245 250 255 260	
gat gct ttt aag ctg gaa tca tta gaa gca aaa aac aga gca ttg aat	932
Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Asn Arg Ala Leu Asn	
265 270 275	
gaa cag att gca aga ttg gaa caa gaa aga gaa aaa gaa ccg aat cgt	980
Glu Gln Ile Ala Arg Leu Glu Gln Glu Arg Glu Lys Glu Pro Asn Arg	
280 285 290	
cta gag tcg ttg aga aaa ctg aag gct tcc tta caa gga gat gtt caa	1028
Leu Glu Ser Leu Arg Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln Gly Asp Val Gln	
295 300 305	
aag tat cag gca tac atg agc aat ttg gag tct cat tca gcc att ctt	1076
Lys Tyr Gln Ala Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His Ser Ala Ile Leu	
310 315 320	
gac cag aaa tta aat ggt ctc aat gag gaa att gct aga gta gaa cta	1124
Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val Glu Leu	
325 330 335 340	
gaa tgt gaa aca ata aaa cag gag aac act cga cta cag aat atc att	1172

Glu Cys Glu Thr Ile Lys Gln Glu Asn Thr Arg Leu Gln Asn Ile Ile	
345 350 355	
gac aac cag aag tac tca gtt gca gac att gag cga ata aat cat gaa	1220
Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg Ile Asn His Glu	
360 365 370	
aga aat gaa ttg cag cag act att aat aaa tta acc aag gac ctg gaa	1268
Arg Asn Glu Leu Gln Gln Thr Ile Asn Lys Leu Thr Lys Asp Leu Glu	
375 380 385	
gct gaa caa cag aag ttg tgg aat gag gag tta aaa tat gcc aga ggc	1316
Ala Glu Gln Gln Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys Tyr Ala Arg Gly	
390 395 400	
aaa gaa gcg att gaa aca caa tta gca gag tat cac aaa ttg gct aga	1364
Lys Glu Ala Ile Glu Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu Ala Arg	
405 410 415 420	
aaa tta aaa ctt att cct aaa ggt gct gag aat tcc aaa ggt tat gac	1412
Lys Leu Lys Leu Ile Pro Lys Gly Ala Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Asp	
425 430 435	
ttt gaa att aag ttt aat ccc gag gct ggt gcc aac tgc ctt gtc aaa	1460
Phe Glu Ile Lys Phe Asn Pro Glu Ala Gly Ala Asn Cys Leu Val Lys	
440 445 450	
tac agg gct caa gtt tat gta cct ctt aag gaa ctc ctg aat gaa act	1508
Tyr Arg Ala Gln Val Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu Leu Asn Glu Thr	
455 460 465	
gaa gaa gaa att aat aaa gcc cta aat aaa aaa atg ggt ttg gag gat	1556
Glu Glu Glu Ile Asn Lys Ala Leu Asn Lys Lys Met Gly Leu Glu Asp	
470 475 480	
act tta gaa caa ttg aat gca atg ata aca gaa agc aag aga agt gtg	1604
Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val	
485 490 495 500	
aga act ctg aaa gaa gaa gtt caa aag ctg gat gat ctt tac caa caa	1652
Arg Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Asp Asp Leu Tyr Gln Gln	
505 510 515	

aaa att aag gaa gca gag gaa gag gat gaa aaa tgt gcc agt gag ctt 1700
Lys Ile Lys Glu Ala Glu Glu Glu Asp Glu Lys Cys Ala Ser Glu Leu
520 525 530

gag tcc ttg gag aaa cac aag cac ctg cta gaa agt act gtt aac cag 1748
Glu Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu Glu Ser Thr Val Asn Gln
535 540 545

ggg ctc agt gaa gct atg aat gaa tta gat gct gtt cag cgg gaa tac 1796
Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu Asp Ala Val Gln Arg Glu Tyr
550 555 560

caa cta gtt gtg caa acc acg act gaa gaa aga cga aaa gtg gga aat 1844
Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr Glu Glu Arg Arg Lys Val Gly Asn
565 570 575 580

aac ttg caa cgt ctg tta gag atg gtt gct aca cat gtt ggg tct gta 1892
Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
585 590 595

gag aaa cat ctt gag gag cag att gct aaa gtt gat aga gaa tat gaa 1940
Glu Lys His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val Asp Arg Glu Tyr Glu
600 605 610

gaa tgc atg tca gaa gat ctc tcg gaa aat att aaa gag att aga gat 1988
Glu Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile Lys Glu Ile Arg Asp
615 620 625

aag tat gag aag aaa gct act cta att aag tct tct gaa gaa tga 2033
Lys Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Leu Ile Lys Ser Ser Glu Glu
630 635 640

agataaaatg ttgatcatgt atatatatcc atagtgaata aaattgtctc agtaaaaaaa 2093

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2150

<210> 79
<211> 642
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Met Lys Arg Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Ser Met
1 5 10 15

Gln Glu Leu Arg Ser Gln Asp Val Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Thr Pro
20 25 30

Gln Thr Lys Glu Lys Pro Thr Phe Gly Lys Leu Ser Ile Asn Lys Pro
35 40 45

Thr Ser Glu Arg Lys Val Ser Leu Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gly His
50 55 60

Gly Ser Arg Asn Ser Gln Leu Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile
65 70 75 80

Lys Asp Pro Arg Pro Leu Asn Asp Lys Ala Phe Ile Gln Gln Cys Ile
85 90 95

Arg Gln Leu Cys Glu Phe Leu Thr Glu Asn Gly Tyr Ala His Asn Val
100 105 110

Ser Met Lys Ser Leu Gln Ala Pro Ser Val Lys Asp Phe Leu Lys Ile
115 120 125

Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp
130 135 140

Thr Lys Phe Glu Glu Glu Val Pro Arg Ile Phe Lys Asp Leu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Phe Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His
165 170 175

Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
180 185 190

Lys Ile His Thr Ala Met Lys Glu Ser Ser Pro Leu Phe Asp Asp Gly
195 200 205

Gln Pro Trp Gly Glu Glu Thr Glu Asp Gly Ile Met His Asn Lys Leu
210 215 220

Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met Ser Gly Ala
225 230 235 240

Asp Ser Phe Asp Glu Met Asn Ala Glu Leu Gln Ser Lys Leu Lys Asp
245 250 255

Leu Phe Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Asn
260 265 270

Arg Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu Glu Gln Glu Arg Glu Lys
275 280 285

Glu Pro Asn Arg Leu Glu Ser Leu Arg Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln
290 295 300

Gly Asp Val Gln Lys Tyr Gln Ala Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His
305 310 315 320

Ser Ala Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala

325

330

335

Arg Val Glu Leu Glu Cys Glu Thr Ile Lys Gln Glu Asn Thr Arg Leu
340 345 350

Gln Asn Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg
355 360 365

Ile Asn His Glu Arg Asn Glu Leu Gln Gln Thr Ile Asn Lys Leu Thr
370 375 380

Lys Asp Leu Glu Ala Glu Gln Gln Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys
385 390 395 400

Tyr Ala Arg Gly Lys Glu Ala Ile Glu Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His
405 410 415

Lys Leu Ala Arg Lys Leu Lys Leu Ile Pro Lys Gly Ala Glu Asn Ser
420 425 430

Lys Gly Tyr Asp Phe Glu Ile Lys Phe Asn Pro Glu Ala Gly Ala Asn
435 440 445

Cys Leu Val Lys Tyr Arg Ala Gln Val Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu
450 455 460

Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile Asn Lys Ala Leu Asn Lys Lys Met
465 470 475 480

Gly Leu Glu Asp Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile Thr Glu Ser
485 490 495

Lys Arg Ser Val Arg Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Asp Asp
500 505 510

Leu Tyr Gln Gln Lys Ile Lys Glu Ala Glu Glu Glu Asp Glu Lys Cys
515 520 525

Ala Ser Glu Leu Glu Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu Glu Ser
530 535 540

Thr Val Asn Gln Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu Asp Ala Val
545 550 555 560

Gln Arg Glu Tyr Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr Glu Glu Arg Arg
565 570 575

Lys Val Gly Asn Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His
580 585 590

Val Gly Ser Val Glu Lys His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val Asp
595 600 605

Arg Glu Tyr Glu Glu Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile Lys
610 615 620

Glu Ile Arg Asp Lys Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Leu Ile Lys Ser Ser
625 630 635 640

Glu Glu

<210> 80

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用於 TCR 分析的 PCR 引子	
<400>	80	
	gtctaccagg cattcgcttc at	22
<210>	81	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用於 TCR 分析的 PCR 引子	
<400>	81	
	tcagctggac cacagccgca gcgt	24
<210>	82	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用於 TCR 分析的 PCR 引子	
<400>	82	
	tcagaaatcc tttctcttga c	21
<210>	83	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用於 TCR 分析的 PCR 引子	

<400> 83

ctagcctctg gaatcctttc tctt

24

<210> 84

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 84

Asn Lys Arg Lys

1

I658049

發明摘要

※ 申請案號：103107588

※ 申請日：

103.3.06

※IPC 分類：

C07K14/47 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

C40B37/06 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

KNTC2 胜肽及含此胜肽之疫苗 / KNTC2 PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

【中文】

本案揭示抗癌的胜肽疫苗。特別是，本案提供誘發CTLs之衍生自KNTC2基因的單離的抗原決定位胜肽，因此適合用於癌症免疫治療的內容。本發明之胜肽包含衍生自KNTC2的胜肽及其有一、二或數個胺基酸被取代、缺失、插入或增加的修飾型態，前提為該修飾型態保留原始序列的CTL誘導活性的要求。本案更提供編碼此胜肽的多核苷酸及包含上述胜肽或多核苷酸為活性劑的醫藥組成物。本案更提供標靶上述胜肽的抗原呈現細胞及單離的CTLs，以及誘導該抗原呈現細胞或CTL的方法。而且，本案提供使用衍生自本發明之KNTC2之胜肽、編碼此胜肽之多核苷酸、或呈現此胜肽之抗原呈現細胞、或醫藥組成物，治療及/或預防(如預防)癌症(腫瘤)、及/或預防轉移的或術後的復發之方法，以及誘導CTLs的方法、誘導抗腫瘤免疫性的方法。

【英文】

Peptide vaccines against cancer are described herein. In particular, isolated epitope peptides derived from the KNTC2 gene that elicit CTLs and thus are suitable

for use in the context of cancer immunotherapy are provided. The inventive peptides encompass both KNTC2 -derived peptides and modified versions thereof, in which one, two, or several amino acids are substituted, deleted, inserted or added, provided such modified versions retain the requisite CTL inducibility of the original sequences. Further provided are polynucleotides encoding such peptides as well as pharmaceutical compositions that include any such peptides or polynucleotides as active agents. Antigen-presenting cells and isolated CTLs that target such peptides, as well as methods for inducing the antigen-presenting cell, or CTL are also provided. Furthermore, the present invention provides methods for the treatment and/or prophylaxis (i.e., prevention) of cancers (tumors), and/or the prevention of a metastatic- or post-operative recurrence thereof, as well as methods for inducing CTLs, methods for inducing anti-tumor immunity, using the peptides derived from KNTC2, polynucleotides encoding the peptides, or antigen-presenting cells presenting the peptides, or the pharmaceutical compositions of the present invention.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無。

申請專利範圍

1. 一種單離胜肽，係由擇自於 SEQ ID NO: 7、2、3、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列所組成。
2. 一種單離胜肽，其具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力，係由擇自於 SEQ ID NO: 7、2、3、17、41、53 及 68 所組成之群組之胺基酸序列所組成，於其中有 1 或 2 個胺基酸經取代，其中該取代擇自由下列所組成之群組：
 - (a) SEQ ID NO: 7、2、3、17、41、53 或 68 之胺基酸序列的 N 端第 2 個胺基酸被取代為白胺酸或甲硫胺酸；以及
 - (b) SEQ ID NO: 7、2、3、17、41、53 或 68 之胺基酸序列的 C 端胺基酸被取代為纈胺酸或白胺酸。
3. 一種多核苷酸，其編碼申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽。
4. 一種誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)的組成物，其中該組成物包括擇自於下列所組成之族群之至少一種活性成分：
 - (a) 申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽；
 - (b) 申請專利範圍第 3 項所述之多核苷酸；
 - (c) 表面上呈現申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之抗原呈現細胞(APC)；以及
 - (d) 表面上呈現申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之外吐小體。
5. 一種治療癌症的醫藥組成物，其中該醫藥組成物包括擇自於下列所組成之族群之至少一種活性成分：
 - (a) 申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽；

- (b) 申請專利範圍第 3 項所述之多核苷酸；
 - (c) 表面上呈現申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之抗原呈現細胞(APC)；
 - (d) 表面上呈現申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之外吐小體；以及
 - (e) 可辨識呈現申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之細胞的細胞毒性 T 淋巴球(CTL)。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之醫藥組成物，其中該醫藥組成物被配製以投藥至 HLA 抗原為 HLA-A2 的個體。
7. 一種體外(*in vitro*)誘導具有細胞毒性 T 淋巴球(CTL)誘導能力之抗原呈現細胞(APC)之方法，其中該方法包括擇自於下列所組成之族群中之步驟：
- (a) 使抗原呈現細胞(APC)接觸申請專利範圍第 1 或 2 項任一項所述之胜肽，以及
 - (b) 將編碼申請專利範圍第 1 或 2 項任一項所述胜肽之多核苷酸導入抗原呈現細胞(APC)。
8. 一種體外(*in vitro*)誘導細胞毒性 T 淋巴球(CTL)之方法，其中該方法包括擇自於下列所組成之族群中之步驟：
- (a) 將 CD8 陽性 T 細胞與表面呈現 HLA 抗原和申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之複合物的抗原呈現細胞(APC)共同培養；
 - (b) 將 CD8 陽性 T 細胞與表面呈現 HLA 抗原和申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之複合物的外吐小體共同培養；以及

- (c) 將編碼 T 細胞受體 (TCR) 二次單元之多核苷酸、或編碼 T 細胞受體 (TCR) 各次單元之多核苷酸導入至 CD8 陽性 T 細胞中，其中由該次單元所形成的 T 細胞受體 (TCR) 可在細胞表面與申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽和 HLA 抗原的複合物結合。
9. 一種單離的抗原呈現細胞 (APC)，其表面呈現 HLA 抗原和申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之複合物。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之抗原呈現細胞 (APC)，其中該抗原呈現細胞 (APC) 以申請專利範圍第 7 項之方法所誘導。
11. 一種單離的細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)，其標靶申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胜肽。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述之細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)，其中該細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 以申請專利範圍第 8 項之方法所誘導。
13. 一種如申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽或編碼該胜肽之多核苷酸之用途，其係用於製造誘導個體中抗癌免疫反應之組成物。
14. 一種抗申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽之抗體。
15. 一種載體，包括編碼申請專利範圍第 1 或 2 項所述胜肽的核苷酸序列。
16. 一種篩選胜肽之方法，該胜肽具有誘導特異細胞毒性對抗呈現衍生自 KNTC2 之片段的細胞之細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 的能力，其中該方法包括：
- (i) 提供候選序列，該候選序列由原始胺基酸序列被一或二

個胺基酸殘基取代所修飾之胺基酸序列所組成，其中該原始胺基酸序列係擇自於 SEQ ID NO: 7、2、3、17、41、53 及 68 所組成之群組，其中該取代擇自由下列所組成之群組：

(a) SEQ ID NO: 7、2、3、17、41、53 或 68 之胺基酸序列的 N 端第 2 個胺基酸被取代為白胺酸或甲硫胺酸；以及

(b) SEQ ID NO: 7、2、3、17、41、53 或 68 之胺基酸序列的 C 端胺基酸被取代為纈胺酸或白胺酸；

(ii) 選擇候選序列，該候選序列，除與 KNTC2 以外，與源自任何已知人類基因產品之胜肽不具有實質上顯著的同源性；

(iii) 將步驟 (ii) 所選之候選序列所形成之胜肽與抗原呈現細胞接觸；

(iv) 將步驟 (iii) 之抗原呈現細胞與 CD8 陽性 T 細胞接觸；以及

(v) 確認具有與該原始胺基酸序列所組成之胜肽相同或較高的細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 誘導能力之胜肽。