



(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 I681973 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 11 日

(21)申請案號：101139634

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 26 日

(51)Int. Cl. : C07K7/06 (2006.01)

A61K38/08 (2019.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

(30)優先權：2011/10/28 美國

61/552,817

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

(72)發明人：中村祐輔 NAKAMURA, YUSUKE (JP)；角田卓也 TSUNODA, TAKUYA (JP)；大澤龍司 OSAWA, RYUJI (JP)；吉村祥子 YOSHIMURA, SACHIKO (JP)；渡邊朝久 WATANABE, TOMOHISA (JP)；中山岳 NAKAYAMA, GAKU (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

CN 1890381B

US 20110229504A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：8 共 180 頁

(54)名稱

TOPK 胜肽及含其之疫苗

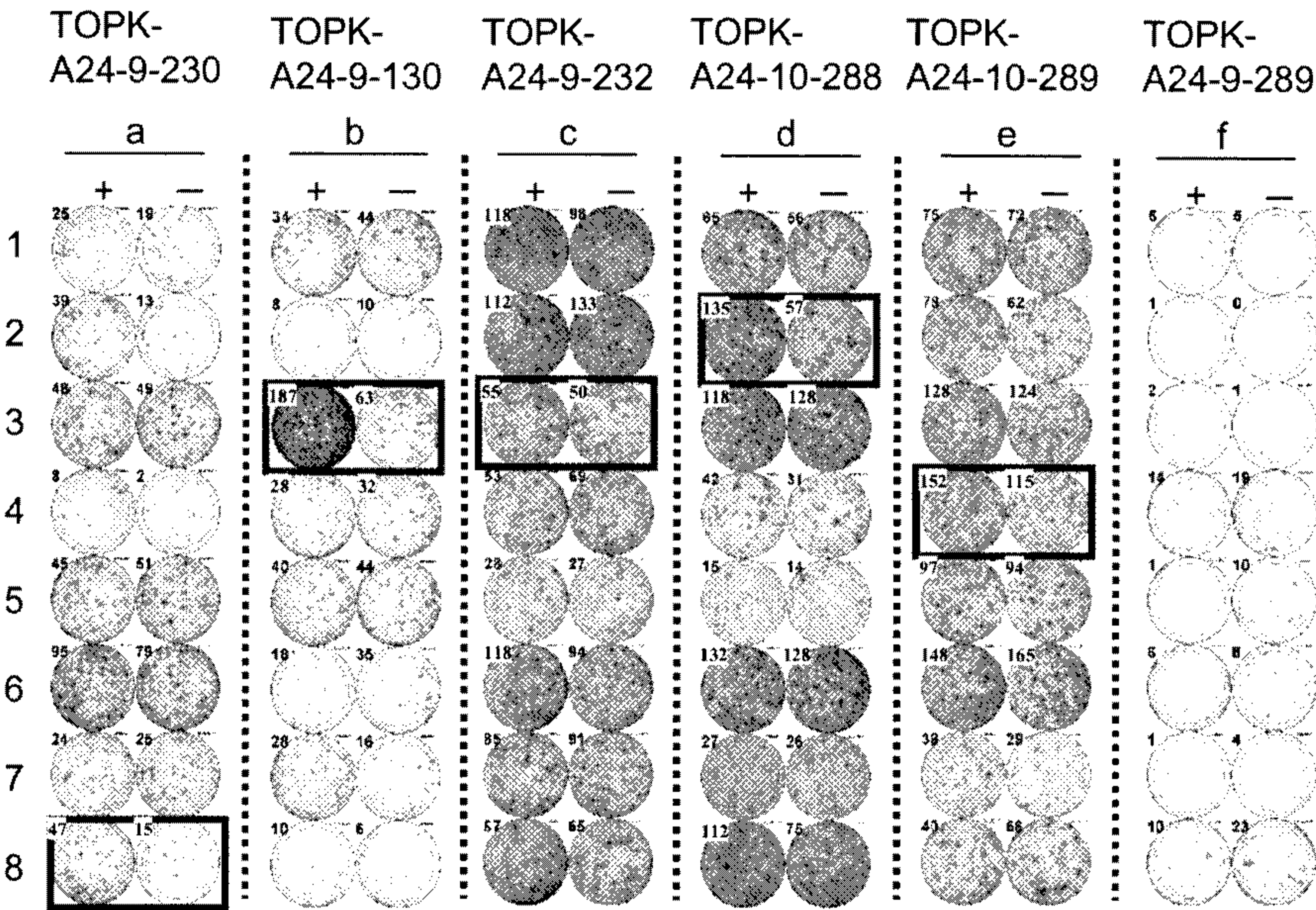
(57)摘要

如於此所詳細討論，來自 TOPK 經分離的胜肽與其免疫活性片段具有誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之能力，且因此適合用於癌症免疫治療，特別是為癌症疫苗。本發明之胜肽包括一 TOPK 衍生之胺基酸序列與其經修飾之變體兩者，於經修飾之變體中，一、二或數個胺基酸被取代、刪除、插入或加入，提供具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的該經修飾之胜肽。更提供編碼出任何上述胜肽的多核苷酸與包括任何上述胜肽或多核苷酸的藥學試劑或組合物。本發明之胜肽、多核苷酸及藥學組合物於癌症與腫瘤之治療與避免之任一或兩者中提供特別的效用，癌症與腫瘤包括，例如，急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia,AML)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌(cholangiocellular carcinoma)、結腸直腸癌(colorectal cancer)、瀰漫型胃癌(diffuse-type gastric cancer)、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤(osteosarcoma)、攝護腺癌(prostate cancer)、腎癌、小細胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)與軟組織腫瘤。

As discussed in greater detail herein, isolated epitope peptides derived from TOPK and immunogenic fragments thereof have an ability to induce cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and thus are suitable for use in cancer immunotherapy, more particularly as cancer vaccines. The peptides of the present invention encompass both of peptides including a TOPK-derived amino acid sequence and modified versions thereof, in which one, two, or several amino acids are substituted, deleted, inserted and/or added, provided such modified versions have CTL inducibility. Further provided are polynucleotides encoding any of the aforementioned peptides as well as pharmaceutical compositions that include any of the aforementioned peptides or polynucleotides. The peptides, polynucleotides, and pharmaceutical compositions of this invention find particular utility in either or both of the treatment and prevention of cancers and tumors, including, for example, acute myeloid leukemia (AML), bladder cancer, breast cancer, cervical cancer,

cholangiocellular carcinoma, colorectal cancer, diffuse-type gastric cancer, non small cell lung cancer (NSCLC), lymphoma, osteosarcoma, prostate cancer, renal carcinoma, small cell lung cancer (SCLC) and soft tissue tumor.

指定代表圖：



第1圖

I681973

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】（中文/英文）

TOPK 胜肽及含其之疫苗 / TOPK PEPTIDES AND VACCINES
INCLUDING THE SAME

【中文】

如於此所詳細討論，來自 TOPK 經分離的胜肽與其免疫活性片段具有誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之能力，且因此適合用於癌症免疫治療，特別是為癌症疫苗。本發明之胜肽包括一 TOPK 衍生之胺基酸序列與其經修飾之變體兩者，於經修飾之變體中，一、二或數個胺基酸被取代、刪除、插入或加入，提供具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力的該經修飾之胜肽。更提供編碼出任何上述胜肽的多核苷酸與包括任何上述胜肽或多核苷酸的藥學試劑或組合物。本發明之胜肽、多核苷酸及藥學組合物於癌症與腫瘤之治療與避免之任一或兩者中提供特別的效用，癌症與腫瘤包括，例如，急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌(cholangiocellular carcinoma)、結腸直腸癌(colorectal cancer)、瀰漫型胃癌(diffuse-type gastric cancer)、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤(osteosarcoma)、攝護腺癌(prostate cancer)、腎癌、小細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)與軟組織腫瘤。

【英文】

As discussed in greater detail herein, isolated epitope peptides derived from TOPK and immunogenic fragments thereof have an ability to induce cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and thus are suitable for use in cancer immunotherapy, more particularly as cancer vaccines. The peptides of the present invention encompass both of peptides including a TOPK-derived amino acid sequence and modified versions thereof, in which one, two, or several amino acids are substituted, deleted, inserted and/or added, provided such modified versions have CTL inducibility. Further provided are polynucleotides encoding any of the aforementioned peptides as well as pharmaceutical compositions that include any of the aforementioned peptides or polynucleotides. The peptides, polynucleotides, and pharmaceutical compositions of this invention find particular utility in either or both of the treatment and prevention of cancers and tumors, including, for example, acute myeloid leukemia (AML), bladder cancer, breast cancer, cervical cancer, cholangiocellular carcinoma, colorectal cancer, diffuse-type gastric cancer, non small cell lung cancer (NSCLC), lymphoma, osteosarcoma, prostate cancer, renal carcinoma, small cell lung cancer (SCLC) and soft tissue tumor.

【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。

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)

TOPK 胜肽及含其之疫苗 /TOPK PEPTIDES AND
VACCINES INCLUDING 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，其當作癌症疫苗及治療與避免腫瘤之藥物為有效的。

【先前技術】

【0002】已證實CD8陽性細胞毒殺性T淋巴球(CTLs)辨認來自建造於主要組織相容性抗原複合體(major histocompatibility complex, MHC) class I分子上之腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens, TAAs)的抗原決定位胜肽，且之後殺死腫瘤細胞。自從發現黑色素瘤抗原(melanoma antigen, MAGE)家族為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(NPL 1)，且腫瘤相關抗原的一些目前正在臨床發展之過程為免疫治療標的中。

【0003】合適的腫瘤相關抗原係對於癌症細胞增殖與存活為必須的。使用此類腫瘤相關抗原為免疫治療標的可將廣為敘述之癌細胞免疫逃脫(immune escape)的風險最小化，而癌細胞免疫逃脫為治療性驅使免疫篩選的結果，歸因於腫瘤相關抗原的刪除、突變或向下調控。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的辨認成為更進一步發展的根

據，且因此對於多種形式癌症之胜肽疫苗接種策略(vaccination strategies)的臨床研究為正進行著(NPL 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，這些癌症疫苗試驗已僅顯示低的客觀反應率(objective response rate) (NPL 11-13)。因此維持新穎之適合做為免疫治療標的之腫瘤相關抗原於本技術領域中的需要。

【0004】 TOPK (T-LAK 細胞起源蛋白質激酶 (cell-originated protein kinase))為一MAPK激酶(MAPKK) 3/6-相關之MAPKK家族之一員的絲胺酸/蘇胺酸激酶 (serine/threonine kinase)。此激酶磷酸 p38 MAPK並參與細胞週期檢查點 (cell cycle check point)之調控(NPL 14, 15)。使用臨床樣本之TOPK的基因表現分析指出， TOPK為於一些惡性癌症中過度表現，例如乳癌、膽管癌 (cholangiocarcinoma)、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma)、白血病 (leukemia)、結腸直腸癌 (colorectal cancer)與黑色素瘤 (melanoma)(NPL 16-19)。指出激酶活性於乳房癌化 (breast carcinogenesis)中扮演重要色的最近之研究已重新開始對癌症相關激酶，例如TOPK的研究。為此目的，北方墨點分析已顯示TOPK轉錄體為於乳癌細胞中高度表現，但於除了睪丸之正常人類組織中，為幾乎無法偵測得到。此外，於乳癌細胞株中藉由siRNA之內生TOPK的剔除 (knockdown)已被顯示減弱胞質分裂且使癌細胞細胞凋亡 (apoptosis)(NPL 20)。

【0005】

【引用文獻】

非專利文獻 (Non Patent Literature)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42

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

[NPL 14] Abe Y et.al., J Bio Chem. 2000 July 14: 21525-21531

[NPL 15], Ayllón V and O'connor R., Oncogene. 2007 May 24;26(24):3451-61

[NPL 16] He F et al., Hum Pathol. 2010 Mar;41(3):415-24

[NPL 17] Li G et al., Ann Hematol. 2006 Sep;85(9):583-90

[NPL 18] Minoo P et al., Int J Oncol. 2010 Sep;37(3):707-18

[NPL 19] Zykova TA et al., Clin Cancer Res. 2006 Dec 1;12(23):6884-93

[NPL 20] Park JH et al., Cancer Res. 2006 Sep 15;66(18):9186-95

【發明內容】

【0006】本發明至少部分基於發現新穎之胜肽，其做為免疫治療之適合標的。由於腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens, TAAs)有時被免疫系統感知為“自身”且因此常不具有天生之免疫抗原性(immunogenicity)，所以適合標的的發現極度重要。在本發明中，TOPK (序列辨識號：86，其由GenBank Accession No. NM_018492 (序列辨識號：85)之基因所編碼)已被證實專一地過度表現於癌細胞中，特別急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌(cholangiocellular carcinoma)、結腸直腸癌

(colorectal cancer)、瀰漫型胃癌(diffuse-type gastric cancer)、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、淋巴癌、骨肉瘤(osteosarcoma)、攝護腺癌(prostate cancer)、腎癌、小細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)與軟組織腫瘤，但不限於此。因此，本發明聚焦於TOPK為一適合之癌症/腫瘤免疫治療之候選物標的。

【0007】為此目的，本發明至少部份關於，於具有誘導專一於TOPK之細胞毒殺性T淋巴球之能力之TOPK之基因產物中之特定抗原決定位胜肽的確認。更詳細如下所討論，使用與HLA（人類白血球組織抗原）-A*2402或HLA-A*0201結合之源自TOPK的候選胜肽來刺激自健康提供者獲得的周邊血液單核球細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。之後建立細胞毒殺性T淋巴球，其具有抗(against)經各候選胜肽脈衝(pulsed)之HLA-A24或HLA-A2陽性目標細胞的專一細胞毒性。此處這些結果證明這些胜肽為HLA-A24或HLA-A2限制的抗原決定位胜肽，其可誘導強而專一之抗表現TOPK之細胞的免疫反應。這些結果更指出TOPK為強效致免疫性與其抗原決定位為腫瘤免疫治療之有效目標。

【0008】因此，本發明一目的為提供經分離的胜肽，其具有與一HLA抗原結合之能力且包括TOPK序列（序列辨識號：86）或一其免疫活性片段。這些胜肽被預期具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力，且因此可被用來in vitro、ex vivo或in vivo誘導一細胞毒殺性T淋巴球或可被直接投予一個體以便in vivo誘導抗癌症的免疫反應，癌症的例子包括，但不限於急性骨髓

性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴癌、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0009】較佳胜肽為九胜肽與十胜肽，且更佳為九胜肽與十胜肽其具有擇自序列辨識號：2至40與42至84中之一胺基酸序列。在這些中，具有擇自序列辨識號：2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76中之一胺基酸序列的胜肽最受喜愛。

【0010】本發明也考慮經修飾之胜肽，其具有擇自序列辨識號：2至40與42至84中之一胺基酸序列，於其中一、二或多個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加入，所提供產生之經修飾的胜肽維持原始未修飾胜肽之必不可少的細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。

【0011】本發明更包括編碼出本發明任一胜肽之經分離的多核苷酸。這些多核苷酸可用以誘導或製備具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。如同前述本發明胜肽，此類抗原呈現細胞可被投予至一個體以誘導抗癌之免疫反應。

【0012】當投予一個體時，本發明之胜肽較佳被呈現於抗原呈現細胞之表面以便誘導將分別之胜肽做為目標的細胞毒殺性T淋巴球。因此，本發明一目標為提供用於誘導一細胞毒殺性T淋巴球之試劑或組合物，此類組合物或試劑包括一或多個本發明之胜肽或一或多個編碼出此類胜肽之多核苷酸。此類試劑或組合物可被用於一原發癌症(primary cancer)、轉移或其手術後復發之治療及/或預防。本發明所考慮之目標癌症的例

子包括，但不限於急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴癌、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0013】本發明更考慮藥學組合物或試劑，其包括本發明一或多個胜肽或一或多個多核苷酸，被配製來用於如上所提及之一原發癌症、轉移或其手術後復發的治療及/或預防。代替本發明胜肽或多核苷酸或除了本發明胜肽或多核苷酸外，本發明藥學試劑或組合物可包括呈現任何之本發明胜肽的抗原呈現細胞及/或外吐小體為活性成分。

【0014】本發明之胜肽或多核苷酸可被用來誘導於表面上呈現HLA抗原與本發明胜肽之一複合物的抗原呈現細胞，例如，藉由將來自一個體之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸或將編碼出本發明胜肽的一多核苷酸引入抗原呈現細胞。此種抗原呈現細胞具有高的抗目標胜肽之細胞毒殺性T淋巴球誘發能力且對於癌症免疫治療為有效的。因此，本發明包括誘導具細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法與藉由此方法獲得之抗原呈現細胞。

【0015】本發明更進一步之一目標為提供誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法，此類方法包括將CD8陽性T細胞與於其表面上呈現HLA抗原與本發明胜肽之一複合物之抗原呈現細胞共培養的步驟，將CD8陽性T細胞與於其表面上表現HLA抗原與本發明胜肽之一複合物之外吐小體共培養的步驟，或引入編碼出T細胞受體(T cell receptor, TCR)次單元多胜肽之多核苷酸的步驟，其中由此次單元多胜肽所形成之T細胞受體可與本發明

胜肽結合。藉由此種方法獲得之細胞毒殺性T淋巴球提供效用於癌症，更特別是急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤之治療及/或避免。因此，本發明包括誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法與藉由此方法獲得之細胞毒殺性T淋巴球。

【0016】本發明又另一目標為提供經分離之抗原呈現細胞，其呈現HLA抗原與本發明胜肽之一複合物於表面上。本發明更提供經分離之細胞毒殺性T淋巴球，其以本發明胜肽為目標。這些抗原呈現細胞與細胞毒殺性T淋巴球可被用於癌症免疫治療。

【0017】本發明又另一目標為提供於一需要之個體中誘導抗癌症之免疫反應的方法，此類方法包括投予一個體一組合物的步驟，此組合物包含擇自一本發明胜肽、編碼出此類胜肽之一多核苷酸，呈現此類胜肽之外吐小體或抗原呈現細胞與可辨認呈現此類胜肽於其表面上之細胞的細胞毒殺性T淋巴球中的至少一成分。

【0018】本發明之應用性擴展至一些關於或起因於TOPK過度表現的疾病中的任一個，例如表現TOPK之癌症，其例子包括，但不限於急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0019】當以下詳細說明被閱讀並結合伴隨之圖式與實施例，本發明之目的與特徵會變得更完全地明白。可瞭解的是，

上面之本發明內容與以下之詳細說明兩者為示範之實施例，並不限制本發明或本發明其他替代實施例。

【0020】特別是，當關於一些特定實施例於此敘述之本發明，可以瞭解的是，敘述為本發明之說明，且並不建構為本發明之限制。各種修飾與應用可被熟悉此技藝人士想到，而無背離本發明精神與範圍，如所附申請專利範圍所述。同樣地，本發明之其他目的、特徵、好處與優點自此內容與下述之特定實施例，為清楚的，且對於熟悉此技藝人士而言可立即明白。此種目的、特徵、好處與優點自上述結合伴隨實施例、資料、圖式與所有要被自其單獨或隨著考慮引入於此之參考文獻而描述的所有合理推論為清楚的。

【圖式簡單說明】

【0021】

第1圖由一系列照片(a)-(e)所組成，其顯示在以源自TOPK之胜肽誘導之細胞毒殺性T淋巴球上之干擾素(IFN)- γ 酵素結合免疫斑點分析(ELISPOT)的結果。分別與控制組相較，於以TOPK-A24-9-230 (序列辨識號：2)誘導之孔洞編號#8 (a)、以TOPK-A24-9-130 (序列辨識號：3)誘導之孔洞編號#3 (b)、以TOPK-A24-9-232 (序列辨識號：6)誘導之孔洞編號#3 (c)、以TOPK-A24-10-288 (序列辨識號：27)誘導之孔洞編號#2 (d)與以TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28)誘導之孔洞編號#4 (e)中的細胞毒殺性T淋巴球顯示強的IFN- γ 產生。於這些照片之孔洞上的正方形指出來自對應之孔洞的細胞被擴張來建立細胞毒殺性T淋巴球細胞株。相對的，做為負資料的典型，從以

- TOPK-A24-9-289 (序列辨識號：1) (f)刺激的細胞毒殺性T淋巴球並未觀察到專一的IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生。

第2圖由一系列照片(a)-(o)所組成，其顯示在以源自TOPK之胜肽誘導之細胞毒殺性T淋巴球上之干擾素(IFN)- γ 酵素結合免疫斑點分析(ELISPOT)的結果。分別與控制組相較，於以TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42)誘導之孔洞編號#7 (a)、以TOPK-A02-9-19 (序列辨識號：45)誘導之孔洞編號#4 (b)、以TOPK-A02-9-183 (序列辨識號：47)誘導之孔洞編號#2 (c)、以TOPK-A02-9-235 (序列辨識號：50)誘導之孔洞編號#8 (d)、以TOPK-A02-9-12 (序列辨識號：51)誘導之孔洞編號#4 (e)、以TOPK-A02-9-285 (序列辨識號：53)誘導之孔洞編號#3 (f)、以TOPK-A02-9-47 (序列辨識號：54)誘導之孔洞編號#3 (g)、以TOPK-A02-10-236 (序列辨識號：62)誘導之孔洞編號#5 (h)、以TOPK-A02-10-231 (序列辨識號：63)誘導之孔洞編號#3 (i)、以TOPK-A02-10-47 (序列辨識號：64)誘導之孔洞編號#8 (j)、以TOPK-A02-10-239 (序列辨識號：66)誘導之孔洞編號#1 (k)、以TOPK-A02-10-272 (序列辨識號：71)誘導之孔洞編號#1 (l)、以TOPK-A02-10-88 (序列辨識號：72)誘導之孔洞編號#4 (m)與以TOPK-A02-10-142 (序列辨識號：76)誘導之孔洞編號#4 (n)中的細胞毒殺性T淋巴球顯示強的IFN- γ 產生。於這些照片之孔洞上的正方形指出來自對應之孔洞的細胞被擴張來建立細胞毒殺性T淋巴球細胞株。相對的，做為負資料的典型，從以

TOPK-A02-9-55 (序列辨識號：41) (o)刺激的細胞毒殺性T淋巴球並未觀察到專一的IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生。

第3圖由一系列線圖(a)-(e)所組成，顯示以TOPK-A24-9-230 (序列辨識號：2) (a)、TOPK-A24-9-130 (序列辨識號：3) (b)、TOPK-A24-9-232 (序列辨識號：6) (c)、TOPK-A24-10-288 (序列辨識號：27) (d)與TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28) (e)刺激之細胞毒殺性T淋巴球細胞株的IFN- γ 產生。細胞毒殺性T淋巴球產生之IFN- γ 的量藉由IFN- γ 酵素連結免疫吸附分析(ELISA)來測量。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性T淋巴球細胞株顯示強而有力之IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生。R/S比指出反應細胞(responder cell) (細胞毒殺性T淋巴球細胞株) 與刺激細胞(stimulator cell)之數目的比。

第4圖由一系列線圖(a)-(c)所組成，顯示藉由來自以TOPK-A24-9-130 (序列辨識號：3) (a)、TOPK-A24-10-288 (序列辨識號：27) (b)與TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28) (c)刺激之細胞毒殺性T淋巴球細胞株之限制稀釋所建立的細胞毒殺性T淋巴球複製的IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性T淋巴球複製顯示強而有力之IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的

- IFN- γ 產生。R/S比指出反應細胞（細胞毒殺性T淋巴球複製）與刺激細胞之數目的比。

第5圖由一系列線圖(a)-(k)所組成，顯示以TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42) (a)、TOPK-A02-9-19 (序列辨識號：45) (b)、TOPK-A02-9-235 (序列辨識號：50) (c)、TOPK-A02-9-12 (序列辨識號：51) (d)、TOPK-A02-9-285 (序列辨識號：53) (e)、TOPK-A02-9-47 (序列辨識號：54) (f)、TOPK-A02-10-236 (序列辨識號：62) (g)、TOPK-A02-10-231 (序列辨識號：63) (h)、TOPK-A02-10-47 (序列辨識號：64) (i)、TOPK-A02-10-239 (序列辨識號：66) (j)與TOPK-A02-10-88 (序列辨識號：72) (k)刺激之細胞毒殺性T淋巴球細胞株的IFN- γ 產生。細胞毒殺性T淋巴球產生之IFN- γ 的量藉由IFN- γ 酵素連結免疫吸附分析(ELISA)來測量。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激建立之細胞毒殺性T淋巴球細胞株顯示強而有力之IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生。R/S比指出反應細胞（細胞毒殺性T淋巴球細胞株）與刺激細胞之數目的比。

第6圖由一對線圖(a)與(b)所組成，顯示藉由來自以TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42) (a)與TOPK-A02-9-285 (序列辨識號：53) (b)刺激之細胞毒殺性T淋巴球細胞株之限制稀釋所建立的細胞毒殺性T淋巴球複製的IFN- γ 產生。結果顯示與控制組相較，藉由以各胜肽刺激所建立之細胞毒殺性T淋巴球複製顯示強而有力之IFN- γ 產生。於圖中，“+”指出抗以適合之

胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生，而“-”指出抗未以任何胜肽脈衝的目標細胞的IFN- γ 產生。R/S比指出反應細胞（細胞毒殺性T淋巴球細胞株）與刺激細胞之數目的比。

第7圖爲一線圖，其顯示抗表現TOPK與HLA-A*2402之目標細胞之細胞毒殺性T淋巴球複製的專一細胞毒殺性T淋巴球活性。將以HLA-A*2402或全長之TOPK基因轉染之COS7細胞製備爲控制組。以TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28)建立之細胞毒殺性T淋巴球複製顯示抗以TOPK與HLA-A*2402兩者轉染之COS7細胞的專一細胞毒殺性T淋巴球活性（菱形）。另一方面，沒有偵測到顯著專一之細胞毒殺性T淋巴球活性，其抗表現HLA-A*2402（三角形）或TOPK（圓形）之任一的目標細胞。

第8圖爲一線圖，其顯示抗表現TOPK與HLA-A*0201之目標細胞之細胞毒殺性T淋巴球複製的專一細胞毒殺性T淋巴球活性。將以HLA-A*0201或全長之TOPK基因轉染之COS7細胞製備爲控制組。以TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42)建立之細胞毒殺性T淋巴球複製顯示抗以TOPK與HLA-A*0201兩者轉染之COS7細胞的專一細胞毒殺性T淋巴球活性（菱形）。另一方面，沒有偵測到顯著專一之細胞毒殺性T淋巴球活性，其抗表現HLA-A*0201（三角形）或TOPK（圓形）之任一的目標細胞。

【實施方式】

【0022】進一步上述概論，本發明之一目的爲提供：

【0023】[1] 一種經分離之胜肽，其具有細胞毒殺性T淋巴

- 球誘發能力，其中該胜肽係由TOPK或一其免疫活性片段之胺基酸序列所組成。

【0024】 [2] [1]之經分離的胜肽，其中該胜肽包括一胺基酸序列，其係擇自由序列辨識號2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76所組成之群組。

【0025】 [3] 一種經分離的胜肽，擇自下列由(i)與(ii)所組成之群組：

(i) 一下列(a)或(b)之經分離的胜肽：

(a) 一經分離的胜肽，包括一胺基酸序列，其擇自由由序列辨識號：2、3、6、27與28所組成之群組；

(b) 一經分離的胜肽，包括一胺基酸序列，其擇自由於其中一、二或數個胺基酸被取代、插入、刪除及/或加入之序列辨識號：2、3、6、27與28所組成之群組，其中該胜肽具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力；

(ii) 一下列(c)或(d)之經分離的胜肽：

(c) 一經分離的胜肽，包括一胺基酸序列，其擇自由由序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76所組成之群組；

(d) 一經分離的胜肽，包括一胺基酸序列，其擇自由於其中一、二或數個胺基酸被取代、插入、刪除及/或加入之序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76所組成之群組，其中該胜肽具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。

【0026】 [4] [3]之經分離的胜肽，其中該胜肽具有下列特徵

之一或兩者：

(a) 從擇自由序列辨識號2、3、6、27與28所組成之群組之一胺基酸序列的N端的第二個胺基酸被取代為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸與色胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 擇自由序列辨識號2、3、6、27與28所組成之群組之一胺基酸序列的C端胺基酸被取代為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的一胺基酸。

【0027】 [5] [3]之經分離的胜肽，其中該胜肽具有下列特徵之一或兩者：

(a) 從擇自由序列辨識號42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76所組成之群組之一胺基酸序列的N端的第二個胺基酸被取代為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 擇自由序列辨識號42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76所組成之群組之一胺基酸序列的C端胺基酸被取代為擇自由纈胺酸與白胺酸所組成之群組的一胺基酸。

【0028】 [6] [1]至[5]之經分離的胜肽，其中該胜肽具有與一人類白血球組織抗原結合的能力。

【0029】 [7] [6]之經分離的胜肽，其中該人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A24或人類白血球組織抗原-A2。

【0030】 [8] [1]至[7]之任一項所述之經分離的胜肽，其中該胜肽為九胜肽或十胜肽。

【0031】 [9] 一種經分離之多核苷酸，其編碼出[1]至[8]項之任一項之經分離的胜肽。

【0032】 [10] 一種誘發細胞毒殺性T淋巴球之組合物，其中該組合物包括一或多個[1]至[6]之任一項所述之胜肽，或一或多個[9]之多核苷酸。

【0033】 [11] 一種藥學組合物，包括：

(a) 一或多個[1]至[8]之任一項所述之胜肽；

(b) 一或多個[9]之多核苷酸；

(c) 一或多個抗原呈現細胞，其呈現[1]至[8]之任一項之胜肽與一人類白血球組織抗原的一複合物於其表面上；

(d) 一或多個外吐小體，其呈現[1]至[8]之任一項之胜肽與一人類白血球組織抗原的一複合物於其表面上；或

(e) 一或多個細胞毒殺性T淋巴球，其可辨認表現[1]至[8]之任一項之胜肽與一人類白血球組織抗原的一複合物於其表面上的一細胞，

與一藥學上可接受之載體組合，

其中配製該藥學組合物用於癌症的治療及/或預防、其手術後復發的避免，及/或一抗癌症免疫反應的誘導。

【0034】 [12] [11]之藥學組合物，被配製來用於投予一個體，其人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A24或人類白血球組織抗原-A2。

【0035】 [13] 一種誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法，該方法包括擇自由下列所組成之群組的步驟：

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

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

【0036】 [14] 一種誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法，該方法包括擇自由下列所組成之群組的一步驟：

(a) 將CD8陽性T細胞與抗原呈現細胞共培養，抗原呈現細胞表現一人類白血球組織抗原與[1]至[8]之任一項之胜肽的複合物於其表面上；

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

(c) 將編碼出T細胞受體次單元多胜肽之一多核苷酸引入一CD8陽性T細胞，其中由該T細胞受體次單元多胜肽所形成之T細胞受體具有與於一細胞表面上之一人類白血球組織抗原與[1]至[8]之任一項之胜肽的一複合物結合的能力。

【0037】 [15] 一種經分離之抗原呈現細胞，其表現一人類白血球組織抗原與[1]至[8]之任一項之胜肽的一複合物於其表面上。

【0038】 [16] [15]之抗原呈現細胞，其藉由[13]之方法來誘導。

【0039】 [17] 一種經分離之細胞毒殺性T淋巴球，其以[1]至[8]之任一項之胜肽為標的。

【0040】 [18] [17]之細胞毒殺性T淋巴球，其藉由[14]之方

法來誘導。

【0041】 [19] 一種於一個體中誘導一抗癌症之免疫反應的方法，該方法包括投予該個體一組合物的步驟，該組合物包括[1]至[8]之任一項之胜肽、一其免疫活性片段或編碼出該胜肽或該片段之一多核苷酸。

【0042】 [20] 一種抗體或其免疫活性片段，其抗[1]至[8]之任一項之胜肽。

【0043】 [21] 一種載體，包括編碼出[1]至[8]之任一項之胜肽的一核苷酸序列。

【0044】 [22] 一種宿主細胞，其被以[21]之載體所轉形或轉染。

【0045】 [23] 一種診斷套組，包括[1]至[8]之任一項之一胜肽、[9]之多核苷酸或[20]之抗體。

【0046】 [24] 一種篩選具有誘導細胞毒殺性T淋巴球之能力的胜肽的方法，該細胞毒殺性T淋巴球具有抗呈現源自TOPK之一片段的細胞的專一細胞毒性活性，其中該方法包括下列步驟：

(i) 提供一候選序列，其由藉由取代、刪除、插入及/或加入一、二或數個胺基酸殘基至一原始胺基酸序列來修飾的一胺基酸序列所組成，其中該原始胺基酸序列係擇自由序列辨識號：2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76所組成之群組；

(ii) 選擇一候選序列，其除了TOPK不與源自任何已知之人類基因產物之胜肽具有實質顯著的同源性；

(iii) 將由於步驟(ii)中所選擇之該候選序列所組成的一胜肽與一抗原呈現細胞接觸；

(iv) 將步驟(iii)之該抗原呈現細胞與一CD8陽性T細胞接觸；以及

(v) 鑑定出其細胞毒殺性T淋巴球誘發能力相同或高於由該原始胺基酸序列所組成之一胜肽的胜肽。

【0047】雖然於本發明實施例之實施或測試中可使用相似或等同於在此敘述之那些的任何方法與材料，但是現在敘述較佳之方法、元件與材料。然而在敘述本發明材料與方法之前，需瞭解的是，此說明書僅為說明並不被意圖來限制。需注意的是，本發明並不限於敘述於此之特定大小、形狀、尺寸、材料、方法學、步驟等，例如於此敘述，這些可按照慣例實驗法及最佳化可將其變更。此外，於此敘述中使用之專門用語僅是為了敘述特別之變化形式或實施例，且不意圖限制僅會受限於所附上之申請專利範圍的本發明範圍。

【0048】於本說明書中提及之各刊物、專利或專利申請之揭露於此以其內容被具體引入為參考文獻。然而，於此並沒有被解釋為承認本發明由於效力或先前發明不被給予先於這些揭露之權力。

【0049】除非特別定義，與此使用之所有技術與科學用語具有如在本發明所屬之領域中技術人士之一所通常瞭解的相同意義。若發生抵觸(包括定義)，本說明書會控制。此外，材料、方法與實施例僅為解釋說明意指為限制。

【0050】I. 定義

【0051】於此使用之單字“一”與“該”意指“至少一”除非以別的方式明確指出。

【0052】使用於與一物質（例如，胜肽、抗體、多核苷酸等）相關之措辭“分離”與“純化”意指此物質其實質上沒有至少一可被另外包含於自然來源中之物質。因此，一經分離或純化之胜肽意指一胜肽其實質上沒有細胞材料，例如碳水化合物、脂質或其他來自胜肽所源自之細胞或組織來源的其他污染蛋白質，或當化學合成時，實質上沒有化學前驅物或其他化學物。措辭“實質上沒有細胞材料”包括，於其中胜肽從細胞之細胞組成被分離之胜肽的製備，而從此細胞其被分離或重組產生。因此，一胜肽其實質上沒有細胞材料，包括具有小於30%、20%、10%或5%（以乾重）之異源蛋白質（此處也意指為一“污染蛋白質”）的多胜肽的製備。當胜肽被重組產生時，也較佳為實質上沒有培養基，其包括具有少於約20%、10%或5%之胜肽製備體積之培養基的胜肽製備。當胜肽藉由化學合成產生時，較佳為實質上沒有化學前驅物或其他化學物，其包括具有包含於胜肽合成小於約30%、20%、10%或5%（以乾重）之胜肽製備體積的化學前驅物或其他化學物的胜肽製備。可顯示特別之胜肽製備包含一經分離或經純化之胜肽，例如，藉由在蛋白質製備之十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳(sodium dodecyl sulfate (SDS)- polyacrylamide gel electrophoresis)與考馬斯亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色後的一單一條帶的出現或膠體的類似物。在較佳實施例中，本發明之胜肽與多核苷酸被分離或純化。

【0053】於此可替換使用之用語“多胜肽”、“胜肽”與“蛋白質”意指胺基酸殘基之一聚合物。此用語適用於胺基酸聚合物，於其中一或多個胺基酸殘基爲一或多個經修飾之殘基或非自然發生之殘基，例如對應自然發生胺基酸之人工化學模仿物，與自然發生胺基酸聚合物。

【0054】於本說明書中有時使用之用語“寡胜肽”被用來意指胜肽，其爲20個胺基酸殘基或更少，一般爲15個胺基酸殘基或更少，且一般爲由介於約8與約11個之間的胺基酸殘基，通常爲9或10個的胺基酸殘基所組成。後者於此意指九胜肽或十胜肽。

【0055】於此使用之用語“胺基酸”意指自然發生與合成之胺基酸，及胺基酸類似物與胺基酸模仿物，其與自然發生之胺基酸起相似作用。胺基酸可爲L-胺基酸或D-胺基酸。自然發生胺基酸爲基因密碼所編碼的那些與於細胞中在轉譯後被修飾的那些（例如羥脯胺酸(hydroxyproline)、 γ -羧基谷胺酸(gamma-carboxyglutamate)與O-磷絲胺酸(O-phosphoserine)）。措辭“胺基酸類似物”意指具有與自然發生胺基酸相同之基礎化學結構（一 α 碳鍵結至一氫、一羧基、一胺基與一R基）的化合物，但具有一經修飾之R基或經修飾之骨架（例如，同絲胺酸(homoserine)、降亮胺酸(norleucine)、甲硫胺酸(methionine)、亞砜(sulfoxide)、甲基硫氨磺(methionine methyl sulfonium)）。措辭“胺基酸模仿物”意指化學化合物其與一般胺基酸具有不同結構，但有相似的功能。

【0056】可藉由由IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature

Commission所建議之其一般所知的三字母符號或一字母符號來指出於此處之胺基酸。

【0057】於此可替換使用用語“基因”、“寡核苷酸”、“多核苷酸”與“核酸”，且除非以別的特別方式指出，其以它們一般被接受的單一字母編碼來指出。

【0058】於此處，可替換使用之用語“試劑”與“組合物”意指一產物，其包括於特定量中特定成分，與任何產物其直接或間接來自於特定量之特定成分的組合。此用語當用於關於修飾詞語“藥學的”(如於“藥學試劑”與“藥學組合物”中)，意圖包括一產物，其包括一活性成分與形成載體的惰性成分，及任何產物其直接或間接來自任兩個或多個成份之組合、複合或聚集，或來自一或多個成分之解離，或來自一或多個成分之反應或相互作用的其他形式。因此，在本發明內容中，用語“藥學試劑”與“藥學組合物”意指藉由混合本發明一分子或一化合物與藥學上或生理上可接受之載體所製成的任何產物。

【0059】於此使用之用語“活性成分”意指在一試劑或一組合物中的物質，其為生物或生理活躍的。特別是，在一藥學試劑或組合物的內容中，用語“活性成分”意指一成分物質其顯示一目標的之藥學作用。例如，若藥學試劑或組合物用於癌症之治療或避免中，在試劑或組合物中的活性成分可直接或間接引起對癌細胞及/或組織的生物或生理作用。較佳為，此作用可包括減低或抑制癌細胞生長、損傷或殺死癌細胞及/或組織等。一般而言，有效成分的間接作用為誘導細胞毒殺性T細胞辨認或殺死癌細胞。在被配製前，“活性成分”也可意指為“主

體(bulk)”、“藥物物質(drug substance)”或“技術產物(technical product)”。

【0060】如此處所使用之措辭“藥學上可接受之載體”或“生理上可接受之載體”意指藥學上或生理上可接受之材料、組合物、物質或載劑，包括，但不限於一液體或固體填充料、稀釋劑、賦形劑、溶劑或套膜材料。

【0061】本發明之一些藥學試劑或組合物提供特別用途為疫苗。在本發明內容中，措辭“疫苗（也意指為一致免疫性組合物）”意指一試劑或組合物，其藉由接種進入動物具有改善、增強及/或誘導抗腫瘤免疫力的功能。

【0062】除非以別的方式定義，用語“癌症”意指過度表現TOPK基因之癌症或腫瘤，其例子包括，但不限於急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴癌、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0063】除非以別的方式定義，於此可替換使用且除非以別的方式特別指出用語“細胞毒殺性T淋巴球”、“細胞毒殺性T細胞”與“CTL”以意指T淋巴球之次族群，且除非以別的方式指出，意指T淋巴球之次群組(sub-group)可辨認非自身細胞（例如，腫瘤/癌症細胞、被病毒感染之細胞），且誘導這些細胞死亡。

【0064】除非特別定義，如於此使用“HLA-A24”，意指包含次型之HLA-A24，次型之例子包括，但不限於HLA-A*2401、HLA-A*2402、HLA-A*2403、HLA-A*2404、HLA-A*2407、

- HLA-A*2408、HLA-A*2420、HLA-A*2425與HLA-A*2488。

【0065】除非特別定義，如於此使用“HLA-A2”，典型意指次型，次型之例子包括，但不限於HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203、HLA-A*0204、HLA-A*0205、HLA-A*0206、HLA-A*0207、HLA-A*0210、HLA-A*0211、HLA-A*0213、HLA-A*0216、HLA-A*0218、HLA-A*0219、HLA-A*0228與HLA-A*0250。

【0066】除非特別定義，於此使用之用語“套組”被使用於關於試劑與其他材料之組合。與此考慮之套組包括微陣列、晶片、標誌等。並無打算使用語“套組”限制於試劑及/或材料之特定組合。

【0067】如於此使用，在一個體或病患的背景中，措辭“個體之（或病患之）HLA 抗原為HLA-A24或HLA-A2”意指此個體或病患同型結合地 (homozygously) 或異質結合地 (heterozygously) 具有HLA-A24或HLA-A2抗原基因做為一主要組織相容性抗原複合體 (major histocompatibility complex, MHC) class I分子，且HLA-A24或HLA-A2抗原被表現於此個體或病患的細胞中為一HLA抗原。

【0068】本發明之方法與組合物之範圍提供用途於癌症之“治療”之內容中，一治療被視為“有效”，若其導致臨床優點，例如於TOPK基因之表現中的減少、或於個體中癌症之大小、普遍程度 (prevalence) 或轉移潛力、癌症之延緩發展、癌症之臨床症狀的減輕、存活時間的延長、手術後復發的抑制等的減少。當治療為預防性 (prophylactically) 提供時，“有效”意指減

緩或避免癌症形成，或避免或減輕癌症之臨床症狀。有效性被確認於相關之診斷或治療特定腫瘤形式的任何已知方法。

【0069】本發明之方法與組合物之範圍提供用途於癌症之“避免”與“預防”之內容中，此類用詞為與此交替使用意指任何活性，其減少死亡率之負載或來自疾病之死亡率。避免與預防可發生於“初期、第二期與第三期避免層級”。初期避免與預防避免了疾病之發展，而第二期與第三期層級之避免與預防包括藉由恢復功能與減少疾病相關併發症，以疾病之發展與症狀之浮現及減少已建立之疾病之負向發展的避免與預防為目的。或者，治療或避免可包括一廣範圍之預防疾病治療，其以減緩特別疾病之嚴重度為目標，例如減少腫瘤之增殖與轉移。

【0070】在本發明內容中，癌症之治療及/或預防，及/或其手術後復發的避免包括任何下列步驟，例如癌細胞之手術移除、似癌細胞之生長抑制、腫瘤之衰退或退化、癌發生之減緩與抑制的誘導、腫瘤退化與轉移之減少與抑制。癌症之有效治療及/或預防減少致死率與改善具有癌症之個體的預後、減低癌症標記於血液中的程度與減緩伴隨著癌症之可偵測症狀。例如，症狀之減輕或改善構成有效治療及/或預防，其包括10%、20%、30%或更加減輕，或穩定疾病。

【0071】在本發明內容中，用語“抗體”意指免疫球蛋白與其片段，其專一與選定蛋白質或其胜肽反應。一抗體可包括人類抗體、靈長類抗體、嵌合抗體(chimeric antibody)、雙專一抗體(bispecific antibody)、人源化抗體、與其他蛋白質或放射標誌融合之抗體，與抗體片段。此外，此處之抗體被使用於最大效

用且特別包含完整單株抗體、多株抗體、形成自至少兩個完整抗體之多專一抗體(multispecific antibody) (例如雙專一抗體) 與抗體片段，只要其存在所需生物活性。一“抗體”意指所有之種類 (例如，IgA、IgD、IgE、IgG與IgM) 。

【0072】除非特別定義，於此使用之所有技術與科學用語為與熟悉此技藝人士所通常瞭解之意義相同。

【0073】 II. 胜肽

【0074】於下方詳述之本發明胜肽可意指為“TOPK胜肽”或“TOPK多胜肽”。

【0075】為了證明來自TOPK之胜肽作用如一被細胞毒殺性T淋巴球(CTLs)所辨認之抗原，分析來自TOPK之胜肽 (序列辨識號：86) 以確定是否其為由一般遇到HLA對偶基因(allele) 之HLA (人類白血球組織抗原) -A24或HLA-A2所限制之抗原決定位(Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994)。

【0076】根據其對HLA-A24之結合親和力所確認之來自TOPK之HLA-A24結合胜肽的候選物，包括：

TOPK-A24-9-230 (序列辨識號：2)、TOPK-A24-9-130 (序列辨識號：3)、TOPK-A24-9-237 (序列辨識號：4)、TOPK-A24-9-155 (序列辨識號：5)、TOPK-A24-9-232 (序列辨識號：6)、TOPK-A24-9-174 (序列辨識號：7)、TOPK-A24-9-73 (序列辨識號：8)、TOPK-A24-9-235 (序列辨識號：9)、TOPK-A24-9-19 (序列辨識號：10)、TOPK-A24-9-205 (序列辨

識 號：11)、TOPK-A24-9-77 (序列辨識號：12)、TOPK-A24-9-270 (序列辨識號：13)、TOPK-A24-9-58 (序列辨識號：14)、TOPK-A24-9-81 (序列辨識號：15)、TOPK-A24-9-278 (序列辨識號：16)、TOPK-A24-9-183 (序列辨識號：17)、TOPK-A24-9-227 (序列辨識號：18)、TOPK-A24-9-13 (序列辨識號：19)、TOPK-A24-9-146 (序列辨識號：20)、TOPK-A24-9-140 (序列辨識號：21)、TOPK-A24-9-103 (序列辨識號：22)、TOPK-A24-9-105 (序列辨識號：23)、TOPK-A24-9-118 (序列辨識號：24)、TOPK-A24-10-31 (序列辨識號：25)、TOPK-A24-10-155 (序列辨識號：26)、TOPK-A24-10-288 (序列辨識號：27)、TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28)、TOPK-A24-10-130 (序列辨識號：29)、TOPK-A24-10-47 (序列辨識號：30)、TOPK-A24-10-73 (序列辨識號：31)、TOPK-A24-10-102 (序列辨識號：32)、TOPK-A24-10-39 (序列辨識號：33)、TOPK-A24-10-4 (序列辨識號：34)、TOPK-A24-10-77 (序列辨識號：35)、TOPK-A24-10-241 (序列辨識號：36)、TOPK-A24-10-12 (序列辨識號：37)、TOPK-A24-10-148 (序列辨識號：38)、TOPK-A24-10-145 (序列辨識號：39)與TOPK-A24-10-114 (序列辨識號：40)。

【0077】下列胜肽導致成功建立細胞毒殺性T淋巴球，在in vitro藉由載有這些胜肽之樹突細胞(dendritic cell, DC)刺激T細胞後：

TOPK-A24-9-230 (序列辨識號：2)、TOPK-A24-9-130 (序

-
- 列辨識號：3)、TOPK-A24-9- 232 (序列辨識號：6)、TOPK-A24-10- 288 (序列辨識號：27)與TOPK-A24-10- 289 (序列辨識號：28)。

【0078】根據其對HLA-A2之結合親和力所確認之來自TOPK之HLA-A2結合胜肽的候選物，包括：

TOPK-A2-9-240 (序列辨識號：42)、TOPK-A2-9-34 (序列辨識號：43)、TOPK-A2-9-236 (序列辨識號：44)、TOPK-A2-9-19 (序列辨識號：45)、TOPK-A2-9-134 (序列辨識號：46)、TOPK-A2-9-183 (序列辨識號：47)、TOPK-A2-9-81 (序列辨識號：48)、TOPK-A2-9-149 (序列辨識號：49)、TOPK-A2-9-235 (序列辨識號：50)、TOPK-A2-9-12 (序列辨識號：51)、TOPK-A2-9-227 (序列辨識號：52)、TOPK-A2-9-285 (序列辨識號：53)、TOPK-A2-9-47 (序列辨識號：54)、TOPK-A2-9-310 (序列辨識號：55)、TOPK-A2-9-132 (序列辨識號：56)、TOPK-A2-9-242 (序列辨識號：57)、TOPK-A2-9-156 (序列辨識號：58)、TOPK-A2-9-138 (序列辨識號：59)、TOPK-A2-9-142 (序列辨識號：60)、TOPK-A2-10-190 (序列辨識號：61)、TOPK-A2-10-236 (序列辨識號：62)、TOPK-A2-10-231 (序列辨識號：63)、TOPK-A2-10-47 (序列辨識號：64)、TOPK-A2-10-234 (序列辨識號：65)、TOPK-A2-10-239 (序列辨識號：66)、TOPK-A2-10-290 (序列辨識號：67)、TOPK-A2-10-37 (序列辨識號：68)、TOPK-A2-10- 20 (序列辨識號：69)、TOPK-A2-10- 241 (序列辨識號：70)、TOPK-A2-10- 272 (序列辨識號：71)、TOPK-A2-10- 88 (序列辨識號：72)、TOPK-A2-10-

81 (序列辨識號：73)、TOPK-A2-10-313 (序列辨識號：74)、TOPK-A2-10-54 (序列辨識號：75)、TOPK-A2-10-142 (序列辨識號：76)、TOPK-A2-10-35 (序列辨識號：77)、TOPK-A2-10-110 (序列辨識號：78)、TOPK-A2-10-223 (序列辨識號：79)、TOPK-A2-10-274 (序列辨識號：80)、TOPK-A2-10-173 (序列辨識號：81)、TOPK-A2-10-141 (序列辨識號：82)、TOPK-A2-10-292 (序列辨識號：83)與TOPK-A2-10-180 (序列辨識號：84)。

【0079】下列胜肽導致成功建立細胞毒殺性T淋巴球，在in vitro藉由載有這些胜肽之樹突細胞(dendritic cell, DC)刺激T細胞後：

TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42)、TOPK-A02-9-19 (序列辨識號：45)、TOPK-A02-9-183 (序列辨識號：47)、TOPK-A02-9-235 (序列辨識號：50)、TOPK-A02-9-12 (序列辨識號：51)、TOPK-A02-9-285 (序列辨識號：53)、TOPK-A02-9-47 (序列辨識號：54)、TOPK-A02-10-236 (序列辨識號：62)、TOPK-A02-10-231 (序列辨識號：63)、TOPK-A02-10-47 (序列辨識號：64)、TOPK-A02-10-239 (序列辨識號：66)、TOPK-A02-10-272 (序列辨識號：71)、TOPK-A02-10-88 (序列辨識號：72)與TOPK-A02-10-142 (序列辨識號：76)。

【0080】上方所提及之被建立的細胞毒殺性T淋巴球顯示強而專一之抗經分別之胜肽脈衝之目標細胞的細胞毒殺性T淋巴球活性。這些結果證明TOPK為一由細胞毒殺性T淋巴球所辨

認之抗原，且這些胜肽爲由HLA-A24或HLA-A2限制之TOPK的抗原決定位胜肽；因此，此類胜肽可有效爲對於藉由細胞毒殺性T淋巴球之細胞毒性的目標抗原。

【0081】由於TOPK基因於包括，例如急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴癌、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤之那些的癌症細胞與組織中被過度表現，且不在大部分正常器官中被表現，所以其表示一良好之免疫治療標的。因此，本發明提供對應於來自TOPK之細胞毒殺性T淋巴球辨認抗原決定位的九胜肽（胜肽由九個胺基酸殘基所組成）與十胜肽（胜肽由十個胺基酸殘基所組成）。本發明九胜肽與十胜肽的特別較佳實施例包括具有擇自序列辨識號：2至40與42至84中之胺基酸序列的那些胜肽。

【0082】通常可使用現今於例如網路可得之軟體程式，例如於Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75與Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17中所敘述的那些，來計算in silico介於各種胜肽與HLA抗原間之結合親和力。例如，於概述Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220中之Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007; 8: 424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, and Nielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796中所述可測量與HLA抗原之結合親和力。測定親和力之方

法敘述，例如於 *Journal of Immunological Methods*(1995, 185: 181-190)與 *Protein Science* (2000, 9: 1838-1846)中。所以熟悉此技藝人士可立即利用此種軟體程式來選擇來自 TOPK 的那些片段，其藉由使用此類軟體程式具有與 HLA 抗原之高結合親和力。因此本發明包括由來自 TOPK 之任何片段所組成之胜肽，其藉由此類已知程式確認出會與 HLA 抗原結合。此外，此類胜肽可包括由 TOPK 序列之全長所構成之胜肽。

【0083】本發明胜肽，特別是本發明之九胜肽與十胜肽可於側面具有額外之胺基酸殘基，只要所產生之胜肽維持其細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。特定之額外胺基酸殘基可由任何種類之胺基酸所組成，只要它們不減少原始胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力。因此，本發明包括具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之胜肽，特別是來自 TOPK 之胜肽（例如包括序列辨識號：2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72 或 76 之一胺基酸序列的胜肽）。此種胜肽，例如小於約 40 個胺基酸，時常小於約 20 個胺基酸與通常小於約 15 個胺基酸。

【0084】一般已知於一胜肽中一、二或多個胺基酸之修飾，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，於一實施例中，本發明胜肽具有細胞毒殺性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序列辨識號：2至40與42至84中的胺基酸序列兩者。換言之，本發明之胜肽具有細胞毒殺性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序列辨識號：2至40與42至84中之胺基酸序列兩者，其提供經修飾之胜肽維持原始胜肽細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。

【0085】熟悉此技藝人士會認定改變一單一胺基酸或整個胺基酸序列之一小百分比的個別修飾（即，刪除、插入、加入及/或取代）至一胺基酸序列傾向產生保存原始胺基酸支鏈的特性。因此它們常被意指為“保守取代 (conservative substitution)”或“保守修飾 (conservative modification)”，其中一蛋白質之改變導致一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：一脂肪族支鏈(G, A, V, L, I, P)；一含羥基支鏈(S, T, Y)；含硫原子支鏈(C, M)；含羧酸與胺基支鏈(D, N, E, Q)；含鹼支鏈(R, K, H)；以及含芳香族支鏈(H, F, Y, W)。此外，下列八個族群各包含於本技術領域中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(N)、麩胺醯胺(Q)；
- 4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；
- 5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫丁胺酸(M)、纈胺酸(V)；
- 6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；
- 7) 絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；以及
- 8) 半胱胺酸(C)、甲硫丁胺酸(M)（參見，例如 Creighton, *Proteins* 1984）。

【0086】此種經保守修飾胜肽也被視為本發明之胜肽。然而，本發明之胜肽並不限於此，且可包括非保守修飾，只要經修飾之胜肽維持原始未修飾胜肽的細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。更進一步而言，經修飾之胜肽應不排除源自TOPK之多形變體 (polymorphic variant)、種間同質體 (interspecies homologues)與對偶基因 (alleles)的細胞毒殺性T淋巴球誘發的胜肽。

【0087】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殺性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比較佳為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%。

【0088】當使用於免疫治療之背景中時，本發明胜肽應被

表現於一細胞或外吐小體之表面上，較佳為一伴隨HLA抗原之複合物。因此，較佳為選擇胜肽，其不僅誘導細胞毒殺性T淋巴球且也擁有對HLA抗原之高結合親合力。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一具有經改善之結合親合力的經修飾胜肽。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(J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307)為已知，可將基於此規則之修飾引入本發明之致免疫性胜肽。

【0089】例如，具有高HLA-A24結合親和力之胜肽傾向具有以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸取代之來自N端的第二個胺基酸。同樣地，於其中C端胺基酸被以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸取代的胜肽傾向具有高的HLA-A24結合親和力。所以，值得嚮往的是，以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸取代來自N端之第二個胺基酸，及/或以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸取代於C端之胺基酸，以為了增加HLA-A24結合親和力。因此，具有擇自序列辨識號：2至40（特別是，序列辨識號；2、3、6、27與28）中之胺基酸序列的胜肽，於其中來自序列辨識號之胺基酸序列之N端之第二個胺基酸被以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸取代，及/或於其中序列辨識號之胺基酸序列之於C端之胺基酸被以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸取代，也被包含於本發明中。又，本發明包括胜肽，其包含一胺基酸序列，於其中一、二或數個胺基酸被取代、

刪除、插入及/或加入於擇自序列辨識號：2至40（特別是，序列辨識號：2、3、6、27與28）中胺基酸序列，此類胜肽具有下列(a)來自N端的第二個胺基酸為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸與(b)C端之胺基酸為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸之特徵之任一或兩者。在較佳實施例中，本發明胜肽包括一胺基酸序列，於其中，在擇自序列辨識號：2至40（特別是，序列辨識號：2、3、6、27與28）中之胺基酸序列中，來自之N端之第二個胺基酸被以苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸取代，及/或於C端之胺基酸被以苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸取代。

【0090】同樣地，顯示高HLA-A2結合親和力之胜肽傾向具有以白胺酸或甲硫丁胺酸取代之來自N端的第二個胺基酸，及/或以纈胺酸與白胺酸取代C端胺基酸。或者，值得嚮往的是，以白胺酸或甲硫丁胺酸取代來自N端之第二個胺基酸，及/或以纈胺酸與白胺酸取代於C端之胺基酸，以爲了增加HLA-A2結合親和力。因此，具有擇自序列辨識號：42至84（特別是，序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76）中之胺基酸序列的胜肽，於其中來自序列辨識號之胺基酸序列之N端之第二個胺基酸被以白胺酸或甲硫丁胺酸取代，及/或於其中序列辨識號之胺基酸序列之於C端之胺基酸被以纈胺酸與白胺酸取代，也被包含於本發明中。又，本發明包括胜肽，其包含一胺基酸序列，於其中一、二或數個胺基酸被取代、刪除、插入及/或加入於擇自序列辨識號：42至84（特別是，序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、

64、66、71、72與76)中胺基酸序列，此類胜肽具有下列(a)來自N端的第二個胺基酸為白胺酸或甲硫丁胺酸與(b)C端之胺基酸為纈胺酸與白胺酸之特徵之任一或兩者。在較佳實施例中，本發明胜肽包括一胺基酸序列，於其中，在擇自序列辨識號：42至84(特別是，序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76)中之胺基酸序列中，來自之N端之第二個胺基酸被以為白胺酸或甲硫丁胺酸取代，及/或於C端之胺基酸被以纈胺酸與白胺酸取代。

【0091】可將取代引入不止於末端胺基酸，也可於胜肽之潛在T細胞受體(TCR)辨認的位置。一些研究已證實一具有胺基酸取代之胜肽可等於或比原來更好，例如CAP1、p53 (264-272), Her-2/neu (369-377)或gp100 (209-217) (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002);168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 and S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

【0092】本發明也考慮一、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。此種具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之經修飾的胜肽也包括於本發明中。

【0093】例如，本發明提供在長度小於15、14、13、12、11或10個胺基酸的一經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i) 擇自序列辨識號：2至24與42至60中之胺基酸序列；

(ii) 一胺基酸序列，其中1、2或數個胺基酸被修飾於擇自

由序列辨識號：2至24與42至60所組成之群組的胺基酸序列中，其中該胜肽具有誘發細胞毒殺性T淋巴球之能力，

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

(a) 來自此序列辨識號之N端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸與色胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b) 此序列辨識號之C端胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的一胺基酸。

(iv) (ii)之胺基酸序列，其中於HLA-A2之背景中，此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(c) 來自此序列辨識號之N端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(d) 此序列辨識號之C端胺基酸為或被修飾為擇自由纈胺酸與白胺酸所組成之群組的一胺基酸。

【0094】此外，本發明也提供在長度小於15、14、13、12或11個胺基酸的一經分離的胜肽，其具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力且包括擇自由下列所組成之群組的胺基酸序列：

(i') 擇自序列辨識號：25至40與61至84中之胺基酸序列；

(ii') 一胺基酸序列，其中1、2或數個胺基酸被修飾於擇自由序列辨識號：25至40與61至84所組成之群組的胺基酸序列中，其中該胜肽具有誘發細胞毒殺性T淋巴球之能力，

(iii') (ii')之胺基酸序列，其中於HLA-A24之背景中，此胺

基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(a') 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫丁胺酸與色胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(b') 此序列辨識號之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的一胺基酸。

(iv') (ii') 之胺基酸序列，其中於 HLA-A2 之背景中，此胺基酸序列具有下列特徵之一或兩者：

(c') 來自此序列辨識號之 N 端之第二個胺基酸為或被修飾為擇自由白胺酸與甲硫丁胺酸所組成之群組的一胺基酸；以及

(d') 此序列辨識號之 C 端胺基酸為或被修飾為擇自由纈胺酸與白胺酸所組成之群組的一胺基酸。

【0095】當那些胜肽與抗原呈現細胞接觸時，這些胜肽與在抗原呈現細胞上之 HLA 抗原結合，以被呈現於抗原呈現細胞上，為具有 HLA 抗原之複合物。或者，當那些胜肽與抗原呈現細胞接觸時，那些胜肽被引入抗原呈現細胞並處理成具有擇自 (i)-(iv) 與 (i')-(iv') 中之胺基酸序列的片段於抗原呈現細胞中，以被呈現於抗原呈現細胞上，為具有 HLA 抗原之複合物。因此，誘導專一於此類胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0096】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，可能誘導負面副作用，例如自體免疫疾病及/或抗特定物質之過敏症候群。因此，

可值得嚮往的是，首先可使用可得之資料庫執行同源搜尋以避免胜肽之序列符合其他蛋白質之胺基酸序列的情況。當相較於目標胜肽，於自然沒有相同於或具有1或2個胺基酸不同的胜肽存在的同源搜尋變得清楚時，爲了增加其與HLA抗原之結合親和力，及/或增加其細胞毒殺性T淋巴球誘發能力而不具副作用之任何危險，可修飾目標胺基酸。

【0097】雖然如上述之具有對HLA抗原高結合親和力的胜肽被預期爲高效能，但根據作爲指示之高親和表現而被選擇之候選胜肽，更進一步被測試細胞毒殺性T淋巴球誘發能力的表現。此處措辭“細胞毒殺性T淋巴球誘發能力”意指當表現於抗原呈現細胞上時，胜肽誘導細胞毒殺性T淋巴球的能力。此外，“細胞毒殺性T淋巴球誘發能力”包括胜肽誘導細胞毒殺性T淋巴球活化、細胞毒殺性T淋巴球增殖、促進藉由細胞毒殺性T淋巴球之目標細胞分解與增加藉由細胞毒殺性T淋巴球之IFN- γ 產生的能力。

【0098】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，並在以刺激胜肽之抗原呈現細胞刺激之後，將抗原呈現細胞與CD8陽性T細胞混合以誘導細胞毒殺性T淋巴球，且之後測量由抗目標細胞之細胞毒殺性T淋巴球產生並釋放之IFN- γ 可達成細胞毒殺性T淋巴球誘發能力的確定。如此反應系統，可使用已被產生來表現人類HLA之抗原基因轉殖動物（例如，於BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, 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 放射標示目標細胞，且可從自目標細胞釋放出的放射活性計算細胞毒殺性T淋巴球之細胞毒殺活性。或者，細胞毒殺性T淋巴球誘發能力可在攜帶經固定之胜肽之抗原呈現細胞存在下，藉由測量由細胞毒殺性T淋巴球產生並釋放的 $\text{IFN-}\gamma$ ，並使用抗 $\text{IFN-}\gamma$ 單株抗體來使於培養基上之抑制區為可見來評估。

【0099】由於如上述測試胜肽之細胞毒殺性T淋巴球誘發能力，發現擇自由序列辨識號：2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76所指出胺基酸序列中的九胜肽或十胜肽顯示特別高之細胞毒殺性T淋巴球誘發能力與對HLA抗原之高結合親和力。因此這些胜肽被示例為本發明之較佳實施例。

【0100】此外，同源分析結果證明此種胜肽不與來自任何其他已知人類基因產物之胜肽具有顯著之同源性。因此，當用於免疫治療時，降低了未知或不需要之免疫反應提升的可能性。因此，也來自此態樣，這些胜肽對於在癌症病患中引起抗TOPK免疫力為有效用。因此，本發明胜肽之較佳例子，包括，但不限於具有擇自由序列辨識號：2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76之胺基酸序列的胜肽。

【0101】如上所提及，本發明胜肽具有誘導專一於TOPK之

細胞毒殺性T淋巴球的能力。例如，具有擇自序列辨識號：2、3、6、27與28中之胺基酸序列的胜肽，或其經修飾的胜肽具有誘發細胞毒殺性T淋巴球的能力，此細胞毒殺性T淋巴球可顯示抗經由HLA-A24表現來自TOPK之胜肽的細胞（例如，表現TOPK與HLA-A24的細胞）的專一細胞毒性的活性。此類細胞的例子包括HLA-A24陽性癌細胞。同樣地，具有擇自序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76中之胺基酸序列的胜肽，或其經修飾的胜肽具有誘發細胞毒殺性T淋巴球的能力，此細胞毒殺性T淋巴球可顯示抗經由HLA-A2表現來自TOPK之胜肽的細胞（例如，表現TOPK與HLA-A2的細胞）的專一細胞毒性的活性。此類細胞的例子包括HLA-A2陽性癌細胞。

【0102】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殺性T淋巴球誘發能力，且更佳為也維持必不可少之HLA結合能力。適合之“其他”胜肽的例子包括：本發明胜肽或來自其他腫瘤相關抗原之細胞毒殺性T淋巴球誘導胜肽。本發明胜肽可直接或間接經由一連結器連結“其他”胜肽。適合之胜肽內連結器為被本技術領域所熟知，且包括，例如AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRRK (R. P. M. Sutmuller 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)。

【0103】例如，也可隨後或同時使用非TOPK腫瘤相關抗原

胜肽以增加經由HLA class I及/或HLA class II之免疫反應。其已相當確認，癌症細胞可表現多於一個腫瘤相關基因。因此，其為在對於熟悉此技藝人士例行實驗之範圍中以確認是否一特定個體表現額外腫瘤相關基因，且之後包括來自於本發明之藥學組合物或疫苗中之此類基因產物的HLA class I-結合胜肽及/或class II-結合胜肽。

【0104】 HLA class I-與HLA class II-結合胜肽之一些對於熟悉此技藝人士而言是已知的（例如，參見Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995），且可以被用於本發明中，以如此處所揭露之那些的類似方式。所以使用分子生物之標準程序，熟悉此技藝人士可立即製備包括一或多個TOPK胜肽與一或多個非TOPK胜肽的多胜肽，或編碼出此類多胜肽的核酸。

【0105】 上述連結胜肽於此處意指為“多面體(polytope)”。即，兩個或多個潛在免疫原性(immunogenic)或免疫反應刺激胜肽的群組，胜肽可以多種排列（例如，連成一串或部分重疊）互相連接。多面體（或編碼出多面體的核酸）可以符合標準免疫步驟被投予，例如至動物，以測試多面體於刺激、增強及/或誘導一免疫反應之功效。

【0106】 胜肽可被直接連接或經由使用位於側面之序列以形成多面體，且多面體為疫苗之用途為本技術領域所熟知（參見，Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990）。製備並含有抗原決定位之

不同數目與組合的多面體並爲了藉由細胞毒殺性T淋巴球的辨認與爲了於增加免疫反應中之功效將其進行測試。

【0107】本發明胜肽也可被進一步被連接至其他物質，只要所產生之連結胜肽維持原始胜肽必不可少之細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。適合之物質的例子包括，例如：胜肽、脂質、糖與糖鏈、乙醯基，天然與合成之聚合物等。胜肽可包含修飾，例如醯基化、支鏈氧化或磷酸化等，所提供之修飾不損壞原始胜肽之生物活性。這些種類之修飾可被執行以授予額外之功能（例如，目標功能與傳送功能）或穩定胜肽。

【0108】例如，爲了 *in vivo* 增加胜肽之穩定度，本技術領域已知引入D-胺基酸、胺基酸模仿物或非天然胺基酸；此內容也適合本發明之胜肽。可以一些方法分析一胜肽的穩定度。例如，可使用肽酶與多種生物培養基，例如人類血漿與血清，來測試穩定度（參見，例如 Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302）。

【0109】此外，如上所提到，在藉由1、2或數個胺基酸殘基取代、刪除、插入或加入之經修飾的胜肽中，可篩選或選擇與原始胜肽相較具有相同或較高之活性的那些。因此本發明也提供一篩選或選擇與原始相較具有相同或較高之活性的經修飾胜肽的方法。說明性之方法包括步驟：

a：修飾（即，取代、刪除、插入或加入）至少一個本發明胜肽之胺基酸殘基，

b：確定胜肽的活性，

c：選擇與原始相較具有相同或較高之活性的胜肽。

【0110】 於較佳實施例中，本發明提供一種篩選具有誘導細胞毒殺性T淋巴球之能力的胜肽的方法，該細胞毒殺性T淋巴球具有抗呈現源自TOPK之一片段的細胞的專一細胞毒性，其中該方法包括下列步驟：

(i) 提供一候選序列，其由藉由取代、刪除、插入及/或加入一、二或數個胺基酸至一原始胺基酸序列來修飾的一胺基酸序列所組成，其中該原始胺基酸序列係擇自由序列辨識號：2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76所組成之群組；

(ii) 選擇一候選序列，其除了TOPK不與源自任何已知之人類基因產物具有實質顯著的同源性；

(iii) 將由於步驟(ii)中所選擇之該候選序列所組成的一胜肽與一抗原呈現細胞接觸；

(iv) 將步驟(iii)之抗原呈現細胞與一CD8陽性T細胞接觸；以及

(v) 鑑定出其細胞毒殺性T淋巴球誘發能力相同或高於由該原始胺基酸序列所組成之一胜肽的胜肽。

【0111】 此處，要被分析之活性可包括MHC結合活性、抗原呈現細胞或細胞毒殺性T淋巴球誘發能力與細胞毒性活性。較佳為要被分析之胜肽的活性為細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。

【0112】 III. TOPK胜肽之製備

【0113】 使用熟知之技術可製備本發明之胜肽。例如，使用重組DNA技術或化學合成可以合成方法製備胜肽。本發明胜

肽可單獨合成或為包括兩或多個胜肽之較長多胜肽。之後可分離此胜肽，即純化或分離以便為實質上無其他自然發生之宿主細胞蛋白質與其片段或任何其他化學物質。

【0114】本發明胜肽可包含修飾，例如糖基化、支鏈氧化或磷酸化，其提供修飾不損壞原始胜肽之生物活性。其他修飾包括可用來，例如增加胜肽之血清半衰期之一或多個D-胺氨酸或其他胺氨酸模仿物的合併。

【0115】藉由根據經選擇之胺氨酸序列的化學合成可獲得本發明之胜肽。可適合此合成之一般胜肽合成方法的例子包括：

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

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

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

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

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

(vi) WO99/67288；以及

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

100-118。

【0116】或者，藉由適應任何已知產生胜肽之基因工程方法可獲得本發明之胜肽（例如，Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62）。例如，首先製備一適合之載體，其懷有一多核苷酸其編碼出目標胜肽於一可表達的形式中（例如，對應於啓動子序列之調控序列的下游），並將載體轉殖進入適合之宿主細胞。之後培養宿主細胞以產生感興趣之胜肽。使用一 *in vitro* 轉譯系統可 *in vitro* 產生胜肽。

【0117】 IV. 多核苷酸

【0118】本發明也提供一多核苷酸，其編碼出任何本發明上述之胜肽。這些包括來自自然發生之 TOPK 基因（例如，GenBank Accession No. NM_018492（序列辨識號：85））的多核苷酸與具有其之保守修飾之核苷酸序列的那些。此處措辭“保守修飾之核苷酸序列”指序列其編碼出相同或實質上相同之胺基酸序列。由於基因密碼的退化，一大數量之功能相同之核酸編碼出任何已知蛋白質。例如，密碼 GCA、GCC、GCG 與 GCU 皆編碼出胺基酸丙胺酸。因此，於藉由一密碼具體指定丙胺酸之每個位置，可改變密碼成為任何上述不會改變編碼出之胜肽的對應密碼。此核酸變化為“沈默變化(silent variation)”，其為保守修飾變化的一種。此處敘述編碼出一胜肽之每個核酸序列也描述核酸之每種可能的沈默變化。熟悉此技藝人士會明白於一核酸中各密碼（除了 AUG，其原本為甲硫胺酸之唯一密碼、與 TGG 其原本為色胺酸之唯一密碼）可被修飾以產生一功

能相同分子。因此，編碼出一胜肽之核酸各沈默變化，被暗示性揭露於各揭露序列中。

【0119】本發明之多核苷酸可由DNA、RNA與其衍生物所組成。如本技術領域所熟知，一DNA適合地由鹼基所組成，例如A、T、C與G，而T於RNA中為U所取代。熟悉此技藝人士可瞭解非自然發生鹼基也可被包含於多核苷酸中。

【0120】本發明之多核苷酸可編碼出本發明之多個胜肽，於其間具有或不具有介於中間之胺基酸序列。例如，介於中間之胺基酸序列可提供多核苷酸或經轉譯之胜肽一裂解位（例如酵素辨認序列）。更進一步而言，多核苷酸可包括任何額外之序列至編碼出本發明胜肽之編碼序列。例如，多核苷酸可為一重組多核苷酸，其包括胜肽表現所需之調控序列，或可為一具有標誌基因與此類之表現載體（質體）。一般而言，可製備此重組多核苷酸，藉由經由使用例如聚合酶與內切酶之一般重組技術的多核苷酸操作。

【0121】可使用重組與化學合成技術兩者以產生本發明之多核苷酸。例如，藉由插進入一適合之載體可產生一多核苷酸，當轉染進入一勝任細胞時，其可被表現。或者，使用PCR技術或表現於適合的宿主可將一多核苷酸放大（參見，例如 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989）。或者，使用固態技術如於 Beaucage SL & Iyer RP, *Tetrahedron* 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., *EMBO J* 1984, 3: 801-5中所敘述，可合成多核苷酸。

【0122】 V. 外吐小體(exosomes)

【0123】本發明進一步地提供稱為外吐小體的胞間囊泡(intracellular vesicles)，其呈現形成於本發明之胜肽與人類白血球抗原表面之間的複合物。例如，藉由使用於日本專利公開號Hei 11-510507與WO99/03499所詳述的方法以及使用從接受治療和/或避免之病人所得的抗原表現細胞可製備外吐小體。本發明之外吐小體可如疫苗般地接種，以相似於本發明的胜肽之方式。

【0124】包括在複合物中的人類白血球抗原形式必須與需要治療及/或預防之個體的人類白血球抗原形式相符。例如，在日本人族群中，HLA-A24與HLA-A2，特別是HLA-A*2402與HLA-A*0201與HLA-A*0206為普遍的，因此為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-A24型之使用有助於獲得有效的結果，且次型，例如HLA-A*2402、HLA-A*0201與HLA-A*0206也提供用途。一般在臨床上，需接受治療之病患的人類白血球抗原形式係進行預先的研究，這可適當地選擇對此特別抗原具有高度結合親合力的胜肽或經由抗原表現具有細胞毒性T淋巴細胞誘發性的胜肽。此外，為了獲得具有高度結合親合力與細胞毒性T淋巴細胞誘發性兩者的胜肽，可以天然產生之TOPK部分胜肽的胺基酸序列為基礎，執行1、2或數個胺基酸的取代、插入、刪除及/或添加。

【0125】當本發明之外吐小體擁有HLA-A24型為一抗原時，包括擇自序列辨識號：2至40(特別是序列辨識號：2、3、6、27與28)中胺基酸序列的胜肽具有特別的效用。

【0126】或者，當本發明之外吐小體擁有HLA-A2型為一抗原時，包括擇自序列辨識號42至84(特別是序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76)中胺基酸序列的胜肽具有特別的效用。

【0127】在一些實施例中，本發明之外吐小體為呈現本發明胜肽與HLA-A24或HLA-A2抗原之一複合物於其表面上之外吐小體。在一些典型實施例中，本發明之外吐小體呈現具有序列辨識號：2、3、6、27或28之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)與HLA-A24之一複合物於其表面上。在其他實施例中，本發明之外吐小體呈現具有序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72或76之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)與HLA-A2之一複合物於其表面上。

【0128】 VI. 抗原呈現細胞(APCs)

【0129】本發明也提供經分離之抗原呈現細胞，其表現形成於HLA抗原與本發明胜肽之間的複合物於其表面上。抗原呈現細胞可來自受到治療及/或避免之病患，且藉由其本身或與包括本發明之胜肽、外吐小體或細胞毒殺性T淋巴球之其他藥物結合可被投予如一疫苗。

【0130】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、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B細胞與活化之T細胞，已知其表現蛋白質(proteinaceous)抗原於其細胞表面以被淋巴球所辨認。由於樹突細胞為一典型抗原呈現細胞，其於抗原呈現細胞中具最強之細胞毒殺性T淋巴球誘導活性，所以樹突細胞可被

較佳地使用爲本發明之抗原呈現細胞。

【0131】例如，藉由誘導來自周邊血液單核細胞之樹突細胞與之後 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 與本發明胜肽接觸（刺激）其可獲得一抗原呈現細胞。當本發明之胜肽投予至一個體，於個體身體內誘導表現本發明胜肽之抗原呈現細胞。於此，措辭“誘導抗原呈現細胞”包括以本發明之胜肽接觸（刺激）一抗原呈現細胞，或將編碼出本發明胜肽之多核苷酸引入一抗原呈現細胞以具有表現形成於HLA抗原與本發明一胜肽之間的複合物於其表面的抗原呈現細胞。例如，藉由在將本發明一或多個胜肽投予至一個體後，自此個體收集抗原呈現細胞可獲得本發明之抗原呈現細胞。或者，藉由將已自個體被收集之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸可獲得本發明之抗原呈現細胞。

【0132】可將本發明之抗原呈現細胞以其本身或結合包括本發明胜肽、外吐小體或細胞毒殺性T淋巴球的其他藥物投予至一個體以誘導於個體中之抗癌免疫反應。例如，*ex vivo* 投予可包括步驟：

- a：自一第一個體收集抗原呈現細胞，
- b：步驟a之抗原呈現細胞與胜肽接觸，以及
- c：將步驟b之抗原呈現細胞投予一第二個體。

【0133】第一個體與第二個體可爲相同個體或可爲不同個體。自步驟b獲得之抗原呈現細胞可被配製且投予疫苗，以治療及/或避免癌症，例如，膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、慢性骨髓性白血病、結腸直腸癌、胃癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、攝護腺癌、

織腫瘤，但不限於此。

【0134】 在本發明內容中，可使用本發明一或多個胜肽以製造用以誘導一抗原呈現細胞之藥學組合物。於此提供用於製造用以誘導一抗原呈現細胞之藥學組合物的一方法或製程，且較佳為包括將本發明胜肽與一藥學上可接受之載體一起混合或配製的步驟。

【0135】 本發明也提供用於誘導一抗原呈現細胞之本發明胜肽的用途。

【0136】 根據本發明一方面，本發明之抗原呈現細胞具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。在抗原呈現細胞之內容中，措辭“細胞毒殺性T淋巴球誘發能力”意指當與一CD8陽性T細胞接觸時，一抗原呈現細胞誘導一細胞毒殺性T淋巴球。再者，“細胞毒殺性T淋巴球誘發能力”包括一抗原呈現細胞誘導細胞毒殺性T淋巴球活化、細胞毒殺性T淋巴球增生、促進目標細胞藉由細胞毒殺性T淋巴球之裂解與增加藉由細胞毒殺性T淋巴球之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TOPK之細胞毒殺性T淋巴球的能力。

【0137】 藉由包括in vitro將編碼出本發明胜肽之多核苷酸轉移至抗原呈現細胞的步驟的方法與上述之方法，可製備此種具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。此經引入之多核苷酸可為DNA或RNA形式。引入方法的例子包括，並無特別限制，各種於此領域一般被執行的方法，可使用例如脂質體轉染(lipofection)、電穿孔法(electroporation)與磷酸鈣方法。更特別地，可執行其如Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J

Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 日本專利公開號2000-509281中所述。藉由轉移編碼出本發明胜肽之基因進入抗原呈現細胞，基因遭遇轉錄、轉譯與此類於細胞中，且之後所獲得之蛋白質藉由MHC Class I或Class II處理，並經由一呈現途徑進行以與呈現本發明胜肽。或者，本發明之抗原呈現細胞可藉由包括將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸之步驟的方法來製備。

【0138】 在一些實施例中，本發明之抗原呈現細胞為表現HLA-A24或HLA-A2抗原與本發明胜肽與之複合物於其表面上之抗原呈現細胞。在一些典型實施例中，本發明之抗原呈現細胞呈現具有序列辨識號：2、3、6、27或28之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)與HLA-A24之一複合物於其表面上。在其他實施例中，本發明之抗原呈現細胞呈現具有序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72或76之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)與HLA-A2之一複合物於其表面上。

【0139】 VII. 細胞毒殺性T淋巴球(CTLs)

【0140】 抗任何本發明胜肽誘導之細胞毒殺性T淋巴球增強in vivo以癌症細胞為標的之免疫反應，且因此就其本身而言，可以相似於胜肽之方式使用為疫苗。因此本發明提供經分離之細胞毒殺性T淋巴球其藉由任一本發明之胜肽專一地被誘導或活化。

【0141】 可獲得此種細胞毒殺性T淋巴球，藉由(1) 將本發明胜肽投予至一個體；(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in vitro接觸（刺激）；(3) 將CD8陽性T細胞或周邊血液單核淋巴球in vitro與表現HLA抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上之抗原呈現細胞或外吐小體接觸；或(4) 引入編碼出T細胞受體次單元的多核苷酸，T細胞受體次單元可形成一T細胞受體，其具有與於一細胞表面上之一HLA抗原與本發明胜肽之複合物結合的能力。藉由上述方法可製備此種用於方法(3)之抗原呈現細胞或外吐小體。(4)之方法之詳細被敘述於下方“VIII. T細胞受體(TCR)”的段落中。

【0142】本發明細胞毒殺性T淋巴球可來自一受到治療及/或避免之病患，且藉由其身或與包括爲了調節作用之胜肽、抗原呈現細胞或外吐小體的其他藥物結合可被投予。所獲得之細胞毒殺性T淋巴球起專一抗目標細胞的作用，而目標細胞其表現本發明胜肽，例如用於誘導之相同胜肽。目標細胞可爲細胞其內生性表現TOPK，例如癌細胞，或被以TOPK基因轉殖之細胞；且由於藉由胜肽刺激表現本發明胜肽於細胞表面之細胞，也可做爲經活化之細胞毒殺性T淋巴球攻擊的目標。

【0143】在一些實施例中，本發明之細胞毒殺性T淋巴球可辨認表現一HLA-A24或HLA-A2抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上的細胞。在細胞毒殺性T淋巴球的內容中，措辭“辨認一細胞”意指經由其TCR與於細胞表面上之一HLA-A24或HLA-A2抗原與本發明胜肽之複合物結合，並顯示抗此細胞之特定細胞毒殺性T淋巴球活性。於此“特定細胞毒殺性T淋巴球活性”意指顯示抗表現一HLA-A24或HLA-A2抗原與本發明胜

肽之複合物的細胞，而不對其他細胞。因此，細胞毒殺性T淋巴球，其顯示專一抗呈現本發明胜肽之細胞的細胞毒性，被包含於本發明中。

【0144】 在一些典型實施例中，本發明之細胞毒殺性T淋巴球可經由HLA-A24辨認一細胞，其呈現具有序列辨識號：2、3、6、27或28之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)。在較佳實施例中，本發明之此類細胞毒殺性T淋巴球可辨認表現TOPK與一HLA-A24之細胞(例如，HLA-A24陽性癌細胞)。

【0145】 在其他實施例中，本發明之細胞毒殺性T淋巴球可經由HLA-A2辨認一細胞，其呈現具有序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72或76之胺基酸序列之胜肽(或其經修飾之胜肽)。在較佳實施例中，本發明之此類細胞毒殺性T淋巴球可辨認表現TOPK與一HLA-A2之細胞(例如，HLA-A2陽性癌細胞)。

【0146】 VIII. T細胞受體(TCR)

【0147】 本發明也提供一組合物其包括由編碼出可形成T細胞受體之次單元之多胜肽的一或多個核酸，與其使用方法。T細胞受體之次單元具有能力形成T細胞受體，其授與專一性至抗腫瘤細胞的T細胞，腫瘤細胞表現TOPK。藉由使用本技術領域所知的方法可確認編碼出為細胞毒殺性T淋巴球之T細胞受體次單元之 α -與 β -支鏈之各個的多核苷酸，而細胞毒殺性T淋巴球以本發明之胜肽所誘導(WO2007/032255與Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如，喜好以聚合酶鏈鎖反應方法來分析T細胞受體次單元。用於分析之聚合酶鏈鎖反應引子

可為，例如5'-R 引子(5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (序列辨識號：87) 為5'端引子與3-TRa-C 引子(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (序列辨識號：88) 專一於T細胞受體 alpha 鏈 C 區、3-TRb-C1 引子(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (序列辨識號：89) 專一於T細胞受體 beta 鏈 C1 區或3-TRbeta-C2 引子(5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (序列辨識號：90) 專一於T細胞受體 beta 鏈 C2 區為3'端引子，但不限於其。引出之T細胞受體可以高親合力結合表現TOPK胜肽之目標細胞，且視需要 *in vivo* 與 *in vitro* 居中有有效殺死表現本發明TOPK之目標細胞。

【0148】編碼出T細胞受體次單元的核苷酸序列(即，編碼出T細胞受體次單元之兩者的多核苷酸或編碼出T細胞受體次單元之各個的多核苷酸)可合併進入適合之載體，例如反轉錄病毒載體。這些載體為本技術領域所熟知。通常包含其之多核苷酸或載體可被轉移至一T細胞(例如，CD8陽性T細胞)，例如一來自一病患之T細胞。有用地，本發明提供一現成(off-the-shelf)的組合物允許快速修飾病人所擁有之T細胞(或其他哺乳動物之那些)以快速簡單產生具有優秀之癌症細胞殺死特性的經修飾T細胞。

【0149】抗本發明胜肽之特定的T細胞受體應具有專一地辨認本發明之一胜肽與一HLA抗原之複合物的能力，當T細胞受體被表現於T細胞表面時，給予T細胞抗表現本發明胜肽與HLA抗原之一複合物的目標細胞之專一活性。藉由任何已知的方法可確認必不可少的活性，其藉由引入編碼出此類T細胞受

體次單元的多核苷酸所製備的細胞毒殺性T淋巴球可專一地辨認此種目標細胞。此類方法之較佳的例子包括，例如使用HLA分子與本發明胜肽之四聚體分析，與ELISPOT分析。藉由ELISPOT分析，可確認藉由上述方法所製備之細胞毒殺性T淋巴球可專一地辨認目標細胞，且藉由細胞內傳送由此辨認所產生的訊號。此外，藉由一已知方法也可確認如上述方法所製備之細胞毒殺性T淋巴球具有抗目標細胞之專一細胞毒性活性。此類方法之例子，例如使用表現TOPK與HLA-A24或HLA-A2兩者之細胞的鉻(chromium)釋放分析。

【0150】在一方面中，本發明提供細胞毒殺性T淋巴球，其藉由以編碼出T細胞受體次單元多胜肽的多胜肽（即，編碼出T細胞受體次單元之兩者的多核苷酸或編碼出T細胞受體次單元之各個的多核苷酸）轉導所製備，其中，藉由此類T細胞受體次單元所形成之T細胞受體可與於細胞表面上具有擇自序列辨識號：2至40中之胺基酸序列的TOPK胜肽與HLA-A24抗原的複合物結合，或可與於細胞表面上具有擇自序列辨識號：42至84中之胺基酸序列的TOPK胜肽與HLA-A2抗原的複合物結合。

【0151】經轉導之細胞毒殺性T淋巴球可*in vivo*自引導至癌症細胞，且可藉由熟知的培養方法*in vitro*擴張(例如Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。本發明細胞毒殺性T淋巴球也可用來形成一致免疫組合物，其於一需要治療或保護之病患中治療與避免癌症之一或兩者為有效(參見WO2006/031221，其內容被引入做為參考)。

【0152】IX. 藥學試劑或組合物

【0153】由於與正常組織相較，TOPK表現於癌症中特別被提高，其例子包括，但不限於急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤，本發明之胜肽或多核苷酸可用於誘導抗癌症免疫反應且因此適合治療及/或避免癌症，及/或避免轉移或其手術後之復發。因此，本發明提供一藥學組合物或試劑配製來癌症之治療及/或預防，及/或此類癌症之手術後復發的避免，此類組合物或試劑包括一或多個本發明胜肽或多核苷酸為活性成分。或者，本發明之胜肽可表現於任何前述外吐小體或細胞表面，例如抗原呈現細胞，以用來作為藥學組合物或試劑。此外，上述以本發明任一胜肽為標的之細胞毒殺性T淋巴球也可用來作為本發明藥學組合物或試劑之活性成分。

【0154】因此，本發明提供試劑或組合物，包括至少一擇自下列中之活性成分：

- (a) 一或多個本發明胜肽
- (b) 於一可表現之形式，一或多個編碼出本發明此種胜肽的多核苷酸；
- (c) 一或多個本發明抗原呈現細胞或一外吐小體；以及
- (d) 一或多個本發明細胞毒殺性T淋巴球。

【0155】本發明之藥學組合物或試劑也提供使用如一疫苗。在本發明內容中，措辭“疫苗”（也意指為一“致免疫組合物”）意指一試劑或組合物，其藉由接種至一動物具有改善、增強及/或誘導抗腫瘤免疫力的功能。換言之，本發明提供用

以誘導於一抗體中之一抗癌免疫反應之藥學試劑或組合物。

【0156】本發明之藥學組合物後試劑可用於治療及/或避免癌症，及/或避免其手術後或轉移復發的避免於一個體或病患中。此類個體之例子包括人類與任何其他哺乳動物，其包括，但不限於小鼠、大鼠、天竺鼠、兔子、貓、狗、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴子、狒狒與黑猩猩，特別是一商業上重要動物或被馴養的動物。在一些實施例中，本發明之藥學試劑或組合物可被配製用來投予至一個體，其HLA抗原為HLA-A24或HLA-A2。

【0157】在另一實施例中，本發明也提供一活性成分用於治療及/或避免癌症或腫瘤，及/或避免其手術後復發的藥學組合物或試劑的製造中的用途，此活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；

(d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及

(e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0158】或者，本發明更提供一用於癌症或腫瘤之治療及避免，及/或其手術後復發之避免的活性成分之一或兩者，活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；

- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；
- (d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及
- (e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0159】或者，本發明更提供一用於用以治療及/或避免癌症或腫瘤，及/或其手術後復發之避免的藥學組合物或試劑之製造的方法或製程，其中方法或製程包括將一藥學上或生理上可接受之載體與一活性成分一起配製的步驟，活性成分擇自：

- (a) 本發明胜肽；
- (b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；
- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；
- (d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及
- (e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0160】在另一實施例中，本發明更提供一用於用以治療及/或避免癌症或腫瘤，及/或其手術後復發之避免的藥學組合物或試劑之製造的方法或製程，其中方法或製程包括將一藥學上或生理上可接受之載體與一活性成分一起混合的步驟，其中活性成分擇自：

- (a) 本發明胜肽；
- (b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；
- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；
- (d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及
- (e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0161】在另一實施例中，本發明也提供一製造用以治療及/或避免癌症或腫瘤，及/或避免其手術後復發的的方法，其中方法包括投予一個體至少一活性成分的步驟，活性成分擇自：

(a) 本發明胜肽；

(b) 於一可表現之形式，編碼出本發明之此種胜肽的多核苷酸；

(c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞；

(d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；以及

(e) 本發明之細胞毒殺性T淋巴球。

【0162】根據本發明，具有擇自序列辨識號：2至40中之胺基酸序列的胜肽可為HLA-A24限制之抗原決定位胜肽。在這些胜肽中，具有擇自序列辨識號：2、3、6、27與28中之胺基酸序列的胜肽於一個體中可有效地誘導強有力且專一之抗表現HLA-A24與TOPK之細胞的免疫反應。同樣地，具有擇自序列辨識號：42至84中之胺基酸序列的胜肽可為HLA-A2限制之抗原決定位胜肽。在這些胜肽中，具有擇自序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76中之胺基酸序列的胜肽於一個體中可有效地誘導強有力且專一之抗表現HLA-A2與TOPK之細胞的免疫反應。因此包括任何具有擇自序列辨識號：2至40（特別是，序列辨識號：2、3、6、27與28）中之胺基酸序列之胜肽與其經修飾之胜肽的本發明藥學組合物或試劑特別適合投予其HLA抗原為HLA-A24之個體。同樣地，包括任何具有擇自序列辨識號：42至84（特別是，序列辨

識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76）中之胺基酸序列之胜肽與其經修飾之胜肽的本發明藥學組合物或試劑特別適合投予其HLA抗原為HLA-A2之個體。相同的東西提供至包含編碼出任何這些胜肽之多核苷酸（即，本發明之多核苷酸）的藥學組合物或試劑。

【0163】由本發明藥學組合物或試劑治療之癌症包括其中關於TOPK之任何之癌症，其包括，但不限於急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0164】本發明藥學組合物或試劑可包括除了上述活性成分外，具有誘導細胞毒殺性T淋巴球抗似癌細胞之能力的其他胜肽、編碼出此其他胜肽之其他多核苷酸、其他表現此其他胜肽之細胞與其類似物。具有誘導細胞毒殺性T淋巴球抗似癌細胞之能力的此類“其他”胜肽之例子，包括，但不限於癌症專一抗原（例如，經確認之腫瘤相關抗原）。

【0165】若需要，本發明之藥學組合物或試劑可視需要包括其他治療物質為一額外之活性成分，只要此物質不抑制活性成分之抗腫瘤功效，活性成分例如任何本發明胜肽。例如，配方可包括抗發炎物質、止痛劑、化學治療與其類似。除了包括其他治療物質於藥劑其本身中，也可將本發明之藥劑與一或多個其他藥學組合物相繼或同時投予。藥劑與藥學組合物的量依照，例如使用何種藥學組合物、要治療之疾病與投藥的計畫與方式。

【0166】熟悉此技藝人士可瞭解，除了此處特別提及之成分外，本發明之藥學組合物或試劑可包括本技術領域一般之其他物質，其具有關於討論中之配方形式（例如填料、黏結劑、稀釋劑、賦形劑等）。

【0167】在本發明一實施例中，本發明之藥學組合物或試劑可被包含於製造之商品與套組，其包含對於要被治療之疾病，例如癌症的病理情況有用之材料。製造之商品可包括具有一標籤之任何本發明藥學組合物或試劑的容器。適合的容器包括瓶、小瓶(vial)與試管。容器可形成自各種材料，例如玻璃或塑膠。於容器上之標籤需指出組合物或試劑為用來治療或避免疾病之一或多個情況。標籤也可指出投藥指示等。

【0168】除了上述容器外，套組包括本發明藥學組合物或試劑可視需要更進一步包括一第二容器，其儲藏一藥學上可接受之稀釋液。其可更包括商業或使用者觀點需要之其他材料，包括其他緩衝溶液、稀釋液、濾器、針、注射器與具有使用說明之包裝插入物。

【0169】藥學組合物或試劑若需要可被包裝於一包(pack)或一分配器，其可包含含有活性成分之一或多單位劑量形式。包裝可例如包括金屬或塑膠箔，例如一泡棉箱(blister pack)。包或分配器可伴隨著投藥指示。

【0170】(1) 藥學試劑或組合物包含胜肽作為活性成分

【0171】可直接投予本發明胜肽為一藥學組合物或試劑，若需要的話，其已被一般配方方法所配製。在之後的例子，除了本發明胜肽外，若適合可包括載體、賦形劑與原始做為藥物

使用之此類而無特別限制。此類載體的例子包括，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)與此類。更進一步而言，若必須，藥學組合物或試劑可含安定劑、懸液劑、防腐劑、界面活性劑與此類。本發明之藥學組合物或試劑可用來抗癌目的。

【0172】可將本發明之胜肽製備為組合，其包括兩個或更多個本發明之胜肽，以in vivo誘導細胞毒殺性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結合。例如，胜肽可被化學連接或表現如一單一融合多胜肽序列。結合之胜肽可為相同或不同。藉由投予本發明之胜肽，經由HLA抗原，高密度呈現胜肽於抗原呈現細胞上，之後對形成於呈現胜肽與HLA抗原之間的複合物專一反應的細胞毒殺性T淋巴球被誘導。或者，抗原呈現細胞（例如，樹突細胞）被從個體移出且之後以本發明胜肽刺激以獲得呈現本發明任何胜肽於其表面上之抗原呈現細胞。將這些抗原呈現細胞再投予至個體以誘導在個體中之細胞毒殺性T淋巴球，且因此可增加了朝向腫瘤相關之內皮細胞的侵犯。

【0173】包含本發明任何胜肽為活性成分之治療及/或避免癌症之藥學組合物或試劑可也包含一已知有效建立細胞免疫力之佐劑。或者，藥學組合物或試劑可與其他活性成分一起被投予，或可被以配製成細粒被投予。佐劑指一化合物，當與具有免疫活性之蛋白質一起投予（或依次）時，其增強抗蛋白質之免疫反應。於此考慮之佐劑，包括於文獻(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)中所描述的那些。適合之佐劑的例子包括，但

不限於包括磷酸鋁、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乳劑與與其類似物。

【0174】此外，於微脂體(liposome)配方與細粒配方中，胜肽連結至幾個微米直徑之小珠，且於配方中，可便利地使用連結至胜肽之脂質。

【0175】在本發明另一實施例中，本發明胜肽也可以一藥學上可接受之鹽類被投予。鹽類之較佳例子包括具有鹼金屬之鹽、具金屬之鹽、具有機鹼之鹽、具有機酸之鹽（例如，醋酸、甲酸(formic acid)、丙酸(propionic acid)、富馬酸(fumaric acid)、馬來酸(maleic acid)、琥珀酸(succinic acid)、酒石酸(tartaric acid)、檸檬酸(citric acid)、蘋果酸(malic acid)、草酸(oxalic acid)、苯甲酸(benzoic acid)、甲磺酸(methanesulfonic acid)等）與具無機酸之鹽（例如，鹽酸、磷酸、氫溴酸(hydrobromic acid)、硫酸等）。如此處所使用，措辭“藥學上可接受之鹽類”意指維持化合物生物有效性與特性及獲得自與無機酸或鹼，例如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲基磺酸(methanesulfonic acid)、乙基磺酸(ethanesulfonic acid)、對甲苯磺酸(p-toluenesulfonic acid)、水楊酸(salicylic acid)與其類似物反應的那些鹽。

【0176】在一些實施例中，本發明之藥學組合物或試劑包括一成分其啟動細胞毒殺性T淋巴球。已定義脂質為可in vivo啟動抗病毒抗原之細胞毒殺性T淋巴球的物質。例如，可將棕

欄酸殘基黏附至離胺酸殘基之 ϵ -與 α -胺基，且之後連結至本發明之一胜肽。之後脂質胜肽可被直接投予於微胞或顆粒中、併入微脂體或乳化於一佐劑中。如脂質啟動細胞毒殺性T淋巴球反應之另一例子，*E. coli*脂蛋白，例如三軟脂酸-S 甘油半胱氨酰-絲氨酰基絲氨酸(tripalmitoyl-S-glycerylcysteiny-l-seryl-serine,P3CSS)可使用來啟動細胞毒殺性T淋巴球，當共價附加至一合適之胜肽（參見，例如Deres et al., *Nature* 1989, 342: 561-4）。

【0177】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（即，直接注射）。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。本發明之胜肽劑量可適合地調整根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法、與此類，且本發明之胜肽劑量一般為0.001 mg至1,000 mg，例如0.01 mg至100 mg，例如0.1 mg至10 mg，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一合適的劑量。

【0178】(2) 藥學試劑或組合物包含多核苷酸為活性成分

【0179】本發明之藥學試劑或組合物也可包含編碼出本發明之胜肽的核酸於一可表達之形式中。此處措辭“於一可表達之形式中”意指多核苷酸，當引入一細胞，*in vivo*會被表現成一誘導抗腫瘤免疫力之多胜肽。在一說明實施例中，感興趣之多核苷酸的核酸序列包括對於表現多核苷酸而言必須之調控要素。可裝配多核苷酸以達到穩定插入目標細胞之基因體（參

見，例如敘述 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12, 對於同源重組卡匣載體之敘述。參見，例如 Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; 美國專利號 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 與 WO 98/04720。DNA輸送技術的例子包括“裸DNA”、經促進 (bupivacaine、聚合物、胜肽居中之) 之輸送、陽離子脂質複合物與顆粒居中之 (“基因槍”) 或壓力居中之傳送 (參見，例如美國專利號 5,922,687)。

【0180】本發明之胜肽也可藉由病毒或細菌載體來表現。表現載體的例子包括減弱病毒宿主，例如牛痘或禽痘。此方法包括使用牛痘病毒，例如為一載體以表現編碼胜肽之核苷酸序列。藉由引入一宿主，此重組之牛痘病毒表現致免疫胜肽且因此引起一免疫反應。於免疫步驟中為有效之牛痘載體與方法敘述於，例如美國專利號 4,722,848。另一載體為 BCG (Bacille Calmette Guerin)。BCG載體敘述於 Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60中。對於治療投藥或免疫有用之其他多種載體，例如腺與腺病毒相關之載體、反轉錄病毒載體、傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhi*) 載體、經解毒之炭疽毒素載體與其類似為明顯的。參見，例如 Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85。

【0181】輸送多核苷酸進入一病患可為直接，於其例子中，個體直接暴露於一攜帶多核苷酸之載體，或為間接，於其例子中，細胞首先 *in vitro* 以感興趣之多核苷酸轉形，之後將細

胞轉殖進入病患。此兩方法分別為已知，為 *in vivo* 與 *ex vivo* 基因治療。

【0182】基因治療之方法之大體回顧，參見 Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; Trends in *Biotechnology* 1993, 11(5): 155-215)。應用於本發明之於重組 DNA 技術中一般熟知的方法被於編者 Ausubel et al., in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; 與 Krieger, in *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990 所述。

【0183】喜愛之胜肽之投藥、多核苷酸之投藥可被執行為口服、皮膚內、皮下、靜脈內、肌肉內、骨內、即/或腹膜注射或此類，與經由全身投藥或局部投藥至標的位置的鄰近區域提供使用。可執行單次投藥或藉由多次投藥追加。於適合載體中或於以編碼出本發明之胜肽的多核苷酸轉形之細胞中的多核苷酸的劑量可適合地調整，根據要治療之疾病、病患年紀、體重、投藥方法與此類，且本發明之胜肽劑量一般為 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.01 mg 至 100 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，例如 0.5 mg 至 5 mg，且可於每數天一次至每數個月一次投藥。熟悉此技藝人士可立即確認一合適與最理想之劑量。

【0184】X. 使用胜肽、多核苷酸、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒殺性 T 淋巴球的方法

【0185】可使用本發明之胜肽與多核苷酸來製備或誘導抗原呈現細胞與細胞毒殺性T淋巴球。也可使用本發明之外吐小體與抗原呈現細胞來製備或誘導細胞毒殺性T淋巴球。胜肽、多核苷酸、外吐小體與抗原呈現細胞可與任何其他化合物結合使用，只要額外之化合物不抑制胞毒殺性T淋巴球誘發能力。因此，任何上述之本發明藥學組合物或試劑可用來製備或誘導細胞毒殺性T淋巴球。除此之外，包括胜肽或多核苷酸的那些也可用來製備誘導抗原呈現細胞，如下所討論。

【0186】(1) 誘導抗原呈現細胞的方法

【0187】本發明提供使用本發明之胜肽或多核苷酸來誘導具有高細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的方法。

【0188】本發明之方法包括*in vitro*、*ex vivo*或*in vivo*將抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸的步驟。例如，*ex vivo*誘導抗原呈現細胞的方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；以及

b：將步驟a之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸。

【0189】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、蘭格罕細胞(Langerhans cell)、巨嗜細胞、B細胞與活化之T細胞，已知其表現蛋白質(proteinaceous)抗原於其細胞表面以被淋巴球所辨認。較佳為，可使用樹突細胞，由於它們於抗原呈現細胞中最強的細胞毒殺性T淋巴球誘發能力。本發明任一胜肽可以其本身或與本發明其他胜肽或源自除了TOPK外之腫瘤相關抗原的細胞毒殺性T淋巴球誘發胜肽結合被使用。

【0190】另一方面，當投予本發明胜肽至一個體時，抗原呈現細胞 *in vivo* 與胜肽接觸，且因此於個體之體內誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。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殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。相似地，當以可表達之形式投予本發明多核苷酸至一個體時，本發明胜肽被表現且 *in vivo* 與抗原呈現細胞接觸，且因此於個體之體內誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞。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殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。“可表達之形式”被描述於上述段落“IX. 藥學試劑或組合物，(2) 藥學試劑或組合物包含多核苷酸為活性成分”中。

【0191】或者，本發明之方法可包括將本發明一多核苷酸引入一抗原呈現細胞以誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的步驟。例如，方法可包括步驟：

a：自一個體收集抗原呈現細胞；以及

b：將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入步驟a之抗原呈現細胞。

【0192】可如前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來執行步驟b。

【0193】或者本發明方法可包括製備一可專一誘導抗TOPK之細胞毒殺性T淋巴球活性的抗原呈現細胞的步驟，經由下列步驟之一：

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

*vivo*接觸；以及

(b) 將編碼出本發明胜肽之一多核苷酸引入抗原呈現細胞。

【0194】或者，本發明可用於誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之一抗原呈現細胞，此類方法包括擇自下列珠中之一步驟：

(a) 將一抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸；

(b) 將一編碼出本發明胜肽的多核苷酸入一抗原呈現細胞。

【0195】在一較佳實施例中，本發明提供誘導或製備具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之一抗原呈現細胞的方法，此類方法包括下列步驟之一：

(a) 將表現HLA-A24之一抗原呈現細胞與具有擇自序列辨識號：2至40（特別是序列辨識號：2、3、6、27與28）中之一胺基酸序列的胜肽或其經修飾之胜肽*in vitro*、*ex vivo*或*in vivo*接觸；以及

(b) 將一編碼出具有擇自序列辨識號：2至40（特別是序列辨識號：2、3、6、27與28）中之一胺基酸序列的胜肽或其經修飾之胜肽的多核苷酸入表現HLA-A24之一抗原呈現細胞。

【0196】藉由上述方法誘導之抗原呈現細胞經由HLA-A24呈現此類胜肽於其表面上，且可誘導具有抗表現HLA-A24與TOPK之細胞的專一細胞毒性活性的細胞毒殺性T淋巴球。

【0197】在另一實施例中，本發明提供誘導或製備具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之一抗原呈現細胞的方法，此類方

法包括下列步驟之一：

(a) 將表現HLA-A2之一抗原呈現細胞與具有擇自序列辨識號：42至84（特別是序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76）中之一胺基酸序列的胜肽或其經修飾之胜肽 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 接觸；以及

(b) 將一編碼出具有擇自序列辨識號：42至84（特別是序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76）中之一胺基酸序列的胜肽或其經修飾之胜肽的多核苷酸入表現HLA-A2之一抗原呈現細胞。

【0198】藉由上述方法誘導之抗原呈現細胞經由HLA-A2呈現此類胜肽於其表面上，且可誘導具有抗表現HLA-A2與TOPK之細胞的專一細胞毒性活性的細胞毒殺性T淋巴球。

【0199】本發明方法可於 *in vitro*、*ex vivo* 或 *in vivo* 執行。較佳為本發明方法可於 *in vitro* 或 *ex vivo* 執行。用於具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞之誘導的抗原呈現細胞，可較佳為表現HLA-A24或HLA-A2抗原之抗原呈現細胞。此類抗原呈現細胞可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自其HLA抗原為HLA-A24或HLA-A2之個體獲得的周邊血液單核細胞來製備。藉由本發明所誘導之抗原呈現細胞可為表現本發明胜肽與HLA抗原（HLA-A24或HLA-A2抗原）之複合物於其表面中之抗原呈現細胞。當藉由本發明方法誘導之抗原呈現細胞被投予至一個體以在此個體中誘發抗癌症免疫反應時，個體較佳為其抗原呈現細胞被取得的同一個。然而，個體可與抗原呈現細胞提供者為不同一個，只要個體具有與抗原呈現細胞提供

者相同之HLA型。

【0200】在另一實施例中，本發明提供用於誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞的試劑或組合物，且此類試劑或組合物包括一或多個本發明胜肽或多核苷酸。

【0201】在另一實施例中，本發明提供本發明胜肽或編碼出此胜肽之多核苷酸於製造配製來誘導抗原呈現細胞之試劑或組合物中的用途。

【0202】或者，本發明更提供本發明胜肽或編碼出此胜肽之多核苷酸對於在誘導具有細胞毒殺性T淋巴球誘發能力之抗原呈現細胞中的用途。

【0203】(2) 誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法

【0204】本發明也提供使用本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體或抗原呈現細胞來誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法。

【0205】本發明也提供使用編碼出一多胜肽（即，T細胞受體次單元）之多核苷酸來誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法，此多胜肽具形成一T細胞受體的能力，而此T細胞受體具有辨認一本發明胜肽與一HLA抗原之複合物的能力。較佳為，誘導細胞毒殺性T淋巴球的方法包括至少一步驟擇自由下列之中：

a：將一CD8陽性T細胞與一抗原呈現細胞接觸，該抗原呈現細胞表現一HLA抗原與本發明胜肽之複合物於其表面；

b：將一CD8陽性T細胞與一外吐小體接觸，該外吐小體表現一HLA抗原與本發明胜肽之複合物於其表面；以及

c：將一多核苷酸引入一CD8陽性T細胞，其中該多核苷酸編碼出一具有形成T細胞受體之能力的多胜肽，該多胜肽具形

成一T細胞受體的能力，而該T細胞受體辨認一本發明胜肽與HLA抗原之複合物。

【0206】當本發明之胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體被投予至一個體時，於個體體內誘導細胞毒殺性T淋巴球，且以表現TOPK癌細胞為目標之免疫反應的強度增強。因此，代替前述步驟，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一個體的步驟。

【0207】或者，藉由ex vivo或in vivo使用它們，也可誘導細胞毒殺性T淋巴球，且在誘導細胞毒殺性T淋巴球後，經活化之細胞毒殺性T淋巴球可返回至個體。例如，方法可包括步驟：

- a：自一個體收集抗原呈現細胞；
- b：將步驟a之抗原呈現細胞與本發明胜肽接觸；以及
- c：將步驟b之抗原呈現細胞與CD8陽性T細胞共培養。

【0208】於上述步驟c中要與CD8陽性T細胞共培養之抗原呈現細胞也可藉由將一本發明多核苷酸轉移進入抗原呈現細胞，如於前述段落“VI. 抗原呈現細胞”中所述來製備，然而，本發明並不限於此，且因此包括任何有效表現一HLA抗原與本發明胜肽之複合物於表面上之表現物的抗原呈現細胞。

【0209】代替上述抗原呈現細胞，可試需要而定使用呈現一HLA抗原與本發明胜肽之複合物於其表面上的外吐小體。換句話說，本發明可包括將呈現一HLA抗原與本發明胜肽之複合物於其表面的外吐小體與本發明胜肽共培養之步驟。此種外吐小體可藉由前述於段落“V. 外吐小體”中之方法來製備。

【0210】適合本發明方法之抗原呈現細胞與外吐小體呈現

本發明胜肽與HLA-A24或HLA-A2之一複合物於其表面上。例如，一抗原呈現細胞或外吐小體，其呈現一HLA-A24與具有擇自序列辨識號：2、3、6、27與28中之胺基酸序列的胜肽（或其經修飾之胜肽）的複合物於其表面上，可較佳地利用於誘導具有抗表現HLA-A24與TOPK之細胞的專一細胞毒性活性。同樣地，一抗原呈現細胞或外吐小體，其呈現一HLA-A2與具有擇自序列辨識號：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72與76中之胺基酸序列的胜肽（或其經修飾之胜肽）的複合物於其表面上，可較佳地利用於誘導具有抗表現HLA-A2與TOPK之細胞的專一細胞毒性活性。

【0211】此外，藉由將一編碼出T細胞受體次單元的多核苷酸引入CD8陽性T細胞也可誘導本發明之細胞毒殺性T淋巴球，其中由此類T細胞受體次單元所形成之T細胞受體具有與於細胞表面上之HLA抗原與本發明胜肽之複合物結合的能力。如於前述段落“VIII. T細胞受體(TCR)”中所述可執行此轉導。

【0212】本發明方法可於*in vitro*、*ex vivo*或*in vivo*執行。較佳為本發明方法可於*in vitro*或*ex vivo*執行。用於細胞毒殺性T淋巴球之誘導的CD8陽性T細胞，可藉由本技術領域中熟知的方法，從來自一個體獲得的周邊血液單核細胞來製備。在較佳實施例中，CD8陽性T細胞的提供者可為其HLA抗原為HLA-A24或HLA-A2之個體。藉由本發明所誘導之細胞毒殺性T淋巴球，其可辨認可為表現本發明胜肽與HLA抗原之複合物於其表面之細胞。此類細胞毒殺性T淋巴球可表現抗呈現本發明胜肽於其表面上之細胞的專一細胞毒性活性，且因此顯示抗表

現 TOPJ 之細胞（例如，癌細胞）的專一細胞毒性活性。當藉由本發明方法誘導之細胞毒殺性 T 淋巴球被投予至一個體以在此個體中誘發抗癌症免疫反應時，個體較佳為其 CD8 陽性 T 細胞被取得的同一個。然而，個體可與 CD8 陽性 T 細胞提供者為不同一個，只要個體具有與 CD8 陽性 T 細胞提供者相同之 HLA 型。

【0213】此外，本發明也提供製造一誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之藥學組合物或試劑的方法或製程，其中該方法包括將本發明之胜肽與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。

【0214】在另一實施例中，本發明提供用於誘導一細胞毒殺性 T 淋巴球的試劑或組合物，其中試劑或組合物包括本發明一或多個胜肽、本發明一或多個多核苷酸、一或多個抗原呈現細胞或外吐小體。

【0215】在另一實施例中，本發明提供本發明胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體於製造配製來誘導細胞毒殺性 T 淋巴球之試劑或組合物中的用途。

【0216】或者，本發明更提供本發明胜肽、多核苷酸、抗原呈現細胞或外吐小體對於在誘導細胞毒殺性 T 淋巴球中的用途。

【0217】(3) 誘導免疫反應的方法

【0218】又，本發明提供誘導抗 TOPK 相關疾病之免疫反應的方法。所考慮的疾病包括癌症，其例子包括，但不限於急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0219】 本發明方法包括投予含任何本發明胜肽或編碼出其之多核苷酸的試劑或組合物的步驟。或者。本發明方法可包括投予表現任何本發明胜肽之外吐小體或抗原呈現細胞的步驟。細節參見“IX. 藥學試劑或組合物”之項目，特別是敘述本發明試劑或組合物為疫苗之用途的部分。此外，可被使用於本發明誘導免疫反應之方法的本發明外吐小體與抗原呈現細胞，被詳細描述在前之於“V. 外吐小體”、“VI. 抗原呈現細胞”與“X. 使用胜肽、外吐小體、抗原呈現細胞與細胞毒殺性T淋巴球的方法”之(1)與(2)的項目。

【0220】 本發明也提供製造一誘導免疫反應之藥學試劑或組合物的方法或製程，其中該方法可包括將本發明之胜肽與藥學上接受之載體一起混合或配製的步驟。

【0221】 或者，本發明方法可包括投予本發明一疫苗或藥學組合物或試劑的步驟，本發明疫苗或藥學組合物包含：

- (a) 本發明胜肽；
- (b) 於一可表現之形式，編碼出本發明胜肽的多核苷酸；
- (c) 表現本發明一胜肽於其表面上之抗原呈現細胞
- (d) 表現本發明一胜肽於其表面上之外吐小體；或
- (e) 本發明之細胞毒殺性T細胞。

【0222】 在本發明內容中，以這些活性成份可治療過度表現TOPK之癌症。此類癌症的例子包括，但不限於急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴癌、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。因此，在包括上述活性成分之

疫苗或藥學組合物或試劑的投予前，其較佳為確認 TOPK 之表現程度於要被治療之個體中是否被提高。因此，在一實施例中，本發明提供治療於一需要之個體中之（過度）表現 TOPK 之癌症的方法，此種方法包括步驟：

i) 測定獲得自具有癌症要治療之個體的生物樣本中的 TOPK 表現程度；

ii) 與正常控制組比較 TOPK 表現程度；以及

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

【0223】或者，本發明也可提供包含擇自上述 (a) 至 (e) 中之群組的至少一成份的疫苗或藥學組合物，要被投予至具有過度表現 TOPK 之癌症的個體中。換句話說，本發明更提供鑑定要被以本發明 TOPK 多胜肽治療之個體的方法，此類方法包括測定來自個體之生物樣本中的 TOPK 表現程度的步驟，其中與基因之正常控制程度相較，此程度增加指出個體可能具有可以本發明 TOPK 多胜肽治療之癌症。本發明治療癌症的方法將於以下更詳細敘述。

【0224】可將任何源自個體之細胞或組織用於 TOPK 表現之測定，只要其包括 TOPK 之目標轉錄或轉譯產物。適合樣本的例子包括，但不限於身體組織或液體、例如血液、唾液與尿液。較佳為，生物樣本包含一細胞族群，其包括一上皮細胞，更佳為源自個體之細胞或組織包含一細胞族群，其包括一上皮細胞，更佳為一癌症上皮細胞或一來自被懷疑癌化之組織的上皮細胞。此外，若需要，細胞可自所獲得之身體組織或液體被

純化，且之後使用為源自個體之樣本。

【0225】要藉由本發明治療之個體較佳為一哺乳類動物。說明之哺乳類動物包括，但不限於，例如，人類、非人類靈長類動物、小鼠、大鼠、狗、貓、馬與牛。

【0226】根據本發明，可測定獲得自一個體之生物樣本中的TOPK表現程度。使用本技術領域已知方法可於轉錄（核酸）產物程度測定表現程度。例如，藉由雜合方法（例如，北方雜合）使用探針可將TOPK的mRNA定量。可於一晶片或陣列上執行偵測。陣列之使用較佳可為用於偵測TOPK表現程度。利用TOPK的序列資訊，熟悉此技藝人士可製備此種探針。例如，TOPK的cDNA可被使用為探針。若需要，可以適合之標誌來標誌探針，例如染劑、螢光物質與同位素，且基因的表現程度可被偵測為雜合標誌的強度。

【0227】此外，藉由擴大偵測方法 (amplification-based detection method)（例如，RT-PCR）使用引子可將TOPK的轉錄產物進行定量。根據基因之可獲得序列資訊可製備此種引子。

【0228】特別是，用於本方法之探針或引子於嚴厲 (stringent)、適度嚴厲、低嚴厲條件下雜合至TOPK的mRNA。如此處使用，措辭“嚴厲（雜合）條件”意指在此在條件下探針或引子會雜合至其目標序列，而不是其他序列。嚴厲條件為序列依賴(sequence-dependent)，且在不同環境下會不同。比起較短之序列，於較高溫度下觀察到較長序列之特定雜合。一般而言，在一定義之離子強度與pH下所選擇之嚴格條件的溫度為低

於一特定序列之熔點(T_m)約 5°C 。 T_m 為溫度(在一定義之離子強度與pH與核酸濃度下)，於其下在平衡下50%之與目標序列互補的探針雜合至目標序列。由於目標序列通常存在過量，所以於 T_m ，在平衡下50%之探針被佔據。一般而言，嚴苛條件為於其中鹽濃度低於1.0 M鈉離子，一般約0.01至1.0 M 鈉離子(或其他鹽)於pH 7.0至8.3，且對於短探針或引子(例如，10至50個核苷酸)而言溫度為至少約 30°C ，對於較長探針或引子而言溫度為至少約 60°C 。也可以添加去穩定試劑(destabilizing substances)，例如甲醯胺(formamide)來達到嚴苛條件。

【0229】本發明之探針或引子一般為一實質上經純化之寡核苷酸。寡核苷酸一般包括核苷酸序列之一區域，其在嚴苛條件下雜合至至少約2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50或25包括一TOPK序列之一核酸之連續意義股(consecutive sense strand)核苷酸序列，或包括一TOPK序列之一核酸之反意義股(anti-sense strand)核苷酸序列，或這些序列之自然發生突變體。特別是，例如，在一較佳實施例中，一於長度具有5-50之寡核苷酸可被使用為用來擴大要被偵測之基因的一引子。更佳為，可以於長度具有15-30b之寡核苷酸探針或引子來偵測TOPK基因之mRNA或cDNA。大小的範圍始於至少10個核苷酸、至少12個核苷酸、至少15個核苷酸、至少20個核苷酸、至少25個核苷酸、至少30個核苷酸，且探針與引子延伸大小始於5-10個核苷酸、10-15個核苷酸、15-20個核苷酸、20-25個核苷酸與25-30個核苷酸。在較佳實施例中，寡核苷酸探針或引子的長度可被擇自15-25。藉由使用此種寡核苷

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

【0230】或者，為了本發明之診斷可偵測轉譯產物。例如，可偵測TOPK蛋白質（序列辨識號：86）或其免疫活性片段之量。測定作為轉錄產物之蛋白質的量的方法包括免疫分析方法，其使用一抗體專一辨認此蛋白質。抗體可為單株或多株。此外，抗體之任何片段或修飾（例如嵌合型抗體(chimeric antibody)、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv等）可被用來偵測，只要片段或經修飾之抗體維持對TOPK蛋白質的結合能力。本發明也提供抗本發明胜肽與其片段的這類抗體。這些用於蛋白質偵測之這些種類的抗體的製備方法為本技術領域所熟知，且任何方法可被使用於本發明中以製備此種抗體與其等同物(equivalent)。

【0231】如根據TOPK基因轉譯產物偵測TOPK基因之表現程度的另一方法，使用抗TOPK蛋白質之抗體經由免疫組織化學(immunohistochemical)分析可測量到染色強度。即，於此測量中，強的染色指出經增加之蛋白質的存在/程度，且同時TOPK基因之高表現程度。

【0232】可確認於癌症細胞中，目標基因，例如TOPK基因的表現程度之為被提升，若從目標基因之控制組程度（例如，於正常細胞中的程度）增加，例如10%、25%、或50%，或增加大於1.1倍、大於1.5倍、大於2.0倍、大於5.0倍、大於10.0倍或更多。

【0233】使用先前自一個體/其疾病階段（癌的或非癌的）為已知的個體收集並儲存的樣本控制組之程度可與癌細胞同時測定。此外，獲得自具有癌症要被治療之一器官的非癌區域的正常細胞被使用為正常控制組。或者，根據獲得自分析先前測定之來自其疾病程度已知之個體之樣本中之TOPK基因的表現程度的結果，藉由統計方法，可測定控制組之程度。此外，控制組程度可為來自先前測試細胞之表現輪廓的資料庫。並且，根據本發明一方面於一生物樣本中之TOPK基因的表現程度，可與多個控制組程度比較，控制組程度被測定自多個參考樣本。較佳為使用一控制組程度測定自一參考樣本，其來自一組織形式相似於源自個體生物樣本之組織形式。此外，較佳為使用具有已知疾病階段之群組中的TOPK基因的表現程度的標準值(standard value)。標準值可獲得自本技術領域任何已知的方法。例如，平均值 $\pm$ 2標準差或平均值 $\pm$ 3標準差，可被使用為標準值。

【0234】本發明之內容中，測定自己知為非癌症之生物樣本的控制組程度被意指為一“正常控制組程度”。另一方面，控制組程度測定自一癌的生物組織，其意指為一“癌的控制組程度”。可將介於樣本表現程度與控制組程度間的不同標準化至

控制核酸的表現程度，例如管家基因(housekeeping gene)，根據細胞之癌症與非癌程度已知其表現程度並無不同。示範之控制基因包括，但不限於 β 肌動蛋白(beta-actin)、甘油醛-3-磷酸去氫酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)與核糖蛋白P1。

【0235】當與正常控制組程度相較TOPK基因的表現程度被增加或相似/等同於癌控制組程度，可診斷個體為具有癌症要被治療。

【0236】本發明也提供(i) 診斷是否一個體被懷疑具有要被治療之癌症，及/或(ii) 選擇癌症治療之個體的方法，此種方法包括步驟：

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

b) 與正常控制組比較TOPK之表現程度；

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

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

【0237】或者，此種方法可包括步驟：

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

b) 與癌症控制組比較TOPK之表現程度；

c) 若TOPK之表現程度相似或等於癌症控制組程度，則診斷個體為具有要被治療之癌症；以及

d) 若個體於步驟c)中被診斷為具有要被治療之癌症，則選擇癌症治療之個體。

【0238】本發明也提供一診斷套組以診斷或測定一個體其為或被懷疑為遭受可被以本發明TOPK多胜肽治療之癌症或於其發展風險，其也在評估與監控癌症免疫治療免疫的功效或應用性中之一或兩者為有用的。較佳為，癌症包括，但不限於急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。更特別的是，套組較佳包括至少一用以偵測來自個體細胞中之TOPK基因的表現程度的試劑，其類試劑可被擇自下列群組：

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

【0239】適合用於TOPK基因之一mRNA之偵測的試劑的例子可包括核酸其專一結合或辨認TOPK mRNA，例如，具有對於TOPK mRNA之一部分互補的序列的寡核苷酸。這些種類之寡核苷酸以專一於TOPK mRNA之引子與探針為例子。根據本技術領域所熟知的方法可製備這些種類之寡核苷酸。若需要，用以偵測TOPK mRNA之試劑可被固定於固體基質(matrix)上。此外，大於一個之用以偵測TOPK mRNA的試劑可被包含於套組中。

【0240】另一方面，用以偵測TOPK蛋白質或其免疫活性片

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

【0241】套組可包含多於一個之前述試劑。套組更可包括用以結合對於TOPK基因之探針或對於TOPK胜肽之抗體的固體基質與試劑、用以培養細胞之培養基與容器、正與負控制組試劑與用以偵測對於TOPK胜肽之抗體的二次抗體。例如，獲得自沒有癌症或遭受癌症或否之個體的組織樣本可作為有用的控制組試劑。本發明之套組可更包括商業或使用者角度所需之其他材料，包括緩衝溶液、稀釋液、濾器、注射針、注射器與具有使用之操作指南的包裝插入物（例如，書面、磁帶或CD-ROM等）。這些試劑或此類可保持於一具有標誌之容器。適合之容器包括瓶子、小玻璃瓶(vial)與試驗試管。容器可形成自多樣化之材料，例如玻璃或塑膠。

【0242】在本發明一實施例中，當試劑為抗TOPK mRNA之

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

【0243】本發明之套組可更包括一正控制組樣本或TOPK標準樣本。藉由收集TOPK正之樣本可製備本發明之正控制組樣本且之後分析它們的TOPK程度。或者，可將經純化之TOPK蛋白質或多核苷酸加至不表現TOPK之細胞以形成正樣本(positive sample)或TOPK標準樣本。於本發明中，經純化之TOPK可為重組蛋白質。正控制組樣本之TOPK程度為，例如，大於臨界值(cut off value)。

【0244】在一實施例中，本發明更提供一診斷套組，包括一蛋白質或其一部份蛋白質，具專一辨認本發明抗體或其片段之能力。

【0245】本發明之部分胜肽的例子包括多胜肽，其係由在本發明蛋白質之胺基酸序列中之至少8個，較佳15個、更佳20個連續胺基酸所組成。使用本發明之一蛋白質或一胜肽（多胜肽），藉由偵測於一樣本（例如，血液、組織）中之一抗體可

診斷癌症。製備本發明蛋白質與胜肽的方法如上所述。

【0246】本發明診斷癌症之方法，可如上所述藉由測定介於抗TOPK抗體與其在對應控制組中之的量的差異來被執行。若個體之細胞或組織含有抗基因之表現產物(TOPK)抗體且抗TOPK抗體的量被測定大於在相較於其在正常控制組之程度中的截斷值時，個體被懷疑遭受癌症。

【0247】在另一實施例中，本發明之診斷套組可包括本發明之胜肽與結合至其之HLA分子。使用抗原胜肽與HLA分子偵測抗原專一細胞毒殺性T淋巴球的方法已被建立(例如，Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6)。因此，本發明之胜肽與HLA分子的複合物可應用至偵測腫瘤抗原專一細胞毒殺性T淋巴球的偵測方法，藉此使早期偵測癌症之復發及/或轉移為可能。此外，其可被用於適合包含本發明胜肽為一活性成分之藥物的個體的篩選，或藥物治療功效的評估。

【0248】特別是，根據已知方法(參見，例如Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6)，可製備放射標誌之HLA分子與本發明胜肽之寡聚複合物，例如四聚體。伴隨使用複合物，可執行診斷，例如藉由將來自被懷疑遭受癌症之個體的周邊血液淋巴球(peripheral blood lymphocytes)中之抗原-胜肽專一細胞毒殺性T淋巴球進行定量。

【0249】本發明更提供藉由使用此處敘述之胜肽抗原決定位，用以評估免疫反應之方法與診斷試劑。在本發明一實施例中，如上述之HLA-A24或HLA-A2限制胜肽被使用為評估或預測一個體之免疫反應的試劑。藉由將免疫抗原(immunogen)與

免疫活性細胞(immunocompetent)*in vivo*或*in vitro*接觸可誘導要被評估之免疫反應。在較佳實施例中，用以評估一免疫反應的免疫活性細胞可選擇自周邊血液、周邊血液淋巴球(PBL)、與周邊血液單核細胞(PBMC)中。收集或分離此類免疫活性細胞的方法為本技術領域所熟知。在一些實施例中，可導致抗原專一細胞毒殺性T淋巴球的產生的任何試劑可使用為試劑，而細胞毒殺性T淋巴球辨認與結合至胜肽抗原決定位。胜肽試劑可不必須被使用為免疫抗原。用於此類分析之分析系統包括相當新近之技術發展，例如四聚體，對細胞內淋巴激素(lymphokines)之染色與干擾素釋放分析或ELISPOT分析。在較佳實施例中，要被以胜肽試劑接觸之免疫勝任細胞可為抗原呈現細胞，其包括樹突細胞。

【0250】例如，本發明胜肽可使用於四聚體染色分析以評估為了抗原專一細胞毒殺性T淋巴球存在之周邊血液單核細胞，在暴露至腫瘤抗原或一免疫抗原後。HLA四聚體複合物可被使用來直接顯現抗原專一細胞毒殺性T淋巴球（參見，例如 Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; 及 Altman et al, Science 174 : 94-96, 1996），並測定於周邊血液單核細胞之樣本中的抗原專一細胞毒殺性T淋巴球族群的頻率。使用本發明胜肽之四聚體試劑可如下敘述被產生：

【0251】在對應之HLA重鏈與 β 2-微球蛋白存在下重新折疊結合至HLA之胜肽，以產生三分子複合物。在複合物中，重鏈之羧端為經生物素化於一預先設計進入蛋白質之位置。之後將卵白素加至複合物以形成由三分子複合物與卵白素

(streptavidin)所組成之四聚體。藉由以螢光標誌卵白素的方式，可使用四聚體來對抗原呈現細胞染色。之後可鑑定細胞，例如藉由流式細胞技術。此類分析可被用於診斷與預後(prognostic)目的。藉由此程序鑑定之細胞也可被用於治療目的。

【0252】本發明也提供評估免疫收回反應(immune recall responses)之試劑(參見，例如Bertoni et al, J. Clin. Invest. 100 : 503-513, 1997與Penna et al, J Exp. Med. 174 : 1565-1570, 1991)，其包括本發明之胜肽。例如，爲了抗原-專一細胞毒殺性T淋巴球的存在，使用特定專一胜肽，可分析獲自具有要被治療之癌症之個體的病患PBMC樣本。藉由培養PBMC與以本發明胜肽刺激細胞可評估含單核細胞之血液樣本。在適合之培養期間後，例如爲了細胞毒殺性T淋巴球活性，分析經擴張之細胞族群。

【0253】胜肽也可使用爲評估一疫苗功效之試劑。使用例如上述方法可分析獲自一以一免疫抗原接種之病患的PBMC。病患爲經HLA分型，且選擇辨認表現於病患中之對偶基因(allele)專一分子的胜肽抗原試劑以分析。藉由於PBMC樣本中之抗原決定位-專一細胞毒殺性T淋巴球的存在，可指出疫苗之免疫抗原性(immunogenicity)。

【0254】本發明之胜肽也用來製造抗體，使用本技術領域已熟知的技術(參見，例如，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; 與 Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1989)，其可有效作為診斷或監測癌症之試劑。此類抗體可包括辨認於HLA分子內容中之胜肽的那些，即，結合至胜肽-MHC複合物的抗體。

【0255】本發明胜肽或組合物具有一些額外之用途，其中一些為此處所述。例如，本發明提供診斷或偵測以TOPK免疫活性胜肽之表現為特徵的一疾病。這些方法包含測定於一生物樣本中之TOPK HLA結合胜肽的表現或TOPK HLA結合胜肽之一複合物與HLA class I分子。藉由以對於胜肽或複合物之結合作伙伴(binding partner)分析可測定或偵測一胜肽之表現或胜肽與HLA class I分子之複合物。在一較佳實施例中，對於胜肽或複合物之結合作伙伴為一抗體其辨認且專一結合至胜肽。藉由使用TOPK引子之標準PCR放大步驟也可測試於一生物樣本，例如一腫瘤切片中之TOPK的表現。腫瘤表現之例子於此被呈現且示範之用於TOPK放大的條件與引子的更進一步揭露可被發現於WO2003/27322中。

【0256】較佳為，診斷方法包含將分離自一個體的生物樣本與專一於TOPK HLA結合胜肽之一試劑接觸以偵測於生物樣本中之TOPK HLA結合胜肽的存在。如此處所使用“接觸”意指以有效接近試劑方式放置生物樣本且在適合之條件下，例如，濃度、溫度、時間、離子強度，以允許介於試劑與存在生物樣本中之TOPK HLA結合胜肽的專一互相作用。一般而言，將試劑接觸生物樣本之條件為熟悉此技藝人士所知之條件以促進介於分子及於生物樣本中之其同類物(cognate)（例如，一蛋白質與其受體同類物、一抗體與其蛋白質抗原同類物、一核酸與

其互補序列同類物)之間的專一互相作用。促進介於分子與其同類物之間的專一互相作用的最理想條件敘述於Low et al 所提出之美國專利號5,108,921。

【0257】可在*in vivo*或*in vitro*之一或兩者執行本發明之診斷方法。因此，在本發明中生物樣本可位於*in vivo*或*in vitro*中。例如，生物樣本可為一*in vivo*組織且專一於TOPK免疫活性多胜肽的試劑可被用來偵測於組織中此類分子的存在。或者，可*in vitro*收集或分離生物樣本(例如血液樣本、腫瘤切片、組織萃取物)。在一特別較佳實施例中，生物樣本可為一含細胞樣本，更佳為一樣本含有收集自要被診斷或測試之個體的腫瘤細胞。

【0258】或者，藉由一方法可執行診斷，此方法藉由以螢光素(fluorescein)標誌HLA多聚複合物染色允許抗原-專一T細胞的直接定量(例如，Altman, J. D. et al., 1996, Science 274 : 94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 10330)。也已提供細胞內淋巴激素(lymphokines)之染色與干擾素釋放分析或ELISPOT分析。四聚體染色、細胞內淋巴激素染色與ELISPOT分析皆顯露比一般分析靈敏至少多10倍(Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8: 413)。也可使用五聚體(例如，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))。

【0259】例如，在一些實施例中，本發明提供診斷或評估被投予本發明至少一TOPK胜肽之個體的免疫反應的方法，方法包括步驟：

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

(b) 偵測或測定於步驟(a)中所誘導之細胞毒殺性T淋巴球的誘導程度；以及

(c) 使個體之免疫反應與細胞毒殺性T淋巴球的誘導程度互相關連。

【0260】在本發明內容中，免疫原較佳包括(a) 擇自序列辨識號：2至40與42至84之胺基酸序列中的TOPK胜肽、具有此種胺基酸序列的胜肽與具有此種胺基酸序列於其中已被以1、2或更多胺基酸取代所修飾的胜肽的至少一個。於期間，適合誘導免疫原專一之細胞毒殺性T淋巴球的條件為本技術領域所熟知。例如，可in vitro培養免疫活性細胞在免疫存在下以誘導免疫原專一之細胞毒殺性T淋巴球。為了誘導免疫原專一之細胞毒殺性T淋巴球，可加入任何刺激因子於細胞培養物中。例如，IL-2為細胞毒殺性T淋巴球誘導之較佳刺激因子。

【0261】在一些實施例中，可在治療前、期間及/或後執行監測或評估要被以胜肽癌症治療之個體的免疫反應的步驟。一般而言，在癌症治療的程序中，一再地將免疫原性胜肽投予至要被治療的個體。例如，可每週投予免疫原性胜肽達3-10週。因此，在癌症治療程序期間，可評估或監測個體之免疫反應。或者，對於癌症治療之評估或監測的步驟可在治療程序完成

時。

【0262】 根據本發明，當與控制組相較時，經增強之免疫原專一之細胞毒殺性T淋巴球的誘導指出要被評估或診斷之個體免疫性地對已被投予之免疫原反應。用以評估免疫反應之適合的控制組包括，例如當免疫活性細胞未與胜肽接觸或與具有除了任何TOPK胜肽之胺基酸序列的控制組胜肽（例如，隨機胺基酸序列）接觸時的細胞毒殺性T淋巴球的誘導程度。在一較佳實施例中，藉由將介於投予至個體之各個免疫原間的免疫反應進行比較，以序列專一方式來評估個體之免疫反應。特別是，甚至當將TOPK胜肽之一些種類的混合物投予至個體時，依據胜肽免疫反應可成多樣化。在此例子中，藉由將介於各個胜肽間的免疫反應進行比較，可確認出對於其個體顯示較高反應之胜肽。

【0263】 XI. 抗體

【0264】 本發明更提供抗體其結合至本發明胜肽。較佳抗體專一結合至本發明胜肽且不會結合（或微弱結合）至其他胜肽。或者抗體可結合本發明胜肽與其同源物(homologs)。抗本發明胜肽之抗體可提供用途於癌症診斷與預後分析及成像方法(imaging methodologies)。相似地，對於在癌症病患中也表現或過度表現TOPK程度而言，此類抗體可提供使用於其他癌症之治療、診斷，及/或預後。此外，細胞內表現之抗體（例如，單鏈抗體）可治療地提供效用於在其中與TOPK之表現相關的癌症，與TOPK之表現相關的癌症例子包括，但不限於，急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、

結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴癌、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0265】本發明也提供TOPK蛋白質（序列辨識號：86）或其片段之偵測及/或定量的各種免疫活性分析，TOPK蛋白質（序列辨識號：86）或其片段包括由擇自由序列辨識號：2至40與42至84所組成之群組的胺基酸序列所組成的多胜肽。此類分析可包括一或多個具辨認及結合TOPK蛋白質或其片段之能力之抗TOPK抗體為適當的。在本發明內容中，與TOPK多胜肽結合之抗TOPK抗體，較佳為辨認一多胜肽，此多胜肽為具有擇自由序列辨識號：2至40與42至84所組成之群組的胺基酸序列，較佳為排除其他胜肽。以抑制測試(inhibition test)之方式可確認抗體之結合專一性。其為，在具有序列辨識號：2至40與42至84的胺基酸序列之任何片段多胜肽存在下，當介於要被分析之抗體與全長之TOPK胜肽之間的結合被抑制時，其被視為專一結合片段。在本發明內容中，在包括，但不限於放射免疫分析 (radio-immunoassays)、免疫色層分析技術 (immuno-chromatograph technique)、酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)、酵素連結免疫螢光分析 (enzyme-linked immunofluorescent assays, ELIFA) 等之多種本技術領域熟知之免疫分析形式中執行此類免疫分析。

【0266】本發明之關於免疫，但非抗體分析也可包括T細胞致免疫性分析 (immunogenicity assay)（抑制或刺激）與主要組織相容性複合物 (major histocompatibility complex, MHC) 結合分析。此外，本發明也考慮具偵測表現TOPK之癌症之能力的

免疫成像分析，其例子包括，但不限於使用本發明之經標誌的抗體的放射顯像成像(radio scintigraphic imaging)方法。此類分析提供臨床用途在TOPK表現之癌症偵測、監控與預後中，TOPK表現之癌症的例子，包括，但不限於，急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0267】本發明也提供結合至本發明胜肽的抗體。本發明抗體可使用於任何形式中，例如單株或多株抗體，且可更包括獲得自將動物，例如兔子，以本發明胜肽進行免疫之抗血清、所有類型之多株或單株抗體、人類抗體與由基因重組產生之人源化抗體。

【0268】使用為一抗原以獲得一抗體之本發明胜肽可來自任何動物種類，但較佳為來自哺乳動物，例如，人類、老鼠或大鼠，更佳為一人類。人類來源胜肽可獲得自此處揭露之核苷酸或胺基酸序列。

【0269】根據本發明，一蛋白質之一完整或部分胜肽可做為免疫抗原。適合之部分胜肽的例子包括，例如，本發明之一胜肽之胺基(N)端或羧基(C)端片段。

【0270】此處，一抗體被定義為一蛋白質其與TOPK胜肽之全長或片段反應。在一較佳實施例中，本發明之抗體可辨認TOPK片段胜肽，其具有擇自由序列辨識號：2至40與42至84所組成之群組的胺基酸序列。合成寡胜肽的方法為本技術領域所熟知。在合成後，在使用為免疫抗原(immunogen)前，胜肽可

視需要被純化。在本發明內容中，寡胜肽（例如9或10員）可與載體結合或連結以增強致免疫性。鑰孔血藍蛋白 (Keyhole-limpet hemocyanin, KLH) 被熟知為載體。結合鑰孔血藍蛋白與胜肽的方法為本技術領域所熟知。

【0271】或者，可將編碼出本發明一胜肽或其片段的一基因插入一已知的表現載體，其之後被轉形至一宿主細胞，如於此所敘述。藉由任何標準方法，所需之胜肽或其片段可自宿主細胞之外部或內部被重新獲得，且之後可被使用為一抗原。或者，可將表現胜肽之整個細胞或其細胞萃出物或一化學合成胜肽使用為抗原。

【0272】可以抗原將任何哺乳動物進行免疫，但較佳為考慮與用來細胞融合之親代細胞的相容性。一般而言可使用嚙齒目 (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*)。

【0273】以抗原免疫動物之方法為本技術領域所熟知。抗原之腹腔內注射 (*intraperitoneal injection*) 或皮下注射 (*subcutaneous injection*) 為免疫哺乳動物之一標準方法。更特別地，可將抗原稀釋或懸浮於一適合量的磷酸鹽緩衝溶液、生理食鹽水等。若需要，可將抗原懸浮液與適合量之標準佐劑，例如佛氏完全佐劑 (*Freund's complete adjuvant*) 混合，製成乳狀液 (*emulsion*) 並且之後投予至哺乳動物。較佳為其之後投予與

· 適合量之佛氏不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant)混合的抗原，每4至21天。也可使用一適合之載體來免疫。於上述免疫後，藉由爲了增加所需之抗體量，以標準方法可檢驗血清。

【0274】藉由自被檢驗以增加於血清中之所需抗體的經免疫動物收集血液且藉由以任何一般方法自血液分離血清，可製備抗本發明胜肽之多株抗體。多株抗體可包括含多株抗體的血清，與含自血清分離之多株抗體的部分(fraction)。例如使用與本發明胜肽結合之親合管柱且更進一步使用蛋白質A或蛋白質G管柱純化此部分，可自僅辨認本發明胜肽之部分純化免疫球蛋白G或M。

【0275】爲了製備單株抗體以使用於本發明內容中，如上所述自經以抗原免疫並確認於血清中所需抗體之增加程度的哺乳動物收集免疫細胞且使免疫細胞遭遇細胞融合。用來細胞融合之免疫細胞，可較佳爲獲自脾臟。其他要被與上述免疫細胞融合之親代細胞包括，例如，哺乳動物之骨髓瘤(myeloma)，且較佳爲具有以藥物篩選之融合細胞之獲得特性的骨髓瘤細胞。

【0276】根據已知方法，例如Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))的方法，可將上述免疫細胞與骨髓瘤細胞融合。

【0277】獲自細胞融合之產生的融合瘤，藉由將它們培養於標準篩選培養基，例如HAT培養基（含亞黃嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶(thymidine)之培養基），可被篩選。通常持續細胞培養於HAT培養基數天至

數週，時間爲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。

【0278】除了其中爲了製備融合瘤、以一抗原免疫一非人類動物的上述方法，可以胜肽、表現胜肽之細胞或其細胞萃取物 *in vitro* 免疫人類淋巴細胞，例如被EB病毒感染的那些。之後，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，以產生一所需人類抗體之融合瘤，所需之人類抗體可與可被獲得之胜肽結合（日本專利公開號 Sho 63-17688）。

【0279】將所獲得之融合瘤可之後接著被轉植進入小鼠之腹腔且萃取腹水。可純化所獲得之單株抗體，藉由例如硫酸銨沉澱、一蛋白質A或蛋白質G管柱、DEAE離子交換色層分析或一與本發明胜肽結合之親和管柱。本發明之一抗體不只可被使用來純化與偵測本發明胜肽，也可作爲本發明胜肽之促進劑與拮抗劑的候選物。

【0280】或者，一產生抗體之免疫細胞，例如一經免疫之淋巴細胞可藉由一致癌基因以永生且被使用來製備單株抗體。

【0281】也可使用基因工程技術來重組製備因此獲得之單株抗體（參見，例如 Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, published in the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)）。例如，一編碼出抗體的DNA可自一免疫細胞，例如產生抗體之一融合瘤或一經免疫的淋巴細胞被複製，插入一適合之載體，且引入一宿主細胞以製

備重組抗體。本發明也提供如上述製備之重組抗體。

【0282】本發明抗體可為一抗體之片段或經修飾之抗體，只要其結合一或多個本發明之胜肽。例如，抗體片段可為Fab、F(ab')₂、Fv或單鏈Fv (scFv)，於其中來自重與輕鏈的Fv片段藉由合適的連結器來連接(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。更特別是，藉由以酵素例如木瓜酵素或胃蛋白酶處理抗體可產生抗體片段。或者，編碼出抗體之基因可被構築、插入一表現載體且表現於一適合的宿主細胞中(參見，例如Co et al., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991))。

【0283】藉由與各種分子，例如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)結合可修飾抗體。本發明提供此類經修飾之抗體。藉由化學修飾一抗體可獲得經修飾之抗體。這些修飾方法為本技術領域中所常見。

【0284】或者，本發明之抗體可被獲得為嵌合抗體，介於來自非人抗體之可變區與來自人類抗體之固定區之間，或為人源化抗體，包括來自非人抗體之互補決定區、架構作用區(frame work region, FR)與來自人類抗體之固定區。根據已知方法可製備此類抗體。藉由齧齒類互補決定區之序列取代人類抗體對應之互補序列可執行人源化(參見，例如Verhoeyen et al., Science

239:1534-1536 (1988))。因此，此類人源化抗體為嵌合抗體，其中實質上少於完整之人類可變區已被來自非人種類之對應序列取代。

【0285】也可使用包括除了架構作用區與固定區尚有人類可變區的全人類抗體。使用各種本技術領域所知的技術可產生此類抗體。例如，*in vitro*方法包括呈現於噬菌體上之人類抗體片段的重組資料庫的使用(例如，Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991))。相似地，藉由將人類免疫球蛋白基因座(*loci*) 引入轉殖動物，例如於其中內生免疫球蛋白基因已被部分或完全去活化的小鼠，可製造人類抗體。此方法被敘述，例如於美國專利號6,150,584, 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

【0286】獲自上述之抗體可被純化至同質(*homogeneity*)。例如，根據用於一般蛋白質的分離與純化方法可執行抗體之分離與純化。例如，藉由合適地選擇與結合管柱色層分析，例如親合管柱、過濾、超過濾、鹽析、透析、對鈉十二烷基的硫酸鹽聚丙烯酰胺凝膠電泳(*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)、等電聚焦法(*isoelectric focusing*)的使用可分開與分離抗體(*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))，但不限於此。蛋白質A管柱與蛋白質G管柱可被使用為親合管柱。要被使用之示範的蛋白質A管柱包括，例如Hyper D、POROS與Sepharose F.F. (Pharmacia)。

【0287】除了親合色層分析(*chromatography*)，適合之色

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。

【0288】 例如，可使用吸收之測量、酵素連結免疫吸附分析(ELISA)、酵素免疫分析(EIA)、放射免疫分析(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中，本發明抗體為固定於一培養盤上，提供本發明胜肽至一培養盤，且之後提供含所需抗體之樣本，如，產生抗體之細胞的培養懸浮液或經純化的抗體。之後，提供辨認第一抗體且被標誌酵素，例如鹼性磷酸酶之第二抗體，且之後培養培養盤。接著在清洗後，將酵素受質，例如對硝基苯磷酸(p-nitrophenyl phosphate)，加至培養盤，並測量吸收以評估樣本之抗原結合活性。胜肽之片段，例如C端或N端之片段可被使用為抗原以評估抗體結合活性。根據本發明，可使用BIAcore (Pharmacia)來評估抗體的活性。

【0289】 上述方法允許本發明胜肽之偵測或測量，藉由露出本發明抗體至假定含本發明胜肽之樣本並偵測或測量由抗體與胜肽所形成之免疫複合物。

【0290】 由於根據本發明之胜肽偵測或測量方法可專一偵測或測量胜肽，方法在使用胜肽之各種實驗中可為有用的。

【0291】 XII. 載體與宿主細胞

【0292】本發明也提供載體與宿主細胞，於其中將編碼出本發明民胜肽之核苷酸引入。本發明之載體提供效用為核苷酸攜帶體(carrier)，特別是DNA於宿主細胞中以表現本發明胜肽，或為基因治療來投予本發明核苷酸而言為有效的。

【0293】當 *E. coli* 被選擇為宿主細胞且載體被放大且大量製造於 *E. coli* (例如，JM109、DH5 alpha、HB101或XL1Blue) 中時，載體應具有適合於 *E. coli* 中放大之“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一抗藥基因)。例如，可使用M13-系列載體、pUC-系列載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script等。此外，pGEM-T、pDIRECT與pT7也可被用來次複製與萃取cDNA與上述載體。當載體被用來產生本發明蛋白質時，一表現載體可提供效用。例如，要被表現於 *E. coli* 中之一表現載體應具有上述特徵以被放大於 *E. coli* 中。當使用 *E. coli*，例如JM109、DH5 alpha、HB101或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。基於那方面，可使用，例如pGEX- 5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen)、pEGFP與pET (於此例子，宿主較佳為BL21，其表現T7 RNA聚合酶)，取代上述載體。另外，載體也可含用於胜肽分泌之訊號序列。一引導要被分泌之胜肽至 *E. coli* 的胞膜

間區(periplasm)的示範之訊號序列為pelB訊號序列(Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987))。將載體引入目標宿主細胞的方式包括，例如，氯化鈣方法，與電穿孔(electroporation)方法。

【0294】除了E. coli，例如來自哺乳動物之表現載體（例如 pcDNA3 (Invitrogen)與 pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8)、來自昆蟲細胞之表現載體（例如，"Bac-to-BAC 桿狀病毒表現系統 (baculovirus expression system)" (GIBCO BRL)、pBacPAK8）、來自植物之表現載體（例如，pMH1、pMH2）、來自動物病毒之表現載體（例如，pHSV、pMV、pAdexLcw）、來自反轉錄病毒之表現載體（例如，pZipneo）、來自酵母菌之表現載體（例如，"Pichia Expression Kit" (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01）與來自枯草桿菌(Bacillus subtilis)之表現載體（例如，pPL608, pKTH50）可被用來產生本發明之多胜肽。

【0295】爲了在於動物細胞，例如CHO、COS或NIH3T3細胞中表現載體，載體應具有表現於此類細胞中所必須的啓動子，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，與篩選轉形物的標誌基因（例如藉由藥物篩選（例如，新黴素(neomycin)、G418之抗藥基因）較佳。具有這些載體特徵之已知載體的例子包括，例如pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV與pOP13。

【0296】於此之後，本發明被詳細描述關於實施例。然而，儘管下述材料方法與例子於製造與使用本發明特定實施例中

可用來協助熟悉此技藝人士，然而其僅打算說明本發明之態樣，且因此不限制本發明之範圍。熟悉此技藝人士會容易地認可相似或等同於在此敘述之那些的方法與材料可被使用於本發明之實施或測試中。

【0297】 實施例

【0298】 材料與方法

【0299】 細胞株

【0300】 T1SI、HLA-A*2402陽性B淋巴母細胞株為自IHWG Cell and Gene Bank (Seattle, WA)所購得、T2、HLA-A*0201陽性B淋巴母細胞株、COS7、非洲綠猴腎細胞株為自ATCC所購得。

【0301】 來自TOPK之胜肽的候選物選擇

【0302】 使用“NetMHC3.0”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)預測來自TOPK (GenBank Accession No: NM_018492; 例如 (序列辨識號: 85))之9員與10員胜肽，其結合至HLA-A*2402與HLA-A*0201分子之任一或兩者。這些胜肽係根據一標準固相合成方法由Biosynthesis (Lewisville, Texas)來合成且藉由逆相高效能液體層析(reversed phase high performance liquid chromatography, HPLC)來純化。分別藉由分析型HPLC與質譜分析確認這些胜肽之純度(>90%)與身份(identity)。將胜肽溶解於二甲基亞砷(dimethylsulfoxide, DMSO)

中於 20 mg/ml 且儲存於 -80°C。

【0303】 *In vitro* 細胞毒殺性 T 淋巴球誘導

【0304】 使用來自單核白血球之樹突細胞做為抗原呈現細胞以誘導抗表現於人類白血球組織抗原 (HLA) 上之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球反應。 *In vitro* 產生樹突細胞如別處所述 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。特別地，由 Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液分離自一正常自願者 (HLA-A* 2402 或 HLA-A* 0201 陽性) 之周邊血液單核細胞，藉由貼附至一塑膠組織培養盤 (Becton Dickinson) 來分離以豐富其如一單核白血球部分。將經豐富單核白血球之族群培養在 1000 U/ml 之人類顆粒 - 巨噬細胞群落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (R&D System) 與 1000 U/ml 之白細胞介素 (interleukin, IL)-4 (R&D System) 存在下於含 2% 之熱去活性自身取得血清 (autologous serum, AS) 之 AIM-V 培養基 (Invitrogen) 中。培養 7 天後，於 AIM-V 培養基中，於 3 µg /ml 之 β-2 微球蛋白 (beta 2-microglobulin) 存在下以 20 µg/ml 之各合成胜肽脈衝 (pulsed) 細胞激素誘導之樹突細胞 3 小時於 37°C。所產生之細胞顯示表現樹突細胞相關分子，例如 CD80、CD83、CD86 與 HLA Class II 於其細胞表面 (資料未顯示)。之後以 X-射線 (20 Gy) 將這些胜肽脈衝之樹突細胞去活性且將其以 1 : 20 之比例與自身取得 CD8 陽性 T 細胞混合，CD8 陽性 T 細胞藉由以 CD8 Positive Isolation Kit (Dyna1) 正選擇獲得。這些培養物設置於 48 孔盤 (Corning)；各孔含 1.5×10^4 胜肽脈衝之樹突細胞、 3×10^5 CD8

陽性 T 細胞與 10 ng/ml 之 IL-7 (R&D System) 於 0.5 ml 之 AIM-V/2% 自身取得血清培養基中。三天之後，以 IL-2 (CHIRON) 添加至培養物至終濃度為 20 IU/ml。第 7 天與第 14 天更以自身取得胜肽脈衝之樹突細胞進一步刺激 T 細胞。以與上述相同之方法每次製備樹突細胞。於第 21 天，第三輪之胜肽刺激後，將細胞毒殺性 T 淋巴球進行抗胜肽脈衝之 TISI 細胞或 T2 細胞測試 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

【0305】細胞毒殺性 T 淋巴球擴張步驟

【0306】使用與由 Riddell et al. (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23) 所敘述之相似方法於培養中擴張細胞毒殺性 T 淋巴球。全部 5×10^4 細胞毒殺性 T 淋巴球懸浮於 25 ml 之含有兩種人類 B 類淋巴母細胞株之 AIM-V/5% 自身取得血清培養基，由 MMC 去活化，在 40 ng/ml 之抗-CD3 單株抗體 (PharMingen) 存在下。在開始培養 1 天後，120 IU/ml 之 IL-2 加入培養中。於第 5、8、11 天以新鮮之含 30 IU/ml 之 IL-2 的 AIM-V/5% 自身取得血清培養基提供給培養物 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006

May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

【0307】細胞毒殺性T淋巴球複製(clone)的建立

【0308】執行稀釋以具有0.3、1與3 細胞毒殺性T淋巴球/孔於96圓底(round-bottomed)微效價盤(Nalge Nunc International)中。細胞毒殺性T淋巴球與 1×10^4 細胞/孔之兩種人類B類淋巴母細胞株、30 ng/ml之抗-CD3抗體與125 U/ml之IL-2於全部150 μ l/孔之含5%自身取得之血清的AIM-V 培養基中一起培養。10天後將50 μ l/孔之IL-2 加入培養基中以達到125 U/ml IL-2之最終濃度。於第14天測試細胞毒殺性T淋巴球之活性，且使用上述相同方法擴張細胞毒殺性T淋巴球複製(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 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)。

【0309】專一之細胞毒殺性T淋巴球活性

【0310】爲了測試專一之細胞毒殺性T淋巴球活性，執行IFN- γ 酵素結合免疫斑點(ELISPOT)分析與IFN- γ 酵素結合免疫吸附(ELISA)分析。製備胜肽脈衝之TISI細胞或T2(1×10^4 /孔)爲刺激細胞(stimulator cell)。於48孔中培養之細胞，細胞毒殺性T淋巴球細胞株與細胞毒殺性T淋巴球複製做爲應答細胞(responder cell)。在製造商步驟下執行IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析與IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析。

【0311】強有力地表現目標基因與HLA-A24或HLA-A02任一或兩者的細胞的建立

【0312】藉由PCR將編碼出目標基因之開放讀框、HLA-A*2402或HLA-A*0201的cDNA放大。將PCR放大產物選殖進一表現載體。使用lipofectamine 2000 (Invitrogen)，根據製造步驟將質體轉染進COS7，其為一目標基因無效、HLA-A*0201無效與HLA-A*2402無效細胞株。於自轉染後2天，以versene (Invitrogen)收集經轉染的細胞且使用為細胞毒殺性T淋巴球活性分析之刺激細胞(5×10^4 細胞/孔)。

【0313】辨認內生表現TOPK與HLA-A*2402或HLA-A*0201之目標細胞株的細胞毒殺性T淋巴球能力

【0314】將細胞毒殺性T淋巴球複製檢驗其辨認內生表現TOPK與HLA-A*2402或HLA-A*0201之目標細胞株之能力。以目標細胞株(5×10^4 細胞/孔)培養所建立之細胞毒殺性T淋巴球細胞株與複製達兩個隔夜。在誘導後藉由ELISA來測量於培養基中之IFN- γ 。按照製造商程序執行IFN- γ ELISA。

【0315】結果

【0316】於癌症中增強之TOPK表現

【0317】使用c-DNA微陣列獲得自各種癌症之廣泛基因表現概況(profile)顯示TOPK (GenBank Accession No. NM_018492，例如，序列辨識號：85)專一地被提升於癌症組織中，當與正常對應組織比較時。急性骨髓性白血病中15個有1個、膀胱癌中18個有15個、乳癌中40個有36個、子宮頸癌中6個有2個、膽管細胞癌中6個有6個、結腸直腸癌中6個有2個、瀰漫型胃癌中1個有1個、非小細胞肺癌中5個有5個、淋巴癌中2個有1個、骨肉瘤中11個有7個、攝護腺癌中19個有12個、腎

癌中12個有3個、小細胞肺癌中14個有14個與軟組織腫瘤中29個有15個，有根據地提升TOPK表現（表1）。

【0318】表1、與正常對應組織比較，於癌症組織中觀察到TOPK之向上調控之例子的比例

癌症/腫瘤	比例
急性骨髓性白血病	1/15
膀胱癌	15/18
乳癌	36/40
子宮頸癌	2/6
膽管細胞癌	6/6
結腸直腸癌	2/6
瀰漫型胃癌	1/1
非小細胞肺癌	5/5
淋巴癌	1/2
骨肉瘤	7/11
攝護腺癌	12/19
腎癌	3/12
小細胞肺癌	14/14
軟組織腫瘤	15/29

【0319】來自TOPK之HLA-A24結合胜肽的預測

【0320】表2a與2b以高結合親和力之順序顯示TOPK之HLA-A24結合的9員與10員胜肽。總共40個具有潛在HLA-A24結合能力之胜肽被選擇且將其試驗以確定抗原決定位胜肽。

【0321】表2a、來自TOPK之HLA-A24結合的9員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
289	SYQKVIELF	21	1
230	IFAFGLTLW	363	2
130	RYKASQDPF	451	3
237	LWEMMTLSI	1351	4
155	KYLHQEKKL	1906	5
232	AFGLTLWEM	3946	6
174	VIKGDFETI	4496	7
73	HYRSVYQKR	4663	8

235	LTLWEMMTL	4781	9
19	SVLCSTPTI	6522	10
205	CYIGTEPWK	7254	11
77	VYQKRLMDE	8604	12
270	AYYAALGTR	8621	13
58	HSPWAVKKI	9096	14
81	RLMDEAKIL	12527	15
278	RPPINMEEL	19706	16
183	KICDVGVSL	25266	17
227	KADIFAFGL	25408	18
13	LSEKKKSVL	26380	19
146	VALNMARGL	26693	20
140	AAIILKVAL	28349	21
103	FTEANDGSL	29275	22
105	EANDGSLCL	29821	23
118	GGEKSLNDL	35171	24

【0322】 表 2b、來自 TOPK 之 HLA-A24 結合的 10 員 胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
31	ASPFMQKLGF	4764	25
155	KYLHQEKKLL	8099	26
288	ESYQKVIELF	9466	27
289	SYQKVIELFS	9631	28
130	RYKASQDPFP	9917	29
47	YLMKRSPRGL	10978	30
73	HYRSVYQKRL	11919	31
102	AFTEANDGSL	14375	32
39	GFGTGVNVYL	21925	33
4	ISNFKTPSKL	21974	34
77	VYQKRLMDEA	23521	35
241	MTLSIPHINL	27049	36
12	KLSEKKKSVL	28153	37
148	LNMARGLKYL	30397	38
145	KVALNMARGL	32052	39
114	AMEYGG EKSL	32705	40

起始位置指自 TOPK 之 N 端之胺基酸殘基的數目。

分離常數 [Kd (nM)] 為來自 “NetMHC3.0”。

【0323】 來自 TOPK 之 HLA-A02 結合 胜肽 的預測

【0324】 表 3a 與 3b 分別以高結合親和力之順序顯示 TOPK 之

HLA-A02結合的9員與10員胜肽。總共44個具有潛在HLA-A02結合能力之胜肽被選擇且將其試驗以確定抗原決定位胜肽。

【0325】 表 3a、來自 TOPK之 HLA-A02結合的 9員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
55	GLSHSPWAV	13	41
240	MMTLSIPHI	37	42
34	FMQKLGFGT	76	43
236	TLWEMMTLS	150	44
19	SVLCSTPTI	230	45
134	SQDPFPAAI	238	46
183	KICDVGVSL	415	47
81	RLMDEAKIL	470	48
149	NMARGLKYL	524	49
235	LTLWEMMTL	648	50
12	KLSEKKKSV	775	51
227	KADIFAFGL	1542	52
285	ELDESYQKV	1902	53
47	YLMKRSPRG	2476	54
310	SAAHIVEAL	3199	55
132	KASQDPFPA	3496	56
242	TLSIPHINL	3753	57
156	YLHQEKKLL	4077	58
138	FPAAILKV	4228	59
142	IILKVALNM	4330	60

【0326】 表 3b、來自 TOPK之 HLA-A02結合的 10員胜肽

起始位置	胺基酸序列	Kd (nM)	序列辨識號
190	SLPLDENMTV	30	61
236	TLWEMMTLSI	32	62
231	FAFGLTLWEM	41	63
47	YLMKRSPRGL	64	64
234	GLTLWEMMTL	74	65
239	EMMTLSIPHI	93	66
290	YQKVIELFSV	101	67
37	KLGFGTGVNV	192	68
20	VLCSTPTINI	290	69
241	MTLSIPHINL	310	70
272	YAALGTRPPI	1347	71
88	ILKSLHHPNI	1656	72
81	RLMDEAKILK	1720	73

313	HIVEALETDV	2345	74
54	RGLSHSPWAV	2364	75
142	IILKVALNMA	2428	76
35	MQKLGFGTGV	2432	77
110	SLCLAMEYGG	3236	78
223	VITDKADIFA	3422	79
274	ALGTRPPINM	3575	80
173	VVIKGDFETI	3955	81
141	AIILKVALNM	4247	82
292	KVIELFSVCT	4637	83
180	ETIKICDVG	4911	84

起始位置指自 TOPK 之 N 端之胺基酸殘基的數目。

分離常數 [K_d (nM)] 為來自 “NetMHC3.0”。

【0327】以 HLA-A*2402 限制之來自 TOPK 之預測胜肽誘導細胞毒殺性 T 淋巴球

【0328】根據敘述於“材料與方法”之步驟產生對於那些來自 TOPK 之胜肽的細胞毒殺性 T 淋巴球。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性（第 1 圖）。與控制組孔洞相較，具有 TOPK-A24-9-230（序列辨識號：2）之孔洞編號 #8 (a)、具有 TOPK-A24-9-130（序列辨識號：3）之孔洞編號 #3 (b)、具有 TOPK-A24-9-232（序列辨識號：6）之孔洞編號 #3 (c)、具有 TOPK-A24-10-288（序列辨識號：27）之孔洞編號 #2 (d) 與具有 TOPK-A24-10-289（序列辨識號：28）之孔洞編號 #4 (e) 顯示強有力之 IFN- γ 產生。另一方面，藉由已顯示於表 2a 與 2b 中之其他胜肽刺激，沒有偵測到專一之細胞毒殺性 T 淋巴球活性，儘管那些胜肽具有與 HLA-A*2402 之可能結合活性。作為負資料之一典型，從以 TOPK-A24-9-289（序列辨識號：1）(f) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球沒有觀察到專一的 IFN- γ 產生。總而言之，這些結果建議來自 TOPK 之 5 個選出的

胜肽可誘導強有力之細胞毒殺性T淋巴球。

【0329】以HLA-A*0201限制之來自TOPK之預測胜肽誘導細胞毒殺性T淋巴球

【0330】藉由IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測胜肽專一細胞毒殺性T淋巴球活性（第2圖）。與控制組孔洞相較，具有TOPK-A02-9-240（序列辨識號：42）之孔洞編號#7（a）、具有TOPK-A02-9-19（序列辨識號：45）之孔洞編號#4（b）、具有TOPK-A02-9-183（序列辨識號：47）之孔洞編號#2（c）、具有TOPK-A02-9-235（序列辨識號：50）之孔洞編號#8（d）、具有TOPK-A02-9-12（序列辨識號：51）之孔洞編號#4（e）、具有TOPK-A02-9-285（序列辨識號：53）之孔洞編號#3（f）、具有TOPK-A02-9-47（序列辨識號：54）之孔洞編號#3（g）、具有TOPK-A02-10-236（序列辨識號：62）之孔洞編號#5（h）、具有TOPK-A02-10-231（序列辨識號：63）之孔洞編號#3（i）、具有TOPK-A02-10-47（序列辨識號：64）之孔洞編號#8（j）、具有TOPK-A02-10-239（序列辨識號：66）（k）#1、具有TOPK-A02-10-272（序列辨識號：71）之孔洞編號#1（l）、具有TOPK-A02-10-88（序列辨識號：72）之孔洞編號#4（m）與具有TOPK-A02-10-142（序列辨識號：76）之孔洞編號#4（n）顯示強有力之IFN- γ 產生。另一方面，藉由已顯示於表3a與3b中之其他胜肽刺激，沒有偵測到專一之細胞毒殺性T淋巴球活性，儘管那些胜肽具有與HLA-A*0201之可能結合活性。作為負資料之典型，從以TOPK-A02-9-55（序列辨識號：41）（o）刺激之細胞毒殺性T淋巴球沒有觀察到專一的IFN- γ 產生。總而言之，這

些結果建議來自 TOPK 之 14 個選出的胜肽可誘導強有力之細胞毒殺性 T 淋巴球。

【0331】抗 TOPK 衍生胜肽之細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株與複製的建立

【0332】藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測，於具有 TOPK-A24-9-230 (序列辨識號：2) 之孔洞編號 #8 (a)、具有 TOPK-A24-9-130 (序列辨識號：3) 之孔洞編號 #3 (b)、具有 TOPK-A24-9-232 (序列辨識號：6) 之孔洞編號 #3 (c)、具有 TOPK-A24-10-288 (序列辨識號：27) 之孔洞編號 #2 (d) 與具有 TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28) #4 (e) 中顯示胜肽專一細胞毒殺性 T 淋巴球活性的細胞被擴張並建立細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株。藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析來測量這些細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的細胞毒殺性 T 淋巴球活性 (第 3 圖)。與無胜肽脈衝之目標細胞相較，細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株顯示強的抗以對應胜肽脈衝之目標細胞的 IFN- γ 產生。此外，如“材料與方法”段落中所述，藉由來自細胞毒殺性 T 淋巴球細胞株的限制稀釋建立細胞毒殺性 T 淋巴球複製，且藉由 IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析測量來自抗經對應胜肽脈衝之 TISI 細胞之細胞毒殺性 T 淋巴球複製的 IFN- γ 產生。從以 TOPK-A24-9-130 (序列辨識號：3) (a)、TOPK-A24-10-288 (序列辨識號：27) (b) 與 TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28) (c) 刺激之細胞毒殺性 T 淋巴球複製觀察到強的 IFN- γ 產生 (第 4 圖)。

【0333】藉由 IFN- γ 酵素結合免疫斑點分析偵測，於具有 TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42) 之孔洞編號 #7(a)、具有

TOPK-A02-9-19 (序列辨識號：45)之孔洞編號#4 (b)、具有 TOPK-A02-9-235 (序列辨識號：50) #8 (c)、具有 TOPK-A02-9-12 (序列辨識號：51)之孔洞編號#4 (d)、具有 TOPK-A02-9-285 (序列辨識號：53)之孔洞編號#3 (e)、具有 TOPK-A02-9-47 (序列辨識號：54)之孔洞編號#3 (f)、具有 TOPK-A02-10-236 (序列辨識號：62)之孔洞編號#5 (g)、具有 TOPK-A02-10-231 (序列辨識號：63)之孔洞編號#3 (h)、具有 TOPK-A02-10-47 (序列辨識號：64)之孔洞編號#8 (i)、具有 TOPK-A02-10-239 (序列辨識號：66)之孔洞編號#1(j)與具有 TOPK-A02-10-88 (序列辨識號：72) 之孔洞編號#4 (k)中顯示 胜肽專一細胞毒殺性T淋巴球活性的細胞被擴張並建立細胞毒殺性T淋巴球細胞株。藉由IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析來測量這些細胞毒殺性T淋巴球細胞株的細胞毒殺性T淋巴球活性(第5圖)。與無胜肽脈衝之目標細胞相較，細胞毒殺性T淋巴球細胞株顯示強的抗以對應胜肽脈衝之目標細胞的IFN- γ 產生。此外，如“材料與方法”段落中所述，藉由來自細胞毒殺性T淋巴球細胞株的限制稀釋建立細胞毒殺性T淋巴球複製，且藉由IFN- γ 酵素結合免疫吸附分析測量來自抗經對應胜肽脈衝之T2細胞之細胞毒殺性T淋巴球複製的IFN- γ 產生。從以 TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42) (a) 與 TOPK-A02-9-285 (序列辨識號：53) (b)刺激之細胞毒殺性T淋巴球複製觀察到強的IFN- γ 產生(第6圖)。

【0334】 抗表現 TOPK與 HLA-A* 2402或 HLA-A* 0201之目標細胞的專一細胞毒殺性T淋巴球活性

【0335】 檢驗經提升抗TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28) 胜肽之所建立的細胞毒殺性T淋巴球複製對於辨認表現TOPK與HLA-A*2402分子之目標細胞的能力。經全長之TOPK與HLA-A*2402基因兩者轉染（對於表現TOPK與HLA-A*2402基因之目標細胞的特定模式）的COS7細胞被製備為刺激細胞，且以全長之TOPK與HLA-A*2402基因之任一轉染的COS7細胞被使用為控制組。於第7圖中，以TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28)刺激之細胞毒殺性T淋巴球複製顯示強的抗表現TOPK與HLA-A*2402兩者之COS7細胞的細胞毒殺性T淋巴球活性。另一方面，沒有偵測到抗控制組之顯著專一的細胞毒殺性T淋巴球活性。因此，此資料清楚證明TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28)胜肽被內生地處理且表現於具有HLA-A*2402分子之目標細胞上且由細胞毒殺性T淋巴球所辨認。檢驗經提升抗TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42)胜肽之所建立的細胞毒殺性T淋巴球複製對於辨認表現TOPK與HLA-A*0201分子之目標細胞的能力。經全長之TOPK與HLA-A*0201基因兩者轉染（對於表現TOPK與HLA-A*0201基因之目標細胞的特定模式）的COS7細胞被製備為刺激細胞，且以全長之TOPK與HLA-A*0201基因之任一轉染的COS7細胞被使用為控制組。於第8圖中，以TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42)刺激之細胞毒殺性T淋巴球細胞株顯示強的抗表現TOPK與HLA-A*0201兩者之COS7細胞的細胞毒殺性T淋巴球活性。另一方面，沒有偵測到抗控制組之顯著專一的細胞毒殺性T淋巴球活性。因此，此資料清楚證明TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42)胜肽被內生地

處理且表現於具有HLA-A*0201分子之目標細胞上且由細胞毒殺性T淋巴球所辨認。這些結果指出此來自TOPK之胜肽爲可用以提供對於具TOPK表現之腫瘤之病患的癌症疫苗。

【0336】 抗原胜肽之同源分析：

【0337】 以 TOPK-A24-9-230 (序列辨識號：2)、TOPK-A24-9-130 (序列辨識號：3)、TOPK-A24-9-232 (序列辨識號：6)、TOPK-A24-10-288 (序列辨識號：27)、TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28)、TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42)、TOPK-A02-9-19 (序列辨識號：45)、TOPK-A02-9-183 (序列辨識號：47)、TOPK-A02-9-235 (序列辨識號：50)、TOPK-A02-9-12 (序列辨識號：51)、TOPK-A02-9-285 (序列辨識號：53)、TOPK-A02-9-47 (序列辨識號：54)、TOPK-A02-10-236 (序列辨識號：62)、TOPK-A02-10-231 (序列辨識號：63)、TOPK-A02-10-47 (序列辨識號：64)、TOPK-A02-10-239 (序列辨識號：66)、TOPK-A02-10-272 (序列辨識號：71)、TOPK-A02-10-88 (序列辨識號：72)或TOPK-A02-10-142 (序列辨識號：76)刺激之細胞毒殺性T淋巴球顯示顯著且專一之細胞毒殺性T淋巴球活性。此結果可能起因於這些胜肽之序列爲與源自己知使人類免疫系統敏感之其他分子的胜肽同源的事實。爲了排除此可能性，對於使用爲關鍵字向BLAST演算法(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)查詢之這些胜肽序列執行同源性分析，而BLAST演算法顯示沒有序列顯示顯著之同源性。同源性分析之結果指出TOPK-A24-9-230 (序列辨識號：2)、TOPK-A24-9-130 (序列辨

識號：3)、TOPK-A24-9-232 (序列辨識號：6)、TOPK-A24-10-288 (序列辨識號：27)、TOPK-A24-10-289 (序列辨識號：28)、TOPK-A02-9-240 (序列辨識號：42)、TOPK-A02-9-19 (序列辨識號：45)、TOPK-A02-9-183 (序列辨識號：47)、TOPK-A02-9-235 (序列辨識號：50)、TOPK-A02-9-12 (序列辨識號：51)、TOPK-A02-9-285 (序列辨識號：53)、TOPK-A02-9-47 (序列辨識號：54)、TOPK-A02-10-236 (序列辨識號：62)、TOPK-A02-10-231 (序列辨識號：63)、TOPK-A02-10-47 (序列辨識號：64)、TOPK-A02-10-239 (序列辨識號：66)、TOPK-A02-10-272 (序列辨識號：71)、TOPK-A02-10-88 (序列辨識號：72)與OPK-A02-10-142 (序列辨識號：76)之序列為獨特的，且因此只有很小可能性，對於我們最佳知識而言，這些分子會對於一些非相關分子提高非計畫中之免疫反應。因此，於此確認之新穎之來自TOPK的HLA-A24或HLA-A02抗原決定位胜肽提供效用於癌症免疫治療之領域中。

【0338】產業利用性

【0339】本發明提供新的腫瘤相關抗原，特別是來自TOPK的那些，其可誘導強且專一的抗腫瘤免疫反應，且因此對於癌症形式之廣泛多樣化而言具有應用性。此腫瘤相關抗原作為抗與TOPK相關之疾病的胜肽疫苗為有效的，與TOPK相關之疾病，例如癌症，更特別是急性骨髓性白血病、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管細胞癌、結腸直腸癌、瀰漫型胃癌、非小細胞肺癌、淋巴癌、骨肉瘤、攝護腺癌、腎癌、小細胞肺癌與軟組織腫瘤。

【0340】當於此詳述本發明與提及其特定實施例時，需瞭解的是，前述敘述本質為示範與解釋且意為說明本發明與其較佳實施例。於例行實驗之中，熟悉此技藝人士可立即瞭解在不脫離本發明之精神下其可實行各種改變與修飾，其邊界與範圍被所附申請專利範圍所定義。

【符號說明】

無。

.

.

【序列表】

<110> 腫瘤療法・科學股份有限公司

<120> TOPK 胜肽及含其之疫苗

<130> ONC-A1113-TW

<150> US 61/552,817

<151> 2011-10-28

<160> 90

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 1

Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 2

Ile Phe Ala Phe Gly Leu Thr Leu Trp
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 3

Arg Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

.

.

<400> 4

Leu Trp Glu Met Met Thr Leu Ser Ile
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 5

Lys Tyr Leu His Gln Glu Lys Lys Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 6

Ala Phe Gly Leu Thr Leu Trp Glu Met

15

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 7

Val Ile Lys Gly Asp Phe Glu Thr Ile
15

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 8

His Tyr Arg Ser Val Tyr Gln Lys Arg
15

<210> 9

.

. <211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 9

Leu Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 10

Ser Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr Ile
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 11

Cys Tyr Ile Gly Thr Glu Pro Trp Lys
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 12

Val Tyr Gln Lys Arg Leu Met Asp Glu
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 13

.

.

Ala Tyr Tyr Ala Ala Leu Gly Thr Arg
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 14

His Ser Pro Trp Ala Val Lys Lys Ile
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 15

Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu
1 5

•
•

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 16

Arg Pro Pro Ile Asn Met Glu Glu Leu
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 17

Lys Ile Cys Asp Val Gly Val Ser Leu
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT

.

. <213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 18

Lys Ala Asp Ile Phe Ala Phe Gly Leu
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 19

Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Val Leu
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 20

Val Ala Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 21

Ala Ala Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 22

Phe Thr Glu Ala Asn Asp Gly Ser Leu

2125-12628-PF

.

. 1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 23

Glu Ala Asn Asp Gly Ser Leu Cys Leu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 24

Gly Gly Glu Lys Ser Leu Asn Asp Leu
1 5

<210> 25

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 25

Ala Ser Pro Phe Met Gln Lys Leu Gly Phe
1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 26

Lys Tyr Leu His Gln Glu Lys Lys Leu Leu
1 5 10

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

.

. <220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 27

Glu Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 28

Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 29

Arg Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe Pro
1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 30

Tyr Leu Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 31

His Tyr Arg Ser Val Tyr Gln Lys Arg Leu
1 5 10

.

.

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 32

Ala Phe Thr Glu Ala Asn Asp Gly Ser Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 33

Gly Phe Gly Thr Gly Val Asn Val Tyr Leu
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 34

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

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 35

Val Tyr Gln Lys Arg Leu Met Asp Glu Ala
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

.

.

<400> 36

Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu
1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 37

Lys Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Val Leu
1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 38

Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu Lys Tyr Leu

1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 39

Lys Val Ala Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 40

Ala Met Glu Tyr Gly Gly Glu Lys Ser Leu
1 5 10

<210> 41

.

. <211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 41

Gly Leu Ser His Ser Pro Trp Ala Val
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 42

Met Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 43

Phe Met Gln Lys Leu Gly Phe Gly Thr
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 44

Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu Ser
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 45

.

.

Ser Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr Ile
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 46

Ser Gln Asp Pro Phe Pro Ala Ala Ile
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 47

Lys Ile Cys Asp Val Gly Val Ser Leu
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 48

Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 49

Asn Met Ala Arg Gly Leu Lys Tyr Leu
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT

.

. <213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 50

Leu Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 51

Lys Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Val
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 52

Lys Ala Asp Ile Phe Ala Phe Gly Leu
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 53

Glu Leu Asp Glu Ser Tyr Gln Lys Val
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 54

Tyr Leu Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly

.

. 1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 55

Ser Ala Ala His Ile Val Glu Ala Leu
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 56

Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe Pro Ala
1 5

<210> 57

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 57

Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 58

Tyr Leu His Gln Glu Lys Lys Leu Leu
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

.

. <220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 59

Phe Pro Ala Ala Ile Ile Leu Lys Val
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 60

Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu Asn Met
1 5

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 61

Ser Leu Pro Leu Asp Glu Asn Met Thr Val
1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 62

Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu Ser Ile
1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 63

Phe Ala Phe Gly Leu Thr Leu Trp Glu Met
1 5 10

.

.

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 64

Tyr Leu Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 65

Gly Leu Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu
1 5 10

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

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 66

Glu Met Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile
1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 67

Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser Val
1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

.

.

<400> 68

Lys Leu Gly Phe Gly Thr Gly Val Asn Val
1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 69

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

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 70

Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu

1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 71

Tyr Ala Ala Leu Gly Thr Arg Pro Pro Ile
1 5 10

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 72

Ile Leu Lys Ser Leu His His Pro Asn Ile
1 5 10

<210> 73

.

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 73

Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 74

His Ile Val Glu Ala Leu Glu Thr Asp Val
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 75

Arg Gly Leu Ser His Ser Pro Trp Ala Val
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 76

Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu Asn Met Ala
1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 77

.

.

Met Gln Lys Leu Gly Phe Gly Thr Gly Val
1 5 10

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 78

Ser Leu Cys Leu Ala Met Glu Tyr Gly Gly
1 5 10

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 79

Val Ile Thr Asp Lys Ala Asp Ile Phe Ala
1 5 10

<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 80

Ala Leu Gly Thr Arg Pro Pro Ile Asn Met
1 5 10

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 81

Val Val Ile Lys Gly Asp Phe Glu Thr Ile
1 5 10

<210> 82
<211> 10
<212> PRT

.

, <213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 82

Ala Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu Asn Met
1 5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 83

Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser Val Cys Thr
1 5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一源自 TOPK 之胜肽

<400> 84

Glu Thr Ile Lys Ile Cys Asp Val Gly Val
1 5 10

<210> 85
<211> 1899
<212> DNA
<213> 人類

<220>
<221> CDS
<222> (202).. (1170)

<400> 85
agcgcgcgac tttttgaaag ccaggagggt tcgaattgca acggcagctg ccgggcgtat 60

gtgttggtgc tagaggcagc tgcagggtct cgctgggggc cgctcgggac caattttgaa 120

gaggtacttg gccacgactt attttcacct ccgaccttc cttccaggcg gtgagactct 180

ggactgagag tggctttcac a atg gaa ggg atc agt aat ttc aag aca cca 231
Met Glu Gly Ile Ser Asn Phe Lys Thr Pro
1 5 10

agc aaa tta tca gaa aaa aag aaa tct gta tta tgt tca act cca act 279
Ser Lys Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr
15 20 25

.

ata aat atc ccg gcc tct ccg ttt atg cag aag ctt ggc ttt ggt act	327
Ile Asn Ile Pro Ala Ser Pro Phe Met Gln Lys Leu Gly Phe Gly Thr	
303540	
ggg gta aat gtg tac cta atg aaa aga tct cca aga ggt ttg tct cat	375
Gly Val Asn Val Tyr Leu Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly Leu Ser His	
455055	
tct cct tgg gct gta aaa aag att aat cct ata tgt aat gat cat tat	423
Ser Pro Trp Ala Val Lys Lys Ile Asn Pro Ile Cys Asn Asp His Tyr	
606570	
cga agt gtg tat caa aag aga cta atg gat gaa gct aag att ttg aaa	471
Arg Ser Val Tyr Gln Lys Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu Lys	
75808590	
agc ctt cat cat cca aac att gtt ggt tat cgt gct ttt act gaa gcc	519
Ser Leu His His Pro Asn Ile Val Gly Tyr Arg Ala Phe Thr Glu Ala	
95100105	
aat gat ggc agt ctg tgt ctt gct atg gaa tat gga ggt gaa aag tct	567
Asn Asp Gly Ser Leu Cys Leu Ala Met Glu Tyr Gly Gly Glu Lys Ser	
110115120	
cta aat gac tta ata gaa gaa cga tat aaa gcc agc caa gat cct ttt	615
Leu Asn Asp Leu Ile Glu Glu Arg Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe	
125130135	
cca gca gcc ata att tta aaa gtt gct ttg aat atg gca aga ggg tta	663
Pro Ala Ala Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu	
140145150	

aag tat ctg cac caa gaa aag aaa ctg ctt cat gga gac ata aag tct 711
Lys Tyr Leu His Gln Glu Lys Lys Leu Leu His Gly Asp Ile Lys Ser
155 160 165 170

tca aat gtt gta att aaa ggc gat ttt gaa aca att aaa atc tgt gat 759
Ser Asn Val Val Ile Lys Gly Asp Phe Glu Thr Ile Lys Ile Cys Asp
175 180 185

gta gga gtc tct cta cca ctg gat gaa aat atg act gtg act gac cct 807
Val Gly Val Ser Leu Pro Leu Asp Glu Asn Met Thr Val Thr Asp Pro
190 195 200

gag gct tgt tac att ggc aca gag cca tgg aaa ccc aaa gaa gct gtg 855
Glu Ala Cys Tyr Ile Gly Thr Glu Pro Trp Lys Pro Lys Glu Ala Val
205 210 215

gag gag aat ggt gtt att act gac aag gca gac ata ttt gcc ttt ggc 903
Glu Glu Asn Gly Val Ile Thr Asp Lys Ala Asp Ile Phe Ala Phe Gly
220 225 230

ctt act ttg tgg gaa atg atg act tta tcg att cca cac att aat ctt 951
Leu Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu
235 240 245 250

tca aat gat gat gat gat gaa gat aaa act ttt gat gaa agt gat ttt 999
Ser Asn Asp Asp Asp Asp Glu Asp Lys Thr Phe Asp Glu Ser Asp Phe
255 260 265

gat gat gaa gca tac tat gca gcg ttg gga act agg cca cct att aat 1047
Asp Asp Glu Ala Tyr Tyr Ala Ala Leu Gly Thr Arg Pro Pro Ile Asn
270 275 280

.

atg gaa gaa ctg gat gaa tca tac cag aaa gta att gaa ctc ttc tct 1095
Met Glu Glu Leu Asp Glu Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser
285 290 295

gta tgc act aat gaa gac cct aaa gat cgt cct tct gct gca cac att 1143
Val Cys Thr Asn Glu Asp Pro Lys Asp Arg Pro Ser Ala Ala His Ile
300 305 310

gtt gaa gct ctg gaa aca gat gtc tag tgatcatctc agctgaagtg 1190
Val Glu Ala Leu Glu Thr Asp Val
315 320

tggcttgctg aaataactgt ttattccaaa atatttacat agttactatc agtagttatt 1250

agactctaaa attggcatat ttgaggacca tagtttcttg ttaacatatg gataactatt 1310

tctaatatga aatatgctta tattggctat aagcacttgg aattgtactg ggttttctgt 1370

aaagtttttag aaactagcta cataagtact ttgatactgc tcatgctgac ttaaaacact 1430

agcagtaaaa cgctgtaaac tgtaacatta aattgaatga ccattacttt tattaatgat 1490

ctttcttaaa tattctatat tttaatggat ctactgacat tagcactttg tacagtacaa 1550

aataaagtct acatttggtt aaaacactga accttttgct gatgtgttta tcaaatgata 1610

actggaagct gaggagaata tgcctcaaaa agagtagctc cttggatact tcagactctg 1670

gttacagatt gtcttgatct cttggatctc ctcagatctt tggtttttgc tttaatttat 1730

taaatgtatt ttccatactg agttttaaatt ttattaattt gtaccttaag catttcccag 1790

ctgtgtaaaa acaataaaac tcaaatagga tgataaagaa taaaggacac tttgggtacc1850

agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa1899

<210> 86

<211> 322

<212> PRT

<213> 人類

<400> 86

Met Glu Gly Ile Ser Asn Phe Lys Thr Pro Ser Lys Leu Ser Glu Lys

15105

Lys Lys Ser Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr Ile Asn Ile Pro Ala Ser

202530

Pro Phe Met Gln Lys Leu Gly Phe Gly Thr Gly Val Asn Val Tyr Leu

354045

Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly Leu Ser His Ser Pro Trp Ala Val Lys

505560

Lys Ile Asn Pro Ile Cys Asn Asp His Tyr Arg Ser Val Tyr Gln Lys

65707580

.

Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu Lys Ser Leu His His Pro Asn
85 90 95

Ile Val Gly Tyr Arg Ala Phe Thr Glu Ala Asn Asp Gly Ser Leu Cys
100 105 110

Leu Ala Met Glu Tyr Gly Gly Glu Lys Ser Leu Asn Asp Leu Ile Glu
115 120 125

Glu Arg Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe Pro Ala Ala Ile Ile Leu
130 135 140

Lys Val Ala Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu Lys Tyr Leu His Gln Glu
145 150 155 160

Lys Lys Leu Leu His Gly Asp Ile Lys Ser Ser Asn Val Val Ile Lys
165 170 175

Gly Asp Phe Glu Thr Ile Lys Ile Cys Asp Val Gly Val Ser Leu Pro
180 185 190

Leu Asp Glu Asn Met Thr Val Thr Asp Pro Glu Ala Cys Tyr Ile Gly
195 200 205

Thr Glu Pro Trp Lys Pro Lys Glu Ala Val Glu Glu Asn Gly Val Ile
210 215 220

Thr Asp Lys Ala Asp Ile Phe Ala Phe Gly Leu Thr Leu Trp Glu Met
225 230 235 240

Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu Ser Asn Asp Asp Asp Asp
245 250 255

Glu Asp Lys Thr Phe Asp Glu Ser Asp Phe Asp Asp Glu Ala Tyr Tyr
260 265 270

Ala Ala Leu Gly Thr Arg Pro Pro Ile Asn Met Glu Glu Leu Asp Glu
275 280 285

Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser Val Cys Thr Asn Glu Asp
290 295 300

Pro Lys Asp Arg Pro Ser Ala Ala His Ile Val Glu Ala Leu Glu Thr
305 310 315 320

Asp Val

^

. <210> 87
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一用於 TCR 分析之 PCR 引子

<400> 87
gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 88
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一用於 TCR 分析之 PCR 引子

<400> 88
tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一用於 TCR 分析之 PCR 引子

<400> 89

tcagaaatcc tttctcttga c

21

<210> 90

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 一用於 TCR 分析之 PCR 引子

<400> 90

ctagcctctg gaatcctttc tctt

24

申請專利範圍

1. 一種具有細胞毒殺性 T 淋巴球誘發能力之經分離的胜肽，該胜肽係擇自下列由 (a) 與 (b) 所組成之群組：
 - (a) 一經分離的胜肽，由序列辨識號：28 之胺基酸序列所組成；以及
 - (b) 一經分離的胜肽，由序列辨識號：28 之胺基酸序列所組成，於其中 1 或 2 個胺基酸被取代，其中該取代擇自下列所組成之群組：
 - (i) 序列辨識號：28 之胺基酸序列的 N 端的第二個胺基酸為被苯丙胺酸、甲硫丁胺酸或色胺酸所取代；以及
 - (ii) 序列辨識號：28 之胺基酸序列的 C 端胺基酸為被苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫丁胺酸所取代。
2. 一種經分離之多核苷酸，其編碼出如申請專利範圍第 1 項所述之經分離的胜肽。
3. 一種誘發細胞毒殺性 T 淋巴球之組合物，其中該組合物包括一或多個如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽，或一或多個如申請專利範圍第 2 項所述之多核苷酸。
4. 一種藥學組合物，包括：
 - (a) 一或多個如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽；
 - (b) 一或多個如申請專利範圍第 2 項所述之多核苷酸；
 - (c) 一或多個抗原呈現細胞 (APC)，其呈現如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽與一人類白血球組織抗原的一複合物於其表面上；
 - (d) 一或多個外吐小體，其呈現如申請專利範圍第 1 項所述

之胜肽與一人類白血球組織抗原的一複合物於其表面上；
或

(e) 一或多個細胞毒殺性 T 淋巴球，其可辨認表現如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽與一人類白血球組織抗原的一複合物於其表面上的一細胞，

與一藥學上可接受之載體組合，

其中配製該藥學組合物用於癌症的治療及/或預防、其手術後復發的避免，及/或一抗癌症免疫反應的誘導。

5. 如申請專利範圍第 4 項所述之藥學組合物，其中該藥學組合物被配製來用於投予一個體，其人類白血球組織抗原為人類白血球組織抗原-A24。

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

(a) *in vitro* 將一抗原呈現細胞與如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽接觸，以及

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

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

(a) 將一 CD8 陽性 T 細胞與一抗原呈現細胞共培養，該抗原呈現細胞表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽的複合物於其表面上；

(b) 將一 CD8 陽性 T 細胞與一外吐小體共培養，該外吐小體

表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽的複合物於其表面上，以及

(c) 將編碼出 T 細胞受體次單元多胜肽之一或複數個多核苷酸引入一 CD8 陽性 T 細胞，其中由該 T 細胞受體次單元多胜肽所形成之 T 細胞受體具有與於一細胞表面上之一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽的一複合物結合的能力。

8. 一種經分離之抗原呈現細胞，其表現一人類白血球組織抗原與如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽的一複合物於其表面上。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之抗原呈現細胞，其藉由如申請專利範圍第 6 項所述之方法來誘導。

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

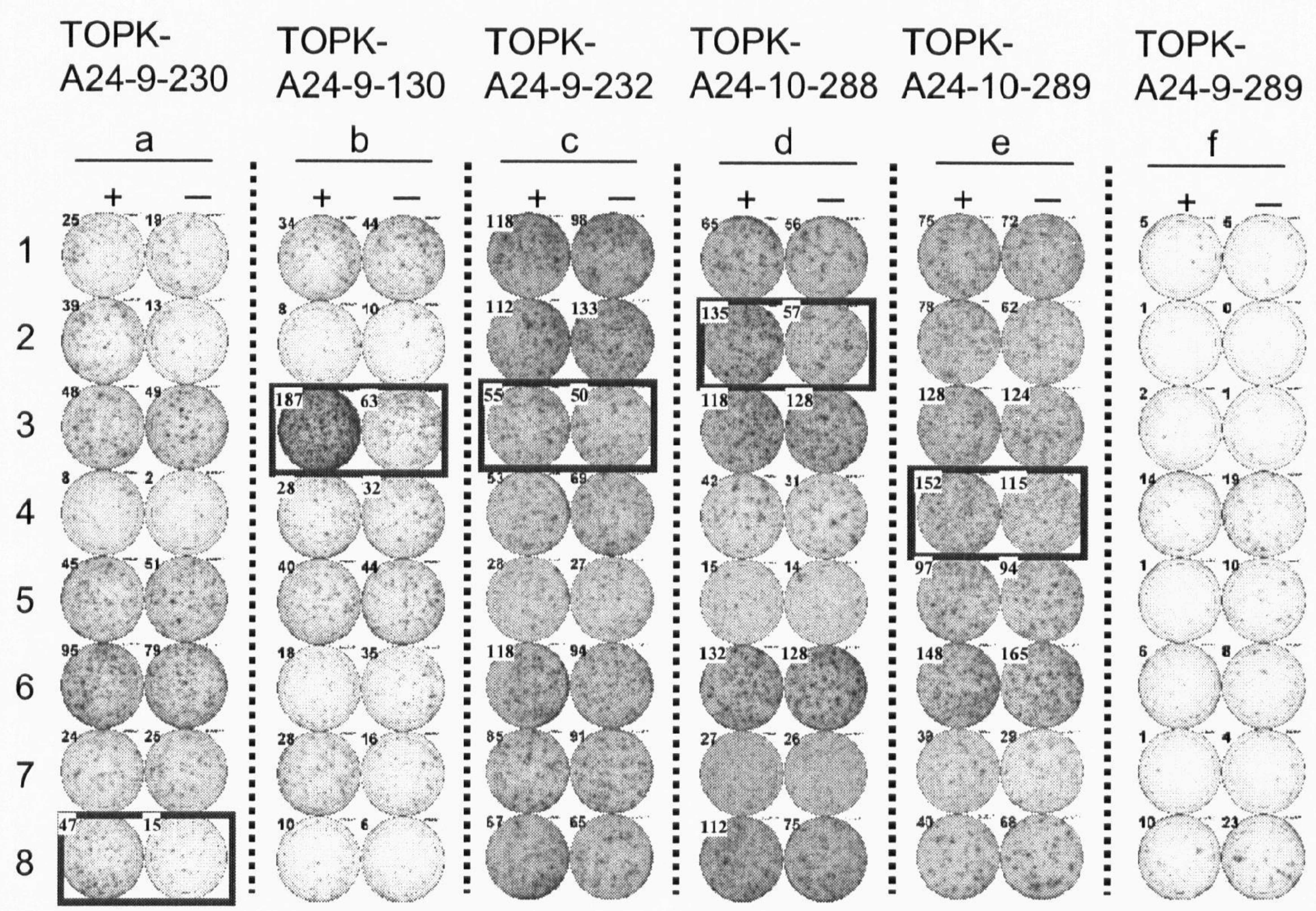
11. 如申請專利範圍第 10 項所述之細胞毒殺性 T 淋巴球，其藉由如申請專利範圍第 7 項所述之方法來誘導。

12. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽或編碼出該胜肽之一多核苷酸在一組合物之製造中的用途，該組成物用於在一個體中誘導一抗癌症之免疫反應。

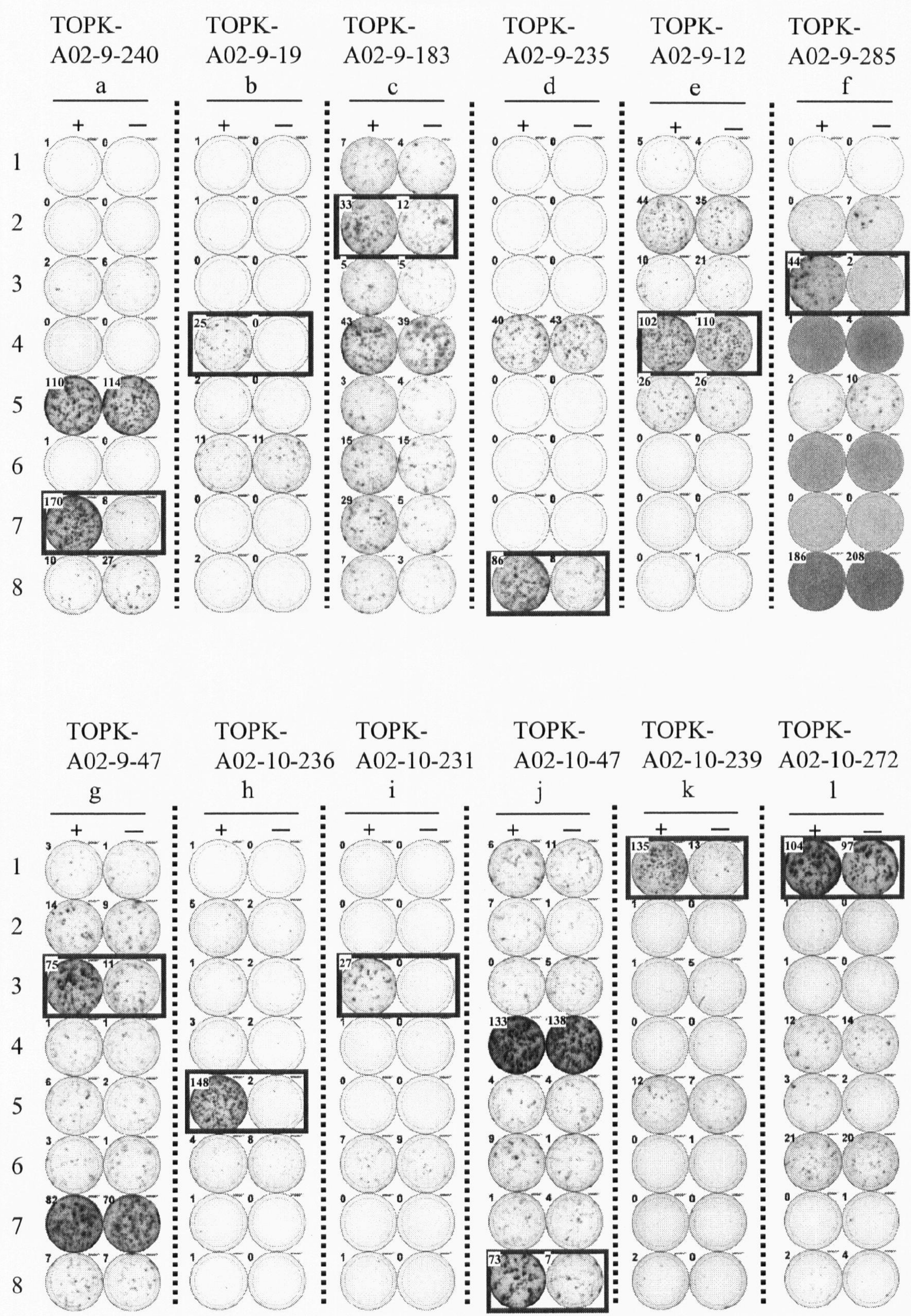
13. 一種抗體，其對抗如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽。

14. 一種載體，包括編碼出如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽的一核苷酸序列。

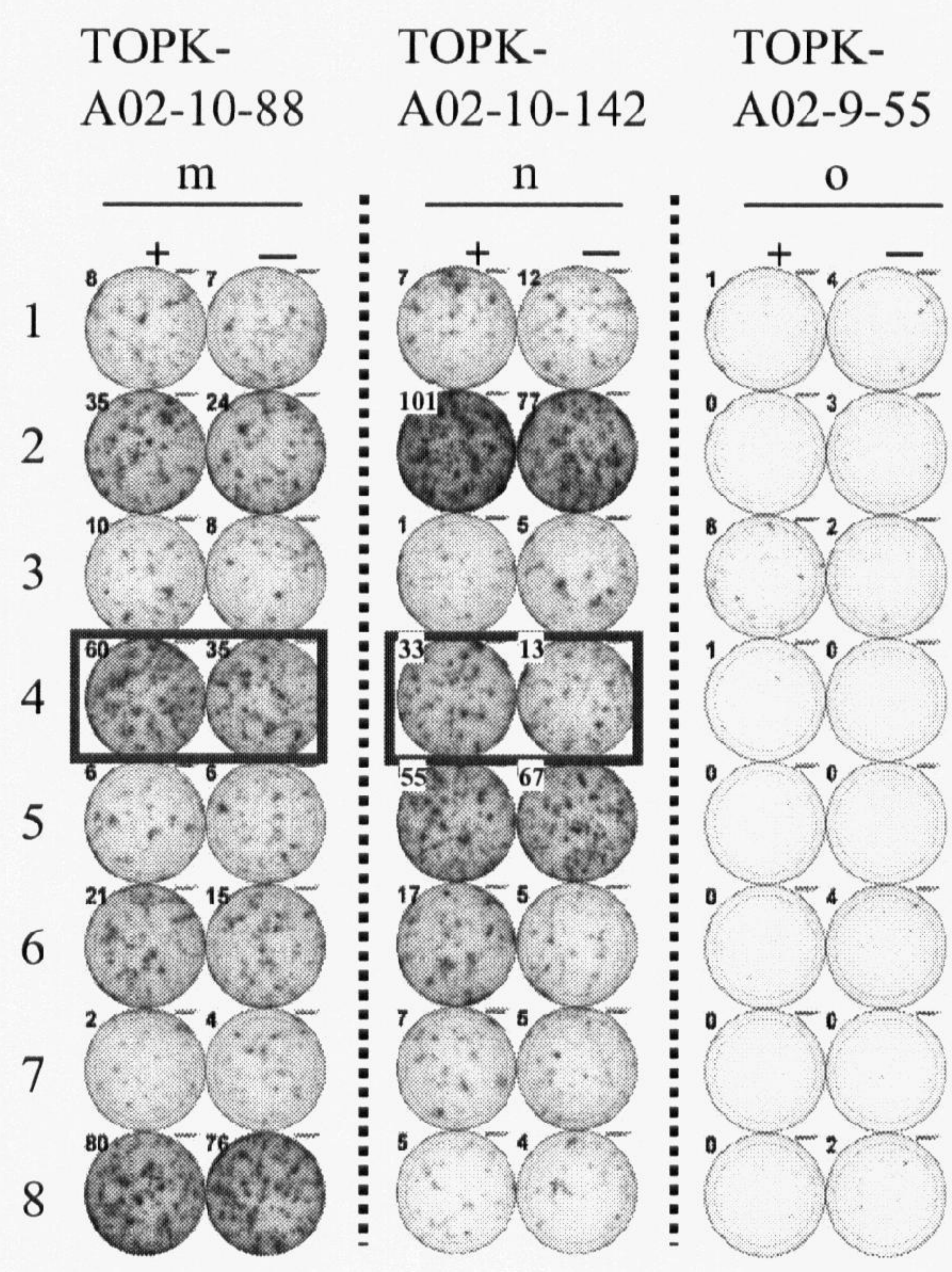
圖式



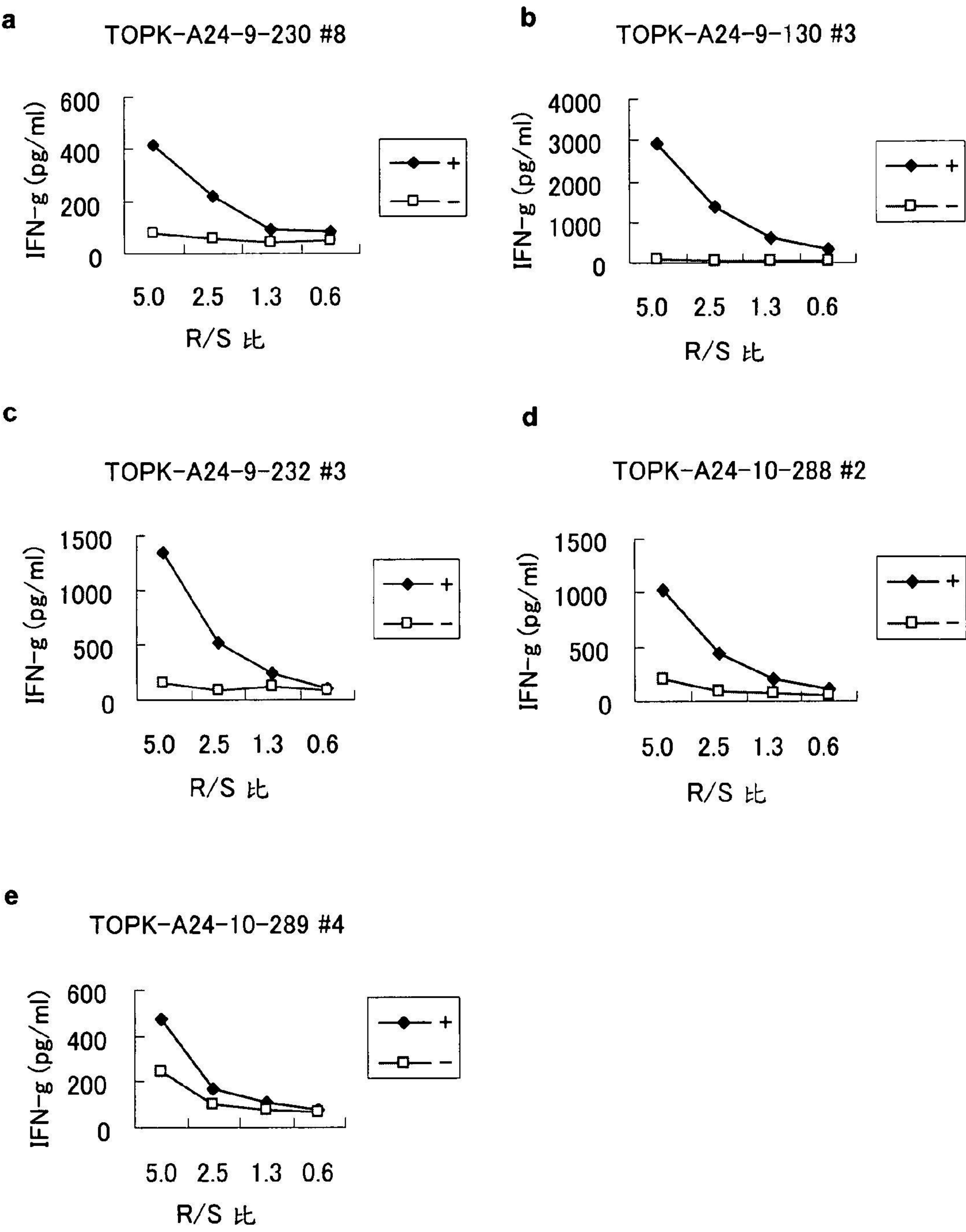
第1圖



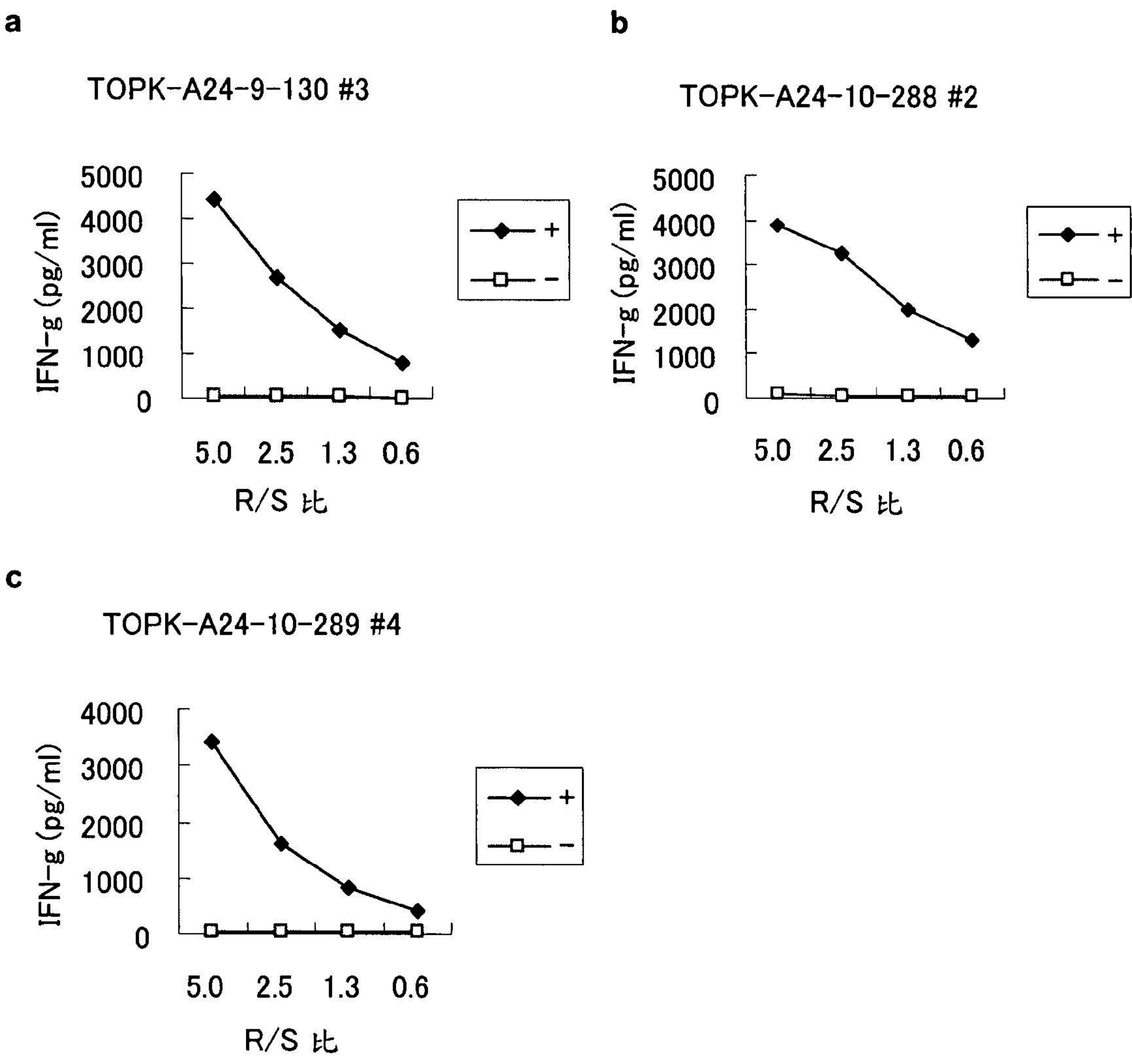
第2圖



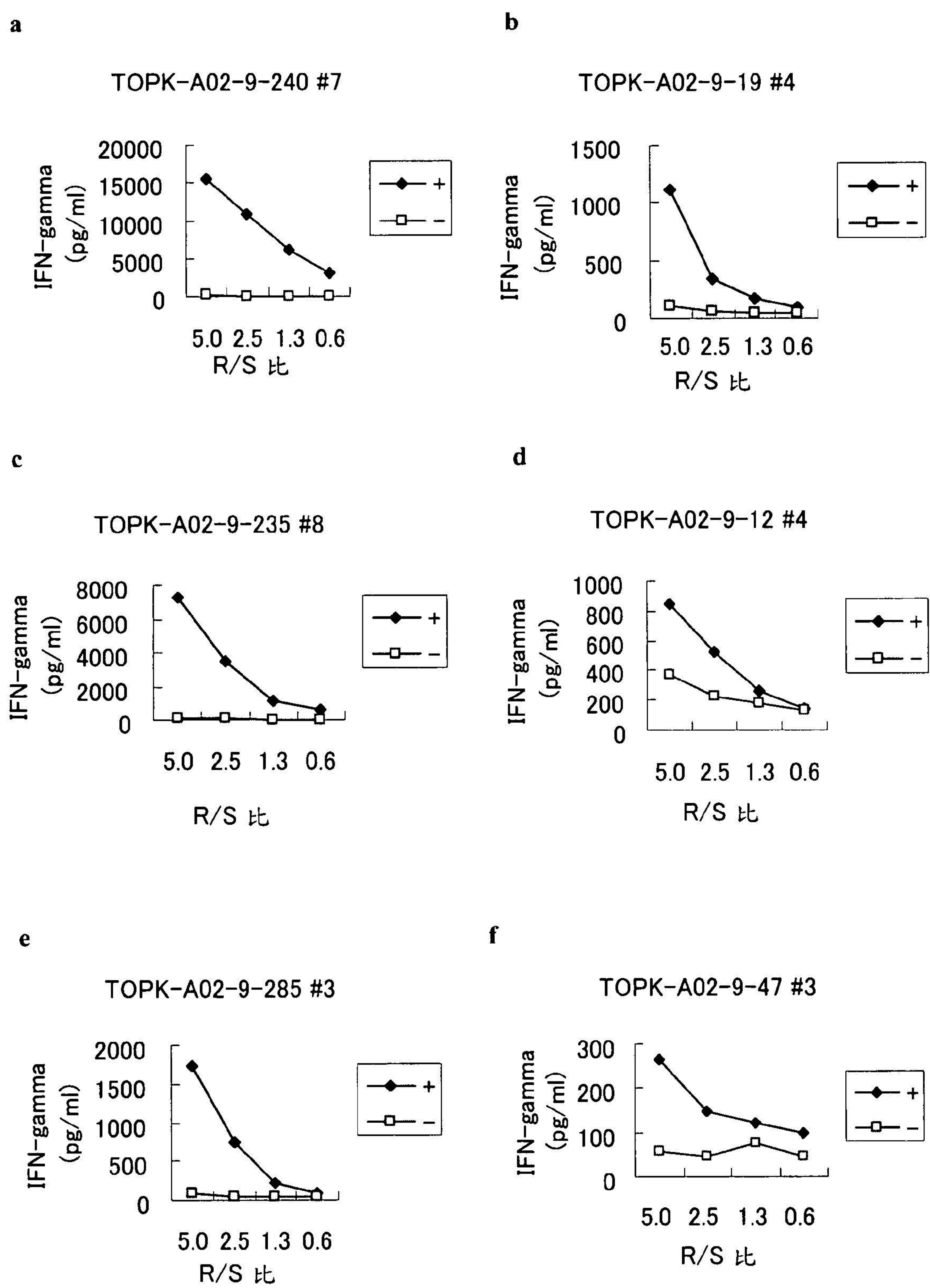
第2圖



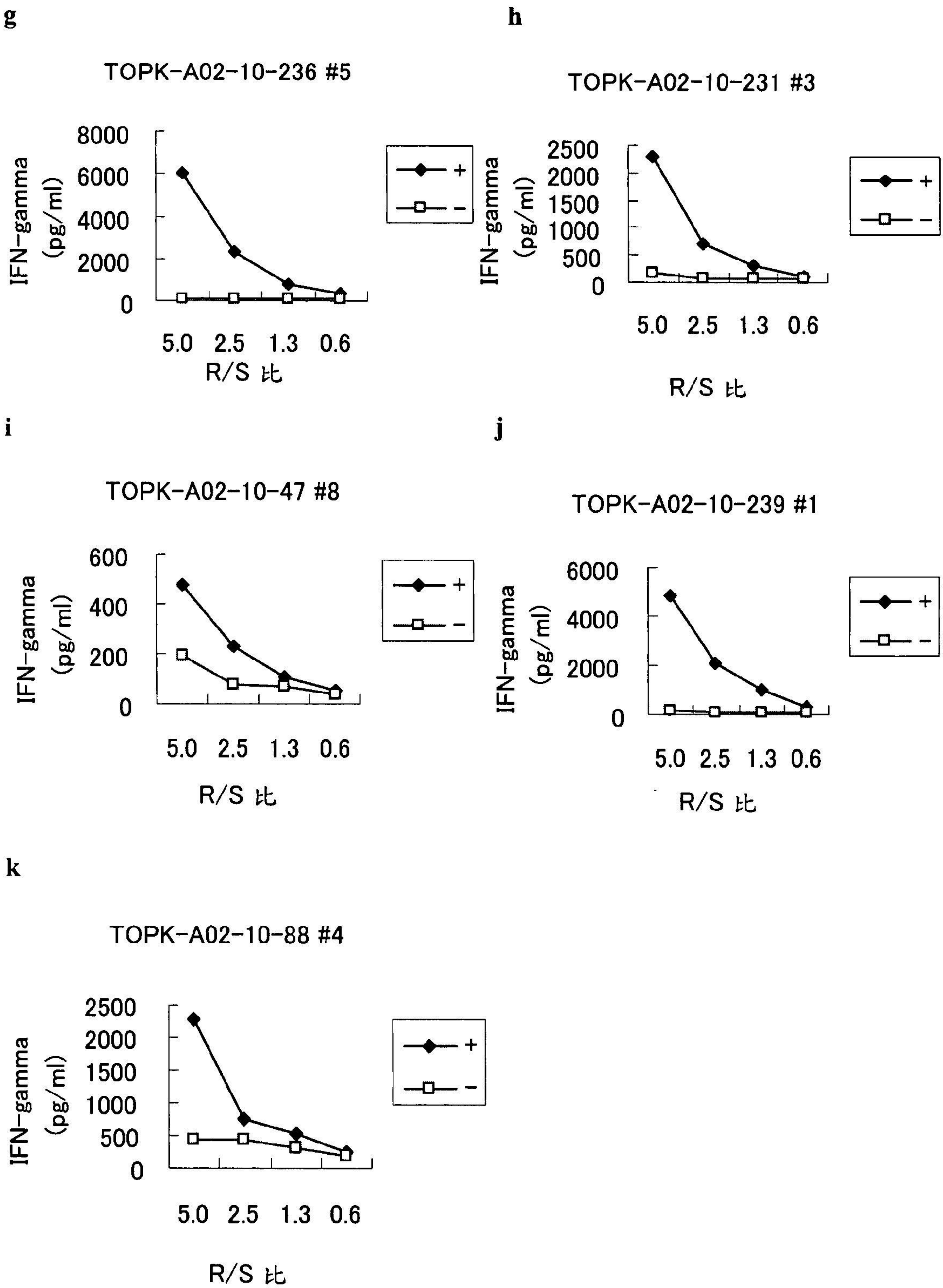
第3圖



第4圖

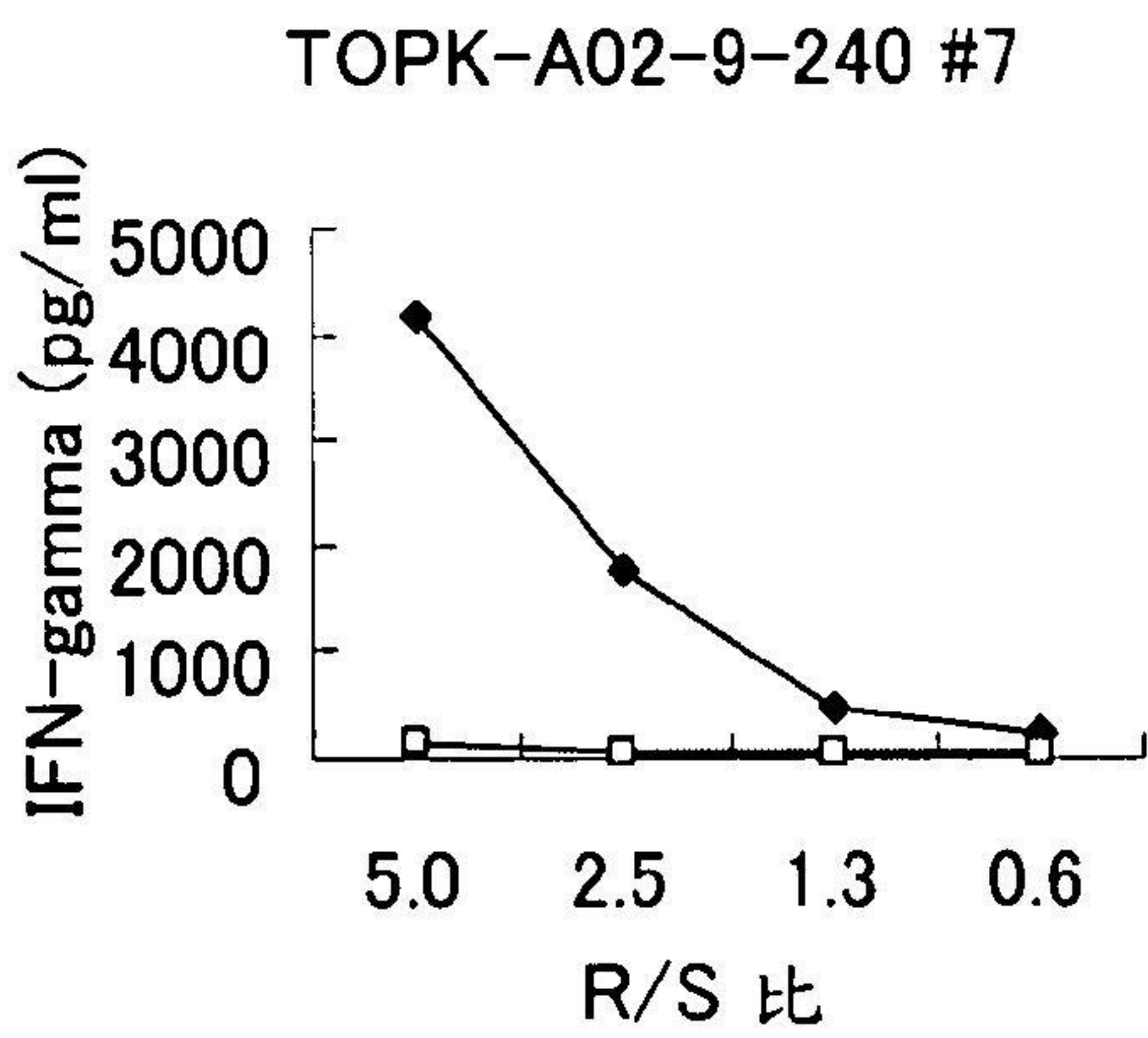


第5圖

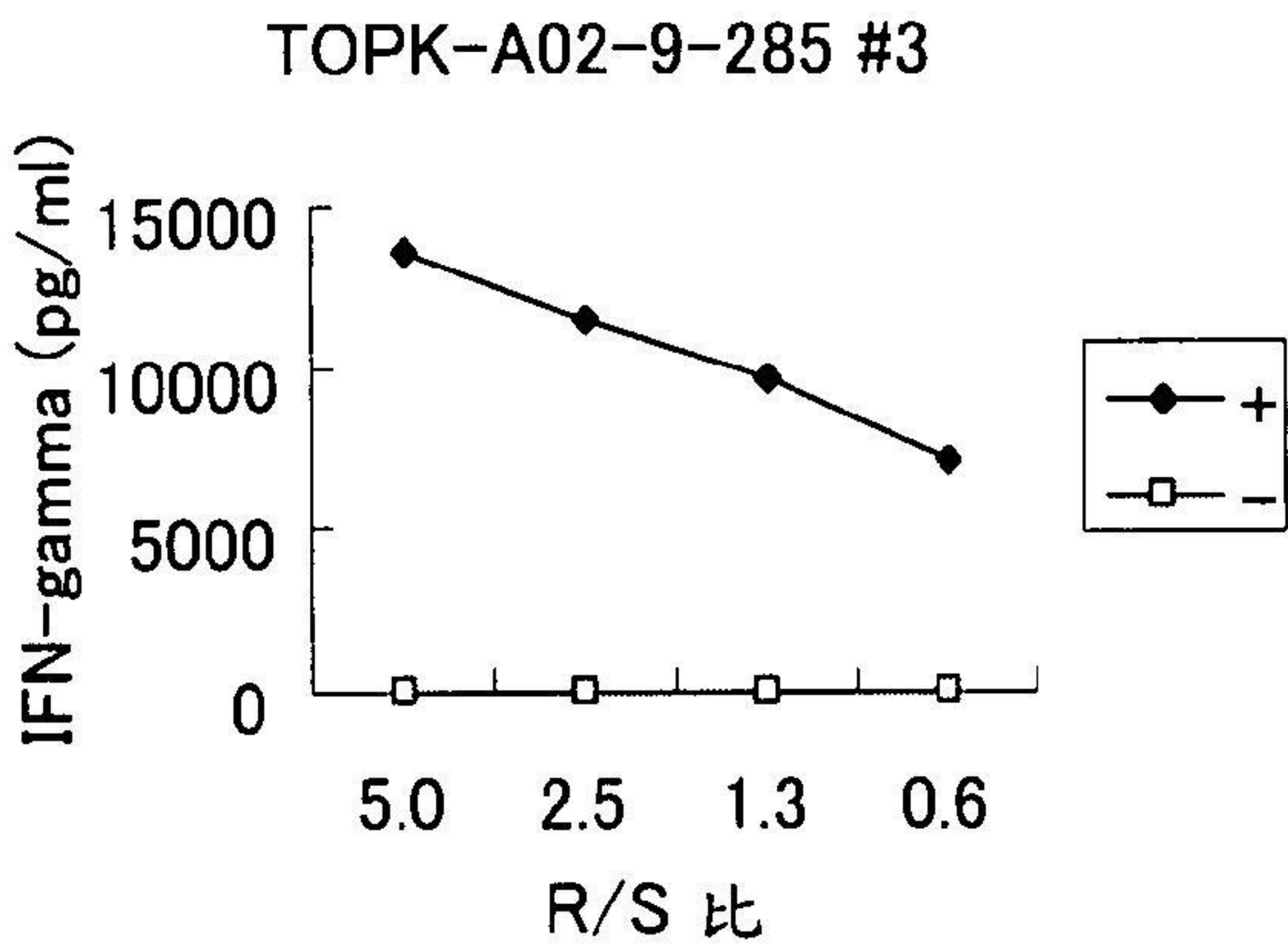


第5圖

a

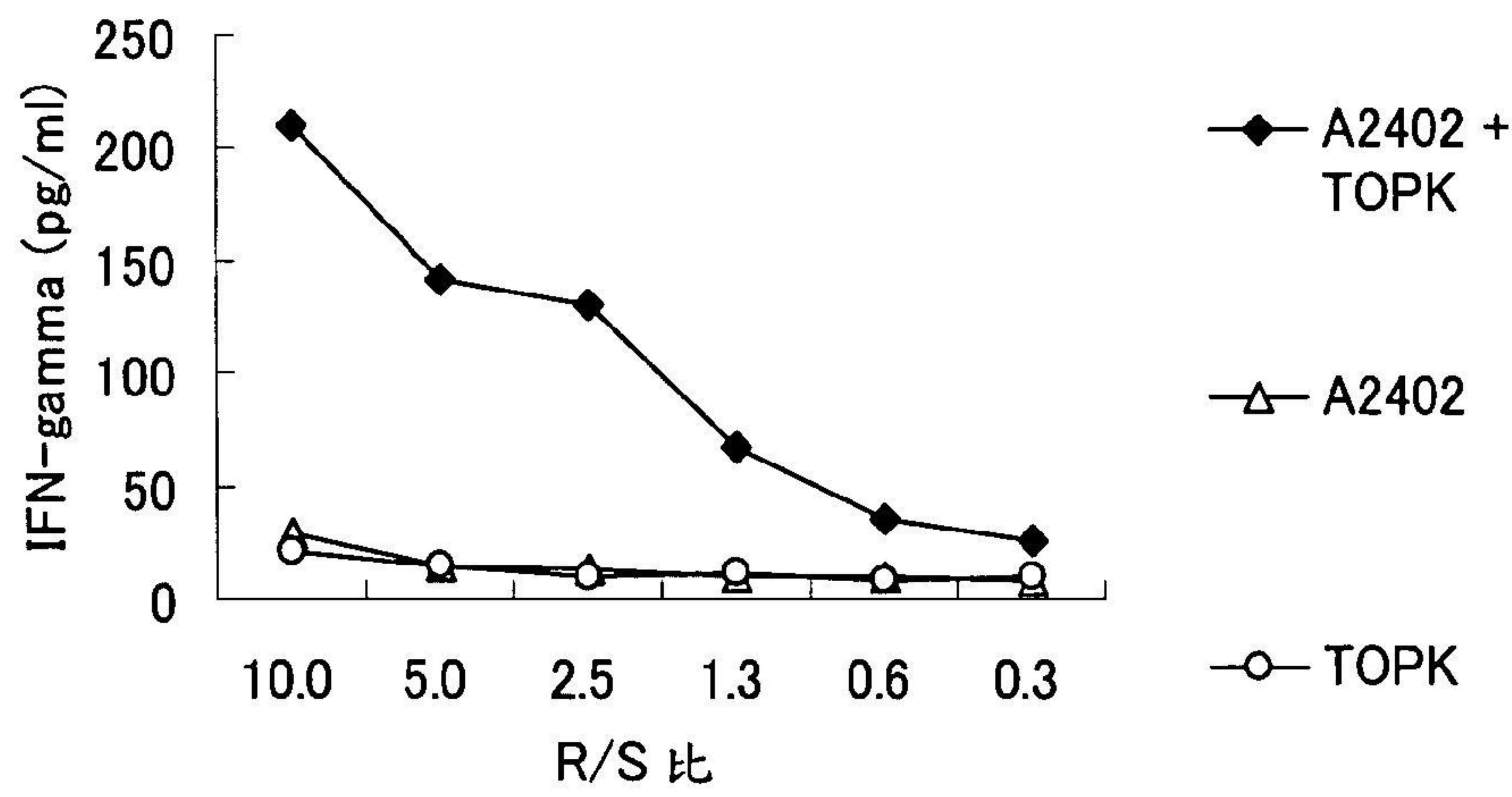


b

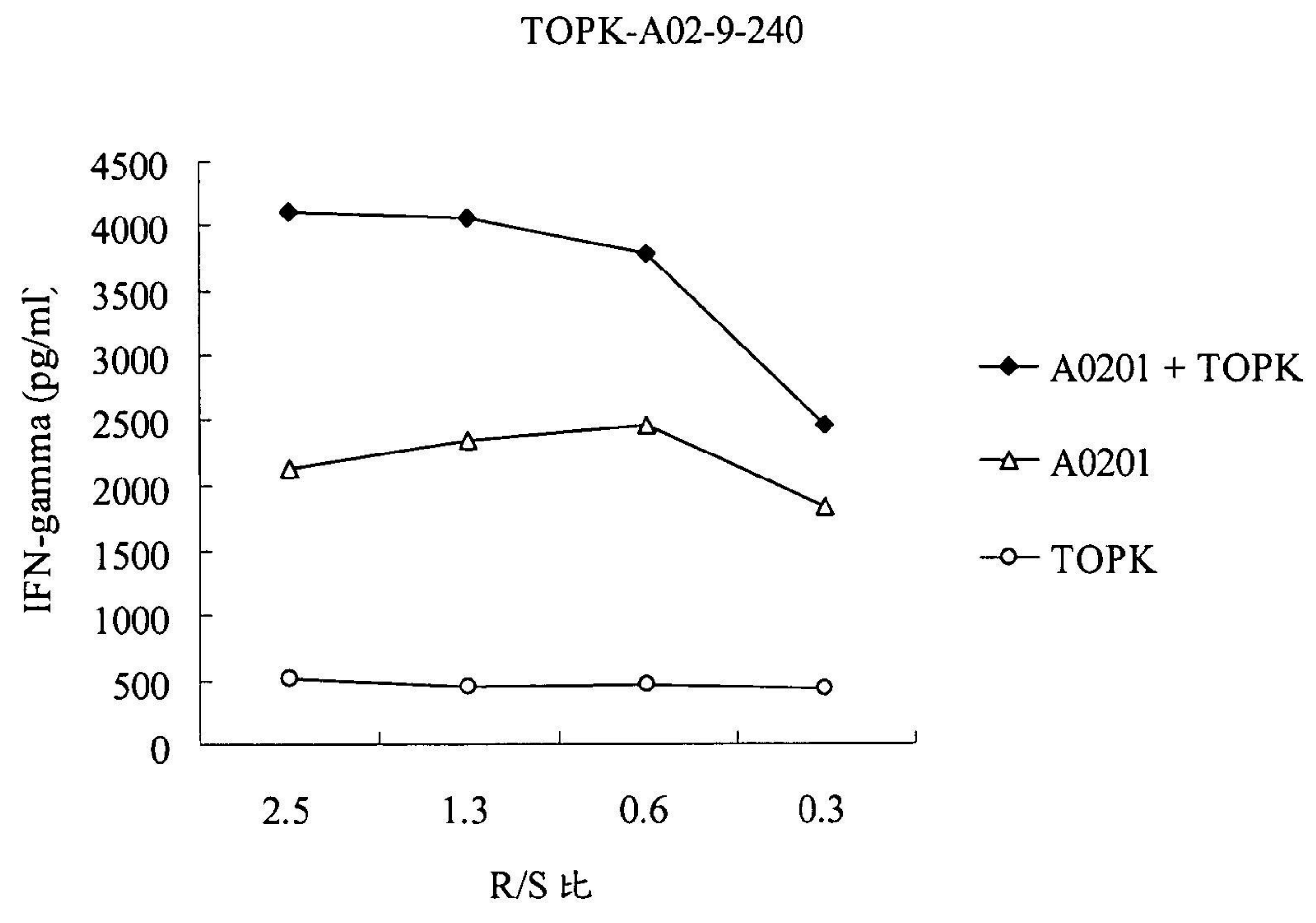


第6圖

TOPK-A24-10-289



第7圖



第8圖