

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96149888

※ 申請日期： 96.12.25

※IPC 分類：

A61k³⁹/395 (2006.01)C07k¹⁶/28 (2006.01)A61P³⁵/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

FOXP3 胜肽疫苗/FOXP3 PEPTIDE VACCINE

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)

腫瘤療法·科學股份有限公司/ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

代表人：(中文/英文)

富田憲介/TOMITA KENSUKE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國神奈川縣川崎市高津區坂戶 3 丁目 2 番 1 號

國籍：(中文/英文)

日本/JAPAN

三、發明人：(共2人)

姓名：(中文/英文)

1. 角田卓也/TSUNODA, TAKUYA

2. 大沢龍司/OSAWA, RYUJI

國籍：(中文/英文)

1.~2. 日本/JAPAN

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、2007/1/3、60/878,615

2. 美國、2007/3/22、60/896,472

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【相關申請案】

本申請案基於 2007 年 1 月 3 日所提申之美國臨時申請案號 60/878,615 及 2007 年 3 月 22 日所提申之美國臨時申請案號 60/896,472 主張優惠。此等申請案之完整教示納入於此作為參考。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於生物科學領域，且特別關於癌症治療之領域。尤其，本發明係關於 Foxp3 胜肽，其作為癌症疫苗極為有用，並關於用於治療及預防腫瘤之藥物。

【先前技術】

已有人證明 CD8⁺ 細胞毒性 T 淋巴球 (CTL) 認識呈現在第 I 類 MHC 分子上之衍生自腫瘤關連抗原 (TAA) 之抗原決定基胜肽，且接著殺死該腫瘤細胞。自從發現 MAGE 家族為第 1 例的 TAA，許多其他 TAA 也已使用免疫學方法被發現 (Boon T, Int J Cancer 54: 177-80, 1993; Boon T et al., J Exp Med 183: 725-9, 1996; van der Bruggen P et al., Science 254: 1643-7, 1991; Brichard V et al., J Exp Med 178: 489-95, 1993; Kawakami Y et al., J Exp Med 180: 347-52, 1994)，其中一些已進入臨床開發階段，作為免疫療法之標靶。

識別誘導有效力且專一性抗腫瘤免疫反應的新 TAA，成為進一步開發臨床胜肽接種策略應用在各種類型癌症之依據 (Harris CC, J Natl Cancer Inst 88: 1442-5, 1996;

Butterfield LH et al., *Cancer Res* 59: 3134-42, 1999; Vissers JLM et al., *Cancer Res* 59: 5554-9, 1999; Van der Burg SH et al., *J Immunol* 156: 3308-14, 1996; Tanaka F et al., *Cancer Res* 57: 4465-8, 1997; Fujie T et al., *Int J Cancer* 80: 169-72, 1999; Kikuchi M et al., *Int J Cancer* 81: 459-66, 1999; Oiso M et al., *Int J Cancer* 81: 387-94, 1999)。

已有人實施多種抗原專一性免疫療法，然而在明顯的腫瘤退化方面，至今僅得到低臨床效力 (Rosenberg SA et al., *Nat Med* 10:909-15, 2004)。其中之一重要原因為，對於罹患進展階段癌症之病患，腫瘤-透過淋巴球(TIL)及周邊血液淋巴球(PBL)之免疫反應不佳 (Miescher S et al., *J Immunol* 136: 1899-907, 1986)。腫瘤所誘導之此免疫抑制為對於腫瘤抗原反應不佳 (Young RC et al., *Am J Med* 52: 63-8, 1972)、T細胞增生不佳 (Alexander JP et al., *Cancer Res* 53: 1380-7, 1993)、喪失細胞激素生產 (Horiguchi S et al., *Cancer Res* 59: 2950-6, 1999)，及 T 細胞及天然殺手細胞之有缺陷的訊息傳遞 (Kono K et al., *Clin Cancer Res* 11: 1825-8, 1996, Kiessling R et al., *Cancer Immunol Immunother* 48: 353-62, 1999)之原因。

為了改良免疫療法之臨床效力，克服腫瘤所誘導之免疫抑制因子的作用是重要的。免疫耐受性 (immunological tolerance) 及保護免受自體免疫，係由中央及周邊機制來

賦予，該些機制包括將胸腺中自我反應性 T 細胞的無性繁殖系刪除，以及誘導在周邊遭遇到自體抗原時之不敏化。最近，已有人解明特性為共表現 CD4 及 CD25 標記之調節 T 細胞 (T-reg)，為 T 細胞之功能上獨特的族群，其功能為維持免疫恆定 (Sakaguchi S et al., J Immunol. 155: 1151-64, 1995, Dieckmann D et al., J Exp Med 193: 1303-10, 2001)。T-reg 細胞為主要抑制各種類型免疫反應之角色其中之一 (Miescher S et al., J Immunol 136: 1899-907, 1986; Young RC et al., Am J Med 52: 63-72, 1972; Alexander JP et al., Cancer Res 53: 1380-7, 1997; Horiguchi S et al., Cancer Res 59: 2950-6, 1999; Kono K et al., Clin Cancer Res 11: 1825-8, 1996; Kiessling R et al., Cancer Immunol Immunother 48: 353-62, 1999)。

雖然對於產生 T-reg 及其功能之關鍵分子間交互作用及訊息傳遞路徑尚未完全明瞭，T-reg 需要由 Foxp3 基因 (GenBank Accession No. NM_014009; SEQ ID NO 1) 所編碼之又頭 (forkhead) 轉錄因子 scurfin (Foxp3; SEQ ID NO 2)，該其轉錄因子 scurfin 控制該些的發展及調節性質 (Fontenot JD et al., Nat Immunol 4: 330-6, 2003, Hori S et al., Science 299: 1057-61, 2003, Khattri R et al., Nat Immunol 4: 304-6, 2003)。再者以經 Foxp3 mRNA 轉染之樹突細胞接種小鼠，引發一 Foxp3 專一性 CTL 反應 (Smita N et al., Cancer Res. Jan 1; 67(1):371-80,

2007)。

因此，Foxp3 作為癌症免疫療法之標靶，且進一步，Foxp3 所編碼之蛋白質之部分胜肽，可作為 CTL 認識之抗原。

【發明內容】

為了改良免疫療法之臨床效力，克服腫瘤所誘導之免疫抑制因子為重要的。已有人發現 T-reg 為抑制多種類型免疫反應之重要角色其中之一。因此，開發標靶於表現 Foxp3 之 T-reg 的疫苗以克服 T-reg-誘導之免疫抑制為重要的。

本發明依據鑑別來自於 Foxp3 之基因產物的抗原決定位胜肽而生，其會引發專一於 Foxp3 胜肽或抗原決定基的細胞毒性 T 淋巴球 (CTL)。將健康提供者之周邊血液單核細胞 (PBMC) 使用來自於 Foxp3 之 HLA-A*24 及 HLA-A*02 結合候選胜肽加以刺激。已證明此等胜肽為受 HLA-A24 或 HLA-A02 限制之抗原決定基胜肽，能對抗表現 Foxp3 之 T-reg 誘導有效力且專一性免疫反應。

綜言之，本發明提供一種用於調節免疫抑制之方法，該方法包含投予本發明之 Foxp3 多胜肽之步驟。例如細胞毒性 T 淋巴球之抗免疫抑制 (即反轉或抵銷免疫抑制)，藉由投予該 Foxp3 多胜肽而誘導。因此，本發明提供一種用於誘導抗免疫抑制之方法，包含投予該 Foxp3 多胜肽之步驟，及提供用於調節免疫抑制之醫藥製劑，該醫藥製劑包含該 Foxp3 多胜肽。

於本發明之一態樣中，本發明提供一種胜肽，該胜肽包含或由擇自於以下群組之胺基酸序列構成 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74。

於本發明另一態樣中，本發明提供一種胜肽，具細胞毒性 T 細胞誘導能力，其中該胜肽包含或由擇自於以下群組之胺基酸序列構成：

(a) SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、17、67 或 74；以及

(b) SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、17、67 或 74，其中一、二或數種胺基酸經取代或加成。

於另一態樣，本發明提供一種胜肽，具細胞毒性 T 細胞誘導能力，其中該胜肽包含擇自於以下所構成族群之胺基酸序列：

(a) SEQ ID NO: 15-19, 22, 24, 27-30 或 37，及

(b) SEQ ID NO: 15-19, 22, 24, 27-30 或 37，其中 1、2 或數種胺基酸經取代或加成。

關於該些實施樣態，於一些實施樣態，自 N-末端起該第 2 個胺基酸為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸。於一些實施形態，該 C-末端胺基酸為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸。於一些實施形態，從 N-末端起算之該第 2 個胺基酸為白胺酸或甲硫胺酸。於一些實施形態，該 C-末端胺基酸為纈胺酸或白胺酸。例如該經取代之胜肽包含 SEQ ID NO: 95、97 或 98 之胺基酸序列。

本發明尚提供組合物，包含本發明之 Foxp3 胜肽，或編碼為本發明 Foxp3 胜肽之多核苷酸，及一製藥上可接

受之擔體或賦形劑。於一些實施形態，該些組合物配方為以一疫苗形式投予。

該些組合物可包含本發明之 Foxp3 胜肽中 1 種或多數不同的胜肽。該些組合物用於抑制 T-reg 細胞為有用，例如抑制增生或壓抑 T-reg 細胞之功能。

於一些實施形態，該些組合物包含一個以上 Foxp3 胜肽，該一個以上 Foxp3 胜肽引發免疫反應，而抑制 HLA 抗原為 HLA-A24 之個體中之 T-reg 細胞。於一些實施形態，該些組合物包含一個以上 Foxp3 胜肽，該一個以上 Foxp3 胜肽引發一免疫反應，而抑制 HLA 抗原為 HLA-A02 之個體中之 T-reg 細胞。

於另一樣態，本發明提供一種組合物，包含編碼本發明 Foxp3 胜肽之一多核苷酸。於一些實施態，該些組合物包含編碼為多數本發明之 Foxp3 胜肽之多數（即 2 以上）多核苷酸。於一些實施形態，該些組合物包含一多核苷酸，該多核苷酸編碼為多數本發明之 Foxp3 胜肽。

於一些實施樣態中，該些組合物包含一其他胜肽，該其他胜肽具誘導對抗癌細胞之細胞毒性 T 細胞之能力，或包含編碼為其他胜肽之其他多核苷酸。

於另一態樣，本發明提供一種外吐小體(exosome)，其表面上呈現一複合體，該複合體包含一 HLA 抗原及本發明之 Foxp3 胜肽。於一些實施形態，該 HLA 抗原擇自於以下所構成之族群：HLA-A24、HLA-A2402、HLA-A02 及 HLA-A0201。

於一相關態樣，本發明提供一種用於治療癌症之方法（例如減少腫瘤細胞生長、促進腫瘤細胞死亡），係藉由對一個體投予一 Foxp3 胜肽或編碼為一 Foxp3 胜肽之多核苷酸。

於另一態樣，本發明提供一種誘導抗原呈現細胞之方法，該抗原呈現細胞具高細胞毒性 T 細胞誘導能力，係藉由投予一本發明之 Foxp3 胜肽或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸。

於另一樣態，本發明提供一種誘導細胞毒性 T 細胞之方法，係藉由投予一本發明之 Foxp3 胜肽或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸。

於一相關樣態，本發明提供一種經離析之細胞毒性 T 細胞，其係由本發明之 Foxp3 胜肽所誘導。

於另一樣態，本發明提供一種抗原呈現細胞，其包含一形成在一 HLA 抗原及一本發明之 Foxp3 胜肽間的複合體。於一些實施形態，該抗原呈現細胞被離析。

於另一樣態，本發明提供一種調節於一個體中之 T-reg 細胞之方法，包含對於該個體投予一疫苗，該疫苗包含本發明之 Foxp3 胜肽或一免疫學上有效之該胜肽片段，或編碼為該胜肽之一多核苷酸。

於實施本發明之治療方法時，該個體或病患可為人類。

應瞭解上述本發明內容及以下詳述之例示實施形態，均非限制本發明或本發明其他替代實施形態。

【實施方式】

I. 定義

在此使用之"一"及"該"除非另有特別指明，意指"至少一"。

用語"多胜肽"、"胜肽"及"蛋白質"在此互通使用，係指胺基酸殘基之聚合物。用語應用於胺基酸聚合物，其中1個以上胺基酸殘基為經修飾之殘基或非天然發生之殘基，例如對應於天然發生之胺基酸之人工化學擬似物，及天然發生之胺基酸聚合物。

在此使用之用語"胺基酸"，係指天然發生及合成胺基酸，及胺基酸類似物及胺基酸擬似物具與天然發生之胺基酸類似功能者。天然發生之胺基酸為遺傳密碼所編碼，並於細胞中轉譯後經修飾者(例如羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸，及O-磷酸絲胺酸)。詞組"胺基酸類似物"係指與天然發生之胺基酸具相同基本化學結構之化合物(鍵結於一氫、一羧基、一胺基及一R基團之 α 碳)，但具一經修飾的R基團或經修飾的骨架(例如高半胱胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砷、甲硫胺酸甲基卅鹽)。詞組"胺基酸擬似物"係指與一般胺基酸具不同結構但具類似功能之化學化合物。

胺基酸在此以其通用的三字母符號或由IUPAC-IUB生化命名委員會建議之一字母符號表示。

用語"基因"、"多核苷酸"、"核苷酸"及"核酸"除有特別指明外，在此係互通，並類似於胺基酸，係以其通常被

接受的單字母碼表示。

除非另外定義，所有在此使用之技術及科學用語，與本發明所屬技術領域中熟習技藝之人士所共通瞭解者具有相同意義。於有抵觸時，以本發明說明書，包括定義為準。

II. 胜肽

為了證明衍生自 Foxp3 之胜肽，作用為細胞毒性 T 細胞 (CTLs) 所認識之一抗原，於本發明中，分析胜肽 Foxp3 之次序列的胜肽以知是否其為由 HLA-A24 或 HLA-A02 所限制之抗原之抗原決定基，該些 HLA-A24 或 HLA-A02 為世界上共通的 HLA 對偶基因 (Date Y et al., Tissue antigen 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994)。為 Foxp3 次序列之 HLA-A24 及 HLA-A02 結合胜肽候選者，使用其對於 HLA-A24 及 HLA-A02 之結合親和性資訊來鑑別。於使用載有此等胜肽之樹突細胞 (DC) 體外刺激 T 細胞後，使用以下序列成功建立 CTL:

Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO 3)、

Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO 7)、

Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO 9)、

Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO 4)、

Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO 5)、

Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO 8)、

Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO 12)、

Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15) 、
Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO 16) 、
Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO 17) 、
Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO 22) 、
Foxp3-A2-10-263 (SEQ ID NO 24) 、
Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27) 、
Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO 28) 、
Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO 29) 、
Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO 30) 、
Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO 37) 、
Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO 18) 、
Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO 19) 、
Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO 67) , 以及
Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO 74) 。

此等建立之 CTL 顯示對抗經該胜肽脈衝 (pulsed) 之標靶細胞具有效能的專一性 CTL 活性。此等結果與 Foxp3 為 CTL 所認識之抗原的結論為一致，且

Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO 3) 、
Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO 7) 、
Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO 9) 、
Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO 4) 、
Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO 5) 、
Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO 8) 、
Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO 12) 、

Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15) 、
 Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO 16) 、
 Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO 17) 、
 Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO 22) 、
 Foxp3-A2-10-263 (SEQ ID NO 24) 、
 Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27) 、
 Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO 28) 、
 Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO 29) 、
 Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO 30) 、
 Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO 37) 、
 Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO 18) 、
 Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO 19) 、
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO 67) ， 以及

Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO 74) 為 HLA-A24 及 HLA-A2 所限制之抗原決定基胜肽。由於 Foxp3 於多數癌症病患中被表現，且與腫瘤所造成免疫抑制因子所誘導之免疫抑制有關連，Foxp3 為一良好之用於免疫療法的標靶，以促進對抗癌症之抗原專一性免疫療法之臨床效力。

因此，本發明提供九胜肽(由 9 個胺基酸殘基構成之胜肽)及十胜肽(由 10 個胺基酸殘基構成之胜肽)。本發明之 Foxp3 胜肽結合於一 HLA 分子並誘導於細胞毒性 T 淋巴球(CTL)之細胞毒性活性。更具體而言，本發明提供由擇自於以下胺基酸序列族群所構成之胜肽：SEQ ID NO：3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74。

一般而言，軟體程式已從網路上可得到，例如 Parker KC. et al, J Immunol. 1994 Jan 1;152(1):163-75 中所述者可用於以電腦試驗 (in silico) 計算在各種胜肽及 HLA 抗原之結合親和性。與 HLA 抗原之結合親和性可如前所述於體外測量，例如於 Parker KC. et al, J Immunol. 1994 Jan 1;152(1):163-75.; Nukaya I. et al, Int J Cancer. 1999 Jan 5;80(1):92-7.; Kuzushima K, et al. (2001) Blood.; 98(6):1872-81.; Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190.; Protein Science, 2000, 9: 1838-1846) 所述。

再者，本發明之 Foxp3 胜肽可與額外的胺基酸殘基相鄰，只要該 Foxp3 胜肽保留其 CTL 誘導能力即可。此種具 CTL 誘導能力之胜肽可少於約 40 個胺基酸，例如少於約 20 個胺基酸，例如少於約 15 個胺基酸。該毗鄰於以下胺基酸序列族群所構成之胜肽：SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74，之胺基酸序列不限定，且可由任意種胺基酸組成，只要其不抑制該胜肽之 CTL 誘導能力即可。因此，本發明尚提供具 CTL 誘導能力之胜肽，包含擇自於以下所構成族群之胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 及 74。

一般而言，已知在蛋白質中修飾 1 個以上胺基酸，有時不影響該蛋白質之功能而甚至增進了該原來的蛋白質的所望功能。事實上，經修飾的胜肽 (即經取代、加成 1、

2 或數個胺基酸殘基至原來的參考序列所修飾的胺基酸序列構成之胜肽) 已知保留該原來的胜肽之生物學活性 (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81: 5662-6, 1984; Zoller and Smith, Nucleic acid Res 10: 6487-500, 1982; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 79: 6409-13, 1982。因此，依照本發明之一實施形態，本發明之具 CTL 誘導能力之胜肽，可由包含 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胺基酸序列所構成，其中 1 個以上胺基酸經加成及 / 或經取代。

熟習此項技藝之人士將了解，改變單一胺基酸或小比例的胺基酸，對於一胺基酸序列進行個別的加成或取代，可能保守原來的胺基酸側鏈之性質；因此稱為 "保守性取代" 或 "保守性修飾"，其中，蛋白質之改變會得到具類似功能之蛋白質。提供功能上類似胺基酸之保守性取代表格為該技術領域中為人所周知的。胺基酸側鏈性質之例有：疏水性胺基酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性胺基酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)，及具以下官能基或共同特性之側鏈：一脂肪族側鏈 (G、A、V、L、I、P)；含羥基之側鏈 (S、T、Y)；含硫原子之側鏈 (C、M)；含羧酸及醯胺之側鏈 (D、N、E、Q)；含鹼之側鏈 (R、K、H)；及含芳香族之側鏈 (H、F、Y、W)。此外，以下 8 個群組包含彼此互為保守性取代之胺基酸：

1) 丙胺酸 (A) 、甘胺酸 (G)；

2) 天冬胺酸 (D) 、麩胺酸 (E)；

- 3) 天冬醯胺酸(N) 、 麩醯胺酸(Q);
- 4) 精胺酸(R) 、 離胺酸(K);
- 5) 異白胺酸(I) 、 白胺酸(L) 、 甲硫胺酸(M) 、 纈胺酸(V);
- 6) 苯丙胺酸(F) 、 酪胺酸(Y) 、 色胺酸(W);
- 7) 絲胺酸(S) 、 蘇胺酸(T) , 以及
- 8) 半胱胺酸(C) 、 甲硫胺酸(M) (見例如 Creighton, Proteins (1984))。

此種經保守性修飾的胜肽，可考量為本發明之胜肽。然而，本發明之胜肽不限於此等，且可包括非保守性修飾，只要該胜肽保留 CTL 誘導能力即可。再者，該經修飾的胜肽不排除可誘導 CTL 之多形變異體之胜肽、種間同源體，及 Foxp3 之對偶基因。

可僅修飾(加成或取代)小數目(例如 1、2 或數個)或小比例的胺基酸殘基，而同時仍維持所需的 CTL 誘導能力(即 CTL 活化)。在此，用語"數個"意指 5 以下或例如 3 以下。經修飾的胺基殘基可為完整胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 及 74 中的 20%以下，例如 15%或 10%以下，例如 1 至 5%。與所鑑別的全整序列具至少 95%、96%、97%、98%、99% 胺基酸序列同一性之 Foxp3 胜肽，為本發明考量的。序列同一性可使用該技術領域中已知的演算法測量，例如 BLAST，可從美國國家生物科技資訊中心(National Center for Biotechnology Information) 取得 (網 站

ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)。

對於目前胜肽之同源性(即序列同一性)分析，

Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO 3)、

Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO 7)、

Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO 9)、

Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO 4)、

Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO 5)、

Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO 8)、

Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO 12)、

Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15)、

Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO 16)、

Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO 17)、

Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO 22)、

Foxp3-A2-10-263 (SEQ ID NO 24)、

Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27)、

Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO 28)、

Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO 29)、

Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO 30)、

Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO 37)、

Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO 18)、

Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO 19)、

Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO 67)，以及

Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO 74)，顯示該些與衍生

自任何其他已知人類基因產物之胜肽不具顯著同源性。此

情形降低了當使用於免疫療法，發生未知或不欲免疫反應之可能性。

當使用於免疫療法，本發明之胜肽將與一 HLA 抗原以複合體形式呈現在細胞或外吐小體表面。因此，除了 CTL 誘導能力，胜肽係以對 HLA 抗原之高結合親和性來選擇。再者，該胜肽可經取代、加成等的胺基酸殘基修飾，以達成較高結合親和性。除了天然顯示的胜肽，由於結合於 HLA 抗原之胜肽序列的規則性(即一致性)已知(J Immunol 152: 3913, 1994; Immunogenetics 41: 178, 1995; J Immunol 155: 4307, 1994)，因此可依據此等規則性實施本發明免疫性胜肽之修飾。例如顯示高 HLA-A24 結合親和性之胜肽，將 N-末端起第 2 胺基酸取代為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸或色胺酸，且將胜肽之 C-末端胺基酸取代成苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸或甲硫胺酸，亦為有用。另一方面，N-末端起第 2 個胺基酸取代為白胺酸或甲硫胺酸，且其中 C-末端胺基酸取代為纈胺酸或白胺酸之胜肽，亦可用為具高 HLA-A02 結合親和性之胜肽。取代不僅實施在末端胺基酸，亦實施在胜肽中具潛力的 TCR 認識位置。Zaremba 等人證明 CAP1 胜肽中之胺基酸取代可等同或較原來者更佳(Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997)。例如該經取代之胜肽包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 95、97 或 98。再者，可將 1 或 2 個胺基酸加成於該胜肽之 N 及/或 C-末端。此種具高 HLA 抗原結合親和性之經修飾胜肽，亦可包括在本發明中。

然而，當該胜肽序列相同於內生性或外源性的具不同功能的蛋白質的一部分胺基酸序列，可能會誘發對抗特定物質之副作用，例如自體免疫疾病或過敏症狀。因此，可使用可取得的資料庫進行同源性研究，以避免或減少或極小化發生該胜肽序列配合於其他蛋白質之胺基酸序列的情形。當經過同源性研究已明瞭不存在與本目標胜肽具一或二胺基酸差異的其他胜肽，則能將本目標胜肽修飾以增加與 HLA 抗原之結合親和性，及/或增加 CTL 誘導能力，而不會有發生副作用的危險。

以上所述對於 HLA 抗原具高結合親和性之胜肽非常有效。該依照以存在高結合親和性作為指標而選的候選胜肽，可實際檢驗其是否存在 CTL 誘導能力。在此，詞組“CTL 誘導能力”代表該胜肽，當呈現在抗原呈現細胞上時，誘導 CTL 之能力。再者“CTL 誘導能力”包括該胜肽誘導 CTL 活化、CTL 增生及增加 IFN- γ 生產之能力。

CTL 誘導能力之確認，可藉由誘導帶有人類 MHC 抗原之抗原呈現細胞（例如 B-淋巴球、巨噬體，及樹突細胞）來實施，或更具體而言，衍生自人類周邊血液單核白血球之樹突細胞，於以該胜肽刺激後，與 CD8-陽性細胞混合，然後測量 CTL 對抗標靶細胞所產生並釋出的 IFN- γ 。至於反應系統，可使用已被生產以表現人類 HLA 抗原之基因轉殖動物（例如敘述於 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 61(8): 764-79, 2000 Aug, Related Articles,

Books, Linkout Induction of CTL reactoin by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) reaction)。例如，可將標靶細胞以 ^{51}Cr 等放射性標定，並從該標靶細胞釋出的放射性來計算細胞毒性活性。或者，可在存在帶有經固定化胜肽之抗原呈現細胞下，測量 CTL 產生及釋出的 $\text{IFN-}\gamma$ ，並使用抗 $\text{IFN-}\gamma$ 單株抗體使培養基上的抑制地帶可見化，以檢驗。

如上所述該胜肽之 CTL 誘導能力之檢驗之結果得到，對於一 HLA 抗原具高結合親和性者不一定具高誘導能力。再者，擇自於包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胜肽的九胜肽或十胜肽，顯示尤高 CTL 誘導能力及對於 HLA 抗原具高結合親和性。

除了上述本發明胜肽之修飾，本發明之胜肽更可連接於其他物質，只要該些保留 CTL 誘導能力即可。可使用之物質包括：胜肽、脂質、糖及糖鏈、乙醯基、天然合成聚合物等。該胜肽可包含之修飾例如糖基化、側鏈氧化或磷酸化；只要該些修飾不破壞此處所述該胜肽之生物學活性即可。此等修飾可實施以對於該多胜肽提供額外功能（例如標靶功能，及傳遞功能）或使安定化。

例如，為了增加一多胜肽之體內安定性，於該技術領域中已知可引入尤有用的各種 D-胺基酸、胺基酸擬似物或非天然胺基酸；此概念也可套用在本發明多胜肽。多胜肽

之安定性，可以用數種方式分析。例如，已使用胜肽酶及各種生物學培養基，例如人類血漿及血清，來測試安定性（見例如 Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 11: 291-302, 1986）。

III. 製備該胜肽

本發明之胜肽可使用習知的技術製備。例如該胜肽可利用重組 DNA 技術或化學合成來合成製備。本發明之胜肽也可個別合成，或合成為包含 2 個以上胜肽（例如 2 個以上 Foxp3 胜肽，或一 Foxp3 胜肽及一非 Foxp3 胜肽）之較長多胜肽。該胜肽可經離析，即純化為實質上不含其他天然發生之寄主細胞蛋白質及其片段，例如經至少約 70%、80% 或 90% 純化。

本發明之胜肽可依據所選擇的胺基酸序列，藉化學合成得到。例如可採用之合成的習知胜肽合成方法，包括：

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

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

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

(iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1985;

(v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (in Japanese), Vol. 14 (peptide synthesis),

Hirokawa, 1991;

(vi) W099/67288;及

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

或者，本發明之胜肽可採用任何用於生產胜肽之已知遺傳工程方法得到（例如 Morrison J. (1977) J. Bacteriology 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss (1983) Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 101: 347-62)。例如，首先，將載有編碼為目標胜肽之多核苷酸的適當載體製備為可表現形式（例如對應於啟動子序列之調節序列下游），並轉形到適當的寄主細胞中。然後培養該寄主細胞以生產該關注的胜肽。該胜肽也可以採用體外轉譯系統，在體外生產。

IV. 多核苷酸

本發明提供多核苷酸，其編碼為任何前述本發明之胜肽。此等包括衍生自天然發生之 Foxp3 基因的多核苷酸，及其經保守性修飾的核苷酸序列。在此，詞組“經保守性修飾的核苷酸序列”係指編碼為相同的或基本上相同的胺基酸序列之序列。因為遺傳密碼之退化性，有許多功能上相同的核酸編碼為任意一給定蛋白質。例如，密碼子 GCA、GCC、GCG 及 GCU 均編碼為胺基酸丙胺酸。因此，於密碼子指定丙胺酸之每一位置，該密碼子可改變為任意對應所述密碼子而不會改變所編碼的多胜肽。此種核酸變異

為“靜默變異”，為一種經保守性修飾的變異。在此編碼為一胜肽的每一核酸序列，亦敘述該核酸之各可能的靜默變異。熟習此項技藝之人士將瞭解核酸中的每一密碼子（除了 AUG，其通常為甲硫氨酸的唯一密碼子，TGG 通常為色氨酸之唯一密碼子），可經修飾以得到功能上相同的分子。總之，編碼為一胜肽之核酸的各靜默變異，在各揭示的序列中暗示敘述於各序列。

本發明之多核苷酸，可由 DNA、RNA 及其衍生物所構成。DNA 適當地由鹼，例如 A、T、C 及 G 所構成。於 RNA，T 取代為 U。

本發明之 Foxp3 多核苷酸，編碼為多種本發明之 Foxp3 胜肽，其間有或無介入 (intervening) 胺基酸序列。例如該介入胺基酸序列可提供該多核苷酸或經轉譯之胜肽一切開部位（例如酵素認識序列）。再者，該多核苷酸除了編碼為該本發明之胜肽之編碼序列外，可包括任何額外的序列。例如該多核苷酸可為重組多核苷酸，包括對於表現該多胜肽必要的調節序列。一般而言，此種重組多核苷酸可藉由以習知重組技術，使用例如聚合酶及核酸內切酶，來操作多核苷酸以製備。

重組及化學合成技術均可用於生產本發明之多核苷酸。例如該多核苷酸可藉由插入當轉染到一勝任細胞內可表現之一適當載體以生產。或者，該多核苷酸可使用 PCR 技術放大或表現於適當的寄主（見例如 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring

Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者，該多核苷酸可使用固相技術合成，如 Beaucage S.L. & Iyer R.P., *Tetrahedron* 48: 2223-311, 1992; Matthes et al., *EMBO J* 3: 801-5, 1984 所述。

V. 醫藥製劑

因為 Foxp3 已鑑別為調節 T(T-reg)細胞之分子，該細胞作用為維持免疫恆定，因此本發明 Foxp3 胜肽或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸，可用於調節 T-reg 細胞。因此，本發明提供一種用於調節 T-reg 細胞之醫藥製劑，包含 1 個以上本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸作為活性成分。

在此，“調節” T-reg 細胞代表修飾體內之 T-reg 細胞狀態，例如抑制 T-reg 細胞增生或壓抑其功能。T-reg 細胞被認為是抑制各種類型免疫反應的主要角色之一，且“壓抑 T-reg 細胞功能”在此意指降低 T-reg 細胞抑制免疫反應之能力。具體而言，T-reg 細胞在周邊作用稱為周邊容忍(peripheral tolerance) (Miescher S et al., *J Immunol* 136: 1899-907, 1986; Young RC et al., *Am J Med* 52: 63-72, 1972; Alexander JP et al., *Cancer Res* 53: 1380-7, 1997; Horiguchi S et al., *Cancer Res* 59: 2950-6, 1999; Kono K et al., *Clin Cancer Res* 11: 1825-8, 1996; Kiessling R et al., *Cancer Immunol Immunother* 48: 353-62, 1999; Fontenot JD et al., *Nat Immunol* 4: 330-6, 2003, Hori S et al., *Science* 299:

1057-61, 2003; Khattri R et al., Nat Immunol 4: 304-6, 2003)。T-reg 細胞例如於一癌症病患，提供免疫抑制效果。因此，過度表現於 T-reg 細胞之本發明 Foxp3 胜肽或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸，可用為治療癌症之醫藥製劑(例如疫苗)。

於本發明中，詞組“疫苗”(亦稱為免疫性組合物)係指一種物質，其作用為於接種到動物體內時，誘導抗腫瘤免疫性或調節 T-reg 之免疫性。

本發明之醫藥製劑可用於治療及/或預防於一個體，例如人類及其他哺乳動物中之癌症，該其他哺乳動物包括但不限於：小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、貓、狗、綿羊、山羊、豬、牛、馬、猴、狒狒及黑猩猩，尤其具經濟價值的動物或馴化動物。

依照本發明，包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之多胜肽，為 HLA-A24 或 HLA-A02 限制抗原決定基胜肽，能誘導對抗表現 Foxp3 之 T-reg 細胞之有效及專一性免疫反應。因此，本醫藥製劑意欲用於對於 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A02 其中之一之個體投予。

欲以本發明醫藥製劑治療之癌症不限，包括其中，Foxp3 表現於該個體之所有種類的癌症。例示之癌症，包括：乳癌、AML、膽囊癌、子宮頸癌、膽管細胞癌(cholangiocellular carcinoma)、CML、直腸結腸癌、子宮內膜異位(Endometriosis)、食道癌、胃癌、胃瀰漫型

癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、神經母細胞瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎臟癌、小細胞肺癌、軟組織腫瘤和睪丸腫瘤。

視需要，本發明之由 Foxp3 胜肽或編碼為一 Foxp3 胜肽之多核苷酸構成之醫藥製劑，可隨意地包括其他治療物質作為活性成分，只要該物質不抑制關注胜肽的 T-reg 細胞調節效果即可。例如，配方可包括抗發炎藥劑、止痛劑、化療藥劑等。除了在此藥劑中包括其他治療物質，本發明之醫藥製劑可與 1 個以上其他藥理藥劑依序或同時投予。藥劑及藥理藥劑之量，取決於例如使用的藥理藥劑類型、欲治療的疾病，及投予的時程及路徑。

應瞭解到除了此處特別提到的成分，本發明之醫藥製劑可包括其他於此配方類型相關的該技術領域中習知的藥劑。

於本發明之一實施形態，本醫藥製劑可包括於製造的物品及含有用於治療欲治療之疾病致病狀態，例如癌症的套組中。製造的物品可包括：一裝有本醫藥製劑並帶有標籤之容器。適當的容器包括瓶、小玻璃瓶，及試管。該容器可由許多材料形成，例如玻璃或塑膠。容器上的標籤應指示該藥劑係用於治療或預防該疾病的 1 個以上情形。該標籤亦可顯示投予說明等。

除了上述容器，包括本發明醫藥製劑之套組，可隨意地更包括一第二容器，裝有製藥上可接受的稀釋劑。可尚包括其他從商業或使用角度會需要的材料，包括其他緩

衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭、針筒及使用說明書。

該醫藥組合物，視需要可為包(pack)或分配裝置的形式，其包括 1 個以上包含該活性成分的單位劑型。該包可例如包括金屬或塑膠箔，例如泡罩。該包或分配裝置可附投予指示說明。

(1) 含該胜肽作為活性成分之醫藥製劑

本發明之胜肽可直接投予作為醫藥製劑，視需要，可以習知的配方方法配方。於此情形，除了本發明之胜肽，額外的擔體、賦形劑等通常用於藥物的物質可適當包括而無特別限制。此種擔體之例有：無菌水、生理鹽液、磷酸緩衝液、培養液等。再者，該醫藥製劑可視需要包括安定劑、懸浮液、保存劑、界面活性劑等。本發明之醫藥製劑，可用於治療及/或預防癌症，尤其調節 T-reg 細胞。

本發明之胜肽可組合成包含二種或以上之本發明 Foxp3 胜肽，以於體內誘導 CTL。該 Foxp3 胜肽可為混合或使用標準技術彼此結合。例如該 Foxp3 胜肽可表現為單一多胜肽序列。組合中的該胜肽，可為相同或不同。藉由投予本發明之 Foxp3 胜肽，該胜肽在抗原呈現細胞之 HLA 抗原上以高密度呈現，然後誘導專一性地對於形成在呈現的胜肽及 HLA 抗原反應間的複合體反應的 CTL。或者，在細胞表面上固定化有本發明之 Foxp3 胜肽的抗原呈現細胞，可藉由從經該本發明之胜肽刺激之個體中移除樹突細胞而達到，藉由再度投予該 Foxp3 胜肽-裝載的樹突細胞給該些個體會該些個體中誘導 CTL，並結果對於該標靶

細胞之侵犯性可增加。

包含本發明之 Foxp3 胜肽作為活性成分之用於調節 T-reg 細胞之醫藥製劑，隨意地可包含一佐劑，以便有效地建立細胞免疫，或該些可以與其他活性成分一起投予，且可配方成顆粒後投予。佐劑係指一種當與具免疫學活性之蛋白質一起(或依序)投予時，增進對抗該蛋白質免疫反應之化合物。可應用之佐劑包括敘述於文獻中者 (Clin Microbiol Rev 7: 277-89, 1994)。例示之佐劑包括但不限於：磷酸鋁、氫氧化鋁、明礬、霍亂毒素、沙門氏桿菌毒素等。

再者，可以方便地使用微脂體配方、該 Foxp3 胜肽結合於數 μm 直徑珠之顆粒配方，脂質結合於該胜肽之配方。

本發明醫藥製劑之一些實施形態，包含一成分，其使細胞毒性 T 淋巴球初始化(prime)。脂質已被鑑別為能在體內使 CTL 對抗病毒性抗原初始化的物質。例如棕櫚酸殘基可附著於離胺酸殘基之 ϵ -及 α -胺基，並連接於本發明之胜肽。接著該脂質化胜肽可直接投予到小粒或微粒，包入微脂體中或於佐劑中乳化。作為其他脂質初始化 CTL 反應，可使用 E. coli 脂蛋白，例如三棕櫚醯基-S-甘油半胱胺基絲胺酸-絲胺酸 (P3CSS) 共價鍵結於適當胜肽，來初始化 CTL (見例如 Deres et al., Nature 342: 561, 1989)。

投予方法可為口服、皮內、皮下、靜脈內注射等，且

全身性投予或局部投予至標靶部位鄰近處為有用的。投予可藉由單次投予或以多此追加投予實施。本發明胜肽之劑量可以依照所欲治療之疾病、病患年紀、體重、投予方法等適當調整，通常為 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，且可每數日至每數月投予一次。熟悉此技藝之人士可適當選擇適當的劑量。

(2) 包括多核苷酸作為活性成分之醫藥製劑

本發明之醫藥製劑，可包含以可表現形式編碼為此處揭示之 Foxp3 胜肽的核酸。在此，詞組“可表現形式”意指該多核苷酸引入於一細胞時，會在體內表現為多胜肽，而誘導抗腫瘤免疫性。於一實施形態，該關注多核苷酸之核酸序列，包括對於表現多核苷酸於標靶細胞為必要的調節元素。該多核苷酸可以安定地插入於標靶細胞之基因體（見例如 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 51: 503-12, 1987 for a description of homologous recombination cassette vectors）。見例如 Wolff et al., Science 247: 1465-8, 1990; U. S. Patent Nos. 5, 580, 859; 5, 589, 466; 5, 804, 566; 5, 739, 118; 5, 736, 524; 5, 679, 647; and WO 98/04720。DNA 類傳遞技術包括“裸露 DNA”、促進性 (bupivacaine、聚合物、胜肽媒介) 傳遞、陽離子性脂質複合體，及微粒媒介("基因槍")或壓力媒介的傳遞(見例如美國專利號碼 5, 922, 687)。

本發明之胜肽亦可由病毒或細菌性載體表現。表現載體之例，包括減毒的病毒寄主，例如牛痘或雞痘病毒。此

方法涉及使用牛痘病毒，例如作為一載體以表現編碼為該胜肽之核苷酸序列。於引入到寄主中時，該重組牛痘病毒表現該免疫性胜肽，並引發免疫反應。有用於免疫實驗步驟中的牛痘載體及方法，敘述於例如美國專利號碼 4,722,848。其他載體為 BCG(Bacille Calmette Guerin)。BCG 載體敘述於 Stover et al., Nature 351: 456-60, 1991。許多的其他載體對於治療性投予或免疫為有用，例如腺病毒及腺病毒相關病毒載體、反轉錄病毒載體、傷寒沙門氏菌載體、去毒炭疽毒素載體等，為顯明的。見例如 Shata et al., Mol Med Today 6: 66-71, 2000; Shedlock et al. J Leukoc Biol 68: 793-806, 2000; Hipp et al., In Vivo 14: 571-85, 2000。

將多核苷酸傳遞到病患體內可為直接的，於此情形將病患直接暴露於帶有多核苷酸之載體，或非直接地，於此情形先將細胞以關注多核苷酸於體外轉形，然後移殖到病患體內。此二種方法為已知，稱為體內或體外 (ex vivo) 基因療法。

關於基因治療方法之一般性評論，見 Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12: 488-505, 1993; Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95, 1991; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 33: 573-96, 1993; Mulligan, Science 260: 926-32, 1993; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 62: 191-217, 1993; Trends in Biotechnology 11(5): 155-215, 1993). Methods commonly known in the

art of recombinant DNA technology which can be used are described in eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; and Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990.

投予方法可為口服、皮內、皮下、靜脈內注射等，且全身性投予或局部投予至標靶部位鄰近處為有用的。投予可藉由單次投予或以多此追加投予實施。於適當擔體中之多核苷酸或經編碼為本發明之胜肽之多核苷酸轉形之細胞之劑量，可以依照所欲治療之疾病、病患年紀、體重、投予方法等適當調整，通常為 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.001 mg 至 1000 mg，例如 0.1 mg 至 10 mg，且可每數日至每數月投予一次。熟悉此技藝之人士可適當選擇適當的劑量。

(3) 外吐小體

或者，本發明提供稱為外吐小體之胞內小囊，其呈現由該本發明之胜肽及 HLA 抗原形成的複合體在表面上。外吐小體可例如藉由使用在國際公開平 11-510507 及 2000-512161 日文翻譯版所述方法製備，且可使用從作為治療及/或預防的標靶的個體得到的抗原呈現細胞製備。本發明之外吐小體可以作為疫苗接種，類似於本發明之胜肽。

使用之 HLA 抗原類型必需符合需要治療及/或預防之個體的 HLA 抗原類型。例如，對於日本人而言，HLA-A24，

尤其 HLA-A2402，時常是適當的。

關於 HLA 抗原，使用在日本人及白種人(Caucasian)高度表現的 A-24 或 A-02 類型，對於獲得有效結果是有利的，且使用包括 A-2402 及 A-0201 之次類型為有用。一般而言，臨床上會先檢查需要治療的病患的 HLA 抗原類型，以能適當選擇對此抗原具高水平結合親和性或具以抗原呈現誘導細胞毒性 T 細胞(CTL)能力之胜肽。再者，為獲得顯示高結合親和性及 CTL 誘導能力之胜肽，可依據該天然發生之 Foxp3 部分胜肽之胺基酸序列，取代或加成一、二或數個胺基酸。

(4) 抗原呈現細胞

本發明尚提供抗原呈現細胞(APC)，其呈現由 HLA 抗原及本發明之胜肽形成的複合體於表面上。藉由接觸本發明之胜肽或編碼為本發明之胜肽之核苷酸得到的該些 APC，可從為治療及/或預防之標靶的個體中製備，且可對該些個體投予，或與其他包含本發明之胜肽、外吐小體之藥物或細胞毒性 T 細胞組合投予作為疫苗。

該些 APC 不限於任何種類細胞，且包括樹突細胞(DC)、朗格(Langerhans)細胞、巨噬體、B 細胞及經活化的 T 細胞，均已知在其細胞表面上呈現蛋白質抗原，以使淋巴球認識。由於 DC 為一代表性的 APC，具有 APC 中最強的 CTL 誘導作用，DC 作為本發明之 APC 尤其有用。

例如 APC 可藉由從周邊血液單核球誘導樹突細胞，然

後使該些於體外、體內(ex vivo)或體內(in vivo)與本發明之胜肽接觸(刺激)得到。當本發明之胜肽對於該些個體投予時，固定化有本發明之胜肽之 APC，於該個體體內被誘導。“誘導 APC”包括使一細胞與該本發明之胜肽或編碼為該本發明胜肽之核苷酸接觸(刺激)，以呈現由 HLA 抗原及本發明之胜肽形成的複合體在細胞表面上。或者，於固定化本發明之胜肽到 APC 後，可將 APC 對於該個體投予作為一疫苗。例如體外(ex vivo)投予可包含以下步驟：

a: 從個體收集 APC，以及

b: 使步驟 a 之 APC 與該胜肽接觸。

由步驟 b 得到之 APC 可對於該個體投予以作為一疫苗。

依照本發明之一樣態，APC 具高水平的 CTL 誘導能力。此具高水平的細胞毒性 T 細胞誘導能力之 APC，可藉由包含以下步驟之方法製備：於體外將包含編碼為本發明之胜肽的多核苷酸的基因轉移到 APC。被引入的基因可為 DNA 或 RNA。引入的方法不特別限制，可使用此領域中習知實施的方法，例如：脂質轉染(lipofection)、電穿孔(electroporation)及磷酸鈣法。更具體而言，可依照以下所述方法實施 Cancer Res 56: 5672-7, 1996; J Immunol 161: 5607-13, 1998; J Exp Med 184: 465-72, 1996; 國際公開 2000-509281 號日文翻譯版。藉由將基因轉移到 APC 中，該基因於細胞中經歷轉錄、轉譯等，且然後得到的蛋白質經第 I 或 II 類 MHC 處理，並經由一呈現路徑來

呈現部分胜肽。

(5) 細胞毒性 T 細胞

被誘導之對抗任何本發明之 Foxp3 胜肽之細胞毒性 T 細胞，被認為可在體內強化免疫系統對於 T-reg 細胞之標靶性，因此可用於作為類似於該胜肽之疫苗。因此，本發明提供離析的細胞毒性 T 細胞，係經由任何本發明胜肽所誘導。

此種細胞毒性 T 細胞可藉由以下方法得到：(1) 對一個體投予本發明之胜肽，或 (2) 於體外使本發明之胜肽接觸 (刺激) 個體衍生之 APC 及 CD8-陽性細胞或周邊血液單核白血球。

該細胞毒性 T 細胞，係從呈現該本發明之胜肽之 APC 所刺激而誘導者，可以從為治療及 / 或預防標靶之個體衍生，且可將其本身投予，或為了與調節效果之目的，與其他藥物一起投予，該其他藥物包括該本發明之胜肽或外吐小體。所得到的細胞毒性 T 細胞專一性地對呈現本發明胜肽例如用於誘導的相同胜肽之標靶細胞作用。該標靶細胞可為內生性表現 Foxp3 之細胞，或經 Foxp3 基因轉染之細胞，及因為以此等胜肽刺激而呈現本發明之胜肽於細胞表面之細胞，也可成為攻擊的標靶。

(6) TCRs

本發明尚提供一種組合物，包含編碼為多胜肽之核酸，其能夠形成 T 細胞受體 (TCR) 之次單元，及使用該組合物之方法。該 TCR 次單元具有形成 TCR 之能力，該 TCR

具有針對呈現本發明胜肽之細胞，給予對 T 細胞之專一性。藉由使用該技術領域中已知的技術，可鑑別出以 1 個以上本發明胜肽所誘導之 CTL 的 TCR 次單元的 α -及 β -鏈核酸(WO2007/032255 及 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。衍生性 TCR 較佳為以高親和力結合於呈現該 Foxp3 胜肽之標靶細胞，且隨意地在體內及體外媒介有效殺死呈現該 Foxp3 胜肽之標靶細胞。

編碼為 TCR 次單元之核酸，可以引入適當的載體，例如反轉錄病毒載體。此等載體為該技術領域中為人周知的。該核酸或包含該核酸的有用載體，可轉移到 T 細胞內，該 T 細胞較佳為來自於一病患。有利地，本發明提供一現成(off-the-shelf)的組合物，容許快速修飾病患自己的 T 細胞(或其他哺乳動物自己的 T 細胞)，以快速且輕易地產生經修飾的 T 細胞，該經修飾的 T 細胞具優越的 T-reg 細胞殺死性質。

並且，本發明提供 CTL，其係藉由將編碼為與本發明 Foxp3 胜肽結合之 TCR 次單元多胜肽的核酸進行轉導(transduction)而製備。該經轉導的 CTL 能於體內形成 T-reg 細胞，並以周知的培養方法於體外培養(例如 Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。本發明之 T 細胞可用於形成免疫性組合物，有用於治療或預防需要治療或保護之病患中的癌症(WO2006/031221)。

VI. 使用 Foxp3 胜肽之方法

本發明之 Foxp3 胜肽及編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷

酸，可用於誘導 APC 及 CTL。該 Foxp3 胜肽及多核苷酸可與其他化合物組合使用，只要該些化合物不抑制其 CTL 誘導能力即可。因此，任何上述本發明醫藥製劑，可用於下述方法。

(1) 誘導抗原呈現細胞 (APCs) 之方法

因此，本發明提供使用本發明之胜肽或編碼為該胜肽之多核苷酸以誘導 APC 之方法。誘導 APC 可依項目 “V-(4) 抗原呈現細胞” 所述實施。本發明尚提供一種誘導 APC 之方法，該 APC 具高水平的細胞毒性 T 細胞誘導能力，其誘導敘述於前揭 “V-(4) 抗原呈現細胞”。或者，依照本發明，提供使用擇自於包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胜肽中的 Foxp3 胜肽，或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸來製造包括抗原呈現細胞之一醫藥組合物。再者，本發明尚提供擇自於胺基酸序列 of SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胜肽的 Foxp3 胜肽，或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸，以供誘導抗原呈現細胞。

(2) 誘導細胞毒性 T 細胞之方法

再者，本發明提供誘導 CTL 之方法，係使用本發明之 Foxp3 胜肽或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸。當將本發明之 Foxp3 胜肽對一個體投予時，在該個體體內會誘導 CTL，且增進標靶於 T-reg 細胞之免疫系統強度。或者，該些可用於體外 (ex vivo) 治療方法，其中，個體衍生的 APC 及 CD8-陽性細胞或周邊血液單核白血球與該本發明之

胜肽於體外接觸(刺激)，於誘導 CTL 後，使細胞回到該個體中。例如該方法可包含以下步驟：

- a: 從個體收集 APC，
- b: 使步驟 a 之 APC 與該胜肽接觸，
- c: 使步驟 b 之 APC 與 $CD8^+$ T 細胞混合，並共同培養以供誘導細胞毒性 T 細胞，以及
- d: 由步驟 c 之共同培養物收集 $CD8^+$ T 細胞。

由步驟 d 得到之具細胞毒性活性之 $CD8^+$ T 細胞，可對於該個體投予作為疫苗。在上述步驟 c 中欲與 $CD8^+$ T 細胞混合之 APC，亦可藉由編碼為本發明胜肽之基因轉移到 APC 中以製備，細節詳述於“V-(4)抗原呈現細胞”；但不限於此，任何對於 T 細胞有效呈現本發明胜肽之 APC 或外吐小體，可用於本方法。或者，依照本發明。提供使用擇自於包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胜肽的 Foxp3 胜肽，或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸，以製造包括 CTL 之醫藥組合物。再者。本發明尚提供擇自於包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胜肽的該 Foxp3 胜肽，或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸，以供誘導 CTL。

(3)調節免疫抑制

如上所述，本發明之胜肽、多核苷酸、外吐小體、APC 及 CTL，可作為疫苗以調節(即抑制)T-reg 細胞。由於 T-reg 被認為是抑制多種類型免疫反應尤其 CTL 細胞毒

性活性之主要角色之一，本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體、APC 及 CTL 之能力，代表該些也可用於抵銷免疫抑制，尤其 CTL 細胞毒性活性。總之，本發明提供一種調節 T-reg 細胞之方法及一種調節(即抵銷)免疫抑制之方法，該些方法包含對於需要的個體投予本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體、APC 或 CTL 之步驟。再者，本發明尚提供使用擇自於包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胜肽的 Foxp3 胜肽，或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸，以製造用於調節免疫抑制之免疫性組合物。或者，本發明尚關於擇自於包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胜肽的 Foxp3 胜肽，或編碼為該 Foxp3 胜肽之多核苷酸，用於調節免疫抑制。

在此，調節免疫抑制代表投予本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體、APC 或 CTL，造成體內的任何種類的變化。於一些實施形態，由本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體、APC 及 CTL 造成之改變，為降低免疫壓抑狀態之水平(抑制或抵銷免疫抑制)，即，誘發抗免疫抑制。因此，本發明更提供一種誘導抗免疫抑制之方法，該方法包含對於一需要的個體投予本發明胜肽、多核苷酸、外吐小體、APC 或 CTL 之步驟。

一般而言，抗免疫抑制包括如下列的免疫反應：

- 誘導對抗表現 Foxp3 之 T-reg 的細胞毒性淋巴球，
- 誘導認識表現 Foxp3 之 T-reg 的抗體，以及

- 誘導抗 Treg 細胞激素生產。

因此，當某一蛋白質接種到一動物中時，誘發任一免疫反應，該蛋白質被判定為具抗免疫抑制誘導作用。由一蛋白質誘導之抗免疫抑制，可藉由觀察寄主免疫系統對抗蛋白質之體內或體外反應而偵測。

例如用於偵測誘導(即，活化)細胞毒性 T 淋巴球之方法為人所周知的。尤其，已知進入活體的外來物質藉由抗原呈現細胞(APC)之作用，而呈現給 T 細胞及 B 細胞。回應於 APC 所呈現的抗原的 T 細胞，由於該抗原的刺激，以抗原專一性方式分化為細胞毒性 T 細胞(或細胞毒性 T 淋巴球;CTL)，然後增生(此稱為活化 T 細胞)。因此，由某一胜肽誘導之 CTL，可藉由以 APC 將該胜肽呈現給 T 細胞，並偵測誘導(即增生、IFN- γ 生產及細胞毒性活性)CTL 來評估。再者，APC 具活化 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、巨噬體、嗜酸性白血球及 NK 細胞之作用。因為 CD4+ T 細胞在抗腫瘤免疫性亦為重要，因此，該胜肽之抗腫瘤免疫性誘導作用，可使用評估此等細胞之活化效果作為指標。

使用樹突細胞(DC)作為 APC 以評估誘導 CTL 作用之方法，為該技術領域中為人所周知的。依照此方法，首先將一測試胜肽與 DC 接觸，然後將此 DC 與 T 細胞接觸。於接觸 DC 後，偵測具對抗表現該關注胜肽之細胞(即呈現在 HLA 分子上)的細胞毒性作用的 T 細胞，顯示該測試胜肽具有誘導細胞毒性 T 細胞之活性。CTL 對抗 T-reg 之活性，

可使用例如 ^{51}Cr -標定的腫瘤細胞之溶解作為指標偵測。或者，使用 ^3H -胸腺嘧啶攝入活性或 LDH (乳糖去氫酶)-釋放作為指標來評估 T-reg 受損的方法，亦為周知且可用於本發明。

DC 以外，周邊血液單核細胞 (PBMCs) 也可用作為 APC。CTL 之誘導據報告在存在 GM-CSF and IL-4 下培養 PBMC 會受到促進。同樣地，CTL 已顯示在存在血蘭蛋白 (keyhole limpet hemocyanin) (KLH) 及 IL-7 下培養 PBMC，會被誘導。

以此等方法已確認具 CTL 誘導活性之測試胜肽，為具 DC 活化作用之胜肽，且隨之具 CTL 誘導活性。因此，誘導對抗腫瘤細胞之 CTL 的 Foxp3 胜肽，作為對抗 T-reg 之疫苗為有用的。再者，藉由與該 Foxp3 胜肽接觸而得到誘導 CTL 抗 T-reg 能力的 APC，作為對抗 T-reg 之疫苗亦為有用的。再者，藉由以 APC 呈現該胜肽抗原而得到細胞毒性之 CTL，亦可作為對抗 T-reg 之疫苗。此種使用 APC 及 CTL 針對 T-reg 之免疫性的調節方法，稱為細胞免疫療法，且包含於本發明。

一般而言，當使用多胜肽於細胞免疫療法，CTL 誘導之效率已知會由於組合具不同結構的多數胜肽並使該些與 DC 接觸而增加。因此，當以蛋白質片段刺激 DC，使用多種類型片段的混合物為有利的。

或者，由一胜肽誘導抗免疫抑制，可藉由觀察誘導抗 T-reg 之抗體生產而確認。例如當以經該胜肽免疫之一個體，例如一人類病患、一實驗室動物，誘導對抗一胜肽的

抗體，且當 T-reg 細胞被此等抗體所抑制，該胜肽被判定為具誘導抗免疫抑制之能力。

抗免疫抑制藉由投予本發明疫苗而誘導，且此誘導能瓦解免疫抑制。此種效果在統計學上可為顯著的。例如於觀察值，顯著水準 5% 以下，其中疫苗對抗 T-reg 之調節作用，係與未投予疫苗之對照組比較。例如可使用 Student's t-test、Mann-Whitney U-test 或 ANOVA 於統計分析。

當使用 APC 或 CTL 作為本發明之疫苗，T-reg 可藉由例如體外 (ex vivo) 方法調節 (即抑制)。更具體而言，收集接受治療或預防之個體的 PBMC，將細胞與該多胜肽在體外 (ex vivo) 接觸，並於誘導 APC 或 CTL 後，可將該細胞對於該個體投予。APC 可藉由將編碼為多胜肽之載體以體外 (ex vivo) 導入於 PBMC。在體外誘導之 APC 或 CTL 可在投予前於體外選殖。藉由選殖及培養具損害標靶細胞高活性之細胞，可以更有效率地實施細胞免疫療法。再者，以此方式離析之 APC 及 CTL，可用於細胞免疫療法，不僅是用在衍生該細胞之個體，也可用於其他個體中的類似疾病類型。

除非另外定義，此處使用之所有技術及科學用語，與本發明所屬技術領域中具通常知識之人士通常瞭解的意義相同發明。雖然可使用類似或等同於此處所述方法及材料實施或測試本發明，但以下將敘述適當的方法及材料。在此引用到的所有出版物、專利申請案及其他參考文獻完整納入作為參考，當發生牴觸，以本發明說明書，包括定

義在內，以本發明說明書為準。此外，該些材料、方法及實施例僅係用於理解，並非意欲限制。

以下呈現實施例來說明本發明，並協助該技術領域中具通常知識者製作並使用。該些實施例絕非意欲限制本發明範圍。

實施例

材料及方法

細胞株

A24LCL 細胞 (HLA-A24/24)、T2 細胞 (HLA-A02/02)、人類 B-淋巴母細胞、293T 及 COS7，購買自 ATCC。

衍生自 Foxp3 之胜肽候選者選擇

以 結 合 預 測 軟 體 “ BIMAS ”
(http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)，預測會與 HLA-A*2402 及 HLA-A*0201 分子結合之衍生自 Foxp3 的 9-mer 及 10-mer 胜肽，演算法依照 Parker KC, et al. ((1994) J Immunol.; 152(1):163-75.) 及 Kuzushima K, et al. ((2001) Blood.; 98(6):1872-81.) 所述。此等胜肽係由 Sigma (Sapporo, Japan) 依照標準固相合成法合成，並經反相 HPLC 純化。純度 (>90%) 及該胜肽同一性，以分析性 HPLC 及質譜分析決定。胜肽溶解於二甲基亞砜 (DMSO)，濃度 20 mg/ml，並保存於 -80°C。

體外 CTL 誘導

使用單核球衍生之樹突細胞(DCs)作為抗原呈現細胞(APCs)，以誘導對抗呈現在HLA上的肽的CTL反應。DCs以另敘方式於體外產生(Horiguchi S. et al. Cancer Res. 59:2950-6)。具體而言，將以Ficoll-Plaque (Pharmacia)溶液從正常自願者(HLA-A*2402 及/或 HLA-A*0201)離析之周邊血液單核細胞(PBMC)，藉由附著於塑膠培養皿(Becton Dickinson)分離，以便使得到單核球部分。將單核球富化於1000 U/ml GM-CSF (R&D System)及1000 U/ml IL-4 (R&D系統)，培養於含2% 經熱失活的從自身取得的血清(AS)的AIM-V培養基(Invitrogen)。培養7日後，將細胞激素-產生之DC，於存在 β 2-微球蛋白3 mcg/ml，在AIM-V培養基中，於攝氏20度加以合成肽20 mcg/ml脈衝4小時。此等經肽脈衝之DC接著以絲裂黴素C(MMC)(30mcg/ml, 30分鐘)失活，並與自身取得之CD8⁺T細胞以1:20比例混合，該CD8⁺T細胞係使用CD8陽性離析套組(Dynal)以陽性選擇得到。此等培養物被放於48-井盤(Corning)；各井於AIM-V/2% AS 0.5 ml中包含 1.5×10^4 經肽脈衝的DC、 3×10^5 CD8⁺T細胞及10 ng/ml的IL-7 (R&D System)。3日後，將此等培養物補充IL-2 (CHIRON)至最終濃度20 IU/ml。於第7及14天，將細胞再以該經肽脈衝的自身取得的DC刺激。DC各次以與上述相同的程序製備。於第21天第3回合的肽刺激後，測試對抗經肽脈衝之A24LCL細胞或T2細胞之CTL活性。

擴大 CTL 之程序

使 CTL 於培養物中使用類似於 Riddell, et al. (Walter et al., N Engl J Med 333(16): 1038-44, 1995; Riddell et al., Nat Med 2(2): 216-23, 1996 Feb) 所述方法擴大族群。將總共 5×10^4 CTL 及 2 種人類 B-淋巴母細胞株再懸浮於 AIM-V/5% AS25 ml, 於含 40 ng/ml 抗 CD3 之單株抗體 (Pharminogen), 以 MMC 失活。於培養 1 天後, 添加 120 IU/ml 的 IL-2 至培養物中。在第 5、8 及 11 天, 於培養物中加入含 30 IU/ml IL-2 的新鮮的 AIM-V/5% AS。

CTL 專一性活性

為了檢測 CTL 之專一性, 使用 IFN- γ ELISPOT 試驗及 IFN- γ ELISA。簡言之, 製備經胜肽脈衝的 A24-LCL、T2 細胞 (1×10^4 /井) 或內生性表現 Foxp3 及 HLA 分子之細胞, 作為刺激子細胞。使用培養在 48 井的 CTL 細胞株, 作為回應子細胞。IFN- γ ELISPOT 試驗及 IFN- γ ELISA, 依照製造程序實施。

BALB/c 小鼠中, 抗原決定位胜肽之免疫原性

為了初始化 (priming) 該胜肽專一性 CTL, 每隻小鼠使用 100 μ l 疫苗混合物進行免疫, 其中含 50 μ l HLA-A24 限制胜肽及 50 μ l IFA。將疫苗於第 0 天, 以皮下注射到小鼠右脅腹作為第 1 次免疫, 於第 7 天注射到左脅腹作為

第 2 次免疫。於第 14 天，使用來自於經注射疫苗之小鼠的脾細胞作為回應子細胞，並使用經或不經胜肽脈衝的 RLmale1 細胞作為刺激子細胞，以供 IFN- γ ELISPOT 試驗。

體內抗腫瘤效果

將 4T1 細胞 (1×10^5 每隻小鼠)，於第 0 天以皮下注射到 BALB/c 小鼠之右脅腹。在第 3 及 10 天，使用 hFoxp3-252 (KLSAMQAHL: SEQ ID NO: 17) 或 mFoxp3-252 (KLGAMQAHL: SEQ ID NO: 88) IFA-接合胜肽接種。

分析 Foxp3-9-252 取代物對於 HLA 分子之親和性

實施 IFN- γ ELISA 試驗以檢驗經取代胜肽對於 HLA-A2 分子之親和性。使用經 Foxp3-9-252-WT (KLSAMQAHL: SEQ ID NO: 17) 胜肽誘導之 CTL 作為回應子細胞，並藉由與 Foxp3-9-252-WT、Foxp3-9-252-9V (KLSAMQAHV: SEQ ID NO: 95) 及 HIV-A02 (SLYNTYATL) 胜肽於攝氏 37 度一起溫育 2 小時製備 T2 細胞作為刺激子細胞。以廣範圍濃度 (10^{-10} 至 10^{-4} mcg/ml) 的各胜肽對於 T2 細胞實施胜肽脈衝。

結果

預測衍生自 Foxp3 之 HLA-A24 及 HLA-A2 結合胜肽

表 1、2 及 3 顯示 Foxp3 蛋白質之 HLA-A*2402 結合

胜肽或 HLA-A*0201 結合胜肽，順序為高結合親和性預測分數。總計選出 60 個胜肽具 HLA-A24 結合活性可能性，26 個胜肽具 HLA-A2 結合活性可能性。

表一、衍生自 Foxp3 之 HLA-A2402 結合 9mer 胜肽

	起始位置	序列	分數	SEQ ID NO
Foxp3-A24-9mer	363	IYHWFTRMF	100	3
	207	VFEEPEDFL	36	4
	332	KFHNMRPPF	20	5
	323	EFLHNMDYF	15	6
	366	WFTRMFAFF	12	7
	337	RPPFTYATL	12	8
	190	SYPLLANGV	10.8	9
	27	RAAPKASDL	9.6	39
	238	MVQSLEQQL	8.64	40
	87	GPLPHLQAL	8.64	41
	252	KLSAMQ AHL	8	17
	8	KPSAPSLAL	8	42
	352	EAPEKQRTL	7.2	43
	240	QSLEQQLVL	7.2	44
	245	QLVLEKEKL	6.6	45
	403	GAVWTVDEL	6.6	46
	185	AVPQSSYPL	6	47
	28	AAPKASDLL	6	48
	141	FSLKARPGL	6	49
	383	NAIRHNLSL	6	50
	186	VPQSSYPLL	6	51
	343	ATLIRWAIL	6	52
	200	KWPGCEKVF	6	53
	68	QLQLPTLPL	6	54
	341	TYATLIRWA	6	55
	115	TPVLQVHPL	6	56
	61	LNPMPPSQL	6	57
	159	EWVSREPAL	6	58

	175	SAPRKDSTL	6	59
	234	LQREMQSL	5.76	60
	304	SLFAVRRHL	5.6	61
	359	TLNEIYHWF	5.04	62

起始位置代表 Foxp3 之 N-末端起算的胺基酸號碼。結合分數來自於“BIMAS”中材料及方法部分所述者。

表二、衍生自 Foxp3 之 HLA-A2402 結合 10mer 胜肽

	起始位置	序列	分數	SEQ ID NO
Foxp3-A24-10mer	341	TYATLIRWAI	70	10
	140	VFSLKARPGL	20	11
	114	RTPVLQVHPL	12	12
	27	RAAPkASDLL	9.6	63
	206	KVFEePEDFL	9.6	64
	402	KGAVwTVDEL	8.8	65
	237	EMVQsLEQQ	8.64	66
	87	GPLPhLQALL	8.64	67
	303	DSLFAVRRHL	8.4	68
	358	RTLNeIYHWF	8.4	69
	5	RPGKpSAPSL	8	70
	382	KNAIrHNLSL	8	71
	190	SYPL1ANGVC	7.5	72
	86	LGPLpHLQAL	7.2	73
	60	SLNPmPPSQL	7.2	74
	184	SAVPqSSYPL	7.2	75
	62	NPMPpSQLQL	7.2	76
	233	LLQReMQSL	7.2	77
	244	QLLVIEKEKL	6.6	78
	185	AVPQsSYPLL	6	79
	149	LPPGiNVASL	6	80
	296	SGPReAPDSL	6	81
	77	VMVApSGARL	6	82
	159	EWVsrEPALL	6	83
	67	SQLQ1PTLPL	6	84

	316	HGNStFPEFL	6	85
	380	TWKNaIRHNL	5.6	86
	363	IYHWfTRMFA	5	87

起始位置代表 Foxp3 之 N-末端起算的胺基酸號碼。結合分數來自於“BIMAS”中材料及方法部分所述者。

表三、衍生自 Foxp3 之 HLA-A0201 結合胜肽

	起始位置	序列	分數	SEQ ID NO
Foxp3-A2-9mer	388	NLSLHKCFV	382.536	13
	95	LLQDRPHFM	190.448	14
	390	SLHKCFVRV	132.149	15
	69	LQLPTLPLV	102.018	16
	252	KLSAMQ AHL	74.768	17
	68	QLQLPTLPL	21.362	18
	304	SLFAVRRHL	15.808	19
	239	VQSLEQQLV	11.988	20
	245	QLVLEKEKL	10.468	21
Foxp3-A2-10mer	359	TLNEIYHWFT	1260.32	22
	206	KVFEEDFL	267.467	23
	263	KMALKASSV	175.812	24
	70	QLPTLPLVMV	159.97	25
	68	QLQLPTLPLV	159.97	26
	94	ALLQDRPHFM	101.099	27
	233	LLQREMVQSL	83.527	28
	152	GINVASLEWV	59.279	29
	77	VMVAPSGARL	26.228	30
	60	SLNPMPPSQL	21.362	31
	299	REAPDSLFAV	18.041	32
	252	KLSAMQ AHLA	17.388	33
	102	FMHQLSTVDA	16.505	34
	223	LLDEKGRAQC	13.851	35
	344	TLIRWAILEA	11.426	36
	246	LVLEKEKLSA	11.21	37
	238	MVQSLEQQLV	10.346	38

起始位置代表 Foxp3 之 N-末端起算的胺基酸號碼。結合分數來自於“BIMAS”中材料及方法部分所述者。

使用經 HLA-A2402 限制之經預測的胜肽刺激 T 細胞

針對衍生自 Foxp3 蛋白質之胜肽的 CTL，依照前揭“材料及方法”的方法產生。得到之 CTL，以 IFN- γ ELISPOT 試驗所顯示可偵測的專一性 CTL 活性如第 1A 及圖 1B 所示。於第 1A 圖，於井編號 #2 及 7 經 Foxp3-A24-9-363 刺激之細胞、#1 及 #6 經 Foxp3-A24-9-366 刺激之細胞、#5 經 Foxp3-A24-9-190 刺激之細胞、#7 經 Foxp3-A24-10-87 及 Foxp3-A24-10-60 刺激之細胞，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於圖 1B，於井編號 #4 經 Foxp3-A24-9-207 刺激之細胞、於 #6 經 Foxp3-A24-9-332 刺激之細胞、於 #6 經 Foxp3-A24-9-337 刺激之細胞，及於 #1 經 Foxp3-A24-10-114 刺激之細胞，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。

使用經 HLA-A0201 限制之經預測胜肽刺激 T 細胞

於第 2A、2B 及 2C 圖顯示 IFN- γ ELISPOT 試驗中，顯示可偵測之專一性 CTL 活性的 CTL。於第 2A 圖，於井編號 #2 經 Foxp3-A2-9-390 刺激之細胞、#2 經 Foxp3-A2-9-69 刺激之細胞、#6 經 Foxp3-A2-9-252 刺激之細胞、#4 經 Foxp3-A2-10-359 刺激之細胞、#7 經 Foxp3-A2-263 刺激之細胞，及 #2 與 #5 經 Foxp3-A2-10-94

刺激之細胞，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 2B 圖，所有井的細胞經 Foxp3-A2-10-233 刺激，井編號 #6 及 #7 經 Foxp3-A2-10-152 刺激之細胞，#5 經 Foxp3-A2-10-77 刺激之細胞，#1 經 Foxp3-A2-10-246 及 Foxp3-A2-10-94 刺激之細胞，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 2C 圖，於井編號 #1、2、4、5、7、9、11 及 12 經 Foxp3-A2-9-390 刺激之細胞，於井編號 #5 及 #11 經 Foxp3-A2-9-304 刺激之細胞，於井編號 #7 經 Foxp3-A2-9-68 刺激之細胞，及於井編號 #12 經 Foxp3-A2-9-252 刺激之細胞，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。

從 Foxp3 專一性胜肽建立 CTL 細胞株

將於陽性井中的細胞擴大族群並實施 IFN- γ ELISA。於第 3A、B、C 圖，經 Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO: 15) 刺激之 CTL 細胞株相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 3D 圖，經 Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) 刺激之 CTL 細胞株，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 3E 圖，經 Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO: 75) 刺激之 CTL 細胞株，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 3F 圖，經 Foxp3-A02-10-94 (SEQ ID NO: 27) 刺激之 CTL 細胞株，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 3G 圖，經 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 68) 刺激之 CTL 細胞株，相較於對照組，顯示有效能

的 IFN- γ 生產。

對抗內生性表現 Foxp3 及 HLA-A*2402 或 HLA-A*0201 之標靶細胞的專一性 CTL 活性

對於所建立的對抗此等胜肽之 CTL 選殖體，檢查其認識內生性表現 Foxp3 及 HLA-A*24 或 02 之標靶細胞的能力。對於 293T 之專一性 CTL 活性被測試，該 293T 經 Foxp3 基因及 HLA-A*24 或 02 分子全長兩者轉染，為內生性表現 Foxp3 及 HLA-A*24 或 02 之標靶細胞的專一性模型，對於 293T 之專一性 CTL 活性係使用由 Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO: 15) 及 Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) 產生的 CTL 細胞株作為效應子細胞測試。於第 4A 及 4B 圖，由 Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO: 15) and Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) 產生的 CTL 細胞株，對於經 Foxp3 及 HLA-A02 兩者轉染的 293T 顯示高專一性 CTL 活性。於第 4C 圖，由 Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) 產生的 CTL 細胞株，對於經 Foxp3 及 HLA-A24 兩者轉染的 293T 顯示高專一性 CTL 活性。另一方面，其對於對照組未顯示顯著的專一性 CTL 活性。清楚顯示 Foxp3-A02-9-390 及 Foxp3-A02-9-252 天然表現於帶有 HLA-A02 及 / 或 24 分子之標靶細胞表面且認識 CTL。再者，此等胜肽為抗原決定基胜肽，可利用於標靶於表現 Foxp3 之 T-reg 的疫苗。

BALB/c 小鼠中，Foxp3-A24-9-252 胜肽之免疫原性

Foxp3-252_m 胜肽疫苗之 BALB/c 小鼠，相較於作為對照組之小鼠，明顯降低(第 6 圖)。考慮統計分析，使用 Foxp3 抗原決定基胜肽進行疫苗接種的小鼠中的腫瘤生長抑制，顯示具顯著差異。

Foxp3 抗原決定基胜肽之胺基酸取代

於前述結果，Foxp3-9-252 胜肽(SEQ ID NO 17)被鑑別為經 HLA-A*2402 及 HLA-A*0201 兩者限制的抗原決定基胜肽。為了增進 Foxp3-9-252 胜肽之免疫原性，選擇單一或一組胺基酸取代以達成相較於天然 Foxp3-9-252 胜肽，對於 HLA-A*2402 或 HLA-A*0201 分子之較高結合親和性；Foxp3-9-252-WT(KLSAMQAHL)(SEQ ID NO 17)。Foxp3-9-252(SEQ ID NO 17)中之胺基酸取代結合分數，從 BIMAS 軟體而來。表四顯示胺基酸序列及來自 Foxp3-9-252 之經取代胜肽對於 HLA-A*2402 及 0201 分子之結合分數。胜肽結合分數來自 BIMAS 軟體。6 或 9 種取代，總共 15 個胜肽，相較於野生型被預測為對於 HLA-A24 或 HLA-A2 分子具較高結合親和性，合成此等胜肽(表四)。

表四、Foxp3-9-252(SEQ ID NO 17)中之胺基酸取代對於 HLA-A*2402 或 0201 分子之結合分數

	胜肽名稱	序列	結合分數	SEQ ID NO
A2402	Foxp3-9-252	KLSAMQAHL	8.0	17
	2Y	KYSAMQAHL	400.0	89
	2F	KFSAMQAHL	40.0	90
	2Y9I	KYSAMQAHI	100.0	91
	2Y9F	KYSAMQAHF	200.0	92

	2F9I	KFSAMQAHI	10.0	93
	2F9F	KFSAMQAHF	20.0	94
A0201	WT	KLSAMQAHL	74.8	17
	9V	KLSAMQAHV	243.4	95
	3Y	KLYAMQAHL	239.3	96
	3M	KLMAMQAHL	276.6	97
	3L	KLLAMQAHL	276.6	98
	3F	KLFAMQAHL	276.6	99
	3Y9V	KLYAMQAHV	779.0	100
	3M9V	KLMAMQAHV	900.7	101
	3L9V	KLLAMQAHV	900.7	102
	3F9V	KLFAMQAHV	900.7	103

接著本案發明人等檢查是否使用此等取代之經胜肽脈衝的刺激子細胞，能為以 Foxp3-9-252-WT 胜肽誘導之 CTL 認識。結果，由 Foxp3-9-252-WT 胜肽誘導的 CTL，產生對抗經 Foxp3-9-252-9V (KLSAMQAHV)(SEQ ID NO 95) 脈衝之 T2 細胞的 IFN- γ ，同樣地，產生對抗經 Foxp3-9-252-WT 胜肽脈衝之 T2 細胞的 IFN- γ (第 7A 圖)。因為從對抗未經任何胜肽脈衝的刺激子細胞的 CTL，未偵測到 IFN- γ 生產，顯示以 Foxp3-9-252-WT 胜肽誘導的 CTL，能認識呈現在 HLA-A2 分子上之 Foxp3-9-252-9V 胜肽及 Foxp3-9-252-WT。

再者，為了評量是否 Foxp3-9-252-9V 胜肽相較於 Foxp3-9-252-WT 胜肽，對於 HLA-A2 分子具較高親和性，使用於廣範圍濃度 (10^{-10} mcg/ml) 經此等胜肽脈衝之刺激子細胞，檢查 CTL 活性。結果，與各經 Foxp3-9-252-WT 或 Foxp3-9-252-9V 胜肽脈衝的刺激子細胞共同培養的

CTL，產生的 IFN- γ 類似(第 7B 圖)。從此等資料顯示呈現 Foxp3-9-252-9V 胜肽於 HLA-A*0201 分子上，可能由以 Foxp3-9-252-WT 胜肽建立的 CTL 所認識。

另一方面，本案發明人等企圖使用 HLA-A*0201 限制之所有取代物，包括 Foxp3-9-252-9V 胜肽，來誘導 CTL。結果，CTL 藉由以 Foxp3-9-252-3M (KLMAMQAHL)(SEQ ID NO 97)、Foxp3-9-252-3L (KLLAMQAHL)(SEQ ID NO 98) 或 Foxp3-9-252-9V 胜肽刺激而誘導(第 7C 圖)。於井編號 3 及 7 經 Foxp3-A02-9-252-3M 刺激之細胞、井編號 7 中經 Foxp3-A02-9-252-3L 刺激之細胞，及井編號 8 中經 Foxp3-A02-9-252-9V 刺激之細胞，相較於對照組，顯示胜肽依存性 IFN- γ 生產。於以 Foxp3-9-252-9V 刺激而誘導之 CTL 細胞株藉由體外擴大族群而建立後，使用經 Foxp3-9-252-WT 或 Foxp3-9-252-9V 胜肽脈衝之刺激子細胞決定 CTL 活性。結果，經 Foxp3-9-252-9V 刺激而誘導之 CTL，認識經 Foxp3-9-252-WT 胜肽脈衝之刺激子細胞，也同等地認識經 Foxp3-9-252-9V 胜肽脈衝之刺激子細胞(第 7D 圖)。此等結果強烈顯示 Foxp3-9-252-9V 胜肽可誘導 Foxp3 專一性 CTL，Foxp3-9-252-WT 胜肽亦如此。

抗原胜肽之同源性分析

經下列胜肽刺激之 CTL 顯示顯著及專一性 CTL 活性：

FOXp3-A24-9-363 (SEQ ID NO 3)、

FOXp3-A24-9-366 (SEQ ID NO 7) 、
 FOXp3-A24-9-190 (SEQ ID NO 9) 、
 FOXp3-A24-9-207 (SEQ ID NO 4) 、
 FOXp3-A24-9-332 (SEQ ID NO 5) 、
 FOXp3-A24-9-337 (SEQ ID NO 8) 、
 FOXp3-A24-10-114 (SEQ ID NO 12) 、
 FOXp3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15) 、
 FOXp3-A2-9-69 (SEQ ID NO 16) 、
 FOXp3-A2-9-252 (SEQ ID NO 17) 、
 FOXp3-A2-10-359 (SEQ ID NO 22) 、
 FOXp3-A2-10-263 (SEQ ID NO 24) 、
 FOXp3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27) 、
 FOXp3-A2-10-233 (SEQ ID NO 28) 、
 FOXp3-A2-10-152 (SEQ ID NO 29) 、
 FOXp3-A2-10-77 (SEQ ID NO 30) 、
 FOXp3-A2-10-246 (SEQ ID NO 37) 、
 FOXp3-A2-9-68 (SEQ ID NO 18) 、
 FOXp3-A2-9-304 (SEQ ID NO 19) 、
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO 67) ， 以及
 Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO 74) 。

此可能意指以下序列

FOXp3-A24-9-363 (SEQ ID NO 3) 、
 FOXp3-A24-9-366 (SEQ ID NO 7) 、
 FOXp3-A24-9-190 (SEQ ID NO 9) 、

FOXP3-A24-9-207 (SEQ ID NO 4)、
FOXP3-A24-9-332 (SEQ ID NO 5)、
FOXP3-A24-9-337 (SEQ ID NO 8)、
FOXP3-A24-10-114 (SEQ ID NO 12)、
FOXP3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15)、
FOXP3-A2-9-69 (SEQ ID NO 16)、
FOXP3-A2-9-252 (SEQ ID NO 17)、
FOXP3-A2-10-359 (SEQ ID NO 22)、
FOXP3-A2-10-263 (SEQ ID NO 24)、
FOXP3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27)、
FOXP3-A2-10-233 (SEQ ID NO 28)、
FOXP3-A2-10-152 (SEQ ID NO 29)、
FOXP3-A2-10-77 (SEQ ID NO 30)、
FOXP3-A2-10-246 (SEQ ID NO 37)、
FOXP3-A2-9-68 (SEQ ID NO 18)、
FOXP3-A2-9-304 (SEQ ID NO 19)、
Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO 67), 以及

Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO 74), 與衍生自其他已知會敏感化人類免疫系統之分子的胜肽為同源。為排除此可能性, 對於該胜肽序列列表, 使用 BLAST 演算法 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) 實施同源性分析, 顯示沒有序列有顯著同源性。

此等結果顯示以下序列

FOXP3-A24-9-363 (SEQ ID NO 3)、

FOXP3-A24-9-366 (SEQ ID NO 7)、
FOXP3-A24-9-190 (SEQ ID NO 9)、
FOXP3-A24-9-207 (SEQ ID NO 4)、
FOXP3-A24-9-332 (SEQ ID NO 5)、
FOXP3-A24-9-337 (SEQ ID NO 8)、
FOXP3-A24-10-114 (SEQ ID NO 12)、
FOXP3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15)、
FOXP3-A2-9-69 (SEQ ID NO 16)、
FOXP3-A2-9-252 (SEQ ID NO 17)、
FOXP3-A2-10-359 (SEQ ID NO 22)、
FOXP3-A2-10-263 (SEQ ID NO 24)、
FOXP3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27)、
FOXP3-A2-10-233 (SEQ ID NO 28)、
FOXP3-A2-10-152 (SEQ ID NO 29)、
FOXP3-A2-10-77 (SEQ ID NO 30)、
FOXP3-A2-10-246 (SEQ ID NO 37)、
FOXP3-A2-9-68 (SEQ ID NO 18)、
FOXP3-A2-9-304 (SEQ ID NO 19)、
FOXP3-A24-10-87 (SEQ ID NO 67)，以及
FOXP3-A24-10-60 (SEQ ID NO 74)為獨特的，且以吾
人的知識範圍內，對於任意無關的分子引發不欲免疫反應
之可能性很小。

結論為，FOXP3 為一種有用於標靶 T-reg 細胞之抗
原，且使用此等抗原決定基胜肽之疫苗對於免疫療法可能

有用。

討論

從第 6 圖之資料，注射各 hFoxp3-252 及 mFoxp3-252 胜肽疫苗，可於體內誘導抗原決定基專一性 CTL。代表兩者 Foxp3 抗原決定基胜肽可誘導對抗表現 Foxp3 及對應之主要組織相容性複合體 (histocompatibility complex) 分子之標靶細胞的 CTL。換言之，暗示此等 CTL 可能認識並調節 T 淋巴球 (T-reg)。為了評量此假設，使用 BALB/c 小鼠檢查經此等 Foxp3 抗原決定基胜肽接種之體內抗腫瘤效果。明顯顯示在各經 hFoxp3-252 及 mFoxp3-252 胜肽接種的小鼠中，具抗腫瘤效果。此等結果強烈顯示腫瘤生長可能藉由抑制 T-reg 於局部腫瘤微環境而抑制，而甚至不用使用 TAA 抗原決定基胜肽接種。本案發明人等認為對抗腫瘤細胞之 CTL，係於腫瘤存在於體內時所誘導，然而，T-reg 也會由一些來自於腫瘤細胞之免疫抑制因子誘導並且抑制抗腫瘤效應子細胞功能。因為使用 Foxp3 抗原決定基胜肽接種能夠藉由殺死或抑制 T-reg 而解除免疫抑制情形，所以能在不接種 TAA 抗原決定基胜肽或使用強佐劑刺激全體免疫系統而顯示抗腫瘤效果。

以此方式，接種 hFoxp3-252 胜肽 (KLSAMQAHL) (SEQ ID NO 17) 能誘導 CTL 及優於 mFoxp3-252 胜肽 (KLGAMQAHL) (SEQ ID NO 88) 之抗腫瘤效果 (於第 5 及 6 圖)。從此等結果，吾人認為接種 hFoxp3-252 胜肽能相

較於接種 mFoxp3-252 胜肽，更有效率地避免免疫學容忍。換言之，由於 hFoxp3-252 之胺基酸序列在第 3 位置不同於 mFoxp3-252，吾人認為 hFoxp3-252 胜肽為體內“非自體抗原”，且可有效地誘導對抗 T-reg 之 CTL。

結論顯示 Foxp3 可作為癌症免疫療法之新穎標靶。再者，此等結果強烈支持以 Foxp3 抗原決定基胜肽接種，能抑制 T-reg 之功能，且應可供許多類型的癌細胞之癌症免疫療法用。

【圖式之簡單說明】

第 1 圖顯示對於經衍生自 Foxp3 之胜肽誘導的 CTL，IFN- γ ELISPOT 試驗的結果照片。第 1A 圖，井編號 #2 及 7 經 Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO 3) 刺激、#1 及 #6 經 Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO 7) 刺激、#5 經 Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO 9) 刺激，及 #7 經 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO 67) 及 Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO 74) 刺激之 CTL，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 1B 圖，井編號 #4 經 Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO 4) 刺激、#6 經 Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO 5) 刺激、#6 經 Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO 8) 刺激，及 #1 經 Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO 12) 刺激之 CTL，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。

第 2 圖顯示對於經衍生自 Foxp3 之胜肽誘導的 CTL，IFN- γ ELISPOT 試驗的結果照片。於第 2A 圖，井編號 #2

經 Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15) 刺激、#2 經 Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO 16) 刺激、#6 經 Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO 17) 刺激、#4 經 Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO 22) 刺激、#7 經 Foxp3-A2-263 (SEQ ID NO 24) 刺激，及 #2 與 #5 經 Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27) 刺激之 CTL，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 2B 圖，所有井經 Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO 28) 刺激、井編號 #6 及 #7 經 Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO 29) 刺激、#5 經 Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO 30) 刺激，及 #1 經 Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO 37) 與 Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27) 刺激之 CTL，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。

於第 2C 圖，井編號 #1、#2、#4、#5、#7、#9、#11 及 #12 經 Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15) 刺激、#5 及 #11 經 Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO 19) 刺激、#7 經 Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO 7) 刺激，#12 經 Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO 17) 刺激之 CTL，相較於對照組，顯示有效能的 IFN- γ 生產。

第 3 圖顯示於陽性井中的細胞擴大族群並實施 IFN- γ ELISA 試驗。於第 3A、B 及 C 圖，經 Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO: 15) 刺激之 CTL 細胞株(實心菱形)，相較於對照組(實心方形)，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於圖 3D，經 Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) 刺激之 CTL 細胞株(實心菱形)，相較於對照組(實心方形)，顯示有效

心三角-) 胜肽脈衝之 T2 細胞作為刺激子細胞 (1×10^4 細胞/井)。對刺激子細胞之胜肽脈衝，係於各種胜肽及胜肽濃度，於攝氏 37 度進行 2 小時。

於第 7C 圖，CTL 能藉由以標靶 HLA-A2 分子之 Foxp3-9-252 取代物刺激而誘導。針對所有標靶 HLA-A2 分子經取代之胜肽的 CTL，係依照"材料及方法"項目所述方法產生。井編號 3 及 7 經 Foxp3-9-252-3M 刺激之細胞，井編號 7 經 Foxp3-9-252-3L 刺激之細胞，及井編號 8 經 Foxp3-9-252-9V 刺激之細胞，相較於對照組，顯示 IFN- γ 生產。於圖 7D，以 Foxp3-9-252-9V 誘導之 CTL，認識以 Foxp3-9-252-WT 胜肽包覆之刺激子細胞。以 Foxp3-9-252-9V 胜肽誘導之 CTL 細胞株，用為回應子細胞。於此試驗中，使用與 Foxp3-9-252-9V (-實心圓-) 一起溫育的 T2 細胞或與 Foxp3-9-252-WT (-空心圓-) 胜肽一起溫育的 T2 細胞及不與胜肽(-空心圓-)一起溫育的 T2 細胞，作為刺激子細胞 (1×10^4 細胞/井)。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 腫瘤療法科學股份有限公司

<120> FOXP3 胜肽疫苗

<130> ONC-A0620P

<150> US 60/878,615

<151> 2007-01-03

<150> US 60/896,472

<151> 2007-03-22

<160> 103

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1869

<212> DNA

<213> 人種

<220>

<221> CDS

<222> (189)..(1484)

<400> 1

gcacacactc atcgaaaaaa atttgatta ttagaagaga gaggtctgcg gctccacac 60

cgtacagcgt ggTTTTctt ctcggataa aagcaaagt gTTTTgata cgtgacagt 120

tcccacaagc caggetgatc cTTTTctg c agtccactc accaagcctg ccctggaca 180

aggaccgc atg ccc aac ccc agg cct ggc aag ccc tcg gcc cct tcc ttg 230

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu

1

5

10

gcc ctt ggc cca tcc cca gga gcc tcg ccc agc tgg agg gct gca ccc 278

Ala Leu Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro

15

20

25

30

2125-9337-PF

1

aaa gcc tca gac ctg ctg ggg gcc cgg ggc cca ggg gga acc ttc cag	326
Lys Ala Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln	
35 40 45	
ggc cga gat ctt cga ggc ggg gcc cat gcc tcc tct tct tcc ttg aac	374
Gly Arg Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn	
50 55 60	
ccc atg cca cca tcg cag ctg cag ctg ccc aca ctg ccc cta gtc atg	422
Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met	
65 70 75	
gtg gca ccc tcc ggg gca cgg ctg ggc ccc ttg ccc cac tta cag gca	470
Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala	
80 85 90	
ctc ctc cag gac agg cca cat ttc atg cac cag ctc tca acg gtg gat	518
Leu Leu Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp	
95 100 105 110	
gcc cac gcc cgg acc cct gtg ctg cag gtg cac ccc ctg gag agc cca	566
Ala His Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro	
115 120 125	
gcc atg atc agc ctc aca cca ccc acc acc gcc act ggg gtc ttc tcc	614
Ala Met Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser	
130 135 140	
ctc aag gcc cgg cct ggc ctc cca cct ggg atc aac gtg gcc agc ctg	662
Leu Lys Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu	
145 150 155	
gaa tgg gtg tcc agg gag ccg gca ctg ctc tgc acc ttc cca aat ccc	710
Glu Trp Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro	
160 165 170	
agt gca ccc agg aag gac agc acc ctt tcg gct gtg ccc cag agc tcc	758
Ser Ala Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser	
175 180 185 190	
tac cca ctg ctg gca aat ggt gtc tgc aag tgg ccc gga tgt gag aag	806

Tyr Pro Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys
 195 200 205

gtc ttc gaa gag cca gag gac ttc ctc aag cac tgc cag gcg gac cat 854
 Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His
 210 215 220

ctt ctg gat gag aag ggc agg gca caa tgt ctc ctc cag aga gag atg 902
 Leu Leu Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met
 225 230 235

gta cag tct ctg gag cag cag ctg gtg ctg gag aag gag aag ctg agt 950
 Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser
 240 245 250

gcc atg cag gcc cac ctg gct ggg aaa atg gca ctg acc aag gct tca 998
 Ala Met Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser
 255 260 265 270

tct gtg gca tca tcc gac aag ggc tcc tgc tgc atc gta gct gct ggc 1046
 Ser Val Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly
 275 280 285

agc caa ggc cct gtc gtc cca gcc tgg tct ggc ccc cgg gag gcc cct 1094
 Ser Gln Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro
 290 295 300

gac agc ctg ttt gct gtc cgg agg cac ctg tgg ggt agc cat gga aac 1142
 Asp Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn
 305 310 315

agc aca ttc cca gag ttc ctc cac aac atg gac tac ttc aag ttc cac 1190
 Ser Thr Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His
 320 325 330

aac atg cga ccc cct ttc acc tac gcc acg ctc atc cgc tgg gcc atc 1238
 Asn Met Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile
 335 340 345 350

ctg gag gct cca gag aag cag cgg aca ctc aat gag atc tac cac tgg 1286
 Leu Glu Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp
 355 360 365

ttc aca cgc atg ttt gcc ttc ttc aga aac cat cct gcc acc tgg aag 1334
 Phe Thr Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys
 370 375 380

aac gcc atc cgc cac aac ctg agt ctg cac aag tgc ttt gtg cgg gtg 1382
 Asn Ala Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val
 385 390 395

gag agc gag aag ggg gct gtg tgg acc gtg gat gag ctg gag ttc cgc 1430
 Glu Ser Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg
 400 405 410

aag aaa cgg agc cag agg ccc agc agg tgt tcc aac cct aca cct ggc 1478
 Lys Lys Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly
 415 420 425 430

ccc tga cctcaagatc aaggaaagga ggatggacga acaggggcca aactggtggg 1534
 Pro

aggcagaggt ggtgggggca gggatgatag gccctggatg tgcccacagg gaccaagaag 1594

tgaggttcc actgtcttgc ctgccagggc cctgttccc ccgctggcag ccaccccctc 1654

cccatcata tcctttgcc caaggctgct cagaggggcc ccggtcctgg ccccagcccc 1714

cacctccgcc ccagacacac cccccagtcg agccctgcag ccaaacagag cttcacaac 1774

cagccacaca gagcctgcct cagctgctcg cacagattac tcagggctg gaaaagtcac 1834

acagacacac aaaatgtcac aatcctgtcc ctcac 1869

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

<213> 人種

<400> 2

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

 Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala
 20 25 30

 Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg
 35 40 45

 Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met
 50 55 60

 Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala
 65 70 75 80

 Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu
 85 90 95

 Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His
 100 105 110

 Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met
 115 120 125

 Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys
 130 135 140

 Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp
 145 150 155 160

 Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala
 165 170 175

Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro
 180 185 190

Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe
 195 200 205

Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu
 210 215 220

Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln
 225 230 235 240

Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met
 245 250 255

Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val
 260 265 270

Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln
 275 280 285

Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser
 290 295 300

Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr
 305 310 315 320

Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met
 325 330 335

Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu
 2125-9337-PF 6

340

345

350

Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr
 355 360 365

Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala
 370 375 380

Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser
 385 390 395 400

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys
 405 410 415

Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro
 420 425 430

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胜肽疫苗

<400> 3

Ile Tyr His Trp Phe Thr Arg Met Phe
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 4

Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 5

Lys Phe His Asn Met Arg Pro Pro Phe

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 6

Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 7

Trp Phe Thr Arg Met Phe Ala Phe Phe

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 8

Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 9

Ser Tyr Pro Leu Leu Ala Asn Gly Val

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 10

Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 11

Val Phe Ser Leu Lys Ala Arg Pro Gly Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 12

Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 13

Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 14

Leu Leu Gln Asp Arg Pro His Phe Met

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 15

Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 16

Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 17

Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 18

Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 19

Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 20

Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 21

Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu

1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 22

Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 23

Lys Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 24

Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 25

Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 26

Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val

1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 27

Ala Leu Leu Gln Asp Arg Pro His Phe Met

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 28

Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 29

Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 30

Val Met Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 31

Ser Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu
 1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 32

Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu Phe Ala Val
 1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 33

Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Leu Ala
 1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 34

Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala

1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 35

Leu Leu Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys

1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 36

Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 37

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

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 38

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

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽

<400> 39

Arg Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu
 1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 40

Met Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 41

Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 42

Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 43

Glu Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 44

Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 45

Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 46

Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 47

Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 48

Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu Leu

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 49

Phe Ser Leu Lys Ala Arg Pro Gly Leu

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 50

Asn Ala Ile Arg His Asn Leu Ser Leu

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 51

Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu Leu

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 52

Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 53

Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 54

Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 55

Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 56

Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 57

Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 58

Glu Trp Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 59

Ser Ala Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 60

Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 61

Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 62

Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe

1 5

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 63

Arg Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu Leu

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 64

Lys Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 65

Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu

1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 66

Glu Met Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu

1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 67

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

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 68

Asp Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu
1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 69

Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe
1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 70

Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu

1 5 10

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 71

Lys Asn Ala Ile Arg His Asn Leu Ser Leu

1 5 10

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 72

Ser Tyr Pro Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys

1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 73

Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu

1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 74

Ser Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu

1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 75

Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 76

Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu

1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 77

Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu

1 5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 78

Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu

1 5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 79

Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu Leu

1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 80

Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu

1 5 10

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 81

Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu

1 5 10

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 82

Val Met Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 83

Glu Trp Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu

1 5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 84

Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu

1 5 10

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 85

His Gly Asn Ser Thr Phe Pro Glu Phe Leu

1 5 10

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 86

Thr Trp Lys Asn Ala Ile Arg His Asn Leu

1 5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 87

Ile Tyr His Trp Phe Thr Arg Met Phe Ala

1 5 10

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 88

Lys Leu Gly Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 89

Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 90

Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 91

Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Ile

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 92

Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Phe

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 93

Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Ile

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 94

Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Phe

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 95

Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Val

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 96

Lys Leu Tyr Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 97

Lys Leu Met Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 98

Lys Leu Leu Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 99

Lys Leu Phe Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 100

Lys Leu Tyr Ala Met Gln Ala His Val

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 101

Lys Leu Met Ala Met Gln Ala His Val

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 102

Lys Leu Leu Ala Met Gln Ala His Val

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽疫苗

<400> 103

Lys Leu Phe Ala Met Gln Ala His Val

1

5

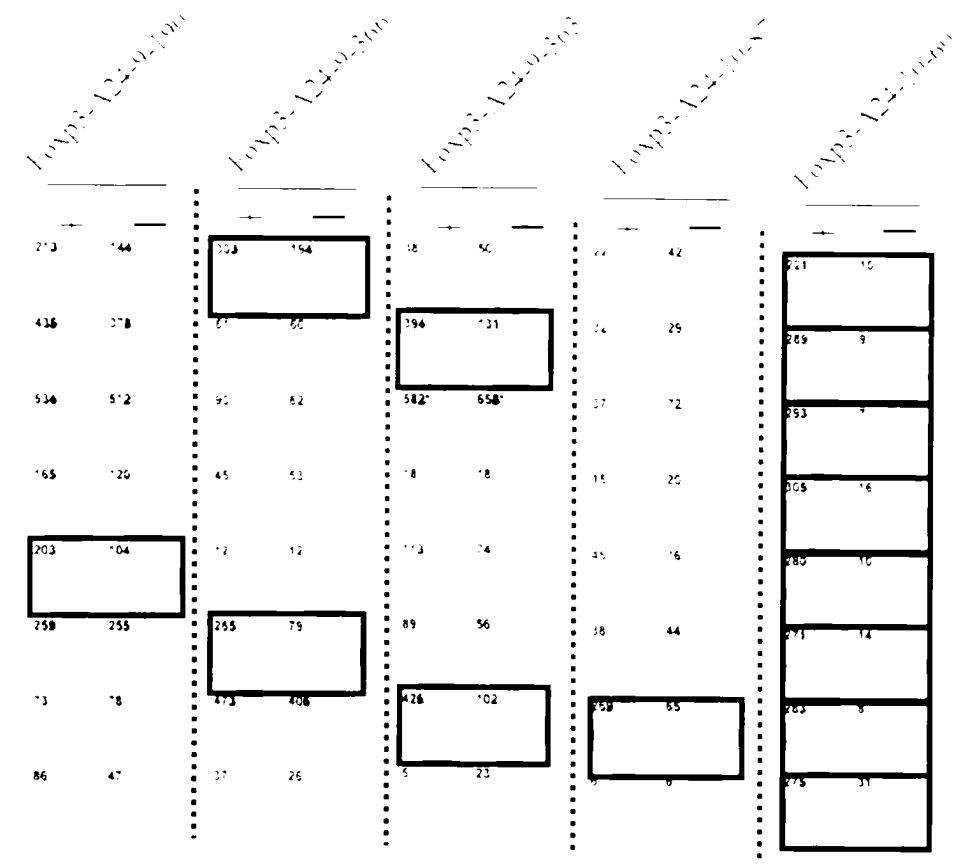
五、中文發明摘要：

本發明提供 Foxp3 胜肽，包含 SEQ ID NO: 3-5、7-9、12、15-19、22、24、27-30、37、67 或 74 之胺基酸序列，及包含上述胺基酸序列之 Foxp3 胜肽且其中 1、2 或數個胺基酸經取代或加成者，且具細胞毒性 T 細胞誘導能力，更提供用於進行調節 T 細胞之調節的藥物，該藥物包含此等 Foxp3 胜肽。本發明之 Foxp3 胜肽可作為疫苗。

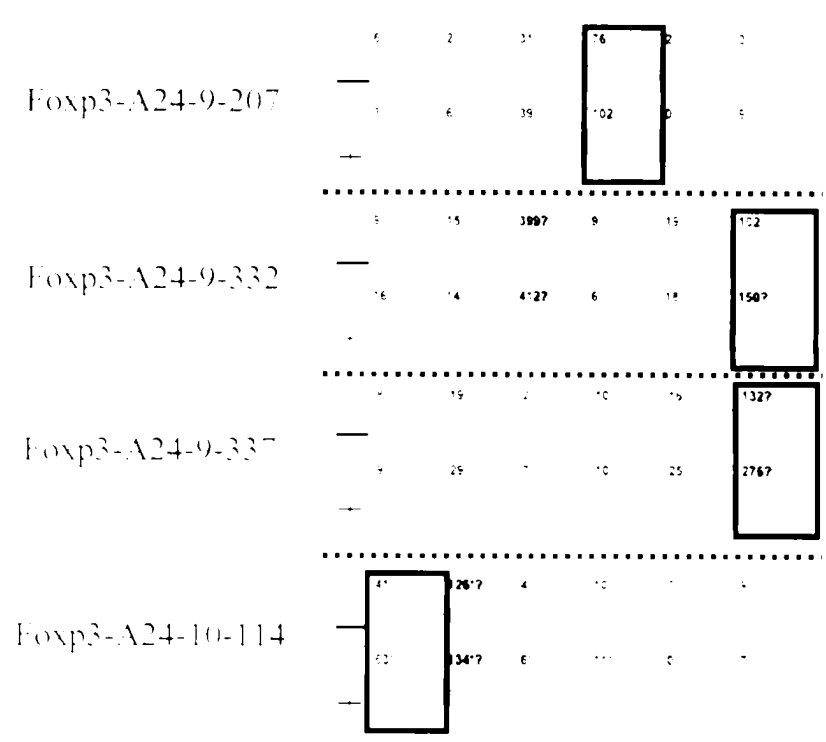
六、英文發明摘要：

The present invention provides Foxp3 peptides comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOs: 3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 or 74, and Foxp3 peptides comprising the above-mentioned amino acid sequences in which 1, 2, or several amino acids are substituted or added, and having cytotoxic T cell inducibility, and also provides drugs for regulating regulatory T cells comprising these Foxp3 peptides. The Foxp3 peptides of this invention find use as vaccines.

A

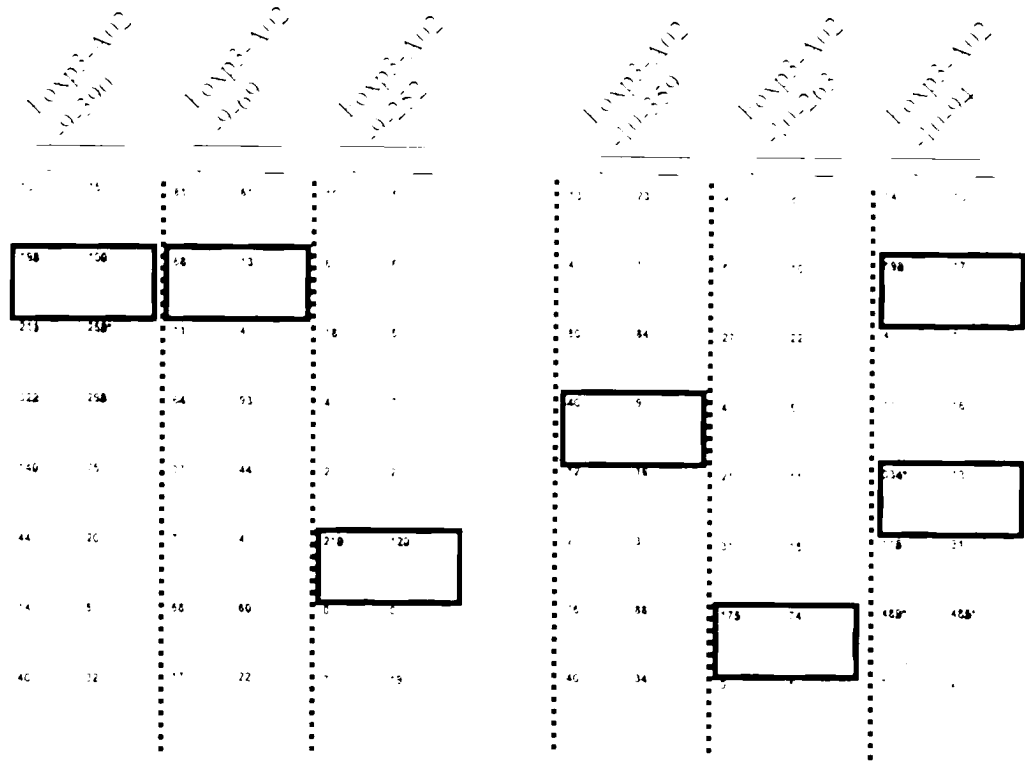


B

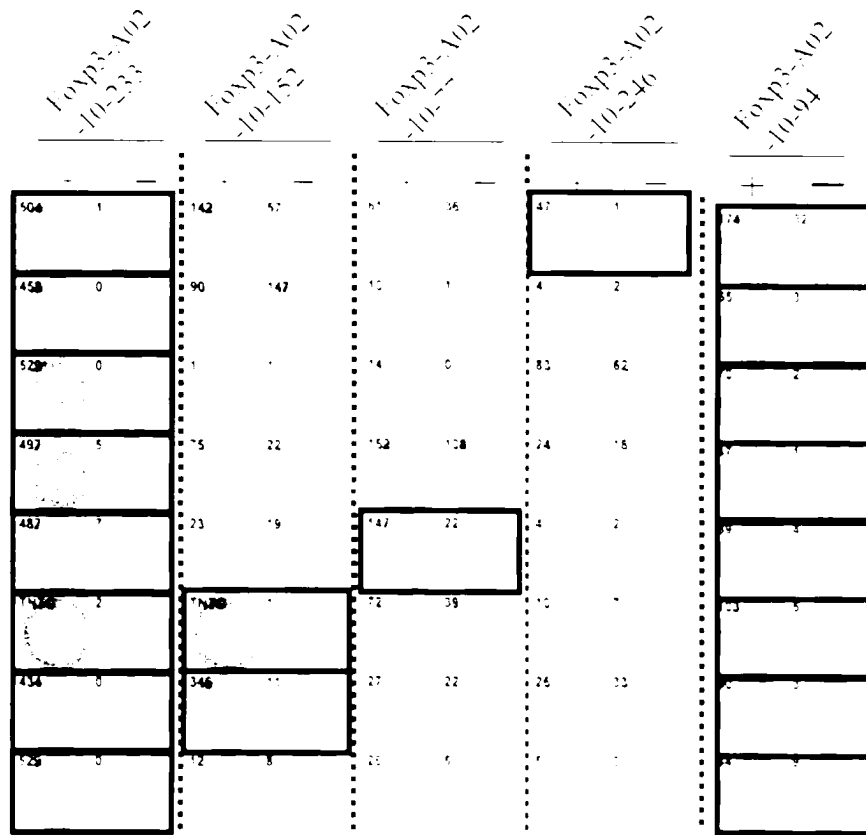


第1圖

A

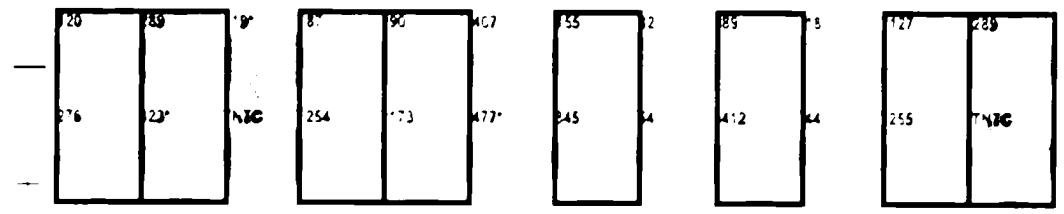


B

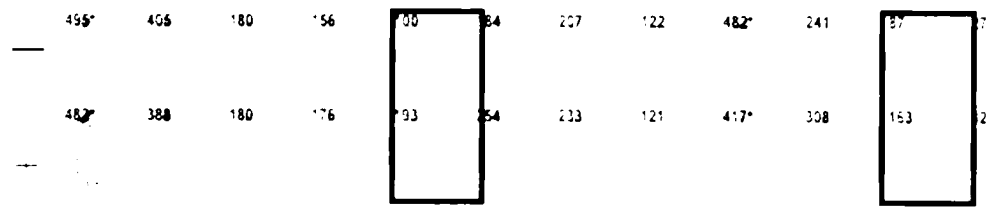


C

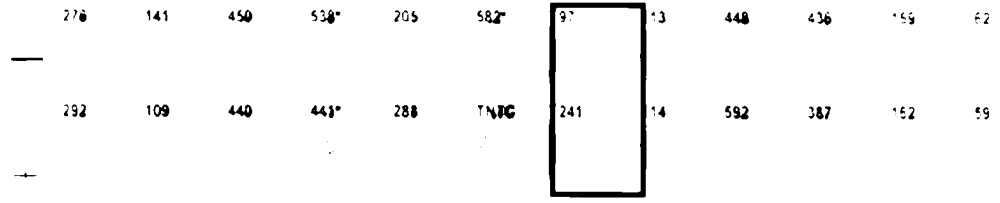
Foxp3-A2-9-390



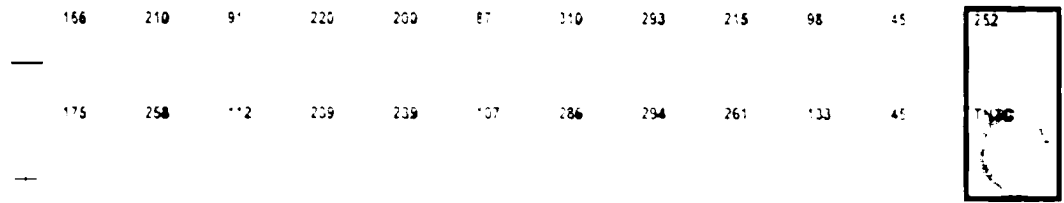
Foxp3-A2-9-304

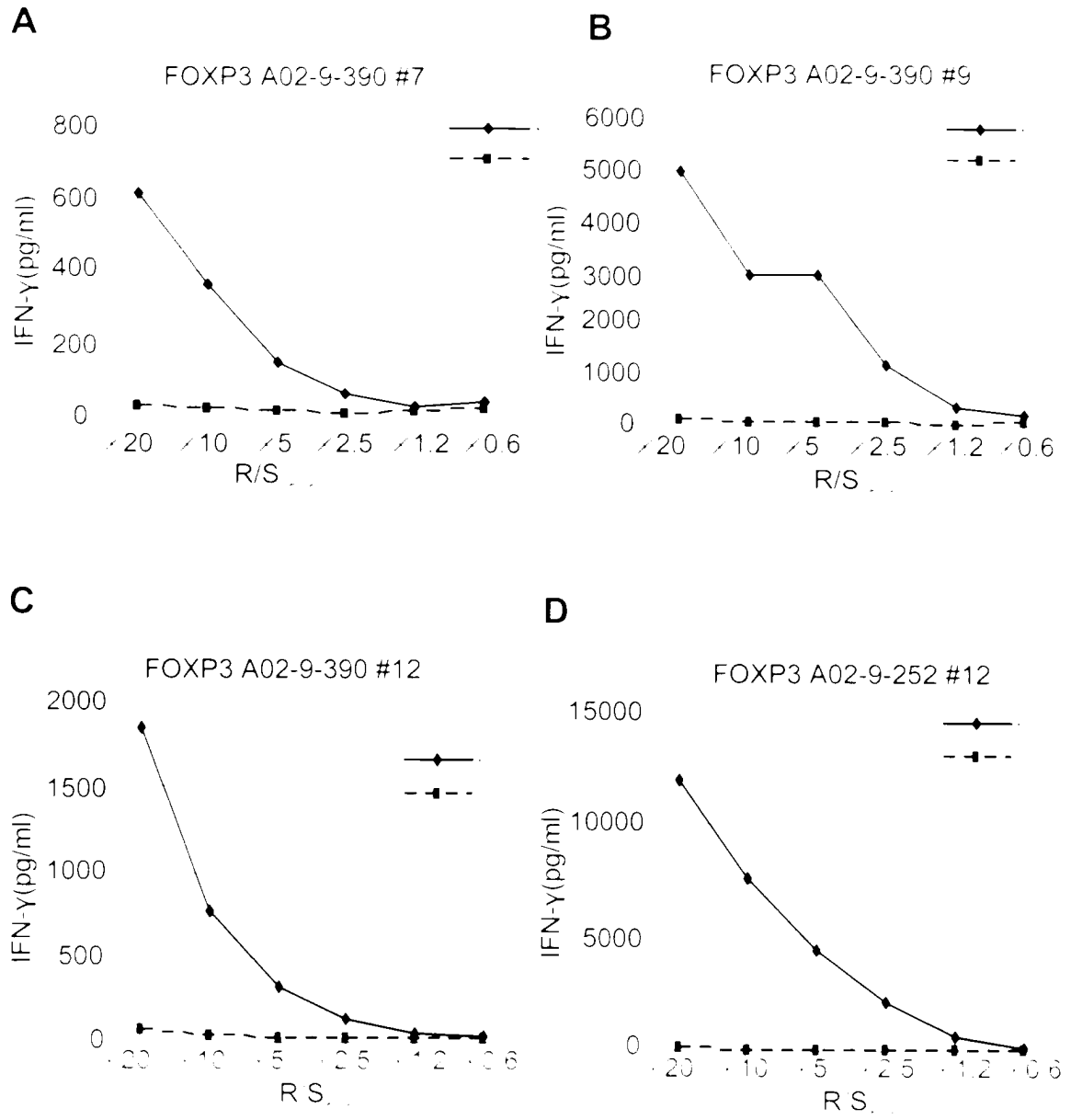


Foxp3-A2-9-68



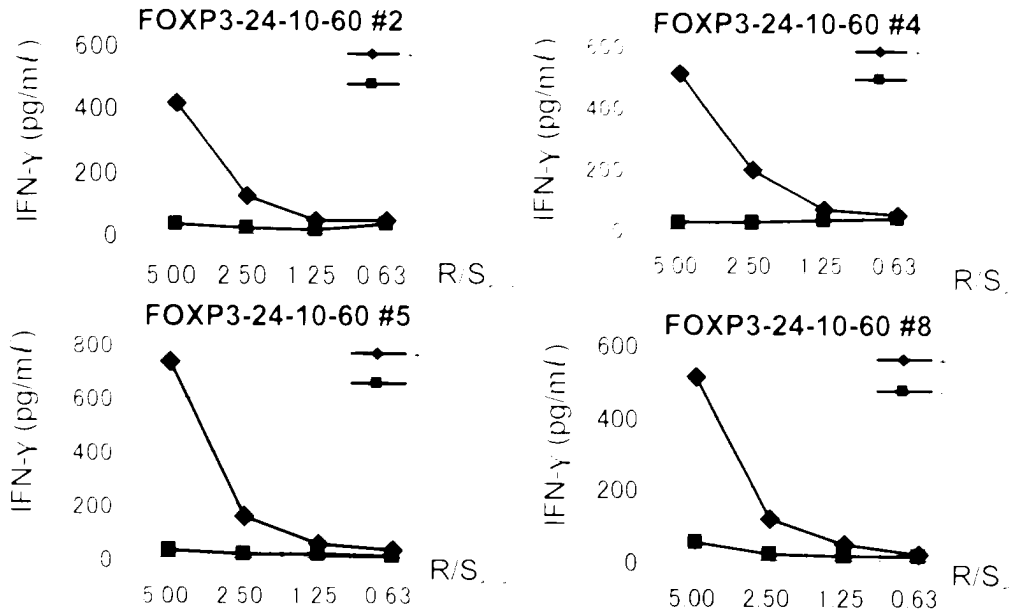
Foxp3-A2-9-252



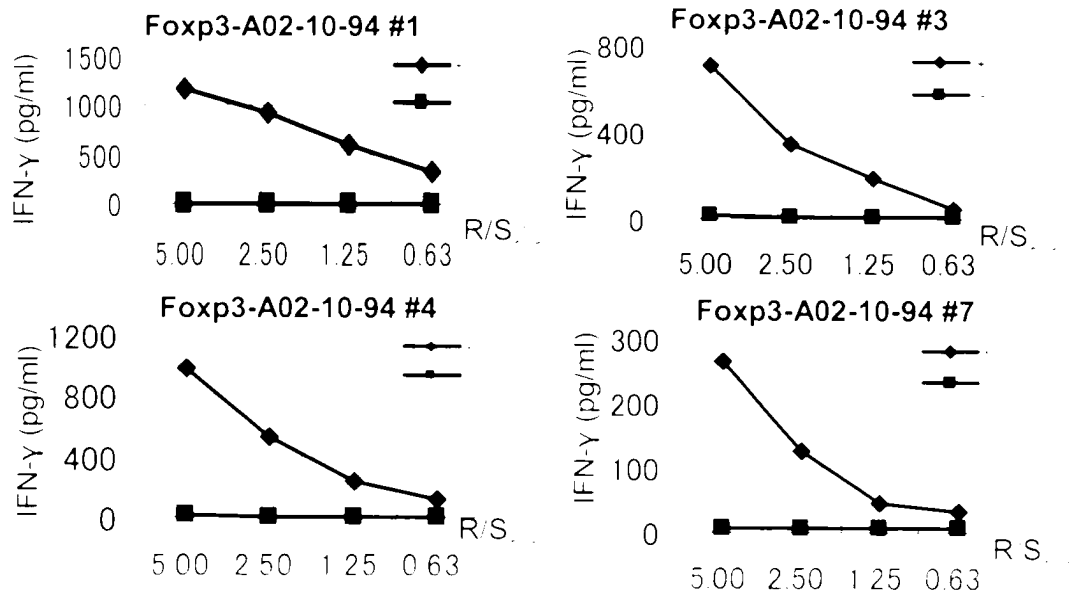


第3圖

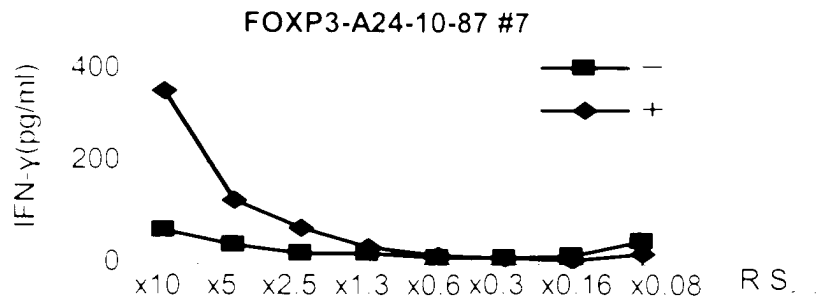
E



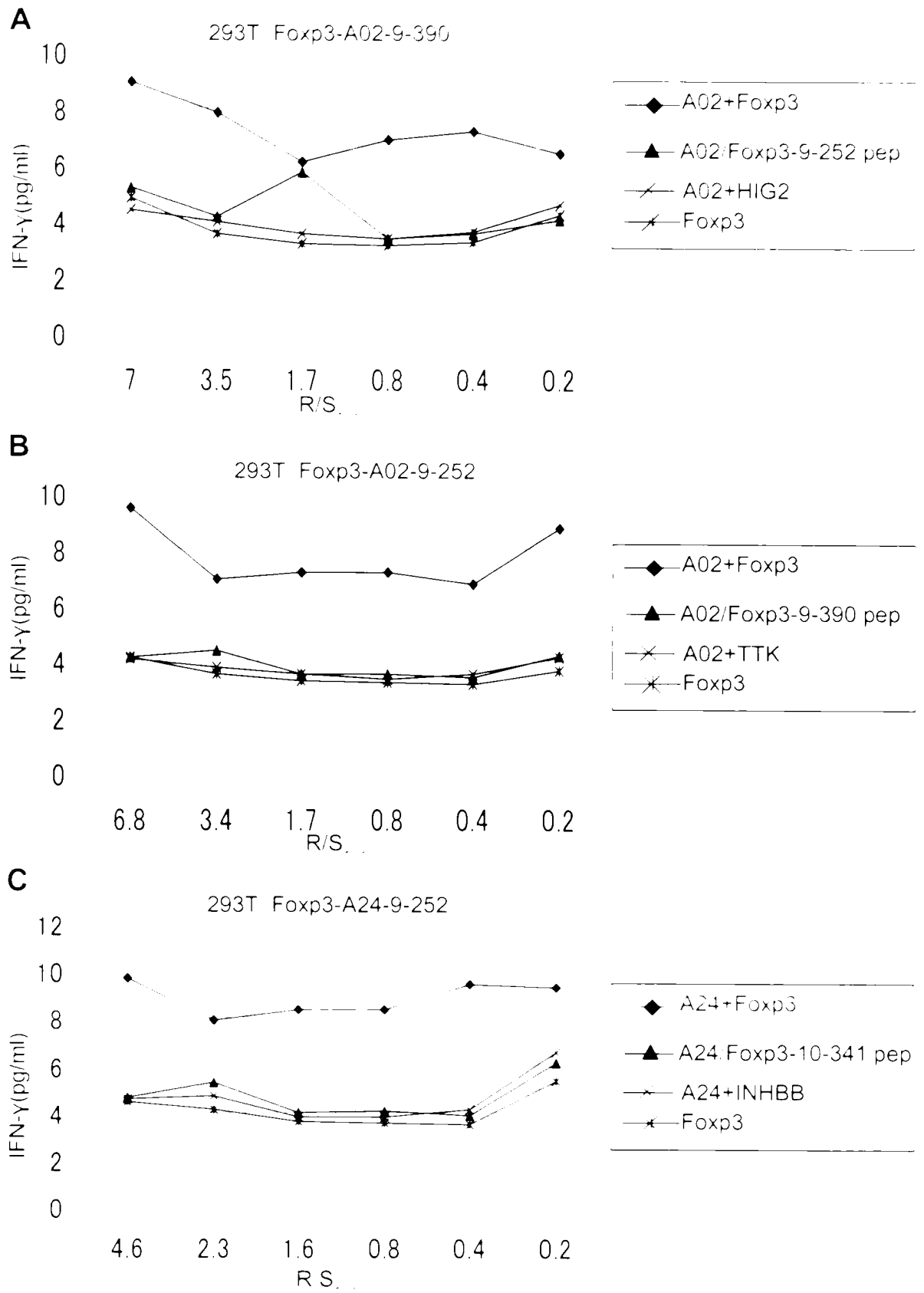
F



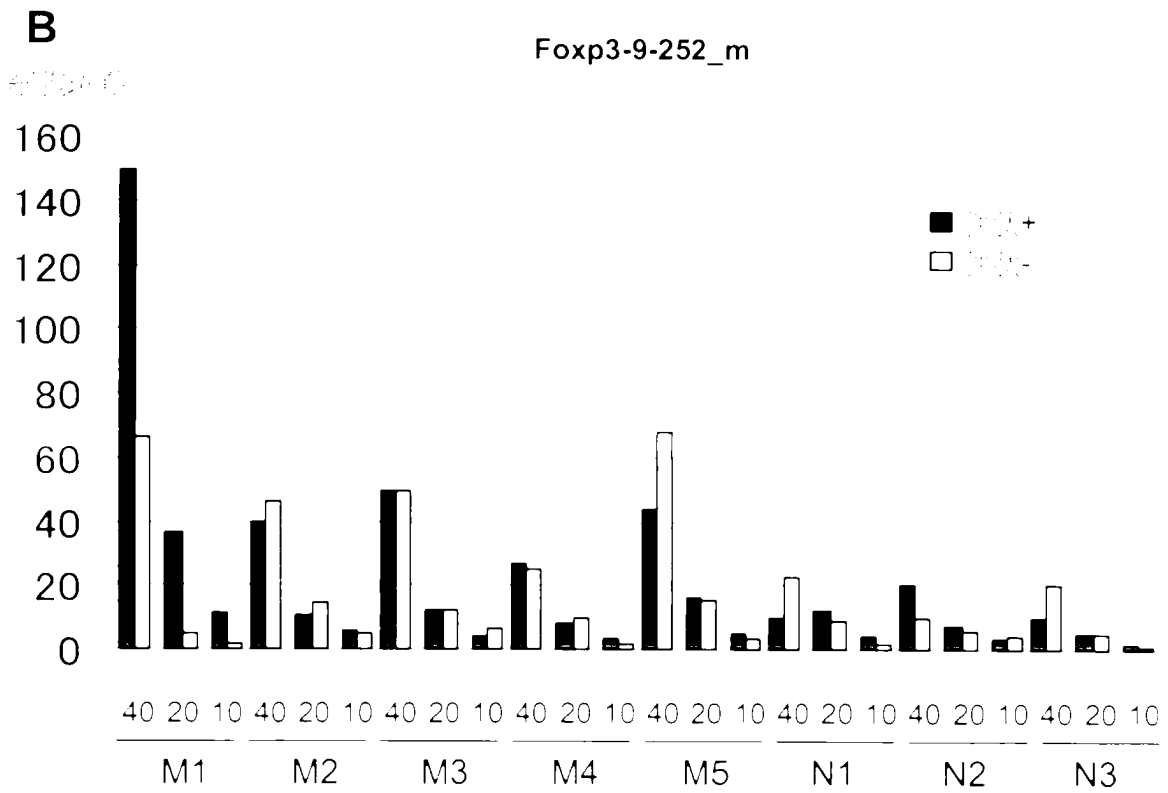
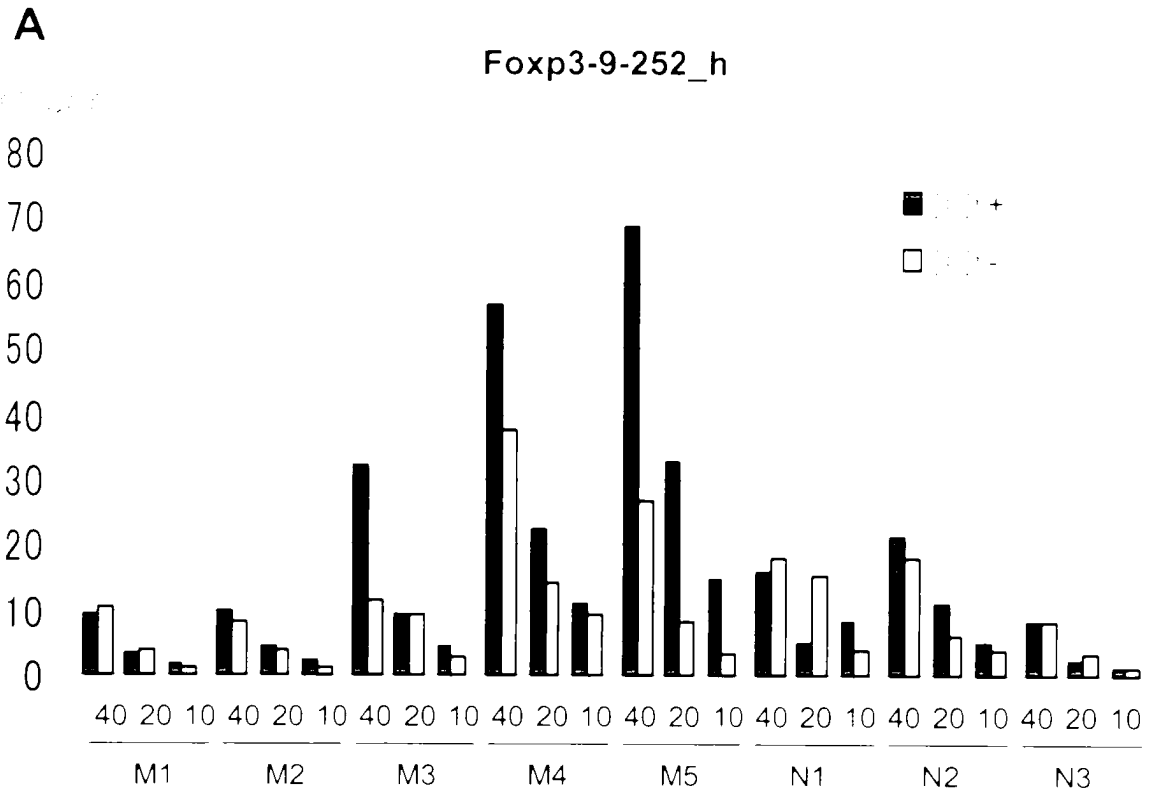
G

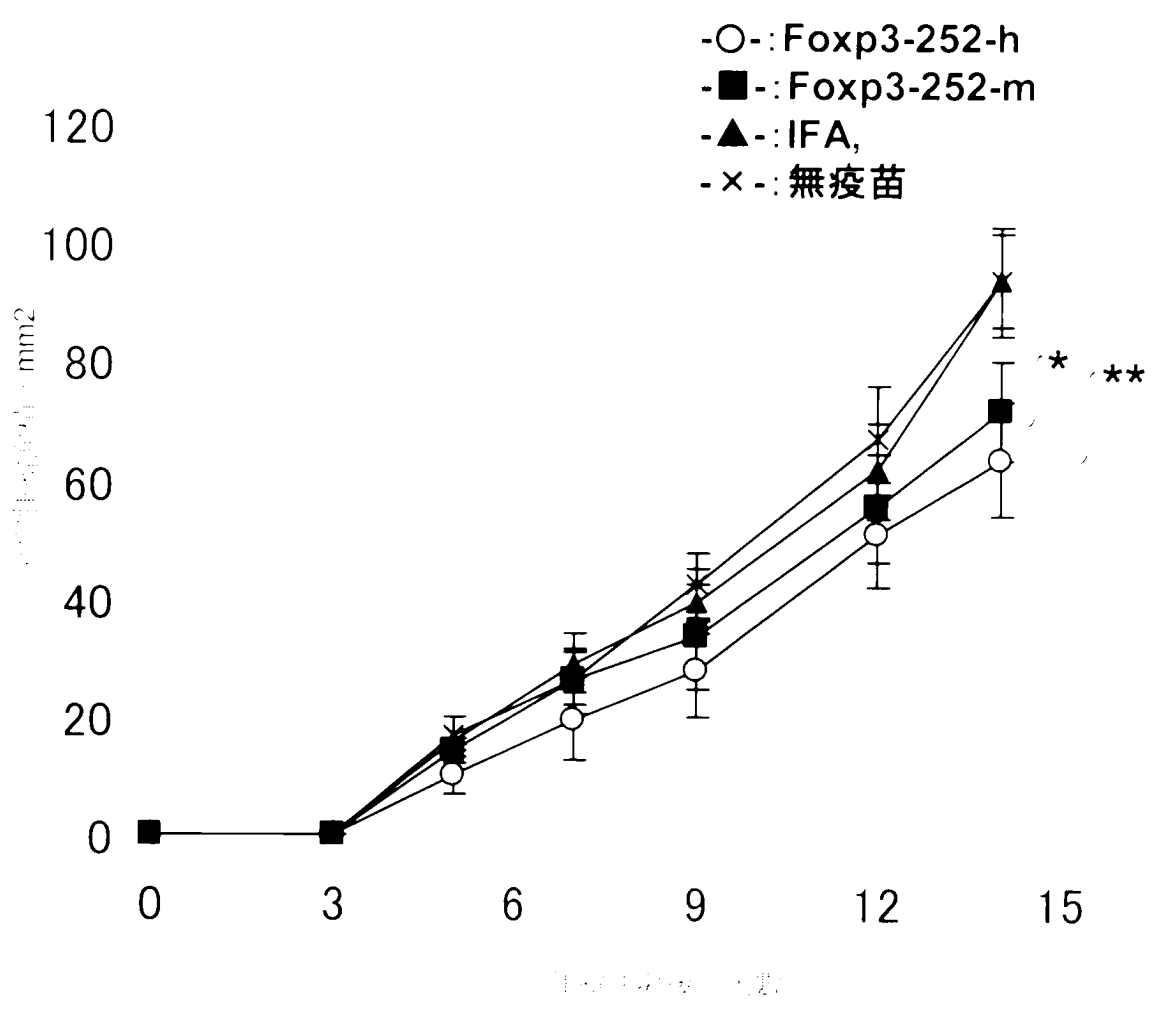


第3圖(續)



第1圖





*, P < 0.01; **, P < 0.005

第6圖

A

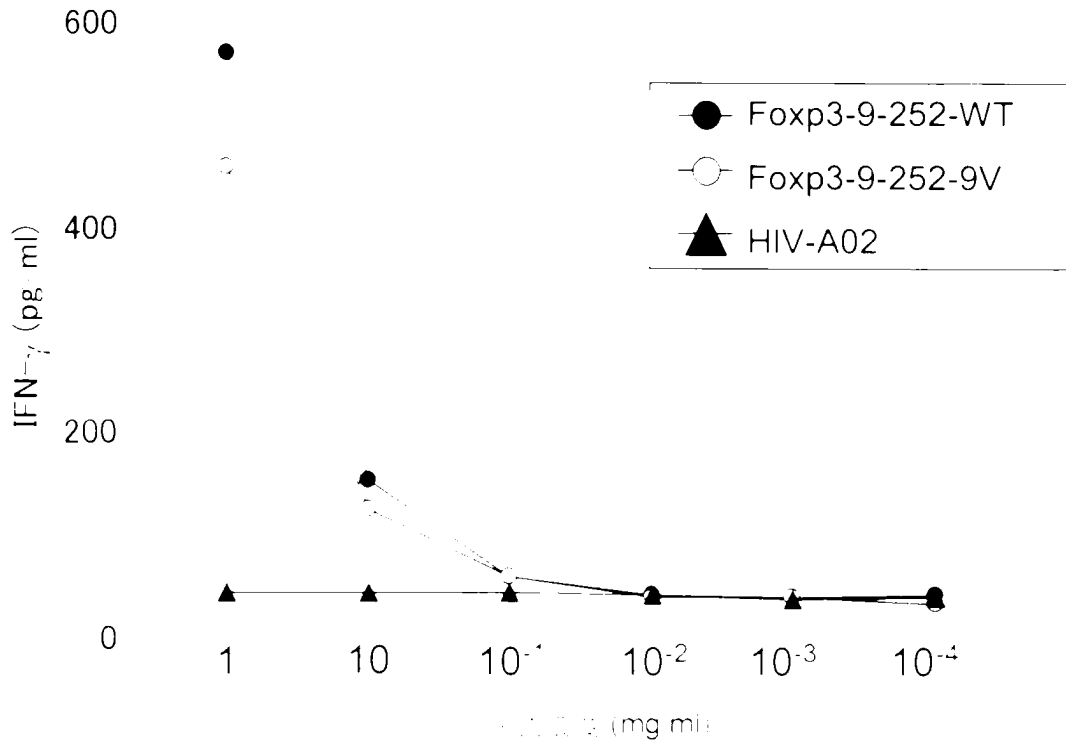
20

	Foxp3-9-252-9V			Foxp3-9-252-WT			Peptide (-)		
R/S ratio	224	240	209	233	240	252	1	1	1
4									
2	116	104	105	120	142	110	0	0	0
1	45	61	36	22	31	46	0	1	0
0.5	24	9	7	15	7	18	0	0	0

回應子：Foxp3-9-252-WT CTL
 刺激子：胜肽腫脈之 T2細胞

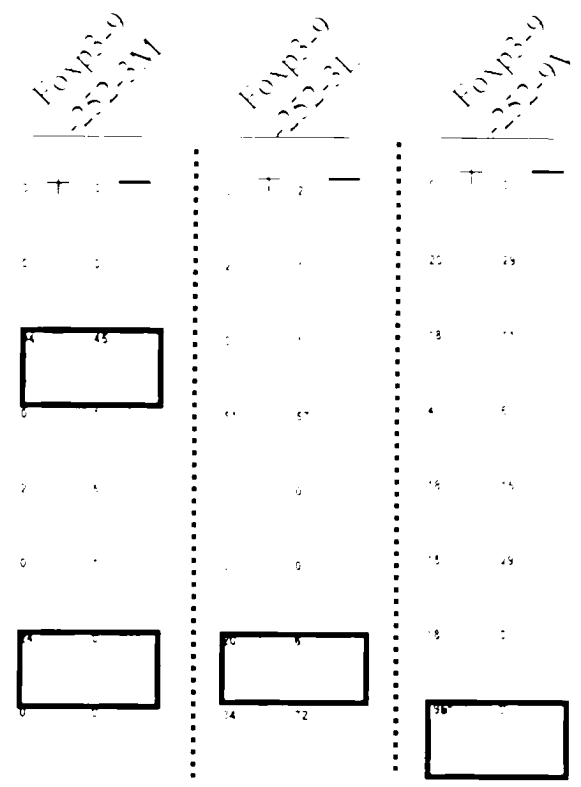
21

B

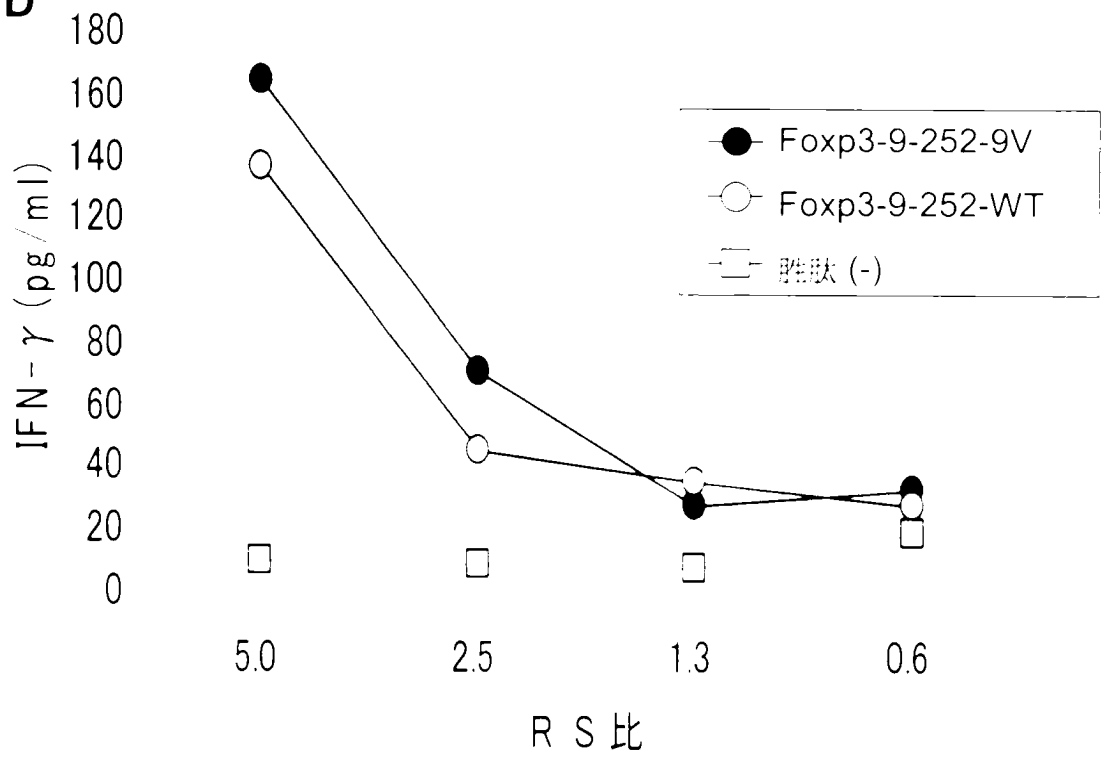


第7圖

22 C



23 D



回應子 : FcγR3-9-252-9V CTL
 刺激子 : 胜肽脈衝之 T2 細胞

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

99年12月20日修正(逕)正整換頁

為了評量針對 BALB/c 小鼠，Foxp3-9-252 胜肽之免疫原性，各以人類 Foxp3-9-252 胜肽 (Foxp3-252_h; KLSAMQAHL) 及小鼠 Foxp3-9-252 胜肽 (Foxp3-252_m; KLGAMQAHL) (SEQ ID NO: 89) 進行免疫。第 2 次注射胜肽後，以 IFN- γ ELISPOT 試驗決定胜肽專一性 CTL 活性(第 5 圖)。

從經注射胜肽疫苗之小鼠獲取的脾細胞，於與對應之經胜肽脈衝的刺激子細胞共同培養的井中，偵測到有效能的 IFN- γ 生產，於對照組井，未顯示 IFN- γ 生產。於圖 5A，於 5 隻小鼠中的 3 隻，偵測到 Foxp3-252_h 胜肽專一性 CTL 反應(M3、M4 及 M5)，但於僅經注射 IFA 之對照組小鼠(N1~N3)，未偵測到此反應。於圖 5B，於 5 隻小鼠中的 1 隻(M1)偵測到 Foxp3-252_m 胜肽專一性 CTL 反應，但僅經注射 IFA 之對照組小鼠(N1~N3)，未偵測到此反應。此等資料顯示經注射 Foxp3-252_h 或 Foxp3-252_m 胜肽疫苗，可於體內誘導對抗經胜肽脈衝的標靶細胞之 CTL。

經注射 Foxp3 抗原決定基胜肽疫苗之抗腫瘤效果

為了以經注射胜肽疫苗之經標靶 Foxp3 檢查抗腫瘤效果，企圖使用 4T1 腫瘤細胞及 BALB/c 小鼠進行體內治療性的處理。於第 0 天，將 4T1 乳癌細胞以皮下注射到 BALB/c 小鼠，然後於腫瘤挑戰後，於第 3 及 10 天，對此等小鼠實施疫苗接種。結果腫瘤生長在經注射 Foxp3-252_h 或

能的 IFN- γ 生產。

於第 3E 圖，經 Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO: 74) 刺激之 CTL 細胞株(實心菱形)，相較於對照組(實心方形)，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 3F 圖，經 Foxp3-A02-10-94 (SEQ ID NO: 27) 刺激之 CTL 細胞株(實心菱形)，相較於對照組(實心方形)，顯示有效能的 IFN- γ 生產。於第 3G 圖，經 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 67) 刺激之 CTL 細胞株(實心菱形)，相較於對照組(實心方形)，顯示有效能的 IFN- γ 生產。

第 4 圖顯示對抗內生性表現 Foxp3 及 HLA-A*02 或 24 之標靶細胞的專一性 CTL 活性。於第 4A 及 B 圖，由 Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO: 15) 及 Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) 誘導的 CTL 細胞株，對於經 Foxp3 及 HLA-A02 兩者轉染的 293T，顯示高專一性 CTL 活性。另一方面，對於對照組，未顯示顯著的專一性 CTL 活性。於第 4C 圖，由 Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) 誘導的 CTL 細胞株，對於經 Foxp3 及 HLA-A24 兩者轉染的 293T，顯示高專一性 CTL 活性。另一方面，對於對照組，未顯示顯著的專一性 CTL 活性。

第 5 圖顯示 Foxp3-252_h 及 Foxp3-252_m 胜肽之體內免疫原性分析。於第 0 及 7 天，經皮下對於 BALB/c 小鼠注射 IFA-結合胜肽或僅注射 IFA。於第 14 天，收取經注射疫苗之小鼠脾細胞並作為回應子細胞。使用經對應脈衝之 1×10^4 RLmale1 細胞(實心方形)，或未經胜肽脈衝之

細胞(空心方形), 作為 IFN- γ ELISPOT 試驗用之刺激子細胞。在每個試驗中, 於 5 隻小鼠 (M1-M5) 使用 Foxp3-252_h (A) 及 Foxp3-252_m (B) 注射疫苗, 於 3 隻小鼠 (N1-N3) 注射 IFA 而沒有注射胜肽作為對照組。

第 6 圖顯示使用 Foxp3 抗原決定基胜肽進行疫苗接種之體內抗腫瘤效果。於第 0 天, 對 BALB/c 小鼠注射 1×10^5 4T1 乳癌細胞株。於第 3 及 10 天, 注射 IFA 結合 Foxp3-252_h (-空心圓-)、IFA 結合 Foxp3-252_m (-實心方形-)、IFA 無結合胜肽 (-實心三角-)。亦於此試驗中製備未經接種疫苗的小鼠 (-x-) 當成對照組的正常腫瘤生長。於接種 Foxp3 抗原決定基胜肽之組別, 觀察到腫瘤生長抑制之顯著差異。*:P < 0.01; **:P < 0.005。

第 7 圖顯示 Foxp3-9-252 取代物對於 HLA 分子之親和性試驗。於第 7A 圖, 以 Foxp3-9-252-WT 誘導之 CTL 認識呈現 Foxp3-9-252-9V 胜肽在 HLA-A2 分子上之細胞。實施 IFN- γ ELISPOT 試驗, 使用經 Foxp3-9-252-WT 胜肽誘導之 CTL 細胞株作為回應子細胞, 並使用經 Foxp3-9-252-WT 或 Foxp3-9-252-9V 胜肽脈衝之 T2 細胞作為刺激子細胞。製備不經胜肽脈衝之 T2 細胞作為對照組。於第 7B 圖, Foxp3-9-252-9V 及 Foxp3-9-252-WT 對於 HLA-A2 分子顯示類似親和性。實施 IFN- γ ELISA 試驗, 使用經 Foxp3-9-252-WT 胜肽誘導之 CTL 細胞株作為回應子細胞 (1×10^5 細胞/井), 並使用經 Foxp3-9-252-WT (-實心圓-)、Foxp3-9-252-9V (-空心圓-) 或 HIV-A02 (-實

十、申請專利範圍：

1. 一種胜肽，由 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列所構成。
2. 一種具細胞毒性 T 細胞誘導能力之胜肽，其具有少於 15 個胺基酸，其中該胜肽包括擇自下列所構成之胺基酸序列：
 - (a) SEQ ID NO:17，以及
 - (b) SEQ ID NO:17，其中一或二個胺基酸經取代或加成。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之胜肽，其中該 N-端第 2 個胺基酸為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸、色胺酸或白胺酸。
4. 如申請專利範圍第 2 或 3 項所述之胜肽，其中該 C-端胺基酸為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸、甲硫胺酸或纈胺酸。
5. 如申請專利範圍第 2 項所述之胜肽，其中該胜肽包含 SEQ ID NO: 95、97 或 98 之胺基酸序列。
6. 一種醫藥製劑，用於調節調節性 T 細胞 (T-reg cell)，包括一種以上申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之胜肽，或編碼為該胜肽之一多核苷酸。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之醫藥製劑，其係用於抑制 T-reg 細胞之增生。
8. 如申請專利範圍第 6 項所述之醫藥製劑，其係用於投予至一 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A02 之個體。
9. 如申請專利範圍第 6 項所述之醫藥製劑，其係用於

抑制 T-reg 細胞之功能。

10. 如申請專利範圍第 6 項所述之醫藥製劑，其係用於治療癌症。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之醫藥製劑，其為一疫苗。

12. 如申請專利範圍第 10 或 11 項所述之醫藥製劑，除了包含申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之胜肽或一編碼為該胜肽之多核苷酸外，其更包括另一胜肽，該另一胜肽具誘導對抗癌細胞之細胞毒性 T 細胞的能力，或編碼該另一胜肽之多核苷酸。

13. 一種外吐小體(exosome)，在其表面上呈現一複合體，該複合體包含一 HLA 抗原及申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之胜肽。

14. 如申請專利範圍第 13 項所述之外吐小體，其中該 HLA 抗原為 HLA-A24 或 HLA-A02。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述之外吐小體，其中該 HLA 抗原為 HLA-A2402 或 HLA-A0201。

16. 一種誘導抗原呈現細胞之體外方法，該抗原呈現細胞具有細胞毒性 T 細胞誘導能力，其係藉由使一抗原呈現細胞接觸申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之胜肽或將包含編碼為該胜肽之多核苷酸的基因轉移到一抗原呈現細胞。

17. 一種誘導細胞毒性 T 細胞之體外方法，其係藉由使抗原呈現細胞及 CD8-陽性細胞或周邊血液單核白血球接觸申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之胜肽或藉由使編碼為與

申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之胜肽結合之 TCR 次單元多胜肽的核酸進行轉導。

18. 一種分離之細胞毒性 T 細胞，其係由申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之胜肽所誘導。

19. 如申請專利範圍第 18 項之細胞毒性 T 細胞，其係由申請專利範圍第 17 項之方法所誘導。

20. 一種抗原呈現細胞，包括一複合體，該複合體係形成在一 HLA 抗原及申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之胜肽之間。

21. 如申請專利範圍第 20 項所述之抗原呈現細胞，其係由申請專利範圍第 16 項之方法所誘導。

22. 一種申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之胜肽、其免疫活性片段或編碼為該胜肽之多核苷酸於製備疫苗之使用，其係用於調節一個體中的 T-reg 細胞。