(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월09일
(11) 등록번호 10-1602010
(24) 등록일자 2016년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7029919
(22) 출원일자(국제) 2011년04월15일
심사청구일자 2014년03월28일
(85) 번역문제출일자 2012년11월15일
(65) 공개번호 10-2013-0095186
(43) 공개일자 2013년08월27일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/056056
(87) 국제공개번호 WO 2011/128448
국제공개일자 2011년10월20일
(30) 우선권주장
1006360.0 2010년04월16일 영국(GB)
61/324,941 2010년04월16일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol . 205 , no. 3 , 1 January 2008 (2008-01-01) , pages 595-610,
CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, vol . 15, no. 28, 1 October 2009 (2009-10-01) , pages 3221-3236,

(73) 특허권자
이매틱스 바이오테크놀로지스 게엠베하
독일 72076 투빙겐 파울-울리흐-스트라쎄 15
(72) 발명자
바인쉔크 토니
독일 73773 아이크발드 임 모르겐라인 15
프리체 옌스
독일 72076 튀빙겐 임 쇼엔블릭 48
(74) 대리인
제일특허법인

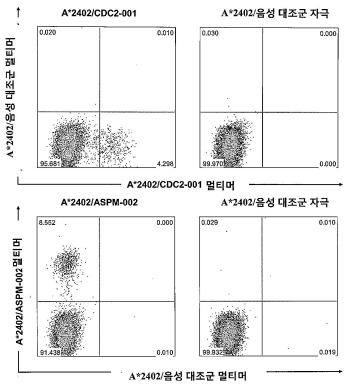
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 **암, 자가면역 및 감염 질환 면역요법 개발을 위한 자연적으로 가공된 HLA-제한 펩티드의 차별 정량법**

(57) 요 약

본 발명은 관련 HLA-결합 펩티드 항원을 1차 조직 검체로부터 표지하는 접근법 없이 대규모로 정량적으로 식별하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 펩티드 백신을 개발하는 데에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 이는 암, 또는 감염과 자가면역 질환에서 분자 수준으로 정의되는 면역 감시 및 HLA-제한 항원 결정인자가 표적으로 기능하는 임의의 면역요법 전략, 예컨대 다양한 아단위 백신 또는 채용성 T-세포 전달 접근법을 위한 신규한 항원의 식별을 위해 매우 유용하다.

대 표 도 - 도3



명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 하나 이상의 질병 1차 조직 샘플, 및 상기 질병 조직에 상응하는 하나 이상의 건강한 1차 조직 샘플을 제공하는 단계;

(b) 주조직 적합 복합체(MHC) 리간드 펩티드를 상기 샘플로부터 단리하는 단계;

(c) 상기 MHC 리간드 펩티드 상에서 HPLC-MS 분석을 수행하는 단계;

(d) 단계 (c)에서 유래하는 각각의 신호에 대한 전구체 이온 신호 강도(면적)를 구하는 단계;

(e) (i) 단편 스펙트럼 집단화(clustering) 및 데이터베이스 검색에 의해 상기 MHC 리간드 펩티드 각각의 서열을 동정하고, (ii) 상이한 질병 1차 조직 샘플 간의 전구체 이온 신호 면적의 그룹화를 행함으로써, 그리고 단계 (c) 및 단계 (d)의 상이한 실행을 행하고 반복 측정 내의 전구체 이온 신호 면적을 정규화함으로써, 오차 추정치를 포함하는 샘플 당 MHC 리간드 펩티드의 평균 양을 결정하는 단계;

(f) (i) 대립유전자-특이적인 서열 아군을 생성하기 위하여 상기 서열을 MHC 대립유전자에 할당하고 (ii) 상이한 샘플 크기 또는 MHC 발현 수준을 설명하기 위하여 대립유전자-특이적인 아군을 사용하여 상기 상이한 샘플 간의 펩티드를 정규화하여, 상이한 질병 1차 조직 샘플 사이에서 비교가능한 MHC 리간드 펩티드의 상대적인 양을 결정하는 단계;

(h) MHC 리간드 펩티드의 상기 평균 양 및 상대적인 양에 기초하여, 상기 질병 샘플 및 상기 건강한 샘플의 MHC 리간드 펩티드에 대한 제시 프로파일 및 제시 점수 중 어느 하나 또는 이들 모두를 계산함으로써, MHC 리간드 펩티드의 잠재적인 과잉-제시를 결정하는 단계; 및

(k) 상기 MHC 리간드 펩티드를 표지-부재(label-free) 정량화하는 단계

를 포함하는, 1차 조직 샘플 상에서 MHC 리간드 펩티드의 식별 및 표지-부재 정량화를 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

MHC 리간드 펩티드가 종양-관련된 펩티드(TAA) 및 질병-관련된 펩티드(DAA)로부터 선택되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

과잉-제시되고/되거나 종양-특이적인 MHC 리간드 펩티드를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 질병 1차 조직 샘플이 종양 샘플 또는 감염된 조직 샘플인 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

단계 (d)에서, HPLC 컬럼에서 MHC 리간드 펩티드의 체류 시간을 조정하여 서열에 대한 지식 없이 반복 실행 내에서 상응하는 신호를 할당하고/하거나 서열에 대한 지식 없이 체류 시간 조정에 의해 상이한 샘플 간에 전구체

이온 신호를 할당하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

생체외에서 수행되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

단계가 표시된 순서대로 수행되는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

표시된 단계로 이루어진 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

합성기에서 또는 수동으로 식별되고/되거나 정량화된 하나 이상의 MHC 리간드 펩티드를 합성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

합성된 펩티드로서 MHC 리간드 펩티드를 면역원성에 관해 시험하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제4항 및 제6항 내지 제11항중 어느 한 항에 있어서,

샘플이 하나의 개인으로부터 유래하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

식별되고/되거나 정량화된 MHC 리간드 펩티드를 기반으로 개인화된 MHC 리간드 프로파일을 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 관련 HLA-결합 펩티드 항원을 1차 조직 검체로부터 대규모로 정량적으로 식별하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 펩티드 백신을 개발하는 데에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 이는 암, 또는 감염과 자가면역 질환에서 분자 수준으로 정의되는 면역 감시 및 HLA-제한 항원 결정인자가 표적으로 기능하는 임의의 면역요법 전략, 예컨대 다양한 아단위 백신 또는 채용성 T-세포 전달 접근법을 위한 신규한 항원의 식별을 위해 매우 유용하다.

배 경 기 술

[0002] 면역 체계의 T-세포를 자극하여 암을 이겨내려는 암 면역요법과 자가면역 질환과 감염 질병을 위한 면역요법의 개발은 1차 악성 조직의 인간 백혈구 항원(HLA)-결합 펩티드 제시 수준의 깊은 지식으로 인해 현저히 향상될 것이다. 이 정보는 단백질, DNA 또는 RNA와 같은 분자 단위 기반의 다른 T-세포 백신 및 특히 펩티드 백신과 관련이 있다. 이 종류의 정량적 데이터는 현재까지 "오믹스(omics)"-스케일로 사용가능하지 않았으며, 이는 흔히 사용되는 정량화 방법이 다른 차별적 화학 표지 전략에 대부분 의존했으며, 이로 인하여 비교될 모든 검체가 하나의 실험 내에서 처리되어야 하는 이유로 이런 연구의 가능한 규모를 심하게 제한했기 때문이다.

[0003] "역면역" 관련 문제를 피하면서 위의 펩티드를 식별하는 방법은 EP1508047B1에서 공개되었다. 상술된 바와 같이, 이 방법은 여기 펩티드의 정량화 방법에 사용될 수 없다. 또 하나의 표지를 사용하는 방법은 WO 2005/076009에서 공개되었으며, 이는 어느 정도의 정량화를 가능하게 하였으나, 대규모에서는 해당되지 않는다. 예를 들면, WO 03/025576 또는 문헌[Martin et al in Proteomics 2003, 3, 2208-2220]에서 다른 표지들이 공개되었다.

[0004] 문헌[Fortier et al, The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome, JEM, Vol. 205, No. 3, March 17, 2008 595-610]에 의해서 또 다른 방법이 공개되었다. 이 방법은 산 용리법 때문에 MHC-결합 펩티드를 비-MHC-결합 펩티드로부터 절개해야 하는 단점이 있다. 이는 b2m-녹아웃(knockout) 세포주를 사용하여 실행된다. 따라서, 이 방법은 1차 환자 종양 물질에는 사용될 수 없다. 이 방법에는, 1차 쥐과 가슴샘세포가 쥐과 EL4 세포와 비교되었다. 출발 수량은 MHC I 분자를 측정함으로 조절되었다. 이것이 유일한 포티어 등의 문헌에 공개된 방법의 큰 제한 요소이다. 더욱이, 다른 크기와 조직 기원의 1차 조직을 다룰 때 필요한 정규화가 적용되지 않았다. 오히려, 균형 잡힌 시작 물질을 사용함으로서 정규화가 쓸모없게 되었다. 그러나, 정규화는 1차 (환자) 물질을 사용할 때는 절대 필요하다.

[0005] 면역 반응의 자극은 숙주 면역 체계에 의하여 이물질이라고 인식이 되는 항원의 존재에 의존한다. 종양-관련된 항원 및 질병 항원의 존재의 발견은 숙주의 면역 체계를 이용하여 종양 성장을 매개하는 가능성을 제기했다. 체액 및 세포 면역 체계를 이용한 여러 가지의 기전이 현재 암 면역요법을 위해 연구되고 있다.

[0006] 세포 면역 반응의 특정한 요소는 특이적으로 종양 세포를 인식하고 파괴하는 능력을 갖고 있다. 종양-침윤 세포 인구 또는 말초 혈관에서 단리된 세포독성 T-세포(CTL)는 이러한 세포들이 암에 대한 면역 방어에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 특히 CD8-양성 T-세포(T-$CD8^+$)는 주조직 적합 복합체(MHC)의 클래스 I 분자에 결합되어 있는 펩티드를 인식한다. 이 펩티드는 보통 8개 내지 10개의 아미노산으로 되어 있으며 세포질에 위치하고 있는 펩티드 또는 결함 리보좀 생성물(DRIPS)로부터 유래되었으며, 또한 이 반응에 중요한 역할을 한다. 인간 MHC-분자는 인간 백혈구 항원(HLA)으로도 알려져 있다.

[0007] MHC 분자는 두 클래스로 나누어 진다. MHC 클래스 I 분자는 대부분의 핵을 갖는 세포에서 찾을 수 있다. MHC 분자는 알파 중쇄와 베타-2-마이크로글로불린(MHC 클래스 I 수용체) 또는 알파와 베타 쇄(MHC 클래스 II 수용체)로 각각 구성되어 있다. 이들의 3차원 형태는 바인딩 홈을 형성하며, 이는 펩티드와의 비공유 결합에 사용된다. MHC 클래스 I은 대부분 내인 단백질, DRIP와 큰 펩티드의 단백질분해 분할로 인해 생성된 펩티드를 제시한다. MHC 클래스 II 분자는 대부분 전문적인 항원 전달 세포(APC)에서 찾아 볼 수 있다. 이들은 주로 APC로부터 세포내 섭취 중 섭취된 외인 또는 막전 단백질의 펩티드를 제시하며, 이는 후에 처리된다. 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합물은 적당한 T-세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8-양성 세포 독성 T 림프구에 의해서 인식이 되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합물은 적당한 TCR을 갖는 CD4-양성 조력 T-세포에 의해 인식된다. TCR, 펩티드와 MHC가 1:1:1의 화학량론적 반응량으로 존재한다는 사실은 잘 알려져 있다.

[0008] 펩티드가 세포 면역 반응을 일으키기 위해서는 MHC-분자와 반드시 결합을 해야 한다. 이 과정은 MHC 분자의 대립유전자와 펩티드의 아미노산 서열의 특정한 다형태에 의존을 한다. MHC 클래스 I 결합 펩티드는 보통 8 내지 12개의 아미노산 잔기의 길이로 이루어져 있으며 보통 서열 중에 두 개의 보존 잔기("고정대")를 갖고 있으며 이는 MHC 분자의 대응하는 바인딩 홈과 상호 작용한다. 이런 방법으로 각 MHC 대립유전자는 "결합 모티브"를 가지게 되며, 이는 어떤 펩티드가 어떤 바인딩 홈에 특정하게 결합을 할 수 있는 지를 결정한다.

[0009] MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서 펩티드는 특정한 종양 세포에서 표현되는 MHC 클래스 I 분자와 결합을 할 수 있어야 할 뿐만 아니라, 특정한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포로부터 인식될 수 있어야 한다.

[0010] 종양-특이적인 CTL에 의해 인식이 되는 항원, 즉 이들의 에피토프가 효소, 수용체 전사 인자 등을 포함한 모든 단백질 클래스로부터 유래하고, 이를 같은 근원의 변하지 않은 세포와 비교하였을 시 각자의 종양에서 상향 조정되어 표현된 것을 말한다.

[0011] 종양-관련된 또는 질병-관련된 항원의 기존 분류는 다음의 주요 군을 포함한다:

[0012] 암-고환(cancer-testis) 항원: 이는 처음으로 식별된 TAA[종양-관련된 항원; 질병-관련된 항원은 DAA로 줄여 쓴다]로서 이 클래스에 해당하는 T 세포에 의해 인식되며, 이는 이들의 멤버가 조직학적으로 다른 인간 종양과 다른 형태로 표현되며, 정상적인 조직 중에서는 단지 고환의 정모세포/정조세포 및 종종 태반에서만 표현이 되기 때문에 원래 암-고환 항원이라고 이름이 지어졌다. 고환의 세포가 클래스 I 및 II HLA 분자를 발현하지 않기 때문에 이 항원은 보통 조직의 T 세포에 의해 인식이 되지 않으며, 따라서 이는 면역적으로 종양-특이적이라고 고려된다. CT 항원 중에 잘 알려진 예로는 MAGE 가족 구성원 또는 NY-ESO-1을 들 수 있다.

[0013] 분화 항원: 이 TAA는 종양과 종양이 발생하는 정상 조직이 공유하고, 거의 대부분은 흑색종과 정상 멜라닌 세포에서 발견된다. 많은 멜라닌 세포 혈통 관련 단백질은 멜라닌의 생합성에 관련이 있으며 따라서 이는 종양-특이적은 아니지만, 암 면역 치료로 널리 사용된다. 몇몇의 예를 들면, 티로시나제와 흑색종의 멜란(Melan)-A/MART-1와 전립선암의 PSA가 있다.

[0014] 과잉 발현된 TAA: 널리 발현되는 TAA를 코딩하는 유전자는 조직학적으로 다른 종류의 종양과 많은 정상 조직에서 검출된 바 있으며, 대부분 정상 조직에서 더 낮은 수준으로 검출된다. 에피토프 중의 대부분이 처리되고 잠재적으로 정상 조직에 의해서 제시되지만, 이는 T-세포 인식의 문턱값에 미치지 못하는 반면, 이들의 종양 세포에서의 과잉 발현은 이전에 설립된 내성을 파괴하여 항암 반응을 유발시킬 수도 있다. 유명한 TAA 클래스의 예를 들면 Her-2/neu, 서비빈(Survivin), 텔로머라제(Telomerase) 또는 WT1이 있다.

[0015] 종양-특이적인 항원: 이 고유의 TAA는 정상 유전자(β-카테닌, CDK4 등을 포함)로부터의 돌연변이로부터 발생한다. 이들의 분자 변화 중 몇몇은 종양 전환 및/또는 진행과 관련이 있다. 종양-특이적인 항원은 보통 조직에 대한 자가 면역 반응 유도의 위험 없이 대부분 강한 면역 반응을 유도할 수 있다. 다른 한편으로, 대부분의 경우 이 TAA는 이들이 인식된 정확한 종양과 단지 관련이 있으며 이는 다른 각각의 종양과 공유되지 않는다.

[0016] 비정상 번역 후 수정에서 일어나는 TAA: 이러한 TAA는 종양에서 특이적으로 또는 과잉으로 발현되지 않지만, 근본적으로 활성적인 종양에서 번역 후 과정 중 종양과 관련이 되는 단백질에서 발생할 수 있다. 이 클래스의 예는 변형된 당화 패턴에서 발생하며 MUC1과 같은 경우처럼 종양의 새로운 에피토프가 될 수 있거나 단백질 스플라이싱 또는 분해 도중에서 생겨날 수 있으며 이는 종양-특이적일 수도 아닐 수도 있다.

[0017] 종양 바이러스 단백질: 이 TAA는 바이러스 단백질로서 이는 종양 발생 과정에서 중요한 역할을 할 수 있으며, 이들이 이물(인간에서 발생되지 않음)이기 때문에, 이들은 T-세포 반응을 일으킬 수 있다. 이러한 단백질의 예로서는 인간 유두종 바이러스 단백질 16형, E6과 E7을 들 수 있으며 이는 자궁경부암에서 발현된다.

[0018] 단백질이 종양-특이적인 또는 종양-관련된 항원 또는 질병-특이적인 또는 질병-관련된 항원으로 세포독성 T-림프구에 의해 인식되고 치료의 목적으로 쓰이려면, 특정한 조건이 성취되어야 한다. 항원은 대부분 종양 세포 또는 감염 세포에서 발현되고, 정상 건강 조직에서는 전혀 발현이 안 되거나 비교적 적은 양만이 발현이 되어야 하며, 예를 들어 5, 10배, 또는 더 높은 비율로 적은 양이 발현되어야 한다.

[0019] 감염 질병에서는 두 가지의 가능성이 있다. 첫째로, 감염 세포가 건강한 세포에서는 발현되지 않는 감염과 직접적으로 관련된 항원을 발현하는 것 또는 감염된 세포가 건강한 세포에서는 아주 작은 양으로만 발현이 되는 항원을 과잉 발현 하는 것, 이는 건강한 세포에서 펩티돔(peptidome)으로 보통 발현이 되는 항원의 과잉 발현을 말한다.

[0020] 더욱 더 바람직한 것은 이 항원이 한 가지 형의 종양, 감염 또는 균주에서 존재하며, 또한 높은 농도(즉, 세포당 펩티드 복사본의 숫자)로 존재한다. 종양-특이적과 종양-관련된 또는 질병-특이적인 및 질병-관련된 항원은 정상 세포가 종양 세포 또는 감염된 세포로서 전환하는 데에 이의 기능으로 인해, 즉, 세포 주기 제어 또는 세포 자멸사 등의 기능으로 인해, 직접적으로 관련이 있는 단백질에서 유래한다.

[0021] 암의 경우, 추가적으로 전환의 직접적인 원인이 되는 이들 단백질의 하류 목표가 상향 조정됨에 따라서 간접적으로 종양과 관련될 수 있다. 이러한 간접적인 종양-관련된 항원은 백신 접근의 목표가 될 수 있다(문헌 [Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95]). 두 경우 모두 에피토프가 항원의 아미노산에 존재하는 것이 중요하고, 따라서 이 종양-관련된 항원에서 파생된 펩티드("면역원 항원")가 생체외 또는 생체내 T-세포 반응을 일으켜야 하기 때문이다.

[0022] 근본적으로, MHC 분자와 결합할 수 있는 어떤 펩티드라도 T-세포 에피토프의 기능을 가질 수 있다. 생체외 또는 생체내 T-세포 반응 유도의 조건은 T 세포가 상응하는 TCR과 함께 존재하며, 이 특정한 에피토프에 대한 면

역적인 내성이 없는 것이다.

[0023] 따라서, TAA와 DAA는 종양 백신 개발의 출발 시점이다. TAA와 DAA를 식별하고 특성화하는 방법은 환자 또는 건강한 대상에서 단리할 수 있는 CTL의 사용에 근거하거나 종양과 정상 조직 사이의 차별된 전사 프로파일 생성 또는 차별된 펩티드 발현 패턴 생성에 근거한다.

[0024] 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주, 또는 선택적으로 이러한 조직 또는 세포주에서 발현이 되는 유전자들의 식별은 이러한 유전자로부터 전사된 항원의 면역 치료에서의 사용에 대한 정확한 정보를 제공하지 않는다. 이는 이러한 항원의 에피토프의 소인구 집단만이 이러한 적용에 적당하기 때문이며 이는 상응하는 TCR을 갖는 T 세포가 존재해야만 하며 이 특정한 에피토프에 대한 면역적 내성이 없거나 낮은 수준으로 존재해야 하기 때문이다. 따라서 과잉 발현되었거나 기능적인 T 세포가 있는 MHC 분자에 대해 제시된 선택적으로 발현된 단백질 펩티드만을 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능적인 T 세포는 특정한 항원이 클론에 의하여 팽창할 수 있으며 작동 세포의 기능을 실행할 수 있는 T 세포("작동 T 세포")로서 정의된다.

[0025] T-조력 세포는 CTL의 항암 면역 작동 기능을 전체적으로 지배하는 데에 중요한 역할을 한다. T_{H1} 유형의 T-조력 세포 반응을 일으키는 T-조력 세포 에피토프는 표면에 암 관련 펩티드/MHC 복합체를 진열하는 암세포를 향한 세포살해 기능을 포함하는 CD8-양성 살해 T 세포의 작동 기능을 유발한다. 이런 방법으로 암 관련 T-조력 세포 펩티드 에피토프는 홀로 또는 다른 암 관련 펩티드와 함께 항암 면역 반응을 유발하는 예방 주사의 활성적인 제약 성분으로 쓰일 수 있다.

발명의 내용

[0026] 따라서, 상기의 관점에서 본 발명의 목적은 다음의 방법을 적어도 부분적으로 제공하는 것이다.

[0027] - 다른 MHC 발현 수준을 갖는 (인간) 조직 샘플의 조작을 허가하는, 즉, 1차 조직 샘플에 적용될 수 있는 방법;

[0028] - 예를 들면 b2m-녹아웃 대응자가 생성되야 하는 세포에 제한되지 않는, 즉, 1차 (인간) 조직 샘플에 적용될 수 있는 방법;

[0029] - "높은-처리량" 수준을 갖는 방법; 및

[0030] - 점진적인, 즉, 수년을 거쳐 새로운 샘플의 양에 대한 데이터를 현재의 데이터에 점진적으로 추가할 수 있는 방법.

[0031] 본 발명의 다른 목표와 장점은 하기 설명에 의해 당업자에게 자명해질 것이다.

[0032] 하기 설명에서, 본 발명은 암을 예로 들어 설명된다. 그렇지만, 이러한 연구 방법은 각각의 면역자가 MHC 클래스 I과 관련이 있다면, 감염 질병, 자가면역 병, 그리고 기생 감염 질병에도 적용될 수 있다. 본 발명은 더 나아가 인간 질병에만 제한되지 않고, 예를 들면 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 쥐, 생쥐를 포함한 쥐과, 염소, 및 태스매니언 데빌과 같은 암에 의해 멸종 위기에 처한 다른 가축 또는 동물을 포함한 포유동물의 질병에도 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1: GC2464 원발성 종양 샘플의 발현을 보여주는 CDC2-001의 질량 스펙트럼의 예. 나노ESI-LCMS가 GC 샘플 2464로부터 용리된 펩티드 풀에서 수행되었다. m/z 597.3501 ± 0.001 Da, z = 2에 대한 질량 크로마토그램은 체류 시간 151.63분에서 펩티드 최고점을 보여 준다. b) 질량 스펙트럼에서 검출된 151.63분에서의 최고점은 질량 스펙트럼의 m/z 597.3501의 신호를 보여 준다. c) 나노ESI-LCMS 실험에서 기록된 지정된 체류 시간에서 선택된 m/z 597.3501 전구체의 충돌적으로 유도된 붕괴 질량 스펙트럼은 GC2464 종양 샘플에서 CDC2-001의 존재를 확인해 주었다. d) 합성 CDC2-001 기준 펩티드의 균열 패턴이 기록되고 서열 검증을 위해 c)에서 보여진 바와 같이 자연적으로 생성된 TUMAP 균열 패턴과 비교되었다.

도 2: 정상 조직의 선택된 단백질과 25개의 위암 샘플의 mRNA 발현 프로파일; CDC2(프로베셋(Probeset) ID: 203213_at); ASPM(프로베셋 ID: 219918_s_at).

도 3: 클래스 I TUMAP의 펩티드-특이적인 생체외 면역원성을 보여주는 결과의 예. CD8+ T 세포는 각각 관계 있

는(왼쪽 패널) 및 관계 없는(오른쪽 패널) 펩티드를 갖는 인공 APC 사용하여 초회 감작되었다. 자극을 삼 회 거친 후, 관계 있는 및 관계 없는 A*2402-멀티머를 사용하여 두 번 염색을 하는 방법으로 펩티드-반응 세포를 검출했다. 보여진 세포는 살아 있는 CD8+ 림프구에 게이팅되었으며, 플롯의 수는 멀티머-양성 세포의 백분율을 나타낸다.

도 4: PTPRZ1(티로신 포스파테아제, 수용체-유형, Z 폴리펩티드 1)의 HLA 클래스 I 펩티드의 제시 프로파일을 보여준다.

도 5: CDK1(사이클린-의존 키나아제 1) HLA 클래스 I 펩티드의 제시 프로파일을 보여준다.

도 6: ASPM(asp(비정상 스핀들) 동족체, 소두증 관련(드로소필라(Drosophila))) HLA 클래스 I 펩티드의 제시 프로파일을 보여준다.

도 7: 다른 조직 아형에서 상당히 변하지 않는 상대적인 b2m 단백질 발현을 보여 준다.

도 8: 효모 알코올탈수소효소 1의 스파이킹된 합성된 펩티드의 생(raw) 그리고 정상화된 신호를 보여 준다. 총 일곱 개의 다른 체류 시간, 전하 상태와 서열 길이를 포함하는 스파이킹된 펩티드가 품질 관리에서 사용이 되었다. 생(raw) 면적은 (예를 들어 질량 분광계의 설치 변화에 의한 치우침을 제거하여) 2 단계 방법에 의해 샘플 내 및 샘플외 변이를 고려하여 정규화되었다. 정상 폐 조직의 샘플 969에 대한 반복 사이의 차이가 나타나 있다.

도 9: 외과수술로 제거된 정상, 종양 조직 및 건강한 공여자로부터 제공된 혈액이 단계별 접근을 사용하여 분석되었다:

1. 악성 및 건강한 조직에서 HLA 리간드가 식별되고 차별적으로 표지 없는 액체 크로마토그래피-결합 질량 분광계(LCMS)에 정량화되어 과잉-제시된 TUMAP(종양-관련된 펩티드)가 결정되었다.

2. 총 유전체의 마이크로어레이에 의한 mRNA 발현 분석이 정상 기관과 조직과 비교했을 때 악성 조직에서 과잉-발현되는 유전자를 식별하기 위해 사용되었다.

3. 식별된 HLA 리간드는 유전자 발현 데이터와 비교되었다. 2단계에서 검출된 것으로 선택적으로 발현된 또는 과잉-발현된 유전자에 의해 코딩된 과잉-제시된 TUMAP는 다-펩티드 백신의 적당한 TUMAP 후보로 고려되었다.

4. TUMAP로 식별된 펩티드의 관련성에 대한 추가적인 증거를 식별하고 이 단백질이 다른 경로에서 중요한 기능을 하는 가능성을 배제하기 위해서 문헌 검색이 실행되었다.

5. 건강한 개인에서 얻어진 혈액의 말초 T 세포는 TUMAP 후보에 대한 반응성을 실험하기 위해 몇몇의 면역측정법을 통해 연구되었다(생체외 T-세포 검정).

도 10: 문헌[OpenMS, M. Sturm and O. Kohlbacher. TOPPView: an open-source viewer for mass spectrometry data. *J Proteome.Res* 8 (7):3760-3763, 2009)에 의해 122분에 펩티드 YLLPAIVHI의 신호와 함께 도표화된 부분 LCMS 지도를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] **정의**

[0035] "제시 프로파일" 또는 "제시 도표"는 별개의 샘플의 펩티드의 제시의 평균을 바 차트로 시각화한 것을 보여준다. 제시는 최고 면적에 대한 과다 관계의 백분율로 표시되어 있다. 편차는 측정된 사본에 기반한 95%의 신뢰구간으로 가시화된다. 만약 펩티드가 샘플에서 식별이 되었으나, 정량이 가능하지 않은 경우, 이는 NA(사용 불가/면적 없음)라는 표지로 표시된다.

[0036] "제시 점수"는 한 군의 펩티드가 다른 군과 비교가 되었을 때의 과잉-제시의 측정이며 이는 0 내지 1의 값을 갖는다. 제시 점수가 작으면 작을수록, 과잉-제시의 확률이 높아진다. 펩티드가 정상 또는 비 질병 샘플에서 발견되지 않았을 경우, 점수는 계산될 수가 없으며, 따라서 점수는 0으로 표시된다.

[0037] 상당히 과잉-제시된 TUMAP의 세트를 결정하기 위해서, 유의 문턱값(예, 0.05)을 결정해야 하며, 이 문턱값보다 작은 제시 점수를 갖는 모든 TUMAP를 포함해야 한다. 따라서, 제시 점수는 TUMAP가 우연히 과잉-제시되는 확률을 반영한다.

[0038] 통계적으로, 제시 점수는 선형 혼합 모델의 p-값이 될 수 있다. 이 경우에, 점수는 제시 데이터(TUMAP 양상 면

적)를 모델화하며 이는 샘플 간 또는 샘플 내의 변형을 무작위 효과로 편입하며, 예를 들면 종양과 정상 조직의 차이를 고정 효과로 편입한다. 더 간단한 접근 방법에서는 제시 점수는 t-테스트의 p-값이 될 수 있다.

[0039] 제시 점수는 다수에 대해서는 오류 발견율(false discovery rate; FDR)을 사용하여 조정된다.

[0040] "품질 관리"라는 용어는 현재 방법에서 쓰이는 데이터가 현재 방법에 쓰일 수 있도록 충분한 기준을 맞추는 것을 확인하는 것을 말한다. 하나의 예를 들면, 펩티드 질량 재현성을 기반으로 면적 내의 펩티드의 모든 분석되는 샘플의 총 식별된 서열과 작은 편차를 갖는 서열의 수, 즉, 하나의 샘플에서 얼마나 많은 수의 펩티드 서열이 식별될 수 있는지(바람직하게는 신뢰할 수 있도록 식별됨), 그리고 그 식별된 펩티드 중의 어떤 백분율의 펩티드(예, 25%, 30%, 50% 또는 심지어 75%)가 작은 편차를 갖는 신뢰 가능한 면적에 부여(예, CV가 20% 이하)될 수 있는지를 말한다. 이것이 상이한 샘플들 사이에 신뢰할 수 있는 정규화의 조건이다. 보통, 신뢰할 수 있도록 식별할 수 있는 펩티드 서열의 수가 높을수록 데이터의 품질이 "좋아진다". 다른 하나의 예는 식별과 면적 견적의 품질을 관리하는 것으로, 예를 들면 "고전적인" 시각 검사를 통해 펩티드 식별 결과와 재현성 면적을 알아보는 것이며, 이는 통계적인 분석으로 행해 질 수 있다.

[0041] **발명의 상세한 설명**

[0042] 본 발명의 첫 번째 양상에서, 본 발명의 목적은 (a) 하나 이상의 병든 1차 조직 샘플, 및 바람직하게는 상기 병든 1차 조직 샘플에 상응하는 하나 이상의 건강한 1차 조직 샘플을 제공하는 단계; (b) 주조직 적합 복합체(MHC) 리간드 펩티드를 상기 샘플로부터 단리하는 단계; (c) 상기 MHC 리간드 펩티드 상에서 HPLC-MS 분석을 수행하는 단계; (d) 단계 (c)에서 유래하는 각각의 신호에 대한 전구체 이온 신호 강도(면적)를 구하는 단계; (e) 상기 MHC 리간드 펩티드의 서열을 단편 스펙트럼 집단화(clustering) 및 데이터베이스 검색에 의해 식별하여 상이한 실행과 샘플 사이의 면적을 분류하고, 반복 실행의 면적을 정규화하여 반복 실행 사이의 기술적인 수행/감도 차이를 보정하여 오차 추정치를 포함하는 샘플 당 각각의 펩티드의 평균 양을 구하는 단계; (f) 상기 서열을 MHC 대립유전자에 할당하여 대립유전자-특이적인 서열 아군을 생성하여 상이한 샘플을 비교하고, 대립유전자-특이적인 아군을 사용하여 상이한 샘플을 정규화하여 상이한 샘플 크기 또는 MHC 발현 수준을 설명하여 샘플 사이에서 비교가능한 상대적인 양을 구하는 단계; (g) 모든 샘플에 대한 펩티드 재현성을 기반으로 데이터 품질 관리를 수행하여 식별된 서열의 총 수 및 면적에서 작은 편차를 갖는 서열의 수를 최대한 많이 확인하는 단계; (h) 제시 프로파일 및 점수를 계산하여 MHC 리간드 펩티드의 잠재적인 과잉-제시를 결정하는 단계; (i) 예를 들어, 펩티드 식별 결과 및 면적 재현성의 시각적인 검사, 또는 통계적인 분석에 의해 식별 및 면적 추정치의 품질을 관리하는 단계; (j) 상기 하나 이상의 병든 1차 조직 샘플에서 검출한 값을 상기 하나 이상의 건강한 1차 조직에서 구한 값과 비교하는 단계; 및 (k) 상기 MHC 리간드 펩티드를 정량화하는 단계를 포함하는, 포유동물로부터의 1차 조직 샘플 상에서 MHC 리간드 펩티드의 식별 및 표지-부재 정량화를 위한 방법에 의해 해결된다.

[0043] 본 발명의 두 번째 양상에서, 본 발명의 목적은 (a) 하나 이상의 병든 1차 조직 샘플, 및 바람직하게는 하나 이상의 포유동물로부터의 병든 1차 조직 샘플에 상응하는 하나 이상의 건강한 1차 조직 샘플을 제공하는 단계; (b) MHC 리간드 펩티드를 상기 샘플로부터 단리하는 단계; (c) 상기 MHC 리간드 펩티드 상에서 HPLC-MS 분석을 수행하는 단계; (d) 단계 (c)에서 유래하는 각각의 신호에 대한 전구체 이온 신호 강도(면적)를 구하는 단계; (e) 상기 MHC 리간드 펩티드의 서열을 단편 스펙트럼 집단화 및 데이터베이스 검색에 의해 식별하여 상이한 실행과 샘플 사이의 면적을 분류하고, 반복 실행의 면적을 정규화하여 반복 실행 사이의 기술적인 수행/감도 차이를 보정하여 오차 추정치를 포함하는 샘플 당 각각의 펩티드의 평균 양을 구하는 단계; (f) 상기 서열을 MHC 대립유전자에 할당하여 대립유전자-특이적인 서열 아군을 생성하여 상이한 샘플을 비교하고, 대립유전자-특이적인 아군을 사용하여 상이한 샘플을 정규화하여 상이한 샘플 크기 또는 MHC 발현 수준을 설명하여 샘플 사이에서 비교가능한 상대적인 양을 구하는 단계; (g) 펩티드 재현성을 기반으로 데이터 품질 관리를 수행하여 식별된 서열의 총 수 및 면적에서 작은 편차를 갖는 서열의 수가 적어도 25, 바람직하게는 50, 더욱 바람직하게는 100임을 확인하는 단계; (h) 제시 프로파일 및 점수를 계산하여 MHC 리간드 펩티드의 잠재적인 과잉-제시를 결정하는 단계; (i) 통계적인 분석에 의해 식별 및 면적 추정치의 품질을 관리하는 단계; (j) 상기 하나 이상의 병든 1차 조직 샘플에서 검출한 값을 상기 하나 이상의 건강한 조직에서 구한 값과 비교하는 단계; 및 (k) 상기 MHC 리간드 펩티드를 정량화하는 단계를 포함하는, 1차 조직 샘플 상에서 MHC 리간드 펩티드의 식별 및 표지-부재 정량화를 위한 방법에 의해 해결된다.

[0044] 본 발명에 따른 바람직한 방법은 식별된 서열과 면적에서 작은 편차를 갖는 서열의 수가 질량 비교 분석에 포함된 상이한 샘플에 비해 상당히 낮지 않다(예를 들어 20% 미만, 예컨대 10% 또는 심지어 1%).

[0045] 본 발명에 따른 바람직한 방법은 상기 MHC 리간드 펩티드가 종양-관련된 펩티드(TAA) 및 질병-관련된 펩티드(DAA)로부터 선택된다.

[0046] 본 발명에 따른 또한 바람직한 방법은 과잉-제시된 및/또는 종양-특이적인 MHC 리간드 펩티드의 선택을 추가로 포함한다.

[0047] 본 발명에 따른 더욱 바람직한 방법은, 상기 질병의 샘플이 종양 샘플이거나 감염된 조직 샘플이다. 본 발명의 내용에 따르면, 환자를 비롯한 대상에서 직접 유래된 샘플은 "1차" 샘플이라고 하며, 이런 1차 조직 또는 종양 샘플은, 확립 종양 세포주의 샘플과 반대이다. 본 발명에 따른 방법에 적합하다면, 이 샘플은 신선한 상태로 또는 보존(예, 냉동 또는 준비)된 상태로 사용될 수 있다.

[0048] 바람직한 예로서, 충격 냉동된 (1차) 조직 샘플의 HLA 펩티드 혼합을 고체 조직에서 예를 들면 HLA-A, -B, -C-특정 항체 w6/32 또는 CNBr-활성화된 세파로스와 결합된 HLA-A*02-특정 항체 BB7.2를 이용하고 후에 산화 처리를 하고, 초 미세 여과를 이용한 면역 침적을 사용하여 획득할 수 있다. 다른 특정한 항체가 이 분야에서 알려진 HLA-대립유전자가 사용될 수 있으며 이의 예는 A*03에 대한 GAP-A3과 B-대립유전자에 대한 B1.23.2를 포함한다. 이 분야에서 잘 알려진 다른 포유동물에 대한 MHC-클래스 I 펩티드를 획득할 수 있는 대응하는 방법이 있다.

[0049] 본 발명에 따른 방법은 바이러스 또는 박테리아 감염과 같은 감염 질병에서 또한 사용될 수 있으며, 이의 예는 뎅기열, 에볼라, 마르부르크 바이러스, 결핵(TB), 수막염 또는 매독을 포함하며, 바람직한 방법은 감염 균 중에 항생제 내성이 있는 균주, 관절염과 같은 자가면역 질병, 말라리아 같은 기생충 감염과 MS 및 파킨슨 병과 같은 다른 병들을 포함한 면역 체계의 MHC 클래스 I에 관련된 질병에서 사용된다.

[0050] 표 1은 인간의 기생충 감염의 바람직한 예를 보여준다:

표 1

원충 생물				
생물 또는 병의 일반명	라틴어 이름	영향을 받는 몸의 부위	유병률	원천/ 전달 (보유소/ 벡터)
바베스열원충증	*Babesia B. divergens, B. bigemina, B. equi, B. microfti, B. duncani*	적혈구	뉴욕, 마타스 바인야드, 난투켓 (다른 종은 세계적 분포를 가지고 있다)	진드기교상
대장섬모충증	Balantidium coli	장관점막		
블라스토시스토시스	Blastocystis	창자	인구의 2 - 20%	감염된 인간 또는 동물의 대변에 오염된 음식 섭취
구포자충	Cryptosporidium	창자	널리 분포	
다이엔타모에비아시스	Dientamoeba fragilis	창자	산업화된 나라의 10%	대변에 오염된 물 또는 음식의 섭취
아메바증	Entamoeba histolytica	창자	열악한 위생 환경, 높은 인구 밀도와 열대 지역	대변-경구 감염
편모충	Giardia lamblia	작은 창자의 루멘	널리 분포	잠복상태의 낭을 가지고 있는 대변에 오염된 물 또는 음식의 섭취
포자충증	Isospora belli	작은 창자의 상피세포	전세계 분포-톡소포자충 또는 와포자충보다 덜 흔함	대변-경구 감염
리슈만편모충증	Leishmania	피부, 점막피부, 또는 내장	내장 리슈만편모충증 - 전세계 분포; 피부 리슈만편모충증 - 구세계; 점막피부 리슈만편모충증 - 신세계	플레보토무스 열 - 야간 플레보토무스 모래파리 몇몇의 종의 물림
일차 아메바 수막뇌염	Naegleria fowleri	뇌	희귀하나 치명적임	오염된 따뜻한 민물 또는 열악하게 염소 처리된 수영장, 또는 온천, 흙의 비강 흡입

[0051]

[0052]

말라리아	Plasmodium falciparum (사례의 80%), Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae	적혈구	열대지역 - 연당 2억5천만 사례	아노펠레스 모기, 밤에 물림
리노스포리듐증	Rhinosporidium seeberi	코, 코인두	인도와 스리랑카	공동 연못에서 목욕을 하는 도중 감염된 물질과 코 점막이 접촉을 했을 경우
톡소포자충 - 기생충 폐렴	Toxoplasma gondii	눈, 뇌, 심장, 간	널리 분포-모든 인구의 3분의 1	톡소플라스마 느린 분열 소체를 가지고 있는 요리되지 않은 또는 덜 요리된 돼지/양/염소고기의 섭취, 톡소플라스마 빠른 분열 소체를 가지고 있는 생우유의 섭취, 톡소플라스모시스의 난모세포를 포함한 하루 이상 된 고양이의 대변에 오염된 물, 음식 또는 흙의 섭취
트리코모나스 감염	Trichomonas vaginalis	여성 비뇨생식관(남성은 무증상)	740만 미국인	성매개 감염
수면병	Trypanosoma brucei	혈액 림프와 중추신경계	5만에서 7만명	야간 체체파리에 물림
샤가스병	Trypanosoma cruzi	대장, 식도, 심장, 신경, 근육과 혈액	멕시코, 중미, 남미, 천육백만에서 천팔백만	트라이아토마/레두비다에 - 곤충 벡터, 야간에 물림
헬민츠 생물(연충)				

[0053]

생물 또는 병의 일반명	라틴 이름	영향을 받는 몸의 부위	유병률	전달/벡터
구충증/구충	Ancylostoma duodenale, Necator americanus	폐, 작은 창자, 혈액	열대, 온난 기후, 습한 기후에서 흔함	L3 유충에 의한 피부 침투
아니사키스증	Anisakis	알레르기 반응	우발적인 숙주	날 생선, 오징어, 낙지의 섭취
회충 - 기생충 폐렴	Ascaris sp. Ascaris lumbricoides	창자, 간, 맹장, 이자, 폐, 뢰플러 증후군	열대, 아열대지방에서 흔함	
회충	Baylisascaris Baylisascaris procyonis, Baylisascaris melis, Baylisascaris transfuga, Baylisascaris columnaris, Baylisascaris devosi, Baylisascaris laevis			종에 따라 다름: 너구리, 오소리, 곰, 수달, 담비의 대변에 오염된 물질 섭취
	Brugia malayi, Brugia timori	림프절	아시아의 열대 지방	곤충
조충 - 조충감염	Cestoda	창자	희귀함	
간흡충증	Clonorchis sinensis; Clonorchis viverrini			
	Dicrocoelium dendriticum	쓸개	희귀함	개미의 섭취
거대신충 감염	Dioctophyme renale	신장(전형적으로 오른쪽)	전세계 분포	민물 날 생선의 섭취
열두조충증 - 조충	Diphyllobothrium latum	창자, 혈액	유럽, 일본, 우간다, 페루, 칠레	민물 날 생선의 섭취
기니충 - 메디나충증	Dracunculus medinensis	피하조직, 근육	수단	

포충증- 조충	Echinococcus granulosus, Echinococcus multilocularis, E. vogeli, E. oligarthrus	간, 폐, 신장, 지라	지중해 국가	중간 숙주로서, 육식동물의 대변에 오염된 물질의 섭취, 확정적인 숙주로서 초식동물의 덜 익힌 고기(내장)의 섭취
	Echinostoma echinatum	작은 창자	극동	날 생선, 날 연체동물 또는 달팽이 섭취
요충 - 요충증	Enterobius vermicularis, Enterobius gregorii	창자, 항문	널리 분포; 온난한 지방	
간 흡충 - 간질증	Fasciola hepatica, Fasciola gigantica	간, 쓸개	유럽, 아프리카, 호주, 미국, 오세아니아의 간질; 아프리카와 아시아에만 있는 거대간질, 두 개의 종에 감염된 인구 240만 명	민물 달팽이
비대흡충증- 창자흡충	Fasciolopsis buski	창자	동아시아 - 천만 명	감염된 수상 식물 또는 물의 섭취(중간 숙주: 양서류의 달팽이)
턱구충증	Gnathostoma spinigerum, Gnathostoma hispidum	피하조직 (피부 아래)	희귀함 - 남동 아시아	익히지 않은 또는 덜 익혀진 고기(예, 민물 생선, 닭고기, 달팽이, 개구리, 돼지고기) 또는 오염된 물의 섭취
왜소조충증	Hymenolepis nana, Hymenolepis diminuta			밀가루 딱정벌레, 딱정벌레, 바퀴벌레에 의해서 오염된 물질의 섭취
로아사상충증, 칼라바르부기	Loa loa filaria	결합 조직, 폐, 눈	서아프리카의 열대 다우림 - 천이백에서 천삼백 명	등에파 - 주간에 등에에 물림
만소넬라증, 사상충증	Mansonella streptocerca	피부의 피하조직		곤충
요코가와흡충증 - 창자충증	Metagonimus yokogawai		시베리아, 만주, 발칸국가, 이스라엘, 스페인	덜 익힌 또는 소금에 절인 생선

[0054]

[0055]

회선사상충증	Onchocerca volvulus, Onchocerciasis	피부, 눈, 조직	시원하고, 빠르게 흐르는 강가의 아프리카, 예멘, 중미와 남미	먹파리/가로무늬꽃등에에 주간 물림
중국 간흡충	Opisthorchis viverrini, Opisthorchis felineus, Clonorchis sinensis	담관	러시아의 150만명	감염된 날, 살짝 소금에 절인 또는 냉동 생선의 섭취
폐흡충증, 폐흡충	Paragonimus westermani; Paragonimus africanus; Paragonimus caliensis; Paragonimus kellicotti; Paragonimus skrjabini; Paragonimus uterobilateralis	폐	동아시아	날, 또는 덜 익혀진 민물게 가재 또는 다른 갑각류 숙주의 섭취
주혈흡충증 - 주혈흡충증 또는 달팽이열 (모든 종류)	Schistosoma sp.		아프리카, 카리브해, 남미 동부, 동아시아, 중동 - 2억 명	감염된 민물 달팽이에 오염된 물의 노출
장 주혈흡충증	Schistosoma mansoni	창자, 간, 지라, 폐, 피부	아프리카, 카리브해, 남미, 아시아, 중동 - 8300만 명	감염된 바이옴팔라리아 민물달팽이에 오염된 물의 피부 노출
방광 주혈흡충증	Schistosoma haematobium	신장, 방광, 요관, 폐, 피부	아프리카, 중동	감염된 불리누스 민물달팽이에 오염된 물의 피부 노출
일본 주혈흡충에 의한 주혈흡충증	Schistosoma japonicum	창자, 간, 지라, 폐, 피부	중국, 동아시아, 필리핀	감염된 온코멜라니아 민물달팽이에 오염된 물의 피부 노출
아시아 창자 혈흡충증	Schistosoma mekongi -		남동아시아	감염된 네오트리쿨라 아페르타 민물달팽이에 오염된 물의 피부 노출

스파르가눔증	Spirometra erinaceieuropaei			개 또는 고양이의 대변에 오염된 물질 섭취 (사람: 종말 숙주)
분선충증 - 기생충 폐렴	Strongyloides stercoralis	창자, 폐, 피부 (급성애벌레이행증)		피부 침투
무구조충	Taenia saginata	창자	세계적인 분포	덜 익힌 소고기의 섭취
갈고리촌충	Taenia solium			덜 익힌 돼지고기의 섭취
개회충증	Toxocara canis, Toxocara cati	간, 뇌, 눈 (톡소카라 카니스 - 내장애벌레이행증, 안구애벌레이행증)	세계적인 분포	무분별탐식증, 톡소카라 충란에 오염된 씻지 않은 음식, 덜 익힌 닭의 간의 섭취
선모충증	Trichinella spiralis, Trichinella britovi, Trichinella nelsoni, Trichinella nativa	근육, 안와골막부위, 작은 창자	개발도상국가에서의 향상된 영양 때문에 개발도상국가에서 더 흔함.	덜 익힌 돼지고기의 섭취
물놀이가려움증	Trichobilharzia regenti, Schistosomatidae			오염된 물에 피부 노출 (달팽이와 척추동물)
편충	Trichuris trichiura, Trichuris vulpis	큰 창자, 항문	전세계에서 세계적으로 흔함	우발적으로 섭취된 인간의 대변에 오염이 된 콩, 쌀과 여러 곡식 또는 흙 등과 같은 충란을 포함한 건조 물질
코끼리 림프 사상충증	Wuchereria bancrofti	림프계	열대와 아열대 지방	야간 모기 물림
다른 생물				
생물 또는 병의 일반명	라틴 이름	영향을 받는 몸의 부위	유병률	전달/벡터
기생충	Archiacanthocephala			
홀존증후군	Linguatula serrata	코인두	중동	덜 익힌 또는 날 림프절(예,

[0056]

				감염된 낙타와 버팔로의 고기)
구더기증	Oestroidea, Calliphoridae, Sarcophagidae	죽은 또는 살아있는 조직		
인간 쇠파리	Dermatobia hominis	피하 조직	중미와 남미	모기 또는 무는 파리
칸디루	Trichomycteridae	요도	아마존 강 유역	어류가 살고 있는 물에 적당한 보호 없이 소변을 보는 것

[0057]

[0058] 자가면역 질병의 예로서는 (공식적으로 자가면역 질병이라고 발표되지 않은 질병을 포함하여) 만성 폐쇄성 폐질환, 강직 척추염, 크론병(두 가지의 원인불명 염증성 창자병("IBD") 중의 하나), 피부 근육염, 당뇨병 제 1형, 자궁내막증, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랭-바레증후군(Guillain-Barre syndrome; GBS), 하시모토병, 화농땀샘염, 카와사키병, IgA 신장병, 특발성 저혈소판 자색반병, 사이질방광염, 홍반루푸스, 혼합결합조직병, 국소피부경화증, 중증 근육무력증, 발작수면, 신경 근육긴장증, 보통 천포창, 악성 빈혈, 건선, 건선 관절염, 다발성 근육염, 원발성 쓸개관간경화, 재발성 다발 신경병증, 류마티스 관절염, 정신분열병, 공피증, 쇠그렌 증후군, 강직 증후군, 관자동맥염("거세포동맥염"으로도 알려짐), 궤양대장염(두 가지의 원인불명 염증성 창자병("IBD") 중의 하나), 혈관염, 백반증과 베게너 육아종증을 포함한다.

[0059] 본 발명은 인간의 질병에 제한이 되어 있지 않고, 소, 돼지, 말, 바람직하게는 경주용 말, 고양이, 개, 쥐, 생쥐와 같은 설치류, 염소, 및 태즈매니언 데빌과 같은 암에 의해 소멸 위기에 처한 동물을 포함한 다른 가축 또는 포유동물에도 사용할 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 방법의 또 다른 바람직한 양태로는 품질의 관리는, 부분적으로나마, 자동 및/또는 수동 또는 가시적 검사를 포함한다.

[0061] 본 발명에 따른 방법의 또 다른 바람직한 양태는 (d) 체류 시간을 조정하여 서열에 대한 지식 없이 반복 실행에 상응하는 신호를 할당하고/하거나 서열에 대한 지식 없이 체류 시간 조정에 의해 상이한 샘플에 상응하는 신호를 할당하는 단계; (h) 유전자 당 하나 초과의 펩티드로부터 상대 제시 데이터를 실행하여 유전자-중심 과잉-제시 점수를 계산하는 단계; 및 (i) 스파이킹된 펩티드를 기반으로 품질 관리를 수행하는 단계로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단계를 추가로 포함한다.

[0062] 본 발명에 따른 방법은 가장 바람직하게는 생체외에서 수행한다.

[0063] 본 발명에 따른 또 다른 양태에서, 상기 방법의 단계는 청구범위 또는 위에서 표시된 순서대로 실행된다. 본 발명에 따른 방법의 또 다른 양태에서 상기 방법은 위에 표시된 바와 같은 단계로 이루어진다.

[0064] 본 발명에 따른 더욱 바람직한 양상에서 상기 방법은 하나의 합성기에서 또는 수동으로 상기 방법에 의해 식별되거나 정량화된 상기 하나 이상의 MHC 리간드 펩티드를 합성하는 단계를 포함한다.

[0065] 본 발명에 따른 바람직한 방법은 합성된 펩티드 또는 정화된 펩티드로서의 상기 MHC 리간드 펩티드의 면역원성을 시험하는 단계를 추가로 포함한다. 이에 관련한 방법은 당업자에게 알려져 있거나 이 분야의 문헌 또는 본원에 기술되어 있다.

[0066] 본 발명에 따른 더욱 바람직한 양상에서, 상기 방법은 개인적인 요법과 진단에 관한 것이다. 이를 위해서, 상기 샘플은 하나의 개인에서 분석이 되거나 유래되었다. 또한, 개인적인 MHC 리간드 프로파일, 바람직하게는 상기 MHC 리간드 펩티드에 기반한 식별된 및/또는 정량화된 개인적 질병-특이적인 MHC 리간드 프로파일은 기술된 바와 같은 본 발명에 따른 방법에 의해서 생성될 수 있다.

[0067] 본 발명에 따른 방법의 더욱 바람직한 양상에서, 상기의 식별된 서열과 작은 편차를 갖는 서열의 총 수는 5 초과, 바람직하게는 25 초과, 더욱 바람직하게는 50 초과, 가장 바람직하게는 100 초과이다.

[0068] 놀랍게도, 본 발명의 내용에 따르면, 본 발명자들은 단리되고 분석되며, 각 백신의 특정 후보인 항원성 종양 펩티드를 발현 분석과 정량화를 결합하여 쉽게 식별할 수 있다. 사상 처음으로, 본 발명자들에 의해서 제공된 이 새로운 접근 방법은 과잉-제시 펩티드 백신 후보를 암 또는 다른 감염된 조직과 다른 몇몇의 비암 조직 또는 비감염 조직 및 기관과 비교할 때 MHC-, 바람직하게는 HLA-제한, 펩티드 수준 직접 상대 정량화 식별과 선택을 가능하게 한다. 이는 액체 크로마토그래피-결합 질량 분석법 소유권 데이터 분석 정보 루트, 서열 식별의 연산법 결합, 스펙트럼 집단화, 이온 계산과 정규화를 이용한 표지-부재 차등 정량법을 개발하여 성취되었다. 이 접근 방법은 HLA 클래스 I 대립유전자에게 적용될 수 있으며, 일상적인 정량화는 이미 두 개의 매우 흔한 대립유전자와 몇몇의 다른 종양에 실행되었다. 광범위한 검토 확증 실험이 이 결과의 정확성을 확인하였다. 정규화 전략은 친화 크로마토그래피 용리의 웨스턴 블롯팅에 의한 베타-2 마이크로글로불린 수준의 특정에 의해 확인되었다.

[0069] 단백질 서열에서 HLA-결합 펩티드를 선택하는 예측 연산법을 기반으로 흔히 사용되는 "역면역학" 접근법은 이러한 접근법이 항원 처리의 중요한 단계를 무시하는 문제에 의해 방해를 받는다. 이런 방법으로 선택된 대부분의 펩티드는 1차 세포 또는 세포주에 생리학적으로 제시되지 않으며 이는 이들이 HLA에는 결합하지만 단백질로부터 처리되지 않기 때문이다.

[0070] 본 발명에 따른 방법의 다른 바람직한 양태에서, 상기 방법은 표지-부재 방법이며, 즉, 이는 표지의 사용을 제외하며, 특히 이때 표지는 예를 들면, 분석되는 펩티드에 대한 화학적인 펩티드를 말하는 것이다.

[0071] 본 발명을 따른 방법의 또 다른 바람직한 양태에서, 상기 방법은 녹아웃 세포, 세포주 또는 동물의 사용을 제외한다.

[0072] 본 발명을 따른 방법의 더욱 바람직한 양상에서, 단리된 MHC/HLA 리간드는 역상 크로마토그래피(예, 나노액퀴티 유피엘씨 시스템(nanoAcquity UPLC system), 워터스(Waters))에 의해 소수성에 따라서 분리되고, 그 후 LTQ-오비트랩(Orbitrap) 하이브리드 질량분광계(써모일렉트론(ThermoElectron))에 의해서 검출된다. 각 샘플은 다섯

번 반복의 LCMS 실행의 표지-부재 획득에 의해 분석된다. LCMS 데이터는 LCMS 조사와 탄뎀(Tandem)-MS (MS/MS) 데이터를 사용하여 분석된다. 데이터 분석은 증식선과 반복적인 샘플 획득을 위해 최적화된다.

[0073] 생성된 탄뎀-MS 스펙트럼은 msn_extract(써모사이언티픽(ThermoScientific))에 의해 추출되었으며 IPI 데이터베이스와 같은 단백질 데이터베이스에 대해 검색되었다. 단백질 데이터베이스는 이후에 HLA 펩티도믹 데이터에 대해 최적화된 문턱값을 사용하여 자동 품질 필터에 의해 확인되었다.

[0074] 향상된 민감도를 위해서, 내부 개발된 스펙트럼 집단화 연산법을 스펙트럼을 알려져 있는 IFL(이매틱스 프래그먼트 스펙트라 라이브러리(Immatics Fragment spectra Library))에서 수집되는 펩티드 MS/MS에 할당하는 데에 사용하였다. 새로운 LCMS 실행의 MS/MS 스캔은 IFL에 증식적으로 스캔 하나 하나씩 추가된다. 집단화는 스펙트럼 데이터에서 적응된 성장하는 k-평균 집단화 연산법을 사용한다.

[0075] 서열 식별과 단편 스펙트럼 집단화 때문에, 상이한 실행과 샘플에서의 같은 서열 또는 집락을 강도 값(면적) 별로 집단화하는 것이 가능해 졌다.

[0076] 상이한 샘플 사이의 동일한 HLA 대립유전자로 제한이 되는 펩티드 군의 비교는 사용가능한 경우 정제에 사용되는 공동 대립유전자-특이적인 항체를 기반으로 하거나 아니면 고정대 아미노산 패턴을 사용하는 공동 HLA-대립유전자로의 서열 지정을 기반으로 할 수 있다.

[0077] 각 신규한 데이터 세트는 데이터베이스(예: MySQL)에 통합되며 이는 사용가능한 단백질체학, 유전체학 및 문헌 데이터와 비교 참조된다.

[0078] LCMS 조사 데이터는 이온 계산과 높은 질량 정확도를 이용하여 독립적으로 분석된다. LCMS 신호와 통합 신호 면적을 추출하기 위해서, 예를 들면 수퍼히른(SuperHirn)(문헌[L. N. Mueller, O. Rinner, A. Schmidt, S. Letarte, B. Bodenmiller, M. Y. Brusniak, O. Vitek, R. Aebersold, and M. Muller. SuperHirn - a novel tool for high resolution LC-MS-based peptide/protein profiling. *Proteomics.* 7 (19):3470-3480, 2007])의 프로그램에서 사용되는 연산법을 사용할 수 있다.

[0079] 두 개의 모든 데이터 세트를 결합하여 각 식별된 펩티드의 정량화된 데이터가 생성되며, 이는 이후 중앙 경향 정규화에 기반한 이단 접근 방법을 통해, 기술적 반복(LC-MS 실행)과 종양과 건강한 조직을 비롯한 다른 조직 공급원의 상이한 샘플 사이의 차이를 고려하여 정규화될 수 있다(상기 참조). 예를 들면, 두 번째의 차이는 다른 MHC 발현 수준 또는 다른 시작 물질의 양에 따라서 유래할 수 있다.

[0080] 최대한의 신뢰성을 위해, 바람직한 양태에서는, 그들의 반복 면적 사이의 25% 미만, 바람직하게는 20% 미만의 작은 변동 계수(coefficient of variation; CV)를 가진 펩티드만이 처음 정규화 단계에서 고려된다.

[0081] 과잉-제시된 펩티드를 추출하기 위해서, 제시 프로파일은 정중 샘플 제시와 반복 변화를 나타내고 계산된다. 프로파일은 관심 있는 종양의 샘플을 정상 조직 샘플의 기준선과 나란히 병렬한다. 이 각 프로파일은 오류 발견율(FDR)(문헌[Y. Benjamini and Y. Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), Vol.57 (No.1):289-300, 1995])에 의한 다중 실험에 대해 조정하여, 선형 혼합 효과 모델(Linear Mixed-Effects Model)(문헌[J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, Sarkar D., R Core team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. 2008])의 p-값을 계산함으로써 과잉-제시 점수를 합할 수 있다.

[0082] 잠재적인 백신 후보로서 선택된 서열 지정과 펩티드의 면적은 수동 검사로 확인된다.

[0083] 본 발명의 더욱 바람직한 선택적 단계는 반복 LC-MS 실행 사이의 체류 시간의 정렬이며, 이는 첫 정상화 단계의 신호에 대한 서열 지정의 필요성을 피하기 위한 것이다.

[0084] 본 발명의 더욱 바람직한 선택적 단계는 상이한 샘플 사이의 체류 시간의 정렬이며, 이는 두 번째 정상화 단계의 신호에 대한 서열 지정의 필요성을 피하기 위한 것이다.

[0085] 본 발명의 더욱 바람직한 선택적 단계는 같은 유전자에서 하나 이상의 펩티드가 식별되었을 때 하나의 펩티드 과잉-제시 점수를 결합하여 유전자-중심 과잉-제시 점수 계산하는 단계이다.

[0086] 본 발명의 더욱 바람직한 선택적 단계는 정의된 수량의 샘플의 스파이킹된 분자를 기반으로 반복 정상화의 자동 품질 제어이다.

[0087] 항원 펩티드를 단리하고 이를 유전자 발현 및 세포의 제시와 이에 따른 종양 조직의 프로파일과 짝을 지음으로

써 많은 숫자의 가능한 면역반응 펩티드의 획득을 피할 수 있다. 오히려, 사실상 MHC-분자에 의해서 제시되고 면역반응 펩티드에 적당한 특정한 펩티드가 본 발명의 방법에 따라 식별된다.

[0088] 본 발명에 따른 방법으로 환자-특이적인 펩티드의 식별이 더욱 가능하다. 즉, 특정한 면역 반응을 일으키기 위해 백신에 쓰여질 특정한 펩티드를 정확하게 그 환자와 맞추는 것이 가능하다.

[0089] 예를 들면, 환자의 샘플을 받고 난 후 산업 실험실에서 현재의 방법에 의해 계통적이고 효율적으로 적당한 면역반응 펩티드를 식별하고, 그 후 펩티드를 진료소에 제공할 수 있다. 진료소는 이 후 이 펩티드를 합성하고 또 투여할 수 있다. 그러나, 실험실은 이 각각의 환자에게 적당한 펩티드를 식별하고 또 생산하는 것도 가능하다.

[0090] 따라서, 본 발명의 새로운 방법은 단순한 서비스 제공에서부터 식별된 면역 활성적인 펩티드의 제공까지를 포함한다.

[0091] 본 발명의 또 다른 양상은 면역활성적인 펩티드이며, 이때 펩티드는 본 발명에 따른 방법에 의해 식별되고/되거나 제조된다. 식별 후 이 펩티드는 선택적으로 특정하게 환자의 치료를 위해 제조할 수 있다.

[0092] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명에 따른 방법에 의해 제조된 하나 또는 그 이상의 펩티드를 포함하는 제약적인 구성에 대한 것이다.

[0093] 이 구성은 배합과 목표 질병에 따라 예를 들면 피하, 피부내 또는 근육내와 같이 비경구적으로 또는 경구적으로 적용될 수 있다. 이렇게 함으로써, 펩티드는 제약적으로 허용되는 운반체에 용해가 되거나 부유되고, 이 제약 구성은 또한 예를 들면 완충제, 결합제 등의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 펩티드는 예를 들면, 사이토킨과 같은 면역자극제와 함께 투여할 수도 있다.

[0094] 본 발명의 한 양상에 따르면, 펩티드는 종양 질병에 대해 그리고 종양 질병의 치료를 위한 약물을 제조하는 데에 사용될 수 있다.

[0095] 치료될 수 있는 종양 질병은 신장, 유방, 이자, 위, 고환 및/또는 피부 또는 AML과 같은 혈액 암을 포함한다. 이 목록은 예를 들기 위한 것이며, 본 발명의 적용을 제한하지 않는다.

[0096] 펩티드는 또한 종양 질병의 요법-코스에 대한 평가에 사용될 수도 있다.

[0097] 펩티드는 또한 다른 예방접종 또는 요법을 감시하는 데에 사용될 수도 있다. 따라서, 펩티드는 치료용뿐만이 아니라 진단용으로도 쓰일 수 있다.

[0098] 본 발명의 다른 양상은 항체를 생성하는 데 쓰이는 펩티드의 사용에 관한 것이다. 다클론 항체는 동물을 펩티드의 주사를 통해 면역화시키고, 이후에 면역글로불린을 정화하는 보통 방법에 의해 획득할 수 있다. 단클론 항체는 이 분야에서 잘 알려진 기준화된 프로토콜에 따라 생성될 수 있다.

[0099] 본 발명의 다른 양상은 본 발명에 따른 방법으로 분리된 펩티드를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 핵산 분자는 DNA- 또는 RNA-분자일 수 있으며, 이는 암의 면역요법에도 쓰일 수 있다. 본 발명의 한 양상에 의하면 이 핵산 분자는 예를 들면 발현 벡터에 의해 제공될 수 있다.

[0100] 본 발명의 다른 양상은 핵산 분자(예, 발현 벡터)에 의해 유전적으로 수정이 되어 본 발명에 따른 식별된 펩티드를 생성하는 세포에 대한 것이다.

[0101] 본 발명의 다른 양상은 펩티드가 본 발명에서 발표된 방법에 의해서 식별되고, 화학적으로 생체외 또는 생체내에서 합성되는 면역반응 펩티드의 제조 방법에 대한 것이다. 펩티드는 이 분야에서 잘 알려진 아미노산의 화학적인 결합을 포함하는 기존 방법에 의해서 생성될 수 있다.

[0102] 펩티드는 예를 들면 세포 없는 시스템과 같은 생체외 그리고 세포를 이용한 생체내에서 생성될 수 있다. 펩티드는 예를 들면 레반드로브스키(Lewandrowski) 등의 EP2111867에서 공개된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0103] 본 발명에 따른 방법에 대한 또 다른 양상은 말초 백혈구, 바람직하게는 T-백혈구의 단리된 항원 펩티드에 대한 반응성이 실험되는 또 하나의 단계를 포함한다.

[0104] 본 발명에 따른 방법에 대한 또 다른 양상은 단리된 항원 펩티드에 대한 말초 백혈구의 반응성이 백혈구에 의해서 생성된 γ-인터페론-mRNA 및/또는 사이토킨-mRNA의 측정에 의해서 이루어지는 것을 포함한다.

[0105] γ-인터페론- 또는 사이토킨-mRNA를 검출함으로써 바람직하게는 T-림프구를 포함하는 항원성 펩티드에 대한 백혈구의 특이적 반응성의 측정이 가능하다. 두 개의 물질이 대응 항원 펩티드에 의해서 활성화된 T-림프구에 의

해서 분비된다.

[0106] 본 발명에 따른 방법에 대한 또 다른 양상은, T-림프구의 존재가 검출되는 또 하나의 추가적인 단계가 실행되는 것이다. 이 방법에 의해, 단리되고 식별된 펩티드에 대한 T-림프구가 어느 정도까지 미리 환자에서 존재하는지를 특별히 검출하는 것이 가능하다. 이 단계를 실행함으로써 백신으로 단지 환자에게 이에 반응하는 T-림프구가 미리 존재하는 펩티드만을 적용할 수 있는 가능성이 있다. 이어서, 이 펩티드는 특정한 T-림프구를 활성화시킬 수 있다.

[0107] 본 발명에 따른 방법에 대한 또 다른 양상은, 백혈구를 항원-제시 분자와 항원성 펩티드의 가공된 결합체를 표지화시켜 특정한 이미 존재하는 T-림프구를 검출하는 것이다.

[0108] 11,000개 이상의 다른 펩티드가 70개의 암과 40개의 비암 샘플에서 본 발명자들에 의해 정량화되었다. 각 암의 과잉-제시 중요성 점수와 각 펩티드와 샘플에 대한 신뢰구간을 포함한 평균 제시 수준이 확립되었다. 종양 조직에서만 제시되는 펩티드와 비암 조직과 기관과 비교했을 때 종양에서 과잉-제시되는 펩티드가 식별되었다.

[0109] "펩티드"란 용어는 본원에서 대부분 인접한 아미노산 사이가 알파-아미노와 카르보닐 기의 펩티드 결합으로 이루어진 아미노산 잔기의 시리즈를 나타내는 데 쓰인다. 펩티드는 바람직하게는 9개의 아미노산으로 되어 있으며, 이는 적게는 8개의 아미노산 길이, 길게는 10, 11, 12, 13 또는 14개의 아미노산 길이로 될 수 있다.

[0110] "올리고펩티드"란 용어는 대부분 인접한 아미노산 사이가 알파-아미노와 카르보닐 기의 펩티드 결합으로 이루어진 아미노산 잔기의 시리즈를 나타내는 데 쓰인다. 이 안에 올바른 에피토프가 들어 있는 한, 본 발명에 있어서 올리고펩티드의 길이는 중요하지 않다. 올리고펩티드는 대부분 30개의 아미노산 잔기보다는 짧고, 14개의 아미노산보다는 길다.

[0111] "폴리펩티드"란 용어는 대부분 인접한 아미노산 사이가 알파-아미노와 카르보닐 기의 펩티드 결합으로 이루어진 아미노산 잔기의 시리즈를 나타내는 데 쓰인다. 이 안에 올바른 에피토프가 들어 있는 한, 본 발명에 있어서 올리고펩티드의 길이는 중요하지 않다. 펩티드 또는 올리고펩티드와 반대로, 폴리펩티드라는 용어는 약 30개 이상의 아미노산 잔기를 갖는 분자를 지칭할 때 쓰인다.

[0112] 만약 어떤 분자를 코딩하는 펩티드, 올리고펩티드, 단백질 또는 폴리뉴클레오티드가 면역 반응을 유도할 수 있다면, 이들이 "면역원성"을 갖고 있다고 한다(이들을 본 발명에서는 "면역원"이라고 칭한다). 본 발명의 경우, 면역원성이란 보다 구체적으로 T-세포 반응을 유도하는 능력으로 정의된다. 따라서, "면역원"이란 면역 반응을 유도하는 능력이 있는 분자를 말하며, 본 발명의 경우, T-세포 반응을 유도할 수 있는 것을 말한다.

[0113] T-세포 "에피토프"는 MHC 클래스 I 수용체에 결합되어 삼성분복합체(MHC 클래스 I 알파 쇄, 베타-2-마이크로글로불린 및 펩티드)로 이루어져 있으며 짝이 맞는 MHC/펩티드 복합체와 적당한 친화력을 갖고 결합하는 T-세포 수용체에 의해 인식될 수 있는 짧은 펩티드를 필요로 한다. MHC 클래스 I 분자와 결합하는 펩티드는 전형적으로 8개에서 14개의 아미노산의 길이로 이루어져 있으며, 가장 전형적으로는 9개의 아미노산으로 이루어져 있다.

[0114] 인간에는 MHC 클래스 I 분자를 코딩하는 세 개의 유전자 좌가 있다(인간의 MHC-분자는 또한 지정된 인간 백혈구 항원이다(HLA)): HLA-A, HLA-B 및 HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 및 HLA-A*024는 유전자 좌에서 발현할 수 있는 다른 MHC 클래스 I 대립유전자의 예이다.

[0115] **치료를 위한 면역요법 방법**

[0116] 면역 반응의 자극은 숙주 면역 체계에 의하여 이물질이라고 인식이 되는 항원의 존재에 의존한다. 종양-관련된 항원 및 질병 항원의 존재의 발견은 숙주의 면역 체계를 이용하여 종양 성장을 매개하는 가능성을 불러 일으켰다. 체액 및 세포 면역 체계를 이용한 여러 가지의 기전이 현재 암 면역요법을 위해 연구되고 있다.

[0117] 세포 면역 반응의 특정한 요소는 특이적으로 종양 세포를 인식하고 파괴하는 능력을 갖고 있다. 종양-침윤 세포 인구 또는 말초 혈관에서 단리된 세포독성 T-세포(CTL)는 이러한 세포들이 암에 대한 면역 방어에 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 특히 CD8-양성 T-세포(T-$CD8^+$)는 주조직 적합 복합체(MHC)의 클래스 I 분자에 결합되어 있는 펩티드를 인식한다. 이 펩티드는 보통 8개 내지 12개의 아미노산으로 되어 있으며 세포질에 위치하고 있는 펩티드 또는 결함 리보좀 생성물(DRIPS)로부터 유래하였으며, 이는 이 반응에 중요한 역할을 한다. 인간 MHC-분자는 역시 인간 백혈구 항원(HLA)으로 알려져 있다.

[0118] MHC 클래스 I 분자는 거의 모든 핵을 갖고 있으며, 대부분 내인성, 세포질 또는 핵 단백질, DRIPS, 및 더 큰

펩티드의 단백질 분해 절단에 의해서 생성되는 펩티드를 제시하는 세포에서 찾을 수 있다. 그러나, 엔도솜 구획에서 또는 외인 공급원에서 근거하는 펩티드도 종종 MHC 클래스 I 분자에서 찾을 수 있다. 이 비전형적인 클래스 I 제시의 방법은 교차-제시라고 알려져 있다.

[0119] 종양-특이적인 또는 종양-관련된 항원으로 세포독성 T-림프구에 의해 인식되고 치료의 목적으로 쓰이려면, 특정한 조건이 성취 되어야 한다. 항원은 대부분 종양 세포에서 발현되고 비교시 적은 양만이 정상 건강 조직에서 발현되어야 한다. 더욱 더 바람직한 것은 이 항원이 한 가지 형의 종양에서만 존재하며, 또한 높은 농도(즉, 세포 당 펩티드 복사본의 숫자)로 존재한다. 종양-특이적인 및 종양-관련된 항원은 정상 세포가 종양 세포로 전환하는 데에 있어서 이의 기능에 인해, 즉, 세포 주기 제어 또는 세포 자멸사 등의 기능에 의해, 직접적으로 관련이 있는 단백질에서 유래한다. 추가적으로 전환의 직접적인 원인이 되는 이들 단백질의 하류 목표가 상향 조정됨에 따라서 간접적으로 종양과 관련될 수 있다. 이러한 간접적인 종양-관련된 항원은 백신 접근의 목표가 될 수 있다. 두 경우 모두 에피토프가 항원의 아미노산에 존재하는 것이 중요하고, 따라서 이 종양-관련된 항원에서 파생된 펩티드("면역원 항원")가 생체외 또는 생체내 T-세포 반응을 일으킬 수 있다.

[0120] 근본적으로, MHC 분자와 결합할 수 있는 어떤 펩티드도 T-세포 에피토프의 기능을 가질 수 있다. 생체외 또는 생체내 T-세포 반응 유도의 조건은 T 세포가 상응하는 TCR과 함께 존재하며, 이 특정한 에피토프에 대한 면역적인 내성이 없는 것이다. 따라서, TAA는 종양 백신 개발의 출발 시점이다. TAA를 식별하고 특성화하는 방법은 환자 또는 건강한 대상에서 단리할 수 있는 CTL의 사용에 근거하거나 종양과 정상 조직 사이의 차별된 전사 프로파일 생성 또는 차별된 펩티드 발현 패턴 생성에 근거한다(문헌[Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27]). 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주, 또는 선택적으로 이러한 조직 또는 세포주에서 발현되는 유전자들의 식별은 이러한 유전자로부터 전사된 항원의 면역 치료에서의 사용에 대한 정확한 정보를 제공하지 않는다. 이는 이러한 항원의 에피토프의 소인구 집단만이 이러한 적용에 적당하기 때문이며 이는 상응하는 TCR을 갖는 T 세포가 존재해야만 하며 이 특정한 에피토프에 대한 면역적 내성이 없거나 낮은 수준으로 존재해야 하기 때문이다. 따라서 과잉 발현되었거나 기능적인 T 세포가 있는 MHC 분자에 대해 제시된 선택적으로 발현된 단백질 펩티드만을 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능적인 T 세포는 특이적인 항원이 클론에 의하여 팽창할 수 있으며 작동 세포의 기능을 실행할 수 있는 T 세포("작동 T 세포")로서 정의된다.

[0121] T-조력 세포는 CTL의 항암 면역 작동 기능을 전체적으로 지배하는 데에 중요한 역할을 한다. TH1 유형의 T-조력 세포 반응을 일으키는 T-조력 세포 에피토프는 표면에 암 관련 펩티드/MHC 복합체를 나타내는 암세포를 향한 세포살해 기능을 포함하는 CD8-양성 살해 T 세포의 작동 기능을 유발한다. 이런 방법으로 암 관련 T-조력 세포 펩티드 에피토프는 홀로 또는 다른 암 관련 펩티드와 함께 항암 면역 반응을 유발하는 예방 주사의 활성적인 제약 성분으로 쓰일 수 있다.

[0122] 이 CD8과 CD4 의존의 두 종류의 반응이 항암 작용에 함께 상승효과를 발휘하면서 공헌하기 때문에, CD8-양성 CTL(MHC 클래스 I 분자) 또는 CD4-양성 CTL(MHC 클래스 II 분자)의 종양-관련된 항원의 식별과 성질 부여는 종양 백신을 개발하는 데에 중요하다. 따라서 본 발명의 목적은 두 가지 클래스의 MHC 복합체에 결합하는 펩티드를 포함하는 결합 펩티드의 구성을 제공하는 것이다.

[0123] 암 치료에 관련된 심각한 부작용과 비용을 고려할 때 암의 예후를 발전시키는 더 향상된 진단 방법이 절실히 필요하다. 따라서, 다른 암, 특히 위암의 생물 표지자를 표시하는 인자를 식별할 필요가 있다. 더 나아가, 암, 특히 위암의 치료에 사용될 수 있는 인자를 식별할 필요가 있다.

[0124] 더 나아가 잔여 종양이 제자리에 남겨져 있거나, 국소적으로 진행된 근치 전립샘절제술 후 생화학적으로 재발한 위암 환자를 위한 현재 확립된 치료 방법이 없다. 이환율을 낮추고 이를 현재 사용이 가능한 치료 방법과 비교했을 때 효능이 비교가능한 새로운 치료 방법이 바람직하다.

[0125] 본 발명은 본 발명의 펩티드를 과잉 발현하는 위암과 다른 종양을 치료할 수 있는 펩티드를 제공한다. 이 펩티드는 질량 분석법에 의해 자연적으로 HLA 분자에 의해 1차 인간 위암 샘플에서 제시가 되는 것으로 보여졌다(실시예 1 및 도 1 참조).

[0126] 펩티드가 유도되는 유전자는 정상 조직과 비교했을 때 위암, 신장세포암, 대장암, 비소세포 폐암, 샘암종, 전립선암, 양성 종양, 악성 흑색종에서 강하게 과잉 발현이 되는 것으로 보여졌으며(실시예 2, 도 2 참조), 이는 펩티드의 종양-관련도를 높게 나타냈다. 즉, 이 펩티드는 정상 세포에서는 제시되지 않고, 종양에서 높은 수준으로 발현된다.

[0127] MHC/HLA-결합 펩티드는 특히 T 림프구/T 세포에 의해 면역 시스템에 의하여 인식된다. T 세포는 식별된 HLA/펩

티드 결합체(예, 유도된 펩티드를 제시하는 위암 세포)를 파괴할 수 있다.

[0128] 본 발명은 다음의 표와 서열 목록과 함께 다음에 국한되지 않는 실시예를 사용하여 더욱 설명될 것이다.

[0129] 서열 번호 1에서 27까지는 표 3과 실시예의 펩티드를 보여준다.

[0130] **실시예**

[0131] 하기 실시예는 TAA/암의 맥락에서 본 발명의 방법을 기술한다. 본 발명은 이 실시예에 국한되지 않으며, 이는 본 발명의 바람직한 양태일 뿐이다. 본 발명의 목적을 위해 본원에 인용된 모든 참조 문헌은 그 전문이 본원에 참고로서 포함된다.

[0132] **방법**

[0133] **조직 샘플**

[0134] 환자의 종양과 정상 조직은 여러 개의 다른 병원에서 분석되는 종양의 종류에 따라 획득되었다. 모든 환자들의 서면 통지 동의는 수술 전에 받았다. 조직은 수술 직후 액화 질소에 충격-동결되었고 TUMAP가 -80℃에서 분리될 때까지 저장되었다.

[0135] **조직 샘플에서 HLA 펩티드의 단리**

[0136] HLA-A, -B, -C-특이적인 항체 W6/32, HLA-A*02-특이적인 항체 BB7.2, CNBr-활성화된 세파로오스, 산성 치료, 및 한외여과를 이용한 약간 개질된 프로토콜에 따라 충격-동결된 조직 샘플의 HLA 펩티드 풀이 면역 침전에 의해 고체 조직에서 얻어졌다. 이 분야에서 알려진 A*03에 대한 GAP-A3, B-대립유전자에 대한 B1.23.2와 같은 다른 HLA-대립유전자와 다른 특이적 항체가 또한 사용될 수 있다.

[0137] **질량 분석법**

[0138] HLA 펩티드 풀은 역상 크로마토그래피(나노액퀴티 유피엘씨 시스템, 워터스)에 의한 소수성에 따라 분리되고, 녹여서 분리된 펩티드는 ESI 공급원을 갖춘 LTQ-오비트랩 하이브리드 질량 분석기(써모일렉트론)에 의해 분석되었다. 펩티드의 풀은 1.7 ㎛ C18 반대-단계 소재(워터스)가 있는 분석적 융합-실리카 마이크로-모세관 컬럼(75 ㎛ i.d. x 250 mm)으로 분 당 400 nL의 유동 속도를 적용하여 직접 로딩된다. 이후에, 펩티드는 1 분에 300 nL 유동 속도로 10% 내지 33%의 2 단계 180 분 이원 구배를 이용해서 분리된다. 구배는 용매 A(물중 0.1% 포름산) 및 용매 B(아세토니트릴중 0.1% 포름산)로 이루어졌다. 금으로 코팅된 유리 모세관(피코팀(PicoTip), 뉴 옵젝티브(New Objective))는 나노ESI 출처의 도입을 위해 사용되었다. LTQ-오비트랩 질량 분석기는 TOP5와 TOP3 전략을 사용하여 데이터 종속 모드로 운영되었다. 간단하게, 스캔 주기는 오비트랩(TOP3에서는 R=30,000, TOP5에서는 R=60,000)의 높은 질량 정확성이 있는 전체 스캔으로 시작되었고, 전에 선택된 이온의 동적 제외가 있는 5개의 가장 풍부한 전구체 이온(TOP5) 또는 전에 선택된 이온의 동적 제외가 있는 3개의 가장 풍부한 전구체 이온(TOP3) 오비트랩(R = 7500)의 MS/MS 스캔이 행해 졌다.

[0139] **데이터 분석**

[0140] 각 샘플에 대해서, TOP5 모드에서 2개 및 TOP3 모드에서 3개의 5개의 표지-부재 반복 LCMS 실행이 획득되었다. LCMS 데이터는 자체 개발된 LCMS 조사와 탄뎀-MS(MS/MS) 데이터를 조사하는 분석의 정보 루트를 통해서 처리되었다. 소유권 데이터 분석은 증가하는 복제 획득 설정을 위해, 및 현존하는 기준 단백질체학 소프트웨어로는 만족스럽게 처리가 되지 않는 소유권 데이터에 대해 최적화되고 적용되었다. 각각의 새로운 데이터 세트는 이매틱스 디스커버리 데이터베이스(Immatics Discovery database; MySQL)에 의해 통합되었다. 모든 데이터는 이용가능한 단백질체학, 유전체학 및 문헌 데이터와 교차-참조된다.

[0141] **서열 식별**

[0142] 탄뎀-MS에 의해 생성된 스펙트럼은 msn_extract(써모사이언티픽)에 의해 추출되며 IPI 데이터베이스에 대해 시퀘스트(Sequest)를 이용하여 검색된다. 단백질 데이터베이스는 이후에 HLA 펩티도믹스 데이터에 대해 최적화된 문턱값을 사용하여 자동 품질 필터에 의해 확인된다. 흥미로운 펩티드 백신 후보는 수동 검사에 의해 확인된다.

[0143] 식별된 펩티드 서열은 생성된 자연 펩티드 단편 패턴과 합성 서열-동등 참조 펩티드의 단편 패턴을 비교함으로써 확인된다. 도 1은 종양 조직에서 얻어진 MHC 클래스 I 관련 펩티드 CDC2-001과 UPLC 시스템의 용리 프로파

일의 예시적인 스펙트럼을 나타낸다.

[0144] 향상된 민감도를 위해서, 내부 개발된 스펙트럼 집단화 연산법이 스펙트럼을 알려져 있는 IFL(이매틱스 프래그먼트 스펙트라 라이브러리)에서 수집되는 펩티드 MS/MS에 할당을 하는 데에 사용되었다. 새로운 LCMS 실행의 MS/MS 스캔은 IFL에 증식적으로 스캔 하나 하나씩 추가된다. 집단화는 스펙트럼 데이터에서 적응된 성장하는 k-평균 집단화 연산법을 사용한다. 스캔 사이의 각 짝의 유사성은 무퀘스트(MuQest)(써모사이언티픽)에 의해서 측정된다. 각 집단은 공통 스펙트럼에 의해 표현된다. 이 공통 스펙트럼은 스펙트럼 중복성을 제거하여 하류 분석의 속도를 빠르게 하기 위해서 사용될 수 있다. 공통 스펙트럼이 실험 MS/MS 스펙트럼의 평균을 사용하여 얻어지기 때문에, 전구체 질량은 더 정확하고, 스펙트럼은 더 낮은 잡음을 보인다.

[0145] **상대적인 TUMAP 정량화**

[0146] LCMS 조사 데이터는 이온 계산과 높은 질량 정확도를 이용하여 독립적으로 분석된다. LCMS 신호와 신호 면적(이온 계산)을 구하기 위해서 수퍼히린(이티에이치 취리히(ETH Zurich)) 프로그램이 사용되었다. 따라서, 각 식별된 펩티드는 정량 데이터와 관련될 수 있고, 따라서 이는 샘플과 조직 간의 상대적 정량화를 허락한다.

[0147] 기술적 및 생물학적 복제 사이의 편차를 고려하여 중앙 경향 정규화에 기반한 이단 접근 방법이 사용되었다. 이 정규화는 가장 높은 측정된 신호가 하우스-키핑(house-keeping) 펩티드에서 나오는 것이라고 가정하며 작은 부분의 과잉-제시 펩티드는 데이터의 중앙 경향에 상당한 영향을 끼치지 않는 것을 가정한다. 첫 번째 정규화 단계에서 같은 샘플의 복제는 각각 관련된 반복 세트에 있는 각 펩티드에 대한 평균 제시를 계산함으로써 정규화된다. 평균은 각 펩티드와 LC-MS 실행의 정규화 인자를 전산화하기 위해 사용된다. 모든 펩티드의 결과의 평균은 실행별 정규화 인자를 보여 주며, 이는 이 특정한 LCMS 실행의 모든 펩티드에게 적용된다. 이러한 접근 방법은 예를 들어 반복 실행 사이의 다른 주사량에 의한 체계적인 샘플 내 변이를 제거할 수 있도록 한다.

[0148] 복제 면적 사이의 25% 미만의 변동 계수(coefficient of variation; CV)를 가진 펩티드만이 다음 정규화 단계에서 고려된다. 정의된 제제 항체(예, BB7.2)의 모든 샘플에 대해 다시 각 펩티드의 평균 제시가 계산된다. 평균은 각 펩티드와 샘플에 대한 정규화 인자를 전산화하기 위해 쓰인다. 모든 펩티드의 결과의 평균은 실행별 정규화 인자를 보여 주며, 이는 이 특정한 샘플의 모든 펩티드에게 적용된다. 다른 조직 무게 또는 MHC 발현 수준에 의한 체계적인 샘플내 변이가 제거된다.

[0149] 과잉-제시된 펩티드를 추출하기 위해, 평균 샘플 제시와 복제 변이를 보여주는 각 펩티드에 대한 제시 프로파일이 계산된다. 프로파일은 관심이 있는 종양 샘플을 정상 조직 샘플의 기준선과 나란히 병렬한다. 이 각 프로파일은 오류 발견율(FDR)에 의한 다중 실험에 대해 조정하여, 선형 혼합 효과 모델(GNU R)의 p-값을 계산함으로써 과잉-제시 점수 통합을 할 수 있다. 모든 펩티드를 p-값에 따라 등급 순위로 정렬하는 것은 제시의 관점에서 볼 때 가장 가망 있는 백신 후보를 산출하는 방법이다.

[0150] **베타-2 마이크로글로불린의 정량화**

[0151] 베타-2 마이크로글로불린(b2m)은 겔에 로딩된 단백질의 양을 정규화하기 위해 베타-엑틴을 참조 단백질로 사용하는 웨스턴 블롯팅에 의해서 정량화되었다.

[0152] **결과**

[0153] **세포주를 사용한 TUMAP 정량화의 개발**

[0154] 정보 루트를 확립하기 위해서, 다른 방법이 적용되었다. 우선 2 및 20%의 희석을 사용한 샘플 변이를 모의하기 위한 JY 세포주를 사용한 희석 실험이 실행되었다. 각 희석된 샘플에 대해 3개의 복제가 만들어졌다. 실행 간 및 샘플 간 편차에 대한 정규화 후 두 샘플 간의 정규화 인자는 9.95였다.

[0155] 두 번째의 실험에서 또 하나의 JY 샘플이 100, 10 및 1 fmol의 희석액 중 트립신 소화된 매스프렙(MassPREP, 상표)(워터스) 단백질 믹스(포스포릴라제 b, BSA, 소 헤모글로빈, 에놀라제, ADH)에 의해 스파이킹되었다. 다시, 각 농도에 대한 3개의 복제가 만들어졌다. 데이터 분석 후, 알려진 스파이킹된 펩티드의 평균 비율은 1:100 fmol 샘플, 100:10 fmol 및 10:1 fmol과 비교할 경우 각각 90, 8 및 11였다.

[0156] 또한, 펩티드 식별의 숫자와 정확성과 세팅의 정량화 정확성을 최대화하기 위한 다른 획득 방법이 실험되었다. 이 목적을 위해, 약 50개의 다른 MS/MS 모드에서의 JY 샘플의 복제품을 실험했다.

[0157] **원발성 종양과 정상 조직**

[0158] 상대적으로 정량화된 TUMAP의 예가 다음에 나와있다.

[0159] **실시예 1**

[0160] 교모세포종 백신 칵테일의 일부인 PTPRZ1(티로신 포스파타아제, 수용체-유형, Z 폴리펩티드 1)의 HLA 클래스 I의 제시 프로파일이다. 빨간 색으로 보여지는 것은 다른 기관의 보통 샘플과 비교했을 때 종양 샘플이다. 각각의 막대는 이 펩티드에 대한 정규화된 정중 샘플 면적을 표시하며, 오류 막대는 최소와 최대 반복 면적을 보여주며 이는 측정 편차의 지표이다.

[0161] **실시예 2**

[0162] **CDC2-001**

[0163] CDK1에 의해 코딩되는 위암 관련 TUMAP의 제시 프로파일. 도 5 참조.

[0164] **실시예 3**

[0165] **ASPM-002**

[0166] ASPM에 의해 코딩되는 위암 관련 TUMAP 제시 프로파일. 도 6 참조.

[0167] **다른 조직의 MHC 단백질 발현**

[0168] 본 발명자는 MHC 발현 수준의 범위를 알기 위해 베타-2-마이크로글로불린을 MHC 알파 쇄/베타-2-마이크로글로불린/펩티드 결합체의 대표 결합체로서 이용하여 다른 조직의 MHC 분자의 발현을 분석하였다(도 7 참조).

[0169] 상대적인 MHC 발현(b2m/베타 액틴)은 정중값 주변에서는 단지 5배 사이에서 변화한다. b2m/베타 액틴 = 0.52. 따라서, 이는 다른 조직 간에 상당히 일관적이다. 이 범위는 질량 분석법 데이터에 기반한 정규화를 실행하기 위해 충분히 좁은 범위이다.

[0170] MHC 분자량의 정규화는 웨스턴 블롯팅(WB)과 비교한 질량 분석법을 기반으로 한다.

표 2

WB-기반과 MS-기반 MHC의 정규화의 비교

[0171]

	TC001T	RCC2216N	RCC2216T	RCC2223N	RCC2223T
상대적 WB 정규화 인자	0.07	2.03	2.58	1.00	0.17
상대적 MS 정규화 인자	0.05	2.53	1.11	1.00	0.30
조직 무게[g]	3.56	0.29	0.89	0.65	1.54
MS 정규화를 위한 ID	119	540	47	908	877

[0172] 요약하면, MS-와 WB-기반 정규화는 아주 유사하다; 이들 정규화 방법 간의 편차는 단지 약 2 정도이다. 더 많은 식별자가 이 계산에 사용된다면 MS 정규화 인자의 정확도는 더 상승한다. 따라서, MS 기반 정규화는 1차 조직 면역 침전물에서 획득된 MHC 분자의 변화하는 양을 보상할 수 있는 신뢰할 수 있는 방법이다.

[0173] **품질 보증**

[0174] 계속적으로 정량화 성능을 확인하기 위해서, 우리는 체류 시간과 신호 면적의 품질 보증을 위한 7개의 합성 비인간 펩티드를 확립하고 도입하였다.

[0175] 각 샘플이 5개의 복제품에 의해 분석되기 때문에, 펩티드 정량화는 측정 문제를 검출하는 편차를 추정하는 것과 함께 이루어진다. 동시에, 본 발명자는 검증을 하는 펩티드의 데이터에 대한 일관성과 정확성을 확인하기 위한 수동 품질 보증 절차를 확립하였다.

[0176] **펩티드의 면역원성 결정과 발현 프로파일의 예**

[0177] **본 발명의 펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 프로파일**

[0178] 대부분의 펩티드가 다른 많은 세포 유형에서도 발현되는 보통 세포 단백질에서 유도되기 때문에, 종양 세포의

표면에 MHC 분자에 의해서 제시가 되더라도 식별된 모든 펩티드가 면역 요법에 적당한 것은 아니다. 이 중에 작은 숫자만의 펩티드가 종양-관련되었으며, 이는 이들이 파생된 종양을 높은 인식 특이성을 갖고 T 세포를 유도할 수 있다. 이러한 펩티드를 식별하고 백신에 의한 자가 면역의 위험을 최소화하기 위해, 본 발명자들은 종양 세포에서 대부분의 보통 조직과 비교했을 때 과잉 발현되는 단백질로부터 유도된 펩티드에 초점을 맞추었다.

[0179] 이상적인 펩티드는 종양에서만 유일한 단백질에서 유도된 것이며 이는 다른 모든 조직에서 존재하지 않는다. 이상적인 발현 프로파일과 비슷한 유전자에서 파생된 펩티드를 식별하기 위해서 식별된 펩티드는 이들이 유도된 단백질과 유전자로 지정되고, 이들 유전자의 발현 프로파일이 생성되었다.

[0180] **RNA 공급원과 제조**

[0181] 외과적으로 제거된 조직 검사물이 두 군데 임상 센터에서 각 환자에게 서면 통지 동의를 받은 후 제공되었다(실시예 1 참조). 종양 조직 검사물은 즉시 액화 질소를 이용하여 수술 직후에 동결되었으며, 이어서 액체 질소 내에서 약절구를 이용하여 균질화되었다. 전체 RNA가 이 샘플과 TRI 시약(앰비온(Ambion), 독일 다름스타트 소재)에 의해 준비가 되었고 이는 RNeasy(퀘아겐(QIAGEN), 독일 힐덴 소재)에 의해서 정제되었고, 이 두 가지 방법을 제조업자의 프로토콜에 따라 수행했다.

[0182] 건강한 인간 조직의 전체 RNA는 시판중이다(앰비온, 영국 헌팅돈 소재; 클론텍(Clontech), 독일 하이델베르그 소재; 스트라타젠(Stratagene), 네덜란드 암스테르담 소재; 바이오체인(BioChain), 미국 캘리포니아주 헤이워드 소재). 몇몇의 개인에서 (2명 내지 123명) RNA가 혼합되었고, 따라서 각 개인으로부터 얻어진 RNA가 같은 비율로 섞였다. 4명의 건강한 자원봉사자로부터 혈액 샘플이 채취되고 이로부터 백혈구가 획득되었다.

[0183] 모든 RNA 샘플의 양과 질은 RNA 6000 피코 랩칩 키트(Pico LabChip Kit)(아길렌트(Agilent))에 의해 아길렌트 2100 바이오애널라이저(Bioanalyzer)(아길렌트, 독일 월드브론 소재)로 확인되었다.

[0184] **마이크로어레이 실험**

[0185] 유전자 발현 분석의 모든 종양 및 정상 조직 RNA 샘플은 아피메트릭스 휴먼 게놈(Affymetrix Human Genome) (HG) U133A 또는 HG-U133 플러스 2.0 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(아피메트릭스, 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재)를 이용하여 행해졌다. 모든 과정은 아피메트릭스 사용 설명서에 의해 행해졌다. 간단히, 두 가닥 cDNA는 수퍼스크립트(SuperScript) RTII(인비트로겐(Invitrogen)) 및 올리고-dT-T7 프라이머(MWG 바이오텍(Biotech), 독일 에버스베르그 소재) 및 RNA 5 내지 8 ㎍을 이용하여 사용 설명서에 따라 합성되었다. 생체외 전사는 U133A 어레이시, 바이오어레이 하이 일드 RNA 트랜스크립트 라벨링 키트(BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit)(엔조 다이아그노스틱스 인코포레이티드(ENZO Diagnostics, Inc.), 미국 뉴욕주 파밍데일 소재)가 사용되었고, U133 플러스 2.0 어레이시, 젠칩 IVT 라벨링 키트(GeneChip IVT Labelling Kit) (아피메트릭스)가 사용되었으며, 이는 cDNA 단편화, 혼성화, 스트렙타비딘-피코에리트린 및 바이오티닐화된 항-스트렙타비딘 항체(몰레큘라 프로브스(Molecular Probes), 네덜란드 라이덴 소재)에 의한 염색 과정을 거쳤다. 영상은 아길렌트 2500A 젠어레이 스캐너(GeneArray Scanner)(U133A) 또는 아피메트릭스 젠-칩 스캐너 3000(U133 플러스 2.0)에 의해서 스캔되었으며 데이터는 GCOS 소프트웨어(아피메트릭스)에 의해서 기본 매개 변수를 사용하여 분석되었다. 표준화를 위해, 아피메트릭스에서 제공된 100개의 관리 유전자가 사용되었다. 상대적인 발현 가치는 소프트웨어에서 제공된 정상 신장 샘플의 신호 로그 비율에 의해 계산되었으며 이는 임의로 1.0으로 설정되었다.

[0186] 도 2에서 보여지는 것처럼 본 발명의 소스 유전자의 발현 프로파일은 위암에서 높은 수준으로 과잉 발현된다.

[0187] **실시예 3**

[0188] **IMA941 MHC 클래스 I 제시 펩티드의 생체외 면역원성**

[0189] IMA941에 포함된 본 발명의 TUMAP의 면역원성에 대한 정보를 얻기 위해서 문헌[Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhring, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978]에 의해서 이미 설명된 잘 설립된 생체외 자극 플랫폼을 사용한 조사를 수행했다. 이 방법으로, 본 발명자는 실험된 32개의 HLA-A*2402 제한 TUMAP의 면역원성을 보여주었으며, 또한 펩티드가 인간 CD8+ 전구체 T 세포에 대한 T-세포 에피토프라는 것을 밝혔다(표 3).

[0190] **생체외 CD8+ T 세포의 프라이밍**

[0191] 펩티드-MHC 결합체(pMHC) 및 항-CD28 항체와 로딩된 인공 항원제시세포(aAPC)에 의해 생체외 자극을 실행하기 위해서, 본 발명자는 우선 CD8 T 세포를 블러드 뱅크 튀빈겐(Blood Bank Tuebingen)에서 획득한 건강한 공여자의 HLA-A*24 백혈구 성분 채집술 생산물 또는 HLA-A*2 백혈구 연층에서 단리했다.

[0192] CD8 T 세포는 직접적으로 영양강화되었거나 PBMC(말초 혈관 단핵세포)가 먼저 기본 경사 분리 매체(PAA, 독일 쾰베 소재)를 사용하여 단리되었다. 단리된 CD8 림프구 또는 PBMC는 10% 열활성화 인간 AB 혈청(PAN-바이오텍, 독일 아이덴바흐 소재), 100 U/ml 페니실린/100 ㎍/ml 스트렙토마이신(캄브렉스(Cambrex), 독일 쾰른 소재), 1 mM 나트륨 피루베이트(씨씨 프로(CC Pro), 독일 오베르돌라 소재), 20 ㎍/ml 겐타마이신(Gentamycin)(캄브렉스), 2.5 ng/ml IL-7(프로모셀(PromoCell), 독일 하이델베르그 소재) 및 10 U/ml IL-2(노바티스 파마(Novartis Pharma), 독일 뉘른베르그 소재)가 보충된 RPMI-글루타맥스(Glutamax)(인비트로겐(Invitrogen), 독일 칼스루헤 소재)를 포함하는 T-세포 매체(TCM)에 배양되었다. TCM에 이 배양 단계에서 사이토카인이 추가되었다. CD8+ 림프구의 분리는 CD8 미세비즈(밀테나이 바이오텍(Miltenyi Biotec), 독일 베르기쉬-글라드바흐 소재)를 이용한 양성 선택을 통해 이루어졌다.

[0193] pMHC/항-CD28 코팅된 비드의 생성, T세포 자극과 실행된 해독은 이전에 약간 수정이 되어 설명되었다(문헌[Walter et al, 4974-78]). 간단히 말해서, 막을 통해서 생기는 도메인이 결핍되고 무거운 체인의 카르복시 말단에서 바이오틴화된 펩티드-로딩된 항체 재조합 HLA-A*2402 및 HLA-A*0201 분자가 만들어졌다. 정제된 동시자극 마우스 IgG2a 항-인간 CD28 Ab 9.3(문헌[Jung Ledbetter, and Muller-Eberhard 4611-15])은 제조 업체(퍼비오(Perbio), 독일 본 소재)가 권장하는 대로 설포-N-하이드록시석신이미도바이오틴을 이용하여 화학적으로 바이오틴화했다. 사용된 비드는 크기가 5.6 ㎛인 스트렙트아비딘 코팅된 스티로폼 입자였다(뱅스 래보러토리스(Bangs Laboratories), 미국 일리노이드주 소재). 높은 및 낮은 음성 대조군으로 쓰인 pMHC는 각각 A*0201/MLA-001(개질된 멜란-A/MART-1의 펩티드 ELAGIGILTV(서열 번호 26))과 A*0201/DDX5-001(DDX5의 YLLPAIVHI(서열 번호 27))였다.

[0194] 600 ng의 바이오틴 항-CD28 플러스 200 ng의 관련된 바이오틴-pMHC(고 밀도 비드)의 존재 하에서 800,000 비드/200 ㎕는 96-웰 플레이트에 코팅되었다. 96-웰 플레이트의 자극은 1 x 10^6 CD8+ T세포와 씻겨지고 코팅된 비드 2 x 10^5를 5 ng/ml IL-12(프로모셀) 추가된 200 ㎕의 TCM에서 3 내지 4일간 37℃, 5% CO_2 및 95% 상대 습도에서 공동배양함으로써 시작된다. 매체의 반은 80 U/ml IL-2로 추가된 새로운 CM에 의해 교환되고 배양은 37℃에서 3 내지 4일간 계속 되었다. 이 자극 주기는 총 세 번 수행되었다. 마지막으로, 멀티머 분석은 세포를 라이브/데드-아쿠아(Live/dead-Aqua) 염료(인비트로겐, 독일 칼스루헤 소재), CD8-FITC 항체 클론 SK1(BD, 독일 하이델베르그 소재) 및 PE- 또는 APC-결합 A*2402 MHC 멀티머로 염색함으로써 수행되었다. 분석을 위해서는 적당한 레이저와 필터를 갖는 BD LSRII SORP 사이토미터가 사용되었다. 펩티드 특이적인 세포는 총 CD8+ T 세포의 백분율로 계산되었다. 멀티머 분석의 평가는 FCS 익스프레스(Express) 또는 플로우조(FlowJo) 소프트웨어(트리스타(Tree Star), 미국 오레곤주 소재)를 사용하여 수행되었다. 특이적인 멀티머 + CD8+ 임파구의 생체외 프라이밍은 적절한 게이팅 및 음성 대조군 자극과의 비교에 의해 검출되었다. 주어진 항원의 면역원성은 건강한 공여자의 최소한 하나의 생체외 자극된 평가가능한 웰이 생체외 자극 후 CD8+ T 세포주를 보이면 발견되었다(즉, 이 웰은 적어도 CD8+ T-세포의 특정 멀티머+ 중의 1%를 포함하고 있으며, 특정 멀티머+ 세포의 백분율은 적어도 음성 대조군 자극의 정중의 10배 이상이다)

[0195] **생체외 펩티드의 면역원성**

[0196] 실험된 HLA 클래스 I 펩티드의 중 25개의 펩티드에서 생체외 면역원성이 펩티드 특이적인 T-세포주를 생산한다고 밝혀졌다. 본 발명의 2개의 펩티드에 대한 TUMAP-특이적인 멀티머 염색 후 예시적인 유동 세포측정법의 결과가 상응하는 음성 대조군과 함께 도 3에 도시된다. 본 발명의 25개의 펩티드에 대한 결과는 표 3에 정리되어 있다.

[0197] 본 발명자들에 의해 실행된 생체외 면역원성 실험의 결과는 양성 실험된 평가가능한 기증자와 웰의 백분율을 보여준다. 각각의 펩티드에 대해 2명 이상의 기증자와 24개의 웰이 평가가능했다.

표 3

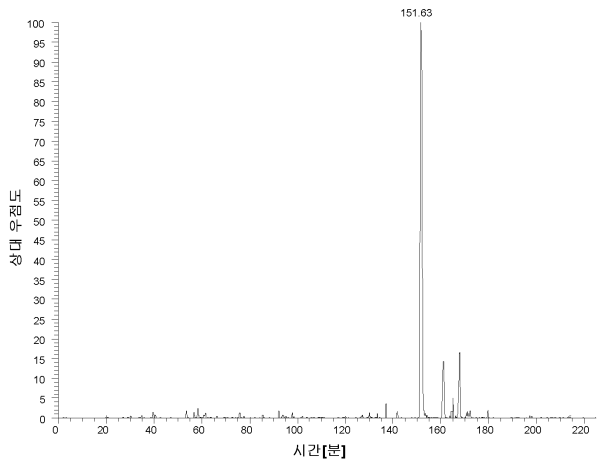
본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 생체외 면역원성

[0198]

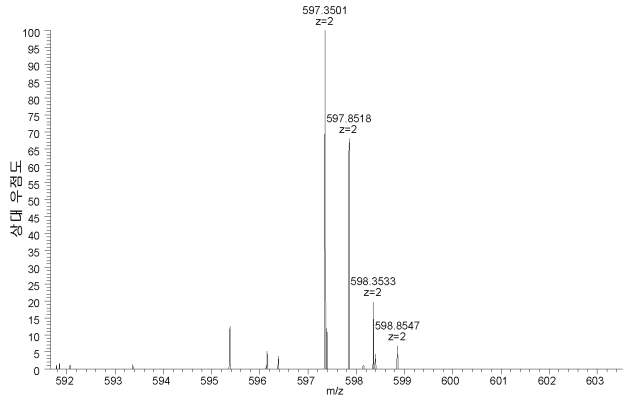
서열 번호	항원	서열	양성 공여자 / 실험된 공여자 [%]	양성 웰 / 실험된 웰 [%]
1	CDC2-001	LYQILQGIVF	88	28
2	ASPM-002	SYNPLWLRI	63	31
3	MMP3-001	VFIFKGNQF	13	1
4	MET-006	SYIDVLPEF	63	22
5	UCHL5-001	NYLPFIMEL	75	14
6	MST1R-001	NYLLYVSNF	50	14
7	KIF2C-001	IYNGKLFDLL	13	2
8	SMC4-001	HYKPTPLYF	75	9
9	PROM1-001	VWSDVTPLTF	83	26
10	MMP11-001	NYLLYVSNF	33	11
11	NFYB-001	VYTTSYQQI	50	7
12	ASPM-001	RYLWATVTI	17	3
13	PLK4-001	QYASRFVQL	60	5
14	ABL1-001	TYGNLLDYL	50	13
15	ATAD2-001	AYAIIKEEL	50	4
16	AVL9-001	FYISPVNKL	100	50
17	HSP90B1-001	KYNDTFWKEF	50	4
18	MUC6-001	NYEETFPHI	50	21
19	NUF2-001	VYGIRLEHF	100	25
20	NUF2-002	RFLSGIINF	50	4
21	PPAP2C-001	AYLVYTDRL	100	54
22	SIAH2-001	VFDTAIAHLF	50	4
23	UQCRB-001	YYNAAGFNKL	100	38
24	IQGAP3-001	VYKVVGNLL	100	24
25	ERBB3-001	VYIEKNDKL	83	15

도면

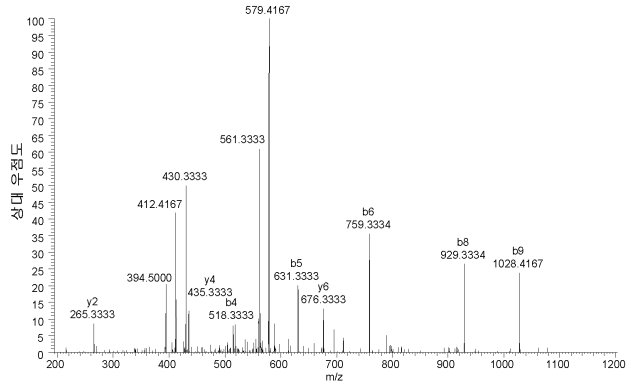
도면1a



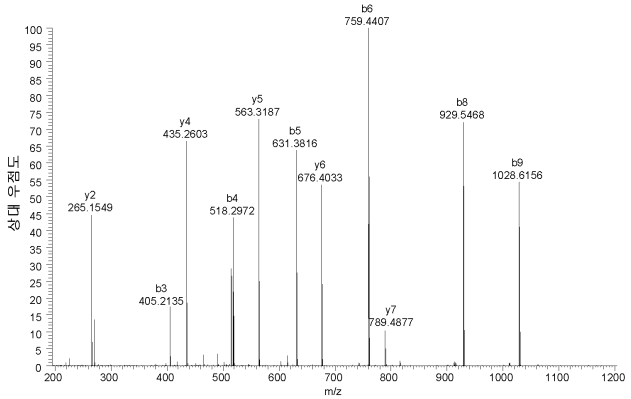
도면1b



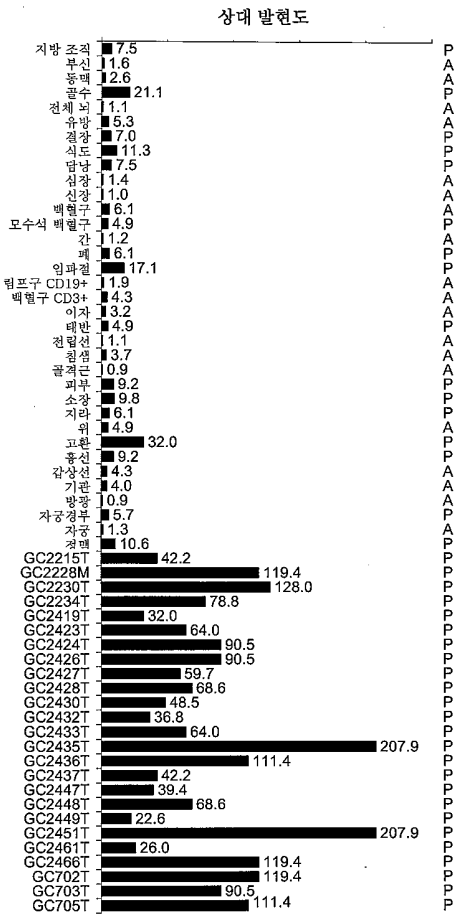
도면1c



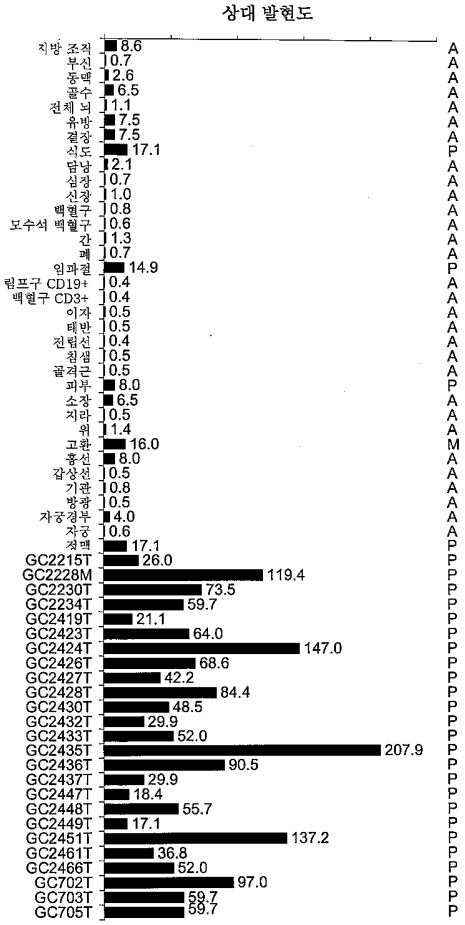
도면1d



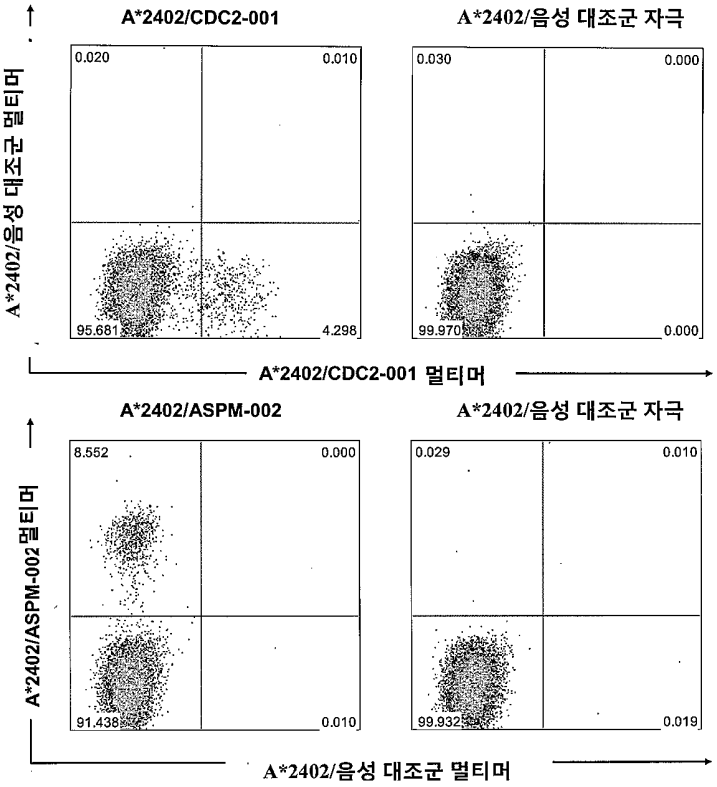
도면2a


상대 발현도
지방 조직 7.5 P
부신 1.6 A
동맥 2.6 A
골수 21.1 P
전체 뇌 1.1 A
유방 5.3 A
결장 7.0 P
식도 11.3 P
담낭 7.5 P
심장 1.4 A
신장 1.0 A
백혈구 6.1 A
모수식 백혈구 4.9 P
간 1.2 A
폐 6.1 P
임파절 17.1 P
림프구 CD19+ 1.9 A
백혈구 CD3+ 4.3 A
이자 3.2 A
태반 4.9 P
전립선 1.1 A
침샘 3.7 A
골격근 0.9 A
피부 9.2 P
소장 9.8 P
지라 6.1 P
위 4.9 A
고환 32.0 P
흉선 9.2 P
갑상선 4.3 A
기관 4.0 A
방광 0.9 A
자궁경부 5.7 P
자궁 1.3 A
정맥 10.6 P
GC2215T 42.2 P
GC2228M 119.4 P
GC2230T 128.0 P
GC2234T 78.8 P
GC2419T 32.0 P
GC2423T 64.0 P
GC2424T 90.5 P
GC2426T 90.5 P
GC2427T 59.7 P
GC2428T 68.6 P
GC2430T 48.5 P
GC2432T 36.8 P
GC2433T 64.0 P
GC2435T 207.9 P
GC2436T 111.4 P
GC2437T 42.2 P
GC2447T 39.4 P
GC2448T 68.6 P
GC2449T 22.6 P
GC2451T 207.9 P
GC2461T 26.0 P
GC2466T 119.4 P
GC702T 119.4 P
GC703T 90.5 P
GC705T 111.4 P

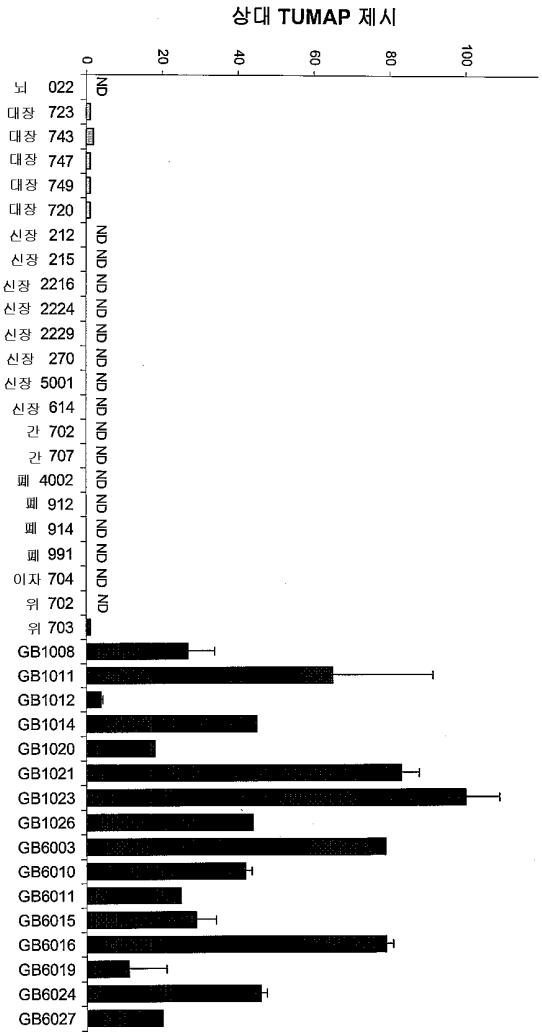
도면2b


상대 발현도
지방 조직 8.6 A
부신 0.7 A
동맥 2.6 A
골수 6.5 A
전체 뇌 1.1 A
유방 7.5 A
결장 7.5 A
식도 17.1 P
담낭 2.1 A
심장 0.7 A
신장 1.0 A
백혈구 0.8 A
모수석 백혈구 0.6 A
간 1.3 A
폐 0.7 A
임파절 14.9 P
림프구 CD19+ 0.4 A
백혈구 CD3+ 0.4 A
이자 0.5 A
태반 0.5 A
전립선 0.4 A
침샘 0.5 A
골격근 0.5 A
피부 8.0 P
소장 6.5 A
지라 0.5 A
위 1.4 A
고환 16.0 M
흉선 8.0 A
갑상선 0.5 A
기관 0.8 A
방광 0.5 A
자궁경부 4.0 A
자궁 0.6 A
정맥 17.1 P
GC2215T 26.0 P
GC2228M 119.4 P
GC2230T 73.5 P
GC2234T 59.7 P
GC2419T 21.1 P
GC2423T 64.0 P
GC2424T 147.0 P
GC2426T 68.6 P
GC2427T 42.2 P
GC2428T 84.4 P
GC2430T 48.5 P
GC2432T 29.9 P
GC2433T 52.0 P
GC2435T 207.9 P
GC2436T 90.5 P
GC2437T 29.9 P
GC2447T 18.4 P
GC2448T 55.7 P
GC2449T 17.1 P
GC2451T 137.2 P
GC2461T 36.8 P
GC2466T 52.0 P
GC702T 97.0 P
GC703T 59.7 P
GC705T 59.7 P

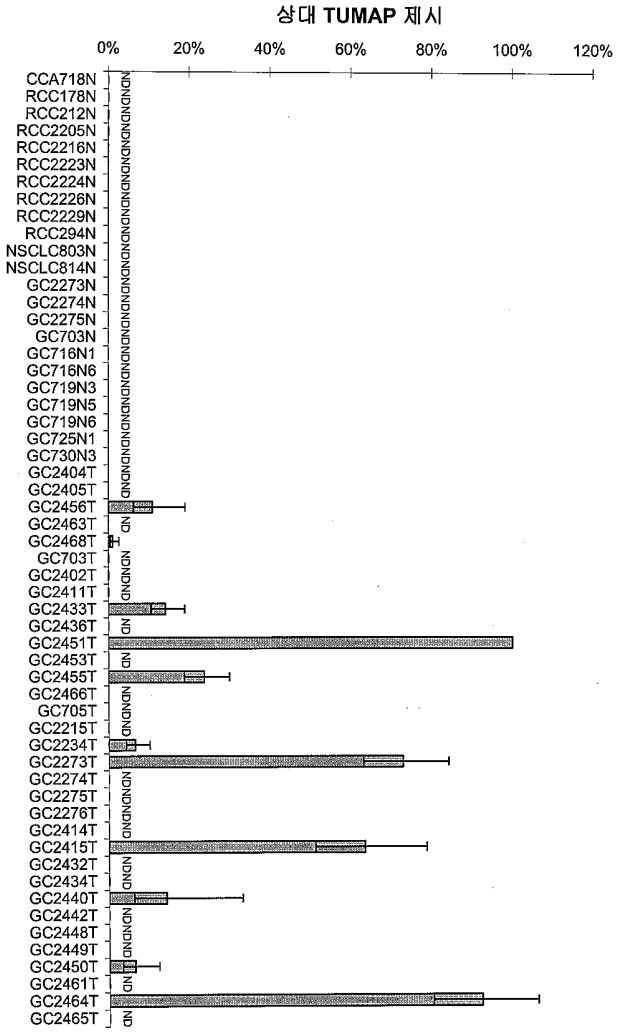
도면3


A*2402/CDC2-001
A*2402/음성 대조군 자극
0.020
0.010
95.681
4.298
0.030
0.000
99.970
0.000
A*2402/음성 대조군 멀티머
A*2402/CDC2-001 멀티머
A*2402/ASPM-002
A*2402/음성 대조군 자극
8.552
0.000
91.438
0.010
0.029
0.010
99.932
0.019
A*2402/ASPM-002 멀티머
A*2402/음성 대조군 멀티머

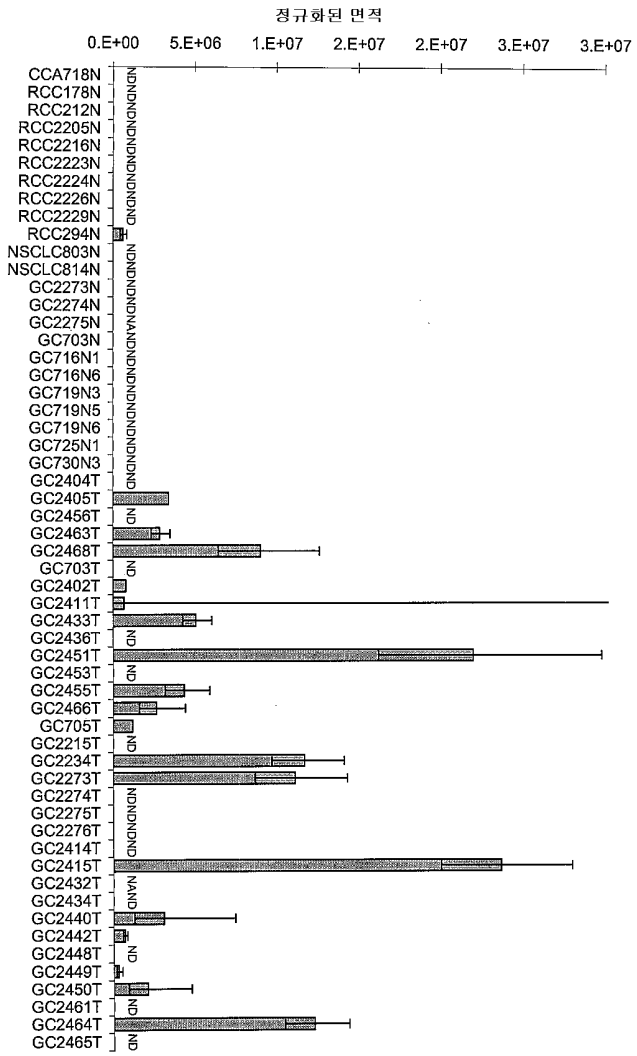
도면4


상대 TUMAP 제시
0
20
40
60
80
100
뇌 022
대장 723
대장 743
대장 747
대장 749
대장 720
신장 212
신장 215
신장 2216
신장 2224
신장 2229
신장 270
신장 5001
신장 614
간 702
간 707
폐 4002
폐 912
폐 914
폐 991
이자 704
위 702
위 703
GB1008
GB1011
GB1012
GB1014
GB1020
GB1021
GB1023
GB1026
GB6003
GB6010
GB6011
GB6015
GB6016
GB6019
GB6024
GB6027
ND

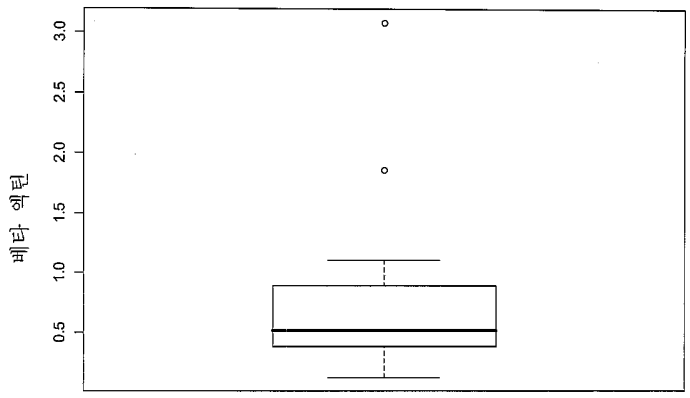
도면5


상대 TUMAP 제시
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
CCA718N
RCC178N
RCC212N
RCC2205N
RCC2216N
RCC2223N
RCC2224N
RCC2226N
RCC2229N
RCC294N
NSCLC803N
NSCLC814N
GC2273N
GC2274N
GC2275N
GC703N
GC716N1
GC716N6
GC719N3
GC719N5
GC719N6
GC725N1
GC730N3
GC2404T
GC2405T
GC2456T
GC2463T
GC2468T
GC703T
GC2402T
GC2411T
GC2433T
GC2436T
GC2451T
GC2453T
GC2455T
GC2466T
GC705T
GC2215T
GC2234T
GC2273T
GC2274T
GC2275T
GC2276T
GC2414T
GC2415T
GC2432T
GC2434T
GC2440T
GC2442T
GC2448T
GC2449T
GC2450T
GC2461T
GC2464T
GC2465T

도면6

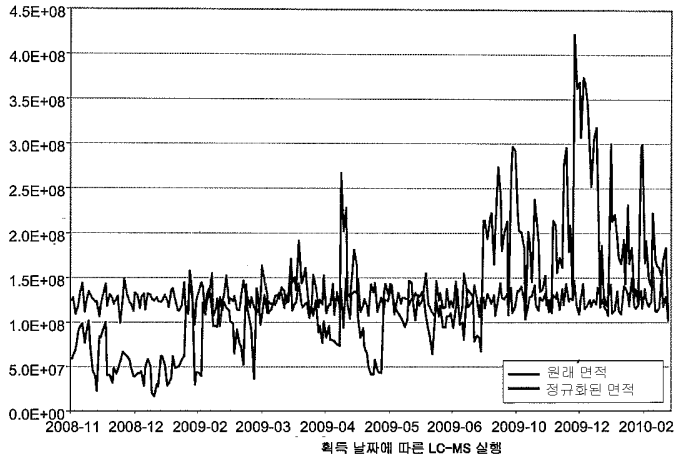


도면7

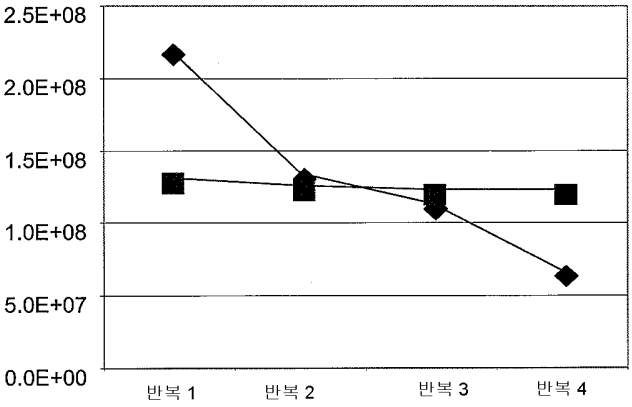


n=12 샘플

도면8

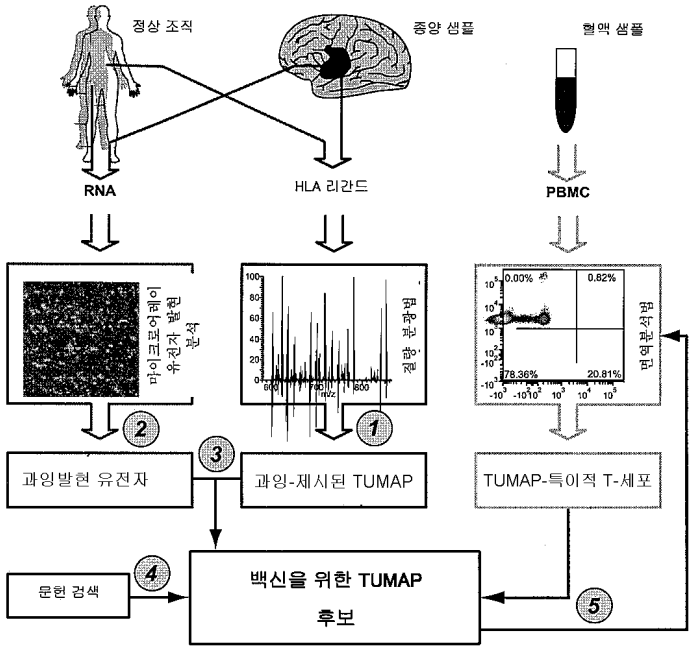


획득 날짜에 따른 LC-MS 실행

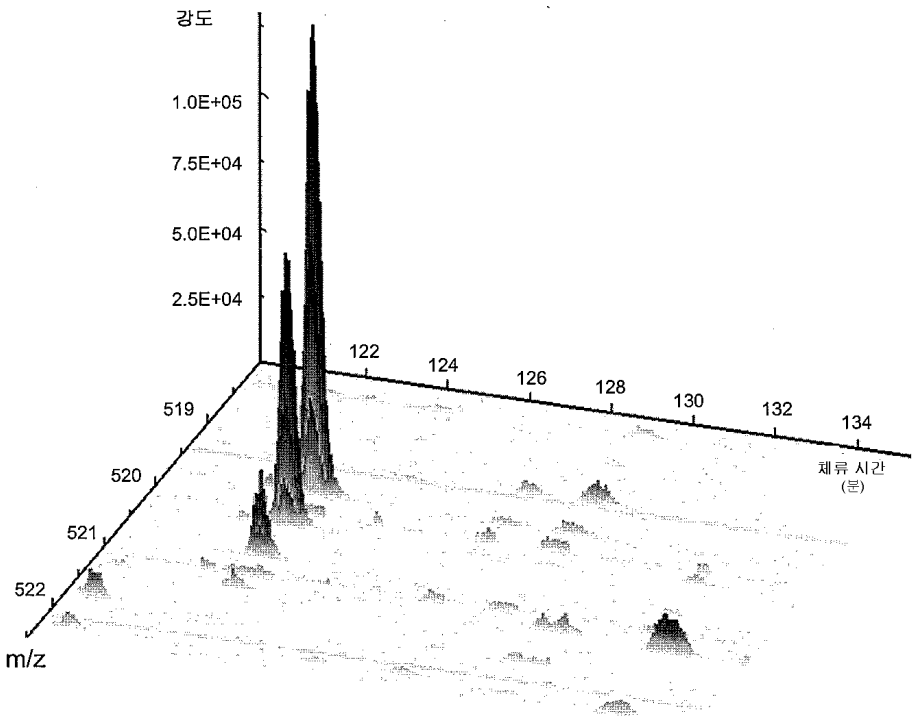


샘플 969 의 LC-MS 실행

도면9



도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Method for differentially quantifying naturally processed HLA-restricted peptides for cancer, autoimmune and infectious diseases immunotherapy development

<130> I31901PCT

<140> PCT/EP2011/056056

<141> 2011-04-15

<150> US 61/324,941

<151> 2010-04-16

<150> GB 1006360.0

<151> 2010-04-16

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe
1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Tyr Asn Gly Lys Leu Phe Asp Leu Leu

1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

His Tyr Lys Pro Thr Pro Leu Tyr Phe

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Tyr Thr Thr Ser Tyr Gln Gln Ile

1 5

<210> 12

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Tyr Leu Trp Ala Thr Val Thr Ile

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Tyr Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Tyr Ala Ile Ile Lys Glu Glu Leu

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Phe Tyr Ile Ser Pro Val Asn Lys Leu

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Tyr Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe

1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Asn Tyr Glu Glu Thr Phe Pro His Ile

1 5

<210> 19

<211> 9

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu

1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Val Phe Asp Thr Ala Ile Ala His Leu Phe

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Tyr Asn Ala Ala Gly Phe Asn Lys Leu

1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Val Tyr Lys Val Val Gly Asn Leu Leu

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu

1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1 5