



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0144850

(43) 공개일자 2015년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

(21) 출원번호 10-2014-0073419

(22) 출원일자 2014년06월17일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

장준

서울 서대문구 연희로 38-20, 103동 1203호 (연희동, 대우아파트)

김명희

경기 부천시 원미구 부일로685번길 40-18, 303호 (역곡동, 영진빌라)

김주영

경기 고양시 덕양구 화신로 105, 2302동 1801호 (행신동, 햇빛마을23단지아파트)

(74) 대리인

손민

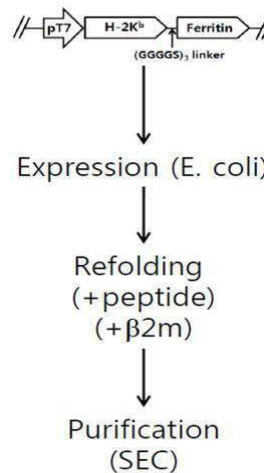
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 MHC-페리틴 결합체, 이를 포함하는 나노파티클 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 MHC(Major Histocompatibility Complex) 펩타이드 및 페리틴의 결합체, 이를 포함하는 나노파티클 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도3



명세서

청구범위

청구항 1

MHC(Major histocompatibility complex) 수용체 단백질 및 페리틴(ferritin) 단백질의 결합체를 24개 함유하는, 나노파티클.

청구항 2

제1항에 있어서 상기 결합체는 이의 MHC 수용체 단백질에 항원 펩타이드가 결합된 것인, 나노파티클.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 결합체의 MHC 수용체 단백질 및 페리틴 단백질은 링커로 서로 연결된 것인, 나노파티클.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 나노파티클은 인공 항원제시복합체(artificial antigen presenting complex)로서 기능할 수 있는 것인, 나노파티클.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 MHC 수용체 단백질이 페리틴의 N-말단에 연결된 것인, 나노파티클.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 MHC 수용체 단백질은 MHC 클래스 I 인, 나노파티클.

청구항 7

분리된 T 세포와 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노파티클을 반응시키는 단계를 포함하는, 체외에서 T 세포의 증식을 촉진하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노파티클을 포함하는, 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조성물은 백신 형태인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노파티클을 포함하는, 암, 후천성 면역 결핍 증후군 및 C형 간염으로 이루어지는 군으로부터 선택된 T 세포 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

MHC 수용체 단백질 및 페리틴(ferritin) 단백질의 결합체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 결합체는 융합 단백질 형태인 것인 결합체.

청구항 13

제12항의 결합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

제13항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 15

제13항의 폴리뉴클레오티드 또는 제14항의 재조합 발현 벡터를 포함하는 형질전환세포.

청구항 16

제11항의 결합체 및 항원 펩타이드를 혼합하는 단계를 포함하는, MHC(Major histocompatibility complex) 수용체 단백질 및 페리틴(ferritin) 단백질의 결합체를 24개 함유하는, 나노파티클의 제조 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 방법은 MHC I 수용체 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체, 항원 펩타이드 및 베타-2-마이크로글로불린(beta-2-microglobulin)을 혼합하는 단계를 포함하는 것인, 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 MHC(Major Histocompatibility Complex) 펩타이드 및 페리틴의 결합체, 이를 포함하는 나노파티클 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

CD8⁺ T 세포는 적응 면역(adaptive immunity)의 주요 세포면역반응을 담당하며, 바이러스 및 세포 내 세균 감염 뿐만 아니라 각종 암에 대하여 숙주를 보호하는 주요한 방어 면역 기구이다. 또한, CD8⁺ T 세포는 특이적으로 외부 물질을 인식하는데 이러한 T 세포의 항원인식은 세포 표면에 발현되는 T 세포 수용체(TCR)에 의해 일어난

다. 하지만 생체에 침입한 이물질, 즉 항원(antigen) 그 자체를 인식하는 것이 아니고, 항원을 탐식하여 처리 후 항원 유래 펩티드 조각을 MHC 분자와 함께 제시해 주는 항원 제시 세포(antigen presenting cell), 예컨대 수지상 세포(dendritic cell)와의 상호작용을 통해 TCR 자극이 전해지면서 활성화된다.

[0003] 이에 질병의 예방 또는 치료를 위하여 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포를 적절하게 활성화 및 증폭시키고자 하였으며, 현재까지는 항원 특이적 T 세포를 증폭하기 위해 자가 유래 항원제시세포를 이용하는 방법이 주로 사용되어 왔으나, 많은 한계점들이 존재하였다. 이러한 배경 하에 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포를 효과적으로 활성화 및 증폭시킬 수 있는 인공 항원 제시세포 또는 인공 항원 제시세포 또는 복합체(artificial antigen presenting cell or complex; aAPC)의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0004] 페리틴은 철을 저장하는 단백질로써 원핵생물과 진핵생물에 널리 존재하고 있다. 페리틴의 분자량은 약 500,000Da으로, 중쇄(Heavy chain)와 경쇄(Light chain)로 구성되어 있고, 자가 조립 능력이 있어 구형 입자를 형성하는 독특한 특성을 나타낸다. 페리틴은 24개의 단량체(중쇄 혹은 경쇄 중 하나로 구성된 단일 단량체 혹은 이중 단량체)가 모여서 거대한 구 형태의 삼차구조를 형성한 단백질로써, 인간 페리틴의 경우 외경은 약 12 nm 이고 내경은 약 8 nm이다. 페리틴은 pH 조건에 따라 단량체로 흩어지기도 하고 24개의 단량체가 결합한 나노입자를 형성하기도 하는데 이러한 특성을 이용하면 페리틴 내에 다양한 물질을 포집할 수 있다.

[0005] 예를 들어, 은과 결합하는 펩타이드를 이용하여 은을 포집한 페리틴을 합성한 사례가 보고되어 있으며(Kramer, R. M.; Li, C.; Carter, D. C.; Stone, M. O.; and Naik, R. R., (2004) J. Am. Chem. Soc., 126(13): 282), MRI 조영제인 Gd-HPDOTA(gadolinium-[10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid]를 포집시킨 페리틴도 보고된 바 있다(Aime, S.; Frullano, L.; and Crich, S. G., (2002) Angew. Chem. Int. Ed., 41: 1017).

[0006] 상기 보고된 바와 같이, 금속과 결합시킨 페리틴을 이용한 바 있으나, MHC(Major Histocompatibility Complex) 펩타이드와 융합하여 이를 인공 항원 제시 세포 및 백신으로 이용하는 것에 대해서는 보고된 바 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 효율적이고 안전한 인공항원제시 복합체(artificial antigen presenting complex)를 제작하고자 예의 노력한 결과, MHC(Major Histocompatibility Complex)-페리틴 결합체를 이용하여 제조한 나노파티클, 이에 결합된 항원 펩타이드를 통하여 항원 특이적 T 세포를 효과적으로 자극하여 증폭시킬 수 있는 효과를 가짐을 확인하였으며, 이에 따라 상기 동형 집합체를 T 세포 기반 백신 및 T 세포의 증폭이 필요한 질환, 예컨대 암 등에 대한 치료제로서 사용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 MHC(Major histocompatibility complex) 수용체 단백질 및 페리틴(ferritin) 단백질의 결합체를 24개 함유하는, 나노파티클을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 분리된 T 세포와 상기 나노파티클을 반응시키는 단계를 포함하는, 체외에서 T 세포의 증식을 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노파티클을 포함하는, 암, 후천성 면역 결핍 증후군 및 C형 간염으로 이루어지는 군으로부터 선택된 T 세포 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 MHC 수용체 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 결합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 포함하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 재조합 발현 벡터를 포함하는 형질전환 세포를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 결합체 및 항원 펩타이드를 혼합하는 단계를 포함하는, MHC 수용체 단백질 및

페리틴 단백질의 결합체를 24개 함유하는, 나노파티클의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 MHC(Major histocompatibility complex) 수용체 단백질 및 페리틴(ferritin) 단백질의 결합체를 24개 함유하는, 나노파티클을 제공한다.
- [0017] 본 발명에서는, MHC 수용체 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체 24개가 조립(assembly)된 나노파티클을 제조하였고, 이렇게 제조된 나노파티클이 인공 항원제시세포(artificial antigen presenting cell)로서 기능할 수 있음을 규명하였다. 구체적으로, 본 발명에서는 MHC 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체 24개로 형성된 나노파티클의 MHC에 항원 펩타이드를 결합시켜 이를 T 세포와 반응시키는 경우, 나노파티클에 제시된 항원 펩타이드에 특이적인 T 세포의 증폭을 효과적으로 유도할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 나노파티클은 환자로부터 분리된 T 세포와 상기 나노파티클을 반응시킨 다음, T 세포를 증폭하여 이를 다시 환자에 투여하는 용도로도 사용될 수 있기는 하나, 이러한 과정 없이도 항원 특이적 T 세포의 증폭이 필요한 개체에 직접적으로 투여함으로써 항원 특이적 T 세포의 효과적인 증식을 가져올 수 있다. 따라서, 본 발명의 나노파티클을 이용하면, 수지상 세포를 분리하고 이를 증폭시킨 후, 증폭된 수지상 세포를 다시 개체에 투여하여 T 세포를 증폭시키는 기존의 수지상 세포 백신 치료법에 비하여, 나노파티클을 개체에 투여하는 과정만으로 간편하게 항원 특이적 T 세포의 증폭 효과를 가져올 수 있는 이점을 가질 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 용어, "MHC 수용체 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체"는 MHC 수용체 단백질과 페리틴 단백질이 화학적 또는 재조합적 방법 등으로 결합된 것을 말한다. 이러한 결합체는 MHC 수용체 단백질의 항원 제시 능력 및 페리틴 단백질의 자가 조립 능력이 저해되지 않도록 연결된 형태임이 바람직하다. 상기 MHC 수용체 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체는 화학적으로 연결되거나, 두 종류 이상의 폴리펩타이드가 효소 작용에 의해 연결되거나, 또는 유전자의 조작을 통하여 두 종류 이상의 상이한 폴리펩타이드가 하나의 폴리펩타이드로 발현된 형태, 즉 융합 단백질 형태로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 그 예로, 결합체를 제조함에 있어서, 당해 기술 분야에 널리 알려진 기술, 예를 들어 펩타이드 합성법 또는 유전공학적 방법으로 제조할 수도 있으며, 유전공학적 방법에 의해 특히 효율적으로 제조할 수 있다. 유전공학적 방법은 유전자 조작에 의해 원하는 단백질을 대장균(*E.coli*) 등의 숙주세포에서 다량으로 발현시키는 방법으로서 이에 관한 기술은 공지문헌에 상세히 기술되어 있다(molecular biotechnology: Principle and Application of Recombinant DNA; ASM Press: 1994, J. chem. Technol. Biotechnol. 1993, 56, 3-13). 상기과 같은 공지 기술들을 사용하여 본 발명에서는 MHC 수용체 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 적절한 발현벡터에 포함시키고, 상기 발현벡터로 적절한 숙주세포를 형질전환시킨 후에 이 숙주세포를 배양시킴으로써 용이하게 제조할 수 있다.
- [0020] 구체적으로, 본 발명의 MHC 수용체 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체는 서열번호 6의 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것이거나, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에서, 용어 "MHC(Major Histocompatibility Complex) 수용체 단백질"은, 구조적 적합성 복합체로 명명되며, 세포에서 단백질의 일부, 예컨대 에피토프를 제시하는 역할을 수행한다. 이러한 MHC의 기능으로 제시된 항원을 통하여 자기 자신의 세포인지 아닌지가 구별될 수 있으므로, 구조적 적합성 복합체에 결합된 항원은 T 세포에 의해 인식될 수 있다. T 세포는 특이 항원 신호에 응답하여 작용하는 항원 특이적 면역세포로서, B 세포와 달리 유리되거나 가용성 형태의 항원과 반응하기보다는 MHC에 결합된 항원을 인식하는 특징이 있다.
- [0022] 특정 세포가 자기 자신의 세포인지 외부의 세포인지 판별할 때 중요한 역할을 한다. T 세포는 특이 항원 신호에 응답하여 작용하는 항원 특이적 면역세포이다. B 세포 역시 항원 특이적이거나, B 세포와 달리 T 세포는 유리된 형태 또는 가용성 형태에서는 항원과 반응하지 않고, 구조적 적합성 복합체(MHC)에 결합된 항원을 인식한다.
- [0023] MHC는 I, II 및 III 세종류가 있으며, 그 중 MHC 클래스(class) I 및 II가 항원제시에 주요하게 관여한다. $CD4^{+}$ T 세포는 MHC 클래스(class) II와 상호작용하여 주로 헬퍼 표현형을 갖게되고, $CD8^{+}$ T 세포는 MHC 클래스(class) I 과 작용하여 세포독성 T 세포의 특성을 갖게된다.

- [0024] 또한, 구체적으로 상기 MHC 수용체 단백질은 MHC 클래스(class) I 또는 II 어느 것이든 가능하나, MHC 클래스 I 에 속하는 펩타이드일 수 있으며, 더욱 구체적으로 MHC 클래스(class) I H-2K^b 펩타이드일 수 있고, 가장 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서, 용어 "페리틴 단백질"은 생물 유래 나노구조체의 구성 성분으로 사용될 수 있는 단백질로서, 24개의 단량체가 자가조립(self-assembly)할 수 있는 단백질을 말한다. 척추동물에서 상기 페리틴 단량체에는 약 19kDa의 분자량을 가지는 L형(light type) 및 약 21kDa의 분자량을 가지는 H형(heavy type) 등이 있으며, 본 발명에서 상기 페리틴 단량체의 종류는 특별히 제한되지 않으며, L형 페리틴 단량체, H형 페리틴 단량체 또는 이들을 모두 사용하여 나노파티클을 제조할 수 있다. L형 페리틴 단량체 및 H형 페리틴 단량체를 모두 사용하는 경우, L형 페리틴 단량체로 주로 이루어진 나노파티클 또는 H형 페리틴 단량체로 주로 이루어진 나노파티클 모두가 제조될 수 있다. 상기 페리틴 단백질의 서열은 미국국립보건원 유전자은행(NCBI GenBank)와 같은 공지의 데이터베이스로부터 용이하게 얻을 수 있으며, 그 예로 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 또한, 본 발명의 실시예에서는 페리틴 유전자의 5' 말단에 MHC class I H-2K^b 유전자를 연결하였으나, 페리틴 단량체가 자가조립하여 집합체를 형성하는 것을 제한하는 것이 아니라면, 어느 위치든 삽입되거나 연결될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 일 실시양태에 따르면 상기 결합체를 구성성분으로 하는 나노파티클은, 이를 구성하는 결합체의 MHC 수용체 단백질에 항원 펩타이드가 결합된 형태일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "항원 펩타이드"는 동물의 면역 체계를 자극하여 항체의 생성을 유발할 수 있는 물질을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 항원 펩타이드는 본 발명에 따른 나노파티클의 MHC에 결합되어 이에 대한 항체를 유발할 수 있는 물질을 말하며, 이러한 항원 펩타이드는 증폭시키고자 하는 항원 특이적 T 세포의 종류에 따라 MHC 수용체 단백질에 결합할 수 있는 크기 및/또는 서열로 고안될 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 항원 펩타이드는 항원 단백질의 에피토프일 수 있으며, 적당한 효율로 MHC 클래스 I 또는 II 분자에 결합할 수 있고, T 세포를 자극하거나 MHC 클래스 I 또는 II와 복합체로 T 세포에 결합할 수 있는 아미노산 서열을 의미할 수 있다. 또한, B 세포가 항체 생산 세포로 분화하는데 요구하는 신호를 제공하는 역할을 하며, 세포 독성 T 세포를 유도하여 표적 세포의 용균을 유도할 수 있다. 특히, 본 발명에서의 항원 펩타이드는 T 세포를 자극시키고 면역반응을 강화하는 한 특정한 것으로 한정되지 않으며 목적에 적합한 단백질, 펩타이드 및 에피토프 등의 사용이 가능하다. 예를 들어, B형 간염 표면 항원 헬퍼 T 세포 에피토프, 클라미디아 트라코미티스(*Chlamydia trachomatis*) 주요 외막 단백질 헬퍼 T 세포 에피토프, 플라즈모디움 팔시파룸 서큘스포로조이트(*Plasmodium falciparum circumsporozoite*) 헬퍼 T 세포 에피토프, 에셰리키아 콜라이(*Escherichia coli*) TraT 헬퍼 T 세포 에피토프, 테타누스 독소이드(*Tetanus toxoid*) 헬퍼 T 세포 에피토프, 디프테리아 독소이드(*diphtheria toxoid*) 헬퍼 T 세포 에피토프, 쉬스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*) 트리오스 포스페이트 이소머라제 헬퍼 T 세포 에피토프, 홍역(measles) 바이러스 F 단백질 헬퍼 T 세포 에피토프, 백일해 백신(pertussis vaccine), BCG(Bacille Calmette-Guerin), 폴리오 백신(polio vaccine), 유행성 이하선염 백신(mumps vaccine), 풍진 백신(rubella vaccine), 광견병 백신(rabies vaccine), 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체, 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 이들의 단편 또는 배합물 등으로부터 유래한 에피토프 서열을 포함할 수 있다.
- [0030] 또한, 당업계에 항원제시복합체와 결합할 수 있는 항원 펩타이드로 개시되어 있는 다양한 흑색종 관련 항원 펩타이드, 난소암 관련 항원 펩타이드, 유방암 관련 항원 펩타이드, 폐암 관련 항원 펩타이드, 백혈병 관련 항원 펩타이드, 다발성 골수종 관련 항원 펩타이드, 림프종 관련 항원 펩타이드 및 전립선암 관련 항원 펩타이드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0031] 구체적으로, MART-1, 티로시나제(tyrosinase), gp100, NY-ESO-1, MUC-1, CA-125, Her-2, survivin, 텔로머라제(telomerase), CAMEL, CEA, livin, SART-1, SCP-1, SSX-2, PRAME, C-Lectin, Pec60, AES, MAGE-3, G250, FBP, SSX-4, SP17, hTERT, MUC-16, MAGE-1, 토포아이스오머라제 II (Topoisomerase II), 인테그린 β8 서브유닛 전구체(Integrin β8 subunit precursor), MUC-1, MAGE-B2, STAT 1, γ-카테닌(γ-Catenin) 또는 H-RYK로부터 유래한 에피토프 서열일 수 있다.

- [0032] 보다 구체적으로 SILSLKEAST (서열번호 10), KMASRSMRL (서열번호 11), ALALAALLVV (서열번호 12), ALLVVDREV (서열번호 13), YMNGTMSQV (서열번호 14), YMDGTMSQV (서열번호 15), ITDQVPFSV (서열번호 16), YLEPGPVTA (서열번호 17), AAGIGILTV (서열번호 18), ELAGIGILTV (서열번호 19), CLTSTVQLV (서열번호 20), HLYQGCQVV (서열번호 21), KIFGSLAFL (서열번호 22), IISAVVGIL (서열번호 23), PLTSIIISAV (서열번호 24), VMAGVGSPYV (서열번호 25), VLVKSPNHV (서열번호 26), ELVSEFSRM (서열번호 27), YLSGANLNL (서열번호 28), GPLTLPV (서열번호 29), SLLMWITQC (서열번호 30), KALFAGPPV (서열번호 31), YLETFREQV (서열번호 32), GLQSPKSPL (서열번호 33), VLLKLRRPV (서열번호 34), ELYIPVDL (서열번호 35), SLLMWITQV (서열번호 36), ILAKFLHWL (서열번호 37), STAPPVHNV (서열번호 38), FLWGPRALV (서열번호 39), FMWGNLTLA (서열번호 40), RLVDFFLLV (서열번호 41), HLSTAFARV (서열번호 42), QLSLLMWIT (서열번호 43), ELWTHSYKV (서열번호 44), KVAELVHFL (서열번호 45), YIFATCLGL (서열번호 46), HLYIFATCL (서열번호 47), MLMAQEALAF (서열번호 48), STLEKINKT (서열번호 49), KASEKIFYV (서열번호 50), SLLMWITQCFL (서열번호 51), ELTLGEFLKL (서열번호 52), LTLGEFLKL (서열번호 53), SLLEKREKT (서열번호 54), TLGEDDPWL (서열번호 55), KLGLKPLEV (서열번호 56), YLWTSKNT (서열번호 57), STAPPAHGV (서열번호 58), GMGSEELRL (서열번호 59), SLGSPVLGL (서열번호 60), YLFFYRKS (서열번호 61), CQQEETFLL (서열번호 62), TLAKFSPYL (서열번호 63), NLTHVLPV (서열번호 64), STFKNWPFL (서열번호 65), SLLQHLIGL (서열번호 66), FLDQRVFFV (서열번호 67), FLDQRVFFV (서열번호 68), FLDQVAFVV (서열번호 69), GLDREQLYL (서열번호 70), VMQHLLSPL (서열번호 71), QQTHGITRL (서열번호 72), LQPLSGPGL (서열번호 73), TLDRDSLIV (서열번호 74), QLYLELSQL (서열번호 75), KVLEYVIKV (서열번호 76), KVADLVGFL (서열번호 77), KTWGQYQV (서열번호 78) 및 VLDGLDVL (서열번호 79)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 서열을 가질 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 대표적인 항원 펩타이드로서, 난알부민(OVA) 단백질의 펩타이드를 사용한 것으로서, 증폭하고자 하는 항원 특이적 T 세포에 따라 본 발명의 나노파티클에 결합되는 항원 펩타이드의 종류는 당업자가 적절하게 고려하여 선택 또는 고안할 수 있는 것으로, 상기 예에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한 구체적으로, 상기 나노파티클을 구성하는 상기 결합체에서 MHC 수용체 단백질과 페리틴 단백질은 펩타이드 결합 또는 이황화결합 등으로 직접적으로 연결될 수 있으며, 또한 링커를 통하여 연결된 형태일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어, "링커(linker)"란 기본적으로는 두 개의 서로 다른 융합파트너(예를 들어, 생물학적 고분자 등)를 수소결합, 정전기적 상호작용, 반데르발스력, 이황화 결합, 염 브릿지, 소수성 상호작용, 공유결합 등을 이용하여 연결할 수 있는 연결체를 의미한다. 바람직하게는 생리학적 조건 또는 다른 표준 펩타이드 조건(예를 들면, 펩타이드 정제 조건, 펩타이드 저장 조건)하에서 적어도 하나의 이황화 결합에 참여할 수 있는 적어도 하나의 시스테인을 가질 수 있으며, 단순히 각각의 융합 파트너를 연결하는 역할 이외에도, 융합 파트너 사이에 일정한 크기의 간격을 부여하는 역할을 수행하거나 또는 결합체에 유연성 또는 강직성을 제공하는 힌지(hinge)의 역할을 수행할 수도 있다. 상기 링커는 비펩타이드 링커 또는 펩타이드 링커일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명에서 용어, "비펩타이드 링커"는 펩타이드 형태가 아닌 링커를 말하며, 구체적으로 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 링커일 수 있다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결될 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용가능한 비펩타이드 링커는 폴리에틸렌 글리콜(polyethyleneglycol; PEG) 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 또는 이들의 조합일 수 있다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0038] 본 발명에서 용어, "펩타이드 링커"는 두 개의 물질로 서로 연결시키는 역할을 수행하는 펩타이드를 말한다. 상기 펩타이드 링커는 단백질의 구조적 유연성을 증가시키거나 각 단백질의 활성이 증진될 수 있도록, 단백질과 단백질 사이에 삽입하는 펩타이드일 수 있다. 펩타이드 링커는 결합되는 각 단백질의 활성을 저해하지 않으면서 불필요한 면역반응을 일으키지 않는 것이라면 길이 및/또는 서열에 제한이 없으나, 구체적으로는 아미노산 1개 내지 20개, 보다 구체적으로는 아미노산 1개 내지 5개로 구성된 펩타이드 링커일 수 있으나, 특별히 이에 제한

되는 것은 아니다.

- [0039] 본 발명에서는 유연성 및 프로테아제에 대해 저항성을 가지고 있는 것으로 알려진 GGGGS(G₄S) 링커를 사용하였다. G₄S 링커는 GGGGS가 반복단위인 링커로서, 그 예로 GGGGS가 3번 반복된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 또한 구체적으로, 본 발명에 따른 나노파티클은 인공 항원제시복합체(artificial antigen presenting complex)로서 기능할 수 있는 특징을 지닌다.
- [0041] 일반적으로 항원제시세포(APC, antigen presenting cell)는 MHC를 이용해서 항원을 T 세포에 나타내며, T 세포는 MHC에 존재하는 항원을 인지하게 된다.
- [0042] 구체적으로, 항원을 탐식하여 처리 후 항원 유래 펩티드 조각을 MHC 분자와 함께 제시해 주는 항원제시세포(antigen presenting cell)와 CD8⁺ T 세포 간의 상호작용을 통해 T 세포에 TCR 자극이 전해지면서 활성화되어 증식될 수 있다. 즉, T 세포를 자극하여 증식시키기 위해서는 MHC와 결합되어 있는 항원이 제시되는 것이 필요하다. 본 발명에서는 항원 펩타이드가 MHC에 결합되도록 MHC 수용체 단백질과 페리틴 단백질을 결합시킨 결합체를 이용하여 나노파티클을 제조하고, 이를 T 세포의 반응을 유도하는 인공 항원제시복합체로서 제공할 수 있음을 확인하였다.
- [0043] 본 발명에 따른 나노파티클은 종래의 자가 유래 항원제시세포에 비해 효율적이고 안전한 효과를 나타낼 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 결합체는 나노파티클이 형성된다면 페리틴 단백질과 MHC 수용체 단백질의 결합 위치는 특별히 제한되지 않으나, 페리틴 단백질의 N- 또는 C-말단에 링커를 통하거나 통하지 않은 형태로 MHC 수용체 단백질이 연결된 형태일 수 있고, 구체적으로 페리틴 단백질의 N-말단에 MHC 수용체 단백질이 연결된 형태일 수 있으며, 이때 링커를 통하여 연결될 수 있다. 그러나 상기 위치에 제한되는 것은 아니며, 페리틴의 자가조립이 방해되지 않는다면 페리틴의 내부 어느 위치든 삽입될 수 있으며 외부에 연결될 수 있다.
- [0045] 또 다른 일구현예로서, 본 발명은 분리된 T 세포와 상기의 나노파티클을 반응시키는 단계를 포함하는, 체외에서 T 세포의 증식을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명 실시예에서는 MHC 펩타이드를 페리틴과 융합하여 융합단백질을 제조한 후 항원 펩타이드를 혼합하면서 자가조립을 통해 MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클을 제작하였으며, 상기 나노파티클이 항원 특이 T 세포를 자극하여 이의 증식을 유도하는 것을 확인하였다(도 6). 이에 따라, 본 발명의 나노파티클은 항원 특이 T 세포를 자극하여 항원 특이 T 세포의 증식을 유도할 수 있으며, 인공 항원제시복합체로 사용될 수 있음에 따라 체내뿐 아니라 체외에서도 분리된 T 세포와 반응하여 T 세포의 증식을 촉진시킬 수 있다.
- [0047] 또 다른 일구현예로서, 본 발명은 상기 나노파티클을 포함하는, 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물은 백신 형태일 수 있다.
- [0048] 특히 본 발명에 따른 나노파티클은 T 세포의 증식 촉진을 가져오므로 T 세포 기반 백신으로 이용할 수 있다.
- [0049] 아울러, 상기 나노파티클을 포함함으로써, 본 발명은 기존의 생균백신의 독성에 관한 문제 및 항원성이 떨어지는 사균백신의 문제를 모두 해결하여 부작용이 없으면서도 효과가 뛰어난 면역 증강용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 면역 증강용 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 적절한 보조제, 기타 통상적인 물질들을 더욱 포함할 수 있고, 면역학적 효과량으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 용어, "면역학적 효과량"이란 면역 증강 효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 정확한 투여 농도는 투여될 특정 면역원에 따라 달라지며 면역반응의 발생을 검사하기 위하여 당업자가 공지된 방법을 이용하여 이를 결정할 수 있다. 또한, 투여형태 및 경로, 수용자의 연령, 건강 및 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 및 치료 횟수에 따라 변화될 수 있다.

- [0051] 담체는 당 분야에 공지로 것으로 안정화제, 희석제, 완충액을 포함할 수 있다. 적절한 안정화제는 솔비톨, 락토즈, 만니톨, 전분, 당, 텍스트란 및 포도당 같은 탄수화물; 알부민 또는 카제인 같은 단백질 등을 포함할 수 있다. 적절한 희석제에는 염, Hanks 균형 염, 링거액 등을 포함할 수 있다. 적절한 완충액에는 알칼리 금속 인산염, 알칼리 금속 탄산염, 알칼리 토금속 탄산염 등을 포함한다. 또한 백신에는 면역반응을 개선 또는 강화시키기 위하여 하나 이상의 면역 아쥘반트(adjutant)를 포함할 수 있다. 적절한 면역 아쥘반트에는 아쥘반트의 예는 알루미늄 히드록시드, 프로이드 완전 또는 불완전 아쥘반트, DEAE 텍스트란, 레바미솔, PCG 및 poly I:C 또는 poly A:U를 포함할 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 공지의 투여 경로를 통하여 투여될 수 있다. 이와 같은 방법에는 경구, 경피, 근육, 복막, 정맥, 피하, 비강 경로를 이용할 수 있지만 이에 국한되지는 않으며, 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0052] 본 발명 실시예에서는 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클을 투여하였을 때 T세포의 증식촉진을 통해 암세포의 성장이 현저하게 늦어진 것을 확인하였으며(도 8), 높은 생존율을 나타내는 것을 관찰하였다(도 9). 또한, 실험결과로부터 상기 나노파티클은 T 세포 증식이 필요한 질환, 특히 후천성 면역 결핍 증후군(AIDS) 및 C형 간염에 대한 예방 또는 치료에 사용할 수 있음을 확인하였다.
- [0053] 이에 따라 본 발명의 또 다른 일구현에는 상기 나노파티클을 포함하는, 암, 후천성 면역 결핍 증후군 및 C형 간염으로 이루어지는 군으로부터 선택된 T 세포 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0054] 구체적으로 상기 암 질환은 간암, 뇌암, 신장암, 췌장암, 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 방광암, 위암, 자궁암, 자궁경부암, 유방암, 갑상선암, 후두암, 인두암, 식도암, 대장암, 담관암, 담낭암, 피부암, 구강암 또는 전립선암일 수 있으나, 본 발명은 면역증강에 따른 암의 예방 또는 치료효과를 나타내는 것으로서, 암의 종류에 구애받지 않는바, 상기 암 질환 종류에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 또한 구체적으로, 후천성 면역 결핍증후군(AIDS)은 인간 면역결핍 바이러스(HIV, human immunodeficiency virus)에 감염되어 체내의 CD4⁺ T 세포가 파괴되어 면역력이 떨어지는 질환을 말한다. 본 발명의 나노파티클은 항원특이적 T 세포의 증식을 유도하는바, T 세포의 결핍으로 면역력이 떨어지는 후천성 면역 결핍증후군의 예방 또는 치료용도로 사용될 수 있다.
- [0056] 또한 구체적으로, C형 간염은 C형 간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV)에 감염되었을 때 이에 대응하기 위한 신체의 면역반응으로 인해 간에 염증이 생기는 질환을 의미하며, B 형 간염과 달리 백신이 개발되어 있지 않고 면역글로불린도 없는 것으로 알려져 있는바, 본 발명의 나노파티클을 이용하여 T 세포를 직접적으로 자극하여 면역반응이 증폭되도록 하여 C형 간염의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.
- [0057] 상기 약학적 조성물은 마우스, 토끼, 랫트, 기니피그, 또는 햄스터와 같은 실험 동물 또는 인간을 포함한 영장류 등에 적용될 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 인간을 포함한 영장류, 더욱 바람직하게는 인간에 적용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 약학적 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 유효성분인 상기 나노파티클의 함량은 당업자의 선택에 따라 적절히 조절하여 사용될 수 있으며, 단독으로 포함되건 또는 그 외 약리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분과 함께 포함될 수도 있다.
- [0059] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 약학적 조성물은 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 봉해제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0060] 상기 약학적 조성물의 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는

기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡슐제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있으며, 주사용 제형이 될 경우 바람직하게는 등장성 수용액 또는 현탁액의 형태가 될 수 있다.

[0061] 상기 약학적 조성물은 멸균제, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제와, 기타 치료학적으로 유용한 물질을 더 함유할 수 있으며, 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있으며, 이외에도 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 제형화할 수 있다.

[0062] 또 다른 일구현예로서, 본 발명은 MHC 수용체 단백질 및 페리틴(ferritin) 단백질의 결합체에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 결합체는 융합 단백질 형태일 수 있다. 본 발명 일실시예에서는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 균에서 유래한 페리틴(ferritin) 유전자의 5' 말단에 MHC class I H-2K^b 유전자를 클로닝을 통해 연결하여 제조하였으나, MHC 수용체 단백질 및 페리틴(ferritin) 단백질의 결합체는 유전공학적 수단인 재조합 방법 외에도 화학적 수단을 통해 연결할 수 있다.

[0063] 또 다른 일구현예로서, 본 발명은 상기 기재된 결합체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드가 RNA인 경우 DNA의 T(티민)이 우라실(U)로 대체되는 것으로 이해할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 공지된 화학적 합성법에 의해 제조할 수 있다.

[0064] 또 다른 일구현예로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.

[0065] “발현 벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물(상기 폴리뉴클레오타이드)이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다.

[0066] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다. 시그널 서열에는 숙주가 대장균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속 균인 경우에는 α-아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모인 경우에는 MFα 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널서열, α-인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 또 다른 일구현예로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다.

[0068] 형질전환은 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형

질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아-매개 형질전환, PEG(polyethylene glycol), 텍스트란 설페이트, 리포펙타민, 입자 충격법(particle bombardment) 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0069] 상기 형질전환세균은 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0070] 또 다른 일구현예로서, 본 발명은 결합체 및 항원 펩타이드를 혼합하는 단계를 포함하는, MHC(Major histocompatibility complex) 수용체 단백질 및 페리틴(ferritin) 단백질의 결합체를 24개 함유하는, 나노파티클의 제조 방법에 관한 것이다.

[0071] 구체적으로, MHC I 수용체 단백질 및 페리틴 단백질의 결합체, 항원 펩타이드 및 베타-2-마이크로글로불린(beta-2-microglobulin, $\beta 2\text{M}$)을 혼합하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 베타-2-마이크로글로불린($\beta 2\text{-microglobulin}$, $\beta 2\text{M}$)은 유핵세포에서 MHC 클래스 I 수용체 단백질의 부요소(minor component)로서 발현되는 면역 단백질이다. MHC 클래스 I 수용체 단백질은 α 사슬과 β 마이크로글로불린의 이합체로서, 베타-2-마이크로글로불린은 불안정한 MHC 클래스 I 수용체 단백질이 고정시켜주는 역할을 하게 된다.

[0072] 상기와 같은 베타-2-마이크로글로불린의 역할상, MHC 클래스 I 수용체 단백질을 고정시켜주거나, 구조를 안정화시킬 수 있는 단백질이면 제한없이 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0073] 본 발명의 융합단백질 및 나노파티클을 이용하여 T 세포의 증식을 자극하여 면역반응을 강화할 수 있으므로 이를 포함하는 면역 증강용 백신 개발에 활용될 수 있으며, 암 세포의 성장을 억제하여, 암 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 pET-23a 벡터시스템에 클로닝된 pET-23a-H-2K^b-페리틴 발현벡터의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 봉입체(inclusion body)상태로 존재하는 H-2K^b-페리틴 융합단백질을 SDS-PAGE를 통해서 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 H-2K^b-페리틴 융합단백질 및 베타-2-마이크로글로불린을 혼합하여 나노파티클을 제조하고 정제하는 과정을 모식도로 나타낸 것이다.

도 4는 정제된 나노파티클을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 제조된 나노파티클의 전자현미경(TEM) 사진을 나타낸 것이다.

도 6은 인공 항원 제시 복합체로서의 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 투여 후 항원 특이 T 세포를 확인하기 위한 실험의 개요도를 나타낸 것이다.

도 7은 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클과 대조군으로서의 아무것도 처리하지 않은 군 및 MHC/H60₃₉₋₄₆-페리틴 나노파티클 처리 후 7일, 9일 및 12일 제의 항원 특이 T 세포의 비율을 나타낸 것이다.

도 8은 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클과 대조군으로서의 MHC/H60₃₉₋₄₆-페리틴 나노파티클 처리 후 7일, 9일 및 12일 제의 항원 특이 T 세포 FACS를 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 인공 항원 제시 복합체로서의 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 및 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 각각 투여

후 항원 특이 T 세포의 증식 효과를 비교하기 위한 실험의 개요도를 나타낸 것이다.

도 10은 MHC/ OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 및 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 각각 10 μ g, 50 μ g씩 투여한 후 항원 특이 T 세포의 증식 효과를 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 11은 비투여군과 MHC/H60₃₉₋₄₆-페리틴 나노파티클을 투여한 군에서 항원 특이 T 세포가 거의 나타나지 않음을 나타낸 그래프이다.

도 12는 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 또는 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 투여한 마우스에서의 암세포 성장을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 또는 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 각각 투여한 마우스의 생존율을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. MHC-페리틴 융합단백질의 제작 및 정제

헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 균에서 유래한 페리틴(ferritin) 유전자(서열번호 1)의 5' 말단에 (GGGS)₃ 링커(서열번호 3)를 PCR을 통해 연결 및 증폭 후 C57BL/6 마우스의 MHC class I H-2K^b(서열번호 2) 유전자와 함께 대장균(*E. coli*)에서 발현시킬 수 있는 pET-23a 벡터 시스템의 BamHI과 XhoI 사이트에 클로닝을 통해 삽입하였다.

표 1

서열번호	방향	프라이머 서열(5'-3')
4	정방향	5'-GGA TCC GGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC AGC atg tta tca aaa gac atc-3'
5	역방향	5'-CTC GAG TCA TTA AGA TTT CCT-3'

상기 클로닝을 통해 제작된 플라스미드를 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질전환 시킨 후 4시간 동안 37℃에서 1mM IPTG를 이용하여 과발현시켰다.

박테리아 세포들을 모은 후 solution buffer(50mM TrisHCl, 25% sucrose, 1mM NaEDTA, 0.1% NaAzide, 10mM DTT, pH 8.0)에 풀어주고 음파처리(sonication)를 하였다. 이후, lysozyme, DNase I, MgCl₂, lysis buffer(50mM TrisHCl, 1% Triton X-100, 0.1% Na deoxycholate, 100mM NaCl, 0.1% NaAzide, 10mM DTT, pH 8.0)를 넣고 반응 시켜준 후에 펠렛(pellet)을 20분 동안 11,000g에서 원심분리 해주고, Triton X-100이 들어있는 washing buffer(50mM Tris-HCl, 0.5% Triton X-100, 100mM NaCl, 1mM NaEDTA, 0.1% NaAzide, 1mM DTT, pH 8.0)로 봉입체(inclusion body)를 풀어주었다. Triton X-100을 제거해 주기 위해 20분 동안 11,000g로 원심분리하여 펠렛을 침전 시킨 후, Triton X-100이 첨가되어있지 않은 washing buffer(50mM TrisHCl, 100mM NaCl, 1mM NaEDTA, 0.1% NaAzide, 1mM DTT, pH 8.0)로 다시 풀어주었다. 20분 동안 11,000g로 원심분리하여 침전시킨 펠렛을 8M urea(25mM MES, 8M Urea, 10mM NaEDTA, 0.1mM DTT, pH 8.0)에 용해시키고 초원심분리 튜브(ultracentrifugation tube)로 옮긴 후 Ti 100 로터(rotor)를 사용하여 20분 동안 48,100rpm으로 초원심분리(ultracentrifugation)하여 최종적으로 상층액을 융합단백질로써 얻어냈다. 최종적으로 얻은 정제된 융합단백질은 10% SDS-PAGE를 통하여 확인하였고(도 2), 적정량씩 나눠서 -80℃에 보관하여 사용하였다. 제조된 H-2K^b-페리틴 융합단백질의 유전자 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 6 및 서열번호 7로 나타내었다.

[0081] 실시예 2. MHC/항원펩타이드-페리틴 24-mer 나노파티클(homopolymer) 및 MHC/항원펩타이드 테트라머(tetramer)의 제작

[0082] 대장균에서 과발현시켜 얻은 융합단백질인 MHC(H-2K^b)-페리틴 중쇄(heavy chain) 및 베타-2-마이크로글로불린(beta-2- microglobulin)을 고농도로 존재하는 H-2K^b-제한 펩타이드(H-2K^b-restricted peptide)와 함께 리폴딩 버퍼(refolding buffer, 100mM Tris-HCl, 400mM L-arginine-HCl, 2mM NaEDTA, 0.5mM oxid. glutathione, 5mM red. glutathione)에서 폴딩(folding)하여 MHC/항원펩타이드-페리틴 융합단백질 나노파티클을 제작하였다.

[0083] H-2K^b-제한 펩타이드로 난알부민(ovalbumin)의 잘 알려진 T 세포 에피토프인 OVA₂₅₇₋₂₆₄(SIINFEKL, 서열번호 8)를 사용하였으며, 대조군으로 H60₃₉₋₄₆(LTFNYRNL, 서열번호 9) 펩타이드를 사용하여 나노파티클을 제작하였다. 이후 젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다(도 3 및 도 4).

[0084] H-2K^b / OVA₂₅₇₋₂₆₄ 단량체(monomer) 역시 동일한 방법으로 제작하였으며, 제작된 H-2K^b / OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 및 H-2K^b / OVA₂₅₇₋₂₆₄ 단량체(monomer)를 사이즈 배제 정제방법(size exclusion purification)인 Superdex-75 fast performance liquid chromatography(FPLC)를 통해 정제 후 사용하였다. 단량체는 중쇄의 C 말단에 존재하는 바이오틴화 사이트(biotinylation site)에 바이오틴-단백질 리가아제 BirA(biotin-protein ligase BirA), d-바이오틴(d-biotin) 및 ATP를 이용하여 바이오틴화하고, 젤 여과 후 정제된 단량체와 PE-conjugated 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 PE-free 스트렙타비딘을 10:1의 분자비(molar ratio)로 반응시켜 테트라머를 제작하였다.

[0085] 실시예 3. 제조된 나노파티클의 투과전자현미경(Transmission electron microscope, TEM)을 통한 확인

[0086] 정제된 MHC/항원펩타이드-페리틴 융합단백질 나노파티클 용액 3ul를 EM 그리드(grid)에 올리고 3ul의 2% 아세트산우라닐(uranyl acetate) 용액으로 염색 후 공기 중에 말려 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과, MHC/항원펩타이드-페리틴 융합단백질 나노파티클로 여겨지는 나노미터 크기(약 27nm)의 구형에 가까운 형태를 관찰할 수 있었다(도 5).

[0087] 실시예 4. MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클의 OVA 특이 T 세포의 증식효과 확인

[0088] MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클이 인공 항원 제시 복합체로서 OVA 항원에 대한 특이 T 세포를 자극하고 증식시킬 수 있는지 확인하기 위하여, OT1 유전자변형 마우스의 비장세포 중 OVA 항원 특이 T 세포를 꼬리 정맥으로 투여하고 하루 뒤 MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클을 투여하였다(도 6). 상기 MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클로서 상기 실시예 2를 통해 제작된 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클을 사용하였다.

[0089] 구체적으로, OT1 유전자변형 마우스의 비장세포 중 OVA 항원 특이 T 세포를 암컷 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥으로 5x10⁵ cells/mouse의 양으로 넣어주어 OVA에 특이적으로 반응 할 수 있는 T 세포를 늘려준 상태에서 하루 뒤에 MHC/ OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 및 H-2Kb/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 꼬리 정맥으로 100μg씩 각각 투여하였고, 대조군으로는 아무것도 투여하지 않은 군과 MHC/H60₃₉₋₄₆-페리틴 나노파티클을 100μg 투여한 군을 사용하였다.

[0090] 투여한 후 7일, 9일 및 12일에 각각 안와정맥총(Retro-Orbital plexus)에서 얻은 혈액 내에 존재하는 OVA 특이 T 세포를 테트라머 염색(tetramer staining)을 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0091] 투여 후 7일 째에는 MHC/ OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클을 투여한 군이 다른 두 대조군에 비해 많은 항원 특이 T 세포가 존재하는 것을 확인 할 수 있었다. 투여 후 9일 째 및 12일 째에는 7일 째와 비교하여 감소한 것을 관찰

하였으며, 두 대조군은 7일, 9일 및 12일 모두 큰 변화없이 낮은 수치를 나타내었다.

[0092] 이 결과를 통하여, MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클이 항원 특이적으로 T 세포를 자극하고 증식시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0093] **실시예 5. OVA 항원 특이 세포독성 T 세포의 확인**

[0094] 상기 실시예 2에서 제조한 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 및 대조군인MHC/H60₃₉₋₄₆-페리틴 나노파티클 10ug 또는 50ug을 암컷 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥으로 투여 후, 7일째에 마우스의 안와정맥총에서 얻은 혈액을 FACS 버퍼(0.5% FBS, 0.09% NaN₃ in PBS)로 세척한 후, 정제된 랫트 항-마우스 CD16/CD32 (BD biosciences, California, USA)와 5μg/ml의 스트렙타비딘 (Invitrogen)을 얼음에서 20분간 반응시켰다. FACS 버퍼로 세척한 후, FITC-conjugated 항-CD44, PE-conjugated OVA₂₅₇₋₂₆₄/Kb 테트라머, PE-Cy5-conjugated 항-CD8 및 APC(antigen presenting cell)-conjugated 항-CD45와 반응시켜 염색하였다. 이후 FACS lysing용액으로 20분간 실온에서 반응시켜 적혈구를 용해시키고 세포를 고정한 후, FACS Calibur cytometer (BD Bioscience, SanDiego, CA)를 사용하여 측정하였다. 이후 CD8⁺ 세포를 모아서 Y축은 테트라머, X축은 CD44로 점 도표(dot plot)를 작성한 후 이중 양성 세포(double positive cell)를 활성화된 OT-1 세포로 판단하였다. Flow cytometry 분석은 Flowjo software (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA)를 사용하였다.

[0095] 투여하고 7일째 이후, 대조군에 비해 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클을 투여하였을 때 활성화된 OT-1 세포의 수가 현저히 많음을 알 수 있었으며(도 8), 이 결과를 통하여, MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클이 항원 특이적으로 T 세포를 자극하고 증식시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0096] **실시예 6. MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클 및 MHC/항원펩타이드-페리틴 테트라머의 항원 특이 T 세포의 증식 효과 비교**

[0097] 인공 항원 제시 복합체로서 MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클과 MHC/항원펩타이드-페리틴 테트라머의 T 세포 자극 효율을 비교하기 위하여, MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클 및 MHC/항원펩타이드-페리틴 융합단백질 테트라머를 각각 동량으로 투여 후 항원 특이 T 세포의 증식 정도를 비교하였으며, 상기 실시예 2에서 제작한 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 및 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 테트라머를 사용하였다.

[0098] 구체적으로, OT1 유전자변형 마우스의 비장세포 중 OVA 항원 특이 T 세포를 암컷 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥으로 5x10⁵ cells/mouse의 양으로 넣어주어 OVA에 특이적으로 반응 할 수 있는 T 세포를 늘려준 상태에서 하루 뒤에 MHC/ OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 및 H-2Kb/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 꼬리 정맥으로 10μg, 50μg씩 투여하였고, 대조군으로는 아무것도 투여하지 않은 군과 MHC/H60₃₉₋₄₆-페리틴 나노파티클을 50μg 투여한 군을 사용하였다(도 9).

[0099] 투여 후 7일째 되는 날 안와정맥총(Retro-Orbital plexus)에서 얻은 혈액 내에 존재하는 OVA 특이 T 세포를 테트라머 염색(tetramer staining)을 이용하여 측정 후 비교하였고, 그 결과는 도 9 및 도 10에 나타내었다.

[0100] 그 결과, MHC/ OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 및 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 각각 10μg씩 투여한 경우에는 차이가 나지 않았으나, 50μg씩 투여한 경우에는 MHC/ OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클을 투여한 경우에 OVA 항원 특이 T 세포가 더 많이 존재하는 것을 확인할 수 있었다(도 10). 대조군에서는 OVA 항원 특이 T 세포가 거의 존재하지 않았다(도 11).

[0101] 상기 결과는 50μg이상 투여해 줄 경우 MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클이 MHC 테트라머 보다 더욱 효과적으로 항원 특이적 T 세포를 자극하고 증식시킬 수 있음을 나타내었다. 이러한 결과로부터 본 발명의 MHC-페리틴 결합체로 형성된 나노파티클을 인공 항원 제시 복합체로서 사용 할 수 있음을 알 수 있었다.

[0102] **실시예 7. MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클의 암세포 성장 억제효과 확인**

[0103]

상기 실시예 2에서 제조한 MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클로 인해 증가한 OVA 항원 특이 T 세포가 암세포의 성장을 억제시킬 수 있는 세포독성이 존재하는지 확인하기 위하여, MHC/ OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클, HC/H60₃₉₋₄₆-페리틴 나노파티클 및 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 각각 10 μ g 또는 50 μ g의 양으로 꼬리정맥에 투여하였으며, 투여 후 19일 째에 고형암을 발생시키는 1 x 10⁶ cells의 EG7 종양세포를 피하투여 하였다. 그 결과 MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클을 투여한 군의 경우, HC/H60₃₉₋₄₆-페리틴 나노파티클을 투여하거나, H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 투여한 경우, 아무것도 투여하지 않은 마우스에 비해 암세포의 성장이 현저하게 늦어진 것을 확인할 수 있었다(도 12). 또한, 마우스 내의 암세포 크기가 200mm 이상이 되었을 경우 사망한 것으로 판단하였으며, MHC/OVA₂₅₇₋₂₆₄-페리틴 나노파티클 또는 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 테트라머를 투여한 마우스는 높은 생존율을 나타내었다(도 13).

[0104]

이러한 결과는 MHC/ OVA₂₅₇₋₂₆₄- 페리틴 나노파티클을 투여하였을 경우, OVA 항원 특이 T 세포가 증가하여 이에 따른 세포독성에 의해 암세포의 성장이 억제 되어 암에 대한 보호 효과를 나타낼 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

[0105]

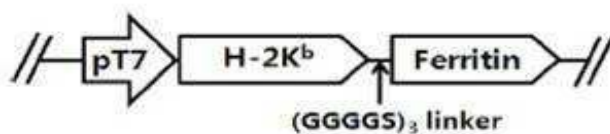
종합하면, 상기 결과들은 본 발명에 따른 MHC/항원펩타이드-페리틴 나노파티클은 생체 내에서 항원 특이 T 세포를 자극하여 이를 증식시키는 인공 항원제시 복합체로 사용할 수 있으며, 향후 T 세포 기반 백신 또는 T 세포의 증폭이 필요한 질병, 예컨대 암, 후천성 면역 결핍증(HIV) 또는 C형 간염(HCV)과 같은 질병에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0106]

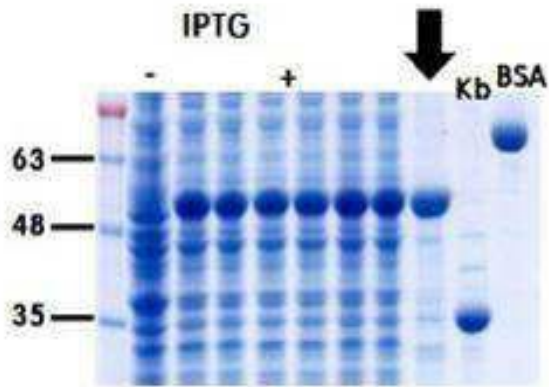
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

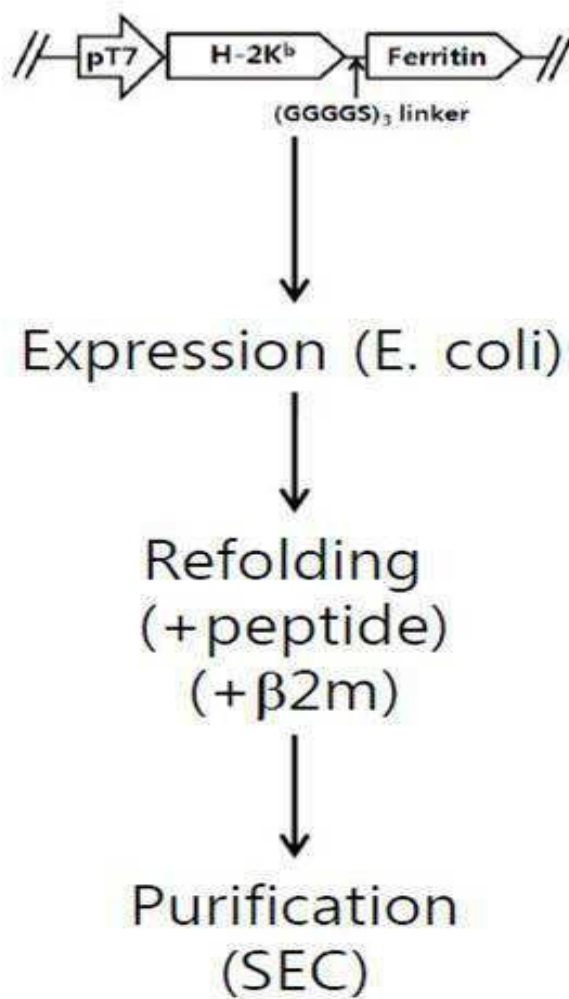
도면1



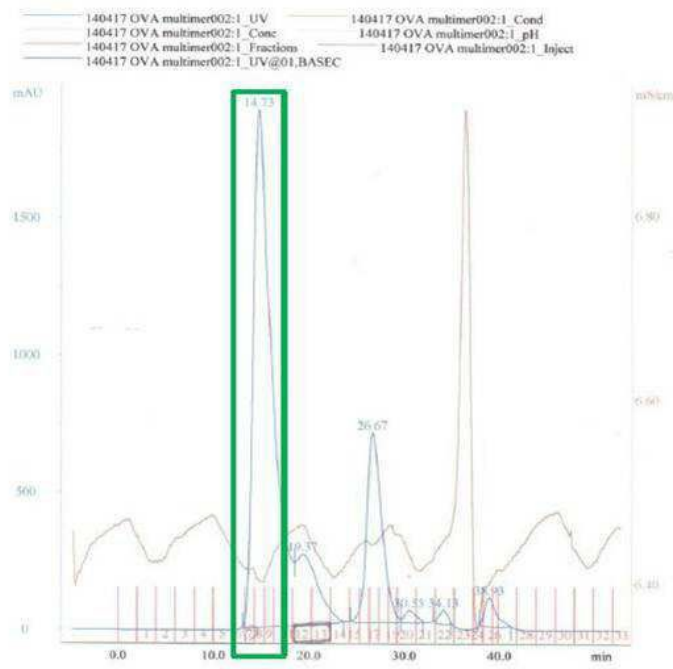
도면2



도면3

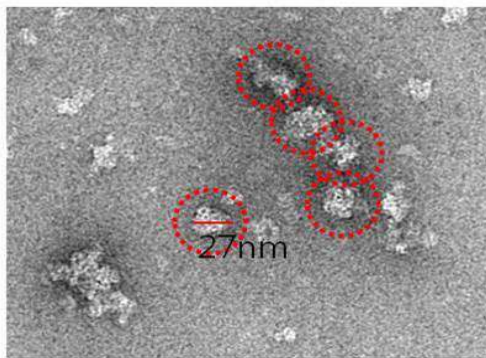


도면4



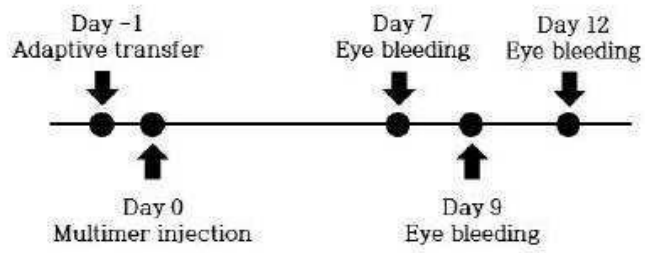
도면5

TEM

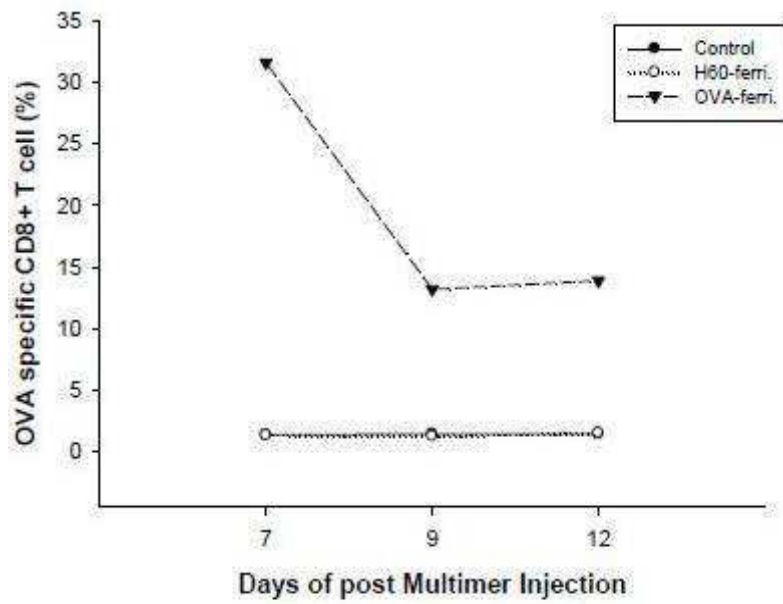


H-2K^b/OVA-ferritin (0.5mg/ml)

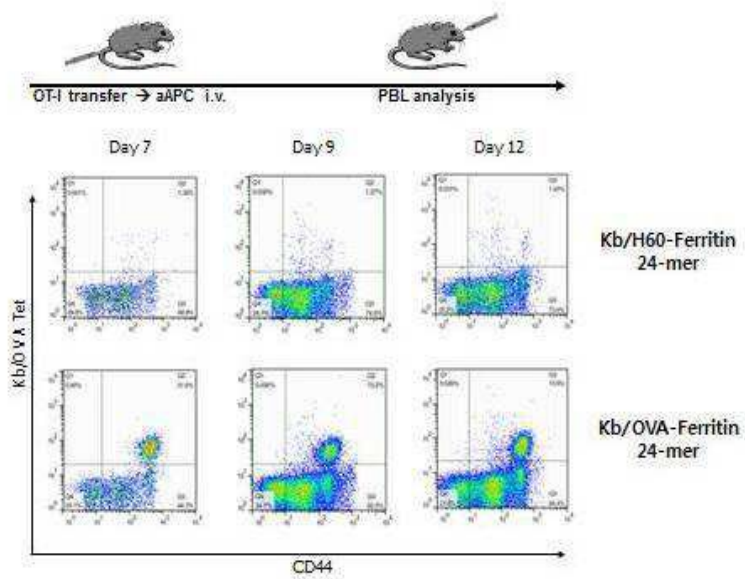
도면6



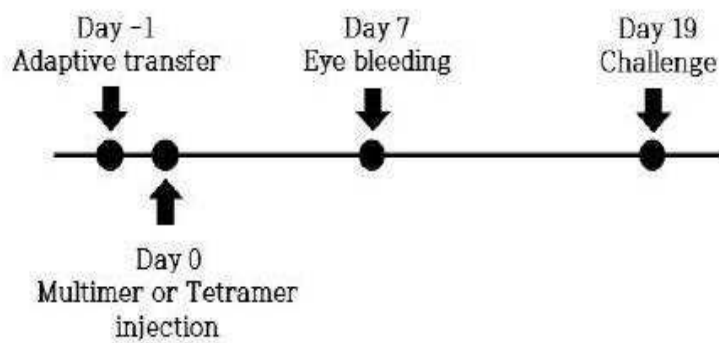
도면7



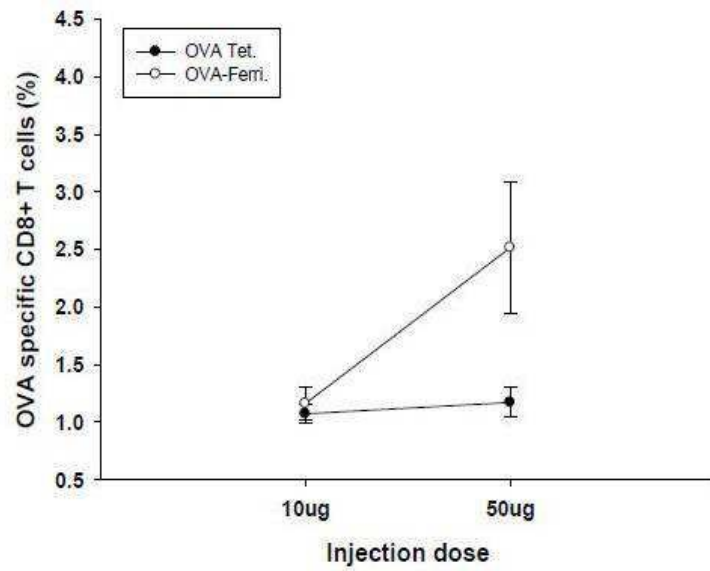
도면8



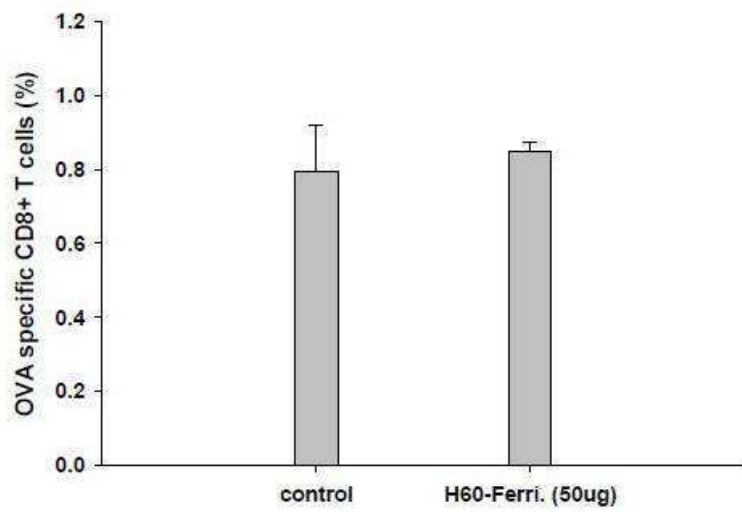
도면9



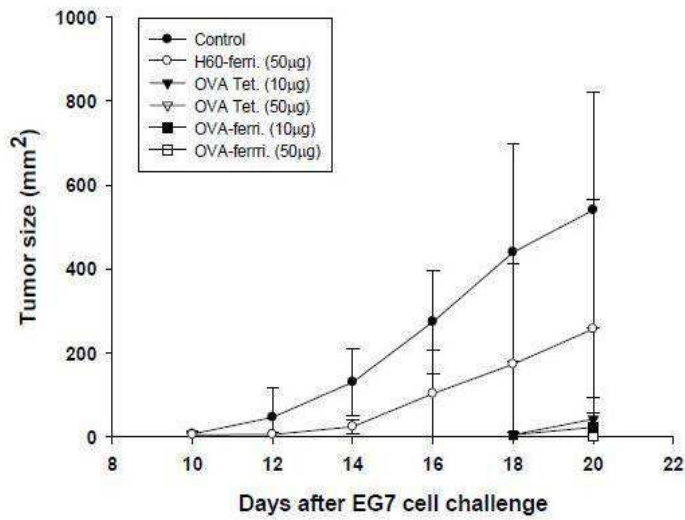
도면10



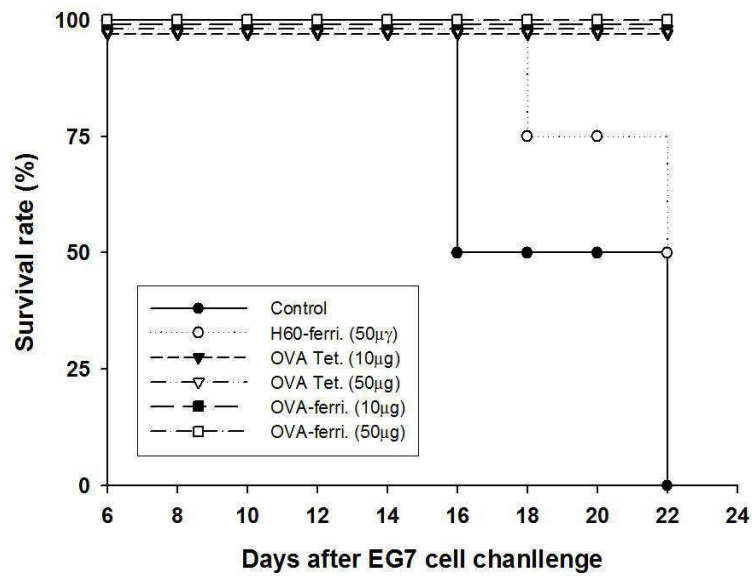
도면11



도면12



도면13



서열목록

- <110> Ewha university-Industry Collaboration Foundation
- <120> MHC-ferritin conjugates, a nanoparticle comprising the same and the use thereof
- <130> KPA140383-KR
- <160> 79
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 507
 <212> DNA
 <213> Helicobacter pylori
 <220><221> gene
 <222> (1)..(507)
 <223> ferritin
 <400> 1

atgttatcaa aagacatcat taagttgcta aacgaacaag tgaataagga aatgaactct 60
 tccaacttgt atatgagcat gagttcatgg tgctataccc atagcttaga tggcgcgggg 120

cttttcttgt ttgaccatgc ggctgaagaa tacgagcatg ctaaaaagct tattatcttc 180
 ttgaatgaaa acaatgtgcc tgtgcaatg accagcatca gcgcgctga gcataagttt 240
 gaaggtttga ctcaaatttt ccaaaaagcc tatgaacatg agcaacacat cagcgagtct 300
 attaacaata tcgtagatca cgccataaaa agcaaagatc atgcgacttt caatttcttg 360
 caatggatg tggctgaaca gcatgaagaa gaagtgcctt tcaaggatat tttggataaa 420
 attgagttga ttggtaatga aaaccatggc ttgtatttag ccgatcagta tgtcaaaggg 480
 atcgctaaaa gcaggaaatc ttaatga 507

<210> 2
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H-2Kb peptide
 <400> 2

Met Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 Gly Leu Gly Glu Pro Arg Tyr Met Glu Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr
 20 25 30
 Glu Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Glu Asn Pro Arg Tyr Glu Pro
 35 40 45
 Arg Ala Arg Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Arg Glu
 50 55 60
 Thr Gln Lys Ala Lys Gly Asn Glu Gln Ser Phe Arg Val Asp Leu Arg

65 70 75 80
 Thr Leu Leu Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Ile
 85 90 95
 Gln Val Ile Ser Gly Cys Glu Val Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg
 100 105 110
 Gly Tyr Gln Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Cys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn
 115 120 125

 Glu Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Leu Ile Thr
 130 135 140
 Lys His Lys Trp Glu Gln Ala Gly Glu Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr
 145 150 155 160
 Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Asn Gly
 165 170 175
 Asn Ala Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr His
 180 185 190
 His Ser Arg Pro Glu Asp Lys Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly

 195 200 205
 Phe Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Glu
 210 215 220
 Leu Ile Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly
 225 230 235 240
 Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln
 245 250 255
 Tyr Tyr Thr Cys His Val Tyr His Gln Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr
 260 265 270

Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser
 275 280

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (GGGGS)3 linker

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 4

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 4

ggatccggcg gcggcggcag cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag catgttatca 60

aaagacatc 69

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 5

ctcgagtcac taagatttcc t 21

<210> 6

<211> 1398

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide sequence of H-2Kb-ferritin fusion protein

<400> 6

atgggtccac actcgtctgag gtatttcgtc accgccgtgt cccggcccgg cctcggggag 60

ccccggtaca tggaagtcgg ctacgtggac gacacggagt tcgtgcgctt cgacagcgac 120

gcggagaatc cgagatatga gccgcgggcg cggcggatgg agcaggaggg gcccagat 180

tgggagcggg agacacagaa agccaagggc aatgagcaga gtttcgaggt ggacctgagg 240

accctgctcg gctactacaa ccagagcaag ggcggctctc acactattca ggtgatctct 300

ggctgtgaag tggggtccga cgggcgactc ctccgcgggt accagcagta cgcctacgac 360

ggctgcgatt acatgcacct gaacgaagac ctgaaaacgt ggacggcggc ggacatggcg 420

gcgctgatca ccaaacacaa gtgggagcag gctggtgaag cagagagact cagggcctac 480

ctggagggca cgtgcgtgga gtggctccgc agatacctga agaacgggaa cgcgacgctg 540

ctgcgcacag attccccaaa ggcccatgtg acccatcaca gcagacctga agataaagtc 600

acctgaggt gctggggccct gggcttctac cctgctgaca tcacctgac ctggcagttg 660

aatggggagg agctgatcca ggacatggag cttgtggaga ccaggcctgc aggggatgga 720

accttccaga agtgggcac tctgtgtgtg cctcttggga aggagcagta ttacacatgc 780

cacgtgtacc atcaggggct gcctgagccc ctcacctga gatgggagcc tcctccatcc 840

ggatccggcg gcgcggcgag cggcggcggc ggagcggcg gcgcggcgag catgttatca 900

aaagacatca ttaagttgct aaacgaacaa gtgaataagg aaatgaactc ttccaacttg 960

tatatgagca tgagttcatg gtgctatacc catagcttag atggcgcggg gcttttcttg 1020

tttgacctg cggtgaaga atacgagcat gctaaaaagc ttattatctt cttgaatgaa 1080

aacaatgtgc ctgtgcaatt gaccagcatc agcgcgcctg agcataagtt tgaaggtttg 1140

actcaaattt tcaaaaaagc ctatgaacat gagcaacaca tcagcgagtc tattaacaat 1200

atcgtagatc acgccataaa aagcaaagat catgcgactt tcaatttctt gcaatggtat 1260

gtggctgaac agcatgaaga agaagtgtt ttcaaggata ttttgataa aattgagttg 1320

attggtaatg aaaacatgg cttgtattta gccgatcagt atgtcaaagg gatcgctaaa 1380

agcaggaaat cttaatga 1398

<210> 7

<211> 464

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-2Kb-ferritin fusion protein

<400> 7

Met Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro

1 5 10 15

Gly Leu Gly Glu Pro Arg Tyr Met Glu Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr

20 25 30

Glu Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Glu Asn Pro Arg Tyr Glu Pro

35 40 45

Arg Ala Arg Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Arg Glu

50 55 60

Thr Gln Lys Ala Lys Gly Asn Glu Gln Ser Phe Arg Val Asp Leu Arg

65	70	75	80
Thr Leu Leu Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Ile			
	85	90	95
Gln Val Ile Ser Gly Cys Glu Val Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg			
	100	105	110
Gly Tyr Gln Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Cys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn			
	115	120	125
Glu Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Leu Ile Thr			
	130	135	140
Lys His Lys Trp Glu Gln Ala Gly Glu Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr			
145	150	155	160
Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Asn Gly			
	165	170	175
Asn Ala Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr His			
	180	185	190
His Ser Arg Pro Glu Asp Lys Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly			
	195	200	205
Phe Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Glu			
	210	215	220
Leu Ile Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly			
225	230	235	240
Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln			
	245	250	255
Tyr Tyr Thr Cys His Val Tyr His Gln Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr			
	260	265	270
Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
	275	280	285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Leu Ser Lys Asp Ile Ile			
	290	295	300
Lys Leu Leu Asn Glu Gln Val Asn Lys Glu Met Asn Ser Ser Asn Leu			
305	310	315	320

Tyr Met Ser Met Ser Ser Trp Cys Tyr Thr His Ser Leu Asp Gly Ala

325 330 335
Gly Leu Phe Leu Phe Asp His Ala Ala Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys
340 345 350
Lys Leu Ile Ile Phe Leu Asn Glu Asn Asn Val Pro Val Gln Leu Thr
355 360 365
Ser Ile Ser Ala Pro Glu His Lys Phe Glu Gly Leu Thr Gln Ile Phe
370 375 380
Gln Lys Ala Tyr Glu His Glu Gln His Ile Ser Glu Ser Ile Asn Asn
385 390 395 400

Ile Val Asp His Ala Ile Lys Ser Lys Asp His Ala Thr Phe Asn Phe
405 410 415
Leu Gln Trp Tyr Val Ala Glu Gln His Glu Glu Glu Val Leu Phe Lys
420 425 430
Asp Ile Leu Asp Lys Ile Glu Leu Ile Gly Asn Glu Asn His Gly Leu
435 440 445
Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr Val Lys Gly Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser
450 455 460

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OVA257-264 peptide

<400> 8

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H60 39-46 peptide

<400> 9

Leu Thr Phe Asn Tyr Arg Asn Leu

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 10

Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ser Thr

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 11

Lys Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 12

Ala Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Val Val

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 13

Ala Leu Leu Val Val Asp Arg Glu Val

1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 14
 Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val

1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 15
 Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val

1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 16
 Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 17
 Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5
 <210> 18

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 18
 Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 19
 Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 20
 Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 21

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val
 1 5
 <210> 22
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 22
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 23
 Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 24
 Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
 1 5
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 25
 Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 26

Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 27

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 28

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 29

Gly Pro Leu Thr Pro Leu Pro Val

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 30

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 31

Lys Ala Leu Phe Ala Gly Pro Pro Val

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 32

Tyr Leu Glu Thr Phe Arg Glu Gln Val

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 33

Gly Leu Gln Ser Pro Lys Ser Pro Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 34

Val Leu Leu Lys Leu Arg Arg Pro Val

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 35

Glu Leu Tyr Ile Pro Ser Val Asp Leu

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 36

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 37

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 38

Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 39

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 40

Phe Met Trp Gly Asn Leu Thr Leu Ala

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 41

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 42

His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 43

Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 44

Glu Leu Trp Thr His Ser Tyr Lys Val

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 45

Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 46

Tyr Ile Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 47

His Leu Tyr Ile Phe Ala Thr Cys Leu

1 5

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 48

Met Leu Met Ala Gln Glu Ala Leu Ala Phe Leu

1 5 10

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 49

Ser Thr Leu Glu Lys Ile Asn Lys Thr

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 50

Lys Ala Ser Glu Lys Ile Phe Tyr Val

1 5

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

<223> antigen peptide

<400> 51

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu

1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 52

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 53

Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 54

Ser Leu Leu Glu Lys Arg Glu Lys Thr

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 55

Thr Leu Gly Glu Asp Asp Pro Trp Leu

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 56

Lys Leu Gly Leu Lys Pro Leu Glu Val

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 57

Tyr Leu Trp Thr Ser Ala Lys Asn Thr

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 58

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 59

Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu Arg Leu

1 5
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 60
 Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu Gly Leu

1 5
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 61
 Tyr Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val

1 5
 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 62
 Cys Gln Gln Glu Glu Thr Phe Leu Leu

1 5
 <210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 63
 Thr Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu

1 5
 <210> 64

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 64
 Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 65
 Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 66
 Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 67
 Phe Leu Asp Gln Arg Val Phe Phe Val
 1 5

<210> 68
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 68
 Phe Leu Asp Gln Arg Val Phe Val Val
 1 5
 <210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 69
 Phe Leu Asp Gln Val Ala Phe Val Val
 1 5
 <210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide

 <400> 70
 Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu
 1 5
 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antigen peptide
 <400> 71
 Val Met Gln His Leu Leu Ser Pro Leu
 1 5
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 72

Gln Gln Thr His Gly Ile Thr Arg Leu

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 73

Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 74

Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 75

Gln Leu Tyr Leu Glu Leu Ser Gln Leu

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 76

Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 77

Lys Val Ala Asp Leu Val Gly Phe Leu

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 78

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen peptide

<400> 79

Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu

1 5