

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)****(11) 공개번호** 10-2021-0129634  
**(43) 공개일자** 2021년10월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 39/0011* (2021.08)  
*A61K 39/001154* (2018.08)
- (21) 출원번호 10-2021-7021684  
(22) 출원일자(국제) 2019년12월13일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2021년07월09일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/066174  
(87) 국제공개번호 WO 2020/123912  
국제공개일자 2020년06월18일
- (30) 우선권주장  
62/779,422 2018년12월13일 미국(US)

- (71) 출원인  
**로드아일랜드하스피탈**  
미합중국로드아일랜드02903프로비던스에디스트리트593
- (72) 발명자  
**완즈, 잭, 알.**  
미국, 02889 로드아일랜드, 워릭, 알드리치 예비뉴 118  
**동, 샤오쿤**  
미국, 02886 로드아일랜드, 워릭, 아파트 12-308, 포스트 로드 3595
- (74) 대리인  
**특허법인 신세기**

전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 발명의 명칭 **ASPH 발현 종양의 성장 및 진행 억제****(57) 요약**

정제된 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와, 대상체에서의 종양 치료를 위한 관문 억제제를 함유하되, 단 종양은 낮은 신생항원 발현 빈도를 보이는 것을 특징으로 하고, 조성물은 대상체에서 자가면역성을 유도하지 않고 항종양 면역 반응을 향진시키는, 대상체내 면역치료를 위한 조성물 및 방법이 개시되어 있다. 활성 성분인 조성물과 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 약학 조성물, 그리고 정제된 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와 면역 관문 억제제를 함유하는 조합 조성물로서, 단 종양은 낮은 신생항원 발현 빈도를 보이는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물 및 조합 조성물도 또한 기재되어 있다.

(52) CPC특허분류

*A61K 39/395* (2013.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*A61P 35/04* (2018.01)  
*C07K 16/2818* (2013.01)  
*C07K 16/2827* (2013.01)  
*A61K 2039/5154* (2013.01)  
*A61K 2039/545* (2013.01)  
*A61K 2039/844* (2018.08)  
*A61K 2300/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와 대상체내 종양 치료를 위한 관문 억제제를 순차 투여 및/또는 동시 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 종양을 치료하기 위한 면역 치료용 조성물로서, 상기 조성물은 정제된 종양 항원과 면역 관문 억제제를 포함하고, 상기 종양은 낮은 신생항원 발현 빈도를 보이는 것을 특징으로 하며, 상기 조성물은 상기 대상체에서 자가면역성을 유도하지 않고 항종양 면역 반응을 향진시키는, 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원은 아스파르트산염 베타-하이드록실라이제(ASPH) 또는 이의 항원 단편인 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 백신 구조체는 정제 ASPH 항원을 발현하는 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 정제 N-말단 ASPH 펩티드(서열 번호 47)를 포함하는 조성물.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 정제 C-말단 ASPH 펩티드(서열 번호 49)를 포함하는 조성물.

#### 청구항 6

제3항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 서열 번호 1 ~ 45로 이루어진 균으로부터 선택되는 정제 펩티드인 조성물.

#### 청구항 7

제3항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 인간 백혈구 항원(HLA) II군 제한 서열 TGYTELVKSLERNWKLI(서열 번호 11)을 포함하는 조성물.

#### 청구항 8

제3항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 HLA I군 제한 서열 YPQSPRARY(서열 번호 26)을 포함하는 조성물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 백신 구조체는 파아지 백신 또는 수지상 세포 백신을 포함하는 조성물.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 파아지 백신은 람다 파아지 기반 백신이고, 상기 수지상 세포 백신은 단리 ASPH 부하 수지상 세포를 포함하는 조성물.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 관문 억제제는 계획 세포 사멸 단백질-1(PD-1) 억제제인 조성물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 PD-1 억제 항체, PD-1 억제 핵산, PD-1 억제 소분자 또는 PD-1 리간드 모의체인 조성물.

#### 청구항 13

제11항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 항 PD-1 모노클로날 항체인 조성물.

**청구항 14**

제11항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 항 계획 사멸 리간드 1(PD-L1) 모노클로날 항체인 조성물.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 종양 발달, 종양 성장, 종양 진행, 상이한 부위로의 전이 확산 또는 이의 조합을 감소시키는 조성물.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 내인성 면역계를 자극하는 조성물.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 ASPH 특이 B 세포 면역 반응의 발생, ASPH 특이 T 세포 면역 반응의 발생, 또는 이의 조합의 발생을 자극하는 조성물.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 분화 클러스터 8(CD8)<sup>+</sup> 세포 활성화, 분화 클러스터 4(CD4)<sup>+</sup> 세포 활성화, 또는 이의 조합의 활성화를 자극하는 조성물.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 상기 종양은 변이부담이 낮은 암인 조성물.

**청구항 20**

정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체를 대상체에 투여하는 단계와, 관문 억제제를 투여하는 단계를 포함하되, 상기 종양은 낮은 신생항원 발현 빈도를 보이는 것을 특징으로 하고, 상기 방법은 상기 대상체에서 자가면역성을 유도하지 않고 항 종양 면역 반응을 향진시키는, 상기 대상체에서 종양을 치료하는 면역치료 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 항원은 ASPH 또는 이의 항원 단편인 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 백신 구조체는 정제 ASPH 항원을 발현하는 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 정제 N-말단 ASPH 펩티드를 포함하는 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 정제 C-말단 ASPH 펩티드를 포함하는 방법.

**청구항 25**

제22항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 서열 번호 1 ~ 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 정제 펩티드인 방법.

**청구항 26**

제22항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 HLA II군 제한 서열 TGYTELKSLERNWKLI(서열 번호 11)을 포함하는 방법.

**청구항 27**

제22항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 HLA I군 제한 서열 YQSPRARY(서열 번호 26)을 포함하는 방법.

**청구항 28**

제20항에 있어서, 상기 백신 구조체는 파아지 백신 또는 수지상 세포 백신을 포함하는 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 파아지 백신은 람다 파아지 기반 백신이거나, 상기 수지상 세포 백신은 단리 ASPH 부하 수지상 세포를 포함하는 방법.

**청구항 30**

제20항에 있어서, 상기 관문 억제제는 PD-1 억제제인 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 PD-1 억제 항체, PD-1 억제 핵산, PD-1 억제 소분자 또는 PD-1 리간드 모의체인 방법.

**청구항 32**

제30항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 항 PD-1 모노클로날 항체인 방법.

**청구항 33**

제30항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 항 PD-L1 모노클로날 항체인 방법.

**청구항 34**

제20항에 있어서, 상기 면역화는 예방적 면역화와 부스터 면역화를 포함하는 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 상기 예방적 면역화는 상기 대상체에 상기 백신 구조체를 1주일 간격으로 3회 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 36**

제34항에 있어서, 상기 부스터 면역화는 상기 대상체에 상기 백신 구조체를 1주일 간격으로 3회 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 37**

제20항에 있어서, 상기 관문 억제제는 상기 백신 구조체와 동시 및/또는 순차 투여되는 방법.

**청구항 38**

제20항에 있어서, 상기 관문 억제제는 5주 ~ 6주 동안 매주 2회 백신과 동시 및/또는 순차 투여되는 방법.

**청구항 39**

제20항에 있어서, 상기 종양은 변이부담이 낮은 암인 방법.

**청구항 40**

제20항에 있어서, 상기 종양은 고형 종양인 방법.

**청구항 41**

제20항에 있어서, 상기 종양은 간세포 암종, 담도암종, 비 소세포 폐암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 위암, 췌장

암, 식도암, 연조직 암, 육종, 골육종, 결장암, 직장암, 골수성 백혈병, 전립선암, 교모세포종 및 림프성 백혈 병으로부터 선택되는 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 상기 종양은 간세포 암종인 방법.

**청구항 43**

제20항에 있어서, 상기 방법은 종양 발달, 종양 성장, 종양 진행, 상이한 부위로의 전이 확산 또는 이의 조합을 감소시키는 것과 연관된 방법.

**청구항 44**

제20항에 있어서, 상기 방법은 내인성 면역계를 자극하는 것과 연관된 방법.

**청구항 45**

제20항에 있어서, 상기 방법은 ASPH 특이 B 세포 면역 반응의 발생, ASPH 특이 T 세포 면역 반응의 발생, 또는 이의 조합의 발생과 연관된 방법.

**청구항 46**

제20항에 있어서, 상기 방법은  $CD8^+$  세포 활성화,  $CD4^+$  세포 활성화, 또는 이의 조합의 활성화와 연관된 방법.

**청구항 47**

제1항 내지 제19항에 의한 상기 조성물을 활성 성분으로서 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 제20항 내지 제46항에 의한 상기 방법을 위한 약학 조성물.

**청구항 48**

정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와 관문 억제제를 포함하는 조합 조성물로서, 상기 종양은 낮은 신생항원 발현 빈도를 보이는 것을 특징으로 하는, 조합 조성물.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 상기 항원은 ASPH 또는 이의 항원 단편인 조성물.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 상기 백신 구조체는 정제 ASPH 항원을 발현하는 조성물.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 정제 N-말단 ASPH 펩티드를 포함하는 조성물.

**청구항 52**

제50항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 정제 C-말단 ASPH 펩티드를 포함하는 조성물.

**청구항 53**

제50항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 서열 번호 1 ~ 45로 이루어진 균으로부터 선택되는 정제 펩티드인 조성물.

**청구항 54**

제50항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 인간 백혈구 항원(HLA) II군 제한 서열 TGYTELVKSLERNWKLI(서열 번호 11)을 포함하는 조성물.

**청구항 55**

제50항에 있어서, 상기 정제 ASPH 항원은 HLA I군 제한 서열 YPQSPRARY(서열 번호 26)을 포함하는 조성물.

**청구항 56**

제48항에 있어서, 상기 백신 구조체는 파아지 백신 또는 수지상 세포 백신을 포함하는 조성물.

**청구항 57**

제56항에 있어서, 상기 파아지 백신은 람다 파아지 기반 백신이거나, 상기 수지상 세포 백신은 단리 ASPH 부하 수지상 세포를 포함하는 조성물.

**청구항 58**

제48항에 있어서, 상기 관문 억제제는 PD-1 억제제인 조성물.

**청구항 59**

제58항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 PD-1 억제 항체, PD-1 억제 핵산, PD-1 억제 소분자 또는 PD-1 리간드 모의체인 조성물.

**청구항 60**

제58항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 항 PD-1 모노클로날 항체인 조성물.

**청구항 61**

제58항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 항 PD-L1 모노클로날 항체인 조성물.

**청구항 62**

대상체에서 전이를 억제하기 위한 면역치료 방법으로서, 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와, 면역 관문 억제제를 상기 대상체에 동시 및/또는 순차 투여하는 단계를 포함하는 면역치료 방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 상기 백신은 피내, 피하, 비내, 근육내, 종양내, 결절내, 림프내, 정맥내, 위내, 복막내, 질내, 방광내 또는 경피 경로를 통해 투여되는 방법.

**청구항 64**

대상체에서 원발성 종양의 성장을 억제하기 위한 면역치료 방법으로서, 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와, 면역조절인자를 상기 대상체에 동시 및/또는 순차 투여하는 단계를 포함하는 면역치료 방법.

**청구항 65**

제64항에 있어서, 상기 면역조절인자는 관문 억제제를 포함하는 방법.

**청구항 66**

제19항에 있어서, 상기 낮은 변이부담은 메가베이스당 0.001 ~ 1 이하의 체세포 돌연변이를 보이는 조성물.

**청구항 67**

대상체에서 종양의 성장을 억제하거나 종양의 전이를 억제하기 위한 방법으로서, 제1항에 의한 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 68**

제67항에 있어서, 상기 조성물을 상기 대상체에 투여하는 상기 단계는 상기 대상체에서 종양 성장 또는 종양 전이의 상승적 억제를 유도하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] **관련 출원**
- [0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에서, 그 내용 전체가 본원에 전체로서 참고문헌으로 첨부되어 있는 미국 가명세서 출원 제62/779,422호(2018년 12월 13일 출원)에 대해 우선권의 이익을 주장하고 있다.
- [0003] **참조로서의 서열 목록 첨부**
- [0004] 2019년 11월 11일에 생성되었으며, 크기가 24,576 바이트인 파일명 "21486-642001W0\_Sequence\_Listing\_ST25.txt"의 서열 목록 텍스트 파일의 내용은 본원에 전체로서 참조로 첨부되어 있다.
- [0005] **발명의 분야**
- [0006] 본 발명은 암을 치료하기 위한 면역치료에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0007] 아스파르트 아스파라기닐 β-하이드록실라아제(ASPH), 경막 암태아 단백질이자 종양 연관 항원(TAA)은 성체에서 악성 세포 다수의 유형에 존재하되, 정상 세포(태반 제외)에는 존재하지 않는다. 고휘 종양 약 80%가 종양 세포의 증식, 생존, 이동, 침습, 줄기세포능(stemness) 및 전이에 필요한 발암유전자인 ASPH를 (인접한 정상 조직에 비해) 과발현한다. 비록 암 치료 분야에서 유의미한 발전이 이루어졌지만, 이러한 파괴적인 질환에 대해 현재 이용 가능한 유효 접근법은 거의 존재하지 않는다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

- [0008] 본 발명은 종양의 발달, 성장, 재발 및 진행뿐 아니라 체내 다른 부위 및 장기로의 전이 확산에 대하여 예상치 못했고 극적인 억제를 달성하기 위한 방법을 제공함으로써, 암 치료법과 관련하여 오랫동안 대두되었던 문제에 대한 해결책을 제공한다. (예컨대 적절한 경우 비교적 "높은" 것으로 간주되는 경우가 메가베이스당 1 초과, 10, 100 또는 100 초과 체세포 돌연변이인 것에 비해, 메가베이스당 0.001 내지 1 이하의 체세포 돌연변이를 보이는) 비교적 낮은 종양변이부담(TMB) 또는 비교적 낮은 신생항원 발현 빈도에 의해 특징지어지는 특정 종양 군의 특별히 정의된 정제 종양 항원(들)(예컨대 ASPH의 N 말단 펩티드(표 4의 서열 번호 47)를 발현하는 람다 과아지 1)에 대한 항원 특이 면역 반응은 (관문 억제제를 비롯한) 면역조절인자의 순차 투여 또는 동시 투여로 말미암아 엄청나게 증폭될 수 있다. 예를 들어 낮은 TMB는 높은 TMB에 상대적인 것인데, 예컨대 메가베이스당 0.001 내지 1 이하인 체세포 돌연변이(낮은 TMB)는 메가베이스당 1 초과, 10, 100 또는 100 초과 체세포 돌연변이(높은 TMB)와 비교된다.
- [0009] 투여는 화합물 또는 조성물을 각각 또는 조합하여(1개를 초과하는 화합물 또는 제제) 동시 투여 또는 순차 투여하는 것을 포함하는 의미이다. 예를 들어 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체는 관문 억제제와 동시에 투여될 수 있다.
- [0010] 다른 예들에서, 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체는 관문 억제제에 대해 순차 투여될 수 있다. "순차" 투여된 2가지 유형의 제제(예컨대 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와 관문 억제제)들이 투여되는 사이사이에 수초, 수분, 수 시간 또는 수일의 시간 차가 주어지는 투여를 의미한다. 이 제제들은 임의의 순서로 투여될 수 있다.
- [0011] 본 발명은 혈액암(예컨대 백혈병) 및 다양한 고휘 종양, 예컨대 간, 췌장, 위, 식도, 결장, 직장, 담관, 담낭, 연조직(예컨대 육종), 중추신경계(예컨대 다형성 교모세포종), 두경부(예컨대 편평세포), 뼈(골육종), 연골(연골육종), 폐(예컨대 비 소세포), 비뇨생식기(예컨대 신장, 난소, 자궁경부), 전립선 및 유방(삼중음성 포함)으로부터 기원하는 악성종양 치료에 널리 적용된다. 몇몇 구현예들에서, 본 방법은 (예컨대 적절한 경우 비교적 "낮은" 것으로 간주되는 경우가 메가베이스당 1 체세포 돌연변이인 것에 비해, 메가베이스당 100 초과)의 체세포

포 돌연변이를 보이는) 비교적 "높은" TMB 또는 비교적 높은 종양 특이 DNA 변경 빈도를 특징으로 하는 종양군으로서, 신생항원의 생성을 유도하는 종양군, 예컨대 흑색종 및 소세포폐암을 치료하는 것을 포함하지 않는다.

[0012] 이 방법은 대다수의 인간 고형 종양에서 과발현되는 것으로서, 화학적으로 정의된 단일 경막 항원, 예컨대 ASPH에 대한 면역 반응을 자극한다. 그 후 항원 특이 B 세포 및 T 세포 면역 반응은 (관문 억제제를 비롯한) 면역조절인자에 의해 놀라운 수준의 증폭을 보이면서, 다양한 백신 양상, 예컨대 파아지, 수지상 세포, DNA 기반, RNA 기반, 염색체의 DNA(ecDNA) 기반 및 펩티드 기반 제제로써 발생된다. 본원에 기재된 방법들의 이점들은 특이적이고 잘 정의된 항원 서열, 예컨대 ASPH의 전장 서열 또는 대안적 스플라이싱된 변이체(예컨대 ASPH의 N-말단 및/또는 C-말단 에피토프)의 정확한 표적화로 말미암아, 부작용을 극히 드물게 또는 아예 보이지 않는다는 점과, 면역 관문(예컨대 PD-1, PD-L1) 억제제가 유의미하게 감소된 양만큼 사용된다는 점을 포함한다.

[0013] 따라서, 본 발명은 대상체에서의 면역 치료를 위한 조성물과 이를 위한 방법, 즉 정제 종양 연관 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체(및 이의 유도체)와 종양을 치료하기 위한 면역조절인자(예컨대 관문 억제제)를 대상체에 동시 또는 순차 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 하는데, 단 이 조성물은 대상체에서 자가면역성을 유도하지 않고 항원 특이 항종양 적응 면역반응을 향진시킨다. 바람직하게 종양은 낮은 신생항원 발현 빈도를 보이는 것을 특징으로 한다. 예를 들어 Yarchoan의 다수와 Schumacher 및 Schreiber는, 췌장암 및 간세포암종(HCC)에서 발견되는 것과 같은 신생항원을 생성하기 위해 비교적 낮은 빈도의 TMB를 정량하는 것을 기재하였다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로 첨부된 문헌(Yarchoan *et al.*, Nat. Rev. Cancer. 2017 Apr;17(4):209-222. Epub 2017 Feb 24; Schumacher and Schreiber, Science 2015 Apr 3;348(6230):69-74) 참조]. 그러나 췌장암과 HCC는 둘 다 종양 세포상 ASPH 발현 수준이 매우 높지만, 정상 세포에서는 그렇지 않다. 뿐만 아니라, 비 소세포 폐암에서는 비교적 높은 신생항원 생성 빈도가 확인되고 아울러, ASPH도 많이 발현되는 것이 확인되었다. 그러므로 이하 표 1에 기재된 바와 같이, 대부분의 고형 종양에서는 ASPH 발현과 신생항원 생성 또는 TMB 사이의 관련성이 적다.

[0014] 예를 들어 정제 항원, 예컨대 화학적으로 정의된 단일 항원은 아스파르트산염 베타-하이드록실라아제(ASPH) 또는 이의 항원 단편 및 이의 유도체(예컨대 대안적 스플라이싱 변이체, 절단체, 돌연변이체, 융합 또는 번역후 변형체)이다. 예를 들어 백신 구조체는 정제 ASPH 항원 및 이의 유도체를 발현한다. 정제 ASPH 항원 및 이의 유도체는, 예컨대 성숙 전장 항원(서열 번호 46)뿐 아니라 정제 N-말단 ASPH 펩티드, 바람직하게 ASPH 단백질 서열의 처음 3분의 1(예컨대 서열 번호 47), 또는 정제 C-말단 ASPH 펩티드, 바람직하게 ASPH 펩티드 서열의 마지막 3분의 1(예컨대 서열 번호 48)을 포함한다. 예시적 항원은 서열 번호 1 ~ 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 정제 펩티드, 예컨대 인간 백혈구 항원(HLA) II군 제한 서열 TGYTELVKSLERNWKLI(서열 번호 11) 또는 HLA I군 제한 서열 YPQSPRARY(서열 번호 26)를 포함한다.

[0015] 몇몇 구현예들에서, 본 백신 구조체는 파아지 백신 또는 수지상 세포 백신을 포함한다. 예를 들어 파아지 백신은 람다 파아지 기반 백신이고, 수지상 세포 백신은 단리된 ASPH(및 이의 유도체)가 부하된(예컨대 항온처리, 형질감염된) 수지상 세포를 포함한다.

[0016] 본 조성물 및 방법은 또한, 예컨대 계획 세포 사멸 단백질-1(PD-1) 신호 차단 또는 억제를 수행하기 위해 면역조절인자(관문 억제제 포함)도 포함하는데, 예컨대 PD-1 신호 차단은 PD-1 억제 항체, PD-1 억제 핵산, PD-1 억제 소분자 또는 PD-1 리간드 모의체를 포함한다. 몇몇 예에서, PD-1 신호 차단은 항 PD-1 모노클로날 항체 또는 항 계획 사멸-리간드 1(PD-L1) 모노클로날 항체 또는 항 계획 사멸-리간드 2(PD-L2) 모노클로날 항체가 사용되어 수행된다.

[0017] 본 조성물은 종양 발달, 성장, 재발/재발생, 진행 또는 상이한 부위/장기로의 전이 확산 또는 이의 조합을 감소시킨다. 본 조성물은 또한 내인성 적응(세포성 및 체액성) 면역계를 자극한다. 예를 들어 본 조성물은 ASPH 특이 B 세포 면역 반응의 발생, ASPH 특이 T 세포 면역 반응의 발생, 또는 이의 조합의 발생을 자극하고/자극하거나, 분화 클러스터 8(CD8)<sup>+</sup> 세포 활성화, 분화 클러스터 4(CD4)<sup>+</sup> 세포 활성화, 성숙 수지상 세포 활성화 또는 이의 조합의 활성화를 자극한다.

[0018] 앞서 논의된 바와 같이, 종양은 TMB가 비교적 낮거나 신생항원 부담이 비교적 낮은 암이다. 예를 들어 신생항원을 생성하기 위한 ASPH에서의 돌연변이 빈도는 비교적 낮은데, 즉 빈번하지 않다(예컨대 메가베이스당 0.001 내지 1 이하의 체세포 돌연변이를 보인다). 시험 대상으로부터 유래한 시료의 TMB는 공지된 암 상태 세포들 또는 세포로 된 기준 시료의 TMB와 비교된다. 시험 시료가 "+"로 점수가 매겨지는지 여부를 확정하기 위한 역치는 요망되는 감도 또는 특이성에 따라 변경될 수 있다.

- [0019] 본원에 사용된 바와 같은 "신생항원"이란 용어는, 종양 특이 돌연변이 유전자에 의해 암호화되는 항원으로서, 대응하는 야생형 부모 항원과 구별되도록 만드는 변형이 적어도 1회 발생한 항원이다. 종양 특이 항원(TSA)에 속하는 종양 신생항원은 종양 세포 표면에 전시되며, 주 조직적합성(MHC) 복합체 환경에서 신생항원 특이 T 세포 수용체(TCR)에 의해 특이적으로 인지되는 펩티드의 레퍼토리이다. 예를 들어 항원은 단백질이고, 신생항원은 종양 세포에서의 돌연변이 또는 종양 세포에 특이적인 번역후 변형을 통해 발생하는 것이다. 신생항원은 폴리펩티드 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 돌연변이는 신생 ORF(neoORF)를 유도하는 틀 이동(frameshift) 또는 비 틀 이동(non-frameshift) 삽입-결실, 미스센스 또는 넌센스 치환, 스플라이싱 부위 변경, 게놈 재정렬 또는 유전자 융합, 구조적 변이체, 또는 임의의 게놈 또는 발현 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이는 또한 대안적 스플라이싱에 의해 유도된 스플라이싱 변이체(예컨대 엑손 스킵핑(exon skipping))을 포함할 수도 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "종양 신생항원"이란 용어는, 대상체의 종양 세포 또는 조직에 존재하되, 대상체의 대응하는 정상 세포 또는 조직에는 존재하지 않는 신생항원이다. 구현예들에서, 본원에 사용된 바와 같은 "신생항원 기반 백신"이란 용어는, 1개 이상의 신생항원, 예컨대 다수 개의 신생항원을 기반으로 한 백신 구조체이다.
- [0020] 또한, 본 발명에는 대상체에서 종양을 치료하는 면역치료 방법으로서, 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와 면역조절인자(관문억제제 포함)를 대상체에 동시 또는 순차 투여하는 단계를 포함하되, 종양은 비교적 낮은 신생항원 발현 빈도를 보이거나, 또는 비교적 낮은 TMB 빈도를 보이는 것을 특징으로 하는 방법이 포함되기도 한다. 예를 들어 면역 관문 억제제(예컨대 전술된 바와 같은 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2의 억제제)는 종양 항원 백신(대상체 항원, 예컨대 정제 ASPH 또는 이의 항원 단편 또는 이의 유도체를 함유하는 과이지 백신, 수지상 세포 백신 또는 기타 백신 제제) 투여와 함께, 예컨대 동시에, 이의 투여 이전 또는 이후에, 예컨대 순차로 투여된다. 본 방법은 대상체에서 자가면역성을 유도하지 않고 항 종양 면역 반응을 향진시킨다. 예를 들어 백신 구조체는 정제 ASPH 항원, 예컨대 정제 N-말단 ASPH 펩티드 또는 정제 C-말단 ASPH 펩티드를 발현한다. 예시적 펩티드는 전술되어 있고, 이하 표 4에 그 서열들이 제공되어 있다.
- [0021] 본 방법은 예방적 면역화뿐 아니라 1회 이상의 부스터 면역화(booster immunization)(들)를 포함한다. 예를 들어 예방적 면역화는 대상체에 백신 구조체를 1주일 간격으로 3회 투여하는 단계를 포함한다. 부스터 면역화는 대상체에 백신 구조체를 1주일 간격으로 3회 투여하는 단계를 포함한다. 면역 관문 억제제는 백신 구조체와 동시에 또는 순차 투여되는데, 예컨대 관문 억제제는 5주 또는 6주 동안 매주 2회 투여된다. 뿐 아니라 이후에 행해지는 장기 부스터는 또한 3개월, 6개월, 12개월, 24개월, 36개월, 48개월마다 1회 면역화하는 것을 포함할 수도 있다.
- [0022] 치료될 종양 군은 전술되어 있으며, 바람직하게는 고형 종양, 예컨대 간세포 암종(HCC), 담도암종, 비 소세포 폐암, (삼중 음성) 유방암, 위암, 췌장암, 식도암, 담낭암, 연조직 육종(예컨대 지방육종), 골육종, 연골육종, 결장 및 직장암, 신암, 두경부 편평세포암종, 골수성 또는 림프성 백혈병, 비노생식기(예컨대 자궁경부) 암, 난소암, 갑상선암, 전립선암, 두경부암, 그리고 다형성 교모세포종이다. 예를 들어 종양은 HCC이다.
- [0023] 본 방법은 종양의 발달, 성장, 재발생/재발, 진행 또는 상이한 부위/장기로의 전이 확산 또는 이의 조합을 감소시키는 것과 연관되어 있다. 예를 들어 본 방법은, 예컨대 ASPH 특이 B 세포 면역 반응의 발생, ASPH 특이 T 세포 면역 반응의 발생, 또는 이의 조합의 발생을 통해 내인성 적응(세포성 및 체액성) 면역계를 자극함으로써 전술된 항종양 효과를 달성한다. 더욱 구체적으로 본 방법은 CD8<sup>+</sup> 세포 활성화, CD4<sup>+</sup> 세포 활성화, 성숙 수지상 세포 활성화 또는 이의 조합의 활성화와 연관되어 있다.
- [0024] 대상체에서 종양을 치료하기 위한 활성 성분으로서 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체 및 면역 조절인자(예컨대 관문억제제)를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 대상체에서의 면역 치료를 위한 약학 조성물도 또한 본 발명에 포함되는데, 이 조성물은 대상체에서 자가면역성을 유도하지 않고 항종양 면역 반응을 향진시킨다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태는, 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와, 면역 관문 억제제를 함께 또는 별도로 포함하는 조합 조성물(combinatorial composition)을 포함한다. 바람직하게 종양은, 바람직하게 비교적 낮은 TMB 빈도 또는 신생항원 발현 빈도를 보이는 것을 특징으로 한다. 정제 종양 항원, 예컨대 화학적으로 정의된 단일 항원은, 예를 들어 아스파르트산염 베타-하이드록실라아제(ASPH) 또는 이의 항원 단편 및 유도체이다. 예를 들어 본 백신 구조체는 성숙 전장 항원, 정제 N-말단 ASPH 펩티드 또는 정제 C-말단 ASPH 펩티드를 포함하는 정제 ASPH 항원을 발현한다. 정제 ASPH 항원의 예로서는 서열 번호 1 ~ 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 정제 펩티드, 예컨대 인간 백혈구 항원(HLA) II군 제한 서열 TGYTELVKSLERNWCLI(서열 번호 11) 또는 HLA

I군 제한 서열 YPQSPRARY(서열 번호 26)를 포함한다.

**[0026]** 면역 관문은 대상체의 면역계에 고유한 공자극 및 억제 요소를 포함한다. 면역 관문은, 대상체의 면역계가 병원성 감염에 반응할 때 조직이 손상되지 않도록 자가내성(self-tolerance)을 유지하는 것과, 생리 면역 반응의 지속기간 및 폭(amplitude)을 조정하는 것을 돕는다. 면역 반응은 또한 T 세포가 종양 세포에 특이한 항원(예컨대 비 자기항원 또는 종양 신생항원), 또는 종양 세포의 특징을 이루는 항원(예컨대 종양 연관 항원(TAA))인 "외래" 항원을 인지할 때 개시될 수 있다. T 세포에 의한 대상체 면역 반응을 제어하는데 사용되는 공자극 신호 및 억제 신호간 평형은 면역 관문 및 이의 유도체에 의해 조정될 수 있다. T 세포가 성숙해져 흉선에서 활성화된 다음, T 세포는 염증 및 손상/상해 부위로 이동하여 방어 기능을 수행하게 된다. T 세포 기능은 직접적인 작용을 통하거나, 방어 면역계에 연루된 사이토카인 및 막성 리간드의 보충을 통해 발휘될 수 있다. T 세포 성숙, 활성화, 증식 및 기능에 연루된 단계들은 공자극 신호 및 억제 신호, 즉 면역 관문을 통해 조절될 수 있다. 종양은 면역-탈출 기작으로서 관문 기능의 탈조절(dysregulation), 재계획 또는 편집을 수행할 수 있다. 그러므로 면역 관문 조절인자의 개발은 치료적으로 가치가 있을 수 있다. 면역 관문 분자 및 이의 유도체(예컨대 번역후 변형체, 절단형, 융합 단백질)의 비제한적 예로서는 백혈구 활성화 유전자 3(LAG3), 글루코코르티코이드 유도성 TNFR 관련 단백질(GITR), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), 살해 면역글로불린 유사 수용체(KIR), T 세포 활성화의 V 도메인 Ig 억제인자(VISTA)(VISTA), 세포독성 T 림프구 항원 4(CTLA4; CD152(분화 클러스터 152)로도 공지됨), B7-H3(CD276), V 세트 도메인 함유 T 세포 활성화 억제인자 1(VTCN1)/B7-H4, B 및 T 림프구 약화인자(BTLA)/CD272, OX40/CD134, CD27, CD70, CD137, CD122, CD180, 흉선세포 선택 연관 고 이동성 군 박스 단백질(TOX), CD28, 유도성 T 세포 공자극인자(ICOS), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 함유 단백질 3(TIM3, A형 간염바이러스 세포 수용체 2(HAVCR2)라고도 공지됨), Ig 및 ITIM 도메인 포함 T 세포 면역수용체(TIGIT), 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO), NADPH 옥시다아제 2(NOX2), 시알산 결합 면역글로불린형 렉틴 7(SIGLEC7)/CD328, SIGLEC9/CD329, SIGLECT-15, 아데노신 수용체 2(A2aR), 계획 사멸 단백질 1(PD1), 계획 사멸 단백질 리간드 1(PD-L1), 계획 사멸 단백질 2(PD-2), 계획 사멸 단백질 리간드 2(PD-L2)/B7-DC, CD40 및 CD40 리간드(CD40L)/CD154를 포함한다. 구현예들에서, 면역 관문 억제제는, 예컨대 PD-1을 포함한다. 다른 구현예들에서, 면역 관문 억제제는, 예컨대 PD-L1을 포함한다.

**[0027]** 면역 관문 억제제는 면역 관문 단백질과 특이적으로 결합하는 화합물 또는 조성물이다. 예를 들어 이 억제제는 단백질 폴리펩티드 또는 비 단백질 화합물, 예컨대 소분자를 포함한다. 예를 들어 면역 관문 단백질은, 예컨대 LAG3, BTLA, KIR, CTLA4, ICOS, TIM3, A2aR, PD1, PD-L1, PD-L2 및 CD40L을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 폴리펩티드 또는 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 몇몇 구현예들에서, 면역 관문 억제제는 간접 핵산 분자이다. 몇몇 구현예들에서, 간접 핵산 분자는 siRNA 분자, shRNA 분자 또는 안티센스 RNA 분자이다. 몇몇 구현예들에서, 면역 관문 억제제는 오피도/니블루맵, 키트루다/렘브롤리주맵, 테센트릭/아테졸리주맵(항 PD-L1 mAb), 바벤시오/아벨루맵(항 PD-L1 mAb), 임핀지/더발루맵(항 PD-L1 mAb), 림타요/세미플리맵-rlwlc(항 PD-1 mAb), 피딜리주맵, CA-170(PD-L1/VISTA 길항제), CA-327(PD-L1/TIM3 길항제), AMP-224, AMP-514, STI-A1110, TSR-042, RG-7446, BMS-936559, BMS-936558, MK-3475, CT 011, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0020718C, AUR-012 및 STI-A1010을 포함한다.

**[0028]** "소분자"란, 광의로서 유기 화합물, 무기 화합물, 또는 저분자량 화합물(예컨대 분자량이 약 2,000 Da 미만이거나 약 1,000 Da 미만인 화합물)을 포함하는 유기금속 화합물이라 지칭될 수 있다. 소분자는 분자량이 약 2,000 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 1,500 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 1,000 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 900 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 800 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 700 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 600 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 500 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 400 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 300 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 200 Da 미만일 수 있거나, 분자량이 약 100 Da 미만일 수 있거나, 또는 분자량이 약 50 Da 미만일 수 있다.

**[0029]** 소분자는 유기 분자 또는 무기 분자이다. 예시적 유기 소분자로서는 지방족 탄화수소, 알코올, 알데히드, 케톤, 유기산, 에스테르, 단당체 및 이당체, 방향족 탄화수소, 아미노산 및 지질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예시적 무기 소분자로서는 미량 무기물, 이온, 자유 라디칼 및 대사물질을 포함한다. 대안적으로, 소분자는 효소의 결합 포켓(binding pocket)을 채우는 단편 또는 소형인 일부 또는 더 긴 아미노산 사슬로 이루어지도록 합성에 의해 조작될 수 있다. 통상적으로 소분자는 1 킬로달톤 미만이다.

**[0030]** 예를 들어 백신 구조체는 과야지 백신 또는 수지상 세포 백신을 포함한다. 예시적 과야지 백신은 람다 과야지 기반 백신을 포함하고, 예시적 수지상 세포 백신은 단리된 ASPH 부하 수지상 세포를 포함한다.

- [0031] 다른 예로서, 면역 관문 억제제는 PD-1 차단제 또는 억제제, 예컨대 PD-1 억제 항체, PD-1 억제 핵산, PD-1 억제 소분자 또는 PD-1 리간드 모의체이다. 몇몇 구현예들에서, PD-1 신호 차단제는 항 PD-1 모노클로날 항체 또는 항 PD-L1 모노클로날 항체이다.
- [0032] 양태들에서, 대상체에서 전이를 억제하는 면역치료 방법으로서, 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와, 면역 관문 억제제를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 제공된다. 예를 들어 본 백신은 피내, 피하, 비내, 근육내, 종양내, 결절내, 림프내, 정맥내, 위내, 복막내, 질내, 방광내, 경피 경로 또는 기타 경로를 통해 투여된다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같은 "전이", "전이성" 및 "전이암"이란 용어는 호환되어 사용될 수 있으며, 증식성 질환 또는 장애, 예컨대 암이 하나의 장기 또는 인접하지 않는 다른 장기나 신체의 일부로부터 확산되는 것을 지칭할 수 있다. 암은 그것이 기원하는 부위, 예컨대 간에서 발생하는데, 이때 해당 부위는 원발성 종양, 예컨대 원발성 간암이라 지칭된다. 원발성 종양 또는 그것이 기원하는 부위에 있는 몇몇 암 세포는 해당 국소 구역의 주변 정상 조직을 관통하여 침습하는 능력 및/또는 림프계 또는 혈관계의 벽을 관통한 다음, 이 계를 통해 순환함으로써 체내 다른 부위 및 조직으로 이동하는 능력을 획득한다. 원발성 종양의 암 세포로 이루어진 종양으로서, 임상상 검출 가능한 두 번째 종양은 전이성 또는 속발성 종양이라 지칭된다. 암세포가 전이되면, 전이성 종양과 그 세포는 기원 종양의 종양 및 그 세포와 유사할 것으로 추정된다. 따라서 만일 폐암이 유방으로 전이되면, 유방중 해당 부위의 속발성 종양은 비정상 폐 세포로 이루어진 것이지, 비정상 유방 세포로 이루어진 것은 아니다. 유방에서의 속발성 종양은 전이성 폐암이라 지칭된다. 그러므로 "전이성 암"이란 어구는, 대상체에 원발성 종양이 현재 발병되었거나 과거 발병한 적이 있으며, 하나 이상의 속발성 종양이 현재 발병된 질환을 지칭한다. "비 전이성 암" 또는 "전이성이 아닌 암이 발병한 대상체"란 어구는, 대상체에 원발성 종양이 현재 발병되었지만 하나 이상의 속발성 종양은 발병되지 않은 질환 또는 그러한 대상체를 지칭한다. 예를 들어 전이성 폐암이란, 원발성 폐 종양의 병력이 있거나 있으면서, 제2의 병소 또는 다수의 병소(예컨대 간, 뼈, 뇌)의 속발성 종양 1개 이상이 다른 장기(예컨대 유방)에서 기원한 원발성 종양으로부터 확산된, 대상체에서의 질환을 지칭한다.
- [0034] 다른 양태들에서, 대상체에서 원발성 종양의 성장을 억제하는 면역치료 방법으로서, 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와, 면역조절인자를 대상체에 동시 또는 순차 투여하는 단계를 포함하는 면역치료 방법이 본원에 제공된다. 구현예들에서, 면역조절인자는 관문 억제제이다. 예를 들어 대상체에서 원발성 종양의 성장을 억제하는 면역치료 방법은 (예컨대 도 1 또는 도 9에 보인 바와 같은 프로토콜을 이용하여) 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체 및 면역조절인자(관문 억제제 포함)를 대상체에 동시 및/또는 순차 투여하는 단계를 포함한다.
- [0035] "투여"는, 화합물 또는 조성물을 개별적으로, 또는 (1개를 초과하는 화합물 또는 제제와) 조합하여 동시 투여 또는 순차 투여하는 것을 포함하는 의미이다. 예를 들어 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체는 관문 억제제와 동시 투여될 수 있다.
- [0036] 다른 예들에서, 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체는 관문 억제제에 순차로 투여될 수 있다. "순차" 투여란, 2개의 유형의 제제(예컨대 정제 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와, 관문 억제제)를 투여하는 사이사이에 수초, 수분, 수 시간 또는 수일의 시간 차가 주어지는 투여를 의미한다. 이러한 제제들은 임의의 순서로 투여될 수 있다.
- [0037] 기재된 조성물과 방법은, 본 치료 방법이 대상체에서 종양 성장 또는 종양 전이의 상승적 억제를 유도한다는 점에서, 암/악성 종양이 성장한다고 진단되었거나 암/악성 종양의 성장이 진행되는 대상체에 유리한 치료 효과를 제공한다.
- [0038] 본원에 개시된 각각의 구현예는 개시된 다른 구현예들 각각에 적용 가능한 것으로 고려된다. 그러므로 본원에 기재된 다양한 요소의 모든 조합은 본 발명의 범위내에 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 특징들과 이점들은 이하 바람직한 구현예들의 설명과 특허청구의 범위로부터 명백할 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실행 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 이하에 기술되어 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0040]

도 1a는 아스파르트릴 아스파라기닐 β-하이드록실라아제(ASPH) 발현 BNL(예컨대 간; BNL 1ME A.7R.1 세포주(ATCC 수탁 번호 TIB-75)) 세포가 사용되는, 간암 마우스 모델에 대한 실험 프로토콜 도해를 도시한 것이다.

도 1b는 면역화 프로토콜의 모식도를 도시한 것이다.

도 2a는 Balb/c 마우스에서 BNL 세포에 의해 발생한 피하 종양의 영상이다.

도 2b는 Balb/c 마우스에서 상이한 시약들이 피하 주사되어 처리된, BNL 세포에 의해 발생한 이종이식 종양의 성장 곡선을 도시한 그래프이다.

도 3은 PD-1 억제제 또는 백신 단독 처리후 대 백신 조합 처리후 BNL 세포에 의해 발생한 간 종양의 대표적인 전체 외관을, 대조군의 경우에서와 비교하여 나타내는 영상이다.

도 4는 BNL 세포에 대한 마우스 비장 세포의 시험관 내 세포독성을 도시하는 그래프이다.

도 5는 ASPH 발현 4T1 유방암 세포를 재자극한 이후 (백신 + PD-1 억제제로 처리된 BNL 종양 보유 마우스로부터 유래한) 비장 세포의 시험관 내 세포독성을 보여주는 막대 그래프이다.

도 6은 시험관 내 재자극후 마우스 비장 세포로부터 인터페론-감마(IFN-γ)가 분비됨을 보여주는 일련의 영상이다. 간암 모델 마우스는 BNL 세포로 제조되어, 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리 및 조합 처리되었으며, 그 결과는 대조군의 경우에서와 비교되었다.

도 7a는 BNL 세포에 의해 발생된 간 종양의 조직학적 특징을 보여주는 영상이다.

도 7b는 CD3<sup>+</sup> T 세포가 종양에 침습하는 것을 면역조직화학(IHC)에 의하여 보여주는 영상이다.

도 7c는 종양 침습성 CD3<sup>+</sup> T 세포 수 산정을 도시한 막대 그래프이다. \*\*\*P<0.001.

도 8은 BNL 세포에 의해 발생된 마우스 간암 모델에서 항원(ASPH) 특이 항체(B 세포 반응)가, 대조군의 경우에서와 비교되게 백신 또는 PD-1 억제제 단독 대 조합에 반응하여 자극되었음을 도시하는 막대 그래프이다.

도 9는 ASPH 발현 4T1 세포에 의해 발생된 동소성 마우스 유방암 모델에 대한 실험 프로토콜을 보여주는 도해이다.

도 10은 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 원발성 유방 종양의 성장 곡선을, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여주는 그래프이다.

도 11은 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 유방 종양의 전체 외관을, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여주는 영상이다(28일차).

도 12는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 폐 전이 병변 감소를, 대조군의 경우에서와 비교하여 나타내는 막대 그래프이다.

도 13a는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 다중 장기 전이 부담 감소를, 대조군의 경우에서와 비교하여 나타내는 막대 그래프이다.

도 13b는 전이가 일어난 마우스 수 대 전이가 일어나지 않은 마우스 수를 나타내는 막대 그래프이다.

도 13c는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 다중 장기 전이 부담 감소를, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여주는 표이다.

도 14는 4T1 세포에 의해 발생된 동소성 유방암 모델의 백신화된 마우스에 있어서 PD-1 억제제의 원발성 종양 성장에 대한 용량 의존적 항종양 효과를 나타낸 그래프이다.

도 15는 4T1 세포에 의해 발생된 동소성 유방암 모델의 백신화된 마우스에서 PD-1 억제제의 폐 전이에 대한 용량 의존적 항종양 효과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 16은 ASPH 발현 4T1 세포에 대한 비장 세포의 시험관 내 세포독성을 보여주는 그래프이다.

도 17은 ASPH 발현 4T1 세포에 의해 발생된 동소성 유방암 모델의 백신화된 마우스에서 (IFNγ 분비에 의해 입증되는 바와 같은) 항원(ASPH) 특이 T 세포 활성화를 보여주는 영상이다.

도 18a는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 원발성 유방 종양에 침습한 CD3<sup>+</sup> 림프구를, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여주는 것으로서; CD3<sup>+</sup> T 세포가 종양내에 침습하였음을 IHC에 의해 보여주는 영상이다.

도 18b는 종양 침습성 CD3<sup>+</sup> T 세포의 수를 산정한 결과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 19a는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 폐 전이에 침습한 CD3<sup>+</sup> 림프구를, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여주는 것으로서; CD3<sup>+</sup> T 세포가 전이 병변에 침습하였음을 IHC에 의해 보여주는 영상이다.

도 19b는 종양 침습성 CD3<sup>+</sup> T 세포의 수를 산정한 결과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 20a는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 동소성 마우스 모델을 대상으로 폐 전이 및 원발성 유방암 종양에서 CD8<sup>+</sup>(효과기) CTL의 특성규명 결과를, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여주는 것으로서; CD3<sup>+</sup> T 세포가 원발성 종양 및 폐 전이 병변에 침습하였음을 면역조직화학 IHC에 의해 보여주는 영상이다.

도 20b는 종양 침습성 CD3<sup>+</sup> T 세포 수를 산정한 결과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 20c는 종양 침습성 CD3<sup>+</sup> T 세포 수를 산정한 결과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 21a는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 동소성 마우스 모델의 폐 전이 및 원발성 유방암 종양에서 CD45RO<sup>+</sup>(기억) CTL의 특성규명 결과를, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여주는 것으로서; CD45RO<sup>+</sup> T 세포가 원발성 종양 및 폐 전이 병변에 침습하였음을 면역조직화학 IHC에 의해 보여주는 영상이다.

도 21b는 종양 침습성 CD45RO<sup>+</sup> T 세포 수를 산정한 결과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 21c는 종양 침습성 CD45RO<sup>+</sup> T 세포 수를 산정한 결과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 22는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시 대 조합 처리시 동소성 마우스 유방암 모델의 항원(ASPH) 특이 항체(B 세포 반응)를, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여주는 막대 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0041] 아스파르틸 아스파라기닐 β-하이드록실라아제(ASPH)는 다수의 유형의 악성종양 세포 표면에 존재하는 종양 연관 항원(TAA), 예컨대 경막 단백질로서, 인간 암의 면역치료 표적이다. 아스파르틸 ASPH는 다수의 신호전달 분자에서 발견되는 아스파르틸 및 아스파라기닐 잔기에서 β-탄소의 하이드록실화를 촉매화하는 것으로 관찰되어 왔다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Engel, FEBS Lett. 1989;251:1-7; Jia *et al.*, J. Biol. Chem. 1992;267:14322-14327; Lavaissiere *et al.*, J. Clin. Invest. 1996;98:1313-1323; Wang *et al.*, J. Biol. Chem. 1991;266:14004-14010) 참조]. 이의 효소 활성은 제2철 및 α-케토글루타르산염뿐 아니라, 상피성장인자(EGF) 유사 반복부를 포함하는 기질의 존재에 의존한다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Engel, FEBS Lett. 1989;251:1-7) 참조].

[0042] 암 발생중 ASPH는 세포 표면으로 이동하여, N-말단 영역 및 C-말단 영역을 세포의 환경에 노출시키고, 이의 기능은 숙주의 면역 반응에 의해 조정된다. 더욱 중요한 점은, 이러한 영역에 존재하는 항원 에피토프의 존재가, ASPH를 보유하는 종양 세포에 특이적인 T 세포 반응을 효율적으로 자극한다는 점이다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Tomimaru *et al.*, Vaccine 2015;33:1256-1266) 참조]. ASPH는 간세포 암종(HCC) 및 담관암종 동계 동물 모델을 대상으로 여기에 제시된 λ 파아지 백신의 특성과 유사한 특성을 가지는 수지상 세포(DC) 극미립자 백신이 사용되는 면역치료에 있어 확실한 표적이다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Noda *et al.* Hepatology 2012;55:86-97; Shimoda *et al.*, J. Hepatol. 2012;56:1129-1135) 참조]. ASPH는 포유동물 진화중에 고도로 보존된다. 이는 발달 초기의 배에서 발현되지만, 출생시 유전자는 침묵되었다가 오로지 정상 세포가 악성 표현형 세포로 변형되는 동안에 재활성화된다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Lavaissiere *et al.*, J. Clin. Invest. 1996;98:1313-1323; Aihara *et al.*, Hepatology 2014;60:1302-1313) 참조].

[0043] ASPH의 과발현은 종양 세포 증식, 이동 및 침습을 자극하므로 ASPH는 암 발생에 직접 기여한다[예를 들어 전체

내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Aihara *et al.*, *Hepatology* 2014;60:1302-1313; Ince *et al.*, *Cancer Res.* 2000;60:1261-1266; Sepe *et al.*, *Lab Invest.* 2002;82:881-891) 참조]. 파아지 백신화는 4T1 세포에 의해 발생한 동소성 유방암 마우스 모델에서 폐 전이를 상당 수준 감소시켰음을 발견한 것은 흥미로웠다. 정상 조직에서의 ASPH 발현은 침습성이 매우 큰 조직으로서, ASPH의 유전자 및 단백질 발현 수준이 다수의 악성 종양, 예컨대 HCC에서 확인되는 수준과 가까운 조직인 태반의 경우를 제외하고는, 일반적으로 매우 적거나 무시할 수 있을 정도이고/정도이거나 검출이 되지 않는다. 이와 관련하여, 단백질 발현에 대한 면역조직화학(IHC) 염색 및 mRNA 수준에 대한 역전사 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은, C형 간염 바이러스(HCV) 및 B형 간염 바이러스(HBV)의 약 85%가 HCC와 관련되어 있으며, 담관암종의 95% 이상은 ASPH 유전자의 상향조절을 보였음을 규명하였다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Noda *et al.* *Hepatology* 2012;55:86-97; Shimoda *et al.*, *J. Hepatol.* 2012;56:1129-1135; Aihara *et al.*, *Hepatology* 2014;60:1302-1313; Cantarini *et al.*, *Hepatology* 2006;44:446-457; Huang *et al.*, *PLoS One* 2016;11:e0150336; Iwagami *et al.*, *Hepatology* 2015) 참조].

[0044] ASPH는 암 발생중 부분적으로 하기 기작들에 의해 자체의 생물 효과를 발휘함이 확인되었다: 1) 노치 신호전달 캐스케이드의 활성화를 촉진함; 2) 카스파아제 3 절단을 통해 세포자살을 억제함; 3) RB1의 인산화를 통해 세포 증식을 향상시킴; 4) 세포 노화를 지연시킴; 그리고 5) 암 줄기 유사 세포를 생성함[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Huang *et al.*, *PLoS One* 2016;11:e0150336; Iwagami *et al.*, *Hepatology* 2015; Dong *et al.*, *Oncotarget* 2015;6:1231-1248) 참조]. ASPH의 전사 조절은 널리 공지된 신호전달 캐스케이드, 예컨대 인슐린(IN)/인슐린 수용체 기질 1(IRS-1)/급가속화 섬유육종(RAF)/랫트 육종(RAS)/미토젠 활성화 단백질(MAP)/세포의 신호 조절 키나아제(ERK), IN/IRS-1/포스포타이딘이노시톨-3-키나아제(PI3 K)/AKT(단백질 키나아제 B) 및 윙리스(Wingless)/통합(WNT)/β-카테닌 신호전달에 의해 제어된다(Cantarini *et al.*, *Hepatology* 2006;44:446-457; Tomimaru *et al.*, *Cancer Lett.* 2013;336:359-369). 이 상황에서, ASPH는 상류 성장 인자 신호전달 경로를, 노치 활성화 및 노치 표적 유전자의 후속 하류 발현과 연결함으로써, 암 발생, 예컨대 간암 발생에 참여하는 핵심 분자가 된다. 종양 세포에는 단백질의 N-말단 영역에 위치하는 모티프의 인산화를 통한 글리코젠 신타아제 키나아제 3β(GSK3β)에 의한 ASPH의 번역후 변형도 또한 존재한다(Monte *et al.*, *Alcohol* 2009;43:225-240).

[0045] 이중 유전자이식 마우스 모델에서 IN/인슐린 유사 성장 인자 1(IGF1)/IRS1 매개 경로뿐 아니라, WNT/β-카테닌 및 ASPH/노치 신호전달 캐스케이드의 활성화는 정상 간이 악성 표현형으로 변형되는 것을 촉진하는데 필요하고 그에 충분한 것으로 보인다. 이는 흥미롭다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Chung *et al.*, *Cancer Lett.* 2016;370:1-9) 참조]. 그러므로 이 추정적 암 발생 단백질의 발현 및 기능의 억제는 치료적 암시(therapeutic implication)를 보일 수 있었다.

[0046] ASPH는 1) 다양한 악성종양의 세포 표면에서 다량 발현되는 경막 단백질이고; 2) (태반을 제외한) 인간 정상 조직에서 매우 낮은 수준/검출 불가능한 수준으로 발현되며; 3) 암세포 증식, 이동, 침습 및 전이를 촉진함에 있어 규정된 역할을 담당하고; 4) 이의 다량 발현은, 질환의 조기 재발, 전체 생존률의 감소, 그리고 거의 분화되지 않은 공격적 표현형으로 특징지어지는 암 환자의 좋지 않은 예후를 제공하므로, 면역치료가 특히 매력적이다 [예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Maeda *et al.*, *Cancer Detect. Prev.* 2004;28:313-318; Wang *et al.*, *Hepatology* 2010;52:164-173) 참조].

[0047] 면역치료 접근법은 관심 단백질이 부하된 수지상 세포(DC)를 주사하는 것을 포함한다. DC는 항원을 인지/포획하고, 처리하여 T 세포에 제시함으로써, T 세포 매개 면역성을 유도 및 조절하도록 특화된 항원 제시 세포(APC)이다. DC는 실험실 동물뿐 아니라 종양 보유 환자를 면역화하는데 널리 사용된다. DC 백신은 점화(priming), 활성화 및 부하된 항원, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 정제 항원, 예컨대 ASPH 또는 이의 항원 단편이다. DC 백신은 포유동물 대상체, 예컨대 인간 환자에서, 예컨대 ASPH 발현 종양을 감소 및 제거하는데 사용된다. 본 조성물과 본 방법은 또한 반려 동물 및 가축, 예컨대 인간, 개, 고양이, 말, 소 또는 돼지인 대상체에 사용되기 적합하다. ASPH 발현 종양은 대부분의 종양류, 예컨대 위장관(예컨대 식도, 위, 결장, 직장), 췌장, 간(예컨대 담관세포 암종, 간세포 암종), 유방, 전립선, 자궁경부, 난소, 나팔관, 후두, (비 세포) 폐, 갑상선, 담낭, 신장, 방광 및 뇌(예컨대 교모세포종)의 종양뿐 아니라 다수의 기타 종양을 포함한다. ASPH 발현 종양은 ASPH를 (인접) 정상 조직에 비하여 증가한 수준으로 발현하는 원발성 종양뿐 아니라, 이러한 ASPH 발현 원발성 종양으로부터의 전이에 의해 발생한 종양을 포함한다.

[0048] 백신화 방법에 사용되는 수지상 세포는, 선택적으로 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 및 IFN-γ를 포함하는 사이토카인의 조합에 의해 세포 외에서 활성화된 후 대상체에 투여된다. 대상체에 투여하는 단계는 T 세

포 매개 항종양 면역 반응을 자극하는 역량이 향상된, 점화 DC 집단을 생성한다. 점화 DC를 제조하는 개선된 방법은 단리된 DC를 항원, 예컨대 ASPH 및 이의 항원 단편, 또는 종양 항원, 예컨대 ASPH 및 알파-태아단백질 (AFP)의 조합을 접촉시키고, 성숙하고 활성화된 항원 제시 세포(APC) 집단을 생성하도록 처리함으로써 수행된다. 항원 항원처리 단계후, DC는 사이토카인들의 조합(사이토카인 콕테일)에 의해 성숙된다. 예를 들어 조합은 GM-CSF 및 IFN- $\gamma$ 를 포함한다. 다른 예들에서, 조합은 인터루킨-4(IL-4)를 추가로 포함한다. 선택적으로 조합은 분화 클러스터 40 리간드(CD40L), TNF  $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, PGE2, 톨 유사 수용체(Toll Like Receptor; TLR) 리간드에 대한 효현제(예컨대 TLR7/8 효현제인 CL097(이미다조퀴놀린 화합물 R848 유도체)) 또는 기타 면역조절 인자를 포함한다. DC는 적어도 10시간(예컨대 12시간, 24시간, 36시간, 40시간, 48시간 또는 이 이상) 동안 사이토카인들의 조합에 노출된다. 항원은 가용성 형태로 존재하거나 고형 지지체에 결합된다. 예를 들어 고형 지지체는 폴리스티렌 비드, 예컨대 생분해성 비드 또는 입자를 포함한다. 수지상 세포는 공지의 방법, 예컨대 백혈구성분채집술(leukapheresis) 또는 세포성분채집술(cytopheresis)에 의해 대상체로부터 취득된다.

[0049] ASPH가 사용되는 수지상 세포 백신은 확립된 간세포 암종(HCC)을 면역 약화 마우스에서 치유하는 것으로 확인된다. ASPH 부하 수지상 세포 백신은 ASPH 발현 종양의 성장을 감소시켜, 종양 부담을 줄여줄 뿐 아니라, 인간에서 종양을 완전히 제거한다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌, 즉 공개 미국 특허출원 제20110076290호 참조].

[0050] 예방용 및 치료용 "과아지 백신"은 암 예방 및 치료 둘 다에 사용될 수 있다. 예를 들어 암 백신 치료법은 박테리오파아지가 발현한 ASPH 단편을 사용하여 범-암 특이 항원(pan-cancer-specific antigen), 예컨대 ASPH를 표적화하도록 디자인된다. 박테리오파아지 표면 발현 ASPH는 면역원성이 크다. 또한, ASPH 단편의 백신으로서의 박테리오파아지 전달은, 항원 제시 및 과아지 애주반트 특성을 제공함으로써 자기항원내성이라는 문제를 해결할 수 있다. 박테리오파아지는 람다, T4, T7 또는 M13/f1중 임의의 하나일 수 있다.

[0051] 박테리오파아지 전시는 펩티드의 면역계로의 유리한 제시를 달성하는 간단한 방식이다. 재조합 박테리오파아지는 시험관 내 및 생체 내에서 그 표면에 다수의 복사체로서 전시하는 에피토프에 대하여 강력한 CD8<sup>+</sup> T 림프구 (CTL) 반응을 점화할 수 있고, T 조력자 세포를 활성화할 수 있으며, 특히 항체 생성을 유도할 수 있는데, 이러한 작용은 모두 보통 애주반트 없이도 이루어질 수 있다.

[0052] 람다 과아지 전시 암 특이 항원, 예컨대 ASPH에 의한 백신화는 다수의 잠재적 이점을 가진다. 이점들 중 한 가지는 펩티드 복사체 다수개가 동일한 람다 과아지상에 전시되고, 일단 초기 과아지 전시가 이루어지면, 추후 진행되는 펩티드 생산은, 펩티드를 담체에 결합시키는 현재의 방법에 비해 훨씬 더 용이해지고, 비용도 덜 들게 될 것이라는 점이다. 미립자로서의 본성으로 말미암아 과아지 전시 펩티드는 주 조직적합성 복합체(MHC) I 및 MHC II 경로 둘 다에 접근할 수 있다는 좋은 증거가 있는데, 이는 람다 과아지 전시 백신이 세포외 항원으로 작용하여 면역계의 세포성 계 및 체액성 계 둘 다를 자극할 수 있음을 암시하고, 다만 대다수의 반응은 항체(MHC II군) 편향성일 것으로 예상된다. 미립자형 항원, 구체적으로 과아지는 교차 점화(cross priming)를 통해 MHC I 경로에 접근할 수 있음이 확인되었는데, 이 점은 이 과정이 세포 반응을 자극하는데 관여할 가능성이 있음을 나타낸다. 이처럼 재활성화된 세포 반응으로서, CD8<sup>+</sup> T 세포에 의해 매개되는 세포 반응은 암세포 제거를 돕는다. 또한, 암에서 선천적 면역성의 역할은 잘 정립된 사실이다. 람다 과아지는 또한 비 특이 면역 자극인자로서 작용할 수 있다. (가능하게는 CpG 모티프의 존재로 말미암는) 외래 DNA와 과아지 외피중 반복 펩티드 모티프의 조합은 아마도 비 특이 면역 자극에 관여하는 것으로 생각된다.

[0053] 요약하면, 전체 람다 과아지 입자는, 이 전체 람다 과아지 입자가 백신 전달 비이클로서 이상적이도록 만드는 고유의 특징 다수를 보유한다. 과아지 전시 백신으로서 사용되기 위한 과아지의 미립자로서의 성질은, 이 과아지 전시 백신이 가용성 재조합 단백질보다 훨씬 더 용이하고 저렴하게 정제되어야 함을 의미한다. 또한, 펩티드 항원은 각각의 백신 회분과 함께 반복 수행되어야 하는 복잡한 화학적 접합 및 하류 정제 공정이 수행될 필요 없이, 천연 애주반트 특성을 가지는 불용성 면역원 담체에 이미 공유 결합하게 되었다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 공개 미국 특허출원 제20140271689호 참조].

[0054] 마우스 ASPH 발현 BNL 세포주(ATCC 수탁번호 TIB-73)는 동계 BALB/c 마우스에 피하 이식될 때 급속한 성장을 보인다. 간암(예컨대 HCC)의 최종증 모델인 접종 동물은 큰 크기와 덜 분화된 상태로 특징지어지는 바와 같은, 진행된 간 종양으로 말미암아, 4주 ~ 5주가 되자마자 안락사되어야 할 수 있다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Shimoda *et al.*, J. Hepatol. 2012;56:1129-1135) 참조]. BNL 유도성 종양에서의 ASPH 발현 수준은 확고하다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Shimoda *et al.*, J. Hepatol. 2012;56:1129-1135) 참조]. 이 간암 모델 계가 사용되었을 때(도 1), 전체 ASPH 펩티드를 함유하는

수지상 세포(DC) 기반 백신이 사용되는 면역치료 접근법이 HCC 성장과 진행을 억제할지 여부에 대한 의문이 해결되었다. 람다 1 파아지 N 말단 ASPH 펩티드 함유 백신 구조체가 HCC 성장과 진행을 억제할지 여부, 그리고 이에 더하여 동시 또는 순차 투여된 관문 억제제에 의해 항종양 효과가 증폭될지를 조사하기 위한 추가 연구들이 수행되었다(도 2a 및 도 2b).

- [0055] 면역화 계획은, 질환의 조기 재발생을 막고, 확립된 미세전이 질환의 성장 및 진행을 늦추기 위한 시도로서 HCC 종양의 수술에 의한 절제 이전에 행해지는 예방적 백신화와, 수술에 의한 절제 이후에 행해지는 부스터 투여에 의해, 제안된 사용에 관한 가설 임상 상황을 해당 계획이 모의할 수 있도록 디자인되었다. 수술후에는 λ 파아지로 유도된 면역 반응[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Kundig *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 2006;117:1470-1476; Sartorius *et al.*, J. Immunol. 2008;180:3719-3728; Zhikui *et al.*, J. Biomol. Screen 2010;15:308-313) 참조] 및 관문 억제제 항 PD1 항체에 의해 유효하게 제거 또는 감소될 수 있는 잔류 종양 세포가 소수 존재할 수 있다.
- [0056] 본원에 기재된 방법 또는 방법들은 기타 암 치료법에 비해 (이하 나열된) 이점을 가진다: (1) 화학적으로 정의된(또는 정제 또는 단리된) 것으로서, 대다수의 인간 고형 종양(표 1 참조)에 고도로 과발현되는 단일 세포 표면 항원(ASPH)에 대한 면역 반응을 자극함; (2) 이 항원 특이 B 세포 및 T 세포 면역 반응의 발생은 백신(파아지, 수지상 세포, DNA 기반 및 펩티드 제제)으로 달성될 수 있음; (3) 이 항원 특이 면역 반응은 면역 관문 억제제가 순차 또는 동시 투여될 때 많이 증폭될 수 있음[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Moser *et al.*, J. Immunol. Methods 2010;353:8-19; Sambrook and Maniatis, Molecular cloning. Second Edition. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 참조]; (4) 종양 발달, 성장 및 진행뿐 아니라 체내 다른 부위의 전이 확산을 놀랍고, 예기치 못하게, 그리고 극적으로 억제시키는 것을 보임.
- [0057] 본 발명은, 치료법이 현재 존재한다 손치더라도 소수 존재할 수 있는, 고형 종양, 예컨대 간세포(HCC) 간, 췌장, 위, 식도 및 삼중 음성 유방암뿐 아니라 육종, 예컨대 표 1에 보인 바와 같은 암 및 육종의 치료를 위해 널리 적용된다.
- [0058] 면역 관문 차단은 면역 세포-종양 세포간 상호작용 조절을 통한 암 관리의 진보된 전략이다. 관문 억제제, 예컨대 항 계획 세포 사멸 단백질-1(PD-1)/계획 사멸-리간드 1(PD-L1) 항체는 부작용이 비교적 제한적이면서 탁월한 항종양 반응을 달성할 수 있는 매우 전도유망한 암 치료 접근법으로 급부상되고 있다.
- [0059] PD-1/PD-L1 경로는 종양 유도성 면역 억제를 매개하는 진보된 관문 분자의 좋은 예이다. 생리적으로 PD-1/PD-L1 경로는 항원을 발현하는 병소의 염증 정도를 제어하여, 정상 조직이 손상되지 않도록 보호한다. T 세포가 표적 세포상 MHC 복합체에 의해 발현되는 항원을 인지하면, 염증 사이토카인이 생산되고, 이때 염증 과정이 개시된다. 이 사이토카인은 표적 조직내 PD-L1 발현을 초래하여, 표적 조직의 Ppd-11과 T 세포상 PD-1 단백질을 결합시킴으로써, 면역 관용(즉 면역계가 제어력을 상실하여, 심지어 면역 반응을 가동시킬 수 있는 항원이 존재할 때조차도 염증 반응이 가중되는 현상)을 유도한다. 임의의 종양, 가장 현저하게는 흑색종에서, 이러한 보호 기작은 PD-L1의 과발현을 통해 잘못된 방식으로 진행되고; 결과적으로는 종양에 대한 면역 반응의 발생이 우회된다. PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1/PD-L1 상호작용을 약리학적으로 억제하므로, 긍정적 면역 반응을 촉진하게 되고, 그 결과 종양 세포가 사멸된다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Alsaab *et al.*, Front Pharmacol. 2017, Aug 23;8:561) 참조]. PD-1 리간드 2(PD-L2), 즉 PD-1에 대한 제2의 리간드도 또한 T 세포 반응 조절에 연루되어 있다. PD-L1 및 PD-L2는 상이한 T 세포 항원을 나타내는데, 그 이유는 PD-L1 특이 T 세포 및 PD-L2 특이 T 세포가 교차 반응하지 않기 때문이다. PD-L2 특히 T 세포는 표적 세포를 사멸시킴으로써 항암 면역성을 직접 지지할 수 있을뿐더러, PD-L2 발현 면역 억제 세포에 반응하여 전염증 사이토카인을 미세환경에 방출함으로써 항암 면역성을 간접적으로 지지할 수 있으므로, PD-L2 특이 T 세포의 (예컨대 백신화에 의한) 활성화는 항암 면역치료에 매력적인 전략을 제공한다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Latchman *et al.*, Nat. Immunol. 2001, Mar;2(3):261-268; Ahmad *et al.*, Oncoimmunology, 2017, Nov 1;7(2):e1390641. eCollection 2018) 참조].

[0060] [표 1]

ASPH를 발현하는, 면역조직화학에 의해 연구된 인간 종양 %

종양 조직 유형	연구횟수	양성 %	기원
간세포암종	87	92	PRC + USA
담관암종	27	100	USA
비소세포폐암	304	82	PRC + USA
유방암	47	85	PRC + USA
위암	51	80	PRC
췌장암	109	97	PRC + USA
연조직육종	30	84	PRC
골육종	18	80	USA
결장암	41	75	USA
신암	49	83	PRC
골수성 백혈병	79	88	PRC
췌장암	46	96	USA
교모세포종	15	98	USA
림프성 백혈병	80	49	PRC
정상 골수	130	0	PRC

PRC=People's Republic of China

PRC = 중화민국 인민; USA = 미합중국 국민

[0061]

[0062]

최근 들어, 4개를 초과하는 관문 억제제(예컨대 항체)가 PD-1, PD-L1 및 세포독성 T 림프구 연관 단백질 4(CTLA-4) 표적화용으로서 시판되고 있다. 이하 표 2 및 표 3은 수행 가능한 조합 치료법을 포함하여 임상 실험 중인 것으로서, 선택된 몇몇 면역치료제, 항 PD-L1 및 항 PD-1를 보여주고 있다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Alsaab *et al.*, Front Pharmacol. 2017, Aug 23;8:561) 참조].

[0063]

[표 2]

임상 실험중인 예시적 면역치료제(항 PD-L1)				
CT 번호	단계	병태	제조사명	추가 제제
아테졸리주맙(PD-L1 억제제) - FDA 승인받음				
NCT02724878	II	불투명 세포 신장암	Dana-Farber Cancer Institute	베바시주맙
NCT02989584	I, II	방광암, 전이성 방 광암, 요로상피암종	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	겜시타빈
				시스플라틴
NCT02302807	III	방광암	Hoffmann-La Roche	도세탁셀
				파클리탁셀
				빈플루닌
NCT02846623	II	소림프구림프종	M.D. Anderson Cancer Center	오비누루주맙
NCT02788279	III	결장직장암	Hoffmann-La Roche	코비메티닙
				레고라페닙
NCT02792192	I, II	고위험 비근육침습성 방광암(NMIBC)	Hoffmann-La Roche	생물요법: 바실레 칼렛-구에린 (BCG)
NCT02902029	II	악성 흑색종	University Hospital, Essen	베무라페닙
				코비메티닙
NCT02908672	III	흑색종	Hoffmann-La Roche	베무라페닙
NCT03024437	I, II	전이성 암	Roberto Pili	베바시주맙
				엔티노스타트
NCT02891824	III	난소암	ARCAGY/GINECO GROUP	아바스틴 + 백금기반

[0064]

				화학요법
NCT03038100	III	난소암; 나팔관암; 복막 신생물	Hoffmann-La Roche	파클리탁셀 카르보플라틴 베바시주맵
NCT02659384	II	난소 신생물	EORTC	베바시주맵 아세틸시알산
NCT02992912	II	전이성 종양 환자	Gustave Roussy, Cancer Campus, Grand Paris	SABR
NCT03016312	III	전립선 신생물 거세저항성	Hoffmann-La Roche	엔잘루타미드
NCT02873195	II	재발 결장직장암종; IVA기 결장직장암; IVB기 결장직장암	Academic and Community Cancer Research, (NCI)	베바시주맵 카페시타빈
NCT02926833	II	난치 미만성 거대B세포림프종	Kite Pharma, Inc. Genentech, Inc.	생물요법: KTE-C19
NCT02748889	II	소세포폐암 (SCLC)	Giuseppe Giaccone, Vanderbilt University, Georgetown University	에토포시드 MPDL3280A
NCT02763579	III	소세포폐암	Hoffmann-La Roche	카르보플라틴 에토포시드
NCT02807636	III	요로상피 암종	Hoffmann-La Roche	카르보플라틴 겔시타빈 시스플라틴
NCT03029832	II	요로상피 암종	Genentech, Inc.	MOXR0916
NCT02875613	II	비인두암	Assuntina Sacco, M.D., Pfizer, University of California, San Diego	-
NCT02912572	II	전이성 자궁내막암	Dana-Farber Cancer Institute, Pfizer	-
NCT02915523	I,	상피성 난소암;	Syndax Pharmaceuticals	엔티노스타트

[0065]

	II	복막암; 나팔관암	Merck KGaA, Pfizer	
NCT02943317	II	상피성 난소암	Verastem, Inc.	VS-6063
NCT02952586	III	두경부 편평세포암종	Pfizer	화학방사선요법
NCT02580058	III	난소암	Pfizer	생물요법: PLD
NCT02603432	III	요로상피암	Pfizer	-
NCT02718417	III	난소암	Pfizer	카르보플라틴 파클리탁셀
NCT02951156	III	미만성 거대 B세포 림프종 (DLBCL)	Pfizer, EMD Serono	우토밀루맵 리툽시맵 아자시티딘 벤다무스틴 겔시타빈 옥살리플라틴

[0066]

[0067]

[표 3]

임상 실험중인 예시적 면역치료제(항 PD-1)				
CT 번호	단계	병태	제조사명	추가 제제
피달리주맙(CT001)(항 PD-1)				
NCT025301 25	II	III기 미만성 거대B세포 림프종; IV기 미만성 거대 B세포 림프종	Northwestern University; Gateway for Cancer Research; National Cancer Institute (NCI)	-
NCT020779 59	I/II	다발성 골수종	Yvonne Efebera; CureTech Ltd; Ohio St. Univ. Comprehensive Cancer Center	레날리도미드
NCT005322 59	III	림프종, 거대세포, 미만성; 림프종, 혼합세포, 미만성; 원발성 종격동 거대B세포 림프종	Cure Tech Ltd	-
NCT014353 69	II	흑색종; 악성 흑색종	Medivation, Inc.	-
NCT005322 59	II	림프종, 거대세포, 미만성; 림프종, 혼합세포, 미만성; 원발성 종격동 거대B세포 림프종	CureTech Ltd	-
NCT008903 05	II	전이성 결장직장암	Medivation, Inc.	FOLFOX
NCT020779 59	II	다발성 골수종	Yvonne Efebera; CureTech Ltd; Ohio State University Comprehensive Cancer Center	레날리도미드, 피달리주맙
NCT025301 25	II	III기 미만성 거대B세포 림프종; IV기 미만성 거대 B세포 림프종	Northwestern University; Gateway for Cancer Research; National	피달리주맙

[0068]

			Cancer Institute (NCI)	
NCT03002376	II	흑색종	Regeneron Pharmaceuticals; Sanofi	-
NCT02760498	II	진행성 피부 편평세포암종	Regeneron Pharmaceuticals	-
NCT02298946	I	결장직장암; 결장직장 신생물; 결장직장암종	National Cancer Institute (NCI); National Institutes of Health Clinical Center (CC)	사이클로-포스파미드
NCT01352884	I	암	MedImmune LLC; GlaxoSmithKline	-
NCT02118337	I	선택 진행성 악성종양	MedImmune LLC	MEDI4736
NCT02013804	I	진행성 악성종양	MedImmune LLC	-
NCT02271945	I	재발성/난치성 공격적 B 세포 림프종	MedImmune LLC	MEDI-551
NCT02678260	I	진행성 악성종양	Novartis Pharmaceuticals	
NCT02605967	II	비인두암종	Novartis Pharmaceuticals	
NCT02608268	I	진행성 악성종양	Novartis Pharmaceuticals	MBG453
NCT02807844	I	TNBC; 횡장암종; 흑색종; 자궁내막암종	Novartis Pharmaceuticals	MCS110
NCT02967692	III	흑색종	Novartis Pharmaceuticals	다브라페닙, 트라메티닙

[0069]

[0070]

항 PD-1/PD-L1 치료법의 반응에 큰 성공과 효능을 얻었음에도 불구하고, 이는 특정 유형의 암에 국한된다. 예를 들어 면역 관문 억제제는 지금까지 변이부담이 더 낮은 암 하위세트, 예컨대 유잉 육종(Ewing sarcoma) 및 전립선암에 있어 활성을 거의 보이지 않았거나 아예 보이지 않았다. 선택되지 않은 결장직장암 환자 집단을 대상으로 한 PD-1 억제제 임상 실험에서, 활성은 거의 보이지 않았거나 아예 보이지 않았다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로서 첨부된 문헌(Yarchoan *et al.*, Nat. Rev. Cancer. 2017 Apr;17(4):209-222. Epub 2017 Feb 24; Schumacher and Schreiber, Science 2015 Apr 3;348(6230):69-74; Postow *et al.*, N. Engl. J. Med. 2018 Jan 11;378(2):158-168) 참조].

[0071]

**일반적 정의**

[0072]

특별하게 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당 분야(예컨대 세포 배양, 분자 유전학 및 생화학 분야)에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가질 것이다.

[0073]

본원에 사용된 바와 같이, 수치 또는 범위에 관한 내용중 "약"이란 용어는, 해당 내용이 더 제한된 범위를 필요로 하지 않는한, 나열되거나 청구된 수치의 값 또는 범위의 ±10%를 의미한다.

[0074]

상기 설명과 특허청구의 범위에서, "~중 적어도 하나"또는 "~중 하나 이상"과 같은 어구 뒤에는 요소 또는 특징에 접속되는 목록이 올 수 있다. "및/또는"이란 용어는 또한 둘 이상의 요소 또는 특징의 목록에서 나타날 수 있다. 이러한 어구가 사용되는 내용과 암시적으로 또는 명시적으로 상충되지 않는 한, 해당 어구는 나열된 요소 또는 특징 중 임의의 개별 요소 또는 특징, 또는 나열된 요소 또는 특징 중 임의의 것과, 나열된 또 다른 요소 또는 특징 중 임의의 것의 조합을 의미하는 것으로 의도된다. 예를 들어 "A 및 B 중 적어도 하나", "A 및 B 중 하나 이상" 및 "A 및/또는 B"라는 어구들은 각각 "A 단독, B 단독, 또는 A와 B 모두"를 의미하도록 의도된다. 세개 이상의 항목을 포함하는 목록에도 유사한 해석이 적용된다. 예를 들어, "A, B 및 C 중 적어도 하나", "A,

B 및 C 중 하나 이상" 및 "A, B 및/또는 C"라는 어구들은 각각 "A 단독, B 단독, C 단독, A 및 B 모두, A 및 C 모두, B 및 C 모두, 또는 A, B 및 C 모두"를 의미하는 것으로 의도된다. 또한, 상기 설명 및 특허청구의 범위에서 "~기반으로 하는"이라는 용어의 사용은 "적어도 부분적으로 ~기반으로 하는"을 의미하는 것으로 의도되어, 나열되지 않은 특징 또는 요소도 허용된다.

- [0075] 매개변수의 범위가 제공되는 경우, 해당 범위 내의 모든 정수 및 정수의 소수점 첫째 자리도 본 발명에 의해 제공됨이 이해된다. 예를 들어, "0.2 mg ~ 5 mg"은 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 0.6 mg 등으로부터 5.0 mg를 포함하여 5.0 mg에 이르기까지를 개시하는 것이다.
- [0076] 소분자는 질량이 2000 달톤 미만인 화합물이다. 소분자의 분자 질량은, 바람직하게 1000 달톤 미만, 더욱 바람직하게 600 달톤 미만인데, 예컨대 화합물은 500 달톤 미만, 400 달톤 미만, 300 달톤 미만, 200 달톤 미만 또는 100 달톤 미만이다.
- [0077] 본원에 사용된 바와 같은 "단리된" 또는 "정제된" 소분자, 핵산 분자, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 단백질은, 이 소분자, 핵산 분자, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 단백질이 제조합 기술에 의해 생산될 때, 다른 세포성 물질 또는 배양 배지로부터 실질적으로 자유롭거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학 진구체 또는 기타 화합물로부터 실질적으로 자유로운 소분자, 핵산 분자, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 단백질이다. 정제된 화합물은 관심 화합물 적어도 60 중량%(건조중량%)이다. 바람직하게 제제는 관심 화합물 적어도 75 중량%, 더욱 바람직하게 적어도 90 중량%, 가장 바람직하게 적어도 99 중량%이다. 예를 들어 정제된 화합물은 요망되는 화합물 적어도 90 중량%, 91 중량%, 92 중량%, 93 중량%, 94 중량%, 95 중량%, 98 중량%, 99 중량% 또는 100 중량%(w/w)인 화합물이다. 순도는 임의의 적당한 표준적 방법, 예컨대 컬럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피 또는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석에 의해 측정된다. 정제된, 또는 단리된 폴리뉴클레오티드(리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA)) 또는 폴리펩티드는, 자연 발생 상태일 때 그것에 측정하는 유전자 또는 서열로부터 자유롭다. "정제된"이란, 멸균 정도가 인간 대상체로의 투여에 안전한(예컨대 감염성 제제 또는 독성 제제가 없는) 경우를 정의하기도 한다. 정제된, 또는 단리된 폴리뉴클레오티드(리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA))는, 자연 발생 상태일 때 그것에 측정하는 유전자 또는 서열로부터 자유롭다. 정제된, 또는 단리된 폴리펩티드는, 자연 발생 상태일 때 그것에 측정하는 아미노산 또는 서열로부터 자유롭다.
- [0078] 마찬가지로, "실질적으로 순수한"이란, 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 자연 발생시 그것에 수반되는 성분들로부터 분리된 경우를 의미한다. 통상적으로 뉴클레오티드 및 폴리펩티드가, 이것들이 자연에 있을 때 결합되는 단백질 및 자연 발생 유기 분자로부터 자유롭게 되어 적어도 60 중량%, 적어도 70 중량%, 적어도 80 중량%, 적어도 90 중량%, 적어도 95 중량%, 또는 심지어 적어도 99 중량% 존재할 때, 이 뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 실질적으로 순수하다.
- [0079] 제제 또는 제제 성분의 "유효량" 및 "치료적 유효량"이란 용어는, 해당 제제 또는 성분이 단독으로나 조합될 때 요망되는 효과를 제공하기에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어 "유효량"이란, 포유동물에서 유리한 임상 효과를 달성하는데 필요한 화합물 단독 또는 조합의 양을 의미한다. 궁극적으로, 참여 전문의 또는 수의사가 적당한 양과 투여 계획을 결정한다.
- [0080] 본원에 사용된 바와 같은 "치료하는 것" 및 "치료"란 용어는, 제제(agent) 또는 제제(formulation)를, 불리한 병태, 장애 또는 질환이 발병한 임상적으로 유증상인 개체에 투여하여, 해당 증상 또는 징후의 중증도 및/또는 발현빈도의 감소를 달성하고, 해당 증상 또는 징후 및/또는 이의 기저 원인을 없애며/없애거나, 손상의 개선 또는 치유를 촉진하는 것을 지칭한다. 대상체에서 질환을 "억제하는 것" 및 "억제"란 용어는, 대상체에서 병태, 장애 또는 질환의 진행 및/또는 합병증을 막거나 감소시키는 것을 의미한다. 예를 들어 억제는 부착 형성(adhesion formation)을 억제하는 것을 포함한다.
- [0081] 전이부를 나타내는 용어로서, "~를 포함하는(including)", "~를 함유하는" 또는 "~에 의해 특징지어지는"과 유의어인 "~를 포함하는(comprising)"이란 용어는 포괄적이거나 비제한적인 것으로서, 추가의 나열되지 않은 요소 또는 방법의 단계를 배제하지 않는다. 이와는 반대로 전이부를 나타내는 어구 "~로 이루어진"은 청구항에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분은 배제한다. 전이부를 나타내는 어구인 "~으로 필수적으로 이루어진"은 특허청구의 범위를 명시된 재료 또는 단계, "그리고 청구된 발명의 기본적인 및 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료 또는 단계"로 한정하는 것이다.
- [0082] 본원에 사용된 바와 같은 "대상체", "환자" 및 "개체" 등의 용어는, 제한하는 것으로 의도되는 것은 아니며, 일반적으로 호환될 수 있다. 즉 "환자"라고 기재된 개체는 반드시 특정 질환이 발생했어야 하는 것은 아니고, 단

지 의료적 조연을 구할 수는 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "대상체"란 용어는, 동물계의 임의의 일원, 예컨대 포유동물을 포함한다. 일 구현예에서, 대상체는 인간이다, 다른 구현예에서, 대상체는 마우스이다. 예를 들어 대상체는 포유동물이다. 포유동물의 비제한적 예로서는 설치류(예컨대 마우스 및 래트), 영장류(예컨대 여우원숭이, 부쉬베이비, 원숭이, 유인원 및 인간), 토끼, 개(예컨대 반려견, 도우미견 또는 임무수행견, 예컨대 경찰견, 군견, 경주견 또는 쇼독(show dog)), 말(예컨대 경주마 및 역용마), 고양이(예컨대 반려묘), 가축(예컨대 돼지, 소, 당나귀, 노새, 들소(bison), 염소, 낙타 및 양) 및 사슴을 포함한다. 구현예들에서, 대상체는 인간이다.

[0083] 본원에 사용된 단수 형태를 나타내는 "하나의(a)", "한(an)" 및 "본(the)"은 내용에 달리 명시되어 있지 않은 한 복수의 대상을 포함한다. 그러므로 예를 들어 "하나의 질환", "하나의 병상" 또는 "하나의 핵산"은 이러한 하나 이상의 구현예를 지칭하는 대상으로서, 당 업자에게 공지된 이 구현예의 등가물을 포함하는 식이다.

[0084] 본원에 사용된 바와 같은 "치료하는 것"은, 예컨대 어떤 장애의 진행을 억제, 퇴행 또는 정체시키는 것을 포함한다. "치료하는 것"은 또한 해당 장애의 임의의 증상 또는 증상들을 막는 것 또는 경감시키는 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 대상체에서 질환의 진행 또는 질환의 합병증을 "억제하는 것"은 대상체에서 해당 질환의 진행 및/또는 해당 질환의 합병증을 막는 것 또는 감소시키는 것을 의미한다.

[0085] 본원에 사용된 바와 같이, 어떤 장애와 연관된 "증상"은 해당 장애와 연관된 임의의 임상 증상 또는 실험실 증상을 포함하되, 대상체가 느끼고 관찰할 수 있는 것에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 본원에 사용된 바와 같이, 치료 화합물의 양에 대하여 언급될 때 "유효(한)"란 용어는, 어떤 화합물이 본 발명의 방식으로 적용될 때 과도한 부작용(예컨대 독성, 염증 또는 알레르기 반응)을 일으키지 않고 해당 화합물의 양이 합리적 이익/위험 비(benefit/risk ratio)에 상응하여 원하는 치료 반응을 달성하기에 충분한 경우를 지칭한다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같은 "약학적으로 허용 가능한" 담체 또는 부형제란, 과도한 부작용(예컨대 독성, 염증 또는 알레르기 반응)을 일으키지 않고 이익/위험 비에 상응하여 인간 및/또는 동물에 사용하기 적합한 담체 또는 부형제를 지칭한다. 이는, 예컨대 본 발명의 화합물을 대상체에 전달하기 위한 것으로서, 약학적으로 허용 가능한 용매, 현탁제 또는 비이클일 수 있다.

[0088] "서열 동일성 백분율"은 선택적으로 정렬된 서열 2개를 비교 윈도우(comparison window)에 대해 비교함으로써 확정되는데, 여기서 비교 윈도우내 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는 두 서열의 최적의 정렬을 도모하기 위해, (부가 또는 결실(즉 갭(gap)을 포함하지 않는) 기준 서열과는 비교되게, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열에 출현하는 위치의 수를 확정하여, 매칭(matching)된 위치 수를 획득한 다음, 매칭된 위치의 수를, 비교 윈도우내 위치의 총 수로 나누고, 그 결과값에 100을 곱해 서열 동일성 백분율을 획득함으로써 산정된다.

[0089] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열에 관한 내용중 "동일한" 또는 "동일성%"란 용어는, 비교 윈도우 또는 서열 비교 알고리즘이 이용되거나, 또는 수동적 정렬 및 시각적 조사에 의해 측정되는 바에 따라 지정되는 영역에 대해 최대의 일치성을 보이도록 비교 및 정렬될 때, 2개 이상의 서열 또는 종속서열이 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 서열과 동일하거나, 이 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 서열을 특정 백분율만큼 가지는(예컨대 특정 영역, 예컨대 전체 폴리펩티드 서열 영역 또는 이의 개별 도메인에 대해 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 이 이상의 동일성을 가지는) 경우를 지칭한다. 이처럼 적어도 약 80% 동일한 서열은 "실질적으로 동일한" 서열이라 칭하여진다. 몇몇 구현예들에서, 서열 2개는 100% 동일하다. 임의의 구현예들에서, 서열 2개는 이 서열들 중 어느 하나(예컨대 서열 2개의 길이가 상이할 경우, 해당 서열 2개 중 더 짧은 서열)의 전체 길이에 대해 100% 동일하다. 다양한 구현예들에서, 동일성이란, 시험 서열의 상보성을 지칭할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 그 길이가, 적어도 약 10개 내지 약 100개, 약 20개 내지 약 75개, 약 30개 내지 약 50개 아미노산 또는 뉴클레오티드인 어떤 영역에 걸쳐 동일성이 존재한다. 임의의 구현예들에서, 그 길이가, 적어도 약 50개 아미노산인 어떤 영역, 더욱 바람직하게 그 길이가 100개 ~ 500개, 100개 ~ 200개, 150개 ~ 200개, 175개 ~ 200개, 175개 ~ 225개, 175개 ~ 250개, 200개 ~ 225개, 200개 ~ 250개, 또는 이 이상의 아미노산인 어떤 영역에 걸쳐 동일성이 존재한다.

[0090] 서열 비교를 위해, 통상 하나의 서열이 기준 서열, 즉 시험 서열이 비교되는 서열의 역할을 한다. 다양한 구현예들에서, 서열 비교 알고리즘이 사용될 때, 시험 서열과 기준 서열은 컴퓨터에 입력되고, 필요하다면 종속서열 좌표가 지정되며, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수가 지정된다. 바람직하게 디폴트 프로그램 매개변수가 사용

될 수 있거나, 또는 대안적 매개변수가 지정될 수 있다. 그 다음, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 매개변수를 바탕으로 하여 기준 서열을 기준으로 시험 서열에 대한 서열 동일성%를 산정한다.

[0091] "비교 윈도우"란, 서열 2개가 최적으로 정렬된 후 어떤 서열이, 연속 위치의 수가 동일한 기준 서열과 비교될 수 있는 분절로서, 연속 위치들의 수 중 어느 하나(예컨대 적어도 약 10개 내지 약 100개, 약 20개 내지 약 75개, 약 30개 내지 약 50개, 100개 내지 500개, 100개 내지 200개, 150개 내지 200개, 175개 내지 200개, 175개 내지 225개, 175개 내지 250개, 200개 내지 225개, 200개 내지 250개)를 보이는 분절을 지칭한다. 다양한 구현예들에서, 비교 윈도우는 정렬된 서열 2개중 어느 하나 또는 둘 다의 전체 길이이다. 몇몇 구현예들에서, 비교되는 서열 2개는 상이한 길이를 가지며, 비교 윈도우는 서열 2개중 더 길거나 더 짧은 전체 길이이다. 비교를 위해 서열들을 정렬하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 서열 비교를 위한 최적의 정렬은, 예컨대 Smith & Waterman의 국소 상동성 알고리즘[Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)], Needleman & Wunsch의 상동성 정렬 알고리즘[J. Mol. Biol. 48:443 (1970)], Pearson & Lipman의 유사성 검색 방법(search for similarity method)[Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)], 이러한 알고리즘들(GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)의 컴퓨터 실행, 또는 수동식 정렬 및 시각적 관찰[예컨대 문헌(Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 1995 증보판) 참조)에 의해 수행될 수 있다.

[0092] 다양한 구현예들에서, 서열 동일성% 및 서열 유사성%를 확정하는데 적합한 알고리즘은 문헌[Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977)] 및 문헌[Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 각각 기재된 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 및 BLAST 2.0은 본원에 기재된 매개변수들과 함께 사용되어, 핵산 및 단백질에 대한 서열 동일성%를 확정할 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 당 분야에 공지된 바와 같이, 미국 국립생물정보센터를 통해 공중이 이용가능하다. 이 알고리즘은, 우선 데이터베이스 서열중 동일한 길이를 가지는 단어와 함께 정렬될 때 "+" 값인 몇몇 역치 점수 T에 매칭되거나 이를 만족시키는, 질문 서열(query sequence)내 길이 W인 짧은 문자들을 동정함으로써 높은 점수의 서열 쌍(High Scoring sequence Pair; HSP)들을 동정하는 것을 포함한다. T는 이웃하는 단어 점수 역치라고 지칭된다 Altschul의 다수, 상동). 이처럼 초기의 이웃하는 단어 히트(hit)들은 이 히트들을 함유하는, 더 긴 HSP를 찾기 위해 검색을 개시하기 위한 시드(seed)로서의 역할을 한다. 단어 히트들은 누적 정렬 점수가 증가할 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양 방향으로 확장된다. 뉴클레오티드 서열의 경우에 누적 점수는 매개변수 M(매칭되는 잔기 쌍에 대한 보상 점수; 항상 0을 초과함) 및 N(미스매칭(mismatching)되는 잔기들에 대한 페널티 점수; 항상 0 미만임)을 사용하여 산정된다. 아미노산 서열의 경우에는 누적 점수를 산정하는데 점수매김 매트릭스가 사용된다. 단어 히트들의 각 방향으로의 확장은, 누적 정렬 점수가 최대 달성 값으로부터 양 X만큼 떨어질 때; "-"로 점수가 매겨지는 잔기 정렬 1회 이상이 축적됨으로 말미암아 누적 점수가 0 또는 그 이하가 될 때; 또는 양 서열중 어느 한 서열의 말단에 도달할 때, 중단된다. BLAST 알고리즘 매개변수인 W, T 및 X는 정렬의 감도와 속도를 결정한다. (뉴클레오티드 서열용인) BLASTN 프로그램은 디폴트값으로서 단어길이(W) 11, 기대값(E) 10, M = 5, N = -4, 그리고 두 가닥 비교를 이용한다. 아미노산 서열용인 BLASTP 프로그램은 디폴트값으로서 단어길이 3, 기대값(E) 10, 그리고 BLOSUM62 점수매김 매트릭스[문헌(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989))을 참조], 정렬값(B) 50, 기대값(E) 10, M = 5, N = -4, 그리고 두 가닥 비교를 이용한다.

[0093] 본 발명은 대상체에서 종양을 치료하기 위해 사용될 약학 조성물을 추가로 제공한다. 약학적으로 허용 가능한 예시적 담체로서는 생리적으로 허용 가능한 염, 카르보폴-폴록사머 유사체, 카르보폴/하이드록시프로필메틸셀룰로스(HPMC), 카르보폴-메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스(CMC), 히알루론산, 사이클로덱스트린 및 석유로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 포함한다.

[0094] 본원에 기재된 조성물과 방법은 그러한 치료를 필요로 하는 포유동물 대상체에 유용하다. 포유동물은, 예를 들어 인간, 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말뿐 아니라, 식용으로 사육된 가축 또는 동물, 예컨대 송아지, 양, 돼지, 닭 및 염소이다. 바람직하게 포유동물은 인간이다.

[0095] 본원에 기재된 조성물은 전신 또는 국소 투여된다. 바람직한 구현예에서, 조성물은 의학적으로 적당할 때 투여된다.

[0096] 본 발명의 더 완전한 이해를 용이하게 하기 위해 실시예가 이하에 제공된다. 하기 실시예들은 본 발명을 제조하고 실시하는 예시적인 방식을 설명해준다. 그러나, 본 발명의 범위는 유사한 결과를 얻기 위해 대안적인 방법이 이용될 수 있기 때문에, 단지 예시의 목적인 이들 실시예에 개시된 특정 구현예들에 제한되지 않는다.

[0097] 실시예

- [0098] 실시예 1: ASPH에 대한 파아지 백신과 항 PD-1 관문 억제제가 조합 전달될 때, ASPH에 대한 파아지 백신화 및 항 PD-1 관문 억제제 치료법의 순차 및 동시 진행은 종양 성장 및 진행을 현저하게, 그리고 놀랍게 감소시킨다
- [0099] 당 분야에서 인지되는 동계 마우스 모델을 대상으로 종양, 예컨대 간 종양, 예컨대 HCC의 종양 성장과 진행에 대해 연구하였다. 실험 프로토콜은 도 1에 기재하였다. 마우스 군은 4개(군당 n = 10마리)였다: (1) 대조군, (2) PD-1 차단 단독 처리군, (3) ASPH 관련 펩티드를 발현하는 파아지 백신 단독 처리군, 그리고 (4) PD-1 차단 + 백신 처리군. 요약하면, 동물을 N-말단 인간 ASPH 펩티드 발현 파아지 백신으로 1주일 간격을 두고 3회 면역화한 다음, BNL 마우스 간암 세포를 피하 접종한 후, 항 PD-1 모노클로날 항체를 5주 ~ 6주 동안 매주 2회 투여하여 PD-1 차단을 유도하였다. 기재된 바와 같이 종양 크기를 측정하였다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로 첨부된 문헌(Iwagami *et al.*, *Heliyon* 2017;3:e00407) 참조]. 도 2a 및 도 2b에 보인 바와 같이, 대조군(미처리)과 PD-1 차단 + 백신 처리군을 비교하였을 때 HCC 발달 및 성장에 현저한 차이가 있었다. 도 3도 또한 백신 또는 PD-1 차단 단독 처리시 종양 성장에 대해 비교적 크지 않은(modest) 항 종양 효과(대조군 항 종양 효과와 조합 처리군의 항 종양 효과의 중간 정도)가 발휘됨을 입증한다. 조합 치료시 BALB/c 마우스로부터 절제된 HCC의 종양 부피에 대하여 현저한 상승 효과가 관찰되었다. ASPH에 대한 파아지 백신화 및 항 PD-1 항체 투여를 조합하여 진행시킨 마우스를 대상으로 한 관찰 기간중 HCC의 성장은, 진행되었더라도 아주 미미하였다.
- [0100]  $CD8^+$  세포독성 T 림프구(CTL) 및  $CD4^+$  조력자 T 세포의 항원 특이 활성화는 파아지 면역화와 PD-1 차단에 의해 자극된다
- [0101] 내인성 면역계에 의해 매개되는, 종양 발달 및 성장에 대한 항 종양 효과를 달성하기 위해서는  $CD8^+$  세포 및  $CD4^+$  세포 둘 다의 활성화가 필요하다.  $CD8^+$  CTL 활성을 측정하는 세포독성 검정을 이하와 같이 수행하였다: BNL 간암 세포를 96웰 평판에 접종한 다음, 1시간 동안 부착되도록 허용하고 나서, 실시예 1 및 도 1에 기재된 4개의 다양한 군으로부터 유래한 비장 세포 현탁액을 4시간 동안 첨가하였는데, 이 때 비장 세포 대 표적 세포의 비에 2:1로부터 20:1에 이르기까지 다양하게 변화를 주었다. 기재된 바와 같이, BNL 세포로부터의 LDH 방출량을 세포독성 활성화에 대한 지표로서 측정하였다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로 첨부된 문헌(Shimoda *et al.*, *J. Hepatol.* 2012;56:1129-1135) 참조]. 항 PD-1 + 백신의 조합 처리후 수득된 비장 세포를 대조군 비장 세포와 비교하였을 때, CTL 활성화에 현저한 증가가 있었다. BNL 간암 표적 세포 용해와 관련하여, 항 PD-1 및 백신 단독으로는 중간 정도의 반응이 발생하였으며, 파아지 백신화는 항 PD-1 투여(PD-1 차단)만큼 유효하였다(도 4).
- [0102] 그 다음, 검사 결과 삼중 음성 유방암 세포, 즉 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 및 과량 HER2 단백질에 대해 음성으로 판명된 암세포(예컨대 4T1; ATCC 수탁 번호 CRL-2539)를 사용하여 또 다른 시험관 내 세포독성 검정을 수행하였는데, 여기서 4T1 세포는 세포 표면상 마우스 ASPH를 발현하기도 하는 것으로 이전에 확인되었던 바, 이 때의 비장 세포는 실시예 1 및 도 1에 기재된 동물 군 4개로부터 유래한 것이었다. 백신 및 PD-1 공동 처리군은 미처리 대조군에 비하여  $CD8^+$  CTL 활성화에 있어 현저한 증가가 있었다. 이 실시예는, ASPH에 대해 생체 내 감작된 비장 세포가, 도 5에 보인 바와 같이 세포 표면상에 내인적으로 ASPH를 발현하는 다른 유형의 종양 세포를 사멸하는데 사용될 수 있음을 보여주었다.
- [0103] 비장 세포 집단에서 활성화된 항원(ASPH) 특이  $CD4^+$  세포 및  $CD8^+$  세포의, 유세포분석법에 의해 산정된 %를 도 6에 보였다. 파아지 백신 및 재조합 ASPH 단백질이 배양 세포에 첨가되어 자극이 이루어진 후 인터페론 감마 분비에 의해 측정된 바에 따르면, ASPH 특이  $CD4^+$  및  $CD8^+$  활성화에 실질적인 증가가 달성되었다. ASPH 백신 또는 항 PD-1 단독 투여시에 비하여 조합 치료시에는 최고 수준의 활성이 관찰되었다. 그러므로 이 연구는 PD-1 차단 및 파아지 면역화의 조합 치료가, 생체 내에서 일어나는 항 종양 효과에 결정적으로 필요한 세포 면역 반응 유형을 달성하였음을 입증하였다.
- [0104] 도 7a는 4개 군에 있어 BNL 종양의 조직학적 외관을 보여준다. 면역조직화학(IHC)에 의해 측정되는 바와 같은 ASPH 발현은 모든 종양 처리군에서 확고하면서 동일하였다. 도 7b는  $CD3^+$  T 세포(갈색)가, 항 PD1 억제제 또는 백신 단독 처리된 동물뿐 아니라, PD1 억제제 및 백신 둘 다 조합 처리된 동물로부터 유래한 종양에 침습하였음을, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여준다. 도 7c는 백신 또는 PD-1 억제제 단독 처리시보다 조합 처리시 더 유의미한 상승 효과를 보임을, 대조군의 경우에서와 비교하여 보여준다. 조합 처리된 종양에는  $CD3^+$  T 세포(TIL)의 현저하고 놀랍게 향상된 침습이 있었다. 이러한 발견은, 조합 치료에 의한 종양 성장 및 진행의 극적인

감소를 부분적으로 설명해준다.

- [0105] 중요한 점은, 항원(ASPH) 특이 항체(B 세포 반응)가 ASPH 발현 BNL 세포에 의해 발생된 간암 모델의 백신 처리군 및 조합 처리군 마우스에서 검출되었다는 점이다(도 8).
- [0106] 실시예 2: ASPH에 대한 파아지 백신과 항 PD-1 관문 억제제가 조합 전달될 때, ASPH에 대한 파아지 백신화 및 항 PD-1 관문 억제제 치료법의 순차 및 동시 진행은 동계 마우스 모델에서 유방 종양 성장 및 진행을 현저하게, 그리고 놀랍게 감소시킨다
- [0107] 이하 기재된 실험들에서는 당 분야에 인지된 동계 마우스 모델을 사용하였다. 실험 프로토콜은 도 9에 보였다. 마우스 군은 이하와 같이 4개(군당 n = 10마리)였다: (1) 대조군, (2) PD-1 차단(마우스 항 PD-1 mAb) 단독 처리군, (3) N-말단 ASPH 펩티드(표 4의 서열 번호 47)을 발현하는 람다 1 파아지 백신 처리군, 그리고 (4) PD-1 차단 + 백신 처리군. N-말단 인간 ASPH 펩티드를 발현하는 파아지 백신으로 동물을 1주일 간격을 두고 3회 면역화한 다음, 4T1 마우스 유방암 세포를 동소(유방 지방패드) 접종하고 나서, 항 PD-1 모노클로날 항체를 1주일에 2회씩 총 5주 ~ 6주 동안 투여하여 PD-1 차단을 진행하였다. 기재된 바와 같이 종양 크기를 측정하였다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로 첨부된 문헌(Iwagami *et al.*, *Helvion* 2017;3:e00407) 참조]. 도 10에 도시한 그래프에 보인 바와 같이, 대조군(미처리)과 PD-1 차단 + 백신 투여 군을 비교하였을 때 유방암 발달과 성장에 현저한 차이가 있었다. 도 11도 또한 백신 또는 PD-1 차단 단독 처리시 종양 성장에 대해 비교적 크지 않은 항 종양 효과(대조군 항 종양 효과와 조합 처리군의 항 종양 효과의 중간 정도)가 발휘됨을 입증한다. BALB/c 마우스의 원발성 종양 성장과 유방암의 폐전이 둘 다에 대한 조합 치료법의 현저하고도 예상치못하였던 효과를 주목한다(도 12). 관찰 기간 동안 ASPH에 대한 파아지 백신화 + 항 PD-1 항체 투여가 진행된 마우스에서는 유방암의 극적으로 감소한 성장, 진행 및 다중 장기 전이(상이하고 원위에 있는 부위, 예컨대 간, 림프절, 비장, 부신 및 신장)가 달성되었다(도 13a ~ 도 13c). 더욱이, 백신화된 마우스에서는 PD-1 억제제의 용량 의존적 항 종양 효과가 관찰되었다(도 14 및 도 15). 고용량(200  $\mu$ g)의 PD-1 억제제는, 원발성 종양 성장과 폐전이 둘 다에 대해 최상의 억제 효과를 보였다.
- [0108] CD8<sup>+</sup> 세포독성 T 림프구(CTL) 및 CD4<sup>+</sup> 조력자 T 세포의 항원 특이 활성화는, 유세포분석법, 시험관 내 세포독성, 면역조직화학 및 ELISA에 의해 입증되는 바에 따르면, 람다 1 파아지 면역화와 PD-1 차단에 의해 자극된다
- [0109] 내인성 면역계에 의해 매개되는, 종양 발달 및 성장에 대한 항 종양 효과를 달성하기 위해서는 CD8<sup>+</sup> 세포 및 CD4<sup>+</sup> 세포 둘 다의 활성화가 필요하다. CD8<sup>+</sup> CTL 활성을 측정하는 세포독성 검정을 이하와 같이 수행하였다: 4T1 세포를 96웰 평판에 접종한 다음, 1시간 동안 부착되도록 허용하고 나서, 실시예 2 및 도 9에 기재된 4개의 다양한 군으로부터 유래한 비장 세포 현탁액을 4시간 동안 첨가하였는데, 이 때 비장 세포 대 표적 세포의 비에 2:1로부터 20:1에 이르기까지 다양하게 변화를 주었다. 기재된 바와 같이, 4T1 세포로부터의 LDH 방출량을 세포독성 활성화에 대한 지표로서 측정하였다[예를 들어 전체 내용이 본원에 참고문헌으로 첨부된 문헌(Shimoda *et al.*, *J. Hepatol.* 2012;56:1129-1135) 참조]. 대조군 비장 세포를 항 PD-1 + 백신의 조합 처리후 수득된 비장 세포와 비교하였을 때, CTL 활성화에 현저한 증가가 있었다. 예를 들어 정제된 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와 관문 억제제의 조합 효과는, 정제된 종양 항원에 대한 면역화를 위한 백신 구조체와 관문 억제제가 각각 별도 투여되었을 때 이 백신 구조체의 효과와 이 관문 억제제의 효과의 합보다 더 컸다. 4T1 표적 세포 용해와 관련하여, 항 PD-1 및 백신 단독으로는 중간 정도의 반응이 발생하였으며, 파아지 백신화는 항 PD-1 투여(PD-1 차단)만큼 유효하였다(도 16).
- [0110] 비장 세포 집단에서 활성화된 항원(ASPH) 특이 CD4<sup>+</sup> 세포 및 CD8<sup>+</sup> 세포의, 유세포분석에 의해 확인된 바에 따른 백분율을 도 17에 보였다. 파아지 백신 및 재조합 ASPH 단백질을 배양 세포에 첨가하여 자극한 후 ASPH 특이 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 활성은, IFN $\gamma$  분비에 의해 측정되는 바에 따르면 실질적으로 증가하였다. 조합 치료시에는 ASPH 백신 또는 항 PD-1의 단독 투여시에 비하여 최고 수준의 활성이 관찰되었다. 그러므로 이 연구는, PD-1 차단 및 파아지 면역화의 조합 치료가, 생체 내에서 일어나는 항 종양 효과에 결정적으로 필요한 세포 면역 반응 유형을 달성하였음을 입증한다.
- [0111] 도 18a 및 도 18b는 CD3<sup>+</sup> T 세포(갈색)가, 대조군, 항 PD1 억제제 또는 백신 단독 처리군뿐 아니라, PD1 억제제 및 백신의 조합 처리군으로부터 유래한 원발성 종양에 침습하였음을 보여준다. 도 19는 조합 처리시가 백신 또는 항 PD-1 억제제 단독 처리시보다 폐 전이에 대하여 상당한 상승 효과, 즉 더 충분한 효과를 나타냄을, 대조

군의 경우에서와 비교하여 보여준다. 조합 처리군에서는 원발성 종양과 폐 전이 둘 다에 CD3<sup>+</sup> T 세포(TIL)들 중 CD8<sup>+</sup> 효과기 세포독성 CTL(도 20a 및 도 20b) 및 CD45RO<sup>+</sup> 기억 CTL(도 21a 및 도 21b)의 현저하고, 상승적으로 향상된 침습이 일어났다. 이러한 발견은, 조합 요법에 의해 극적이면서 상승적인 종양 성장 및 진행의 감소가 달성되었음을 부분적으로 설명해준다.

[0112] 중요한 점은, 항원(ASPH) 특이 항체(B 세포 반응)가 4T1 세포에 의해 발생된 유방암 모델의 백신 처리군 및 조합 처리군 마우스에서 검출되었다는 점이다(도 22).

[0113] [표 4]

서 열		
명칭	서열 번호	서열
p52	서열 번호 1	TSFFTWFMVIALLGWVTSVA
p103	서열 번호 2	AKVLLGLKERSTSEP
p148	서열 번호 3	KEQIQSLLHEMVHAEHVEG
p322	서열 번호 4	QKAKVKKKKPKLLNKF
p415	서열 번호 5	PADLLKLSLKRSDRQQF
p427	서열 번호 6	SDRQQFLGHMRGSLTLQ
p437	서열 번호 7	RGSLTLQRLVQLFPN
p443	서열 번호 8	LQRLVQLFPNDTSLKN
p492	서열 번호 9	VHYGFILKAQNKIAESIP
p557	서열 번호 10	ASVWQRSLYNVNGLKAQPWW
p581	서열 번호 11	TGYTELVKSLERNWKLI
p588	서열 번호 12	KSLERNWKLIRDEGLAVMDK
p725	서열 번호 13	HEVWQDASSFRLIF
p731	서열 번호 14	ASSFRLIFIVDVWHPPEL
VDVWHPPELTPQ QRRSLPAI	서열 번호 15	VDVWHPPELTPQRRSLPAI
ASPH48	서열 번호 16	GLSGTSFFT
ASPH53	서열 번호 17	SFFTWFPMVI
ASPH58	서열 번호 18	FMVIALLG
ASPH62	서열 번호 19	ALLGVWTSV
ASPH72	서열 번호 20	VVWFDLVDY
ASPH79	서열 번호 21	DYEEVLGKL
ASPH81	서열 번호 22	EEVLGKLG

[0114]

ASPH252	서열 번호 23	TDDVTYQVY
ASPH258	서열 번호 24	QVYEEQAVY
ASPH261	서열 번호 25	EEQAVYEPL
ASPH371	서열 번호 26	YPQSPRARY
ASPH374	서열 번호 27	SPRARYGKA
ASPH406	서열 번호 28	QEVASLPDV
ASPH411	서열 번호 29	LPDVPADLL
ASPH475	서열 번호 30	KVYEEVLSV
ASPH478	서열 번호 31	EEVLSVTPN
ASPH484	서열 번호 32	TPNDGFAKV
ASPH488	서열 번호 33	GFAKVHYGF
ASPH491	서열 번호 34	KVHYGFILK
ASPH503	서열 번호 35	KIAESIPYL
ASPH521	서열 번호 36	GTDDGRFYF
ASPH537	서열 번호 37	RVGNKEAYK
ASPH557	서열 번호 38	ASVWQRSLY
ASPH563	서열 번호 39	SLYNVNGLK
ASPH582	서열 번호 40	GYTELVKSL
ASPH611	서열 번호 41	LFLPEDENL
ASPH681	서열 번호 42	GPTNCRLRM
ASPH693	서열 번호 43	LVIPKEGCK
ASPH701	서열 번호 44	KIRCANETR
ASPH711	서열 번호 45	WEEGKVLIF
인간 ASPH 아미노산 서열	서열 번호 46	MAQRKNAKSSGNSSSSGSGSGSTSACSSSPGARRET K HGGHKNGRKGGLSGTSFFTWFMVIALLGVWTSVAVV WFDLVDYEEVLGKLGIIYDADGDGDFDVEDDAKVLLGL KERSTSEPAVPEEAEPHTEPEEQVPVEAEPQNI EDE AKEQIQSLLHEMVHAEHVEGEDLQQEDGPTGEPQ QE DDEFLMATDVDDRFFETLEPEVSHEETEHSYHVEETV SQDCNQDMEEMMSEQENPDSSEPVVEDERLHHD TD DVTYQVYEEQAVYEPLENEGIEITEVTAPPEDNPVED

[0115]

		SQVIVEEVSIFPVEEQQEVPPETNRKTDDEPEQKAKVK KKKPKLLNKFDKTIKAELDAAEKLRKRKIEEAVNAF KELVRKYPQSPRARYGKAQCEDDLAEKRRSNEVLRG AIETYQEVASLPDVPADLLKLSLKRSDRQQFLGHMR GSLTLQRLVQLFPNDTSLKNDLGVGYLLIGDNDNAK KVYEEVLSVTPNDGFAKVHYGFILKAQNKIAESIPYLK EGIESGDPGTDGDRFYFHLGDAMQRVGNKEAYKWYE LGHKRGHFASVWQRSLYNVNGLKAQPWWTPKETGY TELVKSLERNWKLIRDEGLAVMDKAKGLFPEDENL REKGDWSQFTLWQQGRRNENACKGAPKTCTLLEKF PETTGCRRGQIKYSIMHPGTHVWPHTGFTNCLRMH LGLVIPKEGCKIRCANETRTWEEGKVLIFDSDFEHEV WQDASSFRLIFIVDVVHPELTPQQRRSLPAI
인간 ASPH 아미노산 서열의 처음 3분의 1	서열 번호 47	MAQRKNAKSSGNSSSSGSGSSTSAGSSSPGARRETK HGGHKNRKGGLSGTSFFTFWMVIALLGWVTSVAVV WFDLVDYEEVLGKLGHYDADGDGDFDVAKVLGL KERSTSEPAVPEEAEPHTEPEEQVPVEAEPQNIIDE AKEQIQSLHEMVHAHVVEGEDLQQEDGPTGEPQQE DDEFMLATDVDRFETLEPEVSHEETEHSYHVEETV SQDCNQDMEEMMSEQENPDSSEFPVVEDERLHHDTD
인간 ASPH 아미노산 서열의 마지막 3분의 1	서열 번호 48	ESIPYLKEGIESGDPGTDGDRFYFHLGDAMQRVGNK EAYKWYELGHKRGHFASVWQRSLYNVNGLKAQPWW TPKETGYTELVKSLERNWKLIRDEGLAVMDKAKGLF LPEDENLREKGDWSQFTLWQQGRRNENACKGAPKT CTLLEKFPETTGCRRGQIKYSIMHPGTHVWPHTGPT NCLRLMHLGLVIPKEGCKIRCANETRTWEEGKVLIFD DSFEHEVWQDASSFRLIFIVDVVHPELTPQQRRSLPAI
인간 ASPH 뉴클레오티드 서열	서열 번호 49	cggaccgtgcaatggcccagcgtagaatgccaagagcagcg gcaacagcagcagcagcggctccggcagcgtagcacgagtg cgggcagcagcagccccggggccggagagagacaagcat ggaggacacaagaatggaggaaaggcggactctcgggaact cattctcacgtggtttatggtgattgcattgctggcgtctggaca tctgtagctgtctgtttgatcttgtgactatgaggaagtcta ggaaaactaggaatctatgatgctgatggtgatggatttgatg tggatgatgcaaaagtttattaggacttaagagagatctacttc agagccagcagctcccgcagaaggctgagccacacactga gcccaggagcaggtcctgtggaggcagaacccagaatc gagatgaagcaaaagaacaaattcagtcctctccatgaaat ggtacacgcagaacatgtgagggagaagactgcaacaagaa gatggaccacaggagaaccacaacaagaggatgatgatttct tatggcgactgatgtagatgatagattgagaccctggaacctga agtatctcatgaagaaaccgagcatagttaccacgtggaagaga cagttcacaagactgtaacaggataggaagagatgatgctg agcaggaaaatccagattccagtgaccagtagtagaagatgaa agattgcaccatgatacagatgatgaacatccaagtctatgag gaacaagcagtatatgaacctctagaaaatgaagggatagaat

[0116]

		<p>cacagaagtaactgctccccctgaggataatcctgtagaagattc          acaggaattgtagaagaagtaagcattttcctgtggaagaaca          gcaggaagfaccaccagaaacaatagaaaaacagatgatcca          gaacaaaaagcaaaagtttaagaaaaagagcctaactttaaa          taaatttgataagactattaagctgaacttgatgctgcagaaaa          ctccgtaaaaggggaaaaaattgaggaagcagtgatgcatltaa          agaactagfacgcaaataccctcagagtcacagcagagatg          ggaaggcgagtgtaggatgattggctgagaagaggagaag          taatgaggtgctacgtggagccatcgagacctaccaagaggtg          ccagcctacctgatgtccctgcagacctgctgaagctgagttga          agcgtcgtcagacaggcaacaattctaggtcatatgagaggt          ccctgcttaccctgcagagattagttcaactatttccaatgatact          tccttaaaaaatgaccttggcgtgggatacctcttgataggagata          atgacaatgcaaagaaagttatgaagaggtgctgagtgtgacac          ctaatgatggcttctgaaagtcattatggcttcatcctgaaggc          acagaacaaaattgctgagagcatcccatattaaaggaaggaa          tagaatccggagatcctggcactgatgatgggagattttattcca          cctgggggatgccatgcagaggttgggaacaaagggcatat          aagtggatgagcttgggcacaagagaggacacttgcatctgtc          tggcaacgctcactctacaatggaatggactgaaagcacagcc          ttgtggacccecaaaagaaacgggctcacagagttagtaaagt          ctttagaaagaaactggaagttaatcgagatgaaggcctgcag          tgatggataaagccaaggctcttctgcctgaggatgaaaacc          tgagggaaaaaggggactggagccagttcacgctgtggcagca          aggaagaagaatgaaatgcctgcaaggagctcctaaaacc          tgtacctactagaaaagtccccggagacaacaggatgcagaag          aggacagatcaaatattccatcatgcacccgggactcacgtg          ggccgcacacagggcccaaaactgcaggctccgaatgcacct          ggcttgggtattccaaggaaggctgcaagattcgatgtcca          acgagaccaggacctgggaggaaggcaaggtgctcatcttgat          gactccttgagcagaggtatggcaggatgctcatcttccgg          ctgatattcatcgtggatgtggcatccggaactgacaccacag          cagagacgcagcctccagcaattagcatgaattcatgcaagct          tgggaaactctggagaga</p>
--	--	---

[0117]

[0118]

기타 구현예

[0119]

본 발명이 발명의 상세한 설명과 함께 기재되었지만, 전술된 발명의 설명은 첨부된 특허청구의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니라 예시하기 위한 것이다. 다른 양태, 이점 및 수정은 하기 특허청구의 범위 내에 있다.

[0120]

본 명세서에 언급된 특허 및 과학 문헌은, 당업자가 이용 가능한 지식을 확립한다. 본원에 인용된 모든 참고문헌들, 예를 들어 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국을 지정하는 PCT 특허 출원, 공개 외국 특허 및 특허 출원은 그 전체로서 본원에 참고문헌으로 첨부된다. 본원에 인용된 수탁 번호로 표시된 Genbank 및 NCBI 제출자료는 본원에 참조로 첨부되어 있다. 본원에 인용된 것으로서, 공개된 기타 모든 참고문헌, 문서, 원고 및 과학 논문은 본원에 참고문헌으로 첨부된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다. 또한 재료, 방법 및 실시예는 예시적인 것일 뿐, 제한하고자 하는 것은 아니다.

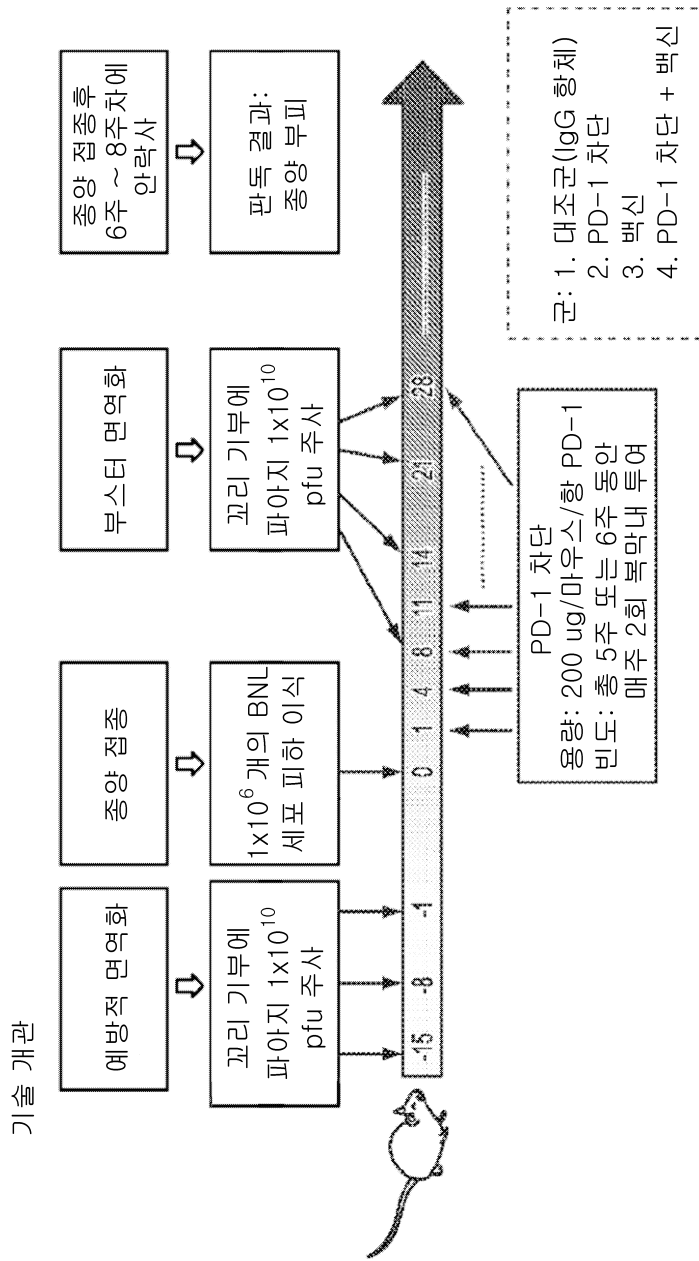
[0121]

본 발명은 바람직한 구현예들을 참조하여 구체적으로 도시 및 기재되었지만, 당업자는 첨부된 특허청구의 범위에 의해 포함된 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부 사항에 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

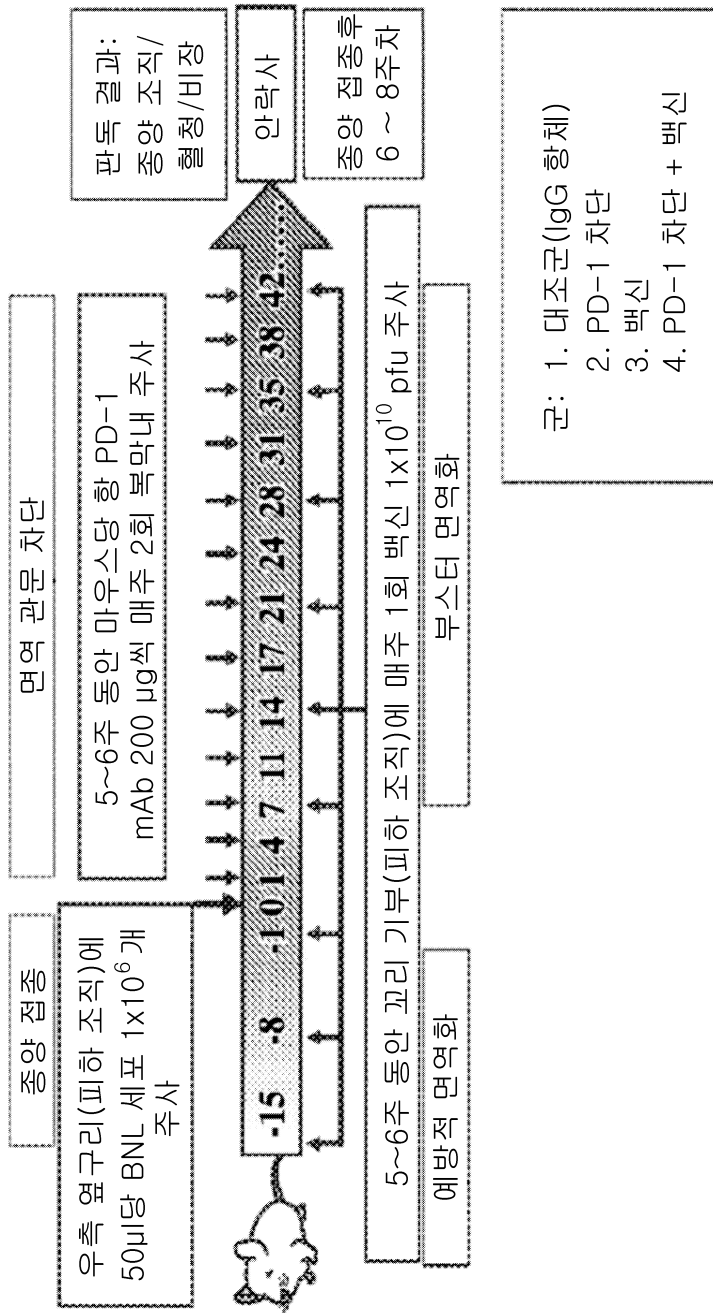
도면1a

실험 프로토콜

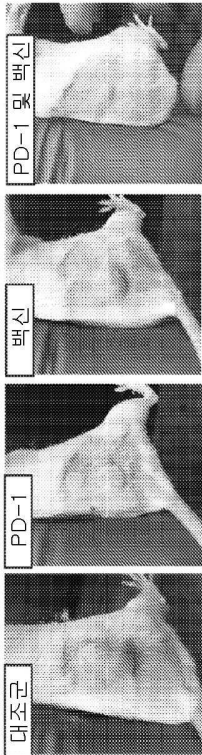


도면1b

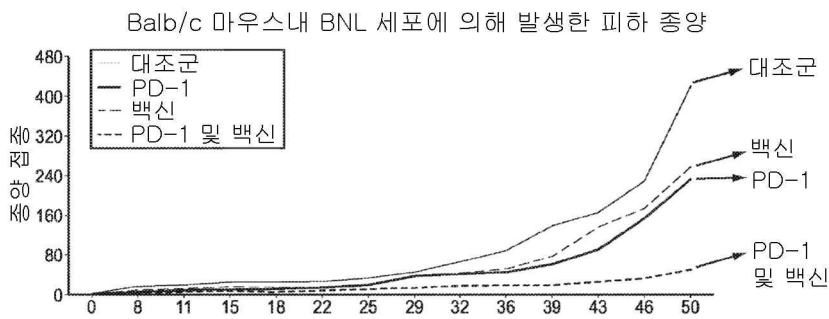
면역화 프로토콜



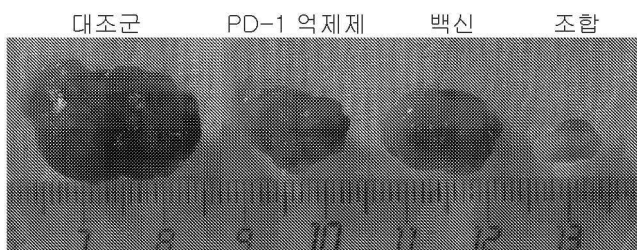
도면2a



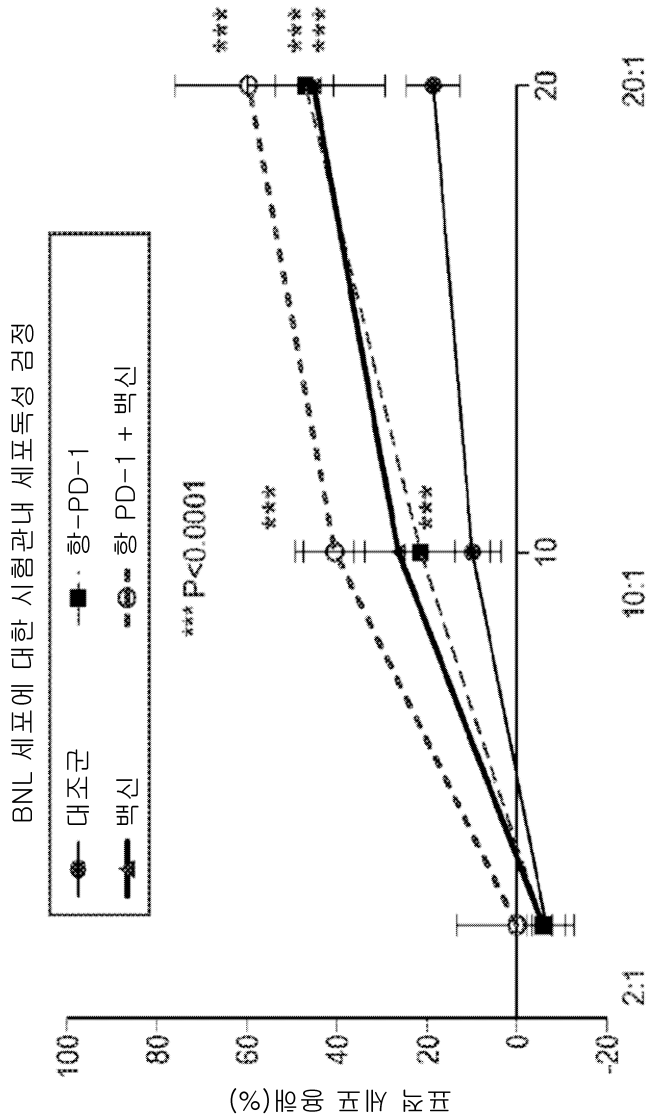
도면2b



도면3



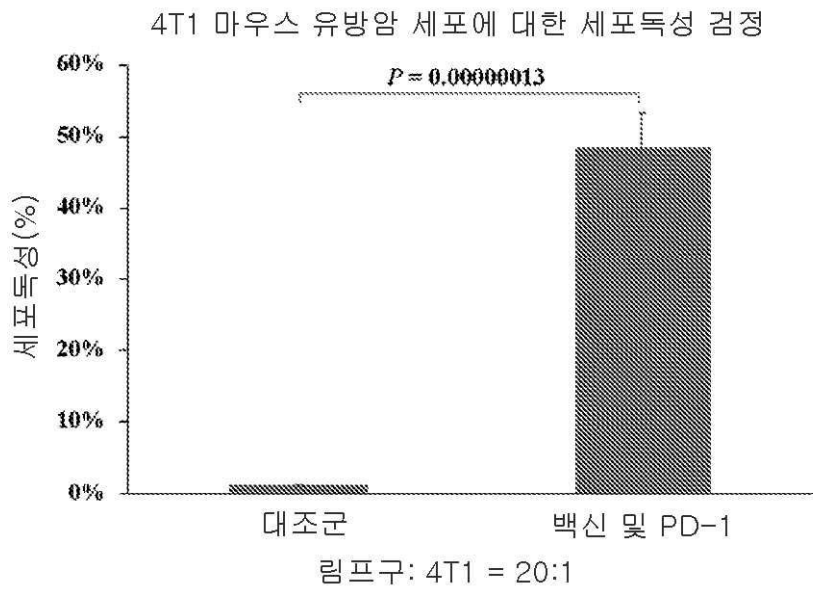
도면4



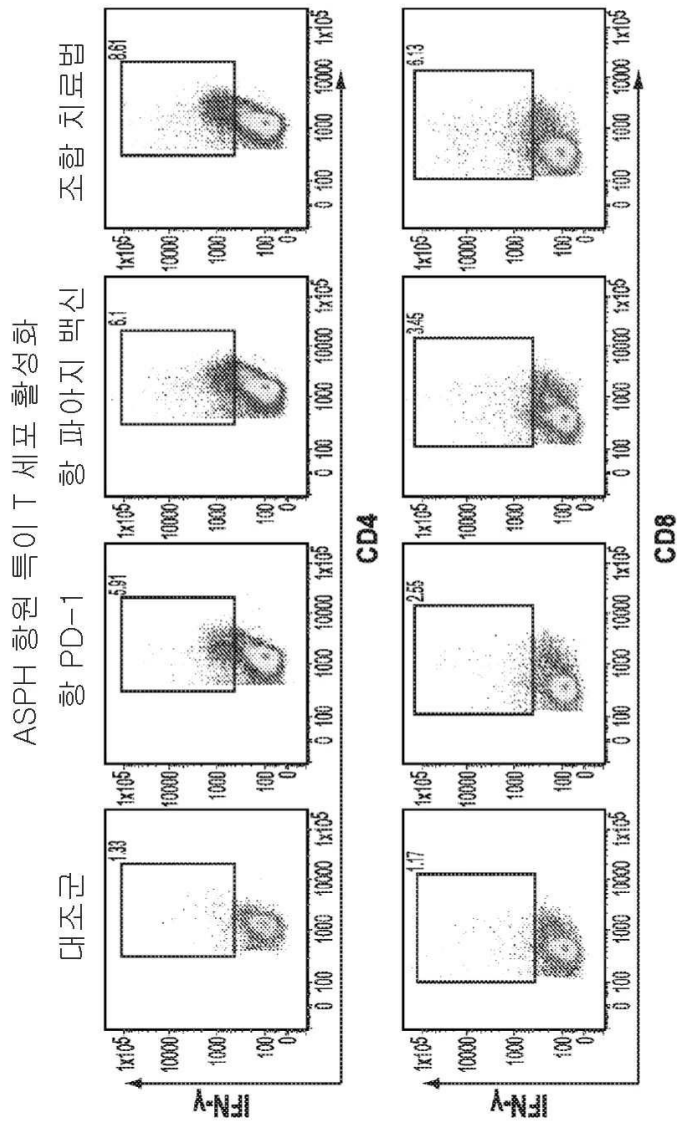
림프구 대 BNL 세포 비

비	평균				SD			
	대조군	항 PD-1	백신	항 PD-1 + 백신	대조군	항 PD-1	백신	항 PD-1 + 백신
2:1	-6.6%	-5.5%	-5.7%	0.3%	4.3%	2.2%	2.2%	13.0%
10:1	9.9%	21.3%	26.6%	40.7%	3.9%	15.1%	23.0%	6.6%
20:1	18.7%	47.1%	44.8%	59.9%	6.0%	6.4%	15.3%	16.3%

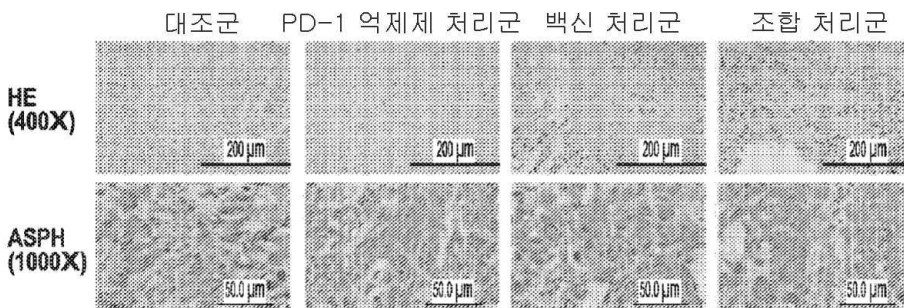
도면5



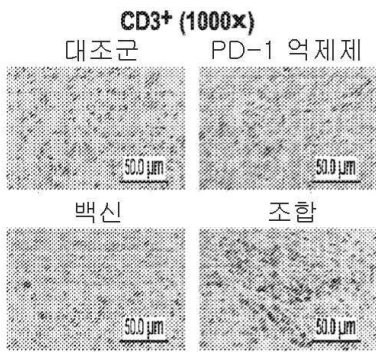
도면6



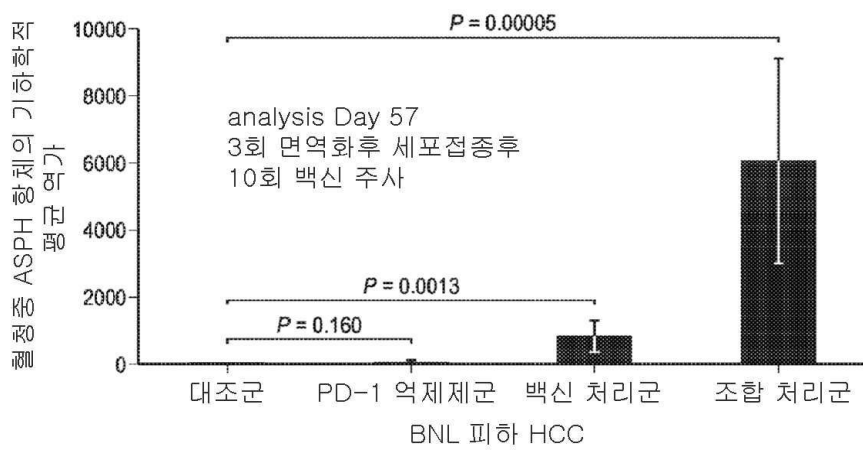
도면7a



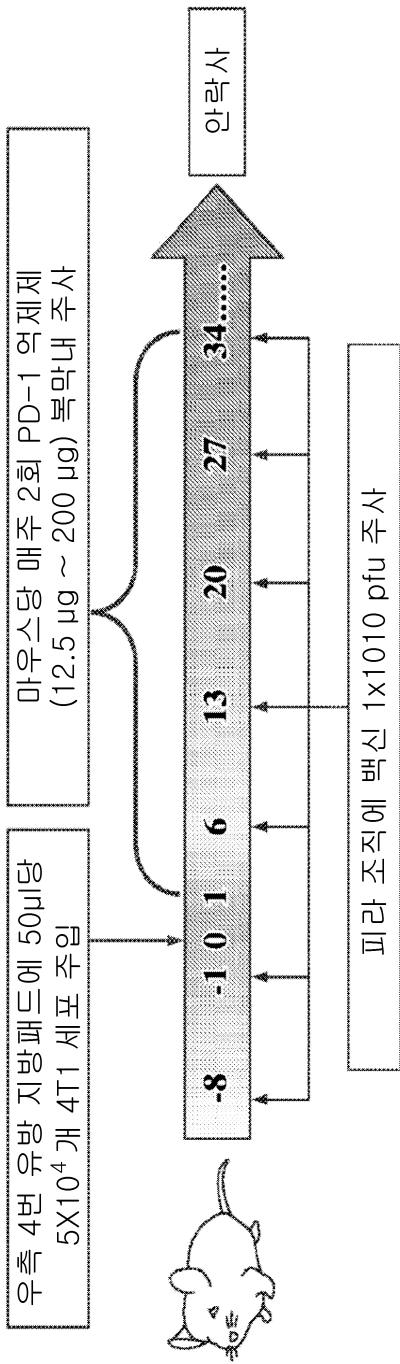
도면7b



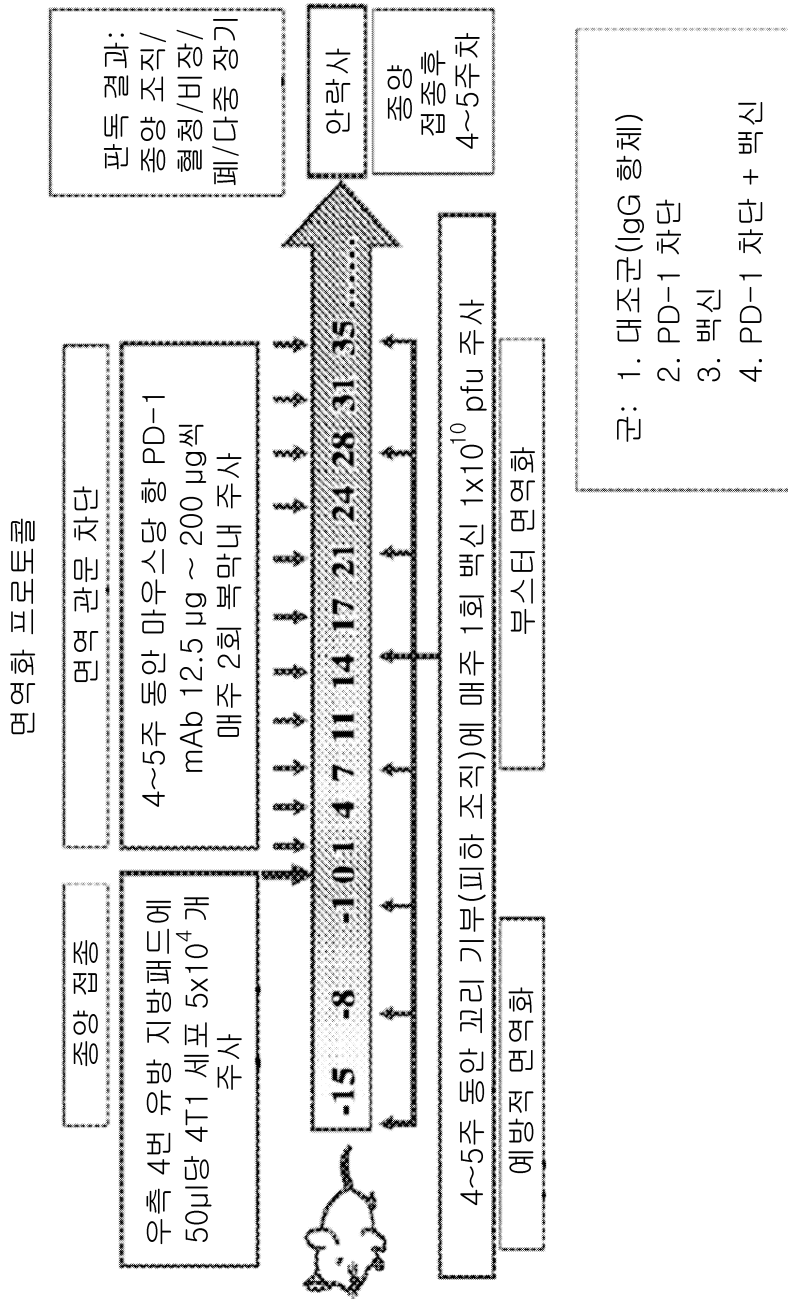
도면8



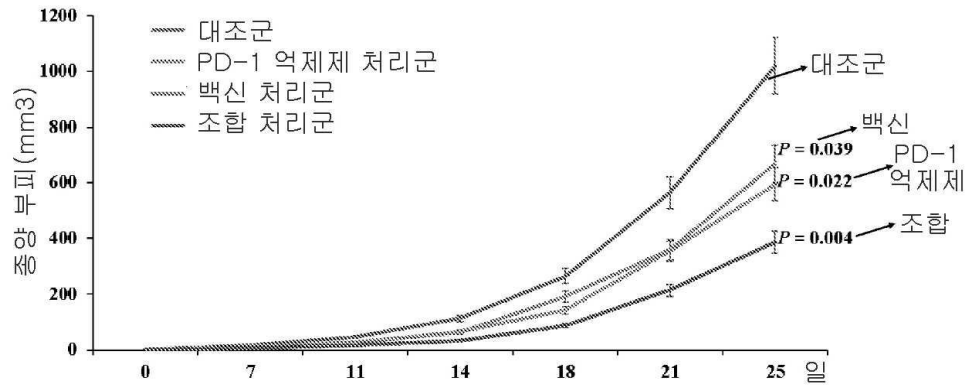
도면9a



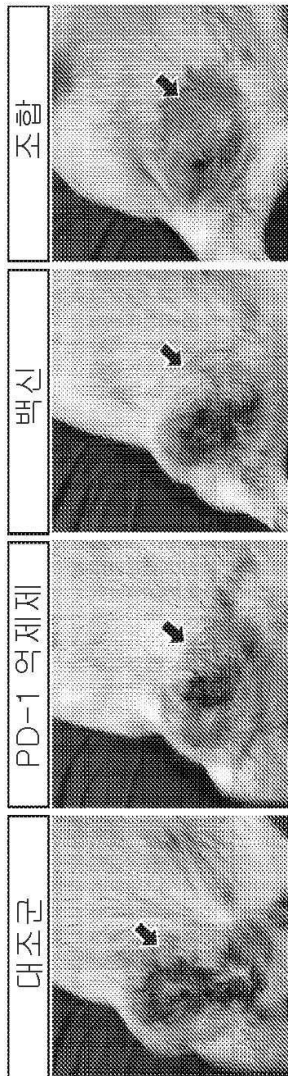
도면9b



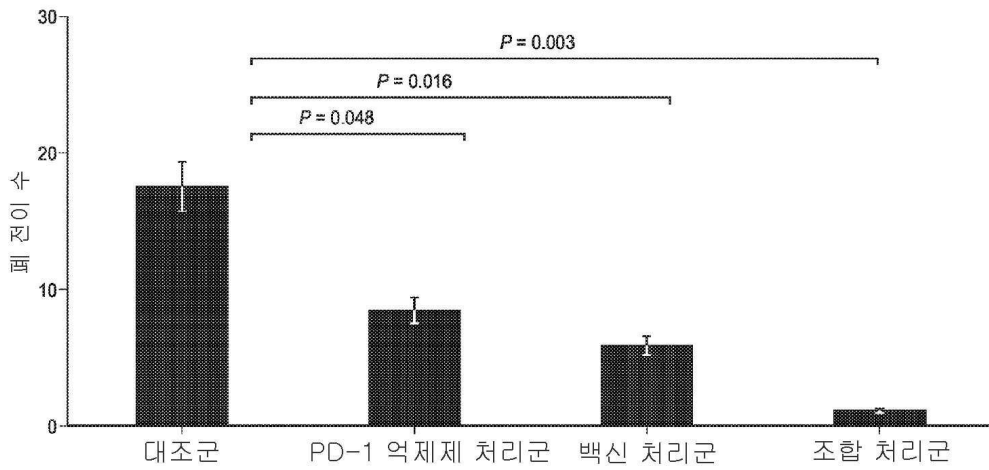
도면10



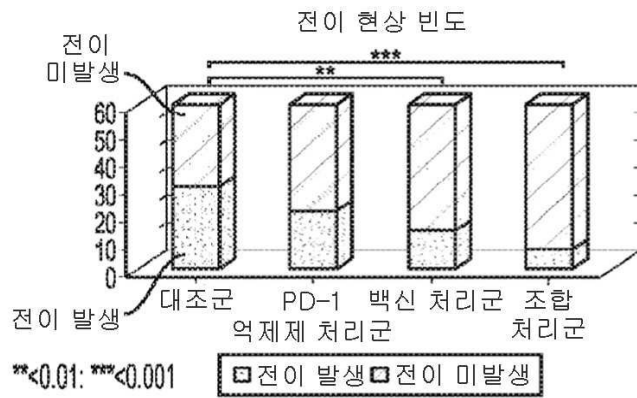
도면11



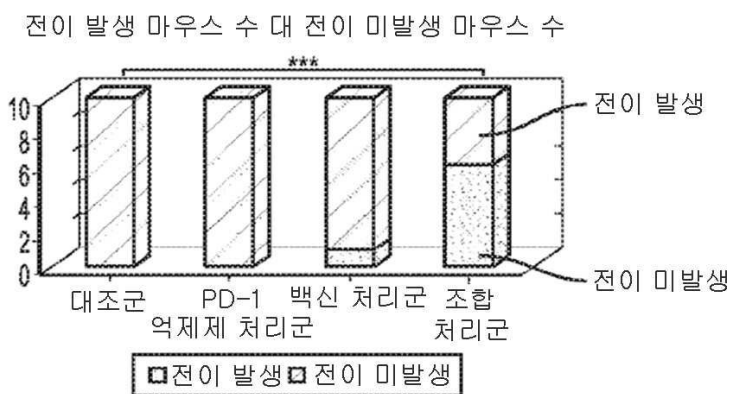
도면12



도면13a



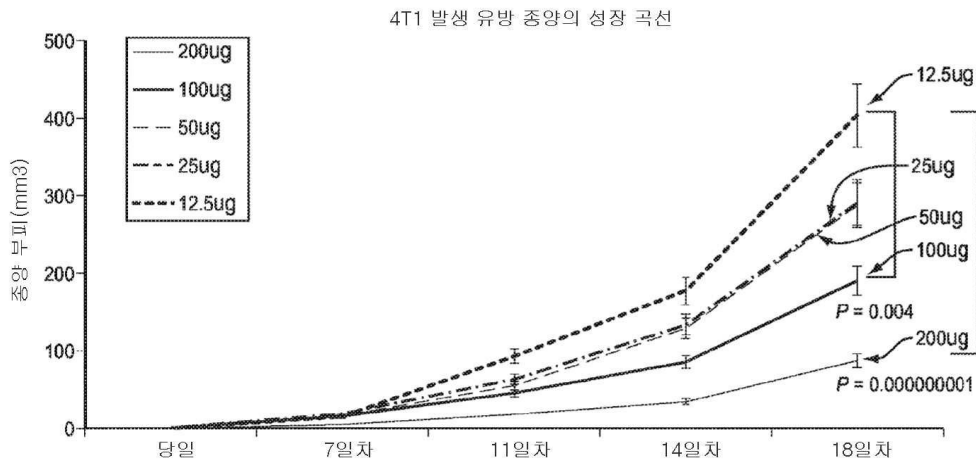
도면13b



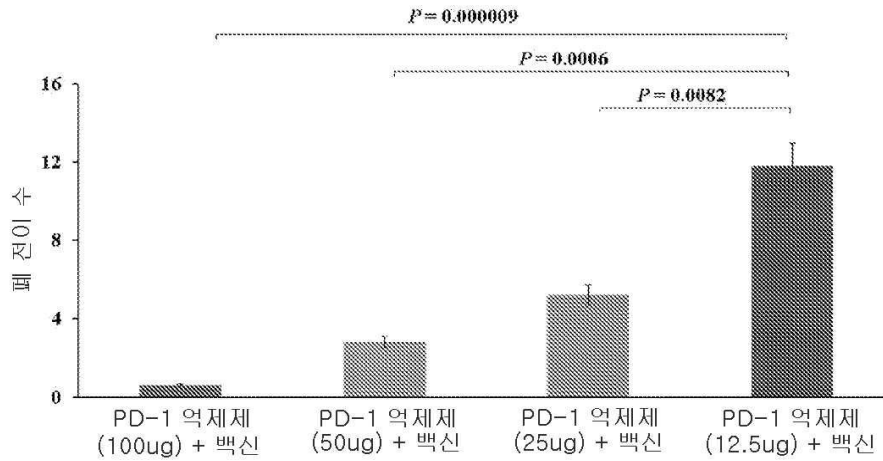
도면13c

	대조군	PD-1 억제제 처리군	백신 처리군	조합 처리군
폐 전이	10/10	8/10	5/10	3/10
림프 전이	10/10	7/10	6/10	4/10
간 전이	2/10	1/10	0	0
비장 전이	2/10	1/10	1/10	0
부신 전이	5/10	4/10	2/10	0
신장 전이	1/10	0	0	0
전이 부담	30	21	14	7
전이 부담의 P값	-	-	0.002	0.00005
전이 미발생	0	0	1	6
전이 미발생시 P값	-	-	-	<0.001

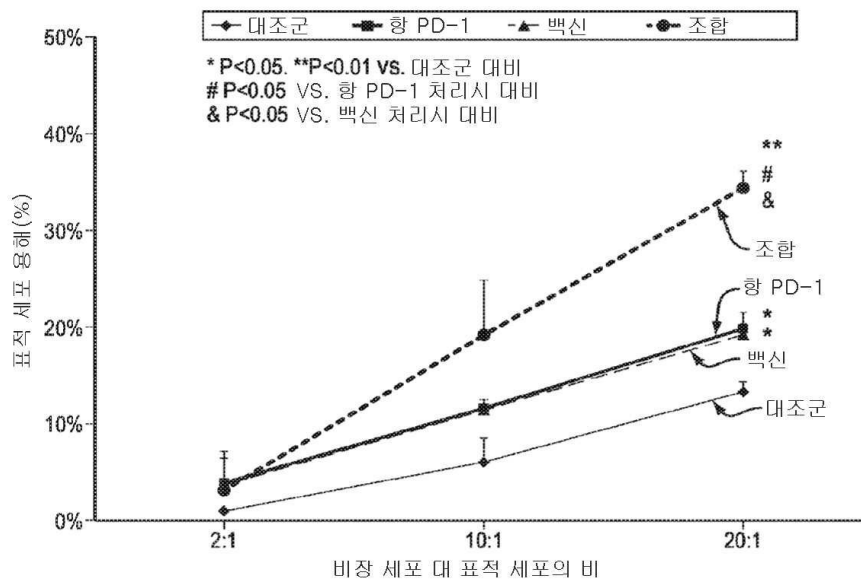
도면14



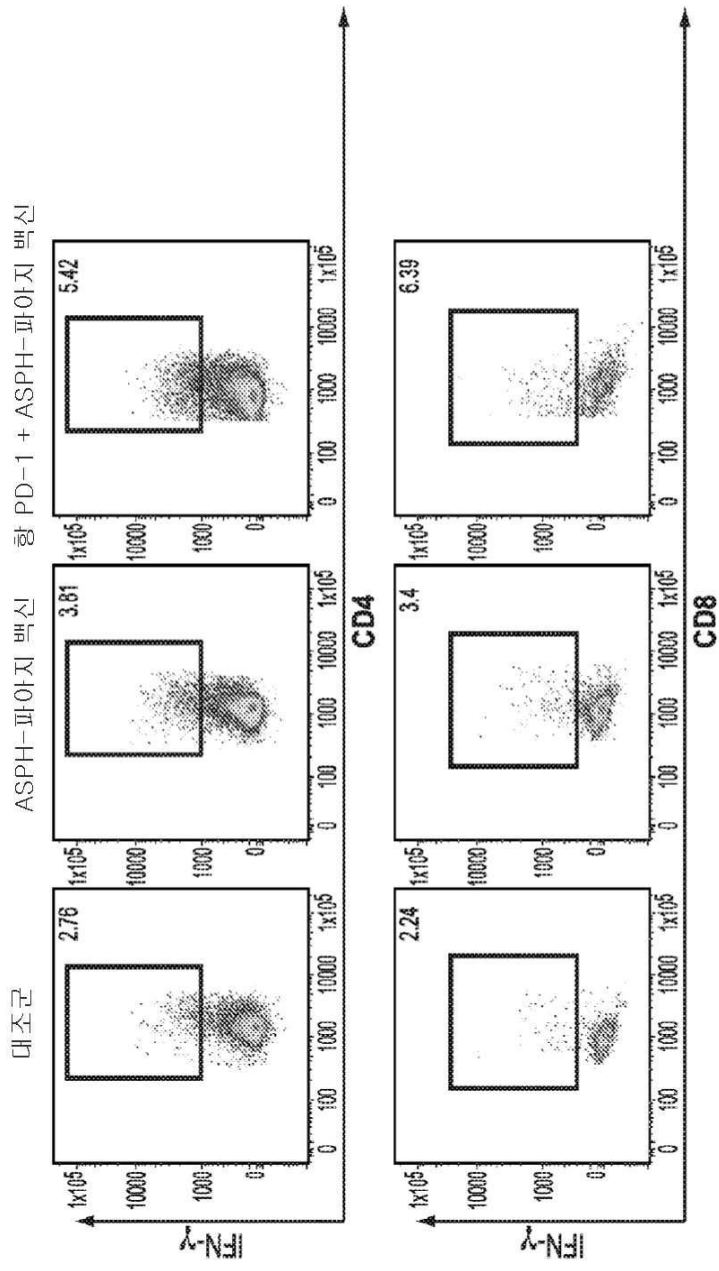
도면15



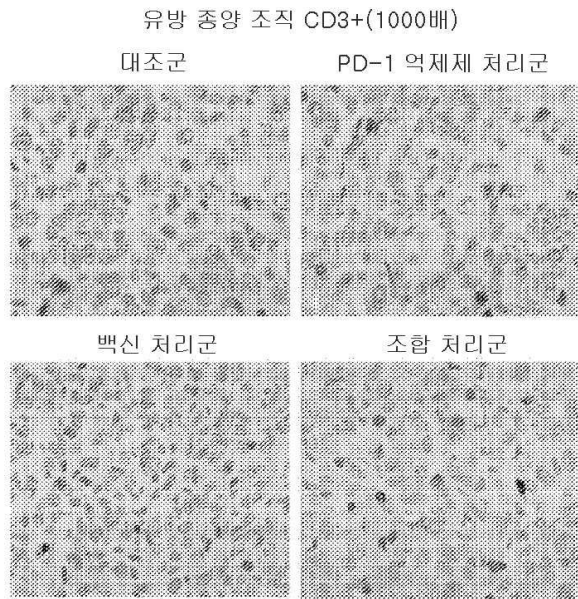
도면16



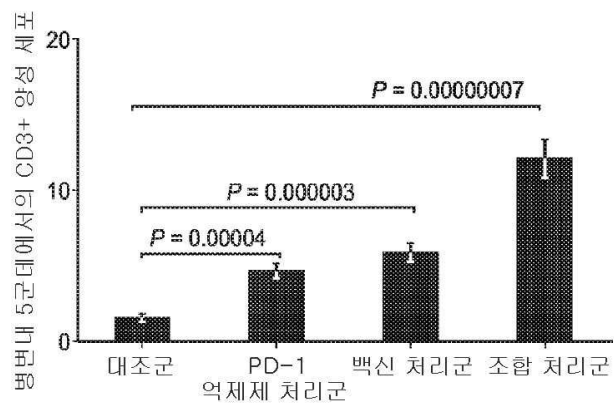
도면17



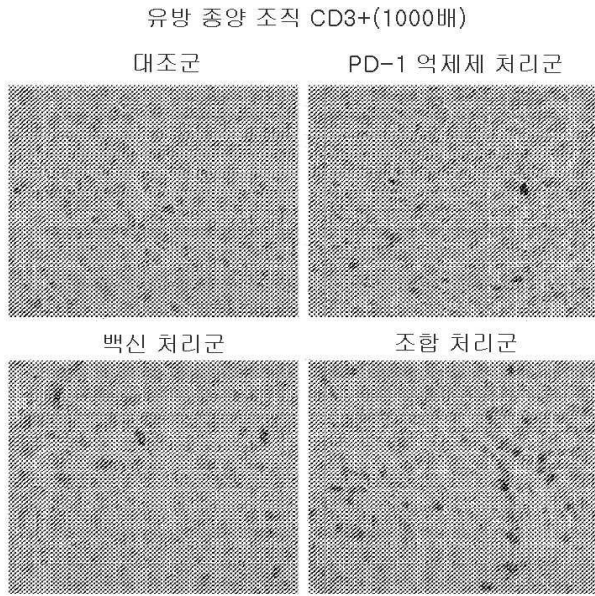
도면18a



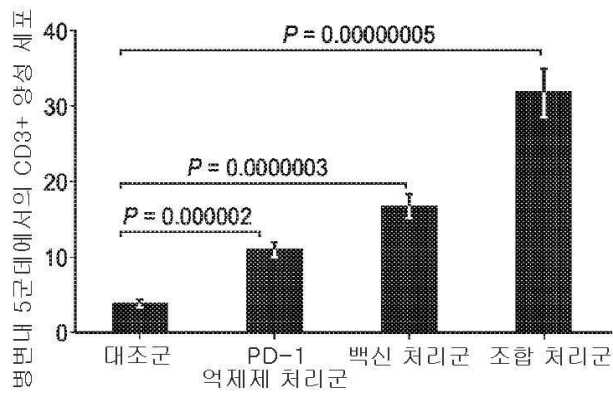
도면18b



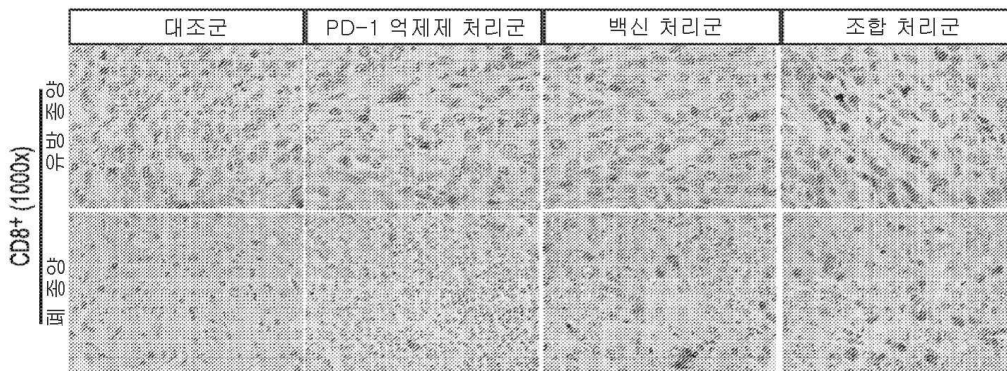
도면19a



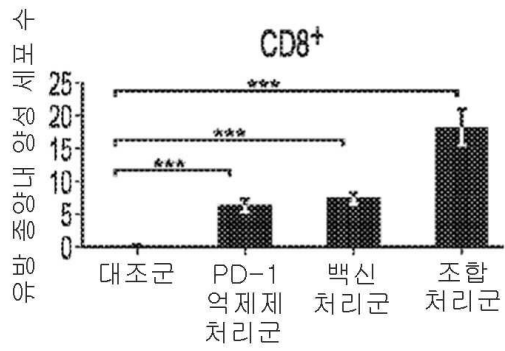
도면19b



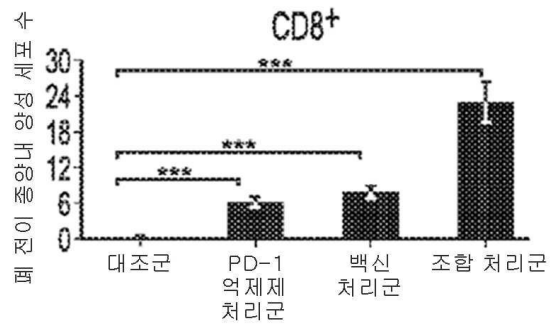
도면20a



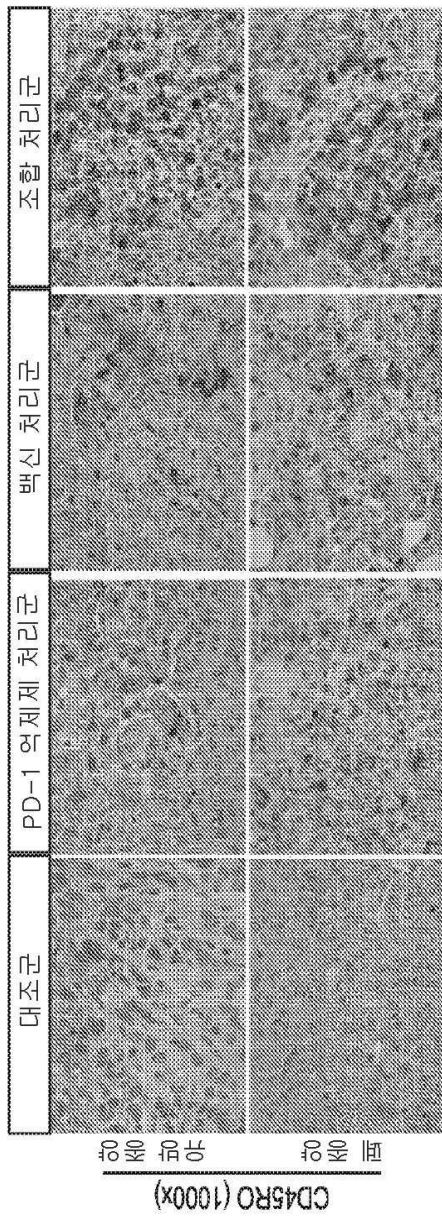
도면20b



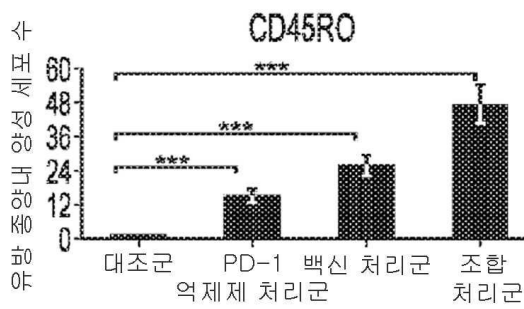
도면20c



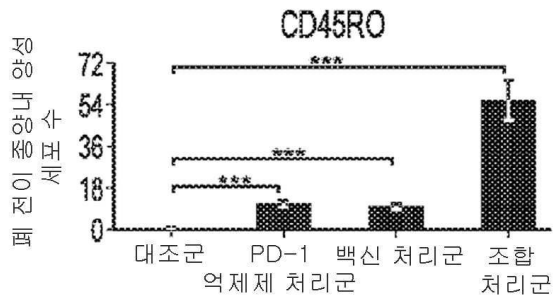
도면21a



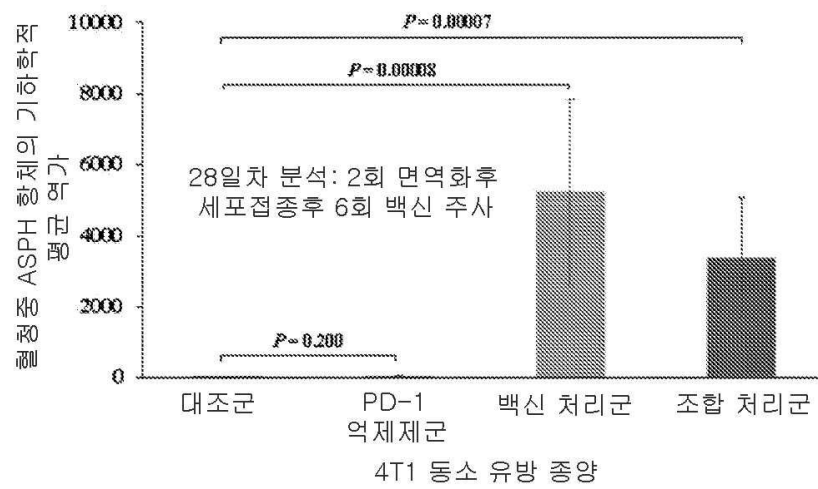
도면21b



도면21c



도면22



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Rhode Island Hospital

<120> Inhibition of ASPH Expressing Tumor Growth and Progression

<130> 21486-642001W0

<150> 62/779,422

<151> 2018-12-13

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p52

<400> 1

Thr Ser Phe Phe Thr Trp Phe Met Val Ile Ala Leu Leu Gly Val Trp

1                    5                    10                    15

Thr Ser Val Ala

20

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p103

<400> 2

Ala Lys Val Leu Leu Gly Leu Lys Glu Arg Ser Thr Ser Glu Pro

1                    5                    10                    15

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p148

<400> 3

Lys Glu Gln Ile Gln Ser Leu Leu His Glu Met Val His Ala Glu His

1                    5                    10                    15

Val Glu Gly

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p322

<400> 4

Gln Lys Ala Lys Val Lys Lys Lys Lys Pro Lys Leu Leu Asn Lys Phe

1                    5                    10                    15

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p415

<400> 5

Pro Ala Asp Leu Leu Lys Leu Ser Leu Lys Arg Arg Ser Asp Arg Gln

1                    5                    10                    15

Gln Phe

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p427

<400> 6

Ser Asp Arg Gln Gln Phe Leu Gly His Met Arg Gly Ser Leu Leu Thr

1                    5                    10                    15

Leu Gln

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p437

<400> 7

Arg Gly Ser Leu Leu Thr Leu Gln Arg Leu Val Gln Leu Phe Pro Asn

1                    5                    10                    15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p443

<400> 8

Leu Gln Arg Leu Val Gln Leu Phe Pro Asn Asp Thr Ser Leu Lys Asn

1                    5                    10                    15

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p492

<400> 9

Val His Tyr Gly Phe Ile Leu Lys Ala Gln Asn Lys Ile Ala Glu Ser

1                    5                    10                    15

Ile Pro

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p557

<400> 10

Ala Ser Val Trp Gln Arg Ser Leu Tyr Asn Val Asn Gly Leu Lys Ala

1                    5                    10                    15

Gln Pro Trp Trp

20

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p58

<400> 11

Thr Gly Tyr Thr Glu Leu Val Lys Ser Leu Glu Arg Asn Trp Lys Leu

1                    5                    10                    15

Ile

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p588

<400> 12

Lys Ser Leu Glu Arg Asn Trp Lys Leu Ile Arg Asp Glu Gly Leu Ala

1                    5                    10                    15

Val Met Asp Lys

20

<210

> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p725

<400> 13

His Glu Val Trp Gln Asp Ala Ser Ser Phe Arg Leu Ile Phe

1                    5                    10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p731

<400> 14

Ala Ser Ser Phe Arg Leu Ile Phe Ile Val Asp Val Trp His Pro Glu

1                    5                    10                    15

Leu

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VDVWHPELTPQRRSLPAI

<400> 15

Val Asp Val Trp His Pro Glu Leu Thr Pro Gln Gln Arg Arg Ser Leu

1                    5                    10                    15

Pro Ala Ile

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH48

<400> 16

Gly Leu Ser Gly Thr Ser Phe Phe Thr

1                    5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH53

<400> 17

Ser Phe Phe Thr Trp Phe Met Val Ile

1                    5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH58

<400> 18

Phe Met Val Ile Ala Leu Leu Gly Val

1                    5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH62

<400> 19

Ala Leu Leu Gly Val Trp Thr Ser Val

1                    5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH72

<400> 20

Val Val Trp Phe Asp Leu Val Asp Tyr

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH79

<400> 21

Asp Tyr Glu Glu Val Leu Gly Lys Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH81

<400> 22

Glu Glu Val Leu Gly Lys Leu Gly Ile

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH252

<400> 23

Thr Asp Asp Val Thr Tyr Gln Val Tyr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH258

<400> 24

Gln Val Tyr Glu Glu Gln Ala Val Tyr

1                    5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH261

<400> 25

Glu Glu Gln Ala Val Tyr Glu Pro Leu

1                    5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH371

<400> 26

Tyr Pro Gln Ser Pro Arg Ala Arg Tyr

1                    5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH374

<400> 27

Ser Pro Arg Ala Arg Tyr Gly Lys Ala

1                    5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH406

<400> 28

Gln Glu Val Ala Ser Leu Pro Asp Val

1                    5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH411

<400> 29

Leu Pro Asp Val Pro Ala Asp Leu Leu

1                    5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH475

<400> 30

Lys Val Tyr Glu Glu Val Leu Ser Val

1                    5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH478

<400> 31

Glu Glu Val Leu Ser Val Thr Pro Asn

1                    5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH484

<400> 32

Thr Pro Asn Asp Gly Phe Ala Lys Val

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH488

<400> 33

Gly Phe Ala Lys Val His Tyr Gly Phe

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH491

<400> 34

Lys Val His Tyr Gly Phe Ile Leu Lys

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH503

<400> 35

Lys Ile Ala Glu Ser Ile Pro Tyr Leu

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH521

<400> 36

Gly Thr Asp Asp Gly Arg Phe Tyr Phe

1                    5  
<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> ASPH537  
<400> 37  
Arg Val Gly Asn Lys Glu Ala Tyr Lys

1                    5  
<210> 38  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> ASPH557  
<400> 38  
Ala Ser Val Trp Gln Arg Ser Leu Tyr

1                    5  
<210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> ASPH563  
<400> 39  
Ser Leu Tyr Asn Val Asn Gly Leu Lys

1                    5  
<210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> ASPH582  
<400> 40  
Gly Tyr Thr Glu Leu Val Lys Ser Leu

1                    5  
<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH611

<400> 41

Leu Phe Leu Pro Glu Asp Glu Asn Leu

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH681

<400> 42

Gly Pro Thr Asn Cys Arg Leu Arg Met

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH693

<400> 43

Leu Val Ile Pro Lys Glu Gly Cys Lys

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH701

<400> 44

Lys Ile Arg Cys Ala Asn Glu Thr Arg

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASPH711

<400> 45

Trp Glu Glu Gly Lys Val Leu Ile Phe

1 5

<210> 46

<211> 758

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Ala Gln Arg Lys Asn Ala Lys Ser Ser Gly Asn Ser Ser Ser Ser

1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Gly Ser Ser Ser Pro Gly Ala

20 25 30

Arg Arg Glu Thr Lys His Gly Gly His Lys Asn Gly Arg Lys Gly Gly

35 40 45

Leu Ser Gly Thr Ser Phe Phe Thr Trp Phe Met Val Ile Ala Leu Leu

50 55 60

Gly Val Trp Thr Ser Val Ala Val Val Trp Phe Asp Leu Val Asp Tyr

65 70 75 80

Glu Glu Val Leu Gly Lys Leu Gly Ile Tyr Asp Ala Asp Gly Asp Gly

85 90 95

Asp Phe Asp Val Asp Asp Ala Lys Val Leu Leu Gly Leu Lys Glu Arg

100 105 110

Ser Thr Ser Glu Pro Ala Val Pro Pro Glu Glu Ala Glu Pro His Thr

115 120 125

Glu Pro Glu Glu Gln Val Pro Val Glu Ala Glu Pro Gln Asn Ile Glu

130 135 140

Asp Glu Ala Lys Glu Gln Ile Gln Ser Leu Leu His Glu Met Val His

145 150 155 160

Ala Glu His Val Glu Gly Glu Asp Leu Gln Gln Glu Asp Gly Pro Thr



Asp Leu Leu Lys Leu Ser Leu Lys Arg Arg Ser Asp Arg Gln Gln Phe  
 420 425 430  
 Leu Gly His Met Arg Gly Ser Leu Leu Thr Leu Gln Arg Leu Val Gln  
 435 440 445  
 Leu Phe Pro Asn Asp Thr Ser Leu Lys Asn Asp Leu Gly Val Gly Tyr  
 450 455 460  
 Leu Leu Ile Gly Asp Asn Asp Asn Ala Lys Lys Val Tyr Glu Glu Val  
 465 470 475 480  
  
 Leu Ser Val Thr Pro Asn Asp Gly Phe Ala Lys Val His Tyr Gly Phe  
 485 490 495  
 Ile Leu Lys Ala Gln Asn Lys Ile Ala Glu Ser Ile Pro Tyr Leu Lys  
 500 505 510  
 Glu Gly Ile Glu Ser Gly Asp Pro Gly Thr Asp Asp Gly Arg Phe Tyr  
 515 520 525  
 Phe His Leu Gly Asp Ala Met Gln Arg Val Gly Asn Lys Glu Ala Tyr  
 530 535 540  
  
 Lys Trp Tyr Glu Leu Gly His Lys Arg Gly His Phe Ala Ser Val Trp  
 545 550 555 560  
 Gln Arg Ser Leu Tyr Asn Val Asn Gly Leu Lys Ala Gln Pro Trp Trp  
 565 570 575  
 Thr Pro Lys Glu Thr Gly Tyr Thr Glu Leu Val Lys Ser Leu Glu Arg  
 580 585 590  
 Asn Trp Lys Leu Ile Arg Asp Glu Gly Leu Ala Val Met Asp Lys Ala  
 595 600 605  
  
 Lys Gly Leu Phe Leu Pro Glu Asp Glu Asn Leu Arg Glu Lys Gly Asp  
 610 615 620  
 Trp Ser Gln Phe Thr Leu Trp Gln Gln Gly Arg Arg Asn Glu Asn Ala  
 625 630 635 640  
 Cys Lys Gly Ala Pro Lys Thr Cys Thr Leu Leu Glu Lys Phe Pro Glu  
 645 650 655  
 Thr Thr Gly Cys Arg Arg Gly Gln Ile Lys Tyr Ser Ile Met His Pro



Asp Phe Asp Val Asp Asp Ala Lys Val Leu Leu Gly Leu Lys Glu Arg  
                   100                                  105                                  110  
 Ser Thr Ser Glu Pro Ala Val Pro Pro Glu Glu Ala Glu Pro His Thr  
                   115                                  120                                  125  
 Glu Pro Glu Glu Gln Val Pro Val Glu Ala Glu Pro Gln Asn Ile Glu  
                   130                                  135                                  140  
 Asp Glu Ala Lys Glu Gln Ile Gln Ser Leu Leu His Glu Met Val His  
  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Ala Glu His Val Glu Gly Glu Asp Leu Gln Gln Glu Asp Gly Pro Thr  
                   165                                  170                                  175  
 Gly Glu Pro Gln Gln Glu Asp Asp Glu Phe Leu Met Ala Thr Asp Val  
                   180                                  185                                  190  
 Asp Asp Arg Phe Glu Thr Leu Glu Pro Glu Val Ser His Glu Glu Thr  
                   195                                  200                                  205  
 Glu His Ser Tyr His Val Glu Glu Thr Val Ser Gln Asp Cys Asn Gln  
  
                   210                                  215                                  220  
 Asp Met Glu Glu Met Met Ser Glu Gln Glu Asn Pro Asp Ser Ser Glu  
 225                                  230                                  235                                  240  
 Pro Val Val Glu Asp Glu Arg Leu His His Asp Thr Asp  
                   245                                  250  
  
 <210> 48  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> the last third of the human ASPH amino acid sequence  
 <400> 48  
 Glu Ser Ile Pro Tyr Leu Lys Glu Gly Ile Glu Ser Gly Asp Pro Gly  
  
 1                                  5                                  10                                  15  
 Thr Asp Asp Gly Arg Phe Tyr Phe His Leu Gly Asp Ala Met Gln Arg  
                   20                                  25                                  30  
 Val Gly Asn Lys Glu Ala Tyr Lys Trp Tyr Glu Leu Gly His Lys Arg  
                   35                                  40                                  45

Gly His Phe Ala Ser Val Trp Gln Arg Ser Leu Tyr Asn Val Asn Gly  
 50 55 60  
 Leu Lys Ala Gln Pro Trp Trp Thr Pro Lys Glu Thr Gly Tyr Thr Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Val Lys Ser Leu Glu Arg Asn Trp Lys Leu Ile Arg Asp Glu Gly  
 85 90 95  
 Leu Ala Val Met Asp Lys Ala Lys Gly Leu Phe Leu Pro Glu Asp Glu  
 100 105 110  
 Asn Leu Arg Glu Lys Gly Asp Trp Ser Gln Phe Thr Leu Trp Gln Gln  
 115 120 125  
 Gly Arg Arg Asn Glu Asn Ala Cys Lys Gly Ala Pro Lys Thr Cys Thr  
 130 135 140  
 Leu Leu Glu Lys Phe Pro Glu Thr Thr Gly Cys Arg Arg Gly Gln Ile  
 145 150 155 160  
 Lys Tyr Ser Ile Met His Pro Gly Thr His Val Trp Pro His Thr Gly  
 165 170 175  
 Pro Thr Asn Cys Arg Leu Arg Met His Leu Gly Leu Val Ile Pro Lys  
 180 185 190  
 Glu Gly Cys Lys Ile Arg Cys Ala Asn Glu Thr Arg Thr Trp Glu Glu  
 195 200 205  
 Gly Lys Val Leu Ile Phe Asp Asp Ser Phe Glu His Glu Val Trp Gln  
 210 215 220  
 Asp Ala Ser Ser Phe Arg Leu Ile Phe Ile Val Asp Val Trp His Pro  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Thr Pro Gln Gln Arg Arg Ser Leu Pro Ala Ile  
 245 250  
 <210> 49  
 <211> 2324  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49

cggaccgtgc aatggcccag cgtaagaatg ccaagagcag cggcaacagc agcagcagcg 60  
 gctccggcag cggtagcacg agtgcgggca gcagcagccc cggggcccgg agagagacaa 120  
 agcatggagg acacaagaat gggaggaaag gcggactctc gggaacttca ttcttcacgt 180  
 ggtttatggt gattgcattg ctgggcgtct ggacatctgt agctgtcgtt tggtttgatc 240  
 ttgttgacta tgaggaagt ctaggaaaac taggaatcta tgatgctgat ggtgatggag 300  
 attttgatgt ggatgatgcc aaagttttat taggacttaa agagagatct acttcagagc 360  
 cagcagtccc gccagaagag gctgagccac aactgagcc cgaggagcag gttcctgtgg 420  
  
 aggcagaacc ccagaatatic gaagatgaag caaaagaaca aattcagtcc ctctccatg 480  
 aatgggtaca cgcagaacat gttgaggag aagacttgca acaagaagat ggaccacag 540  
 gagaaccaca acaaggagat gatgagtctc ttatggcgac tgatgtagat gatagattg 600  
 agaccctgga acctgaagta tctcatgaag aaaccgagca tagttaccac gtggaagaga 660  
 cagtttcaca agactgtaat caggatatgg aagagatgat gtctgagcag gaaaatccag 720  
 attccagtga accagtagta gaagatgaaa gattgcacca tgatacagat gatgtaacat 780  
 accaagtcta tgaggaacaa gcagtatatg aacctctaga aatgaaggg atagaaatca 840  
  
 cagaagtaac tgctcccct gaggataatc ctgtagaaga ttcacaggta attgtagaag 900  
 aagtaagcat tttcctgtg gaagaacagc aggaagtacc accagaaaca aatagaaaaa 960  
 cagatgatcc agaacaaaaa gcaaaaagtt aaaaaagaa gcctaaactt taaataaat 1020  
 ttgataagac tattaaagct gaacttgatg ctgcagaaaa actccgtaa aggggaaaaa 1080  
 ttgaggaagc agtgaatgca tttaaagaac tagtacgcaa ataccctcag agtccacgag 1140  
 caagatatgg gaaggcgagc tgtgaggatg atttggctga gaagaggaga agtaatgagg 1200  
 tgctacgtgg agccatcgag acctaccaag aggtggccag cctacctgat gtccctgcag 1260  
  
 acctgctgaa gctgagttg aagcgtcgt cagacaggca acaatttcta ggtcatatga 1320  
 gaggttccct gcttaccctg cagagattag ttcaactatt tccaatgat acttccttaa 1380  
 aaaatgacct tggcgtggga tacctcttga taggagataa tgacaatgca aagaaagttt 1440  
 atgaagaggi gctgagtgtg acacctaatg atggctttgc taaagtccat tatggcttca 1500  
 tcctgaaggc acagaacaaa attgctgaga gcatccata tttaaaggaa ggaatagaat 1560  
 ccggagatcc tggcactgat gatgggagat tttatttcca cctgggggat gccatgcaga 1620  
 gggttgggaa caaagaggca tataagtgtt atgagcttgg gcacaagaga ggacactttg 1680  
  
 catctgtctg gcaacgtcca ctctacaatg tgaatggact gaaagcacag ccttggtgga 1740  
 ccccaaaaga aacgggttac acagagttag taaagtcttt agaaagaaac tggagtttaa 1800  
 tccgagatga aggccttgca gtgatggata aagccaaagg tctcttcctg cctgaggatg 1860

aaaacctgag ggaaaaagg gactggagcc agttcacgct gtggcagcaa ggaagaagaa	1920
atgaaaatgc ctgcaaagga gctcctaaaa cctgtacctt actagaaaag ttccccgaga	1980
caacaggatg cagaagagga cagatcaaat attccatcat gcaccccggg actcacgtgt	2040
ggccgcacac agggcccaca aactgcaggc tccgaatgca cctgggcttg gtgattccca	2100
aggaaggctg caagattcga tgtgccaacg agaccaggac ctgggaggaa ggcaaggtgc	2160
tcatctttga tgactccttt gagcacgagg tatggcagga tgcctcatct ttccggctga	2220
tattcatcgt ggatgtgtgg catccggaac tgacaccaca gcagagacgc agccttccag	2280
caatttagca tgaattcatg caagcttggg aaactctgga gaga	2324