



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0033577
(43) 공개일자 2019년03월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7005246(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년03월15일
심사청구일자 2019년03월22일
- (62) 원출원 특허 10-2018-7002782
원출원일자(국제) 2011년03월15일
심사청구일자 2018년01월29일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/053863
(87) 국제공개번호 WO 2011/113819
국제공개일자 2011년09월22일
- (30) 우선권주장
61/315,704 2010년03월19일 미국(US)
1004551.6 2010년03월19일 영국(GB)
- (71) 출원인
이매텍스 바이오테크놀로지스 게엠베하
독일 72076 투빈겐 파울-울리히-스트라체 15
- (72) 발명자
바인센크 토니
독일 73773 아이크발트 임 모르겐라인 15
프리체 옌스
독일 72076 튀빈겐 임 쇼엔블리크 48
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

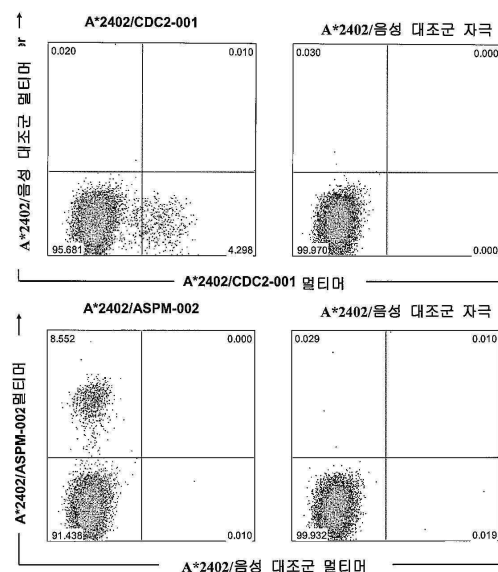
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 위장암 및 위암을 비롯한 여러가지 종양에 대한 신규한 면역 요법

(57) 요약

본 발명은 면역치료방법에 쓰이는 펩티드, 핵산 그리고 세포에 관한 것이다. 특별히, 본 발명은 암의 면역치료에 대한 것이다. 본 발명은 더 나아가 홀로 또는 다른 종양-관련 펩티드와 결합된 종양-관련 세포독성 T 세포 (CTL) 펩티드 에피토프의 항암 면역 반응을 자극하는 백신 구성물의 활성적인 제약적 조성에 관한 것이다. 본 발명은 인간 종양 세포의 HLA 클래스-I 분자에서 파생된 항-종양 면역 반응을 일으킬 수 있는 백신의 구성물로 쓰일 수 있는 95개의 새로운 펩티드 서열과 이들의 변이체에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2013.01)

A61K 39/0011 (2018.08)

C12N 5/0638 (2013.01)

G01N 33/505 (2013.01)

A61K 2039/5158 (2013.01)

A61K 2039/572 (2013.01)

(72) 발명자

발터 스테펜

독일 72764 로이트린겐 스타이넨베르그스트라쎄 2

레반드로브스키 페터

독일 72070 튀빈겐-히르샤우 부르그스트라쎄 14

싱 하르프리트

독일 72072 튀빈겐 바이 텐 페르데스타엘렌 9

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 95, 및 서열번호 1 내지 서열번호 95와 80%, 바람직하게는 90%, 더 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 이들의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 전장 폴리펩티드가 아닌 펩티드, 또는 상기 펩티드와 T 세포 교차-반응을 유도하는 이의 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서,

총 길이가 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개 아미노산인 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

인간 주조직적합 복합체 (MHC) 클래스-I 또는 클래스-II의 분자와 결합하는 능력을 갖는 펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 1 내지 서열번호 95에 따른 아미노산 서열로 이루어지거나 본질적으로 이루어진 펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항중 어느 한 항에 있어서,

개질되고/되거나 비펩티드 결합을 포함하는 펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제5항중 어느 한 항에 있어서,

특히 HLA-DR 항원-관련 불변 쇠(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질인 펩티드.

청구항 7

완전한 인간 단백질이 아닌 제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 따른 펩티드를 코딩하는 핵산.

청구항 8

제7항에 있어서,

DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합인 핵산.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터.

청구항 10

의약에 사용하기 위한 제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항 또는 제8항에 따른 핵산 또는 제9항에 따른 발현 벡터.

청구항 11

제7항 또는 제8항에 따른 핵산 또는 제9항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 12

제11항에 있어서,

항원 제시 세포인 숙주 세포.

청구항 13

제12항에 있어서,

항원 제시 세포가 수지상 세포인 숙주 세포.

청구항 14

제11항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

상기 숙주 세포 또는 이의 배양 매질로부터 펩티드를 분리하는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 따른 펩티드의 생산 방법.

청구항 15

세포독성 T 림프구(CTL)를, 적당한 항원 제시 세포의 표면에 발현된 항원 로딩된 인간 클래스-I 또는 클래스-II MHC 분자와 항원 특이적인 방식으로 상기 CTL을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 시험관내에서 접촉시키는 단계로서, 상기 항원이 제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 따른 펩티드인 단계를 포함하는, 활성화된 CTL의 시험관내 생산 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

항원이, 충분한 양의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써, 적당한 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스-I 또는 클래스-II MHC 분자상에 로딩되는 생산 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

항원 제시 세포가 서열번호 1 내지 서열번호 95 또는 이의 변이체 아미노산 서열을 함유하는 펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함하는 생산 방법.

청구항 18

제1항 내지 제4항중 어느 한 항에 정의된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제15항 내지 제17항중 어느 한 항에 따른 생산 방법에 의해 생산된 활성화된 세포독성 T 림프구(CTL).

청구항 19

효과적인 수의 제15항에 정의된 세포독성 T 림프구(CTL)를 환자에게 투여함을 포함하는, 표적 세포가 제1항 내지 제4항중 어느 한 항에 정의된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자내의 표적 세포를 죽이는 방법.

청구항 20

약제로서 또는 약제의 제조에 있어서, 제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항 또는 제8항에 따른 핵산, 제9항에 따른 발현 벡터, 제11항 내지 제11항중 어느 한 항에 따른 숙주 세포 또는 제18항에 따른 제18항에 따른 세포독성 T 림프구의 용도.

청구항 21

제20항에 있어서,
약제가 백신인 용도.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서,
약제가 암에 대해 활성을 갖는 용도.

청구항 23

제22항에 있어서,
암 세포가 위암 세포, 위장암 세포, 대장직장암 세포, 췌장암 세포, 폐암 세포 또는 신장암 세포인 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 요법에 사용되는 펩티드, 핵산과 세포에 관한 것이다. 특히 본 발명은 암의 면역 요법에 관련되어 있다. 본 발명은 더 나아가 항종양 면역 반응을 자극하는 백신 조성의 활성 제약 성분으로 쓰이는 홀로 또는 다른 종양 관련된 펩티드와 함께 있는 CD8+ T 세포에 의해 인식될 수 있는 종양 관련 에피토프와 관련되어 있다. 본 발명은 특히 세포 독성 T 세포 (CTL) 반응을 비롯한, 항 종양 면역 반응을 도출하는 백신 조성에서 쓰일 수 있는 33개의 새로운 펩티드 서열과 인간 종양 세포의 HLA 클래스-I 분자에서 파생된 그들의 변이체와 관련되어 있다.

배경 기술

[0002] 위장 암은 악성 세포가 위장의 내벽에 형성되는 질병이다. 위 또는 위장 암은 위의 임의의 부분에서 발생할 수 있으며 위 내에서 또는 식도, 폐와 간을 비롯한 다른 기관으로 퍼질 수 있다. 위암은 세계에서 4번째로 가장 흔한 암이며 2002년에 93만 건이 진단되었다. 이는 높은 사망률 (연당 약 80만 건)을 보이며 이로 인해 폐암 이후로 세계에서 두 번째로 가장 흔한 암 사망의 원인이다. 이 암은 남성에서 더 자주 발생하며 아시아 국가와 개발 도상국에서 더 자주 발생한다. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.)

[0003] 이 암은 미국에서 발생하는 총 연간 암 발생건의 2% (2만 5천 500건)에 해당하며, 이는 다른 국가에서 더 자주 발생한다. 이 암은 한국에서 가장 흔한 암 종류이며, 악성 암의 20.8%에 해당한다. 일본에서는 위장 암은 남성에게 가장 흔한 암이다. 매년 미국에서 만 삼천명의 남성과 8천 명의 여성이 위암으로 진단 된다. 대부분 환자는 70세 이상이다.

[0004] 위암은 폐, 유방, 대장, 직장암에 이어 세계에서 4번째로 가장 흔한 암이다. 그리고, 위암은 세계에서 두 번째로 가장 흔한 암 사망의 원인이다. 아메리칸 캔서 소사이어티 (American Cancer Society)는 2007년에 백만 건이 새로 진단되었으며, 거의 70%가 개발 도상국에서 발생하였으며, 80만 명이 이 질병에 의해 사망하였다고 추정한다 (http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Facts_and_Figures_2007_rev2.pdf.)

[0005] 세계에서 이 질병의 발병률은 엄청난 지리적 편차가 있다. 이 질병은 아시아와 남아메리카의 일부분에서 가장 많이 발생하며, 북아메리카에서 가장 낮게 발생한다. 칠레, 일본, 남아메리카와 전 소련 국가에서 가장 높은 사망률을 나타낸다.

[0006] 조기 검진에 의해서 조기 발견이 가능한 일본과 부분적인 한국을 제외하고 조기 검진이 없기 때문에 위암은 종종 말기에 진단이 된다. 따라서, 이는 의료 전문가에게 해결해야 할 숙제로 남아 있다. 위장 암의 위험 요인은 헬리코박터 파일로리의 감염, 흡연, 높은 소금 섭취량, 기타 식습관 요소를 포함한다. 몇몇의 위장 암 (1%에서 3%)이 유전성 위장암 소인 증후군과 관련되어 있다. E-카드헤린 (cadherin) 돌연변이가 미만성 위암의 상염색체 우성 소인을 갖는 25%의 계열에서 발생한다. 이 위암의 초기를 유전성 미만성 위암이라고 한다. 젊은 무증상인 배선절단 보인자에게 유전 상담을 하고 예방 위절제술을 고려하는 것이 유용할 수도 있다.

[0008] 위벽은 점막층 (가장 안쪽), 고유근층 (중간), 장막층 (가장 바깥쪽)을 포함한 3층의 조직으로 만들어져 있다.

위암은 점막층을 만드는 세포에서부터 발생을 하고 자라면서 바깥쪽의 층으로 퍼진다. 4가지의 기본 치료법이 사용된다. 위암에 대한 치료는 수술, 화학 요법, 방사선 요법이나 동시항암화학방사선요법을 포함한다. 수술은 위암에 대한 일차 치료이다. 수술의 목표는 절제 변연에서 조직학적으로 종양세포가 없는 완전 절단 (R0 절단) 이다. 그러나, 국소구역 위암을 갖는 50%의 환자에서 R0 절단이 불가능하다. R1은 미세 잔류 암 (절제 변연에서 조직학적으로 종양세포가 있는)을 나타내고, R2는 전이병변이 없는 거시잔류암을 나타낸다. 환자의 성과는 진단 시 암의 단계에 따라 결정이 된다 (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™).

[0009] 치료 목표의 외과적인 절제술의 5년 생존율은 2기 환자에서 30 내지 50%로 나타나고, 3기 환자에서 10 내지 25%로 나타난다. 이 환자들은 국소 또는 전신 재발의 가능성이 높다. 전이는 위암 환자들의 80 내지 90%에서 나타나며 6개월 생존율은 일찍 진단이 된 경우 65%이며, 늦게 진단이 된 경우 15%이다.

[0010] 따라서 위암, 전립선암, 구강암, 구강 편평암 (OSCC), 급성 골수양 백혈병, 헬리코박터유발 몰트 림프종, 결장암종/결장직장암, 신경교종, 비소세포 폐암 (NSCLC), 자궁 경부암, 인간 유방암, 전립선암, 결장암, 췌장암, 췌관선암, 난소암, 간세포암, 간암, 다른 표현형의 뇌종양, 급성 림프구성 백혈병 (ALL)과 같은 백혈병, 폐암, 유잉 육종암, 자궁 내막암, 머리와 목 편평 세포 암, 후두의 상피 암, 식도암, 구강암, 방광암, 난소암, 신장세포암, 비정형 뇌수막종, 갑상선 유두암, 뇌암, 타액선암, 자궁 경부암, 절외 T/NK-세포 림프종, 비호지킨성 림프종과 폐, 유방과 다른 종양을 포함하는 악성 고형 종양에 대한 효과적이며 안전하고 환자들의 건강을 강화하면서 심각한 부작용을 일으킬 수 있는 화학치료 요법 또는 다른 치료 요법에 의지하지 않는 치료 옵션이 필요하다.

[0011] 본 발명은 면역 시스템을 자극하고 비침습적인 방법으로 항암제의 역할을 하는 펩티드를 포함한다.

발명의 내용

[0012] 면역 반응의 자극은 숙주 면역 시스템에 의해 항원이 외부 항원으로 인식이 됨에 의지한다. 암 관련 항원의 존재에 대한 발명은 숙주 면역 시스템을 이용하여 암의 성장을 중재할 수 있다는 가능성을 불러 일으켰다. 암 면역치료에 사용이 될 수 있는 체액면역과 세포 면역을 모두 포함하는 여러 가지의 기전이 현재 연구 되고 있다.

[0013] 세포면역 반응의 특정한 요소는 특별히 종양 세포를 인식하고 파괴하는 능력을 갖는다. 종양 침투 세포 또는 말초 혈액으로부터의 세포독성 T 세포의 단리는 이 세포가 암에 대한 자연 면역 방어에 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 특히 구조적적합 복합체를 갖는 단백질 또는 세포액에 위치하고 있는 결합 리보솜 생성물 (DRIP)에서 파생한 보통 8 내지 10개의 아미노산 잔기로 되어 있는 펩티드의 클래스-I 분자를 인식하는 CD8-양성 T-세포 (TCD8+)가 특히 이러한 반응에 중요한 역할을 한다. 인간 구조적적합 복합체 분자는 또한 인간 백혈구 항원 (HLA)으로 알려져 있다.

[0014] MHC 분자는 두 클래스로 나누어 진다. MHC 클래스-I 분자는 대부분의 핵을 갖는 세포에서 찾을 수 있다. MHC 분자는 알파 중쇄와 베타-2-저분자글로불린 (MHC 클래스-I 수용체) 또는 알파와 베타 체인 (MHC 클래스-II 수용체)으로 각각 구성되어 있다. 이들의 3차원 형태는 결합 홈을 형성하며, 이는 펩티드와의 비공유결합에 사용이 된다. MHC 클래스-I은 대부분 내인 단백질, DRIP와 큰 펩티드의 단백질분해 분할로 인해 생성된 펩티드를 제시한다. MHC 클래스-II 분자는 대부분 전문적인 항원 전달 세포 (APC)에서 찾아 볼 수 있다. 이들은 주로 APC로부터 세포내 섭취 중 섭취된 외인 또는 막전 단백질의 펩티드를 제시하며, 이는 후에 처리된다. 펩티드와 MHC 클래스-I 분자의 복합물은 적당한 T-세포 수용체 (TCR)를 갖는 CD8-양성 세포 독성 T 림프구에 의해서 인식이 되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스-II 분자의 복합물은 적당한 TCR을 갖는 CD4-양성 조절 T-세포에 의해 인식이 된다. TCR, 펩티드 및 MHC가 1:1:1의 화학량론적 반응량으로 존재한다는 사실은 잘 알려져 있다.

[0015] 펩티드가 세포 면역 반응을 일으키기 위해서는 MHC-분자와 반드시 결합을 해야 한다. 이 반응은 MHC 분자의 대립 유전자와 펩티드의 아미노산 서열의 특정한 다형태에 의존을 한다. MHC 클래스-I 결합 펩티드는 보통 8 내지 12개의 아미노산 잔기의 길이로 이루어져 있으며 보통 서열 중에 두 개의 보존 잔기 ("고정대")를 가지고 있으며 이는 MHC 분자의 대응하는 결합 홈과 상호 작용한다. 이런 방법으로 각 MHC 대립 유전자는 "결합 모티브"를 가지게 되며, 이는 어떤 펩티드가 어떤 결합 홈에 특이적으로 결합을 할 수 있는 지를 결정한다.

[0016] MHC 클래스-I 의존 면역 반응에서는 펩티드는 특정한 종양 세포에서 발현되는 MHC 클래스-I 분자와 결합해야 할 뿐 아니라, 특정한 T 세포 수용체 (TCR)를 갖는 T 세포로부터 인식이 될 수 있어야 한다.

[0017] 종양 특정 CTL에 의해 인식이 되는 항원이란 이들의 에피토프가 효소, 수용체 전사 인자 등을 포함한 모든 단백질 클래스로부터 파생이 되고, 이들이 같은 기원의 변하지 않은 세포와 비교하였을 시 각자의 종양에서 상향조

절되어 발현된 것을 말한다.

[0018] 종양 관련 항원 (TAA)의 현재 분류는 다음의 주요 군을 포함한다:

[0019] a) 암-고환 (cancer-testis) 항원: 이는 처음으로 식별된 TAA로서 이 클래스에 해당하는 T 세포에 의해 인식이 되며, 이는 이들의 멤버가 조직학적으로 다른 인간 종양과 다른 형태로 발현되며, 정상적인 조직 중에서는 단지 고환의 정모세포/정조세포 그리고 종종 태반에서만 발현되기 때문에 원래 암-고환 항원이라고 이름이 지어졌다. 고환의 세포가 클래스-I과 II HLA 분자를 발현하지 않기 때문에 이 항원은 보통 조직의 T 세포에 의해 인식이 되지 않으며, 따라서 이는 면역적으로 종양 특이적이라고 고려된다. CT 항원 중에 잘 알려진 예로는 MAGE 계열 구성원 또는 NY-ESO-1을 들 수 있다.

[0020] b) 분화 항원: 이 TAA는 종양과 종양이 발생하는 정상 조직이 공유한다: 거의 대부분은 흑색종과 정상 멜라닌 세포에서 발견이 된다. 많은 멜라닌 세포 혈통 관련 단백질은 멜라닌의 생합성에 관련이 있으며 따라서 이는 종양 특이적은 아니지만, 암 면역 치료로 널리 사용된다. 몇몇의 예를 들면, 티로시나제와 흑색종의 Melan-A/MART-1과 전립선암의 PSA가 있다.

[0021] c) 과발현된 TAA: 널리 발현되는 TAA를 코딩하는 유전자는 조직학적으로 다른 종류의 종양과 많은 정상 조직에서 검출된 바 있으며, 대부분 정상 조직에서 더 낮은 수준으로 검출된다. 에피토프 중의 대부분이 처리되고 잠재적으로 정상 조직에 의해서 제시가 되지만, 이들이 T-세포 인식의 문턱값에 미치지 못하는 반면, 이들의 종양 세포에서의 과발현은 이전에 설립된 내성을 파괴하여 항암 반응을 유발시킬 수도 있다. 유명한 TAA 클래스는 예를 들면 Her-2/neu, 서비빈(Survivin), 텔로머라제(Telomerase) 또는 WT1이 있다.

[0022] d) 종양 특이적 항원: 이 유일한 TAA는 정상 유전자 (β -카테닌, CDK4 등을 포함한)로부터의 돌연변이로부터 발생한다. 이들의 분자 변화 중 몇몇은 종양 전환 및/또는 진행과 관련이 있다. 종양 특이적 항원은 보통 조직에 대한 자가 면역 반응 유도의 위험 없이 대부분 강한 면역 반응을 유도할 수 있다. 다른 한 편으로, 대부분의 경우 이 TAA는 이들이 인식된 정확한 종양과 단지 관련이 있으며 이는 다른 각각의 종양과 공유되지 않는다.

[0023] e) TAA는 비정상 번역 후 개질에서 일어난다: 이러한 TAA는 종양에서 특이적 발현 또는 과발현되지 않지만, 근본적으로 활성적인 종양에서 번역 후 과정 중 종양과 관련이 되는 단백질에서 발생할 수 있다. 이 클래스의 예는 변형된 당화 패턴에서 발생하며 MUC1과 같은 경우처럼 종양의 새로운 에피토프가 될 수 있거나 단백질 스폰 라이싱 또는 분해 도중에서 생겨날 수 있으며 이는 종양 특이적이 될 수도 안 될 수도 있다.

[0024] f) 암 바이러스 단백질: 이 TAA는 바이러스 단백질로서 이는 종양 발생 과정에서 중요한 역할을 할 수 있으며, 이들이 이물 (인간에서 발생되지 않음)이기 때문에, 이들은 T-세포 반응을 일으킬 수 있다. 이러한 단백질의 예로서는 인간 유두종 바이러스 단백질 16형, E6와 E7을 들 수 있으며 이는 자궁경부암에서 발현이 된다.

[0025] 종양 특이적 또는 종양 관련 항원으로 세포독성 T-림프구에 의해 인식이 되고 치료의 목적으로 쓰이려면, 특정한 조건이 성취되어야 한다. 항원은 대부분 종양 세포에서 발현이 되고 비교적 작은 양만이 정상 건강 조직에서 발현되어야 한다. 더욱 더 바람직한 것은 이 항원이 한 가지 형의 종양에서만 존재하며, 또한 높은 농도 (즉, 세포 당 펩티드 복제물의 숫자)로 존재한다. 종양-특이적 항원과 종양-관련 항원은 정상 세포가 종양 세포로서 전환하는 데에 이의 기능으로 인해, 즉, 세포 주기 제어 또는 세포 자멸사 등의 기능에 직접적으로 관련이 있는 단백질에서 파생이 된다. 추가적으로, 전환의 직접적인 원인이 되는 이들 단백질의 하류 목표가 상향조절됨에 따라서 간접적으로 종양과 관련이 될 수 있다. 이러한 간접적인 종양 관련 항원은 백신 접근의 목표가 될 수 있다 (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). 둘 다의 경우에 에피토프가 항원의 아미노산에 존재하는 것이 중요하고, 따라서 이 종양 관련 항원에서 파생된 펩티드 ("면역원 항원")가 시험관내 또는 생체내 T-세포 반응을 일으킬 수 있다.

[0026] 근본적으로, MHC 분자와 결합할 수 있는 어떤 펩티드도 T-세포 에피토프의 기능을 가질 수 있다. 시험관내 또는 생체내 T-세포 반응 유도의 조건은 T-세포가 상응하는 TCR과 함께 존재를 하며, 이 특정한 에피토프에 대한 면역적인 내성이 없는 것이다.

[0028] 따라서, TAA는 종양 백신 개발의 출발 시점이다. TAA를 식별하고 특성화하는 방법은 환자 또는 건강한 대상에서 단리할 수 있는 CTL의 사용에 근거하거나 종양과 정상 조직 사이의 차별된 전사 프로파일 생성 또는 차별된 펩티드 발현 패턴 생성에 근거한다.

[0029] 하지만, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주, 또는 선택적으로 이러한 조직 또는 세포주에서 발현되는 유전자들의

식별은 이러한 유전자로부터 전사된 항원의 면역 치료에서의 사용에 대한 정확한 정보를 제공하지 않는다. 이는 이러한 항원의 에피토프의 소집단만이 이러한 적용에 적당하기 때문이며 이는 상응하는 TCR을 갖는 T 세포가 존재해야만 하며 이 특정한 에피토프에 대한 면역적 내성이 없거나 낮은 수준으로 존재해야 하기 때문이다. 따라서 과발현되었거나 기능적인 T 세포가 있는 MHC 분자에 대해 제시된 선택적으로 발현된 단백질 펩티드만을 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능적인 T 세포는 특정한 항원이 클론에 의하여 팽창할 수 있으며 작동 세포의 기능을 실행할 수 있는 T 세포 ("작동 T 세포")로서 정의된다.

[0030] T-조력 세포는 CTL의 항암 면역 작동 기능을 총 지배하는 데에 중요한 역할을 한다. TH1 타입의 T-조력 세포 반응을 일으키는 T-조력 세포 에피토프는 표면에 암 관련 펩티드/MHC 복합체를 진열하는 암 세포를 향한 세포살해 기능을 포함하는 CD8-양성 살해 T 세포의 작동 기능을 유발한다. 이런 방법으로 암 관련 T-조력 세포 펩티드 에피토프는 홀로 또는 다른 암 관련 펩티드와 함께 항암 면역 반응을 유발하는 예방 주사의 활성적인 제약 성분으로 쓰일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1: GC2464 원발 종양 샘플의 표시를 보여주는 CDC2-001의 질량 스펙트럼의 예. NanoESI-LCMS가 GC 샘플 2464로부터 용출된 펩티드 풀에서 수행되었다. m/z 597.3501 \pm 0.001 Da, $z = 2$ 에 대한 질량 크로마토그램은 잔류 시간 151.63분에서 펩티드 최고점을 보여 준다. B) 질량 스펙트럼에서 검출된 151.63분에서의 최고점은 질량 스펙트럼의 m/z 597.3501의 신호를 보여 준다. C) NanoESI-LCMS 실험에서 기록된 지정된 잔류 시간으로부터 선택된 m/z 597.3501 전구체의 충돌적으로 유도된 붕괴 질량 스펙트럼은 GC2464 종양 샘플에서 CDC2-001의 존재를 확인해 주었다. D) 합성 CDC2-001 기준 펩티드의 균열 패턴이 기록되고 서열 검증을 위해 C에서 보여진 바와 같이 자연적으로 생성된 TUMAP 균열 패턴과 비교되었다.

도 2: 정상 조직의 선택된 단백질과 25개의 위암 샘플의 mRNA 발현 프로파일

a) CDC2 (프로브셋 번호(Probeset ID) 203213_at)

b) ASPM (프로브셋 번호 219918_s_at)

도 3: 클래스-I TUMAP의 펩티드-특이적 시험관내 면역원성을 보여주는 결과의 예. CD8+ T 세포는 각각 관계 있는 (왼쪽 패널) 그리고 관계 없는 (오른쪽 패널) 펩티드를 갖는 인공 APC를 사용하여 초회 감작되었다. 자극을 3회 거친 후, 관계 있는 그리고 관계 없는 A*2402-멀티머를 사용하여 2회 염색을 하는 방법으로 펩티드-반응 세포를 검출했다. 보여진 세포는 살아 있는 CD8+ 림프구에 게이팅(gating)되었으며, 플롯의 수는 멀티머-양성 세포의 백분율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 별도 언급이 없는 한, 본원에 사용된 모든 용어는 다음과 같이 정의된다. "펩티드"란 대부분 인접한 아미노산 사이가 알파-아미노와 카르보닐 기의 펩티드 결합으로 이루어진 아미노산 잔기의 시리즈를 나타내는 데 쓰인다. 펩티드는 바람직하게는 9개의 아미노산으로 되어 있으며, 이는 적게는 8개의 아미노산 길이이고, 길게는 10, 11, 12, 13, 14개의 아미노산 길이로 되어 있다.

[0033] "올리고펩티드"란 대부분 인접한 아미노산 사이가 알파-아미노와 카르보닐 기의 펩티드 결합으로 이루어진 아미노산 잔기의 시리즈를 나타내는 데 쓰인다. 이 안에 옳은 에피토프 또는 에피토프들이 들어 있는 한, 본 발명에 있어서 올리고펩티드의 길이는 중요하지 않다. 올리고펩티드는 대부분 30개의 아미노산보다 짧고, 적게는 14개의 아미노산으로 이루어져 있다.

[0034] "폴리펩티드"란 대부분 인접한 아미노산 사이가 알파-아미노와 카르보닐 기의 펩티드 결합으로 이루어진 아미노산 잔기의 시리즈를 나타내는 데 쓰인다. 이 안에 옳은 에피토프가 들어 있는 한, 본 발명에 있어서 올리고펩티드의 길이는 중요하지 않다. 펩티드 또는 올리고펩티드와 반대로, 폴리펩티드라는 용어는 30개 이상의 아미노산을 갖는 분자를 말할 때 쓰인다.

[0035] 만약 어떤 분자를 코딩하는 펩티드, 올리고펩티드, 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드가 면역 반응을 유도할 수 있다면, 이들이 "면역원성"을 갖는다고 한다 (이들을 본 발명에서는 "면역원"이라고 일컫는다). 본 발명에서, "면역원성"이란 더 특정히 T-세포 반응을 유도하는 능력으로 정의된다. 따라서, "면역원"이란 면역 반응을 유도하는 능력이 있는 분자를 말하며, 본 발명의 경우, T-세포 반응을 유도하는 것을 말한다.

[0036] T-세포 "에피토프"는 MHC 클래스-I 수용체에 결합되어 삼성분 복합체 (MHC 클래스-I 알파 쇄, 베타-2-저분자글

로불린과 펩티드)로 이루어져 있으며 짝이 맞는 MHC/펩티드 복합체와 적당한 친화력을 가지고 결합하는 T-세포 수용체에 의해 인식이 될 수 있는 짧은 펩티드를 필요로 한다. MHC 클래스-I 분자와 결합하는 펩티드는 전형적으로 8개에서 14개의 아미노산의 길이로 이루어져 있으며, 가장 흔하게 9개의 아미노산으로 이루어져 있다.

[0037] 인간에는 MHC 클래스-I 분자를 코딩하는 세 개의 유전자 좌가 있다 (인간의 MHC-분자는 또한 지정된 인간 백혈구 항원이다 (HLA)): HLA-A, HLA-B, 그리고 HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, 그리고 HLA-A*24는 유전자 좌에서 발현할 수 있는 다른 MHC 클래스-I 대립 유전자의 예이다.

표 1

HLA-A*24의 발현 빈도 F와 가장 흔한 HLA-A*2402 혈청형. 빈도수는 문헌[Mori et al., 1017-27]에서 적용된 미국 인구 사이의 일배체형 빈도 Gf 에서 하디-웨인버그(Hardy-Weinberg) 공식 $F=1-(1-Gf)^2$ 을 적용해 추론 된다(문헌[Mori et al., 1997]). 자세한 내용은 문헌[Chanock et al., 1211-23])을 참고한다.

세계 혈청형 HLA*24와 A*2402의 발현 빈도

대립 유전자	인구	대립유전자 빈도에서 계산된 표현형
A*24	필리핀	65%
A*24	러시아 네넬츠	61%
A*2402	일본	59%
A*24	말레이시아	58%
A*2402	필리핀	54%
A*24	인도	47%
A*24	한국	40%
A*24	스리랑카	37%
A*24	중국	32%
A*2402	인도	29%
A*24	호주 서부	22%
A*24	미국	22%
A*24	러시아 사마라	20%
A*24	남미	20%
A*24	유럽	18%

[0038]

[0039] 본원에 사용되는 것처럼, DNA 배열에 대한 참조는 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA를 포함한다. 그러므로, 특정 서열은, 문맥에서 다르게 나타내지 않는 한, 그 서열의 단일 가닥 DNA, 보완이 있는 그런 서열의 양면 (이중 줄기 DNA) 및 그런 서열의 보완을 말하는 것이다. 용어 "코딩 영역"은 자연적인 게놈 환경에서 유전자의 발현 생성물을 자연스럽게 또는 정상적으로 코딩하는 유전자의 부분(즉, 유전자의 본래의 발현 생성물을 위한 생체 내 코딩하는 영역)을 말한다.

[0040] 코딩 영역은 돌연변이가 아닌 ("정상"), 변이 또는 개조된 유전자에 있을 수 있거나, DNA 서열, 또는 실험실에서 DNA 합성의 기술자에게 잘 알려진 방법을 사용해서 실험실에서 전적으로 합성된 유전자에 있을 수 있다.

[0041] "뉴클레오타이드 서열"은 데옥시리보뉴클레오타이드의 헤테로중합체를 말한다.

[0042] 특정 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 뉴클레오타이드 서열 코딩은 자연적으로 발생하거나 합성 구축될 수도 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 코딩하는 DNA 분절은 cDNA 단편들과 짧은 올리고 뉴클레오타이드 연결기, 또는 일련의 올리고 뉴클레오타이드로부터 어셈블링되어 미생물이나 바이러스 오페론에서 파생된 규제 요소를 가진 재조합 전사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공한다.

[0043] 용어 "발현 생성물"은 유전자의 자연 번역 생성물인 폴리펩티드 또는 단백질이나 유전적 코딩 퇴화로 인해 야기된 임의의 핵산 서열 코딩과 상응하며 그러므로 같은 아미노산을 코딩한다.

[0044] 코딩 서열을 말할 때, 용어 "단편"은 발현 생성물이 완전한 코딩 영역의 발현 생성물과 같은 생물학적 기능이나

활동을 유지하는 완전한 코딩 영역보다 적은 부분의 DNA를 말한다.

- [0045] 용어 "DNA 분절"은 최소한 하나의 상당히 순수한 형태(즉, 내생 오염 물질이 없고, 그의 표준 생화학 방법, 예를 들면, 복제 벡터의 사용에 의한 구성 요소 뉴클레오타이드 서열 및 분절의 식별, 조작 그리고 복구를 가능하게 하는 양 또는 농도임)로 분리되는 DNA에서 파생된 별도의 단편 또는 큰 DNA 구성의 구성 요소로서의 형태의 DNA 중합체를 말한다. 그런 분절은 일반적으로 진행 생물 유전자에 나타나는 내부 비번역 서열, 또는 인트론에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공된다. 비번역 DNA의 서열은 같은 것이 코딩 영역의 조작이나 발현을 방해하지 않는 오픈 리딩 프레임의 하단에 나타날 수 있다.
- [0046] 용어 "프라이머"는 하나의 표준 DNA와 짝을 이룰 수 있는 짧은 핵산 서열이며 DNA 폴리머라제가 테옥시리보뉴클레오타이드 연결을 시작하는 3'-OH 말단을 제공한다.
- [0047] 용어 "프로모터"는 전사를 시작하기 위한 RNA 폴리머라제의 결합에 관련된 DNA의 영역을 뜻한다.
- [0048] 용어 "단리"는 물질이 원래의 환경 (예를 들면, 자연적으로 발생하는 경우에는 자연 환경)에서 제거가 되는 것을 뜻한다. 예를 들면, 자연-발생하는 살아 있는 동물에서 나타나는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 단리되지 않지만, 자연계에서 공존하는 물질의 부분 또는 전체에서 분리되는 같은 뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 단리된다. 그런 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 부분이거나 그런 뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 구성의 한 부분일 수 있으며, 그런 벡터 또는 구성이 자연 환경의 한 부분이 아닐 때 여전히 단리될 수 있다.
- [0049] 본 발명에 밝혀지는 폴리뉴클레오타이드, 그리고 제조함 또는 면역성의 폴리펩티드는 "정제된" 형태일 수도 있다. 용어 "정제된"은 절대 순도를 필요로 하지 않고, 오히려, 그것은 상대적인 정의로서 의도되고, 관련된 기술자들이 이해하는 용어로서 상당히 정제된 제제 또는 부분적으로 정제된 제제를 포함할 수 있다. 예를 들면, cDNA 라이브러리에서 단리된 각각의 클론은 전기 영동 균질성으로 통상적으로 정제된다. 출발 물질 또는 천연 물질의 10배 이상, 바람직하게는 100 또는 1000배 이상, 더욱 바람직하게는 10000 또는 100000배의 정제가 명시적으로 고려된다. 또한 바람직한 무게의 99.999%, 또는 최소한 99.99% 또는 99.9%; 그리고 심지어는 99% 보다 큰 정제도를 가진 제시된 폴리펩티드는 명시적으로 고려된다.
- [0050] 본 발명에서 밝혀진 핵산과 폴리펩티드 발현 생성물은, 그런 핵산 그리고/또는 그런 폴리펩티드를 가진 발현 벡터뿐 아니라, "강화된 형태"일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "강화된"은 물질의 농도가 최소한 그것의 자연적 농도의 (예를 들면) 최소한 2, 5, 10, 100, 또는 1000배 정도이고, 무게로써는 유리하게 0.01%, 가끔적으로는 최소한 무게의 0.1% 정도이다. 무게의 약 0.5%, 1%, 5%, 10%, 그리고 20% 강화된 제제도 고려된다. 서열, 구성, 벡터, 클론, 그리고 본 발명의 다른 물질들은 유리하게 강화된 또는 단리된 형태가 될 수 있다.
- [0051] 용어 "활성 단편"은 예를 들면 토끼, 또는 쥐 그리고 인간을 포함한 포유류 같은 동물에게 따로 또는 적당한 보조제와 함께 투여했을 때 면역 반응을 (즉, 면역성 활동이 있는) 생성하고 면역 반응이 인간과 같은 수용 동물 내에서 T-세포 반응을 자극하는 형태로 면역 반응을 나타내는 단편이다. 다르게는, "활성 단편"은 또한 시험관 내 T-세포 반응을 유도하기 위해서 쓰일 수 있다.
- [0052] 본원에 사용된 "부분", "분절" 및 "단편"이라는 용어는, 폴리펩티드와 관련하여 쓰일 때, 서열이 더 큰 서열의 하위 집합을 형성하는 아미노산 잔기와 같은 잔기의 지속적인 서열을 말한다. 예를 들면, 만약에 폴리펩티드가 트립신이나 키모트립신 같은 일반적인 엔도펩티다아제 중 어떤 치료를 받는다면, 그런 치료로 인해 생기는 올리고펩티드는 시작하는 폴리펩티드의 부분, 분절 또는 단편을 나타낼 것이다. 이것은 그러한 단편이 아미노산 서열의 한 부분으로서 서열번호 1 내지 서열번호 33의 자연적 생성하는, 또는 "부모" 단백질, 즉 서바이빈에 상응하는 서열번호 1 내지 서열번호 33과 완전히 동일하거나 상당히 일치하는 분절, 단편 또는 부분을 가질 것이라고 뜻한다. 폴리뉴클레오타이드에 관련해서 쓰일 때, 이런 용어들은 일반적인 엔도뉴클레아제 중 어떤 것과 함께 언급된 폴리뉴클레오타이드의 치료에 의해 생성된 생성물을 말한다.
- [0053] 본 발명에 따라, 서열을 말할 때 용어 "백분율 일치" 또는 "백분율 일치하는"은 설명되거나 명시된 서열 ("기준 서열")에 비교될 서열("비교 서열")의 정렬 후 서열이 명시된 또는 설명된 서열에 비교되는 것을 말한다. 백분율 일치하는 밀의 공식에 따라서 결정된다:
- [0054] 백분율 일치 = $100[I - (C/R)]$
- [0055] 이때 C는 기준 서열과 비교 서열의 정렬의 길이에 비해 기준 서열과 비교 서열의 차이의 숫자이고, 이때
- [0056] (i) 비교 서열에서 상응하는 정렬된 염기 또는 아미노산이 없는 기준 서열에 각 염기 또는 아미노산,

- [0057] (ii) 기준 서열의 각 껍, 및
- [0058] (iii) 비교 서열의 정렬 된 염기 또는 아미노산과 다른 기준 서열의 각 정렬 된 염기 또는 아미노산이 차이를 구성하고;
- [0059] R은 비교 서열과의 정렬의 길이에 대한 기준 서열 염기 또는 아미노산의 숫자이고 기준 서열에 생긴 껍도 염기 또는 아미노산 개수로 계산된다.
- [0060] 만약에 위에서와 같이 계산된 비교 서열과 기준 서열 사이의 백분율 일치가 특정 최소 백분율과 같거나 더 크면 위에서 계산된 백분율 일치가 특정 백분율 일치보다 작은 경우에 정렬이 있더라도 비교 서열은 기준 서열에 최소 백분율 일치에 있다.
- [0061] 여기에서 밝혀진 본래 펩티드는 달리 언급되지 않는 이상 다른, 아마도 선발적인, 펩티드 쇠의 사이트의 하나 이상의 잔기의 치환에 의해 개질될 수 있다. 그런 치환은, 예를 들면, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 보존적일 수 있다. 심지어 더 보존적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것 같이, 같거나 비슷한 크기와 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종속에서의 서열 변화의 연구에서, 특정 아미노산 치환은 다른 것들보다 더 자주 용납되고 있으며, 이들은 본래의 아미노산과 치환 사이에서 크기, 전하, 극성, 그리고 소수성이 비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보존적 치환"을 정의하는데 기본이 된다.
- [0062] 이때 보존적인 치환은 아래의 다섯 개 군 중 하나의 교환으로 정의된다: 군 1-작은 지방성, 무극성의 또는 약간 극성의 잔기 (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 군 2-극성의, 음성 전하의 잔기와 그들의 아미드 (Asp, Asn, Glu, Gln); 군 3-극성의, 양성 전하된 잔기 (His, Arg, Lys); 군4-큰, 지방성, 무극성 잔기 (Met, Leu, Ile, Val, Cys); 그리고 군 5-큰, 방향족 잔기 (Phe, Tyr, Trp).
- [0063] 덜 보존적인 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 비슷한 성질이지만 크기가 어느 정도 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 아주 비-보존적인 치환은 산성 아미노산을 극성의, 또는 심지어는 성질이 기본적인 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수도 있다. 그러나, 이런 "라디칼" 치환은 화학적 작용이 완전히 예측 불가능하고 라디칼 치환은 단순한 화학 원리에서 예측 가능하지 않은 뜻밖의 발생이 있을 수 있기 때문에 효과가 없다고 기각할 수 없다.
- [0064] 물론, 이런 치환은 일반적인 L-아미노산 외 다른 구성을 포함할 수 있다. 그러므로, D-아미노산은 본 발명의 항원 펩티드에서 흔히 발견되지만 여기에서 아직 공개가 되어야 하는 L-아미노산의 치환이 될 수 있다. 또한, 비-표준 R 기를 가지고 있지 않은 아미노산 (즉, 자연 단백질의 일반적인 20 아미노산에서 찾을 수 없는 R 기) 역시 본 발명에 따라 면역성과 면역성 폴리펩티드를 생산하기 위해서 치환될 수 있다.
- [0065] 만약 하나 이상의 위치에서 아래에서 정의된 것과 굉장히 비슷하거나 더 큰 항원 활동을 가진 치환이 발견되면, 그런 치환의 합성은 합성된 치환이 펩티드의 항원성에 더해지거나 시너지 효과의 결과를 내는지 결정하기 위해 테스트된다. 최대, 펩티드에서 네 가지 이상의 위치는 대체 될 수 없다.
- [0066] 용어 "T-세포 반응"은 특정 확산과 생체 내외에서 유도되는 효과기 기능의 활성화를 뜻하다. MHC 클래스-I 제한 CTL에서는, 효과기 기능이 펩티드-펄스, 펩티드-전조 펄스 또는 자연적 펩티드를 나타내는 목적 세포들의 세포 용해, 사이토킨의 분비, 가급적 인터페론-감마, TNF-알파, 또는 펩티드에서 유도되는 IL-2, 효과기 분자의 분비, 가급적 그랜자임 또는 펩티드에서 유도되는 페로핀류 또는 탈과립 일 수 있다.
- [0067] 바람직하게는, 서열번호 1 내지 33의 펩티드 특정의 CTL이 치환된 펩티드와 시험되었을 때, 치환된 펩티드가 배경수준과 비교했을 시 최대 분해 증가의 반을 달성하는 펩티드의 농도는 약 1 mM 이하이며, 바람직하게는 1 μ M 이하이며, 더 바람직하게는 100 pM 이하이며, 가장 바람직하게는 10 pM 이하이다. 또한 치환된 펩티드가 적어도 한 명, 또는 더 바람직하게는 두 명, 더 바람직하게는 세 명의 개인의 CTL에 의하여 인식이 되는 것이 바람직하다.
- [0068] 따라서, 본 발명의 에피토프는 자연적으로 생성되는 암 관련 또는 암 특정 에피토프와 동일하거나 그들이 실질상 동일한 항원적 활동을 갖는다면, 4개 이하의 잔기 차이가 나는 에피토프를 포함할 수도 있다.
- [0069] 치료에 대한 면역 치료 요법 접근
- [0070] 면역 반응 자극은 자가 면역 구조가 항원의 존재를 이질적 것으로 인식하는 것에 의존한다. 기존의 종양 관련된 항원의 발견은 자가 면역 구조를 종양의 성장에 방해하도록 쓰이는 것의 가능성을 제기한다. 면역 구조의 채역

그리고 세포, 양방을 설비하는 다양한 기전은 현재 암 면역 치료로 탐구된다.

- [0071] 세포 면역 반응의 특정 요소는 종양 세포를 구체적으로 인식하고 파괴할 수 있는 능력이 있다. 종양 침투 세포 집단 또는 말초 혈액에서의 세포독성 T 세포의 분리는, 그러한 세포들이 암에 대한 자연 면역 방어에서 중요한 역할을 한다는 것을 말해준다. 특히 CD8-양성 T 세포 (TCD8+)는 시토솔에 있는 일반적으로 8 내지 12개의 단백질 잔기가 결합이 있는 리보솜 물질 (DRIPS)의 구조적 적합 복합체 (MHC)를 함유한 클래스-I 분자를 인식하고, 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC-분자는 인간 백혈구 항원 (HLA)으로도 지정된다
- [0072] MHC 클래스-I 분자는 내생 단백질 또는 핵 단백질, DRIPS, 그리고 더 큰 단백질의 단백질 가수 분해 분열의 결과인 펩티드나 큰 펩티드를 제시하는 핵이 있는 대부분의 세포에서 찾을 수 있다. 그러나, 엔도솜 구획에서 또는 외인 공급원에서 유래하는 펩티드도 종종 MHC 클래스-I 분자에서 발견된다. 이러한 비전통적인 방식의 클래스 I 제시는 문헌에서 교차-제시로 지칭된다.
- [0073] 단백질이 세포독성에 의해 종양 특성이나 항원 관련으로 인식되고, 치료에 쓰이기 위해서는 특정 전제 조건이 충족 되어야 한다. 항원은 건강한 조직에서는 나타나지 않거나 조금만 나타나야 하고, 종양 세포에서 나타나야 한다. 그리고 더 바람직한 것은, 그 항원이 종양 종류에서 나타나는 것뿐 아니라, 농도도 높아야 한다 (예를 들면, 세포마다 펩티드의 복제 수). 종양 특정 그리고 종양 관련된 항원은 종종 세포 주기나 아포토시스 같은 기능에 의해 정상 세포에서 종양 세포로의 변형에 직접 관련된 단백질에서 파생된다. 또한, 변형을 직접적으로 일으키는 단백질의 하류 목적은 상향조절될 수 있으며 따라서 간접적으로 종양과 관련된다. 이런 간접적 종양 관련 항원은 백신의 표적이 될 수 있다. 중요한 점은 두 가지 경우에서 항원의 아미노산 서열에 있는 항원결정기의 존재는 이런 펩티드 (면역 펩티드)가 종양 관련 항원에서 파생되었기 때문에 T 세포 내의 반응을 인도한다.
- [0074] 기본적으로, MHC 분자를 결합할 수 있는 모든 펩티드는 T-세포 항원결정기로 작용할 수 있다. T 세포 내의 반응 유도의 필요 조건은 상응하는 TCR이 있는 T-세포의 존재와 이 특이적 항원 결정기에 대한 내성의 부재이다.
- [0075] 따라서, TAA는 암 백신을 개발하는 데에 출발점이다. TAA를 식별하고 특성을 나타내는 방법은 환자 또는 건강한 피실험자에게서 추출할 수 있는 CTL의 사용에 기반을 두거나, 종양과 정상 조직 사이의 차별 전사 프로파일 또는 차별 펩티드 발현 패턴에 기반을 둔다 (Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27).
- [0076] 하지만, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주, 또는 선택적으로 이러한 조직 또는 세포주에서 발현이 되는 유전자들의 식별은 이러한 유전자로부터 전사된 항원의 면역 치료에서의 사용에 대한 정확한 정보를 제공하지 않는다. 이는 이러한 항원의 에피토프의 소집단만이 이러한 적용에 적당하기 때문이며 이는 상응하는 TCR을 갖는 T 세포가 존재해야만 하며 이 특정한 에피토프에 대한 면역적 내성이 없거나 낮은 수준으로 존재해야 하기 때문이다. 따라서 과발현되었거나 기능적인 T 세포가 있는 MHC 분자에 대해 제시된 선택적으로 발현된 단백질 펩티드만을 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능적인 T 세포는 특정한 항원이 클론에 의하여 팽창할 수 있으며 작동 세포의 기능을 실행할 수 있는 T 세포 ("작동 T 세포")로서 정의된다.
- [0077] T-조력 세포는 CTL의 항암 면역 작동 기능을 총 지배하는 데에 중요한 역할을 한다. TH1 타입의 T-조력 세포 반응을 일으키는 T-조력 세포 에피토프는 표면에 암 관련 펩티드/MHC 복합체를 진열하는 암 세포를 향한 세포살해 기능을 포함하는 CD8-양성 살해 T 세포의 작동 기능을 유발한다. 이런 방법으로 암 관련 T-조력 세포 펩티드 에피토프는 홀로 또는 다른 암 관련 펩티드와 함께 항암 면역 반응을 유발하는 예방 주사의 활성적인 제약 성분으로 쓰일 수 있다.
- [0078] 이 CD8과 CD4 의존의 두 종류의 반응이 항암 작용에 함께 상승효과를 발휘하면서 공헌하기 때문에, CD8-양성 CTL (MHC 클래스-I 분자) 또는 CD4-양성 CTL (MHC 클래스-II 분자)의 종양관련 항원의 식별과 성질 부여는 종양 백신을 개발하는 데에 중요하다. 따라서 본 발명의 목표는 여러 개의 클래스의 MHC 복합체에 결합하는 펩티드를 포함하는 결합 펩티드의 구성을 제공하는 것이다.
- [0079] 암 치료에 관련된 심각한 부작용과 비용을 고려할 때 암의 예후를 발전시키는 더 향상된 진단 방법이 절실히 필요하다. 따라서, 다른 암, 특히 위암의 생물표지자를 표시하는 인자를 식별할 필요가 있다. 더 나아가, 암, 특히 위암의 치료에 사용이 될 수 있는 인자를 식별할 필요가 있다.
- [0080] 더 나아가 잔여 종양이 제자리에 남겨져 있거나, 국소적으로 진행된 근치전립샘절제술 후 생화학적으로 재발한 위암 환자를 위한 현재 확립된 치료 방법이 없다. 이환율을 낮추고 현재 사용이 가능한 치료 방법과 비교했을 때 효능이 비교 가능한 새로운 치료 방법이 바람직하다.
- [0081] 본 발명은 본 발명의 펩티드를 과발현하는 위암과 다른 종양을 치료할 수 있는 펩티드를 제공한다. 이 펩티드는

질량 분석법에 의해 자연적으로 HLA 분자에 의해 원발 인간 위암 샘플에서 제시가 되는 것으로 보여졌다 (실시예 1과 도 1 참조).

- [0082] 펩티드가 과생된 유전자는 정상 조직과 비교했을 때 위암, 신장세포암, 결장암, 비소세포 폐암, 선암종, 전립선암, 양성종양, 악성 흑색종에서 강하게 과발현이 되는 것으로 보여졌고 (실시예 2, 도 2 참조), 이는 펩티드의 종양 관련도를 높게 보였주었다. 즉, 이 펩티드는 정상 세포에서는 제시가 되지 않고, 종양에서 높은 수준으로 발현이 된다.
- [0083] HLA-결합 펩티드는 특히 T 림프구/T 세포에 의해 면역 시스템에 의하여 인식이 된다. T 세포는 식별된 HLA/펩티드 결합체, 예, 과생된 펩티드를 제시하는 위암 세포를 파괴할 수 있다.
- [0084] 현재 발명의 T 세포 반응을 자극할 수 있는 모든 펩티드는 확증 플랫폼과 비교가 가능했다 (실시예 3과 도 3). 따라서, 이 펩티드는 환자의 면역 반응을 생성하는 데에 유용하고 이로 인하여 종양 세포가 파괴될 수 있다. 환자에서의 면역 반응은 이 묘사된 펩티드가 될 수 있으면 면역성을 향상시키는 물질 (예, 보강제)과 함께 환자에게의 직접 투여 또는 이의 적당한 전구체의 투여로 유도될 수 있다 (예, 연장된 펩티드, 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산). 이러한 치료 백신으로부터 유래하는 면역 반응은 종양 세포에 대해 높은 수준으로 특정하다고 예상되며 이는 본 발명의 목표 펩티드가 정상 세포에서 비교 가능한 숫자로 존재하지 않으며, 이로서 바람직하지 않은 정상 조직에 대한 자가 면역 반응의 위험을 방지한다.
- [0085] 약학 조성물은 펩티드를 유리 형태 또는 약학적으로 허용되는 염의 형태로 포함한다. 여기에서 쓰이는 "약학적으로 허용되는 염"은 산 또는 에이전트의 기본 염을 만듦으로써 변형되는데서 공개되는 펩티드의 과생 생성물을 말한다. 예를 들면, 적당한 산에 대한 반응을 포함한 산 염은 유기 염기로부터 제조된다 (일반적으로 약물의 중성 형태가 중성 $-NH_2$ 기를 가지고 있을 때). 산 염을 제조하는 적당한 산은 예를 들면 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말산, 말론산, 호박산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 벤조산, 계피산, 멘델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 살리실산 같은 유기 산과 무기 지방산, 예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산과 같은 무기 산을 포함한다. 반대로, 펩티드에 나타날 수 있는 산 잔기의 염기성 염의 제제는 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 암모늄, 수산화 칼슘, 트라이메틸아민 같은 약학적으로 허용되는 염기를 사용한다.
- [0086] 특히 바람직한 구현에서 약학 조성물은 아세트산 (아세테이트), 암모늄 또는 염산 (클로라이드)의 염으로 펩티드를 갖는다.
- [0087] 암의 치료에 유용할 뿐만 아니라 본 발명의 펩티드는 진단에서도 유용하다. 펩티드가 위암 세포에서 생성이 되었기 때문에 이 펩티드는 정상 조직에서 존재하지 않는다고 밝혀졌으며, 이 펩티드는 암을 진단하는 데에 쓰일 수 있다.
- [0088] 이 조직생검에서 이 펩티드의 존재는 병리학자가 암을 진단하는 데 도움을 줄 수 있다. 항체, 질량 분광계 또는 이 계통에서 잘 알려진 다른 방법을 이용한 특정한 펩티드의 검출은 병리학자가 조직이 악성인지 염증성인지 또는 질병을 갖는 지를 말해 줄 수 있다. 이러한 기의 펩티드의 존재는 질병 조직의 하위 분류를 가능하게 할 수 있다.
- [0089] 질병 조직 검체에서의 펩티드의 검출은 면역 시스템을 포함하는 치료의 장점에 대한 결정을 할 수 있게 하며, 특히 만약 T-림프구가 활동 이전에 관련이 있을 것으로 예상될 경우 특히 유용하다. MHC 발현의 상실은 감염된 또는 악성 세포가 면역 감시를 이탈하는 방법으로 잘 알려져 있다. 따라서, 이런 펩티드의 존재는 이 분석되는 세포로부터 이 기전이 착취당하지 않는 것을 확인해 준다.
- [0090] 펩티드는 펩티드 또는 MHC 분자와 결합된 펩티드에 대한 T 세포 반응 또는 항체 반응에 대한 림프구의 반응을 분석하는 데 쓰일 수 있다. 이 림프구 반응은 예후를 알려 주는 마커로서 미래의 치료 방법에 대한 결정을 도와 준다. 이러한 반응은 또한 림프구 반응을 다른 방법(예를 들어, 단백질, 핵산, 자가 물질의 백신접종, 림프구의 양자 도입)으로 유도하려는 면역 치료 방법의 대응 마커로서 사용이 가능하다. 유전자요법의 경우에, 펩티드에 대한 림프구 반응은 부작용의 평가에서 고려될 수 있다. 림프구 반응의 감시는 이식 추적조사의 가치 있는 도구 (예, 이식편대 숙주반응의 검출)로 사용이 될 수 있다.
- [0091] 펩티드는 또한 MHC/펩티드 복합체에 대한 특정한 항체를 생성하고 개발하는 데에 사용이 될 수 있다. 이는 질병 조직의 독소 또는 방사능 물질을 목표로 하는 치료에 사용이 될 수 있다. 이러한 항체의 또 다른 사용법은 PET와 같은 영상의 목적으로 질병의 조직에 대한 방사성핵종의 표적을 들 수 있다. 이 사용법은 작은 전이를 검출

하거나 질병 조직의 정확한 크기와 위치를 결정하는 데에 유용하다. 또한, 이는 생검 샘플에 의한 병리학자의 진단을 확증하는 데에도 쓰일 수 있다.

[0092]

표 2는 본 발명에 따른 서열번호에 대한 펩티드를 보여주며 이 펩티드가 파생되는 공급원 단백질을 보여준다. 모든 펩티드는 HLA A*024 대립 유전자와 결합한다.

표 2

본 발명의 펩티드

서열번호	펩티드 코드	서열	원천 단백질
1	CDC2-001	LYQILQGIVF	CDK1
2	ASPM-002	SYNPLWLRI	ASPM
3	UCHL5-001	NYLPFIMEL	UCHL5
4	MET-006	SYIDVLPEF	MET
5	PROM1-001	SYIIDPLNL	PROM1
6	MMP11-001	VWSDVTPLT F	MMP11
7	MST1R-001	NYLLYVSNF	MST1R
8	NFYB-001	VYTTSYQQI	NFYB
9	SMC4-001	HYKPTPLYF	SMC4
10	UQCRB-001	YYNAAGFNK L	UQCRB
11	PPAP2C- 001	AYLVYTDRL	PPAP2C
12	AVL9-001	FYISPVNKL	AVL9
13	NUF2-001	VYGIRLEHF	NUF2
14	ABL1-001	TYGNLLDYL	ABL1
15	MUC6-001	NYEETFPFI	MUC6
16	ASPM-001	RYLWATVTI	ASPM
17	EPHA2-005	VYFSKSEQL	EPHA2
18	MMP3-001	VFIFKGNQF	MMP3
19	NUF2-002	RFLSGIINF	NUF2
20	PLK4-001	QYASRFVQL	PLK4
21	ATAD2-002	KYLTVKDYL	ATAD2
22	COL12A1- 001	VYNPTPNL	COL12A1
23	COL6A3- 001	SYLQAANAL	COL6A3
24	FANCI-001	FYQPKIQQF	FANCI
25	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
26	ATAD2-001	AYAIKEEL	ATAD2

[0093]

27	ATAD2-003	LYPEVFKEKF	ATAD2
28	HSP90B1-001	KYNDTFWKEF	HSP90B1
29	SIAH2-001	VFDTAIAHLF	SIAH2
30	SLC6A6-001	VYPNWAIGL	SLC6A6
31	IQGAP3-001	VYKVVGNLL	IQGAP3
32	ERBB3-001	VYIEKNDKL	ERBB3
33	KIF2C-001	IYNGKLFDLL	KIF2C

[0094]

더 많은 흥미있는 본 발명의 HLA A*024 펩티드

서열번호	펩티드 코드	서열	원천 단백질
34	CCDC88A-001	QYIDKLNEL	CCDC88A
35	CCNB1-003	MYMTVSIIDRF	CCNB1
36	CCND2-001	RYLPQCSYF	CCND2
37	CCNE2-001	IYAPKLQEF	CCNE2
38	CEA-010	IYPDASLLI	CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6
39	CLCN3-001	VYLLNSTTL	CLCN3
40	DNAJC10-001	IYLEVIHNL	DNAJC10
41	DNAJC10-002	AYPTVKFYF	
42	EIF2S3-001	IFSKIVSLF	EIF2S3, LOC255308
43	EIF3L-001	YYYVGFAYL	EIF3L, LOC340947
44	EPPK1-001	RYLEGTSCI	EPPK1
45	ERBB2-001	TYLPTNASLSF	ERBB2
46	GPR39-001	SYATLLHVL	GPR39
47	ITGB4-001	DYTIGFGKF	ITGB4
48	LCN2-001	SYNVTSVLF	LCN2
49	SDHC-001	SYLELVKSL	LOC642502, SDHC
50	PBK-001	SYQKVIELF	PBK
51	POLD3-001	LYLENIDEF	POLD3
52	PSMD14-001	VYISSLALL	PSMD14
53	PTK2-001	RYLPKGFLNQF	PTK2
54	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
55	TSPAN1-002	VYTTMAEHF	TSPAN1
56	ZNF598-001	DYAYLREHF	ZNF598
57	ADAM10-001	LYIQTDHLFF	ADAM10
58	MMP12-001	TYKYVDINTF	MMP12
59	RRM2-001	YFISHVLAF	RRM2

[0095]

60	TMPRSS4-001	VYTKVSAYL	TMPRSS4
61	TSPAN8-001	VYKETCISF	TSPAN8

[0096]

[0097]

다른 발명의 양태에서 위암에 대한 HLA A*02 결합 펩티드가 발표되었다. A*02 그리고/또는 A*24 양성인 경우, 발표된 펩티드의 혼합이 위암의 치료에 사용이 될 수 있다. 바람직한 혼합물은 2개에서 20개의 펩티드이며, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19와 20개의 펩티드의 혼합물이다.

서열번호	펩티드 코드	서열	원천 단백질
62	DIO2-001	ALYDSVILL	DIO2
63	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3
64	LMNB1-001	LADETLLKV	LMNB1
65	WNT5A-001	AMSSKFFLV	WNT5A
66	FAP-003	YVYQNNIYL	FAP
67	COPG-001	VLEDLEVTV	COPG, COPG2, TSGA13
68	COL6A3-002	FLLDGSANV	COL6A3
69	COL6A3-003	NLLDLDYEL	COL6A3
70	COL6A3-004	FLIDSSEGV	COL6A3
71	PSMC2-001	ALDEGDIAL	PSMC2
72	UBE2S-001	ALNEEAGRLLL	UBE2S
73	KIF11-001	ILSPTVVSI	KIF11
74	ADAM8-001	KLLTEVHAA	ADAM8
75	CCNB1-001	ALVQDLAKA	CCNB1
76	CDC6-001	ILQDRLNQV	CDC6
77	F2R-001	TLDPRSFL	F2R
78	OLFM4-001	TLDDLLEYI	OLFM4
79	THY1-001	SLLAQNTSWLL	THY1
80	CEP250-001	SLAEVNTQL	CEP250
81	HIF1A-001	ALDGFVMVL	HIF1A
82	KRAS-001	GVDDAFYTL	KRAS
83	MET-001	YVDPVITSI	MET
84	NCAPG-001	YLLSYIQSI	NCAPG
85	NCAPG-002	QIDDVTIKI	NCAPG
86	TOP-004	YLYGQTTTYL	TOP2A
87	TOP-005	KLDETGNSL	TOP2A
88	LAMC2-002	RLDDLKMTV	LAMC2
89	AHR-001	LTDEILTYV	AHR
90	CCNB1-002	ILIDWLVQV	CCNB1
91	CEACAM6-001	VLYGPDVPTI	CEACAM6
92	COPB1-001	SIFGEDALANV	COPB1

[0098]

93	HMMR-001	KLLEYIEEI	HMMR
94	TPX2-001	KILEDVVG	TPX2
95	TOP-001	KIFDEILVNA	TOP2A, TOP2B

[0099]

[0100]

세포 분열 주기 2 단백질 (CDC2)

[0101]

세린/트레오닌 키나제 CDC2, Cdk1 (사이클린 의존 키나제)로도 알려져 있는 CDC2는 세포 주기의 제어에 중요한 역할을 한다. 이는 G2에서 M로의 전환의 주조정기로 알려져 있다. 세포 분열 간기 끝에, A형 사이클린과 결합한다. 핵막의 붕괴 이후, A형 사이클린은 분열이 되고 사이클린 B로 대체되며, 이는 Cdc2와 함께 유사분열 촉진 요소 (mitosis promoting factor: MPF)를 형성한다. MPF는 유사 분열의 진행에 필수적이다.

[0102]

유사 분열에서 CDC2의 기능은 비중복적이며 Cdk2, 4와 6과 같은 다른 Cdk에 의해 보상이 되지 않는다. 반대로, CDC2는 G1에서 S로의 변화 과정 등과 같은 세포 주기에서도 활동을 한다고 밝혀진 바 있으며, "간기 Cdk"를 대체할 수 있다. 따라서, Cdc2는 세포 주기에서 단 하나의 필수 Cdk로 알려져 있다.

[0103]

CDC2의 과발현 또한 몇몇의 암에서 보여진 바 있다. 암 종류 중에서 CDC2의 과발현은 전립선암, 구강암, 구강 편평 암종 (OSCC), 급성 백혈병 골수암 (AML) (Qian et al.), 헬리코박터 파일로리-유발 물트 림프종 (Banerjee et al., 217-25)과 결장 암종 (Yasui et al., 36-41)에서 발생한다. 위암에서, 과발현 및/또는 향상된 활동성이 보고된 바가 있으며 (23 중의 14건), CDC2 과발현이 원인이라고 제의된 바 있다. 더 나아가, CDC2는 세포 분열 중 활동적인 유전자 중의 하나로 밝혀졌고, 만약 과발현된 경우 종양 염색체 불안정성을 일으킨다. CDC2의 억제제와 다른 Cdk는 종양치료제의 약물 후보로 고려된다 (Shapiro, 1770-83).

[0104]

비정상 스핀들 소두증 관련 단백질 (Abnormal spindle-like microcephaly associated protein -ASPM)

[0105]

비정상 스핀들 소두증 관련 단백질 유전자는 드로소필라(Drosophila) 비정상 스핀들 소두증 관련 단백질의 인간 오르토로그(orthologue)이다. 이는 신경조직발생 조절에 참여하고, 이의 돌연변이는 보통염색체열성질환 원발성 소두증을 일으킨다. ASPM은 유사 분열 시 스핀들 기동 쪽에 집중된다. ASPM의 발현은 신경교종의 표지자로 사용될 수 있으며 치료 목표가 될 잠재성을 갖는다. siRNA에 의한 ASPM 억제는 종양 세포의 증식과 신경계 줄기 세포 증식을 억제한다. ASPM 과발현은 간세포암종에서 향상된 침습성/전이성, 빠른 종양 재발과 불리한 예후를 예측한다. ASPM은 또한 불후의 세포, 암 세포, 그리고 비세포 폐암 (NSCLC) 조직에서 상향조절 된다 (Jung, Choi and Kim 703-13).

[0106]

기질단백분해효소 3 (MMP3)

[0107]

프로젤라티나아제 또는 스트로메리신 1이라고도 불리우는 MMP3은 엔도펩티다아제로서 파이프록틴, 라미닌, 엘라스틴, 프로테오글리칸 핵 단백질과 콜라겐의 비나선식 부분을 포함하는 시험관내기질 (ECM)을 절단한다. MMP는 세포 이동, 배아형성, 조직 리모델링, 혈관 형성 수용유방의 퇴화와 상처 치유 등의 몇몇의 ECM 재배열을 필요로 하는 생리학적인 과정에서 중요하다. MMP3은 역시 혈소판 응집에 중요한 역할을 한다. MMP3의 향상된 발현과 분비를 포함하는 병리학적인 상태로서는 자가 면역 염증 상태와 암을 들 수 있다.

[0108]

MMP3은 몇몇의 종양에서 과발현되며 상피조직과 중간엽세포 간의 이행 (EMT)에 역할을 한다. 이는 또한 조기 단계의 종양 생성에 기여할 수도 있으며, 이는 후성적인 변화를 발생시킴으로서 악성 표현형을 생성할 수 있다 (Lochter et al. 180-93). 발현 수준과 관련된 MMP3 프로모터의 다형성은 식도 선암종 (Bradbury et al. 793-98)과 구강 편평암 (Vairaktaris et al. 4095-100) (Liu et al. 430-35), 헬리코박터 양성 물트 림프종 같은 몇몇 암의 위험도와 예후에 영향을 끼친다고 알려져 있다.

[0109]

c-Met

[0110]

c-MET는 잠재적으로 간세포 성장 인자 (HGF)/스캐터 인자의 세포 성장, 운동, 생존, 시험관내기질 용해와 혈관 생성을 비롯한 종양발생 활동을 증대한다. HGF와의 결합은 ras, 포스포티딜 이노시톨 3'-키나제, 포스포리파제 C γ , 그리고 미토젠-활성화된 단백질 키나제 관련 경로 같은 다운스트림 신호 이벤트를 활성화 한다 (Dong et al. 5911-18; Furge et al. 10722-27; Furge, Zhang, and Vande Woude 5582-89; Montesano et al. 355-65; Naldini et al. 501-04; Ponzetto et al. 4600-08). C-Met 유전자는 주로 상피 세포에서 발현된다. C-MET의 종양 생성 활동 (비상피세포에서 역시)은 증폭/과발현, 돌연변이 활성화, HGF/c-Met 자가분비 루프의 획득 또는 기본 인산화로부터 발생할 수 있다 (Di Renzo et al. 147-54; Ferracini et al. 739-49; Fischer et al. 733-

39; Koochekpour et al. 5391-98; Li et al. 8125-35; Maulik et al. 41-59 ;Qian et al. 589-96; Ramirez et al. 635-44; Tuck et al. 225-32) (Nakaigawa et al. 3699-705). c-Met의 HGF-과발현 유전자 삽입 쥐에서의 기본 활성화는 폭넓은 종양 형성을 촉진한다 (Takayama et al. 701-06; Wang et al. 1023-34). MET의 침묵화는 종양 성장과 전이를 억제한다 (Corso et al. 684-93). MET의 증폭은 인간 위암 진행과 관련된 것으로 보여진 바 있다 (Lin et al. 5680-89) (Yokozaki, Yasui, and Tahara 49-95).

[0111] 유비퀴틴 카르복실-말단 가수분해 효소 L5 (UCHL5)

[0112] 유비퀴틴 C-말단 가수분해 효소 (UCH37) 또는 INO80으로도 알려진 유비퀴틴 카르복실-말단 가수분해 효소 L5(UCHL5)는 탈유비퀴틴화효소로서 프로테아솜과 관련이 있다. 이는 단백질에 첨부되어 있는 말초 끝으로부터 C-말단의 Cys76과 Lys48 사이의 유사 펩타이드 결합을 분해하여 폴리유비퀴틴 쇄를 분열한다 (Nishio et al., 855-60). 핵에서, UCHL5가 Ino80 크로마틴-리모델링 결합체와 관련이 있다. 프로테아솜과 결합을 하면서, 이는 활성화가 되고 전사 또는 DNA 수리에 관여할 수 있으며 이는 Ino80과 프로테아솜에 의해 중재된다고 제의된 바 있다.

[0113] 유비퀴틴 특정 UCHL5와 같은 프로테아제는 세포 주기의 진행, 분화, DNA 복제와 수리, 전사, 단백질 품질 관리, 면역 반응 그리고 세포 자멸사 등을 비롯한 몇몇의 과정과 관련이 있다. UCHL5가 악성 변환에 기여한다는 몇몇의 증거가 있다. 이의 활동은 정상 조직에 비교했을 때 인간 자궁경부암 조직에서 상향조절된다고 밝혀졌다. 이는 TGF-베타 수용체를 탈유비퀴틴화시키고 이의 하류 중재자, Smads를 안정시킬 수 있으며, 따라서 TGF-베타 신호를 강화시킨다. TGF-베타 신호가 강화되면서 종양 촉진자로서 암의 말기에 이용이 될 수 있으나, 다른 한편으로는 이는 역시 암 초기와 개시 전에 암 억제자로 활동할 수 있다 (Bierie and Moses 29-40; Horton et al. 138-43; Wicks et al. 8080-84; Wicks et al. 761-63).

[0114] 포식세포-자극 단백질 수용체 (MST1R)

[0115] MST1R (별명 RON) 수용체는 세포 표면 수용체 티로신 키나제 Met 계열은 일원으로서 이는 상피 세포와 포식세포에서 주로 발현된다. MST1R은 리간드에 의해 세포 이동, 침습, 증식과 생존을 유도할 수 있다. 종양 생성 성질은 생체 외와 동물 모델 생체 내 실험에서 보여진 바 있으며, 이는 인간 암에서 종종 규칙을 따르지 않은 상태로 제어된다 (Dussault and Bellon, 2009). 임상 실험은 MST1R 과발현이 불량한 진단과 전이와 관련되어 있다고 밝혔다. MST1R 발현은 위암종 조직과 이에 상응하는 신생물발달 조직에서 상당한 수준으로 발현된다. 전립선암 세포의 MST1R 유전자 적중 (knockdown) 시, 이는 감소된 생체 외에서 감소된 내피세포의 화학쫄림성과 감소된 종양 성장과 전립선의 생체 내 정위 이식 후 감소된 미세혈관 밀도의 결과를 낳는다. 강하게 종양생성의 성질이 있는 대장암 세포주에서의 siRNA-매개 MST1R의 유전자 적중은 대조군 세포에 비교했을 시 세포 증식이 감소하였다.

[0116] 키네신 유사 단백질 (KIF2C)

[0117] KIF2C는 미세관 디폴리머라제로서 방추 형성 시 동원체-미세관의 부착을 조절한다. 이는 후기 염색체 분리에 중요하며 이는 자매 염색 동원체 분리의 시작을 조절하는 데 필요할 수도 있다. 방해된 동원체로의 미세관 부착은 염색체 이상 분리와 이수배수체를 일으키며, 이는 대부분의 고체 종양에서 보여진다 (Maney et al. 67-131; Moore and Wordeman 537-46). KIF2C는 유방암 (Shimo et al. 62-70), 결장암, 결장직장암과 위암 세포에서 과발현된다 (Nakamura et al. 543-49). KIF2C를 안정적으로 발현하는 위암 세포주 (AZ521)는 가상 형질감염된 세포와 비교했을 시 증가된 증식과 이동을 보인다. 위암에서의 KIF2C의 증가된 발현은 림프계 침투, 림프절 전이와 불량한 예후와 관련이 있을 수 있다. KIF2C에 대한 siRNA를 사용한 유방암 세포의 치료는 이들의 성장을 억제한다.

[0118] 염색체 구조 유지 단백질 4 (Structural maintenance of chromosomes proteins 4, SMC4)

[0119] 염색체 구조 유지 (SMC) 단백질은 염색체 ATPase로서 이는 고차원의 염색체의 조직과 역학과 관련 역할을 한다. SMC4 단백질은 콘텐신 합성체의 핵심 구성 요소이며 이는 크로마틴 응축에 역할을 하며 핵소체 분리, DNA 수리, 그리고 크로마틴 비계의 유지와 관련이 있다. SMC4 유전자는 정상적인 전립선과 침샘에서 높게 발현이 되며, 결장, 췌장과 소장에서 낮게 발현이 되고, 다른 조직에서는 전혀 발현이 되지 않는다. 유방, 전립선, 결장, 췌장암을 포함한 많은 암 세포주와 암 검체에서 RNA가 높은 수준으로 발현이 되는 것이 관찰되었다 (Egland et al. 5929-34).

[0120] 에프린 (Ephrin) 타입-A 수용체 2 (EPAH2)

- [0121] Eph 수용체는 수용체 티로신 키나제 (RTK)의 유일한 계열로서 배아형성 중 배아 패턴링, 신경표적화와 혈관 발달에서 중요한 역할을 한다. ephrin-A1 리간드에 의한 EphA2의 자극은 EphA2 자가인산화를 일으키며, 이 자극은 종양화 변화를 역전시킨다. Eph 수용체와 그들의 리간드 에프린은 종종 많은 종류의 암에서 과발현된다. EphA2는 공격적인 암 세포에서 종종 과발현되고 기능적으로 변화를 거치며, 이는 세포-시험관내 기질 유착과 고정독립 성장과 혈관형성을 통해 종양 성장을 돕는 것으로 알려졌다. EphA2와 에프린A-1의 과발현은 위암에서 보여졌으며, 이는 종양 침습, 종양-결-전이 (TNM) 단계, 림프절 전이와 불량한 예후와 관련이 있다 (Yuan et al. 2410-17).
- [0122] ATAD2
- [0123] ATAD2 (ANCCA로도 알려진) AAA+ ATPase 계열의 단백질의 새로운 멤버이다. 이는 안드로젠 수용체 (AR)와 에스트로젠 수용체 (ER)의 전사 활동을 향상시키며, 이는 각각 IGF1R, IRS-2, SGK1과 생존하는 (AR)과 cyclinD1, c-myc와 E2F1 (ER)의 전사를 불러 일으킨다. 이는 또한 c-Myc의 전사 활동을 향상시킨다. ATAD2 발현은 몇몇의 유방암, 전립선암, 뼈육종을 비롯한 인간 종양에서 높은 수준으로 보여진다. 이의 발현은 불리한 예후와 관련이 있다.
- [0125] AVL9
- [0126] 놀랍게도 이 단백질은 공급원 단백질로 발견이 되었으며, AVL9 단백질과 이에 상응하는 유전자에 대한 단지 몇몇의 제한적인 데이터만이 존재한다.
- [0127] 콜라겐 알파-1 (XII) 쇠 단백질 (Col12A1)
- [0128] 콜라겐 알파-1 (XII) 쇠는 인간에서 COL12A1 유전자로서 코딩되는 단백질이다. 이 유전자는 FACIT (불연속 삼중나선을 가진 피브릴 관련 콜라겐)의 멤버인 타입 XII 콜라겐의 알파 쇠를 코딩한다. 타입 XII 콜라겐은 동종 삼합체이며 이는 타입 I 콜라겐과 관련하여 발견이 되며, 이 관련은 콜라겐 I 피브릴과 주변 기질의 연관을 변경하는 것으로 보여진다. 다르게 스플라이싱된 전사물의 변이체가 코딩하는 다른 이성질형이 발견되었다.
- [0129] 콜라겐 알파-3 (VI) 쇠 단백질 (COL6A3)
- [0130] COL6A3은 타입 VI 콜라겐의 세 개의 알파 쇠 중의 하나인 알파-3 쇠를 코딩한다. 이 단백질 도메인은 시험관내 기질 단백질과 결합하는 것으로 밝혀졌으며 이 상호작용은 콜라겐이 기질 성분을 정리하는데 중요한 역할을 하는 것을 설명한다. 콜라겐 VI의 과발현을 통한 시험관내 기질 리모델링은 난소암 세포의 시스플라틴 내성에 기여한다. 콜라겐 VI의 존재는 종양 등급과 난소암 예후 인자와 관련이 있다 (Sherman-Baust et al. 377-86). COL6A3은 결장직장 종양 (Smith et al. 1452-64), 침샘암 (Leivo et al. 104-13)과 다르게 발현된 위암 (Yang et al. 1033-40)에서 과발현된다. COL6A3은 7개 유전자 중의 하나의 종양 특정 스플라이스 변형으로 식별되었다. 검증된 종양 특정 스플라이스 변화는 높은 수준으로 일치하며, 이는 정상과 암 샘플을 분류하는데, 그리고 몇몇의 경우에는 더 나아가 다른 종양의 단계를 분류하는 데에 쓰일 수 있다 (Thorsen et al. 1214-24).
- [0131] 판코니 빈혈. 상보성집단 I (FANCI)
- [0132] FANCI DNA 손상에 반응하여 단백질은 크로마틴에 국한성을 가지며, 이는 DNA 수리에 관여한다 (Smogorzewska et al. 289-301). FANCI 유전자의 돌연변이는 판코니 빈혈을 일으키며, 이는 유전자적으로 열성 질병이고 이의 성질은 세포유전적 불안정, DNA 교차 결합제에 대한 과민 반응, 증가된 염색체 파손과 결손 DNA 수리 등을 포함한다. FANCI의 대체 스플라이싱은 두 개의 전사 변이체가 다른 이성질형을 코딩하는 결과를 초래한다.
- [0133] 열충격단백질 90kDa 베타 멤버 1 (HSP90B1)
- [0134] HSP90 (또한 포도당-조정 프로틴 94, Grp 94로도 알려진) 멤버 1은 인간 샤페론 단백질이다. 이는 번역, 단백질 품질 관리와 ER-관련 분해 (ERAD), ER 스트레스 센싱과 칼슘 결합/칼슘의 ER에서의 유지 (Christianson et al. 272-82; Fu and Lee 741-44) 등을 포함한 ER-관련 과정에 참여한다. HSP90은 ER-유지 단백질의 전형적인 KEDL 서열을 포함하지만, 이는 종양 세포의 표면에 역시 나타나며 (Altmeyer et al. 340-49), 또한 세포 외에서도 나타난다. HSP는 세포 자멸사 세포를 제외한 괴사 세포와 열충격과 산화스트레스를 포함한 여러 가지의 자극을 받은 세포에서 분비되는 것으로 알려져 있으며 이는 순환 중 일어날 수 있다 (Basu et al. 1539-46; Tsan and Gao 274-79). 세포 외에서 HSP90은 면역 반응을 조정하며 (주로 자극), 이는 항원 제시에 관여한다. 세포 표면

에서, 이는 병원체 침입의 수용체 및/또는 신호에 관여할 수 있다 (Cabanes et al. 2827-38). 종양 특정 세포 표면 발현 또는 분비는 항암 면역을 유도할 수 있다 (Zheng et al. 6731-35). HSP90-기반 백신은 암과 전염병에 대해서 예방과 치료 프로토콜의 두 방면에서 다 면역력을 기부하는 것으로 보여졌다 ((Bolhassani and Rafati 1185-99; Castelli et al. 227-33; Murshid, Gong, and Calderwood 1019-30)에서 검토됨). 하지만 HSP90은 또한 다음과 같은 이유로 암 치료에서 고려될 수 있다. 1) 이는 종양 진행과 관련이 있으며 이는 세포 자멸사, 방사선 손상이나 화학치료에 대한 내성을 보여준다. 그리고 2) 이는 위암, 백악종 (Guo et al. 62-67), 유방암 (Hodorova et al. 31-35)과 같은 종양에서 과발현된다. HSP90의 과발현은 위암의 공격성이 있는 행동과 불량한 예후와 관련이 있다 (Wang, Wang, and Ying 35-41; Zheng et al. 1042-49). 위암 세포에서의 HSP90의 하향조절은 위암 세포 자멸사를 초래한다 (Sheu, Liu, and Lan e1096).

[0135] Muc 6

[0136] MUC6은 점액 세포에서 발현이 된다. 이의 일차 기능은 부식성 또는 단백질 분해제로의 계속된 노출과 같은 손상으로부터의 약한 상피 세포의 보호라고 생각이 된다 (Toribara et al., 1997). MUC6은 또한 상피 기관발생의 역할을 할 수 있다 (Reid and Harris, 1999). MUC6 발현은 정상 위 점액에서 발견이 된다. 이는 장 샘종과 암종, 폐암종 (Hamamoto et al. 891-96), 결장직장 폴립 (Bartman et al. 210-18)과 유방암종 (Pereira et al. 210-13)에서 과발현되는 반면, 이는 상응하는 정상 조직에서는 발현되지 않는다. 점액 암종에서의 높은 수준의 MUC6의 발현은 이가 암의 확대를 막는 장벽의 역할을 한다는 것을 제안하며, 이는 그들이 덜 공격적인 행동을 하는 결과를 낳는다 (Matsukita et al. 26-36). MUC6 발현은 다른 샘종 또는 정상 조직과 비교할 시 위암에서 낮게 나타나며, 이는 종양 크기, 침습의 깊이, 림프와 정맥의 침습, 림프절 전이와 UICC 단계와 반대의 상관 관계를 보인다. MUC6의 하향조절은 위암에서 위 상피 세포와 이들의 분자 기반의 성장, 침습, 전이와 분화의 악성 전환에 기여할 수 있다 (Zheng et al. 817-23). 또한 위암의 주요한 원인인 헬리코박터 파일로리의 감염이 MUC6의 낮은 발현과 관련이 있다는 증거가 있다 (Kang et al. 29-35; Wang and Fang 425-31).

[0137] 동원체 단백질 Nuf2

[0138] NUF2 (CDCA-1) 유전자는 효모 Nuf2와 높은 수준으로 유사한, 보존된 단백질 동원체와 관련된 결합체의 단백질을 코딩한다. 효모 Nuf2는 감수 분열 전기에서 동원체가 이의 스핀들 극체와의 결합을 잃을 시 동원체로부터 사라지며 이는 동원체 분리 조정의 역할을 한다. 이는 서바이빈과 hNuf2 csRNA가 임시적으로 유전자를 적중시키고 이는 다핵화를 일으키며 유사분열을 정지시켜 세포 죽음을 발생시키는 것을 나타냈다 (Nguyen et al. 394-403). Nuf2와 Hec1은 동원체의 오리엔테이션에 극을 향한 힘의 유지를 위한 바깥 판의 안정된 미세관 플러스엔드 결합 사이트의 조직에 필요하다 (DeLuca et al. 519-31). Nuf2 단백질은 NSCLC (Hayama et al. 10339-48), 자궁경부암 (Martin et al. 333-59)에서 과발현되는 것으로 알려졌으며 이는 불량한 예후와 관련이 된다. 외과적으로 제거된 위암 조직에서 (광범위 타입, 6: 장 타입, 4), NUF2의 2개의 변이체가 상향조절되었다. 다른 스플라이싱 변형형은 이 연구에서 검출되었으며 이는 잠재적으로 진단 마커 및/또는 새로운 항암 치료의 목표로서 사용될 수 있다 (Ohnuma et al. 57-68).

[0139] siRNA-매개 NUF2의 유전자 적중은 NSCLC, 난소암, 자궁경부암, 위암, 결장직장암, 신경종양에서 세포 증식과 세포자살 유도를 억제하는 것으로 밝혀졌다.

[0140] 지질 인산염 인산 가수분해효소 2 (PPAP2C)

[0141] 포스파티드산 포스파타아제 (PAP)는 인산을 다이실글리세롤로 전환시키고 글리세로지질의 신생 합성과 인산지방질 가수분해효소 D에 의해 중재되는 수용체-활성화 신호 형질 도입에 관련이 있다. 각자 다른 이성질형을 코딩하는 세가지의 다른 방법으로 스플라이싱된 전사 변이체가 보고되었다. PAAP2C는 전환된 일차 인간 성인 중간엽 줄기 세포 (MSC), 많은 인간 종양에서 상향조절된다. 이는 증가된 세포 증식에 필요할 수도 있다. 촉매적으로 비활동적인 돌연변이가 아닌, PAAP2C의 과발현은 S-상으로의 미숙한 진입을 야기하였으며, 이는 미숙한 사이클린 A 축적을 일으켰다. 유전자 적중은 세포 증식을 감소시키고 S 상으로의 진입을 억제했다 (Flanagan et al. 249-60).

[0142] 40S 리보솜 단백질 S 11은 단백질이다 (RPS11)

[0143] 리보솜은 작은 40S 아단위와 큰 60S 아단위를 갖는다. 같이 이 아단위들은 4개의 RNA 종으로 이루어져 있으며 약 80개의 구조적으로 다른 단백질이다. 이 RPS11 유전자는 40S 아단위의 한 구성원인 리보솜 단백질을 코딩한다. RPS11은 결장직장암 진단의 대변 RNA-기반 마커의 6개의 유전자 중에 하나이다. 이는 특별히 암 환자의 대장세포에서 과발현된다 (Yajima et al. 1029-37).

- [0144] 압센티아 동족체 2에서 E3 유비퀴틴-단백질 리가제 7 (SIAH2)
- [0145] SIAH2는 E3 유비퀴틴 리가제이다. 이의 기질 중에 베타-카테닌, TRAF2와 DCC (결장직장암에서 결실됨) (Habelhah et al. 5756-65; Hu and Fearon 724-32; Nakayama, Qi, and Ronai 443-51)가 존재한다. SIAH2는 또한 핵 단백질 repp86의 분해를 초래하며, 이는 이 단백질의 과발현으로 유도된 유사 분열 정지의 폐기를 야기한다 (Szczepanowski et al. 485-90). SIAH2는 종양 촉진, 그리고 전이 촉진의 성질을 가지고 있으며 이는 2개의 경로를 통해 진행되었으며 이는 문헌 (Nakayama, Qi, and Ronai 443-51)에서 평가되었다: 첫 번째로, 이는 저산소 반응 경로의 단백질의 유비퀴틴화와 분해를 일으키며 이는 저산소 유도 인자 (HIF)의 전사를 향상시킨다 (Nakayama, Qi, and Ronai 443-51) (Calzado et al. 85-91). 두 번째로, 이는 Ras/ERK 신호의 특정한 억제제인 Sprouty2를 저하시킨다. SIAH2 활동은 체장 종양 생성과 관련이 있으며 이는 Ras 신호 체계를 통한 것이라 생각된다 (Nakayama, Qi, and Ronai 443-51).
- [0146] SIAH2의 암에서의 역할이 부분적으로는 논쟁의 여지가 있으나, 몇몇의 보고서는 낮은 수준의 SIAH2가 더욱 불리한 예후나 치료 반응과 관련이 있다고 하고 (Confalonieri et al. 2959-68) (Jansen et al. 263-71), 다른 몇몇의 보고는 이가 종양 생성의 기능을 보인다고 한다 (Frasor et al. 13153-57). SIAH2 억제는 항암 치료에 고려된 바 있으며 이는 흑색종 쥐 모델의 이종이식의 성장 (Qi et al. 16713-18; Shah et al. 799-808)과 누드 쥐로 주입된 인간 폐암 세포주의 성장 (Ahmed et al. 1606-29)을 억제한다고 보여졌다.
- [0147] 나트륨과 클로라이드 의존 타우린 전달체 (SLC6A6)
- [0148] SLC6A6은 나트륨과 클로라이드 의존 타우린 전달체 (TauT)이다 (Han et al., 2006). 타우린 전달체 녹아웃 (tau-/-) 쥐는 미토콘드리아 기능장애를 연루할 수 있는 타우린 결핍에 의해 만성 간질환을 겪을 수 있다 (Warskulat et al., 2006). SLC6A6의 발현은 p53 종양 억제 유전자에 의해 억제될 수 있으며, WT1, c-Jun과 c-Myb와 같은 원종양유전자에 의해서 트랜스액티베이션될 수 있다. SLC6A6의 과발현은 신장 세포를 시스플라틴 유도 종팔독성으로부터 보호할 수 있다 (Han et al., 2006; Han and Chesney, 2009). SLC6A6 mRNA 발현은 인간 장 상피 Caco-2 세포의 종양 괴사 인자 알파 (TNF-알파)에 의해 상향조절된다 (Mochizuki et al., 2005).
- [0149] 유비퀴틴-사이토크롬 c 환원 효소 결합 단백질 (UQCRB)
- [0150] UQCRB-유전자에 의해 코딩된 단백질은 유비퀴틴-사이토크롬 c 환원 효소 결합 단백질 합성체의 한 요소이다. 유비퀴틴에 결합을 하고 전자의 이동에 관여한다. 이 유전자의 돌연변이는 미토콘드리아 합성체 III 부족과 관련이 있다. 유사 유전자가 X 염색체에서 묘사된 바 있다.
- [0151] UQCRB-유전자는 잠재적으로 체장담도암의 암유전자 또는 종양 억제 유전자일 가능성이 있다 (Harada et al., 2009). UQCRB-유전자는 간세포암에서 과발현된다 (Jia et al., 2007).
- [0152] 인간 상피 성장 인자 수용체 3 (ERBB3)
- [0153] ERBB3은 티로신 키나제의 수용체 계열인 인간 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)를 코딩한다. 이는 뉴레굴린, 다른 ERBB와 비ERBB 수용체를 비롯한 다른 키나제에 의해 새로운 기전에 의해 활성화가 된다. 하류에서는 이는 대부분 포스포이노시톨 3-키나제/AKT 생존/유사분열 경로와 상호작용을 하지만, GRB, SHC, SRC, ABL, rasGAP, SYK와 다른 전사 규제자 EBP1과 상호작용을 한다 (Sithanandam and Anderson 413-48). ERBB3 과발현은 위암을 비롯한 많은 암에서 발견이 되며 이는 주요 원인 역할을 하며 예후에 불리한 영향을 끼칠 수 있다 (Kobayashi et al. 1294-301) (Slesak et al. 2727-32). 문헌 (Zhang et al. 2112-18)은 ERBB3의 과발현이 위암의 퍼진 타입 (26.2%)에서 위장 타입 (5.0%)과 비교할 시 더 자주 일어난다고 보여졌다. 두 가지 다의 타입에서, 과발현은 불량한 예후와 관련이 있다. ERBB3의 암치료에서의 표적 개발의 방법으로는 시험관내 도메인의 RNA 압타머 (Chen et al. 9226-31), 합성 전사 인자에 의한 유전자 발현 정지 (Lund et al. 9082-91), 비타민 E 이소머 γ -토코트라이에놀과 같은 작은 분자 억제제 사용 (Samant and Sylvester 563-74), miRNA (Scott et al. 1479-86) 및 siRNA (Sithanandam et al. 1847-59)를 들 수 있다.
- [0154] 프로모닌 1 (Prom1)
- [0155] 기능: CD133으로도 알려진 프로모닌-1은 원래 CD34+ 조혈모세포로 발견이 되었으며 (Yin et al., 1997) 후에 여러 조직의 정상 줄기 세포와 암 줄기 세포 (CSCs)의 마커로 사용이 되었다. 상피세포의 미세용모 등 플라스마 막의 돌출부의 끝에 대부분 위치하기 때문에, 이는 플라스마 막의 토폴로지의 구성에 연관된 기능을 할 수도 있다. 콜레스테롤과 상호 작용하는 것으로 알려져 있기 때문에, 이는 플라스마 막의 적당한 지방의 구성을 유지하는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 27개의 아미노산의 엑손을 지니고 있지 않은 작은 프로모닌-1의 스플라이스

이성질형 AC133-2가 더 나은 마커로 사용이 될 수 있다고 제안된 바 있다 (Mizrak et al., 2008; Bidlingmaier et al., 2008). 단지 작은 백분율의 종양 세포가 보통 프로미닌-1 양성을 나타내며 이는 CSC 마커로서 예상되는 것이다. 종양 타입에 따라, 종양 질량 별 양성 세포의 숫자는 1에서 15%까지이며 대부분 2% 주변이다.

[0156] 프로미닌-1은 종양 형성, 혈관 형성, 화학내성 등과 관련이 된 바 있다 (Zhu et al., 2009a) (Bruno et al., 2006; Hilbe et al., 2004) (Bertolini et al., 2009). 하지만, 프로미닌-1 양성 세포는 NK 세포에 의해 (Castriconi et al., 2007; Pietra et al., 2009) 그리고 세포독성 T 세포에 의해 (Brown et al., 2009) 사멸이 되듯이, 면역 체계로부터 접근이 가능할 수 있다. 많은 종양에서 프로미닌-1 양성 세포가 기능적으로 CSC라는 것이 밝혀졌고 이의 발현이 불량한 예후와 종종 관련이 된다고 밝혀진 바 있지만, 아직도 이에 대한 논쟁은 끊이지 않는다. 몇몇의 보고서는 이가 CSC를 식별하는 데 필요하지도 않고 충분하지도 않다고 한다 (Cheng et al., 2009; Wu and Wu, 2009). 프로미닌-1과 CD44와 같은 다른 분자 또는 프롬1(+), CD34(+), CD44(+), CD38(-), CD24(-) 등과 같은 복수의 결합체가 더 나은 CSC 마커로 활동할 수 있을 가능성이 있다 (Zhu et al., 2009b; Fulda and Pervaiz, 2010).

[0157] 퍼진 위암 타입에서, PROM1 발현은 실리코 분석에 따라 제안되었으며 (Katoh and Katoh, 2007) 이의 보통 위조직과 비교했을 시에 과발현이 문헌 (Smith et al., 2008)에 의해 보고된 바 있다. 하지만, 문헌 (Boegl and Prinz, 2009)은 프로미닌-1 발현이 위암에서 감소되었다고 보고된 바 있으며, 이는 위암의 후기 단계에서 더 낮은 수준으로 나타났다고 밝혔으며, 이로 인해 프로미닌-1의 발현이 종양 성장 보다는, 후기 단계에서 더 낮게 나타나는 혈관 생성과 관련이 있다고 보고했다. 위암 세포주를 사용한 연구에서 문헌 (Takaishi et al., 2009)은 프로미닌-1이 아닌 CD44가 CSC 마커라고 보고했다.

[0158] 기질단백분해효소 11 (MMP11)

[0159] 다른 기질단백분해효소와 마찬가지로, 기질단백분해효소 11 (MMP11)은 엔도캡티다아제로서 개발과 같은 조직 리모델링, 상처 치유와 흉터 생성과 같은 기능이 있다. 또한 지방 세포 분화를 통해 지방 항상성을 부정적으로 규제한다고 알려져 있다. 다른 MMP와 반대로 이는 콜라겐 VI을 제외하고는 보통 세포 외 기질 분자의 분열을 할 수 없다. 하지만, 알파 2-마크로글로불린, 알파 1 항트립신 인슐린양 성장 인자 결합 단백질-1과 라미닌 수용체를 포함한 특정한 세린 프로테아제 억제제 (serpins)와 같은 다른 기질 역시 식별되었다. MMP11은 침습성 유방암 주변의 기질 세포에서 특별히 과발현되는 유전자로 발견되었다. 이는 많은 종양에서 발견이 되었다. MMP11이 거의 모든 침습 인간 암의 간질에서 과발현되나, 육종과 비상피종양에서는 거의 발현되지 않는다고 알려져 있다. 대부분, MMP11은 종양의 바로 옆에 있는 기질 세포에서 발현이 되고, 종양 세포, 정상 조직과 종양에서 멀리 떨어져 있는 기질 세포는 음성을 나타낸다. MMP11의 높은 수준은 악성 표현형/높은 침습성과 불량한 예후와 연관되어 있다. 하지만, 상선 유두암에서는 MMP11 발현이 침습적인 성질과 반대로 연결이 되어 있다. MMP11은 위암 환자의 혈청과 종양 조직에서 감지되며, 이의 발현은 전이와 관련이 있다 (Yang et al.). 더 나아가, 문헌 (Deng et al., 274-81)은 MMP11이 위암의 종양 세포주와 일차성 종양에서 높은 수준으로 발현됨을 밝혔으며, 이는 다른 암 종류가 기질에서만 이를 발현하는 것과 차이가 있으며, 이는 종양 세포의 진행을 향상시킨다.

[0160] 핵 전사 인자 Y 아단위 베타 (NFYB)

[0161] NFYB는 또한 CBF-B 또는 CBF-1이라고 알려져 있으며, 이는 많은 유전자의 촉진자와 증강인자의 NFYA와 NFYC와 함께 CCAAT 모티브 (또는 Y-box라고 불리는 반대의 모티브 ATTGG)와 결합하는 헤테로삼합체 기반 전사 인자 NF-Y (또한 CCAAT-결합 인자 또는 CBF)의 구성인자이다. NF-Y 표적 유전자 중에 MHC 클래스-II 유전자, PDGF 베타 수용체, 몇몇의 열충격단백질, 불일치 수리 유전자 hMLH1, 그리고 국소이성화효소 II 알파를 들 수 있다.

[0162] NFYB는 전형적인 발암유전자가 아니지만, 이의 기능은 종양발생에 기여할 수 있다. 첫 번째로, 사이클린 A, 사이클린 B1, 오로라 A와 cdk1을 포함한 많은 세포 주기 유전자가 NF-Y의 표적이다. 세포는 기능적인 NFYB가 없이는 G2/M 단계에서 정지된다. 문헌 (Park et al.)은 사이클린 B2를 비롯한 다른 세포 주기 관련 유전자들의 결장직장 선암종에서의 상향조절이 NF-Y의 활동 때문일 것이라고 주장한다. 두 번째로, NF-Y 활동은 세포 자살에 대한 반대작용을 한다. NF-Y를 지니지 않은 세포는 p53 활성화와 Bcl-2와 같이 촉진자에 CCAAT-박스를 갖는 항세포자살 유전자를 통해 세포 자살을 겪는다 (Benatti et al. 1415-28). 세 번째로, 이의 종양 형성 성질은 다른 전사 인자와 결합함으로써 향상된다. 예를 들면, p53의 돌연변이는 NF-Y와 p300 단백질에 결합을 하며, 이로 인해 NF-Y 유도 세포 주기 유전자의 발현이 증가한다.

[0163] ABL1

[0164] 이 단백질 티로신 키나제 c-Abl은 핵과 세포질 사이를 왕복한다. 핵 c-Abl은 세포 성장 억제와 세포자살을 유도

하는 반면, 세포질 c-Abl은 성장 인자와 인테그린 리간드를 비롯한 시험관내 자극에 대한 액틴 다이내믹, 형태 형성과 신호전달에서 역할을 할 수 있다. 세포질 c-Abl은 유사분열을 촉진하는 것으로 보고된 바 있다.

[0165] C-Abl 단백질의 활동은 SH3 도메인에 의해 부정적으로 조절이 되며, SH3 도메인의 결실은 ABL1을 발암유전자로 변이시킨다. 만성골수백혈병 (CML)에서 이 유전자는 염색체 22의 BCR (변곡점 클러스터 지역) 유전자의 트랜스 로케이션으로 인해 활성화된다. 이 결과로 형성된 융합 단백질 BCR-ABL은 세포질로 이동을 하고 이는 세포가 사이토카인의 영향을 받지 않고 증식을 하도록 한다 (Zhao et al.). c-Abl 활동성은 유방암과 NSCLC에서 보여진 것처럼 고체 종양에서 상향조절된다. 과발현은 불충분하며 기본구성의 키나제 활동이 단백질 인산화에 필요하다. 유방암 세포에서, c-Abl 인산화는 SFK, EGFR 계열 멤버와 IGF-1 수용체를 포함한 형질막 티로신 키나 제에 의해 유도된다. ABL 융합 단백질은 고체 종양에서 검출된 바가 없다 (Lin and Arlinghaus, 2008). ABL은 위암에서 그리고 관련된 미세혈관에서 발현이 되는 것으로 나타났으며, 이는 혈관 생성에서의 가능한 역할을 제안한다. 중요하게, 헬리코박터 파일로리 세포독성-연관 유전자 A (CagA)는 c-Abl의 활성화를 불러 일으키고, 따라서 EGFR을 인산화하며, 따라서 EGFR 세포내 섭취를 억제한다 (Bauer, Bartfeld, and Meyer 156-69). 몇몇의 티로신 키나제 억제제가 Abl에 특정하다. 이마티닙 (Imatinib) (글리벡 (Gleevec))은 KIT를 표적화한다 (Pytel et al. 66-76) (Croom and Perry, 2003). CML의 일차 치료 요법으로 사용되며 말기 위장장기질종양 (GIST) 환자 에 대한 사용이 허가되었다. 암 치료에 사용되는 다른 억제제로는 다사티닙 (Dasatinib)과 닐로티닙 (Nilotinib) (Pytel et al. 66-76) (Deremer, Ustun, and Natarajan 1956-75)이 있다.

[0166] 폴로 유사 키나제 4 (Plk4)

[0167] 폴로 키나제 계열 멤버 (Plk1-4)는 세포 분열에 중요하며, 유사분열의 몇몇의 단계를 조절한다. Plk4는 중심소 체 형성과 복제를 정리한다 (Rodrigues-Martins et al. 1046-50). Plk1이 확실히 발암유전자인 반면, Plk4 암 에서의 기능은 불확실하다. Plk4의 하향조절과 과발현이 모두 인간, 쥐와 파리의 암과 관련이 있다 (Cunha-Ferreira et al. 43-49). 예를 들면, 직장암에서, Plk4는 과발현이 되지만, 작은 숫자의 환자에서는 강한 Plk4 하향조절이 보고되었다 (Macmillan et al. 729-40). 이는 Plk4의 과발현과 결핍이 이상한 중심소체 형성을 일으 키며, 이는 종양 세포에서 종종 찾아 볼 수 있는 비정상적인 세포중심체의 숫자의 결과를 낳으며, 이로 인해 이 상적인 유사 분열을 불러 일으키고, 따라서 염색체의 분리가 잘 못 일어나며 이수배수체의 결과를 낳는 것으로 설명이 가능하다 (Peel et al. 834-43). (Kuriyama et al. 2014-23). (Korzeniewski et al. 6668-75).

[0168] IQ 모티프 포함 GTPase 활동 단백질 3 (IQGAP3)

[0169] IQGAP는 세포 신호 경로와 세포 골격 건축과 세포 유착에 관련한다. 이는 RasGAP와 비슷한 서열을 갖는 도메인 을 가지고 있으며, 이는 작은 GTPase와 결합을 한다. 하지만 (이름에도 불구하고), 이들 중의 단 하나도 GTPase 활동화 활동을 가지고 있지 않다. IQGAP1과 IQGAP2에 대해 이들은 Rac1과 Cdc42의 GTP-결합 상태를 안정시킨다 고 밝혀진 바 있으며, IQGAP3은 활성화된 Ras를 안정시킨다고 보고되었다 (Nojima et al. 971-78; White, Brown, and Sacks 1817-24). 그들의 IQ-도메인을 통해서 그들은 칼슘/칼모둘린과 결합을 하며, 칼포닌 상동성 도메인에 의해 액틴 필라멘트에 결합을 한다 (White, Brown, and Sacks 1817-24). 문헌 (Wang et al. 567-77)은 IQGAP3이 뇌에서 발현이 된다고 보고하며, 이는 액틴 필라멘트와 Rac1과 Cdc42와 관련이 있다. 이는 액손 의 말단을 축적하며 이는 Rac1/Cdc42-의존 액손 증식을 촉진한다. IQGAP는 암에 관련이 된 바 있다. IQGAP1은 발암유전자로 고려가 된다. 이는 몇몇의 MAP 키나제, 베타-카테닌과 VEGF-매개 신호와 같은 암 관련 경로를 향 상시키며, 이는 많은 종양에서 과발현된다. IQGAP2는 종양 억제제로 기능하며, 이는 불량한 예후를 갖는 위암에 서 낮은 수준으로 발현된다고 보고되었다 (White, Brown, and Sacks 1817-24). IQGAP3에 대해서는 많은 정보가 존재하지 않는다. 문헌 (Skawran et al. 505-16)은 이 간세포암종에서 이 유전자들이 몇몇의 두드러지게 높이 상향조절된 유전자로 밝혔다. 두 개의 연구가 IQGAP가 특별히 쥐 소장, 결장과 간에서 증식하는 (Ki67+) 세포에 서 발현이 된다고 보고했다 (Nojima et al. 971-78) (Kunimoto et al. 621-31).

[0170] 88a를 포함한 코일링된 코일 도메인 (CCDC88A)

[0171] CCDC88A는 액틴 결합 Akt 기질로서 이는 섬유모세포의 액틴 정리와 Akt-의존 세포 이동에 역할을 한다. CCDC88A/Akt 경로는 VEGF-매개 신생아 혈관 생성에도 중요한 역할을 한다.

[0172] CCDC88A는 유방, 대장, 폐, 자궁, 자궁경부 등과 같은 인간 악성 조직의 여러 종류에서 높은 수준으로 발현이 된다. 이는 Akt의 비정상적 활성화와 함께 종양 진행에서 중요한 역할을 한다.

[0173] 사이클린 B1 (CCNB1)

[0174] CCNB1은 유사 분열의 G2/M 단계에서 유도되며 이는 사이클린-의존 키나제 1 (Cdk1)/Cdc2와 함께 유사분열 촉진

인자 (MPF)를 형성한다. 여러 종류의 암에서 과발현이 보고되었고, 이는 대부분 불량한 예후와 관련이 된다 (예를 들어, 유방암 (Aaltonen et al., 2009; Agarwal et al., 2009; Suzuki et al., 2007), 수모세포종 (de et al., 2008), NSCLC (Cooper et al., 2009), 자궁경부암 (Zhao et al., 2006) 등). 이는 12가지의 다른 암에서 환자의 재발 사이의 짧은 기간을 나타내는 11-유전자의 하나로 포함되어 있다 (Glinsky, 2006). 위암에 대한 특정한 정보는 보고된 바 없다.

[0175] 사이클린 D2 (CCND2)

[0176] CCND2는 다른 D-타입 사이클린 (D1과 D3)과 같이 사이클린 의존 키나제 4 (Cdk4) 또는 Cdk6과 결합을 하고 활성화시킨다. 이는 G1/S 변화시에 필요하다. CCND2는 고환, 난소 종양 (Sicinski et al., 1996), 혈액학적 종양 (Hoglund et al., 1996; Gesk et al., 2006)과 헬리코박터 파일로리 감염에 의해서 생길 수 있는 위암과 같은 많은 종양에서 과발현이 되며 이는 불량한 예후와 관련이 있다 (Yu et al., 2003). (Yu et al., 2001) (Oshimo et al., 2003) (Takano et al., 1999) (Takano et al., 2000).

[0177] 사이클린 E2 (CCNE2)

[0178] CCNE2는 다른 종류의 E-타입 사이클린 CCNE1과 같이 Cdk2와 결합을 하고 이를 활성화시킨다. 이 활동의 최고점은 G1/S 단계 변화시에 보여진다. 건강한 상태에서, CCNE2는 정지세포에서는 검출이 되지 않고, 활동적으로 분화하는 세포에서만 검출이 된다 (Payton and Coats, 2002). 이는 유방암 (Desmedt et al., 2006; Ghayad et al., 2009; Payton et al., 2002; Sieuwerts et al., 2006)과 전립선암 (Wu et al., 2009)과 같은 암에서 비정상적으로 발현이 되며 이는 불량한 예후와 관련이 있다.

[0179] 암배아 항원-관련 세포 부착 분자 1, 5와 6 (CEACAM 1, 5와 6)

[0180] CEACAM은 세포막에 앵커된 당단백질로서 세포와 세포간 유착을 매개하며 이는 인테그린 신호 경로를 활성화한다 (Chan and Stanners, 2007). 그들은 또한 에르케리키아 콜라이와 같은 병원체에 대한 수용체로 사용이 될 수도 있으며 (Berger et al., 2004) (Hauck et al., 2006) 또한 이는 면역 조절에 관련이 있을 수 있다 (Shao et al., 2006).

[0181] CEACAM과 CEACAM6은 프로-암발생 기능을 갖는다. 이들은 아노이키스(anoikis)를 억제하며 (Ordonez et al., 2000), 전이를 촉진시키고 (Marshall, 2003; Ordonez et al., 2000), 세포 극화와 조직 건축을 방해한다 (Chan and Stanners, 2007). CEACAM1의 암에서의 기능은 불확실하다. 이는 이른 단계에서는 암 억제 인자로 활동을 할 수도 있고, 전이 형성, 종양 면역 도피를 도울 수 있으며, 후기 단계에서는 혈관 생성을 도울 수 있다 (Hokari et al., 2007; Liu et al., 2007; Moh and Shen, 2009). 이들의 기능은 이성질형에 따라 다르며, CEACAM1은 11개의 스플라이스 변이체의 형태로 있으며, 이들의 비율은 신호의 결과에 영향을 끼친다 (Gray-Owen and Blumberg, 2006; Leung et al., 2006; Neumaier et al., 1993; Nittka et al., 2008). 이 비율은 암에서 변할 수 있다 (Gaur et al., 2008).

[0182] CEACAM5 또는 CEACAM6 또는 이 두 개가 같이 많게는 70%의 인간 종양에서 과발현되며 이는 대부분의 경우 불량한 예후와 관련이 있다 (Chan and Stanners, 2007; Chevinsky, 1991). 혈청 CEACAM5는 결장과 직장 암종에 대한 임상 마커로 자리를 잡았으며, 높은 수준은 불량한 예후와 재발을 나타낸다 (Chevinsky, 1991; Goldstein and Mitchell, 2005). 이는 또한 위암을 포함한 다른 종양의 마커로서 제안이 된 바 있으나, 이의 예후 예측의 능력은 제한되어 있다 (Victorzon et al., 1995). CEACAM1은 종류에 따라 암에서 상향 또는 하향조절이 될 수 있다 (Kinugasa et al., 1998) (Dango et al., 2008) (Simeone et al., 2007). 문헌 (Han et al., 2008)은 높은 수준의 CEACAM5와 CEACAM6을 9개의 위암 세포주에서 발견을 했지만, CEACAM1은 검출되지 않았다. 반대로, 222 환자로부터의 원성 종양 샘플 분석은 CEACAM1에 대한 세포질 또는 세포막 염색을 보였다. 세포질 결합 형태는 향상된 혈관 생성을 보였다 (Zhou et al., 2009). 또한 문헌 (Kinugasa et al., 1998)의 연구에서 위암에서 이의 상향조절이 보여졌다.

[0183] 몇몇의 종양에서는, CEACAM1이 종양 세포에서 하향조절이 되었으며 이는 VEGF의 상향조절을 일으키며, VEGF 또는 저산소 상태는 CEACAM1을 주변의 내피에서 상향조절할 수 있다. 따라서, CEACAM1에 대한 단클론 항체는 VEGF-유도 내피 튜브 생성을 막았다 (Oliveira-Ferrer et al., 2004; Tilki et al., 2006; Ergun et al., 2000).

[0184] 특히, CEACAM5는 항암 약품으로서 백신의 방법을 이용하여 시험된 바 있다. 이 연구는 CEACAM5가 세포 면역 반응의 표적을 사용할 수 있다는 것을 보여 주었다 (Cloosen et al., 2007; Marshall, 2003). CEACAM5 T 세포 에

피토프에 대한 개관은 문헌 (Sarobe et al., 2004)에서 찾아 볼 수 있다.

- [0185] 클로라이드 통로3 (CLCN3)
- [0187] CLCN3은 클로라이드 통로로서 부피-관문통로일 수 있으며 세포 주기 또는 저삼투압의 상태의 경우의 부피 증가에 대한 반응으로 일어날 수 있는 부피의 감소에 대한 조절에 관여할 수 있다 (Lemonnier et al., 2004; Sardini et al., 2003). 하지만, 이 점에 대한 논쟁은 계속되며 (Wang et al., 2004) 세포 자살 중에 일어나는 부피 감소 통로는 CLCN3과 다르다 (Okada et al., 2006).
- [0188] CLCN3 발현은 세포 주기 중에 변한다 (Wang et al., 2004). CLCN3 전류는 암 관련 과정에 중요할 수 있으며 이는 CLCN3이 신경아교종과 같은 상태에서 상향조절되는 점과 일관한다. 종양 세포는 증폭 부피 증가, 저삼투압의 상태 (예를 들어, 종양 주변의 부종) 등을 관리할 수 있어야 한다 (Ernest et al., 2005; Olsen et al., 2003; Sontheimer, 2008).
- [0189] 더 나아가, CLCN3이 후기 세포내 이입 구획의 산화를 증가시킴으로 에토포사이드 내성을 향상시킨다고 보고되었다 (Weylandt et al., 2007). siRNA-매개 CLCN3의 녹다운은 세포 외의 코인두 암 세포의 이동을 감소시켰다 (Mao et al., 2008).
- [0190] DNAJC10
- [0192] DNAJC10은 잘못 접힌 단백질을 인식하고 반대 이동을 효율적으로 하기 위해 풀어주는 초분자 복합체 ER-관련 분해 결합체 멤버의 하나이다 (Ushioda et al., 2008). 이 단백질은 간세포 암에서 높게 나타나는 것으로 보여졌다 (Cunnea et al., 2007). 신경외배엽종양세포에서의 DNAJC10의 siRNA에 의한 녹다운은 펜레티나이드 (fenretinide)에 대한 반응인 세포 자살을 향상시킨다 (Corazzari et al., 2007). ERdj5가 신경모세포종 세포의 생존을 접히지 않은 단백질 반응 (UPR)을 낮춤으로서 감소시킨다 (Thomas and Spyrou, 2009).
- [0193] 진핵세포 번역 시작 인자 2, 아단위 3 감마 (EIF2S3)
- [0194] EIF2S3은 처음 메티오닌 전달 RNA를 40S 리보솜 아단위로 동원하는 단백질 결합체 (EIF2) 중 가장 큰 아단위이다 (Clemens, 1997). RNA-의존 단백질 키나제 (PKR) 등의 EIF의 활동을 하향조절하는 이 키나제의 활동은 세포 자살을 진행시키고 암 억제 작용을 한다 (Mounir et al., 2009). 위암에서 높은 수준의 인산화된 및 인산화되지 않은 EIF2가 보고되었으며, 이의 핵으로의 분포가 보고되었다. 위암에서의 eIF2alpha의 영향이 이 하향조절의 포인트에 관련이 있다 (Lobo et al., 2000).
- [0195] 진핵세포 번역 인자 3 아단위 L (EIF3L)
- [0196] EIF3L은 EIF3의 10 내지 13개의 아단위 중의 하나이며, 이는 작은 리보솜 아단위와 관련이 있다. EIF3은 큰 리보솜 아단위로의 미숙한 결합을 막는다. EIF3은 EIF3 형성에 중요한 5개의 아단위 하나이다 (Masutani et al., 2007). 안티센스 라이브러리에 대한 검색을 간세포암 세포의 5-플루오로유라실의 EIF3L의 하향조절이 항종양발생 활동을 향상시킨다고 제안했다 (Doh, 2008).
- [0197] 에피라킨1 (EPPK1)
- [0198] EPPK1은 플라킨 계열의 유전자로서 이들의 기능은 대부분 알려져 있지 않다. 플라킨 유전자는 세포 골격 필라멘트를 연결하고 이들을 세포막 관련 부착 접합부에 앵커링하는 것으로 알려져 있다 (Yoshida et al., 2008).
- [0199] G-단백질 연결 수용체 39 (GPR39)
- [0200] GPR39는 Gq 단백질 연결 수용체로서 위장과 기초대사 기능에 관련이 있다고 고려된다 (Yamamoto et al., 2009). 이들의 신호는 cAMP를 활성화시키고 혈청 반응 요소를 활성화시킨다 (Holst et al., 2004). GPR39의 내부 리간드는 아마 아연일 것이다 (Chen and Zhao, 2007). GPR39는 세포 사망의 새로운 억제제이며, 따라서 이는 암에서의 세포 자살과 세포질 그물 스트레스의 치료의 표적으로 쓰일 수 있음을 의미한다 (Dittmer et al., 2008). GPR39는 인간 태아 신장 HFK와 발생모체-강화된 줄기 유사 원름 종양 이종이식 (Metsuyanin et al., 2009) 및 세포 사망의 여러 가지의 자극제를 향한 내성이 있는 해마 세포주이다 (Dittmer et al., 2008).
- [0201] ERBB2/HER2/NEU

- [0202] ERBB2는 수용체 티로신 키나제 GFR 계열의 멤버이다. 이의 리간드는 알려지지 않았으나, 다른 HER 계열 멤버의 바람직한 이질이합체 파트너이다 (Olayioye, 2001). 암에서, HER2 암유발유전자로 활동하며, 이는 이 유전자의 높은 수준의 증폭이 세포막에서의 단백질 과발현을 일으키고 따라서 악성 세포에게 유리한 성질을 획득할 수 있기 때문이다 (Slamon et al., 1989). 특정한 백문율의 위암을 포함한 여러 암에서 이의 과발현이 관찰되었다. 대부분, 이는 불량한 예후와 관련이 있다 (Song et al., 2010) (Yonemura et al., 1991) (Uchino et al., 1993) (Mizutani et al., 1993).
- [0203] ERBB2는 단클론 항체 트라스투주맙 (trastuzumab) (허셉틴 (Herceptin)이라는 이름으로 마케팅됨)의 표적이며, 이는 말기 HER2-양성 위암을 갖는 환자들을 위한 화학치료 병용 치료 옵션으로 제안된 바 있다 (Meza-Junco et al., 2009; Van Cutsem et al., 2009). 또 다른 HER2와 HER3 수용체의 결합을 억제하는 단클론 항체, 퍼투주맙 (Pertuzumab), 또한 임상 실험 후기 단계에 있다 (Kristjansdottir and Dizon, 2010). 두 개의 조직학적 타입의 위암 (위장과 퍼진 타입)에서 HER2와 HER3의 선택적인 과발현은 불량한 예후와 관련이 있다 (Zhang et al., 2009).
- [0204] 베타-4 인테그린 (ITGB4)
- [0205] 인테그린은 세포 부착을 매개하며 또한 밖에서 안, 그리고 안에서 밖 신호 전달을 매개한다. 인테그린 베타-4 아단위는 알파-6 아단위와 이종이합을 한다. 결과적으로 형성된 인테그린은 세포안 케라틴 세포골격과 기저막 사이의 헤미데스모솜의 형성을 촉진한다 (Giancotti, 2007). 인테그린 베타-4는 암에서 두 가지의 기능이 있다. 이는 한 편에서 안정적인 부착을 도우며, 침습적인 신호전달을 도와 주며 (Ras/Erk와 PI3K 신호전달 포함), 다른 한편 혈관 형성을 돕는다 (Giancotti, 2007; Raymond et al., 2007). 이는 많은 종양에서 그리고 혈관형성 내피 세포에서 과발현되며 이는 종종 진행과 전이와 관련이 있다. 이는 위암에서, 특히 간질 침습 세포에서 높은 수준으로 나타난다 (Giancotti, 2007; Tani et al., 1996). 그러나, 이는 순차적으로 외파-중간엽세포 변화에 의해 종양이 깊게 침투한 분화되지 않은 위암 세포에서 하향조절이 되고, 이는 베타-4 인테그린이 상피 인테그린이기 때문이다 (Yanchenko et al., 2009).
- [0206] 리포칼린 (LCN2)
- [0207] LCN2 또는 중성구 젤라틴분해효소 리포칼린 (NGAL)은 철 조절 단백질로서 모노머, 호모다имер, 또는 이황결합으로 MMP9와 연결된 헤테로다имер로 존재한다 (Coles et al., 1999; Kjeldsen et al., 1993). 발현은 여러 가지의 암에서 증가되며, 몇몇의 경우에는 진행과 관련이 있다. 기계적으로 이는 MMP9를 안정시킬 수 있고, E-카드헤린 매개 세포와 세포 부착을 바꿀 수 있으며, 따라서 침습을 증가시킬 수 있다. MMP9와 LCN2의 결합체는 위암의 낮은 생존율과 관련이 있다 (Kubben et al., 2007) (Hu et al., 2009). 여러 인간 종양에서, 확실한 종양 촉진의 영향이 발견되었음에도 불구하고, 몇몇의 연구는 예를 들면 결장, 난소, 췌장암에서 LCN2가 종양촉진인자 HIF-1알파, FA-키나제 인산화 그리고 또한 VEGF 합성을 억제하고, 따라서 다른 상태에서는 LCN2가 또한 모순적으로 항암과 항전이 영향이 있다는 것을 보였다 (Bolognino et al., 2009; Tong et al., 2008). LCN2는 ras 활성화를 보이는 암에서 종양 전이를 억제하고 더 나아가 종양 혈관 형성을 억제하는 데에 유용할 수도 있다 (Venkatesha et al., 2006).
- [0208] 숙신산염 탈수소효소 결합체 아단위 C (SDHC)
- [0209] SDHC는 4개의 핵-코딩된 숙신산염 탈수소효소의 아단위 중의 하나이며 (미토콘드리아 결합체 II), 이는 전자를 숙신산염에서 유비퀴논으로 이동을 시키고, 따라서 푸마르산염과 유비퀴놀을 생성한다. 숙신산염 탈수소효소의 결핍은 GIST를 야기할 수 있다 (McWhinney et al., 2007). GIST 계열은 아단위 유전자 SDHB, SDHC, 그리고 SDHD의 돌연변이 때문에 생길 수 있으며, 위장 종양과 관련된 복강 부신경절종이 특별히 SDHC 돌연변이에 의해 생길 수 있다 (Pasini et al., 2008). 유전자 삽입이 된 쥐의 SDHC 단백질의 돌연변이는 산화 스트레스를 만들어 핵 DNA 손상, 돌연변이 생성, 그리고 결과적으로 종양 생성에 관련이 될 수 있다 (Ishii et al., 2005). 숙신산염 탈수소효소는 종양 억제제로 고려된다 (Baysal, 2003; Gottlieb and Tomlinson, 2005). 낮아진 이 효소의 수준은 종양 생성을 야기할 수 있다 (Eng et al., 2003).
- [0210] PDZ-결합 키나제 (PBK)
- [0211] PBK는 MEK3/6-관련 MAPKK 예를 들면 성장 인자 수용체의 하류인 p38 MAP 키나제를 활성화시킨다 (Abe et al., 2000; Ayllon and O'connor, 2007). JNK는 이차적인 표적이 될 수 있다 (Oh et al., 2007). 성인 PBK는 고환에서 발현이 되며 (다음 참조), 정자 발생의 기능이 제안되었다 (Abe et al., 2000; Zhao et al., 2001). 이를 제외하고는, 이는 증식과 종양 세포의 세포자살 내성에 기여할 수 있다. 이는 유사 분열 시, 인산화되어 활성화

가 되며, 이는 세포질 분열과 스핀들 형성에 중요하다 (Gaudet et al., 2000; Matsumoto et al., 2004; Park et al., 2009) (Abe et al., 2007). 다른 성장 촉진과 항 세포 자살 기능은 p53 하향조절과 히스톤 인산화가 있다 (Park et al., 2006; Zykova et al., 2006) (Nandi et al., 2007). PBK는 암고환 항원으로 분류되었으며 (Abe et al., 2000; Park et al., 2006) 이는 많은 암에서 과발현이 되었다고 보여진다.

[0212] 폴리머라제 (DNA-지향) 델타 3 보조 아단위 (POLD3)

[0213] DNA 폴리머라제 델타 결합체는 DNA 복제와 수리에 관련이 있다. 이는 증식 세포 핵 항원 (PCNA), 멀티아단위 복제 인자 C와 4 아단위 폴리머라제 결합체 POLD1, POLD2, POLD3, 및 POLD4를 갖는다 (Liu and Warbrick, 2006). POLD3은 PCNA의 DNA 복제의 연장 단계 중의 폴 델타 주기에서 분리-결합 주기 중의 효율적인 재활용에 중요한 역할을 한다 (Masuda et al., 2007).

[0214] 프로테아좀 (프로좀, 마크로파인) 26S 아단위 비-ATPase, 14 (PSMD14)

[0215] PSMD14는 26S 프로테아좀의 하나의 구성원이다. 이는 19S 결합체에 속하며 (19S 캡; PA700), 이는 프로테아좀 분해 중의 기질 비유비퀴틴화의 역할을 한다 (Spataro et al., 1997). 포유류 세포에서의 PSMD14의 과발현은 세포 증식과 빈블라스틴, 시스플라틴 및 독소루비신 등과 같은 세포 독성 약에 대한 반응에 영향을 끼친다 (Spataro et al., 2002). HeLa 세포에서 PSMD14의 siRNA로 인한 억제체는 세포 생존을 감소시키고 폴리우비퀴틴화된 단백질 수준을 높인다 (Gallery et al., 2007). PSMD14의 siRNA에 의한 하향조절은 세포의 생존에 상당한 영향을 미치며 이는 G0-G1 단계에 세포가 멈추도록 하며, 결과적으로 노화를 일으킨다 (Byrne et al., 2010).

[0216] 프로테아좀 (프로좀, 마크로파인) 26S 아단위 ATPase 2 (PSMC2)

[0217] PSMC2는 26S 프로테아좀 체계의 하나이다. 이는 ATPase의 트리플-A 계열의 일원이며, 이는 샤페론 유사의 활성을 갖는다. 이 아단위는 몇몇의 기본 전사 인자와 상호작용을 하는 것으로 보여졌으며, 추가적으로 프로테아좀 기능에 기여를 하고, 이 아단위는 전사의 조절에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 골격근에서 26S 프로테아좀 체계는 TNF-알파에 의해 활성화될 수 있다 (Tan et al., 2006). B형 간염 조절 유전자 HBx를 갖는 HBx 유전자 삽입된 HCC가 발생하는 쥐에서 PSMC2와 다른 프로테아좀 아단위는 종양 조직에서 상향조절이 된다 (Cui et al., 2006). 19S의 ATPase 아단위 PSMC2의 mRNA 수준은 암 카넥시아에서 증가되어 나타난다 (Combaret et al., 1999).

[0218] 단백질 티로신 키나제 2 (PTK2)

[0219] PTK2는 비수용체 티로신 키나제로서 이는 인테그린 신호를 조절하고 종양 성장, 진행과 전이를 촉진할 수 있다 ((Giaginis et al., 2009); (Hauck et al., 2002); (Zhao and Guan, 2009)). PTK2는 암생성과 암의 진행의 마커로 제안이 된 바 있다 (Su et al., 2002; Theocharis et al., 2009; Jan et al., 2009). 과발현 및/또는 증가된 활동성은 위암을 비롯한 여러가지의 인간 암에서 발견이 된다. PTK2는 또한 가스트린 수용체 하류의 신호를 전달하며, 이는 위암 세포의 증식에 기여한다 (Li et al., 2008b). 8%의 위암은 엡스타인-바 바이러스 (EBV)를 포함한다고 보여진다. EBV-감염 인간 위암 세포주는 증가된 PTK2 인산화를 보인다 (Kassis et al., 2002). 위 상피세포에서 PTK2 티로신 인산화의 수준은 cagA-양성 헬리코박터 파일로리 산물에서 감소하여 나타난다.

[0220] 테트라스파닌 1 (TSPAN1) 및 테트라스파닌 8 (TSPAN8)

[0221] TSPAN1과 TSPAN8은 테트라스파닌 계열에 해당하며, 이는 4개의 세포막 통과 도메인을 가지고 있고, 하나의 세포 내 N-과 C-말단을 가지고 있으며, 이의 기능은 세포 부착과 종양 침습을 포함한다. 이들은 종종 인테그린과 같은 다른 단백질과 결합하여 세포의 표면에 큰 분자 결합체를 형성한다 (Tarrant et al., 2003; Serru et al., 2000). TSPAN1의 기능은 아직 알려지지 않았지만, 분비의 역할을 포함할 수 있다 (Scholz et al., 2009). TSPAN1은 몇몇의 암에서 과발현이 되며, 이는 종종, 암의 단계, 진행과 임상적인 결과와 관련이 있다. 중요하게, 이는 86 건의 위암에서 56.98%의 케이스에서 과발현이 되었다고 보고된 바 있으며, 이 과발현은 임상 단계, 림프구 상태와 양성적으로 관계가 있으며, 이는 생존율과 종양의 분화 단계와 음성적으로 관련이 있다 (Chen et al., 2008). TSPAN8은 여러 종류의 암에서 전이-관련 유전자로 보고되었다 (PMID: 16467180). 위장암에서, TSPAN8 발현은 불량한 예후와 관련이 있다 (PMID: 16849554).

[0222] 아연 집게 단백질 598 (ZNF598)

[0223] ZNF598은 아연 집게 단백질이며 이의 기능은 알려지지 않았다

[0224] A 디스인테그린과 금속단백분해효소 10 (ADAM10)

- [0225] ADAM10은 혈관 형성, 종양 형성에 역할을 한다. 이는 위암에서 발현이 된다. ADAM-10에 대해 선택된 ADAM 억제제에 대한 암의 치료를 위한 임상 실험 중이다 (PMID: 19408347)
- [0226] 기질 금속단백분해효소 12 (MMP12)
- [0227] MMP12는 아연 엔도펩티다아제로서 이는 엘라스틴과 다른 여러 가지의 기질과 비기질 단백질을 분해하며 이는 포식세포의 이동과 혈관형성의 억제에 관련한다 (Chakraborti et al., 2003; Chandler et al., 1996; Sang, 1998). 이는 천식, 폐경기증, 만성 폐쇄성 폐질환, 류마티즘과 종양 성장 등의 조직 파괴 또는 병리학적 과정에서도 중요한 역할을 한다 (Cataldo et al., 2003; Wallace et al., 2008). MMP12 억제제는 이러한 상태에 대한 치료법으로 거론되었다 (Churg et al., 2007; Norman, 2009). MMP12는 종종 암에서 과발현이 되며, 따라 불확실한 기능을 수행할 수 있다. 기질 분해에 따라서 전이에 관련이 있을 수도 있지만, 또한 종양의 성장을 혈관형성에 부정적인 영향을 주는 안지오테틴의 생성에 의해 억제할 수도 있다. 향상된 MMP12 발현이 위암에서 보고된 바 있고, 이는 호의적으로 밝혀졌다. 이는 미세 혈관 밀도, VEGF, 종양 분화 단계, 혈관 침투, 림프구 전이, 재발에 대해서 음성의 관계를 보였다. MMP12 과발현을 보이는 환자는 상당히 향상된 생존율을 보였다 (Cheng et al., 2010; Zhang et al., 2007b; Zhang et al., 2007a).
- [0228] 리보뉴클레오티드 환원요소 M2 (RRM2)
- [0229] RRM2는 리보뉴클레오티드 환원요소의 두 개의 아단위 중의 하나이며 이는 리보뉴클레오티드에서 테옥시리보뉴클레오티드를 생성한다. RRM2의 과발현은 위암을 비롯한 종양에서 관찰이 되었으며 이는 전이의 잠재력을 높인다 (PMID: 18941749) (PMID: 19250552). RRM2의 siRNA에 의한 녹다운은 쥐, 생쥐, 원숭이 등의 종에서 종양의 성장을 낮추었다(PMID: 17929316; PMID: 17404105).
- [0230] 막전위 프로테아제 세린 4 (TMPRSS4)
- [0231] TMPRSS4는 타입 II 막전위 세린 프로테아제로서 세포 표면에 자리를 잡고 있으며 췌장암, 결장암, 위암을 비롯한 암에서 과발현이 된다. 암에서의 TMPRSS4의 생물학적 기능은 알려지지 않았다. TMPRSS4는 4개의 스플라이스 변이체를 갖는다 (Scott et al., 2001; Sawasaki et al., 2004). 난소암에서의 발현은 단계와 관련이 되어 있다 (Sawasaki et al., 2004). TMPRSS4는 폐암 조직에서 높은 수준으로 발현이 되며 siRNA로 처리한 폐와 결장암 세포주의 TMPRSS4의 siRNA 녹다운은 세포 침습과 세포-기질의 부착의 감소와 관련이 있으며 또한 세포 증식을 조절한다 (Jung et al., 2008).
- [0232] 탈이온효소, 요오드티로닌 타입 II (DIO2)
- [0233] DIO2는 프로호르몬 티록신 (T4)을 생물적으로 활성화된 3,3',5-트라이티록신 (T3)으로 전환한다. 이는 갑상선에서 높은 수준으로 발현이 되며, 발현 및/또는 활동은 갑상선 암에서 비정상적으로 조절이 된다고 밝혀졌다 (de Souza Meyer et al., 2005) (Arnaldi et al., 2005). 그러나, 정상적인 폐 그리고 폐암 조직에서도 같게 보여졌으며 (Wawrzynska et al., 2003), 뇌에서도 이것이 관찰되었다 (Murakami et al., 2000).
- [0234] 인슐린 유사 성장 인자 2 mRNA 결합 단백질 3 (IGF2BP3)
- [0235] IGF2BP3은 원초적으로 핵소체에서 존재하고 이는 IGF2 mRNA와 결합을 하며 이 번역을 억제한다. 이는 태아 발생에서 기능이 있으며 성인 조직을 하향조절한다. 종양 세포에서 이는 상향조절이 될 수 있고, 따라서 이는 종양 태아 단백질이라고 알려져 있다 (Liao et al. 2005). 위암을 포함한 많은 암에서 이들이 과발현되었다고 밝혀지고, 또한 불량한 예후와 관련이 있다고 보여진다 (Jeng et al. 2009) (Jiang et al. 2006). IGF2BP3에서 파생된 펩티드는 암 백신 연구에서 실험되었다 (Kono et al. 2009).
- [0236] 라민 B1 (LMNB1)
- [0237] 라민 B1은 핵의 단층 기질의 단백질이며 이는 핵 안정성, 크로마틴 구조와 유전자 발현에 관련이 있다. 세포 자살의 초기 단계에서 라민은 방해가 된다 (Neamati et al. 1995) (Sato et al. 2008b; Sato et al. 2008a; Sato et al. 2009). LMNB1은 거의 모든 정상적인 신체 세포에서 발현이 되며, 위암을 비롯한 암에서 이의 발현이 감소되어 나타난다는 것이 예비 연구에서 보여졌다 (Moss et al. 1999). 간세포암과 같은 다른 암에서, LMNB1은 상향조절이 되고 이는 양성적으로 종양 단계와, 크기 그리고 결절의 숫자와 관련이 있었다 (Lim et al. 2002).
- [0238] 날개없는 타입 MMTV 통합 부위 멤버 5A
- [0239] WNT5A는 분비되는 신호 단백질로서 발달과 종양 형성에 관련이 있다. 프리즐드 (Frizzled)와 LRP5/LRP6 수용체를 통한 정준 WNT5A 신호는 줄기/전구세포를 유지하며, 프리즐드와 ROR2/PTK/Ryk 수용체를 통한 비정준 WNT5A의

신호는 조직 극성, 세포 부착과 이동, 예 종양-기질 경계면에 관련이 있으며 이는 침습의 결과를 초래한다 (Kato and Kato, 2007). 이는 몇몇의 암에서는 종양 억제제의 역할을 할 수 있으나 이는 위암을 포함한 암에서는 상향조절이 되어 있으며, 따라서 전이에 기여를 할 수 있고, 따라서 불량한 예후의 결과를 가져 온다 (Li et al., 2010) (Yamamoto et al., 2009) (Kurayoshi et al., 2006).

[0240] 섬유모세포 활성화 단백질 알파 (FAP)

[0241] FAP는 통합 세포막 젤라틴분해효소이다. 이의 추정적인 세린 프로테아제 활동은 섬유모세포 성장 또는 발달 중의 상피-중간엽세포의 상호작용, 조직 수리와 상피 종양 생성의 역할을 할 수 있다 (Scanlan et al. 1994). FAP는 세포 부착과 이동 과정을 통해, 그리고 ECM 구성의 빠른 분해를 통해 암 성장, 전이와 혈관 생성에 잠재적인 역할을 할 수 있다. 이는 ECM을 침습하는 종양 세포, 암 관련 섬유모세포, 혈관 형성 관련 내피 세포에 존재하지만, 이는 같은 타입의 세포 중 비활동적인 세포에서는 검출되지 않는다 (Dolznic et al. 2005; Kennedy et al. 2009; Rettig et al. 1993; Rettig et al. 1994; Scanlan et al. 1994; Zhang et al. 2010). FAP 발현은 위암 세포에서 그리고 관련된 기질 섬유모세포에서 발견되었다 (Zhi et al. 2010) (Chen et al. 2006) (Mori et al. 2004; Okada et al. 2003). 생쥐 모델에서 FAP-발현 세포는 중복성이 없는 것으로 나타났으며, 종양 미세 환경의 면역 억제 구성원으로 보였다 (Kraman et al. 2010). 종양 백신 생쥐 모델에서, FAP는 성공적으로 CD8+와 CD4+ T 세포 반응의 표적으로 사용된 바 있다 (Loeffler et al. 2006; Wen et al. 2010) (Lee et al. 2005) (Fassnacht et al. 2005).

[0242] 코아토머 단백질 결합체 아단위 감마 (COPG);

[0243] 코아토머 단백질 결합체 아단위 감마 2 (COPG2);

[0244] 코아토머 단백질 결합체 아단위 베타 1 (COPB1)

[0245] COPG, COPG2 그리고 COPB1은 코아토머 결합체의 아단위로서 또한 코트 단백질 결합체 1 (COP1)이라고도 불리며 이는 비클라트린 코팅된 수포와 관련이 있다. COP1-코팅된 수포는 골기에서 ER로의 역행 운반을 돕는다 (Watson et al., 2004). 이는 또한 앞방향으로의 운반에도 관련이 있을 수 있다 (Nickel et al., 1998). 역방향 운반은 COPG와 결합하는 EGFR의 EGF-의존 핵 운반 외의 여러 가지를 포함한다 (Wang et al., 2010). COPG는 폐암 세포와 폐암 관련 미세혈관 내피 세포에서 과발현이 되었다고 나타났다 (Park et al., 2008).

[0246] COPG2의 동시에 도처에 존재하는 서열은 GOPG와 80% 동일하다 (Blagitzko et al., 1999). COPG2는 GOPG 대신에 COP I-유사 결합체를 생성할 수 있으며, 이는 기능적으로 불필요한 것으로 보여진다 (Futatsumori et al., 2000).

[0247] 낭성섬유증 막전위 전도 조절 (CFTR) 발현 세포주내의 COPB1dm1 녹다운은 코아토머 결합체가 CRTR의 세포막으로의 운반에 관련되어 있음을 제안한다 (Denning et al., 1992) (Bannykh et al., 2000).

[0248] 유비퀴틴-접합 효소 E2S (UBE2S)

[0249] UBE2S는 후기 촉진 결합체 (APC)의 보조 인자이며, E3 유비퀴틴 리가제는 유사 분열 출구와 G1을 세포 주기 조절자를 타겟으로 하여 조정한다. UBE2S는 다른 구성체가 기질을 미리 유비퀴틴화시킨 후 유비퀴틴 쇄를 연장한다 (Wu et al., 2010). UBE2S는 또한 VHL 프로테아좀 분해의 단백질이며, 따라서 HIF-1알파를 안정시키며 (Lim et al., 2008), 증식, 상피-중간엽세포 변화와 전이를 돕는다 (Chen et al., 2009) (Jung et al., 2006). UBE2S는 몇몇의 암에서 과발현된다.

[0250] 키네신 계열 멤버 11 (KIF11)

[0251] KIF11은 양극성 세포분열 스피들의 조립에 필요하다. 이는 몇몇의 암에서 상향조절되며 종종 이의 임상병리학적 변수와 관련이 있다 (Liu et al., 2010) (Peyre et al., 2010). KIF11 유사 S-트라이틸-L-시스테인 (STLC)의 작은 분자 억제제는 잠재적인 항암 치료제로 개발이 되었으며, 이는 세포를 세포 분열에서 멈추게 하고 따라서 암 세포의 세포 자살을 촉진한다 (Tsui et al., 2009) (Wiltshire et al., 2010) (Ding et al., 2010). 진료소에서, KIF11 억제제는 그렇게 높지 않은 활동을 보였다 (Kaan et al., 2010; Tunquist et al., 2010; Wiltshire et al., 2010; Zhang and Xu, 2008).

[0252] A 디스인테그린 금속단백분해효소 도메인 8 (ADAM8)

[0253] ADAM8은 처음 면역 특정 ADAM으로 생각이 되었으나, 이는 다른 세포 타입에서도 발견이 되었으며, 이는 대부분 암과 천식을 비롯한 호흡계통 질병을 포함한 염증 또는 ECM 리모델링 상태에서 발견이 된다 (Koller et al.

2009). ADAM8을 포함한 많은 ADAM 종류가 인간 악성 종양에서 발현이 되며, 이는 성장 인자 활동과 인테그린 기능을 조절하며 이는 세포 성장과 침습을 촉진하지만, 현재 정확한 기전은 확실하지 않다 (Mochizuki and Okada 2007). 생쥐 위암에서, ADAM8과 다른 ADAM은 증가되었고, 이는 아마 향상된 EGFR 신호 때문일 것이다 (Oshima et al. 2011).

[0254] 세포 분할 주기 6 동족체 (*S. 세레비지아에*) (CDC6)

[0255] CDC6은 DNA 복제 시작에 필수적이다. 이는 핵을 G1 단계에서 국소화시키고, S 단계의 시작에서 세포질로 운반한다. CDC6은 또한 복제-체크포인트 활성화를 ATR과 상호작용하면서 활성화시킨다 (Yoshida et al. 2010). CDC6의 비정상적인 조절은 INK4/ARF 로커스의 활성화를 일으키고 이는 세 개의 중요한 종양 억제 유전자를 코딩한다: p16INK4a 및 p15INK4b (망막모세포종의 두 개의 활성체), 및 ARF (p53의 활성체) (Gonzalez et al. 2006). CDC6의 siRNA에 의한 녹다운은 증식을 막을 수 있으며 세포 자살을 촉진할 수 있다 (Lau et al. 2006). CDC6은 위암을 비롯한 암에서 상향조절이 된다 (Nakamura et al. 2007) (Tsukamoto et al. 2008).

[0256] F2R 응고 인자 II (트롬빈) 수용체 (F2R)

[0257] 프로티네이즈 활성화 수용체 (PAR1)로도 알려진 F2R은 G-단백질 결합 수용체이다. PAR1, PAR2와 PAR4에 의한 신호는 칼슘 분비 또는 마이트로젠 활성화된 단백질 키나제 활성화를 일으킬 수 있으며 이는 혈소판 응집, 혈관 이완, 세포 증식, 사이토카인 분비와 염증을 야기할 수 있다 (Oikonomopoulou et al. 2010). F2R은 내피와 종양 세포의 증식과 혈관 생성이 관련이 있다고 생각이 되며, 이는 침습적인 전이 암에서 과발현이 된다. 발현 수준은 암의 침습성의 수준과 직접적으로 연관이 있다 (Garcia-Lopez et al. 2010) (Lurje et al. 2010). 위암 세포에서 F2R 활성화는 여러가지의 반응을 일으킬 수 있으며 이는 종양 세포 성장과 침습을 일으킨다 (예를 들어, NF-kappaB, EGFR과 Tenascin-C (TN-C)의 과발현 (Fujimoto et al. 2010)). 따라서, 위암에서 F2R의 발현은 벽 침습의 깊이, 복막안 파종 및 불량한 예후와 관련이 있다 (Fujimoto et al. 2008). 트롬빈 N-말단에 있는 에피토프 (SFLLRNPN)를 비롯한 PAR1 작용제 펩티드 TFLLRNPNDK를 인식하는 생쥐 단클론 항체 항-인간 PAR1 항체 (ATAP-2)가 묘사된 바 있다 (Hollenberg and Compton 2002; Mari et al. 1996; Xu et al. 1995).

[0258] 올팩토메딘 4 (OLFM4)

[0260] OLFM4의 기능은 대부분 알려지지 않았지만, 이는 염증이 있는 결장 상피와 다른 몇몇의 인간 종양 타입에서 과발현이 되며, 특히 소화 기관에서 과발현된다 (Koshida et al., 2007). OLFM4는 인간 소장 줄기 세포의 로버스트 마커이며 이는 결장직장암 세포의 소집단의 마커이다 (van der Flier et al., 2009). OLFM4는 세포자살 촉진 단백질 GRIM-19를 억제하며 (Zhang et al., 2004) (Huang et al., 2010), 세포 주기를 조정하며 S 단계로의 변화를 암 세포의 증식에서 촉진한다. 추가적으로 OLFM4는 암 부타과 전이와 관련이 있다 (Yu et al., 2011b). 쥐의 전립선암 세포에서의 OLFM4의 강제 과발현은 동계 숙주에서의 더 빠른 종양의 생성을 보였다 (Zhang et al., 2004). OLFM4는 위암에서 과발현이 되었다고 보여졌다 (Aung et al., 2006). OLFM4 발현의 억제는 위암 세포에서 세포 독성제가 있을 시 세포 자살을 유도할 수 있다 (Kim et al., 2010). 또한 수술전 위암 환자에서의 혈청 OLFM4 농도는 건강한 기증자에 비교했을 때 더 높게 나타났다 (Oue et al., 2009). OLFM4는 몇몇의 골수성 백혈병의 환자에서 레티노산 (RA)과 탈메틸화제 5-아자-2'-데옥시시티딘의 새로운 유전자 표적으로 인식되었다 (Liu et al., 2010).

[0261] Thy-1 세포 표면 항원 (THY1)

[0262] Thy-1 (CD90)은 GPI-앵커된 T 세포, 신경, 내피 세포와 섬유모세포를 비롯한 많은 세포에서 찾을 수 있는 당단백질이다. Thy-1은 부착, 신경 재발생, 종양 성장, 종양 억제, 이동, 세포 사망, T 세포의 활성화 등에 기여한다 (Rege and Hagood 2006b; Rege and Hagood 2006a) (Jurisic et al. 2010). Thy-1은 성인의 마커로 보여지나 태아의 혈관형성 마커는 아니다 (Lee et al. 1998). 더 나아가, 이는 여러 가지의 줄기 세포 (중간엽세포 줄기 세포, 간 줄기 세포 ("타원 세포") (Masson et al. 2006), 각질형성 세포 줄기 세포 (Nakamura et al. 2006)와 혈구형성 줄기 세포 (Yamazaki et al. 2009))의 마커로 생각이 된다. Thy-1은 위암과 GIST를 포함한 여러 암에서 상향조절이 되며, 따라서 마커로 사용이 될 수 있다 (Yang and Chung 2008; Zhang et al. 2010) (Oikonomou et al. 2007).

[0263] 센트로좀 단백질 250 kDa (CEP250)

[0264] Cep250은 미세관 정리 센터의 응집에 중요한 역할을 한다 (Mayor et al., 2000). 세린/트레오닌 키나제 Nek2의

기질로서 같이 위치하기 때문에 이는 또한 센트로좀 Nek2-관련 단백질 또는 C-Nap1이라고도 불리운다. Nek2 키나제와 이의 기질은 센트로좀 간의 연결을 조정한다 (Bahmanyar et al., 2008). 유사 분열 시작 시, 양극 스피indle 생성을 위해 센트로좀이 분리할 시, C-Nap1은 인산화가 되면, 후에 센트로좀에서 분리가 된다. 시험관내 실험에는 Cep250의 과발현은 센트로좀에서의 미세관 정리의 장애를 일으킨다 (Mayor et al., 2002).

[0265] 저산소증 유도 인자 1 알파 아단위 (기본 나선-고리-나선 전사 인자) (1HIF1A)

[0266] HIF1A는 저산소 상태에서 활성화되는 전사 인자이며, 종종 종양에서 발견이 되는 저산소증 유도 인자 1(HIF)의 산소 민감 아단위이다. 이는 생존, 당 대사, 침습, 전이와 혈관 형성 (예, VEGF)을 포함한 60개 이상의 유전자의 전사를 매개한다. HIF1은 많은 암에서 과발현이 되며 이는 불량한 예후와 관련이 있으며 이는 흥미로운 제약학적 조작의 표적으로 고려된다 (Griffiths et al. 2005; Quintero et al. 2004; Stoeltzing et al. 2004) (Zhong et al. 1999).

[0267] 위암에서, HIF1A는 혈관 형성에 기여하며 (Nam et al. 2011), 이는 종양 크기, 낮은 분화, 종양 단계와 짧은 생존 (Qiu et al. 2011)과 전이 (Wang et al. 2010) (Han et al. 2006; Kim et al. 2009; Oh et al. 2008; Ru et al. 2007)와 관련이 있다. 이는 역시 약 유도된 세포 자살의 억제와 약의 세포내 축적을 막음으로서 내성 5-FU에 대한 내성을 매개하는 것으로 알려져 있다 (Nakamura et al. 2009) (Liu et al. 2008). HIF-1알파-억제제 2-메톡시-에스트라디올은 위암의 전이 성질을 상당히 낮춘다 (Rohwer et al. 2009).

[0268] v-Ki-ras2 키르스텐 (Kirsten) 쥐 육종 바이러스 종양 유전자 호모로그 (KRAS)

[0269] KRAS는 작은 GTPase 상과의 한 일원이며 이는 전종양유전자고 이는 MAPK-와 AKT-를 비롯한 잠재적으로 종양을 일으킬 수 있는 많은 신호 전달 경로에 관련이 되어 있다. 하나의 아미노산 대체가 돌연변이를 일으킬 수 있으며 이는 위암을 비롯한 많은 악성 종양에서 중요한 역할을 하는 단백질로 변화시킬 수 있다 (Capella et al., 1991). KRAS의 종양 발생 돌연변이는 위암에서 드물게 일어난다. 위암의 소집합에, KRAS 로커스는 증폭이 되며, 이는 KRAS 단백질의 과발현을 일으킨다. 따라서, 유전자 증폭은 위암에서의 KRAS 과발현의 기반이 될 수 있다 (Mita et al., 2009). KRAS 대립유전자의 돌연변이는 저산소 자극 VEGF 유도에 기여한다 (Kikuchi et al., 2009; Zeng et al., 2010). KRAS 돌연변이는 암 환자의 혈청 또는 혈장에서 검출이 될 수 있으며, 따라서 이는 쉽게 사용할 수 있는 종양 마커로 제안된 바 있다 (Sorenson, 2000). KRAS-001 펩티드는 두 개의 스플라이스 변이체 중 하나로부터 과생이 되고 (NP_004976 (188 아미노산)), 스플라이스 변이체가 아니다 (NP_203524 (189 아미노산)). 이 스플라이스 변이체는 KRAS-001이 위치하고 있는 그들의 엑손에서 다른 점이 있다.

[0270] 비-SMC 콘텐신 I 결합체 아단위 G (NCAPG)

[0271] NCAPG는 염색체의 구조적 유지 단백질 (SMC)과 비-SMC 단백질로 이루어져 있는 콘텐신 I 결합체의 한 부분으로서, 이는 유사분열 중 염색체 응축과 분리를 조정한다 (Seipold et al., 2009). NCAPG 과발현은 코인두암 (Li et al., 2010), 간세포암 (Satow et al., 2010)과 흑색종 (Ryu et al., 2007)을 포함한 많은 종양에서 보여진다. 정상 조직 중에 NCAPG는 고환에 가장 높은 발현 수준을 보였다. 이는 증식 마커와 잠재적으로 암의 예후 지표자로 쓰여질 가능성을 보인다 (Jager et al., 2000).

[0272] 국소이성화효소 (DNA) II 알파 (TOP2A)와 국소이성화효소 (DNA) II 베타 (TOP2B)

[0273] TOP2A와 TOP2B는 높게 상동하는 DNA 국소이성화효소의 이성질형을 코딩하며, 이는 DNA의 전사 중 국소 해부학 상태를 조정하며 이는 염색체 응축, 크로마티드 분리, 복사와 전이에 관련한다. 국소이성화효소는 안트라사이클린을 포함한 여러 항암 치료물의 표적이며, 약의 내성이 여러 가지의 돌연변이에 의해 생성되었다 (Kellner et al., 2002) (Jarvinen and Liu, 2006). TOP2A (TOP2B가 아닌)는 세포 증식에 필요하다. 이는 HER2 종양 유전자 옆에 자리를 잡고 있으며 HER2-증폭 유방 암의 거의 대부분에서 발견이 되지만 역시 HER2 증폭이 없는 암에서도 발견이 되고 (Jarvinen and Liu, 2003), 다른 종류의 많은 암에서도 발견이 된다. 또한 위암의 소집단에서, TOP2A가 HER2와 함께 증폭이 되고 과발현이 되는 것으로 나타났다 (Varis et al., 2002) (Liang et al., 2008).

[0274] 라미닌 감마 2 (LAMC2)

[0275] 라미닌은 주된 바닥막의 비-콜라겐 성분이다. 이들은 세포 유착, 분화, 이동, 신호와 전이에 관련이 되어 있다. 알파 3과 베타 3 쇄와 함께 감마 2 쇄는 라미닌 5를 이룬다. LAMC2는 세포 내에서 인간 암 세포의 침습적인 성장을 촉진한다. 이는 암의 침습적인 전선에서 높은 수준으로 발현이 되며 이 발현의 수준은 불량한 예후와 관련이 있다 (Tsubota et al., 2010). 라미닌 5의 MMP-2-생성 분리 생성물은 EGFR 신호를 활성화할 수 있으며 세포

이동을 촉진한다 (Schenk et al., 2003). 위암에서, LAMC2는 EGFR 계열 또는 Wnt5a의 일원으로부터 유도가 될 수 있으며, 이의 침습적 성질은 LAMC2에 의존한다고 보여진다 (Tsubota et al., 2010) (Yamamoto et al., 2009).

[0276] 아릴 탄화수소 수용체 (AHR)

[0277] AHR은 TCDD (2,3,7,8-테트라클로로다이벤조-p-다이옥신)와 같은 편평 방향성 탄화수소와 결합을 하며 이는 시토크롬 450 효소와 같은 생체이물 대사 효소와 같은 유전자의 전사를 매개한다. 이는 또한 세포 진행에 역할을 한다 (Barhoover et al. 2010). AhR은 다이옥신의 중앙 촉진의 활동에 부분적으로 관련이 되어 있다고 생각이 되며, 이는 증식을 촉진하고 항세포자살의 기능을 가지고 있으며, 이는 세포 대 세포 간 접촉과, 세포 탈분화와 향상된 이동의 결과를 낳을 수 있다 (Watabe et al. 2010) (Dietrich and Kaina 2010) (Marlowe et al. 2008). AHR 발현은 TGF-베타에 의해 하향조절이 될 수 있으며 (Dohr and Abel 1997; Wolff et al. 2001) 이는 Wnt 또한 베타-카테닌 신호에 의해서 유도가 된다 (Cheshire et al. 2004). AHR 과발현은 위암을 비롯한 많은 암에서 발견이 되며, 이는 CYP1A1 발현의 빈도와 관계가 있다 (Ma et al. 2006). AHR 발현과 핵전위는 보통 조직과 비교했을 시 위암에서 더 높게 발견이 되었고, 이의 발현 수준은 암 발생 중에 천천히 높아졌다 (Peng et al. 2009a). AhR 경로 활성화는 위암 세포 침습성을 높이며 이는 MMP-9의 c-Jun-의존 유도를 통해서라고 생각이 된다 (Peng et al. 2009b). 생쥐 모델에서, 아릴 탄화수소 수용체의 기본적으로 활성화된 돌연변이 (CA-AhR)는 위 종양의 발생을 낳으며, 이는 더 높은 사망률과 관련이 있다 (Andersson et al. 2002; Kuznetsov et al. 2005). 암에서의 AhR의 기능은 불확실하나, 몇 개의 연구에서는 암-억제 활동과 연관이 되어 있다고 보고한다 (Gluschnaider et al. 2010) (Fan et al. 2010).

[0278] 히알루론산-매개 운동 수용체 (RHAMM) (HMMR)

[0279] HMMR은 세포 표면에서 생길 수 있으며 이는 히알루론산 (HA)과 결합을 하며 이는 HA 수용체 CD44와 상호작용을 한다. 이 상호작용은 세포 운동, 상처 치유와 침습과 같은 과정에서 역할을 한다 (Gares and Pilarski, 2000). 세포안에서, HMMR은 세포 골격, 미세관, 센트로좀, 유사분열 스피들과 연관이 있으며, 이는 유사분열 스피들 통합성의 조절의 역할을 한다. HMMR은 몇몇의 암에서 과발현된다 (Sohr and Engeland, 2008). HA는 암 세포를 면역 공격에서 보호한다고 알려져 있다. 혈청 HA는 종종 전이 환자들에서 증가되어 나타난다 (Delpech et al., 1997). HMMR은 중앙 관련 항원 그리고 AML과 CLL에 대한 예후 인자로 식별이 되었다. HMMR에서 과생된 펩티드는 항백혈병 백신에 사용이 되었다. HMMR-001 역시 생체 외 면역원성이 실험이 된 바 있으나, 이는 백신에 사용이 되지 않았다 (Tzankov et al., 2011) (Greiner et al., 2010; Schmitt et al., 2008; Tabarkiewicz and Giannopoulos, 2010) (Greiner et al., 2005). HMMR 과발현은 다른 몇몇의 암에서 발견이 되었으며, 이는 불량한 예후와 관련이 있다. HMMR은 역시 위암에서 CD44와 함께 과발현되며, 이는 침습과 전이를 돕는 것으로 보여진다 (Li et al., 1999) (Li et al., 2000a) (Li et al., 2000b).

[0280] TPX2 미세관 관련 동종 (제노푸서 라에비스 (*Xenopus laevis*)) (TPX2)

[0281] TPRX2는 세포 주기의 S-, G(2)- 와 M-단계에서 발현되는 증식 관련 단백질로서 증식 마커로 일컬어 진다 (Cordes et al., 2010). 이는 예를 들면 유사분열 스피들 조립 등의 정상적 미세관 핵 형성에 필요하며, TPX2는 오로라 A를 동원하고 활성화시킨다 (Bird and Hyman, 2008; Moss et al., 2009). 폴로-유사 키나제 1에 의한 TPX2의 인산화는 오로라 A를 활성화하는 능력을 강화시킨다 (Eckerdt et al., 2009). TPX2는 여러 가지의 중앙 타입에서 과발현이 되며 이는 종종 오로라-A와 함께 발현이 된다 (Asteriti et al., 2010). TPX2의 과발현 (종종 불량한 예후와 관련 또는 후기와 관련)이 나타난 곳의 예는 수막종 (Stuart et al., 2010), 폐암 (Kadara et al., 2009) (Lin et al., 2006; Ma et al., 2006) (Manda et al., 1999) 및 간세포암 (Shigeishi et al., 2009b) (Satow et al., 2010) (Wang et al., 2003)이다.

[0282] 따라서, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 95로부터 선택된 서열을 가지고 있거나 서열번호 1 내지 서열번호 95와 80% 이상 상동성을 갖는 변이체를 포함하는 펩티드, 또는 언급된 펩티드의 T 세포의 교차 반응 유도할 수 있는 이의 변이체에 관한 것이며, 이때 펩티드는 전장 폴리펩티드이다.

[0283] 본 발명은 더 나아가 서열번호 1 내지 서열번호 95로부터 선택된 서열을 가지고 있거나 서열번호 1 내지 서열번호 95와 80% 이상 상동성을 갖는 변이체인 펩티드에 대한 것이며, 이때 펩티드는 전장이 8 내지 100개, 더 바람직하게는 8 내지 30개, 더 바람직하게는 8 내지 14개의 아미노산인 것이다.

[0284] 본 발명은 더 나아가 상기 펩티드에 관한 것이며, 이는 구조적적합 복합체 클래스-I 또는 -II 분자와 결합의 능력을 갖는 것이다.

- [0285] 본 발명은 더 나아가 상기 펩티드에 관한 것이며, 이 펩티드는 서열번호 1 내지 서열번호 95의 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진다.
- [0286] 본 발명은 더 나아가 상기 펩티드에 관한 것이며, 이때 펩티드는 개질되고/되거나 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0287] 본 발명은 더 나아가 상기 펩티드에 관한 것이며, 이때 펩티드는 특별히 HLA-DR 항원 관련 불변 쇠(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질이다.
- [0288] 본 발명은 더 나아가 펩티드가 전체 인간 단백질이 아닌 한, 상기 펩티드를 코딩하는 핵산과 관련이 되어 있다
- [0289] 본 발명은 더 나아가 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 결합인 상기 핵산과 관련이 되어 있다
- [0290] 본 발명은 더 나아가 상기 핵산을 발현할 수 있는 능력을 가진 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0291] 본 발명은 더 나아가 의약에서 사용될 수 있는 상기 펩티드, 상기 핵산 또는 상기 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0292] 본 발명은 더 나아가 상기 핵산 또는 상기 발현 벡터를 포함한 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0293] 본 발명은 더 나아가, 상기 항원 제시 세포인 숙주 세포에 관련된 것이다.
- [0294] 본 발명은 더 나아가, 상기 항원 제시 세포인 숙주 세포에 관련된 것이며, 이때 숙주 세포는 수지상 세포이다.
- [0295] 본 발명은 더 나아가, 상기 펩티드를 생성하는 방법에 관련된 것이며, 이때 방법은 상기 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 펩티드를 상기 숙주 세포 또는 배지로부터 분리하는 단계를 포함한다.
- [0296] 본 발명은 더 나아가, 활성화된 세포독성 T 림프구(CTL)의 시험관내 생성 방법, 시험관내 CTL을 항원이 실려 있는 인간 구조적 복합체 클래스-I 또는 II와 적당한 항원 제시 세포에서 항원 특정 방법으로 CTL을 활성화시키는 데 충분한 시간 동안 접촉을 하는 방법에 관한 것이며, 이때 항원이란 임의의 기술된 펩티드이다
- [0297] 본 발명은 더 나아가, 상기 방법에 관한 것이며, 이때 항원이란 적당한 항원 제시 세포 표면에서 항원과 항원 제시 세포가 충분한 시간 동안 접촉을 하여 발현이 되는 구조적 복합체 클래스-I 또는 -II에서 지니고 있는 것을 말한다.
- [0298] 본 발명은 더 나아가 상기 방법에 관한 것이며 여기에서 항원 제시 세포란 것은 상기 서열번호 1 내지 서열번호 33의 서열을 포함하는 또는 이의 변형된 아미노산의 서열을 포함하는 펩티드를 발현할 능력이 있는 발현 벡터를 갖는 것을 말한다.
- [0299] 본 발명은 더 나아가 상기 방법에 따라 활성화된 세포독성 T 림프구(CTL)에 대한 것이며, 이들은 이때 상기 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 인식할 수 있다.
- [0300] 본 발명은 더 나아가 환자의 표적 세포를 죽이는 방법에 대한 것이며, 이때 표적 세포는 이때 상기 아미노산을 포함한 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 것이며, 이때 방법은 환자에게 효과적인 수의 상기 세포독성 T 림프구(CTL)를 투입하는 것을 말한다.
- [0301] 본 발명은 더 나아가 상기 펩티드, 상기 핵산, 상기 발현 벡터, 상기 세포, 또는 상기 세포독성 T 림프구의 약제로서 또는 약제의 제조에 있어서 용도에 대한 것이다.
- [0302] 본 발명은 더 나아가 약제가 백신인 용도에 관한 것이다.
- [0303] 본 발명은 더 나아가 항암 활성성을 갖는 약제의 용도에 대한 것이다.
- [0304] 본 발명은 더 나아가 암 세포에 대한 상기 용도에 관한 것이며, 이때 암 세포는 위암, 위장암, 결장직장암, 췌장암, 폐암 또는 신장암 세포를 말한다.
- [0305] 본 발명은 더 나아가 특정한 마커 단백질에 대한 것이며 이는 위암의 예후를 예측하는 데 사용이 될 수 있다.
- [0306] 더 나아가, 본 발명은 암 치료의 새로운 표적의 사용에 대한 것이다.
- [0307] 이때 제공된 바와 같이 문헌에서 보여지는 다른 주요 세포 (예, 간, 신장, 심장) 및 정상 위 세포와 비교했을 때 위암 세포에서는 ABL1, ADAM10, AHR, CCND2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EIF2S3, LOC255308, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP12, MMP3, MST1R, NUF2, OLFM4, PROM1, RRM2, THY1, TMPRSS4, TOP2A, TSPAN1, WNT5A, HIF1A와 PTK2에 의해서 코딩되는 단백질이 과발현이 된다.

- [0308] ABL1, ADAM10, ADAM8, AHR, ASPM, ATAD2, CCDC88A, CCNB1, CCND2, CCNE2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, CLCN3, COL6A3, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HIF1A, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, IQGAP3, ITGB4, KIF11, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP3, MST1R, MUC6, NCAPG, NFYB, NUF2, OLFM4, PBK, PLK4, PPAP2C, PROM1, PTK2, RRM2, SIAH2, THY1, TOP2A, TPX2, TSPAN1, TSPAN8, UBE2S, UCHL5와 WNT5A에 의해서 코딩되는 단백질은 악성변화, 세포 성장, 증식, 혈관 생성, 정상 조직으로의 침습 등에 관여하기 때문에, 종양 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 보여졌다. 또한 DNAJC10, EIF2S3, EIF3L, POLD3, PSMC2, PSMD14와 TMPRSS4에 의해 코딩되는 단백질은 암 관련 기능을 가지고 있을 것이라는 몇몇의 증거가 있다.
- [0309] PROM1, WNT5A, SMC4, PPAP2C, GPR38, OLFM4와 THY1에 의해서 코딩된 단백질은 높은 수준으로 발현이 되고/되거나 기능적으로 줄기 세포 및/또는 암 줄기 세포에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. PROM1의 위암 줄기 세포의 마커로의 용도가 토론된 바 있으나, 아직 논쟁의 여지가 있다. 암 줄기 세포는 종양 세포의 소집단으로서 유지된 종양 성장에 필요한 자가 재생의 잠재력을 갖는다. 이러한 세포들은 암 줄기 세포 기생위치라고 불리우는 특별하고 높은 수준으로 정리된 구조에서 자리 잡고 있으며, 이는 암줄기 세포의 자가 재생 잠재력의 유지에 필요하다.
- [0310] AHR, ASPM, ATAD2, CCNB1, CCND2, CCNE2, CDK1 (CDC2), CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HIF1A, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF11, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, LMNB1, MET, MMP11, MMP3, MST1R, MUC6, NCAPG, NUF2, OLFM4, PBK, PPAP2C, PROM1, PTK2, TMPRSS4, TPX2, TSPAN1과 WNT5A 단백질의 종양에서의 과발현은 발전된 질병 단계와 환자들의 불량한 예후와 관련된 것으로 보여진다.
- [0311] 따라서, 본 발명은 위암을 가지고 있을 가능성이 높은 동물, 바람직하게는 인간을 식별하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서 결정된 가능성은 80%에서 100%이다. 이런 방법은 동물 대상에서 나온 종양 샘플에서 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 및 MUC6 단백질 중의 적어도 하나 이상의 수준을 결정하는 것이다. 하나의 양태에서 이 샘플은 근치 수술에 의해서 얻어진다. 또 다른 양태에서는 이 샘플은 마늘 생검에 의해서 얻어진다.
- [0312] MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준이 같은 검사물의 양성 상피 세포와 비교했을 때 20% 이상으로 세포에서 상향조절이 되었다는 것이 결정되면, 이 대상은 위암을 갖는 확률이 높다고 식별이 된다.
- [0313] MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 및 MUC6 단백질 중에 더 많은 단백질이 상향조절되었을 시, 이 동물 대상에서 위암을 가지고 있을 확률은 더욱 더 높아진다.
- [0314] 하나의 양태에서, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 수준의 결정은 정 위치에서 실행이 될 수 있다. 다른 양태에서 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준 결정은 세포 외에서 실행이 될 수 있다. 또 다른 양태에서 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준 결정은 세포 내에서 실행이 될 수 있다. 바람직한 양태에서 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준 결정은 웨스턴 블롯 검사와 접합된 레이저 캡처 현미경으로 실행이 된다.
- [0315] 특정한 양태에서 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준 검출은 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6에 특정한 항체를 이용하여 실행이 된다. 또 다른 양태에서 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준의 결정은 PCR과 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6을 코딩하는 mRNA에 특정한 프라이머를 이용하여 실행이 된다. 또 다른 양태에서 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 수준의 결정은 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6을 코딩하는 mRNA에 특정한 핵산 프로브를 이용하여 실행이 된다. 이러한 양태에서, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준의 결정은 노던 블롯 분석에 의해서 실행된다. 또 다른 양태에서 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준 결정은 리보핵산 분해효소 보호 분석에 의해서 이루어진다. 다른 양태에서 효소 면역법 (ELISA), 방사능면역 분석(RIA) 그리고 웨스턴 블롯 분석 등의 면역학적 실험이 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 (혈액, 혈청, 가래, 소변 또는 복수과 같은) 신체 액체 샘플에서의 폴리펩티드 검출에 쓰여질 수 있다. 생검, 조직 샘플, 그리고 세포 샘플 (난소, 림프절, 난소 표면 상피 세포 찰과 표본, 폐 생검, 간 생검 및 다른 세포를 포함하고 있는 액체 샘플 (복수, 가래, 흉막삼출))이 분해 및/또는 조직 또는 세포 샘플을 용해하고 이를 ELISA, RIA와 웨스턴 블롯 분석과 같은 폴리펩티드 검출을 위한 면역분석을 통해 실행될 수 있다. 이러한 세포 또는 조직 샘플은 또한 예를 들면 역전사효소 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 증폭, 노던 부합법, 슬롯- 또는 dot-블롯팅과 같은 핵산 기반 방법을 통해서 분석이 될 수 있다. 조직 샘플 내의 종양 세포의 분포를 눈에 보이도록 하기

위해서는, 샘플의 조직 구조를 유지하는 진단 실험 (예, 면역조직 염색, 동일 반응계 RNA 혼성화, 또는 동일 반응계 RT-PCR)이 사용이 되어 위암 마커 폴리펩티드 또는 mRNA를 각각 검출할 수 있다. 종양의 세포 내 위치를 확인하기 위해서는 대상에게 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드 (특별히 세포 표면에 위치한 폴리펩티드)에 특이적으로 결합을 하고 접합이 되어 있거나 상자성인 추적자와 결합을 한 (또는 영상 방법에 따라 검출이 가능한 잔기와 결합을 시킨) 항체를 투입하는 MRI를 비롯한 영상 실험이 사용될 수 있다. 또 다른 방법으로는 검출이 가능한 잔기와 결합이 된 이차적인 항체가 사용되어 표지되지 않은 종양 마커 특정 항체가 검출될 수도 있다.

[0316] 추가적으로, 본 발명은 더 나아가 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드, 기능적인 단백질 분해제와 항원적 부분을 포함한 이들의 부분의 키메라/융합 단백질/펩티드에 관한 것이다.

[0317] 잡종 분자의 융합 파트너 또는 섹션은 CD4 양성 T 세포를 자극할 수 있는 적당한 에피토프를 제공한다. CD4양성 자극 에피토프는 이 분야에서 잘 알려져 있으며 이는 테나티스 독소이드에서 식별된 것을 포함한다. 더 나아가 바람직한 양태에서 펩티드는 융합 단백질이며, 특별히 HLA-DR 항원-관련 불변 쇠(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 것이다. 하나의 양태에서 본 발명의 펩티드는 인간 단백질의 절단형 또는 단백질 단편과 다른 폴리펩티드 부분의 융합 단백질이고, 이때 인간 부분은 하나 이상의 발명 아미노산 서열을 포함한다.

[0318] MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드를 포함하는 키메라/융합 단백질, 그리고 단백질 분해와 항원 단편 그리고 키메라/융합 단백질/펩티드를 포함하는 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 단편에 대한 항체 역시 본 발명의 한 부분이다. 또한, 특히 위암을 비롯한 다른 암의 예후의 예측에 이러한 항체들을 이용하는 것 역시 본 발명의 한 부분이다.

[0319] 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및/또는 키메라 항체가 될 수도 있다. 본 발명의 단클론 항체를 생성하는 무한증식 세포주도 본 발명의 한 부분이다.

[0320] 당업자는 몇몇의 경우에, 종양 마커 유전자인 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 높은 발현이 위암을 갖는 대상의 더 불량한 예후를 갖는다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 비교적으로 높은 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 수준은 비교적으로 큰 일차적 종양, 높은 종양 부하 (예, 높은 전이), 또는 비교적으로 많은 악성 종양 표현형이라는 것을 표시할 수 있다.

[0321] MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6을 포함하는 단백질 중에 더 많은 단백질이 과발현이 된다면, 이는 더 불량한 예후를 나타낸다.

[0322] 본 발명의 진단과 예후 예측 방법은 알려진 방법을 포함한다. 예, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드를 검출하기 위한 항체-기반 방법과 핵산 혼성화 및/또는 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 mRNA를 검출하기 위한 증폭-기반 방법을 포함한다.

[0323] 추가적으로, 빠른 종양 세포 파괴는 종종 자가 항체 생성의 결과를 낳기 때문에, 발명의 위암 종양 마커는 혈청 분석에 사용이 되어 대상의 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6에 대한 자가항체를 검출하는 데 쓰일 수 있다. MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드 특정 자가 항체 수준이 정상 대비군 샘플보다 3배 이상 (바람직하게는 5배 이상 또는 7배 이상, 가장 바람직하게는 적어도 10배 또는 20배 이상) 높을 경우 이는 위암일 것이라는 것을 표시한다.

[0324] 세포 표면에 위치하는, 세포 내의, 그리고 분비된 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드는 생검 (예컨대, 위암 세포를 포함하는 조직 또는 세포 생검을 확인하기 위한 조직 또는 세포 샘플 (복수와 같은 액체 샘플에서 얻어진 세포를 포함함))을 분석하는 데 사용이 될 수 있다. 생검은 무손상된 조직 또는 전체 세포 샘플로서 분석이 될 수 있거나, 이 조직 또는 세포 샘플은 분해되고/되거나 액체화되어 특정한 사용되는 진단 실험에 맞도록 만들어질 수도 있다. 예를 들면, 생검 또는 샘플은 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드 또는 mRNA 수준을 동일 반응계에서 검출할 수 있도록 예를 들어 면역조직화법, 동일 반응계 mRNA 혼성화, 또는 동일 반응계 RT-PCR 등을 사용하여 전체 조직 또는 전체 세포 분석에 적용이 될 수 있다. 이 분야의 전문가들은 조직 또는 세포를 폴리펩티드 또는 mRNA 수준 분석을 위해 ELISA, 면역 블롯팅 또는 이와 동등한 방법 또는 mRNA 수준의 RT-PCR, 노던 혼성화 또는 슬롯- 또는 돛-블롯팅을 사용한 핵산-기반 분석 방법 면역에 대해 알고 있을 것이다.

[0325] MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 발현 수준을 측정하기 위한 키트

- [0326] 본 발명은 대상에서 위암 마커 유전자의 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 증가된 발현 수준을 검출할 수 있는 키트를 제공한다. 위암 마커 폴리펩티드를 검출할 수 있는 키트는 바람직하게는 선택된 위암 마커 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 위암 마커 mRNA를 검출하는 키트는 바람직하게는 하나 또는 더 많은 핵산 (예, 하나 또는 더 많은 올리고핵산 프라이머 또는 프로브, DNA 프로브, RNA 프로브, 또는 RNA 프로브를 생성하기 위한 틀)을 포함하며 이는 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 mRNA에 특이적으로 혼성화한다.
- [0327] 특별히, 항체-기반 키트는 항체 또는 이들의 면역반응 단편에 특이적으로 결합된 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드의 존재를 검출하고/하거나 측정하는 데에 쓰일 수 있다. 이 키트는 항원과 항체 사이의 반응을 검출하는 항원과 시약과 반응하는 항체 포함한다. 이러한 키트는 ELISA 키트가 될 수도 있고 이는 대조군을 포함할 수 있다 (예, 특정한 위암 마커 폴리펩티드의 명시된 양), 일차 그리고 필요할 경우 이차 항체, 그리고 검출될 수 있는 잔기를 포함하는 다른 시약들과 위에서 상기한 바와 같은 색깔 시약과 효소 기질 등을 포함할 수 있다. 또 다르게, 진단 키트는 보통 이때 상기 구성 요소와 시약을 포함하는 면역블롯 키트가 될 수도 있다.
- [0328] MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 mRNA 양을 조직 또는 세포 생검에서 측정함으로써 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 발현 수준을 검출하고/하거나 측정하기 위해 핵산 기반 키트가 사용될 수 있다. 예를 들면, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 증가된 발현을 측정하기 위한 RT-PCR 키트는 바람직하게는 위암 마커 mRNA를 cDNA로 역전사시키고, 위암 마커 cDNA의 PCR 증폭을 하기에 충분한 올리고핵산 프라이머를 포함하며, 또한 적당한 음성과 양성 대조군, 그리고 양자화를 위한 내부 대조군을 실행하기 위해 대조군 PCR 템플릿 분자와 프라이머를 포함한다. 당업자는 역전사와 PCR 반응을 위해 적당한 프라이머를 선택하는 방법과 적당한 대조군 반응의 선택을 이해할 것이다. 이것에 대한 안내는 예를 들면 문헌 (F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1997)에서 찾아 볼 수 있다. 여러 가지의 RT-PCR의 변이체가 알려져 있다. MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6으로의 면역독소의 표적 전달은 위암의 치료와 예방을 위해 사용이 될 수 있다. 예를 들면, 세포 표면에 위치한 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 방사선동위원소 또는 다른 독소 화합물과 결합될 수 있다. 항체 결합체는 대상에게 주입이 되어 항체와 이의 조상이 같은 위암 세포 폴리펩티드의 결합을 이루게 하며 이는 위암 세포에 대한 치료 화합물의 표적화된 전달의 결과를 낳으며 따라서 난소암을 치료할 수 있게 된다.
- [0329] 치료 잔기는 독소, 방사선동위원소, 약물, 화합물, 또는 단백질이 될 수 있다 (예를 들면, 문헌 (Bera et al. "Pharmacokinetics and antitumor activity of a bivalent disulfide-stabilized Fv immunotoxin with improved antigen binding to erbB2" Cancer Res. 59:4018-4022 (1999)) 참조). 예를 들면, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6을 발현하는 세포로 표적화된 독소를 전달하기 위해 항체는 박테리아 독소 (예, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소 A, 콜레라 독소) 또는 식물 독소 (예, 리신 독소)와 연결 또는 결합이 될 수 있다. 이 면역 독소는 세포로 전달이 될 수 있으며, 세포 표면에 위치한 위암 마커 폴리펩티드와 결합을 하면서, 독소 결합된 위암 마커 특정 항체는 세포로 전달이 될 수 있다.
- [0330] 추가적으로, 특정한 리간드 (예, 세포 표면 위치한 단백질)가 있는 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드의 경우, 리간드는 위에 상기한 바와 같이 독소 합성물을 위암 세포로 전달하는 데에 있어 항체를 대신할 수 있다.
- [0331] "항체"라는 것은 이때 넓은 의미로 사용이 되며 이는 다클론 그리고 단클론 항체를 포함한다. 완전한 면역글로불린 분자 외에 추가적으로, 이들 면역글로불린 분자와 인간화된 면역글로불린 분자의 버전의 단편 또는 중합체 역시 또한 이들이 상기 바람직한 성질 (예, 위암 마커 폴리펩티드에 대한 특정 결합, 위암 마커 유전자를 높은 수준으로 발현하는 위암 세포로의 독소 전달, 및/또는 위암 마커 폴리펩티드의 활동의 억제)을 갖는 한 "항체"의 용어에 포함이 된다.
- [0332] 가능한 경우 본 발명의 항체는 시중에서 구입이 가능하다. 본 발명의 항체는 역시 잘 알려진 방법을 통해 생산이 가능하다. 기술자는 전장 위암 마커 폴리펩티드 또는 그들의 단편이 본 발명의 항체를 생산하는 데 필요하다는 것을 이해할 것이다. 항체를 생산하기 위해 사용될 폴리펩티드는 부분적으로 또는 전체적으로 자연적인 원산지에서 정제가 될 것이고, 또는 재결합 DNA 기술을 사용하여 생산이 될 수 있다. 예를 들면, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드 또는 이의 단편을 코딩하는 cDNA는 원핵세포 (예, 박테리아)에서 또는 진핵세포 (예, 효모, 곤충, 또는 포유류 세포)에서 얻어 질 수 있으며, 후에 재결합 단백질은

정제되어 위암 마커 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 단클론 또는 다클론 항체를 사용하여 항체가 생산될 수 있다.

[0333] 당업자는 두 개 이상의 다른 세트의 단클론 또는 다클론 항체를 생산하는 것이 필요한 사용도를 위해 특정한 친화력을 갖는 항체를 획득할 수 있는 확률을 최대화한다는 것을 알고 있을 것이다 (예, ELISA, 면역조직화학, 세포내 영상, 면역독소치료). 알려진 방법을 통해 이 항체가 사용될 목적에 따라 바람직한 활동성을 위해 항체가 실험된다 (예, ELISA, 면역조직화학, 면역치료 등; 항체 생산과 실험에 대한 더 많은 정보를 위해서는 예를 들면 문헌 (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988) 참조). 예를 들면, 항체는 ELISA 분석, 웨스턴 블롯 분석, 포말린 고정 위암 또는 조직 절편을 이용하여 실험이 될 수 있다. 처음 생체 외 성질화 후, 치료의 목적을 갖는 또는 세포 내 진단의 사용을 갖는 항체는 알려진 임상 실험 방법으로 실험된다.

[0334] "단클론 항체"라는 것은 이때 상당히 동질한 항체의 집단에서 얻어진 항체를 말한다. 즉, 집단을 이루는 각자의 항체가 자연적으로 적은 숫자로 일어나는 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 말한다. 단클론 항체는 이때 특별히 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 특정한 중 또는 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 동질한 "키메라" 항체를 포함하며, 이들이 바람직한 대향효과를 보인다면, 이들과 같은 항체의 단편들도 포함한다 (미국특허 제4,816,567호).

[0335] 본 발명의 단클론 항체는 하이브리도마 방법을 사용하여 준비가 될 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 생쥐 또는 다른 적당한 숙주 동물이, 전형적으로 면역제로 면역화되어 특정 면역제에 결합할 수 있는 항체를 생산하거나 항체 생산의 능력을 갖는 림프구를 유발한다. 또 다른 방법으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수도 있다.

[0336] 단클론 항체는 미국특허 제4,816,567호에서 기재된 바와 같은 재결합 DNA 방법으로 생산될 수도 있다. 본 발명의 단클론 항체를 코딩하는 DNA는 보통의 방법을 통해 바로 단리가 되고 서열이 정해질 수 있다 (예, 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에게 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 갖는 다른 올리고핵산 프로브를 이용).

[0337] 시험관내 방법은 역시 일가 항체를 생성하는데 적당하다. 특별히 Fab 단편을 만들기 위한 항체의 소화는 이 분야에서 알려진 기본적 기술을 사용하여 얻어질 수 있다. 예를 들면, 파파인을 사용하여 소화가 가능하다. 파파인 소화의 예는 1994년 12월 22일에 출원된 국제특허공개 제WO 94/29348호와 미국특허 제4,342,566호에서 찾아볼 수 있다. 항체의 파파인 소화는 전형적으로 두 개의 동일한 항원 결합 단편을 생성하며, 이는 Fab 단편이라고 불리고, 이는 각각 하나의 항원 결합 부분을 가지고 있으며, 또 남은 Fe 단편을 생성한다. 펩신에 의한 처리는 두 개의 항원 결합 부분 단편을 생성하며 이는 항원 교차 결합의 기능을 갖는다.

[0338] 다른 서열에 결합이 되어 있건 않건, 단편의 활동성이 개질되지 않은 항체 또는 항체 단편과 비교했을 시, 상당히 변하거나 손상이 되지 않는 한, 항체 단편은 삼입, 결실, 특정한 부분 또는 특정 아미노산 잔기의 치환과 같은 다른 선택된 개질을 포함할 수 있다. 이러한 개질은 다이설피드 결합의 능력을 갖는 아미노산의 결실/추가, 생체 장수력 증가, 분비 성질의 변화 등을 포함한 추가적인 성질을 제공할 수 있다. 어떤 경우에도, 항체 단편은 결합 활동, 결합 도메인에 대한 결합 조정 등과 같은 생물적 활성 성질을 포함해야 한다. 항체의 기능적인 또는 활성화된 부분은 이 단백질의 특정한 부분의 돌연변이 유발, 및 이에 따른 발현 및 발현된 폴리펩티드의 실험을 통해 식별이 가능하다. 이러한 방법은 이 분야의 전문가가 정확하게 알 수 있으며 이는 항체 부분을 코딩하는 핵산의 부분 특정 돌연변이 유발을 포함한다.

[0339] 본 발명의 항체는 더 나아가 인간화된 항체 또는 인간 항체를 포함한다. 비인간 (예, 쥐) 항체의 인간화된 항체는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇄 또는 이들의 단편 (Fv, Fab, Fab' 또는 다른 항체의 항원-결합 서열)이며, 이들은 비인간 면역글로불린에서 파생된 최소의 서열을 포함한다. 인간화된 항체는 수용체의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터 잔기가 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 비인간 종 (기증자 항체)의 CDR로 대체된 인간 면역글로불린 (이식받는 항체)이며 이는 바람직한 특이성, 친화성과 능력을 갖는다. 몇몇의 경우에는, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 (FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기와 대체된다. 인간화된 항체는 또한 기증자 항체 또는 수입된 CDR 또는 골격 서열에서도 찾아 볼 수 없는 서열을 포함할 수 있다. 대부분, 인간화된 항체는 거의 다 적어도 하나의, 전형적으로는 두 개의, 변수 도메인을 가지고 있으며, 이는 거의 다 CDR 부분이 상응하는 비인간 면역글로불린과 모두 다 또는 거의 다의 인간 면역글로불린 FR 부분의 공통서열을 갖는다. 또한 인간화된 항체는 최적으로, 적어도 하나의 전형적으로 인간 면역글로불린의 고정 부분 (Fc)을 갖는다.

[0340] 비인간 항체를 인간화하는 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있다. 보통, 인간화된 항체는 비인간 공급원으로부터

도입된 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이 비인간 아미노산 서열은 종종 "수입" 잔기라고 불리며, 이는 전형적으로 "수입" 변수 도메인에서 온다. 인간화는 기본적으로 쥐 CDR 또는 CDR 서열을 상응하는 인간 항체의 서열과 바꾸는 것으로 이루어진다. 따라서, 이러한 "인간화된" 항체는 키메라 항체이며 (미국특허 제 4,816,567호), 이때 완전하지 않은 인간 변수 도메인이 상응하는 비인간 종의 서열과 대체된 것이다. 사실상, 인간화된 항체는 전형적으로 CDR 잔기를 아니면 몇 개의 FR 잔기를 쥐의 항체의 동족 부위의 잔기와 대체한 인간 항체이다.

[0341] 면역화 시, 내부의 면역글로불린 생산이 없을 때, 인간의 전체 항체 레퍼토리를 생산할 수 있는 인간 항체 유전자식 동물 (예, 쥐)이 사용될 수 있다. 예를 들면, 키메라와 종자계 돌연변이의 중쇄 결합 부분의 동형접합 결실이 완전한 내부 항체 생성을 억제하는 것이 상기 기재된다. 이러한 종자계 돌연변이 쥐에서의 인간 종자계 면역글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 접종 시 인간 항체 생성의 결과를 낳을 것이다. 인간 항체는 파지 전사 라이브러리를 통해 생산될 수도 있다

[0342] 본 발명의 항체는 바람직하게는 약학적으로 허용되는 담체를 통해 대상에게 투여된다. 전형적으로, 적당한 약학적으로 허용되는 양의 염이 공식을 등장액으로 만들도록 사용된다. 이러한 약학적으로 허용되는 담체는 식염수, 링거 용액 및 포도당 용액을 포함한다. 이 용액의 pH는 바람직하게는 약 5 내지 8이며, 더 바람직하게는 7 내지 7.5이다. 더 많은 담체는 기질이 예를 들면, 필름, 리포솜 또는 미세입자를 포함한 물질로 이루어져 있는 기질을 포함하고 항체를 포함한 고체 소수성 중합체 반투과 기질 지효성 약학 제제를 포함한다. 이 분야의 전문가에게는 항체가 투여되는 방법과 농도에 따라 특정한 담체가 더 효율적이라는 것을 분명히 알고 있을 것이다.

[0343] 항체는 대상, 환자, 또는 세포로 주사 (예, 정맥내, 복수내, 피하, 근육내)를 통해 또는 효율적으로 혈류로 전달이 가능한 다른 방법을 이용하여 투여될 수 있다. 항체는 또한 종양 내 또는 종양 주변으로 투여될 수 있으며 이로 인해 국소와 체내의 치료 효과를 얻을 수 있다. 국소 또는 정맥내 투여가 바람직하다.

[0344] 항체의 효율적인 용량과 투여 스케줄은 실험을 통해 결정될 수 있으며, 이는 전문가의 결정에 따른다. 이 분야의 전문가는 투여되는 항체의 용량은 항체를 받을 대상, 투여 경로, 그리고 특정한 타입의 항체와 다른 투여되는 약에 따라서 달라진다는 것을 알 것이다. 전형적인 이 항체의 하루 용량은 몸무게 당 1 µg/kg 내지 100 mg/kg으로 달라질 수 있으며, 이는 앞에서 언급된 인자에 따라서 달라진다. 위암 치료를 위한 항체의 투여 후, 치료 항체의 효율성은 이 분야의 전문가가 잘 알고 있는 여러 가지 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들면, 치료를 받는 대상의 위암의 크기, 숫자 그리고 또는 분포가 기본적인 종양 영상 기술을 사용하여 모니터링될 수 있다. 치료상으로 투여된 항체는 항체 투여가 없을 때와 비교했을 시, 종양의 성장을 멈추고, 이에 따라 종양의 크기가 줄어들고/들거나 새로운 종양의 발생을 막으며, 이는 항체가 위암 치료에 효율성이 있다는 것을 의미한다.

[0345] ABL1, ADAM10, AHR, CCND2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EIF2S3, LOC255308, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP12, MMP3, MST1R, NUF2, OLFM4, PROM1, RRM2, THY1, TMPRSS4, TOP2A, TSPAN1, WNT5A, HIF1A와 PTK2 단백질이 정상 조직과 비교했을 때, 적어도 하나 이상의 위암 조직의 소집단에서 높게 발현이 되는 것으로 나타났기 때문에, 이의 발현 또는 활동의 억제는 위암 치료 또는 예방의 치료 전략에 이용될 수 있다.

[0346] 안티센스 치료의 원리는 유전자 발현 (전사 또는 번역을 통한) 서열 특정 억제가 세포내 유전자 DNA 또는 mRNA와 보완 안티센스 종의 혼성화에 의하여 이루어질 수 있다는 가설에 기반을 둔다. 이러한 하이브리드 핵산 듀플렉스의 형성은 표적 종양 항원 코딩 유전자 DNA의 전사, 처리/운반/번역 및/또는 표적 종양 항원 mRNA의 안정성을 방해한다.

[0347] 안티센스 핵산은 여러 가지 방법으로 전달이 될 수 있다. 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 RNA는 종양이 섭취할 수 있도록 대상에게 직접 투여 (예, 정맥내 주입)될 수 있다. 다른 방법으로는 바이러스 또는 안티센스 RNA (또는 RNA 단편)를 코딩하는 플라스미드 벡터가 세포 안으로 투여될 수 있다. 안티센스 효과는 센스 서열에 의해서 유도될 수도 있으나, 표현형의 변화의 정도의 변수가 높다. 효율적인 안티센스 치료로 유도되는 표현형 변화는 예를 들면 표적 mRNA 수준, 표적 단백질 수준 및/또는 표적 단백질 활동 수준의 변화로 평가가 될 수 있다.

[0348] 특정한 예로서, 위종양 마커 기능의 안티센스 유전자 치료로의 억제는 안티센스 위종양 마커 RNA의 직접적인 대상으로 투여에 의해서 이루어질 수 있다. 안티센스 종양 마커 RNA는 어떤 기본적인 방법을 통해 생성이 되고

단리가 될 수 있지만, 이는 가장 빠르게 안티센스 종양 마커 cDNA를 이용하여 높은 효율성을 갖는 촉진자 조정 아래에서 세포 외 전사에 의해 얻어질 수 있다 (예, T7 촉진자). 안티센트 종양 마커 RNA의 세포로의 투여는 하기 직접 핵산 투여의 방법으로 이루어질 수 있다.

[0349] MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 기능을 막는 유전자 요법을 사용한 다른 방법으로는 항-MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 항체 또는 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 항체의 부분의 세포내 발현과 연관이 있다. 예를 들면, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드와 특이적으로 결합하고 이의 생물학적 활동을 억제하는 단클론 항체를 코딩하는 유전자 (또는 유전자 단편)가 특정하게 유전자 조정 서열의 핵산 발현 벡터 내의 전사의 조정 (예, 조직- 또는 종양-특이적)하에 위치한다. 이 벡터는 후에 대상에서 투여되고 이는 위암 세포 또는 다른 세포에게 흡수가 되며, 그 후 이들은 항-MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 항체를 분비하여 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드의 생물학적 활동을 막는다. 바람직하게는 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6 폴리펩티드는 위암 세포의 시험관내 표면에 위치한다.

[0351] 외부 DNA의 투여와 대상의 세포에 의한 흡수 (예, 유전자 신호전달 또는 유전자 형질감염)를 포함하는 상기 방법에서, 본 발명의 핵산은 네이키드 DNA의 형태일 수 있거나, 핵산을 세포로 전달해 위암 마커 단백질의 발현을 억제하는 벡터의 형태일 수도 있다. 벡터는 아데노바이러스 벡터와 같이 시판중인 것일 수도 있다 (퀀텀 바이오 테크놀로지스 인코포레이티드 (Quantum Biotechnologies, Inc., 캐나다 퀘벡 라발 소재)). 핵산 또는 핵산의 세포로의 전달은 여러 가지 기전에 의해 이루어질 수 있다. 하나의 예로서, 시판중인 LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (깁코- 25 BRL 인코포레이티드 (GIBCO- 25 BRL, Inc.), 미국 메릴랜드주 게이터스버그 소재), SUPERFECT (퀴아젠 인코포레이티드 (Qiagen, Inc.), 독일 힐텐 소재)와 TRANSFECTAM (프로메가 바이오텍 인코포레이티드 (Promega Biotec, Inc.), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)와 같은 리포솜을 이용하여 전달이 이루어질 수 있으며, 또한 이 분야에서 기본적으로 사용하는 절차를 사용하여 개발된 리포솜을 사용하여 이루어질 수도 있다. 추가적으로, 본 발명의 핵산 또는 벡터는 세포 내에서 제네트로닉스 인코포레이티드 (Genetronics, Inc., 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)에서 이용가능한 기술인 전기천공 및 SONOPORATION 기계 (ImaRx 파마슈티컬 코포레이션 (ImaRx Pharmaceutical Corp.), 미국 애리조나주 투스콘 소재)를 사용하여 전달될 수 있다.

[0352] 하나의 예로서, 벡터 전달은 레트로바이러스 유전체를 포장할 수 있는 레트로바이러스 벡터 시스템과 같은 바이러스 시스템에 의해서 이루어질 수 있다. 재조합 레트로바이러스는 그 후 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 또는 MUC6의 발현을 억제하는 안티센스 핵산을 감염된 세포로 전달하는 데 쓰인다. 당연히, 변화된 핵산을 포유류 세포로 투여하는 정확한 방법은 레트로바이러스 벡터를 사용하는 것에 국한되지 않는다. 아데노 바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터, 렌티바이러스 벡터, 슈도타입 레트로바이러스 벡터를 포함한 다른 기술 또한 이런 절차에 널리 사용이 가능하다. 리포솜 전달과 수용체-매개 및 다른 세포내 섭취 기전 등의 물리적 형질도입 기술 또한 사용이 될 수 있다. 본 발명은 이와 같은 다른 또는 이외의 자주 사용되는 유전자 전달 방법과 같이 사용이 될 수 있다.

[0353] 이 항체는 역시 세포 내 진단 분석에서도 쓰일 수 있다. 보통, 항체는 방사선뉴클레오티드로 표지되어 있다 (예를 들면 ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P 또는 ^{35}S). 따라서 면역형광조영술을 사용하여 종양의 위치가 결정될 수 있다. 하나의 양태에서, 항체와 이들의 단편은 두 개 이상의 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB와 MUC6의 세포 외 도메인과 결합하며 친화성 (K_d)은 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 이하이다.

[0354] 진단의 목적으로 사용되는 항체는 여러 가지의 영상 방법 사용을 위해 적당한 프로브로 표지될 수 있다. 프로브의 검출 방법은 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 형광, 빛, 동일 초점과 전자 현미경; 자기공명영상과 분광학, 투시검사, 컴퓨터단층촬영, 양전자방출단층촬영. 적당한 프로브는 다음을 포함하지만 다음에 국한되지 않는다: 형광물질, 로다민, 에오신과 다른 플루오로포어, 방사선 동위원소, 금, 가돌리늄과 다른 란타늄, 상자성 철, 플루오린-18과 다른 양전자방출 방사성핵종. 추가적으로, 프로브는 두 개 이상의 기능을 가질 수 있으며, 이는 여기에 열거된 하나 이상의 방법에 의해 검출이 될 수 있다. 이 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 상기 프로브로 표지될 수 있다. 항체의 프로브의 부착은 프로브의 공유 결합, 프로브의 항체로의 합일화, 그리고 프로브를 결합하기 위한 킬레이트제의 공유 결합과 다른 이 분야에서 인식되는 방법을 포함한다. 면역조직 화학법에서, 질병 조직 샘플은 신선하거나 파라핀에 함몰이 되고 포말린과 같은 보존제에 의해 고정될 수 있다. 고정이 되거나 함몰된 섹션은 표지된 일차 항체와 이차 항체와 접촉을 하는 샘플을 함유하고, MST1R,

UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 및 MUC6 단백질이 동일 반응계에서 발현을 검출하기 위해 항체가 사용이 된다.

- [0355] 본 발명은 따라서 펩티드 서열번호 1 내지 서열번호 95로부터 선택된 또는 서열번호 1 내지 서열번호 95의 서열과 85%, 바람직하게는 90% 또는 더 바람직하게는 96% 동질적인 이들의 변이체를 포함하며 이는 T 세포를 유도하여 상기 펩티드와 교차 반응을 한다.
- [0356] 본 발명의 펩티드는 구조적 적합 복합체 클래스-I의 분자와 결합할 능력을 갖는다.
- [0357] 본 발명에서 "상동성"이란 두 개의 펩티드 또는 폴리펩티드와 같은 아미노산 서열의 동일한 정도를 나타낸다. 상기 "상동성"이란 두 개의 서열을 최적의 상태에서 비교할 서열에 대해 정렬을 하여 결정이 된다. 이때 비교될 서열은 최적의 상태에서 정렬을 했을 때 추가 또는 결실을 가지고 있을 수 있다 (예, 틸새). 이러한 동종은 예를 들면, ClustalW 알고리즘을 사용하여 계산될 수 있다. 보통 사용이 가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 특정적으로 벡터(Vector) NTI, GENETYX 또는 공용 데이터베이스에서 제공된 분석 도구 등이 있다.
- [0358] 이 분야의 전문가들은 특정한 펩티드의 변이체에 의해 유도된 T 세포가 펩티드 자신과 교차 반응을 할 수 있는지 평가할 수 있다 (Fong et al. 8809-14); (Appay et al. 1805-14; Colombetti et al. 2730-38; Zaremba et al. 4570-77).
- [0359] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"란 예를 들면, 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기의 측쇄와 변경하여 (예를 들면 하나의 측쇄를 다른 자연적으로 생성되는 아미노산 잔기로 바꾸거나 다른 측쇄로 바꾸는 것), 펩티드가 여전히 서열번호 1 내지 33의 소정 아미노산 서열을 갖는 펩티드와 비교했을 시 HLA 분자에 실질상 같은 방법으로 결합할 수 있다. 예를 들면, 펩티드는 개질이 되어 HLA-A*02 또는 -DR을 포함한 적당한 MHC 분자의 결합 홈에 상호작용을 하며 결합을 할 수 있는 능력을 적어도 유지하거나 향상시키고, 따라서 이들이 활성화된 CTL의 TCR과 적어도 같은 결합 능력이 있거나, 향상된 결합 능력이 있다.
- [0360] 이 CTL은 후에 본 발명에서 정의된 인지된 펩티드의 자연산 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응을 하고 그들을 죽일 수 있다. 과학 논문 (Rammensee, Bachmann, and Stevanovic)과 데이터베이스 (Rammensee et al. 213-19)에서 알아볼 수 있듯이, HLA 결합 펩티드의 특정한 위치는 HLA 수용체 결합 모티브에 맞는 핵산 서열을 형성하는 앵커 잔기이며, 이는 결합 홈을 이루고 있는 폴리펩티드 쇄의 극체, 전기물리학적, 소수성, 공간 성질에 의해 결정된다. 따라서 이 분야의 전문가는 서열번호 1 내지 95의 아미노산 서열을 이들의 앵커 잔기를 유지하면서 개질하여 이러한 변이체들이 MHC 클래스-I 또는 II 분자와 결합을 할 수 있는 능력을 유지할 것인지를 알 수 있다. 본 발명의 변이체는 활성화된 CTL의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 유지하여, 후에 이 CTL은 후에 본 발명에서 정의된 인지된 펩티드의 자연산 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응을 하고 그들을 죽일 수 있다.
- [0361] T 세포 수용체와 상호 작용하는 데에 실질상 많이 관여하지 않는 아미노산 잔기는 T 세포 반응성과 관련 있는 MHC와 결합을 하는 능력을 잃지 않는 다른 아미노산과 교체될 수 있다. 따라서, 이때 주어진 단서 외에, 본 발명의 펩티드는 이때 주어진 아미노산 서열 또는 그의 부분 또는 변이체를 포함한 다른 어떤 펩티드 (이때 발명가들은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 일컫는다)가 될 수도 있다.

표 3

서열번호 1에서 33에 따른 펩티드의 변이체와 모티브

		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	펩티드 코드		L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
서열번호 1	변이체			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	펩티드 코드		S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
서열번호 2	변이체			F								
											L	
											F	
				F							L	
				F							F	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UCLH5-001	펩티드 코드		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
서열번호 3	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	펩티드 코드		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
서열번호 4	변이체			F								
											L	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PROM-001	펩티드 코드		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
서열번호 5	변이체			F								
											F	

[0362]

											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	웹터드 코드		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F
서열번호 6	변이체			Y								
				F								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
				F								L
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MST1R-001	웹터드 코드		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F	
서열번호 7	변이체			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NFYB-001	웹터드 코드		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I	
서열번호 8	변이체			F								
												L
												F
				F								L
				F								F
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SMC4-001	웹터드 코드		H	Y	K	P	T	P	L	Y	F	
서열번호 9	변이체			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UQCRB-001	웹터드 코드		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L

[0363]

서열번호 10	변이체			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PPAP2C-001	펩티드 코드		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L	
서열번호 11	변이체			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
AVL9-001	펩티드 코드		F	Y	I	S	P	V	N	K	L	
서열번호 12	변이체			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-001	펩티드 코드		V	Y	G	I	R	L	E	H	F	
서열번호 13	변이체			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABL1-001	펩티드 코드		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L	
서열번호 14	변이체			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MUC-006	펩티드 코드		N	Y	E	E	T	F	P	H	I	
서열번호 15	변이체			F								

[0364]

											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-001	펩티드 코드		R	Y	L	W	A	T	V	T	I	
서열번호 16	변이체			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EPHA2-005	펩티드 코드		V	Y	F	S	K	S	E	Q	L	
서열번호 17	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MMP3-001	펩티드 코드		V	F	I	F	K	G	N	Q	F	
서열번호 18	변이체			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-002	펩티드 코드		R	F	L	S	G	I	I	N	F	
서열번호 19	변이체			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PLK4-001	펩티드 코드		Q	Y	A	S	R	F	V	Q	L	
서열번호 20	변이체			F								
											F	

[0365]

											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-002	펩티드 코드		K	Y	L	T	V	K	D	Y	L	
서열번호 21	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL12A1-001	펩티드 코드		V	Y	N	P	T	P	N	S	L	
서열번호 22	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL6A3-001	펩티드 코드		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
서열번호 23	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	펩티드 코드		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
서열번호 24	변이체			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	펩티드 코드		Y	Y	K	N	I	G	L	G	F	
서열번호 25	변이체			F								
											L	
											I	

[0366]

				F							L	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-001	펩티드 코드		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
서열번호 26	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	펩티드 코드		L	Y	P	E	V	F	E	K	F	
서열번호 27	변이체			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HSP90B1-001	펩티드 코드		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F
서열번호 28	변이체			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SIAH2-001	펩티드 코드		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F
서열번호 29	변이체			Y								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SLC6A6-001	펩티드 코드		V	Y	P	N	W	A	I	G	L	
서열번호 30	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	

[0367]

				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IQGAP3-001	펩티드 코드		V	Y	K	V	V	G	N	L	L	
서열번호 31	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ERBB3-001	펩티드 코드		V	Y	I	E	K	N	D	K	L	
서열번호 32	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KIF2C-001	펩티드 코드		I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L
서열번호 33	변이체			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	펩티드 코드		L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
서열번호 1	변이체			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	펩티드 코드		S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
서열번호 2	변이체			F								
											L	
											F	
				F							L	
				F							F	

[0368]

		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UCHL5-001	웹터드 코드		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
서열번호 3	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	웹터드 코드		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
서열번호 4	변이체			F								
											L	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PROM-001	웹터드 코드		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
서열번호 5	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	웹터드 코드		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F
서열번호 6	변이체			Y								
				F								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
				F							L	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MST1R-001	웹터드 코드		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F	
서열번호 7	변이체			F								
											L	
											I	

[0369]

				F								L	
				F								I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
NFYB-001	웹터드 코드		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I		
서열번호 8	변이체			F									
												L	
												F	
				F								L	
				F								F	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SMC4-001	웹터드 코드		H	Y	K	P	T	P	L	Y	F		
서열번호 9	변이체			F									
												L	
												I	
				F								L	
				F								I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
UQCRB-001	웹터드 코드		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L	
서열번호 10	변이체			F									
												F	
												I	
				F								F	
				F								I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
PPAP2C-001	웹터드 코드		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L		
서열번호 11	변이체			F									
												F	
												I	
				F								F	
				F								I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
AVL9-001	웹터드 코드		F	Y	I	S	P	V	N	K	L		
서열번호 12	변이체			F									
												F	
												I	
				F								F	

[0370]

				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-001	펩티드 코드		V	Y	G	I	R	L	E	H	F	
서열번호 13	변이체			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABL1-001	펩티드 코드		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L	
서열번호 14	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MUC-006	펩티드 코드		N	Y	E	E	T	F	P	H	I	
서열번호 15	변이체			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-001	펩티드 코드		R	Y	L	W	A	T	V	T	I	
서열번호 16	변이체			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EPHA2-005	펩티드 코드		V	Y	F	S	K	S	E	Q	L	
서열번호 17	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	

[0371]

		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MMP3-001	펩티드 코드		V	F	I	F	K	G	N	Q	F	
서열번호 18	변이체			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-002	펩티드 코드		R	F	L	S	G	I	I	N	F	
서열번호 19	변이체			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PLK4-001	펩티드 코드		Q	Y	A	S	R	F	V	Q	L	
서열번호 20	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-002	펩티드 코드		K	Y	L	T	V	K	D	Y	L	
서열번호 21	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL12A1-001	펩티드 코드		V	Y	N	P	T	P	N	S	L	
서열번호 22	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

[0372]

COL6A3-001	펩티드 코드		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
서열번호 23	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	펩티드 코드		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
서열번호 24	변이체			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	펩티드 코드		Y	Y	K	N	I	G	L	G	F	
서열번호 25	변이체			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-001	펩티드 코드		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
서열번호 26	변이체			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	펩티드 코드		L	Y	P	E	V	F	E	K	F	
서열번호 27	변이체			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HSP90B1-001	펩티드 코드		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F

[0373]

서열번호 28	변이체			F									
													L
													I
				F									L
				F									I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
SIAH2-001	펩티드 코드		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F	
서열번호 29	변이체			Y									
													L
													I
				Y									L
				Y									I
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SLC6A6-001	펩티드 코드		V	Y	P	N	W	A	I	G	L		
서열번호 30	변이체			F									
												F	
												I	
				F								F	
				F								I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
IQGAP3-001	펩티드 코드		V	Y	K	V	V	G	N	L	L		
서열번호 31	변이체			F									
												F	
												I	
				F								F	
				F								I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
ERBB3-001	펩티드 코드		V	Y	I	E	K	N	D	K	L		
서열번호 32	변이체			F									
												F	
												I	
				F								F	
				F								I	
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
KIF2C-001	펩티드 코드		I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L	
서열번호 33	변이체			F									

													F
													I
				F									F
				F									I

더 긴 펩티드 역시 적당할 수 있다. 또한 보통은 8 내지 11개의 아미노산의 길이이지만, MHC 클래스-I 에피토프가 더 긴 실제 에피토프를 포함하는 펩티드 또는 단백질에서 펩티드 처리를 통해 생성되었을 수도 있다. 실제 에피토프 주변에 있는 잔기가 처리 중에 실제 에피토프를 노출하기 위해 필요한 단백질 분해 절단에 실질적으로 영향을 끼치지 않는 잔기인 것이 바람직하다.

따라서, 본 발명은 MHC 클래스-I 에피토프의 펩티드와 변이체도 제공하는데, 그 변이체의 총괄적인 길이가 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 더 바람직하게는 8 내지 14개, 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 아

미노산이 가장 바람직하다

- [0378] 물론, 본 발명의 펩티드 또는 변이체는 인간 주조직적합 복합체 클래스-I 분자와 결합을 할 수 있는 능력을 갖는다. 펩티드 또는 그의 변이체의 MHC 복합체와의 결합은 이 분야에서 알려진 방법으로 실험이 가능하다.
- [0379] 특별히 바람직한 본 발명의 양태는 펩티드가 본질적으로 서열번호 1 내지 서열번호 95의 아미노산 서열을 포함하는 것이다.
- [0380] "본질적으로 이루어지는"이란 본 발명에 따른 펩티드가 서열번호 1 내지 서열번호 95 또는 그의 변이체 이외에 MHC 분자에 대한 에피토프로 기능을 하는 데에 관여하지 않는 추가적인 N-그리고/또는 C-말단에 위치한 아미노산의 서열이 다른 아미노산을 포함한 것이다.
- [0381] 그렇지만, 이 서열은 본 발명의 펩티드의 세포 안으로의 효율적인 삽입을 위해 중요할 수 있다. 본 발명의 구체적인 사항으로 펩티드는 융합 단백질로 이는 예를 들면 HLA-DR 항원-관련 변이체 체 (p33, 앞으로 "Ii"라고 함)의 NCBI, 젠뱅크 수탁 번호(GenBank Accession number) X00497에서 보여지는 80 N-말단 아미노산으로 이루어진다.
- [0382] 추가적으로, 펩티드 또는 변이체는 안정성 그리고/또는 MHC에 대한 결합성을 향상시켜 더 강한 면역 반응을 일으키도록 더 개질이 될 수 있다. 이러한 펩티드 서열을 최적화하는 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들면, 역 펩티드 결합 또는 비펩티드 결합의 삽입을 포함한다.
- [0383] 역 펩티드 결합 아미노산 잔기는 펩티드 링크 (-CO-NH-)로 연결이 되지 않았지만 펩티드 결합이 반대로 되어 있다. 이러한 레트로-인버스 펩티도미메틱은 이 분야에서 알려진, 예를 들면 참조 문헌 (Meziere et al (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237)에서 상기 방법을 이용하여 만들어질 수 있다. 측쇄의 방향 변화가 아닌 척추 아미노산의 변화를 갖는 슈도펩티드를 만드는 것을 포함한다. 문헌 (Meziere et al (1997))은 MHC 결합과 T 조력 세포 반응에서, 이러한 슈도펩티드가 유용하다고 한다. CO-NH 결합 대신에 NH-CO 결합을 포함하고 있는 레트로-인버스 펩티드는 단백질 분해에 대한 내성이 높다.
- [0384] 비펩티드 결합의 예는 다음과 같다: -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, 그리고 -CH₂SO-. 미국특허 제4,897,445호는 비펩티드 결합(-CH₂-NH)의 고체상 합성 방법을 제공하며, 이는 기본 절차로 합성된 폴리펩티드와 NaCNBH₃ 존재 시 아미노 알데히드와 아미노산을 반응시켜 생산된 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0385] 상기 서열을 포함한 펩티드는 이들의 안정성, 생체이용률 및/또는 펩티드에 대한 친화력을 향상시키기 위해 이들의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 추가적인 화학적 기를 가지고 있도록 합성이 될 수 있다. 예를 들면, 카보벤족실, 단실, t-부틸옥시카보닐 등의 소수성 기는 펩티드의 아미노 말단에 더해질 수 있다. 비슷하게, 아세틸 기 또는 9-플루오렌일메톡시-카보닐 기는 펩티드의 아미노 말단에 자리 잡을 수 있다. 추가적으로, 소수성 기, t-부틸옥시카보닐 또는 아미노 기는 펩티드의 카르복시 말단에 더해질 수 있다.
- [0386] 또한, 본 발명의 펩티드는 입체 배열을 변경하기 위해 혼합될 수 있다. 예를 들면, 하나 또는 여러 펩티드 아미노산 잔기의 D-이성체는 보통 L-이성체 대신에 쓰일 수 있다. 또한, 본 발명의 펩티드의 최소한 하나의 아미노산 잔기는 다른 잘 알려진 비자연적으로 나타나는 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 이런 변경은 안정성, 생물학적 이용가능성, 및/또는 발명의 펩티드의 결합 작용을 증진시킬 수 있다
- [0387] 비슷하게, 본 발명의 펩티드 또는 변이체는 펩티드 합성의 이전 또는 이후에 특정 아미노산에 반응함으로써 화학적으로 개질될 수 있다. 이런 개질의 예는 이 분야에서 잘 알려져 있고, 예를 들면, 문헌 (R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005)에 요약되고 본원에 참조로서 혼입되었다. 아미노산의 화학적 개질은 아실화, 아미딘화, 리신의 피리독실화, 감소하는 알킬화, 2,4,6-트라이니트로벤젠 설펜산 (TNBS)이 있는 아미노 기의 트라이니트로벤젠화, 카르복실 기의 아미드 개질, 및 시스테인의 시스테인산으로의 퍼포민산 산화작용에 의한 설피드릴 개질, 수은 파생의 형성, 다른 티올 화합물과 섞인 다이설피드 형성, 말레이미드와의 반응, 요오드화 아세트산 또는 요오드 아세트 아미드와의 카르복시 메틸화, 알칼리성 pH에서의 시안산염의 카바미드화가 있지만 이것 뿐은 아니다. 이것에 대해서, 기술자는 단백질의 화학적 개질에 관한 더 광대한 방법을 위해서 문헌 (Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000))의 15과를 참조한다.
- [0388] 간단하게, 예를 들어 단백질의 라르기닐 잔기의 개질은 부가물을 형성하기 위해 페닐글리옥살, 2,3-부탄다이온

및 1,2-사이클로헥산다이온과 같은 인근 다이카보닐 합성물의 반응에 종종 기반을 둔다. 또 다른 예는 메틸글리 옥살과 아르기닌 잔기의 반응이다. 리신과 히스티딘과 같은 다른 친핵성 위치의 동시 개질이 없이 시스테인은 변경이 가능하다. 결과적으로, 많은 숫자의 제약이 시스테인의 변경에 사용이 가능하다. 시그마-알드리치 (<http://www.sigma-aldrich.com>) 등과 같은 웹사이트가 이러한 특정한 제약에 대한 정보를 제공한다.

- [0389] 선택된 단백질의 이황결합 감수 분열 역시 흔하다. 이황결합은 생물약제의 열처리 동안에 형성되고 산화될 수 있다.
- [0390] 글루탐산 잔기를 변경하기 위해 우드워드 시약 (Woodward's Reagent) K가 사용이 될 수 있다. N-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N'-에틸카보다이이미드는 리신과 글루탐산 사이에 가교 결합을 이루기 위해 사용이 될 수 있다.
- [0391] 예를 들면, 다이에틸피로카보네이트는 단백질의 히스티딘 잔기의 변경을 위한 시약이다. 히스티딘은 또한 4-하이드록시-2-노넬알을 이용하여 변경될 수도 있다.
- [0392] 예를 들어 리신 잔기와 다른 알파-아미노기의 반응은 펩타이드를 표면에 결합하거나 단백질/펩티드와 가교 결합하는 데에 유용하다. 리신은 폴리 (에틸렌)글라이콜과의 결합의 위치이며 이는 단백질의 당화 중에 중요한 변경의 위치이다.
- [0393] 단백질의 메티오닌 잔기는 예를 들면 요오도아세트아미드, 브로모에틸아민 및 클로라민 T를 이용하여 변경이 될 수 있다.
- [0394] 테트라니트로메탄과 N-아세틸이미다졸은 티로신 잔기의 변경을 위해 사용이 될 수 있다. 다이티로신의 형성에 의한 가교 결합은 과산화수소/구리 이온을 통해 이루어질 수 있다.
- [0395] 최근의 연구에서 N-브로모석신이미드, 2-하이드록시-5-니트로벤질 브로마이드 또는 3-브로모-3-메틸-2-(2-니트로페닐머캡토)-3H-인돌 (BPNS-스카톨)이 트립토판의 개질에 사용된다.
- [0396] PEG로의 치료적인 단백질과 펩티드의 성공적인 개질은 순환계 반감기의 확장과 자주 관련되고, 단백질의 글루타르알데히드, 폴리에틸렌 글리콜 아크릴레이트와 포름알데히드와의 가교 결합은 히드로겔의 준비에 쓰인다. 면역 치료를 위한 알레르겐의 화학적 개질은 자주 카바밀화와 칼슘시안산염에 의해서 얻어진다.
- [0397] 본 발명에서 바람직한 사항은 펩티드 또는 이의 변이체에서 이 펩티드가 개질되었거나, 비펩티드를 포함하고 있는 것이다. 보통, 펩티드와 변이체는 (적어도 아미노산 잔기 사이의 펩티드 연결기를 갖는) 문헌 (Lu et al (1981))과 여기에 포함된 참고 문헌에서 발표된 고체상 펩티드 합성 Fmoc-폴리아미드를 이용하여 합성이 될 수 있다. 임시적인 N-아미노기 보호는 9-플루오렌일메틸옥시카보닐 (Fmoc)에 의해 주어진다. 매우 염기 불안정한 보호기의 반복적인 절단은 N,N-다이메틸폼아미드 내의 20% 피페리딘에 의해서 이루어진다. 측쇄 기능은 (세린과 티로신의 경우) 부틸 에터에 의해, (글루탐산과 아스파르트산의 경우) 부틸 에스터에 의해, (리신과 히스티딘)의 경우 부틸옥시카보닐 유도체에 의해 보호될 수 있다. 글루타민 또는 아스파라긴이 C-말단 잔기일 시, 측쇄 아미노산 기능성을 보호하기 위해 4,4'-다이메톡시벤즈하이드릴 기가 쓰인다. 고체상 지원은 세 개의 모노메틸다이메틸아크릴아미드 (측추-모노머), 비스아크릴오일에틸렌 다이아민 (가교 결합기) 및 아크릴오일사르코신 메틸 에스터 (기능제)로 만들어진 폴리다이메틸-아크릴아미드 중합체에 의해 이루어진다. 펩티드에서 사용이 되는 레진의 분리가 가능한 연결체는 산불안정 4-하이드록시메틸-페녹시아세트산 유도체이다. 모든 아미노산 유도체는 그들의 미리 생성된 대칭적인 무수물 유도체에 추가가 되지만, 이에 제외되는 것은 아스파라긴과 글루타민이며, 이는 역 N,N-다이사이클로헥실-카보다이이미드/하이드록시벤조트라이아졸 매개 연결 절차를 거쳐 추가가 된다. 모든 연결과 보호제거 반응은 닌하이드린, 트라이니트로벤젠 설폰산 또는 이소탄을 이용하여 모니터링된다. 합성이 끝나면, 펩티드는 레진 지원에서 분리가 되며 이는 측쇄 보호기의 50% 스캐빈저 혼합을 갖는 95% 트라이플루오로아세트산에 의한 처리로 제거가 되는 동시에 일어난다. 자주 사용되는 스캐빈저는 에탄다이티올, 페놀, 아니솔 및 물을 포함하며, 정확한 선택은 합성이 되고 있는 펩티드의 구성 아미노산에 따라 다르다. 또한 펩티드 합성의 고체상 및 액체상 방법의 혼합 또한 가능하다 (예를 들면, 문헌 (Bruckdorfer, Marder, and Albericio 29-43)과 여기에 있는 참고 문헌 참조).
- [0398] 트라이플루오로아세트산은 진공 상태에서 증발로 제거가 되며 이는 다이에틸 에터로 마쇄되어 조질 펩티드를 생성한다. 이때 존재하는 스캐빈저는 간단한 추출 절차를 거치며, 방수의 동결건조 시 조질 펩티드에서 스캐빈저가 제거된다. 펩티드 합성의 시약은 예를 들면 칼바이오크-노바바이오크 (UK) 리미티드 (Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd), 영국 노팅햄 엔쥐7 2큐제이 소재)와 같은 곳에서 구입할 수 있다.
- [0399] 정제는 결정 작용, 크기 배제 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피와

(보통) 예를 들면, 아세트 니트릴/물 구배 분리를 사용하는 역상 고성능액체 크로마토그래피와 같은 기술 단독 또는 여러 개의 조합으로 실행될 수 있다.

- [0400] 펩티드의 분석은 박막 크로마토그래피, 겔전기 영동법, 특히, 모세관 전기, 고체 상 추출 (CSPE), 역상 고성능액체 크로마토그래피, 산 가수분해 후 아미노산 분석과 고속 원자 폭격 (FAB) 질량 분광계 분석과 MALDI와 ESI-Q-TOF 질량 분광계 분석을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0401] 본 발명의 추가 측면은 발명의 펩티드나 펩티드 변이체에 코딩하는 핵산 (예를 들면, 폴리뉴클레오타이드)을 제공한다. 폴리뉴클레오타이드는 예를 들면, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 재조합, 단독- 그리고/또는 이중-꼬임, 또는 원시 또는 예를 들면, 티오 인산 에스테르 골격이 있는 폴리뉴클레오타이드 같은 안정된 폴리뉴클레오타이드 형일 수 있고, 그것은 펩티드를 위해 코딩만 한다면 인트론을 가질 수도 안 가질 수도 있다. 물론, 자연적으로 일어나는 아미노산 잔기를 가진 펩티드만이 자연적으로 일어나는 펩티드 결합과 만나 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된다. 본 발명의 또 다른 측면은 발명에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 제공한다. 다른 세포 종류의 발현 벡터는 이 분야에서 잘 알려져 있으며 과도한 실험 없이도 선택될 수 있다.
- [0402] 특히 DNA와 같은 폴리뉴클레오타이드를 벡터와 예를 들면 보완 점착 말단을 이용하여 연결하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들면, 보완 단독중합체 트랙이 DNA 단편에 추가가 되어 벡터 DNA에 삽입될 수 있다. 벡터와 DNA 단편은 보완 단독중합체 꼬리와 수소 결합을 하여 재조합 DNA 분자를 형성한다.
- [0403] 하나 이상의 제한 자리를 포함하는 합성된 연결기는 DNA 단편을 벡터로 연결하는 데에 또 다른 방법을 제공한다. 여러 가지의 제한 엔도뉴클레아제 자리를 포함한 합성 연결기는 시중에서 인터내셔널 바이오테크놀로지스 인코포레이티드 (International Biotechnologies Inc, 미국 코네티컷주 뉴 하벤 소재)를 비롯한 여러 곳에서 구입할 수 있다.
- [0404] 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 변경하는 바람직한 방법은 문헌 (Saiki et al. 487-91)에서 공개된 것과 같은 PCR을 이용한다. 이 방법은 예를 들면 적당한 제한 자리를 만들어 적당한 벡터로 DNA를 삽입을 하거나, DNA 변경을 위해 사용이 될 수 있으며, 또 다른 이 분야에서 알려진 방법이 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용이 된다면, 폭스와 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.
- [0406] DNA (또는 레트로바이러스 벡터의 경우, RNA)는 그 후에 적당한 숙주에서 본 발명의 펩티드 또는 그 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 생성하기 위해 발현된다. 따라서, 본 발명의 펩티드 또는 그의 변이체를 코딩하는 DNA는 본 발명의 폴리펩티드의 발현과 생성을 하기 위해 적당한 숙주 세포를 전환하기 위한 발현 벡터를 만들기 위해 알려진 기술을 사용하거나, 적당하게 이때 토론된 점을 고려하여 변경이 될 수 있다. 이러한 기술은 미국특허 제4,440,859호, 제4,530,901호, 제4,582,800호, 제4,677,063호, 제4,678,751호, 제4,704,362호, 제4,710,463호, 제4,757,006호, 제4,766,075호와 제4,810,648호에서 발표되었다.
- [0408] 본 발명의 화합물을 구성하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA (또는 레트로바이러스 벡터의 경우, RNA)는 다양한 다른 DNA 서열과 함께 결합이 되어 적당한 숙주로 삽입이 될 수 있다. DNA의 동요는 숙주의 성질, DNA의 숙주로의 삽입 방법, 그리고 어디에서 에피솜 유지 또는 통합이 바람직한지에 따라 결정이 된다.
- [0409] 일반적으로, DNA는 발현에 적절한 방침과 리딩 프레임에서 플라스미드와 같은 발현 벡터에 삽입된다. 필요하다면, 제어가 일반적으로 발현 벡터에서 유용하지만, 원하는 숙주에 의해 인정되는 적절한 복사와 해석 규제 제어 뉴클레오타이드 서열에 연결될 수 있다. 벡터는 표준 기술에 의해 숙주에 도입된다. 보통, 모든 숙주가 벡터에 의해 전환이 되지는 않는다. 따라서, 전환이 된 숙주 세포를 선택하는 과정이 필요하다. 하나의 선택 기술은 DNA 서열이 발현 벡터에 항생제 내성과 같은 선택이 가능한 전환된 세포의 성질을 갖는 필요한 조정 요소와 함께 삽입되는 것이다.
- [0410] 또 다른 방법으로, 이러한 선택이 가능한 성질을 갖는 유전자가 다른 벡터에 존재할 수도 있으며, 이때 이 다른 벡터는 숙주 세포를 함께 전환하는 데 쓰인다.
- [0411] 본 발명의 재조합 DNA에 의해 전환된 숙주 세포는 이어서 이 분야의 전문가들에게 잘 알려진 충분한 시간 동안 적당한 상태에서 배양이 되며 이는 폴리펩티드의 발현이 가능하도록 하며, 이는 후에 회복이 된다.
- [0412] 박테리아 (에스케리치아 콜라이와 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)), 효모 (예를 들면, 사카로미세스

세레비지아에 (*Saccharomyces cerevisiae*)), 필라멘트 곰팡이 (예를 들면, 아스퍼길러스 종 (*Aspergillus spec.*)), 식물 세포, 동물 세포, 곤충 세포 등을 포함한 많은 발현 시스템이 알려져 있다. 바람직하게는 이 시스템은 ATCC 셀 바이올로지 콜렉션 (ATCC Cell Biology Collection)에서 구입이 가능한 CHO 세포와 같은 포유류 세포이다.

[0413] 기본적인 발현을 위한 전형적인 포유류 세포 벡터 플라스미드는 CMV 또는 SV40 프로모터와 적당한 폴리 A 꼬리를 가지고 있으며, 네오마이신과 같은 또한 내성 마커를 지니고 있다. 하나의 예로서 파마시아(Pharmacia, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)에서 구입가능한 pSVL이 있다. 유도가 가능한 포유류 발현 벡터의 예는 pMSG이며 이 역시 파마시아에서 구입가능하다. 유용한 효모 플라스미드 벡터는 pRS403-406 및 pRS413-416이며 이는 보통 스트라타젠 클로닝 시스템 (Stratagene Cloning Systems, 미국 캘리포니아주 92037 라호야 소재)에서 구입가능하다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효모 통합 플라스미드 (YIps)이며 이는 효모 선택 마커 HIS3, TRP1, LEU2 및 URA3을 포함한다. 플라스미드 pRS413-416은 효모 센트로미어 플라스미드 (Ycps)이다. CMV 프로모터 기반 벡터 (예를 들면 시그마-알드리치에서 구할 수 있음)는 일과성 또는 안정적인 발현, 세포질 발현 또는 분비, FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT의 여러 가지의 결합의 N-말단 또는 C-말단 태깅을 제공한다. 이러한 융합 단백질은 재조합 단백질의 검출, 정제와 분석을 가능하게 한다. 듀얼-태깅 융합은 검출의 유연성을 제공한다.

[0414] 강한 인간 세포거대바이러스 (CMV) 프로모터 조정 부분은 구조 단백질 발현 수준을 COS 세포에서 높게는 1 mg/L 까지 도달하게 한다. 덜 효력있는 세포주에서는, 단백질의 수준은 약 0.1 mg/L 정도이다. SV40 복제 기원의 준제는 SV40 복제 가능 COS 세포에서 높은 수준의 DNA 복제의 결과를 낳는다. CMV 벡터는, 예를 들면, pMB1 (pBR322의 유도체) 박테리아 세포의 복제 기원, 암피실린 내성 선택을 위한 베타락탐아제 유전자, hGH polyA, 및 f1 기원을 포함한다. 프레프로트립신 리더 (PPT) 서열을 포함하는 벡터는 FLAG 융합 단백질을 ANTI-FLAG, 레진과 판을 이용한 정제를 위해 배양기로 방향을 설정할 수 있다. 여러 가지의 숙주 세포와 사용될 수 있는 다른 벡터와 발현 시스템은 이 분야에서 잘 알려져 있다.

[0415] 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 벡터에 의해 전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 몇몇의 경우 박테리아 세포는 원핵 숙주 세포의 바람직한 세포이며, 예를 들면 베데스다 리서치 래보러토리스 인코포레이티드(Bedesda Research Laboratories Inc.), 미국 메릴랜드주 베데스다 소재)에서 구입가능한 에스케리키아 콜라이 균주 DH5와 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection (ATCC), 미국 메릴랜드주 록빌 소재)에서 시판중인 DH5 등의 에스케리키아 콜라이를 포함한다. 바람직한 진핵 세포는 효모, 곤충 그리고 포유류 세포를 포함하며, 바람직하게는 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유모세포 그리고 대장 세포주를 포함한 척추동물 세포이다. 효모 숙주 세포는 스트라타젠 클로닝 시스템 (미국 캘리포니아주 92037 라호야 소재)에서 보통 구할 수 있는 YPH499, YPH500 및 YPH501을 포함한다. 바람직한 포유류 숙주 세포는 ATCC에서 CCL61로 알려진, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, ATCC에서 CRL 1658로 알려진 NIH 스위스 생쥐 태아 세포 NIH/3T3, ATCC에서 CRL 1650으로 알려진 원숭이 신장-유래 COS-1 세포와 인간 태아 신장 세포인 293 세포를 포함한다. 바람직한 곤충 세포는 바콜로바이러스 발현 벡터로 유전자 형질감염될 수 있는 Sf9 세포가 있다. 발현을 위한 적당한 숙주 세포 선택에 대한 내용은 예를 들면 문헌 (Paulina Balbas and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9)과 같은 교과서 또는 이 분야의 전문가들에게 알려진 다른 문헌에서 찾을 수 있다.

[0416] 본 발명의 적당한 세포 숙주를 DNA 구성에 의해 전환을 시키는 것은 잘 알려진 방법이며 이는 사용된 벡터의 타입에 따라 보통 달라진다. 원핵 세포 숙주 세포의 전환에 대한 내용은 예를 들면 문헌 (Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, and Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)을 참조한다. 효모 세포의 전환에 대한 내용은 문헌 (Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY)에서 기술되어 있다. 포유류 세포에 대한 내용에 대해서는 문헌 (The method of Beggs (1978) Nature 275,104-109)을 참조한다. 이런 세포에 대한 형질감염에 유용한 시약의 예는 스트라타젠 클로닝 시스템스 또는 라이프 테크놀로지스 인코포레이티드(Life Technologies Inc., 미국 메릴랜드주 20877 게이터스버그 소재)에서 구할 수 있는 칼슘 인산염과 DEAE-텍스트란 또는 리포솜 약제를 포함한다. 전기천공은 역시 이러한 세포들은 전환시키고/시키거나 형질감염시키는 데에 유용하며, 이는 효모 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포, 척추 세포 등의 전환 분야에서 잘 알려져 있다.

[0417] 성공적으로 전환된 세포, 즉, 본 발명의 DNA 구성을 갖는 세포는, PCR과 같은 잘 알려진 기술을 사용하여 식별

할 수 있다. 또 다른 방법으로는, 항체를 이용하여 상청액의 단백질을 검출할 수 있다.

- [0418] 예를 들면, 박테리아, 효모와 곤충 세포와 같은 본 발명의 특정한 숙주 세포는 본 발명의 펩티드를 제조하는 데에 중요하다. 하지만, 다른 숙주 세포 또한 특정한 치료 방법에서 유용할 수 있다. 예를 들면, 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포가 본 발명의 펩티드를 발현하기 위해 적당한 MHC 분자에 로딩됨으로써 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 발명에 따라 핵산 또는 발현 벡터를 포함하고 있는 숙주 세포를 제공한다.
- [0419] 바람직한 양태에서, 숙주 세포는 항원 제시 세포이며, 특별히 수지상 세포 또는 항원 제시 세포이다. 전립선암 인산효소(PAP)를 포함한 재조합 융합 단백질 APC는 현재 전립선암에 대한 치료법으로 연구가 되고 있다(시폴류셀-T (Sipuleucel-T)) (Rini et al. 67-74; Small et al. 3089-94).
- [0421] 더 나아가 본 발명은 펩티드 또는 이의 변이체를 생산하고, 숙주 세포를 배양하며, 펩티드를 숙주 세포에서 또는 배양기에서 분리하는 방법을 제공한다.
- [0422] 백신에 포함될 각 펩티드의 최적의 양과 처방은 이 분야의 기술자가 과도한 실험 없이도 정할 수 있다. 예를 들면, 펩티드나 그 변이체는 정맥 (i.v.) 주사, 피하 (s.c.) 주사, 피내 (i.d.) 주사, 복막내 (i.p.) 주사, 근육내 (i.m.) 주사에 의해 제조될 수 있다. 바람직한 펩티드 주사 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m.과 i.v.를 포함한다. 바람직한 DNA 주사 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.이다. 예를 들면, 50 µg 내지 1.5 mg, 더 바람직하게는 125 µg 내지 500 µg의 펩티드 또는 DNA 처방을 줄 수 있고 각각의 펩티드와 DNA에 따라 다르다. 이 범위의 처방은 전 실험에 성공적으로 쓰였다 (Brunsvig et al. 1553-64; Staehler et al.).
- [0423] 본 발명의 또 다른 측면은 활성화된 T 세포를 생산하는 세포 외 방법을 포함하며, 이 방법은 세포 외 T 세포를 본 발명의 펩티드인 항원이 적당한 항원 제시 세포의 표면에 발현된 로딩된 MHC와 T 세포를 항원 특이적인 방법으로 활성화시킬 수 있는 적당한 시간 동안 접촉시키는 것을 포함한다. 바람직하게는 항원 제시 세포와 함께 충분한 양의 항원이 사용된다.
- [0424] 바람직하게는 포유류 세포는 TAP 펩티드 전달체의 기능이 없거나 감소된 수준이다. 적당한 세포는 T2, RMA-S 및 드로소필라 (Drosophila) 세포를 포함한 TAP 펩티드 전달체가 없다. TAP는 항원 처리와 관련된 전달체이다.
- [0425] 인간 펩티드 로딩 결핍 세포주 T2는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(미국 메릴랜드주 20852 록빌 파크론 드라이브 12301 소재, 카탈로그 번호 CRL 1992)에서 구입이 가능하며, 드로소필라 세포주와 슈나이더 (Schneider) 라인 2는 ATCC에서 카탈로그 번호 CRL 19863으로 구입가능하며; 생쥐 RMA-S 세포주는 문헌 (Karre et al 1985)에 기술된다.
- [0426] 바람직하게는 숙주 세포는 형질감염 전에 MHC 클래스-I 분자를 실질적으로 발현하지 않는다. 또한 자극 세포가 B7.1, B7.2, ICAM-1 및 LFA 3과 같은 T 세포의 동시-자극 신호를 제공하는 데 중요한 분자를 발현하는 것이 중요하다. 많은 MHC 클래스-I 분자 및 이러한 동시-자극자 분자들의 핵산 서열은 젠뱅크와 EMBL 데이터베이스에서 찾을 수 있다.
- [0427] 항원으로 MHC 클래스-I 에피토프가 사용되는 경우, T 세포는 CD8-양성 CTL이다.
- [0428] 만약 항원 제시 세포가 형질감염이 되고 이러한 에피토프를 발현하도록 한다면, 바람직하게는 세포는 서열번호 1 내지 서열번호 95 또는 이의 변형된 아미노산의 서열을 포함하고 있는 펩티드를 발현하는 발현 벡터를 포함하고 있다.
- [0429] CTL을 시험관내에서 생산할 수 있는 몇몇의 다른 방법이 있다. 예를 들면, 문헌 (Peoples et al (1995) and Kawakami et al (1992))에서 상기 방법은 자가 종양-침윤 림프구를 사용하여 CTL을 생산한다. 문헌 (Plebanski et al (1995))은 자가 말초 혈액 림프구 (PLB)를 사용하여 CTL을 생산한다. 문헌 (Jochmus et al (1997))은 수지상 세포를 펩티드 또는 폴리펩티드로 펠싱하거나, 재조합 바이러스로 감염하는 방법으로 자가 CTL을 생성하는 것을 기술된다. 문헌 (Hill et al (1995)) 및 문헌 (Jerome et al (1993))은 B 세포를 사용하여 CTL을 생산한다. 추가적으로, 펩티드 또는 폴리펩티드에 의해 펠싱된, 또는 재조합 바이러스에 의해 감염된 포식세포가 자가 CTL을 생산하는 데 쓰일 수 있다. 문헌 (S. Walter et al. 2003)은 T 세포를 인공 항원 제시 세포를 사용하여 프라임하는 방법을 기술하며, 이 역시 선택된 펩티드에 대한 T 세포를 생산하는 적당한 방법이다. 이 연구에서 aAPC가 MHC:펩티드 결합체와 폴리스타이린 입자 (미세비즈)의 바이오틴:스트렙타비딘을 이용한 결합에 의해 생산된다. 이 시스템은 aAPC 표면의 MHC 밀도의 정확한 조절을 허가하며, 이는 높은 또는 낮은 총결합력 항원 특이적 T 세포의 반응을 높은 효율성을 가지고 혈액 샘플에서 생산할 수 있다. MHC:펩티드 결합체 외에, aAPC는

항-CD28 항체가 그들의 표면에 결합된 것 같은 다른 단백질의 동시 자극 활동을 지녀야 한다. 더 나아가 이러한 aAPC-기반 시스템은 종종 예를 들면 사이토카인 유사 인터루킨-12와 같은 적당한 액체 인자의 첨가를 필요로 한다.

- [0430] 동종이형의 세포 또한 T 세포의 준비에서 사용이 될 수 있으며 이의 자세한 사항은 국제특허공개 제WO 97/26328 호에서 기술되어 있으며, 이는 여기에 참조문헌으로 포함되어 있다. 예를 들면, 드로소필라 세포와 T2 세포 이외에, 다른 세포도 CHO 세포, 바콜로바이러스-감염 곤충 세포, 박테리아, 효모, 백신 표적 세포 등에서 항원을 제시하는 데에 쓰일 수 있다. 또한 식물과 바이러스도 사용이 될 수 있다(예를 들면, 카우피 모자이크 바이러스를 높은 효율성 있는 시스템을 이용하여 외부 펩티드를 제시하도록 만드는 것을 기술한 문헌 (Porta et al (1994)) 참조).
- [0431] 본 발명의 펩티드에 대해 활성화된 T 세포는 치료에서 유용하다. 본 발명의 다른 측면에서 본 발명의 다음의 방법에 의해 획득할 수 있는 활성화된 T 세포에 대해 제공한다.
- [0432] 위의 방법으로 생산된 활성화된 T 세포는 서열번호 1 내지 95의 서열을 갖는 아미노산으로 구성된 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.
- [0433] 바람직하게는, T 세포는 TCR과 HLA/펩티드-결합체 (예를 들면, 결합)를 통해 상호작용을 하여 인식한다. T 세포는 환자에게 효율적인 활동적인 T 세포의 숫자가 투여되었을 때, 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 표적 세포를 죽이는 데 유용하다. 환자에게 투여된 T 세포는 환자로부터 유도될 수 있으며 위에서 상기 방법대로 활성화가 된다 (즉, 이는 자가 T 세포이다).
- [0434] 다른 방법으로는 T 세포가 환자로부터 유도된 것이 아니라 다른 개인에서 나온 것이다. 물론, 이 개인이 건강한 개인인 것이 바람직하다. 이때 "건강한 개인"이라는 것은, 보통 좋은 건강을 갖는 개인을 말하며, 바람직하게는 면역 시스템의 수행능력이 있으며, 더 바람직하게는, 이 개인은 쉽게 시험되고 검출될 수 있는 병에 시달리지 않는다.
- [0435] 세포 내에서, 본 발명에 따른 CD8-양성 T 세포에 대한 표적 세포는 종양의 세포 (종종 MHC 클래스-I을 발현함) 및/또는 종양 (종양 세포)을 둘러싸는 기질 세포 (종종 MHC 클래스-I을 발현함)이다 (Dengjel et al. 4163-70).
- [0436] 본 발명의 T 세포는 치료 구성의 활성 성분으로 사용이 될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 아미노산 서열을 비정상적으로 발현하는 표적 세포를 죽이는 방법을 제공하며, 이 방법은 위에서 정의된 효율적인 T 세포의 수를 환자에게 투여하는 방법을 포함한다.
- [0437] "비정상적으로 발현된다"라는 것은 폴리펩티드가 이 유전자의 정상 수준과 비교하였을 때 과발현이 되었거나, 종양이 유도된 조직에서는 이 유전자가 발현되지 않으나 종양에서는 발현되는 것을 말한다. "과발현"이란 폴리펩티드가 적어도 정상 세포의 1.2배 이상, 바람직하게는 적어도 2배 이상, 더 바람직하게는 적어도 5배 내지 10배 이상의 수준으로 발현되는 것을 말한다.
- [0438] T 세포는 예를 들면 위에서 상기한 바와 같은 이 분야에서 잘 알려진 방법으로 획득할 수 있다.
- [0439] 흔히 불리우는 T 세포의 입양전달에 대한 프로토콜은 이 분야에서 잘 알려져 있으며 예를 들면 문헌 (Dudley et al. 850-54; Dudley et al. 2346-57; Rosenberg et al. 889-97; Rosenberg et al. 1676-80; Yee et al. 16168-73)에서 찾아 볼 수 있고, 문헌 (Gattinoni et al. 383-93)과 문헌 (Morgan et al.)에서 검토되었다.
- [0440] 펩티드 핵산, 발현 벡터, 세포, 활성화된 CTL, T-세포 수용체 또는 이를 코딩하는 핵산을 포함한 본 발명의 어떤 분자도 병을 치료하는 데에 유용하며 이때 병이란 면역 반응을 도피하는 세포이다. 따라서, 본 발명의 어떤 분자도 약물 또는 약물의 생산에 사용이 될 수 있다. 분자는 그 자체로 또는 본 발명의 다른 분자 또는 알려진 다른 분자와 결합이 되어 사용될 수 있다.
- [0441] 바람직하게는, 본 발명의 약물은 백신이다. 이는 환자에게 직접 투여되거나, 영향을 받은 기관에 또는 전신에 투여되거나, i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v. 또는 생체외로 환자로부터 유래하는 세포 또는 나중에 환자에게 투여될 인간 세포주에 적용되거나, 나중에 환자에게 다시 투여될, 환자로부터 유래하는 면역 세포의 소집단 세포를 선택하는 데 쓰여질 수 있다. 만약 핵산이 시험관내에서 세포로 투여될 경우, 세포가 인터루킨-2와 같은 면역 자극 사이토카인을 동시에 발현하도록 형질감염이 되는 것이 유용할 수 있다. 실질적으로 이 펩티드는 순수하거나, 다른 면역자극 보강제와 결합이 되었거나 (다음 참조) 또는 면역 자극 사이토카인과 결합이 되어 사용이 되거나, 예를 들면 리포솜과 같은 적당한 전달 시스템과 함께 투여될 수 있다. 펩티드는 키홀 림펫 해모시

아닌 또는 마난 (국제특허공개 제WO 95/18145호 및 문헌 (Longenecker, 1993) 참조)과 같은 적당한 담체와 결합이 될 수 있다. 펩티드는 역시 태깅될 수도 있으며 융합 단백질이거나, 하이브리드 분자일 수 있다. 본 발명에서 서열이 주어진 펩티드는 CD4 또는 CD8 세포를 자극하도록 예상된다. 하지만, CD8 CTL의 자극은 CD4 T 조력 세포의 존재 시 더 효율적이다. 따라서, CD8 CTL을 자극하는 MHC 클래스-I 에피토프의 경우 융합 파트너 또는 하이브리드 분자의 부분이 CD4-양성 T 세포를 자극하는 에피토프를 제공한다. CD4- 및 CD8-분자는 적당히 CD4-양성 T 세포를 자극하는 에피토프를 제공한다. CD4- 및 CD8- 자극 에피토프는 이 분야에서 잘 알려져 있으며 본 발명에서 발견된 것들을 포함한다.

[0442] 하나의 측면에서, 백신은 서열번호 1 내지 33의 아미노산 서열 중에 적어도 하나의 펩티드를 갖고 적어도 하나의, 바람직하게는 2 내지 50개, 더 바람직하게는 2 내지 25개, 더 바람직하게는 2 내지 15개, 가장 바람직하게는, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 추가의 펩티드를 갖는다. 이 펩티드는 하나 이상의 특정 TAA로부터 유래할 수 있으며 이는 MHC 클래스-I 분자에 결합을 한다.

[0443] 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 순수하거나 적당한 벡터 또는 전달 시스템에 포함될 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 핵산의 설계 및 삽입 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있다. 이에 대한 설명은 예를 들면 문헌 (Pascolo et al. 117-22)에 기술된 바와 같다. 폴리뉴클레오티드 백신은 쉽게 만들 수 있으나, 이 벡터의 면역 반응의 유도 방법은 아직 완전히 알려져 있지 않다. 적당한 벡터와 전달 시스템은 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함하며, 이와 같은 시스템은 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로 바이러스, 허피스 바이러스, 아데노 관련 바이러스 또는 하나 이상의 바이러스를 포함하는 하이브리드에 기반을 둔다. 비바이러스 전달 시스템은 양이온 지방과 양이온 중합체를 포함하며, 이는 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자총"을 통해 물리적으로 전달되거나 사용될 수 있다. 펩티드 또는 핵산에 의해서 코딩된 펩티드는 예를 들면 위에서 언급한 바와 같이 각각의 반대의 CDR을 위한 T 세포를 자극하는 에피토프와 결합된 융합 단백질일 수 있다.

[0444] 본 발명의 약학 조성물은 최소한 하나의 보조제를 가질 수 있다. 보조제는 특정하지 않게 면역 반응을 향상시키거나 강력하게 하는 물질이다 (예를 들면, 항원에 대한 CTL과 조력-T (TH) 세포에 의해 중재된 면역 반응, 따라서 본 발명의 약제에 유용하다고 간주된다). 적절한 보조제는 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스 (Amplivax, 등록상표), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 플라젤린에서 유도된 플라젤린 또는 TLR5 리간드, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드 (알다라 (ALDARA, 등록상표), 레지퀴모드, 이뮤팩트 (ImuFact) IMP321, IL-2, IL-13, IL-21과 같은 인터루킨, 인터페론-알파 또는 -베타, 또는 이들의 페길레이팅된 유도체, IS 패치 (Patch), ISS, 이스코 매트릭스 (ISCOMATRIX), 이스콤 (ISCOM), 주브이뮌 (JuvImmune), 리포백 (LipoVac), MALP2, MF59, 모노 포스포릴 지질 A, 몬타나이드 (Montanide) IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, 유중수형 유제 배지와 수중유형 유제 배지, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, 온탁 (ONTAK), 오스파 (OspA), 펩텔 (PepTel, 등록상표) 벡터 시스템, 폴리 (라티드 코-글리콜리드), PLG-기반과 텍스트란 극미립자, 탈락토펜, SRL172, 비로솜스 (Virosomes)와 다른 바이러스형 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys, 사포닌에서 파생된 아퀼라 (Aquila) QS21 스티물론, 마이코 박테리아 추출물과 합성 박테리아 세포 벽 의태, 리비스 데톡스 (Ribi's Detox), 퀴 (Quil) 또는 슈퍼포스 (Superfos)와 같은 다른 독점 보조제가 있고 이들에 국한되어 있지 않다. 프로인트 (Freund's) 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 수지상 세포와 그 준비에 특정한 여러 면역성 보조제 (예를 들면 MF59)는 이전에 설명되었다 (Allison and Krummel 932-33). 또한 사이토카인도 쓰일 수 있다. 여러 가지 사이토카인은 임파 조직으로의 (예를 들면, TNF-) 수지상 세포 이전에 영향을 미친다고 직접적으로 연결되어 있고, 수지상 세포를 T-임파구 (예를 들면, GM-CSF, IL-1 및 IL-4) (미국특허 제5,849,589호, 전체적으로 특정하게 참조로서 혼입됨)를 위한 효율적인 항원을 나타내는 세포로의 성숙을 가속시키고, 면역 보조제의 역할을 한다 (예를 들면, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-알파, IFN-베타) [Gabrilovich 1996].

[0445] CpG 면역 촉진 작용 올리고 뉴클레오티드도 백신 환경에서 보조제의 효과를 향상시킨다고 보고되었다. 이론에 의한 구속 없이, CpG 올리고 뉴클레오티드는 주로 TLR9와 같은 톨-유사 수용체 (TLR)를 통해 고유의 (적응하지 않은) 면역 시스템을 활성화시키는 활동을 한다. CpG가 촉진한 TLR9 활성화는 살아있는 또는 죽은 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 조직의 세포 백신 및 예방과 치료 백신의 다량류 결합 같은 펩티드 또는 단백질 항원을 포함한 여러 가지 종류의 항원에 대한 항원 특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요한 것은, TH1 세포의 향상된 활성화와 CD4 세포의 도움이 없을 때도 강한 세포독성 T-임파구(CTL) 생성을 야기하는 수지상 세포 성숙과 분화를 향상시킨다. TLR9 자극에서 유도된 TH1 경향은 명반 또는 보통 TH2 경향을 증진시키는 불완전된 프로인트 보조제 (IFA) 같은 백신 보조제의 존재에도 유지된다. CpG 올리고 뉴클레오티드는 항원이 비교적

약할 때 강한 반응을 유도하는 마이크로입자, 나노입자, 지질 유화제 또는 비슷한 배합물과 같은 다른 보조제와 함께 배합되거나 투여될 때 더욱 큰 보조제 활성을 보인다. 그것들은 면역 반응을 가속시킬 수 있고, 어떤 실험에서는 CpG 없는 전체 용량 백신에 대한 비교할 만한 항체 반응으로 항원 복용을 두 가지 등급 정도로 감소시킬 수 있다 (Krieg 471-84). 미국특허 제6,406,705 B1호는 CpG 올리고 뉴클레오타이드, 비-핵산 산 보조물 그리고 항원-특이적 면역 반응을 유도하는 항원의 결합된 이용을 설명한다. CpG TLR9 경쟁자는 본 발명의 바람직한 약학 조성물의 성분인 몰로겐 (Mologen, 독일 베를린 소재) dSLIM이다 (이중 줄기 루프 면역 조절제). RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9와 같은 다른 TLR 결합 분자 역시 쓰일 수 있다.

[0446] 유용한 보조제의 다른 예로는 치료적으로 작용하고/하거나 보조제로서 작용할 수 있는 CpGs (예, CpR, 이데라 (Idera)), 폴리(I:C)와 같은 dsRNA 유사물질과 이들의 유도체 (예, 암플리젠 (AmpliGen, 등록상표), 힐토놀 (Hiltonol, 등록상표), 폴리-(ICLC), 폴리(IC-R), 폴리(I:C12U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA가 있고, 또한 사이클로포스파미드, 수니티닙, 베바시주맙 (Bevacizumab), 셀레브렉스, NCX-4016, 실데나필, 타달라필, 바르테나필, 소라페닙, 테모졸로미드, 템시롤리무스, XL-999, CP-547632, 파조파닙, VEGF 트랩 (Trap), ZD2171, AZD2171, 항-CTLA4와 면역체계의 다른 중요한 구조 (예, 항-CD40, 항-TGF베타, 항-TNF알파)를 표적으로 하는 물질 및 SC58175를 들 수 있다. 보조제와 본 발명의 상황에서 용이한 첨가제의 양과 농도는 전문가가 과다한 실험 없이도 쉽게 정할 수 있다.

[0447] 바람직한 보조제는 이미퀴모드, 레시퀴모드, GM-CSF, 사이클로포스파미드, 수니티닙, 베바시주맙, 인터페론-알파, CpG 올리고뉴클레오타이드 유도체, 폴리-(I:C)와 그들의 유도체, RNA, 실데나필, 및 PLG 또는 바이로솜의 미립자 제형이다.

[0448] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 양태에서, 보조제는 과립구 포식세포 집락 자극 인자(GM-CSF, 사르그라모스틴), 이미퀴모드와 레시미퀴모드 및 인터페론-알파와 같은 집락-자극 인자를 포함하는 군으로부터 선택된 보조제이다.

[0449] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 양태에서, 보조제는 과립구 포식세포 집락 자극 인자(GM-CSF, 사르그라모스틴), 이미퀴모드와 레시미퀴모드와 같은 집락-자극 인자를 포함하는 군으로부터 선택된 보조제이다.

[0450] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 양태에서, 보조제는 이미퀴모드와 레시미퀴모드이다.

[0451] 이러한 조성물은 피하, 피부내, 근육내, 또는 경구 투여 등의 비경구 투여가 쓰인다. 이것을 위해서, 펩티드와 선택에 따라 다른 분자들은 약물 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체에서 녹여지거나 현탁된다. 추가로, 조성물은 버퍼, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등의 첨가제를 함유할 수 있다. 또한 펩티드는 사이토카인 같은 면역 자극 물질과 같이 투여될 수 있다. 이런 조성물에 쓰일 수 있는 첨가제의 광범위한 목록은 예를 들면 문헌 (A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. Ed. 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press.)에서 찾을 수 있다. 이 조성물은 선종성 암 질병의 예방 및/또는 치료에 쓰일 수 있다. 예시적인 제형은 유럽특허 제EP2113253호에서 발견될 수 있다.

[0452] 본 발명은 암, 특히 위암, 신장세포암, 결장암, 비소세포 폐암, 선암종, 전립선암, 양성 종양, 악성 흑색종의 치료에 유용한 약제를 제공한다.

[0453] 본 발명은 다음과 같은 키트를 포함한다:

[0454] (a) 위에서 설명된 약학 조성물을 액체 또는 동결 건조된 형태로 갖는 용기;

[0455] (b) 선택적으로, 동결 건조된 제형을 위해서 희석된 또는 재구성된 용액을 갖는 두 번째 용기;

[0457] (c) 선택적으로, (i) 용액의 이용 또는 (ii) 동결건조된 제형을 위한 재구성 및/또는 이용에 대한 지침.

[0458] 그 키트는 또한 (iii) 버퍼 (iv) 희석제 (v) 필터 (vi) 바늘, 또는 (v) 주사기 중 하나 이상을 가질 수 있다. 용기로는 병, 약병, 주사기, 또는 테스트 튜브가 바람직하다; 그리고 그것은 다중-사용 용기일 수 있다. 약학 조성물은 동결 건조되는 것이 바람직하다.

[0459] 본 발명의 키트는 본 발명의 동결 건조된 제형을 적당한 용기에 가지고 있고 재구성 및/또는 이용에 대한 지침을 갖는다. 적당한 용기는, 예를 들면, 병, 약병 (예, 듀얼 챔버 튜브), 주사기 (듀얼 챔버 주사기 같은), 및 테스트 튜브이다. 용기는 유리나 플라스틱 같은 다양한 재료로 만들어질 수 있다. 키트 및/또는 용기는 재구성 및/또는 이용에 대한 방침을 말해주는 지침서를 갖는다. 예를 들면, 라벨은 위에서 설명된 대로 동결 건조된 제

형이 펩티드 농도로 재구성되어야 한다고 말해준다. 라벨은 또한 제형이 피하 투여에 유용하고 고안된 것이라는 것을 말할 수 있다.

[0460] 제형을 갖는 용기는 재구성된 제형의 반복적인 투여 (예를 들면, 2 내지 6회 투여)를 가능하게 하는 다중-사용 약병일 수 있다. 키트는 적절한 희석액 (예를 들면, 나트륨 중탄산염 용액)을 갖는 두 번째의 용기를 가질 수 있다.

[0461] 희석액과 동결 건조된 제형을 섞음으로써, 재구성된 제형에서 최종적 펩티드 농도는 가급적이면 최소한 0.15 mg/mL/펩티드 (75 µg)이며 가급적이면 3 mg/mL/펩티드 (1500 µg)를 넘지 않는다. 키트는 버퍼, 희석액, 필터, 바늘, 주사, 사용법이 있는 패키지 삽입물 등 상업 및 사용자의 관점에서 바람직한 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0463] 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 약학 조성물을 가진 하나의 용기를 다른 구성 요소와 (예를 들면, 다른 화합물이나 다른 화합물의 약학 조성물) 함께 또는 없이 가질 수 있거나, 각각의 구성 요소를 위한 다른 용기를 가질 수 있다.

[0464] 가급적이면, 발명의 키트는 두 번째 화합물 (보조제 (예를 들면, GM-CSF), 화학치료법 에이전트, 자연적인 물질, 호르몬이나 길항제, 항-엔지오제네시스 에이전트나 반응 억제제, 아포토시스-유도하는 에이전트나 킬레이트 같은)이나 그것의 약학 조성물과 공동 투여를 위해 포장된 제형을 포함한다. 키트의 구성 요소는 미리 혼합되거나, 각각의 구성 요소가 환자에게 투여 전까지 다른 용기에 담겨 있을 수 있다. 키트의 구성 요소는 하나 또는 여러 가지 액체 용액으로 제공될 수 있으며, 수용액이 바람직하고, 무균 수용액이 더 바람직하다. 키트의 구성요소는 또한 적절한 용매가 더해졌을 때 액체로 바뀌는 고체로 제공될 수 있고, 다른 용기에 제공되는 것이 더 바람직하다.

[0465] 치료 키트의 용기는 약병, 테스트 튜브, 병, 주사기, 또는 어떤 다른 고체나 액체를 동봉하는 수단이 될 수 있다. 일반적으로, 하나 이상의 구성 요소가 있을 때, 키트는 두 번째 병, 또는 다른 용기를 가지며, 이것은 분리된 복용을 허락한다. 키트는 또한 약물 허용 액체를 위한 다른 용기를 가질 수 있다. 가급적으로, 치료 키트는 현재의 키트에 있는 발명의 에이전트의 투여를 가능하게 하는 장치 (예를 들면, 하나 또는 여러 바늘, 주사, 집안기, 피펫 등)를 가진다.

[0466] 현재 약학 조성물은 구두 (경구 투여), 코, 눈, 피하, 피부내, 근육내, 정맥내 또는 경피 투여 같은 임의의 펩티드 투여 방법도 적합하다. 가급적으로 투여는 s.c.이고 i.d.가 제일 바람직하다. 투여는 주입 펌프로 될 수 있다.

[0467] 본 발명의 펩티드인 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB 및 MUC6이 위암에서 유래하기 때문에, 본 발명의 약제는 바람직하게는 위암을 치료하는데 사용이 된다.

[0468] 이제, 본 발명은 하기 실시예를 이용하여 이의 바람직한 양태에 대해 기술될 것이나, 이에 국한되지 않는다. 본 발명의 목적을 위해 여기에 쓰인 모든 참고문헌은 이의 전체 내용이 본원에 참고로서 혼입된다.

[0469] 실시예

[0470] 실시예 1:

[0471] 세포 표면에 제시된 종양 관련 펩티드의 식별

[0472] 조직 샘플

[0473] 환자의 종양 조직은 교토 프리펙처립 유니버시티 오브 메디슨 (Kyoto Prefectural University of Medicine (KPUM), 일본 교토 소재), 오사카 시티 유니버시티 그라듀에이트 스쿨 오브 메디슨 (Osaka City University Graduate School of Medicine (OCU), 일본 오사카 소재) 및 유니버시티 하스피탈 튀빙겐 (University Hospital Tübingen, 독일 소재)에서 획득되었다. 모든 환자들의 서면 통지 동의는 수술 전에 받았다. 조직은 수술 직후 액체 질소에 충격-동결되었고 TUMAP가 -80 °C에서 분리될 때까지 저장되었다.

[0474] 조직 샘플에서 HLA 펩티드의 분리

[0475] 약간 개질된 프로토콜에 따르면, 충격 냉동된 조직 샘플의 HLA 펩티드 풀(pool)은 단단한 조직의 면역 촉진에 의해 HLA-A*02-특정 항체 BB7.2 또는 HLA-A, -B, -C-특이적 항체 W6/32, CNBr-활성화된 세파로오스, 산성 치료

와 한외 여과를 이용해 취득되었다 (Falk, K. 1991; Seeger, F.H. et al. T 1999).

[0476] 방법

[0477] HLA 펩티드 풀은 역상 크로마토그래피 (나노어퀴티 (nanoAcquity) UPLC 시스템, 워터스 (Waters))에 의해 소수성에 따라 분리되고, 녹여서 분리된 펩티드는 ESI 공급원을 갖춘 LTQ-오비트랩 (Orbitrap) 하이브리드 질량 분석기 (터모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific))에 의해 분석되었다. 펩티드의 풀은 1.7 μ m C18 역상 재료 (워터스)가 있는 분석적 융합-실리카 마이크로-모세관 컬럼 (75 μ m i.d. x 250 mm)으로 직접적으로 로딩된다. 이후에, 펩티드는 2 단계 180분 1분에 300 nL 유량에서 10%에서 33%B 이원 구배를 이용해서 분리된다. 구배는 용매 A (물 중 0.1% 포름산) 및 용매 B (아세트오니트릴 중 0.1% 포름산)로 이루어진다. 금 코팅된 유리 모세관 (피코팁 (PicoTip), 뉴 업젝티브 (New Objective))은 나노ESI 공급원으로서의 도입을 위해 사용되었다. LTQ-오비트랩 질량 분석기는 TOP5 전략을 사용하여 데이터 종속 모드로 운영되었다. 간단하게, 스캔 주기는 오비트랩 (R=30.000)의 높은 질량 정확성이 있는 전체 스캔으로 시작되었고, 전에 선택된 이온의 동적 제외가 있는 5개의 가장 풍부한 전구체 이온의 오비트랩 (R = 7500)의 MS/MS 스캔이 행해졌다. 탠덤 질량 스펙트럼은 SEQUEST와 추가적 수동 제어에 의해서 해석되었다. 식별된 펩티드 서열은 합성 서열과 동일한 참조 펩티드의 단편화 패턴과 생성된 자연 펩티드 단편화 패턴을 비교함으로써 확인되었다. 도 1은 MHC 클래스-I 관련된 펩티드 CDC2-001과 이의 UPLC 시스템의 용출법 프로필을 위한 종양 조직에서 얻어진 대표적인 스펙트럼을 보여준다.

[0478] 실시예 2

[0479] 본 발명의 펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 프로파일

[0480] 종양 세포의 MHC 분자에 의해 세포 표면에 제시되는 식별된 펩티드가 모두 면역치료에서 적당한 것은 아니며, 이는 이들의 펩티드의 대부분이 여러 세포 타입에서 발현되는 정상 세포 단백질에서 유래한 것이기 때문이다. 이 펩티드의 소수만이 종양-관련이며 이는 T 세포를 이들이 유래하는 종양에 대한 인식의 높은 특이성을 가지고 유도한다. 이러한 펩티드를 식별하고, 백신 자가면역의 위험을 낮추기 위해 발명가들은 대부분의 정상 세포와 비교했을 때 종양 세포에서 과발현되는 단백질에서 유래하는 펩티드에 초점을 맞추었다.

[0481] 바람직한 펩티드는 종양에 유일하고 다른 조직에서는 존재하지 않는 단백질에서 유래하는 것이다. 이렇게 바람직한 펩티드의 발현 프로파일과 비슷한 펩티드를 식별하기 위해서, 식별된 펩티드는 단백질과 유전자에게 부여되었으며, 이 유전자들의 발현 프로파일 생성되었다.

[0482] RNA 공급원과 제조

[0483] 외과적으로 제거된 조직 검사물이 다른 임상 센터에서 각 환자에게 서면 통지 동의를 받은 후 제공되었다 (실시예 1 참조). 종양 조직 검사물은 즉시 액체 질소를 이용하여 수술 직후에 동결되었으며 이어서 액체 질소 내에서 약절구를 이용하여 균질화되었다. 총 RNA가 이 샘플과 TRI 시약 (암비온 (Ambion), 독일 다름스타트 소재)을 이용하여 제조되었고 이는 RNeasy (퀴아젠 (QIAGEN), 독일 힐텐 소재)에 의해서 정제되었고; 이 두 개의 방법은 제조업자의 프로토콜에 따라 이루어졌다.

[0484] 건강한 인간 조직의 총 RNA는 시중에서 구입이 되었다 (암비온, 영국 헌팅톤 소재; 클론텍 (Clontech), 독일 하이델베르크 소재; 스트라타젠, 네덜란드 암스테르담 소재; 바이오체인 (BioChain), 미국 캘리포니아주 헤이워드 소재). 몇몇의 개인에서 (2 내지 123명의 개인) RNA가 혼합되었고, 따라서 각 개인으로부터 얻어진 RNA가 같은 비율로 섞였다. 4명의 건강한 자원봉사자로부터 혈액 샘플이 채취되고 이로부터 백혈구가 획득되었다.

[0485] 모든 RNA 샘플의 양과 질은 RNA 6000 피코 랩칩 키트 (Pico LabChip Kit, 아질렌트 (Agilent))를 이용하여 아질렌트 2100 바이오어널라이저 (Bioanalyzer, 독일 발트브론 소재 아질렌트)로 확인되었다.

[0486] 마이크로어레이 실험

[0487] 유전자 발현 분석의 모든 종양 그리고 정상 조직 RNA 샘플은 아피메트릭스 휴먼 게놈 (Affymetrix Human Genome (HG)) U133A 또는 HG-U133 플러스 (Plus) 2.0 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이 (아피메트릭스, 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재)를 이용하여 행해졌다. 모든 과정은 아피메트릭스 사용 설명서에 의해 행해졌다. 간단히, 두가닥 cDNA는 슈퍼스크립트 (SuperScript) RTII (인비트로젠 (Invitrogen)) 및 올리고-dT-T7 프라이머 (엠펙스 바이오테크 (MWG Biotech, 독일 에버스베그 소재))를 이용하여 RNA 5 내지 8 μ g를 이용하여 사용 설명서에 따라 합성되었다. 생체 외 전사는 U133A 어레이에는 바이오어레이 하이 일드 RNA 트랜스크립트 라벨링 키트 (BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit) (엔조 다이아그노스틱스 인코포레이티드 (ENZO Diagnostics, Inc., 미국 뉴욕주 파밍데일 소재))가 사용되었고, U133 플러스 2.0 어레이에는 젠칩 IVT 라벨링

키트 (아피메트릭스)가 사용되었으며, 이는 cDNA 단편대기, 혼성화, 스트렙타비딘-피코에리트린 및 바이오티닐화된 항-스트렙타비딘 항체 (몰리클러 프로브스 (Molecular Probes, 네덜란드 라이덴 소재))에 의한 염색 과정을 거쳤다. 영상은 아질렌트 2500A 젠어레이 스캐너 (U133A) 또는 아피메트릭스 젠-칩 스캐너 3000 (U133 플러스 2.0)에 의해서 스캔되었으며 데이터는 GCOS 소프트웨어 (아피메트릭스)에 의해서 기본 매개 변수를 사용하여 분석되었다. 표준화를 위해, 아피메트릭스에서 제공된 100개의 관리 유전자가 사용되었다. 상대적인 발현 가치는 소프트웨어에서 제공된 정상 신장 샘플의 시그널 로그 비율에 의해 계산되었으며 이는 임의로 1.0으로 설정되었다.

[0488] 위암에서 높은 수준으로 과발현되는 본 발명의 소스 유전자의 발현 프로파일이 도 2에 제시된다.

[0489] 실시예 3

[0490] IMA941 MHC 클래스 I 제시된 펩티드에 대한 시험관내 면역성

[0491] IMA941에 포함된 본 발명의 TUMAP의 면역성에 대한 더 많은 정보를 얻기 위해서 문헌 (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978)에서 이미 설명된 잘 설립된 생체 외 자극 플랫폼을 사용한 조사를 수행했다. 이 시스템을 사용하여, 우리는 실험된 54개의 HLA-A*2402 제한 TUMAP 중의 47개, 및 3개의 실험된 본 발명의 HLA-A*0201 제한 TUMAP의 양성 면역성의 결과 (즉, 특정한 T 세포의 증식)를 보여줄 수 있었으며, 또한 이 펩티드가 인간 CD8+ 전구체 T 세포에 대한 T-세포 에피토프라는 것을 밝혔다 (표 4).

[0492] 시험관내 CD8+ T 세포의 프라이밍

[0493] 펩티드-MHC 결합체 (pMHC)와 항-CD28 항체가 로딩된 인공 항원 제시 세포 (aAPC)에 의해 시험관내 자극을 실행하기 위해서, 우리는 우선 CD8 T 세포를 블러드 뱅크 튀빈겐 (Blood Bank Tuebingen)에서 획득한 건강한 기증자의 HLA-A*24 백혈구 성분 채집술 생성물 또는 HLA-A*2 백혈구연충에서 단리했다.

[0494] CD8 T 세포는 직접적으로 영양강화가 되었거나 PBMC (말초 혈관 단핵세포)가 먼저 기본 경사 분리 배지 (PAA, 독일 쾰베 소재)를 사용하여 단리되었다. 단리된 CD8 림프구 또는 PBMC는 10% 열활성화 인간 AB 혈청 (PAN-바이오텍 (Biotech), 독일 아이텐바흐 소재), 100 U/ml 페니실린/100 µg/ml 스트렙토마이신 (캄브렉스 (Cambrex), 독일 콜론 소재), 1 mM 나트륨 피루베이트 (CC 프로 (Pro), 독일 오베돌라 소재), 20 µg/ml 겐타마이신 (Gentamycin) (캄브렉스), 2.5 ng/ml IL-7 (프로모셀 (PromoCell), 독일 하이델베르크 소재) 및 10 U/ml IL-2 (노바르티스 파마 (Novartis Pharma, 독일 뉘른베르크 소재)로 보충된 RPMI-글루타맥스 (Glutamax) (인비트로젠, 독일 칼스루헤 소재)를 포함하는 T-세포 배지 (TCM)에서 배양되었다. TCM에 이 배양 단계에서 사이코카인이 추가되었다. CD8+ 림프구의 단리는 CD8 미세비즈 (밀테닐 바이오텍 (Miltenyi Biotec, 독일 베르거쉬-글라바흐 소재))를 이용한 양성 선택을 통해 이루어졌다.

[0495] pMHC/항-CD28 코팅된 비드의 생성, T 세포 자극과 실행된 해독은 이전에 사소하게 개질이 되어 설명되었다 (Walter et al, 4974-78). 간단히 말해서, 막을 통해서 생기는 도메인이 결합되고 중쇄의 카르복시 말단에서 바이오티닐화된 펩티드-로딩된 항체 재조합 HLA-A*2402 및 HLA-A*0201 분자가 만들어 졌다. 정제된 동시-자극 마우스 IgG2a 항 인간 CD28 Ab 9.3 (Jung Ledbetter, and Muller-Eberhard 4611-15)은 제조 업체 (페르바이오 (Perbio, 독일 본 소재))가 권장하는대로 설폰-N-하이드록시숙신이미도바이티를 이용하여 화학적으로 바이오티닐화되었다. 사용된 비드는 크기가 5.6 µm 스트렙트 아비딘 코팅된 스티로폼 입자였다 (뱅스 래보러토리스 (Bangs Laboratories), 미국 일리노이즈주 소재). 높은 및 낮은 음성 대조군으로 쓰인 pMHC는 각각 A*0201/MLA-001 (개질된 멜란 (Melan)-A/MART-1의 펩티드ELAGIGILTV)과 A*0201/DDX5-001 (DDX5의 YLLPAIVHI)였다.

[0496] 600ng의 바이오틴 항-CD28 플러스 200ng의 관련된 바이오틴-pMHC (고 밀도 비드)의 존재에 800,000 비드/200 µl는 96-웰 플레이트에 코팅되었다. 96-웰 플레이트의 자극은 1x10⁶ CD8+ T세포와 씻겨지고 코팅된 비드 2x10⁵를 5 ng/ml IL-12 (프로모셀) 추가된 200 µl의 TCM에서 3 또는 4일간 37°C, 5% CO₂ 및 95% 상대적 습도에서 공동배양함으로써 시작된다. 배지의 반은 80 U/ml IL-2로 추가된 새로운 CM에 의해 교환되고 배양은 37°C에서 3 또는 4일간 계속되었다. 이 자극 주기는 총 세 번 수행 되었다.

[0497] 마지막으로, 멀티머 분석은 형광 A*0201 또는 A*2402 HLA 멀티머 ({알트만 (Altman) ALTMAN1996/id}) 및 CD8-FITC 항체 클론 SK1 (BD, 독일 하이델베르크 소재) 또는 추가적인 생존력 마커 (라이브/데드-아쿠아

(Live/dead-Aqua) 또는 -바이올렛 (Violet) 염료 (인비트로젠, 독일 칼스루헤 소재)를 가진 것으로 실행되었고, 4가지 색 FACSCalibur (BD) 또는 LSRII SORP 사이토미터 (BD; 각각 파란색 (488 nm), 보라색 (405 nm), 빨간색 (640 nm)과 초록색 (532 nm)을 포함한 18개의 색깔로 이루어진다)에서 시험되었다. 펩티드 특정 세포는 총 CD8+ T 세포의 백분율로 계산 되었다. 테트라머 분석의 평가는 FCS 익스프레스 (Express) 또는 플로우조 (FlowJo) 소프트웨어 (트리 스타 (Tree Star), 미국 오레곤주 소재)를 사용하여 수행되었다. 특정 멀티머 + CD8+ 임파구의 생체 외 감작은 적절한 통문과 음성 대조군 자극과 비교함으로써 발견되었다. 주어진 항원의 면역성은 건강한 기증자의 최소한 하나의 생체 외 자극된 평가 가능한 웰이 생체 외 자극 후 CD8+ T 세포주를 보이면서 발견되었다 (즉, 이 웰의 멀티머 + 세포 집단의 부분은 CD8+ 세포 중 최소한 1%를 가지고 있으며, 이의 빈도는 음성 대조군 (관련 없는 멀티머에 의한 자극과 관련 있는 멀티머의 염색)의 정중값과 비교했을 때 적어도 10배 이상이며, 이 세포는 플롯의 대각선에 위치하고 있지 않다.

[0498] 시험관내 IMA941 펩티드의 면역성

[0499] 실험된 54개의 HLA-A*2402 펩티드 중의 47개, 3개의 실험된 HLA-A*0201 펩티드의 3개의 시험관내 면역성이 펩티드 특정 T-세포주를 생산함으로써 밝혀졌다. 본 발명의 두 개의 펩티드의 TUMAP-특정 멀티머 염색 흐름세포측정법의 결과의 예가 상응하는 음성 대조군과 함께 도 3에 보여져 있다. 본 발명의 54개의 A*2402와 3개의 A*0201 펩티드에 대한 결과는 표 4에 정리되어 있다.

표 4

본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 세포의 면역성. 이매텍스에 의해 행해진 세포의 면역성 실험의 결과는 양성 실험된 평가 가능한 기증자와 웰의 백분율을 보여준다. 한 개의 펩티드에 대해 적어도 4개의 기증자와 48개의 웰이 평가 가능했다.

서열번호	항원	기증자 양성/평가 가능 [%]	웰 양성/평가 가능 [%]
1	CDC2-001	83	28
2	ASPM-002	67	32
18	MMP3-001	11	1
4	MET-006	67	21
3	UCHL5-001	75	12
7	MST1R-001	50	13
33	KIF2C-001	17	2
9	SMC4-001	73	10
17	EPHA2-005	0	0
5	PROM1-001	83	26
6	MMP11-001	33	11
8	NFYB-001	50	7
16	ASPM-001	17	3
20	PLK4-001	60	5
14	ABL1-001	83	18
26	ATAD2-001	33	3
21	ATAD2-002	17	1
27	ATAD2-003	0	0
12	AVL9-001	100	31
22	COL12A1-001	0	0
23	COL6A3-001	0	0
24	FANCI-001	17	1
28	HSP90B1-001	50	7
15	MUC6-001	83	22
13	NUF2-001	100	50
19	NUF2-002	50	6
11	PPAP2C-001	83	29
25	RPS11-001	17	3
29	SIAH2-001	50	8
30	SLC6A6-001	17	1
10	UQCRB-001	83	24
31	IQGAP3-001	100	24
32	ERBB3-001	83	
	CCDC88A-001	0	0
	CCNB1-003	33	3

[0500]

	CCND2-001	17	10
	CCNE2-001	0	0
	CEA-010	40	3
	CLCN3-001	33	6
	DNAJC10-001	50	15
	DNAJC10-002	33	3
	EIF2S3-001	17	1
	EIF3L-001	100	29
	EPPK1-001	17	1
	GPR39-001	50	6
	ITGB4-001	67	20
	LCN2-001	17	1
	SDHC-001	33	3
	PBK-001	0	0
	POLD3-001	67	7
	PSMD14-001	17	1
	PTK2-001	17	4
	TSPAN1-002	17	1
	ZNF598-001	83	17

[0501]

[0502]

하기 펩티드는 이미 이매틱스 (Immatics)의 다른 출원에서 기술된 바 있으며, 이는 IMA901 (MET-001 및 TOP-001), IMA910 (MET-001 및 TOP-001) 및 IMA950 (IGF2BP3-001) 백신에 포함되어 있다. 예를 들어 MET-001은 세포 내에서 뛰어나게 좋은 반응을 일으키며, 이 데이터는 본 발명의 펩티드가 임상적으로 유용하다는 것을 나타낸다.

서열번호	항원	기증자 양성/평가 가능 [%]	웰 양성/평가 가능 [%]
	IGF2BP3-001	50	21
	MET-001	67	42
	TOP-001	40	10

[0504]

[0505]

참고 문헌

[0506]

Ahmed, A. U., et al. "Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth." J Natl.Cancer Inst. 100.22 (2008): 1606-29.

[0507]

Allison, J. P. and M. F. Krummel. "The Yin and Yang of T cell costimulation." Science 270.5238 (1995): 932-33.

[0508]

Altmeyer, A., et al. "Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96." Int J Cancer 69.4 (1996): 340-49.

[0509]

Appay, V., et al. "Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide." Eur.J Immunol. 36.7 (2006): 1805-14.

[0510]

Banerjee, S. K., et al. "Expression of cdc2 and cyclin B1 in Helicobacter pylori-associated gastric MALT and MALT lymphoma : relationship to cell death, proliferation, and transformation." Am J Pathol. 156.1 (2000): 217-25.

[0511]

Bartman, A. E., et al. "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps." Int J Cancer 80.2 (1999): 210-18.

[0512]

Basu, S., et al. "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol. 12.11

(2000): 1539-46.

- [0513] Bauer, B., S. Bartfeld, and T. F. Meyer. "H. pylori selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA." Cell Microbiol. 11.1 (2009): 156-69.
- [0514] Benatti, P., et al. "A balance between NF- κ B and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response." Nucleic Acids Res 36.5 (2008): 1415-28.
- [0515] Bertolini, G., et al. "Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 106.38 (2009): 16281-86.
- [0516] Bierie, B. and H. L. Moses. "TGF-beta and cancer." Cytokine Growth Factor Rev. 17.1-2 (2006): 29-40.
- [0517] Bitoun, E. and K. E. Davies. "The robotic mouse: unravelling the function of AF4 in the cerebellum." Cerebellum. 4.4 (2005): 250-60.
- [0518] Bolhassani, A. and S. Rafati. "Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development." Expert.Rev.Vaccines. 7.8 (2008): 1185-99.
- [0519] Borset, M., et al. "The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies." Leuk.Lymphoma 32.3-4 (1999): 249-56.
- [0520] Bradbury, P. A., et al. "Matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk and prognosis." Carcinogenesis 30.5 (2009): 793-98.
- [0521] Brown, C. E., et al. "Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells." Cancer Research 69.23 (2009): 8886-93.
- [0522] Bruckdorfer, T., O. Marder, and F. Albericio. "From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future." Curr.Pharm.Biotechnol. 5.1 (2004): 29-43.
- [0523] Brunsvig, P. F., et al. "Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer." Cancer Immunol.Immunother. 55.12 (2006): 1553-64.
- [0524] Cabanes, D., et al. "Gp96 is a receptor for a novel Listeria monocytogenes virulence factor, Vip, a surface protein." EMBO J 24.15 (2005): 2827-38.
- [0525] Calzado, M. A., et al. "An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response." Nat.Cell Biol. 11.1 (2009): 85-91.
- [0526] Castelli, C., et al. "Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer." Cancer Immunol.Immunother. 53.3 (2004): 227-33.
- [0527] Castriconi, R., et al. "Both CD133+ and C." Eur.J Immunol. 37.11 (2007): 3190-96.
- [0528] Chanock, S. J., et al. "HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA." Hum.Immunol. 65 (2004): 1211-23.
- [0529] Chen, C. H., et al. "Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100.16 (2003): 9226-31.
- [0530] Chen, Z. and J. J. O'Shea. "Regulation of IL-17 production in human lymphocytes." Cytokine 41.2 (2008): 71-78.
- [0531] Cho, S. O., et al. "Helicobacter pylori in a Korean Isolate Expressed Proteins Differentially in Human Gastric Epithelial Cells." Dig.Dis.Sci. (2009).
- [0532] Christianson, J. C., et al. "OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD." Nat.Cell Biol. 10.3 (2008): 272-82.
- [0534] Cisek, L. J. and J. L. Corden. "Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-

cycle control protein cdc2." Nature 339.6227 (1989): 679-84.

- [0535] Colombetti, S., et al. "Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin." J Immunol. 176.5 (2006): 2730-38.
- [0536] Confalonieri, S., et al. "Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor." Oncogene 28.33 (2009): 2959-68.
- [0537] Corso, S., et al. "Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases." Oncogene 27.5 (2008): 684-93.
- [0538] Cox, C. V., et al. "Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL." Blood 113.14 (2009): 3287-96.
- [0539] Cunha-Ferreira, I., et al. "The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4." Curr.Biol. 19.1 (2009): 43-49.
- [0540] DeLuca, J. G., et al. "Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites." Mol.Biol.Cell 16.2 (2005): 519-31.
- [0541] Deng, H., et al. "Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells." Biochem.Biophys.Res Commun. 326.2 (2005): 274-81.
- [0542] Dengjel, J., et al. "Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas." Clin Cancer Res. 12.14 (2006): 4163-70.
- [0543] Deremer, D. L., C. Ustun, and K. Natarajan. "Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia." Clin Ther. 30.11 (2008): 1956-75.
- [0544] Di Renzo, M. F., et al. "Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer." Clin.Cancer Res. 1.2 (1995): 147-54.
- [0545] Dong, G., et al. "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Res. 61.15 (2001): 5911-18.
- [0546] Dudley, M. E., et al. "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science 298.5594 (2002): 850-54.
- [0547] Dudley, M. E., et al. "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." J.Clin.Oncol. 23.10 (2005): 2346-57.
- [0548] Duong, C., et al. "Pretreatment gene expression profiles can be used to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal cancer." Ann Surg Oncol 14.12 (2007): 3602-09.
- [0549] Eglund, K. A., et al. "High expression of a cytokeratin-associated protein in many cancers." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 103.15 (2006): 5929-34.
- [0550] Eramo, A., et al. "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ 15.3 (2008): 504-14.
- [0551] Esashi, F., et al. "CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair." Nature 434.7033 (2005): 598-604.
- [0552] Escobar, M. A., et al. "Profiling of nuclear extract proteins from human neuroblastoma cell lines: the search for fingerprints." J Pediatr.Surg 40.2 (2005): 349-58.
- [0553] Ferracini, R., et al. "The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit." Oncogene 10.4 (1995): 739-49.
- [0554] Fischer, J., et al. "Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in

multiple hereditary papillary renal cell tumours." Oncogene 17.6 (1998): 733-39.

- [0555] Flanagan, J. M., et al. "Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADAR1 as putative anticancer drug targets." Mol.Cancer Ther. 8.1 (2009): 249-60.
- [0556] Fong, L., et al. "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.15 (2001): 8809-14.
- [0557] Frasor, J., et al. "Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 102.37 (2005): 13153-57.
- [0558] Frew, I. J., et al. "Generation and analysis of Siah2 mutant mice." Mol.Cell Biol. 23.24 (2003): 9150-61.
- [0559] Fu, Y. and A. S. Lee. "Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy." Cancer Biol.Ther. 5.7 (2006): 741-44.
- [0560] Furge, K. A., et al. "Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10722-27.
- [0561] Furge, K. A., Y. W. Zhang, and G. F. Vande Woude. "Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins." Oncogene 19.49 (2000): 5582-89.
- [0562] Gattinoni, L., et al. "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." Nat.Rev.Immunol. 6.5 (2006): 383-93.
- [0563] Gherardi, E. and M. Stoker. "Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met." Cancer Cells 3.6 (1991): 227-32.
- [0564] Glen, A., et al. "iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression." J Proteome.Res 7.3 (2008): 897-907.
- [0565] Gnjjatic, S., et al. "NY-CO-58/KIF2C is overexpressed in a variety of solid tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer." Int J Cancer (2009).
- [0566] Guo, W. C., et al. "Expression and its clinical significance of heat shock protein gp96 in human osteosarcoma." Neoplasma 57.1 (2010): 62-67.
- [0567] Habelhah, H., et al. "Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2." EMBO J 21.21 (2002): 5756-65.
- [0568] Hamamoto, A., et al. "Aberrant expression of the gastric mucin MUC6 in human pulmonary adenocarcinoma xenografts." Int J Oncol 26.4 (2005): 891-96.
- [0569] Harada, T., et al. "Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques." Pancreatology. 9.1-2 (2009): 13-24.
- [0570] Harper, L. J., et al. "Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma." J Oral Pathol.Med 36.10 (2007): 594-603.
- [0571] Hayama, S., et al. "Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis." Cancer Research 66.21 (2006): 10339-48.
- [0572] Hayashi, M., et al. "High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer." Clinical Cancer Research 14.23 (2008): 7843-49.
- [0573] Heike, M., et al. "Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer." Int J Cancer 86.4 (2000): 489-93.
- [0574] Hodorova, I., et al. "Gp96 and its different expression in breast carcinomas." Neoplasma 55.1 (2008): 31-35.
- [0575] Horton, R. A., et al. "A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence

resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein." Anal.Biochem. 360.1 (2007): 138-43.

- [0576] House, C. M., A. Moller, and D. D. Bowtell. "Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways." Cancer Research 69.23 (2009): 8835-38.
- [0577] Howard, E. W., et al. "Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer." Clin. Exp. Metastasis 25.5 (2008): 497-508.
- [0578] Hu, G. and E. R. Fearon. "Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins." Mol. Cell Biol. 19.1 (1999): 724-32.
- [0579] Huang, Y., et al. "Characterization of GPR56 protein and its suppressed expression in human pancreatic cancer cells." Mol. Cell Biochem. 308.1-2 (2008): 133-39.
- [0580] Jansen, M. P., et al. "Downregulation of SIAH2, an ubiquitin E3 ligase, is associated with resistance to endocrine therapy in breast cancer." Breast Cancer Res Treat. 116.2 (2009): 263-71.
- [0581] Jia, H. L., et al. "Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma." Clinical Cancer Research 13.4 (2007): 1133-39.
- [0582] Jucker, M., et al. "The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma." Leuk. Res. 18.1 (1994): 7-16.
- [0583] Jung, G., J. A. Ledbetter, and H. J. Muller-Eberhard. "Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates." Proc Natl Acad Sci U S A 84.13 (1987): 4611-15.
- [0584] Jung, H. M., S. J. Choi, and J. K. Kim. "Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers." J Cell Biochem. 106.4 (2009): 703-13.
- [0585] Kaneko, N., et al. "siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis." Biochem. Biophys. Res Commun. 390.4 (2009): 1235-40.
- [0586] Kang, H. M., et al. "Effects of Helicobacter pylori Infection on gastric mucin expression." J Clin Gastroenterol. 42.1 (2008): 29-35.
- [0587] Ko, M. A., et al. "Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis." Nat. Genet. 37.8 (2005): 883-88.
- [0588] Kobayashi, M., et al. "Activation of ErbB3-PI3-kinase pathway is correlated with malignant phenotypes of adenocarcinomas." Oncogene 22.9 (2003): 1294-301.
- [0589] Koochekpour, S., et al. "Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas." Cancer Res. 57.23 (1997): 5391-98.
- [0590] Korzeniewski, N., et al. "Cullin 1 functions as a centrosomal suppressor of centriole multiplication by regulating polo-like kinase 4 protein levels." Cancer Research 69.16 (2009): 6668-75.
- [0591] Krieg, A. M. "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat. Rev. Drug Discov. 5.6 (2006): 471-84.
- [0592] Kunimoto, K., et al. "Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development." J Cell Physiol 220.3 (2009): 621-31.
- [0593] Kuriyama, R., et al. "Gamma-tubulin-containing abnormal centrioles are induced by insufficient Plk4 in human HCT116 colorectal cancer cells." J Cell Sci. 122.Pt 12 (2009): 2014-23.
- [0594] Lee, H. S., et al. "MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as

prognostic indicators." Cancer 92.6 (2001): 1427-34.

- [0595] Leivo, I., et al. "Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation." Cancer Genet.Cytogenet. 156.2 (2005): 104-13.
- [0596] Lemmel, C., et al. "Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling." Nat.Biotechnol. 22.4 (2004): 450-54.
- [0597] Li, G., et al. "Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development." Oncogene 20.56 (2001): 8125-35.
- [0598] Lim, S. O., et al. "Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules." World J Gastroenterol. 11.14 (2005): 2072-79.
- [0599] Lin, W., et al. "Tyrosine kinases and gastric cancer." Oncogene 19.49 (2000): 5680-89.
- [0600] Liu, B. and Z. LI. "Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin." Blood 112.4 (2008): 1223-30.
- [0601] Liu, S. Y., et al. "Requirement of MMP-3 in anchorage-independent growth of oral squamous cell carcinomas." J Oral Pathol.Med 36.7 (2007): 430-35.
- [0602] Lochter, A., et al. "The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression." Ann N.Y.Acad.Sci. 857 (1998): 180-93.
- [0603] Lund, C. V., et al. "Zinc finger transcription factors designed for bispecific coregulation of ErbB2 and ErbB3 receptors: insights into ErbB receptor biology." Mol.Cell Biol. 25.20 (2005): 9082-91.
- [0604] Ma, S., et al. "Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells." Gastroenterology 132.7 (2007): 2542-56.
- [0605] MacLeod, R. J., M. Hayes, and I. Pacheco. "Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells." Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol 293.1 (2007): G403-G411.
- [0606] Macmillan, J. C., et al. "Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer." Ann Surg Oncol 8.9 (2001): 729-40.
- [0607] Maney, T., et al. "The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view." Int Rev.Cytol. 194 (2000): 67-131.
- [0608] Martin, C. M., et al. "Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy." Methods Mol.Biol. 511 (2009): 333-59.
- [0609] Matsukita, S., et al. "Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma." Histopathology 42.1 (2003): 26-36.
- [0610] Maulik, G., et al. "Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition." Cytokine Growth Factor Rev. 13.1 (2002): 41-59.
- [0611] Mizrak, D., M. Brittan, and M. Alison. "CD133: molecule of the moment." J Pathol. 214.1 (2008): 3-9.
- [0612] Montesano, R., et al. "Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis." Cell Growth Differ. 9.5 (1998): 355-65.
- [0613] Monzani, E., et al. "Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential." Eur.J Cancer 43.5 (2007): 935-46.
- [0614] Moore, A. and L. Wordeman. "The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis." Trends Cell Biol. 14.10 (2004): 537-46.
- [0615] Morgan, R. A., et al. "Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered

Lymphocytes." Science (2006).

- [0616] Mori, M., et al. "HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry." Transplantation 64.7 (1997): 1017-27.
- [0617] Murray, G. I., et al. "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer." Gut 43.6 (1998): 791-97.
- [0618] Murshid, A., J. Gong, and S. K. Calderwood. "Heat-shock proteins in cancer vaccines: agents of antigen cross-presentation." Expert.Rev.Vaccines. 7.7 (2008): 1019-30.
- [0619] Nakaigawa, N., et al. "Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma." Cancer Res. 66.7 (2006): 3699-705.
- [0620] Nakamura, Y., et al. "Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer." Br.J Cancer 97.4 (2007): 543-49.
- [0621] Nakayama, K., J. Qi, and Z. Ronai. "The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response." Mol.Cancer Res 7.4 (2009): 443-51.
- [0622] Naldini, L., et al. "Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET." Oncogene 6.4 (1991): 501-04.
- [0623] Nguyen, Q. N., et al. "Light controllable siRNAs regulate gene suppression and phenotypes in cells." Biochim.Biophys.Acta 1758.3 (2006): 394-403.
- [0624] Nishio, K., et al. "Crystal structure of the de-ubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain." Biochem.Biophys.Res Commun. 390.3 (2009): 855-60.
- [0625] Nojima, H., et al. "IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade." Nat.Cell Biol. 10.8 (2008): 971-78.
- [0626] Nomura, H., et al. "Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas." Int J Cancer 69.1 (1996): 9-16.
- [0627] Nomura, H., et al. "Network-based analysis of calcium-binding protein genes identifies Grp94 as a target in human oral carcinogenesis." Br.J Cancer 97.6 (2007): 792-801.
- [0629] Ohnuma, S., et al. "Cancer-associated splicing variants of the CDCA1 and MSMB genes expressed in cancer cell lines and surgically resected gastric cancer tissues." Surgery 145.1 (2009): 57-68.
- [0630] Park, Y. H., et al. "Capecitabine in combination with Oxaliplatin (XELOX) as a first-line therapy for advanced gastric cancer." Cancer Chemother.Pharmacol. (2007).
- [0631] Pascolo, S., et al. "The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells." Int.Immunol. 17.2 (2005): 117-22.
- [0632] Peel, N., et al. "Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation." Curr.Biol. 17.10 (2007): 834-43.
- [0633] Pereira, M. B., et al. "Immunohistochemical study of the expression of MUC5AC and MUC6 in breast carcinomas and adjacent breast tissues." J Clin Pathol. 54.3 (2001): 210-13.
- [0634] Pietra, G., et al. "Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells." Int Immunol. 21.7 (2009): 793-801.
- [0635] Poller, D. N., et al. "Production and characterization of a polyclonal antibody to the c-erbB-3 protein: examination of c-erbB-3 protein expression in adenocarcinomas." J Pathol. 168.3 (1992): 275-80.

- [0636] Pons, E., C. C. Uphoff, and H. G. Drexler. "Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines." Leuk.Res. 22.9 (1998): 797-804.
- [0637] Ponzetto, C., et al. "A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor." Mol.Cell Biol. 13.8 (1993): 4600-08.
- [0638] Poppe, M., et al. "Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility." Oncogene 26.24 (2007): 3462-72.
- [0639] Pytel, D., et al. "Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy." Anticancer Agents Med Chem. 9.1 (2009): 66-76.
- [0640] Qi, J., et al. "The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 105.43 (2008): 16713-18.
- [0641] Qian, C. N., et al. "Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma." Cancer Res. 62.2 (2002): 589-96.
- [0642] Qian, Z., et al. "Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia." Chem.Biol.Interact. (2009).
- [0643] Ramirez, R., et al. "Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma." Clin Endocrinol.(Oxf) 53.5 (2000): 635-44.
- [0644] Rammensee, H. G., et al. "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics 50.3-4 (1999): 213-19.
- [0645] Rammensee, H. G., J. Bachmann, and S. Stevanovic. MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1997.
- [0646] Rappa, G., O. Fodstad, and A. Lorico. "The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma." Stem Cells 26.12 (2008): 3008-17.
- [0647] Richardson, G. D., et al. "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." J Cell Sci. 117.Pt 16 (2004): 3539-45.
- [0648] Rini, B. I., et al. "Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy." Cancer 107.1 (2006): 67-74.
- [0649] Rodrigues-Martins, A., et al. "Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis." Science 316.5827 (2007): 1046-50.
- [0651] Rosenberg, S. A., et al. "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." N.Engl.J.Med. 316.15 (1987): 889-97.
- [0652] Rosenberg, S. A., et al. "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." N.Engl.J Med 319.25 (1988): 1676-80.
- [0653] Rott, R., et al. "Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells." J Biol.Chem. 283.6 (2008): 3316-28.
- [0654] Rutella, S., et al. "Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors." Clinical Cancer Research 15.13 (2009): 4299-311.
- [0655] Saiki, R. K., et al. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA

polymerase." Science 239.4839 (1988): 487-91.

- [0656] Samant, G. V. and P. W. Sylvester. "gamma-Tocotrienol inhibits ErbB3-dependent PI3K/Akt mitogenic signalling in neoplastic mammary epithelial cells." Cell Prolif. 39.6 (2006): 563-74.
- [0657] Sanidas, E. E., et al. "Expression of the c-erbB-3 gene product in gastric cancer." Int J Cancer 54.6 (1993): 935-40.
- [0658] Scott, G. K., et al. "Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b." J Biol.Chem. 282.2 (2007): 1479-86.
- [0659] Sergina, N. V., et al. "Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3." Nature 445.7126 (2007): 437-41.
- [0660] Shah, M., et al. "Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis." Pigment Cell Melanoma Res 22.6 (2009): 799-808.
- [0661] Shapiro, G. I. "Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment." J Clin Oncol 24.11 (2006): 1770-83.
- [0662] Sherman-Baust, C. A., et al. "Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells." Cancer Cell 3.4 (2003): 377-86.
- [0663] Sheu, M. L., S. H. Liu, and K. H. Lan. "Honokiol induces calpain-mediated glucose-regulated protein-94 cleavage and apoptosis in human gastric cancer cells and reduces tumor growth." PLoS.ONE. 2.10 (2007): e1096.
- [0664] Shimo, A., et al. "Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis." Cancer Sci. 99.1 (2008): 62-70.
- [0665] Singh, S. K., et al. "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res. 63.18 (2003): 5821-28.
- [0666] Singh, S. K., et al. "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature 432.7015 (2004): 396-401.
- [0667] Sithanandam, G. and L. M. Anderson. "The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy." Cancer Gene Ther. 15.7 (2008): 413-48.
- [0668] Sithanandam, G., et al. "Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549." Oncogene 24.11 (2005): 1847-59.
- [0669] Skawran, B., et al. "Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma: upregulation of genes in amplified chromosome regions." Mod.Pathol. 21.5 (2008): 505-16.
- [0670] Slesak, B., et al. "Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis." Anticancer Res 18.4A (1998): 2727-32.
- [0671] Small, E. J., et al. "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." J Clin Oncol. 24.19 (2006): 3089-94.
- [0672] Smith, L. M., et al. "CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers." Br.J Cancer 99.1 (2008): 100-09.
- [0673] Smith, M. J., et al. "Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification." Br.J Cancer 100.9 (2009): 1452-64.
- [0674] Smogorzewska, A., et al. "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair." Cell 129.2 (2007): 289-301.

- [0675] Staehler, M., Stenzl, A., Dietrich, P. Y., Eisen, T., Haferkamp, A., Beck, J., Mayer, A., Walter, S., Singh-Jasuja, H., and Stief, C. A phase I study to evaluate safety, immunogenicity and anti-tumor activity of the multi-peptide vaccine IMA901 in renal cell carcinoma patients (RCC). *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 5098. 6-20-2007. Ref Type: Abstract.
- [0676] Stemmann, O., et al. "Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase." *Cell* 107.6 (2001): 715-26.
- [0677] Suetsugu, A., et al. "Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 351.4 (2006): 820-24.
- [0678] Suva, M. L., et al. "Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma." *Cancer Research* (2009).
- [0679] Swallow, C. J., et al. "Sak/Plk4 and mitotic fidelity." *Oncogene* 24.2 (2005): 306-12.
- [0680] Szczepanowski, M., et al. "Regulation of repp86 stability by human Siah2." *Biochem.Biophys.Res Commun.* 362.2 (2007): 485-90.
- [0681] Tajima, Y., et al. "Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significance and genetic background." *Clinical Cancer Research* 12.21 (2006): 6469-79.
- [0682] Takaishi, S., et al. "Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44." *Stem Cells* 27.5 (2009): 1006-20.
- [0683] Takayama, H., et al. "Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94.2 (1997): 701-06.
- [0685] Teofili, L., et al. "Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease." *Blood* 97.4 (2001): 1063-69.
- [0686] Thorsen, K., et al. "Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis." *Mol.Cell Proteomics.* 7.7 (2008): 1214-24.
- [0687] Tirino, V., et al. "The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer." *Eur.J Cardiothorac.Surg* 36.3 (2009): 446-53.
- [0688] Todaro, M., et al. "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4." *Cell Stem Cell* 1.4 (2007): 389-402.
- [0689] Topol, L., et al. "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." *J Cell Biol.* 162.5 (2003): 899-908.
- [0690] Toribara, N. W., et al. "Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning." *J Biol.Chem.* 268.8 (1993): 5879-85.
- [0691] Tsan, M. F. and B. Gao. "Heat shock protein and innate immunity." *Cell Mol.Immunol.* 1.4 (2004): 274-79.
- [0692] Tuck, A. B., et al. "Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma." *Am.J.Pathol.* 148.1 (1996): 225-32.
- [0693] Vairaktaris, E., et al. "Association of -1171 promoter polymorphism of matrix metalloproteinase-3 with increased risk for oral cancer." *Anticancer Res* 27.6B (2007): 4095-100.
- [0694] Vandenbroeck, K., E. Martens, and I. Alloza. "Multi-chaperone complexes regulate the folding of interferon-gamma in the endoplasmic reticulum." *Cytokine* 33.5 (2006): 264-73.
- [0695] Walter, S., et al. "Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated

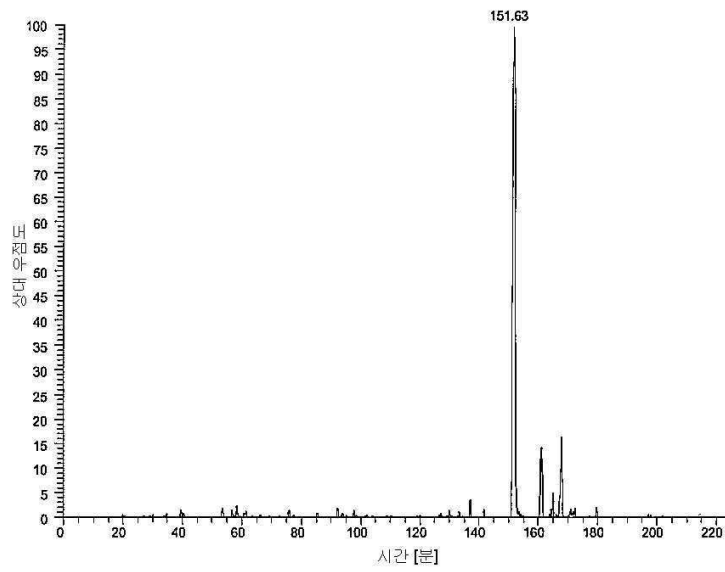
MHC/anti-CD28-coated microspheres." J.Immunol. 171.10 (2003): 4974-78.

- [0696] Wang, Q., et al. "Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance." Cancer Detect.Prev. 29.6 (2005): 544-51.
- [0697] Wang, R., et al. "Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice." J.Cell Biol. 153.5 (2001): 1023-34.
- [0698] Wang, R. Q. and D. C. Fang. "Effects of Helicobacter pylori infection on mucin expression in gastric carcinoma and pericancerous tissues." J.Gastroenterol.Hepatol. 21.2 (2006): 425-31.
- [0699] Wang, S., et al. "IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth." J.Cell Sci. 120.Pt 4 (2007): 567-77.
- [0700] Wang, X., et al. "Immunolocalisation of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in colonic adenocarcinoma." Acta Histochem. 110.2 (2008): 117-23.
- [0701] Wang, X. P., et al. "Expression and significance of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human esophageal carcinoma." World J Gastroenterol. 11.3 (2005): 429-32.
- [0702] Wang, X. P., et al. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma." World J Gastroenterol. 11.7 (2005): 1056-59.
- [0703] Wang, X. P., Q. X. Wang, and X. P. Ying. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human gastric adenocarcinoma." Tohoku J Exp.Med 212.1 (2007): 35-41.
- [0704] Weinschenk, T., et al. "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines." Cancer Res. 62.20 (2002): 5818-27.
- [0705] White, C. D., M. D. Brown, and D. B. Sacks. "IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis." FEBS Lett. 583.12 (2009): 1817-24.
- [0706] Wicks, S. J., et al. "Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway." Biochem.Soc Trans. 34.Pt 5 (2006): 761-63.
- [0707] Wicks, S. J., et al. "The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling." Oncogene 24.54 (2005): 8080-84.
- [0708] Yajima, S., et al. "Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer." Int J Oncol 31.5 (2007): 1029-37.
- [0709] Yang, L., et al. "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." Nature (2008).
- [0710] Yang, S., et al. "Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer." Biochim.Biophys.Acta 1772.9 (2007): 1033-40.
- [0711] Yao, D. F., et al. "Abnormal expression of HSP gp96 associated with HBV replication in human hepatocellular carcinoma." Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int 5.3 (2006): 381-86.
- [0712] Yasui, W., et al. "Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas." Int J Cancer 53.1 (1993): 36-41.
- [0713] Yee, C., et al. "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99.25 (2002): 16168-73.
- [0714] Yin, S., et al. "CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity." Int.J Cancer 120.7 (2007): 1444-50.

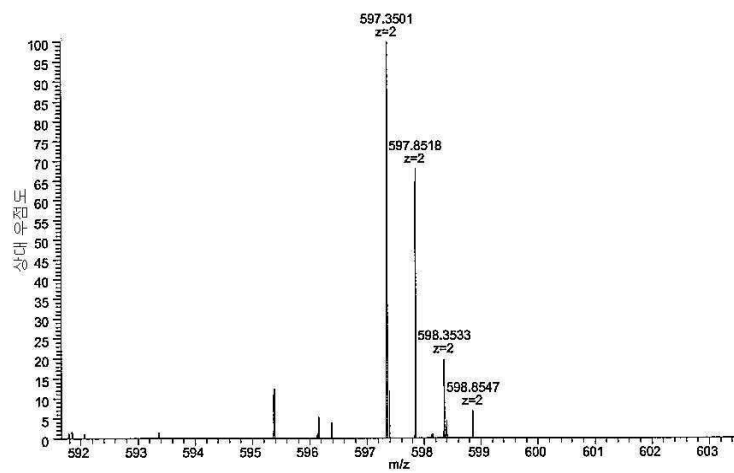
- [0715] Yokozaki, H., W. Yasui, and E. Tahara. "Genetic and epigenetic changes in stomach cancer." Int Rev.Cytol. 204 (2001): 49-95.
- [0716] Yuan, W., et al. "Expression of EphA2 and E-cadherin in gastric cancer: correlated with tumor progression and lymphogenous metastasis." Pathol.Oncol Res 15.3 (2009): 473-78.
- [0717] Yuan, W. J., et al. "Over-expression of EphA2 and EphrinA-1 in human gastric adenocarcinoma and its prognostic value for postoperative patients." Dig.Dis.Sci. 54.11 (2009): 2410-17.
- [0718] Zaremba, S., et al. "Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen." Cancer Res. 57.20 (1997): 4570-77.
- [0719] Zhang, X., R. M. Kedl, and J. Xiang. "CD40 ligation converts TGF-beta-secreting tolerogenic CD4-8-dendritic cells into IL-12-secreting immunogenic ones." Biochem.Biophys.Res Commun. 379.4 (2009): 954-58.
- [0720] Zhang, X. L., et al. "Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer." World J Surg 33.10 (2009): 2112-18.
- [0721] Zhao, C., et al. "Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia." Nature (2009).
- [0722] Zheng, H., et al. "Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity." J Immunol. 167.12 (2001): 6731-35.
- [0723] Zheng, H., et al. "MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays." J Cancer Res Clin Oncol 132.12 (2006): 817-23.
- [0724] Zheng, H. C., et al. "Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas." Hum.Pathol. 39.7 (2008): 1042-49.
- [0725] Zhou, G., et al. "2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers." Mol.Cell Proteomics. 1.2 (2002): 117-24.
- [0726] Zhou, L., et al. "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function." Nature 453.7192 (2008): 236-40.
- [0727] Zhu, K. J., et al. "Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells." Int Immunopharmacol. 9.4 (2009): 412-17.

도면

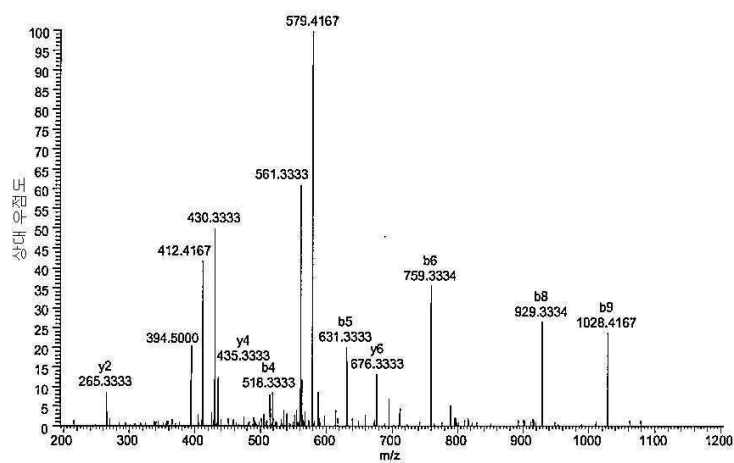
도면1a



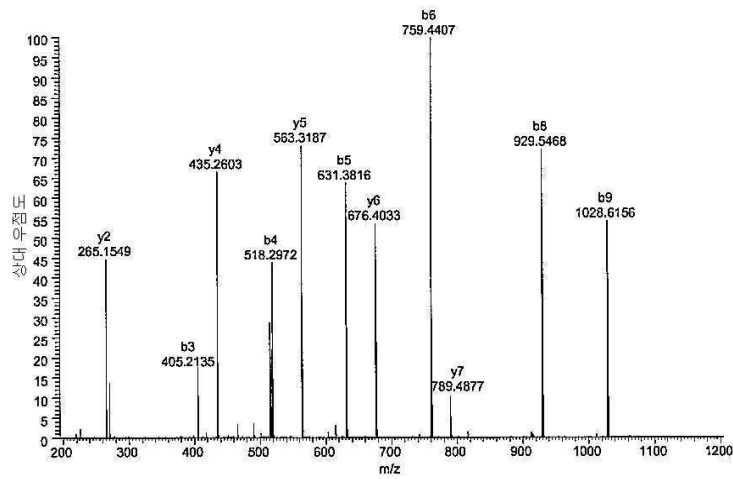
도면1b



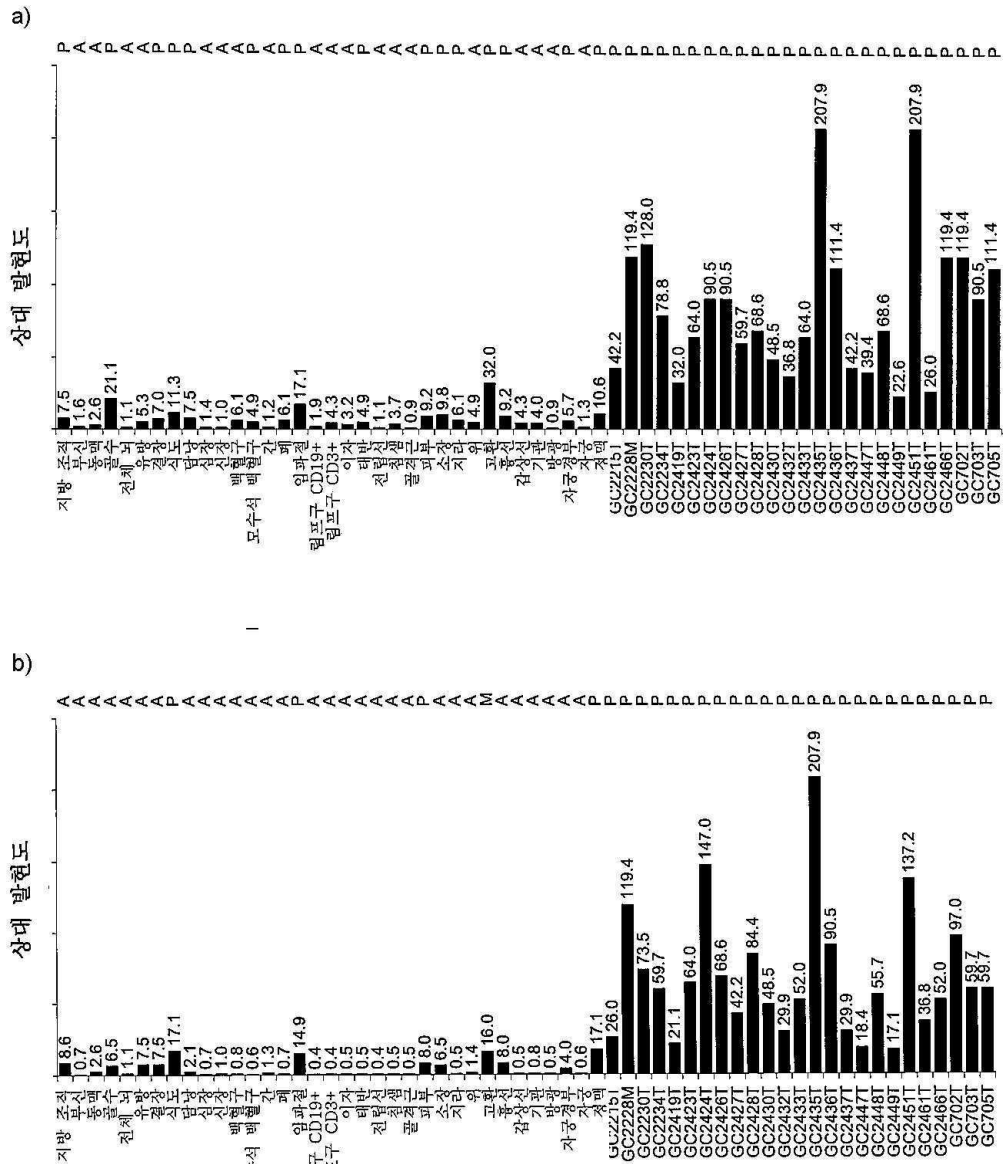
도면1c



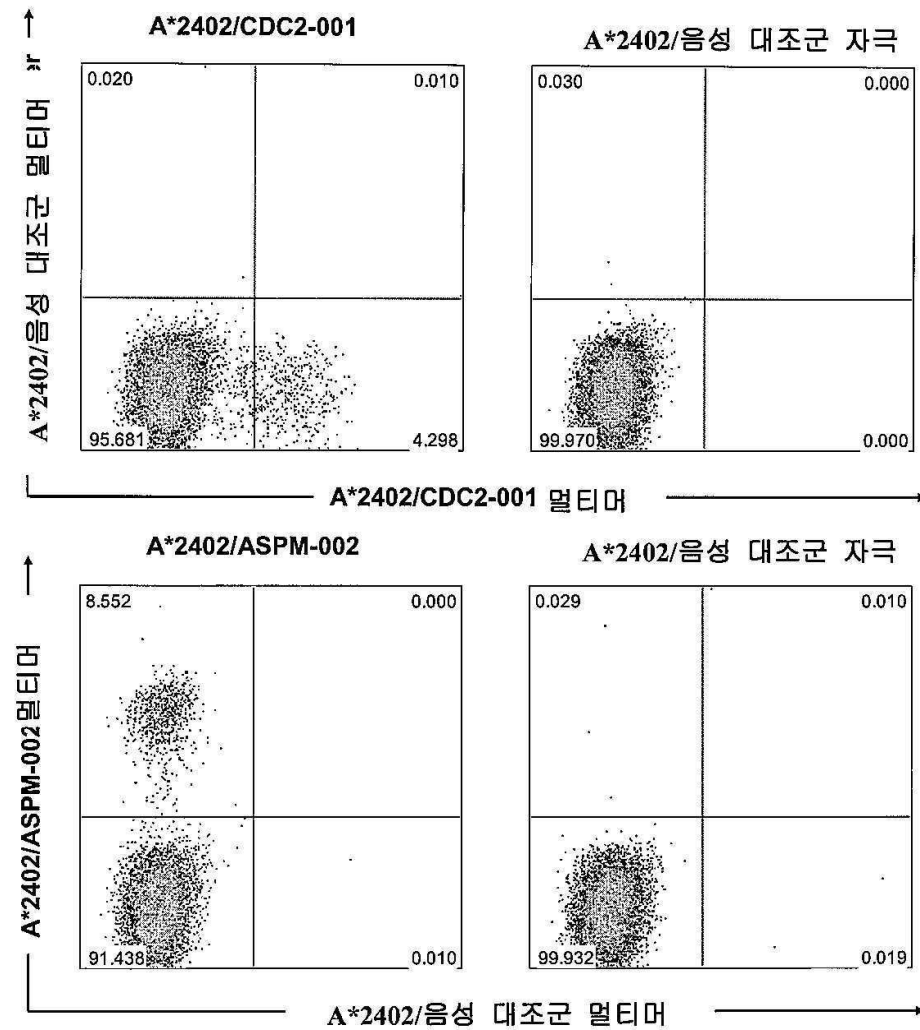
도면1d



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Immatics biotechnologies GmbH
- <120> NOVEL IMMUNOTHERAPY AGAINST SEVERAL TUMORS INCLUDING GASTROINTESTINAL AND GASTRIC CANCER
- <130> I31890PCT
- <140> PCT/EP2011/053863
- <141> 2011-03-15
- <150> US 61/315,704
- <151> 2010-03-19
- <150> GB 1004551.6
- <151> 2010-03-19
- <160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu Asn Leu

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Tyr Thr Thr Ser Tyr Gln Gln Ile

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

His Tyr Lys Pro Thr Pro Leu Tyr Phe

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 10
 Tyr Tyr Asn Ala Ala Gly Phe Asn Lys Leu
 1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu
 1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Phe Tyr Ile Ser Pro Val Asn Lys Leu

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Tyr Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asn Tyr Glu Glu Thr Phe Pro His Ile

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Tyr Leu Trp Ala Thr Val Thr Ile

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Tyr Phe Ser Lys Ser Glu Gln Leu

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe

1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu
 1 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Val Tyr Asn Pro Thr Pro Asn Ser Leu
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Ser Tyr Leu Gln Ala Ala Asn Ala Leu
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Phe Tyr Gln Pro Lys Ile Gln Gln Phe

1 5
 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Tyr Tyr Lys Asn Ile Gly Leu Gly Phe

1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Ala Tyr Ala Ile Ile Lys Glu Glu Leu

1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Leu Tyr Pro Glu Val Phe Glu Lys Phe

1 5
 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Lys Tyr Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe

1 5 10
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

Val Phe Asp Thr Ala Ile Ala His Leu Phe

1 5 10

<210> 30

<211

> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Val Tyr Pro Asn Trp Ala Ile Gly Leu

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Tyr Lys Val Val Gly Asn Leu Leu

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ile Tyr Asn Gly Lys Leu Phe Asp Leu Leu

1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gln Tyr Ile Asp Lys Leu Asn Glu Leu

1 5

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Tyr Met Thr Val Ser Ile Ile Asp Arg Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Tyr Leu Pro Gln Cys Ser Tyr Phe

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ile Tyr Ala Pro Lys Leu Gln Glu Phe

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ile Tyr Pro Asp Ala Ser Leu Leu Ile

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Val Tyr Leu Leu Asn Ser Thr Thr Leu

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ile Tyr Leu Glu Val Ile His Asn Leu

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ala Tyr Pro Thr Val Lys Phe Tyr Phe

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ile Phe Ser Lys Ile Val Ser Leu Phe

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Tyr Tyr Tyr Val Gly Phe Ala Tyr Leu

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Arg Tyr Leu Glu Gly Thr Ser Cys Ile

1 5

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe

1 5 10

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ser Tyr Ala Thr Leu Leu His Val Leu

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Gly Lys Phe

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Tyr Asn Val Thr Ser Val Leu Phe

1 5
 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 Ser Tyr Leu Glu Leu Val Lys Ser Leu

1 5
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe

1 5
 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 Leu Tyr Leu Glu Asn Ile Asp Glu Phe

1 5
 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 Val Tyr Ile Ser Ser Leu Ala Leu Leu

1 5
 <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

Arg Tyr Leu Pro Lys Gly Phe Leu Asn Gln Phe

1 5 10

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Tyr Tyr Lys Asn Ile Gly Leu Gly Phe

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Val Tyr Thr Thr Met Ala Glu His Phe

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Tyr Ala Tyr Leu Arg Glu His Phe

1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Leu Tyr Ile Gln Thr Asp His Leu Phe Phe

1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Thr Tyr Lys Tyr Val Asp Ile Asn Thr Phe

1 5 10

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Tyr Phe Ile Ser His Val Leu Ala Phe

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Val Tyr Lys Glu Thr Cys Ile Ser Phe

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ala Leu Tyr Asp Ser Val Ile Leu Leu

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Ala Asp Glu Thr Leu Leu Lys Val

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Val Leu Glu Asp Leu Glu Val Thr Val

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Asn Leu Leu Asp Leu Asp Tyr Glu Leu

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Phe Leu Ile Asp Ser Ser Glu Gly Val

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Ala Leu Asp Glu Gly Asp Ile Ala Leu

1 5

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Ala Leu Asn Glu Glu Ala Gly Arg Leu Leu Leu

1 5 10

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Ile Leu Ser Pro Thr Val Val Ser Ile

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Leu Val Gln Asp Leu Ala Lys Ala

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ile Leu Gln Asp Arg Leu Asn Gln Val

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Ile

1 5

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu

1 5 10

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Ser Leu Ala Glu Val Asn Thr Gln Leu

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Ala Leu Asp Gly Phe Val Met Val Leu

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Tyr Leu Leu Ser Tyr Ile Gln Ser Ile

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gln Ile Asp Asp Val Thr Ile Lys Ile

1 5

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Tyr Leu Tyr Gly Gln Thr Thr Thr Tyr Leu

1 5 10

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Lys Leu Asp Glu Thr Gly Asn Ser Leu

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Arg Leu Asp Asp Leu Lys Met Thr Val

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Leu Thr Asp Glu Ile Leu Thr Tyr Val

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Ile Leu Ile Asp Trp Leu Val Gln Val

1 5

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile

1 5 10

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ser Ile Phe Gly Glu Asp Ala Leu Ala Asn Val

1 5 10

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Lys Leu Leu Glu Tyr Ile Glu Glu Ile

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val

1 5

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala

1 5 10