



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0039812
(43) 공개일자 2019년04월15일

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/74 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 14/4748 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7008490</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2017년08월24일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년03월25일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/071347</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2018/037085
국제공개일자 2018년03월01일</p> <p>(30) 우선권주장
10 2016 115 974.3 2016년08월26일 독일(DE)
62/379,864 2016년08월26일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
이매텍스 바이오테크놀로지스 게엠베하
독일 72076 투빈겐 파울-울리히-스트라체 15</p> <p>(72) 발명자
마르 안드레아
독일 72076 튀빙겐 키르헨베크 22
바인헨크 토니
독일 73773 아이호발트 임 모르겐라인 15
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
제일특허법인(유)</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 20 항

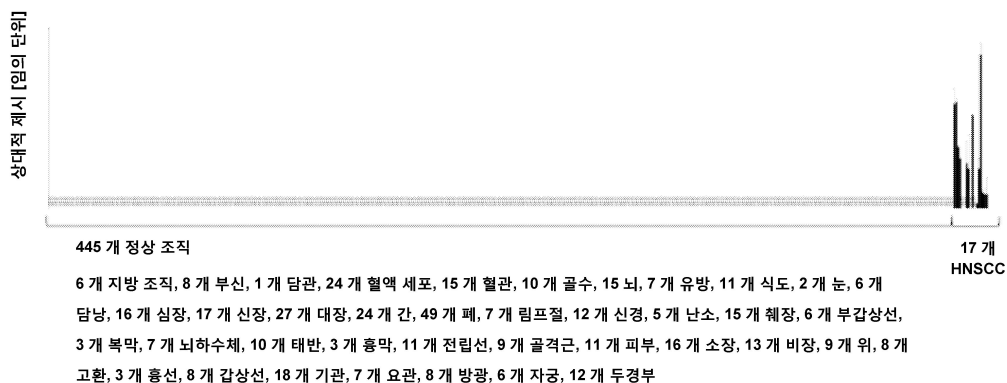
(54) 발명의 명칭 두경부 편평 세포 암종 및 기타 암에 대한 면역요법에서의 사용을 위한 신규 펩티드 및 골격

(57) 요약

본 발명은 면역요법 방법에서 사용을 위한 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단독 또는 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 역할 가능한 기타 중앙 연관 펩티드들과 병용하여 항종양 면역 반응을 촉진하거나 또는 세포를 생체 외 촉진하여 환자로 이전 하기 위한 중앙 연관 T 세포 에피톱에 관한 것이다. 구조적 적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 그러한 펩티드는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적이 될 수도 있다.

대 표 도

펩티드: GLAGGFGGGPGFPV (A*02)
서열식별번호: 1



(52) CPC특허분류

A61K 39/0011 (2018.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/2833 (2013.01)
C07K 16/3053 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 2310/16 (2013.01)

(72) 발명자

비베 아니타

독일 72124 뤼프가르텐 쾰렌스트라쎄 49

송 콜레데

독일 73760 오스트필데른 빌리-바우마이스터-베크
21

슈르 올리버

독일 72074 튀빙겐 아이흐탈덴스트라쎄 19

프리체 옌스

독일 72144 두슬링겐 래르헨베크 11

싱 하르프레트

미국 텍사스주 77005 휴스턴 모닝사이드 드라이브
5122 아파트먼트 525

명세서

청구범위

청구항 1

서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 대해 88% 이상 상동성인 이의 변이체 서열을 포함하는 펩티드로서, 상기 변이체는 주조직 적합 복합체(MHC)의 분자에 결합하고/거나 상기 변이체 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하고, 상기 펩티드는 전장 폴리펩티드가 아닌, 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩티드 또는 이의 변이체의 전체 길이는 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 더욱 바람직하게는 8 내지 16개의 아미노산이고, 가장 바람직하게는 상기 펩티드가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되는, 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩티드는 변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함하거나, 상기 펩티드는, 특히 HLA-DR 항원 연관 불변 쇠(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는, 융합 단백질의 일부인, 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 바람직하게는 MHC 분자에 결합 시 제1항 또는 제2항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체를 특이적으로 인식하는 항체, 특히 가용성 또는 막 결합된 항체.

청구항 5

HLA 리간드와 반응성인 바람직하게는 가용성 또는 막 결합된 T 세포 수용체로서, 상기 리간드가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 75% 이상, 바람직하게는 88% 이상의 동일성을 갖거나, 상기 아미노산 서열이 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91 중 어느 하나로 구성되는, T 세포 수용체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 T 세포 수용체가 가용성 분자로서 제공되고, 임의적으로 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가 효과기 기능을 보유하는, T 세포 수용체.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 바람직하게는 MHC 분자에 결합된 제1항 또는 제2항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체를 특이적으로 인식하는 애타머.

청구항 8

임의적으로 이중 프로모터 서열에 연계된, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제4항에 따른 항체, 제5항 또는 제6항에 따른 TCR, 또는 제7항에 따른 애타머를 인코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 발현하는 발현 벡터.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 또는 제8항에 따른 핵산 또는 발현 벡터를 포함하고, 바람직하게는 수지상 세포, T 세포 또는 NK 세포와 같은 항원 제시 세포로부터 선택되는, 재조합 숙주 세포.

청구항 10

의학에서의 사용을 위한 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제4항에 따른 항체, 제5항 또는 제6항에 따른 TCR, 제7항에 따른 압타머, 제8항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 또는 제9항에 따른 숙주 세포.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제4항에 따른 항체 또는 제5항 또는 제6항에 따른 TCR의 생산 방법으로서, 핵산을 발현하는 제9항에 따른 숙주 세포 또는 제8항에 따른 발현 벡터를 배양하는 단계 및 상기 숙주 세포 또는 이의 배지로부터 상기 펩티드 또는 이의 변이체, 항체 또는 TCR을 분리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

활성화된 T 림프구를 생산하는 시험관 내 방법으로서, T 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화하는데 충분한 시간 동안 적절한 항원 제시 세포 또는 항원 제시 세포를 모방하는 인공 구축물의 표면에 발현된 항원 로딩된 인간 클래스 I 또는 II MHC 분자와 상기 T 세포를 시험관 내에서 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 항원이 제1항 또는 제2항에 따른 펩티드인, 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에서 주어진 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제12항에 따른 방법에 의해 생산되는 활성화된 T 림프구.

청구항 14

하기 a) 내지 i)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 활성 성분, 및 약학적으로 허용가능한 담체, 및 임의적으로 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 안정화제를 포함하는 약학 조성물:

- a) 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택된 펩티드;
- b) 상기 a)에 따른 펩티드 및/또는 펩티드-MHC 복합체와 반응성인 T 세포 수용체;
- c) 상기 a)에 따른 펩티드 및 HLA-DR 항원-연관 불변 체(Ii)의 N-말단 아미노산 1 내지 80을 포함하는 융합 단백질;
- d) 상기 a) 내지 c) 중 어느 하나를 인코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터;
- e) 상기 d)의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포;
- f) T 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화하는데 충분한 시간 동안 적절한 항원 제시 세포의 표면에 발현된 상기 a)에 따른 펩티드와 상기 T 세포를 시험관 내에서 접촉시키는 것을 포함하는 방법 및 이러한 활성화된 T 세포를 자가 조직 또는 다른 환자에게 이전하는 방법에 의해 얻어지는 활성화된 T 림프구;
- g) 상기 a)에 따른 펩티드 및/또는 펩티드-MHC 복합체 및/또는 상기 a)에 따른 펩티드를 제시하는 세포에 대해 반응성이며 예를 들어 면역-활성화 도메인 또는 독소와의 융합에 의해 잠재적으로 변형되는 항체 또는 가용성 T 세포 수용체;
- h) 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택된 펩티드 및/또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택된 펩티드와 MHC 분자의 복합체를 인식하는 압타머;
- i) 상기 a) 내지 h) 중 어느 하나에 따른 접합된 또는 라벨링된 펩티드 또는 골격.

청구항 15

암의 진단 및/또는 치료에서 또는 암에 대한 약제의 생산을 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제4항에 따른 항체, 제5항 또는 제6항에 따른 TCR, 제13항에 따른 활성화된 T 림프구, 제8항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 또는 제9항에 따른 숙주 세포의 용도로서, 상기 암이 바람직하게는 두경부 편평세포 암종, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관암, 뇌암, 만성 림프구성 백혈병, 결장직장 암종, 식도암, 담낭암, 위암, 간세포암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암, 소세포 폐암, 방광암, 자궁암, 및 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91 중 어느 하나의 펩티드가 유래하는 단백질의 과발현을 나

타내는 기타 종양의 군으로부터 선택되는, 용도.

청구항 16

- a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제4항에 따른 항체, 제5항 또는 제6항에 따른 TCR, 제13항에 따른 활성화된 T 림프구, 제8항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 또는 제9항에 따른 숙주 세포를 용액 또는 동결건조된 형태로 함유하는 약학 조성물을 포함하는 용기;
- (b) 임의적으로, 동결건조된 제형을 위한 희석제 또는 재구성 용액을 함유하는 제2 용기;
- (c) 임의적으로, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 156, 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 펩티드; 및
- (d) 임의적으로, (i) 용액의 사용 또는 (ii) 동결건조된 제형의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서를 포함하는 키트.

청구항 17

개별 환자를 위한 개인화된 항암 백신 또는 화합물 기반 및/또는 세포 요법의 생산 방법으로서,

- (a) 상기 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양 연관 펩티드(TUMAP)를 동정하는 단계;
- (b) 정상 조직과 비교하여 종양에서 면역원성 및/또는 과다제시에 대해 사전선별된 펩티드들의 창고를 이용하여 상기 단계 (a)에서 동정된 펩티드를 비교하는 단계;
- (c) 상기 환자에서 동정된 TUMAP와 일치하는 하나 이상의 펩티드를 상기 창고로부터 선택하는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (c)에 근거한 개인화된 항암 백신 또는 화합물 기반 또는 세포 요법을 제조 및/또는 배합하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 TUMAP가

- (a1) 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질의 동정을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교함; 및
- (a2) 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 동정하기 위해, 상기 발현 데이터와 종양 샘플에서 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열의 상관관계를 결정함에 의해 동정되는 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 어서, 창고에 포함된 펩티드들이 다음 단계들에 근거하여 동정되는 방법:

- (aa) 정상 조직과 비교하여 악성 조직에서 과발현된 유전자의 동정을 포함하는, 마이크로어레이 또는 서열결정-기반의 발현 프로파일결정과 같은 고도의 병렬 방법에 의한 게놈-전체 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 수행하는 단계,
- (ab) 상기 단계 (aa)에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드를 선택하는 단계, 및
- (ac) 건강한 공여자 또는 상기 환자의 인간 T 세포를 사용하는 시험관 내 면역원성 검정을 포함하는 선택된 펩티드에 의한 생체 내 T 세포 반응의 유도를 결정하는 단계; 또는
- (ba) 질량 분광분석 방법을 사용하여 상기 종양 샘플로부터 HLA 리간드를 동정하는 단계,
- (bb) 정상 조직과 비교하여 악성 조직에서 과발현된 유전자의 동정을 포함하는, 마이크로어레이 또는 서열결정-기반의 발현 프로파일결정과 같은 고도의 병렬 방법에 의한 게놈-전체 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 수행하는 단계,

- (bc) 동정된 HLA 리간드와 상기 유전자 발현 데이터를 비교하는 단계,
- (bd) 상기 단계 (bc)에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드를 선택하는 단계,
- (be) 종양 조직 상에서 상기 단계 (bd)로부터 선택된 TMAP 및 건강한 조직 상에서 결여되거나 덜 빈번한 검출을 재검출하고 mRNA 수준에서 과발현의 타당성을 확인하는 단계, 및
- (bf) 건강한 공여자 또는 상기 환자의 인간 T 세포를 사용하는 *시험관 내* 면역원성 검정을 포함하는 선택된 펩티드에 의한 생체 내 T 세포 반응의 유도를 결정하는 단계.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 정상의 상응하는 조직에 대해 종양 샘플에 고유한 하나 이상의 돌연변이를 개별 환자로부터 동정하고, 백신에 포함시키거나 세포 요법을 생성하기 위해 상기 돌연변이와 상관관계가 있는 펩티드를 선택함을 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 면역요법 방법에서 사용을 위한 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단독 또는 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 역할 가능한 기타 종양 연관 펩티드들과 병용하여 항종양 면역 반응을 촉진하거나 또는 세포를 생체 외 촉진하여 환자로 이전하기 위한 종양 연관 T 세포 에피토프에 관한 것이다. 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 그러한 펩티드는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적이 될 수도 있다.
- [0002] 본 발명은 항종양 면역 반응을 이끌어내는 백신 조성물에서 또는 약학적/면역학적 활성 화합물 및 세포의 개발을 위한 표적으로 사용할 수 있는 인간 종양 세포의 HLA 클래스 I 분자로부터 유래하는 여러 신규 펩티드 서열 및 이들의 변이체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 두경부 편평 세포 암종(HNSCC)은 역학, 병인 및 치료에 차이가 있는 이질 종양이다(Economopoulou et al., 2016). 이 종양들은 종양이 시작하는 부위별로 범주화된다. 여기에는 구강(입술, 혀의 앞 부분 3분의 2, 잇몸, 볼과 입술 안쪽의 내막, 입의 바닥, 경구개), 인두(비강인두, 연구개를 포함한 구인두, 혀의 바닥, 편도, 하인두), 후두, 부비동 및 비강 그리고 침샘의 암이 포함된다(미국 암 협회, 2015).
- [0004] HNSCC는 세계에서 여섯 번째로 가장 흔한 암으로 세계적으로 진단되는 모든 암 사례의 약 6%를 차지한다(Economopoulou et al., 2016). HNSCC는 발생률과 해부학적 분포에 있어 광범위한 지리적 변이의 특징을 가진다(Vigneswaran and Williams, 2014). 고위험 국가들은 남아시아 및 동남아시아에 위치한다(즉, 인도, 스리랑카, 방글라데시, 파키스탄). 이러한 지역에서는 구강의 편평 세포 암종(OSCC)이 남성에서 가장 흔한 암이고 여성에서는 세 번째로 가장 흔한 암이다(Vigneswaran and Williams, 2014). 유럽의 경우 OSCC의 높은 발생률은 프랑스, 헝가리, 슬로바키아 및 슬로베니아의 지역에서 발견된다. 미국의 경우 HNSCC가 남성 가운데 여덟 번째로 가장 흔한 암이다.
- [0005] HNSCC의 주요 위험 요인은 알코올과 담배 사용이다. 다른 HNSCC의 주요 위험 요인에는 마테차 그리고 보존되거나 소금에 절인 음식의 섭취, 베텔 쿼드의 사용, 목재 분진, 석면 및 합성 섬유에 대한 직업상 노출, 방사능 노출, 인간 유두종 바이러스(HPV)나 엡스타인바 바이러스(EBV)의 암유발 유형에 의한 감염 및 조상(특히 비인두 SCC에서 중국인 조상)가 포함된다(미국 암 협회, 2015).
- [0006] OSCC 및 비강 인두 SCC가 개발 국가에서 감소된 반면, 구인두 SCC의 발생률은 증가되었다. 이것은 SCC의 생물학적 구동요인의 변경에 기여한다(흡연 관련 SCC 대신에 HPV 관련 SCC). HPV 관련 구인두 암은 1988년부터 2004년 사이에 225% 증가했다(미국 암 협회, 2015). HPV 양성 HNSCC는 뚜렷한 질병 객체를 대표할 수 있다. 이러한 종양은 유의하게 개선된 생존 기간과 관련이 있다.
- [0007] 발생률은 성별에 의존한다: 남자 대 여자 비율 범위는 2:1 - 4:1의 범위이다(WHO의 필수 의약품 목록에서 암의 약품의 2014년 리뷰). HNSCC 환자의 5년 생존율은 40-50%이다(세계 보건 기구, 2014). 조기 암(T1, T2)은 치유

비율이 70%-95%이지만(미국 암 협회), HNSCC 환자의 대부분은 국소 진행성 질환을 가진다(Bauml et al., 2016).

- [0008] 초기 HNSCC의 치료에는 수술 또는 방사선에 의한 단일 방식 요법이 관여한다(세계 보건 기구, 2014). 진행성 암은 화학요법과 수술 및/또는 방사선 요법의 병용으로 치료한다.
- [0009] 화학요법에는 대부분 시스플라틴이나 시스플라틴과 유사한 도세탁셀, 시스플라틴, 플루오로우라실(5-FU) 또는 시스플라틴, 에피루비신, 블레오마이신 또는 시스플라틴, 5-FU를 함유하는 병용 약물을 포함한다. 이소트레티노인(13-시스-레티논산)을 1년간 매일 구강 SCC와 후두 SCC에 사용하면 제2차 종양의 발생률을 감소시킨다(미국 암 협회, 2015).
- [0010] HNSCC는 면역억제 질환이며 면역적격 세포의 조절곤란과 시토카인 분비의 부전이 그 특징이다(Economopoulou et al., 2016). 면역요법 전략은 HPV-음성과 HPV-양성 종양 사이에 차이가 있다.
- [0011] HPV 양성 종양에서, 바이러스성 종양단백질 E6 및 E7은 종양 세포에 의해 연속적으로 발현되고 HPV 양성 암 세포의 형질 전환 상태의 유지에 필수적이므로 양호한 표적을 나타낸다. 몇몇 백신접종 요법이 HPV 양성 HNSCC에서 현재 조사 중이며, DNA 백신, 펩티드 백신 및 수지상 세포(DC)가 관여하는 백신이 포함된다. 추가로 HPV-양성 종양 환자를 대상으로 지속적인 제II상 임상 시험에서 림프구고갈 및 이후의 TIL의 자가 주입의 효능을 조사한다(Economopoulou et al., 2016).
- [0012] HPV 음성 종양에서, 몇몇 면역요법 전략이 현재 사용되고 있으며 조사 중이다. 재발성/전이성 HNSCC의 표준 일차 치료로서 키메라 IgG1 항-EGFR 단클론성 항체 세툽시맙이 화학요법과의 병용 시 FDA에 의해 승인되었다. 파니투무맙, 니모투주맙 및 잘루투무맙 등 다른 항-EGFR 단클론성 항체가 HNSCC에서 평가된다. 몇몇 면역 체크포인트 억제제가 HNSCC에서의 사용에 대해 임상 시험을 통해 조사되고 있다. 여기에는 다음 항체가 포함된다: 이필리무맙(항-CTLA-4), 트레멜리무맙(항-CTLA-4), 펌브롤리주맙(항-PD-1), 니볼루맙(항-PD-1), 두르발루맙(항-PD-1), 항-KIR, 우레루맙(항-CD137), 그리고 항-LAG-3.
- [0013] HNSCC 환자에 대한 두 개의 임상 시험에서는 p53 펩티드나 세포자멸 종양 세포가 로딩된 DC의 사용을 평가했다. 그 면역학적 반응이 만족스러웠으며 부작용은 허용가능했다.
- [0014] 몇몇 연구는 입양 T 세포 요법(ACT)을 사용하여 실행했다. T 세포를 조사된 자가 종양 세포 또는 EBV에 대해 유도했다. 질병 통제 및 전체 생존기간의 결과는 유망했다(Economopoulou et al., 2016).
- [0015] 암 치료 관련 심한 부작용 및 비용을 고려하면, 일반적으로 암 특히 두경부 편평 세포 암종의 치료에 사용 가능한 요인을 파악할 필요가 있다. 또한 암의 보다 나은 진단, 예후의 평가 및 치료 성공의 예측을 유도하는 암 진단 그리고 특히 두경부 편평 세포 암종의 바이오마커를 표시하는 요인의 파악도 필요하다.
- [0016] 암의 면역요법은 부작용을 최소화시키는 반면 암 세포에 대한 특이적 표적화의 옵션을 나타낸다. 암 면역요법은 종양 관련 항원의 존재를 이용한다.
- [0017] 종양 관련 항원(TAA)의 현재 분류는 다음과 같은 주요 그룹을 포함한다:
- [0018] a) 암-고환 항원: 제일 처음으로 T 세포에 의해 인식 된 TAA는 이 종류에 속하며, 이는 그 멤버들의 발현이 조직학적으로 인간 종양과 다르며, 정상 조직 중, 고환의 정모 세포/정원 세포에서만 있으며, 때로는 태반에서도 있기 때문에 암-고환(CT)라고 최초로 불려졌다. 고환의 세포들이 클래스 I 또는 II HLA 분자를 발현하지 않기 때문에, 이 항원들은 정상 세포에 있는 T 세포에 의해 인식될 수 없으며 면역학적으로 종양-특정이라고 간주될 수 있다. CT 항원의 잘 알려진 예로는 MAGE 계열 구성원들 및 NY-ESO-1이 있다.
- [0019] b) 분화 항원들: 이 TAA는 종양과 그 종양이 발생한 정상 조직 사이에 공유된다. 대부분의 알려진 분화 항원들은 흑색종과 정상 멜라닌 세포에서 발견된다. 이러한 멜라닌 세포 혈통 관련 단백질의 다수는 멜라닌의 생합성에 관련되어 있으며 그러므로 종양 특이적이지 않지만 암 면역요법에 널리 사용된다. 예로는, 티로시나아제 및 흑색종을 위한 멜란-A/MART-1 또는 전립선암을 위한 PSA가 포함되지만 이로 국한되지 않는다.
- [0020] c) 과발현된 TAA: 일반적으로 낮은 발현 수준이 있는 많은 정상 조직뿐만 아니라 조직학적으로 다른 유형의 종양에서 유전자 인코딩에서 널리 발현된 TAA가 발견된다. 정상 조직에 의해 처리되고 잠재적으로 제시되는 많은 에피토프가 T 세포 인식의 임계치 수준보다 낮을 수 있고, T 세포의 종양 세포에서의 과발현은 이전에 확립된 내성을 중단시켜 항암 반응을 개시할 수 있다. 이 클래스 TAA의 두드러진 예로는 Her-2/neu, 서바이빈, 텔로머라제 또는 WT1가 있다.

- [0021] d) 종양 특이적 항원: 이러한 독특한 TAA는 정상 유전자의 변이로써 발생한다(베타-카테닌, CDK4 등). 이러한 분자 변경의 일부는 종양 변이 및/또는 진행과 관련되어 있다. 종양 특이적 항원은 일반적으로 강한 면역 반응을 정상 조직에 대한 자기 면역 반응에 대한 위험성 없이 유도할 수 있다. 반면에, 대부분의 경우 TAA는 발견되어 일반적으로 많은 개별 종양에서 대개 공유되지 않은 해당 종양에만 적절하다. 종양 특이적(연관된) 아형을 갖는 단백질의 경우 펩티드가 종양(관련) 엑손으로부터 비롯된다면 펩티드의 종양 특이성(또는 연관성) 또한 발생할 수 있다.
- [0022] e) 비정상 번역 후 변형에서 발생하는 TAA: 이러한 TAA는 특이적이 아니고 과발현되지도 않는 단백질에서 발생할 수 있지만 종양에서 주로 활동적인 번역 후 과정에 의해 종양과 관련된다. 이 클래스의 예는 종양 특이적일 수도 있고 아닐 수도 있는 분해 과정 동안 단백질 스플라이싱과 같은 이벤트 또는 MUC1의 경우 종양의 새로운 에피토프로 이끄는 변화된 당화 패턴에서 발생한다.
- [0023] f) 종양 바이러스 단백질: 이러한 TAA는 종양발생 과정에서 중요한 역할을 할 수 있는 바이러스 단백질이며, 그들이 이질적이기 때문에(인간 태생이 아닌), T 세포 반응을 일으킬 수 있다. 이런 단백질의 예로는 인간 유두종 타입 16 바이러스 단백질, 및 경부 암종에서 발현하는 E6와 E7이 있다.
- [0024] T 세포 기반의 면역요법은 종양 관련 또는 종양 특정 단백질로부터 유래된 펩티드 에피토프를 표적으로 하며, 이는 구조적 적합 복합체(MHC)의 분자에 의해 제시된다. 종양특이적 세포 독성 T 림프구에 의해 인식되는 항원, 즉 그들의 에피토프는, 발현되고, 같은 원조의 변형없는 세포들에 비해서, 각각의 종양의 대개 상향조절된 세포인 효소, 수용체, 전사 인자 등과 같은 모든 단백질 클래스에서 유도된 분자일 수 있다.
- [0025] MHC 분자에는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II의 두 클래스가 있다. MHC 클래스 I 분자는 알파 중쇄와 베타-2-마이크로글로불린으로 구성되어 있고, MHC 클래스 II 분자는 알파와 베타 채로 구성되어 있다. 이들의 3차원 형태는 결합 홈을 형성하며, 이는 펩티드와의 비공유결합에 사용된다.
- [0026] MHC 클래스 I 분자는 대부분의 유핵 세포에서 찾을 수 있다. 이는 대부분 내인성 단백질, 결혼 리보솜 생성물(DRIP)과 보다 큰 펩티드의 단백질분해성 절단으로 인해 생성된 펩티드를 제시한다. 하지만 엔도솜 구획이나 외생 출처로부터 유래된 펩티드 또한 MHC 클래스 I 분자에서 발견된다. 이러한 비고전적 방식의 클래스 I 제시는 문헌에서는 교차 제시라고 칭한다(Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). MHC 클래스 II 분자는 대부분 전문적인 항원 제시 세포(APC)에서 찾아볼 수 있으며, 이들은 주로 APC에 의해 섭취된 외인성 또는 막횡단 단백질의 펩티드를 제시하며(예: 세포내이입 동안), 이는 차후에 처리된다.
- [0027] 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합체는 적절한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8 양성 T 세포에 의해서 인식되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체는 적절한 TCR을 갖는 CD4 양성 조력 T 세포에 의해 인식된다. TCR, 펩티드 및 MHC가 이로써 1:1:1의 화학량적 반응량으로 존재한다는 사실은 잘 알려져 있다.
- [0028] CD4-양성 보조 T 세포는 CD8-양성 세포 독성 T 세포에 의한 효과적인 반응을 유도하고 지속하는데 중요한 역할을 한다. 종양 연관 항원(TAA)에서 유도된 CD4 양성 T 세포 에피토프의 동정은 항종양 면역 반응을 일으키기 위한 의약품의 개발에 아주 중요하다(Gnjatic et al., 2003). 종양 부위에서, 보조 T 세포는, 세포독성 T 세포(CTL) 친화적 사이토킨 주위 환경을 지원하고(Mortara et al., 2006) 효과기 세포, 예를 들면 CTL, 자연 살해(NK) 세포, 대식 세포, 과립구를 유치한다(Hwang et al., 2007).
- [0029] 염증이 없는 경우, MHC 클래스 II 분자의 발현은 주로 면역계의 세포, 특히 전문적 항원 제시 세포(APC)로 제한된다, 예를 들면, 단핵 세포, 단핵 세포-유도된 세포, 대식 세포, 모수식 세포. 암 환자에서, 종양의 세포는 MHC 클래스 II를 발현하는 것으로 밝혀졌다(Dengjel et al., 2006). 본 설명의 연장된(더 기다란) 펩티드는 MHC 클래스 II 활성 에피토프로 작용할 수 있다.
- [0030] MHC 클래스 II에 의해 활성화된 조력 T 세포는 항종양 면역에서 CTL 효과기 기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다. CD8 양성 킬러 T 세포의 TH1 유형 지원 효과기 기능의 조력 T 세포 반응을 일으키는 조력 T 세포 에피토프는, 세포 표면에 종양 관련 펩티드/MHC 복합체를 보이는 종양 세포에 대한 세포 독성 기능을 포함한다. 이런 식으로 종양 관련 조력 T 세포 펩티드 에피토프는, 따로 또는 다른 종양 관련 펩티드와 함께, 항종양 면역 반응을 자극하는 백신 조성의 활성 약학 원료로 사용될 수 있다.
- [0031] 예를 들면, 생쥐 같은 포유류 동물 모델에서는 심지어 CD8 양성 T 림프구의 부재하에서도, CD4 양성 T 세포가 인터페론-감마(IFN γ)의 분비에 의한 혈관신생의 저해를 통해 종양 발현을 억제하는 데 충분한 것으로 나타났다(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). CD4 T 세포가 직접적 항종양 작용기라는 증거가 있다

(Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

- [0032] 이전에는 HLA 클래스 II 분자의 구성적 발현이 일반적으로 면역 세포로 제한되기 때문에, 클래스 II 펩티드를 원발성 종양에서 직접 분리하는 것은 가능하지 않다고 간주되었다. 그러나, Dengjel 등은 MHC 클래스 II 에피톱을 종양에서 직접적으로 식별하는데 성공했다(WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).
- [0033] CD8 및 CD4에 의존하는 두 유형의 반응이 함께 상승작용에 의해 항종양 효과에 기여하므로, CD8+ T 세포(리간드:MHC 클래스 I 분자 + 펩티드 에피톱) 또는 CD4 양성 조력 T 세포(리간드:MHC 클래스 II 분자 + 펩티드 에피톱)에 의해 인식되는 종양 관련 항원의 식별 및 특성화가 종양 백신의 개발에 중요하다.
- [0034] MHC 클래스 I 펩티드가 세포 면역 반응을 촉발(유도)하려면 MHC 분자에도 결합해야 한다. 이 과정은 MHC 분자의 대립형질 그리고 그 펩티드의 아미노산 서열의 특정적 다형성에 의존한다. MHC 클래스 I 결합 펩티드는 대개 길이가 8-12개의 아미노산 잔기이며 또한 대개 그 서열 내에 MHC 분자의 상응하는 결합 홈과 상호작용하는 두 개의 유지되는 잔기("고정부")를 포함하고 있다. 이렇게 함으로써 각 MHC 대립형질은 어떤 펩티드가 결합 홈에 특정적으로 결합할 수 있는지 결정하는 "결합 모티프"를 갖는다.
- [0035] MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서, 펩티드는 종양 세포에 의해 발현되는 특정 MHC 클래스 I 분자와 결합할 수 있어야 하며 또한 추후 특정한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포에 의해 인식될 수 있어야 한다.
- [0036] 종양 특이 또는 연관 항원으로서 T 림프구에 의해 단백질이 인식되고, 치료에 사용된다면, 특정한 전제 조건이 충족되어야 한다. 항원은 주로 종양 세포에 의해 발현되어야 하며 비교적 소량일지라도 건강한 정상 조직에 의해서 발현되어서는 안 된다. 바람직한 구현에서, 펩티드는 건강한 정상 조직과 비교하여 종양 세포에 의해 과다 제시되어야 한다. 더 바람직하게는, 각각의 항원이 하나의 유형의 종양에서만 아니라 높은 농도로 나타나는 것이다(즉 세포 마다 펩티드의 각각의 사본 번호). 종양 특이 및 종양 관련 항원은 흔히 기능(예: 세포 주기 조절 또는 세포자멸사의 억제) 때문에 정상 세포를 종양 세포로 전환하는 것과 직접 관련된 단백질에서 유도된다. 또한, 변환을 직접적으로 일으키는 단백질의 하류 표적은 상향조절될 수 있으며 따라서 간접적으로 종양과 연관될 수 있다. 이러한 간접적 종양 관련 항원은 백신 접근법의 표적이 될 수도 있다(Singh-Jasuja et al., 2004). 종양 관련 항원에서 유도된 그러한 펩티드("면역성 펩티드")가 시험관 내 또는 생체 내 T 세포 반응을 유도하도록 하기 위해서 에피톱이 항원의 아미노산 서열에 나타나는 것이 필수적이다.
- [0037] 기본적으로, MHC 분자에 결합할 수 있는 모든 펩티드는 T 세포 에피톱으로서 기능할 수 있다. 시험관 내 또는 생체 내 T 세포 반응의 유도의 전제 조건은 상응하는 TCR이 있는 T 세포의 존재와 이 특정 에피톱에 대한 면역성 내성의 부재이다.
- [0038] 그러므로, TAA는 종양 백신으로 제한되지 않지만 이를 포함하는 T 세포 기반 요법의 개발에 있어서 시작점이 된다. TAA의 식별과 특성화의 방법은 대개 환자 또는 건강한 대상에서 분리될 수 있는 CTL의 사용에 기반하거나, 또는 다른 전송 프로파일 또는 종양과 정상 조직 사이의 차등 전사 프로파일이나 차등 펩티드 발현 패턴의 생성에 기반한다. 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주에서 과발현되거나 그런 조직 또는 세포주에서 선택적으로 발현되는 유전자의 식별은 면역 요법에서 이런 유전자에서 전사된 항원의 이용에 대한 정밀한 정보를 제공하지 않는다. 이것은 상응하는 TCR이 있는 T 세포가 나타나야 하고 이 특정 에피톱에 대한 면역 내성이 없거나 최소화되어야 하므로 이러한 항원의 에피톱의 개개의 하위집단만이 그런 응용에 적합하기 때문이다. 따라서, 본 발명의 매우 바람직한 구현에서, 기능성 T 세포가 있는 MHC 분자와 관련이 있게 나타나는 과다 발현된 그런 펩티드 또는 선택적으로 발현된 단백질만 선택하는 것은 중요하다. 그런 기능성 T 세포는 특정 항원에 의해 자극되었을 때 클론적으로 확대되고 효과기 기능("효과기 T 세포")을 실행할 수 있는 T 세포로 정의된다.
- [0039] 본 설명에 따른 특정 TCR(예: 가용성 TCR) 및 항체 또는 다른 결합 분자(골격)에 의해 펩티드-MHC를 표적화하는 경우, 기저 펩티드의 면역원성은 이차적인 것이다. 이러한 경우 그 제시가 결정 요인이다.

발명의 내용

- [0040] 본 발명의 제 1 양태에서, 본 발명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것으로, 상기 변이체는 MHC에 결합 및/또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하며, 상기 펩티드는 기저의 전장 폴리펩티드가 아니다.
- [0041] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 대

해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것으로, 상기 펩티드나 그 변이체는 8개 내지 100개, 바람직하게는 8개 내지 30개, 가장 바람직하게는 8개 내지 14개의 아미노산의 전장을 갖는다.

[0042] 다음 표에는 본 발명에 따른 펩티드들과 각각의 서열 식별 번호 그리고 이 펩티드들의 장애의 출처(기저) 유전자들이 나와 있다. 표 1 및 표 2의 모든 펩티드는 HLA-A*02에 결합한다. 표 2의 펩티드는 고처리량의 스크리닝 및 높은 오류 비율의 결과로서 과거에 커다란 목록으로 공개되거나 알고리즘을 사용하여 계산되었지만, 과거에는 답과 연관된 점은 전혀 없었다. 표 3의 펩티드는 본 발명에 따른 펩티드와의 병용에서 유용할 수 있는 추가의 펩티드이다. 표 4A 및 표 4B의 펩티드는 또한 해당되는 기저 폴리펩티드의 과발현이나 과다제시에 관여하는 다양한 기타 악성종양의 진단 및/또는 치료에 유용하다.

[0043] [표 1]

[0044] 본 발명에 따른 펩티드, J = 포스포-세린

서열 식별 번호	서열	유전자 ID	공식 유전자 부호
1	GLAGGFGGPGFPV	286887, 3853, 3854	KRT6C, KRT6A, KRT6B
2	PVCPGGGIQEV	286887, 3848, 3852, 3853, 3854, 9119	KRT6C, KRT1, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT75
3	SLYGLGGSKRISI	286887, 3853, 3854	KRT6C, KRT6A, KRT6B
4	ILDINDNPPV	100653137, 1830, 64072	DSG3, CDH23
5	VCPGGGIQEV	286887, 3848, 3852, 3853, 3854, 9119	KRT6C, KRT1, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT75
6	ALYDAELSQM	286887, 3853, 3854	KRT6C, KRT6A, KRT6B
7	ALEEANADLEV	3860, 3861, 3866, 3868, 400578, 644945, 729252	KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT16P2, KRT16P3, KRT16P1
8	AQLNIGNVLPV	6132	RPL8
9	STASAITPSV	3852	KRT5
10	TLWPATPPKA	647024	C6orf132
11	VLFSPPVI	5621	PRNP
12	TLTDEINFL	286887, 3853, 3854	KRT6C, KRT6A, KRT6B
13	SLVSYLDKV		모르는 유전자
14	RIMEGIPTV	242	ALOX12B
15	SMLNNIINL	5317	PKP1
16	ALKDSVQRA	10765	KDM5B
17	SIWPALTQV	100381270	ZBED6
18	YLYPDLSRL	6538	SLC6A11
19	ALAKLLPLL	5655	KLK10
20	YLINEIDRIRA	667	DST
21	FLHEPFSSV	122665, 84659	RNASE8, RNASE7
22	KLPEPCSTV	6707	SPRR3
23	SLPESGLLSV	2178	FANCE
24	LLIAINPQV	9635	CLCA2
25	SLCPPGGGIQEV	196374	KRT78
26	TLVDENQSWYL	341208	HEPHL1
27	YLAEPQWAV	2196	FAT2
28	AVDPVSGSLYV	57451	TENM2
29	RLLPDLDEV	121551	BTBD11
30	TLASLGYAVV	91039	DPP9

[0045]

서열 식별 번호	서열	유전자 ID	공식 유전자 부호
31	HLATVKLLV	54101	RIPK4
32	IQDAEGAIHEV	165904	XIRP1
33	AIYEGVGWNV	57115	PGLYRP4
34	ALDTFSVQV	171177	RHOV
35	ALVGDVILTV	2196	FAT2
36	GLWSSIFSL	123745	PLA2G4E
37	ILLEDVFQL	285973	ATG9B
38	KLLPGVQYV	390928	PAPL
39	LLPEDDTRDNV	1001	CDH3
40	LLTPLNLQI	286887, 3852, 3853, 3854	KRT6C, KRT5, KRT6A, KRT6B
41	RLNGEGVGQVNISV	3853, 3854	KRT6A, KRT6B
42	ALYTSGHLL	5653	KLK6
43	AVLGGKLYV	9903	KLHL21
44	GLGDDSFPI	2125	EVPL
45	GLIEWLENTV	5591	PRKDC
46	GLISSIEAQL	3860	KRT13
47	QLLEGELETL	5493	PPL
48	YLLDYPNNL	26057	ANKRD17
49	YLWEAHTNI	729830	FAM160A1
50	ALSNVVHKV	5268	SERPINB5
51	FLIPSIIFA	150696	PROM2
52	LLFTGLVSGV	284434	NWD1
53	RLVEVGGDVQL	3963, 653499	LGALS7, LGALS7B
54	RLSGEGVGPV	3852	KRT5
55	VLNVGVAEV	285848	PNPLA1
56	FLQLETEQV	64426	SUDS3
57	AILGFALSEA	516, 517, 518	ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3
58	SLSDIQPCL	3691	ITGB4
59	YLQNEVFGL	1832	DSP
60	SLGNFKDDL	23650	TRIM29
61	FVAGYIAGV	5250	SLC25A3
62	ILSSACYTV	5317	PKP1
63	ALMDEINFMKM	3852	KRT5
64	KILEJLFVJL		모르는 유전자
65	ALWGFFPVLL	56851	EMC7

[0046]

서열 식별 번호	서열	유전자 ID	공식 유전자 부호
66	TLLSEIAEL	84629	TNRC18
67	AQLNLIWQL	80381	CD276
68	KILEMDDPRA	6512	SLC1A7
69	YVMESMTYL	28976	ACAD9
70	FLFPAFLTA	2150	F2RL1
71	SLFPYVVL	55117	SLC6A15
72	SLDGNPLAV	25987	TSKU
73	YIDPYKLLPL	54433	GAR1
74	SLTSFLISL	101060198, 7851	MALL
75	ALASAPTSV	80004	ESRP2
76	ILFDEVLTFA	83666	PARP9
77	SLRAFLMPI	79901	CYBRD1
78	VLYGDVEEL	10970	CKAP4
79	GLHQDFPSVVL	51056	LAP3
80	GLYGIKDDVFL	3939	LDHA

[0047]

[0048]

[표 2]

[0049]

이전에 알려진 암 관련이 없는 본 발명에 따른 펩티드

서열 식별 번호	서열	유전자 ID	공식 유전자 부호
81	VLAENPDIFAV	6541	SLC7A1
82	VLDINDNPPV	120114, 1828, 2195	FAT3, DSG1, FAT1
83	QLLQYVYNL	4173	MCM4
84	ALMAGCIQEA	1026	CDKN1A
85	QLIEKITQV	114827	FHAD1
86	SLQERQVFL	9333	TGM5
87	ALPEPSPAA	5339	PLEC
88	LMAAPASTV	7071	KLF10
89	VLDEGLTSV	25909, 285116	AHCTF1, AHCTF1P1
90	TLNDGVVVQV	10146	G3BP1
91	MLFENMGAYTV	4953	ODC1

[0050]

[0051]

[표 3]

[0052] 예를 들어 개인화 암 요법에 유용한 펩티드

서열 식별 번호	서열	유전자 ID	공식 유전자 부호
92	ILLDVKTRL	3728, 3861, 3868, 3872	JUP, KRT14, KRT16, KRT17
93	ALSNVIHKV	5268	SERPINB5
94	SIFEGLLSGV	2709	GJB5
95	SLDENSQQV	6273	S100A2
96	FQLDPSSGVLVTV	2196	FAT2
97	LILESIPVV	5597	MAPK6
98	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
99	TASAITPSV	3852	KRT5
100	VLVSDGVHSV	1952	CELSR2
101	GLLPSAESIKL	132989	C4orf36
102	TLAELQPPVQL	157922	CAMSAP1
103	VLAEGGEGV	10630	PDPN
104	SLSPVILGV	26525	IL36RN
105	STYGGGLSV	3861, 3868	KRT14, KRT16
106	VLVDQSWVL	5655	KLK10
107	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
108	SLYNLGGSKRISI	3852	KRT5
109	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
110	LLPPPPPPA	9509	ADAMTS2
111	SLAPGDVVRQV	79729	SH3D21
112	ALLDGGSEAYWRV	84985	FAM83A
113	NLMASQPQL	5317	PKP1
114	VLVPYEPPQV	8626	TP63
115	VTAAAYMDTVSL	7498	XDH
116	SLWPSPEQL	90480	GADD45GIP1
117	GLAFSLYQA	871	SERPINH1
118	TLLQEQGTKTV	286887, 3852, 3853, 3854	KRT6C, KRT5, KRT6A, KRT6B
119	GLLDPSVFHV	79050	NOC4L
120	YLVAKLVEV	10277	UBE4B
121	SLYGYLRGA	9790	BMS1
122	ILDEAGVKYFL	113828	FAM83F
123	LLSGDLIFL	2709	GJB5
124	YMLDIFHEV	3038	HAS3

[0053]

서열 식별 번호	서열	유전자 ID	공식 유전자 부호
125	ALNPEIVSV	5277	PIGA
126	ILVDWLVEV	85417, 890, 8900	CCNB3, CCNA2, CCNA1
127	SLFGKKYIL	2274	FHL2
128	TLHRETFYL	9134	CCNE2
129	SLSGEIILHSV	121441	NEDD1
130	TLDGAAVNQV	3918	LAMC2
131	LQLDKEFQL	24140	FTSJ1
132	TLYPGRFDYV	338322	NLRP10
133	LLLPLQILL	5650	KLK7
134	ILIGETIKI	5742, 5743	PTGS1, PTGS2
135	GLFSQHFNL	1789	DNMT3B
136	SLMEPPAVLLL	8900	CCNA1
137	GLAPFLLNAV	101060689, 154761, 285966	FAM115C
138	ALLTGHSKA	23165	NUP205
139	QLGPVPVTI	285966	FAM115C
140	YLFENISQL	57115	PGLYRP4
141	FLNPDEVHAI	81610	FAM83D
142	SLVSEQLEPA	11187	PKP3
143	YVYQNNIYL	2191	FAP
144	KISTITPQI	996	CDC27
145	LLYGKYVSV	84065	TMEM222
146	GLLEELVTV	642475	MROH6
147	ILMDPSPEYA	1786	DNMT1
148	LLFDAPDLRL	55561	CDC42BPG
149	VLLNINGIDL	222484	LNK2
150	ILAEPIYIRV	55655	NLRP2
151	QLCDLNAEL	3833	KIFC1
152	SLWQDIPDV	128272	ARHGEF19
153	VLFLGKLLV	204962	SLC44A5
154	KMWEELPEVV	622	BDH1
155	GLLDNPELRV	26263	FBXO22
156	ALINDILGELVKL	85463	ZC3H12C

[0054]

[0055]

더 나아가, 본 발명은 예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관암, 뇌암, 만성 림프구성 백혈병, 결장직장 암종, 식도암, 담낭암, 위암, 간세포암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암, 소세포 폐암, 방광암 및 자궁암과 같은 증식성 질병의 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 펩티 드와 일반적으로 관련이 있다.

[0056]

특히 바람직하기로는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택된 본 발명에 따른 단일 또는 조합의 펩티드들이다. 더 바람직하기로는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 31로 구성된 군으로부터(표 1 참조) 선택된 단일 또는 조합의 펩티드들 그리고 두경부 편평 세포 암종, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관암, 뇌암, 만성 림프구성 백혈병, 결장직장 암종, 식도암, 담낭암, 위암, 간세포암, 흑색종, 비호지킨 림프 종, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암, 소세포 폐암, 방광암, 자궁암 그리고 바람직하게는 두경부암 편평 세포 암종의 면역요법에서의 이들의 사용이다.

[0057]

다음 표 4에 나와 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 많은 펩티드는 다른 종양 유형에서도 발견되며 따라서 다른 적응증의 면역요법에도 사용될 수 있다. 또한 도 1 및 실시예 1도 참조한다.

[0058]

표 4A는 본 발명에 따른 펩티드 및 다른 증식성 질병에서 특히 다른 암 질병에서의 구체적인 사용을 나타낸다. 이 표는 펩티드가 발견된 추가의 종양 유형에서의 선택된 펩티드로서 측정된 종양 샘플에서 5% 넘게 과다제시되 거나 정상 조직 대 종양의 기하학적 평균 비율이 3보다 큰 측정된 종양 샘플에서 5% 넘게 제시된 펩티드를 보여

준다. 과다제시란 가장 높은 제시의 정상 샘플에 비해 중앙 샘플에서의 더 높은 제시로서 정의된다. 과다제시를 시험한 대상의 정상 조직은 다음과 같다: 지방 조직, 부신, 담관, 혈액 세포, 혈관, 골수, 뇌, 식도, 눈, 담낭, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 신경, 췌장, 부갑상선, 복막, 뇌하수체, 흉막, 타액선, 골격근, 피부, 소장, 비장, 위, 흉선, 갑상선, 기관, 요관, 방광.

[표 4A]

서열 식별 번호	서열	다른 관련 기관 / 질병
1	GLAGGFGGPGFPV	담낭암, 담관암
2	PVCPGGGIQEV	NSCLC, SCLC
3	SLYGLGGSKRISI	식도암, 방광암
4	ILDINDNPPV	BRCA, 식도암, 방광암
7	ALEEANADLEV	식도암, 방광암
8	AQLNIGNVLPV	흑색종, 식도암
9	STASAITPSV	흑색종
10	TLWPATPPKA	담낭암, 담관암
11	VLFSSPPVI	흑색종
15	SMLNNIINL	방광암
16	ALKDSVQRA	AML, BRCA, 흑색종, 식도암, 방광암, 자궁암
17	SIWPALTQV	SCLC, AML, BRCA, 흑색종, 자궁암, 담낭암, 담관암
18	YLYPDL SRL	뇌암
19	ALAKLLPLL	식도암, 방광암, 자궁암
20	YLINEIDRIRA	NSCLC, 방광암
21	FLHEPFSSV	방광암
23	SLPESGLLSV	식도암
24	LLIAINPQV	AML, 방광암
27	YLAEPQWAV	식도암, 방광암
29	RLLPDLDEV	AML
31	HLATVKLLV	방광암, 자궁암
32	IQDAEGAIHEV	NHL, 흑색종, 식도암, 방광암
37	ILLEDVFQL	담낭암, 담관암
39	LLPEDDTRDNV	BRCA, 식도암, 방광암
41	RLNGEGVGQVNISV	식도암
42	ALYTSGHLL	식도암, 담낭암, 담관암
43	AVLGKLYV	CLL, NHL, AML, 흑색종, 자궁암
45	GLIEWLENTV	SCLC, OC, 방광암
46	GLISSIEAQL	식도암, 방광암, 자궁암
47	QLLEGELETL	방광암, 자궁암
48	YLLDYPNNL	NHL, BRCA, 흑색종, 식도암, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암
49	YLWEAHTNI	식도암, 자궁암
50	ALSNVVKV	GC, BRCA, 식도암, 방광암

서열 식별 번호	서열	다른 관련 기관 / 질병
51	FLIPSIIFA	방광암, 자궁암
52	LLFTGLVSGV	식도암
53	RLVEVGGDVQL	식도암, 방광암
54	RLSGEGVGPV	식도암
56	FLQLETEQV	BRCA, 흑색종, 방광암, 자궁암
57	AILGFALSEA	AML, BRCA, 흑색종, 자궁암, 담낭암, 담관암
58	SLSDIQPCL	뇌암, BRCA, 식도암, 방광암, 자궁암
59	YLQNEVFGL	SCLC, NHL
60	SLGNFKDDL	NHL, 식도암, 방광암
61	FVAGYIAGV	NSCLC, SCLC, RCC, 뇌암, GC, CLL, NHL, 식도암, 담낭암, 담관암
62	ILSSACYTV	RCC, BRCA, 식도암
63	ALMDEINFMKM	NSCLC, SCLC, NHL
64	KILEJLFVJL	NSCLC, 방광암, 담낭암, 담관암
65	ALWGFFPVLL	CLL, 흑색종
66	TLLSEIAEL	CLL, NHL, AML, 흑색종, OC, 자궁암
67	AQLNLIWQL	SCLC, 흑색종, OC, 자궁암, 담낭암, 담관암
69	YVMESMTYL	방광암, 담낭암, 담관암
70	FLFPAFLTA	AML, 담낭암, 담관암
71	SLFPYVVL	흑색종
72	SLDGNPLAV	식도암, 자궁암, 담낭암, 담관암
73	YIDPYKLLPL	CLL, NHL, AML, 흑색종
74	SLTSFLISL	방광암
75	ALASAPTSV	BRCA, 식도암, 자궁암, 담낭암, 담관암
76	ILFDEVLTFA	CLL, NHL, AML, BRCA, 자궁암, 담낭암, 담관암
77	SLRAFLMPI	AML
78	VLYGDVEEL	CLL, 방광암, 담낭암, 담관암
79	GLHQDFPSVVL	NHL, BRCA, 자궁암
81	VLAENPDIFAV	SCLC, MCC, 흑색종, 방광암
82	VLDINDNPPV	흑색종
83	QLLQYVYNL	SCLC, NHL, AML, 자궁암
85	QLIEKITQV	SCLC, NHL, 흑색종, 방광암, 담낭암, 담관암
86	SLQERQVFL	NHL, 방광암
87	ALPEPSPAA	RCC, NHL, 흑색종, 담낭암, 담관암
88	LMAPAPSTV	뇌암, 식도암, 방광암
89	VLDEGLTSV	SCLC, RCC, CLL, NHL, BRCA, 흑색종, 방광암,

서열 식별 번호	서열	다른 관련 기관 / 질병
		자궁암
90	TLNDGVVVQV	RCC, CLL, NHL, 식도암, 방광암, 자궁암
91	MLFENMGAYTV	SCLC, CLL, NHL, 자궁암

NSCLC= 비소세포 폐암, SCLC= 소세포 폐암, RCC= 신장암, CRC= 결장암 또는 직장암, GC= 위암, HCC= 간암, PC= 췌장암, PrC= 전립선암, 백혈병, BRCA=유방암, OC= 난소암, NHL= 비호지킨 림프종, AML= 급성 골수성 백혈병, CLL= 만성 림프구 백혈병.

표 4B는 본 발명에 따른 펩티드 및 다른 증식성 질병에서 특히 다른 암 질병에서의 구체적인 사용을 나타낸다. 이 표는 펩티드가 발견된 추가의 종양 유형에서의 선택된 펩티드로서 측정된 종양 샘플에서 5% 넘게 과다제시되

거나 정상 조직 대 종양의 기하학적 평균 비율이 3보다 큰 측정된 종양 샘플에서 5% 넘게 제시된 펩티드를 보여 준다. 과다제시란 가장 높은 제시의 정상 샘플에 비해 종양 샘플에서의 더 높은 제시로서 정의된다. 과다제시를 시험한 대상의 정상 조직은 다음과 같다: 지방 조직, 부신, 동맥, 골수, 뇌, 중추 신경, 결장, 식도, 눈, 담낭, 심장, 신장, 간, 폐, 림프절, 백혈구, 췌장, 부갑상선, 말초 신경, 복막, 뇌하수체, 흉막, 직장, 타액선, 골격근, 피부, 소장, 비장, 위, 흉선, 갑상선, 기관, 요관, 방광, 정맥.

[표 4B]

서열 식별 번호	서열	추가 객체
2	PVCPGGIQEV	식도암
6	ALYDAELSQM	식도암
8	AQLNIGNVLPV	방광암
9	STASAITPSV	식도암
16	ALKDSVQRA	HCC
43	AVLGKLYV	RCC, GC, HCC
45	GLIEWLENTV	HCC
47	QLLEGELETL	OC
50	ALSNVVHKV	NSCLC
51	FLIPSIIFA	OC
56	FLQLETEQV	OC
57	AILGFALSEA	HCC
60	SLGNFKDDL	NSCLC
61	FVAGYIAGV	HCC
65	ALWGFFPVLL	HCC
66	TLLSEIAEL	HCC
73	YIDPYKLLPL	BRCA, 방광암
75	ALASAPTSV	HCC
88	LMAFAPSTV	흑색종
89	VLDEGLTSV	GC

NSCLC= 비소세포 폐암, HCC= 간암, BRCA= 유방암, RCC= 신세포 암종, GC= 위암, OC=난소암.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 담낭암 및/또는 담관암의 치료를 위한 서열 식별 번호 1, 10, 17, 37, 42, 48, 57, 61, 67, 69, 70, 72, 75, 76, 78 및 87의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 NSCLC의 치료를 위한 서열 식별 번호 2, 20, 50, 60, 61, 63 및 64의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 SCLC의 치료를 위한 서열 식별 번호 2, 17, 45, 59, 61, 63, 67, 81, 83, 85, 89 및 91의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 식도암의 치료를 위한 서열 식별 번호 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 16, 19, 23, 27, 32, 39, 41, 42, 46, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 58, 60, 61, 62, 72, 75, 88 및 90의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 방광암의 치료를 위한 서열 식별 번호 3, 4, 7, 8, 15, 16, 19, 20, 21, 24, 27, 31, 32, 39, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 53, 56, 58, 60, 64, 69, 73, 74, 78, 81, 85, 86, 88, 89 및 90의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 BRCA의 치료를 위한 서열 식별 번호 4, 16, 17, 39, 48, 50, 56, 57, 58, 62, 73, 75, 76, 79 및 89의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 흑색종의 치료를 위한 서열 식별 번호 8,

9, 11, 16, 17, 32, 43, 48, 56, 57, 65, 66, 67, 71, 73, 81, 82, 85, 87, 88 및 89의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

- [0075] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 AML의 치료를 위한 서열 식별 번호 16, 17, 24, 29, 43, 57, 66, 70, 73, 76, 77 및 83의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0076] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 자궁암의 치료를 위한 서열 식별 번호 16, 17, 19, 31, 43, 46, 47, 48, 49, 51, 56, 57, 58, 66, 67, 72, 75, 76, 79, 83, 89, 90 및 91의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0077] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 뇌암의 치료를 위한 서열 식별 번호 18, 58, 61 및 88의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0078] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 NHL의 치료를 위한 서열 식별 번호 32, 43, 48, 59, 60, 61, 63, 66, 73, 76, 79, 83, 85, 86, 87, 89, 90 및 91의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0079] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 CLL의 치료를 위한 서열 식별 번호 43, 61, 65, 66, 73, 76, 78, 89, 90 및 91의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0080] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 OC의 치료를 위한 서열 식별 번호 45, 47, 51, 56, 66 및 67의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0081] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 GC의 치료를 위한 서열 식별 번호 43, 50, 89 및 61의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0082] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 HCC의 치료를 위한 서열 식별 번호 16, 43, 45, 57, 61, 65, 66 및 75의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0083] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 RCC의 치료를 위한 서열 식별 번호 43, 61, 62, 87, 89 및 90의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0084] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 두경부 편평 세포 암종, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관암, 뇌암, 만성 림프구성 백혈병, 결장직장 암종, 식도암, 담낭암, 위암, 간세포암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암, 소세포 폐암, 방광암 및 자궁암의 군으로부터 선택된 증식성 질병의 바람직하게는 병용 치료를 위한 본 발명에 따른 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0085] 본 발명은 또한 인간 주조직 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 길이 변이체와 같은 연장된 형태의 MHC 클래스 II의 분자와 결합하는 능력을 가진 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.
- [0086] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 (각각) 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 따른 아미노산으로 구성되거나 필수적으로 구성된다.
- [0087] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 변형되며/거나 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0088] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 융합 단백질의 일부이며 특히 HLA-DR 항원-결합 항원-연관된 불변쇄(Ii)에 융합되거나 또는 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체(또는 그 서열 안으로) 융합된다.
- [0089] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.
- [0090] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있으며/거나 발현하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0091] 본 발명은 질병의 치료 및 의학 특히 암의 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0092] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드 또는 본 설명에 따른 상기 펩티드와 MHC의 복합체에 대해 특이적인 항체

및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

- [0093] 본 발명은 또한 T 세포 수용체(TCR), 특히 가용성 TCR(sTCR) 및 자가조직이나 동종이형 T 세포 안으로 조작된 클론된 TCR 그리고 이들은 물론 NK 세포나 상기 TCR을 포함하거나 상기 TCR과 교차반응하는 다른 세포들을 만드는 방법에 관한 것이다.
- [0094] 항체 및 TCR은 현재 본 발명에 따른 펩티드의 면역요법 사용에 대한 추가적 양태이다.
- [0095] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 또는 이전에 기술한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항원 제시 세포이며 바람직하게는 수지상 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0096] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드 제조 방법에 관한 것으로, 그 방법은 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양과 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터 펩티드의 분리를 포함한다.
- [0097] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 상기 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.
- [0098] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 그 항원 제시 세포가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91을 포함하는, 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 31을 포함하는 상기 펩티드 또는 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있거나 발현하는 발현 벡터를 포함한다.
- [0099] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 본 발명에 따른 방법에 의해 생산된 활성화 T 세포에 관한 것이다.
- [0100] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 표적 세포가 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 효과적인 숫자의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0101] 본 설명은 또한 약제로서 또는 약제의 제조에 있어서, 설명된 일체의 펩티드, 본 설명에 따른 핵산, 본 설명에 따른 발현 벡터, 본 설명에 따른 세포, 본 설명에 따른 활성화 T 림프구, T 세포 수용체 또는 기타 펩티드 및/또는 펩티드 MHC 결합 분자의 사용에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 약제가 암에 대해 활성이다.
- [0102] 바람직하게는 상기 약제가 세포 요법, 백신 또는 가용성 TCR 또는 항체에 근거한 단백질이다.
- [0103] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로, 상기 암 세포가 두경부 편평 세포 암종, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관암, 뇌암, 만성 림프구성 백혈병, 결장직장 암종, 식도암, 담낭암, 위암, 간세포암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암, 소세포 폐암, 방광암 및 자궁암 그리고 바람직하게는 두경부 편평 세포 암종의 세포이다.
- [0104] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 펩티드에 근거한 바이오마커에 관한 것으로, 여기서는 암, 바람직하게는 흑색종의 진단에 사용할 수 있는 "표적"이라고 부른다. 이 표지자는 펩티드(들) 자체의 과다제시 또는 상응하는 유전자(들)의 과발현일 수 있다. 이 표지자는 또한 치료, 바람직하게는 면역요법, 가장 바람직하게는 바이오마커에 의해 확인된 동일한 표적을 표적화하는 면역요법의 성공의 확률을 예측하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 가용성 TCR은 관심 대상의 MHC와 복합체인 펩티드의 존재 검출을 위해 종양의 일부를 염색하는데 사용할 수 있다.
- [0105] 임의적으로, 항체는 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가의 작용기 기능을 보유한다.
- [0106] 본 발명은 또한 암 치료의 환경에서 이러한 신규 표적들의 사용에 관한 것이다.
- [0107] ALOX12B는 최종 피부 분화 및 표피 장벽 기능에 관여한다(Furstenberger et al., 2007; Epp et al., 2007). ALOX12B는 암에서 증폭되는 면역억제 인자이다(Rooney et al., 2015). 시스플라틴은 (p)-DeltaNp63alpha를 유도하고 ATM은 이를 인산화한다. 그 이후 편평 세포 암종에서 let7-5p를 하향조절하는 miR-185-5p를 상향조절하여 ALOX12B 발현의 조절을 초래한다(Ratovitski, 2013). ALOX12B는 유방암 및 폐암 위험과 관련이 있다(Lee et al., 2009; Shen et al., 2009).
- [0108] ANKRD17 mRNA 수준은 결장직장 암종에서 널리 하향조절되므로 이 단백질이 결장직장암 검출을 위한 다표적 검사 패널에 대한 잠재적 표지자가 된다(Ioana et al., 2010). 이 단백질은 사이클린 E/Cdk2에 의한 ANKRD17의 인산화를 통해 세포 주기 조절에 관여한다. 과발현은 S기 진입을 촉진시키는 반면, 발현의 고갈은 DNA 복제를 억제

하고 세포주기 진행을 차단하며 종양 억제인자인 p53 및 p21의 발현을 상향조절한다(Deng et al., 2009).

- [0109] ATP5G1은 위암에서 산화적 인산화 경로에서 강화된다(Song et al., 2016). ATP5G1 발현은 두경부 편평 세포 암종에서 감소된다(Koc et al., 2015). 마우스에서 간 재생의 강화(ALR)에 대한 녹아웃(knock-out)은 지방간염 및 간세포 암종의 가속화된 발생을 초래한다. 또한 ATP5G1 발현은 ALR 녹다운(knock-down) 마우스에서 감소된다(Gandhi et al., 2015).
- [0110] ATP5G2는 저등급 및 중간 등급 종양에 비해 고등급 방광암 종양에서 더 메틸화된다(Kitchen et al., 2016). RIZ1은 그 고갈이 변형된 ATP5G2 발현을 초래하는 종양 억제인자이다(Xie et al., 2016b). ATP5G2는 자궁내막 이식과 암 세포주에서 에스트로겐 및 프로게스테론 치료시 고도로 발현된다(Tamm-Rosenstein et al., 2013). ATP5G2 프로모터는 원발성 신세포 암종에서 메틸화된다(Morris et al., 2011).
- [0111] ATP5G3은 위암에서의 산화적 인산화 경로에서 강화된다(Song et al., 2016). ATP5G3은 종양 진행과 음적으로 상관관계가 있으며 세포 이동을 억제하는 PPARalpha 활성화 시 상향조절된다(Huang and Chang, 2016). ATP5G3은 방사선 감수성 유전자일 수 있다(Tsuji et al., 2005).
- [0112] BTBD11은 BTB 도메인 함유 11을 인코딩하며 12q23.3 염색체 상에 위치한다(RefSeq, 2002). BTBD11은 유두상 갑상선 암에서 차등적으로 발현된다(Qu et al., 2016). BTBD11은 TGF-베타 표적 유전자이다(Sawada et al., 2016). BTBD11은 위암에서 돌연변이된다(Leiserson et al., 2015; Leiserson et al., 2016).
- [0113] CD276의 예후적 연관성은 폐 선암종이 있는 흡연 및 비흡연 환자에서 차이가 있다. 높은 CD276 발현은 흡연과 연계된다(Inamura et al., 2017). CD276은 전립선암에서 과메틸화된다(Wang et al., 2016b). CD276은 골육종에서 하향조절되는 miR-124에 의해 조절된다. TGF-베타1은 SMAD 3 및 4 신호 전달을 통해 miR-155를 상향조절하여, CD276 축적을 유발하는 CEBPB 억제에 의해 miR-143 약화를 가져왔다. CD276은 결장직장암에서 하향조절되는 miR-187에 의해 조절된다(Wang et al., 2016e; Trojandt et al., 2016; Zhou et al., 2016; Wang et al., 2016a). CD276은 SREBP-1/FASN 신호전달에 영향을 미침으로써 폐암에서 비정상적 지질 대사를 매개한다. 가용성 CD276은 TLR4/NF-kappaB 신호 전달을 통해 체장암 침윤과 전이를 매개한다(Xie et al., 2016a; Luo et al., 2016). CD276은 암 요법에서 유망한 표적이 될 수 있는 면역 체크포인트이다. 이것은 종양 성장 동안 항암 면역성을 억제하도록 표적이 될 수 있으며, 이는 출현하는 종양에 대해 면역 회피를 제공할 수 있다(Leung and Suh, 2014; Swatler and Kozlowska, 2016; Janakiram et al., 2016). CD276은 고위험 신경모세포종에 의해 발현되며, 종양 혈관구조에서 과발현되고, 종양 생존 및 침윤성에서 중요한 역할을 한다(Bottino et al., 2014). CD276의 녹다운(knock-down)은 약제 민감성(chemo sensitivity)을 증가시키고 전이 잠재력을 감소시킨다. CD276의 녹다운(knock-down)은 세포자멸사 표지자 발현 및 STAT3 인산화의 증가를 초래한다. 비소세포 폐암 세포에서 아스트라갈로사이드 IV 치료는 CD276을 억제하여 세포 성장을 감소시키고 시스플라틴에 대한 약제 민감성을 증가시킨다(Nygren et al., 2011; He et al., 2016). CD276은 식도암, 유방암, 담낭암, 전립선암 및 난소암에서 과발현된다(Barach et al., 2011; Janakiram et al., 2012; Fauci et al., 2012; Chen et al., 2016; Liu et al., 2016). CD276 과발현은 불량한 생존 기간, 예후 및 종양 등급과 상관관계가 있다. CD276은 암 침윤 및 진행을 촉진한다. 하지만 CD276은 항종양 효과도 가질 수 있다. 비소세포 폐암에서 높은 CD276 발현은 림프절 전이와 진행성 TNM 병기의 지표이다(Yi and Chen, 2009; Loos et al., 2010; Nygren et al., 2011; Fauci et al., 2012; Wang et al., 2014a; Ye et al., 2016; Benzon et al., 2016; Wu et al., 2016). CD276은 자연 살해세포의 세포 독성을 하향조절하여 암 면역 침윤을 지원한다(Bottino et al., 2014).
- [0114] CDH23은 그 유전자들이 칼슘 의존 세포-세포 유착 당단백질을 인코딩하는 카드헤린 상계열의 구성원인 카드헤린 관련 23을 인코딩한다. 인코딩된 단백질은 부동섬모의 조직화와 털 번들 형성에 관여하는 것으로 사료된다. 이 유전자는 인간 난청 유전자자리 DFNB12 및 USH1D를 함유하는 영역에 위치한다. 안내인 증후군 1D 및 비증후군성 상염색체 열성 난청 DFNB12는 이 카드헤린 유사 유전자의 돌연변이에 의해 유발된다. 이 유전자의 상향조절은 유방암과도 관련이 있을 수 있다(RefSeq, 2002). TMPS3은 유방암에서 불량한 예후 인자이며 CDH23과 상호작용할 수 있다(Rui et al., 2015). CDH23은 ERalpha를 발현하는 유방암 세포에서 랩틴 치료시 상향조절된다(Binai et al., 2013). CDH23은 유방암에서 상향조절되며 조기 단계의 전이에 관여할 수 있다(Apostolopoulou and Ligon, 2012). CDH23의 소실은 체장암 세포주에서 관찰이 가능하다(Suzuki et al., 2008).
- [0115] CDH3은 종양유전자 신호전달에 관여하며 인테그린, 수용체 티로신 키나아제, 저분자 GTPases, EMT 전사 인자 및 기타 카드헤린 계열 구성원을 활성화한다. CDH3 신호전달은 침윤과 전이를 유도한다(Albergaria et al., 2011; Paredes et al., 2012; Bryan, 2015; Vieira and Paredes, 2015). CDH3의 종양유전자 활성화는 위암 형성에 관여한다(Resende et al., 2011). CDH3 과발현은 유방암, 방광암, 난소암, 전립선암, 자궁내막암, 피부암, 위암,

채장암 및 직장암을 촉진한다(Albergaria et al., 2011; Paredes et al., 2007; Bryan and Tselepis, 2010; Reyes et al., 2013; Vieira and Paredes, 2015). CDH3은 기저유사 유방암에서 발현되는 기저 상피 표지자이다. BRCA1 암종은 CDH3과 같은 기저 표지자의 발현의 특징을 가지며, 고등급의 고도로 증식하는, ER 음성 및 HER3 음성 표현형을 나타낸다(Honrado et al., 2006; Palacios et al., 2008; Rastelli et al., 2010; Dewar et al., 2011). CDH3은 흑색종 및 구강 편평 세포 암종에서 종양 억제인자이다(Haass et al., 2005; Vieira and Paredes, 2015). CDH3은 EMT 표지자로서 사용될 수 있다. 종양 형성 및 진행 동안 E-카드헤린에서 N-카드헤린으로의 이동과 CDH3 발현이 있다(Piura et al., 2005; Bonitsis et al., 2006; Bryan and Tselepis, 2010; Ribeiro and Paredes, 2014). CDH3과 베타-카테닌 사이의 경쟁적 상호작용은 위암에서 세포간 상호작용 부전 및 전이를 유발한다(Moskvina and Mal'kov, 2010). 결장암에서 CDH3은 암 형성의 초기 표지자이다(Alrawi et al., 2006). CDH3의 이상조절은 불량한 예후와 증가된 악성종양의 표지자이다(Knudsen and Wheelock, 2005).

[0116] CLCA2의 과발현은 베타-카테닌 및 베타-카테닌 활성화된 유전자를 하향조절한다(Ramena et al., 2016). CLCA2는 EVA1과 강력하게 상호작용하며, 이것은 또한 p53 및 p63에 의해 유도가능하며 유방암에서 빈번히 하향조절되어 EMT를 유발하고 상피 분화에서 중요하다. 두 단백질 모두 E-카드헤린과 상호작용한다(Ramena et al., 2016). 성인 급성 골수성 백혈병에는 AML1-CLCA2 및 RUNX1-CLCA2 유전자 융합 산물이 있다(Giguere and Hebert, 2010; Jiang et al., 2013). CLCA2는 DNA 손상 시 p73, p53 및 p63에 의해 유도가능하며 증식의 억제제로 작용한다(Walia et al., 2009; Sasaki et al., 2012; Yu et al., 2013; Ramena et al., 2016). CLCA2 발현은 폐 선암 종 환자의 순환하는 종양 세포에서 상승되며 검출량의 증가는 환자의 생존 기간 감소와 관련이 있다(Hayes et al., 2006; Man et al., 2014). CLCA2는 선암종에 비해 폐의 편평 세포 암종에서 더 높게 발현되며 조직학적 종양 등급과 관련이 있다. CLCA2 발현은 비소세포 폐암과 소세포 폐암의 검출에 사용될 수 있다(Hayes et al., 2006; Shinmura et al., 2014). CLCA2의 녹다운(knock-down)은 상피-중간엽 이행, 암 세포 이동 및 침윤을 유발한다. CLCA2는 정상 조건하에서 FAK 신호전달 경로의 억제를 통해 이동과 침입을 억제하는 것으로 사료된다. CLCA2는 베타(4) 인테그린과 연관하여 폐 전이를 매개한다(Abdel-Ghany et al., 2001; Walia et al., 2012; Sasaki et al., 2012; Ramena et al., 2016). CLCA2는 유방암에서 프로모터 과메틸화로 인해 하향조절되며 결장직장암에서 하향조절된다. CLCA2는 방광 암종에서 그리고 흑색종의 전이성 형질전환 동안 차등적으로 발현된다. 외투세포 림프종에서 CLCA2의 복제수 손실이 있다(Gruber and Pauli, 1999; Bustin et al., 2001; Li et al., 2004; Balakrishnan et al., 2006; Riker et al., 2008; Walia et al., 2012; Matin et al., 2014; Ramena et al., 2016).

[0117] DSG1은 각화낭성 치원성 종양에서 과발현되며 경구 상피내 종양에서 높은 발현 비율을 보여준다(Aizawa et al., 2014; Heikinheimo et al., 2015). DSG1 발현은 극세포해리 편평 세포 암종에서 소실되고 연골육종, 경구 편평 세포 암종 및 폐암에서 하향조절된다(Xin et al., 2014; Saaber et al., 2015; Galoian et al., 2015; Jurcic et al., 2015). DSG1 발현은 GRHL1에 의해 조절되며 표준 화학 피부암 형성 프로토콜로 처리한 GRHL1 음성 마우스에서는 유두종이 덜 발생하지만 편평 세포 암종은 더 많이 발생한다(Mlacki et al., 2014). Rhoda 및 GEF Bcr의 하류 표적인 DSG1은 각질세포 분화 표지자이다(Dubash et al., 2013). KLK5는 DSG1을 절단하며, 이는 구강 편평 세포 암종에서 전이 형성과 관련이 있을 수 있다. DSG1 수준의 감소는 채장암 침윤에 관여될 수 있다(Ramani et al., 2008; Jiang et al., 2011). 음성 DSG1 염색은 개선된 항문암 특이적 생존기간과 관련이 있으며 양성 염색은 큰 종양 크기와 림프절 전이와 관련이 있다. 두경부 편평세포 암종에서 DSG1의 소실은 나쁜 예후와 연계가 된다(Wong et al., 2008; Myklebust et al., 2012). 종양수반성 천포창에서 DSG1에 대한 자가항체가 검출될 수 있다(Seishima et al., 2004).

[0118] 식도 편평 세포 암종에서 DSG3 발현은 조직학적 등급과 고도의 상관관계가 있으며 식도 편평 세포 암종에서 생존기간에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 음성 DSG3 발현은 더 나쁜 생존율을 나타냈다. 따라서 DSG3은 식도 편평 세포 암종의 진행에 관여할 수 있으며 예후 표지자의 역할을 할 수 있다(Fang et al., 2014). 원발성 폐 종양에서, DSG3 및 DSG2의 더 높은 발현은 편평 세포 폐 암종의 진단과 상관관계가 있는 것으로 나타난 반면, DSG3의 더 낮은 발현은 더 높은 종양 등급과 유의하게 연계된 것으로 나타났다. 따라서 DSG3은 편평 세포 폐 암종에 대한 가능한 진단 표지자 그리고 폐암에 대한 가능한 분화 표지자 역할을 할 수 있다(Saaber et al., 2015). 높은 DSG3 발현이 불량한 전체 생존 기간을 및 불량한 종양 특이적 생존 기간과 연관 있는 것으로 나타났으므로, 절제된 채장관 선암종에서 DSG3이 부정음적 예후 생체표지자로 기술되었다. 따라서 DSG3 및 그 하류 신호전달 경로가 DSG3을 발현하는 채장관 선암종에서 가능한 치료 표적이 될 수 있다(Ormanns et al., 2015).

- [0119] DSP의 발현 감소는 유방암, 폐암, 자궁경부암 등 여러 암의 종양 진행과 상관관계가 있다(Schmitt-Graeff et al., 2007; Davies et al., 1999; Yang et al., 2012b). 폐암 세포에서 DSP의 발현은 Wnt/베타-카테닌 신호 전달 경로의 억제를 통해 세포 증식, 비부착성 성장, 이동 및 침윤을 유의하게 억제한다(Yang et al., 2012b).
- [0120] DST는 유방암 전이와 관련이 있을 수 있다(Sun et al., 2006). DST에 대한 자가항체는 림프성 백혈구 및 소포 림프종에서 찾을 수 있다(Aisa et al., 2005; Taintor et al., 2007). DST는 비인두 암종에서 6-10B 세포(종양 형성 능력은 있으나 전이 능력은 결여됨)에 비해 5-8F 세포(높은 종양 형성 및 전이 능력)에서 상향조절된다(Fang et al., 2005). DST는 두경부 편평 세포 암종에서 고도로 발현된다(Lin et al., 2004). 신생물과 연관있는 종양수반성 천포창에는 DST에 대한 자가항체가 있다(Yong and Tey, 2013; Wang et al., 2005; Preisz and Karpati, 2007; Zhu and Zhang, 2007). 전립선암에서 DST 발현은 진행과 강력한 역 상관관계가 있다(Vanaja et al., 2003). 항DST 자가항체는 흑색종의 진단에 필요한 유망한 표지자이다(Shimbo et al., 2010). DST는 악액질암 환자의 소변에서 찾을 수 있다(Skipworth et al., 2010). DST는 폐의 선암종 및 편평 세포 암종에서 차등적으로 발현된다(McDoniels-Silvers et al., 2002). DST는 침습성 세포 성장의 시작과 함께 뚜렷하게 상향조절된다(Herold-Mende et al., 2001).
- [0121] EMC7은 ER 막 단백질 복합체 아단위 7을 인코딩하며 15q14 염색체 상에 위치한다(RefSeq, 2002). EMC7은 암에서 새로운 약물 표적 및 진단 생체표지자일 수 있다(Delgado et al., 2014). EMC7은 평양마이신 내성의 허 편평 세포 암종 세포주에서 하향조절된다(Zheng et al., 2010).
- [0122] ESRP2는 상피 세포 유형 특이적 스플라이싱 조절인자를 인코딩한다(RefSeq, 2002). ESRP2는 폐암과 유방암 세포를 포함하여 상이한 암 유형에서 암 세포 운동성을 억제한다. 침윤 전선에서 ESRP2는 TGF-베타에 의해 하향조절되며, 이는 상피-중간엽 이행과 관련 있는 전사 인자의 발현 증가로 이어진다(Gemmili et al., 2011; Horiguchi et al., 2012; Ishii et al., 2014).
- [0123] F2RL1의 PH 도메인 결합 모티프에서 돌연변이는 유방암 성장을 감소시키기에 충분하다(Bar-Shavit et al., 2016). F2RL1은 위암에서 과발현되며 환자의 전체 생존기간과 역의 상관관계가 있다(Sedda et al., 2014). 트립타제는 F2RL1을 활성화하여 암 세포의 증식, 침윤 및 전이를 초래하는 비만 세포에 의해 방출되는 혈관 생성의 매개인자이다(Marech et al., 2014; Ammendola et al., 2014). F2RL1은 암에서 차등적으로 발현되며 돌연변이되는 유전자에 의해 영향을 받는다(D'Asti et al., 2014). F2RL1은 암 진행, 침윤 및 전이에 관여한다(Wojtukiewicz et al., 2015; Canto et al., 2012; Lima and Monteiro, 2013; Gieseler et al., 2013). F2RL1은 선암종, 흑색종, 골육종, 아교모세포종, 수막종, 백혈병 및 편평 세포 암종에서 발현된다(Elste and Petersen, 2010). F2RL1은 TGF-베타 I형 수용체인 ALK5의 발현을 조절한다. F2RL1은 MAP 키나제를 활성화한다(Oikonomopoulou et al., 2010; Witte et al., 2016). 조직 인자 및 인테그린의 상향조절은 F2RL1 신호 전달 촉진 전이를 매개한다(Kasthuri et al., 2009; Ruf et al., 2011; Kocaturk and Versteeg, 2012; Ruf, 2012; Kocaturk and Versteeg, 2013). 트립신 및 PAR2는 증식, 침윤 및 전이를 촉진하는 자가분비 회로를 형성한다. 트립신 자극은 상피 성장 인자 수용체에 대한 MMP 의존 및 PAR2 의존 활성화를 통해 MAPK-ERK 경로 활성화를 초래할 수 있다(Soreide et al., 2006).
- [0124] FAM160A1은 서열 유사성 160 구성원 A1을 가진 계열을 인코딩하며 4q31.3 염색체 상에 위치한다(RefSeq, 2002). 전립선암에서 DY131과 에스트로겐 관련 수용체 베타의 결합 시 FAM160A1 발현이 변형된다(Lu et al., 2015b). 전립선암에는 NFkB-FAM160A1 유전자 융합 산물이 있다(Teles, I et al., 2015). FAM160A1은 양성 종양에 비해 난소암에서 상향조절된다(Li et al., 2012a). 가족성 및 조기 발병 유방암에서 FAM160A1의 소실이 발견될 수 있다(Krepischi et al., 2012). 결장직장암에서 FAM160A1은 하향조절된다(Li et al., 2012b).
- [0125] FANCE는 식도 편평 세포 암종과 관련이 있다(Li et al., 2013). 두경부 편평 세포 암종에서 FANCE의 드문 하향조절의 관찰이 가능하다(Wreesmann et al., 2007). Chk1은 DNA 교차 결합시 FANCE의 인산화를 매개한다(Wang et al., 2007). 가족성 결장직장암은 FANCE에 대한 이중접합 유전자를 나타낸다. 판코니 빈혈 DNA 손상 복구는 결장직장암에 대한 유전성 소인과 연계될 수 있다. 유전성 식도 편평 세포 암종에는 인텔 돌연변이가 관여할 수 있다. FANCE에서 파오 변이체가 유방암이 있는 한 가족에서 발견되었다(Akbari et al., 2011; Seal et al., 2003; Esteban-Jurado et al., 2016). FANCE는 시스플라틴 민감도의 조절에 관여한다(Taniguchi et al., 2003).
- [0126] FAT1은 두경부의 편평 세포암에서 유의하게 돌연변이되고, 자궁경부 선암종, 방광암, 조기 T 세포 전구체 급성 림프구성 백혈병, 플루다라빈 불응성 만성 림프모구성 백혈병, 아교모세포종 및 결장직장암에서 빈번하게 돌연변이되며 또한 식도 편평 세포 암종에서 돌연변이되는 것으로 기술되었다(Gao et al., 2014; Neumann et al.,

2013; Morris et al., 2013; Messina et al., 2014; Mountzios et al., 2014; Cazier et al., 2014; Chung et al., 2015). FAT1은 구강암에서 억압되고 침윤성 유방암에서 우선적으로 하향조절되는 것으로 기술되었다(Katoh, 2012). FAT1은 preB 급성 림프모구성 백혈병에서 불량한 예후와 관련 있는 백혈병에서 상향조절되는 것으로 기술되었다(Katoh, 2012). FAT1은 체장 선암종 및 간세포 암종에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Valletta et al., 2014; Wojtalewicz et al., 2014). FAT1은 히포(Hippo) 신호전달의 활성화를 통해 종양 성장을 억제하고 액틴 중합의 유도를 통해 종양 이동을 촉진하는 것으로 기술되었다(Katoh, 2012). FAT1은 피부 편평 세포 암종에서 후보 암 구동인자 유전자인 것으로 나타났다(Pickering et al., 2014). FAT1은 Wnt 신호전달 및 종양 형성과 관련 있는 종양 억제인자로 기술되었다(Morris et al., 2013).

[0127] FAT3은 안드로겐 수용체의 침묵 시 탁솔에 내성을 보이는 난소 암종 세포주에서 하향조절되는 것으로 나타났으며, 이는 이러한 세포주에서 탁솔에 대한 민감화 증가를 초래했다. 따라서 FAT3은 탁솔에 대한 내성과 연관된 후보 유전자일 수 있다(Sun et al., 2015b). FAT3은 식도 편평 세포 암종에서 돌연변이되는 것으로 나타났으며 히포(Hippo) 신호전달 경로의 조절곤란을 초래했다(Gao et al., 2014). FAT3은 조기 T 세포 전구체 급성 림프모구 백혈병에서 재발적으로 돌연변이되는 것으로 나타났다(Neumann et al., 2013). FAT3은 수막세포성 수막종에 특이적인 시그내처를 갖는 유전자이며, 그에 따라 이러한 아형의 양성 수막종에서 종양 형성과 연관있는 것으로 기술되었다(Fevre-Montange et al., 2009). FAT3은 형성이상 세포로부터의 폐암 발생 시 억압되는 종양 억제인자로 기술되었다(Rohrbeck and Borlak, 2009).

[0128] FHAD1은 산화성 스트레스 반응에 관여하는 NFE2 녹다운(knock-down) 시 하향조절된다(Williams et al., 2016). FHAD1의 CpG 메틸화는 전이성-치명적 전립선암에서 생체표지자로서 사용될 수 있다(Zhao et al., 2017). FHAD1은 식도 편평 세포 암종에서 하향조절되며 시스플라틴에 대한 화학약제에 기여할 수 있다(Tsutsui et al., 2015). FHAD1은 유방암에서 종양 억제 유전자일 수 있다(Iorns et al., 2012).

[0129] G3BP1은 부분적으로 풀어진 3'-말단 기질을 선호하는 DNA-폴기 효소 중 하나인 G3BP 스트레스 입자 조립 인자 1을 인코딩하며, 부분 RNA/DNA 및 RNA/RNA 듀플렉스를 ATP 의존 방식으로 풀 수도 있다(RefSeq, 2002). G3BP1은 HER2+ 유방암에서 약물 반응에 대한 생체표지자로 사용할 수 있다(Chien et al., 2016). 시험관 내 및 생체 내에서 폐암의 진행 및 전이를 억제하는 miR-193a-3p는 G3BP1을 하향조절한다(Deng et al., 2015). G3BP1은 레스베라트롤의 직접 표적이다. G3BP1의 소실은 레스베라트롤로 유도된 p53의 발현 및 세포자멸사를 감소시킨다. G3BP1은 p53 특이적 디유비퀴티나제인 USP10과의 상호작용에 의한 p53의 음성 조절인자이다(Oi et al., 2015). G3BP1은 MYCN에 의해 MYCN의 촉진 영역에 모집되어 그 발현을 조절한다. 유방암에서 G3BP1은 PMP22를 음적으로 조절하여 증식을 증가시킨다(Winslow et al., 2013; Vadie et al., 2015). G3BP1은 암 인지 펩티드 및 세포 사멸 촉진(pro-apoptotic) 펩티드로 구성되는 이중 기능적 펩티드의 표적일 수 있다(Meschenmoser et al., 2013). 후기 구강 편평 세포 암종은 G3BP1 녹다운(knock-down)에 민감하여 세포자멸사의 증가를 유발한다(Xu et al., 2013). G3BP1은 유방암, 구강 편평 세포 암종, 결장암, 체장암, 간세포 암종 및 위암에서 상향조절되며, 불량한 환자 예후, 종양 크기, 혈관 침윤, T 분류 림프절 전이, TNM 병기 및 감소된 전체 생존 기간과 상관관계가 있다(Lo et al., 2012; Winslow et al., 2013; Min et al., 2015; Dou et al., 2016). Y-box 결합 단백질 1은 G3BP1 mRNA의 5'UTR에 결합하여 스트레스 과립 조립체를 위한 G3BP1 스트레스 과립 핵형성체의 가용성을 조절한다. YB-1 또는 G3BP1의 하향 조절은 스트레스 과립 형성 및 종양 침윤의 감소를 초래한다(Ward et al., 2011; Annibaldi et al., 2011; Somasekharan et al., 2015). G3BP1은 H⁺-ATPase의 활성도 및 베타-F1-ATPase mRNA의 번역을 제한한다(Willers and Cuezva, 2011). G3BP1은 이온화 방사선 이전 및 이후에 전골수구성 백혈병 핵체와 함께 공동국소화된다(Liu et al., 2010). 녹차의 주요 화합물인 에피갈로마테킨 갈레이트는 G3BP1에 결합하여 폐 종양형성을 억제한다. G3BP1 발현은 로보스타틴에 의해 영향을 받는다(Klawitter et al., 2010; Shim et al., 2010). G3BP1은 Slug의 상향조절에 의해 암 세포의 성장, 세포자멸사, 운동성, 이동, 침윤 및 전이에 관여한다. G3BP1의 녹다운(knock-down)은 Slug 발현을 감소시키고 상피 표지자인 E-카드헤린을 증가시킨다. 유방암에서 G3BP1의 상향조절은 Smad 신호 전달 경로를 통해 상피-중간엽 이행을 활성화한다. G3BP1은 Ras 및 NF-kappaB 신호전달 유비퀴틴 프로테아솜 경로 및 RNA 처리에 관여한다(French et al., 2002; Zhang et al., 2015; Dou et al., 2016). 간세포 암종에서 강제 G3BP1 발현은 세포 이동을 촉진한다(Dou et al., 2016).

[0130] GAR1은 p53을 활성화시킬 능력이 있다(Zhang et al., 2012). GAR1은 텔로머라제 복합체에 관여한다(Zhu et al., 2004; Rashid et al., 2006; Tomlinson et al., 2008; Pigullo et al., 2009; Low and Tergaonkar, 2013; Heidenreich et al., 2014). GAR1은 세포 생존력에 중요하다(Lubben et al., 1995).

[0131] ITGB4는 전립선암, 위암, 유방암, 구강 편평 세포 암종 및 난소암과 연관이 있으며 체관 선암종에서 상향조절되

는 것으로 나타났다(Chen et al., 2014; Xin et al., 2014; Zubor et al., 2015; Masugi et al., 2015; Gao et al., 2015; Kawakami et al., 2015). ITGB4(CD104라고도 함)는 알파 6 아단위와 연관되는 경향이 있으며, 식도 편평 세포 암종, 방광암 및 난소암과 같은 여러 침윤성 암종의 생물학에서 결정적 역할을 할 가능성이 높다(Kwon et al., 2013; Pereira et al., 2014; Chen et al., 2014). ITGB4에서 단일 뉴클레오티드 다형체는 종양의 공격성과 생존 기간에 영향을 주는 것처럼 보이며 유방암 환자에서 예후적 가치가 있을 수 있다(Brendle et al., 2008).

[0132] KDM5B는 히스톤 H3의 리신 4의 탈메틸화에 의해 특정 종양 억제인자를 억제시킬 수 있는 리신-특이적 히스톤 탈메틸화효소인 단백질 JARID1B를 인코딩한다(RefSeq, 2002). KDM5B는 후생유전적 인자로서 p53 발현을 억제하여 인간 OSCC, 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 유방암 및 폐암의 증식, 이동 및 침윤을 지원한다(Shen et al., 2015a; Tang et al., 2015; Zhao and Liu, 2015; Lin et al., 2015). 또한 JARID1B로 알려진 KDM5B는 다양한 종양 유형에서 PTEN/AKT 신호 전달을 경유하여 상피 중간엽 이행 전이를 촉진한다(Tang et al., 2015a).

[0133] KLHL21은 간세포 암종에서 상향조절되며 바이오임상학적 표지자로서 사용될 수 있다(Shi et al., 2016). KLHL21은 IKKbeta의 음적 조절인자이다. KLHL21 발현은 전염증성(pro-inflammatory) 자극 시 대식세포에서 하향조절된다. KLHL21의 과발현은 IKKbeta 활성화 및 IkappaBalpha 분해를 억제한다(Mei et al., 2016). KLHL21은 뚜렷하게 다른 두 객체인 폐포성 연부조직 육종과 신세포 암종에서 발견되는 이상 유전자 융합 전사 인자인 ASPSCR1-TFE3에 의해 과발현된다(Kobos et al., 2013). KLHL21은 암에 관여할 수 있다(Martinez et al., 2010). KLHL21은 세포질 분열에 필요하며 후기에 염색체 패신저 복합체의 염색체에서 방추 중간대로의 전위를 조절한다. 이것은 Cullin3 기반 E3 유비퀴틴 리가제와 상호작용하고 Aurora B에 직접 결합하여 그 유비퀴틴화를 초래한다(Maerki et al., 2009). KLHL21은 IKK 베타를 표적화를 통하여 TNF 알파 활성화 NF-카파 B 신호 전달을 음적으로 조절한다(Mei et al., 2016).

[0134] KLK6은 세린 단백질 분해효소의 펩티다제 S1 계열의 칼리크레인 아계열 구성원인 칼리크레인 관련 펩티다제 6을 인코딩한다. 늘어나는 증거에 의하면 다수의 칼리크레인이 암 형성에 연루되어 있으며 일부는 새로운 암 및 기타 질환의 생체표지자에 대한 가능성을 갖는다. 이 단백질 분해효소의 발현은 스테로이드 호르몬에 의해 조절되며 다수의 인간 암과 전선 환자의 혈청에서 상승할 수 있다. 인코딩된 단백질 분해효소는 아밀로이드 전구체 단백질 및 알파-시뉴클레인의 절단에 참여할 수 있으며 그에 따라 이 단백질분해효소를 알츠하이머 병과 파킨슨 병에 연루시킨다. 이 유전자는 염색체 19 상의 유전자 클러스터에 위치한다(RefSeq, 2002). KLK6은 p53에 의해 유도가능하며 그 발현은 위암에서 자가포식과 약물 내성을 증가시켰다(Kim et al., 2016). KLK6의 하향조절은 GNA13의 발현 증가와 연관이 있으며 이것은 양성 유방 종양의 침윤과 연계된다(Teo et al., 2016). KLK6은 여러 miRNA를 상향 및 하향조절할 수 있으며 이것들은 세포 주기, MYC, MAPK 및 기타 신호 전달 경로에 영향을 줄 수 있다(Sidiropoulos et al., 2016). KLK6은 전이성 결장직장암에서 파니투무맙 내성에 연계되는 집합에 속한다(Barry et al., 2016). KLK6은 척수 손상, 종양 세포 전이 및 파킨슨병과 같은 알파 시뉴클레인 응집체 병리학에 따른 액손 성장의 조절과 연관이 있다(Xi et al., 2015). KLK6은 고도 침윤성의 PC3 전립선암 및 난소암에서 과발현되며 자궁경부 전암에서 이상조절된다(Tamir et al., 2014; Hwang and Lindholm, 2015). KLK6은 간세포 암종, 유방암, 결장암, 위장암, 성상세포종 등 다양한 객체에서 생체표지자로 사용될 수 있다(Vakrakou et al., 2014; Yu et al., 2015b; Grin et al., 2015; Schrader et al., 2015; Drucker et al., 2015; Mange et al., 2016). KLK6은 진행성 장액성 난소암에서의 전체 생존 기간과 연관이 있으며 그 발현은 다른 임상적 매개변수와 연계될 수 있다(Kolin et al., 2014; Dorn et al., 2015; Yang et al., 2016a; Leung et al., 2016; Ahmed et al., 2016).

[0135] 그 발현이 두경부 편평 세포 암종에서 세포 주기 진행과 연관이 있는 CD34의 녹다운(knock-down)은 KRT1 발현을 상향조절한다(Ettl et al., 2016). KRT1은 플라티코틴 D 치료 시 HepG2에서 하향조절된다(Lu et al., 2015a). 보웬병 표재성 침윤성 암종의 투명 세포 초점에 대한 면역조직화학 염색은 KRT1에 대해 음성이다(Misago et al., 2016). miR-944는 p53의 상향조절 및 ERK 신호전달의 장애에 의해 KRT1 발현을 유도한다(Kim et al., 2015). 편평 세포 암종의 초기 및 후기에서 KRT1 발현이 상향조절된다(Tang et al., 2015b). 핵 분해는 KRT1 발현을 하향조절한다(Naeem et al., 2015). KRT1 발현은 분화 상태에 대한 표지자일 수 있다. 이것은 NMP-52 및 AFP 발현과 조합하여 간세포 암종의 검출에 사용될 수 있다(Attallah et al., 2015; Bruna et al., 2017). KRT1은 도코사헥사엔산 치료 시 상향조절되며, 이것은 유방암 침윤을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Blanckaert et al., 2015). 못 암종(onychocytic carcinoma)에서 증식하는 호염기 세포는 KRT1 발현을 하지 못했다(Wang et al., 2015a). KRT1의 상향조절은 Notch1 수용체 자극과 간접적으로 연관이 있다(Vliet-Gregg et al., 2015). S100A7은 KRT1을 하향조절한다(Li et al., 2015). 구강 편평 세포 암종에서 KRT1의 발현은 p21

및 hsp70 발현과 연관이 있다. KRT1 부재는 Klf4의 부재와 상관관계가 있으며, 이것은 세포 증식을 억제시키고 분화를 촉진시키는 전사 인자이다(Paparella et al., 2015; Frohwitter et al., 2016).

- [0136] KRT13은 케라틴 유전자 계열의 구성원인 케라틴 13을 인코딩한다. 비타민 D는 KRT13 발현을 변형시킨다(Narayanan, 2006). CK13의 면역염색은 점막표피암 종양의 표피양 요소에서 양성이며 악하선에서 발생하는 단형 선암종 및 종양가용성 암종에서는 음성이다(Muramatsu et al., 2003; Matsuzaka et al., 2004; do Prado et al., 2007). 알파 6 베타 4 인테그린의 이상 발현은 KRT13을 상향조절하며, 이것은 피부의 편평 암 발생에서의 조기 사례이다(Tennenbaum et al., 1996). KRT13은 자궁경부 상피내 종양의 생체표지자로 사용될 수 있다. KRT13의 소실은 이행 요로상피 세포 암종에서 종양 등급 및 병기의 표지자이다. KRT13 발현은 피부암 진행의 표지자이다(Slaga et al., 1995; Southgate et al., 1999; Duggan, 2002; Baak et al., 2006). KRT13 발현은 구강 암 줄기 세포와 구강 편평 세포 암종에서 하향조절된다(Morgan and Su, 1994; Sinha et al., 2013).
- [0137] KRT14는 식도, 폐, 후두, 자궁경부 그리고 선종양 치성 종양과 같은 다양한 편평 세포 암종에서 고도로 발현된다. 하지만 이것은 방광의 소세포 암종에서는 부재했으며, 폐 선암종, 위 선암종, 결장직장 선암종, 간세포 암종, 췌관 선암종, 침윤성 유관 선암종, 갑상선 유두상 암종 및 자궁 내막양 선암종에서는 미약했다(Xue et al., 2010; Terada, 2012; Vasca et al., 2014; Hammam et al., 2014; Shruthi et al., 2014). 방광암에서, KRT14 발현은 불량한 생존율과 강력한 관련이 있었다(Volkmer et al., 2012).
- [0138] MCF-7 유방암 세포의 에탄올에 대한 장기 노출은 악성종양 관련 유전자인 KRT15를 상향조절한다(Gelfand et al., 2017). 침윤성 성장이 있는 기저 세포 암종은 KRT15의 음성 발현을 나타낸다(Ziari et al., 2015). KRT15는 한선종과 원주종을 구별하는 데 사용될 수 있다(Sellheyer, 2015). KRT15는 방광암 형성에서 순차적으로 상향조절된다(Chuang et al., 2014). 피부암에서 하향조절되는 SIRT2는 상피 줄기 세포 표지자인 KRT15 발현을 억제한다(Wang et al., 2014b). KRT15는 모낭 줄기세포의 표지자이다(Bongiovanni et al., 2014; Koba et al., 2015; Narisawa et al., 2015). KRT15는 양성 안구 표면 편평 종양에 비해 악성 종양에서 더 강력히 발현되는 비분화된 기저 세포 표지자이다(Nagata et al., 2014). 스펜로이드 선택 표피 편평 세포 암종은 강화된 KRT15 발현을 갖는다(Adhikary et al., 2013). KRT15는 요로상피 암종에서 상향조절된다(Tai et al., 2013). 두경부 종양과 연관된 광선 각화증의 KRT15 염색은 증례의 7%에서 양성이고 선양 남성 암종의 36%에서 양성이다. 국소 피부경화증 형태의 기저 세포 암종 및 미세낭 부속기관 암종에 비해 결합조직형성 모상피종에서 염색이 더 높다(Sabeti et al., 2013; Evangelista and North, 2015; North et al., 2015; Solus et al., 2016). 비소세포 폐암에서 KRT15 상향조절은 전체 생존 기간에 영향을 미치며 NSCLC의 차등 진단용 표지자로서 사용될 수 있다(Gomez-Morales et al., 2013; Boyero et al., 2013). KRT15는 p53 및 ER에 의해 조절된다(Lion et al., 2013).
- [0139] 기저유사 유방암 세포주 그리고 내암종에서 KRT16의 과발현이 발견되었다. 다른 이들은 비재발성 범람모세포종과 재발성 범람모세포종 사이에서 KRT16의 면역조직화학적 발현의 유의한 차이를 발견하지 못했다(Joosse et al., 2012; Ida-Yonemochi et al., 2012; Safadi et al., 2016). 또한 전이성 유방암에 대한 가상(in silico) 분석에서는 KRT16 발현과 더 짧은 무재발 생존 기간 사이에 상관관계가 나타났다(Joosse et al., 2012).
- [0140] KRT5는 젊은 여성의 유방암에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Johnson et al., 2015). KRT5는 젊은 여성의 유방암에서 더 열악한 무질병 생존 기간 그리고 폐경 전 호르몬 수용체 양성 유방암 환자에서 부정적인 임상적 결과와 관련 있는 것으로 나타났다(Johnson et al., 2015; Sato et al., 2014). KRT5는 유방암 세포주인 HCC1937 및 T47D에서 종양 억제인자 BRCA1에 의해 조절되는 것으로 나타났다(Gorski et al., 2010). KRT5는 악성 흉막 중피종에서 탈조절되는 것으로 나타났다(Melaiu et al., 2015). KRT5는 악성 중피종에 대한 진단적 중피 표지자로 기술되었다(Arif and Husain, 2015). KRT5는 자궁내막암의 진행과 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Zhao et al., 2013). KRT5는 우측상 암종 환자의 침습 종양 부위에서 돌연변이되고 하향조절되는 것으로 나타났다(Schumann et al., 2012). KRT5는 정상 조직 샘플에 비해 결장직장암 생검에 차등적으로 발현된 4-단백질 패널의 부분인 것으로 나타났다(Yang et al., 2012). KRT5 및 4-단백질 패널의 다른 세 단백질은 결장직장암에 대한 새로운 표지자 그리고 잠재적인 표적으로 기술되었다(Yang et al., 2012a). KRT5는 기저 세포 암종과 관련 있는 것으로 기술되었다(Depianto et al., 2010). KRT5는 요로상피 암종 줄기 세포를 확인하는 후보로 기술되었다(Hatina and Schulz, 2012).
- [0141] KRT6A는 수술 후 보강 화학요법을 받은 삼중 음성 유방암 환자에서 원위 무재발 생존 기간을 예측하는 예후 모형으로 사용할 수 있는 7 유전자 시그내처의 일부로서 기술되었다(Park et al., 2015b). KRT6A는 인도 흑소의 각암과 위암에서 상향조절되는 것으로 나타났다(El-Rifai et al., 2002; Koringa et al., 2013). KRT6A는 외골

격 점액양 연골육종의 형태학적 및 면역조직화학적 특성을 가진 외음부 육종 2 사례에서 하향조절되는 것으로 나타났다(Dotlic et al., 2014). KRT6A 발현은 구강 편평 세포 암종에서 변형되는 것으로 나타났다(Chanthammachat et al., 2013). KRT6A는 원종양 유전자(proto-oncogene) Src 키나제 활성의 음적 조절 및 상처 복구 동안 피부 각질세포의 이동 가능성과 연관 있는 것으로 나타났다. 이것은 암과 같은 관련있는 환경에서 중요할 수 있다(Rotty and Coulombe, 2012). KRT6A는 인간의 정상형 유방암을 닮은 고유한 유방 종양 모델을 발생시킬 수 있는 양성능(bi-potential) 기원 세포를 표시하는 것으로 나타났다(Bu et al., 2011). KRT6A는 폐의 선암종과 편평 세포 암종의 구별에 사용할 수 있는 25개 유전자 전사 망 시그내처의 중요한 부분으로 기술되었다(Chang et al., 2011).

[0142] KRT6B는 식도암 세포주 KYSE170에서 하향조절되는 유전자의 후보로 나타났다(Kan et al., 2006). KRT6B는 신세포 암종, 산발성 각화낭성 치원성 종양 및 인도 흑소의 각암에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Koringa et al., 2013; Hu et al., 2015; Heikinheimo et al., 2007). KRT6B 기능 상실은 노치1의 발현을 억제하고 시험관 내 신세포 암종 세포사를 유도하는 것으로 나타났다. 따라서 KRT6B와 노치1의 상호작용은 신세포 암종의 진행에 기여하는 것으로 기술되었다(Hu et al., 2015). KRT6B는 세포주 HCC1187 및 HCC70에서 기저 유사 종양 관련 GABRP의 발현 감소 시 발현이 하락하는 기저 유사 유방암과 관련있는 사이토케라틴으로 기술되었다(Sizemore et al., 2014). 또한 기저유사 유방암에서 ERK1/2의 선택적 억제는 KRT6B와 같은 기저 유사 사이토케라틴의 발현 감소 및 이동 감소를 초래하는 것으로 나타났다(Sizemore et al., 2014). 따라서 GABRP-ERK1/2-사이토케라틴 축은 기저 유사 유방암의 이동 표현형을 유지하는 데 관여한다(Sizemore et al., 2014). KRT6B는 원종양 유전자(proto-oncogene) Src 키나제 활성의 음적 조절 및 상처 복구 동안 피부 각질세포의 이동 가능성과 연관있는 것으로 나타났다. 이것은 암과 같은 관련있는 환경에서 중요할 수 있다(Rotty and Coulombe, 2012). KRT6B는 폐의 선암종과 편평 세포 암종의 구별에 사용할 수 있는 25개 유전자 전사 망 시그내처의 중요한 부분으로 기술되었다(Chang et al., 2011). KRT6B는 벤조 (a) 피렌에 의해 유도되는 인간 무한증식 구강 상피 세포의 종양 형성 동안 차등적으로 발현되는 것으로 나타났다(Li et al., 2008).

[0143] KRT6C는 폐의 선암종과 편평 세포 암종의 구별에 사용할 수 있는 25개 유전자 전사 망 시그내처의 중요한 부분으로 기술되었다(Chang et al., 2011).

[0144] KRT75는 12번 염색체의 장완에 응집된 II형 케라틴 계열의 구성원인 케라틴 75를 인코딩한다. 인코딩된 단백질은 모발과 손발톱 형성에서 필수적인 역할을 한다. 이 유전자의 변이는 모발 질환인 가성 모낭염(PFB)과 모발 탈락 증후군(LAHS)과 연관있는 것으로 나타났다(RefSeq, 2002). KRT75는 모세포주에 비해 생체 내 계대 및 재유도 전립선 세포주에서 하향조절된다(Sivanathan et al., 2014). KRT75는 온니코마트리코마에서 발현되며 이것은 손발톱 바닥 및 손발톱 반달을 향하는 분화를 시사할 수 있다(Perrin et al., 2011). KRT75는 21T 유방 세포에서 하향조절된다(Xu et al., 2010). KRT75 발현은 프로테아솜 억제제 및 텍사메타손에 의해 변경될 수 있다(Kinyamu et al., 2008).

[0145] LAP3의 억제는 난소암 세포주 ES-2에서 파신(fascin) 및 MMP-2/9의 하향조절을 통해 침윤 억제를 초래하는 것으로 나타났다. 따라서 LAP3은 잠재적인 항전이 치료 표적으로 작용할 수 있다(Wang et al., 2015b). LAP3의 높은 발현은 신경아교종의 악성종양 등급 및 불량한 예후와 상관관계가 있는 것으로 나타났다(He et al., 2015). LAP3은 세포의 성장, 이동 및 침윤 조절에 의해 신경아교종 진행을 촉진시키는 것으로 나타났으며 따라서 새로운 예후 인자일 수 있다(He et al., 2015). LAP3을 포함하여 아미노산 대사에 관여하는 유전자에서 틀이동 변이가 미세위성 불안정성이 높은 위암과 결장직장암에서 검출되었다(Oh et al., 2014). LAP3은 간세포 암종, 식도 편평 세포 암종 및 전립선암에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Zhang et al., 2014a; Tian et al., 2014; Lexander et al., 2005). LAP3은 세포 주기 및 진행성 세포 이동에서 G1/S 체크포인트를 조절하여 간세포 암종의 세포 증식을 촉진하는 것으로 나타났다(Tian et al., 2014). LAP3의 발현은 또한 간세포 암종의 예후 및 악성 발생과 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Tian et al., 2014). 식도 편평 세포 암종의 세포주 ECA109에서 LAP3의 침묵은 세포 증식 및 집락 형성을 감소시키는 것으로 나타난 반면 LAP3 녹다운(knock-down)은 세포 주기 정지를 초래했다(Zhang et al., 2014a). 식도 편평 세포 암종의 세포주 TE1에서 LAP3의 과발현은 세포 증식과 침윤성을 유리하게 하는 것으로 나타났다(Zhang et al., 2014a). 따라서 LAP3은 식도 편평 세포 암종의 악성 발생에서 역할을 하는 것으로 나타났다(Zhang et al., 2014a).

[0146] LGALS7의 높은 수준은 암 침윤, 성장 및 전이가 증가된 유방암에서 공격적인 표현형과 연관이 있다(Grosset et al., 2016). LGALS7은 결장직장암 환자의 혈청에서 차등적으로 발현되는 반면 CRC 종양의 면역조직화학적 염색은 LGALS7에 대해 음성이다(Lim et al., 2016). LGALS7은 전립선암, 자궁경부암 및 외음부 편평 세포 암종에서 하향조절되며 진행성 임상 병기, 불량한 분화 및 부위 림프절 전이와 상관관계가 있다. 재발현은 세포자멸사의 증

가를 유도한다. VSCC에서 촉진 인자 메틸화의 증가는 진행성 임상적 단계, 불량한 분화 및 부위 림프절 전이와 연관이 있다(Labrie et al., 2015; Jiang et al., 2015; Higareda-Almaraz et al., 2016). 세포질 발현된 LGALS7은 유방암에서 p53을 억제하며 화학약제내성을 증가시킨다(Grosset et al., 2014). LGALS7은 정상의 난소 조직에서 발현되지 않으며 상피 난소암에서 발현된다. 발현은 고등급과 전이성 종양에서 더 빈번하며 전체 생존 기간과 상관관계가 있다. LGALS7 발현은 변이체 p53에 의해 유도된다(Kim et al., 2013; Labrie et al., 2014). LGALS7은 전이성 피부 흑색종의 생체표지자로 사용될 수 있다. 이것은 두경부 편평 및 기저 세포 암종에서 임상적 매개변수들과도 상관관계가 있다(Timar et al., 2010; Cada et al., 2009). LGALS7은 유방암 발생률과 관련이 있다(Tang et al., 2008). LGALS7 발현은 p53에 의해 유도가 가능하며 세포사멸 촉진(pro-apoptotic) 역할을 할 수 있다(Ueda et al., 2004).

[0147] LGALS7B는 HER2 양성 유방암의 공격성을 강력하게 한다(Grosset et al., 2016). LGALS7B는 세포자멸사, 조직 형태 발생, 대사, 운반, 케모카인 활성화 및 면역 반응에 관여하는 분자를 조절한다(Higareda-Almaraz et al., 2016). LGALS7B는 자궁경부암에서 하향조절된다. 낮은 Gal-1 발현과 연관있는 높은 LGALS7B 발현은 더 나은 예후와 연계된다(Higareda-Almaraz et al., 2016). LGALS7B는 외음부 편평 세포 암종에서 과메틸화된다(Jiang et al., 2015). 전립선암에서 LGALS7B의 재발현은 에토포시드 및 시스플라틴에 대한 약제민감성을 강화한다(Labrie et al., 2015). LGALS7B는 외음부 편평 세포 암종, 전립선암 및 결장직장암에서 하향조절된다. LGALS7B의 하향조절은 진행성 임상 병기, 불량한 종양 분화 및 부위 림프절 전이와 연관이 있다(Labrie et al., 2015; Lim et al., 2016; Jiang et al., 2015). 유방암에서 세포질 LGALS7B는 dox 유도된 PARP-1 절단을 억제하여 p53 활성화의 억제와 p21 및 CDKN1A 발현의 감소를 초래한다(Grosset et al., 2014). LGALS7B는 세포자멸사를 상향조절하며 IL-2 및 IFN-감마 발현을 억제한다(Yamaguchi et al., 2013). LGALS7B는 난소암에서 과발현되며 고령, 높은 사망률, 종양 부피의 증가 및 불량한 생존 기간과 연관이 있다(Kim et al., 2013; Labrie et al., 2014). LGALS7B의 면역조직화학 염색은 타액선 종양 유형의 구별에 사용될 수 있다(Remmelink et al., 2011). LGALS7B는 두경부 기저 세포 암종에서 하향조절된다. 두경부 편평 세포 암종에서, LGALS7B는 다른 발현 패턴을 나타내며 다른 발현 수준은 각화 및 분화와 상관관계가 있다(Cada et al., 2009).

[0148] MALL은 폐암 아형의 범주화에 사용될 수 있다(Watanabe et al., 2010). MALL은 전립선암에서 전이 억제인자 유전자일 수 있다(Yi et al., 2009). MALL mRNA 및 단백질 발현은 결장암 환자에서 감소되며, 베신(vessin) 침윤, 질병 재발 및 전이나 사망과 연관이 있다. MALL의 소실은 전체 생존 기간 및 무질병 생존 기간의 감소와 연관이 있다. MALL의 과발현은 세포주에서 세포 증식을 억압하고 이동을 억제한다(Fan et al., 2011; Kim et al., 2008a; Wang et al., 2016c). MALL은 카베울린-1과 상호작용하는 전립선 세포주에 의해 분비된 프로스타틴에서 발견될 수 있다(Llorente et al., 2004). MALL은 비소세포 폐암과 자궁경부 편평세포암에서 하향조절된다. 이것은 신경아교종 세포에서 차등적으로 발현된다(Ai et al., 2003; Hatta et al., 2004; Kettunen et al., 2004).

[0149] MCM4 발현은 식도암을 포함한 여러 객체에서 감소된 생존 기간 및 암 진행과 상관관계가 있는 막형단 당단백질인 탄산 무수화효소 IX의 상향조절과 연관이 있다(Huber et al., 2015). Has-miR-615-3p는 MCM4의 조절에 의해 비인두 암종에 관여될 수 있다(Chen et al., 2015). MCM4는 방광암의 발생에서 역할을 할 수 있다(Zekri et al., 2015). p53의 기능 획득(gain-of-function) 돌연변이는 유방암에서 MCM4의 발현을 증가시킨다(Polotskaia et al., 2015). 감소된 DNA 헬리카아제 활성도를 보여주는 인간 피부암에는 MCM4의 돌연변이가 있다(Ishimi and Irie, 2015). 유방암에서 MCM4 과발현만으로는 보다 짧은 생존기간과 약한 연관이 있다. MCM 복합체의 여섯 부분 모두의 과발현은 보다 더 긴 생존기간과 약한 연관이 있다(Kwok et al., 2015). MCM4는 폐 선암종 및 후두 편평 세포 암종에서 차등적으로 발현된다(Lian et al., 2013; Zhang et al., 2014b). MCM4는 자궁경부암에서 유의하게 과발현된다(Das et al., 2013; Das et al., 2015). MCM4는 결장직장암의 생체표지자로 사용될 수 있다(Fijneman et al., 2012).

[0150] 안티자임 억제제는 ODC1의 유비퀴틴 비의존 분해를 억제하여 가속화된 폴리아민 형성을 초래하며 이것은 위암, 유방암, 간세포 암종 및 식도 편평 세포 암종의 발생을 유발한다(Qiu et al., 2016). 피록시캄은 비흑색종 피부암 형성에 관여하는 ODC1 의존 폴리아민 생성을 억제한다(Campione et al., 2015). ODC1은 세포 분열 조절, 분화, 성숙화 및 세포자멸사에 중요한 푸트레신을 조절한다(Ramani et al., 2014; Zdrojewicz and Lachowski, 2014). ODC1은 Myc 및 MYCN 표적 유전자이며 ODC1의 높은 발현은 신경모세포종에서 무사건 생존 기간의 감소와 연관이 있다(Funakoshi-Tago, 2012; Saletta et al., 2014). ODC1의 차단은 결장직장암에서 예방화학요법에 사용될 수 있다(Zhou et al., 2012).

[0151] PARP9(ARTD9라고도 알려짐)는 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제 계열 구성원 9를 인코딩하며 3q21.1 염색체 상에 위

치한다(RefSeq, 2002). DTX3L은 ARTD8 및 PARP9와 복합체를 형성하며, 종양 억제인자 IRF1을 억제하여 전이성 전립선암 세포의 증식, 화학약제내성 및 생존을 촉진한다(Bachmann et al., 2014). PARP9는 미만성 거대 B 세포 림프종에서 IFN-감마-STAT1-IRF1-p53 신호전달을 억제하며 원종양유전자(proto-oncogenes)인 IRF2 및 BCL-6의 발현을 활성화한다. 이것은 DLBCL의 증식, 생존 및 화학약제내성을 초래한다(Camicia et al., 2013). PARP9 발현은 IFN-감마에 의해 유도가 가능하다(Juszczynski et al., 2006). PARP9는 미만성 거대 B 세포 림프종에서 약물 표적일 수 있다. PARP9는 고위험의 화학약제내성 DLBCL에서 종양유전자의 생존 인자이다(Bachmann et al., 2014; Aguiar et al., 2005; Camicia et al., 2015).

[0152] PKP1은 전립선암 및 식도 선암종에서 하향조절되는 것으로 나타났다(Kaz et al., 2012; Yang et al., 2015). 비신생물 전립선 BPH-1 세포주에서 PKP1의 녹다운(knock-down)이 전립선암 관련 SPOCK1 유전자와 같은 유전자의 세포자멸사 및 차등 발현의 감소를 유도했다(Yang et al., 2015). 집합적으로, PKP1 및 SPOCK1의 변형된 발현은 전립선암에서 빈번하고 중대한 사례로 보이며 PKP1은 종양 억제 기능을 갖는 것으로 제안된다(Yang et al., 2015). PKP1의 감소된 발현은 구강 편평 세포 암종에서 원격 전위 발병까지의 유의하게 더 짧은 시간과 관련 있는 것으로 나타났다(Harris et al., 2015). 프로모터 메틸화를 통한 PKP1 손실은 바레트 식도의 식도 선암종으로의 진행과 관련 있는 것으로 기술되었다(Kaz et al., 2012). PKP1은 비소세포 폐암에서 상향조절되는 것으로 나타났으며 편평 세포 암종 샘플을 구별하는 좋은 표지자일 수 있다(Sanchez-Palencia et al., 2011). PKP1은 잘 분화된 지방육종 세포주 GOT3에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Persson et al., 2008). PKP1의 감소된 발현은 두경부 편평 세포 암종 세포에서 운동성의 증가를 촉진하는 것으로 기술되었다(Sobolik-Delmaire et al., 2007). PKP1 손실은 자궁경부 발암과 관련 있는 것으로 나타났다(Schmitt-Graeff et al., 2007). PKP1은 구인두의 편평 세포 암종 환자에서 국소 재발이나 전이 그리고 불량한 생존 기간과 관련 있는 것으로 나타났다(Papagerakis et al., 2003).

[0153] PLEC는 결장직장 선암종, 두경부 편평세포 암종 및 췌장암에서 과발현된다(Lee et al., 2004; Katada et al., 2012; Bausch et al., 2011).

[0154] 페리플라킨은 T24CDDPR 방광암 세포에서 감소한다(Taoka et al., 2015). PPL 염색 수준은 건강한 조직에 비해 방광암에서 더 낮다. PPL의 소실은 병리학적 병기 및 생존 기간에 연계되어 있다(Matsumoto et al., 2014). PPL은 상피유사 종양 세포와 상관관계가 있다(Kohn et al., 2014). EVPL, 페리플라킨 및 인볼루크린 음성 마우스는 피부암 내성의 표현형을 나타낸다(Cipolat et al., 2014; Natsuga et al., 2015; Natsuga et al., 2016). PPL은 삼중 음성 유방암에서 고도로 발현된다(Choi et al., 2013). 페리플라킨은 과메틸화로 인해 식도 편평 세포 암종에서 하향조절된다. ESCC에서 PPL 녹다운(knock-down)은 세포의 이동 및 부착의 감소와 연관이 있다(Otsubo et al., 2015; Tonoike et al., 2011). 종양수반성 천포창은 PPL에 대항하는 자가항체를 나타낸다(Yong and Tey, 2013; Li et al., 2009; Probst et al., 2009; Zimmermann et al., 2010).

[0155] PRKDC는 자궁내막증 연관 난소암 및 유방암에서 빈번히 변이되는 유전자이다(Er et al., 2016; Wheler et al., 2015). PRKDC는 결장직장 암종에서 정상 조직에 비해 암성 조직에서 상향조절된다. PRKDC 발현이 높은 환자는 전체 생존 기간율이 더 불량하다(Sun et al., 2016).

[0156] PRNP는 막대와 유사한 구조 안으로 응집되는 경향이 있고 5개 일렬(tandem) 옥타펩티드 반복의 고도로 불안정한 영역을 포함하는 막 글리코실포스파티딜 이노시톨 고정 당단백질을 인코딩한다. 이 유전자의 반복 영역 그리고 다른 곳에서의 돌연변이는 다양한 프리온 질병과 연관지어졌다. 이 유전자에서 보다 적고 구조적으로 관련 없는 단백질인 AltPrp를 인코딩하는 중복되는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)이 발견되었다(RefSeq, 2002). 그 생리학적 역할이 완전히 정의되지는 않았지만, PRNP는 신경 줄기 세포의 자가재생, 다분화능 유전자 발현, 증식 및 분화에 관여한다. PNR는 아교모세포종, 유방암, 전립선암 및 결장직장암을 포함한 인간 종양에서 역할을 한다(Yang et al., 2016b; Corsaro et al., 2016). PRNP는 결장직장암에서 상피-중간엽 이행에 기여하는 것으로 나타났다(Du et al., 2013). 위암에서 MGr1-Ag/37LRP와 합쳐진 PNRP의 과발현은 불량한 예후를 예측한다(Zhou et al., 2014). PNRP 발현은 세포의 산화환원 상태와 관련이 있으며 항산화 방어에 참여할 수 있다. 유방암과 결장암에서 PNRP의 침묵은 항암 약물에 대하여 암 세포를 민감화시키는 것으로 나타났다(Sauer et al., 1999; Meslin et al., 2007; Park et al., 2015a; Yun et al., 2016).

[0157] PROM2는 폐 선암종에서 특이적으로 상향조절된다(Bao et al., 2016). PROM2는 탄력섬유종과 인간 전립선암에서 발현된다. PROM2는 낮은 공격성의 전립선암에서 더 높게 발현되고 높은 공격성의 전립선암에서 더 낮게 발현된다(Yamazaki, 2007; Zhang et al., 2002). PROM2는 결장암에서 하향조절된다(Deng et al., 2013). PROM2 발현은 헴색소성 신세포 암종과 호산성 과립세포종을 차별하는 데 사용될 수 있다(Rohan et al., 2006).

- [0158] RIPK4는 피부의 편평 세포 암종에서 하향조절되는 것으로 나타났다(Poligone et al., 2015). RIPK4는 혀의 편평 세포 암종 세포주 Tca-8113에서 이동 및 침습, 미만성 거대 B세포 림프종에서 생존 기간 그리고 자궁경부 편평 세포 암종에서 전체 및 무질병 생존 기간, 진행 및 불량한 예후와 관련이 있다(Wang et al., 2014c; Liu et al., 2015; Kim et al., 2008b). RIPK4는 가족성 췌장암과 관련이 있다(Lucito et al., 2007). RIPK4는 자궁경부 편평 세포 암종에서 잠재적 진단 및 독립적 예후 생체표지자 그리고 설암 예후 및 치료에 대한 생체표지자일 수 있다(Wang et al., 2014c; Liu et al., 2015).
- [0159] RNASE7 발현은 피부암에서 점진적으로 감소된다(Scola et al., 2012). RNASE7 발현은 여러 백혈병 유발 단백질 티로신 키나제에 의해 영향을 받는다(Pierce et al., 2008).
- [0160] RPL8 발현은 MYC 유도된 핵 항원과 핵소체 단백질 66에 의해 영향받을 가능성이 있다(Chowdhury et al., 2014). RPL8은 골육종에 관여할 수 있다(Sun et al., 2015a; Yang and Zhang, 2013). RPL8은 MYC에 의해 활성화되는 NO-66에 의해 조절된다(Ge et al., 2012). RPL8에서의 돌연변이는 다이아몬드-블랙판 빈혈과 연결된다(Gazda et al., 2012). RPL8 발현은 화학요법 반응과 연결될 수 있다(Salas et al., 2009). RPL8은 간세포 암종에서 이상조절된다(Liu et al., 2007). RPL8의 MHCII 의존 발현은 흑색종에서 발견될 수 있다(Swoboda et al., 2007).
- [0161] SERPINB5는 유방암, 폐암, 두경부암, 구강암 및 전립선암 등을 포함한 다수의 암 유형에 있어 진단에 대한 소중한 분자 표지자 및 예후의 예측자이다(Marioni et al., 2009; Lonardo et al., 2010; Sager et al., 1996; Sheng, 2004). SERPINB5는 HDAC1 활성도의 내인성 조절인자로서 작용하고 p53 종양 억제인자 경로와 상호작용한다(Maass et al., 2000; Kaplun et al., 2012).
- [0162] SLC25A3은 만성 골수성 백혈병에서 탈조절된다(Oehler et al., 2009). SLC25A3의 결손은 BAX의 스트레스 유도 미토콘드리아성 표적화를 폐기한다(Buttner et al., 2011).
- [0163] 파클리탁셀 유도된 신경병증 통증이 있는 랫드에서 SLC6A11 발현이 감소되며, 이 현상은 파클리탁셀로 치료받는 암종 환자에서 관찰이 가능하다(Yadav et al., 2015). ALA 및 그 메틸 에스테르 MAL은 피부암의 광선역학 요법에서 사용되는 전구약물(pro-drug)이다. 이 흡수는 SLC6A11에 의해 매개된다(Novak et al., 2011; Schulten et al., 2012; Baglo et al., 2013). 발프로산 나트륨에 의한 신경아교종 세포의 만성 치료는 SLC6A11 mRNA 발현을 감소시킨다(Gao et al., 2003).
- [0164] SLC6A15는 결장직장암에서 과메틸화되며 이에 따라 하향조절되고 대변 기반 검사의 후보 생체표지자일 수 있다(Kim et al., 2011; Mitchell et al., 2014).
- [0165] SLC7A1은 급성 골수성 백혈병 모세포에서 구조적으로 발현된다. 이러한 모세포는 아르기닌-재생 경로 효소의 결핍을 나타내며 그에 따라 아르기닌 축적과 세포 증식 및 생존을 초래한다(Mussai et al., 2015). SLC7A1은 결장직장암에서 과발현되어 아르기닌 축적과 세포 성장을 초래한다. 염색체 13 유전자들의 과발현은 CRC에서 꽤 흔하다(Camps et al., 2013; Lu et al., 2013). SLC7A1은 대식세포 분화의 표지자로 사용될 수 있다. 그 발현은 THP1 단핵세포 분화의 유도 동안 증가한다(Barilli et al., 2011). MCF-7 유방암 세포주의 성장은 L-아르기닌에 의존적이다. 이것은 SLC7A1을 발현하고, SLC7A1 녹다운(knock-down)은 아르기닌 흡수의 감소와 세포 생존력의 감소 및 세포자멸사의 증가를 초래한다(Abdelmagid et al., 2011). SLC7A1은 다수의 암에서 발현되는 헵 옥시케나제-1의 발현과 강력한 상관관계가 있으며 종양의 성장과 생존을 촉진한다(Tauber et al., 2010). SLC7A1은 간세포 암종에서 하향조절되는 간 특이적 miR-122의 직접 표적이다. miR-122 하향조절은 SLC7A1의 상향조절과 세포간 아르기닌 수준의 증가를 초래한다. 이 경로는 또한 결장직장암에서 유래하는 간 전이의 중요한 기전이기도 하다(Kedde and Agami, 2008; Iino et al., 2013; Kishikawa et al., 2015). 단백질 키나제 C의 활성화는 SLC7A1 내부화를 초래한다. 스트레스는 SLC7A1의 차등 발현을 유도한다(Kakuda et al., 1998; Rotmann et al., 2006).
- [0166] SUDS3의 소실은 변형된 세포 형태와 세포 이동의 증가를 유도한다(Smith et al., 2012). SUDS3은 흉선 세포 분화에 관여한다(Lee et al., 2012). SUDS3은 항종양 효과를 가질 수 있다(Ramakrishna et al., 2012). USP17은 SUDS3을 탈유비퀴틴화하여 암에서 SUDS3과 연관 있는 변형된 HDAC 활성을 초래한다(Ramakrishna et al., 2011). SUDS3은 유사분열에 관여한다(Pondugula et al., 2009). SUDS3은 유방암에서 발현된다(Silveira et al., 2009). SUDS3 염색체 분리를 통제하고 p53과 상호작용이 가능하다(David et al., 2006).
- [0167] TENM2는 초경 나이에 관여할 수 있다. 이른 AAM은 제2형 당뇨병, 유방암과 난소암 및 심혈관 질환과 연관이 있으며, 늦은 AAM은 낮은 골무기질 밀도와 심리학적 장애와 연관이 있다(Yermachenko and Dvornyk, 2016). 인구

밀도가 높은 지역에 거주하는 폐암 환자에서 DOCK2-TENM2 유전자 융합 전사체가 존재한다(Yu et al., 2015a). TENM2는 대부분의 악성 중피종 세포에서 발현된다(Ziegler et al., 2012). TENM2는 식도 편평 세포 암종에서 하향조절될 수 있다(Kan et al., 2006).

[0168] II기 결장암에서 TGM5의 국소성 결손은 이 객체에 대한 구동인자일 수 있다(Brosens et al., 2010). 비소세포 폐암에서 발생하는 TGM5 돌연변이는 흡연자나 비흡연자 사이에 차이를 나타내지 않는다(Yongjun Zhang et al., 2013; Broderick et al., 2009; Rafnar et al., 2011; Choi et al., 2016). 전립선암에서의 TGFBR3 소실 또한 TGM5를 하향조절한다(Sharifi et al., 2007).

[0169] XIRP1은 기저 유사 유방암의 전이에서 돌연변이된다(Hoadley et al., 2016). 삼중 음성 유방암에서는 ER+ HER2-유방암에 비해 XIRP1 촉진인자 모티프 유전자 시그내처가 강화된다(Willis et al., 2015). 비타민 C 치료 시 XIRP1이 상향조절되며 이는 또한 암에서 세포 성장을 감소시킨다(Marshall et al., 2012; Nagappan et al., 2013). XIRP1은 두경부 편평 세포 암종에서 돌연변이되며 종양 억제인자 유전자일 수 있다(Lee et al., 2010). XIRP1은 산화성 스트레스와 연관 있는 유전자이다(Baluchamy et al., 2010).

[0170] ZBED6은 결장직장암에서 과발현되는 IGF2의 전사 억제인자이며 세포 증식을 촉진한다. ZBED6의 녹다운(knock-down)은 RKO 세포주에서 세포 주기에 영향을 주고 강화된 세포 성장을 유도하며 HCT116 세포에서는 세포 성장을 감소시킨다. ZBED6은 Wnt, Hippo, TGF-베타, EGFR 및 PI3K 신호전달에 관여하는 여러 유전자들의 전사 억제인자이며, 이 유전자들은 모두 결장직장암 형성에 관여한다(Markljung et al., 2009; Andersson, 2009; Andersson et al., 2010; Huang et al., 2014; Jiang et al., 2014; Clark et al., 2015; Akhtar et al., 2015).

[0171] 발명의 상세한 설명

[0172] 면역 반응 자극은 숙주 면역계가 외부 물질로 인식하는 항원의 존재에 의존한다. 종양 연관 항원의 발견은 숙주의 면역계를 종양 성장에 개입하는 데 사용할 가능성을 제기했다. 면역계의 체액성 그리고 세포성 지류를 이용하는 다양한 기전이 현재 암 면역 치료에서 탐색되고 있다.

[0173] 세포 면역 반응의 특정 요소는 종양 세포를 특정하게 인식하고 파괴하는 능력이 있다. 종양 침윤 세포 모집단 또는 말초 혈액으로부터 T 세포의 분리는 그러한 세포가 암에 대한 자연 면역 방어에서 중요한 역할을 수행함을 시사한다. 특히 CD8-양성 T 세포는 세포질에 위치한 단백질이나 결손 리보솜 산물들(DRIPS)로부터 유래된 보통 8에서 10개의 주 조직적합 복합체(MHC)-포함 펩티드의 클래스 I 분자를 인지하며, 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC 분자는 또한 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지정된다.

[0174] "T 세포 반응"이란 용어는 특이적 증식과 시험관 내 또는 생체 내에서 유도되는 작용기 기능의 활성화를 의미한다. MHC 클래스 I 제한 세포 독성 T 세포의 경우, 효과기 기능이 펩티드 펄스, 펩티드 전조 펄스 또는 자연적 펩티드 제시 표적 세포들의 용해, 사이토킨의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 인터페론-감마, TNF-알파, 또는 IL-2, 효과기 분자의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 그랜자임 또는 퍼로린 또는 탈과립일 수 있다.

[0175] "펩티드"란 용어는 여기서 이웃 아미노산의 알파 아미노와 카보닐기 사이에 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 일련의 아미노산 잔기를 지정하기 위해 사용한다. 펩티드는 아미노산 9개의 길이가 바람직하지만 짧게는 아미노산 8개일 수도 있고 길게는 10, 11, 12, 13 또는 14개일 수도 있으며, MHC 클래스 II 펩티드의 경우(본 설명의 펩티드의 연장된 변이) 그 길이가 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산일 수 있다.

[0176] 더욱이 "펩티드"라는 용어는 알파 아미노기와 이웃 아미노산의 카보닐기 사이의 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 아미노산 잔기의 서열에 의한 염을 포함한다. 바람직하게는 그 염은 예를 들어 염화물 또는 아세트산(삼불화아세트산) 염과 같은 약학적으로 허용가능한 펩티드의 염이다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 펩티드가 생체 내에서 염이 아니므로 생체 내 상태의 펩티드와는 실질적으로 다르다는 점을 유의해야 한다.

[0177] "펩티드"라는 용어는 "올리고펩티드"도 포함한다. 여기에서 "올리고펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노기 및 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 발명에서 올리고펩티드의 길이는 정확한 에피토프 또는 에피토프들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 올리고펩티드는 일반적으로 약 30개 아미노산 잔기 보다 길이가 짧고, 15개 아미노산보다 길다.

[0178] "폴리펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노기와 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 일련의 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 발명에서 폴리펩티드의 길이는 정확한 에피토프들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 펩티드 또는 올리고 펩티드와 다르게, 폴리펩티드는 약 30개 아미노산 잔기 이상

의 분자를 가지고 있는 것을 지칭한다.

- [0179] 이런 분자의 펩티드, 올리고펩티드, 단백질, 또는 폴리뉴클레오타이드 코딩은 면역 반응을 유도할 수 있으면 "면역성"(따라서, 본 발명에서의 "면역원")이다. 본 발명의 경우, 면역성은 T 세포 반응을 유도하는 능력으로 특정하게 정의된다. 그러므로, "면역원"은 면역 반응을 유도할 수 있는 분자이고, 본 발명의 경우, T 세포 반응을 유도할 수 있는 분자이다. 다른 양태에서, 면역원은 펩티드, 펩티드와 MHC의 복합체, 올리고펩티드 및/또는 특정 항체나 항체에 대한 TCR을 높이는데 사용되는 단백질일 수 있다.
- [0180] 클래스 I T 세포 "에피통"은 적당한 친화력을 가진 MHC/펩티드 혼합물에 결합하는 T 세포 수용체에 일치하는 T 세포에 의해 인식되는 삼항 혼합물(MHC 클래스 I 알파 쇄, 베타-2-미세글로블린 및 펩티드)을 생성하는 클래스 I 또는 II MHC 수용체에 결합하는 짧은 펩티드를 필요로 한다. MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드는 일반적으로 길이가 8 내지 14개 아미노산이며, 가장 일반적으로 길이가 9개 아미노산이다.
- [0181] 인간에는 MHC 클래스 I 분자를 인코딩하는 세 개의 유전자 자리가 있다(인간의 MCH-분자는 또한 지정된 인간 백혈구 항원이다(HLA)): HLA-A, HLA-B 및 HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 및 HLA-A*07은 이러한 유전자 좌에서 발견할 수 있는 다른 MHC 클래스 I 대립형질의 예이다.
- [0182] 표 5는 HLA-A*02 및 HLA-A*24 그리고 가장 빈번한 HLA-DR 혈청형의 발현 빈도 F를 나타낸다. 빈도는 Mori 등 (Mori et al., 1997)으로부터 조정된 미국 인구 내에서의 일배체형 빈도 Gf로부터 도출되며, 하디-와인버그 공식 $F = 1 - (1-Gf)^2$ 을 사용한다. A*02 또는 A*24와 일부 HLA-DR 대립형질의 조합은 강화되거나 연관 불평형으로 인해 단일 빈도보다 덜 빈번할 수 있다. 자세한 내용은 Chanock 등(Chanock et al., 2004)을 참조한다.

[0183] [표 5]

대립형질	집단	대립형질로부터 계산된 표현형
A*02	백인(북미)	49.1%
A*02	미국 흑인(북미)	34.1%
A*02	아시아계 미국인(북미)	43.2%
A*02	중남미계 미국인(북미)	48.3%
DR1	백인(북미)	19.4%
DR2	백인(북미)	28.2%
DR3	백인(북미)	20.6%
DR4	백인(북미)	30.7%
DR5	백인(북미)	23.3%
DR6	백인(북미)	26.7%
DR7	백인(북미)	24.8%
DR8	백인(북미)	5.7%
DR9	백인(북미)	2.1%
DR1	미국 흑인(북미)	13.20%
DR2	미국 흑인(북미)	29.80%
DR3	미국 흑인(북미)	24.80%
DR4	미국 흑인(북미)	11.10%
DR5	미국 흑인(북미)	31.10%
DR6	미국 흑인(북미)	33.70%
DR7	미국 흑인(북미)	19.20%
DR8	미국 흑인(북미)	12.10%
DR9	미국 흑인(북미)	5.80%
DR1	아시아계 미국인(북미)	6.80%
DR2	아시아계 미국인(북미)	33.80%
DR3	아시아계 미국인(북미)	9.20%
DR4	아시아계 미국인(북미)	28.60%
DR5	아시아계 미국인(북미)	30.00%
DR6	아시아계 미국인(북미)	25.10%
DR7	아시아계 미국인(북미)	13.40%
DR8	아시아계 미국인(북미)	12.70%
DR9	아시아계 미국인(북미)	18.60%
DR1	중남미계 미국인(북미)	15.30%
DR2	중남미계 미국인(북미)	21.20%
DR3	중남미계 미국인(북미)	15.20%
DR4	중남미계 미국인(북미)	36.80%
DR5	중남미계 미국인(북미)	20.00%

[0184]

대립형질	집단	대립형질로부터 계산된 표현형
DR6	중남미계 미국인(북미)	31.10%
DR7	중남미계 미국인(북미)	20.20%
DR8	중남미계 미국인(북미)	18.60%
DR9	중남미계 미국인(북미)	2.10%
A*24	필리핀	65%
A*24	러시아 네네츠	61%
A*24:02	일본	59%
A*24	말레이시아	58%
A*24:02	필리핀	54%
A*24	인도	47%
A*24	대한민국	40%
A*24	스리랑카	37%
A*24	중국	32%
A*24:02	인도	29%
A*24	호주 서부	22%
A*24	미국	22%
A*24	러시아 사마라	20%
A*24	남미	20%
A*24	유럽	18%

[0185]

[0186]

본 발명의 펩티드는 바람직하게 본 발명의 백신에 포함되면 여기서 설명된 바와 같이 A*02에 결합한다. 백신은 또한 범결합 MHC 클래스 II 펩티드를 포함할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 백신은 A*02 양성인 환자에서 암의 치료에 사용할 수 있는 반면, 이러한 펩티드의 범결합 성격으로 인해 MHC 클래스 II 동종이형에 대한 선택이 필요하지 않다.

[0187]

본 발명의 A*02 펩티드가 다른 대립유전자, 예를 들어 A*24에 결합하는 펩티드와 합쳐지면, MHC 클래스 I 대립자만을 해결하는 것에 비해 더 높은 비율의 환자 모집단을 치료할 수 있다. 하나의 대립 유전자로는 대부분의 모집단에서 50% 미만의 환자를 해결할 수 있는 반면, HLA-A*24 및 HLA-A*02 에피토프를 포함하는 백신은 모든 관련된 모집단에서 60% 이상의 환자를 치료할 수 있다. 구체적으로 다양한 지역에서 이러한 대립유전자의 적어도 하나에 양성인 환자의 비율은 다음과 같다: 미국 61%, 서유럽 62%, 중국 75%, 대한민국 77%, 일본 86%(www.allelefrequencities.net으로부터 계산했음).

[0188]

한 바람직한 구현에서 "뉴클레오티드 서열"이란 용어는 디옥시리보뉴클레오티드의 이중중합체를 말한다.

[0189]

특정 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩은 자연적으로 발생하거나 합성 구축될 수도 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 인코딩하는 DNA 분절은 cDNA 단편들과 짧은 올리고 뉴클레오티드 링커, 또는 올리고 뉴클레오티드의 연속에서 미생물이나 바이러스 오페론에서 유도된 규제 요소를 가진 재조합 모사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공하기 위해서 조립된다.

[0190]

여기서 사용되는 용어 "펩티드를 코딩(또는 인코딩)하는 뉴클레오티드"는 예를 들어, 수지상 세포 또는 TCR 제조에 유용한 다른 세포계에 의해 서열이 발현되는 생물학적 체계와 호환가능한 인공(사람이 만든) 시작 및 정지 코돈을 포함하는 펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩을 지칭한다.

[0191]

여기서 사용되는 핵산 서열에 대한 지칭에는 한 가닥 및 두 가닥 핵산 모두가 포함된다. 그러므로, 예를 들어 DNA의 경우 특정 서열이란 환경에서 대안적으로 나타내지 않는 한, 이러한 서열의 한 가닥 DNA, 보완이 있는 이러한 서열의 중복(두 가닥 DNA) 및 이러한 서열의 보완을 지칭한다.

[0192]

용어 "코딩 영역"은 자연적인 계능 환경에서 유전자의 발현 생성물에 대해 자연스럽게 또는 정상적으로 코딩하는 유전자의 부분을 지칭한다(즉, 유전자 본래의 발현 생성물에 대한 생체 내 영역 코딩).

[0193]

코딩 영역은 비변이("정상")이거나 변이 또는 개조된 유전자로부터 유래할 수 있거나, 또는 심지어 DNA 서열, 또는 실험실에서 DNA 합성의 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용해서 실험실에서 전적으로 합성된 유전자로부터 유래할 수 있다.

[0194]

용어 "발현 생성물"은 유전자의 자연 번역 제품인 폴리펩티드 또는 단백질 또는 유전적 코딩 퇴화로 인해 결과

된 어떤 핵산 서열 코딩과 상응하며 그러므로 같은 아미노산을 코딩한다.

- [0195] 코딩 서열을 말할 때, 용어 "단편"은 발현 제품이 완전한 코딩 영역의 발현 생성물과 같은 생물학적 기능이나 활동을 유지하는 완전한 코딩 영역보다 적은 부분의 DNA를 지칭한다.
- [0196] 용어 "DNA 분절"은 최소한 하나의 상당히 순수한 형태로 분리되는 DNA 에서 유도된 별도의 단편 또는 큰 DNA 구성의 구성 요소로서의 형태의 DNA 중합체를 말한다, 예를 들면, 내생 오염이 없고 분절트의 식별, 조작 및 복구를 가능하게 하는 양 또는 농도이며 그 의 표준 생화학 방법에 따른 구성 요소 뉴클레오티드 서열은, 예를 들면, 복제 벡터이다. 이러한 분절은 일반적으로 진행 생물 유전자에 존재하는 내부 비번역 서열, 또는 인트론에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공된다. 비번역 DNA 서열은 동일 서열이 코딩 영역의 조작이나 발현을 방해하지 않는 오픈 리딩 프레임의 하단에 나타날 수 있다.
- [0197] 용어 "프라이머"는 하나의 표준 DNA와 짝을 이룰 수 있는 짧은 핵산 서열을 의미하며 DNA 폴리머라아제가 디옥시리보 뉴클레오티드 체 합성을 시작하는 유리 3'-OH 말단을 제공한다.
- [0198] 용어 "프로모터"는 전사를 시작하기 위한 RNA 폴리머라아제의 결합에 관여하는 DNA 영역을 뜻한다.
- [0199] 용어 "분리"는 물질이 원래의 환경(예: 자연적으로 발생하는 경우에는 자연 환경)에서 제거되는 것을 뜻한다. 예를 들면, 자연 발생하는 살아 있는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 분리되지 않지만, 자연계에서 공존하는 물질의 부분 또는 전체에서 분리되는 같은 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 제거된다. 그런 폴리뉴클레오티드는 벡터의 부분이며 또는 그런 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 구성의 한 부분일 수 있으며, 그런 벡터 또는 구성이 자연 환경의 한 부분이 아닐 때 여전히 격리될 수 있다.
- [0200] 본 발명에서 밝혀지는 폴리뉴클레오티드, 및 재조합 또는 면역성의 폴리펩티드는 "정화" 상태 일수도 있다. 용어 "정제"는 절대적인 순도를 필요로 하지 않는다. 오히려, 그것은 상대적인 정의를 의도하며, 관련된 당업자들이 이해하는 용어로서 상당히 정제된 제조 또는 부분적으로 정제된 제조를 포함할 수 있다. 예를 들면, cDNA 라이브러리에서 분리된 각각의 클론은 전기 영동 동일성으로 통상적으로 정제된다. 시작 물질 또는 자연 물질의 최소한 하나 이상의 순서, 바람직하게는 2 내지 3개 순서, 더 바람직하게는 4 내지 5개 순서의 크기로 정제가 명시적으로 심사숙고된다. 또한 바람직하게는 중량으로 99.999%, 또는 최소한 99.99% 또는 99.9%; 및 심지어는 바람직하게는 99%보다 큰 순도를 가진 특허청구범위에 기재된 폴리펩티드는 명시적으로 심사숙고된다.
- [0201] 본 발명에서 밝혀진 핵산과 폴리펩티드 발현 생성물은, 그런 핵산 및/또는 그런 폴리펩티드를 가진 발현 벡터뿐만 아니라, "강화된 형태"일 수 있다. 여기에서 사용되는 것처럼, 용어 "강화"는 물질의 농도가 최소한 그것의 자연적 농도(예를 들면)의 최소한 2, 5, 10, 100, 또는 1000배 정도이고, 유리하게는 0.01 중량%, 바람직하게는 최소한 약 0.1 중량% 정도임을 의미한다. 중량으로 약 0.5%, 1%, 5%, 10% 및 20% 강화된 제조 또한 계획한다. 서열, 구성, 벡터, 클론, 및 본 발명의 다른 물질들은 유리하게 강화된 또는 격리된 형태가 될 수 있다. 용어 "활성 단편"은 예를 들면 토끼 또는 쥐 및 인간을 포함한 포유류 같은 동물에게 따로 또는 선택적으로 적당한 보조제와 함께 또는 매개체로서 투여했을 때 면역 반응(즉, 면역성 활동이 있는)을 생성하고 인간과 같은 받는 동물 내에서 T 세포 반응을 자극하는 형태로 면역 반응을 나타내는 펩티드, 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 단편을 의미한다. 그렇지 않으면, "활성 단편"은 또한 시험관 내 T 세포 반응을 유도하기 위해서 사용될 수도 있다.
- [0202] 여기에서 사용되는, "부분", "분절" 및 "단편" 이라는 용어는, 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 서열이 더 큰 서열의 하위 집합을 형성하는 경우 아미노산 잔기와 같은 잔기의 지속적인 서열을 언급한다. 예를 들면, 만약에 폴리펩티드가 트립신이나 키모트립신 같은 일반적인 엔도펩티다아제 치료를 받는다면, 그런 치료로 인해 생기는 올리고펩티드는 폴리펩티드의 시작 부분, 분절 또는 단편을 나타낼 것이다. 폴리뉴클레오티드와 관련해서 사용될 때, 이러한 용어들은 일반적인 엔도뉴클레아제 중 어떤 것과 함께 상기 폴리뉴클레오티드의 치료에 의해 생성된 생성물을 지칭한다.
- [0203] 본 발명에 따라, 서열을 말할 때 용어 "백분율 동일성" 또는 "백분율 동등한"은 설명되거나 명시된 서열("기준 서열")에 비교될 서열의 정렬 후("비교 서열") 서열이 명시된 또는 설명된 서열에 비교되는 것을 말한다. 백분율 동일성은 하기 공식에 따라서 결정된다:
- [0204] 백분율 동일성 = $100 [1 - (C/R)]$
- [0205] 상기 식에서,
- [0206] C는 기준 서열과 비교 서열의 정렬의 길이에 비해 기준 서열과 비교 서열의 차이의 개수이되,

- [0207] (i) 비교 서열에서 상응하는 정렬된 염기 또는 아미노산이 없는 기준 서열에 각 염기 또는 아미노산,
- [0208] (ii) 기준 서열의 각 차이, 및
- [0209] (iii) 비교 서열의 정렬된 기초 또는 아미노산과 다른 기준 서열에서 각 정렬된 염기 또는 아미노산은 차이를 구성하며,
- [0210] (iv) 정렬은 정렬된 서열의 위치 1에서 시작해야 하고;
- [0211] R은 비교 서열과의 정렬의 길이에 대한 기준 서열 염기 또는 아미노산의 수이고 기준 서열에 생긴 공백도 염기 또는 아미노산 개수로 계산된다.
- [0212] 만약에 위에서와 같이 계산된 비교 서열과 기준 서열 사이의 백분율 동일성이 특정 최소 백분율과 같거나 더 크면 위에서 계산된 백분율 동일성이 특정 백분율 동일성보다 작은 경우에 정렬이 있더라도 비교 서열은 기준 서열에 대해 특정한 최소 백분율 동일성이 있다.
- [0213] 위에서 언급된 바와 같이, 본 설명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 대해 88% 상동성인 그 변이체 또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체를 제공한다. 본 설명의 펩티드는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I의 분자에 결합하는 능력 또는 연장된 버전의 상기 펩티드가 클래스 II에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0214] 본 발명에서, "상동"이라는 용어는 두 개의 아미노산 서열, 즉, 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 일치 정도를 일컫는다. 전술한 "상동"은 비교될 두 개의 서열을 최적 상태에서 나란히 정렬하여 비교하여 결정된다. 이러한 서열 상동 관계는 예를 들면 ClustalW 알고리즘을 이용하여 정렬을 만들어 계산할 수 있다. 일반적으로 사용 가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 구체적으로 벡터 NTI, GENETYX 또는 다른 도구들은 공용 데이터베이스에서 제공된다.
- [0215] 이 분야의 당업자는 특정 펩티드의 변이체에 의해서 유도된 T 세포가 그 펩티드 자체와 교차 반응할 수 있을지를 평가할 수 있을 것이다(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).
- [0216] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"에 의해, 발명자들은 예를 들면, 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기의 측쇄가 변경되어 그 펩티드가 여전히 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91의 아미노산 서열로 구성된 펩티드와 실질적으로 같은 방법으로 HLA 분자와 결합할 수 있음을 의미한다(예를 들면 그들을 자연적으로 발생하는 다른 아미노산 잔기 또는 다른 측쇄로 펩티드로 구성된다). 예를 들면, 펩티드 변형에 의해 HLA-A*02 또는 -DR과 같은 적합한 MHC 분자의 결합 홈과 상호 작용하여 결합하는 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지할 수 있으며 이에 따라 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 향상시키지 않더라도 적어도 유지한다.
- [0217] 이 T 세포들은 그 결과로 본 발명의 한 양태에서 정의가 된 바 있는 같은 혈종의 펩티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 상호 반응을 하고 그 세포들을 죽인다. 과학 문헌 및 데이터 베이스(Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)에서 얻을 수 있듯이, HLA 결합 펩티드의 특정 위치는 전형적으로 HLA 수용기의 결합 모티프에 일치하는 핵심 고정 잔기이며 이는 결합 홈을 이루고 있는 폴리펩티드의 극성, 전기 물리성, 소수성 및 공간적 특성에 의해 정의된다. 따라서 이 분야의 당업자는 알려진 고정 잔기를 유지함으로써 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 정해진 아미노산을 변형할 수 있을 것이며 이러한 변이체들이 MHC 클래스 I 또는 II 분자와 결합할 수 있는 능력을 유지할 수 있는지를 결정할 수 있어야 한다. 이 본 발명의 변이체는 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 유지하고, 이는 그 결과로 본 발명의 양태에서 같은 혈종의 펩티드라고 정의가 된 자연 아미노산 서열을 포함하고 있는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 상호 반응을 하고 이들을 죽인다.
- [0218] 여기에서 밝혀진 본래 (변형되지 않은) 펩티드는 달리 언급되지 않는 이상 다른, 아마도 선택적인, 펩티드 쇠의 사이트의 하나 이상의 잔기의 치환에 의해 변형될 수 있다. 바람직하게 이러한 치환은 아미노산 쇠의 끝에 위치한다. 그런 치환은, 예를 들면, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 한 아미노산이 구조 및 특성이 유사한 아미노산에 의해 치환됨으로써 그 성격이 보존적일 수 있다 심지어 더 보수적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것 같이, 같거나 비슷한 크기와 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종속에서의 서열 변화의 연구에서, 특정 아미노산의 치환은 다른 것들보다 더 자주 용납되고 있으며, 이들은 본래의 아미노산과 치환 사이에서 크기, 전하, 극성, 및 소수성이

비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보수적 치환"을 정의하는데 기본이 된다.

- [0219] 여기서 보존적 치환은 아래의 다섯 개 그룹 중 하나의 교환으로 정의된다: 그룹 1- 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성의 잔기(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 그룹 2- 극성, 음전하를 가진 잔기와 그 아미드(Asp, Asn, Glu, Gln); 그룹 3- 극성, 양전하를 가진 잔기(His, Arg, Lys); 그룹 4- 큰, 지방족, 비극성 잔기(Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 그룹 5- 큰, 방향족 잔기(Phe, Tyr, Trp).
- [0220] 덜 보존적 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 비슷한 성질이지만 크기가 어느 정도 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 아주 비보수적인 치환은 산성 아미노산을 극성, 또는 심지어 염기성 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수도 있다. 그러나 이러한 "급진적" 치환은 화학적 작용이 완전히 예측 불가능하고 급진적 치환은 단순한 화학 원리에서 예측 가능하지 않은 뜻밖의 발생이 있을 수 있기 때문에 효과가 없다고 기각할 수는 없다.
- [0221] 물론, 이런 치환은 일반적인 L-아미노산 외 다른 구조를 포함할 수 있다. 그러므로, D-아미노산이 본 발명의 항원 펩티드에서 흔히 발견되지만 여기에서 아직 공개가 되어야하는 L-아미노산을 치환할 수 있다. 또한, 비표준 아미노산(즉, 흔히 자연적으로 발생하는 단백질성 아미노산이 아닌) 역시 본 발명에 따라 면역원과 면역원성 폴리펩티드를 생산하기 위해서 치환 목적으로 사용될 수 있다.
- [0222] 아래에서 정의된 것과 상당히 동일하거나 더 큰 항원 활성이 있는 펩티드의 하나 이상의 위치에서 치환이 발견되면, 이러한 치환의 조합은 조합된 치환이 펩티드의 항원성에 추가적 효과 또는 시너지 효과의 결과를 내는지 결정하기 위해 시험된다. 최대한으로, 펩티드의 4개가 넘는 위치에서 동시에 치환될 수 없을 것이다.
- [0223] 여기서 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 필수적으로 구성된 펩티드는, 인간 주조직 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 또는 부정적으로 영향받지 않고, 하나 또는 두 개의 비앵커 아미노산(앵커 모티프에 대해서는 아래 참조)이 교환될 수 있다. 또 다른 구현에서, 여기서 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 필수적으로 구성되는 펩티드에 있어서, 비변형 펩티드에 비해 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 상당히 변경되거나 부정적으로 영향을 받지 않고, 하나 또는 두 개의 아미노산이 해당되는 보수적 교환 파트너들(아래 참조)과 교환될 수 있다.
- [0224] T 세포 수용체와의 상호작용에 상당히 기여를 하지 않는 아미노산 잔기들은, 이와 결합함으로써 T 세포의 반응성에 큰 영향을 주지 않고 관련된 MHC와의 결합을 제거하지 않는 다른 아미노산과의 교체에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 주어진 조건 외에도, 본 발명의 펩티드는 아미노산 서열 또는 그 한 부분 또는 주어진 변이체를 포함하는(발명자들이 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다고 일컫는) 어떠한 펩티드가 될 수도 있다.

[표 6]

[0226] 서열 식별 번호 4, 6 및 10에 따른 펩티드의 변이체 및 모티프

위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
서열 식별 번호: 4	I	L	D	I	N	D	N	P	P	V
변이체										I
										L
										A
		M								
		M								I
		M								L
		M								A
		A								
		A								I
		A								L
		A								A
		V								
		V								I
		V								L
		V								A
		T								
		T								I
		T								L
		T								A
		Q								
		Q								I
		Q								L
		Q								A
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
서열 식별 번호: 6	A	L	Y	D	A	E	L	S	Q	M
변이체										V
										I
										L
										A
		M								V
		M								I
		M								L
		M								A
		A								V
		A								I
		A								L

[0227]

		A								A
		V								V
		V								I
		V								L
		V								A
		T								V
		T								I
		T								L
		T								A
		Q								V
		Q								I
		Q								L
		Q								A
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
서열 식별 번호: 10	T	L	W	P	A	T	P	P	K	A
변이체										V
										I
										L
		M								V
		M								I
		M								L
		M								
		A								V
		A								I
		A								L
		A								
		V								V
		V								I
		V								L
		V								
		T								V
		T								I
		T								L
		T								
		Q								V
		Q								I
		Q								L
		Q								

[0228]

[0229]

더 긴(연장된) 펩티드도 적합할 수 있다. 또한 대개 길이가 8-11개의 아미노산이지만, MHC 클래스 I 에피토프이 더 긴 펩티드로부터 처리되는 펩티드 또는 실제 에피토프를 포함하는 단백질에 의해 생성될 가능성도 있다. 실제 에피토프가 양측에 있는 장기는 처리 동안 실제 에피토프를 노출하는데 필요한 단백질 분해에 의한 분할에 상당한 영향을 주지 못하는 잔기이다.

[0230]

본 발명의 펩티드는 4개까지의 아미노산만큼 연장할 수 있는데 즉, 1, 2, 3 및 4개의 아미노산이 4:0과 0:4 사이에서 일체의 조합으로 양쪽 어디로든 추가될 수 있다. 본 발명에 따른 연장의 조합은 표 7에서 찾아볼 수 있다:

[0231]

[표 7]

[0232] 본 발명에 따른 펩티드의 연장(확장)의 조합

C-말단	N-말단
4	0
3	0 또는 1
2	0 또는 1 또는 2
1	0 또는 1 또는 2 또는 3
0	0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4
N-말단	C-말단
4	0
3	0 또는 1
2	0 또는 1 또는 2
1	0 또는 1 또는 2 또는 3
0	0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4

[0233]

[0234] 연장/확장을 위한 아미노산은 해당 단백질의 원래 서열의 펩티드나 기타 모든 아미노산일 수 있다. 연장은 펩티드의 안정성이나 가용성 강화를 위해 사용될 수 있다.

[0235] 따라서, 본 발명의 에피톱은 자연적으로 발생하는 종양 관련 또는 종양 특정 에피톱과 동일하거나 또는 실질상 동등한 항원적 활동력을 가지고 있는 한, 참조 펩티드와 비교 시 4개 이하의 다른 잔기를 가지고 있는 에피톱을 포함한다.

[0236] 다른 구현에 있어서 펩티드는 한쪽 또는 양쪽에서 4개가 넘는 아미노산으로 연장되며, 바람직하게는 최대 30개의 아미노산 길이로 연장된다. 이는 MHC 클래스 II 결합 펩티드로 이어질 수 있다. MHC 클래스 II에 대한 결합은 당업계에서 알려진 방법으로 시험할 수 있다.

[0237] 따라서, 본 발명은 MHC 등급 I 에피토프의 펩티드와 변이체를 제공하며, 여기서 펩티드 또는 변이체는 8 내지 100, 9 내지 100, 10 내지 100, 11 내지 100, 12 내지 100, 8 내지 30, 9 내지 30, 10 내지 30, 11 내지 30, 12 내지 30, 가장 바람직하게는 8 내지 14, 9 내지 14, 10 내지 14, 11 내지 14, 12 내지 14의 전체 길이를 갖는다. 또한 본 발명은 MHC 클래스 I 에피토프의 펩티드와 변이체를 제공하며 여기서 펩티드 또는 변이체는 전체 길이가 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개의 아미노산이며, 연장된 클래스 II 결합 펩티드의 경우 그 길이는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 아미노산일 수도 있다.

[0238] 물론, 본 발명에 따른 펩티드 또는 변이체는 인간 구조적 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖게 된다. 펩티드 또는 변이체의 MHC 복합체에 대한 결합은 당업계의 방법에 의해 시험할 수 있다.

[0239] 바람직하게는, 본 발명에 따른 펩티드 특정 T 세포가 치환 펩티드에 대해 시험될 때, 치환 펩티드가 배경에 상대적으로 세포 용해의 최대 증가의 절반을 달성할 때의 펩티드 농도는 약 1 mM 이하, 바람직하게 약 1 μ M 이하, 더 바람직하게 약 1 nM 이하, 여전히 더 바람직하게 약 100 pM 이하, 및 가장 바람직하게는 약 10 pM 이하이다. 치환 펩티드가 1명 이상, 최소 2명 및 더 바람직하게는 3명의 개인으로부터의 T 세포에 의해 인식되는 것 또한 바람직하다.

[0240] 본 발명의 특히 바람직한 구현에서 그 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.

[0241] "본질적으로 구성되는"이란 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91의 어느 서열 또는 이 변이체 외에도 본 발명에 따른 추가적인 N- 및/또는 C-말단에 위치하고 있는 아미노산이 MHC 분자 에피톱에 대한 에피톱으로 기능하는 펩티드의 한 부분을 반드시 형성하지 않는 펩티드를 일컫는다.

[0242] 그럼에도 불구하고, 이 길이의 아미노산은 본 발명에 따르면 세포 안으로의 효율적인 펩티드의 도입에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현에서는, 펩티드는 예를 들면 NCBI, GenBank Accession-number X00497에서 유도된 것처럼 HLA-DR 항원-결합 불변쇄(p33, 다음의 "Ii")의 80개 N-말단 아미노산을 포함하고 있는 융합 단백질의 일부이다. 다른 융합에서는, 본 발명의 펩티드는 항체에 의해 특이적으로 표적이 될 수 있도록 여기서 설명된 상기 항체나 그 기능적 일부 특히 항체의 서열에 대해 또는 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체에 대해 또는 그 안으로 융합될 수 있다.

[0243] 추가적으로, 펩티드 또는 변이체는 안정성 및/또는 MHC 분자와의 결합성을 높여 더 강한 면역 반응을 일으킬 수

있도록 변형될 수 있다. 펩티드 서열의 최적화를 위한 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들면 반대 펩티드 결합 또는 비-펩티드 결합을 도입하는 것이 있다.

[0244] 반대 펩티드 결합에서는 아미노산 잔기가 펩티드(-CO-NH-) 연결로 결합되어 있지 않으나 펩티드 결합이 반대로 되어있다. 이러한 역-인버스 펩티드 모방형 물질은 이 분야에서 잘 알려진 방법으로 생성될 수 있으며, 이 방법의 예는 이 문헌의 참조 문헌으로 포함된 Meziere 등(1997)(Meziere et al., 1997)이다. 이 방법은 백본의 변형을 포함하지만, 측쇄의 방향을 바꾸지 않는 유사펩티드를 만드는 것을 포함한다. Meziere 등(Meziere et al., 1997)은 MHC 결합과 T 조력 세포 반응에서 이 유사 펩티드가 유용하다는 것을 보여준다. CO-NH 대신에 NH-CO 결합을 포함하고 있는 역-인버스 펩티드는 단백질 가수 분해에 대한 저항력이 훨씬 높다.

[0245] 비-펩티드 결합의 예는 $-CH_2-NH$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, 및 $-CH_2SO-$ 이다. 미국 특허 번호 4,897,445는 기본 과정을 거쳐 합성된 폴리펩티드와 아미노 알데히드와 아미노산을 $NaCNBH_3$ 존재 하에 반응시켜 생성된 비-펩티드 결합을 포함한 폴리펩티드 쇄의 비-펩티드 결합($-CH_2-NH$) 고체상 합성의 방법을 제공한다.

[0246] 위에서 기술된 서열을 가지고 있는 펩티드는 안정성, 생물가용성, 및/또는 펩티드의 결합을 증가 시키기 위해 추가적인 화학 그룹을 아미노 및 또는 카복시 말단에 결합할 수도 있다. 예를 들면, 카보벤족실, 단실, 또는 t-부틸옥시카보닐 그룹 등의 수소성 그룹이 펩티드의 아미노 말단에 추가될 수 있다. 비슷하게, 아세틸 그룹 또는 9-플루오렌메톡시-카보닐-그룹이 펩티드의 아미노 말단에 위치할 수도 있다. 또한, 수소성 그룹, t-부틸옥시카보닐, 또는 아미도 그룹 또한 펩티드의 카복시 말단에 추가될 수 있다.

[0247] 또한, 이 발명의 펩티드는 그들의 입체 배치를 변화시키기 위해 생성될 수도 있다. 예를 들면, 펩티드의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 D-이성질체가 보통의 L-이성질체 대신에 사용될 수도 있다. 더 나아가서, 발명의 펩티드의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 비-자연적으로 일어나는 아미노산 잔기와 치환될 수도 있다. 이와 같은 변화는 안정성, 생물가용성, 및/또는 본 발명의 펩티드의 결합을 증가시킬 수 있다.

[0248] 유사하게, 이 발명의 펩티드 또는 변이체는 특정한 아미노산을 펩티드 생성 전 또는 후에 반응시킴으로써 화학적으로 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예는 이 분야에서 잘 알려져 있으며 예를 들어 이 문헌의 참조 문헌에 포함되어 있는 R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004(Lundblad, 2004)에 잘 기술되어 있다. 아미노산의 화학 변형은 아실화, 아미딘화, 리신의 피리독실화, 환원성 알킬화 반응, 아미노산의 2,4,6-트리니트로벤젠 설포화(TNBS)에 의한 트라이 니트로 벤질화, 카복실 그룹의 아미드 변형 및 퍼포민산에 의한 설피드릴 변형, 시스틴의 시스테인산으로의 산화, 머큐리얼 유도체 생성, 다른 티올 합성의 다이설피드 생성, 말레이미드와의 반응, 요오드화 아세트산 또는 요오드 아세트 아미드에 의한 카복시메틸레이션 및 사이안산 염에 알칼리성 산도에서의 의한 카바미드화를 포함하지만 이에 국한 되지 않은 변형을 말한다. 이에 관해서, 당업자는 더 광대한 단백질의 화학 변형에 대한 방법론에 대해서는 Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000)(Coligan et al., 1995)의 15장을 참조하길 바란다.

[0249] 간단히 말하면, 예를 들어 단백질의 아르기닌 잔기는 흔히 페닐글리옥산, 2,3-부탄디온 및 1,2-사이클로헥산디온과 같은 조처의 디카르보닐 화합물과의 반응에 근거하여 부가물을 형성한다. 다른 예는 메틸글리옥살과 아르기닌 잔기와의 반응이다. 시스테인은 리신과 히스티딘과 같은 다른 친핵성 좌의 동시 변형 없이 변형시킬 수 있다. 그 결과 다수의 시약들이 시스테인 변형에 사용 가능하다. Sigma-Aldrich(<http://www.sigma-aldrich.com>)와 같은 회사들의 웹사이트에서는 특정한 시약에 관한 정보를 제공하고 있다.

[0250] 단백질에서 이황화 결합의 선택적 환원 또한 흔하다. 단백질에서 이황화 결합은 생물약제의 열 처리 동안 형성되어 산화될 수 있다. 우드워드의 시약 K는 특정 글루탐산 잔기의 변형에 사용될 수 있다. N-(3디메틸아미노)프로필-1-N'-에틸카르보디이미드를 사용하여 리신 잔기와 글루탐산 잔기 사이의 분자 내 가교를 형성할 수 있다. 예를 들어 디메틸카보네이트는 단백질에서 히스티딘 잔기의 변형을 위한 시약이다. 히스티딘은 4-히드록시-2-노네날을 사용하여 변형시킬 수 있다. 리신 잔기와 다른 알파 아미노기의 작용은, 예를 들어, 펩티드의 표현 결합 또는 단백질/펩티드들의 가교에 유용하다. 리신은 폴리(에틸렌)글리콜의 부착의 부위이며 단백질의 당화에서 중요 변형 부위이다. 단백질에서 메티오닌 잔기는 예를 들어 이오도아세트아미드, 브로모에틸아민 및 클로르아민 T를 사용하여 변형시킬 수 있다.

[0251] 테트라니트로메탄 및 N-아세틸이미다졸은 티로신 잔기의 변형에 사용할 수 있다. 디티로신의 형성을 통한 가교

형성은 과산화 수소/구리 이온으로써 성취할 수 있다.

[0252] 트립토판의 변형에 대한 최근의 연구에서는 N-브로모숙신이미드, 브롬화 2-키드록시-5-니트로벤질 또는 3-브로모-3-메틸-2-(2-니트로페닐메르 캅토)-3H-인돌(BPNS-스카톨)이 사용된 바 있다.

[0253] PEG를 이용한 치료용 단백질과 펩티드의 성공적인 변형은 흔히 동시 순환 반감기의 증가를 시키는 것과 연관되어 있는 반면, 단백질과 글루타르알데히드, 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트 및 포름알데히드와 교차 결합이 히드로겔의 준비에 사용된다. 면역 치료를 위한 알레르겐의 화학적 변형은 종종 칼륨 시안산염의 카바밀화와 관련이 있다.

[0254] 본 발명의 또 다른 구현은 비자연적으로 발생하는 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 156에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되며 약학적으로 허용 가능한 염으로 합성적으로 생성되었다(예: 합성되었다). 펩티드를 합성적으로 생성하는 방법들은 당업계에서 잘 알려져 있다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 생체 내 상태(들)에서의 펩티드와 실질적으로 다르며, 이는 생체 내에서 생성된 펩티드는 염이 아니기 때문이다. 펩티드의 비자연적 염 형태는 특히 예를 들어 여기서 공개된 펩티드 백신과 같이 펩티드를 포함하는 약학 조성물의 맥락에서 상기 펩티드의 용해도를 매개한다. 치료할 시험대상자에게 펩티드를 효율적으로 제공하기 위해서는 충분하며 적어도 실질적인 펩티드(들)의 용해도가 요구된다. 바람직하게, 상기 염은 펩티드의 약학적으로 허용가능한 염이다. 본 발명에 따른 이러한 염에는 음이온으로 PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- , 그리고 양이온으로 NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} 및 Ba^{2+} 를 포함하는 계열의 염과 같은 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 염이 포함된다. 특히 염은 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 및 $\text{Ba}(\text{SCN})_2$ 으로 부터 선택된다. 특히 바람직하기로는 예를 들어 염화물 또는 아세트산(트리플루오로아세트산) 염과 같은 NH 아세테이트, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl 및 CaCl_2 이다.

[0255] 펩티드 또는 변이체, 여기에서 펩티드는 변환되었거나 또는 비-펩티드 결합을 포함하는 것이 본 발명 구현에서 바람직하다. 보통, 펩티드와 변이체(적어도 펩티드 링크를 아미노산 잔기 사이에 포함하는 것들)는 Lukas et al. 및 그 문헌의 참조 자료에서 기술된 바처럼 고체상 펩티드 합성의 Fmoc-폴리아미드 모드에서 합성될 수 있다. (Lukas et al., 1981) 그리고 여기에 인용된 참조문헌에서 공개된 Fmoc-폴리아미드 방식의 고체상 펩티드 합성에 의해 합성될 수 있다. 일시적인 N-말단 그룹 보호는 9-플루오렌메틸옥시카보닐(Fmoc)에 의해 제공된다. 이렇게 염기 불안정한 보호 그룹의 반복적인 절단은 N, N-디메틸포름아미드의 20% 피페리딘을 이용하여 이루어진다. 측쇄 기능은 부틸 에테르(세린, 트레오닌 및 티로신의 경우), 부틸 에스터(글루탐산 및 아스파르트산의 경우), 부틸옥시카보닐 변이체(리신과 히스티딘의 경우), 트라이틸 변이체(아르기닌의 경우) 그리고 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤젠술포닐 유도체(아르기닌의 경우)로서 보호될 수 있다. 글루타민 또는 아스파라긴이 C-말단의 잔기인 경우, 4,4'-디메톡시벤조히드릴이 사용되어 측쇄 아미도 기능을 보호한다. 고체형 보조는 디메틸아크릴아미드(백본-모노머), 비스아크릴로일에틸렌 디아민(가교 결합) 및 아크릴로일사르코신 메틸 에스터(기능 작용제)의 3개의 모노머로 만들어진 폴리디메틸-아크릴아미드 중합체에 기반을 둔다. 펩티드 대 레진 절단 가능 연결 작용제로 사용되는 것은 산-불안정 4-히드록시메틸-페녹시아세트산 유도체이다. 모든 아미노산 유도체는 역 N, N-디사이클로헥실-카보다이이미드/1-히드록시벤조트리아졸에 의한 커플링 과정에 의해 추가되는 아스파라진과 글루타민을 제외하여 미리 생성된 대칭의 무수물 유도체로서 추가된다. 모든 커플링과 탈보호 반응은 다펜, 트리니트로벤젠 술포산 또는 이소틴 실험 과정에 의해 모니터링된다. 합성 완성 시에, 펩티드는 레진 기반에서 50% 스캐빈저 믹스를 포함한 95% 트리플루오로아세트산에 의한 측쇄 보호기 제거와 동시에 절단된다. 일반적으로 사용되는 스캐빈저에는 에탄디올, 페놀, 아니솔 및 물이 포함되며, 정확한 선택은 합성되는

펩티드를 구성하는 아미노산에 따라 달라진다. 또한 펩티드의 합성에서 고체상 및 용액상의 조합 방식도 가능하다(예를 들어 (Bruckdorfer et al., 2004) 및 여기에 인용된 참조 문헌 참고).

- [0256] 트리플루오로아세트산은 진공하 증발에 의해 제거되며 그 이후 디에틸 에테르에 의한 분쇄로 조 펩티드를 얻는다. 존재하는 일체의 스캐빈저는 수성상의 냉동건조로써 스캐빈저가 없는 조 펩티드를 생성하는 간단한 추출 과정에 의해 제거된다. 펩티드 합성 시약들은 일반적으로 예를 들어 Calbiochem-Novabiochem(Nottingham, 영국)로부터 얻을 수 있다.
- [0257] 정제는 재결정화, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 예를 들어 아세토니트릴/물 구배 분리를 사용하는 (대개) 액상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 기법의 하나 또는 그 조합에 의해 수행할 수 있다.
- [0258] 펩티드의 분석은 박막 크로마토그래피, 전기 이동, 특히 모세관 전기 이동, 고체상 추출(CSPE), 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 산 가수분해 후 아미노산 분석 및 고속 원자 폭격 질량 분광분석, 및 MALDI와 ESI-QTOF 질량 분광분석 등에 의해 이루어진다.
- [0259] 과도 제시된 펩티드를 선택하기 위해, 중간값 샘플 제시는 물론 복제 변이를 보여주는 제시 프로파일도 계산된다. 이 프로파일은 관심 대상의 종양 객체 샘플을 정상 조직 샘플의 기준에 병치된다. 다음은 선형 혼합 효과 모형 (Pinheiro et al., 2015)의 P값을 계산하되 위발견율(Benjamini and Hochberg, 1995)에 의해 다중 검증에 대해 조절함으로써 이러한 프로파일을 하나씩 과다제시 점수로 강화시킬 수 있다(실시예 1 및 도 1 참조).
- [0260] 질량 분석에 의한 HLA 리간드의 동정 및 상대적 정량화를 위해, 충격동결된 조직 샘플에서 얻어진 HLA를 정화하고 HLA-연관 펩티드를 격리했다. 격리된 펩티드는 분리하여 그 서열을 온라인 나노-전기분무-이온화(nanoESI) 액체 크로마토그래피-질량 분석(LC-MS) 실험에 의해 식별했다. 두경부 편평 세포 암종 샘플(N = 17 A*02-양성 샘플)로부터 기록된 자연적 종양 관련 펩티드(TUMAP)의 과편 패턴을 동등한 서열을 가진 상응하는 합성 참조 펩티드의 과편 패턴과 비교하여, 얻어진 펩티드 서열을 확인했다. 펩티드는 원발성 종양의 HLA 분자의 리간드로서 직접 식별되었기 때문에, 그 결과는 14명의 두경부 편평 세포 암종 환자에서 얻어진 원발 종양 조직에 대해 식별된 펩티드의 자연적 처리와 제시에 대한 직접적 증거를 제공한다.
- [0261] 발견 파이프라인 XPRESIDENT® v2.1(예를 들어 전체가 여기에 포함되는 US 2013-0096016을 참고)은 몇 가지 다른 비암성 조직 및 기관에 비해 암 조직에 대한 HLA-제한 펩티드 수준의 직접적인 상대적 정량화를 기준으로 관련 있는 과도-제시된 펩티드 백신 후보의 식별과 선택을 허용한다. 이는 서열 식별, 스펙트럼 집락화, 전하 이온 계수화, 정제 시간 정렬, 상태 디컨볼루션 및 정상화에 필요한 알고리즘을 조합시킨 독점 데이터 분석 파이프라인에 의해 처리하여 획득한 LC-MS 데이터를 사용한 label-free 차등 정량화의 개발에 의해 성취되었다.
- [0262] 펩티드와 샘플 각각에 대한 오류 측정치 등 제시 수준이 확립되었다. 종양 조직에 배타적으로 제시된 펩티드 그리고 종양에서 과도-제시된 펩티드 대비 비암성 조직 및 기관이 식별된 바 있다.
- [0263] 두경부 편평 세포 암종 조직 샘플에서 얻은 HLA-펩티드 복합체를 정제하고 HLA-연관 펩티드를 LC-MS로 분리하여 분석했다. 원발성 두경부 편평 세포 암종 샘플에 대한 이러한 접근 방식을 통해 본 출원에 포함된 모든 TUMAP를 식별했으며, 원발성 두경부 편평 세포 암종에 대한 제시가 확인되었다.
- [0264] 복수의 두경부 편평 세포 암종 및 정상 조직에 대해 식별된 TUMAP를 label-free LC-MS 데이터에 대한 이온-계수화를 사용하여 정량화했다. 이 방법은 펩티드의 LC-MS 신호 영역이 샘플에 존재하는 풍부함과 상관관계가 있음을 가정한다. 다양한 LC-MS 실험에서 펩티드의 모든 정량적 신호들을 LC-MS 실험을 중심 경향에 근거하여 정상화하고 샘플 당 평균화하여 제시프로파일이라 부르는 막대 도표에 통합시켰다. 이 제시 프로파일은 단백질 데이터베이스 검색, 스펙트럼 군락화, 충전 상태 디컨볼루션(방전) 및 시간 성격 및 정제 정상화와 같은 다른 분석 방법들을 통합시킨다.
- [0265] 펩티드의 과다제시 외에도, 기저 유전자의 mRNA 발현을 시험했다. 정상 조직 및 암 조직의 RNASeq 분석을 통해 mRNA 데이터를 획득했다(실시예 2 및 도 2 참조). 정상 조직 데이터의 추가 출처는 약 3000개 정상 조직 샘플로부터 공개적으로 이용 가능한 RNA 발현 데이터의 데이터베이스였다(Lonsdale, 2013). 코딩 mRNA가 암 조직에서 고도로 발현되지만 필수 정상 조직에서는 매우 낮거나 부재하는 단백질들로부터 유래된 펩티드는 본 발명에 바람직하게 포함되었다.
- [0266] 본 발명은 본 발명의 펩티드를 과다 또는 배타적으로 제시하는 암/종양, 바람직하게는 두경부 편평 세포 암종의 치료에 유용한 펩티드를 제공한다. 이 펩티드는 질량 분석법에 의해 원발성 인간 두경부 편평 세포 암종 샘

플 상에서 HLA 분자에 의해 자연적으로 제시되는 것으로 나타났다.

- [0267] 이 펩티드들이 유래된 다수의 출처 유전자/단백질("전장 단백질"이나 "기저 단백질"로도 지정됨)는 정상조직에 비해 암에서 고도로 과발현되는 것으로 나타났다(본 발명과 관련하여 "정상 조직"은 출처 유전자의 종양 연관 정도가 높은 것을 보여주는 건강[주요 적응증의 증상 조직 삽입] 세포 또는 기타 정상 조직 세포를 의미한다(실시예 2 참조). 더욱이 펩티드 자체는 종양 조직 상에서(본 발명과 관련하여 "종양 조직"이란 두경부 편평 세포 암종을 앓는 환자의 샘플을 의미한다) 강력히 과다제시되지만 정상 조직 상에서는 그렇지 않다(실시예 1 참조).
- [0268] HLA-결합된 펩티드는 면역계 특히 T 림프구에 의해서 인식될 수 있다. T 세포는 인식되는 HLA/펩티드 복합물을 제시하는 세포들을 파괴하며, 예를 들면, 유도된 펩티드를 제시하는 두경부 편평 세포 암종 세포이다.
- [0269] 본 발명의 펩티드는 T 세포 반응을 자극할 수 있으며/거나 과다제시되는 것으로 나타났으므로, 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR 특히 sTCR의 생산에 사용될 수 있다(실시예 3 및 도 4 참조). 더욱이 해당되는 MHC와 복합된 펩티드는 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR 특히 sTCR의 생산에도 사용될 수 있다. 해당 방법들은 당업자에게 잘 알려져 있으며 해당 문헌에서도 찾을 수 있다. 그러므로, 본 발명의 펩티드는 환자의 종양 세포를 파괴할 수 있는 면역 반응을 생성하는데 유용하다. 환자의 면역 반응은 설명된 펩티드의 직접적인 투여 또는 면역성을 강화할 수 있는 제제(즉, 보조제)와 섞인 적당한 전조 물질(예를 들면, 연장된 펩티드, 단백질, 또는 이러한 펩티드를 인코딩하는 핵산)을 환자에게 투여하는 것으로 유도될 수 있다. 이런 치료적 백신에서 생긴 면역 반응은 본 발명의 목적 펩티드가 비교가능한 복사수로 정상 조직에서는 나타나지 않고, 환자의 정상 세포에 대한 기피되는 자기 면역 반응의 위험을 배제하기 때문에 종양 세포에 아주 특정할 수 있다.
- [0270] 본 설명은 알파 채 및 베타 채("알파/베타 TCR")를 포함하는 T 세포 수용체(TCR)에 관한 것이다. 또한 MHC 분자에 의해 제시되는 경우 TCR 및 항체에 결합할 수 있는 발명의 펩티드가 제공된다. 본 설명은 또한 본 설명의 TCR 및 펩티드를 발현하는 핵산, 벡터 및 숙주 세포; 그리고 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.
- [0271] 용어 "T 세포 수용체"(약자로 TCR)는 알파 폴리펩티드 채(알파 채) 및 베타 폴리펩티드 채(베타 채)를 포함하는 이질이합체 분자를 지칭하며, 여기서 이질이합체 수용체는 HLA 분자에 의해 제시된 펩티드 항원에 결합하는 능력이 있다. 이 용어는 소위 감마/델타 TCR 또한 포함한다.
- [0272] 한 구현에서, 본 설명은 여기서 기술된 대로 TCR의 생산 방법을 제공하며, 이 방법은 TCR의 발현 촉진에 적합한 조건 하에서 TCR을 발현시킬 수 있는 숙주 세포의 배양을 포함한다.
- [0273] 본 설명은 다른 양태에서 본 설명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 그 항원이 적합한 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩되거나 항원/클래스 I 또는 II MHC 복합체 단량체의 사량체화에 의해 그 항원이 클래스 I 또는 II MHC 사합체 위에 로딩된다.
- [0274] 알파/베타 TCR의 알파 및 베타 채 그리고 감마/델타 TCR의 감마 및 델타 채는 일반적으로 각각 2개의 "도메인" 즉, 가변 및 불변 도메인을 갖는 것으로 간주된다. 가변 도메인은 가변 영역(V) 및 결합 영역(J)의 연쇄로 구성된다. 가변 도메인은 리더 영역(L) 또한 포함할 수 있다. 베타 및 델타 채 또한 다양성 영역(D)을 포함할 수 있다. 알파 및 베타 불변 도메인은 또한 알파 및 베타 채를 세포막에 고정시키는 C-말단 막횡단(TM) 도메인을 포함할 수 있다.
- [0275] 감마/델타 TCR에 대하여, 여기서 사용된 용어 "TCR 감마 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 감마 V(TRGV) 영역과 TCR 감마 J(TRGJ) 영역의 연계를 지칭하며, 또한 용어 TCR 감마 불변 도메인은 세포의 TRGC 영역이나 C-말단 절단된 TRGC 서열을 지칭한다. 마찬가지로 용어 "TCR 델타 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 델타 V(TRDV) 영역과 TCR 델타 D/J(TRDD/TRDJ) 영역의 연계를 지칭하며, 용어 "TCR 델타 불변 도메인"은 세포의 TRDC 영역이나 C-말단 절단된 TRDC 서열을 지칭한다.
- [0276] 본 설명의 TCR은 바람직하게는 결합 친화도(KD)가 약 100 μ M 이하, 약 50 μ M 이하, 약 25 μ M 이하 또는 약 10 μ M 이하인 발명의 펩티드-HLA 분자 복합체에 결합한다. 더욱 바람직하게는, 결합 친화도가 약 1 μ M 이하, 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하를 갖는 고친화도 TCR이다. 본 발명의 TCR은 바람직한 결합 친화도 범위에 대한 제한되지 않는 예에는 약 1 nM 내지 약 10 nM, 약 10 nM 내지 약 20 nM, 약 20 nM 내지 약 30 nM, 약 30 nM 내지 약 40 nM, 약 40 nM 내지 약 50 nM, 약 50 nM 내지 약 60 nM, 약 60 nM 내지 약 70 nM, 약 70 nM 내지 약 80 nM, 약 80 nM 내지 약 90 nM 및 약 90 nM 내지 약 100 nM가 포함된다.

- [0277] 본 설명의 TCR와 관련하여 여기서 사용되는, "특이적 결합" 및 그 문법적 변형어는 100 μ M 이하의 펩티드-HLA 분자 복합체에 대한 결합 친화도(KD)를 갖는 TCR을 의미하는 것으로 사용된다.
- [0278] 본 설명의 알파/베타 이질이합체 TCR은 그 불변 도메인 사이에 도입된 이황화 결합을 가질 수 있다. 이러한 유형의 바람직한 TCR에는 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열을 갖는 것들이 포함되는데, 단 TRAC의 Thr 48 및 TRBC1이나 TRBC2의 Ser 57이 시스테인 잔기로 교체는 경우는 예외로, 상기 시스테인은 TCR의 TRAC 불변 도메인 서열과 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 사이에 이황화 결합을 형성한다.
- [0279] 위에서 언급한 도입된 쇠간 결합의 유무에 관계 없이, 본 설명의 알파/베타 이질이합체 TCR은 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열을 가질 수 있으며, TCR의 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열은 TRAC의 엑손 2의 Cys4와 TRBC1이나 TRBC2의 엑손 2의 Cys2 사이에 있는 자연 이황화 결합에 의해 연결될 수 있다.
- [0280] 본 설명의 TCR은 방사성핵종, 형광단 및 비오틴으로 구성된 군으로부터 선택된 검출가능한 라벨을 포함할 수 있다. 본 설명의 TCR은 방사성핵종, 화학요법제, 독소와 같은 활성 치료제에 접합될 수 있다.
- [0281] 한 구현에서, 알파 쇠에 적어도 1개의 돌연변이를 가지며/갖거나 베타 쇠에 적어도 1개의 돌연변이를 갖는 본 설명의 TCR은 돌연변이되지 않은 TCR에 비해 변형된 당화를 갖는다.
- [0282] 한 구현에서, TCR 알파 쇠에 적어도 1개의 돌연변이를 가지며/갖거나 TCR 베타 쇠에 적어도 1개의 돌연변이를 갖는 TCR은 펩티드-HLA 분자 복합체에 대해 결합 친화도 및/또는 결합 반감기를 가지며, 이는 비돌연변이 TCR 알파 쇠 및/또는 비돌연변이 TCR 베타 쇠를 포함하는 TCR의 그것에 대해 적어도 2배이다. 종양 특이적 TCR의 친화도 강화 및 그 이용은 최적의 TCR 친화도에 대한 범위의 존재에 의존한다. 그러한 창 의 존재는, HLA-A2 제한 병원체에 특이적인 TCR의 KD 값이 HLA-A2 제한 종양 관련 자가 항원에 특이적인 TCR에 대해 일반적으로 약 10배 낮다는 관찰에 근거한다. 현재 종양은 개인 자체의 세포로부터 발생하기 때문에 종양 항원이 면역성일 수 있음에도 불구하고, 돌연변이된 단백질이나 변형된 번역 처리를 가진 단백질만이 면역계에 의해 이물질로 보이게 된다. 상향조절되거나 과발현되는 항원(소위 자가 항원)이 반드시 종양에 대한 기능적 면역 반응을 유도하지는 않을 것이다: 이러한 항원에 고도로 반응성인 TCR을 발현하는 T 세포는 중추 관용으로 알려진 과정에서 흥선 내부로부터 음적으로 선택되었을 것이며, 자가 항원에 대해 낮은 친화도 TCR을 갖는 T 세포만 남는다는 것을 의미한다. 그러므로, 본 설명의 TCR이나 변이체의 본 발명에 따른 펩티드에 대한 친화도는 다음에 설명된 바와 같이 당업계에서 잘 알려진 방법들로 강화시킬 수 있다.
- [0283] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 HLA-A*02 음성의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 A2/펩티드 단량체와 함께 배양, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0284] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결합을 보상하는 방대한 TCR 레퍼토리를 발현하는 전체 인간 TCR알파베타 유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자전 마우스의 획득, 펩티드에 의한 마우스의 면역접종, 유전자전이 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양, 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0285] 한 양태에서, 본 설명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 본 설명의 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇠를 인코딩하는 핵산을 감마 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 발현 벡터로 클로닝한다. 재조합 바이러스를 생성한 다음 항원 특이성 및 기능적 결합성과 같은 기능성에 대해 시험했다. 다음에는 최종 생성물의 분취물을 사용하여 표적 T 세포 모집단(일반적으로 환자 PBMC로부터 정제된)을 형질도입하며, 모집단은 환자에 주입하기 전에 팽창시킨다.
- [0286] 또 다른 양태에서, 본 설명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 당업계에서 알려진 기법(예: 시험관 내 전사 시스템)으로 TCR RNA를 합성한다. 다음에는 시험관 내에서 합성된 TCR RNA를 종양 특이적 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇠의 재발현을 위하여, 전기천공에 의해 건강한 공여자로부터 얻은 일차 CD8+ T 세포 내로 도입시킨다.
- [0287] 이러한 발현을 증가시키려면, 본 설명의 TCR을 인코딩하는 핵산을 레트로바이러스 긴 말단 반복(LTR), 거대세포 바이러스(CMV), 쥐 줄기세포 바이러스(MSCV) U3, 포스포글리세레이트 키나제(PGK), 베타-액틴, 유비퀴틴 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)/CD43 복합 프로모터, 연장 인자 (EF)-1a, 비장 포커스-형성 바이러스(SFFV) 프로모터

와 같은 강력한 프로모터에 작동하도록 연계시킬 수 있다. 바람직한 한 구현에서, 이 프로모터는 발현되고 있는 핵산에 대해 이중이다.

- [0288] 강력한 프로모터 외에도, 본 설명의 TCR 발현 카세트가 도입 유전자 발현을 강화시킬 수 있는 추가의 요소를 포함할 수 있으며, 여기에는 렌티바이러스 구성(Follenzi et al., 2000)의 핵 전위를 촉진시키는 중추 폴리퓨린 관(cPPT), 그리고 RNA 안정성의 증가로 도입 유전자 발현을 증가시키는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절요소(wPRE) (Zufferey et al., 1999)가 포함된다.
- [0289] 본 발명의 TCR의 알파 및 베타쇄는 별개의 벡터에 위치한 핵산에 의해 인코딩될 수 있거나 동일한 벡터에 위치한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0290] 높은 수준의 TCR 표면 발현을 성취하려면 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타쇄가 높은 수준으로 전사되는 것이 요구된다. 이를 위해서, 본 설명의 TCR-알파 및 TCR-베타쇄를 단일 벡터에서 바이시스트로닉(bicistronic) 구성으로 클로닝할 수 있으며, 이는 이러한 장애를 극복할 수 있는 것으로 나타났다. TCR-알파 및 TCR-베타쇄 사이의 바이러스성 내재 리보솜 진입 부위(IRES)의 사용은 두쇄의 조율된 발현을 초래하며, 이는 TCR-알파 및 TCR-베타쇄가 번역 도중 단일 전사체로부터 생성되어 TCR-알파 및 TCR-베타쇄의 동등한 몰비의 생산을 보장하기 때문이다(Schmitt et al. 2009).
- [0291] 본 설명의 TCR을 인코딩하는 핵산은 코돈 최적화에 의해 숙주 세균의 발현을 증가시킬 수 있다. 유전자 코드의 반복성은 하나를 초과하는 코돈에 의해 일부의 아미노산 인코딩을 허용하지만, 일부 코돈은 다른 코돈에 비해 "최적" 미만이며 이것은 일치하는 tRNA 그리고 다른 요인들의 상대적 가용성 때문이다(Gustafsson et al., 2004). 각 아미노산이 포유류 유전자 발현을 위한 최적의 코돈에 의해 인코딩되도록 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 서열의 변경 그리고 mRNA 불안정성이나 잠재 스플라이스 부위의 제거는 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 발현을 유의하게 강화시키는 것으로 나타났다(Scholten et al., 2006).
- [0292] 더욱이, 도입된 TCR 및 내생 TCR 사이의 틀린 짝짓기는 자가면역성에 대해 유의한 위험을 제기하는 특이성의 획득을 초래할 수 있다. 예를 들어, 혼합된 TCR 이합체의 형성은 적절하게 짝지어진 TCR 복합체의 형성에 이용할 수 있는 CD3 분자의 숫자를 감소시킬 수 있으므로, 도입된 TCR을 발현하는 세포의 기능적 결합성을 유의하게 감소시킬 수 있다(Kuball et al., 2007).
- [0293] 틀린 짝짓기를 감소하기 위해 도입된쇄의 내생 TCR과의 짝짓기 능력은 감소시키면서 쇠간 친화도를 촉진시키기 위해 본 설명의 도입된 TCR쇄의 C-말단 도메인을 변형시킬 수 있다. 이러한 전략에는 인간 TCR-알파 및 TCR-베타 C-말단 도메인을 이의 쥐 상대물(쥐 C-말단 도메인)로 교체, 제2 시스틴 잔기를 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타쇄로 도입하여 C-말단 도메인의 제2 쇠간 이황화 결합의 생성, TCR-쇄 및 TCR-베타쇄의 C-말단 도메인(' knob-in-hole'))에서 상호작용하는 잔기의 교환, 그리고 TCR-알파 및 TCR-베타쇄의 가변 도메인을 CD3ζ에 직접 융합(CD3ζ 융합) 등이 포함될 수 있다(Schmitt et al. 2009).
- [0294] 한 구현에서, 숙주 세포는 본 설명의 TCR을 발현하도록 공학제조된다. 바람직한 한 구현에서, 숙주 세포는 인간 T 세포나 T 세포 전구세포이다. 일부 구현에서, 이 T 세포나 T 세포 전구세포는 암 환자로부터 얻는다. 다른 구현에서, 이 T 세포나 T 세포 전구세포는 건강한 공여자로부터 얻는다. 본 설명의 숙주 세포는 치료할 환자에 대해 동종 또는 자가 세포이다. 한 구현에서, 숙주는 알파/베타 TCR을 발현하도록 형질전환된 감마/델타 T 세포이다.
- [0295] "약학 조성물"이란 의학적 환경에서 인간에서 투여하기에 적합한 조성물이다. 바람직하게, 약학 조성물은 무균 상태이며 GMP 지침에 따라 생산된다.
- [0296] 약학 조성물은 유리 형태 또는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 된 펩티드를 포함한다(위의 내용 참조). 한 양태에서, 본 문서에서 기술된 펩티드는 약학적으로 허용가능한 염의 형태이다. 다른 양태에서, 약학적 염의 형태인 펩티드는 결정성 형태이다.
- [0297] 한 양태에서, 본 문서에서 기술된 약학적으로 허용가능한 염은 약학적 용도에 허용가능한 범위 내에서 독성 프로파일을 지닌 염을 지칭한다.
- [0298] 여기서 사용되는 것처럼, "약학적으로 허용가능한 염"은 펩티드가 산 또는 제제의 염기 염을 만들며 변형되는 공개된 펩티드의 유도체를 말한다. 예를 들면, 산성 염은 적당한 산과의 반응을 가진 자유 염기(일반적으로 중성 NH2기가 있는 약물의 중성 형태)로부터 제조된다. 산 염을 준비할 때 적당한 산은 예를 들면, 염산, 브롬화 수소산, 황산, 질산 인산과 같은 같은 무기산 뿐만 아니라 초산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 수산, 말산,

말론산, 호박산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 벤조산, 계피산, 맨델릭산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산같은 유기산을 포함한다. 반대로, 펩티드에서 나타날 수 있는 산성 모이어티의 염기 염의 제조는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 트리메틸아민과 같은 약학적으로 허용 가능한 염기를 사용한다.

[0299] 한 양태에서, 약학적으로 허용가능한 염은, 본 문서에서 기술된 펩티드의 용해도 및/또는 안정성을 증가시킬 수 있다. 다른 양태에서, 본 문서에서 기술된 약학적 염은 상응하는 담체 펩티드 또는 복합체로부터 예를 들어 적절한 산이나 염기와 본 문서에서 기술된 펩티드나 복합체를 반응시켜 통상적인 방법으로 제조할 수 있다. 다른 양태에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 결정성 형태 또는 반결정성 형태이다. 또 다른 양태에서, 약학적으로 허용 가능한 염은 예를 들어 다음에 기술된 것들을 포함할 수 있다: Handbook of Pharmaceutical Salts (약학적 염의 핸드북): Properties, Selection, and Use By P. H. Stahl and C. G. Wermuth (Wiley-VCH 2002) 그리고 L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, in "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology(제약 기술의 백과사전)". J. Swarbrick and J. C. Boylan, Vol.13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, pp. 453-499, 이 참조문헌은 모두 그 전문이 여기에 포함된다.

[0300] 본 발명의 펩티드의 약학적으로 허용가능한 염 형태는 원래의(맨(naked)) 펩티드 즉, 약학적으로 허용 가능한 염이나 달리 변형된 형태가 아닌 것보다 안정성을 증가시킨다. 여기서 사용되는 증가된 안정성에는 다음의 측정가능한 감소나 절감이 포함된다: 탈아미드화, 산화, 가수분해, 이황화물 상호교환, 라세미화 및 가수분해. 펩티드의 안정성은 완제품으로 또는 생산 절차 동안이나 보관 동안에 평가가 가능하다. 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 형태의 펩티드는 시험관 내에서 충분한 안정성을 가지므로 약 0℃와 약 60℃와 같은 상업적으로 의미 있는 온도에서 적어도 1주일, 바람직하게는 적어도 1개월, 보다 바람직하게는 적어도 3개월 그리고 가장 바람직하게는 적어도 6개월과 같은 상업적으로 의미 있는 기간 동안의 보관을 허용한다. 안정성은 예를 들어 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)와 같은 당업자에게 알려진 일체의 물리화학적 특성화 기법을 사용하여 측정 이 가능하다.

[0301] 또한, 펩티드 염의 안정성은 혈장에서 덜 효소적인 분해(아미노펩티다제, 엑소펩티다제 및 합성효소에 의한 분해)에 의해 그리고/또는 원래의 펩티드에 비해 생체내 반감기의 개선을 통해 결정할 수 있다. MHC I 항원 제시를 위해 생성된 원래 9합체 펩티드는 세포막이나 MHC I 분자와 같은 다른 분자에 의해 결합되지 않는 한 세포 간 반감기가 단 몇 초인 것으로 판정되었다(Reits et al., Immunity. 2004; 20: 495-506).

[0302] 그 밖에 본 발명의 펩티드의 약학적으로 허용가능한 염은 수용액에서 개선된 용해도와 안정성을 나타낸다. Berge et al., Pharmaceutical Salts, J. Pharm. Sci. 1977; 66(1): 1-19. 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 형태의 펩티드는 수용액에서 적어도 4일 동안, 적어도 5일 동안, 적어도 6일 동안 그리고 더 바람직하게는 적어도 7일 동안 안정하다.

[0303] 특별히 바람직한 약학 조성물의 구현은 초산(아세트산염), 삼불화 초산 또는 염산(염화물)의 염으로의 펩티드를 가진다.

[0304] 바람직하게는, 본 발명의 약제는 백신과 같은 면역치료제이다. 이는 환자의 영향을 받은 기관에 직접적으로 투여될 수 있거나 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.로서 전신에 투여되거나 또는 환자에게서 또는 나중에 환자에게 투여될 인간 세포주에 생체 외로 적용될 수도 있거나 또는 나중에 환자에게 다시 투여될 환자로부터 유래하는 면역 세포의 부분 집단에 시험관 내로 사용될 수도 있다. 만약 핵산이 시험관 내에서 세포에 투여 되면, 인터루킨-2와 같은 면역 유도 사이토카인과 함께 발현되는 것이 유용할 수도 있다. 펩티드는 상당히 순도가 높을 수도 있고, 또는 면역-유도 보조제(아래 참조)와 합성되어 있거나 또는 면역-유도 사이토카인과 함께 합성체로 사용되거나, 또는 리포솜과 같은 적당한 전달 체계와 함께 투여될 수도 있다. 펩티드는 또한 keyhole limpet haemocyanin(KLH) 또는 mannan(WO 95/18145 및 (Longenecker et al(1993) 참조)과 같은 적당한 담체와 함께 복합될 수도 있다. 펩티드는 또한 꼬리표를 달거나, 융합 단백질이거나 혼성 분자일 수도 있다. 본 발명에 서열이 주어진 이 펩티드들은 CD4 또는 CD8 T 세포를 자극할 것으로 기대한다. 하지만 CD8 T 세포의 자극은 CD4 T 조력 세포에 의해 제공되는 조력의 존재에 더 효율적이다. 그러므로 CD8 CTL을 자극하는 MHC 클래스 I 에피토프의 경우, 융합 짝 또는 하이브리드 분자의 선택은 CD4-양성 T 세포를 자극한다. CD4-와 CD8-자극유도 에피토프는 이 분야에서 잘 알려졌고 본 발명에서 식별된 것들을 포함한다.

[0305] 한 양태에서, 이 백신은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91을 명시하는 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 펩티드 그리고 적어도 하나의 추가적인 펩티드 바람직하게는 2개 내지 50개이고, 더 바람직하게는 2개 내지 25개이며, 보다 더 바람직하게는 2개 내지 20개이고 가장 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개의 펩티드를 포함한다. 펩티드(들)는 하나 또는 그 이상의 특정한 TAA에서 유도되었고 이는 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합할 수 있다.

- [0306] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 펩티드 또는 펩티드 변이체를 인코딩하는 핵산(예를 들면 폴리뉴클레오티드)에 대한 정보를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이의 조합일 수 있으며, 한 가닥 및/또는 이중 체로 되어 있을 수 있고, 또는 본래의 형일 수도 또는 예를 들면 포스포로티오에이트 백본을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드의 안정화된 형태로 되어 있을 수도 있으며, 펩티드를 코딩하는 한 인트론을 포함할 수도 또는 그렇지 않을 수도 있다. 물론, 자연적으로 발생하는 펩티드 결합에 의해 결합이 된 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해서 인코딩될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터에 대한 설명을 제공한다.
- [0307] 특히 DNA와 같은 폴리뉴클레오티드를 예를 들면 보완 응집성 말단을 이용하여 연결하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들면, 보완 동종중합체 트랙트가 벡터 DNA에 삽입될 DNA 분절에 추가될 수 있다. 벡터와 DNA 분절은 이후 보완 동종중합체 꼬리와 함께 수소 결합을 이용하여 재조합 DNA 분자를 형성할 수 있다.
- [0308] 하나 또는 그 이상의 제한 부위를 포함하는 합성된 링커는 DNA 분절과 벡터를 결합하는 다른 방법을 제시한다. 여러 가지의 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는 합성 링커는 상업적으로 International Biotechnologies Inc.(New Haven, CN, USA)를 비롯한 곳에서 구입이 가능하다.
- [0309] 본 발명에서 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA를 변환하는 바람직한 방법은 Saiki RK 등(Saiki et al., 1988)에 의해 발표된 바 있는 폴리머라아제 연쇄 반응을 이용한다. 이 방법은 예를 들면 적당한 제한 부위를 만들어 적당한 벡터로의 DNA 도입 또는 이 분야에서 알려져 있는 DNA를 다른 용도를 위해 변환하는 데에 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용된다면, 수두 또는 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.
- [0310] DNA(또는 레트로 바이러스 벡터일 시, RNA)는 그 후 적당한 숙주에서 발현되며 이는 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 가지고 있는 폴리펩티드를 생성한다. 따라서, 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 DNA는 알려진 기술과 여기에서 배울 수 있는 것과 함께 적당히 사용되어 적당한 숙주 세포를 본 발명의 폴리펩티드를 발현하고 생성하는 것으로 형질전환을 시키는 데에 사용된다 이러한 기법은 예를 들어 다음에 공개되어 있다: 미국 특허 번호 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075 및 4,810,648.
- [0311] 본 발명의 합성물을 만드는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우, RNA)는 많은 종류의 다른 DNA 서열과 결합되어, 적당한 숙주로의 도입을 유도할 수 있다. 동반 DNA는 숙주의 특성, DNA를 숙주로 도입하는 방법, 및 에피소말 유지 또는 통합이 필요한 지에 따라 결정될 것이다.
- [0312] 일반적으로, DNA는 플라스미드와 같은 발현 벡터로 발현을 위한 적합한 방향 및 올바른 리딩 프레임에 맞추어 삽입된다. 필요할 경우, DNA는 바람직한 숙주에 의해 인식되는 적당한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오티드 서열(하지만, 이 제어는 대부분의 경우 발현 벡터 내에 이미 존재한다)과 함께 연결될 수도 있다. 벡터는 그 후 숙주로 기본적인 기술을 통해 도입된다. 보통, 모든 숙주가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 세포를 선택하는 것이 필요할 것이다. 하나의 선택 기술은 발현 벡터에 필요한 형질전환된 세포에서 선택이 가능한 예를 들면, 항생제 저항력과 같은, 제어 요소를 통합시키는 것이다.
- [0313] 다른 방법으로는, 이러한 선택이 가능한 특성이 다른 벡터에 있을 수도 있으며, 이는 바람직한 숙주 세포를 동시 형질전환하는 데에 사용된다.
- [0314] 본 발명의 재조합 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 충분한 시간 동안 적당한 상태에서 당업자에 의해서 배양되고 이는 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하며, 이는 후에 회복된다.
- [0315] 박테리아(예: 대장균(*E. coli*)과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들면 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류(예를 들면 아스페르길스 스피시스(*Aspergillus spec.*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포 등의 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직하게는, 그 체계는 ATCC Cell Biology Collection에서 구할 수 있는 CHO 세포와 같은 포유류 세포일 수 있다.
- [0316] 구조성 발현을 위한 전형적인 포유류 세포 벡터 플라스미드는 CMV 또는 SV40 촉진제와 적당한 폴리 A 꼬리 및 네오마이신과 같은 저항 표지자를 포함한다. 하나의 예는, Pharmacia(미국 뉴저지주 Piscataway)에서 구할 수 있는 pSVL이다. 유도가능 포유류 발현 벡터의 예는 pMSG이며 이 또한 Pharmacia에서 구할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 벡터는 pRS403-406과 pRS413-416이며 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems(미국 캘리포니아주

La Jolla 92037)에서 구할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효소 통합 플라스미드(YIps)이며 이는 효소 선택 표지자 HIS3, TRP1, LEU2와 URA3을 통합한다. 플라스미드 pRS413-416는 효모 동원체 플라스미드(Ycps)이다. (예를 들면 Sigma-Aldrich로부터 입수한), CMV 프로모터 기반 벡터는 일시적인 또는 안정된 발현, 세포질 발현 또는 분비, 및 FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT 등의 다양한 조합으로 N-말단 또는 C-말단 표지 등을 제공한다. 이러한 융합 단백질은 재조합 단백질의 검출, 정제와 분석을 가능하게 한다. 듀얼-태깅된 융합은 검출의 유연성을 제공한다.

[0317] 강한 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 조절 영역은 구성적인 단백질 발현 수준을 높게는 COS 세포에서 1mg/L까지 구동시킨다. 좀 더 효능이 약한 세포주에서는, 단백질 수준이 전형적으로 약 0.1mg/L 정도이다. SV40 복제 원점이 있음으로서 SV40, 복제를 가능하게 하는 COS 세포 DNA 복제의 수준이 높은 결과를 낳는다. CMV 벡터는 예를 들면 세균 세포에서의 복제를 위한 pMB1(pBR322의 유도체) 기원, 즉, 세균, hGH polyA 및 f1 원천에서 압괴실린 내성 선택에 필요한 b-락타마아제를 포함할 수 있다. 프리-프로-트립신 리더(PPT) 서열을 포함하는 벡터는 FLAG 융합 단백질을 ANTI-FLAG 항체, 수지 및 플레이트를 사용하여 정제하기 위한 배양 배지로 분비하도록 방향을 정할 수가 있다. 다른 벡터와 발현 체계는 여러 가지의 숙주 세포 사용에 대해 널리 알려져 있다.

[0318] 다른 구현에서는 본 발명의 2개 이상 펩티드나 펩티드 변이체가 인코딩 됨으로써 연속적인 순서로 발현된다("줄로 엮은 유리알" 구조와 유사). 그렇게 함으로써 펩티드나 펩티드 변이체는 예를 들어 LLLLLL과 같은 링커 아미노산의 퍼짐에 의해 함께 연결 또는 융합될 수 있으며 또한 그 사이에 추가의 펩티드 없이 연결될 수 있다. 이러한 구조들은 암 요법에서도 사용할 수 있으며 MHC I 및 MHC II 모두가 연관되는 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0319] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 벡터 구성에 의해 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.. 숙주 세포는 원핵 세포이거나 진핵 세포일 수 있다. 세균 세포가 일부의 상황에서 바람직한 원핵 숙주 세포일 수 있으며, 보통 예를 들면 Bethesda Research Laboratories Inc.(미국 메릴랜드주 Bethesda)에서 구할 수 있는 *E. coli* 균주 DH5, 그리고 American Type Culture Collection(ATCC)(미국 메릴랜드주 Rockville, No ATCC 31343)의 RR1과 같은 *E. coli* 균주이다. 바람직한 진핵 숙주 세포는 효모, 곤충, 포유류 세포를 포함하고, 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유아세포와 대장 세포주 등의 척추 동물 세포가 바람직하다. 효모 숙주 세포는 YPH499, YPH500 및 YPH501를 포함하며, 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems(미국 캘리포니아주 La Jolla, 92037)에서 구입이 가능하다. 바람직한 포유류 숙주 세포는 ATCC에서 구입이 가능한 CCL61로 알려져 있는 중국 햄스터 난소 세포, CRL 1658로 알려져 있는 스위스 생쥐 배아 세포 NIH/3T3, CRL 1650 세포로 알려져 있는 원숭이 신장 유도 COS-1 세포와 293 세포로 알려져 있는 인간 배아 신장 세포를 들 수 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이며 이는 배칼로바이러스 발현 벡터에 의해 세포로 감염될 수 있다. 발현을 위한 적당한 숙주 세포의 선택에 대한 개관은 예를 들면 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 및 당해 분야의 숙련자에게 공지된 문헌에서 찾을 수 있다.

[0320] 적당한 세포 숙주를 본 발명의 DNA 구성으로 형질전환하는 것은 보통 사용되는 벡터의 유형이 따라 결정되는 잘 알려진 방법으로 완성된다. 원핵 숙주 세포의 형질전환에 대해서는 예를 들면 Cohen 등(Cohen et al., 1972) 및 (Green and Sambrook, 2012)을 참조한다. 효모 세포의 형질 전환은 Sherman 등(Sherman et al., 1986)에 나와 있다 Beggs의 방법 또한 유용하다(Beggs, 1978). 척추 동물 세포에 대해서는, 이러한 세포의 형질주입에 유용한 시약, 예를 들면 칼슘 인산염과 DEAE-덱스트란 또는 리포솜 공식에 대한 내용은 Stratagene Cloning Systems, 또는 Life Technologies Inc.(미국 메릴랜드주 Gaithersburg 20877)에 나와 있다. 전기 천공법 역시 형질전환 또는/및 세포를 감염시키는 데에 유용하며 이는 효소 세포, 박테리아 세포, 곤충세포 및 척추동물 세포 형질전환에 잘 알려져 있다.

[0321] 성공적으로 형질전환이 된 세포는, 즉 본 발명의 DNA 구성을 가지고 있는 세포는, 잘 알려진 PCR과 같은 기술로 식별된다. 다른 방법으로는, 상청액에 존재하는 단백질은 항생제를 사용함으로써 검출될 수 있다.

[0322] 본 발명의 특정한 숙주 세포, 예를 들면 박테리아, 효소 및 곤충 세포와 같은 세포는 본 발명의 펩티드의 준비에 유용하다는 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다른 숙주 세포 또한 특정한 치료 방법에 유용할 수도 있다. 예를 들면, 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포는 적당한 MHC 분자에 적재가 되도록 하는 본 발명의 펩티드를 발현하는 데 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 핵산 또는 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0323] 바람직한 구현에서, 숙주 세포는 항원 제시 세포이며, 특히 수지상 세포 또는 항원 제시 세포이다. 전립선암 인

산효소(PAP)를 포함하는 재조합 융합 단백질로써 적재된 APC가 무증상이나 최소 증상의 전이성 HRPC(Sipuleucel-T)의 치료를 위해 2010년 4월 29일 미국 식품의약품청(FDA)에 의해 승인되었다(Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

- [0324] 본 발명의 다른 양태는 펩티드 또는 그의 변이체의 숙주 세포를 배양하고 펩티드를 숙주 세포 또는 배지에서 격리하는 것을 포함한 생산 방법을 제공한다.
- [0325] 펩티드에 대한 다른 구현에서는, 핵산 또는 발명의 벡터 발현이 의학에서 사용된다. 예를 들어, 펩티드나 그 변이체는 정맥내(i.v.) 주사, 피하(s.c.) 주사, 피내(i.d.) 주사, 복강내(i.p.) 주사, 근육내(i.m.) 주사용으로 제조될 수 있다. 펩티드 투여의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m., 및 i.v. 투여를 포함한다. DNA 투여의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v. 투여를 포함한다. 펩티드 또는 DNA의 50 µg 및 1.5 mg, 바람직하게는 125 µg 내지 500 µg 사이의 용량이 각각의 펩티드 또는 DNA에 따라서 투여될 수 있다. 이러한 범위의 용량이 이전의 임상시험에서 성공적으로 사용된 바 있다(Walter et al., 2012).
- [0326] 면역 접종에 사용된 폴리뉴클레오티드는 상당히 순도가 높거나 적당한 벡터 또는 전달 체계에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 핵산을 설계하고 도입하는 방법들이 업계에 잘 알려져 있다. 개요는 예를 들어, Teufel 등에 제공되어 있다(Teufel et al., 2005). 폴리뉴클레오티드 백신은 만들기가 쉽지만, 이들 벡터의 면역 반응을 유도하는 동작 모드는 완전히 이해가 되지 않았다. 적당한 벡터와 전달 체계는 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노 연관 바이러스 또는 한 개 이상의 바이러스를 포함하는 혼성체 등의 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 체계는 양이온 지질과 양이온 중합체를 포함하고 있으며 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자 총"과 같은 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 펩티드 또는 핵산에 의해 인코딩된 펩티드는 융합 단백질이 될 수도 있고, 예로서는 위에서 언급한 각각의 반대 CDR을 위한 T 세포를 유도하는 에피톱을 들 수 있다.
- [0327] 본 발명의 약제는 하나 또는 그 이상의 보조제를 포함할 수 있다. 보조제는 면역 반응을 비특이적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질이다(예: 항원에 대한 CD8-양성 T 세포 및 조력 T(TH) 세포에 의해서 증대된 면역 반응). 따라서, 본 설명에서 보조제는 유용한 약제 구성이라고 간주할 수 있다. 적당한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스(), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 플라젤린 또는 플라젤린에서 유도된 TLR5 리간드, FLT3 리간드, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(ALDARA®), 레스퀴미드, ImuFact IMP321, IL-2, IL-13, IL-21과 같은 인터루킨, 인터페론 알파 또는 베타, 또는 이들의 폐결화된 유도체, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, 주브이툼(JuvImmune), LipoVac, MALP2, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, 유증수형과 수증유형 에멀전, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, PepTel® 벡터 시스템, PLG와 텍스트란 극미립자, 탈락토페린, SRL172, 비로솜(Virosomes) 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타글루칸, Pam3Cys, 사포닌에서 유도된 아퀼라스 QS21 스틸물론, 마이코박테리아 추출물과 합성 세균의 세포벽 모방제, 및 다른 리비의 데톡스(Ribi's Detox), 쿠일(Quil), 또는 슈퍼포스(Superfos)와 같은 독점 보조제 등이 있다. Freund's 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 여러 면역적 보조제(예: MF59)는 수지상 세포에 특이적이고, 그 제조 방법은 이전에 설명된 바 있다(Allison and Krummel, 1995). 또한, 사이토킨도 사용될 수 있다. 여러 사이토킨은 수지상 세포의 림프 조직으로의 이동에 영향을 주는데 직접적으로 연관된 바 있으며(예: TNF-), 이는 수지상 세포의 더 효율적인 T 림프구에 대한 항원 제시 세포로의 성장을 가속시키고(예: GM-CSF, IL-1 및 IL-4) (미국 특허 번호 5,849,589, 구체적으로 여기에 그 전문이 참조 문헌으로 포함됨) 면역보조제의 역학을 한다(예: IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-알파, IFN-베타)(Gabrilovich et al., 1996).
- [0328] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 백신 환경에서 보조제의 효율성을 높이는 것으로 나타났다. 이 이론에 국한하지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 톨-유사 수용체(TLR), 특히 TLR9를 통해 천성(비-적응) 면역 체계를 활성화시킨다. CpG에 의해 유도된 TLR9의 활성화는 펩티드 또는 단백질 항원, 살아 있거나 죽은 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포 백신 및 예방적 및 치료적 백신의 다당류 접합체를 포함한 넓은 종류의 항원에 대한 항원 특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게 이는 수지상 세포의 성숙 및 차별화를 향상시키고 이는 TH1 세포의 활성화를 향상시키며 강한 세포독성 T 림프구(CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움이 없을 때에도 향상시킨다. TLR9 자극에 의해 일어난 TH1 바이러스는 보통 TH2 바이러스를 촉진시키는 alum 또는 비완성된 프로인트 보조제(Freund's adjuvant(IFA))와 같은 백신 보조제가 존재할 때도 유지된다. CpG 올리고뉴클레오티드는 다른 보조제와 함께 제조되거나 함께 투여될 시 또는 특히 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 얻어 내기 위해 필요한 미세입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 비슷한 제약으로 되어 있을 경우 더 큰 보조제 활동을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 여러 연구에서 보여진 바 있듯이 CpG가 없을 때 백신 전체 용량이

일으키는 항체 반응 수준으로 항원의 용량을 약 두 배 정도 줄일 수 있도록 한다(Krieg, 2006). 미국 특허 번호 6,406,705 B1은 CpG 올리고뉴클레오타이드, 비핵산 보조제 및 항원 특정 면역 반응을 일으키는 항원의 병용에 대해 설명한다. CpG TLR9 길항제는 Mologen(Berlin, Germany)에 의해 만들어진 dSLIM(double Stem Loop Immunomodulator)이며 이는 본 발명의 제약 조성의 바람직한 성분이다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9 등의 다른 TLR 결합 분자 또한 사용이 가능하다.

[0329] 다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 화학적으로 변형된 CpGs(예: CpR, Idera), Poly(I:C)와 같은 dsRNA 유사체 및 이의 유도체(예: AmpliGen®, Hiltonol®, poly-(ICLC), poly(IC-R), poly(I:C12U)), 면역활성적인 작은 분자 및 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 및 사이클로포스아미드, 수니티닙, 베바시주맵, 셀레브렉스, NCX-4016, 실테나필, 타달라필, 바르테나필, 소라페닙, 테모졸로마이드, 템시롤리무스, XL-999, CP-547632, 파조파닙, VEGF 트랩, ZD2171, AZD2171, 안티-CTLA4 및 SC58175와 같은 항원을 들 수 있으며 이는 치료적으로 또는 보조제의 역할을 할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 보조제와 첨가제의 양과 농도는 특별히 다른 실험할 필요 없이 기술이 뛰어난 개인에 의해서 쉽게 결정될 수 있다.

[0330] 바람직한 보조제들은 항-CD40, 이미퀴모드, 레시퀴모드, GM-CSF, 사이클로포스파마이드, 수리티닙, 베바시주맵, 인터페론-알파, CpG, 올리고뉴클레오타이드 및 유도체, poly-(I:C) 및 유도체, RNA, 실테나필, 그리고 PLG 또는 비로숨 미립자 제제이다.

[0331] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 그래눌로사이트 마크로파지 콜로니-자극 인자(GM-CSF, 사르가라모스틴), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드, 레시퀴모드 및 인터페론-알파같은 콜로니-자극 인자로 구성된 군에서 선택된다.

[0332] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 그래눌로사이트 마크로파지 콜로니-자극 인자(GM-CSF, 사르가라모스틴), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 및 레시퀴모드와 같은 콜로니-자극 인자로 구성된 군에서 선택된다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 또는 레시퀴모드이다. 훨씬 더 바람직한 보조제는 Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC(Hiltonol®) 및 anti-CD40 mAB 또는 이들의 조합들이다.

[0333] 이 조성물은 피하, 피부내, 근육내와 같은 비경구 투약 또는 경구 투약에 사용된다. 이를 위해, 펩티드 그리고 선택적으로 다른 분자들을 약학적으로 허용되는, 바람직하게는 수용성 담체에 용해 또는 현탁한다. 추가로, 이 조성물은 완충제, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등의 부형제를 포함할 수 있다. 또한 펩티드는 사이토킨 같은 면역 자극 물질과 함께 투여될 수 있다. 이러한 성분에 사용될 수 있는 방대한 부형제 목록은 예를 들어 A. Kibbe, 약학적 부형제 핸드북(Kibbe, 2000)에서 확인할 수 있다. 이러한 조성물은 선종성 또는 암성 질병의 방지, 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예시적 제제는 예를 들어 EP2112253에서 찾아볼 수 있다.

[0334] 한 양태에서, 본 문서에서 기술된 펩티드나 다른 분자가 수용성 담체와 결합될 수 있다. 한 양태에서, 상기 수용성 담체는 이온 교환제, 알루미늄, 스테아린산 알루미늄, 스테아린산 마그네슘, 레시틴, 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질, 인산염과 같은 완충 물질, 글리신, 소르빈산, 소르빈산 칼륨, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 황산 프로타민, 인산 수소 이나트륨, 인산 이칼슘, 인산 수소 칼륨, 염화 나트륨, 아연 염, 콜로이드 실리카, 규산 마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 아세트산 폴리비닐피롤리돈 비닐, 셀룰로스 기반 물질(예: 미결정 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 아세테이트 숙신네이트, 프탈산 히드록시프로필 메틸셀룰로스), 전분, 유당 일수화물, 만니톨, 황산 트레할로스 나트륨 라우릴 및 나트륨 크로스카멜로스과 같은 염이나 전해질, 폴리에틸렌 글리콜, 카르복시 메틸셀룰로스 나트륨, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로부터 선택된다.

[0335] 한 양태에서, 상기 수용성 담체는 본 문서에서 기술된 그러한 성분들과 같은 물이 아닌 담체 성분과 물이 합쳐진 다중물 성분을 포함한다. 다른 양태에서, 상기 수용성 담체는 펩티드나 본 문서에서 기술된 다른 분자와 합쳐지면, 예를 들어 개선된 용해도, 유효성 및/또는 개선된 면역요법과 같은 개선된 물성을 부여할 수 있다. 추가로, 이 조성물은 완충제, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등의 부형제를 포함할 수 있다. 예를 들어 "약학적으로 허용가능한 희석제"에는 용매, 증량제, 안정화제, 분산제, 코팅, 향균제 및 항진균제, 등장성이며 흡수를 지연하는 제제 그리고 생리학적으로 호환성인 것들이 포함될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 희석제의 예에는 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 중 하나 이상 이들의 조합이 포함된다. 다수의 경우에서 예를 들어 트레할로스와 수크로스와 같은 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알코올 또는 염화나트륨을 그 조성물에 포함하는 것이 바람직한 것이다. 습윤제와 같은 약학적으로 허용가능한 물질이나 습윤제나 유

화제, 보존제 또는 완충제와 같은 보조 물질의 소량 또한 본 발명의 적용범위 내에 있다. 추가로, 이 조성물은 완충제, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등의 부형제를 포함할 수 있다.

[0336] 본 발명에 따른 백신에 의해 일어나는 면역 반응이 다른 세포 단계 및 다른 개발 단계에서는 암을 공격한다는 것을 인지하는 것이 중요하다. 더욱이, 암과 연관된 다른 신호전달 경로가 공격을 받는다. 이것은 단 하나 또는 여러 표적만을 다루는 백신에 비해 이점이며, 이로 인해 종양이 공격에 쉽게 적응(종양 탈출)하도록 유발할 수 있다. 더욱이, 모든 개별 종양들이 같은 패턴의 항원을 발현하는 것은 아니다. 그러므로 종양 연관된 여러 펩티드들의 조합은 모든 개별 종양이 적어도 표적의 일부를 갖도록 보장한다. 이 조성물은 각 종양이 여러 항원을 발현하도록 예상되며 또한 종양 성장 및 유지에 필요한 여러 독립적 경로를 다루도록 설계되었다. 그리하여 백신은 보다 큰 환자 모집단을 위해 "기성품으로" 쉽게 사용이 가능하다. 이는 백신으로 치료할 환자의 사전 선택을 HLA 형질정도로 제한할 수 있고, 항원 발현을 위해 어떠한 추가의 바이오마커 평가를 요구하지 않음을 의미하지만, 효능에 중요한 여러 표적들이 유도된 면역 반응에 의해 동시에 공격됨을 여전히 보장한다 (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

[0337] 여기서 사용된 "골격"이란 용어는 (예: 항원성) 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 말한다. 한 구현에서, 골격은 그것이 부착되는 객체를 (예: (제2) 항원 결합 모이어티) 표적 부위, 예를 들어 특정 유형의 종양 세포 또는 항원성 결정인자를 갖는 종양 기질(예: 현재 용도에 따른 MHC와 펩티드의 복합체)로 향하도록 지시할 수 있다. 또 다른 구현에서 골격은 그 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원을 통해 신호전달을 활성화할 수 있다. 골격은 항체 및 그 단편, 항체 중쇄 변수 영역 및 항체 경쇄 변수 영역을 포함하는 항체의 도메인에 결합하는 항원, 적어도 하나의 안키린 반복 모티프 및 단일 도메인 항원 결합(SDAB) 분자를 포함하는 결합 단백질, 압타머, (가용성) TCR 그리고 동중 또는 자가 T 세포와 같은 (변형된) 세포를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 어떤 분자가 표적에 결합하는 골격인지 평가하기 위해, 결합 분석을 수행할 수 있다.

[0338] "특이적" 결합이란 그 골격이 다른 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC 복합체보다 관심 대상의 펩티드-MHC 복합체에 더 잘 결합하며, 그 정도는 특정 표적이 포함된 세포를 줄일 수 있는 활성 분자로 무장한 골격이 특정 표적이 없는 다른 세포는 죽일 수 없으며 다른 펩티드-MHC 복합체를 제시하는 것을 의미한다. 교차반응성 펩티드-MHC의 펩티드가 자연적으로 발생하지 않는다면, 즉, 인간 HLA-펩티도로부터 유래되지 않는다면, 다른 펩티드-MHC 복합체에 대한 결합은 관련이 없다. 표적 세포 살해를 평가하는 검사는 당업계에 잘 알려져 있다. 이 검사는 변경되지 않는 펩티드-MHC 제시를 가진 표적 세포(일차 세포 또는 세포주) 또는 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC 수준이 도달되는 정도로 펩티드가 포함된 세포를 사용하여 수행해야 한다.

[0339] 각 골격은 라벨이 제공하는 신호의 존재나 부재를 판단함으로써 결합된 골격이 검출 가능하도록 제공하는 라벨링을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 골격은 형광 염료나 임의의 다른 해당되는 세포 표지자 분자를 사용하여 라벨링이 가능하다. 그러한 표지자 분자는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 형광 라벨링은(예를 들어 형광 염료에 의해 제공되는) 형광이나 레이저 스캐닝 현미경 또는 유세포 분석에 의해 결합된 압타머의 가시화를 제공할 수 있다.

[0340] 각 골격은 IL-21, 항-CD3, 항-CD28과와 같은 제2 활성 분자와 접합될 수 있다.

[0341] 폴리펩티드 골격에 대한 추가 정보는 예를 들어 WO 2014/071978A1의 배경 부분과 거기에 인용된 참조문헌을 참고한다.

[0342] 본 발명은 또한 압타머에 관한 것이다. 압타머란(예는 WO 2014/191359 및 여기에 인용된 문헌을 참조) 정의된 삼차원적 구조로 접힐 수 있으며 특정 표적 구조를 인식할 수 있는 짧은 단일 핵산 분자이다. 이것은 표적 요법의 개발에 필요한 적합한 대안인 것으로 보여진 바 있다. 압타머는 높은 친화도 및 특이성으로 다양한 복합체 표적에 선택적으로 결합하는 것으로 나타난 바 있다.

[0343] 세포 표면에 위치한 분자를 인식하는 압타머들이 지난 십 년 동안 식별되었으며 진단 및 치료 접근 방식을 개발하기 위한 수단을 제공한다. 압타머가 독성 및 면역원성을 거의 보유하지 않는 것으로 나타났으므로, 생의학 적용을 위한 유력한 후보이다. 실제로 압타머, 예를 들어 전립선 특이적 막-항원을 인식하는 압타머는 표적 대상의 요법을 위해 성공적으로 사용되어 왔으며 또한 생체 내 모델에서의 이중익식에 기능적인 것으로 나타난 바 있다. 더욱이, 특이적 종양 세포주를 인식하는 압타머가 식별된 바 있다.

[0344] DNA 압타머는 다양한 암 세포 그리고 특히 고형 종양으로부터 유래하는 것들을 위한 광범위 인식 성질을 밝히기 위해 선택 가능한 반면에, 비종양형성의 그리고 원발성의 건강한 세포는 인식되지 않는다. 식별된 압타머가 특이적 종양 아형을 인식할 뿐만 아니라 일련의 종양과 상호작용한다면, 이로 인해 압타머는 소위 광범위 진단 및

치료에 적용될 수 있다.

- [0345] 더욱이, 유세포 분석을 사용한 세포 결합 거동의 조사에 의하면 압타머는 나노몰 범위에서 매우 양호하고 뚜렷한 친화성을 드러내는 것으로 나타났다.
- [0346] 압타머는 진단 및 치료 목적으로 유용하다. 더욱이, 일부 압타머를 종양 세포가 취하며 그리하여 종양 세포 안으로의 siRNA와 같은 항암제의 표적 인도를 위한 분자 부형제로서 기능이 가능할 수 있다.
- [0347] 압타머는 세포와 조직 그리고 바람직하게는 현재 본 설명에 따른 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91의 어떤 것에 따른 서열로 구성되며 이를 포함하는 펩티드나 TCR과 MHC 분자와의 복합체에 대하여, 세포 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 기법을 사용하여 선택이 가능하다.
- [0348] 본 발명의 펩티드는 MHC/펩티드 합성물에 대한 특정 항체를 생성하고 개발하는데 사용될 수 있다. 이들은 병변 조직에 치료, 독성 물질 표적화 또는 방사능 물질로 사용될 수 있다. 이런 항체의 또 다른 사용은 PET 같은 이미징 목적을 위해 병변 조직의 방사성 핵종을 표적화 할 수도 있다. 이 사용은 작은 전이를 감지하거나 병든 조직의 크기와 정확한 위치를 결정하는데 도움이 될 수 있다.
- [0349] 그러므로, 본 발명의 다른 양태는 HLA-제한 항원과 복합되는 인간 주 조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II와 특이적으로 결합하는 재조합 항체의 생산 방법을 제공하는 것으로, 이 방법은 상기 HLA-제한 항원과 복합되는 가용성 형태의 MHC 클래스 I 또는 II 분자로써 상기 인간 주 조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II를 발현하는 세포를 포함하는 유전자 조작된 비인간 포유동물의 면역화; 상기 비인간 포유동물의 세포를 생산하는 항체로부터 mRNA 분자의 분리; 상기 mRNA 분자에 의해 인코딩된 단백질을 표시하는 파지 디스플레이 라이브러리의 생산; 및 상기 파지 디스플레이 라이브러리로부터 적어도 하나의 파지의 분리를 포함하며 상기 적어도 하나의 파지는 상기 HLA-제한 항원과 복합되는 상기 인간 주 조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II와 특이적으로 결합하는 상기 항체를 나타낸다.
- [0350] 본 발명의 다른 양태는 HLA 제한 항원과 복합되는 인간 주 조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 것으로 이 항체는 바람직하게는 다클론 항체, 단클론 항체, 양특이성 항체 및/또는 키메라 항체이다.
- [0351] 그러한 항체 및 단일쇄 클래스 I 주조직 적합 복합체의 생산을 위한 해당 방법들 그리고 이러한 항체의 생산을 위한 다른 도구들은 WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 및 출판물(Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003)에 공개되어 있으며, 이들은 본 설명의 목적을 위해 그 전문이 참조 문헌에 명백히 포함되어 있다.
- [0352] 바람직하게는 항체는 20 나노몰 미만의 바람직하게는 10 나노몰 미만의 결합 친화력으로써 복합체와 결합하는데, 이는 본 발명의 문맥 상 "특이적"으로 간주된다.
- [0353] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택된 서열 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 대해 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 동등한) 이의 변이체 또는 상기 펩티드와 T 세포 교차반응을 유도하는 이의 변이체를 포함하는 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 전장 폴리펩티드가 아니다.
- [0354] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91로 구성된 군으로부터 선택된 서열 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 대해 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 동등한) 이의 변이체에 관한 것으로, 상기 펩티드나 변이체가 갖는 전체 길이는 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개의 아미노산이다.
- [0355] 본 발명은 또한 인간 주 조직적합, 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖는 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.
- [0356] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.
- [0357] 본 발명은 또한 본 발명에 의한 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 (화학적으로) 변형되거나/며 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0358] 본 발명은 또한 본 발명에 의한 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 특히 HLA-DR 항원-연관된 불변쇄(Ii)의 N-말단을 포함하는 융합 단백질의 일부이거나 또는 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는

안으로) 융합된다.

- [0359] 본 발명은 또한 본 발명이 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것으로, 단 펩티드가 완전한(전체) 인간 단백질은 아니다.
- [0360] 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.
- [0361] 본 발명은 더욱 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0362] 본 발명은 또한 의학에서 특히 흑색종의 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0363] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 또는 전에 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0364] 본 발명은 또한 항원 제시 세포, 바람직하게는 수지상 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0365] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드를 생산하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양 및 상기 숙주 세포나 그 배양 배지로부터 펩티드의 분리를 포함한다.
- [0366] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.
- [0367] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 항원 제시 세포가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91을 포함하는 상기 펩티드 또는 상기 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.
- [0368] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 본 발명에 따른 방법에 의해 생산된 활성화 T 세포에 관한 것이다.
- [0369] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 표적 세포가 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 효과적인 숫자의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0370] 본 발명은 또한 설명한 일체의 펩티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 또는 본 발명에 따른 활성화된 세포 독성 T 림프구를 약제로서 또는 약제의 제조에서의 사용에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로 상기 약제가 암에 대해 활성을 갖는다.
- [0371] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로 상기 약제가 백신이다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로 상기 약제가 암에 대해 활성을 갖는다.
- [0372] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로, 상기 암 세포는 두경부 편평세포 암종 세포 또는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관암, 뇌암, 만성 림프구성 백혈병, 결장직장 암종, 식도암, 담낭암, 위암, 간세포암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암, 소세포 폐암, 방광암 및 자궁암과 같은 기타 고형이나 혈액 종양 세포이다.
- [0373] 본 발명은 또한 두경부 편평세포 암종의 진단 및/또는 예후에 사용될 수 있는 여기서 "표적"이라 부르는 본 발명에 따른 펩티드에 근거하는 특정 표지자 단백질 및 생체표지자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암 치료를 위해 이러한 신규 표적의 사용에 관한 것이다.
- [0374] 용어 "항체" 또는 "항체들"은 여기에서 광범위한 의미로 사용되며, 다클론 및 단클론 항체를 둘 다 포함한다. 무손상 또는 "온전한" 면역 글로불린 항체 분자뿐만 아니라, 용어 "항체"에 포함되어 있는 것은 그런 면역글로불린 분자와 인간화된 버전의 면역글로불린 버전의 단편(예: CDR, Fv, Fab 및 Fc 단편) 또는 중합체이며, 이 단편은 본 설명에 따른 바람직한 특성(예를 들면, 두경부 편평세포 암종 표지자 (폴리)펩티드의 특정 결합, 높아진 수준의 두경부 편평세포 암종 표지자 유전자를 발현하는 암 세포에 독소 전달, 및/또는 두경부 편평세포 암종 표지자 폴리펩티드의 활성 억제)을 나타낸다.
- [0375] 가능한 한, 본 발명의 항체는 상용 소스에서 구입해야 한다. 본 발명의 항체는 잘 알려진 방법을 통해서 만들어질 수도 있다. 이 분야의 기술자는 전장 두경부 편평세포 암종 표지자 폴리펩티드 또는 그 단편이 발명의 항체를 만드는 데 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 항체를 생성하는 데에 사용될 폴리펩티드는 자연적인 원천에서 부분적으로 또는 완전히 정화될 수 있으며, 또는 재조합 DNA 기술을 이용하여 만들어질 수도 있다.
- [0376] 예를 들어, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91에 따른 폴리펩티드 또는 이의 변이체나 단편에 따른 펩티

드와 같은 본 발명에 따른 펩티드를 인코딩하는 cDNA는 원핵 세포(예: 세균) 또는 진핵 세포(예: 효모, 곤충 또는 포유동물 세포)에서 발현될 수 있으며, 그 다음 그 재조합 단백질을 정화시켜, 본 발명에 따른 항체의 생성에 사용되는 흑색종 표지 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론성 또는 다클론성 항체 제제를 생성하는데 사용할 수 있다.

[0377] 당업자는 두 개 이상의 다른 단클론 또는 다클론 항체의 조합의 생성을 의도하는 사용(예: ELISA, 면역조직화학, *생체 내* 이미징, 면역 독소 요법)에 요구되는 특이성 및 친화성을 갖는 항체의 획득 가능성을 최대화함을 인식할 것이다. 이 항체들은 그 항체들이 사용되는 목적에 의거하여 알려진 방법에 의해 바람직한 활성도에 대해 시험된다(예: ELISA, 면역조직화학, 면역요법 등; 항체의 생성과 시험에 관한 추가 지침은 예를 들어 Greenfield, 2014를 참고한다(Greenfield, 2014)). 예를 들어, 항체는 포르말린 고정 폐암이나 동결된 조직 분절의 ELISA 분석법, 웨스턴 블롯, 면역조직화학 염색으로 시험할 수 있다. 치료 또는 *생체 내* 진단용을 위한 항체는 초기의 *시험관 내* 특성화 이후, 알려진 임상 시험 방법에 따라 시험한다.

[0378] "단클론 항체"라는 용어는 여기서 상당한 균등질 항체 개체군에서 획득이 된 것을 말한다. 즉, 이 개체군이 포함하는 각각의 항체는 자연적으로 일어날 수 있는 소수의 돌연변이체를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 여기서 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 특정한 중 또는 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체의 서열과 상응하거나 일치하고,쇄의 나머지 부분은 다른 중 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체, 및 이러한 항체의 단편의 서열과 상응하거나 일치하고, 희망하는 상반되는 활동성을 보여주는 "키메라(chimeric)" 항체를 포함한다(미국 특허 번호 4,816,567, 여기에 그 전문이 참조 문헌으로 포함됨).

[0379] 본 발명의 단클론 항체는 하이브리도마 방법을 사용하여 준비될 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 생쥐 또는 다른 적당한 숙주 동물이 보통 면역성을 주는 작용제에 의해 면역되어, 면역성을 주는 작용제에 특정적으로 결합하는 항체를 생산하거나 이를 생산할 수 있는 능력을 가지고 있는 림프구를 유도해 낸다. 다른 방법으로는, 림프구는 *시험관 내*에서 면역될 수도 있다.

[0380] 단클론 항체는 또한 미국 특허 번호 4,816,567에서 설명된 바와 같은 재조합 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 인코딩하는 DNA는 손쉽게 격리되고 전통적인 방법을 사용하여 염기 서열 분석이 가능하다(예, 마우스 유래 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특정하게 결합할 수 있는 능력이 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써).

[0381] *시험관 내* 방법 또한 1가의(monovalent) 항체를 준비하는 데에 적당하다. 이 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 항체를 분할화시켜 항체의 단편을 특히 여기서는 Fab 단편을 생산할 수 있다. 예를 들면, 파파인을 사용하여 소화가 이루어질 수 있다. 파파인 소화의 예는 WO 94/29348 및 미국 특허 번호 4,342,566에 설명되어 있다. 항체의 파파인 소화는 보통 각각 하나의 항원 결합 위치 및 남은 Fe 단편을 포함한 Fab 단편이라 부르는 동등한 두 개의 항원 결합 단편을 생산한다. 펩신 처리는 하나의 F(ab')₂ 단편과 하나의 pFc' 단편을 제공한다.

[0382] 항체 단편도, 이가 다른 서열과 붙어 있든 그렇지 않든 간에, 이 단편의 활동력이 변경되지 않은 항체 또는 항체 단편에 비교할 시, 현저하게 바뀌거나 또는 손상이 되지 않는 한, 삽입, 삭제, 치환, 또는 특정한 위치의 또는 특정한 아미노산 잔기의 다른 선택된 변경을 포함할 수 있다. 이러한 변경은 이항화물 결합의 능력이 있는 아미노산의 제거/추가, 생체물 수명의 증가, 분비 특징의 변화 등의 추가적인 특성을 제공할 수 있다 어떤 경우에도, 항체 단편은 결합 활성, 결합 도메인에서의 결합 조절 등의 생활성물 성질을 소유하고 있어야 한다. 항체의 기능 또는 활동 범위는 단백질의 특정한 지역의 돌연변이 생성, 발현 및 이 발현된 폴리펩티드의 실험에 의해 확인될 수 있다. 이러한 방법은 이 분야의 기술자가 손쉽게 알 수 있는 기술이며 이는 항체 단편을 인코딩하는 핵산의 위치 특이적 돌연변이 생성을 포함할 수 있다.

[0383] 본 발명의 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체를 더욱 포함할 수 있다. 인간화된 형태의 비-인간(예, 쥐과 동물) 항체는 최소의 비-인간 면역글로불린 항체에서 유도된 서열을 포함하는 키메라 면역글로불린항체, 면역글로불린쇄 또는 이들의 단편(Fv, Fab, Fab' 또는 다른 항체의 항원 결합의 결과)이다. 인간화된 항체는 보완 결정 영역(complementary determining region(CDR))의 잔기가 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 비인간 종(공여 항체)의 CDR의 잔유물로 바뀐 요구되는 특이성, 친화도 및 수용력을 가진 인간 면역글로불린(수납 항체)이다. 일부 예에서는, 인간 면역글로불린의 Fv 구조(FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 교체된다. 인간화된 항체는 수납 항체 또는 수입된 CDR 또는 구조 서열의 어디에서도 찾을 수 없는 서열을 포함하기도 한다. 보통, 인간 항체는 변이성 도메인을 적어도 하나 또는 거의 대부분 두 개를 포함하며, 모든 또는 실질상 모든 CDR 범위는 비-인간 면역글로불린에 상응하고 모든 또는 실질상 모든 구조 범위는 인간 면역글로불린 일치 서열이다. 인간화된 항체는 이상적으로 적어도 보통 인간 면역 글로불린의 면역글로불린 불변 범위(Fc)의 한 부분 또한 포함할 것이다.

- [0384] 이 분야에서 비인간 항체를 인간화하는 방법은 잘 알려져 있다. 보통, 인간화된 항체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 비인간 근원에서 이에 도입된다. 이 비인간 아미노산 잔류들은 종종 "수입" 잔기이라고 일컬어지며, 이는 대개 "수입" 변수 도메인에서 출처한다. 인간화는 본질적으로 설치류의 CDR 또는 상응하는 인간 항체 서열의 CDR 서열을 인간의 것으로 교체하는 것으로 실행될 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 키메릭 항체(미국 번호 4,816,567)이며, 이 때 상당히 온전하지 않은 인간 변수 도메인이 비인간 종의 해당 서열로 치환되었다. 실제로, 인간화된 항체는 보통 여러 CDR 잔기 및 가능하게는 여러 구조 잔기가 이 설치류의 유사한 영역의 잔기와 치환된 인간 항체이다.
- [0385] 면역되었을 때, 내생의 면역글로불린 생성이 없는 중에 전체 인간 항체를 생산할 수 있는 유전자 변형 동물(예, 생쥐)이 사용될 수 있다. 예를 들면, 키메릭 배선 돌연변이 생쥐의 항체의 중쇄 결합 영역 유전자 동형 삭제는 내생 항체 생산의 완전한 억제 결과를 가져온다. 이러한 배선 돌연변이 생쥐로의 인간 배선 면역글로불린 유전자 정렬 이입은 항원이 존재할 때 인간 항체 생산의 결과를 낳을 것이다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리에서도 생산될 수 있다.
- [0386] 본 발명의 항체는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체에 의해서 피험자에게 투여된다. 보통, 적당한 약학적으로 허용 가능한 염이 제형을 등장 상태로 만들기 위해 제형에 사용된다. 약학적으로 허용 가능한 운반의 예로는, 링거 용액(Ringer's solution) 및 포도당 용액이 있다. 이 용액의 pH는 바람직하게는 약 5 내지 약 8 사이이며, 더 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5 사이이다. 더 많은 담체는 항체를 포함하는 세포간질이 막, 리포솜 또는 미세입자와 같은 형태로 되어 있는 고체 소수성 중합체 반투성의 세포간질과 같은 지속적인 방출 준비를 포함한다. 예를 들어, 투여 방법 및 투여되는 항체의 농도에 따라 어떤 담체가 더 바람직한지는 이 분야의 당업자에게는 명백할 것이다.
- [0387] 항체는 피험자, 환자 또는 세포에 주사(예, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내), 또는 주입과 같은 혈액으로서의 전달이 효율적으로 이루어 질 수 있는 다른 방법으로 투여될 수 있다. 항체는 국소뿐만 아니라 전신의 치료 효과를 얻기 위해 종양 내 또는 종괴 주위의 방법으로도 투여될 수도 있다. 국소 또는 정맥내 주사가 바람직하다.
- [0388] 항체 투여의 효율적인 용량과 일정은 경험적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정을 내리는 것은 이 분야의 기술 중의 하나다. 이 분야의 당업자는 투여되는 항체의 용량은 예를 들어 이 항체를 받는 대상, 투여 방법, 사용되는 특정한 항체의 종류 및 투여되는 다른 약들에 따라 달라진다는 것을 이해할 것이다. 단독으로 사용될 시 전형적인 항체의 일일 용량은 1 µg/kg 내지 100 mg/kg로 다를 수 있으며, 위에 언급된 요인을 고려할 때 이보다 더 높을 수도 있다. 바람직하게는 두경부 편평세포 암종의 치료를 위한 항체의 투여 후, 이 분야의 기술자들에게 알려진 다양한 방법으로 이 항체의 치료적 효능을 평가할 수 있다. 예를 들면, 치료를 받고 있는 시험대상자에서 암의 크기, 수자, 및/또는 분포 등이 종양 영상 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 항체의 투여가 없을 경우 발생할 질병 경과에 비교하여, 종양의 성장을 정지하고, 종양을 오그라들게 하고, 그리고/또는 새로운 종양의 성장을 예방하는 치료의 목적으로 투여된 항체는 효과있는 암의 치료라고 할 수 있다.
- [0389] 본 발명의 다른 양태는 특이적 펩티드-MHC 복합체를 인지하는 가용성 T 세포 수용체의 생산 방법을 제공하는 것이다. 이러한 가용성 T 세포 수용체는 특이적 T 세포 클론으로부터 생성 가능하며, 그 친화력은 보완결정 부위를 표적으로 하는 돌연변이유발성에 의해 증가시킬 수 있다. T 세포 수용체 선택의 목적 상, 파지 디스플레이를 사용할 수 있다(US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). 파지 디스플레이 동안 T 세포 수용체의 안정화 목적 상 그리고 약물로서의 실용적인 용도의 경우, 알파 및 베타쇄는 연계될 수 있으며, 예를 들어, 비선천적 이황화 결합, 기타 공유 결합(단일 쇠 T 세포 수용체) 또는 이합체화 도메인에 의해 연결된다(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). T 세포 수용체는 표적 세포에 대한 특정 기능의 실행을 목적으로 독소, 약물, 사이토킨(예를 들어 미국 2013/0115191 참고), 항-CD3 도메인 등과 같은 작용기 세포를 모집하는 도메인과 연결될 수 있다. 더욱이 이것은 입양 전달에 사용되는 T 세포에서 발견될 수 있다. 추가 정보는 WO 2004/033685A1 및 WO 2004/074322A1에서 찾을 수 있다. sTCR의 조합은 WO 2012/056407A1에 설명되어 있다. 이 생산에 관한 추가 방법들은 WO 2013/057586A1에 공개되어 있다.
- [0390] 그 밖에, 본 발명의 펩티드 및/또는 TCR 또는 항체 또는 다른 결합하는 분자는 생검 샘플에 근거한 병리학자의 암 진단을 확인하는 데 사용이 가능하다.
- [0391] 항체 또는 TCR은 생체 내의 진단 분석에 사용될 수도 있다. 일반적으로, 항체는 방사성핵종으로 라벨링되고(예, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ³H, ³²P 또는 ³⁵S) 면역섬광계수법(immunoscintigraphy)을 사용하여 종양의 위치가 결정될 수 있다. 한 구현에서는, 항체 또는 그 단편은 위에 언급된 언급된 단백질로 구성된 군으로부터

선택한 두 개 또는 그 이상의 단백질 표적의 세포와 도메인에 결합을 하고 친화도 값(Kd)은 $1 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ 미만이다.

- [0392] 진단의 용도로 사용되는 항체는 여러가지의 영상 방법으로 감지될 수 있는 적당한 프로브로 라벨이 될 수 있다. 프로브의 검출 방법은 형광, 광학, 공초점 및 전자 현미경, 자기 공명 단층 촬영 영상 및 분광기 형광 투시법, 전산화 단층 촬영과 양전자 방사 단층 촬영법을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 적당한 프로브는 플루오레세인, 로다민, 에오신과 다른 형광체, 방사성 동위 원소, 금, 가돌리늄과 다른 란타넘계열 원소, 상자성체의 이온, 플루오르-18 및 다른 양전자 방출 방사성 핵종 등을 포함하지만, 이에 국한되지 않는다. 또한, 프로브는 두개의 또는 그 이상의 기능을 가지고 있을 수 있으며, 여기에 나열된 하나 이상의 방법으로 검출할 수 있다. 이러한 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 여기에 나열된 프로브로 라벨이 될 수 있다. 이렇게 항체와 프로브를 연결하는 것으로는 이 분야에서 잘 알려진 것들 중에 프로브의 공유원자 연결, 프로브의 항체로의 편입, 및 프로브의 결합을 위한 키레이트 화합물의 공유원자 연결 등을 들 수 있다. 면역조직 화학을 위해서, 질병 조직 샘플은 신선하거나 냉동되었거나 또는 파라핀에 포매되어 포르말린과 같은 방부제로 고정되어 있을 수 있다. 고정되었거나 포매되어 있는 샘플을 포함하고 있는 조직 분절은 라벨링된 1차 항체 및 2차 항체와 접촉되며 여기서 항체는 제자리 단백질 발현의 검출에 사용된다.
- [0393] 본 발명의 다른 양태는 활성화된 T 세포와 항원 적재된 적당한 항원 제시 세포의 표면에서 시험관 내 T 세포를 항원이 본 발명의 펩티드라고 할 때 항원 특정 방식으로 활성화시키는 데 충분한 시간 동안에 발현되는 인간 클래스 I 또는 MHC 분자의 접착을 포함하는 시험관 내의 방법으로 생성하는 방법을 포함한다. 바람직하게는, 충분한 양의 항원이 항원 제시 세포와 함께 사용된다.
- [0394] 바람직하게는, 포유류 세포는 TAP 펩티드 트랜스포터가 결핍되어 있거나, 감소된 수준 또는 기능을 가지고 있다. TAP 펩티드 트랜스포터가 결핍되어 있는 적당한 세포로는 T2, RMA-S 및 초파리 세포를 들 수 있다. TAP이란 항원 처리에 관련된 트랜스포터를 일컫는다.
- [0395] 인간 펩티드 적재 결핍 세포주 T2는 Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA의 카탈로그 번호 CRL 1992에서 구입이 가능하고, 초파리 세포주 Schneider 2는 ATCC의 카탈로그 번호 CRL 19863에서 구입이 가능하며, 생쥐 RMA-S 세포주는 Ljunggren 등(Ljunggren and Karre, 1985)에서 묘사가 된 바 있다.
- [0396] 바람직하게는, 숙주 세포는 감염전에 대부분 MHC 클래스 I 분자를 발현하지 않는다. 또한 프로모터 세포가 B7.1, B7.2, ICAM-1 및 LFA 3과 같은 T 세포에 대한 공동자극 신호를 제공하는 데 중요한 분자를 발현하는 것이 바람직하다. 다수의 MHC 클래스 II 분자의 핵산 서열 및 동시자극 분자의 서열은 GenBank와 EMBL 데이터베이스에서 공개적으로 제공된다.
- [0397] MHC 클래스 I 에피토프는 항원으로 사용되는 경우, T 세포는 CD8-양성 T 세포이다.
- [0398] 만약 항원 제시 세포가 전달감염되어 그러한 에피토프를 발현한다면, 바람직하게는 그 세포는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91을 포함하는 펩티드 또는 이의 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.
- [0399] T 세포를 시험관 내에서 생성하는 여러 다른 방법도 사용될 수 있다. 예를 들어, 자가 조직 종양-침윤 림프구는 CTL의 생성에 사용이 가능하다. Plebanski et al. Plebanski 등(Plebanski et al., 1995)은 자가 조직 말초의 혈액(PLB)을 T 세포의 준비 시 사용한다. 더욱이 수지상 세포를 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄스시키거나, 또는 재조합 바이러스에 의한 감염에 의해 자가조직 T 세포의 생산도 가능하다. 또한 자가조직 T 세포의 생산에서 B 세포도 사용할 수 있다. 또한, 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄스된 또는 재조합된 바이러스에 의해 감염된 대식세포가 자가조직 T 세포의 준비 시 사용될 수 있다. S. Walter 등(Walter et al., 2003)은 인공 항원 제시 세포(aAPCs)를 사용하는 시험관 내 T 세포의 프라이밍을 기술하며, 이는 역시 선택된 펩티드에 대한 펩티드에 대해 T 세포를 생성하는 데에도 사용될 수 있다. 본 발명에서, aAPC는 미리 생성된 MHC:펩티드 복합체를 폴리스티렌 입자(마이크로 비드)의 표면과 커플링을 시키고 바이오틴-스트렙타비딘 생화학을 이용함으로써 생성되었다. 이 체계는 aAPC의 정확한 MHC 밀도를 제어할 수 있도록 허용하며, 이는 항원-특정 T 세포 반응을 혈액 샘플에서 높은 효율성으로 고- 또는 저-결항력을 선택적으로 유도해낼 수 있게 한다. MHC:펩티드 합성체를 제외하고, aAPC는 그들의 표면에 커플된 항-CD28 항원과 같은 동시-자극 활동을 가지고 다른 단백질을 운반해야 한다. 더욱이 이러한 aAPC-기반 체계는 종종 예를 들면, 인터루킨-12와 같은 사이토카인 등 적당한 용해 요소의 추가를 요구한다.
- [0400] 동종이계 세포는 T 세포의 준비에 역시 사용될 수 있으며 방법은 WO 97/26328에 더 자세하게 기술되어 있으며,

여기에 참조 문헌으로 포함되어 있다. 예를 들어, 초파리 세포와 T2 세포에 추가적으로, CHO 세포, 배컬로바이러스-감염 곤충 세포, 박테리아, 효소, 백시니아-감염된 표적 세포 등과 같은 다른 세포들도 항원을 제시하는 데에 사용될 수 있다. 또한 식물성 바이러스를 사용할 수 있다(예를 들어, Porta 등(Porta et al., 1994)을 참조). 이는 외부 펩티드의 제시를 위한 카우피 모자이크 바이러스의 높은 수확 체계로서의 개발을 기술한다.

- [0401] 이 실험의 펩티드에 대해 활성화된 T 세포는 치료에서 유용하다. 따라서, 본 발명의 더 나아간 양태는 앞서 말한 발명의 방법으로 획득할 수 있는 활성화된 T 세포에 대한 내용을 제공한다.
- [0402] 위에서 말한 방법으로 생성된 활성화된 T 세포는, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 91의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드를 이상 발현하는 세포를 선택적으로 인지한다.
- [0403] 바람직하게는, T 세포는 그의 TCR을 HLA/펩티드-합성체(예, 결합)와 상호작용을 함으로서 이런 세포를 인식한다. 이 T 세포는 효율적인 활성화된 T 세포의 숫자가 투여되었을 시 발명의 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자의 표적 세포를 죽이는 데 유용하다. 환자에게 투여된 T 세포는 위에서 기술된 바와 같이 환자에게 유도되고 활성화된다(즉, 이는 자가 조직 T 세포이다). 다른 방법으로는, T 세포는 환자에게 유도가 안 되고, 다른 개인에서 유도된다. 물론, 이 개인이 건강한 개인인 것이 바람직하다. 발명자들이 말하는 "건강한 개인"이라고 함은 개인이 전체적으로 좋은 건강을 가지고 있으며, 바람직하게는 충분한 면역 체계를 가지고 있으며, 더 바람직하게는, 손쉽게 실험되고 감지될 수 있는 어떤 질병도 겪고 있지 않다는 것이다.
- [0404] 생체 안에서, 본 발명에 따른 CD8-양성 T 세포는 종양 세포(이들은 가끔 MHC 클래스 II를 발현하기도 한다)이거나 또는 종양을 감싸고 있는 간질성 세포(종양 세포)(이는 가끔 MHC 클래스 II를 또한 발현하기도 한다(Dengjel et al., 2006)).
- [0405] 본 발명의 T 세포는 활성적인 치료 구성의 성분으로 사용될 수도 있다. 따라서, 발명은 본 발명의 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자의 표적 세포를 죽이고 환자에게 위에 정의된 바처럼 효율적인 T 세포의 숫자를 투여하는 방법을 제공한다.
- [0406] 본 발명자는 "비정상적으로 발현되는"이라는 구절에 의해, 폴리펩티드가 정상 수준에 비교했을 때 과다 발현되거나 또는 유전자가 종양이 유도된 조직에서는 침묵적이지만(silent) 종양에서는 발현되는 것 또한 의미한다. 본 발명자는 "과다 발현"이라는 구절에 의해, 폴리 펩티드가 정상 조직에서 존재하는 수준의 적어도 1.2배 이상으로 존재하는 것을 말하고, 바람직하게는 적어도 2배, 더 바람직하게는 적어도 5배 또는 10배로 존재하는 것을 의미한다.
- [0407] T 세포는 예를 들면 위에서 기술된 바와 같은 방법으로 얻어질 수 있다.
- [0408] 흔히 T 세포의 입양 전송이라고 불리우는 것에 대한 프로토콜은 이 업계에서 잘 알려져 있다. 그 리뷰는 다음에서 찾을 수 있다: Gattioni 등 및 Morgan 등(Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).
- [0409] 본 발명의 다른 양태에는 핵산이 클로닝되며 숙주 세포 바람직하게는 T 세포에 개입되는 T 세포 수용체를 생성하는 데 있어서 MHC와 복합된 펩티드의 사용이다. 다음 이 유전자 조합된 T 세포는 암의 요법을 위해 환자로 이 전시킬 수 있다.
- [0410] 본 발명의 모든 분자(즉, 펩티드, 핵산, 항체, 발현 벡터, 세포, 활성화된 T 세포, T 세포, T 세포 수용체 또는 이를 인코딩하는 핵산)가 병을 고치는 데에 있어서 면역 반응을 피할 수 있는 성질을 가진 세포에 포함되어 있는 것이 중요하다. 따라서, 본 발명에 포함되어 있는 어떤 분자든지 약제로 사용되거나 약제를 만드는 데에 사용될 수 있다. 이 분자는 단독으로 사용될 수도 있고, 어떤 알려진 분자와 함께 결합하여 사용될 수도 있다.
- [0411] 본 발명은 다음을 포함한 키트(kit)를 포함한다:
- [0412] (a) 위에 기술된 바와 같은 약학 조성물을 용액 또는 동결건조된 형태로 포함하고 있는 용기;
- [0413] (b) 임의적으로 희석제 또는 동결건조된 제형을 위한 재구성 용액을 포함하는 제2 용기; 및
- [0414] (c) 임의적으로(i) 용액의 사용 또는(ii) 동결건조된 제형의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서.
- [0415] 이 키트는 하나 이상의 (iii) 완충제, (iv) 희석제, (v) 필터, (vi) 주사바늘 또는 (vii) 주사기를 더욱 포함할 수 있다. 용기는 바람직하게는 병, 바이알, 주사기 또는 시험관이며 또한 반복사용 용기일 수 있다. 약학 조성물은 바람직하게는 동결건조된다.

- [0416] 본 발명에 사용되는 키트는 바람직하게는 동결건조되어 있는 약제를 적당한 용기와 이들의 재구성 및/또는 사용에 관한 지침서를 함께 포함한다. 적당한 용기는 예를 들면, 병, 바이알(예: 듀얼 챔버 바이알), 주사기(듀얼 챔버 주사기 등) 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리나 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성할 수 있다. 바람직하게는 키트 및/또는 용기에는 재구성 및/또는 사용에 필요한 지시사항을 나타내는 지침이 포함된다. 예를 들어, 라벨 상에서 동결건조된 제형을 상기 펩티드 농도로 재구성해야 한다고 지시할 수 있다. 라벨은 또한 약제가 피하투여가 가능한지 아니면 유용한지를 보여줄 수도 있다.
- [0417] 제형을 포함한 용기는 재구성된 약제의 반복된 투여를 가능하게 하는 다용도 바이알일 수 있다(예: 약 2 내지 6 회의 투여). 키트는 또한 적당한 희석제(예: 중탄산 용액)를 포함하는 제2 용기를 포함할 수도 있다.
- [0418] 희석제와 동결건조된 약제를 섞을 때는, 재구성된 약제의 최종 펩티드 농도가 바람직하게는 적어도 0.15 mg/mL/펩티드(= 75 µg)이고 바람직하게는 3 mg/mL/펩티드(= 1500 µg)를 넘지 않아야 한다. 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입 및 사용 설명서 등의 사용자의 입장에서 필요한 것을 더 추가로 포함할 수도 있다.
- [0419] 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 약학 조성물을 포함하는 하나의 용기를 다른 제품과 함께 또는 단독으로 포함하거나(예: 다른 화합물들 또는 이 다른 화합물들의 약학 조성물) 각각의 조성물을 각자 다른 용기에 포함할 수 있다.
- [0420] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 다음과 같은 제2 화합물 또는 그들의 조성물과 함께 투여될 수 있는 약학 조성물을 포함한다. 보조제(예: GM-CSF), 화학요법제, 자연 생산품, 호르몬 또는 길항제, 항-혈관신생 제제 또는 억제제, 괴사유도제 또는 킬레이터. 키트의 조성물은 미리 혼합되어 있을 수도 있고 또는 각각의 조성물이 각각 따로 용기에 담겨 있을 수도 있다. 키트의 조성물은 하나 또는 그 이상의 액체 용액에 제공될 수도 있고, 바람직하게는 수용액, 더욱 바람직하게는 무균 수용액에 제공된다. 키트의 조성물은 적당한 용해제를 첨가함으로써 액체로 바뀔 수 있는 고체로 제공될 수도 있고, 바람직하게는 이는 다른 용기에 담겨 제공된다.
- [0421] 치료 키트의 용기는 바이알, 실험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 고체나 액체를 담을 수 있는 다른 어떤 용기일 수 있다. 보통, 하나 이상의 구성물이 있을 경우, 키트는 제2 물약병 또는 다른 용기를 포함하고, 이는 각각의 복용을 가능하게 한다. 키트는 약학적으로 허용가능한 액체를 포함하고 있는 용기를 포함할 수도 있다. 바람직하게는, 치료 키트는 현재 키트의 조성물인 발명의 제제를 투여할 수 있는 기구를 포함한다(예: 하나 또는 그 이상의 바늘, 주사기, 안약 투입제, 피펫 등).
- [0422] 본 제형은 구강(경구), 비강, 안약 형태의, 피하의, 피내, 근육내, 혈관내 또는 경피 등 어떠한 투여 형태이든 펩티드 투여에 적당한 약제이다. 바람직하게는 투여는 피하(s.c.)이며, 가장 바람직하게는 주입 펌프에 의한 피내(i.d.)일 수 있다.
- [0423] 본 발명의 펩타이드가 두경부 편평 세포 암으로부터 분리되었기 때문에, 본 발명의 의약은 바람직하게는 두경부 편평 상피암의 치료에 사용된다.
- [0424] 본 발명은 또한 사전선별된 TUMAP의 창고로부터 선택된 적어도 하나의 펩티드가 포함된 약학 조성물의 제조를 포함하는 개별 환자의 개인화 약학 조성물의 생산 방법을 포함하며, 여기서 약학 조성물에 사용되는 적어도 하나의 펩티드는 개별 환자의 적합성을 위해 선택된다. 한 구현에서, 약학적 성분은 백신이다. 이 방법은 TCR 분리 또는 가용성 항체 그리고 다른 치료 옵션과 같은 하류 용도를 위해 T 세포 클론의 생산에도 적응시킬 수 있다.
- [0425] "개인화 약학"이란, 활성적으로 개인화된 암 백신 및 자가 환자 조직을 사용하는 적응적 세포 세포 요법을 포함하는 한 명의 개별 환자의 치료를 위해서만 사용되는 그러한 개별 환자를 위해 구체적으로 맞춤화된 요법을 의미해야 한다.
- [0426] 여기에서 사용되는 용어 "창고"란 특정한 종양 유형에서 면역원성 및/또는 과다제시에 대해 사전선별된 펩티드의 군을 지칭해야 한다. "창고"란 용어는 백신에 포함된 특정한 펩티드가 물리적 시설에서 사전제조되어 보관되는 백신에 포함된다는 것을 내포함을 의도하지 않지만 그 가능성은 심사숙고된다. 이 펩티드는 생산된 개인화 백신마다 새로 제조될 수 있거나 사전제조되어 보관될 수 있음이 명시적으로 심사숙고된다. 창고(예: 데이터베이스의 형태)는 다양한 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 대립유전자를 가진 담낭암 및 담관암종 환자의 분석된 종양 조직에서 고도로 과다 발현된 종양-연관 펩티드들로서 구성된다. 창고는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 펩티드나 연장된 MHC 클래스 I 펩티드를 조합할 수 있다. 창고는 몇몇 AML 조직들로부터 수집된 종양 연관 펩티드

외에도, HLA-A*02 및 HLA-A*24 표지자 펩티드를 포함할 수 있다. 이 펩티드들은 TUMAPS에 의해 유도된 T 세포 면역성의 크기 비교를 허용하며 그에 따라 항종양 반응을 유발하는 백신의 용량에 대해 중요한 결정을 내리도록 허용한다. 둘째로, 이들은 환자에서 "자가" 항원으로부터 유래된 TUMAP에 대한 일체의 백신 유도된 T 세포 반응이 관찰되지 않는 경우 "비자가" 항원으로부터 유래된 중요한 양성 대조 펩티드로 기능한다. 그리고 셋째로, 환자의 면역적격의 상태에 대한 결론을 내리도록 허용할 수 있다.

- [0427] 참고용 TUMAP는 유전자 발현 분석, 질량 분석 및 T 세포 면역학(XPresident®)이 조합된 통합 기능적 유전체 접근방식을 사용하여 동정된다. 이 접근 방식은 정상 조직에서는 발현되지 않거나 최소한으로만 발현되지만 고 비율의 종양에서는 진정하게 존재하는 TUMAPs만을 추가 분석을 위해 선택하도록 보증한다. 펩티드 선택을 위하여, 환자로부터의 AML 샘플 그리고 건강한 공여자의 혈액을 단계적 접근 방식으로 분석했다:
- [0428] 1. 악성 종양 물질로부터의 HLA 리간드는 질량 분석에 의해 파악되었다.
- [0429] 2. 마이크로어레이에 의한 유전체-전체의 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 사용하여, 정상 기관과 조직들의 범위와 비교하여 악성 조직(담낭암 및 담관암중)에서 과발현된 유전자들을 동정했다.
- [0430] 3. 확인된 HLA 리간드를 유전자 발현 데이터와 비교했다. 종양 조직 상에서 과다제시되거나 선택적으로 제시된 펩티드들, 바람직하게는 2단계에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드들은 다중-펩티드 백신용으로 적절한 TUMAP 후보로 간주했다.
- [0431] 4. TUMAP로서 동정된 펩티드의 관련성을 지지하는 추가의 증거를 파악하기 위해 문헌 연구를 수행했다.
- [0432] 5. mRNA 수준에서의 과다 발현의 타당성은 3단계에서 종양 조직으로부터 선택된 TUMAPs의 재검출 그리고 건강한 조직에 대한 검출의 부재(또는 낮은 빈도)에 의해 확인되었다.
- [0433] 6. 선택된 펩티드에 의한 생체 내 T 세포 반응의 유도가 가능한지 여부를 평가하기 위해, 건강한 공여자는 물론 AML 환자의 인간 T 세포를 사용하여 시험관 내 면역원성 검사를 수행했다.
- [0434] 한 양태에서, 펩티드를 참고에 포함시키기 전에 면역원성에 대해 사전 스크리닝이 수행된다. 제한이 아니라 한 예로서, 펩티드/MHC 복합체와 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원 제시 세포를 가진 건강한 공여자의 CD8+ T 세포를 반복적으로 자극하는 시험관 내 T 세포 초기감작을 포함하는 방법을 사용하여 참고에 포함된 펩티드의 면역원성을 결정한다.
- [0435] 이 방법은 희귀한 암과 드문 발현 프로필을 가진 환자에서 바람직하다. 현재 개발되고 있는 고정 성분을 가진 다중펩티드 각테일과는 대조적으로, 참고는 종양의 항원이 실제 발현과 백신과 유의하게 더 높은 일치치를 허용한다. 다중표적 접근 방식에서는 단일 펩티드 또는 "재고" 펩티드들의 조합을 각 환자에 대해 사용한다. 이론상으로, 예를 들어 50개 라이브러리로부터 선택된 5개의 다른 항원 펩티드에 근거한 접근방법은 이미 약 17백만 가지의 가능한 약품(DP) 성분을 초래할 것이다.
- [0436] 한 양태에서 여기 그리고 다음에 설명되는 본 발명에 따른 방법에 근거하여, 이 펩티드들은 개별 환자를 위한 적합성에 근거하여 백신에 포함되도록 선택된다.
- [0437] HLA 표현형, 전사체학 및 펩티도믹스 데이터는 환자의 종양 물질과 혈액 샘플로부터 수집하여 참고(데이터베이스)와 환자 고유의(즉 돌연변이된) TUMAP를 포함하는 각 환자에 대해 가장 적절한 펩티드를 동정한다. 환자 종양에서 선택적으로 발현되거나 과다 발현되는 펩티드를 선택하게 되며, 이는 가능한 경우 환자의 개별 PBMC로써 시험했을 때 강한 시험관 내 면역원성을 나타냈다.
- [0438] 바람직하게는 백신에 포함되는 펩티드는 다음으로 구성되는 방법에 의해 확인된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드들(TUMAPs)의 동정; (b) (a)에서 동정된 펩티드를 위에 설명된 펩티드들의 참고(데이터베이스)와 비교; 및 (c) 그 환자에서 동정된 종양-연관 펩티드와 상관관계가 있는 참고(데이터베이스)로부터 적어도 하나의 펩티드 선택을 포함하는 방법에 의해 확인된다. 예를 들어, 종양 샘플에 의해 제시되는 TUMAP는 다음에 의해 확인된다: (a1) 종양 샘플에서 과다 발현되거나 이상 발현된 단백질의 파악을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 모양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 그리고 (a2) 종양에 의해 과다 발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 파악하기 위해, 발현 데이터를 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계 결정. 바람직하게는, MHC 리간드의 서열은 종양 샘플로부터 분리된 MHC 분자로부터 결합된 펩티드를 용출시키고 용출된 리간드의 서열결정에 의해 확인된다. 바람직하게는, 종양 샘플과 정상 조직을 같은 환자로부터 얻는다.

- [0439] 참고(데이터베이스) 모델을 사용한 펩티드의 선택 외에도 또는 이에 대한 대안으로, TUMAP가 환자에서 새로 확인된 다음 백신에 포함될 수 있다. 한 예로서, 후보 TUMAPs 환자에서, (a1) 종양 샘플에서 과다 발현되거나 이상 발현된 단백질의 파악을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 모양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 그리고 (a2) 종양에 의해 과다 발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 파악하기 위해, 발현 데이터를 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계의 결정에 의해 동정할 수 있다. 다른 예로서, 개별 환자로부터의 정상의 상응하는 조직과 비교해서 종양 샘플에 대해 고유한 돌연변이를 포함하는 단백질을 확인할 수 있으며 그 돌연변이를 특이적으로 표적화하는 TUMAP의 파악이 가능하다. 예를 들어, 종양 및 상응하는 정상 조직의 유전체는 전체 유전체의 서열 결정에 의해 서열을 결정할 수 있다: 유전자의 단백질 코딩 영역에서 비동의 돌연변이 발견을 위해, 종양 조직으로부터 유전체의 DNA 및 RNA를 추출하고 비돌연변이 유전체의 배아계역은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 추출한다. 응용 NGS 접근방식은 단백질 코딩 영역의 재배열결정으로 제약된다(엑손 재배열결정). 이 목적을 위해, 인간 샘플로부터 엑손 DNA를 업체가 공급한 표적 강화 키트를 사용한 다음 예를 들어 HiSeq2000(Illumina)로써 서열을 결정하여 포획한다. 추가적으로 유전자 발현의 직접적 정량화 그리고 돌연변이된 유전자가 환자의 종양에서 발현된다는 검증을 위해 종양 mRNA의 서열을 결정한다. 그에 따른 수백만의 서열 리드는 소프트웨어 알고리즘을 통해 처리된다. 출력 목록에는 돌연변이와 유전자 발현이 포함된다. 종양 특이적 체세포 돌연변이는 PBMC 유래된 종자계 변이와 비교하여 결정한 다음 우선순위화한다. 다음에는 새로 동정된 펩티드를 위에 설명한 창고의 면역원성에 대해 시험할 수 있으며, 적절한 면역원성을 소유하는 후보 TUMAP를 선택하여 백신에 포함시킨다.
- [0440] 한 예시적 구현에서, 백신에 포함된 펩티드는 다음에 의해 확인된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드들(TUMAP)을 위에 설명한 방법으로 동정한다; (b) 상응하는 정상 조직과 비교하여 종양에서 면역원성과 과제시에 대해 사전선택된 펩티드들의 창고를 이용하여 (a)에서 동정된 펩티드와 비교한다; (c) 환자에서 동정된 종양-연관 펩티드와 상관관계가 있는 적어도 하나의 펩티드를 창고(데이터베이스)에서 선택한다; 그리고 (d) 임의적으로 (a)에서 새로 동정된 적어도 하나의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인한다.
- [0441] 한 예시적 구현에서, 백신에 포함된 펩티드는 다음에 의해 확인된다: (a) 개인 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드(TUMAP)를 동정한다; 그리고 (b) (a)에서 새로 동정된 적어도 하나의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인한다.
- [0442] 개인화 펩티드 기반 백신에 대한 펩티드를 선택하면, 백신이 생산된다. 백신은 바람직하게는 20 내지 40% DMSO, 바람직하게는 약 30 내지 35% DMSO, 예컨대 약 33% DMSO에 용해된 개별 펩티드들로 구성된 액체 제형이다.
- [0443] 제품에 포함되어야 할 펩티드는 각각 DMSO에 용해한다. 단일 펩티드 용액의 농도는 제품에 포함시킬 펩티드의 숫자에 의존하여 선택해야 한다. 단일 펩티드-DMSO 용액은 동등하게 혼합하여 제품에 포함되는 모든 펩티드를 포함하는 용액이 펩티드 당 내지 2.5 mg/ml의 농도를 갖도록 한다. 다음 혼합된 용액을 주사 용수와 1:3의 비율로 희석하여 33% DMSO에서 펩티드 당 0.826 mg/ml의 농도를 달성한다. 희석된 용액을 0.22 μ m 무균 필터를 통해 여과시킨다. 최종 벌크 용액을 얻는다.
- [0444] 중 벌크 용액을 바이알에 채운 다음 사용 때까지 -20°C에서 보관한다. 바이알 하나에는 700 μ L의 용액을 함유하고 각 펩티드를 0.578 mg개씩 함유한다. 이 가운데 500 μ L(펩티드 당 약 400 μ g)는 피내 주사에 응용한다.
- [0445] 암 치료에 유용함에 덧붙여, 본 발명의 펩티드는 진단으로도 유용하다. 펩티드가 두경부 편평세포 암종 세포에서 생성되고 이런 펩티드가 정상 조직에서는 나타나지 않는다는 것이 결정되었기 때문에 이런 펩티드는 암의 존재의 진단에 사용될 수 있다.
- [0446] 혈액 세포에서 주장되는 펩티드의 조직 생체 검사에서의 존재는 암의 진단 시 병리학자를 도울 수 있다. 항체, 질량 분석, 또는 이 분야에 다른 알려진 방법을 통한 특정 펩티드의 탐지는 그 조직 샘플이 악성 또는 염증이 있는지 또는 일반적으로 병들어 있는지 또는 두경부 편평세포 암종의 바이오마커로 사용가능한지 병리학자에게 알려줄 수 있다. 펩티드의 그룹의 존재는 병든 조직의 분류 또는 하위 분류를 가능하게 한다.
- [0447] 병든 조직 표본의 펩티드의 탐지는 특히 만약 T 림프구가 작용 기전에 참여하는 것으로 알려져 있거나 기대할 때, 면역계를 포함한 치료의 이익에 대한 결정을 내릴 수 있게 한다. MHC 발현의 손실은 감염된 악성 세포가 면역 감시를 탈출하는 데에서 잘 설명되는 기전이다. 펩티드의 존재는 이 기전이 분석된 세포에서 악용되지 않는 것을 보여준다.
- [0448] 본 발명의 펩티드는 펩티드 또는 MHC 분자에 합성된 펩티드에 대한 T 세포 반응 또는 항체 반응 같은 펩티드에

대한 림프구 반응을 분석하는데 사용될 수 있다. 이런 림프구 반응은 추가 치료 단계에서 결정을 내릴 때 전조 표지자로 사용될 수 있다. 이런 반응은 또한 림프구 반응을 여러 방법으로, 예를 들면, 단백질 백신, 핵산, 자가 조직 물질, 림프구의 양자 전송을 유도하는 것을 목표로 하는 면역치료 접근방식의 대리 반응 표지자로 사용될 수 있다. 유전자 치료 설정에서, 펩티드에 대한 림프구 반응은 부작용의 평가에서 고려할 수 있다. 림프구 반응의 모니터링은 이식 요법의 후속 시험을 위한 중요한 도구가 될 수도 있다, 예를 들면, 융합의 감지 대 숙주 및 숙주 대 융합 질병.

[0449]

본 발명을 그 바람직한 구현을 설명하는 다음 실시예를 통해 그리고 동반되는 그림을 참조하여 하되 이로써 제한됨이 없이 설명한다. 본 발명의 목적상 본 문서에 인용되는 모든 참조 문헌은 그 전문이 참조 문헌으로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0450]

도 1a 내지 도 1d는 정상 조직(흰색 막대) 및 두경부 편평세포 암종(검은색 막대)에서 다양한 펩티드의 과다 제시를 보여준다. 도 1a) 유전자 부호들: KRT6C, KRT6A, KRT6B, 펩티드: GLAGFGGPGFPV(서열 식별 번호: 1) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 6개 지방 조직, 8개 부신, 1개 담관, 24개 혈액 세포, 15개 혈관, 10개 골수, 15 뇌, 7개 유방, 11개 식도, 2개 눈, 6개 담낭, 16개 심장, 17개 신장, 27개 대장, 24개 간, 49개 폐, 7개 림프절, 12개 신경, 5개 난소, 15개 췌장, 6개 부갑상선, 3개 복막, 7개 뇌하수체, 10개 태반, 3개 흉막, 11개 전립선, 9개 골격근, 11개 피부, 16개 소장, 13개 비장, 9개 위, 8개 고환, 3개 흉선, 8개 갑상선, 18개 기관, 7개 요관, 8개 방광, 6개 자궁, 12개 두경부, 17개 HNSCC. 도 1b) 유전자 부호들: KRT6C, KRT6A, KRT6B, 펩티드: SLYGLGGSKRISI(서열 식별 번호: 3) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 6개 지방 조직, 8개 부신, 1개 담관, 24개 혈액 세포, 15개 혈관, 10개 골수, 15 뇌, 7개 유방, 11개 식도, 2개 눈, 6개 담낭, 16개 심장, 17개 신장, 27개 대장, 24개 간, 49개 폐, 7개 림프절, 12개 신경, 5개 난소, 15개 췌장, 6개 부갑상선, 3개 복막, 7개 뇌하수체, 10개 태반, 3개 흉막, 11개 전립선, 9개 골격근, 11개 피부, 16개 소장, 13개 비장, 9개 위, 8개 고환, 3개 흉선, 8개 갑상선, 18개 기관, 7개 요관, 8개 방광, 6개 자궁, 12개 두경부, 17개 HNSCC. 도 1c) 유전자 부호: KRT5, 펩티드: STASAITPSV(서열 식별 번호: 9) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 6개 지방 조직, 8개 부신, 1개 담관, 24개 혈액 세포, 15개 혈관, 10개 골수, 15 뇌, 7개 유방, 11개 식도, 2개 눈, 6개 담낭, 16개 심장, 17개 신장, 27개 대장, 24개 간, 49개 폐, 7개 림프절, 12개 신경, 5개 난소, 15개 췌장, 6개 부갑상선, 3개 복막, 7개 뇌하수체, 10개 태반, 3개 흉막, 11개 전립선, 9개 골격근, 11개 피부, 16개 소장, 13개 비장, 9개 위, 8개 고환, 3개 흉선, 8개 갑상선, 18개 기관, 7개 요관, 8개 방광, 6개 자궁, 12개 두경부, 17개 HNSCC. 도 1d) 유전자 부호: SLC25A3, 펩티드: FVAGYIAGV(서열 식별 번호: 61) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 3개 세포주(2개 신장, 1개 췌장), 7개 정상 조직(1개 부신, 1개 결장, 2개 림프절, 1개 태반, 2개 비장), 36개 암 조직(5개 백혈구성 백혈병 암, 3개 뇌암, 2개 유방암, 1개 식도암, 1개 담낭암, 5개 두경부암, 1개 신장암, 1개 간암, 8개 폐암, 4개 림프절암, 3개 난소암, 2개 위암). 도 1e 내지 도 1q는 상이한 암 조직(검은 점)에서 다양한 펩티드의 과다제시를 보여준다. 상부: 기술적인 반복 측정치의 MS 신호 강도 중간값이 단일 HLA-A*02 양성 정상(회색 점) 그리고 펩티드가 검출된 종양 샘플(검은 점)에 대해 점으로 표시되어 있다. 종양과 정상 샘플은 출처 기관에 따라 그룹화되고, 상자 수염 도표는 복수 샘플의 정규화 신호 강도에 대한 중간값, 25번째 백분위수 및 75번째 백분위수(상자) 그리고 최저치 및 최대치(수염)을 나타낸다. 정상 기관은 위험 범주에 따라 순서가 매겨진다(혈액 세포, 혈관, 뇌, 간, 폐: 고위험, 회색 점; 생식 기관, 유방, 전립선: 저위험, 회색 점; 다른 모든 기관들: 중간 위험; 회색 점). 하부: 각 기관에서 상대적 펩티드 검출 빈도가 막대 도표로서 표시되어 있다. 패널 아래의 숫자는 각 기관에 대해 분석한 샘플의 합계 가운데 펩티드가 검출된 샘플의 숫자를 나타낸다(정상 샘플 N = 526, 종양 샘플 N = 562). 한 샘플에서 펩티드가 검출되었지만 기술적인 이유로 정량화할 수 없었다면, 그 샘플은 검출 빈도의 제시에 포함되지만 도면의 상부에는 점으로 표시되지 않는다. 조직(왼쪽부터 오른쪽으로)들: 정상 샘플: 혈액 세포; bloodvess(혈관); 뇌; 심장; 간; 폐; adipose(지방 조직); adren.gl.(부신); 담관; 방광; BM(골수); 연골; esoph(식도); 눈; gallbl(담낭); 두경부; 신장; large_int(대장); LN(림프절); 신경; 췌장; parathyr(부갑상선); perit(복막); pituit(뇌하수체); 흉막; skel.mus(골격근); 피부; small_int(소장); 비장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁. 종양 샘플: AML: 급성 골수성 백혈병; BRCA: 유방암; CCC: 담관세포 암종; CLL: 만성 림프구성 백혈병; CRC: 결장직장암; GBC: 담낭암; GBM: 아교모세포종; GC: 위암; GEJC: 위 분문 식도 암; HCC: 간세포 암종; HNSCC: 두경부암; MEL: 흑색종; NHL: 비호지킨 림프종; NSCLC: 비소세포 폐암; OC: 난소암; OSCAR: 식도암; PACA: 췌장암; PRCA: 전립선암; RCC: 신세포 암종; SCLC: 소세포 폐암; UBC: 방광 암종; UEC: 자궁 및 자궁내막암. 도 1e) 유전자 부호(들): KRT6C, KRT6A, KRT1, KRT6B, KRT75, KRT5, 펩티드: PVCPPGGIQEV(서열 식별 번호: 2), 도 1f) 유전자

부호: PKP1, 펩티드: SMLNNIINL(서열 식별 번호: 15), 도 1g) 유전자 부호: PRKDC, 펩티드: GLIEWLENTV(서열 식별 번호: 45), 도 1h) 유전자 부호: ATP5G2, ATP5G1, ATP5G3, 펩티드: AILGFALSEA(서열 식별 번호: 57), 도 1i) 유전자 부호: ITGB4, 펩티드: SLSDIQPCL(서열 식별 번호: 58), 도 1j) 유전자 부호: KRT5, 펩티드: ALMDEINFMKM(서열 식별 번호: 63), 도 1k) 유전자 부호: ESRP2, 펩티드: ALASAPTSV(서열 식별 번호: 75), 도 1l) 유전자 부호: PARP9, 펩티드: ILFDEVLTF(서열 식별 번호: 76), 도 1m) 유전자 부호: MCM4, 펩티드: QLLQYVYNL(서열 식별 번호: 83), 도 1n) 유전자 부호: FHAD1, 펩티드: QLIEKITQV(서열 식별 번호: 85), 도 1o) 유전자 부호: PLEC, 펩티드: ALPEPSPAA(서열 식별 번호: 87), 도 1p) 유전자 부호: G3BP1, 펩티드: TLNDGVVVQV(서열 식별 번호: 90), 도 1q) 유전자 부호: ODC1, 펩티드: MLFENMGAYTV(서열 식별 번호: 91).

도 2는 정상 조직(흰색 막대) 및 15개 두경부 편평세포 암종 샘플(검은색 막대)의 패널에서 두경부 편평세포 암종에서 고도로 과발현되거나 배타적으로 발현된 본 발명의 근원 유전자들의 예시적 발현 프로파일을 보여준다. 도 2a) 유전자 부호: PGLYRP4, 펩티드: AIYEGVGWNV(서열 식별 번호: 33); 도 2b) 유전자 부호: PAPL, 펩티드: KLLPGVQYV(서열 식별 번호: 38); 도 2c) 유전자 부호: LGALS7, LGALS7B, 펩티드: RLVEVGQDVQL(서열 식별 번호: 53).

도 3은 펩티드-특이적 다합체 염색 이후 예시적 면역원성 데이터: 유세포 측정 결과를 보여준다.

도 4는 건강한 HLA-A*02+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 다음 서열 식별 번호와의 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*2로써 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다: 각각 17 펩티드(A, 왼쪽 패널), 서열 식별 번호: 28 펩티드(B, 왼쪽 패널), 서열 식별 번호: 29 펩티드(C, 왼쪽 패널), 서열 식별 번호: 3주기의 자극 후, A*02/다음 서열 식별 번호로써 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 17 (A), A*02/ 서열 식별 번호: 28 (B) 또는 A*02/ 서열 식별 번호: 29 (C). 오른쪽 패널들(A, B 및 C)은 관련이 없는 A*02/펩티드 복합체로써 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존 가능한 단일 유리(singlet) 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 부울 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0451] 실시예

[0452] 실시예 1

[0453] 세포 표면에 제시한 종양 연관 펩티드의 동정 및 정량화

[0454] 조직 샘플

[0455] 환자의 종양 조직은 다음으로부터 얻었다: Asterand(Detroit, MI, 미국 & Royston, Herts, 영국); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, 미국). 정상 조직은 다음으로부터 얻었다: Asterand(Detroit, MI, 미국 & Royston, Herts, 영국); Bio-Options Inc. (Brea, CA, 미국); BioServe(Beltsville, MD, 미국); Capital BioScience Inc.(Rockville, MD, 미국); Geneticist Inc.(Glendale, CA, 미국); Kyoto Prefectural University of Medicine(KPUM) (Kyoto, 일본); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, 미국); Tissue Solutions Ltd.(Glasgow, 영국); University Hospital Geneva(Geneva, 스위스); University Hospital Heidelberg(Heidelberg, 독일); University Hospital Tuebingen(Tuebingen, 독일). 수술이나 부검 전에 모든 환자의 동의서가 제출되었다. 조직은 절제 후 즉시 충격동결한 다음 TUMAP의 분리까지 -70°C 이하에서 보관했다.

[0456] 조직 샘플에서 HLA 펩티드의 분리

[0457] 약간 변형된 프로토콜(Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) 에 따르면, 충격 냉동된 조직 샘플의 HLA 펩티드 풀은 단단한 조직의 면역 촉진에 의해 HLA-A*02-특이 항체 BB7.2 또는 HLA-A, -B, -C-특정 항체 W6/32, CNBr-활성화 된 세포파로오스, 산성치료와 한외 여과를 이용해 취득되었다.

[0458] 질량분광 분석

[0459] 얻어진 HLA 펩티드 풀은 그들의 소수성에 의해 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리되었고(nanoAcquity UPLC system, Waters) 녹여서 분리하는 펩티드는 ESI 소스를 갖춘 LTQ-velos 및 융합 하이브리드 질량 분석기(ThermoElectron)에 의해 분석되었다. 펩티드 풀은 분당 400nL의 유량을 적용하여 1.7 μm C18 역상 물질(Waters)로 충전된 합성-실리카 마이크로-모세관 칼럼(75 μm i.d. x 250 mm)에 바로 로딩된다. 이어서, 펩티드

는 두-단계 180분-10% 내지 33%의 이진 구배를 이용하여 분리되고, 여기서 유량은 분당 300nL이다. 그라디언트는 용매 A(물의 0.1% 포름산)와 용매 B(아세트니트릴의 0.1% 포름산)로 이루어져 있다. 금이 입혀진 유리 모세관(PicoTip, New Objective)이 미세-ESI 소스로의 도입에 사용되었다. LTQ-Orbitrap 질량 분석기가 TOP5 전략을 이용한 데이터-의존 모드에서 작동되었다. 간략하게, 스캔 사이클은 오비트랩(orbitrap)의 높은 질량 정확도($R = 30\,000$)의 전스캔으로 시작되고, 이후 5개의 가장 많은 이전에 선택한 이온의 동적 배제에 의한 전조 이온에 대한 오비트랩($R = 7500$)의 MS/MS 스캔이 이어진다. 탠덤 질량 스펙트럼은 SEQUEST와 추가적인 수동 컨트롤에 의해 해석된다. 동정된 펩티드 서열은 생성된 자연 펩티드 분절 패턴과 합성을 서열-일치 참고 펩티드와의 비교를 통해 보증되었다.

[0460] 비표지 상대적 LC-MS 정량화는 이온 계측 즉, LC-MS 특징의 추출 및 분석에 의해 수행했다(Mueller et al., 2007). 이 방법은 펩티드의 LC-MS 신호 영역이 샘플 내의 풍부함과 상관관계가 있음을 가정으로 한다. 추출된 특징은 전하 상태 디컨볼루션 및 정제 시간 정렬에 의해 더욱 처리되었다(Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). 마지막으로 모든 LC-MS 특징은 서열 확인 결과와 상호 참조하여 다른 샘플과 조직의 정량 데이터를 펩티드 제시 프로필에 합쳤다. 이 정량 데이터를 중심 경향성에 따라 2단 형태로 정상화함으로써 기술적인 생물학적 복제 내에서의 변동을 고려했다. 그리하여 동정된 펩티드는 하나씩 정량 데이터와 연관시키며 샘플과 조직 사이의 상대적 정량화를 허용할 수 있다. 그 밖에 펩티드 후보로부터 얻어진 모든 정량 데이터를 수동으로 검사하여 데이터 일관성을 보증하고 자동화 분석의 정확성을 확인했다. 펩티드마다 평균 샘플 제시는 물론 복사 변이를 보여주는 제시 프로필을 계산했다. 이 프로필은 두경부 편평세포 암종 샘플을 정상 조직 샘플의 기준선에 병치한다. 예시적인 과다제시된 펩티드의 제시 프로필이 도 1에 나와 있다. 예시적 펩티드의 제시 점수는 표 8에 나와 있다.

[0461] 표 8은 제시 점수를 나타낸다. 이 표는 정상 조직의 패널에 비해 매우 고도로 과다제시되거나(+++), 정상 조직의 패널에 비해 고도로 과다제시되거나(++) 또는 정상 조직의 패널에 비해 과다제시되는(+) 펩티드들을 나열한다. 종양과의 비교에 대해 적합하다고 간주되는 정상조직의 패널은 다음으로 구성된다: 지방 조직, 부신, 담관, 혈액 세포, 혈관, 골수, 뇌, 식도, 눈, 담낭, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 신경, 췌장, 부갑상선, 복막, 뇌하수체, 흉막, 타액선, 골격근, 피부, 소장, 비장, 위, 흉선, 갑상선, 기관, 요관, 방광.

[0462] [표 8]

서열 식별 번호	서열	웹티드 제시
1	GLAGGFGGPGFPV	+++
2	PVCPGGIQEV	+++
3	SLYGLGGSKRISI	+++
4	ILDINDNPPV	+++
5	VCPGGIQEV	+++
6	ALYDAELSQM	+++
7	ALEEANADLEV	+++
8	AQLNIGNVLPV	+++
9	STASAITPSV	+++
10	TLWPATPPKA	+++
11	VLFSPPVI	+++
12	TLTDEINFL	+++
13	SLVSYLDKV	+++
14	RIMEGIPTV	+++
15	SMLNNIINL	+
16	ALKDSVQRA	+++
17	SIWPALTQV	+++
19	ALAKLLPLL	+++
20	YLINEIDRIRA	+++
21	FLHEPFSSV	+++
22	KLPEPCPSTV	+++
23	SLPESGLLSV	+++
24	LLIAINPQV	+++
25	SLCPPGGIQEV	+++
26	TLVDENQSWYL	+++
27	YLAEPQWAV	+++
28	AVDPVSGSLYV	+++
29	RLLPDLDEV	+++
30	TLASLGYAVV	+++
31	HLATVKLLV	+++
32	IQDAEGAIHEV	+++
33	AIYEGVGWNV	+++
34	ALDTFSVQV	+++
35	ALVGDVILTV	+++
36	GLWSSIFSL	+++
37	ILLEDVFQL	+++
38	KLLPGVQYV	+++

[0463]

서열 식별 번호	서열	펩티드 제시
39	LLPEDDTRDNV	+++
40	LLTPLNLQI	+++
41	RLNGEGVGQVNISV	+++
42	ALYTSGHLL	+++
43	AVLGKLYV	+++
44	GLGDDSFPI	+++
45	GLIEWLENTV	+++
46	GLISSIEAQL	+++
47	QLLEGELETL	+++
48	YLLDYPNNL	+++
49	YLWEAHTNI	+++
50	ALSNVVKV	+++
51	FLIPSIIFA	+++
52	LLFTGLVSGV	+++
53	RLVEVGQDVQL	+++
54	RLSGEGVGPV	+++
55	VLNVGVAEV	+++
56	FLQLETEQV	+++
58	SLSDIQPCL	+++
60	SLGNFKDDL	+++
61	FVAGYIAGV	+++
62	ILSSACYTV	+++
63	ALMDEINFMKM	++
67	AQLNLIWQL	+
69	YVMESMTYL	+
70	FLFPAFLTA	+++
71	SLFPYVVI	+++
72	SLDGNPLAV	+++
73	YIDPYKLLPL	+++
74	SLTSFLISL	+++
75	ALASAPTSV	+++
78	VLYGDVEEL	+++
79	GLHQDFPSVVL	+
81	VLAENPDIFAV	+++
82	VLDINDNPPV	+++
83	QLLQYVYNL	+++
84	ALMAGCIQEA	+++
85	QLIEKITQV	+++
86	SLQERQVFL	+++

[0464]

서열 식별 번호	서열	펩티드 제시
88	LMAFAPSTV	++
90	TLNDGVVVQV	+
91	MLFENMGAYTV	+

[0465]

[0466] **실시예 2**

[0467] 본 발명의 펩티드를 인코딩하는 유전자의 발현 프로파일

[0468] 정상 세포와 비교한 종양 세포 상의 펩티드의 과다 제시 또는 특이적 제시는 면역요법에서의 그 유용성에 대해 충분하며 일부 펩티드는 정상 조직에서도 발생하는 그 근원 단백질에도 불구하고 종양 특이적이다. 여전히 mRNA 발현 양상 분석은 면역요법을 위한 펩티드 표적의 선택에서 추가적 안정성 수준을 추가한다. 특히 친화도 성숙 TCR과 같은 안정성 위험이 높은 치료적 옵션의 경우에는, 이상적 표적 펩티드는 종양에 고유하며 정상 조직에는

없는 단백질로부터 유래될 것이다.

[0469] RNA 원천 및 준비

[0470] 수술로 제거된 조직 검체는 위에서 나타낸 바와 같이(실시예 1 참조) 각각의 환자로부터 동의서를 얻은 다음 제공되었다. 종양 조직 검체는 수술 직후 스냅-냉동되었고 절구와 유봉을 이용하여 액체 질소 환경 아래에서 균질화되었다. 총 RNA는 TRI 시약(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)을 이용하여 샘플로부터 만들었으며, 이는 RNeasy(QIAGEN, Hilden, Germany)에 의해 청소되었다; 이 두 가지 방법은 모두 제조업체의 설명서에 따라 실행되었다.

[0471] RNASeq 실험을 위한 건강한 인체 조직의 총 RNA는 다음으로부터 얻었다.

[0472] Asterand(Detroit, MI, 미국 & Royston, Herts, 영국); BioCat GmbH(Heidelberg, 독일); Bio-Options Inc.(Brea, CA, 미국); BioServe(Beltsville, MD, 미국); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, 미국); Geneticist Inc.(Glendale, CA, 미국); Istituto Nazionale Tumori "Pascale"(Naples, 이탈리아); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, 미국); University Hospital Heidelberg(Heidelberg, 독일). RNASeq 실험을 위한 종양 조직의 총 RNA는 다음으로부터 얻었다: Asterand(Detroit, MI, 미국 & Royston, Herts, 영국); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, 미국).

[0473] RNA 샘플의 양과 질은 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent, Waldbronn, Germany)에 의해 RNA 6000 Pico LabChip Kit(Agilent)를 사용하여 분석되었다.

[0474] RNAseq 실험

[0475] 종양 및 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 CeGaT(Tuebingen, 독일)사의 차세대 시퀀싱(RNAseq)으로 수행하였다. 간단히 말하면, 시퀀싱 라이브러리는 제공사의 프로토콜(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)에 따라 Illumina HiSeq v4 시약 키트를 사용하여 준비하며, 여기에는 RNA 분절, cDNA 변환 및 시퀀싱 어댑터 추가가 포함된다. 복수의 샘플에서 유래한 라이브러리들은 동일한 몰로 혼합한 다음, Illumina HiSeq 2500 시퀀서에서 그 제조사의 설명에 따라 서열을 결정함으로써 50 bp의 싱글 엔드 리드(single end read)를 생성한다. 처리된 리드는 STAR 소프트웨어를 사용하여 인간 게놈(GRCh38)에 대해 매핑한다. 발현 데이터는 RPKM(백만개 매핑된 리드당 킬로베이스당 리드, Cufflinks 소프트웨어에 의해 생성)으로 전사물 수준 상 그리고 엑손 수준 상(총 리드, Bedtools 소프트웨어에 의해 생성)에서 제공되며, 앙상블 서열 데이터베이스(Ensembl77)의 주석에 기반한다. 엑손 리드는 엑손 길이 및 정렬 크기에 대해 정규화하여 RPKM 수치를 얻는다.

[0476] 본 발명의 두경부 편평 세포 암종에서 고도로 과다 발현 또는 배타적으로 발현되는 출처 유전자의 예시적 발현 프로파일 제2도에 나와 있다. 추가의 예시적 유전자의 발현 점수가 표 9에 나와 있다.

[0477] 표 9는 발현 점수를 나타낸다. 이 표는 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 매우 고도로 과발현되거나(+++), 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 고도로 과발현되거나(++) 또는 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 과발현되는(+) 유전자의 펩티드를 나열하고 있다. 이 점수의 베이스라인은 다음의 적절한 정상조직에 대한 측정치로부터 계산했다: 지방 조직, 부신, 담관, 혈액 세포, 혈관, 골수, 뇌, 식도, 눈, 담낭, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 신경, 췌장, 부갑상선, 복막, 뇌하수체, 흉막, 타액선, 골격근, 피부, 소장, 비장, 위, 흉선, 갑상선, 기관, 요관, 방광. 동일한 조직 유형에 대해 여러 샘플의 발현 데이터가 있는 경우, 모든 해당 샘플의 산술 평균을 그 계산에 사용했다.

[0478] [표 9]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현
1	GLAGGFGGPGFPV	+++
2	PVCPGGIQEV	+++
3	SLYGLGGSKRISI	+++
4	ILDINDNPPV	+++
5	VCPGGIQEV	+++
6	ALYDAELSQM	+++
7	ALEEANADLEV	+++
9	STASAITPSV	+++
12	TLTDEINFL	+++
14	RIMEGIPTV	+++
15	SMLNNIINL	+++
19	ALAKLLPLL	+++
20	YLINEIDRIRA	++
21	FLHEPFSSV	+++
24	LLIAINPQV	+++
26	TLVDENQSWYL	+++
27	YLAEPQWAV	+
33	AIYEGVGWNV	+++
34	ALDTFSVQV	++
35	ALVGDVILTV	+
36	GLWSSIFSL	+++
38	KLLPGVQYV	+++
39	LLPEDDTRDNV	+++
40	LLTPLNLQI	+++
41	RLNGEGVGQVNISV	+++

[0479]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현
49	YLWEAHTNI	+
51	FLIPSIIFA	+++
53	RLVEVGGDVQL	+++
54	RLSGEGVGPV	+++
59	YLQNEVFGL	+++
60	SLGNFKDDL	+++
62	ILSSACYTV	+++
63	ALMDEINFMKM	+++
82	VLDINDNPPV	+++
91	MLFENMGAYTV	++

[0480]

[0481]

실시예 3

[0482]

MHC 클래스 I 제시 펩티드의 시험관 내 면역원성

[0483]

본 발명의 TUMAP의 면역원성에 대한 정보를 얻기 위해, 본 발명자는 펩티드/MHC 복합체 및 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원 제시 세포(aAPC)를 갖는 CD8⁺ T 세포의 반복된 자극을 근거로 시험관 내 T 세포 초회 감작을 사용하여 조사를 수행했다. 이 방법으로 우리는 지금까지 HLA-A*0201제한된 TUMAP의 면역원성을 보여줄 수 있었으며, 이것은 이 펩티드들이 인간에 존재하는 CD8⁺ 전조 T 세포에 대한 T 세포 에피톱이라는 것을 보여주었다(표 10).

[0484]

CD8⁺ T 세포의 시험관 내 감작

[0485]

펩티드-MHC 복합체(pMHC) 및 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원 제시 세포에 의한 시험관 내 자극을 수행하기 위해, 본 발명자는 독일 소재 TUniversity clinics Mannheim에서 동의서를 받은 건강한 공여자로부터의 CD8 마이 크로비드(Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, 독일)를 사용한 양성 선택을 통해 신선한 HLA-A*02 백혈구 성분 채집 산물로부터 CD8⁺ T 세포를 먼저 분리했다.

[0486]

PBMC 및 분리된 CD8⁺ 림프구는 10% 열 비활성화된 인간 AB 혈청(PAN-Biotech, Aidenbach, 독일), 100 U/ml 페 니실린 / 100 µg/ml 스트렙토마이신(Cambrex, Cologne, 독일), 1 mM 피루브산 나트륨(CC Pro, Oberdorla, 독일), 20 µg/ml 젠타마이신(Cambrex)으로 보충된 RPMI-Glutamax(Invitrogen, Karlsruhe, 독일)을 포함하는 T 세포 배지(TCM)에서 사용할 때까지 배양했다. 이 단계에서 2.5 ng/ml IL-7(PromoCell, Heidelberg, 독일) 및 10 U/ml IL-2(Novartis Pharma, Nuernberg, 독일) 또한 TCM에 추가했다.

[0487]

pMHC/항-CD28 코팅된 비드의 생성, T 세포 자극 및 관독은 고도로 정의된 시험관 내 체계에서 수행했으며, 자극 조건 당 8가지 다른 pMHC 분자 그리고 관독 조건 당 8가지 다른 pMHC 분자를 각각 사용했다.

[0488]

정제된 공동-자극 쥐 IgG2a 항인체 CD28 Ab 9.3(Jung et al., 1987)은 제조사가 권장하는 술폰-N-히드록시숙신 이미도비오틴을 사용하여 화학적으로 비오틴닐화 했다(Perbio, Bonn, 독일). 사용된 비드는 스트렙티비딘으로 코팅된 직경 5.6 µm의 폴리스티렌 입자였다(Bangs Laboratories, Illinois, 미국).

[0489]

양성과 음성 대조 자극으로 사용되는 pMHC는 각각 A*0201/MLA-001(변형된 Melan-A/MART-1의 펩티드 ELAGIGITLV(서열 식별 번호 157))와 A*0201/DDX5- 001(DDX5 의 YLLPAIVHI, 서열 식별 번호 158)였다.

[0490]

800.000 비드 / 200 µl는 4 x 12.5 ng 비오틴-pMHC 존재 하에 96-웰 플레이트에서 코팅하고 세척한 다음 600 ng 비오틴 항-CD28를 첨가하여 200 µl의 부피로 만들었다. 자극은 1×10^6 CD8⁺ T 세포를 5 ng/ml IL-12(PromoCell)로 보충된 200 µl TCM에서 37°C 및 3일 동안 세척하고 코팅된 2×10^5 비드와 함께 96-웰 플레이트에서 공동배양함으로써 개시했다. 매체의 반은 80 U/ml IL-2로 추가된 새로운 TCM에 의해 교환되고 배양은 37°C에서 4일간 계속되었다. 이 자극 주기는 총 세 번 수행되었다. 조건 당 8가지 다른 pMHC(분자를 사용하는 pMHC 멀티머의 관독을 위해, 이미 설명된 바와 같이(Andersen et al., 2012) 2차원 조합대수적 코팅 접근 방식을 사

용했으며, 5가지 다른 형광색소와의 결합을 허용하는 약간의 변형이 있었다. 마지막으로 다합체 분석은 Live/dead 근 IR 염료(Invitrogen, Karlsruhe, 독일), CD8-FITC 항체 클론 SK1(BD, Heidelberg, 독일) 및 형광 pMHC 다합체로써 세포를 염색하여 수행했다. 분석에는 적절한 레이저 및 필터가 장착된 BD LSRII SORP 세포측정기를 사용했다. 펩티드 특이 세포는 총 CD8+ T 세포의 백분율로 계산되었다. 다합체 분석의 평가는 FCS Express 소프트웨어(De Novo Software) 사용하여 수행되었다. 특정 다합체 + CD8+ 림프구의 시험관 내 초기감작은 음성 대조군 자극과 비교함으로써 감지되었다. 주어진 항원의 면역성은 건강한 기증자의 최소한 하나의 시험관 내 자극된 평가 가능한 웰이 시험관 내 자극 후 CD8+ T 세포주를 보이면 발견되었다(예를 들면, 이 웰은 CD8+ T 세포 중 최소한 1%의 특정 테트라머+를 가졌으며 특정 테트라머+ 세포의 백분율은 최소한 음성 대조군 자극의 매체보다 10배여야 한다).

[0491] 두정부 편평 세포 암종 펩티드의 시험관 내 면역원성

[0492] 실험된 HLA 클래스 I 펩티드에서, 시험관 내 면역원성은 펩티드 특정 T 세포주의 형성에 의해 입증될 수 있었다. 도 3에는 본 발명의 2개 펩티드에 대한 TUMAP 특이적 다합체 염색 후 얻은 예시적 유세포 측정 결과 그리고 상응하는 음성 대조가 나타났다. 도 4에는 본 발명의 3개 펩티드에 대한 TUMAP 특이적 다합체 염색 후 얻은 예시적 유세포 측정 결과 그리고 상응하는 음성 대조가 나타났다. 본 발명의 17개의 펩티드에 대한 결과는 표 10A에 요약되어 있다. 본 발명의 17개 펩티드에 대한 추가 결과가 표 10B에 요약되어있다.

[0493] 표 10A는 본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 시험관 내 면역원성으로서, 본 발명의 펩티드 출원자 실행한 시험관 내 면역원성 실험의 예시적 결과를 나타낸다. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++.

[0494] [표 10A]

서열 식별 번호	펩티드 코드	서열	웰	공여자
98	RAD54B-001	SLYKGLLSV	++	++++
101	C4orf36-001	GLLPSAESIKL	+	++++
105	KRT-010	STYGGGLSV	+	++++
108	KRT5-001	SLYNLGGSKRISI	+	++++
109	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	+	+++
113	PKP1-002	NLMASQPQL	+++	++++
114	TP6-001	VLVPYEPPQV	+	++++
118	KRT-006	TLLQEQGTKTV	+	++
123	GJB5-001	LLSGDLIFL	++	++++
127	FHL2-001	SLFGKKYIL	++	++++
135	DNMT3B-001	GLFSQHFNL	+	++
137	LOC-002	GLAPFLLNAV	+	++++
143	FAP-003	YVYQNNIYL	+	++
145	TMEM222-001	LLYGKYVSV	++	++++
147	DNMT1-001	ILMDPSPEYA	+++	++++
150	NLRP2-001	ILAEPIYIRV	+++	++++
154	BDH1-001	KMWHEELPEVV	+	++++

[0495]

[0496] 표 10B는 본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 시험관 내 면역원성으로서, 본 출원자가 본 발명의 HLA-A*02 제한 펩티드에 대해 실행한 시험관 내 면역원성 실험의 예시적 결과를 나타낸다. 시험관 내 면역원성 실험의 결과가 표시되어 있다. 양성 웰 및 공여자의 백분율은(평가가능한 것 가운데) 다음의 표시로 요약된다: <20 % = +; 20

% - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++.

[표 10B]

서열 식별 번호	서열	웰 양성 [%]
1	GLAGGFGGPGFPV	+
3	SLYGLGGSKRISI	+
8	AQLNIGNVLPV	+
10	TLWPATPPKA	+
11	VLFSPPVI	++
12	TLTDEINFL	+
13	SLVSYLDKV	++
16	ALKDSVQRA	+
17	SIWPALTQV	++++
18	YLYPDLSRL	+
19	ALAKLLPLL	++
20	YLINEIDRIRA	+
26	TLVDENQSWYL	++
28	AVDPVSGSLYV	+++
29	RLLPDLDEV	++
30	TLASLGYAVV	+++
82	VLDINDNPPV	+

실시예 4

펩티드의 합성

모든 펩티드는 Fmoc-전략을 사용하여 표준 및 확립된 고체상 펩티드 합성으로써 합성되었다. 각 개별 펩티드의 정제와 순도로 질량 분석법과 분석 RP-HPLC에 의해 결정했다. 펩티드는 순도가 >50%인 흰색에서 황백색의 동결 건조물(삼불화 초산염)로 얻어졌다. 모든 TUMAP는 바람직하게는 삼불화아세트산 염 또는 아세트산 염으로 투여되지만, 다른 염의 형태 또한 가능하다.

실시예 5

MHC 결합 검정

본 발명에 따른 T 세포 기반 요법의 후보 펩티드를 MHC 결합 능력(친화도)에 대해 더 실험했다. 개별 펩티드-MHC 복합체는 UV-리간드 교환에 의해 만들었으며, UV에 민감한 펩티드가 UV 조사 후 분할된 다음 분석된 관심 대상의 펩티드로 교환되었다. 펩티드 수용성 MHC 분자를 효과적으로 결합하고 안정화시킬 수 있는 펩티드 후보만이 MHC 복합체의 해리를 막는다. 이 교환작용의 수율을 결정하기 위해, 안정화된 MHC 복합체의 경쟁(베타2m) 검출에 근거하여 ELISA를 수행했다. 이 검정은 Rodenko 등에서 일반적으로 설명된대로 수행했다(Rodenko et al., 2006).

96 웰 MAXISorp 플레이트(NUNC)를 실온 그리고 PBS에서 2ug/ml 스트렙타비딘으로 밤새 코팅하고 4회 세척한 다음 블로킹 완충액을 함유하는 2% BSA와 37℃에서 1시간 동안 블로킹을 진행했다. 되접기된 HLA-A*02:01/MLA-001 단량체가 표준의 역할을 했으며, 그 범위는 15 내지 500 ng/ml였다. UV-교환 반응을 위한 펩티드-MHC 단량체는 블로킹 완충제로 100배 희석되었다. 샘플은 37℃에서 1시간 배양 후 4회 세척하고 2 ug/ml HRP 접합된 항-베타2m으로 37℃에서 1시간 배양한 다음 NH₂SO₄로 정지시킨 TMB 용액으로 검출했다. 흡광은 450nm에서 측정했다. 높은 교환 수율(바람직하게는 50% 초과, 그리고 가장 바람직하게는 75% 초과)을 보이는 후보 펩티드가 일반적으로 항체나 그 단편 및/또는 T 세포 수용체나 그 단편의 생성 및 생산을 위해 선호되는데, 이는 MHC 분자에 대한 충분한 결합성을 보이며 MHC 복합체의 해리를 막기 때문이다.

표 11은 MHC 클래스 I 결합 점수를 나타낸다. HLA 클래스 I 제한 펩티드의 HLA-A*02:01에 대한 결합 범위는 펩티드 교환 수율에 의해 정해졌다: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

[0507] [표 11]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
1	GLAGGFGGPGFPV	++++
2	PVCPGGIQEV	+++
3	SLYGLGGSKRISI	+++
4	ILDINDNPPV	+++
5	VCPPGGIQEV	+++
6	ALYDAELSQM	+++
7	ALEEANADLEV	+++
8	AQLNIGNVLPV	++++
9	STASAITPSV	++
10	TLWPATPPKA	+++
11	VLFSPPVI	++++
12	TLTDEINFL	++++
13	SLVSYLDKV	++++
14	RIMEGIPTV	++++
15	SMLNNIINL	+++
16	ALKDSVQRA	+++
17	SIWPALTQV	++++
18	YLYPDL SRL	++++
19	ALAKLLPLL	++++
20	YLINEIDRIRA	++++
21	FLHEPFSSV	++++
22	KLPEPCPSTV	+++
23	SLPESGLLSV	+++
24	LLIAINPQV	++++
25	SLCPPGGIQEV	++++
26	TLVDENQSWYL	+++
27	YLAEPQWAV	++++
28	AVDPVSGSLYV	++++
29	RLLPDLDEV	++++
30	TLASLG YAVV	+++
31	HLATVKLLV	++++
32	IQDAEGAIHEV	++++
33	AIYEGVGWNV	++++
34	ALDTFSVQV	++++
35	ALVGDVILTV	++++
36	GLWSSIFSL	++++
37	ILLEDVFQL	++++

[0508]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
38	KLLPGVQYV	++++
39	LLPEDDTRDNV	+++
40	LLTPLNLQI	+++
41	RLNGEGVGQVNISV	++
42	ALYTSGHLL	++++
43	AVLG GKLYV	++++
44	GLGDDSFPI	++++
45	GLIEWLENTV	++++
46	GLISSIEAQL	++++
47	QLLEGELETL	+++
48	YLLDYPNNL	+++
49	YLWEAHTNI	++++
50	ALSNVVHKV	++++
51	FLIPSIIFA	++++
52	LLFTGLVSGV	+++
53	RLVEVG GDVQL	++++
54	RLSGEGVGPV	+++
55	VLNVGVAEV	+++
56	FLQLETEQV	++++
57	AILGFALSEA	++++
58	SLSDIQPCL	+++
59	YLQNEVFGL	+++
60	SLGNFKDDL	+++
61	FVAGYIAGV	++++
62	ILSSACYTV	++++
63	ALMDEINFMKM	++++
64	KILEJL FVJL	+++
65	ALWGFFPVLL	++++
66	TLLSEIAEL	++++
67	AQLNLIWQL	++++
68	KILEMDDPRA	++
69	YVMESMTYL	++++
70	FLFPAFLTA	++++
71	SLFPYV VLI	++++
72	SLDGNPLAV	++++
73	YIDPYKLLPL	+++
74	SLTSFLISL	+++
75	ALASAPTSV	++++
76	ILFDEVLTFA	++++

[0509]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
77	SLRAFLMPI	++
78	VLYGDVEEL	+++
79	GLHQDFPSVVL	+++
80	GLYGIKDDVFL	++++
81	VLAENPDIFAV	+++
82	VLDINDNPPV	+++
83	QLLQYVYNL	++++
84	ALMAGCIQEA	++++
85	QLIEKITQV	+++
86	SLQERQVFL	+++
87	ALPEPSPAA	+++
88	LMAPAPSTV	+++
89	VLDEGLTSV	++++
90	TLNDGVVVQV	++++
91	MLFENMGAYTV	++++

[0510]

[0511] 참조 문헌 목록

- Abdel-Ghany, M. et al., J Biol Chem **276** (2001): 25438-25446
 Abdelmagid, S. A. et al., J Cell Biochem. **112** (2011): 1084-1092
 Adhikary, G. et al., PLoS.One. **8** (2013): e84324
 Aguiar, R. C. et al., J Biol Chem **280** (2005): 33756-33765
 Ahmed, N. et al., Biol Chem **397** (2016): 1265-1276
 Ai, R. et al., Gene Expr. **11** (2003): 35-45
 Aisa, Y. et al., Int.J Hematol. **82** (2005): 266-269
 Aizawa, S. et al., J Oral Sci. **56** (2014): 209-214
 Akbari, M. R. et al., Hum.Genet. **129** (2011): 573-582
 Akhtar, Ali M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **112** (2015): 7743-7748
 Albergaria, A. et al., Int.J Dev.Biol **55** (2011): 811-822
 Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933
 Alrawi, S. J. et al., Anticancer Res **26** (2006): 107-119
 Ammendola, M. et al., Biomed.Res Int. **2014** (2014): 154702
 Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902
 Andersson, L., Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol **74** (2009): 319-325
 Andersson, L. et al., Transcription. **1** (2010): 144-148
 Annibaldi, A. et al., PLoS.One. **6** (2011): e29024
 Apostolopoulou, M. et al., PLoS.One. **7** (2012): e33289
 Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814
 Arif, Q. et al., Arch.Pathol.Lab Med. **139** (2015): 978-980
 Attallah, A. M. et al., Tumour.Biol **36** (2015): 7667-7674
 Baak, J. P. et al., J Clin Pathol. **59** (2006): 1017-1028
 Bachmann, S. B. et al., Mol Cancer **13** (2014): 125
 Baglo, Y. et al., PLoS.One. **8** (2013): e65200
 Bailey, C. M. et al., J Cell Physiol **209** (2006): 617-624
 Balakrishnan, A. et al., Genes Chromosomes.Cancer **45** (2006): 883-892
 Baluchamy, S. et al., In Vitro Cell Dev.Biol Anim **46** (2010): 718-725
 Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274
 Bao, L. et al., Cell Biol Toxicol. **32** (2016): 419-435
 Bar-Shavit, R. et al., Methods Cell Biol **132** (2016): 341-358
 Barach, Y. S. et al., Trends Mol.Med **17** (2011): 47-55
 Barilli, A. et al., J Leukoc.Biol **90** (2011): 293-303
 Barry, G. S. et al., Oncotarget. **7** (2016): 18953-18964
 Bauml, J. M. et al., Ther.Adv.Med.Oncol **8** (2016): 168-175
 Bausch, D. et al., Clin Cancer Res **17** (2011): 302-309
 Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282
 Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109
 Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300
 Benzon, B. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. (2016)
 Binai, N. A. et al., Endocrine. **44** (2013): 496-503
 Blanckaert, V. et al., Int.J Oncol **46** (2015): 2649-2655
 Bongiovanni, L. et al., Vet.Dermatol. **25** (2014): 138-140
 Bonitsis, N. et al., Exp.Oncol **28** (2006): 187-193

[0512]

- Bottino, C. et al., *Front Immunol.* **5** (2014): 56
 Bouameur, J. E. et al., *J Invest Dermatol.* **134** (2014): 885-894
 Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
 Boyero, L. et al., *Int.J Med Sci.* **10** (2013): 1166-1173
 Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
 Brendle, A. et al., *Carcinogenesis* **29** (2008): 1394-1399
 Broderick, P. et al., *Cancer Res* **69** (2009): 6633-6641
 Brosens, R. P. et al., *J Pathol.* **221** (2010): 411-424
 Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
 Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
 Bruna, F. et al., *Stem Cell Res* **18** (2017): 5-13
 Bryan, R. T., *Philos.Trans.R Soc.Lond B Biol Sci.* **370** (2015): 20140042
 Bryan, R. T. et al., *J Urol.* **184** (2010): 423-431
 Bu, W. et al., *Oncogene* **30** (2011): 4399-4409
 Bustin, S. A. et al., *DNA Cell Biol* **20** (2001): 331-338
 Buttner, S. et al., *EMBO J* **30** (2011): 2779-2792
 Cada, Z. et al., *Histol.Histopathol.* **24** (2009): 41-48
 Camicia, R. et al., *J Cell Sci.* **126** (2013): 1969-1980
 Camicia, R. et al., *Mol.Cancer* **14** (2015): 207
 Campione, E. et al., *Drug Des Devel.Ther.* **9** (2015): 5843-5850
 Camps, J. et al., *Cancer Res* **73** (2013): 2003-2013
 Canto, I. et al., *Mini.Rev Med Chem* **12** (2012): 804-811
 Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
 Cazier, J. B. et al., *Nat Commun.* **5** (2014): 3756
 Chang, H. H. et al., *Cancer* **117** (2011): 353-360
 Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
 Chanthammachat, P. et al., *Arch.Oral Biol* **58** (2013): 1677-1685
 Chen, J. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **8** (2015): 2026-2032
 Chen, L. et al., *Oncotarget.* (2016)
 Chen, Q. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e88386
 Chien, A. J. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **155** (2016): 521-530
 Choi, J. R. et al., *Ann.Occup.Environ.Med* **28** (2016): 13
 Choi, Y. K. et al., *Cancer Genomics Proteomics.* **10** (2013): 265-275
 Chowdhury, R. et al., *Nature* **510** (2014): 422-426
 Chuang, J. J. et al., *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **279** (2014): 322-330
 Chung, T. K. et al., *Int.J Cancer* **137** (2015): 776-783
 Cipolat, S. et al., *Elife.* **3** (2014): e01888
 Clark, D. L. et al., *J Anim Sci.* **93** (2015): 2546-2558
 Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* **16** (2003a): 324-332
 Cohen, C. J. et al., *J Immunol* **170** (2003b): 4349-4361
 Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69** (1972): 2110-2114
 Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
 Colombetti, S. et al., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738
 Corsaro, A. et al., *Oncotarget.* **7** (2016): 38638-38657
 D'Asti, E. et al., *Semin.Thromb.Hemost.* **40** (2014): 284-295
 Das, M. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e69607

[0513]

- Das, M. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015): 9987-9994
 David, G. et al., *Oncogene* **25** (2006): 7354-7360
 Davies, E. L. et al., *Eur.J Cancer* **35** (1999): 902-907
 Delgado, A. P. et al., *Cancer Genomics Proteomics*. **11** (2014): 201-213
 Deng, M. et al., *J Biol Chem* **284** (2009): 7875-7888
 Deng, W. et al., *Cell Physiol Biochem*. **35** (2015): 1677-1688
 Deng, Y. et al., *Cancer Invest* **31** (2013): 97-102
 Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
 Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003): 2197-2207
 Depianto, D. et al., *Nat Genet.* **42** (2010): 910-914
 Dewar, R. et al., *Arch.Pathol.Lab Med* **135** (2011): 422-429
 do Prado, R. F. et al., *Oral Surg.Oral Med Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* **104** (2007): e40-e44
 Dorn, J. et al., *Oncol Lett.* **9** (2015): 418-424
 Dotlic, S. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* **22** (2014): 537-542
 Dou, N. et al., *Am.J Cancer Res* **6** (2016): 2641-2650
 Drucker, K. L. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015): 565
 Du, L. et al., *Cancer Res* **73** (2013): 2682-2694
 Dubash, A. D. et al., *J Cell Biol* **202** (2013): 653-666
 Duggan, M. A., *Gan To Kagaku Ryoho* **29 Suppl 1** (2002): 176-193
 Economopoulou, P. et al., *Ann.Transl.Med.* **4** (2016): 173
 Eichler, T. E. et al., *Kidney Int.* **90** (2016): 568-579
 El-Rifai, W. et al., *Cancer Res* **62** (2002): 6823-6826
 Elste, A. P. et al., *J Mol.Histol.* **41** (2010): 89-99
 Epp, N. et al., *J Cell Biol* **177** (2007): 173-182
 Er, T. K. et al., *J Mol.Med.(Berl)* (2016)
 Esteban-Jurado, C. et al., *Eur.J Hum.Genet.* **24** (2016): 1501-1505
 Ettl, T. et al., *Clin Exp.Med* (2016)
 Evangelista, M. T. et al., *J Cutan.Pathol.* **42** (2015): 824-831
 Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
 Fan, J. et al., *Clin Cancer Res* **17** (2011): 2908-2918
 Fang, W. K. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 871-876
 Fang, W. Y. et al., *Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai)* **37** (2005): 541-546
 Fauci, J. M. et al., *Gynecol.Oncol* **127** (2012): 420-425
 Fevre-Montange, M. et al., *Int.J Oncol* **35** (2009): 1395-1407
 Fijneman, R. J. et al., *Clin Cancer Res* **18** (2012): 2613-2624
 Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
 French, J. et al., *Histochem.J* **34** (2002): 223-231
 Frohwitter, G. et al., *Oncol Lett.* **12** (2016): 107-113
 Funakoshi-Tago, M., *Yakugaku Zasshi* **132** (2012): 1267-1272
 Furstenberger, G. et al., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **82** (2007): 128-134
 Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
 Galoian, K. et al., *Mol.Clin Oncol* **3** (2015): 171-178
 Gandhi, C. R. et al., *Gastroenterology* **148** (2015): 379-391
 Gao, W. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015): 367
 Gao, Y. et al., *Di Yi.Jun.Yi.Da.Xue.Xue.Bao.* **23** (2003): 885-887
 Gao, Y. B. et al., *Nat Genet.* **46** (2014): 1097-1102

[0514]

- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
 Gazda, H. T. et al., *Hum.Mutat* **33** (2012): 1037-1044
 Ge, W. et al., *Nat Chem Biol* **8** (2012): 960-962
 Gelfand, R. et al., *Int.J Oncol* **50** (2017): 49-65
 Gemmill, R. M. et al., *Cancer Lett* **300** (2011): 66-78
 Gieseler, F. et al., *Cell Commun.Signal* **11** (2013): 86
 Giguere, A. et al., *Cancer Genet.Cytogenet* **202** (2010): 94-100
 Gnjjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003): 8862-8867
 Godkin, A. et al., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
 Gomez-Morales, M. et al., *Histopathology* **63** (2013): 103-113
 Gorski, J. J. et al., *Breast Cancer Res Treat* **122** (2010): 721-731
 Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
 Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
 Grin, A. et al., *Hum.Pathol* **46** (2015): 541-548
 Grosset, A. A. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014): 801
 Grosset, A. A. et al., *PLoS.One* **11** (2016): e0166731
 Gruber, A. D. et al., *Cancer Res* **59** (1999): 5488-5491
 Gupta, S. K. et al., *Innate.Immun.* **19** (2013): 86-97
 Haass, N. K. et al., *Pigment Cell Res* **18** (2005): 150-159
 Hammam, O. et al., *J Egypt.Soc.Parasitol* **44** (2014): 733-740
 Harris, T. M. et al., *Arch.Pathol.Lab Med* **139** (2015): 494-507
 Hatina, J. et al., *Neoplasma* **59** (2012): 728-736
 Hatta, M. et al., *J Obstet.Gynaecol.Res* **30** (2004): 53-58
 Hayes, D. C. et al., *Anticancer Res* **26** (2006): 1567-1575
 He, C. S. et al., *Cell Physiol Biochem* **40** (2016): 1221-1229
 He, X. et al., *Int.J Biol Macromol* **72** (2015): 1081-1089
 Heidenreich, B. et al., *Curr.Opin.Genet.Dev* **24** (2014): 30-37
 Heikinheimo, K. et al., *J Dent.Res* **86** (2007): 544-549
 Heikinheimo, K. et al., *J Dent.Res* **94** (2015): 101-111
 Herold-Mende, C. et al., *Cell Tissue Res* **306** (2001): 399-408
 Higareda-Almaraz, J. C. et al., *BMC.Cancer* **16** (2016): 680
 Hoadley, K. A. et al., *PLoS.Med* **13** (2016): e1002174
 Honrado, E. et al., *Crit Rev Oncol Hematol* **59** (2006): 27-39
 Horiguchi, K. et al., *Oncogene* **31** (2012): 3190-3201
 Hu, J. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol* **8** (2015): 9182-9188
 Huang, Y. P. et al., *Biomedicine.(Taipei)* **6** (2016): 3
 Huang, Y. Z. et al., *Sci.Rep.* **4** (2014): 4570
 Huber, A. R. et al., *BMC.Gastroenterol* **15** (2015): 80
 Hwang, M. L. et al., *J Immunol* **179** (2007): 5829-5838
 Hwang, Y. S. et al., *J Cancer Prev* **20** (2015): 121-128
 Ida-Yonemochi, H. et al., *Mod.Pathol* **25** (2012): 784-794
 Iino, I. et al., *Cancer Sci* **104** (2013): 624-630
 Inamura, K. et al., *Lung Cancer* **103** (2017): 44-51
 Ioana, M. et al., *J Gastrointestin.Liver Dis* **19** (2010): 155-159
 Iorns, E. et al., *Breast Cancer Res Treat* **135** (2012): 79-91
 Ishii, H. et al., *J Biol Chem* **289** (2014): 27386-27399

[0515]

- Ishimi, Y. et al., *J Biochem.* **157** (2015): 561-569
 Janakiram, M. et al., *Discov Med* **14** (2012): 229-236
 Janakiram, M. et al., *Immunotherapy* **8** (2016): 809-819
 Jiang, L. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e94187
 Jiang, M. M. et al., *Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi.* **21** (2013): 821-829
 Jiang, R. et al., *J Biol Chem* **286** (2011): 9127-9135
 Jiang, Y. et al., *Oncol Lett.* **10** (2015): 3826-3831
 Johnson, R. H. et al., *Oncotarget.* (2015)
 Joosse, S. A. et al., *Clin Cancer Res* **18** (2012): 993-1003
 Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
 Jurcic, V. et al., *Histol.Histopathol.* **30** (2015): 945-953
 Juszczynski, P. et al., *Mol.Cell Biol* **26** (2006): 5348-5359
 Kakuda, D. K. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1414** (1998): 75-84
 Kan, T. et al., *Oncology* **70** (2006): 25-33
 Kaplun, A. et al., *Crit Rev Eukaryot.Gene Expr.* **22** (2012): 249-258
 Kasthuri, R. S. et al., *J Clin Oncol* **27** (2009): 4834-4838
 Katada, K. et al., *J Proteomics.* **75** (2012): 1803-1815
 Katoh, M., *Int.J Oncol* **41** (2012): 1913-1918
 Kawakami, K. et al., *Int.J Oncol* (2015)
 Kaz, A. M. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **51** (2012): 384-393
 Kedde, M. et al., *Cell Cycle* **7** (2008): 899-903
 Kettunen, E. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* **149** (2004): 98-106
 Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* **rd** (2000)
 Kim, H. J. et al., *Anticancer Res* **33** (2013): 1555-1561
 Kim, K. et al., *Int.J Colorectal Dis.* **23** (2008a): 569-580
 Kim, K. H. et al., *Nucleic Acids Res* **43** (2015): 7462-7479
 Kim, S. W. et al., *Blood* **111** (2008b): 1644-1653
 Kim, T. W. et al., *Oncotarget.* (2016)
 Kim, Y. H. et al., *Ann.Surg.Oncol* **18** (2011): 2338-2347
 Kinyamu, H. K. et al., *Mol.Carcinog* **47** (2008): 845-885
 Kishikawa, T. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 8339-8352
 Kitchen, M. O. et al., *Epigenetics.* **11** (2016): 237-246
 Klawitter, J. et al., *Breast Cancer Res* **12** (2010): R16
 Knudsen, K. A. et al., *J Cell Biochem.* **95** (2005): 488-496
 Koba, S. et al., *Am.J Dermatopathol.* **37** (2015): e31-e36
 Kobos, R. et al., *J Pathol.* **229** (2013): 743-754
 Koc, E. C. et al., *Mitochondrion.* **24** (2015): 113-121
 Kocaturk, B. et al., *Thromb.Res* **129 Suppl 1** (2012): S69-S75
 Kocaturk, B. et al., *J Thromb.Haemost.* **11 Suppl 1** (2013): 285-293
 Kohn, K. W. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e99269
 Kolin, D. L. et al., *Biol Chem* **395** (2014): 1087-1093
 Koringa, P. G. et al., *Vet.Comp Oncol* (2013)
 Krepischi, A. C. et al., *Breast Cancer Res* **14** (2012): R24
 Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* **5** (2006): 471-484
 Kwok, H. F. et al., *Am.J Cancer Res* **5** (2015): 52-71
 Kwon, J. et al., *Int J Oncol* **43** (2013): 1523-1530

[0516]

- Labrie, M. et al., PLoS.One. **10** (2015): e0131307
 Labrie, M. et al., Oncotarget. **5** (2014): 7705-7721
 Lee, D. J. et al., Cancer Biol Ther. **10** (2010): 689-693
 Lee, D. M. et al., Environ.Toxicol.Pharmacol. **34** (2012): 858-868
 Lee, J. Y. et al., Carcinogenesis **30** (2009): 1528-1531
 Lee, K. Y. et al., J Med. **35** (2004): 141-149
 Leiserson, M. D. et al., Genome Biol **16** (2015): 160
 Leiserson, M. D. et al., Genome Biol **17** (2016): 168
 Leung, F. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **25** (2016): 1333-1340
 Leung, J. et al., Immune.Netw. **14** (2014): 265-276
 Lexander, H. et al., Anal.Quant.Cytol.Histol. **27** (2005): 263-272
 Li, J. et al., Chin Med J (Engl.) **122** (2009): 486-495
 Li, J. Z. et al., Chin Med.J (Engl.) **121** (2008): 1882-1890
 Li, L. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **13** (2012a): 3265-3270
 Li, T. et al., Exp.Dermatol. **24** (2015): 342-348
 Li, W. Q. et al., Carcinogenesis **34** (2013): 1536-1542
 Li, X. et al., Oncogene **23** (2004): 1474-1480
 Li, X. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **419** (2012b): 148-153
 Li, Y. et al., J Cell Physiol **212** (2007): 675-681
 Lian, M. et al., PLoS.One. **8** (2013): e84854
 Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
 Lim, L. C. et al., Pathol.Oncol Res **22** (2016): 169-177
 Lima, L. G. et al., Biosci.Rep. **33** (2013)
 Lin, C. S. et al., Cancer Lett. **368** (2015): 36-45
 Lin, H. S. et al., Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg. **130** (2004): 311-316
 Lion, M. et al., Cell Cycle **12** (2013): 1211-1224
 Liu, C. L. et al., Eur.Rev Med Pharmacol.Sci. **20** (2016): 4466-4473
 Liu, D. Q. et al., Sci.Rep. **5** (2015): 11955
 Liu, J. et al., J Biochem. **148** (2010): 659-667
 Liu, Y. et al., Oncol Rep. **18** (2007): 943-951
 Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759
 Llorente, A. et al., J Cell Sci. **117** (2004): 5343-5351
 Lo, W. Y. et al., J Proteomics. **77** (2012): 154-166
 Lonardo, F. et al., Curr.Pharm.Des **16** (2010): 1877-1881
 Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
 Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585
 Loos, M. et al., Clin Dev.Immunol. **2010** (2010): 683875
 Low, K. C. et al., Trends Biochem.Sci. **38** (2013): 426-434
 Lu, J. J. et al., Chin J Nat Med. **13** (2015a): 673-679
 Lu, Y. et al., BMC.Mol.Biol **16** (2015b): 21
 Lu, Y. et al., PLoS.One. **8** (2013): e73866
 Lubben, B. et al., J Biol Chem **270** (1995): 11549-11554
 Lucito, R. et al., Cancer Biol Ther. **6** (2007): 1592-1599
 Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
 Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
 Luo, D. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. (2016)

[0517]

- Maass, N. et al., *Acta Oncol* **39** (2000): 931-934
 Maerki, S. et al., *J Cell Biol* **187** (2009): 791-800
 Man, Y. et al., *Tohoku J Exp.Med* **234** (2014): 29-40
 Mange, A. et al., *J Proteomics*. **142** (2016): 114-121
 Marech, I. et al., *World J Gastroenterol*. **20** (2014): 8910-8920
 Marioni, G. et al., *Acta Otolaryngol*. **129** (2009): 476-480
 Markljung, E. et al., *PLoS.Biol* **7** (2009): e1000256
 Marshall, P. A. et al., *J Steroid Biochem.Mol.Biol* **132** (2012): 147-159
 Martinez, O. et al., *PLoS.One*. **5** (2010): e10398
 Masugi, Y. et al., *Lab Invest* **95** (2015): 308-319
 Matin, S. F. et al., *Urol.Oncol* **32** (2014): 309-316
 Matsumoto, K. et al., *Biomed.Res* **35** (2014): 201-206
 Matsuzaka, K. et al., *Bull.Tokyo Dent.Coll*. **45** (2004): 229-233
 McDoniels-Silvers, A. L. et al., *Clin Cancer Res* **8** (2002): 1127-1138
 Mei, Z. Z. et al., *J Biol Chem* **291** (2016): 18176-18189
 Melaiu, O. et al., *Mutat.Res* **771** (2015): 6-12
 Meschenmoser, K. et al., *In Vivo* **27** (2013): 431-442
 Meslin, F. et al., *Cancer Res* **67** (2007): 10910-10919
 Messina, M. et al., *Blood* **123** (2014): 2378-2388
 Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
 Min, L. et al., *Histopathology* **67** (2015): 677-688
 Misago, N. et al., *J Dermatol*. **43** (2016): 439-442
 Mitchell, S. M. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014): 54
 Mlacki, M. et al., *PLoS.One*. **9** (2014): e89247
 Morgan, P. R. et al., *Eur.J Cancer B Oral Oncol* **30B** (1994): 160-166
 Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
 Mori, M. et al., *Transplantation* **64** (1997): 1017-1027
 Morris, L. G. et al., *Nat Genet*. **45** (2013): 253-261
 Morris, M. R. et al., *Oncogene* **30** (2011): 1390-1401
 Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res*. **12** (2006): 3435-3443
 Moskvina, L. V. et al., *Arkh.Patol*. **72** (2010): 58-61
 Mountzios, G. et al., *Ann.Oncol* **25** (2014): 1889-1900
 Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* **7** (2008): 51-61
 Mueller, L. N. et al., *Proteomics*. **7** (2007): 3470-3480
 Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
 Muramatsu, T. et al., *Oral Oncol* **39** (2003): 199-203
 Mussai, F. et al., *Blood* **125** (2015): 2386-2396
 Myklebust, M. P. et al., *Br.J Cancer* **106** (2012): 756-762
 Naeem, A. S. et al., *Cell Death.Differ*. **22** (2015): 2123-2132
 Nagappan, A. et al., *BMC.Biochem*. **14** (2013): 24
 Nagata, M. et al., *PLoS.One*. **9** (2014): e93164
 Narayanan, B. A., *Curr.Cancer Drug Targets*. **6** (2006): 711-727
 Narisawa, Y. et al., *J Dermatol*. **42** (2015): 445-452
 National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
 Natsuga, K. et al., *J Invest Dermatol*. (2015)
 Natsuga, K. et al., *J Invest Dermatol*. **136** (2016): 99-106

[0518]

- Neumann, M. et al., *Blood* **121** (2013): 4749-4752
- North, J. P. et al., *Am.J Surg.Pathol.* **39** (2015): 1347-1356
- Novak, B. et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **384** (2011): 583-602
- Nygren, M. K. et al., *Front Biosci.(Elite.Ed)* **3** (2011): 989-993
- Oehler, V. G. et al., *Blood* **114** (2009): 3292-3298
- Oh, H. R. et al., *Cell Oncol (Dordr.)* **37** (2014): 455-461
- Oi, N. et al., *Oncogene* **34** (2015): 2660-2671
- Oikonomopoulou, K. et al., *Biol Chem* **391** (2010): 299-310
- Ormanns, S. et al., *Br.J Cancer* **113** (2015): 1460-1466
- Otsubo, T. et al., *Cancer Med* **4** (2015): 415-425
- Palacios, J. et al., *Pathobiology* **75** (2008): 85-94
- Papagerakis, S. et al., *Hum.Pathol.* **34** (2003): 565-572
- Paparella, M. L. et al., *J Oral Pathol.Med* **44** (2015): 801-809
- Paredes, J. et al., *Breast Cancer Res* **9** (2007): 214
- Paredes, J. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1826** (2012): 297-311
- Park, J. Y. et al., *Oncotarget* **6** (2015a): 5342-5353
- Park, J. H. et al., *Int.J Cancer* **136** (2015b): 1976-1984
- Pereira, P. M. et al., *Org.Biomol.Chem.* **12** (2014): 1804-1811
- Perrin, C. et al., *Am.J Dermatopathol.* **33** (2011): 131-139
- Persson, F. et al., *Cancer Lett.* **260** (2008): 37-47
- Pickering, C. R. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 6582-6592
- Pierce, A. et al., *Mol.Cell Proteomics.* **7** (2008): 853-863
- Pigullo, S. et al., *Pediatr.Blood Cancer* **52** (2009): 376-378
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Piura, B. et al., *Harefuah* **144** (2005): 261-5, 303, 302
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- Poligone, B. et al., *J Invest Dermatol.* **135** (2015): 869-876
- Polotskaia, A. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **112** (2015): E1220-E1229
- Pondugula, S. et al., *Mol.Cell Biol* **29** (2009): 4891-4905
- Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- Preis, K. et al., *Orv.Hetil.* **148** (2007): 979-983
- Probst, C. et al., *Clin Chim.Acta* **410** (2009): 13-18
- Qiu, S. et al., *Cancer Sci.* (2016)
- Qu, T. et al., *Mol.Med Rep.* **14** (2016): 5041-5048
- Rafnar, T. et al., *Cancer Res* **71** (2011): 1356-1361
- Ramakrishna, S. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e37772
- Ramakrishna, S. et al., *J Biol Chem* **286** (2011): 10505-10514
- Ramani, D. et al., *Clin Nutr.* **33** (2014): 14-22
- Ramani, V. C. et al., *BMC.Cancer* **8** (2008): 373
- Ramena, G. et al., *PLoS.One.* **11** (2016): e0147489
- Rammensee, H. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- Rashid, R. et al., *Mol.Cell* **21** (2006): 249-260
- Rastelli, F. et al., *Tumori* **96** (2010): 875-888
- Ratovitski, E. A., *FEBS Lett.* **587** (2013): 3581-3586

- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Rommelink, M. et al., *Histopathology* **58** (2011): 543-556
- Resende, C. et al., *Helicobacter*. **16 Suppl 1** (2011): 38-44
- Reyes, C. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* **21** (2013): 283-286
- Ribeiro, A. S. et al., *Front Oncol* **4** (2014): 371
- Riker, A. I. et al., *BMC.Med Genomics* **1** (2008): 13
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rohan, S. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 6937-6945
- Rohrbeck, A. et al., *PLoS.One.* **4** (2009): e7315
- Rooney, M. S. et al., *Cell* **160** (2015): 48-61
- Rotmann, A. et al., *Biochem.J* **395** (2006): 117-123
- Rotty, J. D. et al., *J Cell Biol* **197** (2012): 381-389
- Ruf, W., *Thromb.Res* **130 Suppl 1** (2012): S84-S87
- Ruf, W. et al., *J Thromb.Haemost.* **9 Suppl 1** (2011): 306-315
- Rui, X. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **8** (2015): 5435-5442
- Saaber, F. et al., *Pathol.Res Pract.* **211** (2015): 208-213
- Sabeti, S. et al., *Indian J Dermatol.* **58** (2013): 331-336
- Safadi, R. A. et al., *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.* **121** (2016): 402-411
- Sager, R. et al., *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **213 (Pt 1)** (1996): 51-64
- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Salas, S. et al., *Int.J Cancer* **125** (2009): 851-860
- Saletta, F. et al., *BBA.Clin* **1** (2014): 59-77
- Sanchez-Palencia, A. et al., *Int.J Cancer* **129** (2011): 355-364
- Sasaki, Y. et al., *Cancer Biol Ther.* **13** (2012): 1512-1521
- Sato, T. et al., *Oncogene* **33** (2014): 2215-2224
- Sauer, H. et al., *Free Radic.Biol Med* **27** (1999): 1276-1283
- Sawada, K. et al., *J Oral Sci.* **58** (2016): 325-331
- Schmitt-Graeff, A. et al., *Histopathology* **51** (2007): 87-97
- Schrader, C. H. et al., *Mol.Cancer* **14** (2015): 107
- Schulten, R. et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **385** (2012): 969-979
- Schumann, H. et al., *Br.J Dermatol.* **167** (2012): 929-936
- Scola, N. et al., *Br.J Dermatol.* **167** (2012): 591-597
- Seal, S. et al., *Cancer Res* **63** (2003): 8596-8599
- Sedda, S. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 11977-11984
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- Seishima, M. et al., *Arch.Dermatol.* **140** (2004): 1500-1503
- Sellheyer, K., *J Cutan.Pathol.* **42** (2015): 90-101
- Sharifi, N. et al., *Prostate* **67** (2007): 301-311
- Shen, M. et al., *Environ.Mol.Mutagen* **50** (2009): 285-290
- Shen, X. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015): 7133-7142
- Sheng, S., *Front Biosci.* **9** (2004): 2733-2745
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Shi, L. et al., *BMC.Cancer* **16** (2016): 815
- Shim, J. H. et al., *Cancer Prev.Res (Phila)* **3** (2010): 670-679

[0520]

- Shimbo, T. et al., PLoS.One. **5** (2010): e10566
 Shinmura, K. et al., Dis.Markers **2014** (2014): 619273
 Shruthi, D. K. et al., J Oral Maxillofac.Pathol. **18** (2014): 365-371
 Sidiropoulos, K. G. et al., Mol.Oncol **10** (2016): 993-1007
 Silveira, A. C. et al., Cancer Lett. **276** (2009): 32-37
 Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
 Sinha, N. et al., Oral Oncol **49** (2013): 854-862
 Sivanathan, L. et al., Prostate **74** (2014): 537-546
 Sizemore, G. M. et al., J Biol Chem **289** (2014): 24102-24113
 Skipworth, R. J. et al., Int.J Oncol **36** (2010): 973-982
 Slaga, T. J. et al., Prog.Clin Biol Res **391** (1995): 1-20
 Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
 Smith, K. T. et al., Mol.Cell Proteomics. **11** (2012): 1815-1828
 Sobolik-Delmaire, T. et al., Cell Commun.Adhes. **14** (2007): 99-109
 Solus, J. F. et al., Int.J Surg.Pathol. **24** (2016): 29-36
 Somasekharan, S. P. et al., J Cell Biol **208** (2015): 913-929
 Song, B. et al., Exp.Ther.Med **12** (2016): 2455-2468
 Soreide, K. et al., J Pathol. **209** (2006): 147-156
 Southgate, J. et al., Histol.Histopathol. **14** (1999): 657-664
 Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
 Sun, B. C. et al., Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi. **86** (2006): 1808-1812
 Sun, L. et al., Mol.Med Rep. **12** (2015a): 4266-4272
 Sun, N. K. et al., Oncotarget. **6** (2015b): 27065-27082
 Sun, S. et al., Gene **584** (2016): 90-96
 Suzuki, A. et al., Cancer Sci. **99** (2008): 986-994
 Swatler, J. et al., Postepy Hig.Med Dosw.(Online.) **70** (2016): 25-42
 Swoboda, R. K. et al., Cancer Res **67** (2007): 3555-3559
 Tai, G. et al., PLoS.One. **8** (2013): e81167
 Taintor, A. R. et al., J Am.Acad.Dermatol. **56** (2007): S73-S76
 Tamir, A. et al., J Ovarian.Res **7** (2014): 109
 Tamm-Rosenstein, K. et al., PLoS.One. **8** (2013): e68907
 Tang, B. et al., Oncotarget. **6** (2015a): 12723-12739
 Tang, H. B. et al., Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi. **88** (2008): 1553-1556
 Tang, X. H. et al., Oncotarget. **6** (2015b): 24424-24435
 Taniguchi, T. et al., Nat Med **9** (2003): 568-574
 Taoka, Y. et al., Biomed.Res **36** (2015): 253-261
 Tauber, S. et al., Mol.Cancer **9** (2010): 200
 Teles, Alves, I et al., Oncogene **34** (2015): 568-577
 Tennenbaum, T. et al., J Investig.Dermatol.Symp.Proc. **1** (1996): 157-161
 Teo, C. R. et al., Cell Signal. **28** (2016): 1479-1488
 Terada, T., Int.J Clin Exp.Pathol. **5** (2012): 596-600
 Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
 Tian, S. Y. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014): 3752-3762
 Timar, J. et al., Clin Exp.Metastasis **27** (2010): 371-387
 Tomlinson, R. L. et al., Mol.Biol Cell **19** (2008): 3793-3800
 Tonoike, Y. et al., BMC.Cell Biol **12** (2011): 41

[0521]

- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
Trojandt, S. et al., *Hum.Immunol.* **77** (2016): 1223-1231
Tsuji, A. B. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **333** (2005): 1370-1377
Tsutsui, M. et al., *Int.J Oncol* **47** (2015): 867-874
Ueda, S. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 5672-5676
Vadie, N. et al., *RNA.Biol* **12** (2015): 893-899
Vakrakou, A. et al., *Biol Chem* **395** (2014): 1105-1117
Valletta, D. et al., *Carcinogenesis* **35** (2014): 1407-1415
Vanaja, D. K. et al., *Cancer Res* **63** (2003): 3877-3882
Vasca, V. et al., *Oncol Lett.* **8** (2014): 2501-2504
Vieira, A. F. et al., *Mol.Cancer* **14** (2015): 178
Vigneswaran, N. et al., *Oral Maxillofac.Surg.Clin North Am.* **26** (2014): 123-141
Vliet-Gregg, P. A. et al., *Virology* **478** (2015): 50-60
Volkmer, J. P. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **109** (2012): 2078-2083
Walia, V. et al., *Cancer Res* **69** (2009): 6624-6632
Walia, V. et al., *Oncogene* **31** (2012): 2237-2246
Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
Wang, J. et al., *Br.J Dermatol.* **153** (2005): 558-564
Wang, L. et al., *J Cutan.Pathol.* **42** (2015a): 361-367
Wang, L. et al., *Int.J Cancer* **134** (2014a): 2764-2771
Wang, L. et al., *Tumour.Biol* **37** (2016a): 14939-14947
Wang, M. et al., *Exp.Dermatol.* **23** (2014b): 636-638
Wang, S. et al., *Cytokine* **86** (2016b): 110-118
Wang, X. et al., *Oncotarget.* **7** (2016c): 22911-22927
Wang, X. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **110** (2013): 15997-16002
Wang, X. et al., *Mol.Cell Biol* **27** (2007): 3098-3108
Wang, X. et al., *Eur.J Pharmacol.* **768** (2015b): 116-122
Wang, X. et al., *Sci.Rep.* **6** (2016d): 19006
Wang, X. et al., *Int.J Biol Markers* **29** (2014c): e150-e159
Wang, Z. S. et al., *Oncotarget.* **7** (2016e): 44266-44276
Ward, A. M. et al., *RNA.Biol* **8** (2011): 1173-1186
Watanabe, T. et al., *Cancer Cell Int.* **10** (2010): 2
Wheler, J. J. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015): 442
Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
Willers, I. M. et al., *Biochim.Biophys. Acta* **1807** (2011): 543-551
Williams, L. M. et al., *Aquat.Toxicol.* **180** (2016): 141-154
Willis, S. et al., *Meta Gene* **4** (2015): 129-141
Winslow, S. et al., *Mol.Cancer* **12** (2013): 156
Witte, D. et al., *J Clin Med* **5** (2016)
Wojtalewicz, N. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e90461
Wojtukiewicz, M. Z. et al., *Cancer Metastasis Rev* **34** (2015): 775-796
Wong, M. P. et al., *Pathology* **40** (2008): 611-616
World Health Organization, (2014), <http://www.who.int/en/>
Wreesmann, V. B. et al., *ORL J Otorhinolaryngol.Relat Spec.* **69** (2007): 218-225
Wu, S. et al., *Oncotarget.* (2016)

[0522]

- Xi, Y. et al., *Monoclon.Antib.Immunodiagn.Immunother.* **34** (2015): 346-353
- Xie, C. et al., *Sci.Rep.* **6** (2016a): 27528
- Xie, X. et al., *Obesity.(Silver.Spring)* **24** (2016b): 389-397
- Xin, Z. et al., *Virchows Arch.* **465** (2014): 35-47
- Xu, C. et al., *PLoS.Genet.* **9** (2013): e1003169
- Xu, X. et al., *Proteomics.* **10** (2010): 1374-1390
- Xue, L. Y. et al., *Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.* **32** (2010): 838-844
- Yadav, R. et al., *J Neurochem.* **133** (2015): 857-869
- Yamaguchi, T. et al., *Exp.Dermatol.* **22** (2013): 840-842
- Yamazaki, K., *Ultrastruct.Pathol.* **31** (2007): 209-219
- Yang, C. et al., *Tumour.Biol* (2015)
- Yang, F. et al., *Biomed.Rep.* **4** (2016a): 681-686
- Yang, H. Y. et al., *J Proteomics.* **75** (2012a): 3639-3653
- Yang, J. et al., *Curr.Opin.Oncol* **25** (2013): 398-406
- Yang, L. et al., *Carcinogenesis* **33** (2012b): 1863-1870
- Yang, L. et al., *J Biol Chem* **291** (2016b): 3905-3917
- Ye, Z. et al., *Cell Physiol Biochem.* **39** (2016): 1568-1580
- Yermachenko, A. et al., *Gene* **590** (2016): 85-89
- Yi, K. H. et al., *Immunol.Rev* **229** (2009): 145-151
- Yi, Y. et al., *Mol.Cytogenet.* **2** (2009): 18
- Yong, A. A. et al., *Australas.J Dermatol.* **54** (2013): 241-250
- Yongjun Zhang, M. M. et al., *J Cancer Res Ther.* **9** (2013): 660-663
- Yu, X. J. et al., *EBioMedicine* **2** (2015a): 583-590
- Yu, Y. et al., *ACS Appl.Mater.Interfaces.* **7** (2015b): 4401-4405
- Yu, Y. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e83943
- Yun, C. W. et al., *Anticancer Res* **36** (2016): 4449-4458
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- Zdrojewicz, Z. et al., *Postepy Hig.Med Dosw.(Online.)* **68** (2014): 393-403
- Zekri, A. R. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **16** (2015): 3543-3549
- Zhang, H. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 17039-17053
- Zhang, Q. et al., *Endocrinology* **143** (2002): 4788-4796
- Zhang, S. et al., *J Mol.Histol.* **45** (2014a): 283-292
- Zhang, W. et al., *Tumori* **100** (2014b): 338-345
- Zhang, Y. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e30188
- Zhao, L. H. et al., *Genet.Mol.Res* **14** (2015): 5417-5426
- Zhao, L. J. et al., *Chin Med.J (Engl.)* **126** (2013): 4260-4264
- Zhao, S. et al., *Clin Cancer Res* **23** (2017): 311-319
- Zheng, G. et al., *FEBS J* **277** (2010): 4506-4518
- Zhou, L. et al., *Int.J Cancer* **135** (2014): 2329-2337
- Zhou, P. et al., *Eur.J Cancer Prev.* **21** (2012): 231-240
- Zhou, X. et al., *Oncotarget.* **7** (2016): 67196-67211
- Zhu, X. et al., *J Dermatol.* **34** (2007): 503-511
- Zhu, Y. et al., *Mol.Biol Cell* **15** (2004): 81-90
- Ziari, K. et al., *Biologicals* **43** (2015): 181-185
- Ziegler, A. et al., *Cancer Lett.* **326** (2012): 1-7
- Zimmermann, J. et al., *J Dtsch.Dermatol.Ges.* **8** (2010): 598-606
- Zubor, P. et al., *Mol.Biol.Rep.* **42** (2015): 977-988

[0523]

페티드: GLAGGFGGPGFPV (A*02)
서열식별번호: 1

상대적 제시 [임의 단위]

445 개 정상 조직

6 개 지방 조직, 8 개 부신, 1 개 담관, 24 개 혈액 세포, 15 개 혈관, 10 개 골수, 15 뇌, 7 개 유방, 11 개 식도, 2 개 눈, 6 개
담낭, 16 개 심장, 17 개 신장, 27 개 대장, 24 개 간, 49 개 폐, 7 개 림프절, 12 개 신경, 5 개 난소, 15 개 체장, 6 개 부갑상선,
3 개 복막, 7 개 뇌하수체, 10 개 태반, 3 개 흉막, 11 개 전립선, 9 개 골격근, 11 개 피부, 16 개 소장, 13 개 비장, 9 개 위, 8 개
고환, 3 개 홍선, 8 개 갑상선, 18 개 기관, 7 개 요관, 8 개 방광, 6 개 자궁, 12 개 두경부

17 개

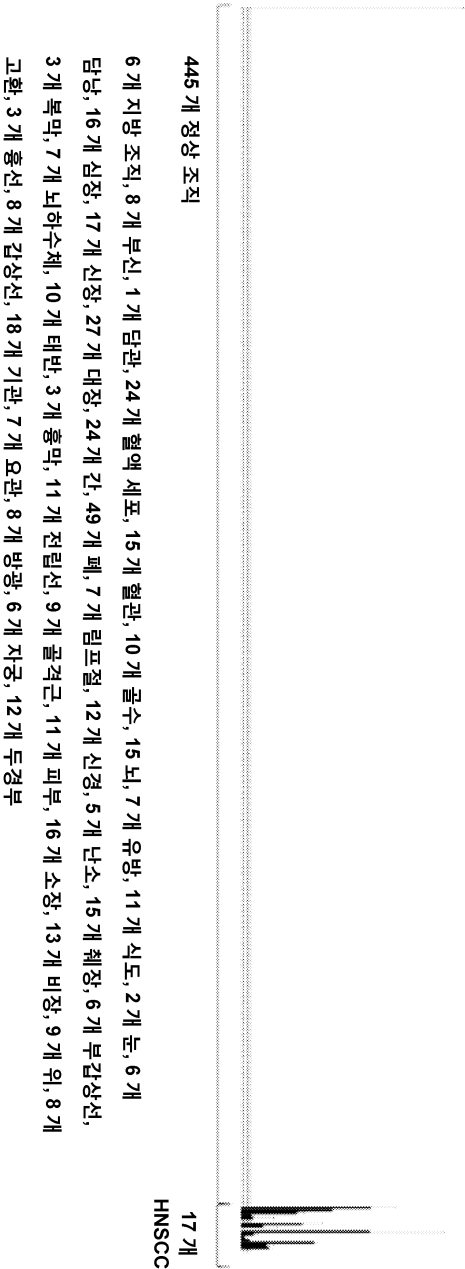
HNSCC

도면

도면1a

펩티드: SYGLGGSKRISI (A*02)
서열식별번호: 3

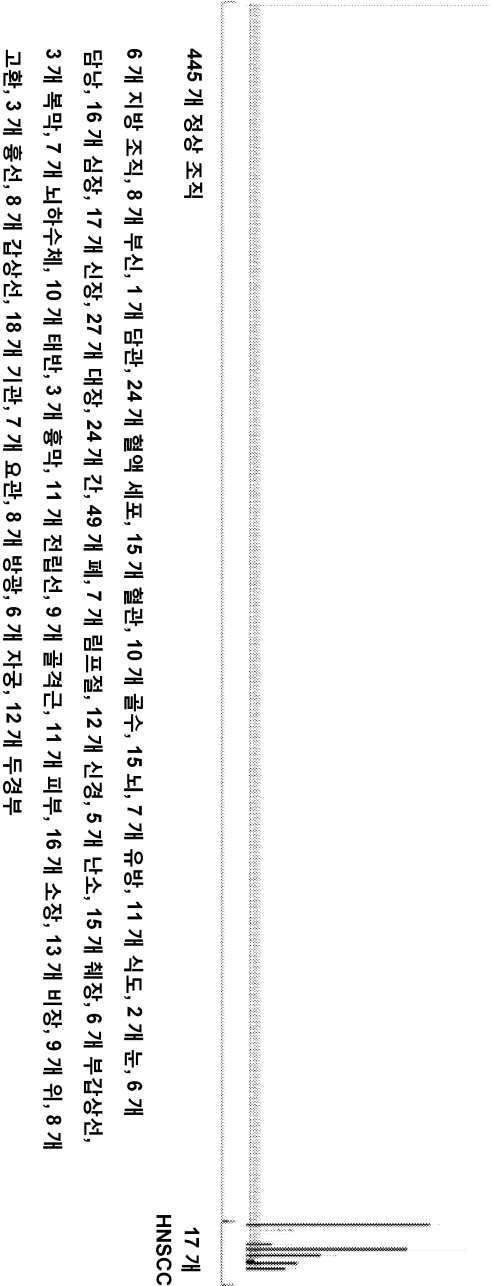
상대적 제시 [임의 단위]



도면1b

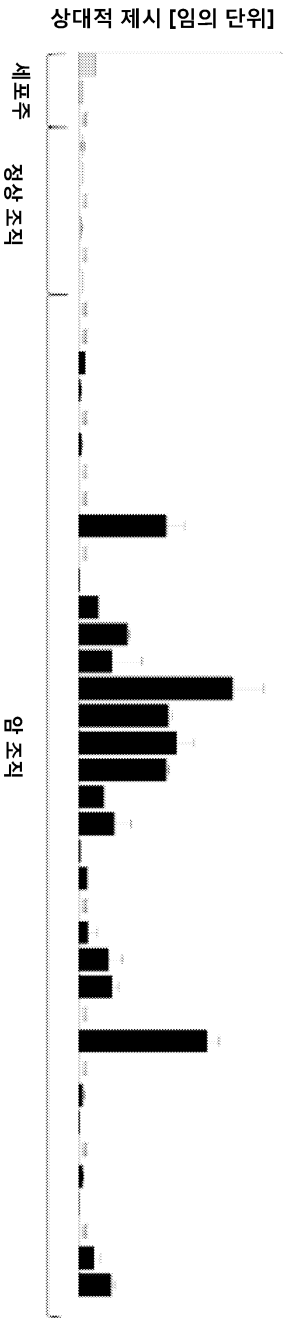
페이지: STASAITPSV (A*02)
서열식별번호: 9

상대적 제시 [임의 단위]



도면1c

펩티드: FVAGYIAGV (A*02)
서열식별번호: 61

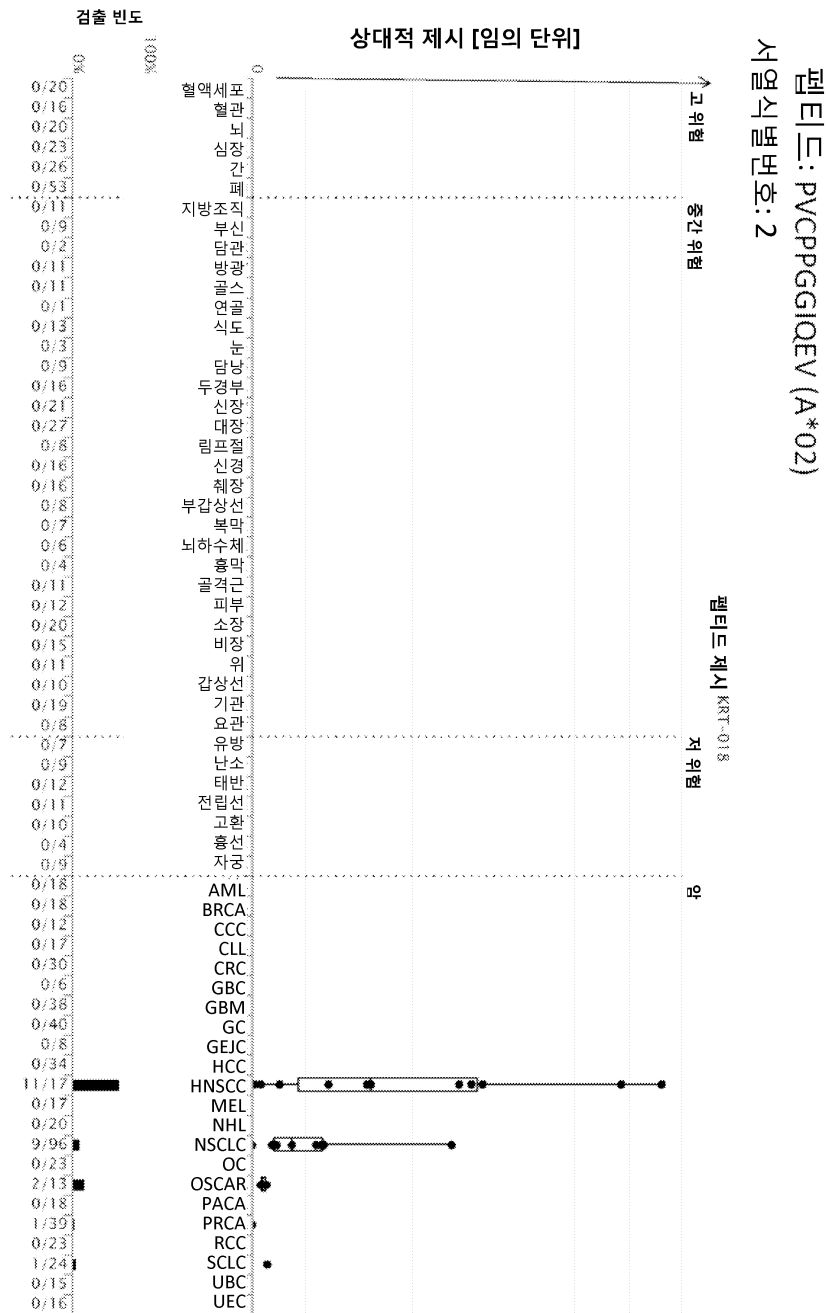


펩티드 검출 내용

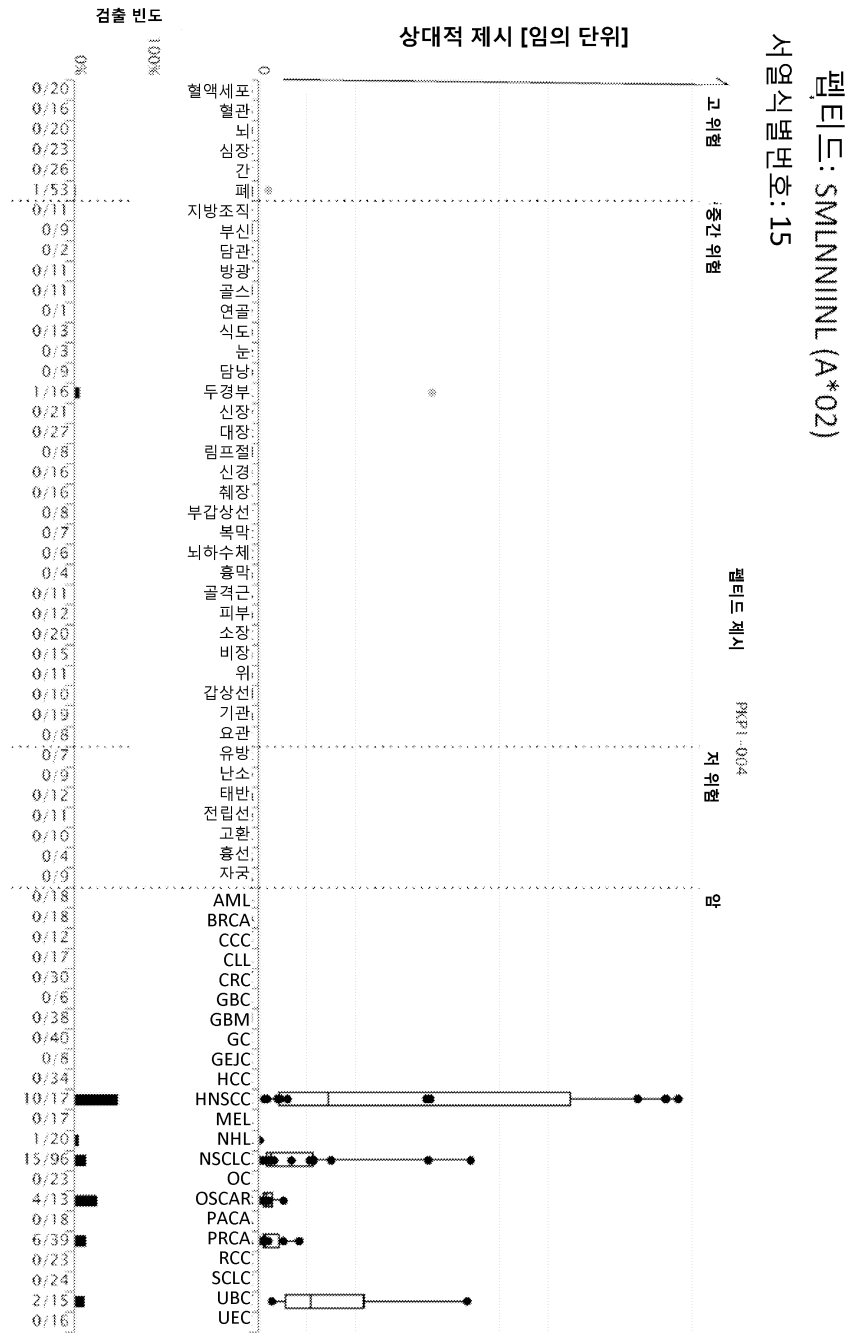
3 개 세포주(2 개 신장, 1 개 체장), 7 개 정상 조직(1 개 부신, 1 개 결장, 2 개 림프절, 1 개 태반, 2 개 비장), 36 개 암 조직(5 개 백혈구성 백혈병
암, 3 개 뇌암, 2 개 유방암, 1 개 식도암, 1 개 담낭암, 5 개 두경부암, 1 개 신장암, 1 개 간암, 8 개 폐암, 4 개 림프절암, 3 개 난소암, 2 개 위암)
(왼쪽부터 오른쪽으로 샘플들)

도면 1d

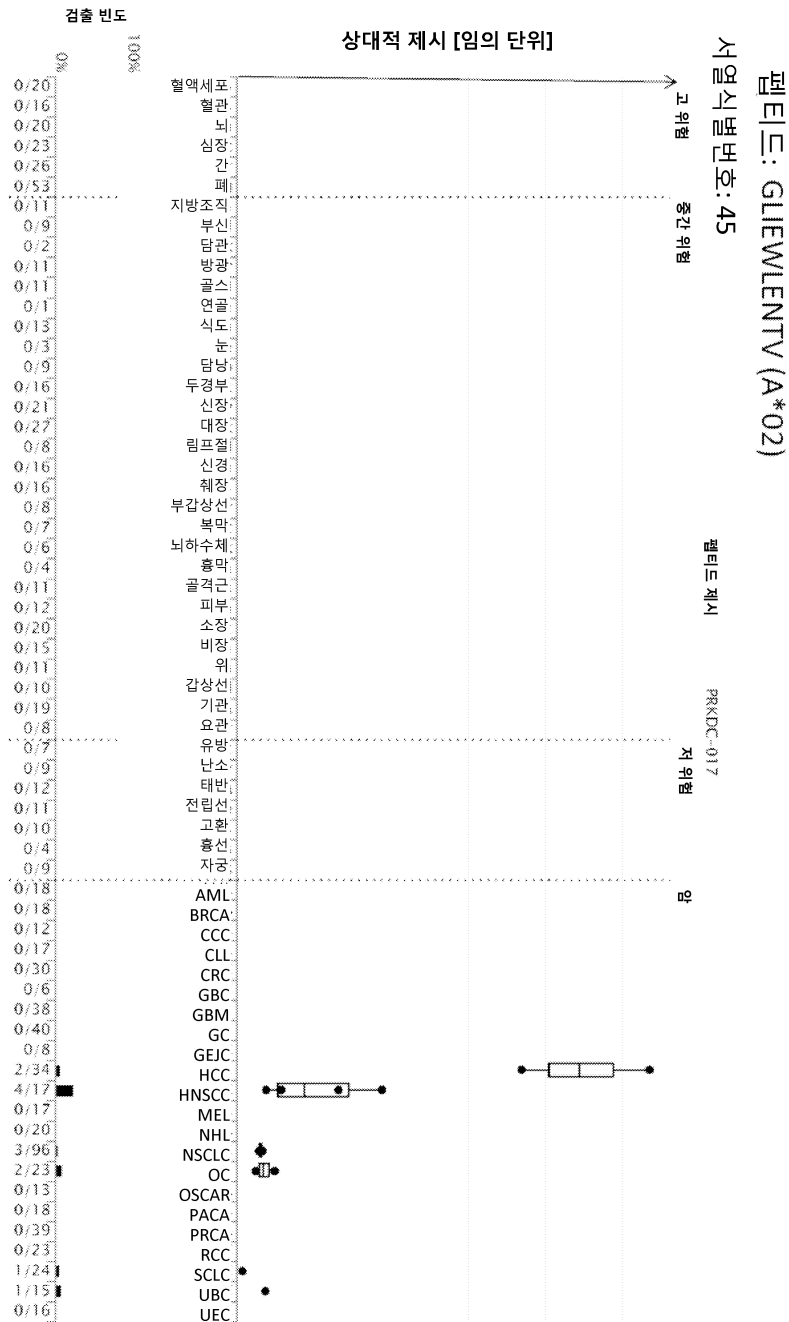
도면 1e



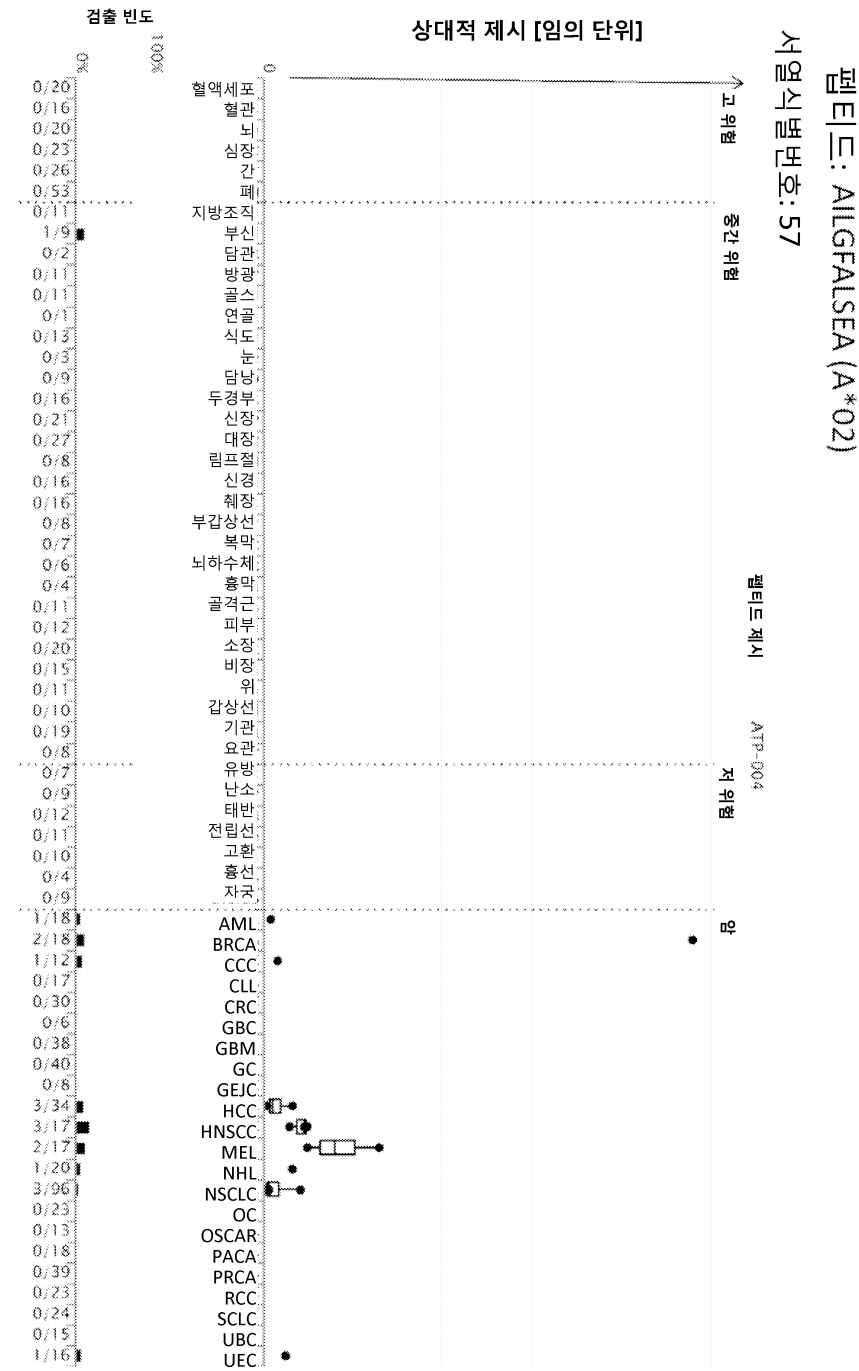
도면1f



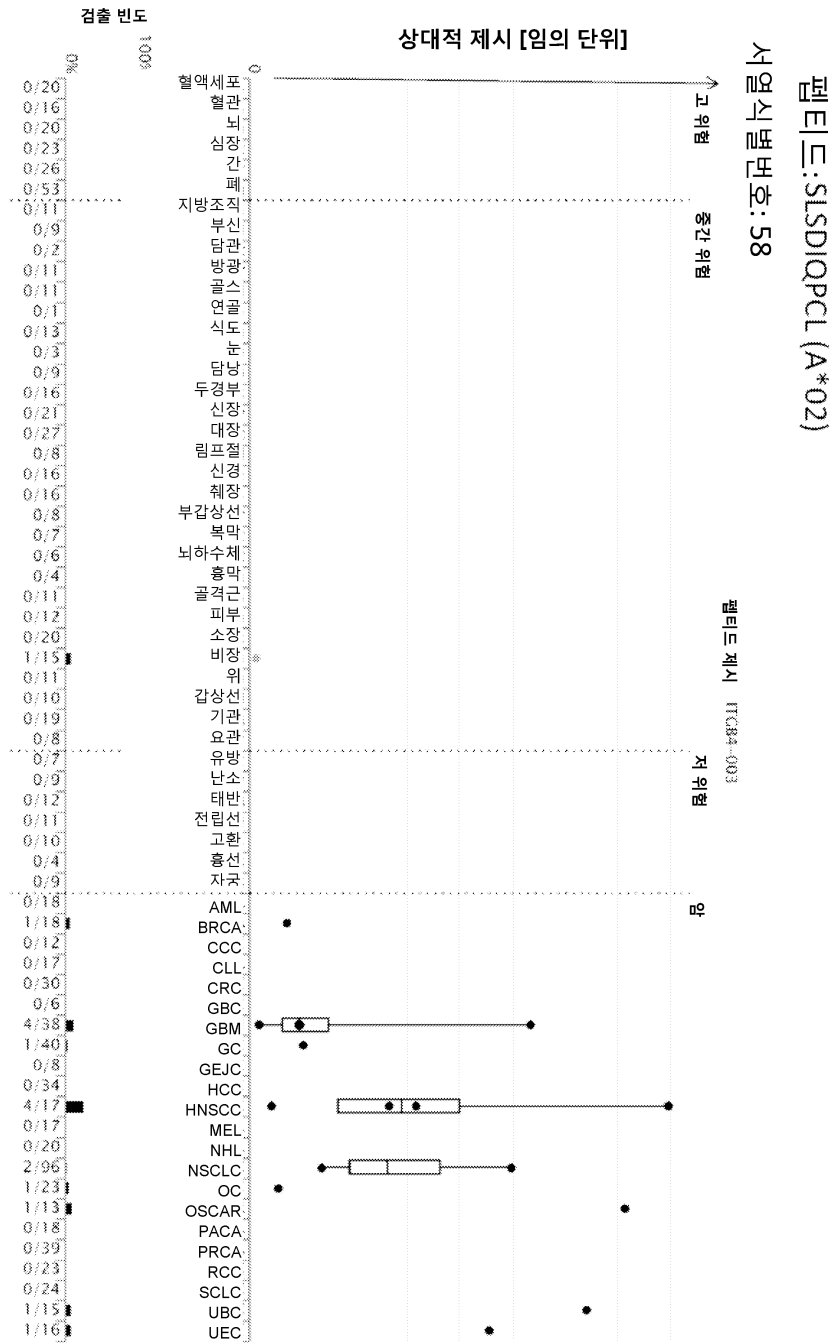
도면1g



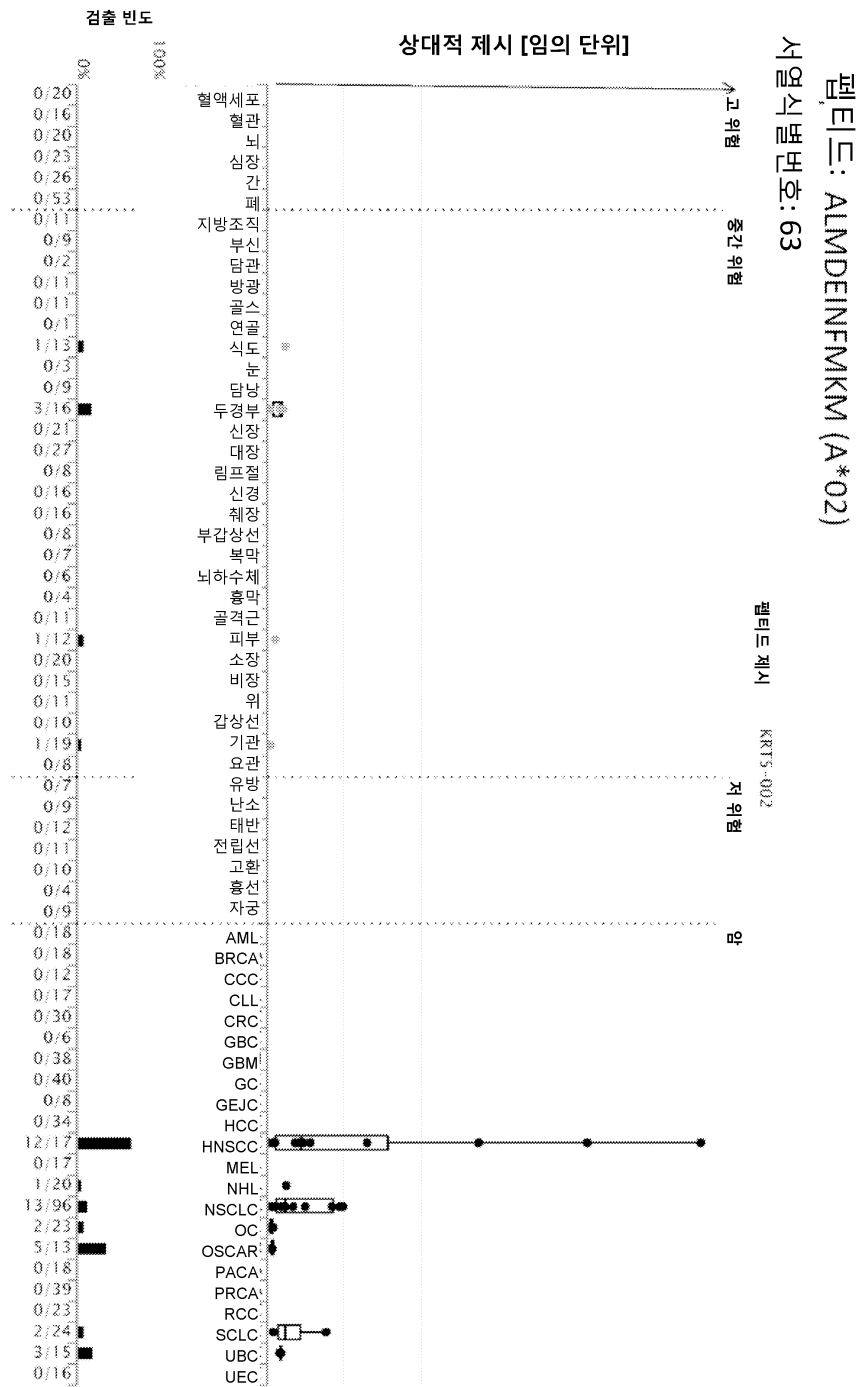
도면1h



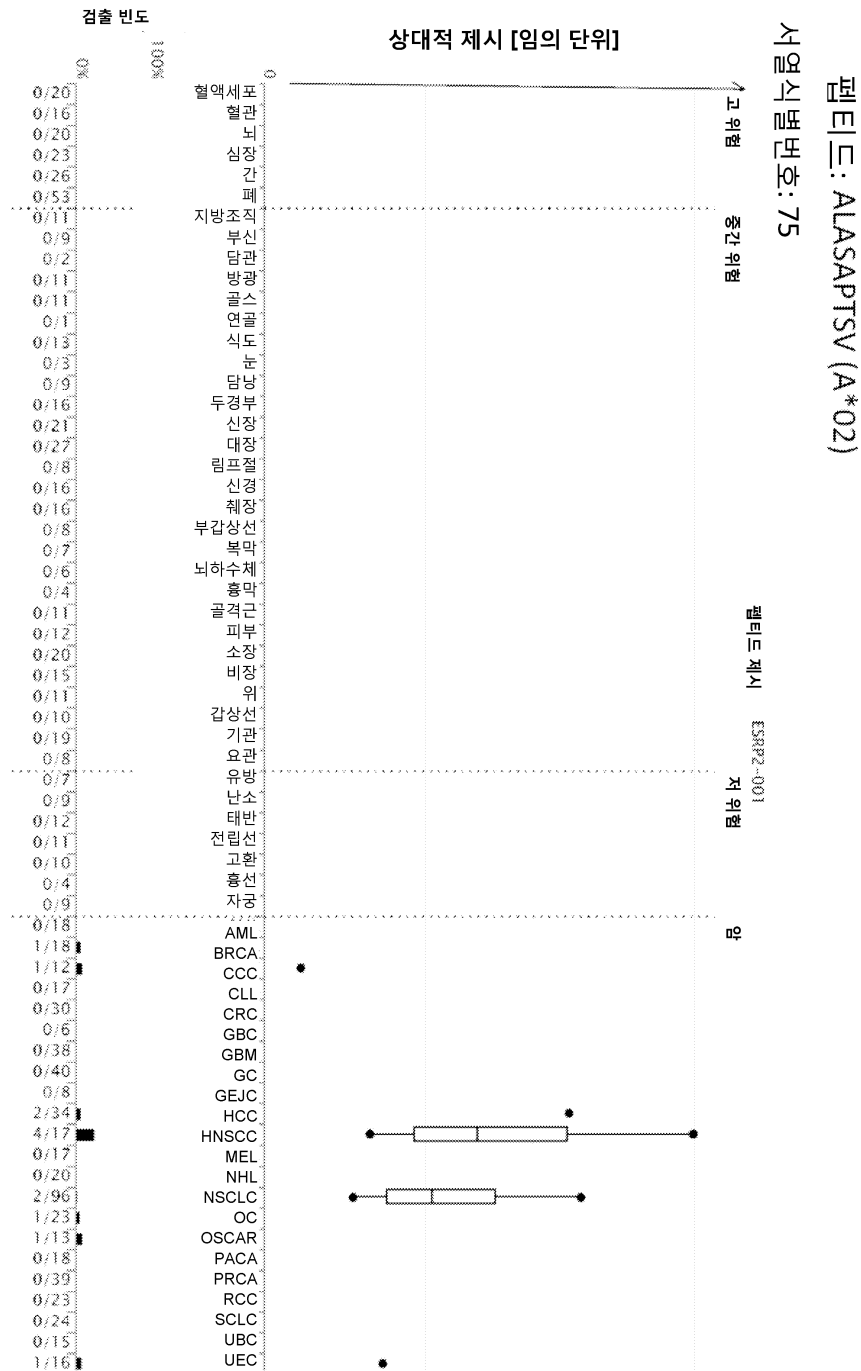
도면1i



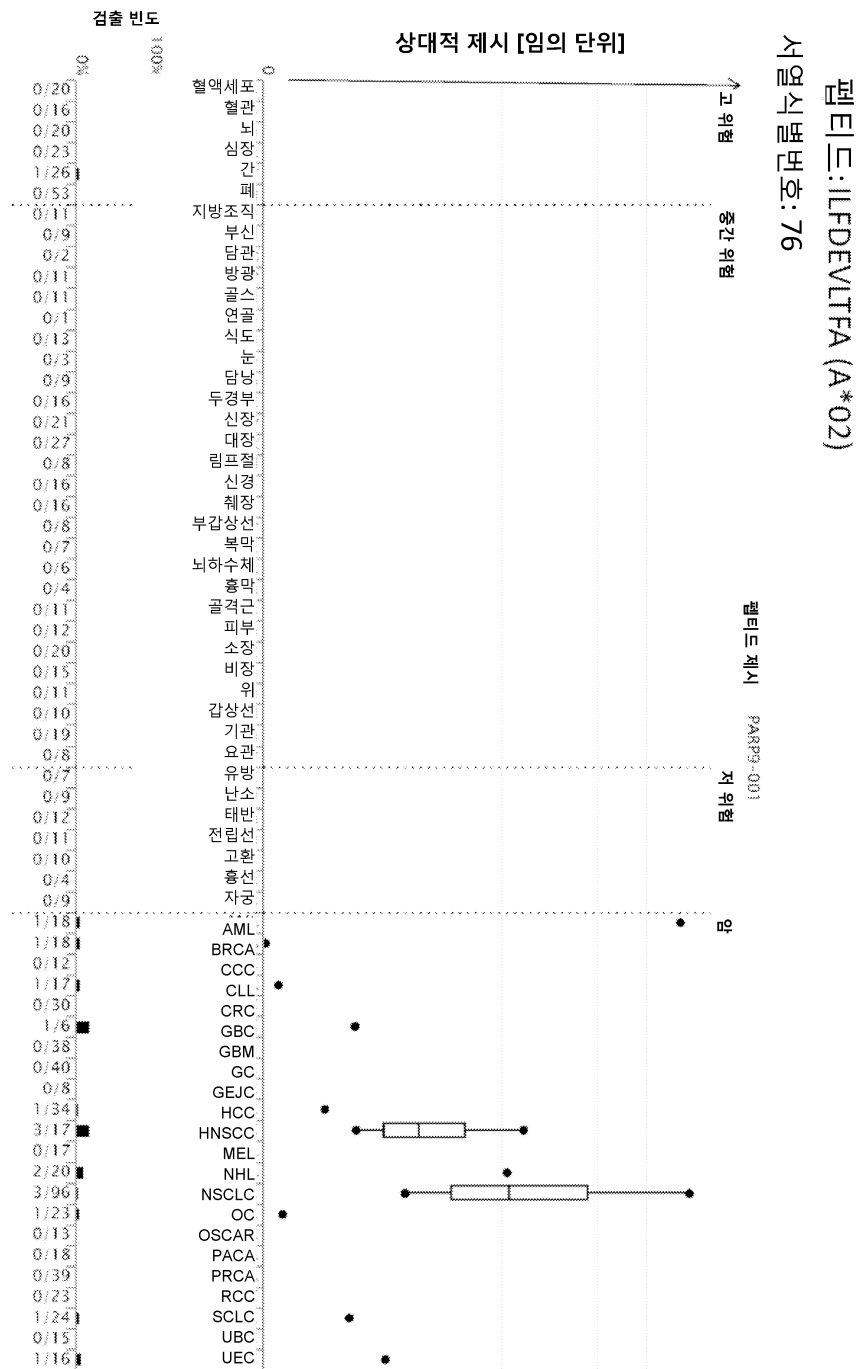
도면1j



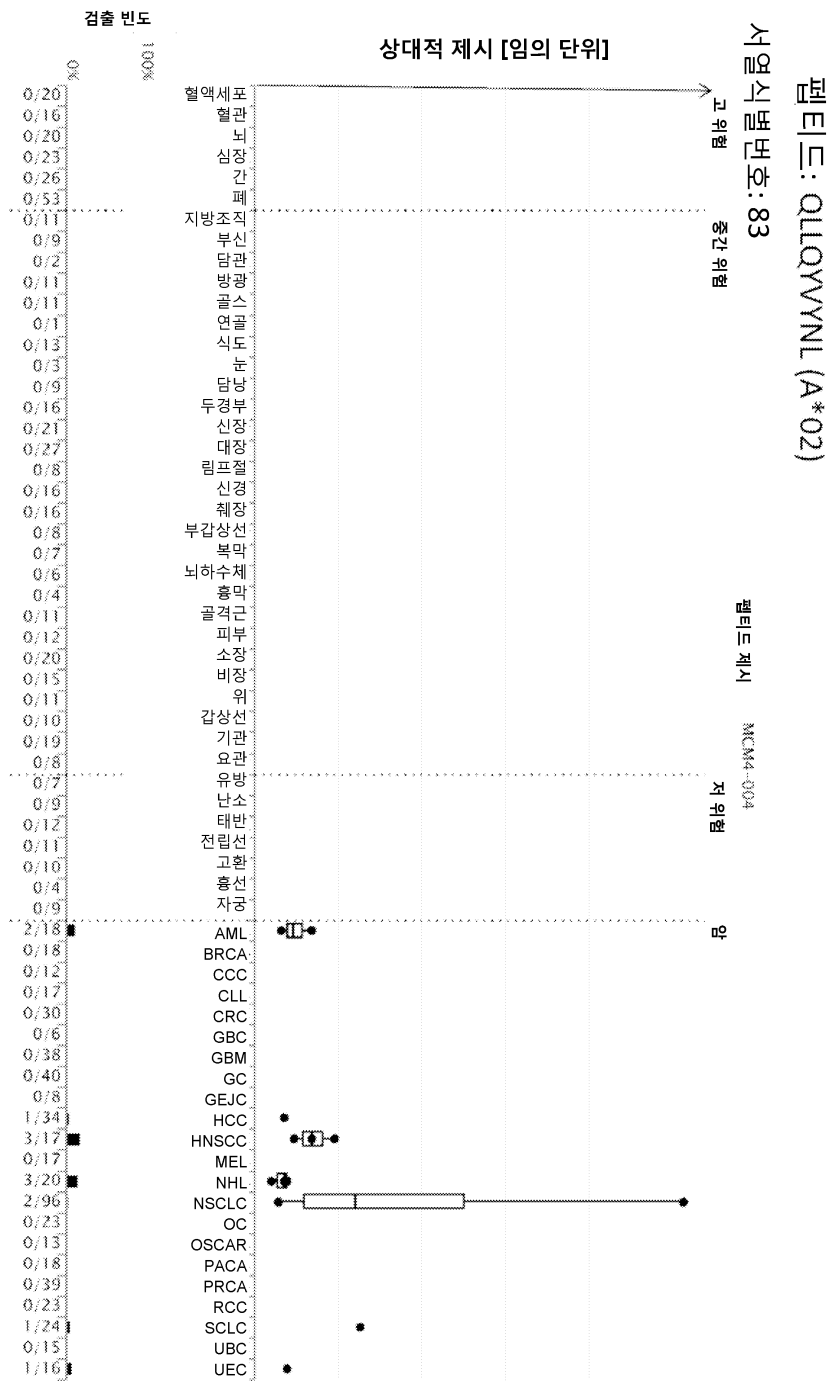
도면1k



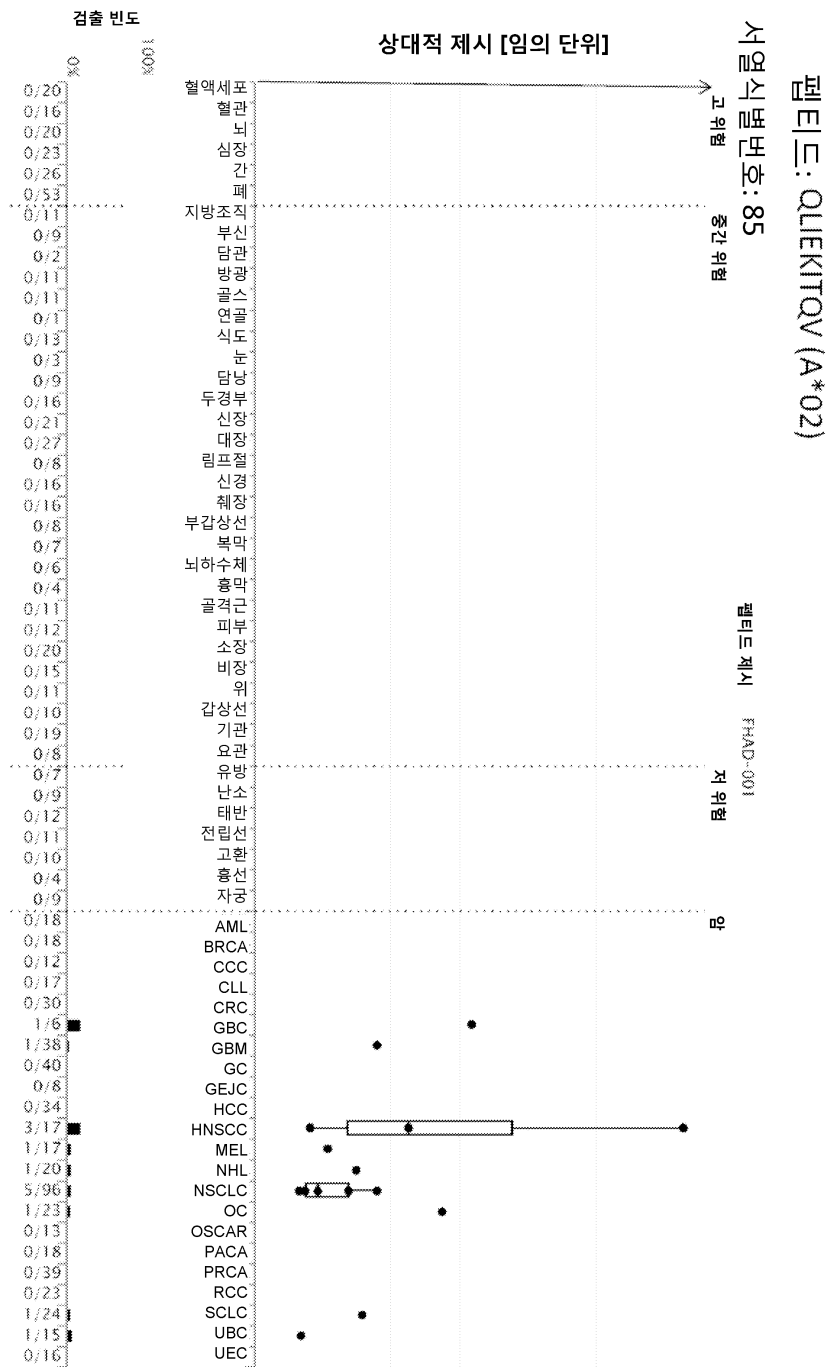
도면11



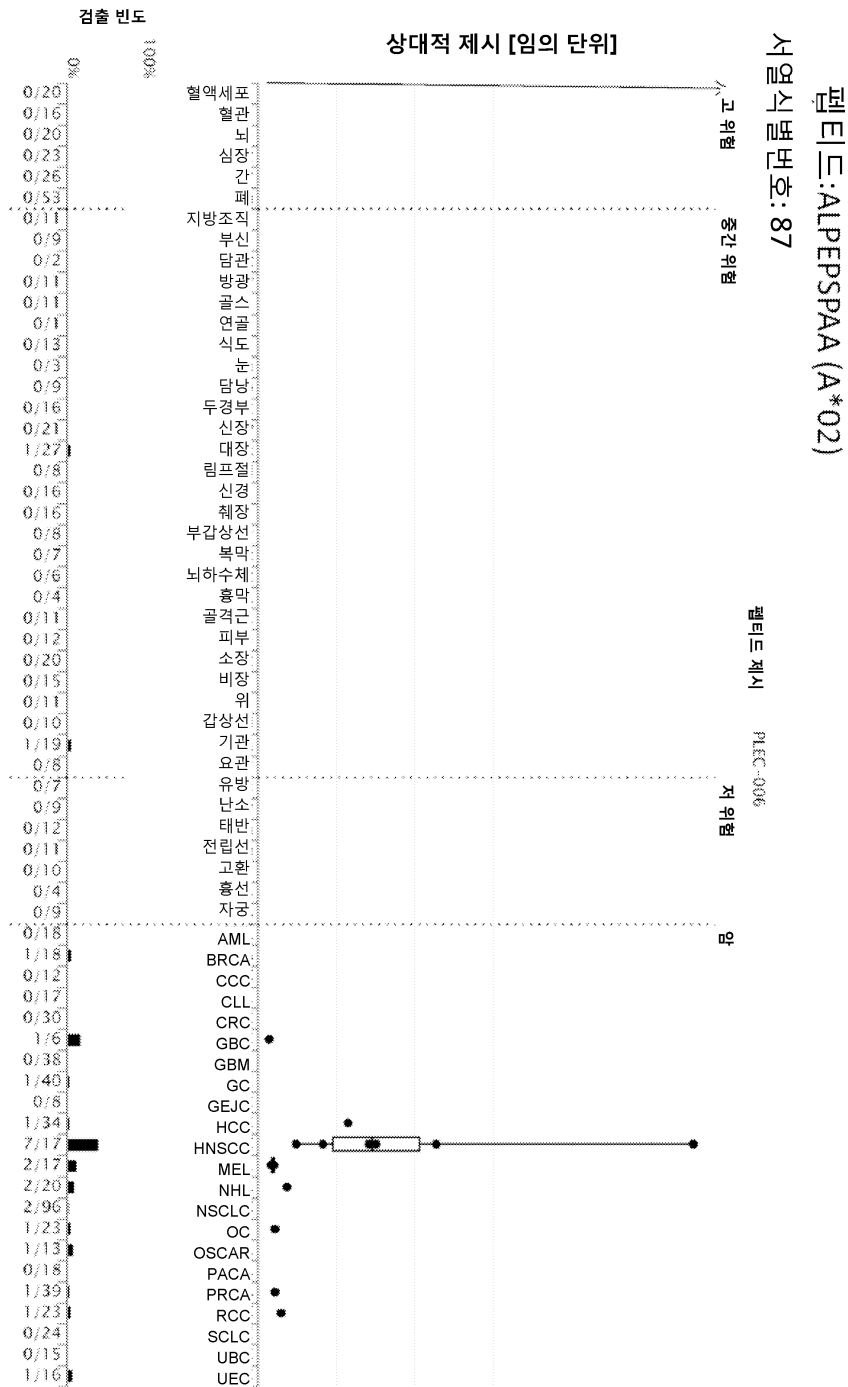
도면 1m



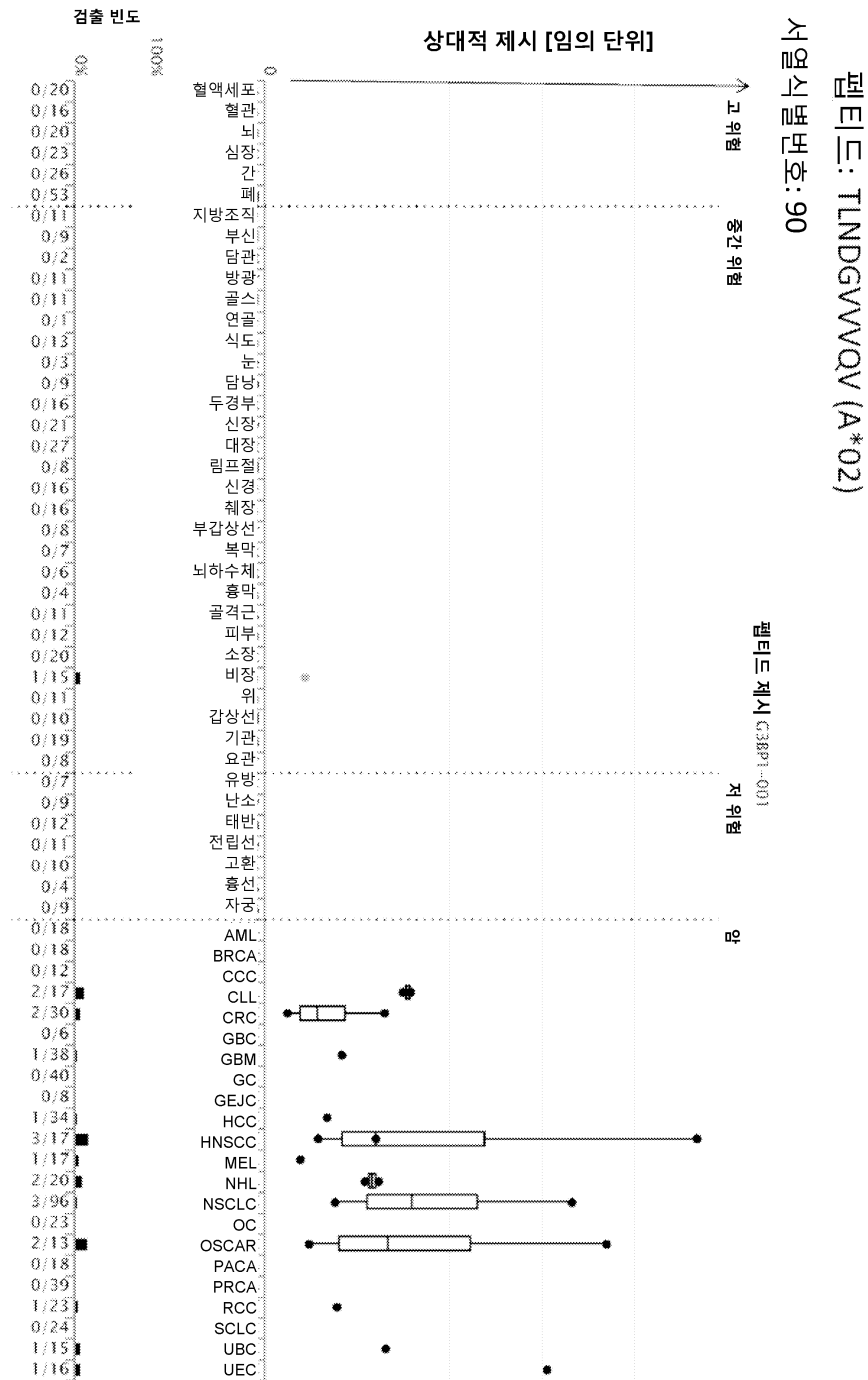
도면 1n



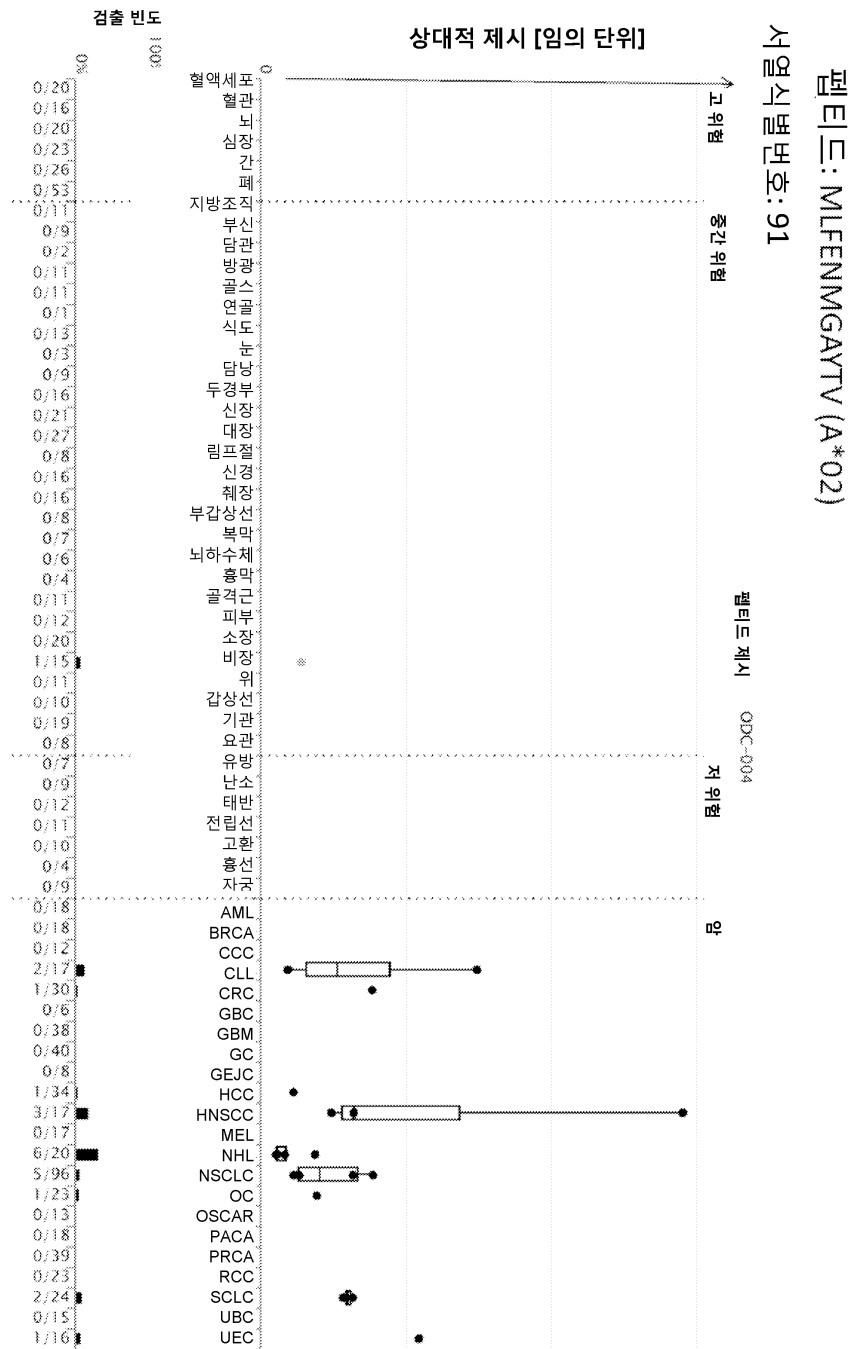
도면10



도면1p

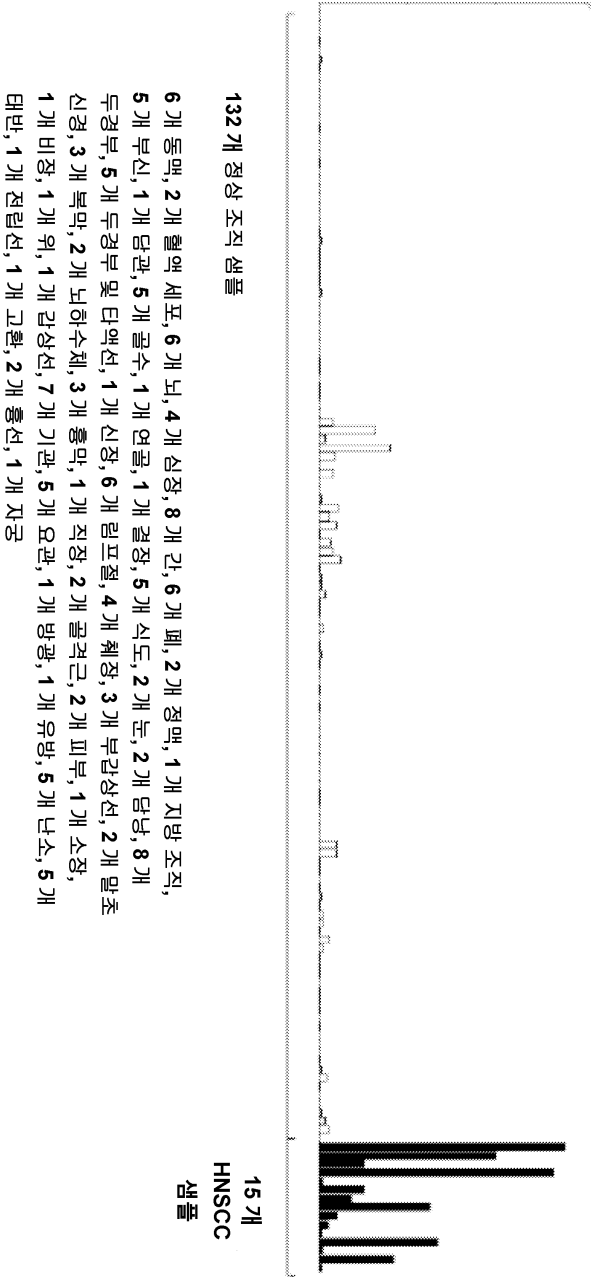


도면1q



유전자: PGLYRP4
펩티드: AIYEGVGWNV
서열 식별 번호: 33

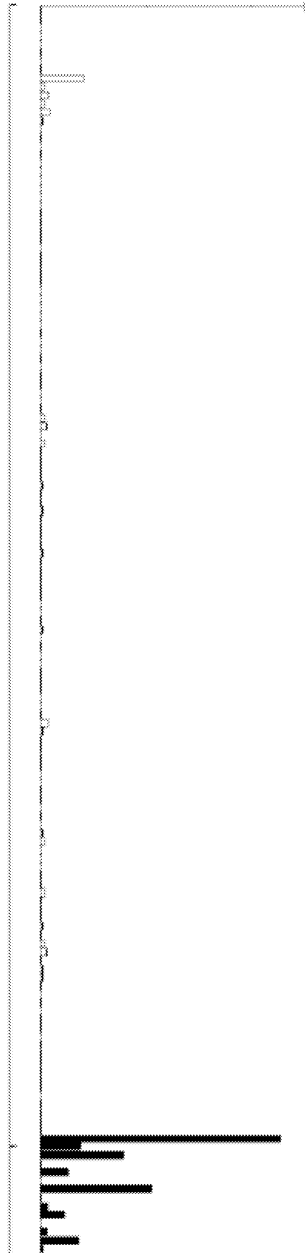
상대적 FPKM 전사체군 AIYEGVGWNV



도면2a

유전자: PAPL
 펩티드: KLLPGVQYV
 서열 식별 번호: 38

상대적 FPKM 전사체군 KLLPGVQYV



132 개 정상 조직 샘플

6 개 동맥, 2 개 혈액 세포, 6 개 뇌, 4 개 심장, 8 개 간, 6 개 폐, 2 개 정맥, 1 개 지방 조직, 5 개 부신, 1 개 담관, 5 개 골수, 1 개 연골, 1 개 결합, 5 개 식도, 2 개 눈, 2 개 담낭, 8 개

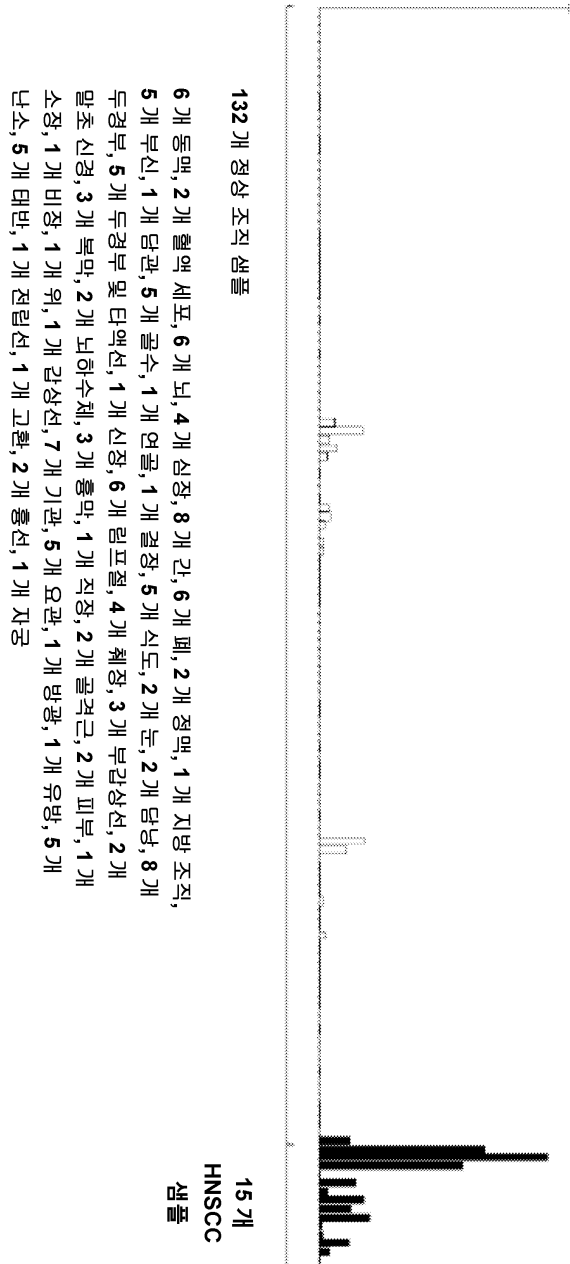
두경부, 5 개 두경부 및 타액선, 1 개 신장, 6 개 림프절, 4 개 체장, 3 개 부갑상선, 2 개 말초 신경, 3 개 복막, 2 개 뇌하수체, 3 개 흉막, 1 개 직장, 2 개 골격근, 2 개 피부, 1 개 소장, 1 개 비장, 1 개 위, 1 개 갑상선, 7 개 기관, 5 개 요관, 1 개 방광, 1 개 유방, 5 개 난소, 5 개 태반, 1 개 전립선, 1 개 고환, 2 개 흉선, 1 개 자궁

15 개
 HNSCC
 샘플

도면2b

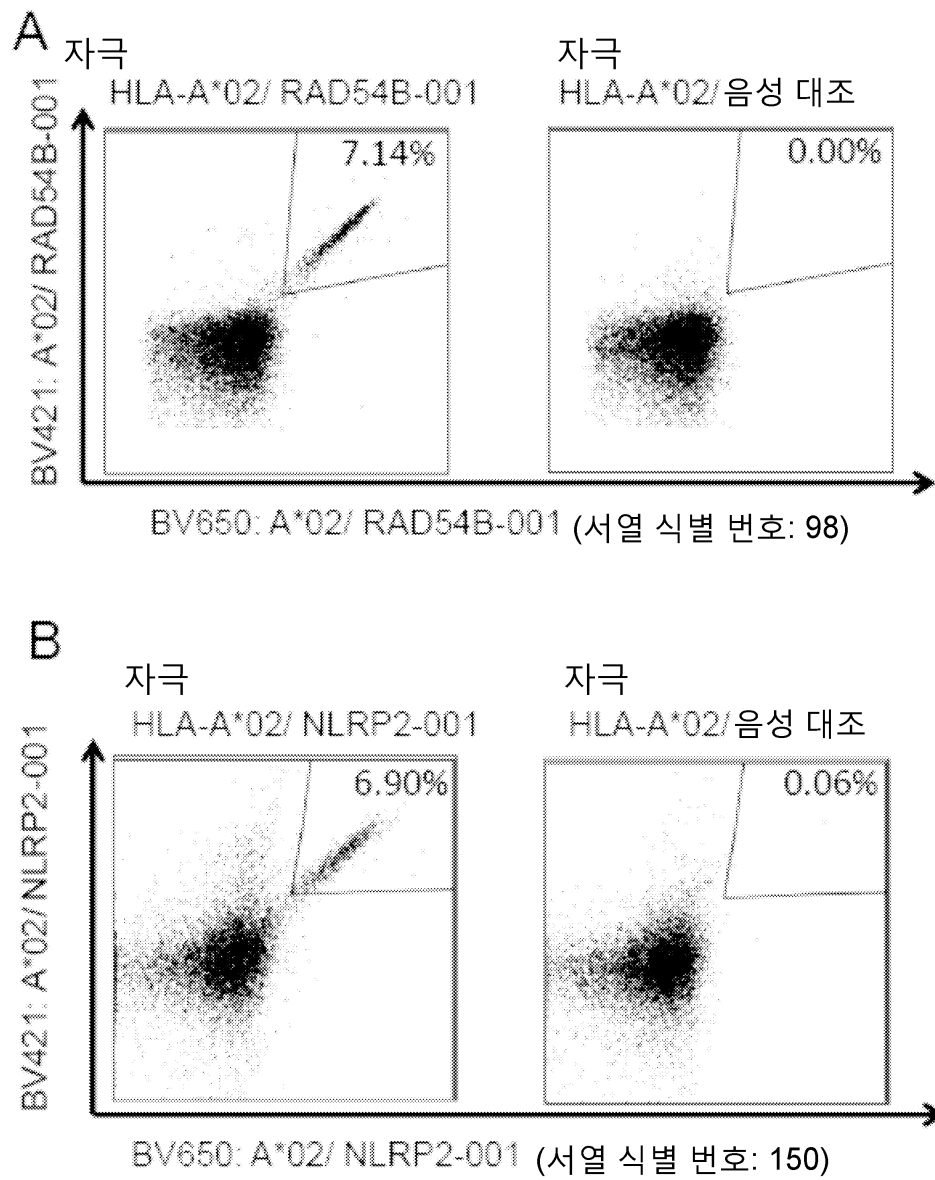
유전자: LGALS7, LGALS7B
 펩티드: RLVEVGGDVQL
 서열 식별 번호: 53

상대적 FPKM 전사체군 RLVEVGGDVQL

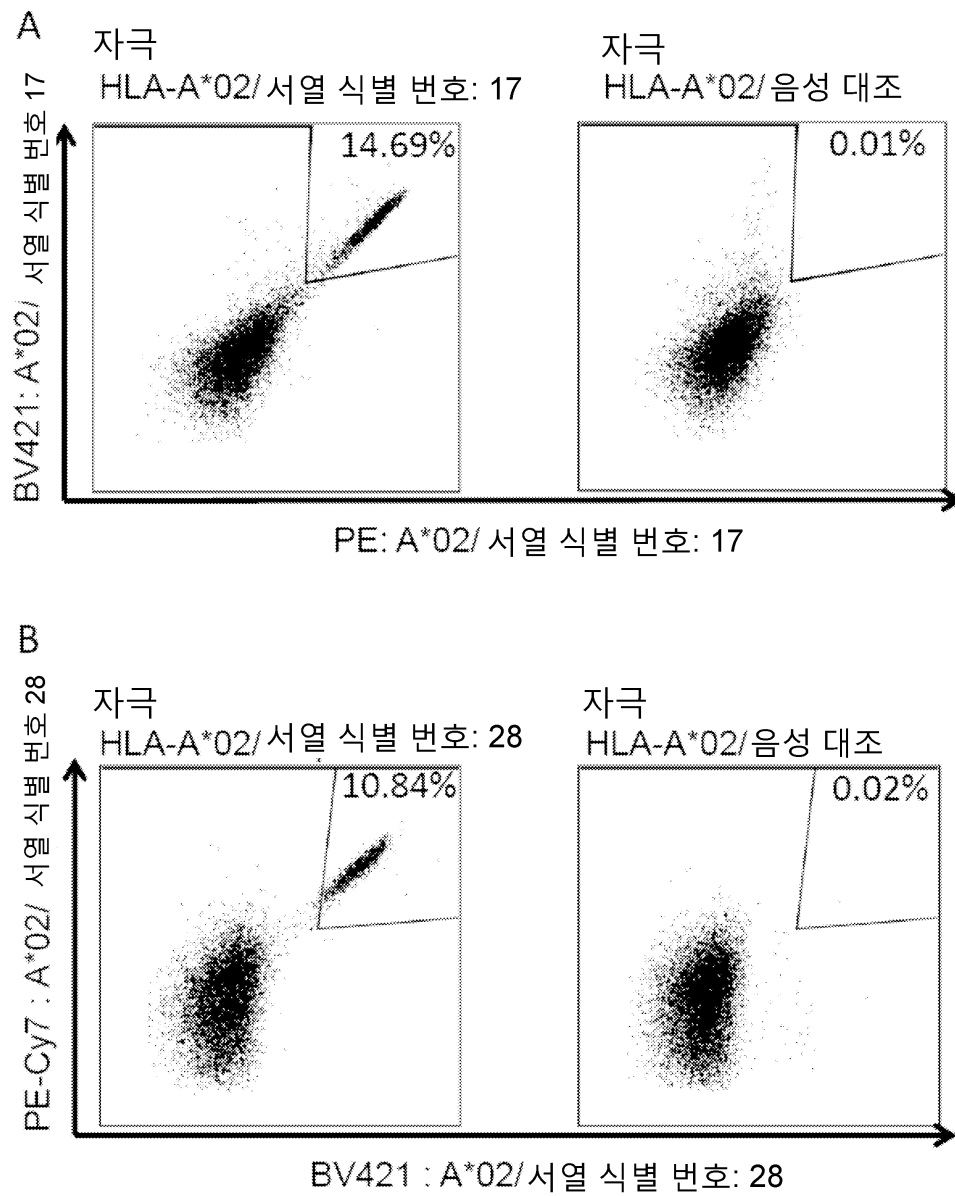


도면2c

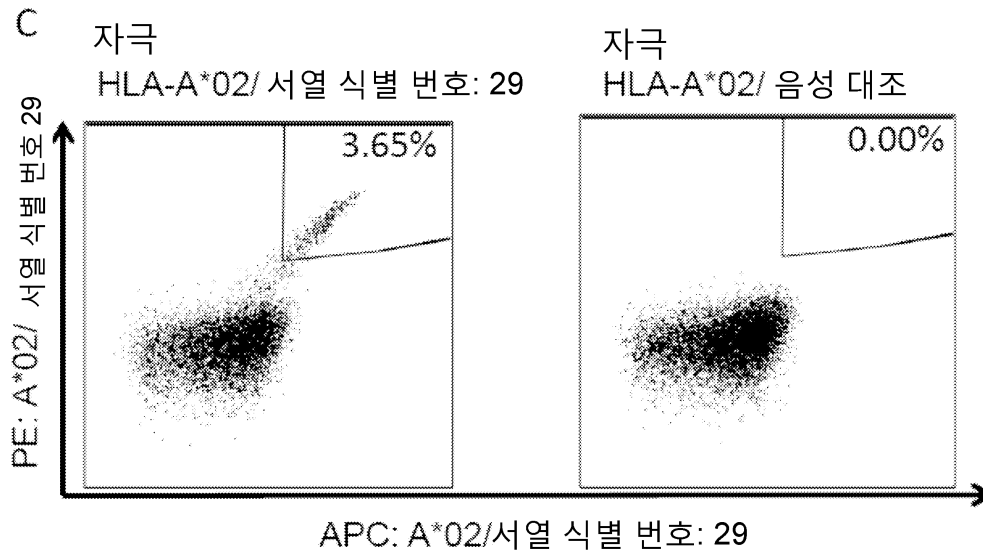
도면3



도면4a



도면4b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Immatics Biotechnologies GmbH
- <120> Novel peptides and scaffolds for use in immunotherapy against head and neck squamous cell carcinoma and other cancers
- <130> I32988W0
- <140> PCT/EP2017/071347
- <141> 2017-08-24
- <150> DE 102016115974.3
- <151> 2016-08-26
- <150> US 62/379,864
- <151> 2016-08-26
- <160> 158
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Gly Leu Ala Gly Gly Phe Gly Gly Pro Gly Phe Pro Val

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Val Cys Pro Pro Gly Gly Ile Gln Glu Val

1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Leu Tyr Gly Leu Gly Gly Ser Lys Arg Ile Ser Ile

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val

1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Cys Pro Pro Gly Gly Ile Gln Glu Val

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Leu Tyr Asp Ala Glu Leu Ser Gln Met

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Leu Glu Glu Ala Asn Ala Asp Leu Glu Val

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Gln Leu Asn Ile Gly Asn Val Leu Pro Val

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Thr Ala Ser Ala Ile Thr Pro Ser Val

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Leu Trp Pro Ala Thr Pro Pro Lys Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val Ile

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Thr Leu Thr Asp Glu Ile Asn Phe Leu

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Leu Val Ser Tyr Leu Asp Lys Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Arg Ile Met Glu Gly Ile Pro Thr Val

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Met Leu Asn Asn Ile Ile Asn Leu

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Leu Lys Asp Ser Val Gln Arg Ala

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ser Ile Trp Pro Ala Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Leu Tyr Pro Asp Leu Ser Arg Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Leu Ala Lys Leu Leu Pro Leu Leu

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Tyr Leu Ile Asn Glu Ile Asp Arg Ile Arg Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Phe Leu His Glu Pro Phe Ser Ser Val

1 5

<210> 22

<211>

> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Lys Leu Pro Glu Pro Cys Pro Ser Thr Val

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Leu Pro Glu Ser Gly Leu Leu Ser Val

1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Leu Leu Ile Ala Ile Asn Pro Gln Val

1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Leu Cys Pro Pro Gly Gly Ile Gln Glu Val

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Leu Val Asp Glu Asn Gln Ser Trp Tyr Leu

1 5 10

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Tyr Leu Ala Glu Pro Gln Trp Ala Val

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Val Asp Pro Val Ser Gly Ser Leu Tyr Val

1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Leu Leu Pro Asp Leu Asp Glu Val

1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Thr Leu Ala Ser Leu Gly Tyr Ala Val Val

1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

His Leu Ala Thr Val Lys Leu Leu Val

1 5

<210> 32

<211>

> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ile Gln Asp Ala Glu Gly Ala Ile His Glu Val

1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Ile Tyr Glu Gly Val Gly Trp Asn Val

1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ala Leu Asp Thr Phe Ser Val Gln Val

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 35

Ala Leu Val Gly Asp Val Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Leu Trp Ser Ser Ile Phe Ser Leu

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ile Leu Leu Glu Asp Val Phe Gln Leu

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Lys Leu Leu Pro Gly Val Gln Tyr Val

1 5

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Leu Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val

1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Leu Leu Thr Pro Leu Asn Leu Gln Ile

1 5

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Leu Asn Gly Glu Gly Val Gly Gln Val Asn Ile Ser Val

1 5 10

<210> 42

<211>

> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Leu Tyr Thr Ser Gly His Leu Leu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Val Leu Gly Gly Lys Leu Tyr Val

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Leu Gly Asp Asp Ser Phe Pro Ile

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Gly Leu Ile Glu Trp Leu Glu Asn Thr Val

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Leu Ile Ser Ser Ile Glu Ala Gln Leu

1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Leu Leu Glu Gly Glu Leu Glu Thr Leu

1 5 10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Tyr Leu Leu Asp Tyr Pro Asn Asn Leu

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Tyr Leu Trp Glu Ala His Thr Asn Ile

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ala Leu Ser Asn Val Val His Lys Val

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Phe Leu Ile Pro Ser Ile Ile Phe Ala

1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Leu Leu Phe Thr Gly Leu Val Ser Gly Val

1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Arg Leu Val Glu Val Gly Gly Asp Val Gln Leu

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Arg Leu Ser Gly Glu Gly Val Gly Pro Val

1 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Val Leu Asn Val Gly Val Ala Glu Val

1 5

<210>

> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Phe Leu Gln Leu Glu Thr Glu Gln Val

1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Ile Leu Gly Phe Ala Leu Ser Glu Ala

1 5 10

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ser Leu Ser Asp Ile Gln Pro Cys Leu

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Tyr Leu Gln Asn Glu Val Phe Gly Leu

1 5

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ser Leu Gly Asn Phe Lys Asp Asp Leu Leu

1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Phe Val Ala Gly Tyr Ile Ala Gly Val

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ile Leu Ser Ser Ala Cys Tyr Thr Val

1 5

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ala Leu Met Asp Glu Ile Asn Phe Met Lys Met

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Lys Ile Leu Glu Ser Leu Phe Val Ser Leu

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ala Leu Trp Gly Phe Phe Pro Val Leu Leu

1 5 10

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Leu Leu Ser Glu Ile Ala Glu Leu

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu

1 5

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Lys Ile Leu Glu Met Asp Asp Pro Arg Ala

1 5 10

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Tyr Val Met Glu Ser Met Thr Tyr Leu

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Phe Leu Phe Pro Ala Phe Leu Thr Ala

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Ser Leu Phe Pro Tyr Val Val Leu Ile

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Ser Leu Asp Gly Asn Pro Leu Ala Val

1 5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Tyr Ile Asp Pro Tyr Lys Leu Leu Pro Leu

1 5 10

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Ser Leu Thr Ser Phe Leu Ile Ser Leu

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Leu Ala Ser Ala Pro Thr Ser Val

1 5

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ile Leu Phe Asp Glu Val Leu Thr Phe Ala

1 5 10

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Leu Arg Ala Phe Leu Met Pro Ile

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Val Leu Tyr Gly Asp Val Glu Glu Leu

1 5

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Gly Leu His Gln Asp Phe Pro Ser Val Val Leu

1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Asp Asp Val Phe Leu

1 5 10

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Val Leu Ala Glu Asn Pro Asp Ile Phe Ala Val

1 5 10

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Val Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val

1 5 10

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213>

Homo sapiens

<400> 83

Gln Leu Leu Gln Tyr Val Tyr Asn Leu

1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Glu Ala

1 5 10

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gln Leu Ile Glu Lys Ile Thr Gln Val

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Leu Gln Glu Arg Gln Val Phe Leu

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Ala Leu Pro Glu Pro Ser Pro Ala Ala

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Leu Met Ala Pro Ala Pro Ser Thr Val

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Val Leu Asp Glu Gly Leu Thr Ser Val

1 5

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Thr Leu Asn Asp Gly Val Val Val Gln Val

1 5 10

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Met Leu Phe Glu Asn Met Gly Ala Tyr Thr Val

1 5 10

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ile Leu Leu Asp Val Lys Thr Arg Leu

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Ala Leu Ser Asn Val Ile His Lys Val

1 5

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Ser Ile Phe Glu Gly Leu Leu Ser Gly Val

1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Ser Leu Asp Glu Asn Ser Asp Gln Gln Val

1 5 10

<210> 96

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Phe Gln Leu Asp Pro Ser Ser Gly Val Leu Val Thr Val

1 5 10

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Leu Ile Leu Glu Ser Ile Pro Val Val

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Thr Ala Ser Ala Ile Thr Pro Ser Val

1 5

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Val Leu Val Ser Asp Gly Val His Ser Val

1 5 10

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Thr Leu Ala Glu Leu Gln Pro Pro Val Gln Leu

1 5 10

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Val Leu Ala Glu Gly Gly Glu Gly Val

1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Ser Thr Tyr Gly Gly Gly Leu Ser Val

1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Val Leu Val Asp Gln Ser Trp Val Leu

1 5

<210> 107

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Tyr Leu Glu Glu Asp Val Tyr Gln Leu

1 5

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Ser Leu Tyr Asn Leu Gly Gly Ser Lys Arg Ile Ser Ile

1 5 10

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 110

Leu Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala

1 5

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Ser Leu Ala Pro Gly Asp Val Val Arg Gln Val

1 5 10

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Ala Leu Leu Asp Gly Gly Ser Glu Ala Tyr Trp Arg Val

1 5 10

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Asn Leu Met Ala Ser Gln Pro Gln Leu

1 5

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Val Leu Val Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Val Thr Ala Ala Tyr Met Asp Thr Val Ser Leu

1 5 10

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Ser Leu Trp Pro Ser Pro Glu Gln Leu

1 5

<

210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 117
 Gly Leu Ala Phe Ser Leu Tyr Gln Ala
 1 5
 <210> 118
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 118
 Thr Leu Leu Gln Glu Gln Gly Thr Lys Thr Val
 1 5 10
 <210> 119
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 119
 Gly Leu Leu Asp Pro Ser Val Phe His Val
 1 5 10
 <210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>
 > Homo sapiens
 <400> 120
 Tyr Leu Val Ala Lys Leu Val Glu Val
 1 5
 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 121
 Ser Leu Tyr Gly Tyr Leu Arg Gly Ala

1 5
 <210> 122
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 122
 Ile Leu Asp Glu Ala Gly Val Lys Tyr Phe Leu

1 5 10
 <210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 123
 Leu Leu Ser Gly Asp Leu Ile Phe Leu

1 5
 <210> 124
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 124
 Tyr Met Leu Asp Ile Phe His Glu Val

1 5
 <210> 125
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 125
 Ala Leu Asn Pro Glu Ile Val Ser Val

1 5
 <210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 126

Ile Leu Val Asp Trp Leu Val Glu Val

1 5

<210> 127

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Ser Leu Phe Gly Lys Lys Tyr Ile Leu

1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Thr Leu His Arg Glu Thr Phe Tyr Leu

1 5

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Ser Leu Ser Gly Glu Ile Ile Leu His Ser Val

1 5 10

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Thr Leu Asp Gly Ala Ala Val Asn Gln Val

1 5 10

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Leu Gln Leu Asp Lys Glu Phe Gln Leu

1 5

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Phe Asp Tyr Val

1 5 10

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Leu Leu Leu Pro Leu Gln Ile Leu Leu

1 5

<210> 134

<

211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Gly Leu Phe Ser Gln His Phe Asn Leu

1 5

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Ser Leu Met Glu Pro Pro Ala Val Leu Leu Leu

1 5 10

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 137

Gly Leu Ala Pro Phe Leu Leu Asn Ala Val

1 5 10

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Ala Leu Leu Thr Gly Ile Ile Ser Lys Ala

1 5 10

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Gln Leu Gly Pro Val Pro Val Thr Ile

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Tyr Leu Phe Glu Asn Ile Ser Gln Leu

1 5

<210> 141

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Phe Leu Asn Pro Asp Glu Val His Ala Ile

1 5 10

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Ser Leu Val Ser Glu Gln Leu Glu Pro Ala

1 5 10

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu

1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Lys Ile Ser Thr Ile Thr Pro Gln Ile

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Leu Leu Tyr Gly Lys Tyr Val Ser Val

1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val

1 5

<210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Ile Leu Met Asp Pro Ser Pro Glu Tyr Ala

1 5 10

<210> 148

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Leu Leu Phe Asp Ala Pro Asp Leu Arg Leu

1 5 10

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Val Leu Leu Asn Ile Asn Gly Ile Asp Leu

1 5 10

<210> 150

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val

1 5 10

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Gln Leu Cys Asp Leu Asn Ala Glu Leu

1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Ser Leu Trp Gln Asp Ile Pro Asp Val

1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Val Leu Phe Leu Gly Lys Leu Leu Val

1 5

<210> 154

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Lys Met Trp Glu Glu Leu Pro Glu Val Val

1 5 10

<210> 155

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Gly Leu Leu Asp Asn Pro Glu Leu Arg Val

1 5 10

<210> 156

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

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

1 5 10

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1 5