



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월13일

(11) 등록번호 10-1585042

(24) 등록일자 2016년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7002216

(22) 출원일자(국제) 2008년07월18일

심사청구일자 2013년04월22일

(85) 번역문제출일자 2010년01월29일

(65) 공개번호 10-2010-0051643

(43) 공개일자 2010년05월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/070496

(87) 국제공개번호 WO 2009/012460

국제공개일자 2009년01월22일

(30) 우선권주장

60/961,206 2007년07월19일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20070104689 A1

(73) 특허권자

헬스 리서치 인코포레이티드

미국 뉴욕 14263 버팔로 엘름 앤드 칼턴 스트리트

(72) 발명자

치에시엘스키 마이클

미국 뉴욕 14127 오차드 파크 사일런트 메도우 레인

펜스터메이커 로버트, 에이.

미국 뉴욕 14127 오차드 파크 컨트리사이드 레인 310 아파트 7호

(74) 대리인

하영욱

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 암 백신으로서의 서비빈 펩티드

(57) 요약

본 발명은 서비빈 발현 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 조성물은 MHC-I 결합 특성이 향상된 서비빈 펩티드 모방체를 함유한다. 상기 방법은 MHC-I 결합 특성이 향상된 서비빈 펩티드 모방체를 개체에 투여하여 그 개체에 있어서의 서비빈 발현 암세포의 성장을 억제시키는 것을 포함한다.

대표도

AA49-ENEPLAQCFCKELEGWEPDD-AA71 {야생형; SEQ ID NO:3}

C에서 M으로의 변경

DLAQMFFCFCKELEGW = SVN53-67/M57  
(SEQ ID NO:6)

AQMFFCFKEL = SVN55-64/M57  
(SEQ ID NO:15)

QMFFCFKEL = SVN56-64/M57  
(SEQ ID NO:16)

MFFCFKEL = SVN57-64/M57  
(SEQ ID NO:17)

야생형

DLAQCFCKELEGW = SVN53-67  
(SEQ ID NO:18)

AQCFFCFKEL = SVN55-64  
(SEQ ID NO:19)

QCFFCFKEL = SVN56-64  
(SEQ ID NO:20)

CFFCFKEL = SVN57-64  
(SEQ ID NO:11)

DLAQMFFCFCKELEGW  
(SEQ ID NO:6)

AQMFFCFKEL  
(SEQ ID NO:15)

QMFFCFKEL  
(SEQ ID NO:16)

MFFCFKEL  
(SEQ ID NO:17)

} MHC 클래스 II 리간드

} MHC 클래스 I 리간드  
(SVN53-67 내에도 함유됨)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

암이 진단되거나 의심되는 개체에 있어서 서비빈을 발현하는 암세포의 성장을 억제하는 조성물로서,  
SEQ ID NO:4(ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD)의 펩티드 또는 그 단편을 포함하고,  
상기 단편은 SEQ ID NO:4의 9개 이상의 인접한 아미노산을 포함하고, 상기 단편은 SEQ ID NO:5(QMFFCF)의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,  
상기 펩티드는 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:15 및 SEQ ID NO:16으로 이루어진 서열의 군에서 선택된 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,  
상기 펩티드는 SEQ ID NO:6(DLAQMFFCFKELEGW)의 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,  
상기 펩티드는 면역원성 단백질 캐리어에 접합되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,  
상기 조성물은 상기 펩티드로 배양된 수지상 세포를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,  
면역 보강제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서,  
상기 개체는 신경교종이 진단된 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 9

제 1 항에 있어서,  
상기 개체는 림프종이 진단된 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 조성물 중의 펩티드는 상기 펩티드를 흡수한 수지상 세포에 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 13

제 1 항에 있어서,

상기 암세포는 종양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 14

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 종양의 절제 후에 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 15

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 개체에 있어서의 서비빈에 대한 세포 매개 면역 반응을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 16

포유류의 수지상 세포의 정제된 개체군으로서,

수지상 세포가 제 1 항에 기재된 펩티드를 사용하여 배양되어서, 상기 펩티드가 상기 수지상 세포에 흡수되어 있는 것을 특징으로 하는 포유류의 수지상 세포의 정제된 개체군.

#### 청구항 17

제 16 항에 있어서,

상기 펩티드는 SEQ ID NO:6의 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 포유류의 수지상 세포의 정제된 개체군.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 일반적으로 암 백신에 관한 것이고, 보다 구체적으로는 암 백신으로서 사용되는 수식된 서비빈 펩티드에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

서비빈은 아포토시스 단백질의 억제제(IAP)과에 속하는 16.5kDa 세포내 단백질이다. 서비빈은 유사분열 방추 장치와 협력하여 작용해서 세포 분열을 조절한다. 이것은 세포 주기의 G2/M기 동안에 소정 세포에서 발현되고, 이러한 세포 주기의 진행 동안 방추 미세소관 형성 중심과 관련이 있다[Zhao J, et al. (2000) J Cell Sci, 113:4363-71; Li F, et al. (1998) Nature, 396:580-4; Fortugno P, et al. (2002) J Cell Sci, 115:575-85]. 또한, 서비빈은 직접 아포토시스를 억제하는 소정의 카스파제의 기능을 조절하는 것으로 나타나 있다[Tamm I, et al. (1998) Cancer Res, 58:5215-20; Conway et al. (2000) Blood 95:1435-42; Shin S, et al. (2001) Biochemistry, 40:1117-23]. 또한, 서비빈은 세포 주기 진행을 허락하는 사이클린 D/cdk4 복합체를 억제한다[Fukuda S, Pelus LM. (2002) Cell Cycle, 1(5):322-6]. 따라서, 서비빈은 다수의 각종 세포 위치에서 세포 주기를 조절하고 아포토시스 세포 사멸을 억제하는 중요한 역할로서 기능한다.

[0003]

서비빈은 대부분의 암세포에 있어서 세포 주기의 G(2)/M기 동안 과발현되고, 현재까지 동정된 가장 특효의 항암제 중 하나이다. 이것은 대부분의 종양에서 발현되고, 일반 성인 조직에서는 거의 검출할 수 없다[Overwijk WW,

et al. (1998) J Exp Med, 188:277-86; Adida C, et al. (1998) Am J Pathol 152:43-49]. 서비빈은 일부 경우에 있어서 조혈 성장 인자에 의해 촉진되어진 CD34(+) 조혈모 세포 및 전구 세포 내에서 발현되지만, 일반적으로 이들 세포의 표면 상에는 존재하지 않는다[Fukuda S, Pelus LM. (2002) Cell Cycle. 1(5):322-6].

[0004]

다수의 다른 암 이외에도, 서비빈 발현은 보통 불량한 예후와 관련된 악성 신경교종에서 발생한다[Kajiwara Y, et al. (2003) Cancer 97:1077-1083; Sasaki T, (2002) Acta Neuropathol(Berl) 104:105-109; Chakravarti A, et al. (2002) J Clin Oncol, 20:1063-8]. 서비빈은 다수의 각종 암 형태로 발현되므로, 결과적으로 종양 백신 표적으로서의 용도는 항암 백신 치료에 큰 영향을 갖는다. 그러나, 종래 연구에서는 하기 종양 공격 후 투여시 유효한 서비빈 펩티드가 동정되지 않았다. 또한, 인간에 있어서의 서비빈 펩티드의 잠재 유효성에 관한 데이터를 거의 구할 수 없다. 따라서, 서비빈 항암 면역 치료법으로서 사용하기 위한 강한 세포 면역 반응을 유발할 수 있는 서비빈 펩티드가 요구되고 있다.

### 발명의 내용

[0005]

본 발명은 서비빈을 발현하는 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 조성물은 야생형 서비빈 단백질 서열의 아미노산 위치 57에서의 시스테인에서 메티오닌으로의 변경을 함유하는 서비빈 펩티드 모방체를 포함한다. 상기 펩티드는 9-23개 길이의 아미노산이고, SEQ ID NO:4(ENEPDLAQMFCCFKELEGWEPDD)의 서열 또는 그 단편을 가지며, 여기에서 상기 단편은 SEQ ID NO:4의 적어도 9개의 인접한 아미노산을 포함하고, 또한 여기에서 상기 단편은 SEQ ID NO:5(QMFFCF)의 서열을 포함한다. 상기 펩티드는 야생형 서비빈 서열을 갖는 펩티드에 의해서 유발된 세포 매개 면역 반응에 비하여 서비빈 발현 인간 암세포에 대한 향상된 인간 세포 매개 면역 반응을 촉진시킬 수 있다. 또한, 상기 펩티드는 신경교종의 마우스 모델에서 생존을 연장시키는 것이 입증되어 있다.

[0006]

본 발명의 방법은 서비빈 발현 암이 진단되거나 또는 의심되는 개체에게 암의 성장을 억제하도록 본 발명의 펩티드를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0007]

또한, 본 발명의 펩티드가 적재된 포유류의 수지상 세포가 실질적으로 정제된 개체군이 제공된다.

### 도면의 간단한 설명

[0008]

도 1은 야생형 및 본 발명에서 사용된 변경된 펩티드 서열의 요약을 제공한다.

도 2는 박스 내에 MHC 클래스 I(HLA-A\*0201) 에피토프를 나타내는 야생형과 변경된 펩티드 서열의 비교도를 제공한다. 본 발명의 펩티드 전체에서 일반적인 서열(QMFFCF)은 서비빈-53-67/57M에서 이탤릭체로 인쇄되어 있다.

도 3은 서비빈 펩티드 결합 분석에서 얻어진 인비트로 시험 데이터의 대표도를 제공한다.

도 4는 서비빈 아미노산 53-67에 기초하여 변경된 펩티드를 사용하여 GL261 뮌헨 모델에 있어서의 두개내 생존 연구에서 얻어진 데이터의 대표도를 제공한다. 상기 펩티드는 펩티드 적재 수지상 세포(DC) 백신을 사용하거나 또는 키텔 림프 헤모시아닌(KLH) 접합체로서 투여했다.

도 5는 본 발명의 방법에 따라 치료된 마우스(우측 패널) 및 음성 대조군(좌측 패널)으로부터의 자기 공명 영상 분석의 대표 사진을 제공한다.

도 6a, 도 6b 및 도 6c는 서비빈 펩티드의 HLA-A\*0201 결합 특성의 분석으로부터의 데이터의 대표도를 제공한다. 도 6a 및 도 6b에 요약된 데이터를 얻기 위해서, MHC 클래스 I 펩티드의 경쟁적 전위 분석에 서비빈 펩티드 에피토프를 사용했다. IC50은 형광 표지된 공지의 인간 MHC 클래스 I 리간드(HPV18-27)를 전위시키기 위해 요구되는 서비빈 펩티드의 50% 억제 농도를 나타낸다. 양성 대조군 펩티드(Flu & gp100)는 공지의 면역원성 MHC 클래스 I 리간드를 나타낸다. 데이터는 3개의 샘플의 평균 형광값±S.E.M.을 나타낸다. 도 6c는 야생형과 변경된 서비빈 펩티드 에피토프의 특정 HLA-A\*0201 펜타머 결합에 관한 데이터의 대표도를 제공한다.

도 7은 인간 신경교종 시험편으로부터의 서비빈 mRNA의 RT-PCR 증폭의 전기영동 분리의 대표도를 제공한다. 인간 신경교종의 세포 용출액에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 사용하여 증폭시켰다. 대조군(M)뿐만 아니라 11/12 샘플에서도 소망되는 사이즈의 서비빈 밴드가 분명하게 검출되었다. 대조군 밴드는 서비빈 cDNA의 PCR로부터 유도되었다.

도 8은 동종 불일치 U87 신경교종(HLA-A\*03 T 세포 vs. HLA-A\*02 신경교종; 동종 불일치)으로 공격된 서비빈 적재 자가 수지상 세포를 통한 엑스비보 T 세포 촉진으로부터 얻어진 데이터의 대표도를 제공한다.

도 9는 동종 U87 신경교종(HLA-A\*02; 동종 일치)으로 공격된 서비빈 적재 자가 수지상 세포를 통한 엑스비보 T

세포 촉진으로부터 얻어진 데이터의 대표도를 제공한다.

도 10은 동종 U87 신경교종(HLA-A\*02; 동종 일치)으로 공격된 서비빈 적재 자가 수지상 세포를 통한 엑스비보 T 세포 촉진이 행해진 제 2 경우의 대표도를 제공한다.

도 11은 자가 신경교종(HLA-A\*03, HLA-A\*29; 자가)으로 공격된 서비빈 적재 자가 수지상 세포를 통한 엑스비보 T 세포 촉진으로부터 얻어진 데이터의 대표도를 제공한다.

도 12는 동종 DS-GBM 신경교종(HLA-A\*03; 동종 일치)으로 공격된 서비빈 적재 자가 수지상 세포를 통한 엑스비보 T 세포 촉진으로부터 얻어진 데이터의 대표도를 제공한다.

도 13은 자가 CNS 림프종(HLA-A\*2901, HLA-A\*3002; 자가)으로 공격된 서비빈 적재 자가 수지상 세포를 통한 엑스비보 T 세포 촉진으로부터 얻어진 데이터의 대표도를 제공한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009]

본 발명은 서비빈을 발현하는 암세포의 성장을 억제하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 서비빈 발현 암세포를 함유하는 종양의 성장을 억제할 수 있는 강한 항종양 세포 매개 면역력을 유발하는 서비빈 펩티드 모방체를 포함한다. 본 발명의 방법은 서비빈 발현 암이 진단되거나 또는 의심되는 개체의 서비빈 발현 암세포의 성장을 억제하기 위해 그 개체에게 본 발명의 펩티드 모방체를 유효량 투여하는 것을 포함한다. 여기에서 사용된 성장의 억제는 존재하는 종양의 크기 감소를 포함할 수 있다.

[0010]

본 발명의 방법은 서비빈 발현 암세포에 대한 세포 매개 면역 반응을 촉진한다. 세포 매개 면역력의 발생과 관련하여, 강한 세포 면역 반응은 펩티드 에피토프가 MHC 클래스 I 분자에 결합한 항원 제시 세포(APC)의 표면에 표시되는 것을 요구하고, 이것은 CD8+ T 세포 반응(세포 독성 T 세포 또는 CTL)을 트리거링할 수 있다고 생각된다. 그 자체를 지속하기 위해서, CTL 면역 반응은 MHC 클래스 II 분자에 결합한 펩티드 에피토프를 사이토카인 분비 CD4+ T 세포(T 헬퍼 세포)에 제시하는 것을 통해서 지지되는 것이 바람직하다. 소정의 서비빈 펩티드가 CTL 반응을 유발하는 것으로 나타났지만, 아미노산 번호 53-67로부터의 서비빈 영역으로부터 실행가능한 펩티드 백신 후보를 제공하기 위한 시도는 아마도 HLA\*0201 결합능의 결핍으로 인하여 실패한 것으로 추정된다 [Bachinsky MM, et al. (2005) Cancer Immun. 22;5:6].

[0011]

본 발명은 야생형 서비빈 서열로부터 유도된 펩티드를 제공함으로써 이들 제한 및 다른 제한을 극복하고, 여기에서 상기 펩티드는 MHC I 결합 특성을 향상시키는 변경된 아미노산 서열을 포함하여서 상기 펩티드가 서비빈 발현 암세포에 대한 인간 CTL 반응을 유발하는 야생형 펩티드보다 더욱 유효하다.

[0012]

인간 및 마우스 서비빈 단백질의 전체 아미노산 서열은 SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2로서 각각 제공된다. 인간 및 마우스 서열은 아미노산 31과 아미노산 71 사이에서 100% 동종이다.

[0013]

본 발명에서 제공된 펩티드는 전장 서비빈의 단편이다. 그리고, 상기 단편은 9-23 아미노산 사이즈의 범위 내일 수 있다. SEQ ID NO:3(ENEPDLAQCFKKELEGWEPDD)은 야생형 서비빈 아미노산 49-71로 이루어진다.

[0014]

본 발명의 9-23 아미노산 펩티드는 각각 야생형 서비빈 단백질 서열 중 아미노산 위치 57에서 시스테인에서 메티오닌으로의 변경(C에서 M으로의 변경)을 포함한다.

[0015]

SEQ ID NO:4(ENEPDLAQMFCKKELEGWEPDD)는 전장 서비빈의 아미노산 위치 57에서 C에서 M으로의 변경(상기 C에서 M으로의 변경은 SEQ ID NO:4의 아미노산 번호 9에 존재함)이 아니면, 야생형 서비빈 아미노산 49-71로 이루어진 23 아미노산 펩티드이다. 본 발명의 펩티드는 9-23 아미노산 사이의 모든 정수를 포함하여 SEQ ID NO:4의 9-23 인접 아미노산으로 이루어질 수 있고, 여기에서 상기 펩티드는 전장 서비빈의 아미노산 위치 57에서 C에서 M으로의 변경을 포함한다. 또한, 본 발명의 펩티드는 각각 SEQ ID NO:5(QMFFCF)의 코어 서열을 포함한다. 대표 서비빈 펩티드 및 상기 펩티드에 대해 여기에서 사용된 명명법은 도 1에 제공된다.

[0016]

또한, 본 발명에 의해 제공된 펩티드의 비한정 소정예는 도 2에 나타내고, 여기에서 SEQ ID NO:5의 코어 에피토프 서열은 박스 내에 나타내며, 도 2의 우측에 박스 내에 나타난 펩티드 중 보다 긴 적합한 펩티드 서열에 있어서 이탤릭체로 인쇄되어 있다. 따라서, 이탤릭체로 인쇄된 코어 서열을 포함하는 박스 내의 서열은 각각 본 발명의 범위 내에 포함되는 펩티드의 서열이다.

[0017]

한 실시형태에 있어서, 본 발명의 펩티드는 SEQ ID NO:6(DLAQMFFCFKKEGW)으로 이루어진다. 이러한 펩티드는 "SVN53-67/M57", "서비빈 M57" 및 "M57"로서 대안적으로 언급된다. SVN53-67/M57은 CD4+ 헬퍼 T 세포 반응을 유발하기 위해서 인간 MHC II 분자를 결합시킬 수 있는 에피토프와 인간 MHC I 분자를 결합시키기 위한 에피토프

프를 함유한다.

[0018] 어느 특별한 이론에 한정시킨 것 이외에는 본 발명의 펩티드에 있어서 C에서 M으로의 변경은 MHC I에 대한 보다 효율적인 앵커링을 통하여 부분적으로 인간 면역 시스템에 대한 MHC I 결합 에피토프의 제시를 향상시켜, 상기 펩티드, 상기 MHC I 분자 및 아마도 T 세포 수용체 사이의 관련 기간을 보다 길게 하여 면역 반응을 보다 활성화시킨다고 생각된다. 보다 짧은 펩티드는 MHC I에 주로 결합할 수 있다. 15-mer SVN53-67/M57과 같이 보다 긴 펩티드는 MHC 클래스 I 이외에 MHC 클래스 II에 결합하도록 설정된다.

[0019] 본 발명자들은 SVN53-67/M57에 있어서 C에서 M 아미노산으로의 치환이 MHC I 결합을 야생형 서열에 비하여 HLA-A\*0201에 대한 원위치 결합 분석에 있어서 약 73배 증가시킨다(도 2 및 도 6c를 요약함)는 것을 입증한다. 또한, 본 발명자들은 C에서 M으로의 변경을 포함하는 펩티드를 인간 신경교종 및 CNS 림프종 시험편에 대한 강한 엑스비보 용출 반응을 유발할 뿐만 아니라 CD8+ CTL을 효과적으로 촉진시키고, CD4+ T 세포 유도 사이토카인 지지를 촉진시키며, 뇌종양의 마우스 모델에서의 생존을 향상시키는데(그리고, 잠재적으로는 신경교종을 치유함) 사용할 수 있다는 것도 알아냈다. 따라서, 본 발명의 펩티드는 가공 펩티드와 MHC-I 앵커 잔기의 에피토프 사이의 향상된 관계를 수반하므로 인간에 있어서 인비보 백신으로서 사용되는 경우, 서비빈 발현 암세포에 대하여 향상된 MHC-I 결합 및 향상된 CTL 활성을 유발하는 방법에 사용될 수 있다고 기대된다.

[0020] SVN 53-67 펩티드(C에서 M으로의 변경을 포함하거나 또는 포함하지 않음)는 큰 환자 집단을 총체적으로 나타내는 다수의 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 분자에 결합하는 것으로 기대된다(표 1).

표 1

| MHC 클래스 I  |                  | MHC 클래스 II             |
|------------|------------------|------------------------|
| HLA-A*0201 | HLA-B*08         | HLA-DRB1*0301 (DR17)   |
| HLA-A*03   | HLA-B*1501 (B62) | HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4) |
| HLA-A*1101 | HLA-B*1510       |                        |
| HLA-A*2402 | HLA-B*18         | HLA-DRB1*0701          |
| HLA-A*2402 | HLA-B*2705       | HLA-DRB1*1501 (DR2b)   |
| HLA-A*26   | HLA-B*2709       |                        |
| HLA-A*6801 | HLA-B*3901       |                        |
| HLA-B*0702 | HLA-B*4402       |                        |
| HLA-B*08   | HLA-B*5101       |                        |
| HLA-B*1402 |                  |                        |

[0021]

[0022] 본 발명의 펩티드는 당업자에게 공지된 임의의 기술 또는 이하의 개선된 기술에 의해서 제조될 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드는 고체상 합성 기술(Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 15:2149-2154(1963); M. Bodanszky et al., (1976) Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed.; Kent and Clark-Lewis in Synthetic Peptides in Biology and Medicine, p. 295-358, eds. Alitalo, K., et al. Science Publishers, (Amsterdam, 1985))을 이용하여 제조될 수 있다. 또한, The Proteins, Vol. II, 3d Ed., p. 105-237, Neurath, H., et al., Eds., Academic Press, New York, N.Y. (1976)에 기재된 바와 같이, 용액법에 의한 펩티드의 합성도 사용될 수 있다. 합성된 펩티드는 분취용 고성능 액체 크로마토그래피 또는 당해 기술 분야에서 사용할 수 있는 다른 유사한 기술에 의해 실질적으로 정제되어도 좋다. 합성 펩티드의 조성은 아미노산 조성 분석 기술에 의해 확인될 수 있다.

[0023] 본 발명의 펩티드는 면역 반응을 향상시키기 위해서 적합한 면역 보강제와 함께 조제되어도 좋다. 적합한 면역 보강제로는 한정되지 않지만, 알루미늄히드록사이드 및 알루미늄과 칼슘의 포스페이트겔을 포함하는 미네랄염, 오일 에멀전 및 계면활성제계 포물레이션, 사포닌, AS02[SBAS2](수중유형 에멀전), Montanide ISA-51 및 ISA-720, 비로졸을 포함하는 미립자 면역 보강제, AS04[SBAS4]A1염, MPL, ISCOMS(사포닌과 지질의 구조적 복합체), 폴리락티드 코글리콜라이드(PLG), 천연 및 합성 미생물 유도제, 지질성 면역 촉진제 OM-174(지질 A 유도제), 면



역 촉진성 CpG 모티프를 함유하는 합성 올리고뉴클레오타이드, 수식 세균 독소, hGM-CSF 및 hIL-12, hIL-15, hIL-17, hIL-21을 포함하는 내인성 인간 면역 조절제, 금 입자를 포함하는 Immudaptin 및 불활성 비히클이 포함된다. 상기 펩티드는 공지된 기술에 따라 상기 펩티드와 표준 약제학적으로 허용 가능한 캐리어를 조합하여 제조된 종래의 경구 투여형으로 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 캐리어의 소정에는 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (2005) 21st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins에서 찾을 수 있다.

[0024] 한 실시형태에 있어서, 본 발명의 펩티드는 면역원성 캐리어 단백질에 접합되어도 좋다. 적합한 캐리어로는 한정되지 않지만, 투구게 헤모시아닌(LPH), 검미목 헤모시아닌(TTH), 및 소 혈청 알부민(BSA), 과산화물 독소이드 및 디프테리아 독소, DHBcAg, 폴리리포틸리보실포스페이트(PRP), PncPD11, 및 나노 입자 제형이 포함된다.

[0025] 한 실시형태에 있어서, 적합한 면역원성 캐리어 단백질은 키홀 림프 헤모시아닌(KLH)이다.

[0026] 또한, 본 발명의 펩티드는 펩티드 적재 수지상 세포로서 투여되어도 좋다. 따라서, 그 방법은 상기 수지상 세포가 펩티드를 흡수하여 펩티드 내에 존재하는 MHC 에피토프의 제시를 용이하게 하는 펩티드 적재 수지상 세포가 얻어지도록 본 발명의 펩티드로 배양된 수지상 세포를 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 목적으로 사용된 수지상 세포는 펩티드로의 배양 후에 전달되는 개체로부터 분리되거나 또는 동종 일치의 개체로부터 얻어지기도 좋다. 따라서, 본 발명은 포유류 수지상 세포의 실질적으로 정제된 개체군을 포함하는 조성물도 제공하고, 여기에서 상기 수지상 세포는 상기 수지상 세포가 펩티드를 흡수하도록 본 발명의 펩티드로 배양된다.

[0027] 당업자에게 공지된 각종 방법을 사용하여 본 발명의 조성물을 개체에게 도입해도 좋다. 이들 방법으로는 한정되지 않지만, 두개내, 척수강내, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 경구 및 비강내 경로가 포함된다.

[0028] 본 발명의 방법에 사용되는 특정 투여 방법의 형태 및 특성은 투여의 경로 및 개체의 사이즈 및 질병의 단계 등 기타 널리 공지되어 있는 변수에 의해 좌우될 것이라는 것은 당업자에게 인식될 것이다. 이러한 기준 및 여기에서 나타낸 데이터에 기초하여, 당업자는 어느 특정 개체에 대하여 서비빈 발현 암세포의 성장을 억제하기 위한 펩티드의 유효량을 결정할 수 있다. 일반적으로, 펩티드의 투여량은  $\mu\text{g}\sim\text{mg}$  정도의 범위일 것으로 생각된다.

[0029] 본 발명의 방법은 종래 항암 치료와 조합하여 행할 수 있다. 이러한 치료로는 한정되지 않지만, 화학 치료, 외과적 처치 및 방사선 치료가 포함된다. 본 발명의 조성물은 이러한 항암 치료의 이전, 동시 또는 이후에 투여될 수 있다.

[0030] 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것이지만, 본 발명에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 실시예 1

[0032] 본 실시예는 SYFPEITHI 분석에 의해 MHC 클래스 I 분자에 결합하는 것으로 예측되는 선택된 서비빈 펩티드 에피토프의 인비트로 분석을 제공한다(표 2). 양성 대조군 펩티드(OVA-258)는 강한 잠재 결합력을 나타내는 스코어를 갖는 공지의 면역원성 MHC 클래스 I 리간드를 나타낸다. 밑줄 그어진 아미노산 잔기는 MHC I 앵커 위치를 나타낸다.

표 2

| 예측된 H-2K <sup>b</sup> 결합 위치 | 에피토프                           | 스코어 |
|-----------------------------|--------------------------------|-----|
| OVA-258                     | S I I N F E K L (SEQ ID NO:7)  | 25  |
| SVN-9                       | A W Q P F L K D (SEQ ID NO:8)  | 12  |
| SVN-18                      | R I S T F K N W (SEQ ID NO:9)  | 13  |
| SVN-39                      | A E A G F I H C (SEQ ID NO:10) | 12  |
| SVN-57-64                   | C F F C F K E L (SEQ ID NO:11) | 20  |
| SVN-57-64/M57               | M F F C F K E L (SEQ ID NO:17) | 20  |
| SVN-82                      | S G C A F L S V (SEQ ID NO:12) | 18  |
| SVN-L82                     | L G C A F L S V (SEQ ID NO:13) | 18  |
| SVN-97                      | T L G E F L K L (SEQ ID NO:14) | 22  |

[0033]

[0034]

펩티드 결합 분석에 관한 인비트로 시험 데이터는 도 3에 나타난다. 도 3에 나타난 데이터를 얻기 위해서, 종래 MHC 클래스 I 펩티드 결합 분석에 서비린 펩티드 에피토프를 사용했다. 도 3의 평균 형광값은 H2-K<sup>b</sup>에 대한 SVN 펩티드의 결합을 나타낸다. 표면 MHC 클래스 I 분자의 발현이 부족한 무린 RMA-S 세포의 표면 상에서의 H2-K<sup>b</sup> 분자의 상향 조절은 실제 인비트로 서비린 펩티드 결합을 측정하는데 사용되었다. 도 3에 나타난 데이터는 370 °C에서의 100 μM 펩티드의 결합을 나타낸다. 음성 대조군은 MHC 클래스 I에 결합하지 않는 무관한 펩티드이다. 데이터는 3개의 샘플의 평균 형광값±S.E.M을 나타낸다.

[0035]

도 3에 나타난 데이터에서 알 수 있듯이, 컴퓨터 분석은 MHC 결합 강도에 대한 변경된 펩티드 서열의 효과를 신뢰할 만하게 예측하기에는 불충분하다. 특히, SVN<sub>97-104</sub>는 현재 임상 시험 중이지만, SVN<sub>97-104</sub>를 나타내는 표 2의 데이터가 야생형 또는 돌연변이형 SVN 57-64 펩티드 중 어느 하나보다 강한 결합을 나타내어야만 함에도 불구하고, SVN 57-64wt보다 낮고, SVN 57-64/M57 보다 현저하게 낮은 결합을 나타내는 펩티드이다. 또한, 아미노산에 대한 다른 변경으로 결합을 향상시켜도 좋지만, 본 발명자들은 야생형 서열에 비하여 향상된 MHC 보유력을 예측한 컴퓨터 분석에도 불구하고, 아미노산 앵커 위치 57, 59 및 64로의 변경(57C>L, 59F>Y 및 64L>V 변경 포함)은 펩티드에 대한 면역 반응을 향상시키지 않는다는 것을 알아냈다. 또한, 본 발명자들은 서비린 아미노산 위치 82에서의 S에서 M으로의 변경을 포함하는 서비린 노나펩티드의 분석에 의거하여, MHC 클래스 I 제 1 앵커 위치의 아미노산이 메티오닌으로 적게 치환되는 것이 두개내 신경교종의 마우스 모델에서 생존성을 반드시 향상시키는 것은 아니라는 것을 알아냈다.

[0036]

실시예 2

[0037]

본 실시예는 두개내 신경교종의 마우스 모델을 치료하는데 있어서의 본 발명의 방법의 효능을 입증한다.

[0038]

서비린을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응을 유발하는 본 발명의 펩티드의 능력을 평가하기 위해서, 본 발명자들은 신경교종에 대한 백신 효능을 시험하기 위하여 가능한 가장 엄격한 모델인 것으로 생각되는 것을 사용했다. 이 점과 관련하여, 피하 종양에 대하여 얻어진 결과가 두개내 유효성에 반영되지 않는 경우가 있으므로, 두개내 종양의 성장은 특히 암 백신으로도 억제하기 매우 어렵다는 것이 널리 알려져 있다. 다수의 M57계 펩티드 전략에 대한 반응에 있어서의 두개내 종양의 억제된 성장은 본 발명의 유효한 항-신생물 효과를 지지한다.

[0039]

구체화되지 않은 경우, 본 실시예에 나타난 데이터는 동종동계 GL261-C57BL/6 무린 두개내 신경교종 모델을 사용하여 발생되었다. 뇌내 GL261 신경교종 모델은 짧은 생존 기회, 높은 초기 생존 및 일정한 번식을 특징으로 한다.

[0040]

본 실시예에 나타난 데이터를 얻기 위해서, 하기 재료 및 방법을 사용했다.



- [0041] <세포주 및 배양 조건>
- [0042] GL261 무린 신경교종 세포는 10% 소 태아 혈청, 5000유닛 페니실린/스트렙토마이신, 50  $\mu$ M 2-메르캅토에탄올, 25mM HEPES, 및 1x 비필수 아미노산을 함유하는 완전 돌베코 변형 이글 배지(DMEM)의 100mm 조직 배양 플레이트 상에 1주당 2~3회 배지를 변화시키면서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 성장된다. DC2.4 수지상 세포주는 10% 소 태아 혈청, 5000유닛 페니실린/스트렙토마이신, 50  $\mu$ M 2-메르캅토에탄올, 25mM HEPES, 1x 비필수 아미노산 및 20ng/ml GM-CSF(Pepro Tech, Rocky Hill, NJ)를 함유하는 RPMI에서  $2 \times 10^6$  세포/ml의 밀도로 배양되었다. GL261 무린 신경교종 세포는 10% 소 태아 혈청, 5000유닛 페니실린/스트렙토마이신, 50  $\mu$ M 2-메르캅토에탄올, 25mM HEPES, 및 1x 비필수 아미노산을 함유하는 완전 돌베코 변형 이글 배지(DMEM)의 100mm 조직 배양 플레이트 상에 1주당 2~3회 배지를 변화시키면서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 성장되었다.
- [0043] <펩티드>
- [0044] 펩티드 합성은 Fmoc 화학 및 고체 지지 수지(Sigma-Genosys, The Woodlands, TX)를 사용하여 행하였다. 펩티드는 각각 사용하기까지 -20℃에 보관되었고, DMSO로 희석되었다. 오브알부민(OVA) 펩티드 서열 SIINFEKL은 대조군으로서 사용했다.
- [0045] <펩티드 적재 DC를 갖는 마우스의 면역>
- [0046] 펩티드 적재 수지상 세포(DC)는 DC2.4 세포주, 또는 예를 들면 Ciesielski et al. Cancer Immunol Immunother. 2006 Vol. 12, pp1491-503에 이미 기재된 바와 같이 배양을 통해 성장하는 채취된 골수 유도 수지상 세포(BMD C)로부터 발생되었다. BMDc는 안락사된 6주령 C57BL/6 마우스의 장골로부터 채취하고, 세포는 10% 소 태아 혈청, 5000유닛 페니실린/스트렙토마이신, 50  $\mu$ M 2-메르캅토에탄올, 25mM HEPES, 1x 비필수 아미노산 및 20ng/ml GM-CSF(PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)를 함유하는 RPMI에서  $2 \times 10^6$  세포/ml의 밀도로 배양한다. 48 시간 후, 비부착성 세포는 제거하고, GM-CSF를 함유하는 배지를 보충한다. 6일 후, 펩티드 적재를 위해 비부착성 세포를 채취한다. DC2.4 세포 및 BMDc는  $3 \times 10^6$  DC/ml를 함유하는 각각의 웰에 첨가된 각 펩티드 40 $\mu$ g으로 적재된다. 펩티드 및 DC는 37℃에서 2시간 동안 배양하고, 채취하여 세정하고 PBS에 재현탁시킨다. 경구 투여를 통하여 각각의 동물에 백신을 접종하기 위해서, 총  $1 \times 10^6$  DC가 사용되는 것이 일반적이다. 생존에 따라 동일한 조성의 부스터 백신을 7일마다 제공한다.
- [0047] <비장 세포 및 T 세포 분리>
- [0048] 백신 접종된 C57BL/6 마우스의 비장 조직을 희생점에서 채취한다. 세포는 살균 포셉으로 마우스 비장에서부터 채취하여 70 $\mu$ m 필터(BD Falcon)를 통과시킨다. 비장 세포는 10% 소 태아 혈청, IL-2(10유닛/ml) 및 IL-7(1ng/ml)을 함유하는 DMEM에서 배양한다. 배지는 2일째 및 7일째에 보충한다. T 세포를 분리하기 위해서, 비장 세포를 5분 동안 원심 분리하여 펠렛을 RBC 용출 버퍼(R&D Systems)에 재현탁시킨다. 세포를 2회 세정하고, 완전 RPMI 배양 배지에 재현탁시킨다.
- [0049] <CTL에 의한 종양 세포 용출>
- [0050] 생세포/사세포 매개 세포 독성 키트(Molecular Probes-Invitrogen)를 사용하여 표적 종양 세포의 특정 T 세포 용출을 위한 세포 분석을 행한다. GL261 세포는 트립신 처리하여  $1 \times 10^6$  세포/ml로 현탁시키고, 이어서 10 $\mu$ l DiOC<sub>18</sub> 표지(녹색 형광)를 37℃에서 20분 동안 첨가한다. 표지한 후에 세포를 원심분리하고, PBS에서 2회 세정하고, DMEM에  $1 \times 10^6$  세포/ml로 재현탁시킨다. 이어서,  $1 \times 10^4$  GL261 DiOC<sub>18</sub>-표지된 표적 세포를 독립 배양 튜브에 첨가한다. 백신 접종된 동물로부터의 비장 세포를 37℃에서 2시간 동안 1:25~1:100의 범위의 비로 표적 세포에 첨가한다. 또한, 조건은 배경 레벨, 자연막 무결성 손실 및 최대 용출을 분석하기 위해서 설정된다. 투과 세포막을 가진 세포를 표지하기 위해서 각 튜브에 요오드화 프로피듐을 첨가한다. 세포를 펠렛화하여 FACS 분석에 사용한다. 세포 독성률을 식:(실험 PI-DiOC<sub>18</sub> 세포-자연)/(최대 PI-DiOC<sub>18</sub>-자연 PI-DiOC<sub>18</sub>) $\times 100$ 을 이용하여 산출한다. 최대 방출은 DiOC<sub>18</sub> 표지된 표적 세포를 반복하여 냉동-해동함으로써 측정한다. 이펙터 세포 부재 하에 PI-DiOC<sub>18</sub> 세포를 배양함으로써 자연 방출을 측정한다. FCS Express 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석한다. 분석은 GL261 세포를 게이팅하여 이펙터 세포로부터의 임의의 배경을 제거하는 것에 기초한다.

[0051]

<뇌내 GL261 종양 세포 주사 및 생존 분석>

[0052]

수컷 C57BL/6 마우스를 케타민(80mg/kg) 및 크실라진(20mg/kg)의 복강내(i.p.) 주사로 안락사시키고, 정위 헤드프레임(David Kopf Instruments, Tujunga, CA)에 고정시킨다. 두피 중간선을 절개하여 정수리점을 동정한다. 심층 전두부 백질에의 세포 이식을 위한 정위 좌표(정수리점에 대하여 2.0mm 옆)를 측정한다. 상기 점에 천공구멍을 뚫고,  $1 \times 10^5$  GL261 세포를  $5\mu\text{l}$ 의 DMEM에 현탁시켜 뇌경막에 대하여 3.0mm의 깊이로 25게이지 카놀라의 고정된 해밀턴 주사기를 통하여 주입한다.  $2.5\mu\text{l}/\text{분}$ 으로 주입을 행한다. 바늘을 꺼내고 절개를 봉합했다. 카플란-마이어 생존 플롯을 작성하고, 모든 그룹에 대하여 중간 생존 시간을 측정한다. 로그랭크 만텔-콕스법(logrank Mantel-Cox Method)을 사용하여 생존 차이의 중요성을 평가한다.

[0053]

무린 두개내 신경교종 모델에 있어서의 생존 연구로부터의 결과의 요약은 표 3에 제공된다.

표 3

| 펩티드 서열  | 결과                                  |
|---|-------------------------------------|
| DLAQMFFCFKELEGW (SVN53-67/57M)<br>(SEQ ID NO:6) | DC 백신 = 53일의 중간 생존<br>2/8 100일 생존체  |
| DLAQMFFCFKELEGW (SVN53-67/57M)<br>(SEQ ID NO:6) | KLH 백신 = 51일의 중간 생존<br>1/8 100일 생존체 |
| AQMFFCFKEL (SVN55-64/57M)<br>(SEQ ID NO:15)     | DC 백신 = 43일의 중간 생존                  |
| QMFFCFKEL (SVN56-64/57M)<br>(SEQ ID NO:16)      | DC 백신 = 40일의 중간 생존                  |
| MFFCFKEL (SVN57-64/57M)<br>(SEQ ID NO:17)       | DC 백신 = 29일의 중간 생존                  |
| DLAQCFFCFKELEGW (SVN53-67)<br>(SEQ ID NO:18)    | DC 백신 = 57일의 중간 생존<br>2/8 100일 생존체  |
| CFFCFKEL (SVN57-64)<br>(SEQ ID NO:11)           | DC 백신 = 25일의 중간 생존                  |

[0054]

[0055]

도 4는 뇌내 GL261 신경교종을 이식한 C57BL/6 마우스의 생존을 나타내는 두개내 생존 연구로부터의 데이터의 요약도를 제공한다. 도 4에 나타난 데이터를 얻기 위해서, 마우스에  $1 \times 10^5$  GL261 세포를 두개내에 이식하고, 서비빈 펩티드 DC 백신으로 치료했다. C57BL/6 마우스를 Incomplete Freund's Adjuvant(IFA) plus 100ng GM-CSF 중의  $100\mu\text{g}$  SVN 53-67/M57-KLH 펩티드를 직접 피하 주사하는 것뿐만 아니라 SVN57-64계 변경 펩티드 또는 OVA258-265 펩티드 적재 DC2.4 세포로 면역 치료했다. 백신 접종은 종양 세포 이식 4일 후에 시작되었고, 7일마다 반복(부스팅)하여 치료 환경을 촉진시켰다. 카플란-마이어법(Kaplan-Meier method)에 따라 생존을 플로팅했다. 초고 자장 MRI에 의해 장기간 생존자의 종양 부재를 확인했다.

[0056]

표 3 및 도 4에서 알 수 있듯이, 펩티드 SVN57-64/M57 DC 백신은 GL261-C57BL/6 신경교종 모델에 있어서 야생형 펩티드 이상으로 적당히 생존을 향상시킨다. 중요하게는 SVN53-67/M57 및 SVN53-67(야생형) 모두 DC 백신으로서 사용된 경우에 40일이 지난 마우스에 100% 생존률을 부여한다. 또한, SVN53-67/M57은 KLH 백신으로서도 시험되어 중간 생존이 51일이었다.

[0057]

도 5는 도 4에 나타난 생존 곡선에서의 마우스의 대표적인 자기 공명 영상을 제공한다. 일반적으로는 악성 종양은 좌측 패널의 대조군 마우스 뇌에 나타난 바와 같이 18일까지 성장한다. SVN53-67/M57 펩티드 백신을 투여받은 마우스는 40일째에도 종양이 없었다. 백신 접종된 마우스 영상의 전좌측 반구에서 작은 바늘관 및 잔존 상처 세포 조직이 관찰될 수 있다.

[0058]

따라서, 본 실시예는 본 발명의 펩티드가 신경교종의 임상 관련 마우스 모델에서 생존을 향상시킬 수 있고, 잠재적으로 치유가능하다는 것을 입증한다.

[0059]

실시예 3

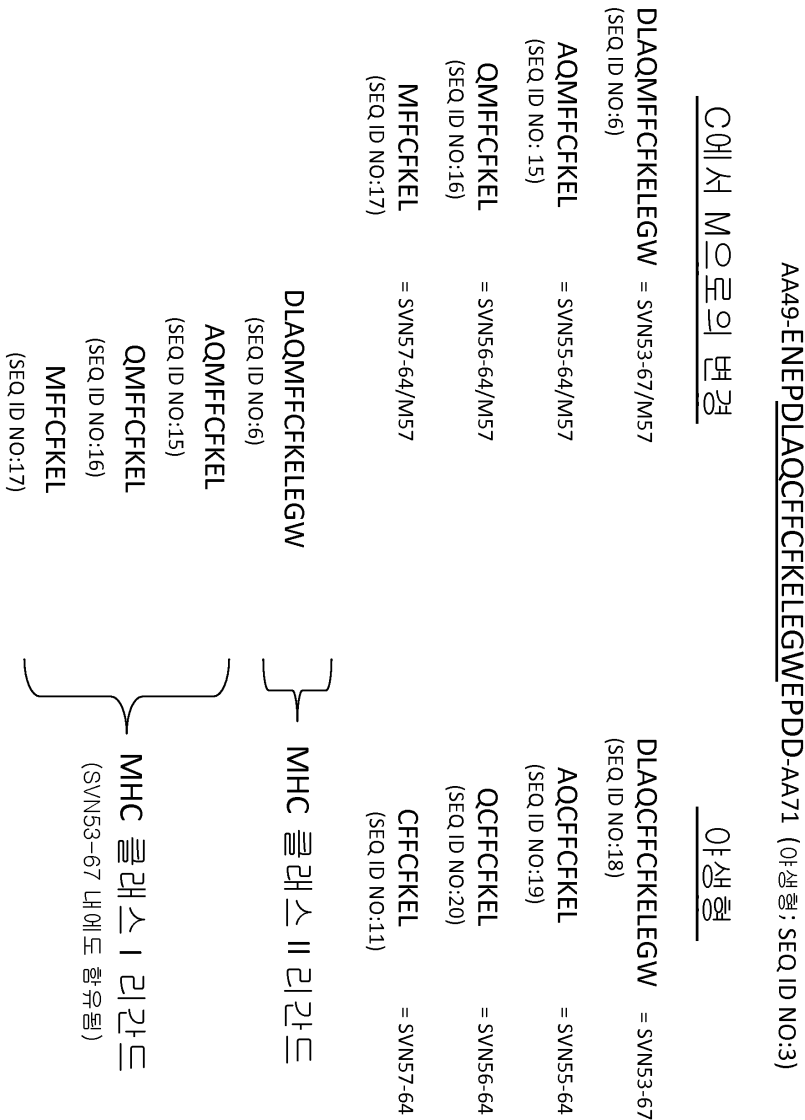
- [0060] 본 실시예는 야생형 펩티드에 비하여 본 발명의 펩티드의 향상된 MHC 클래스 I 결합을 입증하고, 또한 본 발명의 방법은 비신경교종 암세포를 포함하여 서비빈을 발현하는 인간 암세포에 대한 향상된 세포 매개 면역 반응을 유발할 수 있다는 것을 입증한다.
- [0061] 어느 특별한 이론에 한정되지 않고, SVN53-67/M57 및 SVN53-67은 마우스 H-2Kb 분자에 대한 앵커 위치에 있지 않은 M57 변경으로 인하여 C57BL/6 마우스에서 유사한 생존 프로파일을 나타내는 것으로 생각된다. 이와 같이, 펩티드는 모두 마우스에서 유사한 정도로 H-2Kb(뮤린 MHC 클래스 I 상대)에 결합할 것이다. 변경된 인간 에피토프를 함유함에도 불구하고(이러한 아미노산 변경이 T 세포 수용체와의 상호 작용으로 인하여 면역력에 부정적인 영향을 미치는 것으로 기대될 수 있다는 사실에도 불구하고), SVN53-67/M57이 마우스에서의 야생형 면역원성 반응을 유지한다는 관찰은 그것이 유효한 펩티드 모방체이고, SVN53-67/M57이 백신으로서 사용되는 경우에 C에서 M으로의 변경이 유해한 효과를 부여하지 않는다는 것을 나타낸다. 그러나, 인간 MHC I과의 향상된 상호 작용을 용이하게 하는 서열을 함유하도록 57C에서 M으로의 변경이 야생형 펩티드를 변경하므로, 본 발명의 펩티드가 그 향상된 잠재력을 나타내도록 기대되는 것은 인간에게 투여할 때이다. 이것은 야생형 및 M57 펩티드의 이질적인 MHC 클래스 I 결합 특성에 의해 지지된다(도 6a~도 6c). 경쟁적 펩티드 결합 분석에 의해 측정된 바와 같이, SVN53-67/M57은 야생형 SVN53-67보다 약 12배 강한 HLA-A\*0201에 결합한다(도 6a, 도 6b). 또한, 서비빈/MHC 클래스 I-특정 펜타머를 사용함으로써, 코어 펩티드 SVN56-64/M57은 야생형 SVN56-64보다 약 73배 강한 HLA-A\*0201에 결합한다(도 6c). 총체적으로, 이것은 C>M 변경에 의해 야생형 서비빈 서열에 비하여 향상된 MHC 클래스 I 분자에 대한 펩티드 모방체의 친화도가 향상된다는 것을 나타낸다. 따라서, C에서 M으로의 변경은 MHC 클래스 I 결합에 있어서 야생형 서열보다 현저한 향상을 유발한다. 이러한 향상은 자가 암세포에 대한 CTL 활성을 향상시키는 것으로 기대될 것이다. 따라서, 야생형 펩티드에 비하여, SVN53-67/M57이 동종 HLA 일치 인간 신경교종(도 9, 도 10), 자가 개체 신경교종(도 11, 도 12) 및 자가 인간 림프종 세포(도 13)에 대한 CTL 매개 사멸에 있어서 3-5배의 증가를 유발한다는 것은 주목할 만하고, 본 발명의 방법이 야생형 서열을 갖는 펩티드에 의해 유도되는 것보다 현저하게 향상된 세포 매개 면역 반응을 유발할 수 있다는 것이 입증된다. 또한, 도 13의 데이터는 본 발명의 방법이 신경교종 이외의 인간 암세포에 대한 세포 매개 면역 반응을 유발할 수 있다는 것을 입증한다. 따라서, 본 발명의 방법은 서비빈을 발현하는 모든 형태의 암세포에 대하여 광범위한 적용성을 갖는 것으로 기대된다.
- [0062] 실시예 4
- [0063] 본 실시예는 인간 U87 교묘세포종 또는 인간 림프종 세포가 투여된 서비빈 적재 자가 인간 수지상 세포를 사용한 엑스비보 T 세포 촉진을 입증한다. 이들 투여로부터 얻어진 데이터는 도 8~도 13에 나타낸다.
- 도 8~도 13에 나타난 데이터를 생성하기 위해서, 유세포 분석기를 사용하는 생세포/사세포 매개 세포 독성법을 사용하여 표적 세포의 특정 T 세포 용출을 위한 CTL 분석을 행하였다. 환자로부터 유래된 말초 혈액 단구 세포(PBMC)를 GM-CSF 및 IL-4 존재 하에 DC 엑스비보로 배양했다. 미성숙 DC로의 분화 5-6일 후, 특정 펩티드를 CD-40L과 함께 첨가하여 성숙 DC를 촉진 및 성장시켰다. 성숙 후에 추가로 자가 PBMC를 첨가하여 CTL로 성장하게 했다. 10일 후, 세포를 제거하고 배양시 자가 또는 동종 인간 신경교종 세포와 혼합하여 세포 사멸 능력을 평가했다. 표적 신경교종 세포에 CTL을 37°C에서 2시간 동안 5:1~40:1의 범위의 비로 첨가했다. 분석은 표지된 신경교종 세포를 게이팅하여 이펙터 세포로부터 배경을 제거하는 것에 기초한다. 에탄올 처리 표적 세포를 사용하여 최대 세포 독성을 촉진시켰다. 자연 세포 독성은 이펙터 세포의 부재 하에 배양된 표적 세포를 나타낸다. Flu 및 gp100 펩티드 촉진은 부가적 촉진 대조군을 나타낸다. 데이터는 3개의 샘플의 특정 용출 평균 백분율±S.E.M.을 나타낸다.
- [0064] 도 13에 나타난 데이터는 자가 CNS 림프종 세포(자가 또는 동종 신경교종 대신)에 대한 CTL의 효과를 분석한 것을 제외하고는 근본적으로 도 9~도 12에서와 동일한 방법으로 얻어졌다.
- [0065] 도 9~도 12에 나타난 데이터는 동종 일치 또는 자가 신경교종에 대하여 강한 세포 매개 면역 반응을 유발하는데 있어서 본 발명의 펩티드의 효능을 입증한다. 따라서, 본 발명의 방법은 개체에게 투여시와 유사한 반응을 유발하는 것으로 기대된다. 중요하게는 자가 CNS 림프종 세포에 대해서도 강한 세포 매개 면역 반응이 발생하여(도 13), 본 발명의 펩티드는 교묘세포종 세포에 대해서 세포 매개 반응을 유발할 수 있는 것에만 한정되지 않는다는 것이 입증된다.
- [0066] 따라서, 상기 데이터에 기초하여 본 발명의 방법은 개체에 있어서 임의의 형태의 서비빈 발현 암세포에 대하여 유효한 세포 매개 면역 반응을 유발하여 이러한 암세포의 성장을 억제하는 것으로 기대된다.

[0067]

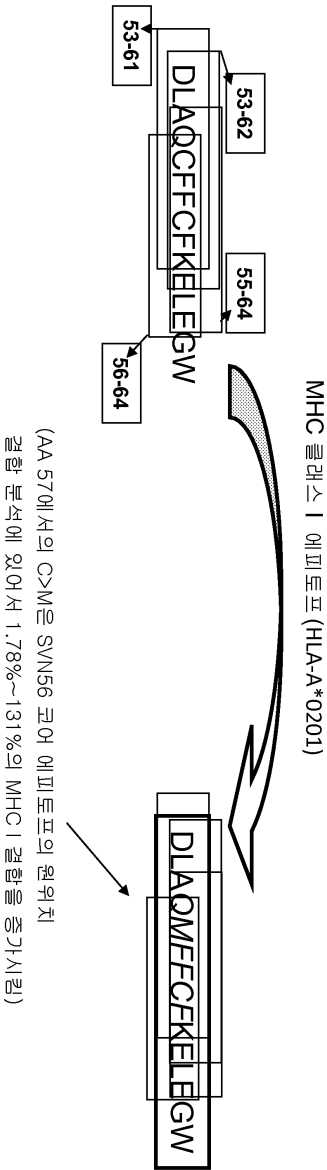
본 발명은 특정 실시형태를 통해 설명했다. 그러나, 조성, 방법 및 장치에 대한 일반적인 변경은 당업자에게 명백할 것이고, 이러한 변경은 본 발명의 범위 내에 포함되도록 의도된다.

도면

도면1

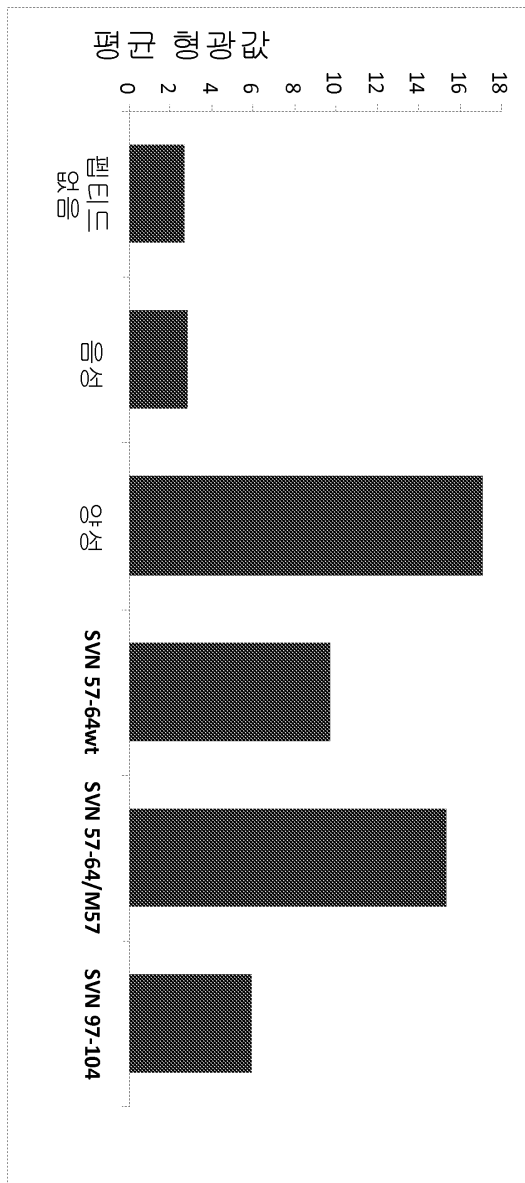


서미번 - 53-67/57M



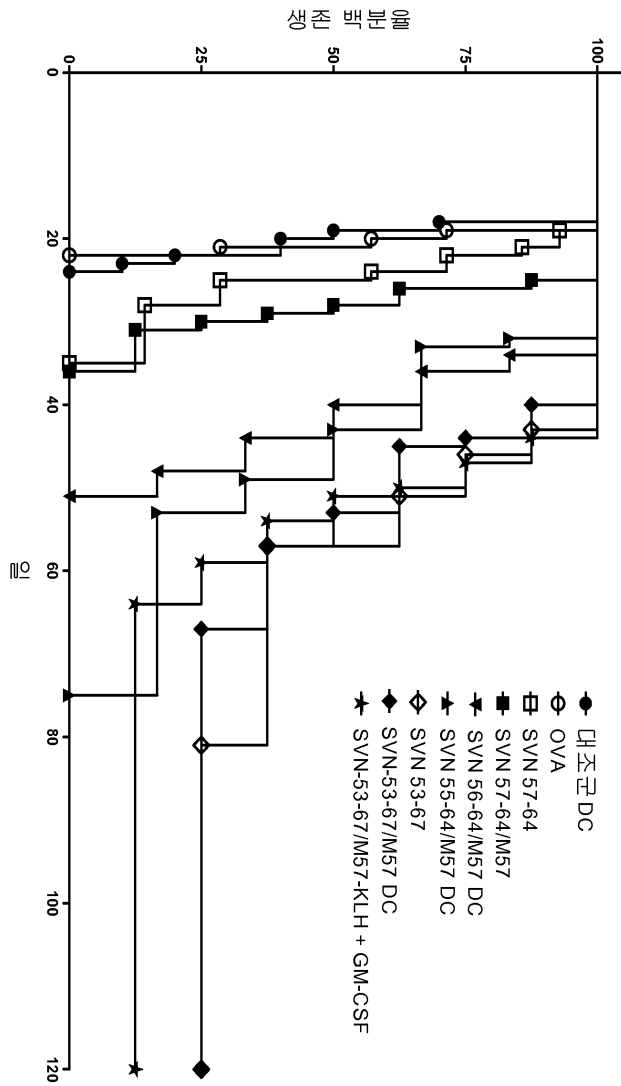
도면2

도면3



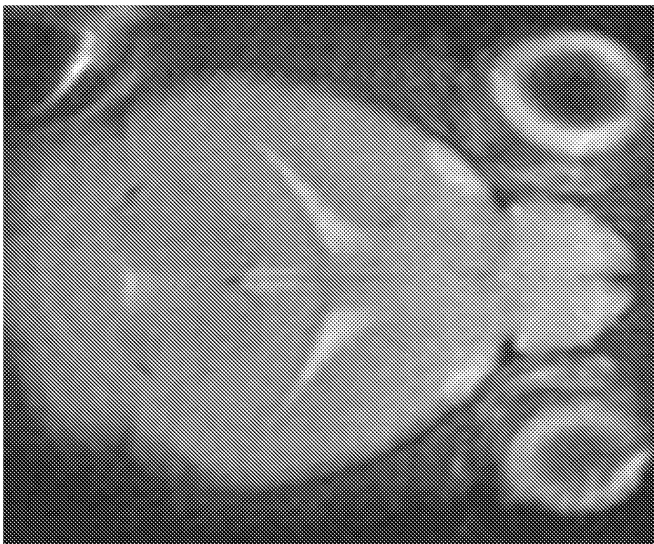
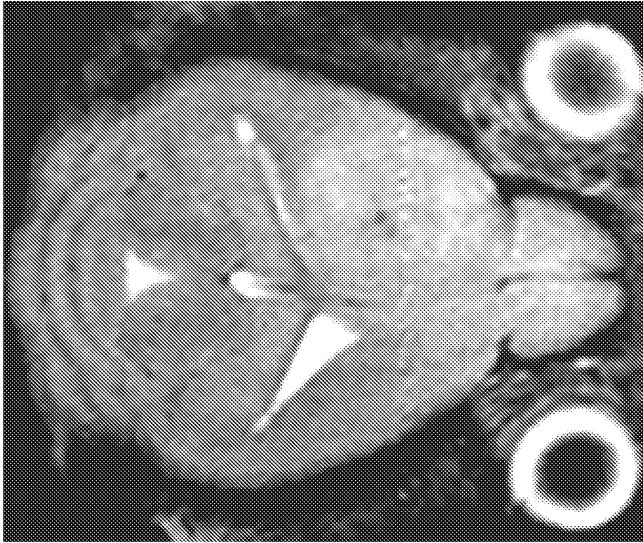


# 마우스 두개내

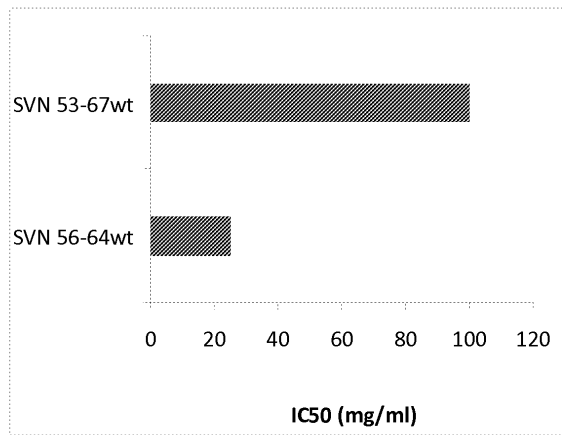


도면4

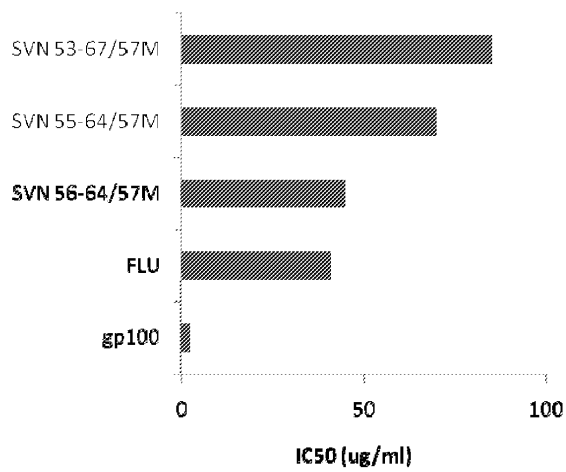
도면5



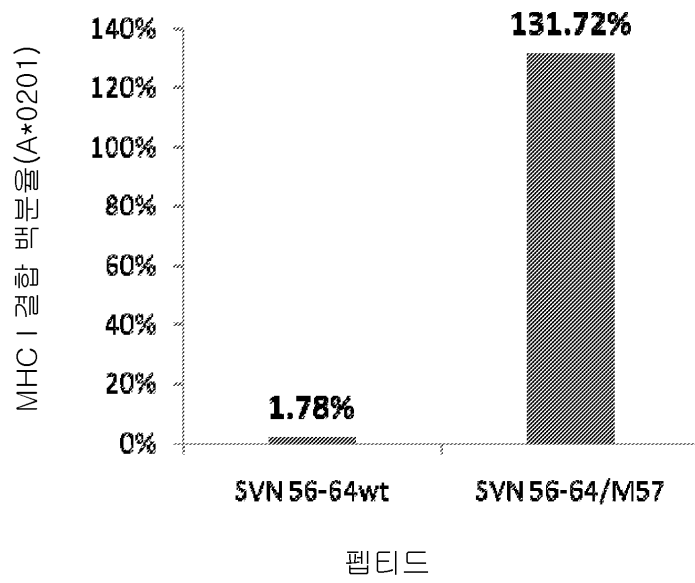
도면6a



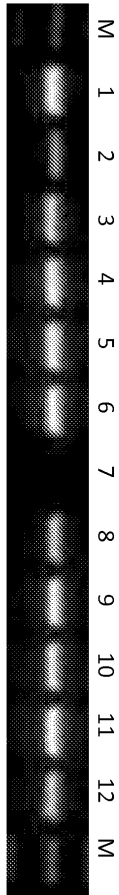
도면6b



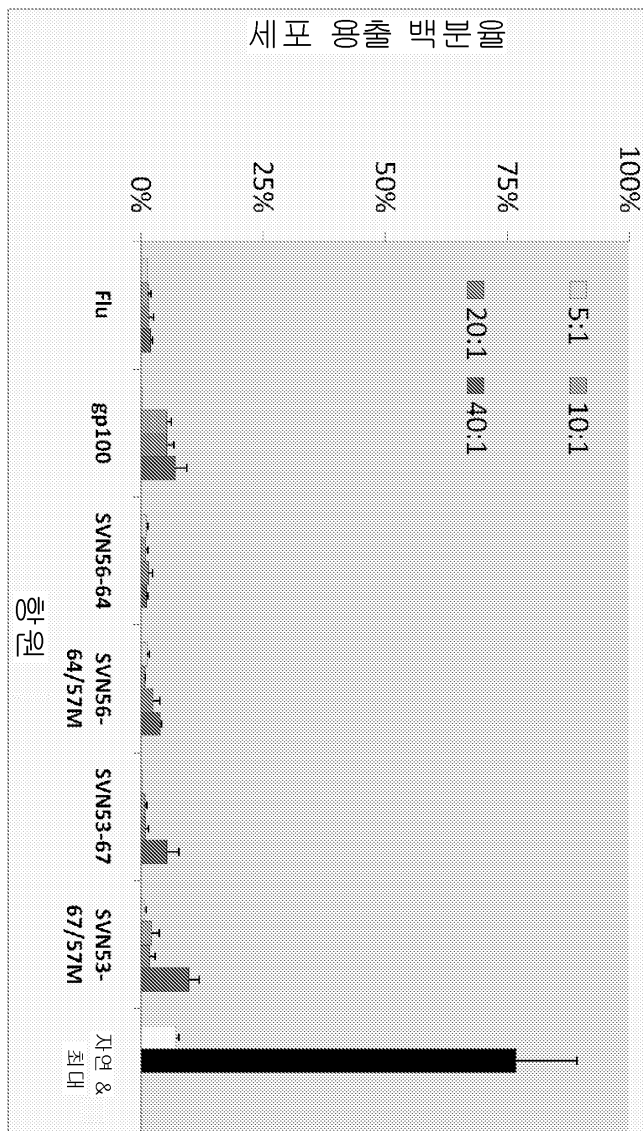
도면6c



도면7

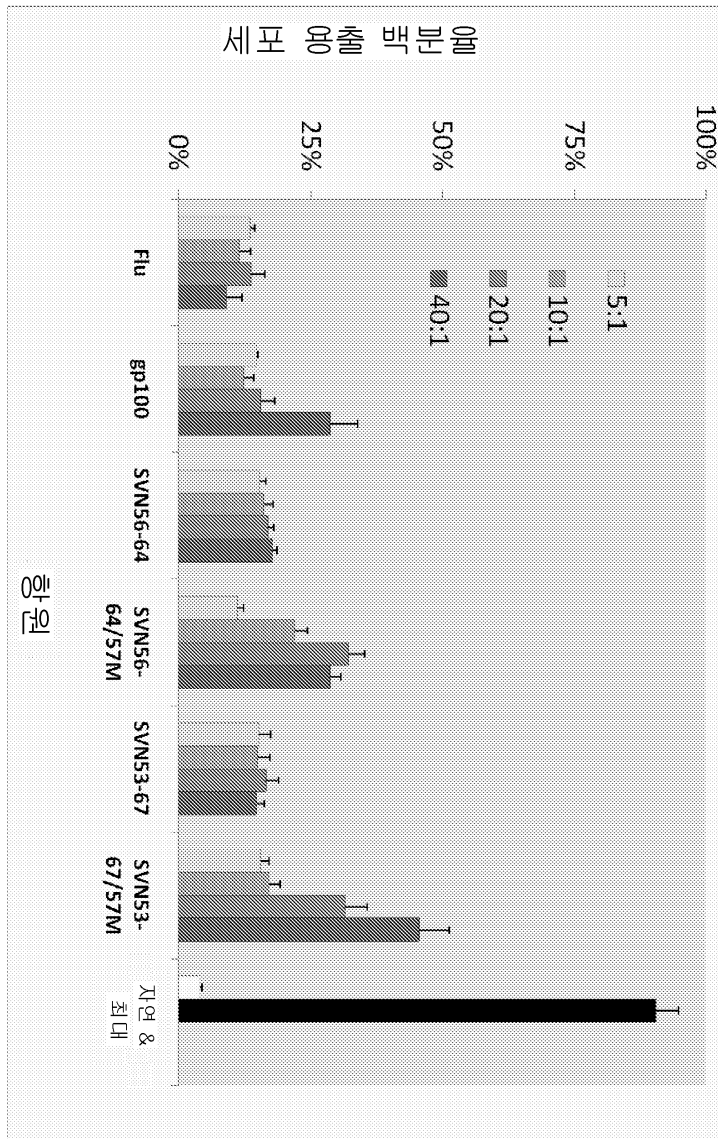


도면8

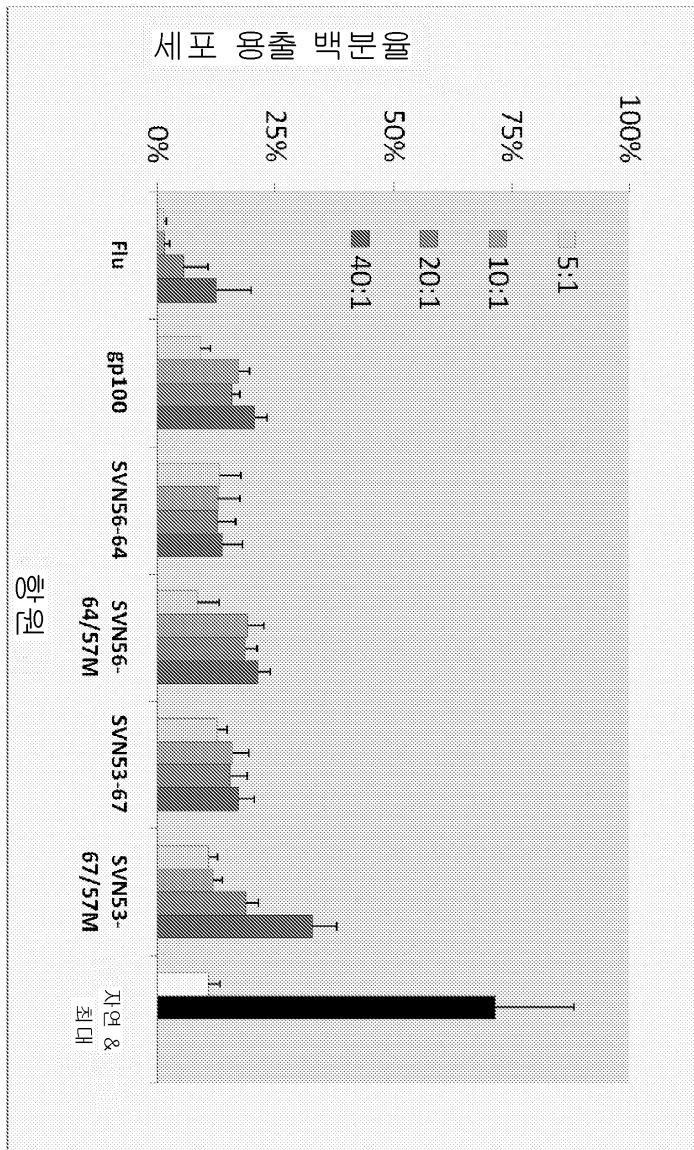




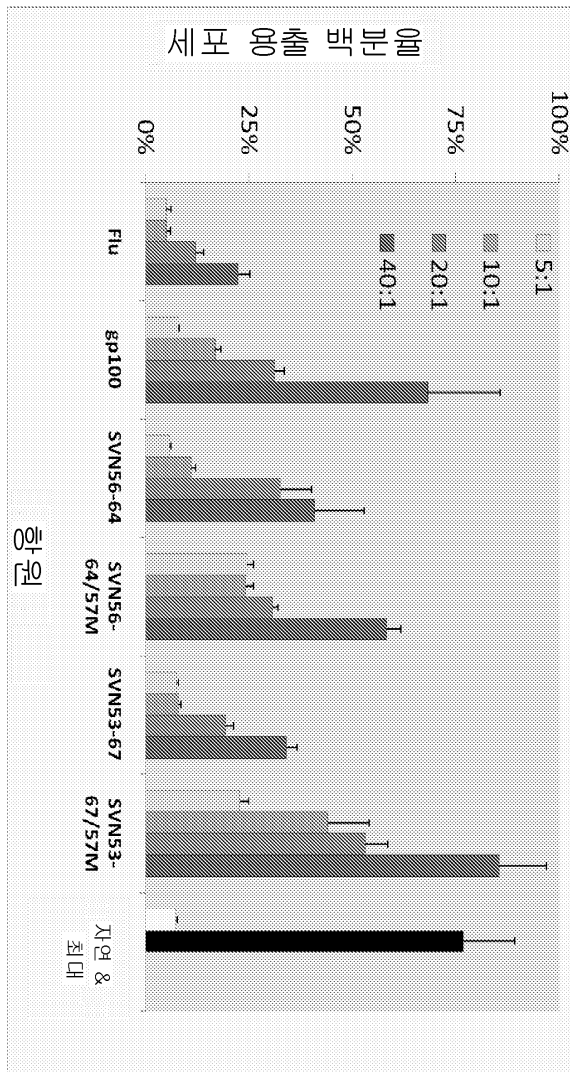
도면9



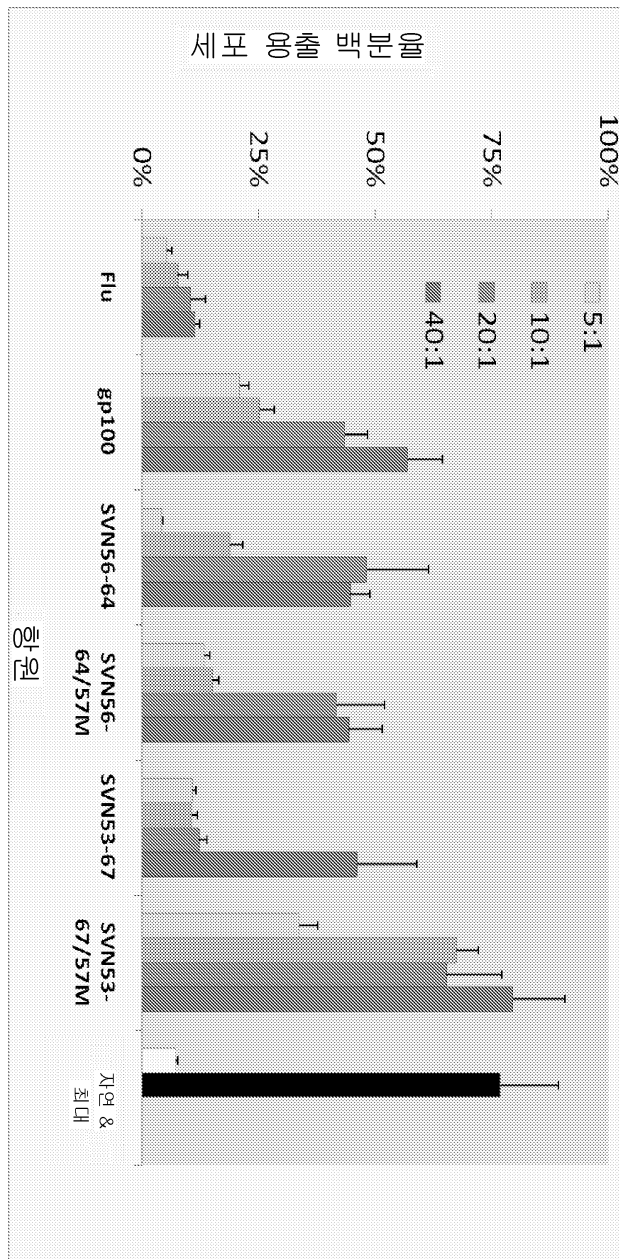
도면10



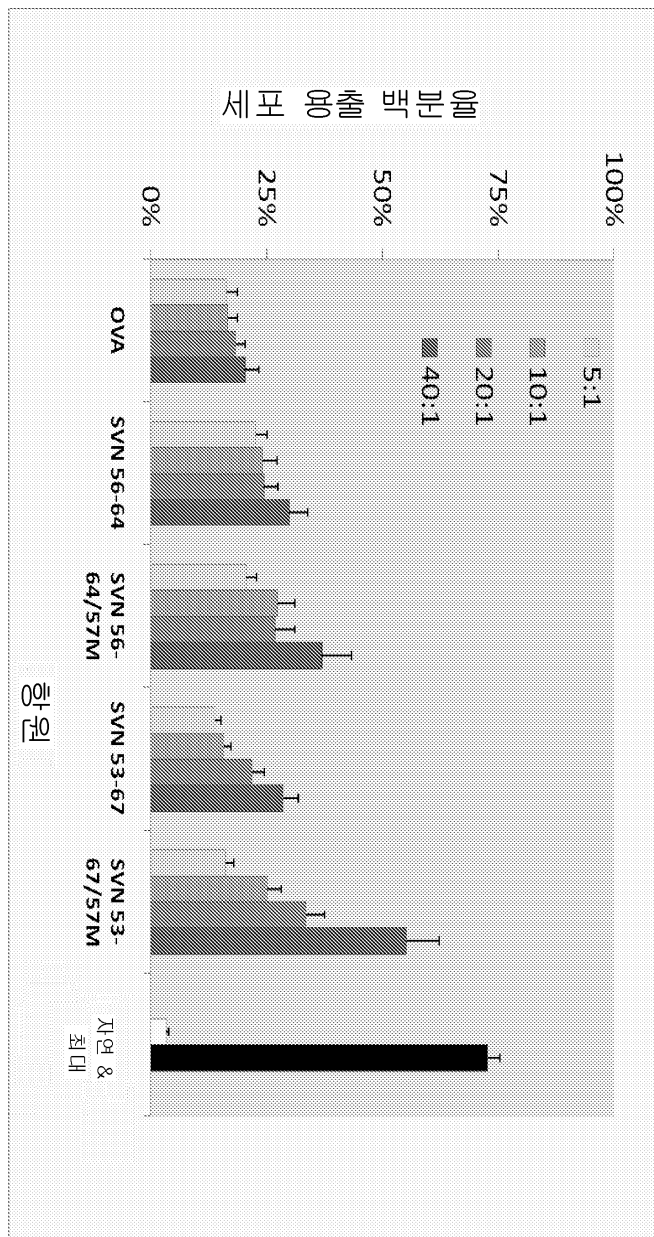
도면11



도면12



도면13



## 서열목록

### SEQUENCE LISTING

- <110> Fenstermaker, Robert A  
Ciesielski, Michael J
- <120> SURVIVIN PEPTIDES AS CANCER VACCINES
- <130> 003551.00331
- <150> 60/961,206

<151> 2007-07-19

<160> 20

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 142

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp

1 5 10 15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala

20 25 30

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr

35 40 45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

50 55 60

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His

65 70 75 80

Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu

85 90 95

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys

100 105 110

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala

115 120 125

Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp

130 135 140

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Met Gly Ala Pro Ala Leu Pro Gln Ile Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asn



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

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

Lys Thr Thr Arg Gln Ser Ile Glu Gln Leu Ala Ala  
                         130                    135                    140

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> human

<400> 3

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1                    5                    10                    15

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp

20

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> wild type survivin amino acids 49-71 with C to M change at amino  
acid position 57

<400> 4

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5 10 15

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp

20

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> survivin vaccine core epitope C to M change at amino acid 57 of

full length survivin

<400> 5

Gln Met Phe Phe Cys Phe

1 5

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> survivin amino acids 53-67 with C to M change at position 57

<400> 6

Asp Leu Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp

1 5 10 15

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> human

<400> 7

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> human

<400> 8

Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> human

<400> 9

Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> human

<400> 10

Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> human

<400> 11

Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> human

<400> 12

Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> SVN-L82 S to L change

<400> 13

Leu Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> human

<400> 14

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C to M change at position 57

<400> 15

Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C to M change at position 57

<400> 16

Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> SVN-57-64 with C to M change at position 57

<400> 17

Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> human

<400> 18

Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp

1 5 10 15

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> human

<400> 19

Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5 10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 20

Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5