



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0104350
(43) 공개일자 2012년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) **C12N 15/12** (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7018341
(22) 출원일자(국제) 2010년12월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년07월13일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/007228
(87) 국제공개번호 WO 2011/074236
국제공개일자 2011년06월23일
(30) 우선권주장
61/286,213 2009년12월14일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
온코세라피 사이언스 가부시키가이샤
일본, 가나가와 213-0012, 가와사키시, 다카쓰구,
사카도 3쵸메 2-1
(72) 발명자
나카무라 유스케
일본 1138654 토쿄 분쿄쿠 흥고 7쵸메 3-1 고쿠리
츠다이가쿠호우진 토쿄다이가쿠 나이
츠노다 타쿠야
일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카쓰쿠 사카
도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이
샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **T MEM 2 2 웨티드 및 이를 포함한 백신**

(57) 요 약

서열번호 33의 아미노산 서열로 구성된 분리된 웨티드 또는 이의 단편은 HLA 항원에 결합하고, 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 유도성(inducibility)을 가지므로, 암 면역치료의 맥락에서, 보다 특히 본 발명에 기재된 암 백신 사용에 적합하다. 또한, 본 발명은 필수적인 세포독성 T 세포 유도성을 유지하는 한, 하나들 또는 일부 아미노산이 도입(insertions), 치환(substitutions) 또는 첨가된(additions) 상기 웨티드 또는 단편을 포함하는 웨티드를 제공한다. 또한, 상기 웨티드 중 어느 것을 암호화하는 핵산(nucleic acids) 및 상기 웨티드 또는 핵산 중 어느 것을 포함하는 약학적 제제(agents), 물질(substances) 및 조성물(compositions)을 제공한다. 본 발명의 상기 웨티드, 핵산, 약학적 제제, 물질 및 조성물은 특히 암 및 종양에서 사용된다.

(72) 발명자

오사와 류지

일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카츠쿠 사카
도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이샤
나이

요시무라 사치코

일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카츠쿠 사카
도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이샤
나이

와타나베 토모히사

일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카츠쿠 사카
도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이샤
나이

(30) 우선권주장

61/287,650 2009년12월17일 미국(US)

61/326,380 2010년04월21일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

HLA 항원에 결합하고, 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 유도성(inducibility)을 가지는 서열 번호 92의 아미노산 서열로 구성된 분리된 웨티드 또는 이의 면역학적 활성 단편(immunologically active fragment).

청구항 2

제 1항에 있어서, HLA 항원은 HLA-A24 또는 HLA-A2인 분리된 웨티드.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 웨티드는 서열번호 1 내지 16, 18 내지 32 및 34 내지 90으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 분리된 웨티드.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 웨티드는 서열번호 1 내지 16, 18 내지 32 및 34 내지 90으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에서 1, 2 또는 일부 아미노산이 도입(inserted), 치환(substituted), 결실(deleted) 또는 첨가된(added) 아미노산 서열로 구성되는 것인 분리된 웨티드.

청구항 5

제 4항에 있어서, HLA-A24의 맥락에서, 상기 웨티드는 하기 특성 중 하나 또는 둘 모두를 가지는 분리된 웨티드:

- (a) 상기 N-말단으로부터 두 번째 아미노산이 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 메티오닌(methionine) 및 트립토판(tryptophan)의 군으로부터 선택된 것임; 및
- (b) 상기 C-말단 아미노산이 페닐알라닌, 루신(leucine), 이소루신(isoleucine), 트립토판 및 메티오닌의 군으로부터 선택된 것임.

청구항 6

제 4항에 있어서, HLA-A2에서, 하기 특성 중 하나 또는 둘 모두를 가지는 분리된 웨티드:

- (a) 상기 N-말단으로부터 두번째 아미노산이 루신 및 메티오닌으로 구성된 군으로부터 선택된 것임; 및
- (b) 상기 C-말단 아미노산이 발린(valine) 및 루신으로 구성된 군으로부터 선택된 것임.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 웨티드는 노나펩티드(nonapeptide) 또는 테카펩티드(decapeptide)인 분리된 웨티드.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항의 어느 항의 펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드(poly nucleotide).

청구항 9

하나 또는 그 이상의 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드(들), 또는 하나 또는 그 이상의 제 8항의 폴리뉴클레오티드(들)를 포함하는 CTL 유도용 제제(agent).

청구항 10

하나 또는 그 이상의 제 1항 또는 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드(들), 또는 하나 또는 그 이상의 제 8항의 폴리뉴클레오티드(들)를 포함하는 암의 치료 및/또는 예방(prophylaxis), 및/또는 이의 수술 후 재발의 예방(prevention)용 약학적 제제.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 제제는 HLA 항원이 HLA-A24 또는 HLA-A2인 개체에 투여되기 위해 제형화된 것인 약학적 제제.

청구항 12

하기 단계 중 하나를 포함하는 CTL 유도성이 있는 항원제시세포(antigen-presenting cell, APC)를 유도하기 위한 방법:

- (a) 시험관내(in vitro), 생체외(ex vivo) 또는 생체내(in vivo)에서, 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드를 APC에 접촉시키는 단계; 및
- (b) 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC에 도입시키는 단계.

청구항 13

하기 단계 중 적어도 하나를 포함하는 방법 중 어느 것으로 CTL를 유도하는 방법:

- (a) CD8-양성 T 세포를, HLA 항원 및 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드의 복합체를 그 표면에 제시하는 APC와 공-배양(co-culture)하는 단계;
- (b) CD8-양성 T 세포를, HLA 항원 및 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드의 복합체를 그 표면에 제시하는 엑소솜(exosome)과 공-배양(co-culture)하는 단계; 및
- (c) 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드와 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR) 서브유닛 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 T 세포로 도입시키는 단계.

청구항 14

HLA 항원 및 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 분리된 APC.

청구항 15

제 14항에 있어서, 제 12항의 방법으로 유도된 분리된 APC.

청구항 16

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드를 표적으로 하는 분리된 CTL.

청구항 17

제 16항에 있어서, 제 13항의 방법으로 유도된 CTL.

청구항 18

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩티드, 이의 면역학적 활성 단편, 또는 상기 펩티드 또는 상기 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제를 개체에 투여하는 것을 포함하는 개체에서 암에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 19

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 기재된 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드(nucleotide) 서열을 포함하는 벡터(vector).

청구항 20

제 19항에 따른 발현 벡터(expression vector)로 형질전환(transformed) 또는 형질도입된(transfected) 숙주 세포.

청구항 21

서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28, 31, 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 제 3항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 분리된 펩티드.

명세서**기술분야**

[0001] 본 발명은 생물과학 분야, 보다 구체적으로 암 치료 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암 백신으로서 매우 효과적인 신규한 펩티드 및 종양을 치료 및 예방하기 위한 약물에 관한 것이다.

[0002] 우선권

[0003] 본 출원은 2009년 12월 14일에 출원된 미국 가출원 제 61/286,213 호, 2009년 12월 17일에 출원된 미국 가출원 제 61/287,650 호, 2010년 04월 21일에 출원된 미국 가출원 제 61/326,380호에 대한 우선권을 주장하며, 전체 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 통합된다.

배경기술

[0004] CD8 양성(CD8 positive) CTLs은 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 종류 I 분자에서 발견되는 종양관련 항원(tumor-associated antigens, TAA)에서 유래한 에피토프 펩티드(epitope peptide)를 인지한 후, 종양세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있다. TAA의 첫 번째 예로 흑색종 항원(melanoma antigen,

MAGE) 패밀리의 발견 이후, 다른 많은 TAA가 주로 면역학적 접근을 통해 발견되었다(비특허문헌 1, 2). 상기 TAA 중 일부는 현재 면역치료법의 표적으로서 임상 개발 과정에 있다.

[0005] 유망한 TAA는 암 세포의 종식 및 생존에 필수적이다. 면역치료를 위한 표적으로서 이러한 TAA의 이용은 치료상으로 유도된 면역 선별(immune selection)의 결과로서, TAA의 결실, 돌연변이 또는 하향-조절(down-regulation)에 기인한 암세포의 면역 회피(immune escape)의 잘 묘사된 위험을 최소화할 수 있다. 따라서, 강력하고 특이적인 항종양 면역반응을 유도할 수 있는 새로운 TAA를 동정은 그 이상의 발전을 보장하고, 다양한 종류의 암에 대한 펩티드 백신 전략의 임상 조사가 진행중이다(비특허문헌 3 내지 10). 지금까지, TAA 유래 펩티드를 이용한 일부 임상 시도가 보고되었다. 불행히도, 상기 현재 암 백신 시도의 많은 것은 낮은 목표 회답률(response rate)만을 보였다(비특허문헌 11 내지 13). 그러므로, 면역요법의 표적으로 유용한 신규 TAA의 확인이 여전히 요구된다.

[0006] 그 목적을 달성하기 위하여, 23,648 개 유전자를 함유하는 전체-게놈(genome-wide) cDNA 마이크로어레이(microarray)로 유전자 발현 프로파일링(gene expression profiling)을 통하여, TMEM22(GenBank Accession No. NM_025246, NM_001097599, NM_001097600), 막관통단백질 22(transmembrane protein 22)가 신세포암(renal cell carcinoma, RCC)의 세포 성장에 관련된 막관통단백질로서 확인되었다(비특허문헌 14). 노던 블랏 분석(Northern blot analysis)은 RCC 임상 시료 및 세포주에서 특이적으로 상향 조절된 TMEM22 발현을 확인하였고, 정상 인간 조직에서 겨우 탐지 가능한 발현만을 확인하였다. 또한, 특이적 siRNA에 의한 TMEM22 발현의 하향 조절은 결과적으로 유의적인 RCC 세포 성장의 감소를 나타내었다(비특허문헌 15). 하지만, 암세포의 맥락에서 상기 TMEM22의 병리생리학(pathophysiological)적 역할 및 생물학적 기능은 아직 보고되지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [비특허문헌 0001] Boon T, Int J Cancer 1993, 54(2): 177-80
- [비특허문헌 0002] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996, 183(3): 725-9
- [비특허문헌 0003] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88(20): 1442-55
- [비특허문헌 0004] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999, 59(13): 3134-42
- [비특허문헌 0005] Vissers JL et al., Cancer Res 1999, 59(21): 5554-9
- [비특허문헌 0006] van der Burg SH et al., J Immunol 1996, 156(9): 3308-14
- [비특허문헌 0007] Tanaka F et al., Cancer Res 1997, 57(20): 4465-8
- [비특허문헌 0008] Fujie T et al., Int J Cancer 1999, 80(2): 169-72
- [비특허문헌 0009] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81(3): 459-66
- [비특허문헌 0010] Oiso M et al., Int J Cancer 1999, 81(3): 387-94
- [비특허문헌 0011] Belli F et al., J Clin Oncol 2002, 20(20): 4169-80
- [비특허문헌 0012] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002, 188: 33-42
- [비특허문헌 0013] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10(9): 909-15
- [비특허문헌 0014] Hirota E et al., Int J Oncol. 2006; 29(4):799-827
- [비특허문헌 0015] Dobashi S et al., Oncol Rep. 2009; 21(2):305-12

발명의 내용

[0008] [본 발명의 개요]

[0009] 본 발명은, 최소한 부분적으로, 면역치료법의 적합한 표적으로서 신규한 펩티드의 발견에 기초한다.

TAA(tumor-associated antigen)는 일반적으로 면역계에 대해 "자기(self)"로 인지되어 종종 내재 면역성을 갖지 않기 때문에, 적절한 표적의 발견은 매우 중요하다. TMEM22(기재된 바와 같이, 예를 들면, 서열번호 91 및 92, 또한 GenBank Accession No. NM_025246, NM_001097599, NM_001097600로 표시된)이 급성골수성 백혈병 (acute myelogenous leukemia), 방광암(bladder cancer), 담관세포암(cholangiocellular carcinoma, CCC), 식도암(esophagus cancer), 림프종(lymphoma), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal cell carcinoma, CCC) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)를 포함하지만, 이에 한정하지 않는 암들의 조직에 상향 조절의 확인을 인지함으로써, 본 발명은 TMEM22를 면역치료의 후보 표적으로써 초점을 맞춘다.

[0010] 그 목적을 달성하기 위하여, 또한, 본 발명은 TMEM22 특이적인 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes, CTL)을 유도하는 능력을 가지는 TMEM22의 특이적 에피토프 펩티드(epitope peptide)의 동정에 최소 부분적으로 규제된다. 하기에 기술된 것과 같이, 건강한 공여자로부터 수득된 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)는 TMEM22로부터 유래된 HLA-A*2402 또는 HLA-A*0201에 결합하는 후보 펩티드를 사용하여 자극되었다. 그런 다음 각 후보 펩티드를 부가(pulsed)하여 HLA-A24 또는 HLA-A2 양성 표적 세포에 대하여 특이적 세포 독성을 갖는 CTL 세포주가 확립되었다. 종합하여, 상기 결과는 상기 펩티드가 TMEM22를 발현하는 세포에 대해 강력하고 특이적 면역반응을 유도할 수 있는 HLA-A24 또는 HLA-A2에 제한된 에피토프(epitope) 펩티드임을 증명한다. 또한, 상기 결과는 TMEM22는 강한 면역반응을 유도하고 그것의 에피토프는 암/종양 면역치료법에 효과적인 표적임을 증명한다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 HLA 항원에 결합하고, CTL 유도성(inducibility)을 가지는 분리된 TMEM22(서열번호 92) 펩티드 또는 이의 단편을 제공하는 것이다. 이러한 펩티드는 체외(ex vivo)에서 CTL을 유도하는 것에 사용될 수 있고, 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 개체에 투여될 수 있으며, 암의 예는 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 림프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정하지 않는다. 바람직한 펩티드는 노나펩티드 또는 데카펩티드, 보다 바람직하게 강한 CTL 유도성을 나타내고, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28, 31, 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28, 31, 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83의 아미노산 서열을 가지고, 이는 변형된 펩티드가 원래의 펩티드의 필요한 CTL 유도성을 유지하는 한, 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산이 치환(substituted), 결실(deleted) 또는 첨가된(added) 변형된 펩티드(modified peptides)를 고려한다.

[0013] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 CTL 유도성이 있는 항원-제시 세포(antigen-expressing cells, APCs)를 유도에 사용될 수 있거나, 본 발명의 펩티드와 같이, 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 개체에 투여될 수 있다.

[0014] 개체 내 투여될 때, 본 발명의 펩티드는 각각의 펩티드를 표적으로 하는 CTL을 유도하기 위하여 바람직하게 APC의 표면에 제시된다. 그러므로, 본 발명의 한 목적은 본 발명의 하나 또는 그 이상의 펩티드 또는 그러한 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제 또는 조성물과 같은, CTL을 유도하는 제제 또는 조성물을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 본 발명의 펩티드 또는 이러한 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(polynucleotides)를 포함하는 약학적 제제(pharmaceutical agents)를 고려하며, 상기 제제는 암의 치료 및/또는 예방에 유용하고, 암의 예는 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 림프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 본 발명의 다른 목적은 암의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발 방지를 위해 제조된 본 발명의 상기 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 중 어떤 것을 포함하는 약학적 제제를 제공하는 것이다. 본 발명의 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 대신에 또는 추가하여, 상기 본 발명의 약학적 제제는 유효성분으로 본 발명의 펩티드 중 어떤 것을 제시하는 APC 또는 엑소솜(exosomes)을 선택적으로 포함한다.

[0015] 본 발명의 펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 예를 들면 개체 유래 APC를 펩티드에 접촉시키거나 또는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC에 도입시킴으로써 상기 표면에 HLA 항원 및 본 발명의 펩티드의 복합체를 제시하는 APC를 유도에 사용될 수 있다. 이러한 APC는 상기 표적 펩티드에 대한 높은 CTL 유도성(inducibility)를 갖고 그러므로 암 면역치료법에 유용하다. 따라서, 본 발명의 다른 목적은 CTL 유도성이 있는 APC를 유도하기 위한 방법 및 상기 방법에 의해 수득된 APC를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 CD8-양성 세포와, 이의 표면에 본 발명의 펩티드를 제시하는 APC 또는 엑소솜을 공배양하는(co-culturing) 단계 또는 본 발명의 펩티드에 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 아단위

(subunit)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는 CTL 유도 방법을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 방법으로 수득된 CTL은 암의 치료 및/또는 예방에서 유용하고, 암의 예는 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 림프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 그러므로, 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법에 의해 수득된 CTL을 제공하는 것이다.

[0017] 또한, 본 발명의 다른 목적은 암에 대한 면역반응을 그것을 필요로 하는 개체에서 유도하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 TMEM22 또는 이의 단편, TMEM22 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 TMEM22 또는 이의 단편을 제시하는 엑소솜 또는 APC를 포함하는 제제 또는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0018] 본 발명의 적용가능성(applicability)은 TMEM22 과발현에 관련되거나, 과발현으로 인한 질환의 수 중 어떤 것으로 확장할 수 있고, 암을 포함하며, 암의 예는 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 림프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0019] 뿐만 아니라, 본 발명의 또 다른 목적은 도면 및 실시예를 포함하는 하기 자세한 묘사를 읽을 때, 보다 전체적으로 명백해질 것이다. 하지만, 본 발명의 상기 요약 및 하기의 자세한 묘사는 실시예이고, 본 발명이나 또는 본 발명의 다른 대안적 실시예를 제한하지 않는다. 특히, 본 발명이 여기에서 많은 구체적 실시예와 함께 기술되지만, 그 기술은 본 발명의 예일 뿐, 본 발명을 제한하지 않는다. 본 발명의 뜻(spirit) 및 범위(scope) 내에서, 첨부된 청구항에 의해 기술된 것과 같이 다양한 변형 및 적용이 당업자에게 일어날 수 있다. 동일하게, 본 발명의 다른 목적, 특징, 유용성(benefit) 및 이점(advantages)는 상기 요약 및 하기에 기술된 특정 실시예로부터 명백해질 것이고, 용이하게 당업자에게도 명백할 것이다. 상기 목적, 특징, 유용성 및 이점은 동반되는 실시예, 데이터, 도면 및 그로부터 가능한 모든 타당한 추론과 함께, 단독으로, 또는 여기서 통합된 참조문헌의 고려와 함께 상기로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 본 발명의 다양한 측면 및 적용은 도면의 간단한 설명을 고려하여 당업자에게 명백해 질 것이다. 그리고, 본 발명의 자세한 설명 및 이의 바람직한 실시예는 하기와 같다.

[도 1]

도1은 TMEM22 유래 웨브티드들로 유도된 CTL의 IFN-감마 ELISPOT 분석의 결과를 나타내는 사진을 묘사한다. TMEM22-A24-9-390(서열번호 1)로 자극된 웨(well) 번호 #4(a), TMEM22-A24-9-274(서열번호 2)로 자극된 #7(b), TMEM22-A24-9-372(서열번호 3)로 자극된 #3 및 #5(c), TMEM22-A24-9-331(서열번호 4)로 자극된 #8(d), TMEM22-A24-9-385(서열번호 5)로 자극된 #4, #6 및 #7(e), TMEM22-A24-9-204(서열번호 6)로 자극된 #3, #4 and #5(f), TMEM22-A24-9-297(서열번호 10)로 자극된 #3, #6 및 #8(g), TMEM22-A24-9-98(서열번호 12)로 자극된 #3(h), TMEM22-A24-9-375(서열번호 16)로 자극된 #2 및 #4(i), TMEM22-A24-10-137(서열번호 18)로 자극된 #5(j), TMEM22-A24-10-140(서열번호 19)로 자극된 #1(k), TMEM22-A24-10-204(서열번호 22)로 자극된 #2, #3 and #4(l), TMEM22-A24-10-282(서열번호 28)로 자극된 #1, #6, #8(m) 및 TMEM22-A24-10-177(서열번호 31)로 자극된 #7(n) 안의 CTL은 각각 대조군에 비해 강력한 IFN-감마 생산을 나타냈다. 이러한 사진의 상기 웨의 사각형은 해당하는 웨 유래 세포를 CTL 세포주를 수립하기 위해 중식한 것을 나타낸다. 대조적으로, 음성 데이터의 대표적인 예로, 특이적 IFN-감마 생산은 웨브티드-부가된(pulsed) 표적 세포에 대하여 TMEM22-A24-10-8(서열번호 17)로 자극된 상기 CTL에서는 나타나지 않았다(o). 이러한 사진의 상기 웨의 사각형은 해당하는 웨 유래 세포를 CTL 세포주를 수립하기 위해 중식한 것을 나타낸다. 도면에서, “+”는 적절한 웨브티드로 부가된 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 웨브티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 2]

도 2는 TMEM22-A24-9-390(서열번호 1)(a), TMEM22-A24-9-274(서열번호 2(b), TMEM22-A24-9-372(서열번호 3)(c), TMEM22-A24-9-331(서열번호 4)(d) TMEM22-A24-9-385(서열번호 5)(e), TMEM22-A24-9-204(서열번호 6)(f), TMEM22-A24-9-297(서열번호 10)(g), TMEM22-A24-9-375(서열번호 16)(h), TMEM22-A24-10-137(서열번호 18)(i), TMEM22-A24-10-204(서열번호 22)(j) TMEM22-A24-10-282(서열번호 28)(k) 및 TMEM22-A24-10-177(서열번호 31)(l)로 자극된 CTL 세포주의 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지된 IFN-감마 생산을 보여주는 선 그래프를 묘사한다. 상기 결과는 각 웨브티드 자극에 의해 수립된 CTL 세포주가 대조군에 비해 강력한 IFN-감마 생산을 보인

것을 증명한다. 도면에서, “+”는 적절한 웨티드로 부가된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 웨티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 3]

도 3은 TMEM22-A24-9-331(서열번호 4)(a), TMEM22-A24-9-204(서열번호 6)(b), TMEM22-A24-9-297(서열번호 10)(c) and TMEM22-A24-10-204(서열번호 22)(d)로 자극된 상기 CTL 세포주로부터 제한 희석(limiting dilution)하여 수립된 상기 CTL 클론(clones)의 IFN-감마 생산을 나타내는 선 그래프를 묘사한다. 상기 결과는 대조군에 비해 각 웨티드 자극에 의해 수립된 CTL 클론이 강력한 IFN-감마 생산을 보이는 것을 증명한다. 도면에서, “+”는 적절한 웨티드로 부가된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 웨티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 4]

도 4는 외인성으로 TMEM22 및 HLA-A*2402를 발현하는 상기 표적세포에 대한 특이적 CTL 활성을 나타내는 선 그래프를 묘사한다. HLA-A*2402 또는 TMEM22 유전자의 전장으로 형질도입된(transfected) COS7 세포가 대조군으로 제조되었다. 상기 TMEM22-A24-9-385(서열번호 5)로 수립된 CTL 세포주는 TMEM22 및 HLA-A*2402 둘 다로 형질전환된 COS7 세포에 대하여 강력한 CTL 활성을 보였다(마름모꼴). 한편, HLA-A*2402(세포) 또는 TMEM22(원) 각각을 발현하는 표적세포에 대해서는 유의적인 특이적 CTL 활성이 탐지되지 않았다.

[도 5a-f]

도 5a-f는 TMEM22 유래 웨티드로 유도된 CTL에서 IFN-감마 ELISPOT 분석의 결과를 나타내는 사진을 묘사한다. 상기 TMEM22-A02-9-338(서열번호 35)가 있는 웰 번호 #4 (a), TMEM22-A02-9-381(서열번호 38)가 있는 #2(b), TMEM22-A02-9-367(서열번호 41)가 있는 #6 (c), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48) 가 있는 #3(d), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61)가 있는 #5(e), 및 TMEM22-A02-10-304(서열번호 62)가 있는 #8(f)의 CTL은 각각 대조군에 비해 강력한 IFN-감마 생산을 보였다. 이러한 사진의 상기 웰의 사각형은 해당하는 웰 유래 세포를 CTL 세포주를 수립하기 위해 증식한 것을 나타낸다. 도면에서, “+”는 적절한 웨티드로 부가된 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 웨티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 5g-m]

도 5g-m은 TMEM22 유래 웨티드로 유도된 CTL에 IFN-감마 ELISPOT 분석의 결과를 나타낸 사진을 묘사한다. TMEM22-A02-10-167(서열번호 65) 웰 번호 #4가 있는(g), TMEM22-A02-10-363(서열번호 67) 가 있는 #6 (h), TMEM22-A02-10-103(서열번호 70)가 있는 #5(i), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74) 가 있는 #5(j), TMEM22-A02-10-229(서열번호 77)가 있는 #5(k) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83)가 있는 #6(l)의 CTL은 각각 대조군에 비해 강력한 IFN-감마 생산을 보였다. 이러한 사진의 상기 웰의 사각형은 해당하는 웰 유래 세포를 CTL 세포주를 수립하기 위해 증식한 것을 나타낸다. 대조적으로, 음성 데이터의 대표적인 예로서, TMEM22-A02-9-305(서열번호 33)(m)로 자극된 상기 CTL에서 특이적 IFN-감마 생산은 나타나지 않았다. 도면에서, “+”는 적절한 웨티드로 부가된 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 웨티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 6a-f]

도 6a-f는 TMEM22-A02-9-338(서열번호 35)(a), TMEM22-A02-9-381(서열번호 38)(b), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48)(c), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61)(d), TMEM22-A02-10-304(서열번호 62)(e), 및 TMEM22-A02-10-167(서열번호 65)(f)로 자극된 상기 CTL 세포주의 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지된 IFN-감마 생산을 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 결과는 대조군에 비해, 각 웨티드 자극으로 수립된 CTL 세포주가 강력한 IFN-감마 생산을 보이는 것을 증명한다. 도면에서, “+”는 적절한 웨티드로 부가된 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 웨티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 6g-j]

도 6g-j는 TMEM22-A02-10-363(서열번호 67)(g), TMEM22-A02-10-103(서열번호 70)(h), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74)(i) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83)(j)으로 자극된 CTL 세포주의 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지된 IFN-감마 생산을 나타내는 선 그래프를 묘사한다. 상기 결과는 대조군에 비해, 각 웨티드 자극으로 수립된 CTL 세포주가 강력한 IFN-감마 생산을 보이는 것을 증명한다. 도면에서, “+”는 적절한 웨티드로 부가된 표적

세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 7a-f]

도 7a-f는 TMEM22-A02-9-381(서열번호 38)(a), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48)(b), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61)(c), TMEM22-A02-10-304(서열번호 62)(d), TMEM22-A02-10-167(서열번호 65)(e), and TMEM22-A02-10-363(서열번호 67)(f)로 자극된 상기 CTL 세포주로부터 제한 희석하여 수립된 CTL 클론의 IFN-감마 생산을 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 결과는 대조군에 비해, 각 펩티드 자극으로 수립된 CTL 세포주가 강력한 IFN-감마 생산을 보이는 것을 증명한다. 도면에서, “+”는 적절한 펩티드로 부가된 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 7g-i]

도 7g-i은 TMEM22-A02-10-103(서열번호 70)(g), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74)(h) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83)(i)로 자극된 상기 CTL 세포주로부터 제한 희석하여 수립된 상기 CTL 클론의 IFN-감마 생산을 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 결과는 대조군에 비해, 각 펩티드 자극으로 수립된 CTL 세포주가 강력한 IFN-감마 생산을 보이는 것을 증명한다. 도면에서, “+”는 적절한 펩티드로 부가된 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 8]

도 8은 TMEM22 및 HLA-A*0201를 외생적으로 발현하는 상기 표적 세포에 대한 특이적 CTL 활성을 보이는 선그래프를 묘사한다. HLA-A*0201 또는 TMEM22 유전자 전장을 형질전환시킨 COS7세포를 대조군으로 제조하였다. TMEM22-A02-10-195(서열번호 74)로 수립된 CTL클론은 TMEM22 및 HLA-A*0201 둘 다를 형질전환 시킨 COS7 세포(검정 마름모꼴)에 대하여 특이적 CTL 활성을 보였다. 한편, HLA-A*0201(세포) 또는 TMEM22(원) 각각을 발현하는 표적세포에 대하여 유의적인 특이적 CTL 활성을 탐지되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

비록 여기서 기술한 것과 유사하거나 또는 동등한 어떤 방법 및 재료가 본 발명의 실시예의 검사 또는 실행에서 사용될 수 있지만, 선호되는 방법, 장치, 및 재료는 여기서 기술된다. 하지만, 본 발명의 재료 및 방법을 기술하기 전에, 본 발명은 여기서 기술한 특정한 크기, 종류, 면적, 재료, 방법론, 프로토콜(protocol)로 제한되지 않는데, 이것은 그것들이 일반적인 실험 및/또는 최적화에 따라 다양할 수 있기 때문이다. 또한, 본 기술에서 사용되는 전문용어(terminology)는 오직 실시예 또는 특정 버전(version)을 기술하려는 것이고, 이것은 오직 하기 청구항에 의해서만 제한되는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0022]

각 발표(publication)의 공개, 특히 또는 특허 출원은 그 전문이 구체적으로 여기에서 참고문헌으로 통합된다. 하지만, 어느 것도 여기에서 이전 발명 또는 그러한 공개보다 선행한다는 자격으로 본 발명에서 인정되지 아니함을 이해해야 한다.

[0023]

따로 정의되지 않는 한, 여기에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그러나, 대립이 있는 경우에는, 용어의 정의를 포함한 본 발명의 상세한 설명이 규제할 것이다. 또한, 상기 재료(materials), 방법 및 실시예는 오직 설명하는 것이며, 제한하려는 것이 아니다.

[0024]

I. 정의

[0025]

본 발명에서 사용되는 용어 “a”, “an”, 및 “the”는 따로 명시되지 않는 한, “적어도 1개”를 의미한다.

[0026]

본 발명에서 호환적으로 사용되는 용어 “폴리펩티드(polypeptide)”, “펩티드(peptide)” 및 “단백질(protein)”은 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 상기 용어는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 변형된 잔기, 또는 자연적으로 발생한 아미노산 중합체(naturally occurring amino acid polymer)뿐만 아니라 자연적으로 발생한 아미노산에 상응하는 인공 화학 모방체(artificial chemical mimetic)와 같은 비자연적으로 발생한 잔기(non-naturally occurring residue)를 가지는 아미노산 중합체에 적용된다.

[0027]

본 명세서에서 쓰인 상기 용어 “올리고펩티드(oligopeptide)”는 20 개 잔기 또는 보다 적은, 일반적으로 15개

잔기 또는 보다 적은 길이이고, 일반적으로 약 8 개 및 약 11 개 잔기, 종종 9 개 또는 10 개 잔기 사이로 구성되는 본 발명의 웹터드에 관련하여 사용된다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 "아미노산(amino acid)"라는 용어는 자연적으로 발생한 아미노산과 비슷하게 기능하는 아미노산 유사체(analog) 및 아미노산 모방체 뿐만 아니라 자연적으로 발생한 및 합성(synthetic) 아미노산을 의미한다. 자연적으로 발생한 아미노산은 세포 안에서 번역(translation) 후에 변형된 것뿐 아니라 유전자코드에 의해 암호화된 것이다[예를 들면, 하이드록시프롤린(hydroxyproline), 감마-카복시글루탐산(γ -carboxyglutamate) 및 O-포스포세린(O-phosphoserine)]. 상기 용어 "아미노산 유사체"는 자연적으로 발생한 아미노산과 동일한 기본적인 화학 구조(수소, 카복실기, 아미노기 및 R기에 결합하는 α 탄소)를 가지고 있지만, 변형된 R기 또는 변형된 골격(backbone)을 가지는 화합물을 의미한다[예를 들면, 호모세린(homoserine), 노르루신(norleucine), 메티오닌(methionine), 살포사이드(sulfoxide), 메티오닌 메틸 살포니움(methionine methyl sulfonium)]. 상기 용어 "아미노산 모방체"는 서로 다른 구조를 갖지만, 일반적인 아미노산과 비슷한 기능이 있는 화학적 화합물을 의미한다.

[0029] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명위원회가 권장하는, 일반적으로 알려진 3문자 약어(symbol) 또는 1문자 약어에 의해 불린다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어 "유전자", "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드", "뉴클레오티드" 및 "핵산"은 따로 명시되지 않는 한, 호환적으로 사용되며, 상기 아미노산과 유사하게, 일반적으로 인정되는 1문자 코드에 의해 불린다.

[0031] 여기서 호환적으로 사용되는 "조성물(composition)", "물질(substance)" 및 "제제(agent)"이라는 용어는 구체적 양의 구체적 성분의 조합으로부터, 직접적으로 또는 간접적으로, 형성되는 어떠한 생산물뿐 아니라, 구체적 양의 구체적 성분을 포함하는 생산물에 관한 것이다. 약학적 조성물에 관련한 상기 용어는 유효 성분, 및 담체로 구성된 어떤 비유효 성분을 포함하는 생산물, 뿐만 아니라 물 또는 그 이상의 성분의 조합, 복합(complexation) 또는 집적(aggregation)으로부터, 또는 성분의 하나 또는 그 이상의 분리로부터, 또는 성분의 하나 또는 그 이상의 상호결합 또는 반응의 다른 종류로부터, 직접적으로 또는 간접적으로, 형성되는 어떤 생산물을 포함한다. 따라서, 본 발명의 내용에서, 상기 용어 "약학적 조성물"은 본 발명의 화합물 및 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체의 혼합에 의해 만들어진 어떤 약학적 조성물에 관한 것이다. 여기서 사용되는 "약학적으로 허용가능한 담체" 또는 "생리학적으로 허용가능한 담체"라는 표현은 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 재료(material), 조성물, 물질 또는 수단(vehicle)을 의미하고, 이는 한 기관(organ), 또는 신체의 한 부분으로부터 개체 스캐폴드된(scaffolded) 폴리파마코어(polypharmacophores)을 다른 기관, 또는 신체의 다른 부분으로 운반하거나 또는 수송하는데 관련된 액체 또는 고체 필러(filler), 희석제, 첨가제, 영제 또는 캡슐화 물질(encapsulating material)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명에서 상기 용어 "유효성분(active ingredient)"은 생물학적 또는 생리학적으로 활성이 있는 제제 또는 조성물의 물질에 관한 것이다. 특히, 약학적 제제 또는 조성물에서 "유효성분"은 목표 약학적 효과를 나타내는 물질에 관한 것이다. 예를 들면, 암의 치료 또는 예방에서 사용을 위한 약학적 제제 또는 조성물의 경우, 상기 제제 또는 조성물의 유효성분은 암세포 및/또는 조직에 직접적으로 또는 간접적으로 최소 하나의 생물학적 또는 생리학적 작용(action)을 유도할 수 있다. 바람직하게, 이러한 작용은 암 세포 성장 감소 또는 저해, 암 세포 및/또는 조직의 손상 또는 살해(killing), 및 등등을 포함할 수 있다.

[0033] 일반적으로, 유효 성분의 간접적 효과는 암세포를 인지하거나 살해하는 CTL의 유도이다. 제조되기 전에 "유효성분"은 또한 "대량(bulk)", "약물 물질(drug substance)" 또는 "기술적 제품(technical product)"으로 나타낸다.

[0034] 본 발명의 상기 약학적 제제 또는 조성물은 백신(vaccine)으로 특히 사용된다. 본 발명의 맥락에서, 상기 구 "백신" (또한 "면역성 조성물(immunogenic composition)"로 나타낸)은 동물에 접종할 때 항-종양 면역력(immunity)을 유도하는 기능을 가지는 물질에 관한 것이다.

[0035] 별도로 명시되지 않는 한, 상기 용어 "암(cancer)"는 TMEM22를 과발현하는 암, 암의 예는 급성골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia), 방광암(bladder cancer), 담관세포암(cholangiocellular carcinoma, CCC), 식도암(esophagus cancer), 림프종(lymphoma), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal cell carcinoma, RCC) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0036] 별도로 명시되지 않는 한, "세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)", "세포독성 T 세포(cytotoxic T

cell)" 및 "CTL"이라는 용어는 호환되어 쓰이며 따로 명시되지 않는 한, 비자기 세포(non-self cell, 예를 들면 종양 세포, 바이러스에 감염된 세포)를 인식할 수 있고 이러한 세포의 사멸을 유도할 수 있는 T 림프구의 하위 집단(sub-group)을 나타낸다.

[0037] 별도로 명시되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 상기 용어 "HLA-A24"는 대표적으로 HLA-A*2402와 같은 아형(subtypes)에 관한 것이다.

[0038] 별도로 명시되지 않는 한, 여기서 사용되는 상기 용어 "HLA-A2"는 대표적으로 HLA-A*0201 및 HLA-A*0206를 의미한다.

[0039] 별도로 명시되지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 "키트(kit)"라는 용어는 시약(reagent) 및 다른 물질의 혼합을 의미한다. 키트는 마이크로어레이(microarray), 칩(chip), 마커(marker) 등을 포함할 수 있다. "키트" 용어는 시약 및/또는 다른 물질의 특정 혼합으로 한정하지 않는다.

[0040] 본 명세서에서 사용되는 것으로서, 개체 또는 환자의 맥락에서, 상기 구 "HLA-A2 양성"은 HLA-A2 항원 유전자를 동형 또는 이형으로 가지는 개체 또는 환자이고, HLA-A2 항원은 HLA항원으로서 상기 환자 또는 개체의 세포에서 발현되는 것에 관한 것이다.

[0041] 유사하게, 본 명세서에서 사용되는 것으로서, 개체 또는 환자의 맥락에서, 상기 구 "HLA-A24 양성"은 또한 HLA-A24 항원 유전자를 동형 또는 이형으로 가지는 개체 또는 환자이고, HLA-A24 항원은 HLA항원으로서 상기 환자 또는 개체의 세포에서 발현되는 것에 관한 것이다.

[0042] 본 발명의 방법 및 조성물이 암의 "치료(treatment)"라는 맥락에서 유용성을 갖는 범위 내에서, TMEM22 유전자의 발현 감소, 또는 개체 내에서 암의 크기, 유병(prevalence), 또는 전이력(metastatic potential)이 감소하는 것과 같은 임상적 이득을 초래한다면 치료는 "효과적인(efficacious)" 것으로 여겨진다. 상기 치료가 예방적으로 이용될 때에는, "효과적(efficacious)"이라는 의미는 그것이 암의 형성을 지연시키거나 방지하거나 또는 암의 임상적 증상을 방지하거나 경감시키는 것을 의미한다. 효과는 특정 종양 타입을 진단하거나 또는 치료하기 위해 알려진 방법과 관련하여 결정된다.

[0043] 본 발명의 방법 및 조성물이 암의 "예방(prevention)" 및 "예방(prophylaxis)"의 맥락에서 유용성을 갖는 범위 내에서, 질병으로부터 치사율(mortality) 또는 사망률(morbidity)의 부담(burden)을 감소시키는 어떤 활성을 지칭하기 위하여 상기의 용어들은 여기서 상호교환된다. 방지 및 예방은 "1차, 2차 및 3차 예방 수준"에서 일어날 수 있다. 1차 예방 및 방지가 질병의 발달을 피하는 것인 반면, 2차 및 3차 예방 및 방지는 질병 진행의 방지 및 예방 및 증상의 나타남 뿐만 아니라 기능을 개선시킴으로써 또는 질병 관련 합병증을 감소시킴으로써 이미 수립된 질병의 부정적 영향 감소시키는 활성을 포함한다. 또는, 방지 및 예방은 특정 장애(disorder)의 심각도를 완화시키는, 예를 들면 종양의 증식 및 전이를 감소시키는 예방적 치료법의 넓은 범위를 포함한다.

[0044] 본 발명의 맥락에서, 암의 치료 및/또는 예방 및/또는 암 수술 후 재발의 방지는 암세포의 수술적 제거, 암세포의 성장 억제, 종양의 퇴화(involution) 또는 퇴행(regression), 암 발생의 완화(remission) 및 억제(suppression), 종양의 퇴행, 및 전이의 감소 또는 억제와 같은 상기 단계의 하나를 포함한다. 효과적인 암의 치료 및/또는 예방은 치사율을 감소시키고 암을 가지는 개개인의 진단을 개선시키며, 혈액에 있는 종양 마커의 수준을 감소시킨다. 예를 들면, 증상의 감소 또는 개선은 효과적으로 치료하는 것을 의미하고 및/또는 예방은 10%, 20%, 30% 또는 그 이상의 감소, 또는 안정 병변(stable disease)을 포함한다.

[0045] 본 발명의 맥락에서, "항체(antibody)"라는 용어는 지정된 단백질 또는 그것의 웹티드에 대해 특이적으로 반응하는 면역글로불린(immunoglobulin) 및 그것의 단편을 의미한다. 항체는 인간 항체(human antibodies), 영장류 항체(primatized antibodies), 키메라 항체(chimeric antibodies), 이중특이적 항체(bispecific antibodies), 인간화된 항체(humanized antibodies), 다른 단백질 또는 방사선 표지와 결합된 항체, 및 항체 단편을 포함할 수 있다. 또한, 여기서 항체는 넓은 의미에서 사용되고 특히 완전한 단일클론 항체(intact monoclonal antibodies), 다클론 항체(polygonal antibodies), 최소한 2개의 완전한 항체로부터 형성된 다중 특이적 항체[multispecific antibodies, 예를 들면 이중특이적 항체(bispecific antibodies)], 및 항체 단편을 그들이 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한 포함한다. "항체"는 모든 종류(예를 들면, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)를 가르킨다.

II. 웹티드

- [0047] TMEM22으로부터 유래된 웨프티드가 CTL에 의해 인식되는 항원으로서 기능 한다는 것을 보이기 위하여, TMEM22(서열 번호: 92)에서 유래된 웨프티드가 흔히 HLA 대립 유전자와 만나는 HLA-A24 또는 A2에 의해 제한되는 항원 에피토프인지 결정하기 위하여 TMEM22(서열 번호: 159)에서 유래된 웨프티드를 분석하였다(Date Y et al., *Tissue Antigens* 47:93-101, 1996; Kondo A et al., *J Immunol* 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., *J Immunol* 152:3913-24, 1994).
- [0048] HLA-A24와 결합 친화력(binding affinity)에 기초하여 TMEM22로부터 유래된 HLA-A24 결합 웨프티드 후보가 동정되었다. 하기 웨프티드는 후보웨프티드로서 확인되었다:
- [0049] TMEM22-A24-9-390(서열번호 1),
- [0050] TMEM22-A24-9-274(서열번호 2),
- [0051] TMEM22-A24-9-372(서열번호 3),
- [0052] TMEM22-A24-9-331(서열번호 4),
- [0053] TMEM22-A24-9-385(서열번호 5),
- [0054] TMEM22-A24-9-204(서열번호 6),
- [0055] TMEM22-A24-9-368(서열번호 7),
- [0056] TMEM22-A24-9-37(서열번호 9),
- [0057] TMEM22-A24-9-297(서열번호 10)
- [0058] TMEM22-A24-9-137(서열번호 11),
- [0059] TMEM22-A24-9-98(서열번호 12),
- [0060] TMEM22-A24-9-197(서열번호 13),
- [0061] TMEM22-A24-9-283(서열번호 14),
- [0062] TMEM22-A24-9-142(서열번호 15),
- [0063] TMEM22-A24-9-375(서열번호 16),
- [0064] TMEM22-A24-10-137(서열번호 18),
- [0065] TMEM22-A24-10-140(서열번호 19),
- [0066] TMEM22-A24-10-153(서열번호 20),
- [0067] TMEM22-A24-10-170(서열번호 21),
- [0068] TMEM22-A24-10-204(서열번호 22),
- [0069] TMEM22-A24-10-257(서열번호 23),
- [0070] TMEM22-A24-10-319(서열번호 24),
- [0071] TMEM22-A24-10-355(서열번호 25),
- [0072] TMEM22-A24-10-372(서열번호 26),
- [0073] TMEM22-A24-10-402(서열번호 27),
- [0074] TMEM22-A24-10-282(서열번호 28),
- [0075] TMEM22-A24-10-297(서열번호 29),
- [0076] TMEM22-A24-10-104(서열번호 30), 및
- [0077] TMEM22-A24-10-177(서열번호 31).
- [0078] 또한, 시험관 내(*in vitro*)에서 상기 웨프티드를 부가한(pulsed)[적재한(loaded)] 수지상 세포(dendritic cells;

DC)에 의해 T 세포를 자극시킨 후, CTL은 하기 웹티드의 각각을 이용하여 성공적으로 수립되었다:

[0079] TMEM22-A24-9-390(서열번호 1),

[0080] TMEM22-A24-9-274(서열번호 2),

[0081] TMEM22-A24-9-372(서열번호 3),

[0082] TMEM22-A24-9-331(서열번호 4),

[0083] TMEM22-A24-9-385(서열번호 5),

[0084] TMEM22-A24-9-204(서열번호 6),

[0085] TMEM22-A24-9-297(서열번호 10),

[0086] TMEM22-A24-9-375(서열번호 16),

[0087] TMEM22-A24-10-137(서열번호 18),

[0088] TMEM22-A24-10-204(서열번호 22),

[0089] TMEM22-A24-10-282(서열번호 28), 및

[0090] TMEM22-A24-10-177(서열번호 31).

[0091] TMEM22 유래 웹티드에 결합하는 HLA-A2 후보는 HLA-A2에 대한 그들의 결합 친화성에 기초하여 확인되었다. 하기 웹티드는 후보 웹티드로서 확인되었다:

[0092] TMEM22-A2-9-196(서열번호 32),

[0093] TMEM22-A2-9-262(서열번호 34),

[0094] TMEM22-A2-9-338(서열번호 35),

[0095] TMEM22-A2-9-213(서열번호 36),

[0096] TMEM22-A2-9-379(서열번호 37),

[0097] TMEM22-A2-9-381(서열번호 38),

[0098] TMEM22-A2-9-364(서열번호 39),

[0099] TMEM22-A2-9-320(서열번호 40),

[0100] TMEM22-A2-9-367(서열번호 41),

[0101] TMEM22-A2-9-99(서열번호 42),

[0102] TMEM22-A2-9-380(서열번호 43),

[0103] TMEM22-A2-9-337(서열번호 44),

[0104] TMEM22-A2-9-302(서열번호 45),

[0105] TMEM22-A2-9-112(서열번호 46),

[0106] TMEM22-A2-9-143(서열번호 47),

[0107] TMEM22-A2-9-218(서열번호 48),

[0108] TMEM22-A2-9-225(서열번호 49),

[0109] TMEM22-A2-9-265(서열번호 50),

[0110] TMEM22-A2-9-357(서열번호 51),

[0111] TMEM22-A2-9-230(서열번호 52),

[0112] TMEM22-A2-9-345(서열번호 53),

- [0113] TMEM22-A2-9-360(서열번호 54),
- [0114] TMEM22-A2-9-217(서열번호 55),
- [0115] TMEM22-A2-9-211(서열번호 56),
- [0116] TMEM22-A2-9-234(서열번호 57),
- [0117] TMEM22-A2-9-123(서열번호 58),
- [0118] TMEM22-A2-9-247(서열번호 59),
- [0119] TMEM22-A2-9-105(서열번호 60),
- [0120] TMEM22-A2-10-217(서열번호 61),
- [0121] TMEM22-A2-10-304(서열번호 62),
- [0122] TMEM22-A2-10-212(서열번호 63),
- [0123] TMEM22-A2-10-320(서열번호 64),
- [0124] TMEM22-A2-10-167(서열번호 65),
- [0125] TMEM22-A2-10-338(서열번호 66),
- [0126] TMEM22-A2-10-363(서열번호 67),
- [0127] TMEM22-A2-10-296(서열번호 68),
- [0128] TMEM22-A2-10-112(서열번호 69),
- [0129] TMEM22-A2-10-103(서열번호 70),
- [0130] TMEM22-A2-10-136(서열번호 71),
- [0131] TMEM22-A2-10-265(서열번호 72),
- [0132] TMEM22-A2-10-337(서열번호 73),
- [0133] TMEM22-A2-10-195(서열번호 74),
- [0134] TMEM22-A2-10-205(서열번호 75),
- [0135] TMEM22-A2-10-269(서열번호 76),
- [0136] TMEM22-A2-10-229(서열번호 77),
- [0137] TMEM22-A2-10-148(서열번호 78),
- [0138] TMEM22-A2-10-133(서열번호 79),
- [0139] TMEM22-A2-10-359(서열번호 80),
- [0140] TMEM22-A2-10-380(서열번호 81),
- [0141] TMEM22-A2-10-224(서열번호 82),
- [0142] TMEM22-A2-10-356(서열번호 83),
- [0143] TMEM22-A2-10-379(서열번호 84),
- [0144] TMEM22-A2-10-291(서열번호 85),
- [0145] TMEM22-A2-10-301(서열번호 86),
- [0146] TMEM22-A2-10-378(서열번호 87),
- [0147] TMEM22-A2-10-302(서열번호 88),
- [0148] TMEM22-A2-10-287(서열번호 89) 및

[0149] TMEM22-A2-10-130(서열번호 90).

[0150] 또한, 이러한 웨티드로 부가한(pulsed)[적재한] DC에 의한 T 세포의 시험관내 자극 후에, CLT은 하기 각 웨티드를 이용하여 성공적으로 수립되었다:

[0151] TMEM22-A2-9-338(서열번호 35),

[0152] TMEM22-A2-9-381(서열번호 38),

[0153] TMEM22-A2-9-367(서열번호 41),

[0154] TMEM22-A2-9-218(서열번호 48),

[0155] TMEM22-A2-10-217(서열번호 61),

[0156] TMEM22-A2-10-304(서열번호 62),

[0157] TMEM22-A2-10-167(서열번호 65),

[0158] TMEM22-A2-10-363(서열번호 67),

[0159] TMEM22-A2-10-103(서열번호 70),

[0160] TMEM22-A2-10-195(서열번호 74),

[0161] TMEM22-A2-10-229(서열번호 77) 및

[0162] TMEM22-A2-10-356(서열번호 83).

[0163] 상기 수립된 CTL은 각각의 웨티드에 의해 자극받은 표적 세포에 대해 강력한 특이적 CTL 활성을 보인다. 본 발명의 이러한 결과는 TMEM22가 CTL에 의해 인식되는 항원이며, 상기 검사되는 웨티드들은 HLA-A24 또는 HLA-A2에 의해 제한되는 TMEM22의 에피토프 웨티드임을 나타낸다.

[0164] 상기 TMEM22 유전자가 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 림프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포 폐암을 포함하지만, 이를 한정하지 않는 암세포 및 암 조직에 과발현되어 있지만, 대부분의 정상 기관에서 발현되지 않기 때문에, 이것은 면역치료에 대한 좋은 표적이다. 따라서, 본 발명은 TMEM22의 CTL에 의해 인식되는 에피토프에 상응하는 노나웨티드(nonapeptides, 9개의 아미노산으로 구성된 웨티드)와 데카웨티드(decapeptides, 10개의 아미노산으로 구성된 웨티드)를 제공한다. 구체적으로 본 발명의 노나웨티드 및 데카웨티드의 바람직한 예는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28, 31, 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 이러한 웨티드를 포함한다.

[0165] 일반적으로, Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1):163-75, Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003) 및 Nielsen et al., Protein Sci 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004)에 기재되어 있는 것과 같이, 인터넷상에서와 같은 현재 사용가능한 소프트웨어 프로그램은 컴퓨터 상(in silico)에서 다양한 웨티드와 HLA 항원 사이의 결합 친화성(binding affinity)을 산출하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 참조로서 Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1):163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6):1872-81에 기재되어 있는 것과 같이, HLA 항원과의 결합 친화성을 측정할 수 있다. 결합 친화성을 결정하는 방법은, 예를 들면: the Journal of Immunological Methods, 1995, 185:181-190; 및 Protein Science, 2000, 9:1838-1846에 기재되어 있다. 따라서, 하나를 HLA 항원에 높은 결합 친화도를 가지는 TMEM22 유래 그것들의 단편을 선별하기 위하여 이러한 소프트웨어 프로그램을 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 이러한 알려진 프로그램을 이용하여 확인된 HLA 항원에 결합하는 TMEM22 유래 어떤 단편으로 구성된 웨티드를 포함한다. 본 발명의 웨티드는 TMEM22의 전장 웨티드일 수 있다.

[0166] 상기 결과의 웨티드가 이의 CTL 유도성을 유지하는 한, 본 발명의 웨티드는 부가적 아미노산 잔기를 인접시킬 수 있다. 상기 본 발명의 웨티드의 측면에 배치된 특정한 아미노산 잔기는 원래 웨티드의 CTL 유도성을 손상시키지 않는 한, 어떤 유형의 아미노산으로도 구성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 TMEM22 유래 웨티드를 포함하고, HLA 항원에 대한 결합 친화성을 갖는 웨티드를 포함한다. 일반적으로, 상기 웨티드들은 전형적으로 약 40 아미노산 미만, 보통 20 아미노산 미만, 대개 약 15 아미노산 미만이다.

[0167] 일반적으로, 어떠한 웨티드 중의 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산의 변형은 상기 단백질의 기능에 영향을 미치지 않고, 그리고 어떠한 경우에는 원래 단백질의 원하는 기능을 증진시킬 수 있다. 실제로, 변형된 웨티드

(즉, 원래의 참조 서열에 대하여 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 첨가 또는 도입됨으로써 변형된 아미노산 서열로 구성되는 펩티드)가 원래의 펩티드의 생물학적 활성을 보유하고 있다는 것이 알려져 있다(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10:6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79:6409-13). 따라서, 본 발명의 한 실시예에서, 본 발명의 펩티드는 CTL 유도성을 가질 수 있고, 펩티드는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28, 31, 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지며, 여기에서 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산은 첨가, 도입 및/또는 치환된다.

[0168] 당업자는 단일 아미노산 또는 적은 비율의 아미노산을 변화시키는 아미노산 서열에 대한 개개의 첨가 또는 치환이 원래 아미노산 서열 측쇄(side-chain)의 특성의 보존을 야기시키는 경향이 있다는 것을 알고 있다; 따라서, 상기의 것을 "보존적 치환(conservative substitution)" 또는 "보존적 변형(conservative modification)"이라고 하며, 여기서 단백질의 변화는 원래의 단백질과 동일한 기능을 가지는 변형된 단백질을 야기한다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환표는 당업계에서 잘 알려져 있다. 보존하기에 바람직한 아미노산 측쇄 특징의 예는 소수성 아미노산(hydrophobic amino acids: A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산(hydrophilic amino acids: R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), 및 하기 작용기 또는 공통적 특징을 가지는 측쇄를 포함한다; 지방족 측쇄(aliphatic side-chain: G, A, V, L, I, P); 수산기(hydroxy group)를 포함하는 측쇄(S, T, Y); 황 원자(sulfur atom)를 포함하는 측쇄(C, M); 카복실산 및 아미드(carboxylic acid and amide)를 포함하는 측쇄(D, N, E, Q); 염기(base)를 포함하는 측쇄(R, K, H); 및 방향족(aromatic)을 포함하는 측쇄(H, F, Y, W). 또한, 하기 8개 군 각각은 당업계에서 서로에게 보존적 치환이라고 받아들여지는 아미노산을 포함한다:

[0169] 1) 알라닌(alanine; A), 글리신(glycine; G);

[0170] 2) 아스파라긴산(aspartic acid; D), 글루탐산(glutamic acid; E);

[0171] 3) 아스파라긴(asparagine; N), 글루타민(glutamine; Q);

[0172] 4) 아르기닌(arginine; R), 리신(lysine; K);

[0173] 5) 이소루신(isoleucine; I), 루신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 발린(valine; V);

[0174] 6) 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(tryptophan; W);

[0175] 7) 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T); 및

[0176] 8) 시스테인(cysteine; C), 메티오닌(methionine; M)(예를 들면, Creighton, Proteins 1984 참조).

[0177] 이러한 보존적으로 변형된 펩티드 또한 본 발명의 펩티드로 간주한다. 그러나, 본 발명의 펩티드는 그들에 한정되지 않고, 그 결과적인 변형된 펩티드가 원래 펩티드의 CTL 유도성을 가지는 한, 비보존적인 변형도 포함할 수 있다. 또한, 변형된 펩티드는 CTL 유도 가능한, 다형성 변종(polymorphic variants), 중간 상동체(interspecies homologues), 및 TMEM22 대립 유전자의 펩티드를 제외하지 않는다.

[0178] 아미노산 잔기는 본 발명의 펩티드에 도입, 치환 또는 첨가될 수 있거나, 또는, 아미노산 잔기는 더 높은 결합 친화도를 달성하기 위해 그것으로부터 결실될 수 있다. 필수적인 CTL 유도성을 계속 유지하기 위하여, 소수만이(예를 들면, 1, 2 또는 여러 개) 또는 아미노산의 적은 비율이 바람직하게 변형된다(도입, 결실, 첨가 및/또는 치환). 본 발명에서, 상기 용어 "여러 개"는 5 개 또는 그 이하의 아미노산, 예를 들면 4 개, 3 개 또는 그 이하의 아미노산을 의미한다. 변형되는 아미노산의 비율은 바람직하게는 20% 또는 그 이하, 보다 바람직하게는 15% 또는 그 이하, 그보다 더 바람직하게는 10% 또는 그 이하 또는 1 내지 5%일 수 있다.

[0179] 면역치료법의 맥락에서 사용되었을 경우, 본 발명의 펩티드는 세포의 표면 또는 엑소솜, 바람직하게는 HLA 항원과 복합체로서 제시되어야만 한다. 자연적으로 나타나는 펩티드뿐만 아니라, HLA 항원에 결합함으로써 나타나는 펩티드 서열의 규칙성은 이미 알려져 있기 때문에(J Immunol 1994, 152:3913; Immunogenetics 1995, 41:178; J Immunol 1994, 155:4307), 상기 규칙성에 근거한 변형은 본 발명의 면역원성 펩티드(immunogenic peptides)에 도입될 수 있다.

[0180] 예를 들면, HLA-A24 결합을 증가시키기 위해, N-말단으로부터 두번째 아미노산을 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 메티오닌(methionine), 또는 트립토판(tryptophan)으로 치환, 및/또는 C-말단에서 상기 아미노산이 페닐알라닌, 루신(leucine), 이소루신(isoleucine), 트립토판 또는 메티오닌으로 치환하는 것이 바람

직할 수 있다. 따라서, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28 및 31 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 웨티드, 이는 N-말단의 두번째 아미노산이 페닐알라닌, 티로신, 메티오닌, 또는 트립토판으로 치환되고, 및, 웨티드, 및/또는 이는 상기 서열번호들의 아미노산 서열의 C-말단이 페닐알라닌, 루신, 이소루신, 트립토판, 또는 메티오닌으로 치환된 웨티드가 본 발명에 포함된다.

[0181] 또는, 높은 HLA-A2 결합 친화도를 나타내는 웨티드에서, N-말단으로부터 두 번째 아미노산이 루신 또는 메티오닌으로 치환되거나, 상기 아미노산에서 C-말단이 발린 또는 루신으로 치환된 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 서열번호 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 웨티드, 이는 상기 서열번호의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 두 번째 아미노산 서열이 루신 또는 메티오닌으로 치환되고, 및 웨티드, 및/또는 이는 상기 서열 번호의 아미노산 서열의 C-말단이 발린 또는 루신으로 치환된 것이 본 발명에 포함된다.

[0182] 치환은 말단 아미노산 뿐만 아니라 가능성 있는 웨티드의 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR)인지 부위에 도입될 수 있다. 여러 연구, 예를 들면 CAP1, p53(₂₆₄₋₂₇₂), Her-2/neu(₃₆₉₋₃₇₇) 또는 gp100(₂₀₉₋₂₁₇)(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol.(2002) Feb 1;168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother.(2003) 52: 199-206 and S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy(2004) 53, 307-314)는 아미노산 치환을 가지는 웨티드는 원래의 웨티드와 동일하거나 또는 보다 좋은 기능을 가질 수 있다는 것을 나타내었다.

[0183] 또한, 본 발명은 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산이 상기 기재된 웨티드의 N 및/또는 C-말단으로 첨가될 수 있다. 높은 HLA 항원 결합 친화력을 갖고 CTL 유도성을 보유하는 상기 변형 웨티드는 본 발명에 의해 포함될 수 있다.

[0184] 그러나, 상기 웨티드 서열이 서로 다른 기능을 가지는 내인성 또는 외인성 단백질의 아미노산 서열의 한 부분과 동일할 경우, 특이적 물질에 대한 자가면역질환 및/또는 특정 물질에 대한 알레르기 증상 등의 부작용이 유발될 가능성이 있다. 따라서, 상기 웨티드 서열이 다른 단백질의 아미노산 서열과 일치하는 상황을 피하기 위해서, 사용가능한 데이터베이스를 이용하여 상동성 검색을 먼저 수행하는 것이 바람직하다. 목표 웨티드(objective peptide)와 비교하여 하나 또는 두 개의 아미노산 차이가 있는 웨티드마저도 존재하지 않는다는 것이 상동성 검색에서 드러날 경우, 어떠한 부작용의 위험 없이 HLA 항원과 결합 친화성, 및/또는 CTL 유도성을 증강시키기 위해, 상기 목표 웨티드를 변형시킬 수 있다.

[0185] 상기와 같이, HLA 항원에 대해 높은 결합 친화성을 가지는 웨티드는 매우 효과적일 것이라고 기대되지만, 높은 결합 친화성의 존재에 따라 지표로서 선택된 후보 웨티드는 CTL 유도성의 존재에 대해 한층 더 검토된다. 본 발명에서, 상기 용어 "CTL 유도성"은 항원-제시 세포(antigen-presenting cells; APCs) 상에 제시될 경우에 CTL을 유도하는 웨티드의 능력을 의미한다. 또한, "CTL 유도성"은 웨티드의 CTL 활성화, CTL 증식을 유도하고, CTL에 의한 표적세포의 용해 촉진시키며, 및 CTL의 IFN-감마(gamma) 생산을 증가시키는 능력을 포함한다.

[0186] CTL 유도성의 확인은 인간 MHC 항원을 보유하는 APCs[예를 들면, B-림프구, 대식세포(macrophage) 및 수지상세포(dendritic cell; DC)], 또는 보다 구체적으로는 인간 말초 혈액 단핵 백혈구(human peripheral blood mononuclear leukocytes)에서 유래된 수지상세포를 유도하고, 및 웨티드를 사용하여 자극시킨 후, CD8 양성 세포와 혼합하고, 그 후에 표적세포에 대한 CTL에 의해 생산 및 방출되는 IFN-감마를 측정하여 수행할 수 있다. 반응계로서, 인간 HLA 항원을 발현하도록 제작된 형질전환 동물(예를 들면, BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8):764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*2402/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response에 기재된 것)을 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 표적세포를 ⁵¹Cr 등으로 방사 표지할 수 있고, 상기 표적세포로부터 방출된 방사능으로부터 세포독성 활성을 산출할 수 있다. 또는, CTL 유동성은 고정화된 웨티드를 가진 항원-제시 세포(APCs)의 존재하에 CTL에 의해 IFN-감마(gamma)를 측정함으로써 그리고 항-IFN-감마 단일클론 항체를 이용한 배지에서 억제 영역을 가시화함으로써 검사될 수 있다.

[0187] 상기 기술된 웨티드의 CTL 유도성을 시험한 결과, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28, 31 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83로 나타낸 아미노산 서열을 가지는 웨티드들 중에서 선택된 노나웨티드(nonapeptides) 또는 데카웨티드(decapeptides)가 특히 높은 CTL 유도성 및 HLA-A 항원에 높은 결합 친화도를 보이는 것을 확인하였다. 따라서, 이러한 웨티드들은 본 발명의 바람직한 실시예로서 예시된다.

- [0188] 또한, 상동성 분석(homology analysis)의 결과는 이러한 웨티드들이 어떠한 다른 알려진 인간 유전자 산물 유래 웨티드와 현저한 상동성을 갖지 않음을 보인다. 이것은 상기 웨티드를 면역치료법에서 사용하였을 때, 알려지지 않거나 또는 원하지 않은 면역 반응에 대한 가능성을 낮춘다. 그러므로, 또한 이러한 측면으로부터, 이러한 웨티드들은 암 환자의 TMEM22에 대한 면역력을 유도하는 것에 유용하다. 따라서, 본 발명의 웨티드는, 바람직하게, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28, 31, 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83 중에서 선택된 아미노산 서열로 구성된 웨티드이다.
- [0189] 상기에서 논의된 본 발명의 변형뿐 아니라, 본 발명은 연결된 웨티드가 필수적인 CTL 유도성을 가지고 있는 한 다른 웨티드와 연결될 수 있다. 예시적인 적절한 다른 웨티드는 하기를 포함한다: 본 발명의 웨티드 또는 다른 TAA로부터 유래된, CTL 유도성웨티드. 상기 웨티드 사이의 링커(linker)는 당업계에 잘 알려져 있는데, 예를 들면, AAY(P.M. Daftarian et al., J Trans Med 2007. 5:26), AAA, NKRK(R. P. M. Sutmuller et al., J Immunol. 2000. 165: 7308-7315) 또는 K(S. Ota et al., Can Res. 62. 1471-1476. K.S. Kawamura et al., J Immunol. 2002. 168: 5709-5715)가 있다.
- [0190] 예를 들면, 비-TMEM22(non-TMEM22) 종양관련 항원 웨티드는 HLA 종류 I 및/또는 종류 II를 통해서 면역반응을 증강시키기 위하여 거의 동시에 사용될 수 있다. 암 세포는 하나 이상의 종양관련 유전자를 발현할 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. 특정 개체가 추가적 종양관련 유전자를 발현하는지 결정하는 것 및 그 후 본 발명에 따른 TMEM22 조성물 또는 백신에서 상기 유전자의 발현 생물물로부터 유래된 HLA 종류 I 및/또는 HLA 종류 II 결합 웨티드를 포함하는 것은 당업계에서 평범한 기술 중 하나를 위한 일반적인 실험방법의 영역 내에 있다.
- [0191] HLA 종류 I 및 HLA 종류 II 결합 웨티드의 예는 당업자에게 알려져 있을 수 있고(예를 들면, Coulie. Stem Cells 13:393-403. 1995를 참조), 여기서 공개하는 것과 같은 방법으로 본 발명에서 사용될 수 있다. 당업자는 하나 또는 그 이상의 TMEM22 웨티드 및 하나 또는 그 이상의 비-TMEM22 웨티드를 포함하는 폴리웨티드, 또는 분자 생물학의 표준 절차에 따라 상기 웨티드를 암호화하는 핵산을 제조할 수 있다.
- [0192] 상기 연결된 웨티드는 여기에서 "폴리톱(polytopes)"이라고 하며, 즉, 다양한 조절[예를 들면, 연결(concatenated), 겹침(overlapping)]에서 함께 연결될 수 있는 웨티드를 자극시키는 둘 또는 그 이상의 잠재적인 면역형성적 또는 면역 반응의 군이다. 면역 반응을 자극, 증진 및/또는 유발시키는 폴리톱의 효과를 검사하기 위하여 상기 폴리포어(polyppore)(또는 폴리톱을 암호화하는 핵산)은 표준 면역화 프로토콜에 따라, 예를 들면 동물에 투여될 수 있다.
- [0193] 웨티드는 폴리톱을 형성하기 위해 직접적으로 또는 인근 서열의 사용을 통해 함께 연결될 수 있고, 백신으로서 폴리톱의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다[예를 들면 Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(13):5845-5849. 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284. 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):882-826. 1996; Tarn et al., J Exp Med. 171(1):299-306. 1990을 참조]. 에피토프의 다양한 수 및 조합을 포함하는 폴리톱은 제조될 수 있고 CTL에 의한 인지 및 면역 반응을 증강시키는 효과(efficacy)를 위해 사용될 수 있다.
- [0194] 또한, 상기 기재된 웨티드는 그들이 원래 웨티드의 CTL 유도성을 보유하고 있는 한, 다른 물질에 더 결합될 수 있다. 모범적인 물질은 하기와 같은 예를 포함할 수 있다: 웨티드, 지질, 당 및 당 측쇄, 아세틸기, 천연 및 합성 폴리머 등. 상기 변형이 원래의 웨티드의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 한, 당화(glycosylation), 측쇄 산화, 및/또는 인산화 등의 변형을 포함할 수 있다. 이러한 종류의 변형은 추가적인 기능(예를 들어, 표적 기능 및 전달 기능)을 제공하거나 및/또는 상기 웨티드를 안정시키기 위해 수행될 수 있다.
- [0195] 예를 들면, 폴리웨티드의 생체 내 안정성을 증대시키기 위해, D-아미노산, 아미노산 모방체, 또는 비천연 아미노산을 도입하는 것은 당업계에서 잘 알려져 있으며; 이 개념은 또한 본 발명의 폴리웨티드에 쓰일 수 있다. 폴리웨티드의 안정성은 여러 가지 방법으로 검사될 수 있다. 예를 들면, 웨티다제(peptidases) 및 인간 혈장 및 혈청과 같은 다양한 생물학적 배지는 안정성 시험에 사용될 수 있다(예를 들면, Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin. 1986, 11:291-302 참조).
- [0196] 또한, 상기에 기술된 것과 같이, 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산 잔기에 의해 치환되거나, 결실되거나 또는 첨가되어 변형된 웨티드 중에서, 원래의 웨티드와 비교하여 동일하거나 또는 더 높은 활성을 갖는 것은 스크리닝 되거나 또는 선택될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 또한 원래의 것에 비교하여 동일하거나 더 높은 활성을 갖는 변형된 웨티드를 스크리닝하거나 또는 선택하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 상기 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:

- [0197] a: 본 발명 펩티드의 최소한 하나의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 첨가하는 단계;
- [0198] b: 펩티드의 활성을 결정하는 단계: 및
- [0199] c: 원래의 것에 비교하여 동일하거나 더 높은 활성을 갖는 펩티드를 선택하는 단계.
- [0200] 여기서, 상기 활성은 MHC 결합 활성, APC, 또는 CTL 유도성 및 세포독성 활성을 포함할 수 있다.
- [0201] 본 발명의 펩티드가 시스테인 잔기(cystein residue)를 포함할 경우, 상기 펩티드는 시스테인 잔기의 SH 그룹 사이의 이황화 결합(disulfide bond)을 통해 이량체(dimers)를 형성하는 경향이 있다. 따라서, 본 발명의 펩티드의 이량체는 또한 본 발명의 펩티드에 포함된다.
- [0202] 여기에서, 본 발명의 펩티드는 "TMEM22 펩티드(들)" 또는 "TMEM22 폴리펩티드(들)"로 기술될 수 있다.

III. TMEM22 펩티드의 제조

- [0204] 본 발명의 펩티드는 잘 알려진 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드는 재조합 DNA 기술 또는 화학 합성을 사용하여 합성적으로 제조할 수 있다. 본 발명의 펩티드는 개별적으로, 또는 두 개 또는 이상의 펩티드로 구성된 더 긴 폴리펩티드로 합성할 수 있다. 상기 펩티드는 다른 자연적으로 발생한 숙주 세포 단백질 및 이의 단편, 또는 다른 화학 물질이 거의 없도록 분리, 즉 정제 되거나 분리될 수 있다.
- [0205] 본 발명의 펩티드는 여기서 기술하는 본 펩티드(original peptide)의 생물학적 활성을 저해하지 않는다면, 당화(glycosylation), 측쇄 산화, 또는 인산화와 같은 변형을 포함할 수 있다. 다른 예시적 변형은 펩티드의 혈청 반감기(serum half life)를 증가시키기 위해 D-아미노산 또는 사용될 수 있는 다른 아미노산 모방체의 통합을 포함할 수 있다.
- [0206] 본 발명의 펩티드는 선택된 아미노산 서열을 기반으로 화학 합성을 통해 얻을 수 있다. 합성에 적용될 수 있는 보편적인 펩티드 합성 방법의 예는 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다:
- [0207] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- [0208] (ii) The Proteins, Vol 2, Academic Press, New York, 1976;
- [0209] (iii) Peptide Synthesis(일본어), Maruzen Co, 1975;
- [0210] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis(일본어), Maruzen Co, 1985;
- [0211] (v) Development of Pharmaceuticals(제 2판)(일본어), Vol. 14(peptide synthesis), Hirokawa, 1991;
- [0212] (vi) WO99/67288; 및
- [0213] (vii) Barany G. & Merrifield RB, Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis," Academic Press, New York, 1980, 100-118.

- [0214] 또는, 본 발명의 펩티드는 펩티드를 제작하기 위한 임의의 잘 알려진 유전자 조작 방법을 사용해서 얻을 수 있다(예를 들면, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(Wu et al. 판) 1983, 101:347-62). 예를 들면, 우선, 목표 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현 가능한 종류(예를 들면, 프로모터 서열에 해당하는 조절 서열의 아래부분(downstream))로 포함하여 적절한 벡터를 제조하고 적절한 숙주 세포에 형질전환한다. 그 다음에, 상기 숙주 세포를 원하는 펩티드를 제작하기 위해 배양한다. 또한 상기 펩티드는 시험관 내(in vitro) 번역 시스템을 조정하여(adapting) 시험관 내에서 제조될 수도 있다.

IV. 폴리뉴클레오티드

- [0216] 또한, 본 발명은 본 발명의 상기 언급한 펩티드 중 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이들은 자연적으로 존재하는 TMEM22 유전자[GenBank Accession No. NM_025246, NM_001097599, NM_001097600(예를 들면, 서열 번호: 91)]에서 유래한 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 이의 보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열로 을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명에서, 상기 용어 "보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열"은 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 서열을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴(degeneracy)

때문에, 많은 수의 기능적으로 동일한 핵산은 모든 주어진 단백질을 암호화한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCU 및 GCG은 모두 알라닌 아미노산을 암호화한다. 따라서, 코돈에 의해 결정되는 알라닌의 모든 위치에서, 암호화되는 폴리펩티드의 변경없이, 상기 코돈은 상응하는 코돈 중 어느 하나로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이를 "침묵 변이(silent variations)"라 하고, 보존적으로 변형된 변종의 한 종류이다. 웨პ티드를 암호화하는 본 발명의 모든 핵산 서열은 상기 핵산의 모든 가능한 침묵 변종도 나타낸다. 당업계에서 보편적인 것 중 하나는 핵산의 각 코돈(보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG은 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 얻기 위해 변형될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 웨პ티드를 암호화하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 공개된 각 서열에서 암시적으로 기재되어 있다.

[0217] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로 구성될 수 있다. DNA는 A, T, C 및 G와 같은 염기로 적절하게 구성되고, T는 RNA에서 U로 대체된다. 당업자는 비-자연적으로 존재하는 염기 또한 폴리뉴클레오티드에 포함된다는 것을 인지할 것이다.

[0218] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 아미노산 서열 사이의 개입(intervening) 유무를 불문하고 본 발명의 웨პ티드를 포함하는 다양한 웨პ티드를 암호화할 수 있다. 예를 들면, 상기 개재 아미노산 서열은 폴리뉴클레오티드 또는 번역된 웨პ티드의 절단 부위(예를 들면, 효소 인식 서열)를 제공할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 웨პ티드를 암호화하는 코딩 서열에 대한 어떠한 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 웨პ티드의 발현에 필요한 조절 서열을 포함하는 재조합형 폴리뉴클레오티드일 수 있고 또는 마커 유전자 등을 가지는 발현 벡터(플라스미드)일 수도 있다. 일반적으로, 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드는, 예를 들면, 중합효소(polymerase) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 이용한 종래의 재조합 기술을 통해 폴리뉴클레오티드를 조작하여 제조할 수 있다.

[0219] 재조합 기술 및 화학 합성 기술은 모두 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 제작하는 데 사용할 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드는 반응능(competent) 세포에 형질전환되어 발현하는 적절한 벡터 내에 삽입하여 제작할 수 있다. 또는, PCR 기술 또는 적절한 숙주에서의 발현을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시킬 수 있다(예를 들면, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). 또는, Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5에 기재되어 있는 것과 같이, 고체상 기술을 이용하여 폴리뉴클레오티드를 합성할 수 있다.

V. 엑소솜(Exosomes)

[0220] 또한, 본 발명은 본 발명의 웨პ티드와 HLA 항원 사이에 형성된 복합체를 그 표면에 제시하는 엑소솜이라는 세포 내 소낭을 제공한다. 엑소솜은 예를 들면, 일본 특허출원 제 11-510507호 및 WO99/03499에 설명된 방법을 사용하여 제조할 수 있고, 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 환자에게서 얻어진 APCs를 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 엑소솜은 본 발명의 상기 웨პ티드와 유사한 방법으로 백신으로서 접종할 수 있다.

[0221] 복합체에 함유된 HLA 항원의 종류는 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 개체의 HLA 항원의 종류와 일치해야 한다. 예를 들면, 일본인 집단에 대하여, HLA-A24 및 HLA-A2(특히, HLA-A*2402, HLA-A*0201 및 HLA-A*0206)이 흔하고 그러므로 일본인 환자의 치료에 적합할 것이다. 일본인과 백인에게서 높게 발현되는 상기 A24 또는 A2 종류의 사용은 효과적인 결과를 얻기 위해 바람직하고, HLA-A*2402, HLA-A*0201 및 HLA-A*0206과 같은 아류형(subtype)도 이용할 수 있다. 일반적으로, 임상에서는, 치료를 필요로 하는 환자의 HLA 항원의 종류는 미리 검사되고 있어, 상기 특정 항원에 대해 높은 수준의 결합 친화성을 갖거나, 항원제시에 의한 세포독성 T 세포(CTL) 유도성을 가지는 웨პ티드를 적절하게 선택하는 것이 가능하게 된다. 또한, 높은 결합 친화성 및 CTL 유도성을 가지는 웨პ티드를 얻기 위하여, 자연에 존재하는 TMEM22 부분적 웨პ티드의 아미노산 서열을 바탕으로 하나, 둘 또는 여러 아미노산의 치환, 도입 및/또는 첨가가 수행될 수 있다.

[0223] A24형 HLA 항원을 본 발명의 엑소솜을 위해 사용한 경우, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28 및 31 중 어느 하나의 서열을 가지는 웨პ티드가 사용된다.

[0224] 또는, A2 형 HLA 항원을 본 발명의 엑소솜을 위해 사용할 경우, 서열번호 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83 중에서 선택된 서열을 가지는 웨პ티드가 사용된다.

VI. 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs)

- [0226] 또한, 본 발명은 HLA 항원과 본 발명의 웨티드 사이에 형성된 복합체를 그 표면에 제시하는 분리된 항원-제시 세포(antigen presenting cells; APCs)를 제공한다. 상기 APCs는 치료 및/또는 예방을 받는 환자로부터 유래될 수 있고, 그 자체로 또는 본 발명의 웨티드, 액소솜 또는 CTL을 포함하는 다른 약물과 조합하여 투여될 수 있다.
- [0227] 상기 APCs는 특정한 종류의 세포에 한정되지 않고, 수지상세포(DC), 랑게르한스(Langerhans) 세포, 마크로파지(macrophage), B세포 및 활성화 T 세포를 포함할 수 있는데, 이들은 림프구에 의해 인식되기 위하여 세포 표면에 단백질성 항원을 제시하는 것이 알려져 있다. 수지상세포는 강력한 CTL 유도 작용을 가지는 APCs 중 하나이므로, 수지상세포는 본 발명의 APCs로서 사용할 수 있다.
- [0228] 예를 들면, 말초 혈액 단핵구로부터 DCs를 유도하고, 그런 다음 그것들을 시험관 내(in vitro), 생체 내(in vivo) 또는 생체 외(ex vivo)에서 본 발명의 웨티드와 접촉(자극)시켜 본 발명의 APCs를 얻을 수 있다. 본 발명의 웨티드를 개체에 투여하면, 본 발명의 웨티드가 제시된 APCs가 개체의 체내에서 유도된다. 따라서 본 발명의 APCs는 본 발명의 웨티드를 개체에 주입한 후 개체에서 수집할 수 있다. 또는, 본 발명의 상기 APCs는 본 발명의 상기 웨티드가 주입된 개체로부터 수집한 APCs와 접촉함으로써 얻을 수 있다.
- [0229] 본 발명의 상기 APC는 단독 또는 상기 웨티드, 액소솜 또는 본 발명의 CTL을 포함하는 다른 약물과의 조합으로 개체에서 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 개체로 투여될 수 있다. 예를 들면, 생체 외 투여는 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0230] a: 첫번째 개체로부터 APCs 수집하는 단계,
- [0231] b: 단계 a의 APCs와 상기 웨티드를 접촉하는 단계 및
- [0232] c: 단계 b의 APCs를 2번째 개체에 투여하는 단계.
- [0233] 첫 번째 개체와 두 번째 개체는 같은 개체일 수 있고, 또는 다른 개체일 수 있다. 또는, 본 발명에 따라서, 항원-제시 세포를 유도하는 약학적 조성물을 제조하기 위한 본 발명의 웨티드의 사용이 제공된다. 또한, 본 발명은 항원-제시 세포를 유도하는 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 과정을 제공한다. 또한, 본 발명은 항원-제시 세포를 유도하기 위한 본 발명의 웨티드를 제공한다. 단계 b에서 수득된 APC는 암 치료 및/또는 예방을 위한 백신으로 투여될 수 있고, 암의 예는 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 림프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0234] 또한, 본 발명은 APC 유도용 약학적 조성물의 제조를 위한 방법 또는 과정을 제공하며, 이는 본 발명의 웨티드와 약학적으로 허용가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)를 혼합하거나 제형화하는 과정을 포함한다.
- [0235] 본 발명의 하나의 측면에 따르면, APCs는 높은 수준의 CTL 유도성을 가지고 있다. "높은 수준의 CTL 유도성"이라는 용어에 있어서, 상기 높은 수준은 웨티드와 접촉시키지 않는 APCs 또는 CTL을 유도할 수 없는 웨티드와 접촉시킨 APCs의 CTL 유도성수준과 비교한 CTL 유도성수준이다. 높은 수준의 세포독성 T 세포 유도성을 가지는 이러한 APCs는 본 발명의 웨티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한 유전자를 시험관 내에서 APCs에 도입하는 단계를 포함하는 방법으로 제조할 수 있다. 상기 도입 유전자는 DNA 또는 RNA 종류일 수 있다. 도입 방법으로는, 특별한 제한 없이, 본 기술분야에서 일반적으로 실시되는 다양한 방법, 예를 들면, 리포렉션(lipofection), 전기천공법(electroporation), 및 인산칼슘법등이 포함된다. 보다 구체적으로는, 이는 Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 특허공보 제 2000-509281호에 기재된 것에 따라 실시할 수 있다. 유전자를 APCs로 도입함으로써, 상기 유전자는 세포 안에서 전사 및 번역을 겪고, 이렇게 얻어진 단백질은 MHC 종류 I 또는 종류 II에 의해 처리되고, 제시 경로를 거쳐 웨티드가 제시된다.
- [0236] VII. 세포독성 T 세포(Cytotoxic T lymphocytes; CTL)
- [0237] 본 발명의 임의의 웨티드에 대해 유도된 세포독성 T 세포는 생체 내에서 종양 관련 내피를 표적으로 하는 면역 반응을 증강하고 그로 인하여 상기 웨티드 그 자체와 유사한 방법으로 백신으로서 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 웨티드에 의해 특이적으로 유도 또는 활성화된 분리된 세포독성 T 세포를 제공한다.

[0238] 이러한 CTL은(1)본 발명의 웨티드를 개체에 투여, 개체로부터 CTL 수집; 또는 (2) 개체 유래 APCs, CD8 양성 T 세포, 또는 본 발명의 웨티드와 함께 시험관 내에서 말초 혈액 단핵 림프구 접촉(자극) 후 CTL 분리; 또는(3) CD8 양성 T 세포 또는 말초 혈액 단핵 림프구와 시험관 내에서 그것의 표면에 HLA 항원과 본 발명의 웨티드 복합체를 제시하는 APCs 또는 액소솜을 접촉하고 CTL 분리; 또는(4) 본 발명의 웨티드와 결합하는 T 세포 수용체 서브유닛(subunit)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자의 상기 CTL로의 도입으로 얻어질 수 있다. 상기 APCs 및 액소솜은 상기 기재 방법 및(4) 방법에 의해 준비될 수 있으며,(4)의 방법은 아래 "VIII. T 세포 수용체(TCR)" 부분에서 열거된다.

[0239] 본 발명의 CTL은 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 개체로부터 유래할 수 있고, 그 자체, 또는 조절 효과의 목적을 위한 본 발명의 웨티드 또는 액소솜을 포함하여 다른 약물과 조합하여 투여할 수 있다. 상기 얻어진 세포 독성 T 세포는 본 발명의 웨티드, 예를 들어, 유도를 위해 사용한 것과 동일한 웨티드를 제시하는 표적 세포에 대해 특이적으로 작용한다. 상기 표적 세포는 암세포와 같은 TMEM22를 내생적으로 발현하는 세포, 또는 TMEM22 유전자가 형질전환된 세포이고; 본 발명의 웨티드에 의한 자극에 의해 세포 표면에 상기 웨티드를 제시하는 세포도 활성화된 CTL 공격의 표적이 될 수 있다.

VIII. T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)

[0241] 또한, 본 발명은 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)의 서브유닛(subunit)를 형성할 수 있는 폴리웨티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물 및 이를 이용한 방법을 제공한다. TCR 서브유닛(subunit)는 TMEM22를 발현하는 종양세포에 대한 특이성을 T 세포에 부여하는 TCR 형성 능력을 가진다. 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 웨티드로 유도된 CTL의 TCR 서브유닛(subunit)을 구성하는 알파쇄(alpha chain) 및 베타쇄(beta chain)를 암호화하는 핵산을 동정할 수 있다(WO2007/032255 및 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288, 2003). 예를 들면, 상기 PCR 방법은 TCR을 분석하는데 바람직하다. 상기분석을 위한 PCR 프라이머는, 예를 들어, 5' 측면(side) 프라이머로서 5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3' (서열 번호: 93) 및 TCR 알파 사슬(alpha chain) C 부위에 특이적인 3-TRa-C 프라이머(5'-tcagctggaccacccgcagcgt-3')(서열 번호: 94), TCR 베타 사슬(beta chain) C1 부위에 특이적인 3-TRb-C1 프라이머(5'-tcagaaatccttcttgac-3')(서열 번호: 95) 또는 3' 측면 프라이머로서 TCR 베타 사슬 C2 부위에 특이적인 3-TR 베타-C2 프라이머(5'-ctagcctctgaaatccttctt-3')(서열 번호: 96)일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 상기 TCR 유도체는 TMEM22를 제시하는 표적세포에 높은 결합력(avidity)으로 결합할 수 있고, 상기 TMEM22 웨티드를 제시하는 표적세포의 효과적인 사멸을 생체 내 또는 시험관 내에서 선택적으로 매개할 수 있다.

[0242] 상기 TCR 서브유닛을 암호화하는 핵산은 적절한 벡터, 예를 들면 레트로바이러스 벡터에 통합될 수 있다. 이러한 벡터는 당업계에 잘 알려져 있다. 핵산 또는 그것을 함유한 벡터는 T 세포, 예를 들면 환자로부터의 T 세포에 유용하게 도입될 수 있다. 유리하게는, 본 발명은 환자 그들의(또는 다른 포유류의 것) T 세포가 암세포를 죽일 수 있는 탁월한 특징을 갖는, 용이하고 빠르게 변형된 T 세포를 생산하도록 급격한 변화를 허용하는, 바로 살 수 있는 조성물(off-the-shelf composition)을 제공한다.

[0243] 특이적 TCR은 특이적으로 본 발명의 웨티드 및 HLA 분자의 복합체를 특이적으로 인지할 수 있는 수용체(receptor)이고, 이것은 상기 TCR이 상기 T 세포 표면에 있을 때, 표적세포에 대한 T 세포 특이적 활성을 제공한다. 상기 복합체의 특이적 인식은 어떤 알려진 방법에 의해 수행될 수 있고, 바람직한 방법은 예를 들면, HLA 분자 및 본 발명의 웨티드를 이용한 테트라머(tetramer) 분석, 및 ELISPOT 분석을 포함한다. ELISPOT 분석을 수행함으로써, 세포 표면에 TCR을 발현하는 T 세포가 TCR에 의해 세포를 인지하고, 신호가 세포내부로 이동되는 것이 확인될 수 있다. 상기 복합체가 T 세포 표면에 상기 복합체가 존재할 때, T 세포 세포독성 활성을 줄 수 있는 것의 확인은 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다. 바람직한 방법은, 예를 들면, 크로미움 방출 분석(chromium release assay)과 같은 HLA 양성 표적세포에 대한 세포독성 활성의 확인을 포함한다.

[0244] 또한, 본 발명은 TMEM22 웨티드, 예를 들면 HLA-A24의 맥락에서, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28 및 31, 및 또한 HLA-A2 맥락에서 서열번호 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83 웨티드에 결합하는 TCR 아단위(subunit) 폴리웨티드를 암호화하는 핵산(nucleic acid)로 형질전환하여 제조된 CTL을 제공한다.

[0245] 상기 형질전환된 CTL은 생체 내에서 암세포로 흄밍(homing)할 수 있으며, 잘 알려진 시험관 내 배양 방법으로

증식시킬 수 있다[예를 들면, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461(1989)]. 본 발명의 상기 CTL은 치료나 보호를 필요로 하는 환자의 암의 치료 또는 예방에 유용한 면역학적 조성물을 구성하는데 쓰일 수 있다 (WO2006/031221).

IX. 약학적 제제 또는 조성물

TMEM 발현은 정상암에 비해 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 럼프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하는 암에서 특이적으로 증가되어 있기 때문에, 본 발명의 웨პ티드 또는 이러한 웨პ티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(polynucleotides)는 암 또는 종양의 치료를 위한 및/또는 예방을 위한, 및/또는 이의 수술 후 재발의 예방에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 유효성분으로 하나 또는 그 이상의 본 발명의 웨პ티드, 또는 상기 웨პ티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 암 또는 종양의 치료를 위한 및/또는 예방을 위한, 및/또는 이의 수술 후 재발의 예방을 위한 약학적 제제, 물질 또는 조성물을 제공한다. 또는, 본 발명의 웨პ티드는 상기 엑소솜 또는 약학적 제제, 물질 또는 조성물로서 사용되는 APCs와 같은 세포의 임의의 표면에서 발현될 수 있다. 또한, 상기 언급한 본 발명의 어떤 웨პ티드를 표적으로 하는 세포독성 T 세포는 또한 본 발명의 약학적 제제 및 조성물의 유효 성분으로서 사용될 수 있다.

본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 백신으로 사용될 수 있다. 본 발명에서, "백신(vaccine)"이라는 표현(면역원 조성물; immunogenic composition이라고 명명)은 동물에게 투여되었을 때 항종양 면역을 유도하는 기능을 가지는 물질을 일컫는다.

본 발명의 물질 및 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 마우스(mouse), 랫(rat), 기니피그(guinea-pig), 토끼, 고양이, 개, 양, 염소, 돼지, 소, 말, 원숭이, 개코원숭이 및 침팬치를 포함하지만 이로 제한되지 않은 다른 포유류, 특히 상업적으로 중요한 동물 또는 사육되는 동물 및 인간을 포함한 개체 또는 환자에서 암을 치료 및/또는 방지, 및/또는 수술 후 재발을 방지하기 위해 사용될 수 있다.

다른 실시예에서, 본 발명은 또한 암 또는 종양의 치료를 위한 약학적 조성물 또는 제제의 제조에서 하기에서 선택된 유효성분의 용도를 제공한다:

[0251] (a) 본 발명의 웨პ티드;

[0252] (b) 발현가능한 형태로 본 발명에 공개된 웨პ티드를 암호화하는 핵산;

[0253] (c) 본 발명의 웨პ티드를 이의 표면에 제시하는 APC 또는 엑소솜; 및

[0254] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0255] 또는, 본 발명은 또한, 암 또는 종양의 치료의 용도를 위한 하기에서 선택된 유효 성분을 제공한다:

[0256] (a) 본 발명의 웨პ티드;

[0257] (b) 발현가능한 형태로 본 발명에 공개된 웨პ티드를 암호화하는 핵산;

[0258] (c) 본 발명의 웨პ티드를 이의 표면에 제시하는 APC 또는 엑소솜; 및

[0259] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0260] 또는, 본 발명은 추가적으로 암 또는 종양을 치료를 위한 약학적 조성물 또는 제제를 제조하기 위한 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법 또는 과정은 유효 성분으로서 하기로부터 선택되는 약학적으로 또는 생리활성적으로 허용가능한 유효 성분이 있는 담체를 제형화하는 단계를 포함한다:

[0261] (a) 본 발명의 웨პ티드;

[0262] (b) 발현할 수 있는 종류로 본 명세서에 공개된 이러한 웨პ티드를 암호화하는 핵산;

[0263] (c) 본 발명의 웨პ티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜; 및

[0264] (d) 본 발명의 CTL.

[0265] 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 종양 또는 암을 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 제제를 제조하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법 또는 과정은 하기로부터 선택되는 유효 성분이 있는 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체를 혼합하는 단계를 포함한다:

- [0266] (a) 본 발명의 펩티드;
- [0267] (b) 발현할 수 있는 종류로 본 명세서에 공개된 이러한 펩티드를 암호화하는 핵산;
- [0268] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜; 및
- [0269] (d) 본 발명의 CTL.
- [0270] 또는, 상기 약학적 조성물 또는 제제 또는 본 발명은 암 또는 종양의 예방 및 이의 수술 후 예방 각각 또는 둘 다에 사용될 수 있다.
- [0271] 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 백신으로 사용된다. 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 맥락에서, 상기 구 “백신(vaccine)” (또한 “면역성 조성물(immunogenic composition)”로 나타낸)은 동물에 접종하여 항-종양 면역력(immunity)을 유도하는 기능을 가지는 물질에 관한 것이다.
- [0272] 본 발명의 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 인간을 포함한 개체 또는 환자 및 마우스(mouse), 뱃(rat), 기니-피그(guinea-pig), 토끼(rabbit), 고양이(cat), 개(dog), 양(sheep), 염소(goat), 돼지(pig), 소(cattle), 말(horse), 원숭이(monkey), 개코원숭이(baboon), 및 침팬지(chimpanzee), 특히 상업적으로 중요한 동물 또는 가축(domesticated animal)을 포함하지만, 이에 한정하지 않은 어떤 다른 포유류의 이의 암 또는 종양의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발의 예방에 사용될 수 있다.
- [0273] 본 발명에 따라, HLA-A24에 제한된 에피토프 펩티드 또는 후보로 알려진 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28 및 31 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 펩티드 및 또한 HLA-A2에 제한된 에피토프 또는 상기 후보로 알려진 서열번호 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77 및 83은 강력하고 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있다. 따라서, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 18, 19, 22, 28, 31 및 35, 38, 41, 48, 61, 62, 65, 67, 70, 74, 77, 83의 아미노산 서열을 가지는 이러한 펩티드 중 어느것을 포함하는 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 HLA 항원이 각각 HLA-A24 및 HLA-A2인 개체에 투여에 특히 적합하다. 같은 것이 본 발명의 펩티드 중 어떤 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(즉, 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 약학적 제제, 물질 및 조성물에 적용된다.
- [0274] 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 상기 기재한 유효 성분뿐만 아니라, 암 세포에 대해 CTL을 유도하는 능력이 있는 다른 펩티드, 상기 다른 펩티드를 암호화하는 다른 폴리뉴클레오티드, 상기 다른 펩티드들을 제시하는 다른 세포를 포함할 수 있다. 여기서, 암세포에 대해 CTL을 유도하는 능력을 가지는 다른 펩티드들은 암 특이적 항원(예를 들어, 동정된 TAA들)에 의해 예시가 될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0275] 본 발명의 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 상기 유효 성분, 예를 들면 본 발명의 펩티드의 어떤 것과 같은 것의 항종양적 효과를 억제하지 않는 한, 필요하다면 선택적으로 다른 치료적 물질을 유효 성분으로서 포함한다. 예를 들면, 제제는 항염증적 제제, 진통제, 화학요법 및 그와 같은 종류의 것을 포함할 수 있다. 그 약제 안에 다른 치료적 물질을 포함하는 것뿐 아니라, 본 발명의 약제는 역시 하나 또는 그 이상의 다른 약학적 제제과 단계적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 약제 및 약학적 제제의 양은, 예를 들면, 사용되는 약학적 제제의 유형, 치료되는 질병, 투여의 일정과 루트(route)에 의존한다.
- [0276] 특히 상기 언급한 성분 뿐만 아니라, 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 논의가 되고 있는 제형의 종류에 관하여 당업계에서 일반적인 다른 물질을 포함할 수 있다.
- [0277] 본 발명의 한 실시예에서, 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물은, 예를 들어 암과 같은, 질병의 병리 조건을 치료하는데, 유용한 물질을 포함하는 제품 및 키트에 포함될 수 있다. 상기 제품은 라벨이 있는 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물 중 어느 하나의 용기를 포함할 수 있다. 적합한 용기는 병, 바이알(vial) 및 테스트 튜브를 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 만들어질 수 있다. 상기 용기의 라벨은 상기 질병의 하나 또는 그 이상의 조건을 치료 또는 예방하는데 사용되는 제제인 것을 나타내야 한다. 또한 라벨은 투여에 관한 지시 등에 대해 나타낼 수 있다.
- [0278] 또한 상기 기재한 용기뿐 아니라, 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물을 포함한 키트는 선택적으로 약학적으로 허용할 수 있는 희석액을 보관하는 두 번째 용기를 포함할 수 있다. 또한 이것은 상업적 및 사용자의 관점으로부터 바람직한 다른 물질, 다른 베퍼, 희석액, 필터, 니들, 주사기 및 사용설명서를 포함할 수 있다.
- [0279] 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물은, 바람직하다면, 유효 성분이 포함된 하나 또는 그 이상의 구성 단위 제형을 포함할 수 있는 팩 또는 디스펜서(dispenser) 장치에 존재할 수 있다. 상기 팩은, 예를 들어, 금속 또는

블리스터 팩과 같은 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치는 투여에 대한 지시에 의해 동반될 수 있다.

[0280] (1) 상기 펩티드를 유효 성분으로 포함하는 약학적 제제, 물질 또는 조성물

[0281] 본 발명의 펩티드들은 약학적 제제, 물질 또는 조성물로 직접적으로 투여될 수 있으며, 또는 필요하다면, 종래의 제조 방법에 의해 제조되기도 한다. 후자의 경우, 본 발명의 펩티드 뿐만 아니라, 담체, 부형약 및 약물에서 평이하게 사용되는 것이 특이적 제한 없이 적절한 것으로 포함될 수 있다. 상기 담체들은 멸균된 물, 생리학적 살린(saline), 인산 버퍼(phosphate buffer), 배양 유액 등이다. 또한, 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 필요하다면, 안정제, 혼탁액, 보존료, 계면활성제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 항암 목적으로 사용될 수 있다.

[0282] 본 발명의 펩티드들은 생체 내에서 CTL을 유도하기 위해 둘 또는 그 이상의 본 발명의 펩티드를 포함하는 조합으로 준비될 수 있다. 상기 펩티드는 혼합제(cocktail)의 종류를 가질 수 있고, 또는 표준 기술을 이용하여 각각 다른 것이 접합될 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드들은 단독 융합 폴리펩티드 서열로서 발현되거나 화학적으로 연결될 수 있다. 상기 조합의 펩티드들은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 본 발명의 펩티드들을 투여함으로써, 펩티드들은 APCs에 HLA 항원에 의해 높은 밀도로 제시되며, 그 후에 제시된 펩티드 및 HLA 항원으로 구성된 복합체에 대해 특이적으로 반응하는 CTL은 유도된다. 또는, 본 발명의 펩티드가 있는 개체에서 유래한 APC(예를 들면, DC) 자극으로 수득될 수 있는 본 발명의 펩티드 중 어떤 것을 이의 세포 표면에 제시하는 APC는 개체에 투여될 수 있고, 결과적으로 개체에서 CTL이 유도되고, 암 세포에 대한 공격성(aggressiveness)이 증가될 수 있다.

[0283] 또한, 본 발명의 펩티드를 유효 성분으로 포함하는 암 또는 종양의 치료 및/또는 예방에 대한 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 세포성 면역을 효과적으로 확립한다고 알려진 보강제(adjuvant)을 포함할 수 있다. 또는 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 다른 유효 성분과 함께 투여될 수 있으며, 또는 과립(granule)으로 제형되어 투여될 수 있다. 보강제는 면역학적 활성을 가진 단백질과 함께(또는 연속적으로) 투여될 때, 상기 단백질에 대한 면역 반응을 증진시키는 화합물을 나타낸다. 여기서 고려되고 있는 보강제는 문헌(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)에 기술되어 이는 것들을 포함한다. 예시적인 적절한 보강제는 알루미늄 포스페이트(aluminum phosphate), 알루미늄 하이드록시드(aluminum hydroxide), 알럼(alum), 콜레라 독소(cholera toxin), 살모넬라 독소(salmonella toxin)와 같은 것을 포함하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0284] 또한, 리포좀 제형, 미세한 마이크로미터 지름의 비드(bead)가 결합된 펩티드를 가지는 과립 제형, 및 지질(lipid)과 결합되는 펩티드 제형이 편리하게 쓰일 수 있다.

[0285] 본 발명의 다른 실시태양에서, 또한 본 발명의 펩티드들은 약학적으로 허용가능한 염의 종류로 투여될 수 있다. 상기 염(salts)의 바람직한 예는 알칼리 금속(alkali metal), 금속염(salts with a metal), 유기염기염(salts with an organic base), 유기산염(salts with an organic acid) 및 무기산염(salts with an inorganic acid)을 포함한다. 여기서 사용되는 "약학적으로 허용가능한 염"은 생물학적 효과성 및 화합물의 특성을 보유하고, 하이드로클로릭산(hydrochloric acid), 하이드로브로믹산(hydrobromic acid), 수화수산(sulfuric acid), 니트릭산(nitric acid), 포스포릭산(phosphoric acid), 메탄술포닉산(methanesulfonic acid), 에탄술포닉산(ethanesulfonic acid), p-톨루엔술포닉산(p-toluenesulfonic acid), 살리실릭산(salicylic acid) 및 그와 같은 것과 같은 무기산 또는 염기와 반응함으로써 수득될 수 있는 염을 의미한다. 염의 바람직한 예는 알카리 메탈이 있는 염, 메탈이 있는 염, 유기 염기가 있는 염, 유기산이 있는 염 및 무기산이 있는 염을 포함한다.

[0286] 또한, 어떤 실시예에서, 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 CTL을 준비하는 구성요소를 포함한다. 지질은 바이러스 항원에 대해 생체 내에서 CTL을 초회감작(priming)시킬 수 있는 제제 및 조성물로 확인되었다. 예를 들면, 팔미트산 잔기(palmitic acid residues)는 라이신 잔기의 엡실론-아미노(epsilon-amino) 및 알파-아미노(alpha-amino) 그룹에 붙여질 수 있으며, 그 후에 본 발명의 펩티드들과 연결될 수 있다. 지질화 펩티드들은 마이셀(micelle) 또는 입자(particle) 안에 직접적으로 투여되거나, 리포좀(liposome)에 통합되거나, 또는 보강제에 유화시킬 수 있다. CTL 반응을 준비시키는 지질의 또 다른 예로, 적절한 펩티드들과 공유적으로 결합될 때, 트리팔미토일-S-글리세릴시스테인리세릴-세린(tri palmitoyl-S-glycercylcysteinyl-seryl-serine, P3CSS)과 같은 *E. coli* 지질단백질(lipidprotein)이 CTL을 준비하는 것에 사용될 수 있다(참조, 예를 들어, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

[0287] 투여 방법은 경구, 피내, 피하, 정맥 주사, 또는, 및 전신 투여 또는 표적하는 장소 부근에 국소 투여일 수 있다. 상기 투여는 단독 투여로 수행될 수 있으며 또는 다수의 투여로 신장시킬 수 있다. 본 발명의 웨티드의 복용량은 치료되기 위한 질환, 환자의 연령, 몸무게, 투여 방법, 등등에 알맞게 적용될 수 있고, 보통 0.001mg 내지 1000mg, 예를 들면, 0.1mg 내지 10mg이며, 몇 일 내지 몇 달에 한 번 투여될 수 있다. 당업자가 적절하게 알맞은 용량을 선택할 수 있다.

[0288] (2)폴리뉴클레오티드를 유효 성분으로 포함하는 약학적 제제, 물질 또는 조성물

[0289] 또한, 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물은 발현할 수 있는 종류로 본 명세서에서 공개된 웨티드를 암호화하는 핵산을 함유할 수 있다. 여기에서, 상기 용어 "발현할 수 있는 종류"는 세포 안으로 상기 폴리뉴클레오티드가 도입되었을 때, 생체 내에서 폴리뉴클레오티드가 항종양 면역을 유도하는 폴리웨티드로 발현될 것임을 의미한다. 예시된 실시태양에서, 관심있는 폴리뉴클레오티드의 핵산 서열은 폴리뉴클레오티드의 발현에 대해 필요한 조절 요소를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 표적세포의 유전체로 안정한 삽입을 향상시키기 위해 준비 될 수 있다(예를 들어, 상동성 재조합 카세트 벡터에 대해 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 참조). 예를 들어, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; U.S. Patent Nos. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 및 WO 98/04720를 참조한다. DNA-기반의 전달 기술의 예로서 "네이키트 DNA(naked DNA)", 용이한 전달[부피바카인(bupivacaine), 폴리머, 웨티드-매개], 양이온 지질 복합체 및 입자-매개("유전자 총") 또는 압력-매개 전달을 포함한다(참조, 예를 들어, U.S. Patent No. 5,922,687).

[0290] 또한, 본 발명의 웨티드는 바이러스 또는 세균 벡터로 발현될 수 있다. 발현 벡터의 예로 백시니아(vaccinia) 또는 계두(fowlpox)와 같은 강화된 바이러스 숙주를 포함한다. 이러한 접근은 백시니아 바이러스의 사용, 예를 들어, 상기 웨티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 발현하는 벡터를 포함한다. 숙주에 도입하였을 때, 상기 재조합 백시니아 바이러스(vaccinia virus)는 면역성 웨티드를 발현하고, 그렇게 함으로써 면역 반응을 유도한다. 면역법 프로토콜에서 유용한 백시니아 벡터 및 방법은, 예를 들어, U.S. Patent No. 4,722,848에 기재되어 있다. 다른 벡터는 BCG(Bacille Calmette Guerin)이다. BCG 벡터는 Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60에 기재되어 있다. 치료상의 투여 또는 면역법에 대한 유용한 다양한 다른 벡터들, 예를 들어, 아데노 및 아데노-관련 바이러스 벡터(adeno-associated virus vectors), 레트로바이럴 벡터(retroviral vectors), 살모넬라 타이피 벡터(Salmonella typhi vectors), 독성이 없는 탄저균 독소 벡터(detoxified anthrax toxin vectors), 기타 같은 종류의 것이 분명할 것이다(참조, 예를 들어, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85).

[0291] 개체로의 폴리뉴클레오티드 전달은 폴리뉴클레오티드를 운반하는 벡터에 개체가 직접적으로 노출되는 직접적 경우 또는 세포가 시험관 내에서 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 첫 번째로 형질 전환된 후, 세포가 개체에 이식되는 간접적 경우 중 어느 것이 될 수 있다. 이 두 가지 방법이 각각 생체 내 및 생체 외 유전자 치료법으로 알려져 있다.

[0292] 유전자 치료의 상기 방법의 일반적인 리뷰는(Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215 참조)를 참조한다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 재조합 DNA의 일반적으로 당업계에 알려진 방법은 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; and Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990에 기재되어 있다.

[0293] 투여 방법은 경구, 피내, 피하, 정맥 주사, 또는, 및 전신 투여 또는 표적하는 장소 부근에 국소 투여일 수 있다. 상기 투여는 단독 투여로 수행될 수 있으며 또는 다수의 투여로 신장시킬 수 있다. 적절한 담체에 포함된 상기 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 상기 웨티드를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포의 용량은 치료되기 위한 질환, 환자의 연령, 몸무게, 투여 방법, 등등에 알맞게 적용될 수 있으며, 그리고 보통 0.001mg 내지 1000mg, 예를 들면, 0.001mg 내지 1000mg, 예를 들면, 0.1mg 내지 10mg이며, 몇 일 내지 몇 달에 한 번 투여될 수 있다. 당업자는 적합한 용량을 적절히 선택할 수 있다.

[0294] X. 웨티드, 엑소솜, APCs 및 CTL을 이용하는 방법

- [0295] 본 발명의 웨티드 및 폴리뉴클레오티드는 APCs 및 CTL을 제조하거나 또는 유도하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 엑소솜 및 APCs는 CTL을 유도하는데 사용될 수 있다. 상기 웨티드, 폴리뉴클레오티드, 엑소솜 및 APCs는 부가적인 화합물이 그들의 CTL 유도성을 저해하지 않는 한 어떠한 다른 화합물의 조합으로 사용될 수 있다. 따라서, 상기에 언급한 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물 중 어떤 것은 CTL을 유도하는데 사용될 수 있다. 그것에 더하여, 또한 이러한 웨티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것은 아래 기재된 APCs를 유도하는데 사용될 수 있다.
- [0296] (1) 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs) 유도 방법
- [0297] 본 발명은 본 발명의 웨티드 또는 폴리웨티드를 사용하여 높은 CTL유도성이 있는 APCs를 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 시험관 내(*in vitro*), 생체 외(*ex vivo*) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 웨티드를 APCs와 접촉하는 하기 단계를 포함한다. 예를 들어, 생체 외에서 웨티드와 APCs를 접촉하는 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0298] a: 개체로부터 APCs를 수집하는 단계; 및
- [0299] b: 웨티드 및 단계 a의 APCs를 접촉하는 단계.
- [0300] APCs는 특정한 종류의 세포에 한정되지 않으며, 림프구에 의해 인식되기 위해서 단백질성의 항원을 그들의 세포 표면에 발현하는 것으로 알려져 있는 수지상세포, 랑게르ハン스 세포, 대식세포, B 세포 및 활성화된 T 세포를 포함한다. DCs는 상기 APCs들 사이에서 이의 가장 강한 CTL 유도성때문에 사용될 수 있다. 본 발명의 어떠한 웨티드는 단계 b의 웨티드로서 단독으로 또는 본 발명의 다른 웨티드와 조합으로 함께 사용될 수 있다.
- [0301] 또는 본 발명의 웨티드는 생체 내에서(*in vivo*) 상기 웨티드와 APC를 접촉하기 위해 개체에 투여될 수 있다. 그 결과, 높은 CTL 유도성이 있는 APC는 개체의 몸에서 유도될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한, 생체내에서 APC를 유도하기 위해 본 발명의 웨티드를 개체에 투여하는 방법을 고려한다. 또한, 본 발명의 웨티드가 발현되고 생체내에서 APC와 접촉하고, 결과적으로 개체의 몸에서 높은 CTL 유도성이 있는 APC를 유도하도록, 발현가능한 형태로 개체 내에 본 발명의 웨티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 투여하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명은 또한 생체내에서 APC를 유도하기 위해 개체에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 투여하는 단계를 고려한다. 상기 구 “발현가능한 형태(expressible form)”은 상기 부분 “IX. 약학적 제제, 물질 (2) 유효성분으로 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약학적 제제, 물질”에 기재된다.
- [0302] 또한, 본 발명은 CTL 유도성이 있는 APC를 유도하기 위해 APC로 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 포함한다. 예를 들면, 상기 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0303] a: 개체로부터 APCs의 수집하는 단계; 및
- [0304] b: 본 발명의 웨티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 도입하는 단계.
- [0305] 단계 b는 상기 “VI. 항원-제시 세포” 부분에 기재한 것과 같이 수행될 수 있다.
- [0306] 또는, 본 발명은 TMEM22에 대한 특이적 CTL 활성을 유도하는 항원-제시 세포(APC)를 제조하는 방법을 제공하고, 여기에서 상기 방법은 하기의 단계의 하나를 포함할 수 있다:
- [0307] (a) 시험관내에서(*in vitro*), 생체외에서(*ex vivo*), 또는 생체내에서(*in vivo*) APC를 본 발명의 웨티드와 접촉시키는 단계; 및
- [0308] (b) 본 발명의 웨티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC로 도입시키는 단계.
- [0309] (2) CTL을 유도하는 방법
- [0310] 또한, 본 발명은 본 발명의 웨티드, 폴리웨티드, 또는 엑소솜 또는 APCs를 사용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0311] 또한 본 발명은 본 발명의 웨티드 및 HLA 항원의 복합체를 인지하는 T 세포 수용체(TCR) 서브유닛을 형성할 수 있는 폴리웨티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공한다. 바람직하게, CTLs를 유도하는 방법은 하기 중에서 선택된 최소 하나의 단계를 포함한다:

- [0312] (a) CD8-양성 T 세포를 그 표면에 HLA 항원 및 본 발명의 웨티드의 복합체를 제시하는 항원-제시 세포 및/또는 엑소솜과 접촉시키는 단계; 및
- [0313] (b) 본 발명의 웨티드 및 HLA 항원의 복합체를 인지하는 TCR 서브유닛을 형성할 수 있는 폴리웨티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 CD8 양성 세포로 도입시키는 단계.
- [0314] 본 발명의 웨티드, 폴리뉴클레오티드, APCs, 또는 엑소솜이 개체로 투여될 때, CTL은 개체의 몸에서 유도되고, 표적하는 암세포에 대한 면역 반응의 강도는 증진된다. 따라서, 본 발명은 또한, CTL을 유도하기 위해 본 발명의 웨티드, 폴리뉴클레오티드, APCs 또는 엑소솜을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 고려한다.
- [0315] 또는, CTL은 그들을 생체 외에서 사용으로 유도될 수 있다. 그런 경우에, CTL 유도 후, 활성화된 CTL은 개체에 되돌려질 것이다. 예를 들면, 상기 CTL 유도를 위한 본 발명의 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0316] (a) 개체로부터 APCs를 수집하는 단계;
- [0317] (b) 웨티드와 단계 a)의 APCs를 접촉하는 단계; 및
- [0318] (c) CD8 양성 세포와 단계 b)의 APCs를 공배양(co-culture)하는 단계.
- [0319] 상기 단계(c)에서 CD8-양성 세포와 공배양된 APCs는 상기 "VI. 항원-제시 세포" 부분에서 기재한 것과 같이 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 APCs에 형질전환함으로써 준비될 수 있으나, 본 발명은 이에 한정되지 않고 본 발명의 웨티드 및 HLA항원의 복합체를 그것의 표면에 효과적으로 제시하는 모든 APCs를 포함한다.
- [0320] 상기 APCs 대신에, 본 발명의 웨티드 및 HLA 항원의 복합체를 표면에 제시하는 엑소솜도 사용될 수 있다. 즉, 본 발명은 또한 HLA 항원 및 본 발명의 웨티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 엑소솜을 CD8-양성 세포와 공배양하는(co-cultured) 방법을 포함한다. 상기 엑소솜은 상기 "V. 엑소솜" 부분에 기술된 방법에 의해 준비될 수 있다.
- [0321] 또한, 본 발명의 웨티드에 결합하는 TCR 서브유닛을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 CD8-양성 세포에 도입시킴으로써 CTL은 유도될 수 있다. 이러한 형질 도입은 상기 "VIII. T 세포 수용체(TCR)" 부분에 기재된 것과 같이 수행될 수 있다.
- [0322] 또한, 본 발명은 CTL을 유도하는 약학적 제제, 물질 또는 조성물을 제조하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 웨티드와 약학적으로 허용가능한 운반체를 혼합 또는 제조하는 단계를 포함한다.
- [0323] (3) 면역 반응을 유도하는 방법
- [0324] 또한, 본 발명은 TMEM22와 관련된 질병에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 적합한 질병은 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 럼프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0325] 본 발명의 방법은 본 발명의 어떤 웨티드 또는 그들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 본 발명의 어떤 웨티드를 제시하는 엑소솜 또는 APCs의 투여를 고려한다. 상세하게는, "IX. 약학적 제제, 물질 또는 조성물", 특히 백신으로서 본 발명의 약학적 제제, 물질 및 조성물의 사용을 기술하는 부분을 참조할 수 있다. 또한, 면역 반응을 유도하기 위한, 본 발명의 방법에 적용될 수 있는 엑소솜 또는 APCs는 상기 "V. 엑소솜", "VI. 항원-제시 세포(APCs)", 및 "X. 웨티드, 엑소솜, APC 및 CTL을 사용하는 방법"의(1) 및(2)에 상세하게 기술되어 있다.
- [0326] 또한, 본 발명은 면역 반응을 유도하기 위한 약학적 제제, 물질 또는 조성물을 제조하는 방법 또는 과정을 제공하고, 여기에서 상기 방법은 약학적으로 허용가능한 담체(carrier)와 함께 본 발명의 웨티드를 첨가하거나 또는 제형하는 단계를 포함한다.
- [0327] 또는, 본 발명의 방법은 하기를 포함하는 백신 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다:
- [0328] (a) 본 발명의 웨티드;
- [0329] (b) 발현 가능한 형태로서 여기에서 공개된 웨티드를 암호화하는 핵산;

- [0330] (c) 표면에 본 발명의 웨პ티드를 제시하는 APC 또는 엑소솜; 또는
- [0331] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.
- [0332] 본 발명의 맥락에서, TMEM22를 과발현하는 암은 이러한 유효 성분으로 치료될 수 있다. 이러한 암의 예는 급성 골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 림프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 유효 성분을 함유하는 백신 또는 약학적 제제 뜯느 조성물의 투여 이전에, 검사될 암 세포 또는 조직에서 TMEM22의 발현 수준이 동일한 기간의 정상 세포와 비교하여 증가되었다는 것을 확인하는 것은 바람직하다. 따라서, 한 실시예에서, 본 발명은 TMEM22를 과발현하는 암을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:
- [0333] i) 치료될 암을 갖는 개체로부터 수득된 암 세포 또는 조직에서 TMEM22의 발현 수준을 결정하는 단계;
- [0334] ii) TMEM22의 발현 수준을 정상 대조군 수준과 비교하는 단계; 및
- [0335] iii) 상기 기술된(a) 내지(d) 중에서 선택된 최소 하나의 구성요소를 TMEM22가 정상 대조군과 비교하여 과발현되는 암을 갖는 개체에게 투여되는 단계.
- [0336] 또는, 본 발명은 또한 TMEM22가 과발현된 암을 갖는 개체에 투여에서 사용을 위한 상기 기술된(a) 내지(d) 중에서 선택된 최소 하나의 구성요소를 포함하는 백신 또는 약학적 조성물을 제공한다. 다시 말하면, 본 발명은 본 발명의 TMEM22 폴리펩티드로 치료되는 개체를 알아내는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 개체-유래 암 세포 또는 조직에서 TMEM22의 발현수준을 결정하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 유전자의 정상 대조군 수준과 비교하여 증가된 수준은 그 개체가 본 발명의 TMEM22 폴리펩티드로 치료될 수 있는 암을 가지고 있다는 것을 나타낸다. 본 발명의 암을 치료하는 상기 방법은 하기의 보다 상세하게 기술되어 있다.
- [0337] TMEM22의 전사 또는 번역 생산물을 포함하는 한, 어떤 개체-유래 암 세포 또는 조직은 TMEM22의 발현의 결정을 위해 사용될 수 있다. 적절한 생물학적 시료는 몸 조직 및 혈액, 가래 및 요(urine)과 같은 체액을 포함하지만, 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 개체-유래 세포 또는 조직은 상피 세포, 보다 바람직하게는 암 상피세포 또는 암으로 의심되는 조직으로부터 유래한 상피세포를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 또한, 필요하다면, 상기 세포는 수득된 몸의 조직 및 체액으로부터 정제된 후, 개체-유래 세포 또는 조직으로서 사용될 수 있다.
- [0338] 본 발명의 맥락에서, 비-암성(non-cancerous)으로 알려진 생물학적 시료로부터 결정된 대조군 수준은 "정상 대조군 수준(normal control level)"이라고 한다. 반면, 만약 대조군 수준이 암성(cancerous) 생물학적 시료로부터 결정된다면, "암 대조군 수준(cancerous control level)"이라고 한다. 시료 발현 수준 및 대조군 발현 수준 사이의 상이성은 대조군 핵산, 예를 들면 암 또는 암이 아닌 세포의 상태에 따라 그 발현 수준이 상이하지 않은 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)의 발현 수준으로 평준화시킬 수 있다. 대조군 유전자의 예는 베타-액틴, 글리세랄데히드 3 포스페이트 디하이드로게나아제(glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) 및 리보좀 단백질 P1(ribosomal protein P1)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.
- [0339] 본 발명의 방법에 의해 치료될 개체는 바람직하게는 포유류이다. 포유류의 예는 인간, 비-인간 영장류(non-human primate), 쥐(mouse), 쥐(rat), 개 고양이, 말, 및 소를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.
- [0340] 본 발명에 따르면, 개체로부터 수득된 상기 암 세포 또는 조직에서 TMEM22의 발현 수준이 결정된다. 상기 발현 수준은 당업계에 알려진 방법을 이용하여 전사(핵산) 생산물 수준에서 결정될 수 있다. 예를 들면, TMEM22의 mRNA는 혼성화 방법으로 탐침을 이용하여 정량될 수 있다(예를 들어, Northern hybridization). 탐지는 침 또는 어레이(array)로 수행될 수 있다. 어레이의 사용은 TMEM22의 발현 수준을 탐지하는데 바람직하다. 당업자들은 이러한 TMEM22의 서열정보를 이용하여 탐침을 제조할 수 있다. 예를 들면, TMEM22의 cDNA는 탐침으로 사용될 수 있다. 만약 필요하다면, 상기 탐침은 염료, 형광 물질 및 동위원소와 같은, 적절한 표지로 표지될 수 있으며, 유전자의 발현 수준은 혼성화된 표지의 강도로 탐지될 수 있다.
- [0341] 또한, TMEM22 유전자의 전사 생산물은 증폭-기반 탐지 방법에 의해 프라이머를 사용하여 정량될 수 있다(예를 들면, RT-PCR). 또한, 상기 프라이머는 상기 유전자의 이용가능한 서열 정보를 기반으로 제조될 수 있다.
- [0342] 특히, 상기 제시된 방법에 대해 사용된 탐침 또는 프라이머는 염격한 상태, 적절하게 염격한 상태 또는 낮게 염격한 상태하에서 TMEM22의 mRNA와 혼성화된다. 본 명세서에 사용되었던, 상기 용어 "염격한(혼성화) 조건"은 탐침 또는 프라이머가 그것의 표적 서열에 혼성화하는 조건을 나타내지만, 다른 서열에는 혼성화되지 않는다. 염격한 조건은 서열-의존적이며, 다른 환경하에서 달라질 것이다. 더 긴 서열의 특이적 혼성화는 짧은 서열에

비해 높은 온도에서 관찰된다. 일반적으로, 염격한 조건의 온도는 정의된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대해 열융해점(Thermal melting point, T_m)보다 약 5°C 낮게 선택된다. 상기 T_m 은(정의된 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에) 50%의 상기 탐침이 상보적으로 상기 표적 서열에 동등하게 혼성화되는 온도이다. 상기 표적 서열이 일반적으로 과다하게 존재하므로, T_m 에서 상기 탐침의 50%는 동등하게 점유된다. 일반적으로, 염격한 조건은 염 약 1.0M 소듐 이온 미만인 농도일 수 있으며, 일반적으로, pH 7.0 내지 8.3에서 약 0.01 내지 1.0M 소듐 이온(또는 다른 염들) 온도는 짧은 탐침 또는 프라이머에 대해 적어도 약 30°C이고,(예를 들면, 10 내지 50 뉴클레오티드) 긴 탐침 또는 프라이머에 대해서는 적어도 약 60°C이다. 염격한 조건은 포름아마이드(formamide)와 같은 불안정화 제제의 첨가로 얻을 수 있다. 상기 탐침(probes) 또는 프라이머(primers)는 특정한 크기일 수 있다. 상기 크기는 최소 10 개 뉴클레오티드(nucleotides), 최소 12 개 뉴클레오티드, 최소 15 개 뉴클레오티드, 최소 20 개 뉴클레오티드, 최소 25개 뉴클레오티드, 최소 30 개 뉴클레오티드 범위일 수 있고, 상기 탐침 및 프라이머는 5-10 개 뉴클레오티드, 10-15 개 뉴클레오티드, 15-20 개 뉴클레오티드, 20-25 개 뉴클레오티드 및 25-30 개 뉴클레오티드의 크기 범위일 수 있다.

[0343] 또는, 변역 생산물(즉 단백질)은 본 발명의 진단을 위해 탐지될 수 있다. 예를 들면, TMEM22 단백질(서열 번호: 92)은 결정될 수 있다. 변역 생산물로서 단백질의 양을 결정하는 방법은 상기 단백질을 인식하는 특이적 항체를 사용한 면역분석 방법을 포함한다. 상기 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 또한, 그 단편 또는 변형된 항체가 TMEM22 단백질에 결합하는 능력을 유지하는 한, 항체의 어떤 단편 또는 변형(예를 들어, 키메라 항체, scFv, Fab, F(ab')2, Fv, 등등)은 탐지를 위해 쓰일 수 있다. 단백질의 탐지를 위해 상기 유형의 항체를 준비하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 방법은 본 발명에서 이러한 항체 및 그들의 등가물을 준비하는 것에 적용될 수 있다.

[0344] TMEM22 유전자 발현 수준을 탐지하기 위한 다른 방법은 그것의 변역 산물에 기초하기 때문에, 염색의 강도는 TMEM22 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직학적 분석을 통해 관측될 수 있다. 즉, 상기 측정에서, 강한 염색은 증가된 단백질/수준의 존재, 동시에, TMEM22 유전자의 높은 발현수준을 나타낸다.

[0345] 만약 예를 들어 10%, 25%, 또는 50%; 또는 1.1배 이상, 1.5배 이상, 2.0배 이상, 5.0배 이상, 10.0배 이상 또는 그 이상과 같이 상응하는 표적 유전자의 대조군 수준(예를 들면 정상 세포내 수준) 이상이면, 표적 유전자, 예를 들면, 암세포에서 TMEM22 유전자를 포함하는 발현 수준은 증가되는 것으로 결정될 수 있다.

[0346] 질환 상태(암성 또는 비암성)라고 알려진 개체/개체(들)로부터 수거되고 저장된 시료를 사용하여 암세포와 동일한 시간에 대조군 수준은 결정될 수 있다. 또한, 치료될 암을 갖는 기관의 비-암성 부위로부터 수득된 정상 세포는 정상 대조군으로서 사용할 수 있다. 또는 이전에 수집되고 저장된 시료를 사용함으로써 상기 암세포와 동시에 확인될 수 있다. 또는, 상기 대조군 수준은 이전에 질환 상태에 있다고 알려진 생물학적 시료에서 확인된 TMEM22 유전자의 발현 수준을 분석함으로써 얻어진 상기 결과를 기반으로 하는 통계학적인 방법으로 확인될 수 있다. 또한, 이전에 시험된 세포의 발현 패턴 데이터베이스로부터 대조군 수준은 유래될 수 있다. 또한, 본 발명의 측면에 따르면, 생물학적 시료 안의 TMEM22 유전자의 발현 수준은 대조군 수준과 복수로 비교될 수 있으며, 이는 복수의 참조 시료로부터 결정될 수 있다. 생물학적 시료과 유사한 조직 종류로부터 유래된 참조 시료로부터 대조군을 결정하는 것이 바람직하다. 또한, 질환 상태로 알려져 있는 군의 TMEM22 유전자의 발현 수준의 기준치를 이용하는 것이 바람직하다. 기준치는 당업계에 알려진 어떤 방법에 의해 얻을 수 있다. 예를 들면, 평균 $+/ - 2$ S.D. 또는 평균 $+/ - 3$ S.D.의 범위가 기준치로 사용될 수 있다.

[0347] 본 발명의 맥락에서, 암이 없는(non-cancerous)것으로 알려진 생물 시료로부터 결정된 대조군 수준은 “정상 대조군 수준(normal control level)”으로 나타낸다. 한편, 만약, 상기 대조군 수준이 암 생물 시료로부터 결정될 경우, 이것은 “암 대조군 수준(cancerous control level)”으로 나타낸다. TMEM22 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 수준에 비해 증가되었을 때, 또는 암 대조군 수준에 유사/동등할 때, 개체는 치료될 암을 갖는 것으로 진단될 수 있다.

[0348] 또한, 본 발명은 (i) 치료될 암을 가질 것으로 의심되는 개체를 진단, 및/또는 (ii) 암을 치료하기 위한 개체를 선택하는 방법을 제공하고, 그 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0349] (a) 치료될 암을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득된 암 세포 또는 조직에서 TMEM22의 발현 수준을 결정하는 단계;

[0350] (b) TMEM22의 발현 수준을 정상 대조군 수준과 비교하는 단계;

[0351] (c) 만약 TMEM22의 발현 수준이 정상 대조군 수준과 비교하여 증가되었다면, 개체가 치료될 암을 갖는 것으로

진단하는 단계; 및

[0352] (d) 단계(c)에서 개체가 치료될 암을 갖는 것으로 진단되었다면, 암 치료를 위한 개체를 선택하는 단계.

[0353] 또는, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0354] (a) 치료될 암을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득한 암 세포 또는 조직에서 TMEM22의 발현 수준을 결정하는 단계;

[0355] (b) TMEM22의 발현 수준을 암 대조군 수준(cancerous control level)과 비교하는 단계;

[0356] (c) 만약 TMEM22의 수준이 암 대조군 수준과 비교하거나 또는 동등하다면, 개체가 치료될 암을 갖는 것으로 진단하는 단계; 및

[0357] (d) 단계(c)에서 개체가 치료될 암을 갖는 것으로 진단되었다면, 암 치료를 위한 개체를 선택하는 단계.

[0358] 본 발명은 본 발명의 TMEM22 폴리펩티드로 치료될 수 있는 암으로 고통받는 개체를 결정하기 위한 키트(kit)를 제공하고, 이것은 암의 진단을 검사하거나 및/또는 암 치료법, 특히 암 면역 치료법의 효율성을 모니터하기 위하여 유용할 수 있다. 진단 또는 결정될 수 있는 적절한 암의 예는 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 텁프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 키트는 바람직하게는 개체-유래 암 세포에서 TMEM22 유전자의 발현을 탐지하기 위한 최소한 하나의 시약을 포함하고, 상기 시약은 하기 중에서 선택될 수 있다:

[0359] (a) TMEM22 유전자의 mRNA를 탐지하기 위한 시약;

[0360] (b) TMEM22 단백질을 탐지하기 위한 시약; 및

[0361] (c) TMEM22 단백질의 생물학적 활성을 탐지하기 위한 시약.

[0362] TMEM22의 mRNA를 탐지하기 위한 적절한 시약의 예는 TMEM22 mRNA에 특이적으로 결합하거나 또는 TMEM22 mRNA를 확인하는, 예를 들면 TMEM22 mRNA의 부분에 대한 상보적 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드와 같은 핵산을 포함한다. 이러한 유형의 올리고뉴클레오티드는 TMEM22 mRNA에 특이적인 프라이머 및 탐침으로 증폭될 수 있다. 이러한 유형의 올리고뉴클레오티드는 당업계에 잘 알려진 방법에 기초하여 준비될 수 있다. 만약 필요하다면, TMEM22 mRNA를 탐지하기 위한 시약은 고체 매트릭스에 고정화될 수 있다. 또한, TMEM22 mRNA를 탐지하기 위한 하나 이상의 시약은 키트에 포함될 수 있다.

[0363] 다른 한편으로는, TMEM22 단백질을 탐지하기 위한 적절한 시약의 예는 TMEM22 단백질에 대한 항체를 포함한다. 상기 항체는 단일클론(monoclonal) 또는 다중클론(polygonal)일 수 있다. 또한 그 단편 또는 변형된 항체가 TMEM22 단백질에 결합하는 능력을 유지하는 한, 상기 항체의 어떤 단편 또는 변형 [예를 들어, 키메라 항체, scFv, Fab, F(ab')2, Fv 등]은 시약으로 사용될 수 있다. 단백질 탐지를 위한 이러한 유형의 항체를 준비하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 방법은 이러한 항체 및 그것의 등가물을 준비하는 방법도 본 발명에서 적용될 수 있다. 또한, 항체는 직접적인 연결 또는 간접적인 표지 기술을 통해 신호 발생 분자로 표지될 수 있다. 표지 및 항체 표지에 대한 방법 및 그들의 표적으로 항체의 결합을 탐지하는 것은 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 표지 및 방법은 본 발명에 적용될 수 있다. 또한, TMEM22 단백질을 탐지하기 위한 하나 이상의 시약은 키트 안에 포함될 수 있다.

[0364] 키트는 상기 언급한 시약의 하나 이상을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 고체 매트릭스 및 TMEM22 유전자에 대한 탐침에 결합하는 시약 또는 TMEM22 웨티드에 대한 항체, 배지 및 배양하는 세포를 위한 용기, 양성 및 음성 대조군 시약, 및 TMEM22 웨티드에 대한 항체를 탐지하기 위한 2차 항체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 암이 없거나 또는 암을 겪고 있는 개체(이에 관계없이)로부터 얻어진 조직 시료는 유용한 대조 시약으로 제공할 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 바람직한 상업적 및 사용자의 관점으로부터, 버퍼, 회색액, 필터, 바늘(needle), 주사기 및 사용설명서(예를 들어, 문서, 테이프, CD-ROM)를 포함하는 다른 물질을 포함한다. 적절한 용기는 병, 바이알(vials) 및 테스트 투브(test tube)를 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 만들어졌다.

[0365] 어떤 실시예에서, TMEM22 mRNA에 대한 탐침이 시약일 때, 상기 시약은 탐지 부위가 적어도 한 개로 구성되는 다공성 스트립과 같은 고체 매트릭스에 고정화될 수 있다. 다공성 스트립의 측정 또는 탐지는 각각의 구성하는 핵산(탐침)부위의 많은 수를 포함할 수 있다. 시험 스트립은 또한 음성 및/또는 양성 대조군에 대한 부위를 포함할 수 있다. 또는, 대조군 부위는 시험 스트립으로부터 분리된 스트립에 위치할 수 있다. 선택적으로 다른

탐지 부위는 고정화된 핵산의 다른 양, 즉, 첫번째 탐지 부위의 높은 양 및 다음 부위 안의 적은 양을 포함할 수 있다. 시험 시료를 더했을 때, 탐지가능한 신호를 제시하는 부위의 수는 시료 안에 존재하는 TMEM22 mRNA의 양의 정량적 지표를 제공한다. 상기 탐지 부위는 어떠한 적절하게 탐지가능한 모양으로 구성될 수 있으며, 일반적으로 시험 스트립의 바 또는 도트 스패닝(dot spanning) 상기 너비 안에 있다.

[0366] 또는 본 발명의 키트는 양성 대조군 시료 또는 TMEM22 표준 시료를 포함할 수 있다. 본 발명의 양성 대조군 시료는 TMEM22 양성 시료를 수거하고 그들의 TMEM22 수준을 검사함으로써 준비될 수 있다. 또는, 양성 시료 또는 TMEM22 시료를 형성하기 위해, 정제된 TMEM22 단백질 또는 폴리뉴클레오티드를 TMEM22를 발현하지 않는 세포에 첨가할 수 있다. 본 발명에서, 정제된 TMEM22는 재조합 단백질일 수 있다. 양성 대조군 시료의 TMEM22 수준은, 예를 들면 판정 기준치(cut-off) 값 이상이다.

[0367] 또한 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 항원 또는 그것의 단편을 특이적으로 인지할 수 있는 단백질 또는 그것의 단편을 포함하는 진단용 키트를 제공한다.

[0368] 여기서 고려되는 본 발명의 단백질의 부분 펩티드(partial peptide) 예는 본 발명 단백질의 아미노산 서열에서 최소한 8개, 바람직하게는 15개, 보다 바람직하게는 20개의 연속적인 아미노산으로 구성된 폴리펩티드를 포함한다. 암은 시료(예를 들면, 혈액, 조직)에서 본 발명의 펩티드(폴리펩티드) 또는 단백질을 사용하여 항체를 탐지함으로써 진단될 수 있다. 본 발명의 단백질 및 펩티드를 제조하는 방법은 상기에 기술되어 있다.

[0369] 암을 진단하기 위한 방법은 항-TMEM22 항체의 양 및 상기 기술된 것과 같은 상응하는 대조군 시료에서의 양 사이의 차이를 결정함으로써 수행될 수 있다. 개체의 세포 또는 조직이 유전자의 발현 생산물(TMEN22)에 대한 항체를 포함하고, 항-TMEM22 항체의 양이 정상 대조군에서의 것과 비교하여 판정 기준치(cut-off) 이상으로 결정되면, 그 개체는 암을 앓고 있는 것으로 추정된다.

[0370] 한 실시예에서, 본 발명의 진단용 키트는 본 발명의 펩티드 및 그것에 결합하는 HLA 분자를 포함할 수 있다. 항원성 펩티드 및 HLA 분자를 사용하여 항원 특이적 CTL을 탐지하는 방법은 이미 수립되었다(예를 들면, Altman JD et al., Science. 1996. 274(5284): 94-6). 따라서, 본 발명의 펩티드 및 HLA 분자의 복합체는 종양 항원 특이적 CTL을 탐지하기 위한 탐지 방법에 적용될 수 있고, 그러므로 조기 탐지(earlier detection), 암의 재발 및/또는 전이가 가능하다. 또한, 이것은 본 발명의 펩티드를 유효 성분으로서 포함하는 약학물(pharmaceuticals)과 함께 적용할 수 있는 개체의 선택, 또는 약학물의 치료 효과의 검사에 적용될 수 있다.

[0371] 특히, 알려진 방법에 따르면(예를 들면 Altman JD et al., Science. 1996. 274(5284): 94-6 참조), 방사선 표지된 HLA 분자 및 본 발명의 펩티드의 테트라머와 같은 올리고머 복합체가 준비될 수 있다. 복합체를 사용하여, 예를 들면, 암으로 고통받는 것으로 의심되는 개체 유래 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocytes)에서 항원-펩티드 특이적 CTL을 정량함으로써 상기 진단이 수행될 수 있다.

[0372] 또한, 본 발명은 여기에서 기술된 펩티드 에피토프를 이용함으로서 개체의 면역 반응을 평가하기 위한 방법 또는 진단제를 제공한다. 어떤 실시예에서, 여기서 기술된 HLA A-24 제한된 펩티드는 개체에서 면역 반응을 평가하거나 또는 예측하기 위한 시약으로서 사용된다. 평가되는 면역 반응은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 면역원(immunogen)을 면역능력이 있는 세포(immunocompetent cell)을 접촉시킴으로써 유도한다. 바람직한 실시예에서, 면역 반응을 평가하는 면역능력이 있는 세포(immunocompetent) 있는 세포는 말초 혈액(peripheral blood), 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocyte, PBL) 및 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 중에서 선택될 수 있다. 상기 면역능력이 있는 세포를 수집하거나 분리하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 어떤 실시예에서, 펩티드 에피토프와 결합하고 그것을 인지하는 항원 특이적 CTL의 형성을 야기하는 어떤 제제 또는 조성물은 시약(reagent)로 적용될 수 있다. 펩티드 시약은 면역원으로서 사용되지 않아도 된다. 상기 분석을 위해 사용된 검사 시스템은 테트라머(tetramer), 세포내 림포카인(lymphokine) 및 인터페론(interferon) 분비 검사법을 위한 염색, 또는 ELISPOT과 같은 상대적으로 최근의 기술 발달을 포함한다. 바람직한 실시예에서, 펩티드 시약과 접촉하는 면역기능이 있는 세포는 수지상 세포를 포함한 항원-제시 세포일 수 있다.

[0373] 예를 들면, 본 발명의 펩티드는 종양 세포 항원 또는 면역원에 노출되어 항원-특이적 CTL의 존재를 위해 말초 혈액 단핵구를 검사하기 위한 테트라머 염색 검사법에서 사용될 수 있다. HLA 테트라머 복합체는 말초 혈액 단핵구의 시료에서 직접적으로 항원 특이적 CTL을 가시화 하고(Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; 및 Altman et al., Science 174: 94-96. 1996 참조), 항원-특이적 CTL 집단의 빈도를 결정하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 펩티드를 사용한 테트라머 시약은 하기에 기술된 것과 같이 생산될 수 있다.

[0374]

HLA 분자에 결합하는 웨티드를 상응하는 HLA 중쇄 및 베타 2-마이크로글로불린의 존재하에 3분자 복합체를 생산하기 위하여 다시 접는다(refolding). 상기 복합체에서, 중쇄의 카복실 말단을 그 전에 단백질로 조작되었던 부위에서 바이오틴화한다. 그 후, 상기 3분자 복합체 및 스트렙토아비딘(streptoavidin)으로 구성된 테트라머를 형성하기 위하여 스트렙토아비딘을 복합체에 첨가한다. 형광으로 표지된 스트렙토아비딘으로써, 상기 테트라머는 항원-특이적 세포를 염색시키는데 사용될 수 있다. 그 후 상기 세포는, 예를 들면 세포 유통 분석(flow cytometry)에 의해서 동정된다. 상기 분석은 진단용 또는 예후의 목적을 위해 사용될 수 있다. 상기 과정에 의해 동정된 세포는 또한 치료적 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0375]

또한, 본 발명은 면역 회상 반응(immune recall response)을 평가하기 위해 본 발명의 웨티드를 포함하는 시약을 제공한다(Bertoni et al., J. Clin. Invest. 100: 503-513. 1997 및 Penna et al., J. Exp. Med. 174: 1565-1570. 1991 참조). 예를 들면, 치료될 암을 앓고 있는 개개인으로부터의 환자 PBMC 시료는 특이적 웨티드를 사용하여 항원-특이적 CTL의 존재를 위해 분석된다. 단핵구를 포함하는 혈액 시료는 PBMC를 배양하고 상기 세포를 본 발명의 웨티드로 자극시킴으로써 검사된다. 적절한 배양 기간 후에, 상기 증식된 세포 집단에서 예를 들면 CTL 활성을 분석한다.

[0376]

상기 웨티드는 백신의 효험(efficacy)를 평가하기 위해 시약으로서 사용될 수 있다. 면역원으로 예방접종된 환자로부터 수득한 PBMCs를, 예를 들면 상기 방법 중 하나를 사용하여 분석할 수 있다. 환자는 분석을 위해 선택되었다는 점에서, 환자는 HLA 종류가 있고, 대립 유전자 특이적 분자를 인지하는 웨티드 에피토프 시약이 있다. 백신의 면역원성은 PBMC 시료에서 에피토프-특이적 CTLs의 존재에 의해 나타날 수 있다. 본 발명의 웨티드는 당업계에서 잘 알려진 기술을 사용함으로써 항체를 만드는데 사용될 수 있고(예를 들면 Current Protocols IN IMMUNOLOGY. Wiley/Greene. NY; 및 Antibodies a laboratory Manual. Harlow and Lane. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989를 참조), 이것은 암을 진단하고 모니터하는 시약으로서 유용할 수 있다. 상기 항체는 HLA 분자의 맥락에서, 웨티드를 인지하는 것, 즉 웨티드-MHC 복합체에 결합하는 항체일 수도 있다.

[0377]

본 발명의 웨티드 및 조성물은 많은 첨가적 용도를 갖고, 그 일부는 여기서 기술된다. 예를 들면, 본 발명은 TMEM22 면역원성 폴리웨티드의 발현에 의해 특징화되는 질환을 진단하고 탐지하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 생물학적 시료에서 TMEM22 HLA 결합 웨티드, 또는 TMEM22 HLA 결합 웨티드 및 HLA 종류 I 분자의 복합체의 발현을 결정하는 것과 관련이 있다. 웨티드 또는 웨티드 및 HLA 종류 I 분자의 복합체의 발현은 상기 웨티드 또는 복합체의 결합 파트너로 검사함으로써 결정되거나 탐지될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 웨티드 또는 복합체를 위한 결합 파트너는 웨티드에 특이적으로 결합하고 인지하는 항체이다. 생물학적 시료, 예를 들면 종양 조직검사(biopsy)에서 TMEM22의 발현은 TMEM22 프라이머를 사용한 일반적인 PCR 증폭 프로토콜에 의하여 검사될 수 있다. 종양 발현의 예는 여기서 나타나고 나아가 TMEM22에 대한 예시적인 조건 및 프라이머의 공개는 WO2003/27322에서 발견될 수 있다.

[0378]

바람직하게, 상기 진단 방법은 생물학적 시료에서 TMEM22 결합 웨티드의 존재를 탐지하기 위하여 TMEM22 HLA 결합 웨티드를 위한 특이적 물질과 함께 개체로부터 분리된 생물학적 시료를 접촉시키는 것과 관련이 있다. 여기서 사용된 것과 같이, "접촉"은 물질 및 생물학적 시료에 존재하는 TMEM22 HLA 결합 웨티드 사이에서 특이적 상호결합이 생성될 수 있도록 시약과 충분히 근접한 곳과 예를 들면 농축, 온도, 시간, 이온화 강도와 같은 적절한 조건에 생물학적 시료를 놓아두는 것을 의미한다. 일반적으로, 분자 및 상기 분자의 생물학적 시료에 있는 인지체(cognate)(예를 들면, 단백질 및 상기 단백질 인지체 수용체, 항체 및 상기 항체 인지체 단백질, 핵산 및 상기 핵산에 상보적 서열 인지체) 사이의 특이적 상호결합을 촉진하기 위해 물질을 생물학적 시료과 접촉시키는 조건은 당업자에게 자명하다. 분자 및 그것의 인지체 사이의 특이적 상호결합을 촉진시키기 위한 예시적인 조건은 Low et al.에 의해 발행된 U.S. Patent No. 5,108,921에 기술되어 있다.

[0379]

본 발명의 진단 방법은 생체 내 및 시험관 내 중 하나 또는 그 모두에서 수행될 수 있다. 따라서, 생물학적 시료는 본 발명에서 생체내 또는 시험관 내에 위치할 수 있다. 예를 들면, 생물학적 시료는 생체내에서 조직일 수 있고, TMEM22 면역원성 폴리웨티드에 특이적인 물질은 그 조직에서 상기 분자의 존재를 탐지하기 위해 사용될 수 있다. 또는, 생물학적 시료는 시험관내에서 수집되거나 또는 분리될 수 있다(예를 들면, 혈액 시료, 종양 조직검사, 조직 추출물). 특별히 선호되는 예에서, 생물학적 시료는 세포 포함 시료일 수 있고, 보다 바람직하게는 진단되거나 치료되는 개체로부터 수집된 종양 세포를 포함하는 시료일 수 있다.

[0380]

또는, 상기 진단은 형광으로 표지된 HLA 다중결합 복합체를 사용한 염색을 통해 항원-특이적 T 세포의 직접적인 정량을 허용하는 방법에 의해 수행될 수 있다(예를 들면, Altman. J. D. et al., 1996, Science 274: 94; Altman. J. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330;). 세포내 림포카인 염색 및 인터페론-감마

(interferon-gamma) 분비 검사법 또는 ELISPOT이 제공된다. 테트라머 염색, 세포내 립포카인 염색 및 ELISPOT 검사법 모두는 일반적인 검사에 비해 최소한 10배 이상의 민감하다(Murali-Krishna, K. et al., 1998, *Immunity* 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, *J. Exp. Med.* 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, *Curr. Biol.* 8: 314;). 펜타머(pentamer)(예를 들면 US 2004-209295A), 텍스트라머(dextramer)(예를 들면, WO 02/072631), 및 스트렙타머[예를 들면 *Nature Medicine* 6. 631-637(2002)] 또한 사용될 수 있다.

[0381] 예를 들면, 어떤 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 웨티드 중 최소 하나의 TMEM22가 투여된 개체의 면역학적 반응을 진단하거나 평가하는, 하기의 단계를 포함하는 방법 제공한다:

[0382] (a) 면역원(immunogen)에 대해 특이적 CTL의 유도의 적합한 조건하에 면역원과 면역능력이 있는 세포를 접촉하는 단계;

[0383] (b) 단계(a)에서 유도된 CTL 유도 수준을 탐지하거나 결정하는 단계; 및

[0384] (c) CTL 유도 수준이 있는 개체의 면역반응을 연관시키는(correlating) 단계.

[0385] 본 발명에서, 상기 면역원은 서열번호 1 내지 16, 18 내지 32 및 34 내지 90의 아미노산 서열, 이러한 아미노산 서열을 가지는 웨티드, 및 1, 2 또는 그 이상의 아미노산 치환으로 변형된 이러한 아미노산 서열을 가지는 웨티드 중에서 선택되는 TMEM22 웨티드 중 최소 하나이다. 그 동안에 면역원 특이적 CTL의 유도 적합 조건은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 면역능력이 있는 세포는 면역원 특이적 CTL을 유도하기 위해 면역원의 존재하에 배양될 수 있다. 면역원 특이적 CTL을 유도하기 위해, 어떤 자극 인자(stimulating factors)가 상기 세포 배양에 첨가될 수 있다. 예를 들면, IL-2가 CTL 유도를 위한 바람직한 자극 인자이다.

[0386] 어떤 실시예에서, 웨티드 암 치료로 치료되는 개체의 면역학적 반응을 모니터하거나 평가하는 단계는 치료 전, 동안 및/또는 후에 수행될 수 있다. 일반적으로, 암 치료의 프로토콜(protocol) 동안, 면역성 웨티드는 반복적으로 치료되는 개체에 투여된다. 예를 들면, 면역성 웨티드는 3-10 주 동안 매 주 투여될 수 있다. 따라서, 개체의 면역학적 반응은 암 치료 프로토콜 동안 평가되거나 모니터될 수 있다. 또는 암치료에 대한 면역학적 반응의 평가 또는 모니터링(monitoring)의 단계는 치료 프로토콜의 완료일 수 있다.

[0387] 본 발명에 따라, 대조군에 비해 면역원 특이적 CTL의 증가된 유도는 투여된 면역원에 대한 면역학적으로 평가되거나 진단된 개체를 나타낸다. 상기 면역학적 반응을 평가하기 위한 적합한 대조군은, 예를들면, 면역능력이 있는 세포가 웨티드 없이 또는 어떤 TMEM22 웨티드(예를 들면, 무작위 아미노산 서열) 외에 아미노산 서열을 가지는 대조군 웨티드와 접촉되었을 때 CTL 유도 수준을 포함한다.

[0388] 바람직한 실시예에서, 개체에 투여된 각 면역원 사이의 면역 반응을 비교함으로써 상기 개체의 면역학적 반응은 서열 특이적 면에서 평가된다. 특히, 일부 유형의 TMEM22 웨티드의 혼합물이 개체에 투여될지라도, 면역 반응은 상기 웨티드에 따라 다를 수 있다. 그런 경우에는 각 웨티드 사이의 면역 반응의 비교에 의해 더 높은 반응을 보이는 개체에 대한 웨티드가 동정될 수 있다.

XI. 항체

[0390] 본 발명은 본 발명의 웨티드에 결합하는 항체를 제공한다. 바람직한 항체는 특이적으로 본 발명의 웨티드와 결합하고 본 발명의 웨티드가 아닌 것에 결합하지 않을 것이다(또는 약하게 결합). 또는, 항체는 본 발명의 웨티드 뿐만 아니라 그것의 상동체와 결합한다. 본 발명의 웨티드에 대한 항체는 암 진단 또는 예후 검사법, 이미지화 방법론(imaging methodology)에서 사용될 수 있다. 유사하게, 상기 항체는 암 환자에서 발현되거나 또는 과발현되는 정도의 다른 암을 치료, 진단 및/또는 예후에서 사용될 수 있다. 또한, 세포 내 발현되는 항체(예를 들면, 단일 사슬 항체)는 TMEM22의 발현이 관련된 암, 예를 들면 급성골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia, AML), 방광암(bladder cancer), 담관세포암(cholangiocellular carcinoma, CCC), 식도암(esophagus cancer), 림프종(lymphoma), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal cell carcinoma, RCC) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0391] 또한, 본 발명은 TMEM22 단백질(서열 번호: 92) 또는 서열 번호 1 내지 16, 18 내지 32 및 34 내지 90 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리웨티드를 포함하는 그것의 단편의 탐지 및/또는 정량을 위한 다양한 면역학적 검사법을 제공한다. 상기 검사법은 TMEM22 단백질 또는 그것의 단편과 결합하고 인지할 수 있는 하나 또는 그 이상의 항-TMEM22 항체를 적절하게 포함할 수 있다.

- [0392] 본 발명에서, TMEM22 폴리펩티드와 항-TMEM22 항체의 결합은 바람직하게 서열 번호 1 내지 16, 18 내지 32 및 34 내지 90 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 인지한다. 항체의 결합 특이성은 억제 검사 (inhibition test)를 사용하여 확인될 수 있다. 즉, 서열 번호 1 내지 16, 18 내지 32 및 34 내지 90의 아미노산 서열 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 어떤 단편의 폴리펩티드의 존재하에서 분석될 항체 및 TMEM22 폴리펩티드 전장 사이의 결합이 억제될 때, 상기 항체는 그 단편에 특이적으로 결합하는 것을 보여준다. 본 발명에서, 상기 면역학적 검사법은 당업계에 잘 알려진 다양한 면역학적 검사법 종류 내에서 수행되고, 방사선면역검사법(radioimmunoassay), 면역-크로마토그래프 기술(immuno-chromatograph technique), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), ELIFA(enzyme-linked immunofluorescent assay), 및 그와 같은 것의 다양한 유형을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0393] 또한, 본 발명의 관련된 면역학적이지만 비항체 검사법은 T 세포 면역원성 검사법(억제성 또는 자극성)뿐만 아니라 MHC(major histocompatibility complex) 결합 검사법을 포함할 수 있다. 또한, TMEM22를 발현하는 암을 탐지할 수 있는 면역학적 이미지 방법은 본 발명에 의해 제공되고, 본 발명의 표지된 항체를 사용한 방사선 동위 원소 이미지 방법(radioscintigraphic imaging method)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 상기 검사법은 TMEM22를 발현하는 암, 예를 들면 급성골수성 백혈병, 방광암, 담관세포암, 식도암, 림프종, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 암의 탐지, 모니터, 및 예후에 임상적으로 유용하다.
- [0394] 본 발명은 본 발명의 웨პ티드와 결합하는 항체를 제공한다. 본 발명의 항체는 단일클론 또는 다중클론 항체와 같은 어떠한 형체에서도 사용될 수 있고, 또한 본 발명의 웨პ티드로 면역화된 동물, 예를 들면 토끼에 의해 수득된 항혈청을 포함하고, 모든 종류의 다중클론 및 단일클론 항체, 인간항체, 및 유전적 재조합에 의해 생성된 인간화된 항체를 포함한다.
- [0395] 항체를 얻기 위해 항원으로서 사용된 본 발명의 웨პ티드는 어떠한 동물의 종류에서도 유래될 수 있으나, 바람직하게는 인간, 마우스(mouse), 또는 랫(rat), 보다 바람직하게는 인간과 같은 포유류로부터 유래된 것이다. 인간-유래 웨პ티드는 여기서 공개된 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열로부터 수득될 수 있다.
- [0396] 본 발명에 따라, 면역원성 항원으로서 사용되는 상기 웨პ티드는 완전한 단백질일 수도 있고 상기 단백질의 부분적 웨პ티드일 수도 있다. 예를 들면, 부분적 웨პ티드는 본 발명 웨პ티드의 아미노 N 말단 또는 카복시(C) 말단 단편을 포함할 수 있다.
- [0397] 본 발명에서, 항체는 TMEM22 웨პ티드의 전장 또는 단편에 반응하는 단백질로 정의된다. 바람직한 실시예에서는, 본 발명의 항체는 서열 번호 1 내지 16, 18 내지 32 및 34 내지 90중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 TMEM22의 단편 웨პ티드를 인지할 수 있다. 올리고웨პ티드를 합성하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 합성 후에, 웨პ티드는 면역원으로서 사용되기 전에 선택적으로 정제될 수 있다. 본 발명에서, 올리고웨პ티드(예를 들면 9 또는 10mer)는 면역원성을 증진시키기 위해 담체와 결합되거나 연결될 수 있다. KLH(Keyhole-Limpet hemocyanin)은 담체로서 잘 알려져 있다. KLH와 웨პ티드를 결합시키는 방법도 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0398] 또는, 본 발명의 웨პ티드를 암호화하는 유전자 또는 그것의 단편은 알려진 발현 벡터로 삽입될 수 있고, 그 후 여기서 기술되는 것과 같이 숙주 세포에 형질도입시키는데 사용된다. 원하는 웨პ티드 또는 그것의 단편은 어떤 표준 방법에 의해 숙주 세포의 안 또는 밖으로부터 회복될 수 있고, 그 후에 항원으로서 사용될 수 있다. 또는, 웨პ티드를 발현하는 전체 세포 또는 그들의 용해물(lysate) 또는 화학적으로 합성된 웨პ티드가 항원으로서 사용될 수 있다.
- [0399] 모든 포유류 동물은 항원으로 면역화될 수 있지만, 세포 융합에 사용된 모 세포(parental cell)와 양립성 (compatibility)이 있는 것이 바람직하다. 일반적으로, 설치류(Rodentia), 토끼류(Lagomorpha) 또는 영장류 (Primates) 과(family)의 동물이 사용될 수 있다. 설치류의 동물은 예를 들면 마우스, 랫 및 햄스터(hamster)를 포함한다. 토끼류는 예를 들면 토끼(rabbit)을 포함한다. 영장류는 예를 들면 필리핀 원숭이(Macaca fascicularis), 붉은털 원숭이(rhesus monkey), 망토개코원숭이(sacred baboon) 및 침팬지와 같은 토끼목 [Catarrhini(늙은 세계 원숭이, old world monkey)]의 원숭이를 포함한다.
- [0400] 항원으로 동물을 면역화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 항원의 복강내(intraperitoneal) 주입 또는 피하(subcutaneous) 주입이 포유류의 면역화를 위한 표준 방법이다. 보다 구체적으로, 항원은 PBS(phosphate buffered saline), 생리적 살린(physiological saline) 등의 적절한 양에서 희석되거나 서스펜션될 수 있다. 바람직하다면, 상기 항원 서스펜션은 적절한 양의 프로인트 완전 보강제(Freund's complete adjuvant)와 같은 표준 보강제와 혼합되고, 유화액으로 만들어진 후 포유류 동물에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 그 후에 4

내지 21일마다 프로인트 완전 보강제의 적절한 양과 함께 혼합한 항체를 여러번 투여하는 것이다. 적절한 담체(carrier)도 면역화를 위해 사용될 수 있다. 상기와 같은 면역화 후, 혈청은 원하는 항체의 양의 증가를 위한 표준 방법에 의해 조사될 수 있다.

- [0401] 본 발명의 웨티드에 대한 다중 클론 항체는 혈청에서 바라는 항체의 증가를 위해 시험되는 면역화된 포유류의 혈액을 수거함으로써, 그리고 어떠한 보편적인 방법에 의해 혈액으로부터 혈청을 분리시킴으로써 준비될 수 있다. 다중클론 항체는 다중클론 항체를 포함하는 혈청을 포함할 뿐만 아니라 상기 다중클론 항체를 포함한 분획물을 혈청으로부터 분리할 수 있다. 면역글로불린(immunoglobulin) G 또는 M은 오직 본 발명의 웨티드를 인지하는 분획물로부터 예를 들면 본 발명의 웨티드와 연결된 친화성 컬럼을 사용하여, 그리고 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼을 사용하여 상기 분획물을 정제하는 것에 의해 준비될 수 있다.
- [0402] 단일클론 항체를 준비하기 위하여, 항원으로 면역화시킨 포유류로부터 면역세포를 수거하고, 그 면역세포에서 상기 기술된 것과 같이 혈청에서 바라는 항체의 증가된 수준을 검사하고, 세포 융합을 한다. 바람직하게, 세포 융합을 위해 사용되는 면역 세포는 비장으로부터 수득된다. 바람직한 상기 면역세포와 함께 융합되는 다른 모 세포는 포유류의 골수 세포(myeloma cell), 보다 바람직하게는 약물에 의해 융합된 세포의 선택을 위해 획득한 특성을 갖는 골수 세포를 포함한다.
- [0403] 상기 면역 세포 및 골수 세포는 알려진 방법, 예를 들면 Milstein et al.[Galfre and Milstein, Method Enzymol 73: 3-26(1981)]의 방법에 따라 융합될 수 있다.
- [0404] 상기 세포 융합에 의해 수득된 결과인 하이브리도마(hybridoma)는 HAT 배지[히포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)을 포함하는 배지]와 같은 표준 선택 배지에 그들을 배양함으로써 선택될 수 있다. 상기 세포 배양은 일반적으로 HAT 배지에서 몇 일 내지 몇 주동안 지속되는데, 이는 원하는 하이브리도마를 제외하고 모든 다른 세포(non-fused cell)을 사멸시키기 위해 충분한 시간이다. 그 후, 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 복제(clone)시키고 스크린하기 위해 표준 제한 희석(standard limiting dilution)을 수행한다.
- [0405] 하이브리도마를 제조하기 위해 비인간 동물을 항원으로 면역화시킨 상기 방법 뿐만 아니라, EB 바이러스에 의해 감염된 인간과 같은 인간 림프구는 웨티드, 웨티드를 발현하는 세포 또는 그들의 용해물을 사용하여 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 그 후, 상기 웨티드에 결합할 수 있는 원하는 인간 항체를 생산하는 하이브리도마를 생산하기 위해, 면역화된 림프구를 U266과 같은 무한으로 분열할 수 있는 인간 유래 골수 세포와 융합한다 (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Sho 63-17688).
- [0406] 그 후 상기 수득된 하이브리도마를 마우스(mouse)의 복강(abdominal cavity)로 이식하고 그 복수를 추출한다. 상기 수득한 단일클론 항체를, 예를 들면 암모늄 황산 침전, 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼, DEAE 이온 교환 크로마토그래피 또는 본 발명의 웨티드가 연결된 친화성 컬럼과 같은 방법에 의해 정제할 수 있다. 본 발명의 항체는 본 발명의 웨티드의 정제 및 탐지에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 본 발명의 웨티드의 작용제 및 길항제에 대한 후보로서 사용될 수도 있다.
- [0407] 또는, 항체를 생산하는 면역화된 림프구와 같은 면역 세포는 종양유전자(oncogene)에 의해 무한증식 (immortalization)될 수 있고 단일클론 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다.
- [0408] 그러므로 수득된 단일클론 항체는 유전자 조작 기술을 사용하여 재조합적으로 제조될 수 있다[예를 들면 MacMillan Publishers LTD 의해 영국에서 출간된 Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies(1990) 참조]. 예를 들면, 항체를 암호화하는 DNA는 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 면역화된 림프구와 같은 면역 세포로부터 클론될 수 있고, 적절한 벡터로 삽입될 수 있으며, 재조합 항체를 만들기 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 기술된 재조합 항체를 제공한다.
- [0409] 또한, 본 발명의 항체는 하나 또는 그 이상의 본 발명 웨티드와 결합하는 한 항체의 단편 또는 변형된 항체일 수 있다. 예를 들면, 상기 항체 단편은 Fab, F(ab')₂, Fv 또는 단일 쇄 Fc(scFv)일 수 있고, 여기서 H 및 L 사슬로부터의 Fv 단편은 적절한 링커(linker)에 의해 연결된다[Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83(1988)]. 보다 구체적으로, 항체 단편은 파페인(papain) 또는 펩신(pepsin)과 같은 효소와 함께 항체를 처리함으로써 생성될 수 있다. 또는, 상기 항체 단편을 암호화하는 유전자는 제조될 수 있고, 발현 벡터로 삽입될 수 있으며 적절한 숙주 세포내에서 발현될 수 있다[예를 들면, Co et al., J Immunol 152: 2968-76(1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515(1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63(1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121:

663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7(1991) 참조].

[0410] 항체는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG)과 같은 다양한 분자와 연결됨으로써 변형될 수 있다. 본 발명은 상기 변형된 항체를 제공한다. 상기 변형된 항체는 화학적으로 변형된 항체로부터 얻을 수 있다. 상기 변형 방법은 당업계에서 보편적이다.

[0411] 또는, 본 발명의 항체는 비인간 항체로부터 유래된 가변 부위(variable region) 및 인간 항체로부터 유래된 불변 부위(constant region) 사이의 키메라 항체로서, 또는 비인간 항체로부터 유래된 CDR(complementarity determining region), FR(framework region) 및 인간항체로부터 유래된 불변 부위를 포함하는 인간화된 항체로서 수득될 수 있다. 상기 항체는 알려진 기술에 따라 제조될 수 있다. 인간 항체의 상응하는 서열에 대한 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 치환함으로써 인간화(humanization)이 수행될 수 있다[예를 들면, Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988) 참조]. 따라서, 상기 인간화된 항체는 키메라 항체이고, 여기서 온전한 인간 가변 도메인 보다 상당히 적은 도메인은 비인간 종류로부터 그에 상응하는 서열에 의해 치환되었다.

[0412] 전체적으로 인간 프레임워크 및 불변 부위 뿐만 아니라 인간 가변 부위로 구성된 인간 항체 또한 사용될 수 있다. 상기 항체는 당업계에 알려진 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들면 시험관 내 방법(in vitro method)은 인간 항체 단편이 제시되는 박테리오파지의 재조합 라이브러리[예를 들면, Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381(1991)]의 사용과 관련이 있다. 유사하게, 인간 항체는 인간 면역글로불린 위치(loci)를 형질전환 동물, 예를 들면 내재성 면역 글로불린 유전자(endogenous immunoglobulin gene)이 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스로 도입시킴으로써 만들어질 수 있다. 상기 접근은 예를 들면 U.S. Patent Nos. 6,150,584, 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016에 기술되어 있다.

[0413] 상기와 같이 수득한 항체는 동종성(homogeneity)으로 정제될 수 있다. 예를 들면 항체의 분리 및 정제는 일반적인 단백질에서 사용되는 분리 및 정제 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들면, 적절하게 선택되고 혼합된 컬럼 크로마토그래피의 사용, 예를 들면 친화성 크로마토그래피, 여과, 울트라여과, 염-외 희석(salting-out dialysis), SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 등점적 전기영동(isoelectric focusing)에 의해 상기 항체는 분리(separation) 및 분리(isolation)될 수 있으나[Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)], 이에 한정되지는 않는다. 단백질 A 컬럼 및 단백질 G 컬럼은 친화성 컬럼으로서 사용될 수 있다. 사용되는 예시적인 단백질 A 컬럼은 예를 들면 Hyper D, POROS 및 Sepharose F.F.(Pharmacia)를 포함한다.

[0414] 친화성을 제외한 크로마토그래피의 예는, 예를 들면 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography), 소수성 크로마토그래피(hydrophobic chromatography), 겔 여과(gel filtration), 역상 크로마토그래피(reverse-phase chromatography), 흡착 크로마토그래피(adsorption chromatography) 및 그와 같은 것[Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996)]을 포함한다. HPLC 및 FPLC와 같은 크로마토그래피 절차는 액체상 크로마토그래피(liquid-phase chromatography)에 의해 수행될 수 있다.

[0415] 예를 들면, 흡수도의 측정, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), EIA(enzyme immunoassay), RIA(radioimmunoassay) 및/또는 면역형광이 본 발명 항체의 항원 결합 활성(antigen binding activity)을 측정하기 위해 사용될 수 있다. ELISA에서, 본 발명의 항체를 플레이트에 고정시키고, 본 발명의 웨티드를 플레이트에 첨가한 후, 항체를 생산하는 세포의 배양 상층액 또는 정제된 항체와 같은 원하는 항체를 포함하는 시료를 첨가한다. 그 후, 1차 항체를 인지하고 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase)와 같은 효소로 표지된 2차 항체를 적용하고, 상기 플레이트를 배양한다. 그 다음, 씻어준 후, p-니트로페닐 포스페이트(p-nitrophenyl phosphate)와 같은 효소 기질을 플레이트에 적용시키고, 상기 시료의 항원 결합 활성을 평가하기 위하여 그 흡수도를 측정한다. C 말단 또는 N 말단 단편과 같은 웨티드의 단편은 항체의 결합 활성을 평가하기 위해 항원으로서 사용될 수 있다. 비아코어[BIACore(Pharmacia)]는 본 발명에 따른 항체의 활성을 평가하기 위하여 사용될 수 있다.

[0416] 상기 방법은 본 발명의 항체를 본 발명의 웨티드를 포함한다고 가정되는 시료에 노출시킴으로써 본 발명의 웨티드를 탐지 또는 측정하게 해주고 상기 항체 및 상기 웨티드에 의해 형성된 면역 복합체를 탐지 또는 측정하게 해준다.

[0417] 본 발명에 따른 웨티드를 탐지 또는 측정하는 방법은 특이적으로 웨티드를 탐지 또는 특정할 수 있기 때문에,

이 방법은 상기 펩티드를 사용하는 다양한 실험에서 유용할 것이다.

[0418] XII. 벡터 및 숙주 세포

[0419] 본 발명은 또한 본 발명의 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 도입시키는 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 벡터는 뉴클레오티드, 특히 숙주세포에서 본 발명의 DNA를 보유하기에 유용할 수 있고, 본 발명의 펩티드를 발현시키기에 또는 유전자 치료를 위한 본 발명의 뉴클레오티드를 투여하기에 유용할 수 있다.

[0420] *E.coli*가 숙주 세포이고 벡터가 *E.coli* 내에서(예를 들면, JM109, DH5 alpha, HB101 또는 XL1Blue) 대량으로 증폭되고 생산될 때, 상기 벡터는 *E.coli* 내에서 증폭되기 위해 "ori" 및 형질전환된 *E.coli*를 선별하기 위한 유전자 마커[예를 들면 암피실린(ampicillin), 테트라사이클린(tetracycline), 카나마이신(kanamycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 또는 그와 같은 것과 같은 약물에 의해 선별되는 약물 내성 유전자]을 가져야 한다. 예를 들면 M13-시리즈 벡터, pUC-시리즈 벡터, pBR322, pBluescript, pCR-Script 등이 사용될 수 있다. 또한, pGEM-T, pDIRECT 및 pT7 또한 상기 기술된 cDNA 뿐만 아니라 벡터를 서브클로닝하고 추출하기 위해 사용될 수 있다. 벡터가 본 발명의 단백질을 생산하기 위해 사용될 때, 발현 벡터는 특히 유용하다.

[0421] 예를 들면, *E.coli*에서 발현되는 발현 벡터는 *E.coli* 내에서 증폭되기 위하여 상기 특징을 가져야 한다. JM109, DH5 alpha, HB101 또는 XL1 Blue와 같은 *E.coli*를 숙주 세포로서 사용할 때, 벡터는 *E.coli*내에서 원하는 유전자를 효율적으로 발현시키는 프로모터, 예를 들면 lacZ 프로모터[Ward et al., Nature 341: 544-6(1989); FASEB J 6: 2422-7(1992)], araB 프로모터[Better et al., Science 240: 1041-3(1988)], T7 프로모터 또는 그와 같은 것을 가져야 한다. 상기 면에서, 예를 들면 pGEX-5X-1(Pharmacia), "QIAexpress system"(Qiagen), pEGFP 및 pET(이 경우에는, 숙주 세포는 우선적으로 T7 RNA 중합효소를 발현하는 BL21이다)가 상기 벡터를 대신 사용될 수 있다. 또한, 상기 벡터는 펩티드 분비를 위한 신호 서열(signal sequence)을 포함할 수 있다. *E. coli*의 주변 세포질(periplasm)로 분비되도록 펩티드에 지시하는 신호 서열의 예는 pelB 신호 서열[Lei et al., J Bacteriol 169: 4379(1987)]이 있다. 벡터를 표적 숙주 세포로 도입시키기 위한 수단은 예를 들면 칼슘 클로라이드(calcium chloride) 방법 및 전기침공(electroporation) 방법을 포함한다.

[0422] *E.coli* 뿐만 아니라, 예를 들면, 포유류로부터 유래된 발현 벡터[예를 들면, pcDNA3(Invitrogen) 및 pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17): 5322(1990)), pEF, pCDM8], 곤충 세포로부터 유래된 발현 벡터[예를 들면, "Bac-to-BAC baculovirus expression system"(GIBCO BRL), pBacPAK8], 식물로부터 유래된 발현 벡터[예를 들면, pMH1, pMH2], 동물 바이러스로부터 유래된 발현 벡터(예를 들면, pHSV, pMV, pAdExLcw), 레트로바이러스로부터 유래된 발현 벡터(예를 들면, pZIpneo), 효모로부터 유래된 발현 벡터[예를 들면, "Pichia Expression Kit"(Invitrogen), pNV11, SP-Q01] 및 바실러스 섭틸릭스(*Bacillus subtilis*)로부터 유래된 발현 벡터(예를 들면, pPL608, pKTH50)가 본 발명의 폴리펩티드를 생산하기 위해 사용될 수 있다.

[0423] CHO, COS 또는 NIH3T3와 같은 동물 세포에서 벡터를 발현시키기 위해서, 벡터는 상기 세포 내에서 발현에 필요한 프로모터, 예를 들면 SV40 프로모터[Mulligan et al., Nature 277: 108(1979)], MMLV-LTR 프로모터, EF1 알파 프로모터[Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322(1990)], CMV 프로모터 및 그와 같은 것을 가져야 하고, 바람직하게 형질전환체를 선별하기 위한 유전자 마커[예를 들면, 약물(neomycin, G418)에 의해 선별되는 약물 내성 유전자]를 가져야 한다. 상기 특징을 가진 알려진 벡터의 예는, 예를 들면 pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV 및 pOP13를 포함한다.

[0424] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 그리고 당업자가 동일한 것을 만들고 이용하는 것을 돋기 위해 제시한다. 실시예는 본 발명의 범위를 어떠한 방법으로도 제한하는 의도가 아니다.

[0425] 실시예

[0426] 재료 및 방법

[0427] 세포주

[0428] HLA-A*2402-양성 B-림프아형 세포주(lymphoblastoid cell line)인 TISI는 IHWG Cell and Gene Bank(Seattle, WA)로부터 구입하였다. HLA-A*0201- 양성 B-림프아형 세포주(lymphoblastoid cell line)인 T2 및 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주(African green monkey kidney cell line)인 COS7는 ATCC로부터 구입하였다.

[0429] TMEM22 유래 펩티드의 후보 선별

[0430] HLA-A*2402 분자에 결합하는 TMEM22 유래 9-머(9-mer) 및 10-머(10-mer) 펩티드를 결합 예측 소프트웨어인 “BIMAS” (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)(Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81)) 및 “NetMHC 3.0” (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/)(Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004))를 이용하여 예측하였다. 또한, HLA-A*0201 분자에 결합하는 TMEM22 유래 9-머(9-mer) 및 10-머(10-mer) 펩티드를 “NetMHC3.0”를 이용하여 예측하였다. 이러한 펩티드들은 표준 고체상 합성 방법(standard solid phase synthesis method)에 따라 Bio Synthesis Inc.(Lewisville, Texas)로부터 합성되었고, 역상 고속 액체 크로마토그래피(reversed phase high performance liquid chromatography, HPLC)로 정제되었다. 상기 펩티드의 순도(>90%) 및 확인(identity)은 각각 분석용 HPLC 및 질량분석(mass spectrometry analysis)을 통하여 각각 측정하였다. 펩티드를 디메틸설폐시드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 20mg/ml로 용해하고, -80°C에서 저장하였다.

[0431] 시험관 내에서의 CTL 유도

[0432] 단핵구 유래 수지상세포(dendritic cell, DC)를 항원-제시 세포(antigen-presenting cell, APC)로 사용하여 인간 백혈구 항체(human leukocyte antigen, HLA)에 제시된 펩티드에 대한 CTL 반응을 유도하였다. DC를 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)에 기술된 것과 같이 생산하였다. 특히, 정상 지원자(HLA-A*2402 양성 또는 HLA-A*0201 양성)로부터 피콜-플라크(Ficoll-Plaque; Pharmacia) 용액에 의해 분리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMCs)를 플라스틱 조직 배양 접시(Becton Dickinson)에 부착하는 것을 이용하여 분리하여 그들을 단핵구 분획물로 수득하였다. 단핵구가 많은 집단을 2% 열-불활성화 자신의 혈청(heat-inactivated autologous serum; AS)를 포함한 AIM-V 배지(Invitrogen)에 과립대식세포집락자극인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF, R&D System)의 1000U/ml 및 IL(interleukin)-4(R&D System)의 1000U/ml의 존재하에 배양하였다. 배양 7일 후, 3시간 동안 37°C에서 AIM-V 배지안에서, 베타 2-마이크로글로불린(beta 2-microglobulin) 3μg/ml의 존재하에서 사이토카인-유도 DCs에 합성된 펩티드 각각의 20μg/ml를 부과하였다.

[0433] 생성된 세포는 그들의 표면에 CD80, CD83, CD86 및 HLA 종류 II와 같은 DC-관련 분자를 발현하는 것으로 나타났다(데이터는 보여지지 않음). 상기 펩티드-부과 DC는 X-방사선 처리(20Gy)에 의하여 비활성화되었고 자신의 CD8+ T 세포와 1:20 비율로 혼합되어, CD8 양성 분리 키트(CD8 positive Isolation Kit; Dynal)를 사용한 양성 선택에 의해 수득되었다. 상기 배양은 48-웰 플레이트(Corning)에서 수행되었고; 각 웰은 AIM-V/2% AS 배지 0.5ml에 1.5×10^4 펩티드-부과 DC, 3×10^5 CD8+ T 세포 및 IL-7(R&D system)의 10ng/ml을 포함하였다. 3일 후, 상기 배양에 IL-2(CHIRON)을 첨가하여 최종 농도가 20U/ml이 되도록 하였다. 7일 째 및 14일 째, 상기 T 세포를 나아가 자신의 펩티드-부과 DC로 자극시켰다.

[0434] 상기 DCs를 상기 기술된 동일한 방법으로 각 시간에서 준비되었다. 21일 째 펩티드 자극 3번 째 후 CTL은 펩티드-부가된(pulsed) TISI 세포(A24) 또는 T2 세포(A2)에 대하여 검사되었다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0435] CTL 증식 과정

[0436] Riddell et al.에 의해 기술된 것과 유사한 방법을 사용하여 CTL을 배양하에 증식시켰다(Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23). 40ng/ml의 항 CD3 단일 클론 항체(Pharmingen)의 존재 하에서, 미토마이신 C(mitomycin C)에 의해 불활성화된 두 종류의 인간 B 텁프아세포주와 함께 총 5×10^4 CTL을 AIM-V/5% AS 배지의 25ml에 부유하였다. 배양 시작한 뒤 1일 후, IL-2의 120IU/ml를 상기 배양에 첨가하였다. 5, 8 및 11일째에 IL-2의 30IU/ml를 포함하는 신선한 AIM-V/5% AS 배지를 상기 배양에 공급하였다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et

al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0437] CTL 클론의 수립

96 웰 둥근 밑면 마이크로 타이터 플레이트(round-bottomed micro titer plate, Nalge Nunc International)에 한 웰당 0.3, 1 및 3 CTL이 되도록 희석하였다. CTL을 1×10^4 세포/웰(well)의 두 종류의 인간 B 림프아구양 세포주, 30ng/ml의 항-CD3 항체 및 IL-2의 125U/ml와 함께, 5%의 AS를 포함하는 AIM-M 배지의 총 150 μ l/웰에서 배양하였다. 10일 후, IL-2의 최종농도가 125U/ml이 되도록 상기 배지에 IL-2의 50 μ l/웰을 첨가하였다. 14일째에 CTL 활성을 시험하였고, 상기와 기술된 것과 동일한 방법을 이용하여 CTL 클론을 증식시켰다[Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506].

[0439] 특이적인 CTL 활성

특이적인 CTL 활성을 조사하기 위하여, 인터페론-감마(interferon-gamma; IFN- γ) ELISPOT(enzyme-linked immunospot) 검사 및 IFN-감마 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 실시하였다. 구체적으로, 펩티드-부가 TISI(A24) 또는 T2(A2)(1×10^4 /웰)을 자극 세포(stimulator cell)로서 제조하였다. 반응 세포(responder cell)로서 48웰에 배양된 세포를 사용하였다. IFN-감마 ELISPOT 검사 및 IFN-감마 ELISA 검사를 제조사 과정에 따라서 수행하였다.

[0441] 표적 유전자 및 HLA-A24/HLA-A02 중 하나 또는 그 모두를 발현하게 하는 세포의 수립

표적 유전자 또는 HLA-A*2402 또는 HLA-A*0201의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 암호화하는 cDNA를 PCR에 의해 증폭시켰다. 상기 PCR-증폭 생산물을 발현 벡터(expression vector)로 클로닝되었다. 제조사에서 제공하는 과정에 따라서 리포펙타민2000(lipofectamine 2000)(Invitrogen)을 사용하여, 상기 플라스미드를 표적 유전자 및 HLA-A24/A2 음성 세포주, COS7으로 형질도입시켰다. 형질도입 2일 후에, 상기 형질도입된 세포를 versene(Invitrogen)을 사용하여 수거하였고, CTL 활성 검사를 위해 표적세포로서 사용되었다(5×10^4 세포/웰).

[0443] 결과 1

[0444] 암에서 증가된 TMEM22 발현

cDNA-마이크로어레이(microarray)를 이용하여 다양한 암으로부터 수득된 전체 유전자 발현 프로파일(profile) 데이터는 TMEM22(GenBank Accession No. NM_025246, NM_001097599, NM_001097600; for example, 서열번호 91) 발현이 증가된 것을 나타내었다. TMEM22 발현은 6 개 급성골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia, AML) 중에서 1 개, 29 방광암(bladder cancers) 중에서 1개, 신세포암(renal cell carcinoma, RCC) 1 개 중에서 1 개, 식도암(esophagus cancer) 41개 중에서 6 개, 림프종(lymphoma) 1개 중에서 1개, 전립선암(prostate cancer) 6개 중에서 4개, 신세포암(renal cell carcinoma, RCC) 13 개 중에서 9 개 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC) 21개 중에서 13개에서 유효하게 증가되었다(표 1).

표 1

**정상조직에 비하여 암조직에서 관측된
TMEM22의 상향조절 예의 비율**

암	비율
AML	1/6
Bladder Cancer	1/29
CCC	1/1
Esophagus Cancer	6/41
Lymphoma	1/1
Prostate Cancer	4/6
RCC	9/13
SCLC	13/21

[0446]

결과 2

TMEM22 유래 HLA-A24에 결합하는 펩티드의 예측

[0449]

표 2 및 3은 HLA-A24에 결합하는 TMEM22의 9-머 및 10-머를 높은 결합 친화도 순으로 나타낸다. 서열번호 1 내지 9 및 17 내지 27 유래 펩티드는 BIMAS에 의해 예측되었다. 서열번호 10 내지 16 및 28 내지 31 유래 펩티드는 NetMHC 3.0로 예측되었다. 가능성있는 HLA-A24 결합 능력이 있는 전체 31 개의 펩티드를 선별하였고, 상기 에피토프 펩티드(epitope peptides)를 결정하기 위해 조사하였다.

표 2

TMEM22 유래 HLA-A24에 결합하는 9머 펩티드

서열번호	시작 위치	아미노산 서열	점수
1	390	GYKLYWRNL	200
2	274	VYRSIKEKI	77
3	372	IYDVFGGVI	50
4	331	AFLGVYYAL	42
5	385	VFVLAGYKL	33
6	204	VFSAILAFL	28
7	368	IFPSIYDVF	21
8	67	AFFGTMDTL	20
9	37	GYEEINEGY	12.6
서열번호	시작 위치	아미노산 서열	Kd (nM)
10	297	IWGISTMFI	49
11	137	IFIRSVFQV	95
12	98	IFQSRKMWI	169
13	197	MWRATTTVF	184
14	283	SMWTALFTF	209
15	142	VFQVLSVLV	371
16	375	VFGGVIIMI	444

[0450]

표 3

TMEM22 유래 HLA-A24에 결합하는 10머 펩티드

서열번호	시작 위치	아미노산 서열	점수
17	8	KYPVKKRVKI	165
18	137	IFIRsVFQVL	60.48
19	140	RSVFqVLSVL	16.8
20	153	YYQEaPFGPS	10.8
21	170	FYGVcNVISI	50
22	204	VFSAiLAFLL	24
23	257	GYTMtVMAGL	280
24	319	SYLlalCVCS	10.5
25	355	IVVAmVLQLL	10.08
26	372	IYDVfGGVII	50
27	402	DYQEiLDSPI	108
서열번호	시작 위치	아미노산 서열	Kd (nM)
28	282	ISMWTALFTF	83
29	297	IWGISTMFIL	149
30	104	MWIVLFGSAL	323
31	177	ISITCAYTSF	426

시작위치는 TMEM22의 N-말단으로부터 아미노산 잔기의 수를 나타낸다.

결합점수(Binding score)는 "BIMAS"로부터 유래된다.

해리상수(Dissociation constant)[Kd(nM)]은 "NetMHC3.0"로부터 유래된다.

[0451]

HLA-A*2402로 제한된 TMEM22 유래 예측된 펩티드로 CTL 유도 및 TMEM22 유래 펩티드로 자극한 CTL 세포주에 대한 수립

TMEM22 유래 이러한 펩티드에 대한 CTL은 “재료 및 방법”에 기재된 프로토콜에 따라 제조하였다. 펩티드 특이적 CTL 활성은 IFN-감마(gamma) ELISPOT 분석으로 결정하였다(도 1a-n). 하기 웰 번호는 대조군에 비해 강력한 IFN-감마 생산을 보였다: TMEM22-A24-9-390(서열번호 1)로 자극된 웰 번호 #4(a), TMEM22-A24-9-274(서열번호 2)로 자극된 #7(b), TMEM22-A24-9-372(서열번호 3)로 자극된 #3 및 #5(c), TMEM22-A24-9-331(서열번호 4)로 자극된 #8(d), TMEM22-A24-9-385(서열번호 5)로 자극된 #4, #6 및 #7(e), TMEM22-A24-9-204(서열번호 6)로 자극된 #3, #4 및 #5 with(f), TMEM22-A24-9-297(서열번호 10)로 자극된 #3, #6 및 #8(g), TMEM22-A24-9-98(서열번호 12)로 자극된 #3(h), TMEM22-A24-9-375(서열번호 16)로 자극된 #2 및 #4(i), TMEM22-A24-10-137(서열번호 18)로 자극된 #5(j), TMEM22-A24-10-140(서열번호 19)로 자극된 #1(k), TMEM22-A24-10-204(서열번호 22)로 자극된 #2, #3 및 #4(l), TMEM22-A24-10-282(서열번호 28)로 자극된 #1, #6, 및 #8(m) 및 TMEM22-A24-10-177(서열번호 31)로 자극된 #7(n). 한편, 펩티드가 HLA-A*2402에 가능한 결합 활성을 가짐에도 불구하고, 강력한 IFN-감마 생산은 표 2에서 나타낸 다른 펩티드 자극으로는 탐지될 수 없었다. 예를 들면, 음성데이터의 대표적인 예로서, 특이적 IFN-감마 생산은 TMEM22-A24-10-8(서열번호 17)로 자극된 CTL로부터 관측되지 않았다(도 1o). 상기 결과는 TMEM22 유래 14개 펩티드가 강력한 CTL을 유도할 수 있는 펩티드로 선별된 것을 나타낸다.

[0454] CTL 세포주의 수립 및 TMEM22 특이적 펩티드에 대한 클론(clones)

IFN-감마 ELISPOT 분석으로 탐지된 펩티드 특이적 CTL 활성을 보였던 TMEM22-A24-9-390(서열번호 1)가 있는 웰 번호 #4, TMEM22-A24-9-274(서열번호 2)가 있는 #7, TMEM22-A24-9-372(서열번호 3)가 있는 #5, TMEM22-A24-9-331(서열번호 4)가 있는 #8, TMEM22-A24-9-385(서열번호 5)가 있는 #6, TMEM22-A24-9-204(서열번호 6)가 있는 #3, TMEM22-A24-9-297(서열번호 10)가 있는 #8, TMEM22-A24-9-375(서열번호 16)가 있는 #4, TMEM22-A24-10-137(서열번호 18)가 있는 #5, TMEM22-A24-10-204(서열번호 22)가 있는 #3, TMEM22-A24-10-282(서열번호 28)가 있는 #8 및 TMEM22-A24-10-177(서열번호 31)가 있는 #7에서 상기 세포는 증식되었고, CTL 세포주는 상기 부문 “재료 및 방법”에 기재한 것과 같이 제한 회석(limiting dilution)으로 수립하였다. CTL 세포주의 CTL 활성은 IFN-감마 ELISPOT 분석으로 탐지하였다(도 2a-1). 모든 CTL은 펩티드를 부가하지 않은 표적 세포와 비교하여 상응하는 펩티드를 부가한 표적 세포에 대한 강력한 IFN-감마 생산을 나타낸다. 또한, CTL 클론을 CTL 세포주로부터 제한 회석하여 수립하였고, 펩티드 부가된(pulsed) 표적 세포에 대하여 CTL 클론으로부터 IFN-감마 생산을 IFN-감마 ELISPOT 분석으로 탐지하였다. 강력한 IFN-감마 생산은 도 3a-d에서 TMEM22-A24-9-331(서열번호 4), TMEM22-A24-9-204(서열번호 6), TMEM22-A24-9-297(서열번호 10) 및 TMEM22-A24-10-204(서열번호 22)으로 자극된 CTL 클론으로부터 탐지하였다.

[0456] TMEM22 및 HLA-A*2402를 발현하는 표적세포에 대한 특이적 CTL 활성

이러한 펩티드에 대하여 형성된 상기 수립된 CTL 세포주는 TMEM22 및 HLA-A*2402 유전자를 발현하는 표적 세포를 인지하는 그들의 능력에 대해 조사되었다. TMEM22 및 HLA-A*2402 유전자의 전장 둘 모두를 형질도입한(transfected) COS7 세포(TMEM22 및 HLA-A*2402 유전자를 발현하는 표적 세포에 대한 특이적 모델)에 대하여 특이적 CTL 활성을 해당하는 펩티드로 형성된 CTL 세포주를 이용하여 시험하였다. TMEM22 유전자 또는 HLA-A*2402의 전장 각각을 형질전환시킨 COS7 세포를 대조군으로 제조하였다. 도 4에서, 상기 TMEM22-A24-9-385(서열번호 5)로 자극된 CTL은 TMEM22 및 HLA-A*2402 둘 다를 발현하는 COS7 세포에 대하여 강력한 CTL 활성을 보였다. 한편, 대조군에 대하여 유의적인 특이적 CTL 활성을 탐지되지 않았다. 따라서, 이러한 데이터는 명백히 TMEM22-A24-9-385(서열번호 5)의 펩티드가 내생적으로(endogenously) 처리되고, HLA-A*2402 분자와 함께 제시되고, CTL에 의해 인지되는 것을 증명한다. 이러한 결과는 TMEM22 유래 이러한 펩티드가 TMEM22를 발현하는 종양이 있는 환자에 대한 암 백신으로 적합할 수 있는 것을 나타낸다.

[0458] 항원 펩티드의 상동성 분석

TMEM22-A24-9-390(서열번호 1), TMEM22-A24-9-274(서열번호 2), TMEM22-A24-9-372(서열번호 3), TMEM22-A24-9-331(서열번호 4), TMEM22-A24-9-385(서열번호 5), TMEM22-A24-9-204(서열번호 6), TMEM22-A24-9-297(서열번호 10), TMEM22-A24-9-98(서열번호 12), TMEM22-A24-9-375(서열번호 16), TMEM22-A24-10-137(서열번호 18), TMEM22-A24-10-140(서열번호 19), TMEM22-A24-10-204(서열번호 22), TMEM22-A24-10-282(서열번호 28) 및 TMEM22-A24-10-177(서열번호 31)로 자극된 CTL은 유의적이고 특이적인 CTL 활성을 보였다. 이 결과는 TMEM22-A24-9-390(서열번호 1), TMEM22-A24-9-274(서열번호 2), TMEM22-A24-9-372(서열번호 3), TMEM22-A24-9-331(서열번호 4), TMEM22-A24-9-385(서열번호 5), TMEM22-A24-9-204(서열번호 6), TMEM22-A24-9-297(서열번호 10), TMEM22-A24-9-98(서열번호 12), TMEM22-A24-9-375(서열번호 16), TMEM22-A24-10-137(서열번호 18), TMEM22-A24-10-140(서열번호 19), TMEM22-A24-10-204(서열번호 22), TMEM22-A24-10-282(서열번호 28) 및 TMEM22-A24-10-177(서열번호 31)의 서열이 인간 면역 시스템을 민감화시킨다고 알려진 다른 분자로부터 유래된 펩티드와 상동성을 갖는다는 사실 때문일 수 있다. 이러한 가능성을 배제하기 위하여, 상동성 분석을 수행하였다. 유의적인 상동성을 갖는 서열을 나타내지 않는 BLAST 알고리즘(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)을 사용하여 이 펩티드 서열에 대해 분석하였다. 상동성 분석의 결과는 TMEM22-A24-9-390(서열번호 1), TMEM22-A24-9-274(서열번호 2), TMEM22-A24-9-372(서열번호 3), TMEM22-A24-9-331(서열번호 4), TMEM22-A24-9-385(서열번호 5), TMEM22-A24-9-204(서열번호 6), TMEM22-A24-9-297(서열번호 10), TMEM22-A24-9-98(서열번호 12), TMEM22-A24-9-375(서열번호 16), TMEM22-A24-10-137(서열번호 18), TMEM22-A24-10-140(서열번호 19), TMEM22-A24-10-204(서열번호 22), TMEM22-A24-10-282(서열번호 28) 및 TMEM22-A24-10-177(서열번호 31)의 서열은 유일하고, 따라서 우리의 지식으로는, 이 분자가 어떤 관련없는 분자에 대하여 의도하지 않은 면역 반응을 야기하는 가능성은 거의 없다는 것을 가르킨다.

[0460] 결론적으로, TMEM22로부터 유래한 신규한 HLA-A*24 에피토프 펩티드는 동정되었다. 또한, 본 발명의 결과는 TMEM22의 에피토프 펩티드가 암 면역치료에서 사용에 적합할 수 있는 것을 증명한다.

[0461] 결과 3

[0462] TMEM22 유래 HLA-A02에 결합하는 펩티드의 예측

[0463] 표 4 및 5는 HLA-A02에 결합하는 TMEM22의 9머 및 10머 펩티드를 높은 결합 친화도 순으로 나타낸다. 가능성 있는 HLA-A02 결합 능력이 있는 전체 59개 펩티드가 선별되었고, 상기 에피토프 펩티드를 결정하기 위해 조사되었다.

표 4

TMEM22 유래 HLA-A02에 결합하는 9-머 펩티드

서열번호	시작 위치	아미노산 서열	Kd (nM)
32	196	TMWRATTTV	12
33	305	ILQEPIPL	14
34	262	VMAGLTTAL	27
35	338	ALDKFHPAL	32
36	213	LVDEKMYAV	36
37	379	VIIIMISVFV	49
38	381	IMISVFVLA	54
39	364	LVLHIFPSI	56
40	320	YLIAICVCS	61
41	367	HIFPSIYDV	66
42	99	FQSRKMWIV	70
43	380	IIMISVFVL	79
44	337	YALDKFHPA	87
45	302	TMFILQEPI	108
46	112	ALAHCVAL	113
47	143	FQVLSVLVV	115
48	218	MAYVDMATV	119
49	225	TVVCSILGV	125
50	265	GLTTALSMI	164
51	357	VAMVLQLLV	196
52	230	ILGVCLVMI	259
53	345	ALVSTVQHL	261
54	360	VLQLLVHLI	357
55	217	KMAYVDMAT	527
56	211	FLLVDEKMA	882
57	234	CLVMIPNIV	1330
58	123	RLVSDRSKV	1792
59	247	SLLNAWKEA	2005
60	105	WIVLFGSAL	8810

[0464]

표 5

TMEM22 유래 HLA-A02에 결합하는 10머-펩티드

서열번호	시작 위치	아미노산 서열	Kd (nM)
61	217	KMAYvDMATV	10
62	304	FILQePIIPL	10
63	212	LLVDeK MAYV	16
64	320	YLIAiCVCST	16
65	167	RLFFyGVCNV	18
66	338	ALDKfHPALV	18
67	363	LLVLhIFPSI	21
68	296	TIWGiSTMFI	45
69	112	ALAHzCVALI	50
70	103	KMWIVLFGSA	61
71	136	LIFIrSVFQV	66
72	265	GLTTaLSMIV	85
73	337	YALDkFHPAL	93
74	195	TTMWRAATTIV	104
75	205	FSAILAFLLV	158
76	269	ALSMIVYRSI	169
77	229	SILGvCLVMI	174
78	148	VLVVcYYQEA	186
79	133	SLELIFIRSV	197
80	359	MVLQILVLHI	210
81	380	IIMISVFVLA	218
82	224	ATVVCSILGV	219
83	356	VVAMvLQLLV	220
84	379	VIIMiSVFVL	226
85	291	FGWTgTIWGI	233
86	301	STMFILQEPI	246
87	378	GVIIImISVFV	257
88	302	TMFIIQEPII	257
89	287	ALFTfGWTGT	391
90	130	KVPSIELIFI	559

[0465]

HLA-A*0201에 제한된 TMEM22 유래 예측된 펩티드에 의한 CTL 유도

[0467]

TMEM22 유래 펩티드에 대한 CTL은 상기 “재료 및 방법”의 프로토콜에 따라 제조하였다. 펩티드 특이적 CTL 활성을 IFN-감마 ELISPOT 분석으로 결정하였다(도 5a-1). 하기 웰 번호는 대조군에 비해 강력한 IFN-감마 생산을 증명하였다: TMEM22-A02-9-338(서열번호 35)가 있는 #4(a), TMEM22-A02-9-381(서열번호 38)가 있는 #2(b), TMEM22-A02-9-367(서열번호 41)가 있는 #6(c), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48)가 있는 #3(d), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61)가 있는 #5(e), TMEM22-A02-10-304(서열번호 62)가 있는 #8(f), TMEM22-A02-10-167(서열번호 65)가 있는 #4(g), TMEM22-A02-10-363(서열번호 67)가 있는 #6(h), TMEM22-A02-10-103(서열번호 70)가 있는 #5(i), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74)가 있는 #5(j), TMEM22-A02-10-229(서열번호 77)가 있는 #5(k) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83)가 있는 #6(l). 한편, 펩티드가 HLA-A*0201에 가능한 결합 활성을 가짐에도 불구하고, 특이적 CTL 활성을 표 3a 및 3b에 나타낸 다른 펩티드 자극에 의해 탐지되지 않았다. 음성 데이터의 대표로서, 특이적 IFN-감마 생산은 TMEM22-A02-9-305(서열번호 33)(m)로 자극된 CTL로부터 관측되지 않았다. 따라서, 상기 결과는 TMEM22 유래 12개 펩티드가 강력한 CTL을 유도할 수 있는 펩티드로 선별된 것을 나타낸다.

[0468]

TMEM22 유래 펩티드에 대한 CTL 세포주 및 클론의 수립

[0469]

IFN-감마 ELISPOT 분석에 의해 탐지된 펩티드 특이적 CTL 활성을 보였던 웰번호 TMEM22-A02-9-338(서열번호

35)가 있는 #4(a), TMEM22-A02-9-381(서열번호 38)가 있는 #2(b), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48)가 있는 #3(c), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61)가 있는 #5(d), TMEM22-A02-10-304(서열번호 62)가 있는 #8(e), TMEM22-A02-10-167(서열번호 65)가 있는 #4(f), TMEM22-A02-10-363(서열번호 67)가 있는 #6(g), TMEM22-A02-10-103(서열번호 70)가 있는 #5(h), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74)가 있는 #5(i) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83)가 있는 #6(j)의 상기 세포는 증식되었고, CTL 세포주는 상기 부분 “재료 및 방법”에 기재된 제한 희석으로 수립되었다. 이러한 CTL 세포주의 CTL 활성을 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지하였다(도 6a-j). 상기 CTL은 웨티드 부가 없는 표적 세포에 비해 해당 웨티드로 부가된 표적세포에 대하여 강력한 IFN-감마 생산을 보였다. 또한, 상기 CTL 클론은 상기 “재료 및 방법”에 기재된 CTL 세포주로부터 제한 희석하여 수립하였고, 웨티드 부가된 표적세포에 대하여 CTL 클론으로부터 IFN-감마 생산을 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지하였다. 강력한 IFN-감마 생산을 TMEM22-A02-9-381(서열번호 38)(a), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48)(b), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61)(c), TMEM22-A02-10-304(서열번호 62)(d), TMEM22-A02-10-167(서열번호 65)(e), TMEM22-A02-10-363(서열번호 67)(f), TMEM22-A02-10-103(서열번호 70)(g), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74)(h) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83)(i)로 자극한 CTL 클론으로부터 확인하였다(도 7a-i)

[0470] TMEM22 및 HLA-A*0201를 발현하는 표적세포에 대한 특이적 CTL 활성

[0471] 각 웨티드에 대하여 형성된 상기 수립된 CTL 세포주 및 클론은 TMEM22 및 HLA-A*0201를 발현하는 표적세포를 인지하는 능력에 대해 조사되었다. TMEM22 및 HLA-A*0201 유전자의 전장 둘 다로 형질전환된 COS7 세포(TMEM22 및 HLA-A*0201 유전자를 발현하는 표적세포에 대한 특이적 모델)에 대한 특이적 CTL 활성을 해당하는 웨티드에 대하여 형성된 CTL 세포주 및 클론을 사용하여 시험하였다. TMEM22 또는 HLA-A* 0201의 전장 각각으로 형질전환된 COS7 세포를 대조군으로 제조하였다. 도 8에서, 상기 TMEM22-A02-10-195(서열번호 74)로 자극된 CTL 클론은 TMEM22 및 HLA-A*0201 둘 다를 발현하는 COS7 세포에 대하여 강력한 CTL 활성을 보였다. 한편, 유의적인 특이적 CTL 활성은 대조군에 대하여 탐지되지 않았다. 따라서, 이러한 데이터는 TMEM22-A02-10-195(서열번호 74)의 웨티드가 내생적으로 처리되고, HLA-A*0201 분자와 함께 이의 표적세포에 제시되며, CTL에 의해 인지되는 것을 명백히 증명하였다. 이러한 결과는 TMEM22 유래 웨티드가 TMEM22를 발현하는 종양이 있는 환자에 대한 암백신으로 적용될 수 있는 것을 나타낸다.

[0472] 항원 웨티드의 상동성 분석

[0473] TMEM22-A02-9-338(서열번호 35), TMEM22-A02-9-381(서열번호 38), TMEM22-A02-9-367(서열번호 41), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61), TMEM22-A02-10-304(서열번호 62), TMEM22-A02-10-167(서열번호 65), TMEM22-A02-10-363(서열번호 67), TMEM22-A02-10-103(서열번호 70), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74), TMEM22-A02-10-229(서열번호 77) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83)로 자극된 상기 CTL은 유의적이고 특이적인 CTL 활성을 보였다. 이러한 결과는 TMEM22-A02-9-338(서열번호 35), TMEM22-A02-9-381(서열번호 38), TMEM22-A02-9-367(서열번호 41), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61), TMEM22-A02-10-304(서열번호 62), TMEM22-A02-10-167(서열번호 65), TMEM22-A02-10-363(서열번호 67), TMEM22-A02-10-103(서열번호 70), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74), TMEM22-A02-10-229(서열번호 77) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83)의 서열이 인간 면역 시스템을 민감하게 하는 것으로 알려진 다른 분자 유래 웨티드와 상동성이 있기 때문일 것이다. 이러한 가능성을 배제하기 위하여, 상동성 분석을 유의적인 상동성이 있는 서열을 나타내지 않는 BLAST 알고리즘(algorithm)(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 쿼리(queries)를 이용하여 이러한 웨티드 서열에 대하여 수행하였다. 상동성 분석의 결과는 하기의 서열이 유일한 것임을 나타낸다: TMEM22-A02-9-338(서열번호 35), TMEM22-A02-9-381(서열번호 38), TMEM22-A02-9-367(서열번호 41), TMEM22-A02-9-218(서열번호 48), TMEM22-A02-10-217(서열번호 61), TMEM22-A02-10-304(서열번호 62), TMEM22-A02-10-167(서열번호 65), TMEM22-A02-10-363(서열번호 67), TMEM22-A02-10-103(서열번호 70), TMEM22-A02-10-195(서열번호 74), TMEM22-A02-10-229(서열번호 77) 및 TMEM22-A02-10-356(서열번호 83). 따라서, 이 분자가 어떤 관련없는 분자에 대하여 의도하지 않은 면역 반응을 야기할 수 있는 가능성은 거의 없다.

[0474] 결론적으로, 신규한 TMEM22 유래 HLA-A*0201 에피토프 웨티드가 동정되었고, 암 면역치료에 대해 적용되는 것을 증명하였다.

산업상 이용가능성

[0475]

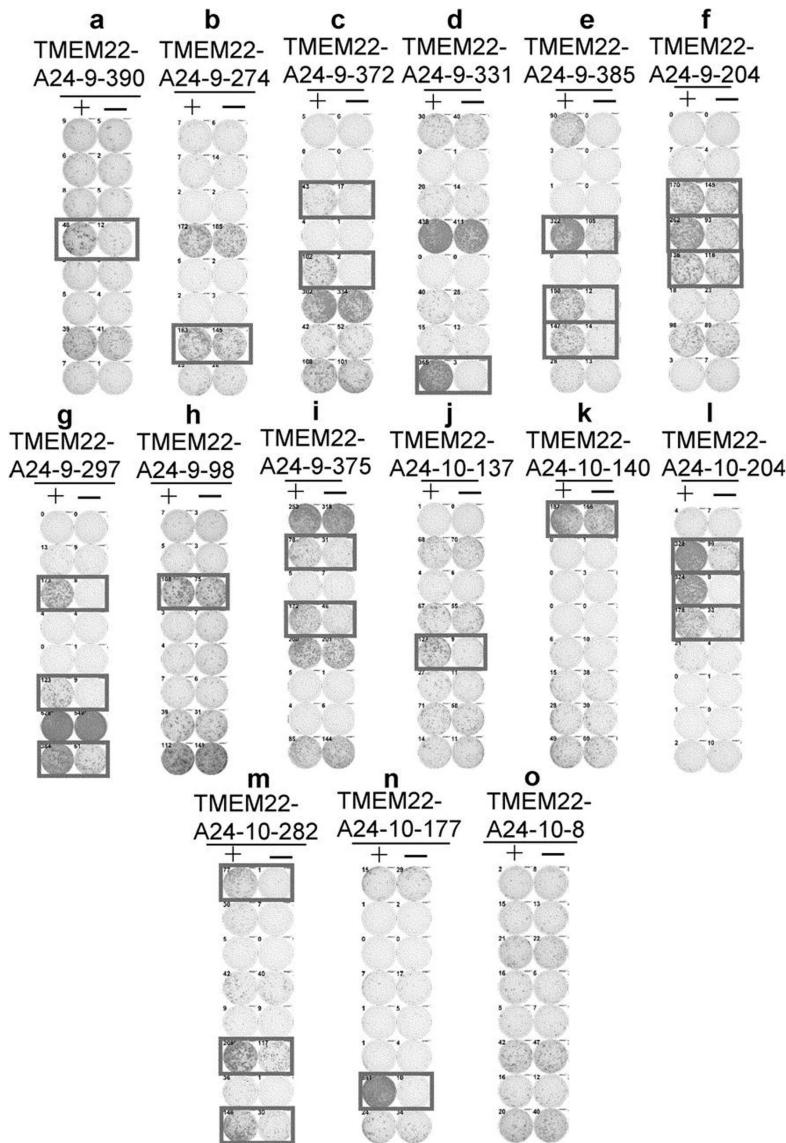
본 발명은 새로운 TAA, 특히 강력하고 특이적인 항-종양 면역반응을 유도하고 다수의 암에 적용 가능성을 가진 TMEM22으로부터 유래된 것을 제공한다. 이러한 TAA는 TMEM22 관련 질병에 대한, 예를 들면 암, 보다 구체적으로 급성골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia, AML), 방광암(bladder cancer), 담관세포암(cholangiocellular carcinoma, CCC), 식도암(esophagus cancer), 림프종(lymphoma), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal cell carcinoma, RCC) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)에 대한 웹티드 백신으로 추가적인 개발을 정당하게 한다.

[0476]

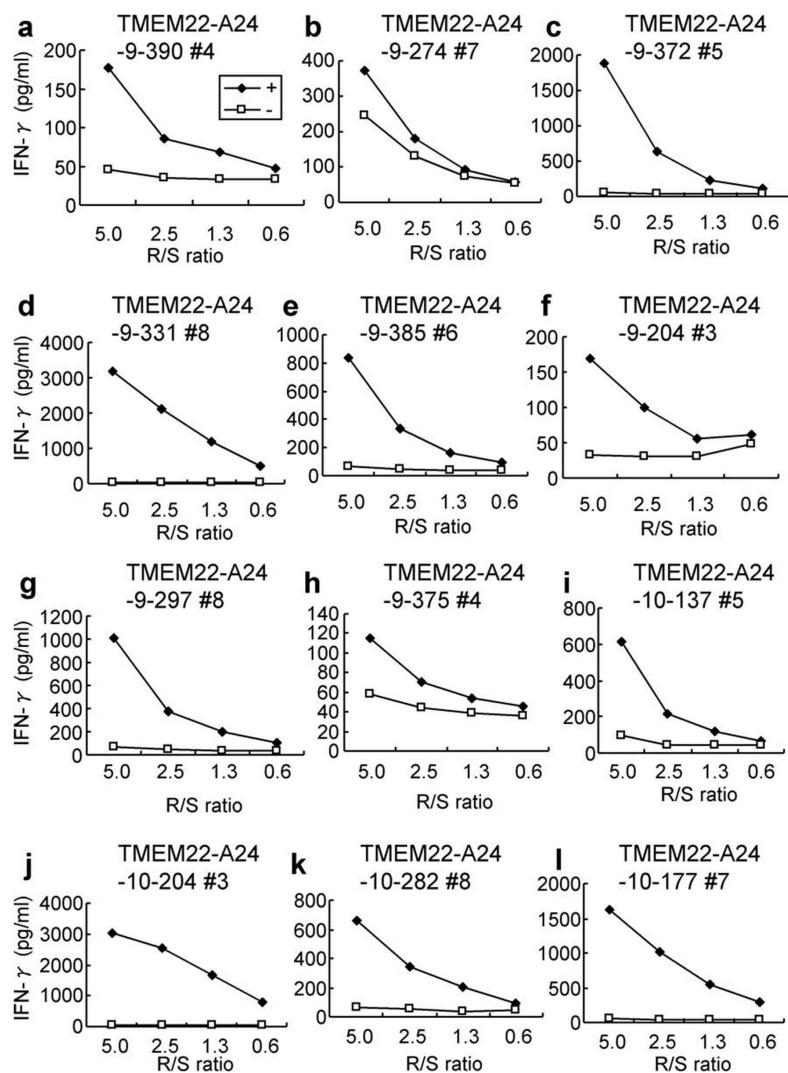
본 발명이 여기서 그의 구체적 실시예와 함께 상세히 기술되는 동안, 앞선 기술이 예시적 설명적 특징이었고 본 발명 및 바람직한 실시예를 예시하려는 의도를 가지고 있다는 것이 이해되어야 한다. 일반적인 실험 방법을 통해, 당업자는 본 발명의 뜻과 범위, 첨부된 청구항에 의해 정의된 경계 및 한계내에서 용이하게 다양한 변화 및 변형이 있을 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 본 발명의 경계(metes 및 bounds)는 상기 기술에 의해 정의되는 것을 의도하는 것이 아니고, 하기 청구항 및 이의 등가물에 의해 정의되는 것을 의도한다.

도면

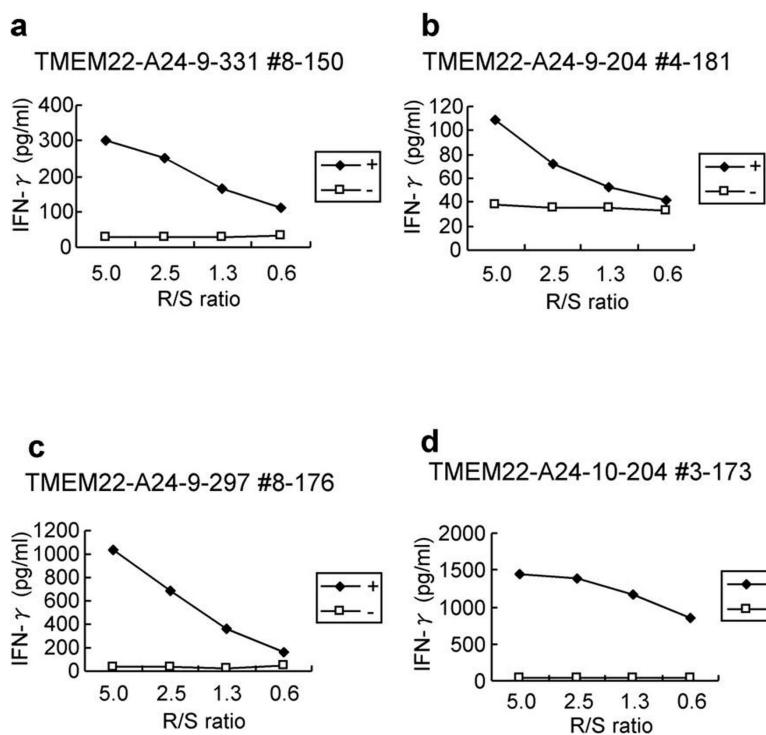
도면1



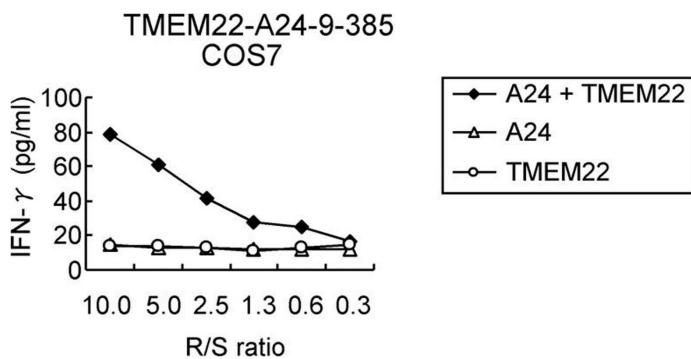
도면2



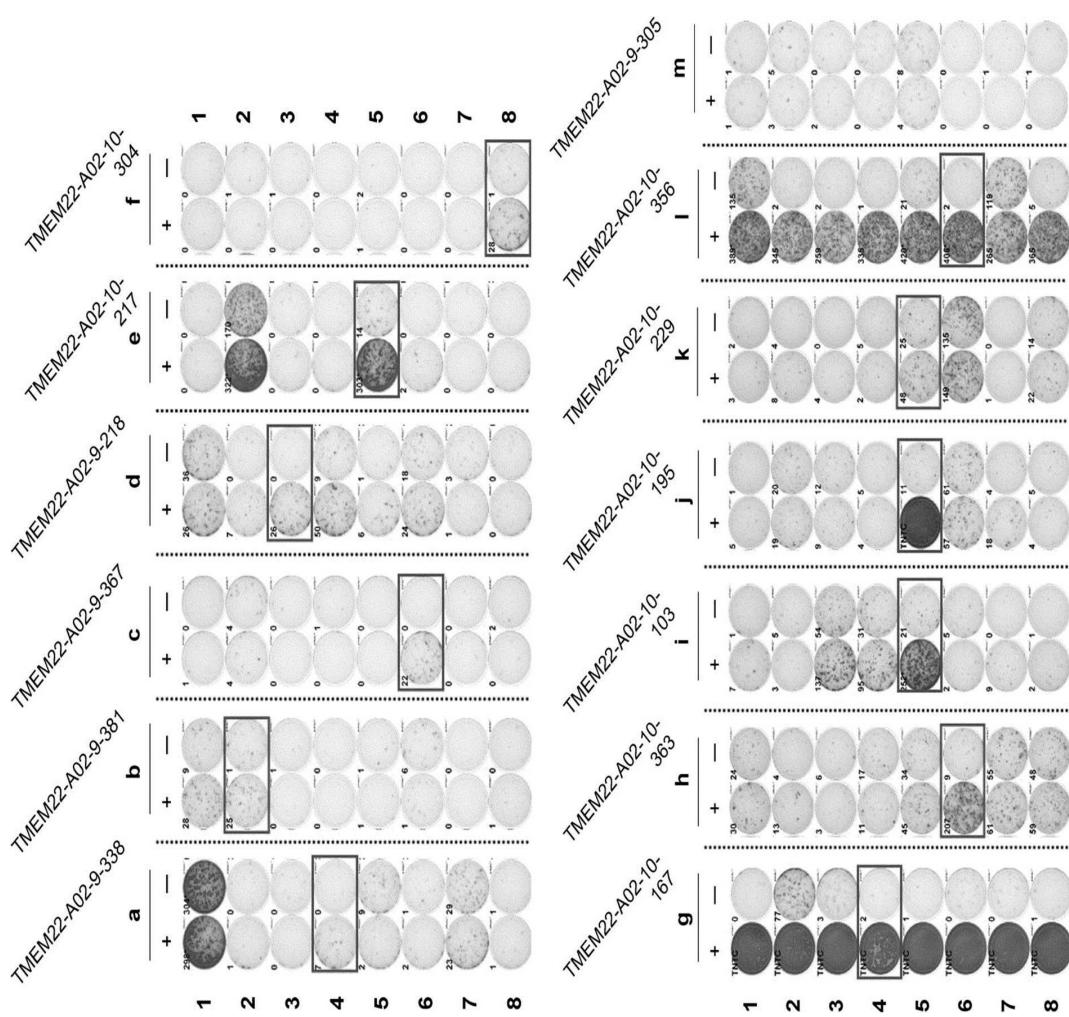
도면3



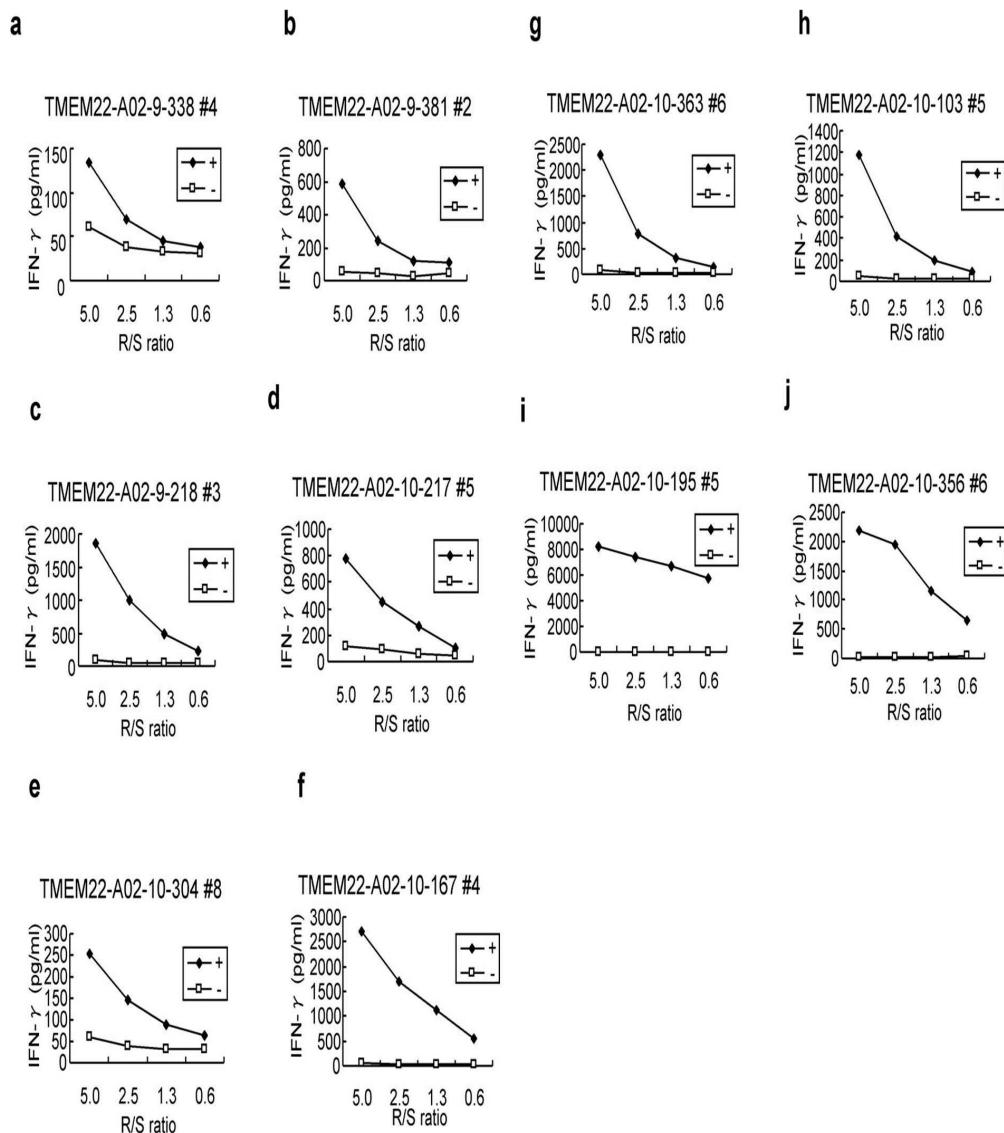
도면4



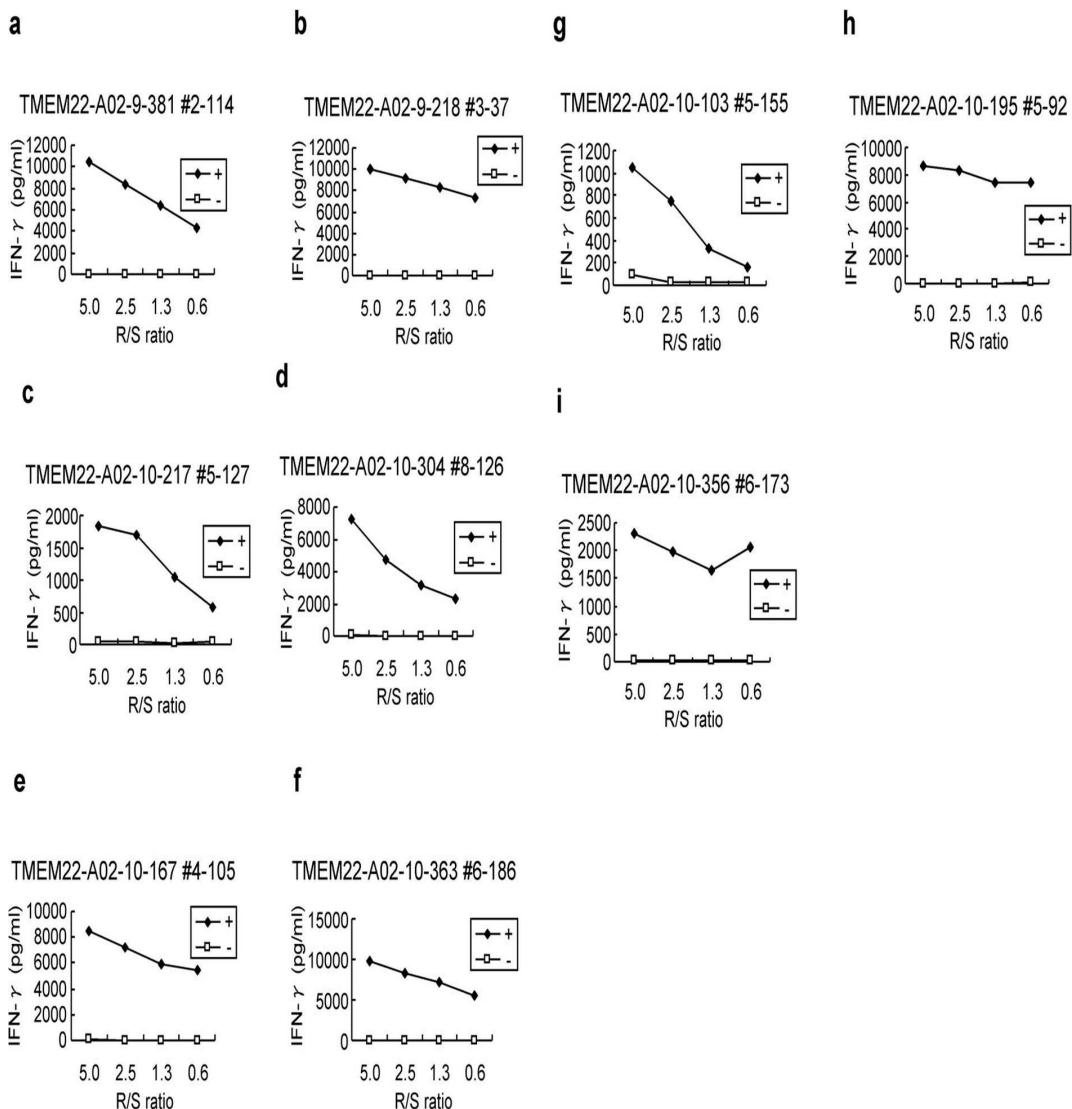
도면5



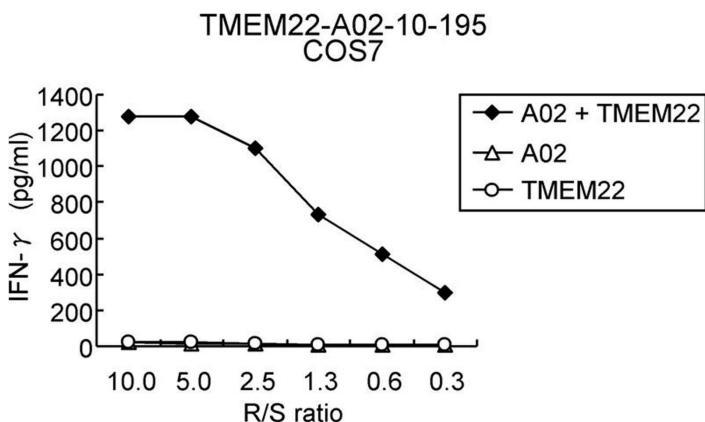
도면6



도면7



도면8



서 열 목록

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> TMEM22 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

<130> 12fpi-05-14
 <150> US 61/286,213
 <151> 2009-12-14
 <150> 61/287,650
 <151> 2009-12-17
 <150> 61/326,380
 <151> 2010-04-21
 <160> 96
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 1

Gly Tyr Lys Leu Tyr Trp Arg Asn Leu

1 5

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 2

Val Tyr Arg Ser Ile Lys Glu Lys Ile

1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 3

Ile Tyr Asp Val Phe Gly Gly Val Ile

1 5

<210> 4
 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 4

Ala Phe Leu Gly Val Tyr Tyr Ala Leu

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 5

Val Phe Val Leu Ala Gly Tyr Lys Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 6

Val Phe Ser Ala Ile Leu Ala Phe Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 7

Ile Phe Pro Ser Ile Tyr Asp Val Phe

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 8

Ala Phe Phe Gly Thr Met Asp Thr Leu

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 9

Gly Tyr Glu Glu Ile Asn Glu Gly Tyr

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 10

Ile Trp Gly Ile Ser Thr Met Phe Ile

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 11

Ile Phe Ile Arg Ser Val Phe Gln Val

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 12

Ile Phe Gln Ser Arg Lys Met Trp Ile

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400>

> 13

Met Trp Arg Ala Thr Thr Thr Val Phe

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 14

Ser Met Trp Thr Ala Leu Phe Thr Phe

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 15

Val Phe Gln Val Leu Ser Val Leu Val

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 16

Val Phe Gly Gly Val Ile Ile Met Ile

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 17

Lys Tyr Pro Val Lys Lys Arg Val Lys Ile

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 18

Ile Phe Ile Arg Ser Val Phe Gln Val Leu

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 19

Arg Ser Val Phe Gln Val Leu Ser Val Leu

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 20

Tyr Tyr Gln Glu Ala Pro Phe Gly Pro Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 21

Phe Tyr Gly Val Cys Asn Val Ile Ser Ile

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 22

Val Phe Ser Ala Ile Leu Ala Phe Leu Leu

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 23

Gly Tyr Thr Met Thr Val Met Ala Gly Leu

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 24

Ser Tyr Leu Ile Ala Ile Cys Val Cys Ser

1 5 10

<210>

25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 25

Ile Val Val Ala Met Val Leu Gln Leu Leu

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 26

Ile Tyr Asp Val Phe Gly Gly Val Ile Ile

1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 27

Asp Tyr Gln Glu Ile Leu Asp Ser Pro Ile

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 28

Ile Ser Met Trp Thr Ala Leu Phe Thr Phe

1 5 10

<210> 29

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 29
 Ile Trp Gly Ile Ser Thr Met Phe Ile Leu

1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 30

Met Trp Ile Val Leu Phe Gly Ser Ala Leu

1 5 10

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 31

Ile Ser Ile Thr Cys Ala Tyr Thr Ser Phe

1 5 10

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 32

Thr Met Trp Arg Ala Thr Thr Thr Val

1 5

<210> 33
 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 33

Ile Leu Gln Glu Pro Ile Ile Pro Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 34

Val Met Ala Gly Leu Thr Thr Ala Leu

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 35

Ala Leu Asp Lys Phe His Pro Ala Leu

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 36

Leu Val Asp Glu Lys Met Ala Tyr Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 37

Val Ile Ile Met Ile Ser Val Phe Val

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 38

Ile Met Ile Ser Val Phe Val Leu Ala

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 39

Leu Val Leu His Ile Phe Pro Ser Ile

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 40

Tyr Leu Ile Ala Ile Cys Val Cys Ser

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 41

His Ile Phe Pro Ser Ile Tyr Asp Val

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 42

Phe Gln Ser Arg Lys Met Trp Ile Val

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400>

> 43

Ile Ile Met Ile Ser Val Phe Val Leu

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 44

Tyr Ala Leu Asp Lys Phe His Pro Ala

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 45

Thr Met Phe Ile Leu Gln Glu Pro Ile

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 46

Ala Leu Ala His Gly Cys Val Ala Leu

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 47

Phe Gln Val Leu Ser Val Leu Val Val

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 48

Met Ala Tyr Val Asp Met Ala Thr Val

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 49

Thr Val Val Cys Ser Ile Leu Gly Val

1 5
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400>
 > 50

Gly Leu Thr Thr Ala Leu Ser Met Ile

1 5
 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 51

Val Ala Met Val Leu Gln Leu Leu Val

1 5
 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 52

Ile Leu Gly Val Cys Leu Val Met Ile

1 5
 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 53

Ala Leu Val Ser Thr Val Gln His Leu

1 5

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 54

Val Leu Gln Leu Leu Val Leu His Ile

1 5

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 55

Lys Met Ala Tyr Val Asp Met Ala Thr

1 5

<210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 56

Phe Leu Leu Val Asp Glu Lys Met Ala

1 5

<210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400>

> 57

Cys Leu Val Met Ile Pro Asn Ile Val

1 5

<210> 58

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 58

Arg Leu Val Ser Asp Arg Ser Lys Val

1 5

<210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 59

Ser Leu Leu Asn Ala Trp Lys Glu Ala

1 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 60

Trp Ile Val Leu Phe Gly Ser Ala Leu

1 5

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 61

Lys Met Ala Tyr Val Asp Met Ala Thr Val

1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 62

Phe Ile Leu Gln Glu Pro Ile Ile Pro Leu

1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 63

Leu Leu Val Asp Glu Lys Met Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 64

Tyr Leu Ile Ala Ile Cys Val Cys Ser Thr

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 65

Arg Leu Phe Phe Tyr Gly Val Cys Asn Val

1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 66

Ala Leu Asp Lys Phe His Pro Ala Leu Val

1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 67

Leu Leu Val Leu His Ile Phe Pro Ser Ile

1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 68

Thr Ile Trp Gly Ile Ser Thr Met Phe Ile

1 5 10

<210>

69

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 69

Ala Leu Ala His Gly Cys Val Ala Leu Ile

1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 70

Lys Met Trp Ile Val Leu Phe Gly Ser Ala

1 5 10

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 71

Leu Ile Phe Ile Arg Ser Val Phe Gln Val

1 5 10

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 72

Gly Leu Thr Thr Ala Leu Ser Met Ile Val

1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 73

Tyr Ala Leu Asp Lys Phe His Pro Ala Leu

1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 74

Thr Thr Met Trp Arg Ala Thr Thr Thr Val

1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 75

Phe Ser Ala Ile Leu Ala Phe Leu Leu Val

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 76

Ala Leu Ser Met Ile Val Tyr Arg Ser Ile

1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 77

Ser Ile Leu Gly Val Cys Leu Val Met Ile

1 5 10

<210>

78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 78

Val Leu Val Val Cys Tyr Tyr Gln Glu Ala

1 5 10
 <210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 79

Ser Leu Glu Leu Ile Phe Ile Arg Ser Val

1 5 10
 <210> 80
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 80

Met Val Leu Gln Leu Leu Val Leu His Ile

1 5 10
 <210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 81

Ile Ile Met Ile Ser Val Phe Val Leu Ala

1 5 10
 <210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 82

Ala Thr Val Val Cys Ser Ile Leu Gly Val

1 5 10

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 83

Val Val Ala Met Val Leu Gln Leu Leu Val

1 5 10

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 84

Val Ile Ile Met Ile Ser Val Phe Val Leu

1 5 10

<210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 85

Phe Gly Trp Thr Gly Thr Ile Trp Gly Ile

1 5 10

<210> 86
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 86

Ser Thr Met Phe Ile Leu Gln Glu Pro Ile

1 5 10

<210>

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 87

Gly Val Ile Ile Met Ile Ser Val Phe Val

1 5 10

<210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence
 <400> 88

Thr Met Phe Ile Leu Gln Glu Pro Ile Ile

1 5 10

<210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 89

Ala Leu Phe Thr Phe Gly Trp Thr Gly Thr

1 5 10

<210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 90

Lys Val Pro Ser Leu Glu Leu Ile Phe Ile

1 5 10

<210> 91
 <211> 2079
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 91

ccgcgcgtct ccaactccgg cgccagtcag gttgtgggtt gggggcggcg gagggcggag 60

agcgcaggcg cagagtccgc gcggcggcgc ccctccctt ccgcgtactt ccggcaggcg 120

ccgcctcga ttcccagg cgagggcagc cccgcgtcag tcgcctccgg ggcacccctt 180

tcgcccacac acgcaggtaa ccgggccccg ggagccggc ggcggcggcg gactgggacc 240

ttgatccctgc ctgccccggcc gcccgacaag ggaatgagag cggaccccgaa actccacaca 300

ccgcgttta gccgccacac ctaagggca caacagtctt ttggtaag ggccgggctg 360

ggggcgcacgc gccccggccg ctttgcagac ttgggtgc tctgcacgc gcctgaaagg 420

ccgcggggcc cgcatttctc tgtgctgccc tcctggagaa ccggacacgc gggacgggag 480

ggccagcatc ggctacggcc cggtttcccg ttctttccg ctgtcgctg tctggccct 540

cttcgcagcgt ccatgatgaa ggccagggc tggtgccttc ctctccca gtagccaacc 600

caagcaaggg aattgattat ctgaagaaat ggatacttct ccctccagaa aatatccagt 660

taaaaaacgg gtgaaaatac atcccaacac agtgatggtaa atataactt ctcatatcc 720

ccagcctggc gatgatggat atgaagaaat caatgaaggc tatggaaatt ttatggagga 780

aaatccaaag aaaggctgc tgagtgaaat gaaaaaaaaa gggagagctt tcttgaaac 840

catggatacc ctacccac caacagaaga cccaatgatc aatgagattt gacaattcca 900

gagcttgca gaaaaaaaaa ttttcaatc ccgaaaaatg tggatagtgc tggttgatc 960

tgcttggtt catggatgtg tagctcttat cactaggctt gttctgtatc ggtctaaagt 1020

tccatctcta gaactgattt ttatccgttc tggtttcag gtcttatctg tgtagttgt 1080

gtgttactat caggaggccc ctttggacc cagtgatac agattacgac tctttttta 1140

tggtgtatgc aatgtcattt ctatcacttg tgcttataca tcatttcaa tagttcc 1200

cagcaatggg accactatgt ggagagccac aactacagtc ttcatggca ttttggctt 1260

tttactcgta gatgagaaaa tggtttatgt tgacatggct acagttgtt gcagcatctt 1320

aggtgttgtt ctgtcatga tccaaacat tggatgaa gacaattttt tgtaatgc 1380

ctggaaagaa gccttgggtt acaccatgac tggatggctt ggactgacca ctgcctctc 1440

aatgatagta tacagatcca tcaaggagaa gatcagcatg tggactgcac tggttacttt 1500

tggttggactt gggacaatattt gggaaatatc tactatgtt attcttcaag aaccatcat 1560

cccatttagat ggagaaacctt ggagttatctt cattgtata tggatgtt ctactgcac 1620

attcttagga gtttattatgtt cttggacaa attccatcca gctttggta gcacagtaca 1680

acatggag attgtggtag ctatggctt gcagcttcgtgcaca tatttcctag 1740

catctatcat gttttggag gggtaatcat tatgattagt gttttgtcc ttgctggcta 1800

taaacttac tggaggaatt taagaaagca ggactaccag gaaatactag actctccat 1860

taaatgaata cctgattatt attgtctcat taatgttcag ttattatgt tactgccatt 1920

ttaatgtta cctatgaatg tctttgtgt tatataactg acagagtgtcataaaatata 1980

taatataac aaatgcagaa aatttattct agtctaataat attcaaatac aaatattaaa 2040

tatataat acgttatgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 2079

<210> 92

<211> 412

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Met Asp Thr Ser Pro Ser Arg Lys Tyr Pro Val Lys Lys Arg Val Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile His Pro Asn Thr Val Met Val Lys Tyr Thr Ser His Tyr Pro Gln

20	25	30
----	----	----

Pro Gly Asp Asp Gly Tyr Glu Glu Ile Asn Glu Gly Tyr Gly Asn Phe

35	40	45
----	----	----

Met Glu Glu Asn Pro Lys Lys Gly Leu Leu Ser Glu Met Lys Lys

50	55	60
----	----	----

Gly Arg Ala Phe Phe Gly Thr Met Asp Thr Leu Pro Pro Pro Thr Glu

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Pro Met Ile Asn Glu Ile Gly Gln Phe Gln Ser Phe Ala Glu Lys

85	90	95
----	----	----

Asn Ile Phe Gln Ser Arg Lys Met Trp Ile Val Leu Phe Gly Ser Ala

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Ala His Gly Cys Val Ala Leu Ile Thr Arg Leu Val Ser Asp Arg

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Lys Val Pro Ser Leu Glu Leu Ile Phe Ile Arg Ser Val Phe Gln

130	135	140
-----	-----	-----

Val Leu Ser Val Leu Val Val Cys Tyr Tyr Gln Glu Ala Pro Phe Gly

145	150	155	160
Pro Ser Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Phe Phe Tyr Gly Val Cys Asn Val			
165	170	175	
Ile Ser Ile Thr Cys Ala Tyr Thr Ser Phe Ser Ile Val Pro Pro Ser			
180	185	190	
Asn Gly Thr Thr Met Trp Arg Ala Thr Thr Val Phe Ser Ala Ile			
195	200	205	
Leu Ala Phe Leu Leu Val Asp Glu Lys Met Ala Tyr Val Asp Met Ala			
210	215	220	
Thr Val Val Cys Ser Ile Leu Gly Val Cys Leu Val Met Ile Pro Asn			
225	230	235	240
Ile Val Asp Glu Asp Asn Ser Leu Leu Asn Ala Trp Lys Glu Ala Phe			
245	250	255	
Gly Tyr Thr Met Thr Val Met Ala Gly Leu Thr Thr Ala Leu Ser Met			
260	265	270	
Ile Val Tyr Arg Ser Ile Lys Glu Lys Ile Ser Met Trp Thr Ala Leu			
275	280	285	
Phe Thr Phe Gly Trp Thr Gly Thr Ile Trp Gly Ile Ser Thr Met Phe			
290	295	300	
Ile Leu Gln Glu Pro Ile Ile Pro Leu Asp Gly Glu Thr Trp Ser Tyr			
305	310	315	320
Leu Ile Ala Ile Cys Val Cys Ser Thr Ala Ala Phe Leu Gly Val Tyr			
325	330	335	
Tyr Ala Leu Asp Lys Phe His Pro Ala Leu Val Ser Thr Val Gln His			
340	345	350	
Leu Glu Ile Val Val Ala Met Val Leu Gln Leu Leu Val Leu His Ile			
355	360	365	
Phe Pro Ser Ile Tyr Asp Val Phe Gly Gly Val Ile Ile Met Ile Ser			
370	375	380	
Val Phe Val Leu Ala Gly Tyr Lys Leu Tyr Trp Arg Asn Leu Arg Lys			
385	390	395	400
Gln Asp Tyr Gln Glu Ile Leu Asp Ser Pro Ile Lys			

	405	410	
<210>	93		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>			
>	Artificial Sequence		
<220><223>	Artificial sequence		
<400>	93		
gtctaccagg cattcgcttc at		22	
<210>	94		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Artificial sequence		
<400>	94		
tcagctggac cacagccgca gcgt		24	
<210>	95		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Artificial sequence		
<400>	95		
tcagaaatcc ttctcttga c		21	
<210>	96		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Artificial sequence		
<400>	96		
ctagcctctg gaatccttcc tctt		24	