(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월01일
(11) 등록번호 10-1863557
(24) 등록일자 2018년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7028426
(22) 출원일자(국제) 2011년03월30일
심사청구일자 2016년03월16일
(85) 번역문제출일자 2012년10월30일
(65) 공개번호 10-2013-0033367
(43) 공개일자 2013년04월03일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2011/001909
(87) 국제공개번호 WO 2011/122022
국제공개일자 2011년10월06일
(30) 우선권주장
61/320,577 2010년04월02일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008102557 A1*
JP2009531273 A
WO2007150077 A2
Kubo RT. et al, J Immunol 152:pp.3913-3924 (1994. 1.28.).*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
온코세라피 사이언스 가부시키가이샤
일본, 가나가와 213-0012, 가와사키시, 다카쯔구, 사카도 3쵸메 2-1
(72) 발명자
나카무라 유스케
일본 1138654 토쿄 분쿄쿠 홍고 7쵸메 3-1 고쿠리츠다이가쿠호우진 토쿄다이가쿠 나이
츠노다 타쿠야
일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카츠쿠 사카도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **ＥＣＴ２펩티드 및 이를 포함한 백신**

(57) 요 약

HLA 항원에 결합하고 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte, CTL)을 유도하며, 또한, 암의 면역치료의 맥락에서, 구체적으로 암 백신에 사용하기 적합한 서열번호 42에서 유래한 분리된 펩티드 및 이의 단편이 본 명세서에 기재되었다. 상기 신규한 펩티드는 상기 아미노산 서열, 및 하나, 둘, 또는 여러 개의 아미노산이 치환(substituted), 결실(deleted), 도입(inserted) 또는 첨가(added)된, 이의 변형된 형태를 포함하며, 상기 변형된 형태는 원래 서열의 HLA 결합 및/또는 CTL 유도성을 유지한다. 상기 어떠한 펩티드 또는 핵산을 포함 또는 고려하는 약학적 제제(agent), 물질(substance), 및/또는 조성물(composition)로써 상기 어떤 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 본 발명의 상기 펩티드, 핵산, 약학적 제제, 물질 및 조성물은 암 또는 종양, 예를 들어 방광암(bladder cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 간내담도암(cholangiocellular carcinoma), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 대장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer), 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)을 치료하기 위해 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

오사와 류지

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

요시무라 사치코

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

와타나베 토모히사

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

세포독성 T 세포(CTL) 유도성을 가지는 15 아미노산 미만의 분리된 펩티드, 여기서 상기 펩티드는 하기를 포함하는 군으로부터 선택된 분리된 펩티드:

(a) 서열번호 1, 3 및 21로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩티드, 및

(b) 서열번호 1, 3 및 21로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에서 1 또는 2개의 아미노산이 치환된 아미노산 서열로 구성된 분리된 펩티드, 여기서 상기 치환은 하기로 구성된 군으로부터 선택됨:

(i) 서열번호 1, 3 또는 21인 아미노산의 N-말단으로부터 두 번째 아미노산이 메티오닌(methionine)으로 치환; 및

(ii) 서열번호 1, 3 또는 21인 아미노산의 C-말단 아미노산이 발린(valine) 또는 루신(leucine)으로 치환.

청구항 5

삭제

청구항 6

서열번호 1, 3 및 21로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 분리된 펩티드.

청구항 7

제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 암호화하고 있는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

제 4항 또는 제 6항의 하나 또는 그 이상의 펩티드(들), 또는 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 암호화하는 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 CTL 유도용 조성물.

청구항 9

암의 치료 및/또는 예방 및/또는 수술 후의 재발을 방지하기 위한 약학적 조성물, 여기서 상기 약학적 조성물은 제 4항 또는 제 6항의 하나 또는 그 이상의 펩티드(들), 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 암호화하는 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드(들), 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 자신의 표면에 제시하는 하나 또는 그 이상의 항원 제시 세포(APC), 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 자신의 표면에 제시하는 하나 또는 그 이상의 엑소솜, 또

는 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 표적으로 하는 하나 또는 그 이상의 CTL을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 HLA 항원이 HLA-A2 인 개체에 투여하기 위하여 제형화된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암의 치료를 위해서 제형화된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 12

하기로 구성된 군으로부터 선택된 단계를 포함하는, CTL 유도성과 함께 APC를 유도하는 인비트로(in vitro) 방법:

(a) 시험관 내(in vitro)에서 APC를 제 4항 또는 제 6항의 펩티드와 접촉시키는 단계, 및

(b) 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC에 도입시키는 단계.

청구항 13

하기로 구성된 군으로부터 선택된 단계를 포함하는 CTL를 유도하기 위한 인비트로(in vitro) 방법:

(a) HLA 항원 및 제 4항 또는 제 6항의 펩티드의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC와, CD8-양성 T 세포를 공-배양(co-culture)하는 단계;

(b) HLA 항원 및 제 4항 또는 제 6항의 펩티드의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 엑소솜(exosome)과, CD8-양성 T 세포를 공-배양하는 단계; 및

(c) 제 4항 또는 제 6항의 펩티드와 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR) 서브유닛 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 T 세포로 도입시키는 단계.

청구항 14

제 4항 또는 제 6항의 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 분리된 APC.

청구항 15

제 12항의 방법으로 유도된 분리된 APC.

청구항 16

제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 표적으로 하는 분리된 CTL.

청구항 17

제 13항의 방법으로 분리된 CTL.

청구항 18

개체에서 암에 대한 면역반응을 유도하기 위한 조성물 제조에 있어서 제 4항 또는 제 6항의 펩티드, 또는 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하는 방법.

청구항 19

제 4항 또는 제 6항의 펩티드에 대한 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편.

청구항 20

제 10항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암의 치료를 위해서 제형화된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

암 또는 종양의 치료 및/또는 예방을 위한 약학적 조성물 제조에 있어서, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 활성성분을 이용하는 방법:

(a) 제 4항 또는 제 6항의 펩티드;

(b) 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드;

(c) 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 제시하는 APC;

(d) 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 제시하는 엑소솜; 및

(e) 제 4항 또는 제 6항의 펩티드를 표적하는 CTL.

발명의 설명

기 술 분 야

[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 2010년 4월 2일에 출원된 미국 가출원 제 61/320.577 호에 대한 우선권을 주장하며, 전체 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 통합된다.

배 경 기 술

[0004] CD8 양성(CD8 positive) CTL은 주 조직적 합성 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, Boon T, Int

J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; 비특허문헌 2, Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9). 상기 TAA 중 일부는 현재 면역치료법의 표적으로서 임상 개발 과정에 있다.

[0005] 유망한 TAA는 암 세포의 증식 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, Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; 비특허문헌 4, Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; 비특허문헌 5, Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; 비특허문헌 6, van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; 비특허문헌 7, Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; 비특허문헌 8, Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; 비특허문헌 9, Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; 비특허문헌 10, Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94). 지금까지, 종양관련 항원 유래 펩티드를 이용한 일부 임상 시도가 보고되었다. 불행히도, 현재 암 백신 시도의 다수는 낮은 목표 회답률(response rate)만을 보였다(비특허문헌 11, Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; 비특허문헌 12, Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; 비특허문헌 13, Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9):909-15). 그러므로, 면역요법의 표적으로 유용한 신규 TAA의 확인이 여전히 요구된다.

[0006] 상피세포 변형 서열 2(Epithelial cell transforming sequence 2, ECT2) 암 유전자(진뱅크 등록번호 AY376439; 예를 들어, 서열번호 41)는 암에서 상향 조절되는 확인된 전사물(transcript)에서 발견되었다. ECT2 유전자는 방광암(bladder cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 간내담도암(cholangiocellular carcinoma), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 대장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer), 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)를 포함하나, 이를 한정하지 않는 다양한 종류의 암에서 종양 세포 특이적으로 상향조절하고, 또한 이는 본 발명의 특별한 부분이다(특허문헌 1, WO2007/013671; 특허문헌 2, WO2008/102557; 특허문헌 3, WO2010/007791). 특히, ECT2 유래된 면역학적 펩티드는 상기 항원을 발현하는 종양세포를 선택적으로 죽이는데 유용하게 사용될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) WO2007/013671

(특허문헌 0002) WO2008/102557

(특허문헌 0003) WO2010/007791

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80

(비특허문헌 0002) Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

(비특허문헌 0003) Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55

(비특허문헌 0004) Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42

(비특허문헌 0005) Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

(비특허문헌 0006) van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14

(비특허문헌 0007) Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8

(비특허문헌 0008) Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72

(비특허문헌 0009) Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66

(비특허문헌 0010) Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94

(비특허문헌 0011) Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80

(비특허문헌 0012) Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42

(비특허문헌 0013) Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9):909-15

발명의 내용

[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. ECT2(GenBank Accession No. AY376439로 암호화 된 서열번호 42(예를 들어, 서열번호 41))가 방광암(bladder cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 간내담도암(cholangiocellular carcinoma), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 대장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer), 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)를 포함하지만, 이에 한정하지 않는 암들의 조직에 상향 조절의 확인을 인지함으로써, 본 발명은 ECT2를 항암/항종양 면역치료의 후보 표적으로써 초점을 맞추고, 더욱 특이적으로, 신규한 ECT2 에피토프(epitope) 펩티드가 적합한 면역치료의 표적으로 제공될 것이다.

[0010] 결론적으로, 최소한 본 발명은 ECT2 특이적인 CTL을 유도하는 능력을 가지는 ECT2의 유전자 대사산물 중에서 특이적 에피토프 펩티드(epitope peptide)를 동정하였다. 하기에 기술된 것과 같이, 건강한 공여자로부터 수득된 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)는 ECT2로부터 유래된 HLA-A*0201에 결합하는 후보 펩티드를 사용하여 자극되었다. 그런 다음 각 후보 펩티드를 부가(pulsed)하여 HLA-A2 양성 표적 세포에 대하여 특이적 세포 독성을 갖는 CTL 세포주가 확립되었다. 상기 결과는 상기 펩티드는 ECT2를 발현하는 세포에 대해 강력하고 특이적 면역반응을 유도할 HLA-A2에 제한된 에피토프(epitope) 펩티드임을 증명한다. 또한, 상기 결과는 ECT2는 강한 면역성이 있고, 그것의 에피토프는 암/종양 면역치료법에 효과적인 표적임을 증명한다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 HLA 항원에 결합하고, ECT2(서열번호 42) 및 이의 면역학적 활성 단편을 포함하는, 분리된 펩티드를 제공하는 것이다. 상기 펩티드를 CTL 유도성을 갖는다고 예상되고, 따라서 체외(ex vivo)에서 CTL을 유도하는 것에 사용될 수 있고, 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 개체에 투여될 수 있으며, 암의 예는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정하지 않는다. 바람직한 펩티드는 노나펩티드(nonapeptides) 및 데카펩티드(decapeptides)이고, 보다 바람직하게는 서열번호 1 내지 40중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 노나펩티드 및 데카펩티드이다. 더욱 바람직하게는 강한 CTL 유도성을 갖고, 서열번호 1, 3 및 21 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다.

[0012] 또한, 본 발명은 변형된 펩티드가 원래의 펩티드의 필요한 CTL 유도성을 유지하는 한, 서열번호 1 내지 40 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지고, 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산이 치환(substituted), 삽입(inserted), 결실(deleted) 또는 첨가(added)된 변형된 펩티드(modified peptides)를 고려한다.

[0013] 본 발명은 본 발명의 펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 또한 포함한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 CTL 유도성이 있는 항원-제시 세포(antigen-expressing cells, APCs)의 제조 또는 유도에 사용될 수 있거나, 상기에 기술된 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 APC의 표면에 제시된다. 그러므로, 본 발명의 하나의 목적은 CTL을 유도하기 위하여 본 발명의 어떤 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함 또는 혼합하는 제제(agent), 조성물(composition) 및/또는 물질(substance)을 제공하는 것이다. 상기 제제는 암의 치료 및/또는 예방 및/또는 수술 후의 재발에 사용될 수 있으며, 상기 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암,

신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 본 발명의 다른 목적은 암의 치료 및 /또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발 방지를 위해 본 발명의 하나 또는 그 이상의 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 중 어떤 것을 포함 또는 고려하는 약학적 제제, 조성물 및 물질을 제공하는 것이다. 본 발명의 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 약학적 제제, 조성물 또는 물질에 대신 또는 추가하여 본 발명의 펩티드를 제시하는 APC 또는 엑소솜을 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 개체 유래된 APC가 상기 펩티드와 접촉 또는 본 발명의 펩티드를 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드를 APC내로 도입하여, 상기 표면에 HLA 항원과 상기 펩티드의 복합체를 제시하고 있는 APC를 유도하는데 사용될 것이다. 상기 APC는 표적 펩티드에 대해서 높은 CTL 유도성을 갖고있고, 암 면역치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은 상기 방법으로 얻어진 APC와 함께, CTL 유도성을 갖는 APC를 유도하는 방법을 포함한다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 CD8-양성 세포와, 이의 표면에 본 발명의 펩티드를 제시하는 APC 또는 엑소솜을 공배양하는(co-culturing) 단계, 또는 상기 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, 상기 방법으로 수득된 CTL은 암의 치료 및/또는 예방에서 유용하고, 암의 예로는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 그러므로, 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법에 의해 수득된 CTL을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 암에 대한 면역반응을, 그것을 필요로 하는 개체에서 암에 대한 면역반응을 유도하는 방법을 제공하는 것이고, 상기 방법은 ECT2 폴리펩타이드 또는 이의 면역학적 단편, ECT2 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, ECT2 폴리펩티드를 제시하는 엑소솜 또는 APC를 포함하는 조성물 또는 물질을 투여하는 단계를 포함하는 것이다.

[0018] 본 발명의 적용가능성은 암과 같이 ECT2의 과발현과 관련 있거나, 이로부터 발생하는 수많은 질병으로 확대할 수 있고, 암의 예로는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하나 이에 한정하지 않는다.

[0019] 더욱 특이적으로, 본 발명은 하기를 제공한다:

[0020] [1] 상기 펩티드는 HLA 항원에 결합하고 CTL을 유도하는, 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩티드 또는 이의 면역학적 활성 단편,

[0021] [2] [1]에 분리된 펩티드에 있어서, 상기 HLA 항원이 HLA-A2인 분리된 펩티드,

[0022] [3] [1] 또는 [2]에 분리된 펩티드에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 1 내지 40을 포함한 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 분리된 펩티드,

[0023] [4] 하기를 포함하는 군으로부터 선택된 분리된 펩티드:

[0024] (a) HLA 항원에 결합 및 CTL을 유도하고, 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩티드 및 이의 면역학적 활성 단편,

[0025] (b) (a)의 분리된 펩티드에 있어서, 상기 HLA 항원이 HLA-A2인 분리된 펩티드,

[0026] (c) (a) 또는 (b)의 분리된 펩티드는 서열번호 1 내지 40으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 분리된 펩티드, 및

[0027] (d) (a) 또는 (b)의 분리된 펩티드는 서열번호 1 내지 40으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지고, 1, 2 또는 여러 개의 아미노산이 치환(substituted), 삽입(inserted), 결실(deleted) 또는 첨가(added)된, 원래의 펩티드의 CTL 유도성을 유지하는 변형된 펩티드,

[0028] [5] [4]의 분리된 펩티드에 있어서, 서열번호 1 내지 40으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 하기의 특징을 하나 또는 모두 갖는 분리된 펩티드:

[0029] (a) N-말단에서부터 두 번째 아미노산이 루신(leucine) 또는 메티오닌(methionine)으로 구성된 군으로부터 선택; 및

[0030] (b) C-말단의 아미노산이 발린(valine) 또는 루신으로 구성된 군으로부터 선택,

[0031] [6] [1] 내지 [5]의 어느 하나의 분리된 펩티드에 있어서, 상기 펩티드는 노나펩티드 또는 데카펩티드인 분리된 펩티드,

[0032] [7] [1] 내지 [6]의 어느 한 펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드,

[0033] [8] CTL 유도용 조성물은 [1] 내지 [6]의 하나 또는 그 이상의 펩티드 또는 [7]의 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드로 구성된 CTL 유도용 조성물,

[0034] [9] 암의 치료 및/또는 예방 및/또는 수술 후의 재발 방지를 위한 약학적 조성물에 있어서, 상기 약학적 조성물은 [1] 내지 [6]의 하나 또는 그 이상의 펩티드 또는 [7]의 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드로 구성,

[0035] [10] [9]의 약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물은 HLA 항원이 HLA-A2인 개체에 투여하기 위해 제형화된 약학적 조성물,

[0036] [11] [9] 또는 [10]의 약학적 조성물에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암의 치료를 위해 제형화된 약학적 조성물,

[0037] [12] 하기를 포함하는 군으로부터 선택된 단계로 구성된 CTL 유도성으로 항원제시세포를 유도하기 위한 방법:

[0038] (a) 시험관 내에서(in vitro), 생체 외에서(ex vivo) 또는 생체 내에서(in vivo), [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드와 APC를 접촉, 및

[0039] (b) [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC로 도입,

[0040] [13] 하기로 구성된 군으로부터 선택된 단계로 구성된 방법으로 CTL을 유도하는 방법:

[0041] (a) CD8 양성 T 세포와, HLA 항원 및 [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드의 복합체를 표면에 제시하는 APC를 공배양(co-culturing);

[0042] (b) CD8 양성 T 세포와, HLA 항원 및 [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드의 복합체를 표면에 제시하는 엑소솜을 공배양(co-culturing); 및

[0043] (c) [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드와 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 아단위(subunit)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 유전자를 T 세포로 도입,

[0044] [14] HLA 항원 및 [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 분리된 APC,

[0045] [15] [12]의 방법으로 유도된 [14]의 APC,

[0046] [16] [1] 내지 [6]의 어떤 펩티드를 표적으로 하는 분리된 CTL,

[0047] [17] [13]의 방법으로 유도된 [16]의 CTL,

[0048] [18] 암에 대한 면역반응을 필요로 하는 개체에서 암에 대한 면역반응을 유도하는 방법으로 상기 방법은, [1] 내지 [6]의 펩티드, 이의 면역학적 활성 단편, 또는 상기 펩티드 또는 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 조성물을 개체에 투여되는 단계를 포함한 방법,

[0049] [19] [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드에 대한 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편,

[0050] [20] [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드를 암호화한 뉴클레오티드 서열로 구성된 벡터,

[0051] [21] [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 펩티드, [7]의 뉴클레오티드 또는 [19]의 항체로 구성된 진단 키트.

[0052] 본 발명의 상기 요약 및 하기의 상세한 설명은 실시예이고, 본 발명 또는 본 발명의 다른 대안적 실시예를 제한하지 않는다.

[0053] 뿐만 아니라, 본 발명의 또 다른 목적 및 특징은 도면 및 실시예를 포함하는 하기 상세한 설명을 읽을 때, 보다 전체적으로 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 상기 요약 및 하기의 상세한 설명은 실시예이고, 본 발명이나 또는 본 발명의 다른 대안적 실시예를 제한하지 않는다. 특히, 본 발명이 여기에서, 많은 구체적 실시예와 함께 설명되지만, 그 설명은 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명을 제한하지 않는다. 본 발명의 정신(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, 당업자에게도 용이하게 명백할 것이다. 상기 목적, 특징, 유용성 및 이점은

부수되는 실시예, 데이터, 도면 및 그로부터 가능한 모든 타당한 추론과 함께, 단독으로, 또는 여기서 통합된 참조문헌의 고려와 함께 상기로부터 명백할 것이다.

[0054]

도면의 간단한 설명

[0055] 본 발명의 다양한 측면 및 적용은 도면의 간단한 설명을 고려하여 당업자에게 명백해 질 것이다. 그리고, 본 발명의 상세한 설명 및 이의 바람직한 실시예는 하기와 같다.

[도 1]

도 1은 ECT2 유래 펩티드로 유도된 CTL의 IFN-감마 ELISPOT 결과를 나타낸 일련의 그림 (a) 내지 (c)로 구성되어 있는 도이다. ECT2-A02-9-34(서열번호 1)로 자극된 웰 번호 #6(a), ECT2-A02-9-664(서열번호 3)으로 자극된 웰 번호 #5(b) 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)로 자극된 웰 번호 #1(c)는 대조군과 비교하여 강력한 IFN-감마의 생산을 보였다. 상기 도의 웰에 네모는 각 웰에 해당하는 세포가 CTL 세포주로 수립되도록 확장되었음을 나타낸다. 도면에서, "+"는 적절한 펩티드로 부가된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, "-"는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 2]

도 2는 ECT2-A02-9-34(서열번호 1)(a), ECT2-A02-9-664(서열번호 3)(b) 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)(c)로 자극된 CTL 세포주의 IFN-감마 생산을 IFN-감마 ELISA 검사법으로 확인한 결과를 나타낸, 일련의 선그래프 (a) 내지 (c)로 구성되어 있다. 상기 결과는 각각의 펩티드로 자극되어 수립된 CTL 세포주가 대조군과 비교하여 강력한 IFN-감마의 생산을 나타냄을 보여준다. 도면에서, "+"는 적절한 펩티드로 부가된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, "-"는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 3]

도 3은 ECT2-A02-9-34(서열번호 1)(a) 및 ECT2-A02-9-664(서열번호 3)(b)로 자극된 CTL 세포주로부터 제한 희석(limiting dilution)하여 수립된 CTL 클론의 IFN-감마 생산을 나타내는, 한쌍의 선 그래프 (a) 및 (b)로 묘사되어 있다. 상기 결과는 각 펩타이드로 자극되어 수립된 CTL 클론이 대조군과 비교하여 강한 IFN-감마 생산을 보임을 나타낸다. 도면에서, "+"는 적절한 펩티드로 부가된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, "-"는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 4]

도 4는 외생적(exogenously)으로 ECT2 및 HLA-A*0201을 발현하는 표적세포에 대한 특이적인 CTL 활성을 묘사하는 한 쌍의 선그래프 (a) 및 (b)로 구성되어 있다. HLA-A*0201 또는 전장의 ECT2 유전자로 형질도입(transfected)한 COS7 세포가 대조군으로 준비되었다. ECT2-A02-9-34(서열번호 1)(a)로 수립된 CTL 클론 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)(b)로 수립된 CTL 클론은 ECT2 및 HLA-A*0201 모두로 형질도입 된 COS7 세포주(검은원)에 대하여 특이적인 CTL 활성을 나타냈다. 반면에, HLA-A*0201(삼각형) 또는 ECT2(흰원)중 하나를 발현하는 표적세포에 대해서는 유의적인 특이적 CTL 활성은 탐지되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 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 발명의 설명은 단지 설명하기 위한 것일 뿐, 제한되지 않음을 이해해야 한다. 본 발명은 또한, 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.

[0057] 본 명세서에서 언급된 각 발표(publication)의 공개, 특허 또는 특허 출원은 그 전문이 구체적으로 여기에서 참고문헌으로 통합된다. 하지만, 여기에서 어떤 것도 그 발명이 선행발명이라는 이유로 상기 공개보다 선행자격을 주지 않는 것을 승인하는 것으로 간주하지는 않는다.

[0058] 따로 정의되지 않는 한, 여기에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자에게 일반적

으로 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.

[0059] I. 정의

[0060] 본 발명에서 사용되는 용어 "a", "an", 및 "the"는 따로 명시되지 않는 한, "적어도 1개"를 의미한다.

[0061] 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(들), 또는 자연적으로 발생한 아미노산 중합체(들)(naturally occurring amino acid polymer)뿐만 아니라 자연적으로 발생한 아미노산에 상응하는 인공 화학 모방체(들)(artificial chemical mimetic)와 같은 비자연적으로 발생한 잔기(들)(non-naturally occurring residue)를 가지는 아미노산 중합체에 적용될 것이다.

[0062] 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 펩티드에 관련하여 사용된다.

[0063] 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. 아미노산은 L-아미노산 또는 D-아미노산 둘 중 하나일 수 있다. 자연적으로 발생한 아미노산은 세포 안에서 번역(tranlation) 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 α탄소)를 가지고 있지만, 하나 또는 그 이상이 변형된 R기 또는 변형된 골격(backbone)을 가지는 화합물을 의미한다[예를 들면, 호모세린(homoserine), 노르루신(norleucine), 메티오닌(methionine), 설폭사이드(sulfoxide), 메티오닌 메틸 설포니움(methionine methyl sulfonium)]. 상기 용어 "아미노산 모방체"는 서로 다른 구조를 갖지만, 일반적인 아미노산과 비슷한 기능이 있는 화학적 화합물을 의미한다.

[0064] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명위원회(Biochemical Nomeclatere Commission)가 권장하는, 일반적으로 알려진 3문자 약어(symbol) 또는 1문자 약어로 표기된다.

[0065] 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.

[0066] 여기서 호환적으로 사용되는 "제제(agent)", "물질(substance)" 및 "조성물(composition)"이라는 용어는 구체적 양의 구체적 성분의 조합으로부터, 직접적으로 또는 간접적으로, 형성되는 어떠한 생산물뿐 아니라, 구체적 양의 구체적 성분을 포함하는 생산물에 관한 것이다. 변형된 "약학적"(예를 들어, "약학적 제제" 및 "약학적 조성물")에 관련한 상기 용어는 유효 성분, 및 담체로 구성된 어떤 비유효 성분을 포함하는 생산물, 뿐만 아니라 둘 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 제제" 및 "약학적 조성물"은 본 발명의 분자 또는 화합물 및 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체의 혼합에 의해 만들어진 어떤 약학적 생산물에 관한 것이다.

[0067] 여기서 사용되는 "약학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)" 또는 "생리학적으로 허용가능한 담체(physiologically acceptable carrier)"라는 용어는 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 재료(material), 조성물, 물질 또는 수단(vehicle)을 의미하고, 이는 한 기관(organ), 또는 신체의 한 부분으로부터 개체 스캐폴드된(scaffolded) 폴리파머코어(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.

[0068] 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물은 백신으로 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명 문맥의 맥락에서, 상기 용

어 "백신"("면역학적 조성물"로도 언급)은 동물에 접종되어 항-종양 면역성을 유도하는 기능을 가진 물질을 말한다.

[0069] 본 발명에서 상기 용어 “유효성분(active ingredient)”은 생물학적 또는 생리학적으로 활성이 있는 제제 또는 조성물의 물질에 관한 것이다. 특히, 약학적 제제 또는 조성물에서 상기 “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.

[0070] 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 나타낼 것이다.

[0071] 별도로 언급하지 않는 한, "암"은 ECT2 유전자를 과발현하는 것을 의미하며, 상기 암은 방광암(bladder cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 간내담도암(cholangiocellular carcinoma), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 대장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer), 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0072] 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/암 세포, 바이러스에 감염된 세포)를 인식할 수 있고 이러한 세포의 사멸을 유도할 수 있는 T 림프구의 하위집단(sub-group)을 나타낸다.

[0073] 별도로 명시되지 않는 한, 여기서 사용되는 상기 용어 "HLA-A2"는 아류형(subtype)인, 예를 들어 HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 및 HLA-A*0250을 포함하나 이에 한정하지 않는다.

[0074] 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.

[0075] 본 명세서에서 사용되는 것으로서, 개체 또는 환자의 맥락에서, 상기 구(phrase) “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.

[0076] 본 발명의 방법 및 조성물이 암의 "치료(treatment)"라는 맥락에서 유용성을 갖는 범위 내에서, ECT2 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.

[0077] 본 발명의 방법 및 조성물이 암의 "방지(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 진행 및 증상 발현의 방지 및 예방뿐만 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.

[0078] 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 예후(progrosis)를 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.

[0079] 본 발명의 맥락에서, "항체(antibody)"라는 용어는 지정된 단백질 또는 그것의 펩티드에 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 가장 넓은 의미에서 사용되고 특히 완전한 단일클론 항체(intact monoclonal antibodies), 다클론 항체(polyclonal abtibodies), 최소한 2개의 완전한 항체로부터 형성된 다중특이적 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 가리킨다.

[0080] 따로 정의하지 않는 한, 본 명세서의 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 분야의 보편적인 전문자가 일반적으로 이해되는 동일한 의미를 갖는다.

[0081] **II. 펩티드**

[0082] ECT2로부터 유래된 펩티드가 CTL에 의해 인식되는 항원으로서 기능 한다는 것을 보이기 위하여, ECT2(서열 번호: 42)에서 유래된 펩티드가 흔히 HLA 대립 유전자와 만나는 HLA-A2에 의해 제한되는 항원 에피토프인지 결정하기 위하여 ECT2(서열 번호: 42)에서 유래된 펩티드를 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).

[0083] HLA-A2와 결합 친화력(binding affinity)에 기초하여 ECT2로부터 유래된 HLA-A2 결합 펩티드 후보가 동정되었다. 하기의 후보펩티드가 동정되었다:

[0084] ECT2-A2-9-34(서열번호 1),

[0085] ECT2-A2-9-619(서열번호 2),

[0086] ECT2-A2-9-664(서열번호 3),

[0087] ECT2-A2-9-662(서열번호 4),

[0088] ECT2-A2-9-634(서열번호 5),

[0089] ECT2-A2-9-145(서열번호 6),

[0090] ECT2-A2-9-561(서열번호 7),

[0091] ECT2-A2-9-98(서열번호 8),

[0092] ECT2-A2-9-575(서열번호 9),

[0093] ECT2-A2-9-240(서열번호 10),

[0094] ECT2-A2-9-292(서열번호 11),

[0095] ECT2-A2-9-823(서열번호 12),

[0096] ECT2-A2-9-220(서열번호 13),

[0097] ECT2-A2-9-755(서열번호 14),

[0098] ECT2-A2-9-357(서열번호 15),

[0099] ECT2-A2-9-438(서열번호 16),

[0100] ECT2-A2-9-874(서열번호 17),

[0101] ECT2-A2-9-568(서열번호 18),

[0102] ECT2-A2-9-166(서열번호 19),

[0103] ECT2-A2-9-443(서열번호 20),

[0104] ECT2-A2-10-33(서열번호 21),

[0105] ECT2-A2-10-633(서열번호 22),

[0106] ECT2-A2-10-144(서열번호 23),

[0107] ECT2-A2-10-701(서열번호 24),

[0108] ECT2-A2-10-754(서열번호 25),

[0109] ECT2-A2-10-557(서열번호 26),

[0110] ECT2-A2-10-191(서열번호 27),

[0111] ECT2-A2-10-774(서열번호 28),

[0112] ECT2-A2-10-428(서열번호 29),

[0113] ECT2-A2-10-618(서열번호 30),

[0114] ECT2-A2-10-97(서열번호 31),

[0115] ECT2-A2-10-20(서열번호 32),

[0116] ECT2-A2-10-574(서열번호 33)

[0117] ECT2-A2-10-461(서열번호 34),

[0118] ECT2-A2-10-664(서열번호 35),

[0119] ECT2-A2-10-575(서열번호 36),

[0120] ECT2-A2-10-430(서열번호 37),

[0121] ECT2-A2-10-511(서열번호 38),

[0122] ECT2-A2-10-471(서열번호 39), 및

[0123] ECT2-A2-10-87(서열번호 40).

[0124] 또한, 시험관 내(in vitro)에서 상기 펩티드를 부가한(pulsed)[적재한(loaded)] 수지상 세포(dendritic cells; DC)에 의해 T 세포를 자극시킨 후, CTL은 하기 펩티드의 각각으로 자극된 DC에 의하여 성공적으로 수립되었다:

[0125] ECT2-A2-9-34(서열번호 1),

[0126] ECT2-A2-9-664(서열번호 3), 및

[0127] ECT2-A2-10-33(서열번호 21).

[0128] 상기 수립된 CTL은 각각의 펩티드에 의해 자극받은 표적 세포에 대해 강력한 특이적 CTL 활성을 보인다. 상기 결과는 ECT2가 CTL에 의해 인식되는 항원이며, 상기 검사되는 펩티드들은 HLA-A2에 의해 제한되는 ECT2의 에피토프 펩티드임을 나타낸다.

[0129] 상기 ECT2 유전자가 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이를 한정하지 않는 암세포 및 암 조직에 과발현되어 있지만, 대부분의 정상 기관에서 발현되지 않기 때문에, 이것은 암 면역치료에 대한 좋은 표적이다. 따라서, 본 발명은 ECT2 유래, CTL 인식 에피토프의 노나펩티드(nonapeptides, 9개의 아미노산으로 구성된 펩티드)와 데카펩티드(decapeptides, 10개의 아미노산으로 구성된 펩티드)를 제공한다. 또한, 본 발명은 HLA 항원에 결합 및 세포독성 T 세포를 유도하는 분리된 펩티드를 제공하고, 상기 펩티드는 서열번호 42의 아미노산 서열을 가지며, 이의 면역학적 단편을 갖는다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 실시예에서, 본 발명은 서열번호 1 내지 40 중으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 제공한다.

[0130] 일반적으로, Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1,152(1):163-75 및 Nielsen M et al., Protein Sci

2003; 12:1007-17에 기재되어 있는 것과 같이, 인터넷상에서와 같은 현재 사용가능한 소프트웨어 프로그램은 컴퓨터 상(in silico)에서 다양한 펩티드와 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):1872-81, Larsen MV et al., BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31; 8:424, Buus S et al., Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12:1007-17, 및 예를 들어, Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220에 요약된 Nielsen M et al., PLoS ONE 2007; 2:e796에 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 ECT2 유래 그것들의 단편을 선별하기 위하여 이러한 소프트웨어 프로그램을 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 이러한 알려진 프로그램을 이용하여 확인된 HLA 항원에 결합하는 ECT2 유래 어떤 단편으로 구성된 펩티드를 포함한다. 또한, 상기 펩티드는 ECT2의 전장(full length) 펩티드를 포함할 수 있다.

[0131] 본 발명의 펩티드, 특히 본 발명의 노나펩티드 및 데카펩티드인, 본 발명의 펩티드는 상기 펩티드가 이의 CTL 유도성을 유지하는 한, 부가적 아미노산 잔기를 인접시킬 수 있다. 상기 본 발명의 펩티드의 측면에 배치된 특정한 부가적인 아미노산 잔기는 원래 펩티드의 CTL 유도성을 손상시키지 않는 한, 어떤 유형의 아미노산으로도 구성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 ECT2 유래의 펩티드를 포함하고, HLA 항원에 결합능력을 가진 펩티드를 포함한다. 상기 펩티드들은, 예를 들어 약 40 아미노산 미만, 보통 20 아미노산 미만, 대개 약 15 아미노산 미만이다.

[0132] 일반적으로, 펩티드 중에서 하나 또는 그 이상의 아미노산의 변형은 상기 단백질의 기능에 영향을 미치지 않고, 또한 어떠한 경우에는 원래 단백질의 원하는 기능을 증진시킨다고 알려져 있다. 실제로, 변형된 펩티드(즉, 원래의 참조 서열에 대하여 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 첨가 및/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 실시예에 의해, CTL 유도성을 가진 본 발명의 펩티드는 서열번호 1 내지 40 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지며, 여기에서 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산이 첨가, 도입, 결실 및/또는 치환된 것으로 구성되어있다.

[0133] 당업자는 단일 아미노산 또는 적은 비율의 아미노산을 변화시키는 아미노산 서열에 대한 개개의 첨가 도입, 결실 및/또는 치환이 원래 아미노산 서열 측쇄(side-chain)의 특성의 보존을 야기시키는 경향이 있다는 것을 알 수 있을 것이다; 따라서, 상기의 것을 "보존적 치환(conservative substitution)" 또는 "보존적 변형(conservative modification)"이라고 하며, 여기서 단백질의 변화는 원래의 단백질과 비슷한 기능을 가지는 변형된 단백질을 야기한다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환표는 당업계에서 잘 알려져 있다. 아미노산 측쇄의 특징의 예는 소수성 아미노산(hydrophobic amino acids: A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산(hydrophillic 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 서로에게 보존적 치환인 아미노산을 포함한다:

[0134] 1) 알라닌(alanine; A), 글리신(glycine; G);

[0135] 2) 아스파라긴산(aspartic acid; D), 글루탐산(glutamic acid; E);

[0136] 3) 아스파라긴(aspargine; N), 글루타민(glutamine; Q);

[0137] 4) 아르기닌(arginine; R), 리신(lysine; K);

[0138] 5) 이소루신(isoleucine; I), 루신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 발린(valine; V);

[0139] 6) 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(tryptophan; W);

[0140] 7) 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T); 및

[0141] 8) 시스테인(cysteine; C), 메티오닌(methionine; M)(예를 들면, Creighton, Proteins 1984 참조).

[0142] 이러한 보존적으로 변형된 펩티드 또한 본 발명의 펩티드로 간주한다. 그러나, 본 발명의 펩티드는 그들에 한정되지 않고, 그 결과적인 변형된 펩티드가 원래 펩티드의 필요한 CTL 유도성을 가지는 한, 비보존적인 변형도 포함할 것이다. 또한, 상기 변형된 펩티드는 CTL 유도 가능한, 다형성 변종(polymorphic variants), 종간 상동체(interspecies homologues), 및 ECT2 대립 유전자의 펩티드를 제외하지 않는다.

[0143] 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 5개 또는 그 이하의 아미노산, 예를 들면 4개 또는 3개 또는 그 이하의 아미노산을 의미한다. 변형되는 아미노산의 비율은 20% 또는 그 이하, 바람직하게는 15% 또는 그 이하, 더 바람직하게는 10% 또는 그 이하 또는 그보다 더욱 바람직하게는 1 내지 5%일 수 있다.

[0144] 암 면역치료법의 맥락에서 사용되었을 경우, 본 발명의 펩티드는 세포의 표면 또는 엑소솜, 바람직하게는 HLA 항원과 복합체로서 제시될 것이다. 따라서, 상기 펩티드는 CTL을 유도할 뿐만 아니라, HLA 항원에 높은 결합능력을 가진 것을 선택하는 것이 바람직하다. 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.

[0145] 예를 들어, 높은 HLA-A2 결합 친화도를 나타내는 펩티드에서, N-말단으로부터 두 번째 아미노산이 루신 또는 메티오닌으로 치환되거나, 상기 아미노산에서 C-말단이 발린 또는 루신으로 치환되는 경향이 있다. 따라서, 서열번호 1 내지 40 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 상기 펩티드는, 서열번호의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 두 번째 아미노산 서열이 루신 또는 메티오닌으로 치환되고, 및/또는 상기 서열번호의 아미노산 서열의 C-말단이 발린 또는 루신으로 치환된 것이 본 발명에 포함된다.

[0146] 치환은 말단 아미노산 뿐만 아니라 가능성 있는 펩티드의 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR)인지 부위에 도입될 수 있다. 여러 연구, 예를 들면 CAP1, $p53_{(264-272)}$, $Her\text{-}2/neu_{(369-377)}$ 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 펩티드는 원래의 펩티드와 동일하거나 또는, 더욱 좋은 기능을 가질수 있다는 것을 나타내었다.

[0147] 본 발명은 상기 펩티드의 N 및/또는 C-말단의 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산을 도입을 고려한다. 높은 HLA 항원 결합능력이 있고, CTL 유도성을 유지하는 상기 변형된 펩티드 역시 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 본 발명은 하기를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성되고, 14, 13, 12, 11, 또는 10개 미만 길이의 분리된 펩티드를 제공한다:

[0148] (i) 서열번호 1 내지 20을 포함하는 군에서부터 선택된 아미노산 서열로, 상기 아미노산 서열에 1, 2 또는 여러 개의 아미노산이 치환되고, HLA 항원에 결합 및 세포독성 T 세포를 유도하는 펩티드, 및

[0149] (ii) (i)에 있어서, 상기 아미노산 서열은 하기의 특징을 하나 또는 모두 갖는다:

[0150] (a) 서열번호의 N-말단에서부터 두 번째 아미노산이 루신 또는 메티오닌을 포함한 군으로부터 선택; 및

[0151] (b) 서열번호의 C-말단의 아미노산이 발린 또는 루신을 포함한 군으로부터 선택.

[0152] 또한, 본 발명은 하기를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 15, 14, 13, 12, 또는 11개 미만의 아미노산 길이인 분리된 펩티드를 제공한다:

[0153] (i) 서열번호 21 내지 40을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 서열로, 상기 아미노산 서열에 1, 2 또는 여러 개의 아미노산이 치환되고, HLA 항원에 결합 및 세포독성 T 세포를 유도하는 펩티드, 및

[0154] (ii) (i)에 있어서, 상기 아미노산 서열은 하기의 특징을 하나 또는 모두 갖는다:

[0155] (a) 서열번호의 N-말단에서부터 두 번째 아미노산이 루신 또는 메티오닌을 포함한 군으로부터 선택; 및

[0156] (b) 서열번호의 C-말단의 아미노산이 발린 또는 루신을 포함한 군으로부터 선택.

[0157] 상기 펩티드들은 상기 펩티드가 APC와 접촉하거나 APC에 도입될때, (i), (ii), (i'), 및 (ii')의 펩티드를 제시

하기 위해, APC에서 가공된다.

[0158] 그러나, 상기 펩티드 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 펩티드 서열이 다른 단백질의 아미노산 서열과 일치하는 상황을 피하기 위해서, 사용가능한 데이터베이스를 이용하여 상동성 검색을 수행하는 것이 할 수있는 하나이다. 목표 펩티드(objective peptide)와 하나 또는 두 개의 아미노산 차이가 있는 펩티드마저도 존재하지 않는다는 것이 상동성 검색에서 드러날 경우, 어떠한 부작용의 위험 없이 HLA 항원과 결합 친화성, 및/또는 CTL 유도성을 증강시키기 위해, 상기 목표 펩티드를 변형시킬 것이다.

[0159] 상기와 같이, HLA 항원에 대해 높은 결합 친화성을 가지는 펩티드는 매우 효과적일 것이라고 기대되지만, 높은 결합 친화성의 존재에 따라 지표로서 선택된 후보 펩티드는 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 펩티드의 능력을 의미한다. 또한, "CTL 유도성"은 펩티드의 CTL 활성화, CTL 증식을 유도하고, CTL에 의한 표적세포의 용해 촉진시키며, 및 CTL의 IFN-감마(gamma) 생산을 증가시키는 능력을 포함한다.

[0160] 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 펩티드를 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 MHC(HLA) class II restricted T(H) response에 기재된 것)을 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 표적세포를 ^{51}Cr 등으로 방사 표지할 수 있고, 상기 표적세포로부터 방출된 방사능으로부터 세포독성 활성을 산출할 수 있다. 또는, CTL 유동성은 고정화된 펩티드를 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.

[0161] 상기 기술된 펩티드의 CTL 유도성을 시험한 결과, 서열번호 1 내지 40 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 펩티드들 중에서 선택된 노나펩티드(nonapeptides) 및 데카펩티드(decapeptides)가 특히 높은 CTL 유도성 및 HLA-A 항원에 높은 결합 친화도를 보이는 것을 확인하였다. 따라서, 이러한 펩티드들은 본 발명의 바람직한 실시예로서 예시된다.

[0162] 또한, 상동성 분석(homology analysis)의 결과는 이러한 펩티드들이 어떠한 다른 알려진 인간 유전자 산물 유래 펩티드와 현저한 상동성을 공유하지 않음을 보인다. 이것은 상기 펩티드를 면역치료법에서 사용하였을 때, 알려지지 않거나 또는 원하지 않은 면역 반응에 대한 가능성을 낮춘다. 그러므로, 또한 이러한 측면으로부터, 이러한 펩티드들은 암 환자의 ECT2에 대한 면역력을 유도하는 것에 유용하다. 따라서, 본 발명의 펩티드는, 바람직하게, 서열번호 1 내지 40 중에서 선택된 아미노산 서열을 가진 것으로 본 발명에 의해 구성된 펩티드이다.

[0163] 상기에서 논의된 본 발명의 변형뿐 아니라, 본 발명은 연결된 펩티드가 원래 펩티드의 필수적인 CTL 유도성을 가지고 있는 한 다른 펩티드와 연결될 수 있고, 보다 바람직하게는 그것의 필수적인 HLA 결합도 역시 유지한다. 예시적인 "다른" 펩티드는 하기를 포함한다: 본 발명의 펩티드 또는 다른 TAA로부터 유래된, CTL 유도성 펩티드. 상기 펩티드 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.

[0164] 예를 들면, 비-ECT2(non-ECT2) 종양관련 항원 펩티드는 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. 또한, 특정 개체가 추가적 종양관련 유전자를 발현하는지 결정하고 그 후 본 발명의 ECT2 조성물 또는 백신에서 상기 유전자의 발현 생산물로부터 유래된 HLA 종류 I 및/또는 HLA 종류 II 결합 펩티드를 포함할 것인가는 당업계에서 평범한 기술 중 하나를 위한 일반적인 실험방법의 영역 내에 있다.

[0165] HLA 종류 I 및 HLA 종류 II 결합 펩티드의 예는 당업자에게 알려져 있고(예를 들면, Coulie. Stem Cells

13:393-403. 1995를 참조), 여기서 공개하는 것과 같은 방법과 연결하여 본 발명에서 사용될 수 있다. 당업자는 하나 또는 그 이상의 ECT2 펩티드 및 하나 또는 그 이상의 비-ECT2 펩티드를 포함하는 폴리펩티드, 또는 분자 생물학의 일반절차를 이용하여 상기 펩티드를 암호화하는 핵산을 제조할 수 있다.

[0166] 상기 연결된 펩티드는 여기에서 "폴리톱(polytopes)"이라고 하며, 즉, 다양한 조절[예를 들면, 연결(concatenated), 겹침(overlapping)]에서 함께 연결될 수 있는 펩티드를 자극시키는 둘 또는 그 이상의 잠재적인 면역형성적 또는 면역 반응의 군이다. 면역 반응을 자극, 증진 및/또는 유발시키는 폴리톱의 효과를 검사하기 위하여 상기 폴리톱(또는 폴리톱을 암호화하는 핵산)은 표준 면역화 프로토콜에 따라, 예를 들면 동물에 투여될 수 있다.

[0167] 펩티드는 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 Biothechnol. 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.

[0168] 본 발명의 상기 펩티드는 그들이 원래 펩티드의 CTL 유도성을 보유하고 있는 한, 다른 물질에 더 결합할 수 있다. "다른" 물질의 설명적인 예는 펩티드, 지질, 당 및 당 측쇄, 아세틸기, 천연 및 합성 폴리머 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 변형이 이곳에 설명된 펩티드의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 한, 당화(glycosylation), 측쇄 산화, 또는 인산화 등의 변형을 포함할 수 있다. 이러한 종류의 변형은 추가적인 기능(예를 들어, 표적 기능 및 전달 기능)을 제공하거나 또는 상기 폴리펩티드를 안정시키기 위해 수행될 수 있다.

[0169] 예를 들면, 폴리펩티드의 생체 내 안정성을 증대시키기 위해, D-아미노산, 아미노산 모방체, 또는 비천연 아미노산을 도입하는 것은 당업계에서 잘 알려져 있으며; 이 개념은 또한 본 발명의 폴리펩티드에 쓰일 것이다. 폴리펩티드의 안정성은 여러 가지 방법으로 검사될 수 있다. 예를 들면, 펩티다제(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).

[0170] 또한, 상기에 기술된 것과 같이, 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산 잔기에 의해 치환되거나, 삽입되거나, 결실되거나 또는 첨가되어 변형된 펩티드 중에서, 원래의 펩티드와 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 펩티드를 스크리닝하거나 또는 선택하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 상기 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:

[0171] a: 본 발명 펩티드의 최소한 하나의 아미노산 잔기가 치환, 삽입, 결실 또는 첨가하는 단계:

[0172] b: 펩티드의 활성을 결정하는 단계: 및

[0173] c: 원래의 것에 비교하여 동일하거나 더 높은 활성을 갖는 펩티드를 선택하는 단계.

[0174] 여기서, 상기 활성은 MHC 결합 활성, APC, 또는 CTL 유도성 및 세포독성 활성을 포함할 수 있다.

[0175] 여기에서, 본 발명의 펩티드는 "ECT2 펩티드(들)" 또는 "ECT2 폴리펩티드(들)"로 기술될 수 있다.

[0176] **III. ECT2 펩티드의 제조**

[0177] 본 발명의 펩티드는 잘 알려진 기술을 사용하여 제조할 것이다. 예를 들면, 상기 펩티드는 재조합 DNA 기술 또는 화학 합성으로 합성적으로 제조할 것이다. 본 발명의 펩티드는 개별적으로, 또는 두 개 또는 이상의 펩티드를 포함한 더 긴 폴리펩티드로 합성할 것이다. 상기 펩티드는 다른 자연적으로 발생한 숙주 세포 단백질 및 이의 단편, 또는 다른 화학 물질이 거의 없도록 분리, 즉 정제되거나 분리될 수 있다.

[0178] 본 발명의 펩티드는 여기서 기술하는 본 펩티드(original peptide)의 생물학적 활성을 저해하지 않는다면, 당화(glycosylation), 측쇄 산화, 또는 인산화와 같은 변형을 포함할 것이다. 다른 예시적 변형은 펩티드의 혈청 반감기(serum half life)를 증가시키기 위해 D-아미노산 또는 사용될 수 있는 다른 아미노산 모방체의 통합을 포함할 것이다.

[0179] 본 발명의 펩티드는 선택된 아미노산 서열을 기반으로 화학 합성을 통해 얻을 수 있다. 예를 들어, 합성에 적용될 수 있는 보편적인 펩티드 합성 방법은 하기를 포함한다:

[0180] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

[0181] (ii) The Preteins, Vol 2, Academic Press, New York, 1976;

[0182] (iii) Peptide Synthesis(일본어),Maruzen Co, 1975;

[0183] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis(일본어), Maruzen Co, 1985;

[0184] (v) Development of Pharmaceuticals(제 2판)(일본어), Vol. 14(peptide synthesis), Hirokawa, 1991 ;

[0185] (vi) WO99/67288; 및

[0186] (vii) Barany G. & Merrifield RB, Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis,"Academic Press, New York, 1980, 100-118.

[0187] 또는, 본 발명의 펩티드는 펩티드를 제작하기 위한 임의의 잘 알려진 유전자 조작 방법을 사용해서 얻어질 것이다(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. 상기 벡터 및 숙주세포는 본 발명에서 역시 제공된다. 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.

[0188]

[0189] **IV. 폴리뉴클레오티드**

[0190] 또한, 본 발명은 본 발명의 상기 언급한 펩티드 중 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이들은 자연적으로 존재하는 ECT2 유전자[GenBank Accession No. AY376439(예를 들면, 서열 번호: 41)]에서 유래한 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 이의 보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열을 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, GCU및 GCG은 모두 알라닌 아미노산을 암호화한다. 따라서, 코돈에 의해 결정되는 알라닌의 모든 위치에서, 암호화되는 폴리펩티드의 변경없이, 상기 코돈은 상응하는 코돈 중 어느 하나로 변경될 것이다. 이러한 핵산 변이를 "침묵 변이(silent variations)"라 당업계에 알려져 있고, 보존적으로 변형된 변종의 한 종류를 대표한다. 펩티드를 암호화하는 본 명세서에 묘사된 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, 공개된 각각의 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 그것과 연관된 침묵변이가 내포된 사실을 나타낸다.

[0191] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로 구성될 것이다. 당업계에 잘 알려진 바와 같이, DNA 분자는 자연적으로 생성되는 염기인 A, T, C 및 G와 같은 염기로 적절하게 구성되고, T는 RNA에서 U로 대체된다. 당업자는 비-자연적으로 존재하는 염기 또한 폴리뉴클레오티드에 포함된다는 것을 인지할 것이다.

[0192] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 아미노산 서열 사이의 개입(intervening) 유무를 불문하고 본 발명의 펩티드를 포함하는 다양한 펩티드를 암호화할 것이다. 예를 들면, 상기 개재 아미노산 서열은 폴리뉴클레오티드 또는 번역된 펩티드의 절단 부위(예를 들면, 효소 인식 서열)를 제공할 것이다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 코딩 서열에 대한 어떠한 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 펩티드의 발현에 필요한 조절 서열을 포함하는 재조합형 폴리뉴클레오티드일 수 있고 또는 마커 유전자등을 가지는 발현 벡터(플라스미드)일 것이다. 일반적으로, 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드는, 예를 들면, 중합효소(polymerase)및 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 이용한 종래의 재조합 기술을 통해 폴리뉴클레오티드를 조작하여 제조할 수 있을 것이다.

[0193] 재조합 기술 및 화학 합성 기술은 모두 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 제작하는 데 사용할 것이다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드는 반응능(competent) 세포에 형질전환되어 발현하는 적절한 벡터 내에 삽입하여 제작할 것이

다. 또는, PCR 기술 또는 적절한 숙주에서의 발현을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시킬 것이다(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 것이다.

[0194] **V. 엑소솜(Exosomes)**

[0195] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩티드와 HLA 항원 사이에 형성된 복합체를 그 표면에 제시하는 엑소솜이라는 세포 내 소낭(vehicle)을 제공한다. 엑소솜은 예를 들면, 일본 특허출원 제 11-510507호 및 WO99/03499에 설명된 방법을 사용하여 제조될 것이고, 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 환자에게서 얻어진 APCs를 사용하여 제조될 것이다. 본 발명의 엑소솜은 본 발명의 상기 펩티드와 유사한 방법으로 백신으로서 접종될 것이다.

[0196] 복합체에 함유된 HLA 항원의 종류는 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 개체의 HLA 항원의 종류와 반드시 일치해야 한다. 예를 들면, 일본인을 위해서는 HLA-A2, 특히, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 및 HLA-A*0250이 적합할 것이다. 일본인과 백인에게서 높게 발현되는 A24 또는 A2 종류의 사용은 효과적인 결과를 얻기 위해 바람직하고, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 및 HLA-A*0250과 같은 아류형(subtype)도 이용할 수 있다. 일반적으로, 임상에서는, 치료를 필요로 하는 환자의 HLA 항원의 종류는 미리 검사되고 있어, 상기 항원에 대해 높은 수준의 결합 친화성을 갖거나, 항원제시에 의한 세포독성 T 세포(CTL) 유도성을 가지는 펩티드를 적절하게 선택하는 것이 가능하게 된다. 또한, 높은 결합 친화성 및 CTL 유도성을 보이는 펩티드를 얻기 위하여, 자연에 존재하는 ECT2 부분적 펩티드의 아미노산 서열을 바탕으로, 1, 2, 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 삽입, 결실, 또는 도입이 수행될 수 있다.

[0197] A2형 HLA 항원을 본 발명의 엑소솜을 위해 사용한 경우, 서열번호 1 내지 40 중 어느 하나의 서열을 가지는 펩티드가 특히 사용된다.

[0198] **VI. 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs)**

[0199] 또한, 본 발명은 HLA 항원과 본 발명의 펩티드 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 펩티드, 엑소솜 또는 CTL을 포함하는 다른 약물과 조합하여 투여될 것이다.

[0200] 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 활성을 가지는 APCs 중 하나이므로, 수지상세포는 본 발명의 APCs로서 사용할 수 있다.

[0201] 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 펩티드와 접촉(자극)시켜 본 발명의 APCs를 얻을 수 있다. 본 발명의 펩티드를 개체에 투여하면, 본 발명의 펩티드가 제시된 APCs가 개체의 체내에서 유도된다. 따라서 본 발명의 APCs는 본 발명의 펩티드를 개체에 주입한 후 개체에서 수집할 수 있다. 또는, 본 발명의 상기 APCs는 본 발명의 상기 펩티드가 주입된 개체로부터 수득한 APCs와 접촉함으로써 얻게 될 수 있다.

[0202] 본 발명의 상기 APC는, 그들 자신에 의해 개체내의 암에 대하여 면역반응을 유도할 개체에게, 또는 상기 펩티드, 엑소솜 또는 본 발명의 CTL을 포함하는 다른 약물과의 조합으로 개체로 투여될 수 있다. 예를 들면, 생체 외 투여는 하기 단계를 포함할 것이다:

[0203] a: 첫번째 개체로부터 APCs 수집하는 단계,

[0204] b: 단계 a의 APCs와 상기 펩티드를 접촉하는 단계 및

[0205] c; 단계 b의 APCs를 2번째 개체에 투여하는 단계.

[0206] 첫 번째 개체와 두 번째 개체는 같은 개체일 수 있고, 또는 다른 개체일 수 있다. 단계 b에서 수득된 APC는 암 치료 및/또는 예방을 위한 백신으로 투여될 수 있고, 암의 예는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0207] 또한, 본 발명은 APC 유도용 약학적 조성물의 제조를 위한 방법 또는 과정을 제공하며, 이는 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)를 혼합하거나 제형화하는 과정을 포함한다.

[0208] 본 발명의 하나의 측면에 따르면, APCs는 높은 수준의 CTL 유도성을 가지고 있다. "높은 수준의 CTL 유도성"이라는 용어에 있어서, 상기 높은 수준은 펩티드와 접촉시키지 않는 APCs 또는 CTL을 유도할 수 없을지도 모르는 펩티드와 접촉시킨 APCs의 CTL 유도성수준과 비교한 CTL 유도성 수준이다. 높은 수준의 세포독성 T 세포 유도성을 가지는 이러한 APCs는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한 유전자를 시험관 내에서 APCs에 도입하는 단계를 포함하는 방법으로 제조될 것이다. 상기 도입 유전자는 DNA 또는 RNA 종류일 수 있다. 도입 방법으로는, 특별한 제한 없이, 본 기술분야에서 일반적으로 실시되는 다양한 방법, 예를 들면, 리포펙션(lipofection), 전기천공법(electroporation), 및 인산칼슘법등이 포함될 것이다. 보다 구체적으로는, 이는 Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 특허공보 제2000-509281호에 기재된 것에 따라 실시될 것이다. 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 부분적인 펩티드가 제시된다.

[0209] **VII. 세포독성 T 세포(Cytotoxic T lymphocytes; CTL)**

[0210] 본 발명의 임의의 펩티드에 대해 유도된 세포독성 T 세포는 생체 내에서 종양 관련 내피를 표적으로 하는 면역반응을 증강하고 그로 인하여 상기 펩티드 그 자체와 유사한 방법으로 백신으로서 사용될 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 펩티드에 의해 특이적으로 유도 또는 활성화된 분리된 세포독성 T 세포를 제공한다.

[0211] 이러한 CTL은(1)본 발명의 펩티드를 개체에 투여 또는 (2) 개체 유래 APCs, CD8 양성 T 세포, 또는 본 발명의 펩티드와 함께 시험관 내에서 말초 혈액 단핵 림프구 접촉(자극) 또는(3) CD8 양성 T 세포 또는 말초 혈액 단핵 림프구와 시험관 내에서 그것의 표면에 HLA 항원과 본 발명의 펩티드 복합체를 제시하는 APCs 또는 엑소솜을 접촉하고 또는(4) 본 발명의 펩티드와 결합하는 T 세포 수용체 서브유닛(subnit)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자의 도입으로 얻어질 것이다. 상기 APCs 또는 엑소솜은 상기 기재 방법 및(4)의 상세한 방법에 의해 준비될 수 있으며,(4)의 방법은 아래 "VIII. T 세포 수용체(TCR)" 부분에서 열거된다.

[0212] 본 발명의 CTL은 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 개체로부터 유래할 수 있고, 그 자체, 또는 조절 효과의 목적을 위한 본 발명의 펩티드 또는 엑소솜을 포함하여 다른 약물과 조합하여 투여할 수 있다. 상기 얻어진 세포독성 T 세포는 본 발명의 펩티드, 예를 들어, 유도를 위해 사용한 것과 동일한 펩티드를 제시하는 표적 세포에 대해 특이적으로 작용한다. 상기 표적 세포는 암세포와 같은 ECT2를 내생적으로 발현하는 세포, 또는 ECT2 유전자가 형질전환된 세포이고; 본 발명의 펩티드에 의한 자극에 의해 세포 표면에 상기 펩티드를 제시하는 세포도 활성화된 CTL 공격의 표적이 될 수 있다.

[0213] **VIII. T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)**

[0214] 또한, 본 발명은 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)의 서브유닛(subunit)를 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물 및 이를 이용한 방법을 제공한다. TCR 서브유닛(subunit)은 ECT2를 발현하는 종양세포에 대한 특이성을 T 세포에 부여하는 TCR 형성 능력을 가진다. 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 펩티드로 유도된 CTL의 TCR 서브유닛을 구성하는 알파쇄(alpha chain) 및 베타쇄(beta chain)를 암호화하는 핵산이 동정 될 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 ii5'-R 프라이머(5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (서열 번호: 93) 및 TCR 알파 사슬(alpha chain) C 부위에 특이적인 3-TRa-C 프라이머(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3')(서열

번호: 94), TCR 베타 사슬(beta chain) C1 부위에 특이적인 3-TRb-C1 프라이머(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3')(서열 번호: 95) 또는 3' 측면 프라이머로서 TCR 베타 사슬 C2 부위에 특이적인 3-TR 베타-C2 프라이머(5'-ctagcctctggaatccttctctt-3')(서열 번호: 96)일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 상기 TCR 유도체는 ECT2를 제시하는 표적세포에 높은 결합력(avidity)으로 결합할 수 있고, 상기 ECT2 펩티드를 제시하는 표적세포의 효과적인 사멸을 생체 내 또는 시험관 내에서 선택적으로 매개할 수 있다.

[0215] 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.

[0216] 특이적 TCR은 본 발명의 펩티드 및 HLA 분자의 복합체를 특이적으로 인지할 수 있는 수용체이고, 이것은 상기 TCR이 상기 T 세포 표면에 제시되어 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 펩티드를 이용한 HLA 중합체 염색 분석(HLA multimer staining analysis), 및 ELISPOT 분석을 포함한다. ELISPOT 분석을 수행함으로써, 세포 표면에 TCR을 발현하는 T 세포가 TCR에 의해 세포를 인지하고, 신호가 세포 내부로 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.

[0217] 또한, 본 발명은 ECT2 펩티드, 예를 들면 HLA-A2 맥락에서 서열번호 1 내지 40 펩티드에 결합하는 TCR 아단위(subunit) 폴리펩티드를 암호화하는 핵산(nucleic acid)으로 형질전환하여 제조된 CTL을 제공한다.

[0218] 상기 형질전환된 CTL은 생체 내에서 암세포로 홈밍(homing)할 수 있으며, 잘 알려진 배양 방법으로 시험관 내에서 증식시킬 수 있다[예를 들면, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461(1989)]. 본 발명의 상기 CTL은, 치료나 보호를 필요로 하는 환자에서 암의 치료 또는 예방에 유용한 면역학적 조성물을 구성하는데 사용될 수 있다(WO2006/031221).

[0219] **IX. 약학적 물질 또는 조성물**

[0220] ECT2 발현은 정상 세포와 비교하여 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하는 암에서 특이적으로 증가하기 때문에, 본 발명의 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 암의 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 펩티드, 또는 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 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 펩티드는 상기 엑소좀 또는 약학적 물질 또는 조성물로서 사용되는 APCs와 같은 세포의 임의의 표면에서 발현할 수 있다. 또한, 상기 언급한 본 발명의 어떤 펩티드를 표적으로 하는 세포독성 T 세포는 또한 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물의 유효 성분으로서 사용될 수 있다.

[0221] 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 의미한다.

[0222] 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 환자에게서 암을 치료 및/또는 방지, 및/또는 수술 후 재발을 방지하기 위해 사용될 수 있다.

[0223] 다른 실시예에서, 본 발명은 하기 중에서 선택된 유효성분으로 암 또는 종양의 치료 및/또는 예방을 위해 제형화된 약학적 제제, 물질 또는 조성물을 생산함에 있어 유효성분의 사용을 제공한다:

[0224] (a) 본 발명의 펩티드;

[0225] (b) 발현가능한 형태로 본 발명에 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0226] (c) 본 발명의 펩티드를 이의 표면에 제시하는 APC 또는 엑소솜; 및

[0227] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0228] 또는, 본 발명은 또한, 암 또는 종양의 치료 또는 예방의 용도를 위한 하기에서 선택된 유효 성분을 제공한다:

[0229] (a) 본 발명의 펩티드;

[0230] (b) 발현가능한 형태로 본 발명에 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0231] (c) 본 발명의 펩티드를 이의 표면에 제시하는 APC 또는 엑소솜; 및

[0232] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0233] 또는, 본 발명은 추가적으로 암 또는 종양을 치료 또는 예방을 위한 약학적 제제, 조성물 또는 물질을 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:

[0234] (a) 본 발명의 펩티드;

[0235] (b) 발현할 수 있는 종류로 본 명세서에 공개된 이러한 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0236] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜;및

[0237] (d) 본 발명의 CTL.

[0238] 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 종양 또는 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 제제, 조성물 또는 물질을 제조하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법 또는 과정은 하기로부터 선택되는 유효 성분이 있는 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체를 혼합하는 단계를 포함한다:

[0239] (a) 본 발명의 펩티드;

[0240] (b) 발현할 수 있는 종류로 본 명세서에 공개된 이러한 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0241] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜;및

[0242] (d) 본 발명의 CTL.

[0243] 본 발명에 따라, HLA-A2에 제한된 에피토프 펩티드 또는 후보로 알려진 서열번호 1 내지 40은 강력하고 특이적인 면역 반응을 유도할 것이다. 따라서, 서열번호 1 내지 40의 아미노산 서열을 가지는 이러한 펩티드 중 어느 것을 포함하는 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물은 HLA 항원이 각각 HLA-A2인 개체에 투여에 특히 적합하다. 그러므로, 본 발명의 펩티드 중 어떤 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(즉, 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 약학적 물질 또는 조성물에 적용된다.

[0244] 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물로 치료되는 암은 ECT2가 관련된(예를 들어, 과다발현) 어떤 암을 포함하며, 암의 예는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0245] 상기 약학적 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.

[0246] 본 발명의 상기 약학적 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 포함할 수 있다. 예를 들면, 물질 또는 조성물은 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 물질 또는 조성물과 단계적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 약제 및 약학적 물질 또는 조성물의 양은, 예를 들면, 사용되는 약학적 물질 또는 조성물의 유형, 치료되는 질병, 투여의 일정과 루트(route)에 의존한다.

[0247] 특히 상기 언급한 성분뿐만 아니라, 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물은 논의가 되고 있는 제형의 종류에 관하여 당업계에서 일반적인 다른 물질 또는 조성물을 포함될 수 있다.

[0248] 본 발명의 한 실시예에서, 상기 약학적 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 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 물질 또는 조성물인 것을 나타내야 한다. 또한 라벨은 투여에 관한 지시 등에 대해 나타낼 수 있다.

[0249] 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 버퍼, 희석액, 필터, 니들, 주사기 및 사용설명서를 포함할 수 있다.

[0250] 상기 약학적 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 동반 할 수 있다.

[0251] (1) 상기 펩티드를 유효 성분으로 포함하는 약학적 물질 또는 조성물

[0252] 본 발명의 펩티드들은 약학적 물질 또는 조성물로 직접적으로 투여될 수 있으며, 또는 필요하다면, 종래의 제조방법에 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 물질 또는 조성물은 필요하다면, 안정제, 현탁액, 보존료, 계면활성제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물은 항암 목적으로 사용될 수 있다.

[0253] 본 발명의 펩티드들은 생체 내에서 CTL을 유도하기 위해 둘 또는 그 이상의 본 발명의 펩티드의 조합으로 준비될 수 있다. 상기 펩티드는 혼합제(cocktail)일 수 있고, 또는 표준 기술을 이용하여 각각 다른 것이 접합 될 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드들은, 링커(예를 들어, Lysine linker: K. S. Kawamura et al., J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715)로 하나 또는 여러 개의 아미노산을 가진, 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, APC(예를 들면, DC)는 개체에서 제거되고, 그리고나서 본 발명의 어떤 펩티드를 그것의 표면에 제시하고 있는 APC를 얻기 위해, 본 발명의 펩티드로 자극된다. 상기 APC는 개체에서 CTL을 유도하기 위해, 개체에 재투여되고, 그 결과로 종양-결합 내피(tumor-associated endothelium)에 대한 공격성(aggressiveness)이 증가될 수 있다.

[0254] 또한, 본 발명의 펩티드를 유효 성분으로 포함하는 암의 치료 및/또는 예방에 대한 상기 약학적 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 어떠한 화합물, 물질 또는 조성물을 나타낸다. 여기서 고려되고 있는 보강제는 문헌(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)에 기술되어 이는 것들을 포함한다. 예시적인 보강제는 알루미늄 포스페이트(aluminum phosphate), 알루미늄 하이드록시드(aluminum hydroxide), 알럼(alum), 콜레라 독소(cholera toxin), 살모넬라 독소(salmonella toxin), 불완전 프로인트 보강제(Incomplete Freund's adjuvant, IFA), 완전 프로인트 보강제(Complete Freund's adjuvant, CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, O/W 에멀전(O/W emulsion)과 같은 것을 포함하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0255] 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.

[0256] 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 aci

d)를 포함한다.

[0257] 또한, 어떤 실시예에서, 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물은 CTL을 준비하는 구성요소를 포함한다. 지질은 바이러스 항원에 대해 생체 내에서 CTL을 초회감작(priming)시킬 수 있는 물질 또는 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(tripalmitoyl-S-glycerylcysteinyl-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).

[0258] 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 펩티드의 복용량은 치료되기 위한 질환, 환자의 연령, 몸무게, 투여 방법, 등등에 알맞게 적용될 수 있고, 보통 0.001mg 내지 1,000mg, 예를 들면, 0.01mg 내지 100mg이며, 며칠 내지 몇 달에 한 번 투여될 수 있다. 당업자가 적절하게 알맞은 용량을 선택할 수 있다.

[0259] (2)폴리뉴클레오티드를 유효 성분으로 포함하는 약학적 물질 또는 조성물

[0260] 또한, 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 발현할 수 있는 종류로 본 명세서에서 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 여기에서, 상기 용어 "발현할 수 있는 종류"는 세포 안으로 상기 폴리뉴클레오티드가 도입되었을 때, 생체 내에서 폴리뉴클레오티드가 항종양 면역을 유도하는 폴리펩티드로 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 98/04720을 또한 참조한다. DNA-기반의 전달 기술의 예로서 "네이키트 DNA(naked DNA)", 용이한 전달[부피바카인(bupivacaine), 폴리머, 펩티드-매개], 양이온 지질 복합체 및 입자-매개("유전자 총")또는 압력-매개 전달을 포함한다(참조, 예를 들어, U.S. Patent No. 5,922,687).

[0261] 또한, 본 발명의 펩티드는 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 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 발현하는 벡터를 포함한다. 숙주에 도입하였을 때, 상기 재조합 백시니아 바이러스(vaccinia virus)는 면역성 펩티드를 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).

[0262] 환자로의 폴리뉴클레오티드 전달은 폴리뉴클레오티드를 운반하는 벡터에 환자가 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.

[0263] 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 발명에 적용될 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.

[0264] 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 펩티드를 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 1,000mg, 예를 들면, 0.01mg 내지 100mg이며, 며칠 내지 몇 달에 한 번 투여될 수 있다. 당업자는 적합한 용량을 적절히 선택할 수 있다.

[0265] **X.펩티드, 엑소솜, APCs 및 CTL을 이용하는 방법**

[0266] 본 발명의 펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 APCs 및 CTL을 제조하거나 또는 유도하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 엑소솜 및 APCs는 CTL을 유도하는데 사용될 수 있다. 상기 펩티드, 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 물질 또는 조성물 중 어떤 것은 CTL을 유도하는데 사용될 수 있다. 그것에 더하여, 또한 이러한 펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것은 아래 기재된 APCs를 유도하는데 사용될 수 있다.

[0267] (1) 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs) 유도 방법

[0268] 본 발명은 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드를 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 펩티드를 APCs와 접촉하는 하기 단계를 포함한다. 예를 들어, 생체 외에서 펩티드와 APCs를 접촉하는 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0269] a: 개체로부터 APCs를 수집하는 단계; 및

[0270] b: 펩티드 및 단계 a의 APCs를 접촉하는 단계.

[0271] APCs는 특정한 종류의 세포에 한정되지 않으며, 림프구에 의해 인식되기 위해서 단백질성의 항원을 그들의 세포 표면에 발현하는 것으로 알려져 있는 수지상세포, 랑게르한스 세포, 대식세포, B 세포 및 활성화된 T 세포를 포함한다. 바람직하게 DCs는 상기 APCs들 사이에서 이의 가장 강한 CTL 유도성을 갖는 이후로 사용될 수 있다. 본 발명의 어떠한 펩티드는, 본 발명의 다른 펩티드와 조합으로 함께 사용될 수 있다.

[0272] 반면에 본 발명의 펩티드가 개체에 투여될 때, 생체 내에서(in vivo) 상기 APC는 펩티드와 접촉되고, 그 결과 높은 CTL 유도성이 있는 APC는 개체의 몸에서 유도될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 펩티드를 개체에 투여하는 것을 고려한다. 비슷하게, 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 발현되는 형태로 개체에 투여될 때, 본 발명의 펩티드가 발현되고 생체 내에서 APC와 접촉하여, 결과적으로 개체의 몸에서 높은 CTL 유도성이 있는 APC를 유도한다. 따라서, 본 발명은 또한 개체에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 투여하는 단계를 고려할 것이다. 상기 구 "발현가능한 형태(expressible form)"는 상기 부분 "IX. 약학적 물질 및 조성물 (2) 유효성분으로 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약학적 물질 또는 조성물"에 기재된다.

[0273] 또한, 본 발명은 CTL 유도성이 있는 APC를 유도하기 위해 APC로 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 포함할 것이다. 예를 들면, 상기 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0274] a: 개체로부터 APCs의 수집하는 단계; 및

[0275] b: 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 도입하는 단계.

[0276] 단계 b는 상기 "VI. 항원-제시 세포" 부분에 기재한 것과 같이 수행될 수 있다.

[0277] 또는, 본 발명은 ECT2에 대한 특이적 CTL 활성을 유도하는 항원-제시 세포(APC)를 제조하는 방법을 제공하고, 여기에서 상기 방법은 하기의 단계의 하나를 포함할 수 있다:

[0278] (a) 시험관내에서(in vitro), 생체외에서(ex vivo), 또는 생체내에서(in vivo) APC를 본 발명의 펩티드와 접촉시키는 단계; 및

[0279] (b) 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC로 도입시키는 단계.

[0280] (2) CTL을 유도하는 방법

[0281] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드, 또는 엑소솜 또는 APCs를 사용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공한다.

[0282] 또한 본 발명은 본 발명의 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 인지하는 T 세포 수용체(TCR) 서브유닛을 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공한다. 바람직하게, CTLs을 유도하는 방법은 하기 중에서 선택된 최소 하나의 단계를 포함한다:

[0283] a) CD8-양성 T 세포를 그 표면에 HLA 항원 및 본 발명의 펩티드의 복합체를 제시하는 항원-제시 세포 및/또는 엑소솜과 접촉시키는 단계; 및

[0284] b) 본 발명의 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 인지하는 TCR 서브유닛을 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 CD8 양성 세포로 도입시키는 단계.

[0285] 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, APCs, 또는 엑소솜이 개체로 투여될 때, CTL은 개체의 몸에서 유도되고, 표적하는 암세포에 대한 면역 반응의 강도는 증진된다. 따라서, 본 발명의 방법은 CTL을 유도하기 위해 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, APCs 또는 엑소솜을 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0286] 또는, CTL은 그들을 생체 외에서 사용으로 유도될 수 있고, CTL 유도 후, 활성화된 CTL은 개체에 되돌려질 수 있다. 예를 들면, 상기 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0287] a: 개체로부터 APCs를 수집하는 단계;

[0288] b: 펩티드와 단계 a)의 APCs를 접촉하는 단계; 및

[0289] c: CD8 양성 세포와 단계 b)의 APCs를 공배양(co-culture)하는 단계.

[0290] 상기 단계 c에서 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 펩티드 및 HLA항원의 복합체를 그것의 표면에 효과적으로 제시하는 모든 APCs를 포함한다.

[0291] 상기 APCs 대신에, 본 발명의 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 표면에 제시하는 엑소솜도 사용될 수 있다. 즉, 본 발명은 HLA 항원 및 본 발명의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 엑소솜을 공배양하는(co-cultured) 것을 포함한다. 상기 엑소솜은 상기 "V. 엑소솜" 부분에 기술된 방법에 의해 준비될 수 있다.

[0292] 또한, 본 발명의 펩티드에 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.

[0293] 또한, 본 발명은 CTL을 유도하는 약학적 물질 또는 조성물을 제조하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용가능한 운반체를 혼합 또는 제조하는 단계를 포함한다.

[0294] (3) 면역 반응을 유도하는 방법

[0295] 또한, 본 발명은 ECT2와 관련된 질병에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 적합한 질병은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0296] 본 발명의 방법은 본 발명의 어떤 펩티드 또는 그들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 물질(들) 또는 조성물(들)을 투여하는 단계를 포함할 것이다. 또한, 본 발명의 방법은 본 발명의 어떤 펩티드를 제시하는 엑소솜 또는 APCs의 투여를 고려한다. 상세하게는, "IX. 약학적 물질 또는 조성물", 특히 백신으로서 본 발명의 약학적 물질 또는 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. 펩티드, 엑소솜, APC 및 CTL을 사용하는 방법"의(1) 및(2)에 상세하게 기술되어 있다.

[0297] 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 펩티드를 첨가하거나 또는 제형하는 단계를 포함할 것이다.

[0298] 또는, 본 발명의 방법은 하기를 포함하는, 본 발명의 백신 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있

다:

[0299] (a) 본 발명의 펩티드;

[0300] (b) 발현 가능한 형태로서 여기에서 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0301] (c) 표면에 본 발명의 펩티드를 제시하는 APC 또는 엑소솜; 또는

[0302] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0303] 본 발명의 맥락에서, ECT2를 과발현하는 암은 이러한 유효 성분으로 치료될 수 있다. 이러한 암의 예는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 유효 성분을 포함하는 백신 또는 약학적 제제 또는 조성물의 투여 이전에, 검사될 세포 또는 조직에서 ECT2의 발현 수준이 동일한 기간의 정상 세포와 비교하여 증가하였다는 것을 확인하는 것은 바람직하다. 따라서, 한 실시예에서, 본 발명은 ECT2를 과발현하는 암을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:

[0304] i) 치료될 암을 갖는 개체로부터 수득된 암 세포 또는 조직에서 ECT2의 발현 수준을 결정하는 단계;

[0305] ii) ECT2의 발현 수준을 정상 대조군 수준과 비교하는 단계; 및

[0306] iii) 상기 기술된(a) 내지(d) 중에서 선택된 최소 하나의 구성요소를 ECT2가 정상 대조군과 비교하여 과발현되는 암을 갖는 개체에 투여되는 단계.

[0307] 또는, 본 발명은 또한 ECT2가 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 ECT2 폴리펩티드로 치료되는 개체를 알아내는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 개체-유래 암 세포 또는 조직에서 ECT2의 발현수준을 결정하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 유전자의 정상 대조군 수준과 비교하여 증가한 수준은 그 개체가 본 발명의 ECT2 폴리펩티드로 치료될 수 있는 암이 있다는 것을 나타낸다. 본 발명의 암을 치료하는 상기 방법은 하기에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0308] ECT2의 전사 또는 번역 생산물을 포함하는 한, 어떤 개체-유래 암 세포 또는 조직은 ECT2의 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.

[0309] 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.

[0310] 본 발명에 따르면, 개체로부터 수득된 세포 또는 조직에서 ECT2의 발현 수준이 결정될 것이다. 상기 발현 수준은 당업계에 알려진 방법을 이용하여 전사(핵산) 생산물 수준에서 결정될 수 있다. 예를 들면, ECT2의 mRNA는 혼성화 방법으로 탐침을 이용하여 정량될 수 있다(예를 들어, Northern hybridization). 탐지는 칩 또는 어레이(array) 또는 이와 같은 것으로 수행될 수 있다. 어레이의 사용은 ECT2의 발현 수준을 탐지하는데 바람직할 것이다. 당업자들은 이러한 ECT2의 서열정보를 이용하여 탐침을 제조할 수 있다. 예를 들면, ECT2의 cDNA는 탐침으로 사용될 수 있다. 만약 필요하다면, 상기 탐침은 염료, 형광 물질 및 동위원소와 같은, 적절한 표지로 표지 될 수 있으며, 유전자의 발현 수준은 혼성화된 표지의 강도로 탐지될 수 있다.

[0311] 또한, ECT2(서열 번호 42)의 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.

[0312] 특히, 상기 제시된 방법에 대해 사용된 탐침 또는 프라이머는 엄격한 상태, 적절하게 엄격한 상태 또는 낮게 엄격한 상태하에서 ECT2의 mRNA와 혼성화된다. 본 명세서에 사용되었던, 상기 용어 "엄격한(혼성화) 조건"은 탐침 또는 프라이머가 그것의 표적 서열에 혼성화하는 조건을 나타내지만, 다른 서열에는 혼성화되지 않는다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며, 다른 환경하에서 달라질 것이다. 더 긴 서열의 특이적 혼성화는 짧은 서열에 비해 높은 온도에서 관찰된다. 일반적으로, 엄격한 조건의 온도는 정의된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대해 열융해점(Thermal melting point, Tm)보다 약 5℃ 낮게 선택된다. 상기 Tm은(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, Tm에서 상기 탐침의 50%는 동등하게 점유된다. 일반적으로, 엄격한 조건은 염 약 1.0 M 소듐 이온 미만인 농도일 수 있으며, 일반적으로, pH 7.0 내지 8.3에서 약 0.01 내지 1.0 M 소듐 이온(또는 다른 염들) 온도는 짧은 탐침 또는 프라이머에 대해 적어도 약 30℃이고,(예를 들면, 10 내지 50 뉴클레오티드) 긴 탐침 또는 프라이머에 대해서는 적어도 약 60℃이다. 엄격한 조건은 포름아마이드(formamide)와 같은 불안정화 물질의 첨가로 얻을 수 있다.

[0313] 본 발명의 탐침 또는 프라이머는 전형적으로 올리고 뉴클레오티드로 대부분 정제된다. 상기 올리고 뉴클레오티드는 엄격한 조건에서 최소한 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 또는 25가 혼성화되는 뉴클레오티드 서열의 부분, ECT2 서열을 포함하는 핵산의 연이은 센스 사슬(sense strand) 뉴클레오티드 서열, 또는 ECT2 서열로 구성된 핵산의 안티센스 사슬(anti sense strand) 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열에서 자연적으로 발생한 돌연변이를 포함한다. 세부적으로, 예를 들어, 바람직한 실시예에서, 5 - 50개의 올리고 뉴클레오티드는 상기 유전자를 증폭하거나 검출하기 위한 프라이머로 사용될 수 있다. 더욱 바람직하게, ECT2 유전자의 mRNA 또는 cDNA는 특정한 길이, 일반적으로 15 - 30개의 올리고뉴클레오티드 탐침 또는 프라이머로 검출될 수 있다.

[0314] 바람직한 실시예에서, 올리고뉴클레오티드 탐침 또는 프라이머의 길이는 15 - 25개로부터 선택될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드 탐침 또는 프라이머를 이용한 유전자의 검출을 위한 분석 절차, 기계 또는 시약은 잘 알려져 있다(예를 들어, 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이, PCR). 상기 분석법에서, 탐침 또는 프라이머는 태그(tag) 또는 링커 서열을 포함한다. 또한, 탐침 또는 프라이머는 검출가능한 표지 또는 포착되기 위한 친화성 리간드(affinity ligand)로 변형될 수 있다. 또한, 검출 절차에 기초한 혼성화에서, 몇 백의 염기(예를 들어, 약 100 - 200)에서 몇 킬로의 염기(예를 들어, 1000 - 2000)를 가진 폴리뉴클레오티드도 역시 탐침으로 사용될 수 있다(예를 들어, 노던 블랏 분석 또는 cDNA 마이크로어레이 분석).

[0315] 또는, 번역 생산물(즉 단백질)은 본 발명의 진단을 위해 탐지될 수 있다. 예를 들면, ECT2 단백질(서열 번호: 42) 또는 이의 면역학적 단편은 결정될 수 있다. 번역 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 ECT2 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. 본 발명의 펩티드 및 이의 단편에 대한 상기 항체는 본 발명에서 제공된다. 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.

[0316] ECT2 유전자 발현 수준을 탐지하기 위한 다른 방법은 그것의 번역 산물에 기초하기 때문에, 염색의 강도는 ECT2 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직학적 분석을 통해 측정될 수 있다. 즉, 상기 측정에서, 강한 염색은 증가한 단백질의 존재/수준과 동시에, ECT2 유전자의 높은 발현수준을 나타낸다.

[0317] 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 ECT2 유전자의 발현 수준은 증가하는 것으로 결정될 수 있다.

[0318] 질환 상태(들)(암성 또는 비암성)라고 알려진 개체(들)로부터 수거되고 저장된 시료(들)를 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 ECT2 유전자의 발현 수준(들)을 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 ECT2 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 ECT2 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.

[0319] 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. 시료의 발현 수준 및 대조군 수

준의 차이는, 예를 들어 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)과 같이 세포의 암성 또는 비암성 상태에서 발현 수준이 달라지지 않는, 대조 핵산의 발현수준으로 보정할 수 있다. 대조 유전자의 예는, 베타-액틴(beta-actin), 글리세랄데하이드 3 포스페이트 디하이드로제네이즈(glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase), 및 리보솜 단백질 P1(ribosomal protein P1)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0320] ECT2 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 수준에 비해 증가하였을 때, 또는 암 대조군 수준에 유사/동등할 때, 개체는 치료될 암을 갖는 것으로 진단될 수 있다.

[0321] 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 포함할 것이다:

[0322] a) 치료될 암을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득된 암 세포 또는 조직에서 ECT2의 발현 수준을 결정하는 단계;

[0323] b) ECT2의 발현 수준을 정상 대조군 수준과 비교하는 단계;

[0324] c) 만약 ECT2의 발현 수준이 정상 대조군 수준과 비교하여 증가하였다면, 개체가 치료될 암을 갖는 것으로 진단하는 단계; 및

[0325] d) 단계 c)에서 개체가 치료될 암을 갖는 것으로 진단되었다면, 암 치료를 위한 개체를 선택하는 단계.

[0326] 또는, 상기 방법은 하기의 단계를 포함할 것이다:

[0327] a) 치료될 암을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득한 암 세포 또는 조직에서 ECT2의 발현 수준을 결정하는 단계;

[0328] b) ECT2의 발현 수준을 암 대조군 수준(cancerous control level)과 비교하는 단계;

[0329] c) 만약 ECT2의 수준이 암 대조군 수준과 비교하거나 또는 동등하다면, 개체가 치료될 암을 갖는 것으로 진단하는 단계; 및

[0330] d) 단계 c)에서 개체가 치료될 암을 갖는 것으로 진단되었다면, 암 치료를 위한 개체를 선택하는 단계.

[0331] 본 발명은 본 발명의 ECT2 폴리펩티드로 치료될 수 있는 암으로 고통받거나 예상되는 개체를 진단 또는 결정하기 위한 진단 키트(kit)를 제공하고, 이것은 암의 진단을 검사하거나 및/또는 암 치료법, 특히 암 면역 치료법의 효율성 또한 적용가능성을 모니터하기 위하여 유용할 수 있다. 진단 또는 결정될 수 있는 적절한 암의 예는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 키트는 바람직하게는 개체-유래 암 세포에서 ECT2 유전자의 발현을 탐지하기 위한 최소한 하나의 시약을 포함할 것이고, 상기 시약은 하기 중에서 선택될 수 있다:

[0332] (a) ECT2 유전자의 mRNA를 탐지하기 위한 시약;

[0333] (b) ECT2 단백질 또는 이의 면역학적 단편을 탐지하기 위한 시약; 및

[0334] (c) ECT2 단백질의 생물학적 활성을 탐지하기 위한 시약.

[0335] ECT2의 mRNA를 탐지하기 위한 적절한 시약의 예는 ECT2 mRNA에 특이적으로 결합하거나 또는 ECT2 mRNA를 확인하는, 예를 들면 ECT2 mRNA의 부분에 대한 상보적 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드와 같은 핵산을 포함한다. 이러한 유형의 올리고뉴클레오티드는 ECT2 mRNA에 특이적인 프라이머 및 탐침으로 증폭될 수 있다. 이러한 유형의 올리고뉴클레오티드는 당업계에 잘 알려진 방법에 기초하여 준비될 수 있다. 만약 필요하다면, ECT2 mRNA를 탐지하기 위한 시약은 고체 매트릭스에 고정화될 수 있다. 또한, ECT2 mRNA를 탐지하기 위한 하나 이상의 시약은 키트에 포함될 수 있다.

[0336] 다른 한편으로는, ECT2 단백질 또는 이의 면역학적 단편을 탐지하기 위한 적절한 시약의 예는 ECT2 단백질 또는 이의 면역학적 단편에 대한 항체를 포함할 것이다. 상기 항체는 단일클론(monoclonal) 또는 다중클론(polyclonal)일 수 있다. 또한 그 단편 또는 변형된 항체가 ECT2 단백질 또는 이의 면역학적 단편에 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, ECT2 단백질을 탐지하기 위한 하나 이상의 시약은 키트 안에 포함될 수 있다.

[0337] 키트는 상기 언급한 시약의 하나 이상을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 고체 매트릭스 및 ECT2 유전자에 대한 탐침에 결합하는 시약 또는 ECT2 펩티드에 대한 항체, 배지 및 배양하는 세포를 위한 용기, 양성 및 음성 대조군 시약, 및 ECT2 펩티드에 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, 희석액, 필터, 바늘(needle), 주사기 및 사용설명서(예를 들어, 문서, 테이프, CD-ROM)를 포함하는 다른 물질을 포함한다. 적절한 용기는 병, 바이알(vials) 및 테스트 튜브(test tube)를 포함할 것이다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 만들어졌다.

[0338] 어떤 실시예에서, ECT2 mRNA에 대한 탐침이 시약일 때, 상기 시약은 탐지 부위가 적어도 한 개로 구성되는 다공성 스트립과 같은 고체 메트릭스에 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 ECT2 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.

[0339] 또는 본 발명의 키트는 양성 대조군 시료 또는 ECT2 표준 시료를 포함할 수 있다. 본 발명의 양성 대조군 시료는 ECT2 양성 시료를 수거하고 그들의 ECT2 수준을 검사함으로써 준비될 수 있다. 또는, 양성 시료 또는 ECT2 표준 시료를 형성하기 위해, 정제된 ECT2 단백질 또는 폴리뉴클레오티드를 ECT2를 발현하지 않는 세포에 첨가할 수 있다. 본 발명에서, 정제된 ECT2는 재조합 단백질일 수 있다. 양성 대조군 시료의 ECT2 수준은, 예를 들면 판정 기준치(cut-off) 값 이상이다.

[0340] 또한 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 항원 또는 그것의 단편을 특이적으로 인지할 수 있는 단백질 또는 그것의 단편을 포함하는 진단용 키트를 제공한다.

[0341] 여기서 고려되는 본 발명의 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.

[0342] 암을 진단하기 위한 방법은 항-ECT2 항체의 양 및 상기 기술된 것과 같은 상응하는 대조군 시료에서의 양 사이의 차이를 결정함으로써 수행될 수 있다. 개체의 세포 또는 조직이 유전자의 발현 생산물(ECT2)에 대한 항체를 포함하고, 항-ECT2 항체의 양이 정상 대조군에서의 것과 비교하여 판정 기준치(cut-off) 이상으로 결정되면, 그 개체는 암을 앓고 있는 것으로 추정된다.

[0343] 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.

[0344] 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.

[0345] 또한, 본 발명은 여기에서 기술된 펩티드 에피토프를 이용함으로서 개체의 면역 반응을 평가하기 위한 방법 또는 진단제를 제공한다. 어떤 실시예에서, 여기서 기술된 HLA-A02 제한된 펩티드는 개체에서 면역 반응을 평가하거나 또는 예측하기 위한 시약으로서 사용된다. 평가되는 면역 반응은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 면역

원(immunogen)을 면역능력이 있는 세포(immunocompetent cell)을 접촉시킴으로써 유도한다. 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(lynphokine) 및 인터페론(interferon) 분비 검사법을 위한 염색, 또는 ELISPOT과 같은 상대적으로 최근의 기술 발달을 포함한다. 바람직한 실시예에서, 면역반응을 측정하기 위한 면역기능이 있는 세포는 말초혈액(peripheral blood), 말초혈액 단핵구(peripheral blood lymphocyte, PBL), 및 말초혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)로부터 선택될 것이다. 상기 면역기능이 있는 세포를 수집 또는 분리는 당업계에 잘 알려져 있다. 또 다른 바람직한 실시예에서, 면역기능이 있는 세포는 수지상 세포와 같은 항원제시세포를 포함한 펩티드 시약(reagent)와 접촉된다.

[0346] 예를 들면, 본 발명의 펩티드는 종양 세포 항원 또는 면역원에 노출되어 항원-특이적 CTL의 존재를 위해 말초혈액 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.

[0347] HLA 분자에 결합하는 펩티드를 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 유동 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.

[0348] 또한, 본 발명은 면역 회상 반응(immune recall response)을 평가하기 위해 본 발명의 펩티드를 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 펩티드를 사용하여 항원-특이적 CTL의 존재를 위해 분석된다. 단핵구를 포함하는 혈액 시료는 PBMC를 배양하고 상기 세포를 본 발명의 펩티드로 자극시킴으로써 검사된다. 적절한 배양 기간 후에, 상기 증식된 세포 집단에서 예를 들면 CTL 활성을 분석한다.

[0349] 상기 펩티드는 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 펩티드 에피토프 시약이 있다. 백신의 면역원성은 PBMC 시료에서 에피토프-특이적 CTLs의 존재에 의해 나타날 수 있다. 본 발명의 펩티드는 당업계에서 잘 알려진 기술을 사용함으로써 항체를 만드는데 사용될 수 있고(예를 들면, CURRENTPROTOCOLSINIMMUNOLOGY, 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, 펩티드를 인지하는 것, 즉 펩티드-MHC 복합체에 결합하는 항체일 수도 있다.

[0350] 본 발명의 펩티드 및 조성물은 많은 첨가적 용도를 갖고, 그 일부는 여기서 기술된다. 예를 들면, 본 발명은 ECT2 면역원성 폴리펩티드의 발현에 의해 특징화되는 질환을 진단하고 탐지하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 생물학적 시료에서 ECT2 HLA 결합 펩티드, 또는 ECT2 HLA 결합 펩티드 및 HLA 종류 I 분자의 복합체의 발현을 결정하는 것과 관련이 있다. 펩티드 또는 펩티드 및 HLA 종류 I 분자의 복합체의 발현은 상기 펩티드 또는 복합체의 결합 파트너로 검사함으로써 결정되거나 탐지될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 펩티드 또는 복합체를 위한 결합 파트너는 펩티드에 특이적으로 결합하고 인지하는 항체이다. 생물학적 시료, 예를 들면 종양 조직검사(biopsy)에서 ECT2의 발현은 ECT2 프라이머를 사용한 일반적인 PCR 증폭 프로토콜에 의하여 검사될 수 있다. 종양 발현의 예는 여기서 나타나고 나아가 ECT2에 대한 예시적인 조건 및 프라이머의 공개는 본 명세서의 선행기술문헌인 WO2003/27322에서 발견될 수 있다.

[0351] 바람직하게, 상기 진단 방법은 생물학적 시료에서 ECT2 결합 펩티드의 존재를 탐지하기 위하여 ECT2 HLA 결합 펩티드를 위한 특이적 물질과 함께 개체로부터 분리된 생물학적 시료를 접촉시키는 것과 관련이 있다. 여기서 사용된 것과 같이, "접촉"은 물질 및 생물학적 시료에 존재하는 ECT2 HLA 결합 펩티드 사이에서 특이적 상호결

합이 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 본 명세서의 선행기술문헌인 Low et al.에 의해 발행된 U.S. Patent No. 5,108,921에 기술되어 있다.

[0352] 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, ECT2 면역원성 폴리펩티드에 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.

[0353] 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 림포카인 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), 덱스트라머(dextramer)(예를 들면, WO 02/072631), 및 스트렙타머[예를 들면 Nature Medicine 6. 631-637(2002)] 또한 사용될 수 있다.

[0354] 또한, 어떤 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 펩티드 중 최소 하나의 ECT2가 투여된 개체의 면역학적 반응을 진단하거나 평가하는, 하기의 단계를 포함하는 방법 제공한다:

[0355] (a) 면역원(immunogen)에 대해 특이적 CTL의 유도의 적합한 조건하에 면역원과 면역능력이 있는 세포를 접촉하는 단계;

[0356] (b) 단계(a)에서 유도된 CTL 유도 수준을 탐지하거나 결정하는 단계;및

[0357] (c) CTL 유도 수준이 있는 개체의 면역반응을 연관시키는(correlating) 단계.

[0358] 본 발명의 맥락에서, 상기 면역원은 (a)서열번호 1 내지 40 중에서 선택된 ECT2 펩티드, (b)1, 2 또는 그 이상의 아미노산 치환으로 변형된 이러한 아미노산 서열을 가지는 펩티드 중 최소 하나이다. 그동안에 면역원 특이적 CTL의 유도 적합 조건은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 면역능력이 있는 세포는 면역원 특이적 CTL을 유도하기 위해 면역원의 존재 하에 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.

[0359] 어떤 실시예예서, 펩티드 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 펩티드는 반복적으로 치료되는 개체에 투여된다. 예를 들면, 면역성 펩티드는 3-10 주 동안 매 주 투여될 수 있다. 따라서, 개체의 면역학적 반은은 암 치료 프로토콜 동안 평가되거나 모니터될 수 있다. 또는 암치료에 대한 면역학적 반응의 평가 또는 모니터링(monitoring)의 단계는 치료 프로토콜의 완료일 수 있다.

[0360] 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 펩티드 없이 또는 어떤 ECT2 펩티드(예를 들면, 무작위 아미노산 서열) 외에 아미노산 서열을 가지는 대조군 펩티드와 접촉되었을 때 CTL 유도 수준을 포함한다. 바람직한 실시예에서, 개체에 투여된 각 면역원 사이의 면역 반응을 비교함으로써 상기 개체의 면역학적 반응은 서열 특이적 면에서 평가된다. 특히, 일부 유형의 ECT2 펩티드의 혼합물이 개체에 투여될지라도 , 면역 반응은 상기 펩티드에 따라 다를 수 있다. 그런 경우에는 각 펩티드 사이의 면역 반응의 비교에 의해 더 높은 반응을 보이는 개체에 대한 펩티드가 동정 될 수 있다.

[0361] **XI. 항체**

[0362] 본 발명은 본 발명의 펩티드에 결합하는 항체를 제공한다. 바람직한 항체는 특이적으로 본 발명의 펩티드와 결합하고 본 발명의 펩티드가 아닌 것에 결합하지 않을 것이다(또는 약하게 결합). 또는, 항체는 본 발명의 펩티드 뿐만 아니라 그것의 상동체와 결합한다. 본 발명의 펩티드에 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 ECT2의 발현이 관련된 암, 예를 들면 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 암을 위해 치료적으로 사용될 수 있다.

[0363] 또한, 본 발명은 ECT2 단백질(서열 번호 42) 또는 서열 번호 1 내지 40 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 그것의 단편의 탐지 및/또는 정량을 위한 다양한 면역학적 검사법을 제공한다. 상기 검사법은 ECT2 단백질 또는 그것의 단편과 결합하고 인지할 수 있는 하나 또는 그 이상의 항-ECT2 항체를 적절하게 포함할 수 있다. 본 발명에서, ECT2 폴리펩티드와 항-ECT2 항체의 결합은 바람직하게 서열 번호 1 내지 40 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 폴레펩티드를 인지한다. 항체의 결합 특이성은 억제 검사(inhibition test)를 사용하여 확인될 수 있다. 즉, 서열 번호 1 내지 40의 아미노산 서열 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 어떤 단편의 폴리펩티드의 존재하에서 분석될 항체 및 ECT2 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.

[0364] 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, ECT2를 발현하는 암을 탐지할 수 있는 면역학적 이미지 방법은 본 발명에 의해 제공되고, 본 발명의 표지된 항체를 사용한 방사선 동위원소 이미지 방법(radioscintigraphic imaging method)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 상기 검사법은 ECT2를 발현하는 암, 예를 들면 방광암, 유방암, 자궁경부암, 간내담도암, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 식도암, 비소세포성 폐암, 림프종, 췌장암, 전립선암, 신장암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 암의 탐지, 모니터, 및 예후에 임상적으로 유용하다.

[0365] 본 발명은 본 발명의 펩티드와 결합하는 항체를 제공한다. 본 발명의 항체는 단일클론 또는 다중클론 항체와 같은 어떠한 형체에서도 사용될 수 있고, 또한 본 발명의 펩티드로 면역화된 동물, 예를 들면 토끼에 의해 수득된 항혈청을 포함하고, 모든 종류의 다중클론 및 단일클론 항체, 인간항체, 및 유전적 재조합에 의해 생성된 인간화된 항체를 포함한다.

[0366] 항체를 얻기 위해 항원으로서 사용된 본 발명의 펩티드는 어떠한 동물의 종류에서도 유래할 수 있으나, 바람직하게는 인간, 마우스(mouse), 또는 랫(rat), 보다 바람직하게는 인간과 같은 포유류로부터 유래한 것이다. 인간-유래 펩티드는 여기서 공개된 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열로부터 수득될 수 있다.

[0367] 본 발명에 따라, 면역원성 항원으로서 사용되는 상기 펩티드는 완전한 단백질일 수도 있고 상기 단백질의 부분적 펩티드일 수도 있다. 예를 들면, 부분적 펩티드는 본 발명 펩티드의 아미노(N) 말단 또는 카복시(C) 말단 단편을 포함할 수 있다.

[0368] 본 발명에서, 항체는 ECT2 펩티드의 전장 또는 단편에 반응하는 단백질로 정의된다. 바람직한 실시예에서는, 본 발명의 항체는 서열 번호 1 내지 40중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 ECT2의 단편 펩티드를 인지할 수 있다. 올리고펩티드를 합성하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 합성 후에, 펩티드는 면역원으로서 사용되기 전에 선택적으로 정제될 수 있다. 본 발명에서, 올리고펩티드(예를 들면 9 또는 10mer)는 면역원성을 증진시키기 위해 담체와 결합되거나 연결될 수 있다. KLH(Keyhole-Limpet hemocyanin)은 담체로서 잘 알려져 있다. KLH와 펩티드를 결합시키는 방법도 당업계에 잘 알려져 있다.

[0369] 또는, 본 발명의 펩티드를 암호화하는 유전자 또는 그것의 단편은 알려진 발현 벡터로 삽입될 수 있고, 그 후 여기서 기술되는 것과 같이 숙주 세포에 형질도입시키는데 사용된다. 원하는 펩티드 또는 그것의 단편은 어떤 표준 방법에 의해 숙주 세포의 안 또는 밖으로부터 회복될 수 있고, 그 후에 항원으로서 사용될 수 있다. 또는, 펩티드를 발현하는 전체 세포 또는 그들의 용해물(lysate) 또는 화학적으로 합성된 펩티드가 항원으로서

사용될 수 있다.

[0370] 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.

[0371] 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 후매 4 내지 21일마다 프로인트 완전 보강제의 적절한 양과 한께 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.

[0372] 본 발명의 펩티드에 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 펩티드를 인지하는 분획물로부터 예를 들면 본 발명의 펩티드와 연결된 친화성 컬럼을 사용하여, 그리고 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼을 사용하여 상기 분획물을 정제하는 것에 의해 준비될 수 있다.

[0373] 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.

[0374] 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.

[0375] 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 세포을 복제(clone)시키고 스크린하기 위해 표준 제한 희석(standard limiting dilution)을 수행한다.

[0376] 하이브리도마를 제조하기 위해 비인간 동물을 항원으로 면역화시킨 상기 방법 뿐만 아니라, EB 바이러스에 의해 감염된 인간과 같은 인간 림프구는 펩티드, 펩티드를 발현하는 세포 또는 그들의 용해물을 사용하여 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 그 후, 상기 펩티드에 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).

[0377] 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 펩티드가 연결된 친화성 컬럼과 같은 방법에 의해 정제할 수 있다. 본 발명의 항체는 본 발명의 펩티드의 정제 및 탐지에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 본 발명의 펩티드의 작용제 및 길항제에 대한 후보로서 사용될 수도 있다.

[0378] 또는, 항체를 생산하는 면역화된 림프구와 같은 면역 세포는 종양유전자(oncogene)에 의해 무한증식(immortalization)될 수 있고 단일클론 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0379] 그러므로 수득된 단일클론 항체는 유전자 조작 기술을 사용하여 재조합적으로 제조될 수 있다[예를 들면

MacMillan Publishers LTD의해 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.

[0380] 또한, 본 발명의 항체는 하나 또는 그 이상의 본 발명 펩티드와 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].

[0381] 항체는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG)와 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.

[0382] 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.

[0383] 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.

[0384] 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(sepseration) 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.

[0385] 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.

[0386] 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 펩티드를 플레이

트에 첨가한 후, 항체를 생산하는 세포의 배양 상층액 또는 정제된 항체와 같은 원하는 항체를 포함하는 시료를 첨가한다. 그 후, 1차 항체를 인지하고 알칼리 포스파타아제(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 펩티드의 단편은 항체의 결합 활성을 평가하기 위해 항원으로서 사용될 수 있다. 비아코어[BIAcore(Pharmacia)]는 본 발명에 따른 항체의 활성을 평가하기 위하여 사용될 수 있다.

[0387] 상기 방법은 본 발명의 항체를 본 발명의 펩티드를 포함한다고 가정되는 시료에 노출시킴으로써 본 발명의 펩티드를 탐지 또는 측정하게 해주고 상기 항체 및 상기 펩티드에 의해 형성된 면역 복합체를 탐지 또는 측정하게 해준다.

[0388] 본 발명에 따른 펩티드를 탐지 또는 측정하는 방법은 특이적으로 펩티드를 탐지 또는 특정할 수 있기 때문에, 이 방법은 상기 펩티드를 사용하는 다양한 실험에서 유용할 것이다.

[0389] **XII. 벡터 및 숙주 세포**

[0390] 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.

[0391] E.coli가 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.coli를 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.

[0392] 예를 들면, E.coli에서 발현되는 발현 벡터는 E.coli 내에서 증폭되기 위하여 상기 특징을 가져야 한다. JM109, DH5 alpha, HB101 또는 XL1 Blue와 같은 E.coli를 숙주 세포로서 사용할 때, 벡터는 E.coli내에서 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 벡터들 대신 사용될 수 있다. 또한, 상기 벡터는 펩티드 분비를 위한 신호 서열(signal sequence)을 포함할 수 있다. E. coli의 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.

[0393] 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.

[0394] 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 것를 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.

[0395] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 그리고 당업자가 동일한 것을 만들고 이용하는 것을 돕기 위해 제시한다. 실시예는 본 발명의 범위를 어떠한 방법으로도 제한하는 의도가 아니다.

[0396] **실시예**

[0397] **재료 및 방법**

[0398] 세포주

[0399] B-림프아형 세포주(lymphoblastoid cell line)인 T2(HLA-A2) 및 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주(African green monkey kidney cell line)인 COS7는 ATCC로부터 구입하였다.

[0400] ECT2 유래 펩티드의 후보 선별

[0401] HLA-A*0201 분자에 결합하는 ECT2 유래 9-머(9-mer) 및 10-머(10-mer) 펩티드를 결합 예측 소프트웨어인 "BIMAS"(www-bimas.citdcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla_bindken_parker_comboform)(Parker et al.(J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima et al.(Blood 2001, 98(6): 1872-81))를 이용하여 예측하였다. 이러한 펩티드들은 표준 고체상 합성 방법(standard solid phase synthesis method)에 따라 Biosynthesis(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 디메틸설폭시드(dimethylsulfoxide, DMSO)에 20 mg/ml로 용해하고, -80℃에서 저장하였다.

[0402] 시험관 내에서의 CTL 유도

[0403] 단핵구 유래 수지상세포(dendritic cell, DC)를 항원-제시 세포(antigen-presenting cell)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*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 분리한 단핵구 분획물을 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 1,000 U/ml 및 IL(interleukin)-4(R&D System) 의 1,000 U/ml의 존재하에 배양하였다. 배양 7일 후, 3시간 동안 37℃에서 AIM-V 배지안에서, 베타 2-마이크로글로볼린(beta 2-microglobulin) 3 μg/ml의 존재하에서 사이토카인-유도 DCs에 합성된 펩티드 각각의 20 μg/ml를 부과하였다. 생성된 세포는 그들의 표면에 CD80, CD83, CD86 및 HLA 종류 II와 같은 DC-관련 분자를 발현하는 것으로 나타났다(데이터는 기재안함). 상기 펩티드-부과 DC는 X-방사선 처리(20 Gy)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 수행하고; 각 웰은 AIM-V/2% AS 배지 0.5 ml에 1.5 x 10^4 펩티드-부과 DC, 3 x 10^5 CD8+ T 세포 및 IL-7(R&D system)의 10 ng/ml을 포함하였다. 3일 후, 상기 배양에 IL-2(CHIRON)을 첨가하여 최종 농도가 20 U/ml이 되도록 하였다. 7일째 및 14일째, 상기 T 세포를 나아가 자신의 펩티트-부과 DC로 자극시켰다. 상기 DCs를 상기 기술된 동일한 방법으로 각 시간에서 준비하였다. 21일째 펩티드 자극 3번째 후 CTL은 펩티드-부가된(pulsed) T2 세포에 대하여 검사하였다(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).

[0404] CTL 증식 과정

[0405] 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). 40 ng/ml의 항 CD3 단일 클론 항체(Pharmingen)의 존재 하에서, 미토마이신 C(mitomycin C)에 의해 불활성화된 두 종류의 인간 B 림프아세포주와 함께 총 $5x10^4$ CTL을 AIM-V/5% AS 배지의 25 ml에 부유하였다. 배양 시작한 뒤 1일 후, IL-2의 120 IU/ml를 상기 배양에 첨가하였다. 5, 8 및 11일째에 IL-2의 30 IU/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).

[0406] CTL 클론의 수립

[0407] 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, 30 ng/ml의 항-CD3 항체 및 IL-2의 125 U/ml와 함께, 5%의 AS를 포함하는 AIM-M 배지의 총 150 μl/웰에서 배양하였다. 10일 후, IL-2의 최종농도가 125 U/ml이 되도록 상기 배지에 IL-2의 50 μl/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].

[0408] 특이적인 CTL 활성

[0409] 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 T2(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.

[0410] 표적 유전자 및 HLA-A02 중 하나 또는 그 모두를 발현하게 하는 세포의 수립

[0411] 표적 유전자 또는 HLA-A*0201의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 암호화하는 cDNA를 PCR에 의해 증폭시켰다. 상기 PCR-증폭 생산물은 발현 벡터(expression vector)로 클로닝하였다. 제조사에서 제공하는 과정에 따라서 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000)(Invitrogen)을 사용하여, 상기 플라스미드를 표적 유전자 및 HLA-A*0201-눌 세포주, COS7으로 형질도입시켰다. 형질도입 2일 후에, 상기 형질도입된 세포를 versene(Invitrogen)을 사용하여 수거하였고, CTL 활성 검사를 위해 표적세포로서 사용하였다(5×10^4세포/웰).

[0412] **결과**

[0413] 암에서 증가된 ECT2 발현

[0414] cDNA-마이크로어레이(microarray)를 이용하여 다양한 암으로부터 수득된 전체 유전자 발현 프로파일(profile) 데이터는 ECT2(GenBank Accession No. AY376439; 예를 들어, 서열번호 41) 발현이 증가한 것을 나타내었다. ECT2 발현은 방광암 19개 중에서 17개, 유방암 12개 중에서 5개, 자궁경부암 14개 중에서 14개, 간내담도암 13개 중에서 13개, 만성 골수성 백혈병 5개 중에서 5개, 대장암 8개 중에서 7개, 식도암 16개 중에서 12개, 비소세포성 폐암 16개 중에서 6개, 림프종 10개 중에서 8개, 췌장암 1개 중에서 1개, 전립선암 13개 중에서 10개, 신장암 6개 중에서 3개 및 소세포폐암 13개 중에서 12개에서 유효하게 증가하였다(표 1).

표 1

[0415] **정상조직에 비하여 암 조직에서 관측된 ECT2의 상향조절 예의 비율**

방광암	17/19
유방암	5/12
자궁경부암	14/14
간내담도암	13/13
만성 골수성 백혈병	5/5
대장암	7/8
식도암	12/16
비소세포성 폐암	6/16
림프종	8/10
췌장암	1/1
전립선암	10/13
신장암	3/6
소세포폐암	12/13

[0416] ECT2 유래 HLA-A02에 결합하는 펩티드의 예측

[0417] 표 2a 및 2b는 HLA-A02에 결합하는 ECT2의 9-머 및 10-머를 높은 결합 친화도 순으로 나타낸다. 가능성 있는 HLA-A02 결합 능력이 있는 전체 40개의 펩티드를 선별하였고, 상기 에피토프 펩티드(epitope peptides)를 결정하기 위해 조사하였다.

【표 2a】

ECT2 유래 HLA-A02에 결합하는 9-머 펩티드

서열번호	시작위치	아미노산 서열	점수
1	34	LLIGSTSYV	650.311
2	619	QIFDVVYEV	333.677
3	664	FLFNDCLEI	177.566
4	662	TLFLFNDCL	147.174
5	634	LLSSHRSLV	118.238
6	145	MMNLVLCFT	115.74
7	561	LLIRPVQRL	83.527
8	98	VVTDFQDSV	78.982
9	575	LLNDLKKHT	51.94
10	240	FQDCILSFL	50.414
11	292	FEPSKKLYV	34.216
12	823	ALMTSHGSV	33.455
13	220	NEQDFYAAV	31.606
14	755	MLCRHVANT	29.137
15	357	AQLSRETDV	26.092
16	438	NILATIIQL	24.997
17	874	TLSRSTTHL	21.362
18	568	RLPSVALLL	21.362
19	166	TLVHHMGGV	20.796
20	443	IIQLFQVPL	18.975

[0418]

[0419] 시작위치는 ECT2의 N-말단에서부터 아미노산 잔기의 수를 나타낸다.

[0420] 결합점수는 "BIMAS"로부터 유래되었다.

【표 2b】

ECT2 유래 HLA-A02에 결합하는 10-머 펩티드

서열번호	시작위치	아미노산 서열	점수
21	33	NLLIgSTSYV	1415.383
22	633	NLLSsHRSLV	257.342
23	144	SMMNIVLCFT	251.905
24	701	LMPLsQIKKV	196.407
25	754	KMLCrHVANT	160.303
26	557	SLVEILIRPV	131.175
27	191	TQGEkFRVAV	109.867
28	774	YTADpESFEV	105.669
29	428	ELYQtESNYV	91.809
30	618	KQIFdVVYEV	56.767
31	97	FVVTdFQDSV	52.126
32	20	SIFDsKVTEI	50.051
33	574	LLLNdLKKHT	46.873
34	461	ILAPeEIKTI	40.792
35	664	FLFNdCLEIA	39.07
36	575	LLNDIKKHTA	34.627
37	430	YQTEsNYVNI	29.924
38	511	DLVKtYPPFV	28.69
39	471	FGSIpDIFDV	27.86
40	87	GLDSpEFENV	25.901

[0421]

[0422] 시작위치는 ECT2의 N-말단에서부터 아미노산 잔기의 수를 나타낸다.

[0423] 결합점수는 "BIMAS"로부터 유래되었다.

[0424] HLA-A*0201로 제한된 ECT2 유래 예측된 펩티드로 CTL 유도

[0425] ECT2 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-c). ECT2-A02-9-34(서열번호 1)로 자극된 웰 번호 #6(a), ECT2-A02-9-664(서열번호 3)로 자극된 웰 번호 #5(b) 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)으로 자극된 웰 번호 #1(c)에서, 대조군과 비교하여 강한 IFN-감마 생산을 확인하였다. 상기 결과는 ECT2 유래된 ECT2-A02-9-34(서열번호 1)(a), ECT2-A02-9-664(서열번호 3)(b), 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)(c)가 강한 CTL을 유도할 수 있는 펩티드로써 스크린 되었음을 나타낸다.

[0426] ECT2 유래 펩티드에 대한 CTL 세포주 및 클론의 수립

[0427] IFN-감마 ELISPOT 분석에 의해 탐지된 펩티드 특이적 CTL 활성을 보였던, ECT2-A02-9-34(서열번호 1)로 자극된 웰 번호 #6(a), ECT2-A02-9-664(서열번호 3)로 자극된 웰 번호 #5(b) 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)으로 자극된 웰 번호 #1(c)의 상기 세포는 증식되었고, CTL 세포주는 상기 “재료 및 방법”에 기재된 제한 희석으로 수립되었다. 이러한 CTL 세포주의 CTL 활성을 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지하였다(도 2a-c). 상기 CTL은 펩티드 부가 없는 표적 세포에 비해 해당 펩티드로 부가된 표적세포에 대하여 강력한 IFN-감마 생산을 보였다. 또한, 상기 CTL 클론은 상기 “재료 및 방법”에 기재된 CTL 세포주로부터 제한 희석하여 수립하였고, 펩티드 부가된 표적세포에 대하여 CTL 클론으로부터 IFN-감마 생산을 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지하였다. 도 3에서

강력한 IFN-감마 생산을 ECT2-A02-9-34(서열번호 1)(a) 및 ECT2-A02-9-664(서열번호 3)(b)로 자극된 CTL 클론으로부터 확인하였다.

[0428] ECT2 및 HLA-A*0201를 발현하는 표적세포에 대한 특이적 CTL 활성

[0429] 상기 펩티드에 대하여 형성된 상기 수립된 CTL 세포주 및 클론은 ECT2 및 HLA-A*0201 분자를 외생적으로 발현하는 표적세포를 인지하는 능력에 대해 조사되었다. ECT2 및 HLA-A*0201 분자 유전자의 전장 모두로 형질전환된 COS7 세포(ECT2 및 HLA-A*0201 유전자를 외생적으로 발현하는 표적세포에 대한 특이적 모델)에 대한 특이적 CTL 활성을, 이펙터 세포(effector cell)로써 해당하는 펩티드에 대해 형성된 CTL 세포주 및 클론을 사용하여 시험하였다. ECT2 또는 HLA-A*0201의 전장 각각으로 형질전환된 COS7 세포를 대조군으로 제조하였다. 도 4에서, 상기 ECT2-A02-9-34(서열번호 1)(a) 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)(b)로 자극된 CTL 클론은 ECT2 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 ECT2-A02-9-34(서열번호 1)(a), ECT2-A02-10-33(서열번호 21)(b)가, HLA-A*0201 분자를 갖고, CTL에 의해 인식되는 표적세포에 자연적으로 발현되었음을 나타낸다. 이러한 결과는 ECT2 유래된 ECT2-A02-9-34(서열번호 1)(a) 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)(b)가 ECT2를 발현하는 종양이 있는 환자의 치료를 위한 암 백신으로 적합할 수 있음을 나타낸다.

[0430] 항원 펩티드의 상동성 분석

[0431] ECT2-A02-9-34(서열번호 1), ECT2-A02-9-664(서열번호 3), 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)으로 자극된 상기 CTL은 유의적이고 특이적인 CTL 활성을 보였다. 이러한 결과는 ECT2-A02-9-34(서열번호 1), ECT2-A02-9-664(서열번호 3), 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)의 서열이 인간 면역 시스템을 민감하게 하는 것으로 알려진 다른 분자 유래 펩티드와 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 펩티드 서열에 대하여 수행하였다. 상동성 분석의 결과는 ECT2-A02-9-34(서열번호 1), ECT2-A02-9-664(서열번호 3), 및 ECT2-A02-10-33(서열번호 21)의 서열이 유일한 것임을 나타내고 따라서, 우리가 아는 한, 이 분자가 어떤 관련없는 분자에 대하여 의도하지 않은 면역 반응을 야기할 수 있는 가능성은 거의 없다.

[0432] 결론적으로, 신규한 ECT2 유래 HLA-A2 에피토프 펩티드가 동정되었다. 또한, 상기 에피토프 펩티드는 암 면역치료의 사용에 적합할 것으로 증명되었다.

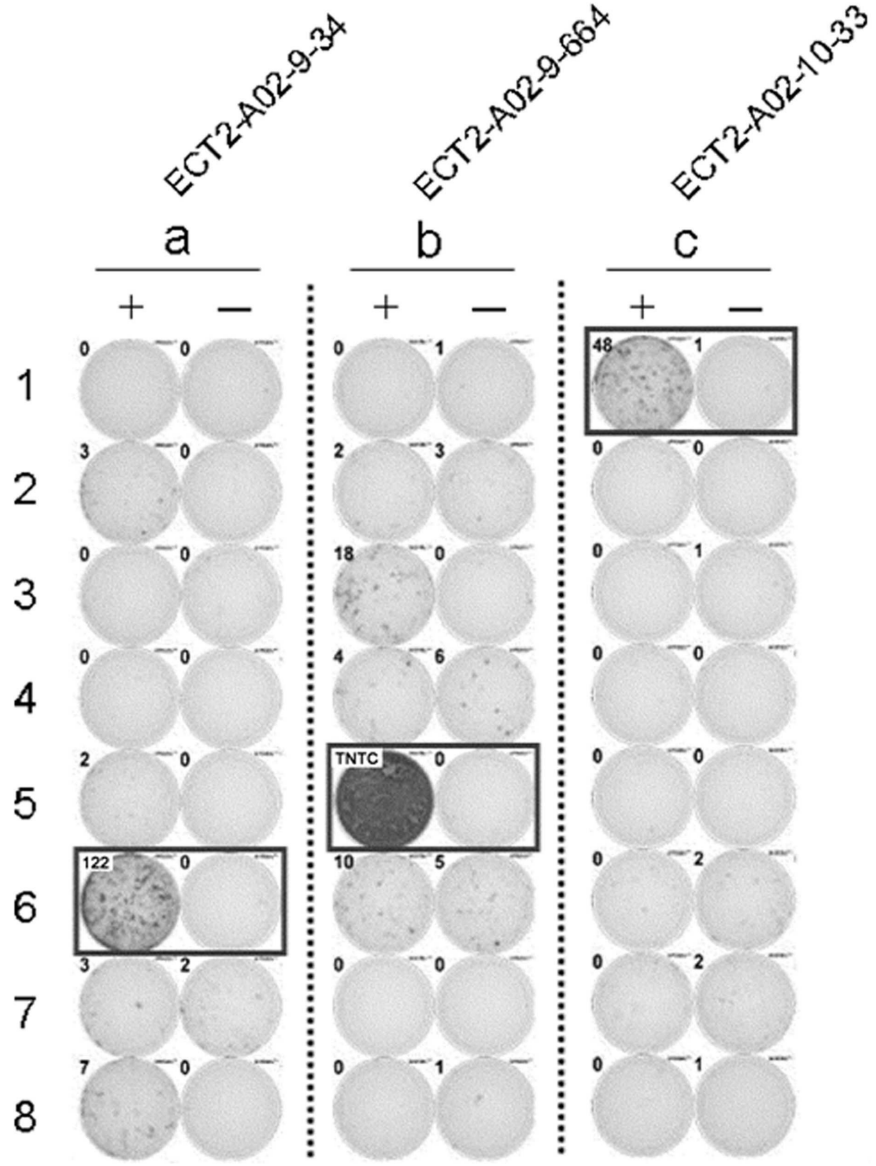
산업상 이용가능성

[0433] 본 발명은 새로운 TAA, 특히 강력하고 특이적인 항-종양 면역반응을 유도하고 다수의 암에 적용 가능성을 가진 ECT2로부터 유래한 것을 제공한다. 이러한 TAA는 ECT2 관련 질병에 대한, 예를 들면 암, 보다 구체적으로 방광암(bladder cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 간내담도암(cholangiocellular carcinoma), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 대장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer), 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)에 대한 펩티드 백신으로 유용하게 사용할 수 있다.

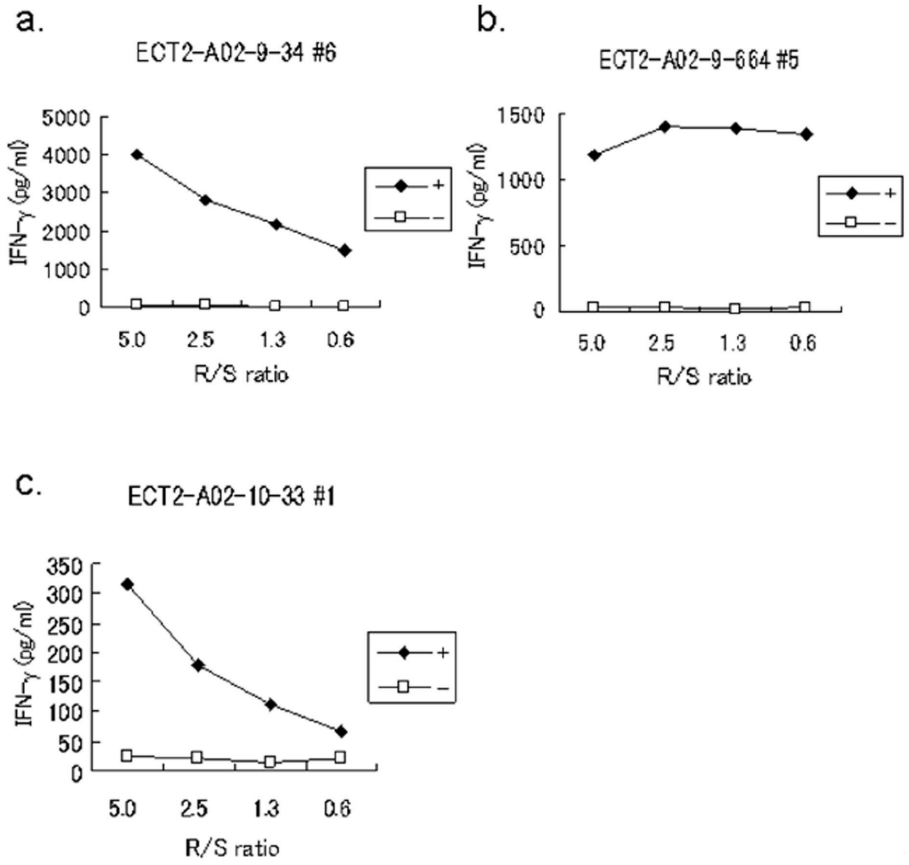
[0434] 본 발명이 여기서 그의 구체적 실시예와 함께 상세히 기술되는 동안, 앞선 기술이 예시적 설명적 특징이었고 본 발명 및 바람직한 실시예를 예시하려는 의도를 가지고 있다는 것이 이해되어야 한다. 일반적인 실험 방법을 통해, 당업자는 본 발명의 뜻과 범위, 첨부된 청구항에 의해 정의된 경계 및 한계내에서 용이하게 다양한 변화 및 변형이 있을 수 있다는 것을 인지할 것이다.

도면

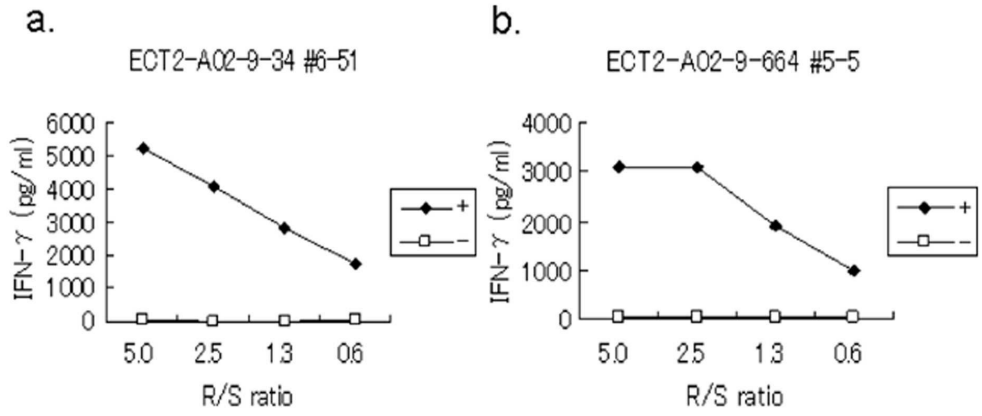
도면1


ECT2-A02-9-34
ECT2-A02-9-664
ECT2-A02-10-33
a
b
c
+
−
1
2
3
4
5
6
7
8
0
0
0
1
48
1
3
0
2
3
0
0
0
1
18
0
0
0
0
0
4
6
0
0
2
0
TNTC
0
0
0
122
0
10
5
0
2
3
2
0
0
0
2
7
0
0
1
0
1

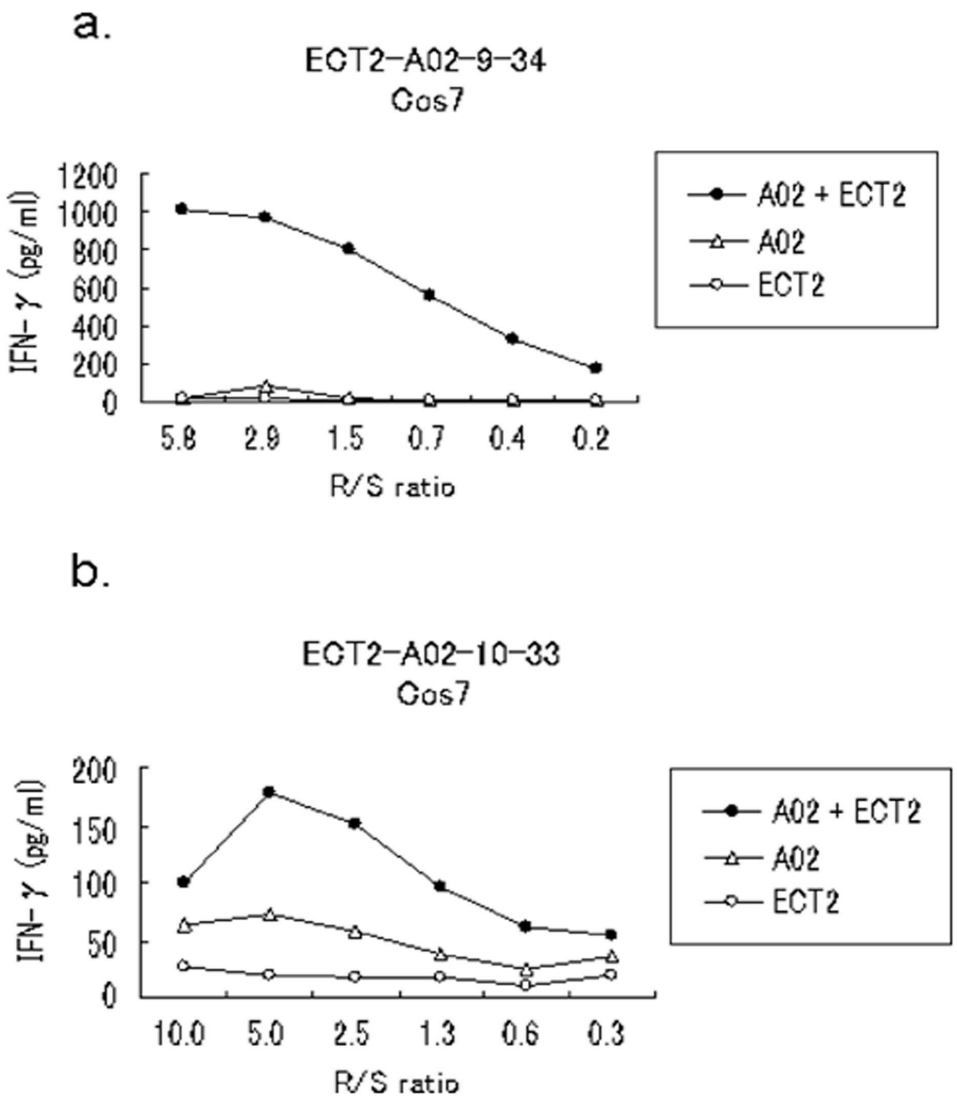
도면2


a.
ECT2-A02-9-34 #6
IFN-γ (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
b.
ECT2-A02-9-664 #5
IFN-γ (pg/ml)
1500
1000
500
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
c.
ECT2-A02-10-33 #1
IFN-γ (pg/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−

도면3


a.
ECT2-A02-9-34 #6-51
IFN-γ (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
b.
ECT2-A02-9-664 #5-5
IFN-γ (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−

도면4



서 열 목 록

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> ECT2 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

<130> ONC-A1010P

<150> US 61/320,577

<151> 2010-04-02

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 1

Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

An artificially synthesized peptide sequence

<400> 2

Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr Glu Val

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 3

Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 4

Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 5

Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu Val

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 6

Met Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 7

Leu Leu Ile Arg Pro Val Gln Arg Leu

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 8

Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 9

Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 10

Phe Gln Asp Cys Ile Leu Ser Phe Leu

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 11

Phe Glu Pro Ser Lys Lys Leu Tyr Val

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 12

Ala Leu Met Thr Ser His Gly Ser Val

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 13

Asn Glu Gln Asp Phe Tyr Ala Ala Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 14

Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 15

Ala Gln Leu Ser Arg Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400

> 16

Asn Ile Leu Ala Thr Ile Ile Gln Leu

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 17

Thr Leu Ser Arg Ser Thr Thr His Leu

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 18

Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Leu Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 19

Thr Leu Val His His Met Gly Gly Val

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 20

Ile Ile Gln Leu Phe Gln Val Pro Leu

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 21

Asn Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 22

Asn Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu Val

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 23

Ser Met Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 24

Leu Met Pro Leu Ser Gln Ile Lys Lys Val

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 25

Lys Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 26

Ser Leu Val Glu Leu Leu Ile Arg Pro Val

1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 27

Thr Gln Gly Glu Lys Phe Arg Val Ala Val

1 5 10

<210>

28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 28

Tyr Thr Ala Asp Pro Glu Ser Phe Glu Val

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELYQtESNYV

<400> 29

Glu Leu Tyr Gln Thr Glu Ser Asn Tyr Val

1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 30

Lys Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr Glu Val

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 31

Phe Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val

1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 32

Ser Ile Phe Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile

1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 33

Leu Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr

1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 34

Ile Leu Ala Pro Glu Glu Ile Lys Thr Ile

1 5 10

<210>

35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 35

Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile Ala

1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 36

Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 37

Tyr Gln Thr Glu Ser Asn Tyr Val Asn Ile

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 38

Asp Leu Val Lys Thr Tyr Pro Pro Phe Val

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 39

Phe Gly Ser Ile Pro Asp Ile Phe Asp Val

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 40

Gly Leu Asp Ser Pro Glu Phe Glu Asn Val

1 5 10

<210> 41

<211> 4349

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

tttttgaatc ggttgtggcg gccgcggcga ggaatggcgg tatttgtgag aggagtcggc 60

gtttgaagag gtggaactcc tagggctttt ttgagagtga cggagtctac ctcttgttac 120

ctagactgga gtgcagtggc acgatctcgg ctcactgcaa cctctgcctc ccgggttcaa 180

gcgattctcc tgcctcagcc tcctgagtag ctgggattac aggtgcctgc caccaagccc 240

agctaatttt tgtattttta gtagagatgg ggtttcattg tgttggccag gctggtctcg 300

aactcctgac ctcgtgatcc gcccgccttg gcctcccaaa gtgctaggat tacaagtgtg 360

agccaccgcg tccggccttt caaatggtat ttttgatttt cctcttccag tccttaaagc 420

agctgattta gaagaataca aatcatggct gaaaatagtg tattaacatc cactactggg 480

aggactagct tggcagactc ttccattttt gattctaaag ttactgagat ttccaaggaa 540

aacttactta ttggatctac ttcatatgta gaagagatgc ctcagattga aacaagagtg 600

atattggttc aagaagctgg aaaacaagaa gaacttataa aagccttaaa ggacattaaa 660

gtgggctttg taaagatgga gtcagtggaa gaatttgaag gtttggattc tccggaattt 720

gaaaatgtat ttgtagtcac ggactttcag gattctgtct ttaatgacct ctacaaggct 780

gattgtagag ttattggacc accagttgta ttaaattgtt cacaaaaagg agagcctttg 840

ccattttcat gtcgcccgtt gtattgtaca agtatgatga atctagtact atgctttact 900

ggatttagga aaaaagaaga actagtcagg ttggtgacat tggtccatca catgggtgga 960

gttattcgaa aagactttaa ttcaaaagtt acacatttgg tggcaaattg tacacaagga 1020

gaaaaattca gggttgctgt gagtctaggt actccaatta tgaagccaga atggatttat 1080

aaagcttggg aaaggcggaa tgaacaggat ttctatgcag cagttgatga ctttagaaat 1140

gaatttaaag ttcctccatt tcaagattgt attttaagtt tcctgggatt ttcagatgaa 1200

gagaaaacca atatggaaga aatgactgaa atgcaaggag gtaaatattt accgcttgga 1260

gatgaaagat gcactcacct tgtagttgaa gagaatatag taaaagatct tccctttgaa 1320

ccttcaaaga aactttatgt tgtcaagcaa gagtggttct ggggaagcat tcaaatggat 1380

gcccgagctg gagaaactat gtatttatat gaaaaggcaa atactcctga gctcaagaaa 1440

tcagtgtcaa tgctttctct aaatacccct aacagcaatc gcaaacgacg tcgtttaaaa 1500

gaaacacttg ctcagctttc aagagagaca gacgtgtcac catttccacc ccgtaagcgc 1560

ccatcagctg agcattccct ttccataggg tcactcctag atatctccaa cacaccagag 1620

tctagcatta actatggaga caccccaaag tcttgtacta agtcttctaa aagctccact 1680

ccagttcctt caaagcagtc agcaaggtgg caagttgcaa aagagcttta tcaaactgaa 1740

agtaattatg ttaatatatt ggcaacaatt attcagttat ttcaagtacc attggaagag 1800

gaaggacaac gtggtggacc tatccttgca ccagaggaga ttaagactat ttttggtagc 1860

atcccagata tctttgatgt acacactaag ataaaggatg atcttgaaga ccttatagtt 1920

aattgggatg agagcaaaag cattggtgac atttttctga aatattcaaa agatttggta 1980

aaaacctacc ctccctttgt aaacttcttt gaaatgagca aggaaacaat tattaaatgt 2040

gaaaaacaga aaccaagatt tcatgctttt ctcaagataa accaagcaaa accagaatgt 2100

ggacggcaga gccttgttga acttcttatc cgaccagtac agaggttacc cagtgttgca 2160

ttacttttaa atgatcttaa gaagcataca gctgatgaaa atccagacaa aagcacttta 2220

gaaaaagcta ttggatcact gaaggaagta atgacgcata ttaatgagga taagagaaaa 2280

acagaagctc aaaagcaaat ttttgatgtt gtttatgaag tagatggatg cccagctaat 2340

cttttatctt ctcaccgaag cttagtacag cgggttgaaa caatttctct aggtgagcac 2400

ccctgtgaca gaggagaaca agtaactctc ttcctcttca atgattgcct agagatagca 2460

agaaaacggc acaaggttat tggcactttt aggagtcctc atggccaaac ccgaccccca 2520

gcttctctta agcatattca cctaatgcct ctttctcaga ttaagaaggt attggacata 2580

agagagacag aagattgcca taatgctttt gccttgcttg tgaggccacc aacagagcag 2640

gcaaatgtgc tactcagttt ccagatgaca tcagatgaac ttccaaaaga aaactggcta 2700

aagatgctgt gtcgacatgt agctaacacc atttgtaaag cagatgctga gaatcttatt 2760

tatactgctg atccagaatc ctttgaagta aatacaaaag atatggacag tacattgagt 2820

agagcatcaa gagcaataaa aaagacttca aaaaaggtta caagagcatt ctctttctcc 2880

aaaactccaa aaagagctct tcgaagggct cttatgacat cccacggctc agtggaggga 2940

agaagtcctt ccagcaatga taagcatgta atgagtcgtc tttctagcac atcatcatta 3000

gcaggtatcc cttctccctc ccttgtcagc cttccttcct tctttgaaag gagaagtcat 3060

acgttaagta gatctacaac tcatttgata tgaagcgtta ccaaaatctt aaattataga 3120

aatgtataga cacctcatac tcaaataaga aactgactta aatggtactt gtaattagca 3180

cgttggtgaa agctggaagg aagataaata acactaaact atgctatttg atttttcttc 3240

ttgaaagagt aaggtttacc tgttacattt tcaagttaat tcatgtaaaa aatgatagtg 3300

attttgatgt aatttatctc ttgtttgaat ctgtcattca aaggccaata atttaagttg 3360

ctatcagctg atattagtag ctttgcaacc ctgatagagt aaataaattt tatgggtggg 3420

tgccaaatac tgctgtgaat ctatttgtat agtatccatg aatgaattta tggaaataga 3480

tatttgtgca gctcaattta tgcagagatt aaatgacatc ataatactgg atgaaaactt 3540

gcatagaatt ctgattaaat agtgggtctg tttcacatgt gcagtttgaa gtatttaaat 3600

aaccactcct ttcacagttt attttcttct caagcgtttt caagatctag catgtggatt 3660

ttaaaagatt tgccctcatt aacaagaata acatttaaag gagattgttt caaaatattt 3720

ttgcaaattg agataaggac agaaagattg agaaacattg tatattttgc aaaaacaaga 3780

tgtttgtagc tgtttcagag agagtacggt atatttatgg taattttatc cactagcaaa 3840

tcttgattta gtttgatagt cgtcgtcgga attttatttt gaaggataag accatgggaa 3900

aattgtggta aagactgttt gtacccttca tgaaataatt ctgaagttgc catcagtttt 3960

actaatcttc tgtgaaatgc atagatatgc gcatgttcaa ctttttattg tggtcttata 4020

attaaatgta aaattgaaaa ttcatttgct gtttcaaagt gtgatatctt tcacaatagc 4080

ctttttatag tcagtaattc agaataatca agttcatatg gataaatgca tttttatttc 4140

ctatttcttt agggagtgct acaaatgttt gtcacttaaa tttcaagttt ctgttttaat 4200

agttaactga ctatagattg ttttctatgc catgtatgtg ccacttctga gagtagtaaa 4260

tgactctttg ctacatttta aaagcaattg tattagtaag aactttgtaa ataaatacct 4320

aaaacccaag tgtaaaaaaa aaaaaaaaa 4349

<210> 42

<211> 882

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ala Glu Asn Ser Val Leu Thr Ser Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ser Ser Ile Phe Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile Ser Lys Glu
20 25 30

Asn Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val Glu Glu Met Pro Gln Ile
35 40 45

Glu Thr Arg Val Ile Leu Val Gln Glu Ala Gly Lys Gln Glu Glu Leu
50 55 60

Ile Lys Ala Leu Lys Asp Ile Lys Val Gly Phe Val Lys Met Glu Ser
65 70 75 80

Val Glu Glu Phe Glu Gly Leu Asp Ser Pro Glu Phe Glu Asn Val Phe
85 90 95

Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val Phe Asn Asp Leu Tyr Lys Ala
100 105 110

Asp Cys Arg Val Ile Gly Pro Pro Val Val Leu Asn Cys Ser Gln Lys

115 120 125

Gly Glu Pro Leu Pro Phe Ser Cys Arg Pro Leu Tyr Cys Thr Ser Met
130 135 140

Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr Gly Phe Arg Lys Lys Glu Glu Leu
145 150 155 160

Val Arg Leu Val Thr Leu Val His His Met Gly Gly Val Ile Arg Lys
165 170 175

Asp Phe Asn Ser Lys Val Thr His Leu Val Ala Asn Cys Thr Gln Gly
180 185 190

Glu Lys Phe Arg Val Ala Val Ser Leu Gly Thr Pro Ile Met Lys Pro
195 200 205

Glu Trp Ile Tyr Lys Ala Trp Glu Arg Arg Asn Glu Gln Asp Phe Tyr
210 215 220

Ala Ala Val Asp Asp Phe Arg Asn Glu Phe Lys Val Pro Pro Phe Gln
225 230 235 240

Asp Cys Ile Leu Ser Phe Leu Gly Phe Ser Asp Glu Glu Lys Thr Asn
245 250 255

Met Glu Glu Met Thr Glu Met Gln Gly Gly Lys Tyr Leu Pro Leu Gly
260 265 270

Asp Glu Arg Cys Thr His Leu Val Val Glu Glu Asn Ile Val Lys Asp
275 280 285

Leu Pro Phe Glu Pro Ser Lys Lys Leu Tyr Val Val Lys Gln Glu Trp
290 295 300

Phe Trp Gly Ser Ile Gln Met Asp Ala Arg Ala Gly Glu Thr Met Tyr
305 310 315 320

Leu Tyr Glu Lys Ala Asn Thr Pro Glu Leu Lys Lys Ser Val Ser Met
325 330 335

Leu Ser Leu Asn Thr Pro Asn Ser Asn Arg Lys Arg Arg Arg Leu Lys
340 345 350

Glu Thr Leu Ala Gln Leu Ser Arg Glu Thr Asp Val Ser Pro Phe Pro
355 360 365

Pro Arg Lys Arg Pro Ser Ala Glu His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Leu
370 375 380

Leu Asp Ile Ser Asn Thr Pro Glu Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Thr
385 390 395 400

Pro Lys Ser Cys Thr Lys Ser Ser Lys Ser Ser Thr Pro Val Pro Ser
405 410 415

Lys Gln Ser Ala Arg Trp Gln Val Ala Lys Glu Leu Tyr Gln Thr Glu
420 425 430

Ser Asn Tyr Val Asn Ile Leu Ala Thr Ile Ile Gln Leu Phe Gln Val
435 440 445

Pro Leu Glu Glu Glu Gly Gln Arg Gly Gly Pro Ile Leu Ala Pro Glu
450 455 460
Glu Ile Lys Thr Ile Phe Gly Ser Ile Pro Asp Ile Phe Asp Val His
465 470 475 480

Thr Lys Ile Lys Asp Asp Leu Glu Asp Leu Ile Val Asn Trp Asp Glu
485 490 495
Ser Lys Ser Ile Gly Asp Ile Phe Leu Lys Tyr Ser Lys Asp Leu Val
500 505 510
Lys Thr Tyr Pro Pro Phe Val Asn Phe Phe Glu Met Ser Lys Glu Thr
515 520 525
Ile Ile Lys Cys Glu Lys Gln Lys Pro Arg Phe His Ala Phe Leu Lys
530 535 540
Ile Asn Gln Ala Lys Pro Glu Cys Gly Arg Gln Ser Leu Val Glu Leu

545 550 555 560
Leu Ile Arg Pro Val Gln Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Leu Leu Asn
565 570 575
Asp Leu Lys Lys His Thr Ala Asp Glu Asn Pro Asp Lys Ser Thr Leu
580 585 590
Glu Lys Ala Ile Gly Ser Leu Lys Glu Val Met Thr His Ile Asn Glu
595 600 605
Asp Lys Arg Lys Thr Glu Ala Gln Lys Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr
610 615 620

Glu Val Asp Gly Cys Pro Ala Asn Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu
625 630 635 640
Val Gln Arg Val Glu Thr Ile Ser Leu Gly Glu His Pro Cys Asp Arg
645 650 655
Gly Glu Gln Val Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile Ala
660 665 670
Arg Lys Arg His Lys Val Ile Gly Thr Phe Arg Ser Pro His Gly Gln
675 680 685
Thr Arg Pro Pro Ala Ser Leu Lys His Ile His Leu Met Pro Leu Ser

690 695 700

Gln Ile Lys Lys Val Leu Asp Ile Arg Glu Thr Glu Asp Cys His Asn

705 710 715 720

Ala Phe Ala Leu Leu Val Arg Pro Pro Thr Glu Gln Ala Asn Val Leu

725 730 735

Leu Ser Phe Gln Met Thr Ser Asp Glu Leu Pro Lys Glu Asn Trp Leu

740 745 750

Lys Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr Ile Cys Lys Ala Asp Ala

755 760 765

Glu Asn Leu Ile Tyr Thr Ala Asp Pro Glu Ser Phe Glu Val Asn Thr

770 775 780

Lys Asp Met Asp Ser Thr Leu Ser Arg Ala Ser Arg Ala Ile Lys Lys

785 790 795 800

Thr Ser Lys Lys Val Thr Arg Ala Phe Ser Phe Ser Lys Thr Pro Lys

805 810 815

Arg Ala Leu Arg Arg Ala Leu Met Thr Ser His Gly Ser Val Glu Gly

820 825 830

Arg Ser Pro Ser Ser Asn Asp Lys His Val Met Ser Arg Leu Ser Ser

835 840 845

Thr Ser Ser Leu Ala Gly Ile Pro Ser Pro Ser Leu Val Ser Leu Pro

850 855 860

Ser Phe Phe Glu Arg Arg Ser His Thr Leu Ser Arg Ser Thr Thr His

865 870 875 880

Leu Ile

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 43

gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 44

tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 45

tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 46

ctagcctctg gaatcctttc tctt 24