



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0008092
(43) 공개일자 2013년01월21일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>A61K 39/385</i> (2006.01) <i>A61P 37/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-7033292 (분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2004년07월25일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2006-7001783
원출원일자(국제) 2004년07월25일
심사청구일자 2008년12월31일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2012년12월20일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/008330</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2005/014036
국제공개일자 2005년02월17일</p> <p>(30) 우선권주장
0309188 2003년07월25일 프랑스(FR)</p> | <p>(71) 출원인
에이씨 이문 에스.에이.
스위스, 체하-1015 라우산느, 이피에프엘-피에스 이 빌딩 비</p> <p>(72) 발명자
마들렛, 클라우딘
프랑스, 51100 레임스, 22 루 데스 물린스
토시, 피에르-프랑수아
프랑스, 91160 팔라인빌리에르, 8 루 데스 하우스 프레스나이스
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
한양특허법인</p> |
|--|--|

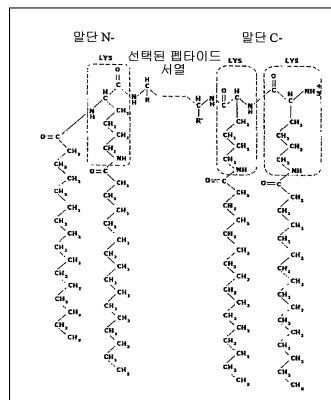
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료에서 다중약물 내성 억제용 P-당단백질 170에 대한 표적 치료학적 백신**

(57) 요약

본 발명의 목적은 담체 및 항원성 구조로 컨쥬게이트를 포함하고, 상기 컨쥬게이트는 P-170 단백질의 세포외 루프로부터 유래된 적어도 하나의 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역성 조성물이다. 각 펩타이드는 적당한 투여 조건 하에 항-P-170 항체의 유도를 허용하기 위하여 C12 내지 C24 사이의 탄소 사슬을 함유하는 몇 개의 지방산 분자와 결합한다. 본 발명은 다중약물 내성 치료 수단을 명확히 하기 위한 상기 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

니콜라우, 클라우데

미국, 엠에이 02459, 뉴턴, 166 그린우드 스트리트

히크만, 데이비드 티.

스위스, 1635 라 투어 드 트레메, 시테 에스티.-미
첼 12

특허청구의 범위

청구항 1

10 내지 25개의 아미노산 잔기로 구성된 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 컨주게이트를 포함하는 조성물로서, 상기 하나 이상의 펩타이드는:

서열 번호:5 또는 서열 번호:6으로 구성되거나,

서열 번호:5 또는 서열 번호:6을 포함하거나, 또는

서열 번호:5 또는 서열 번호:6의 10개 이상의 연속적인 아미노산으로 구성되고, 상기 하나 이상의 펩타이드의 각각은, 비로솜(virosome) 또는 리포솜, 및 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 지방산의 적어도 2개의 분자와 결합되는 것인, 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 암 치료 동안 어떤 환자에게서 나타나는 다중약물 내성(pleiotropic resistance(다면발현성내성) 또는 multidrug resistance) 치료에 유용한 신규한 약제를 위한 조사 배경 및 개발을 포함한다.
- [0002] 특히, 본 발명은 암 치료 동안 다중약물 내성으로부터 고통받는 환자들에게서 이러한 내성을 감소 또는 전환시킬 목적으로 면역반응을 유도하기 위해 사용될 수 있는 약제에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 다중약물 내성의 출현 예방용 약제에 관한 것이다.
- [0003] 이 점에 있어서, 본 발명은 첫째로, 담체 및, 둘째로, 펩타이드 영역과 C12 내지 C24 사이의 탄소 사슬을 함유하는 지방산 분자 사이의 공유결합에 의해 형성된 컨주게이트를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 상기 펩타이드 일부는 P-170 단백질의 세포외 루프중 적어도 하나로부터 유래한다. 적당한 조건 하에 투여된 이러한 면역원성 조성물은 항-P-170 항체의 유도를 허용한다.
- [0004] 또한, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 리포솜과 결합한 컨주게이트를 기초로 한 상기 조성물을 이용한 면역화 방법에 관한 것이다. 상세하게, 본 발명은 환자에게 투여된 화학요법 치료 이전에, 동시에 또는 이후에 이행하는 면역화 방법에 관한 것이다.
- [0005] 마지막으로, 본 발명은 항암제로 치료한 암으로부터 고통받는 환자에게서 나타나는 다중약물 내성의 생체내(in vivo) 치료, 또는 이와 같은 다중약물 내성의 예방을 위한 본 발명에 따른 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [0006] 다중약물 내성(multidrug resistance; MDR)의 현상은 화학요법 약물, 특히 암 치료를 위해 사용된 약물에 대해 저항성을 나타내는 암세포주에서 1970년대 말 증명되었다. 다중약물 내성은 이러한 약물이 다른 구조 및 특이성을 가질때 환자의 치료를 위해 사용된 화학요법 약물에 관한 다면발현성 내성(pleiotropic resistance)에 의해 특징지어진다. 암세포의 다면발현성 내성을 선택 또는 유도할 수 있는 약물 중 콜히친, 아드리아마이신, 악티노마이신, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 미톡산트론을 들 수 있을 것이다. 표현형의 관점으로부터, 다중약물 내성은 세포독성 약물의 세포내 축적 감소, 세포의 생리학적 변형, 및 P-gp 단백질 또는 택일적으로 P-170 단백질로 불리는 P-당단백질의 세포막에서 과발현되는 것으로 특징지어진다(Van der Blik et al. 1988. Gene. 71(2):401-411, Thiebaut et al. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. 84(21): 7735-7738, Endicott et al. 1989 Annu. Rev. Biochem. 58: 137-171). P-170 단백질은 세포 밖으로 약제의 활성적 흐름(활성적 유출이라고도 함)을 초래하고, 이러한 현상은 ATP 소비에 의존한다. P-170 단백질에 의한 인지, 및 다양한 구조 및 기능을 가지는 온갖 종류의 화합물의, 처리된 세포 밖으로 P-170 단백질-매개된 배출은 이러한 단백질의 기능의 가장 불가사의한 양상 중 하나로 남아있다. 교차내성(cross-resistance)에 기인한 약물들 사이의 공통적인 구조적 특징의 증명의 부족은 P-170 단백질의 영향 하에 계획된 배출을 하지 못하는 약물들의 개발을 허용하지 않는다.
- [0007] 화학요법에 대한 종양의 다중약물 내성은 의학 암종학(medical cancerology)에서 중심 문제로 된다. 지원치료에서 경과를 관찰하는 동안에도, 약물 내성의 문제는 더 좋은 치료율을 얻는데 장애로 남아있다. 종양세포는 치

료 초기부터 화학요법에 반응하지 않을 수 있음을 유의한다. 이러한 새로운(*de novo*) 다중약물 내성은 불행하게도 고형 종양의 여러 타입에서 일반적이다. 게다가, 초기에 화학요법에 반응하는 종양에서 그 자체가 명백하고, 다소 짧은 기간에 치료에 대한 내성이 그 후에 전개되는 후천적 내성의 현상을 관찰하는 것이 가능하여 왔다.

[0008] 더욱 효율적이기 위하여, 항암 치료는 세포 밖으로 약물의 P-170 단백질-매개된 유출을 막아 다중약물 내성을 회피할 수 있는 다중약물 내성-조절제(회귀제(reverting agents)라 함)와 병용하여 왔다. 베라파밀, 퀴닌 및 시클로스포린과 같은 현재의 회귀제는 그들이 P-170 단백질의 유출 활성을 억제하기 위해 요구되는 양으로 사용되었을 때 환자가 받아들일 수 없는 독성을 초래한다. 예를 들어, 베라파밀은, 독성에 대해 제한용량이기도 한 치료에 효과적인 용량으로 투여하였을 때 고혈압, 심부정맥(cardiac arrhythmia) 및 울혈성 심장부전(congestive heart failure)과 같은 기능부전이 환자에게서 나타나기 때문에 암 전환(cancer reversion) 치료에서 이의 한계를 빠르게 보여준다(Miller et al. 1991. J Clin Oncol 9(1): 17-24).

[0009] 최근 텍스베라파밀, PSC 833(시클로스포린 유도체)와 같은 유사체, 및 가장 최근에는 레보레토이리 세르비아(Laboratoires Servier)의 S9788은 다중약물 내성을 극복하기 위해 임상시험을 하여 왔다. 그러나, 이러한 신규한 회귀제는 회귀제의 전세대에 보고되어 있는 것과 비교가능한 사용에 대한 제한을 경험한다. 사실, S9788 (6-[4-2,2-디-(4-플루오로페닐)에틸아미노]-1-피페리디닐]-N,N'-디-2-프로페닐-1,3,5-트리아진-2,4-디아민), 트리아진아미노피페리딘 유도체를 사용한 다중약물 내성의 치료를 위한 시험은 심장독성, 심실성 부정맥(ventricular arrhythmia) 및 Torsade de pointe의 현상의 출현에 이어 이러한 제품의 사용을 제한하는 특징이 있다(Stupp et al. 1998. Ann Oncol 9(11): 1233-1242). 그 결과, 다중약물 내성 현상은 화학요법으로 다루기 힘든 환자를 위해 독성의 역치(threshold)와 균등한 치료 용량으로 인해 신규한 및 통상적인 회귀제로 제지하는 것이 어렵다.

[0010] 또한, 면역요법(immunotherapy), 특히 단일클론 항체의 사용은 환자에게서 나타나는 다중약물 내성을 치료하기 위해 계획되어 왔다. 단일클론 항체 MRK16을 사용하여 난소암에서 종양의 형성을 억제하기 위하여 첫번째로 테스트하였다(Tsuruo. 1989. Cancer Treat Res 48: 1811-1816). 더욱 최근에, 다중약물 내성의 치료에서 단일클론 면역요법은 메체트너 및 로닌손(Mechetner and Roninson)에 의해 더욱 철저히 연구되어 왔다(1992. Proc Natl Acad Sci USA vol.89 pp.5824-5828). 사실, 인간 P-당단백질의 세포의 항원결정부위(epitope)에 대해 지향되는 단일클론 항체 UIC2를 얻고, 항암제에 저항성을 갖는 세포주에서 시험관내(*in vitro*) 테스트하였다. 시험관내에서 단일클론 항체 UIC2의 억제 효과는 최대 임상 용량(3 μ M)으로 사용된 베라파밀의 용량과 유사함을 보여주었다. 항-P-170 단일클론 항체는 P-170 단백질의 ATPase 활성을 억제하고, P-170 단백질에 대한 완제의약품(medicinal product)의 결합을 억제함으로써 이들의 효과를 발휘한다.

[0011] 환자에게 단일클론 항체를 주사하는 것을 기초로 한 적당한 면역요법은 종양의 잔여 내성 세포를 제거할 수 있는 한 유리할 수 있다. 그러나, 항체의 특이성, 독성, 효능 및 작용 메커니즘의 인식의 부족은 P-170 단백질의 과발현으로 인한 다중약물 내성을 극복하기 위한 이러한 접근의 사용을 제한한다. 특히, 항-마우스 항체 또는 항-토끼 항체 면역 반응과 관련된 부작용 및 단일클론 항체의 인간화(humanization)의 부족에 관련된 어려움은 단일클론 면역요법에서 주요한 것이 아니다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 다중약물 내성의 적어도 부분적으로 공지된 치료의 단점을 개선하기 위하여, 암에서 다중약물 내성을 위해 이미 사용가능한 치료로 선택적인 방법을 제안하는 것이다. 이러한 점에서, 본 발명은 P-당단백질(P-170 단백질)에 대해 특이적인 다중클론 자동항체의 유발을 기초로 한 면역요법을 제시한다. 이러한 면역요법은 P-170 단백질의 세포의 루프 중 적어도 하나로부터 유래된 펩타이드가 항원성 능력의 발현을 허용하거나 증진시키는 형태로 존재하고 투여될 때, 특히 이들이 약제학적으로 허용가능한 담체와 결합되었을 때 환자에게서 항체를 유도하기 위해 P-170 단백질의 세포의 루프 중 적어도 하나로부터 유래된 펩타이드를 포함하는 컨주게이트의 항원성 능력을 이용하여 얻어진다. 특히, 항체들은 인간 P-170에 대하여 유도된 자가 항체들이다.

과제의 해결 수단

[0013] 따라서, 본 발명은 첫째로, 담체 및, 둘째로, 항원성 구조로서 P-170 단백질의 세포의 루프로부터 유래된 적어도 하나의 펩타이드의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 컨주게이트를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이며, 각 펩타이드는 적당한 투여 조건 하에 항-P-170 항체의 유도를 허용하기 위하여 C12 내지 C24 사

이의 탄소 사슬을 함유하는 적어도 두개의 지방산 분자와 결합한다.

[0014] 본 발명의 저자들은 놀랍고도 뜻밖에 본 발명에 기재된 면역원성 조성물로 면역화하고 암세포를 접종한 다음, 화학요법 치료단계를 따른 마우스에서 생존시간이 77% 증가됨을 보여주었다.

[0015] 다중약물 내성의 치료에서 얻어진 최상의 공표된 결과는 동일한 암 모델이 다른 물질로 치료한 쥐에서 생존이 49% 증가를 나타내었기 때문에, 이러한 결과는 매우 희망적이다(Pierre et al. 1992. Invest New Drug. 10: 137-148). 게다가, Yang et al.(1999. BBRC. 266: 167-173)은 동일한 세포주로 빈크리스틴 및 시클로스포린 A 로 처리한 쥐에서 생존이 단지 35% 증가함을 관찰하였다.

도면의 간단한 설명

[0016] 본 발명은 하기 도면에 의해 설명되나, 이에 한정되지 않는다.

- 도 1 : 펩타이드 분자당 4분자의 팔미트산(C16)이 결합된 마우스 P-170 단백질의 세포의 단편에 대응하는 합성 펩타이드의 설명.
- 도 2 : 고체 지지체에서 펩타이드를 합성하기 위한 Boc/벤질 방법의 개략적 설명.
- 도 3 : 마우스에서 면역화 및 P388R 세포의 주사 후 화학요법을 위한 프로토콜.
- 도 4 : Lp2로 면역화된 마우스의 혈청에서 면역화 시간(첫번째, 두번째, 세번째 주사)의 함수로서 항체역가(antibody titer)의 설명. 항-mpp1, mpp2 및 mpp4 항체를 정량하고, 다양한 아이소타입(isotype)을 각각 Ig(M, G3, G2a, G2b, G1) 특이적인 항-쥐 이차 항체(anti-murine secondary antibodies)를 이용하여 검출하였다. 각 막대그래프는 면역화 12일 후 수득한 마우스의 5개 혈청으로 얻어진 평균값을 나타낸다. 하나의 단위는 0.2 μ g Ig/ml와 일치한다.
- 도 5 : Lp4로 면역화된 마우스의 혈청에서 면역화 시간(첫번째, 두번째, 세번째 주사)의 함수로서 항체역가의 설명. 항-mpp1, mpp2 및 mpp4 항체를 정량하고, 다양한 아이소타입을 각각 Ig(M, G3, G2a, G2b, G1) 특이적인 항-쥐 이차 항체를 이용하여 검출하였다. 각 막대그래프는 면역화 12일 후 수득한 마우스의 5개 혈청으로 얻어진 평균값을 나타낸다. 하나의 단위는 0.2 μ g Ig/ml와 일치한다.
- 도 6 : Lp3로 면역화된 마우스의 혈청에서 면역화 시간(첫번째, 두번째, 세번째 주사)의 함수로서 항체역가의 설명. 항-mpp1, mpp2 및 mpp4 항체를 정량하고, 다양한 아이소타입을 각각 Ig(M, G3, G2a, G2b, G1) 특이적인 항-쥐 이차 항체를 이용하여 검출하였다. 각 막대그래프는 면역화 12일 후 수득한 마우스의 5개 혈청으로 얻어진 평균값을 나타낸다. 하나의 단위는 0.2 μ g Ig/ml와 일치한다.
- 도 7 : Lp1로 면역화된 마우스의 혈청에서 면역화 시간(첫번째, 두번째, 세번째 주사)의 함수로서 항체역가의 설명. 항-mpp1, mpp2 및 mpp4 항체를 정량하고, 다양한 아이소타입을 각각 Ig(M, G3, G2a, G2b, G1) 특이적인 항-쥐 이차 항체를 이용하여 검출하였다. 각 막대그래프는 면역화 12일 후 수득한 마우스의 5개 혈청으로 얻어진 평균값을 나타낸다. 하나의 단위는 0.2 μ g Ig/ml와 일치한다.
- 도 8 : Lp1 및 Lp2로 면역화된 마우스의 생존시간. 시간 0에서, 10⁶ 화학내성(chemoresistant) P388R 세포를 접종하였다. 1일, 10일 및 22일에, 5.5 mg/kg의 독소루비신을 주사하고, 4일 및 14일에, 2.5 mg/kg의 빈블라스틴을 주사하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] P-당단백질 또는 P-170 단백질은 줄리아노 및 링에 의해 확인된 170 kDa의 막-결합 인당단백질(membrane-bound phosphoglycoprotein)이다(1976. Biochim Biophys Acta 455(1): 152-162). 쥐(murine) P-170 단백질은 두개의 동등한 실체를 형성하는 1276 아미노산으로 구성된다. 분자의 소수성 도메인은 1 내지 12로 번호를 매기고, 화학요법적 약물의 유출에 연루된다. 쥐 P-170 단백질의 세포의 루프 1, 2, 및 4는 이들이 사실상 항원성일 수 있다고 제시하는 그들의 명백한 세포의 토폴로지(topology)에 대해 선택되어 왔다. 동등한 양식으로, 인간 P-170 단백질(Chen et al. 1986 Cell. 47(3): 381-389)은 6개의 막횡단 나선 도메인(transmembrane helical domains) 및 뉴클레오티드 결합 사이트를 각각 포함하는 두개의 동종 도메인으로 구성되어 있는 1280 아미노산 단백질이다. 이러한 막횡단 도메인의 소수성 영역은 세포 밖으로부터 P-170 단백질의 인지를 위한 단편일 것으로 여겨지는 세포외 루프를 형성한다. 또한, 인간 P-170 단백질의 세포외 루프 1, 4 및 6은 특히 그들의 지정된(marked) 세포외 위치에 기인하여 높은 항원성 능력(antigenic capacity)을 갖는 것으로 선택되어 왔다.

- [0018] 본 발명에서 사용된 면역요법은 화학요법적 약물의 치료 효과를 명백하게 하기 위해 암 화학요법에 부가한다.
- [0019] 본 발명에서 통상의 의미대로, "암"은 두가지 주요 특성에 의해 정의된다: 외부 신호에 의해 조절되지 않는 세포성장 및 증식, 및 먼 사이트 이식에 의해 전이(metastase)를 형성하기 위한 능력과 함께 적절한 조직에 침범하는 능력.
- [0020] 이러한 특징들은 암세포의 본래의 성질, 즉 상기 암세포에서 이들의 카리오טיפ(caryotypic) 및 게놈 불안정성, 통제불능의 증식, 새로운 표현형의 획득에 의해 수반된 이들의 전이능력, 및 종양유전자(oncogene)의 활성화 및 탈억제(derepression)의 결과이다. 따라서, 용어 "암"은 본 발명에서, 상기 특성을 갖고, 원발성 종양(primary tumor) 및/또는 전이성 종양(이차 종양(secondary tumor))의 발생을 향해 특별히 발달하는 세포성장 또는 증식의 어느 단계를 의미하는 것으로 이해된다.
- [0021] 게다가, 본 발명의 목적을 위해, 표현 "다중약물 내성을 위한 치료"는 죽음을 피하기 위해, 바람직하게는 항암 의약품에 대한 민감성을 재확립하기 위해 이의 결과를 제한하기 위하여 다중약물 내성과 싸우도록 의도되는 모든 의학 치료를 의미하는 것으로 이해된다. 이 점에 있어서, 다중약물 내성을 위한 치료의 목적은 화학요법에 민감한 세포 표현형에 대해 완전한 전환을 유도함으로써, 이상적으로 다중약물 내성을 치료하는 방향으로 향하게 된다. 그러나, 이러한 전환은 부분적일 수 있다: 그 결과, 다중약물 내성의 치료는 환자의 장기적인 완화를 허용하는 일시적으로 억제하는 것으로 입증될 것이다. 또한, 다중약물 내성을 위한 치료는 환자에게서 새로운 또는 후천적인 다중약물 내성의 출현을 막을 수 있는 예방능력에 의해 특징지어진다.
- [0022] 따라서, 본 발명은 첫째로, 담체 및, 둘째로, 항원성 구조로서 P-170 단백질의 세포의 루프로부터 유래된 적어도 하나의 펩타이드의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 컨주게이트를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이며, 각 펩타이드는 적당한 투여 조건 하에 항-P-170 항체의 유도를 허용하기 위하여 C12 내지 C24 사이의 탄소 사슬을 함유하는 적어도 두개의 지방산 분자와 결합한다.
- [0023] 또한, 본 발명에서, 면역원성 조성물은 암으로부터 고통받는 환자에게서 나타나는 다중약물 내성의 전환을 위해 항-P-170 항체의 유도를 허용한다.
- [0024] 바람직한 구현예에서, 컨주게이트는 P-170 단백질의 적어도 두개의 세포의 루프, 바람직하게는 적어도 세개의 세포의 루프의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함한다.
- [0025] 본 발명에 따른 표현 "컨주게이트"는, 지질-펩타이드 혼합된 분자를 형성하기 위하여, C12 내지 C24 사이의 탄소 사슬을 함유하는 지방산 분자, 및 본 발명에 기재된 바와 같은 아미노산 서열 사이의 공유결합에 의해 형성된 시약과 일치한다. 특히 고체상 합성에 의해 얻어진 펩타이드 서열은 분자의 지질 영역을 형성하는 지방산 분자에 공유결합되어 있다.
- [0026] 본 발명의 목적을 위해, P-170 단백질로부터 용어 "유래된 펩타이드"는, 상기 "유래된 펩타이드"가 그것이 유래된 세포의 루프의 적어도 하나의 항원결정부위를 가지는 한, P-170 단백질의 세포의 루프 각각을 만드는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 의미한다. 유리하게 세포의 루프로부터 유래된 펩타이드는 5 내지 50의 아미노산 잔기, 바람직하게는 5 내지 40, 또는 10 내지 30, 유리하게는 10 내지 25 잔기를 갖는다. 이러한 정의의 관계에서는 하기와 같다: (1) 펩타이드가 유래된 것으로부터 세포의 루프의 대응하는 서열과 아미노산 서열이 동일한 펩타이드, 또는 (2) 펩타이드가 유래된 것으로부터 세포의 루프의 서열에 대하여 아미노산 서열이 변형된 펩타이드, 상기 변형은 하나 이상의 잔기의 삽입, 결실 또는 치환, 특히 보존적인 치환(conservative substitution)에 의해 점돌연변이(point mutation)를 구성하는 것이 가능하고, 따라서 형성된 펩타이드는 P-170 단백질의 항원결정부위를 여전히 운반하는 것을 제공한다. 특히, 용인할 수 있는 돌연변이는 본 발명의 조성물에 포함되었을 때 변형된 펩타이드의 배열(conformation)을 방해하지 않는 돌연변이이다. 이것은 본 발명에 따른 조성물에서 제형화되었을 때 항체를 유도하기 위하여 변형된 펩타이드의 능력에 의해 입증될 수 있다.
- [0027] 바람직하게, 본 발명의 펩타이드는 특히 하기에 기재된 방법을 이용하여 화학적 합성에 의해 얻어진다.
- [0028] 본 발명에서, P-당단백질(또는 P-170 단백질)의 "세포의 루프"는 세포의 토폴로지를 갖는 P-170 단백질의 각 아미노산 서열 또는 이러한 단백질의 항원결정부위를 운반하는 서열로서 선택될 수 있을 정도의 세포의 환경을 가진 중요한 연결을 의미한다.
- [0029] 본 발명에 사용된 합성 펩타이드를 만드는 아미노산 서열은 그 자체로 항원성일 수 있으며, 또는 그들이 펩타이드가 유래되는 것으로부터 세포의 루프에서 그들과 대응하는 아미노산 서열의 배열을 보존하는 배열, 또는 적당

한 투여 조건 하에 항체의 생산을 유도하는 능력을 형성한 펩타이드를 주기 위해 충분히 유사한 배열에 존재할 때 항원성일 수 있다. 예를 들어, 항체의 생산을 유도하는 능력은 본 발명에서 제조된 펩타이드로 면역화된 마우스 또는 어느 다른 공지의 수단에 의해서 입증될 수 있다. 따라서, 면역원성 조성물에서, 유리하게 본 발명의 펩타이드는, 형성된 조성물에 면역원성 능력을 주기 위해서, 펩타이드가 유래되는 것으로부터 루프의 세포의 부분의 배열을 재생산하고, 또는 상기 배열과 유사한 3차원 배열을 가진다. 유리하게, 펩타이드의 적당한 표시 (presentation)는 면역원성 조성물의 다른 구성성분과 결합함으로써 생긴다.

[0030] 항체의 생산을 이끌어내는 능력은 특히 본 발명의 펩타이드가 적당한 담체, 특히 리포솜과 결합한 컨주게이트 형태이기 위하여 합성되고 변형된 펩타이드일 때 얻어진다.

[0031] 본 발명에 따른 컨주게이트는 면역원성 조성물에서 담체에 의해 운반된 항원성 구조와 일치한다. 본 발명에서, "항원성 구조"는 항원/항체 복합체를 형성하기 위해 항체와 반응할 수 있는 분자를 의미한다. 상기 면역원성 조성물의 "항원성 구조"는 주어진 항원에 대해 특이적인 항체의 형성에 대응하는 면역원성(immunogenicity)의 현상을 유도하는 능력과 같은 것을 가질 수 있거나 또는 가질 수 없다.

[0032] 예로서, 이러한 컨주게이트들은 하기 표 1에 기재된 실험 프로토콜에 따라 합성한 후 그들의 서열, 그들의 분자량 및 그들의 순도에 의해 특징지워진 쥐 P-170 단백질의 세포의 루프 1(mpp1) 및 적어도 하나의 세포의 루프 2(mpp2) 또는 4(mpp4)로부터 유래된 펩타이드를 포함한다.

표 1

[0033]

컨주게이트 이름	아미노산 서열	계산된 분자량	관찰된 분자량	순도 (%)
mpp1 서열 번호 1	K-G-GNMTDSFTKAEASILPSITNQ SGPNSTLIISNSSLEEE-G-K-K-NH ₂	5436	5437	91.6
mpp2 서열 번호 2	K-G-KVLTSFTNKELQAYAK-G-K-K-NH ₂	3293	3293	93.8
mpp4 서열 번호 3	K-G-SRDDDMETKRQEN-G-K-K-NH ₂	3190	3188	95.3

[0034] 쥐 P-170 단백질의 세포의 루프 1, 2 및 4로부터 유래된 펩타이드의 계산된 및 관찰된 분자량은 질량분석기로 분석함으로써 얻어졌다. 즉:

[0035] - 계산된 분자량용 [M+H]⁺

[0036] - 측정된 분자량용 MALDI-TOF 및 PDMS-TOF, 즉,

[0037] (매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight))

[0038] (플라즈마 탈착 질량분석기 - 비행 시간 (Plasma Desorption Mass Spectrometry - Time of Flight)).

[0039] 게다가, 아미노산 서열은 아미노산의 기대수 및 얻어진 수(기대된/얻은)를 입증하기 위하여 110°C에서 6N HCl/페놀에서 분취물의 가수분해로 분석된다.:

[0040] mpp 1, A (2/1.5), D (5/4.4), E (5/6.6), F (1/0.6), G (4/3.4), I (4/3.6), K (4/4.0), L(3/3.5), M (1/0.7), P (2/1.8), T (4/3.0), S (8/7.4).

[0041] mpp 2, A (2/2.3), D (1/1.2), E (2/2.4), F (1/1.0), G (2/2.1), K (6/6.0), L (2/2.1), S (1/0.9), V (1/1.0), Y (1/1.0).

[0042] mpp 4, D (5/5.0), E (3/3.1), G (2/2.0), K (4/3.7), S (1/0.9), R (2/1.9).

[0043] 특별히 유리한 본 발명의 구현예에 따르면, 컨주게이트는 인간 P-170 단백질의 세포의 루프 1 (hpp1) (hpp: 인간 팔미토일 펩타이드(human palmitoyl peptide)) 및 적어도 하나의 세포의 루프 4 (hpp4) 및 6 (hpp6)으로부터 유래된 펩타이드를 포함한다. 따라서, 컨주게이트의 펩타이드는 세포의 루프 1 (hpp1) 및 4 (hpp4), 또는 세

포의 루프 1 (hpp1) 및 6 (hpp6)으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다.

[0044] 바람직하게, 면역원성 조성물의 컨주게이트는 인간 P-170 단백질의 세개의 루프 1 (hpp1), 4 (hpp4) 및 6 (hpp6)으로부터 유래된 펩타이드를 포함한다.

[0045] P-170 단백질의 루프 1의 47-아미노산 길이가 주어지며, 이 루프로부터 유래된 펩타이드는 당화(glycosylation) 사이트에서 쪼개짐(cleavage)에 의해 얻어진 세개의 단편으로 나뉘어지는 상기 루프 1로부터 생길 수 있다. 세개의 유래된 펩타이드는 다음 세개의 컨주게이트 hpp1a, hpp1b 및 hpp1c를 발생시키며, 이것의 합성이 수행될 수 있다. 다른 펩타이드는 하나 이상의 항원결정부위를 함유하는 이러한 세개의 펩타이드의 단편일 수 있다. 그 결과, 본 발명에 따른 컨주게이트는 당화 사이트에서 상기 루프 1의 쪼개짐으로부터 생긴 세개의 펩타이드와 대응하는 인간 P-170 단백질의 세포외 루프 1로부터 유래된 펩타이드의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0046] 컨주게이트의 펩타이드 서열은 이들이 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 제조하기 위해, 특히 리포솜과 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 컨주게이트의 펩타이드는 각각 하기의 아미노산 서열:

[0047] - 루프 1에 대해 (서열 번호 4):

[0048] GEMTDIFANAGNLEDLLMSNITNRS DINDTGFFMNLE

[0049] EDMTRYAYYYS

[0050] - 루프 1a에 대해 (서열 번호 5): GEMTDIFANAGNLEDLLMS

[0051] - 루프 1b에 대해 (서열 번호 6): NITNRS DINDTGFF

[0052] - 루프 1c에 대해 (서열 번호 7): MNLEEDMTRYAYYYS

[0053] - 루프 4에 대해 (서열 번호 8): FSRIIGVFTRIDDPETKRQNSNLF S

[0054] - 루프 4a에 대해 (서열 번호 9): FTRIDDPETKRQNSNLF S

[0055] - 루프 6에 대해 (서열 번호 10): FRFGAYLV AHKLSMFED

[0056] 및/또는 이의 조합으로부터 선택된다.

[0057] 세포외 루프 1에 대해, 유리하게 동일한 조성물에서 세개의 펩타이드 1a, 1b 및 1c로 구성된 것이 사용될 것이다. 택일적으로, 펩타이드 1a 및 1b, 또는 1a 및 1c, 또는 1b 및 1c가 사용될 것이다.

[0058] 표 2는 인간 P-170 단백질의 세포외 루프 1, 4 및 6에 대응하는 컨주게이트의 아미노산 서열을 요약한다. 유래된 펩타이드의 서열에 대응하는 아미노산 서열은 대문자이며, 반면 소문자는 지방산 분자에 결합하기 위해 부가된 아미노산과 일치한다.

[0059] 표 2에 기재된 펩타이드의 서열, 분자량 및 순도는 표 1의 펩타이드에 대해 상기 기재된 기술에 의해 제어될 수 있다.

[0060] 유리하게, 세포외 루프로부터 유래된 펩타이드는 합성 후 HPLC 크로마토그래피로 측정되어 90%와 동등하거나 그 이상, 유리하게는 91% 내지 98%인 순도를 갖는다.

표 2

[0061]

컨주게이트 이름	인간 P-170으로부터 아미노산 서열
Hpp1 (서열 번호 11)	K-G-GEMTDIFANAGNLEDLLMSNITNRS DINDTGFFMNLE EDMTRYAYYYS-G-K-K-NH ₂
Hpp1a (서열 번호 12)	K-G-GEMTDIFANAGNLEDLLMS-G-K-K-NH ₂
Hpp1b (서열 번호 13)	K-G-NITNRS DINDTGFF-G-K-K-NH ₂
Hpp1c (서열 번호 14)	K-G-MNLEEDMTRYAYYYS-G-K-K-NH ₂
Hpp4 (서열 번호 15)	K-G-FSRIIGVFTRIDDPETKRQNSNLF S-G-K-K-NH ₂
Hpp4a (서열 번호 16)	K-G-FTRIDDPETKRQNSNLF S-G-K-K-NH ₂
Hpp6 (서열 번호 17)	K-G-FRFGAYLV AHKLSMFED-G-K-K-NH ₂

- [0062] 본 발명에서, 세포의 루프의 서열(대문자로 표시됨)에 대응하는 아미노산 서열은 지방산 잔기가 결합되는 아미노산 잔기(소문자 활자케이스로 이하에서 설명한 펩타이드에서 표시됨)에 의해, 특히 그들의 말단에서 확장될 수 있다. 아미노산 서열과 지방산 분자를 결합한 본 발명의 다양한 컨주게이트 서열은 하기의 표에 있는 형태로 표시된다.
- [0063] 유리하게, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23 또는 C24 탄소 사슬을 함유하는 지방산 분자가 있으며, 바람직하게는 C16 팔미트산 분자이다. C12 내지 C24의 지방산 분자의 탄소 사슬은 선형(linear) 또는 분지(branched)이다. 바람직하게, 지방산 분자는 선형 탄소 사슬을 갖는다. 한편으로, 지방산 분자는 펩타이드 합성하는 동안, 특히 강산 존재 하에 탈보호화의 마지막 단계 동안 양립할 수 없는 반응때문에 단불포화(monounsaturated) 또는 다불포화(polyunsaturated)도 아닐 수 있다.
- [0064] 바람직하게, 각 컨주게이트는 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 적어도 4개의 지방산 분자, 바람직하게는 펩타이드의 N- 및 C-말단 끝에 분포된 지방산 분자를 포함한다. 지방산에 따라, 아미노산 서열 안에 포함된 다른 분포를 상상할 수 있다. 또한, 이러한 펩타이드는 지방산 분자에 공유결합되어 있다.
- [0065] 바람직하게, 컨주게이트에 있는 펩타이드는 4개의 팔미트산 분자에 각각 결합되어 있다; 따라서, 이들은 테트라팔미토일레이티드(tetrapalmitoylated)이다.
- [0066] 바람직하게, 두개의 팔미트산 분자는 펩타이드의 N-말단 끝에 결합되어 있고, 두개의 팔미트산 분자는 펩타이드의 C-말단 끝에 결합되어 있다.
- [0067] 바람직하게, 표 2에 나타난 대로, C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 지방산 분자와 결합하기 위하여, 컨주게이트의 펩타이드의 세포의 루프의 아미노산 서열은 하나 이상의 아미노산 잔기로 N- 및/또는 C-말단 위치에서 확장된다.
- [0068] 상기 펩타이드와 상기 지방산의 결합은 N-말단 위치에서 독점적으로, 또는 택일적으로 C-말단 위치에서 독점적으로 수행될 수 있다. 유리하게, 컨주게이트에서, 펩타이드와 지방산의 결합은 펩타이드 서열의 N-말단 및 C-말단 위치에서 수행되어, 테트라팔미토일레이티드 서열을 얻는다.
- [0069] 택일적으로 또는 점증적으로, 지방산과 펩타이드 서열 내 내부 잔기의 결합을 계획할 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명에서 정의한 대로, 컨주게이트는 하나 이상의 PEG 분자를 포함할 수 있다.
- [0071] 항원으로서 사용된 펩타이드의 면역원성/면역원성 특질을 증가시키기 위해, "PEG화(pegylation)", 즉 PEG 분자를 펩타이드에 공유결합하여 구성되는 공정은 당업자에게 잘 알려진 기술이다(2002. Adv Drug Deliv Rev. 54(4): 459-476).
- [0072] 이러한 공정은 특히 펩타이드 서열의 접근 용이성, 및 이런 식으로 항원의 제시를 증가시키는 것을 가능하게 한다.
- [0073] 일반적으로, 펩타이드 서열이 길수록 PEG 분자의 수가 더 많다.
- [0074] 유리하게, 1 내지 8000의 PEG 분자는 본 발명에 기재된 대로 컨주게이트의 펩타이드의 세포의 루프의 아미노산 서열의 N- 및/또는 C-말단 위치에서 발견된 리신(K) 잔기에 부착된다. 리포솜의 지질 이중층에서 이러한 항원성 복합체를 재구성하는 것을 가능하게 하기 위해, 각 펩타이드는 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 적어도 두개의 지방산 분자, 또는 포스파티딜에탄올아민 분자에 각각 결합된 폴리에틸렌 글리콜(1-8000)의 적어도 두개의 사슬에 공유적으로 부착된다. 적당한 투여 조건 하에, 이러한 항원은 보조-리포솜에서 항-P-170 항체의 유도를 재구성한다.
- [0075] 본 발명에서, 면역원성 조성물의 표현 "담체"는 면역 체계에서 항원성 구조의 수송을 제공하는 임의의 약제를 의미한다. 특히, 본 발명에 따른 담체는 리포솜, *Neissera meningitides* OMPCs 또는 *Escherichia coli* TraT와 같은 세균 막단백질, 장내세균(entobacterial) Omp 단백질, 나노입자, 미셀, 금입자, 마이크로비드(microbead) 및 비로솜(virosome)으로 구성될 수 있다.

- [0076] 상기 언급된 컨주게이트로부터 본 발명의 면역원성 조성물을 형성하기 위하여, 리포솜은 본 발명의 조성물에서 컨주게이트를 막기 위한 담체로서 유리하게 선택된다.
- [0077] 유리하게, 상기 컨주게이트는 리포솜의 표면에 존재한다.
- [0078] 본 발명의 목적을 위해, 용어 "리포솜"은 P-당단백질(P-170)의 세포의 루프로부터 유래되고 항원결정부위를 운반하는 펩타이드의 면역 체계의 세포에 제시를 보증하고, 하나 이상의 인지질 층으로 구성된 인공의 구형입자를 의미하는 것으로 이해된다.
- [0079] 유리하게, 본 발명에 따른 조성물은 컨주게이트 및 리포솜을 1/10 내지 1/1000, 바람직하게 1/50 내지 1/500의 몰비율, 유리하게 1/250의 몰비율로 포함한다.
- [0080] 유리하게, 리포솜은 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디미리스토일포스파티딜글리세롤(DMPG) 및 콜레스테롤을 각각 0.9:0.1:0.7의 몰비율로 혼합하여 제조된다. 바람직하게 상기 사용된 제품은 내독소(endotoxin), 프리온(prion) 또는 바이러스의 오염 가능성을 피하기 위한 합성 원료이다. 예를 들어, DMPC 및 DMPG 인지질은 합성 원료(Avanti Polar Lipids USA)이고, 98% 순도의 콜레스테롤은 동물 원료이다. 또한 합성 원료이며 면역반응을 증가시키는 것으로 알려져 있는(Fries et al. 1992. Proc Natl Acad Sci 89(1): 358-362) 모노포스포릴 인지질 A(MPLA)를 리포솜에 가하고, 40 μ g/ μ mol의 인지질의 농도에서 시험하였다.
- [0081] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 적어도 하나의 보조제를 포함한다. 본 발명에서, 용어 "보조제"는 면역반응의 비특이적 자극을 허용하고, 항원성 구조의 항원성을 증가시키는 제품을 의미하는 것으로 사용된다. 보조제는 항원성 구조의 파면(deposition) 사이트로 포식성(phagocytic) 세포를 이동시키고, 면역 체계의 자극을 늘리는 항원보다 느린 방출을 보증함으로써 작용한다.
- [0082] 특히, 본 발명의 면역원성 조성물에서 사용된 보조제는 알룸, 칼슘 포스페이트, 인터루킨 1, 모노포스포릴 인지질 A (MPLA) 및/또는 단백질 및 폴리사카라이드의 마이크로캡슐로 이루어진 균으로부터 선택된다. 유리하게, 알룸은 본 발명에서 사용된 보조제이다.
- [0083] 이와 같은 면역원성 조성물은 용액, 또는 주사용 현탁제(injectable suspensions), 또는 주사 전에 용해시키기 알맞은 고체 형태, 예를 들어 하기 기재된 대로, 본 발명의 조성물을 이용하기 위한 키트로 제조된다.
- [0084] 또한, 본 발명은 P-170 단백질의 적어도 하나의 세포의 루프로부터 유래되고, 이들이 기재된 대로 면역원성 조성물에서 사용되었을 때 항-P-170 항체의 유도하는 펩타이드에 관한 것이다. 이러한 펩타이드는 하기 아미노산 서열로부터 각각 선택된다:
- [0085] 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15, 서열 번호 16 및 서열 번호 17.
- [0086] 또한, 본 발명은 상기 기재된 대로 핵산, DNA 또는 RNA, 펩타이드를 암호화(encoding)하는 서열을 포함한다.
- [0087] 본 발명은 그 자체로 및 상기에 한정된 것들을 고려한 면역원성 조성물 그 자체 뿐만 아니라, 이러한 조성물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0088] 하기의 실험결과는 특이적 펩타이드와 단지 팔미트산 두분자만의 결합은 면역원성 반응의 발현을 일으키지 않을 수 있다는 것을 보여준다. 이것은 면역원성 반응의 유도를 위해 필요한 배열이 형성된 컨주게이트를 주기 위하여, 지방산을 선택하는 것이 필요하다는 것을 반영한다.
- [0089] 또한, 본 발명에 따른 컨주게이트의 합성, 특히 그들의 펩타이드 영역에 특히 주목하여야 한다. 사실, Tosi et al. (1995)에 의한 이전의 연구는, 43 아미노산을 가진 가장 긴 컨주게이트인 mpp1의 펩타이드 서열이 면역반응을 얻는 것이 가능하지 않다는 것을 설명하였다. 이러한 관찰에 관하여 설명 또는 작업 가정이 없을때, 발명자들은 본 발명에서 매우 정확한 펩타이드 합성의 중요 역할을 발견하였다. 따라서, 발명자들은 초기 말단화 반응에서 이들의 연루를 피함으로써 어떤 아미노산의 보다 효율적인 생성을 허용하는 개선된 합성방법이 특히 면역반응적인 mpp1 서열을 얻을 수 있도록 함을 밝혔다. 따라서, 본 발명에 따른 컨주게이트는 Boc/벤질 방법에 따

른 고체-지지체 합성에 의해 발명의 면역원성 조성물을 생산하는 알맞는 형태로 얻어질 수 있다.

- [0090] 이런 점에서, 실시예 부분에 기재된 대로, 쥐 P-170의 세포외 루프 1, 2, 및 4의 서열에 대응하는 펩타이드는 tert-부틸옥시카보닐/벤질 또는 Boc/벤질 방법, 및 *in situ*, N-[(1H-벤조트리아졸-1-일)(디메틸아미노)메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트 N-옥사이드 (N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-N-methylmethan-aminium hexafluorophosphate N-oxide)로의 활성화를 이용하여 Applied Biosystems 430A 펩타이드 합성기에 의해 합성되었다.
- [0091] 펩타이드의 합성은 (13,14)-tert-부틸옥시카보닐/벤질 및, *in situ*, N-[(1H-벤조트리아졸-1-일)(디메틸아미노)메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트 N-옥사이드 (N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-N-methylmethan-aminium hexafluorophosphate N-oxide)와 함께 활성화를 이용하여, 펩타이드 합성기, 예를 들어 Applied Biosystems 430A 합성기에 의해 수행되었다(Scholzer M. et al Science 1992, 256 (5054): 221-225).
- [0092] 이러한 방법에 따라, 컨주게이트의 합성은 Boc/벤질 방법에 따라 고체 지지체 위에서 컨주게이트의 펩타이드의 세포외 루프의 아미노산 서열의 합성을 기초로 하고, 그 다음 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 지방산 분자와 결합시키기 위해 하나 이상의 아미노산 잔기로 N- 및/또는 C-말단 위치에서 연장하고, 이들을 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 지방산과 결합시키기 위해 N- 및 C-말단 리신의 아민 작용기의 탈보호화로 이루어지는 단계를 수행한다. 마지막 단계는 무수 불산(anhydrous hydrofluoric acid)과 같은 강산으로 수지와 같은 고체 지지체 위에서 합성된 컨주게이트의 쪼개짐이다.
- [0093] 향상된 합성방법은 초기 종결반응에서 이들의 연루를 피함으로써 어떤 아미노산의 생성을 더 효율적으로 한다.
- [0094] 상기 펩타이드와 지방산의 결합은 N-말단 위치 또는, 택일적으로 C-말단 위치에서 수행될 수 있다.
- [0095] 유리하게, 컨주게이트에서, 펩타이드와 지방산의 결합은 펩타이드 서열의 N-말단 및 C-말단 위치에서 수행하여, 테트라팔미토일레이티드 서열을 얻는다.
- [0096] 택일적으로 또는 점증적으로, 지방산을 펩타이드 서열에 있는 내부 잔기와 결합시키는 계획은 가능하다.
- [0097] 면역원성 조성물의 각 펩타이드는 하나 이상의 PEG 분자에 의해 몇개의 지방산 분자와 결합될 수 있다.
- [0098] 그러면, 얻어진 컨주게이트는 리포솜의 표면에 존재하게 된다.
- [0099] 선택적으로, 일단 그들이 합성되면, 컨주게이트는 역상 고성능 크로마토그래피(RP-HPLC 또는 reverse-phase high performance liquid chromatography)로 정제된다. 이러한 정제단계는 크로마토그래피 피크의 넓힘 및 용해도 문제를 초래하는 지질 사슬의 존재에 의해 정교하게 만들어진다. 펩타이드의 연장 동안, 형성된 불순물로부터 원하는 생성물의 분리는 어렵고 낮은 수율일 수 있다. 게다가, 지방산이 C-말단 위치에 있는 한, 정제는 어려울 수 있다. 이러한 경우, 사실 원하는 생성물뿐만 아니라, 그러나 불순물은 크로마토그래피의 어려움의 원인인 친유성(lipophilic) 부분을 운반한다. 게다가, 이러한 방법은 합성의 끝에서 강한 배지에서 쪼개짐과 탈보호화의 단계를 포함하기 때문에, 이러한 처리는 친유성 부분의 선택을 제한한다(Deprez et al. 1996. Vaccine 14(5): 375-382; Stober et al. (1997) Bioorg. Med. Chem. 5(1): 75-83).
- [0100] 리포솜의 표면에서, 얻어진 컨주게이트의 체시는 기계적으로 얻어진다. 특별히, 리포솜과 혼합된 컨주게이트는 그들의 지질 이중 사슬에 의해 리포솜의 인지질막 내에 정확히 들어맞는다.

- [0101] 또한, 본 발명은, 본 발명에 따른 면역화 방법에서 이러한 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0102] 따라서, 본 발명은, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 첫번째 투여, 특히 주사, 및 상기 조성물의 부스트 투여 (booster), 예를 들어 두번의 연속적인 주사를 포함하는 면역화 방법에 관한 것이다. 동일한 항원을 여러번 노출시키는 부스트 주사는 강한 두번째 면역반응을 유도한다. 면역 체계에 P-170 단백질의 세포외 루프로부터 유래된 펩타이드의 반복적인 노출은, 면역적인 기억 및 높은 항체역가와 함께 빠른 다음 두번째 반응을 유도한다.
- [0103] 보다 특히, 본 발명의 면역화방법에서, 인간에게 주사는 한달 간격으로 수행된다.
- [0104] 일 구현예에 의하면, 본 발명에 따른 조성물로의 면역화는 환자에게 투여된 항암 치료와 동시에 또는 앞서 수행될 수 있다.
- [0105] 바람직하게, 면역화는 환자에게서 다중약물 내성 표현형의 출현을 예방 및 방지(anticipate)하기 위하여 화학요법 치료보다 우선한다. 이러한 치료 계획은 암의 진단 및 발달이 진단일로부터 적어도 30일 지연되도록 의약 치료학적 처리(화학요법)를 할 때 화학요법 치료와 동시에 하는 면역화에 대해 바람직할 것이다. 암의 늦은 치료는 사용된 본 발명의 조성물로의 면역화 방법을 예방하지 못한다. 사실, 항암 치료 및 상기 면역원성 조성물로의 면역화의 동시 병용은 다중약물 내성 표현형의 출현에 치료적 또는 완화하는 효과를 갖는 항-P-170 자가항체를 생성하는 면역 반응을 유도한다. 본 발명의 조성물로의 면역화의 치료적 효과는 다중약물 내성 표현형의 전환에 의해 설명된다. 본 발명에서, 다중약물 내성 표현형의 "전환(reversion)"은 다중약물 내성의 표현형으로부터 "화학요법 치료에 민감한" 표현형으로의 변화를 의미한다.
- [0106] 본 발명의 목적을 위해, 용어 "화학요법", "항암" 또는 "화학요법 약물"은 세포독성약물에 기초한 원발성(primary) 또는 이차(secondary) 종양의 임의의 치료적 또는 완화적 치료를 의미하도록 의도한다. 일반적으로 화학요법은 몇 주기의 치료를 필요로 한다.
- [0107] 화학요법 치료에 우선하는 면역화 방법에서, 본 발명에 따른 조성물의 첫번째 주사의 실행은 화학요법 치료의 시작에 적어도 60일, 바람직하게 63 내지 67일 앞선다.
- [0108] 본 발명에 따른 조성물은 국소적으로, 전신적으로(경구, 비강 및 다른 점막 경로를 경유) 및/또는 비경구적으로(정맥내, 경피내, 근육내 또는 복강내) 또는 이러한 경로의 조합에 의해 투여될 수 있으며, 다중약물 내성에 대한 보호적인 면역 반응을 효과적으로 유도할 수 있다. 조성물은 상기 다양한 경로를 통해 쉽게 투여하기 위하여 제형화될 수 있다. 특히, 두번째 화합물(습윤제, 유탄제 또는 완충제)의 선택은 투여의 선택된 방법에 의해 지시된다.
- [0109] 유리하게, 면역화는 인간 및 마우스에서 각각 근육내 및 복강내 투여로 수행된다.
- [0110] 또한, 본 발명의 주제 중 하나는 본 발명에 따른 컨주게이트의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 인간 또는 쥐 P-170에 대해 유도된 항체, 특히 자가항체의 제공에 관한 것이다.
- [0111] 이러한 항체는 IgG1, IgG2 및 IgG3 아이소타입, 및 IgM을 포함하는 군으로부터 선택된 다중클론 또는 단일클론 항체일 수 있다. 특히, IgG2 항체는 아형(subtype) 2a 또는 2b일 수 있다.
- [0112] 또한, 본 발명은 첫째로, 담체 및, 둘째로, 항-mp1 항체의 유도를 허용하는 P-170 단백질의 세포외 루프 1로부터 유래된 적어도 하나의 펩타이드를 포함하는 컨주게이트를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이며, 각 펩타이드는 C12 내지 C24 사이의 탄소 사슬을 함유하는 몇개의 지방산 분자와 결합하고, 상기 컨주게이트는 암으로 고통받는 환자에게서 나타나는 다중약물 내성의 전환(reversion)을 위해 P-170 단백질의 세포외 루프 1의 배열의 전부 또는 일부를 나타낸다.
- [0113] 특히, 이러한 조성물은 인간 P-170 단백질을 암호화하는 MDR1 유전자를 발현하는 고형 종양의 치료를 위해 적합하다.
- [0114] 또한, 본 발명은 암으로 고통받는 환자에게서 나타나는 다중약물 내성의 치료 및/또는 예방을 위한 백신을 생성

하기 위한, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다. 계획한 대로, 암은 신장암, 간암, 직장암, 장암(cancer of intestine), 전립선암, 유방암, 방광암, 뇌암, 혈액암(백혈병) 및/또는 골수조직암(cancer of medullary tissues; 골수종(myeloma))일 것이다. 또한, 인간 P-170 단백질을 암호화하는 MDR1 유전자를 발현하는 고형 종양일 수 있다. 또한, 면역원성 조성물의 사용은 항암 치료와 병행하여 수행될 수 있다.

[0115] 특히, 임상 I/II 단계에서, 고형 종양, 특히 신장암, 간암, 직장암, 장암, 전립선암, 유방암, 방광암, 뇌암, 혈액암(백혈병) 및/또는 골수조직암(골수종)과 같은 인간 P-170 단백질을 암호화하는 MDR1 유전자를 발현하는 암을 가진 환자에게서 본 발명의 백신을 사용하는 것을 계획한다. 이러한 임상 연구를 위해 선택된 환자는 표준 치료에 대해 비면역억제(non-immunodepression) 및 관용(tolerance)의 기준에서 선택될 것이다. 이러한 시험과 동시에 약동학(Pharmacodynamic) 및 관용 연구는 이러한 동일한 환자에게서 수행될 것이다.

[0116] 마지막으로, 본 발명에 따른 조성물은 인간에게서 다중약물 내성 표현형의 전환율을 임상적으로 평가하기 위하여, 자발적으로 다중약물 내성을 발현하는 환자에게 직접 사용될 것이다.

[0117] 또한, 본 발명은 상기 기재된 대로 면역원성 조성물의 투여를 포함하는 암, 특히 신장, 간, 장, 대장, 전립선, 유방, 방광, 뇌, 혈액(백혈병) 및/또는 골수조직(골수종)을 침범하는 암으로부터 고통받는 환자에게서 나타나는 다중약물 내성의 치료 및/또는 예방 방법을 포함한다.

[0118] 특히, 상기 기재한 바와 같은 치료에 의해 표적된 암은 인간 P-170 단백질을 암호화하는 MDR1 유전자를 발현하는 고형 종양이다.

[0119] 마지막으로, 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 포함하는 면역원성 조성물의 사용을 위한 키트 및, 선택적으로 사용을 위한 시약 및/또는 사용설명서를 계획한다.

[0120] **실시예**

[0121] I-1 펩타이드 영역과 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 지방산 분자의 공유 결합에 의해 형성된 컨주게이트의 제조

[0122] 펩타이드의 합성은 (13,14)-tert-부틸옥시카보닐/벤질 및, in situ, N-[(1H-벤조트리아졸-1-일)(디메틸아미노)메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 핵사플루오로포스페이트 N-옥사이드와 함께 활성화를 이용하여, 펩타이드 합성기, 예컨대 Applied Biosystems 430A 합성기에서 수행될 수 있고(Scholzer M. et al Science 1992, 256 (5054): 221-225), 그 후 펩타이드 분자당 4분자의 팔미트산이 공유결합될 수 있다(도 1).

[0123] 초기 중결 반응에서 이들의 연루를 피함으로써 어떤 아미노산의 생성을 더 효율적으로 하는 개선된 합성방법은 발전되어 왔다. 이것은 길이(43 아미노산) 때문에 mpp1의 경우에 특히 유리하다. 특히 쥐 펩타이드 mpp1, mpp2 및 mpp4가 합성되었고, 합성의 결과(펩타이드 서열의 분석, 분자량 및 순도의 분석)는 상기 표 1에 기록하였으며, 각 펩타이드는 총 산 가수분해 후 아미노산 분석에 의한 그의 서열, 질량분석기 분석에 의한 분자량, 및 HPLC에 의한 그의 정제를 위하여 제어되어 왔다.

[0124] 이러한 방법에 따라, 컨주게이트의 합성은 원하는 펩타이드 서열의 수지 상에서 발생을 기초로 하고, 그 다음 이들을 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 지방산과 결합시키기 위해 N- 및 C-말단 리신의 아민 작용기를 탈보호화 한다. 마지막 단계는 무수 불산으로 쪼개진다. 컨주게이트는 Boc/벤질 방법을 이용하여 얻어졌다. 최적의 접근은 고체상 위에서의 펩타이드 서열의 발생, 및 그 다음 아민(또는 티올) 작용기를 선택적으로 탈보호화 하도록 활성화된 지방산의 결합으로 이루어진다. 만일 지방산이 N-말단 끝에 도입된다면, 펩타이드는 어느 특별한 작용기 정렬을 필요로 하지 않는다. 또다른 한편, C-말단 위치에 지방산의 도입은 일반적으로 리신 곁사슬(side chain)의 ε-아미노 작용기 위에서 수행된다. Boc/벤질 방법에서, 펩타이드의 합성 동안 Boc-L-Lys(Fmoc)-OH 아미노산을 도입하는 것이 필수적이다. 완전한 서열을 발생시킨 후, 아미노 작용기는 탈보호화 되

고, 그 다음 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 지방산으로 아실화(acylated) 된다. 컨쥬게이트는 마침내 탈 보호화되고, 무수 불산인 강산의 존재 하에서 수지로부터 쪼개진다(도 2).

[0125] **I-2 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 2 또는 4개의 지방산에 결합된 펩타이드의 면역원성 정도의 평가**

[0126] 본 발명에 따른 컨쥬게이트의 면역원성 정도를 더 이해하기 위하여, 두가지 타입의 컨쥬게이트를 생산하고 시험 하였다. 컨쥬게이트의 첫번째 타입은 펩타이드 분자당 C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 4개의 지방산 분자에 공유 결합된 쥐 P-170 단백질의 세포의 루프로부터 유래된 펩타이드의 합성된 서열에 대응한다. 컨쥬게이트의 두번째 타입은 두개의 지방산 분자에만 결합된 펩타이드로 구성되어 있다. 이러한 연구는 디팔미토일레이티드(dipalmitoylated) 및 테트라팔미토일레이티드(tetrapalmitoylated) 컨쥬게이트의 특이적 예에 의해 설명된다.

[0127] 표 3은 쥐 P-170 단백질의 루프 1, 2 및 4에 대응하는 디- 및 테트라팔미토일레이티드 컨쥬게이트의 서열, 도트 블롯(Dot Blot) 기술에 의해 항체의 검출을 통해 측정된 이들의 면역원성 능력, 및 형광(fluorescence) 단위에 의한 항체역가를 나타내고 있다. 두개의 팔미틸 잔기를 갖는 컨쥬게이트를 함유한 리포솜을 수용한 마우스는, 쥐 P-170 단백질의 루프 4에 대응하는 mpp'4을 제외하고는 면역반응을 나타내지 않는다. 그러나, 이러한 컨쥬게이트에 의해 유도된 항체역가는 mpp4, 즉 4개의 팔미틸 잔기에 결합된 동일한 서열에 의해 유도된 역가보다 4배 더 낮다. mpp4 및 mpp2 컨쥬게이트는 400 형광 단위의 영역에서 항체역가와 함께 면역반응을 생기게 한다. 첫번째 펩타이드 합성에서, 펩타이드 합성으로부터 기인할 수 있는, 가장 긴 아미노산 서열에 대응하는 mpp1 컨쥬게이트의 주사에 뒤따르는 어떠한 항체도 검출되지 않았다. 사실, 많은 가능한 화학적 종결이 있고, 또는 이러한 첫번째 배치의 펩타이드의 면역 반응의 결핍을 설명할 수 있는 화학적 재연결(chemical rebridging)이 있기 때문에, 이러한 루프의 합성은 매우 어렵고 길다. 따라서 동물의 면역화 시험을 위해, 특히 루프 1의 펩타이드의 추가 합성이 수행되었다.

[0128] 이러한 결과를 고려하여, C12 내지 C24의 탄소 사슬을 함유하는 4개의 지방산 분자에 펩타이드 각 분자가 결합되어 있는 모델은, 본 발명에 따른 면역원성 조성물 내에서 리포솜의 막으로 합병된 상기 컨쥬게이트의 면역원성 능력을 강화한다(도 1). 따라서, N 및 C 말단 끝에서 소수성 상호작용(hydrophobic interactions)에 의해 유도된 3차 구조는 중요하고 특이적인 체액의(humoral) 면역반응을 유도하는 역할을 한다. 이러한 소수성-타입 상호작용은 P-170 단백질의 세포의 루프의 천연 구조와 균등한 3차 구조로서 정의된 루프 배열을 창조하기에 충분히 강하다. "천연(natural)" 배열은 펩타이드 분자당 4개의 C12 내지 C24의 지방산 잔기에 결합된 컨쥬게이트의 경우, 담체의 표면, 바람직하게는 리포솜의 표면에서 안정되게 노출된다. 두개의 요인에 의한 소수성 상호작용에서 감소는, 본 발명에 따른 컨쥬게이트의 항원성 잠재성의 거의 완전한 억제에서 생기는 "천연" 구조를 얻기에 불충분할 것이다.

표 3

[0129]

컨쥬게이트 이름	아미노산 서열	팔미틸 사슬의 수	도트 블롯에 의한 항체의 검출	Ac 역가 형광 단위 (Ac fluorescence titer units)
mpp1	K-G-GNMTDSFTKAEASILPS ITNQSFPNSLIIISNSSLEEE-G-K-K-NH ₂	4	-	<10
mpp'1a	G-GNMTDSFTKAEAS-G-K-NH ₂	2	시험안함	시험안함
mpp'1b	G-LPSITNQSFPNS-G-K-NH ₂	2	-	<10
mpp'1c	G-TLIIISNSSLEEE-G-K-NH ₂	2	-	<10
mpp'2	G-KVLTSFTNKELQAYAK-G-K-NH ₂	2	-	<10
mpp2	K-G-KVLTSFTNKELQAYAK-G-K-K-NH ₂	4	+	360
mpp'4	G-SRDDDMETKRQEN-G-K-NH ₂	2	+	100
mpp4	K-G-SRDDDMETKRQEN-G-K-K-NH ₂	4	+	400

[0130] **I-3 백신 제제**

- [0131] 면역원성 조성물은 하기를 포함하여 제조한다.:
- [0132] Lp1 : 컨쥬게이트, 리포솜(DMPC, DMPG, 콜레스테롤)
- [0133] Lp2 : 리포솜(DMPC, DMPG, 콜레스테롤)
- [0134] Lp3 : 리포솜(DMPC, DMPG, 콜레스테롤), MPLA, 컨쥬게이트
- [0135] Lp4 : 컨쥬게이트.

[0136] 리포솜은 그들의 표면에 3개의 컨쥬게이트 mpp1, mpp2 및 mpp3가 인지질과 1:250의 몰비율로 가해져 존재한다. 이러한 조합의 균질화를 허용하는 유기용매는 증발하여 버리고, 무균 PBS (pH=7.4)로 수화한 후 결과 필름을 최종 인지질 농도가 4mM 되게 조절하였다. 마지막으로, 현탁액에 있는 리포솜은 면역화 시간에 부피 비율로 무균 알룸(Pasteur Merieux)과 혼합하였다. 따라서, 백신 제제를 면역성을 위한 보조제로 알룸을 포함하는 제형에서 면역원성 조성물 Lp1, Lp2, Lp3 및 Lp4에 대응하는 동물에게 주사하였으며, 알룸은 백신의 흡수시간을 연장할 수 있는 능력을 가졌다.

[0137] **I-4 동물**

[0138] C57B1/6 암컷 및 DBA/2 수컷의 교배로부터 유래된 6 내지 10주령의 암컷 B6D2F1 마우스로 연구를 수행하였다 (Charles River Laboratories). 실험에 사용된 마우스의 무게는 19 내지 22g이었다. 혈액 시료는, retro-orbital sinus로부터, 면역화 후 7 내지 12일에 동물로부터 얻었다.

[0139] **I-5 면역화 프로토콜**

[0140] 마우스는 200 μ l의 백신 조성물로 복강내 주사하며, 2주일 간격으로, 3번 면역화하였다. 이러한 실험 프로토콜은 9 마리의 B6D2F1 마우스 군에서 4개의 제제로 수행하였다(Iffa Credo, L'Arbresle, France).

[0141] 면역화에 의해 유도된 다양한 면역글로불린(immunoglobulins)을 도트 블롯으로 정량화하기 위해, 부스터 하루 전 및 최종 주사 15일 후 retro-orbital sinus로부터, 각 마우스로부터 100 μ l의 혈액을 얻었다. 그 후 각 혈액 시료는 원심분리하고, 분리된 혈청은 정량을 위해 사용하였다.

[0142] **I-6 항암제**

[0143] 독소루비신(Dox) (Sigma) 및 빈블라스틴(VLB)은 고형암의 유도의 생체내 모델 및 면역화 후 화학요법을 위한 프로토콜에서 항암제로 사용되었다.

[0144] 독소루비신은 안트라사이클린계 중 주요 세포 성장억제 항신생물제 (cytostatic antineoplastic agent)이며, 따라서 많은 종양의 치료에서 단독으로 또는 병용하여 널리 사용되고 있다. 독소루비신의 작용의 주요 형태는 DNA 위상이성질화효소 II (topoisomerase II)의 저해로 나타난다. 그러나, 모든 항암 의약품과 같이, 독소루비신은 부작용, 특히 혈액학적(hematological), 소화성 및 염증성 타입, 및 특별히 화학요법 치료에서 이의 사용이 제한받는 심장독성의 부작용을 갖는다. 독소루비신 용액은 본 발명의 실험에서 10⁻³ mol/l의 농도로 사용된다.

[0145] 빈블라스틴은 중기(metaphase)에서 세포 유사분열을 차단하기 위한 약제로서 치료에서 일반적으로 사용된 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid)이며, 여기서 유사분열 방추체 독(mitotic spindle poison)의 이름이 나왔다. 따라서, 빈블라스틴은 빨리 나뉘어지는 세포를 우선적으로 치료한다; 따라서, 고환암 및 카포시 육종(Kaposi's sarcoma)의 치료에 특히 적합하다. 그러나, 빈블라스틴은 많은 가지각색의 독성 징후가 있으며, 주요 징후는 혈액 독성이다. 마지막으로, 빈블라스틴 용액은 본 발명의 실험에서 10⁻² mol/l의 농도로 사용된다.

[0146] **I-7 고형 종양 유도의 생체내 모델**

[0147] 쥐 흑색종(murine melanoma)으로부터 기원되고 그의 독소루비신에 대한 저항성에 대해 선택된 B16R 세포주는, 고형암의 발병을 위해 본 발명에서 선택되었다. B16R 세포는 시험관내(in vitro)에서 배양되고, 대수증식기(exponential growth phase)에서 수합되었으며, 마우스의 뒤측면으로 피하주사에 의해 투여되기 전 인산완충용액(PBS)으로 세척한다. 주사량은 0.85% NaCl 내 1.10^6 B16R 세포 현탁액 $50\mu\text{l}$ 이다(Candido KA et al. Cancer Res 2001, 61 (1):228-236). 마우스는 암세포의 접종 후 22일 내지 24일 기간 안에 평균 크기 $2.0 \text{ g} \pm 1.2 \text{ g}$ 의 흑색종이 발생한다.

[0148] 종양 발달 후, B16R 세포주는 독소루비신으로의 화학요법 치료에 저항하는 것을 확인하였다. 그 결과, 앞의 실험 조건은 쥐 P388R 세포로부터 고형 종양을 유도하기 위한 모델 역할을 하고(murine lymphoid neoplasma cells characterized and used as reference cells for their MDR properties - Kohls WD. et al. Cancer Res 1986 Sep, 46(9): 4352-6), 또한 독소루비신에 대해 저항한다.

[0149] 다른 종양 세포는 그들이 시험된 화학요법에 대해 내성을 나타내는 것을 제공하기 위해 사용될 수 있다.

[0150] **I-8 면역화 후 화학요법을 위한 프로토콜**

[0151] 도 3에 나타난 대로, 두개의 항암제, 빈블라스틴 및 독소루비신을 사용하는 화학요법을 위한 프로토콜을 수립하였다. 백신 제제 Lp1 및 Lp2로 미리-면역화된 마우스의 화학요법 치료는 10^6 P388R 암세포를 피하주사한 뒤 하루 후에 시작하고(0일), 5.5 mg/kg의 용량으로 독소루비신을 주 1회 주사하고(1일, 10일 및 22일), 2.5 mg/kg의 용량으로 빈블라스틴을 교차 주사하였다(4일 및 14일). 이 기간 동안, 음식물 섭취, 물 섭취 및 쥐의 체중, 및 그들의 생존을 기록하였다. P388R 세포로 주사하기 전, 항-P-170 항체를 정량화하고 그들의 활성을 모니터 하기 위하여, 마우스 혈청의 시료를 면역화 후 15 내지 45일 동안 얻었다.

[0152] **I-9 도트 블롯에 의한 면역 반응의 분석**

[0153] PBS에 희석된 항원성 분자로 역할을 하는 본 발명에 따른 컨주게이트는, 니트로셀룰로스 막 위에서 주변 온도에서 첫째로 침전된다. 30분 후, 이러한 항원성 분자들은 PBS-5% 탈지우유(skim milk)를 함유하는 용액 3ml로 블로킹된다. 상기 막을 세척없이, 1%의 탈지우유 및 0.1%의 트윈 20을 함유하는 2ml의 PBS 안에서, PBS와 함께 부피비율로(volume-for-volume) 미리 희석시킨 $24\mu\text{l}$ 의 쥐 혈청과 함께 주변 온도에서 2시간 동안 인큐베이트한다. 상기 쥐 혈청은 세번째 면역화 후 15일 내지 45일 기간 동안 얻었다. PBS-1% 탈지우유-0.1% 트윈 20에서 세번 세척한 후, 막을 1/3000으로 희석시킨 퍼옥시다제 항-마우스 이차 항체를 함유하는 3ml의 PBS-1% 탈지우유-0.1% 트윈 20에서 주변 온도에서 1시간 동안 인큐베이트한 다음, 3ml의 PBS-1% 탈지우유-0.1% 트윈 20에서 두번 세척한다. 막을 PBS 단독에서 10분 동안 한번 세척하고, $500\mu\text{l}$ 의 PBS에서 밤새도록 4°C의 냉장고에 보관하였다. 화학발광(chemoluminescence) 퍼옥시다제 기질(ECL™ kit, AMERSHAM Pharmacie Biotech)을 막 표면에 침착시키고 ($0.125 \text{ ml}/\text{cm}^2$), 1분간 방치하고, 그 다음 막을 빼서 두개의 Saran® 필름 사이로 "cold" 카세트에 놓았다. 막을 신호의 강도에 의존하여 수분 내지 1시간의 다양한 시간으로 KODAK X-OMAT 필름에 모아진 퍼옥시다제에 의한 루미놀의 산화 반응으로부터 나온 방사광(emitted light)인 방사능 사진 촬영(autoradiography)으로 즉시 노출시킨다. 항체역가는 상기 체계에 적합한 농도계(densitometer)를 이용하여 측정하였다. 화학발광 반응의 민감성은 실험 조건 하에 0.2ng/ml에서 평가된 유도된 항체의 검출을 위한 역치이다.

[0154] 상기 기재된 백신 제제로 면역화된 마우스에서 생체내 면역 반응을 평가하기 위한 실험 프로토콜은 항-mpp1, mpp2 및 mpp4 항체 및 Ig (M, G3, G2a, G2b, G1) 특이적인 항-쥐 이차 항체를 사용한다.

[0155] **I-10 백신 제제로 면역화된 B6D2F1 마우스에서 생체내 면역 반응**

[0156] 대조군 백신 Lp2로 면역화된 B6D2F1 마우스의 면역 반응은 IgM 항체를 주로 나타낸다. IgM 항체의 농도는 MPLA 존재로 인해 다중클론 aspecific type의 면역 반응을 반영한 3개의 면역화 동안에 일정하게 남는다. IgM 항체에 대한 값은 Lp1 백신으로 면역화된 마우스의 혈청에서 발견된 것으로부터 뺐다(도 4).

[0157] 백신 제제 Lp4로 면역화된 쥐는 첫번째 면역화 후, 항-mpp1, 항-mpp2 및 항-mpp3 IgM 항체를 나타낸다. IgG1 항체 면역 반응을 현저하게 나타나게 하기 위해, 세번째 면역화 후 IgM 항체가 사라질 때까지 이의 양을 감소시킨

다(도 5).

- [0158] Lp3 백신으로의 마우스의 면역화는 첫번째 주사 후 IgM 항체의 발현을 유도한다. IgM 항체역가는 면역 반응이 주로 IgG2b 항체 반응이 되는 기간 동안, 두번째 면역화 후 감소한다. 세번째 주사 후, IgG1 항체역가는 최대이다: 게다가, 이러한 면역 반응은 세개의 컨주게이트에 대해 양성이고, mpp2 컨주게이트가 가장 면역원성이다(도 6).
- [0159] Lp1 백신 제제로의 마우스의 면역화는 P-170 단백질의 세포의 루프 1, 2 및 4에 대해 지향되는 IgM 항체의 현저한 출현을 유도한다. IgG 항-mpp2 항체 반응이 현저하게 나타나게 하기 위해서, IgM 항체의 양은 두번째 및 세번째 면역화 동안 감소한다.
- [0160] IgG3, IgG2a 및 IgG2b 항체역가는 대략적으로 기본값보다 2 내지 3배 더 크고, 반면 IgG1 항체역가는 5배 더 크다(도 7).
- [0161] IgG1 항체의 양을 비교하여, mpp2 컨주게이트는 mpp1 및 mpp4 컨주게이트보다 각각 2.6배 및 2배 더 면역원성이라고 관찰된다. 게다가, Lp1 백신 제제는 가장 강한 전체 면역 반응, 즉 세포의 루프 1, 2 및 4에 각각 대응하는 아이소타입(IgM, G3, G2a, G2b, G1)을 유도한다.
- [0162] mpp1 컨주게이트에 의해 유도된 항체역가는, 토시 등(Tosi et al.)에서 관찰된 결과와 같지 않게, mpp2 및 mpp4 컨주게이트에 대해 검출된 항체역가의 값에서 유의하고 견줄만하다 (1995. Biochemical and biophysical research communications 212(2): 494-500).
- [0163] Lp1 백신 제제가 가장 좋은 면역원성 능력을 가졌다고 측정된 후, 이의 이상독성(innocuity)은 마지막 면역화 후 18개월의 기간에 걸쳐 체크되었다. 면역화된 마우스는 Lp2 대조군 백신으로 면역화된 마우스와 비교하여 체중에서 주목할만한 변화는 나타나지 않았다. 게다가, Lp1 백신 제제로 면역화된 동물에서 불면증 및 식욕에 관한 행동 변형은 관찰되지 않았다. 마지막으로, P-170 단백질을 자연적으로 발현하는 기관(비장, 간, 신장, 부신성 샘(adrenoglands), 췌장, 난소, 심장 및 폐)의 조직 병리학적인(histopathological) 분석은 Lp1 백신 제제로 면역화된 마우스에서 유도된 독성의 및/또는 자가면역의 결핍을 증명하였다. 특히, 복강내 위치 또는 기관(간, 췌장, 비장 및 난소)의 주변에서만 관찰될 수 있는 병변은 면역원성 조성물에서 알룸의 사용에 대해 한정적으로 분포되었다. 관찰된 병변을 유도하는 약제를 관찰하기 위한 상보적 분석은 이러한 결과를 확인하였다.
- [0164] **I-11 Lp1 백신 제제로의 면역화와 관련된 항-화학내성 활성의 생체내 평가**
- [0165] Lp1 및 Lp2(대조군) 백신 제제로 면역화된 마우스에서 다중약물 내성 표현형의 발달의 생체내 연구는 고행암의 유도의 프로토콜에 따라 시작하였고, 화학요법 치료 계획을 뒤따라 수행하였다. 항암치료는 암세포의 접종 후 1일 시작하였다.
- [0166] P388R 세포를 면역화된 마우스 내에 주사하기 전에, Lp1 백신 제제로 면역화된 마우스의 혈청에서 항체역가를 측정하였다 : 각각 혈청의 100%, 40% 및 80%는 0.3, 0.21 및 0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1U는 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 상응)의 평균값을 갖는 항-mpp1, 2 및 4 IgG1-타입 항체를 나타내었다.
- [0167] Lp1 및 Lp2 백신으로 면역화된 마우스에 대한 생존시간은 시간의 함수로 나타내었다(도 8).
- [0168] 그래프로 나타낸 결과는, Lp1로 면역화된 마우스의 군에 대한 평균 생존시간이 39일이고, 반면 Lp2 제제로 면역화된 마우스의 군에서는 22일임을 나타낸다. 따라서, 예방방법에서 Lp1 백신 제제로 면역화된 마우스는 대조군과 비교하여 평균 생존시간에서 77% 증가를 나타낸다.
- [0169] Lp2 군에서는, 70일의 생존시간이 마우스 중 하나에서 관찰되었다.
- [0170] 비록 이와 같은 화학요법 치료가 내성 암세포의 주사로부터 시작하여 단지 22일만 투여하였더라도, 생존시간에서 이러한 77% 증가가 관찰되었다. 그런데, 생존율이 항암제의 투여 끝부터 떨어지기 시작하는 것이 관찰되었다.: 그 결과, 이로부터, 후자가 본 발명에 따른 조성물로 면역화된 환자에게서 얻어진 자가항체와 같지 않게, 치료효과를 가진다는 지식에서, 만일 화학요법 치료가 계속된다면 완전한 전환이 관찰되는 것이 추론될 수 있다.
- [0171] 이러한 결과는, 동일한 암 모델로의 다중약물 내성의 치료에서 얻어진 가장 좋게 공표된 결과가 100mg/kg/day의 용량에서 S9788로 처리된 마우스에서 생존율이 48% 증가함을 나타내었기 때문에 매우 진도 유망하다(Pierre et

al. 1992. Invest New Drug. 10: 137-148). 게다가, Yang et al. (1999. BBRC. 266: 167-173)은 동일한 세포 주와 함께 빈크리스틴 및 시클로스포린 A로 처리된 마우스에서 생존율이 35% 증가하는 것을 관찰하였다. 또한, 다른 저자들은 트랜스-플루벤틱솔과 같은 어떤 전환제는 암세포의 침해가능성의 증가로 사망률을 가속화할 수 있다는 것을 증명하였다.

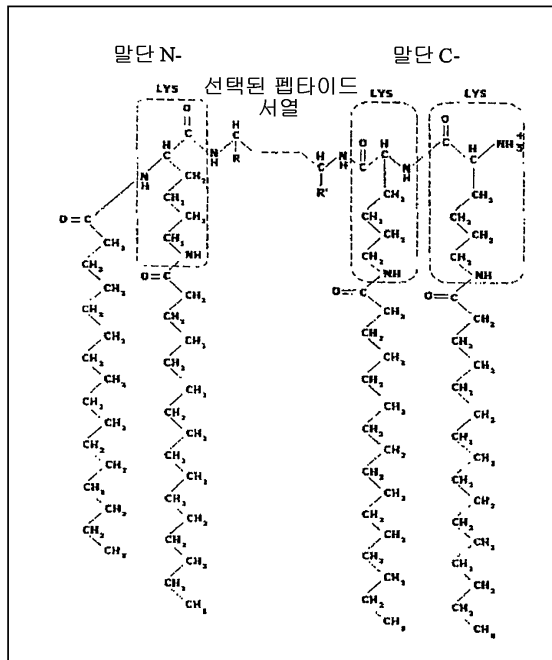
[0172] 이러한 생존시간의 증가는, 암세포는 임상적으로 관찰된 것보다 더 큰 내성 정도를 가지기 때문에 그들이 접촉되자마자 실험 쥐의 암모델이 치료의 효과에 대해 큰 노력을 요하므로 모두를 더욱 더 기쁘게 한다. 이러한 관찰은 암세포가 주사되자마자 전환제가 활성화적이라는 것을 암시한다.; 그런데, 이러한 약제는 치료동안 서서히 도달하는 세포독성 농도에서 일반적으로 활성화적이라는 것을 유의하라.

[0173] Lp1 백신 제제로의 면역화는 마우스에서 활성화적인 자가항체의 형성을 빠르게 유도하고, 오래 지속되는 방법에서 화학요법에 대한 생체내 내성을 억제한다. 따라서, Lp1 백신으로의 면역화는 화학요법 치료에 난치인 환자에게서 화학내성을 빨리 억제시키고, 항암제의 활성을 생체내에서 회복시키는 것이 가능하다. 상보적 실험 동안, Lp1 제제로 면역화된 마우스에서 순환하는 자가항체는 어떠한 세포독성, 자가면역 병변의 발생, 암세포의 회피가능성에서 어떤 증가도 유도하지 않는다.

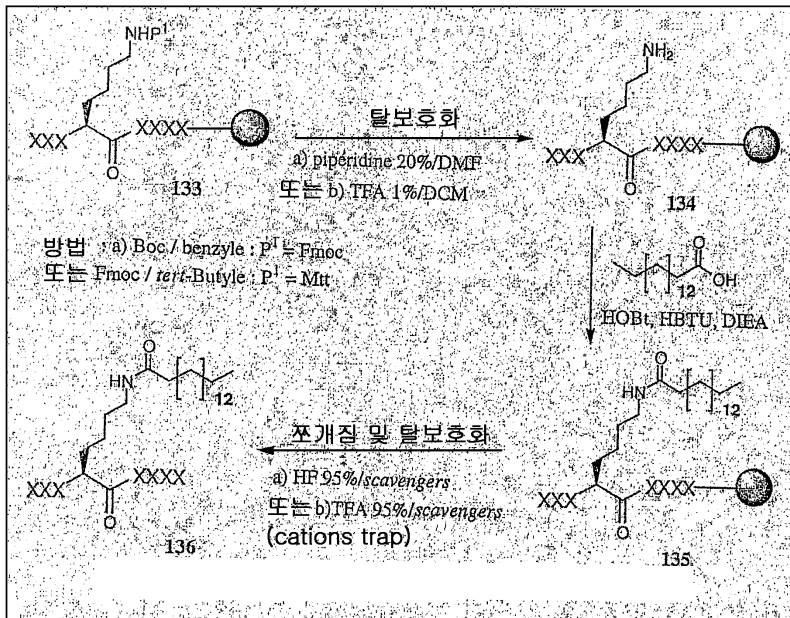
[0174] 상기 명세서는 특히 쥐 P170 단백질의 펩타이드에서 이용한다. 그러나, 기재된 프로토콜은 모든 다른 펩타이드, 특히 인간 P170 단백질에 대해 상기 기재된 것들의 합성과 유사한 방법으로 수월하게 적용할 수 있다.

도면

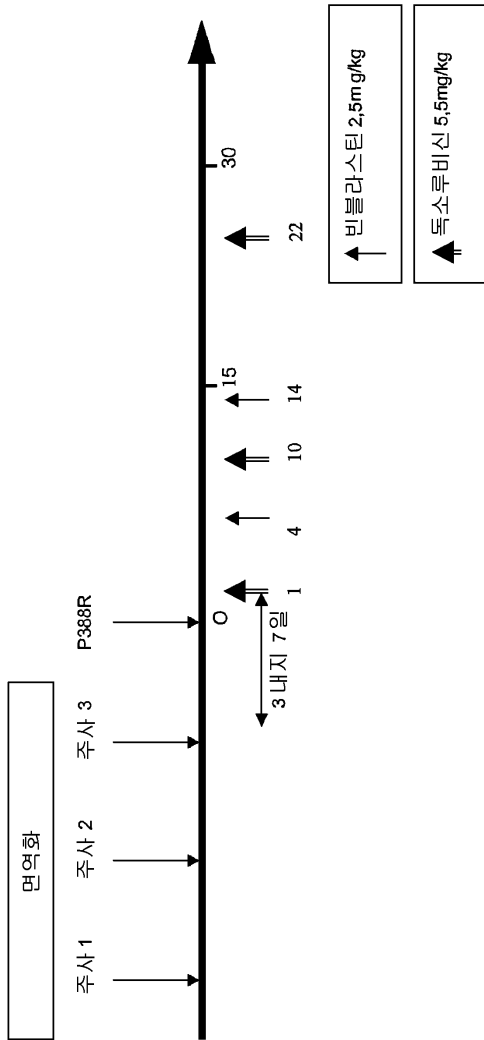
도면1



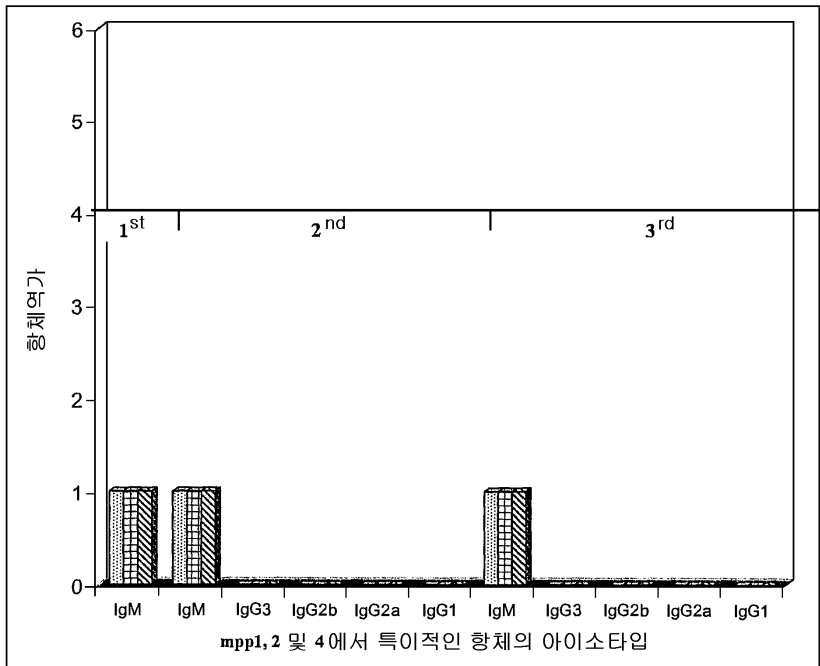
도면2






도면3

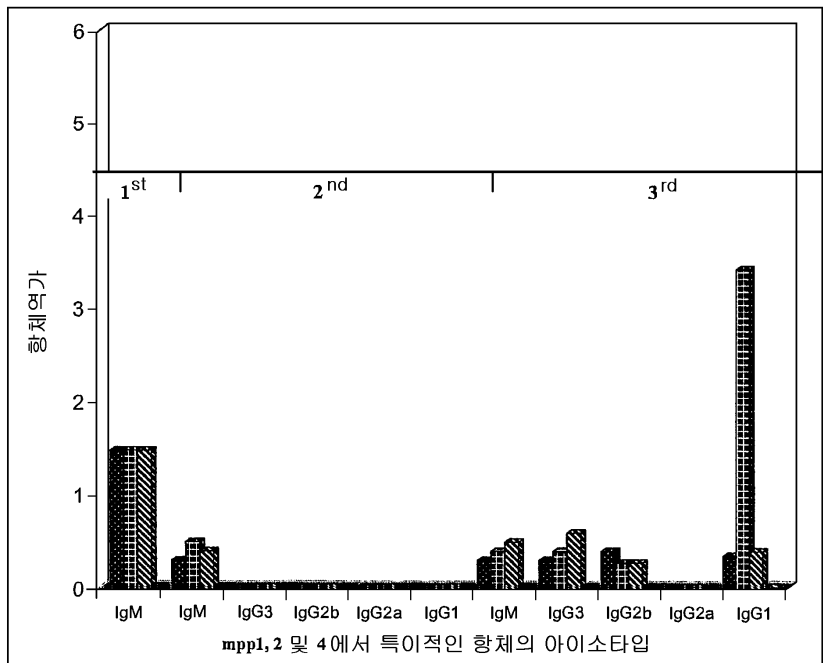





도면4



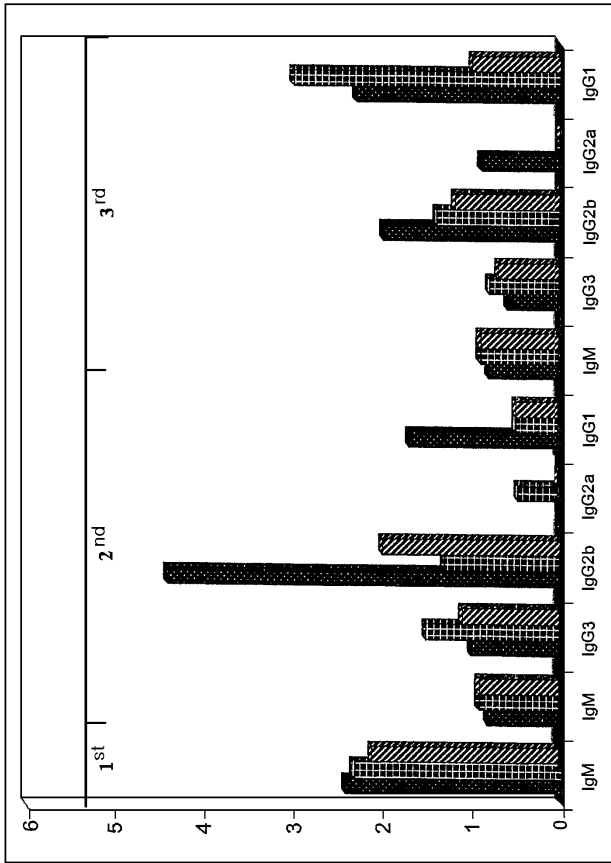
항체 항-mpp1 , 항체 항-mpp2 , 항체 항-mpp4 

도면5



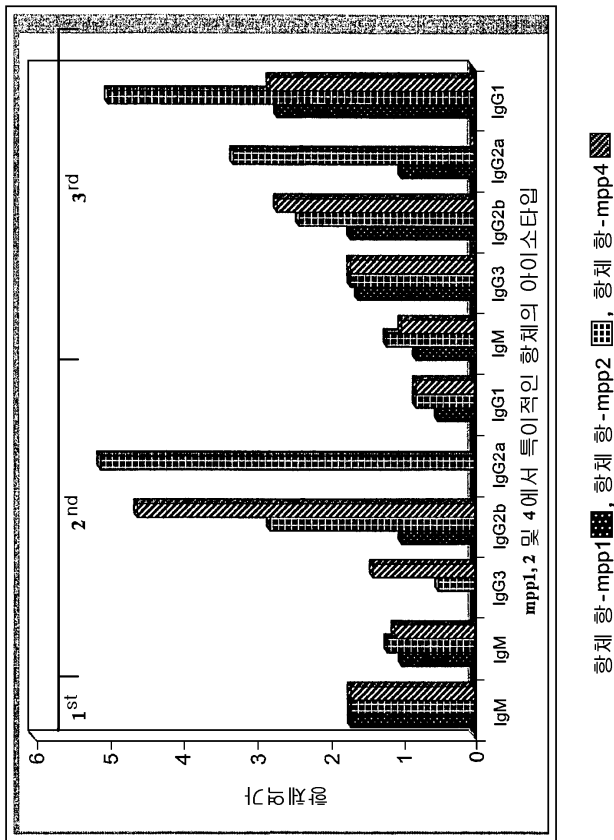
항체 항-mpp1 , 항체 항-mpp2 , 항체 항-mpp4 

도면6

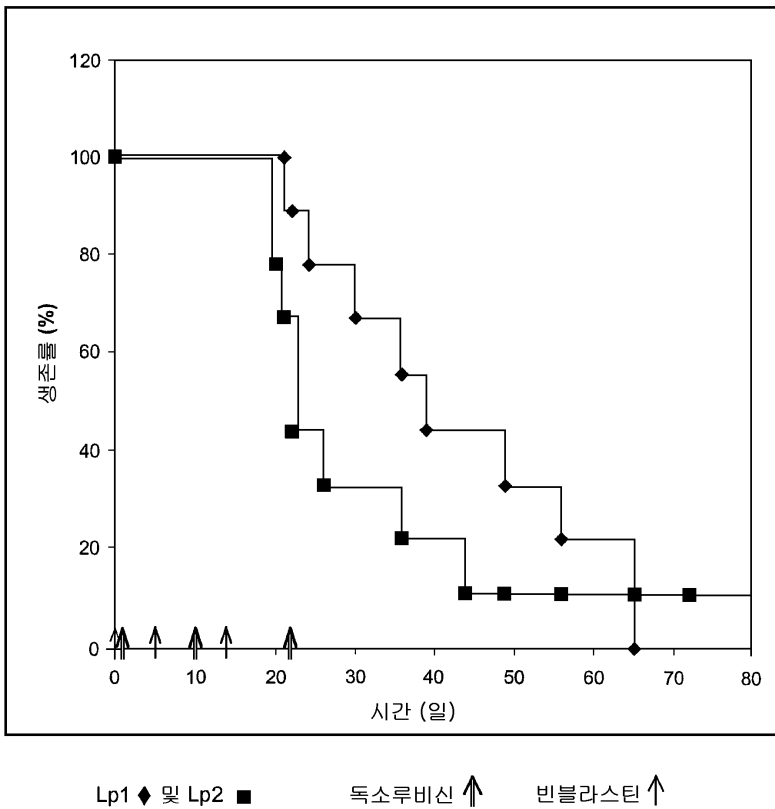


항체 항-mpp1, 항체 항-mpp2, 항체 항-mpp3, 항체 항-mpp4

도면7



도면8



서열 목록

<110> University of Reims
AC Immune S.A.

<120> TARGETED THERAPEUTIC VACCINE AGAINST P-GLYCOPROTEIN 170 FOR
INHIBITING MULTIDRUG RESISTANCE IN THE TREATMENT OF CANCERS

<130> ACI PCT 001

<150> FR 03 091 88 000

<151> 2003-07-25

<160> 17

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Lys Gly Gly Asn Met Thr Asp Ser Phe Thr Lys Ala Glu Ala Ser Ile

1 5 10 15

Leu Pro Ser Ile Thr Asn Gln Ser Gly Pro Asn Ser Thr Leu Ile Ile

20 25 30

Ser Asn Ser Ser Leu Glu Glu Glu Gly Lys Lys

35 40

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Lys Gly Lys Val Leu Thr Ser Phe Thr Asn Lys Glu Leu Gln Ala Tyr

1 5 10 15

Ala Lys Gly Lys Lys

20

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213>

> Mus musculus

<400> 3

Lys Gly Ser Arg Asp Asp Asp Met Glu Thr Lys Arg Gln Asn Glu Asn

1 5 10 15

Gly Lys Lys

<210> 4

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 4

Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu Glu Asp Leu

1 5 10 15

Leu Met Ser Asn Ile Thr Asn Arg Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe

20 25 30

Phe Met Asn Leu Glu Glu Asp Met Thr Arg Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Ser

35 40 45

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 5

Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu Glu Asp Leu

1 5 10 15

Leu Met Ser

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 6

Asn Ile Thr Asn Arg Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe Phe

1 5 10

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 7

Met Asn Leu Glu Glu Asp Met Thr Arg Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Ser

1 5 10 15

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 8

Phe Ser Arg Ile Ile Gly Val Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro Glu Thr

1 5 10 15

Lys Arg Gln Asn Ser Asn Leu Phe Ser

20 25

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 9

Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro Glu Thr Lys Arg Gln Asn Ser Asn Leu

1 5 10 15

Phe Ser

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 10

Phe Arg Phe Gly Ala Tyr Leu Val Ala His Lys Leu Met Ser Phe Glu
 1 5 10 15

Asp

<210> 11

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Gly Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu Glu
 1 5 10 15

Asp Leu Leu Met Ser Asn Ile Thr Asn Arg Ser Asp Ile Asn Asp Thr
 20 25 30

Gly Phe Phe Met Asn Leu Glu Glu Asp Met Thr Arg Tyr Ala Tyr Tyr
 35 40 45

Tyr Ser Gly Lys Lys
 50

<210

> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Gly Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu Glu
 1 5 10 15

Asp Leu Leu Met Ser Gly Lys Lys
 20

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Gly Asn Ile Thr Asn Arg Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe Phe

1 5 10 15

Gly Lys Lys

<210

> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Lys Gly Met Asn Leu Glu Glu Asp Met Thr Arg Tyr Ala Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Ser Gly Lys Lys

20

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Gly Phe Ser Arg Ile Ile Gly Val Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro

1 5 10 15

Glu Thr Lys Arg Gln Asn Ser Asn Leu Phe Ser Gly Lys Lys

20 25 30

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Gly Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro Glu Thr Lys Arg Gln Asn Ser

1 5 10 15

Asn Leu Phe Ser Gly Lys Lys

20

<210> 17

<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17

Lys Gly Phe Arg Phe Gly Ala Tyr Leu Val Ala His Lys Leu Met Ser

1 5 10 15

Phe Glu Asp Gly Lys Lys

20