



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0098701  
(43) 공개일자 2018년09월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**G01N 33/574** (2006.01) **A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01) **C12N 15/113** (2010.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**G01N 33/57449** (2013.01)  
**A61K 31/7088** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7024634(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년02월19일  
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2011-7021993  
 원출원일자(국제) 2010년02월19일  
 심사청구일자 2014년12월30일
- (85) 번역문제출일자 2018년08월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/001062
- (87) 국제공개번호 WO 2010/094499  
 국제공개일자 2010년08월26일
- (30) 우선권주장  
 09002452.2 2009년02월20일  
 유럽특허청(EPO)(EP)  
 (뒷면에 계속)
- (71) 출원인  
 가니메드 파마슈티칼스 게엠베하  
 독일 55131 마인츠 안 데르 골드그루베 12  
 요하네스 구텐베르크-유니버시티 마인츠  
 독일 데-55128 마인츠 자르스트라쎄 21
- (72) 발명자  
 사힌, 우구르  
 독일 55116 마인츠 필립-폰-자베른-플라츠 1  
 튀레시, 외즐렘  
 독일 55116 마인츠 필립-폰-자베른-플라츠 1  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 박장원

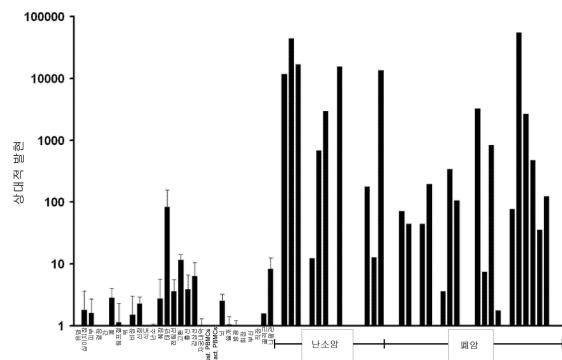
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 암의 진단 및 치료를 위한 방법 및 조성을

### (57) 요약

본 발명은 난소암 및 폐암 조직 등과 같은 암 조직의 특징이고 그리고 대상체에서의 암 질병의 치료 또는 진단을 위한 표적을 상징하는 핵산 및 아미노산 서열의 동정에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 39/00* (2013.01)

*C12N 15/113* (2013.01)

*G01N 33/57423* (2013.01)

*G01N 33/68* (2013.01)

(72) 발명자

**코슬로브스키, 미카엘**

독일 65933 프랑크푸르트 아우토켄스트라세 50

**헬프텐바인, 게르드**

독일 35329 게뮌덴 니데르-오메네르 스트라세 16

**발테르, 코르텐**

독일 65203 비스바덴 휘글레르스트라세 3

**벨르, 스테판**

독일 55299 나켄하임 포마르드스트라세 22a

**오프레아, 가브리엘라-엘레나**

독일 55128 마인츠 암 오스테르그라펜 4

(30) 우선권주장

61/154,167 2009년02월20일 미국(US)

09010164.3 2009년08월06일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/231,843 2009년08월06일 미국(US)

09014135.9 2009년11월11일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/260,135 2009년11월11일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

종양 항원의 발현 및/또는 활성의 억제제를 포함하며, 여기에서 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

(i) 종양 항원의 발현의 억제제는 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 선택적으로 혼성화하는 억제 핵산이고, 상기 억제 핵산은 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, siRNA, siRNA 또는 이를 인코딩하는 DNA로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 것이거나 또는

(ii) 종양 항원의 활성의 억제제는 상기 종양 항원에 특이적으로 결합하는 항체임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

종양 항원의 리간드 또는 종양 항원을 인코딩하는 핵산의 리간드를 포함하는 약제학적 조성물,

여기에서 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩된 아미노산 서열을 포함하고, 또한 여기에서 상기 종양 항원의 리간드 또는 종양 항원을 인코딩하는 핵산의 리간드는 하나 또는 그 이상의 치료학적 효과기 부분에 부착되고, 상기 치료학적 효과기 분자는 바람직하게는 방사선표지, 세포독소(cytotoxin) 또는 세포독소 효소이다.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 종양 항원의 리간드는 상기 종양 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하거나 또는 상기 종양 항원을 인코딩하는 핵산의 리간드는 상기 핵산에 선택적으로 혼성화하는 핵산임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

다음으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 억제를 포함하는 약제학적 조성물:

(i) 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 또는 상기 펩티드의 유도체,

(ii) 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산의 유도체,

(iii) 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 숙주세포,

(iv) 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 바이러스,

(v) 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 상기 펩티드의 유도체를 제시하는 세포,

(vi) 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 결합하는 항체 또는 T 세포 수용체,

(vii) 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 인식하도록 인 비트로 감작화된 면역반응 세포, 및

(viii) 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 인식하는 T 세포 수용체를 인코딩하는 핵산으로 형질도입된 효과기 세포 또는 줄기 세포,

여기에서, 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의하여 인코딩된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 종양 항원 펩티드는 상기 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하는 것이다.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 펩티드가 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 펩티드이거나 또는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 펩티드를 생성하도록 가공될 수 있는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 숙주세포가 인코딩된 펩티드 또는 그의 가공 생성물에 결합하는 MHC 분자를 발현하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제5항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간 또는 인간화된 항체이거나 또는 항체의 단편 또는 합성 항체임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제5항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서, 치료학적 또는 예방학적 종양 백신의 형태임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 10

제5항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, 종양 질병을 치료 또는 예방하기 위하여 사용되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 따른 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 종양 질병을 갖거나 또는 종양 질병의 발달의 위험이 있는 환자를 치료하는 방법,

상기 투여는 바람직하게는 종양에 대한 CTL 활성을 유도 또는 촉진하는데, 상기 종양은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의하여 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 종양 항원을 클래스 I MHC로 제시함에 의하여 특징 지워진다.

#### 청구항 12

환자로부터 분리된 생물학적 시료 중에서, 다음으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 매개변수를 검출 및/또는 그 양을 결정하는 것을 포함하는 종양 질병을 진단, 검출 또는 모니터링하는 방법:

(i) 종양 항원의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 핵산,

(ii) 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드,

(iii) 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 결합하는 항체,

(iv) 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 인식하는 T 세포 및/또는

(v) 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 제시하는 세포,

여기에서, 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 종양 항원 펩티드는 상기 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

### 청구항 13

살포된 또는 순환하는 종양 세포 또는 전이성 종양세포를 포함하거나 또는 포함하는 것으로 의심되는, 환자로부터 분리한 생물학적 시료 중에서 (i) 종양 항원의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 핵산 및/또는 (ii) 상기 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드의 검출 및/또는 그의 양을 결정하는 것을 포함하는, 환자 내에서 순환하는 종양 세포를 검출하는 방법,

여기에서, 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 종양 항원 펩티드는 상기 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

### 청구항 14

종양을 갖는 환자의 조직 또는 기관으로부터 분리한 생물학적 시료 중에서 (i) 종양 항원의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 핵산 및/또는 (ii) 상기 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드의 검출 및/또는 그의 양을 결정하는 것을 포함하는, 환자 내에서 전이성 난소암 세포 또는 전이성 폐암 세포를 검출하기 위한 방법,

여기에서, 조직 또는 기관에 종양이 없는 경우 세포가 상기 핵산 또는 펩티드를 실질적으로 발현하지 않으며,

여기에서, 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 종양 항원 펩티드는 상기 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

### 청구항 15

제12항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 시료가 조직 또는 기관으로부터 유래되는 것이고, 여기에서 상기 조직 또는 기관에 종양이 없는 경우 세포가 상기 종양 항원 및/또는 상기 종양 항원을 인코딩하는 핵산을 실질적으로 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 16

제12항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 및/또는 그의 양의 결정이

(i) 상기 생물학적 시료를 검출되거나 및/또는 그의 양이 결정되어야 할 핵산, 펩티드, 항체, T 세포 또는 세포에 특이적으로 결합하는 약제와 접촉시키는 단계, 및

(ii) 상기 약제와 상기 검출되거나 또는 그의 양이 결정되어야 할 핵산, 펩티드, 항체, T 세포 또는 세포와의 사이의 복합체의 형성을 검출되거나 및/또는 그의 양을 결정하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 17

제16항에 있어서,

(i) 상기 핵산에 특이적으로 결합하는 약제가 상기 핵산에 특이적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것이거나,

(ii) 상기 펩티드에 특이적으로 결합하는 약제가 상기 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것이거나,

(iii) 상기 항체에 특이적으로 결합하는 약제가 상기 항체에 특이적으로 결합하는 펩티드를 포함하는 것이거나, 또는

(iv) 상기 T 세포에 특이적으로 결합하는 약제가 MHC 분자와 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 사이의 복합체를 제시하는 세포를 포함하는 것임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 약제가 검출가능한 표지를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

다음에 특이적으로 결합하는 약제를 포함하는 진단 시험 키트:

- (i) 종양 항원의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 핵산,
- (ii) 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드,
- (iii) 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 결합하는 항체,
- (iv) 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 인식하는 T 세포 및/또는
- (v) 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 제시하는 세포,

여기에서, 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 종양 항원 펩티드는 상기 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하고,

여기에서, 상기 약제는 바람직하게는 검출 가능한 표지를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

**청구항 20**

종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 결합하는 약제,

여기에서 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 종양 항원 펩티드는 상기 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하고,

여기에서 상기 약제는 바람직하게는 항체, 보다 바람직하게는 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간 항체 또는 인간화된 항체, 항체의 단편 또는 합성 항체임을 특징으로 한다.

**청구항 21**

제20항에서 청구된 약제 및 치료학적 효과기 부분 또는 검출가능한 표지 간의 접합체.

**청구항 22**

종양 항원이 서열 목록의 서열 확인 번호 2에 따른 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 조성물, 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 방법, 제19항에 따른 진단 시험 키트, 제20항에 따른 약제 또는 제21항에 따른 접합체.

**청구항 23**

종양 질병이 난소암 특히 난소선암 및 난소기형암종, 소세포폐암종(SCLC)과 비-소세포폐암종(NSCLC)을 포함하는 폐암 특히 편평세포폐암종 및 선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암 특히 기저세포암종 및 편평세포암종, 악성 흑색종, 두경부암 특히 악성 다형선종, 육종 특히 활막육종과 암육종, 담관암, 방광암 특히 이행상피종양과 유두암종, 신장암 특히 투명세포신세포암종과 유두상신세포암종을 포함하여 신세포암종, 대장암, 회장암을 포함하여 소장암 특히 소장선암과 회장선암, 고환태생성암, 태반융모상피암, 자궁경부암, 고환암 특히 고환정상피종, 고환기형종 및 태생성 고환암 및 자궁암 및 이들의 전이형태들, 바람직하게는 난소암, 폐암, 전이성 난소암 및 전이성 폐암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제10항 또는 제22항의 약제학적 조성물, 또는 제11항 내지 제12항, 제14항 내지 제18항 및 제22항 중의 어느 한 항에 따른 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 암의 진단 및 치료를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

암은 전세계에 걸쳐 명백한 건강상의 문제이며, 여전히 가장 중요한 사망원인 중의 하나이다.

[0003]

난소암(ovarian cancer)은 난소로부터 일어나는 암종(cancerous growth)이다. 난소암은 여성에 있어서 다섯 번째로 중요한 암으로 사망하는 원인이며, 부인과 암에 있어서 가장 중요한 사망의 원인이다. 여성은 약 1.5%의 난소암의 평생의 위험을 가지며, 이는 두 번째로 가장 흔한 부인과 악성종양(malignancy)이 된다.

[0004]

난소암의 진단은 비정상적인 물리적 검사(pelvic examination)를 포함하여), 혈액검사(특히, CA-125에 대하여) 또는 의료영상연구(medical imaging studies)로부터 의심될 수 있다. 상기 진단은 복강(abdominal cavity)을 검사하기 위한 외과적 절차와 생체조직검사(biopsies)를 행하고 그리고 복수(abdominal fluid) 내에서 암세포를 찾는 것에 의하여 확진될 수 있다. 치료에는 대개 화학요법 및 외과적 수술 및 때로 방사선요법이 포함된다.

[0005]

나이 든 여성 및 이 질병을 앓는 일차친족 또는 이차친족(first or second degree relative with the disease)을 갖는 여성들에서 난소암의 위험의 증가가 존재하고 있다. 난소암의 유전적 형태(hereditary forms)는 특정의 유전자(가장 험자하게는 BRCA1 및 BRCA2)에서의 돌연변이에 의해 야기될 수 있다. 불임의 여성들 및 자궁내막증(endometriosis)이라 불리우는 상태의 여성들, 임신을 전혀 하지 않았던 여성들 및 폐경 이후 에스트로겐 대체요법(postmenopausal estrogen replacement therapy)을 사용하고 있는 여성들도 증가된 위험 상태에 있다. 경구피임약들의 사용은 보호인자(protective factor)이다. 난관들을 차단하는 외과적 수술(난관결찰)을 받은 여성들에서도 또한 위험이 저감된다.

[0006]

난소암은 대개 나쁜 예후를 갖는다. 대부분의 케이스가 진전된 단계들에 도달할 때까지 진단되지 않음을 의미하는 어떠한 명백한 초기 검출 또는 스크리닝 시험도 결여하기 때문에 이는 불균형적으로 치명적이다. 이 암을 현재 앓고 있는 환자들의 60% 이상이 이미 3기(stage III) 또는 4기암이며, 이때에는 이미 난소를 넘어서 확산되었다. 난소암은 복강 내에서 자연적으로 발생하는 유체 내로 세포를 내뿜는다. 이를 세포는 자궁(uterus), 방광(urinary bladder), 창자(bowel) 및 창자벽의 내벽(장막(omentum))들을 포함하여 다른 복부(복막)의 구조들 상에 이식될 수 있다. 이를 세포는 심지어 암이 의심되기도 전에 새로운 종양 성장을 형성하기 시작할 수 있다.

[0007]

난소암의 모든 단계들에 대한 5년 생존율은 45.5%이다. 이 질병에 있어서 암이 여전히 원발부위(primary site)으로 국한되어 있는 초기에 진단이 이루어진 케이스에 대해서는 5년 생존율은 92.7%이다.

[0008]

난소종양(ovarian tumors)의 주 분류는 다음과 같다 : 상피성 종양(Epithelial tumors), 이들은 모든 난소종양의 약 75% 그리고 난소악성종양(ovarian malignancies)의 90 내지 95%에 달함; 성기식 간질성 난소종양(sex cord-stromal tumors), 이들은 모든 난소 신생물(ovarian neoplasms)의 약 5 내지 10%에 달함; 생식세포종(germ cell tumors), 이들은 모든 난소 신생물의 약 15 내지 20%에 달함; 전이암(metastatic tumors), 난소악성종양의 약 5%에 달하며 또한 대개 유방암, 대장암, 자궁내막암, 위암 및 자궁경부암로부터 야기됨. 난소암은 난소의 내벽(lining) 내에서(상피성 난소암을 야기함) 또는 난자세포 내에서(생식세포종을 야기함) 가장 흔하게 형성된다.

[0009]

또한 상피성 난소암(ovarian epithelial carcinoma)으로도 알려진 표층 상피성 간질성 종양(surface epithelial-stromal tumor)은 난소암의 가장 흔한 형태이다. 표층 상피성 간질성 종양은 양성 또는 악성이 될 수 있는 난소 신생물의 클래스(class)이다. 이러한 그룹 내의 신생물들은 난소 표층 상피로부터(변성된 복막) 또는 이소성 자궁내막(ectopic endometrial)이나 나팔관(Fallopian tube ; tubal) 조직으로부터 유래되는 것으로 여겨진다. 표층 상피성 간질성 종양에는 장액성 종양(serous tumor), 자궁내막양 종양(endometrioid tumor) 및 점액성 낭선암종(mucinous cystadenocarcinoma)이 포함된다.

[0010]

폐암(lung cancer)은 폐의 조직들 내에서의 제거되지 않는 세포 성장의 질병이다. 이러한 성장은 전이를 야기 할 수 있으며, 이는 인접하는 조직의 침투(invasion) 및 폐 너머로의 침입(infiltration)이다. 남성에 있어서는 가장 흔하고, 여성에 있어서는 두 번째로(유방암 다음으로) 가장 흔한 암-관련 사망의 원인인 폐암은 전세계

적으로 연간 130만명(1.3 million)의 사망의 원인이다.

[0011] 폐암에는 유피피종암(epidermoid cancers)들 및 선암(adenocarcinomas)이 포함된다. 폐암의 대부분이 상피세포로부터 일어나는 암종-악성종양(carcinomas-malignancies)이다. 폐암은 5가지의 병리조직학적 기준들로 특징지워질 수 있다. 편평상피세포암종(squamous epithelial carcinoma), 선암, 큰세포암종(large cell carcinoma), 선편평암종(adenosquamous carcinoma) 및 소세포폐암종(small cell lung carcinoma ; SCLC)들 사이에서 구별이 이루어진다. 처음 4개는 문헌에서는 비-소세포폐암종(non-SCLC ; NSCLC)으로 언급된다.

[0012] 비-소세포폐암종(NSCLC)은 때때로 외과적 수술로서 치료되는 반면, 소세포폐암종(SCLC)은 대개 화학요법 및 방사선요법에 더욱 잘 반응한다.

[0013] 폐암은 흉부엑스레이(chest x-ray) 및 컴퓨터단층촬영법(computed tomography ; CT 스캔) 상에서 보여질 수 있다. 이러한 진단은 생체조직검사로 확진된다. 이는 대개 기관지내시경(bronchoscopy) 또는 CT-유도 생검(CT-guided biopsy)을 통하여 수행된다. 치료 및 예후는 암의 조직학적 형태(histological type), 기수(stage ; 확산의 정도) 및 환자의 수행능력(patient's performance status)에 의존적이다. 가능한 치료들에는 외과적 수술, 화학요법 및 방사선요법들이 포함된다. 치료에 의하여, 5년 생존율은 14%이다.

[0014] 면역체계는 선천성 면역 및 후천성 면역의 2가지의 양상을 경유하여 세포를 인식하고 파괴하는 능력을 갖는다. 생득적 구성요소(innate component)는 대식세포(macrophages), 자연살해(natural killer ; NK) 세포, 단핵구(monocytes)들 및 과립구(granulocytes)로 이루어진다. 이들 세포는 세포의 형질전환에 포함된 분자의 패턴들을 동정하고 그리고 여러 사이토카인(cytokines) 및 염증성 매개물질(inflammatory mediators)을 방출한다. 생득적 반응(innate response)은 후천적 면역 반응에서 존재하는 특징인 외래 항원에 대한 기억능력을 결여하고 있다. 면역체계의 후자의 구성요소는 또한 림프구(lymphocytes) 상의 수용체의 존재에 의해 부여되는 외래 항원에 대한 특이성(specifity)을 특징으로 한다. 항원표출세포(antigen presenting cells ; APCs)는 또한 후천성 반응에서 하나의 역할을 수행하며 - 이들은 외래 항원을 감싸고 그리고 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex ; MHC)의 맥락에서 이들을 림프구에게로 제시한다. CD4+ T 세포는 MHC 클래스 II 분자들의 문맥 내에서 항원을 인식하는 수용체를 가지며, 이는 계속해서 이들이 사이토카인들 및 그 이상의 활성의 CD8+ 림프구(CTLs)들 또는 B 세포를 방출하도록 하는 것을 가능하게 한다. CD8+ 림프구(CTLs)들은 세포매개면역(cell-mediated immunity)의 일부이며 자연세포사멸(apoptosis) 또는 퍼포린-매개 세포 용해(perforin-mediated cell lysis)를 통하여 MHC 클래스 I 분자들의 문맥 내에서 존재하는 세포를 제거하는 능력이 있다. T-세포 매개 면역이 항-종양 반응(anti-tumor response)에서 필수적인 역할을 수행한다는 것은 널리 받아들여지고 있다.

[0015] B 세포는 면역글로불린들의 방출에 관여하고 있으며, 마찬가지로 체액성 면역 체계(humoral immune system)의 일부이다.

[0016] 적절하게 조준되고 그리고 향상되는 경우, 면역 기능들이 악성의 병소(malignant lesions)를 제어하고 그리고 심지어 근절하는 데 치료학적으로 활용될 수 있다. 발암에 연관된 유전학적 및 후성유전학적 변화들은 미생물 항원(microbial antigens)과 유사한 방식으로 면역 체계에 의하여 인식될 수 있는 항원을 생성한다.

[0017] 당해 기술분야에서는 난소암 및 폐암, 특히 난소선암(ovarian adenocarcinomas)과 세기관지선암(bronchiolar adenocarcinomas) 및 이들로부터 유래되는 전이암의 특이적인, 신뢰할 수 있고 그리고 감작적인 진단 및 치료학적 접근을 허용하는 이를 암의 유전자 표지(genetic markers) 및 표적(targets)에 대한 요구가 존재하고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 난소암 및 폐암, 특히 난소선암과 세기관지선암 및 이들로부터 유래되는 전이암 등과 같은 암의 치료 및 진단에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 난소암 및 폐암 등과 같은 암 상에 존재하고 그리고 이를 질병의 진단학적 및 치료학적 접근방법에 대한 표적으로서 기능할 수 있는 분자성 구조의 동정에 관한 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0019] 본 발명은 난소 및 폐의 암 조직 등과 같은 암 조직의 특징적이고 그리고 대상체에서의 종양 질병의 치료 또는 진단을 위한 표적을 제공하는 핵산 및 아미노산 서열(sequences)의 동정에 관한 것이다.

- [0020] 이를 서열은 상기 세포의 원형질막(plasma membrane) 내에 존재하고 그리고 세포-외 영역(extra-cellular region) 상에서 접근가능한 것으로 확인된 단백질을 포함하여 상기 서열이 예방 백신 및 치료 백신을 포함하여 암 백신의 제조에서 유용할 수 있다.
- [0021] 종양 세포 내에서 발현될 것으로 본 발명에 따라 동정된 핵산은 서열 목록(sequence listing)의 서열 확인 번호 (SEQ ID NO) 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체(variant)를 포함한다. 바람직하게는, 종양 세포 내에서 발현될 것으로 본 발명에 따라 동정된 상기 핵산은 서열 목록의 서열 확인 번호 2에 따른 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 웨티드를 인코딩(encode) 한다. 본 명세서에서는 이를 핵산은 또한 "종양-연관 핵산(tumor-associated nucleic acids)" 또는 단순히 "종양 핵산(tumor nucleic acids)"이라고 정의된다.
- [0022] 다른 관점에 있어서, 본 발명은 또한 본 명세서에서 "종양-연관 항원(tumor-associated antigens)" 또는 단순히 "종양 항원(tumor antigens)"이라고 정의된 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산에 의해 인코딩된 웨티드에 관한 것이다. 따라서, 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원은 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩된 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원은 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 2에 따른 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함한다.
- [0023] 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 또한 본 명세서에서 "종양 항원 웨티드(tumor antigen peptides)"로 정의되는 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원의 상기 서열로부터 유도된 아미노산 서열을 포함하는 웨티드를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 상기 종양 항원 웨티드는, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 MHC 클래스 I에 의한 제시에 의하여 특징 되어지는 세포에 대하여 세포 반응을 자극할 수 있거나 및/또는 그 자체로 사용되거나 또는 면역원성 운반자(immunogenic carrier)에 부착되어 사용되는 경우에 본 발명에 따라 동정된 종양 항원에 특이적으로 결합하는 항체들을 유발할 수 있다. 바람직한 종양 항원 웨티드는 클래스 I MHC 분자들에 대하여 직접적으로 또는 가공에 후속하여 제시될 수 있다. 바람직하게는 본 발명에 따른 상기 종양 항원 웨티드는 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 제시 웨티드이거나 또는 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 제시 웨티드를 생성하도록 가공될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 종양 항원 웨티드는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 상기 단편은 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 제시 웨티드이거나 또는 상기 단편에 결합하는 항체들을 유발할 수 있는 것이다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 종양 항원 웨티드는 이러한 단편의 상기 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하며 이러한 단편, 즉 본 발명에 따라 동정된 종양 항원으로부터 유래된 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 제시 웨티드 또는 상기 단편에 결합하는 항체들을 유발할 수 있는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원으로부터 유도된 면역원(immunogen)을 생성하도록 가공된다. 따라서, 본 발명에 따른 종양 항원 웨티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산에 의해 인코딩된 아미노산 서열을 포함하는 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하며, 바람직하게는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 2에 따른 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 종양 항원의 단편의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 종양 항원 웨티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.
- [0024] 본 발명은 대체로 종양 핵산 또는 종양 항원을 표적화하는 것에 의한 종양 질병의 치료 및/또는 진단을 포함한다. 이를 방법은 이러한 종양 핵산 및/또는 종양 항원을 발현하는 세포의 선택적인 견출 및/또는 세포의 박멸(eradication)을 제공하여 그에 의하여 이러한 종양 핵산 및/또는 종양 항원을 발현하지 않는 정상 세포에 대한 역효과를 최소화한다. 따라서, 치료 또는 진단에 선호되는 질병은 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 핵산 및/또는 종양 항원 중의 하나 또는 그 이상이 이러한 종양 질병, 특히 본 명세서에서 기술된 바와 같은 암 질병을 발현하는 것이다.
- [0025] 본 발명에 따르면, 특히 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원을 표적화하기에 적절한 것은 비-막관통 부분(non-transmembrane portion)에 대응하는 상기 종양 항원의 일부분, 특히 상기 종양 항원의 세포외 부분(extracellular portion)이거나 또는 이를 포함하는 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 일부분 또는 부분은 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다. 따라서, 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원에 결합할 수 있는 본 발명에 따라 사용되는 독립체(entities)는 바람직하게는 비-막관통 부분, 특히 상기

종양 항원의 세포외 부분에 대응하거나 또는 이들을 포함하는 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원의 일부분에 결합할 수 있는 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 일부분 또는 부분은 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다. 유사하게, 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원에 대하여 특이성을 갖는 면역반응을 유도하기 위한 본 발명에 따라 사용되는 펩티드 및 핵산은 바람직하게는 비-막관통 부분, 특히 상기 종양 항원의 세포외 부분에 대응하거나 또는 이들을 포함하는 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원의 일부분에 대하여 특이성을 유도한다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 일부분 또는 부분은 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다. 바람직하게는, 상기 펩티드는 비-막관통 부분, 특히 상기 종양 항원의 세포외 부분에 대응하거나 또는 이들을 포함하는 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원의 일부분에 실질적으로 대응하는 서열을 포함하며, 상기 핵산은 이러한 펩티드를 인코딩한다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 일부분 또는 부분은 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

[0026] 본 발명의 하나의 관점은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현 및/또는 활성의 억제제의 투여를 포함하는 종양 질병, 특히 난소암 및 폐암의 치료를 위한 요법들에 관한 것이다.

[0027] 이러한 관점에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현 및/또는 활성의 억제제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 억제제는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산에 대하여 특이적인 것이다. 다른 구체예에 있어서, 상기 억제제는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원에 대하여 특이적인 것이다. 본 발명에 따르면, 문구 "발현 및/또는 활성의 억제"는 발현 및/또는 활성의 완전하거나 또는 필수적으로 완전한 억제 및 발현 및/또는 활성에서의 감소를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현의 상기 억제는 예를 들면 전사를 억제시키는 것에 의하여 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 코딩(coding)하는 전사물(transcript) 즉, mRNA의 생성을 억제하거나 또는 전사물의 수준을 감소시키는 것에 의하여 또는 전사물의 분해를 유발시키는 것에 의하여 및/또는 예를 들면 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 코딩하는 전사물의 번역을 억제시키는 것에 의하여 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 생성을 억제시키는 것에 의하여 일어날 수 있다. 바람직하게는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현 및/또는 활성의 상기 억제는 종양 세포 성장을 감소시키거나 및/또는 종양 세포 사멸을 유발시키고, 그에 따라 종양-억제(tumor-inhibiting) 또는 종양-파괴(tumor-destroying) 효과를 갖는다.

[0028] 특정의 구체예에 있어서, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현의 상기 억제제는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산에 대하여 선택적으로 혼성화(hybridizing)하고 그리고 그에 대하여 특이적이며, 그에 의하여 그의 전사 및/또는 번역(translation)을 억제하는(예를 들면 감소시키는) 억제 핵산(inhibitory nucleic acid)(예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, siRNA, siRNA 또는 이를 인코딩하는 DNA)이다.

[0029] 본 발명의 억제 핵산에는 목표 핵산에 대해 안티센스 방향(antisense orientation) 내에서 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 포함된다. 적절한 억제 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 길이에 있어서 5 내지 수백의 뉴클레오티드, 전형적으로는 길이에 있어서 약 20 내지 70 뉴클레오티드 또는 그 이하, 심지어 보다 전형적으로는 길이에 있어서 약 10 내지 30 뉴클레오티드 내에서 변한다. 이들 억제 올리고뉴클레오티드는 유리(맨 상태의(naked)) 핵산으로서 또는 보호된 형태, 예를 들면 리포좀 내에 캡슐화된 상태로 투여될 수 있다. 리포좀으로 또는 다른 보호된 형태의 사용은 생체 내 안정성을 향상시킬 수 있고 그에 따라 표적 부위에로의 전달을 용이하게 할 수 있기 때문에 유리할 수 있다.

[0030] 또한, 종양 표적 핵산은 종양 세포 내의 대응하는 mRNA들의 개열(cleavage)을 표적하는 리보자임들을 설계하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 이들 리보자임은 유리(맨 상태의) 형태로 또는 안정성 및/또는 표적화를 향상시키는 전달 시스템, 예를 들면, 리포좀의 사용에 의하여 투여될 수 있다.

[0031] 또한, 상기 표적 종양 핵산은 상기 종양 핵산의 발현을 억제(예를 들면, 감소)시킬 수 있는 siRNA를 설계하는데 사용될 수 있다. 상기 siRNA는 유리(맨 상태의) 형태로 또는 안정성 및/또는 표적화를 향상시키는 전달 시스템, 예를 들면, 리포좀들의 사용에 의하여 투여될 수 있다. 이들은 또한 그들의 전구체들 또는 DNA를 인코딩하는 형태로 투여될 수 있다.

[0032] siRNA는 바람직하게는 센스 RNA 스트랜드(strand) 및 안티센스 RNA 스트랜드들을 포함하며, 여기에서 상기 센스 및 안티센스 RNA 스트랜드들은 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성하고, 그리고 여기에서 상기 센스 RNA 스트랜드는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 내의 약 19 내지 약 25개의 인접 뉴클레오티드들의 표적 서열, 바람직하게는

상기 표적 종양 항원을 코딩하는 mRNA와 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0033] 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 활성의 억제제는 상기 종양 항원에 특이적으로 결합하는 항체이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 항체는 특이적으로 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 펩티드에 결합한다. 상기 종양 항원에의 상기 항체의 결합은 예를 들면 결합 활성 또는 촉매적 활성을 억제하는 것에 의하여 상기 종양 항원의 기능을 간섭할 수 있다.

[0034] 또한 또 다른 관점에 있어서 본 발명은 표적 분자의 리간드, 즉 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 또는 종양 항원의 투여를 포함하는 종양 질병의 치료를 위한 요법에 관한 것이다. 이러한 관점에 있어서, 상기 표적 핵산에 선택적으로 혼성화하는 핵산이 투여될 수 있거나 또는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 투여될 수 있으며, 선택적으로 표적으로 하고 그리고 이들 표적, 예를 들면 종양 세포를 발현하는 세포를 사멸시키기 위한 치료학적 효과기 부분(therapeutic effector moieties)들, 예를 들면, 방사선포지, 세포독소(cytotoxins)들, 세포독소 효소(cytotoxic enzymes) 등에 부착될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 항체는 특이적으로 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 펩티드에 결합한다.

[0035] 이러한 관점에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 또는 종양 항원의 리간드를 포함하며, 상기 리간드는 하나 또는 그 이상의 치료학적 효과기 부분에 부착된 것인 약제학적 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 리간드는 상기 종양 핵산 또는 종양 항원에 대하여 특이적인 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 종양 핵산 또는 종양 항원의 상기 리간드는 종양 세포 성장 감소 및/또는 종양 세포 사멸을 유도하고 그에 따라 종양-억제 또는 종양-파괴 효과를 갖는다.

[0036] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 종양 핵산 및 종양 항원의 동정(identification)은 동정된 항원을 포함하는 종양 세포를 공격하고 그에 의하여 종양 질병의 발달을 지연 또는 방지하거나 또는 종양 세포를 박멸하는 것에 기초하는 특이적인 면역요법들을 개발하는 것을 가능하게 한다. 면역요법은 종양 세포 파괴 면역 반응들을 유도하는 공통의 목표를 갖는 다양한 개입(interventions) 및 기술이 포함된다. 이들 핵산 및 항원을 활용하는 다양한 임상적인 접근법들이 이하에서 요약한 바와 같이 가능하다. 암 면역요법(cancer immunotherapy)에 대한 접근법들은 능동법주와 수동법주(active and passive categories)들로 구분될 수 있다. 능동 면역요법(active immunotherapy)은 종양에 대한 면역 반응을 촉진시키기 위한 시도로서 항원 또는 이러한 항원을 인코딩하는 핵산을 사용한 환자들의 직접적인 면역화(immunization)와 관련될 수 있다. 수동 면역요법은 항암 반응들을 직접적으로 매개하는 목표를 갖는 면역제제(immune reagents)들의 투여를 의미한다. 본 발명은 두 접근방법 모두를 고려한다.

[0037] 이러한 관점에 있어서, 본 발명은 (i) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 펩티드의 유도체를 포함하는 펩티드, (ii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 핵산 또는 상기 핵산의 유도체, (iii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 숙주세포, (iv) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 바이러스, (v) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드 또는 상기 펩티드의 유도체의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 제시하는 세포, (vi) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 결합하는 항체 또는 T 세포 수용체, (vii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 인식하도록 인 비트로 감작화된(sensitized) 면역반응 세포(immunoreactive cell), 및 (viii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 인식하는 T 세포 수용체를 인코딩하는 핵산으로 형질도입(transduced)된 효과기 세포(effector cell)(또는 줄기 세포(stem cell))들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 약제(agents)를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0038] 하나의 구체예에 있어서, (i)에 따른 펩티드는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 펩티드이거나 또는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 펩티드, 바람직하게는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 제시 펩티드를 생산하도록 가공될 수 있다. 바람직하게는 상기 펩티드는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는

서열을 갖거나 또는 이러한 서열을 갖는 웨티드 단편을 생산하도록 가공될 수 있다. 바람직하게는, 상기 웨티드는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 클래스 I MHC에 의한 제시에 의해 특징지워지는, 종양에 대하여 세포 반응을 자극할 수 있는 것이거나 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현에 위하여 특징지워지는, 종양에 대하여 체액성 면역 반응을 자극할 수 있는 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 웨티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

[0039] 하나의 구체예에 있어서, (ii)에 따른 핵산은 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드를 코딩하거나 또는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드, 바람직하게는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 제시 웨티드를 생산하도록 가공될 수 있는 웨티드를 코딩한다. 바람직하게는, 상기 웨티드는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 서열을 갖거나 또는 이러한 서열을 갖는 웨티드 단편을 생성하도록 가공될 수 있다. 바람직하게는, 상기 웨티드는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 클래스 I MHC에 의한 제시에 위하여 특징지워지는, 종양에 대하여 세포 반응을 자극할 수 있거나 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현에 위하여 특징지워지는 종양에 대하여 체액성 면역 반응을 자극할 수 있는 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 웨티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다. 이러한 핵산은 플라스미드 또는 발현 벡터 내에 제시될 수 있으며 또한 촉진제(promoter)에 기능적으로 연결될 수 있다.

[0040] 하나의 구체예에 있어서, (iii)에 따른 숙주세포는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드를 코딩하거나 또는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드, 바람직하게는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 제시 웨티드를 생산하도록 가공될 수 있는 웨티드를 코딩한다. 바람직하게는, 상기 웨티드는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 서열을 갖거나 또는 이러한 서열을 갖는 웨티드 단편을 생성하도록 가공될 수 있다. 바람직하게는, 상기 웨티드는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 클래스 I MHC에 의한 제시에 위하여 특징지워지는, 종양에 대하여 세포 반응을 자극할 수 있거나 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현에 위하여 특징지워지는, 종양에 대하여 체액성 면역 반응을 자극할 수 있는 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 웨티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다. 상기 숙주세포는 재조합 세포가 될 수 있고, 그리고 인코딩된 웨티드 또는 그의 가공 생성물(procession product)을 분비할 수 있고, 이를 표면 상에 발현시킬 수 있고 그리고 바람직하게는 부가적으로 상기 웨티드 또는 그의 가공 생성물에 결합하고 그리고 바람직하게는 상기 세포 표면 상에 상기 웨티드 또는 그의 가공 생성물을 제시하는 MHC 분자를 발현할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 숙주세포는 상기 MHC 분자를 내생적으로 발현한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 숙주세포는 상기 MHC 분자 및/또는 상기 웨티드 또는 그의 가공 생성물을 재조합 방법으로 발현한다. 상기 숙주세포는 바람직하게는 비증식성이다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 숙주세포는 항원-제시 세포, 특히 수지상세포(dendritic cell), 단핵구 또는 대식세포이다.

[0041] 하나의 구체예에 있어서, (iv)에 따른 바이러스는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드를 코딩하거나 또는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드, 바람직하게는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 제시 웨티드를 생산하도록 가공될 수 있는 웨티드를 코딩한다. 바람직하게는, 상기 웨티드는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 서열을 갖거나 또는 이러한 서열을 갖는 웨티드 단편을 생성하도록 가공될 수 있다. 바람직하게는, 상기 웨티드는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 클래스 I MHC에 의한 제시에 위하여 특징지워지는, 종양에 대하여 세포 반응을 자극할 수 있거나 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현에 위하여 특징지워지는, 종양에 대하여 체액성 면역 반응을 자극할 수 있는 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 웨티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

[0042] 하나의 구체예에 있어서, (v)에 따른 세포는 내생적으로 MHC 분자를 발현한다. 다른 구체예에 있어서, 상기 세포는 재조합적으로 MHC 분자 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨티드의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드를 발현한다. 바람직하게는 상기 세포는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨티드의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드 또는 그의 표면 상에서의 MHC 분자들에 의한 상기 웨티드의 유도체를 발현한다. 바람직하게는 상기 제시되는 웨티드는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II,

바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 서열을 갖는 웨티드이다. 상기 세포는 바람직하게는 비증식성이다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 세포는 수지상세포, 단핵구 또는 대식세포 등과 같은 항원-제시 세포이다. 따라서, 바람직한 구체예에 있어서, (v)에 따른 상기 세포는 클래스 I MHC로 제시된 본 명세서에서 기술된 바와 같은 종양 항원 웨티드를 포함하는 항원 제시 세포이다.

[0043] 하나의 구체예에 있어서, (vi)에 따른 항체는 모노클로날 항체이다. 다른 구체예들에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체, 인간 항체 또는 인간화된 항체이거나 또는 항체의 단편 또는 합성 항체이다. 상기 항체는 치료학적 효과기 부분 또는 검출가능한 표지에 결합될 수 있다. 바람직하게는 (vi)에 따른 상기 항체 또는 T 세포 수용체는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 웨티드 내의 서열에 결합한다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 T 세포 수용체는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 웨티드에 결합한다.

[0044] 바람직하게는, (vii)에 따른 세포는 그 단편이 바람직하게는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 웨티드 내의 서열에 결합한다. 하나의 구체예에 있어서, (vii)에 따른 세포는 (a) 환자 또는 동일 종들의 다른 개체, 특히 건강한 개체로부터 또는 다른 종들의 개체로부터 획득된 면역반응 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) 상기 샘플을 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하는 웨티드 또는 상기 웨티드의 유도체를 제시하는 세포과 상기 웨티드에 대한 CTL들의 생성을 촉진하는 조건들 하에서 접촉시키는 단계 및 (c) 상기 CTL들을 환자에게 상기 종양 항원을 발현하고 그리고 바람직하게는 이를 종양 세포 등과 같은 클래스 I MHC로 제시하는 세포를 용해하기에 적절한 양으로 도입하는 단계들을 포함하는 방법에 의해 수득 가능하다.

[0045] 하나의 구체예에 있어서, 상기 방법은 수득된 CTL들의 T 세포 수용체를 복제하고 그리고 상기 T 세포 수용체를 코딩하는 핵산을 상기 환자 또는 동일 종들의 다른 개체, 특히 건강한 개체로부터 또는 다른 종들의 개체로부터 수득된 CTL들 또는 미성숙의 CTL들 등과 같은 효과기 세포에로 전달하는 단계를 포함하며, 따라서 상기 효과기 세포는 원하는 특이성을 수용하고 그리고 상기 환자에게로 도입될 수 있다. (viii)에 따른 효과기 세포는 이러한 방법으로 생산될 수 있다.

[0046] 앞서 기술한 바와 같은 약제를 사용하는 예방접종(vaccination)은, 특히 종양 세포 등과 같은 세포 내에서 발현되는 경우에, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원에 대하여 CD4+ 헬퍼 T-세포 반응(CD4+ helper T-cell response) 및/또는 CD8+ T-세포 반응(CD8+ T-cell response)을 유발할 수 있는 MHC 클래스 II-제시 에피토프(epitopes)들을 제공할 수 있다. 달리 또는 부가적으로, 앞서 기술한 바와 같은 약제를 사용하는 예방접종은, 특히 종양 세포 등과 같은 세포 내에서 발현되는 경우에, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원에 대하여 CD8+ T-세포 반응을 유발할 수 있는 MHC 클래스 I-제공 에피토프들을 제공할 수 있다. 더욱이, 앞서 기술한 바와 같은 약제를 사용하는 예방접종은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원에 대하여 특이적인 항체들을 유발할 수 있다.

[0047] 하나의 구체예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 바람직하게는 면역조절제 또는 이를 인코딩하는 핵산을 더 포함하는 치료학적 또는 예방학적 항암 백신이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 면역조절제는 양성의 공자극성 분자(positive costimulatory molecule)의 작용제(agonist), 예를 들면, CTL의 공자극을 발휘할 수 있는 면역글로불린-융합 단백질(Ig-fusion protein)이다. 다른 구체예에 있어서, 상기 공자극성 분자는 음성의 공자극성 분자(negative costimulatory molecule)의 길항제(antagonist), 예를 들면, CTL 공자극의 억제를 감소시킬 수 있는 항체이다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 면역조절제는 항-CTLA4 항체이다.

[0048] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 수용가능한 담체(carrier)를 포함할 수 있으며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 보조제(adjuvants)들, 안정화제(stabilizers)들 등을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 다른 관점은 종양 질병의 예방학적 및/또는 치료학적 처치를 위한 본 명세서에서 기술된 약제 및 조성물의 용도를 포함한다.

[0050] 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 종양 질병을 갖거나 또는 종양 질병의 발달의 위험에 있는 환자를 치치하는 치료학적 및 예방학적 방법을 제공한다. 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 종양 세포 사멸을 유도하는 방법을 제공한다.

[0051] 바람직하게는, 상기 종양 질병은 바람직하게는 난소암 특히 난소선암 및 난소기형암종(ovarian

teratocarcinoma), 소세포폐암종(SCLC)과 비-소세포폐암종(NSCLC)을 포함하는 폐암 특히 편평세포폐암종(squamous cell lung carcinoma) 및 선암, 위암(gastric cancer), 유방암, 간암(hepatic cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암 특히 기저세포암종(basal cell carcinoma) 및 편평세포암종(squamous cell carcinoma), 악성 흑색종(malignant melanoma), 두경부암(head and neck cancer) 특히 악성 다형선종(malignant pleomorphic adenoma), 육종(sarcoma) 특히 활막육종(synovial sarcoma)과 암육종(carcinosarcoma), 담관암(bile duct cancer), 방광암(cancer of the urinary bladder) 특히 이행상피종양(transitional cell carcinoma)과 유두암종(papillary carcinoma), 신장암(kidney cancer) 특히 투명세포신세포암종(clear cell renal cell carcinoma)과 유두상신세포암종(papillary renal cell carcinoma)을 포함하여 신세포암종(renal cell carcinoma), 대장암(colon cancer), 회장암(cancer of the ileum)을 포함하여 소장암(small bowel cancer) 특히 소장선암(small bowel adenocarcinoma)과 회장선암(adenocarcinoma of the ileum), 고환태생성암(testicular embryonal carcinoma), 태반융모상피암(placental choriocarcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 고환암(testicular cancer) 특히 고환정상피종(testicular seminoma), 고환기형종(testicular teratoma) 및 태생성 고환암(emбриonic testicular cancer) 및 자궁암(uterine cancer) 및 이들의 전이형태들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 암 질병이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 암 질병은 난소암, 폐암, 전이성 난소암 및 전이성 폐암로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 것이다. 바람직하게는, 상기 난소암은 암종 또는 선암이다. 바람직하게는, 상기 폐암은 암종 또는 선암이고 그리고 바람직하게는 세기관지암종(bronchiolar carcinoma) 또는 세기관지선암 등과 같은 세기관지암(bronchiolar cancer)이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 종양 세포는 암과 같은 세포이다.

[0052]

바람직하게는, 본 명세서에서 기술된 약제 및 조성물은 치료학적으로 활성인 물질이 조직 또는 기관에 전달되지 않거나 또는 실질적으로 전달되지 않도록 하는 방법으로 투여되며, 여기에서 세포는, 종양이 없는 경우에, 태반조직(placenta tissue) 등과 같은 조직 또는 기관이 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는 것이다. 이러한 목적을 위하여, 본 명세서에서 기술된 상기 약제 및 조성물은 국부적으로 투여될 수 있다. 바람직하게는 상기 약제 및 조성물은 난소 및/또는 폐들에 전달된다.

[0053]

여러 구체예들에 따르면, 본 발명의 방법은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현 및/또는 활성의 억제제, 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 또는 종양 항원의 리간드 및/또는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 면역요법제들의 투여를 포함한다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 방법은 본 명세서에서 기술된 바와 같은 약제학적 조성물을 환자에게 투여하고 그리고 바람직하게는 환자를 본 명세서에서 기술된 항-종양 백신으로 예방접종시키는 것을 포함한다. 당해 기술분야에서 공지된 다양한 예방접종 방법 중 임의의 것이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 항-종양 백신은 바람직하게는 클래스 I MHC로 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 제시에 의하여 특징지워지는 종양에 대하여 CTL 활성을 유도하거나 촉진시킬 수 있는 것이다. 이들은 보조제들과 조합하여 사용될 수 있으며, 이는 T 세포에 대하여 직접적으로 또는 APC들을 통하여 작용하는 것에 의하여 면역 체계의 자극을 용이하게 한다. 보조제들은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 양성의 면역조절효과를 갖는 면역조절 물질들을 포함한다.

[0054]

여러 구체예에 있어서, 본 발명의 상기 방법은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 발현하고 그리고 바람직하게는 클래스 I MHC로 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 제시하는 종양 세포에 대하여 항-종양 CTL 반응의 자극, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 발현하고 그리고 바람직하게는 클래스 I MHC로 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 제시하는 종양 세포의 성장의 억제 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 발현하고 그리고 바람직하게는 클래스 I MHC로 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 제시하는 세포의 사멸의 유도를 포함한다.

[0055]

하나의 관점에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 발현 및/또는 활성의 억제제, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 핵산 또는 종양 항원의 리간드 및/또는 본 명세서에서 기술된 치료의 방법에서 사용하기 위하여 본 명세서에서 기술된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 면역요법제들을 제공한다. 하나의 구체예에 있어서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 치료의 방법에서 사용하기 위하여 본 발명에서 기술된 바와 같은 약제학적 조성물을 제공한다.

[0056]

본 명세서에서 기술된 면역요법들 등과 같이 종양 핵산 또는 종양 항원을 표적화하는 것에 기초하는 치료들은 외과적 절제술(surgical resection) 및/또는 방사선요법 및/또는 전통적인 화학요법들과 결합될 수 있다.

[0057]

본 발명의 다른 관점은 진단, 검출 또는 모니터링, 즉 종양 질병의 퇴행(regression), 진전(progression), 경과(course) 및/또는 시작(onset)의 결정을 위한 방법을 제공하는 것이다. 바람직하게는 상기 방법은 표적 분자에

특이적으로 결합하는 모노클로날 항체들 및 핵산 탐침(nucleic acid probes)들 등과 같은 리간드의 용도를 포함한다. 적절한 표적 분자들은 (i) 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산, (ii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 그로부터 유도되는 종양 항원 웨티드, (iii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원에 대한 항체 또는 그로부터 유도되는 종양 항원 웨티드, (iv) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 인식하는 T 세포 또는 그로부터 유도된 종양 항원 웨티드 및/또는 (v) 클래스 I 또는 클래스 II MHC, 바람직하게는 클래스 I MHC로 본 발명에 따라 동정된 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨티드를 제시하는 세포가다. 이러한 방법은 대상체가 종양 질병을 발달시킬 (증가된) 위험을 갖거나 또는 위험의 상태에 있는 지의 여부 또는 예를 들면 치료 요법(treatment regimen)이 유효한 지의 여부를 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0058] 따라서, 본 발명은 환자로부터, 바람직하게는 종양 질병을 갖거나 종양 질병을 갖는 것으로 의심되거나 또는 종양 질병을 앓는 것으로 의심되거나 또는 종양 질병의 잠재성을 갖는 환자로부터 분리한 생물학적 샘플 중에서 (i) 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산의 핵산 서열을 포함하는 핵산 / 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드를 코딩하는 핵산, (ii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨티드의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드, (iii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨티드의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드에 결합하는 항체, (iv) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨티드의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드를 인식하는 T 세포 및/또는 (v) 클래스 I 또는 클래스 II MHC, 바람직하게는 클래스 I MHC로 본 발명에 따라 동정된 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨티드의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드를 제시하는 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 매개변수(parameters)를 검출 및/또는 그 양을 결정하는 것을 포함하는 종양 질병의 진단, 검출 또는 모니터링하는 방법에 관한 것이다.

[0059] 하나의 구체예에 있어서, (i)에 따른 핵산은 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드를 생성하도록 가공된 웨티드, 바람직하게는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 제시 웨티드를 코딩한다.

[0060] 하나의 구체예에 있어서, (ii)에 따른 웨티드는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드이거나 또는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제시 웨티드, 바람직하게는 종양 항원 특이적 MHC 클래스 I 제시 웨티드를 생성하도록 가공될 수 있다.

[0061] 바람직하게는 (iv)에 따른 T 세포는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 웨티드 내의 서열을 인식한다.

[0062] 하나의 구체예에 있어서, (v)에 따른 세포는 그의 표면 상에 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 상기 웨티드를 제시한다. 상기 세포는 바람직하게는 비증식성이다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 세포는 수지상세포, 단핵구 또는 대식세포 등과 같은 항원-제시 세포이다. 따라서, 바람직한 구체예에 있어서, (v)에 따른 상기 세포는 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 클래스 I MHC로 제공되는 종양 항원 웨티드를 포함하는 항원 제시 세포이다. 다른 구체예에 있어서, 상기 세포는 종양 세포이다.

[0063] 하나의 구체예에 있어서, (i)에 따른 상기 핵산 또는 (ii)에 따른 상기 웨티드는 세포, 바람직하게는 종양 세포 내에서 원위치에서(in situ) 검출되거나 또는 그의 양이 결정된다. 하나의 구체예에 있어서, (ii)에 따른 상기 웨티드는 세포의 표면 상에서 원형질막 내에 내포되거나 또는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I과의 복합체(complex)에 포함되어 검출되거나 또는 그의 양이 결정된다.

[0064] 바람직하게는, 본 발명의 방법을 사용하여 진단되거나, 검출되거나 또는 모니터링될 상기 종양 질병은 바람직하게는 난소암 특히 난소선암 및 난소기형암종, 소세포폐암종(SCLC)과 비-소세포폐암종(NSCLC)을 포함하는 폐암 특히 편평세포폐암종 및 선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 폐부암 특히 기저세포암종 및 편평세포암종, 악성 흑색종, 두경부암 특히 악성 다형선종, 육종 특히 활막육종과 암육종, 담관암, 방광암 특히 이행상피종양과 유두암종, 신장암 특히 투명세포신세포암종과 유두상신세포암종을 포함하여 신세포 암종, 대장암, 회장암을 포함하여 소장암 특히 소장선암과 회장선암, 고환태생성암, 태반융모상피암, 자궁경부암, 고환암 특히 고환정상피종, 고환기형종 및 태생성 고환암 및 자궁암 및 이들의 전이형태들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 암 질병이다.

[0065] 본 발명에 따른 종양 질병의 진단, 검출 또는 모니터링을 위한 방법의 하나의 구체예에 있어서, 생물학적 샘플 및/또는 대조/참조 샘플(control/reference sample)은 종양 질병에 의한 감염에 대해 진단되거나, 검출되거나 또는 모니터링되어야 할 조직 또는 기관에 대응하는 조직 또는 기관으로부터 유래된 것; 예를 들면, 진단되거나 검출되거나 또는 모니터링되어야 할 종양 질병은 난소암이고 그리고 생물학적 샘플 및/또는 대조/참조 샘플이

난소 조직이다. 이러한 조직들 및 기관들은 예를 들면 본 명세서에서는 서로 다른 종양 질병 및 암과 연관되어 기술된다.

[0066] 종양 질병의 진단, 검출 또는 모니터링을 위한 방법의 하나의 구체예에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 조직 또는 기관으로부터 나온 것이고, 여기에서 상기 세포는, 상기 조직 또는 기관이 종양이 없는 경우에, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는 것이다. 바람직하게는, 상기 조직은 태반 조직 이외의 조직이다. 바람직하게는, 상기 조직은 난소, 폐, 유방, 십이지장(duodenum), 피부, 결장(colon), 간, 림프절(lymph node), 위장, 비장(spleen), 신장, 식도(esophagus), 췌장, 자궁내막, 뇌, 쓸개(gallbladder), 방광, 회장, 부신(adrenal gland), 직장(rectum) 및 골격근(skeletal muscle)의 조직, 바람직하게는 난소의 조직 또는 폐의 조직이다.

[0067] 본 발명에 따르면, 발현의 수준이 태반 세포 또는 태반 조직 내에서의 발현에 비하여 낮은 경우 및/또는 난소 종양 세포 및/또는 폐 종양 세포 또는 난소암 조직 및/또는 폐암 조직 내에서의 발현에 비하여 낮은 경우, 종양 항원 및/또는 종양 핵산은 실질적으로 발현되지 않은 것이다. 바람직하게는, 상기 발현의 수준은 상기한 세포 또는 조직들에 비하여 10% 이하, 바람직하게는 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.05% 또는 심지어 그 이하이다. 바람직하게는, 상기 발현의 수준이 검출 한계(detection limit) 이하인 경우, 종양 항원 및/또는 핵산은 실질적으로 발현되지 않은 것이다.

[0068] 상기 진단, 검출 또는 모니터링을 위한 방법은 정량적 및/또는 정성적 평가, 예를 들면, 표적 분자들의 절대적 및/또는 상대적 측정, 예를 들면, 종양 핵산 또는 종양 항원의 발현 수준들을 허용한다.

[0069] 상기 양의 검출 및/또는 결정을 수행하기 위한 수단들은 본 명세서에서 기술된 것이거나 또는 당해 기술분야에서 숙련된 자들에게는 자명한 것이 될 수 있다.

[0070] 바람직하게는, 본 발명의 상기 방법에서의 검출 및/또는 양의 결정은 (i) 생물학적 샘플을 검출되거나 및/또는 그의 양이 결정되어야 할 핵산, 웨티드, 항체, T 세포 또는 세포에 특이적으로 결합되는 약제와 접촉시키는 단계, 및 (ii) 상기 약제와 검출되어야 하거나 또는 결정되어야 할 양의 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 또는 상기 세포와의 사이의 복합체의 형성을 검출하거나 및/또는 그의 양을 결정하는 단계를 포함한다.

[0071] 전형적으로, 생물학적 샘플 내의 표적 분자의 수준은 참조 수준(reference level)과 비교되며, 여기에서 상기 참조 수준으로부터의 편차는 대상체에서의 종양 질병의 존재 및/또는 단계를 표시한다. 상기 참조 수준은 대조 샘플(예를 들면, 건강한 조직 또는 대상체로부터의) 또는 건강한 대상체들로부터의 중간 수준(median level)로서 결정된 바와 같은 수준이 될 수 있다. 상기 참조 수준으로부터의 "편차"는 적어도 10%, 20% 또는 30%, 바람직하게는 적어도 40% 또는 50% 또는 심지어 그 이상으로 증가하거나 또는 감소하는 것과 같은 임의의 명백한 변화를 나타낸다. 바람직하게는, 상기 생물학적 샘플 내의 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 존재 또는 참조 수준에 비하여 증가된 상기 생물학적 샘플 내의 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 양은 종양 질병의 존재를 나타낸다.

[0072] 전형적으로, 본 발명의 상기 방법에서의 검출 및/또는 양의 결정은 표적 분자에 특이적으로 결합하는 표지된 리간드들, 예를 들면, 표적 핵산에 혼성화하는 표지된 핵산 탐침 및/또는 표적 웨티드에 특이적으로 결합하는 표지된 항체 또는 그의 단편/유도체의 사용을 포함한다.

[0073] 본 발명에 따르면, 핵산의 검출 또는 핵산의 양의 결정은 혼성화 또는 핵산 증폭 기술들을 포함하는 방법 등과 같은 공지의 핵산 검출 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 또는 노던 블랏 분석(Northern blot analysis)을 사용하여 mRNA 전사물들이 검출되거나 또는 그의 양이 결정된다.

[0074] 이러한 핵산 검출법들은 상기 표적 핵산에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드들의 사용을 포함할 수 있다. 적절한 올리고뉴클레오티드들은 전형적으로 길이에 있어서 5 내지 수백개의 뉴클레오티드들, 보다 전형적으로는 길이에 있어서 약 20 내지 70개의 뉴클레오티드들 또는 그보다 짧은 것들, 심지어 보다 전형적으로는 길이에 있어서 전형적으로 약 10 내지 30개의 뉴클레오티드들 사이에서 변한다.

[0075] 본 발명에 따르면, 웨티드의 검출 또는 웨티드의 양의 결정은 상기 웨티드에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하는 면역검출(immunodetection)을 포함하나 이에 제한되지 않는 것을 포함하여 다수의 방법로 수행될 수 있다. 바람직하게는, 상기 항체는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하는 서열에 결합한다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 서열은 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터

선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

[0076] 웨티드를 검출하는 항체들을 사용하는 방법은 잘 알려져 있으며, 효소면역측정법(ELISA), 경합결합측정법(competitive binding assays)들을 포함한다. 일반적으로, 이러한 분석법들은 직접적으로 표적 웨티드를 특이적으로 결합하거나 또는 간접적으로 검출을 위하여 제공되는 표지, 예를 들면, 인디케이터 효소(indicator enzymes)들, 방사선표지(radiolabels)들, 형광단(fluorophore)들 또는 상자성 입자(paramagnetic particles)들에 결합된 항체 또는 항체 단편을 사용한다.

[0077] 본 발명에 따르면, 항체의 검출 또는 항체의 양의 결정은 상기 항체에 특이적으로 결합하는 웨티드를 사용하여 수행될 수 있다.

[0078] T 세포는 생체검사 및 절제 또는 다른 원천으로부터 유도되는 것 등과 같은 환자의 말초 혈액, 림프절, 조직 샘플들로부터 분리될 수 있다. 원발성 T 세포 또는 다른 적절한 유도체들에 대하여 반응성 분석법(reactivity assays)들이 수행될 수 있다. 예를 들면, T 세포는 하이브리도마(hybridomas)들을 생성하도록 융합될 수 있다. T 세포 민감성(T cell responsiveness)을 측정하는 분석법들이 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 증식분석법(proliferation assays)들 및 사이토카인 방출 분석법(cytokine release assays)들을 포함한다.

[0079] 하나의 구체예에 있어서, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨티드의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드를 인식하는 상기 T 세포는 종양 항원-반응 CTL(tumor antigen-responsive CTL)이다.

[0080] 하기의 바람직한 구체예들을 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 방법로 CTL이 검출될 수 있고 그의 양이 결정될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, CTL들은 적절한 형광 종양 항원 웨티드/MHC 사량체(tetramer)를 사용하여 직접적으로 염색된다. 다른 구체예에 있어서, "트랩(TRAP)" 분석법(단백질 전달에 의한 APC들의 T-세포 인식")이 사용된다(예를 들면, 문헌 Beadling et al. Nature Medicine 12:1208 (2006)을 참조하시오). 다른 구체예에 있어서, 혈액 샘플들에서의 T 세포의 검출은 유안과 그의 동료들에 의해 개발된 방법을 사용하여 수행된다(문헌 Cytotherapy 8:498, 2006을 참조). 반응성 T 세포에 대한 분석법들 및 지수들(indices)은 공지되어 있으며, 감마-인터페론 엘리스폿(IFN-gamma ELISPOT) 및 감마-인터페론 세포내 사이토카인 염색(IFN-gamma intracellular cytokine staining)의 사용을 포함하나 이들에 제한되지 않는다.

[0081] T 세포 클론(T cell clone)이 특정의 항원성 웨티드에 반응하는 지의 여부를 결정하기 위한 다른 여러 방법이 당해 기술분야에서 공지되어 있다. 전형적으로, 상기 웨티드는 1 내지 3일의 기간 동안 T 세포의 혼탁액에 첨가된다. 상기 T 세포의 반응은 증식, 예를 들면 표지된 티미딘(labeled thymidine)의 흡수(uptake)에 의하거나 또는 사이토카인, 예를 들면 인터류킨-2(IL-2)들의 방출에 의하여 측정될 수 있다. 방출된 사이토카인들의 존재를 검출하기 위한 여러 분석법들이 획득가능하다.

[0082] T 세포 세포독성 분석법(T cell cytotoxic assays)들이 종양 항원에 대하여 특이성을 갖는 세포독성 T 세포를 검출하는 데 사용될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 세포독성 T 세포가 MHC 클래스 I 분자들을 갖는 종양 항원 웨티드를 제시하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 그들의 능력에 대하여 시험되었다. 종양 항원 웨티드를 제시하는 표적 세포는 표지되고 그리고 환자 샘플로부터의 T 세포의 혼탁액에 첨가될 수 있다. 용해된 세포로부터의 표지의 방출을 정량하는 것에 의하여 세포독성(cytotoxicity)이 측정될 수 있다. 이러한 분석에는 동시에 그리고 총 방출에 대한 대조들이 포함될 수 있다.

[0083] 예를 들면, T 세포를 활성화하거나 세포에 대해 특이성을 갖는 CTL들에 의한 세포의 용해를 측정하는 것과 같은 세포 반응을 유도하는 그의 능력에 대하여 시험하는 것에 의하여 웨티드를 제시하는 세포가 검출될 수 있고 그리고 그의 양이 결정될 수 있다.

[0084] 검출되어야 하거나 및/또는 그의 양이 결정되어야 할 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 존재 및/또는 참조 수준과 비교하여, 예를 들면, 종양 질병이 없는 환자와 비교하여 증가된 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 양은 상기 환자에서의 종양 질병의 존재 또는 종양 질병의 위험(즉, 종양 질병의 발달의 잠재성)을 나타낼 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 검출되어야 할 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 존재 및/또는 결정되어야 할 그의 양 및/또는 참조 수준과 비교하여, 예를 들면, 종양 질병이 없는 환자와 비교하여 증가된 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 양은 전이성 난소암 또는 전이성 폐암 등과 같은 전이성 암의 존재 또는 전이성 암의 위험을 나타낼 수 있다.

[0085] 하나의 구체예에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 조직 또는 기관에서 유래된 것이며, 여기에서 세포는, 상기 조

직 또는 기관이 종양이 없는 경우에, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는다. 본 발명의 상기 방법에 의하여 환자에서의 종양 질병의 존재 또는 종양 질병의 위험의 표시는 상기 종양 질병이 상기 조직 또는 기관 내에 존재하는 것 또는 상기 조직 또는 기관이 상기 종양 질병의 위험에 있는 것을 나타낼 수 있다.

[0086] 하나의 구체예에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 조직 또는 기관으로부터 유래되며, 여기에서 세포는, 상기 조직 또는 기관이 종양이 없는 경우에, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는 것이며, 또한 상기 조직 또는 기관은 선택적으로 예를 들면 상기 조직 또는 기관의 시각적 검사 또는 세포의 배양 시험(culture testing)에 의하여 이미 종양 질병에 의해 감염되어 있는 것으로 진단된 것이다. 이러한 구체예에 있어서, 검출되어야 하거나 및/또는 결정되어야 할 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 존재 및/또는 그의 양 및/또는 대조 수준과 비교하여, 예를 들면, 종양 질병이 없는 환자와 비교하여 증가된 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 양은 상기 종양 질병이 전이성 난소암 또는 전이성 폐암임을 나타낼 수 있다. 이러한 시험을 위하여 바람직한 생물학적 샘플들은 이러한 전이성 암에 대하여 감수성인 것으로 알려진 조직을 포함할 수 있다. 이러한 조직들은 본 명세서에서 기술된다.

[0087] 본 발명의 상기 방법에 의한 환자 내에서의 전이성 난소암 또는 전이성 폐암의 존재 또는 위험의 표시는 또한 상기 환자 내에서의 난소암 및 폐암의 존재 또는 위험을 나타낼 수 있다.

[0088] 본 발명의 종양 질병의 진단, 검출 또는 모니터링을 위한 방법은 또한 구체예들을 포함하며, 여기에서 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 검출 또는 그 양의 결정에 의하여 종양 질병의 전이성 거동(metastatic behavior)을 평가 및/또는 예후하는 것이 가능하며, 여기에서, 바람직하게는, 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 존재 및/또는 대조 수준, 예를 들면, 상기 질병이 없거나 또는 상기 질병의 전이가 없는 환자와 비교하여 증가된 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 양은 종양 질병의 전이성 거동 또는 종양 질병의 전이성 거동에 대한 위험을 나타낼 수 있다.

[0089] 하나의 구체예에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 조직 또는 기관으로부터 유래되며, 여기에서 세포는, 상기 조직 또는 기관이 종양이 없는 경우, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 종양 질병은 상기 조직 또는 기관 내에 존재한다.

[0090] 본 발명에 따른 모니터링의 방법은 바람직하게는 시간에 있어서 제1의 지점에서의 제1의 샘플 및 시간에 있어서 제2의 지점에서의 다른 샘플에서의 앞서 언급한 매개변수들 중의 하나 또는 그 이상의 검출 및/또는 그 양의 결정을 포함하며, 여기에서 상기 두 샘플들을 비교하는 것에 의하여 종양 질병의 퇴행, 진전, 경과 및/또는 시작이 결정될 수 있다.

[0091] 환자로부터 보다 이른 시기에 취해진 생물학적 샘플에 비교하여 생물학적 샘플 내에서 감소된 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 양은 퇴행, 궁정적 경과, 예를 들면, 성공적인 치료 또는 상기 환자에서의 종양 질병의 시작에 대한 감소된 위험을 나타낼 수 있다.

[0092] 하나의 구체예에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 조직 또는 기관으로부터 유래되며, 여기에서 세포는, 상기 조직 또는 기관이 종양이 없는 경우, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 종양 질병은 상기 조직 또는 기관 내에 존재한다.

[0093] 환자로부터 보다 이른 시기에 취해진 생물학적 샘플에 비교하여 생물학적 샘플 내에서 증가된 상기 핵산, 상기 웨티드, 상기 항체, 상기 T 세포 및/또는 상기 세포의 양은 진전, 부정적 경과, 예를 들면, 성공적이지 못한 치료, 재발(recurrence) 또는 전이성 거동, 상기 환자에서의 종양 질병의 시작 또는 시작에 대한 위험을 나타낼 수 있다.

[0094] 하나의 구체예에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 조직 또는 기관으로부터 유래되며, 여기에서 세포는, 상기 조직 또는 기관이 종양이 없는 경우, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 종양 질병은 상기 조직 또는 기관 내에 존재한다.

[0095] 특정의 관점에 있어서, 본 발명은 종양 질병의 검출, 즉 그 위치 또는 부위, 예를 들면 특정의 조직 또는 기관을 결정하는 방법에 관한 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 방법은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원에 결합되고 그리고 검출가능한 표지에 짹지워진(coupled) 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 항체는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아

미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 웹티드에 결합한다. 상기 항체는 모노클로날 항체가 될 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체, 인간 항체 또는 인간화된 항체, 항체의 단편 또는 합성 항체이다.

- [0096] 상기 환자 내에서의 조직 또는 기관의 표지화(labelling)는 상기 조직 또는 기관에서의 종양 질병의 존재 또는 그 위험을 나타낼 수 있다.
- [0097] 하나의 구체예에 있어서, 상기 조직 또는 기관은 조직 또는 기관이, 여기에서 세포는, 상기 조직 또는 기관이 종양이 없는 경우, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는다.
- [0098] 하나의 구체예에 있어서, 상기 조직 또는 기관은 조직 또는 기관이며, 여기에서 세포는, 종양이 없는 경우에, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는 것이며, 또한 상기 조직 또는 기관은 상기 조직 또는 기관의 시각적 검사 또는 배양 시험에 의하여 종양 질병에 의해 감염되어 있는 것으로 진단된 것이다. 이 구체예에 있어서, 상기 조직 또는 기관의 표지화는 상기 종양 질병이 전이성 난소암 또는 전이성 폐암임을 나타낼 수 있다.
- [0099] 본 발명의 방법에 의하여 조직 또는 기관 내의 전이성 난소암 또는 전이성 폐암의 존재 또는 그 위험의 표시는 또한 환자 내에서의 난소암 및 폐암의 존재 또는 그 위험을 나타낼 수 있다.
- [0100] 바람직하게는 본 발명의 종양 질병의 진단, 검출 또는 모니터링을 위한 방법에서의 상기 종양 질병은 태반 조직 이외의 조직의 종양 질병이다. 바람직하게는, 상기 조직은 난소, 폐, 유방, 십이지장, 피부, 결장, 간, 럼프절, 위장, 비장, 신장, 식도, 췌장, 자궁내막, 뇌, 쓸개, 방광, 회장, 부신, 직장 및 골격근, 바람직하게는 난소의 조직 또는 폐의 조직이다. 다른 관점에 있어서, 상기 종양 질병은 난소암, 폐암, 전이성 난소암 및 전이성 폐암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- [0101] 앞서 기술한 바와 같이 본 발명의 상기 방법을 사용하는 종양 질병 및/또는 전이성 종양 질병 및/또는 종양 질병의 재발의 긍정적인 진단은 본 명세서에서 기술된 치료의 방법로 처리가 가능한 종양 질병 및/또는 전이성 종양 질병 및/또는 종양 질병의 재발을 나타낼 수 있다.
- [0102] 순환하는 종양 세포(Circulating tumor cells ; CTCs ; 혈중종양세포)들은 극히 낮은 농도들로 상피-파생 암(epithelial-derived cancers)들을 갖는 환자들의 말초 혈액 내에서 관찰되었다. 이들 세포의 수는 샘플을 취하는 시기에서 진행성 질환을 갖는 전이성 암 환자들의 집단(cohorts)에 대한 결과(outcome)와의 상관관계를 나타내었다. 일부 보고서들은 대장암으로 감염된 환자들에서의 순환하는 종양 세포에 대한 예후 역할을 제안하고 있다. 따라서, 순환하는 종양 세포를 측정하는 기기가 가치가 있는 진단 도구(diagnostic tool)가 될 수 있다.
- [0103] 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 핵산 및 종양 항원은 환자에서의 순환하는 종양 세포를 검출하기 위한 방법에서 유용하다. 상기 방법은 전이성 암 또는 초기 단계의 암의 존재를 나타낼 수 있다. 상기 방법의 하나의 관점에 있어서, 시료(specimen) 내에서의 순환하는 종양 세포의 존재는 포유동물 대상체에서의 암의 재발의 발생 가능성(likelihood)을 나타낸다. 상기 방법의 다른 관점에 있어서, 상기 시료 내에서의 순환하는 종양 세포의 존재는 포유동물 대상체에서의 암의 차도 상태(remission status)를 나타낸다.
- [0104] 따라서 본 발명은, 산포되거나 또는 순환하는 종양 세포 또는 전이성 종양세포를 포함하거나 또는 포함하는 것으로 의심되는, 환자로부터 분리한 생물학적 시료 중에서 (i) 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산의 핵산 서열을 포함하는 핵산 / 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 아미노산 서열을 포함하는 웹티드를 코딩하는 핵산 및/또는 (ii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의, 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웹티드의 아미노산 서열을 포함하는 웹티드를 검출 및/또는 그의 양을 결정하는 것을 포함하는 환자에서의 순환하는 종양 세포를 검출하기 위한 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 환자는 종양 질병을 갖고 있거나, 종양 질병을 갖고 있는 것으로 또는 결리는 것(falling ill)으로 의심되거나, 종양 질병의 잠재성을 갖고 있는 환자이다.
- [0105] 따라서, 본 발명의 순환하는 종양 세포를 검출하기 위한 상기 방법에 있어서, 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 이들로부터 유도되는 종양 항원 웹티드가 표적 분자들의 존재에 의해 특징지워지는 세포를 동정하기 위한 표적 분자들로서 사용된다. 이들 세포는 순환하는 종양 세포를 나타내는 것으로 여겨진다.
- [0106] 하나의 구체예에 있어서, 세포, 바람직하게는 종양 세포 내에서 원위치에서 상기 핵산 또는 상기 웹티드가 검출되거나 또는 그 양이 결정된다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 웹티드는 상기 세포의 표면 상에서 원위치에서

원형질막 내에 내포되거나 또는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I과의 복합체에 포함되어 검출되거나 또는 그의 양이 결정된다. 이러한 표적 분자들의 상기 검출 및/또는 그 양의 결정을 수행하기 위한 수단들은 본 명세서에서 기술되었으며, 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 자명한 것일 수 있다.

- [0107] 산포되거나 또는 순환하는 종양 세포 또는 전이성 종양세포를 포함하거나 또는 포함하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플에는, 예를 들면, 혈액, 혈청, 복수, 골수(bone marrow), 객담(sputum), 기관지 흡입액(bronchial aspirate) 및/또는 기관지 세척물(bronchial lavage)들이 포함된다.
- [0108] 상기 방법의 하나의 관점에 있어서, 상기 생물학적 샘플 내의 (i)에 따른 상기 핵산 및/또는 (ii)에 따른 상기 웨티드의 존재 또는 대조 수준에 비하여 증가된 상기 생물학적 샘플 내의 상기 핵산 및/또는 상기 웨티드의 양은 상기 환자에서의 순환하는 종양 세포의 존재를 나타낸다.
- [0109] 상기 방법의 하나의 관점에 있어서, 상기 샘플 내의 순환하는 종양 세포의 존재는 상기 환자 내에서의 종양 질병, 특히 전이성 종양 질병의 존재 또는 그 위험을 나타낼 수 있다. 다른 관점에 있어서, 상기 샘플 내의 순환하는 종양 세포의 존재는 상기 환자 내에서의 초기 단계 종양 질병의 존재 또는 그 위험을 나타낼 수 있다. 또 다른 관점에 있어서, 상기 환자 내에서의 순환하는 종양 세포의 존재는 난소암, 폐암, 전이성 난소암 및 전이성 폐암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 종양 질병의 존재 또는 그 위험을 나타낼 수 있다.
- [0110] 특정의 구체예들에 있어서, 본 발명의 상기 방법은 투여되었거나 또는 투여될 암 요법의 성공을 평가 및/또는 예후하는 것을 가능하게 한다. 상기 방법의 하나의 관점에 있어서, 상기 샘플 내의 상기 순환하는 종양 세포의 존재는 상기 환자 내에서의 암 전이 또는 암 재발의 존재 또는 그 위험을 나타낼 수 있다. 상기 방법의 다른 관점에 있어서, 상기 샘플 내의 상기 순환하는 종양 세포의 존재는 상기 환자 내에서의 암의 차도 상태를 나타낼 수 있다.
- [0111] 본 발명의 순환하는 종양 세포를 검출하기 위한 상기 방법을 사용하는 순환하는 종양 세포의 검출은 본 명세서에서 기술된 치료의 방법에 따라 치료가 가능한 종양 질병 및/또는 종양 질병의 전이 및/또는 종양 질병의 재발을 나타낼 수 있다.
- [0112] 상세한 관점에 있어서, 상기 샘플 내의 상기 순환하는 종양 세포의 존재는 림프종(lymphoma), 골수종(myeloma), 신경아세포종(neuroblastoma), 유방암, 난소암, 폐암, 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 소세포폐암, 원발성 뇌종양(primary brain tumors), 위암, 대장암, 췌장암, 방광암, 고환암, 갑상선암, 신경아세포종, 식도암, 비뇨생식기관암(genitourinary tract cancer), 자궁경부암, 자궁내막암, 부신피질암(adrenal cortical cancer) 또는 전립선암을 포함하나 이들에 제한되지 않는 암의 존재 또는 그 위험을 나타낼 수 있다.
- [0113] 바람직하게는, 순환하는 종양 세포에 대한 이러한 분석은 표적 웨티드에 직접적으로 대향하는 항체들을 사용하여 수행되며, 여기에서 상기 항체들은 검출가능하게 표지된다. 하나의 특정한 구체예에 있어서, 순환하는 종양 세포에 대한 이러한 분석은 표적 웨티드에 직접적으로 대향하는 모노클로날 항체들을 통한 면역형광분석법(immunofluorescence assays)들을 사용하여 수행되며, 바람직하게는 환자들의 말초혈액에 대하여 수행된다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 항체들은 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 웨티드에 결합한다.
- [0114] 혈액 내의 순환하는 종양 세포의 존재는 전이성 종양 질병 또는 전이성 종양 질병의 위험 및 열악한 결과 및 낮은 생존율과 상관될 수 있다.
- [0115] CTC 검출을 위한 현재 획득가능한 가장 신뢰할 만한 방법은 면역세포화학적으로 표지된 종양 세포(immunocytochemically labeled tumor cells)들의 인식을 위한 상분석(image analysis)을 사용하는 자동화된 디지털 현미경(automated digital microscopy ; ADM)이다. 그러나, ADM은 800세포/초의 매우 느린 스캔 속도로 불리하다. 문헌 Kraeft et al, Clin Cancer Res 10: 3020-8, 2004을 참조하시오. 상기 ADM 스캔 속도는 제한된 시야의 장(field of view)으로 인한 많은 횟수의 샘플의 단계적 진전(stepping)과 연관된 잠재기(latency)에 의해 제한된다.
- [0116] 이러한 속도상의 제한을 피하기 위해서는, 스캐닝을 필요로 하는 세포의 총 수를 감소시키기 위한 여러 CTC 풍부화 기술(CTC enrichment technologies)들이 개발되었다. 지금까지 이들 풍부화 접근법들 중 가장 성공적인 것은 면역자기풍부화(immunomagnetic enrichment ; IME)이다. 문헌들 Smirnov et al, Cancer Res 65: 4993-7, 2005; Allard et al, Clin Cancer Res 10: 6897-904, 2004; Cristofanilli et al, N Engl J Med 351: 781-91, 2004들을 참조하시오. IME의 대부분의 실행들에 있어서, 작은 자성 비드(magnetic beads)들에 결합된 모노클로

날 항체들이 상피세포 부착 분자(epithelial cell adhesion molecule ; EpCAM)을 표적으로 한다. 계속해서 상기 비드들은 풍부화를 위하여 자장 내에서 조작된다.

[0117] 본 발명의 또 다른 관점은, 종양을 갖는 환자의 조직 또는 기관으로부터 분리한 생물학적 시료 중에서 (i) 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산의 핵산 서열 / 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 아미노산 서열을 포함하는 웨프티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 핵산 및/또는 (ii) 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 웨프티드를 포함하는 웨프티드의 검출 및/또는 그 양을 결정하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 세포는, 조직 또는 기관들이 종양이 없는 경우, 상기 핵산 또는 웨프티드를 실질적으로 발현하지 않는, 환자에서의 전이성 난소암 세포 또는 전이성 폐암 세포를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0118] 따라서, 전이성 난소암 세포 또는 전이성 폐암 세포를 검출하는 방법에 있어서, 표적 분자들의 존재에 의해 특징지워지는 종양 세포를 동정하기 위하여 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 그로부터 유도되는 종양 항원 웨프티드가 표적 분자들로서 사용된다. 이들 세포는 전이성 난소암 세포 또는 전이성 폐암 세포를 나타내는 것으로 여겨진다. 하나의 구체예에 있어서, 세포, 바람직하게는 종양 세포 내에서 원위치에서 상기 핵산 또는 상기 웨프티드가 검출되거나 또는 그 양이 결정된다.

[0119] 하나의 구체예에 있어서, 상기 웨프티드는 세포의 표면 상에서 원위치에서 원형질막 내에 내포되거나 또는 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I과의 복합체에 포함되어 검출되거나 또는 그의 양이 결정된다. 이러한 표적 분자들의 상기 검출 및/또는 그 양의 결정을 수행하기 위한 수단들은 본 명세서에서 기술되었으며, 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 자명한 것일 수 있다.

[0120] 본 발명에 따르면, 발현의 수준이 태반 세포 또는 태반 조직 내에서의 발현에 비하여 낮은 경우 및/또는 난소 종양 세포 및/또는 폐 종양 세포 또는 난소 종양 조직 및/또는 폐 종양 조직 내에서의 발현에 비하여 낮은 경우, 핵산 및/또는 웨프티드는 실질적으로 발현되지 않는다. 바람직하게는, 상기 발현의 수준은 상기 세포 또는 조직들에 비하여 10% 이하, 바람직하게는 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.05% 또는 심지어 그 이하이다. 바람직하게는, 발현의 수준이 검출 한계 이하인 경우 핵산 및/또는 웨프티드는 실질적으로 발현하지 않는다.

[0121] 바람직하게는, 상기 조직은 태반 조직 이외의 조직이며, 바람직하게는 난소 조직 또는 폐 조직 이외의 조직이다. 바람직하게는, 상기 조직은 유방, 십이지장, 피부, 결장, 간, 럼프절, 위장, 비장, 신장, 식도, 췌장, 자궁내막, 뇌, 쓸개, 방광, 회장, 부신, 직장 및 골격근의 조직이다. 바람직하게는, 이러한 조직은 전이성 난소암 및/또는 전이성 폐암에 대하여 감수성인 것으로 알려진 조직이다. 이러한 조직들은 본 명세서에서 기술된다.

[0122] 바람직하게는, 상기 조직 또는 기관은 상기 조직, 기관의 시각적 검사 또는 배양 시험에 의하여 이미 종양 질병에 의해 감염되어 있는 것으로 진단된 것이다.

[0123] 상기 방법의 하나의 관점에 있어서, 상기 생물학적 샘플 내에서의 (i)에 따른 상기 핵산 및/또는 (ii)에 따른 상기 웨프티드의 존재 또는 대조 수준에 비하여 증가된 상기 생물학적 샘플 내에서의 상기 핵산 및/또는 웨프티드의 양은 상기 조직 또는 기관 내에서의 전이성 난소암 세포 또는 전이성 폐암 세포의 존재 또는 그 위험을 나타낸다. 상기 조직 또는 기관 내에서의 전이성 난소암 세포 또는 전이성 폐암 세포의 존재는 또한 상기 환자 내에서의 난소암 및 폐암의 존재 또는 그 위험을 나타낼 수 있다.

[0124] 전이성 난소암 세포 또는 전이성 폐암 세포의 양성 진단(positive diagnosis)은 그로부터 상기 생물학적 샘플이 분리된 조직 또는 기관의 종양이 본 명세서에서 기술된 치료의 방법으로 처리가 가능하다는 것을 나타낼 수 있다.

[0125] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 진단, 검출 또는 모니터링을 위한 방법에서, 그리고 순환하는 종양 세포를 검출하기 위한 방법에서 및/또는 전이성 난소암 세포 또는 전이성 폐암 세포를 검출하는 방법에서 유용한 진단 시험 키트(diagnostic test kits)들에 관한 것이다. 하나의 구체예에서의 이들 키트들은 앞서 정의된 바와 같이 표적 분자들에 특이적으로 결합하는 리간드 및 선택적으로 검출 가능한 표지, 예를 들면, 인디케이터 효소들, 방사선표지들, 형광단들 또는 상자성 입자들을 포함한다. 특정의 구체예에 있어서, 상기 리간드는 앞서 기술된 바와 같이 표적 핵산에 대하여 특이적인 핵산 프라이머(nucleic acid primers)들 또는 탐침들, 또는 앞서 기술된 바와 같이 표적 웨프티드에 대하여 특이적인 이들의 항체 또는 유도체들을 포함한다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 항체는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 웨프티드에 대해 특이적인 것이다. 키트들은 정보 소책자(informative pamphlets)들, 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 방법을 실행하는 시약들을 어떻게 사용하는 지에 대해 정보를 제공하는 소책자들을 포함할 수 있다.

- [0126] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은 재조합 핵산 분자, 특히 DNA 또는 RNA 분자에 관한 것이며, 이는 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 핵산을 포함한다.
- [0127] 본 발명은 또한 본 발명의 재조합 핵산 분자를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다. 바람직하게는, 이러한 숙주세포는 인코딩된 펩티드를 발현한다.
- [0128] 상기 숙주세포는 재조합 세포가 될 수 있고, 인코딩된 펩티드를 분비할 수 있고, 이를 표면 상에 발현할 수 있고, 그리고 바람직하게는 부가적으로 상기 펩티드 또는 그의 가공 생성물에 결합하는 MHC 분자를 발현할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 숙주세포는 상기 MHC 분자를 내생적으로 발현한다. 다른 구체예에 있어서, 상기 숙주세포는 상기 MHC 분자 및/또는 상기 펩티드 또는 이들의 가공 생성물을 재조합 방법으로 발현한다. 상기 숙주세포는 바람직하게는 비증식성이다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 숙주세포는 항원-제시 세포, 특히 수지상세포, 단핵구 또는 대식세포이다.
- [0129] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 상기 펩티드의 유도체에 관한 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 펩티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.
- [0130] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 상기 펩티드의 유도체에 결합하는 약제에 관한 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 펩티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 약제는 단백질 또는 펩티드, 특히 항체, T 세포 수용체 또는 MHC 분자이다. 또 다른 구체예들에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간 항체 또는 인간화된 항체, 조합 기술(combinatory techniques)들에 의해 생산된 항체, 항체의 단편 또는 합성 항체이다.
- [0131] 본 발명은 또한 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 상기 펩티드의 유도체를 결합하는 본 발명의 약제와 치료학적 효과기 부분 또는 검출가능한 표지 사이의 컨쥬게이트(conjugate)에 관한 것이다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0132] 도 1은 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR)에 의한 정상 조직들과 암에 걸린 조직들 내에서의 CLDN6 발현의 정량화를 나타내는 그래프이다. 태반을 제외하고는 정상 조직들 내에서는 단지 흔적량의 CLDN6 전사물들이 검출될 수 있었다. CLDN6의 높은 발현은 난소암(선암) 및 폐암(선암)들로부터의 샘플들 내에서 발견되었다.
- 도 2는 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 사용하는 정상 조직들 내에서의 CLDN6 발현의 정량화를 나타내는 그래프이다. 각 정상 조직 형태에 대하여 3 개체들로부터의 조직들이 시험되었다. 40회(cycles)의 역전사 중합효소 연쇄반응 이후 정상 조직들 내에서 단지 흔적량의 CLDN6 전사물들이 검출될 수 있었다. 발현 컷오프(expression cutoff ; 과선, 모든 정상 조직들의 평균 발현 + 3 STDs (99% 백분위수(percentile)))를 약간 초과하는 유일한 정상 조직은 태반이었다. 에러바(error bars)들, STD.
- 도 3a 내지 도 3h들은 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 사용하는 암에 걸린 조직들과 세포주들 내에서의 CLDN6 발현의 정량화를 나타내는 그래프들이다. 정상 조직들과는 대조적으로, 본 발명자들은 난소암(선암), 폐암(비-소세포폐암종, 선암에서의 가장 높은 빈도 및 발현 수준들과 함께), 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암(기저세포암종 및 편평세포암종), 악성 흑색종, 두경부암(악성 다형선종), 육종(활막육종과 암육종), 담관암, 신세포암(투명세포신세포암종과 유두암종), 자궁암, 방광암(유두암종) 및 암세포주들 A2780(난소암), NIH-OVCAR3(난소암), HCT-116(대장암), EFO-27(난소암), CPC-N(SCLC), NCI-H552(NSCLC), SNU-1(위암), KATOIII(위암), YAPC(췌장암), AGS(위암), FU97(위암), MKN7(위암) 들로부터의 샘플들에서 CLDN6의 높은 발현을 발견하였다. 암에 걸린 조직들 및 세포주들 내에서의 CLDN6 발현 빈도를 과대평가하지 않기 위하여, 단지 정상 조직 발현 컷오프의 적어도 10배 이상의 전사를 수준들만을 양성으로 분류하였다(과선).
- 도 4는 정상 조직들 내에서의 CLDN6 발현의 웨스턴 블러팅 분석을 나타내는 도면이다. 5개까지의 개체들로부터의 조직 용해물들을 각 정상 조직 형태에 대하여 시험하였다. 분석된 정상 조직들의 어느 것에서도 CLDN6 단백

질 발현이 검출되지 않았다. NIH-OVCAR3, 양성 대조.

도 5는 암에 걸린 조직들 내에서의 CLDN6 발현의 웨스턴 블릿 분석을 나타내는 도면이다. 정상 조직들과는 대조적으로, 난소암 및 폐암으로부터의 샘플들에서 CLDN6 단백질의 높은 발현이 검출되었다. NIH-OVCAR3, 양성 대조.

도 6은 암세포주들 내에서의 CLDN6 발현의 웨스턴 블릿 분석을 나타내는 도면이다. CLDN6 발현 플라스미드로 감염시킨 HEK293세포(양성 대조), NIH-OVCAR3(난소암), MKN7(위암), AGS(위암), CPC-N(SCLC), HCT-116(대장암), FU97(위암), NEC8(고환태생성암), JAR(태반융모상피암), JEG3(태반융모상피암), BEWO (태반융모상피암) 및 PA-1(난소기형암종)들 내에서 CLDN6 발현이 검출되었다.

도 7은 정상 세포 내에서의 CLDN6 발현의 면역조직화학(Immunohistochemical ; IHC) 분석을 나타내는 도면이다. 분석된 조직들의 어느 것에서도 CLDN6 단백질 발현이 검출되지 않았다. 췌장, 십이지장 및 신장 내에서 보여지는 검은 표식(dark marks)들은 세포 구조들과는 연관이 없는 염료 침전물(dye precipitates)들을 나타낸다.

도 8a 내지 도 8h들은 암에 걸린 조직들 내에서의 CLDN6 발현의 면역조직화학 분석을 나타내는 도면들이다. 정상 조직들과는 대조적으로, (a) 난소암, (b) 폐암, (c) 피부암, (d) 췌장암, 위암, (e) 유방암, 방광암(이행상 피암), (f) 자궁경부암, 고환암(정상피종), (g) 자궁암, 소장암 및 (h) 고환암(태생성암 및 기형종)들로부터의 조직 영역(tissue sections)들 상에서 강하거나 또는 적어도 분명한 염색(staining)이 관측되었다. 염색은 명백하게 악성의 상피세포 분포(malignant epithelial cell populations)들의 원형질막에서 강조된 반면에, 인접하는 기질의 및 비-악성의 상피세포는 음성이었다. 이들 결과들은 CLDN6 단백질이 악성의 세포의 원형질막에 국부화(localized) 되었다는 것을 나타낸다.

도 9는 암세포 내에서의 CLDN6 발현의 유세포분석(Flowcytometric analysis)을 나타내는 도면이다. CLDN6의 세포외 영역(extracellular domain of CLDN6 ; αCLDN6)을 표적하는 통상의 모노클로날 항체를 사용하여 천연의 세포를 염색시켰다. 대조로서 CLDN6 발현 플라스미드로 감염된 HEK293 세포 및 감염되지 않은 HEK293 세포를 사용하였다. 감염되지 않은 대조 세포의 표지화는 관측되지 않았으나, 그러나 CLDN6 감염 대조 세포 내에서 그리고 내생적으로 CLDN6를 발현하는 AGS(위암), NIH-OVCAR3(난소암), HCT-116(대장암) 및 CPC-N(SCLC) 암세포에서 강한 표지화가 관측되었다. 이들 결과들은 명백하게 CLDN6가 암세포의 원형질막에서 국부화되고 그리고 세포외 단백질 영역(extracellular protein domain)에 대하여 직접적으로 모노클로날 항체들에 의하여 표적화될 수 있다는 것을 보여주고 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0133] 본 발명의 일부 관점들은 이하에서 요약될 수 있는 능동 또는 수동 면역요법적 접근법의 수단에 의하여 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 및 종양 항원을 활용하는 종양 질병, 특히 암 질병의 면역요법을 구체화한다:
- [0134] 면역요법
- [0135] I. 능동 면역요법("암백신")
- [0136] i) 항원 또는 웨프티드(천연의 또는 변성된)
- [0137] ii) 상기 항원 또는 웨프티드를 인코딩하는 핵산
- [0138] iii) 상기 항원 또는 웨프티드를 인코딩하는 재조합 세포
- [0139] iv) 상기 항원 또는 웨프티드를 인코딩하는 재조합 바이러스들
- [0140] v) 항원 또는 웨프티드(천연의 또는 변성된)로 펄스(pulsed)되거나 또는 상기 항원 또는 웨프티드를 인코딩하는 핵산로 감염된 항원 제시 세포
- [0142] II. 수동 면역요법("입양면역요법(adoptive immunotherapy)")
- [0143] vi) 항원을 인식하는 항체 또는 T 세포 수용체의 전달
- [0144] vii) 인 비트로 감작화된 세포의 항원으로의 전달(별크상태 또는 클론화 집단
- [0145] viii) 항원을 인식하고 그리고 바람직하게는 종양-특이적 클래스 I MHC 제시 웨프티드에 대해 반응성인 T 세포 수

용체를 인코딩하는 핵산으로 감염된 효과기 세포(또는 줄기 세포)의 전달

[0146] 로의 면역화.

[0147] 지난 수년간, 종양 면역(tumor immunity)에서의 CD8+ T 세포의 역할에 대하여 많은 주목을 끌었다. 종양-특이적 CD8+ CTLs는 종양 세포를 직접적으로 용해시키고 그리고 동물 모델들 내에서의 생체 내에서 종양 덩어리를 근절할 수 있는 것으로 나타났다. 그러나, CD4+ T 세포 또한 중요한 역할을 수행하는 것으로 여겨지며, 최적의 암 백신이 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다의 참여를 요구하게 될 것이다.

[0148] 온전하거나 또는 실질적으로 온전한 종양 항원으로의 면역화는 클래스 I 및 클래스 II 애피토프들 둘 다에 대한 동시적 면역화의 잠재적 잇점을 갖기는 하나, 종양 항원을 대량으로 정제하기 위해서는 과도한 그리고 시간-소모적인 노력들을 요구한다. 종양 항원 내의 MHC 클래스 I 및 클래스 II 펩티드의 동정은 순수한 합성 펩티드의 높은 수준들로의 면역화를 가능하게 한다. 상기 펩티드 접근법은 또한 사용에 대하여 어느 애피토프들을 선택하느냐에 의하여 MHC 클래스 I 및 클래스 II 반응(또는 혼합물) 사이에서 선택을 할 수 있다는 잇점을 갖는다. 펩티드로의 면역화는 또한 T 세포의 서로 다른 서브세트(subset)를 자극하기 위하여 덜우월하거나(subdominant) 및/또는 모호한(cryptic) 애피토프들이 선택(항원 가공에 대한 필요가 "다듬기(trimming)" 역할을 우회하거나 또는 감소시킬 수 있는 것과 같이)될 수 있다는 것을 의미한다. 또한 상기 펩티드는 그의 면역원성(immunogenicity)을 증가시키도록 변성(예를 들면 그들의 HLA 클래스 I 또는 II 앵커 부위들(anchor sites)에서)될 수 있다.

[0149] 본 발명은 종양-특이적 클래스 I MHC 제시 펩티드 및 이들을 사용하는 방법, 그리고 종양-특이적 클래스 I MHC 제시 펩티드에 반응성인 세포독성 T 림프구(CTLs) 및 이들을 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0150] 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 클래스 I MHC로 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 제시에 의하여 특징지워지는 종양에 대한 세포 반응을 자극할 수 있는 항-종양 백신을 제공한다. 본 발명의 상기 항-종양 백신은 바람직하게는 종양 항원 펩티드 또는 종양 항원 펩티드 핵산을 포함한다.

[0151] 본 발명은 또한 본 발명에 따라 동정된 하나 또는 그 이상의 상기 종양 항원 또는 이들로부터 유도되는 하나 또는 그 이상의 종양 항원 펩티드를 인코딩하는 핵산의 용도를 포함한다. 이렇게 인코딩된 상기 항원 또는 펩티드가 치료적 또는 예방적 항-종양 백신로서 유효하다는 것 또한 예상된다. 예를 들면, 이들 핵산의 특정하게 고려되는 응용은 이러한 항원에 대한 CTL 반응 및/또는 체액성 면역 반응 등과 같은 세포 반응의 유도를 포함한다.

[0152] 플라스미드 DNA로의 면역화는 CD8+ T 세포, CD4+ T 세포 및 항체들로 이루어지는 항원-특이적 면역 반응을 유도할 수 있다. DNA는 면역화의 유전자 총 면역화 방법(gene gun method of immunization)에 의해 투여될 수 있다. 유전자 총 면역화에 있어서, 플라스미드 DNA는 금입자들 상에 코팅될 수 있으며, 후속하여 고압의, 헬륨-구동 유전자 총(helium-driven gene gun)에 의해 피부 내로 DNA-코팅된 입자들이 전달될 수 있다.

[0153] 분자 생물학에서의 발전은 본 명세서에서 기술된 바와 같은 종양 항원 또는 종양 항원 펩티드를 인코딩하는 재조합 바이러스들을 구축하는 것을 가능하게 하였다. 지금까지 여러 재조합 바이러스 백신이 사용되었다.

[0154] 여러 바이러스 백터들이 악성 질병의 면역요법을 강화시키는 그들의 잠재성과 관련하여 유망한 결과들을 나타내었다. 복제가능 및 복제불가능 바이러스(replication competent and replication incompetent viruses)들이 사용될 수 있으며, 후자의 그룹이 선호된다. 헤르페스 바이러스(herpes virus), 아데노바이러스(adenovirus), 백시니아(vaccinia), 레오바이러스(reovirus) 및 뉴캐슬병 바이러스(New Castle Disease viruses)들이 본 발명에 따라 유용한 선호되는 바이러스들의 예들이다.

[0155] 수지상세포(DC) 등과 같은 항원 제시 세포(APC)가 MHC 클래스 I-제시 펩티드 또는 종양 용해물(tumor lysate)에 적하(loaded)되거나 또는 종양 항원을 인코딩하는 아데노바이러스를 이용하는 감염에 의하는 것과 같이 핵산으로 감염될 수 있다.

[0156] 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 항-종양 백신은 종양 항원 펩티드가 적하된 APC를 포함한다. 이러한 관점에 있어서, 프로토콜(protocol)들은 수지상세포가 인공적으로 종양 항원 펩티드를 제시하는 방법으로 조작된 수지상세포(DC)들의 인 비트로 배양/분화(*in vitro* culture/differentiation)에 기초할 수 있다. 유전적으로 가공된 수지상세포의 생산은 종양 항원 또는 종양 항원 펩티드를 인코딩하는 핵산의 수지상세포 내로의 도입을 포함할 수 있다. mRNA로의 수지상세포의 형질감염(transfection)은 강한 항종양 면역력(antitumor immunity)의 유망한 항원-적하 기술(antigen-loading technique)이다.

[0157]

수지상세포(DC)들은 주변 조직(peripheral tissues)를 내에 포획된 항원을 MHC 클래스 II 및 I 항원 제시 경로(MHC class II and I antigen presentation pathways)를 둘 다를 경유하여 T 세포에로 제시하는 백혈구 분포(leukocyte populations)들이다. 수지상세포가 면역 반응의 잠재적인 유도물질(inducers)이고 그리고 이들 세포의 활성화가 항종양 면역의 유도에 대하여 절대적인 단계라는 것은 잘 알려져 있다. 수지상세포 성숙(maturation)은 이러한 항원-제시 수지상세포가 T-세포 원자극(T-cell priming)을 유도하는 수지상세포 활성의 상태를 의미하는 반면에, 미성숙 수지상세포에 의한 그의 제시는 내성(tolerance)의 결과를 가져온다. 수지상세포 성숙은 주로 선천적인 수용체(박테리아의 DNA, 바이러스의 DNA, 내독소(endotoxin) 등), 친-염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)(종양괴사인자(TNF), 인터류킨-1(IL-1), 인터페론들(IFNs)), CD40L에 의한 CD40의 수지상세포 표면 상에의 연결 및 스트레스가 많은 세포 사멸(stressful cell death)을 겪고 있는 세포로부터 방출된 물질들에 의해 검출되는 미생물 특성들을 갖는 생체분자에 의해 주로 야기된다. 상기 수지상세포는 시험관 내에서 과립대식세포집락자극인자수용체(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; GM-CSF) 및 알파-종양괴사인자(tumor necrosis factor alpha) 등과 같은 사이토카인들과 함께 골수세포를 배양하는 것에 의해 유도될 수 있다.

[0158]

본 발명의 또 다른 구체예는 항체들, 바람직하게는 앞서 정의한 바와 같은 표적 항원에 대한 모노클로날 항체들의 제조를 포함한다. 이러한 모노클로날 항체들은 통상의 방법에 의하여 생산될 수 있으며, 인간 모노클로날 항체들, 인간화된 모노클로날 항체들, 키메라 모노클로날 항체들, 단일쇄 항체들(single chain antibodies) 예를 들면 scFv's 및 Fab나Fab' 단편들 등과 같은 항원-결합 항체 단편들 등을 포함하여 이들의 단편들 또는 유도체들이 포함될 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 모노클로날 항체들의 제조를 위한 방법은 당해 기술분야에서는 공지되어 있다. 일반적으로, 모노클로날 항체들의 제조는 적절한 숙주(host)의 대상체 항원로의 면역화, 그들로부터의 면역 세포의 단리, 모노클로날 항체들을 단리하기 위한 이러한 면역 세포의 사용 및 이러한 항원에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체들의 스크리닝(screening)을 포함한다. 항체 단편들은 공지의 방법, 예를 들면 모노클로날 항체들의 효소적 개열(enzymatic cleavage)에 의해 제조될 수 있다.

[0159]

이들 모노클로날 항체들 및 단편들은 수동 항-종양 면역요법에 유용하거나 또는 치료학적 효과기 부분, 예를 들면, 방사선표지들, 세포독소, 치료효소, 자연세포사멸을 유도하는 약제 등에 부착되어 표적화된 세포독성시험(cytotoxicity), 즉 종양 세포를 사멸시키도록 할 수 있다. 본 발명의 하나의 구체예에 있어서, 이러한 항체 또는 단편들은 표지되거나 표지되지 않은 형태로, 단독으로 또는 다른 치료제(therapeutics), 예를 들면, 시스플라틴(cisplatin), 메토트렉세이트(methotrexate), 아드리아마이신(adriamycin) 등 암 요법에 적절한 화학요법제들(chemotherapeutic)과 함께 투여된다.

[0160]

수동 항-종양 면역요법을 위하여 사용되는 경우, 항체들은 치료학적 효과기 부분에 부착되거나 또는 부착되지 않을 수 있다. 바람직하게는 본 명세서에서 기술된 상기 항체는 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity ; CDC) 매개 세포 용해, 항체 의존성 세포상 세포독성(antibody dependent cellular cytotoxicity ; ADCC) 매개 세포 용해, 자연세포사멸, 동형 부착(homotypic adhesion) 및/또는 식세포작용(phagocytosis)을 유도하는 것에 의한, 바람직하게는 CDC 매개 세포 용해 및/또는 ADCC 매개 세포 용해를 유도하는 것에 의한 세포의 사멸을 매개한다. 본 명세서에서 기술된 상기 항체는 바람직하게는 ADCC 또는 CDC를 통하여 면역 체계의 구성요소들과 상호작용한다. 그러나, 본 발명의 항체는 또한 단순히 세포 표면 상에서 종양 항원에 결합하고, 그에 따라, 예를 들면, 상기 세포의 증식을 차단하는 것에 의하여 효과를 발휘할 수 있다.

[0161]

ADCC는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 효과기 세포, 특히 림프구들의 세포-사멸 능력(cell-killing ability)을 기술하고 있으며, 이는 바람직하게는 항체에 의해 표지되는 표적 세포를 필요로 한다.

[0162]

ADCC는 바람직하게는 항체들이 종양 세포 상의 항원에 결합하고 그리고 면역 효과기 세포의 표면 상에서 항체 Fc 도메인(Fc domains)들이 Fc 수용체(Fc receptors ; FcR)과 연계(engage)되는 경우에 일어난다. Fc 수용체의 여러 족(families)들이 동정되었으며, 또한 특정의 세포 집단들이 특징적으로 제한된 Fc 수용체를 발현한다. ADCC는 항원 제공과 종양-지향 T-세포 반응들의 유도를 야기하는 즉각적 종양 파괴(immediate tumor destruction)의 가변도(variable degree)를 직접적으로 유도하는 메카니즘으로 보여질 수 있다. 바람직하게는, ADCC의 생체 내 유도는 종양-지향 T-세포 반응들 및 숙주-유도 항체 반응(host-derived antibody responses)들을 야기할 수 있다.

[0163]

CDC는 또 다른 항체들에 의해 지향될 수 있는 세포-사멸법(cell-killing method)이다. 면역글로불린 M(IgM)은 보체 활성화(complement activation)을 위한 가장 효과적인 아이소타입(isotype)이다. 면역글로불린 1(IgG1) 및 면역글로불린 3(IgG3)들은 또한 전통적인 보체-활성화 경로를 통하여 CDC로의 지향에서 둘 다 매우 유효하다.

바람직하게는, 이러한 캐스케이드(cascade)에 있어서, 항원-항체 복합체들의 형성은 면역글로불린 분자 등과 같은 참여 항체 분자들의 C<sub>h</sub>2 도메인들 상의 매우 가까운 다중의 C1q 결합부위(multiple C1q binding sites)들의 탈은폐(uncloaking)의 결과를 가져온다(C1q는 보체 C1의 3가지의 하위성분(subcomponents)들 중의 하나이다). 바람직하게는 이들 탈은폐된 C1q 결합부위들은 앞서의 낮은-친화성(low-affinity)의 C1q-IgG 상호작용을 높은 접착력(high avidity)으로 전환시키고, 이는 일련의 다른 보체 단백질을 포함하는 사건들의 캐스케이드를 촉발시키고 그리고 효과기-세포 화학주성/활성화 약제(effectuator-cell chemotactic/activating agents) C3a 및 C5a의 단백질 가수분해성 방출(proteolytic release)을 야기한다. 바람직하게는 상기 보체 캐스케이드는 막 공격복합체(membrane attack complex)의 형성이라는 결과로 끝나고, 이는 세포막 내에 세포 내외로의 물과 용질들의 자유로운 통과를 용이하게 하고 그리고 자연세포사멸을 야기할 수 있는 구멍들을 생성한다.

[0164] 종양 항원을 인식할 수 있는 면역 세포(선택적으로 유전적으로 변성된)들로의 수동 면역요법은 선택된 환자들에서의 암의 퇴행을 매개하는 데 효과가 있다. 이들 기술들은 종양 반응성 T 세포의 복제 또는 다클론성 배양물(polyclonal cultures)의 생체-외 부활(ex-vivo reactivation) 및 확장에 기초할 수 있다. 배양 후, T 세포는 인터류킨-2(IL-2)와 함께 환자 내로 재주입될 수 있다. 시험관 내 기술들이 개발되었으며, 여기에서 인간 림프구들이 항원 제시 세포에 대하여 제공된 종양 항원 펩티드에 인 비트로 감작화되었다. 반복적인 시험관 내 자극에 의하여 세포는 큰 용량으로 인간 종양 항원을 인식하도록 유도될 수 있다. 이들 세포의 입양 전이(adoptive transfer)는 생체 내에서 종양 퇴행을 매개함에 있어서 통상적으로 성장된 세포에 비하여 보다 더 효과적일 수 있다.

[0165] 하나의 구체예에 있어서, 자가 세포독성 림프구(autologous cytotoxic lymphocytes)들 또는 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocytes)들이 암을 앓고 있는 환자로부터 수득될 수 있다. 상기 림프구들은 배양물 내에서 성장될 수 있으며 또한 종양 항원-반응성 CTL들이 MHC 클래스 I으로 제시된 종양 항원 펩티드, 단독으로 또는 적어도 하나의 면역조절제의 존재 중에서, 바람직하게는 부가적으로 사이토카인들과 함께, 배양에 의해 확장될 수 있다. 계속해서 상기 종양 항원-반응성 CTL들은 환자에서 상기 종양을 감소시키거나 또는 제거하기에 충분한 양으로 상기 환자 내로 다시 주입된다.

[0166] 현존하는 반응이 불충분한 경우에, 환자들은 림프구 수확에 앞서 항-종양 펩티드 백신으로 사전-자극(pre-stimulated)될 수 있다. 입양 전이된 CTL들이 낮은 투여량 내지 중간 투여량(intermediate doses)들에서 인터류킨-2(IL-2)와 함께 가장 잘 생존할 수 있다는 것이 기대되고 있다.

[0167] "종양 항원-반응성 CTL"에 대하여는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드에 대해 반응성인 CD8+ T 세포를 의미하며, 이는, 예를 들면, 종양 세포의 표면 상에서 클래스 I MHC로 제시된다.

[0168] 본 발명에 따르면, CTL 반응성(responsiveness)은 지속된 칼슘 유동(calciun flux), 세포 분화, 감마-인터페론(IFN-gamma) 및 알파-종양괴사인자 등과 같은 사이토카인들의 생성, CD44 및 CD69 등과 같은 활성화 표지(activation markers)들의 상향조절(upregulation) 및 종양 항원 발현 표적 세포의 특이적인 세포용해적 사멸(cytolytic killing)들을 포함한다. CTL 반응성은 또한 CTL 반응성을 정확하게 나타내는 인공 리포터(artificial reporter)를 사용하여 결정될 수 있다.

[0169] "종양 항원 펩티드" 또는 "종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드"는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편 또는 펩티드의 아미노산 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 포함하는 올리고펩티드(oligopeptide) 또는 폴리펩티드(polypeptide)를 의미한다. 바람직하게는, 종양 항원 펩티드는 본 명세서에서 클래스 I MHC로 동정된 종양 항원, 바람직하게는 종양 항원-반응성 CTL의 제시에 의하여 특징지워지는 종양에 대한 세포 반응을 자극하거나 및/또는 그 자체로서 또는 면역원성 운반자에 부착되어 사용되는 경우에 본 발명에 따라 동정된 종양 항원에 특이적으로 결합하는 항체들을 유도할 수 있는 것이다. 본 발명에 따른 종양 항원 펩티드는 바람직하게는 서열 목록의 서열 확인 번호 2에 따른 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 단편에 실질적으로 대응하는 서열을 포함하는 펩티드이거나 또는 상기 펩티드의 유도체이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 펩티드는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다. 종양 항원 펩티드는 임의의 길이가 될 수 있다.

[0170] 종양 항원 펩티드가 직접적으로, 즉 가공 없이, 특히 개열 없이 제공되는 경우, 이는 MHC 분자, 특히 클래스 I MHC 분자에 결합하기에 적절한 길이를 가지며, 바람직하게는 길이에 있어서 7 내지 20개의 아미노산들이며, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 7 내지 12개의 아미노산들이며, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 8 내지 11개, 특히 길이에 있어서 9 또는 10개의 아미노산들이다. 바람직하게는, 직접적으로 제시될 수 있는 종양 항원 펩티

드의 상기 서열은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 아미노산 서열로부터 유도된 것, 즉 그의 서열이 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하고 그리고 바람직하게는 완전히 동일한 것이다. 종양 항원 펩티드가 가공 후에, 특히 개열 후에 제시되는 경우, 가공에 의해 생성된 상기 펩티드는 MHC 분자, 특히 클래스 I MHC 분자에 결합하기에 적절한 길이를 가지며, 바람직하게는 길이에 있어서 7 내지 20개의 아미노산들이며, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 7 내지 12개의 아미노산들이며, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 8 내지 11개, 특히 길이에 있어서 9 또는 10개의 아미노산들이다. 바람직하게는, 가공 후에 제시되는 상기 펩티드의 상기 서열은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 아미노산 서열로부터 유도된 것, 즉 그의 서열이 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하고 그리고 바람직하게는 완전히 동일한 것이다. 따라서, 하나의 구체예에 있어서 본 발명에 따른 종양 항원 펩티드는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하고 그리고 바람직하게는 완전히 동일한 길이에 있어서 7 내지 20개의 아미노산들, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 7 내지 12개의 아미노산들, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 8 내지 11개의 아미노산들, 특히 길이에 있어서 9 또는 10개의 아미노산들의 서열을 포함하며, 상기 종양 항원 펩티드의 후속하는 가공은 상기 제시된 펩티드를 구성한다. 그러나, 상기 종양 항원 펩티드는 또한 앞서 언급한 서열 보다 짧아 더 길이가 긴 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편에 실질적으로 대응하고 그리고 바람직하게는 완전히 동일한 서열을 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 종양 항원 펩티드는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 전체 서열을 포함할 수 있다.

[0171]

바람직하게는, 종양 항원 펩티드가 직접적으로 또는 가공 후에 클래스 I MHC 분자들로 제시될 수 있으며, 이렇게 제시되는 경우에는 종양 항원-반응성 CTL을 자극할 수 있다. 상기 클래스 I MHC에 의해 제시되는 펩티드의 서열에 실질적으로 대응하는 아미노산 서열을 갖는 펩티드는 상기 클래스 I MHC에 의해 제시되는 바와 같은 상기 펩티드의 TCR 인식을 위하여 또는 펩티드의 MHC에로의 결합을 위하여 필수적이지 않은 하나 또는 그 이상의 잔기들에서 다를 수 있다. 이러한 실질적으로 대응하는 펩티드는 또한 종양 항원-반응성 CTL을 자극할 수 있다. TCR 인식에는 영향을 주지 않으나 MHC에의 결합의 안정성을 강화시키는 잔기들에서 제공된 펩티드와는 차별되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드는 상기 종양 항원 펩티드의 면역원성을 개선시킬 수 있으며, 본 명세서에서는 "최적화된 펩티드(optimized peptides)들"로 언급될 수 있다. 이를 잔기들 중의 어느 것이 보다 더 상기 MHC 또는 상기 TCR들 중의 어느 것에의 결합에 영향을 더 줄 것인지에 대한 현준하는 지식을 사용하여, 실질적으로 대응하는 펩티드의 설계하기 위한 합리적인 접근법이 사용될 수 있다. 그 결과의 기능성인 펩티드는 종양 항원 펩티드로 고려된다.

[0172]

"면역반응 세포(immunoreactive cell)"에 대하여는 적절한 자극에 의하여 면역 세포(B 세포, 헬퍼 T 세포(helper T cell) 또는 CTL 등과 같은)로 성숙될 수 있는 세포를 의미한다. 따라서, 면역반응 세포는 CD34+ 조혈모세포(hematopoietic stem cells)들, 미성숙의 T 세포 및 미성숙의 B 세포를 포함한다. 종양 항원을 인식하는 CTL들을 생산하기를 희망하는 경우, 상기 면역반응 세포가 생산, 분화 및/또는 CTL들의 선택에 유리한 조건들 하에서 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 또는 종양 항원 펩티드를 제시하는 세포와 접촉된다.

[0173]

"클래스 I MHC로의 종양 항원의 제시에 의해 특징지워지는 세포" 또는 "클래스 I MHC를 갖는 종양 항원을 제시하는 세포" 또는 유사한 표현들에 대하여는, 예를 들면, MHC 클래스 I 분자들의 문맥 내에서 종양 항원의 가공에 의하여 종양 세포 또는 이것이 발현하는 상기 종양 항원을 제시하는 항원 제시 세포 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 단편 등과 같은 세포를 의미한다. 유사하게, 용어 "클래스 I MHC로의 종양 항원의 제시에 의해 특징지워지는 종양"은 클래스 I MHC로의 종양 항원의 제시에 의하여 특징지워지는 세포를 포함하는 종양을 의미한다.

[0174]

"제시된 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 단편" 또는 유사한 표현들에 대하여는 직접적으로 항원 제시 세포에 첨가되는 경우에 MHC 클래스 I 또는 클래스 II, 바람직하게는 MHC 클래스 I에 의해 제시될 수 있는 단편을 의미한다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 단편은 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 발현하는 세포, 예를 들면, 종양 세포에 의해 천연적으로 제시되는 단편이다.

[0175]

"종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식하는 세포" 또는 "종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식하는 면역반응 세포" 또는 유사한 표현들에 대하여는 어느 정도의 특이성으로, 특히 항원 제시 세포 또는 종양 세포의 표면 상에서 등과 같이 MHC 분자와의 문맥 내에서 제공되는 경우에, 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식할 수 있는 세포를 의미한다. 바람직하게는, 상기 인식은 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식하는 상기 세포가 반응성이 되도록 하는 것을 가능하게 한다. 상기 세포가 MHC 클래스 II 분자들의 문맥 내에서 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식하는 수용체를 갖는 헬

퍼 T 세포(CD4+ T 세포)인 경우, 그러한 반응성은 사이토카인들의 방출 및/또는 CD8+ 림프구(CTLs)들 및/또는 B 세포의 활성화를 포함할 수 있다. 상기 세포가 CTL인 경우, 그러한 반응성은, 예를 들면, 자연세포사멸 또는 퍼포린-매개 세포 용해를 경유하여 MHC 클래스 I 분자들의 문맥 내에서 제공되는 세포, 즉 클래스 I MHC를 갖는 종양 항원의 제시에 의하여 특징지워지는 세포의 제거를 포함할 수 있다. 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식하고 그리고 반응성인 이러한 CTL은 또한 본 명세서에서 "종양 항원-반응성 CTL"로 정의된다. 상기 세포가 이러한 면역 B 세포인 경우, 이러한 반응성은 면역글로불린들의 방출을 포함할 수 있다.

[0176] "종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식하는 T 세포 수용체"에 대하여는 어느 정도의 특이성으로, 특히 MHC 분자들의 문맥 내에서 제시되는 경우에, 상기 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식할 수 있는 T 세포 수용체를 의미한다. 바람직하게는, 상기 인식은 종양 항원 또는 상기 종양 항원으로부터 유도되는 종양 항원 펩티드를 인식하는 상기 T 세포 수용체가 앞서 개괄한 바와 같이 반응성이 되도록 하는 것을 가능하게 한다.

[0177] "종양 항원에 대한 세포 반응"은 클래스 I 또는 클래스 II MHC를 갖는 종양 항원의 제시에 의하여 특징지워지는 세포에 관련된 세포 반응을 포함하는 것을 의미한다. 상기 세포 반응은 '헬퍼(helper)' 또는 '킬러(killer)'로 작용하는 T 세포 또는 T 림프구들로 불리우는 세포에 관련된다. 헬퍼 T 세포(또한 CD4+ T 세포로도 정의됨)은 상기 면역 반응을 제어(regulating)하는 것에 의하여 중요한 역할을 수행하며, 킬러 세포(또한 세포독성 T 세포, 세포용해 T 세포(cytolytic T cells)들, CD8+ T 세포 또는 CTL들로도 정의됨)은 종양 세포를 사멸시켜 보다 많은 종양 세포의 생성을 방지한다. 비록 면역 반응의 두 팔(arms)들이 필요한 것으로 여겨지나, 상기 CTL 반응은 암을 제어하는 데 보다 중요할 수 있다.

[0178] 본 발명에 따르면, 대조 샘플 또는 대조 유기체(organism) 등과 같은 "대조"는 실험 샘플 또는 실험 유기체, 즉 환자들로부터 본 발명의 방법에 따라 얻은 결과들과 서로 연관시키고 그리고 비교하는 데에 사용될 수 있다. 전형적으로 대조 유기체는 건강한 유기체, 특히 암 질병으로 고생하지 않는 유기체이다.

[0179] "대조값" 또는 "대조 수준"은 충분히 많은 수의 대조들을 측정하는 것에 의하여 경험적으로 결정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 대조값은 적어도 2, 바람직하게는 적어도 3, 바람직하게는 적어도 5, 바람직하게는 적어도 8, 바람직하게는 적어도 12, 바람직하게는 적어도 20, 바람직하게는 적어도 30, 바람직하게는 적어도 50 또는 바람직하게는 적어도 100개의 대조들을 측정하는 것에 의하여 결정된다.

[0180] 본 발명에 따르면, 용어 "결합(binding)"은 바람직하게는 특이적인 결합에 관한 것이다. "특이적인 결합"은 항체 등과 같은 약제가 다른 표적에 결합하는 것에 비하여 특이적인 에피토프 등과 같은 표적에 더 강하게 결합하는 것을 의미한다. 약제가 제2 표적에 대한 해리상수(dissociation constant) 보다 낮은 해리상수( $K_D$ )로 제1 표적에 결합하는 경우, 약제는 제2 표적에 비하여 제1 표적에 더 강하게 결합한다. 바람직하게는, 상기 약제가 특이적으로 결합하는 상기 표적에 대한 상기 해리상수( $K_D$ )는 상기 약제가 특이적으로 결합하지 않는 상기 표적에 대한 해리상수( $K_D$ ) 보다  $10^2$ -배,  $10^3$ -배,  $10^4$ -배,  $10^5$ -배,  $10^6$ -배,  $10^7$ -배,  $10^8$ -배,  $10^9$ -배 또는  $10^{10}$ -배 이상 더 낮다.

[0181] 본 발명에 따르면, 핵산은 바람직하게는 디옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)이다. 본 발명에 따른 핵산은 게놈 DNA, cDNA, mRNA, 재조합적으로 생산되고 화학적으로 합성된 분자들을 포함한다. 본 발명에 따르면, 핵산은 단일 스트랜드 또는 이중 스트랜드 및 선형 또는 공유적으로 원형으로 폐쇄된 분자(covalently circularly closed molecule)로서 존재할 수 있다.

[0182] 용어 "본 발명에 따라 동정된 종양 핵산"과 "본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 인코딩하는 핵산"들은 유사한 의미들을 갖는다.

[0183] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, 상기 용어 "RNA"는 적어도 하나의 리보뉴클레오티드 잔기를 포함하는 분자를 의미한다. "리보뉴클레오티드"에 대하여는 베타-D-리보-푸라노스 부분(beta-D-ribo-furanose moiety)의 2'-위치에서 히드록실기를 갖는 뉴클레오티드를 의미한다. 상기 용어는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드들의 첨가(addition), 결실(deletion), 치환(substitution) 및/또는 변형(alteration)에 의하여 자연적으로 발생하는 RNA와는 다른 변경된 RNA뿐만 아니라 이중 스트랜드 RNA, 단일 스트랜드 RNA, 부분적으로 정제된 RNA 등과 같은 단리된 RNA(isolated RNA), 본질적으로 순수한(pure) RNA, 합성 RNA, 재조합적으로 생산된 RNA를 포함한다. 이러한 변형들은 RNA의 말단(들) 또는 내부에 등과 같은, 예를 들면, 상기 RNA의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오

티드들에 비-뉴클레오티드 물질(non-nucleotide material)을 첨가하는 것을 포함할 수 있다. RNA 분자들 내의 뉴클레오티드들은 또한 비-천연적으로 발생하는 뉴클레오티드들 또는 화학적으로 합성된 뉴클레오티드들 또는 디옥시뉴클레오티드들 등과 같은 비-표준의 뉴클레오티드(non-standard nucleotides)들을 포함할 수 있다. 이들 변형된 RNA들은 유사체(analogs)들 또는 천연적으로 발생하는 RNA의 유사체들로 언급될 수 있다.

[0184] 핵산의 검출 또는 그 양의 결정에 대하여 본 명세서에서 참조가 이루어져 있는 경우, 실제로 검출되어야 하거나 또는 그 양이 실제로 결정되어야 하는 상기 핵산은 바람직하게는 mRNA이다. 그러나, 이는 또한 간접적으로 mRNA가 검출되거나 또는 mRNA의 양이 결정되는 구체예들을 포함할 수 있음을 이해되어야 한다. 예를 들면, mRNA는 cDNA로 변형될 수 있으며, 상기 cDNA가 검출되거나 또는 그의 양이 결정될 수 있다. 본 명세서에서는 mRNA는 상기 cDNA 등가물(equivalent)로 주어진다. 당해 기술분야에서 숙련된 자는 상기 cDNA 서열이 상기 mRNA 서열에 등가인 것을 이해할 수 있으며, 본 명세서에서는 동일한 목적, 예를 들면, 검출되어야 할 상기 핵산을 혼성화시키는 탐침들의 생산을 위하여 사용될 수 있다. 따라서, 상기 서열 목록 내에 나타난 상기 서열에 대하여 참조가 이루어진 경우, 이는 또한 상기 서열의 상기 RNA 등가물들을 포함하는 것이다.

[0185] 본 발명에 따라 기술된 상기 핵산은 바람직하게는 단리된 것이다. 용어 "단리된 핵산"은 상기 핵산이 (i) 예를 들면, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의하여 시험관 내(in vitro)에서 증폭되거나, (ii) 복제(cloning)에 의하여 재조합적으로 생산되거나, (iii) 예를 들면, 개열 및 겔-전기영동 분획(gel-electrophoretic fractionation)에 의하여 정제되거나 또는 (iv) 예를 들면, 화학 합성에 의하여 합성된 것을 의미한다. 단리된 핵산은 재조합 DNA 기술들에 의한 조작을 위하여 획득가능한 핵산이다.

[0186] 예를 들면, 핵산 및 아미노산 서열에 대한 본 발명에 따른 용어 "변이체(variant)"는 임의의 변이체, 특히 돌연변이, 스플라이스 변이체(splice variants), 입체 배열(conformations), 아이소폼(isoforms), 대립유전자 변이체(allelic variants), 종의 변이체(species variants) 및 종의 상동체(species homologs), 특히 천연적으로 존재하는 것들을 포함한다. 대립유전자 변이체는 유전자의 정상 서열 내에서의 변형에 관한 것이며, 그 유의성(significance)은 종종 명백하지 않다. 완전한 유전자 염기서열 결정법(gene sequencing)은 종종 주어진 유전자에 대한 다수의 대립유전자 변이체를 동정한다. 종의 상동체는 그로부터 주어진 핵산 또는 아미노산 서열이 유래되는 다른 종들의 원천을 갖는 핵산 또는 아미노산 서열이다.

[0187] 핵산 분자들에 대하여는, 상기 용어 "변이체"는 축퇴 핵산 서열(degenerate nucleic acids)들을 포함하며, 여기에서 본 발명에 따른 축퇴 핵산은 유전자 코드(genetic code)의 축퇴(degeneracy)로 인하여 코돈 서열(codon sequence) 내에서의 대조 핵산(reference nucleic acid)과는 다른 핵산이다.

[0188] 더욱이, 본 발명에 따른 특정의 핵산 서열의 "변이체"는 적어도 2개, 적어도 4개 또는 적어도 6개, 그리고 바람직하게는 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 10개 이하, 15개 이하 또는 20개 이하 등과 같은 단일 또는 다중의 뉴클레오티드 치환, 결실 및/또는 첨가를 포함하는 핵산 서열을 포함한다.

[0189] 바람직하게는, 주어진 핵산 서열과 상기 주어진 핵산 서열의 변이체인 핵산 서열 사이의 동일성의 정도(degree of identity)는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 심지어 보다 바람직하게는 적어도 90% 또는 가장 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 될 수 있다. 상기 동일성의 정도는 바람직하게는 적어도 약 30개, 적어도 약 50개, 적어도 약 70개, 적어도 약 90개, 적어도 약 100개, 적어도 약 150개, 적어도 약 200개, 적어도 약 250개, 적어도 약 300개 또는 적어도 약 400개의 뉴클레오티드들의 영역에 대하여 주어진다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 동일성의 정도는 상기 대조 핵산 서열의 전체 길이에 대하여 주어진다.

[0190] "서열 유사성(sequence similarity)"은 동일하거나 또는 보존적 아미노산 치환(conservative amino acid substitutions)을 나타내는 아미노산들의 백분율을 나타낸다. 2개의 폴리펩티드 또는 핵산 서열 사이에서의 서열 동일성은 상기 서열 사이에서 동일한 아미노산 또는 뉴클레오티드의 백분율을 나타낸다.

[0191] "동일성 백분율(percentage identity)"라는 용어는 가장 잘 정렬된 이후 수득된, 비교되어야 할 2개의 서열 사이에서 동일한 뉴클레오티드들 또는 아미노산 잔기들의 백분율을 나타내는 것으로 의도되며, 이 백분율은 순전히 통계적인 것이고 그리고 상기 2개의 서열 사이의 차이들은 무작위적으로 그리고 그 전체 길이에 걸쳐 분포된다. 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 서열 비교들은 통상적으로 이들을 적절하게 정렬시킨 이후 이들 서열을 비교하는 것에 의해 수행되며, 상기 비교는 서열 유사성의 국부적인 영역(local regions)들을 동정하고 그리고 비교하기 위하여 단편에 의하여 또는 "비교의 창(window of comparison)"에 의하여 수행된다. 비교를 위한 상기 서열의 적절한 정렬은 수작업을 제외하고도 문헌 Smith and Waterman, 1981, Ads App. Math.

2, 482의 국부적 상동 알고리즘(local homology algorithm)의 수단들에 의하여, 문헌 Neddeleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443의 국부적 상동 알고리즘의 수단들에 의하여, 문헌 Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444의 유사성 조사 방법(similarity search method)의 수단들에 의하여, 또는 이를 알고리즘들을 사용하는 컴퓨터 프로그램들의 수단들(미합중국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재 제네티кс 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group) 위스콘신 제네티克斯 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package) 내의 GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 및 TFASTA)에 의하여 이루어질 수 있다.

[0192] 동일성 백분율은 비교되는 2개의 서열 사이의 동일한 위치들의 수를 결정하고, 이 수를 비교된 위치들의 수로 나누고, 그리고 그 수득된 결과를 100으로 곱하는 것으로 계산되어 이를 두 서열 사이의 동일성 백분율을 수득하도록 한다.

[0193] 2개의 서열이 서로에 대하여 상보적인 경우, 하나의 핵산은 다른 하나의 핵산에 대하여 "혼성화할 수 있는" 또는 "혼성화하는" 것이다. 2개의 서열이 다른 하나에 대하여 안정한 듀플렉스(duplex)를 형성할 수 있는 것들인 경우, 하나의 핵산은 다른 핵산에 대하여 "상보적"이다. 본 발명에 따르면, 혼성화는 바람직하게는 폴리뉴클레오티드들 사이에서 특이적인 혼성화를 허용하는 조건(가혹 조건) 하에서 수행된다. 가혹 조건은, 예를 들면, 문헌 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Editors, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 또는 문헌 Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Editors, John Wiley & Sons, Inc., New York에서 기술되었으며, 예를 들면, 혼성화 완충제(hybridization buffer ; 3.5 x SSC, 0.02% 피콜(Ficoll), 0.02% 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 0.02% 소 혈청 알부민, 2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7), 0.5% SDS, 2mM EDTA) 내에서 65°C에서의 혼성화를 의미한다. SSC는 0.15M 염화나트륨//0.15 M 시트르산나트륨, pH 7이다. 혼성화 이후, 예를 들면 그에 상기 DNA가 전달된 막을 실온에서 2 X SSC로, 계속해서 68°C 이하의 온도에서 0.1 내지 0.5 X SSC/0.1 X SDS로 세척하였다.

[0194] 상보성 백분율(percent complementarity)은 제2의 핵산 서열과 수소결합들(예를 들면, 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick base pairing))을 형성할 수 있는 핵산 분자 내의 인접하는 잔기들의 백분율을 나타낸다(예를 들면, 10개 중의 5, 6, 7, 8, 9, 10개들은 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 100% 상보적임). "완전하게 상보적"이나 또는 "충분히 상보적"은 핵산 서열의 모든 인접하는 잔기들이 제2의 핵산 서열 내의 인접하는 잔기들의 동일한 수와 수소결합 할 수 있다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 상보성의 정도는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 심지어 보다 바람직하게는 적어도 90% 또는 가장 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 상보성의 정도는 100%이다.

[0195] 용어 "유도체"는 뉴클레오티드의 염기, 당 또는 인산 상에서의 핵산의 임의의 화학적 유도체화를 포함한다. 용어 "유도체"는 또한 천연적으로 발생하는 것이 아닌 뉴클레오티드들 및 뉴클레오티드 유사체들을 포함하는 핵산을 포함한다. 바람직하게는, 핵산의 유도체화는 그의 안정성을 증가시킨다.

[0196] 본 발명에 따르면, 종양 항원 또는 종양 항원 웨티드를 코딩하는 핵산이 단독으로 또는 다른 핵산, 바람직하게는 이종 기원(heterologous)의 핵산과 함께 존재할 수 있다. 바람직하게는, 종양 항원 또는 종양 항원 웨티드를 코딩하는 핵산은 상기 종양 항원 또는 종양 항원 웨티드를 발현한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 핵산은 상기 핵산에 대해 동종 기원(homologous) 또는 이종 기원일 수 있는 발현 제어 서열(expression control sequences)들 또는 조절 서열(regulatory sequences)들에 기능적으로 연결된다. 코딩 서열(coding sequence) 및 조절 서열은, 만일 이들이 다른 하나에 상기 코딩 서열의 발현 또는 전사가 상기 조절 서열의 제어 하에 또는 영향 하에 있는 것과 같은 방법으로 공유적으로 연결되는 경우, "기능적으로" 연결되었다고 한다. 상기 코딩 서열이 기능 단백질(functional protein)로 번역되고, 계속해서 조절 서열이 기능적으로 상기 코딩 서열에 연결되는 경우, 상기 조절 서열의 유도는 상기 코딩 서열 내에서의 프레임 쉬프트(frame shift)를 야기함이 없이 또는 상기 코딩 서열이 원하는 단백질 또는 웨티드로 번역되는 것을 불가능하게 함 없이 상기 코딩 서열을 전사하는 결과를 가져온다.

[0197] 용어 "발현 제어 서열(expression control sequence)" 또는 "조절 서열(regulatory sequence)"는 프로모터(promoters)들, 인핸서(enhancers)들 및 유전자의 발현을 조절하는 다른 조절 인자(control elements)들을 포함한다. 본 발명의 특정의 구체예들에 있어서, 발현 제어 서열은 조절될 수 있다. 조절 서열의 정확한 구조는 종들의 기능 또는 세포 유형(cell type)에 따라 다양하게 변할 수 있으나, 그러나 대체로 TATA 박스(TATA box),

캡형성 서열(capping sequence), CAAT 서열 등과 같이 개별적으로 전사 및 번역의 개시에 관여하는 5' 미전사된(untranscribed) 그리고 5' 미번역된(untranslated) 서열을 포함한다. 보다 구체적으로는, 5' 미전사된 조절서열은 기능적으로 연결된 유전자의 전사 제어(transcriptional control)를 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역(promoter region)을 포함한다. 조절 서열은 또한 인핸서 서열 또는 상류 활성화기 서열(upstream activator sequences)들을 포함할 수 있다.

[0198] 본 발명에 따르면, 핵산은 더욱 숙주 세포로부터의 상기 핵산에 의해 인코딩된 상기 단백질 또는 웨티드의 분비(secrcretion)를 제어하는 웨티드를 코딩하는 다른 핵산과 함께 제공될 수 있다. 본 발명에 따르면, 핵산은 또한 상기 인코딩된 단백질 또는 웨티드가 상기 숙주 세포의 세포막 상에 고착(anchored)되도록 하거나 또는 상기 세포의 특정의 세포소기관(organelles)들 내로 구분되도록 하는 것을 야기하는 웨티드를 코딩하는 다른 핵산과 함께 제공될 수 있다. 유사하게, 리포터 유전자(reporter gene) 또는 임의의 "태그(tag)"를 나타내는 핵산과의 조합이 가능하다.

[0199] 바람직한 구체예에 있어서, 재조합 핵산 분자는, 본 발명에 따르면, 적절한 경우에는 프로모터를 갖는 벡터이며, 이는 핵산, 예를 들면, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 코딩하는 핵산의 발현을 제어한다. 용어 "벡터"는 본 명세서에서는 그의 가장 일반적인 의미로 사용되며, 상기 핵산을, 예를 들면, 원핵 및/또는 진핵 세포 내로 도입되도록 하고, 적절한 경우에는, 게놈(genome) 내로 통합되도록 하는 것을 가능하게 하는 핵산에 대한 임의의 매개 비히클(intermediary vehicle)을 포함한다. 이러한 종류의 벡터들은 바람직하게는 세포 내에서 복제되거나 및/또는 발현된다. 매개 비히클은, 예를 들면, 전기천공(electroporation), 미세입자들로의 투사(bombardment with microprojectiles), 리포좀 투여(liposomal administration), 아그로박테리아(agrobacteria)의 도움에 의한 전달 또는 DNA 또는 RNA 바이러스들을 통한 삽입(insertion)에서의 사용에 적합화되도록 할 수 있다. 벡터들에는 플라스미드들, 파지플라스미드 복합체(phagemids)들, 박테리오파지(bacteriophages)들 또는 바이러스 게놈들이 포함된다.

[0200] 본 발명에 따라 동정된 종양 항원을 코딩하는 상기 핵산은 숙주 세포의 형질감염(transfection)에 사용될 수 있다. 여기에서 핵산은 재조합 DNA 및 RNA 둘 다를 의미한다. 재조합 RNA는 DNA 주형(DNA template)의 시험관내 전사(in-vitro transcription)에 의해 제조될 수 있다. 더욱이, 이는 적용에 앞서 서열의 안정화, 캡형성(capping) 및 폴리아데닐화(polyadenylation)에 의하여 변형될 수 있다.

[0201] 본 발명에 따르면, 용어 "숙주 세포"는 외인성 핵산(exogenous nucleic acid)로 형질전환(transformed) 또는 형질감염될 수 있는 임의의 세포와 관련된 것이다. 용어 "숙주 세포"은, 본 발명에 따르면, 원핵 세포(예를 들면, 대장균(*E. coli*) 또는 진핵 세포(예를 들면, 수지상세포, B 세포, CHO 세포(중국 햄스터 난소 세포), COS 세포(아프리카초록색원숭이 신장유래 배양세포주 CV-1 세포), K 562 세포(자연살해세포의 암세포), 효모 세포(yeast cells) 및 곤충 세포(insect cells)을 포함한다. 인간, 마우스(mice), 햄스터(hamsters), 돼지(pigs), 염소(goats), 영장류(primates)들로부터의 세포 등과 같은 포유동물 세포가 특히 선호된다. 상기 세포는 다양한 조직 형태들로부터 유래될 수 있으며, 일차 세포(primary cells) 및 세포주(cell lines)들을 포함한다. 특정의 예들에는 각질세포(keratinocytes)들, 말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocytes)들, 골수의 줄기세포(stem cells of the bone marrow)들 및 배아 줄기세포(embryonic stem cells)들이 포함된다. 다른 구체예들에 있어서, 상기 숙주 세포는 항원-제시 세포, 특히 수지상세포, 단핵구 또는 대식세포이다. 핵산은 상기 숙주 세포 내에 단일 복제본(single copy) 또는 2 또는 그 이상의 복제본들의 형태로 존재할 수 있으며, 하나의 구체예에 있어서, 상기 숙주 세포 내에서 발현된다.

[0202] 본 발명에 따르면, "발현"은 그의 가장 일반적인 의미로 사용되며, RNA 또는 RNA와 단백질의 생산을 포함한다. 이는 또한 핵산의 부분적인 발현을 포함한다. 더욱이, 발현은 일시적으로 또는 지속적으로 수행될 수 있다. 포유동물 세포에서의 바람직한 발현 시스템들에는 pcDNA3.1, pcDNA3.3 및 pRc/CMV(미합중국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠사(Invitrogen))들이 포함되며, 이들은 G418에 대한 내성을 부여하는 유전자 등과 같은 선별 가능한 마커를 포함하고(그에 따라, 안정적으로 형질감염된 세포주가 선별되도록 하는 것을 가능하게 함), 거대세포 바이러스(cytomegalovirus ; CMV)의 인핸서-프로모터 서열을 포함한다.

[0203] MHC 분자가 종양 항원 또는 종양 항원 웨티드를 제시하는 본 발명의 그러한 경우들에 있어서, 발현 벡터는 또한 상기 MHC 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 MHC 분자를 코딩하는 상기 핵산 서열은 상기 종양 항원 또는 상기 종양 항원 웨티드를 코딩하는 상기 핵산으로서 동일한 발현 벡터 상에 존재할 수 있거나, 또는 두 핵산이 서로 다른 발현 벡터들 상에 존재할 수 있다. 후자의 경우에 있어서, 상기 두 발현 벡터들은 하나의 세포 내로 공형질감염(cotransfected) 될 수 있다. 숙주 세포가 상기 종양 항원이나 상기 종양 항원 웨티

드 또는 상기 MHC 분자 둘 다를 발현하지 않는 경우, 그들을 코딩하는 두 핵산은 동일한 발현 벡터 상 또는 서로 다른 발현 벡터들 상 중의 어느 하나에서 상기 세포 내로 형질감염될 수 있다. 상기 세포가 이미 상기 MHC 분자를 발현하고 있는 경우, 단지 상기 종양 항원 또는 상기 종양 항원 웹티드를 코딩하는 상기 핵산 서열이 상기 세포 내로 형질감염될 수 있다.

[0204] "안티센스 분자(antisense molecules)" 또는 "안티센스 핵산"은 핵산의 발현의 조절, 특히 감소를 위하여 사용될 수 있다. 용어 "안티센스 분자" 또는 "안티센스 핵산"은, 본 발명에 따르면, 올리고리보뉴클레오티드(oligonucleotide), 올리고디옥시리보뉴클레오티드(oligodeoxyribonucleotide), 변성된 올리고리보뉴클레오티드 또는 변성된 올리고디옥시리보뉴클레오티드이고, 그리고 생리적인 조건들 하에서 특정의 유전자를 포함하는 DNA 또는 상기 유전자의 mRNA에 혼성화하고, 그에 의하여 상기 유전자의 전사 및/또는 상기 mRNA의 번역을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 본 발명에 따르면, "안티센스 분자"는 또한 그의 천연의 프로모터에 대하여 역방향(reverse orientation)인 핵산 또는 그의 일부를 포함하는 구조물(construct)을 포함한다. 핵산 또는 그의 일부분의 안티센스 전사물은 천연적으로 발생하는 mRNA와 듀플렉스를 형성하고, 그에 의하여 상기 mRNA의 축적 또는 번역을 방지할 수 있다. 또 다른 가능성은 핵산의 불활성화를 위한 리보자임(ribozymes)들의 용도이다.

[0205] 바람직한 구체예들에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 번역 개시 부위, 전사 개시 부위 또는 프로모터 부위 등과 같은 N-말단 또는 5' 상류 부위(5' upstream site)와 혼성화한다. 다른 구체예들에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 3' 미번역 영역(3' untranslated region) 또는 mRNA 스플라이싱 부위(mRNA splicing site)와 혼성화한다.

[0206] 하나의 구체예에 있어서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합(phosphodiester bond)에 의해 하나의 뉴클레오티드의 5' 말단과 다른 하나의 뉴클레오티드의 3' 말단이 서로 연결되어 있는 리보뉴클레오티드, 디옥시리보뉴클레오티드 또는 이들의 조합으로 이루어진다. 이를 올리고뉴클레오티드들은 통상적인 방법으로 합성되거나 또는 재조합적으로 생산될 수 있다.

[0207] 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 "변형된" 올리고뉴클레오티드이다. 여기에서, 상기 올리고뉴클레오티드는, 표적에 결합하는 능력을 손상시키지 않으면서, 예를 들면, 안정성 또는 치료 효과를 증진시키기 위하여 매우 다양한 방법으로 변형될 수 있다. 본 발명에 따르면, 용어 "변형된" 올리고뉴클레오티드는 (i) 적어도 그의 2개의 뉴클레오티드가 합성 뉴클레오시드(nucleoside) 결합(즉, 포스포디에스테르 결합이 아닌 뉴클레오시드간 결합)에 의하여 서로 연결되어 있거나, 및/또는 (ii) 핵산에서 일반적으로 발견되지 않는 화학 작용기(chemical group)가 올리고뉴클레오티드에 공유적으로 연결되어 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 바람직한 합성 뉴클레오시드 결합들은 포스포로티오에이트(phosphorothioates), 알킬포스포네이트(alkyl phosphonates), 포스포로디티오에이트(phosphorodithioates), 포스페이트에스테르(phosphate esters), 알킬포스포노티오에이트(alkyl phosphonothioates), 포스포르아미데이트(phosphoramides), 카바메이트(carbamates), 카르보네이트(carbonates), 포스페이트트리에스테르(phosphate triesters), 아세트아미데이트(acetamides), 카르복시메틸에스테르 및 웹티드이다.

[0208] 용어 "변형된 올리고뉴클레오티드"는 또한 공유적으로 변형된 염기 및/또는 당을 갖는 올리고뉴클레오티드들을 포함한다. 예를 들면, "변형된 올리고뉴클레오티드"는 3' 위치의 히드록시기 및 5' 위치의 포스페이트기 이외의 저분자량 유기기(organic groups)들에 공유적으로 결합하는 당 잔기(sugar residues)들을 갖는 올리고뉴클레오티드들을 포함한다. 예를 들면, 변형된 올리고뉴클레오티드들은 2'-0-알킬화 리보오스 잔기 또는 리보오스 대신 아라비노스 등과 같은 다른 당을 포함할 수 있다.

[0209] 올리고뉴클레오티드들에 대한 앞서 기술된 모든 구체예들은 또한 폴리뉴클레오티드들에 적용될 수 있음을 이해되어야 한다.

[0210] 본 명세서에서 사용되는 "짧은 간섭 RNA(small interfering RNA)" 또는 "siRNA"은 분해되어야 하는 표적 유전자 또는 mRNA를 동정하는 데 사용되는, 바람직하게는 길이에 있어서 10개 이상의 뉴클레오티드들, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 15개 이상, 가장 바람직하게는 길이에 있어서 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드들의 단리된 RNA 분자를 의미한다. 19 내지 25개의 뉴클레오티드들의 범위가 siRNA들로서 가장 바람직하다.

[0211] 본 발명에 따른 siRNA는 부분 정제된 RNA, 실질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA 또는 재조합적으로 생산된 RNA와 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드들의 첨가, 결실, 치환 및/또는 변경에 의하여 천연적으로 발생하는 RNA로부터

터 달라진 변형된 RNA들을 포함할 수 있다. 이러한 변형들은 상기 siRNA의 상기 말단(들) 또는 상기 siRNA 내의 하나 또는 그 이상의 내부 뉴클레오티드들 등에로의 비-뉴클레오티드 물질의 첨가; siRNA가 뉴클레아제 소화(nuclease digestion)에 저항하도록 만드는 변형들(예를 들면, 상기 2'-치환된 리보뉴클레오티드(2'-substituted ribonucleotides)들의 사용 또는 당-인산 골격(sugar-phosphate backbone)에의 변형들); 또는 상기 siRNA 내의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드들의 디옥시리보뉴클레오티드로의 치환을 포함할 수 있다. 더욱이, siRNA는 변형된 올리고뉴클레오티드들에 대하여 기술한 바와 같이, 특히 하나 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 연결들을 도입하는 것에 의하여 그의 안정성이 증가하도록 변형될 수 있다.

[0212]

상기 siRNA의 하나 또는 두 스트랜드들은 또한 3'-오버행(3'-overhang)을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "3'-오버행"은 RNA 스트랜드의 3' 말단으로부터 연장되는 적어도 하나의 쌍을 이루지 않는(unpaired) 뉴클레오티드를 의미한다. 따라서, 하나의 구체예에 있어서, 상기 siRNA는 길이에 있어서 1 내지 약 6개의 뉴클레오티드(리보뉴클레오티드들 또는 디옥시리보뉴클레오티드들을 포함), 바람직하게는 길이에 있어서 1 내지 약 5개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 1 내지 약 4개의 뉴클레오티드 및 특히 바람직하게는 길이에 있어서 약 2 내지 약 4개의 뉴클레오티드들 중의 적어도 하나의 3'-오버행을 포함한다. 상기 siRNA 분자의 두 스트랜드들이 하나의 3'-오버행을 포함하는 구체예에 있어서, 상기 오버행들의 길이는 각 스트랜드에 대하여 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 가장 바람직한 구체예에 있어서, 상기 3'-오버행은 상기 siRNA의 두 스트랜드들 상에 존재하고, 그리고 길이에 있어서 2개의 뉴클레오티드들이다. 예를 들면, 본 발명의 상기 siRNA의 각 스트랜드는 디디옥시티미딜산(dideoxythymidyllic acid ; "TT") 또는 디우리딜산(diuridylic acid ; "uu")의 3'-오버행을 포함할 수 있다.

[0213]

상기 siRNA의 안정성을 향상시키기 위하여, 상기 3'-오버행들도 역시 분해에 대하여 안정해질 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 오버행들은 아데노신(adenosine) 또는 구아노신(guanosine) 뉴클레오티드들 등과 같은 퓨린 뉴클레오티드(purine nucleotides)들을 포함하는 것에 의하여 안정화된다. 달리, 변형된 유사체들에 의한 피리미딘 뉴클레오티드들의 치환, 예를 들면, 상기 3'-오버행들 내의 우리딘 뉴클레오티드들의 2'-디옥시티미딘으로의 치환이 용인되며, RNAi 분해의 효율에 영향을 미치지 않는다. 특히, 2'-디옥시티미딘 내의 2'-히드록실의 부재는 조직 배양 배지 내에서의 상기 3'-오버행의 뉴클레아제 저항성을 뚜렷하게 증가시킨다.

[0214]

상기 siRNA의 상기 센스 및 안티센스 스트랜드는 2개의 상보적 단일-스트랜드 RNA 분자를 포함하거나 또는 2개의 상보적 부분이 염기쌍이고 그리고 단일-스트랜드 "헤어핀(hairpin)" 영역에 의하여 공유적으로 연결되는 단일의 분자를 포함할 수 있다. 즉, 상기 센스 부위와 안티센스 부위는 링커 분자(linker molecule)를 통하여 공유적으로 연결될 수 있다. 상기 링커 분자는 폴리뉴클레오티드 또는 비-뉴클레오티드 링커가 될 수 있다. 임의의 이론에 의하여 구속되는 것을 원치 않으나, siRNA 분자의 상기 후자의 형태의 상기 헤어핀 영역은 "다이서(Dicer)" 단백질(또는 그의 상당물)에 의하여 세포내적으로 개열되어 2개의 개별적인 염기-쌍을 이루는 RNA 분자들로 이루어지는 siRNA를 형성한다.

[0215]

본 명세서에서 사용된 바와 같은 "표적 mRNA"는 하향조절(downregulation)에 대하여 표적인 RNA 분자를 의미한다.

[0216]

첫번째로 전사된 뉴클레오티드가 퓨린인 경우, pol III 프로모터로부터의 RNA들의 발현이 단지 효율적인 것으로 여겨지는 것과 같이, siRNA는 표적 부위(targeting site)에서의 변화 없이 pol III 발현 벡터들로부터 발현될 수 있다.

[0217]

본 발명에 따른 siRNA는 임의의 표적 mRNA 서열("표적 서열") 내의 대략 19 내지 25개의 인접하는 뉴클레오티드들의 임의의 스트레치(stretch)에 표적화될 수 있다. siRNA에 대한 표적 서열을 선별하기 위한 기술들은, 예를 들면, 문헌 토마스 투쉴(Tuschl T.)과 그의 동료들의 "The siRNA User Guide", revised Oct. 11, 2002에 주어져 있으며, 그의 전체 상세한 설명이 본 명세서에서 참조로 인용된다. 상기 문헌 "The siRNA User Guide"은 미합중국 뉴욕 소재 록펠러 대학(Rockefeller University)의 RNA 분자 생물학 연구실(Laboratory of RNA Molecular Biology)의 토마스 투쉴 박사에 의해 유지되는 월드와이드웹(world wide web) 상의 웹사이트에서 획득가능하며, 상기 록펠러 대학의 웹사이트에 접근하고 그리고 키워드 "siRNA"로 검색하는 것에 의하여 찾을 수 있다. 따라서, 혼존 siRNA의 센스 스트랜드는 상기 표적 mRNA 내의 약 19개 내지 약 25개의 뉴클레오티드들의 임의의 인접하는 스트레치와 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0218]

일반적으로, 상기 표적 mRNA 상의 표적 서열은 바람직하게는 개시 코돈(start codon)으로부터 50 내지 100 nt 하향흐름(즉, 3'-방향 내)에서 개시하는, 상기 표적 mRNA에 대응하는 주어진 cDNA 서열로부터 선택될 수 있다. 그러나, 상기 표적 서열은 5'- 또는 3'-미번역 영역들 내 또는 상기 개시 코돈 근처의 영역 내에 위치될 수 있

다.

- [0219] siRNA는 당해 기술분야에서 숙련된 자들에게는 알려진 다수의 기술들을 사용하여 수득될 수 있다. 예를 들면, siRNA는 화학적으로 합성되거나 또는 투철의 미합중국 공개특허 공보 제2002/0086356호에서 기술된 드로소필라인비트로 시스템(Drosophila in vitro system) 등과 같은 당해 기술분야에서 공지된 방법을 사용하여 재조합적으로 생산될 수 있으며, 그의 전체 상세한 설명이 본 명세서에서 참조로 인용된다.
- [0220] 바람직하게는, siRNA는 적절하게 보호된 리보뉴클레오시드(ribonucleoside) 포스포르아미다이트(phosphoramidites)를 및 통상의 DNA/RNA 합성기(DNA/RNA synthesizer)를 이용하여 화학적으로 합성된다. siRNA는 2개의 별개의 상보적 RNA 분자들로, 또는 2개의 상보적인 영역들을 갖는 단일의 RNA 분자로서 합성될 수 있다.
- [0221] 달리, siRNA는 또한 임의의 적절한 프로모터를 이용하여 재조합 원형 또는 선형 DNA 플라스미드들로부터 발현될 수도 있다. siRNA의 투여 또는 siRNA의 약제학적 조성을 내로의 내포(incorporation)에 대한 참조가 본 명세서에서 이루어지는 경우, 본 발명에 따른 이러한 구체예들이 포함된다. 플라스미드로부터의 본 발명의 siRNA를 발현시키기 위한 적절한 프로모터들은, 예를 들면, U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 사이토메갈로바이러스 프로모터를 포함한다.
- [0222] 다른 적절한 프로모터들의 선별은 당해 기술 분야의 기술 내에 존재한다. 본 발명의 재조합 플라스미드들 또한 특정 조직 내에서 또는 특정 세포 내의 환경에서 siRNA의 발현을 유도할 수 있거나 또는 조절할 수 있는 프로모터들을 포함할 수 있다.
- [0223] 재조합 플라스미드들로부터 발현된 상기 siRNA는 표준 기술들에 의하여 배양된 세포 발현 시스템(cultured cell expression systems)들로부터 단리되거나 또는 세포 내적으로 발현될 수 있다. 생체 내에서 siRNA를 세포로 전달하기 위한 재조합 플라스미드들의 사용이 이하에서 상술된다. siRNA는 2개의 분리된, 상보적 RNA 분자들로서 또는 2개의 상보적 영역들을 갖는 단일의 RNA 분자로서 재조합 플라스미드로부터 발현될 수 있다.
- [0224] siRNA를 발현하는 데 적절한 플라스미드들의 선별, 상기 siRNA의 상기 플라스미드 내로의 발현을 위한 핵산 서열을 삽입하는 방법 및 상기 재조합 플라스미드의 대상의 세포내로 전달하는 방법은 당해 기술 분야의 기술 내에 존재한다.
- [0225] siRNA는 또한 생체 내에서 세포 내적으로 재조합 바이러스 벡터들로부터 발현될 수 있다. 상기 재조합 바이러스 벡터들은 상기 siRNA를 인코딩하는 서열 및 상기 siRNA 서열을 발현하기 위한 임의의 적절한 프로모터를 포함한다. 상기 재조합 바이러스 벡터들은 또한 특정 조직 내에서 또는 특정 세포 내의 환경에서 siRNA의 발현을 유도할 수 있거나 또는 조절할 수 있는 프로모터들을 포함할 수 있다. siRNA는 2개의 분리된, 상보적 RNA 분자들로서 또는 2개의 상보적 영역들을 갖는 단일의 RNA 분자로서 재조합 플라스미드로부터 발현될 수 있다.
- [0226] 용어 "펩티드"는 라는 용어는 올리고- 및 폴리펩티드를 포함하고, 펩티드 결합들에 의하여 공유적으로 연결된 2개 또는 그 이상, 바람직하게는 3개 또는 그 이상, 바람직하게는 4개 또는 그 이상, 바람직하게는 6개 또는 그 이상, 바람직하게는 8개 또는 그 이상, 바람직하게는 10개 또는 그 이상, 바람직하게는 13개 또는 그 이상, 바람직하게는 16개 또는 그 이상, 바람직하게는 21개 또는 이상 및 바람직하게는 8개 이하, 10개 이하, 20개 이하, 30개 이하, 40개 이하 또는 50개 이하, 특히 100개 이하의 아미노산들을 포함하는 물질들을 의미한다. 용어 "단백질"은 크기가 큰 펩티드, 바람직하게는 100개 이상의 아미노산 잔기들을 갖는 펩티드를 의미하나, 그러나, 대체로 용어 "펩티드" 및 "단백질"은 동의어이며 본 명세서에서는 상호 호환적으로 사용된다.
- [0227] 바람직하게는, 본 발명에 따라 개시된 상기 단백질 및 펩티드는 단리된다. 용어 "단리된 단백질(isolated protein)" 또는 "단리된 펩티드"는 그의 본래의 환경으로부터 분리된 단백질 또는 펩티드를 의미한다. 단리된 단백질 또는 펩티드는 필수적으로 정제된 상태일 수 있다. 용어 "필수적으로 정제된(essentially purified)"는 상기 단백질 또는 펩티드가 자연 또는 생체 내에서 연관되는 다른 물질들이 필수적으로 없는 것을 의미한다.
- [0228] 이러한 단백질 및 펩티드는, 예를 들면, 항체들의 생산 및 면역학적 또는 진단학적 분석에 또는 치료제들로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 개시된 단백질 및 펩티드는 조직 또는 세포 분쇄액(cell homogenates)들 등과 같은 생물학적 샘플들로부터 단리될 수 있으며, 또한 다양한 원핵 또는 진핵 발현 시스템들 내에성 재조합적으로 발현될 수 있다.
- [0229] 본 발명의 목적들에 대하여는, 단백질 또는 펩티드의 또는 아미노산 서열의 "변이체"는 아미노산 삽입 변이체(amino acid insertion variants), 아미노산 결실 변이체 및/또는 아미노산 치환 변이체를 포함한다.

- [0230] 아미노산 삽입 변이체는 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 융합 및 특정 아미노산 서열 내의 하나 또는 둘 또는 그 이상의 아미노산의 삽입을 포함한다. 삽입을 갖는 아미노산 서열 변이체의 경우에 있어서, 비록 그 결과의 생성물의 적절한 스크리닝을 갖는 무작위 삽입이 또한 가능하기는 하나, 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들이 하나의 아미노산 서열 내의 특정의 부위(site) 새로 삽입된다.
- [0231] 아미노산 결실 변이체는 상기 서열로부터 하나 또는 그 이상의 아미노산들의 제거에 의해 특정 지워진다.
- [0232] 아미노산 치환 변이체는 상기 서열 내의 적어도 하나의 잔기가 제거되고 그리고 그의 위치에 다른 잔기가 삽입되는 것에 의해 특정 지워진다. 상동 단백질 또는 웨პ티드 간의 보존적이지 않은 상기 아미노산 서열 내의 위치들에 존재하는 변형 및/또는 아미노산을 유사한 특성을 갖는 다른 것으로 치환하는 것이 선호된다.
- [0233] 바람직하게는, 단백질 변이체 내에서의 아미노산 변화는 보존적 아미노산 변화, 즉 유사하게 하전되거나 또는 하전되지 않은 아미노산의 치환이다. 보존적 아미노산 변화는 그들의 측쇄 내에 연관된 아미노산의 족(family)의 하나의 치환을 포함한다. 천연적으로 발생하는 아미노산은 대체로 4개의 족, 즉 산성(아스파르테이트, 글루타메이트), 염기성(라이신, 아르기닌, 히스티딘), 비-극성(알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 페티오닌, 트립토판) 및 하전되지 않은 극성(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스틴, 세린, 트레오닌, 티로신) 아미노산으로 구분된다.
- [0234] 바람직하게는, 유사성의 정도(degree of similarity), 바람직하게는 주어진 아미노산 서열과 상기 주어진 아미노산 서열의 변이체인 아미노산 서열 사이의 동일성은 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 심지어 보다 바람직하게는 적어도 90% 또는 가장 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 될 수 있다. 상기 유사성 또는 동일성의 정도는 바람직하게는 적어도 약 20개, 적어도 약 40개, 적어도 약 60개, 적어도 약 80개, 적어도 약 100개, 적어도 약 120개, 적어도 약 140개, 적어도 약 160개, 적어도 약 200개 또는 250개의 아미노산의 영역에 대하여 주어진다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 유사성 또는 동일성의 정도는 상기 대조 아미노산 서열의 전체 길이에 대하여 주어진다. 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 때에 따라서는 방향족 아미노산으로 함께 분류된다.
- [0235] 본 명세서에서 기술된 상기 웨პ티드 및 아미노산 변이체는, 예를 들면, 고상 합성법(solid phase synthesis ; Merrifield, 1964) 및 유사한 방법 또는 재조합 DNA 조작 등과 같은 공지의 웨პ티드 합성 기술의 도움에 의하여 용이하게 제조될 수 있다. 치환들, 삽입들 또는 결실들을 갖는 단백질 및 웨პ티드를 제조하기 위한 DNA 서열의 조작이, 예를 들면, 문헌 Sambrook et al. (1989)에 상세하게 기술되어 있다.
- [0236] 본 발명에 따르면, 단백질 또는 웨პ티드의 "유도체"는 단백질 및 웨პ티드의 변형된 형태이다. 이와 같은 변형은 임의의 화학적 변형을 포함하며, 탄수화물, 지방 및/또는 단백질 또는 웨პ티드와 같은 상기 단백질 또는 웨პ티드와 관련 있는 임의의 문자의, 단일 또는 수개의 치환, 결실 및/또는 첨가를 포함한다. 상기 용어 "유도체"는 상기 단백질 또는 웨პ티드의 모든 기능적 화학적 등가물까지 확장된다. 바람직하게는 변형된 웨პ티드는 증가된 안정성 및/또는 증가된 면역원성을 가진다.
- [0237] 본 발명에 따르면, 핵산 또는 아미노산 서열, 웨პ티드의 실질적으로 대응하는 아미노산 서열 또는 단편 또는 유도체의 변이체는 각각 그것이 유도된 것으로부터의 상기 핵산 또는 아미노산 서열, 상기 아미노산 서열 또는 상기 웨პ티드의 기능적 특성(functional property)을 갖는다. 이러한 기능적 특성에는 항체들과의 상호작용(interaction), 다른 웨პ티드 또는 단백질과의 상호작용, 핵산의 선택적 결합 및 효소적 활성들이 포함된다. 하나의 구체예에 있어서, 핵산 또는 아미노산의 서열, 웨პ티드의 실질적으로 대응하는 아미노산 서열 또는 단편 또는 유도체의 변이체는 각각 그것이 유도된 것으로부터의 상기 핵산, 아미노산 서열, 상기 아미노산 서열 또는 상기 웨პ티드와 면역학적으로 등가물이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 기능적 특성은 면역학적 특성(immunological property)이다. 특정한 특성은 MHC 분자들과 복합체를 형성하고, 그리고 적절한 경우, 면역 반응, 바람직하게는 세포독성 또는 T 헬퍼 세포를 자극하는 것에 의한 면역 반응을 생성하는 능력이다. 종양 항원의 단편은 상기 종양 항원의 적어도 6개, 바람직하게는 적어도 8개, 적어도 10개, 적어도 12개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개 또는 적어도 50개의 인접하는 아미노산들을 포함한다. 종양 항원의 단편은 바람직하게는 8개 이하, 특히 10개 이하, 12개 이하, 15개 이하, 20개 이하, 30개 이하 또는 55개 이하의 상기 종양 항원의 인접하는 아미노산의 서열을 포함한다. 종양 항원의 단편은 바람직하게는 MHC 분자와 함께 제시될 수 있고 그리고 그렇게 제시되는 것이 세포 반응을 자극할 수 있는 상기 종양 항원의 일부이다.
- [0238] 종양 항원의 바람직한 단편은 생체 내 세포독성 T-림프구들의 자극에 적절할 뿐만 아니라 생체 외(ex vivo) 치료학적 입양 전이를 위한 연장되고, 자극된 T-림프구들의 생산에 적절하다.

- [0239] 상기 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 특이적 항체들을 포함하는 항혈청(antisera)은 여러표준 공정들에 의하여 제조될 수 있다; 예를 들면, 문헌 "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" by Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9; "Antibodies: A Laboratory Manual" by Ed Harlow, David Lane, ISBN: 0879693142 및 "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN 0879695447들을 참조하시오. 그에 의하여, 복합 막 단백질(complex membrane proteins)들을 그의 천연 형태로 인식하는 친화적이고 특이적인 항체들을 생성하는 것이 또한 가능하다(문헌 Azorsa et al., J. Immunol. Methods 229: 35-48, 1999; Anderson et al., J. Immunol. 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, J. Immunol. Methods 234: 107-116, 2000들을 참조). 이는 특히 치료학적으로 사용될 항체들의 제조 뿐만 아니라 많은 진단학적 응용예들에도 연관된다. 이러한 관점에 있어서, 상기 표적 분자를 생리학적으로 접힌 형태로 빌현하는 세포 뿐만 아니라 세포외 부분적 서열(extracellular partial sequences)들을 갖는 전단백질(whole protein)로 면역화시키는 것이 가능하다. 모노클로날 항체들은 전통적으로 하이브리도마 기술을 사용하여 제조된다. (상세한 기술들에 대하여는 다음의 문헌들을 참조하시오 : "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" by Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9; "Antibodies: A Laboratory Manual" by Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142; "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447).
- [0240] 항체의 단지 작은 부분, 즉 파라토프(paratope)는 그의 에피토프에의 상기 항체의 결합에 포함된다고 알려져 있다(예를 들면, 문헌 Clark, W.R. (1986), The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991), Essential Immunology, 7th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford 참고). pFc' 및 Fc 부위들은, 예를 들면, 보체 캐스케이드(complement cascade)의 효과기들이기는 하나, 항원 결합에 포함되지는 않는다. 그로부터 상기 pFc' 부위가 효소적으로 제거되었거나 또는 상기 pFc' 부위 없이 제조된 항체는,  $F(ab')_2$  단편이라고 칭해지며, 완전한 항체의 두 항원 결합 부위들을 운반한다. 유사하게, 그로부터 상기 Fc 부위가 효소적으로 제거되었거나 또는 상기 Fc 부위 없이 제조된 항체는, Fab 단편이라고 칭해지며, 손상되지 않은 항체 분자의 하나의 항원 결합 부위를 운반한다. 더욱이, Fab 단편들은 항체의 공유적으로 결합된 경쇄(light chain)와 상기 항체의 중쇄(heavy chain)의 부분으로 이루어지며, Fd라고 칭하여진다. 상기 Fd 단편들은 항체 특이성을 주요 결정요인(determinants)들이며(단일 Fd 단편은 상기 항체의 상기 특이성을 변화시킬 수 없이 10개 이하의 서로 다른 경쇄들과 연관될 수 있음), 상기 Fd 단편들은, 단리되는 경우, 에피토프에 결합하는 능력을 보유한다.
- [0241] 상기 항원 에피토프와 직접적으로 상호작용하는 상보적 결정부(complementary-determining regions ; CDRs)들 및 상기 파라토프의 3차 구조(tertiary structure)를 유지하는 프레임워크 영역(framework regions ; FRs)들이 항체의 항원-결합부(antigen-binding part) 내에 위치된다. 상기 중쇄의 상기 Fd 단편과 면역글로불린 IgG 면역글로불린들의 상기 경쇄 둘 다는 매 경우에서 3개의 상보적 결정부들(CDR1 내지 CDR3)들에 의해 분리되는 4개의 프레임워크 영역들(FR1 내지 FR4)을 포함한다. 상기 CDR들, 특히 상기 CDR3 부위들, 특히 상기 중쇄의 상기 CDR3 부위들은 항체 특이성에 크게 영향을 미친다.
- [0242] 포유동물 항체의 비-CDR 부위들은 원래의 항체의 상기 에피토프에 대한 상기 특이성을 유지하면서 동일하거나 또는 서로 다른 특이성을 갖는 항체들의 유사한 부위들로 대체될 수 있는 것으로 알려져 있다. 이는 비인간(nonhuman) CDR들이 인간 FR 및/또는 Fc/pFc' 부위들에 공유적으로 연결되어 기능성 항체를 생산하는 "인간화(humanized)" 항체들의 개발을 가능하게 만들었다.
- [0243] 또 다른 예로서, 국제공개특허공보 제WO 92/04381호는 쥐과의 FR 영역(murine FR regions)들의 적어도 일부가 인간 유래의 FR 영역들로 대체되어 있는 인간화된 쥐과의 RSV 항체들의 생산 및 용도를 개시하고 있다. 항원-결합 능력을 갖는 손상되지 않은 항체들의 단편들을 포함하는 이러한 종류의 항체들은 종종 "키메라" 항체라고 언급된다.
- [0244] 본 발명에 따르면, 용어 "항체"는 또한  $F(ab')_2$ , Fab, Fv 및 항체들의 Fd 단편들, 상기 Fc 및/또는 FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄-CDR3 영역들이 상동의 인간 또는 비인간의 서열로 대체되어 있는 키메라 항체들, 상기 FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄-CDR3 영역들이 상동의 인간 또는 비인간의 서열로 대체되어 있는 키메라  $F(ab')_2$ -단편 항체들, 상기 FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄-CDR3 영역들이 상동의 인간 또는 비인간의 서열로 대체되어 있는 키메라 Fab-단편 항체들 및 상기 FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 영역들이 상동의 인간 또는 비인간의 서열로 대체되어 있는 키메라 Fd-단편 항체들을 포함한다. 용어 "항체"는 또

한 "단일-쇄" 항체들을 포함한다.

[0245] 본 발명에 따라 사용되는 경우, 종양 항원에 특이적으로 결합하는 비-항체 단백질 및 펩티드는 항체들로 대체될 수 있다. 이러한 종류의 결합가능한 물질들은, 예를 들면, 간단하게 용액내에서 부동화된 형태로 제조될 수 있는 펩티드 라이브러리들을 퇴화시키는 것에 의하거나 또는 파지-디스플레이(phage-display) 라이브러리들로서 제공될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 아미노산들을 갖는 펩티디들의 조합적 라이브러리들을 제조하는 것 또한 가능할 것이다. 펩토이드(peptoids)들 및 비-펩티드 합성 잔기들의 라이브러리들 또한 제조될 수 있다.

[0246] 항체들은 또한 종양 항우너들을 발현하는 세포 및 조직들을 표시하기 위한 치료학적 표지에 결합될 수 있다. 이들은 또한 치료학적 효과기 부분에 결합될 수 있다.

[0247] 하나의 구체예에 있어서, 본 명세서에서 기술되는 상기 항체는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 본 발명에 따라 동정된 상기 종양 항원의 일부에 특이적으로 결합한다. 하나의 구체예에 있어서, 본 명세서에서 기술되는 상기 항체는 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 본 명세서에서 기술되는 상기 종양 항원 펩티드에 특이적으로 결합한다. 이러한 항체들은 면역화를 위한 상기 서열 목록의 서열 확인 번호 3, 4 및 5로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 펩티드를 사용하여 수득될 수 있다.

[0248] 검출가능한 표지들에는 (i) 검출가능한 신호(signal)을 제공하거나, (ii) 예를 들면, 형광공명에너지전이(FRET ; fluorescence Resonance Energy Transfer) 등과 같이, 제1 또는 제2의 표지에 의하여 제공되는 검출가능한 신호를 변형시키도록 제2의 표지(second label)와 상호작용하거나, (iii) 이동성(mobility), 예를 들면, 전하, 소수성, 형상 또는 다른 물리적 매개변수(physical parameters)들에 의한 전기영동 이동성에 영향을 주거나 또는 (iv) 포획 부분(capture moiety), 예를 들면, 친화도(affinity), 항체/항원 또는 이온성 복합체화(ionic complexation) 하도록 기능하는 임의의 표지가 포함된다. 표지로서 적절한 것들은 형광 표지들, 발광 표지들, 발색단 표지들, 방사성 동위원소 표지들, 동위원소 표지들 바람직하게는 안정한 동위원소 표지들, 동중핵(isobaric) 표지들, 효소 표지들, 입자 표지들 특히 금속입자 표지들, 자성입자 표지들, 중합체입자 표지들 등과 같은 구조물들, 비오틴(biotin) 등과 같은 작은 유기 분자들, 결합제(binding agents)들의 사용에 의하여 검출될 수 있는 세포부착 단백질 또는 렉틴(lectins)들, 표지-서열을 포함하는 핵산 및/또는 아미노산 잔기들 등과 같은 수용체(receptors)들 또는 결합분자(binding molecules)들이다. 검출가능한 표지들에는 바륨설페이트(barium sulfate), 이오세탐산(iocetamic acid), 이오파노산(iopanoic acid), 칼슘이포데이트(calciun ipodate), 소듐디아트리조에이트(sodium diatrizoate), 메글루민디아트리조에이트(meglumine diatrizoate), 메트리즈아미드(metrizamide), 소듐티로파노에이트(sodium tyropanoate) 및 불소-18 및 탄소-11 등과 같은 양전자 방사체(positron emitters)들, 요오드-123, 테크네튬-99m, 요오드-131 및 인듐-111 등과 같은 감마방사체(gamma emitters), 불소 및 가돌리늄 등과 같은 핵자기공명용 핵종(nuclides for nuclear magnetic resonance)들을 포함하는 방사성 진단제(radio diagnostic) 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0249] 본 발명에 따르면, 용어 "치료학적 효과기 분자(therapeutic effector molecule)"는 치료 효과를 발휘할 수 있는 임의의 분자를 의미한다. 본 발명에 따르면, 치료학적 효과기 분자는 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 종양 항원을 발현하는 세포에 선택적으로 안내되는 것이며, 항암제들, 방사성 요오드 표기화된 화합물들, 독소들, 세포증식억제 또는 세포용해 약제 등을 포함한다. 항암제들에는, 예를 들면, 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 아자티오프린(azathioprine), 벨로마이신설페이트(bleomycin sulfate), 부설판(busulfan), 카무스틴(carmustine), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 시클로스포린(cyclosporine), 시타라비딘(cytarabidine), 다카바진(dacarbazine), 닉티노마이신(dactinomycin), 다우노루빈(daunorubin), 독소루비신(doxorubicin), 택솔(taxol), 에토포시드(etoposide), 플루오로우라실(fluorouracil), 인터페론-α, 로무스틴(lomustine), 머캡토퓨린(mercaptopurine), 메토트렉세이트(methotrexate), 미토탄(mitotane), 프로카바진 염산염(procabarazine HCl), 티오구아닌(thioguanine), 빈블라스틴설페이트(vinblastine sulfate) 및 빈크리스틴설페이트(vincristine sulfate)들이 포함된다. 다른 항암제들은, 예를 들면, 문헌 Goodman and Gilman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 8th Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc.에, 특히 52장(Antineoplastic Agents (Paul Calabresi and Bruce A. Chabner)에 개시되어 있다. 독소는 미국자리공 항바이러스 단백질(pokeweed antiviral protein), 콜레라 독소, 백일해 독소(pertussis toxin), 리신(ricin), 겔로닌(gelonin), 아브린(abrin), 디프테리아 외독소(diphtheria exotoxin) 또는 슈도모나스(Pseudomonas) 외독소 등과 같은 단백질이

될 수 있다. 독소 잔기들은 또한 코발트-60 등과 같은 고에너지 방출 방사성 핵종(radionuclides)들이 될 수도 있다.

[0250] 용어 "주요 조직적합성 복합체(major histocompatibility complex)" 또는 "MHC"는 MHC 클래스 I 및 클래스 II 들을 포함하며, 모든 척추동물(vertebrates)들 내에 존재하는 유전자들의 복합체들에 연관된다. MHC 단백질 또는 분자들은 T 세포 수용체(TCR)들에 의하여 인식을 위하여 펩티드를 결합시키고 그리고 이들을 제공하는 것에 의하여 정상의 면역 반응들에서의 램프구와 항원 제시 세포 사이에서의 신호화(signaling)에 포함된다. MHC 분자들은 세포 내부의 처리격실(processing compartment) 내의 펩티드를 결합하고, 그리고 T 세포에 의한 인식을 위하여 이들 펩티드를 항원 제시 세포의 표면 상에 제공한다. 달리 HLA로도 정의되는 인간 MHC 영역은 6번 염색체(chromosome 6) 상에 위치하며, 상기 클래스 I 및 클래스 II 영역들을 포함한다. 본 발명의 모든 관점들 중의 하나의 바람직한 구체예에 있어서, MHC 분자는 HLA 분자이다.

[0251] 본 명세서에서 사용되는 "감소(reduce)" 또는 "억제(inhibit)"는 대조 샘플(예를 들면, siRNA로 처리하지 않은 샘플)에 비하여, 예를 들면, 단백질 또는 mRNA의 수준에서 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 75% 이상 전체적인 감소를 야기하는 능력을 의미한다. RNA 또는 단백질 발현의 감소 또는 억제는 표적화된 mRNA의 개열 또는 분해를 통하여 일어날 수 있다. 단백질 발현 또는 핵산 발현에 대한 분석은 당해 기술분야에서 공지되어 있으며, 예를 들면, 효소면역측정법(ELISA), 단백질 발현에 대한 웨스턴 블로팅 분석 및 RNA에 대한 노던 블로팅(northern blotting) 또는 리보뉴클레아제 보호 분석(RNase protection assays)들이 포함된다.

[0252] 용어 "환자(patient)"는 본 발명에 따르면 인간, 인간 이외의 영장류 또는 다른 동물, 특히 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 마우스(mouse) 및 랫트(rat) 등과 같은 설치류 등과 같은 포유동물을 의미한다. 특히 바람직한 구체예에 있어서, 상기 환자는 인간이다.

[0253] 본 발명에 따르면, 용어 "증가된(increased)" 또는 "증가량(increased amount)"은 적어도 10%, 특히 적어도 20%, 적어도 50% 또는 적어도 100%로의 증가를 의미한다. 만일 시험 샘플에서는 검출가능하나 대조 샘플에서는 존재하지 않거나 또는 검출불가능한 경우, 대조 샘플에 비하여 생물학적 샘플 등과 같은 시험 샘플 내에서 물질의 양이 또한 증가되었다.

[0254] 본 발명에 따르면, 용어 "종양" 또는 "종양 질병"은 세포(신생세포(neoplastic cells)들 또는 종양 세포가라고도 불리움)의 비정상적인 성장에 의하여 형성된 팽윤(swelling) 또는 병소(lesion)를 의미한다. "종양 세포"에 대하여는 신속하고 제어되지 않는 세포 증식(cellular proliferation)에 의하여 성장하고 그리고 새로운 성장의 중지(cease)를 개시시키는 자극 이후에 성장을 지속하는 비정상적인 세포를 의미한다. 종양은 정상 조직과의 구조적 조직화(structural organization) 및 기능적 조정(functional coordination)의 부분적 또는 완전한 결여를 나타내며, 대개는 조직의 구별되는 덩어리를 형성하며, 이는 양성, 전암상태(pre-malignant) 또는 악성(malignant)이 될 수 있다.

[0255] 바람직하게는, 본 발명에 따른 종양 질병은 암 질병, 즉 악성 질병이며, 종양 세포는 암 세포이다. 바람직하게는, 종양 질병은 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 및/또는 종양 항원이 발현되거나 또는 비정상적으로 발현되는 세포에 의해 특징지워지며, 종양 세포 또는 순환하거나 또는 전이성의 종양 세포는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산 및/또는 종양 항원의 발현 또는 비정상적인 발현에 의하여 특징지워진다. 바람직하게는, 종양 질병, 종양 세포 또는 순환하거나 또는 전이성의 종양 세포는 클래스 I MHC를 갖는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원의 제시에 의하여 특징지워진다.

[0256] "비정상적인 발현(abnormal expression)"은 본 발명에 따르면 건강한 개체에서의 상태에 비하여 발현이 변경되거나, 바람직하게는 증가되는 것을 의미한다. 발현에 있어서의 증가는 적어도 10%, 특히 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%, 적어도 10000% 또는 심지어 그 이상으로 증가하는 것을 의미한다. 하나의 구체예에 있어서, 발현은 단지 질병에 걸린 조직 내에서 발견되는 반면에 건강한 조직 내에서는 발현은 억제된다.

[0257] 본 발명에 따르면, 발현의 수준이 태반 세포 또는 태반 조직 내에서의 발현에 비하여 낮거나 및/또는 난소암 세포 및/또는 폐암 세포 또는 난소암 조직 및/또는 폐암 조직 내에서의 발현에 비하여 낮은 경우, 조직 또는 기관의 세포는 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는다. 바람직하게는, 발현의 수준은 상기 세포 또는 조직들에 비하여 10% 이하, 바람직하게는 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.05% 이하 또는 심지어 그 보다 낮다. 바람직하게는, 발현의 수준이 검출 한계 이하인

경우, 종양 항원 및/또는 핵산은 실질적으로 발현하지 않는다. 바람직하게는, 조직이 종양이 없는 즉, 종양 질병을 갖지 않는 경우, 본 발명에 따라 동정된 종양 항원 및/또는 본 발명에 따라 동정된 종양 핵산을 실질적으로 발현하지 않는 세포는 난소, 폐, 유방, 심이지장, 피부, 직장, 간, 림프절, 위장, 비장, 신장, 식도, 췌장, 자궁내막, 뇌, 쓸개, 방광, 회장, 부신, 직장 및 골격근의 조직, 바람직하게는 난소의 조직 또는 폐의 조직이다. 바람직하게는 이러한 조직은 태반 조직 이외의 조직이다.

[0258] 바람직하게는, 본 발명에 따른 종양 질병은 암이며, 여기에서 본 발명에 따른 용어 "암"은 백혈병(leukemias), 정상피종(seminomas), 흑색종(melanomas), 기형종(teratomas), 림프종(lymphomas), 신경아세포종(neuroblastomas), 신경교종(gliomas), 직장암, 자궁내막암(endometrial cancer), 신장암, 부신암(adrenal cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 혈액암(blood cancer), 폐암, 뇌암, 자궁경부암, 장암(intestinal cancer), 간암, 대장암, 위암, 장암(intestine cancer), 두경부암, 소화기암(gastrointestinal cancer), 림프절암(lymph node cancer), 식도암(esophagus cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 췌장암, 이비인후암(ear, nose and throat (ENT) cancer), 유방암, 전립선암, 자궁암, 난소암 및 폐암 및 이들의 전이를 포함한다. 이들의 예들은 폐암종(lung carcinomas), 유방암종(mamma carcinomas), 전립선암종(prostate carcinomas), 대장암종(colon carcinomas), 신장세포암종(renal cell carcinomas), 자궁경부암종(cervical carcinomas) 또는 앞서 기술된 상기 암 형태들 및 종양의 전이들이다. 본 발명에 따른 용어 암은 또한 암의 전이들을 포함한다.

[0259] 본 발명에 따른 바람직한 종양 질병 또는 암은 난소암 특히 난소선암 및 난소기형암종, 소세포폐암종(SCLC)과 비-소세포폐암종(NSCLC)을 포함하는 폐암 특히 편평세포폐암종 및 선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암 특히 기저세포암종 및 편평세포암종, 악성 흑색종, 두경부암 특히 악성 다형선종, 육종 특히 활막육종과 암육종, 담관암, 방광암 특히 이행상피종양과 유두암종, 신장암 특히 투명세포신세포암종과 유두상신세포암종을 포함하여 신세포암종, 대장암, 회장암을 포함하여 소장암 특히 소장선암과 회장선암, 고환태생성암, 태반용모상피암, 자궁경부암, 고환암 특히 고환정상피종, 고환기형종 및 태생성 고환암 및 자궁암 및 이들의 전이형태들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 것이다.

[0260] 본 발명에 따른 특히 바람직한 종양 질병 또는 암은 난소암, 폐암, 전이성 난소암 및 전이성 폐암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 난소암은 난소암종(ovarian carcinoma) 또는 난소선암이다. 바람직하게는, 상기 폐암은 암종 또는 선암이고, 그리고 바람직하게는 세기관지암종 또는 세기관지선암 등과 같은 세기관지암이다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 종양 세포는 이러한 암의 세포이다. 전이성 난소암에는 전이성 난소암종 및 전이성 난소선암이 포함되고 그리고 전이성 폐암에는 전이성 폐암종, 전이성 폐선암, 전이성 세기관지암종 및 전이성 세기관지선암이 포함된다.

[0261] 폐암의 주요 형태들은 소세포폐암종(SCLC) 및 비-소세포폐암종(NSCLC)들이다. 상기 비-소세포폐암종의 3가지의 아형(sub-types)들 즉 편평세포폐암종(squamous cell lung carcinoma), 선암 및 큰세포암종들이 존재한다. 선암은 폐암의 대략 10%로 고려된다. 이 암은 대개 둘 다 보다 중앙에 위치하는 경향이 있는 소세포폐암 및 편평세포폐암과는 대조적으로 폐들 내에서 가장자리에서 나타난다.

[0262] 피부암은 피부 상에서의 악성의 성장이다. 가장 흔한 피부암은 기저세포암, 편평세포암 및 흑색종들이다. 악성 흑색종은 피부암의 심각한 형태이다. 이는 멜라닌세포(melanocytes)라고 불리우는 색소세포의 제어되지 않는 성장에 기인한다.

[0263] 본 발명에 따르면, "암종"은 기관들의 내벽층(상피세포) 내에서 시작되는 암이다.

[0264] "세기관지암종"은 말단 세기관지들의 상피로부터 유도되는 것으로 여겨지는 폐의 암종이며, 여기에서 신생의 조직은 폐포벽(alveolar walls)들을 따라 확장되고 그리고 상기 폐포들 내에서 작은 덩어리들로 성장한다. 점액(mucin)이 상기 세포의 일부에서 그리고 상기 폐포들 내의 물질 내에서 나타날 수 있으며, 이는 또한 노출된 세포(denuded cells)들을 포함한다.

[0265] "선암"은 선상 조직(glandular tissue) 내에서 유래되는 암이다. 이 조직은 또한 상피 조직으로 알려진 보다 큰 조직 분류의 일부이다. 상피 조직은 피부, 분비선(glands)들 및 신체의 공동들 및 기관들을 덧대는(lines) 다양한 다른 조직을 포함한다. 상피는 외배엽(ectoderm), 내배엽 및 중배엽(mesoderm)으로부터 태생유전학적으로 유도된다. 선암으로 분류되기 위해서는, 세포가 분비 특성(secretory properties)들을 갖는 한, 상기 세포는 분비선의 일부이어야 할 필요는 없다. 이러한 암종의 형태는 인간을 포함하여 일부 고등한 포유동물들에서 발생할 수 있다. 잘 분화된 선암은 이들이 유래되는 상기 선상 조직들과 닮는 경향이 있는 반면에 거의 분화되

지 않은 것들은 그러하지 아니할 수 있다. 생체조직검사로부터의 세포를 염색하는 것에 의하여, 병리학자는 종양이 선암 또는 어느 다른 형태의 암인지의 여부를 결정할 수 있을 것이다. 신체 내에서 분비선들의 어디에나 있는 속성(ubiquitous nature)으로 인하여 신체의 많은 조직들 내에서 발생할 수 있다. 각 분비선이 동일한 물질을 분비하지 않을 수 있는 반면에, 상기 세포에로의 외분비 기능(exocrine function)이 존재하는 한, 분비선으로 여겨지며, 그의 악성의 형태는 선암으로 호칭된다. 악성선암(malignant adenocarcinomas)은 다른 조직들을 침입하며 종종 그렇게 하기에 충분한 주어진 시간에 전이한다. 난소선암은 난소암종의 가장 흔한 형태이다. 이는 장액성(serous) 및 점액성(mucinous)의 선암, 투명세포선암 및 자궁내막양선암(endometrioid adenocarcinoma)을 포함한다.

[0266] "낭포선암(cystadenocarcinoma)"은 난소암의 하나의 형태인 표층 상피성 간질성 종양의 악성의 형태이다.

[0267] 표층 상피성 간질성 종양은 난소 표층 상피(변형된 복막)로부터 또는 이소성 자궁내막이나 나팔관 조직으로부터 유래되는 것으로 난소 신생물(ovarian neoplasms)들의 클래스이다. 이 그룹의 종양은 모든 난소 종양의 대부분으로 고려진다.

[0268] 기형암종은 기형종(teratoma)과 태생성 암종(embryonal carcinoma)과, 또는 융모암(choriocarcinoma)과, 또는 이를 둘 다와의 혼합물인 생식세포종(germ cell tumor)을 의미한다. 융모암은 대개는 태반의, 악성의, 영양포성 및 침습적인 암(malignant, trophoblastic and aggressive cancer)이다. 이는 폐들에로의 초기의 혈행성 확산에 의해 특징지워진다.

[0269] 육종은 중배엽 중식의 결과를 가져오는 연결조직(뼈, 연골(cartilage), 지방)의 암이다. 이는 상피 유래인 암 종과는 대조적이다. 활막육종은 팔 또는 다리의 관절들 근처에서 대개 발생하는 암의 드문 형태이다. 이는 연조직(soft tissue) 육종의 하나이다.

[0270] 또한 신세포암 또는 신세포선암으로 알려진 신세포암종은 혈액을 여과하고 그리고 폐기생성물(waste products)들을 제거하는 신장 내의 세뇨관(very small tubes)인 근위곡세뇨관(proximal convoluted tubule)의 라이닝(lining ; 덧대는 것) 내에서 유래되는 신장암이다. 신세포암종은 성인들에서 신장암의 단연코 가장 흔한 형태이고 그리고 모든 비뇨생식기암(genitourinary tumors)들 중의 가장 치명적인 것이다. 신세포암종의 뚜렷한 아형(subtypes)들은 투명세포신세포암종 및 유두상신세포암종이다. 투명세포신세포암종은 신세포암종의 가장 흔한 형태이다. 현미경 하에서 관찰하는 경우, 투명세포신세포암종을 구성하는 상기 세포는 매우 흐리하거나 투명하게 나타난다. 유두상신세포암종은 두 번째로 흔한 아형이다. 이들 암은 종양의 대부분이 아닌 경우에 일부에서 작은 손가락-유사 돌기들(유두(papillae)라고도 불리움)을 형성한다.

[0271] "전이"에 대하여는 그의 원래의 위치(original site)로부터 신체의 다른 부분으로의 암세포의 확산을 의미한다. 상기 전이의 형성은 매우 복잡한 과정이며, 원발성 종양(primary tumor)으로부터의 악성 세포의 탈착(detachment), 세포외 매트릭스(extracellular matrix)의 침입(invasion), 체강(body cavity) 및 혈관(vessels)들에 들어가기 위한 내피기저막(endothelial basement membrane)들의 침투 및 후속하여 혈액에 의하여 이송된 이후에 표적 기관들에로의 침입(infiltration)에 의존적이다. 최종적으로, 표적 자리에서의 새로운 종양의 성장, 즉 2차종양(secondary tumor) 또는 전이성 종양은 신생혈관 형성(angiogenesis)에 의존적이다. 종양 세포 또는 성분들이 잔류할 수 있고 그리고 전이 잠재성(metastatic potential)을 발전시킬 수 있기 때문에 종양 전이는 종종 원발성 종양의 제거 이후에도 발생한다. 하나의 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 용어 "전이"는 상기 원발성 종양 및 국부적인 림프절계(regional lymph node system)로부터 이격되어 있는 전이에 연관되는 "원격 전이(distant metastasis)"에 연관된 것이다.

[0272] 2차 또는 전이성 종양의 세포는 상기 원래의 종양에서의 세포과 유사하다. 이는, 예를 들면, 만일 난소암이 간으로 전이되는 경우, 2차종양은 비정상적인 간세포가 아닌 비정상적인 난소세포로 이루어진다는 것을 의미한다. 따라서 상기 간 내의 상기 종양은 간암이 아닌 전이성 난소암으로 불리워진다.

[0273] 난소암에 있어서, 전이는 하기의 방법, 즉 직접적인 접촉 또는 확장에 의하여, 이는 나팔관, 자궁, 방광, 직장 등과 같은 난소 근처 또는 주변에 위치하는 근처의 조직 또는 기관들에 침투할 수 있으며; 복강 내로의 접종(seeding) 또는 방출(shedding)에 의하여, 이는 난소암 확산의 가장 흔한 방법인 방법로 일어날 수 있다. 암세포는 난소 덩어리로부터 느슨하게 분리되고, 림프관(lymphatic vessels)들에 침투하고 그리고 계속해서 폐 또는 간 등과 같은 신체의 다른 영역들 또는 원거리의 기관들에로 이동하는 것에 의하거나; 난소 덩어리로부터 느슨하게 분리되고, 혈관계(blood system)에 침투하고 그리고 계속해서 신체의 다른 영역들 또는 원거리의 기관들에로 이동하는 것에 의하여 상기 난소 덩어리의 표면으로부터 분리되고 그리고 간, 위, 결장 또는 횡격막

(diaphragm) 등과 같은 복부 내 다른 구조들에 "강하(drop)" 한다.

[0274] 본 발명에 따르면, 전이성 난소암은 나팔관 내의 암, 창자 내의 암 등과 같은 복부의 기관들 내의 암, 자궁 내의 암, 방광 내의 암, 직장 내의 암, 간 내의 암, 위 내의 암, 결장 내의 암, 횡격막 내의 암, 폐들 내의 암, 복부 또는 골반(복막)의 라이닝 내의 암 및 뇌 내의 암을 포함한다. 유사하게, 전이성 폐암은 상기 폐들로부터 원거리 및/또는 신체 내의 여러 부위들에로 확산하는 암을 의미하며, 간 내의 암, 부신 내의 암, 를 내의 암 및 뇌 내의 암을 포함한다.

[0275] 한 사람이 과거에 감염되었던 상태로 다시 감염되는 경우, 재발(relapse) 또는 회귀(recurrence)가 일어난다. 예를 들면, 만일 환자가 종양 질병으로 고통을 받았었고, 상기 질병의 성공적인 치료를 받았으며, 다시 상기 질병이 발달하는 경우, 새로이 발달된 질병은 재발 또는 회귀로 고려될 수 있다. 그러나, 본 발명에 따르면, 종양 질병의 재발 또는 회귀는 원래의 종양 질병의 부위에서 일어날 수 있으나 반드시 그러한 것은 아니다. 따라서, 예를 들면, 환자가 난소암으로 고통을 받았었고, 성공적인 치료를 받은 경우, 재발 또는 회귀는 난소 종양의 발생 또는 난소와는 다른 부위에서의 종양의 발생이 될 수 있다. 종양의 재발 또는 회귀는 또한 상기 원래의 종양의 부위에서와 마찬가지로 상기 원래의 종양의 부위와는 다른 부위에서 종양이 일어나는 상황들을 포함한다. 바람직하게는, 상기 환자가 그를 위하여 치료를 받았던 상기 원래의 종양은 원발성 종양이고 그리고 상기 원래의 종양의 부위와 다른 부위에서의 종양은 2차 또는 전이성 종양이다.

[0276] 본 발명에 따르면, 생물학적 샘플은 체액(bodily fluids)들 및/또는 세포 샘플(cellular sample)을 포함하여 조직 샘플이 될 수 있으며, 세절채취법(punch biopsy)을 포함하는 조직 생검(tissue biopsy)에 의하고 그리고 혈액, 기관지 흡입물(brochial aspirate), 가래, 소변, 대변 또는 다른 체액들을 취하는 것에 의하는 것 등과 같은 통상적인 방법으로 수득될 수 있다. 본 발명에 따르면, 용어 "생물학적 샘플"은 또한, 생물학적 샘플들의 분획(fractions)들 또는 단리물(isolates)들, 예를 들면, 핵산 및 펩티드/단백질 단리물(peptide/protein isolates)들 등과 같은 가공된 생물학적 샘플들을 포함한다.

[0277] 본 발명에 따르면, 용어 "면역반응 세포(immunoreactive cell)"는 적절한 자극에 의하여 면역세포(B 세포, T 헬퍼 세포 또는 세포용해성 T 세포(cytolytic T cell) 등과 같은)로 성숙할 수 있는 세포를 의미한다. 면역반응 세포는 CD34+ 조혈모세포(CD34+ hematopoietic stem cells), 미숙 및 성숙 T 세포, 및 미숙 및 성숙 B 세포를 포함한다. 종양 항원을 인식하는 세포 용해성 또는 T 헬퍼 세포의 생산을 원하는 경우, 상기 면역반응 세포는 세포용해성 T 세포 및 T 헬퍼 세포의 생산, 분화 및/또는 선별에 유리한 조건 하에서 종양 항원을 발현하는 세포와 접촉시킨다. 항원에 노출되는 경우, T 세포 전구체들의 세포용해성 T 세포로의 분화는 면역계의 영양계 선택(clonal selection)과 유사하다.

[0278] 용어 "T 세포" 및 "T 림프구"들은 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용되며, T 헬퍼 세포(CD4+ T cells)들 및 세포용해성 T 세포를 포함하는 세포독성 T 세포(CTLs, CD8+ T cells)들을 포함한다.

[0279] 일부 치료 방법은 환자의 면역계의 반응에 기초하며, 이는 클래스 I MHC를 갖는 종양 항원을 제시하는 암 세포 등과 같은 질병에 걸린 세포의 용해의 결과를 가져온다. 이와 관련하여, 예를 들면, 종양 항원 펩티드와 MHC 분자의 복합체에 특이적인 자기유래(autologous) 세포독성 T 림프구가 종양 질병을 갖는 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 세포독성 T 림프구의 시험관 내 생산이 공지되어 있다. T 세포를 분화시키는 하나의 방법의 구체 예를 국제공개특허공보 제WO-A-9633265호에서 찾을 수 있다. 일반적으로, 혈액 세포 등과 같은 세포를 포함하는 샘플을 환자로부터 채취하고, 그리고 상기 복합체를 제공하고 그리고 세포독성 T 림프구(예를 들면, 수지상 세포)의 증식을 야기할 수 있는 세포와 상기 세포를 접촉시킨다. 상기 표적 세포는 COS 세포 등과 같은 형질감염된 세포가 될 수 있다. 이들 형질감염된 세포는 그들의 표면 상에 원하는 복합체를 제시하고, 그리고 세포독성 T 림프구들과 접촉하는 경우, 후자의 증식을 자극한다. 계속해서, 상기 클론 확장된(clonally expanded) 자기 유래 세포독성 T 림프구들을 상기 환자에게 투여한다.

[0280] 세포독성 T 림프구들을 선택하는 다른 방법에 있어서, MHC 클래스 I 분자/펩티드 복합체들의 형광 사량체 (fluorogenic tetramers)들이 세포독성 T 림프구들의 특이적인 클론(clones)들을 수득하는 데 사용된다(문헌 Altman et al., Science 274:94-96, 1996; Dunbar et al., Curr. Biol. 8:413-416, 1998들을 참조).

[0281] 더욱이, 원하는 복합체(예를 들면, 수지상세포)를 제시하는 세포는 높은 친화도(affinity)를 갖는 특이적인 세포독성 T 림프구들의 증식의 결과를 가져올 수 있는 건강한 개체들 또는 다른 종들(예를 들면, 마우스)의 세포독성 T 림프구들과 결합될 수 있다. 이들 증식된 특이적 T 림프구들의 높은 친화도의 T 세포 수용체는 복제되고 그리고 선택적으로 상이한 정도로 인간화될 수 있으며, 그에 따라 수득되는 상기 T 세포 수용체는 유전자 전

이(gene transfer)를 통해, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터(retroviral vectors)를 사용하여 환자의 T 세포내로 형질도입시킬 수 있다. 계속해서, 이들 유전적으로 변형된 T 림프구를 이용하여 입양 전이가 수행될 수 있다(문헌 Stanislawski et al., Nat Immunol. 2:962-70, 2001; Kessels et al., Nat Immunol. 2:957-61, 2001들을 참조).

[0282] 세포 독성 T 림프구들은 또한 그 자체가 공지된 방법으로 생체 내에서 생성될 수 있다. 한 가지 방법은 MHC 클래스 I/펩티드 복합체를 발현하는 비증식성의 세포를 사용한다. 본 명세서에서 사용되는 세포는 대개 방사선 조사된 종양 세포 또는 상기 복합체의 발현에 필요한 하나 또는 2개의 유전자들로 형질감염된 세포(즉, 상기 항원성 펩티드와 상기 제시되는 MHC분자) 등과 같이 상기 복합체를 발현하는 것들이 될 수 있다. 또 다른 바람직한 형태는, 예를 들면, 리포좀 전달(liposomal transfer)에 의하거나 또는 전기천공(electroporation)에 의하여 재조합 RNA의 형태로의 상기 종양 항원을 도입하는 것이다. 그 결과의 세포는 대상 복합체를 제시하고 그리고 이후 증식되는 자기유래 세포독성 T 림프구들에 의하여 인식된다.

[0283] 생체 내에서 항원-제시 세포 내로의 내포를 가능하게 하도록 종양 항원 또는 종양 항원 펩티드를 보조제들과 결합하는 것에 의하여 유사한 효과가 달성될 수 있다. 상기 종양 항원 또는 종양 항원 펩티드는 단백질로서, DNA(예를 들면, 벡터 내에 포함되어)로서 또는 RNA로서 제공될 수 있다. 상기 종양 항원은 상기 MHC 분자에 대한 펩티드 파트너(peptide partner)를 생산하도록 가공될 수 있으나, 반면에, 그의 단편은 추가적인 가공이 필요없이 제공될 수 있다. 후자는 특히 이들이 MHC 분자들에 결합될 수 있는 경우의 케이스이다. 완전한 항원이 수지상세포에 의하여 생체 내에서 가공되는 투여 형태로 주어지는 것이 바람직하며, 이는 또한 효과적인 면역 반응에 요구되는 T 헬퍼 세포 반응을 생성할 수 있기 때문이다(문헌 Ossendorp et al., Immunol Lett. 74:75-9, 2000; Ossendorp et al., J. Exp. Med. 187:693-702, 1998). 일반적으로, 종양 항원의 유효량을, 예를 들면, 피내주사(intradermal injection)을 통하여, 환자에게 투여하는 것이 가능하다. 그러나, 절내로 (intranodally) 림프절 내로 주사가 실행될 수도 있다(문헌 Maloy et al., Proc Natl Acad Sci USA 98:3299-303, 2001).

[0284] 또한, 본 발명에 따라 기술된 약제학적 조성물 및 치료방법은 본 명세서에서 기술된 질병의 치료학적 치료 또는 예방을 하기 위한 면역화 또는 백신 접종에 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 용어 "면역화" 또는 "백신 접종"들은 항원에 대한 면역 반응의 증가 또는 활성화에 연관된다. 암에 대한 면역화 효과를 시험하기 위하여 동물 모델들을 사용하는 것이 가능하다. 예를 들면, 종양을 생성시키기 위하여 인간 암세포를 마우스 내로 도입시킬 수 있다. 상기 동물에 투여된 약제에 의한 면역화의 유효성에 대한 측정으로서 상기 암세포에 대한 효과(예를 들면, 종양 크기에서의 감소)가 측정될 수 있다.

[0285] 면역화 또는 백신 접종을 위한 조성물의 일부로서, 바람직하게는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 약제(agents)가 면역 반응을 유도하거나 또는 면역 반응을 증가시키기 위한 하나 또는 그 이상의 보조제들과 함께 투여된다. 보조제는 면역 반응을 강화시키는 물질이다. 보조제들은 항원 보유체(antigen reservoir)를 제공(세포외적으로 또는 대식세포 내로)하고, 대식세포를 활성화시키고 및/또는 특정의 림프구들을 자극하는 것에 의하여 면역 반응을 강화시킬 수 있다. 보조제들은 공지되어 있으며, 또한 모노포스포릴 리피드 A(monophosphoryly lipid A ; MPL, 스미스클라인 비참(SmithKline Beecham)), QS21(스미스클라인 비참), DQS21(스미스클라인 비참 ; 국제공개특허공보 제WO 96/33739호), QS7, QS17, QS18 및 QS-L1(문헌 So et al., Mol. Cells 7:178-186, 1997) 등과 같은 사포닌, 불완전 프로인트 보조제(incomplete Freund's adjuvant), 완전 프로인트 보조제(complete Freund's adjuvant), 비타민 E, 몬타나이드(montanide), 명반(alum), CpG 올리고뉴클레오티드(문헌 Kreig et al., Nature 374:546-9, 1995 참조) 및 스쿠알렌 및/또는 토코페롤 등과 같은 생분해성 오일로부터 제조되는 다양한 유중수(water-in-oil) 에멀젼을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 본 발명에 따르면, 펩티드는 DQS21/MPL과의 혼합물로 투여된다. MPL에 대한 DQS21의 비율은 통상적으로 약 1:10 내지 10:1, 바람직하게는 약 1:5 내지 5:1, 특히 약 1:1이다. 인간에의 투여를 위해서는, 백신 제형(vaccine formulation)은 전형적으로는 약 1 $\mu$ g 내지 약 100 $\mu$ g의 범위로 DQS21 및 MPL을 포함한다.

[0286] 상기 환자의 면역 반응을 자극하는 다른 물질들 또한 투여될 수 있다. 예를 들면, 림프구들에 대한 그들의 조절 특성들로 인하여 백신 접종에 있어서 사이토카인을 사용하는 것이 가능하다. 이러한 사이토카인들에는, 예를 들면, 백신의 보호 작용을 증가시키는 것으로 나타난 인터루킨-12(IL-12)(문헌 Science 268:1432-1434, 1995을 참조), GM-CSF 및 IL-18들이 포함된다.

[0287] 면역 반응을 강화시키고 그리고 그에 따라 백신 접종에 사용될 수 있는 다수의 화합물들이 존재한다. 상기 화합물들에는 B7-1 및 B7-2(각각, CD80 및 CD86) 등과 같이 단백질 또는 핵산의 형태로 제공되는 공자극분자

(costimulating molecules)들이 포함된다.

[0288] 웹티드는 공지된 방법 그대로 투여될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 생체 외적(ex vivo) 방법, 즉, 세포의 환자로부터의 추출, 핵산을 내포하도록 하기 위한 상기 세포의 유전적 변형 및 변형된 세포의 상기 환자 내로의 재도입에 의하여 핵산이 투여된다. 이는 일반적으로 시험관 내에서 유전자의 기능적 복제(functional copy)를 환자의 세포 내로 도입하는 것과 유전적으로 변형된 세포를 상기 환자 내로 재도입시키는 것을 포함한다. 상기 유전자의 기능적 복제는 상기 유전자가 상기 유전적으로 변형된 세포 내에서 발현되는 것을 허용하는 조절 인자(regulatory elements)들의 기능적 조절 하에 있다. 형질감염법 및 형질도입법들은 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 공지된 것이다.

[0289] 또한 본 발명은, 예를 들면, 바이러스들 및 표적-제어된 리포좀(target-controlled liposomes)들 등과 같은 벡터들을 사용하는 것에 의한 핵산의 투여를 제공한다.

[0290] 바람직한 구체예에 있어서, 핵산을 투여하기 위한 바이러스 또는 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated viruses), 백시니아 바이러스(vaccinia virus) 및 약독화 폭스 바이러스(attenuated pox viruses)들을 포함하는 폭스 바이러스(pox viruses), 쎈리기 삼림 바이러스 (Semliki Forest virus), 레트로바이러스, 신드비스 바이러스 (Sindbis virus) 및 Ty 바이러스-유사 입자(Ty virus-like particles)들로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 아데노바이러스 및 레트로바이러스가 특히 바람직하다. 상기 레트로바이러스들은 전형적으로는 복제 결함(replication-deficient)이 있다(즉, 이들은 감염성 입자들을 생성할 수 없다).

[0291] 핵산을 시험관 내 또는 생체 내에서 세포 내로 도입하기 위한 방법에는 핵산 인산칼슘 침전물(nucleic acid calcium phosphate precipitates)들의 형질감염, DEAE와 연관된 핵산의 형질감염, 대상의 핵산을 운반하는 상기 바이러스들로의 형질감염 또는 감염, 리포좀-매개 형질감염 등이 포함된다. 특정의 구체예들에 있어서, 상기 핵산을 특정의 세포 내로 도입하는 것이 바람직하다. 이러한 구체예들에 있어서, 세포에 핵산을 투여하기 위하여 사용되는 담체(carrier ; 예를 들면, 레트로바이러스 또는 리포좀)는 결합된 표적제어 분자를 가질 수 있다. 예를 들면, 상기 표적 세포 상의 표면 막 단백질(surface membrane protein)에 특이적인 항체 또는 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등과 같은 분자는 상기 핵산 담체 내에 내포되거나 또는 부착될 수 있다. 바람직한 항체들에는 종양 항원에 선택적으로 결합하는 항체들이 포함된다. 핵산이 리포좀들을 통하여 투여되는 것을 원하는 경우, 표적 제어 및/또는 흡수를 가능하게 하기 위하여, 세포내 섭취(endocytosis)와 연관된 표면 막 단백질에 결합하는 단백질이 상기 리포좀 제형 내로 내포될 수 있다. 이러한 단백질에는 특정한 세포 유형에 특이적인 캡시드 단백질 또는 그의 단편들, 내면화되는(internalized) 단백질에 대한 항체들, 세포 내 부위들에 접근(addressing)하는 단백질 등이 포함된다.

[0292] 본 발명의 상기 치료학적으로 활성인 화합물들은 주사(injection) 또는 주입(infusion)을 포함하는 통상적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 상기 투여는, 예를 들면, 경구적으로, 정맥 내로, 복막 내로, 근육 내로, 피하로 또는 경피적으로 수행될 수 있다. 바람직하게는, 항체들은 폐 에어로졸(lung aerosol)의 방법으로 치료학적으로 투여된다. 안티센스 핵산은 저속 정맥내 투여(slow intravenous administration)에 의하여 투여되는 것이 바람직하다.

[0293] 본 발명의 상기 조성물은 유효량으로 투여된다. "유효량"은 단독 또는 추가의 투여량(doses)들과 함께 원하는 반응 또는 원하는 효과를 달성하는 양을 의미한다. 특정의 질병 또는 특정의 증상(condition)의 치료의 경우에 있어서, 상기 원하는 반응은 바람직하게는 상기 질병의 경과(course)의 억제와 연관된다. 이는 상기 질병의 진전을 늦추고, 그리고, 특히 상기 질병의 진전을 방해하거나 또는 역행시키는 것을 포함한다. 질병 또는 증상의 치료에서의 상기 원하는 반응은 또한 상기 질병 또는 상기 증상의 개시의 지연 또는 개시의 방지가 될 수 있다. 본 발명에 따르면, 암의 진단 또는 치료는 또한 이미 형성되었거나 또는 형성될 암 전이들의 진단 도는 치료를 포함할 수 있다. 본 발명에 따르면, 용어 "치료(treatment)"는 치료학적 치료 및 예방학적 치료 즉, 방지와 포함한다.

[0294] 본 발명의 조성물의 유효량은 치료되어야 할 증상, 상기 질병의 중증도(severeness), 연령, 생리적 상태, 신장과 체중 등을 포함하여 환자의 개인적 매개변수(individual parameters), 치료 기간, 수반되는 치료법의 형태(존재하는 경우), 투여의 특정한 경로 및 유사 인자(similar factors)들에 의존적이다. 따라서, 투여될 본 발명의 상기 조성물의 투여량들은 여러 가지의 이러한 매개변수들에 의존적이다. 환자의 반응이 초기 투여량(initial dose)으로 불충분한 경우, 보다 높은 투여량(효과적으로는 상이한, 보다 국부화된 투여의 경로에 의하여 달성되는 보다 높은 투여량들)이 사용될 수 있다.

- [0295] 본 발명의 상기 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균되고(sterile) 그리고 원하는 반응 또는 원하는 효과를 발생시키기에 유효한 양의 치료학적 활성 물질을 포함한다.
- [0296] 일반적으로, 1ng 내지 1mg, 바람직하게는 10ng 내지 100 $\mu$ g 패티드의 투여량들이 제형화되고 그리고 투여된다. 핵산(DNA 및 RNA)들의 투여를 원하는 경우, 1ng 내지 0.1mg의 투여량들이 제형화되고 그리고 투여될 수 있다.
- [0297] 본 발명의 상기 치료학적 조성물은 일반적으로 약제학적으로 호환될 수 있는 양들 및 약제학적으로 호환될 수 있는 제제(preparation)로 투여된다. 용어 "약제학적으로 호환될 수 있는("pharmaceutically compatible)"은 상기 약제학적 조성물의 활성 성분의 작용과 상호작용하지 않는 비독성의 물질을 의미한다. 이러한 종류의 제제들에는 일반적으로 염(salts), 완충 물질(buffer substances), 보존제(preservatives), 담체(carriers), 예를 들면 CpG 올리고뉴클레오티드, 사이토카인, 케모카인, 사포닌, GM-CSF 및/또는 RNA 등과 같은 보조제들 등과 같은 면역-강화 물질(immunity-enhancing substances) 및 적절한 경우, 다른 치료학적으로 활성인 화합물들이 포함될 수 있다. 약품(medicine)에 사용되는 경우, 상기 염은 약제학적으로 호환될 수 있어야 한다. 그러나, 약제학적으로 호환될 수 있는 염들을 제조하는 데 약제학적으로 호환될 수 없는 염들이 사용될 수 있으며, 본 발명에 포함된다. 이러한 종류의 약리학적으로 또는 약제학적으로 호환될 수 있는 염들에는 하기의 산들, 즉 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, 시트르산, 포름산, 말론산, 숙신산 등의 산들로부터 제조되는 것들이 될 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 약제학적으로 호환될 수 있는 염들은 또한 나트륨염, 칼륨염 또는 칼슘염들 등과 같은 알칼리금속염들 또는 알칼리토금속염들로 제조될 수 있다.
- [0298] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 호환될 수 있는 담체를 포함할 수 있다. 용어 "담체(carrier)"는 상기 활성의 성분에 적용을 용이하게 하도록 하기 위하여 결합되는, 천연 또는 합성의 속성의 유기 또는 무기 성분들을 의미한다. 본 발명에 따르면, 용어 "약제학적으로 호환될 수 있는 담체"는 환자에게 투여하기에 적절한 하나 또는 그 이상의 호환될 수 있는 고체 또는 액체 충진제(fillers), 희석제(diluents) 또는 캡슐화제(encapsulating substances)들을 포함한다. 본 발명의 상기 약제학적 조성물의 상기 성분들은 일반적으로 원하는 약제학적 효율성을 실질적으로 손상시키는 상호작용이 일어나지 않는 것들이다.
- [0299] 본 발명의 상기 약제학적 조성물은 염(salt) 중의 아세트산, 염중의 시트르산, 염 중의 봉산 및 염 중의 인산 등과 같은 적절한 완충 물질들을 포함할 수 있다.
- [0300] 상기 약제학적 조성물은 또한, 적절한 경우, 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride), 클로로부탄올(chlorobutanol), 파라벤(paraben) 및 티메로살(thimerosal) 등과 같은 적절한 보존제를 포함할 수 있다.
- [0301] 상기 약제학적 조성물은 일반적으로 일정한 투여량 형태(uniform dosage form)으로 제공되며, 그 자체가 알려진 방법으로 제조될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은, 예를 들면, 캡슐(capsules), 정제(tablets), 로젠제(lozenges), 용액제(solutions), 혼탁제(suspensions), 시럽제(syrups), 엘리서제(elixirs) 또는 에멀젼제(emulsion)의 형태가 될 수 있다.
- [0302] 비경구적 투여(parenteral administration)에 적합한 조성물은 일반적으로 상기 활성 화합물의 멸균된 수성 또는 비수성의 제제를 포함하며, 이는 바람직하게는 수용자(recipient)의 혈액과 등장이다. 호환가능한 담체들 및 용제들의 예들에는 링거액(Ringer solution) 및 등장의 염화나트륨 용액들이다. 게다가, 대개는 멸균의, 고정유(fixed oil)들이 용액 또는 혼탁액 매질로 사용된다.
- [0303] 본 명세서에서 사용되는 경우, 용어 "포함한다/포함하는(comprises/comprising)"은 언급된 특징, 정수, 단계 또는 성분의 존재를 특정하는 것으로 고려되나, 그러나 하나 또는 그 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 성분 또는 이들의 군의 존재 또는 부가를 배제하는 것을 아님은 강조되어야 한다. 특정의 측정이 상호적으로 상이한 종속 항에서 언급되거나 또는 상이한 구체예에서 기술되었다는 단순한 사실은 이를 측정의 조합이 유리하게 사용될 수 없다는 것을 나타내는 것은 아니다. 그러나, 용어 "포함한다/포함하는"은 또한 언급된 특징, 정수, 단계 또는 성분으로 이루어지는 구체예를 포함한다.
- [0305] 이하, 본 발명은 후술하는 도면 및 실시예에 의하여 보다 상세히 설명할 것이나, 이들 도면 및 실시예는 단지 예시적인 목적으로 사용된 것이며 본 발명을 한정하는 것이 아니다. 발명의 상세한 설명 및 실시예에 의하여, 본 발명에 포함되는 추가의 실시 상태도 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련자가 접근가능하다.

[0307]

실시예

[0309]

본 명세서에서 사용되는 기술 및 방법은 본 명세서에서 기술되어 있거나 또는 그 자체로서 공지된 방법으로 그 리고 예를 들면 문헌 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.에 기재된 바에 따라 수행된다. 키트(kit) 및 시약(reagents)의 사용을 포함하는 모든 방법은 달리 표시되지 않는 한, 제조업자의 설명서에 따라 수행된다.

[0311]

실시예 1 : CLDN6는 난소종양 및 폐종양에 특이적인 표지(marker)이다.

[0312]

CLDN6(서열 확인 번호 1에 따른 핵산 서열, 서열 확인 번호 2에 따른 아미노산 서열) 발현을 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 사용하여 정상 조직 및 난소암과 폐암(선암)으로부터의 시료 내에서 정량화시켰다.

[0313]

RNA 추출을 위하여, 앞서 기술된 바와 같이 제1-가닥(first-strand) cDNA 합성 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다(문헌 Koslowski et al, 2006; Koslowski et al, 2007들을 참조). 40회 역전사 중합효소 연쇄반응에서 3중으로 실시간 정량적 발현 분석을 수행하였다. HPRT로의 표준화(normalization) 이후(센스 5'-TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3'; 안티센스 5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3', 62°C 어닐링(annealing)),  $\Delta\Delta CT$  계산을 이용하여 CLDN6(센스 5'-CTT ATC TCC TTC GCA GTG CAG-3'; 안티센스 5'-AAG GAG GGC GAT GAC ACA GAG-3', 60°C 어닐링)의 발현을 정량하였다. 각 정상 조직형에 대하여 3개 이하의 개체들로부터의 조직들을 시험하였다.

[0314]

태반을 제외하고는, 정상 조직 내에서 단지 흔적량의 CLDN6 전사물들이 검출될 수 있었다. 대조적으로, 본 발명자들은 난소암(선암) 및 폐암(선암)으로부터의 시료 내에서 CLDN6의 높은 발현을 발견하였다; 도 1 참조.

[0316]

실시예 2 : 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하는 정상 조직, 암에 걸린 조직 및 세포주에서의 CLDN6 발현의 정량

[0317]

제조업자 지시에 따라 RNeasy 미니 키트(RNeasy Mini Kit ; 키아제(Qiagen))를 사용하여 동결된 조직 시편(tissue specimens) 및 암세포주로부터 총 세포 RNA를 추출하고, dT<sub>18</sub> 올리고뉴클레오티드로 프라이머화하고(primed), 그리고 슈퍼스크립트 II(Superscript II ; 기브코/라이프테크(GIBCO/Lifetech))로 역전사시켰다. 수득된 cDNA의 완결성(integrity)을 30회의 중합효소 연쇄반응에서의 p53 전사물들의 증폭에 의하여 시험하였다(센스, 5'-CGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCG-3'; 안티센스, 5'-CCTAACAGCTGCCAACTGTAG-3'; 어닐링 온도 67°C). HPRT로의 정규화 이후(센스 5'-TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3'; 안티센스 5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3'; 62°C 어닐링),  $\Delta\Delta CT$  계산을 이용하여 CLDN6의 발현(센스 5'-CTT ATC TCC TTC GCA GTG CAG-3'; 안티센스 5'-AAG GAG GGC GAT GAC ACA GAG-3'; 60°C 어닐링)을 정량하였다.

[0318]

각 정상 조직 형태에 대하여 3개의 개체로부터의 조직을 시험하였다. 40회의 역전사-중합효소 연쇄반응 이후, 정상 조직 내에서는 단지 흔적량의 CLDN6 전사물이 검출될 수 있었다; 도 2 참조. 발현 컷오프(파선, 모든 정상 조직들의 평균 발현 + 3 STDs(99% 백분위수))를 약간 초과하는 유일한 정상 조직은 태반이었다. 에러바들, STD.

[0319]

정상 조직과는 대조적으로, 본 발명자들은 난소암(선암), 폐암(NSCLC, 선암에서 가장 높은 빈도 및 발현 수준들로), 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암(기저세포암종 및 편평세포암종), 악성 흑색종, 두경부암(악성 다형선종), 육종(활막육종과 암육종), 담관암, 신세포암종(투명세포신세포암종과 유두암종), 자궁암, 방광암(유두암종) 및 암세포주들 A2780(난소암), NIH-OVCAR3(난소암), HCT-116(대장암), EFO-27(난소암), CPC-N(SCLC), NCI-H552(NSCLC), SNU-1(위암), KATOIII(위암), YAPC(췌장암), AGS(위암), FU97(위암), MKN7(위암)들로부터의 샘플들에서 CLDN6의 높은 발현을 발견하였다; 도 3a 내지 도 3g 참조. 암에 걸린 조직 및 세포주 내에서의 CLDN6 발현 빈도를 과대평가하지 않기 위하여, 단지 정상 조직 발현 컷오프의 적어도 10배 이상의 전사물 수준만을 양성으로 분류하였다(파선).

[0320]

실시예 3 : 웨스턴 블로트 분석을 사용하는 정상 조직, 암에 걸린 조직 및 세포주에서의 CLDN6 발현의 정량화

[0321]

웨스턴 블로트 분석을 위하여 램나이-세포 용해 완충제(Laemmli-lysis buffer)로 세포용해된 세포로부터 추출된

20 $\mu$ g의 총 단백질을 사용하였다. 추출물들을 환원 샘플 완충제(reducing sample buffer ; 로쓰(Roth)) 내에서 희석시키고, SDS-PAGE에 적용시키고, 그리고 후속적으로 PVDF막(PVDF membrane ; 폴(Pall)) 상으로 전기이동(electrotransferred) 시켰다. CLDN6(에이알피(ARP))와 베타-액틴(beta-Actin ; 애브켐(Abcam))에 대하여 반응성인 폴리클로날 항체들로 면역염색(immunostaining)을 수행하였으며 후속하여 고추냉이-페옥시다아제 공액화된 염소 항-마우스(horseradish-peroxidase conjugated goat anti-mouse) 및 염소 항-토끼 2차 항체(goat anti-rabbit secondary antibodies ; 다코(Dako))들로의 원발성 항체들을 검출하였다.

[0322] 각 정상 조직 형태에 대하여 5개체 이하들로부터의 조직 용해물을 시험하였다. 분석된 상기 정상 조직들 중의 어느 것에서도 CLDN6 단백질 발현이 검출되지 않았다; 도 4 참조. NIH-OVCAR3, 양성 대조.

[0323] 정상 조직들과는 대조적으로 난소암 및 폐암로부터의 샘플에서 CLDN6 단백질의 높은 발현이 검출되었다; 도 5 참조. NIH-OVCAR3, 양성 대조.

[0324] CLDN6 발현 플라스미드(양성 대조), NIH-OVCAR3(난소암), MKN7(위암), AGS(위암), CPC-N(SCLC), HCT-116(대장암), FU97(위암), NEC8(고환胎생성암), JAR(태반용모상피암), JEG3(태반용모상피암), BEWO(태반용모상피암) 및 PA-1(난소기형암종)들로 형질감염된 HEK293 세포 내에서 CNDN6 발현이 검출되었다; 도 6 참조.

#### 실시예 4 : 정상 조직들과 암에 걸린 조직들 내에서의 CLDN6 발현의 면역조직화학(IHC) 분석

파라핀-매립된 조직 절편(paraffin-embedded tissue sections)(4 $\mu$ m)들을 열판(HI 1220, 라이카(Leica)) 상에서 1시간 동안 58°C에서 배양시켰다. 슬라이드(slides)들을 로티클리어(roticlear ; 로쓰) 내에서 실온에서 2 × 10분 동안 배양시키는 것에 의하여 상기 절편들로부터 파라핀을 제거하였다. 그 후, 상기 절편들을 분급된 알코올(graded alcohol) 내에서 재수화(rehydrated)(99%, 2 x 96%, 80% 및 70%, 각 5분)시켰다. 10mM 시트르산염 완충제(citrate buffer ; pH 6.0) + 0.05% 트윈-20(Tween-20) 내에서 15분간 120°C(15 프사이(psi))에서 슬라이드들을 끓이는 것에 의하여 항원 회수(retrieval)를 수행하였다. 끓이기 직후에 슬라이드들을 PBS 내에서 5분간 배양시켰다. 내생성 페옥시다아제 활성을 메탄올(MeOH) 내의 0.3% 과산화수소(hydrogen peroxide)로 실온에서 15분간 차단시켰다. 비-특이적인 결합을 피하기 위하여 상기 슬라이드들을 PBS 내의 10% 염소 혈청으로 실온에서 30분간 차단시켰다. 그 후, 상기 슬라이드들을 CLDN6-특이적 폴리클로날 항체(1 $\mu$ g/ml)(에이알피)와 함께 4°C에서 밤새도록 배양시켰다. 그 다음 날, 상기 슬라이드들을 PBS로 실온(3 x 5분)에서 세척하고 그리고 100 $\mu$ l의 2차 항체(파워비전 폴리 HRP-항-토끼 면역글로불린 즉시사용용(PowerVision poly HRP-Anti-Rabbit IgG ready-to-use ; 임무노로직(ImmunoLogic))과 함께 실온에서 1시간 동안 배양시켰다. 그 후, 슬라이드들을 PBS로 실온에서 5분간 3회 세척하였다. 벡터 라보레이토리즈(Vector Laboratories ; 미국 캘리포니아주 벌링게임(Burlingame) 소재)의 벡터 노바레드 기질 키트 에스케이-4800(VECTOR NovaRED Substrate Kit SK-4800)을 사용하는 것에 의하여 최종 염색을 수행하였다. 절편들을 헤마토실린(haematoxylin)으로 실온에서 90초 동안 대비염색(counterstained) 시켰다. 분급된 알코올들로 탈수(70%, 80%, 2x 96% 및 99%, 각 5분) 및 자일롤(Xylool) 내에서 10분간 배양시킨 후, 슬라이드들을 엑스-트라 키트(X-tra Kit ; 메다이트 히스토테크닉(Medite Histotechnic))에 탑재시켰다.

[0327] 분석된 상기 조직들 중의 어느 것도 CLDN6 단백질 발현이 검출되지 않았다; 도 7 참조. 췌장, 십이지장 및 신장 내에서 볼 수 있는 검은 표식(marks)들은 세포 구조물들과 연관이 없는 염료 침전물들을 나타낸다.

[0328] 정상 조직들과는 대조적으로, (a) 난소암, (b) 폐암, (c) 피부암, (d) 췌장암, 위암, (e) 유방암, 방광암(이행상피종양), (f) 자궁경부암, 고환암(정상피종), (g) 자궁암, 소장암 및 (h) 고환암(태생성 및 기형종)들로부터의 조직 절편들 상에서 강하거나 또는 적어도 명백한 염색이 관측되었다; 도 8a 내지 8h 참조. 염색은 악성의 상피 세포군(epithelial cell populations)들의 원형질막에서 뚜렷하게 강조된 반면에, 인접하는 기질 및 비-악성의 상피세포는 음성이었다. 이들 결과들은 CLDN6 단백질이 악성의 세포의 원형질막에 국부화되었다는 것을 나타내고 있다.

#### 실시예 5 : 암 세포 내에서의 CLDN6 발현의 유세포 분석

[0330] 세포를 5mM EDTA/PBS로 수확하고 그리고 PBS/2% FCS/0.1% 산나트륨염(NaAcid) 내에서 재현탁시켰다. 2 x 10<sup>5</sup> 세포를 4°C에서 30분간 CLDB6(알엔디(R&D))의 세포외 영역(extracellular domain)을 표적화하는 마우스 모노클로날 항체와 함께 배양시켰다. 세척 후, 세포를 APC-표지된 염소-항 마우스 2차 항체(APC-labeled goat anti-mouse secondary antibody ; 잭슨 임무노리서치 라보레이토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories))와 함께 4°C에서 30분간 배양시켰다. 세척 후, 세포를 프로피디움 이오다이드(propidium iodide ; PI)로 염색시켰다. 통문(gating) 이후 비디 팩스어레이 바이오아날라이저 시스템(BD FACSArray Bioanalyzer System)을 사용하여

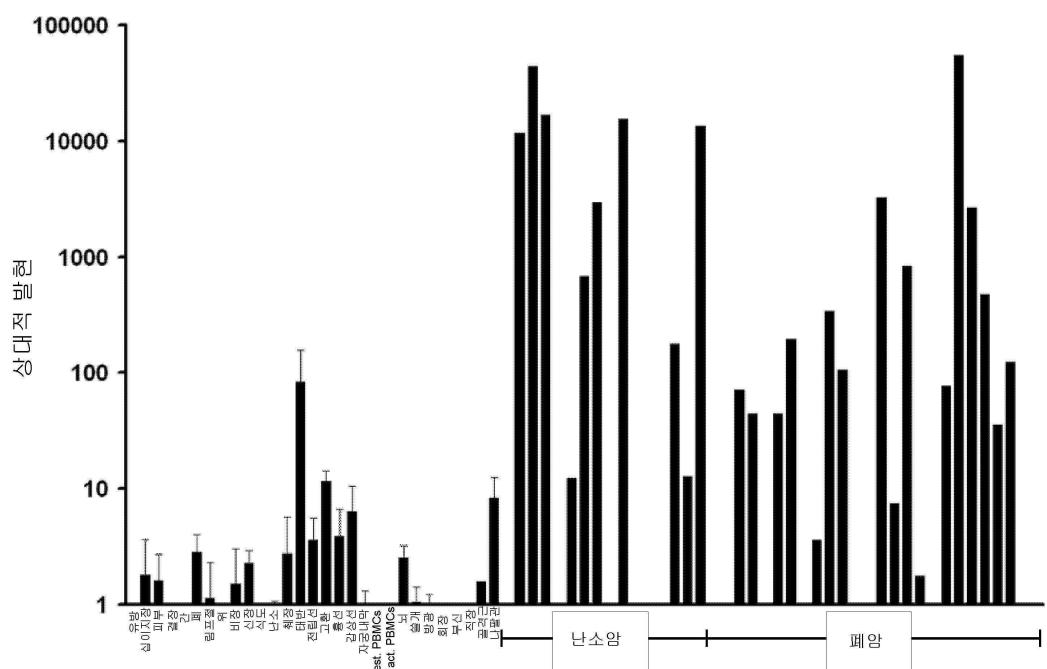
살아 있는 것(PI-음성 세포)에 대한 분석을 수행하였다.

[0331]

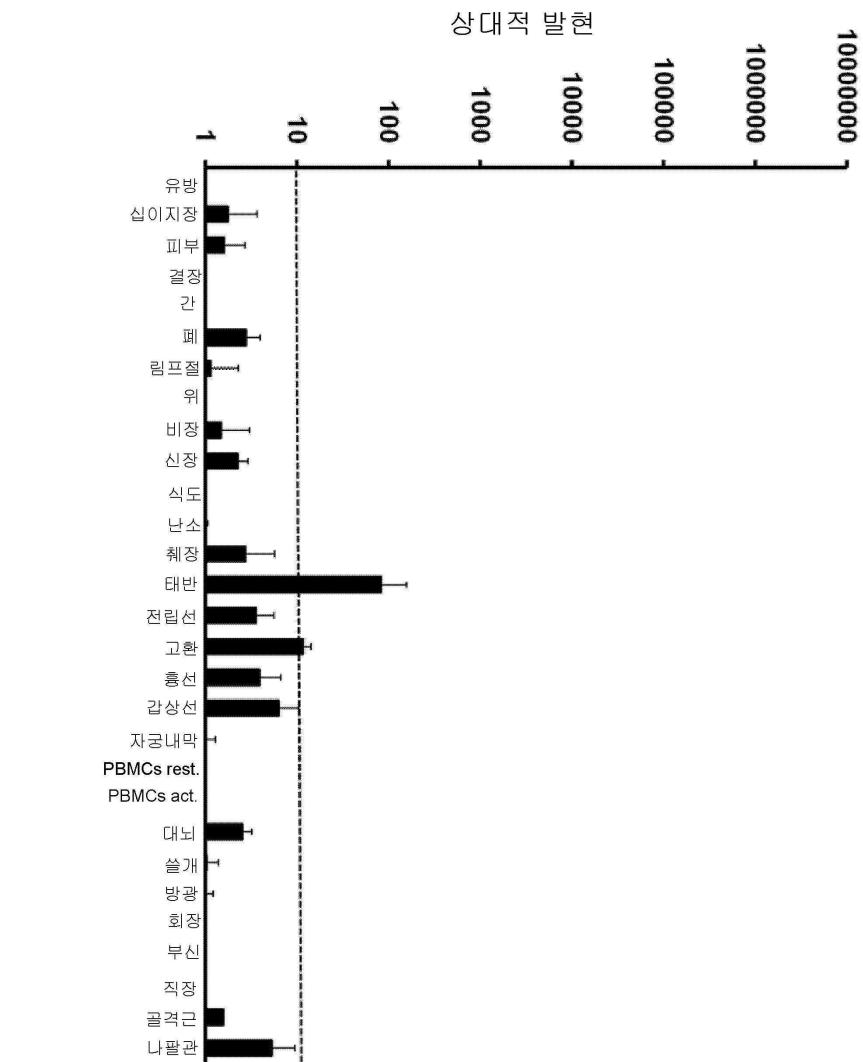
천연의 세포를 CLDN6( a CLDN6)의 세포외 영역을 표적화하는 통상의 모노클로날 항체를 사용하여 염색시켰다. 대조로서 CLDN6 발현 플라스미드로 형질감염된 HEK293 세포 및 형질감염되지 않은 HEK293 세포를 사용하였다. 형질감염되지 않은 대조 세포에서는 표지화가 관측되지 않았으나, 그러나, CLDN6 형질감염된 대조 세포 내에서는 그리고 내생성 CLDN6 발현 AGS(위암), NIH-OVCAR3(난소암), HCT-116(대장암) 및 CPC-N(SCLC) 암세포 내에서는 강한 표지화가 관측되었다; 도 9 참조. 이들 결과들은 CLDN6가 암세포의 원형질막에 국부화되어 있으며 세포외 단백질 영역에 직접적으로 대향하는 모노클로날 항체들에 의하여 표적화될 수 있다는 것을 명백하게 보여주고 있다.

## 도면

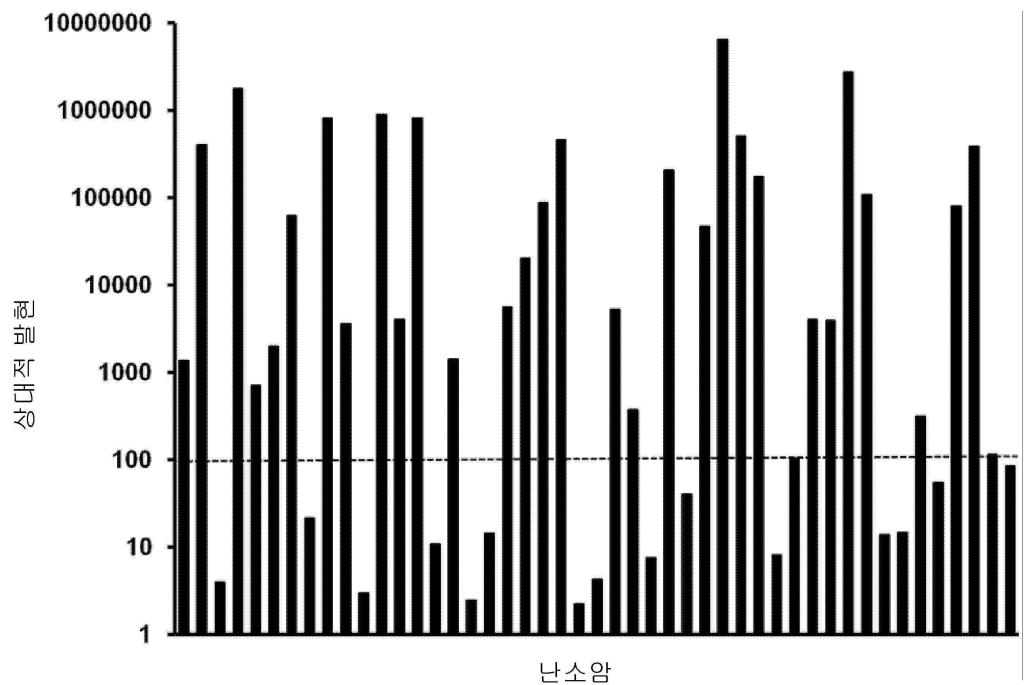
### 도면1



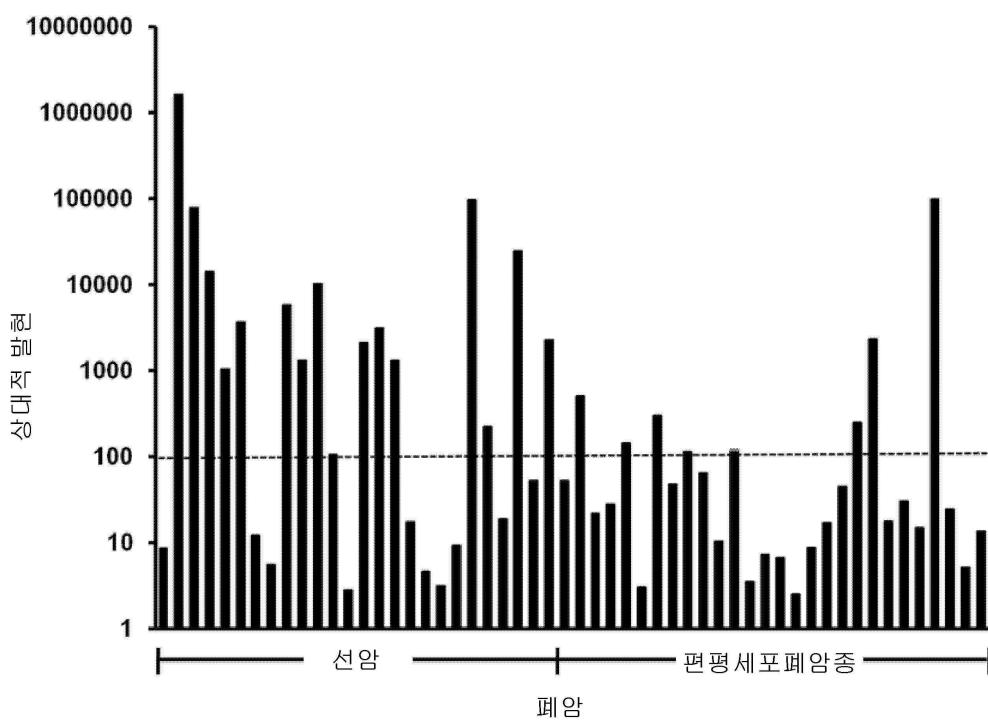
## 도면2



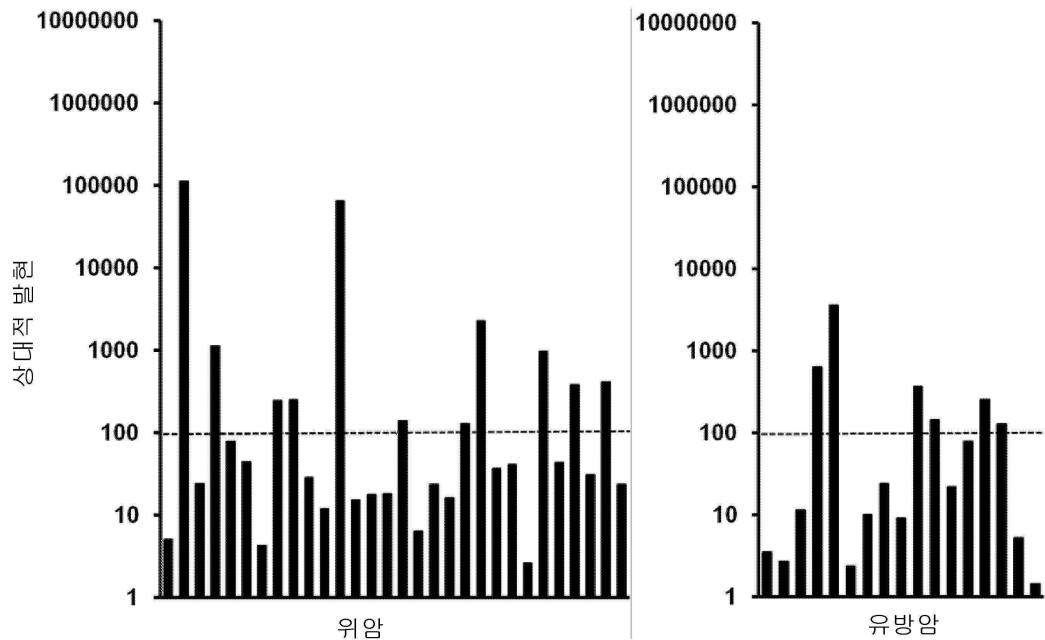
### 도면3a



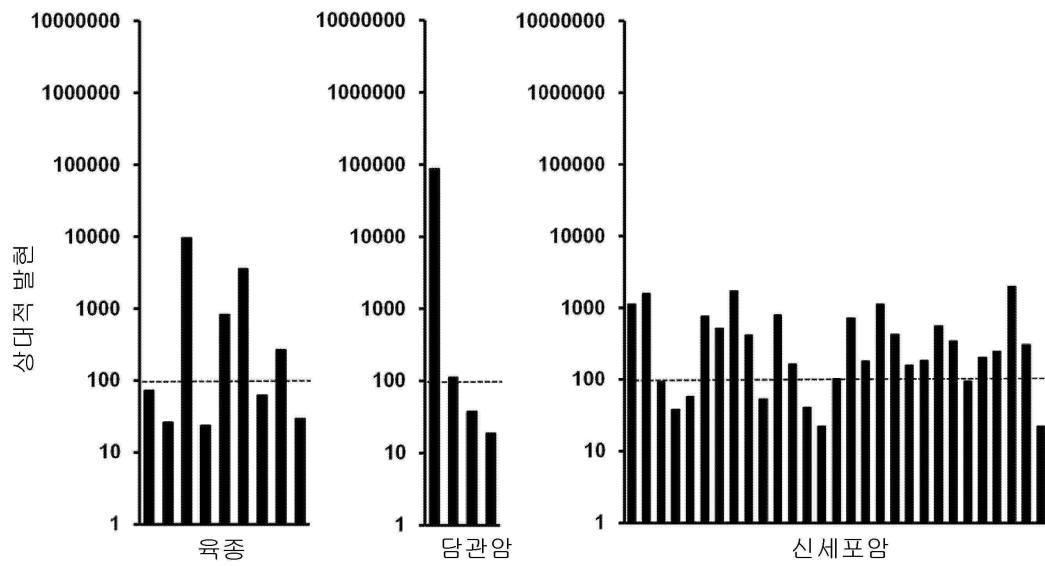
### 도면3b



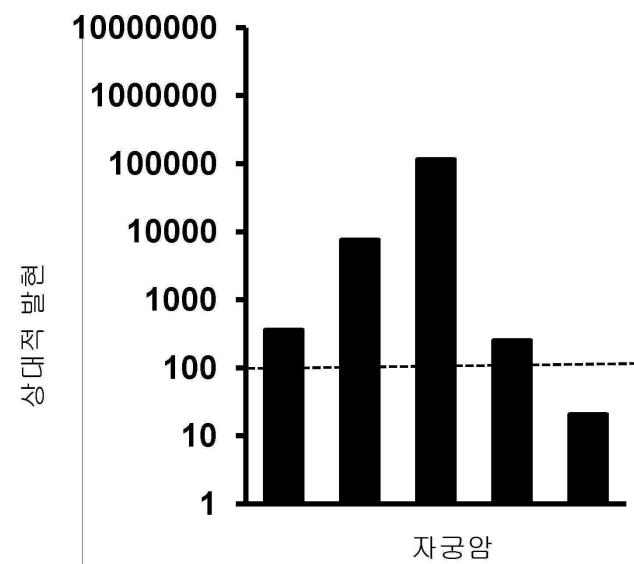
도면3c



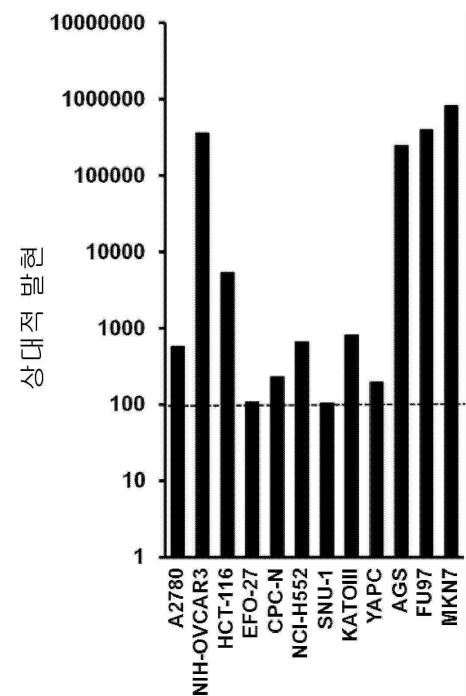
### 도면3e



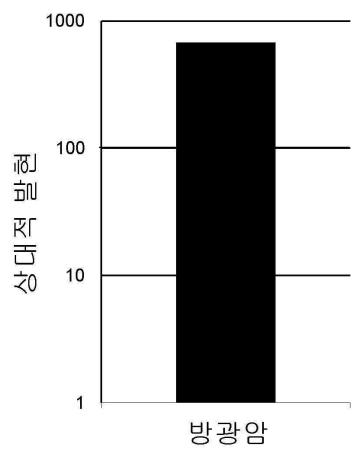
### 도면3f



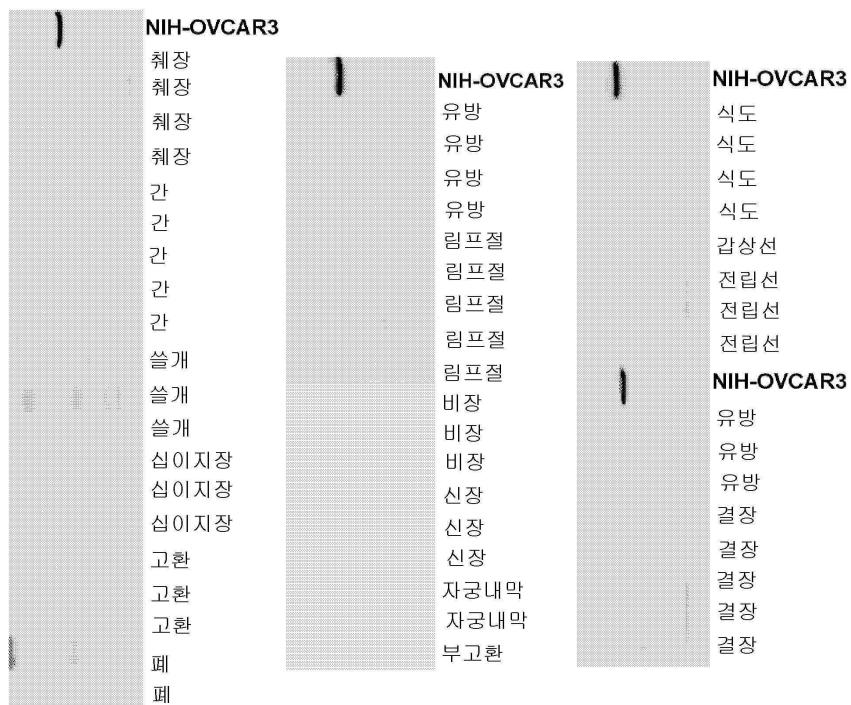
도면3g



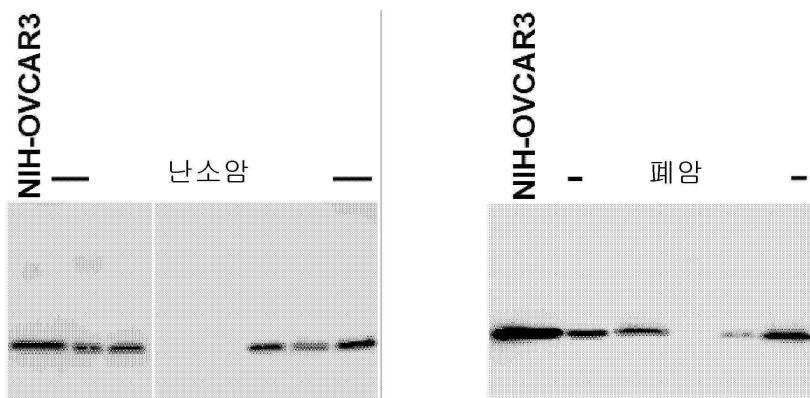
도면3h



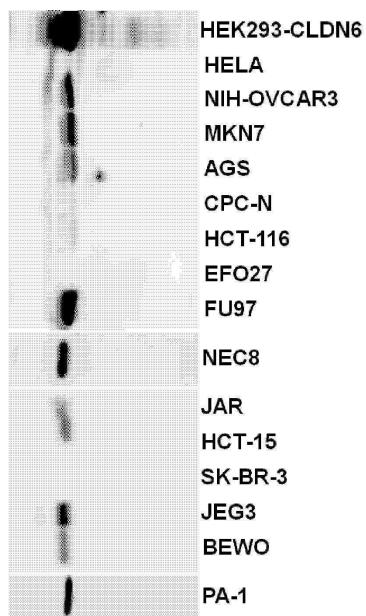
## 도면4



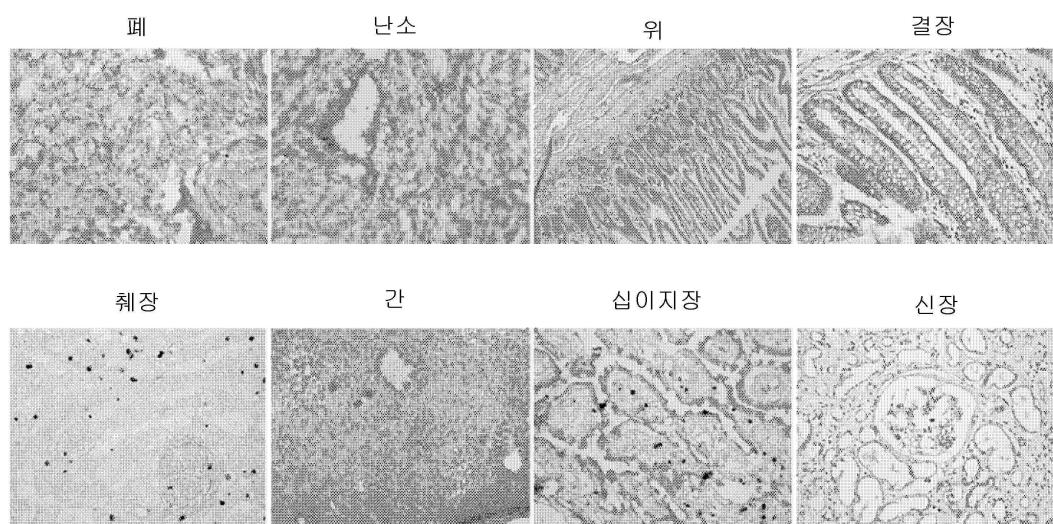
## 도면5



도면6

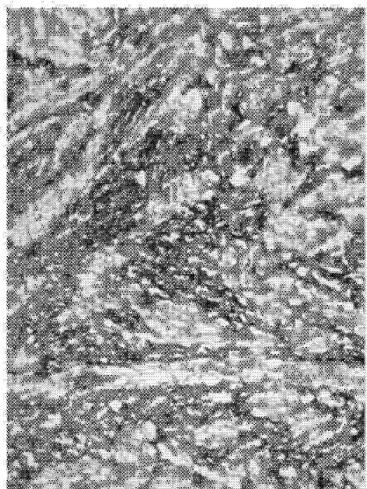


도면7

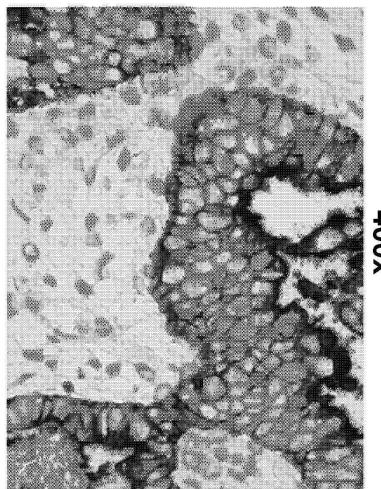
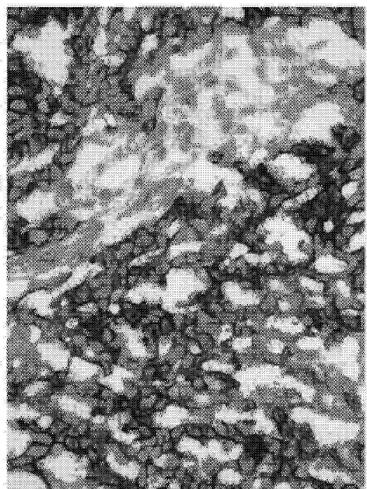


도면8a

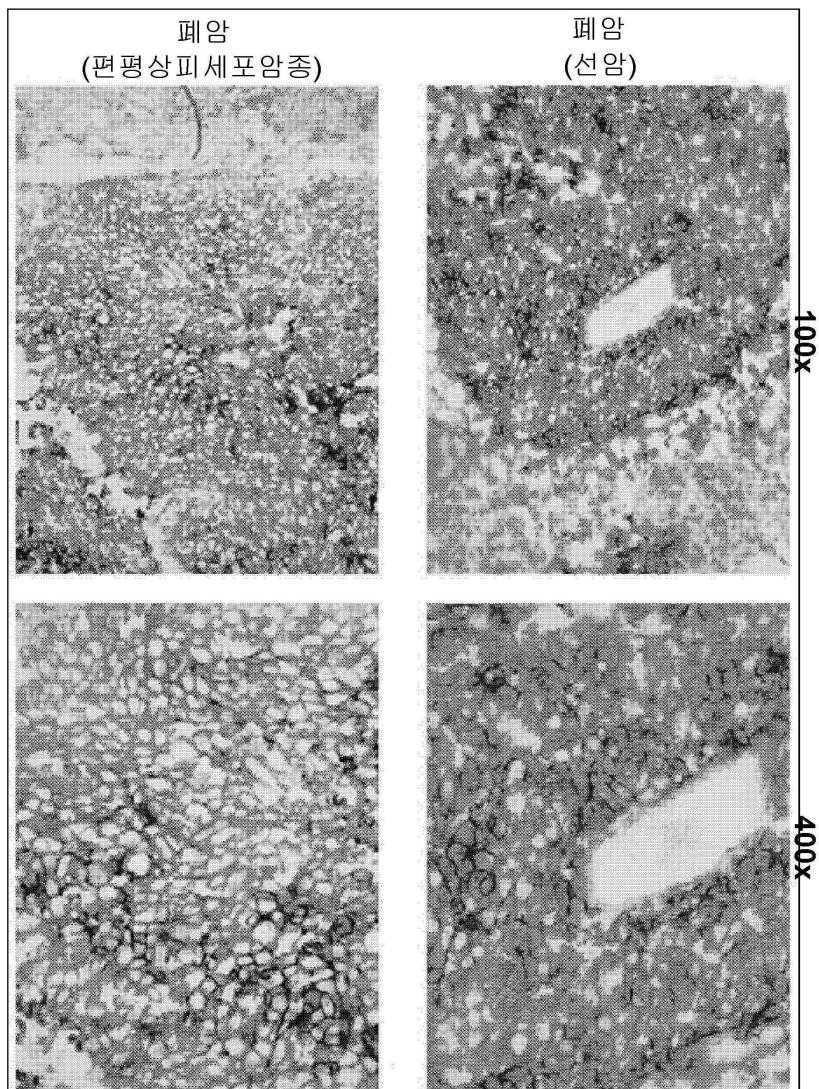
난소암



난소암

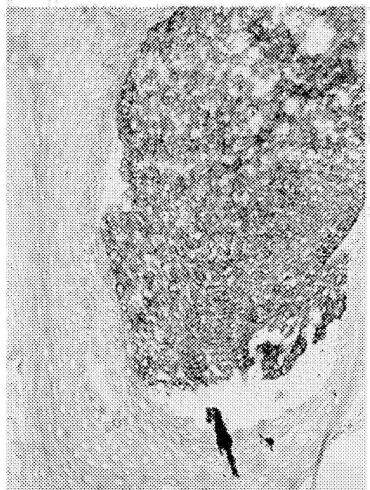


도면8b

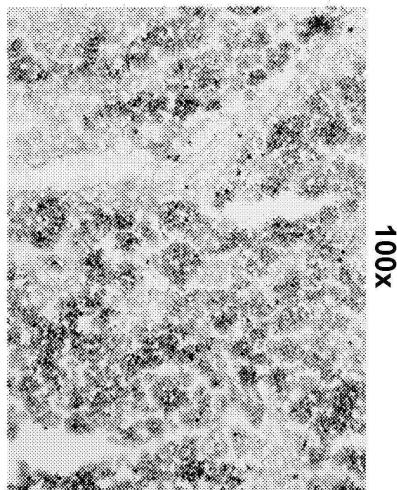


도면8c

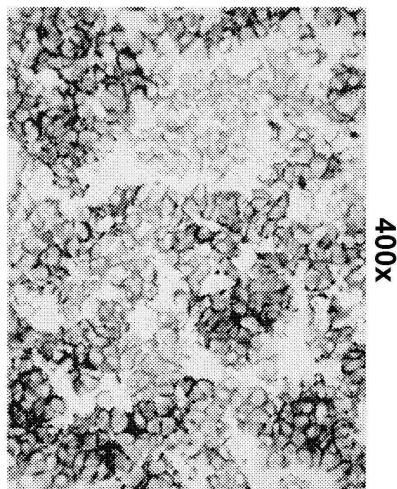
피부암



피부암

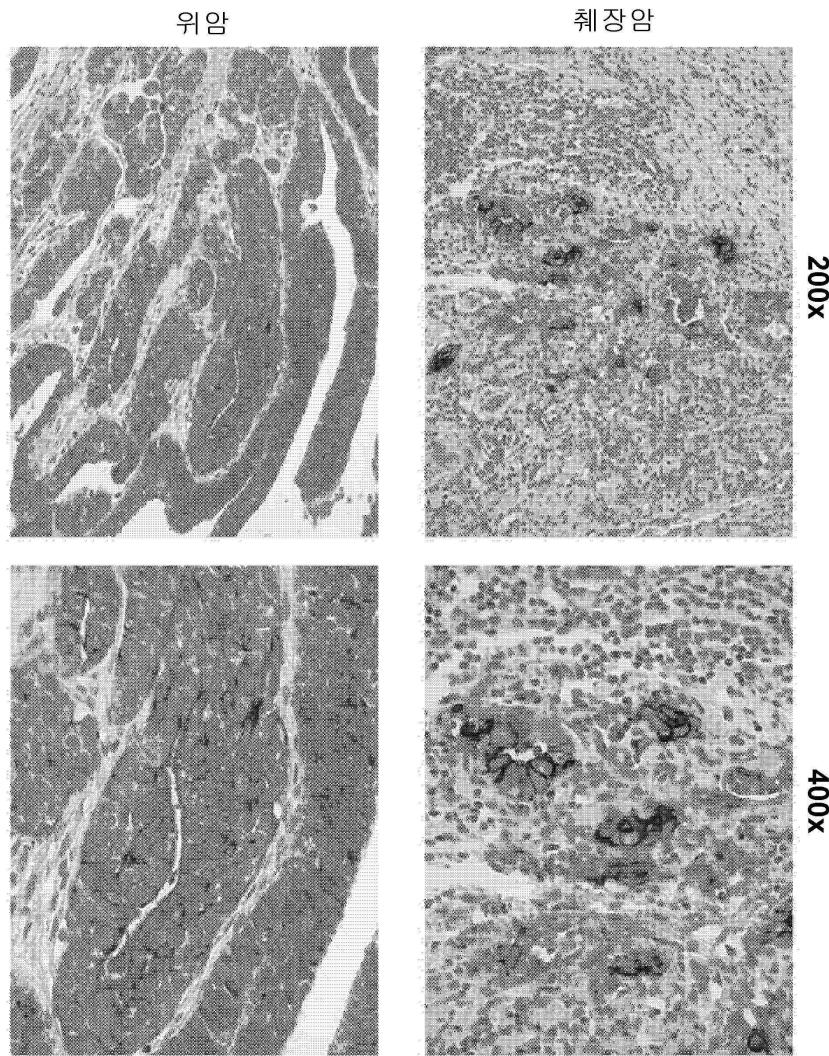


100x

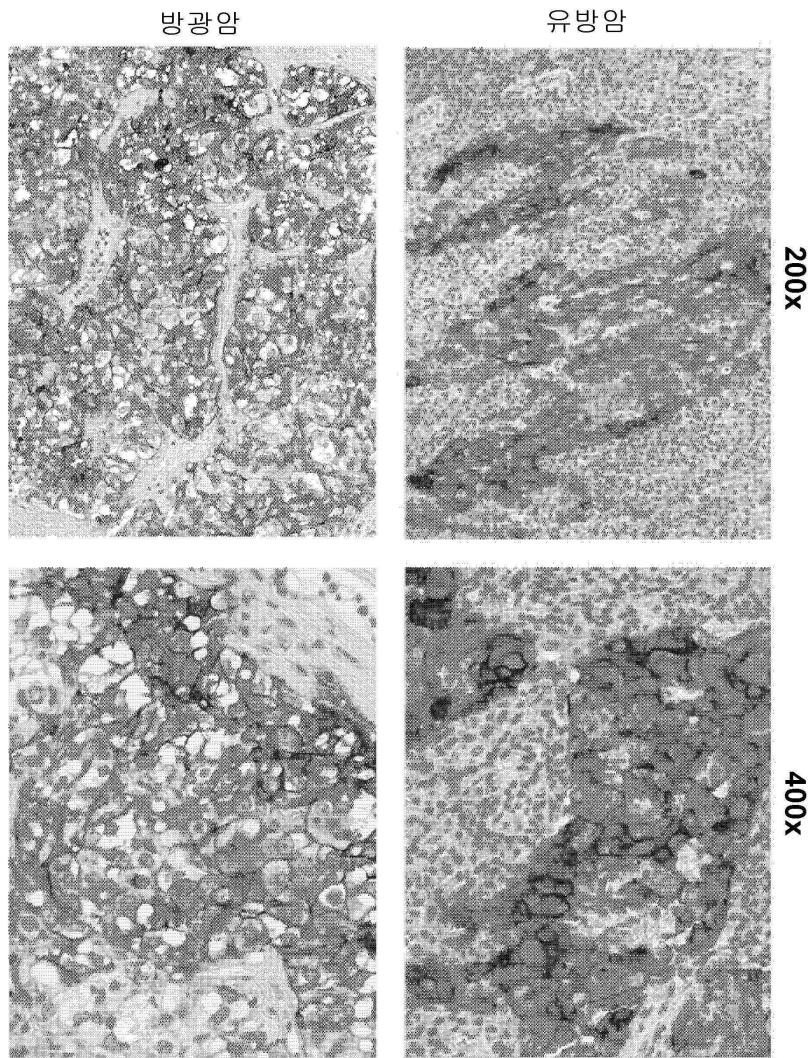


400x

도면8d

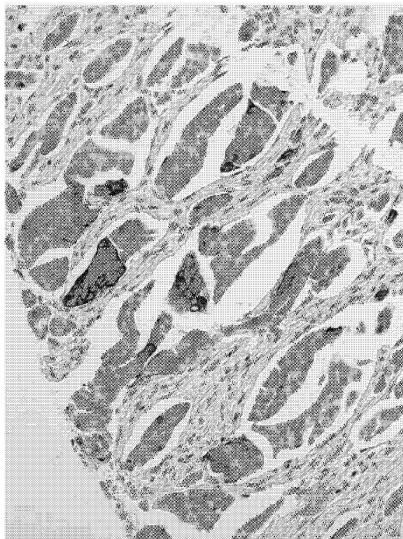


도면8e

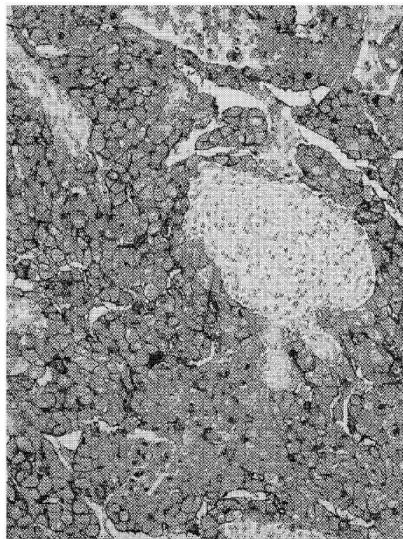


도면8f

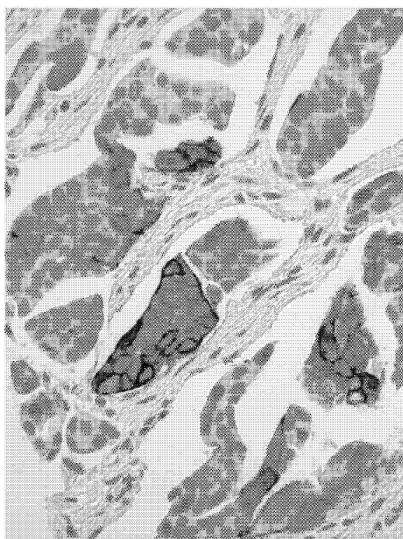
자궁경부암



고환암(정상피종)



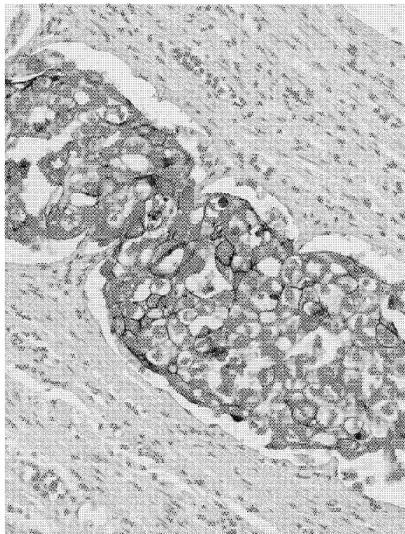
200x



400x

도면8g

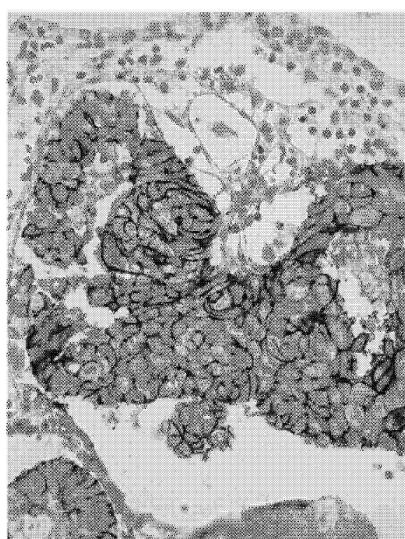
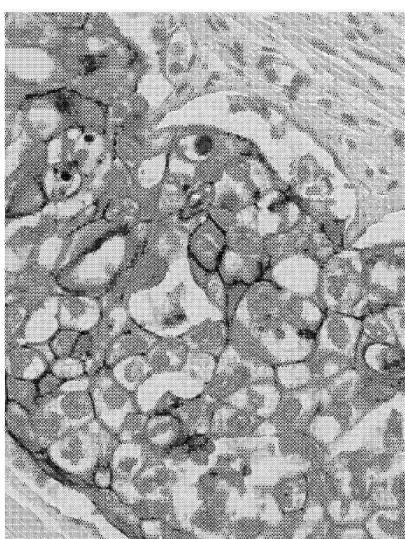
소장암



자궁암



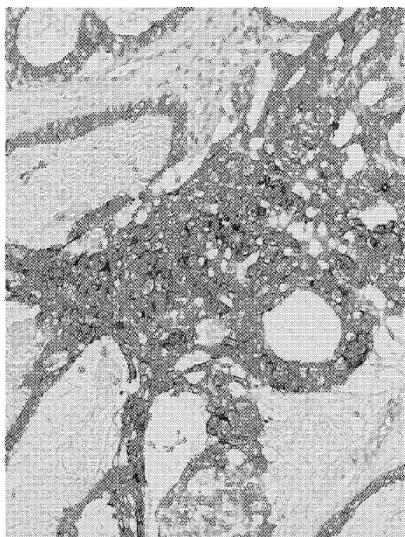
200x



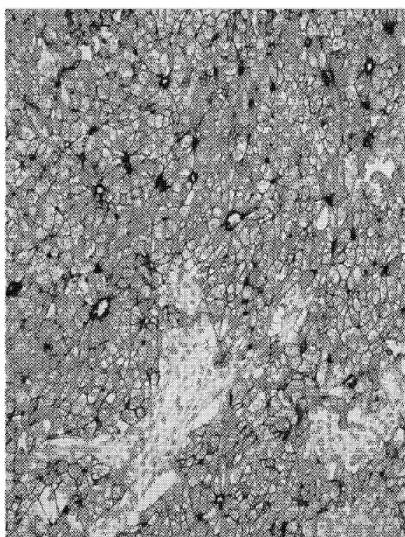
400x

도면8h

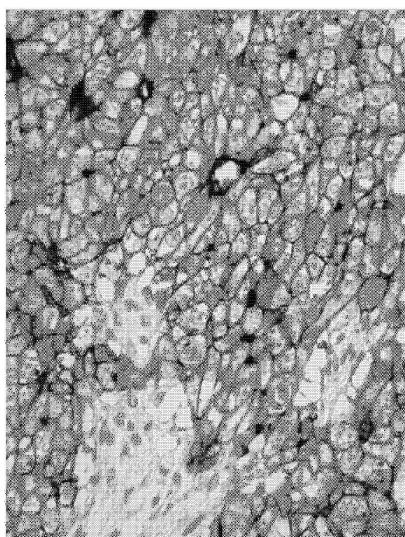
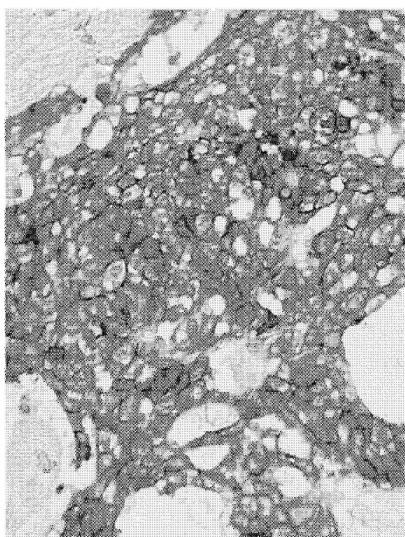
고환암(기형종)



고환암(태생성암)



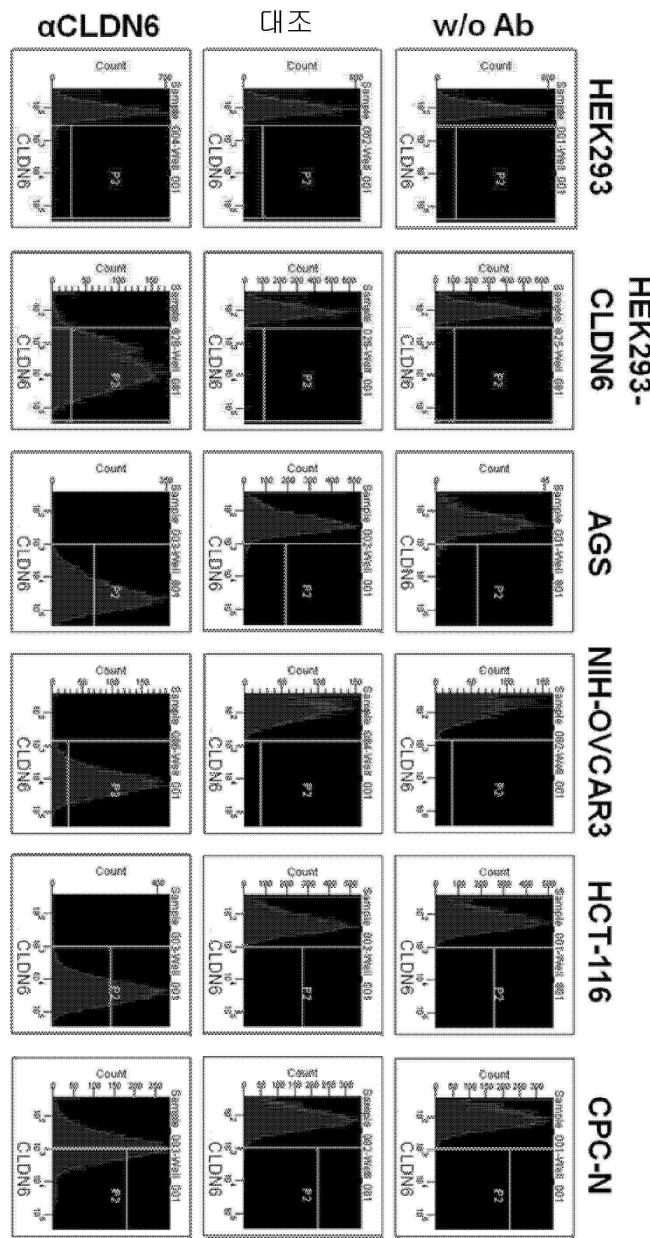
200x



400x

## 도면9

## 아이소타입



&lt;151&gt; 2009-08-06

&lt;150&gt; EP 09014135.9

&lt;151&gt; 2009-11-11

&lt;150&gt; US 61/154,167

&lt;151&gt; 2009-02-20

&lt;150&gt; US 61/231,843

&lt;151&gt; 2009-08-06

&lt;150&gt; US 61/260,135

&lt;151&gt; 2009-11-11

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1369

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

cgacactcg	cctaggaatt	tcccttatct	ccttcgcagt	gcagctcctt	caacctcgcc	60
atggcctctg	ccggaatgca	gatcctggga	gtcgtcctga	cactgctggg	ctgggtgaat	120
ggcctggct	cctgtccct	gccccatgtgg	aagggtaccg	cttcatcg	caacagcatc	180
gtggtggccc	agggtgggtg	ggagggcctg	tggatgtcct	gcgtggtgca	gagcaccggc	240
cagatgcagt	gcaagggtgta	cgactcactg	ctggcgctgc	cacaggacct	gcaggctgca	300
cgtccctct	gtgtcatcg	cctccttg	gccctgttc	gcttgctggt	ctacccgt	360
ggggccaagt	gtaccac	tgtggaggag	aaggattcca	aggccgcct	ggtgctacc	420

tctgggattg	tctttgtcat	ctcagggtc	ctgacgctaa	tccccgtgt	ctggacggcg	480
catgccatca	tccgggactt	ctataacccc	ctgggtggctg	aggcccaaaa	gcgggagctg	540
ggggcctccc	tctacttggg	ctggcgccc	tcaggcctt	tgttgctgg	tgggggttg	600
ctgtgctgca	cttgcccctc	gggggggtcc	caggccccca	gcattacat	ggcccgctac	660
tcaacatctg	cccctgccc	ctctcgcccc	ccctctgagt	accctaccaa	gaattacgtc	720
tgacgtggag	ggaaatgggg	gctccgctgg	cgctagagcc	atccagaagt	ggcagtgccc	780
aacagcttgc	ggatgggttc	gtacctttg	tttctgcctc	ctgctat	tttttgact	840

gaggatattt	aaaattcatt	tgaaaactga	gccaaagggt	tgactcagac	tctcacttag	900
gctctgtgt	ttctcaccct	tggatgtgg	agccaaagag	gggatgctt	gagattctgg	960

atcttgacat gcccacatctta gaagccagtc aagctatgga actaatgcgg aggctgcttg 1020  
 ctgtgctggc tttcaacaa gacagactgt ccccaagagt tcctgctgct gctggggct 1080  
 gggcttcctt agatgtcact ggacagctgc ccccatcct actcaggtct ctggagctcc 1140  
 tctttcacc cctggaaaaa caaatgtact gttaacaag gactgcccac ctccggaact 1200  
 tctgacctct gttcctccg tcctgataag acgtccaccc cccagggcca ggtcccagct 1260

atgttagaccc ccgcacccac ctccaaacact gcacccttct gccctgcccc cctcgctca 1320  
 cccctttac actcacattt ttatcaaata aagcatgttt tgtagtgc 1369

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 220

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu  
 1 5 10 15

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val  
 20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu

35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys

50 55 60  
 Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala

65 70 75 80  
 Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu

85 90 95  
 Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp

100 105 110

Ser Lys Ala Arg Leu Val Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser  
 115 120 125

Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile  
 130 135 140

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu  
 145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu

165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly

180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser

195 200 205

Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val

210 215 220

<210> 3

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala

1 5 10 15

Gln Val Val Trp Glu Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr

20 25 30

Gly Gln Met Gln Cys Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln

35 40 45

Asp Leu Gln Ala Ala

50

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln

1 5 10 15

Cys Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala

20 25 30

Ala

<210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys

1 5 10

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Oligonucleotide  
 <400> 6

cttatctcct tcgcagtgca g 21

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Oligonucleotide  
 <400> 7

aaggaggcgc atgacacaga g 21

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Oligonucleotide  
 <400> 8

tgacactggc aaaacaatgc a 21

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Oligonucleotide  
 <400> 9

ggtcctttc accagcaagc t

21

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Oligonucleotide

&lt;400&gt; 10

cgtgagcgct tcgagatgtt ccg

23

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Oligonucleotide

&lt;400&gt; 11

cctaaccagc tgcccaactg tag

23