



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월23일
(11) 등록번호 10-1841475
(24) 등록일자 2018년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7021961
(22) 출원일자(국제) 2011년01월24일
심사청구일자 2016년01월20일
(85) 번역문제출일자 2012년08월22일
(65) 공개번호 10-2012-0127467
(43) 공개일자 2012년11월21일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2011/000352
(87) 국제공개번호 WO 2011/089921
국제공개일자 2011년07월28일
(30) 우선권주장
61/297,996 2010년01월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2005073374 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
온코세라피 사이언스 가부시키가이샤
일본, 가나가와 213-0012, 가와사키시, 다카쓰구,
사카도 3쵸메 2-1
(72) 발명자
나카무라 유스케
일본 1138654 도쿄 분쿄구 홍고 7쵸메 3-1 고쿠리
즈다이가쿠호우진 도쿄다이가쿠 나이
츠노다 타쿠야
일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카츠크 사카
도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이
샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김지윤

(54) 발명의 명칭 변형된 MELK 펩티드 및 이를 함유하는 백신

(57) 요약

변형된 MELK 에피토프 펩티드의 아미노산 서열로 구성된 분리된 펩티드 또는 이의 단편은 HLA 항원에 결합하고, 야생형 MELK 에피토프 펩티드의 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 유도성(inducibility) 보다 더 높은 CTL 유도성을 가지므로, 암 면역치료 또는 자궁내막증 면역치료의 맥락에서, 보다 특히 본 발명에 기재된 암 또는 자궁내막증 백신 사용에 적합하다. 또한, 본 발명은 필수적인 세포독성 T 세포 유도성을 유지하는 한, 하나 둘 또는 일부 아미노산이 삽입(insertions), 치환(substitutions) 또는 첨가된(additions) 상기 펩티드 또는 단편을 포함하는 펩티드를 제공한다. 또한, 상기 펩티드 중 어느 것을 암호화하는 핵산(nucleic acids) 및 상기 펩티드 또는 핵산 중 어느 것을 포함하는 약학적 물질(substances) 및 조성물(compositions)을 제공한다. 본 발명의 상기 펩티드, 핵산, 약학적 제제, 물질 및 조성물은 특히 암, 종양 및 자궁내막증에서 사용된다.

(72) 발명자

오사와 류지

일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카즈쿠 사카
도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시기가이샤
나이

요시무라 사치코

일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카즈쿠 사카
도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시기가이샤
나이

와타나베 토모히사

일본 2130012 카나가와 카와사키시 타카즈쿠 사카
도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시기가이샤
나이

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

서열번호 44, 35 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 분리된 펩티드.

청구항 10

CTL 유도성을 가지는 분리된 펩티드로서, 여기서 상기 펩티드는 1 또는 2 개의 아미노산이 치환된 서열번호 44, 35 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성되고, 상기 치환은 하기의 하나 또는 둘 모두인 분리된 펩티드:

(a) 서열번호 44, 35 또는 41의 아미노산의 상기 N-말단으로부터 두 번째 아미노산은 페닐알라닌(phenylalanine), 메티오닌(methionine) 및 트립토판(tryptophan)으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산으로 치환된 것; 및

(b) 서열번호 44, 35 또는 41의 아미노산 서열의 상기 C-말단 아미노산은 류신(leucine), 이소류신(isoleucine), 트립토판 및 메티오닌으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산으로 치환된 것.

청구항 11

삭제

청구항 12

제 9항 또는 제 10항의 펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드(polynucleotide).

청구항 13

하나 또는 그 이상의 제 9항 또는 제 10항의 펩티드, 또는 하나 또는 그 이상의 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, CTL 유도용 조성물(composition).

청구항 14

하나 또는 그 이상의 제 9항 또는 제 10항의 펩티드, 또는 하나 또는 그 이상의 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 암 또는 자궁내막증의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발의 방지를 위한 약학적 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 조성물은 HLA 항원이 HLA-A24인 개체에 투여하기 위해 제형화된(formulated) 약학적 조성물.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 조성물은 암 또는 자궁내막증 치료를 위해 제형화된 약학적 조성물.

청구항 17

하기 단계 중 하나를 포함하는 CTL 유도성이 있는 항원 제시세포(antigen-presenting cell, APC)를 유도하는 시험관 내(in vitro) 방법:

- (a) APC와, 제 9항 또는 제 10항의 펩티드를 시험관 내(in vitro)에서 접촉하는 단계; 및
- (b) 제 9항 또는 제 10항의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC로 도입하는 단계.

청구항 18

하기 단계 중 적어도 하나를 포함하는 방법 중 어느 것으로 CTL을 유도하는 시험관 내(in vitro) 방법:

- (a) CD8-양성 T 세포와, HLA 항원 및 제 9항 또는 제 10항의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 APC를 공배양하는(co-culturing) 단계;
- (b) CD8-양성 T세포와, HLA 항원 및 제 9항 또는 제 10항의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 엑소솜과 공배양하는 단계; 및
- (c) 제 9항 또는 제 10항의 펩티드와 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 아형(subunit) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 T 세포로 도입하는 단계.

청구항 19

HLA 항원 및 제 9항 또는 제 10항의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 분리된 APC.

청구항 20

HLA 항원 및 제 9항 또는 제 10항의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 분리된 APC에 있어서, 상기 APC는 하기 단계 중 하나를 포함하는 방법으로 유도된 분리된 APC:

- (a) APC와, 제 9항 또는 제 10항의 펩티드를 시험관 내(in vitro)에서 접촉하는 단계; 및
- (b) 제 9항 또는 제 10항의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC로 도입하는 단계.

청구항 21

제 9항 또는 제 10항의 펩티드를 표적으로 하는 분리된 CTL.

청구항 22

제 9항 또는 제 10항의 펩티드를 표적으로 하는 분리된 CTL에 있어서, 하기 단계 중 적어도 하나를 포함하는 방법으로 유도된 분리된 CTL.

- (a) CD8-양성 T 세포와, HLA 항원 및 제 9항 또는 제 10항의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 APC를 공배양하는(co-culturing) 단계;
- (b) CD8-양성 T세포와, HLA 항원 및 제 9항 또는 제 10항의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 엑소솜과 공배양하는 단계; 및
- (c) 제 9항 또는 제 10항의 펩티드와 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 아형(subunit) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 T 세포로 도입하는 단계.

청구항 23

개체에서 암 또는 자궁내막증(endometriosis)에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 조성물의 제조를 위해, 제 9항 또는 제 10항의 펩티드, 이의 면역학적 활성 단편, 또는 상기 펩티드 또는 상기 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물과학 분야, 보다 구체적으로 암 치료 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암 백신으로서 매우 효과적인 신규한 펩티드 및 종양(또는 MELK 과발현에 관련된 질환)을 치료하고, 예방하기 위한 약물에 관한 것이다.

[0002] 우선권

[0003] 본 출원은 2010년 1월 25일에 출원된 미국 가출원 61/297,966에 대한 우선권을 주장하며, 전체 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 통합된다.

배경 기술

[0004] CD8 양성(CD8 positive) 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)는 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 종류 I 분자에서 발견되는 종양관련 항원(tumor-associated antigens, TAA)에서 유래한 에피토프 펩티드(epitope peptide)를 인지한 후, 종양세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있다. TAA의 첫 번째 예로 흑색종 항원(melanoma antigen, MAGE) 패밀리의 발견 이후, 다른 많은 TAA가 주로 면역학적

접근을 통해 발견되었다(비특허문헌 1, 2). 상기 TAA 중 일부는 현재 면역치료법의 표적으로서 임상 개발 과정에 있다.

[0005] 유망한 TAA는 암 세포의 증식 및 생존에 필수적이다. 면역치료를 위한 표적으로서 이러한 TAA의 이용은 치료상으로 유도된 면역 선별(immune selection)의 결과로서, TAA의 결실, 돌연변이 또는 하향-조절(down-regulation)에 기인한 암세포의 면역 회피(immune escape)의 잘 묘사된 위험을 최소화할 수 있다. 따라서, 강력하고 특이적인 항종양 면역반응을 유도할 수 있는 새로운 TAA를 동정은 그 이상의 발전을 보장하고, 다양한 종류의 암에 대한 펩티드 백신 전략의 임상 조사가 진행중이다(비특허문헌 3-10). 지금까지, TAA 유래 펩티드를 이용한 시험의 일부 임상 보고가 있었다(비특허문헌 11-13). 일부 성공이 관찰되었지만, 면역 치료 표적으로 신규한 TAA의 필요는 여전히 남아있다.

[0006] 모계 배아 류신 지퍼 키나아제(maternal embryonic leucine zipper kinase, MELK)는 포유류 배아 발달에 관련된 snf1/AMPK 세린-트레오닌(serine-threonine) 키나아제 패밀리의 신규한 구성원으로서 기존에 확인되었다(비특허문헌 14). 이 유전자는 줄기 세포 재생(비특허문헌 15), 세포 주기 진행(비특허문헌 16, 17) 및 전-mRNA 스플라이싱(비특허문헌 18)에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 보인다. 그 목적을 달하기 위해서, 23,040 유전자를 함유하는 전체-게놈(genome-wide) cDNA 마이크로어레이(microarray)로 유전자 발현 프로파일링(gene expression profiling)을 통하여, 본 발명자들은 유방암(breast cancer)에서 상향-조절된 MELK를 확인하였다(비특허문헌 18).

[0007] MELK는 일부 암 세포, 예를 들면, 폐(lung), 방광(bladder), 림프종(lymphoma) 및 자궁경부암(cervical cancer) 세포에서 상향 조절된다. 많은 인간 조직 및 암세포주의 노던블랏 분석(Northern blot analysis)에서 MELK가 유방암 및 세포주의 대부분에서 높은 수준에서 현저히 과발현된 것을 증명하였지만, 심장(heart), 간(liver), 폐(lung) 및 신장(kidney)과 같은 정상 필수 기관에서는 발현되지 않았다. 또한, siRNA에 의한 MELK 발현의 억제는 인간 유방암 세포의 성장을 야기하는 것을 유의적으로 나타낸다. 펩티드의 면역원성(immunogenicity)을 증가시키기 위해, MHC 또는 T 세포 수용체(receptor)와 상호작용에 중요한 펩티드의 아미노산 잔기(residue)의 변형에 대한 많은 연구가 보고되었다(비특허문헌 20, 21).

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) W02005/073374

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80
 (비특허문헌 0002) Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9
 (비특허문헌 0003) Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55
 (비특허문헌 0004) Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42
 (비특허문헌 0005) Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9
 (비특허문헌 0006) van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14
 (비특허문헌 0007) Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8
 (비특허문헌 0008) Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72
 (비특허문헌 0009) Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66
 (비특허문헌 0010) Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94
 (비특허문헌 0011) Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80
 (비특허문헌 0012) Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42

- (비특허문헌 0013) Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15
- (비특허문헌 0014) Heyer BS et al., Dev Dyn. 1999 Aug 215(4):344-51
- (비특허문헌 0015) Nakano I et al., J Cell Biol. 2005 Aug 1, 170(3):413-27)
- (비특허문헌 0016) Blot J et al., Dev Biol. 2002 Jan 15, 241(2):327-38
- (비특허문헌 0017) Seong HA et al., Biochem J. 2002 Feb 1, 361(Pt 3):597-604
- (비특허문헌 0018) Vulsteke V et al., J Biol Chem. 2004 Mar 5, 279(10):8642-7. Epub 2003 Dec 29
- (비특허문헌 0019) Lin ML et al., Breast Cancer Res. 2007; 9(1):R17
- (비특허문헌 0020) Valmori D, et al., J Immunol. 1998 Feb 15;160(4):1750-8
- (비특허문헌 0021) Salazar E, et al., Int J Cancer. 2000 Mar 15;85(6):829-38

발명의 내용

[본 발명의 개요]

본 발명은, 최소한 부분적으로, 면역치료법의 적합한 표적으로서 신규한 펩티드의 발견에 기초한다. TAA(tumor-associated antigen)는 일반적으로 면역계에 대해 "자기(self)"로 인지되어 종종 내재 면역성을 갖지 않기 때문에, 적절한 표적의 발견은 매우 중요하다. MELK(기재된 바와 같이, 예를 들면, 서열번호 47에 서)(GenBank Accession No. NM_014791(서열번호 46)의 유전자로 암호화된)이 자궁내막증(endometriosis) 및 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 담관세포 상피성암(cholangiocellular carcinoma), 만성골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(liver cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)(WO2010/013485)을 포함하지만, 이에 한정하지 않는 암의 조직에서 상향조절의 확인을 인지함으로써, 본 발명은 MELK를 암 면역치료의 후보 표적으로써 초점을 맞춘다.

그 목적을 달성하기 위하여, 또한, 본 발명은 MELK 특이적인 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes, CTL)를 유도하는 능력을 가지는 MELK의 특이적 에피토프 펩티드(epitope peptide)의 동정에 최소 부분적으로 규제된다. 하기에 기술된 것과 같이, 건강한 공여자로부터 수득된 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)는 변형된 MELK 에피토프 펩티드, 즉, 야생형 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6) 유래 A*2402에 결합하는 후보 펩티드를 이용하여 자극하였다. 그런 다음 각 후보 펩티드를 부가(pulsed)하여 HLA-A24 양성 표적 세포에 대하여 특이적 세포 독성을 갖는 CTL 세포주가 확립되었다. 종합하여, 상기 결과는 상기 펩티드가 MELK를 발현하는 세포에 대해 강력하고 특이적 면역반응을 유도할 수 있는 HLA-A24에 제한된 에피토프(epitope) 펩티드임을 증명한다. 또한, 상기 결과는 MELK는 강한 면역반응을 유도하고 그것의 에피토프는 암/종양 면역치료법에 효과적인 표적임을 증명한다.

따라서, 본 발명의 목적은 HLA 항원에 결합하는 MELK(서열번호 47) 유래 변형된 에피토프 펩티드의 분리된 펩티드, 특히, 야생형 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)의 변형된 에피토프 펩티드 또는 이의 면역학적 활성 단편을 제공하는 것이다. 제시된 펩티드는 CTL 유도성을 가진다. 따라서, 그들은 체외에서(ex vivo) CTL를 유도하기 위해 사용될 수 있거나, 자궁내막증 및, 암, 예를 들면 유방암, 방광암, 자궁경부암, 담관세포 상피성암, 만성골수성 백혈병, 결장암, 식도암, 위암, 폐암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않은 암에 대해서 면역 반응을 유도하기 위해 개체에 투여될 수 있다. 바람직한 펩티드는 노나펩티드(nonapeptides), 및 일반적으로, 서열번호 35-45로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성된다. 이중에서, 서열번호 35, 41 및 44 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 상기 펩티드는 특히 강한 CTL 유도성을 나타냈고, 따라서 본 발명에서 특히 유용하다.

또한, 본 발명은 서열번호 35-45의 아미노산 서열을 가지고, 이는 변형된 펩티드가 원래의 펩티드의 필요한 원래의 CTL 유도성을 유지하는 한, 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산이 치환(substituted), 결실(deleted) 또는 첨가된(added) 변형된 펩티드(modified peptides)를 고려한다.

- [0015] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 CTL 유도성이 있는 항원-제시 세포(antigen-expressing cells, APCs)를 유도에 사용될 수 있거나, 본 발명의 펩티드와 같이, 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 개체에 투여될 수 있다.
- [0016] 개체 내 투여될 때, 본 발명의 펩티드는 각각의 펩티드를 표적으로 하는 CTL을 유도하기 위하여 바람직하게 APC의 표면에 제시된다. 그러므로, 본 발명의 한 목적은 본 발명의 하나 또는 그 이상의 펩티드 또는 그러한 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 물질(substance)과 같은, CTL을 유도하는 물질을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 본 발명의 펩티드 또는 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 물질(pharmaceutical substances)을 고려하며, 상기 조성물은 자궁내막증 및 암, 상기 암은 유방암, 방광암, 자궁경부암, 담관세포 상피성암, 만성골수성 백혈병, 결장암, 식도암, 위암, 폐암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 제한하지 않는 암의 치료 및/또는 예방(prophylaxis)을 위해, 및/또는 이의 수술 후 재발의 예방을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 목적은 자궁내막증 또는 암의 치료 및 /또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발 방지를 위해 제조된 본 발명의 상기 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 중 어떤 것을 포함하는 약학적 조성물 또는 물질을 제공하는 것이다. 본 발명의 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 대신에 또는 추가하여, 상기 본 발명의 물질 또는 약학적 제제는 유효성분으로 본 발명의 펩티드 중 어떤 것을 제시하는 APC 또는 엑소솜(exosomes)을 선택적으로 포함한다.
- [0017] 본 발명의 펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 예를 들면 개체 유래 APC를 펩티드에 접촉시키거나 또는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC에 도입시킴으로써 상기 표면에 HLA 항원 및 본 발명의 펩티드의 복합체를 제시하는 APC를 유도에 사용될 수 있다. 이러한 APC는 상기 표적 펩티드에 대한 높은 CTL 유도성(inducibility)을 갖고 그러므로 암 면역치료법에 유용하다. 따라서, 본 발명의 다른 목적은 CTL 유도성이 있는 APC를 유도하기 위한 방법 및 상기 방법에 의해 수득된 APC를 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적은 CD8-양성 세포와, 이의 표면에 본 발명의 펩티드를 제시하는 APC 또는 엑소솜을 공배양하는(co-culturing) 단계 또는 본 발명의 펩티드에 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 아단위(subunit)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는 CTL 유도 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 방법에 의해 수득할 수 있는 CTL은 자궁내막증, 유방암, 방광암, 자궁경부암, 담관세포 상피성암, 만성골수성 백혈병, 결장암, 식도암, 위암, 폐암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암과 같은 MELK가 과발현하는 질환을 치료 및/또는 방지에서 또한 유용하다.
- [0019] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 이를 필요로 하는 개체에서 암에 대하여 면역반응을 유도하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 개체에 변형된 MELK 또는 이의 면역학적 활성 단편, 변형된 MELK 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 변형된 MELK 또는 이의 단편을 제시하는 엑소솜 또는 APC를 함유하는 물질 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0020] 본 발명의 적용가능성(applicability)은 MELK 과발현에 관련되거나, 과발현으로 인한 질환의 수 중 어떤 것으로 확장할 수 있고, 암을 포함하며, 암의 예는 자궁내막증 및 유방암, 방광암, 자궁경부암, 담관세포 상피성암, 만성골수성 백혈병, 결장암, 식도암, 위암, 폐암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 보다 특히, 본 발명은 하기를 제공한다:
- [0022] [1] HLA 항원에 결합하고 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 유도성을 가지고, 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성되거나 서열번호 6의 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환(substitutions)을 포함하는 아미노산 서열로 구성된 분리된 펩티드,
- [0023] [2] [1]에서, 상기 HLA 항원은 HLA-A24인 HLA 항원인 분리된 펩티드,
- [0024] [3] [1]에서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 6의 아미노산 서열에서 (a)-(d)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 분리된 펩티드:
- [0025] (a) N-말단(terminal) 아미노산,
- [0026] (b) N-말단(terminus) 아미노산으로부터 세번째 아미노산,

- [0027] (c) C-말단(terminus) 아미노산으로부터 세번째 아미노산 및
- [0028] (d) C-말단(terminal) 아미노산,
- [0029] [4] [3]에서, 상기 폴리펩티드는(i) 내지 (iv)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 분리된 펩티드:
- [0030] (i) 서열번호 6의 아미노산 서열의 N-말단 아미노산에서 E 부터 K 또는 R 까지 아미노산 치환,
- [0031] (ii) 서열번호 6의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 세 번째 아미노산에서 C 부터 E, I, L, M, N 또는 P 까지 아미노산 치환,
- [0032] (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열에서 C-말단으로부터 세번째 아미노산에서 E 부터 N 또는 Q까지 아미노산 치환 및
- [0033] (iv) 서열번호 6의 아미노산 서열의 C-말단 아미노산에서 F 부터 L 까지 아미노산 치환,
- [0034] [5][4]에서, 상기 펩티드는 단독 아미노산 치환을 포함하는 분리된 펩티드,
- [0035] [6][4]에서, 상기 펩티드는 두 개 아미노산 치환을 포함하는 분리된 펩티드,
- [0036] [7][4]에서, 상기 펩티드는 세 개 아미노산 치환을 포함하는 분리된 펩티드,
- [0037] [8][4]에서, 상기 펩티드는 네 개 아미노산 치환을 포함하는 분리된 펩티드,
- [0038] [9][4]-[5]에서, 서열번호 35-45로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩티드,
- [0039] [10] HLA 항원에 결합하고, CTL 유도성을 가지며, 서열번호 35- 45로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 상기 펩티드에서 1, 2, 또는 일부 아미노산이 삽입, 치환, 결실 또는 첨가된, 분리된 펩티드,
- [0040] [11] 하기 특성 중 하나 또는 둘 모두를 가지는 [10]의 분리된 펩티드:
- [0041] (a) 상기 N-말단으로부터 두 번째 아미노산은 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 메티오닌(methionine) 및 트립토판(tryptophan)의 군으로부터 선택된 것임; 및
- [0042] (b) 상기 C-말단 아미노산은 페닐알라닌, 류신(leucine), 이소류신(isoleucine), 트립토판 및 메티오닌의 군으로부터 선택된 것임,
- [0043] [12] [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드(polynucleotide),
- [0044] [13] 하나 또는 그 이상의 [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드, 또는 하나 또는 그 이상의 [12]의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, CTL 유도용 물질(substance),
- [0045] [14] 하나 또는 그 이상의 [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드, 또는 하나 또는 그 이상의 [12]의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 암 또는 자궁내막증의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발의 방지를 위한 약학적 조성물,
- [0046] [15] [14]에서, 상기 조성물은 HLA 항원이 HLA-A24인 개체에 투여하기 위해 제형화된(formulated) 약학적 조성물,
- [0047] [16] [14] 또는 [15]에서, 상기 조성물은 암 또는 자궁내막증 치료를 위해 제형화된 약학적 조성물,
- [0048] [17] 하기 단계 중 하나를 포함하는 항원 제시세포(antigen-presenting cell, APC)를 유도하는 방법:
- [0049] (a) [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드와 시험관 내(in vitro), 체외(ex vivo) 또는 체내에서(in vivo) 접촉하는 단계; 및
- [0050] (b) [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC로 도입하는 단계,
- [0051] [18] 하기 단계 중 적어도 하나를 포함하는 방법 중 어느 것으로 CTL을 유도하는 방법:
- [0052] (a) CD8-양성 T 세포와, HLA 항원 및 [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 APC를 공배양하는(co-culturing) 단계;
- [0053] (b) CD8-양성 T세포와, HLA 항원 및 [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는

엑소솜과 공배양하는 단계;

- [0054] (c) [1] 내지 [9] 중 어느 하나의 펩티드와 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 아형(subunit) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 도입하는 단계,
- [0055] [19] HLA 항원 및 [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 분리된 APC,
- [0056] [20] [19]에서, 상기 APC는 [17]의 방법으로 유도된 분리된 APC,
- [0057] [21] [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드를 표적으로 하는 분리된 CTL,
- [0058] [22] [21]에 있어서, [18]의 방법으로 유도된 분리된 CTL, 및
- [0059] [23] [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 펩티드, 이의 면역학적 활성 단편, 또는 상기 펩티드 또는 상기 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는 개체에서 암 또는 자궁내막증에 대하여 면역반응을 유도하는 방법.
- [0060] 본 발명의 상기 요약 및 하기의 자세한 묘사 둘 모두는 예시하는 실시예이며, 본 발명 또는 본 발명의 다른 대체하는 실시예를 제한하는 것이 아닌 것이 이해되어야 한다.
- [0061] 뿐만 아니라, 본 발명의 또 다른 목적은 도면 및 실시예를 포함하는 하기 자세한 묘사를 읽을 때, 보다 전체적으로 명백해질 것이다. 하지만, 본 발명의 상기 요약 및 하기의 자세한 묘사는 실시예이고, 본 발명이나 또는 본 발명의 다른 대안적 실시예를 제한하지 않는다. 특히, 본 발명이 여기에서 많은 구체적 실시예와 함께 기술되지만, 그 기술은 본 발명의 예일 뿐, 본 발명을 제한하지 않는다. 본 발명의 뜻(spirit) 및 범위(scope) 내에서, 첨부된 청구항에 의해 기술된 것과 같이 다양한 변형 및 적용이 당업자에게 일어날 수 있다. 동일하게, 본 발명의 다른 목적, 특징, 유용성(benefit) 및 이점(advantages)는 상기 요약 및 하기에 기술된 특정 실시예로부터 명백해질 것이고, 용이하게 당업자에게도 명백할 것이다. 상기 목적, 특징, 유용성 및 이점은 동반되는 실시예, 데이터, 도면 및 그로부터 가능한 모든 타당한 추론과 함께, 단독으로, 또는 여기서 통합된 참조문헌의 고려와 함께 상기로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 본 발명의 다양한 측면 및 적용은 도면의 간단한 설명을 고려하여 당업자에게 명백해 질 것이다. 그리고, 본 발명의 자세한 설명 및 이의 바람직한 실시예는 하기와 같다.

[도 1]

도 1은 MELK 유래 펩티드로 유도된 기증자 A의 CTL에서 IFN-감마(gamma) ELISPOT 분석의 결과를 나타내는 사진을 묘사한다. MELK-A24-9-87(서열번호 6)(a), MELK-A24-10-637(서열번호 23)(b), MELK-A24-9-199(서열번호 1)(d) 및 MELK-A24-9-78(서열번호 21)(e)로 자극된 상기 CTL은 강력한 IFN-감마 생산 능력을 보였다. 대조적으로, 음성데이터의 대표적인 예로써, 특이적 IFN-감마 생산은 MELK-A24-9-96(서열번호 2)(c)로 자극한 CTL에서 보이지 않았다. 도면에서, “+”는 관련있는 펩티드로 부가된(pulsed) 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 2]

도 2는 CTL 세포주의 수립의 결과를 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 강력한 IFN-감마 생산은 MELK-A24-9-87(서열번호 6)(a), MELK-A24-10-637(서열번호 23)(b) 및 MELK-A24-9-199(서열번호 1)(c)로 자극된 CTL 세포주로부터 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지되었다. 도면에서, “검정 마름모”는 관련있는 펩티드로 부가된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “흰색 사각형”은 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 3]

도 3은 상기 CTL 클론의 수립의 결과를 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 강력한 IFN-감마 생산은 MELK-A24-9-87(서열번호 6)(a) 및 MELK-A24-9-199(서열번호 1)(b)로 자극된 CTL 클론(clone)으로부터 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지되었다. 도면에서, “검정 마름모”는 MELK-A24-9-87(서열번호 6)로 부가된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “흰색 사각형”은 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적세포에 대한 IFN-감마 생산

을 나타낸다.

[도4]

도 4는 외생적으로 MELK 및 HLA-A*2402를 발현하는 표적 세포에 대하여 특이적인 CTL 활성을 보여주는 선 그래프를 묘사한다. HLA-A*2402 또는 MELK 전장 유전자로 형질전환된 COS7 세포를 대조군으로 제조하였다. 상기 CTL MELK-A24-9-87(서열번호 6)으로 수립된 클론(clone)은 MELK 및 HLA-A-A*2402 둘 다로 형질전환된 COS7에 대하여 특이적 CTL 활성을 보였다(검정 마름모). 반면에, HLA-A*2402(흰색 삼각형) 또는 MELK(흰색 원) 각각을 발현하는 표적세포에 대한 유의적인 특이적 CTL 활성은 탐지되지 않았다.

[도 5A]

도 5A는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6) 유래 변형된 펩티드로 유도된 기증자 B의 CTL에서 IFN-감마 ELISPOT 분석을 나타내는 사진을 묘사한다. MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35)(a), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41)(b) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)(c)로 자극된 상기 CTL은 사각형으로 나타낸 것과 같이 강력한 IFN-감마 생산 능력을 보였다. 반면에, 상기 펩티드 특이적 IFN-감마 생산은 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)(d)로 자극된 CTL로부터 탐지되지 않았다. 도면에서, “+”는 관련있는 펩티드로 부가된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 5B]

도 5B는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6) 유래 변형된 펩티드로 유도된 기증자 C의 CTL에서 IFN-감마 ELISPOT 분석의 결과를 나타내는 사진을 묘사한다. MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)(a)로 자극된 상기 CTL은 강력한 IFN-감마 생산 능력을 보였다. 반면에, 상기 펩티드 특이적 IFN-감마 생산은 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)(b)로 자극된 CTL로부터 탐지되지 않았다. 도면에서, “+”는 관련있는 펩티드로 부가된 상기 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “-”는 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다. MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 웰 번호 #14의 상기 세포는 CTL 세포주를 수립하기 위하여 증식되었다. 낮은 IFN-감마 생산을 보이는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 자극된 웰 번호 #4의 상기 세포 또한 증식되었다.

[도 6]

도 6a-c는 기증자 B의 PBMC 유래 유도된 CTL 세포주의 수립의 결과를 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 강력한 IFN-감마 생산은 IFN-감마 ELISA 분석에 의해 MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35)(a), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41)(b) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)(c)로 자극된 상기 CTL 세포주로부터 탐지되었다. 도면에서, “검정 마름모”는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 부가된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “흰색 사각형”은 관련없는 HIV 펩티드로 부가된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다. 도 6d-e는 기증자 C의 PBMC로부터 유도된 CTL 세포주의 수립의 결과를 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 IFN-감마 생산은 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)(d)로 자극된 CTL 세포주로부터 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지되었다. 상기 CTL 세포주는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)(e)로 자극된 PBMC로부터 수립되지 않았다. 도면에서, “검정 마름모”는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 자극된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “흰색 사각형”은 관련없는 HIV 펩티드로 자극된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 7]

도 7a-c는 기증자 B의 PBMC로부터 유도된 CTL 클론의 수립의 결과를 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 강력한 IFN-감마 생산이 MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35)(a), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41)(b) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)(c)로 자극된 CTL 클론으로부터 탐지되었다. 도면에서, “검정 마름모”는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 부가된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “흰색 사각형”은 관련없는 HIV 펩티드로 부가된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다. 도 7d는 기증자 C의 PBMC로부터 유도된 상기 CTL 클론의 수립의 결과를 나타내는 선그래프를 묘사한다. 상기 강력한 IFN-감마 생산이 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 상기 CTL 클론으로부터 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지되었다. 도면에서, “검정 마름모”는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 부가된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “흰색 사각형”은 관련없는 HIV 펩티드로 부가된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

[도 8]

도 8은 MELK 및 HLA-A*2402를 외생적으로 발현하는 표적세포에 대한 특이적 CTL 활성을 나타내는 선그래프를 묘

사한다. (a) 상기 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 수립된 상기 CTL 세포주는 MELK를 발현하고, HLA-A*2402를 발현하지 않는 다른 세포주(흰색 원; T47D, 흰색 사각형; KP-1N)에 비해 MELK 및 HLA-A*2402(검정 마름모; KLM-1, 검정 삼각형; MDA-MB-435S) 둘 다를 발현하는 종양세포에 대하여 강력한 CTL 활성을 나타냈다. (b) 항-HLA class I mAb의 처리에 의한 CTL 반응의 저해를 보여준다. MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 수립된 상기 CTL 클론은 KP-1N(흰색 사각형)에 비해 KLM-1(검정 마름모)에 대하여 특이적 CTL 활성을 보였다. 상기 KLM-1(검정 마름모)에 대한 IFN-감마 생산은 대조군으로 정상 마우스 IgG의 처리(하이픈)에 비해 항-HLA class I mAb의 처리(흰색 마름모)에 의해 저해되었다.

[도 9]

도 9는 MELK-A24-9-199(서열번호 1) 특이적 CTL 클론의 반응성의 결과를 나타내는 선그래프를 묘사한다. 도 9(a)에서, “검정 마름모”는 MELK-A24-9-199(서열번호 1)로 부가된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타내고, “흰색 사각형”은 어떤 펩티드로 부가되지 않은 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다. 도 9(b)에서, MELK 및 HLA-A*2402(검정 마름모; KLM-1) 둘 다를 발현하는 종양세포주 및 MELK를 발현하지만 HLA-A*2402(흰색 사각형; KP-1N)을 발현하지 않는 종양 세포주에 대한 IFN-감마 생산을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 비록 여기서 기술한 것과 유사하거나 또는 동등한 어떤 방법 및 재료가 본 발명의 실시예의 검사 또는 실행에서 사용될 수 있지만, 선호되는 방법, 장치, 및 재료는 여기서 기술된다. 하지만, 본 발명의 재료 및 방법을 기술하기 전에, 본 발명은 여기서 기술한 특정한 크기, 종류, 면적, 재료, 방법론, 프로토콜(protocol)로 제한되지 않는데, 이것은 그것들이 일반적인 실험 및/또는 최적화에 따라 다양할 수 있기 때문이다. 또한, 본 기술에서 사용되는 전문용어(terminology)는 오직 실시예 또는 특정 버전(version)을 기술하려는 것이고, 이것은 오직 하기 청구항에 의해서만 제한되는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0064] 각 발표(publication)의 공개, 특허 또는 특허 출원은 그 전문이 구체적으로 여기에서 참고문헌으로 통합된다. 하지만, 어느 것도 여기에서 이전 발명 또는 그러한 공개보다 선행한다는 자격으로 본 발명에서 인정되지 아니함을 이해해야 한다.

[0065] 따로 정의되지 않는 한, 여기에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그러나, 대립이 있는 경우에는, 용어의 정의를 포함한 본 발명의 상세한 설명이 규제할 것이다. 또한, 상기 재료(materials), 방법 및 실시예는 오직 설명하는 것이며, 제한하려는 것이 아니다.

I. 정의

[0067] 본 발명에서 사용되는 용어 "a", "an", 및 "the"는 따로 명시되지 않는 한, "적어도 1개"를 의미한다.

[0068] 본 발명에서 호환적으로 사용되는 용어 "폴리펩티드(polypeptide)", "펩티드(peptide)" 및 "단백질(protein)"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 상기 용어는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 변형된 잔기, 또는 자연적으로 발생한 아미노산 중합체(naturally occurring amino acid polymer)뿐만 아니라 자연적으로 발생한 아미노산에 상응하는 인공 화학 모방체(artificial chemical mimetic)와 같은 비자연적으로 발생한 잔기(non-naturally occurring residue)를 가지는 아미노산 중합체에 적용된다.

[0069] 본 명세서에서 쓰인 상기 용어 “올리고펩티드(oligopeptide)”는 20 개 잔기 또는 보다 적은, 일반적으로 15개 잔기 또는 보다 적은 길이이고, 일반적으로 약 8 개 및 약 11 개 잔기, 종종 9 개 또는 10 개 잔기 사이로 구성되는 본 발명의 펩티드에 관련하여 사용된다.

[0070] 본 발명에서 사용되는 "아미노산(amino acid)"라는 용어는 자연적으로 발생한 아미노산과 비슷하게 기능하는 아미노산 유사체(analog) 및 아미노산 모방체 뿐만 아니라 자연적으로 발생한 및 합성(synthetic) 아미노산을 의미한다. 아미노산은 L-아미노산 또는 D-아미노산일 수 있다. 자연적으로 발생한 아미노산은 세포 안에서 번역(tranlation) 후에 변형된 것뿐 아니라 유전자코드에 의해 암호화된 것이다[예를 들면, 하이드록시프롤린(hydroxyproline), 감마-카복시글루탐산(γ -carboxyglutamate) 및 O-포스포세린(O-phosphoserine)]. 상기 용어 "아미노산 유사체"는 자연적으로 발생한 아미노산과 동일한 기본적인 화학 구조(수소, 카복실기, 아미노기 및 R기에 결합하는 α 탄소)를 가지고 있지만, 변형된 R기 또는 변형된 골격(backbone)을 가지는 화합물을 의미

한다[예를 들면, 호모세린(homoserine), 노르루신(norleucine), 메티오닌(methionine), 설펍사이드(sulfoxide), 메티오닌 메틸 설펍소늄(methionine methyl sulfonium)]. 상기 용어 "아미노산 모방체"는 서로 다른 구조를 갖지만, 일반적인 아미노산과 비슷한 기능이 있는 화학적 화합물을 의미한다.

[0071] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명위원회가 권장하는, 일반적으로 알려진 3문자 약어(symbol) 또는 1문자 약어에 의해 불린다.

[0072] 본 발명에서 사용된 용어 "유전자", "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드", "뉴클레오티드" 및 "핵산"은 따로 명시되지 않는 한, 호환적으로 사용되며, 상기 아미노산과 유사하게, 일반적으로 인정되는 1문자 코드에 의해 불린다.

[0073] 여기서 호환적으로 사용되는 "조성물(composition)", "물질(substance)" 또는 "제제(agent)"이라는 용어는 구체적 양의 구체적 성분의 조합으로부터, 직접적으로 또는 간접적으로, 형성되는 어떠한 생산물뿐 아니라, 구체적 양의 구체적 성분을 포함하는 생산물에 관한 것이다. 약학적 조성물에 관련한 상기 용어는 유효 성분, 및 담체로 구성된 어떤 비유효 성분을 포함하는 생산물, 뿐만 아니라 둘 또는 그 이상의 성분의 조합, 복합(complexation) 또는 집적(aggregation)으로부터, 또는 성분의 하나 또는 그 이상의 분리로부터, 또는 성분의 하나 또는 그 이상의 상호결합 또는 반응의 다른 종류로부터, 직접적으로 또는 간접적으로, 형성되는 어떤 생산물을 포함한다. 따라서, 본 발명의 내용에서, 상기 용어 "약학적 조성물"은 본 발명의 화합물 및 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체의 혼합에 의해 만들어진 어떤 약학적 조성물에 관한 것이다. 여기서 사용되는 "약학적으로 허용가능한 담체" 또는 "생리학적으로 허용가능한 담체"라는 표현은 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 재료(material), 조성물, 물질 또는 수단(vehicle)을 의미하고, 이는 한 기관(organ), 또는 신체의 한 부분으로부터 개체 스캐폴드된(scaffolded) 폴리파머코어(polypharmacophores)을 다른 기관, 또는 신체의 다른 부분으로 운반하거나 또는 수송하는데 관련된 액체 또는 고체 필러(filler), 희석제, 첨가제, 영제 또는 캡슐화 물질(encapsulating material)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 본 발명에서 상기 용어 "유효성분(active ingredient)"은 생물학적 또는 생리학적으로 활성이 있는 제제 또는 조성물의 물질에 관한 것이다. 특히, 약학적 제제 또는 조성물에서 "유효성분"은 목표 약학적 효과를 나타내는 물질에 관한 것이다. 예를 들면, 암의 치료 또는 예방에서 사용을 위한 약학적 제제 또는 조성물의 경우, 상기 제제 또는 조성물의 유효성분은 암세포 및/또는 조직에 직접적으로 또는 간접적으로 최소 하나의 생물학적 또는 생리학적 작용(action)을 유도할 수 있다. 바람직하게, 이러한 작용은 암 세포 성장 감소 또는 저해, 암 세포 및/또는 조직의 손상 또는 살해(killing), 및 등등을 포함할 수 있다. 일반적으로, 유효 성분의 간접적 효과는 암세포를 인지하거나 살해하는 CTL의 유도이다. 제조되기 전에 "유효성분"은 또한 "대량(bulk)", "약물 물질(drug substance)" 또는 "기술적 제품(technical product)"으로 나타낸다.

[0075] 본 발명의 상기 약학적 제제 또는 조성물은 백신(vaccine)으로 특히 사용된다. 본 발명의 맥락에서, 상기 구 "백신" (또한 "면역성 조성물(immunogenic composition)"로 나타낸)은 동물에 접종할 때 항-종양 면역력(immunity)을 유도하는 기능을 가지는 물질에 관한 것이다.

[0076] 별도로 명시되지 않는 한, 상기 용어 "암(cancer)"은 MELK 유전자를 과발현하는 암을 나타내고, 암의 예는 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 담관세포 상피성암(cholangiocellular carcinoma), 만성골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(liver cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0077] 별도로 명시되지 않는 한, 상기 용어 "자궁내막증(endometriosis)"은 MELK 유전자를 과발현하는 자궁내막증을 나타내고, 자궁내막증의 예는 개정판 American Fertility Society classification에 의해 분류된 자궁내막증의 단계 I(경미한(Minimal)), II(가벼운(Mild)), III(중간(Moderate)), 또는 IV(심각한(Severe))를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0078] 별도로 명시되지 않는 한, "세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)", "세포독성 T 세포(cytotoxic T cell)" 및 "CTL"이라는 용어는 호환되어 쓰이며 따로 명시되지 않는 한, 비자기 세포(non-self cell, 예를 들면 종양 세포, 바이러스에 감염된 세포)를 인식할 수 있고 이러한 세포의 사멸을 유도할 수 있는 T 림프구의 하위 집단(sub-group)을 나타낸다.

- [0079] 별도로 명시되지 않는 한, 상기 용어 “HLA-A24”는 HLA-A*2402와 같은 아형(subtype)을 함유하는 상기 HLA-A24 유형을 나타낸다.
- [0080] 별도로 명시되지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 "키트(kit)"라는 용어는 시약(reagent) 및 다른 물질의 혼합을 의미한다. 키트는 마이크로어레이(microarray), 칩(chip), 마커(marker)등을 포함할 수 있다. "키트" 용어는 시약 및/또는 다른 물질의 특정 혼합으로 한정하지 않는다.
- [0081] 본 명세서에서 사용되는 것으로서, 개체 또는 환자에 따른, 상기 용어 “HLA-A24 양성”은 상기 개체 또는 환자가 HLA-A24 항원 유전자를 동형 또는 이형으로 가지고, HLA-A24 항원이 상기 개체 또는 환자의 세포에서 HLA 항원으로 발현되는 것을 나타낸다.
- [0082] 본 발명의 방법 및 조성물이 암 또는 자궁내막증의 "치료(treatment)"라는 맥락에서 유용성을 갖는 범위 내에서, MELK 유전자의 발현 감소, 또는 개체 내에서 암 또는 자궁내막증의 크기, 유병(prevalence), 또는 전이력(metastatic potential)이 감소하는 것과 같은 임상적 이득을 초래한다면 치료는 "효과적인(efficacious)"것으로 여겨진다. 상기 치료가 예방적으로 이용될 때에는, "효과적(efficacious)"이라는 의미는 그것이 암 또는 자궁내막증의 형성을 지연시키거나 방지하거나 또는 암 또는 자궁내막증의 임상적 증상을 방지하거나 경감시키는 것을 의미한다. 효과는 질환 또는 특정 종양 타입을 진단하거나 또는 치료하기 위해 알려진 방법과 관련하여 결정된다.
- [0083] 본 발명의 방법 및 조성물이 암 또는 자궁내막증과 같은 질환의 "방지(prevention)" 및 "예방(prophylaxis)"의 맥락에서 유용성을 갖는 범위 내에서, 질병으로부터 치사율(mortality) 또는 사망률(morbidity)의 부담(burden)을 감소시키는 어떤 활성을 지칭하기 위하여 상기의 용어들은 여기서 상호교환된다. 방지 및 예방은 "1차, 2차 및 3차 예방 수준"에서 일어날 수 있다. 1차 예방 및 방지가 질병의 발달을 피하는 것인 반면, 2차 및 3차 예방 및 방지는 질병 진행의 방지 및 예방 및 증상의 나타남 뿐만 아니라 기능을 개선시킴으로써 또는 질병 관련 합병증을 감소시킴으로써 이미 수립된 질병의 부정적 영향 감소시키는 활성을 포함한다. 또는, 방지 및 예방은 특정 장애(disorder)의 심각도를 완화시키는, 예를 들면 종양의 증식 및 전이를 감소시키는 예방적 치료법의 넓은 범위를 포함한다.
- [0084] 본 발명의 맥락에서, 암 또는 자궁내막증의 치료 및/또는 예방 및/또는 암 수술 후 재발의 방지는 암세포의 수술적 제거, 암세포의 성장 억제, 종양의 퇴화(involution) 또는 퇴행(regression), 암 발생의 완화(remission) 및 억제(suppression), 종양의 퇴행, 및 전이의 감소 또는 억제와 같은 상기 단계 중 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 효과적인 암의 치료 및/또는 예방은 치사율을 감소시키고 암을 가지는 개체의 진단을 개선시키며, 혈액에 있는 종양 마커의 수준을 감소시킨다. 예를 들면, 증상의 감소 또는 개선은 효과적으로 치료하는 것을 의미하고 및/또는 예방은 10%, 20%, 30% 또는 그 이상의 감소, 또는 안정 병변(stable disease)을 포함한다.
- [0085] 본 발명의 맥락에서, "항체(antibody)"라는 용어는 지정된 단백질 또는 그것의 펩티드에 대해 특이적으로 반응하는 면역글로불린(immunoglobulin) 및 그것의 단편을 의미한다. 항체는 인간 항체(human antibodies), 영장류 항체(primatized antibodies), 키메라 항체(chimeric antibodies), 이중특이적 항체(bispecific antibodies), 인간화된 항체(humanized antibodies), 다른 단백질 또는 방사선 표지와 결합된 항체, 및 항체 단편을 포함할 수 있다. 또한, 여기서 항체는 넓은 의미에서 사용되고 특히 완전한 단일클론 항체(intact monoclonal antibodies), 다클론 항체(polyclonal antibodies), 최소한 2개의 완전한 항체로부터 형성된 다중특이적 항체[multispecific antibodies, 예를 들면 이중특이적 항체(bispecific antibodies)], 및 항체 단편을 그들이 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한 포함한다. "항체"는 모든 종류(예를 들면, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)를 가르킨다.

[0086] **II. 펩티드**

- [0087] MELK으로부터 유래된 변형된 펩티드가 CTL에 의해 인식되는 항원으로서 기능 한다는 것을 보이기 위하여, MELK-A24-9-87 WT(서열 번호 6)에서 유래된 변형된 펩티드가 흔히 HLA 대립 유전자와 만나는 HLA-A24에 의해 제한되는 항원 에피토프인지 결정하기 위하여 MELK(서열 번호: 159)에서 유래된 펩티드를 분석하였다(Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994).

- [0088] 야생형 MELK-A24-9-87(MELK-A24-9-87_WT)(서열번호 6) 보다 더 유효하게 특이적 CTL을 유도하는 잠재적인 능력을 가지는, HLA-A24에 결합하는 MELK 유래 변형된 펩티드의 후보는 HLA-A24에 그들의 결합 친화도에 기초하여 동정되었다. 즉, 본 발명에 따라, 서열번호 6의 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 함유하는 변형된 펩티드가 제공된다.
- [0089] 본 발명에서, MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6) 중 변형된 펩티드에서 아미노산 치환의 수는 적어도 하나이다. 일부 실시예에서, 치환의 수는 서열번호 6의 아미노산에서 하기 부위 (a)-(d)에서 하나, 두 개, 세 개 또는 네 개의 치환이다.
- [0090] (a) N-말단(terminal) 아미노산,
- [0091] (b) N-말단(terminus)으로부터 세 번째 아미노산,
- [0092] (c) C-말단(terminus)으로부터 세 번째 아미노산 및
- [0093] (d) C-말단(terminal) 아미노산.
- [0094] HLA 항원에 결합에 의해 제시되는 아미노산의 서열에서 보존되는 잔기의 부위는 이미 알려져 있다(J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307). 상기 보존된 잔기에 따라서, N-말단 및 C-말단으로부터 두 번째 아미노산에서 치환은 HLA-A24와 상기 펩티드의 결합을 유지하거나 증가하는 것을 도입시킬 수 있다. 하지만, (a)-(d)로서 나타난 상기 부위는 보존된 잔기의 부위가 다르다. 다시 말해서, 본 발명은 기존에 알려진 보존된 잔기와 다른 치환으로 개선된 CTL 유도가능성을 가지는 변형된 펩티드를 제공한다.
- [0095] 본 발명의 실시예에서, 이러한 부위에서 치환은 (i) 내지 (iv)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0096] (i) 서열번호 6의 아미노산 서열에서 N-말단 아미노산에서 E 부터 K 또는 R까지 아미노산 치환,
- [0097] (ii) 서열번호 6의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 세 번째 아미노산에서 C 부터 E, I, L, M, N 또는 P 까지 아미노산 치환,
- [0098] (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열에서 C-말단으로부터 세 번째 아미노산에서 E 부터 N 또는 Q 까지 아미노산 치환,
- [0099] (iv) 서열번호 6의 아미노산 서열에서 C-말단 아미노산에서 F 부터 L 까지 아미노산 치환,
- [0100] 펩티드에서 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산의 변형은 하기에 자세히 기재된 것과 같이, 펩티드의 기능에 영향을 주지 않을 것이다. 하기의 펩티드들은 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)에 비해 더 높은 결합 능력을 가지는 후보 펩티드로 동정되었다:
- [0101] MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35),
- [0102] MELK-A24-9-87_1R(서열번호 36),
- [0103] MELK-A24-9-87_9L(서열번호 37),
- [0104] MELK-A24-9-87_3E(서열번호 38),
- [0105] MELK-A24-9-87_3I(서열번호 39),
- [0106] MELK-A24-9-87_3L(서열번호 40),
- [0107] MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41),
- [0108] MELK-A24-9-87_3N(서열번호 42),
- [0109] MELK-A24-9-87_3P(서열번호 43),
- [0110] MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44), 및
- [0111] MELK-A24-987_7Q(서열번호 45).
- [0112] 이러한 펩티드가 적재된(loaded) 수지상 세포(dendritic cells, DCs)에 의해 T-세포의 시험관내 자극 후에, CTL은 하기 펩티드를 이용하여 성공적으로 수립되었다:

- [0113] MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35),
- [0114] MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41), 및
- [0115] MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44).
- [0116] 상기 수립된 CTL은 각각의 펩티드에 의해 자극받은 표적 세포에 대해 강력한 특이적 CTL 활성을 보인다. 본 발명에서 이러한 결과는 상기 펩티드들이 HLA-A24에 의해 제한된 MELK의 변형된 에피토프 펩티드인 것을 증명한다.
- [0117] MELK 유전자가 자궁내막증 및 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 담관세포 상피성암(cholangiocellular carcinoma), 만성골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(liver cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)을 포함하지만, 이에 한정하지 않은 암 세포 및 조직에서 과발현되어 있고, 대부분의 정상 기관에서 발현되지 않기 때문에, 이것은 면역치료에서 우수한 표적이다. 따라서, 본 발명은 CTL을 인식하는 MELK의 변형된 에피토프에 해당하는 노나 펩티드(아홉 개의 아미노산 잔기로 구성된 펩티드)를 제공한다. 본 발명의 노나펩티드의 바람직한 예는 서열번호 35-45 중에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 이러한 펩티드를 포함한다.
- [0118] 일반적으로, Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1):163-75에 기재되어 있는 것과 같이, 인터넷상에서와 같은 현재 사용가능한 소프트웨어 프로그램은 컴퓨터 상(in silico)에서 다양한 펩티드와 HLA 항원 사이의 결합 친화성(binding affinity)을 산출하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 참조로서 Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1):163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6):1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31; 8: 424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, and Nielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796, which are summarized in, e.g., Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220.에 기재되어 있는 것과 같이, HLA 항원과의 결합 친화성을 측정할 수 있다. 결합 친화성을 결정하는 방법은, 예를 들면: the Journal of Immunological Methods, 1995, 185:181-190; 및 Protein Science, 2000, 9:1838-1846에 기재되어 있다. 따라서, 하나를 HLA 항원에 높은 결합 친화도를 가지는 MELK 유래 그것들의 면역학적 활성 단편을 선별하기 위하여 이러한 소프트웨어 프로그램을 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 이러한 알려진 프로그램을 이용하여 확인된 HLA 항원에 결합하는 MELK 유래 어떤 면역학적 활성 단편으로 구성된 펩티드를 포함한다. 본 발명의 펩티드는 MELK의 전장 펩티드일 수 있다.
- [0119] 상기 결과의 펩티드가 이의 CTL 유도성을 유지하는 한, 본 발명의 펩티드는 부가적 아미노산 잔기를 인접시킬 수 있다. 상기 본 발명의 펩티드의 측면에 배치된 특정한 아미노산 잔기는 원래 펩티드의 CTL 유도성을 손상시키지 않는 한, 어떤 유형의 아미노산으로도 구성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 MELK 유래 변형된 펩티드를 포함하고, HLA 항원에 대한 결합 친화성을 갖는 펩티드를 포함한다. 일반적으로, 상기 펩티드들은 전형적으로 약 40 아미노산 미만, 보통 20 아미노산 미만, 대개 약 15 아미노산 미만이다.
- [0120] 일반적으로, 어떠한 펩티드 중의 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산의 변형은 상기 단백질의 기능에 영향을 미치지 않고, 그리고 어떠한 경우에는 원래 단백질의 원하는 기능을 증진시킬 수 있다. 실제로, 변형된 펩티드(즉, 원래의 참조 서열에 대하여 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 첨가 또는 도입됨으로써 변형된 아미노산 서열로 구성되는 펩티드)가 원래의 펩티드의 생물학적 활성을 보유하고 있다는 것이 알려져 있다(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10:6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79:6409-13). 따라서, 본 발명의 한 실시예에서, 본 발명의 펩티드는 CTL 유도성을 가질 수 있고, 펩티드는 서열번호 35-45 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지며, 여기에서 하나, 둘 또는 그 이상의 아미노산은 첨가, 삽입 및/또는 치환된다.
- [0121] 당업자는 단일 아미노산 또는 적은 비율의 아미노산을 변화시키는 아미노산 서열에 대한 개개의 첨가 또는 치환이 원래 아미노산 서열의 특성의 보존을 야기시키는 경향이 있다는 것을 알고 있다; 따라서, 상기의 것을 "보존적 치환(conservative substitution)" 또는 "보존적 변형(conservative modification)"이라고 하며, 여기서 단백질의 변화는 원래의 단백질과 동일한 기능을 가지는 변형된 단백질을 야기한다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환표는 당업계에서 잘 알려져 있다. 보존하기에 바람직한 아미노산 측쇄 특징의 예는 소

수성 아미노산(hydrophobic amino acids: A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산(hydrophilic amino acids: R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), 및 하기 작용기 또는 공통적 특징을 가지는 측쇄를 포함한다; 지방족 측쇄(aliphatic side-chain: G, A, V, L, I, P); 수산기(hydroxy group)를 포함하는 측쇄(S, T, Y); 황 원자(sulfur atom)를 포함하는 측쇄(C, M); 카복실산 및 아마이드(carboxylic acid and amide)를 포함하는 측쇄(D, N, E, Q); 염기(base)를 포함하는 측쇄(R, K, H); 및 방향족(aromatic)을 포함하는 측쇄(H, F, Y, W). 또한, 하기 8개 군 각각은 당업계에서 서로에게 보존적 치환이라고 받아들여지는 아미노산을 포함한다:

- [0122] 1) 알라닌(alanine; A), 글리신(glycine; G);
- [0123] 2) 아스파라긴산(aspartic acid; D), 글루탐산(glutamic acid; E);
- [0124] 3) 아스파라긴(asparagine; N), 글루타민(glutamine; Q);
- [0125] 4) 아르기닌(arginine; R), 리신(lysine; K);
- [0126] 5) 이소루신(isoleucine; I), 루신(leucine; L), 메티오닌(methionine; M), 발린(valine; V);
- [0127] 6) 페닐알라닌(phenylalanine; F), 티로신(tyrosine; Y), 트립토판(tryptophan; W);
- [0128] 7) 세린(serine; S), 트레오닌(threonine; T); 및
- [0129] 8) 시스테인(cysteine; C), 메티오닌(methionine; M)(예를 들면, Creighton, Proteins 1984 참조).

[0130] 이러한 보존적으로 변형된 펩티드 또한 본 발명의 펩티드로 간주한다. 그러나, 본 발명의 펩티드는 그들에 한정되지 않고, 그 결과적인 변형된 펩티드가 원래 펩티드의 CTL 유도성을 가지는 한, 비보존적인 변형도 포함할 수 있다. 또한, 변형된 펩티드는 CTL 유도 가능한, 다형성 변종(polymorphic variants), 종간 상동체(interspecies homologues), 및 MELK 대립 유전자의 펩티드를 제외하지 않는다.

[0131] 아미노산 잔기는 본 발명의 펩티드에 삽입, 치환 또는 첨가될 수 있거나, 또는, 아미노산 잔기는 더 높은 결합 친화도를 달성하기 위해 그것으로부터 결실될 수 있다. 필수적인 CTL 유도성을 계속 유지하기 위하여, 소수만이(예를 들면, 1, 2 또는 여러 개) 또는 아미노산의 적은 비율이 바람직하게 변형된다(삽입, 결실, 첨가 및/또는 치환). 본 발명에서, 상기 용어 "여러 개"는 5 개 또는 그 이하의 아미노산, 예를 들면 4 개, 3 개 또는 그 이하의 아미노산을 의미한다. 변형되는 아미노산의 비율은 바람직하게는 20% 또는 그 이하, 보다 바람직하게는 15% 또는 그 이하, 그보다 더 바람직하게는 10% 또는 그 이하 또는 1 내지 5%일 수 있다.

[0132] 또한, 본 발명의 펩티드는 아미노산 잔기가 삽입, 치환 또는 부가될 수 있거나, 더 높은 결합 친화도를 달성하기 위하여 아미노산 잔기가 삭제될 수 있다. 면역치료법의 맥락에서 사용되었을 경우, 본 발명의 펩티드는 세포의 표면 또는 엑소솜, 바람직하게는 HLA 항원과 복합체로서 제시되어야만 한다. 자연적으로 나타나는 펩티드뿐만 아니라, HLA 항원에 결합함으로써 나타나는 펩티드 서열의 규칙성은 이미 알려져 있기 때문에(J Immunol 1994, 152:3913; Immunogenetics 1995, 41:178; J Immunol 1994, 155:4307), 상기 규칙성에 근거한 변형은 본 발명의 면역원성 펩티드(immunogenic peptides)에 도입될 수 있다. 예를 들면, HLA-A24 결합을 증가시키기 위해, N-말단으로부터 두번째 아미노산을 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 메티오닌(methionine), 또는 트립토판(tryptophan)으로 치환, 및/또는 C-말단에서 상기 아미노산이 페닐알라닌, 루신(leucine), 이소루신(isoleucine), 트립토판 또는 메티오닌으로 치환하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 서열번호 35-45 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 펩티드, 이는 N-말단의 두번째 아미노산이 페닐알라닌, 티로신, 메티오닌, 또는 트립토판으로 치환되고, 및, 펩티드, 및/또는 이는 상기 서열번호들의 아미노산 서열의 C-말단이 페닐알라닌, 루신, 이소루신, 트립토판, 또는 메티오닌으로 치환된 펩티드가 본 발명에 포함된다.

[0133] 치환은 말단 아미노산 뿐만 아니라 가능성 있는 펩티드의 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR)인지 부위에 도입될 수 있다. 여러 연구, 예를 들면 CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ 또는 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol.(2002) Feb 1;168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother.(2003) 52: 199-206 and S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy(2004) 53, 307-314)는 아미노산 치환을 가지는 펩티드는 원래의 펩티드와 동일하거나 또는 보다 좋은 기능을 가질 수 있다는 것을 나타내었다.

[0134] 또한, 본 발명은 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산이 상기 기재된 펩티드의 N 및/또는 C-말단으로 첨가될 수 있다. 높은 HLA 항원 결합 친화력을 갖고 CTL 유도성을 보유하는 상기 변형 펩티드는 본 발명에 의해 포함될 수 있다.

- [0135] 상기와 같이 더 높은 결합 친화도를 달성하기 위하여 상기 펩티드의 N-말단으로부터 두 번째 아미노산 및 N 및/또는 C-말단에서 변형이 보고되었지만, N-말단으로부터 일곱 번째 아미노산에서의 변형의 효과는 아직 설명되지 않았다.
- [0136] 그러나, 상기 펩티드 서열이 서로 다른 기능을 가지는 내인성 또는 외인성 단백질의 아미노산 서열의 한 부분과 동일할 경우, 특이적 물질에 대한 자가면역질환 및/또는 특정 물질에 대한 알레르기 증상 등의 부작용이 유발될 가능성이 있다. 따라서, 상기 펩티드 서열이 다른 단백질의 아미노산 서열과 일치하는 상황을 피하기 위해서, 사용가능한 데이터베이스를 이용하여 상동성 검색을 먼저 수행하는 것이 바람직하다. 목표 펩티드(objective peptide)와 비교하여 하나 또는 두 개의 아미노산 차이가 있는 펩티드마저도 존재하지 않는다는 것이 상동성 검색에서 드러날 경우, 어떠한 부작용의 위험 없이 HLA 항원과 결합 친화성, 및/또는 CTL 유도성을 증강시키기 위해, 상기 목표 펩티드를 변형시킬 수 있다.
- [0137] 상기와 같이, HLA 항원에 대해 높은 결합 친화성을 가지는 펩티드는 매우 효과적일 것이라고 기대되지만, 높은 결합 친화성의 존재에 따라 지표로서 선택된 후보 펩티드는 CTL 유도성의 존재에 대해 한층 더 검토된다. 본 발명에서, 상기 용어 "CTL 유도성"은 항원-제시 세포(antigen-presenting cells; APCs) 상에 제시될 경우에 CTL을 유도하는 펩티드의 능력을 의미한다. 또한, "CTL 유도성"은 펩티드의 CTL 활성화, CTL 증식을 유도하고, CTL에 의한 표적세포의 용해 촉진시키며, 및 CTL의 IFN-감마(gamma) 생산을 증가시키는 능력을 포함한다.
- [0138] CTL 유도성의 확인은 인간 MHC 항원을 보유하는 APCs[예를 들면, B-림프구, 대식세포(macrophage) 및 수지상세포(dendritic cell; DC)], 또는 보다 구체적으로는 인간 말초 혈액 단핵 백혈구(human peripheral blood mononuclear leukocytes)에서 유래된 수지상세포를 유도하고, 및 펩티드를 사용하여 자극시킨 후, CD8 양성 세포와 혼합하고, 그 후에 표적세포에 대한 CTL에 의해 생산 및 방출되는 IFN-감마를 측정하여 수행할 수 있다. 반응계로서, 인간 HLA 항원을 발현하도록 제작된 형질전환 동물(예를 들면, BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8):764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*2402/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response에 기재된 것)을 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 표적세포를 ⁵¹Cr 등으로 방사 표지할 수 있고, 상기 표적세포로부터 방출된 방사능으로부터 세포독성 활성을 산출할 수 있다. 또는, CTL 유도성은 고정화된 펩티드를 가진 항원-제시 세포(APCs)의 존재하에 CTL에 의해 IFN-감마(gamma)를 측정함으로써 그리고 항-IFN-감마 단일클론 항체를 이용한 배지에서 억제 영역을 가시화함으로써 검사될 수 있다.
- [0139] 상기 기술된 펩티드의 CTL 유도성을 시험한 결과, 서열번호 35-45로 나타난 아미노산 서열을 가지는 펩티드들 중에서 선택된 노나펩티드(nonapeptides) 또는 데카펩티드(decapeptides)가 특히 높은 CTL 유도성 및 HLA-A 항원에 높은 결합 친화도를 보이는 것을 확인하였다. 따라서, 이러한 펩티드들은 본 발명의 바람직한 실시예로서 예시된다.
- [0140] 또한, 상동성 분석(homology analysis)의 결과는 이러한 펩티드들이 어떠한 다른 알려진 인간 유전자 산물 유래 펩티드와 현저한 상동성을 갖지 않음을 보인다. 이것은 상기 펩티드를 면역치료법에서 사용하였을 때, 알려지지 않거나 또는 원하지 않은 면역 반응에 대한 가능성을 낮춘다. 그러므로, 또한 이러한 측면으로부터, 이러한 펩티드들은 암 또는 자궁내막증 환자의 MELK에 대한 면역력을 유도하는 것에 유용하다. 따라서, 본 발명의 펩티드는, 바람직하게, 서열번호 35-45 중에서 선택된 아미노산 서열로 구성된 펩티드이다.
- [0141] 상기에서 논의된 본 발명의 변형뿐 아니라, 본 발명은 연결된 펩티드가 원래 펩티드의 필수적인 CTL 유도성을 가지고 있는 한 다른 펩티드와 연결될 수 있다. 예시적인 적절한 다른 펩티드는 하기를 포함한다: 본 발명의 펩티드 또는 다른 TAA로부터 유래된, CTL 유도성펩티드. 적합한 펩티드 사이의 링커(linker)는 당업계에 잘 알려져 있는데, 예를 들면, AAY(P.M. Daftarian et al., J Trans Med 2007. 5:26), AAA, NKRR(R. P. M. Suttmuller et al., J Immunol. 2000. 165:5 7308-7315) 또는 K(S. Ota et al., Can Res. 62. 1471-1476. K.S. Kawamura et al., J Immunol. 2002. 168: 5709-5715)가 있다.
- [0142] 예를 들면, 비-MELK(non-MELK) 종양관련 항원 펩티드는 HLA 종류 I 및/또는 종류 II를 통해서 면역반응을 증강시키기 위하여 거의 동시에 사용될 수 있다. 암 세포는 하나 이상의 종양관련 유전자를 발현할 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. 특정 개체가 추가적 종양관련 유전자를 발현하는지 결정하는 것 및 그 후 본 발명에 따른 MELK 조성물 또는 백신에서 상기 유전자의 발현 생산물로부터 유래된 HLA 종류 I 및/또는 HLA 종류 II 결합 펩티드를 포함하는 것은 당업계에서 평범한 기술 중 하나를 위한 일반적인 실험방법의 영역 내에 있다.

- [0143] HLA 종류 I 및 HLA 종류 II 결합 펩티드의 예는 당업자에게 알려져 있고(예를 들면, Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995를 참조), 여기서 공개하는 것과 같은 방법으로 본 발명에서 사용될 수 있다. 따라서, 당업자는 하나 또는 그 이상의 MELK 펩티드 및 하나 또는 그 이상의 비-MELK 펩티드를 포함하는 폴리펩티드, 또는 분자 생물학의 표준 절차를 이용하여 상기 펩티드를 암호화하는 핵산을 쉽게 제조할 수 있다.
- [0144] 상기 연결된 펩티드는 여기에서 "폴리톱(polytopes)"이라고 하며, 즉, 다양한 조절[예를 들면, 연결(concatenated), 겹침(overlapping)]에서 함께 연결될 수 있는 펩티드를 자극시키는 둘 또는 그 이상의 잠재적인 면역형성적 또는 면역 반응의 군이다. 면역 반응을 자극, 증진 및/또는 유발시키는 폴리톱의 효과를 검사하기 위하여 상기 폴리톱(polytope)(또는 폴리톱을 암호화하는 핵산)은 표준 면역화 프로토콜에 따라, 예를 들면 동물에 투여될 수 있다.
- [0145] 펩티드는 폴리톱을 형성하기 위해 직접적으로 또는 인근 서열의 사용을 통해 함께 연결될 수 있고, 백신으로서 폴리톱의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다[예를 들면 Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):882-826, 1996; Tarn et al., J Exp Med. 171(1):299-306, 1990을 참조]. 에피토프의 다양한 수 및 조합을 포함하는 폴리톱은 제조될 수 있고 CTL에 의한 인지 및 면역 반응을 증강시키는 효과(efficacy)를 위해 사용될 수 있다.
- [0146] 상기 본 발명의 펩티드의 변형에 대하여, 또한, 상기 기재된 펩티드는 그들이 원래 펩티드의 CTL 유도성을 보유하고 있는 한, 다른 물질에 더 결합될 수 있다. 모범적인 물질은 하기와 같은 예를 포함할 수 있다: 펩티드, 지질, 당 및 당 측쇄, 아세틸기, 천연 및 합성 폴리머 등. 상기 변형이 원래의 펩티드의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 한, 당화(glycosylation), 측쇄 산화, 및/또는 인산화 등의 변형을 포함할 수 있다. 이러한 종류의 변형은 추가적인 기능(예를 들어, 표적 기능 및 전달 기능)을 제공하거나 및/또는 상기 펩티드를 안정시키기 위해 수행될 수 있다.
- [0147] 예를 들면, 폴리펩티드의 생체 내 안정성을 증대시키기 위해, D-아미노산, 아미노산 모방체, 또는 비천연 아미노산을 도입하는 것은 당업계에서 잘 알려져 있으며; 이 개념은 또한 본 발명의 폴리펩티드에 쓰일 수 있다. 폴리펩티드의 안정성은 여러 가지 방법으로 검사될 수 있다. 예를 들면, 펩티다제(peptidases) 및 인간 혈장 및 혈청과 같은 다양한 생물학적 배지는 안정성 시험에 사용될 수 있다(예를 들면, Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986,11:291-302 참조).
- [0148] 또한, 상기에 기술된 것과 같이, 하나, 둘 또는 여러 개의 아미노산 잔기에 의해 치환되거나, 결실되거나 또는 첨가되어 변형된 펩티드 중에서, 원래의 펩티드와 비교하여 동일하거나 또는 더 높은 활성을 갖는 것은 스크리닝 되거나 또는 선택될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 또한 원래의 것에 비교하여 동일하거나 더 높은 활성을 갖는 변형된 펩티드를 스크리닝하거나 또는 선택하는 방법을 제공한다. 실례가 되는 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:
- [0149] a: 본 발명 펩티드의 최소한 하나의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 첨가하는 단계;
- [0150] b: 펩티드의 활성을 결정하는 단계: 및
- [0151] c: 원래의 것에 비교하여 동일하거나 더 높은 활성을 갖는 펩티드를 선택하는 단계.
- [0152] 본 발명에서, 상기 분석되는 활성은 MHC 결합 활성, APC, 또는 CTL 유도성 및 세포독성 활성을 포함할 수 있다.
- [0153] 본 발명에서, 본 발명의 펩티드는 "MELK 펩티드(들)" 또는 "MELK 폴리펩티드(들)"로 기술될 수 있다.

[0154] III. 변형된 MELK 펩티드의 제조

- [0155] 본 발명의 펩티드는 잘 알려진 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드는 재조합 DNA 기술 또는 화학 합성을 사용하여 합성적으로 제조할 수 있다. 본 발명의 펩티드는 개별적으로, 또는 두 개 또는 이상의 펩티드로 구성된 더 긴 폴리펩티드로 합성할 수 있다. 상기 펩티드는 다른 자연적으로 발생한 숙주 세포 단백질 및 이의 단편, 또는 다른 화학 물질이 거의 없도록 분리, 즉 정제 되거나 분리될 수 있다.
- [0156] 본 발명의 펩티드는 여기서 기술하는 본 펩티드(original peptide)의 생물학적 활성을 저해하지 않는다면, 당화(glycosylation), 측쇄 산화, 또는 인산화와 같은 변형을 포함할 수 있다. 다른 예시적 변형은 펩티드의 혈청

반감기(serum half life)를 증가시키기 위해 D-아미노산 또는 사용될 수 있는 다른 아미노산 모방체의 통합을 포함할 수 있다.

- [0157] 본 발명의 펩티드는 상기 변형이 본 발명에 기재된 상기 펩티드의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 한 글리코실화(glycosylation), 측쇄 산화(side chain oxidation), 또는 인산화(phosphorylation)와 같은 변형을 함유할 수 있다. 다른 변형은, 예를 들면, 상기 펩티드의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있는 D-아미노산 또는 다른 아미노산 유사체(mimetics)를 포함한다.
- [0158] 본 발명의 펩티드는 선택된 아미노산 서열을 기반으로 화학 합성을 통해 얻을 수 있다. 합성에 적용될 수 있는 보편적인 펩티드 합성 방법의 예는 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다:
- [0159] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- [0160] (ii) The Preteins, Vol 2, Academic Press, New York, 1976;
- [0161] (iii) Peptide Synthesis(일본어), Maruzen Co, 1975;
- [0162] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis(일본어), Maruzen Co, 1985;
- [0163] (v) Development of Pharmaceuticals(제 2판)(일본어), Vol. 14(peptide synthesis), Hirokawa, 1991;
- [0164] (vi) W099/67288; 및
- [0165] (vii) Barany G. & Merrifield RB, Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis," Academic Press, New York, 1980, 100-118.
- [0166] 또는, 본 발명의 펩티드는 펩티드를 제작하기 위한 임의의 잘 알려진 유전자 조작 방법을 사용해서 얻을 수 있다(예를 들면, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(Wu et al. 판) 1983, 101:347-62). 예를 들면, 우선, 목표 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현 가능한 종류(예를 들면, 프로모터 서열에 해당하는 조절 서열의 아래부분(downstream))로 포함하여 적절한 벡터를 제조하고 적절한 숙주 세포에 형질전환한다. 그 다음에, 상기 숙주 세포를 원하는 펩티드를 제작하기 위해 배양한다. 또한 상기 펩티드는 시험관 내(in vitro) 번역 시스템을 조정하여(adapting) 시험관 내에서 제조될 수도 있다.

[0167] IV. 폴리뉴클레오티드

- [0168] 또한, 본 발명은 본 발명의 상기 언급한 펩티드 중 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이들은 자연적으로 존재하는 MELK 유전자[GenBank Accession No. NM_014791(예를 들면, 서열 번호 46)]에서 유래한 변형된 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 이의 보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열로 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명에서, 상기 용어 "보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열"은 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 서열을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴(degeneracy) 때문에, 많은 수의 기능적으로 동일한 핵산은 모든 주어진 단백질을 암호화한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCU 및 GCG은 모두 알라닌 아미노산을 암호화한다. 따라서, 코돈에 의해 결정되는 알라닌의 모든 위치에서, 암호화되는 폴리펩티드의 변경없이, 상기 코돈은 상응하는 코돈 중 어느 하나로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이를 "침묵 변이(silent variations)"라 하고, 보존적으로 변형된 변종의 한 종류이다. 펩티드를 암호화하는 본 발명의 모든 핵산 서열은 상기 핵산의 모든 가능한 침묵 변종도 나타낸다. 당업계에서 보편적인 것 중 하나는 핵산의 각 코돈(보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG은 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 얻기 위해 변형될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 펩티드를 암호화하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 공개된 각 서열에서 암시적으로 기재되어 있다.
- [0169] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로 구성될 수 있다. DNA는 A, T, C 및 G와 같은 염기로 적절하게 구성되고, T는 RNA에서 U로 대체된다. 당업자는 비-자연적으로 존재하는 염기 또한 폴리뉴클레오티드에 포함된다는 것을 인지할 것이다.
- [0170] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 아미노산 서열 사이의 개입(intervening) 유무를 불문하고 본 발명의 펩티드를 포함하는 다양한 펩티드를 암호화할 수 있다. 예를 들면, 상기 개재 아미노산 서열은 폴리뉴클레오티드 또는 번역된 펩티드의 절단 부위(예를 들면, 효소 인식 서열)를 제공할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 본

발명의 펩티드를 암호화하는 코딩 서열에 대한 어떠한 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 펩티드의 발현에 필요한 조절 서열을 포함하는 재조합형 폴리뉴클레오티드일 수 있고 또는 마커 유전자들을 가지는 발현 벡터(플라스미드)일 수도 있다. 일반적으로, 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드는, 예를 들면, 중합효소(polymerase) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 이용한 종래의 재조합 기술을 통해 폴리뉴클레오티드를 조작하여 제조할 수 있다.

[0171] 재조합 기술 및 화학 합성 기술은 모두 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 제작하는 데 사용할 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드는 반응능(competent) 세포에 형질전환되어 발현하는 적절한 벡터 내에 삽입하여 제작할 수 있다. 또는, PCR 기술 또는 적절한 숙주에서의 발현을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시킬 수 있다(예를 들면, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). 또는, Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5에 기재되어 있는 것과 같이, 고체상 기술을 이용하여 폴리뉴클레오티드를 합성할 수 있다.

[0172] V. 엑소솜(Exosomes)

[0173] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩티드와 HLA 항원 사이에 형성된 복합체를 그 표면에 제시하는 엑소솜이라는 세포 내 소낭을 제공한다. 엑소솜은 예를 들면, 일본 특허출원 제 11-510507호 및 W099/03499에 설명된 방법을 사용하여 제조할 수 있고, 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 환자에게서 얻어진 APCs를 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 엑소솜은 본 발명의 상기 펩티드와 유사한 방법으로 백신으로서 접종할 수 있다.

[0174] 복합체에 함유된 HLA 항원의 종류는 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 개체의 HLA 항원의 종류와 일치해야 한다. 예를 들면, 일본인 집단에 대하여, HLA-A24(특히, A*2402)가 흔하고 그러므로 일본인 환자의 치료에 적합할 것이다. 일본인과 백인 중에서 높게 발현되는 A24 종류의 사용은 효과적인 결과를 얻기 위해 바람직하다. 일반적으로, 임상에서는, 치료를 필요로 하는 환자의 HLA 항원의 종류는 미리 검사되고 있어, 상기 특정 항원에 대해 높은 수준의 결합 친화성을 갖거나, 항원제시에 의한 세포독성 T 세포(CTL) 유도성을 가지는 펩티드를 적절하게 선택하는 것이 가능하게 된다. 또한, 높은 결합 친화도 및 CTL 유도성을 가지는 펩티드를 수득하기 위해, 1, 2 또는 일부 아미노산의 치환, 삽입 및/또는 첨가는 상기 변형된 MELK 부분 펩티드, 즉, MELK-A24-9-87_{WT}(서열번호 6) 유래 변형된 펩티드의 아미노산 서열에 기초하여 수행될 수 있다.

[0175] A24형 HLA 항원을 본 발명의 엑소솜을 위해 사용한 경우, 서열번호 35-45 중 어느 하나의 서열을 가지는 펩티드가 사용된다.

[0176] VI. 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs)

[0177] 또한, 본 발명은 HLA 항원과 본 발명의 펩티드 사이에 형성된 복합체를 그 표면에 제시하는 분리된 항원-제시 세포(antigen presenting cells; APCs)를 제공한다. 상기 APCs는 치료 및/또는 예방을 받는 환자로부터 유래될 수 있고, 그 자체로 또는 본 발명의 펩티드, 엑소솜 또는 CTL을 포함하는 다른 약물과 조합하여 투여될 수 있다.

[0178] 상기 APCs는 특정한 종류의 세포에 한정되지 않고, 수지상세포(DC), 랑게르한스(Langerhans) 세포, 매크로파지(macrophage), B세포 및 활성화 T 세포를 포함할 수 있는데, 이들은 림프구에 의해 인식되기 위하여 세포 표면에 단백질성 항원을 제시하는 것이 알려져 있다. 수지상세포는 강력한 CTL 유도 작용을 가지는 APCs 중 하나이므로, 수지상세포는 본 발명의 APCs로서 사용할 수 있다.

[0179] 예를 들면, 말초 혈액 단핵구로부터 DCs를 유도하고, 그런 다음 그것들을 시험관 내(in vitro), 생체 내(in vivo) 또는 생체 외(ex vivo)에서 본 발명의 펩티드와 접촉(자극)시켜 본 발명의 APCs를 얻을 수 있다. 본 발명의 펩티드를 개체에 투여하면, 본 발명의 펩티드가 제시된 APCs가 개체의 체내에서 유도된다. 상기 용어 “유도된 APC”는 HLA 항원 및 본 발명의 펩티드 사이에 형성된 복합체를 이의 세포 표면에 제시하기 위해 본 발명의 펩티드 또는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드(nucleotide)를 접촉한(자극한) 세포를 포함한다. 따라서 본 발명의 APCs는 본 발명의 펩티드를 개체에 주입한 후 개체에서 수집할 수 있다. 또는, 본 발명의 상기 APCs는 본 발명의 상기 펩티드가 주입된 개체로부터 수집한 APCs와 접촉함으로써 얻을 수 있다.

[0180] 본 발명의 상기 APC는 단독 또는 상기 펩티드, 엑소솜 또는 본 발명의 CTL을 포함하는 다른 약물과의 조합으로 개체에서 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 개체로 투여될 수 있다. 예를 들면, 생체 외 투여는 하기 단계

를 포함할 수 있다:

- [0181] a: 첫 번째 개체로부터 APCs를 수집하는 단계,
- [0182] b: 단계 a의 APCs와 상기 펩티드를 접촉하는 단계 및
- [0183] c: 단계 b의 APCs를 2번째 개체에 투여하는 단계.
- [0184] 첫 번째 개체와 두 번째 개체는 같은 개체일 수 있고, 또는 다른 개체일 수 있다. 또는, 본 발명에 따라서, 항원-제시 세포를 유도하는 약학적 조성물을 제조하기 위한 본 발명의 펩티드의 사용이 제공된다. 또한, 본 발명은 항원-제시 세포를 유도하는 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 과정을 제공한다. 또한, 본 발명은 항원-제시 세포를 유도하기 위한 본 발명의 펩티드를 제공한다. 단계 b에서 수득된 APC는 자궁내막증(endometriosis) 또는 암 치료 및/또는 예방을 위한 백신으로 투여될 수 있고, 암의 예는 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 담관세포 상피성암(cholangiocellular carcinoma), 만성골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(liver cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0185] 또한, 본 발명은 APC 유도용 약학적 조성물의 제조를 위한 방법 또는 과정을 제공하며, 이는 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)를 혼합하거나 제형화하는 과정을 포함한다.
- [0186] 본 발명의 하나의 측면에 따르면, APCs는 높은 수준의 CTL 유도성을 가지고 있다. "높은 수준의 CTL 유도성"이라는 용어에 있어서, 상기 높은 수준은 펩티드와 접촉시키지 않는 APCs 또는 CTL을 유도할 수 없는 펩티드와 접촉시킨 APCs의 CTL 유도성수준과 비교한 CTL 유도성수준이다. 높은 수준의 세포독성 T 세포 유도성을 가지는 이러한 APCs는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한 유전자를 시험관 내에서 APCs에 도입하는 단계를 포함하는 방법으로 제조할 수 있다. 상기 도입 유전자는 DNA 또는 RNA 종류일 수 있다. 도입 방법으로는, 특별한 제한 없이, 본 기술분야에서 일반적으로 실시되는 다양한 방법, 예를 들면, 리포펙션(lipofection), 전기천공법(electroporation), 및 인산칼슘법등이 포함된다. 보다 구체적으로는, 이는 Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 특허공보 제 2000-509281호에 기재된 것에 따라 실시할 수 있다. 유전자를 APCs로 도입함으로써, 상기 유전자는 세포 안에서 전사 및 번역을 겪고, 이렇게 얻어진 단백질은 MHC 종류 I 또는 종류 II에 의해 처리되고, 제시 경로를 거쳐 펩티드가 제시된다.
- [0187] **VII. 세포독성 T 세포(Cytotoxic T lymphocytes; CTL)**
- [0188] 본 발명의 임의의 펩티드에 대해 유도된 세포독성 T 세포는 생체 내에서 종양 관련 내피를 표적으로 하는 면역 반응을 증강하고 그로 인하여 상기 펩티드 그 자체와 유사한 방법으로 백신으로서 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 펩티드에 의해 특이적으로 유도 또는 활성화된 분리된 세포독성 T 세포를 제공한다.
- [0189] 이러한 CTL은 (1) 본 발명의 펩티드를 개체에 투여, 개체로부터 CTL 수집; 또는 (2) 개체 유래 APCs, CD8 양성 T 세포, 또는 본 발명의 펩티드와 함께 시험관 내에서 말초 혈액 단핵 림프구 접촉(자극) 후 CTL 분리; 또는 (3) CD8 양성 T 세포 또는 말초 혈액 단핵 림프구와 시험관 내에서 그것의 표면에 HLA 항원과 본 발명의 펩티드 복합체를 제시하는 APCs 또는 엑소솜을 접촉하고 CTL 분리; 또는 (4) 본 발명의 펩티드와 결합하는 T 세포 수용체 서브유닛(subunit)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자의 상기 CTL로의 도입으로 얻어질 수 있다. 상기 APCs 및 엑소솜은 상기 기재 방법 및(4) 방법에 의해 준비될 수 있으며, (4)의 방법은 아래 "VIII. T 세포 수용체(TCR)" 부분에서 열거된다.
- [0190] 본 발명의 CTL은 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 개체로부터 유래할 수 있고, 그 자체, 또는 조절 효과의 목적을 위한 본 발명의 펩티드 또는 엑소솜을 포함하여 다른 약물과 조합하여 투여할 수 있다. 상기 얻어진 세포독성 T 세포는 본 발명의 펩티드, 예를 들어, 유도를 위해 사용한 것과 동일한 펩티드를 제시하는 표적 세포에 대해 특이적으로 작용한다. 상기 표적 세포는 암 또는 자궁내막증 세포와 같은 MELK를 내생적으로 발현하는 세

포, 또는 MELK 유전자가 형질전환된 세포이고; 본 발명의 펩티드에 의한 자극에 의해 세포 표면에 상기 펩티드를 제시하는 세포도 활성화된 CTL 공격의 표적이 될 수 있다.

[0191] **VIII. T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)**

[0192] 또한, 본 발명은 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)의 서브유닛(subunit)을 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물 및 이를 이용한 방법을 제공한다. TCR 서브유닛(subunit)은 MELK를 발현하는 종양세포에 대한 특이성을 T 세포에 부여하는 TCR 형성 능력을 가진다. 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 펩티드로 유도된 CTL의 TCR 서브유닛(subunit)을 구성하는 알파쇄(alpha chain) 및 베타쇄(beta chain)를 암호화하는 핵산을 동정할 수 있다(WO2007/032255 및 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288, 2003). 예를 들면, 상기 PCR 방법은 TCR을 분석하는데 바람직하다. 상기분석을 위한 PCR 프라이머는, 예를 들어, 5' 측면(side) 프라이머로서 5'-R 프라이머(5'-gtctaccaggcattcgcttcattcat-3')(서열 번호 49) 및 TCR 알파 사슬(alpha chain) C 부위에 특이적인 3-TRa-C 프라이머(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3')(서열 번호 50), TCR 베타 사슬(beta chain) C1 부위에 특이적인 3-TRb-C1 프라이머(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3')(서열 번호 51) 또는 3' 측면 프라이머로서 TCR 베타 사슬 C2 부위에 특이적인 3-TR 베타-C2 프라이머(5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3')(서열 번호 52)일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 상기 TCR 유도체는 변형된 MELK를 제시하는 표적세포에 높은 결합력(avidity)으로 결합할 수 있고, 상기 변형된 MELK 펩티드를 제시하는 표적세포의 효과적인 사멸을 생체 내 또는 시험관 내에서 선택적으로 매개할 수 있다.

[0193] 상기 TCR 서브유닛을 암호화하는 핵산은 적절한 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터에 통합될 수 있다. 이러한 벡터는당업계에 잘 알려져 있다. 핵산 또는 그것을 함유한 벡터는 T 세포, 예를 들면 환자로부터의 T 세포에 유용하게 도입될 수 있다. 유리하게는, 본 발명은 환자 그들의(또는 다른 포유류의 것) T 세포가 암세포를 죽일 수 있는 탁월한 특징을 갖는, 용이하고 빠르게 변형된 T 세포를 생산하도록 급격한 변화를 허용하는, 바로 살 수 있는 조성물(off-the-shelf composition)을 제공한다.

[0194] 특이적 TCR은 특이적으로 본 발명의 펩티드 및 HLA 분자의 복합체를 특이적으로 인지할 수 있는 수용체(receptor)이고, 이것은 상기 TCR이 상기 T 세포 표면에 있을 때, 표적세포에 대한 T 세포 특이적 활성을 제공한다. 상기 복합체의 특이적 인식은 어떤 알려진 방법에 의해 수행될 수 있고, 바람직한 방법은 예를 들면, HLA 분자 및 본 발명의 펩티드를 이용한 테트라머(tetramer) 분석, 및 ELISPOT 분석을 포함한다. ELISPOT 분석을 수행함으로써, 세포 표면에 TCR을 발현하는 T 세포가 TCR에 의해 세포를 인지하고, 신호가 세포내부로 이동되는 것이 확인될 수 있다. 상기 복합체가 T 세포 표면에 상기 복합체가 존재할 때, T 세포 세포독성 활성을 줄 수 있는 것의 확인은 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다. 바람직한 방법은, 예를 들면, 크로미움 방출 분석(chromium release assay)과 같은 HLA 양성 표적세포에 대한 세포독성 활성의 확인을 포함한다.

[0195] 또한, 본 발명은 변형된 MELK 펩티드, 예를 들면 HLA-A24의 맥락에서, 서열번호 35-45 펩티드에 결합하는 TCR 아단위(subunit) 폴리펩티드를 암호화하는 핵산(nucleic acid)로 형질전환하여 제조된 CTL을 제공한다. 상기 형질전환된 CTL은 생체 내에서 암세포로 호밍(homing)할 수 있으며, 잘 알려진 시험관 내 배양 방법으로 증식시킬 수 있다[예를 들면, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461(1989)]. 본 발명의 상기 CTL은 치료나 보호를 필요로 하는 환자의 암의 치료 또는 예방에 유용한 면역학적 조성물을 구성하는데 쓰일 수 있다(WO2006/031221).

[0196] 방지(Prevention) 및 예방(prophylaxis)은 질환으로부터 사망(mortality) 또는 사망률(morbidity)의 부담을 감소시킬 수 있는 어떤 활성을 포함한다. 방지 및 예방은 “초기에, 2차 및 3차 방지 수준”을 야기할 수 있다. 초기 방지 및 예방이 질환의 발달을 피하는 반면, 방지 및 예방의 2차 및 3차 수준은 질환의 진행 및 증상의 발생의 방지 및 예방뿐만 아니라 기능을 회복하고, 질환 관련된 합병증을 감소시킴으로써 이미 수립된 질환의 부정적 영향을 감소시키는 것을 목표로 한다. 또는, 방지 및 예방은 특정한 질환의 심각성을 완화시키는 것을 목표로 하는 광범위한 예방 치료, 예를 들면 종양 또는 자궁내막증의 증식 및 전이(metastasis)를 감소, 혈관형성(angiogenesis)의 감소를 포함한다.

[0197] 암의 예방에 대한 치료 및/또는 수술 후 이의 재발의 방지는 하기 단계 중 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다: 암 세포의 외과적 제거, 암세포의 성장의 저해, 종양의 퇴행 또는 복구, 암의 발생의 차단 및 억제제의 유도, 종양 퇴행, 및 전이의 감소 또는 저해. 효과적으로 암의 치료 및/또는 예방은 사망을 감소시키고, 암을 가지는 개체의 진행을 개선하고, 혈액내의 종양 마커의 수준을 감소시키고, 암을 수반한 탐지가능한 증상을 완화

시킨다. 예를 들면, 증상의 감소 또는 개선은 효과적으로 치료 및/또는 예방은 10%, 20%, 30% 또는 그 이상의 감소 또는 안정한 질환을 포함하는 것으로 여겨진다.

IX. 약학적 제제 또는 조성물

MELK 발현이 자궁내막증(endometriosis) 및 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 담관세포 상피성암(cholangiocellular carcinoma), 만성골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(liver cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)을 포함하는 암에서 정상 조직에 비해 특이적으로 높기 때문에, 본 발명의 펩티드 또는 이러한 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 자궁내막증 및 암 또는 종양의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발의 방지를 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 본 발명의 펩티드, 또는 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 암, 종양 또는 자궁내막증의 치료를 위한 및/또는 예방을 위한, 및/또는 이의 수술 후 재발의 예방을 위한 약학적 물질 또는 조성물을 제공한다. 또는, 본 발명의 펩티드는 상기 엑소솜 또는 약학적 물질 또는 조성물로서 사용되는 APCs와 같은 세포의 임의의 표면에서 발현될 수 있다. 또한, 상기 언급한 본 발명의 어떤 펩티드를 표적으로 하는 세포독성 T 세포는 또한 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물의 유효 성분으로서 사용될 수 있다.

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

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

다른 실시예에서, 본 발명은 또한 암, 종양 또는 자궁내막증을 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 물질의 제조에서 유효 성분의 용도를 제공하며, 상기 유효성분은 하기 중에서 선택된다:

(a) 본 발명의 펩티드;

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

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

(d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

또는, 본 발명은 또한 암, 종양 또는 자궁내막증의 치료 또는 예방에서 이용을 위한 유효 성분을 제공하며, 상기 유효 성분은 하기 중에서 선택된다:

(a) 본 발명의 펩티드;

(b) 본 발명에서 발현가능한 형태로 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산;

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

(d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

또는, 본 발명은 추가적으로 암, 종양 또는 자궁내막증을 치료를 위한 약학적 조성물 또는 물질을 제조하기 위한 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법 또는 과정은 유효 성분으로서 하기로부터 선택되는 약학적으로 또는 생리활성적으로 허용가능한 유효 성분이 있는 담체를 제형화하는 단계를 포함한다:

(a) 본 발명의 펩티드;

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

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

- [0216] (d) 본 발명의 CTL.
- [0217] 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 암, 종양 또는 자궁내막증을 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 물질을 제조하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법 또는 과정은 하기로부터 선택되는 유효 성분이 있는 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체를 혼합하는 단계를 포함한다:
- [0218] (a) 본 발명의 펩티드;
- [0219] (b) 발현할 수 있는 종류로 본 명세서에 공개된 이러한 펩티드를 암호화하는 핵산;
- [0220] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜; 및
- [0221] (d) 본 발명의 CTL.
- [0222] 또는, 본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 본 발명의 펩티드, 또는 하나 또는 그 이상의 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 구성된, CTL을 유도하기 위한 물질을 제공한다. 또는, 상기 약학적 조성물 또는 물질 또는 본 발명은 암, 종양 또는 자궁내막증의 예방 및 이의 수술 후 예방 각각 또는 둘 다에 사용될 수 있다.
- [0223] 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물은 백신으로 사용된다. 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 맥락에서, 상기 구 “백신(vaccine)” (또한 “면역성 조성물(immunogenic composition)”로 나타낸)은 동물에 접종하여 항-종양 면역력(immunity)을 유도하는 기능을 가지는 물질에 관한 것이다.
- [0224] 본 발명의 상기 약학적 물질 또는 조성물은 인간을 포함한 개체 또는 환자 및 마우스(mouse), 랫(rat), 기니-피그(guinea-pig), 토끼(rabbit), 고양이(cat), 개(dog), 양(sheep), 염소(goat), 돼지(pig), 소(cattle), 말(horse), 원숭이(monkey), 개코원숭이(baboon), 및 침팬지(chimpanzee), 특히 상업적으로 중요한 동물 또는 가축(domesticated animal)을 포함하지만, 이에 한정하지 않은 어떤 다른 포유류의 이의 암, 종양 또는 자궁내막증의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발의 예방에 사용될 수 있다.
- [0225] 본 발명에 따라, 서열번호 35-45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 펩티드는 강력하고 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 HLA-A24에 제한된 에피토프 펩티드 또는 후보로 알려졌다. 따라서, 서열번호 35-45의 아미노산 서열을 가지는 이러한 펩티드 중 어느 것을 포함하는 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물은 HLA 항원이 각각 HLA-A24인 개체에 투여에 특히 적합하다. 같은 것이 본 발명의 펩티드 중 어떤 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(즉, 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 약학적 물질 및 조성물에 적용된다.
- [0226] 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물에 의해 치료되는 암, 종양, 또는 자궁내막증은 제한되지 않고, MELK가 관련된 질환의 모든 종류를 포함하며, 자궁내막증(endometriosis) 및 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 담관세포 상피성암(cholangiocellular carcinoma), 만성골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(liver cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)를 포함하지만, 이에 한정하지 않는다.
- [0227] 상기 약학적 물질 또는 조성물은 상기 기재한 유효 성분뿐만 아니라, 암 세포에 대해 CTL을 유도하는 능력이 있는 다른 펩티드, 상기 다른 펩티드를 암호화하는 다른 폴리뉴클레오티드, 상기 다른 펩티드들을 제시하는 다른 세포를 포함할 수 있다. 여기서, 암세포에 대해 CTL을 유도하는 능력을 가지는 다른 펩티드들은 암 특이적 항원(예를 들어, 동정된 TAA들)에 의해 예시가 될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0228] 본 발명의 상기 약학적 물질 또는 조성물은 상기 유효 성분, 예를 들면 본 발명의 펩티드의 어떤 것과 같은 것의 항종양적 효과를 억제하지 않는 한, 필요하다면 선택적으로 다른 치료적 물질을 유효 성분으로서 포함한다. 예를 들면, 제제(formulation)는 항염증적 물질, 진통제, 화학요법 및 그와 같은 종류의 것을 포함할 수 있다. 그 약제 안에 다른 치료적 물질을 포함하는 것뿐 아니라, 본 발명의 약제는 역시 하나 또는 그 이상의 다른 약학적 물질과 단계적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 약제(medication) 및 약학적 물질의 양은, 예를 들면, 사용되는 약학적 물질의 유형, 치료되는 질병, 투여의 일정과 루트(route)에 의존한다.
- [0229] 특히 상기 언급한 성분뿐만 아니라, 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물은 논의가 되고 있는 제형의 종류에 관하여 당업계에서 일반적인 다른 물질을 포함할 수 있다.
- [0230] 본 발명의 한 실시예에서, 상기 약학적 제제, 물질 또는 조성물은, 예를 들어 암 또는 자궁내막증과 같은, 질병

의 병리 조건을 치료하는데, 유용한 물질을 포함하는 제품 및 키트에 포함될 수 있다. 상기 제품은 라벨이 있는 상기 약학적 물질 또는 조성물 중 어느 하나의 용기를 포함할 수 있다. 적합한 용기는 병, 바이알(vial) 및 테스트 튜브를 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 만들어질 수 있다. 상기 용기의 라벨은 상기 물질이 하나 또는 그 이상의 질환의 상태를 치료하거나 방지하기 위해 사용되는 것을 나타내야 한다. 또한 라벨은 투여에 관한 지시 등에 대해 나타낼 수 있다.

[0231] 또한 상기 기재한 용기뿐 아니라, 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물을 포함한 키트는 선택적으로 약학적으로 허용할 수 있는 희석액을 보관하는 두 번째 용기를 포함할 수 있다. 또한 이것은 상업적 및 사용자의 관점으로부터 바람직한 다른 물질, 다른 버퍼, 희석액, 필터, 니들, 주사기 및 사용설명서를 포함할 수 있다.

[0232] 상기 약학적 물질 또는 조성물은, 바람직하다면, 유효 성분이 포함된 하나 또는 그 이상의 구성 단위 제형을 포함할 수 있는 팩 또는 디스펜서(dispenser) 장치에 존재할 수 있다. 상기 팩은, 예를 들어, 금속 또는 블리스터 팩과 같은 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치는 투여에 대한 지시에 의해 동반될 수 있다.

[0233] (1) 상기 펩티드를 유효 성분으로 포함하는 약학적 물질 또는 조성물

[0234] 본 발명의 펩티드들은 약학적 물질 또는 조성물로 직접적으로 투여될 수 있으며, 또는 필요하다면, 종래의 제조 방법에 의해 제조되기도 한다. 후자의 경우, 본 발명의 펩티드 뿐만 아니라, 담체, 부형약 및 약물에서 평이하게 사용되는 것이 특이적 제한 없이 적절한 것으로 포함될 수 있다. 상기 담체들은 멸균된 물, 생리학적인 살린(saline), 인산 버퍼(phosphate buffer), 배양 유액 등이다. 또한, 상기 약학적 물질 또는 조성물은 필요하다면, 안정제, 현탁액, 보존료, 계면활성제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물은 항암 목적으로 사용될 수 있다.

[0235] 본 발명의 펩티드들은 생체 내에서 CTL을 유도하기 위해 둘 또는 그 이상의 본 발명의 펩티드를 포함하는 조합으로 준비될 수 있다. 상기 펩티드는 혼합제(cocktail)의 종류를 가질 수 있고, 또는 표준 기술을 이용하여 각각 다른 것이 접합될 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드들은 단독 융합 폴리펩티드 서열로서 발현되거나 화학적으로 연결될 수 있다. 상기 조합의 펩티드들은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 본 발명의 펩티드들을 투여함으로써, 펩티드들은 APCs에 HLA 항원에 의해 높은 밀도로 제시되며, 그 후에 제시된 펩티드 및 HLA 항원으로 구성된 복합체에 대해 특이적으로 반응하는 CTL은 유도된다. 또는, APC(예를 들면, DC)는 개체로부터 제거된 후 그들의 세포 표면에 본 발명의 펩티드 중 어느 것을 제시하는 APC를 획득하기 위하여 본 발명의 펩티드로 자극된다. 이러한 APC는 개체에서 CTL을 유도하기 위하여 개체에 재투여되고, 결과적으로 종양-연관된 내피(endothelium)로 공격성이 증가될 수 있다.

[0236] 또한, 본 발명의 펩티드를 유효 성분으로 포함하는 암, 종양 또는 자궁내막증의 치료 및/또는 예방에 대한 상기 약학적 물질 또는 조성물은 세포성 면역을 효과적으로 확립한다고 알려진 보강제(adjuvant)를 포함할 수 있다. 또는 약학적 물질 또는 조성물은 다른 유효 성분과 함께 투여될 수 있으며, 또는 과립(granule)으로 제형되어 투여될 수 있다. 보강제는 면역학적 활성을 가진 단백질과 함께(또는 연속적으로) 투여될 때, 상기 단백질에 대한 면역 반응을 증진시키는 화합물을 나타낸다. 여기서 고려되고 있는 보강제는 문헌(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)에 기술되어 있는 것들을 포함한다. 예시적인 적절한 보강제는 알루미늄 포스페이트(aluminum phosphate), 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide), 알루미늄(alum), 콜레라 독소(cholera toxin), 살모넬라 독소(salmonella toxin)를 포함하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0237] 또한, 리포솜 제형, 미세한 마이크로미터 지름의 비드(bead)가 결합된 펩티드를 가지는 과립 제형, 및 지질(lipid)과 결합되는 펩티드 제형이 편리하게 쓰일 수 있다.

[0238] 본 발명의 다른 실시태양에서, 또한 본 발명의 펩티드들은 약학적으로 허용가능한 염의 종류로 투여될 수 있다. 상기 염(salts)의 바람직한 예는 알칼리 금속(alkali metal), 금속염(salts with a metal), 유기염기염(salts with an organic base), 유기산염(salts with an organic acid) 및 무기산염(salts with an inorganic acid)를 포함한다. 여기서 사용되는 "약학적으로 허용가능한 염"은 생물학적 효과성 및 화합물의 특성을 보유하고, 하이드로클로릭산(hydrochloric acid), 하이드로브로믹산(hydrobromic acid), 황포릭산(sulfuric acid), 질트릭산(nitric acid), 인산(phosphoric acid), 메탄술폰산(methanesulfonic acid), 에탄술폰산(ethanesulfonic acid), p-톨루엔술폰산(p-toluenesulfonic acid), 살리실릭산(salicylic acid) 및 그와 같은 것과 같은 무기산 또는 염기와 반응함으로써 수득될 수 있는 염을 의미한다.

- [0239] 또한, 어떤 실시예에서, 본 발명의 약학적 물질 또는 조성물은 CTL을 준비하는 구성요소를 포함한다. 지질은 바이러스 항원에 대해 생체 내에서 CTL을 초회감작(priming)시킬 수 있는 물질로 확인되었다. 예를 들면, 팔미트산 잔기(palmitic acid residues)는 라이신 잔기의 엡실론-아미노(epsilon-amino) 및 알파-아미노(alpha-amino) 그룹에 붙여질 수 있으며, 그 후에 본 발명의 펩티드들과 연결될 수 있다. 지질화 펩티드들은 마이셀(micelle) 또는 입자(particle) 안에 직접적으로 투여되거나, 리포솜(liposome)에 통합되거나, 또는 보강제에 유화시킬 수 있다. CTL 반응을 준비시키는 지질의 또 다른 예로, 적절한 펩티드들과 공유적으로 결합될 때, 트리팔미토일-S-글리세릴시스테인리세릴-세린(tripalmitoyl-S-glycerylcysteinyl-seryl-serine, P3CSS)과 같은 E. coli 지질단백질(lipidprotein)이 CTL을 준비하는 것에 사용될 수 있다(참조, 예를 들어, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).
- [0240] 투여 방법은 경구, 피내, 피하, 정맥 주사, 또는, 및 전신 투여 또는 표적하는 장소 부근에 국소 투여될 수 있다. 상기 투여는 단독 투여로 수행될 수 있으며 또는 다수의 투여로 신장시킬 수 있다. 본 발명의 펩티드의 복용량은 치료되기 위한 질환, 환자의 연령, 몸무게, 투여 방법, 등등에 알맞게 적용될 수 있고, 보통 0.001mg 내지 1000mg, 예를 들면, 0.1mg 내지 10mg이며, 몇 일 내지 몇 달에 한 번 투여될 수 있다. 당업자가 적절하게 알맞은 용량을 선택할 수 있다.
- [0241] (2)폴리뉴클레오티드를 유효 성분으로 포함하는 약학적 물질 또는 조성물
- [0242] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 발현할 수 있는 종류로 본 명세서에서 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산을 함유할 수 있다. 여기에서, 상기 용어 "발현할 수 있는 종류"는 세포 안으로 상기 폴리뉴클레오티드가 도입되었을 때, 생체 내에서 폴리뉴클레오티드가 항종양 면역을 유도하는 폴리펩티드로 발현될 것임을 의미한다. 예시된 실시태양에서, 관심있는 폴리뉴클레오티드의 핵산 서열은 폴리뉴클레오티드의 발현에 대해 필요한 조절 요소를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 표적세포의 유전체로 안정한 삽입을 향상시키기 위해 준비될 수 있다(예를 들어, 상동성 재조합 카세트 벡터에 대해 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 참조). 예를 들어, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; U.S. Patent Nos. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 및 WO 98/04720를 참조한다. DNA-기반의 전달 기술의 예로서 "네이키트 DNA(naked DNA)", 용이한 전달[부피바카인(bupivacaine), 폴리머, 펩티드-매개], 양이온 지질 복합체 및 입자-매개("유전자 총") 또는 압력-매개 전달을 포함한다(참조, 예를 들어, U.S. Patent No. 5,922,687).
- [0243] 또한, 본 발명의 펩티드는 바이러스 또는 세균 벡터로 발현될 수 있다. 발현 벡터의 예로 백신시아(vaccinia) 또는 계두(fowlpox)와 같은 강화된 바이러스 숙주를 포함한다. 이러한 접근은 백신시아 바이러스의 사용, 예를 들어, 상기 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 발현하는 벡터를 포함한다. 숙주에 도입하였을 때, 상기 재조합 백신시아 바이러스(vaccinia virus)는 면역성 펩티드를 발현하고, 그렇게 함으로써 면역 반응을 유도한다. 면역법 프로토콜에서 유용한 백신시아 벡터 및 방법은, 예를 들어, U.S. Patent No. 4,722,848에 기재되어 있다. 다른 벡터는 BCG(Bacille Calmette Guerin)이다. BCG 벡터는 Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60에 기재되어 있다. 치료상의 투여 또는 면역법에 대한 유용한 다양한 다른 벡터들, 예를 들어, 아데노 및 아데노-관련 바이러스 벡터(adeno-associated virus vectors), 레트로바이러스 벡터(retroviral vectors), 살모넬라 타이피 벡터(Salmonella typhi vectors), 독성이 없는 탄저균 독소 벡터(detoxified anthrax toxin vectors), 기타 같은 종류의 것이 분명할 것이다(참조, 예를 들어, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85).
- [0244] 개체로의 폴리뉴클레오티드 전달은 폴리뉴클레오티드를 운반하는 벡터에 개체가 직접적으로 노출되는 직접적 경우 또는 세포가 시험관 내에서 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 첫 번째로 형질 전환된 후, 세포가 개체에 이식되는 간접적 경우 중 어느 것이 될 수 있다. 이 두 가지 방법이 각각 생체 내 및 생체 외 유전자 치료법으로 알려져 있다.
- [0245] 유전자 치료의 상기 방법의 일반적인 리뷰는(Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215 참조)를 참조한다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 재조합 DNA의 일반적으로 당업계에 알려진 방법은 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; and Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990에 기재되어 있다.

[0246] 투여 방법은 경구, 피내, 피하, 정맥 주사, 또는, 및 전신 투여 또는 표적하는 장소 부근에 국소 투여될 수 있다. 상기 투여는 단독 투여로 수행될 수 있으며 또는 다수의 투여로 신장시킬 수 있다. 적절한 담체에 포함된 상기 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 상기 펩티드를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포의 용량은 치료되기 위한 질환, 환자의 연령, 몸무게, 투여 방법, 등등에 알맞게 적용될 수 있으며, 그리고 보통 0.001mg 내지 1000mg, 0.1mg 내지 10mg이며, 몇 일 내지 몇 달에 한 번 투여될 수 있다. 당업자는 적합한 용량을 적절히 선택할 수 있다.

[0247] **X. 펩티드, 엑소솜, APCs 및 CTL을 이용하는 방법**

[0248] 본 발명의 펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 APCs 및 CTL을 제조하거나 또는 유도하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 엑소솜 및 APCs는 CTL을 유도하는데 사용될 수 있다. 상기 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 엑소솜 및 APCs는 부가적인 화합물이 그들의 CTL 유도성을 저해하지 않는 한 어떠한 다른 화합물의 조합으로 사용될 수 있다. 따라서, 상기에 언급한 본 발명의 약학적 제제, 물질 또는 조성물 중 어떤 것은 CTL을 유도하는데 사용될 수 있다. 그것에 더하여, 또한 이러한 펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것은 아래 기재된 APCs를 유도하는데 사용될 수 있다.

[0249] (1) 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs) 유도 방법

[0250] 본 발명은 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드를 사용하여 높은 CTL 유도성이 있는 APCs를 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 시험관 내(in vitro), 생체 외(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo)에서 본 발명의 펩티드를 APCs와 접촉하는 하기 단계를 포함한다. 예를 들어, 생체 외에서 펩티드와 APCs를 접촉하는 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0251] a: 개체로부터 APCs를 수집하는 단계; 및

[0252] b: 펩티드 및 단계 a의 APCs를 접촉하는 단계.

[0253] APCs는 특정한 종류의 세포에 한정되지 않으며, 림프구에 의해 인식되기 위해서 단백질성의 항원을 그들의 세포 표면에 발현하는 것으로 알려져 있는 수지상세포, 랑게르한스 세포, 대식세포, B 세포 및 활성화된 T 세포를 포함한다. DCs는 상기 APCs들 사이에서 이의 가장 강한 CTL 유도성때문에 사용될 수 있다. 본 발명의 어떠한 펩티드는 단계 b의 펩티드로서 단독으로 또는 본 발명의 다른 펩티드와 조합으로 함께 사용될 수 있다.

[0254] 또는, 본 발명의 펩티드는 생체 내에서(in vivo) 상기 펩티드와 APC를 접촉하기 위해 개체에 투여될 수 있다. 그 결과, 높은 CTL 유도성이 있는 APC는 개체의 몸에서 유도될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한, 생체내에서 APC를 유도하기 위해 본 발명의 펩티드를 개체에 투여하는 방법을 고려한다. 또한, 본 발명의 펩티드가 발현되고 생체내에서 APC와 접촉하고, 결과적으로 개체의 몸에서 높은 CTL 유도성이 있는 APC를 유도하도록, 발현가능한 형태로 개체 내에 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 투여하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명은 또한 생체내에서 APC를 유도하기 위해 개체에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 투여하는 단계를 고려한다. 상기 구 “발현가능한 형태(expressible form)”는 상기 부분 “IX. 약학적 물질 (2) 유효성분으로 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약학적 물질”에 기재된다.

[0255] 또한, 본 발명은 CTL 유도성이 있는 APC를 유도하기 위해 APC로 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 포함한다. 예를 들면, 상기 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0256] a: 개체로부터 APCs를 수집하는 단계; 및

[0257] b: 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 도입하는 단계.

[0258] 단계 b는 상기 “VI. 항원-제시 세포” 부분에 기재한 것과 같이 수행될 수 있다.

[0259] 또는, 본 발명은 MELK에 대한 특이적 CTL 활성을 유도하는 항원-제시 세포(APC)를 제조하는 방법을 제공하고, 여기에서 상기 방법은 하기의 단계의 하나를 포함할 수 있다:

[0260] a: 시험관 내에서(in vitro), 생체외에서(ex vivo), 또는 생체내에서(in vivo) APC를 본 발명의 펩티드와 접촉시키는 단계; 및

- [0261] b: 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APC로 도입시키는 단계.
- [0262] (2) CTL을 유도하는 방법
- [0263] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드, 또는 엑소솜 또는 APCs를 사용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0264] 또한 본 발명은 본 발명의 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 인지하는 T 세포 수용체(TCR) 서브유닛을 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공한다. 바람직하게, CTLs을 유도하는 방법은 하기 중에서 선택된 최소 하나의 단계를 포함한다:
- [0265] a: CD8-양성 T 세포를 그 표면에 HLA 항원 및 본 발명의 펩티드의 복합체를 제시하는 항원-제시 세포 및/또는 엑소솜과 접촉시키는 단계; 및
- [0266] b: 본 발명의 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 인지하는 TCR 서브유닛을 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 CD8 양성 세포로 도입시키는 단계.
- [0267] 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, APCs, 또는 엑소솜이 개체로 투여될 때, CTL은 개체의 몸에서 유도되고, 표적하는 암세포에 대한 면역 반응의 강도는 증진된다. 따라서, 본 발명은 또한, CTL을 유도하기 위해 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, APCs 또는 엑소솜을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 고려한다.
- [0268] 또는, CTL은 그들을 생체 외에서 사용으로 유도될 수 있다. 그런 경우에, CTL 유도 후, 활성화된 CTL은 개체에 되돌려질 것이다. 예를 들면, 상기 CTL 유도를 위한 본 발명의 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0269] a: 개체로부터 APCs를 수집하는 단계;
- [0270] b: 펩티드와 단계 a)의 APCs를 접촉하는 단계; 및
- [0271] c: CD8 양성 세포와 단계 b)의 APCs를 공배양(co-culture)하는 단계.
- [0272] 상기 단계 c에서 CD8-양성 세포와 공배양되는 상기 APC는 또한 “VI. 항원제시세포(Antigen-presenting cells, APC)” 부분에 기재된 것과 같이 APC로 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 형질전환함에 의해 제조될 수 있다; 이에 한정되지 않으며, HLA 항원 및 본 발명의 상기 펩티드의 복합체를 이의 표면에 효과적으로 제시하는 어떤 APC는 즉각적인 방법(instant method)에서 사용될 수 있다.
- [0273] 상기 APCs 대신에, 본 발명의 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 표면에 제시하는 엑소솜도 사용될 수 있다. 즉, 본 발명은 또한 HLA 항원 및 본 발명의 펩티드의 복합체를 이의 표면에 제시하는 엑소솜을 CD8-양성 세포와 공배양하는(co-cultured) 방법을 포함한다. 상기 엑소솜은 상기 “V. 엑소솜” 부분에 기술된 방법에 의해 준비될 수 있다.
- [0274] 또한, 본 발명의 펩티드에 결합하는 TCR 서브유닛을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 CD8-양성 세포에 도입시킴으로써 CTL은 유도될 수 있다. 이러한 형질 도입은 상기 “VIII. T 세포 수용체(TCR)” 부분에 기재된 것과 같이 수행될 수 있다.
- [0275] 또한, 본 발명은 CTL을 유도하는 약학적 제제, 물질 또는 조성물을 제조하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용가능한 운반체를 혼합 또는 제조하는 단계를 포함한다.
- [0276] (3) 면역 반응을 유도하는 방법
- [0277] 또한, 본 발명은 MELK와 관련된 질환에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 방법을 제공한다. 적합한 질환은 자궁 내막증(endometriosis) 및 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 담관세포 상피성암(cholangiocellular carcinoma), 만성골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(liver cancer), 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)를 포함한다.
- [0278] 본 발명의 방법은 본 발명의 어떤 펩티드 또는 그들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 물질 또는 조성

물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 본 발명의 어떤 펩티드를 제시하는 엑소솜 또는 APCs의 투여를 고려한다. 상세하게는, "IX. 약학적 물질 또는 조성물", 특히 백신으로서 본 발명의 약학적 물질 및 조성물의 사용을 기술하는 부분을 참조할 수 있다. 또한, 면역 반응을 유도하기 위한, 본 발명의 방법에 적용될 수 있는 엑소솜 또는 APCs는 상기 "V. 엑소솜", "VI. 항원-제시 세포(APCs)", 및 "X. 펩티드, 엑소솜, APC 및 CTL을 사용하는 방법"의 (1) 및 (2)에 상세하게 기술되어 있다.

[0279] 또한, 본 발명은 면역 반응을 유도하기 위한 약학적 물질 또는 조성물을 제조하는 방법 또는 과정을 제공하고, 여기에서 상기 방법은 약학적으로 허용가능한 담체(carrier)와 함께 본 발명의 펩티드를 첨가하거나 또는 제형하는 단계를 포함한다.

[0280] 상기 방법은 하기를 함유하는 본 발명의 백신의 투여를 포함한다:

[0281] a: 본 발명의 하나 또는 그 이상의 에피토프, 또는 이의 면역학적 활성 단편;

[0282] b: 상기 에피토프 펩티드 또는 (a)의 면역학적 활성 단편을 암호화하는 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드;

[0283] c: 본 발명의 하나 또는 그 이상의 분리된 CTL; 또는

[0284] d: 본 발명의 하나 또는 그 이상의 분리된 항원-제시 세포.

[0285] 본 발명의 맥락에서, MELK를 과발현하는 질환은 상기 유효 성분으로 치료될 수 있다. 상기 질환은 자궁내막증 및 유방암, 방광암, 자궁경부암, 담관세포 상피성암, 만성골수성 백혈병, 결장암, 식도암, 위암, 폐암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 유효 성분을 함유하는 백신 또는 약학적 제제 또는 조성물의 투여 이전에, 검사될 암 또는 자궁내막증 세포 또는 조직에서 MELK의 발현 수준이 동일한 기간의 정상 세포와 비교하여 증가되었다는 것을 확인하는 것은 바람직하다. 따라서, 한 실시예에서, 본 발명은 MELK를 과발현하는 암 또는 자궁내막증을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:

[0286] i) 치료될 암을 갖는 개체로부터 수득된 암 또는 자궁내막증 세포 또는 조직에서 MELK의 발현 수준을 결정하는 단계;

[0287] ii) MELK의 발현 수준을 정상 대조군 수준과 비교하는 단계; 및

[0288] iii) 상기 기술된 (a) 내지 (d)로 구성된 군으로부터 선택된 최소 하나의 구성요소를 MELK가 정상 대조군과 비교하여 과발현되는 암 또는 자궁내막증을 갖는 개체에게 투여되는 단계. 또는, 본 발명은 또한 MELK가 과발현된 암 또는 자궁내막증을 갖는 개체에 투여에서 사용을 위한 상기 기술된 (a) 내지 (d)로 구성된 군에서 선택된 최소 하나의 구성요소를 함유하는 백신 또는 약학적 조성물을 제공한다. 다시 말하면, 본 발명은 본 발명의 MELK 폴리펩티드로 치료되는 개체를 알아내는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 개체-유래 암 또는 자궁내막증 세포 또는 조직에서 MELK의 발현수준을 결정하는 단계를 포함할 수 있고, 여기에서 상기 유전자의 정상 대조군 수준과 비교하여 증가된 수준은 그 개체가 본 발명의 MELK 폴리펩티드로 치료될 수 있는 암 또는 자궁내막증을 가지고 있다는 것을 나타낸다. 본 발명의 암 또는 자궁내막증을 치료하는 상기 방법은 하기에 보다 상세하게 기술될 것이다.

[0289] 본 발명의 방법에 의해 치료될 개체는 바람직하게는 포유류이다. 포유류의 예는 인간, 비-인간 영장류(non-human primate), 쥐(mouse), 쥐(rat), 개 고양이, 말, 및 소를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0290] 본 발명에 따르면, 개체로부터 수득된 상기 암 또는 자궁내막증 세포 또는 조직에서 MELK의 발현 수준이 결정된다. 상기 발현 수준은 당업계에 알려진 방법을 이용하여 전사(핵산) 생산물 수준에서 결정될 수 있다. 예를 들면, MELK의 mRNA는 혼성화 방법으로 탐침을 이용하여 정량될 수 있다(예를 들어, Northern hybridization). 탐지는 칩 또는 어레이(array)로 수행될 수 있다. 어레이의 사용은 MELK의 발현 수준을 탐지하는데 바람직하다. 당업자들은 이러한 MELK의 서열정보를 이용하여 탐침을 제조할 수 있다. 예를 들면, MELK의 cDNA는 탐침으로 사용될 수 있다. 만약 필요하다면, 상기 탐침은 염료, 형광 물질 및 동위원소와 같은, 적절한 표지로 표지될 수 있으며, 유전자의 발현 수준은 혼성화된 표지의 강도로 탐지될 수 있다.

[0291] 또한, MELK(예를 들면, 서열번호 46) 유전자의 전사 생산물은 증폭-기반 탐지 방법에 의해 프라이머를 사용하여 정량될 수 있다(예를 들면, RT-PCR). 상기 프라이머는 상기 유전자의 이용가능한 서열 정보를 기반으로 제조될 수 있다.

[0292] 특히, 상기 제시된 방법에 대해 사용된 탐침 또는 프라이머는 엄격한 상태, 적절하게 엄격한 상태 또는 낮게 엄

격한 상태하에서 MELK의 mRNA와 혼성화된다. 본 명세서에 사용되었던, 상기 용어 “엄격한(혼성화) 조건”은 탐침 또는 프라이머가 그것의 표적 서열에 혼성화하는 조건을 나타내지만, 다른 서열에는 혼성화되지 않는다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며, 다른 환경하에서 달라질 것이다. 더 긴 서열의 특이적 혼성화는 짧은 서열에 비해 높은 온도에서 관찰된다. 일반적으로, 엄격한 조건의 온도는 정의된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대해 열용해점(Thermal melting point, T_m)보다 약 5 섭씨온도(degree centigrade) 낮게 선택된다. 상기 T_m 은 (정의된 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에) 50%의 상기 탐침이 상보적으로 상기 표적 서열에 동등하게 혼성화되는 온도이다. 상기 표적 서열이 일반적으로 과다하게 존재하므로, T_m 에서 상기 탐침의 50%는 동등하게 점유된다. 일반적으로, 엄격한 조건은 염 약 1.0M 소듐 이온 미만인 농도일 수 있으며, 일반적으로, pH 7.0 내지 8.3에서 약 0.01 내지 1.0M 소듐 이온(또는 다른 염들) 온도는 짧은 탐침 또는 프라이머에 대해 적어도 약 30 섭씨온도이고, (예를 들면, 10 내지 50 뉴클레오티드) 긴 탐침 또는 프라이머에 대해서는 적어도 약 60 섭씨온도이다. 엄격한 조건은 포름아마이드(formamide)와 같은 불안정화 물질의 첨가로 얻을 수 있다. 상기 탐침(probes) 또는 프라이머(primers)는 특정한 크기일 수 있다. 상기 크기는 최소 10 개 뉴클레오티드(nucleotides), 최소 12 개 뉴클레오티드, 최소 15 개 뉴클레오티드, 최소 20 개 뉴클레오티드, 최소 25개 뉴클레오티드, 최소 30 개 뉴클레오티드 범위일 수 있고, 상기 탐침 및 프라이머는 5-10 개 뉴클레오티드, 10-15 개 뉴클레오티드, 15-20 개 뉴클레오티드, 20-25 개 뉴클레오티드 및 25-30 개 뉴클레오티드의 크기 범위일 수 있다.

[0293] 또는, 번역 생산물(즉 단백질)은 본 발명의 진단을 위해 탐지될 수 있다. 예를 들면, MELK 단백질(서열 번호 47)은 결정될 수 있다. 번역 생산물로서 단백질의 양을 결정하는 방법은 상기 단백질을 인식하는 특이적 항체를 사용한 면역분석 방법을 포함한다. 상기 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 또한, 그 단편 또는 변형된 항체가 MELK 단백질에 결합하는 능력을 유지하는 한, 항체의 어떤 단편 또는 변형(예를 들어, 키메라 항체, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, 등등)은 탐지를 위해 쓰일 수 있다. 단백질의 탐지를 위해 상기 유형의 항체를 준비하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 방법은 본 발명에서 이러한 항체 및 그들의 등가물을 준비하는 것에 적용될 수 있다.

[0294] MELK 유전자 발현 수준을 탐지하기 위한 다른 방법은 그것의 번역 산물에 기초하기 때문에, 염색의 강도는 MELK 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직화적 분석을 통해 측정될 수 있다. 즉, 상기 측정에서, 강한 염색은 증가된 단백질의 존재/수준, 동시에, MELK 유전자의 높은 발현수준을 나타낸다.

[0295] 만약 예를 들어 10%, 25%, 또는 50%; 또는 1.1배 이상, 1.5배 이상, 2.0배 이상, 5.0배 이상, 10.0배 이상 또는 그 이상과 같이 상응하는 표적 유전자의 대조군 수준(예를 들면 정상 세포내 수준) 이상이면, 표적 유전자, 예를 들면, 암 또는 자궁내막증 세포에서 MELK 유전자 발현 수준은 증가되는 것으로 결정될 수 있다.

[0296] 질환 상태(질병에 걸린 또는 질병에 걸리지 않은)라고 알려진 개체/개체(들)로부터 수거되고 저장된 시료를 사용하여 암 또는 자궁내막증 세포와 동일한 시간에 대조군 수준은 결정될 수 있다. 또한, 치료될 암 또는 자궁내막증을 갖는 기관의 질병에 걸리지 않은 부위로부터 수득된 정상 세포는 정상 대조군으로서 사용할 수 있다. 또는 이전에 수집되고 저장된 시료를 사용함으로써 상기 암세포와 동시에 확인될 수 있다. 또는, 상기 대조군 수준은 이전에 질환 상태에 있다고 알려진 생물학적 시료에서 확인된 MELK 유전자의 발현 수준을 분석함으로써 얻어진 상기 결과를 기반으로 하는 통계학적인 방법으로 확인될 수 있다. 또한, 이전에 시험된 세포의 발현 패턴 데이터베이스로부터 대조군 수준은 유래될 수 있다. 또한, 본 발명의 측면에 따르면, 생물학적 시료 안의 MELK 유전자의 발현 수준은 대조군 수준과 복수로 비교될 수 있으며, 이는 복수의 참조 시료로부터 결정될 수 있다. 생물학적 시료와 유사한 조직 종류로부터 유래된 참조 시료로부터 대조군을 결정하는 것이 바람직하다. 또한, 질환 상태로 알려져 있는 군의 MELK 유전자의 발현 수준의 기준치를 이용하는 것이 바람직하다. 기준치는 당업계에 알려진 어떤 방법에 의해 얻을 수 있다. 예를 들면, 평균 \pm 2 S.D. 또는 평균 \pm 3 S.D. 의 범위가 기준으로 사용될 수 있다.

[0297] 본 발명의 맥락에서, 질병에 걸리지 않은 것으로 알려진 생물 시료로부터 결정된 대조군 수준은 “정상 대조군 수준(normal control level)”으로 나타낸다. 한편, 만약, 상기 대조군 수준이 질병에 걸린 생물 시료로부터 결정될 경우, 이것은 “질병에 걸린 대조군 수준(control level)”으로 나타낸다. MELK 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 수준에 비해 증가되었을 때, 또는 질병에 걸린 대조군 수준에 유사/동등할 때, 개체는 치료될 질병에 걸린 것으로 진단될 수 있다.

[0298] 보다 특이적으로, 본 발명은 (i) 치료될 암 또는 자궁내막증을 가질 것으로 의심되는 개체를 진단, 및/또는 (ii) 암 또는 자궁내막증을 치료하기 위한 개체를 선택하는 방법을 제공하고, 그 방법은 하기의 단계를 포함한다

다:

- [0299] a: 치료될 암 또는 자궁내막증을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득된 암 또는 자궁내막증 세포 또는 조직에서 MELK의 발현 수준을 결정하는 단계;
- [0300] b: MELK의 발현 수준을 정상 대조군 수준과 비교하는 단계;
- [0301] c: 만약 MELK의 발현 수준이 정상 대조군 수준과 비교하여 증가되었다면, 개체가 치료될 암 또는 자궁내막증을 갖는 것으로 진단하는 단계; 및
- [0302] d: 단계 (c)에서 개체가 치료될 암 또는 자궁내막증을 갖는 것으로 진단되었다면, 암 또는 자궁내막증 치료를 위한 개체를 선택하는 단계.
- [0303] 또는, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:
- [0304] a: 치료될 암 또는 자궁내막증을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득한 암 또는 자궁내막증 세포 또는 조직에서 MELK의 발현 수준을 결정하는 단계;
- [0305] b: MELK의 발현 수준을 질병에 걸린 대조군 수준(control level)과 비교하는 단계;
- [0306] c: 만약 MELK의 수준이 질병에 걸린 대조군 수준과 비교하거나 또는 동등하다면, 개체가 치료될 암 또는 자궁내막증을 갖는 것으로 진단하는 단계; 및
- [0307] d: 단계(c)에서 개체가 치료될 암 또는 자궁내막증을 갖는 것으로 진단되었다면, 암 또는 자궁내막증 치료를 위한 개체를 선택하는 단계.
- [0308] 또한, 본 발명은 본 발명의 MELK 폴리펩티드로 치료될 수 있는 자궁내막증 또는 암으로부터 고통받는 개체를 결정하기 위한 키트를 제공하고, 이는 또한 암 면역치료의 효과를 평가 및/또는 모니터링하는 것에 유용할 수 있다. 바람직하게, 암은 자궁내막증 및 유방암, 방광암, 자궁경부암, 담관세포 상피성암, 만성골수성 백혈병, 결장암, 식도암, 위암, 폐암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정하지 않는다. 보다 특이적으로, 개체 유래 암 또는 자궁내막증 세포에서 MELK 유전자의 발현을 탐지하기 위한 상기 키트는 바람직하게 하기 군으로부터 선택될 수 있는 시약(reagent)을 포함한다:
- [0309] (a) MELK 유전자의 mRNA를 탐지하기 위한 시약;
- [0310] (b) MELK 단백질을 탐지하기 위한 시약; 및
- [0311] (c) MELK 단백질의 생물학적 활성을 탐지하기 위한 시약.
- [0312] MELK의 mRNA를 탐지하기 위한 적절한 시약의 예는 MELK mRNA에 특이적으로 결합하거나 또는 MELK mRNA를 확인하는, 예를 들면 MELK mRNA의 부분에 대한 상보적 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드와 같은 핵산을 포함한다. 이러한 유형의 올리고뉴클레오타이드는 MELK mRNA에 특이적인 프라이머 및 탐침으로 증폭될 수 있다. 이러한 유형의 올리고뉴클레오타이드는 당업계에서 잘 알려진 방법에 기초하여 준비될 수 있다. 만약 필요하다면, MELK mRNA를 탐지하기 위한 시약은 고체 매트릭스에 고정화될 수 있다. 또한, MELK mRNA를 탐지하기 위한 하나 이상의 시약은 키트에 포함될 수 있다.
- [0313] 다른 한편으로는, MELK 단백질을 탐지하기 위한 적절한 시약은 MELK 단백질에 대한 항체를 포함한다. 상기 항체는 단일클론(monoclonal) 또는 다중클론(polyclonal)일 수 있다. 또한 그 단편 또는 변형된 항체가 MELK 단백질에 결합하는 능력을 유지하는 한, 상기 항체의 어떤 단편 또는 변형 [예를 들어, 키메라 항체, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv 등]은 시약으로 사용될 수 있다. 단백질 탐지를 위한 이러한 유형의 항체를 준비하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 방법은 이러한 항체 및 그것의 등가물을 준비하는 방법도 본 발명에서 적용될 수 있다. 또한, 항체는 직접적인 연결 또는 간접적인 표지 기술을 통해 신호 발생 분자로 표지될 수 있다. 표지 및 항체 표지에 대한 방법 및 그들의 표적으로 항체의 결합을 탐지하는 것은 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 표지 및 방법은 본 발명에 적용될 수 있다. 또한, MELK 단백질을 탐지하기 위한 하나 이상의 시약은 키트 안에 포함될 수 있다.
- [0314] 키트는 상기 언급한 시약의 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 암 또는 자궁내막증이 없거나 또는 암 또는 자궁내막증을 겪고 있는 개체(이에 관계없이)로부터 얻어진 조직 시료는 유용한 대조 시약으로 제공할 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 바람직한 상업적 및 사용자의 관점으로부터, 버퍼, 희석액, 필터, 바늘(needle), 주사기 및 사용설명서(예를 들어, 문서, 테이프, CD-ROM)를 포함하는 다른 물질을 포함한다. 적절한 용기는

병, 바이알(vials) 및 테스트 튜브(test tube)를 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 만들어졌다.

[0315] 어떤 실시예에서, MELK mRNA에 대한 탐침이 시약일 때, 상기 시약은 탐지 부위가 적어도 한 개로 구성되는 다공성 스트립과 같은 고체 매트릭스에 고정화될 수 있다. 다공성 스트립의 측정 또는 탐지는 각각의 구성하는 핵산(탐침)부위의 많은 수를 포함할 수 있다. 시험 스트립은 또한 음성 및/또는 양성 대조군에 대한 부위를 포함할 수 있다. 또는, 대조군 부위는 시험 스트립으로부터 분리된 스트립에 위치할 수 있다. 선택적으로 다른 탐지 부위는 고정화된 핵산의 다른 양, 즉, 첫번째 탐지 부위의 높은 양 및 다음 부위 안의 적은 양을 포함할 수 있다. 시험 시료를 더했을 때, 탐지가능한 신호를 제시하는 부위의 수는 시료 안에 존재하는 MELK mRNA의 양의 정량적 지표를 제공한다. 상기 탐지 부위는 어떠한 적절하게 탐지가능한 모양으로 구성될 수 있으며, 일반적으로 시험 스트립의 바 또는 도트 스페닝(dot spanning) 상기 너비 안에 있다.

[0316] 또는 본 발명의 키트는 양성 대조군 시료 또는 MELK 표준 시료를 포함할 수 있다. 본 발명의 양성 대조군 시료는 MELK 양성 시료를 수거하고 그들의 MELK 수준을 검사함으로써 준비될 수 있다. 또는, 양성 시료 또는 MELK 표준 시료를 형성하기 위해, 정제된 MELK 단백질 또는 폴리뉴클레오티드를 MELK를 발현하지 않는 세포에 첨가할 수 있다. 본 발명에서, 정제된 MELK는 재조합 단백질일 수 있다. 양성 대조군 시료의 MELK 수준은, 예를 들면 판정 기준치(cut-off) 값 이상이다.

[0317] 또한 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 항원 또는 그것의 단편을 특이적으로 인지할 수 있는 단백질 또는 그것의 단편을 포함하는 진단용 키트를 제공한다.

[0318] 여기서 고려되는 본 발명의 단백질의 부분 펩티드(partial peptide) 예는 본 발명 단백질의 아미노산 서열에서 최소한 8개, 바람직하게는 15개, 보다 바람직하게는 20개의 연속적인 아미노산으로 구성된 폴리펩티드를 포함한다. 암 또는 자궁내막증은 시료(예를 들면, 혈액, 조직)에서 본 발명의 펩티드(폴리펩티드) 또는 단백질을 사용하여 항체를 탐지함으로써 진단될 수 있다. 본 발명의 단백질 및 펩티드를 제조하는 방법은 상기에 기술되어 있다.

[0319] 본 발명의 암 또는 자궁내막증을 진단하기 위한 방법은 항-MELK 항체의 양 및 상기 기술된 것과 같은 상응하는 대조군 시료에서의 양 사이의 차이를 결정함으로써 수행될 수 있다. 개체의 세포 또는 조직이 유전자의 발현 생성물(MELK)에 대한 항체를 포함하고, 항-MELK 항체의 양이 정상 대조군에서의 것과 비교하여 판정 기준치(cut-off) 이상으로 결정되면, 그 개체는 암 또는 자궁내막증을 앓고 있는 것으로 추정된다.

[0320] 한 실시예에서, 본 발명의 진단용 키트는 본 발명의 펩티드 및 그것에 결합하는 HLA 분자를 포함할 수 있다. 항원성 펩티드 및 HLA 분자를 사용하여 항원 특이적 CTL을 탐지하는 방법은 이미 수립되었다(예를 들면, Altman JD et al., Science. 1996. 274(5284): 94-6). 따라서, 본 발명의 펩티드 및 HLA 분자의 복합체는 중앙 항원 특이적 CTL을 탐지하기 위한 탐지 방법에 적용될 수 있고, 그러므로 조기 탐지(earlier detection), 암의 재발 및/또는 전이가 가능하다. 또한, 이것은 본 발명의 펩티드를 유효 성분으로서 포함하는 약학물(pharmaceuticals)과 함께 적용할 수 있는 개체의 선택, 또는 약학물의 치료 효과의 검사에 적용될 수 있다.

[0321] 특히, 알려진 방법에 따르면(예를 들면 Altman JD et al., Science. 1996. 274(5284): 94-6 참조), 방사선 표지된 HLA 분자 및 본 발명의 펩티드의 테트라머와 같은 올리고머 복합체가 준비될 수 있다. 복합체를 사용하여, 예를 들면, 암으로 고통받는 것으로 의심되는 개체 유래 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocytes)에서 항원-펩티드 특이적 CTL을 정량함으로써 상기 진단이 수행될 수 있다.

[0322] 또한, 본 발명은 여기에서 기술된 펩티드 에피토프를 이용함으로써 개체의 면역 반응을 평가하기 위한 방법 또는 진단제를 제공한다. 어떤 실시예에서, 여기서 기술된 HLA A-24 제한된 펩티드는 개체에서 면역 반응을 평가하거나 또는 예측하기 위한 시약으로서 사용된다. 평가되는 면역 반응은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 면역원(immunogen)을 면역능력이 있는 세포(immunocompetent cell)를 접촉시킴으로써 유도한다. 바람직한 실시예에서, 면역 반응을 평가하는 면역능력이(immunocompetent) 있는 세포는 말초 혈액(peripheral blood), 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocyte, PBL) 및 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 중에서 선택될 수 있다. 상기 면역능력이 있는 세포를 수집하거나 분리하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 어떤 실시예에서, 펩티드 에피토프와 결합하고 그것을 인지하는 항원 특이적 CTL의 형성을 야기하는 어떤 제제 또는 조성물은 시약(reagent)로 적용될 수 있다. 펩티드 시약은 면역원으로서 사용되지 않아도 된다. 상기 분석을 위해 사용된 검사 시스템은 테트라머(tetramer), 세포내 림포카인(lymphokine) 및 인터페론(interferon) 분비 검사법을 위한 염색, 또는 ELISPOT과 같은 상대적으로 최근의 기술 발달을 포함한다. 바람

직한 실시예에서, 펩티드 시약과 접촉하는 면역기능이 있는 세포는 수지상 세포를 포함한 항원-제시 세포일 수 있다.

[0323] 예를 들면, 본 발명의 펩티드는 종양 세포 항원 또는 면역원에 노출되어 항원-특이적 CTL의 존재를 위해 말초 혈액 단핵구를 검사하기 위한 테트라머 염색 검사법에서 사용될 수 있다. HLA 테트라머 복합체는 말초 혈액 단핵구의 시료에서 직접적으로 항원 특이적 CTL을 가시화 하고(Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; 및 Altman et al., Science 174: 94-96, 1996 참조), 항원-특이적 CTL 집단의 빈도를 결정하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 펩티드를 사용한 테트라머 시약은 하기에 기술된 것과 같이 생산될 수 있다.

[0324] HLA 분자에 결합하는 펩티드를 상응하는 HLA 중쇄 및 베타 2-마이크로글로불린의 존재하에 3분자 복합체를 생산하기 위하여 다시 접는다(refolding). 상기 복합체에서, 중쇄의 카복실 말단을 그 전에 단백질로 조작되었던 부위에서 바이오틴화한다. 그 후, 상기 3분자 복합체 및 스트렙토아비딘(streptoavidin)으로 구성된 테트라머를 형성하기 위하여 스트렙토아비딘을 복합체에 첨가한다. 형광으로 표지된 스트렙토아비딘으로써, 상기 테트라머는 항원-특이적 세포를 염색시키는데 사용될 수 있다. 그 후 상기 세포는, 예를 들면 세포 유동 분석(flow cytometry)에 의해서 동정된다. 상기 분석은 진단용 또는 예후의 목적을 위해 사용될 수 있다. 상기 과정에 의해 동정된 세포는 또한 치료적 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0325] 또한, 본 발명은 면역 회상 반응(immune recall response)을 평가하기 위해 본 발명의 펩티드를 포함하는 시약을 제공한다(Bertoni et al., J. Clin. Invest. 100: 503-513, 1997 및 Penna et al., J. Exp. Med. 174: 1565-1570, 1991 참조). 예를 들면, 치료될 암을 앓고 있는 개개인으로부터의 환자 PBMC 시료는 특이적 펩티드를 사용하여 항원-특이적 CTL의 존재를 위해 분석된다. 단핵구를 포함하는 혈액 시료는 PBMC를 배양하고 상기 세포를 본 발명의 펩티드로 자극시킴으로써 검사된다. 적절한 배양 기간 후에, 상기 증식된 세포 집단에서 예를 들면 CTL 활성을 분석한다.

[0326] 상기 펩티드는 백신의 효험(efficacy)을 평가하기 위해 시약으로서 사용될 수 있다. 면역원으로 예방접종된 환자로부터 수득한 PBMCs를, 예를 들면 상기 방법 중 하나를 사용하여 분석할 수 있다. 환자는 분석을 위해 선택되었다는 점에서, 환자는 HLA 종류가 있고, 대립 유전자 특이적 분자를 인지하는 펩티드 에피토프 시약이 있다. 백신의 면역원성은 PBMC 시료에서 에피토프-특이적 CTLs의 존재에 의해 나타날 수 있다. 본 발명의 펩티드는 당업계에서 잘 알려진 기술을 사용함으로써 항체를 만드는데 사용될 수 있고(예를 들면 Current Protocols IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; 및 Antibodies a laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989를 참조), 이것은 암 또는 자궁내막증을 진단하고 모니터링하는 시약으로서 유용할 수 있다. 상기 항체는 HLA 분자의 맥락에서, 펩티드를 인지하는 것, 즉 펩티드-MHC 복합체에 결합하는 항체일 수도 있다.

[0327] 본 발명의 펩티드 및 조성물은 많은 첨가적 용도를 갖고, 그 일부는 여기서 기술된다. 예를 들면, 본 발명은 MELK 면역원성 폴리펩티드의 발현에 의해 특징화되는 질환을 진단하고 탐지하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 생물학적 시료에서 MELK HLA 결합 펩티드, 또는 MELK HLA 결합 펩티드 및 HLA 종류 I 분자의 복합체의 발현을 결정하는 것과 관련이 있다. 펩티드 또는 펩티드 및 HLA 종류 I 분자의 복합체의 발현은 상기 펩티드 또는 복합체의 결합 파트너로 검사함으로써 결정되거나 탐지될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 펩티드 또는 복합체를 위한 결합 파트너는 펩티드에 특이적으로 결합하고 인지하는 항체이다. 생물학적 시료, 예를 들면 종양 또는 자궁내막증 조직검사(biopsy)에서 MELK의 발현은 MELK 프라이머를 사용한 일반적인 PCR 증폭 프로토콜에 의하여 검사될 수 있다. 종양 발현의 예는 여기서 나타나고 나아가 MELK에 대한 예시적인 조건 및 프라이머의 공개는 WO2003/27322에서 발견될 수 있다.

[0328] 바람직하게, 상기 진단 방법은 생물학적 시료에서 MELK 결합 펩티드의 존재를 탐지하기 위하여 MELK HLA 결합 펩티드를 위한 특이적 물질과 함께 개체로부터 분리된 생물학적 시료를 접촉시키는 것과 관련이 있다. 여기서 사용된 것과 같이, "접촉"은 물질 및 생물학적 시료에 존재하는 MELK HLA 결합 펩티드 사이에서 특이적 상호결합이 생성될 수 있도록 시약과 충분히 근접한 곳과 예를 들면 농축, 온도, 시간, 이온화 강도와 같은 적절한 조건에 생물학적 시료를 놓아두는 것을 의미한다. 일반적으로, 분자 및 상기 분자의 생물학적 시료에 있는 인지체(cognate)(예를 들면, 단백질 및 상기 단백질 인지체 수용체, 항체 및 상기 항체 인지체 단백질, 핵산 및 상기 핵산에 상보적 서열 인지체) 사이의 특이적 상호결합을 촉진하기 위해 물질을 생물학적 시료와 접촉시키는 조건은 당업자에게 자명하다. 분자 및 그것의 인지체 사이의 특이적 상호결합을 촉진시키기 위한 예시적인 조건은 Low et al.에 의해 발행된 U.S. Patent No. 5,108,921에 기술되어 있다.

[0329] 본 발명의 진단 방법은 생체 내 및 시험관 내 중 하나 또는 그 모두에서 수행될 수 있다. 따라서, 생물학적 시

료는 본 발명에서 생체내 또는 시험관 내에 위치할 수 있다. 예를 들면, 생물학적 시료는 생체내에서 조직일 수 있고, MELK 면역원성 폴리펩티드에 특이적인 물질은 그 조직에서 상기 분자의 존재를 탐지하기 위해 사용될 수 있다. 또는, 생물학적 시료는 시험관내에서 수집되거나 또는 분리될 수 있다(예를 들면, 혈액 시료, 종양 조직검사, 조직 추출물). 특별히 선호되는 예에서, 생물학적 시료는 세포 포함 시료일 수 있고, 보다 바람직하게는 진단되거나 치료되는 개체로부터 수집된 종양 또는 자궁내막증 세포를 포함하는 시료일 수 있다.

[0330] 또는, 상기 진단은 형광으로 표지된 HLA 다중결합 복합체를 사용한 염색을 통해 항원-특이적 T 세포의 직접적인 정량을 허용하는 방법에 의해 수행될 수 있다(예를 들면, Altman, J. D. et al., 1996, Science 274: 94; Altman, J. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330;). 세포내 림포카인 염색 및 인터페론-감마(interferon-gamma) 분비 검사법 또는 ELISPOT이 제공된다. 테트라머 염색, 세포내 림포카인 염색 및 ELISPOT 검사법 모두는 일반적인 검사에 비해 최소한 10배 이상의 민감하다(Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8: 314;). 펜타머(pentamer)(예를 들면 US 2004-209295A), 텍스트라머(dextramer)(예를 들면, WO 02/072631), 및 스트렙타머[예를 들면 Nature Medicine 6. 631-637(2002)] 또한 사용될 수 있다.

[0331] 예를 들면, 어떤 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 펩티드 중 최소 하나의 MELK가 투여된 개체의 면역학적 반응을 진단하거나 평가하는, 하기의 단계를 포함하는 방법 제공한다:

[0332] a: 면역원(immunogen)에 대해 특이적 CTL의 유도의 적합한 조건하에 면역원과 면역능력이 있는 세포를 접촉하는 단계;

[0333] b: 단계 (a)에서 유도된 CTL 유도 수준을 탐지하거나 결정하는 단계; 및

[0334] c: CTL 유도 수준이 있는 개체의 면역반응을 연관시키는(correlating) 단계.

[0335] 본 발명에서, 상기 면역원은 서열번호 6, 35-45의 아미노산 서열, 이러한 아미노산 서열을 가지는 펩티드, 및 1, 2 또는 그 이상의 아미노산 치환으로 변형된 이러한 아미노산 서열을 가지는 펩티드 중에서 선택되는 MELK 펩티드 중 최소 하나이다. 그 동안에 면역원 특이적 CTL의 유도 적합 조건은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 면역능력이 있는 세포는 면역원 특이적 CTL을 유도하기 위해 면역원의 존재 하에 배양될 수 있다. 면역원 특이적 CTL을 유도하기 위해, 어떤 자극 인자(stimulating factors)가 상기 세포 배양에 첨가될 수 있다. 예를 들면, IL-2가 CTL 유도를 위한 바람직한 자극 인자이다.

[0336] 어떤 실시예에서, 펩티드 암 치료로 치료되는 개체의 면역학적 반응을 모니터하거나 평가하는 단계는 치료 전, 동안 및/또는 후에 수행될 수 있다. 일반적으로, 암 치료의 프로토콜(protocol) 동안, 면역성 펩티드는 반복적으로 치료되는 개체에 투여된다. 예를 들면, 면역성 펩티드는 3-10 주 동안 매주 투여될 수 있다. 따라서, 개체의 면역학적 반응은 암 치료 프로토콜 동안 평가되거나 모니터될 수 있다. 또는 암치료를 위한 면역학적 반응의 평가 또는 모니터링(monitoring)의 단계는 치료 프로토콜의 완료일 수 있다.

[0337] 본 발명에 따라, 대조군에 비해 면역원 특이적 CTL의 증가된 유도는 투여된 면역원에 대한 면역학적으로 평가되거나 진단된 개체를 나타낸다. 상기 면역학적 반응을 평가하기 위한 적합한 대조군은, 예를 들면, 면역능력이 있는 세포가 펩티드 없이 또는 어떤 TMEM 펩티드(예를 들면, 무작위 아미노산 서열) 외에 아미노산 서열을 가지는 대조군 펩티드와 접촉되었을 때 CTL 유도 수준을 포함한다.

[0338] 바람직한 실시예에서, 개체에 투여된 각 면역원 사이의 면역 반응을 비교함으로써 상기 개체의 면역학적 반응은 서열 특이적 면에서 평가된다. 특히, 일부 유형의 MELK 펩티드의 혼합물이 개체에 투여될지라도, 면역 반응은 상기 펩티드에 따라 다를 수 있다. 그런 경우에는 각 펩티드 사이의 면역 반응의 비교에 의해 더 높은 반응을 보이는 개체에 대한 펩티드가 동정될 수 있다.

[0339] XI. 항체

[0340] 본 발명은 본 발명의 펩티드에 결합하는 항체를 제공한다. 바람직한 항체는 특이적으로 본 발명의 펩티드와 결합하고 본 발명의 펩티드가 아닌 것에 결합하지 않을 것이다(또는 약하게 결합). 또는, 항체는 본 발명의 펩티드 뿐만 아니라 그것의 상동체와 결합한다. 본 발명의 펩티드에 대한 항체는 암 또는 자궁내막증 진단 또는 예후 검사법, 이미지화 방법론(imaging methodology)에서 사용될 수 있다. 유사하게, 상기 항체는 암 환자에서 발현되거나 또는 과발현되는 정도의 다른 암 또는 자궁내막증을 치료, 진단 및/또는 예후에서 사용될 수 있다. 또한, 세포 내 발현되는 항체(예를 들면, 단일 사슬 항체)는 MELK의 발현이 관련된 자궁내막증 또는, 예를 들

면 자궁내막증 및 유방암, 방광암, 자궁경부암, 담관세포 상피성암, 만성골수성 백혈병, 결장암, 식도암, 위암, 폐암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0341] 또한, 본 발명은 MELK 단백질(서열 번호 47) 또는 서열 번호 35, 41, 44 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 그것의 단편의 탐지 및/또는 정량을 위한 다양한 면역학적 검사법을 제공한다. 상기 검사법은 MELK 단백질 또는 그것의 단편과 결합하고 인지할 수 있는 하나 또는 그 이상의 항-MELK 항체를 적절하게 포함할 수 있다.

[0342] 본 발명에서, MELK 폴리펩티드와 항-MELK 항체의 결합은 바람직하게 서열 번호 35, 41, 44 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 인지한다. 항체의 결합 특이성은 억제 검사(inhibition test)를 사용하여 확인될 수 있다. 즉, 서열 번호 35, 41, 44의 아미노산 서열 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 어떤 단편의 폴리펩티드의 존재하에서 분석될 항체 및 MELK 폴리펩티드 전장 사이의 결합이 억제될 때, 상기 항체는 그 단편에 특이적으로 결합하는 것을 보여준다. 본 발명에서, 상기 면역학적 검사법은 당업계에 잘 알려진 다양한 면역학적 검사법 종류 내에서 수행되고, 방사선면역검사법(radioimmunoassay), 면역-크로마토그래프 기술(immuno-chromatograph technique), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), ELIFA(enzyme-linked immunofluorescent assay), 및 그와 같은 것의 다양한 유형을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0343] 또한, 본 발명의 관련된 면역학적이지만 비항체 검사법은 T 세포 면역원성 검사법(억제성 또는 자극성)뿐만 아니라 MHC(major histocompatibility complex) 결합 검사법을 포함할 수 있다. 또한, MELK를 발현하는 암 또는 자궁내막증을 탐지할 수 있는 면역학적 이미지 방법은 본 발명에 의해 제공되고, 본 발명의 표지된 항체를 사용한 방사선 동위 원소 이미지 방법(radioscintigraphic imaging method)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 상기 검사법은 MELK를 발현하는 자궁내막증 또는 암, 예를 들면 자궁내막증 및 유방암, 방광암, 자궁경부암, 담관세포 상피성암, 만성골수성 백혈병, 결장암, 식도암, 위암, 폐암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신세포암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 암의 탐지, 모니터, 및 예후에 임상적으로 유용하다.

[0344] 본 발명은 본 발명의 펩티드와 결합하는 항체를 제공한다. 본 발명의 항체는 단일클론 또는 다중클론 항체와 같은 어떠한 형체에서도 사용될 수 있고, 또한 본 발명의 펩티드로 면역화된 동물, 예를 들면 토끼에 의해 수득된 항혈청을 포함하고, 모든 종류의 다중클론 및 단일클론 항체, 인간항체, 및 유전적 재조합에 의해 생성된 인간화된 항체를 포함한다.

[0345] 항체를 얻기 위해 항원으로서 사용된 본 발명의 펩티드는 어떠한 동물의 종류에서도 유래될 수 있으나, 바람직하게는 인간, 마우스(mouse), 또는 랫(rat), 보다 바람직하게는 인간과 같은 포유류로부터 유래된 것이다. 인간-유래 펩티드는 여기서 공개된 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열로부터 수득될 수 있다.

[0346] 본 발명에 따라, 면역원성 항원으로서 사용되는 상기 펩티드는 완전한 단백질일 수도 있고 상기 단백질의 부분적 펩티드일 수도 있다. 예를 들면, 부분적 펩티드는 본 발명 펩티드의 아미노 N 말단 또는 카복시(C) 말단 단편을 포함할 수 있다.

[0347] 본 발명에서, 항체는 MELK 펩티드의 전장 또는 단편에 반응하는 단백질로 정의된다. 바람직한 실시예에서는, 본 발명의 항체는 서열 번호 35, 41, 44 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 MELK의 단편 펩티드를 인지할 수 있다. 올리고펩티드를 합성하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 합성 후에, 펩티드는 면역원성으로서 사용되기 전에 선택적으로 정제될 수 있다. 본 발명에서, 올리고펩티드(예를 들면 9 또는 10mer)는 면역원성을 증진시키기 위해 담체와 결합되거나 연결될 수 있다. KLH(Keyhole-Limpet hemocyanin)은 담체로서 잘 알려져 있다. KLH와 펩티드를 결합시키는 방법도 당업계에 잘 알려져 있다.

[0348] 또는, 본 발명의 펩티드를 암호화하는 유전자 또는 그것의 단편은 알려진 발현 벡터로 삽입될 수 있고, 그 후 여기서 기술되는 것과 같이 숙주 세포에 형질도입시키는데 사용된다. 원하는 펩티드 또는 그것의 단편은 어떤 표준 방법에 의해 숙주 세포의 안 또는 밖으로부터 회복될 수 있고, 그 후에 항원으로서 사용될 수 있다. 또는, 펩티드를 발현하는 전체 세포 또는 그들의 용해물(lysate) 또는 화학적으로 합성된 펩티드가 항원으로서 사용될 수 있다.

[0349] 모든 포유류 동물은 항원으로 면역화될 수 있지만, 세포 융합에 사용된 모 세포(parental cell)와 양립성(compatibility)이 있는 것이 바람직하다. 일반적으로, 설치류(Rodentia), 토끼류(Lagomorpha) 또는 영장류(Primates) 과(family)의 동물이 사용될 수 있다. 설치류의 동물은 예를 들면 마우스, 랫 및 햄스터(hamster)

를 포함한다. 토끼류는 예를 들면 토끼(rabbit)을 포함한다. 영장류는 예를 들면 필리핀 원숭이(Macaca fascicularis), 붉은털 원숭이(rhesus monkey), 망토개코원숭이(sacred baboon) 및 침팬지와 같은 토끼목 [Catarrhini(늑은 세계 원숭이, old world monkey)]의 원숭이를 포함한다.

[0350] 항원으로 동물을 면역화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 항원의 복강내(intraperitoneal) 주입 또는 피하(subcutaneous) 주입이 포유류의 면역화를 위한 표준 방법이다. 보다 구체적으로, 항원은 PBS(phosphate buffered saline), 생리적 살린(physiological saline) 등의 적절한 양에서 희석되거나 서스펜션될 수 있다. 바람직하다면, 상기 항원 서스펜션은 적절한 양의 프로인트 완전 보강제(Freund's complete adjuvant)와 같은 표준 보강제와 혼합되고, 유화액으로 만들어진 후 포유류 동물에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 그 후에 4 내지 21일 마다 프로인트 완전 보강제의 적절한 양과 함께 혼합한 항체를 여러번 투여하는 것이다. 적절한 담체(carrier)도 면역화를 위해 사용될 수 있다. 상기와 같은 면역화 후, 혈청은 원하는 항체의 양의 증가를 위한 표준 방법에 의해 조사될 수 있다.

[0351] 본 발명의 펩티드에 대한 다중 클론 항체는 혈청에서 바라는 항체의 증가를 위해 시험되는 면역화된 포유류의 혈액을 수거함으로써, 그리고 어떠한 보편적인 방법에 의해 혈액으로부터 혈청을 분리시킴으로써 준비될 수 있다. 다중클론 항체는 다중클론 항체를 포함하는 혈청을 포함할 뿐만 아니라 상기 다중클론 항체를 포함한 분획물을 혈청으로부터 분리할 수 있다. 면역글로불린(immunoglobulin) G 또는 M은 오직 본 발명의 펩티드를 인지하는 분획물로부터 예를 들면 본 발명의 펩티드와 연결된 친화성 컬럼을 사용하여, 그리고 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼을 사용하여 상기 분획물을 정제하는 것에 의해 준비될 수 있다.

[0352] 단일클론 항체를 준비하기 위하여, 항원으로 면역화시킨 포유류로부터 면역세포를 수거하고, 그 면역세포에서 상기 기술된 것과 같이 혈청에서 바라는 항체의 증가된 수준을 검사하고, 세포 융합을 한다. 바람직하게, 세포 융합을 위해 사용되는 면역 세포는 비장으로부터 수득된다. 바람직한 상기 면역세포와 함께 융합되는 다른 모 세포는 포유류의 골수 세포(myeloma cell), 보다 바람직하게는 약물에 의해 융합된 세포의 선택을 위해 획득한 특성을 갖는 골수 세포를 포함한다.

[0353] 상기 면역 세포 및 골수 세포는 알려진 방법, 예를 들면 Milstein et al.[Galfre and Milstein, Method Enzymol 73: 3-26(1981)]의 방법에 따라 융합될 수 있다.

[0354] 상기 세포 융합에 의해 수득된 결과인 하이브리도마(hybridoma)는 HAT 배지[히포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)을 포함하는 배지]와 같은 표준 선택 배지에 그들을 배양함으로써 선택될 수 있다. 상기 세포 배양은 일반적으로 HAT 배지에서 몇 일 내지 몇 주 동안 지속되는데, 이는 원하는 하이브리도마를 제외하고 모든 다른 세포(non-fused cell)를 사멸시키기 위해 충분한 시간이다. 그 후, 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 복제(clone)시키고 스크린하기 위해 표준 제한 희석(standard limiting dilution)을 수행한다.

[0355] 하이브리도마를 제조하기 위해 비인간 동물을 항원으로 면역화시킨 상기 방법 뿐만 아니라, EB 바이러스에 의해 감염된 인간과 같은 인간 림프구는 펩티드, 펩티드를 발현하는 세포 또는 그들의 용해물을 사용하여 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 그 후, 상기 펩티드에 결합할 수 있는 원하는 인간 항체를 생산하는 하이브리도마를 생산하기 위해, 면역화된 림프구를 U266과 같은 무한으로 분열할 수 있는 인간 유래 골수 세포와 융합한다 (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Sho 63-17688).

[0356] 그 후 상기 수득된 하이브리도마를 마우스(mouse)의 복강(abdominal cavity)로 이식하고 그 복수를 추출한다. 상기 수득한 단일클론 항체를, 예를 들면 암모늄 황산 침전, 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼, DEAE 이온 교환 크로마토그래피 또는 본 발명의 펩티드가 연결된 친화성 컬럼과 같은 방법에 의해 정제할 수 있다. 본 발명의 항체는 본 발명의 펩티드의 정제 및 탐지에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 본 발명의 펩티드의 작용제 및 길항제에 대한 후보로서 사용될 수도 있다.

[0357] 또는, 항체를 생산하는 면역화된 림프구와 같은 면역 세포는 종양유전자(oncogene)에 의해 무한증식 (immortalization)될 수 있고 단일클론 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0358] 따라서, 수득된 단일클론 항체는 유전자 조작 기술을 사용하여 재조합적으로 제조될 수 있다[예를 들면 MacMillan Publishers LTD의해 영국에서 출간된 Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies(1990) 참조]. 예를 들면, 항체를 암호화하는 DNA는 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 면역화된 림프구와 같은 면역 세포로부터 클론될 수 있고, 적절한 벡터로 삽입될 수 있으며, 재조합 항체를 만들기 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 기술된 재조합 항체를 제공한다.

- [0359] 또한, 본 발명의 항체는 하나 또는 그 이상의 본 발명 펩티드와 결합하는 한 항체의 단편 또는 변형된 항체일 수 있다. 예를 들면, 상기 항체 단편은 Fab, F(ab')₂, Fv 또는 단일쇄 Fc(scFv)일 수 있고, 여기서 H 및 L 사슬로부터의 Fv 단편은 적절한 링커(linker)에 의해 연결된다[Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83(1988)]. 보다 구체적으로, 항체 단편은 파파인(papain) 또는 펩신(pepsin)과 같은 효소와 함께 항체를 처리함으로써 생성될 수 있다. 또는, 상기 항체 단편을 암호화하는 유전자는 제조될 수 있고, 발현 벡터로 삽입될 수 있으며 적절한 숙주 세포내에서 발현될 수 있다[예를 들면, Co et al., J Immunol 152: 2968-76(1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515(1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63(1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7(1991) 참조].
- [0360] 항체는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG)와 같은 다양한 분자와 연결됨으로써 변형될 수 있다. 본 발명은 상기 변형된 항체를 제공한다. 상기 변형된 항체는 화학적으로 변형된 항체로부터 얻을 수 있다. 상기 변형 방법은 당업계에서 보편적이다.
- [0361] 또는, 본 발명의 항체는 비인간 항체로부터 유래된 가변 부위(variable region) 및 인간 항체로부터 유래된 불변 부위(constant region) 사이의 키메라 항체로서, 또는 비인간 항체로부터 유래된 CDR(complementarity determining region), FR(framework region) 및 인간항체로부터 유래된 불변 부위를 포함하는 인간화된 항체로서 수득될 수 있다. 상기 항체는 알려진 기술에 따라 제조될 수 있다. 인간 항체의 상응하는 서열에 대한 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 치환함으로써 인간화(humanization)이 수행될 수 있다[예를 들면, Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988) 참조]. 따라서, 상기 인간화된 항체는 키메라 항체이고, 여기서 온전한 인간 가변 도메인 보다 상당히 적은 도메인은 비인간 종류로부터 그에 상응하는 서열에 의해 치환되었다.
- [0362] 전체적으로 인간 프레임워크 및 불변 부위 뿐만 아니라 인간 가변 부위로 구성된 인간 항체 또한 사용될 수 있다. 상기 항체는 당업계에 알려진 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들면 시험관 내 방법(in vitro method)은 인간 항체 단편이 제시되는 박테리오파지의 재조합 라이브러리[예를 들면, Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381(1991)]의 사용과 관련이 있다. 유사하게, 인간 항체는 인간 면역글로불린 위치(loci)를 형질전환 동물, 예를 들면 내재성 면역 글로불린 유전자(endogenous immunoglobulin gene)이 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스로 도입시킴으로써 만들어질 수 있다. 상기 접근은 예를 들면 U.S. Patent Nos. 6,150,584, 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016에 기술되어 있다.
- [0363] 상기와 같이 수득한 항체는 동종성(homogeneity)으로 정제될 수 있다. 예를 들면 항체의 분리 및 정제는 일반적인 단백질에서 사용되는 분리 및 정제 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들면, 적절하게 선택되고 혼합된 컬럼 크로마토그래피의 사용, 예를 들면 친화성 크로마토그래피, 여과, 울트라여과, 염-외 회석(salting-out dialysis), SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 등점적 전기영동(isoelectric focusing)에 의해 상기 항체는 분리(separation) 및 분리(isolation)될 수 있으나[Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)], 이에 한정되지는 않는다. 단백질 A 컬럼 및 단백질 G 컬럼은 친화성 컬럼으로서 사용될 수 있다. 사용되는 예시적인 단백질 A 컬럼은 예를 들면 Hyper D, POROS 및 Sepharose F.F.(Pharmacia)를 포함한다.
- [0364] 친화성을 제외한 크로마토그래피의 예는, 예를 들면 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography), 소수성 크로마토그래피(hydrophobic chromatography), 겔 여과(gel filtration), 역상 크로마토그래피(reverse-phase chromatography), 흡착 크로마토그래피(adsorption chromatography) 및 그와 같은 것 [Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996)]을 포함한다. HPLC 및 FPLC와 같은 크로마토그래피 절차는 액상 크로마토그래피(liquid-phase chromatography)에 의해 수행될 수 있다.
- [0365] 예를 들면, 흡수도의 측정, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), EIA(enzyme immunoassay), RIA(radioimmunoassay) 및/또는 면역형광이 본 발명 항체의 항원 결합 활성(antigen binding activity)을 측정하기 위해 사용될 수 있다. ELISA에서, 본 발명의 항체를 플레이트에 고정시키고, 본 발명의 펩티드를 플레이트에 첨가한 후, 항체를 생산하는 세포의 배양 상층액 또는 정제된 항체와 같은 원하는 항체를 포함하는 시료를 첨가한다. 그 후, 1차 항체를 인지하고 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase)와 같은 효소로 표지된 2차 항체를 적용하고, 상기 플레이트를 배양한다. 그 다음, 씻어준 후, p-니트로페닐 포스페이트(p-nitrophenyl phosphate)와 같은 효소 기질을 플레이트에 적용시키고, 상기 시료의 항원 결합 활성을 평가하기 위하여 그 흡

수도를 측정한다. C 말단 또는 N 말단 단편과 같은 펩티드의 단편은 항체의 결합 활성을 평가하기 위해 항원으로 사용될 수 있다. 비아코어[BIAcore(Pharmacia)]는 본 발명에 따른 항체의 활성을 평가하기 위하여 사용될 수 있다.

[0366] 상기 방법은 본 발명의 항체를 본 발명의 펩티드를 포함한다고 가정되는 시료에 노출시킴으로써 본 발명의 펩티드를 탐지 또는 측정하게 해주고 상기 항체 및 상기 펩티드에 의해 형성된 면역 복합체를 탐지 또는 측정하게 해준다.

[0367] 본 발명에 따른 펩티드를 탐지 또는 측정하는 방법은 특이적으로 펩티드를 탐지 또는 특정할 수 있기 때문에, 이 방법은 상기 펩티드를 사용하는 다양한 실험에서 유용할 것이다.

[0368] XII. 벡터 및 숙주 세포

[0369] 본 발명은 또한 본 발명의 펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 도입시키는 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 벡터는 뉴클레오타이드, 특히 숙주세포에서 본 발명의 DNA를 보유하기에 유용할 수 있고, 본 발명의 펩티드를 발현시키기에 또는 유전자 치료를 위한 본 발명의 뉴클레오타이드를 투여하기에 유용할 수 있다.

[0370] E.coli가 숙주 세포이고 벡터가 E.coli 내에서(예를 들면, JM109, DH5 alpha, HB101 또는 XL1Blue) 대량으로 증폭되고 생산될 때, 상기 벡터는 E.coli 내에서 증폭되기 위해 "ori" 및 형질전환된 E.coli를 선별하기 위한 유전자 마커[예를 들면 암피실린(ampicillin), 테트라사이클린(tetracycline), 카나마이신(kanamycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 또는 그와 같은 것과 같은 약물에 의해 선별되는 약물 내성 유전자]을 가져야 한다. 예를 들면 M13-시리즈 벡터, pUC-시리즈 벡터, pBR322, pBluescript, pCR-Script 등이 사용될 수 있다. 또한, pGEM-T, pDIRECT 및 pT7 또한 상기 기술된 cDNA 뿐만 아니라 벡터를 서브클로닝하고 추출하기 위해 사용될 수 있다. 벡터가 본 발명의 단백질을 생산하기 위해 사용될 때, 발현 벡터는 특히 유용하다.

[0371] 예를 들면, E.coli에서 발현되는 발현 벡터는 E.coli 내에서 증폭되기 위하여 상기 특징을 가져야 한다. JM109, DH5 alpha, HB101 또는 XL1 Blue와 같은 E.coli를 숙주 세포로서 사용할 때, 벡터는 E.coli내에서 원하는 유전자를 효율적으로 발현시키는 프로모터, 예를 들면 lacZ 프로모터[Ward et al., Nature 341: 544-6(1989); FASEB J 6: 2422-7(1992)], araB 프로모터[Better et al., Science 240: 1041-3(1988)], T7 프로모터 또는 그와 같은 것을 가져야 한다. 상기 면에서, 예를 들면 pGEX-5X-1(Pharmacia), "QIAexpress system"(Qiagen), pEGFP 및 pET(이 경우에는, 숙주 세포는 우선적으로 T7 RNA 중합효소를 발현하는 BL21이다)가 상기 벡터들 대신 사용될 수 있다. 또한, 상기 벡터는 펩티드 분비를 위한 신호 서열(signal sequence)을 포함할 수 있다. E. coli의 주변 세포질(periplasm)로 분비되도록 펩티드에 지시하는 신호 서열의 예는 pelB 신호 서열[Lei et al., J Bacteriol 169: 4379(1987)]이 있다. 벡터를 표적 숙주 세포로 도입시키기 위한 수단은 예를 들면 칼슘 클로라이드(calcium chloride) 방법 및 전기침공(electroporation) 방법을 포함한다.

[0372] E.coli 뿐만 아니라, 예를 들면, 포유류로부터 유래된 발현 벡터[예를 들면, pcDNA3(Invitrogen) 및 pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17): 5322(1990)), pEF, pCDM8], 곤충 세포로부터 유래된 발현 벡터[예를 들면, "Bac-to-BAC baculovirus expression system"(GIBCO BRL), pBacPAK8], 식물로부터 유래된 발현 벡터(예를 들면, pMH1, pMH2), 동물 바이러스로부터 유래된 발현 벡터(예를 들면, pHSV, pMV, pAdexLcw), 레트로바이러스로부터 유래된 발현 벡터(예를 들면, pZIpneo), 효모로부터 유래된 발현 벡터[예를 들면, "Pichia Expression Kit"(Invitrogen), pNV11, SP-Q01] 및 바실러스 섭틸릭스(Bacillus subtilis)로부터 유래된 발현 벡터(예를 들면, pPL608, pKTH50)가 본 발명의 폴리펩티드를 생산하기 위해 사용될 수 있다.

[0373] CHO, COS 또는 NIH3T3와 같은 동물 세포에서 벡터를 발현시키기 위해서, 벡터는 상기 세포 내에서 발현에 필요한 프로모터, 예를 들면 SV40 프로모터[Mulligan et al., Nature 277: 108(1979)], MMLV-LTR 프로모터, EF1 알파 프로모터[Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322(1990)], CMV 프로모터 및 그와 같은 것을 가져야 하고, 바람직하게 형질전환체를 선별하기 위한 유전자 마커[예를 들면, 약물(neomycin, G418)에 의해 선별되는 약물 내성 유전자]를 가져야 한다. 상기 특징을 가진 알려진 벡터의 예는, 예를 들면 pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV 및 pOP13를 포함한다.

[0374] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 그리고 당업자가 동일한 것을 만들고 이용하는 것을 돕기 위해 제시한다. 실시예는 본 발명의 범위를 어떠한 방법으로도 제한하는 의도가 아니다.

- [0375] **실시예**
- [0376] **재료 및 방법**
- [0377] 세포주
- [0378] 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen)(HLA)-A*2402 양성 B-림프아형 세포주(positive B-lymphoblastoid cell line)인 TISI를 IHWG Cell and Gene Bank(Seattle, WA)로부터 구입하였다. COS7, MDA-MB-435S 및 T47D를 ATCC로부터 구입하였다. KLM-1 및 KP-1N를 각각 RIKEN cell bank 및 JCRB cell bank으로부터 구입하였다.
- [0379] MELK 유래 펩티드의 후보 선별
- [0380] HLA-A*2402 분자에 결합하는 MELK 유래 9-머(9-mer) 및 10-머(10-mer) 펩티드를 Parker KC et al.(J Immunol 1994, 152(1): 163-75), 및 Kuzushima K et al.(Blood 2001, 98(6): 1872-81)에 기재된 알고리즘인 결합 예측 소프트웨어 "BIMAS" (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)를 이용하여 예측하였다. HLA-A*2402(RYLKQQLGI(서열번호 48))에 대하여 제한된 HIV 펩티드를 대조군으로 이용하였다. 또한, HLA-A*0201 분자에 결합하는 MELK 유래 9-머(9-mer) 및 10-머(10-mer) 펩티드를 "NetMHC3.0"를 이용하여 예측하였다. 이러한 펩티드들은 표준 고체상 합성 방법(standard solid phase synthesis method)에 따라 BioSynthesis Inc.(Lewisville, TX)로부터 합성되었고, 역상 고속 액체 크로마토그래피(reversed phase high performance liquid chromatography, HPLC)로 정제되었다. 상기 펩티드의 순도(>90%) 및 확인(identity)은 각각 분석용 HPLC 및 질량분석(mass spectrometry analysis)을 통하여 각각 측정하였다. 펩티드를 디메틸설폭시드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 20mg/ml로 용해하고, -80℃에서 저장하였다.
- [0381] 시험관 내에서의 CTL 유도
- [0382] 단핵구 유래 수지상세포(dendritic cell, DC)를 항원-제시 세포(antigen-presenting cell, APC)로 사용하여 HLA에 제시된 펩티드에 대한 CTL 반응을 유도하였다. DC를(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)에 기술된 것과 같이 생산하였다. 특히, 기증자 A, B 및 C로 명명된 세 명의 건강한 기증자(HLA-A*2402 양성)로부터 피콜-플라크(Ficoll-Plaque; Pharmacia) 용액에 의해 분리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMCs)를 플라스틱 조직 배양 접시(Becton Dickinson)에 부착하는 것을 이용하여 분리하여 그들을 단핵구 분획물로 수득하였다. 단핵구가 많은 집단을 2% 열-불활성화 자신의 혈청(heat-inactivated autologous serum; AS)를 포함한 AIM-V 배지(Invitrogen)에 과립대식세포집락자극인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF, R&D System)의 1,000U/ml 및 IL(interleukin)-4(R&D System)의 1,000U/ml의 존재하에 배양하였다. 배양 7일 후, 3시간 동안 37℃에서 AIM-V 배지안에서, 베타 2-마이크로글로불린(beta 2-microglobulin) 3 micro-g/ml의 존재하에서 사이토카인-유도 DCs에 합성된 펩티드 각각의 20 micro-g/ml를 부과하였다.
- [0383] 생성된 세포는 그들의 표면에 CD80, CD83, CD86 및 HLA 종류 II와 같은 DC-관련 분자를 발현하는 것으로 나타났다(테이터는 보이지 않음). 상기 펩티드-부과 DC는 X-방사선 처리(20Gy)에 의하여 비활성화되었고 자신의 CD8+ T 세포와 1:20 비율로 혼합되어, CD8 양성 분리 키트(CD8 positive Isolation Kit; Dynal)를 사용한 양성 선택에 의해 수득되었다. 상기 배양은 48-웰 플레이트(Corning)에서 수행되었고; 각 웰은 AIM-V/2% AS 배지 0.5ml에 1.5×10^4 펩티드-부과 DC, 3×10^5 CD8+ T 세포 및 IL-7(R&D system)의 10ng/ml을 포함하였다. 3일 후, 상기 배양에 IL-2(CHIRON)을 첨가하여 최종 농도가 20U/ml이 되도록 하였다. 7일 째 및 14일 째, 상기 T 세포를 나아가 자신의 펩티드-부과 DC로 자극시켰다.
- [0384] 상기 DCs를 상기 기술된 동일한 방법으로 각 시간에서 준비하였다. 21일 째 펩티드 자극 3번 째 후 CTL은 펩티드-부과된(pulsed) A24 LCL 세포에 대하여 검사되었다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).
- [0385] CTL 증식 과정

- [0386] Riddell et al.에 의해 기술된 것과 유사한 방법을 사용하여 CTL을 배양하에 증식시켰다(Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23). 40ng/ml의 항 CD3 단일 클론 항체(Pharmingen)의 존재 하에서, MMC에 의해 불활성화된 두 종류의 인간 B 림프아세포주와 함께 총 5×10^4 CTL을 AIM-V/5% AS 배지의 25ml에 부유하였다. 배양 시작한 뒤 1일 후, IL-2의 120IU/ml를 상기 배양에 첨가하였다. 5, 8 및 11일째에 IL-2의 30IU/ml를 포함하는 신선한 AIM-V/5% AS 배지를 상기 배양에 공급하였다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).
- [0387] CTL 클론의 수립
- [0388] 96 웰 둥근 밑면 마이크로 타이터 플레이트(round-bottomed micro titer plate, Nalge Nunc International)에 한 웰당 0.3, 1 및 3 CTL이 되도록 희석하였다. CTL을 1×10^4 세포/웰(well)의 두 종류의 인간 B 림프아구양 세포주, 30ng/ml의 항-CD3 항체 및 IL-2의 125U/ml와 함께, 5%의 AS를 포함하는 AIM-M 배지의 총 150 micro-l/웰에서 배양하였다. 10일 후, IL-2의 최종농도가 125U/ml이 되도록 상기 배지에 IL-2의 50 micro-l/웰을 첨가하였다. 14일째에 CTL 활성을 시험하였고, 상기와 기술된 것과 동일한 방법을 이용하여 CTL 클론을 증식시켰다[Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506].
- [0389] 특이적인 CTL 활성
- [0390] 특이적인 CTL 활성을 조사하기 위하여, 인터페론-감마(interferon-gamma; IFN- γ) ELISPOT(enzyme-linked immunospot) 검사 및 IFN-감마 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 실시하였다. 구체적으로, 펩티드-부가 A24 LCL(1×10^4 /웰) 및 종양세포주(5×10^4 /웰)을 자극 세포(stimulator cell)로서 제조하였다. 반응 세포(responder cell)로서 48웰에 배양된 CTL 세포주 및 클론(clone) 세포를 사용하였다. IFN-감마 ELISPOT 검사 및 IFN-감마 ELISA 검사를 제조사 과정에 따라서 수행하였다.
- [0391] 플라스미드 형질전환(transfection)
- [0392] 표적 유전자 또는 HLA-A*2402의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 암호화하는 cDNA를 PCR에 의해 증폭시켰다. 상기 PCR-증폭 생산물은 pCAGGS 벡터(vector)로 클로닝되었다. 제조사에서 제공하는 과정에 따라서 리포펙타민2000(lipofectamine 2000)(Invitrogen)을 사용하여, 상기 플라스미드를 표적 유전자 및 HLA-A24 음성 세포주, COS7으로 형질도입시켰다. 형질도입 2일 후에, 상기 형질도입된 세포를 versene(Invitrogen)을 사용하여 수거하였고, CTL 활성 검사를 위해 자극세포(stimulator cell)로서 사용되었다(5×10^4 세포/웰).
- [0393] 저해 분석
- [0394] HLA-class I에 제한된 CTL 활성을 확인하기 위하여, 자극 세포를 항-HLA class I 단일클론항체(monoclonal antibody) W6/32(BioLegend) 또는 정상 마우스 IgG(Santa Cruz Biotechnology) 10 micro-g/ml로 30분 동안 4 섭씨온도에서 배양하였다. 상기 처리된 세포는 CTL 활성을 시험하기 위해 자극제(stimulator)로써 사용하였다.
- [0395] 결과
- [0396] MELK 유래 HLA-A24에 결합하는 펩티드의 예측
- [0397] 표 1 및 2는 높은 결합 친화도 순으로 HLA-A24에 결합하는 MELK 유래 9머 및 10머 펩티드를 나타낸다. 잠재적인 HLA-A24 결합 활성이 있는 총 34 개의 펩티드를 선별하였고, 에피토프 펩티드를 결정하기 위해 시험하였다.

표 1

HLA-A24에 결합하는 MELK 유래 9머 펩티드

서열번호	시작 부위	아미노산 서열	결합 점수
1	199	LYVLMCGFL	300
2	96	DYIISQDRL	300
3	560	HYNVTTRL	300
4	373	DYDWCEDDL	200
5	9	KYYELHETI	144
6	87	EYCPGGELF	120
7	637	VYKRLVEDI	60
8	610	QFELEVCQL	30
9	588	DFVQKGYTL	30
10	526	VFGSLERGL	24
11	567	RLVNPQQL	14.4
12	603	DFGKVTMQF	14
13	522	KGAKVFGSL	13.4
14	326	RGKPVRLRL	13.4
15	450	KNQHKREIL	12
16	230	KWLSPSSIL	12
17	395	KYWTESNGV	12
18	502	RCRSVELDL	11.2
19	145	KLKLIDFGL	11.2
20	574	LLNEIMSIL	10.1
21	78	TANKIFMVL	10.1
22	225	KYDVPKWLS	10

[0398]

표 2

HLA-A24에 결합하는 MELK 유래 10머 펩티드

서열번호	시작 부위	아미노산 서열	결합 점수
23	637	VYKRLVEDIL	280
24	309	QYDHLTATYL	200
25	142	EYHKLLIDF	100
26	139	LFDEYHKLKL	26.4
27	532	RGLDKVITVL	20.2
28	230	KWLSPSSILL	12
29	55	KTEIEALKNL	12
30	295	RNNRQTMEDL	12
31	223	RGKYDVPKWL	11.2
32	632	KGDAWVYKRL	11.2
33	266	DYNYPVEWQS	10.5
34	463	RYTTPSKARN	10

[0399]

[0400]

시작 부위는 MELK의 N-말단으로부터 아미노산 잔기의 수를 나타낸다.

[0401]

결합 점수는 “BIMAS”로부터 유래된다.

[0402]

HLA-A*2402로 제한된 MELK 유래 예측된 펩티드로 CTL 유도

[0403]

MELK 유래 이러한 펩티드에 대한 기증자 A의 PBMC 유래 CTL은 “재료 및 방법”에 기재된 프로토콜에 따라 제조하였다. 펩티드 특이적 CTL 활성은 IFN-감마(gamma) ELISPOT 분석으로 결정하였다(도 1). 하기의 웰 번호는 대조군 웰에 비하여 강력한 IFN-감마 생산을 증명하였다: MELK-A24-9-87(서열번호 6)로 자극된 웰 번호 2(a), MELK-A24-10-637(서열번호 23)(b)로 자극된 웰 번호 1 및 3(b), MELK-A24-9-199(서열번호 1)로 자극된 웰 번호 8(d) 및 MELK-A24-9-78(서열번호 21)로 자극된 웰 번호 4(e)는 대조군 웰에 비해 강력한 IFN-감마 생산을 증명하였다. 한편, 이러한 펩티드가 HLA-A*2402와 가능한 결합 활성을 가짐에도 불구하고, 강력한 IFN-감마 생산은 표 1에 나타난 다른 펩티드로 자극에 의해서 탐지될 수 없었다. 예를 들면, MELK-A24-9-96(서열번호 2)로 자극된 CTL 반응의 전형적인 음성데이터는 도 1c에서 보여졌다. 결과적으로, MELK 유래 4 개의 펩티드가 강력한 CTL을 유도할 수 있는 펩티드로서 선별된 것을 나타낸다.

[0404]

MELK 특이적 펩티드에 대한 CTL 세포주 및 클론(clones)의 수립

[0405]

3번 웰에서 IFN-감마 ELISPOT 분석으로 탐지된 펩티드 특이적 CTL 활성을 나타낸 세포를 증식시켰고, CTL 세포주를 수립하였다. 상기 CTL 세포주의 CTL 활성은 IFN-감마 ELISA 분석으로 탐지하였다(도 2). 모든 CTL 세포주는 펩티드 부가 없는 표적 세포에 비해 MELK-A24-9-87(서열번호 6)(a) MELK-A24-10-637(서열번호 23)(b) 및 MELK-A24-9-199(서열번호 1)(c)로 부가된 표적세포에 대한 IFN-감마 생산을 증명하였다. 또한, 상기 CTL 세포주를 “재료 및 방법”에 기재된 것과 같이 CTL 세포주를 수립하기 위하여 희석하였고, 배양하였다. 관련있는 펩티드로 부가된 표적세포에 대한 CTL 클론으로부터 IFN-감마 생산을 IFN-감마 ELISA 분석을 통해 결정하였다. 강력한 IFN-감마 생산은 도 3에서 MELK-A24-9-87(서열번호 6) 및 MELK-A24-9-199(서열번호 1)로 자극된 CTL 클론으로부터 확인되었다.

[0406] MELK 및 HLA-A*2402를 발현하는 표적세포에 대한 특이적 CTL 활성

[0407] 상기 수립된 MELK-A24-9-87(서열번호 6)에 대하여 형성된 CTL 클론은 MELK 및 HLA-A*2402를 발현하는 표적 세포를 인식하는 그들의 능력에 대하여 시험되었다. MELK의 전장 및 HLA-A*2402 둘 다로 형질전환된 COS7 세포 (MELK 및 HLA-A*2402를 발현하는 표적세포에 대한 특이적 모델)에 대한 특이적 CTL 활성을 MELK-A24-9-87(서열 번호 6)로 자극된 CTL 클론을 이용하여 시험하였다. MELK의 전장 또는 HLA-A*2402 각각으로 형질전환된 COS7 세포를 대조군으로 제조하였다. 도 4에서, MELK-A24-9-87(서열번호 6)로 자극된 상기 CTL 클론은 MELK 및 HLA-A*2402 둘 다를 발현하는 COS7 세포에 대하여 강력한 CTL 활성을 보였다. 한편, 상기 대조군에 대하여 유의적인 특이적 CTL 활성은 탐지되지 않았다. 따라서, 이러한 데이터는 내생적으로 처리되고, HLA-A*2402 분자와 표적세포에서 제시되는 MELK-A24-9-87(서열번호 6)의 펩티드가 상기 CTL로 인식되는 것을 명백히 증명하였다.

[0408] HLA-A24에 결합하는 MELK-A24-9-87 변형된 펩티드의 예측

[0409] 나중에, 본 발명자들은 MELK-A24-9-87(서열번호 6)로부터 하나의 아미노산 잔기가 치환된 변형된 펩티드가 야생형 MELK-A24-9-87(MELK-A24-9-87_WT)(서열번호 6)보다 MELK-A24-9-87 특이적 CTL을 더 유도하는 잠재적 능력을 가지는 것을 연구하였다. 표 3은 높은 결합 친화도 순으로 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)의 변형된 서열인 후보 펩티드들을 나타낸다. MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)에 비해 더 높은 결합 능력을 가지는 것으로 예측된 총 11개의 펩티드를 선별하였고, 면역원성을 조사하였다.

표 3

MELK-A24-9-87 유래 변형된 펩티드

서열번호	펩티드 명칭	아미노산 서열	결합 점수
35	MELK-A24-9-87_1K	KYCPGGELF	240
36	MELK-A24-9-87_1R	RYCPGGELF	240
37	MELK-A24-9-87_9L	EYCPGGELL	240
38	MELK-A24-9-87_3E	EYEPGGELF	180
39	MELK-A24-9-87_3I	EYIPGGELF	180
40	MELK-A24-9-87_3L	EYLPGGELF	180
41	MELK-A24-9-87_3M	EYMPGGELF	180
42	MELK-A24-9-87_3N	EYNPGGELF	180
43	MELK-A24-9-87_3P	EYPPGGELF	180
44	MELK-A24-9-87_7N	EYCPGGNLF	144
45	MELK-A24-9-87_7Q	EYCPGGQLF	144
6	MELK-A24-9-87_WT	EYCPGGELF	120

[0410]

[0411] 결합 점수는 “BIMAS”로부터 유래한다.

[0412] MELK-A24-9-87 유래 변형된 펩티드의 CTL 유도

[0413] 표 3의 변형된 펩티드에 대한 CTL 반응성(reactive)을 “재료 및 방법”에 기재된 프로토콜에 따라 제조하였다. 펩티드 특이적 CTL 반응을 IFN-감마 ELISPOT 분석으로 결정하였다. 도 5A는 기증자 B의 PBMC 유래 유도된 CTL

에서 IFN-감마 ELISPOT 분석의 결과를 나타낸다. 하기의 웰 번호는 대조군에 비해 강력한 IFN-감마 생산을 증명하였다: MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35)로 자극한 웰 번호 #1, #3 및 #12(a), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41)로 자극한 #2(b) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극한 #10 및 #12(c). 한편, MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 자극된 PBMC로부터 특이적 IFN-감마 생산은 탐지되지 않았다(d).

[0414] 다른 기증자 C의 PBMC를 또한 표 3에서 변형된 펩티드로 자극하였다. 도 5B는 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 웰 번호 #14는 대조군에 비해 강력한 IFN-감마 생산의 증명하는 것을 나타낸다. 한편, MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 자극된 CTL(b) 및 기증자 B의 PBMC로부터 특이적 IFN-감마 생산은 탐지되지 않았다. 이러한 결과는 MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)이 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)에 비하여 우수한 면역원성을 가지는 것을 나타내었다.

[0415] MELK 변형된 펩티드로 자극된 CTL 세포주 및 클론(clone)의 수립

[0416] 기증자 B 유래 MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35)로 자극된 #1번 웰, MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41)로 자극된 #2번 웰 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 #12번 웰 및 기증자 C 유래 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 #14번 웰을 CTL 세포주를 수립하기 위해 증식하였다. 경미한 IFN-감마 생산을 보였던 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)으로 자극된 #4번 웰 안의 세포 역시 증식되었다.

[0417] 이러한 CTL 세포주의 CTL 활성을 IFN-감마 ELISA 분석으로 결정하였다. 도 6에서, MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35)(a), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41)(b) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)(c)로 자극된 기증자 B 유래 CTL 세포주가 관련없는 HIV 펩티드를 부가한 표적 세포에 비해 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 부가된 표적세포에 대해 강력한 IFN-감마 생산을 나타냈다. MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 자극되고, 증식된 세포가 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)(e)로 부가된 표적 세포에 대하여 IFN-감마 생산을 나타내지 않는 반면, MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 기증자 C 유래 CTL 세포주는 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6) 펩티드 특이적 IFN-감마 생산을 보였다(d).

[0418] 그 뒤에, CTL 클론을 “재료 및 방법”에 기재한 바와 같이 제한 희석으로 수립하였고, 이러한 CTL 클론의 CTL 활성을 IFN-감마 ELISA 분석으로 결정하였다. 상기 강력한 IFN-감마 생산을 관련없는 HIV 펩티드로 부가된 표적 세포에 비해, MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)로 부가된 표적 세포에 대한 기증자 B 유래 MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)(도 7a-c)로 자극된 CTL 클론 및 기증자 C 유래 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 CTL 클론으로부터 탐지하였다. 이러한 두 명의 기증자의 CTL 유도의 결과를 종합하여, MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)이 MELK-A24-9-87_WT(서열번호 6)에 비하여 강력한 MELK-A24-9-87-반응성 CTL을 유도하는 우수한 면역원성을 가지는 것을 증명하였다.

[0419] MELK 및 HLA-A*2402를 발현하는 표적세포에 대한 특이적 CTL 활성

[0420] 상기 수립된 CTL 세포주 및 클론은 MELK 및 HLA-A*2402를 발현하는 표적 세포를 인식하는 그들의 능력이 시험되었다. 도 8a에서, MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 CTL 세포주는 종양 세포주 MDA-MB-435S(MELK+, A24+) 및 KLM-1(MELK+, A24+)에 대하여 강력한 CTL 활성을 보였고, T47D(MELK+, A24-) 및 KP-1N(MELK+, A24-)에 대한 CTL 활성은 보이지 않았다. HLA-class I-제한적인 맥락에서 야기된 이러한 CTL 활성을 확인하기 위하여, 저해분석을 CTL의 항원-특이적 반응을 차단하기 위한 항-HLA-class I 단일클론 항체를 이용하여 수행하였다. 도 8b에서, 상기 KLM-1(MELK+, A24+)에 대한 CTL의 IFN-감마 생산은 정상 마우스 IgG에 비해 항-HLA-class I 단일클론 항체에 의해 완전히 저해되었다. 이러한 결과는 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 유도된 CTL이 HLA-class I-제한된 맥락에서 HLA-A*2402와 표적세포 위에 자연적으로 발현되는 MELK 에피토프 펩티드를 인식할 수 있는 것을 명백히 증명하였다. 대표적인 음성적인 데이터로서, 도 9는 MELK-A24-9-199(서열번호 1)(a)로 부가된 표적 세포에 대한 MELK-A24-9-199(서열번호 1) 특이적 CTL 클론 및 종양 세포 주 KLM-1(MELK+, A24+) 및 KP-1N(MELK+, A24-)(b)의 IFN-감마 생산을 나타낸다. MELK-A24-9-199(서열번호 1) 특이적 CTL 클론이 펩티드가 부가된 표적세포를 인식하는 능력을 가졌지만, 종양 세포주 KLM-1(MELK+, A24+)에 대하여 IFN-감마 생산을 보이지 않았다. 이러한 결과는 MELK-A24-9-199(서열번호 1)가 MELK를 발현하는 종양 세포에 자연적으로 제시되지 않는 것을 제안한다.

[0421] 항원 펩티드의 상동성 분석

[0422] MELK-A24-9-87(서열번호 6), MELK-A24-10-637(서열번호 23), MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)로 자극된 CTL은 유의적이고 특이적인 CTL 활성을 보였다. 이 결과는 MELK-A24-9-87(서열번호 6), MELK-A24-10-637(서열번호 23), MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)의 서열이 인간 면역 시스템을 민감화시킨다고 알려진 다른 분자로부터 유래된 펩티드와 상동성을 갖는다는 사실 때문일 수 있다. 이러한 가능성을 배제하기 위하여, 상동성 분석을 수행하였다. 유의적인 상동성을 갖는 서열을 나타내지 않는 BLAST 알고리즘(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)을 사용하여 이 펩티드 서열에 대해 분석하였다. 상동성 분석의 결과는 MELK-A24-9-87(서열번호 6), MELK-A24-10-637(서열번호 23), MELK-A24-9-87_1K(서열번호 35), MELK-A24-9-87_3M(서열번호 41) 및 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)의 서열은 유일하고, 따라서 우리의 지식으로는, 이 분자가 어떤 관련없는 분자에 대하여 의도하지 않은 면역 반응을 야기하는 가능성은 거의 없다는 것을 가르친다.

[0423] 결론적으로, 신규한 MELK 유래 MELK-A24-9-87(서열번호 6)의 변형된 서열을 가지는 에피토프 펩티드가 동정되었다. 본 발명에 제시된 결과는 MELK-A24-9-87(서열번호 6) 유래 변형된 펩티드인 MELK-A24-9-87_7N(서열번호 44)가 MELK-A24-9-87(서열번호 6)에 비해 MELK를 발현하는 표적 세포를 인식하는 CTL을 효과적으로 유도하고, 강력한 CTL 활성을 보이는 것을 증명하였다.

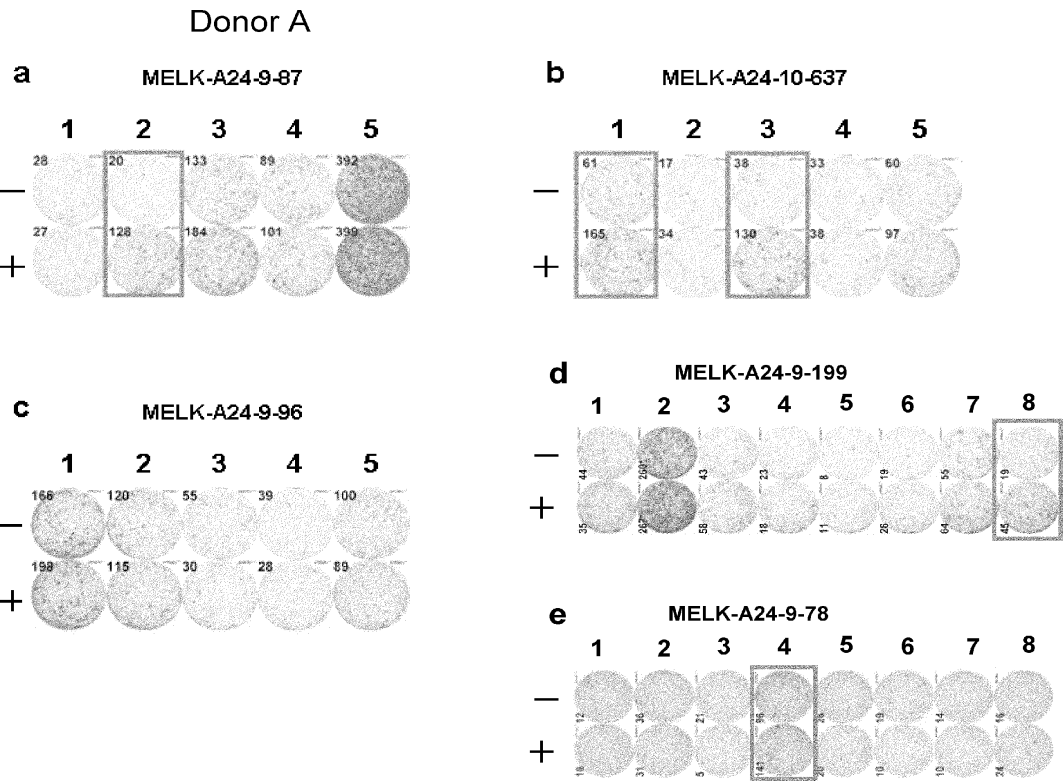
산업상 이용가능성

[0424] 본 발명은 신규한 TAA를, 특히 강력하고 특이적인 항-종양 면역 반응을 유도하고, 암을 포함하는 다수의 질환에 적용가능성을 가지는 변형된 MELK 펩티드 유래 펩티드들을 기재한다. 이러한 TAA는 MELK 과발현과 연관된 질환, 예를 들면 자궁내막증(endometriosis) 및 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 담관세포 상피성암(cholangiocellular carcinoma), 만성골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(liver cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 림프종(lymphoma), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신세포암(renal carcinoma) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)에 대한 펩티드 백신으로 유용하다.

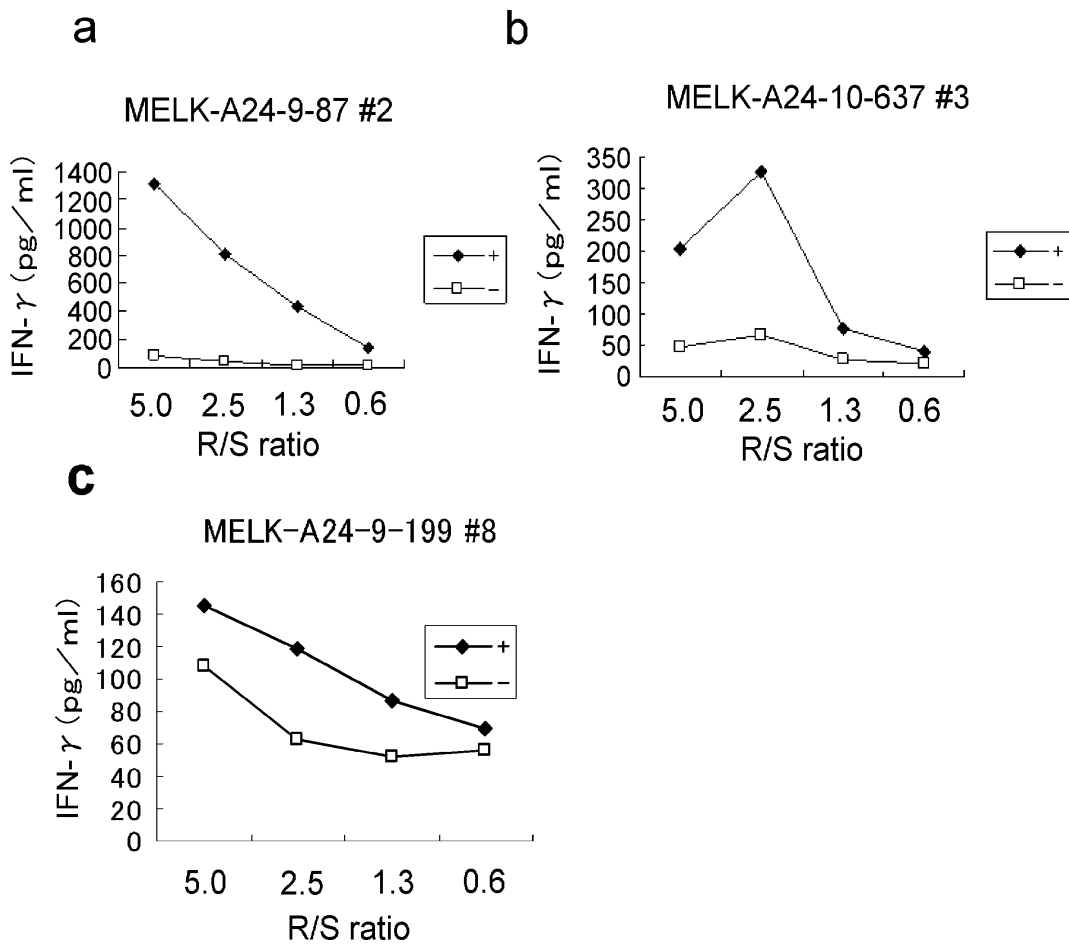
[0425] 본 발명이 여기서 그의 구체적 실시예와 함께 상세히 기술되는 동안, 앞선 기술이 예시적 설명적 특징이었고 본 발명 및 바람직한 실시예를 예시하려는 의도를 가지고 있다는 것이 이해되어야 한다. 일반적인 실험 방법을 통해, 당업계의 당업자는 하기 첨부된 청구항에 의해 정의되는 본 발명의 뜻과 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 변화 및 변형이 가능한 것을 쉽게 인지할 것이다.

도면

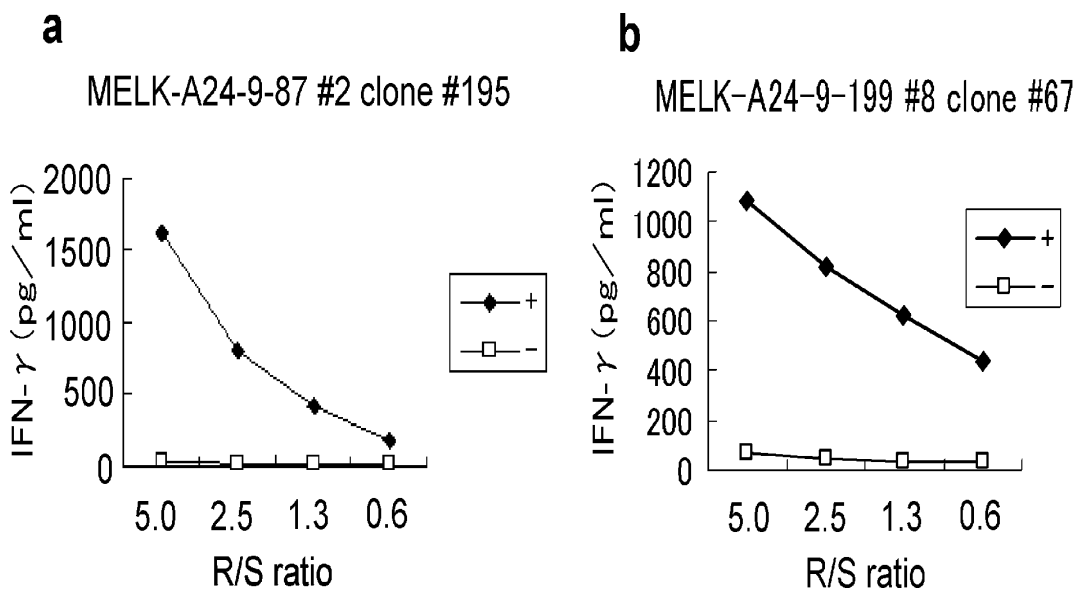
도면1



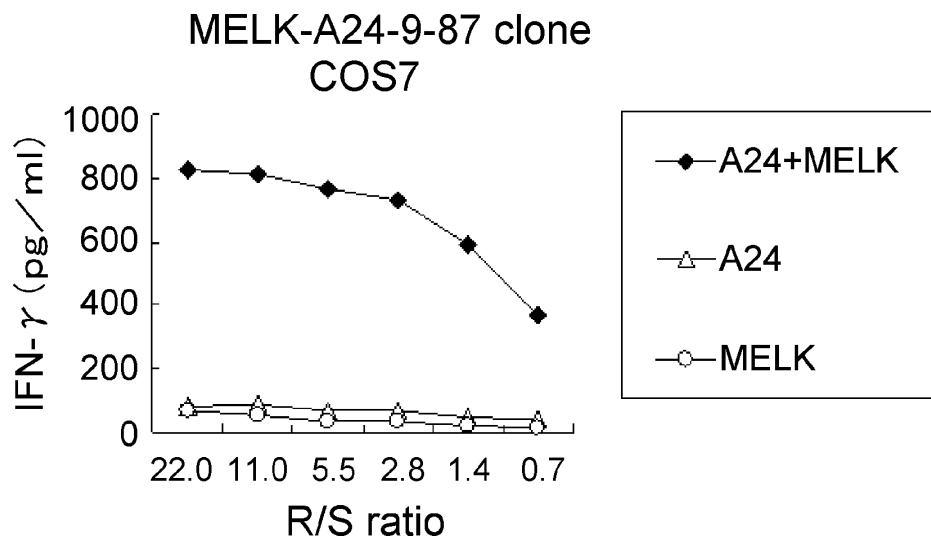
도면2



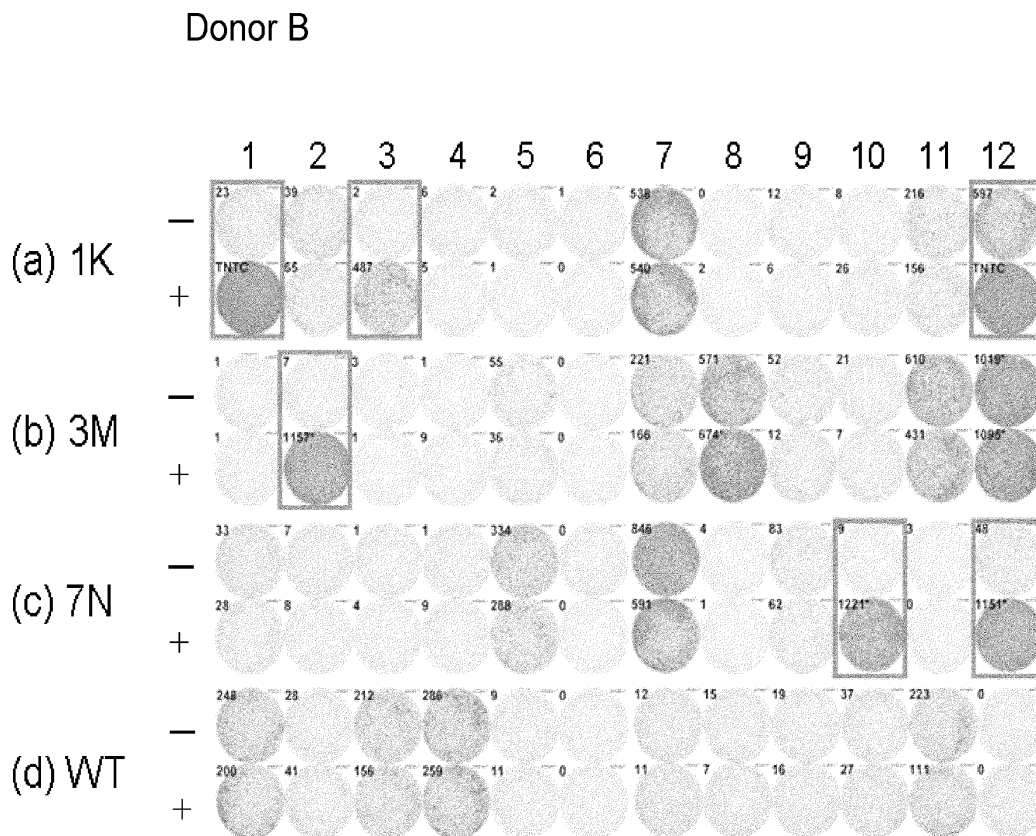
도면3



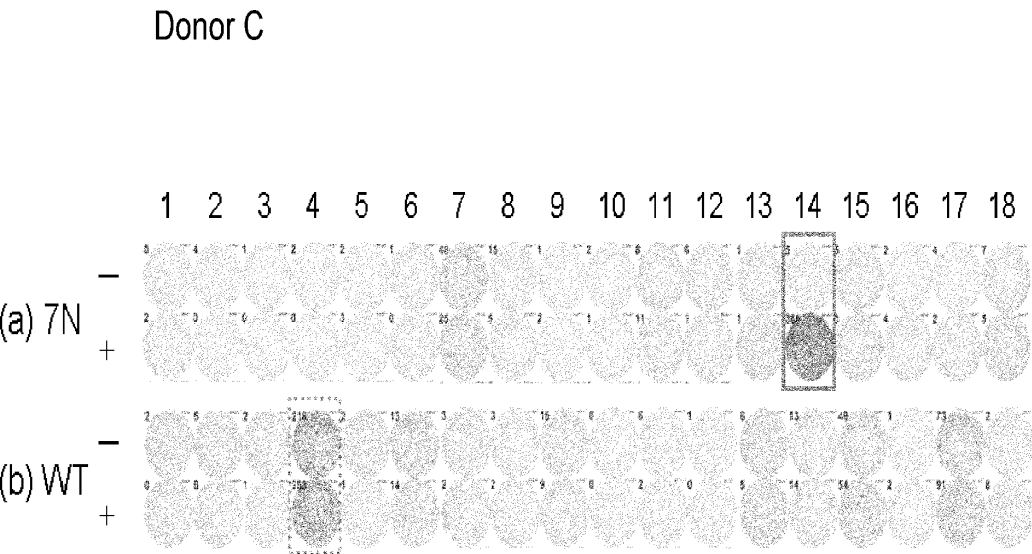
도면4



도면5a

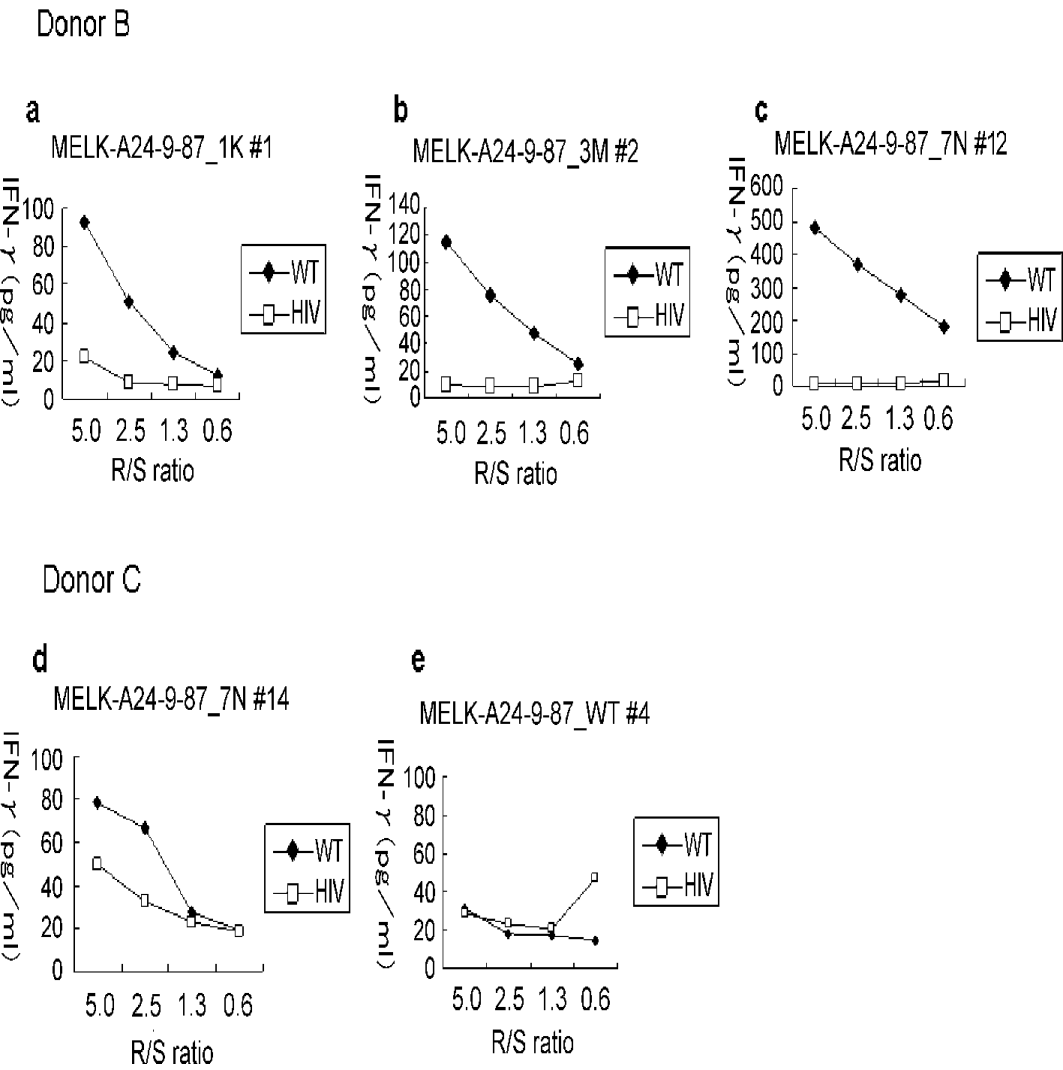


도면5b



도면6

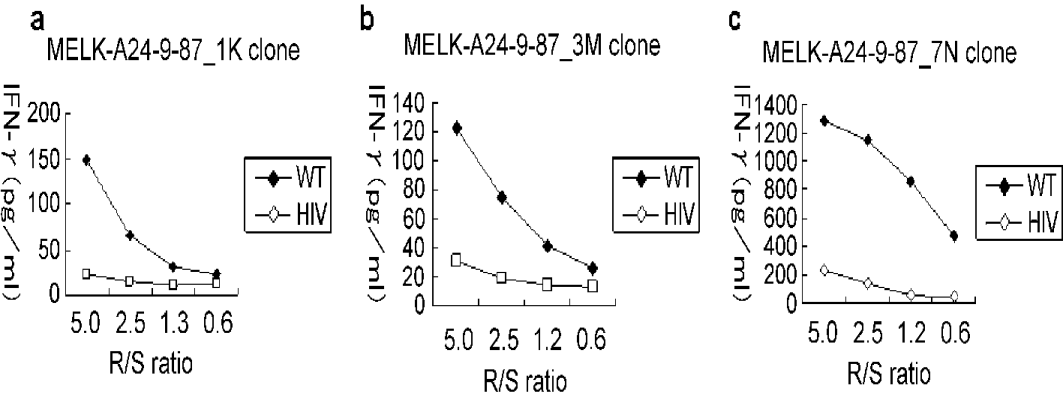
Establishment of CTL lines



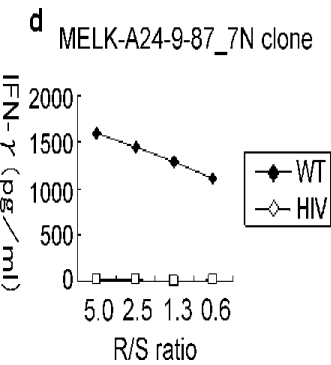
도면7

Establishment of CTL clones

Donor B

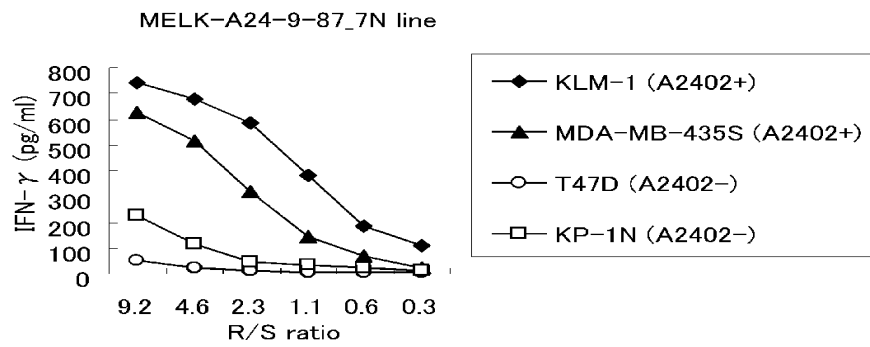


Donor C

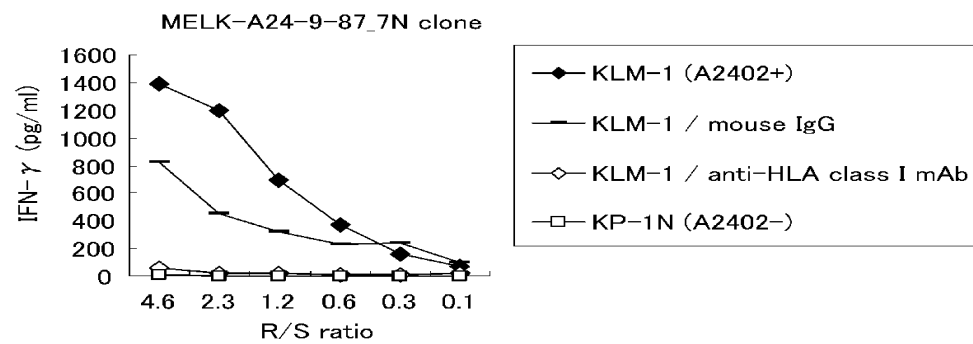


도면8

a

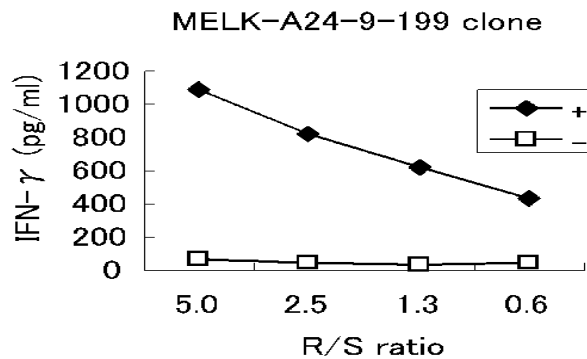


b

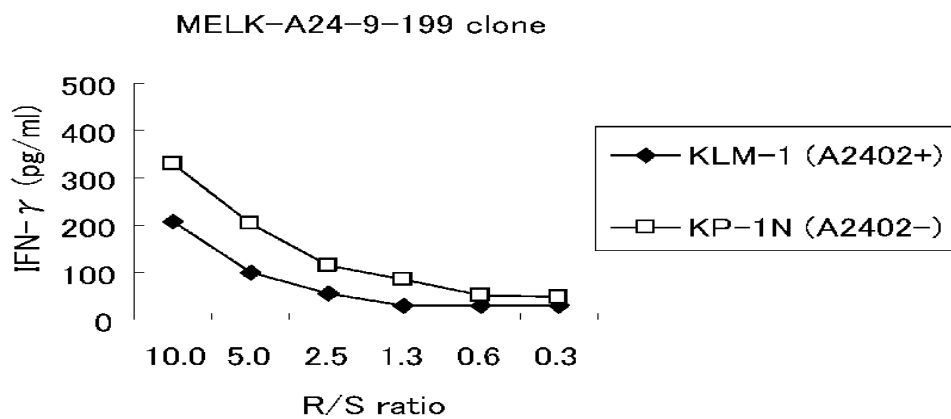


도면9

a



b



서열 목록

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
 <120> MODIFIED MELK PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME
 <130> 12fpi-07-04
 <150> US 61/297,996
 <151> 2010-01-25
 <160> 52
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 1
 Leu Tyr Val Leu Met Cys Gly Phe Leu
 1 5
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > An artificially synthesized peptide
 <400> 2
 Asp Tyr Ile Ile Ser Gln Asp Arg Leu
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 3
 His Tyr Asn Val Thr Thr Thr Arg Leu
 1 5
 <210> 4
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 4
 Asp Tyr Asp Trp Cys Glu Asp Asp Leu

1 5
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 5
 Lys Tyr Tyr Glu Leu His Glu Thr Ile

1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 6
 Glu Tyr Cys Pro Gly Gly Glu Leu Phe

1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 7
 Val Tyr Lys Arg Leu Val Glu Asp Ile

1 5
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 8

Gln Phe Glu Leu Glu Val Cys Gln Leu

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 9

Asp Phe Val Gln Lys Gly Tyr Thr Leu

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 10

Val Phe Gly Ser Leu Glu Arg Gly Leu

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 11

Arg Leu Val Asn Pro Asp Gln Leu Leu

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 12

Asp Phe Gly Lys Val Thr Met Gln Phe

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 13

Lys Gly Ala Lys Val Phe Gly Ser Leu

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400>

> 14

Arg Gly Lys Pro Val Arg Leu Arg Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 15

Lys Asn Gln His Lys Arg Glu Ile Leu

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 16

Lys Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 17

Lys Tyr Trp Thr Glu Ser Asn Gly Val

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 18

Arg Cys Arg Ser Val Glu Leu Asp Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

An artificially synthesized peptide

<400> 19

Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 20

Leu Leu Asn Glu Ile Met Ser Ile Leu

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 21

Thr Ala Asn Lys Ile Phe Met Val Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 22

Lys Tyr Asp Val Pro Lys Trp Leu Ser

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 23

Val Tyr Lys Arg Leu Val Glu Asp Ile Leu

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 24

Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala Thr Tyr Leu

1 5 10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 25
 Glu Tyr His Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 26
 Leu Phe Asp Glu Tyr His Lys Leu Lys Leu
 1 5 10
 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 27
 Arg Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Leu
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 28
 Lys Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu Leu
 1 5 10
 <210> 29

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 29

Lys Thr Glu Ile Glu Ala Leu Lys Asn Leu

1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 30

Arg Asn Asn Arg Gln Thr Met Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 31

Arg Gly Lys Tyr Asp Val Pro Lys Trp Leu

1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 32

Lys Gly Asp Ala Trp Val Tyr Lys Arg Leu

1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 33

Asp Tyr Asn Tyr Pro Val Glu Trp Gln Ser

1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 34

Arg Tyr Thr Thr Pro Ser Lys Ala Arg Asn

1 5 10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 35

Lys Tyr Cys Pro Gly Gly Glu Leu Phe

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 36

Arg Tyr Cys Pro Gly Gly Glu Leu Phe

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 37

Glu Tyr Cys Pro Gly Gly Glu Leu Leu

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

An artificially synthesized peptide

<400> 38

Glu Tyr Glu Pro Gly Gly Glu Leu Phe

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 39

Glu Tyr Ile Pro Gly Gly Glu Leu Phe

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 40

Glu Tyr Leu Pro Gly Gly Glu Leu Phe

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide

<400> 41
 Glu Tyr Met Pro Gly Gly Glu Leu Phe
 1 5
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 42
 Glu Tyr Asn Pro Gly Gly Glu Leu Phe
 1 5
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 43
 Glu Tyr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Phe
 1 5
 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 44
 Glu Tyr Cys Pro Gly Gly Asn Leu Phe
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400>
 > 45

Glu Tyr Cys Pro Gly Gly Gln Leu Phe

1 5
 <210> 46
 <211> 2501
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (139)..(2091)
 <400> 46
 cgaaaagatt cttaggaacg ccgtaccagc cgcgtctctc aggacagcag gccctgtcc 60
 ttctgtcggg cgccgctcag ccgtgccctc cgcccctcag gttctttttc taattccaaa 120
 taaacttgca agaggact atg aaa gat tat gat gaa ctt ctc aaa tat tat 171
 Met Lys Asp Tyr Asp Glu Leu Leu Lys Tyr Tyr

1 5 10
 gaa tta cat gaa act att ggg aca ggt ggc ttt gca aag gtc aaa ctt 219
 Glu Leu His Glu Thr Ile Gly Thr Gly Gly Phe Ala Lys Val Lys Leu
 15 20 25
 gcc tgc cat atc ctt act gga gag atg gta gct ata aaa atc atg gat 267
 Ala Cys His Ile Leu Thr Gly Glu Met Val Ala Ile Lys Ile Met Asp
 30 35 40
 aaa aac aca cta ggg agt gat ttg ccc cgg atc aaa acg gag att gag 315

Lys Asn Thr Leu Gly Ser Asp Leu Pro Arg Ile Lys Thr Glu Ile Glu
 45 50 55
 gcc ttg aag aac ctg aga cat cag cat ata tgt caa ctc tac cat gtg 363
 Ala Leu Lys Asn Leu Arg His Gln His Ile Cys Gln Leu Tyr His Val
 60 65 70 75
 cta gag aca gcc aac aaa ata ttc atg gtt ctt gag tac tgc cct gga 411
 Leu Glu Thr Ala Asn Lys Ile Phe Met Val Leu Glu Tyr Cys Pro Gly
 80 85 90
 gga gag ctg ttt gac tat ata att tcc cag gat cgc ctg tca gaa gag 459
 Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Ile Ser Gln Asp Arg Leu Ser Glu Glu
 95 100 105

gag acc cgg gtt gtc ttc cgt cag ata gta tct gct gtt gct tat gtg	507
Glu Thr Arg Val Val Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val Ala Tyr Val	
110 115 120	
cac agc cag ggc tat gct cac agg gac ctc aag cca gaa aat ttg ctg	555
His Ser Gln Gly Tyr Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu	
125 130 135	
ttt gat gaa tat cat aaa tta aag ctg att gac ttt ggt ctc tgt gca	603
Phe Asp Glu Tyr His Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu Cys Ala	
140 145 150 155	
aaa ccc aag ggt aac aag gat tac cat cta cag aca tgc tgt ggg agt	651
Lys Pro Lys Gly Asn Lys Asp Tyr His Leu Gln Thr Cys Cys Gly Ser	
160 165 170	
ctg gct tat gca gca cct gag tta ata caa ggc aaa tca tat ctt gga	699
Leu Ala Tyr Ala Ala Pro Glu Leu Ile Gln Gly Lys Ser Tyr Leu Gly	
175 180 185	
tca gag gca gat gtt tgg agc atg ggc ata ctg tta tat gtt ctt atg	747
Ser Glu Ala Asp Val Trp Ser Met Gly Ile Leu Leu Tyr Val Leu Met	
190 195 200	
tgt gga ttt cta cca ttt gat gat gat aat gta atg gct tta tac aag	795
Cys Gly Phe Leu Pro Phe Asp Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Tyr Lys	
205 210 215	
aag att atg aga gga aaa tat gat gtt ccc aag tgg ctc tct ccc agt	843
Lys Ile Met Arg Gly Lys Tyr Asp Val Pro Lys Trp Leu Ser Pro Ser	
220 225 230 235	
agc att ctg ctt ctt caa caa atg ctg cag gtg gac cca aag aaa cgg	891
Ser Ile Leu Leu Leu Gln Gln Met Leu Gln Val Asp Pro Lys Lys Arg	
240 245 250	
att tct atg aaa aat cta ttg aac cat ccc tgg atc atg caa gat tac	939
Ile Ser Met Lys Asn Leu Leu Asn His Pro Trp Ile Met Gln Asp Tyr	
255 260 265	
aac tat cct gtt gag tgg caa agc aag aat cct ttt att cac ctc gat	987

Asn Tyr Pro Val Glu Trp Gln Ser Lys Asn Pro Phe Ile His Leu Asp	
270 275 280	
gat gat tgc gta aca gaa ctt tct gta cat cac aga aac aac agg caa	1035
Asp Asp Cys Val Thr Glu Leu Ser Val His His Arg Asn Asn Arg Gln	
285 290 295	
aca atg gag gat tta att tca ctg tgg cag tat gat cac ctc acg gct	1083
Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Leu Trp Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala	
300 305 310 315	
acc tat ctt ctg ctt cta gcc aag aag gct cgg gga aaa cca gtt cgt	1131
Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Ala Lys Lys Ala Arg Gly Lys Pro Val Arg	
320 325 330	
tta agg ctttct tct ttc tcc tgt gga caa gcc agt gct acc cca ttc	1179
Leu Arg Leu Ser Ser Phe Ser Cys Gly Gln Ala Ser Ala Thr Pro Phe	
335 340 345	
aca gac atc aag tca aat aat tgg agt ctg gaa gat gtg acc gca agt	1227
Thr Asp Ile Lys Ser Asn Asn Trp Ser Leu Glu Asp Val Thr Ala Ser	
350 355 360	
gat aaa aat tat gtg gcg gga tta ata gac tat gat tgg tgt gaa gat	1275
Asp Lys Asn Tyr Val Ala Gly Leu Ile Asp Tyr Asp Trp Cys Glu Asp	
365 370 375	
gat tta tca aca ggt gct gct act ccc cga aca tca cag ttt acc aag	1323
Asp Leu Ser Thr Gly Ala Ala Thr Pro Arg Thr Ser Gln Phe Thr Lys	
380 385 390 395	
tac tgg aca gaa tca aat ggg gtg gaa tct aaa tca tta act cca gcc	1371
Tyr Trp Thr Glu Ser Asn Gly Val Glu Ser Lys Ser Leu Thr Pro Ala	
400 405 410	
tta tgc aga aca cct gca aat aaa tta aag aac aaa gaa aat gta tat	1419
Leu Cys Arg Thr Pro Ala Asn Lys Leu Lys Asn Lys Glu Asn Val Tyr	
415 420 425	
act cct aag tct gct gta aag aat gaa gag tac ttt atg ttt cct gag	1467
Thr Pro Lys Ser Ala Val Lys Asn Glu Glu Tyr Phe Met Phe Pro Glu	

430	435	440	
cca aag act cca gtt aat aag aac cag cat aag aga gaa ata ctc act			1515
Pro Lys Thr Pro Val Asn Lys Asn Gln His Lys Arg Glu Ile Leu Thr			
445	450	455	
acg cca aat cgt tac act aca ccc tca aaa gct aga aac cag tgc ctg			1563
Thr Pro Asn Arg Tyr Thr Thr Pro Ser Lys Ala Arg Asn Gln Cys Leu			
460	465	470	475
aaa gaa act cca att aaa ata cca gta aat tca aca gga aca gac aag			1611
Lys Glu Thr Pro Ile Lys Ile Pro Val Asn Ser Thr Gly Thr Asp Lys			
480	485	490	
tta atg aca ggt gtc att agc cct gag agg cgg tgc cgc tca gtg gaa			
Leu Met Thr Gly Val Ile Ser Pro Glu Arg Arg Cys Arg Ser Val Glu			1659
495	500	505	
ttg gat ctc aac caa gca cat atg gag gag act cca aaa aga aag gga			1707
Leu Asp Leu Asn Gln Ala His Met Glu Glu Thr Pro Lys Arg Lys Gly			
510	515	520	
gcc aaa gtg ttt ggg agc ctt gaa agg ggg ttg gat aag gtt atc act			1755
Ala Lys Val Phe Gly Ser Leu Glu Arg Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr			
525	530	535	
gtg ctc acc agg agc aaa agg aag ggt tct gcc aga gac ggg ccc aga			1803
Val Leu Thr Arg Ser Lys Arg Lys Gly Ser Ala Arg Asp Gly Pro Arg			
540	545	550	555
aga cta aag ctt cac tat aat gtg act aca act aga tta gtg aat cca			1851
Arg Leu Lys Leu His Tyr Asn Val Thr Thr Thr Arg Leu Val Asn Pro			
560	565	570	
gat caa ctg ttg aat gaa ata atg tct att ctt cca aag aag cat gtt			
Asp Gln Leu Leu Asn Glu Ile Met Ser Ile Leu Pro Lys Lys His Val			1899
575	580	585	
gac ttt gta caa aag ggt tat aca ctg aag tgt caa aca cag tca gat			1947
Asp Phe Val Gln Lys Gly Tyr Thr Leu Lys Cys Gln Thr Gln Ser Asp			
590	595	600	

ttt ggg aaa gtg aca atg caa ttt gaa tta gaa gtg tgc cag ctt caa 1995

Phe Gly Lys Val Thr Met Gln Phe Glu Leu Glu Val Cys Gln Leu Gln

605 610 615

aaa ccc gat gtg gtg ggt atc agg agg cag cgg ctt aag ggc gat gcc 2043

Lys Pro Asp Val Val Gly Ile Arg Arg Gln Arg Leu Lys Gly Asp Ala

620 625 630 635

tgg gtt tac aaa aga tta gtg gaa gac atc cta tct agc tgc aag gta 2091

Trp Val Tyr Lys Arg Leu Val Glu Asp Ile Leu Ser Ser Cys Lys Val

640 645 650

taattgatg gattcttcca tctgccgga tgagtgtggg tgtgatacag cctacataaa 2150

gactgttatg atcgctttga ttttaaagtt cattggaact accaacttgt ttctaaagag 2210

ctatcttaag accaatatct ctttgttttt aaacaaaaga tattattttg tgtatgaatc 2270

taaatcaagc ccatctgtca ttatgttact gtctttttta atcatgtggt tttgtatatt 2330

aataattggt gactttctta gattcacttc catatgtgaa tgtaagctct taactatgtc 2390

tctttgtaat gtgtaatttc tttctgaaat aaaaccattt gtgaatataa aaaaaaaaaa 2450

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2501

<210> 47

<211> 651

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Lys Asp Tyr Asp Glu Leu Leu Lys Tyr Tyr Glu Leu His Glu Thr

1 5 10 15

Ile Gly Thr Gly Gly Phe Ala Lys Val Lys Leu Ala Cys His Ile Leu

20 25 30

Thr Gly Glu Met Val Ala Ile Lys Ile Met Asp Lys Asn Thr Leu Gly

35 40 45

Ser Asp Leu Pro Arg Ile Lys Thr Glu Ile Glu Ala Leu Lys Asn Leu

50 55 60

Arg His Gln His Ile Cys Gln Leu Tyr His Val Leu Glu Thr Ala Asn

65 70 75 80

Lys Ile Phe Met Val Leu Glu Tyr Cys Pro Gly Gly Glu Leu Phe Asp
 85 90 95
 Tyr Ile Ile Ser Gln Asp Arg Leu Ser Glu Glu Glu Thr Arg Val Val
 100 105 110
 Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val Ala Tyr Val His Ser Gln Gly Tyr
 115 120 125
 Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Phe Asp Glu Tyr His
 130 135 140
 Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu Cys Ala Lys Pro Lys Gly Asn
 145 150 155 160
 Lys Asp Tyr His Leu Gln Thr Cys Cys Gly Ser Leu Ala Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Pro Glu Leu Ile Gln Gly Lys Ser Tyr Leu Gly Ser Glu Ala Asp Val
 180 185 190
 Trp Ser Met Gly Ile Leu Leu Tyr Val Leu Met Cys Gly Phe Leu Pro
 195 200 205
 Phe Asp Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Tyr Lys Lys Ile Met Arg Gly
 210 215 220
 Lys Tyr Asp Val Pro Lys Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gln Gln Met Leu Gln Val Asp Pro Lys Lys Arg Ile Ser Met Lys Asn
 245 250 255
 Leu Leu Asn His Pro Trp Ile Met Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Val Glu
 260 265 270
 Trp Gln Ser Lys Asn Pro Phe Ile His Leu Asp Asp Asp Cys Val Thr
 275 280 285
 Glu Leu Ser Val His His Arg Asn Asn Arg Gln Thr Met Glu Asp Leu
 290 295 300
 Ile Ser Leu Trp Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala Thr Tyr Leu Leu Leu
 305 310 315 320
 Leu Ala Lys Lys Ala Arg Gly Lys Pro Val Arg Leu Arg Leu Ser Ser
 325 330 335

Phe Ser Cys Gly Gln Ala Ser Ala Thr Pro Phe Thr Asp Ile Lys Ser
340 345 350

Asn Asn Trp Ser Leu Glu Asp Val Thr Ala Ser Asp Lys Asn Tyr Val
355 360 365

Ala Gly Leu Ile Asp Tyr Asp Trp Cys Glu Asp Asp Leu Ser Thr Gly
370 375 380

Ala Ala Thr Pro Arg Thr Ser Gln Phe Thr Lys Tyr Trp Thr Glu Ser
385 390 395 400

Asn Gly Val Glu Ser Lys Ser Leu Thr Pro Ala Leu Cys Arg Thr Pro
405 410 415

Ala Asn Lys Leu Lys Asn Lys Glu Asn Val Tyr Thr Pro Lys Ser Ala

420 425 430

Val Lys Asn Glu Glu Tyr Phe Met Phe Pro Glu Pro Lys Thr Pro Val
435 440 445

Asn Lys Asn Gln His Lys Arg Glu Ile Leu Thr Thr Pro Asn Arg Tyr
450 455 460

Thr Thr Pro Ser Lys Ala Arg Asn Gln Cys Leu Lys Glu Thr Pro Ile
465 470 475 480

Lys Ile Pro Val Asn Ser Thr Gly Thr Asp Lys Leu Met Thr Gly Val
485 490 495

Ile Ser Pro Glu Arg Arg Cys Arg Ser Val Glu Leu Asp Leu Asn Gln
500 505 510

Ala His Met Glu Glu Thr Pro Lys Arg Lys Gly Ala Lys Val Phe Gly
515 520 525

Ser Leu Glu Arg Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Leu Thr Arg Ser
530 535 540

Lys Arg Lys Gly Ser Ala Arg Asp Gly Pro Arg Arg Leu Lys Leu His
545 550 555 560

Tyr Asn Val Thr Thr Thr Arg Leu Val Asn Pro Asp Gln Leu Leu Asn

565 570 575

Glu Ile Met Ser Ile Leu Pro Lys Lys His Val Asp Phe Val Gln Lys

580 585 590
 Gly Tyr Thr Leu Lys Cys Gln Thr Gln Ser Asp Phe Gly Lys Val Thr
 595 600 605
 Met Gln Phe Glu Leu Glu Val Cys Gln Leu Gln Lys Pro Asp Val Val
 610 615 620
 Gly Ile Arg Arg Gln Arg Leu Lys Gly Asp Ala Trp Val Tyr Lys Arg
 625 630 635 640

Leu Val Glu Asp Ile Leu Ser Ser Cys Lys Val

645 650
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> An artificially synthesized peptide
 <400> 48

Arg Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Leu Gly Ile

1 5 10
 <210> 49
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial sequence
 <400> 49

gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 50
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial sequence
 <400> 50

tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 51
 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 51

tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 52

ctagcctctg gaatcctttc tctt 24