



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0080372
(43) 공개일자 2021년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/4748 (2013.01)
A61K 39/00119 (2018.08)
(21) 출원번호 10-2021-7010920
(22) 출원일자(국제) 2019년10월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년04월13일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2019/052980
(87) 국제공개번호 WO 2020/079448
국제공개일자 2020년04월23일
(30) 우선권주장
18201634.5 2018년10월19일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
더 프란시스 크릭 인스티튜트 리미티드
영국, 그레이터 런던 엔더블유1 1에이티 런던 미드랜드 로드 1
에나라 바이오 리미티드
영국, 옥스포드셔 옥스4 4지에이, 옥스포드, 1 로버트 로빈슨 애비뉴, 막달렌 센터 더 옥스포드 사이언스 파크
(72) 발명자
카시오티스 조지
영국, 런던 그레이터 런던 엔더블유1 1에이티, 1 미드랜드 로드, 씨/오 더 프란시스 크릭 인스티튜트 리미티드
영 조지
영국, 런던 그레이터 런던 엔더블유1 1에이티, 1 미드랜드 로드, 씨/오 더 프란시스 크릭 인스티튜트 리미티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 76 항

(54) 발명의 명칭 신규의 암 항원 및 방법

(57) 요약

암, 특히 흑색종, 특히 피부 흑색종 및 포도막 흑색종의 치료, 예방 및 진단에 유용한 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 개시한다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C12N 5/0639 (2013.01)

A61K 2039/876 (2018.08)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

아틱 잔

영국, 런던 그레이터 런던 엔더블유1 1에이티, 1
미드랜드 로드, 씨/오 더 프란시스 크릭 인스티튜
트 리미티드

스니더스 브람

영국, 런던 그레이터 런던 엔더블유1 1에이티, 1
미드랜드 로드, 씨/오 더 프란시스 크릭 인스티튜
트 리미티드

퍼킨스 데이비드

영국, 런던 그레이터 런던 엔더블유1 1에이티, 1
미드랜드 로드, 씨/오 더 프란시스 크릭 인스티튜
트 리미티드

마리노 파비오

영국, 런던 그레이터 런던 더블유씨2비 6에스티,
71 킹스웨이, 씨/오 에나라 바이오 리미티드

테네트 니콜라

영국, 런던 그레이터 런던 더블유씨2비 6에스티,
71 킹스웨이, 씨/오 에나라 바이오 리미티드

명세서

청구범위

청구항 1

(c) 서열번호 1-10 중 어느 하나의 서열; 및
 (d) (a)의 서열의 변이체(variant); 및
 (c) (a)의 서열의 면역원성 단편(immunogenic fragment)
 중에서 선택된 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드(isolated polypeptide).

청구항 2

제1항에 있어서,
 서열번호 11-32 및 51-78 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지는 단리된 펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,
 (i) 제1항 또는 제2항에 따르는 하나 이상의 다른 폴리펩티드, (ii) 흑색종 관련 항원인 다른 폴리펩티드, (iii) 면역반응을 증대시킬 수 있는 폴리펩티드 서열(즉 면역자극제 서열(immunostimulant sequence)) 및 (iv) 강한 CD4+ 도움을 제공하여 항원 에피토프(antigen epitope)에 대한 CD8+ T-세포반응을 증가시킬 수 있는, 예를 들어 범용(universal) CD4 헬퍼 에피토프를 포함하는 폴리펩티드 서열 중에서 선택된 제2 또는 추가의 폴리펩티드에 융합된 단리된 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는(encoding) 단리된 핵산.

청구항 5

제4항에 있어서,
 DNA인 핵산.

청구항 6

제5항에 있어서,
 서열번호 33-40 및 41-50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지는 핵산.

청구항 7

제6항에 있어서,
 인간 숙주 세포에서 발현에 코돈 최적화된(codon optimised) 핵산.

청구항 8

제4항에 있어서,
 RNA인 핵산.

청구항 9

제4항, 제5항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서,
 인공 핵산 서열인 핵산.

청구항 10

제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따르는 핵산을 포함하는 벡터(vector).

청구항 11

제10항에 있어서,

인간 숙주 세포에서 번역 활성 RNA 분자의 전사를 허용하기에 적합한 조절 요소(regulatory element)를 암호화하는 DNA를 포함하는 벡터.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

바이러스 벡터인 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서,

아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAV), 알파바이러스, 헤르페스 바이러스, 아레나 바이러스, 홍역 바이러스, 포스바이러스(poxvirus), 파라믹소바이러스, 렌티바이러스 및 라브도바이러스(rhabdovirus) 벡터인 벡터.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 면역원성 약학 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 백신 조성물.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서,

하나 이상의 면역자극제를 포함하는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

면역자극제가 알루미늄 염, 사포닌, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, 수중 유 유화액(oil-in-water emulsion), 아미노알킬 글루코사아미니드 4-포스페이트, 리포폴리사카라이드 및 이의 유도체 및 다른 TLR4 리간드, TLR7 리간드, TLR8 리간드, TLR9 리간드, IL-12 및 인터페론 중에서 선택되는 조성물.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

비경구 투여에 적합한 멸균 조성물인 조성물.

청구항 19

약제(medicine)에 사용하기 위한 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는, 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물.

청구항 20

인간에게 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 투여함을

포함하는, 인간에서 면역반응을 상승시키는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

면역 반응이, 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 변이체 및 면역원성 단편 중에서 선택된 서열을 발현하는 암성 종양(cancerous tumor)에 대하여 상승되는 방법.

청구항 22

인간에서 면역반응을 상승시키는데 사용하기 위한, 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는, 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서,

면역 반응이, 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 또는 변이체 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현하는 암성 종양에 대하여 상승되는, 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물.

청구항 24

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암을 앓고 있는 인간 환자를 치료하거나, 또는 암이 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수 있는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법으로서, 상기 인간에게 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는, 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 투여함을 포함하는 방법.

청구항 25

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현하는, 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는, 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물.

청구항 26

암을 앓고 있는 인간에서 암의 치료를 위해 상기 인간에게 자극 및/또는 증폭된 T-세포의 후속적인 재도입을 위한, 상기 인간으로부터 유래된 T-세포의 생체의 자극 및/또는 증폭에 사용하기 위한, 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는, 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물.

청구항 27

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는, 인간의 암 치료 방법으로서, 상기 인간으로부터 임의로 항원-제시 세포(antigen-presenting cell)와 함께 적어도 T-세포를 포함하는 백혈구의 집단(population)을 채취하고, 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물의 존재하에서 상기 T-세포를 자극 및/또는 증폭시키고, 적어도 자극 및/또는 증폭된 T-세포를 포함하는 상기 백혈구 중 일부 또는 전부를 인간에게 재도입시킴을 포함하는 방법.

청구항 28

제21항 및 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

암이 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종인 방법 또는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 사용하기 위한 조성물.

청구항 29

서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암 세포에 대하여 세포독성인 T-세포 집단의 제조 공정으로서, (a) 암 환자로부터 T-세포를 임의로 항원-제시 세포와 함께 수득하고 (ii) 상기 T-세포 집단을 생체외에서 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는, 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물로 자극하고 증폭시킴을 포함하는 공정.

청구항 30

제29항의 공정에 의해 수득될 수 있는 T-세포 집단.

청구항 31

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는, 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물로 자극된 T-세포.

청구항 32

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물의 생체의 로딩(*ex vivo* loading)에 의해 변형되거나 또는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드를 발현하도록 유전자 조작된 항원 제시 세포.

청구항 33

제32항에 있어서,

수지상 세포인 항원 제시 세포.

청구항 34

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물이 로딩되거나 또는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드를 발현하도록 유전자 조작된 세포로부터 제조된 폴리펩티드가 로딩된 엑소좀(exosome).

청구항 35

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따르는 T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포 또는 엑소좀을 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 약학 조성물.

청구항 36

약제에 사용하기 위한, 제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따르는 T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포 또는 엑소좀.

청구항 37

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암을 앓고 있는 인간을 치료하거나, 또는 암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수 있는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법으로서, 상기 인간에게 제30항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따르는 T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포, 엑소좀 또는 조성물을 투여함을 포함하는 방법.

청구항 38

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현하는, 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 제30항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따르는 T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포, 엑소좀 또는 조성물.

청구항 39

제29항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

암이 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종인 공정, 방법 또는 T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포, 엑소좀 또는 사용하기 위한 조성물.

청구항 40

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드에 면역특이적(immunospecific)인 단리된 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 41

제40항에 있어서,

단클론 항체(monoclonal antibody) 또는 이의 단편인 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서,

세포독성 모이어티(moiety)에 커플링(coupling)된 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 43

약제에 사용하기 위한, 제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따르는 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 44

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따르는 항원-결합 폴리펩티드를 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 약학 조성물.

청구항 45

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암을 앓고 있는 인간을 치료하거나, 또는 암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수 있는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법으로서, 상기 인간에게 제40항 내지 제42항 및 제44항 중 어느 한 항에 따르는 항원-결합 폴리펩티드 또는 조성물을 투여함을 포함하는 방법.

청구항 46

제40항 내지 제42항 및 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현하는, 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 항원-결합 폴리펩티드 또는 조성물.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서,

암이 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종인 방법, 항원-결합 폴리펩티드 또는 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드이거나 또는 이러한 폴리펩티드의 부분인 HLA-결합된 폴리펩티드에 면역특이적인 단리된 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 49

제48항에 있어서,

T-세포 수용체 또는 이의 단편인 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서,

대상체(subject)에서 세포독성 세포 또는 다른 면역 성분에 결합할 수 있는 또 다른 폴리펩티드에 커플링되는 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 51

표면 상에서 제48항 내지 제50항 중 어느 한 항의 항원-결합 폴리펩티드를 발현하도록 조작된 세포독성 세포.

청구항 52

제51항에 있어서,
T-세포인 세포독성 세포.

청구항 53

약제에 사용하기 위한, 제51항 또는 제52항에 따르는 세포독성 세포.

청구항 54

제51항 또는 제52항에 따르는 세포를 포함하는 약학 조성물.

청구항 55

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암을 앓고 있는 인간 환자를 치료하거나, 또는 암이 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수 있는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법으로, 상기 인간에게 제51항 또는 제52항에 따르는 세포를 투여함을 포함하는 방법.

청구항 56

제51항 또는 제52항에 있어서,

암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현하는, 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 세포독성 세포.

청구항 57

인간을 암을 앓고 있는 것으로서 진단하는 방법으로서, 상기 암의 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 또는 변이체 중에서 선택된 폴리펩티드 서열, 또는 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산을 발현하는지의 여부를 결정하는 단계, 및 상기 폴리펩티드 또는 상응하는 핵산이 상기 암 세포에서 과발현되는 경우 상기 인간을 암을 앓고 있는 것으로서 진단하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 58

피부 흑색종인 암을 앓고 있는 인간을 진단하는 방법으로서, 상기 암의 세포가 서열번호 2, 6, 7, 8 및 9 중 어느 하나 및 이의 면역원성 단편 또는 변이체의 선택된 폴리펩티드 서열, 또는 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산을 발현하는지의 여부를 결정하는 단계, 및 상기 폴리펩티드 또는 상응하는 핵산이 상기 암 세포에서 과발현되는 경우 상기 인간을 피부 흑색종인 암을 앓고 있는 것으로서 진단하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 59

피부 흑색종 또는 포도막 흑색종(uveal melanoma)인 암을 앓고 있는 인간을 진단하는 방법으로서, 상기 암의 세포가 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 및 이의 면역원성 단편 또는 변이체 중에서 선택된 폴리펩티드 서열, 또는 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산을 발현하는지의 여부를 결정하는 단계, 및 상기 폴리펩티드 또는 상응하는 핵산이 상기 암 세포에서 과발현되는 경우 상기 인간을 피부 흑색종 또는 포도막 흑색종인 암을 앓고 있는 것으로서 진단하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 60

암을 앓고 있는 인간의 치료 방법으로서,

(a) 상기 암의 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 또는 변이체 중에서 선택된 폴리펩티드 서열, 또는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산(예를 들어, 서열번호 33-40 및 서열번호 41-50의 서열 중에서 선택됨)을 발현하는지의 여부를 결정하는 단계; 및 이를 발현하는 경우

(b) 상기 인간에게 제1항 내지 제18항, 제30항 내지 제35항, 제40항 내지 제42항, 제44항, 제50항, 제51항 및 제53항 중 어느 한 항에 따르는 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터, 조성물, T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세

포, 엑소좀, 항원-결합 폴리펩티드 또는 세포독성 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 61

- (a) 서열번호 1-10 중 어느 하나의 서열; 또는
- (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- (c) 암을 앓고 있는 인간의 종양으로부터 분리된 (a)의 서열의 면역원성 단편

중에서 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드의 용도, 또는 상기 인간이 제1항 내지 제18항, 제30항 내지 제35항, 제40항 내지 제42항, 제44항, 제51항, 제52항 및 제54항 중 어느 한 항에 따르는 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터, 조성물, T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포, 엑소좀, 항원-결합 폴리펩티드 또는 세포독성 세포를 포함하는 백신에 의한 치료에 적합할 수 있는지의 여부를 결정하기 위한 생물마커(biomarker)로서, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 용도.

청구항 62

제60항 또는 제61항에 있어서,
암이 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종인 방법 또는 용도.

청구항 63

제21항 및 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,
폴리펩티드가

- (a) 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중 어느 하나의 서열; 및
- (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- (c) (a)의 서열의 면역원성 단편

중에서 선택된 서열을 포함하며, 예를 들어 폴리펩티드가 서열번호 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 및 76-77 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지고, 예를 들어 핵산이 서열번호 33, 35, 36 또는 40 중 어느 하나 중에서 선택되거나 또는 41, 43, 44, 45 및 50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지며, 암이 포도막 흑색종인, 방법 또는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 사용하기 위한 조성물.

청구항 64

제45항 또는 제46항에 있어서,
폴리펩티드가

- (a) 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중 어느 하나의 서열; 및
- (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- (c) (a)의 서열의 면역원성 단편

중에서 선택된 서열을 포함하며, 예를 들어 폴리펩티드가 서열번호 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 및 76-77 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지고, 예를 들어 핵산이 서열번호 33, 35, 36 또는 40 중 어느 하나 중에서 선택되거나 또는 41, 43, 44, 45 및 50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지며, 암이 포도막 흑색종인, 방법 또는 항원-결합 폴리펩티드 또는 사용하기 위한 조성물.

청구항 65

제29항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리펩티드가

(a) 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중 어느 하나의 서열; 및

(b) (a)의 서열의 변이체; 및

(c) (a)의 서열의 번역원성 단편

중에서 선택된 서열을 포함하며, 예를 들어 폴리펩티드가 서열번호 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 및 76-77 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지고, 예를 들어 핵산이 서열번호 33, 34, 36 또는 40 중 어느 하나 중에서 선택되거나 또는 41, 43, 44, 45 및 50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지며, 암이 포도막 흑색종인, 공정, 방법 또는 T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포, 엑소좀 또는 사용하기 위한 조성물.

청구항 66

제60항 또는 제61항에 있어서,

폴리펩티드가

(a) 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중 어느 하나의 서열; 및

(b) (a)의 서열의 변이체; 및

(c) (a)의 서열의 번역원성 단편

중에서 선택된 서열을 포함하며, 예를 들어 폴리펩티드가 서열번호 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 및 76-77 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지고, 예를 들어 핵산이 서열번호 33, 35, 36 또는 40 중 어느 하나 중에서 선택되거나 또는 41, 43, 44, 45 및 50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지며, 암이 포도막 흑색종인 방법 또는 용도.

청구항 67

제3항에 있어서,

서열번호 1, 2, 3 및 4의 서열; 또는 상기 각각의 서열에 대하여, 서열의 변이체 또는 서열의 번역원성 단편 중에서 선택된 2개 이상(예를 들어, 2, 3 또는 4개)의 서열을 포함하는 융합 폴리펩티드.

청구항 68

제67항에 있어서,

(i) (a) 서열번호 1의 서열; 및

(b) (a)의 서열의 변이체; 및

(c) (a)의 서열의 번역원성 단편

중에서 선택된 서열; 및

(ii) (a) 서열번호 2의 서열; 및

(b) (a)의 서열의 변이체; 및

(c) (a)의 서열의 번역원성 단편

중에서 선택된 서열; 및

(iii) (a) 서열번호 3의 서열; 및

(b) (a)의 서열의 변이체; 및

(c) (a)의 서열의 번역원성 단편

중에서 선택된 서열; 및

- (iv) (a) 서열번호 4의 서열; 및
- (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- (c) (a)의 서열의 면역원성 단편

중에서 선택된 서열

을 포함하는 융합 폴리펩티드.

청구항 69

제68항에 있어서,

서열번호 1, 2, 3 및 4의 서열을 포함하는 융합 폴리펩티드.

청구항 70

제68항에 있어서,

- (i) (a) 서열번호 1의 서열; 및
- (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- (c) (a)의 서열의 면역원성 단편

중에서 선택된 서열; 및

- (ii) (a) 서열번호 2의 서열; 및
- (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- (c) (a)의 서열의 면역원성 단편

중에서 선택된 서열; 및

- (iii) (a) 서열번호 4의 서열; 및
- (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- (c) (a)의 서열의 면역원성 단편

중에서 선택된 서열

을 포함하는 융합 폴리펩티드.

청구항 71

제70항에 있어서,

서열번호 1, 2 및 4의 서열을 포함하는 융합 폴리펩티드.

청구항 72

제67항 내지 제71항 중 어느 한 항에 따르는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 73

제72항에 있어서,

DNA인 핵산.

청구항 74

제73항에 따르는 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 75

제73항에 있어서,

인간 숙주 세포에서 번역 활성 RNA 분자의 전사를 허용하기에 적합한 조절 요소를 암호화하는 DNA를 포함하는 벡터.

청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서,

바이러스 벡터인 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 특히 흑색종(melanoma)(예를 들어 피부 흑색종(cutaneous melanoma) 또는 포도막 흑색종(uveal melanoma))을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 항원성 폴리펩티드 및 상응하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 특히 상기 핵산 및 폴리펩티드를 포함하는 약학 및 면역원성(immunogenic) 조성물, 상기 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드가 로딩(loading)되고/되거나 상기에 의해 자극된 면역세포, 상기 폴리펩티드에 특이적인 항체 및 상기 폴리펩티드를 인식하는 분자로 (자기유래 또는 달리) 유전자 조작된 세포에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 병원성 미생물에 대한 정상적인 면역감시(immunosurveillance)의 일환으로서, 모든 세포는 세포내 단백질을 분해시켜 모든 세포의 표면상에서 발견되는 주조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex; MHC) 부류 I 분자상에 로딩되는 펩티드를 생성시킨다. 숙주 세포로부터 유래되는 상기 펩티드의 대부분은 자기로 인식되며, 적응 면역계에 보이지 않는 채로 있다. 그러나, 외래(비-자기)의 펩티드는 상기 MHC I-펩티드 복합체에 단단히 결합하는 T-세포 수용체(TCR)를 암호화하는(encoding) 미경험 CD8+ T-세포의 확대를 자극할 수 있다. 상기 확대된 T-세포 집단(population)은 외래 항원-태그된 세포를 제거할 수 있는 효과기 CD8+ T-세포(세포독성 T-림프구 - CTL 포함)뿐만 아니라, 상기 외래 항원-태그된 세포가 동물의 생애에서 나중에 나타날 때 다시-증폭될 수 있는 기억 CD8+ T-세포를 생성시킬 수 있다.

[0003] MHC 부류 II 분자(이의 발현은 통상적으로 수지상 세포(DC)와 같은 전문 항원-제시 세포(antigen-presenting cell; APC)로 제한된다)는 대개 외인성 환경으로부터 내면화된 펩티드가 로딩된다. T-세포 부착 분자(CD54, CD48) 및 공-자극 분자(CD40, CD80, CD86)를 포함한 다양한 인자의 존재하에서 미경험 CD4+ T-세포로부터의 상보성 TCR의 MHC II-펩티드 복합체와의 결합은 CD4+ T-세포의 효과기 세포(예를 들어 T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_{FH} , T_{reg} 세포)로의 성숙화를 유도한다. 이들 효과기 CD4+T-세포는 항체-분비 형질세포로의 B-세포 분화를 촉진할 뿐만 아니라 항원-특이적 CD8+ CTL의 분화를 촉진할 수 있으며, 이에 의해 단기 효과기 기능 및 장기 면역학적 기억을 모두 포함한, 외래 항원에 대한 적응 면역 반응의 유도를 도울 수 있다. DC는 외부에서 유래된 항원(예를 들어 병원체 또는 종양 세포로부터 방출된 펩티드 또는 단백질)을 이의 MHC I 분자상으로 전달함으로써 펩티드 항원의 교차-제시 과정을 수행하여, 미경험 CD8+ T-세포의 확대를 자극하는 대안의 경로를 제공함으로써 면역학적 기억의 생성에 기여할 수 있다.

[0004] 면역 기억(구체적으로 항원-특이적 B 세포/항체 및 항원-특이적 CTL)은 미생물 감염을 억제하는데 중요한 역할을 하며, 면역 기억은 중요한 병원성 미생물에 의해 야기된 질병을 예방하는 다수의 백신을 개발하는데 활용되었다. 면역 기억은 또한 종양 형성의 억제에 핵심적인 역할을 하는 것으로 공지되어 있으나, 유효한 암 백신은 거의 개발되지 않았다.

[0005] 암은 사망률의 두 번째 선도 원인으로, 전 세계 모든 사망의 거의 1/6을 차지한다. 2015년 암으로 사망한 880만 명 가운데 가장 많은 목숨을 앗아간 암은 폐암(169만명), 간암(788,000명), 대장암(774,000명), 위암(754,000명), 유방암(571,000명)이었다. 2010년 암의 경제적 영향은 미화 1.16조 달러로 추산되었으며, 새로운 사례의 수는 향후 20년 동안 대략 70%까지 증가할 것으로 예상된다(World Health Organisation Cancer Facts 2017).

- [0006] 피부 흑색종에 대한 현행 요법은 다양하며 상기 종양의 위치 및 질병의 병기에 따라 크게 달라진다. 비-전이 흑색종에 대한 주요 치료는 종양과 주변 조직을 제거하는 수술이다. 말기 흑색종은 림프절 절제, 방사선요법 또는 화학요법을 포함하는 치료가 필요할 수 있다. 음성 면역조절제, 예를 들어 PD-1/PD-L1 및 CTLA4를 표적화하는 항체의 사용을 포함한 면역관문봉쇄 전략이 최근에 흑색종을 포함한 다양한 악성 종양에 대한 치료에 혁신을 가져왔다(Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018) *Science*, 359:1350-1355.). 관문봉쇄 요법의 놀라운 가치, 및 이의 임상적 이득과 환자 자신의 암에 대한 상기 환자의 적응 면역 반응(구체적으로 T-세포 기반 면역반응)과의 널리 알려진 연관성은 유효한 암 백신, 백신 양상, 및 암 백신 항원에 대한 조사를 다시 활성화하였다.
- [0007] 인간 내인성 레트로바이러스(HERV)는 외인성 감염성 레트로바이러스의 선조 생식계통 통합의 잔재이다. HERV는 바이러스 게놈에 측면 인접한 긴 말단 반복부(LTR)의 존재를 특징으로 하는 내인성 레트로요소(retroelement)의 그룹에 속한다. 상기 그룹은 또한 포유동물의 명백한 LTR 레트로트랜스포손(MaLR)을 포함하며 따라서 집합적으로 LTR 요소(본원에서 집합적으로 모든 LTR 요소를 의미하는 ERV로서 지칭된다)로서 공지되어 있다. ERV는 포유동물 게놈의 상당한 비율(8%)을 구성하며, 서열 상동성을 기반으로 대략 100개의 과로 분류될 수 있다. 다수의 ERV 서열이 LTR에 측면 인접된 *gag*, *pro*, *pol* 및 *env* 유전자로 이루어지는 원형 레트로바이러스 게놈 구조를 공유하는 결합성 프로바이러스를 암호화한다. 일부 온전한 ERV ORF는 HIV-1과 같은 외인성 감염성 레트로바이러스에 의해 암호화된 단백질과 특징을 공유하는 레트로바이러스 단백질을 생성시킨다. 상기와 같은 단백질은 효능 있는 면역 반응을 유도하는 항원으로서 작용하며(Hurst & Magiorkinis, 2015, *J. Gen. Virol* 96:1207-1218), 이는 ERV에 의해 암호화된 폴리펩티드가 T 및 B-세포 수용체 선택 과정 및 중추 및 말초 관용을 벗어날 수 있음을 암시한다. ERV 생성물에 대한 면역 반응성은 감염 또는 암에서 자발적으로 발생할 수 있으며, ERV 생성물은 일부 자가면역 질병의 원인으로 연루되었다(Kassiotis & Stoye, 2016, *Nat. Rev. Immunol.* 16:207-219).
- [0008] 진화 중 돌연변이 및 재조합 사건의 축적으로 인해, 대부분의 ERV-유래된 서열은 일부 또는 모든 이의 유전자에 대한 기능성 개방 판독 프레임 상실했으며 따라서 감염성 바이러스를 생성시키는 능력을 상실하였다. 그러나, 이들 ERV 요소는 다른 유전자들처럼 생식계통 DNA에서 유지되며 적어도 일부의 유전자에서 단백질을 생성시키는 능력을 여전히 갖는다. 실제로, HERV-암호화된 단백질이 다양한 인간 암에서 검출되었다. 예를 들어, HERV-K *env* 유전자, Rec 및 Np9의 이어맞추기 변이체(variant)는 악성 고환 생식세포에서만 발견되고 건강한 세포에서는 발견되지 않는다(Ruprecht et al., 2008, *Cell Mol Life Sci* 65:3366-3382). HERV 전사물의 증가된 수준이 또한 건강한 조직과 비교하여, 전립선암과 같은 암에서 관찰되었다(Wang-Johanning, 2003, *Cancer* 98:187-197; Andersson et al., 1998, *Int. J. Oncol.* 12:309-313). 추가로, HERV-E 및 HERV-H의 과발현이 면역억제성인 것으로 입증되었으며, 이는 또한 암 발생에 기여할 수 있다(Mangeney et al., 2001, *J. Gen. Virol.* 82:2515-2518). 그러나, HERV가 암의 발생 또는 병원성에 기여할 수 있는 정확한 기전(들)은 여전히 알려져 있지 않다.
- [0009] 주변 이웃 숙주 유전자 발현의 조절해제 외에, 새로운 게놈 부위에 대한 ERV 조절 요소(regulatory element)의 활성화 및 전이는 신규 전사물의 생성을 유도할 수 있으며, 그 중 일부는 발암 성질을 가질 수 있다(Babaian & Mager, *Mob. DNA*, 2016, , Lock et al., *PNAS*, 2014, 111:3534-3543).
- [0010] 광범위한 백신 양상이 공지되어 있다. 잘 설명된 한 가지 접근법은 면역반응(B 세포 및 T 세포 반응 포함)을 높이고 면역기억을 자극할 목적으로 항원성 폴리펩티드를 대상체(subject)에게 직접 전달함을 수반한다. 대안으로, 폴리뉴클레오티드를, 상기 폴리뉴클레오티드-암호화된 면역원성 폴리펩티드가 생체내에서 발현되도록 벡터(vector)를 사용하여 대상체에게 투여할 수 있다. 암에 대한 예방학적 백신접종 및 치료학적 치료전략 모두에서 항원의 전달을 위한 바이러스 벡터, 예를 들어 아데노바이러스 벡터의 용도가 잘 연구되었다(Wold et al. *Current Gene Therapy*, 2013, *Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy*, 13:421-433). 면역원성 펩티드, 폴리펩티드, 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 또한 환자-유래된 항원 제시 세포(APC)를 로딩하는데 사용할 수 있으며, 이어서 이를 치료학적 또는 예방학적 면역 반응을 이끌어내는 백신으로서 상기 대상체에게 주입할 수 있다. 상기 접근법의 일례는 프로벤지(Provenge)이며, 이는 현재 유일한 FDA-승인된 항암 백신이다.
- [0011] 암 항원이 또한 다양한 비-백신 치료 양상에 상기 항원을 사용함으로써 암의 치료 및 예방에 활용될 수 있다. 이들 요법은 2가지 상이한 부류: 1) 항원-결합 생물학적 제제, 2) 입양세포요법으로 나뉜다.
- [0012] 항원-결합 생물학적 제제는 전형적으로 항원으로 장식된 암세포를 인식하고 이의 파괴를 촉진하는 다가 조작된 폴리펩티드로 이루어진다. 상기 생물학적 제제의 항원-결합 성분은 비제한적으로 TCR, 고-친화성 TCR, 및 다양한 기술(단클론 항체(monoclonal antibody) 기술에 기반한 기술 포함)에 의해 생성된 TCR 유사물질을 포함한,

TCR-기반 생물학적 제제로 이루어질 수 있다. 이러한 유형의 다가 생물학적 제제의 세포용해 부분은 세포독성 화학물질, 생물학적 독소, 표적화 모티프(motif) 및/또는 면역세포의 표적화 및 활성화를 촉진하는 면역자극(immune stimulating) 모티프로 이루어질 수 있으며, 이 중 어느 것이든 종양 세포의 치료학적 파괴를 촉진한다.

- [0013] 입양세포요법은, 제거되고 백신 항원 제제(세포 및 무세포 성분을 포함하여, 다른 인자의 존재 또는 부재하에서 T-세포와 배양된)로 생체외에서 자극된, 환자 자신의 T-세포를 기반으로 할 수 있다(JCI Insight. 2018 Oct 4;3(19). pii: 122467. doi: 10.1172/jci.insight.122467). 대안으로, 입양세포요법은 암 항원을 인식하는 항원 결합 폴리펩티드를 발현하도록 의도적으로 조작된 세포(환자 또는 비-환자-유래된 세포 포함)를 기반으로 할 수 있다. 이들 항원-결합 폴리펩티드는 항원 결합 생물학적 제제에 대해 상술한 부류와 같은 부류에 속한다. 따라서, 암 항원-결합 폴리펩티드를 발현하도록 유전자 조작된 림프구(자기유래 또는 비-자기유래)를 암 치료를 위한 입양 세포 요법으로서 환자에게 투여할 수 있다.
- [0014] 암에 대한 유효 면역 반응을 높이기 위한 ERV-유래된 항원의 사용은 암의 쥐 모델에서 종양 퇴화 및 보다 유리한 예후를 촉진함에 있어서 유망한 결과를 나타내었다(Kershaw et al., 2001, Cancer Res. 61:7920-7924; Slansky et al., 2000, Immunity 13:529-538). 따라서, HERV 항원-중추 면역요법 시험이 인간에서 고려되었지만(Sacha et al., 2012, J.Immunol 189:1467-1479), 부분적으로, 확인된 종양 특이적 ERV 항원의 심각한 한계로 인해 진보가 제한되었다.
- [0015] WO 2005/099750은 HERV-K Me1 종양 항원에 대한 교차-반응성 면역반응을 높이는 데 통상적이고 흑색종에 대한 보호를 부여하는, 감염성 병원체에 대한 기존 백신의 고정된 서열을 식별한다.
- [0016] WO 00/06598은 흑색종에서 우선적으로 발현되는 HERV-AVL3-B 종양 관련 유전자의 식별, 및 상기 유전자의 발현을 특징으로 하는 상태의 진단 및 치료를 위한 방법 및 생성물에 관한 것이다.
- [0017] WO 2006/119527은 흑색종-관련된 내인성 레트로바이러스(MERV)로부터 유래된 항원성 폴리펩티드, 및 흑색종의 검출 및 진단뿐만 아니라 상기 질병의 예후를 위한 이의 용도를 제공한다. 항암 백신으로서 항원 폴리펩티드의 용도를 또한 개시한다.
- [0018] WO 2007/137279는 예를 들어 암세포 증식을 예방하거나 억제하기 위한 HERV-K+ 결합 항체의 용도와 함께, HERV-K+ 암의 검출, 예방 및 치료를 위한 방법 및 조성물을 개시한다.
- [0019] WO 2006/103562는 HERV-K의 env 유전자로부터의 면역억제성 Np9 단백질이 발현되는 암을 치료 또는 예방하는 방법을 개시한다. 발명은 또한 상기 단백질의 활성을 억제할 수 있는 핵산 또는 항체를 포함하는 약학 조성물, 또는 상기 단백질에 대한 면역반응을 유도할 수 있는 면역원 또는 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0020] WO 2007/109583은 종양 세포상의 HERV-E 항원에 반응성인 풍부한 면역세포 집단을 포함하는 조성물을 제공함으로써, 포유동물 대상체에서 신생물 질병을 예방하거나 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0021] 문헌[Humer J, et al., 2006, Canc. Res., 66:1658-63]은 흑색종-관련된 내인성 레트로바이러스로부터 유래된 흑색종 마커를 식별한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 암, 특히 흑색종, 특히 피부 및 포도막 흑색종의 면역요법에 사용될 수 있는 추가의 HERV-관련된 항원 서열을 식별할 필요가 있다.

과제의 해결 수단

- [0023] 발명자는 놀랍게도, 피부 흑색종 세포에서 높은 수준으로 발견되지만 정상적인 건강한 조직에서는 검출되지 않거나 또는 매우 낮은 수준으로 발견되는 LTR 요소를 포함하거나 LTR 요소에 인접한 게놈 서열로부터 유래되는 몇몇 RNA 전사물을 발견하였다(실시예 1 참조). 상기와 같은 전사물을 본원에서 암-특이적 LTR-요소 스페닝 전사물(CLT)이라 지칭한다. 더욱이, 발명자는 상기 CLT에 의해 암호화된 잠재적인 폴리펩티드 서열(즉 개방관독프레임(ORF))의 하위집합이 암세포에서 번역되고, 항원-처리 기구의 성분에 의해 처리되며, I 부류 및 II 부류 주조직적합성 복합체(MHC 부류 I, 및 MHC 부류 II) 및 I 부류 및 II 부류 인간백혈구항원(HLA 부류 I, HLA 부류 II) 분자와 함께 종양 조직에서 발견되는 세포의 표면에 제시됨을 나타내었다(실시예 2 참조). 이러한 발견은

상기 폴리펩티드(본원에서 CLT 항원이라 지칭됨)가 결론적으로 항원성임을 입증한다. 따라서, CLT 항원의 암세포 제시는 상기 세포를 상기 CLT 항원에 대한 동족 T-세포 수용체(TCR)를 갖는 T-세포에 의한 제거에 민감하게 만들것으로 예상되며, 상기 동족 TCR을 갖는 T-세포를 증폭시키는 CLT 항원-기반 백신화 방법/접생은 암세포(및 상기 세포를 함유하는 종양), 특히 흑색종, 특히 피부 흑색종 종양에 대한 면역반응을 이끌어낼 것으로 예상된다. 흑색종 대상체로부터의 T-세포는 실제로 본원에 개시된 CLT 항원으로부터 유래된 펩티드에 반응성이며 T-세포를 증폭시키고 T-세포 수용체 서열을 증폭시킨다(실시예 3 참조). 발명자는 CLT 항원에 특이적인 T-세포가 종추관용에 의해 정상적인 대상체의 T-세포 레퍼토리로부터 결실되지 않았음을 확인하였다(실시예 4 참조). 건강한 공여자 T-세포의 생체의 배양물에서 CLT 항원 특이적 T-세포의 존재 및 사멸 활성이 측정되었다(실시예 5 참조). 최종적으로, qRT-PCR 연구는 CLT가 비-흑색종 세포주와 비교하여 흑색종 세포주로부터 추출된 RNA에서 특이적으로 발현됨을 확인시켰다(실시예 7 참조).

[0024] 발명자는 또한 놀랍게도 피부 흑색종에서의 과발현뿐만 아니라 몇몇 CLT 항원-암호화 CLT가 포도막 흑색종에서도 또한 과발현됨을 발견하였다. 상기 CLT에 의해 암호화된 CLT 항원 폴리펩티드 서열은 포도막 흑색종 세포 및 상기 세포를 함유하는 종양에 대해 면역반응을 이끌어낼 것으로 예상된다.

[0025] 본 발명의 주제인 CLT 및 CLT 항원은 암 게놈 아틀라스에서 발견되는 공지된 종양 게놈 서열로부터 쉽게 유래될 수 있는 표준 서열이 아니다. 상기 CLT는 ERV 기원의 전사 조절 서열에 의해 구동되는 복잡한 전사 및 이어맞추기 사건으로부터 생성되는 전사물이다. 상기 CLT는 높은 수준으로 발현되고 CLT 항원 폴리펩티드 서열은 정상적인 인간 단백질의 서열이 아니기 때문에, 강력하고 특이적인 면역반응을 유도할 수 있을 것으로 예상되며(실제로 확립되었다 - 실시예 3-5 참조), 따라서 암 면역요법 상황에서 치료학적 용도에 적합하다.

[0026] 종양 세포를 특성화하는 고도로 발현된 전사물 중에서 발견된 CLT 항원은 본 발명 이전에는, 인간에서 존재하고 단백질 산물을 생성시키며 면역반응을 자극하는 것으로 공지되지 않았으며, 다수의 포맷으로 사용될 수 있다. 첫 번째, 본 발명의 CLT 항원 폴리펩티드를 종양 세포에 대해 치료학적 또는 예방학적 면역반응을 유도하는 백신으로서 대상체에게 직접 전달할 수 있다. 두 번째, 암호화된 CLT 항원의 발현을 증대시키도록 코돈 최적화(codon optimised)될 수 있는 본 발명의 핵산을 직접 투여하거나 또는 달리 생체내 전달을 위해 벡터에 삽입하여 대상체에서 종양 세포에 대해 치료학적 또는 예방학적 면역반응을 유도하는 백신으로서 상기 암호화된 단백질 생성물을 생성시킬 수 있다. 세 번째, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드를 사용하여 환자-유래된 항원 제시 세포(APC)를 로딩할 수 있으며, 이어서 이를 종양 세포에 대해 치료학적 또는 예방학적 면역반응을 유도하는 백신으로서 대상체내에 주입할 수 있다. 네 번째, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드를 대상체의 T-세포의 생체의 자극에 사용하여, 자극된 T-세포 제제를 생성시키고, 이를 암 치료를 위한 치료법으로서 대상체에게 투여할 수 있다. 다섯 번째, MHC I 분자에 복합체화된 CLT 항원을 인식하고 암세포를 사멸시키도록(또는 사멸을 촉진하도록) 추가로 변형된 T-세포 수용체(TCR) 또는 TCR 유사물질과 같은 생물학적 분자를 암 치료를 위한 치료법으로서 대상체에게 투여할 수 있다. 여섯 번째, MHC 세포에 복합체화된 CLT 항원을 인식하는 생물학적 분자의 키메라 버전을 T-세포(자기유래 또는 비-자기유래)내에 도입시킬 수 있으며, 생성되는 세포를 암 치료를 위한 치료법으로서 대상체에게 투여할 수 있다. 상기 및 다른 용도를 하기에 보다 상세히 기재한다.

[0027] 따라서, 본 발명은 특히

[0028] (a) 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 서열 및

[0029] (b) (a)의 서열의 변이체; 및

[0030] (c) (a)의 서열의 면역원성 단편(immunogenic fragment)

[0031] 중에서 선택된 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드(isolated polypeptide)(본원에서 이후에 "본 발명의 폴리펩티드"라 칭한다)를 제공한다.

[0032] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자(본원에서 이후에 "본 발명의 핵산"이라 칭한다)를 제공한다.

[0033] 본 발명의 폴리펩티드 및 본 발명의 핵산뿐만 아니라 본 발명의 관련 태양은 하기에 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 암 면역요법 및 예방학, 특히 흑색종의 면역요법 및 예방학의 다양한 구현예에 유용할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0034]

각각의 도 1 내지 15에 대해서, 상부 패널은 환자의 종양 샘플에서 단리된 펩티드의 추출된 MS/MS 스펙트럼(할당된 단편 이온과 함께)을 도시하고 하부 패널은 단편 이온에 대해 맵핑된 선형 펩티드 서열의 위치를 나타내는 스펙트럼의 렌더링(rendering)을 도시한다.

도 1. 환자 Mel-3의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 11의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 2. 환자 Mel-3의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 12의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 3. 환자 Mel-5의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 13의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 4. 환자 Mel-16의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 13의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 5. 환자 Mel-26의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 15의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 6. 환자 Mel-20의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 16의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 7. 환자 Mel-35의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 17의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 8. 환자 Mel-3의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 19의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 9. 환자 Mel-27의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 21의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 10. 환자 Mel-27의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 20의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 11. 환자 Mel-27의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 22의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 12. 환자 Mel-27의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 23의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 13. 환자 Mel-27의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 24의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 14. 환자 Mel-16의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 25의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 15. 환자 Mel-41의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 26의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 16은 서열번호 27에 기인한 환자 Mel-15의 면역펩티도믹(immunopeptidomic) 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 17은 서열번호 29에 기인한 환자 Mel-10의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 18은 서열번호 14에 기인한 환자 Mel-5의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 19는 서열번호 21에 기인한 환자 Mel-4의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 20은 서열번호 31에 기인한 환자 Mel-18의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 21은 서열번호 13에 기인한 환자 Mel-16의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 22는 서열번호 19에 기인한 환자 Mel-3의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 23은 서열번호 28에 기인한 환자 Mel-6의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 24는 서열번호 18에 기인한 환자 Mel-18의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 25는 서열번호 30에 기인한 환자 Mel-4의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 26은 서열번호 20에 기인한 환자 Mel-4의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

럼을 도시한다.

도 27은 서열번호 16에 기인한 환자 Me1-20의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 28은 서열번호 12에 기인한 환자 Me1-3의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

각각의 도 29 내지 42에 대해서, 상부 패널은 환자의 종양 샘플에서 단리된 펩티드의 추출된 MS/MS 스펙트럼(할당된 단편 이온과 함께)을 도시하고 하부 패널은 단편 이온에 대해 맵핑된 선형 펩티드 서열의 위치를 나타내는 스펙트럼의 랜더링을 도시한다.

도 29. 환자 Me1-40의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 51의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 30. 환자 Me1-41의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 51의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 31. 환자 Me1-27의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 52의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 32. 환자 Me1-39의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 52의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 33. 환자 2MT3의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 13의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 34. 환자 2MT10의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 13의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 35. 환자 2MT3의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 12의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 36. 환자 2MT4의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 16의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 37. 환자 2MT3의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 17의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 38. 환자 1MT1의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 53의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 39. 환자 2MT3의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 51의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 40. 환자 2MT3의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 19의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 41. 환자 2MT1의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 19의 펩티드에 대한 스펙트럼.

도 42. 환자 2MT12의 종양 샘플로부터 단리된 서열번호 54의 펩티드에 대한 스펙트럼.

각각의 도 43 내지 50은 같은 서열에 상응하는 합성 펩티드의 고유 스펙트럼(하부)에 대한 환자 종양 샘플로부터 단리된 펩티드의 고유 MS/MS 스펙트럼(상부)의 정렬을 도시한다.

도 43은 서열번호 13에 기인한 환자 2MT3의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 44는 서열번호 12에 기인한 환자 2MT3의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 45는 서열번호 16에 기인한 환자 2MT4의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 46은 서열번호 17에 기인한 환자 2MT3의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 47은 서열번호 53에 기인한 환자 1MT1의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 48은 서열번호 51에 기인한 환자 2MT3의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 49는 서열번호 19에 기인한 환자 2MT3의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 50은 서열번호 54에 기인한 환자 2MT12의 면역펩티도믹 분석으로부터의 펩티드 단편의 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다.

도 51 패널 A 내지 C는 특정한 중앙 항원-유래된 펩티드와의 배양에 반응하는 환자 PBMC 배양물로부터의 중앙 항원-특이적 T-세포 증폭을 도시한다.

도 52 패널 A 내지 D는 흑색종 환자 PBMC로부터의 특정한 TCR-함유 T-세포를 증폭시킬 수 있는 CLT 항원-유래된 펩티드(서열번호 55 내지 서열번호 72)의 요약을 제공한다.

도 53은 CLT 항원 1로부터의 HLA-A*0201-제한 펩티드(서열번호 73)에 대한 정상 공혈자로부터의 CD8 T-세포 반응을 도시한다.

도 54는 CLT 항원 2로부터의 HLA-A*0201-제한 펩티드(서열번호 75)에 대한 정상 공혈자로부터의 CD8 T-세포 반응을 도시한다.

도 55는 CLT 항원 4로부터의 HLA-A*0201-제한 펩티드(서열번호 76)에 대한 정상 공혈자로부터의 CD8 T-세포 반응을 도시한다.

도 56 패널 A 내지 D는 같은 공여자로부터의 미경험 CD45RO-음성 CD8 T-세포와 비교된, 기억 CD45RO-양성 CD8 T-세포에서 각각 CLT 항원 1 및 CLT 항원 4로부터의 HLA-B*0702 제한 펩티드(서열번호 74 및 77)에 대한 반응성을 도시한다.

도 57은 CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드(서열번호 73), CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드(서열번호 78) 및 CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드(서열번호 77)에 특이적인 정상 CD8 T-세포의 HLA 오량체 염색을 도시한다.

도 58은 CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드(서열번호 77)로 펄스화된 C1RB7-표적 세포를 사멸시키는 확대된, 오량체-분류된 CD8 T-세포를 도시한다.

도 59 패널 A 내지 C는 흑색종 암세포주에서 CLT 항원 1을 암호화하는 CLT(서열번호 33), CLT 항원 2를 암호화하는 CLT(서열번호 34) 및 CLT 항원 3 및 4를 암호화하는 CLT(서열번호 35)의 전사를 입증하는 qRT-PCR 분석 결과를 도시한다.

서열의 설명

서열번호 1은 CLT 항원 1의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 2는 CLT 항원 2의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 3은 CLT 항원 3의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 4는 CLT 항원 4의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 5는 CLT 항원 5의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 6은 CLT 항원 6의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 7은 CLT 항원 7의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 8은 CLT 항원 8의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 9는 CLT 항원 9의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 10은 CLT 항원 10의 폴리펩티드 서열이다

서열번호 11 내지 14는 CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열이다

서열번호 15 및 16은 CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열이다

서열번호 17 및 18은 CLT 항원 3으로부터 유래된 펩티드 서열이다

서열번호 19는 CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열이다

서열번호 20 내지 22는 CLT 항원 5로부터 유래된 펩티드 서열이다

서열번호 23 및 24는 CLT 항원 6으로부터 유래된 펩티드 서열이다

서열번호 25는 CLT 항원 7로부터 유래된 펩티드 서열이다

서열번호 26은 CLT 항원 8로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 27 내지 29는 CLT 항원 9로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 30 내지 32는 CLT 항원 10으로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 33은 CLT 암호화 CLT 항원 1의 cDNA 서열이다
 서열번호 34는 CLT 암호화 CLT 항원 2의 cDNA 서열이다
 서열번호 35는 CLT 암호화 CLT 항원 3 및 4의 cDNA 서열이다
 서열번호 36은 CLT 암호화 CLT 항원 5의 cDNA 서열이다
 서열번호 37은 CLT 암호화 CLT 항원 6의 cDNA 서열이다
 서열번호 38은 CLT 암호화 CLT 항원 7 및 8의 cDNA 서열이다
 서열번호 39는 CLT 암호화 CLT 항원 9의 cDNA 서열이다
 서열번호 40은 CLT 암호화 CLT 항원 10의 cDNA 서열이다
 서열번호 41은 CLT 항원 1을 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 42는 CLT 항원 2를 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 43은 CLT 항원 3을 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 44는 CLT 항원 4를 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 45는 CLT 항원 5를 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 46은 CLT 항원 6을 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 47은 CLT 항원 7을 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 48은 CLT 항원 8을 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 49는 CLT 항원 9를 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 50은 CLT 항원 10을 암호화하는 cDNA 서열이다
 서열번호 51 내지 52는 CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 53은 CLT 항원 3으로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 54는 CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 55 내지 57는 CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 58 내지 66은 CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 67 내지 69는 CLT 항원 3로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 70 내지 72는 CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 73 내지 74는 CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 75는 CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 76 내지 77은 CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열이다
 서열번호 78은 CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열이다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 폴리펩티드

[0036] "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"란 용어는 본원에서 호환 가능하게 사용되며 길이, 동시-번역 또는 후-번역 변형과 관계 없이 아미노산의 임의의 펩티드-연결된 체를 지칭한다.

- [0037] "아미노산"이란 용어는 천연 발생 아미노산뿐만 아니라 상기 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 유사물질 중 어느 하나를 지칭한다. 천연 발생 아미노산은 유전 암호에 의해 암호화된 20개의 L-아미노산뿐만 아니라, 나중에 변형된 아미노산, 예를 들어 하이드록시프롤린, γ -카복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. "아미노산 유사체"란 용어는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉 수소, 카복실기, 아미노기, 및 R기에 결합하는 α 탄소를 갖지만 천연 발생 아미노산에 비해 변형된 R기 또는 변형된 펩티드 주쇄를 갖는 화합물을 지칭한다. 예로는 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설펍사이드, 메티오닌 메틸 설펍염 및 노르류신을 포함한다. 아미노산 유사물질은 아미노산의 일반적인 화학 구조와 상이하지만 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 구조를 갖는 화학적 화합물을 지칭한다. 적합하게 아미노산은 천연 발생 아미노산 또는 아미노산 유사체, 특히 천연 발생 아미노산 및 특히 유전 암호에 의해 암호화된 20개의 L-아미노산 중 하나이다.
- [0038] 아미노산은 본원에서 통상적으로 공지된 3문자 기호 또는 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission에 의해 권장되는 1-문자 기호에 의해 지칭될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드를 이의 통상적으로 허용되는 1-문자 암호로 지칭할 수 있다.
- [0039] 따라서, 본 발명은
- [0040] (a) 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 서열; 및
- [0041] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0042] (c) (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0043] 중에서 선택된 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0044] 본 발명은 또한
- [0045] (a) 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 서열 마이너스 초기 메티오닌 잔기; 및
- [0046] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0047] (c) (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0048] 중에서 선택된 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0049] 일반적으로, 본 발명의 폴리펩티드 서열의 변이체는 고도의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들어 변이체는 적합하게는 이의 전체 길이에 걸쳐 관련된 참조 서열과 적어도 약 80% 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 85% 동일성 및 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 동일성(예를 들어 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%)을 갖는다.
- [0050] 적합하게 상기 변이체는 면역원성 변이체이다. 변이체는 예를 들어 림프증식(예를 들어 T-세포 증식)을 통한 세포의 활성화, 배양 상등액 중 사이토카인(예를 들어 IFN-감마)의 생성(ELISA 등에 의해 측정된) 또는 세포내 및 세포외 염색(예를 들어 면역 마커, 예를 들어 CD3, CD4, CD8, IL2, TNF-알파, IFN γ , 1형 IFN, CD40L, CD69 등에 특이적인 항체 사용)에 이은 유식 세포 분석기에 의한 분석에 의한 T-세포 반응의 특성화를 측정하는, 항원으로서 폴리펩티드를 갖는 PBMC 또는 전혈의 시험관내 재자극 분석(예를 들어 수년 내지 1년, 예를 들어 6개월 이하, 1일 내지 1개월 또는 1 내지 2주 기간 동안의 재자극)에서, 참조 서열의 활성의 적어도 20%, 적합하게는 적어도 50% 및 특히 적어도 75%(예를 들어 적어도 90%)인 반응을 이끌어내는 면역원성 변이체인 것으로 간주된다(즉 상기 변이체의 서열이 변이체이다).
- [0051] 상기 변이체는 예를 들어 보존적으로 변형된 변이체일 수 있다. "보존적으로 변형된 변이체"는 변경(들)이 기능적으로 유사한 아미노산에 의한 아미노산의 치환 또는 상기 변이체의 생물학적 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 잔기의 치환/결실/부가를 생성시키는 것이다. 전형적으로, 변이체의 상기와 같은 생물학적 기능은 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종 암 항원에 대한 면역 반응을 유도하게 될 것이다.
- [0052] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당해 분야에 주지되어 있다. 변이체는 다른 종에서 발견되는 폴리펩티드의 동족체를 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다양한 폴리펩티드는 참조 서열과 비교하여 다수의 치환, 예를 들어 보존적 치환(예를 들어 1-25, 예를 들어 1-10, 특히 1-5, 및 특히 하나의 아미노산 잔기(들)가 변경될 수 있다)을 함유할 수 있다. 치환, 예를 들어 보존적 치환의 수는 참조 서열 잔기 수의 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하, 예를 들어

1% 이하일 수 있다. 일반적으로, 보존적 치환은 하기에 명시된 아미노산 그룹 중 하나 내에 있을 것이지만, 일부 상황에서 항원의 면역원성 성질에 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 다른 치환이 가능할 수 있다. 하기 8 개 그룹은 각각 서로에 대해 전형적인 보존적 치환인 아미노산을 함유한다:

- [0054] 1) 알라닌(A), 글리신(G);
- [0055] 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);
- [0056] 3) 아스파라진(N), 글루타민(Q);
- [0057] 4) 아르기닌(R), 리신(K);
- [0058] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V);
- [0059] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);
- [0060] 7) 세린(S), 쓰레오닌(T); 및
- [0061] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)

[0062] (예를 들어 Creighton, Proteins 1984 참조).

[0063] 적합하게 상기와 같은 치환은 에피토프의 면역학적 구조를 변경시키지 않으며(예를 들어 상기 치환은 1차 서열에서 맵핑시 에피토프 영역내에서 발생하지 않으며), 따라서 항원의 면역원성 성질에 현저한 영향을 미치지 않는다.

[0064] 폴리펩티드 변이체는 또한 추가적인 아미노산이 참조 서열에 비해 삽입된 것을 포함한다, 예를 들어 상기와 같은 삽입은 1-10 위치(예를 들어 1-5 위치, 적합하게는 1 또는 2 위치, 특히 1 위치)에서 발생할 수 있으며, 예를 들어 각각의 위치에서 50 이하(예를 들어 20 이하, 특히 10 이하, 특히 5 이하)의 아미노산의 부가를 수반할 수 있다. 적합하게 상기와 같은 삽입은 에피토프의 영역에서 발생하지 않으며, 따라서 항원의 면역원성 성질에 현저한 영향을 미치지 않는다. 삽입의 일례는 문제 항원의 발현 및/또는 정제를 돕기 위한 히스티딘 잔기의 짧은 신장부(예를 들어 2-6 잔기)를 포함한다.

[0065] 폴리펩티드 변이체는 아미노산이 참조 서열에 비해 결실된 변이체를 포함한다, 예를 들어 상기와 같은 결실은 1-10 위치(예를 들어 1-5 위치, 적합하게는 1 또는 2 위치, 특히 1 위치)에서 발생할 수 있으며, 예를 들어 각각의 위치에서 50 이하(예를 들어 20 이하, 특히 10 이하, 특히 5 이하)의 아미노산의 결실을 수반할 수 있다. 적합하게 상기와 같은 결실은 에피토프의 영역에서 발생하지 않으며, 따라서 항원의 면역원성 성질에 현저한 영향을 미치지 않는다.

[0066] 당업자는 특정한 단백질 변이체가 치환, 결실 및 부가(또는 이들의 임의의 조합)를 포함할 수 있음을 알 것이다. 예를 들어 치환/결실/부가는 목적하는 환자 HLA 분자에 결합시 증대되어(또는 중립 효과를 가져), 면역원성을 잠재적으로 증가시킬 수도 있다(또는 면역원성을 변화시키지 않은 채로 둔다).

[0067] 본 발명에 따른 면역원성 단편은 전형적으로 CLT 항원의 길이에 따라 완전길이 폴리펩티드 서열로부터 적어도 9 개의 인접한 아미노산(contiguous amino acid)(예를 들어 적어도 9 또는 10개), 예를 들어 적어도 12개의 인접한 아미노산(예를 들어 적어도 15 또는 적어도 20개의 인접한 아미노산), 특히 적어도 50개의 인접한 아미노산, 예를 들어 적어도 100개의 인접한 아미노산(예를 들어 적어도 200개의 인접한 아미노산)을 포함할 것이다. 적합하게 상기 면역원성 단편은 완전길이 폴리펩티드 서열의 길이의 적어도 10%, 예를 들어 적어도 20%, 예를 들어 적어도 50%, 예를 들어 적어도 70% 또는 적어도 80%일 것이다.

[0068] 면역원성 단편은 전형적으로 적어도 하나의 에피토프를 포함한다. 에피토프는 B 세포 및 T-세포 에피토프를 포함하며 적합하게 면역원성 단편은 적어도 하나의 T-세포 에피토프, 예를 들어 CD4+ 또는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다.

[0069] T-세포 에피토프는 HLA 분자에 결합시 T-세포(예를 들어 CD4+ 또는 CD8+ T-세포)에 의해 인식되는 아미노산의 짧은 인접한 신장부이다. T-세포 에피토프의 식별은 당업자에 주지된 에피토프 맵핑 실험을 통해 성취될 수 있다(예를 들어 Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (1993); Beißbarth et al., 2005, *Bioinformatics*, 21(Suppl. 1):i29-i37 참조).

[0070] 암에서 T-세포 반응의 중요한 연루의 결과로서, 적어도 하나의 T-세포 에피토프를 함유하는 서열번호 1-10의 완

전질이 폴리펩티드의 단편이 면역원성일 수 있고 면역보호에 기여할 수 있음은 쉽게 자명하다.

- [0071] 인간과 같은 다양한 이계 집단에서, 상이한 HLA 유형은 특정 에피토프가 상기 집단의 모든 구성원에 의해 인식되지 않을 수도 있는 것으로 이해될 것이다. 결과적으로, 폴리펩티드에 대한 면역반응의 인식 수준 및 규모를 최대화하기 위해서, 일반적으로 면역원성 단편이 완전질이 서열로부터 다수의 에피토프(적합하게는 CLT 항원내의 모든 에피토프)를 함유하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0072] 유용할 수 있는 서열번호 1-10의 폴리펩티드의 특정 단편은 적어도 하나의 CD8+ T-세포 에피토프, 적합하게는 적어도 2개의 CD8+ T-세포 에피토프 및 특히 모든 CD8+ T-세포 에피토프를 함유하는 것, 특히 다수의 HLA 대립유전자와 관련된 것, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 이상의 대립유전자와 관련된 것을 포함한다. 유용할 수 있는 서열번호 1-10의 폴리펩티드의 특정 단편은 적어도 하나의 CD4+ T-세포 에피토프, 적합하게는 적어도 2개의 CD4+ T-세포 에피토프 및 특히 모든 CD4+ T-세포 에피토프를 함유하는 것(특히 다수의 HLA 대립유전자와 관련된 것, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 이상의 대립유전자와 관련된 것)을 포함한다. 그러나, 백신 설계의 업자는 외인성 CD4+ T-세포 에피토프를 본 발명의 CD8+ T-세포 에피토프와 병용하여 본 발명의 CD8+ T-세포 에피토프에 대한 목적하는 반응을 성취할 수 있었다.
- [0073] 완전질이 폴리펩티드의 개별적인 단편을 사용하는 경우, 상기와 같은 단편은, 예를 들어 림프증식(예를 들어 T-세포 증식)을 통한 세포의 활성화, 배양 상등액 중 사이토카인(예를 들어 IFN-감마)의 생성(ELISA 등에 의해 측정된) 또는 세포내 및 세포외 염색(예를 들어 면역 마커, 예를 들어 CD3, CD4, CD8, IL2, TNF-알파, IFN-감마, 1형 IFN, CD40L, CD69 등에 특이적인 항체 사용)에 이은 유식 세포 분석기에 의한 분석에 의한 T-세포 반응의 특성화를 측정하는, 항원으로서 폴리펩티드를 갖는 PBMC 또는 전혈의 시험관내 재 자극 분석(예를 들어 수년 내지 1년, 예를 들어 6개월 이하, 1일 내지 1개월 또는 1 내지 2주 기간 동안의 재 자극)에서, 참조 서열의 활성의 적어도 20%, 적합하게는 적어도 50% 및 특히 적어도 75%(예를 들어 적어도 90%)인 반응을 이끌어내는 경우 면역원성인 것으로 간주된다(즉 상기 단편의 서열은 단편이다).
- [0074] 일부 상황에서 완전질이 폴리펩티드(중복일 수도, 또는 중복이지 않을 수도 있으며 완전질이 서열 전체를 포함할 수도, 또는 포함하지 않을 수도 있다)의 다수의 단편을 사용하여 상기 완전질이 서열 자체에 동등한 생물학적 반응을 획득할 수 있다. 예를 들어, 상술한 바와 같은 적어도 2개의 면역원성 단편(예를 들어 3, 4 또는 5개)은 함께 PBMC 또는 전혈의 시험관내 재 자극 분석(예를 들어 T-세포 증식 및/또는 IFN-감마 생성 분석)에서 참조 서열의 적어도 50%, 적합하게는 적어도 75% 및 특히 적어도 90% 활성을 제공한다.
- [0075] 서열번호 1-10의 폴리펩티드의 예시적인 면역원성 단편, 및 따라서 본 발명의 예시적인 펩티드는 서열번호 11-32의 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지는 폴리펩티드를 포함한다. 서열번호 1-4의 폴리펩티드의 추가의 예시적인 면역원성 단편, 및 따라서 본 발명의 예시적인 펩티드는 서열번호 51-78의 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지는 폴리펩티드를 포함한다. 서열번호 11-17, 19-28, 30-31 및 51-54의 서열은 면역펩티도믹 분석으로부터 HLA 부류 I 분자에 결합되는 것으로 확인되었다(실시예 2 및 2.1 참조). 서열번호 18, 29 및 32의 서열은 면역펩티도믹 분석으로부터 HLA 부류 II 분자에 결합되는 것으로 확인되었다(실시예 2 참조). 서열번호 55-78의 서열은 NetMHC 소프트웨어에 의해 HLA 부류 I 분자에 결합되는 것으로 예측되었으며 면역학적 검증 분석에 사용되었다(실시예 3, 4 및 5 참조).
- [0076] 핵산
- [0077] 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산(본 발명의 핵산이라 칭한다)을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 핵산은 서열번호 33-40 또는 41-50 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어진다.
- [0078] "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"란 용어는 본원에서 호환 가능하게 사용되며 뉴클레오티드 단량체 특히 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 단량체로부터 제조된 중합체성 거대분자를 지칭한다. 상기 용어는, 천연 발생 및 비천연발생이고, 참조 핵산과 유사한 성질을 가지며, 참조 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되거나 또는 시스템 중에서 연장된 반감기를 갖도록 되어 있는 공지된 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 주쇄 잔기 또는 연결을 함유하는 핵산을 포함한다. 상기와 같은 유사체의 예는 비제한적으로 포스포로티오에이트, 포스포아미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산(PNA)을 포함한다. 적합하게 "핵산"이란 용어는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 단량체의 천연 발생 중합체를 지칭한다. 적합하게 본 발명의 핵산 분자는 재조합체이다. 재조합체는 핵산 분자가 클로닝, 제한 또는 결합 단계, 또는 자연에서 발견되는 핵산 분자(예를 들어 cDNA의 경우에)와 별개의 핵산 분자를 생성시키는 다른 과

정의 생성물임을 의미한다. 하나의 구현예에서 본 발명의 핵산은 인공 핵산 서열(예를 들어 비-천연 발생 코돈 사용을 갖는 cDNA 서열 또는 핵산 서열)이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 핵산은 DNA이다. 대안으로, 본 발명의 핵산은 RNA이다.

- [0079] DNA(데옥시리보핵산) 및 RNA(리보핵산)는 각각 데옥시리보실 및 리보실 부분인 당 부분의 주쇄를 갖는 핵산 분자를 지칭한다. 당 부분은 4개의 천연 염기(DNA에서 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C) 및 티민(T), 및 RNA에서 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C) 및 우라실(U))인 염기에 연결될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "상응하는 RNA"는 참조 DNA와 동일한 서열을 갖지만, DNA에서의 티민(T)이 RNA에서 우라실(U)로 치환된 RNA이다. 상기 당 부분은 또한 비천연 염기, 예를 들어 이노신, 잔토신, 7-메틸구아노신, 디하이드로유리딘 및 5-메틸시티딘에 연결될 수 있다. 당(데옥시리보실/리보실) 부분간의 천연 포스포디에스테르 연결은 임의로 포스포로티오에이트 연결로 대체될 수 있다. 본 발명의 적합한 핵산은 당 부분 사이에 포스포디에스테르 연결을 갖는 데옥시리보실 또는 리보실 당 주쇄에 부착된 천연 염기로 이루어진다.
- [0080] 하나의 구현예에서 본 발명의 핵산은 DNA이다. 예를 들어 상기 핵산은 서열번호 33-40 또는 41-50 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어진다. 동일한 아미노산 서열을 암호화하지만 유전 암호의 축퇴에 기반한 상이한 핵산을 갖는 서열번호 33-40 또는 41-50 중에서 선택된 서열의 변이체를 포함하거나 또는 상기 변이체로 이루어지는 핵산을 또한 제공한다.
- [0081] 따라서, 상기 유전 암호의 축퇴로 인해, 다수의 상이하지만 기능적으로 동일한 핵산은 임의의 주어진 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 암호화한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 명시되는 모든 위치에서, 상기 코돈은 상기 암호화된 폴리펩티드를 변경시키지 않으면서 기재된 상응하는 코돈 중 어느 하나로 변경될 수 있다. 상기와 같은 핵산 변이는 보존적으로 변형된 변이의 한 종인 "침묵"(때때로 "퇴화" 또는 "매우 밀접한")으로서 지칭된다) 변이체를 도출한다. 폴리펩티드를 암호화하는 본원에 개시된 모든 핵산 서열은 또한 상기 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 가능하게 한다. 당업자는 핵산 중의 각 코돈(통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 UGG 제외)을 기능적으로 동일한 분자를 생성시키도록 변형시킬 수 있음을 알 것이다. 상응하게, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 각 침묵 변이는 각각의 기재된 서열에 내포되고 본 발명의 태양으로서 제공된다.
- [0082] 퇴화 코돈 치환을 또한 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3의 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성시킴으로써 성취할 수 있다(Batzer *et al.*, 1991, Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260:2605-2608; Rossolini *et al.*, 1994, Mol. Cell. Probes 8:91-98).
- [0083] 서열번호 33-40 또는 41-50 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지는 본 발명의 핵산은 참조 서열과 비교하여 다수의 침묵 변이(예를 들어 1-50, 예를 들어 1-25, 특히 1-5, 및 특히 1 코돈(들)이 변경될 수 있다)를 함유할 수 있다.
- [0084] 하나의 구현예에서 본 발명의 핵산은 RNA이다. 본원에 제공된 DNA 서열에 상응하고 데옥시리보뉴클레오타이드 주쇄 대신에 리보뉴클레오타이드 주쇄를 가지며 티민(T) 대신에 측쇄 염기 우라실(U)을 갖는 RNA 서열을 제공한다.
- [0085] 따라서 본 발명의 핵산은 서열번호 33-40 또는 41-50 중에서 선택된 cDNA 서열의 RNA 균등물을 포함하거나 또는 이로 이루어지며 참조 서열과 비교하여 다수의 침묵 변이(예를 들어 1-50, 예를 들어 1-25, 특히 1-5, 및 특히 1 코돈(들)이 변경될 수 있다)를 함유할 수 있다. "RNA 균등물"은 참조 cDNA 서열과 동일한 유전 정보를 함유하는 RNA 서열을 의미한다(즉 데옥시리보뉴클레오타이드 주쇄 대신에 리보뉴클레오타이드 주쇄와 동일한 코돈을 함유하고 티민(T) 대신에 측쇄 염기 우라실(U)을 갖는다).
- [0086] 본 발명은 또한 상기 언급한 cDNA 및 RNA 서열에 상보성인 서열을 포함한다.
- [0087] 하나의 구현예에서, 본 발명의 핵산을 인간 숙주 세포에서의 발현에 코돈 최적화한다.
- [0088] 본 발명의 핵산은 전사되고 DNA 핵산의 경우에 본 발명의 폴리펩티드로 번역되며 RNA 핵산의 경우에 본 발명의 폴리펩티드로 번역될 수 있다.
- [0089] **폴리펩티드 및 핵산**
- [0090] 적합하게, 본 발명에 사용되는 폴리펩티드 및 핵산을 단리한다. "단리된" 폴리펩티드 또는 핵산은 이의 원래 환경으로부터 제거된 것이다. 예를 들어, 천연 발생 폴리펩티드 또는 핵산은, 천연 시스템 중에 공존하는 물질 중 일부 또는 전부와 분리되는 경우, 단리된다. 핵산은 예를 들어 천연 환경의 일부가 아닌 백터내에 클로닝되는

경우 단리되는 것으로 간주된다.

- [0091] "천연 발생(naturally occurring)"은 폴리펩티드 또는 핵산 서열과 관련하여 사용되는 경우 자연에서 발견되고 합성적으로 변형되지 않은 서열을 의미한다.
- [0092] "인공"은 폴리펩티드 또는 핵산 서열과 관련하여 사용되는 경우 자연에서 발견되지 않는, 예를 들어 천연 서열의 합성 변형이거나 또는 비천연 서열을 함유하는 서열을 의미한다.
- [0093] "이중"이란 용어는 하나의 핵산 또는 폴리펩티드와 또 다른 핵산 또는 폴리펩티드와의 관계와 관련하여 사용되는 경우 상기 2개 이상의 서열이 서로 자연에서와 동일한 관계로 발견되지 않음을 가리킨다. "이중" 서열은 또한 천연 발생 핵산 또는 숙주 유기체에서 발견되는 폴리펩티드 서열로부터 단리되거나, 유래되거나 기초하지 않은 서열을 의미할 수 있다.
- [0094] 상기에 나타난 바와 같이, 폴리펩티드 변이체는 바람직하게는 이의 전체 길이에 걸쳐 관련된 참조 서열과 적어도 약 80% 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 85% 동일성 및 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 동일성(예를 들어 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%)을 갖는다.
- [0095] 2개의 밀접하게 관련된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 비교할 목적으로, 제1 서열과 제2 서열간의 "서열 동일성%"를 계산할 수 있다. 폴리펩티드 서열은 다른 폴리펩티드 서열과, 이들이 전체 길이에 걸쳐 100% 서열 동일성을 공유하는 경우 같거나 또는 동일하다고 한다. 서열 중의 잔기를 좌측에서 우측으로, 즉 폴리펩티드의 경우 N- 에서 C-말단으로 넘버링한다. 2개 이상의 폴리펩티드 서열의 상황에서 "동일한" 또는 "동일성" 백분율이란 용어는 비교창에 걸쳐 최대의 상응성으로 비교하고 정렬시킬 때, 동일하거나 또는 동일한 아미노산 잔기의 명시된 백분율(즉 70% 동일성, 임의로 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위-서열을 지칭한다. 적합하게, 상기 비교를 상기 참조 서열의 전체 길이에 상응하는 창에 걸쳐 수행한다.
- [0096] 서열 비교를 위해서, 하나의 서열이 참조 서열로서 작용하며, 여기에 시험 서열을 비교한다. 서열 비교 알고리즘 사용시, 시험 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요한 경우 하위서열 좌표를 지정하며, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수를 지정한다. 디폴트 프로그램 매개변수를 사용하거나, 또는 대안의 매개변수를 지정할 수 있다. 이어서 서열 비교 알고리즘은 상기 프로그램 매개변수에 기초하여, 참조 서열에 대한 시험 서열의 서열 동일성 백분율을 계산한다.
- [0097] 본원에 사용된 바와 같은 "비교창"은 2개의 서열을 최적으로 정렬시킨 후에 인접한 위치의 동일한 수의 참조 서열에 하나의 서열을 비교할 수 있는 분절을 지칭한다. 비교를 위한 서열들의 정렬 방법은 당해 분야에 주지되어 있다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬을, 예를 들어 문헌[Smith & Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman & Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson & Lipman, 1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444]의 유사성 방법에 대한 검색에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행에 의해(GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 수동 정렬 및 시각 검사에 의해(예를 들어 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 1995 supplement)] 참조) 수행할 수 있다.
- [0098] 유용한 알고리즘의 일례는 PILEUP이다. PILEUP은 관계 및 서열 동일성 퍼센트를 나타내기 위해 점진적인 쌍 정렬을 사용하여 관련 서열의 그룹으로부터 다수의 서열 정렬을 생성시킨다. 상기는 또한 정렬을 생성시키는데 사용되는 클러스터링 관계를 나타내는 트리 또는 덴도그램을 플롯팅한다. PILEUP은 문헌[Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360]의 점진적인 정렬 방법의 단순화를 사용한다. 상기 사용된 방법은 문헌[Higgins & Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153]에 기재된 방법과 유사하다. 상기 프로그램은 각각 최대 5,000 뉴클레오티드 또는 아미노산 길이의 300개 이하의 서열을 정렬시킬 수 있다. 상기 다중 정렬 과정은 2개의 가장 유사한 서열의 쌍 정렬로 시작하여, 2개의 정렬된 서열의 클러스터를 생성시킨다. 이어서 상기 클러스터를 다음으로 가장 관련된 서열 또는 정렬된 서열들의 클러스터에 정렬시킨다. 서열의 2개 클러스터를 2개의 개별적인 서열의 쌍 정렬의 단순한 연장에 의해 정렬시킨다. 최종 정렬을 일련의 점진적인 쌍 정렬에 의해 성취한다. 상기 프로그램을 특정 서열 및 서열 비교 영역에 대한 이의 아미노산 좌표를 지정하고 프로그램 매개변수를 지정함으로써 실행시킨다. PILEUP을 사용하는 경우, 하기의 매개변수를 사용하여 참조 서열을 다른 시험 서열에 비교하여 서열 동일성 관계 퍼센트를 측정한다: 디폴트 끊김 가중치(3.00), 디폴드 끊김 길이 가중치(0.10), 및 가중된 단부 끊김. PILEUP을 GCG 서열 분석 소프트웨어 패키지, 예를 들어 버전 7.0(Devereaux *et al.*, 1984, *Nuc. Acids*

Res. 12:387-395)으로부터 획득할 수 있다.

- [0099] 서열 동일성 퍼센트 및 서열 유사성 측정에 적합한 알고리즘의 또 다른 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘으로, 이들은 각각 문헌[Altschul *et al.*, 1977, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402] 및 문헌[Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410]에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 the National Center for Biotechnology Information(website at www.ncbi.nlm.nih.gov/)을 통해 공개적으로 입수할 수 있다. 상기 알고리즘은 먼저, 데이터베이스 서열 중 동일한 길이의 단어와 정렬시 일부 양의 값의 임계 점수 T와 합치되거나 이를 만족시키는 조화 서열 중 길이 W의 짧은 단어를 식별함으로써 고득점 서열 쌍(HSP)을 식별할 수만한다. T는 이웃 단어 점수 임계로서 지칭된다(상기 Altschul *et al.*). 이러한 초기 이웃 단어 적중은 상기를 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 검색을 시작하는 시드로서 작용한다. 상기 단어 적중은 누적 정렬 점수가 증가할 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양방향으로 확장된다. 누적 점수는, 뉴클레오티드 서열의 경우 매개변수 M(합치하는 잔기쌍에 대한 보상 점수; 항상 >0) 및 N(오합지 잔기에 대한 벌점 점수; 항상 <0)을 사용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 채점 행렬을 사용하여 누적 점수를 계산한다. 각 방향에서 단어 적중의 확장은 상기 누적 정렬 점수가 최대 성취값에서 X의 양만큼 떨어질 때; 상기 누적 점수가 하나 이상의 음의-득점 잔기 정렬의 누적으로 인해 0 이하로 갈때; 또는 어느 한 서열의 단부에 도달할 때 중단된다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 단어길이 및 10의 기대값(E), 및 50의 BLOSUM62 채점 행렬(문헌[Henikoff & Henikoff, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915] 참조) 정렬(B), 10의 기대값(E), M=5, N=-4, 및 상기 두 가닥의 비교를 사용한다.
- [0100] BLAST 알고리즘은 또한 2개 서열간의 유사성의 통계학적 분석을 수행한다(예를 들어 문헌[Karlin & Altschul, 1993, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787]을 참조하시오). 상기 BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 한 척도는 최소 합 확률(P(N))로, 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간의 일치이 우연히 발생할 확률의 표시를 제공한다.
- [0101] 서열간의 "차이"는 제1 서열과 비교된, 제2 서열의 한 위치에서의 단일 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 지칭한다. 2개 서열은 1, 2 또는 그 이상의 상기와 같은 차이를 함유할 수 있다. 제1 서열과 달리는 동일한(100% 서열 동일성) 제2 서열 중의 삽입, 결실 또는 치환은 감소된 서열 동일성%를 생성시킨다. 예를 들어, 동일한 서열이 9 잔기 길이인 경우, 제2 서열 중 하나의 치환은 88.9%의 서열 동일성을 생성시킨다. 동일한 서열이 17 아미노산 잔기 길이인 경우, 제2 서열 중 2개의 치환은 88.2%의 서열 동일성을 생성시킨다.
- [0102] 한편으로, 제1의 참조 서열을 제2의 비교 서열에 비교하기 위해서, 상기 제2 서열을 생성시키기 위해 상기 제1 서열에 대해 이루어진 부가, 치환 및/또는 결실의 수를 확인할 수 있다. 부가는 하나의 잔기의 제1 서열에의 부가이다(제1 서열의 어느 한 말단에서의 부가 포함). 치환은 제1 서열 중 하나의 잔기의 하나의 상이한 잔기에 의한 치환이다. 결실은 제1 서열로부터 하나의 잔기의 결실이다(제1 서열의 어느 한 말단에서의 결실 포함).
- [0103] 본 발명의 폴리펩티드의 생성
- [0104] 본 발명의 폴리펩티드를 예를 들어 문헌[Green and Sambrook 2012 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 개시된 기법을 사용하여 수득하고 조작할 수 있다. 특히, 인공 유전자 합성을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 생성시킨 다음(Nambiar *et al.*, 1984, *Science*, 223:1299-1301, Sakamar and Khorana, 1988, *Nucl. Acids Res.*, 14:6361-6372, Wells *et al.*, 1985, *Gene*, 34:315-323 및 Grundstrom *et al.*, 1985, *Nucl. Acids Res.*, 13:3305-3316) 적합한 유기체에서 발현시켜 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 예를 들어 고상 DNA 합성에 의해 합성적으로 생성시킬 수 있다. 전체 유전자를 전구체 주형 DNA의 필요 없이 드노보 합성할 수 있다. 목적하는 올리고뉴클레오티드를 수득하기 위해서, 구성 블록을 생성물의 서열에 의해 요구되는 순서로 성장하는 올리고뉴클레오티드 서열에 순차적으로 커플링(coupling)시킨다.쇄 조립의 종료시, 생성물을 고상에서 용액으로 방출시키고, 탈보호시키고, 수집한다. 생성물을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 분리하여 목적하는 올리고뉴클레오티드를 고순도로 수득할 수 있다(Verma and Eckstein, 1998, *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134). 상기 비교적 짧은 분절을 다양한 유전자 증폭 방법(Methods Mol Biol., 2012; 834:93-109)을 사용하여, 무수한 재조합 DNA-기반 발현 시스템에 사용하기에 적합한 보다 긴 DNA 분자로 쉽게 조립한다. 본 발명의 상황에서 당업자는 본 발명에 기재된 폴리펩티드 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 예를 들어 바이러스 벡터를 포함한 다양한 백신 생성 시스템에 쉽게 사용할 수 있음을 알 것이다.
- [0105] 미생물 숙주(예를 들어 세균 또는 진균)에서 본 발명의 폴리펩티드의 생성을 위해서, 본 발명의 핵산은 적합한 조절 및 통제 서열(프로모터, 종결 신호 등) 및 상기 숙주에서 단백질 생성에 적합한 폴리펩티드 분비를 촉진하

는 서열을 포함할 것이다. 유사하게, 본 발명의 폴리펩티드를, 진핵생물 세포(예를 들어 중국 햄스터 난소 세포 또는 드로소필라 S2 세포)의 배양물에, 적합한 조절 및 통제 서열(프로모터, 종결 신호 등) 및 상기 세포에서 단백질 생성에 적합한 폴리펩티드 분비를 촉진하는 서열과 결합된 본 발명의 핵산을 형질도입시킴으로써 생성시킬 수 있었다.

[0106] 재조합 수단에 의해 생성된 본 발명의 폴리펩티드의 개선된 단리를, 상기 폴리펩티드의 한 쪽 단부를 향해 히스티딘 잔기의 신장부(통상적으로 His-태그로서 공지됨)의 부가를 통해 임의로 촉진시킬 수 있다.

[0107] 폴리펩티드를 또한 합성적으로 생성시킬 수 있다.

[0108] *벡터*

[0109] 추가적인 구현예에서, 본 발명의 핵산 중 하나 이상을 포함하는 유전자 구조물을, 본 발명의 폴리펩티드가 생체 내에서 생성되어 번역반응을 이끌어내도록 생체 내에서 세포에 도입시킨다. 핵산(예를 들어 DNA)은 핵산 발현 시스템, 세균 및 일부 바이러스 발현 시스템을 포함하여, 당업자에게 공지된 다양한 전달 시스템 중 어느 하나 내에 존재할 수 있다. 다양한 유전자 전달 기법이 또한 당해 분야에 주지되어 있다, 예를 들어 문헌[Rolland, 1998, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:143-198] 및 상기 문헌 중에 인용된 참고문헌에 기재되어 있다. 이들 접근법 중 다수를 예시를 위해 하기에 개략한다.

[0110] 상응하게, 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 벡터(또한 본원에서 'DNA 발현 구조물' 또는 '구조물'이라 칭한다)를 제공한다.

[0111] 적합하게, 상기 벡터는 인간 숙주 세포에서 번역 활성 RNA 분자의 전사를 허용하기에 적합한 조절 요소(예를 들어 적합한 프로모터 및 종결 신호)를 암호화하는 핵산을 포함한다. "번역 활성 RNA 분자"는 인간 세포의 번역 기구에 의해 단백질로 번역될 수 있는 RNA 분자이다.

[0112] 상응하게, 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터(본원에서 이후에 "본 발명의 벡터" 다음에)를 제공한다.

[0113] 특히, 상기 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV)(예를 들어 AAV 5형 및 2형), 알파바이러스(예를 들어 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV), 신드비스 바이러스(SIN), 쉼리키 포레스트 바이러스(SFV)), 헤르페스 바이러스, 아레나바이러스(예를 들어 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV)), 홍역 바이러스, 포스바이러스(poxvirus)(예를 들어 변형된 우두 안카라(MVA)), 파라믹소바이러스, 렌티바이러스, 또는 라브도바이러스(rhabdovirus)(예를 들어 수포성 구내염 바이러스(VSV)) 벡터일 수 있다, 즉 상기 벡터는 상기 언급한 바이러스 중 어느 하나로부터 유래할 수 있다. 아데노바이러스가 이의 중간 크기 게놈, 조작의 용이성, 고역가, 넓은 표적-세포 범위 및 고 감염성으로 인해 유전자 전달 벡터로서 사용하기에 특히 적합하다. 상기 바이러스 게놈의 양쪽 단부는 100-200 염기쌍의 반전된 반복부(ITR)(이는 바이러스 DNA 복제 및 패키징에 필요한 시스 요소이다)를 함유한다. 상기 게놈의 초기(E) 및 말기(L) 영역은 바이러스 DNA 복제의 개시에 의해 세분되는 상이한 전사 단위를 함유한다. E1 영역(E1A 및 E1B)은 바이러스 게놈 및 몇몇 세포 유전자의 전사 조절을 담당하는 단백질을 암호화한다. E2 영역(E2A 및 E2B)의 발현은 바이러스 DNA 복제를 위한 단백질의 합성을 생성시킨다. 이들 단백질은 DNA 복제, 말기 유전자 발현 및 숙주 세포 차단(shut-off)(Renan, 1990)에 관련된다. 대부분의 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 말기 유전자의 생성물은 오직 주요 말기 프로모터(MLP)에 의해 허여된 단일의 1차 전사물의 상당한 처리 후에만 발현된다. MLP는 감염 말기 중 특히 효율적이며, 상기 프로모터로부터 전사된 모든 mRNA는 상기를 번역에 바람직한 mRNA로 만드는 5'-3'자 리더(TPL) 서열을 갖는다. 초기 유전자 중 하나 이상이 결실된 바이러스 게놈으로부터 생성되는 복제-결합 아데노바이러스가 특히 유용한데, 그 이유는 상기가 복제가 제한되고, 백신접종된 숙주 내에서 및 백신접종된 숙주의 접촉에 병원성 확산의 가능성이 적기 때문이다.

[0114] *다른 폴리뉴클레오티드 전달*

[0115] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 구조물은 단순히 네이키드 재조합 DNA 플라스미드로 이루어질 수 있다. 문헌[Ulmer *et al.*, 1993, *Science* 259:1745-1749]을 참조하며 문헌[Cohen, 1993, *Science* 259:1691-1692]에 리뷰되어 있다. 상기 구조물의 전달은 예를 들어 세포막을 물리적으로 또는 화학적으로 투과시킬 수 있는 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 이를 특히 시험관내 전달에 적용할 수 있으나 또한 생체내 사용에도 적용할 수 있다. 관심 유전자를 암호화하는 DNA를 또한 생체내에서 유사한 방식으로 전달하고 유전자 산물을 발현시킬 수 있음이 구상된다. 다중 전달 시스템을 사용하여 동물 모델 및 인간에서 DNA 분자를 전달하였다. 상기 기술에 기반한 일부 제품이 동물에서의 사용에 허가되었으며 인간에서는 2

및 3상 임상 시험 중에 있다.

[0116] RNA 전달

[0117] 본 발명의 다른 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 구조물은 네이키드, 재조합 DNA-유래된 RNA 분자로 이루어질 수 있다(Ulmer et al., 2012, Vaccine 30:4414-4418). DAN-기반 발현 구조물의 경우에, 다양한 방법을 사용하여 RNA 분자를 시험관내 또는 생체내에서 세포내로 도입시킬 수 있다. 상기 RNA-기반 구조물은 단순한 메신저 RNA(mRNA) 분자를 모방하도록 설계될 수 있으며, 따라서 도입된 생물학적 분자는 숙주 세포의 번역 기구에 의해 바로 번역되어 상기가 도입된 세포에서 이의 암호화된 폴리펩티드를 생성시킨다. 대안으로, RNA 분자를 바이러스 RNA-의존적인 RNA 폴리머라제에 대한 이의 구조 유전자내에 통합시킴으로써, 상기 분자가 도입된 세포내에서 자가-증폭되게 하는 방식으로 설계할 수 있다. 따라서, 자가-증폭 mRNA(SAMTM) 분자(Geall et al. 2012, PNAS, 109:14604-14609)로서 공지된 상기 유형의 RNA 분자는 일부 RNA-기반 바이러스 벡터와 성질을 공유한다. mRNA-기반 또는 SAMTM RNA를 추가로 변형시켜(예를 들어 이의 서열 변경에 의해서 또는 변형된 뉴클레오티드의 사용에 의해서) 안정성 및 번역을 증대시키고(Schlake et al., RNA Biology, 9: 1319-1330), 상기 두가지 유형의 RNA를 제형화하여(예를 들어 유화액으로(Brito et al., Molecular Therapy, 2014 22:2118-2129) 또는 지질 나노입자로(Kranz et al., 2006, Nature, 534:396-401)) 안정성을 촉진하고/하거나 시험관내 또는 생체내에서 세포에 진입시킬 수 있다. 변형된(및 변형되지 않은) RNA의 무수한 제형이 동물 모델 및 인간에서 백신으로서 시험되었으며 다중 RNA-기반 백신이 진행 중인 임상 시험에 사용되고 있다.

[0118] 약학 조성물

[0119] 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 및 벡터를 면역원성 조성물 및 백신 조성물(모두 본원에서 이후에 "본 발명의 조성물")과 같은 약학 조성물에서의 전달을 위해 제형화할 수 있다. 본 발명의 조성물은 적합하게는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 포함한다.

[0120] 따라서, 하나의 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 포함하는 면역원성 약학 조성물을 제공한다.

[0121] 또 다른 구현예에서 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 약학 조성물의 제조는 예를 들어 문헌[Powell & Newman, eds., Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach), 1995]에 일반적으로 기재되어 있다. 본 발명의 조성물은 또한 생물학적으로 활성 또는 불활성일 수 있는 다른 화합물을 함유할 수 있다. 적합하게, 본 발명의 조성물은 비경구 투여에 적합한 멸균 조성물이다.

[0122] 본 발명의 몇몇 바람직한 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본 발명의 하나 이상(예를 들어 하나)의 폴리펩티드를 포함하는 본 발명의 약학 조성물을 제공한다.

[0123] 본 발명의 몇몇 바람직한 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본 발명의 하나 이상(예를 들어 하나)의 핵산 또는 본 발명의 하나 이상(예를 들어 하나)의 벡터를 포함하는 본 발명의 조성물을 제공한다.

[0124] 하나의 구현예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상(예를 들어 하나)의 폴리뉴클레오티드 및 하나 이상(예를 들어 하나)의 폴리펩티드 성분을 포함할 수 있다. 대안으로, 상기 조성물은 하나 이상(예를 들어 하나)의 벡터 및 하나 이상(예를 들어 하나)의 폴리펩티드 성분을 포함할 수 있다. 한편으로, 상기 조성물은 하나 이상(예를 들어 하나)의 벡터 및 하나 이상(예를 들어 하나)의 폴리뉴클레오티드 성분을 포함할 수 있다. 상기과 같은 조성물은 증대된 면역반응을 제공할 수 있다.

[0125] 약학적으로 허용 가능한 염

[0126] 본 발명의 조성물이 본원에 제공된 핵산 또는 폴리펩티드의 약학적으로 허용 가능한 염을 함유할 수 있음은 자명할 것이다. 상기과 같은 염은 유기 염기(예를 들어 1차, 2차 및 3차 아민 및 염기성 아미노산의 염) 및 무기 염기(예를 들어 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘 및 마그네슘 염)를 포함한 약학적으로 허용 가능한 무독성 염기로부터 제조될 수 있다.

[0127] 약학적으로 허용 가능한 담체

[0128] 당업자에게 공지된 다수의 약학적으로 허용 가능한 담체를 본 발명의 조성물에 사용할 수 있지만, 사용되는 담체의 최적의 유형은 투여 방식에 따라 변할 것이다. 본 발명의 조성물을, 예를 들어 비경구, 국소, 경구, 코, 정맥내, 두개내, 복강내, 피하 또는 근육내 투여, 바람직하게는 비경구, 예를 들어 근육내, 피하 또는 정맥내

투여를 포함한 임의의 적합한 투여 방식을 위해 제형화할 수 있다. 비경구 투여의 경우, 담체는 바람직하게는 수를 포함하며 pH 조절용 완충제, 안정화제, 예를 들어 계면활성제 및 아미노산 및 긴장성 조절제, 예를 들어 염 및 당을 함유할 수 있다. 조성물을 사용 시점에서 회석되는 동결건조된 형태로 제공하고자 하는 경우, 상기 제형은 동결보호제, 예를 들어 트레할로스와 같은 당을 함유할 수 있다. 경구 투여의 경우, 상기 담체 또는 고체 담체 중 어느 하나, 예를 들어 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로스, 글루코스, 슈크로스 및 마그네슘 카보네이트를 사용할 수 있다.

[0129] 따라서, 본 발명의 조성물은 완충제(예를 들어 중성 완충된 염수 또는 포스페이트 완충된 염수), 탄수화물(예를 들어 글루코스, 만노스, 슈크로스 또는 텍스트란), 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 아미노산, 예를 들어 글리신, 산화방지제, 세균발육저지제, 킬레이트제, 예를 들어 EDTA 또는 글루타치온, 제형을 수용자의 혈액과 등장성, 저장성 또는 약한 고장성으로 만드는 용질, 현탁제, 증점제 및/또는 보존제를 포함할 수 있다. 한편으로, 본 발명의 조성물을 동결건조물로서 제형화할 수 있다.

[0130] 면역자극제(Immunostimulant)

[0131] 본 발명의 조성물은 또한 하나 이상의 면역자극제를 포함할 수 있다. 면역자극제는 외인성 항원에 대한 면역반응(항체 및/또는 세포-매개된)을 증대시키거나 강화시키는 임의의 물질일 수 있다. 면역자극제(종종 백신 제형의 상황에서 항원보강제로서 지칭된다)의 예는 알루미늄 염, 예를 들어 알루미늄 하이드록사이드 젤(알룸) 또는 알루미늄 포스페이트, Q21을 포함하는 사포닌, 면역자극성(immunostimulatory) 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 CPG, 수중유 유화액(예를 들어 오일이 스쿠알렌인 경우), 아미노알킬 글루코스아미니드 4-포스페이트, 리포폴리사카라이드 또는 이의 유도체, 예를 들어 3-de-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL®) 및 다른 TLR4 리간드, TLR7 리간드, TLR8 리간드, TLR9 리간드, IL-12 및 인터페론을 포함한다. 따라서, 적합하게 본 발명의 조성물의 하나 이상의 면역자극제는 알루미늄 염, 사포닌, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, 수중유 유화액, 아미노알킬 글루코스아미니드 4-포스페이트, 리포폴리사카라이드 및 이의 유도체 및 다른 TLR4 리간드, TLR7 리간드, TLR8 리간드 및 TLR9 리간드 중에서 선택된다. 면역자극제는 또한 다른 면역 성분, 예를 들어 PD-1 및 CTLA-4를 포함하여, 면역관문 수용체와의 상호작용을 차단하는 단클론 항체와 특이적으로 상호작용하는 단클론 항체를 포함할 수 있다.

[0132] 제조합체-핵산 전달 방법(예를 들어 DNA, RNA, 바이러스 벡터)의 경우에, 단백질-기반 면역자극제를 암호화하는 유전자를 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 유전자와 함께 쉽게 전달할 수 있다.

[0133] 서방성 방출

[0134] 본원에 기재된 조성물을, 투여에 따른 화합물의 느린/서방성 방출을 수행하는 서방성 제형(즉 캡슐, 스펀지, 패치 또는 젤(예를 들어 폴리사카라이드로 구성된)과 같은 제형)의 부분으로서 투여할 수 있다.

[0135] 보관 및 패키징

[0136] 본 발명의 조성물을 단위-용량 또는 수회-용량 용기, 예를 들어 밀봉된 앰풀 또는 바이알 중에서 제공할 수 있다. 상기와 같은 용기는 바람직하게는 사용시까지 제형의 멸균성을 보존하도록 밀봉된다. 일반적으로, 제형을 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 유화액으로서 보관할 수 있다. 대안으로, 본 발명의 조성물을 사용 직전에 멸균 액체 담체(예를 들어 주사용 수 또는 염수)의 첨가만을 요하는 동결-건조된 상태로 보관할 수도 있다.

[0137] 투여량

[0138] 본 발명의 각각의 조성물 중의 핵산, 폴리펩티드 또는 벡터의 양을, 치료 또는 예방용으로 적합한 투여량이 획득되는 방식으로 제조할 수 있다. 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 유효 수명뿐만 아니라 다른 약물학적 고려사항과 같은 인자가 상기와 같은 조성물 제조 분야의 업자에 의해 고려될 것이며, 그 자체로서 다양한 투여량 및 치료 섭생이 바람직할 수 있다.

[0139] 전형적으로, 치료학적 또는 예방학적 유효량을 포함하는 조성물은 투여당 약 0.1 ug 내지 약 1000 ug의 본 발명의 폴리펩티드, 보다 전형적으로는 투여당 약 2.5 ug 내지 약 100 ug의 폴리펩티드를 전달한다. 짧은 형태의 긴 합성 펩티드로 전달되는 경우, 용량은 1 내지 2000 ug/펩티드/용량의 범위일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 조성물에 대하여, 상기는 전형적으로 투여당 약 10 ug 내지 약 20 mg의 본 발명의 핵산, 보다 전형적으로는 투여당 약 0.1 mg 내지 약 10 mg의 본 발명의 핵산을 전달한다.

- [0140] 치료되거나 예방되는 질병
- [0141] 본원의 어딘가에 나타난 바와 같이, 서열번호 1-10은 피부 흑색종에서 과발현되는 CLT 항원에 상응하는 폴리펩티드 서열이다.
- [0142] 하나의 구현예에서, 본 발명은 약제(medicine)에 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 제공한다.
- [0143] 본 발명의 추가의 태양은 인간에게 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 인간에서 면역반응을 상승시키는 방법에 관한 것이다.
- [0144] 본 발명은 또한 인간에서 면역반응을 상승시키는데 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 제공한다.
- [0145] 인간에서 면역반응을 상승시키는데 사용하기 위한 약제의 제조를 위한 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물의 용도를 또한 제공한다.
- [0146] 적절하게 상기 면역반응은 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 변이체 및 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현하는 암성 종양(cancerous tumor)에 대하여 상승된다. 본 상황에서 "상응하는"은 상기 종양이, 말하자면 서열번호 A(A는 서열번호 1-10 중 하나이다) 또는 이의 변이체 또는 면역원성 단편을 발현하는 경우, 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물 및 이를 포함하는 약제는 서열번호 A 또는 이의 변이체 또는 면역원성 단편을 기본으로 할 것임을 의미한다.
- [0147] 적절하게 상기 면역반응은 CD8+ T-세포, CD4+ T-세포 및/또는 항체 반응, 특히 CD8+ 세포용해 T-세포 반응 및 CD4+ 헬퍼 T-세포 반응을 포함한다.
- [0148] 적절하게 상기 면역반응은 종양, 특히 서열번호 1-10 및 이의 변이체 및 이의 면역원성 단편 중에서 선택된 서열을 발현하는 종양에 대하여 상승한다.
- [0149] 바람직한 구현예에서, 상기 종양은 흑색종 종양, 예를 들어 피부 흑색종 종양이다.
- [0150] 상기 종양은 원발성 종양 또는 전이성 종양일 수 있다.
- [0151] 본 발명의 추가의 태양은 암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암을 앓고 있는 인간 환자를 치료하거나, 또는 암이 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수 있는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 인간에게 본 발명의 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 투여함을 포함한다.
- [0152] 본 발명은 또한 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 암의 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현한다.
- [0153] 서열번호 33, 35, 36 및 40에 상응하는 전사물이 또한 포도막 흑색종에서 과발현되었다. 결과적으로, 대안의 구현예에서, 상기 종양은 포도막 흑색종 종양이고/이거나 상기 종양은 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중에서 선택된 서열을 발현한다.
- [0154] 따라서, 본 발명은 본 발명에 따라 사용하기 위한 방법 또는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 폴리펩티드는
- [0155] (a) 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중 어느 하나의 서열; 및
- [0156] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0157] (c) (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0158] 중에서 선택된 서열을 포함하며, 예를 들어 상기 폴리펩티드는 서열번호 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 및 76-77 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지고, 예를 들어 상기 핵산은 서열번호 33, 35, 36 또는 40 중 어느 하나 중에서 선택되거나 또는 41, 43, 44, 45 및 50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지며, 암은 포도막 흑색종이다.

- [0159] "예방" 및 "예방학"이란 단어는 본원에서 호환 가능하게 사용된다.
- [0160] 치료 및 백신화 섭생
- [0161] 치료학적 섭생은 (i) 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 (ii) 본 발명의 하나 이상의 추가적인 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터 및/또는 (iii) 항원보강제와 임의로 동시에 투여되는 항원성 단백질과 같은 다양한 다른 치료학적으로 유용한 화합물 또는 분자와 같은 추가의 성분과 동시적인(예를 들어 공-투여) 또는 순차적인(예를 들어 초회 항원자극-추가 항원자극(prime-boost)) 전달을 수반할 수 있다. 공-투여의 예는 동측 공-투여 및 대측 공-투여를 포함한다. "동시" 투여는 적합하게는 동일한 치료 라운드 중에 모든 성분이 전달됨을 지칭한다. 적합하게는 모든 성분을 동시에(예를 들어 DNA 및 단백질 모두의 동시 투여) 투여하지만, 하나의 성분을 수분 이내에(예를 들어 동일한 병원 예약 또는 의사 방문시에) 또는 수시간 이내에 투여할 수도 있다.
- [0162] 일부 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터의 "초회 항원자극(priming)" 또는 1차 투여에 이어 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터의 하나 이상의 "추가 항원자극(boosting)" 또는 후속적인 투여가 이어진다("초회 및 추가 항원자극" 방법). 하나의 구현예에서 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 초회-추가 백신화 섭생에 사용한다. 하나의 구현예에서 상기 초회 및 추가 항원자극은 모두 본 발명의 폴리펩티드(각각의 경우에 본 발명의 동일한 폴리펩티드)에 의한 것이다. 하나의 구현예에서, 상기 초회 및 추가 항원자극은 모두 본 발명의 핵산 또는 벡터(각각의 경우에 본 발명의 동일한 핵산 또는 벡터)에 의한 것이다. 대안으로, 상기 초회 항원자극을 본 발명의 핵산 또는 벡터를 사용하여 수행할 수 있고 상기 추가 항원자극을 본 발명의 폴리펩티드를 사용하여 수행할 수 있거나, 또는 상기 초회 항원자극을 본 발명의 폴리펩티드를 사용하여 수행할 수 있고 상기 추가 항원자극을 본 발명의 핵산 또는 벡터를 사용하여 수행할 수 있다. 통상적으로 상기 1차 또는 "초회 항원자극" 투여 및 2차 및 "추가 항원자극" 투여는 약 1-12주 이후, 또는 4-6개월 이후에 제공된다. 후속적인 "추가 항원자극" 투여는 매 1 내지 6주 정도로 빈번히 제공되거나 또는 훨씬 나중에(수년 이후에) 제공될 수 있다.
- [0163] 항원 조합
- [0164] 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 본 발명의 하나 이상의 다른 폴리펩티드 또는 핵산, 벡터 및/또는 흑색종, 예를 들어 피부 또는 포도막 흑색종에 대해 면역반응의 상승을 야기하는 다른 항원 폴리펩티드(또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터)와 함께 사용할 수 있다. 이들 다른 항원 폴리펩티드는 다양한 공급원으로부터 유래될 수 있었으며, 충분히-기재된 흑색종-관련 항원, 예를 들어 GPR143, PRAME, MAGE-A3 또는 pMel(gp100)을 포함할 수 있었다. 한편으로 상기는 다른 유형의 흑색종 항원, 예를 들어 환자-특이적 신생항원(Lauss et al. (2017). Nature Communications, 8(1), 1738. <http://doi.org/10.1038/s41467-017-01460-0>), 보유된-인트론 신생항원(Smart et al. (2018). Nature Biotechnology. <http://doi.org/10.1038/nbt.4239>), 이어맞춰진 변형 신생항원(Hoyos et al., Cancer Cell, 34(2), 181-183. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.008>; Kahles et al. (2018). Cancer Cell, 34(2), 211-224.e6. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.001>), 손상된 펩티드 처리와 관련된 T-세포 에피토프를 암호화하는 항원으로서 공지된 범주 내에 있는 흑색종 항원(TIEPPs; Gigoux, M., & Wolchok, J. (2018). JEM, 215, 2233, Marijt et al. (2018). JEM 215, 2325), 또는 발견된 신생항원(CLT 항원 포함)을 포함할 수 있었다. 또한, 이들 다양한 공급원으로부터의 항원 펩티드를 (i) 비-특이적 면역자극/항원보강 중 및/또는 (ii) 예를 들어 강한 CD4 헬퍼 T-세포를 이끌어내는 것으로 공지된 범용(universal) CD4 헬퍼 에피토프를 포함하는 항원(폴리펩티드로서, 또는 폴리뉴클레오타이드로서, 또는 상기 CD4 항원을 암호화하는 벡터로서 전달됨)과 합하여, 공-투여된 항원에 의해 유도된 항-흑색종-특이적 반응을 증폭시킬 수 있다.
- [0165] 상이한 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 동일한 제형 또는 별도의 제형 중에서 제형화할 수 있다. 한편으로, 폴리펩티드를, 본 발명의 폴리펩티드가 제2 또는 추가의 폴리펩티드에 융합된 융합 단백질(하기 참조)로서 제공할 수 있다.
- [0166] 상기 언급한 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 제공할 수 있다.
- [0167] 보다 일반적으로, 2개 이상의 성분을 함께 사용하는 경우, 상기 성분을 예를 들어:
- [0168] (1) 2개 이상의 개별적인 항원성 폴리펩티드 성분으로서;
- [0169] (2) 2개(또는 추가의) 폴리펩티드 성분을 모두 포함하는 융합 단백질로서;
- [0170] (3) 하나 이상의 폴리펩티드 및 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 성분으로서;

- [0171] (4) 2개 이상의 개별적인 폴리뉴클레오타이드 성분으로서;
- [0172] (5) 2개 이상의 개별적인 폴리펩티드 성분을 암호화하는 단일 폴리뉴클레오타이드로서; 또는
- [0173] (6) 2개(또는 추가의) 폴리펩티드 성분을 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 단일 폴리뉴클레오타이드로서
- [0174] 제공할 수 있었다.
- [0175] 편의상, 다수의 성분이 존재하는 경우 이들은 단일 융합 단백질 또는 단일 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드내에 함유되는 것이 종종 바람직할 수 있다(하기 참조). 본 발명의 하나의 구현예에서 모든 성분을 폴리펩티드로서(예를 들어 단일 융합 단백질 내에) 제공한다. 본 발명의 대안의 구현예에서 모든 성분을 폴리뉴클레오타이드(예를 들어 단일 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 단일 융합 단백질을 암호화하는 것)로서 제공한다.
- [0176] 융합 단백질(융합 폴리펩티드)
- [0177] 항원 조합의 상기 논의에 대한 구현예로서, 본 발명은 또한, 개별적인 항원을 암호화하는 서열을 함께 융합시키는 핵산 구조물을 생성시킴으로써 본 발명의 제2 또는 추가의 폴리펩티드에 융합된 본 발명에 따른 단리된 폴리펩티드(본원에서 이후에 "본 발명의 결합 폴리펩티드")를 제공한다. 본 발명의 결합 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드에 대해 본원에 기재된 유용성을 가질 것으로 예상되며, 우수한 면역원 또는 백신 활성 또는 예방학적 또는 치료학적 효과(반응의 폭 및 깊이의 증가 포함)의 장점을 가질 수 있고, 이게 집단에서 특히 가치가 있을 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 융합은 또한 백신 항원 및/또는 벡터화된 백신(핵산 백신 포함)의 구성 및 제조의 효율을 증가시키는 이점을 제공할 수 있다.
- [0178] 항원 조합 섹션에 상술한 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드 및 본 발명의 결합 폴리펩티드를 또한 하기 중 하나 이상을 포함하여, 본 발명의 폴리펩티드가 아닌 폴리펩티드 서열에 융합시킬 수 있다:
- [0179] (a) 흑색종 관련 항원이고 따라서 백신에서 면역원 서열로서 잠재적으로 유용한 다른 폴리펩티드(예를 들어 상기에서 지칭된 GPR143, PRAME, MAGE-A3 및 pMel(gp100)); 및
- [0180] (b) 면역반응을 증대시킬 수 있는 폴리펩티드 서열(즉 면역자극제 서열(immunostimulant sequence)).
- [0181] (c) 강한 CD4+ 도움을 제공하여 CLT 항원 에피토프(antigen epitope)에 대한 CD8+ T-세포 반응을 증가시킬 수 있는, 예를 들어 범용 CD4 헬퍼 에피토프를 포함하는 폴리펩티드 서열.
- [0182] 예시적인 융합 폴리펩티드는 서열번호 1, 2, 3 및 4의 서열 중에서 선택된 2개 이상(예를 들어, 2, 3 또는 4개)의 서열; 또는 각각의 상기 서열에 대하여, 상기 서열의 변이체 또는 상기 서열의 면역원성 단편을 포함한다.
- [0183] 예시적인 융합 폴리펩티드는
- [0184] (i) (a) 서열번호 1의 서열 및
- [0185] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0186] (c) 예를 들어 서열번호 11-14, 55-57 및 73-74 중에서 선택된 (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0187] 중에서 선택된 서열; 및
- [0188] (ii) (a) 서열번호 2의 서열 및
- [0189] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0190] (c) 예를 들어 서열번호 15-16, 58-66, 75 및 78 중에서 선택된 (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0191] 중에서 선택된 서열; 및
- [0192] (iii) (a) 서열번호 3의 서열 및
- [0193] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0194] (c) 예를 들어 서열번호 17-18, 53 및 67-69 중에서 선택된 (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0195] 중에서 선택된 서열; 및
- [0196] (iv) (a) 서열번호 4의 서열 및

- [0197] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0198] (c) 예를 들어 서열번호 19, 51-52, 54, 70-72 및 76-77 중에서 선택된 (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0199] 중에서 선택된 서열
- [0200] 을 포함한다.
- [0201] 예를 들어 상기 융합 폴리펩티드는 서열번호 1, 2, 3 및 4의 서열을 포함한다.
- [0202] 또 다른 예시적인 융합 폴리펩티드는
- [0203] (i) (a) 서열번호 1의 서열 및
- [0204] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0205] (c) 예를 들어 서열번호 11-14, 55-57 및 73-74 중에서 선택된 (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0206] 중에서 선택된 서열; 및
- [0207] (ii) (a) 서열번호 2의 서열 및
- [0208] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0209] (c) 예를 들어 서열번호 15-16, 58-66, 75 및 78 중에서 선택된 (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0210] 중에서 선택된 서열; 및
- [0211] (iii) (a) 서열번호 4의 서열 및
- [0212] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0213] (c) 예를 들어 서열번호 19, 51-52, 54, 70-72 및 76-77 중에서 선택된 (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0214] 중에서 선택된 서열
- [0215] 을 포함한다.
- [0216] 예를 들어 상기 융합 폴리펩티드는 서열번호 1, 2 및 4의 서열을 포함한다.
- [0217] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드에 준용하여 본 발명의 상기 언급한 융합 폴리펩티드 및 다른 태양(백터, 조성물, 세포 등)을 암호화하는 핵산을 제공한다.
- [0218] *CLT 항원-결합 폴리펩티드*
- [0219] 종양-발현된 항원에 면역특이적(immunospecific)인 항원-결합 폴리펩티드(본 발명의 폴리펩티드)를, 항원-장식된 종양 세포에 세포용해 세포를 모집하여 이의 파괴를 매개하도록 설계할 수 있다. 항원-결합 폴리펩티드에 의한 세포용해 세포의 하나의 상기와 같은 모집 기전은 항체-의존적인 세포-매개된 세포독성(ADCC)으로서 공지되어 있다. 따라서 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드에 면역특이적인 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다. 항원-결합 폴리펩티드는 단클론 항체 및 이의 단편, 예를 들어 도메인 항체, Fab 단편, Fv 단편, 및 VHH 단편과 같은 항체를 포함하며, 이들은 비-인간 동물 중(예를 들어 설치류 또는 카멜리드)에서 생성되고 인간화될 수 있거나 또는 비-인간 중(예를 들어 인간 면역계를 갖도록 유전자 변형된 설치류)에서 생성될 수 있다.
- [0220] 항원-결합 폴리펩티드를 당업자에게 주지된 방법에 의해 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 단클론 항체를 특이 항체-생성 B 세포와, 조직 배양물 중에서 생육하는 능력 및 항체쇄 합성의 부재에 대해 선택된 골수종(B 세포 암) 세포를 융합시킴으로써 하이브리도마 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다(Köhler and Milstein, 1975, Nature 256(5517): 495-497 및 Nelson et al., 2000 (Jun), Mol Pathol. 53(3):111-7; 이들은 내용 전체가 본원에 참고로 인용된다).
- [0221] 측정된 항원에 대한 단클론 항체를 예를 들어
- [0222] a) 앞서 결정된 항원으로 면역화/노출된 동물(인간 포함)의 말초 혈액으로부터 수득된 림프구를, 하이브리도마를 형성시키기 위해서 불멸 세포 및 바람직하게는 골수종 세포로 불멸화시키고,
- [0223] b) 상기 형성된 불멸화된 세포(하이브리도마)를 배양하고 목적하는 특이성을 갖는 항체를 생성하는 세포를 회수

함

- [0224] 으로서 수득할 수 있다.
- [0225] 단클론 항체를
- [0226] a) 박터, 특히 파지 및 보다 특히 섬유상 박테리오파지에, 동물(적합하게는 앞서 결정된 항원으로 면역화된)의 림프구, 특히 말초 혈액 림프구로부터 수득된 DNA 또는 cDNA 서열을 클로닝하고;
- [0227] b) 상기 항체의 생성을 허용하는 조건하에서 원핵생물 세포를 상기 박터로 형질전환시키고,
- [0228] c) 상기 항체에 항원-친화성 선택을 가하여 상기 항체를 선택하고,
- [0229] d) 목적하는 특이성을 갖는 항체를 회수하고,
- [0230] e) 항원에 노출된 환자, 또는 항원으로 실험적으로 면역된 동물의 B 세포로부터 수득된 항체-암호화 핵산 분자를 발현시키는
- [0231] 단계를 포함하는 공정에 의해 수득할 수 있다.
- [0232] 이어서 상기 선택된 항체를 통상적인 재조합 단백질 생성 기술(예를 들어 유전자 조작된 CHO 세포로부터)을 사용하여 생성시킬 수 있다.
- [0233] 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드에 면역특이적인 단리된 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다. 적합하게, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 단클론 항체 또는 이의 단편이다.
- [0234] 몇몇 구현예에서, 항원-결합 폴리펩티드를 세포독성 모이어티(moiety)에 커플링시킨다. 예시적인 세포독성 모이어티는 항체의 Fc 도메인을 포함하며, 상기 Fc 수용체-함유 세포를 모집하여 ADCC를 촉진할 것이다. 대안으로, 상기 항원-결합 폴리펩티드를 생물학적 독소, 또는 세포용해 화학물질에 연결시킬 수 있다.
- [0235] 항원-결합 폴리펩티드의 또 다른 중요한 부류는 본 발명의 항원의 HLA-디스플레이된 단편에 결합하는 T-세포 수용체(TCR)-유래된 분자를 포함한다. 상기 구현예에서, 종양 세포 표면상의 CLT 항원(또는 이의 유도체)을 인식하는 TCR-기반 생물학 제제(환자로부터 직접 유래된 TCR, 또는 특이적으로 조작된 고-친화성 TCR 포함)는 또한, 상기 면역 세포를 종양으로 유인하여 치료학적 이득을 제공하는, T-세포(또는 또 다른 부류의 면역세포)상의 성분을 인식하는 표적화 부분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 표적화 부분은 또한 재배향된 면역세포의 이로운 활성화(세포용해 활성화 포함)을 또한 자극할 수 있다.
- [0236] 따라서, 하나의 구현예에서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드이거나 또는 이의 부분인 HLA-결합된 폴리펩티드에 면역특이적이다. 예를 들어, 항원-결합 폴리펩티드는 T-세포 수용체이다.
- [0237] 하나의 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드를, 대상체에서 세포독성 세포 또는 다른 면역 성분에 결합할 수 있는 또 다른 폴리펩티드에 커플링시킬 수 있다.
- [0238] 하나의 구현예에서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 약제에 사용하기 위한 것이다.
- [0239] 하나의 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드를 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기과 같은 조성물은 비경구 투여에 적합한 멸균 조성물일 수 있다. 예를 들어 상기 약학 조성물의 개시내용을 참조하시오.
- [0240] 본 발명은 암을 앓고 있는 인간의 치료 방법(여기에서 상기 암의 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현한다) 또는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법(여기에서 상기 암의 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수도 있다)을 제공하며, 상기 방법은 상기 인간에게 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드 또는 상기 항원-결합 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다.
- [0241] 하나의 구현예에서, 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 세포독성 모이어티에 커플링될 수 있는 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드, 또는 상기 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 암의 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현한다.
- [0242] 적합하게 상기 구현예 중 어느 하나에서, 암은 흑색종, 특히 피부 흑색종이다.

- [0243] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 방법 또는 항원-결합 폴리펩티드 또는 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 폴리펩티드는
- [0244] (a) 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중 어느 하나의 서열; 및
- [0245] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0246] (c) (a)의 서열의 번역원성 단편
- [0247] 중에서 선택된 서열을 포함하며, 예를 들어 상기 폴리펩티드는 서열번호 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 및 76-77 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지고, 예를 들어 상기 핵산은 서열번호 33, 35, 36 또는 40 중 어느 하나 중에서 선택되거나 또는 41, 43, 44, 45 및 50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지며, 여기에서 상기 암은 포도막 흑색종이다.
- [0248] 항원-결합 폴리펩티드(예를 들어 항체 또는 이의 단편)를 예를 들어 5-1000 mg, 예를 들어 25-500 mg, 예를 들어 100-300 mg, 예를 들어 약 200 mg의 용량으로 투여할 수 있다.
- [0249] *생체내에서 항원 제시를 촉진하기 위한 세포 요법*
- [0250] 다양한 세포 전달 비히클 중 어느 하나를 약학 조성물내에 사용하여 항원-특이적 면역반응의 생성을 촉진할 수 있다. 따라서 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드의 생체외 로딩(ex vivo loading)에 의해 변형되거나 또는 본 발명의 폴리펩티드를 발현하도록 유전자 조작된 단리된 항원 제시 세포(본원에서 이후에 "본 발명의 APC"라 칭한다)인 세포를 제공한다. 항원 제시 세포(APC)는 예를 들어 수지상 세포, 대식세포, B 세포, 단핵세포 및 효율적인 APC가 되도록 조작될 수 있는 다른 세포이다. 상기와 같은 세포를, 항원을 제시하는 능력을 증가시키고, T-세포 반응의 활성화 및/또는 유지를 개선시키고, 및/또는 수용자와 면역학적으로 양립성(즉 합치된 HLA 하플로 타입)이도록 유전자 변형시킬 수 있지만, 필요하지는 않다. APC를 일반적으로는 다양한 생물학적 유체 및 기관 중 어느 하나로부터 단리할 수 있으며, 상기는 자기유래, 동종이계, 동계 또는 이종발생 세포일 수 있다.
- [0251] 본 발명의 몇몇 바람직한 구현예는 APC로서 수지상 세포 또는 이의 전구세포를 사용한다. 따라서, 하나의 구현예에서 본 발명의 APC는 수지상 세포이다. 수지상 세포는 매우 효능있는 APC(Banchereau & Steinman, 1998, *Nature*, 392:245-251)이며 예방학적 또는 치료학적 면역성을 이끌어내기 위한 생리학적 항원보강제로서 유효한 것으로 입증되었다(Timmerman & Levy, 1999, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529 참조). 일반적으로, 수지상 세포는 이의 전형적인 모습(제자리 별모양, 시험관내에서 볼 수 있는 뚜렷한 세포질 돌기(가지돌기)를 갖는다), 매우 효율적으로 항원을 흡수하고, 처리하고, 제시하는 능력 및 미경험 T-세포 반응을 활성화하는 능력에 기초하여 식별될 수 있다. 수지상 세포를 물론 생체내 또는 생체외에서 수지상 세포상에서 흔하게 발견되지 않는 특정한 세포-표면 수용체 또는 리간드를 발현하도록 조작할 수 있으며, 상기와 같이 변형된 수지상 세포는 본 발명에 의해 고려된다. 수지상 세포에 대한 대안으로서, 항원-로딩된 분비된 소낭(엑소좀(exosome)이라 칭한다)을 면역원성 조성물내에서 사용할 수 있다(문헌[Zitvogel et al., 1998, *Nature Med.* 4:594-600] 참조). 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드가 로딩된 엑소좀을 제공한다.
- [0252] 수지상 세포 및 전구세포를 말초 혈액, 골수, 림프절, 비장, 피부, 제대혈 또는 임의의 다른 적합한 조직 또는 유체로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 수지상 세포를 말초 혈액으로부터 수득된 단핵세포의 배양물에 사이토카인, 예를 들어 GM-CSF, IL-4, IL-13 및/또는 TNF α 의 조합을 첨가함으로써 생체외에서 분화시킬 수 있다. 대안으로, 말초 혈액, 제대혈 또는 골수로부터 수득된 CD34-양성 세포를, 배양 배지에 GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 리간드, LPS, flt3 리간드, 및/또는 수지상 세포의 분화, 성숙화 및 증식을 유도하는 다른 화합물(들)의 조합을 첨가함으로써 수지상 세포로 분화시킬 수 있다.
- [0253] 수지상 세포를 편의상 "미성숙" 및 "성숙" 세포로서 분류하며, 이는 2개의 잘 특성화된 표현형을 구별되게 한다. 그러나, 상기 명명법을 모든 가능한 중간 분화 단계를 제외하는 것으로 해석해서는 안 된다. 미성숙 수지상 세포는 Fc γ 수용체 및 만노스 수용체의 고발현과 상관있는 높은 항원 흡수 및 처리 능력을 갖는 APC로서 특성화된다. 성숙 표현형은 전형적으로 상기 마커의 발현은 낮지만, T-세포 활성화를 담당하는 세포 표면 분자, 예를 들어 부류 I 및 부류 II MHC, 부착 분자(예를 들어 CD54 및 CD11) 및 공자극 분자(예를 들어 CD40, CD80, CD86 및 4-1BB)의 발현은 높은 것을 특징으로 한다.
- [0254] APC를 또한 폴리펩티드가 세포 표면상에서 발현되도록 유전자 조작할 수 있다, 예를 들어 단백질(또는 이의 일부 또는 다른 변이체)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 형질감염시킬 수 있다. 상기와 같은 형질감염은 생체외

에서 일어날 수 있으며, 이어서 상기와 같은 형질감염된 세포를 포함하는 약학 조성물을 본원에 기재된 바와 같이 사용할 수 있다. 대안으로, 수지상 세포 또는 다른 항원 제시 세포를 표적화하는 유전자 전달 비히클을 환자에게 투여하여, 생체내에서 발생하는 형질감염을 생성시킬 수 있다. 예를 들어 수지상 세포의 생체내 및 생체외 형질감염을 일반적으로 당해 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 WO 97/24447에 기재된 방법, 또는 문헌 [Mahvi *et al.*, 1997, *Immunology and Cell Biology* 75:456-460]에 기재된 유전자총 접근법을 사용하여 수행할 수 있다. 수지상 세포의 항원 로딩은 수지상 세포 또는 전구세포를 폴리펩티드, DNA(예를 들어 플라스미드 벡터) 또는 RNA; 또는 항원-발현 재조합 세균 또는 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV)(예를 들어 AAV 5형 및 2형), 알파바이러스(예를 들어 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV), 신드비스 바이러스(SIN), 쉼리키 포레스트 바이러스(SFV), 헤르페스 바이러스, 아레나바이러스(예를 들어 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV)), 홍역 바이러스, 폭스바이러스(예를 들어 변형된 우두 안카라(MVA) 또는 계두), 파라믹소바이러스, 렌티바이러스, 또는 라브도바이러스(예를 들어 수포성 구내염 바이러스(VSV))와 배양함으로써 성취할 수 있다. 폴리펩티드 로딩에 앞서, 상기 폴리펩티드를 T-세포 도움을 제공하는 면역학적 상대(예를 들어 담체 분자)에 공유적으로 접합시킬 수 있다. 대안으로, 수지상 세포를 접합되지 않은 면역학적 상대로, 별도로 또는 상기 폴리펩티드 또는 벡터의 존재하에서 펄스화시킬 수 있다.

- [0255] 본 발명은 항원 제시 세포에의, 폴리펩티드 항원의 특별하게 설계된 짧은, 화학 합성된 에피토프-암호화된 단편의 전달을 제공한다. 당업자는 이러한 유형의 분자(또한 긴 합성 펩티드(SLP)로서 공지됨)가 시험관내에서 세포를 자극(또는 로딩)하기 위해(Gornati *et al.*, 2018, *Front. Imm.*, 9:1484), 또는 생체내에서 항원 제시 세포내에 폴리펩티드 항원을 도입하는 방법으로서(Melief & van der Burg, 2008, *Nat Rev Cancer*, 8:351-60) 본 발명의 항원성 폴리펩티드를 사용하기 위한 치료학적 플랫폼을 제공함을 알 것이다.
- [0256] 하나의 구현예에서, 본 발명의 항원 제시 세포(적합하게는 수지상 세포이다)를 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기와 같은 조성물은 비경구 투여에 적합한 멸균 조성물일 수 있다. 예를 들어 상기 약학 조성물의 개시내용 참조.
- [0257] 하나의 구현예에서, 약제에 사용하기 위한 본 발명의 항원 제시 세포(적합하게는 수지상 세포이다)를 제공한다.
- [0258] 또한, 암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암을 앓고 있는 인간 환자를 치료하거나, 또는 암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수 있는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 인간에게 상기 본 발명의 항원 제시 세포(상기는 적합하게는 수지상 세포이다), 또는 상기 본 발명의 항원 제시 세포를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다.
- [0259] 하나의 구현예에서, 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 상기 본 발명의 항원 제시 세포(상기는 적합하게는 수지상 세포이다), 또는 상기 본 발명의 항원 제시 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 암 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현한다.
- [0260] 하나의 구현예에서, 본 발명의 엑소좀을 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기와 같은 조성물은 비경구 투여에 적합한 멸균 조성물일 수 있다. 예를 들어 상기 약학 조성물의 개시내용을 참조하십시오. 조성물은 면역자극제를 임의로 포함할 수 있다 - 상기 면역자극제의 개시내용을 참조하십시오.
- [0261] 하나의 구현예에서, 약제에 사용하기 위한 본 발명의 엑소좀을 제공한다.
- [0262] 또한, 암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암을 앓고 있는 인간 환자를 치료하거나, 또는 암 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수 있는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 인간에게 상기 본 발명의 엑소좀 또는 상기 본 발명의 엑소좀을 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다.
- [0263] 하나의 구현예에서, 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 본 발명의 엑소좀 또는 상기 본 발명의 엑소좀을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 암의 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현한다. 상기 구현예 중 어느 하나에서, 적합하게 상기 암은 흑색종 특히 피부 흑색종이다.
- [0264] 자극된 T-세포 요법

- [0265] 본 발명의 폴리펩티드에 면역특이적인 T-세포의 생체내 또는 생체외 APC-매개된 생성 외에, 자기유래 또는 비-자기유래 T-세포를 대상체로부터, 예를 들어 말초 혈액, 체대혈로부터 및/또는 성분채집술에 의해 분리하고, APC 세포의 MHC 분자(신호 1)상에 로딩된 종양-관련 항원의 존재하에서 자극하여, 상기 항원에 면역특이적인 TCR에 의한 T-세포의 증식을 유도할 수 있다.
- [0266] 성공적인 T-세포 활성화는 각각 항원-제시 세포 및 T-세포상의 공자극 표면 분자 B7 및 CD28의 결합을 요한다(신호 2). 최적의 T-세포 활성화를 성취하기 위해서, 신호 1 및 2가 모두 요구된다. 환언하면, 공자극(신호 2)의 부재하에서 항원성 펩티드 자극(신호 1)은 충분한 T-세포 활성화를 유도할 수 없으며, T-세포 반응을 생성시킬 수 있다. 공자극 분자 외에, T-세포 활성화를 방지하는 신호를 유도하는 억제 분자, 예를 들어 CTLA-4 및 PD-1이 또한 존재한다.
- [0267] 따라서 자기유래 또는 비-자기유래 T-세포가 본 발명의 폴리펩티드의 존재하에서 자극되고, 확대되며, 항원-특이적 TCR이 환자의 MHC에 의해 제시된 항원을 인식하는 한, 암세포가 본 발명의 상응하는 폴리펩티드를 발현하는 암의 위험이 있거나 또는 암을 앓고 있는 환자에게 다시 전달될 수 있고, 여기에서 상기 상응하는 폴리펩티드를 발현하는 암 세포를 표적화하고 이의 사멸을 유도할 것이다.
- [0268] 하나의 구현예에서, 암을 앓고 있는 인간에서 상기 암의 치료를 위해 상기 인간에게 자극 및/또는 증폭된 T-세포의 후속적인 재도입을 위한, 상기 인간으로부터 유래된 T-세포의 생체외 자극 및/또는 증폭에 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물을 제공한다.
- [0269] 본 발명은 인간의 암 치료 방법을 제공하며, 여기에서 상기 암 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하고, 상기 방법은 상기 인간으로부터 임의로 항원-제시 세포와 함께 적어도 T-세포를 포함하는 백혈구의 집단을 채취하고, 본 발명의 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물의 존재하에서 상기 T-세포를 자극 및/또는 증폭시키고, 적어도 자극 및/또는 증폭된 T-세포를 포함하는 상기 백혈구 중 일부 또는 전부를 상기 인간에게 재도입시킴을 포함한다.
- [0270] 상기 구현예 중 어느 하나에서, 적합하게 암은 흑색종 특히 피부 흑색종이다.
- [0271] 하나의 구현예에서, 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현하는 암세포에 세포독성인 T-세포 집단의 제조 공정을 제공하며, 상기 공정은 (a) 암 환자로부터 T-세포 및 항원-제시 세포를 수득하고 (ii) 상기 T-세포 집단을 생체외에서 본 발명의 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물로 자극하고 증폭시킴을 포함한다.
- [0272] 상기 상황에서 "상응하는"은 상기 암세포가, 말하자면 서열번호 A(A는 서열번호 1-10 중 하나이다) 또는 이의 변이체 또는 면역원성 단편을 발현하는 경우, 상기 T-세포 집단을 생체외에서 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터, 또는 상기 중 하나를 함유하는 조성물의 형태로 서열번호 A 또는 이의 변이체 또는 면역원성 단편으로 자극하고 증폭시킴을 의미한다.
- [0273] 예를 들어, 상기와 같은 공정에서, 배양 및 확대를 수지상 세포의 존재하에서 수행한다. 상기 수지상 세포를 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터로 형질감염시키고 본 발명의 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다.
- [0274] 본 발명은 상기 언급한 공정 중 어느 하나에 의해 수득될 수 있는 T-세포 집단(본원에서 이후에 본 발명의 T-세포 집단)을 제공한다.
- [0275] 하나의 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터 또는 조성물로 자극된 T-세포(본원에서 이후에 본 발명의 T-세포)인 세포를 제공한다.
- [0276] 하나의 구현예에서, 본 발명의 T-세포 집단 또는 T-세포를 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기와 같은 조성물은 예를 들어 비경구 투여에 적합한 멸균 조성물일 수 있다.
- [0277] 하나의 구현예에서, 약제에 사용하기 위한 본 발명의 T-세포 집단 또는 T-세포를 제공한다.
- [0278] 또한, 암을 앓고 있는 인간을 치료하는 방법(여기에서 상기 암 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현한다) 또는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법(여기에서 상기 암 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수도 있다)을 제공하며, 상기 방법은 상기 인간에게 본 발명의 상기 T-세포 집단 또는 T-세포 또는 본 발명의 상기 T-세포 집단 또는 T-세포를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다.
- [0279] 하나의 구현예에서, 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 본 발명의 T-세포 집단, 본 발명의 T-

세포 또는 본 발명의 상기 T-세포 집단 또는 T-세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 암 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현한다. 상기 구현에 중 어느 하나에서, 암은 흑색종 특히 피부 흑색종이다.

- [0280] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 공정, 방법 또는 T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포, 엑소좀 또는 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 폴리펩티드는
- [0281] (a) 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중 어느 하나의 서열; 및
- [0282] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0283] (c) (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0284] 중에서 선택된 서열을 포함하며, 예를 들어 상기 폴리펩티드는 서열번호 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 및 76-77 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지고, 예를 들어 상기 핵산은 서열번호 33, 35, 36 또는 40 중 어느 하나 중에서 선택되거나 또는 41, 43, 44, 45 및 50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지며, 여기에서 상기 암은 포도막 흑색종이다.
- [0285] 조작된 면역세포 요법
- [0286] 인간 HLA 분자에 복합체화된 CLT 항원-유래된 펩티드를 인식하는 TCR 또는 TCR 유사물질(문헌[Dubrovsky *et al.*, 2016, Oncoimmunology] 참조)을 포함하여, 상술한 모든 유형의 CLT 항원-결합 폴리펩티드의 유도체를 T-세포(자기유래 또는 비-자기유래)의 표면에 발현되도록 조작할 수 있으며, 이어서 이를 암 치료를 위해 입양 T-세포 요법으로서 투여할 수 있다.
- [0287] 이들 유도체는 "키메라 항원 수용체(CAR)"의 범주내에 있으며, 이를 본원에서 사용시 예를 들어 인공 T-세포 수용체, 키메라 T-세포 수용체, 또는 키메라 면역수용체라 지칭할 수 있으며 특정한 면역 효과기 세포상에 인공적인 특이성을 접목시키는 조작된 수용체를 포함한다. CAR을 사용하여 T-세포상에 단클론 항체의 특이성을 부여할 수 있으며, 이에 의해 다수의 특이적 T-세포가, 예를 들어 입양세포 요법에 사용하기 위해 생성되게 할 수 있다. CAR은 종양 관련 항원, 본 발명의 폴리펩티드(여기에서 상기 폴리펩티드는 HLA-결합된다)에 대한 세포의 특이성을 유도할 수 있다.
- [0288] 환자에서 암을 치료하기 위한 또 다른 접근법은 T-세포를 유전자 변형시켜, 키메라 항원 수용체(CAR)의 발현을 통해 종양 세포상에서 발현된 항원을 표적화하는 것이다. 상기 기술은 문헌[Wendell & June, 2017, Cell, 168: 724-740](내용 전체가 참고로 인용된다)에 리뷰되어 있다.
- [0289] 상기과 같은 CAR T-세포를, 대상체로부터, 예를 들어 말초 혈액, 제대혈로부터 및/또는 성분채집술에 의해 세포의 샘플(여기에서 상기 샘플은 T-세포 또는 T-세포 전구세포를 포함한다)을 수득하고, 상기 세포를 본 발명의 폴리펩티드(여기에서 상기 폴리펩티드는 HLA-결합된다)에 면역특이적인 키메라 T-세포 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산으로 형질감염시키는 방법에 의해 생성시킬 수 있다. 상기과 같은 핵산은 상기 세포의 게놈내에 통합될 수 있을 것이며, 상기 세포를 상기 대상체에게 유효량으로 투여하여 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 세포에 대한 T-세포 반응을 제공할 수 있다. 예를 들어, 상기 대상체의 세포 샘플을 수집할 수 있다.
- [0290] 상기 CAR-발현 T-세포를 생성시키는데 사용되는 세포는 자기유래 또는 비-자기유래일 수 있는 것으로 생각된다.
- [0291] 트랜스제닉 CAR-발현 T-세포는 불활성화된 내인성 T-세포 수용체 및/또는 내인성 HLA의 발현을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 세포를 조작하여 내인성 알파/베타 T-세포 수용체(TCR)의 발현을 제거할 수 있다.
- [0292] 세포의 형질감염 방법은 당해 분야에 주지되어 있으나, 일렉트로포레이션과 같은 고도로 효율적인 형질감염 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, CAR 구조물을 발현하는 본 발명의 핵산 또는 벡터를 뉴클레오펙션(nucleofection) 기구를 사용하여 세포내에 도입시킬 수 있다.
- [0293] CAR-발현 T-세포에 대한 세포 집단을 상기 세포의 형질감염 후에 농축시킬 수 있다. 예를 들어, CAR을 발현하는 세포를, 상기 CAR에 의해 결합된 항원 또는 CAR-결합 항체의 사용에 의해, 발현하지 않는 것들로부터 분류할 수 있다(예를 들어 FACS를 통해). 대안으로, 상기 농축 단계는 비 T-세포의 고갈 또는 CAR 발현이 없는 세포의 고갈을 포함한다. 예를 들어 CD56+ 세포를 배양 집단에서 고갈시킬 수 있다.
- [0294] 트랜스제닉 CAR-발현 세포의 집단을 생체외에서, CAR-발현 T-세포의 증식을 선택적으로 증대시키는 배지에서 배

양할 수 있다. 따라서, 상기 CAR-발현 T-세포를 생체외에서 확대시킬 수 있다.

- [0295] CAR 세포의 샘플을 보존할 수 있다(또는 배양물 중에서 유지시킬 수 있다). 예를 들어, 샘플을 나중의 확대 또는 분석을 위해 저온보존할 수 있다.
- [0296] CAR-발현 T-세포를 다른 치료제, 예를 들어 PD-L1 길항제를 포함하는 관문 억제제와 함께 사용할 수 있다.
- [0297] 하나의 구현예에서, 표면상에서 상기 항원-결합 폴리펩티드 중 어느 하나를 발현하도록 조작된 세포독성 세포를 제공한다. 적합하게, 상기 세포독성 세포는 T-세포이다.
- [0298] 하나의 구현예에서, 약제에 사용하기 위한, 표면상에서 상기 항원-결합 폴리펩티드 중 어느 하나를 발현하도록 조작된 세포독성 세포(적합하게는 T-세포이다)를 제공한다.
- [0299] 본 발명은 본 발명의 세포독성 세포(적합하게는 T-세포이다)를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0300] 암을 앓고 있는 인간 환자의 치료 방법(여기에서 상기 암 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현한다) 또는 암을 앓는 것으로부터 인간을 예방하는 방법(여기에서 상기 암의 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 및 변이체 중에서 선택된 서열을 발현할 수도 있다)을 제공하며, 상기 방법은 상기 인간에게 본 발명의 세포독성 세포(적합하게는 T-세포이다)를 투여함을 포함한다.
- [0301] 하나의 구현예에서, 본 발명의 세포독성 세포(적합하게는 T-세포이다)는 인간에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 것이며, 여기에서 상기 암 세포는 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 중에서 선택된 상응하는 서열을 발현한다.
- [0302] *병용 요법*
- [0303] 본 발명에 따른 암 치료 방법을 다른 요법, 특히 관문 억제제 및 인터페론과 병용하여 수행할 수 있다.
- [0304] 폴리펩티드, 핵산, 벡터, 항원-결합 폴리펩티드 및 입양세포 요법(APC 및 T-세포-기반)을, 예를 들어 유도된 면역 반응의 크기 및/또는 폭을 개선시키거나, 또는 다른 활성(예를 들어 선천 또는 적응 면역반응의 다른 태양의 활성화, 또는 종양 세포의 파괴)을 제공하기 위해서 면역원성을 증대시키도록 설계된 다른 성분과 병용할 수 있다.
- [0305] 상응하게, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 벡터를 약학적으로 허용 가능한 담체; 및 (i) 하나 이상의 추가의 면역원성 또는 면역자극성 폴리펩티드(예를 들어 인터페론, IL-12, 관문분해 분자 또는 이를 암호화하는 핵산, 또는 상기와 같은 핵산을 포함하는 벡터), (ii) 본 발명의 주제인 폴리펩티드 생성물의 변역 및/또는 제시를 증대시키는 소분자(예를 들어 HDAC 억제제 또는 암세포의 후성적 프로파일을 변형시키는 다른 약물) 또는 생물학적 제제(폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 핵산, 또는 상기와 같은 핵산을 포함하는 벡터로서 전달된다)와 함께 포함하는 본 발명의 조성물(즉 면역원성, 백신 또는 약학 조성물) 또는 다수의 상기와 같은 조성물의 키트를 제공한다.
- [0306] 관문 억제제(암세포상의 정상적인 단백질, 또는 이에 반응하는 T-세포상의 단백질을 차단한다)는 CLT-항원 기반 요법과의 병용에 특히 중요한 부류의 약물일 수 있는데, 그 이유는 상기 억제제가 면역계 공격에 대한 암의 주요 방어 중 하나를 극복하고자 하기 때문이다.
- [0307] 따라서, 본 발명의 하나의 태양은 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터, 항원-결합 폴리펩티드, 조성물, T-세포, T-세포 집단, 또는 항원 제시 세포를 관문 억제제와 함께 투여함을 포함한다. 예시적인 관문 억제제는 PD-1 억제제, 예를 들어 펄브롤리주맙(키트루다) 및 니볼루맙(옵디보), PD-L1 억제제, 예를 들어 아테졸리주맙(테센트릭), 아벨루맙(바벤시오) 및 두르발루맙(임핀지) 및 CTLA-4 억제제, 예를 들어 이필리무맙(예르보이) 중에서 선택된다.
- [0308] 인터페론(예를 들어 알파, 베타 및 감마)은 인체가 매우 소량으로 만들어내는 단백질의 한 패밀리이다. 인터페론은 암세포 분열을 늦추거나 또는 정지시키고, 암세포가 자신을 면역계로부터 보호하는 능력을 감소시키고, 및/또는 적응면역계의 다수의 태양을 증대시킬 수 있다. 인터페론은 전형적으로, 예를 들어 허벅지 또는 복부에 피하 주사로 투여된다.
- [0309] 따라서, 본 발명의 하나의 태양은 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터, 항원-결합 폴리펩티드 또는 조성물을 인터페론, 예를 들어 인터페론 알파와 함께 투여함을 포함한다.

- [0310] 본 발명의 상이한 양식을 또한 병용할 수 있다, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 및 벡터를 본 발명의 APC, T-세포 또는 T-세포 집단과 병용할 수 있다(하기에 논의된다).
- [0311] 본 발명의 하나 이상의 양식을 또한 통상적인 항암 화학요법 및/또는 방사선과 병용할 수 있다.
- [0312] 진단
- [0313] 또 다른 태양에서, 본 발명은 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종을 진단하거나, 또는 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 벡터, 항원-결합 폴리펩티드, 입양세포 요법, 또는 조성물에 의한 치료에 적합한 인간 대상체를 진단하기 위해서 본 발명의 폴리펩티드 또는 핵산 중 하나 이상을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0314] 따라서 본 발명은 암을 앓고 있는 인간의 진단 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 암의 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 또는 변이체 중에서 선택된(예를 들어 서열번호 11-32 및 51-78의 서열 중에서 선택된) 폴리펩티드; 또는 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산(예를 들어 서열번호 33-40 및 서열번호 41-50의 서열 중에서 선택됨)을 발현하는지의 여부를 결정하는 단계, 상기 폴리펩티드 또는 상응하는 핵산이 상기 암세포에서 과발현되는 경우 상기 인간을 암을 앓고 있는 것으로서 진단하는 단계를 포함한다.
- [0315] 본 발명은 피부 흑색종인 암을 앓고 있는 인간을 진단하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 암의 세포가 서열번호 2, 6, 7, 8 및 9 및 이의 면역원성 단편 또는 변이체 중에서 선택된 폴리펩티드 서열; 또는 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산을 발현하는지의 여부를 결정하는 단계, 상기 폴리펩티드 또는 상응하는 핵산이 상기 암세포에서 과발현되는 경우 상기 인간을 피부 흑색종인 암을 앓고 있는 것으로서 진단하는 단계를 포함한다.
- [0316] 본원에서 사용되는 바와 같이, 암세포에서 "과발현되는"은 암세포에서의 발현 수준이 정상 세포에서보다 더 높음을 의미한다.
- [0317] 본 발명은 피부 흑색종 또는 포도막 흑색종인 암을 앓고 있는 인간을 진단하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 암의 세포가 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 및 이의 면역원성 단편 또는 변이체 중에서 선택된 폴리펩티드 서열; 또는 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산을 발현하는지의 여부를 결정하는 단계, 상기 폴리펩티드 또는 상응하는 핵산이 상기 암세포에서 과발현되는 경우 상기 인간을 피부 흑색종 또는 포도막 흑색종인 암을 앓고 있는 것으로서 진단하는 단계를 포함한다.
- [0318] 상기 과발현을, 암을 갖고 있지 않는 것으로 공지된 대조용 인간 대상체에서의 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드의 수준에 참조하여 측정할 수 있다. 따라서 과발현은 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드가 상기 대조용 대상체에서보다 시험 대상체에서 현저하게 더 높은 수준(예를 들어 30%, 50%, 100% 또는 500% 더 높은 수준)으로 검출됨을 가리킨다. 상기 대조용 인간 대상체가 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드를 검출할 수 없는 수준으로 갖는 경우에, 진단은 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드를 검출함으로써 도달될 수 있다.
- [0319] 본 발명은 또한 암을 앓고 있는 인간의 진단 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0320] (a) 상기 암의 세포가 서열번호 1-10 및 이의 어느 하나의 면역원성 단편 또는 변이체(예를 들어 서열번호 11-32 및 51-78의 서열 중에서 선택됨) 중에서 선택된 폴리펩티드 서열; 또는 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산(예를 들어 서열번호 33-40 및 서열번호 41-50의 서열 중에서 선택됨)을 발현하는지의 여부를 결정하는 단계; 이를 발현하는 경우
- [0321] (b) 상기 인간에게 본 발명의 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터, 조성물, T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포, 항원-결합 폴리펩티드 또는 세포독성 세포를 투여하는 단계
- [0322] 를 포함한다.
- [0323] 또한, (a) 서열번호 1-10 중 어느 하나의 서열; 또는
- [0324] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0325] (c) 암을 앓고 있는 인간의 종양으로부터 단리된 (a)의 서열의 면역원성 단편
- [0326] 중에서 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드의 용도, 또는 상기 인간이 본 발명의 상응하는 폴리펩티드, 핵산, 벡터, 조성물, T-세포 집단, T-세포, 항원 제시 세포, 항원-결합 폴리펩티드 또는 세포독성 세포를 포함하는 백신에 의한 치료에 적합할 수 있는지의 여부를 측정하기 위한 생물마커(biomarker)로서, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 용도를 제공한다.

- [0327] 적합하게, 암은 흑색종 특히 피부 흑색종이다.
- [0328] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법 또는 용도를 제공하며, 여기에서 상기 폴리펩티드는
- [0329] (a) 서열번호 1, 3, 4, 5 및 10 중 어느 하나의 서열; 및
- [0330] (b) (a)의 서열의 변이체; 및
- [0331] (c) (a)의 서열의 번역원성 단편
- [0332] 중에서 선택된 서열을 포함하며, 예를 들어 상기 폴리펩티드는 서열번호 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 및 76-77 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지고, 예를 들어 상기 핵산은 서열번호 33, 35, 36 또는 40 중 어느 하나 중에서 선택되거나 또는 41, 43, 44, 45 및 50 중 어느 하나 중에서 선택된 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어지며, 암은 포도막 흑색종이다.
- [0333] 적합하게 본 발명의 폴리펩티드는 서열번호 1-10 또는 이의 단편, 예를 들어 이의 번역원성 단편(예를 들어 서열번호 11-32 및 51-78의 서열 중에서 선택됨) 중에서 선택된 서열을 갖는다.
- [0334] 적합하게 본 발명의 핵산은 서열번호 33-40 또는 41-50 중 어느 하나 또는 이의 단편, 예를 들어 이의 번역원성 단편 중에서 선택된 서열을 갖거나 포함한다.
- [0335] 핵산의 존재를 검출하기 위한 키트는 주지되어 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화하는 적어도 2개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 키트를 실시간 PCR(RT-PCR) 반응내에서 사용하여 특정한 핵산의 검출 및 반-정량분석을 허용할 수 있다. 상기와 같은 키트는 포스터 공명 에너지 전달(FRET)의 결과로서 형광 신호의 생성에 의해(예를 들어 TaqMan® 키트) 또는 이중가닥 DNA의 결합시(예를 들어 SYBR® Green 키트) PCR 산물의 검출을 허용할 수 있다. 일부 키트(예를 들어, 표적 DNA의 엑손에 걸쳐 있는 TaqMan® 탐침을 함유하는 키트)는 mRNA, 예를 들어 본 발명의 핵산을 암호화하는 전사물의 검출 및 정량분석을 허용한다. 몇몇 키트를 사용하는 분석을 복합 포맷으로 설정하여 다중 핵산을 하나의 반응내에서 동시에 검출할 수 있다. 활성 DNA(즉 발현을 가리키는 특정한 후성적 서명을 운반하는 DNA)의 검출을 위한 키트를 또한 사용할 수 있다. 상기와 같은 키트내에 존재할 수 있는 추가적인 성분은 본 발명의 핵산의 검출을 용이하게 하는 진단 시약 또는 리포터를 포함한다.
- [0336] 본 발명의 핵산을 또한 액체 생검을 통해, 환자의 혈액 샘플을 사용하여 검출할 수 있다. 상기와 같은 기술은 수술 생검에 대한 비-침습적인 대안을 제공한다. 상기와 같은 혈액 샘플로부터 혈장을 분리하고 본 발명의 핵산의 존재에 대해 분석할 수 있다.
- [0337] 본 발명의 폴리펩티드를, 환자 종양 샘플의 균질화된 제제 중에서 본 발명의 폴리펩티드를 검출하기 위해 ELISA 유형 분석에서 항원-특이적 항체에 의해 검출할 수 있다. 대안으로, 본 발명의 폴리펩티드를 면역조직화학 분석에 의해 검출할 수 있으며, 상기 분석은 광학 현미경분석을 사용하여, 적합하게 표지된 항체 제제를 사용함으로써 염색된 환자 종양 샘플의 절편을 검사함으로써 폴리펩티드 항원의 존재를 식별한다. 추가의 대안으로서, 본 발명의 폴리펩티드를, 광학 현미경분석을 사용하여, 적합하게 표지된 항체 제제를 사용함으로써 염색된 환자 종양 샘플의 절편을 검사함으로써 폴리펩티드 항원의 존재를 식별하는 면역조직화학 분석에 의해 검출할 수 있다.
- [0338] 본 발명의 폴리펩티드를 또한, 상기가 상기 폴리펩티드에 대해 발생한 T-세포를 자극할 수 있는지의 여부를 결정함으로써 검출할 수 있다.
- [0339] 암 또는 종양, 예를 들어 흑색종 예를 들어 피부 흑색종의 세포를 예를 들어 암, 예를 들어 흑색종 예를 들어 피부 흑색종의 생검으로부터 수득할 수 있다.
- [0340] 인간에서 암, 특히 흑색종 예를 들어 피부 흑색종의 치료 방법은 (i) 본 발명에 따른 핵산 또는 폴리펩티드의 존재를 검출하고 (ii) 대상체에게 본 발명에 따른 핵산, 폴리펩티드, 벡터, 세포, T-세포 또는 T-세포 집단 또는 조성물을 투여함(및 바람직하게는 검출된 동일한 핵산 또는 폴리펩티드 또는 이의 단편을 투여함)을 포함한다.
- [0341] 인간에서 암, 특히 흑색종 예를 들어 피부 흑색종의 치료 방법은 또한 대상체에게 본 발명에 따른 핵산, 폴리펩티드, 벡터, 세포, T-세포 또는 T-세포 집단 또는 조성물을 투여함을 포함하며, 상기 대상체에서 본 발명에 따른(및 바람직하게는 동일한) 핵산 또는 폴리펩티드의 존재가 검출되었다.
- [0342] 특히, 진단하고자 하는 및 적합한 경우 치료하고자 하는 암은 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종이다.
- [0343] 서열번호 1, 3, 4, 5 또는 10의 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편이 검출되는 경우 암은 피부 흑색종 또는

포도막 흑색종일 수 있다.

[0344] 특정한 구현예

[0345] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 1을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 11-14 중 어느 하나를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 11-14 중 2, 3 또는 4개를 포함한다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 55-57 또는 73-74 중 어느 하나를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 11-14, 55-57 및 73-74를 모두 포함한다(중복되는 서열이 1회를 초과하여 존재할 필요가 없도록 가능한 서열 겹침이 허용된다). 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 33 또는 서열번호 41을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종 또는 포도막 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0346] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 2를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 15 또는 16을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 15 및 16을 포함한다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 58-66, 75 및 78을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 15-16, 58-66, 75 및 78을 모두 포함한다(중복되는 서열이 1회를 초과하여 존재할 필요가 없도록 가능한 서열 겹침이 허용된다). 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 34 또는 서열번호 42를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0347] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 3을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 17 또는 18을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 17 및 18을 포함한다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 53 및 67-69 중 어느 하나를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 17, 서열번호 18 및 서열번호 53을 포함한다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 17-18, 53 및 67-69를 모두 포함한다(중복되는 서열이 1회를 초과하여 존재할 필요가 없도록 가능한 서열 겹침이 허용된다). 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 35 또는 서열번호 43을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종 또는 포도막 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0348] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 4를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 19를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 51 또는 서열번호 52를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 54를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 70-72 및 76-77 중 어느 하나를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 19 및 서열번호 51이나 서열번호 52 중 하나를 포함한다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 54 및 서열번호 51이나 서열번호 52 중 하나를 포함한다. 추가의 예시적인 단편은 서열번호 19, 51-52, 54, 70-72 및 76-77을 모두 포함한다(중복되는 서열이 1회를 초과하여 존재할 필요가 없도록 가능한 서열 겹침이 허용된다). 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 35 또는 서열번호 44를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종 또는 포도막 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0349] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 5를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 20-22 중 어느 하나를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 36 또는 서열번호 45를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포

및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종 또는 포도막 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0350] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 6을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 23 또는 서열번호 24를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 37 또는 서열번호 46을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0351] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 7을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 25를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 38 또는 서열번호 47을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0352] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 8을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 26을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 38 또는 서열번호 48을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0353] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 9를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 27-29 중 어느 하나를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 39 또는 서열번호 49를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0354] 하나의 구현예에서, CLT 항원 폴리펩티드는 서열번호 10을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 예시적인 단편은 서열번호 30-32 중 어느 하나를 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상기 폴리펩티드 서열을 암호화하는 예시적인 핵산은 서열번호 40 또는 서열번호 50을 포함하거나 또는 상기로 이루어진다. 상술한 바와 같은 상응하는 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀이 제공된다. 상기 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA), T-세포, T-세포 집단, 세포독성 세포, 항원-결합 폴리펩티드, 항원 제시 세포 및 엑소좀을 암, 특히 흑색종, 예를 들어 피부 흑색종 또는 포도막 흑색종의 치료에 사용할 수 있다. 관련된 진단 방법을 또한 제공한다.

[0355] 실시예

[0356] 실시예 1 - CLT 식별

[0357] 목적은 LTR 요소로 전적으로 또는 부분적으로 이루어지는 암-특이적 전사물을 식별하는 것이었다.

[0358] 첫 번째 단계로서, 본 발명자는 포괄적인 범-암 전사체를 드노보 어셈블리하였다. 이를 성취하기 위해서, The Cancer Genome Atlas(TCGA) 컨소시엄으로부터 수득되고 광범위하게 다양한 암 유형을 나타내는 768개 환자 샘플로부터의 RNA-서열분석 판독(각각의 32가지 암 유형(31개의 원발성 및 1개의 전이성 흑색종)으로부터의 24개의 성별-균형 샘플; 표 S1)을 게놈-유도 어셈블리에 사용하였다. 상기 성별-균형 샘플(성별-특이적 조직 제외)을 cutadapt(v1.13)(Marcel M., 2011, EMBnet J., 17:3)를 사용하여 어댑터 및 품질(Q20) 트리밍하고 길이 여과하였으며(둘 다 ≥ 35 뉴클레오타이드 쌍의 판독), khmer(v2.0)(Crusoe et al., 2015, F1000Res., 4:900)를 사용하

여 각각 200 및 3의 최대 및 최소 깊이에 대해서 kmer-정규화하였다($k=20$). 관독을 STAR(2.5.2b)을 사용하여 GRCh38에 맵핑하였고, 이때 설정은 TCGA에 걸쳐 사용된 경우와 동일하였으며, 비활성화된 인실리코 깊이 정규화가 내장된 게놈-유도 어셈블리를 위해 Trinity(v2.2.0)(Trinity, Grabherr, M.G., et al., 2011, Nat. Biotechnol., 29:644-52)로 보내었다. 대부분의 어셈블리 프로세스는 32-코어 HPC 노드에서 256GB RAM내에서 완료되었으며, 실패한 프로세스는 1.5 TB RAM 노드를 사용하여 다시 실행되었다. 생성되는 콘티그를 폴리(A)-트리밍(SeqClean v110222내의 트림폴리) 및 엔트로피-필터링하여(≥ 0.7) 저품질 및 인공 콘티그(BBMap v36.2내의 bbdduk)를 제거하였다. 암 유형에 따라, 원래 24개의 샘플을 Salmon(v0.8.2 또는 v0.9.2)을 사용하여 세척된 어셈블리에 준-맵핑하였으며(Patro, R., et al., 2017, Nat. Methods, 14:417-419), 이때 <0.1 전사물/100만 (TPM)으로 발현되는 것으로 밝혀진 콘티그가 제거되었다. 나머지는 GMAP(v161107)(Wu et al., 2005, Bioinf., 21:1859-1875)를 사용하여 GRCh38에 맵핑하였으며, 길이의 $\geq 85\%$ 에 걸쳐 $\geq 85\%$ 동일성으로 정렬되지 않는 콘티그는 상기 어셈블리로부터 제거되었다. 최종적으로, 모든 암 유형에 대한 어셈블리를 함께 편평화하고 gffread(Cufflinks v2.2.1)를 사용하여 가장 긴 연속 전사물로 병합시켰다(Trapnell et al., 2010, Nat. Biotech., 28:511-515). 이러한 어셈블리 프로세스는 반복적인 요소를 평가할 수 있도록 특별히 설계되었으므로, 모노엑소닉(monoexonic) 전사물은 유지되었지만 플래그가 지정되었다. GENCODE v24basic 및 MiTranscriptome(Iyer et al. 2015, Nat. Genet., 47: 199-208)과의 비교에 의해 전사물 어셈블리 완전성과 품질을 평가하였다. 본 발명자는 GENCODE내에 나타난 특유의 이어맞추기 부위의 목록을 킵과일하고 상기 이어맞추기 부위가 2-뉴클레오타이드 유예창내에서 전사체 어셈블리내에 존재하는지를 시험하였다. 상기 프로세스는 1,001,931개 전사물을 식별하였으며, 이 중 771,006개는 이어맞춰졌고 230,925개는 모노엑소닉이었다.

[0359] 별도로, 상기 어셈블리된 콘티그를, LTR 요소를 함유하는 전사물 확인을 위해 게놈 반복 서열 주석과 오버레이 하였다. LTR 및 비-LTR 요소를 앞서 기재된 바와 같이 애노테이션(annotation)하였다(Attig et al., 2017, Front. In Microbiol., 8:2489). 간단히, 공지된 인간 반복 패밀리를 나타내는 히든 마코프 모델(HMM)(Dfam 2.0 library v150923)을 사용하여, nhmmer(Wheeler et al., 2013, Bioinform., 29:2487-2489)로 구성된 RepeatMasker Open-3.0(Smit, A., R. Hubley, and P. Green, <http://www.repeatmasker.org>, 1996-2010)으로 GRCh38을 애노테이션하였다. HMM-기반 스캐닝은 BLAST-기반 방법과 비교하여 애노테이션의 정확도를 증가시킨다(Hubley et al., 2016, Nuc. Acid. Res., 44:81-89). RepeatMasker는 LTR 및 내부 영역을 별도로 애노테이션하며, 따라서 동일한 요소에 대한 인접한 애노테이션을 병합하도록 표 형식의 출력을 분석하였다. 상기 프로세스는 하나 이상의 완전한 또는 부분적인 LTR 요소를 함유하는 181,967개의 전사물을 생성시켰다.

[0360] 백만당 전사물(TPM)을 Salmon을 사용하여 모든 전사물에 대해 평가하였으며 각각의 암 유형내에서의 발현을 811 개의 건강한 조직 샘플(입수할 수 있는 경우, TCGA로부터 및 별도로 GTEx(The Genotype-Tissue Expression Consortium, 2015, Science, 348:648-60)로부터의 모든 유형의 암에 대한 건강한 조직-합치된 대조군)에 걸친 발현과 비교하였다. 전사물은 임의의 샘플 중에서 1 TPM 초과로 검출되는 경우 암에서 특이적으로 발현되고 하기의 기준을 충족한 경우 암-특이적인 것으로서 간주되었다: i. 각각의 암 유형의 24개 샘플 중 ≥ 6 에서 발현된다; ii. 모든 건강한 조직 샘플 중 $\geq 90\%$ 에서 <10 TPM으로 발현된다; iii. 임의의 대조용 조직 유형에서 $\geq 3x$ 중간 발현으로 관심 암 유형에서 발현된다; 및 iv. 입수가 가능한 경우, 각각의 건강한 조직의 $\geq 3x$ 90번째 백분위로 관심 암 유형에서 발현된다. 이러한 발현 한계 외에, 전사물 선택은 잠재적으로 잘못어셈블리된 콘티그 또는 3' 번역되지 않은 영역(UTR)에 LTR 요소를 갖는 전사물을 제외하고, 수동 검사에 기반하였다. 전사 방향을 명확하게 지정할 수 없는 경우 두 가닥에 상응하는 전사물을 고려하였다.

[0361] 이어서 암-특이적 전사물의 목록을 완전한 또는 부분적인 LTR 요소를 함유하는 전사물의 목록과 교차시켜 2개의 기준을 모두 충족시키는 5,923개 전사물(암-특이적 LTR 요소-스패닝 전사물로 CLT라 지칭된다)의 목록을 생성시켰다.

[0362] 단백질-암호화 가능성을 갖는 CLT를 식별하기 위해서, 본 발명자는 디코돈(육량체) 점수의 길이 및 적합성에 기초하여, ORF 예측 알고리즘을 실시시켰다. HMM을 Ensembl CDS 서열로부터 유래된 육량체상에서 훈련시키고 ORF ≥ 300 뉴클레오타이드를 순방향으로 취하였으며, 이때 이의 센스 육량체 점수는 안티센스 점수를 초과하였다. 상기 필터는 적어도 99 아미노산 길이의 단백질을 잠재적으로 암호화하는 885개 CLT를 식별하였다.

[0363] CLT에 의해 잠재적으로 암호화된 독특한 단백질 서열을 식별하기 위해서, 선택된 CLT의 최대 ORF로부터 번역된 서열을, 유연한-마스킹 부재하에 tblastn(BLAST + v2.3.0)을 사용하여 전체 전사물 어셈블리로부터 ≥ 210 뉴클레오타이드의 모든 ORF로부터 번역된 서열에 대해 조회하였다. 오직 적중되지 않거나 또는 E-값 $>10^{-5}$ 의 적중을 갖는 CLT만을 유지시켰다.

- [0364] CLT에 의해 암호화된 암-특이적 항원의 특이성을 추가로 확실히 하기 위해서, 본 발명자는 건강한 조직에서 발현될 수도 있는 다른 단백질과의 잠재적인 교차-반응성을 검사하였다. 이를 위해서, 임의의 다른 예측된 단백질과 <85% 아미노산 서열 동일성(단백질의 전체 길이에 걸쳐)을 갖는 번역된 ORF를 유지시켰다. 하나 이상의 예측된 단백질과 >85% 서열 동일성을 보이는 CLT-암호화된 단백질의 경우에, 본 발명자는 유사한 단백질을 암호화하는 전사물의 발현 패턴을 조사하였다. 상기 추가적인 전사물이 암-특이적인 방식으로 또한 발현되는 경우(상기 나열된 기준을 근거로), 각각의 CLT를 선택된 후보 목록에 유지시켰다. 상기 추가적인 전사물이 또한 건강한 조직에서 발현되는 경우, 각각의 CLT는 폐기하였다. 이들 선택 기준의 조합은 충분히 독특한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화할 가능성을 갖는 최종 139개의 CLT 목록을 생성시켰다.
- [0365] 이들 139개 CLT 중에서, 14개는 피부 흑색종에 특이적이었으며(즉 이들은 상기 방법에 따라 TGCA에서 피부 흑색종 샘플에서 특이적으로 상향조절되는 것으로 밝혀졌으며), 7개는 피부 흑색종 및 포도막 흑색종에 특이적이었(즉 이들은 상기 방법에 따라 TGCA에서 피부 흑색종 및 포도막 흑색종 샘플에서 특이적으로 상향조절되는 것으로 밝혀졌다). 이들 피부 흑색종 특이적 CLT 중 4개는 본원에서 서열번호 34, 37, 38 및 39를 갖는 것으로서 식별된다. 상기 피부 흑색종 및 포도막 흑색종 특이적 CLT 중 4개는 본원에서 서열번호 33, 35, 36 및 40을 갖는 것으로서 식별된다.
- [0366] 실시예 2 - 면역펩티도믹 분석
- [0367] 면역펩티도믹 분석은 세포 또는 조직에서 HLA 분자와 관련된 특정한 펩티드의 직접적인 검출을 허용하는 매우 유효한 기술이다. 상기 기법은 생물학적 샘플로부터 HLA 분자의 친화성 정제 및 이어서 HLA 분자로부터 결합된 펩티드의 용출 및 나노-울트라 성능 액체 크로마토그래피 질량 분광분석법(nUPLC-MS²)(Freudenmann et al., 2018, *Immunology* 154(3):331-345)에 의한 상기 펩티드의 평가로 이루어진다. 상기 방법에 의해 생성된 질량 분광분석(MS) 스펙트럼을 사용하여 HLA 부류 I 및 HLA 부류 II 분자에 결합된 짧은 펩티드를 정확하게 식별할 수 있다. 스펙트럼 해석 및 서열 식별에 사용되는 소프트웨어는 스펙트럼 합치를 위한 소정의 단백질 서열 목록의 가용성에 따라 변한다. 공지된 전사체 또는 심지어 전체 게놈으로부터 유래된 모든 개방 관독 프레임(ORF)에 상응하는 소정의 목록을 사용하여 MS 데이터를 검색할 수 있지만(Nesvizhskii et al., 2014, *Nat. Methods* 11: 1114-1125), 이러한 매우 큰 서열 데이터베이스를 조사하면 제시된 펩티드의 식별을 제한하는 매우 높은 틀린 거짓 비율이 발생된다. 추가적인 기술 문제(예를 들어 류신 질량 = 이소류신 질량) 및 이론적 문제(예를 들어 펩티드 이어맞추기(Liepe, et al., 2016, *Science* 354(6310): 354-358))는 매우 큰 데이터베이스, 예를 들어 공지된 전사체 또는 전체 게놈으로부터 생성된 것의 사용과 관련된 한계를 증가시킨다. 따라서, 실제로, 잠재적인 폴리펩티드 서열의 충분히-한정된 세트에 대한 참조 없이 신규 항원을 식별하기 위해 면역펩티도믹 분석을 수행하는 것은 특별히 어렵다.
- [0368] 바싸니 스테른버그(Bassani-Sternberg) 등(Bassani-Sternberg et al., 2016, *Nature Commun.*, 7: 13404)은 전체 인간 프로테오믹스에 대해 보고된 폴리펩티드에 대해 25명의 피부 흑색종 환자로부터 유래된 HLA 결합 펩티드 샘플에서 수집된 MS 데이터를 조사했다. 상기 분석을 통해 알려진 인간 단백질과 합치하는 수십만 개의 펩티드가 밝혀졌다. 예상된 바와 같이, 이러한 펩티드에는 PRAME, MAGEA3 및 TRPM1(멜라스타틴)을 포함한 다중 종양-관련 항원(TAA) 내에서 발견되는 펩티드가 포함되었다. 또한, 5명의 상기 환자로부터의 MS 데이터는 5명 환자의 게놈 분석에 의해 검출된 환자 특이적 돌연변이 단백질 서열로부터 생성된 폴리펩티드 목록에 의해 조사되어, 상기 환자의 HLA 부류 I 및 HLA 부류 II 분자상에 제시된 환자 특이적 신생 항원을 밝혀내었다.
- [0369] 실시예 1에서 지칭된 139개 CLT로부터 유래된 예측된 폴리펩티드 서열(ORF) 중 다수는 인간 프로테오믹스에 함유되지 않는다. 면역펩티도믹 평가의 상세한 지식을 적용함으로써, 발명자는 상기 신규의 잠재적인 CLT 항원 서열 세트와 함께 바싸니 스테른버그 등(데이터베이스 링크: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894>)의 원 데이터 파일을 조사하였다.
- [0370] 상기 분석을 수행하기 위해서, 각각의 CLT에 의해 암호화된 모든 가능한 ORF로부터의 펩티드 서열을 각 CLT에 대해 단일 펩티드 파일로 연결하거나 연결하지 않았으며, 이들 연결된 파일(분석 A) 또는 단일 펩티드 파일(분석 B)을 사용하여, PeaksTM 소프트웨어(분석 A) 또는 Mascot 소프트웨어(분석 B)를 사용함으로써 인간 프로테오믹스에서 발견된 모든 폴리펩티드(UniProt(분석 A) 또는 UniProt 및 masDB(분석 B))와 함께, PXD004894 데이터세트 중의 원 스펙트럼을 조사하였다.
- [0371] 분석 A에서, 이들 연구의 결과는 보고된 프로테오믹스에서 발견되지 않은 8개의 ORF에 기인할 수 있는, 바싸니 스테른버그 등에 의해 검사된 25명 환자로부터의 종양 샘플로부터 면역침전된 HLA 부류 I 분자와 관련있는 14개의 펩

티드를 식별하였다(표 1 참조). 분석 B에서, 이들 연구의 결과는 보고된 프로테오믹스에서 발견되지 않은 7개의 ORF에 기인할 수 있는, 바싸니 스텐버그 등에 의해 검사된 25명 환자로부터의 종양 샘플로부터 면역침전된 HLA 부류 I 분자 또는 HLA 부류 II 분자와 관련있는 14개의 펩티드를 식별하였다(표 2 참조). 상기 인용된 환자들로부터의 HLA 부류 I 및 HLA 부류 II 분자와 관련된 이들 펩티드의 검출은 상기 분자가 유래된 10개의 ORF(표 1 및 2, 서열번호 1-10)가 흑색종 조직에서 번역되었고 HLA 부류 I 또는 HLA 부류 II 분자와 복합체화된 면역계에 제시되었음을 확인시킨다. 이를 근거로, 상기 ORF에 의해 암호화된 폴리펩티드는 CLT 항원으로서 정의되었다. 표 1 및 2는 UniProt 데이터베이스에 있지 않은 CLT 항원에서 발견된 펩티드의 성질을 나타낸다. 도 1-32는 표 1 및 표 2에 나타난 각각의 펩티드로부터의 전형적인 질량 분광분석 스펙트럼을 도시한다. 상기 도면들은 nUPLC-MS²에 의해 개별적인 환자 SKCM 종양에서 검출된 바와 같은 표시된 펩티드 서열에 대한 단편 스펙트럼을 도시한다(바싸니 스텐버그 등으로부터; PEAKS 소프트웨어에 의해 PRIDE 데이터셋으로부터 상 추출됨). 검출된 모든 단편을 스펙트럼 위의 펩티드 서열 중에 나타내고 가장 풍부한 단편 이온을 각각의 스펙트럼에 할당한다. 도 1-15, 29-32(분석 A)에서, 도면의 하부 패널은 예측된 스펙트럼에 대한 서열 애노테이션을 제시하는 반면, 도 16-28의 우측(분석 B)에 표 형태로 유사한 데이터를 도시한다. 단편 이온을 하기와 같이 애노테이션한다: b: N-말단 단편 이온; y: C-말단 단편 이온; -H₂O: 수 상실; -NH₃: 암모니아의 상실; [2+] 이중 하전된 펩티드 이온; pre: 단편화되지 않은 전구체 펩티드 이온.

[0372] 표 1 및 2로부터의 HLA 부류 I과 관련하여 검출된 다수의 펩티드를 평가하여 HLA 부류 I 상위유형에의 예측된 결합 강도를 측정하였다. 구체적으로, 9 아미노산 이상 길이의 표 3에 참조된 모든 HLA 부류 I-관련된 펩티드를 NetMHC 4.0 예측 소프트웨어(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>)를 사용하여 조사하여 HLA 부류 I 유형 A 및 B 상위유형에 대한 이의 결합을 예측하였다. 이러한 예측 연구의 결과는 11개의 펩티드(또는 이들로부터 유래된 9-머)가 모두 시험된 상위유형 중 적어도 하나에 결합할 것으로 예측됨을 나타내었다(표 3 참조). 이들 중에서, 다수의 서열이 조사된 HLA 부류 I 상위유형내 특정한 유형에 높은 신뢰도(낮은 %순위 점수)로 결합하는 것으로 예측되었다.

[0373] 종합하면, 표 1-3 및 도 1-32에 나타난 데이터는 흑색종 환자에서 상응한 CLT 항원의 제시에 대한 분명한 강한 지지를 제공한다.

[0374] 요약하면: 상기 예측된 ORF로부터 유래된 면역펩티도믹 펩티드의 식별은 상기 CLT가 종양 조직에서 폴리펩티드(서열번호 1-10; CLT 항원으로서 지칭됨)로 번역됨을 입증한다. 이어서 상기는 상기 세포의 면역감시 기구에 의해 처리되고, HLA 부류 I 또는 HLA 부류 II 분자상에 로딩되어, 상기 세포가 생성되는 펩티드/HLA 부류 I 또는 펩티드/HLA 부류 II 복합체를 인식하는 T-세포에 의한 세포용해에 표적화되게 할 수 있다. 따라서, 이들 CLT 항원 및 이의 단편은 종양이 상기 항원을 발현하는 환자에서 흑색종의 치료를 위한 다양한 치료학적 양상에 유용할 것으로 예상된다.

표 1

[0375] CLT 항원 명칭 및 서열번호에 대한 교차 참조와 함께 SKCM 종양 샘플의 면역펩티도믹 분석(분석 A)에 의해 식별된 펩티드의 목록

펩티드 서열 ¹	펩티드 서열번호	CLT 항원 번호	CLT 항원 서열번호	환자 # ²	펩티드 질량 ³	펩티드 길이	면적 ⁴	스펙트럼 # ⁵	Ppm ⁶
VQQGWFFPR	서열번호 11	1	서열번호 1	Me1-3	1163.59	9	350000	1	9.4
VVRGGAGFAAR	서열번호 12	1	서열번호 1	Me1-3	1059.59	11	3970000	8	5.1
HLADRKLSL	서열번호 13	1	서열번호 1	Me1-5	1051.61	9	125000000	2	-1.1
HLADRKLSL	서열번호 13	1	서열번호 1	Me1-16	1051.61	9	3290000	30	5.1
ADSLILDF	서열번호 15	2	서열번호 2	Me1-26	892.45	8	83300	1	0.9
SSFSTLASLDK	서열번호 16	2	서열번호 2	Me1-20	1154.58	11	860000	2	-6.7
NTPNIVSLR	서열번호 17	3	서열번호 3	Me1-35	1012.57	9	4690000	2	3.8

KTKGSLSVFR	서열번호 19	4	서열번호 4	Mel-3	1121.66	10	1200000	3	4.8
AAFDRVHF	서열번호 51	4	서열번호 4	Mel-40	1032.51	9	227000	1	0.3
AAFDRVHF	서열번호 51	4	서열번호 4	Mel-41	1032.514	9	8700000	3	7.8
AFDRVHF	서열번호 52	4	서열번호 4	Mel-27	961.4769	8	1240000	3	7.9
AFDRVHF	서열번호 52	4	서열번호 4	Mel-39	961.47	8	1940000	3	2.6
DIPIKPW	서열번호 21	5	서열번호 5	Mel-5	867.49	7	1280000	5	5.3
DIPIKPW	서열번호 21	5	서열번호 5	Mel-27	867.49	7	1790000	6	9.1
RVADIPIKPW	서열번호 20	5	서열번호 5	Mel-5	1193.69	10	8710000	4	4.7
RVADIPIKPW	서열번호 20	5	서열번호 5	Mel-27	1193.69	10	82000000	6	9.8
RVADIPIKP	서열번호 22	5	서열번호 5	Mel-27	1007.61	9	30300000	6	8
RSRDNFAVW	서열번호 23	6	서열번호 6	Mel-21	1149.57	9	21900000	4	8.5
RSRDNFAVW	서열번호 23	6	서열번호 6	Mel-27	1149.57	9	19800000	6	7.8
RSRDNFA	서열번호 24	6	서열번호 6	Mel-21	864.42	7	41000000	3	8.8
RSRDNFA	서열번호 24	6	서열번호 6	Mel-27	864.42	7	2550000	3	7.9
SPGISLVF	서열번호 25	7	서열번호 7	Mel-16	818.45	8	546000	1	8.3
SSDSTILVL	서열번호 26	8	서열번호 8	Mel-41	933.50	9	63600	1	13.1

[0376] ¹질량 분광분석법에 의해 식별된 펩티드. 모든 펩티드는 HLA 부류 I 펩티드이다.

[0377] ²Bassani-Sternberg *et al*, 2016, Nature Comm., 7: 13404

[0378] ³계산된 펩티드 질량.

[0379] ⁴질량 스펙트럼으로부터의 PeaksTM 프로그램 면적; 선택된 면적값을 하나 초과하는 스펙트럼이 획득된 펩티드에 대해 나타낸다.

[0380] ⁵펩티드가 검출된 스펙트럼의 번호

[0381] ⁶관찰된 질량과 계산된 질량간의 편차; 선택된 ppm 값을 하나 초과하는 스펙트럼이 획득된 펩티드에 대해 나타낸다.

표 2

[0382] CLT 항원 명칭 및 서열번호에 대한 교차 참조와 함께 SKCM 종양 샘플의 면역펩티도믹 분석(분석 B)에 의해 식별된 펩티드의 목록

펩티드 서열 ¹	펩티드 서열번호	CLT 항원 번호	CLT 항원 서열번호	환자 # ²	펩티드 질량 ³	펩티드 길이	스펙트럼 # ⁴	질량 델타 ⁵
HLADRKLSL	서열번호 13	1	서열번호 1	Mel-16	1051.61	9	3	0.01015
VVRGGAGFAAR	서열번호 12	1	서열번호 1	Mel-3	1059.59	11	1	0.001564

ARLQGSVTL	서열번호 14	1	서열번호 1	Me1-5	985.56	9	1	0.007816
SSFSTLASLDK	서열번호 16	2	서열번호 2	Me1-20	1154.58	11	2	0.004607
QPEVGIIIPSVLLMR P*	서열번호 18	3	서열번호 3	Me1-18	1743.90	15	1	-0.052238
KTKGSLSVFR	서열번호 19	4	서열번호 4	Me1-3	1121.66	10	2	0.005258
RVADIPIKPW	서열번호 20	5	서열번호 5	Me1-4	1193.69	10	1	0.009444
RVADIPIKPW	서열번호 20	5	서열번호 5	Me1-5	1193.69	10	1	0.00549
DIPIKPW	서열번호 21	5	서열번호 5	Me1-4	867.49	7	1	0.008214
AGRMSKSLVIK	서열번호 27	9	서열번호 9	Me1-15	1188.70	11	3	-0.000087
PQSAGRM	서열번호 28	9	서열번호 9	Me1-6	745.35	7	1	0.007525
AGSQSSSFTRGHTG ETPQ*	서열번호 29	9	서열번호 9	Me1-10	1875.83	18	1	0.04998
RSNLSIFL	서열번호 30	10	서열번호 10	Me1-4	990.55	8	2	-0.005184
FSLCLFTL	서열번호 31	10	서열번호 10	Me1-18	942.49	8	1	-0.000214
FSLCLFTL	서열번호 31	10	서열번호 10	Me1-15	942.49	8	13	-0.0026
SRRVFSRFSYMTFY SFRSYIKV*FV*	서열번호 32	10	서열번호 10	Me1-7	3370.48	24	1	0.006099

[0383] ¹질량 분광분석법에 의해 식별된 펩티드. 모든 펩티드는 a*(HLA 부류 II인 것들)로 표시되지 않는 한 HLA 부류 I 펩티드이다.

[0384] ²Bassani-Sternberg *et al*, 2016, Nature Comm., 7: 13404

[0385] ³계산된 펩티드 질량.

[0386] ⁴펩티드가 검출된 스펙트럼의 번호

[0387] ⁵관찰된 질량과 계산된 질량간의 편차; 선택된 질량 델타값을 하나 초과하는 스펙트럼이 획득된 펩티드에 대해 나타낸다.

[0388] *는 HLA 부류 II 펩티드를 표시한다.

표 3

[0389] CLT 항원 명칭 및 서열번호에 대한 교차 참조와 함께, 12개의 HLA 부류 I 상위유형 대립유전자(HLA-A0101, HLA-A0201, HLA-A0301, HLA-A2402, HLA-A2601, HLA-B0702, HLA-B0801, HLA-B1501, HLA-B2705, HLA-B3901, HLA-B4001, HLA-B5801)에 대한 질량 분광분석-식별된 펩티드(길이 ≥9 잔기)의 예측되는 NetMHC 4.0 결합

12 인간 HLA 부류 1A & B 상위유형에의 결합 예측 ¹	펩티드 서열	<5.1%의 순위 점수를 갖는 대립유전자의 수 ²	<2.1%의 순위 점수를 갖는 대립유전자의 수 ³	펩티드 서열번호	CLT 항원 번호	환자 # ⁴
예	VQQGWFFPR	2/12	1/12	서열번호 11	1	Me1-3
예	VVRGGFAGFAAR	3/12	0	서열번호 12	1	Me1-3
예	HLADRKLSL	6/12	3/12	서열번호 13	1	Me1-5/Me1-16

예	ARLQGSVTL	7/12	3/12	서열번호 14	1	Mel-5
예	SSFSTLASLTK	7/12	3/12	서열번호 16	2	Mel-20
예	NTPNIVSLR	1/12	1/12	서열번호 17	3	Mel-35
예	KTKGSLSVFR	4/12	2/12	서열번호 19	4	Mel-3
예	AAFDRAVHF	12/12	6/12	서열번호 51	4	Mel-40/Mel-41
예	RVADIPIKPW	1/12	1/12	서열번호 20	5	Mel-4/Mel-5/Mel-27
예	RVADIPIKP	0/12	0/12	서열번호 22	5	Mel-27
예	RSRDNFAVW	3/12	1/12	서열번호 23	6	Mel-21/Mel-27
예	SSDSTILVL	2/12	1/12	서열번호 26	8	Mel-41
예	AGRMSKSLVIK	4/12	4/12	서열번호 27	9	Mel-15

[0390] ¹임의의 순위 점수에서 조사된 HLA 부류 I 상위유형에의 예측된 결합.

[0391] ²<5.1%의 순위 점수로 결합(약한 결합)하는 것으로 예측된 HLA 부류 I 상위유형의 분획.

[0392] ³<2.1%의 순위 점수로 결합(보다 강한 결합)하는 것으로 예측된 HLA 부류 I 상위유형의 분획.

[0393] ⁴Bassani-Sternberg *et al.*, 2016, Nature Comm., 7: 13404

[0394] 실시예 2.1 - 추가적인 면역펩티도믹 분석

[0395] 실시예 2에 기재된 분석 외에, 발명자는 또한 신규의 면역펩티도믹 연구를 통해 예측된 ORF로부터 유래된 펩티드를 식별하였다. 하기에 기재된 상기 추가의 연구는 상기 CLT가 종양 조직에서 CLT 항원 폴리펩티드로 번역됨을 추가로 입증한다.

[0396] 발명자는 흑색종으로 진단된 10명 환자의 동결된 종양 조직을 구하였다. 0.05 내지 1 g의 샘플을 균질화하였으며, 용해물을 고속으로 원심분리시키고 등분화된 용해물을 항-인간 HLA 부류 I 단클론 항체(W6/32)에 공유 결합된 단백질 A(ProA) 비드와 혼합하였다. 상기 혼합물을 4℃에서 밤새 배양하여 항체에 대한 HLA 부류 I 분자 결합을 개선시켰다(Ternette *et al.*, 2018 Proteomics 18, 1700465). 상기 HLA 부류 I-결합된 펩티드를 10% 아세트산을 사용하여 상기 항체로부터 용출시키고 이어서 상기 펩티드를 역상 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 다른 고분자량 성분으로부터 분리시켰다(Ternette *et al.*, 2018). 상기 정제된, 용출된 펩티드에 nUPLC-MS를 가하고, 한정된 전하 대 질량비(m/z)의 특정 펩티드를 질량 분광계내에서 선택하고, 단리하고, 단편화하고, MS/MS를 가하여 생성되는 단편 이온의 m/z를 밝혀(Ternette *et al.*, 2018), 상기 각각의 종양 샘플에 대한 면역펩티드에 상응하는 MS/MS 데이터세트를 생성시켰다.

[0397] 면역펩티도믹 평가의 상세한 지식을 적용함으로써, 발명자는 PEAKSTM 소프트웨어(v8.5 및 vX, Bioinformatics Solutions Inc)를 사용하여 인간 프로테옴(UniProt)에서 발견되는 모든 폴리펩티드 서열과 함께 검색된(각각의 CLT에 대해서) CLT 항원 1, 2, 3 및 4번(표 4; 서열번호 1-4)과 함께 발명자에 의해 제조된 10개의 흑색종 종양에 대한 HLA-부류 I 데이터세트의 스펙트럼을 조사하였다. 세포에서 발견되는 대부분의 부류 I HLA-결합된 펩티드는 구성적으로 발현된 단백질로부터 유래되기 때문에, UniProt 프로테옴과 상기 데이터베이스의 동시 조사는 본 발명자의 CLT ORF 서열의 MS/MS 스펙트럼에의 할당이 올바른지를 확실하게 하는데 도움이 된다.

[0398] 상기 연구의 결과는 발명자에 의해 수득된 10개의 흑색종 환자 샘플의 종양 샘플로부터 면역침전된 HLA 부류 I 분자와 관련된 8개의 개별적인 펩티드(표 4; 서열번호 1-4)를 식별하였다. 상기 펩티드는 CLT-유래된 ORF의 아미노산 서열에 상응하였으며, 공지된 인간 프로테옴(UniProt)내에 존재하는 폴리펩티드 서열에는 상응하지 않았다. 발명자의 데이터세트 중의 CLT 항원 서열번호 1-4(표 4)로부터 식별된 8개 펩티드 중 2개가 바싸니 스텐버그 등에 의해 조사된 환자로부터의 종양 샘플로부터 면역침전된 HLA 부류 I 분자와 관련된 10개의 개별적인 펩티드(실시예 2 및 표 1 & 2에 개략된 동일한 CLT 항원 서열번호 1-4로부터의)에 추가된다.

[0399] HLA 부류 I 분자와 관련된 상기 펩티드의 검출은 상기가 유래된 4개의 ORF가 먼저 흑색종 조직에서 번역되고, HLA 부류 I 경로를 통해 처리되고, 최종적으로 HLA 부류 I 분자와의 복합체 중에서 면역계에 제시되었음을 확인시킨다. 표 4는 CLT 항원에서 발견된 펩티드의 성질을 나타낸다. 도 33-42는 표 4에 나타난 각각의 펩티드로부터의 전형적인 MS/MS 스펙트럼을 도시한다. 이들 도면 각각의 상부 패널은 MS/MS 펩티드 단편 프로파일을 도시

하며, 이때 표준 MS/MS 애노테이션(b: N-말단 단편 이온; y: C-말단 단편 이온; -H₂O: 수 상실; -NH₃: 암모니아의 상실; [2+] 이중 하전된 펩티드 이온; pre: 단편화되지 않은 전구체 펩티드 이온; a_n-n: 내부 단편 이온)을 PEAKS 소프트웨어에 의한 발명자의 데이터세트로부터 추출된 상에서 가장 풍부한 단편 이온 피크 위에 나타낸다. 각 도면의 하부 패널은 상기 단편 이온에 맵핑된 선형 펩티드 서열의 위치를 가리키는 스펙트럼의 렌더링을 도시한다. 표 4에서 펩티드에 할당된 높은 -10lgP 점수와 일관되게, 상기 스펙트럼은 상기 분석에서 발견된 펩티드의 서열(서열번호 12, 13, 16, 17, 19, 51, 53 및 54)과 정확하게 합치하는 다수의 단편을 함유한다.

[0400] 길이가 적어도 9AA인 표 4로부터의 HLA 부류 I와 관련하여 검출된 모든 펩티드를 NetMHCpan 4.0 예측 소프트웨어(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>)를 사용하여 평가하여 HLA 부류 I 유형 A 및 B 상위유형에 대한 이의 예측된 결합 강도를 측정하였다. 이러한 예측 연구의 결과는 상기 펩티드(또는 이들로부터 유래된 9-머)가 모두 시험된 상위유형 중 적어도 하나에 결합할 것으로 예측됨을 나타내었다(표 5 참조). 이들 중에서, 다수의 서열이 조사된 HLA 부류 I 상위유형내 특정한 유형에 높은 신뢰도(낮은 %순위 점수)로 결합하는 것으로 예측되었다. 상기 검출된 펩티드가 모두 환자 집단에 있을 것으로 예상된 HLA 유형에 결합하는 것으로 예상되었다는 사실은 이의 검출과 일치한다. 더욱이, 발명자의 데이터세트로부터의 종양 샘플에서 발견된 모든 펩티드가, 상기 환자 샘플에서 본 발명자가 검출한 HLA 유형 중 하나에 결합함이 NetMHCpan 4.0에 의해 예측되었다.

[0401] 본 발명자가 실시예 2.1에서 발견한 펩티드 서열에 대한 종양 조직-유래된 MS 스펙트럼의 할당에 대한 추가의 확실성을 제공하기 위해서, 발명자의 데이터에서 종양 샘플에 적용된 동일한 조건을 사용하여 상기 발견된 서열을 갖는 펩티드를 합성하고 nUPLC-MS²를 수행하였다. 선택된 펩티드에 대한 스펙트럼의 비교를 도 43-50에 도시한다. 각각의 도면에서 상부 스펙트럼은 종양 샘플(발명자의 종양 조직 데이터베이스 중에서 - 도 33-42)에 상응하고, 하부 스펙트럼은 동일한 서열의 합성적으로 생성된 펩티드에 상응한다. 검출된 이온 단편의 선택된 m/z 값을 상기 MS/MS 스펙트럼에서 각 단편 피크의 위/아래에 도시한다. 이들 도면은 단편들의 정확한 정렬을 밝히며(종양- 및 합성 펩티드-유래된 단편 이온간의 실험적으로 측정된 m/z 값의 작은 차이는 충분히 <0.05 달톤의 m/z 허용 범위내에 있다), 이는 CLT-암호화된 펩티드에 대한 각각의 종양 조직-유래된 스펙트럼의 할당의 진실성(veracity)을 입증한다.

[0402] 종합하면, 표 4, 도 33-42 및 도 43-50에 나타난 펩티드 데이터는 흑색종 환자에서 상응한 CLT 항원의 번역, 처리 및 제시에 대한 분명한 강한 지지를 제공한다.

[0403] 이들 CLT의 암-특이성을 추가로 입증하기 위해서, 발명자는 37개의 정상적인 조직 샘플(10개의 정상 피부, 9개의 정상 폐 및 18개의 정상 유방 조직)을 처리하였으며 면역펩티도믹 분석을 위해 준비하였다. 발명자는 이들 정상 조직 샘플로부터의 HLA-부류 I 데이터세트의 스펙트럼을 조사하여, CLT 항원 1, 2, 3 및 4번의 폴리펩티드 서열로부터 유래된 모든 가능한 펩티드 서열을 검색하였다. CLT 항원 1, 2, 3 및 4번으로부터 유래된 펩티드는 정상 조직 샘플의 세트에서 검출되지 않았으며(표 6), 이는 상기 CLT가 암-특이적 발현을 갖는다는 추가적인 확인을 제공한다.

[0404] 요약하면: 상기 예측된 ORF로부터 유래된 면역펩티도믹 펩티드의 추가적인 식별은 상기 CLT가 종양 조직에서 폴리펩티드(서열번호 1-4; CLT 항원으로서 지칭됨)로 번역됨을 추가로 입증한다. 따라서, 상기 CLT 항원 및 이의 단편은 종양이 상기 항원을 발현하는 환자에서 흑색종의 치료를 위한 다양한 치료학적 양상에 유용할 것으로 예상된다.

표 4

[0405] CLT 항원 명칭 및 서열번호에 대한 교차 참조와 함께 흑색종 종양 샘플의 추가적인 면역펩티도믹 분석에 의해 식별된 펩티드의 목록

펩티드 서열 ¹	펩티드 서열번호	CLT 항원 번호	CLT 항원 서열번호	환자 # ²	펩티드 질량 ³	펩티드 길이	면적 ⁴	스펙트럼 # ⁵	Ppm ⁶
HLADRKLSL	서열번호 13	1	서열번호 1	2MT3	1051.61	9	154000	2	-1.4
HLADRKLSL	서열번호 13	1	서열번호 1	2MT10	1051.61	9	ND	1	3.4

VVRGGAGFAAR	서열번호 12	1	서열번호 1	2MT3	1059.59 4	11	985000	6	-0.9
SSFSTLASLDK	서열번호 16	2	서열번호 2	2MT4	1154.58 2	11	559000	1	0.9
NTPNIVSLR	서열번호 17	3	서열번호 3	2MT3	1012.56 7	9	884000	1	-2.8
RPLRIKGVF	서열번호 53	3	서열번호 3	1MT1	1084.686 9	9	1940000 0	7	0
AAFDRAVHF	서열번호 51	4	서열번호 4	2MT3	1032.51 4	9	ND	1	-1.3
KTKGSLSVFR	서열번호 19	4	서열번호 4	2MT3	1121.655 6	10	1010000 0	6	-0.7
KTKGSLSVFR	서열번호 19	4	서열번호 4	2MT1	1121.655 6	10	1010000 0	2	-0.7
KTKGSLSVF	서열번호 54	4	서열번호 4	2MT12	965.555	9	4830000	1	1.2

[0406] ND - 측정 안 됨

[0407] ¹질량 분광분석법에 의해 식별된 HLA 부류 I 펩티드.

[0408] ²발명자의 데이터세트(1MT1, 1MT2, 1MT3, 2MT1, 2MT2, 2MT3, 2MT4, 2MT9, 2MT10, 2MT12).

[0409] ³계산된 펩티드 질량.

[0410] ⁴질량 스펙트럼으로부터의 PeaksTM 프로그램 면적; 선택된 면적값을 하나 초과하는 스펙트럼이 획득된 펩티드에 대해 나타낸다.

[0411] ⁵펩티드가 검출된 스펙트럼의 번호

[0412] ⁶관찰된 질량과 계산된 질량간의 편차; 선택된 ppm 값을 하나 초과하는 스펙트럼이 획득된 펩티드에 대해 나타낸다.

표 5

[0413] CLT 항원 명칭 및 서열번호에 대한 교차 참조와 함께, 12개의 HLA 부류 I 상위유형 대립유전자(HLA-A0101, HLA-A0201, HLA-A0301, HLA-A2402, HLA-A2601, HLA-B0702, HLA-B0801, HLA-B1501, HLA-B2705, HLA-B3901, HLA-B4001, HLA-B5801)에 대한 질량 분광분석-식별된 펩티드(길이 ≥9 잔기)의 예측되는 NetMHC 4.0 결합

12 인간 HLA 부류 1A & B 상위유형에의 결합 예측 ¹	펩티드 서열	<5.1%의 순위 점수를 갖는 대립유전자의 수 ²	<2.1%의 순위 점수를 갖는 대립유전자의 수 ³	펩티드 서열번호	CLT 항원 번호	환자 # ⁴
예	HLADRKLSL	6/12	3/12	서열번호 13	1	2MT3 2MT10
예	VVRGGFAGFAAR	3/12	0	서열번호 12	1	2MT3
예	SSFSTLASLDK	7/12	3/12	서열번호 16	2	2MT4
예	NTPNIVSLR	1/12	1/12	서열번호 17	3	2MT3
예	RPLRIKGVF	2/12	2/12	서열번호 53	3	2MT1
예	AAFDRAVHF	12/12	6/12	서열번호 51	4	2MT3
예	KTKGSLSVFR	4/12	2/12	서열번호 19	4	2MT1 2MT3
예	KTKGSLSVF	7/12	4/12	서열번호 54	4	2MT12

[0414] ¹임의의 순위 점수에서 조사된 HLA 부류 I 상위유형에의 예측된 결합.

[0415] ²<5.1%의 순위 점수로 결합(약한 결합)하는 것으로 예측된 HLA 부류 I 상위유형의 분획.

[0416] ³<2.1%의 순위 점수로 결합(보다 강한 결합)하는 것으로 예측된 HLA 부류 I 상위유형의 분획.

[0417] ⁴발명자의 데이터세트(1MT1, 1MT2, 1MT3, 2MT1, 2MT2, 2MT3, 2MT4, 2MT9, 2MT10, 2MT12).

표 6

[0418] 정상 조직 샘플 세트 중 CLT 항원 1 내지 4로부터 펩티드-유래된 수

항원	피부	폐	유방
CLT 항원 1	0/10	0/9	0/18
CLT 항원 2	0/10	0/9	0/18
CLT 항원 3	0/10	0/9	0/18
CLT 항원 4	0/10	0/9	0/18

[0419] 실시예 1, 2 및 2.1에 제공된 결과는 전체적으로 또는 부분적으로 암 게놈 아틀라스(TCGA) 연구 네트워크(The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research) Network(<http://cancergenome.nih.gov/>); 및 유전자형-조직 발현 (GTEx) 프로젝트(Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project)(the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, 및 NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, 및 NINDS에 의해 뒷받침된다)에 의해 생성된 데이터에 기초한다.

[0420] 실시예 3 - HERVFEST

[0421] 특이적 T-세포의 기능 확대(Functional expansion of specific T-cell;FEST) 기술을 사용하여, MANA 에피토프에 반응하는 환자 T-세포의 검출에 기초하여 암 환자의 종양 세포에서 발견된 "돌연변이-관련 신생항원"(MANA) 레퍼토리에 존재하는 치료학적으로 관련된 종양-유래된 에피토프를 식별하였다(Anagnostou et al., Cancer Discovery 2017; Le et al., Science 2017; Forde et al., NEJM 2018; Danilova et al., Cancer Immunol. Res. 2018). 실시예 1, 2 & 2.1(표 1-6, 도 1-50)에 설명된 방법을 사용하여 발견한 CLT 항원에 FEST 기술의 적용을 사용하여 암 환자에서 CLT 항원에 대한 치료학적으로 관련된 T-세포 반응을 식별할 수 있다.

[0422] 면역 노출을 겪은 대상체에서 에피토프-특이적 T-세포를 식별하기 위한 다른 분석(예를 들어 ELISPOT)처럼, "FEST" 기술은 항원-제시 세포 및 적합한 항원 펩티드를 포함하는 생체의 배양물 중에서 동족 T-세포를 활성화/확대시킴으로써 이의 특이성을 유도한다. 상기 기법은 항원(또는 항원들)으로부터 유래된 표적 펩티드 패널로부터의 개별적인 펩티드와 배양된 세포에서 확대된 특정한 TCR을 검출하기 위해 상기 증폭된 배양물 중에 존재하는 T-세포 수용체(TCR) DNA 서열의 차세대 서열분석(구체적으로: TCR-V β CDR3 영역을 표적화하는 TCRseq)을 사용한다는 점에서 다른 면역학적 분석과 상이하다. 동일한 환자 중의 종양 조직에의 TCRseq의 적용을 또한 사용하여, TCR/T-세포가 생체외에서 검출되는 경우, 펩티드-자극된 배양물이 또한 암 조직 중 제자리에서 발견된 종양-침윤성 림프구내에 존재하는지의 여부를 입증할 수 있다. 따라서, MANAFEST는 환자 T-세포에 의해 인식되어, 정상 및 암 환자로부터의 종양 조직의 전체-엑솜 서열분석에 의해 발견된 다수의 돌연변이 펩티드 중에서 기능적으로 관련된 MANA 펩티드의 식별을 허용하는 MANA 에피토프를 식별하기 위한 유력한 기술임이 입증되었다(Le et al., Science 2017; Forde et al., NEJM 2018; Danilova et al., Cancer Immunol. Res. 2018; Smith et al., J Immunother Cancer 2019).

[0423] CLT 항원예의 MANAFEST 방법(Danilova et al., Cancer Immunol. Res. 2018)의 적용을 하기와 같이 수행하였다. 상기 방법(본 발명자는 HERVFEST라 지칭할 것이다)은 하기의 단계들로 이루어진다: 단계 1: 선택된 HLA 부류 I 대립유전자와 효율적으로 결합하는 에피토프를 함유하는 것으로 예측되는 펩티드를 CLT 항원에서 식별하였다. 단계 2: 적합한 흑색종 환자로부터의 PBMC를 HLA 부류 I 유형에 의해 단계 1에서 선택된 펩티드 라이브러리에 합치시켰다. 단계 3: 상기 환자로부터의 PBMC를 T-세포 및 비 T-세포 분획으로 분리하였다. 비 T-세포를 다시 환자의 T-세포에 가하고, 이어서 20-50 웰(배양물당 250,000개의 T-세포를 함유한다)에 분할하고, 다양한 T-세포 생육 인자 및 개별적인 CLT 항원-유래된 합성 펩티드(단계 1/2에서 선택됨)와 함께 10일간 번식시켰다. 단계 4: TCRseq(TCR-V β CDR3 서열의 서열분석)를 모든 웰에서 수행하였으며 개별적인 CLT 항원-유래된 펩티드의 존재하에서 증폭된(그러나 대조용 펩티드의 존재하에서 또는 펩티드 자극의 부재하에서 증폭되지 않는) TCR-V β CDR3 서열을 식별하였다. 따라서 상기 분석의 개별적인 웰 중의 증폭된 TCR-V β CDR3 서열의 존재는 흑색종 환자에서 면역 반응을 이끌어낸 CLT 항원-유래된 펩티드를 식별한다. 단계 5: TCRseq를 또한 종양 샘플상에서 수행하여, 상기 CLT-항원 증폭된 TCR을 갖는 T-세포가 환자 종양으로 귀소하였는지의 여부를 측정하여, 상기 TCR

을 갖는 T-세포가 환자 종양내의 CLT 항원-유래된 펩티드를 인식한다는 추가적인 증거를 제공할 수 있다.

[0424] HERVFAST 분석을 CLT 항원 1-4(서열번호 1-4)로부터 유래된 펩티드로 수행하였다. 상기 연구에 사용된 펩티드의 패널(상기 단계 1 참조)은 본 발명자의 분석을 위해 입수할 수 있는 환자 종양 샘플에서 통상적으로 발견된 8개의 HLA 부류 I 유형에 강하게 결합하는 것으로 예측되는 CLT 항원-유래된 펩티드의 NetMHC 예측에 기초하였다. 상기 HERVFAST 분석에서 하나 이상의 TCR을 증폭시킨 CLT 항원-유래된 펩티드를 표 7에 제공한다. 표 7은 또한 각 환자의 PBMC-유래된 배양물로 시험된 CLT 항원 펩티드의 HLA 부류 I 유형(들)을 가리킨다. 상기 연구에서 시험되고 상기 분석에서 하나 이상의 TCR을 증폭시킨 PBMC를 갖는 환자의 HLA 부류 I 유형을 표 8에 나타낸다.

[0425] 도 51 패널 A는 NSCLC 환자-특이적 MANA 펩티드에 의한 TCR 증폭을 입증하는 공개된 데이터를 도시한다(Forde et al., NEJM 2018). 수직축은 수평축상에 나열된 MANA 또는 대조용 펩티드의 존재하에서 배양된 세포의 웰에 대한 각각 표시된 TCR-Vβ CDR3 서열의 출현율을 도시한다. MANA7을 함유하는 웰에서의 증폭은 상기 환자의 T-세포 레퍼토리가 상기 펩티드에 반응하는 T-세포를 포함함을 가리킨다. 도 51의 패널 B 및 C는 표시된 CLT 항원 펩티드 및 대조용 펩티드의 존재하에서 배양된 2명의 흑색종 환자로부터의 PBMC의 전형적인 TCR 증폭 데이터를 도시한다. 패널 A의 경우에서와 같이, 패널 B & C에서 관찰된 특정한 증폭은 상기 흑색종 환자의 T-세포 레퍼토리가 특정한 CLT 항원-유래된 펩티드와 반응성인 T-세포를 포함함을 입증한다. 패널 B는 CLT 항원 1, 2 & 4로부터의 패널 15 HLA 부류 I A*02 펩티드로 자극된 모든 웰 중의 흑색종 환자 222B의 PBMC의 LMSSFSTLASL-자극된 웰에서 검출된 TCR의 빈도를 도시한다. 3개의 TCR 서열이 증폭되었다. LMSSFSTLASL(서열번호 61)은 CLT 항원 2로부터 유래된 A*02 결합 펩티드이다. 패널 C는 CLT 항원 1, 2 & 4로부터의 15 HLA 부류 I A*02 펩티드 및 CLT 항원 1, 2, 3 & 4로부터의 24 HLA 부류 I A*03 펩티드의 패널로 자극된 모든 웰 중의 흑색종 환자 224B의 PBMC의 MVACRIKTR-자극된 웰에서 검출된 TCR의 빈도를 도시한다. 하나의 TCR 서열이 증폭되었다. MVACRIKTR(서열번호 64)은 CLT 항원 2로부터 유래된 A*03 결합 펩티드이다.

[0426] 이들 실험에 사용된 대조용 펩티드/조건은 하기와 같았다: CEF = CMV, EBV 및 인플루엔자 펩티드의 혼합물; SL9, TV9 및 QK1 = HIV-1 대조용 펩티드; 펩티드 없음 = 펩티드 부재하에서의 배양; 기준선 = 배양 전 T-세포.

[0427] 도 52는 상기 환자에 의해 완료된 연구에서 하나 이상의 TCR을 증폭시킨 CLT 항원 1-4에 대한 모든 CLT 항원 펩티드의 요약을 도시한다. 각각의 패널은 면역펩티도믹 분석에 의해 검출된 펩티드가 오버레이된 CLT 항원 1-4의

아미노산 서열을 나타낸다(**파선밑줄** 또는 **굵은** 텍스트로 표시됨; 실시예 2 & 2.1 참조). 상기 서열 아래, HERVFAST-검출된 펩티드(도 51 참조)를, 상기가 검출된 흑색종 환자의 수(표 8) 및 표적화된 HLA 부류 I 유형과 함께 나타낸다.

[0428] 각각의 HERVFAST 검출의 성질을 하기와 같이 정의한다:

[0429] · 평범한 텍스트: 단일 TCR의 현저한 증폭

[0430] · **굵은 텍스트**: 다수 TCR의 현저한 증폭

[0431] · **밑줄친 이탤릭체 텍스트**: 다른 웰에서 검출된 단일 TCR의 현저한 증폭

[0432] · **밑줄친 굵은 텍스트**: 다수 TCR의 현저한 증폭, 이 중 적어도 하나는 다른 웰에서 검출되었다

[0433] 이러한 결과는 CLT 항원 1-4가 흑색종 환자 중에 존재하고 상기 CLT 항원으로부터 유래된 펩티드가 상기 흑색종 환자에서 특이적인 T-세포 반응을 이끌어낸 강한 증거를 제공하며, 이는 흑색종을 치료하는 치료학적 중재에 대한 표적으로서 상기 CLT 항원의 가치를 입증한다.

표 7

[0434] HERVFAST 분석에서 하나 이상의 TCR을 증폭시킨 CLT 항원-유래된 펩티드

참조 CLT 항원	서열번호	펩티드 서열	펩티드에 대한 HLA 부류 I-유형(NetMHC에 의해 예측됨)	HERVFAST 패널 참조
1	서열번호55	VPANTYNALK	HLA-A*03:01	37
1	서열번호56	RLGGCQAWWR	HLA-A*03:01	41
1	서열번호57	ANTYNALKSR	HLA-A*11:01	60

1	서열번호13	HLADRKLSL	HLA-B*07:02	109
2	서열번호58	LVTDVACRI	HLA-A*01:01	8
2	서열번호59	LILDFQPLQL	HLA-A*01:01	13
2	서열번호60	MSSFSTLASL	HLA-A*01:01	15
2	서열번호59	LILDFQPLQL	HLA-A*02:01	25
2	서열번호61	LMSSFSTLASL	HLA-A*02:01	27
2	서열번호62	LMSSFSTLA	HLA-A*02:01	23
2	서열번호63	QLMSSFSTLA	HLA-A*02:01	26
2	서열번호64	MVACRIKTR	HLA-A*03:01	46
2	서열번호16	SSFSTLASLDK	HLA-A*03:01	45
2	서열번호64	MVACRIKTR	HLA-A*11:01	67
2	서열번호65	VTDMVACRIK	HLA-A*11:01	69
2	서열번호66	SPADSLIL	HLA-B*07:02	119
2	서열번호78	SLILDFQPL	HLA-A*02:01	20
3	서열번호67	NTPNIVSLRA	HLA-A*01:01	18
3	서열번호68	VLLMRPLRIK	HLA-A*11:01	78
3	서열번호69	MRPLRIKGVF	HLA-B*07:02	124
4	서열번호70	FLFLELWL	HLA-A*02:01	30
4	서열번호71	SVFRELHPA	HLA-A*02:01	29
4	서열번호72	SPPSSTAPL	HLA-B*07:02	132

표 8

[0435]

HERVFEST 분석에 사용된 흑색종 환자 PBMC의 특징

환자	HLA 대립 유전자 A1	HLA 대립 유전자 A2	HLA 대립 유전자 B1	HLA 대립 유전자 B2	HLA 대립 유전자 C1	HLA 대립 유전자 C2	HERVFEST 연구에 서 표적화된 HLA(들)
204B	A*01:01	A*25:01	B*03:01	B*16:01	C*07:01	C*12:03	A*01
222B	A*02:01	A*30:02	B*44:02	Not known	C*05:01	B*18:01	A*02
224B	A*02:01	A*03:01	B*35:01	B*40:02	C*04:01	C*02:02	A*02, A*03
293B	A*02:01	A*30:01	B*13:02	B*44:02	C*06:02	C*05:01	A*02
254C	A*11:01	A*32:01	B*15:01	B*56:01/ 56:55	C*01:02	C*03:03	A*11
188B	A*02:01	A*11:01	B*7:02	B*14:02	C*07:02	C*08:02	A*11, B*07
271B	A*01:01	A*01:01	B*08:01	B*08:01	C*07:01	C*07:01	A*01
225B	A*02:01	A*03:01	B*07:02	B*51:01	C*07:02	C*14:02	A*03, B*07

[0436]

실시예 4 - CLT 항원에 특이적인 고-친화성 T-세포가 정상적인 대상체의 T-세포 레퍼토리에서 결실되지 않음을 입증하기 위한 분석

[0437]

ELISPOT 분석을 사용하여, CLT 항원-특이적인 CD8 T-세포가 건강한 개인의 정상적인 T-세포 레퍼토리에 존재하고 따라서 상기 환자의 미경험 및 흉선 조직에서 암-특이적 CLT 항원의 발현으로 인한 증추관용에 의해 결실되지 않았음을 보일 수 있다. 상기 유형의 ELISPOT 분석은 다수의 단계를 포함한다. 단계 1: CD8 T-세포 및 CD14 단핵세포를 정상 공혈자의 말초 혈액으로부터 분리할 수 있으며, 상기 세포를 시험되는 특정한 CLT 항원과 합치하도록 HLA 분류한다. CD8 T-세포를 기억 마커 CD45RO에 대한 자기 표지된 항체를 사용하여 미경험 및 기억 하위유형으로 추가로 세분할 수 있다. 단계 2: CD14 단핵세포를 14일 동안 CD8 T-세포와 공-배양하기에 앞서 3시간 동안 개별적인 또는 모은 CLT 항원 펩티드로 펄스화한다. 단계 3: 확대된 CD8 T-세포를 상기 배양물로부터 분리하고 펩티드로 펄스화된 신선한 단핵세포로 밤새 재-자극한다. 상기 펩티드는 개별적인 CLT 항원 펩티드, 무관한 대조용 펩티드 또는 감염성(예를 들어 CMV, EBV, Flu, HCV) 또는 자기(예를 들어 Mart-1) 항원에 대해 확고한 반응을 이끌어내는 것으로 공지된 펩티드를 포함할 수 있다. 재-자극을 항-인터페론 감마(IFN γ) 항체-코팅된 플레이트상에서 수행한다. 상기 항체는 펩티드-자극된 T-세포에 의해 분비된 임의의 IFN γ 를 포획한다. 밤새 활성화에 이어서, 상기 세포를 상기 플레이트로부터 세척하고 상기 플레이트상에 포획된 IFN γ 를 추가의 항-IFN γ 항체 및 표준 비색분석 염료로 검출한다. IFN γ -생성 세포가 원래 상기 플레이트상에 있었던 경우, 어두운 스폿이 뒤에 남는다. 상기과 같은 분석으로부터 유래된 데이터는 스폿수, 중간 스폿 크기 및 중간 스폿 강

도를 포함한다. 이들은 IFN γ 를 생산하는 T-세포의 빈도 및 세포당 IFN γ 의 양의 척도이다. 추가로, CLT 항원에 대한 상기 반응의 크기의 척도는 특이적인 펩티드가 없는 단핵세포에 대한 배경 반응으로 나뉘는, 스폿 수 또는 중간 스폿 크기에서 측정된 특이적인 반응인 자극 지수(SI)로부터 유도될 수 있다. 자극 강도의 미터는 스폿수에 대한 자극 지수에 스폿 강도에 대한 자극 지수를 곱하여 유도된다. 이렇게 하여, CLT 항원 및 대조용 항원에 대한 반응의 비교를 사용하여, 미경험 대상체가 CLT 항원-기반 면역원성 제형의 백신화에 의해 확대될 수 있는 CLT 항원-반응성 T-세포의 확고한 레퍼토리를 함유함을 입증할 수 있다. 표 9는 HLA-합치된 정상 공혈자로부터 현저한 CD8 T-세포 반응을 유도한 CLT 항원-유래된 펩티드의 목록을 제공한다. 결과를 도 53-56에 나타낸다. 수평 막대는 데이터의 평균을 나타낸다. 통계학적 유의수준을 Kruskal Wallis 검정 일원 Anova로 측정하고 Dunns 보정으로 반복 측정을 보정하였다. 도 53은 CLT 항원 1(도면에서 CLT001)로부터의 HLA-A*0201-제한 펩티드에 대한 정상 공혈자로부터의 현저한 CD8 T-세포 반응을 도시한다. 도 54에 도시된 실시예는 또한 HLA-A*0201에 의해 제한된 CLT 항원 2(도면에서 CLT002)로부터 유래된 펩티드에 대한 정상 공혈자로부터의 CD8 반응을 입증한다. 도 55는 CLT 항원 4(도면에서 CLT004)로부터의 HLA-A*0201-제한 펩티드에 대한 정상 공혈자로부터의 현저한 CD8 T-세포 반응을 도시한다. 도 56은 기억 CD45RO-양성 CD8 T-세포에서 CLT 항원 1 및 4(도면에서 CLT001 및 CLT004)로부터의 HLA-B*0702 제한 펩티드에 대한 반응의 결여를 도시한다(패널 A 및 C). 대조적으로, 동일한 공혈자로부터의 미경험 CD45RO-음성 CD8 T-세포는 CLT001 및 CLT004 모두로부터의 펩티드에 현저하게 반응한다(도 56, 패널 B 및 D).

표 9

HLA-합치된 정상 공혈자로부터 현저한 CD8 T-세포 반응을 유도한 CLT 항원-유래된 펩티드

참조 CLT 항원	서열번호	펩티드 서열	펩티드에 대한 HLA-유형(NetMHC에 의해 예측됨)
1	서열번호 73	RLQGSVTLV	HLA-A*02:01
1	서열번호 74	VPANTYNAL	HLA-B*07:02
2	서열번호 75	QLMSSFSTL	HLA-A*02:01
4	서열번호 76	FLELWLPEPML	HLA-A*02:01
4	서열번호 77	APLLGSEPL	HLA-B*07:02

실시예 5 - CLT 항원 펩티드 오랑체에 의한 반응성 T-세포 염색

건강한 공여자 및 흑색종 환자에서 CLT 항원에 특이적인 순환 CD8 T-세포의 존재 및 활성을 HLA 부류 I/펩티드-오랑체("오랑체") 염색 및/또는 시험관내 사멸 분석을 사용하여 측정할 수 있다. 따라서, 실시예 1, 2 및 2.1 (표 1 내지 6, 도 1 내지 50)에서 설명된 방법을 사용하여 발견한 CLT 항원에서의 상기 방법의 적용을 사용하여, 암 환자에서 CLT 항원에 대한 치료학적으로 관련된 T-세포 반응의 존재를 입증할 수 있다.

상기 연구를 위해서, 건강한 공여자 또는 환자 혈액으로부터 분리한 CD8 T-세포를 다양한 배양 방법, 예를 들어 항-CD3 및 항-CD28 코팅된 현미경 비드 + 인터류킨-2를 사용하여 확대시킨다. 이어서 확대된 세포를 CLT 펩티드 오랑체(HLA 분자의 펩티드-결합 홈에서 관련된 CLT 항원 펩티드에 결합된 HLA 부류 I 분자의 오랑체로 이루어진다)를 사용하여 이의 T-세포 수용체의 특정한 CLT 항원-반응성에 대해 염색할 수 있다. 결합을 상기 오랑체 구조의 또다른 다량체화 도메인에 특이적인 피코에리쓰린 또는 알로피코시아닌-접합된 항체 단편에 의한 검출에 의해 측정한다. 상기 오랑체 염료 외에, 추가의 표면 마커, 예를 들어 기억 마커 CD45RO 및 리소좀 방출 마커 CD107a를 조사할 수 있다. 오랑체 양성 및 특정한 표면 마커와의 연관성을 사용하여 상기 오랑체-반응성 T-세포 집단의 수 및 상태(기억 대 미경험/줄기)를 모두 추론할 수 있다.

오랑체 염색된 세포를 또한 형광 활성화된 세포 분류기(FACS)를 사용하여 분류하고 정제할 수 있다. 이어서 분류된 세포를 시험관내 사멸 분석에서 표적 세포를 사멸하는 이의 능력에 대해 추가로 시험할 수 있다. 상기 분석은 CD8 T-세포 집단, 및 형광 표지된 표적 세포 집단을 포함한다. 이 경우에, 상기 CD8 집단은 CLT 항원-특이적이거나 또는 CD8 T-세포 오랑체-분류되며 Mart-1과 같이 강한 사멸 반응을 유도하는 것으로 공지된 양성-대조용 항체에 특이적이다. 상기 연구를 위한 표적 세포는 HLA-A*02를 발현하는 펩티드-펄스화된 T2 세포, HLA-A*02, 03 또는 B07로 형질감염된 펩티드-펄스화된 C1R 세포 또는 CLT/CLT 항원을 발현하는 것으로 앞서 입증된 흑색종 세포주 또는 환자 종양 세포를 포함할 수 있다. T2 또는 C1R 세포를 펄스화하는데 사용된 펩티드는 CLT 항원 펩티드 또는 양성 대조용 펩티드를 포함한다. 표적 세포를 카복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르(CFSE, 세포

증식 염료)로 형광 표지할 수 있으며 7AAD의 흡수에 의해 사멸이 표시된다. 이렇게 하여, 표적 세포가 CD8 T-세포에 의해 매개된 세포사멸에 의해 사멸될 때, 적색 형광이 획득되며 이중 적색/녹색 양성으로 된다. 따라서, 오랑체-분류된, CLT 항원-특이적 CD8 T-세포에의 상기와 같은 사멸 분석의 적용을 사용하여 흑색종 환자 또는 건강한 공여자 T-세포의 생체의 배양물에서 CLT-항원-특이적 T-세포의 세포독성 활성을 열거할 수 있다. 도 57은 CLT 항원 1, 2 및 4(도면에서 CLT001, CLT002 및 CLT004)로부터 유래된 펩티드에 의한 건강한 공여자 CD8 T-세포의 HLA 오랑체 염색을 도시한다. 도 58은 CLT004-펄스화된 C1R-B7 표적 세포를 사멸시키는 확대된 CLT004 오랑체 분류된 세포를 도시한다. 펩티드-펄스화된 C1R-B7 세포의 현저한 사멸은 3:1 및 1:1 효과기 대 표적 세포비에서 명백하다.

[0443] 실시예 6 - 마우스 면역원성 연구

[0444] CLT 항원의 면역원성을 입증하기 위해서, 마우스를 하나 이상의 CLT 항원을 발현하는 복제-결합 아데노바이러스 벡터로 접종할 수 있으며 상기 마우스로부터 수득된 T-세포를 IFN γ ELISPOT 분석(Mennuni et al., Int.J.Cancer, 2005)을 사용하여 CLT 항원-특이적 T-세포의 존재에 대해 시험할 수 있다. 간단히, 마우스를 CLT 항원-발현 재조합 아데노바이러스로 접종하고 적합한 시점에서 인도적으로 안락사시키고, 비장 세포의 제제를 상기 CLT 항원에 상응하는 중복 펩티드의 존재(또는 부재)하에서 쥐 IFN γ 에 대한 단클론 항체로 유도체화된 다중웰 디쉬의 웰에 로딩한다. 적합한 시간에 이어서, 고정화된 IFN γ 를 상이한 단클론 항체로 염색하여 세포/스팟을 열거할 수 있게 하며, 이어서 이를 상기 웰에 로딩된 전체 세포와 비교하여 CLT 항원-반응성 T-세포의 정량적인 판독정보를 제공한다.

[0445] 실시예 7 - 흑색종 세포에서 CLT 발현을 검증하기 위한 분석

[0446] a) 흑색종 세포주에서 CLT 발현의 qRT-PCR 검증

[0447] 정량적인 실시간 폴리머라제 체 반응(qRT-PCR)은 주어진 생물학적 샘플로부터 추출된 RNA 중에 존재하는 특정 전사물의 양을 측정하는 광범위 기법이다. 관심 전사물에 대한 특정한 핵산 프라이머 서열을 설계하고, 상기 프라이머들간의 영역을 후속적으로 일련의 열주기 반응을 통해 증폭시키고 삽입 염료(SYBR 그린)의 사용을 통해 형광에 의해 정량분석한다. CLT에 대한 프라이머 쌍을 설계하고 흑색종 세포주로부터 추출된 RNA에 대해 분석한다. 비-흑색종 세포주를 음성 대조용으로서 사용하였다. 구체적으로, 흑색종 세포주 COLO 829(ATCC 참조번호 CRL-1974), MeWo(ATCC 참조번호 HTB-65), SH-4(ATCC 참조번호 CRL-7724) 및 대조용 세포주 HepG2(간세포 암종, ATCC 참조번호 HB-8065), 주르캣(T-세포 백혈병, ATCC 참조번호 TIB152) 및 MCF7(선암종, ATCC 참조번호 HTB-22)을 시험관내에서 확대시키고 RNA를 1×10^6 급속-동결된 세포로부터 추출하고, cDNA로 역전사시켰다. 표준 기법에 따른 qRT-PCR 분석 WITH SYBR 그린 검출을 각 CLT의 2개 영역에 대해 설계된 프라이머, 및 참조 유전자로 수행하였다. 상대적인 정량분석(RQ)을 하기와 같이 계산하였다:

[0448]
$$RQ = 2^{[Ct(\text{참조}) - Ct(\text{표적})]}$$

[0449] 상기 실험의 결과를 도 59에 나타낸다. 패널 A는 3개의 흑색종 세포주 및 4개의 비-흑색종 세포주로부터 추출된 RNA상의 CLT 암호화 CLT 항원 1(서열번호 33)의 상이한 영역을 표적화하는 2개의 프라이머 세트(1+2 및 3+4)에 의한 qRT-PCR 분석의 결과를 도시한다. 패널 B는 3개의 흑색종 세포주 및 4개의 비-흑색종 세포주로부터 추출된 RNA상의 CLT 암호화 CLT 항원 2(서열번호 34)의 상이한 영역을 표적화하는 2개의 프라이머 세트(5+6 및 7+8)에 의한 qRT-PCR 분석의 결과를 도시한다. 패널 C는 3개의 흑색종 세포주 및 4개의 비-흑색종 세포주로부터 추출된 RNA상의 CLT 암호화 CLT 항원 3/4(서열번호 35)의 상이한 영역을 표적화하는 2개의 프라이머 세트(9+10 및 11+12)에 의한 qRT-PCR 분석의 결과를 도시한다. 이들 결과는 비-흑색종 세포와 비교된, 흑색종 세포주로부터 추출된 RNA에서의 CLT의 특이적인 발현을 입증한다. 시험된 각각의 흑색종 세포주에서 CLT가 검출되었다.

[0450] b) 제자리 흑색종 세포에서 CLT 발현의 RNAScope 검증

[0451] 전사물 발현 분석의 제자리 하이브리드화(ISH) 방법은 주어진 전사물의 존재 및 발현 수준을 시편의 조직병리학 적 상황내에서 볼 수 있게 한다. 전통적인 RNA ISH 분석은 항체 또는 효소-기반 비색분석 반응의 조합에 의해 생성된 신호를 통해 시각화되는, 목적하는 RNA 서열의 짧은 신장부에 특이적인 올리고뉴클레오타이드 탐침에 의한 제자리 고유 RNA 분자의 인식을 수반한다. RNAScope는 최근에 개발된 제자리 하이브리드화-기반 기법으로, 보다 진보된 탐침 화학이 생성된 신호의 특이성을 확실시하고 표적 전사물의 민감한, 단일-분자 시각화를 허용한다(Wang et al 2012 J Mol Diagn. 14(1): 22-29). 전사물 분자에 대한 양성 염색은 주어진 세포에서 작은 적색 점으로서 나타나며, 이때 다수의 점은 다수의 전사물의 존재를 가리킨다.

- [0452] CLT에 대한 RNAScope 탐침을 설계하고 12개의 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 피부 흑색종 종양 코어의 섹션상에서 분석하였다. 발현 신호의 채점을 하기와 같이 각 코어의 전형적인 상에 대해 수행하였다:
- [0453] · CLT 탐침에 대해 양성 염색을 갖는 세포의 추정%, 가장 가까운 10의 자릿수로 반올림
- [0454] · 하기로써 주어진 섹션에 대한 세포당 발현의 추정 수준:
- [0455] · 0 = 염색 없음
- [0456] · 1 = 세포당 1-2개 점
- [0457] · 2 = 세포당 2-6개 점
- [0458] · 3 = 세포당 6-10개 점
- [0459] · 4 = 세포당 >10개 점
- [0460] 각 CLT의 발현이, 종양-유래된 RNAseq 데이터로부터 CLT의 발견 검증 및 몇몇 샘플에 대한 종양 조직내 발현의 균일성 확인 및 또한 분석된 각 환자 코어 중의 적어도 하나의 CLT 존재의 표시와 독립적으로, 다수의 상이한 환자 종양 코어에 걸쳐 검출되었다.

표 10

- [0461] 흑색종 환자 조직 코어에서 RNAScope의 채점

		CLT 항원 1 (서열번호 33)		CLT 항원 2 (서열번호 34)		CLT 항원 3/4 (서열번호 35)	
조직	코어	양성 세포의 %	점수	양성 세포의 %	점수	양성 세포의 %	점수
흑색종	61	10	1	80	4	10	1
흑색종	62	80	2	80	2	100	4
흑색종	63	100	4	0	0	100	4
흑색종	64	0	0	0	0	100	3
흑색종	65	70	3	0	0	80	4
흑색종	66	100	3	50	2	90	3
흑색종	67	100	3	100	4	50	2
흑색종	68	0	0	0	0	100	3
흑색종	69	90	3	100	4	100	4
흑색종	70	0	0	0	0	70	3
흑색종	71	0	0	0	0	80	4
흑색종	72	100	3	100	4	60	2

- [0462] 본 명세서 및 하기의 청구항 전체를 통해, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, '포함하다'란 단어 및 '포함하는'과 같은 변화는 서술된 정수, 단계, 정수들의 그룹 또는 단계들의 그룹을 포함함을 의미하지만 임의의 다른 정수, 단계, 정수들의 그룹 또는 단계들의 그룹의 제외를 의미하는 것은 아님을 이해할 것이다.
- [0463] 본 발명의 명세서 전체를 통해 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 참고문헌은 내용 전체가 본원에 참고로 인용된다.
- [0464] 본 발명은 바람직한 및 보다 바람직한 그룹 및 적합한 및 보다 적합한 그룹 및 상기 인용된 그룹들의 구현예의 모든 조합을 포함한다.
- [0465] 서열 목록
- [0466] 서열번호 1 (CLT 항원 1의 폴리펩티드 서열)
- [0467] MWNFFRRELTSNGFPENFSLDVPANTYNALKSRLCDPNADHTSCSPCSLHAAGALPGTGRQRWRVELAHLADRKLSLRDVSRLRQGGERRSGIAVKVVRGGAGFAARLQGSVTLVQQGWFFPRLGGCQAWWRMGAVVWCGELLTCTS
- [0468] 서열번호 2 (CLT 항원 2의 폴리펩티드 서열)
- [0469] MTGVLIRRGDLVTDMAVACRIKTRFRGHTKAAICKTRKESSAETSPADSLILDFQPLQLMSSFSTLASLDDK

[0470]	서열번호 3 (CLT 항원 3의 폴리펩티드 서열)
[0471]	MNTPNIVSLRAHQPEVGIIPSVLLMRPLRIKGVFHHIHSPLHGENQGFTLCLQGAPPSSSV
[0472]	서열번호 4 (CLT 항원 4의 폴리펩티드 서열)
[0473]	MAKTKGSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWLPEPMLSSSPSSSTAPLLGSEPLRHWEASLSR
[0474]	서열번호 5 (CLT 항원 5의 폴리펩티드 서열)
[0475]	MKRKANRWRLSLRNGLLPSTPRATQQIPMEFLNSRVADIPIKPW
[0476]	서열번호 6 (CLT 항원 6의 폴리펩티드 서열)
[0477]	MRGFLWRVETRGVEGSMRGPQKVLGNRLPGAGRNARSRDNFAVW
[0478]	서열번호 7 (CLT 항원 7의 폴리펩티드 서열)
[0479]	MVYYGNPESSPGISLVFGLLRDRMQPGFSVSQEGDPVGITDHLGC
[0480]	서열번호 8 (CLT 항원 8의 폴리펩티드 서열)
[0481]	MPAQLKFTLQVNPATKMRVTLLSQPMETYEGDVLGVQTPYSSDSTILVL
[0482]	서열번호 9 (CLT 항원 9의 폴리펩티드 서열)
[0483]	MGSSRVGERMMEESRTGQKVNPGNTGKLFVGVGISRIAKVKGECGQGFSDKSDVITHQRTHTGGKPYVCRECGRALAGSQTSSTVTRGHTQGRSLMSAESV SGALAGSQSSSFTRGHTGETPQSAGRMSKSLVIKPYLNSHKKTNVIITHLHTPALRWLQRKSANPLHSPRV
[0484]	서열번호 10 (CLT 항원 10의 폴리펩티드 서열)
[0485]	MHSLQIFSLCLFTLLIVSFIVQKPFNLIRSNLISIFLLVEIAFEDLVMNYPKLTSSRVFSRFSYMTFYSFYSYIKVFVSSQIDFFSLVKGRGPVQAHFSMWF CYSG
[0486]	서열번호 11 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
[0487]	VQQGWFFPR
[0488]	서열번호 12 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
[0489]	VVRGGAGFAAR
[0490]	서열번호 13 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
[0491]	HLADRKLSL
[0492]	서열번호 14 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
[0493]	ARLQGSVTL
[0494]	서열번호 15 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
[0495]	ADSLILDF
[0496]	서열번호 16 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
[0497]	SSFSTLASLDK
[0498]	서열번호 17 (CLT 항원 3으로부터 유래된 펩티드 서열)
[0499]	NTPNIVSLR
[0500]	서열번호 18 (CLT 항원 3으로부터 유래된 펩티드 서열)
[0501]	QPEVGIIPSVLLMRP
[0502]	서열번호 19 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
[0503]	KTKGSLSVFR

- [0504] 서열번호 20 (CLT 항원 5로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0505] RVADIPKIPW
- [0506] 서열번호 21 (CLT 항원 5로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0507] DIPIKPW
- [0508] 서열번호 22 (CLT 항원 5로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0509] RVADIPKIP
- [0510] 서열번호 23 (CLT 항원 6으로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0511] RSRDNFAVW
- [0512] 서열번호 24 (CLT 항원 6으로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0513] RSRDNFA
- [0514] 서열번호 25 (CLT 항원 7로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0515] SPGISLVF
- [0516] 서열번호 26 (CLT 항원 8로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0517] SSDSTILVL
- [0518] 서열번호 27 (CLT 항원 9로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0519] AGRMSKSLVIK
- [0520] 서열번호 28 (CLT 항원 9로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0521] PQSAGRM
- [0522] 서열번호 29 (CLT 항원 9로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0523] AGSQSSSFTRGHTGETPQ
- [0524] 서열번호 30 (CLT 항원 10으로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0525] RSNLSIFL
- [0526] 서열번호 31 (CLT 항원 10으로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0527] FSLCLFTL
- [0528] 서열번호 32 (CLT 항원 10으로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0529] SRRVFSRFSYMTFYSFRSYIKVFV
- [0530] 서열번호 33 (CLT 암호화 CLT 항원 1의 cDNA 서열)
- [0531] CGGGGCCAGTCTTTCCCGTGCTATTCTCGTGATAGTGAATAAGTCTCACAAGATCTGATGGGTTTATCAGGGGTTTTCATTTTGCTTCTCCTCATTTTCTT
TTGCTGCTGTAATGTAAGAAACGCCTTTTGCTCCTGCCATAATTCTGAGGCCTCACAGCCATGTGGAATCTTTCAGGAGAGAATTAACATCCAATGGATT
CCCAGAAAACCTTTTCCCTCGATGTACCAGCAAACACCTACAATGCCCTGAAAAGCCGCCTCTGCGACCCAATGCAGATCACACGTCCTGTCCCAGCCCCTG
CAGCCTCCACGCGGCGGGTGCACTGCCAGGCACGGGAAGGCAGCGCTGGCGAGTAGAACTGGCCCATCTCGCAGATAGGAAGCTGAGCCTCAGGGACGTTTC
ACGCCTTCGTCAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGATTGCCGTGAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGGTTTGCTGCCCCACTTCAGGGATCTGTACCCCTCGT
CCAGCAGGGTTGGTTCTTCCCGAGGCTGGGAGGATGCCAAGCCTGGTGAGGATGGGGGCGGTGGTGTGGGTGGGGAGCTTCTGACTTGACATCCTGAGG
GAACCTTCTGCAGCTGATGTGTAACCTGGACCCAGGCCGTGCCCTCCAGGAATCCCAAGGCTATGGCCCCCTCAGGTCCTGCTGGGGTGTGGCCCCACC
TCTGCCTCAGAATGCAGGGGTTCTGCAGGAAGCCGAGACCAGCCTGCTGCCTTGGGCCCTAGGGACACTGCAGCCCCAGAAAGTACTGTGGGGGACAAAA
GAGTTGTTTCTCGGGGAGAAAAACCTGTGAGGAAATGCAGGTGCCACAGAGGAAATCCTCCTGGGGAGGAGGTAACCTGTTCATCCTCGGCCGACACG
GGACTGCCTGGTGCCTGGTACCCACAGCCGTACCTGCCGCACGCATCTCTCCATGGTTTGCTAATTACTTCCATTAGTTTTAAACAACTTGACAAGAGAC
AGAAGGGTCCAGAGAGAAATTAATCTAACTGTTTAAACATGT
- [0532] 서열번호 34 (CLT 암호화 CLT 항원 2의 cDNA 서열)

[0533]

CACCTCCATCACTGCGAATTATAATTCGACATGAGATTTGGGAGATGACACAAAACCAACCATATCAGTCTTTAAAGAGTTAAGTTAAAATAAGCTCTTTA
AAGTGGGCCCTAATCCAGTATGACTGGTGTCTTTATAAGAAGAGGAGATTTGGTACAGACATGGTGCATGCAGAATAAAGACTTTTCGAGGACACACTGA
GAAGGCAGCCATCTGCAAAACAAGGAAAGAGTCCTCAGCAGAAACAGTCTGCAGACTCCTTGATCTTGAGCTTCCAGCCACTGCAATTGATGTCAAGCTT
CAGCACCTTGCATCTCTGGATAAATGAAATGTACCCAGTGCCGCTCTGTTTCAGATCTGTGCAATAAAGAGCAAAAGCATAAAACCAAGTCAAGGCTTT
GAGGGAGTGACCTACAAAATGCATAATGTGAAACAATGCAAAAGCGAAAGGTGCAAAATCCCCATCAAAGAGCTGGAGGCTGACAGATGCGCCAGTGATAAT
TCCCATCTTCCAACACAGGAGCAGAGCTTCCATTTTCCATAACAGAACACAGCCAGAGCAGCTGGAAGGCAGGGCCGCATCCAGACTTCCACCAACAATG
GGATGAGACTTGACATCTGGAATCACAACCACAACAGACCTGAGAGACCCACCAGCTTGATGACAAGCTTCTTCTTTCAAAGAAAGGTATCAGTCTGGGGGA
CCTAGTGCTGCAAACCATGACAAATTAAGTGTGGCATCCCTCACTTGACATAATGGAAGTCAAGTATATTTTAAATTAACAAGAGTTATTTTATGTAAGCT
TCTCTCATTCTCCACTGTGCGTGCTCGGGGCTGGTGGTGAGGAAAAAGAAACAGCTGTGCGGAAGCATCAAGAAAAGGCAAGTCATGAAGTCTTAGAG
ATCAGTGACATGTAAGAAAAAGAGTGAGGAGAAAAATATTCCTACTAAAGTTTTCATTTGTTTACCTTCTGTACATAGACTTCCAAGAGTTAGAAGTC
TAGGATTTGATCTCCAAATCTTCTGTCAGATTACTCATCTTCATTTTCATTCATATAGTCCAGGGGTTGTACAAAGGAAGATGCCAGTTCTTCCCAATCA
TAACTAAGATATCAAGAGATATTCTTTTGAATGTAAACAAGGAGATCTGAAGTTTCATCTGAAAAAATAAATGGTTTTAGGCGGTATGACCATGGGATGC
TGGACCAGGATGGTAAGCTTCAGGAAACAGAATCTGGAGAATGCCAGCTGCTCCACAGGAAGCATCAGGGAAGAAGAAGAGGTGTGAAGTCTGCCTT
CTGCTCTGCTGGGATCCCTTTCACATCTCCTTTCCTCCAGGCAGTTTGGTTCCTGGCCATTTCCAGGTGTGACTCACTCAGGATGGTAAGCATCTTCTCT
CCTACCCAGAGTAGAGGATGAAGACCTCATCTCAGAGGTGAAGGGAGCTCCAGAGAGAGGTCTCAAACCTCCAGCATTAACTGTAAAGAAGCTTCATGAG
CTGCTGGAGAACCTGGGAAATGACCAATTATAGGGACAGAGCTCAAATACTCTGGGACACTCTAGTAGCTGAGAAAGTTCCAACCTCCAGGGTGATAGAGGAC
TGCCTGGCAAACCATCATCAAGCAGAAGACCTGATACTAACATCACAGGCTATGGTTTATTACTGAAGATCAGTGCTTACACCTGCCAGAGGTTCAGAAG
CAAACCTATCATTGTTCTCCCTGGAGATGTTGGCCACATTCTGAAAAGTGTGGTCAGTAGTAGCAACAGAAAGCAATTGTGCTTGCCAAGCACATGTCAC
TGTCCCAGCCCTTCCCCAACACAACCCAGTAGGTGCTTCTGGCTGCAAACTTGGGAAAGTCACTTGACCTGTCTGAGGTTCCTTCTAATCTGGCCT
GGCGAAGATAAGAAAAACAGTTTATTTAAAGTGTCTAGCAAGTGTCTGGACCAAAATAGGACCTCTGAAATGGTTATGGTAGTGCTGTTAAGGTGATGTTT
TAAGTGCTGATGAGCACAAAGATGGGTAAGATATTCCTTCTGTTAAATCTACAGTCTAATGAGAGAGAACAAAGATGAATGCACAATAACTGTCTATTAGAA
CAGGATTATGAGAAGGTGTGAATTTCTGTAAAAATCAGAACAGGGAGTAATATGATCCAGGTGATTGGCAGGGGGTGGGGTCTGGATTCAACTGGAGAG
GGAGCTGGCAGGGAAGGCTTCTGGAGGATGAGAGTTCAACAAGGGGCAGGTGTAGGATGTGGGTGGCCAAGTGACTGGGCAGAAGGAGCTGCAGAAGTAAG
ACCCCAATCAGGAAGACAAGGGCTGCTGAGAAACACAGAGCTACAAAGTGCAAGTCAGGAAGAGTTGGGATGAGATTAGAAGGGGGTCTGGGGCCAGACT
GTGGAAGGCCAAATGCCGGGCTAAGGAGTTGTACTTAATTCAGTGGTCAACGGGGAGTCACTGGAGGCTGTTGAGCAGGAGAGTTGCTTCTTTACAGCT
GTGCCAGACTAAATTAACCTAAACAGTACTTTATAGCTGGAAAGGGAAGGCCCAGGAATAGCTCTTGACTCAGAAACAGGCATTGGGGAAGGTAATGAGAA
ACAGCCGTGACTGATCAAGCAGAGAGGTTAATTAATTTGTAATTATGTGAAAGGCCATTAACCACTAGTTCACATAGAGATAACTGTCTAGTGGGGC
TTCAAAGACAAACGCTTCTTTTAACTTGAATAGGGGATGTTTGTCTCTGTGGAGGAGATATGATTAAGATACTTAATAATGGTAGATAAACA

[0534]

서열번호 35 (CLT 암호화 CLT 항원 3 및 4의 cDNA 서열)

[0535]

AAACACACTAAGGGCTTTGTTATGGAAGTGAATGTGTCCTCTCCCCAGAGTCACAGGATTATGAAGCCATAATCCTCAATGTGACTATATTGGAGCAGGGG
CCTTTACAGACATAATTAATTAATGAGGTGATAGAGTGGGGCCCTAGTCTGATAGGACTGGTGTCTTACAAGAAGAGGGAGAGTCTCAGAGAGTCTCT
CTCTCTCGGCATGGACACAAAAGAAAAGCCATGTGAGGACACAGAGAGAAGGTGGCTGTCTACGAGCTAGGAAGAAAGGCCTACCCGAAACCAACCTCAC
AGCAGCTCCATCTTGAGACTTCCAGCCTCCGGAAGTGTGAGAAAAATAATGTTTGAATTCAGGTCGGTGTATTTGTGAAGGCCATCCTAGCAATGAATA
CTCCTAACATTGTCTCTTAAGAGCTCACCAGCCTGAGGTAGGAATCATTCCATCTGTGTTACTAATGAGACCGCTGAGGATCAAAGGGGTTTTCCACCACA
TCCACTCACCTCTACATGGCGAAAACCAAGGTTCACTCTCTGTCTTCAGGGAGCTCCACCCAGCAGCAGCGTTTGACAGAGCTGTTCACTTCTCTCTCTG
GAGCTGTGGCTTCCAGAGCCCATGCTCAGCAGTTCCCTCCTTCTCGACTGCTCCTCTCTTAGGCTCAGAGCCACTCAGACATTGGGAAGCAAGTTTGTC
AGATGACAGAGAACCAGGTAATGGATTGAGTGATGAACAGGAAGTTCATTATGAGTTTTTGGCCACACCTCCAAAGTGACGACTTAGCCAGAAATGGG
ATAACTGGGTTTTCCCTACTTCTCTTTTATCATCCTCAATGAGAGTGACCAATATTAGAGCTAGATGGAACCTTAGTGAATCTGGCTACTCGTCCCGTCC
CACCAGCCTGCCACCATTTCAAGTTTGAAGAGACAAGACACATGGACCTTATGTAATTACTGGGGATTACCCAGGAGTCTGTGGCAAAAGTCAAGTCTCT
TCCCTCCCTGCTTCCCGCCCTGTCTCTGGTACTTTCTACCAACACTGGGCTGTTTCTGTGATCACACTTAAGCGTACCTAACCTGCGAATGTCTGATAGAA
GGTGCTAATGAACATGATTTAGCTTTAACACTCAGTTTTCTAAAGGGACACGTGGGGGCAGCAATGTTAGGCAAAAACAATTCCAGTTCTAGCCTCTACT
GTCTACATATGTGTATACATTTGGGAAACGTTTGGGAAAGGGATATTGAGAGCTTCTTTTCTTTTTTGTGGTTAGTTATTTGATGATATTGAGATTGTT
TCTGAGCCATGTGCTTCAACATCGGATTGGGGATTTGAGAAAAAGTTTTAGTCACTGTGATTCCATTTAGCTTCCAAATGTGCTCTGCTAAGAGACTTAA
AGCACTCATAAATAGCACGTGTGCTCTTCTTGCAGTGTGTTGCTAATTTTGTAGTCACATCTTTTATAGAAAATCATGAGATTGGTGTACAGAGACTGGAATA
AATATAGTCAAACTTATGGTGAAGATTTCCTTTAGCTGTTTTCATAATCCATTTCCATTGTTATGATTATTGATGAATAAAACATTTTCTTTAGGTAGATA
CTTCTTTTTTCCCCCACCTTGATTTAATGTTTCCACTCTTATGTCAAGTTTCTTATTACTCCCTAATAACTCTCAATAAAATAATGATTCTGGGAGATT
ATTCTGCTTTCTACTATCACCTGTTGATTGAAAAGACAGAACAAATACCGTAGAAGCTTCACTAATACATTGAAAGATAAAATGATAATACTAAATACTA
AAATATGAAAAGTGATACTAAAGTGGAGTCTGGCACTAGTATTTTTTTTTTGTAGTCTTAAATTTTATTTTATTTTGAATTTTTTAAATATATAT
GTTATGTTCTGGGATACATGTGCAGAACGTGAGGTTGTACATAGGTATACAGGTCTGGCACTAGTATTTTGTGCCCACAAAATATCAAGCATGTATCCA
AACTGCTCAAGACACATTAAGACACAGGTAATCTGTAGGCATATTCAGGCTGTAGTTGCATTTTTTGGTTTTCTGTGGCTTTCAGTGAAGTTGAGGT

AATTCATGGGAAACAGTCAACAAAGAAGTGCCAGTATTAGAAATCCAAGAGCCATTCTCTAGCTTCTCCAGAATCAAGACTTTAGAGGTAATTTCTATCA
 AACTGACATTTCTGTCTGCAATTAACAATGAACACATAGCATTATGTTTAATTGCAACCTGTTTAAAGCAGATTGGATGCTAAGGTTTAAAGACACTCT
 TCAGTCAAAAAGGTCTTTAATCAGGTTTTAATCTTGAGCACAATCTAGGACACAGCATCATAGACTAACTCATTGAGAATAGGTGTTGTCATCTAATCC
 TAACCACCCCAACCAACAAGCTGAATAGCTCTGGGCTCAGTATATACATTTGTACTGGGCTCAGTACACACCTAAGCTGGGTTTCAATATATGCCACT
 TTATAGTGAGAGGCAATTTGTATAGAGCTCTGGGTTCACTATATACATTTGTACTGGGCTCA

[0536] 서열번호 36 (CLT 암호화 CLT 항원 5의 cDNA 서열)

[0537] GGGAGGGGGCCATTGGCGGGGCCACTTCAAAGGAAAAGCTCTAGTCCCTACCTCTCTCACATCCTAAGGCTGCCTTTGTGGGATTCCACACAGAACAGCCT
 GGAAGCTTGGGGCCCTGGCTTCCTTTCTGGCCTGGGAGTCAGGTATGTTGGCCATCGCTTCACAGCAATCATGAGGGCCAGGCCCAAGTGTCAATGCT
 CCTCATGGGACTGCTCCTCTTAAAGGTGGGCCCTCCTCACCAGCTCCCTGCCCTGGCCAAGGAGGAGGCTGAAAGAGCCTGAGCTGTGCCCTCTCCATT
 CCACTGCTGTGGCAGGGTCAGAAATCTTGGATAGAGAAAACCTTTTGCAACCGGGAATGTATCTTTGTAATTCCTAGCATGAAAGACTCTAACAGGTGTGTC
 TGTGGCCAGTTCACCAACCAGCATATCCCCCTCTGCCAAGTGCAACCCAGCAAAAATGAAGAGGAAAGCAAAACAGGTGGAGACTCAGCCTGAGAAATGG
 TCTGTGCAAGCACACCAGAGCTACCCAACAGATTTCCTATGGAGTTCCTGAATTCAGGGTGGCGGATATTCCAATAAGCCATGGTGAGAAAGGCATTC
 AGACATGGTGCCACTAGGATCACAGCTTTTATGGCGGCCAGTCTCCAGCCCCAACTGCAGATACCTGGTCTTCTTCATGGCTGTGGCTCAATCTTCCTA
 GATATTTTCATTGAAAAACCAAGAGATATATCTGTGCACATGGCTTTTAGCCATGAGGCTTGGAACTGGACACCCTGTAAGAATCTAGTGTCCCGTAA
 ATCCATACCAAGCTCTGAATCCACAACAGGCTCTGGCCCAACCTGCAACACACTCCATTGCTCCATCTTCAGTAAAGGAAGACAAATTCATTTTCT
 AATACTGTGGACCTGCAGCCCCCTTAGATGTGTTGAGAGTCTTTGGAATATTTTCTCTGAGGTCTGTCCACAGCTTCCCTGGGCTGCGCTCAGCTGGC
 CCGAGAAGGACCAAGGTCCCTCACATTTGCATGTAAACAGGGAGTGCCCTCTGCCCTTCCAGTGAGCCCTGCCAGCGTGGGGGAGGCTTCAGCTCTGTGATC
 CGTTCAGCTCACTCTGAATTACACTCTACATGCCAGTCACAGACTTTTGAATTCATTTTATTCTACTGGCCCAACATCATGTTAAAAATAAAATTT
 AGCTGTGTTCCAAATGCTGCAATATACAGTCTTCTGAAATGGCACCCCTACATATTAGCCAGACACAAAGAAGCAGTTTATAGGAGACAAGGCATCTGAGCA
 TTATTAGCCTCCTCCTCACTTTGAAGAGGTCAAGTTCATGGGTGGGCCCATGATCGCTGACCCATTTACTCAACAACATCCTCATCCAATCTCTGGGCCA
 CTGTTCTAGCTAAGCCAGCTTTGGAACCTATTCCTCCAACATTAGGATTGCCAGATAAAATACAGGACACCCAGTTATATTGAATTCAGACATACATTGG
 ATAAATTTTTCAGTACAAGTATGTCCAAATATTGCATGATTATTTGCATTTAATAAAAAATGTTGTACTGAAACATTTTTCATTGTTCTCTAAATTTCAAAT
 TTAATGGGTGTCTTGGTCTGTTTGGCTGCTATAACAAATTGCCTTAGGCTGGGGAATTTATAAACAACAGAAATTTATTGCTCACATTTCTAGAGTCTGGG
 AGGCCAAGATCAAGGTGCCAGCAGATTGGTGCCTGGCGAGGGCCATCCTCTGCTTCATAGATAGCACCTTCTGTGTCTCTCATGGCAGAAGCAG
 AGAACAAGCTCTCTGAGTCCTC

[0538] 서열번호 37 (CLT 암호화 CLT 항원 6의 cDNA 서열)

[0539] CTGGAATTTCCAGCCTCCAGAACTGTGAGAAATAAATTTTGTGTTTAATCCATCCAGTCTGTGATATTTTGTATGGCAGCTGAAGCAGTCAGGAAAGG
 ATCCTCCCCATCTCTGCAGAAGCCTGACCATCCCCCTAGAGGGCTGGGAGGAAGTGGGTTTGCATACAGTCCCTGTTGACTCTAGTGCCCCCTGCTGGCC
 CCAGACGCGAGTTCCGGCGAGGCTTCAGGGTACAGTCCCCCGAGCCAGAAGCCGGGCTGCAGCGCTCAGACCGCTCCGGGACACCCACCCGCTTCC
 CAGGCGTGACCTGTCAACAGGTCTGTATTGGCGACAAAAGGAGCAGCCTGAATGTAGGGAAGCAGGGCGGAGTCTCTGCAGGCTCGGGGGAGGGAGGG
 GCGTGAATGCGTGGATTCTGTGGAGAGTGGAAACCGGGAGTCGAGGGGAGCATGCGCGGGCCTCAGAAAGTCTGGGAAACCGACTCCCGGGAGCAGGG
 AGGAACGCGCGCTCCAGAGACAACTTCGCGGTGTGGTGAATCTCTGAGGAAAAACCGTGCCTGGCAACAAGTGACTGAGACCTAGAAATCCAAGCGTTGG
 AGGTCTGAGGCCAGCCTAAGTCGTTCAAAATGGAACGAAGCGTTTGTGGGGTTCATTTCAGAGCCGATACATCAGCATGAGTGTGTGGACAAGCCACG
 GAGACTGTGGAGCTGGCAGGGCAGAGCCTGCTGAAGGATGAGGCCCTGGCCATTGCCGCCCTGGAGTTGCTGCCAGGGAGCTCTTCCGCCACTCTTCAT
 GGCAGCCTTTGACGGGAGACACAGCCAGACCTGAAGGCAATGGTGCAGGCCTGGCCCTTCACTGCTCCCTCTGGGAGTGTGATGAAGGGACAACATCT
 TCACCTGGAGACCTTCAAGCTGTGCTGTATGGACTTGATGTGCTCCTTGCCAGGAGGTTGCCCCAGGAGGTGAAACTCAAGTGTGGATTACGGAA
 GAACTCTCATCAGGACTTCTGGACTGTATGGTCTGGAACAGGGCCAGTCTGTACTATTTCAGAGCCAGAAGCAGCTCAGCCATGACAAAGAAGCGAAA
 AGTAGATGGTTTGAGCACAGAGGCAGAGCAGCCCTTCATTCCAGTAGAGGTGCTCGTAGACCTGTTCTCAAGGAAGGTGCTGTGATGAATGTTCTCCTA
 CCTATTGAGAAAGTGAAGCGAAAGAAAAATGTACTACGCCTGTGCTGTAAGAAGCTGAAGATTTTGAATGCCCATGCAGGATATCAAGATGATCCTGAA
 AATGGTGAGCTGGACTCTATTGAAGATTTGGAAGTGACTGTACCTGGAAGCTACCCACCTTGGCGAAATTTTCTCCTTACCTGGGCCAGATGATTAATCT
 GCGTAGACTCCTCCTCTCCACATCCATGCATCTTCTACATTTCCCGGAGAAGGAAGAGCAGTATATCGCCAGTTACCTCTCAGTTCCTCAGTCTGCA
 GTGCCTGCAGGCTCTCTATGTGGACTCTTTATTTTCTTTAGAGGCCGCTGGATCAGTTGCTCAGGCACGTGATGAACCCCTTGGAAACCTCTCAATAAC
 TAACTGCCGGCTTTTCGAAGGGGATGTGATGCATCTGTCCAGAGTCCAGCGTCAGTCAGCTAAGTGTCTGAGTCTAAGTGGGGTCATGCTGACCGATGT
 AAGTCCCAGAGCCCTCAAGCTCTGTGAGAGAGCCTCTGCCACCTCCAGGACCTGGTCTTTGATGAGTGTGGGATCACGATGATCAGCTCCTTGCCCT
 CCTGCCTTCCTGAGCCACTGCTCCAGCTTACGACCTTAAGCTTCTACGGGAATTCATCTCCATATCTGCCCTGCAGAGTCTCCTGCAGACCTCATCGG
 GCTGAGCAATCTGACCCAGTGTGTATCCTGTCCCTGGAGAGTTATGAGGACATCCATGGTACCCTCCACCTGGAGAGGCTTGCTATCTGCATGCCAG
 GCTCAGGAGTGTGTGTGAGTTGGGGCGGCCAGCATGGTCTGGCTTAGTGCCAAACCCCTGTCTCTACTGTGGGACAGAACCTTCTATGACCCGAGCC
 CATCCTGTGCCCTGTTTCATGCCTAATTAGCTGGGTGCACATATCAAAATGCTTCATTCTGCATACTGGACACTAAAGCCAGGATGTGCATGCATCTTGAA
 GCAACAAAGCAGCCACAGTTTCAGACAAATGTTTCAAGTGTGAGTGAAGAAAACATGTTTCAAGTGAAGAAAAACATTCAGACAAATGTTTCAAGTGAAGAAAAA

GGGGAAGTTGGGGGTAGGCAGATGTTGACTTGAGGAGTTAATGTGATCTTTGGGGAGATACATCTTATAGAGTTAGAAATAGAATCTGAATTTCTAAAGGGA
GATTCGTGGCTTGGGAAGTACATGTAGGAGTTAATCCCTGTGTAGACTGTTGTAAAGAAACTGTTGAAAATAAGAGAGAAGCAATGTGAAGC

[0540] 서열번호 38 (CLT 암호화 CLT 항원 7 및 8의 cDNA 서열)

[0541] GAGACAGGTCTCACTCTGTTGCCCGGTGAGGAAAGTGGCACAATCACAGCTCACTGCAGTCTCAGTCTCCAGGCTCAAGATGGATACATTAAAGGTATGGT
GATCCGGTCCACCGTGTGGTTAGGATTCCCAAATTTTGTGACAGCGTCTCGGATATGAACCACACGGAATTTGGCCTGTGCTTTCTGCGTGGGGAGTGC
GATGTGGATCCAGCTGTTGTACAGTGCCTGCTTCTGGTGGCTGTTTGTCTATGCAGTGGATGCTTATCTGGTGTCCGGAGATCGGCAGGACTGAGCACCAT
CCTGCTGTATCACATCATGGCGTGGGGCTGGCCACCCTGCTGTGTGGAGGGAGCCGCATGCTCTACTACCCTTCGGTGTCCAGGTGTGAGCGGGGCT
GGACCACGCCATCCCCACTATGTCACCATGTACCTGCCCTGCTGCTGGTTCTCGTGGCGAACCCCATCCTGTTCCAAAAGACAGTGACTGCAGTGGCCTC
TTTACTTAAAGGAAGACAAGGCATTTACACGGAGAACGAGAGGAGGATGGGAGCCGTGATCAAGATCCGATTTTCAAAATCATGCTGGTTTAAATTATTG
TTGGTTGTGCAATATCATCAATGAAAGCCTTTTATTCTATCTTGAGATGCAACAGATATCAATGGAGGTTCTTTGAAACCTGTGAGAAGTGCAGCCAAGAC
CACATGGTTTATTATGGGAATCCTGAATCCAGCCCAGGGATTTCTCTGTCTTTGGCCTTCTACGGCTGGACAGGATGCAGCCTGGGTTTTCAGTCTCCAG
GAAGGAGATCCAGTGGGAATCACTGACCACCTCGGCTGCTGAGGGGGCTCACCCATCCCCACTGATGCCCCATGAAAACCTGCTTCCGGGAAGGTGTCTCA
AGTGGGTGGGAGACTTCTGACGAAGCCCTGAGCATGCTGTCTGAAGGTTCTGATGCCAGCACAATTGAAATTCACACTGCAAGTGAATCCTGCAACAAAA
TGAGGGTGACCTGCTCTCCAACCCATGGAGACCTATGAAGGGGATGTGCTGGGGGTCCAGACCCCATATTCTCAGACTCAACAATTCTGTCTTTAGA
ACTGTGTTCTCACCTTCCAACACTGCACGCGGAGGTAGCGGCCCCAAACCTGTCTCATCACCAGCTAGAGCTTCTTCCGAAGGGCCTTTAGGAT
AGGAGAAAGGGTTTATGCACACAGTGTGAGA

[0542] 서열번호 39 (CLT 암호화 CLT 항원 9의 cDNA 서열)

[0543] CCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGAGGAGAATTGCTTGAATCCGGGAGGCGAGGTTGCAGTGAGGGGAGATTGTGCCACTGCACTCCAGCCTG
GGCGACAGAGGGAGACTCCATATCAAAAAGAAAAAAATCTCTAGAGTTTGAAACATTTACCAACCAAACTGATTTCTCATCACCTCTTAGTCAAAAC
CTCCTTGATGGCCTTCAGAGGAGAACAGAGTAAACACCAGAAGAACTCAGGAGGAAGGAGACTGAAGGAAAGATGTATAGCCTGCGAGAAAGAAAGGGTCA
TGCATACAAAGAGATCAGCGAGCCACAGGATGATGACTACCTCTATTGTGAGATGTGTCAGAAGTCTTTCATTGACAGCTGTGCTGCTCATGGGCCCCCTAC
ATTTGTAAAGGACAGTGCAGTGGACAAGGGGCATCCCAACCGTTTCAGCCCTCAGTCTGCCCCCGGGGCTGAGAATTGGGCCATCAGGCATCCCTCAGGCTGG
GCTTGGAGTATGGAACGAGGCATCTGATCTGCCACTGGGCTGCACTTTGGCCCTATGAGGGCCGAATTACAGAAGACGAAGAGGAGCAACAGTGGATA
TTCCTGGCTAATACCAAGGGGAGAACTGCTATGAGTATGTGGATGGAAGATAAATCCTCGGCAACTGGATGAGAACCAAGCCAGAGATCCATCCAT
GTCCCTCATGCTGTCTGGCCTTTTCAAGTCAAAAATTTCTCAGTCAACATGTGGAACGCAATCACTCCTCTCAGAAGTCTCCAGGACCATCTGCAAGAAAAAC
TTCTCCAACCAGAGAATCCCTGCCAGGGGATCAGAATCAGGAGCGGCAATATTCTGATCCACGCTGCTGTAATGACAAAACCAAGGTCAAGAGATCAAAG
AAAGTCCAAACTCTGAATAAAAGGACATGGCAGAGGGAGATTTCAGGGCCTTTTCTAGCCACCCAAAGGACAAATGGGGAGCTCTAGAGTGGGAGAAA
GAATGATGGAAGAAGAGTCCAGAACAGGCCAGAAAGTGAATCCAGGGAACACAGGCAAAATTTTGTGGGGTAGGAATCTCAAGAATTGCGAAAGTCAAAAT
ATGGAGAGTGTGGCAAGGTTTTCAGTGATAAGTCAGATGTTATTACACACAAAGGACACACAGGGGGGAAGCCCTACGCTGCAGAGAGTGTGGGAGGG
CTTTAGCCGAAGTCAGACCTCTCAGTCCAGAGGACACACAGGGGAGAAAGCCTTATGTCTGCAGAGAGTGTGAGCGGGGCTTTAGCCGAAGTCAGT
CCTCCTATTACAGAGGACACACAGGGGAGACGCCCCAGTCTGCAGGAAGGATGAGTAAGTCATTAGTAATAAAACCTTATCTCAATAGCCACAAGAAGA
CAAACGTGATCACCACACTTGCACACCCAGCTCTGAGGTGGCTTCAGCGAAAGTCTGCTAACCCCTTACATTCCCGAGAGTGTAAAGAGATCGGAAAT
AACTAATTAACAAATCCGCCACTTTTCATGACTAGAGTTGAGGAAGAACAGGGGATAGTTCTGTAAGTGTTCGGGGGACGTCAACATGTGTGGTTGTTTCC
GCACTGATCCCTCCATTTTGTGTTTGGCTCCTGTTCTAATTAATTTTGTCTCCATACATATCTGAACCCCAAGTGTGTACCTCATTCTCCCTTATCA
CTGAAGGAAGGAAGAGTCCAGAAGGGCCACAGAGAACTCAAACGTTCAAGTCTCCACAGGAATTAACCCAGAAAGACATAAACTTGGAGTCCATC
TGGTTAATTTATTGGAGAATCGATTCCCAAGTCCAGGAAGAGAAATGTAGGGTTTTACAGAGTCGCAGCAGGAAAGAGAGTCCCTGGTCTCCTGGGAAGTG
TGACCTCTTCAATGGACCCCTCTCCTCTGCTGCCATACTCCCCCTTGGCTCCCCCTGTCTCCTCTCCTGATTTCCTCCAATCTCTGTAGCCCCAGAAGTGA
ACGCCAGACAGGAACACGCATGTGTATATATGTGTTACAGTGTGCTATGTGTGTTAAGCCTGCATGCATGGGTGTGGGGTATGTGCCCTCTGTGTACGT
ATCTGTGTGAGTGTGGGGTTTCAAGGGTGTATTAGGAATAACGCTCAAAATCCTAAGGAAATGAATACTCTGAGAGAAGAGAGACAGCCCTCTCATACT
GTTTTATATTGTTTTTATACTCAGAAAAGGAAAAAGCAAACTAAAGGCAGGTAGCCTGGCGCTAGGAACAGACCTGAAACCAAGGAACAGACCCGA
AACCAGGCTGGGCGGCTGACCTAAGCCTGGTAGTTAAATTCGACCCCTGACCTAGCAACTGATGTTATCTATAGATTATAGAAAGACATTGTGAAACT
TCCCGTCTGTTCTGTTCCACTCTGACCATCGGTGCATGCAGCCCTGTACCTACCCCTGCTTGTCTAATCGATCAGACCTCTCAGTGGACCCCTT
AGAGTTGTGAGCCCTTAAAGGGACAGGAATTGCTCACTCGGGAGCTCGGCTCTTGAGACAGCAGTCTGTCTGATGCTCCTGGCCGAATAAACCGCTTCCT
TCTT

[0544] 서열번호 40 (CLT 암호화 CLT 항원 10의 cDNA 서열)

[0545] CCCACCTACTGATTTACCAACTCTTTTTCATTTCAACTTTTATTTTAGGTCCAGAGGGTACATGTGTGAGTTTGTGATGAGTATATTGTGTGACACTCAT
GTATGGGGTACAAATAATCCCAACCAATGTAGAGAACAATATCCAATAGGCAGTTCTTCAGGCCCTTTCTCCATCTGCCCCCCCCACATGGTAGAT
CCCAGTGTCTATTGTGCCATCTTTATGTCCATGCATAACCAATGTTTAGTTCCTACTTATAAGTGAGAGCATGCAGTATTGGGCTTCTGTGCCACATTA

ATTCACTTAAGATAATGGTCTCCAGCTGGATCCATATTGATGCAAAGTACATAATTTCTTTCATTTTATGGCTGCATAGTATCCATGTTATGTTGTACCA
CATTTCCTTTATCCAGTCCATAGCTGATGGACATCTACATTGATTCCATGTCCTCATTAATGTGAATAGTGTGTTGATGAACATATGAATGTATGTGCTTT
TTGGTAGAATAATTTATTTCTTTGGATATAAAGCCAGTAATGGAATTGCTGGGTCGAATCGTCGTTCTTTTGTAAAGTCTTTGAGATATCTCCAAGTTTC
GTTCCACAGGCACGTAAATAGTTTACATTCCACCAATAATGAACACGATTCCTTTTCTCCACAACCTGTCAACATCTGTTATTTTTTACTTTTAAAT
AGTAGCCATTCTGACTGGTGTGTGATGGTACTTCATTATGGCTTTTATTCGCATTTCTTTCTGACTTGTGATTTTGTAGTAGTTTTTCATATGTTTGTGGC
GACATGTATGTCTCTGAGAAGAGCCTGTTCATGTTTTTTGCCACTTCTTAACAGGGCTGTTCATCTTTGCTTGTGATTGTTCAAGTTTCTTAGAGAT
AGTGGATATTAGATCTCTGTGGATGCATAGTTTGCAAATATTTCTCTCTGTCTGTTTACCCTGTTGATAGTTTCTTTTATTGTGCAGAAACCTTTAATT
TAATCAGGTCCAACCTATCCATTTTTCTTTTGGTTGAAATTGCTTTTGGAGCTTAGTTATGAATTATTTGCCAAAGCTGACGTCAAGAAGGGTATTCTCTA
GGTTTTCTTATATGACATTTTATAGTTTATAGTCTTATATTAAGTCTTTGTTTCATCTCAAATTGACTTTTTTCTCTGGTAAAAGGTAGGGGTCCAGTTC
AAGCTCATTTTTCCATGTGGTTTTGTTACAGTGGGTAGCTGCAGACATGAGCTGGGCAGGAGAGGCCTCTTCTAACAGGAATGTCAGGTGACCA

[0546] 서열번호 41 (CLT 항원 1을 암호화하는 cDNA 서열)

[0547] ATGTGGAACCTTCTCAGGAGAGAATTAACATCCAATGGATTCCCAGAAAACCTTTCCCTCGATGTACCAGCAAACACCTACAATGCCCTGAAAAGCCGCCTC
TGCGACCCCAATGCAGATCACACGTCTGTCCCAGCCCCTGCAGCCTCCACGCGGGGGTGCAGTCCAGGCACGGGAAGGCAGCGCTGGCGAGTAGAACTG
GCCCATCTCGCAGATAGGAAGCTGAGCCTCAGGGACGTTTACGCCTTCGCTCAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGATTGCCGTGAAGGTGGTGAGAGGAGGA
GCGGGGTTTGTCTGCCCAGCTTCAGGGATCTGTACCCCTCGTCCAGCAGGGTTGGTTCTTCCCAGGCTGGGAGGATGCCAAGCCTGGTGGAGGATGGGGGCG
GTGGTGTGGTGTGGGGAGCTTCTGACTTGCACATCC

[0548] 서열번호 42 (CLT 항원 2를 암호화하는 cDNA 서열)

[0549] ATGACTGGTGTCTTATAAGAAGAGGAGATTGGTTCACAGACATGGTTGCATGCAGAATAAAGACTTTTCGAGGACACACTGAGAAGGCAGCCATCTGCAAA
ACAAGGAAAGAGTCTCAGCAGAAACAGTCTGTCAGACTCCTTGATCTTGGACTTCCAGCCACTGCAATTGATGTCAAGCTTCAGCACCTTGCATCTCTG
GATAAA

[0550] 서열번호 43 (CLT 항원 3을 암호화하는 cDNA 서열)

[0551] ATGAATACTCCTAACATTGTCTCTTTAAGAGCTCACCAGCCTGAGGTAGGAATCATTCCATCTGTGTTACTAATGAGACCGCTGAGGATCAAAGGGGTTTTTC
CACCACATCCACTCACCTCTACATGGCGAAAACCAAGGGTTCACTCTCTGTCTTCAAGGAGCTCCACCCAGCAGCAGCGTT

[0552] 서열번호 44 (CLT 항원 4를 암호화하는 cDNA 서열)

[0553] ATGGCGAAAACCAAGGGTCACTCTCTGTCTTCAAGGAGCTCCACCCAGCAGCAGCGTTTGACAGAGCTGTTCACTTCTCTCTCTGGAGCTGTGGCTTCCA
GAGCCCATGCTCAGCAGTTCCTCTCTCTCTCTGACTGCTCTCTCTTAGGCTCAGAGCCACTCAGACATTGGGAAGCAAGTTGTCAAGA

[0554] 서열번호 45 (CLT 항원 5를 암호화하는 cDNA 서열)

[0555] ATGAAGAGGAAAGCAAACAGGTGGAGACTCAGCCTGAGAAATGGTCTGTTGCCAAGCACACCCAGAGCTACCCAACAGATTCTATGGAGTCTTGAATTCC
AGGGTGGCGGATATTCCAATAAAGCCATGG

[0556] 서열번호 46 (CLT 항원 6을 암호화하는 cDNA 서열)

[0557] ATGCGTGGATTCTGTGGAGAGTGGAACACGGGGAGTCGAGGGGAGCATGCGGGGCTCAGAAAGTCTGGGAAACCGACTCCCGGGAGCAGGGAGGAAC
GCGGCTCCAGAGACAACTTCGCGGTGTGG

[0558] 서열번호 47 (CLT 항원 7을 암호화하는 cDNA 서열)

[0559] ATGGTTTATTATGGGAATCCTGAATCCAGCCCAGGATTCTCTTGTCTTTGGCCTTCTACGGCTGGACAGGATGCAGCCTGGGTTTTAGTCTCCAGGAA
GGAGATCCAGTGGGAATCACTGACCACCTCGGCTGC

[0560] 서열번호 48 (CLT 항원 8을 암호화하는 cDNA 서열)

[0561] ATGCCAGCACAATTGAAATTCACACTGCAAGTGAATCCTGCAACAAAAATGAGGGTGACCCTGCTCTCCCAACCCATGGAGACCTATGAAGGGGATGTGCTG
GGGTCCAGACCCCATATTCCTCAGACTCAACAATCTTGTCTT

[0562] 서열번호 49 (CLT 항원 9를 암호화하는 cDNA 서열)

[0563] ATGGGGAGCTCTAGAGTGGGAGAAAGATGATGGAAGAAGAGTCCAGAACAGGCCAGAAAGTGAATCCAGGGAACACAGGCAAATTATTTGTGGGGGTAGGA
ATCTCAAGAATTGCGAAAGTCAAATATGGAGAGTGTGGGCAAGGTTTCACTGATAAGTCAGATGTTATTACACACAAAGGACACACAGGGGGGAAGCCC
TACGTCTGCAGAGAGTGTGGAGGGCTTTAGCCGGAAGTCAGACCTCCTCAGTCACCAGAGGACACACAGGGGAGAAGCCTTATGTCTGCAGAGAGTGTG
AGCGGGGCTTTAGCCGGAAGTCAGTCTCTCTCATTCACCAGAGGACACACAGGGGAGACGCCCAGTCTGCAGGAAGGATGAGTAAGTCATTAGTAATAAAA

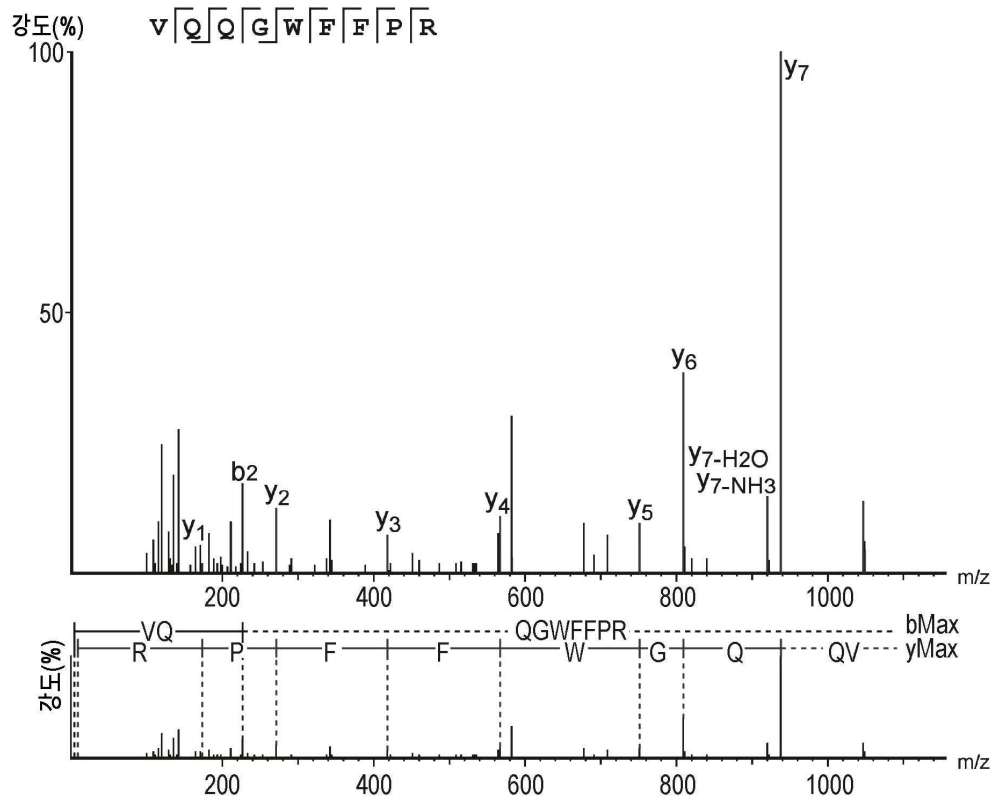
CCTTATCTCAATAGCCACAAGAAGACAAACGTGATACCACACACTTGACACCCCCAGCTCTGAGGTGGCTTCAGCGAAAGTCTGCTAACCCCTTACATTCC
CCGAGAGTG

- [0564] 서열번호 50 (CLT 항원 10을 암호화하는 cDNA 서열)
- [0565] ATGCATAGTTTGCAAATATTTCTCTCTGTCTGTTACCCTGTTGATAGTTTCTTTATTGTGCAGAAACCCCTTAATTTAATCAGGTCCAACCTTATCCATT
TTTCTTTTGGTTGAAATTGCTTTTGAGGACTTAGTTATGAATTATTTGCCAAAGCTGACGTCAAGAAGGGTATTCTCTAGGTTTTCTTATATGACATTTTAT
AGTTTTAGGTCTTATATTAAGTCTTTGTTTCATCTCAAATTGACTTTTTTCTCTGGTAAAAGGTAGGGGTCCAGTTCAAGCTCATTTTTCCATGTGGTTT
TGTTACAGTGGG
- [0566] 서열번호 51 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0567] AAFDRAVHF
- [0568] 서열번호 52 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0569] AFDRAVHF
- [0570] 서열번호 53 (CLT 항원 3으로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0571] RPLRIKGVF
- [0572] 서열번호 54 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0573] KTKGSLSVF
- [0574] 서열번호55 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0575] VPANTYNALK
- [0576] 서열번호56 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0577] RLGQCQAWWR
- [0578] 서열번호57 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0579] ANTYNALKSR
- [0580] 서열번호58 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0581] LVTDMAVACRI
- [0582] 서열번호59 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0583] LILDFQPLQL
- [0584] 서열번호60 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0585] MSSFSTLASL
- [0586] 서열번호61 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0587] LMSSFSTLASL
- [0588] 서열번호62 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0589] LMSSFSTLA
- [0590] 서열번호63 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0591] QLMSSFSTLA
- [0592] 서열번호64 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0593] MVACRIKTFR
- [0594] 서열번호65 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
- [0595] VTDMVACRIK

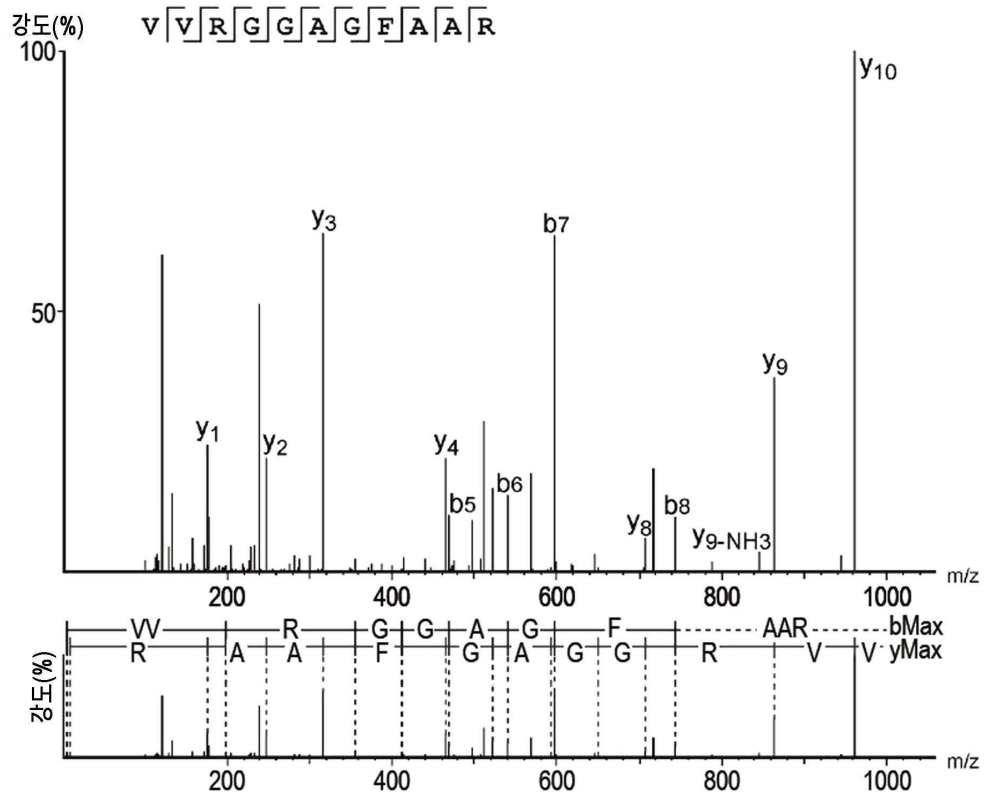
[0596]	서열번호66 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
[0597]	SPADSLIL
[0598]	서열번호67 (CLT 항원 3으로부터 유래된 펩티드 서열)
[0599]	NTPNIVSLRA
[0600]	서열번호68 (CLT 항원 3으로부터 유래된 펩티드 서열)
[0601]	VLLMRPLRIK
[0602]	서열번호69 (CLT 항원 3으로부터 유래된 펩티드 서열)
[0603]	MRPLRIKGVF
[0604]	서열번호70 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
[0605]	FLFLELWL
[0606]	서열번호71 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
[0607]	SVFRELHPA
[0608]	서열번호72 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
[0609]	SPPSSTAPL
[0610]	서열번호73 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
[0611]	RLQGSVTLV
[0612]	서열번호74 (CLT 항원 1로부터 유래된 펩티드 서열)
[0613]	VPANTYNAL
[0614]	서열번호75 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
[0615]	QLMSSFSTL
[0616]	서열번호76 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
[0617]	FLELWLPEPML
[0618]	서열번호77 (CLT 항원 4로부터 유래된 펩티드 서열)
[0619]	APLLGSEPL
[0620]	서열번호 78 (CLT 항원 2로부터 유래된 펩티드 서열)
[0621]	SLILDFQPL

도면

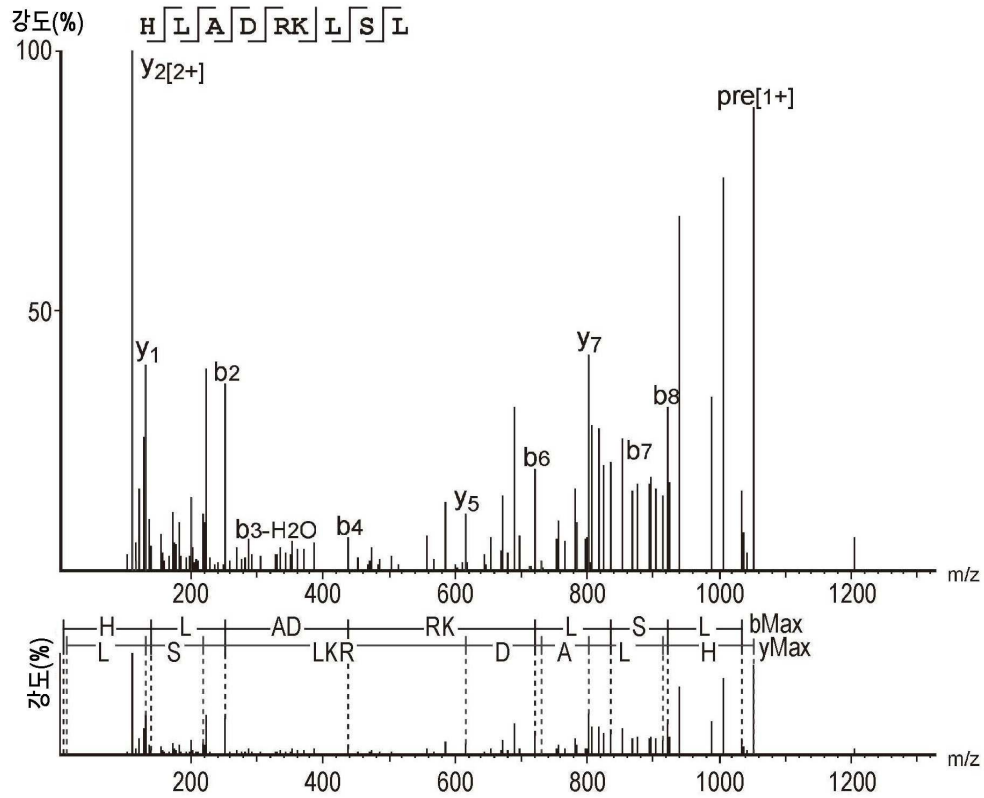
도면1



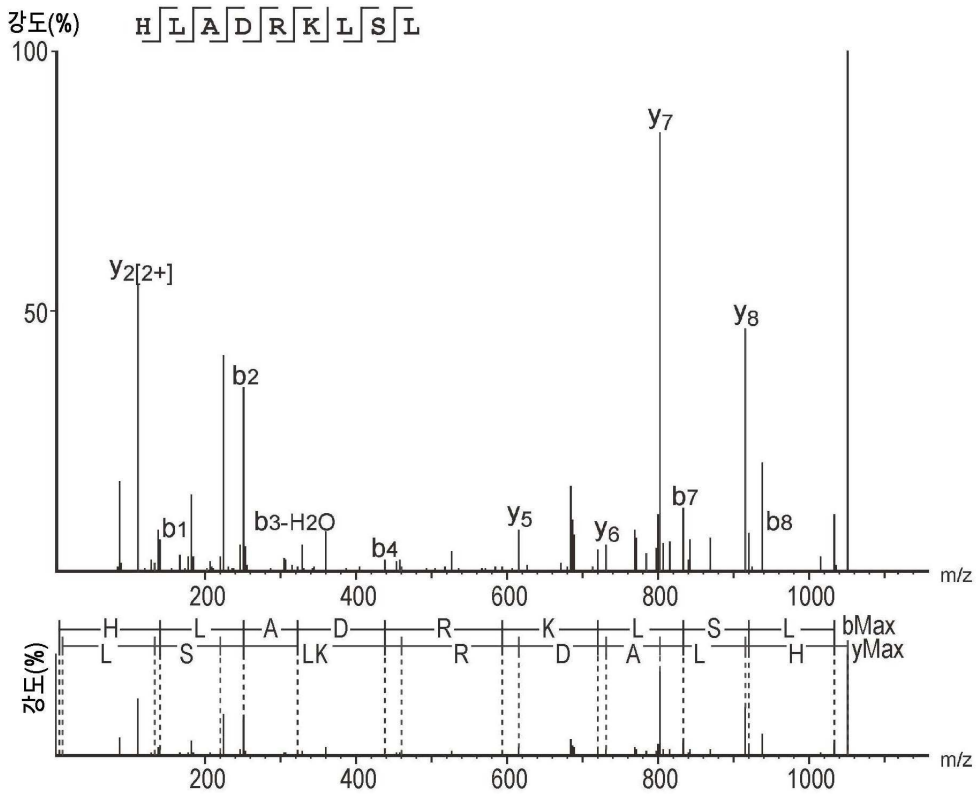
도면2



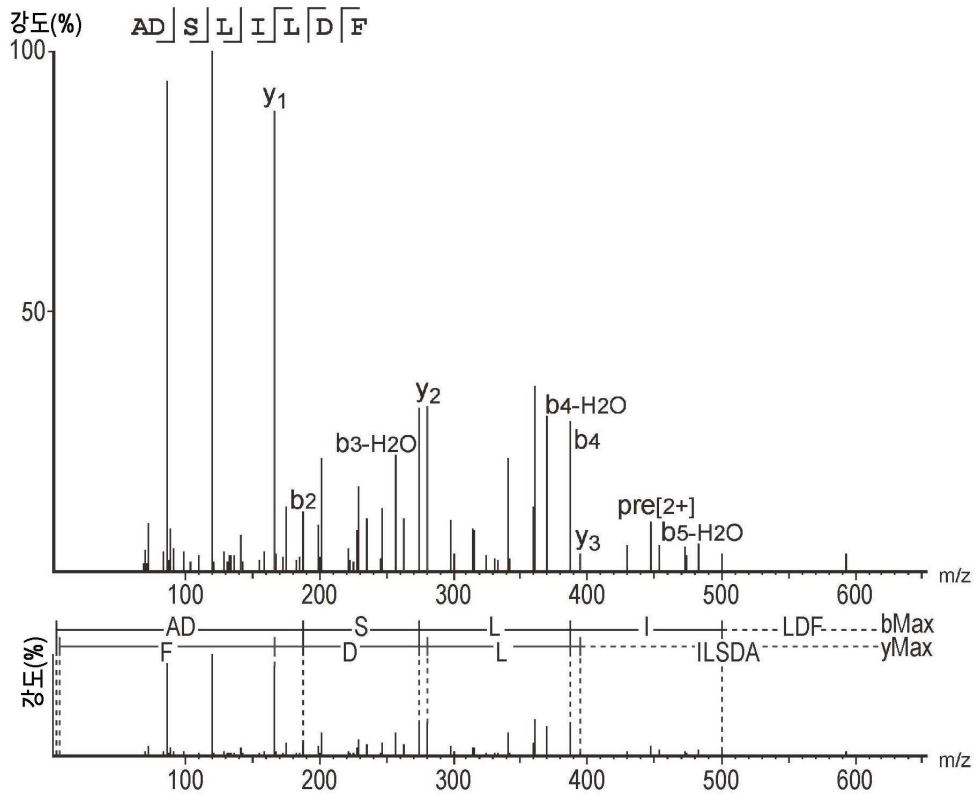
도면3



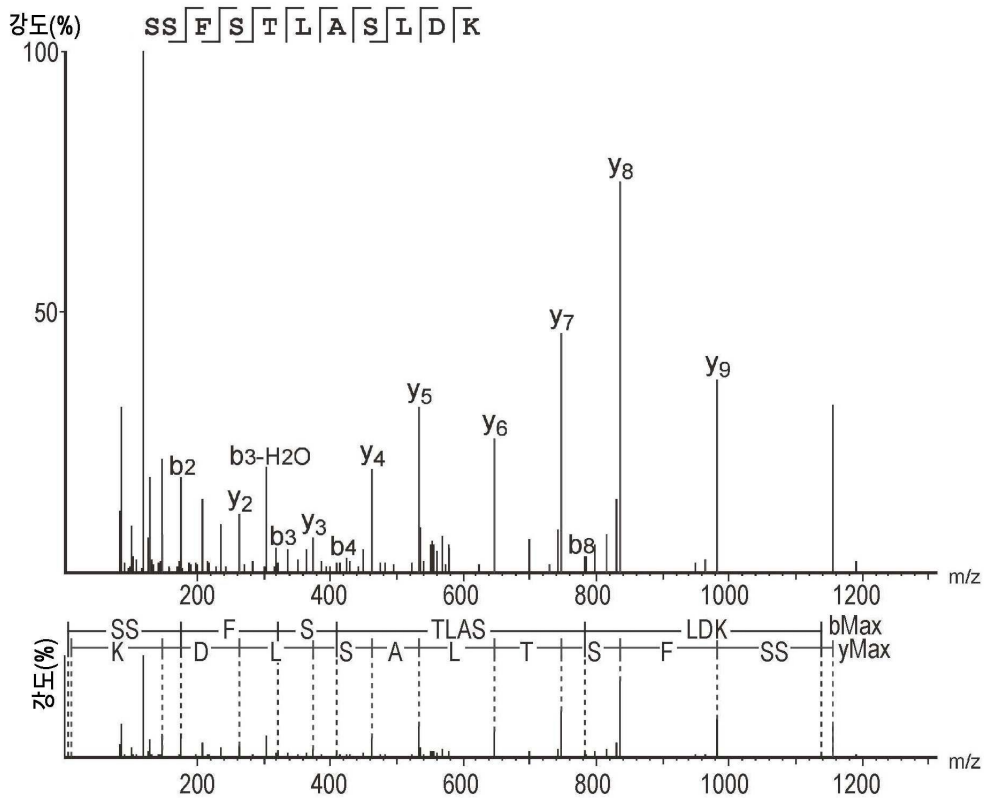
도면4



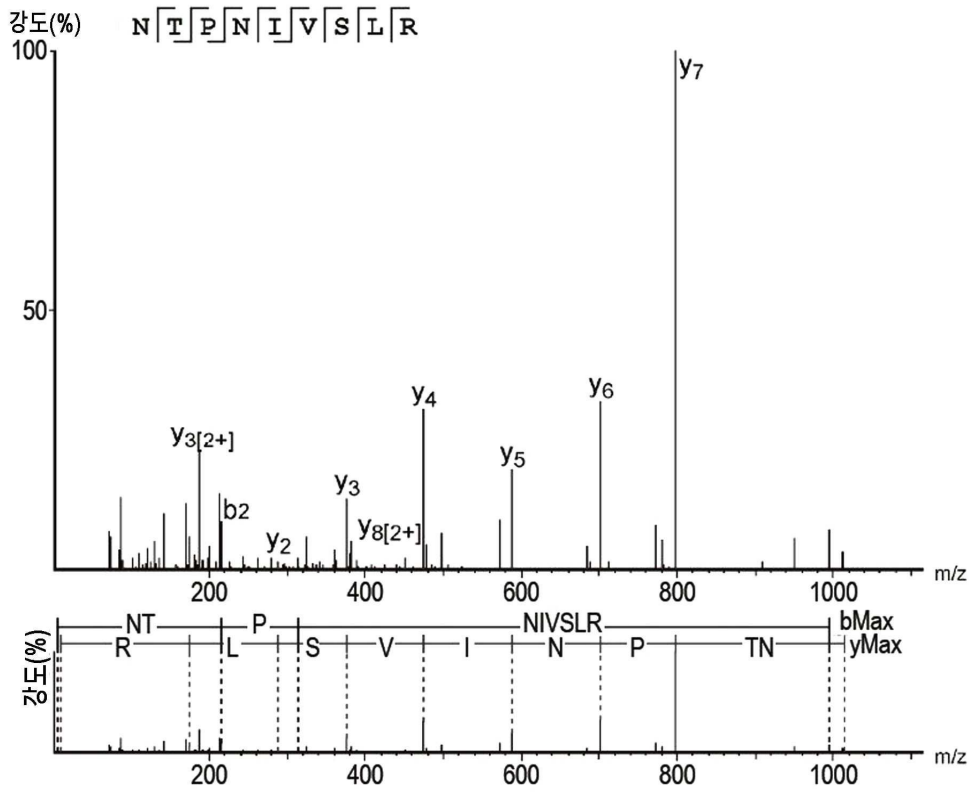
도면5



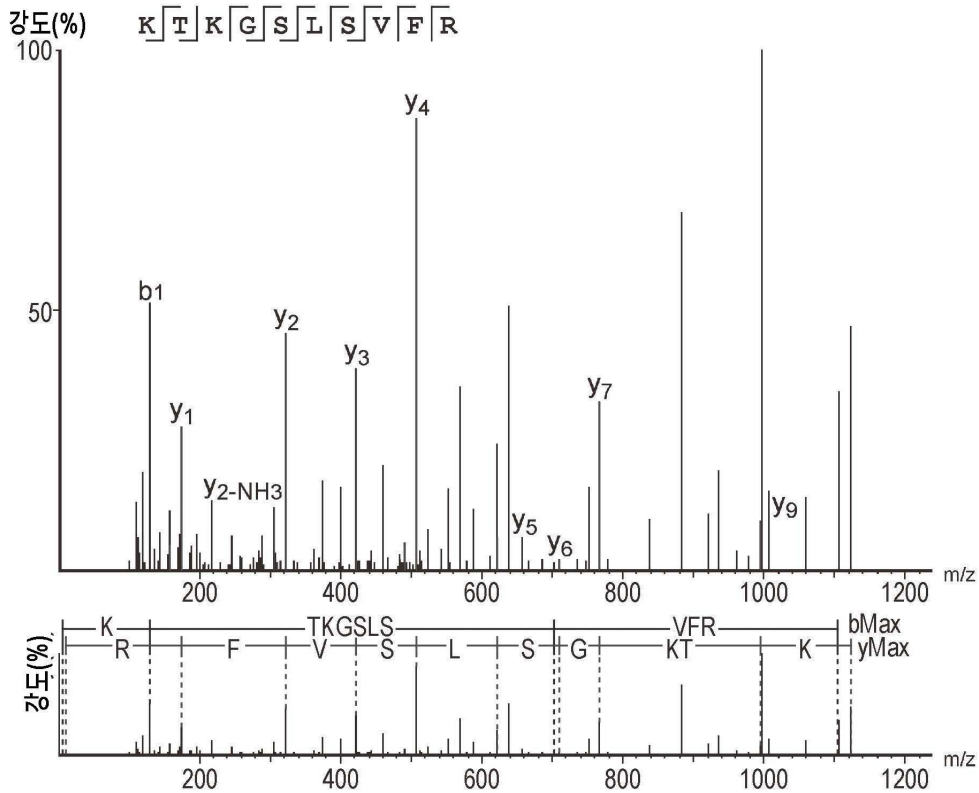
도면6



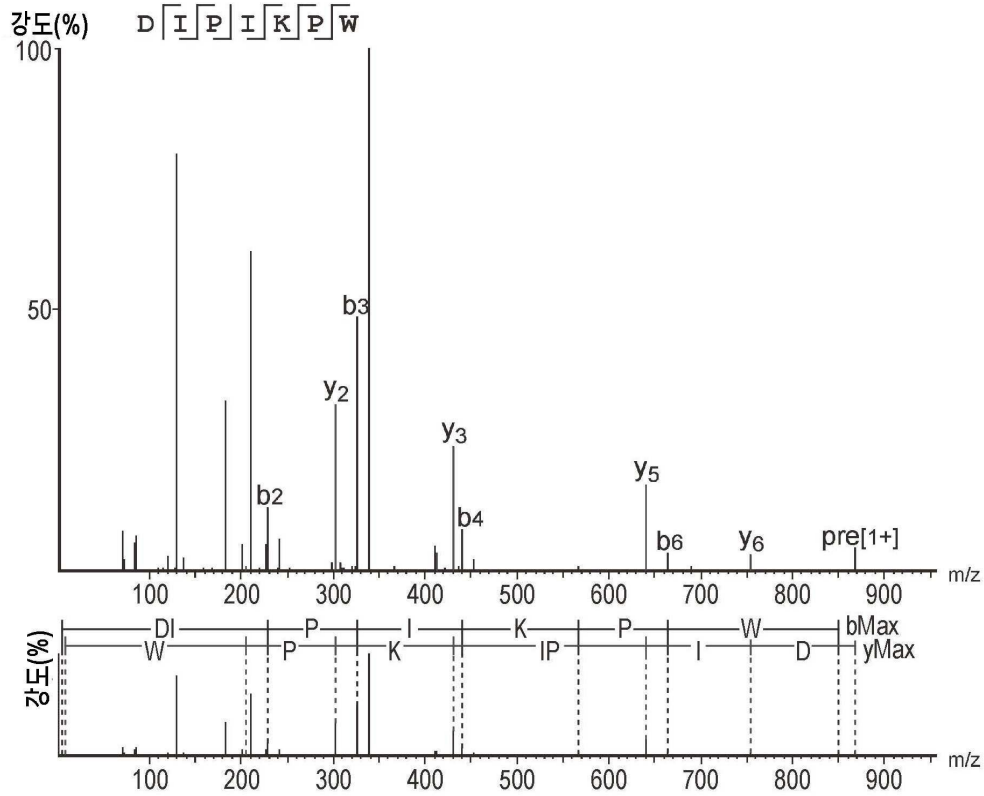
도면7



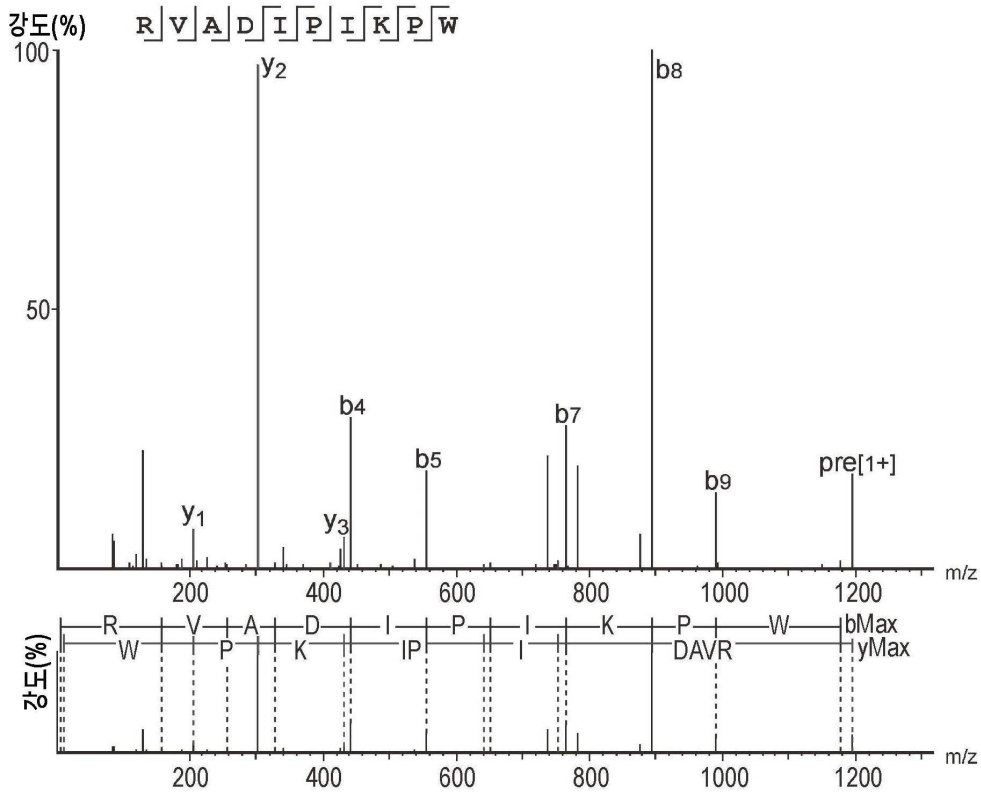
도면8



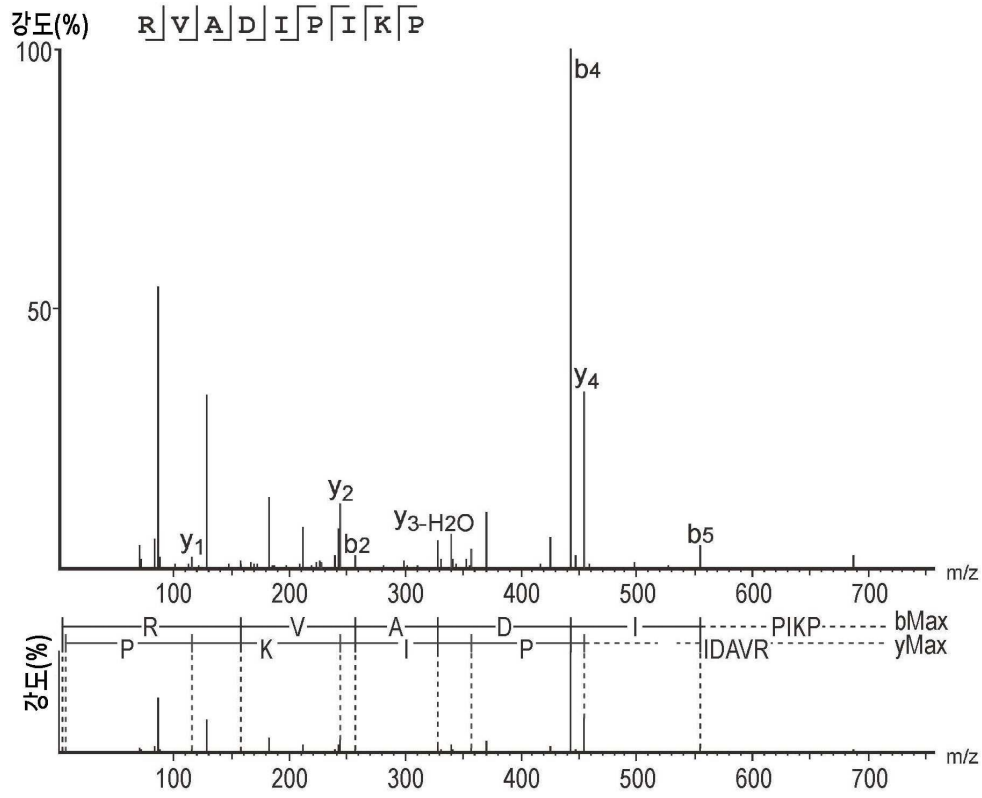
도면9



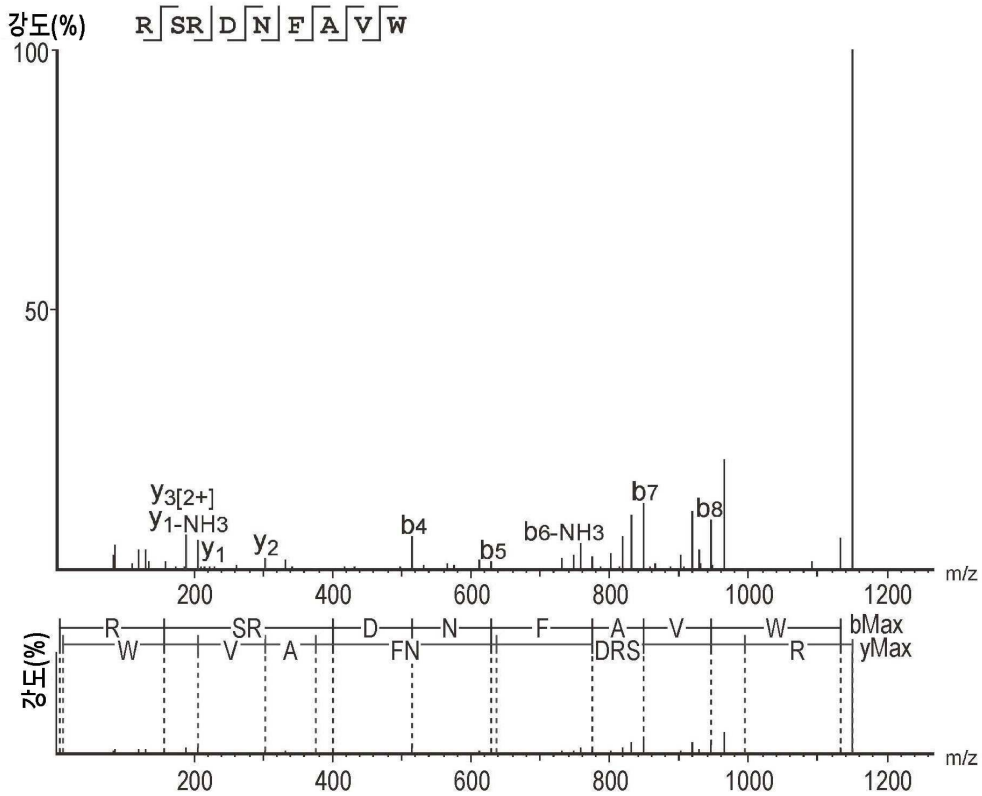
도면10



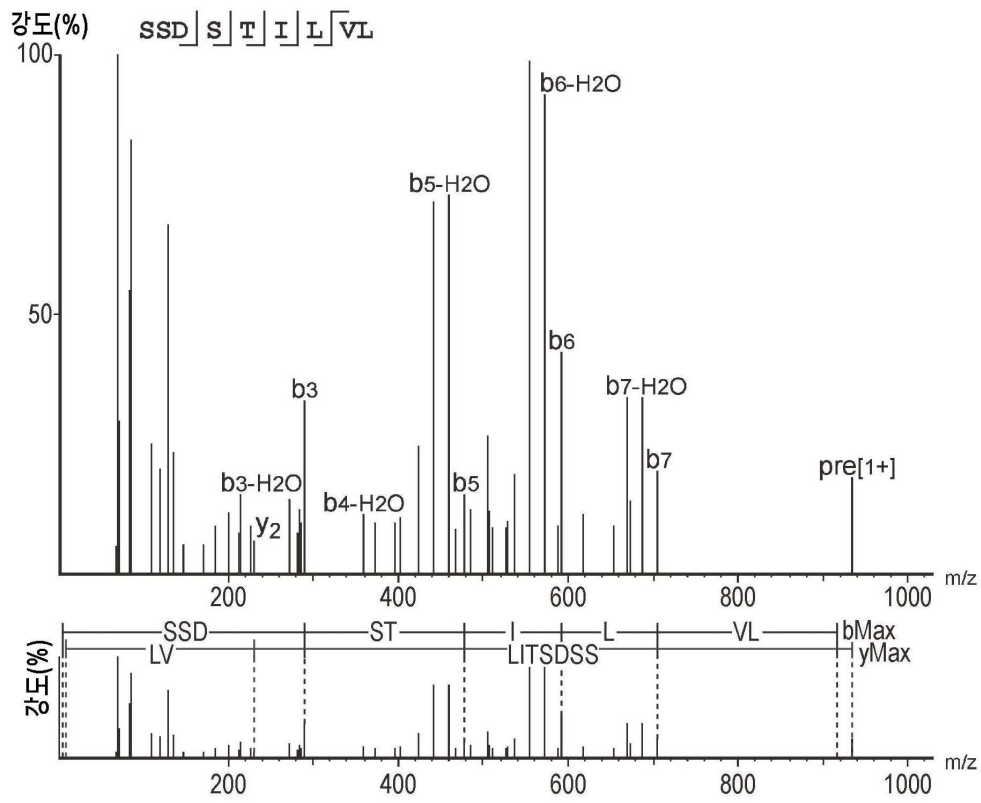
도면11



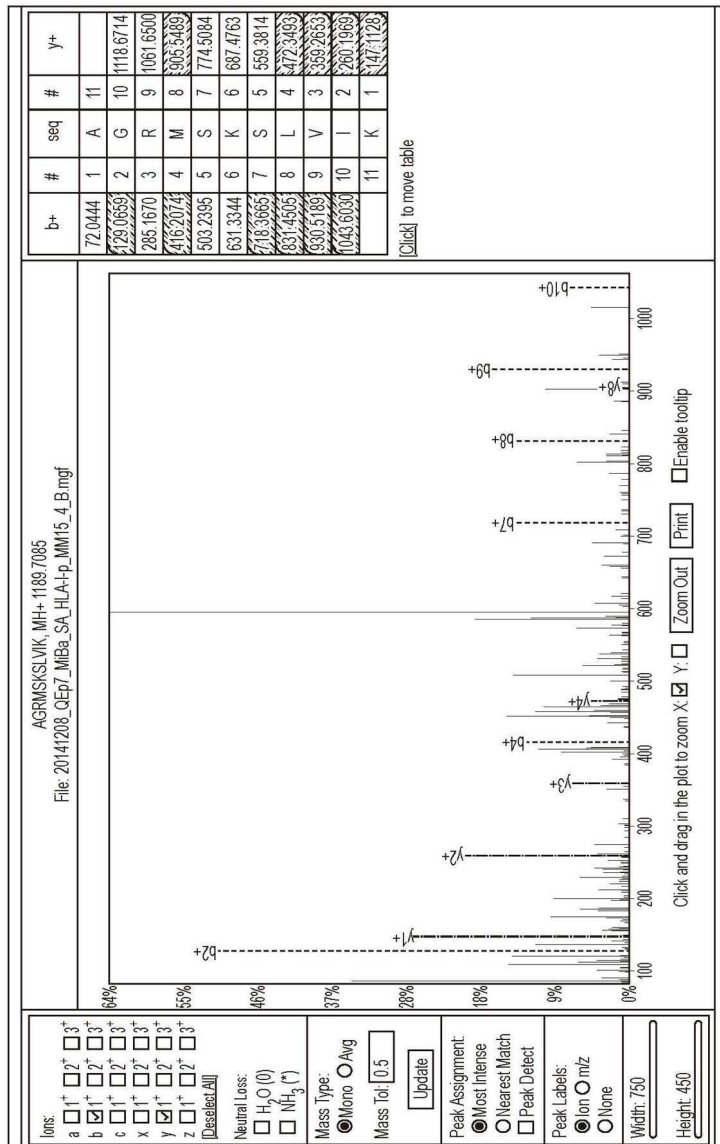
도면12



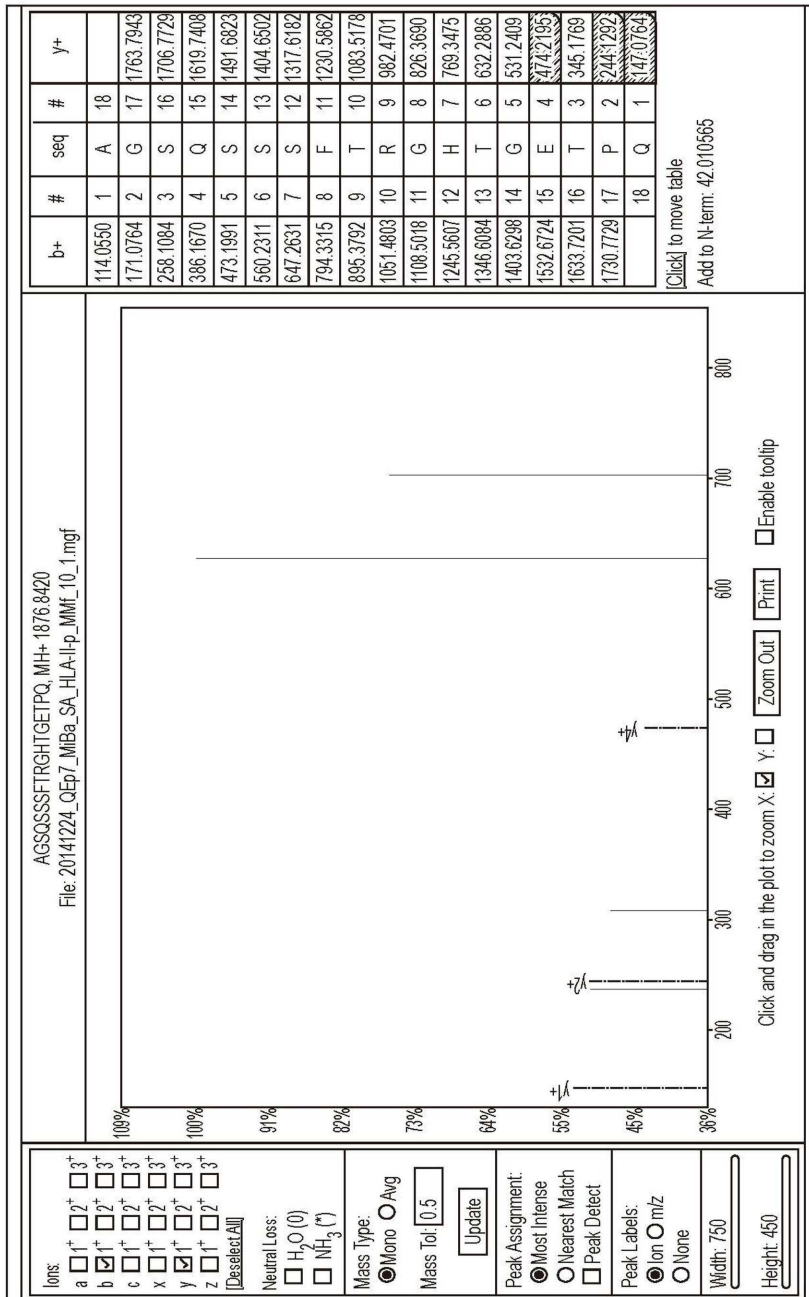
도면15



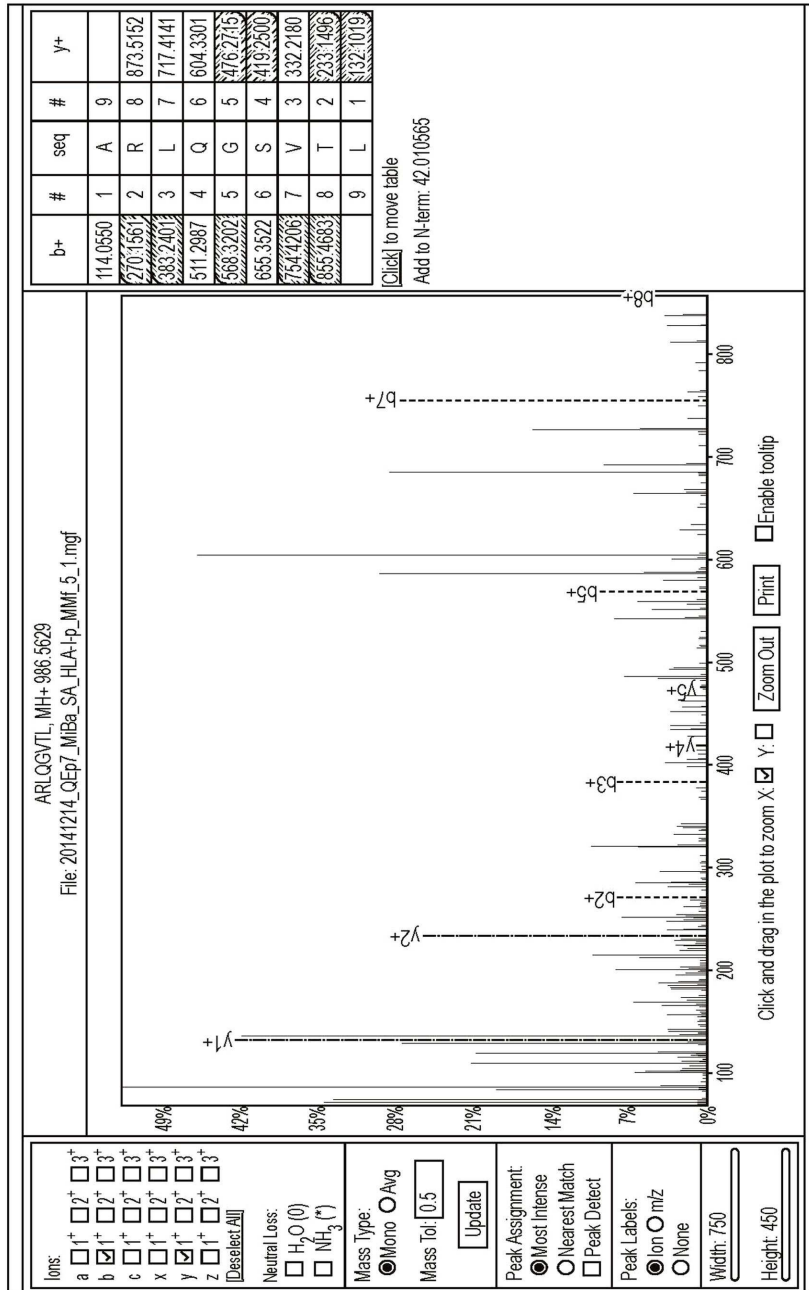
도면16



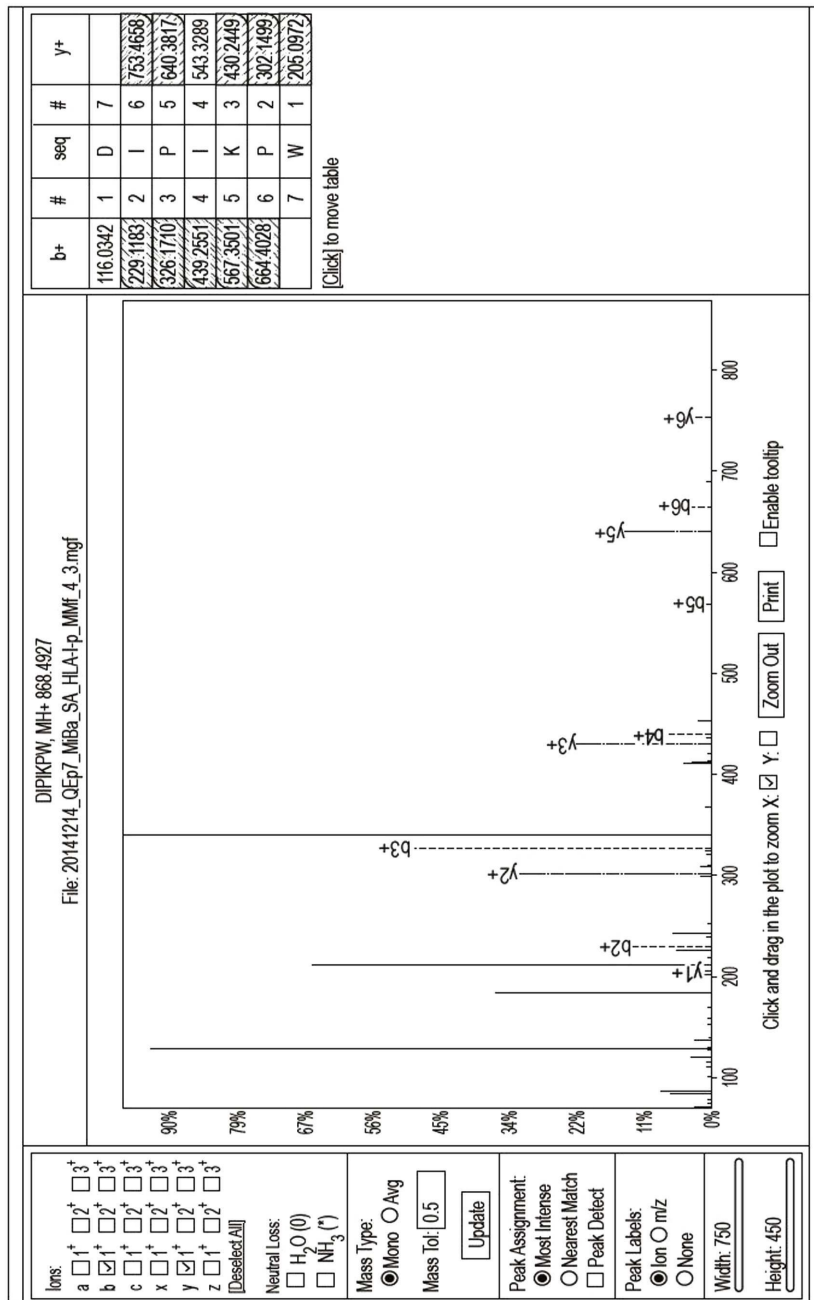
도면17



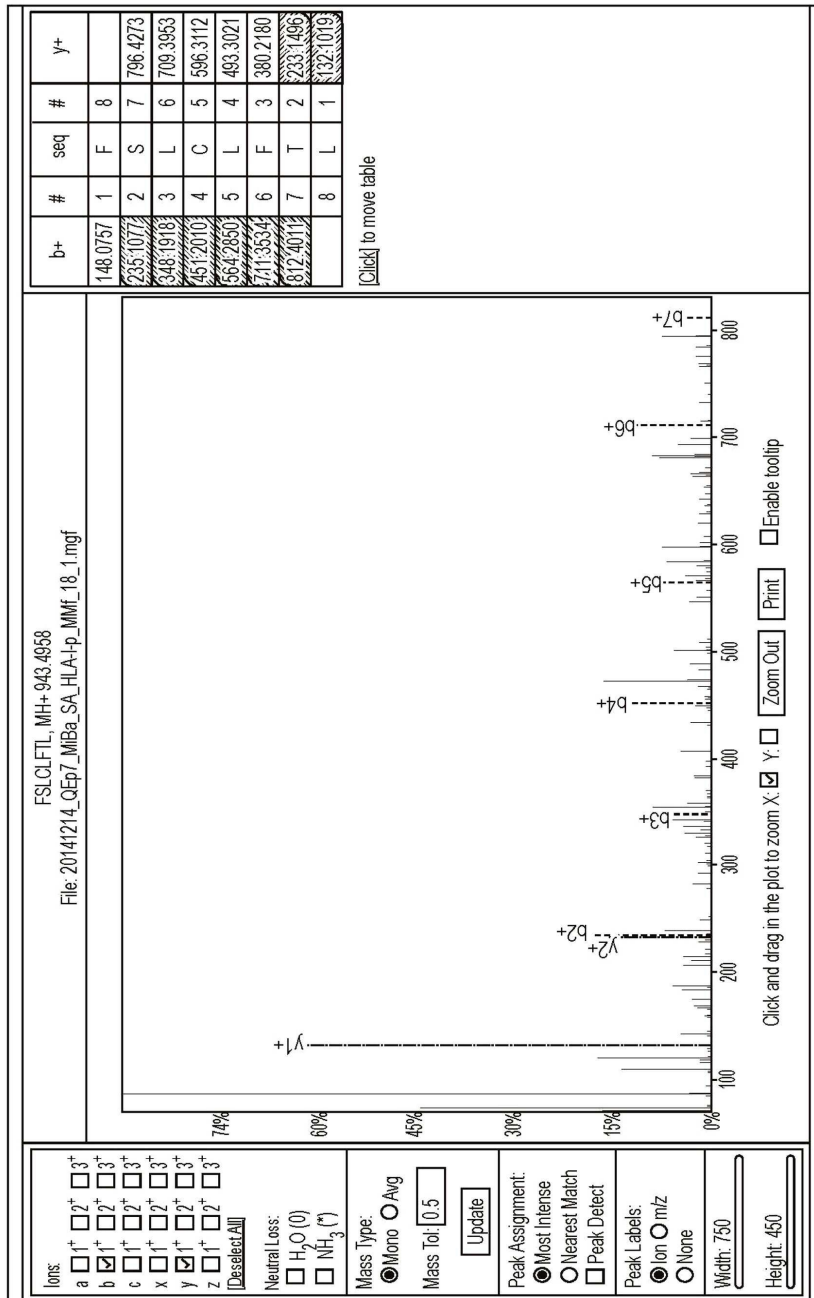
도면18



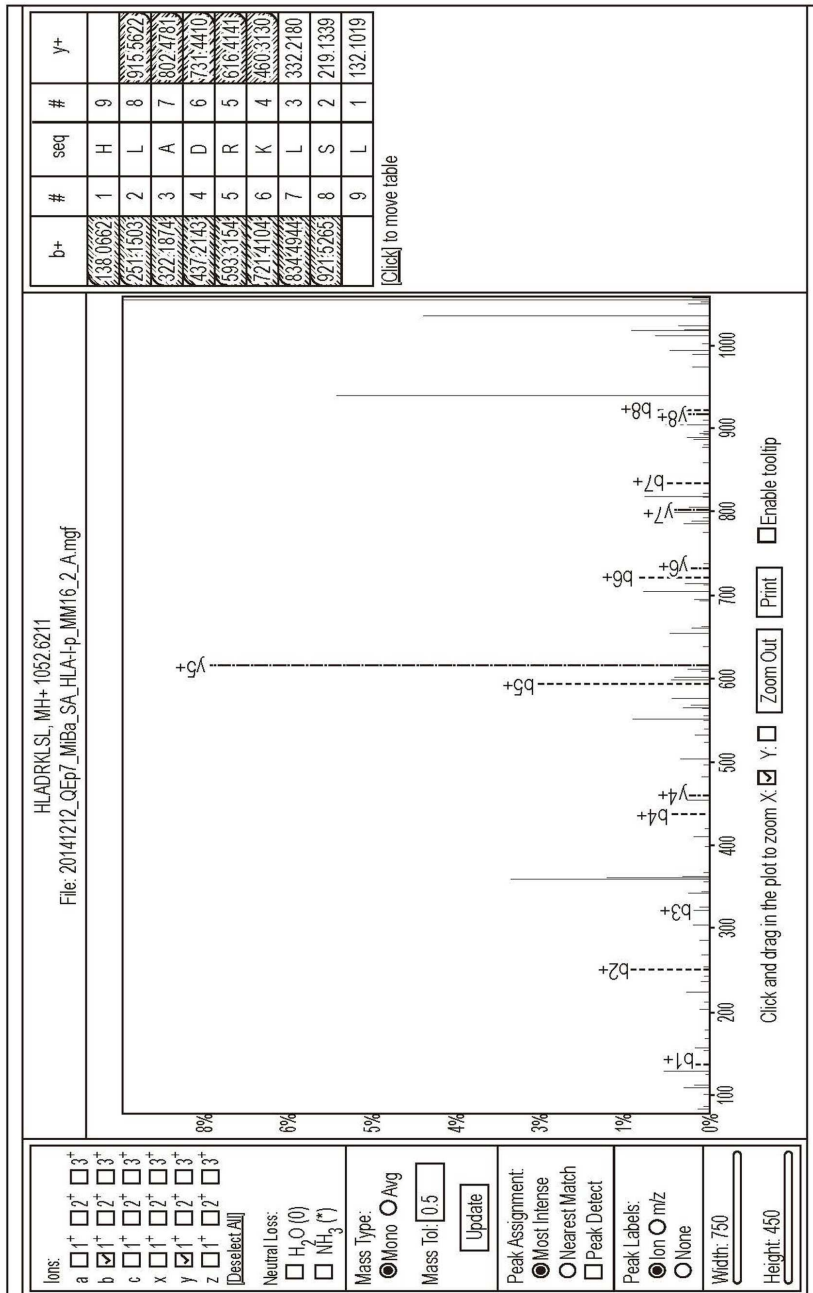
도면19



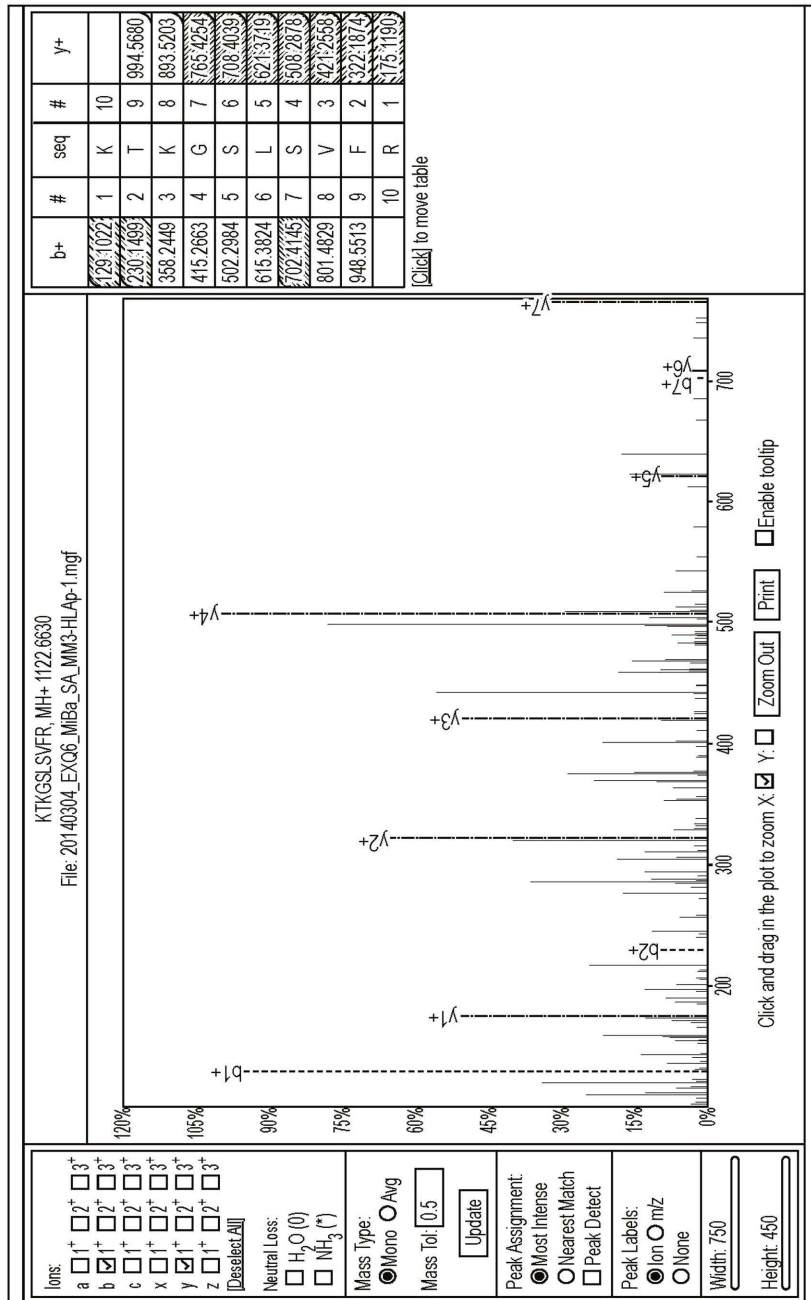
도면20



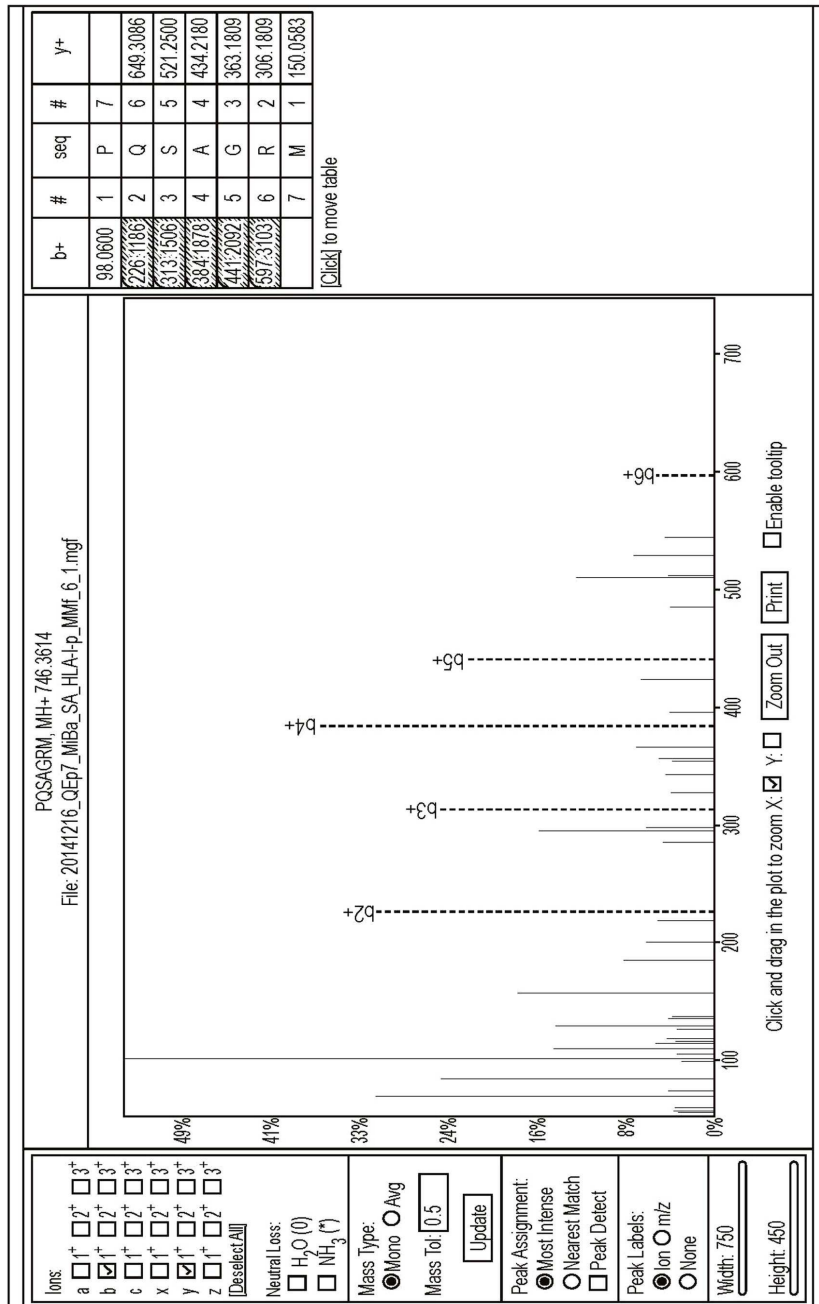
도면21



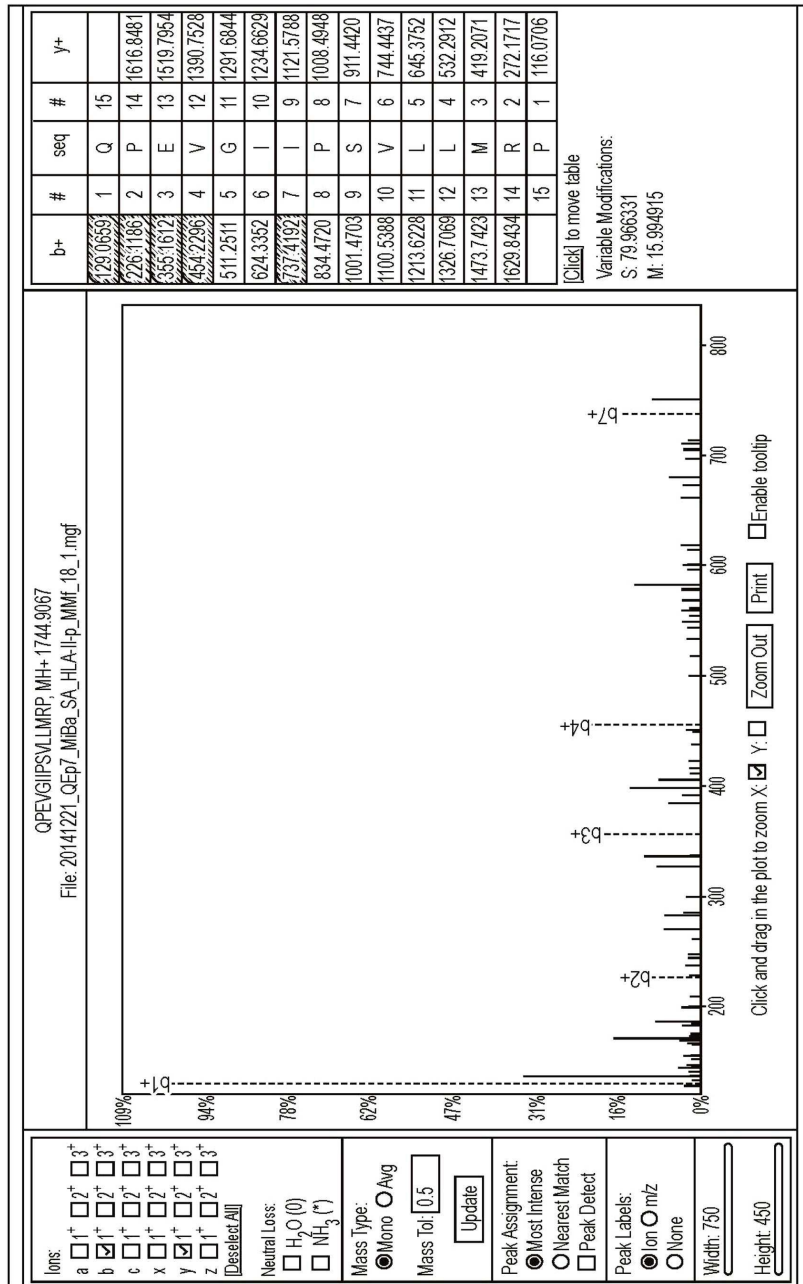
도면22



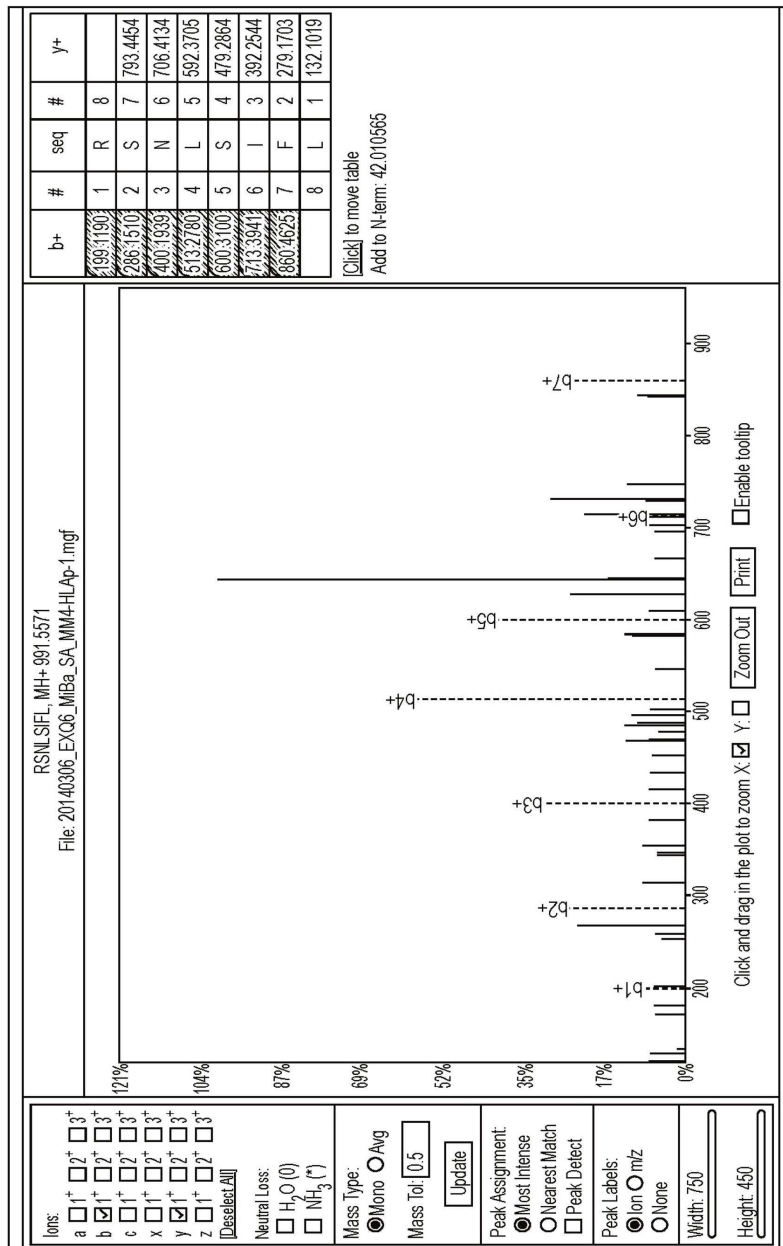
도면23



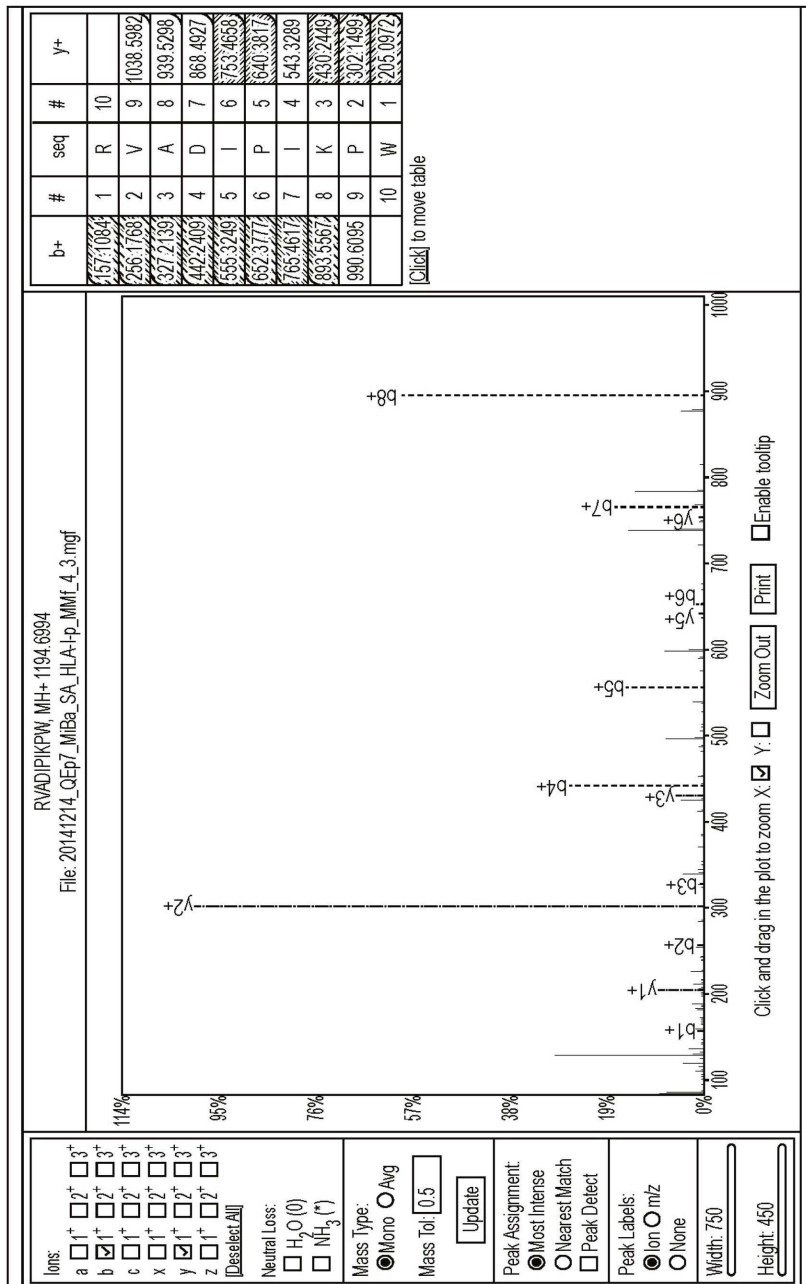
도면24



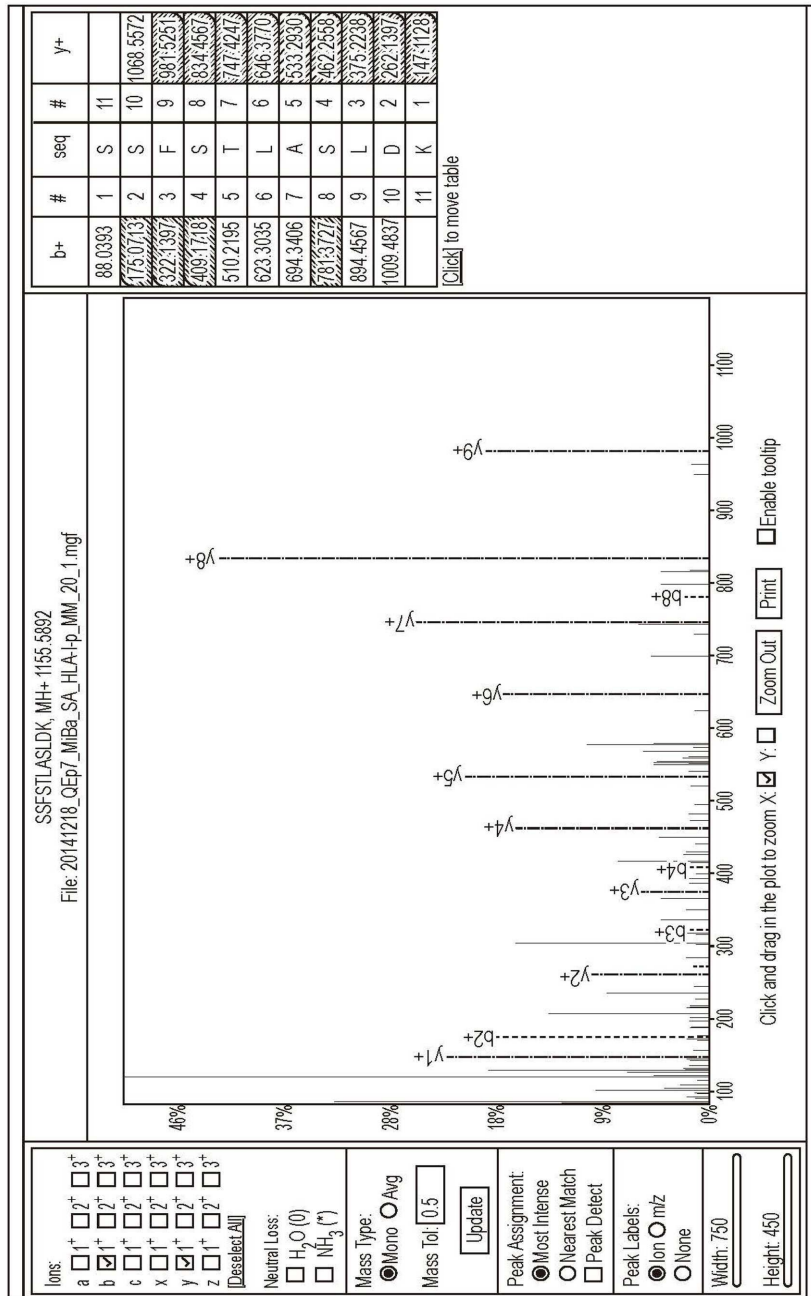
도면25



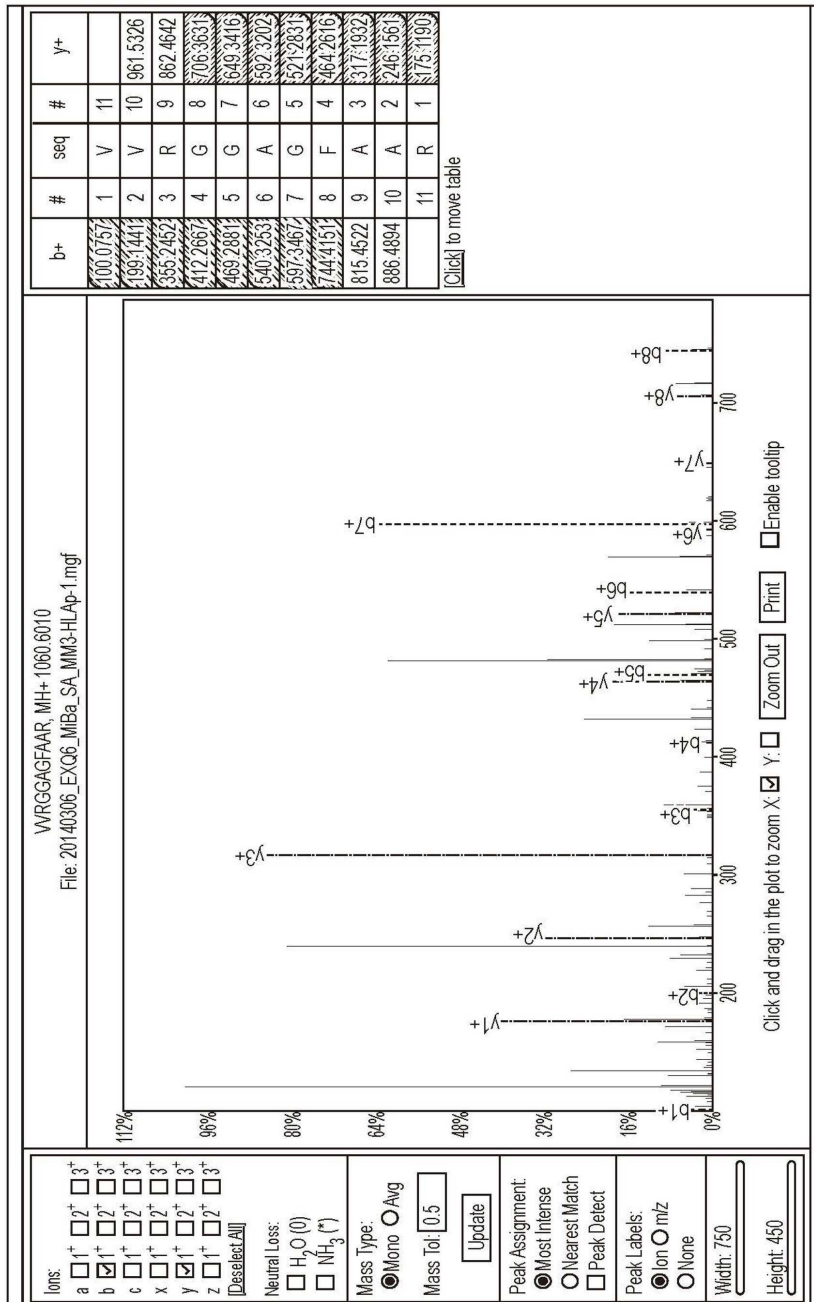
도면26



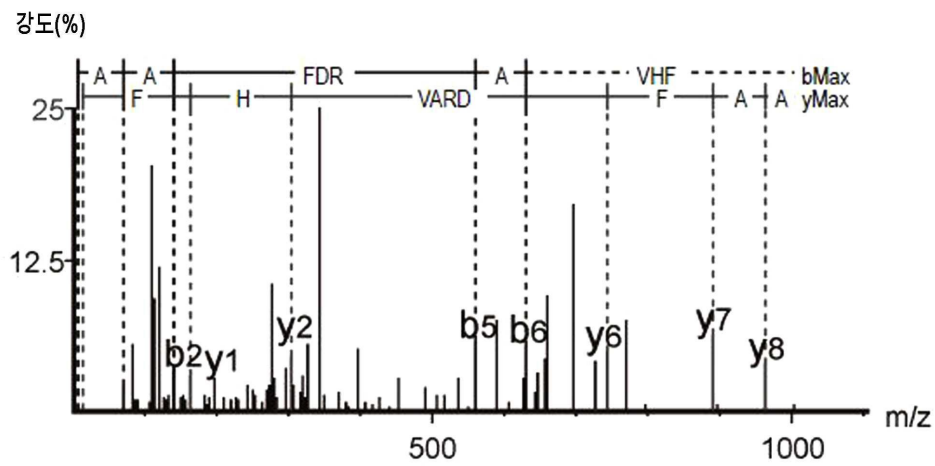
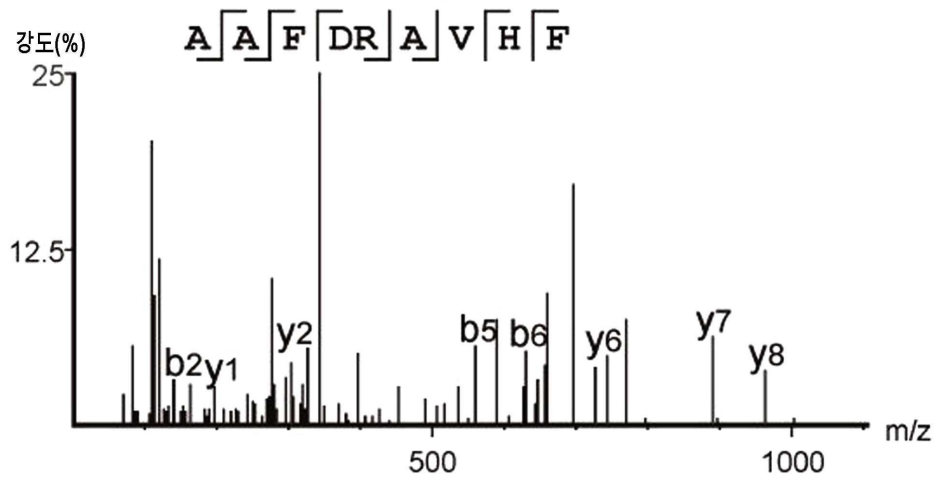
도면27



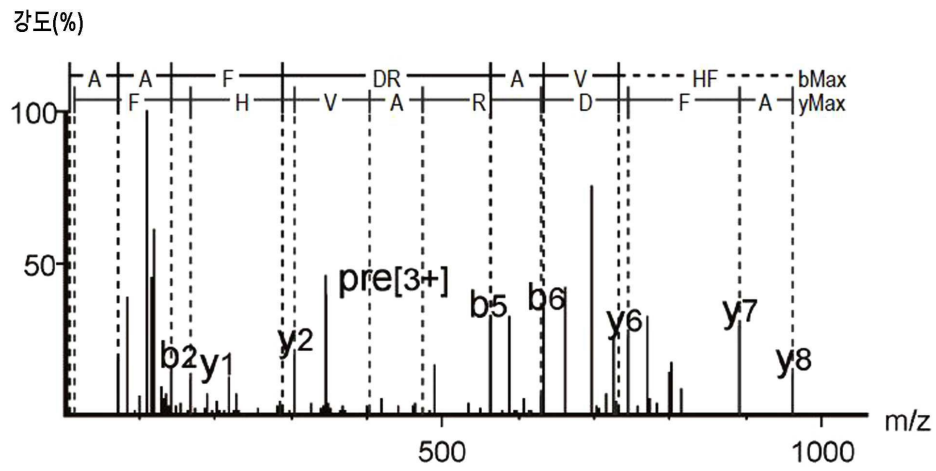
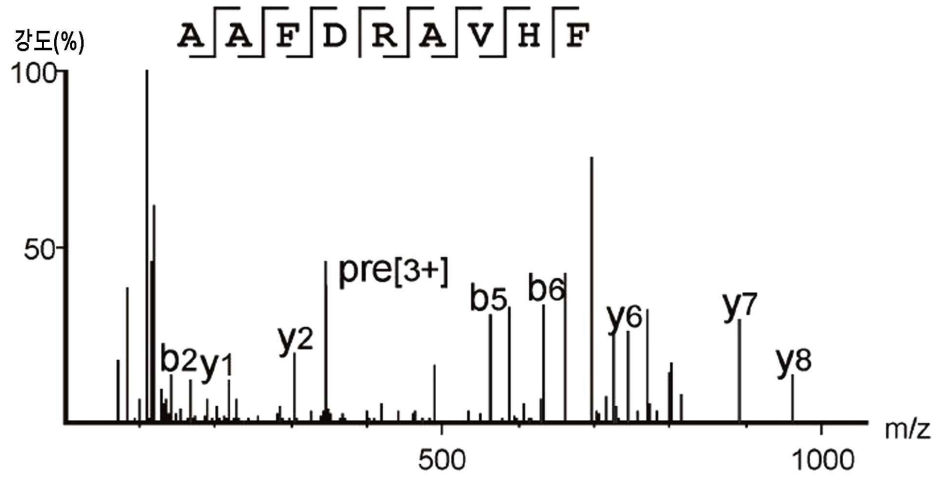
도면28



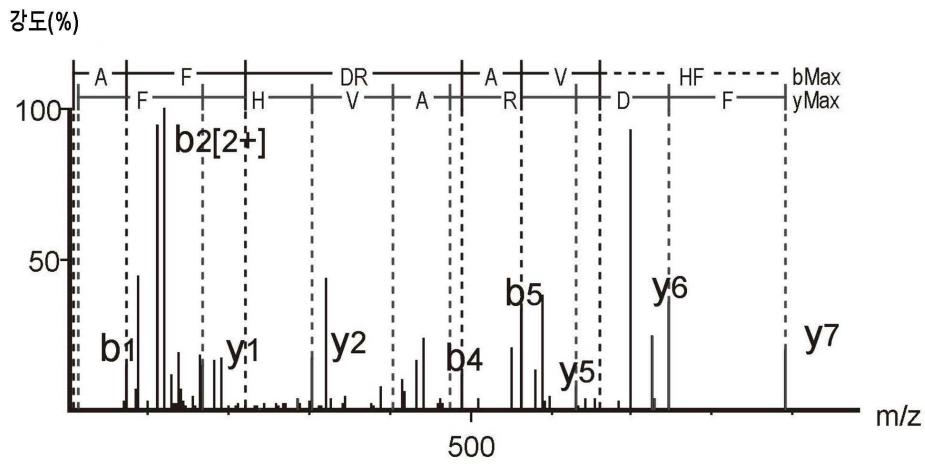
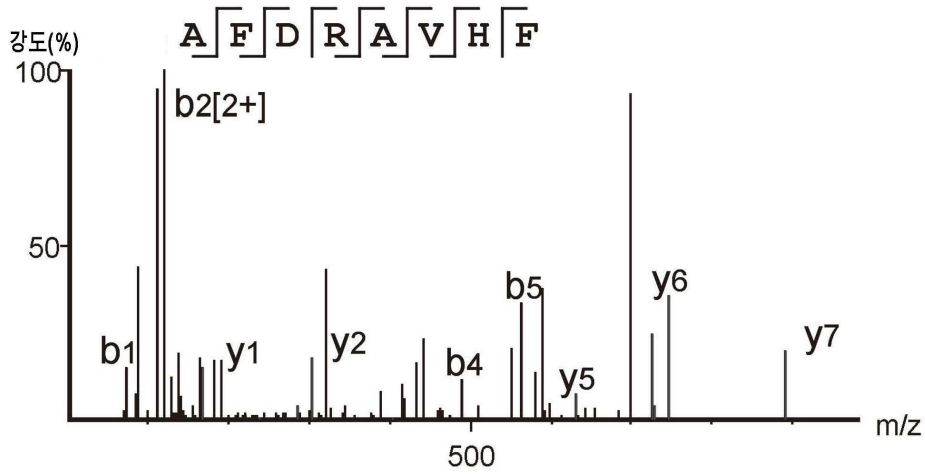
도면29



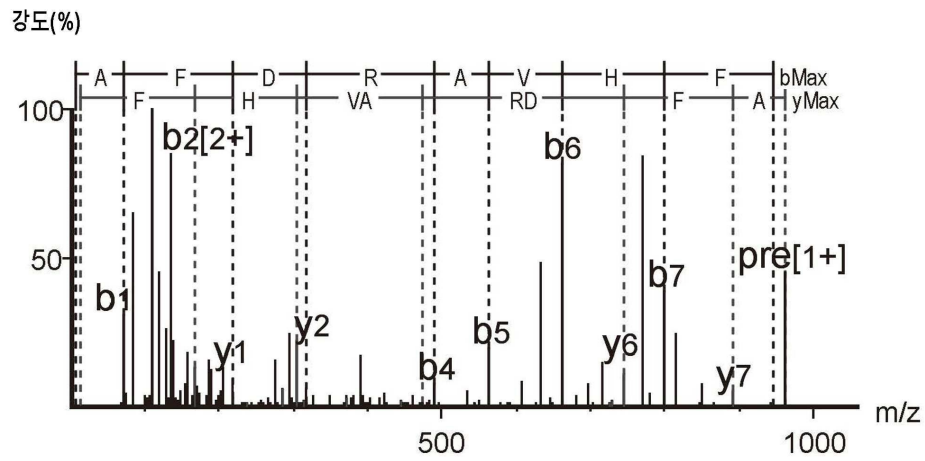
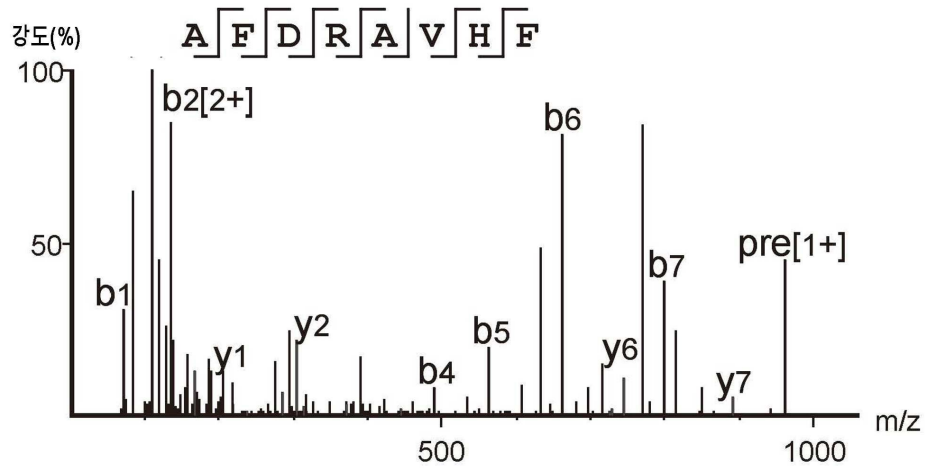
도면30



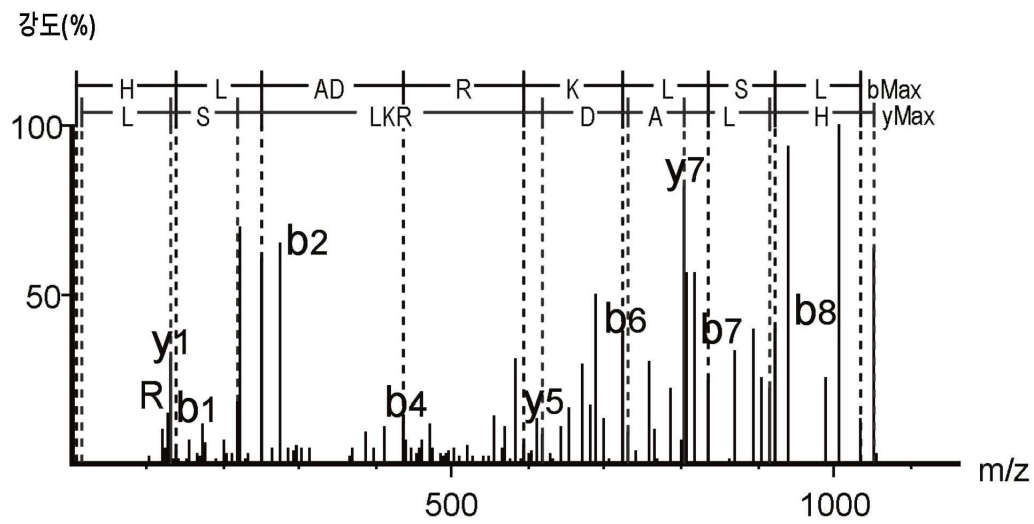
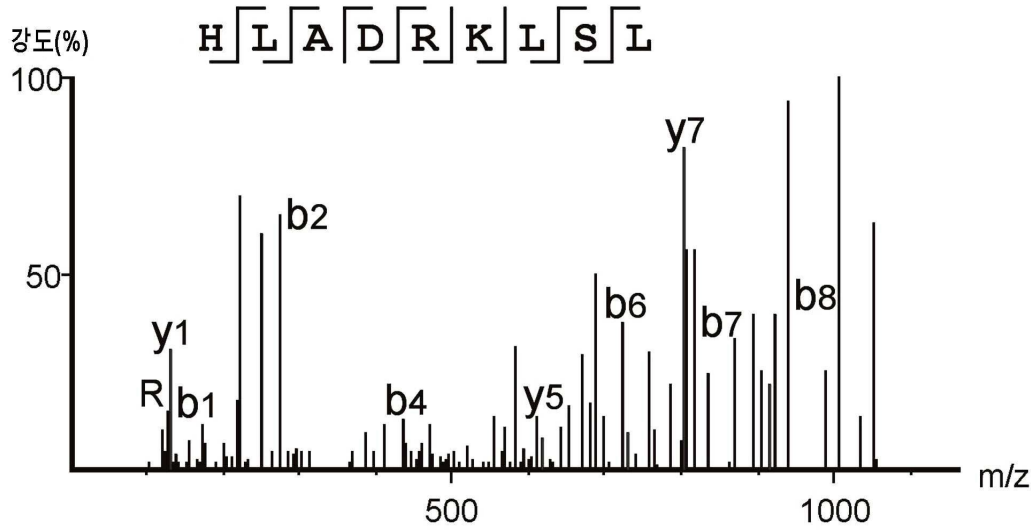
도면31



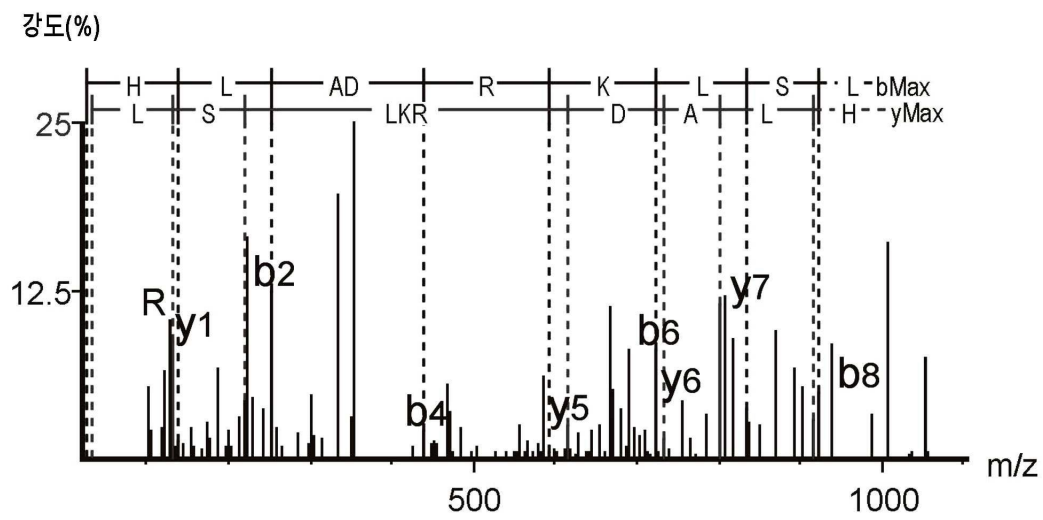
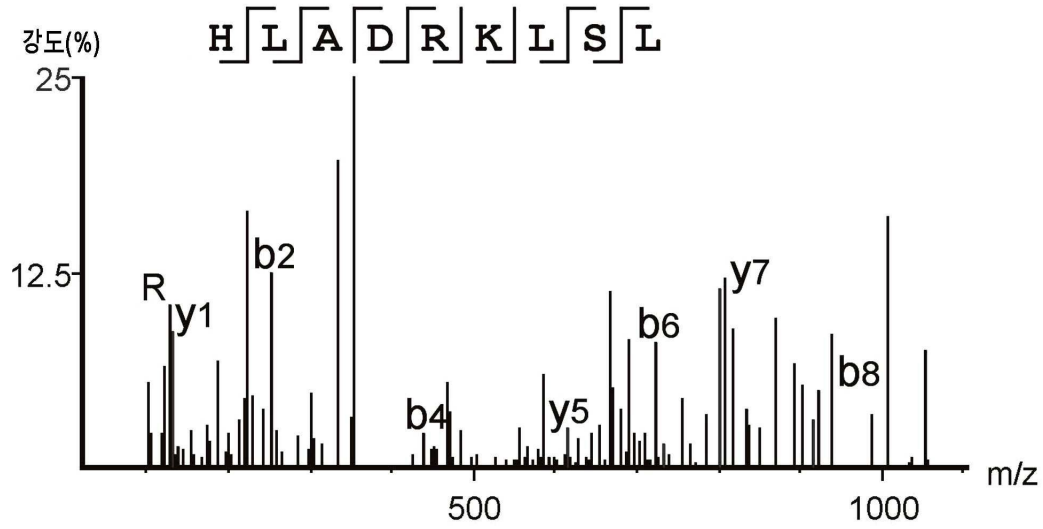
도면32



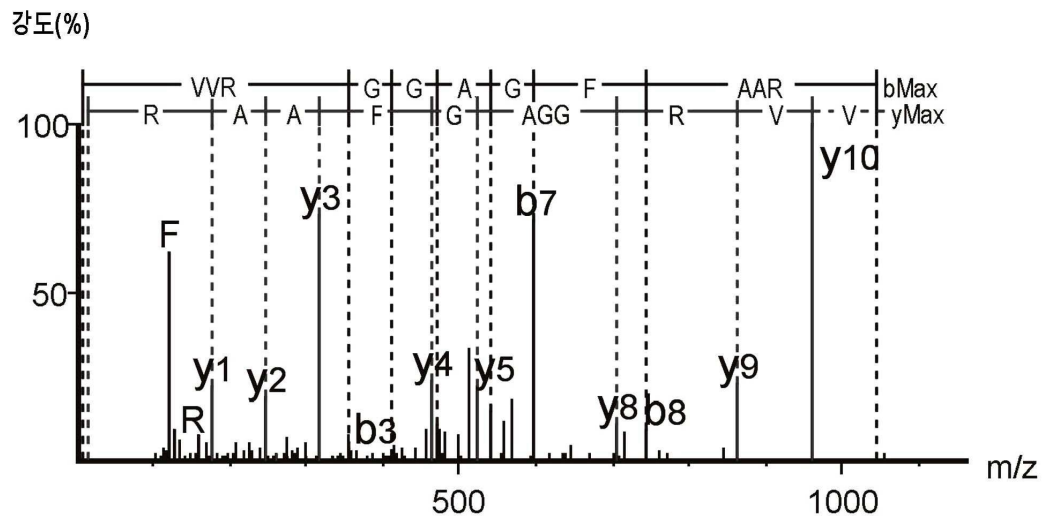
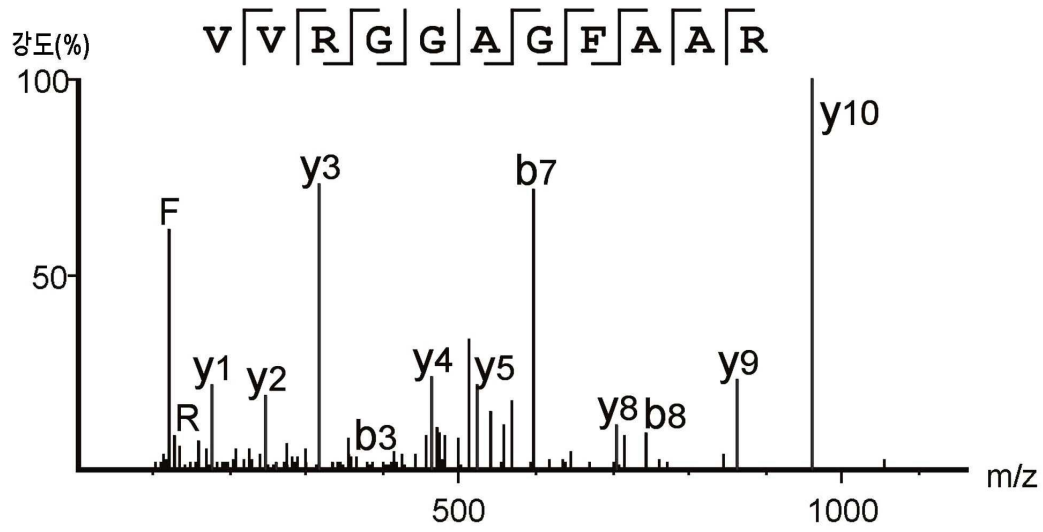
도면33



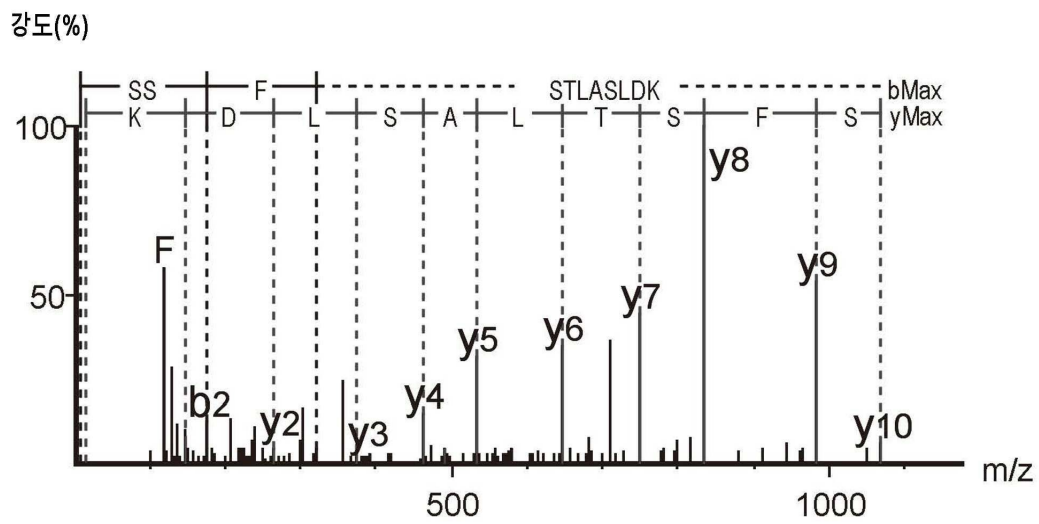
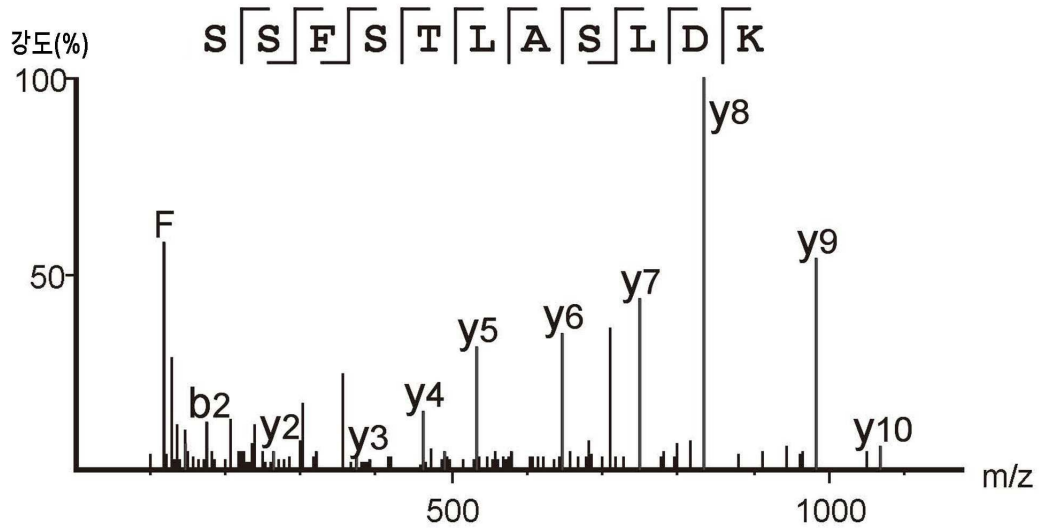
도면34



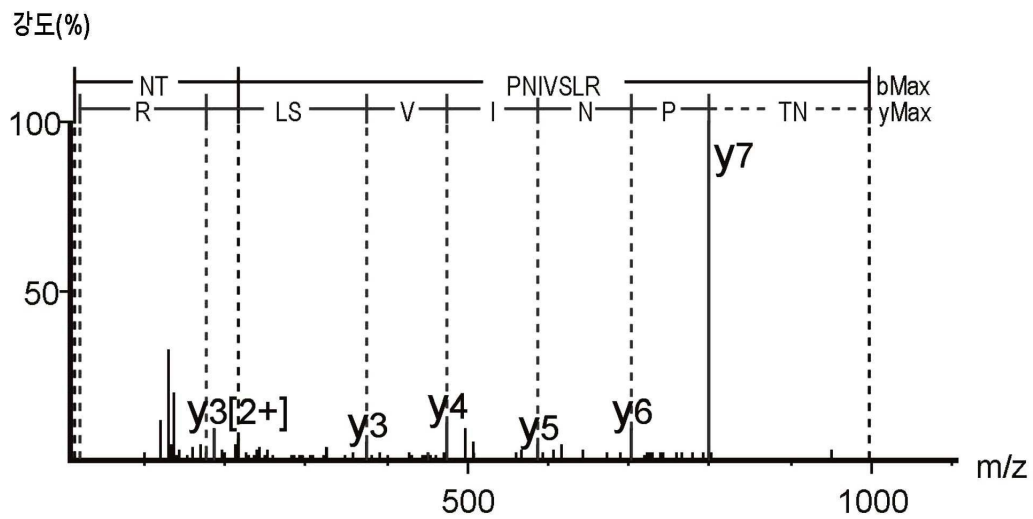
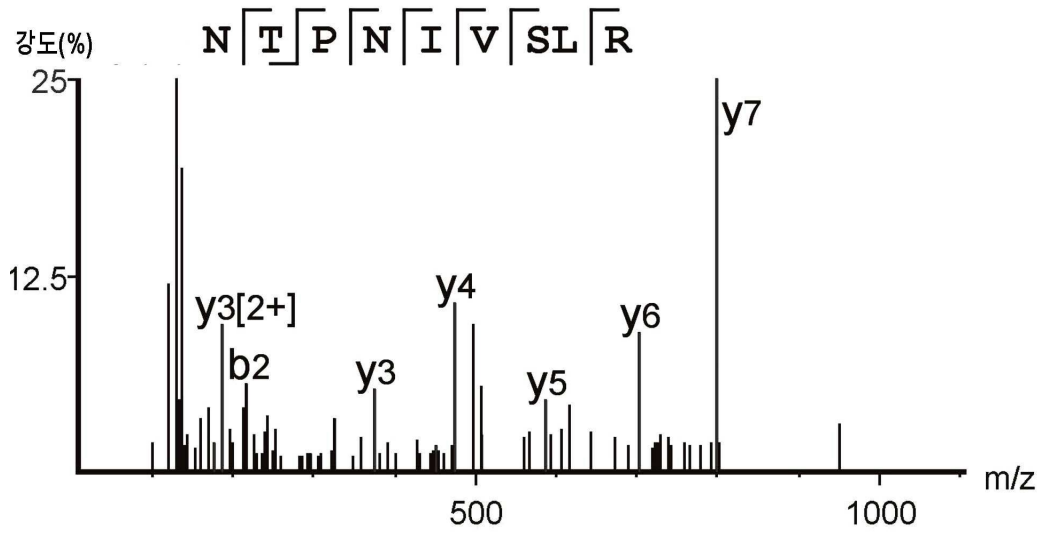
도면35



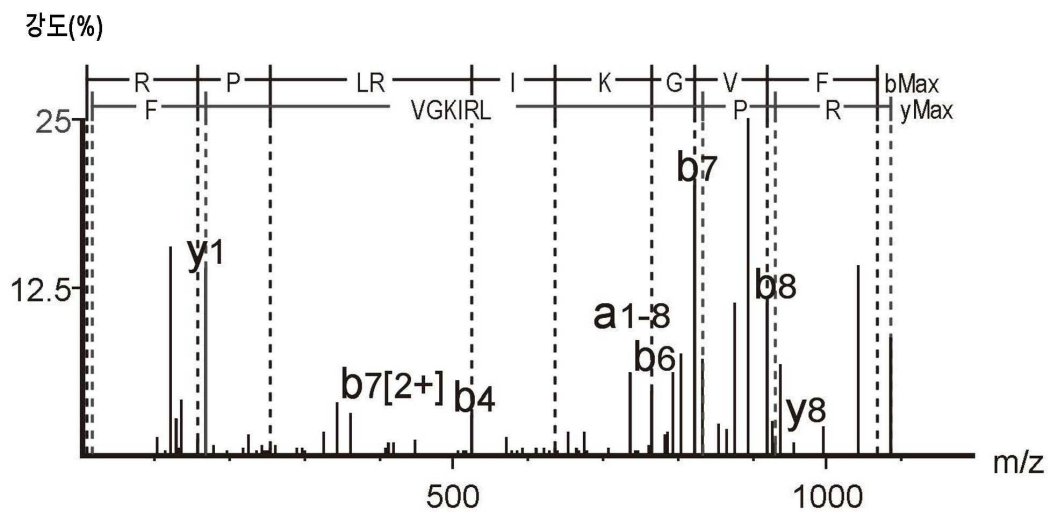
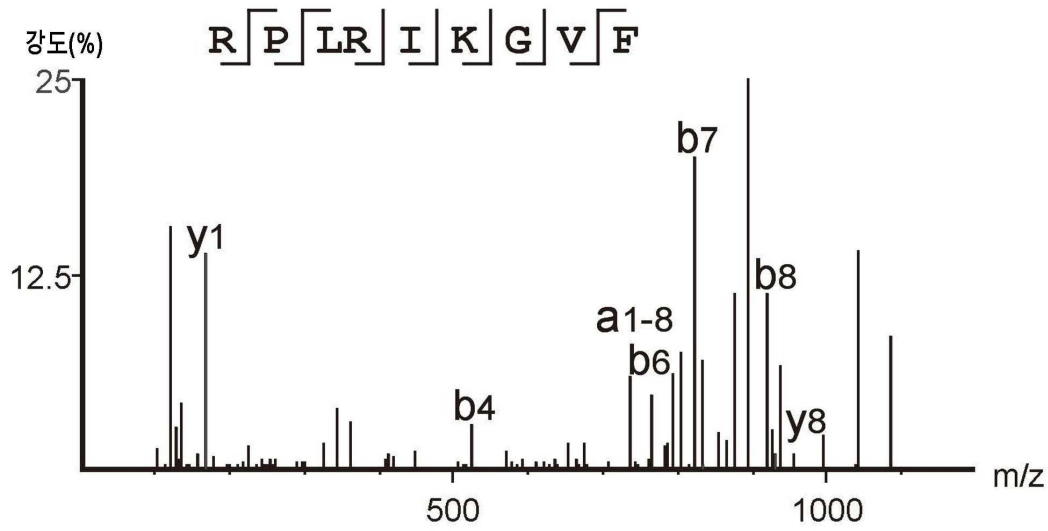
도면36



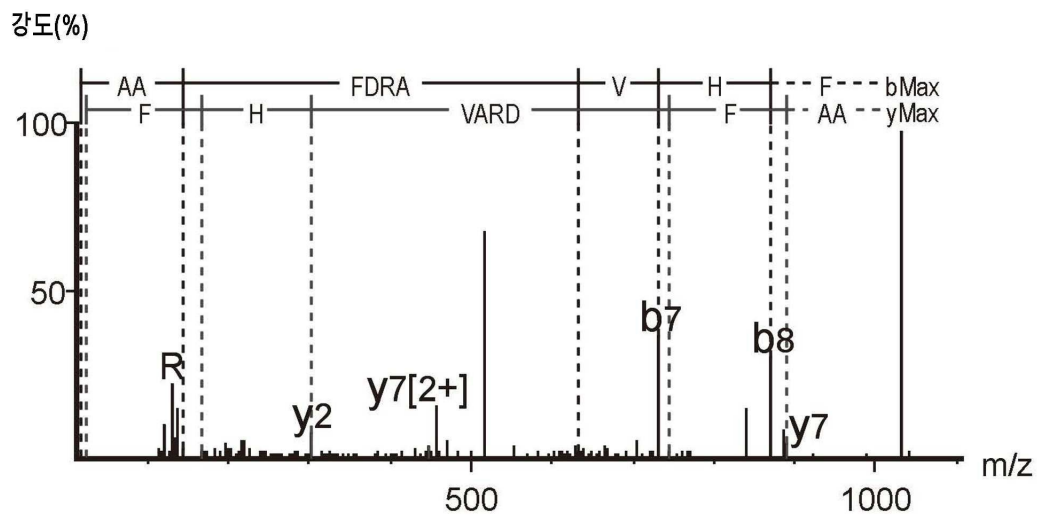
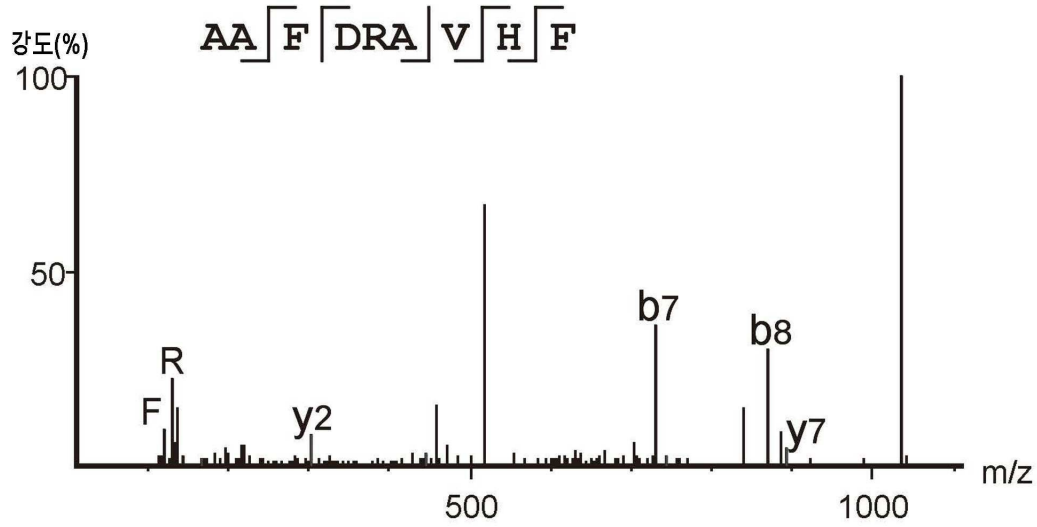
도면37



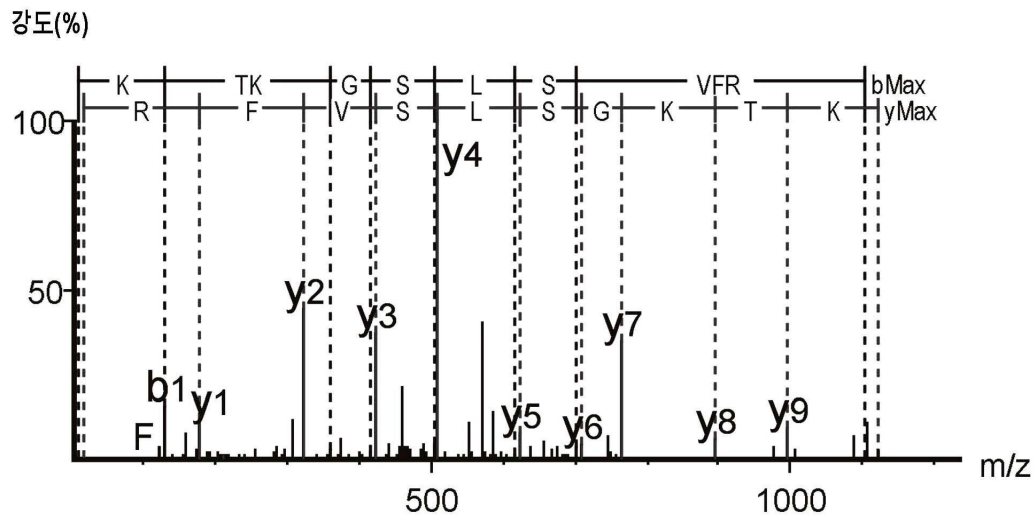
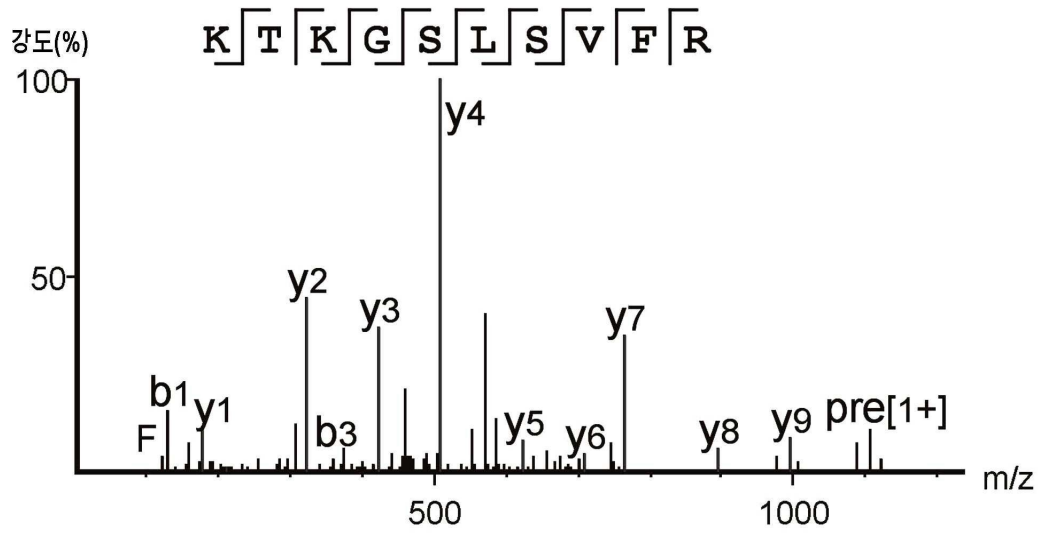
도면38



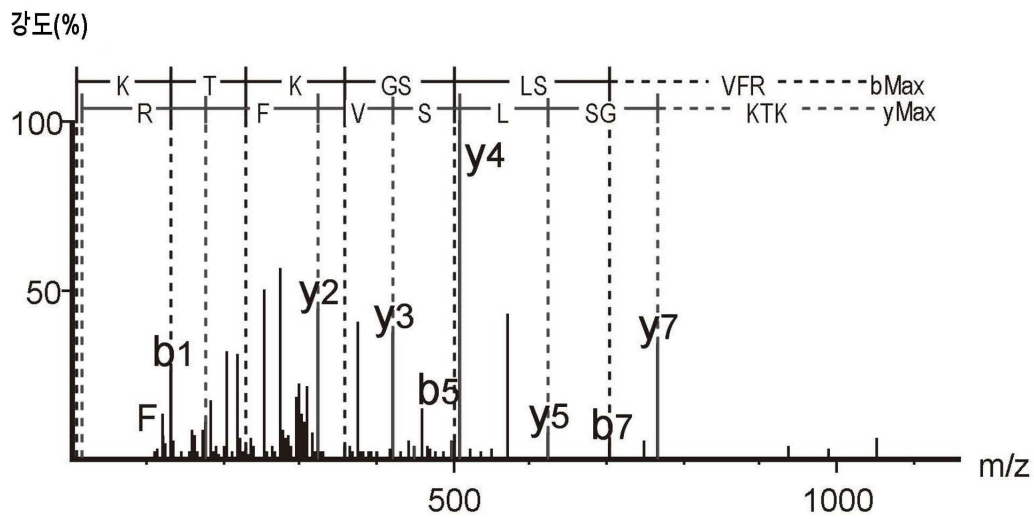
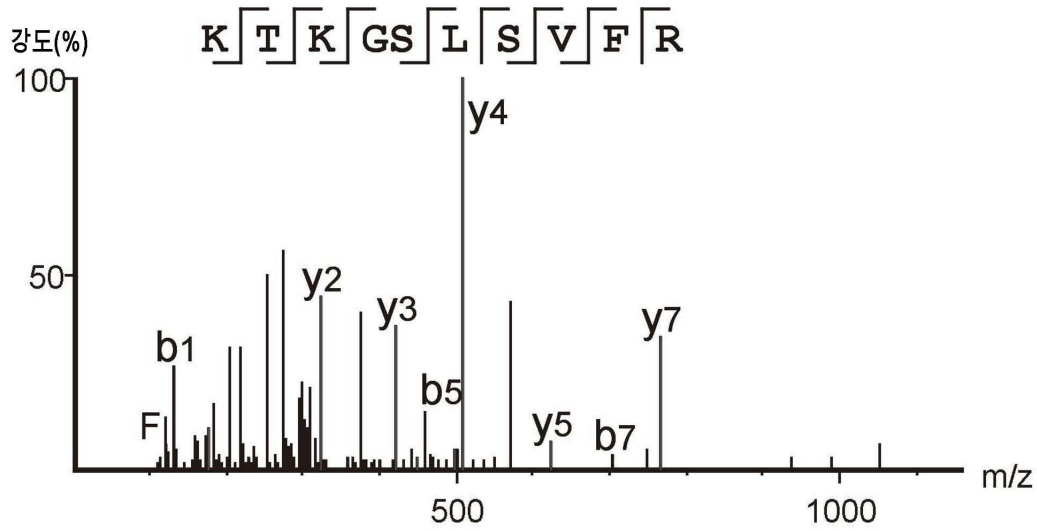
도면39



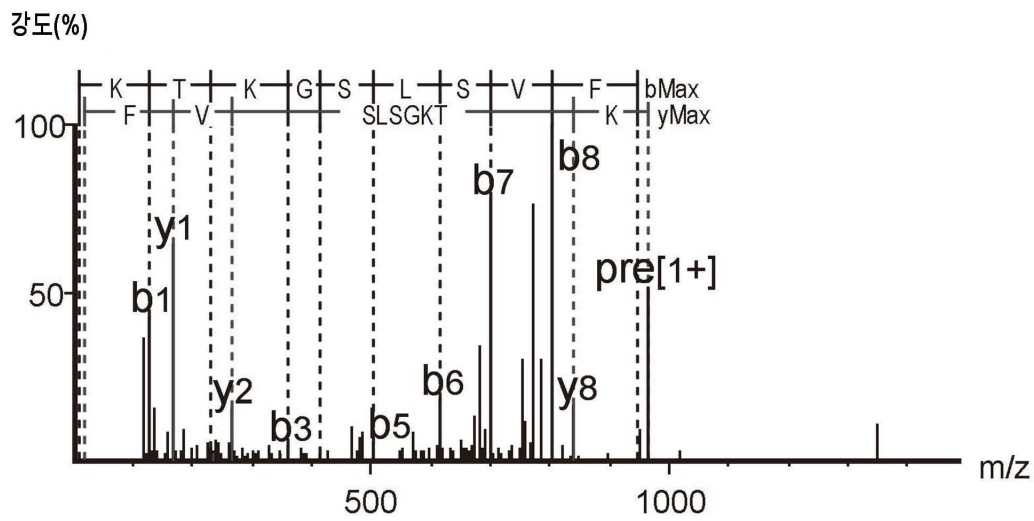
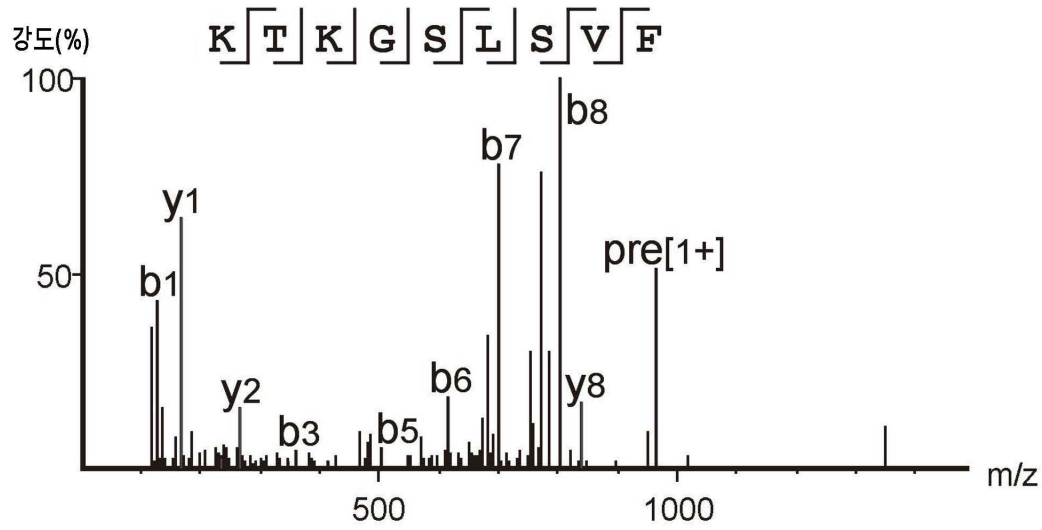
도면40



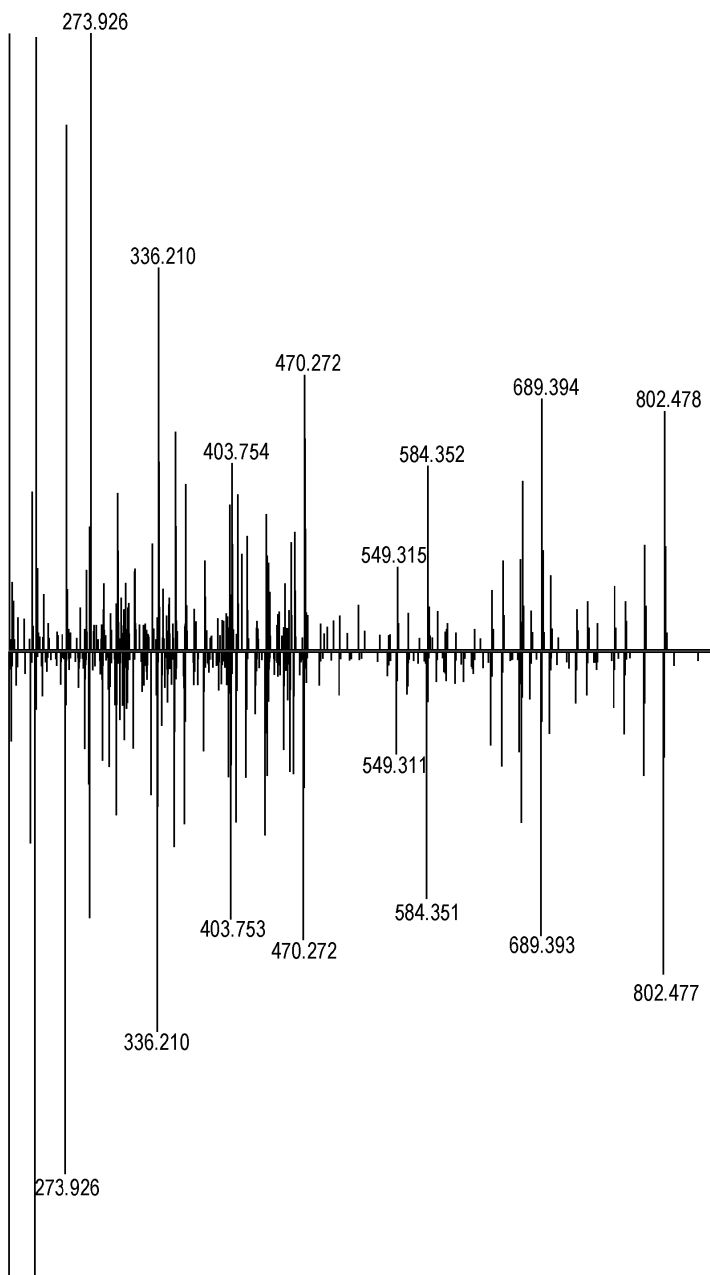
도면41



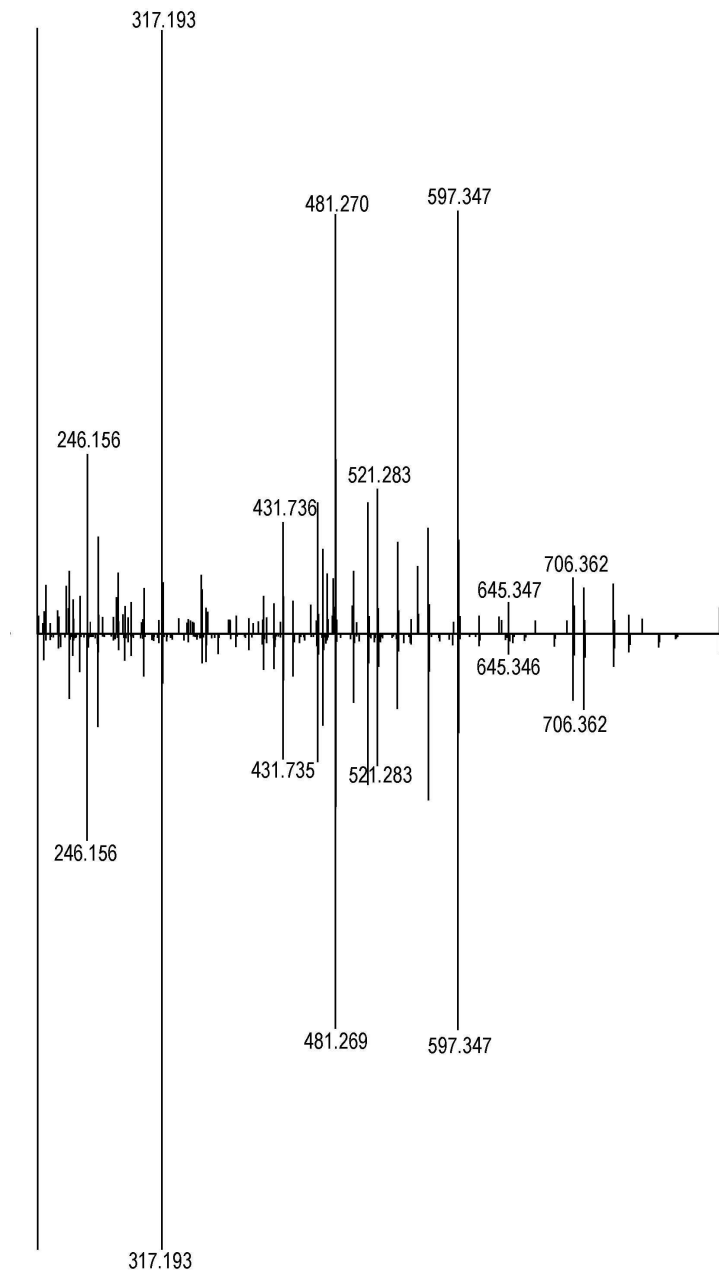
도면42



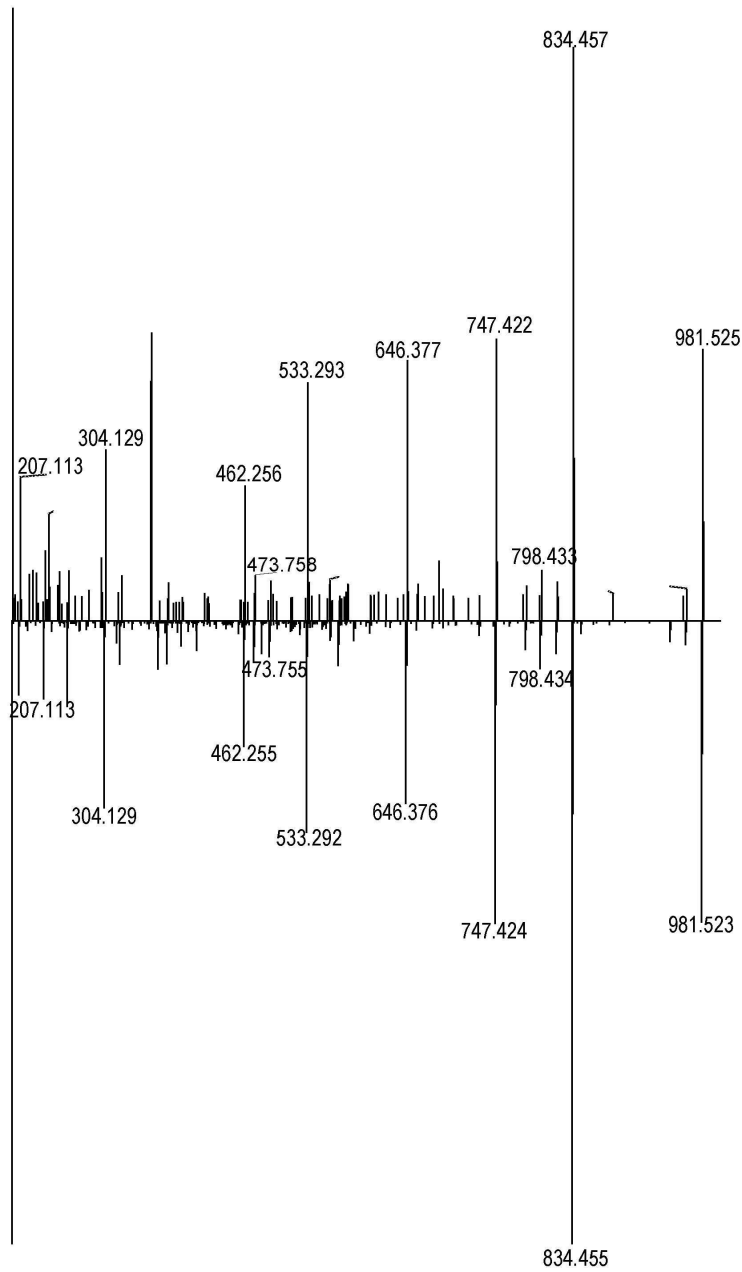
도면43



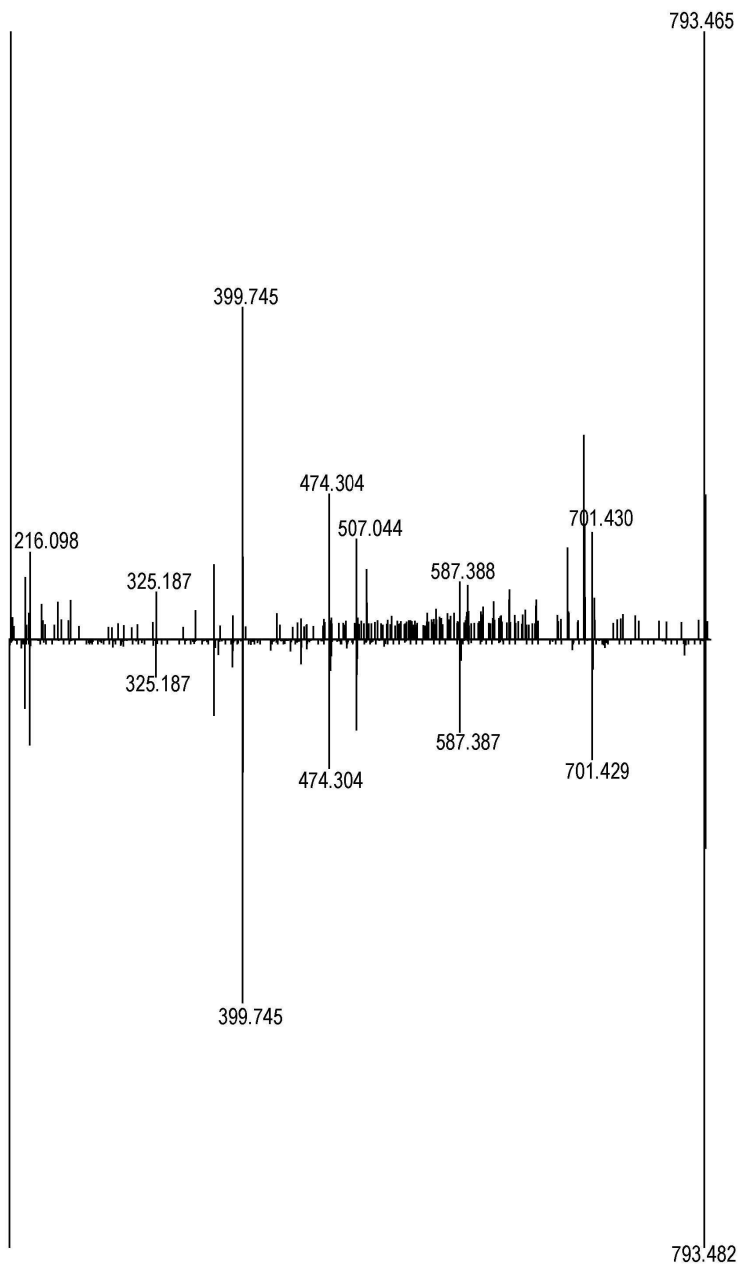
도면44



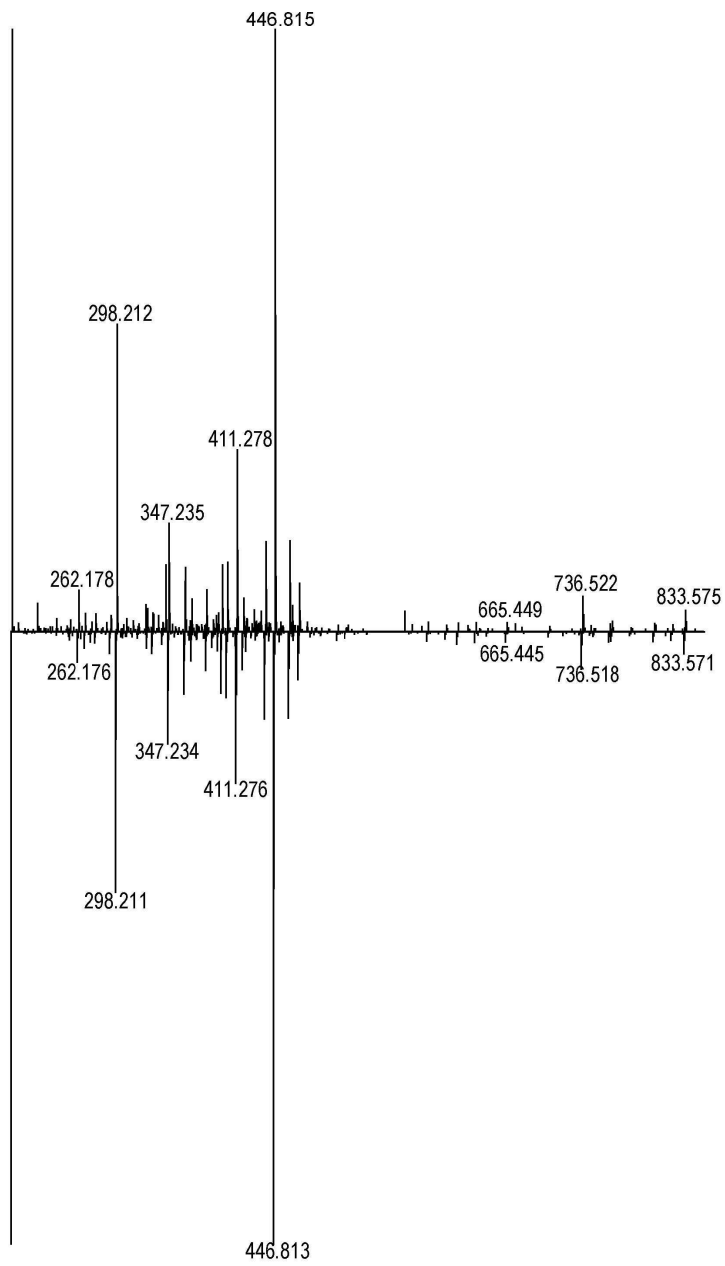
도면45



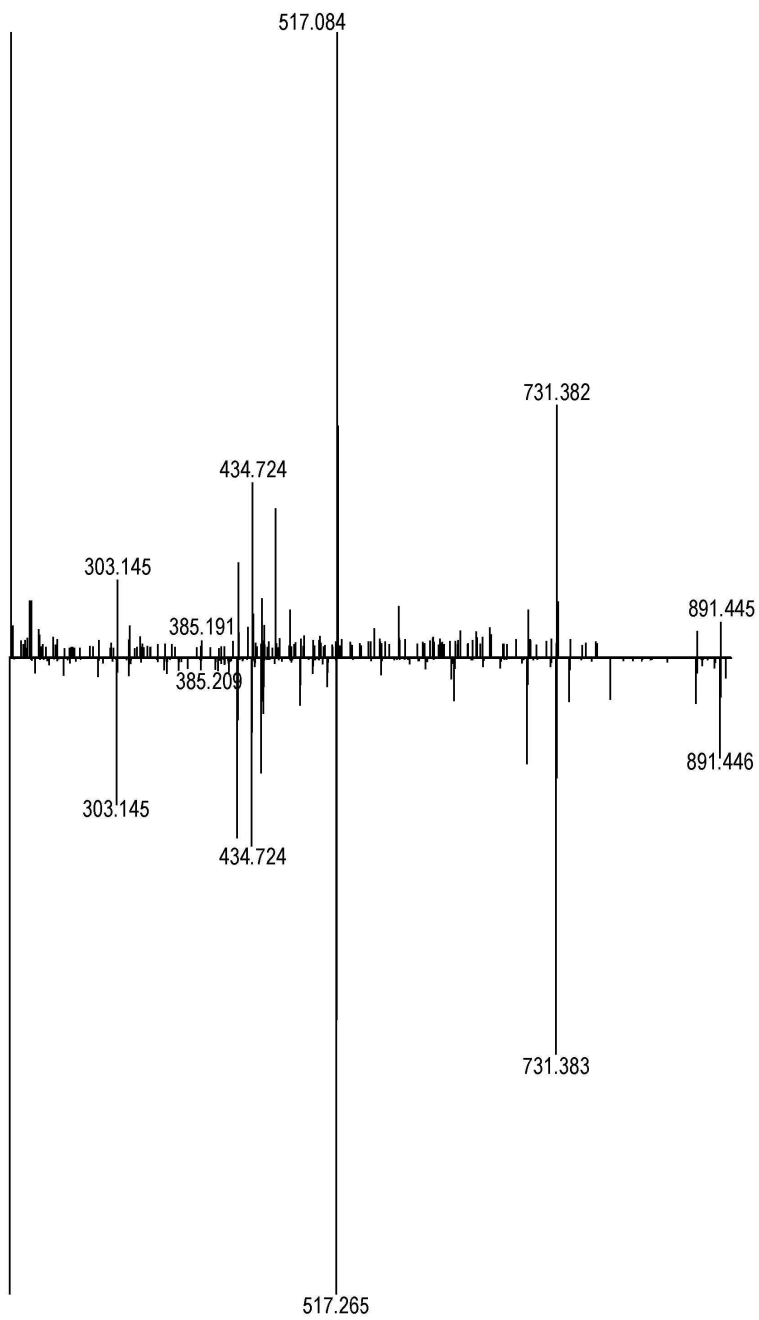
도면46



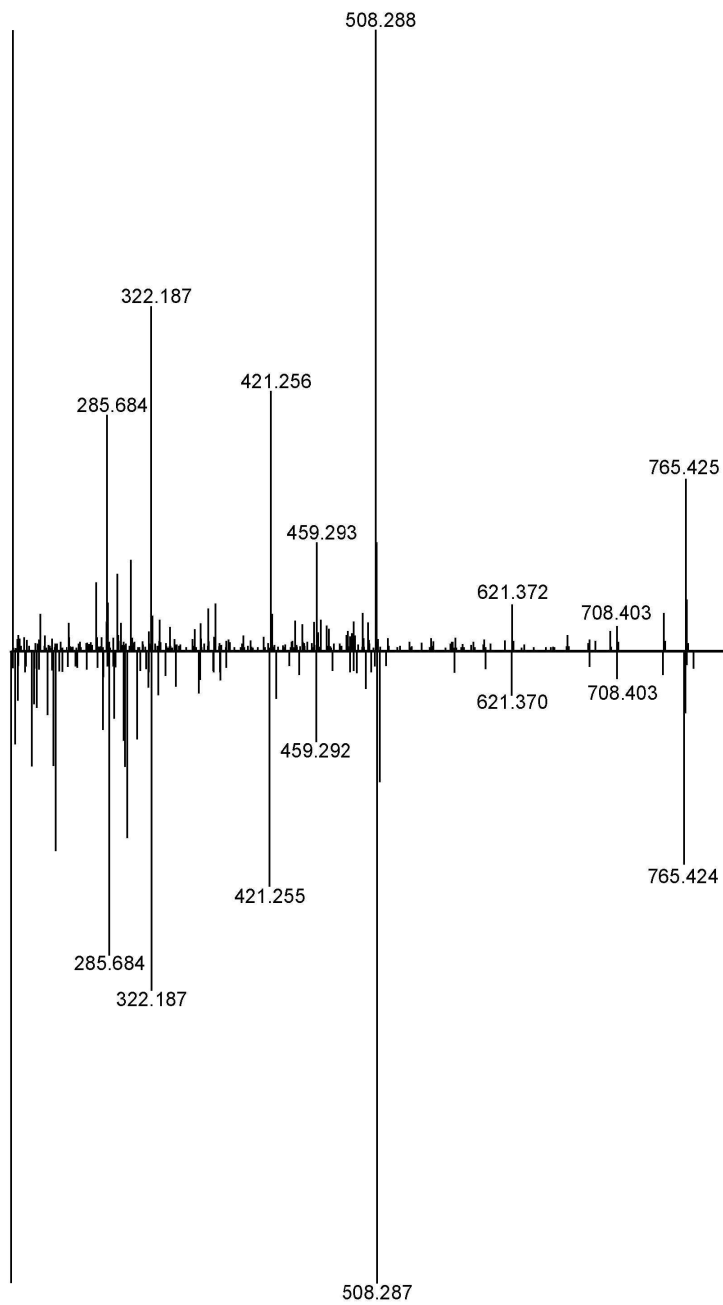
도면47



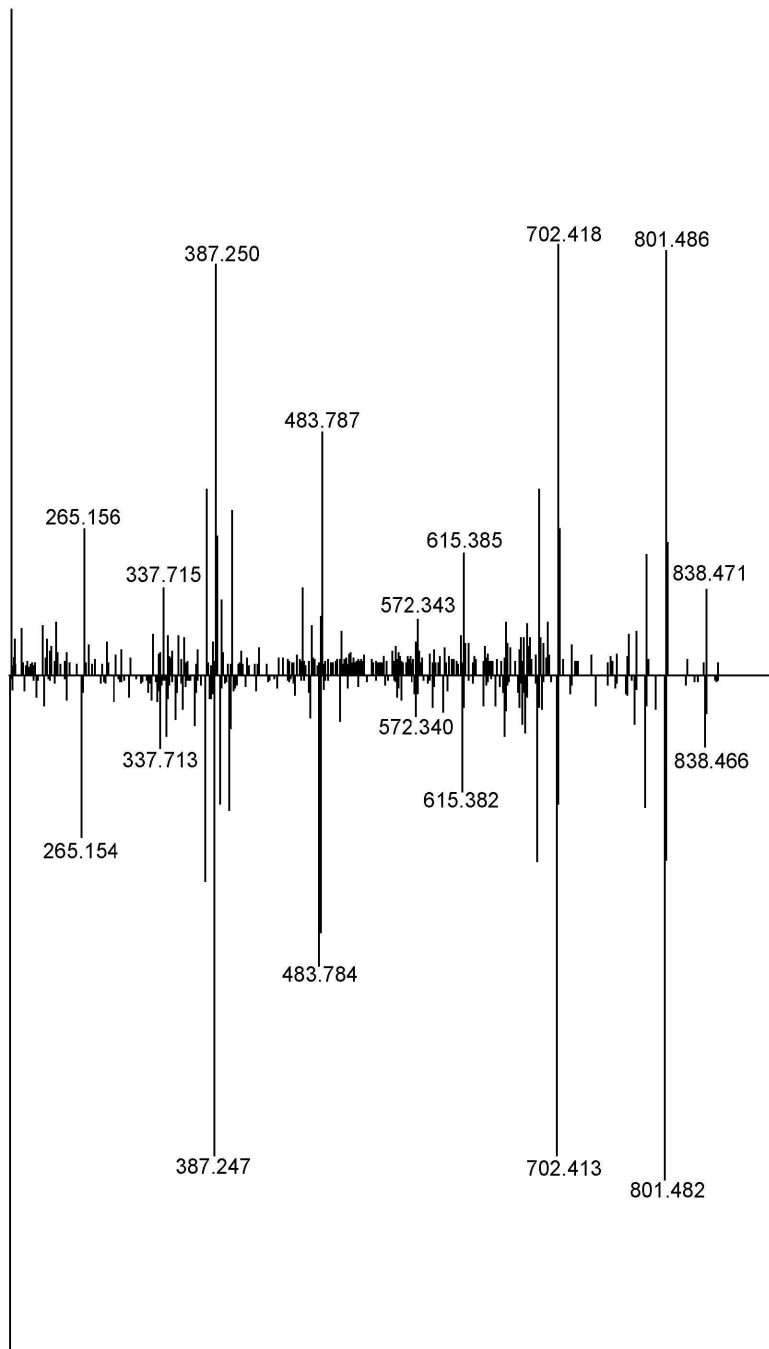
도면48



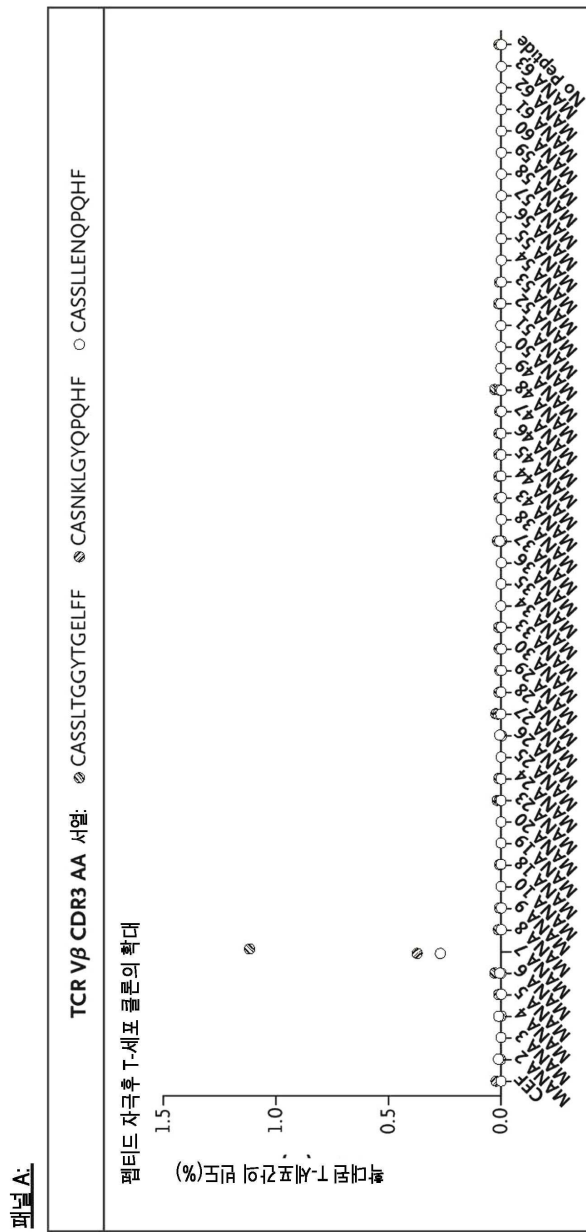
도면49



도면50

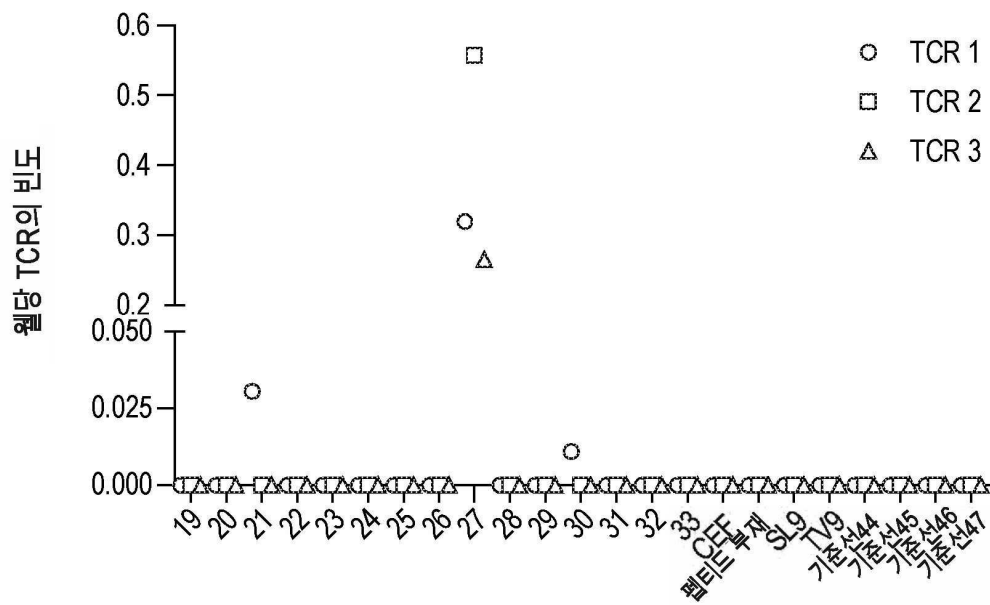


도면51a

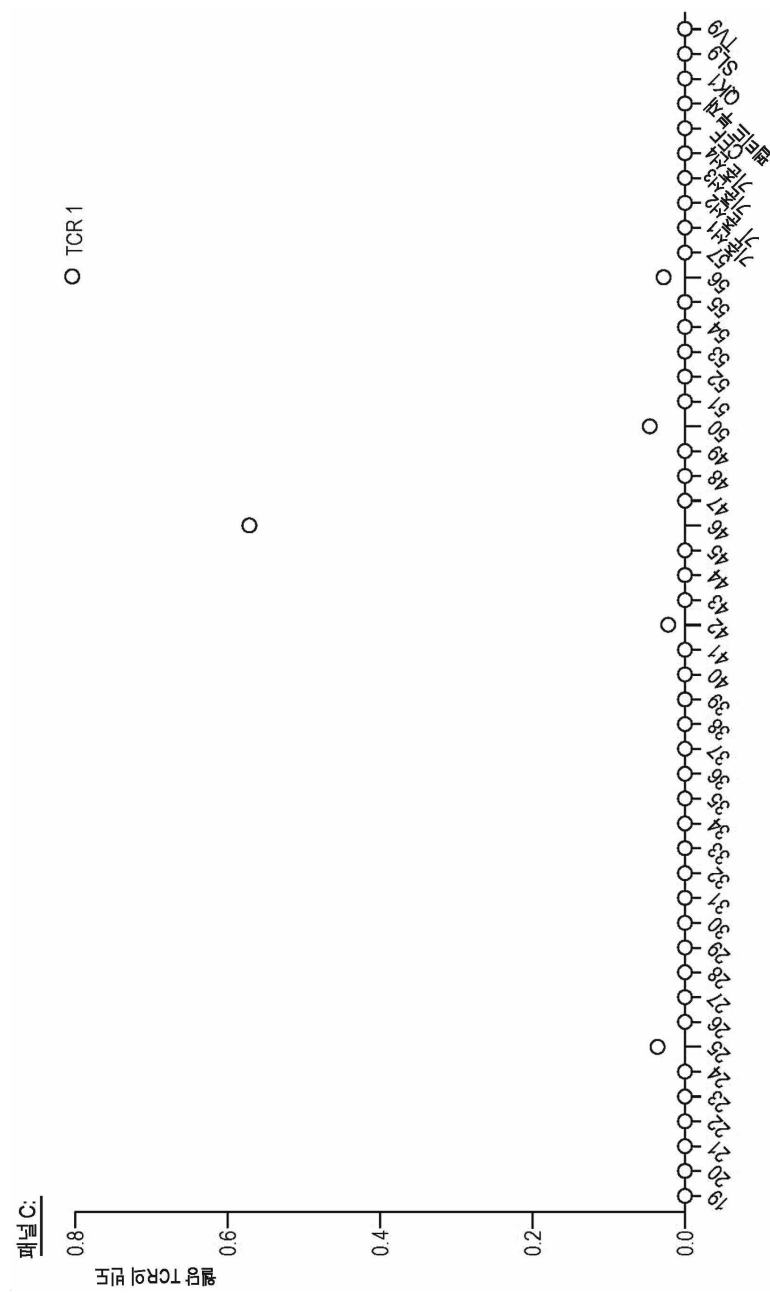


도면51b

패널 B:



도면51c



도면52a

패널 A: HERVFEST 검출된 펩티드 위의 CLT 항원 1 서열(질량 분석법-발견된 펩티드 주석)

CLT Ant 1 >	MW ~~NT~~ FRRELTSNGFPENFSLDVPANTYNALKSR ~~LC~~ DPNADHTSCPS ~~CS~~ LHAA ~~GA~~ LPCTGRQWRVELA ~~HLADRKLSL~~ R ~~LD~~ VSR ~~LR~~ Q ~~G~~
Pat. 188B	ANTYNALKSR (A*11)
Pat. 188B	HLADRKLSL (B*07)
Pat. 224B	VPANTYNALK (A*03)
CLT Ant 1 >	GERRSGIAK ~~V~~ VRGAGFAARLQGSVTIL ~~YQ~~ QGWFFPR ~~LG~~ CGQAWRMGAVVNCCELLTCTS
Pat. 224B	RLGCGQAWNR (A*03)

도면52b

LILDFQPLQL (A*02)

패널 B: HERVFEST 검출된 펠티드 위의 CLT 항원 2 서열(질량 분석법-발견된 펠티드 주석)

CLT Ant 2 > MTGVLIRRGDLVTDWVACRIKTFRGHTEKAAICKTRKESAEETSP	<u>ADSLILDFQPLQLMSSSFSTIASLIDK</u>
Pat. 222B	<u>LILDFQPLQL (A*02)</u>
Pat. 222B	<u>LMSSSFSTIASL (A*02)</u>
Pat. 222B	SLILDFQPL
Pat. 224B	<u>LMSSSFSTIA (A*02)</u>
Pat. 224B	<u>QLMSSSFSTIA (A*02)</u>
Pat. 224B	<u>MVACRIKTFR (A*03)</u>
Pat. 254C	<u>MVACRIKTFR (A*11)</u>
Pat. 254C	<u>VTDWVACRIK (A*11)</u>
Pat. 225B	<u>SSSFSTIASLIDK (A*03)</u>
Pat. 225B	<u>SPADSLIL (B*07)</u>
Pat. 225B	SLILDFQPL
Pat. 271B	<u>LVTDMVACRI (A*01)</u>
Pat. 271B	<u>LILDFQPLQL (A*01)</u>
Pat. 271B	<u>MSSSFSTIASL (A*01)</u>
Pat. 188B	<u>SLILDFQPL</u>
Pat. 293B	SLILDFQPL

도면52c

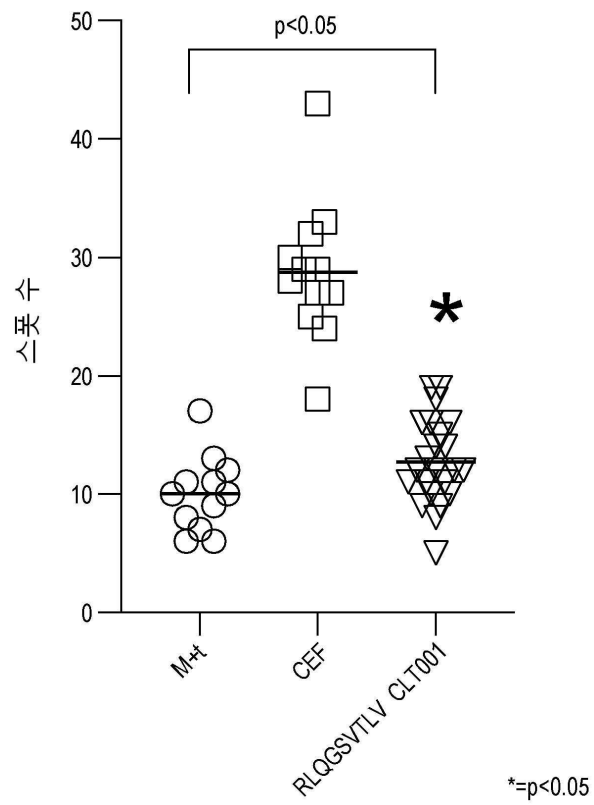
패널 C: HERVFEST 검출된 펩티드 위의 CLT 항원 3 서열(질량 분석법-발견된 펩티드 주석)

CLT Ant 3 >	<u>MT</u> <u>PNIV</u> <u>SLRA</u> <u>HQ</u> <u>PE</u> <u>VG</u> <u>IP</u> <u>SV</u> <u>LL</u> <u>MR</u> <u>PL</u> <u>RI</u> <u>KGV</u> <u>FH</u> <u>TH</u> <u>SP</u> <u>LG</u> <u>EN</u> <u>Q</u> <u>FT</u> <u>IC</u> <u>LQ</u> <u>GA</u> <u>PP</u> <u>SS</u> <u>SV</u>
Pat.254C	VLLMRPLRIK (A*11)
Pat.225B	MRPLRIKGVF (B*07)
Pat.271B	NTPNIVSLRA (A*01)

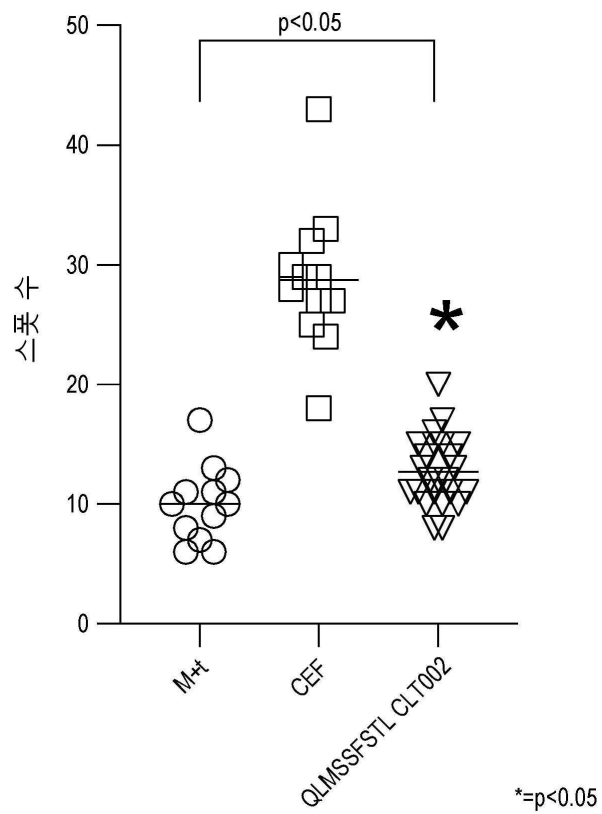
패널 D: HERVFEST 검출된 펩티드 위의 CLT 항원 4 서열(질량 분석법-발견된 펩티드 주석)

CLT Ant 4 >	MAKTKGSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWPEPMLSSPPSPSTAPLIGSEPLRHWEASLSR
Pat.222B	FLLELWL (A*02)
Pat.222B	SVRELHPA (A*02)
Pat.224B	FLLELWL (A*02)
Pat.225B	SPSSSTAPL (B*07)

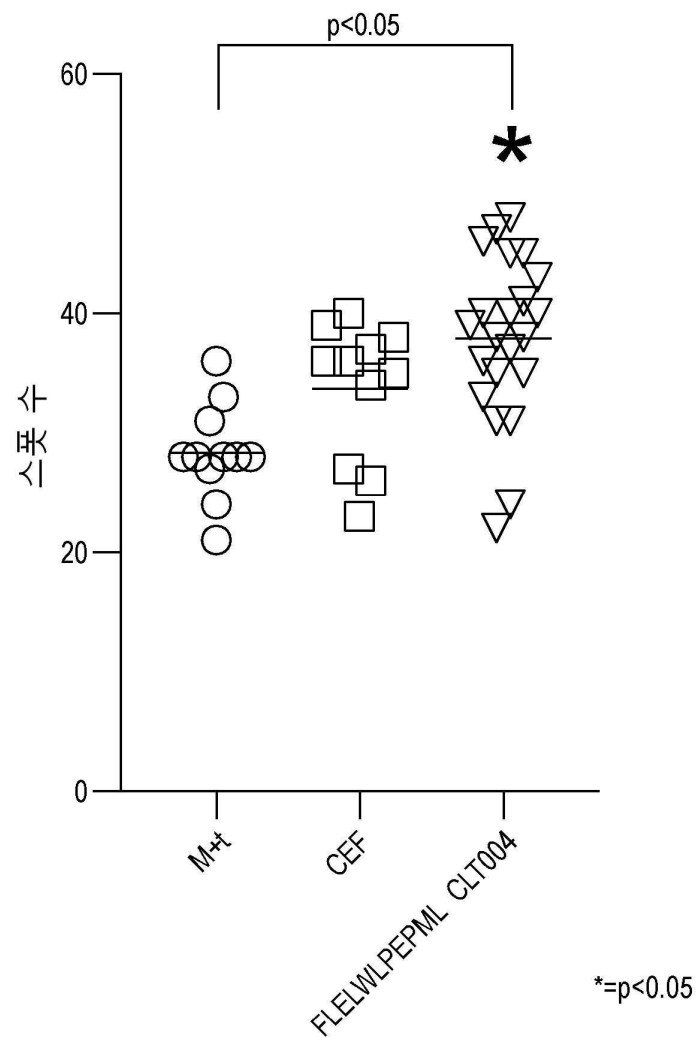
도면53



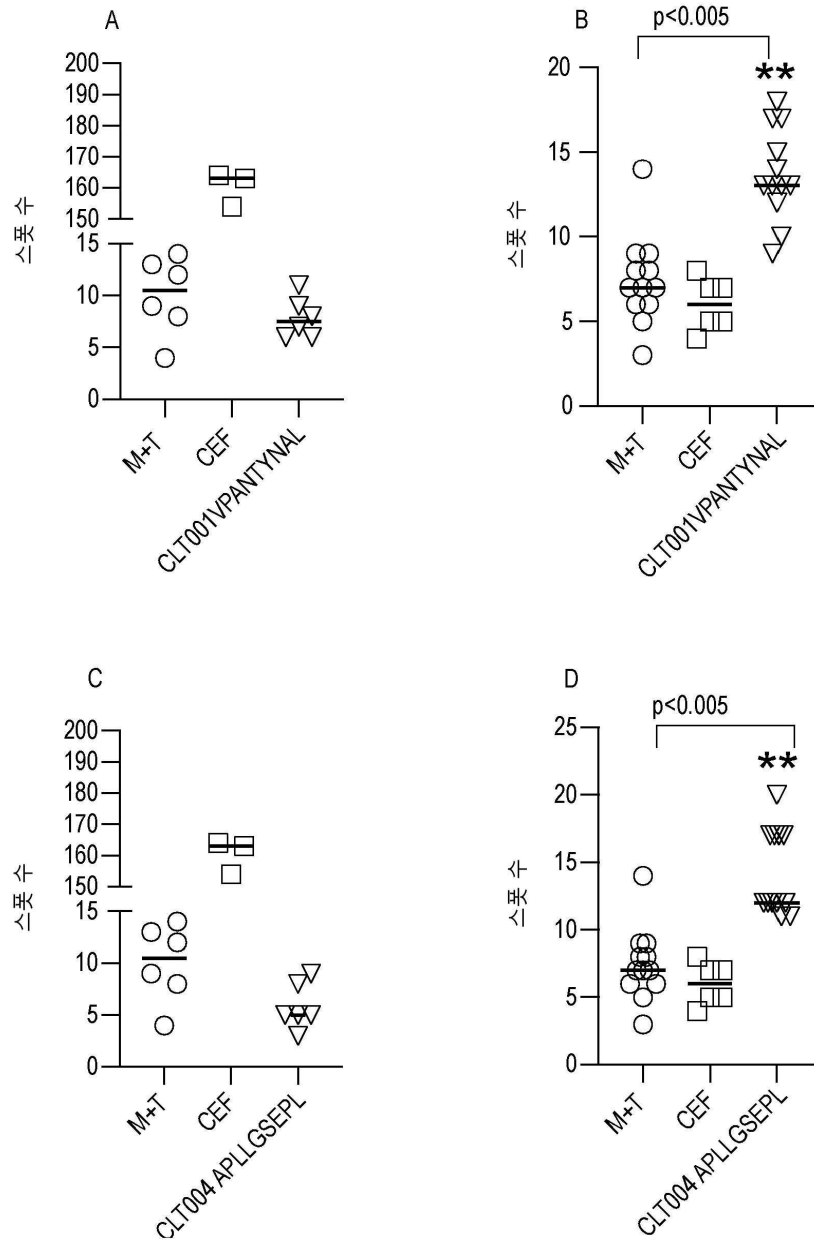
도면54



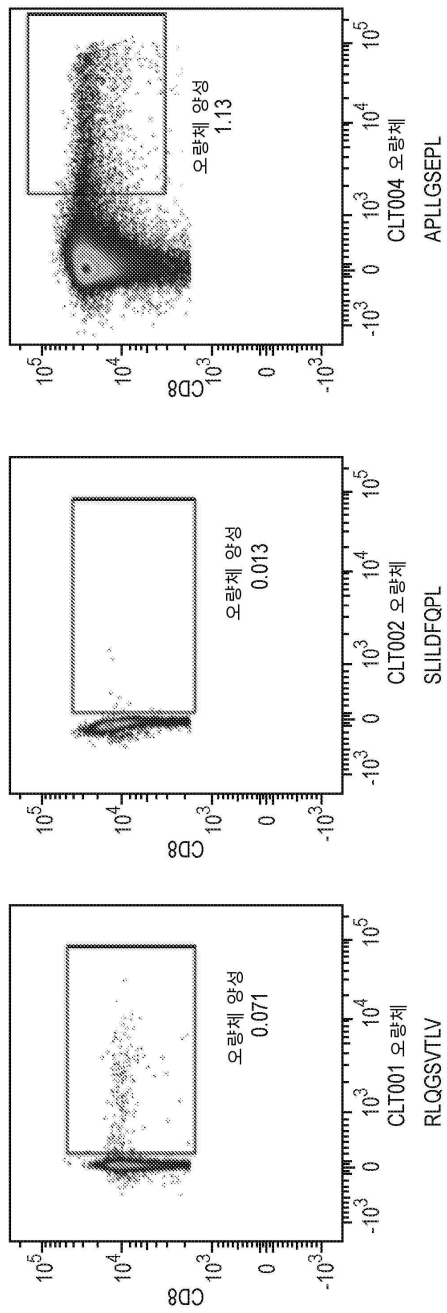
도면55



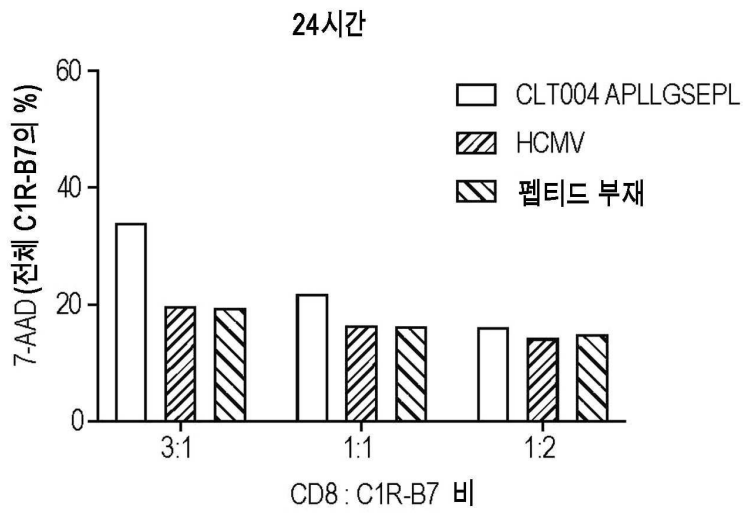
도면56



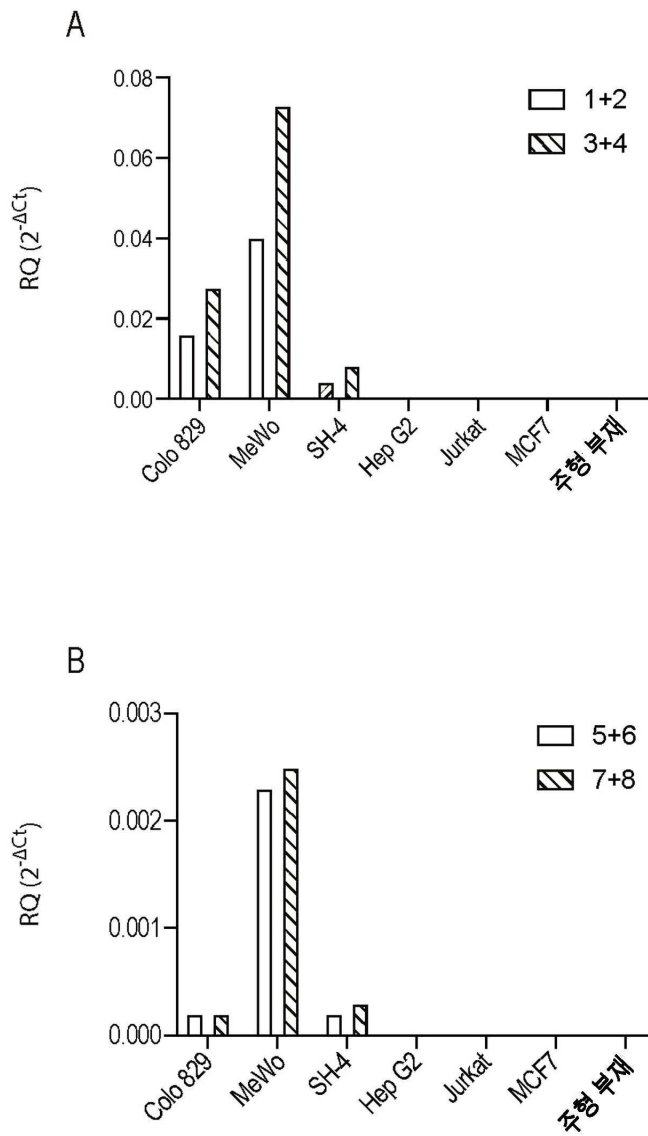
도면57



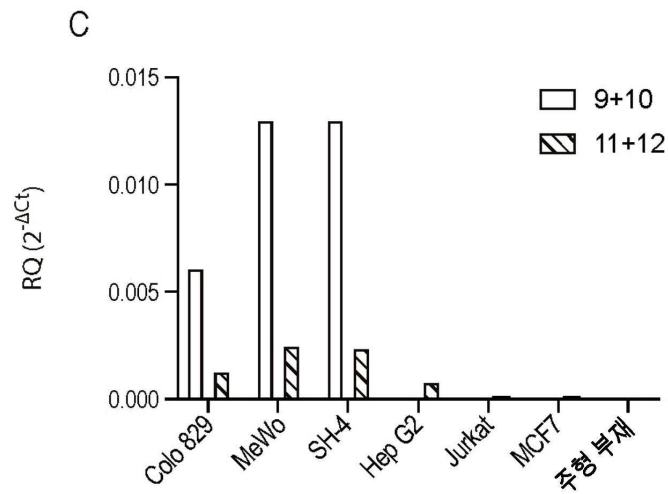
도면58



도면59a



도면59b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ervaxx Limited

The Francis Crick Institute Limited

<120> NOVEL CANCER ANTIGENS AND METHODS

<130> IPA210218-GB

<150> EP 18201634.5

<151> 2018-10-19

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 148

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Trp Asn Phe Phe Arg Arg Glu Leu Thr Ser Asn Gly Phe Pro Glu

1 5 10 15

Asn Phe Ser Leu Asp Val Pro Ala Asn Thr Tyr Asn Ala Leu Lys Ser

20 25 30

Arg Leu Cys Asp Pro Asn Ala Asp His Thr Ser Cys Pro Ser Pro Cys

35 40 45

Ser Leu His Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Thr Gly Arg Gln Arg Trp
50 55 60

Arg Val Glu Leu Ala His Leu Ala Asp Arg Lys Leu Ser Leu Arg Asp
65 70 75 80

Val Ser Arg Leu Arg Gln Gly Gly Glu Arg Arg Ser Gly Ile Ala Val

85 90 95
Lys Val Val Arg Gly Gly Ala Gly Phe Ala Ala Arg Leu Gln Gly Ser
100 105 110

Val Thr Leu Val Gln Gln Gly Trp Phe Phe Pro Arg Leu Gly Gly Cys
115 120 125

Gln Ala Trp Trp Arg Met Gly Ala Val Val Trp Cys Gly Glu Leu Leu
130 135 140

Thr Cys Thr Ser

145

<210> 2

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Gly Val Leu Ile Arg Arg Gly Asp Leu Val Thr Asp Met Val
1 5 10 15

Ala Cys Arg Ile Lys Thr Phe Arg Gly His Thr Glu Lys Ala Ala Ile
20 25 30

Cys Lys Thr Arg Lys Glu Ser Ser Ala Glu Thr Ser Pro Ala Asp Ser
35 40 45

Leu Ile Leu Asp Phe Gln Pro Leu Gln Leu Met Ser Ser Phe Ser Thr

50 55 60
Leu Ala Ser Leu Asp Lys

65 70

<210> 3

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asn Thr Pro Asn Ile Val Ser Leu Arg Ala His Gln Pro Glu Val

1 5 10 15

Gly Ile Ile Pro Ser Val Leu Leu Met Arg Pro Leu Arg Ile Lys Gly

20 25 30

Val Phe His His Ile His Ser Pro Leu His Gly Glu Asn Gln Gly Phe

35 40 45

Thr Leu Cys Leu Gln Gly Ala Pro Pro Ser Ser Ser Val

50 55 60

<210> 4

<211> 64

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Lys Thr Lys Gly Ser Leu Ser Val Phe Arg Glu Leu His Pro

1 5 10 15

Ala Ala Ala Phe Asp Arg Ala Val His Phe Leu Phe Leu Glu Leu Trp

20 25 30

Leu Pro Glu Pro Met Leu Ser Ser Ser Pro Pro Ser Ser Thr Ala Pro

35 40 45

Leu Leu Gly Ser Glu Pro Leu Arg His Trp Glu Ala Ser Leu Ser Arg

50 55 60

<210> 5

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Lys Arg Lys Ala Asn Arg Trp Arg Leu Ser Leu Arg Asn Gly Leu

1 5 10 15

Leu Pro Ser Thr Pro Arg Ala Thr Gln Gln Ile Pro Met Glu Phe Leu

20 25 30

Asn Ser Arg Val Ala Asp Ile Pro Ile Lys Pro Trp

35 40

<210> 6

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Arg Gly Phe Leu Trp Arg Val Glu Thr Arg Gly Val Glu Gly Ser

1 5 10 15

Met Arg Gly Pro Gln Lys Val Leu Gly Asn Arg Leu Pro Gly Ala Gly

20 25 30

Arg Asn Ala Arg Ser Arg Asp Asn Phe Ala Val Trp

35 40

<210> 7

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Val Tyr Tyr Gly Asn Pro Glu Ser Ser Pro Gly Ile Ser Leu Val

1 5 10 15

Phe Gly Leu Leu Arg Leu Asp Arg Met Gln Pro Gly Phe Ser Val Ser

20 25 30

Gln Glu Gly Asp Pro Val Gly Ile Thr Asp His Leu Gly Cys

35 40 45

<210> 8

<211> 49

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 8

Met Pro Ala Gln Leu Lys Phe Thr Leu Gln Val Asn Pro Ala Thr Lys

1 5 10 15

Met Arg Val Thr Leu Leu Ser Gln Pro Met Glu Thr Tyr Glu Gly Asp

20 25 30

Val Leu Gly Val Gln Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Ser Thr Ile Leu Val
 35 40 45

Leu

<210> 9

<211> 173

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Gly Ser Ser Arg Val Gly Glu Arg Met Met Glu Glu Glu Ser Arg

1 5 10 15
 Thr Gly Gln Lys Val Asn Pro Gly Asn Thr Gly Lys Leu Phe Val Gly
 20 25 30
 Val Gly Ile Ser Arg Ile Ala Lys Val Lys Tyr Gly Glu Cys Gly Gln
 35 40 45
 Gly Phe Ser Asp Lys Ser Asp Val Ile Thr His Gln Arg Thr His Thr
 50 55 60
 Gly Gly Lys Pro Tyr Val Cys Arg Glu Cys Gly Arg Ala Leu Ala Gly

65 70 75 80
 Ser Gln Thr Ser Ser Val Thr Arg Gly His Thr Gln Gly Arg Ser Leu
 85 90 95
 Met Ser Ala Glu Ser Val Ser Gly Ala Leu Ala Gly Ser Gln Ser Ser
 100 105 110
 Ser Phe Thr Arg Gly His Thr Gly Glu Thr Pro Gln Ser Ala Gly Arg
 115 120 125
 Met Ser Lys Ser Leu Val Ile Lys Pro Tyr Leu Asn Ser His Lys Lys

130 135 140
 Thr Asn Val Ile Thr Thr His Leu His Thr Pro Ala Leu Arg Trp Leu
 145 150 155 160
 Gln Arg Lys Ser Ala Asn Pro Leu His Ser Pro Arg Val
 165 170

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met His Ser Leu Gln Ile Phe Ser Leu Cys Leu Phe Thr Leu Leu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ile Phe Leu Leu Val Glu Ile Ala Phe Glu Asp Leu Val Met Asn

35 40 45

Tyr Leu Pro Lys Leu Thr Ser Arg Arg Val Phe Ser Arg Phe Ser Tyr

50 55 60

Met Thr Phe Tyr Ser Phe Arg Ser Tyr Ile Lys Val Phe Val Ser Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

His Phe Ser Met Trp Phe Cys Tyr Ser Gly

100 105

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Gln Gln Gly Trp Phe Phe Pro Arg

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Val Val Arg Gly Gly Ala Gly Phe Ala Ala Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

His Leu Ala Asp Arg Lys Leu Ser Leu

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Arg Leu Gln Gly Ser Val Thr Leu

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Asp Ser Leu Ile Leu Asp Phe

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ser Ser Phe Ser Thr Leu Ala Ser Leu Asp Lys

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Asn Thr Pro Asn Ile Val Ser Leu Arg

1 5

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Pro Glu Val Gly Ile Ile Pro Ser Val Leu Leu Met Arg Pro

1 5 10 15

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Thr Lys Gly Ser Leu Ser Val Phe Arg

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Val Ala Asp Ile Pro Ile Lys Pro Trp

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Ile Pro Ile Lys Pro Trp

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Val Ala Asp Ile Pro Ile Lys Pro

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Ser Arg Asp Asn Phe Ala Val Trp

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Ser Arg Asp Asn Phe Ala

1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Pro Gly Ile Ser Leu Val Phe

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Ser Asp Ser Thr Ile Leu Val Leu

1 5

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Gly Arg Met Ser Lys Ser Leu Val Ile Lys

1 5 10

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Gln Ser Ala Gly Arg Met

1 5

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Gly Ser Gln Ser Ser Ser Phe Thr Arg Gly His Thr Gly Glu Thr

1 5 10 15

Pro Gln

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Arg Ser Asn Leu Ser Ile Phe Leu

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Phe Ser Leu Cys Leu Phe Thr Leu

1 5

<210> 32

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ser Arg Arg Val Phe Ser Arg Phe Ser Tyr Met Thr Phe Tyr Ser Phe

1 5 10 15

Arg Ser Tyr Ile Lys Val Phe Val

20

<210> 33

<211> 1063

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

cggggccagt ctttcccgct ctattctcgt gatagtgaat aagcttcaca agatctgatg 60

ggttttatcag gggttttcat ttgtcttctt cctcatcttc ttttgcctgt gtaatgtaag 120

aaacgccttt tgctcctgc cataattctg aggcctcaca gccatgtgga acttcttcag 180

gagagaatta acatccaatg gattcccaga aaacttttcc ctcatgttac cagcaaacac 240

ctacaatgcc ctgaaaagcc gcctctgcga cccaatgca gatcacacgt cctgtcccag 300

cccctgcagc ctccacgcgg cgggtgcact gccaggcacg ggaaggcagc gctggcgagt 360

agaactggcc catctcgcag ataggaagct gagcctcagg gacgtttcac gccttcgtca 420

agggtgtgag aggaggagcg ggattgccgt gaaggtggtg agaggaggag cggggtttgc 480

tgcccgaactt cagggatctg tcacctcgt ccagcagggt tggttcttcc cgaggctggg 540

aggatgcaa gcctggtgga ggatgggggc ggtggtgtgg tgtggggagc ttctgacttg 600

cacatcctga gggaaccttc tgcagctgat gtgtgaactg gacccagcgc cgtgcctccg 660

aggaatcccc aaggctatgg cccctcaggt cctgctgggg tgttgcccc cacctctgcc 720

tcagaatgca ggggttctgc aggggaagccg cagaccagcc tgctgccttg ggccctaggg 780

acactgcagc ccagaaaagt actgtggggg acaaaagagt tgtttctcgg gggagaaaac 840

acctgtgagg aaatgcaggt gccacagagg gaaatcctcc tggggaggag ggtacctgtt 900

ccatcctcgg ccgacacggg actgcctggt gcctgttacc cacagccgct acctgccgca 960

cgcatctctc catggtttgc taattacttc cattagtttt aaacaaactt gacaagagac 1020

agaagggtcc agagagaaat taaatctaac tgtttaaaca tgt 1063

<210> 34

<211> 2851

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

cacctccatc actgcgaatt ataattcgac atgagatttg ggagatgaca caaaacaaaa 60

ccatatcagt ctttaaagag ttaagttaaa ataagctctt taaagtgggc cctaattccag 120

tatgactggt gtctttataa gaagaggaga ttgtgtcaca gacatggttg catgcagaat 180

aaagactttt cgaggacaca ctgagaaggc agccatctgc aaaacaagga aagagtcctc 240

agcagaaacc agtcctgcag actccttgat ctgtgacttc cagccactgc aattgatgtc 300

aagcttcagc acccttgcat ctctggataa atgaaatgtc accccagctg cgtccttgt 360

tcagatctgt gcaataaaga gcaaagcata aaaccaagtc aaggctttga gggagtgtacc 420

tacaaaatgc ataattgtgaa acaatgcaaa agcgaaaagg gcaaaatccc catcaaagag 480

ctggaggctg acagatgcgc cagtataat tcccatcttc caacacagga gcacagcttc 540

cattttccat aacagaacaa cagccagagc agctggaagg cagggccgca tcccagactt 600

ccaccaacaa tgggatgaga ctgtacatct ggaatcacia ccacaacaga cctgagagac 660

ccaccagctt gatgacaagc ttcttctttc aaagaaaggc atcagtctgg gggacctagt 720

gctgcaaacc atgacaaatt aagtgtggca tccctcactt gcataatgga actcagtgat 780

atTTTTtaat taacaagagt tatttttatg taagcttctc tcattcctcc actgtgcgtg 840

ctcgggggct ggtggtgagg aaaaagaaaa cagctgtgcg ggaagcatca agaaaaggca 900

agtcataag tcttagagat cagtacatg taagaaaaag agtgaggaga aaaatattcc 960

tactaaagtt ttccatttgt ttaccttctt tgtcacatag acttccaaga gttagaagtc 1020

taggatttga tctccaaatc ttctgtgcag attactcacc ttcatctcat tcatatagtc 1080

caggggtttg tacaaggaa gatgccagtt cttcccaat cataactaag atatcaagag 1140

atattctttt gaaatgtaac aaaggagatc tgaagttcat ctgaaaaaa taaatggttt 1200

taggcggtca tgaccatggg atgctggacc aggatggtta gcttcaggaa acagaatctg 1260

gagaatgccc agctgtcccc acaggaagca tcagggaaga agaagaagag gtgtgaagtc 1320

tgccttctgc tctgtggga tccctttcac atctccttg cctccaggca gttttggttc 1380

ctggccattt ccaggtgtga ctactcagg atggttaagca tcttctctcc taccagagt 1440

agaggatgaa gacctatct cagaggttga agggagctcc agagagaggt ctcaaacttc 1500

cagcattaac tgctaaagaa gcttcatgag ctgctggaga acctgggaaa tgaccaatta 1560
tagggacaga gctcaaatac tctgggacac tctagtagct gagaaagttc caactccagg 1620
gtgatagagg actgcctggc aaaccatcat caaagcagaa gacctgatac taacatcaca 1680
ggctatggtt tattactgaa gatcagtgtc tacaccctgc cagaggttca gaagcaaact 1740
tatcattgtt ctccctggag atgttggccc acattctgaa aagtgtggtc agtagtagca 1800

acagaaagca attgtgcttg ccaagcaciaa tgtcactgtc cccagccctt cccccaacac 1860
aaccagtag gtgcttcttg gctgcaaact tgggaaagtc acttgacctg tctgaggttc 1920
catttctaa tctggcctgg cgaagataag aaaaacagtt tatttaaagt gtctagcaaa 1980
gtgcttgga caaaatagga cctctgaaat ggttatggta gtgctgttaa ggtgatgttt 2040
taagtgtga tgagcaciaa gatgggtaag atattccttc tgttaaaatc tacagtctaa 2100
tgagagagaa caagatgaat gcacaataac tgtcattcag aacaggatta tgagaagggtg 2160
tgaatttctg tgaaaaatca gaacaggag taatatgatc ccaggtgatt ggcagggggt 2220

gggggtctgg attcaactgg agaggagct ggcagggaag gcttcttgga ggatgagagt 2280
tcaacaaggg gcaggtgtag gatgtgggtg gccaaagtac tgggcagaag gagctgcaga 2340
agtaagacc caaatcagga agacaagggc ctgctgagaa acacagacta caaagtgcac 2400
gtgcaggaag agttgggatg agattagaag ggggtctggg gccagactgt ggaaggccca 2460
aatgccgggc taaggagttt gtacttaatt cagtgggtcaa cggggagtca ttggaggctg 2520
ttgagcagga gagtgtcttt ctttacagct gtgccagact aaattaaacc taaacagtac 2580
tttatagctg gaaagggaag gccaggaat agctcttgac tcagaaacag gcattgggga 2640

aggtaatgag aaacagccgt gactgatcaa agcagagagg ttaattaaat ttgtaattat 2700
tgtgaaagc cattaaaaac cctagtacac tagagataac tgctctagtg gggcttcaaa 2760
gacaaacgt tcttttaacc ttgaataggg ggaatgttgc ttctctgtgg aggagatatg 2820
attaagatac ttaataaatg gtagataaac a 2851

<210> 35
<211> 2614
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 35

aaacacacta agggctttgt tatggactga aatgtgtcct ctccccagag tcacaggatt 60
atgaagccat aatcctcaat gtgactatat ttggagcagg ggcctttaca gacataatta 120

aattaaatga ggtcataaga gtggggccct agtctgatag gactgggtgc cttacaagaa 180

gagggagagt cctcagagag tcctctctct cggcatggac acaaaagaaa agccatgtga 240

ggacacagag agaaggtggc tgtctacgag ctaggaagaa aggcctcacc ggaaaccaac 300

cctcacagca gctccatctt ggacttcag cctccggaac tgtgagaaaa taaatgtttg 360

caattcaggt cggttgtatt ttgtgaaggc catcctagca aatgaatact ctaacattg 420

tctctttaag agctcaccag cctgaggtag gaatcattcc atctgtgtta ctaatgagac 480

cgctgaggat caaaggggtt ttccaccaca tccactcacc tctacatggc gaaaaccaag 540

ggttcactct ctgtcttcag ggagctccac ccagcagcag cgtttgacag agctgttcac 600

ttctcttcc tggagctgtg gcttcagag cccatgtca gcagttcccc tccttcttcg 660

actgtcctc tcttagctc agagccactc agacattggg aagcaagttt gtcaagatga 720

cagagaaccg aggtaatgga ttcgagtga gaaacaggaa gttcattcat gagtttttgg 780

ccacacctcc aaagtacga cttagccaga aatgggataa ctgggtttcc ctacttctct 840

tttatcatcc tcaatgagag tgacaaata ttagagctag atggaacctt agtgaaaatc 900

tggctactcg tcccgctcca ccagcctgcc acccatttca agtttgaaga gacaaagaca 960

catggacctt atgtaattac tggggattac ccaggagtc tgtggcaaaa gtcagcttct 1020

tcctccctg ctccccgcc ctgtctctgg tactttctac caacactggg ctgtttctgt 1080

gatcacactt aagcgtacct aacctgcga tgctgtatag aagggtctaa tgaacatgat 1140

ttagctttaa cactcagttt tctaaaggga cagtggggg cagcaaatgt ttaggcaaaa 1200

acaattccag ttctagcctc tactgtctac atatgtgtat acatttgga aacgtttggg 1260

aaagggatat ttgagagctt ctttttctt tttgtggtt agttatttga tgatattgag 1320

attgtttctg agccatgtgc ttcaacatcg gattggggat ttcagaaaaa gttttagtca 1380

ctgtgattcc atttagcttc caaatgtgtc tctgctaaga gacttaaaag cactcataaa 1440

tagcacgtgt gtcttctttg cagtgtttgc taattttgag tcacatcttt ttagaaaatc 1500

atgagatttg gtgtcacaga gactggaata aatatagtca aacttattgg tgaagatttc 1560

ctttagctgt ttccataatc catttccatt gttatgatta ttgatgaata aaacattttc 1620

tttaggtaga tacttctttt tccccccac cttgatttaa tgtttccact cttattgtca 1680

agtttcttat tactccctaa taactctcaa taaaataatg attcctggga gattattcct 1740

gctttctac tatcacctgt tgatttgaaa agacagaaca ataccgtaga agcttcacta 1800

atacattgaa agataaaatg ataatactaa atactaaaat atgaaaagt atactaaaag 1860

tggagtcctg gcactagtat tttttttttt gactctttaa attttattta tttatttttg 1920

aattttttta aattatatgt tatgttctgg gatacatgtg cagaacgtgc aggtttgtta 1980

cataggtata caggtctggc actagtattt tgttgccaca aaatatcaag catgtatcca 2040

aactgctcaa gacacattaa agacacaggt aatctgtagg catattcagg ctgttagttt	2100
gcattttttg gttttcttgt ggcttttcagt gcaagttgag gtaattcatg ggaaacagtc	2160
accaaagaag tgccagtatt agaaatccaa gagccatttc tctagcttct tccagaatca	2220
agactttaga ggtaatttct atcaacacig gacatttcct gtcigcaatt aacaatgaac	2280
acatagcatt atgtttaatt gcaacctgtt taaagcagat tggatgctaa ggtttaagaa	2340
cactcttcag tcaaaaaggt cttttaatca ggtttttaat cttgagcaca atctaggaca	2400
cagcatcata gactaactca ttcgagaata ggtgttgtca tctaactcta accaccccca	2460
ccaccaacaa gctgaatagc tctgggctca gtatatacat ttgtactggg ctcagtacac	2520
acacctaagc tgggttcagt atatgccact ttatagttag aggcattttg taatgagagc	2580
tctgggttca ctatatacat ttgtactggg ctca	2614
<210> 36	
<211> 1858	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 36	
gggagggggc catggcgggg ccacttcaaa ggaaaagctc tagctccct accctctca	60
catcctaagg ctgcctttgt gggattccac acagaacagc ctggaagctt ggggccctgg	120
cttccttttc tggcctggga gtcaggatcat ggggccatcg cttcacagca atcatgaggg	180
cccaggccca agtgtcaca tgcctctcat ggggactgct cctcttaaag ggtgggcct	240
cctcaccag ctccctgccc tggccaagga ggaggctgaa agagcctgag ctgtgcctc	300
tccattccac tgctgtggca gggtcagaaa tcttgatag agaaaacctt ttgcaaacgg	360
gaatgtatct ttgtaattcc tagcatgaaa gactctaaca ggtgttgctg tggccagttc	420
accaaccagc atatccccc tctgccaagt gcaacacca gcaaaaatga agaggaaagc	480
aaacaggtgg agactcagc tgagaaatgg tctgttgcca agcacacca gagctacca	540
acagattcct atggagtct tgaattccag ggtggcggat attccaataa agccatggtg	600
agaaaggcat tcagacatgg tgccactagg atcacagctt tcattggcgg ccagtctccc	660
agccccaac tgcagatacc tggctcttct catggctgtg gctcaatctt cctagatatt	720
tcattgaaaa accaagagat atatctgtgc acatggcttt tagccatgag gcttggaac	780
tggacaccac tgtaagaac atctagtgtc ccgtaaatcc ataccaaagc tctgaatcca	840
caaaccaggc tctgcccaca cctgcaaac acactccatt gctccatctt cagtaaagga	900
agacaaattc atttttctaa taactgtgga cctgcagccc ccttagatgt gttgagagtc	960

tttgaaata ttttctctg aggtctgtcc acagcttccc tgggcctgcg ctacgtggc	1020
ccgagaagga ccaaggtccc tcacatttgc atgtaaacag ggagtgccct ctgcccttcc	1080
agttagccct gccagcgtgg gggaggcttc agctctgtga tccgttccag ctactctga	1140
attacactcc tacatgccca gtcacagact ttttgcaatt tcattttatt tcaactggccc	1200
aacatcattg ttaaaataaa atttagctgt gttccaaatg ctgcaatata cagtcttctg	1260
aatggcacc ctacatatta gccagacac aaagaagcag tttataggag acaaggcatc	1320
tgagcattat tagcctcctc ctactttga agaggtcaag ttcattgggtg ggcccatgat	1380
cgctgaccc atttactcaa caacatctc atccaacttc ttgggccact gttctagcta	1440
agccagcttt ggaacctatt cctccaacat taggattgcc agataaaata caggacaccc	1500
agttatattt gaacttcaga cataattgg ataaatttcc agtacaagta tgtcccaat	1560
attgcatgat ttattgcatt taataaaaat gttgtactga aacatttttc attgttcctc	1620
taaaattcaa atttaactgg gtgtcttggc ctgtttggct gctataaca attgccttag	1680
gctggggaat ttataaaca cagaaattta ttgctcacat ttctagagtc tgggaggccc	1740
aagatcaagg tgccagcaga tttggtgcct ggcgagggcc catcctctgc ttcatagata	1800
gcaccttctt gcgtgtcct cacatggcag aagcagagaa caagctctct gagtcctc	1858
<210> 37	
<211> 2538	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 37	
cttggacttc ccagcctcca gaactgtgag aaataaattt ttgttgttta atccatccag	60
tctgtgatat tttgttatgg cagctgaagc agtcaggaaa ggatcctccc catctctgca	120
gaagcctgac catcccccta gagggcctgg gaggaagtgg gttttgcata cagtccctgt	180
tgactctagt gccccctgct ggccccagac gcgagttccg gcgaggcttc aggggtacagc	240
tccccgcag ccagaagccg ggcctgcagc gcctcagcac cgctccggga cacccacccc	300
gcttcccagg cgtgacctgt caacaggtct gtattggcga caaaaggagc agccctgaat	360
gtagggaaag cagggcggag tcctctgcag gctcggggga ggggaggggc gtgaatgcgt	420
ggatttctgt ggagagtga aacacgggga gtcgagggga gcatgcgcgg gcctcagaaa	480
gttctgggaa accgactccc gggagcaggg aggaacgcgc gctccagaga caacttcgcg	540
gtgtggtgaa ctctctgagg aaaaacacgt gcgtggcaac aagtactga gacctagaaa	600
tccaagcgtt ggaggtcctg aggccagcct aagtcgcttc aaaatggaac gaaggcgttt	660

gtggggttcc attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact	720
tgtggagctg gcagggcaga gcctgctgaa ggatgaggcc ctggccattg cgcacctgga	780
gttgctgccc agggagctct tcccgccact cttcatggca gcctttgacg ggagacacag	840
ccagaccctg aaggcaatgg tgcaggcctg gcccttcacc tgcctccctc tgggagtgt	900
gatgaaggga caacatcttc acctggagac cttcaaagct gtgcttgatg gacttgatgt	960
gtccttggcc caggagggtc gccccaggag gtggaaactt caagtgtgg atttacggaa	1020
gaactctcat caggacttct ggactgtatg gcttggaac agggccagtc tgtactcatt	1080
tccagagcca gaagcagctc agcccatgac aaagaagcga aaagtagatg gtttgagcac	1140
agaggcagag cagcccttca ttccagtaga ggtgctcgta gacctgttcc tcaaggaagg	1200
tgcctgtgat gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaaga aaaatgtact	1260
acgcctgtgc tgtaagaagc tgaagatttt tgcaatgccc atgcaggata tcaagatgat	1320
cctgaaaatg gtgcagctgg actctattga agatttggaa gtgacttgta cctggaagct	1380
accacacttg gcgaaatttt ctcttacct gggccagatg attaacttgc gtagactcct	1440
cctctccac atccatgcat ctctctacat tccccggag aaggaagagc agtatatgc	1500
ccagttcacc tctcagttcc tcagttcgca gtgcctgcag gctctctatg tggactcttt	1560
atttttctt agaggccgcc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ctttggaac	1620
cctctcaata actaactgcc ggctttcgga aggggatgtg atgcatctgt cccagagtcc	1680
cagcgtcagt cagctaagt tcttgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtcc	1740
cgagccctc caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggcttttga	1800
tgagtgtggg atcacggatg atcagctcct tgccctcctg ccttcctga gccactgctc	1860
ccagcttacg accttaagct tctacgggaa ttccatctcc atatctgccc tgcagagtct	1920
cctgcagcac ctcatgggc tgagcaatct gaccacgtg ctgtatcctg tccccctgga	1980
gagttatgag gacatccatg gtacctcca cctggagagg cttgcctatc tgcagccag	2040
gctcaggag ttgctgtgtg agttggggcg gccagcatg gtctggctta gtgccaacc	2100
ctgtctcac tgtggggaca gaaccttcta tgaccggag cccatcctgt gccctgttt	2160
catgccta at tagctgggtg cacatatcaa atgcttcatt ctgcatact ggacactaaa	2220
gccagatgt gcatgcatct tgaagcaaca aagcagccac agtttcagac aaatgttcag	2280
tgtgagttag gaaaacatgt tcagttagga aaaaacattc agacaaatgt tcagttagga	2340
aaaaaagggg aagttggggg taggcagatg ttgacttgag gagttaatgt gatctttggg	2400
gagatacatc ttatagagtt agaaatagaa tctgaatttc taaagggaga ttctggcttg	2460
ggaagtlacat gtaggagtta atccctgtgt agactgttgt aaagaaactg ttgaaaataa	2520

agagaagcaa tgtgaagc 2538

<210> 38

<211> 1256

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

gagacaggtc tcaactctgtt gcccggtcag gaaagtggca caatcacagc tcaactgcagt 60

ctcagctctcc caggctcaag atggatacat ttaaggtatg gtgatccggt ccaccgtgtg 120

gttaggattc ccaaattttg ttgacagcgt ctccgatatg aaccacacgg aaatttgccc 180

tgctgctttc tgcgtgggga gtgcgatgtg gatccagctg ttgtacagtg cctgcttctg 240

gtggctgttt tgctatgcag tggatgctta tctggtgatc cggagatcgg caggactgag 300

caccatcctg ctgtatcaca tcatggcgtg gggcctggcc accctgctct gtgtggaggg 360

agccgccatg ctctactacc ctccgtgtc cagggtgtgag cggggcctgg accacgccat 420

ccccactat gtcaccatgt acctgccct gctgctgggt ctcgtggcga accccatcct 480

gttccaaaag acagtgactg cagtggcctc ttactttaa ggaagacaag gcatttacac 540

ggagaacgag aggaggatgg gagccgtgat caagatccga tttttcaaaa tcatgctggt 600

tttaattatt tgttggttgt cgaatatcat caatgaaagc cttttattct atcttgagat 660

gcaaacagat atcaatggag gttctttgaa acctgtcaga actgcagcca agaccacatg 720

gtttattatg ggaatcctga atccagccca gggatttctc ttgtctttgg ctttctacgg 780

ctggacagga tgcagcctgg gttttcagtc tcccaggaag gagatccagt gggaatcact 840

gaccacctcg gctgctgagg gggctcacc atccccactg atgccccatg aaaaccctgc 900

ttccgggaag gtgtctcaag tgggtgggca gacttctgac gaagccctga gcatgctgtc 960

tgaaggttct gatccagca caattgaaat tcacactgca agtgaatcct gcaacaaaaa 1020

tgagggtgac cctgctctcc caaccatgg agacctatga aggggatgtg ctgggggtcc 1080

agaccccata ttctcagac tcaacaattc ttgttcttta gaactgtgtt ctcaccttcc 1140

caacactgca ctgccgaagt gtagcggccc ccaaaccttg ctctcatcac cagctagagc 1200

ttcttccga agggccttta ggataggaga aagggttcat gcacacacgt gtgaga 1256

<210> 39

<211> 2657

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

cctgtagtcc cagctactca ggaggtctgag gcaggagaat tgcttgaatc cgggaggcgg	60
aggttgcagt gaggggagat tgtgccactg cactccagcc tgggcgacag agggagactc	120
catatcaaaa agaaaaaaaa atctctagag ttggaaaca ttaccaacc aaaccactga	180
tttctcatca cctcttagtc aaacctcctt ggatggcctt cagaggagaa cagagtaaac	240
accagaagaa ctcaggagga aggagactga aggaaagatg tatagcctgc gagaaagaaa	300
gggtcatgca tacaagaga tcagcgagcc acaggatgat gactacctct attgtgagat	360
gtgtcagaac ttcttcattg acagctgtgc tgctcatggg cccctacat ttgtaaagga	420
cagtgcagtg gacaaggggc atccaaccg ttcagccctc agtctgcccc cggggctgag	480
aattgggccca tcaggcatcc ctcaggctgg gcttggagta tggaacgagg catctgatct	540
gccactgggt ctgcactttg gccctatga gggccgaatt acagaagacg aagaggcagc	600
caacagtgga tattcctggc taatcaccaa ggggagaaac tgctatgagt atgtggatgg	660
aaaagataaa tcctcgcca actggatgag aaccaaagcc agagatccat ccatgtccct	720
catgctgtct ggccctttca agtcaaaaat ttctcagtca acatgtggaa cgcaatcact	780
cctctcagaa ctcccagga ccatctgcaa gaaaacttct ccaaccagag aatccctgcc	840
caggggatca gaatcaggag cggcaatatt ctgatccacg ctgctgtaat gacaaaacca	900
aaggtcaaga gatcaaagaa aggtccaaac tcttgaataa aaggacatgg cagagggaga	960
tttcaagggc cttttctagc ccaccaaag gacaaatggg gagctctaga gtgggagaaa	1020
gaatgatgga agaagagtcc agaacaggcc agaaagtgaa tccagggaac acaggcaaat	1080
tatttgtggg ggtaggaatc tcaagaattg cgaaagtcaa atatggagag tgtgggcaag	1140
gtttcagtga taagtcagat gttattacac accaaaggac acacacaggg gggaagccct	1200
acgtctgcag agagtgtggg agggcttttag ccggaagtca gacctctca gtcaccagag	1260
gacacacaca ggggagaagc cttatgtctg cagagagtgt gagcggggct ttagccggaa	1320
gtcagtcctc ctattcacc agaggacaca caggggagac gcccagtct gcaggaagga	1380
tgagtaagtc attagtaata aaaccttatt tcaatagcca caagaagaca aacgtgatca	1440
ccacacactt gcacacccca gctctgaggt ggcttcagcg aaagtctgct aacccttac	1500
attccccgag agtgtaaaga gatcggaat aactaatata acaaatccgc cactttcatg	1560
actagagtgt aggaagaaca ggggatagtt ctgtaagtgt tcgggggacg tcaacatgtg	1620
tggttgtttc ccgactgat cccctccatt ttttgtgtt tgctctctgt tctaattaat	1680
tttgtctcca tacatatctg aacccaagt gtgtacctca ttcttccctt atcactgaag	1740
gaaggaagag tccagaaggc ccacagagaa ctcaaactgt cagttcaagt ctccacagga	1800

attcaacccc agaaagacat aaacttggag tccatctggt ttaattattg gagaatcgat	1860
tcccaagtcc aggaagagaa atgtaggggt ttacagagtc gcagcaggaa agagagctcc	1920
ctggctcctt gggaagtgtg acctcttcta atggaccctt ctctctgct gccatactcc	1980
cccttggctc cccctgtctc ctctctgat ttctccaat ctctgtagcc ccagaagtga	2040
acgccagaca ggaacacgca tgttgttata tatgtgttca cgtgtgctat gtgtgttaag	2100
cctgcatgca tgggtgtggg ggtatgtgcc ctctgtgtac gtatctgtgt gagtgtgggg	2160
gtttcaaggg tgiattagga ataacgtca aaatcctaag gaaattgaat actctgagag	2220
aagagagaca gaccctctca tactgtttta tattgtttta tactcagaaa aggaaaaaga	2280
agcaaaaacta aaggcaggta gcctggcgcc taggaaccag acctgaaacc aaggaaccag	2340
acccgaaacc aggcctgggc cggcctgacc taagcctggt agttaaatt cgaccctga	2400
cctagcaact gatgttatct atagattata gaaagacatt gtgaaacttc ccggtctgtt	2460
ctgttccact ctgaccatcg gtgcatgcag ccctgtcac ctacccctg ctgtctaat	2520
cgatcacgac cctctcacgt ggacccctt agagtgtga gcccttaaaa gggacaggaa	2580
ttgtcactc ggggagctcg gctcttgaga cagcagctt gctgatgctc ctggccgaat	2640
aaaccgcttc ctctttt	2657
<210> 40	
<211> 1319	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 40	
cccactact gatttaccac ctctttttca tttcaacttt tatittaggt ccagagggt	60
catgtgtgag tttgttgcac gacttatattg tgtgacactc atgtatgggg tacaaataat	120
cccaacacca atgtagagaa cacaatatcc aataggcagt tcttcaggcc ctttctccat	180
cctgcccctc cccacatggt agatcccagt gtctattgtg cccatcttta tgtccatgca	240
taaccaatgt ttagttccca cttataagtg agagcatgca gtattgggct ttctgtgccc	300
acattaattc acttaagata atggctccca gctggatcca tattgatgca aagtacataa	360
tttctttcat tttatggctg catagtattc catgttatgt ttgtaccaca ttttctttat	420
ccagtccata gcgatggac atctacattg attccatgct ctcattaatg tgaatagtgt	480
tttgatgaac atatgaatgt atgtgtcttt ttggtagaat aatttatattt cctttggata	540
taaagccagt aatggaattg ctgggtcgaa tcgtcgttct tttgtaagtt ctttgagata	600
tctccaagtt tcgttccaca ggcaactgaaa tagtttacat tcccaccaat aatgaacacg	660

cattcccttt tctccacaac cctgtcaaca tctgttattt ttttactttt taatagtagc 720
cattctgact gggtgtgat ggtacttcat tatggcttcc attcgcatth ctttctgac 780
ttgtgattht gagtagtht tcatatgtht gttggcgaca tgtatgtctt ctgagaagag 840
cctgttcatg ttttttgccc acttcttaac agggctgttc atcttttgct tgttgatttg 900
ttcaagtht ttagagatag tggatattag atctctgttg gatgcatagt ttgcaaatat 960

tttctctctg tctgtttacc ctgttgatag tttcttttat tgtgcagaaa ccttttaatt 1020
taatcaggtc caacttatcc atttttcttt tggttgaaat tgcttttgag gacttagtta 1080
tgaattatth gccaaagctg acgtcaagaa gggatattct taggttttct tatatgacat 1140
tttatagtht taggtcttat attaaagtct ttgtttcatc tcaaattgac ttttttctc 1200
tggtaaaagg taggggtcca gttcaagctc atttttccat gtggttttgt tacagtgggt 1260
agctgcagac atgagctggg caggagaggc ctcttcctaa caggaatgtc aggtgacca 1319

<210> 41

<211> 444

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

atgtggaact tcttcaggag agaattaaca tccaatggat tcccagaaaa cttttccctc 60
gatgtaccag caaacaccta caatgccctg aaaagccgcc tctgcgaccc caatgcagat 120
cacacgtcct gtcccagccc ctgcagctc cacgcggcgg gtgcactgcc aggcacggga 180
aggcagcgct ggcgagtaga actggcccat ctgcagata ggaagctgag cctcagggac 240
gtttcacgcc ttcgtcaagg tggtagagg aggagcggga ttgccgtgaa ggtggtaga 300
ggaggagcgg ggtttgctgc ccgacttcag ggaatctgca cctcgtcca gcagggttg 360
ttcttccga ggctgggagg atgccaagcc tggtaggaga tggggcggtt ggtgtggtgt 420

ggggagcttc tgacttgac atcc 444

<210> 42

<211> 210

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

atgactggtt ttcttataag aagaggagat ttggtcacag acatggttgc atgcagaata 60
aagacttttc gaggacacac tgagaaggca gccatctgca aaacaaggaa agagtctca 120
gcagaaacca gtctgcaga ctcttgatc ttggacttcc agccactgca attgatgca 180

agcttcagca cccttgcatc tctggataaa 210

<210> 43

<211> 183

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

atgaatactc ctaacattgt ctctttaaga gctcaccagc ctgaggtagg aatcattcca 60

tctgtgttac taatgagacc gctgaggatc aaaggggttt tccaccacat ccactcacct 120

ctacatggcg aaaaccaagg gttcactctc tgtcttcagg gagctccacc cagcagcagc 180

gtt 183

<210> 44

<211> 192

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

atggcgaaaa ccaaggggtc actctctgtc ttcaggagc tccaccagc agcagcgttt 60

gacagagctg ttcacttctt ctctctggag ctgtggcttc cagagcccat gctcagcagt 120

tccctctctt ctctgactgc tctctcttta ggctcagagc cactcagaca ttgggaagca 180

agtttgtcaa ga 192

<210> 45

<211> 132

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

atgaagagga aagcaaacag gtggagactc agcctgagaa atggtctgtt gccaagcaca 60

cccagagcta cccaacagat tcctatggag ttcttgaatt ccagggtggc ggatattcca 120

ataaagccat gg 132

<210> 46

<211> 132

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

atgcgtggat ttctgtggag agtggaaaca cggggagtcg aggggagcat gcgcgggcct 60
cagaaagttc tgggaaaccg actcccggga gcaggaggga acgcgcgctc cagagacaac 120
ttcgcggtgt gg 132

<210> 47
<211> 138
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 47

atggtttatt atgggaatcc tgaatccagc ccagggatit ctcttgtctt tggccttcta 60
cggctggaca ggatgcagcc tgggttttca gtctcccagg aaggagatcc agtgggaatc 120
actgaccacc tcggctgc 138

<210> 48
<211> 147
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 48

atgccagcac aattgaaatt cacaactgca gtgaatcctg caacaaaaat gagggtgacc 60
ctgctctccc aacctatgga gacctatgaa ggggatgtgc tgggggtcca gaccccatat 120
tcctcagact caacaattct tgttctt 147

<210> 49
<211> 519
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 49

atggggagct ctagagtggg agaaagaatg atggaagaag agtccagaac aggccagaaa 60
gtgaatccag ggaacacagg caaattatit gtgggggtag gaatctcaag aattgcgaaa 120

gtcaaatatg gagagtgtgg gcaaggtttc agtgataagt cagatgttat tacacaccaa 180
aggacacaca caggggggaa gccctacgtc tgcagagagt gtgggagggc tttagccgga 240
agtcagacct cctcagtcac cagaggacac acacagggga gaagccttat gtctgcagag 300
agtgtgagcg gggcttttagc cggaagtcag tcctcctcat tcaccagagg acacacaggg 360
gagaccccc agtctgcagg aaggatgagt aagtcattag taataaaacc ttatctcaat 420
agccacaaga agacaaacgt gatcaccaca cacttgacac cccagctct gaggtggctt 480

cagcgaaagt ctgctaacct cttacattcc ccgagagtg 519

<210> 50

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

atgcatagtt tgcaaatatt ttctctctgt ctgtttacct tgttgatagt ttcttttatt	60
gtgcagaaac cctttaattt aatcagggtcc aacttatcca tttttctttt ggttgaaatt	120
gcttttgagg acttagttat gaattatttg ccaaagctga cgtcaagaag ggtattctct	180
aggttttctt atatgacatt ttatagtttt aggtcttata ttaaagctct tgtttcatct	240
caaattgact tttttctctt ggtaaaaggt aggggtccag ttcaagctca tttttccatg	300
tggttttgtt acagtggg	318

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Ala Ala Phe Asp Arg Ala Val His Phe

1	5
---	---

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Phe Asp Arg Ala Val His Phe

1	5
---	---

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Arg Pro Leu Arg Ile Lys Gly Val Phe

1	5
---	---

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Lys Thr Lys Gly Ser Leu Ser Val Phe

1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Val Pro Ala Asn Thr Tyr Asn Ala Leu Lys

1 5 10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Arg Leu Gly Gly Cys Gln Ala Trp Trp Arg

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Asn Thr Tyr Asn Ala Leu Lys Ser Arg

1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Leu Val Thr Asp Met Val Ala Cys Arg Ile

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Leu Ile Leu Asp Phe Gln Pro Leu Gln Leu

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Met Ser Ser Phe Ser Thr Leu Ala Ser Leu

1 5 10

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Leu Met Ser Ser Phe Ser Thr Leu Ala Ser Leu

1 5 10

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Leu Met Ser Ser Phe Ser Thr Leu Ala

1 5

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Leu Met Ser Ser Phe Ser Thr Leu Ala

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Met Val Ala Cys Arg Ile Lys Thr Phe Arg

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Val Thr Asp Met Val Ala Cys Arg Ile Lys

1 5 10

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Ser Pro Ala Asp Ser Leu Ile Leu

1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Asn Thr Pro Asn Ile Val Ser Leu Arg Ala

1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 Val Leu Leu Met Arg Pro Leu Arg Ile Lys
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 Met Arg Pro Leu Arg Ile Lys Gly Val Phe
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 Phe Leu Phe Leu Glu Leu Trp Leu
 1 5
 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 Ser Val Phe Arg Glu Leu His Pro Ala
 1 5
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 Ser Pro Pro Ser Ser Thr Ala Pro Leu
 1 5
 <210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Arg Leu Gln Gly Ser Val Thr Leu Val

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Val Pro Ala Asn Thr Tyr Asn Ala Leu

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Leu Met Ser Ser Phe Ser Thr Leu

1 5

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Phe Leu Glu Leu Trp Leu Pro Glu Pro Met Leu

1 5 10

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Pro Leu Leu Gly Ser Glu Pro Leu

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Ser Leu Ile Leu Asp Phe Gln Pro Leu

1

5