



등록특허 10-2283639



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월02일

(11) 등록번호 10-2283639

(24) 등록일자 2021년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/38 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/38 (2013.01)

A61K 39/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7004398(분할)

(22) 출원일자(국제) 2008년04월11일

심사청구일자 2020년03월13일

(85) 번역문제출일자 2020년02월14일

(65) 공개번호 10-2020-0019776

(43) 공개일자 2020년02월24일

(62) 원출원 특허 10-2018-7014920

원출원일자(국제) 2008년04월11일

심사청구일자 2018년06월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/060044

(87) 국제공개번호 WO 2008/150577

국제공개일자 2008년12월11일

(30) 우선권주장

60/941,524 2007년06월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

J. Clin. Oncol., Vol. 23, No. 30, pp. 7536-7545 (2005.09.12.)*

US20020055614 A1

WO2005014634 A1

WO2004069866 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 14 항

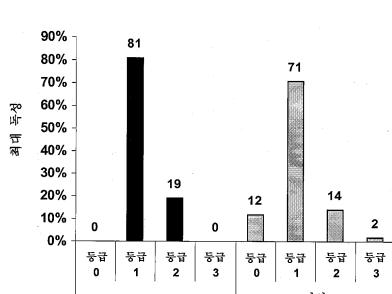
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 유방암 재발 예방용 백신

(57) 요 약

본 발명은, 임상적 완화 상태의 환자에서 유방암에 대한 보호 또는 치료 면역을 유도 및 유지시키는 효과와 함께, HER2/neu 종양유전자의 웹타이드인 E75에 대한 보호적 세포독성 T-림프구 반응을 유도 및 유지시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 약제학적으로 허용되는 담체, 애주번트, 예를 들어 재조합 사람 GM-CSF, 및

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

E75 펩타이드를 포함하는 백신 조성물의 유효량을 최적 용량 및 스케줄로 환자에게 투여함을 포함한다. 본 발명의 방법은 E75-특이적 T 세포 면역이 감소하기 때문에 1년 단위 또는 반년 단위로 부스터 백신을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또한, 본 발명은 상기 방법에 사용하기 위한 백신 조성물에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

C07K 16/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

피험자에서 HER2/neu 발현 종양에 대해 보호 또는 치료 면역을 유도하기 위한 약제학적 백신 조성물로서, 상기 HER2/neu 발현 종양이 HER2/neu 유전자 발현에 대해 0 초과 내지 $2.0 \pm 20\%$ 미만의 형광 동소 하이브리드화 (FISH) 등급분류를 가지며, 상기 조성물이 약제학적으로 유효한 담체, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 웹타이드 및 애주번트를 포함하며, 이때 상기 애주번트는 유화제, 무라밀 디펩타이드, 아브리딘, 수산화알루미늄, 키토산-기본 애주번트, 사포닌, 오일, 암피겐 (Amphigen), LPS, 세균 세포벽 추출물, 세균 DNA, CpG 서열, 합성 올리고뉴클레오타이드, 사이토카인 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물(들)을 포함하는 것인, 약제학적 백신 조성물.

청구항 2

피험자에서 HER2/neu 발현 종양에 대한 면역을 유지하기 위한 약제학적 부스터 조성물로서, 상기 HER2/neu 발현 종양이 HER2/neu 유전자 발현에 대해 0 초과 내지 $2.0 \pm 20\%$ 미만의 형광 동소 하이브리드화 (FISH) 등급분류를 가지며, 상기 조성물이 약제학적으로 유효한 담체, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 웹타이드 및 애주번트를 포함하며, 이때 상기 애주번트는 유화제, 무라밀 디펩타이드, 아브리딘, 수산화알루미늄, 키토산-기본 애주번트, 사포닌, 오일, 암피겐 (Amphigen), LPS, 세균 세포벽 추출물, 세균 DNA, CpG 서열, 합성 올리고뉴클레오타이드, 사이토카인 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물(들)을 포함하는 것인, 약제학적 부스터 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 피험자가 사람인, 약제학적 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유화제가 라우르산 및 올레산의 칼륨, 나트륨 및 암모늄 염; 지방산의 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염; 나트륨 라우릴 설페이트와 같은 유기 설포네이트; 세틸트리에틸암모늄 브로마이드; 글리세릴에스테르; 폴리옥시에틸렌 글리콜 에스테르 및 에테르; 소르비탄 지방산 에스테르 및 이들의 폴리옥시에틸렌; 아카시아; 젤라틴; 레시틴 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약제학적 백신 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 애주번트가 광유, 식물성유 또는 동물성유로 이루어진 군으로부터 선택되는 오일 성분을 포함하는 것인, 약제학적 백신 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 애주번트가 프로인트 완전 애주번트 (FCA) 또는 프로인트 불완전 애주번트 (FIA)인, 약제학적 백신 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 애주번트가 인터페론 알파 (IFN- α), 인터루킨-2 (IL-2) 및 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인을 포함하는 것인, 약제학적 백신 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 애주번트가 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF)인, 약제학적 백신 조성물.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 유화제가 라우르산 및 올레산의 칼륨, 나트륨 및 암모늄 염; 지방산의 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염; 나트륨 라우릴 설페이트와 같은 유기 설포네이트; 세틸트리에틸암모늄 브로마이드; 글리세릴에스테르; 폴리옥시에틸렌 글리콜 에스테르 및 에테르; 소르비탄 지방산 에스테르 및 이들의 폴리옥시에틸렌; 아카시아; 젤라틴; 레시틴 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약제학적 부스터 조성물.

청구항 10

제2항에 있어서, 상기 애주번트가 광유, 식물성유 또는 동물성유로 이루어진 군으로부터 선택되는 오일 성분을 포함하는 것인, 약제학적 부스터 조성물.

청구항 11

제2항에 있어서, 상기 애주번트가 프로인트 완전 애주번트 (FCA) 또는 프로인트 불완전 애주번트 (FIA)인, 약제학적 부스터 조성물.

청구항 12

제2항에 있어서, 상기 애주번트가 인터페론 알파 (IFN- α), 인터루킨-2 (IL-2) 및 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인을 포함하는 것인, 약제학적 부스터 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 애주번트가 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF)인, 약제학적 부스터 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, HER2/neu 발현 종양이 HER2/neu 단백질 발현에 대해 1+ 또는 2+의 면역조직화학 (IHC) 등급 분류를 갖는 것인, 약제학적 백신 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 보호 및 치료 백신 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 유방암 완화 상태에 있는 환자에서 유방암의 치료 및 재발을 예방하기 위한 웹타이드 백신에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 특히, 공개 출원, 기술 잡지 및 학위 논문을 포함하는 다양한 공개문이 명세서 전반에 걸쳐 인용된다. 이들 인용 공개문 각각이 전부 다목적으로 본원에 참조로 삽입된다.
- [0003] 유방암 (BCa)는 여성에서 가장 흔한 암 진단물이며, 여성들 간에 암-관련 사망의 제2의 주요 원인이다 [참조: Ries LAG, et al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute, Bethesda, MD]. 지난 20년간 유방암 치료에 있어서의 주요한 진전은 무병 생존 (disease-free survival: DFS) 비율을 상당히 개선시켰다. 예를 들어, 종양-관련된 항원에 대해 반응성인 항체를 사용하는 요법을 이용하여 질환 진행을 느리게 하거나 질환 재발을 예방하도록 특정 세포성 과정을 차단하였다. 유방암 치료에 있어 최근의 진전에도 불구하고, 상당수의 환자들이 중국에는 재발된 질환에 의해 사망할 것이다. 따라서, 재발 질환의 진전을 방지하거나 느리게 하거나 막는 처리가 필요하다.
- [0004] 백신은 투여가 쉽고 감염성 질환에 대해 관측되는 높은 성공률 때문에 이러한 치료 및 예방에 대해 매력적인 모델이다. 암 백신을 제작하는 기본 개념은 이론상으론 간단하다. 그러나, 실시에 있어 고형 종양에 대한 효과적인 암 백신의 개발은 제한된 성공을 갖는다. 예를 들어, 전이성 흑색종에 대해 지시되는 펩타이드 백신의 투여를 시도한 일 그룹은 단지 2.6%의 객관적인 반응률을 관측하였다 [참조: Rosenberg SA et al. (2004) Nat. Med. 10:909-15)].
- [0005] 이러한 낮은 성공률에 대한 많은 가능한 설명들이 있다 [참조: Campoli M et al. (2005) Cancer Treat. Res. 123:61-88]. 예를 들어, 항원이 특정 유형의 종양 세포와 특이적으로 관련되더라도, 종양 세포는 단지 낮은 수준의 항원을 발현할 수 있거나, 잠적 부위 또는 면역 첨출로부터 감춰진 다른 부위에 위치될 수 있다. 또한, 종양은 종종 이들이 진행될 때 항원을 훌륭으로써 항원적 프로필을 변화시킨다. 또한, 종양 세포는 매우 낮은 수준의 MHC 단백질 및 면역 반응을 생성하는데 필요한 다른 공동-자극 단백질을 발현할 수 있다는 사실이 낮은 성공률에 기여한다.
- [0006] 종양에 대한 예방접종 시도시 직면하는 추가의 문제는 진행된 단계의 암을 갖는 환자에서 발생한다. 이러한 환자는 보다 큰 원발성 및 전이성 종양을 갖는 경향이 있으며, 종양의 내부에 있는 세포들이 불량한 혈류 때문에 접근하기 쉽지 않을 수 있다. 이는 백신 전략이 혈액암의 치료에 대해 보다 성공적인 경향을 갖는다는 관측과 일치한다 [참조: Radford KJ et al. (2005) Pathology 37:534-50; 및 Mollidrem JJ (2006) Biol. Bone Marrow Transplant. 12:13-8]. 또한, 종양이 전이성이 되면, 종양은 미세환경으로 면역억제 인자를 방출하는 능력을 나타낼 수 있다 [참조: Campoli, 2005; 및 Kortylewski M et al. (2005) Nature Med. 11:1314-21]. 또한, 전이성 종양은 말초혈 텁프구 수의 감소 및 수지상 세포의 이상기능과 연관되었다 [참조: Gillanders WE et al. (2006) Breast Diseases: A Year Book and Quarterly 17:26-8].
- [0007] 이러한 요인들 중 일부 또는 전부가 효과적인 예방 또는 치료 백신을 개발하는데 있어서의 어려움에 기여할 수 있는 한편, 주요한 근본적인 난제는 대부분의 종양 항원이 자가 항원이거나 자가 항원과 높은 정도의 상동성을 갖는다는 것이며, 따라서 엄격한 면역 관용을 갖는 것으로 예측된다. 따라서, 많은 펩타이드-기본 암 백신은 면역-자극 애주번트의 존재 또는 부재하에 낮은 면역원성 및 특이성의 결여에 기인해 임상 실시에서 단지 제한된 성공을 가질 수 있다는 것이 분명하다.
- [0008] 단일 항원에 기초한 원형 유방암 백신은 동물 실험 및 유방암 환자의 임상 시험에서 측정가능한 면역 반응을 유도하는데 있어 제법 성공적이었다. 그러나, 관측된 면역 반응은 표준 수술 및 화학요법에 의한 완화시 처하는 질환 재발에 대해 임상적으로 유의한 보호 면역으로 전환되지 못했다. 따라서, 새로운 백신 접근은 BC 환자에서 재발률 및 전체 생존을 더욱 증진시킬 필요가 있다.
- [0009] 바람직한 백신 에피토프는 신생물에 의해 배양적으로 또는 적어도 증가된 수준으로 발현되는 것이다. HER2/neu는 많은 상피 악성종양에서 발현되는 원종양유전자이다 [참조: Slamon DJ et al. (1989) Science 244:707-12]. HER2/neu 단백질의 유전자 증폭 및 과발현이 BCa의 20 내지 25%에서 나타나며, 이의 과다 존재는 불행한 예후의 지시자이다 [참조: Pritchard KI et al. (2006) N. Engl. J. Med. 354:2103-11]. HER2/neu는 상당히 광범위하게 연구되었으며, 수개의 면역원성 펩타이드가 이러한 단백질로부터 확인되었다. 하나의 이러한 펩타이드가 E75라 불리며, HER2/neu (서열번호 1)의 아미노산 369 - 377에 상응한다 [참조: 미국특허 제6,514,942호].
- [0010] E75를 항암 백신으로서, 예를 들어 상이한 면역애주번트와 병용되고 [참조: Zaks TZ et al. (1998) Cancer Res. 58:4902-8; Knutson KL et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:1014-8; 및 Murray JL et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:3407-18]; 자가 수지상 세포에 로딩 후 재주입되거나 [참조: Brossart P et al. (2000) Blood

96:3102-8; 및 Kono K et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:3394-3400]; CD4 헬퍼 T-세포를 모집하기 위해 HLA 제II형 분자를 결합할 수 있는 보다 긴 웹타이드에 끼이는 [참조: Disis ML et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:1289-97; 및 Disis ML et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20:2624-32] 단일 웹타이드 백신으로서 사용하는 시도들이 있었다. 각각의 접근법은 E75-특이적 세포독성 T 세포-매개된 면역 반응을 자극하였으나, 진행된 상태의 유방암을 갖는 여성에서 임상적으로 유의한 치료 또는 보호 면역을 입증하지는 못했다.

[0011]

HER2/neu는 표피 성장 인자 수용체 부류의 일원이며, 세포 성장 및 증식을 조절하는데 수반되는 185-kd 타이로신 키나제 수용체를 암호화한다 [참조: Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosome 17 to bands q12-21.32. Genomics 1989;4:362-366; Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. Nat Rev Mol Cell Bio 2001;2:127-137]. HER/neu의 과발현 및/또는 증폭은 침습성 유방암 (BCa)의 25 내지 30%에서 발견되며, 보다 공격적인 종양 및 보다 나쁜 임상 결과와 연관된다 [참조: Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235:177-182; Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989;244:707-12; Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: A 30-year follow-up. J Clin Oncol 1992;10:1044-1048].

[0012]

HER2/neu 상태의 측정은 주로 면역조직화학 (immunohistochemistry: IHC) 및 형광 동소 하이브리드화 (fluorescence in situ hybridization: FISH)의 2가지 시험을 통해 수행된다. IHC는 HER2/neu 단백질의 발현을 검출하며, 0 내지 3+ (0 = 음성, 1⁺ = 낮은 발현, 2⁺ = 중간 발현, 3⁺ = 과발현)의 준정량적 스케일로 보고된다. 다른 한편으로, FISH는 HER2/neu 유전자의 증폭 (과다 카페)을 검출하며, HER2/neu 유전자 카페 대 염색체 17 유전자 카페의 비율로서 표현되며, FISH가 2.0 카페 이상이면 "과발현"으로 해석된다 [참조: Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. Hum Pathol 2005;36:250-261]. IHC 및 FISH의 동시발생률은 약 90%이다 [참조: Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. J Clin Oncol 1999;17:1533-1541]. FISH는 회고 분석시 트라스투주마브 (Tz) 반응에 대한 우수한 예측자인 것으로 보이므로 표준으로 간주되며; 보다 객관적이며 재생적이다 [참조: Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, et al. Evaluation of HER-2/neu Gene Amplification and Overexpression: Comparison of Frequently Used Assay Methods in a Molecularly Characterized Cohort of Breast Cancer Specimens. J Clin Oncol 2002;14:3095-3105; Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? J Pathol 2003;199:411-417; Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2007;25:118-145].

[0013]

HER2/neu의 원종양유전자로서의 확인 및 정량화는 Tz (Herceptin®)의 사용을 포함하는 체액성 또는 항체-기본 수동 면역요법을 이끌었다. Tz는 HER2/neu 단백질의 세포외 근접막 도메인을 결합하는 재조합의 사람화된 모노클로날 항체이다 [참조: Plosker GL, Keam SJ. Trastuzumab: A review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer. Drugs 2006;66:449-475]. Tz는 HER2/neu 과발현 (IHC 3⁺ 또는 FISH ≥2.0) 결절-양성 (NP) 및 전이성 BCa 환자에 대해 처방되며 [참조: Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002;20:719-726; Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005;353: 1659-1672], 낮거나 중간 정도의 HER2/neu 발현을 갖는 환자에서 매우 제한적인 활성을 나타낸다 [참조: Herceptin (Trastuzumab) prescription product insert. South San Francisco, CA: Genentech Inc; revised September 2000].

[0014]

추구되는 면역요법의 또 다른 형태는 예방접종 및 HER2/neu와 같은 종양 관련된 항원 (TAA)의 에피토프에 대한 세포성 면역 반응을 표적하는 활성 면역요법이다. HER2/neu는 HER2/neu-발현 암세포를 인식하고 사멸시키도록 면역계를 자극할 수 있는 수개의 면역원성 웹타이드의 공급원이다 [참조: Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, et al. Identification of immunodominant peptide of the HER2/neu proto-oncogene recognized by ovarian tumor-specific CTL lines. J Exp Med 1995;181:2109-2117].

[0015] E75 (KIFGSLAFL, HER2/neu, 369-377)는 HER2/neu 원종양유전자 부류의 펩타이드 서열이며, 암세포를 파괴할 세포독성 T 림프구 (CTL)를 자극하기 위한 항암 백신으로서 임상 시도에 사용되고 있다 [참조: Zaks, T. et.al. Immunization with a peptide epitope (369-377) from HER-2/neu leads to peptide specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. Cancer Research. 58 (21): 4902-8. 1998; Knutson KL, Schiffman K, Cheever MA, et al: Immunization of cancer patients with HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. Clin Cancer Res 8:1014-1018, 2002; Murray JL, Gillogly ME, Przepiorka D, et al: Toxicity, immunogenicity, and induction of E75-specific tumorlytic CTLs by HER-2 peptide E74 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer. Clin Cancer Res 8:3407-3418, 2002; Avigan D, Vasir B, Gong J, et al. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cell cancer induces immunological responses. Clin Cancer Res 2004: 10:4699-4708; Disis ML, Gooley TA, Rinn K, et al. Generation of T-cell immunity to the HER2/neu protein after active immunization with UER2/neu peptide-based vaccines. J Clin Oncol 2002;20:2624-32; Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR, et al. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. Clin Cancer Res 5:1289-1297, 1999].

[0016] HER2/neu 원종양유전자에 기초한 표적화된 수동 면역요법은 주로 Tz (Herceptin®)의 사용에 초점이 맞추어졌다. Tz는 HER2/neu 단백질의 세포외 근접막 도메인에 결합하는 재조합의 사람화된 모노클로날 항체이다. Tz는 규제 기관에 의해 승인되었으며, 전이성 유방암 환자 및 결절-양성 유방암 환자에 대해 정해진 애주번트에서 HER2/neu 과발현 (IHC 3+ 또는 FISH >2.0) 종양의 치료를 위해 처방된다. Tz는 다수의 임상 시험을 거쳤으며, 현재 전이 환자의 치료 및 HER2/neu가 과발현되는 고위험의 유방암 환자의 애주번트 치료에 관례적으로 사용된다. 그러나, Tz는 낮거나 중간 정도의 HER2/neu 발현을 갖는 환자에서는 제한된 활성을 나타낸다. 따라서, Tz로 보여진 이전의 결과에 기초할 때, HER2/neu를 표적하는 면역원성 펩타이드 백신은 낮은 수준 및 중간 수준의 HER2/neu 종양 발현을 갖는 암 환자에서는 효과적인 것으로 예상되지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 당해 기술 분야에서는 임상적 완화 상태에 있는 유방암 환자에게 질환의 재발에 대해 신뢰할 수 있는 보호를 제공할 백신을 생성하기 위해 E75의 면역보호 및 치료 가능성을 개발할 필요가 있다.

[0018] 본 발명은 유방암 임상적 완화 상태에 있는 환자에서 유방암 재발에 대한 면역을 유도하여 이를 유지시키는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 약제학적으로 유효한 담체 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함하는 조성물의 유효량을 환자에게 투여함을 포함한다. 투여는 당해 기술 분야에서 적합한 모든 수단, 예를 들어 주사 또는 접종, 특히 피내 주사에 의해 수행될 수 있으며, 하나 이상의 분할 용량으로 투여될 수 있다. 이러한 용량은 동일 농도의 펩타이드를 포함할 수 있고, 면역애주번트가 실질적으로 동시에 투여될 수 있으며, 하나의 접종 부위에 투여되거나 피부 표면에서 서로 떨어지게 위치될 수 있다. 조성물은 보호 면역을 확보할 때까지 월단위로 약 3 내지 6회 이상 투여될 수 있다. 일부 양상에서, 조성물은 애주번트, 예를 들어 재조합 사람 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF)를 추가로 포함한다.

[0019] 일부 양상에서, 본 방법은 약제학적으로 유효한 담체 및 서열번호 2의 펩타이드를 포함하는 조성물의 유효량을 포함하는 부스터 백신 용량을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 양상에서, 부스터 조성물은 애주번트, 예를 들어 GM-CSF를 추가로 포함한다. 부스터의 투여는 접종 또는 주사에 의해 수행될 수 있으며, 6개월 또는 12개월마다 투여될 수 있다.

[0020] 환자는 임의의 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 사람이다. 특정 양상으로, 사람은 사람 백혈구 항원 A2 또는 사람 백혈구 항원 A3으로 혈액-유형화되는 주요 조직적합성 항원에 대해 양성이다. 다른 양상으로, 사람은 검출 가능한 수준의 HER2/neu 발현에 대해 양성이다. 일부 양상으로, 사람은 낮거나 중간 정도의 HER2/neu-발현자이다. 예를 들어, 일부 바람직한 양태에서, 사람은 1+ 또는 2+의 면역조직화학 (immunohistochemistry: IHC) 등급분류 및 2.0 미만의 형광 동소 하이브리드화 (fluorescence in situ hybridization: FISH) 등급분류를 갖는다. 다른 양상으로, 사람은 3+ 이하의 IHC 등급분류를 가질 수 있다. 다른 양태에서, 사람은 HER2/neu의 과발현자일 수 있다. 예를 들어, 일부 바람직한 양태에서, 사람은 3+의 면역조직화학 (IHC) 등급분류 및 2.0 이상의 형광 동소 하이브리드화 (FISH) 등급분류를 갖는다.

[0021] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물에 관한 것이다. 이러한 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 유효량, 애주번트, 예를 들어 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자, 및 최적화된 면역화 스케줄을 포함한다. 일부 특정 양상으로, 백신 조성물에 대한 바람직한 농도 및 스케줄은 (1) 1 mg/ml의 펩타이드 및 0.25 mg/ml의 애주번트, (2) 0.5 mg/ml의 펩타이드 및 0.25 mg/ml의 애주번트, (3) 0.1 mg/ml의 펩타이드 및 0.25 mg/ml의 애주번트, 및 (4) 0.5 mg/ml의 펩타이드 및 0.125 mg/ml의 애주번트를 포함하고, 각각은 6개월 동안의 매달 접종후 3년 이상 동안 매년 부스터 접종된다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 발명의 방법 및 다른 양상에 대한 다양한 용어가 본원 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐 사용된다. 이러한 용어는 달리 나타내지 않는 한 당해 기술 분야에서의 일반적인 의미를 가질 것이다. 다른 구체적으로 정의된 용어는 본원에서 제공되는 정의와 일치하는 방식으로 파악되어야 한다.

[0023] 용어 "예방하다"는, 방사선학적 또는 물리적 조사의 결과를 포함하여 임의의 객관적 또는 주관적 변수로 측정시, 임상적 완화 상태의 환자에서 유방암 재발 (recurrence/relapse)을 미리 막는데 있어서의 모든 성공 또는 성공의 징후를 언급한다.

[0024] "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 특정 생물학적 결과, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 본원에 기술되거나 예시된 생물학적 결과를 달성하기에 효과적인 본원에서 기술되는 바와 같은 화합물, 물질 또는 조성물의 양을 언급한다. 이러한 결과는, 이로 제한됨이 없이, 당해 기술 분야에서 적합한 임의의 수단에 의해 측정되는 바와 같은, 유방암의 예방 및 보다 특히 재발 유방암의 예방, 예를 들어, 대상체에서 재발의 예방을 포함할 수 있다. 최적 치료학적 양은 최상의 치료 결과를 달성하기 위한 용량, 스케줄 및 부스터의 사용을 언급한다.

[0025] "약제학적으로 허용되는"은 조성, 제형, 안전성, 환자 허용성 및 생물 이용성에 대해 약리학적/독성학적 관점으로부터 환자에게 허용되고 물리적/화학적 관점으로부터 조제 약제사에 대해 허용되는 특성들 및/또는 물질을 언급한다. "약제학적으로 허용되는 담체"는 활성 성분(들)의 생물학적 활성의 효과를 방해하지 않는 매질을 언급하며, 투여시 숙주에 무독성이다.

[0026] "보호 면역" 또는 "보호 면역 반응"은 대상체가 항원, 예를 들어 본원에 기술되고 예시되는 유방암 항원의 면역 원성 성분에 대해 활성 면역 반응을 개시하여 상기 항원에의 후속 노출시 대상체의 면역계가 항원을 발현하는 세포를 표적화하고 파괴할 수 있어 대상체에서 암의 재발로부터 이환율 및 사망률의 범위를 감소시키는 것을 의미한다. 본 발명에서 보호 면역은 바람직하게는, 단 이로 제한됨이 없이, T 림프구에 의해 부여된다.

[0027] 본원에서 사용되는 용어 "약"은, 측정가능한 값, 예를 들어 양, 시간적 지속 기간 등을 언급하는 경우, 구체화된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 더욱 바람직하게는 $\pm 1\%$, 더더욱 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 변화, 예를 들어 기술된 방법을 수행하기에 적합한 변화를 포함하는 것으로 의미된다.

[0028] "펩타이드"는 펩타이드 결합 또는 변형된 펩타이드 결합, 즉 펩타이드 이소스테어 (isostere)에 의해 서로 연결되는 2개 이상의 아미노산을 포함하는 모든 펩타이드를 언급한다. 폴리펩타이드는, 일반적으로 펩타이드, 올리고펩타이드 또는 올리고로 언급되는 단쇄 및 일반적으로 단백질로 언급되는 장쇄를 모두 언급한다. 폴리펩타이드는 20개의 유전자-암호화되는 아미노산 이외의 아미노산을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 천연 과정, 예를 들어 해독후 프로세싱에 의하거나 당해 기술 분야에서 널리 알려진 화학적 변형 기술에 의해 변형되는 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 변형은 기본 교재 및 보다 상세한 단행서, 및 방대한 연구 문헌에 잘 기술되어 있다. 변형은 펩타이드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복실 말단을 포함하여 폴리펩타이드 중 임의의 위치에서 발생할 수 있다. 동일한 유형의 변형이 지정된 폴리펩타이드의 수개의 위치에서 동일하거나 다른 정도로 존재할 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 또한, 지정된 폴리펩타이드는 많은 유형의 변형을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 유비퀴틴화의 결과로서 측쇄화될 수 있으며, 이들은 측쇄화가 존재하거나 부재하는 사이클일 수 있다. 사이클화, 측쇄화 및 측쇄화되고 사이클화된 폴리펩타이드가 천연 해독후 과정으로부터 생성되거나 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헵 잔기의 공유 부착, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유 부착, 가교-결합, 사이클화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유적 가교-결합물의 형성, 시스틴의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백분해 프로세싱, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 단백질로의 아미노산의 전령-RNA 매개된 첨가, 예를 들어 아르기닐화, 및 유비퀴틴화를 포함한다.

함한다.

[0029] "부스터"는 보호 면역을 증진, 연장 또는 유지하고 조절 T-세포에 의해 매개되는 T-세포 반응의 하향-조절을 극복하기 위해 환자에게 투여되는 일정 용량의 면역원을 언급한다.

[0030] "유방암이 없는 (free of breast cancer)" 또는 "질환이 없는 (disease free)" 또는 NED (질환의 증거가 없음: No Evidence of Disease)는 환자가 현재 표준의 의료 요법으로의 처리에 의해 유도되는 임상적 완화 상태에 있는 것을 의미한다. 동의어로 사용되는 "완화" 또는 "임상적 완화"는, 비록 암성 세포가 신체에 여전히 존재할 수 있지만, 유방암의 임상적 징후, 방사선학적 징후 및 증상이 임상 진단에 기초할 때 상당히 감소되거나 완전히 사라진 것을 의미한다. 따라서, 완화는 부분적 및 완전한 완화를 포함하는 것으로 의도된다. 잔류 암 세포의 존재는 CTC (순환 종양 세포: Circulating Tumor Cell)와 같은 검정에 의해 계수될 수 있으며, 재발이 예측될 수 있다.

[0031] "재발 (relapse, recurrence) 또는 "재출현 (resurgence)"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 개선 또는 완화 기간 후 유방암의 회귀에 대한 방사선학적 진단 또는 유방암의 회귀에 대한 징후 및 증상을 언급한다.

[0032] 유방암은 세계적으로 여성에 관한 주요 건강 문제이다. 오늘날까지 시도되어온 유방암 백신은, 특히 질환이 없는 환자에서 재발 예방과 관련하여 효능이 제한적이었다. 본 발명에 따라, 특정 조건 하에서 HER2/neu 발암유전자의 웨타이드인 E75 (서열번호 2)를 환자에 투여함으로써 질환이 없는 환자에서 유방암의 재발을 효과적으로 예방될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 또한, 예기치 못하게도, E75 웨타이드는 MHC HLA-A2 및 -A3와 연관되므로 HLA-A2 및 -A3 하플로타입 (haplotype)을 갖는 환자에서 보호 면역을 유도할 수 있다는 것이 확인되었다.

[0033] 따라서, 본 발명은 유방암 재발에 대한 보호 면역을 유도하기 위한 백신 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 유방암, 보다 특히 재발성 유방암에 대한 보호 면역의 유도 및 유지를 위한 방법에 관한 것이다. 일부 양상에서, 상기 방법은 약제학적으로 유효한 담체 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리웨타이드를 포함하는 조성물의 유효성을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 미국 특허 공개 번호 20050169934에 기술되는 바와 같은 아미노산에 대해 변형된 측쇄를 갖는 변이체를 포함하여, 서열번호 2의 변이체가 본 발명의 백신 조성물 및 방법에서 면역원으로 사용하기에 적합하다.

[0034] 대상체는 모든 동물일 수 있으며, 바람직하게는 포유동물, 예를 들어 사람, 마우스, 래트, 햄스터, 기니아피그, 토끼, 고양이, 개, 원숭이, 소, 말, 돼지 등이다. 사람이 가장 바람직하다. 매우 바람직한 양상으로, 사람은 HLA-A2 또는 HLA-A3 하플로타입에 대해 양성이다. 다른 바람직한 양상으로, 사람은 사람 HER2/neu의 발현에 대해 양성이며, 낮은 및/또는 중간인 HER2/neu 발현 종양을 갖는 사람 및 HER2/neu의 과발현자인 사람을 포함한다.

[0035] 백신 조성물은 당해 기술 분야에서 적합한 임의의 수단에 따라 동결-건조되거나 액체 제제로서 제형화될 수 있다. 액체 형태의 제제의 비제한적 예는 용액, 혼탁물, 시럽, 슬러리 및 에멀젼을 포함한다. 적합한 액체 담체는 모든 적합한 유기 또는 무기 용매, 예를 들어 물, 알콜, 식염수, 완충된 식염수, 생리 식염수, 덱스트로즈 용액, 물 프로필렌 글리콜 용액 등을 포함하며, 바람직하게는 멸균 형태로 존재한다.

[0036] 백신 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산부가염 (활성 폴리웨타이드의 유리 아미노 그룹과 함께 형성됨)을 포함하며, 이는 무기산, 예를 들어 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예를 들어 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 함께 형성된다. 또한, 유리 카복실 그룹으로부터 형성되는 염은 무기 염기, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 제2철 수산화물, 및 유기 염기, 예를 들어 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도될 수 있다.

[0037] 백신 조성물은 바람직하게는 대상체에게 접종 또는 주사하기 위해 제형화된다. 주사를 위해, 본 발명의 백신 조성물은 수성 용액, 예를 들어 물 또는 알콜 중에 또는 생리학적으로 적합한 완충액, 예를 들어 핸크스 (Hanks) 용액, 링거 (Ringer) 용액 또는 생리학적 식염 완충액 중에 제형화될 수 있다. 용액은 제형화제, 예를 들어 혼탁제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다. 또한, 주사 제형은, 예를 들어 사용하기 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균수, 식염수 또는 알콜로 재구성함으로써, 사용 직전에 주사에 적합한 액체 형태 제제로 전환되는 고체 형태 제제로 제조될 수 있다.

[0038] 또한, 백신 조성물은 지연 방출 비히클 또는 데포 (depot) 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 장기간 작용 제형은 접종 또는 이식 (예를 들어 피하 또는 근육내)에 의하거나 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 백신 조성물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질 (예를 들어, 허용되는 오일 중의 에멀젼으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체, 예를 들어 난용성 염으로서 제형화될 수 있다. 리포좀 및 에멀젼

은 담체로서 사용하기에 적합한 전달 비히클로서 널리 알려진 예이다.

[0039] 백신 조성물은 백신의 보호 효능을 증진시키는 작용제, 예를 들어 애주번트를 포함할 수 있다. 애주번트는 E75 웨타이드 항원에 대한 보호 면역 반응을 증진시키도록 작용하여 백신에 필요한 항원의 양 및/또는 보호 면역 반응을 생성하는데 필요한 투여 횟수를 감소시키도록 작용하는 임의의 화합물 또는 화합물들을 포함한다. 애주번트는, 예를 들어 유화제, 무라밀 디웨타이드, 아브리딘, 수성 애주번트, 예를 들어 수산화알루미늄, 키토산-기본 애주번트, 및 다양한 사포닌 중 임의의 것, 오일 및 당해 기술 분야에 공지된 기타 물질, 예를 들어 암페겐 (Amphigen), LPS, 세균 세포벽 추출물, 세균 DNA, CpG 서열, 합성 올리고뉴클레오타이드 및 이의 배합물 [참조: Schijfins et al. (2000) Curr. Opin. Immunol. 12:456], 미코박테리얼 플레이 (*M. phlei*) 세포벽 추출물 (MCWE) (미국 특허 번호 4,744,984), 엠.플레이 DNA (M-DNA) 및 M-DNA-엠.플레이 세포벽 복합체 (MCC)를 포함할 수 있다. 유화제로서 사용될 수 있는 화합물은 천연 및 합성 유화제 및 음이온성, 양이온성 및 비이온성 화합물을 포함한다. 합성 화합물 중, 음이온성 유화제는, 예를 들어 라우르산 및 올레산의 칼륨, 나트륨 및 암모늄 염, 지방산의 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염, 및 유기 설포네이트, 예를 들어 나트륨 라우릴 설페이트를 포함한다. 합성 양이온성 작용제는, 예를 들어 세틸트리에틸암모늄 브로마이드를 포함하며, 합성 비이온성 작용제는 글리세릴에스테르 (예: 글리세릴 모노스테아레이트), 폴리에틸렌 글리콜 에스테르 및 에테르, 및 소르비탄 지방산 에스테르 (예: 소르비탄 모노팔미테이트) 및 이들의 폴리옥시에틸렌 유도체 (예: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트)로 예시된다. 천연 유화제는 아카시아, 젤라틴, 레시틴 및 콜레스테롤을 포함한다.

[0040] 기타 적합한 애주번트는 오일 성분, 예를 들어 단일 오일, 오일 혼합물, 유중수 에멀젼 또는 수중유 에멀젼으로 형성될 수 있다. 오일은 광유, 식물성유 또는 동물성유일 수 있다. 광유는 중류 기술을 통해 와셀린로부터 수득되는 액체 탄화수소이며, 또한 당해 기술 분야에서 액체 파라핀, 액체 와셀린 또는 화이트 광유로도 언급된다. 적합한 동물성유는, 예를 들어 간유, 가자미유, 큰청어유, 오렌지 러기유 (orange roughy oil) 및 상어간유를 포함하며, 이들 모두 시판된다. 적합한 식물성유는, 예를 들어 카놀라유, 아몬드유, 면실유, 옥수수유, 올리브유, 낙화생유, 흥화유, 참기름, 대두유 등을 포함한다. 프로인트 완전 애주번트 (FCA) 및 프로인트 불완전 애주번트 (FIA)는 백신 제제에 통상 사용되는 2가지의 일반적인 애주번트이며, 또한 본 발명에서 사용하기에도 적합하다. FCA 및 FIA 모두 광유중수 에멀젼이다; 그러나, FCA는 사멸된 미코박테리움 종 (*Mycobacterium sp.*)도 또한 포함한다.

[0041] 또한, 면역조절 사이토카인도 백신 효능을 향상시키기 위해, 예를 들어 애주번트로서 백신 조성물에 사용될 수 있다. 이러한 사이토카인의 비제한적 예는 인터페론 알파 (IFN- α), 인터루킨-2 (IL-2) 및 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF) 또는 이의 배합물을 포함한다. GM-CSF가 매우 바람직하다.

[0042] E75 웨타이드 항원을 포함하고 애주번트를 추가로 포함하는 백신 조성물은, 이로 제한됨이 없이, 혼합, 초음파 처리 및 마이크로유동화 (microfluidation)를 포함한 당업자에게 널리 공지된 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 애주번트는 백신 조성물의 약 10% 내지 약 50% (v/v), 보다 바람직하게는 약 20% 내지 약 40% (v/v), 더욱 바람직하게는 약 20% 내지 약 30% (v/v), 또는 이들 범위 내의 임의의 정수로 포함될 수 있다. 약 25% (v/v)가 매우 바람직하다.

[0043] 백신 조성물은 주입 또는 주사 (예: 정맥내, 근육내, 피내, 피하, 경막내, 십이지장내, 복강내 등)에 의해 투여될 수 있다. 또한, 백신 조성물은 비내, 질, 직장, 경구, 또는 경피로 투여될 수 있다. 추가로, 백신 조성물은 "바늘-없는" 전달 시스템에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 피내 주사에 의해 투여된다. 투여는 의사 또는 의료 보조원의 지시에 따를 수 있다.

[0044] 주사는 수회 주사로 나눌 수 있으며, 이러한 분할 접종은 바람직하게는 실질적으로 동시에 투여된다. 분할 접종으로 투여되는 경우, 면역원의 용량은 바람직하게는, 반드시 필수적이지는 않지만, 각각의 분리된 주사시 동등하게 할당된다. 애주번트가 백신 조성물에 존재하는 경우, 애주번트의 용량은 바람직하게는, 반드시 필수적이지는 않지만, 각각의 분리된 주사시 동등하게 할당된다. 분할 접종을 위한 분리된 주사는 바람직하게는 환자의 신체에서 실질적으로 서로 인접하게 투여된다. 일부 바람직한 양상으로, 주사는 신체에서 서로 적어도 약 1 cm 떨어지게 투여된다. 일부 바람직한 양상으로, 주사는 신체에서 서로 적어도 약 2.5 cm 떨어지게 투여된다. 매우 바람직한 양상으로, 주사는 신체에서 서로 적어도 약 5 cm 떨어지게 투여된다. 일부 양상으로, 주사는 신체에서 서로 적어도 약 10 cm 떨어지게 투여된다. 일부 양상으로, 주사는 신체에서 서로 10 cm 초과로, 예를 들어 적어도 약 12.5, 15, 17.5, 20 cm 또는 그 이상으로 떨어지게 투여된다. 일차 예방접종 주사 및 부스터 주사는 본원에서 기술되고 예시되는 바와 같이 분할 접종으로 투여될 수 있다.

[0045] 다양한 대안적 약제학적 전달 시스템이 이용될 수 있다. 이러한 시스템의 비제한적 예는 리포좀 및 에멀젼을

포함한다. 특정 유기 용매, 예를 들어 디메틸설폐사이드가 또한 사용될 수 있다. 추가로, 백신 조성물은 지연 방출 시스템, 예를 들어 치료제를 포함하는 고형 중합체의 반투과성 매트릭스를 사용하여 전달될 수 있다. 이 용가능한 다양한 지연 방출 물질이 당업자에게 널리 알려져 있다. 지연 방출 캡슐은, 이들의 화학적 특성에 따라, 수일 내지 수주 내지 수개월의 범위에 걸쳐 백신 조성물을 방출할 수 있다.

[0046] 유방암 완화 상태에 있는 환자에서 유방암 재발을 예방하기 위해서, 치료학적 유효량의 백신 조성물이 대상체에 게 투여된다. 치료학적 유효량은, 당해 기술 분야에서 적합한 임의의 수단에 의해 측정시, 환자에서 E75-특이 적 세포독성 T-림프구 ($CD8^+$) 수의 임상적으로 유의한 증가 및 항원에 대한 세포독성 T-림프구 반응의 임상적으로 유의한 증가를 제공할 것이다. 대체로 환자에서, 치료학적 유효량의 백신 조성물은 남아있는 미세한 질환을 파괴하여 환자에서 유방암의 재발 위험을 유의하게 감소 또는 제거시킬 것이다.

[0047] 백신 조성물의 유효량은, 이로 제한됨이 없이, 인종, 암종, 치수, 신장, 체중, 연령, 환자의 전체적 건강 상태, 제형의 유형, 투여 방식 또는 방법, 또는 유방암이 환자에서 재발할 가능성을 상당히 증가시키는 위험 인자의 존재 또는 부재를 포함하여 많은 변수에 의존적일 수 있다. 이러한 위험 인자는, 이로 제한됨이 없이, 수술 유형, 림프절의 상태 및 양성의 수, 종양의 크기, 종양의 조직학적 등급, 호르몬 수용체 (에스트로겐 및 프로게스테론 수용체)의 존재/부재, HER2/neu 발현, 림프절관 침윤 및 유전적 소인 (BRCA 1 및 2)를 포함한다. 일부 바람직한 양태에서, 유효량은 환자가 림프절 양성 또는 림프절 음성인지의 여부에 의존적이며, 환자가 림프절 양성인 경우 양성 림프절의 수 및 정도에 의존적이다. 모든 경우에서, 적합한 유효량은 일반적으로 통상적인 최적화 기술 및 전문가의 능숙하고 정통한 판단 및 당업자에게 분명한 기타 인자들을 이용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본원에 기술되는 치료학적 유효량의 백신 조성물은 대상체에게 실질적인 독성을 일으키지 않으면서 치료학적 예방 이점을 제공할 것이다.

[0048] 백신 조성물의 독성 및 치료 효율은, 예를 들어 LD50 (집단의 50%에 치명적인 용량) 및 ED50 (집단의 50%에 치료학적으로 효과적인 용량)을 측정하기 위한, 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 측정될 수 있다. 독성과 치료 효과 사이의 용량 비율이 치료 지수이며, 이는 LD50/ED50의 비율로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 백신 조성물이 바람직하다. 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻어지는 자료는 환자에서 사용하기 위한 일정 범위의 용량을 제형화하는데 이용될 수 있다. 이러한 백신 조성물의 용량은 바람직하게는 독성이 매우 적거나 없는 ED50을 포함하는 일정 범위의 순환 농도 내에 속한다. 용량은 사용되는 용량 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 다양할 수 있다.

[0049] 독성 정보는 특정 대상체, 예를 들어 사람에서 유용한 용량을 보다 정확히 결정하는데 이용될 수 있다. 치료의는 독성 또는 기관 기능이상 때문에 투여를 끝내거나 중단하거나 조절할 수 있으며, 임상 반응이 반응을 개선시키는데 적합하지 않은 경우 필요에 따라 처리를 조절할 수 있다. 재발 유방암의 예방에 있어 투여 용량의 크기는 다른 요인들 중에서 환자 상태의 중증도, 재발에 대한 상대적 위험 또는 투여 경로에 따라 다양할 것이다. 환자 상태의 중증도는, 예를 들어 부분적으로 표준 예후적 평가 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0050] 백신 조성물은 유방암의 재발에 대해 보호 면역을 유도 및/또는 지탱하기에, 보다 구체적으로 E75 (서열번호 2)에 대한 세포독성 T 림프구 반응을 유도 및/또는 지탱하기에 적합한 임의의 스케줄로 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 일차 예방접종으로서 본원에서 기술되고 예시되는 바와 같은 백신 조성물을 환자에게 투여한 후, 보호 면역을 지지 및/또는 유지하기 위해 부스터를 투여할 수 있다.

[0051] 일부 양상에서, 백신 조성물은 1개월 당 1회, 2회 또는 그 이상의 횟수로 환자에게 투여될 수 있다. 6개월 동안 연속해서 매월 1회씩의 투여가, 특히 일차 예방접종 스케줄에 대해 보호 면역 반응을 확립하는데 바람직하다. 일부 양상으로, 부스터는 일차 예방접종 스케줄을 마친 후 일정 간격으로, 예를 들어 6개월 이상의 간격으로 투여될 수 있다. 부스터의 투여는 바람직하게는 6개월 마다 수행한다. 또한, 부스터는 필요에 따라 투여될 수 있다.

[0052] 일차 예방접종 및 부스터 접종을 포함한 백신 투여 스케줄은, 환자에게 필요한 한, 환자의 수명을 뛰어넘기 위해, 예를 들어 수년의 과정에 걸쳐 계속될 수 있다. 일부 양상으로, 백신 스케줄은 백신 요법의 시작시에 보다 빈번한 투여를 포함하며, 보호 면역을 유지하기 위한 시간 동안은 보다 덜 빈번한 투여 (예: 부스터)를 포함한다.

[0053] 백신 조성물은 백신 요법의 시작시에는 보다 저용량이 투여되고, 시간이 지남에 따라 보다 고용량이 투여될 수 있다. 또한, 백신은 백신 요법의 시작시에는 보다 고용량이 투여되고, 시간이 지남에 따라 보다 저용량이 투여될 수 있다. 일차 백신 및 부스터 투여의 횟수 및 투여되는 E75의 용량은, 당해 기술 분야에서 적합한 임의의

수단에 따라 담당 의사에 의해 결정되는 바와 같이, 개개 환자의 특정 요구를 만족시키도록 맞춰지고/지거나 조절될 수 있다.

[0054] 일부 양상으로, 부스터로서 투여하기 위한 조성물을 포함하는 백신 조성물은 약 0.1 mg 내지 약 10 mg의 E75 웨타이드를 포함한다. 일부 바람직한 양상으로, 조성물은 약 0.5 mg의 E75를 포함한다. 일부 바람직한 양상으로, 조성물은 약 2 mg의 E75를 포함한다. 일부 바람직한 양상으로, 조성물은 약 1 mg의 E75를 포함한다.

[0055] 일부 바람직한 양상으로, 부스터로서 투여하기 위한 조성물을 포함하는 E75 함유 백신 조성물은 GM-CSF를 추가로 포함한다. 이러한 조성물은 바람직하게는 약 0.01 mg 내지 약 0.5 mg의 GM-CSF를 포함한다. 일부 바람직한 양상으로, 조성물은 약 0.125 mg의 GM-CSF를 포함한다. 일부 바람직한 양상으로, 조성물은 약 0.25 mg의 GM-CSF를 포함한다.

[0056] 일부 특히 바람직한 양상으로, 백신 조성물은 1 ml의 총 용적 중 1 mg의 E75 웨타이드 및 0.125 내지 0.250 mg의 GM-CSF를 포함하고, 각각 0.5 ml의 분할 접종으로 매달 투여되며, 환자의 신체에서 약 5 cm 떨어지게 주사되고, 동시에 또는 혼합 투여된다. 투여 스케줄은 바람직하게는 6개월 동안 매달 투여된다. 약 48시간 후, 주사부위는 홍반 및 경화의 국소 반응에 대해 평가될 수 있다. 2개의 부위에서의 반응이 융합성이이고, 총 경화 면적이 100 mm²를 초과하는 경우 (또는 환자가 등급 2를 초과하는 임의의 전신 독성을 경험하는 경우), 비록 웨타이드의 용량은 동일하게 하는 것이 의도될지라도, GM-CSF의 용량은, 예를 들어 절반으로 감소될 수 있다. 환자가 후속 용량에 대해 활발한 반응을 나타내는 경우, GM-CSF를, 예를 들어 절반으로 더욱 감소시킬 수 있다. 환자가 활발한 반응을 나타내지 않는 경우, 환자는 보다 고용량의 GM-CSF 용량으로 투여될 수 있다. 일부 양상으로, 부스터의 투여 스케줄 및 투여요법도 마찬가지로 결정되며, 1 mg의 E75 및 0.25 mg의 GM-CSF를 포함하는 백신 조성물의 투여로 시작하는 부스터는 일차 예방접종 백신 스케줄을 마친 후 약 6개월마다 투여된다.

발명의 효과

[0057] 본원 발명은 임상적 완화 상태에 있는 유방암 환자의 재발을 예방할 수 있는 백신을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0058] 본원 발명에 대한 추가의 이해를 제공하기 위해 포함되는 것으로서 본원에 삽입되고 본원의 일부를 구성하는 첨부된 도면은, 본원 발명의 양상들을 설명하며 설명과 함께 본원 발명의 원칙을 설명하는 것을 돋는다.

도 1은 E75로 예방접종된 환자에 의해 경험되는 최대의 국소 및 전신 독성을 나타낸다. 국소 독성 (주사 부위에서의 홍반 및 경화)는 백신에 대한 반응을 나타내는 목적하는 효과이다. 가장 일반적인 등급 2 국소 독성을 의약을 필요로 하는 가려움 (pruritis) 또는 불편감 (discomfort)이었다. 대부분의 일반적인 전신 독성을 뼈 통증, 플루-유사 증상 및 피로 (일반적으로 GM-CSF와 연관됨)였으며, 24시간 미만으로 지속되었다. 2가지의 등급 3 전신 독성은 혀의 혈관부종 (6회차 접종 후) 및 뼈 통증이었다.

도 2는 20개월 중앙 추적 (median follow-up)에서의 카플란 메이어 무병 생존 곡선 (Kaplan Meier disease-free survival curve)을 도시한다. 171명의 등록된 환자에 대해, 예방접종된 그룹에서의 재발률은, 20개월의 중앙 추적에서 관측 그룹에서의 14.2%와 비교하여 ($P = 0.04$), 5.6%였다. 예방접종된 그룹 및 대조군에서의 무병 생존률은 각각 92.5% 및 77%였다.

도 3A 및 3B는 백신-유도된 E75 CTL 반응을 도시한다. (A) 모든 환자에 대한 백신-유도된 E75-특이적 CTL, CD8⁺ E75-특이적 CTL의 중앙 (median) 수준은 예방접종전 (pre-vaccination) 수준 (0.39%, 범위: 0 - 3.28%)으로부터 최대 (maximum) 수준 (1.8, 범위: 0.4 - 12.2%, $P < 0.0001$) 및 예방접종후 (post-vaccination) 수준 (0.70%, 범위: 0.06 - 2.91%, $P = 0.002$)으로 상당히 증가되었다. 특이적 CD8⁺ T-세포의 예방접종전 수준과 장기간 (long-term) (6개월) 수준 사이에는 차이가 없었다. (B) 기준 면역에 기초한 백신-유도된 E75-특이적 CTL. 기준 면역을 갖는 환자 및 기준 면역을 갖지 않는 환자는, 유사한 중앙 최대 수준 및 예방접종후 수준과 함께, E75 예방접종에 대한 패턴에 있어 동일한 패턴을 나타내었다. 그러나, 기준 면역이 없는 환자에서는 예방접종부터 예방접종후 6개월까지의 이랑체 수준에서 상당한 증가가 있었다 (0.13% [범위: 0 - 0.28%] 대 0.45% [범위: 0 - 2.68%], $P < 0.0001$).

도 4A 내지 4D는 지연형 과민반응 시험의 결과를 도시한다. (A) 예방접종후 모든 환자에 대한 DTH. 대조군 2.1 ± 0.5 mm는 웨타이드 14.0 ± 1.4 mm와 비교된다 ($P < 0.0001$). (B) NN 환자에 대한 예방접종전 및 예방접종후 DTH. 식염수 대조군 대 예방접종전 웨타이드에는 차이가 없었다. 예방접종후에는, 예방접종후 대조군 (p

< 0.001) 및 예방접종전 E75 DTH ($P < 0.001$)과 비교하여, E75 웨타이드에 대한 DTH 반응에 상당한 증가가 있었다. (C) 시험에 의한 예방접종후 DTH. NP 환자는, NN 환자와 비교하여, 상당히 큰 DTH 반응을 가졌다 (17.3 ± 2.4 mm 대 10.9 ± 1.5 mm, $P = 0.02$). 이는 NN 그룹에서 중앙 총 백신 용량에서의 차이에 기인할 수 있다 ($2000 \mu\text{g}$ 대 $4000 \mu\text{g}$, $P < 0.0001$). (D) 투여량에 의한 예방접종후 DTH. $6000 \mu\text{g}$ 미만의 E75가 투여된 환자는, 총 $6000 \mu\text{g}$ 이 투여된 환자와 비교하여, 상당히 적은 DTH 반응을 가졌다 (13.3 ± 1.9 mm 대 25.1 ± 4.0 mm, $P = 0.008$).

도 5는 부스터 환자에서의 CD8^+ T-세포 수준을 도시한다. 일차 예방접종 시리즈 투여한지 6개월 후 부스터를 받은 환자는 일차 예방접종 시리즈로부터 6개월을 초과한 환자보다 상당히 높은 수준의 CD8^+ T-세포를 가졌다. 6개월을 초과하는 환자는 일차 예방접종후 6개월에서의 이들 자신의 수준으로부터 0.7% 내지 0.44%의 유의하지 않은 저하를 나타내었다.

도 6은 등급화된 국소 및 전신 독성을 도시한다. 대부분의 환자는 등급 1 국소 독성을 경험하였고, 단지 2명의 환자만 등급 2 국소 독성을 경험하였다. 절반 이상의 환자가 전신 독성이 없었으며, 등급 2 또는 3 전신 독성은 없었다. 등급 1 독성을 경험한 11명의 환자는 피로 (4), 두통 (4), 근육통 (3), 오한 (2), 열 (2), 설사 (1), 권태감 (1), 뼈 통증 (1) 및 관절통 (1)을 포함하였다 (괄호는 예의 수).

도 7은 SRI가 결여된 환자에서의 부스터 반응이 항원 특이적 CD8^+ T-세포의 수를 증가시키는 경향을 나타내었다는 것을 도시한다.

도 8은 효소-결합된 면역흡수 (enzyme-linked immunoabsorbance)에 의해 검출되는 증가된 IFN- γ 분비 세포를 나타내는 환자수를 도시한다. 전체적으로, 91%의 환자가 ELISPOT으로 측정시 증가된 항원-특이적 (작용적) T-세포를 나타내었으며, 50%는 뚜렷한 증가를 나타내었다 (50% 이상의 검정에서 증가된 IFN- γ 분비 세포).

도 9는 부스터 환자에서의 국소 반응을 도시한다. 일차 예방접종 시리즈의 완성에 보다 근접하여 일시적으로 부스터를 받은 환자 (9개월 이하; 밝은색 막대)가, 일차 백신접종 시리즈로부터 9개월 초과한 환자에서보다 상당히 큰 LR을 가졌다. 두 그룹은 일차 시리즈 말에 유사한 LR을 가졌다 (좌측). 이들 자료는 보다 빠르게 부스터를 받은 환자에서의 부스터의 부가적 효과 및 보다 늦게 부스터를 받은 환자에 대한 유지 효과를 제시한다.

도 10은 일차 시리즈의 진행 동안 증가하는 LR을 도시하며, 두 그룹이 초기 시리즈에서는 동일하였으며 유일한 차이가 일차 시리즈로부터의 시간임을 설명한다. vax 6의 수는 도 7에 도시되는 바로 전 LR의 수와 상이한데, 이는 일부 환자가 단지 4번의 접종을 받았기 때문이다. 두 그룹은 9개월 이하 그룹이 보다 커던 (97 대 80, $p = 0.04$) 백신 3을 제외하고는 모든 포인트에서 통계학적으로 동일하였다.

도 11A 내지 도 11D는 HER2/neu LE 대 OE에 의한 E75 제II상 시험에 등록된 환자들의 면역원성 (평균±SE) 및 임상 반응 (절대적 재발 및 사망률)을 도시한다.

11A. 시험관내 면역 반응 - 모든 시험관내 전-최대 (pre-max) % 특이적 CD8^+ T-세포는 통계학적으로 증가하였으며 ($\text{LE } p < 0.001$, $\text{OE } p < 0.001$), LE 환자는 OE 환자와 비교하여 증가된 최대 (max) 반응을 가졌다 ($p = 0.04$).

11B. 생체내 면역 반응 - 모든 생체내 전-후 (pre-post) DTH는 통계학적으로 증가하였다 ($\text{LE } p < 0.001$, $\text{OE } p = 0.02$).

11C. 재발률 - 재발률은 모든 예방접종된 LE 및 OE 환자에서 감소하였으나, 통계학적으로 유의하지 않았다.

11D. 사망률 - 예방접종된 LE 환자는 사망률이 감소되는 경향을 가졌다 ($p = 0.08$).

도 12A 내지 도 12D는 HER2/neu IHC 발현 수준 (0, 1+, 2+, 3+)에 의한 E75 제II상 시험에 등록된 환자들의 면역원성 (평균±SE) 및 임상 반응 (절대적 재발 및 사망률)을 도시한다.

12A. 시험관내 면역 반응 - 모든 시험관내 전-최대 % 특이적 CD8^+ T-세포는 통계학적으로 증가하였으며, 반면 단지 HER2/neu 1+ 전-장기간 (pre-long term)만이 유의성을 갖는 경향을 나타냈다 ($p = 0.08$).

12B. 생체내 반응 - 모든 생체내 전-후 DTH는 통계학적으로 증가하였다 ($0 \text{ p} = 0.03$, $1+ \text{ p} = 0.02$, $2+ \text{ p} = 0.02$, $3+ \text{ p} = 0.05$).

12C. 재발률 - 재발률은 모든 예방접종된 IHC 수준에서 감소하였으나, 통계학적으로 유의하지 않았다.

12D. 사망률 - 사망률은 모든 예방접종된 IHC 수준에서 감소하였으며, HER2/neu IHC 1+ 환자에서 통계학적으로 유의하였다 ($p = 0.04$).

도 13A 및 13B는 ODG 대 SDG에 대한 이량체 검정 및 DTH를 나타낸다. (A) ODG 대 SDG의 유의한 차이가 평균한 (average) 예방접종전 CD8⁺ E75-특이적 T 세포 수준에서 나타났다 ($0.91 \pm 0.13\%$ 대 $0.54 \pm 0.11\%$, $p = 0.03$). 평균한 최대 CD8⁺ E75-특이적 T 세포 수준 간에는 유의한 차이가 없었다. 최적 용량은 CD8⁺ E75-특이적 T 세포의 월간 예방접종후 비율 (%)의 평균에 대해 증가하는 경향을 나타내었다 ($0.87 \pm 0.10\%$ 대 $0.67 \pm 0.05\%$, $p = 0.07$). 6개월에 그룹간에는 평균한 장기간 CD8⁺ E75-특이적 T 세포 수준에 차이가 없었다. (B) ODG 대 SDG 사이의 직교 평균 (orthogonal mean) DTH 반응 (mm)은 대조군 접종물과 차이가 없었다 ($3.0 \pm 1.1\text{mm}$ 대 $2.0 \pm 0.5\text{mm}$). 웨타이드에 대한 DTH 반응은 ODG 대 SDG에서 상당히 증가하였다 ($21.5 \pm 2.5\text{mm}$ 대 $11.3 \pm 1.3\text{mm}$, $p = 0.00021$).

도 14는 SDG와 ODG 사이의 임상 재발률에 대한 비교를 나타낸다. SDG와 비교하여 ODG는 보다 낮은 재발률 ($p = 0.27$) (단 상당히 짧은 중앙 추적)을 갖는 경향을 나타냈다. 그러나, ODG는 상당히 더 공격적인 질환을 갖는 보다 짧은 환자들로 구성되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059]

본 발명을 수행하기 위한 구체적 실시예에 대한 하기 실시 양태는 단지 설명을 위한 것으로서, 어떠한 방식으로도 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0060]

실시예 1

[0061]

환자 선별

[0062]

결절-양성 (NP) 및 결절-음성 (NN) 시험은 지역의 Institutional Review Boards에 의해 승인되었으며, 조사 신약 적용 (BB-IND#9187) 하에 Walter Reed Army Medical Center (Washington, DC) 및 Joyce Murtha Breast Care Center (Windber, PA)에서 수행되었다. 모든 환자는 유방암 (BCa)로 조직학적으로 확인되었으며, 등록 전 수술, 화학 요법 및 방사선 요법 (필요시)의 표준 절차를 마쳤다. 호르몬 요법의 환자는 이들의 특별한 요법을 계속 수행하였다. BCa 환자는 적합한 상담 및 동의 후 적합한 시험 (NP 또는 NN)에 등록하였으며, E75가 일반적인 접단의 약 40 내지 50%에서 발견되는 HLA-A2에 일차적으로 결합하므로 HLA 유형화하였다. HLA-A2⁺ 환자를 예방접종하였으며, HLA-A2⁻ 환자는 임상적 재발의 가망성에 대해 판측되었다. HLA-A3⁺ 환자를 A2 환자와 나란히 시험에 등록하고, 등록시 유효 (active) 용량 스케줄로 처리하였다. 환자들을 예방접종하기 전, 환자들의 피부를 일단의 리콜 항원 (불거리, 파상풍 및 캔디다 (*Candida*))으로 시험하였다. 환자가 2개 초과의 항원에 반응하는 경우 (5 mm 초과), 면역적격인 것으로 간주되었다.

[0063]

총 186명의 환자가 2가지의 E75 백신 시험 (NP = 95, NN = 91)에 등록되었으며, 이들은 표준 요법 후 질병이 없으나 재발의 위험이 높은 환자였다. HLA-A2⁺ 및 나중에 HLA-A3⁺ 처리 후, 환자 (n = 101)에 예방접종을 하였다 (49 NP, 52 NN; 90 HLA-A2⁺ 및 11 HLA-A3⁺). 모든 다른 환자 (n = 85)들은 판측으로 배정되었다. 5명의 백신 환자 및 4명의 판측 환자들은 비록 독성 때문은 아니지만 연구에서 배제되었다. 따라서, 96명의 예방접종된 환자 및 81명의 판측된 환자가 분석에 이용가능하였다. 2가지 그룹에 대한 인구통계학적 및 예후적 인자가 표 1에 나타나 있다.

표 1

예방접종된 환자 및 관측 환자에 대한 인구통계학적 및 예후적 인자

| | 예방접종됨, HLA-A2 ⁺ , A3 ⁺ (n=96) [†] | 관측됨, HLA-A2 ⁺ , A3 ⁺ (n=81) [‡] | P |
|------------------------------|--|--|------|
| 연령 중앙값(세) | 58.9 | 55.1 | |
| 범위(세) | 32-80 | 34-87 | 0.33 |
| 인종 | | | |
| 백인, % | 89.6 | 81.5 | |
| 기타, % | 10.4 | 18.5 | 0.12 |
| 종양 크기 | | | |
| T1, % | 69.8 | 60.5 | 0.20 |
| T2-T4, % | 30.2 | 39.5 | 0.20 |
| 조직학적 등급 | | | |
| I-II, % | 64.5 | 59.5 | 0.50 |
| III, % | 35.5 | 40.5 | 0.50 |
| 결절-양성, % | 46.9 | 56.8 | 0.19 |
| 중앙 + 결절(NP 단독) | 2.0 | 2.5 | |
| 범위 | 1-25 | 1-15 | 0.17 |
| HER2/neu IHC 3+ 또는 FISH +, % | 25.8 | 28.4 | 0.32 |
| 호르몬 수용체 음성, % | 31.6 | 17.3 | 0.03 |
| XRT, % | 71.9 | 80.2 | 0.20 |
| 화학예방, % | 65.6 | 78.8 | 0.05 |
| 애주변트 헤르셉틴, % | 5.2 | 3.7 | 0.60 |

[0064]

[0065] † 101명의 환자가 백신 암(arm)에 등록됨. 2명이 관측으로 전환되고, 1명은 애주변트 트라스투주마브 때문에 철회하고, 1명은 연장된 비관련 질환 때문에 철회하고, 1명은 개인적 이유로 철회함.

[0066]

‡ 85명의 환자가 관측 암에 등록됨. 2명은 추적을 놓치고, 4명은 MHC II 웨타이드 백신 시험 때문에 철회함. 2명의 환자가 백신 암(arm)으로부터 얻어짐.

[0067]

두 그룹은 대부분의 표준 예후적 범주에서 동일하였다. 그러나, 보다 많은 예방접종된 환자가 호르몬-수용체 음성이었으며, 따라서 백신 그룹 중의 보다 적은 환자가 애주변트 호르몬 요법에 의존하였다. 각각의 시험들에 대한 조사에서, 대조군과 비교하여 NN 시험의 보다 많은 예방접종된 환자가 HER2/neu 과다-발현 종양을 가졌으며 (25.0% 대 7.1%, P < 0.05), 보다 적은 환자가 애주변트 방사선 요법을 받았다 (64.7% 대 85.7%, P < 0.05).

[0068]

시험 동안, E75는 2가지의 일반적으로 사용되는 HLA-웨타이드 결합 알고리즘 BIMAS (서열번호 3) 및 SYFPEITHI (서열번호 4)로부터 얻어지는 결합 친화성 자료에 기초하여 HLA-A3⁺ 환자에서 사용될 수 있는 것으로 입증되었다. 추가로, 예비-임상 평가로 E75-자극된 HLA-A3⁺ CTL이 HLA-A3⁺ HER2/neu-발현 암 세포를 분해할 수 있는 것으로 입증되었다 (자료 미제시).

[0069]

비록 HLA-A3 서브세트가 HLA-A2 서브세트와 비교하여 결절 상태에 있어 차이는 없었지만 (54.5% 대 45.9%, P = 0.59), 이들은 보다 적은 수의 종양을 갖는 경향이 있었고 (90.9% T1 대 65.7%, P = 0.08), 호르몬적으로 무감각한 종양을 덜 가지는 것 같았고 (18.2% 대 29.6%, P = 0.4), 보다 적은 HER2/neu 과발현 종양을 가졌다 (0% 대 31.5%, P = 0.028).

[0070]

실시예 2

[0071]

예방접종 및 임상 프로토콜

[0072]

E75 웨타이드는 NeoMPS, Inc. (San Diego, CA)에 의해 우수한 제조 실시 등급으로 상업적으로 생산되었다. 웨

타이드 순도 (> 95%)는 고성능 액체 크로마토그래피 및 질량 분광법으로 확인하고, 아미노산 함량은 아미노산 분석으로 결정하였다. 멸균 및 일반적 안전성 시험은 제작자에 의해 수행되었다. 동결건조된 웨타이드를 멸균 식염수에 0.5 ml 중 100 µg, 500 µg 또는 1000 µg으로 재구성하였다. 웨타이드를 투여시에 해동하고, 0.5 ml 중의 GM-CSF (Berlex, Seattle, WA)와 혼합하며, 1.0 ml의 접종물을 분할한 후, 2개의 위치에서 5 cm 떨어지게 피내 (intradermally) 투여하였다. 모든 접종물은 동일한 사지에서 투여되었다.

[0073]

예방접종 시리즈. NP 시험은 초기 단계에서 웨타이드의 용량을 상승시키고 후기 단계에서 스케줄을 변화시키는 2 단계 안전성 시험으로서 디자인되었다. 백신 시리즈의 세부 사항은 이미 공개되었다 [참조: Peoples GE et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23:7536-45]. 간단히 설명하면, 100 µg, 500 µg 또는 1000 µg의 E75가 4회 또는 6회 월간 주사되도록 3 내지 6명의 환자 (HLA-A2⁺ 또는 HLA-A3⁺)가 각각 배정되었다 (각각 100.6, 500.4, 500.6, 1000.4 및 1000.6) (표 2). NP 환자들에서 최적 용량을 결정하고 확인하기 위해 그룹들을 궁극적으로 증대시켜 후기 용량 그룹의 환자의 숫자가 보다 커졌다.

표 2

NP 및 NN 시험 디자인

| 환자군 | 환자의 수 HLA-A2 ⁺ (A3 ⁺) | 웨타이드 용량† (µg) | GM-CSF 용량† (µg) | 예방접종 (월) [‡] |
|--------------|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| 결절-양성 | | | | |
| 100.6 | 2* | 100 | 250 | 0,1,2,3,4,5 |
| 500.4 | 6 | 500 | 250 | 0,1,2,5 |
| 500.6 | 6 | 500 | 250 | 0,1,2,3,4,5 |
| 1000.4 | 9 (2) | 1000 | 250 | 0,1,2,5 |
| 1000.6 | 16 (4) | 1000 | 250 | 0,1,2,3,4,5 |
| 결절-음성 | | | | |
| 500.125.3 | 10 | 500 | 125 | 0,1,5 |
| 500.125.4 | 10 | 500 | 125 | 0,1,2,5 |
| 500.250.4 | 10 (3) | 500 | 250 | 0,1,2,5 |
| 500.250.6 | 10 (2) | 1000 | 250 | 0,1,2,3,4,5 |
| 1000.250.6 | 6 | 1000 | 250 | 0,1,2,3,4,5 |
| 총계 | 85 (11) | | | |

[0074]

[0075] † 웨타이드를 0.5 ml 멸균 식염수에 혼탁시키고, GM-CSF 및 멸균 식염수와 배합하여 접종 당 1.0 ml의 최종 용적이 되게 하였다

[0076]

‡ 백신을 3 내지 4주마다 투여하였다.

[0077]

* 100.6 그룹에 속하는 한 명의 환자가 시험을 그만두었으며, 이 용량 그룹에서 어떠한 보충도 이루어지지 않았다.

[0078]

NN 시험은 GM-CSF의 용량을 변화시키고 접종 스케줄을 변화시킴으로써 최적의 생물학적 용량을 더욱 조율하고자 디자인되었다. 비-HER2/neu-발현 종양을 갖는 환자는 이번 시험에서 아마도 항원을 접촉한 적이 없는 (antigen-naive) 숙주를 예방접종하는 것에 대한 실행가능성을 측정하기 위해 허용되었다. 10명의 환자가 각각의 용량 그룹에 배정되고 5개월에 걸쳐 3회, 4회 또는 6회의 월간 주사를 받았다 (표 2).

[0079]

말초혈액단핵세포 (PBMC) 분리 및 배양. 각각의 예방접종 전 및 백신 시리즈를 마친지 1개월 후 (백신 후 : post-vaccine) 및 6개월 후 (장기간: long-term) 채혈하였다. 50 ml의 혈액을 채혈하고, PBMC를 분리시켰다. PBMC를 세척하고, 배양 배지에 재현탁시킨 후, 립프구의 공급원으로서 사용하였다.

[0080]

독성. 즉각적인 과민반응을 조사하기 위해 예방접종한 지 1시간 후 환자를 관측하고, 48 내지 72시간 후 주사 부위를 측정하여 독성을 조사하였다. 독성은 NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events, v3.0에 의해 등급을 매겼으며, 0 내지 5의 스케일로 보고하였다. 보다 낮은 용량 그룹에서 유의한 독성이 나타나지 않는 경우에만 하나의 용량 그룹으로부터 다음 용량 그룹으로 진행하였다. 환자-특이적 결과를 시리즈 동안 발생하는 최대 국소 독성 및 전신 독성에 기초하여 보고하였다.

- [0081] 국소 및 전신 독성은 경미하였으며, 모든 환자들이 백신 시리즈를 마쳤다. 국소 독성은 등급 1 (81%) 및 등급 2 (19%)였다. 전신 독성은 최소였으며 (등급 0 (12%), 등급 1 (71%), 등급 2 (14%) 및 등급 3 (2%) (도 1)), 등급 4 또는 5의 전신 독성은 관측되지 않았다. 관측된 독성은 GM-CSF와 일치하므로, GM-CSF의 50% 감소가 유의한 국소 또는 전신 반응 (환자의 18.7%)의 경우에 실시되었다.
- [0082] 독성 프로필은 A3 환자가 A2 카운터파트와 동일하였다: 두 그룹 모두에 대한 최대 국소 독성은 등급 1 (82%) 및 등급 2 (18%)였다. 최대 전신 독성 (A3 대 A2)은 등급 0 (0% 대 15%), 등급 1 (92% 대 68%), 등급 2 (8% 대 14%) 및 등급 3 (0% 대 2%; $p = 0.4$)이었다. A3 환자의 국소 반응은 각각의 용량 그룹 내의 A2 환자와 동일하였다. 따라서, HLA-A3⁺ 환자 사이의 독성 프로필은 HLA-A2⁺ 환자와 비교하여 차이가 없었으며, 국소 반응은 로버스트 (robust)와 같았다. 등급 2 국소 독성은 각각 18%와 비교하여 20%였으며, 이는 유사한 생체내 면역원성을 제시한다.
- [0083] 임상 재발. 환자의 일차 암연구자에 의해 처방되는 바와 같이 모든 환자들을 관심 대상의 암 스크리닝 표준물에 대한 임상 재발에 대해 관측하였다. 생검으로 증명되거나 원발성 암연구 팀에 의해 재발에 대해 치료되는 경우, 환자는 재발된 것으로 간주되었다.
- [0084] 프로토콜 디자인에 대해, 일차 분석을 18개월의 중앙 추적 (median follow-up)으로 개시하였다. 이러한 분석을 마친 후, 171명의 환자들을 등록하였으며, 예방접종된 그룹에서의 재발률은, 20개월의 중앙 추적에서 관측 그룹에서의 14.2%와 비교하여 ($P = 0.04$), 5.6%였다. 예방접종된 그룹 및 대조군에서의 무병 생존률 (disease-free survival rate)은 각각 92.5% 및 77%였다 (도 2). 예방접종된 그룹에서의 단지 1명의 사망 (전체 생존 [OS] 99%, $P = 0.1$)과 비교하여, 관측 그룹에서는 4명이 사망하였다 (OS 95.1%).
- [0085] 두 가지 시험의 추적조사가, 감소되는 면역 및 프로토콜 디자인에 있어 부스터 접종의 결여에도 불구하고 5년까지 연장되었다. 최신 분석 결과, 58개월에 백신 그룹에서의 늦은 재발을 포함하여 두 그룹 모두에서 추가의 재발이 보고되었다. 26개월의 중앙 추적조사에 있어, 등록된 186명의 환자가 있었으며, 재발률은, 관측 그룹에서의 14.8% ($P = 0.15$)와 비교하여, 백신 그룹에서는 8.3%였다. 뼈에서만의 재발은 대조군 환자에서 재발률 50% (6/12)를 차지했으며, 예방접종된 재발 환자에서 0%를 차지했다 ($P = 0.04$).
- [0086] HLA A3⁺ 환자에서의 재발률은 HLA A2⁺ 환자와 유사하였다 (9.1% 대 8.2%).
- [0087] 통계학적 분석. 재발률은 카플란-메이어 방법에 의한 생존 분석을 이용하여 그룹들간을 비교하였으며, 재발된 대상체의 비율을 로그-랭크 (log-ranked) 분석을 이용하여 비교하였다. 임상-병리 인자에 대한 P 값을 필요에 따라 윌콕슨 (Wilcoxon), 피셔 정확 시험 (Fisher's exact test) 또는 χ^2 를 이용하여 계산하였다. 예방접종전 및 예방접종후 이량체 (dimer) 수준을 비교하는 P 값을 윌콜슨을 이용하여 계산하고, DTH에 대해서는 스튜던트 t-시험을 이용하여 계산하였다.
- [0088] 실시예 3
- [0089] HLA-A2:면역글로불린 이량체 검정
- [0090] 환자로부터 새로이 분리된 PBMC 중 CD8⁺ E75-특이적 세포의 존재는 이량체 검정을 이용함으로써 직접적으로 평가되었다. 간략히 설명하면, HLA-A2:면역글로불린 (Ig) 이량체 (PharMingen, San Diego, CA) 1 μ g을 과량의 (5 μ g) 웨타이드 및 0.5 μ g의 β 2-마이크로글로불린 (Sigma, St. Louis, MO)와 37°C에서 밤새 항온처리한 후 사용시까지 4°C에서 저장함으로써 상기 이량체에 E75 또는 대조군 웨타이드 (E37, 폴레이트 결합 단백질 (25 - 33) RIAWARTEL (서열번호 5))를 로딩하였다. PBMC를 세척하고, 파르민겐 스테인 완충액 (PharMingen Stain Buffer, PharMingen)에 재현탁한 후, 5 ml의 환자 폴리스티렌 튜브 (Becton Dickinson, Mountain View, CA)에 5×10^5 개 세포/100 μ l/튜브로 첨가하고, 로딩된 이량체 및 항체로 염색하였다. 각각의 환자에서 CD8⁺ E75-특이적 세포의 수준을 각각의 연속적 예방접종에 반응하여 측정하였으며, 모든 접종후 측정치를 각각의 환자에 대해 평균을 낸 후, 이들의 접종전 수준과 비교하였다.
- [0091] E75-특이적 CTL을 예방접종전 및 1개월 (예방접종후: post-vaccination) 및 6개월 (장기간)에 이량체 검정에 의해 새로운 생체외 PMBC에서 평가하였다. 이량체 검정은 기능성 면역 검정 (세포독성 및 사이토카인 분비)과 서로 관련이 있는 것으로 이미 밝혀졌다 [참조: Peoples GE et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23:7536-45]. 증가는 CD8⁺ E75-특이적 CTL의 패턴이 백신 시리즈, 피킹 (peaking) 및 이어 완성에 의한 정체기로의 후퇴 동안 관

측되었다.

[0092] 모든 환자에 대한 누적적인 이량체 반응이 도 3A에 나타나 있다. 예방접종전부터 예방접종후 및 피크 수준까지 중앙 CD8⁺ E75-특이적 세포가 통계학적으로 유의하게 증가하였다. 장기간 수준은 예방접종전 수준과 다르지 않았다. 단지 48.3%의 환자가 예방접종후 6개월에 유의한 잔류 면역 (0.5 초과의 이량체로 정의됨)을 유지하였다.

[0093] E75에 대한 선재성 면역 (0.3 초과의 이량체로 정의됨)은 42.7%의 환자에서 나타났다 (도 3B). 동일한 패턴의 이량체 반응은 초기 이량체 수준과 무관하게 나타났다. 그러나, 선재성 면역이 결여된 환자는 장기간 이량체 수준에 상당한 증가가 있었다.

실시예 4

지연성 과민반응

[0096] 두 시험 모두에서, DTH 반응은, 이전에 기술된 바와 같이 [참조: Peoples GE et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23:7536-45], 백신 시리즈를 마친지 1개월 후 0.5 ml의 생리식염수 (GM-CSF 부재) 중의 100 µg의 E75 및 용적 대조군으로서 0.5 ml의 생리식염수로 평가하였다. DTH 반응을 감응성 볼펜 방법을 이용하여 48 내지 72시간에 2차원으로 측정하고, 직교 평균으로 보고하며, 대조군과 비교하였다. NN 시험에서, 또한 DTH를 예방접종전에 수행하였다.

[0097] 생체내 면역 반응. 백신의 생체내 효과를 측정하기 위해서, 식염수 용적 대조군과 함께 피내 주사되는 100 µg의 E75로 백신 시리즈를 마친지 1개월 후 예방접종후 DTH를 측정하였다. 모든 예방접종된 환자에서, 74%의 환자는 14.0 ± 1.4 mm의 E75에 대한 평균 경화와 함께 양성 예방접종후 DTH를 가졌으며, 이는 대조군의 2.1 ± 0.5 mm 와 대조된다 ($P < 0.0001$) (도 4A).

[0098] NN 환자는 예방접종후 DTH뿐만 아니라 예방접종전 DTH를 가졌다 (도 4B). 예방접종전, E75와 대조군 사이에는 DTH에 차이가 없었다. 예방접종후, E75에 대한 DTH 반응은 대조군보다 통계학적으로 커졌으며, E75 DTH는 예방접종전과 비교하여 예방접종후 상당히 상이하였다 (10.9 ± 1.5 mm 대 2.8 ± 0.8 mm, $P < 0.0001$).

[0099] NP 환자는 NN 환자보다 큰 예방접종후 E75 DTH 반응을 나타내었으며 (도 4C), 그 차이는 NN 환자가 전체적으로 보다 소량의 E75를 수령하기 때문일 수 있다. 용량의 함수로서 DTH 반응을 평가하는 경우, 6000 µg의 E75를 수령한 환자는 6000 µg 미만의 웹타이드를 수령한 환자와 비교하여 상당히 큰 DTH 반응을 나타내었다 (25.1 ± 4.0 mm 대 13.3 ± 1.9 mm, $P = 0.008$) (도 4D).

[0100] HLA-A3⁺ 환자는 HLA-A2⁺와 견줄만한 예방접종후 DTH를 나타내었다 (10.5 ± 2.7 mm 대 15.1 ± 1.9 mm, $P = 0.38$).

실시예 5

HLA-A3⁺ ELISPOT 검정

[0103] HLA-A3⁺ 환자에 대한 백신 반응을 또한 E75-특이적 인터페론-γ ELISPOT으로 평가하였다. ELISPOT에 의해, A3 환자는 기선에서 0 내지 30개 스폷/10⁶개 세포 범위를 나타내고, 예방접종후 3 내지 448개 스폷/10⁶개 세포 범위로 증가하였다 ($p = 0.04$). 매우 중요하게도, 임상 재발은 두 그룹 모두에서 동일하였으며 (A3, 9.1% 대 A2, 8.2%), 대조군에서의 14.8%와 비교되었다.

실시예 6

유방암 백신 부스터

[0106] 환자. 결절-양성 (NP) 및 결절-음성 (NN) 시험은 지역의 Institutional Review Boards에 의해 승인되었으며, Walter Reed Army Medical Center (WRAMC: Washington, DC) 및 Joyce Murtha Breast Care Center (Windber, PA)에서 수행되었다. 이를 임상 시험은 Food and Drug Administration에 의해 승인된 조사 신약 적용 (BB-IND #9187) 하에 수행되었다. 모든 환자는 유방암으로 조직학적으로 확인되었으며, 표준 요법을 마쳤으며, 초기 등록시 질환이 없고 면역적격이었다. HLA-A2⁺ 및 HLA-A3⁺ 환자를 상기 실시예에 나타난 바와 같이 6개월의 기간에 걸쳐 다양한 용량의 E75 및 GM-CSF 및 다양한 스케줄에 따라 예방접종하였다. 환자들이 일차 예방접종 시리즈

를 마친지 적어도 6개월일 때 선택적인 부스터 용량의 E75 (1 mg) + GM-CSF (0.250 mg)를 제공하였다.

[0107] 25명의 환자가 부스터 예방접종을 받았다 (표 3). 절반 이상 (56%)만 NP 유방암이었다. 예방접종전으로부터 중앙 시간은 12개월 (범위: 6 내지 24개월)이었다. 환자는 일차 시리즈 후 6개월에 부스터를 수령한 경우 조기 부스터 (EB) 환자로 평가되거나 일차 시리즈 후 6개월을 초과하여 수령한 경우 후기 부스터 (LB) 환자로 평가되었다.

표 3

| 환자 인구통계 | |
|-----------------------|----------------|
| | 환자 (n=25) |
| 연령 중앙값 (세) | 56 (범위: 31-76) |
| ≥ T2 | 28% |
| 결절 양성 | 56% |
| 등급 3 | 32% |
| ER-PR- | 28% |
| HER2/neu 과발현 | 20% |
| 일차 표준 요법으로부터의 시간 (개월) | 33 (9-200) |
| 일차 백신 시리즈로부터의 시간 (개월) | 12 (6-24) |

[0108]

[0109] 잔류 E75-특이적 면역은 HLA-A2:IgG 이랑체로 측정시 시간에 따라 감소되었다. EB 그룹 ($n = 6$)에서 $CD8^+$ T-세포의 중앙 수준은, LB 그룹 ($n = 13$) (0.44%, 0 - 2.67%, $p = 0.02$)과 비교하여, 1.4% (0.61 - 3.43% 범위)였다. LB 환자에 대해, 초기 시리즈의 6개월 후 중앙 이랑체 수준은 0.70% (0.19% - 1.55%)였다. 이는 EB 환자의 6개월 이랑체 수준과 상당히 상이하였다 (도 5).

[0110] 부스터 백신. E75 웨타이드는 NeoMPS (San Diego, CA)에 의해 우수한 제조 실시 등급으로 상업적으로 생산되었다. 웨타이드 순도를 고성능 액체 크로마토그래피 및 질량 분광법으로 확인하고, 아미노산 함량을 아미노산 분석으로 측정하였다. 웨타이드는 95% 초과로 정제되었다. 멸균 및 일반 안전성 시험은 제작자에 의해 수행되었다. 동결건조된 웨타이드를 0.5 mL 중 1000 μ g의 농도로 멸균 식염수에 재구성하였다. 웨타이드를 0.5 mL 중의 GM-CSF (Berlex, Seattle, WA)와 혼합하고, 1.0 mL 접종물을 나눈 후, 2개 부위에서 5 cm 떨어지게 피내 투여하였다. 부스터 예방접종은 일차 시리즈와 동일한 사지에 투여되었다.

[0111] 독성. 환자를 예방접종후 1시간에 즉각적 과민반응에 대해 관측하였다. 독성은 NCI Common Toxicity Criteria for Adverse Events, v3.0에 의해 등급을 매겼으며, 0 내지 5 등급으로 보고하였다. 이전에 유의한 (등급 2 또는 3) 국소 또는 전신 독성을 가졌던 환자들은 0.125 mg으로 감소된 용량의 GM-CSF를 수령하였다.

[0112] 부스터 용량은 매우 잘 허용되었으며 (도 6), 주로 등급 1의 국소 독성을 나타내었다 (목적하는 효과). 절반 이상의 환자가 전신적 호소증상이 없었다. 등급 3 또는 4의 독성은 없었다. 단지 1명의 환자 (4%)가 일차 시리즈 동안보다 부스터동안 높은 등급의 독성을 가졌다 (등급 2의 국소 염증).

[0113] 말초혈액단핵세포 분리 및 배양. 부스터 예방접종 전에 채혈하고, 부스터 투여 후 3 내지 4주에 채혈하여 Vacutainer CPT 튜브에서 말초혈액단핵세포를 분리하고, 림프구의 공급원으로 사용하였다.

[0114] *HLA-A2:면역글로불린 이랑체* 검정. 환자로부터 새로이 분리된 PBMC 중 $CD8^+$ E75-특이적 세포의 존재를 상기 실시예 3에 기술된 바와 같이 이랑체 검정을 이용하여 직접적으로 평가하였다. 간단히 설명하면, HLA-A2:면역글로불린 (Ig) 이랑체 (PharMingen, San Diego, CA) 1 μ g을 과량의 (5 μ g) 웨타이드 및 0.5 μ g의 β 2-마이크로글로불린 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO)과 37°C에서 밤새 항온처리한 후 사용시까지 4°C에서 저장함으로써 상기 이랑체에 E75 또는 대조군 웨타이드 (폴레이트 결합 단백질 웨타이드-E37 (25 - 33) RIAWARTEL (서열번호 5))를 로딩하였다. PBMC를 세척하고, 파르민겐 스테인 완충액 (PharMingen, San Diego, CA)에 재현탁한 후, 5 mL의 환자 폴리스티렌 튜브 (Becton Dickinson, Mountain View, CA)에 5×10^5 개 세포/100 μ l/튜브로 첨가하고, 로딩된 이랑체 및 항체로 염색하였다. 각각의 HLA-2 $^+$ 환자에서 $CD8^+$ E75-특이적 세포의 수준을 백신 부스터 투여 전 및 후에 측정하였다.

[0115] 항원 특이적 $CD8^+$ T-세포를 부스터 예방접종전 및 3 내지 4주 후 정량하였다. 유의한 잔류 면역 (SRI, 0.5% 이

상의 항원 특이적 CD8⁺ T-세포로 정의됨)이 LB 환자의 30.8% (4/13)과 비교하여 EB 환자에서는 두 그룹 모두에서 100% (6/6)로 상당히 상이하였다 ($p = 0.01$). SRI ($n = 8$)가 없는 환자들에서는 0.43% (0 - 0.49%)로부터 0.87% (0 - 2.3%; $p = 0.08$)까지 E75-특이적 CD8⁺ T-세포 (도 7)가 증가하는 경향이 있었다.

[0116] 효소-결합 면역스폿 검정. IFN-γ 생성 세포를 펫타이드와의 항온배양 직후 (생체외) 또는 7일 후 BD ELISPOT 키트를 사용하여 검출하였다. 새로운 PBMC를 IL-7을 포함하는 배지 (생체외) 또는 IL-7을 포함하는 배지 및 포함하지 않는 배지 (7일) 중에 웰 당 5×10^5 개 세포 (생체외) 또는 1×10^5 개 세포 (7일)의 농도로 ELISPOT 플레이트에 도말하였다. 세포를 펫타이드 (E37, FluM, E75, GP2, HER2/neu 1 μg 또는 5 μg)의 존재 또는 부재 하에 16시간 (생체외) 또는 7일 동안 자극하였다. 7일 웰에서의 추가의 항온배양은 E75+HER2/neu 1 μg 또는 5 μg의 배합물을 포함하였다. 충분한 세포가 이용가능한 경우, 총 16회의 검정을 각각의 혈액 샘플에 대해 수행하였다. 항온배양을 마치고 제작자의 지시에 따라 플레이트를 처리하였다. 바이오티닐화된 검출 항체를 가지고, 플레이트를 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 항온처리 후, 플레이트를 세척하였다. 아비딘-HRP 용액을 1시간 동안 가하고, AEC 기질 용액을 사용하여 스풋을 전개시켰다. 스풋을 Immunospot Series 2 분석기 및 ImmunoSpot 소프트웨어를 사용하여 계수하였다.

[0117] 모든 환자는, 단일 채혈로부터의 PBMC의 입수가능성에 따라, 16회 이하의 상이한 검정으로 부스터 예방접종전 및 후에 정량화되는 IFN-γ 생성 세포를 가졌다. 22명의 환자는 적어도 하나의 짹지은 (paired) 부스터전 및 부스터후 ELISPOT 검정 (중앙 10회 검정/환자, 범위: 1 - 14)을 가졌다. 이들 환자들에서 부스터전 255회의 총 검정이 있었으며, 이중 54.5%가 검출가능한 IFN-γ 생성을 보였다. 194회의 쌍을 이룬 검정에서 (동일한 펫타이드 농도를 갖는 동일한 환자로부터의 부스터전 및 부스터후 샘플), 78 (40.2%)는 부스터로 증가된 IFN-γ 생성 세포를 나타내었다. 모두 합해서, 20/22 (91%)의 환자가 하나 이상의 검정에서 증가된 IFN-γ 생성 세포를 나타내었으며, 11 (50%)은 적어도 50%의 검정에서 증가된 IFN-γ 생성 세포를 나타내었다. 결과가 도 8에 나타나 있다.

[0118] 국소 반응. 국소 반응 (LR)은 반응에 대한 생체내 기능 평가로서 측정하였다. LR은 예방접종후 48 내지 72시간에 두 방향으로 측정하였으며 감응성 볼 포인트 방법을 이용하여 직교 평균 ± SE로 보고하였다. LR을 환자 자신의 이전 LR과 비교하여 부스터에 대한 반응을 평가하였다.

[0119] 일차 시리즈로부터 9개월 이하에 부스터를 수령한 환자 ($n = 12$)는 일차 시리즈로부터 9개월을 초과하여 부스터를 수령한 환자 ($n = 13$) (79 ± 4 mm, $p = 0.01$)에 비해 상당히 큰 LR (103 ± 7 mm)을 가졌다. 일차 시리즈의 말에 두 그룹을 비교하는 경우, 두 그룹간에는 차이가 없었다 (9 이하, 81 ± 5 mm; 9개월 초과, 85 ± 8 mm, $p = 0.73$). 결과가 도 9 및 10에 나타나 있다.

[0120] 통계학적 분석. HLA:IgG 이량체 값은 중앙값으로 보고하였으며, P 값은 윌콘슨 시험을 이용하여 계산하였다. 균형잡힌 비교를 위해, 피셔 정확도 시험을 이용하였다. 국소 반응의 비교는 필요한 경우 짹을 이루거나 짹을 이루지 않은 스튜던트 t-시험으로 수행하였다.

0121] 실시예 7

HER2/neu 발현 수준에 대한 HER2/neu (E75) 펫타이드 백신 반응

[0123] 임상 시험을 결절-양성 및 결절-음성 BCa 환자에서 HER2/neu E75-펩타이드 백신으로 수행하였다. 이들 환자는 모든 수준의 HER2/neu 발현으로 구성된다. HER2/neu 상태의 결정은 주로 2가지 시험, 면역조직화학법 (IHC) 및 형광 동소 하이브리드화 (FISH)를 통해 수행하였다. IHC는 HER2/neu 단백질의 과발현을 검출하며, 0 내지 3+ (0 = 음성, 1+ = 저발현, 2+ = 중간 발현, 3+ = 과발현)의 준-정량적 스케일로 보고된다. 다른 한편, FISH는 HER2/neu 유전자의 증폭 (과다 카피)을 검출하며, HER2/neu 대 염색체 17의 비율로서 표현되고, FISH가 2.0 카피를 초과하는 경우 과발현으로 해석된다. IHC 및 FISH의 동시발생 비율은 약 90%이다.

재료 및 방법:

[0125] 서브세트 분석을 HER2/neu 발현 수준에 기초하여 제II상 E75 백신 시험에 등록된 163명의 BCa 환자로 수행하였다. 환자들을 저발현자 (LE = IHC 1+ - 2+ 및 FISH > 0, 단 < 2.0) 대 과발현자 (OE = IHC 3+ 및/또는 FISH > 2.0)로 평가했으며, IHC 상태 (0, 1+, 2+, 3+)로 평가하였다. 분석은 표준 임상병리학적 인자, 백신에 대한 면역학적 반응 (생체내 DTH 반응 및 시험관내 HLA-A2:IgG 이량체 검정) 및 임상 반응 (절대 재발 및 사망률)에 대해 수행되었다.

- [0126] 환자 특징 및 임상 프로토콜: E75 NP 및 NN 시험은 Institutional Review Boards에 의해 승인되었으며, 조사 신약 적용 (BB-IND#9187) 하에 Walter Reed Army Medical Center (Washington, DC) 및 Joyce Murtha Breast Care Center (Windber, PA)에서 수행되었다. 모든 환자는 BCa로 조직학적으로 확인되었으며, 등록 전 수술, 화학 요법 및 방사선 요법 (필요시)의 표준 절차를 완결하였다. 호르몬 요법의 환자는 이들의 특별한 요법을 계속 수행하였다. BCa 환자는 적합한 상담 및 동의 후 적합한 시험 (NP 또는 NN)에 등록하였으며, E75가 일반적인 집단의 약 40 내지 50%에서 발견되는 HLA-A2에 일차적으로 결합하므로 HLA 유형화하였다. HLA-A2⁺ 환자를 예방접종하였으며, HLA-A2⁻ 환자는 임상 재발의 가망성에 대해 관측되었다. 이어서, HLA-A3⁺ 환자를 예방접종하였다. 예방접종하기 전에, 환자들을 일단의 리콜 항원으로 피부 시험을 하였다 (Mantoux 시험). 환자가 2개 초과의 항원에 대해 반응하는 경우 (>5 mm) 면역적격인 것으로 간주되었다.
- [0127] 백신: E75 웨타이드는 NeoMPS, Inc. (San Diego, CA)에 의해 우수한 제조 실시 등급으로 상업적으로 생산되었다. 웨타이드 순도 (>95%)는 고성능 액체 크로마토그래피 및 질량 분광법으로 증명되었다. 멸균 및 일반적 안전성 시험은 제작자에 의해 수행되었다. 동결건조된 웨타이드를 멸균 식염수 0.5 ml에 100 µg, 500 µg 또는 1000 µg으로 재구성하였다. 웨타이드를 0.5 ml 중의 GM-CSF (Berlex, Seattle, WA)와 혼합하였다. 1.0 ml의 접종물을 분할한 후, 동일한 사지에서 5 cm 떨어지도록 2개의 위치에서 피내 투여하였다.
- [0128] 예방접종 시리즈: NP 시험은 초기 단계에서 웨타이드의 용량을 상승시키고 후기 단계에서 스케줄을 변화시키는 2 단계 안전성 시험으로서 디자인되었다. 백신 시리즈의 세부 사항은 이미 공개되어 있다. 간단히 설명하면, 100 µg, 500 µg 또는 1000 µg의 E75가 4회 또는 6회 월간 주사되도록 3 내지 6명의 환자가 각각 배정되었다 (각각 100:6, 500:4, 500:6, 1000:4 및 1000:6). NP 환자들에서 최적 용량을 결정하고 확인하기 위해 그룹들을 궁극적으로 증대시켜 후기 용량 그룹의 환자의 숫자가 보다 커졌다.
- [0129] NN 시험은 GM-CSF의 용량을 변화시키고 접종 스케줄을 변화시킴으로써 최적의 생물학적 용량을 더욱 조율하고자 디자인되었다. HER2/neu IHC 0 종양을 갖는 12명의 환자는 이번 시험에서 아마도 항원을 접촉한 적이 없는 숙주를 예방접종하는 것에 대한 실행가능성을 측정하기 위해 허용되었다. 10명의 환자가 변화하는 GM-CSF 용량 (125 µg 또는 250 µg)과 함께 500 µg의 일정한 E75 웨타이드가 3회, 4회 또는 6회의 월간 주사되는 각각의 용량 그룹에 배정되었다.
- [0130] 독성: 환자에 대한 즉각적인 과민반응을 조사하기 위해 예방접종한 지 1시간 후 관측하고, 48 내지 72시간 후 주사 부위를 측정하여 독성을 조사하였다. 독성은 NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0에 의해 등급을 매겼으며, 0 내지 5의 스케일로 보고하였다. 보다 낮은 용량 그룹에서 유의한 독성이 나타나지 않는 경우에만 하나의 용량 그룹으로부터 다음 용량 그룹으로 진행하였다. 환자-특이적 결과를 시리즈 동안 발생하는 최대 국소 독성 및 전신 독성에 기초하여 보고하였다.
- [0131] 말초혈액단핵세포 (PBMC) 분리 및 배양: 각각의 예방접종 전 및 백신 시리즈를 마친지 1개월 후 (백신 후 : post-vaccine) 및 6개월 후 (장기간: long-term) 채혈하였다. 50 ml의 혈액을 채혈하고, PBMC를 분리시켰다. 전술된 바와 같이 PBMC를 세척하고, 배양 배지에 재현탁시킨 후, 럼프구의 공급원으로서 사용하였다.
- [0132] HLA-A2:면역글로불린 이량체 검정: 환자로부터 새로이 분리된 PBMC 중 CD8⁺ E75-특이적 세포의 존재를 전술된 바와 같이 이량체 검정을 이용하여 직접적으로 평가하였다. 간단히 설명하면, HLA-A2:면역글로불린 (Ig) 이량체 (PharMingen, San Diego, CA) 1 µg을 과량의 (5 µg) 웨타이드 및 0.5 µg의 β2-마이크로글로불린 (Sigma, St. Louis, MO)과 37°C에서 밤새 항온처리한 후 사용시까지 4°C에서 저장함으로써 상기 이량체에 E75 또는 대조군 웨타이드 (E37, 폴레이트 결합 단백질 (25 - 33) RIAWARTEL (서열번호 5))를 로딩하였다. PBMC를 세척하고, 파르민겐 스테인 완충액 (PharMingen)에 재현탁한 후, 5 ml의 환자 폴리스티렌 튜브 (Becton Dickinson, Mountain View, CA)에 5×10^5 개 세포/100 µl/튜브로 첨가하고, 로딩된 이량체 및 항체로 염색하였다. 각각의 환자에서 각각의 연속적인 예방접종에 반응한 CD8⁺ E75-특이적 세포의 수준을 측정하고, 접종후 평균 수준을 접종전 수준과 비교하였다.
- [0133] 자연성 과민반응 (DTH): 두 시험 모두에서, DTH 반응은 이전에 기술된 바와 같이 백신 시리즈를 마친지 1개월 후 0.5 ml의 생리식염수 (GM-CSF 부재) 중의 100 µg의 E75 및 용적 대조군으로서 0.5 ml의 생리식염수로 평가하였다. DTH 반응을 감응성 볼펜 방법을 이용하여 48 내지 72시간에 2차원으로 측정하고, 직교 평균으로 보고하며, 대조군과 비교하였다. NN 시험에서, 또한 DTH를 예방접종전에 수행하였다.

- [0134] **임상 재발:** 모든 환자들을 이들의 일차 암연구자들에 의해 처방되는 바와 같이 관심 대상의 암 스크리닝의 표준 물에 대한 임상 재발에 대해 관측하였다. 환자는 생검으로 입증되거나 일차 암연구 팀에 의해 재발이 치료되는 경우 재발로 간주되었다.
- [0135] **통계학적 분석:** 재발률은 카플란-메이어 방법에 의한 생존 분석을 이용하여 그룹들간을 비교하였으며, 재발된 대상체의 비율을 로그-랭크 분석을 이용하여 비교하였다. 임상-병리 인자에 대한 P 값을 필요에 따라 월록슨, 피셔 정확 시험 또는 χ^2 를 이용하여 계산하였다. 예방접종전 및 예방접종후 이량체 수준을 비교하는 P 값 및 DTH를 짹을 이루거나 (paired) 짹을 이루지 않은 (unpaired) 투-테일드 스튜던트 t-시험 (two-tailed Student t-test)을 이용하여 계산하였다.
- [0136] **결과:**
- [0137] LE (대조군 = 44, 백신 = 56) 대 OE 환자 (대조군 = 22, 백신 = 29) 및 IHC 상태 대조군 및 백신 그룹 (각각 0 = 5 대 7, 1+ 15 대 25, 2+ 24 대 26, 3+ 13 대 19)을 평가하였다. LE 대 OE 및 모든 IHC 상태의 예방접종된 그룹 모두 면역학적으로 반응하였으나, LE 환자 및 보다 구체적으로 IHC 1+ 환자는 증가된 장기간 시험관내 면역 반응 (각각 p = 0.04 및 p = 0.08)을 가졌다. 또한, 대조군과 비교하여 LE 환자는 사망률이 감소하는 경향이 있고 IHC 1+ 환자는 사망률이 감소하였다 (각각 p = 0.08 및 p = 0.04).
- [0138] **환자:** 186명의 환자를 E75 백신 조사에 등록하였다: 9명은 철회하였으므로 (4명은 대조군 환자, 5명은 예방접종된 환자, 독성 때문에 철회한 환자는 없음), 177명이 시험을 마쳤다. NP 시험의 모든 대조군 (C) 및 예방접종 (V) 환자 (C = 46, V = 45, 총 = 91명 환자)에 대해 IHC, FISH 또는 이둘 모두를 수행하였다. NN 시험에서 (C = 35, V = 51, 총 = 86명의 환자), 12명의 환자가 HER2/neu IHC 0 종양을 가졌다 (C = 5, V = 7). 또한, NN 시험에서, 14명의 환자 (C = 7, V = 7)의 종양은 IHC 또는 FISH를 수행하지 않았다 - 이들 14명의 환자는 서브 세트 분석으로부터 제외되었다; 따라서, 163명의 환자가 분석될 수 있었다.
- [0139] **LE 대 OE 서브세트 분석:**
- [0140] **발현에 대한 환자:** LE (IHC 1+ - 2+ 또는 FISH > 0 및 < 2.0) 대 OE (IHC 3+ 또는 FISH > 2.0)를 비교하는 서브 세트 분석을 수행하였다. 대조군의 66명의 환자에 대해 IHC 또는 FISH를 수행하였다 (LE = 44, OE = 22). E75 백신 그룹의 총 85명의 환자에 대해 IHC 또는 FISH를 수행하였다 (LE = 56, OE = 29). LE (각각 67% 대 66%) 및 OE 그룹 (각각 33% 대 34%)에 필적하는 수의 C 및 V 환자가 있었다.
- [0141] LE 대 OE 환자의 인구 통계학, 예후 인자 및 치료 프로파일이 표 4에 나타나 있다. LE 환자에 대해, C 및 V 환자간에는 통계학적 차이가 주목되지 않았다. OE 환자에 대해서는, 통계학적으로 큰 수의 V 환자가 C 그룹에서 보다 호르몬 수용체 음성이었다 (p = 0.02) (표 4).

표 4

LE 대 OE에 의한 E75 제II상 시험에 등록된 환자들의
인구통계학, 예후 인자 및 치료 프로필

| | LE 대조군 (n = 44) | LE 백신 (n = 56) | P | OE 대조군 (n = 22) | OE 백신 (n = 29) | P |
|--------------------|--------------------------|----------------------|-----|-----------------------|----------------------|--------------|
| 연령 중앙값(세) 범위(세) | 55 31-82 | 56 27-77 | 0.7 | 50 32-75 | 52 37-68 | 0.1 |
| 인종 | | | | | | |
| 백인, % | 86.4% | 89.3% | 0.8 | 72.7% | 86.2% | 0.3 |
| 기타, % | 13.6% | 10.7% | 0.8 | 27.3% | 13.8% | 0.3 |
| 종양 크기 | | | | | | |
| T2-T4, % | 38.6% | 33.9% | 0.7 | 31.8% | 34.5% | 0.9 |
| 조직학적 등급 | | | | | | |
| 등급 III, % | 27.2% | 30.4% | 0.8 | 63.6% | 62.1% | 0.9 |
| 결절 양성(NP), % | 54.5% | 58.9% | 0.7 | 90.1% | 55.2% | 0.06 |
| 호르몬 수용체 -, % | 15.9% | 19.6% | 0.8 | 27.3% | 62.1% | 0.02* |
| 화학요법, % | 72.7% | 75.0% | 0.8 | 86.4% | 96.6% | 0.3 |
| XRT, % | 84.1% | 75.0% | 0.3 | 72.7% | 75.9% | NS |
| 호르몬 요법, % | 81.8% | 76.8% | 0.6 | 63.6% | 41.4% | 0.2 |
| 헤르셉틴, % | 0.2% | 0.2% | NS | 9.1% | 24.1% | 0.3 |

*통계학적으로 유의한 차이.

[0142]

[0143] 발현에 대한 면역학적 반응: E75 백신은 LE 및 OE 환자 모두에서 시험관내 면역 반응을 유도할 수 있었다. 백신 전 (pre-vaccine)부터 최대 (max) E75-특이적 CD8⁺ T 세포까지의 유의한 증가가 두 그룹 모두에서 주목되었다 (LE p < 0.001, OE p < 0.001). LE 환자는 OE 환자와 비교하여 통계학적으로 보다 높은 최대 면역 반응을 가졌다 (p = 0.04) (도 11A).

[0144]

LE 및 OE 환자 모두, 예방접종전 및 후에 DTH를 통해 측정시, 생체내 면역 반응을 유도할 수 있었다. 유의한 전-후 (pre-post) DTH 증가가 두 카테고리 모두에서 주목되었다 (LE p < 0.001, OE p = 0.02) (도 11B). 비록 LE의 예방접종후 DTH (LE post-DTH)가 OE의 예방접종후 DTH (OE post-DTH)보다 크지만 (각각 15.9 + 1.9 mm 대 12.8 + 2.0 mm), 통계학적 유의성은 없다 (p = 0.5). 종합적으로, E75 백신은 LE 환자에서 보다 면역학적으로 활성인 것으로 보인다.

[0145]

[0145] 발현에 대한 임상 반응: 재발 및 사망률로 평가되는 임상 반응이 도 11C 및 11D에서 주목된다. 모든 V 환자 (LE = 10.7% 대 OE = 13.8%)는 C 환자 (LE & OE = 18.2%)와 비교하는 경우 감소된 재발을 갖는 것으로 보였으나, 이러한 수치는 통계학적으로 유의하지 않았다. 보다 중요하게도, V 환자에서 사망률이 감소되는 경향이 있었으며, LE 환자에서 가장 강하게 나타났다 (C = 6.8% 대 V = 0.0%; p = 0.08).

[0146]

IHC 상태 서브세트 분석:

[0147]

IHC 상태에 대한 환자: C 그룹은 IHC를 받은 57명의 환자의 병리 피검자를 가졌다 (0 = 5, 1+ = 15, 2+ = 24, 3+ = 13). E75 V 그룹은 IHC를 받은 77명의 환자의 병리 피검자를 가졌다 (0 = 7, 1+ = 25, 2+ = 26, 3+ = 19). 필적하는 비율 (%)의 C 및 V 환자가 각각의 IHC 그룹에 있었다 (0 C = 8.8% 대 V = 9.1%; 1+ C = 26.3% 대 V = 32.5%, 2+ C = 42.1% 대 V = 33.8%, 3+ C = 22.8% 대 V = 24.7%).

[0148]

IHC 상태에 대한 인구 통계학, 예후 인자 및 치료 프로파일이 표 5에 나타나 있다. IHC 상태 그룹에 대한 예후 인자에 있어 2가지의 유의한 차이가 있었다. IHC 1+ 환자는 V 그룹과 비교하여 C 그룹에서 보다 큰 비율 (%)의 T2-T4 종양을 가졌다 (66.7% 대 30.8%, p = 0.05). IHC 3+ C 환자는 모두 NP였으며, V 환자의 42.1%가 NP였다 (p = 0.003).

표 5

| | 0 대조군 (n=5) | 1+ 백신 (n=7) | 1+ 대조군 (n=15) | 2+ 대조군 (n=24) | 2+ 백신 (n=26) | 3+ 대조군 (n=13) | 3+ 백신 (n=19) | P |
|---------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|
| 연령 중앙값 (세) | 50 | 60 | 54 | 54 | 50 | 49 | 51 | 0.2 |
| 별위 (세) | 38.74 | 31.74 | 0.4 | 44.82 | 42.71 | 0.4 | 31.75 | 27.77 |
| 인종 | | | | | | | | |
| 백인, % | 100.0% | 71.4% | 0.5 | 73.3% | 84.0% | 0.4 | 87.5% | 92.3% |
| 기타, % | 0.0% | 28.6% | NS | 26.7% | 16.0% | NS | 12.5% | 7.7% |
| 총암 그룹 | | | | | | | | |
| T2-T4, % | 40.0% | 14.3% | 0.5 | 66.7% | 28.0% | 0.05* | 29.2% | 46.2% |
| 조직학적 등급 | | | | | | | | |
| 등급 III, % | 20.0% | 14.3% | 0.6 | 33.3% | 36.0% | 0.7 | 37.5% | 38.5% |
| 결절 양성 (NP), % | 0.0% | 0.0% | NS | 80.0% | 60.0% | 0.3 | 79.2% | 80.8% |
| 호르몬 수용체 -, % | 20.0% | 14.3% | 0.6 | 13.3% | 28.0% | 0.4 | 16.7% | 11.5% |
| 체적 요법, % | 80.0% | 42.9% | 0.3 | 80.0% | 76.0% | 0.9 | 87.5% | 96.2% |
| XRT, % | 100.0% | 42.9% | 0.08 | 66.7% | 76.0% | 0.7 | 87.5% | 96.2% |
| 호르몬 요법, % | 80.0% | 85.7% | 0.6 | 80.0% | 72.0% | 0.9 | 79.2% | 73.1% |
| 체르셉틴, % | 0.0% | 0.0% | NS | 0.0% | 0.0% | NS | 8.3% | 7.7% |

* 통계학적으로 유의한 차이

[0149]

IHC 상태에 대한 면역학적 반응: E75 백신은 모든 IHC 카테고리에서 시험관내 면역 반응을 유도할 수 있었다. 모든 IHC 그룹 (0, 1+, 2+, 3+)은 백신 전 (pre-vaccine)부터 최대 (max) E75-특이적 CD8⁺ T 세포까지의 유의한 증가에 의해 주목되는 바와 같이 백신에 반응하였다 (0 p = 0.007, 1+ p < 0.001, 2+ p = 0.004, 3+ p = 0.002). 오로지 IHC 1+ 환자만이 E75-특이적 CD8⁺ T 세포에 있어 유의한 전 내지 장기간 (pre to long-term) 증가 경향이 있었다 (p = 0.08) (도 12A).

[0150]

또한, 모든 환자들이, 예방접종전 및 예방접종후 DTH를 통해 측정시, 생체내 면역 반응을 유도할 수 있었다.

유의한 전-후 DTH 증가가 모든 IHC 카테고리에서 주목되었다 (0 p = 0.03, 1+ p = 0.02, 2+ p = 0.02, 3+ p = 0.05). 종합적으로, IHC에 의해 측정되는 HER2/neu 발현과 무관하게, 백신은 면역학적으로 효과적이었으나, IHC 1+ 환자에서 가장 효과적인 것으로 보인다 (도 12B).

[0151]

IHC 상태에 대한 임상 반응: 재발 및 사망률로 평가되는 임상 반응이 도 12C 및 12D에서 주목된다. 모든 IHC 카테고리에서 (단 환자가 재발되지 않는 IHC 0은 제외), C 및 V 환자를 비교하는 경우, 비록 그 수치는 통계학적으로 유의하지 않으나, 재발률이 감소되었다. 보다 중요하게도, IHC 1+ 환자에서 사망률이 유의하게 감소되

[0152]

IHC 상태에 대한 임상 반응: 재발 및 사망률로 평가되는 임상 반응이 도 12C 및 12D에서 주목된다. 모든 IHC 카테고리에서 (단 환자가 재발되지 않는 IHC 0은 제외), C 및 V 환자를 비교하는 경우, 비록 그 수치는 통계학적으로 유의하지 않으나, 재발률이 감소되었다. 보다 중요하게도, IHC 1+ 환자에서 사망률이 유의하게 감소되

었다 ($C = 20\%$ 및 $V = 0\%$ 사망률) ($p = 0.04$).

[0153] 이전의 제II상 시험에서, E75 백신의 투여로 재발률이 감소되었으며, 20개월에서의 사망률이 감소하는 경향이 있었으나, 부스터의 사용 없이 면역이 감소됨에 따라 이러한 차이는 유의성을 상실하였다. 모든 수준의 HER2/neu 발현을 갖는 환자들은 백신에 대해 면역학적으로 반응하였으나, LE (및 특히 IHC 1+) 환자가 보다 활발한 면역학적 반응을 갖고 감소되는 사망률과 함께 가장 큰 임상적 이점을 유도하는 것으로 나타났다. 또한, 항원을 접촉한 적이 없는 환자가 백신에 면역학적으로 잘 반응하는 것으로 나타났다.

[0154] 본원에서 물리적 특성, 예를 들어 문자량 또는 화학적 특성, 예를 들어 화학식에 대해 범위가 사용되는 경우, 특정 양상들의 모든 조합 및 서브조합을 포함시키고자 한다.

[0155] 본원에서 인용되는 모든 공개문 및 특허원은, 각각의 개별 공개문 또는 특허원이 다목적으로 참조로 삽입시키고자 특정하게 개별적으로 지시되는 바와 같이, 다목적으로 전부 참조로 본원에 삽입된다.

[0156] 비록 앞서의 기술이 본 발명의 이해를 분명히 하고자 설명 및 예시로서 다소 상세히 기술되었지만, 당업자라면 본 발명의 교시에 비추어 볼 때 첨부된 특허청구범위의 취지 또는 범위를 벗어남이 없이 이에 특정 변화 및 변경이 가능할 수 있다는 것을 쉽게 서열 목록

[0157] 서열번호 1 (HER2/neu 아미노산 서열)

```
MKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTLYLPTNASLSFL-
QDIQEVGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNNTPVGTA
SPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLLIDTNRSR
ACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPK
HSDCLACLHFHNHSIGICEHLCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLST
DVGSCTLVCPLHNQEVTAEDEGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEF
AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDL
SVFQNLQVIRGRILHNGAYSITLQGLGISWLGLRSIRELGSGLALIHHTHLCFVHTV
PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPQTQCVNCSQFLRGQ
ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFC
VARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSI
ISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQM
RILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDE
AYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENGRGLGSQDLLNWCMQ
IAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLIDETEYHADGGKVI
KWMALESILRRRFTHQSDVWSYGTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQP
PICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDS
TFYRSLLEDDDMGDLVDAEYLVQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLT
LGLEPSEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGLGMAAKGLQSLPTHDPSPQLRYSEDPTV
PLPSETDGYVAPLTCSQPPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPG
KNGVVKDVFAFGAVENPEYLTPQGGAAPQHPPPSPAFSPAFDNLYWDQDPPERGAPP
```

[0158] *

[0159] 서열번호 2 (E75 웹타이드)

[0160] KIFGSLAFL

[0161] 서열번호 3

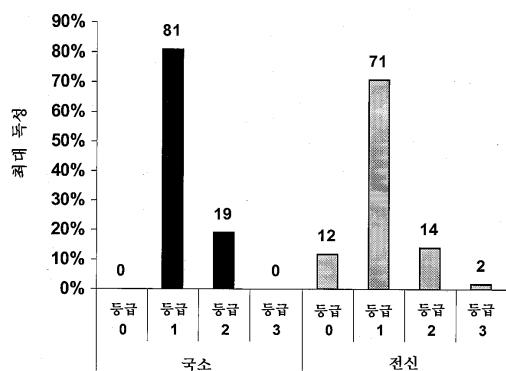
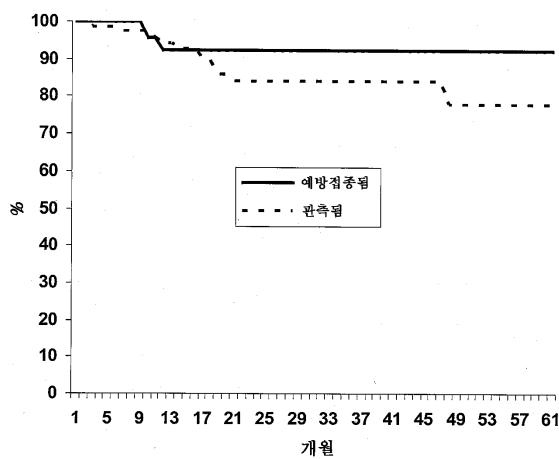
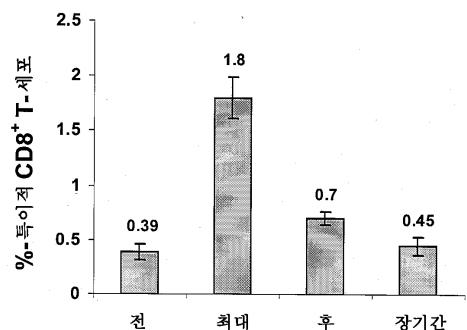
[0162] BIMAS

[0163] 서열번호 4

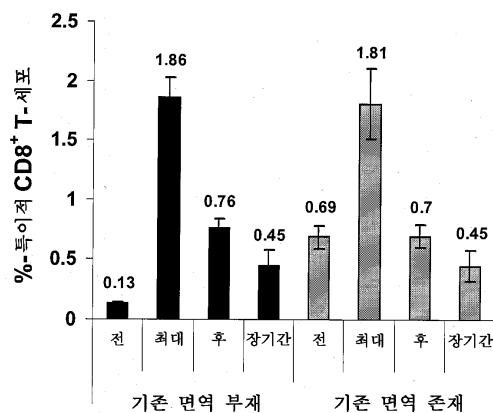
[0164] SYFPEITHI

[0165] 서열번호 5

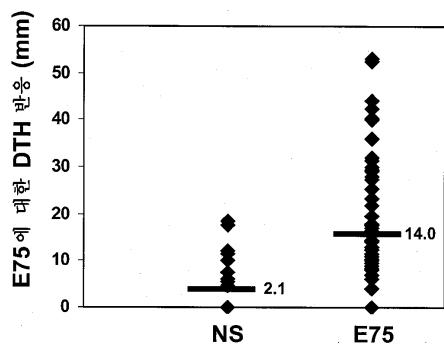
[0166] RIAWARTEL

도면**도면1****도면2****도면3a**

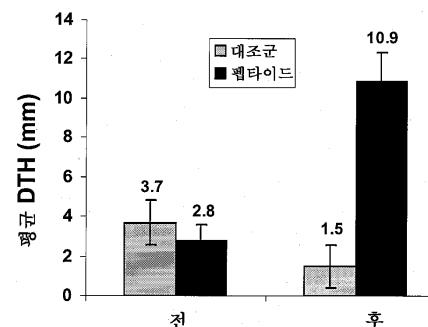
도면3b



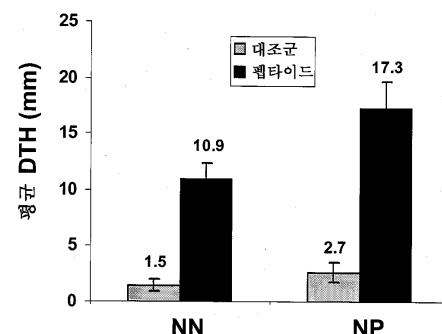
도면4a



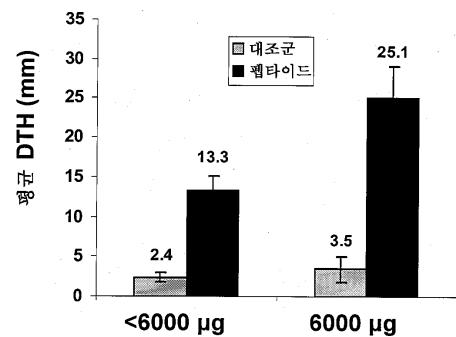
도면4b



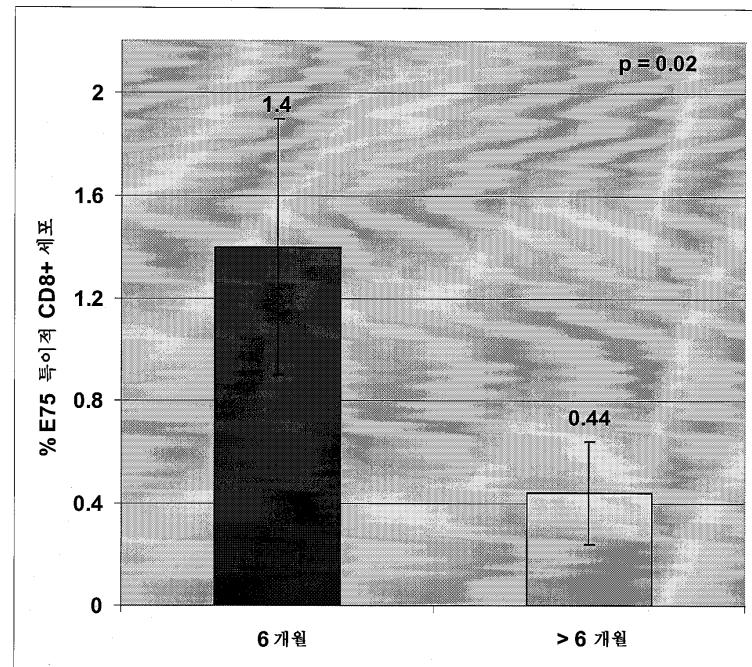
도면4c



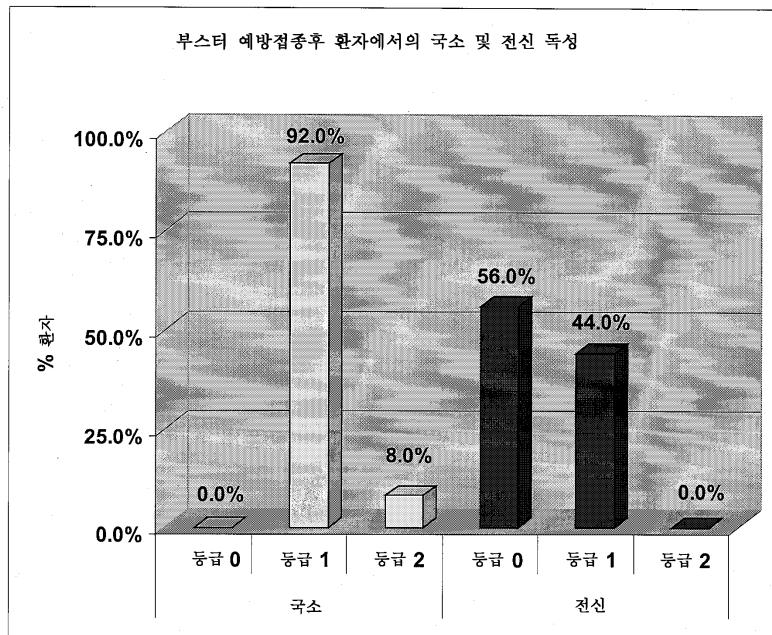
도면4d



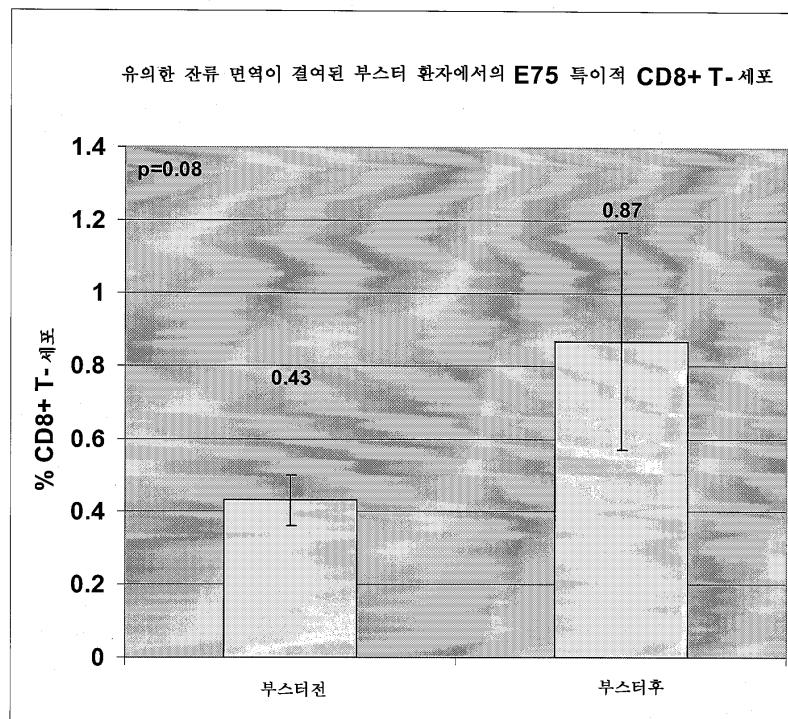
도면5



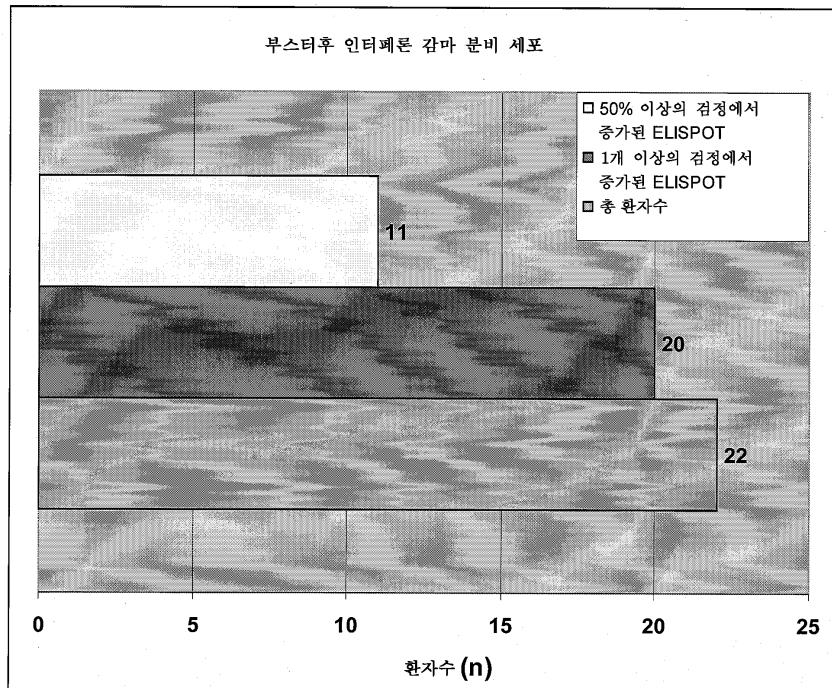
도면6



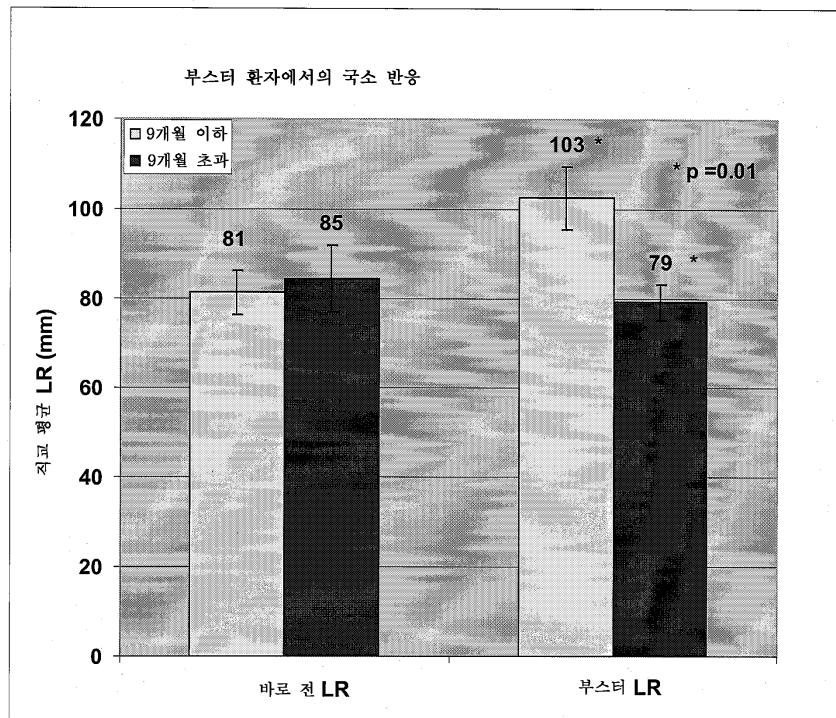
도면7



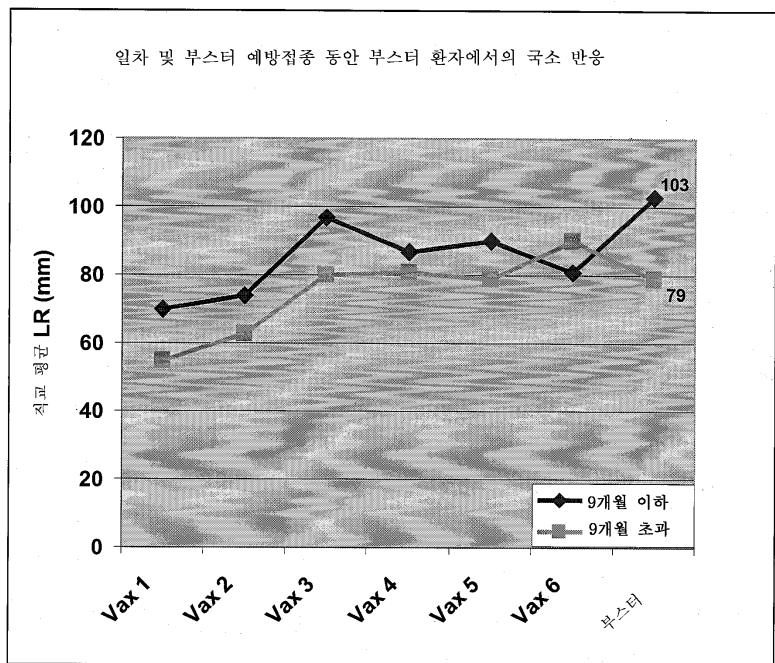
도면8



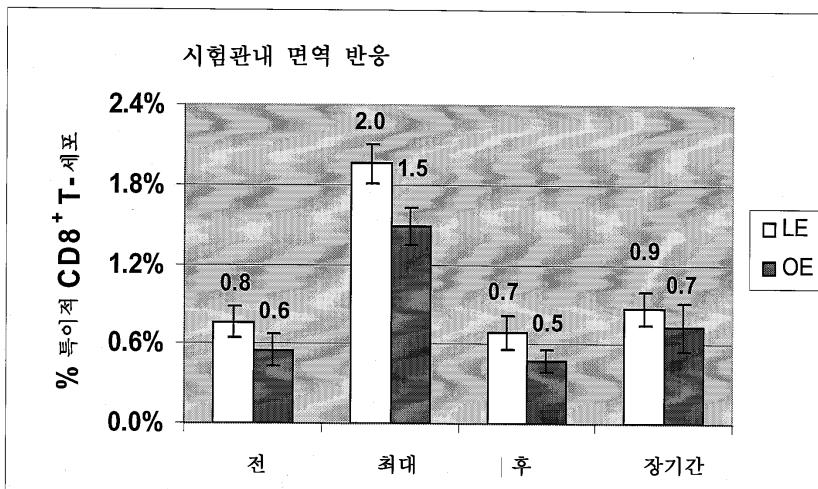
도면9



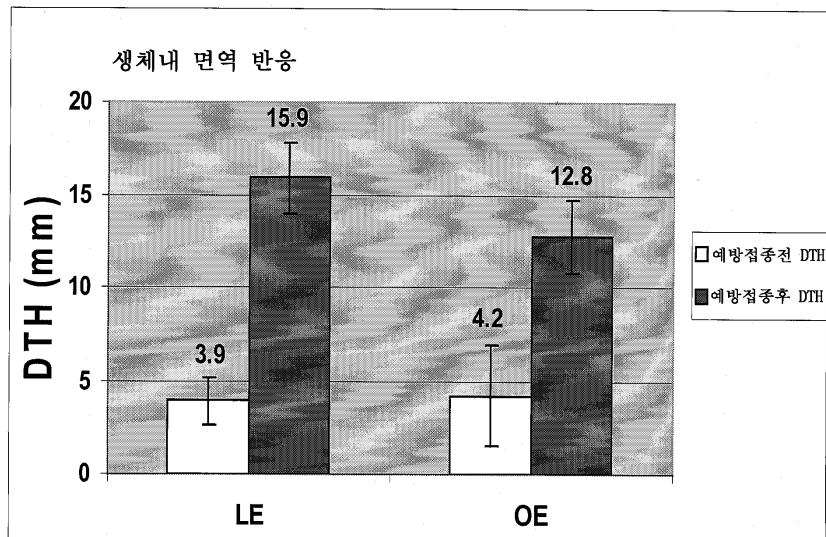
도면10



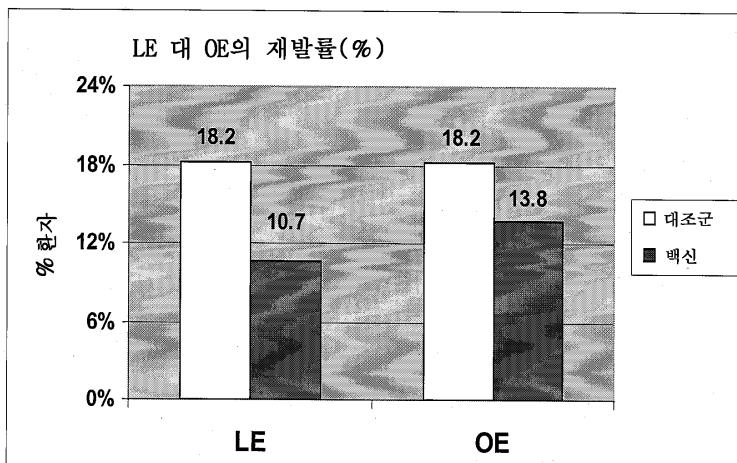
도면11a



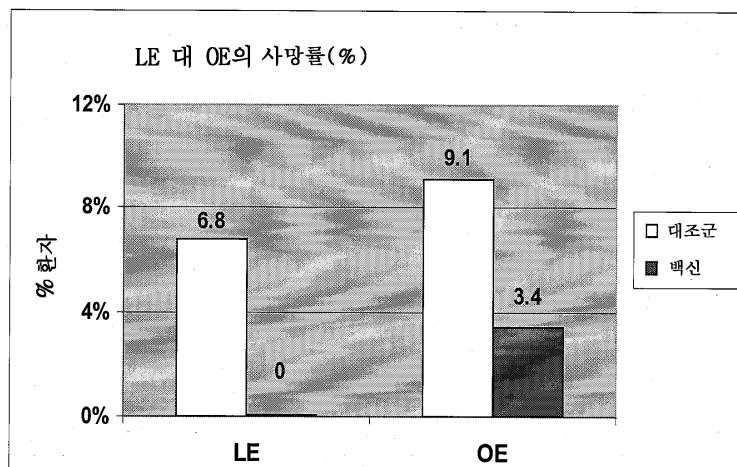
도면11b



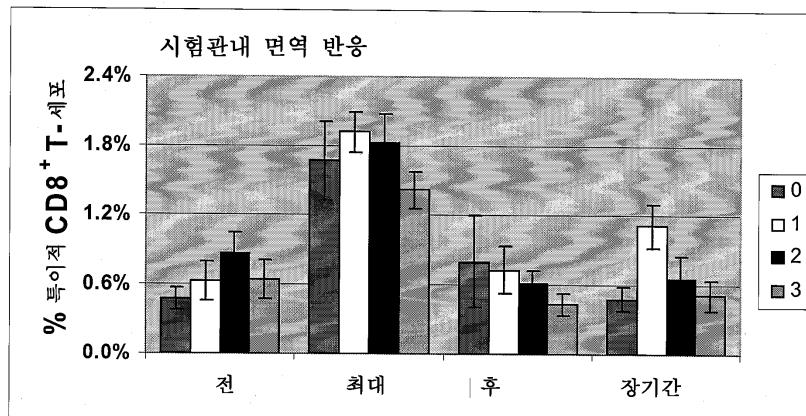
도면11c



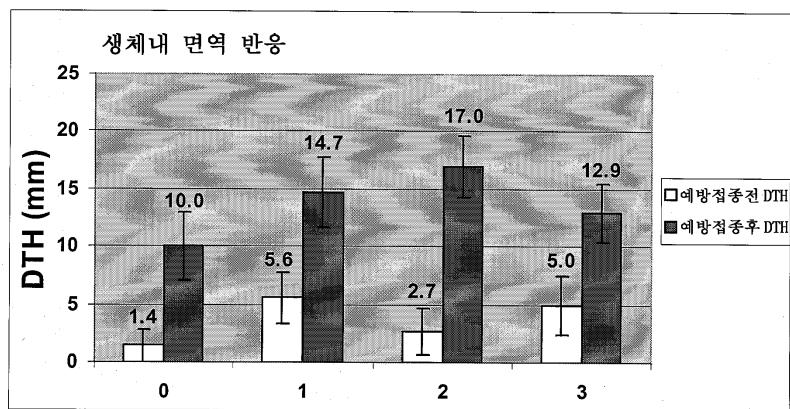
도면11d



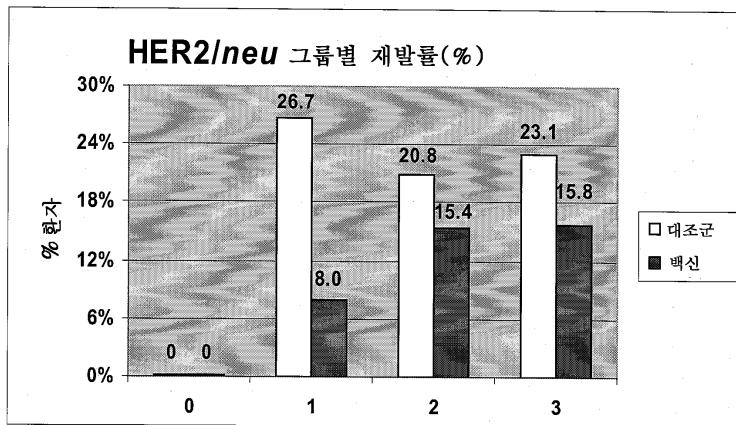
도면12a



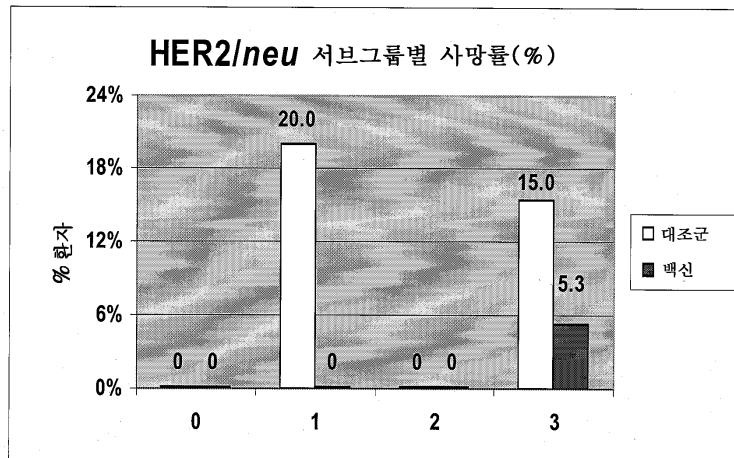
도면12b



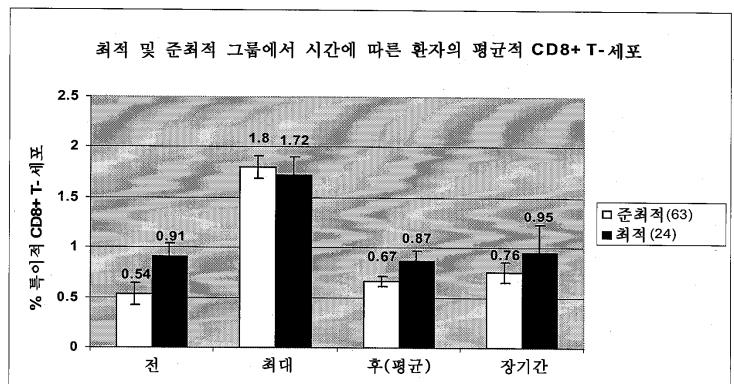
도면12c



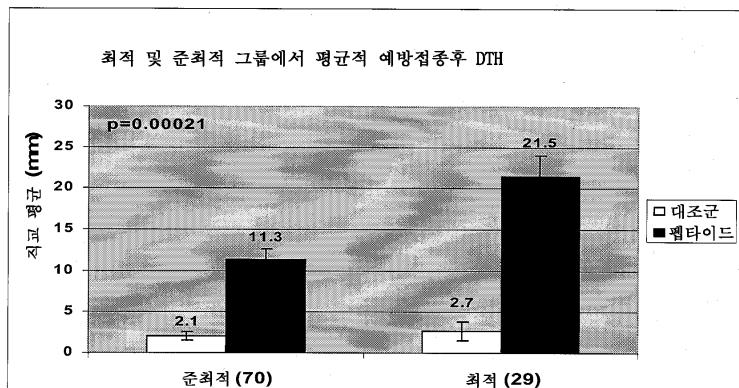
도면12d



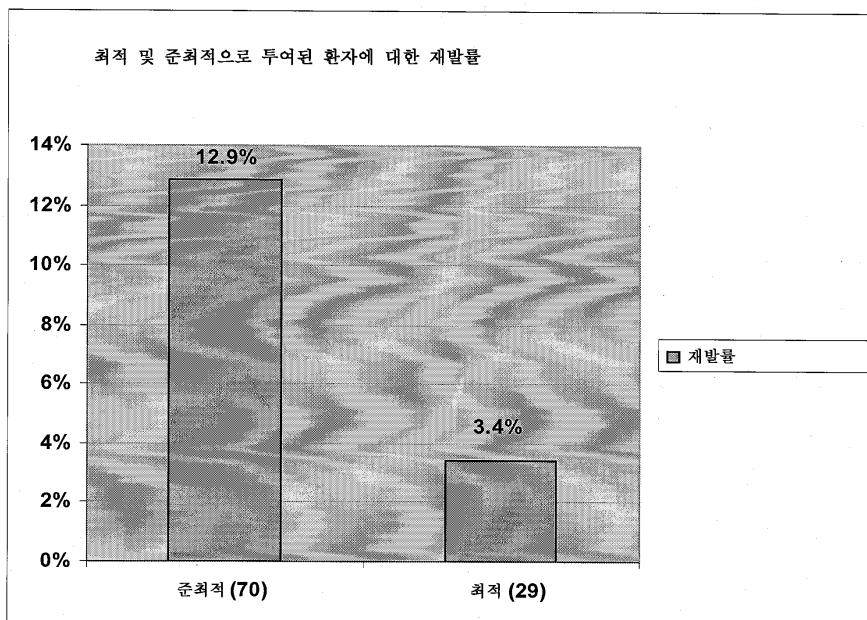
도면13a



도면13b



도면14



서 열 목 록

<110> The Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine, Inc.

<120> Vaccine for the prevention of breast cancer relapse

<130> HMJF-0009

<150> US 60/941,524

<151> 2007-06-01

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 1

Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu

1 5 10 15

Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu

20 25 30

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln

35 40 45

Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val

50 55 60

Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp

65 70 75 80

Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr

85 90 95

Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu

100 105 110

Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn

115 120 125

Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His

130 135 140

Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg

145 150 155 160

Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly

165 170 175

Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly

180 185 190

Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu

195 200 205

Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala

210 215 220

Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala

225 230 235 240

Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu

245 250 255

Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn

260 265 270

Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His

275 280 285

Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys
 290 295 300
 Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu
 305 310 315 320
 Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly
 325 330 335
 Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp
 340 345 350
 Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln
 355 360 365
 Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala
 370 375 380
 Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val
 385 390 395 400
 Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
 405 410 415
 Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly
 420 425 430
 Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His
 435 440 445
 Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu
 450 455 460
 His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala
 465 470 475 480
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr
 485 490 495
 Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu
 500 505 510
 Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg
 515 520 525
 His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val

| | | |
|---|-----|-----|
| 530 | 535 | 540 |
| Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro | | |
| 565 | 570 | 575 |
| Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala | | |
| 580 | 585 | 590 |
| Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp | | |
| 595 | 600 | 605 |
| Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile | | |
| 610 | 615 | 620 |
| Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val | | |
| 625 | 630 | 635 |
| Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr | | |
| 645 | 650 | 655 |
| Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro | | |
| 660 | 665 | 670 |
| Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr | | |
| 675 | 680 | 685 |
| Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val | | |
| 690 | 695 | 700 |
| Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val | | |
| 705 | 710 | 715 |
| Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu | | |
| 725 | 730 | 735 |
| Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val | | |
| 740 | 745 | 750 |
| Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr | | |
| 755 | 760 | 765 |
| Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg | | |
| 770 | 775 | 780 |

Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala

785 790 795 800

Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu

805 810 815

Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr

820 825 830

Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His

835 840 845

Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile

850 855 860

Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val

865 870 875 880

Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile

885 890 895

Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro

900 905 910

Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys

915 920 925

Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser

930 935 940

Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln

945 950 955 960

Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg

965 970 975

Ser Leu Leu Glu Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu

980 985 990

Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu

| | | |
|---|------|------|
| 1025 | 1030 | 1035 |
| Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser | | |
| 1040 | 1045 | 1050 |
| Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu | | |
| 1055 | 1060 | 1065 |
| Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser | | |
| 1070 | 1075 | 1080 |
| Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val | | |
| 1085 | 1090 | 1095 |
| Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro | | |
| 1100 | 1105 | 1110 |
| Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro | | |
| 1115 | 1120 | 1125 |
| Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu | | |
| 1130 | 1135 | 1140 |
| Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly | | |
| 1145 | 1150 | 1155 |
| Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala | | |
| 1160 | 1165 | 1170 |
| Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp | | |
| 1175 | 1180 | 1185 |
| Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro | | |
| 1190 | 1195 | 1200 |
| Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr | | |
| 1205 | 1210 | 1215 |
| Leu Gly Leu Asp Val Pro Val | | |
| 1220 | 1225 | |

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 2

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 3

Asx Ile Met Ala Ser

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 4

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 5

Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu

1 5