(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월14일
(11) 등록번호 10-2421307
(24) 등록일자 2022년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 15/74* (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
*A61K 39/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
*C07K 14/705* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 15/746* (2013.01)
*A61K 38/00* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0160382
(22) 출원일자 2021년11월19일
심사청구일자 2021년11월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020210046811 A*
US20210236614 A1*
KR1020210098148 A
Cancer Immunol. Immunother. (2016) 65:797-804.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
**을지대학교 산학협력단**
경기도 성남시 수정구 산성대로 553 (양지동, 을지대학교)
**충남대학교산학협력단**
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
**이승훈**
대전광역시 서구 둔산서로 95
**김철중**
대전광역시 유성구 대학로 99
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**한윤호**

전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **암 발생 및 성장 억제를 위한 신규 항암 백신 조성물 및 그를 이용한 백신화 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 락토바실러스 속 균주 표면에 PD-L1-T epitope 단백질을 발현시켜 백신화를 유도하여 대장암을 비롯한 다양한 암의 발생 및 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 항암 백신 조성물 및 그를 이용한 백신화 방법을 제공한다.

*대 표 도* - 도13c



(52) CPC특허분류
***A61K 39/0011*** (2021.08)
***A61P 35/00*** (2018.01)
***C07K 14/70503*** (2013.01)
*A61K 2039/523* (2013.01)
*C07K 2319/00* (2013.01)
(72) 발명자
**이명신**
대전광역시 서구 둔산서로 95
**이종수**
대전광역시 유성구 대학로 99
**강윤희**
대전광역시 서구 둔산서로 95
**한승로**
대전광역시 서구 둔산서로 95

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 2020113066 |
| 과제번호 | NRF-2020R1I1A3066989 |
| 부처명 | 교육부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 지역대학우수과학자 지원사업 |
| 연구과제명 | 세균 표면 발현 시스템을 이용한 면역관문 표적 암백신 개발 |
| 기 여 율 | 1/2 |
| 과제수행기관명 | 을지대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2020.06.01 ~ 2023.05.31 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 2021161030 |
| 과제번호 | NRF-2021R1A6A1A03045495 |
| 부처명 | 교육부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 대학중점연구소 지원사업 |
| 연구과제명 | 재난형 수의바이러스 기초기전연구 및 예방적 응용연구 |
| 기 여 율 | 1/2 |
| 과제수행기관명 | 충남대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2021.06.01 ~ 2030.05.31 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

PD-L1이 T epitope에 연결된 융합단백질이 표면에 제시되도록 형질전환된, 재조합 박테리아를 유효성분으로 포함하는 유방암(Breast cancer), 폐암(Lung cancer), 대장암(Colorectal cancer), 위암(Gastric cancer), 방광암(Bladder cancer), 췌장암(Pancreatic cancer), 전립선암(Prostate cancer) 및 미만성거대B세포림프종(diffuse large B-cell lymphoma)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 PD-1/PD-L1 관련 암에 대해 항암 활성을 갖는 항암 백신 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서

상기 융합단백질은 PgsA anchor와 결합함으로써 표면에 제시되는, 항암 백신 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 융합단백질은 pKV-Pald-PgsA380L 벡터의 다중 복제 사이트에 삽입되는, 항암 백신 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 박테리아는 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 파라박테로이드 속(*Parabacteroides* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.) 및 엔테로코커스 속(*Enterrococcus* sp.)으로부터 선택되는 비병원성 박테리아인, 항암 백신 조성물.

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

제1항의 항암 백신 조성물을 인간을 제외한 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 유방암(Breast cancer), 폐암(Lung cancer), 대장암(Colorectal cancer), 위암(Gastric cancer), 방광암(Bladder cancer), 췌장암(Pancreatic cancer), 전립선암(Prostate cancer) 및 미만성거대B세포림프종(diffuse large B-cell lymphoma)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 PD-1/PD-L1 관련 암의 예방 또는 치료방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 항암 백신 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 락토바실러스 속 균주 표면에 PD-L1-T epitope 단백질을 발현시킨 암 발생 및 성장 억제를 위한 신규 항암 백신 조성물 및 그를 이용한 백신화 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] PD-L1은 암세포의 표면이나 조혈세포에 있는 단백질로 Programmed Death-1(PD-1) 수용체에 결합하며 T-cell의 증식과 발현을 억제하는 음성 조절 시그널링 기전(negative regulatory signaling pathway)을 활성화한다

(Freeman *et. al. J ExpMed*, 192:1027, 2000). 따라서 PD-1 ligand 1(PD-L1 또는 CD274)이라고도 부른다. 인간 PD-L1 유전자는 290개의 아미노산 잔기의 전체 단백질을 인코딩하며(NCBI accession NP_054862.1) PD-L1 단백질은 세포 표면에 발현된 후 제거되는 주요 펩타이드를 포함한다. PD-L1은 인체의 심장, 폐, 흉성 및 혈관내피세포에서 발현되며, 인체 내 다른 많은 조직과 항원제시세포(Antigen Presenting Cells), 말초혈액단핵세포(Peripheral Blood Monocytes) 및 다른 면역세포를 포함하는 세포 타입에서 낮은 수치로 발현된다(Freeman *et. al. J Exp Med*, 192:1027; 2000, Eppihimer *et. al. Microcirculation*, 9:133, 2002). 대다수의 세포 타입은 IFN-γ, IL-12 및 타입 I 인터페론에 의해 자극되면 PD-L1의 수치가 높게 발현된다. 최근에는 PD-L1이 PD-1과의 결합 대신 B7-1(B7 family member의 하나로 CD80으로 불림)과 특정 상호작용을 하는 것으로 보고되었다(Butte *et.al. Immunity* 27:111, 2007). PD-L1과 CD80이 상호작용할 경우 T 세포의 기능과 활성이 음성 조절되고, 마우스 내 PD-L1과 CD80의 상호작용을 차단할 경우 OVA 항원에 대한 면역반응이 강화되었다. 따라서 PD-L1의 PD-1 및 CD80에 대한 결합을 동시에 차단함으로써 암 및 바이러스 감염에 대한 치료의 시너지 효과를 나타낼 수 있다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2018-0037222호는 신규한 항-PD-L1 항체에 대해 개시하고 있다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0003] 그러나 상기 선행기술은 항-PD-L1 항체를 이용한 종양치료에 대한 것으로 마우스 등의 숙주에 PD-L1 백신화를 유도하여 종양의 발생 및 성장 억제에 관한 연구는 여전히 미개척 분야라 할 수 있다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 락토바실러스 속 균주 표면에 PD-L1-T epitope 단백질을 발현시켜 백신화를 유도함에 따라 기존 PD-L1을 균주의 표면에 발현한 백신화 방법보다 더 높은 종양 발생 및 성장의 억제 효과를 나타내는 신규 항암 백신 조성물 및 그를 이용한 백신화 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

### *과제의 해결 수단*

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, PD-L1이 T epitope에 연결된 융합단백질이 표면에 제시되도록 형질전환된, 재조합 박테리아가 제공된다.

[0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 재조합 박테리아를 유효성분으로 포함하는, 항암 백신 조성물이 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 항암 백신 조성물을 암이 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 예방 또는 치료방법이 제공된다.

### *발명의 효과*

[0008] 상기한 바와 같이 본 발명의 신규 항암 백신 조성물 및 그를 이용한 백신화 방법은 기존 백신화 방법을 개선하여 락토바실러스 속 균주의 표면에 PD-L1-T epitope를 발현시켜 종양의 발생 및 성장을 더욱 효과적으로 억제하므로 암의 재발 방지를 위한 치료제로 활용 가능하고 종래 암의 면역 치료를 위한 항체 치료 등에 비해 치료비용 절감 효과를 기대할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

### *도면의 간단한 설명*

[0009] 도 1은 본 발명의 마우스 PD-L1-T epitope 융합 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 그림으로, PD-Long1(HLA-A2 일부를 포함한 17개의 아미노산), PD-Long2(HLA class Ⅱ일부를 포함한 23개 아미노산)를 마우스 PD-L1의 부분 서열과 융합시키고 유전자 컨스트럭션을 위해 제한효소를 부착한 그림이다.

도 2a는 본 발명의 마우스 T epitope를 *Latobacillus casei* 표면에 발현시키기 위해 제조된 벡터의 구조를 나타내는 개요도이다.

도 2b는 본 발명의 PD-L1-T epitope를 포함하는 유전자 컨스트럭트의 구조를 나타내는 개요도이다.

도 2c는 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei*에서 생산된 mPD-L1-T epitope 항원을 웨스턴 블랏 분석으로 확인한 겔 사진이다. PgsA anchor(42 kDa) 및 mPD-L1-T epitope(17 kDa)의 결합된 항원이 54 kDa 부위에서 확

인되었다.

도 3은 본 발명에서 BALB/c 마우스를 이용한 실험 진행 일정을 나타내는 개요도이다.

도 4a는 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei*를 투여한 BALB/c 마우스의 개별 중량 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei*를 투여한 BALB/c 마우스의 평균 중량 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 CT26 마우스 대장암 세포주에서 인터페론감마(IFN-γ)를 처리하고 자극하여 PD-L1 발현을 관찰한 FACS 분석 결과를 나타내는 그래프이다. 인터페론감마(IFN-γ) 자극에 의해 PD-L1 발현이 7.1배 증가됨을 확인하였다.

도 6a는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 항원을 3차 접종 후에 BALB/c 마우스에서 mPD-L1 항체 생성 여부를 확인한 ELISA 분석 결과를 나타내는 그래프이다. BALB/c 마우스의 성공적인 mPD-L1 백신화를 관찰하였다.

도 6b는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 항원을 3차 접종 후에 BALB/c 마우스에서 mPD-L1 항체 생성을 여부를 확인한 ELISA 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 BALB/c 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 개별 종양 성장을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7b는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 BALB/c 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 종양 성장 곡선을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7c는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 BALB/c 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 적출한 종양의 크기를 비교한 사진이다.

도 7d는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 BALB/c 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 종양 부피의 평균을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7e는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 BALB/c 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 종양 무게의 평균을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 BALB/c 마우스 모델에서 적출한 종양 조직을 면역조직화학염색을 통해 mPD-L1 발현을 관찰한 현미경 사진이다.

도 9는 본 발명에서 C57BL/6 마우스를 이용한 실험 진행 일정을 나타내는 개요도이다.

도 10a는 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei*를 투여한 C57BL/6 마우스의 개별 중량 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10b는 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei*를 투여한 C57BL/6 마우스의 평균 중량 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 MC38 마우스 대장암 세포주에서 인터페론감마(IFN-γ)를 처리하고 자극하여 PD-L1 발현을 관찰한 FACS 분석 결과를 나타내는 그래프이다. 인터페론감마(IFN-γ) 자극에 의해 PD-L1 발현이 10.7배 증가됨을 확인하였다.

도 12a는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 항원을 3차 접종 후에 C57BL/6 마우스에서 mPD-L1 항체 생성 여부를 확인한 ELISA 분석 결과를 나타내는 그래프이다. C57BL/6 마우스의 성공적인 mPD-L1 백신화를 관찰하였다.

도 12b는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 항원을 3차 접종 후에 C57BL/6 마우스에서 mPD-L1 항체 생성을 여부를 확인한 ELISA 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13a는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 C57BL/6 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 개별 종양 성장을 분석한 그래프이다.

도 13b는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 C57BL/6 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 종양 성장 곡선을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13c는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 C57BL/6 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검

증한 것으로 적출한 종양의 크기를 비교한 사진이다.

도 13d는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 C57BL/6 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 종양 부피의 평균을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13e는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 C57BL/6 마우스 모델에서 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증한 것으로 종양 무게의 평균을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 C57BL/6 마우스 모델에서 적출한 종양 조직을 면역조직화학염색을 통해 mPD-L1 발현을 관찰한 현미경 사진이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0010] **용어의 정의:**

[0011] 본 명세서에서 사용되는 용어 "락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)"는 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)의 혐기성 미생물로 낮은 pH조건에서 저항력이 크고 산과 담즙에 강하며 인간 상피세포선에 뛰어난 접착력을 나타낸다.

[0012] 본 명세서에서 사용되는 용어 "PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)"은 암세포의 표면이나 조혈세포에 있는 단백질로 원래 B7 protein family member(B7-H1)로 부터 복제되었다(Dong *et al., Nature. Med,* 5:1365, 1999). 그래서 CD274 또는 B7-H1라고도 부른다. PD-L1 전체 길이의 계산된 분자량은 33 kDa이지만 당화(glycosylation)에 의해 웨스턴 블랏에서 관찰되는 분자량은 50 kDa이다. 암세포의 표면에 있는 단백질인 PD-L1, PD-L2가 T 세포의 표면에 있는 단백질인 PD-1과 결합하면, T 세포는 암세포를 공격하지 못한다. 항-PD-1 항체나 항-PD-L1 항체와 같은 면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)는 T 세포의 PD-1 또는 암세포 표면의 PD-L1에 달라붙어 암세포의 면역 회피 기능을 억제한다. 지금까지 동정된 PD-L1(B7-H1) 및 PD-L2(B7-DC) 서열은 PD-1과 반응하여 TCR 및 CD28로 매개된 T 세포 활성, 성장인자(growth factor) 및 IL-2 또는 IFN-ɣ와 같은 사이토카인의 억제 및 음성 신호전달(negative signal transduction)을 유도하는 것으로 알려지고 있다(Riley *et. al. Immunol. Rev*, 229:114, 2009).

[0013] 본 명세서에서 사용되는 용어 "T epitope"는 CTL(cytotoxic T lymphocyte) 면역 반응을 유도하기 위해 PD-L1 전구체 유래의 HLA-A2 서열을 포함한 17개의 아미노산으로 구성된 PD-Long1(서열번호 3)과 HLA class Ⅱ 서열을 포함한 23개의 아미노산으로 구성된 PD-Long2(서열번호 4) 펩타이드를 의미한다(S. Munir Ahmada *et al., Oncoimmunology,* VOL. 5, NO. 8, 2016).

[0014] **발명의 상세한 설명:**

[0015] 본 발명의 일 관점에 따르면, PD-L1이 T epitope에 연결된 융합단백질이 표면에 제시되도록 형질전환된, 재조합 박테리아가 제공된다.

[0016] 상기 재조합 박테리아에 있어서, 상기 융합단백질은 PgsA anchor와 결합함으로써 표면에 제시될 수 있고 상기 융합단백질은 pKV-Pald-PgsA380L 벡터의 다중 복제 사이트에 삽입될 수 있다. 또한 상기 PD-L1은 포유동물 유래 PD-L1일 수 있고 상기 포유동물은 영장목, 식육목, 장비목, 우제목, 기제목 또는 설치목일 수 있으며 인간을 포함한 영장목, 개(서열번호 5), 사자, 호랑이, 및 고양이(서열번호 6)를 포함하는 식육목, 집쥐, 햄스터, 생쥐(서열번호 9), 및 기니피그를 포함하는 설치목, 토끼 및 우는토끼를 포함하는 토끼목, 말, 당나귀, 코뿔소, 및 맥을 포함하는 기제목, 소, 사슴, 산양, 양, 및 영양을 포함하는 우제목, 코끼리를 포함하는 장비목 등의 포유동물일 수 있으나 바람직하게는 인간 PD-L1(서열번호 7 또는 8)일 수 있다. 상기 서열번호 7은 인간 PD-L1 변이체 1 서열이고 서열번호 8은 인간 PD-L1 변이체 2 서열이다.

[0017] 상기 재조합 박테리아에 있어서, 상기 박테리아는 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 파라박테로이드 속(*Parabacteroides* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.) 및 엔테로코커스 속(*Enterrococcus* sp.)으로부터 선택되는 비병원성 박테리아일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 재조합 박테리아를 유효성분으로 포함하는, 항암 백신 조성물이 제공된다.

[0019] 상기 항암 백신 조성물에 있어서, 유방암(Breast cancer), 폐암(Lung cancer), 대장암(Colorectal cancer), 위암(Gastric cancer), 방광암(Bladder cancer), 췌장암(Pancreatic cancer), 전립선암(Prostate cancer) 또는

미만성거대B세포림프종(diffuse large B-cell lymphoma)에 대해 항암 활성을 가질 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 항암 백신 조성물을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 예방 또는 치료방법이 제공된다. 이때 상기 개체는 암 질환을 보유하거나 또는 발병한, 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 바람직하게는 포유동물일 수 있고 더 바람직하게는 인간을 제외한 포유동물일 수 있다. 또한 상기 박테리아는 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 파라박테로이드 속(*Parabacteroides* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.) 또는 엔테로코커스 속(*Enterrococcus* sp.)일 수 있다. 이때, 상기 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 박테리아는 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 가세리( *Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)일 수 있다. 또한, 상기 엔테로코커스 속(*Enterrococcus* sp.) 박테리아는 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*) 또는 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)일 수 있고 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.) 박테리아는 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)일 수 있다. 또한 상기 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.) 박테리아는 스트렙토코커스 써머필루스(*Streptococcus thermophilus*)일 수 있고 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 박테리아는 비피도박테리움 비피덤(*Bfidobacterium bifidum*), 비피도박테리움브레베(*Bifidobacterium breve*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 또는 비피도박테리움 락티스(Bfidobacterium lactis)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 상기 항암 백신 조성물은 폐암, 위암, 간암, 골암, 췌장암, 담낭암, 담관암, 피부암, 두경부암, 피부 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 대장암, 결장암, 유방암, 자궁 육종, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 식도암, 후두암, 소장암 또는 갑상선암에 대해 항암 활성을 가질 수 있고 바람직하게는 PD-1/PD-L1의 상호작용과 관련된 종양 또는 암일 수 있으며 보다 바람직하게는 유방암(Breast cancer), 폐암(Lung cancer), 대장암(Colorectal cancer), 위암(Gastric cancer), 방광암(Bladder cancer), 췌장암(Pancreatic cancer), 전립선암(Prostate cancer) 또는 미만성거대B세포림프종(diffuse large B-cell lymphoma)일 수 있다.

[0022] 본 발명의 약학적 조성물은 염수, 완충 염수, 덱스트로스, 물, 글리세롤 및 에탄올에서 선택되는 약학적 희석제 중 1종 이상 포함할 수 있으며, 희석제는 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 투여목적 및 질병에 따라 상이하게 적용될 수 있다. 실질적으로 투여되는 활성 성분의 양은 다양한 관련 요소, 즉 치료하고자 하는 질병, 환자상태의 정도, 다른 약제(예를 들어 주화성 약제)와 공동투여여부, 환자의 나이, 성별, 체중, 음식, 투여시간, 투여경로, 및 조성물의 투여비율(ratio)을 고려하여 결정하여야 한다. 상기 조성물은 투여량 및 투여경로가 질병의 형태 및 심각성에 따라 조절될 수 있기는 하지만 하루에 한번 또는 1-3번 나누어 투여될 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있고, 상기 담체 외에 약학적으로 허용가능한 보조제, 부형제 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 문서에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여시, 활성 성분의 신속한 방출, 또는 지속 또는 지연된 방출이 가능하도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말 형태를 포함한다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 경구 이외의 투여경로, 즉 직장, 정맥, 복막 및 근육, 동맥, 경피, 비강(nasal), 흡입, 안구, 및 피하를 통한 약제투여를 의미한다. 또한 약학적 조성물은 경구 투여 형태, 주입 가능한 용액 또는 국소제제와 같은 어떠한 형태로도 제제화될 수 있다. 아울러, 본 발명의 약학적 조성물은 0.1 mg/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 더 바람직하게는 1 mg/kg 내지 600 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 한편, 상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히

조절될 수 있다.

[0025] 암세포 내 PD-L1 과발현은 각기 다른 종류의 조직과 폐(Konishi *et. al. Clin. Cancer. Res*, 10:5094, 2004), 간(Shi *et. al. Int. J. Cancer*, 128:887, 2008), 위(Wu *et. al., Acta. Histochem,* 108:19, 2006), 신장(Thompson *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci*, 101:17174, 2004), 유방(Ghebeh *et. al. Neoplasia*, 8:190, 2006), 난소(Hamanishi *et. al. Proc. Natl. Acad. Sci*, 104:3360, 2007), 췌장(Nomi *et. al. Clin. Cancer. Res.* 13:2151, 2007), 멜라닌 세포(Hino *et. al. Cancer*, 116:1757, 2010) 및 식도(Ohigashi *et. al. Clin. Cancer. Res.* 11:2947, 2005) 등의 기관과 관련된 다양한 암에서 보고되었고 암에서 증가된 PD-L1의 발현은 환자 생존의 나쁜 예후와 관련이 있다.

[0026] 항-B7-H1 항체 또는 항-PD-L1 항체에 의해 PD-L1과 PD-1의 결합이 차단되면 T-cell의 증식과 기능적 활성을 자극하며 종양 성장과 바이러스 감염에 대한 면역반응이 강화된다(Iwai *et.al. PNAS,* 99:12293, 2002). 상기 연구들의 보고에 따라 PD-L1/PD-1 신호전달의 억제는 인체 내 암 세포의 성장, 바이러스 감염 및 확산에 대한 면역반응을 활성화시킨다. 일반적인 간세포 감염 바이러스인 HBV 및 HCV는 간세포 내 PD-1L의 과발현을 유도하고 T 효과기 세포 내 PD-1 신호전달을 활성화하여 바이러스 감염의 T 세포 탈진(T cell exhaustion) 및 면역관용을 유도한다(Boni *et.al. J. Virol*, 8:4215, 2007). 마찬가지로 HIV 감염도 유사한 메커니즘에 의해 인간의 면역체계를 회피한다. 길항제 분자(Antagonist molecule)에 의해 유도된 PD-L1/PD-1 신호전달의 치료조절은 암과 만성 바이러스 감염 차단을 위한 면역세포의 관용을 회복하고 재활성화 시킨다고 보고한바 있다(Blank *et.al., Cancer. Immunol. Immunother.* 54:307, 2005). 현재까지 항-PD-L1 항체를 이용한 종양치료 방법 관련 연구들이 대부분 수행되었지만 마우스 등의 숙주에 PD-L1 백신화를 유도하여 종양 발생 및 성장 억제에 미치는 영향을 분석한 연구는 제한적으로 수행되었다. 이에 본 발명자들은 대장균인 *Lactobacillus casei* 표면에 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)을 발현시킨 항원을 이용한 방법을 개선하여 PD-L1-T epitope 벡터를 제조하였고 상기 항원을 마우스에 주사하여 백신화된 마우스 모델(syngeneic mouse model, BALB/c, C57BL/6)에 대장암 세포주인 CT26 및 MC38을 각각 주입한 결과 기존 PD-L1을 균주의 표면에 발현한 백신화 방법보다 더 높은 종양 발생 및 성장의 억제 효과를 관찰함에 따라 본 발명을 완성하였다. 본 발명의 PD-L1-T epitope 백신화 방법을 통한 종양 발생 및 성장의 억제 효과로 대장암을 포함하는 다양한 암 발생 예방 및 수술 후 재발 방지를 위한 복합치료방법을 제공할 수 있다. 본 발명은 면역관문단백질(Immune Checkpoint)을 타겟으로 암의 면역치료를 위한 PD-1, PD-L1 항체 치료방법을 제공하는 기존 특허들과는 달리, 숙주(사람, 개를 포함하는 포유동물) 내 PD-L1-T epitope 백신화(vaccination)를 통해 종양 발생 및 성장의 억제, 수술 후 암의 재발을 방지할 수 있는 치료방법으로 국내 및 국외에서 최초로 보고되는 연구내용이다.

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0028] **실시예 1: PD-L1-T epitope 항원 및 벡터의 제조**

[0029] 본 발명자들은 마우스 PD-L1-T epitope 단백질을 *Lactobacillus casei* 균주 표면에 발현시키기 위한 벡터 및 mPD-L1-T epitope 융합단백질을 암호화하는 유전자 컨스트럭트를 제조하였다. 구체적으로 PD-L1-T epitope를 *Lactobacillus casei* 균주 표면에 발현시켜서 만든 PD-L1-T epitope 항원을 충남대학교 수의과대학 김철중 교수님 실험실에서 제공받아 실험을 수행하였다. 상기 마우스 PD-L1-T epitope는 477 bp의 염기서열로 구성되며, 17 kDa의 분자량을 갖는 단백질로, PD-L1 항원의 T 세포 반응을 극대화시키기 위한 T epitope로 PD-Long1(9 mer의 HLA-A2 서열을 포함한 17개의 아미노산, 서열번호 3)과 PD-Long2(15 mer의 HLA class Ⅱ서열을 포함한 23개의 아미노산, 서열번호 4) 펩타이드를 마우스 PD-L1과 함께 발현되도록 제조하였다(도 1).

[0030] 상기 마우스 PD-L1-T epitope 염기서열을 합성하여 pKV-Pald-PgsA380L 벡터의 다중 복제 사이트(multicloning site)에 삽입하여 마우스 PD-L1-T epitope를 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 균주 표면에 발현시키는 벡터를 제조하였다(도 2a 및 2b). 상기 벡터를 상기 균주에 도입시킨 후 형질전환된 *L.casei*를 배양하여 마우스PD-L1-T epitope가 *L.casei* 표면에 발현되도록 하였다. 그 후 불활성화 시켜서 마우스에 주입할 수 있는 항원을 제조하였다. 상기 제조한 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei*에서 생산된 마우스 PD-L1-T epitope 항원(59 kDa)을 웨스턴 블랏으로 분석한 결과 PgsA anchor(42 kDa) 및 mPD-L1-T epitope(17 kDa)의 결합된 항원이 마우스 PgsA anchor-PD-L1 항원(54 kDa)과 거의 유사한 위치에서 확인되었다(도 2c).

[0031] **실시예 2: 마우스 동물모델 제조**

[0032] 본 발명자들은 상기 mPD-L1-T epitope 백신화를 위한 두 종류의 마우스 동물모델을 제조하였다. 구체적으로 상기 실시예 1에서 제조한 mPD-L1-T epitope/*L.casei* 항원을 두 종류의 마우스(BALB/c 및 C57BL/6)에 적용하여 제조하였다. 종래 제조한 mPD-L1/*L.casei* 항원군을 실험에 포함시켜 본 발명에서 T epitope를 부착하여 제조된 mPD-L1-T epitope/*L.casei* 항원의 백신화에 따른 개선된 항암효과를 비교하였다. 우선 5주령의 수컷 BALB/c 마우스 및 5주령의 암컷 C57BL/6을 코아텍(www.koatech.co.kr; 평택, 경기도, 대한민국)에서 구입하여, 식품의약품안전처의 동물실험 가이드라인에 따라 을지대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 동물실험을 수행하였다(승인번호 EUIACUC18-29). 상기 수컷 BALB/c 및 암컷 C57BL/6 마우스는 각각 PBS 그룹(7마리), PgsA/*L.casei* 그룹(7마리), PgsA-mPD-L1/*L.casei* 그룹(8마리) 및 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei* 그룹(8마리)으로 분류하였고 한 케이지(cage)에 3 또는 4마리씩 합사 후, 물과 사료를 주며 일주일간 새로운 환경에 적응시켰다. 그 후 6주령 때부터 각 그룹별로 준비된 항원을 마우스 뒷다리 허벅지를 통해 2주마다 근육주사(intramuscular injection) 하여 mPD-L1-T epitope 백신화된 마우스 모델을 제조하였다. 특히, 2주마다 근육주사를 할 때는 마우스의 왼쪽과 오른쪽 뒷다리를 바꾸어가며 주사했다(도 3 및 9). 상기 마우스 동물모델을 제조하는 기간 동안에 각 그룹별 마우스의 몸무게 변화를 일주일마다 측정하였다. 그 결과, BALB/c 및 C57BL/6 마우스 모두 실험기간 동안 대조군 및 실험군 간의 몸무게 차이는 거의 없는 것으로 나타났다(도 4 및 10). 상기 결과는 본 발명의 mPD-L1-T epitope/*L.casei* 항원을 이용한 mPD-L1-T epitope 백신화가 마우스에 유해하지 않음을 시사하는 것이다.

[0033] **실시예 3: 대장암 세포의 준비**

[0034] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 두 종류의 mPD-L1-T epitope 백신화된 마우스 동물모델(BALB/c 및 C57BL/6)에 이식(challenging)하기 위한 마우스 대장암 세포인 CT26 및 MC38을 준비하였다. 구체적으로 마우스 대장암 세포주인 CT26 및 MC38을 5 x $10^5$ cells/T75 배양 플라스크에 파종하고 1일 후에 20 ng/ml의 마우스 인터페론감마를 처리하여 3일간 자극(stimulation)시킴으로써 PD-L1의 발현을 증가시켰다. 인터페론감마에 의해 PD-L1 발현이 증가된 대장암 세포들을 항-PD-L1 항체로 30분간 염색하였고, 형광물질인 APC가 결합된 IgG 이차항체를 30분간 결합시킨 후 FACS 분석을 실시하였다. 그 결과, CT26 세포주는 인터페론감마 자극을 주지 않은 실험군과 비교하여 인터페론감마를 처리한 실험군의 PD-L1 발현이 7.1배 증가하였고(도 5) 마찬가지로 MC38 세포주도 인터페론감마 처리에 의해 PD-L1 발현이 10.7배 증가하였다(도 11). 또한 히스토그램 분석으로 인터페론감마 자극을 처리한 세포에서 PD-L1 발현 세포가 증가한 것을 확인하였다. 그 후 본 발명자들은 인터페론감마 자극에 의해 PD-L1 발현이 증가된 CT26 및 MC38 세포를 1 x $10^6$/ml로 준비하여 마우스 한 마리당 100 $\mu\ell$ 용량으로 주입하여 동물실험에 사용하였다.

[0035] **실시예 4: 백신화 확인**

[0036] 본 발명자들은 마우스 모델에서 혈청을 채취하여 mPD-L1-T epitope 백신화 성공 여부를 확인하였다. 구체적으로 3번째 항원 접종 4일 후에 각 그룹별 마우스에서 채혈 후 30분 동안 상온에 방치한 다음 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 혈액으로부터 상층액인 혈청을 분리하였다. 그 후 분리된 항원을 1:100부터 1:100000까지 순차적으로 희석하였고, 항-PD-L1 항원이 코팅된 ELISA 플레이트에 처리하여 2시간 동안 상온에서 결합시켰다. 이어서 TBST 완충액으로 상기 플레이트를 세 번 세척하였고 HRP가 결합된 IgG 이차항체를 처리하였으며 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 상기 플레이트를 TBST 완충액으로 다시 세 번 세척하였고 OPD 발색시약을 처리 후, 항원-항체 반응이 일어난 샘플이 발색되도록 하였으며 황산(sulfuric acid)을 처리하여 반응을 중지시켰다. 그 후 OD 490 nm ELISA Reader를 이용하여 광학 밀도(optical density) 결과를 분석하였고, 각 그룹별 mPD-L1-T epitope 백신화 정도를 비교하였다. 그 결과 PBS 및 PgsA/*L.casei* 그룹의 마우스들은 백신화되지 않았으나 PgsA-mPD-L1/*L.casei* 그룹 및 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei* 그룹은 mPD-L1 항체가 잘 생성되어 백신화에 성공한 것을 확인하였다(도 6 및 12).

[0037] **실시예 5: 대장암 발생 및 성장의 억제 효과 검증**

[0038] 본 발명자들은 본 발명의 mPD-L1-T epitope 백신화 마우스 모델을 이용하여 대장암 발생 및 성장의 억제 효과를 검증하였다. 구체적으로 CT26 및 MC38 마우스 대장암 세포주를 mPD-L1-T epitope 백신화가 확인된 BALB/c 및 C57BL/6 마우스에 항원 3차 근육주사 후 일주일째 되는 날에 상기 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 그 후, 대장암 발생 및 성장을 6주 동안 관찰하였고, 종양 발생이 육안으로 확인되어 측정가능한 시기가 되면 3~4일 단위로 일주일에 두 번씩 종양의 크기를 측정하여 개체별 종양 성장을 확인하였으며 각 마우스 모델에서 그룹별로 측정된 종양 성장 수치의 평균값 및 표준편차를 분석하였다. 그 결과, PgsA-mPD-L1/*L.casei* 그룹 및

본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei* 그룹에서 발생한 종양의 성장이 PBS 및 PgsA/*L.casei* 그룹과 비교하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 특히 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei* 그룹은 PgsA-mPD-L1/*L.casei* 그룹과 비교하여 더 감소된 성장 속도를 나타내었다(도 7a, 7b, 13a 및 13b). 또한 대장암 세포주를 이식하고 6주 후에 마우스를 희생시켜 종양을 적출한 다음 종양의 크기를 비교한 결과 PgsA-mPD-L1/*L.casei* 그룹 및 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei* 그룹의 종양의 크기가 PBS 및 PgsA/*L.casei* 그룹에 비해 유의하게 작은 크기임을 관찰하였다(도 7c 및 13c). 특히 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei* 그룹에서 발생하고 성장한 종양의 크기가 PgsA-mPD-L1/*L.casei*의 종양의 크기보다 현저히 작은 것으로 나타났다(도 7d, 7e, 13d 및 13e).

[0039] 아울러, 상기 마우스 모델로부터 적출한 종양 조직에서 발현하고 있는 마우스 PD-L1을 면역조직화학염색법으로 관찰한 결과 PBS 및 PgsA/*L.casei* 그룹에 비해 PgsA-mPD-L1/*L.casei* 그룹 및 본 발명의 PgsA-mPD-L1-T epitope/*L.casei* 그룹에서 PD-L1 발현이 현저히 감소한 것을 확인하였다(도 8 및 14). 상기 결과에 따라 본 발명의 마우스 모델을 통한 mPD-L1 및 mPD-L1-T epitope 백신화는 대장암의 발생 및 성장을 억제하는 것으로 나타났고, 특히 mPD-L1-T epitope 백신화 방법은 종래 mPD-L1 백신화 방법에 비해 더 높은 항암효과를 나타내어 종양 발생 및 성장을 더 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[0040] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

## 도면

### 도면1

Murine PD-L1-T epitope sequence (477 bp)

BamHI PD-Long1 PD-L1 IgV like domain

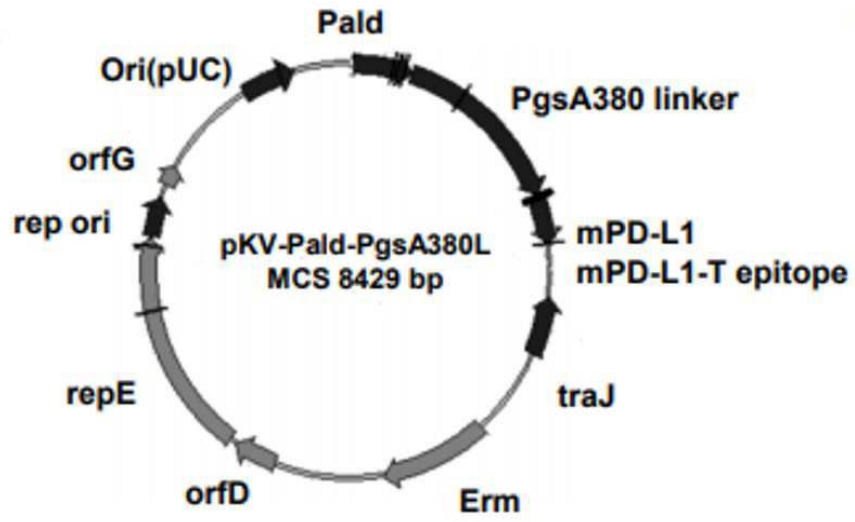
gga tcc tttatgacctattggcat**ctgctgaacgcgtttaccgtgaccgtg**ccgaaa gac ttg tac gtg gtg gag tat
ggc agc aac gtc acg atg gag tgc aga ttc cct gta gaa cgg gag ctg gac ctg ctt gcg tta gtg gtg
tac tgg gaa aag gaa gat gag caa gtg att cag ttt gtg gca gga gag gag gac ctt aag cct cag cac
agc aac ttc agg ggg aga gcc tcg ctg cca aag gac cag ctt ttg aag gga aat gct gcc ctt cag atc
aca gac gtc aag ctg cag gac gca ggc gtt tac tgc tgc ata atc agc tac ggt ggt gcg gac tac aag
cga atc acg ctg aaa gtc aat gcc cca tac cgc aaa atc aac gtgattctgggcgcgattctgctgtgcctgggcgt
ggcgctgacctttatttttcgcctg cgcaaaggc taa gtc gac PD-Long2

Stop SalI

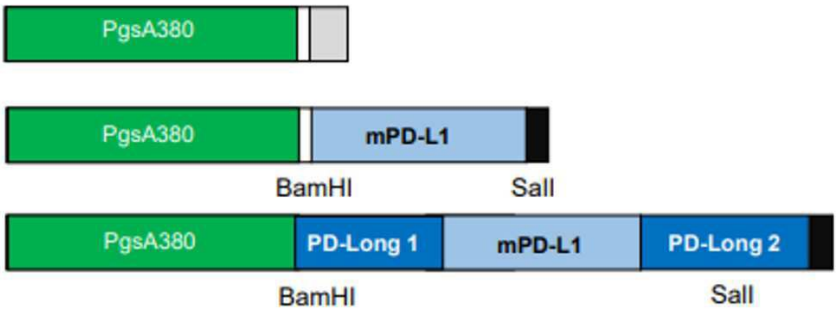
Murine PD-L1-T epitope amino acid (17 kDa)

FMTYWH**LLNAFTVTV**PKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQ
VIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGG
ADYKRITLKVNAPYRKINVILGAILL**CLGVALTFI**FRLRKG

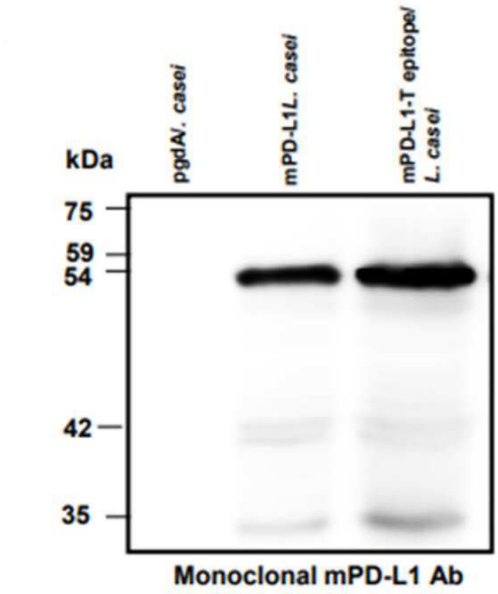
도면2a



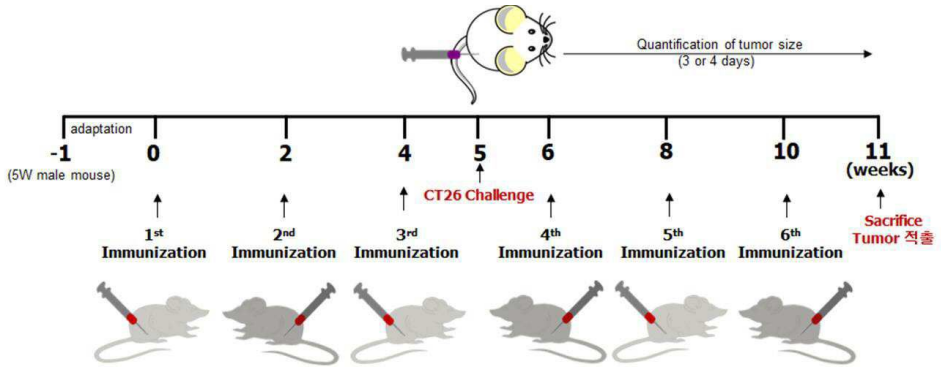

도면2b



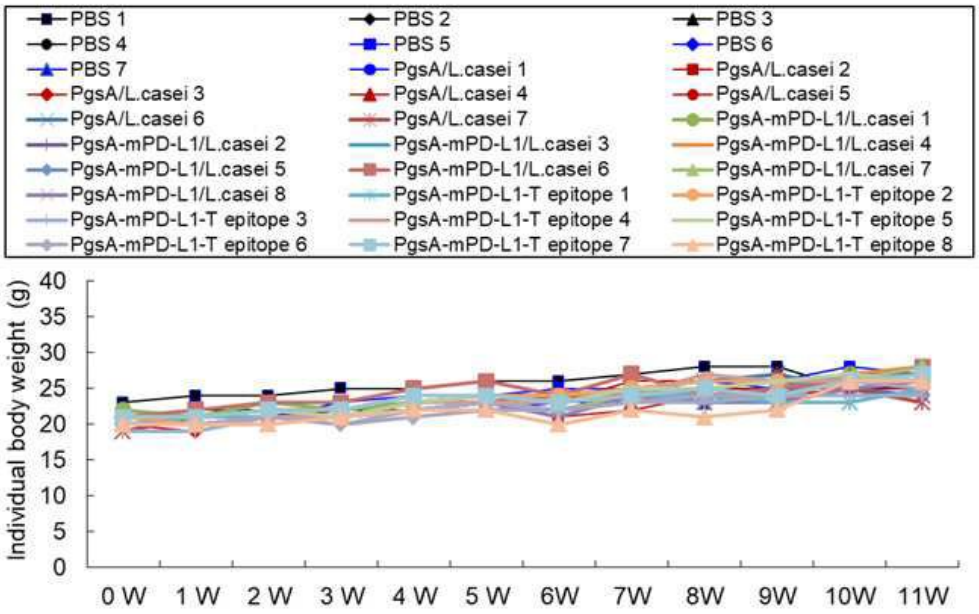

도면2c



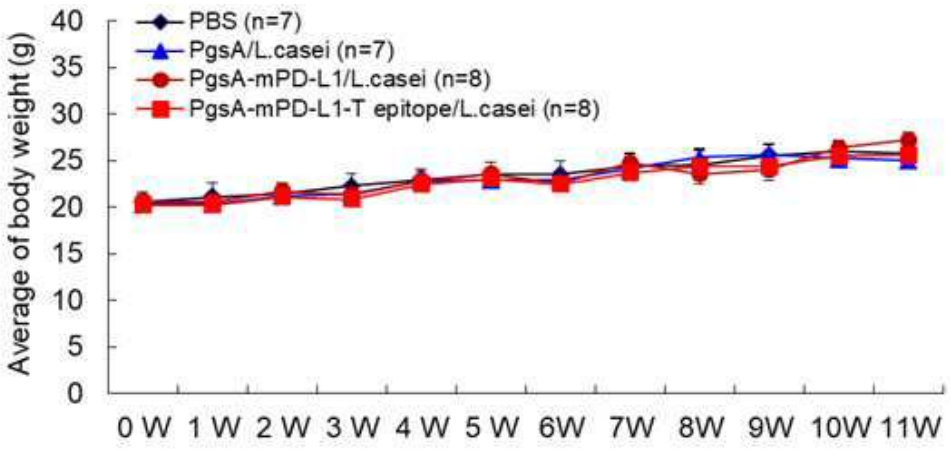
도면3



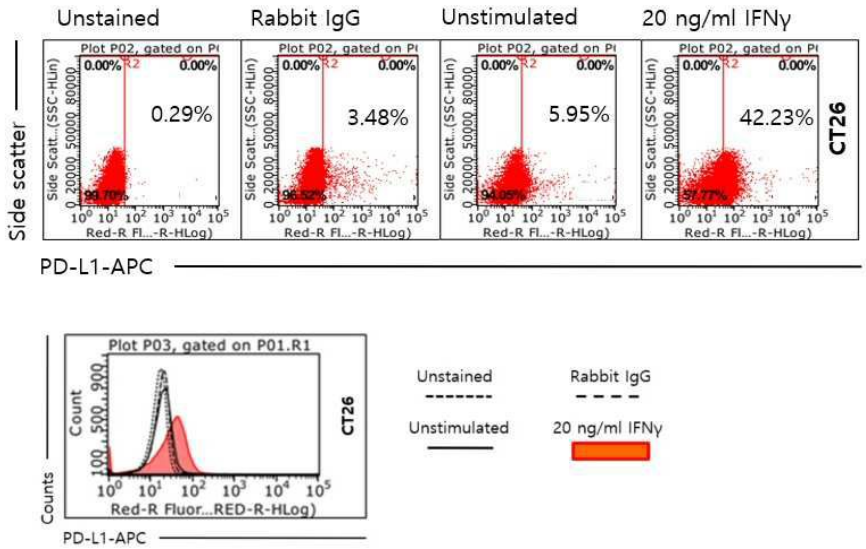

도면4a



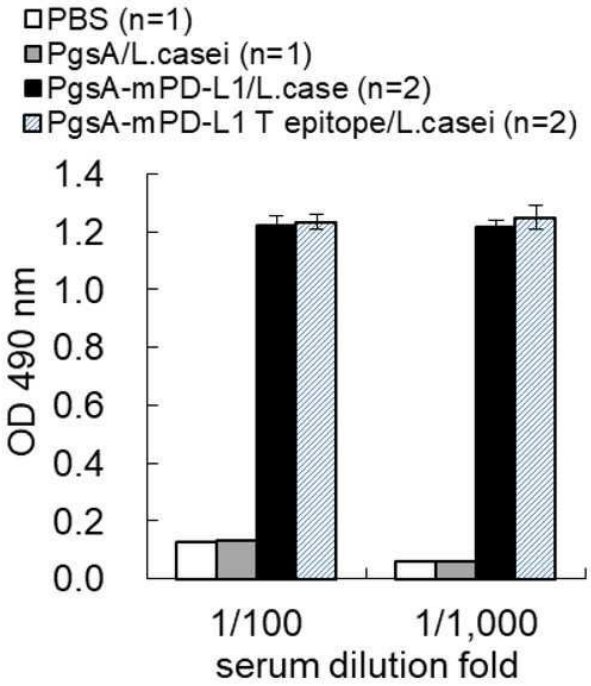

도면4b



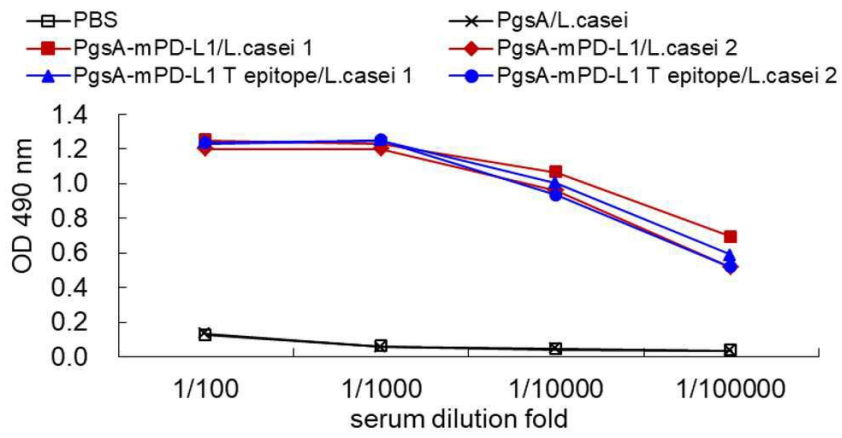
도면5


Unstained
Rabbit IgG
Unstimulated
20 ng/ml IFNγ
Side scatter
PD-L1-APC
0.29%
3.48%
5.95%
42.23%
CT26
Plot P03, gated on P01.R1
Count
Counts
Red-R Fluor...RED-R-HLog)
Unstained
Rabbit IgG
Unstimulated
20 ng/ml IFNγ

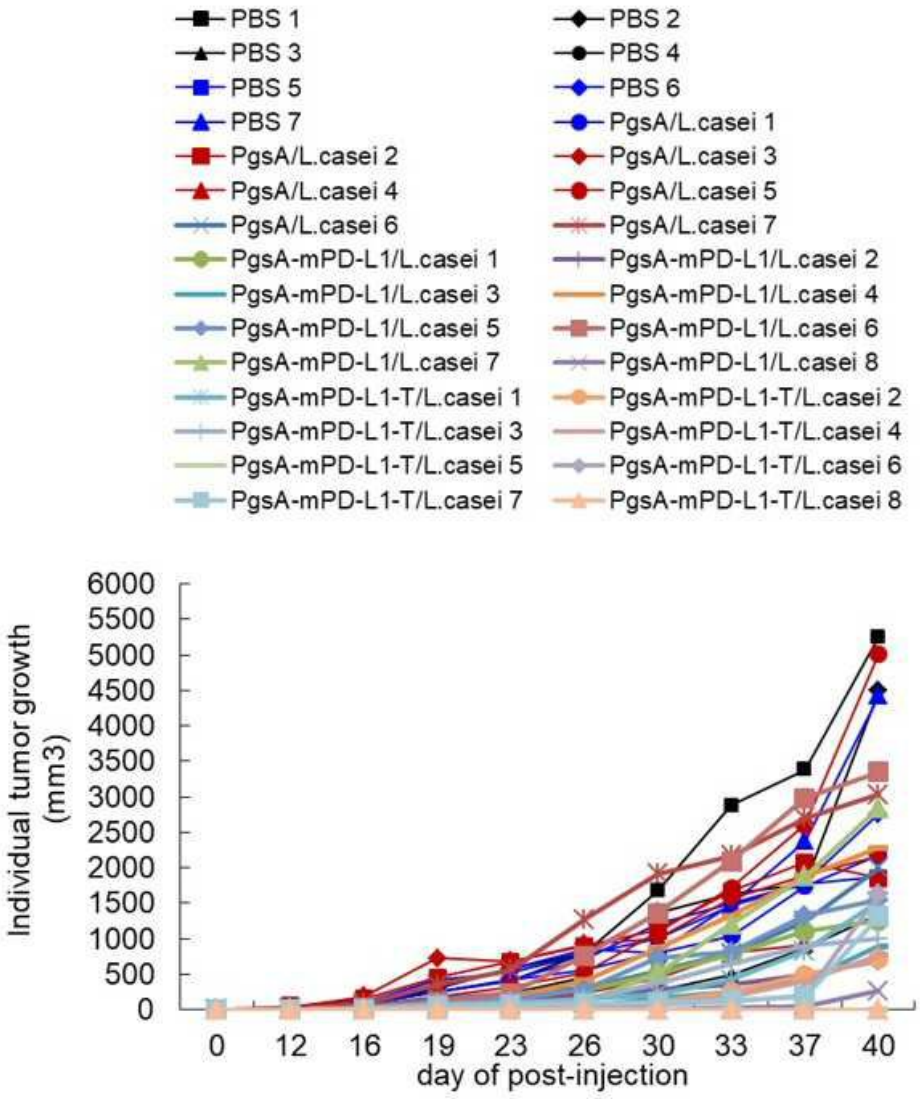
도면6a


PBS (n=1)
PgsA/L.casei (n=1)
PgsA-mPD-L1/L.case (n=2)
PgsA-mPD-L1 T epitope/L.casei (n=2)
OD 490 nm
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1/100
1/1,000
serum dilution fold

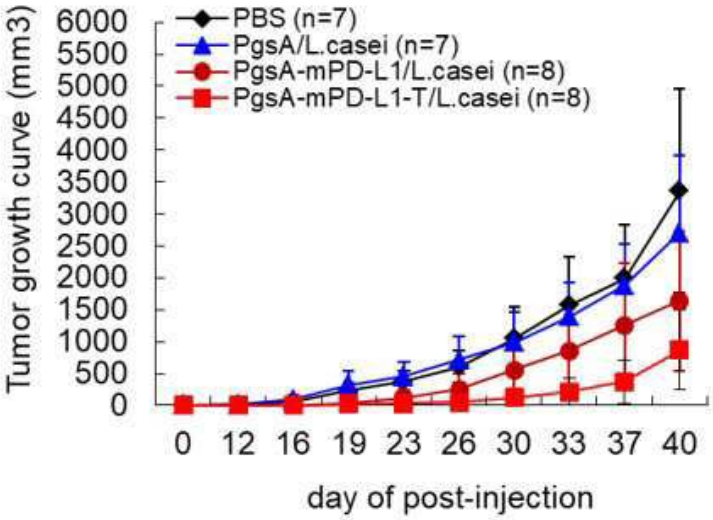
도면6b


PBS
PgsA/L.casei
PgsA-mPD-L1/L.casei 1
PgsA-mPD-L1/L.casei 2
PgsA-mPD-L1 T epitope/L.casei 1
PgsA-mPD-L1 T epitope/L.casei 2
OD 490 nm
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1/100
1/1000
1/10000
1/100000
serum dilution fold

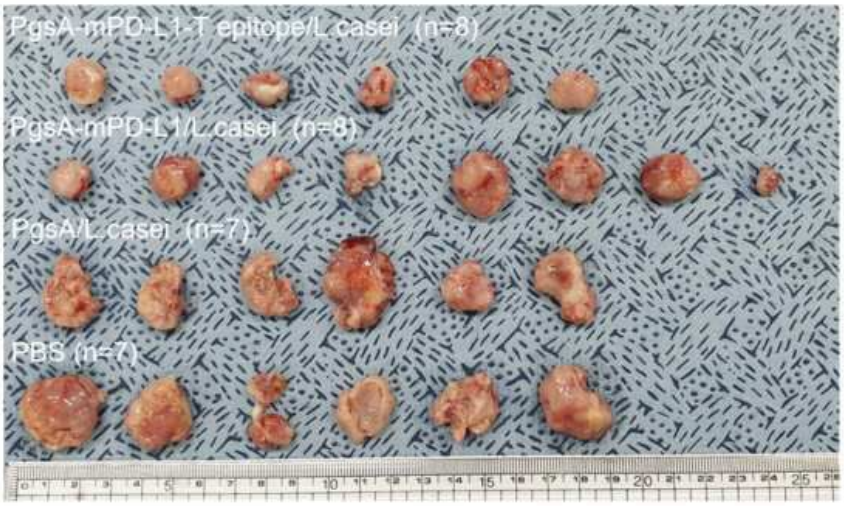
도면7a


PBS 1
PBS 2
PBS 3
PBS 4
PBS 5
PBS 6
PBS 7
PgsA/L.casei 1
PgsA/L.casei 2
PgsA/L.casei 3
PgsA/L.casei 4
PgsA/L.casei 5
PgsA/L.casei 6
PgsA/L.casei 7
PgsA-mPD-L1/L.casei 1
PgsA-mPD-L1/L.casei 2
PgsA-mPD-L1/L.casei 3
PgsA-mPD-L1/L.casei 4
PgsA-mPD-L1/L.casei 5
PgsA-mPD-L1/L.casei 6
PgsA-mPD-L1/L.casei 7
PgsA-mPD-L1/L.casei 8
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 1
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 2
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 3
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 4
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 5
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 6
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 7
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 8
Individual tumor growth (mm3)
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
12
16
19
23
26
30
33
37
40
day of post-injection

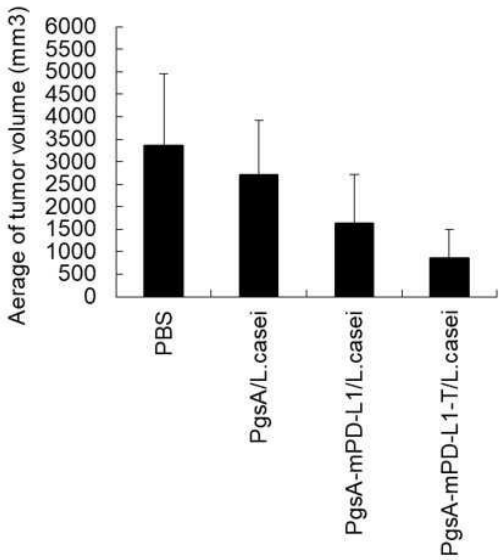
도면7b


PBS (n=7)
PgsA/L.casei (n=7)
PgsA-mPD-L1/L.casei (n=8)
PgsA-mPD-L1-T/L.casei (n=8)
Tumor growth curve (mm3)
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 12 16 19 23 26 30 33 37 40
day of post-injection

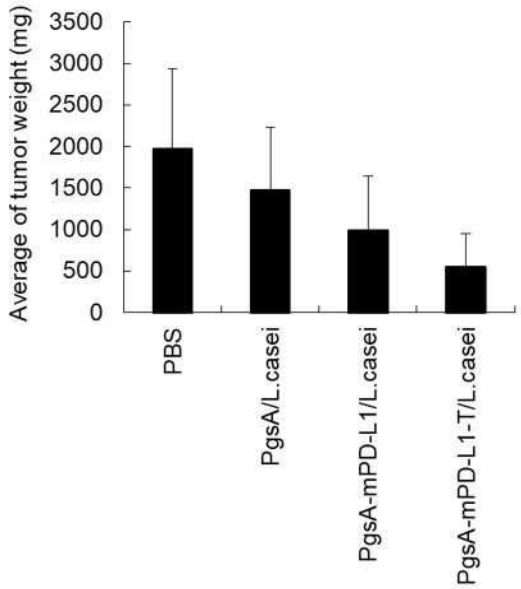
도면7c


PgsA-mPD-L1-T epitope/L.casei (n=8)
PgsA-mPD-L1/L.casei (n=8)
PgsA/L.casei (n=7)
PBS (n=7)

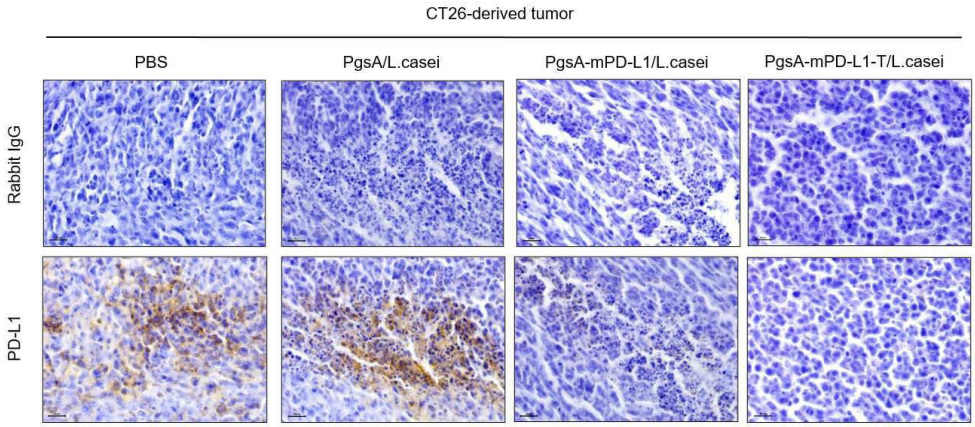
도면7d


Aerage of tumor volume (mm3)
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
PBS
PgsA/L.casei
PgsA-mPD-L1/L.casei
PgsA-mPD-L1-T/L.casei

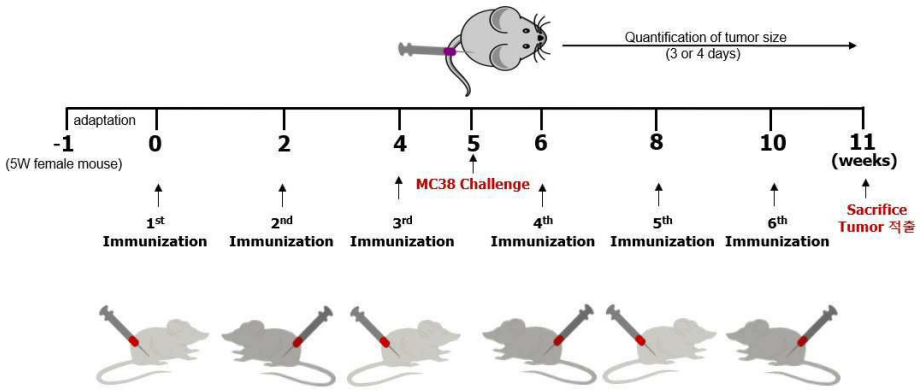
도면7e


Average of tumor weight (mg)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
PBS
PgsA/L.casei
PgsA-mPD-L1/L.casei
PgsA-mPD-L1-T/L.casei

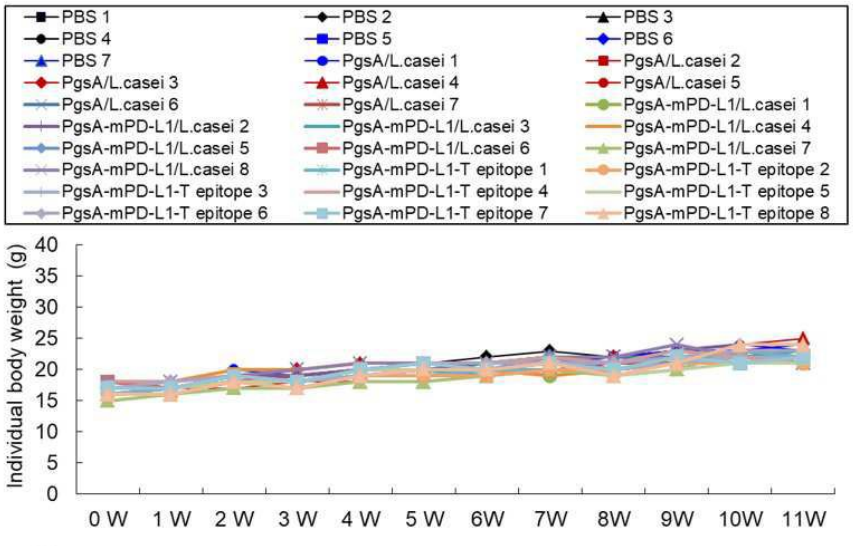
도면8



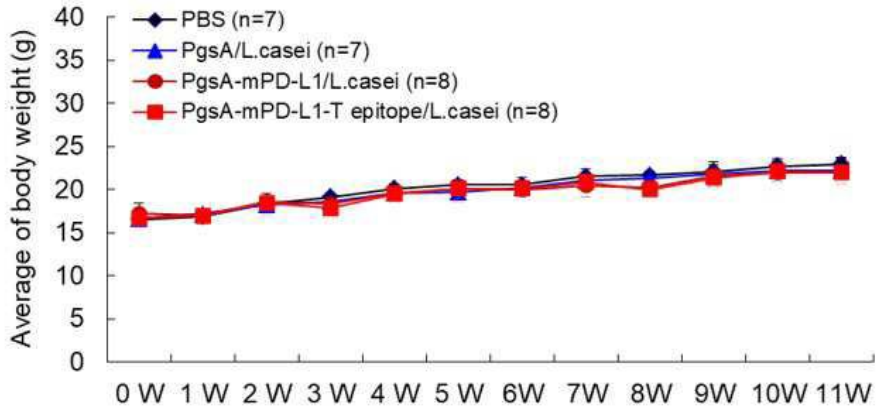

도면9



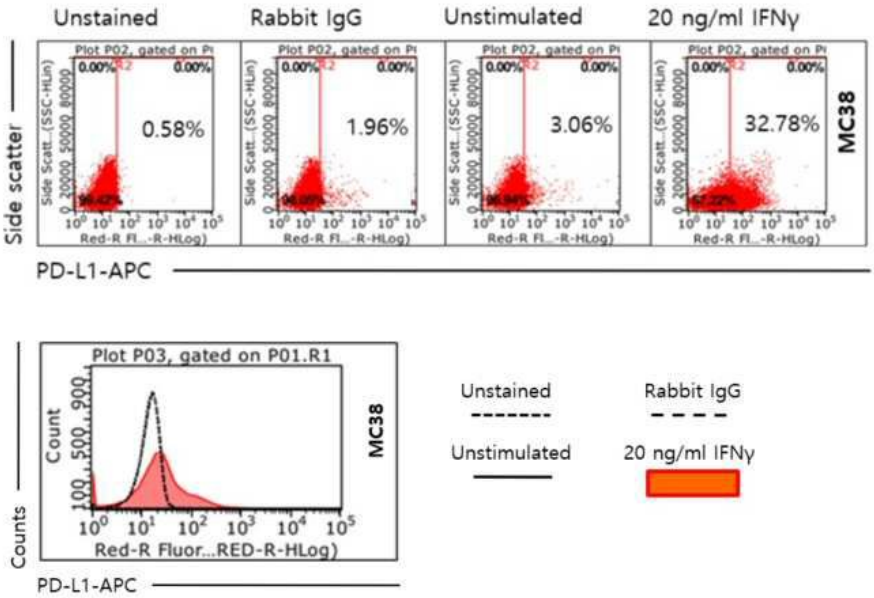

도면10a



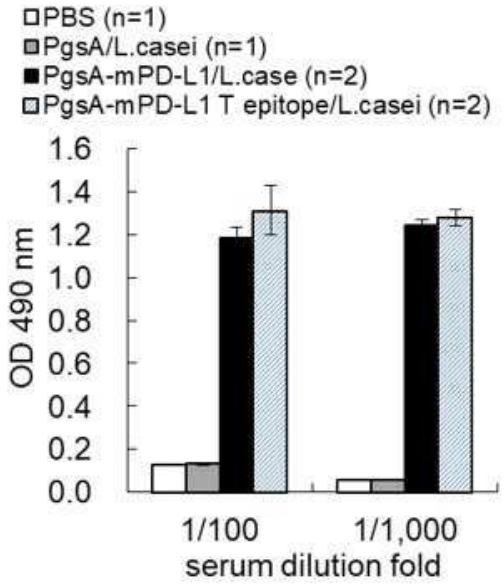
도면10b


PBS (n=7)
PgsA/L.casei (n=7)
PgsA-mPD-L1/L.casei (n=8)
PgsA-mPD-L1-T epitope/L.casei (n=8)
Average of body weight (g)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0 W 1 W 2 W 3 W 4 W 5 W 6W 7W 8W 9W 10W 11W

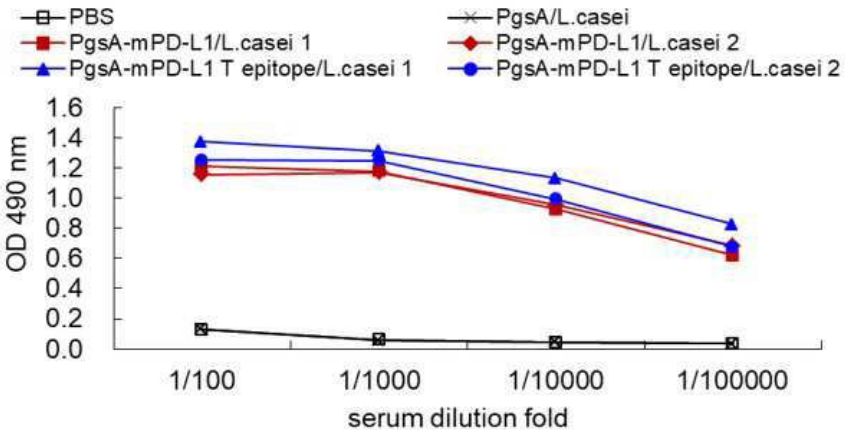
도면11


Unstained
Rabbit IgG
Unstimulated
20 ng/ml IFNγ
Side scatter
PD-L1-APC
0.58%
1.96%
3.06%
32.78%
MC38
Plot P03, gated on P01.R1
Count
Counts
Red-R Fluor...RED-R-HLog)
Unstained
Rabbit IgG
Unstimulated
20 ng/ml IFNγ

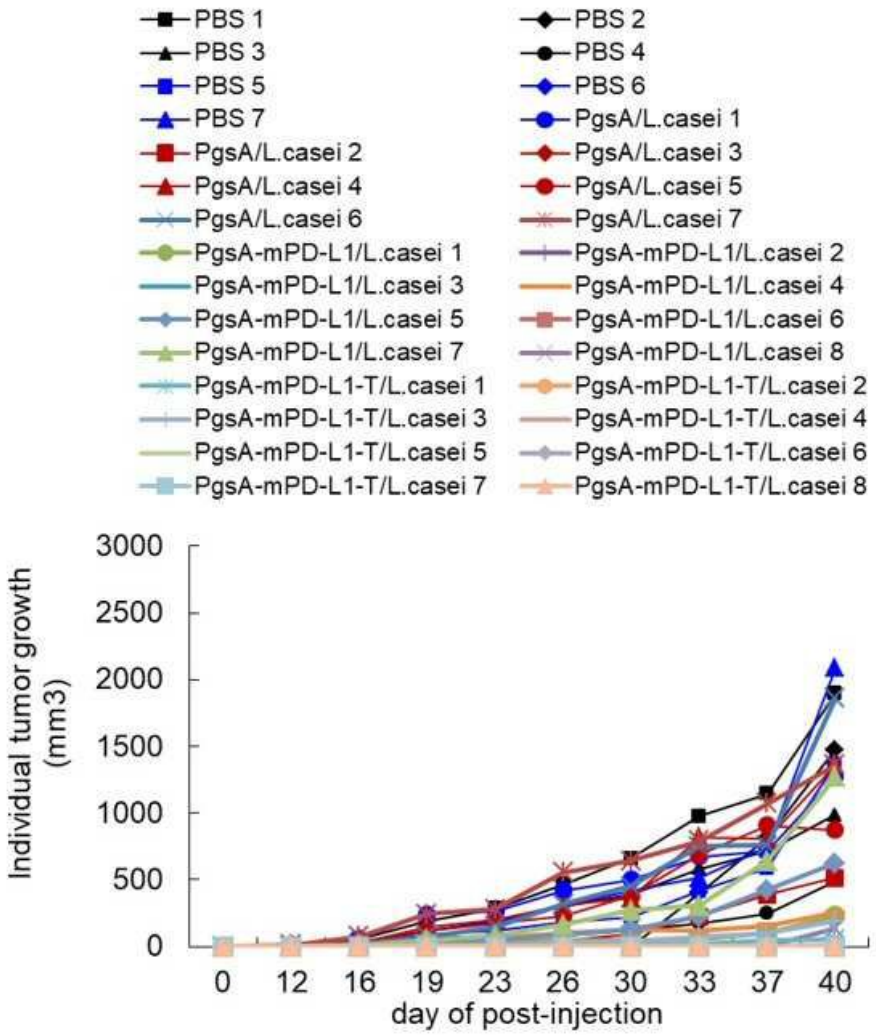
도면12a


PBS (n=1)
PgsA/L.casei (n=1)
PgsA-mPD-L1/L.case (n=2)
PgsA-mPD-L1 T epitope/L.casei (n=2)
OD 490 nm
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1/100
1/1,000
serum dilution fold

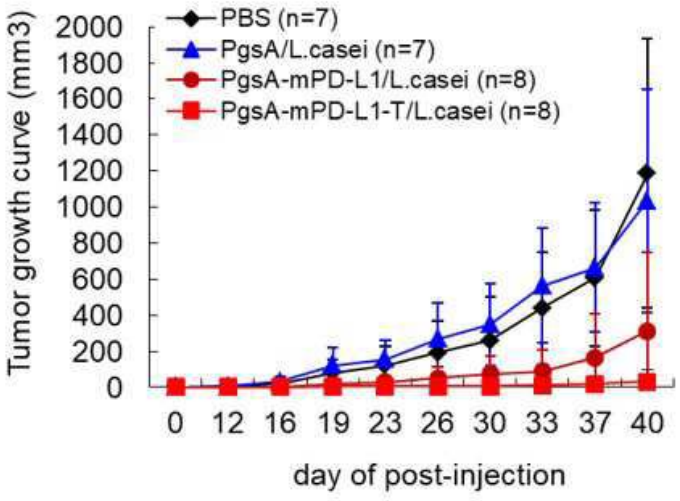
도면12b


PBS
PgsA/L.casei
PgsA-mPD-L1/L.casei 1
PgsA-mPD-L1/L.casei 2
PgsA-mPD-L1 T epitope/L.casei 1
PgsA-mPD-L1 T epitope/L.casei 2
OD 490 nm
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1/100
1/1000
1/10000
1/100000
serum dilution fold

도면13a


PBS 1
PBS 2
PBS 3
PBS 4
PBS 5
PBS 6
PBS 7
PgsA/L.casei 1
PgsA/L.casei 2
PgsA/L.casei 3
PgsA/L.casei 4
PgsA/L.casei 5
PgsA/L.casei 6
PgsA/L.casei 7
PgsA-mPD-L1/L.casei 1
PgsA-mPD-L1/L.casei 2
PgsA-mPD-L1/L.casei 3
PgsA-mPD-L1/L.casei 4
PgsA-mPD-L1/L.casei 5
PgsA-mPD-L1/L.casei 6
PgsA-mPD-L1/L.casei 7
PgsA-mPD-L1/L.casei 8
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 1
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 2
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 3
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 4
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 5
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 6
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 7
PgsA-mPD-L1-T/L.casei 8
Individual tumor growth (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 12 16 19 23 26 30 33 37 40
day of post-injection

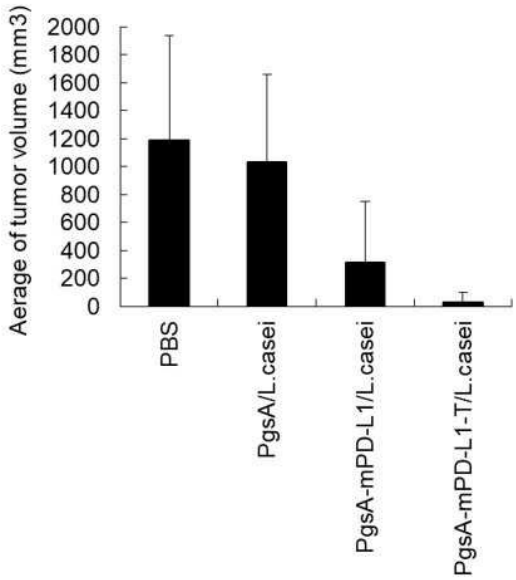
도면13b


PBS (n=7)
PgsA/L.casei (n=7)
PgsA-mPD-L1/L.casei (n=8)
PgsA-mPD-L1-T/L.casei (n=8)
Tumor growth curve (mm3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 12 16 19 23 26 30 33 37 40
day of post-injection

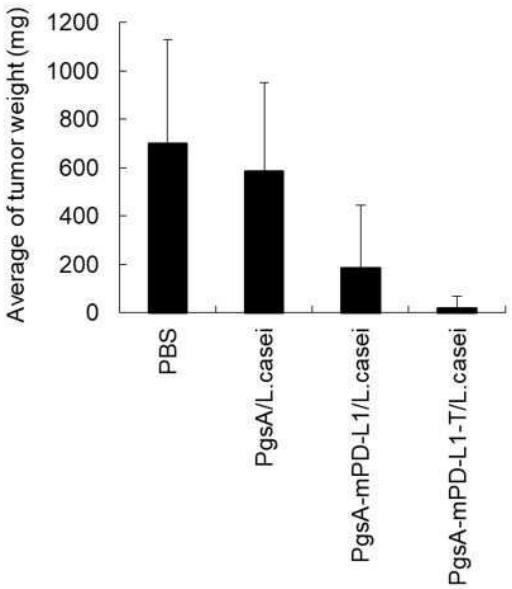
도면13c


PgsA-mPD-L1-T epitope/L.casei (n=8)
PgsA-mPD-L1/L.casei (n=8)
PgsA/L.casei (n=7)
PBS (n=7)

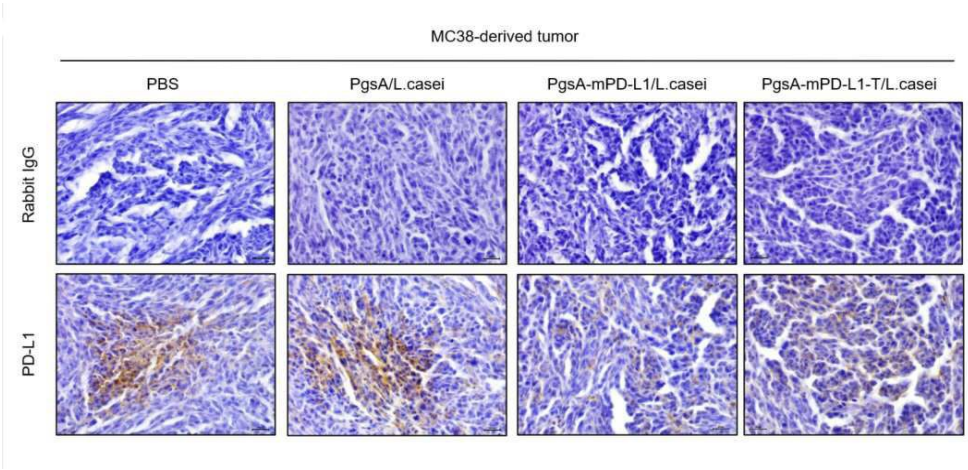
도면13d


Aerage of tumor volume (mm3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
PBS
PgsA/L.casei
PgsA-mPD-L1/L.casei
PgsA-mPD-L1-T/L.casei

도면13e




도면14




서 열 목 록

<110> EULJI UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> Novel anti-cancer vaccine composition for inhibiting cancer occurrence and growth and vaccination method using same

<130> PD21-6122

<160> 9

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 474

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine PD-L1-T epitope sequence

<400> 1

ggatccttta tgacctattg gcatctgctg aacgcgttta ccgtgaccgt gccgaaagac 60

ttgtacgtgg tggagtatgg cagcaacgtc acgatggagt gcagattccc tgtagaacgg 120

gagctggacc tgcttgcgtt agtggtgtac tgggaaaagg aagatgagca agtgattcag 180

tttgtggcag gagaggagga ccttaagcct cagcacagca acttcagggg gagagcctcg 240

ctgccaaagg accagctttt gaagggaaat gctgcccttc agatcacaga cgtcaagctg 300

caggacgcag gcgtttactg ctgcataatc agctacggtg gtgcggacta caagcgaatc 360

acgctgaaag tcaatgcccc ataccgcaaa atcaacgtga ttctgggcgc gattctgctg 420

tgcctgggcg tggcgctgac ctttattttt cgcctgcgca aaggctaagt cgac 474

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine PD-L1-T epitope amino acid sequence

<400> 2

Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro
1 5 10 15

Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys
20 25 30

Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr
35 40 45

Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu
50 55 60

Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro
65 70 75 80

Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val
85 90 95

Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly
100 105 110

Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys

115 120 125

Ile Asn Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu
130 135 140
Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly
145 150

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> PD-Long1
<400> 3
Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro
1 5 10 15
Lys

<210> 4
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> PD-Long2
<400> 4
Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe
1 5 10 15
Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly
20

<210> 5
<211> 113
<212> PRT
<213> Canis lupus
<400> 5
Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Gly Asn Val Thr Met Glu Cys Lys
1 5 10 15
Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asn Leu Phe Ala Leu Ile Val Tyr Trp

20 25 30

Glu Met Glu Asp Lys Lys Ile Ile Gln Phe Val Asn Gly Lys Glu Asp
35 40 45
Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Ser Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys
50 55 60
Asp Gln Leu Phe Leu Gly Lys Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Arg
65 70 75 80
Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys Leu Ile Gly Tyr Gly Gly Ala
85 90 95
Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val His Ala Pro Tyr Arg Asn Ile

100 105 110
Ser

<210> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> Felis catus
<400> 6
Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg
1 5 10 15
Phe Pro Val Glu Glu Gln Leu Asp Leu Val Ser Leu Ile Val Tyr Trp
20 25 30
Glu Met Glu Asp Lys Lys Ile Ile Gln Phe Val Gln Gly Lys Glu Asp
35 40 45

Leu Lys Val Gln His Arg Ser Tyr Ser Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys
50 55 60
Asp Gln Leu Phe Leu Gly Lys Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asn Val Thr
65 70 75 80
Leu Glu Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys Leu Ile Gly Tyr Gly Gly Ala
85 90 95
Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val His Ala Pro Tyr Arg Lys Ile
100 105 110

Asn

<

210>  7

<211>  113

<212>  PRT

<213>  Artificial Sequence

<220><223>  PD-L1 Homo sapiens variant 1

<400>  7

Arg Ile Leu Val Val Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys
1  5  10  15

Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp
20  25  30

His Gln Val Leu Ser Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu
35  40  45

Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr

50  55  60

Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn
65  70  75  80

His Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro
85  90  95

Asn Glu Arg Thr His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu
100  105  110

Gly

<210>  8

<211>  113

<212>  PRT

<213>  Artificial Sequence

<220><223>  PD-L1 Homo sapiens variant 2

<400>  8

Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys
1  5  10  15

Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp
20 25 30
Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp
35 40 45
Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys
50 55 60

Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys
65 70 75 80
Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala
85 90 95
Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile
100 105 110
Asn

<210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 9
Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg

1 5 10 15
Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp
20 25 30
Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp
35 40 45
Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys
50 55 60
Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys
65 70 75 80

Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala
85 90 95
Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile

100 105 110

Asn