



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0055725
(43) 공개일자 2021년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/21 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/21 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7009691
 (22) 출원일자(국제) 2019년09월06일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2021년04월01일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2019/073883
 (87) 국제공개번호 WO 2020/049169
 국제공개일자 2020년03월12일

(30) 우선권주장
 18306173.8 2018년09월06일
 유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
상뜨르 레옹 베라르
 프랑스 에프-69008 리옹 튀 라넥 28
상뜨르 나쇼날 드 라 리쉴르쉬 샴피외르
 프랑스 에프-75016 파리 튀 미셸-앙즈 3
 (뒷면에 계속)

(72) 발명자
데필 스테판
 프랑스 69003 리옹 튀 샴보베트 22
토논 로리
 프랑스 69008 리옹 튀 데 알루이에뜨 7
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
김태현

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **항암 백신을 위한 공유된 종양 항원으로서 HERV-K-유래된 항원**

(57) 요약

적어도 하나의 펩타이드, 또는 생체내 상기 적어도 하나의 펩타이드의 발현을 유도하는 발현 벡터를 포함하는 조성물 또는 백신으로서, 상기 펩타이드가 공유된 HERV-K 유래된 항원 및 약제학적으로 허용되는 비히클 또는 부형제로 이루어지거나 이들을 포함하는, 조성물 또는 백신. 그러한 펩타이드로 치료받은 환자의 세포독성 T 림프구(CTL)를 포함하거나, 그러한 펩타이드를 인지하는 T-세포 수용체(TCR) 조작된 T 세포를 포함하는 조성물.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
A61K 2039/585 (2013.01)
A61K 2039/80 (2018.08)
C12N 2740/10034 (2013.01)

(71) 출원인

**인스티튜트 내셔널 드 라 쎄데 에 드 라 리세르세
메디칼르 (인 썸)**

프랑스, 파리 75013, 퀴에 드 툴비아크 101

위니베르시테 끌로드 베르나르 리옹 I

프랑스 빌뢰르반 에프-69100, 불바르 뒤 11 노바브
르 1918 43

(72) 발명자

코 크리스토프

프랑스 01360 브레쏰레스 그랑데 튀 398

보나벤투라 파올라

프랑스 69007 리옹 튀 라샤이스 45

발라데아우 제니

프랑스 69970 마렌느 랫 그랑데 테레 20

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 조성물:

- 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 펩타이드들, 또는 생체내(*in vivo*) 상기 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 펩타이드들의 발현을 유도하는 하나 이상의 발현 벡터(들) -상기 펩타이드들은 9 내지 100개 아미노산 잔기를 갖고 상기 펩타이드들 각각은 서열번호 1 내지 7의 서열의 에피토프들 중 적어도 하나를 포함하고, 각각의 펩타이드는 다른 나머지 펩타이드들과 비교하여 적어도 하나의 상이한 에피토프를 포함함 -; 또는
- 적어도 하나의 펩타이드, 또는 생체내 상기 적어도 하나의 펩타이드의 발현을 유도하는 발현 벡터 - 상기 펩타이드는 9 내지 100개 아미노산 잔기를 갖고 서열번호 1 내지 7의 서열의 에피토프들 중 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개를 포함함 -;

및 약제학적으로 허용되는 비히클 또는 부형제.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1 및/또는 서열번호 6의 서열의 에피토프를 포함하는 하나 이상의 펩타이드를 포함하거나 발현하는, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열번호 1 내지 7의 서열의 에피토프들을 포함하는 3, 4, 5, 6 또는 7개의 펩타이드들을 포함하거나 발현하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 펩타이드들이 9 내지 100, 70, 50, 40, 30, 25, 또는 20개 아미노산 잔기 및 서열번호 1 내지 7의 서열의 적어도 하나의 상기 에피토프를 포함하는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 9 내지 100, 70, 50, 40, 30, 25, 또는 20개 아미노산 잔기의 펩타이드 각각이 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 중 하나의 특정 에피토프를 포함하는, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드(들)가 서열번호 1 내지 7의 서열의 상기 에피토프들 중 적어도 하나를 포함하는, HERV gag 또는 pol의 9 내지 100, 70, 50, 40, 30, 25, 또는 20개 연속 아미노산 잔기를 포함하는, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드(들)가 서열번호 1 내지 7의 서열의 상기 에피토프들 중 적어도 하나를 포함하는, HERV gag 또는 pol의 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18개 연속 아미노산 잔기를 포함하는, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 펩타이드들이 서열번호 8 내지 14로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 상기 조성물이 이들 중 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개를 포함하는, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 펩타이드가 9량체 에피토프(9-mer epitope)를 포함하는 서열번호 8 내지 14의 서열의 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28개 연속 아미노산 잔기로 이루어진, 조성물.

어지고, 상기 조성물이 이들 중 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개를 포함하는, 조성물.

청구항 10

백신 또는 면역원성 조성물에 있어서,

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물, 및 약제학적으로 허용되는 비히클 또는 부형제, 및 바람직하게 애쥬반트를 포함하는 백신 또는 면역원성 조성물.

청구항 11

조성물에 있어서,

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 펩타이드로 치료받은 환자의 세포독성 T 림프구를 포함하거나, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 펩타이드를 인지하는 T-세포 수용체 (TCR) 조작된 T 세포, 및 약제학적 비히클을 포함하는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 암, 특히, 3중 음성 유방암을 포함하는 유방암, 난소암, 흑색종, 육종, 기형암종, 방광암, 폐암 (비 소세포 폐 암종 및 소세포 폐 암종), 두경부암, 결장-직장암, 교모세포종 및 백혈병을 치료하는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 13

서열번호 2 내지 14의 서열의 펩타이드들, 및 10 내지 100개, 70개, 50개, 40개, 30개, 25개, 또는 20개 아미노산을 갖고 서열번호 2 내지 7의 적어도 하나의 상기 펩타이드를 포함하는 펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 단리된 펩타이드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일부 중앙 서브타입에서 공유되고, 항원 조성물, 면역원성 조성물, 항암 백신 또는 T 세포-기반 면역 치료요법에서 뿐만 아니라 진단, 예후 및 면역모니터링에서 사용될 수 있는 HERK-K 항원으로부터 유래된 에피토프 또는 네오에피토프의 동정에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 암 및 면역치료요법 분야, 및 하나 이상, 바람직하게 수개의 이들 에피토프를 포함하고 암의 진단, 예후 및 면역모니터링에서 그리고 암의 치료 및 예방에 유용한 펩타이드-기반 항원 면역원성 조성물, 및 암의 치료 및 예방을 위해 하나 이상, 바람직하게 수개의 이들 에피토프를 포함하는 면역원성 조성물 및 백신의 개발에 관한 것이다. 대안으로서, 본 발명의 조성물은 생체내 상기 펩타이드의 발현을 수행하거나 유도하는 벡터 또는 벡터들을 포함하고, 예를 들어, 상기 벡터들은 DNA 또는 RNA 벡터들, 또는 세균 또는 바이러스 벡터일 수 있다.

배경 기술

[0002] 인간 내인성 레트로바이러스 (Human endogenous retroviruses(HERV))는 인간 게놈의 8%를 나타낸다. 이들은 바람직하게 외인성 레트로바이러스의 고대 생식세포 계열 감염의 잔재에 상응한다. 대부분의 HERV 유전자는 DNA 재조합, 돌연변이 및 결실로 인해 비-기능성이지만 일부는 그룹-특이적 항원 (Gag), 역전사효소와 함께 폴리머라제 (Pol) 및 외피 (Env) 표면 유닛을 포함하는 기능성 단백질을 생성한다. HERV 발현은 후성적 기전에 의해 정상 세포에서 억제된다.

[0003] HERV는 《바이러스 모방》과 연계된 강한 면역원성 성질을 갖고 이들의 발현은 탈메틸화로 인해 일부 고형 종양에서 증가된다. HERV는 발암에서 가능한 병원성 체제를 나타내는 것으로 사료되고, 여기서, 이들은 삼입 돌연변이유발에 의해 또는 염색체 변형에서의 관여에 의해 작용할 수 있다. HERV-K Rec 및 Np9와 같은 일부 HERV 단백질은 또한 추정 발암유전자이다.

[0004] 암에서의 HERV의 발현은 면역계 상의 상이한 효과와 연관된다:

[0005] - Env 유닛의 면역억제 도메인을 통한 면역조절

- [0006] - HERV dsRNA (선천성 I형 인터페론 신호전달을 유발하는)에 의한 선천성 면역의 활성화
- [0007] - HERV 항원에 대한 후천성 면역 반응의 유도.

발명의 내용

- [0008] 발명의 요약
- [0009] 따라서, 본 발명에 따르면, 단리되거나 정제된 펩타이드, 및 적어도 하나의 그러한 펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 생체내 그러한 적어도 하나의 펩타이드의 발현을 유도하는 발현 벡터가 제공되고, 상기 펩타이드는 서열 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열로 이루어진 에피토프로 이루어지거나 이를 포함한다. 조성물은 적당한 액체, 완충액 또는 비히클을 추가로 포함할 수 있다. 인간의 치료에 사용하기 위한 조성물에서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 비히클, 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0010] 특히, 적어도 하나의 펩타이드, 및 약제학적으로 허용되는 비히클, 담체 또는 부형제를 포함하는 면역원성 조성물, 또는 생체내 상기 적어도 하나의 펩타이드의 발현을 유도하는 발현 벡터가 제공되고, 상기 펩타이드는 서열 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7)의 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열로 이루어진 에피토프로 이루어지거나 이를 포함한다.
- [0011] 또한, 적어도 하나의 펩타이드, 및 약제학적으로 허용되는 비히클, 담체 또는 부형제를 포함하는 백신 또는 항암 백신, 또는 생체내 상기 적어도 하나의 펩타이드의 발현을 유도하는 발현 벡터가 제공되고, 상기 펩타이드는 서열 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7)의 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열로 이루어진 에피토프로 이루어지거나 이를 포함한다.
- [0012] 본 발명에 따른 조성물은 특히 다음을 포함할 수 있다:
- [0013] 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 펩타이드들, 또는 생체내 상기 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 펩타이드들의 발현을 유도하는 하나 이상의 발현 벡터(들) - 상기 펩타이드들은 9 내지 100개 아미노산 잔기를 갖고 상기 펩타이드들 각각은 서열번호 1 내지 7의 서열의 에피토프 중 적어도 하나, 특히 하나를 포함하고, 각각의 펩타이드는 다른 나머지 펩타이드들과 비교하여 적어도 하나의 상이한 에피토프를 포함함 -; 또는
- [0014] 적어도 하나의 펩타이드, 또는 생체내 상기 적어도 하나의 펩타이드의 발현을 유도하는 발현 벡터 - 상기 펩타이드는 9 내지 100개 아미노산 잔기를 갖고 서열번호 1 내지 7의 서열의 에피토프들 중 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개를 포함함 -.
- [0015] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물은 특히 다음을 포함할 수 있다:
- [0016] 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 펩타이드들, 또는 생체내 상기 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 펩타이드들의 발현을 유도하는 하나 이상의 발현 벡터(들) - 상기 펩타이드들은 9 내지 100개 아미노산 잔기를 갖고 하나는 서열번호 1 또는 6의 서열의 에피토프를 포함하고, 적어도 또 다른 하나는 서열번호 1 내지 7의 서열의 다른 에피토프 중 적어도 하나를 포함하고, 각각의 펩타이드는 다른 나머지 펩타이드들과 비교하여 적어도 하나의 상이한 에피토프를 포함함 -; 또는
- [0017] 적어도 하나의 펩타이드, 또는 생체내 상기 적어도 하나의 펩타이드의 발현을 유도하는 발현 벡터 - 상기 펩타이드는 9 내지 100개 아미노산 잔기를 갖고 서열번호 1 또는 6의 서열의 에피토프, 특히 둘 다의 에피토프를 포함하는, 서열번호 1 내지 7의 서열의 에피토프의 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개를 포함함 -.
- [0018] 이후 본원에 제공된 바와 같이, 본 발명에 따른 조성물은 하기의 구현예를 포함할 수 있다 (그러나, 다른 구현예는 또한 나머지 기재로부터 나타날 것이다):
- [0019] - 상기 조성물은 서열번호 1 내지 7의 서열의 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 펩타이드들을 포함하거나; 상기 조성물은 이들 펩타이드의 생체내 발현을 유도하는 하나 이상의 발현 벡터를 포함하고; 하나의 구현예에서, 서열번호 1 또는 서열번호 6의 서열의 펩타이드 또는 이들 펩타이드 둘 다는 존재하거나 발현되고;
- [0020] - 상기 조성물은 9 내지 100개 아미노산 잔기 및 서열번호 1 내지 7의 서열의 상기 펩타이드들의 적어도 하나를

포함하는 펩타이드를 포함하고; 상기 펩타이드는 본원에 개시된 에피토프 중 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개를 포함할 수 있고; 하나의 구현예에서, 상기 조성물은 본원에 개시된 바와 같은 gag 에피토프 및/또는 pol 에피토프, 또는 gag 및/또는 pol의 이들 에피토프 중 적어도 2개 또는 3개를 포함할 수 있거나; 이것은 이러한 또는 이들 펩타이드의 생체내 발현을 유도하는 하나 이상의 발현 벡터를 포함하고; 하나의 구현예에서, 상기 포함되거나 발현된 펩타이드는 서열번호 1 또는 6의 서열의 펩타이드 또는 이들 펩타이드 둘 다를 포함하고;

- [0021] - 상기 조성물은 9 내지 100개 아미노산 잔기를 갖는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 펩타이드를 포함하고, 각각의 하나는 서열번호 1 내지 7의 서열의 에피토프 중 적어도 하나, 바람직하게 하나를 포함하고, 각각의 펩타이드는 다른 나머지 펩타이드들과 비교하여 적어도 하나의 상이한 에피토프를 포함하거나, 상기 조성물은 이들 펩타이드의 생체내 발현을 유도하는 하나 이상의 발현 벡터를 포함하고; 하나의 구현예에서, 서열번호 1 또는 6의 서열의 펩타이드 또는 이들 펩타이드 둘 다는 존재하거나 발현되고;
- [0022] - 9 내지 100개 아미노산 잔기의 각각의 함유되거나 발현된 펩타이드는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 중 하나의 특정 (조성이 다른 펩타이드와는 상이한) 에피토프를 포함하고;
- [0023] - 상기 함유되거나 발현된 펩타이드(들)은 서열번호 1 내지 7의 서열의 상기 펩타이드의 적어도 하나를 포함하는 HERV gag 또는 pol의 9 내지 50개 아미노산 잔기를 포함하고;
- [0024] - 상기 조성물은 서열번호 8 내지 14의 펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 펩타이드를 포함하거나; 상기 조성물은 이러한 펩타이드 또는 이들 펩타이드의 생체내 발현을 유도하는 하나 이상의 발현 벡터를 포함하고; 하나의 구현예에서, 서열번호 8 또는 서열번호 13의 서열의 펩타이드 또는 이들 펩타이드 둘 다는 존재하거나 발현된다.
- [0025] 서열번호 4, 2, 및 1의 서열의 에피토프는 HERV-K gag로부터 기원한다. 서열번호 5, 3, 6 및 7의 서열의 에피토프는 HERV-K pol로부터 기원한다. 이들은 MHO 부류 I HLA-A2 에피토프이다. 하나의 구현예에서, 조성물은 1, 2 또는 3개 HERV-K gag 에피토프를 포함하거나 발현한다. 하나의 구현예에서, 조성물은 1, 2, 3 또는 4개 HERV-K pol 에피토프를 포함하거나 발현한다.
- [0026] 조성물과 관련하여, 본 발명에 따른 면역원성 조성물 또는 백신과 관련하여, 상기 함유되거나 발현된 펩타이드는 9 내지 100개, 특히 9 내지 70개, 또는 9 내지 50개, 40개, 30개, 25개, 20개 연속 잔기들을 포함할 수 있고, 바람직하게 상기 잔기는 HERV-K gag 및/또는 pol로부터, 보다 바람직하게 상기된 에피토프 중 적어도 하나를 포함하는 고유 컨센서스 HERV-K gag 및/또는 pol 서열로부터 유래한다. 상기 펩타이드는 길이가 50개 미만의 잔기, 예를 들어, 길이가 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 45개인 잔기일 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 조성물, 면역원성 조성물 또는 백신 (이후 반대로 지적되지 않는 경우 "조성물"로서 지칭됨)은 특히 gag 및/또는 pol로부터 기원하는 HERV-K의 하나 초과인 이들 펩타이드, 또는 특히 gag 및/또는 pol로 기원하는 HERV-K의 하나 초과인 이들 펩타이드의 생체내 발현을 유도하는 발현 벡터, 또는 특히, gag 및/또는 pol로부터 기원하는 HERV-K의 (이들 펩타이드의) 상이한 펩타이드의 생체내 발현을 각각 유도하는 수개의 (하나 초과)의 발현 벡터를 포함할 수 있다.
- [0028] 하나의 구현예에서, 펩타이드 (9개 초과인 잔기를 갖는)는 9량체 에피토프 및 소정의 길이의 펩타이드를 형성하는 N-말단 및/또는 C-말단에서 인접한 아미노산을 포함하는 고유 HERV-K 단편이다. 하나의 구현예에서, 상기 펩타이드는 2개 이상의 HERV-K 에피토프 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 개시된 에피토프)를 포함한다.
- [0029] 하나의 구현예에서, 펩타이드 (9개 초과인 잔기를 갖는)는 9량체 에피토프 및 N-말단 및/또는 C-말단에서 인접한 아미노산 및 소정의 길이의 펩타이드를 형성하는 추가의 외래 아미노산을 포함하는 고유 HERV-K 단편이다. 하나의 구현예에서, 상기 펩타이드는 2개 이상의 HERV-K 에피토프 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 개시된 에피토프)를 포함한다.
- [0030] 또 다른 구현예에서, 조성물에 포함되거나 발현되는 펩타이드 전부 또는 일부는 HERV-K에 대해 외래성이다. 이러한 구현예에서, 상기 펩타이드는 2개 이상의 HERV-K 에피토프, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 기재된 에피토프를 용이하게 포함할 수 있다. 펩타이드의 길이는 다수의 에피토프, 및 가능한 추가의 아미노산을 포함시키기 위해 적합하다. 따라서, 펩타이드는 9개 또는 10 내지 69개 펩타이드 길이 이상일 수 있다.
- [0031] 바람직하게, 상기 조성물은 다음을 포함하거나 벡터는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 상이한 펩타이드의 발현을 유도하고, 각각의 펩타이드는 서열 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3),

YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열로 이루어진 상이한 에피토프를 포함하거나 이들로 이루어진다.

- [0032] 하나의 구현예에서, 상기 조성물은 다음을 포함하거나 상기 백터는 서열 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열로 이루어진 적어도 2개의 상이한 에피토프를 포함하거나 이들로 이루어진 적어도 하나의 펩타이드의 발현을 유도한다. 하나의 구현예에서, 펩타이드는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 상기 에피토프를 포함하거나; 발현 백터는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 상기 에피토프를 포함하는 펩타이드의 발현을 유도한다.
- [0033] 수개의 용액은 동일한 환자에서 조성물에 또는 발현 생성물에 제공되는 상이한 에피토프를 갖도록 존재한다. 조성물은 다음을 포함할 수 있거나 백터는 상기 그룹의 하나 이상의 상이한 에피토프를 포함하는 하나 이상의 펩타이드의 발현을 유도하여 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 상기 에피토프 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7)은 상기 조성물에 존재하거나 발현된다.
- [0034] 본 발명에 따라 하나 초과 펩타이드의 발현을 유도하는 발현 백터를 언급하는 경우, 수개의 펩타이드의 발현을 유도하는 백터 (여기서, 상기 펩타이드는 그룹의 1개의 에피토프, 또는 1개 초과, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7개의 에피토프를 포함할 수 있다), 또는 적어도 2개의 발현 백터를 포함하는 조성물을 가질 수 있고, 여기서, 수개의 백터 각각은 적어도 1개의 펩타이드의 발현을 유도한다. 하나의 구현예에서, 조성물은 하나의 단일 백터 또는 수개의 백터를 포함하고 백터(들)는 하나 이상의 펩타이드 및 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 상기 에피토프의 발현을 유도한다.
- [0035] 본 발명에 따른 에피토프 및 다른 gag 또는 pol 아미노산 잔기들을 포함하는 단리되거나 정제된 29량체 펩타이드의 예는 다음과 같다:
- [0036] KSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKVKSTK (서열번호 8),
- [0037] TLLDSIAHGHRLIPYDWEILAKSSLSPSQ (서열번호 9),
- [0038] LAKSSLSPSQFLQFKTWWIDGVQEQVRRN (서열번호 10),
- [0039] GPLQPGLPSPAMIPKDWPLLIIDLKDCF (서열번호 11),
- [0040] KLIDCYTFLQAEVANAGLAIASDKIQTST (서열번호 12),
- [0041] WIRPTLGIPTYAMSNLFSILRGSDLSNSK (서열번호 13), 및
- [0042] RDVETALIKYSMDDQLNQLFNLLQQTVRK (서열번호 14). 이들 단리된 또는 정제된 29량체 펩타이드 또는 단편 또는 9량체 에피토프를 포함하는 28 내지 10개 아미노산 잔기의 단리되거나 정제된 형태하에서 각각의 하나가 본 발명의 목적이다. 상기 펩타이드는 길이가 29개 미만의 잔기, 예를 들어, 9량체 에피토프를 포함하는 서열번호 8 내지 14의 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 또는 28개의 잔기일 수 있다. 흥미롭게도, 상기 에피토프에 부가된 아미노산 서열은 서열번호 8 내지 14의 펩타이드의 경우에서와 같이 다른 잠재적 CD4 및/또는 CD8 T 에피토프를 포함할 수 있다. 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 에피토프 및 C-말단 및/또는 N-말단에서 "추가 아미노산"을 포함하는 펩타이드를 제공한다. 이들 추가 아미노산은 서열 1 내지 16과 함께 본원에 개시된 바와 같은 gag 또는 pol 서열일 수 있다. 그러나, 본 발명은 이들 gag/pol 서열 내 이들 "추가 아미노산"의 수준에서 아미노산의 변형을 포함한다. 따라서, 본 발명은 서열 1 내지 16을 포함하는 상기 서열들을 포함하고, 여기서, 상기 추가 아미노산 서열은 gag/pol 서열과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성 백분율을 갖는다.
- [0043] 하나의 구현예에서, 본 발명의 조성물은 서열번호 8의 펩타이드, 또는 서열번호 13의 펩타이드, 또는 서열번호 8 및 13의 펩타이드 둘 다 및 서열번호 8 내지 14의 다른 1, 2, 3, 4, 5개의 다른 펩타이드를 포함하거나 발현한다.
- [0044] 하나의 구현예에서, 상기 조성물은 애쥬반트를 추가로 포함한다.
- [0045] 단리되거나 정제된 형태하의 펩타이드 RLIPYDWEI (서열번호 2)가 본 발명의 목적이다.

- [0046] 단리되거나 정제된 형태하의 펩타이드 KLIDCYTFL (서열번호 3)이 본 발명의 목적이다.
- [0047] 단리되거나 정제된 형태하의 펩타이드 YLSFIKILL (서열번호 4)이 본 발명의 목적이다.
- [0048] 단리되거나 정제된 형태하의 펩타이드 AMIPKDWPL (서열번호 5)이 본 발명의 목적이다.
- [0049] 단리되거나 정제된 형태하의 펩타이드 YAMSNLFSI (서열번호 6)가 본 발명의 목적이다.
- [0050] 단리되거나 정제된 형태하의 펩타이드 SMDDQLNQL (서열번호 7)이 본 발명의 목적이다.
- [0051] 단리되거나 정제된 형태하의 서열번호 1 내지 7의 상기 펩타이드의 적어도 하나를 포함하는 10 내지 100개 아미노산의 펩타이드가 본 발명의 목적이다.
- [0052] 단리되거나 정제된 형태하의 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), 및 SMDDQLNQL (서열번호 7) 에피토프 중 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개를 포함하는 펩타이드가 본 발명의 목적이다. 상기 펩타이드는 바람직하게 FLQFKTWWI (서열번호 1) 및/또는 YAMSNLFSI (서열번호 6)를 포함한다.
- [0053] 하나의 구현예에서, 이러한 펩타이드는 9 내지 100개, 특히 9 내지 70개, 또는 9 내지 50개, 40개, 30개, 25개, 20개, 또는 심지어 10 내지 30개, 12 내지 25개, 바람직하게 14 내지 18개, 예를 들어, 14, 15, 16, 17, 또는 18개 연속의 잔기들, 연속 잔기들, 바람직하게 HERV-K gag 및/또는 pol, 보다 바람직하게 고유 컨센서스 HERV-K gag 및/또는 pol 서열의 연속 잔기들을 포함할 수 있고, 이는 상기된 에피토프 중 적어도 하나를 포함하며, 서열번호 1 내지 7의 서열의 상응하는 에피토프에 추가의 아미노산을 갖고, 이는 본원에 개시된 바와 같이 HERV-K gag 또는 pol에 존재하는 바와 같고 상기 에피토프의 5', 3', 또는 5' 및 3'에서 연장하는 아미노산들을 갖는다. 상기 펩타이드는 길이가 50개 미만의 잔기, 예를 들어, 길이가 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 45개인 잔기, 전형적으로 14, 15, 16, 17 또는 18개인 잔기일 수 있다. 본 발명의 또 다른 목적은 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7), 및 이들 중 적어도 2개 (특히, 이들 중 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산, 및 환자에서 핵산 (폴리뉴클레오타이드)의 생체내 발현을 유지하는데 필요한 요소들을 포함하는 발현 벡터이다.
- [0054] 3개의 gag 에피토프를 포함하는 HERVK-gag 폴리펩타이드의 하나의 예:

MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGVVKVSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDL
 KDWSQKETEGHLHCEYVAEPVMAQSTQNVQYNQLQEVIYPETLKLEESKPRGTSPLPAG
 QVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPPEQYGYPGMPPAPQGRAPYP
 QPPTRRNLNPTAPPSRQGSKLHEIAQEGEPPTVEARYKSFSIKKDKDMKEGVKQYGNPNSP
 YMRLLDSIAHGHRLLIPYDWEILAKSSLSPSQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRANPPVNI
 DADQLLGIGQNWSTISQQALMQNEAIEQVRAICLRAWEKIQDPSKEPYPDFVARLQDVA
 QKSIADKARKVIVELMAYENANPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHK
 AMLMAQAITGVVLGGQVRTFGRKCYNCGQIGHLKKNCPVLNKNQITQATTTGREPPDLC
 NEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYNNCPPPP (서열번호
 15)
- [0055]

[0056] 4개의 pol 에피토프를 포함하는 HERVK-pol 폴리펩타이드의 하나의 예:

NKSRKRRNRESLLGAATVEPPKPIPLTWKTEKPVVWNQWPLPKQKLEALHLLAN
 EQLEKGHIEPSFSPWNSPVFVIQKKSGKWRMLTDLRAVNAVIQPMGPLQPGLPSPAMIP
KDWPLIIIDLKDCFFTIPLAEQDCEKFAFTIPAINNKEPATRFQWKVLPQGMLNSPTICQTF
 VGRALQPVREKFSDCYIIHCIDDILCAAETKDKLIDCYTFLQAEVANAGLAIASDKIQTSTPF
 HYLGMQIENRKIKPQKIEIRKDTLKLNDLFQKLLGDINWIRPTLGIPTYAMSNLFSILRGDSD
 LNSKRMLTPEATKEIKLVEEKIQSAQINRIDPLAPLQLLIFATAHSPTGIIIQNTDLVEWSFLP
 HSTVKTFTLYLDQIATLIGQTRLRIIKLCGNPDKIVVLTKEQVRQAFINSGAWKIGLANFVG
 IIDNHYPKTKIFQFLKLTWILPKITRREPLENALTVFTDGSSNGKAAAYTGPKERVIKTPYQS
 AQRAELVAVITVLQDFDQPINIISDSAYVVQATRDVETALIKYSMDDQLNQLFNLLQQTVR
 KRNFPFYITHIRAHTNLPGLTKANEQADLLVSSALIKAQELHALTHVNAAGLKNKFDVTW
 KQAKDIVQHCTQCQVLHLPTQEAGVNPRGLCPNALWQMDVTHVPSFGRLSYVHVTVDT
 YSHFIWATCQSTSHVKKHLLSCFAVMGVPEKIKTDNGPGYCSKAFQKFLSQWKISHTTGI
 PYNSQGQAIVERTNRTLKTQLVKQKEGGDSKCTTPQMQLNLALYTLNFLNIYRNQTTTSA
 EQHLTGKKSPGENQLPVWIPTRHLKFYNEPIRDAKSTSA (서열번호 16)

[0057]

[0058] 서열번호 15 및 16의 단리되거나 정제된 폴리펩타이드는 본원에 정의된 바와 같고 서열번호 15 및/또는 서열번호 16의 폴리펩타이드(들)를 포함하거나 이를 발현하는 조성물, 면역원성 조성물 및 항암 백신과 같이 본 발명의 목적이다.

[0059] 하나의 구현예에서, 발현 벡터는 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 에피토프를 포함하는 9 내지 100개, 특히, 9 내지 70개, 또는 9 내지 50개, 40개, 30개, 25개, 20개의 아미노산 펩타이드(암화화된 펩타이드는 길이가 50개 미만의 잔기, 예를 들어, 길이가 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 45개 잔기일 수 있다)을 암호화하는 핵산 및 환자에서 상기 핵산 (폴리뉴클레오타이드)의 생체내 발현을 위해 필요한 요소들을 포함한다. 상기 언급된 바와 같이, 상기 벡터는 벡터가 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 에피토프-함유 펩타이드의 발현을 유도하거나 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 상기 에피토프를 포함하는 펩타이드의 발현을 유도하도록 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 언급된 바와 같이, 벡터는 하나 또는 수개의 이들 에피토프, 및 관련 에피토프에 추가로 아미노산 잔기들을 포함하는 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 추가의 잔기들은 pol 또는 gag로부터 기원할 수 있거나, gag 또는 pol에 외래성일 수 있다.

[0060] 발현 작제물 또는 벡터는 비-바이러스 발현 작제물, 예를 들어, 세균 발현 작제물, DNA 또는 RNA 발현 작제물 또는 바이러스 발현 작제물일 수 있다. 발현 작제물은 항원 제공 세포에 위치할 수 있다. 작제물은 발현 작제물의 세포의 계층으로의 통합을 유도할 수 있다.

[0061] 본 발명은 또한 암을 치료하는데 사용하기 위한 이들 조성물에 관한 것이다. 상기 용도와 관련된 암은 특히 (그러나 제한 없이) 하기의 암으로부터 선택될 수 있다: 3중 음성 유방암(triple negative breast cancer)을 포함하는 유방암, 난소암, 흑색종, 육종, 기형암종, 방광암, 폐암 (비 소세포 폐 암종(non small cell lung carcinoma) 및 소세포 폐 암종(small cell lung carcinoma)), 두경부암(head and neck cancer), 결장-직장암 (colo-rectal cancer), 교모세포종, 및 백혈병 등, 예를 들어, 3중 음성 유방암을 포함하는 유방암, 난소암, 흑색종, 육종, 기형암종, 방광암 및 백혈병.

[0062] 상기 용도는 환자에서, 예를 들어, 유방암 환자에서 T-세포 반응, B-세포 반응 또는 둘 다를 활성화시키는 것을 목적으로 할 수 있다.

[0063] 본 발명은 또한 본원에 개시된 바와 같은 암을 치료하기 위한 면역원성 조성물 또는 백신의 제조를 위한, 본원에 개시된 바와 같은 하나의 9량체 에피토프 또는 수개의 9량체 에피토프, 또는 본원에 개시된 바와 같은 하나의 발현 벡터 또는 수개의 발현 벡터들 또는 본원에 개시된 바와 같은 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0064] 본 발명의 또 다른 목적은 이를 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된 바와 같은 치료학적 유효량의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여함을 포함하는, 암을 치료하기 위한 방법이다. 상기 설명된 바와 같이, 조성물은 펩타이드

드 또는 펩타이드들, 또는 하나 이상의 발현 벡터들 또는 작제물들(constructs)을 포함할 수 있다. 상기 방법은 1회 초과로 백신을 투여함을 포함할 수 있다. 펩타이드의 투여되는 하루 치료학적 유효량 (본 발명에 따른 펩타이드 또는 펩타이드들의 총양)은 0.01 mg 내지 10 mg, 0.025 mg 내지 5.0 mg 범위일 수 있거나, 0.025 mg 내지 1.0 mg의 범위일 수 있다.

[0065] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 암 치료를 필요로 하는 환자의 세포독성 T 림프구 (Cytotoxic T Lymphocyte(CTL))를 본 발명에 따른 조성물 또는 면역원성 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (b) 단계 (a)의 치료학적 유효량의 CTL을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 암을 치료하기 위한 방법이다. 상기 방법은 투여 전 생체의 또는 생체내 방법에 의해 상기 CTL을 확장시킴을 추가로 포함할 수 있다. 접촉은 본 발명의 펩타이드(들)가 로딩된 항원-제공 세포(antigen-presenting cell loaded with the peptide(s))를 제공하거나 발현 작제물로부터 상기 펩타이드(들) 또는 폴리뉴클레오타이드(들)를 발현시킴을 포함할 수 있다. 치료학적 이득을 제공하기 위해 요구되는 CTL 세포의 치료학적 유효량은 대상체의 킬로그램 체중 당 약 0.1×10^4 내지 약 5×10^9 개 세포일 수 있다. 상기 방법은 1회 초과로 단계 (b)를 수행함을 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명은 또한 환자의 세포독성 T 림프구 (CTL)를 본 발명에 따른 조성물 또는 면역원성 조성물과 접촉시키는 단계 및 가능하게는 상기 CTL을 생체의 확장시키는 단계를 포함하는, CTL을 제조하는 방법에 관한 것이다. 접촉은 본 발명의 펩타이드(들)로 로딩된 항원-제공 세포를 제공하거나 발현 작제물로부터 상기 펩타이드(들) 또는 폴리펩타이드(들)를 발현시킴을 포함할 수 있다.

[0067] 상기 개시된 바와 같이 제조된, 약제학적 비히클에서 그러한 CTL을 포함하는 조성물은 또한 본 발명의 목적이다.

[0068] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명으로부터의 에피토프 펩타이드를 인지(recognizing)하는 T-세포 수용체 (TOR) 조작된 T 세포(T-cell Receptor (TCR) engineered T cell) 및 약제학적 비히클 내 그러한 T 세포를 포함하는 조성물이다. 이들 T 세포를 제조하는 공정은 당업자에게 공지되어 있다. 이것은 하기와 같을 수 있다 (상기 공정은 또한 본 발명의 목적이다): (i) TOR α 및 β 쇄는 본 발명으로부터의 에피토프 펩타이드를 인지하는 T 세포로부터 단리되어 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스)로 삽입되고; (ii) 환자 또는 공여자의 말초 혈액으로부터 단리된 T 세포는 그러한 벡터로 변형시켜 목적하는 TCR $\alpha 3$ 서열을 암호화시키고; (iii) 이어서, 이들 변형된 T 세포는 시험관내 확장시켜 치료를 위해 충분한 수를 수득하고 환자에게 투여된다. 참고로, TOR 서열은 TOR 친화성의 최적화를 위해 변형될 수 있다. 이들 T 세포의 사용 방법, 예를 들어, 암의 치료 방법은 본 발명의 또 다른 목적이고, 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 상기 T 세포를 투여함을 포함한다. 치료학적 이득을 제공하기 위해 요구되는 T 세포의 치료학적 유효량은 대상체의 킬로그램 체중 당 약 0.1×10^4 내지 약 5×10^9 개 세포일 수 있다.

[0069] 하나의 구현예에서, 상기 암은 3중 음성 유방암 (TNBC), 다른 유방암, 난소암, 흑색종, 육종, 기형암종, 방광암, 폐암 (비 소세포 폐 암종 및 소세포 폐 암종), 두경부암, 결장-직장암, 교모세포종, 및 백혈병, 예를 들어, 3중 음성 유방암을 포함하는 유방암, 난소암, 흑색종, 육종, 기형암종, 방광암 및 백혈병이다.

[0070] 본원에 개시된 바와 같이 에피토프로 만들어지거나 이를 포함하는 항원을 사용하여 항-HERV-K 항체를 생성하고 HERV-K+ 암 환자에서 항-HERV-K 항체의 존재를 검출할 수 있다.

[0071] 본 발명에 따른 적어도 하나의 항원성 펩타이드를 포함하는 에피토프 및 조성물은 진단, 예후 또는 면역모니터링 방법에 사용될 수 있다. 특히, 본 발명은 또한 환자에서 면역 반응의 면역모니터링을 위한 방법에 관한 것이다. 면역치료요법 (본 발명의 에피토프 또는 조성물을 사용한 백신 또는 후천성 항종양 T 세포 반응을 유도하는 임의의 다른 면역치료요법) 후 항종양 후천성 반응의 유도는 본 발명의 HERV 에피토프에 대한 특이적 T 세포 반응의 측정에 의해 평가된다. 측정은 예를 들어, 직접적으로 또는 본 발명에 기재된 펩타이드를 사용한 생체의 자극 후 본 발명에 기재된 에피토프를 함유하는 다량체를 사용함에 의해 수행될 수 있다. T 세포 반응의 측정은 또한 FACS 분석, ELISA, ELISPOT 또는 특이적 T 세포 활성화를 검출하기 위한 다른 방법을 사용함에 의해 본 발명의 펩타이드를 사용한 생체의 자극 후 수행될 수 있다.

[0072] 하나의 구현예에서, 생물학적 샘플은 종양으로부터의 혈액, 순환 세포를 함유하는 혈액 유도체 또는 림프구이다. 바람직하게, 상기 방법은 혈액 중 일부 림프구가 시험관내 자극시 관심 대상의 펩타이드를 특이적으로 인지할 수 있고/있거나 이에 대해 특이적으로 재활성화될 수 있는지를 결정함을 포함한다.

[0073] 당업자는 종양 연관 펩타이드에 대한 면역 반응이 생성되는지를 결정하는 다양한 검정법을 알고 있다. 용어 "

면역 반응"은 세포 및 체액성 면역 반응 둘 다를 포함한다. 다양한 B 림프구 및 T 림프구 검정, 예를 들어, ELISA, 세포독성 T 림프구 (CTL) 검정, 예를 들어, 크로뮴 방출 검정, 말초 혈액 림프구 (PBL)를 사용한 증식 검정, 사량체 검정 및 사이토킨 생성 검정은 널리 공지되어 있다. 본원에 참조로 포함되는 문헌 (Benjamini et al. (1991))을 참조한다.

[0074] 발명의 상세한 설명

[0075] 본원 발명자들은 인간 계놈 상에 HERV 서열을 위치시키고 HERV의 RNAseq 분석을 개발하였다. 공중의 데이터베이스로부터, 이의 42개가 3중 음성 유방암 (TNBC)으로부터 기원하고 42개가 ER+ 서브타입으로부터 기원하는 84개 유방암의 RNAseq 데이터를 사용하여, 이들은 본 발현을, 이의 51개가 종양 주변 영역으로 기원하고 5개가 포유동물 감소 샘플로부터 기원하는 정상의 유방 조직 샘플로부터의 RNAseq와 비교하였다. 19개 HERV는 특이적으로 TNBC에서 과발현되고, 이들 대부분은 HERV-K 계열에 속한다.

[0076] 다수의 성분 분석은 HERV가 3중 음성 서브타입을 특징 분석하기 위해 사용될 수 있음을 보여주었다. HERV 발현은 각각 HERV의 전사를 양성으로 및 음성으로 조절하는 2개의 인자인 보다 높은 OCT4 (POU5F1) 및 보다 낮은 TRIM28 수준과 연관된다. EMT 시그니처와의 연관성이 또한 관찰되었고 이는 TNBC에서 엄격한 특성과 연관될 수 있다. 흥미롭게도, T 세포 및 세포독성 림프구 전사체 시그니처와 유의적으로 상호관련된 HERV 발현은 I형 인터페론 (IFN) 반응 및 항원 제공 세포 시그니처의 존재에 의해 설명될 수 있다. 이펙터 T 세포 시그니처는 면역조절 시그니처 (음성 면역 관문 및 ID01/2를 포함함) 및 서프레서 세포 (조절 T 세포 및 MDSC를 포함함)에 의해 균형 조절된다.

[0077] HERV의 다형태는 흔히 특이적 HERV 항원에 대한 T 세포 반응을 특징 분석하거나 암 백신접종의 전략에서 이들을 사용하는 주요 장벽으로서 고려된다. TNBC를 특징 분석하는 제한된 수의 HERV의 특이적 발현을 기준으로, TNBC에서 발현되는 상이한 HERV 간에 공유된 Gag 및 PoI 단백질 내부에 통상의 영역을 동정할 수 있고 이어서 이들 도메인에 존재하는 T 세포 에피토프를 결정할 수 있는 것으로 추정되었다. 각각의 단백질에 대해 온전한 ORF를 함유하는, TNBC에서 과발현된 여러 HERV-K로부터의 Gag 및 PoI에서 통상의 영역은 효과적인 것으로 발견되었다. 흥미롭게도, 이들 공유된 도메인은 상이한 에피토프 예측 도구 (NetMHC I 및 II를 포함함)를 사용하여, 가장 흔한 MHC 부류 I 및 II 대립형질에 대해 잠재적 강한 에피토프 결합제에 농축된 여러 영역을 함유한다.

[0078] 예측된 HLA-A2 에피토프에 상응하는 9량체 펩타이드를 합성하고 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)의 자극으로 관심 대상의 펩타이드에 대한 특이적 반응을 유도하는 시험관내 프로토콜에 대해 사용된다. 특이적 CD8+ T 세포의 존재는 다량체 염색에 의해 평가되었고 기능적 반응 (IFN 감마 생성 및 탈과립화)은 추가로 동족체 펩타이드로 펄싱된 T2 세포(T2 cells pulsed with the cognate peptide)에 대하여 평가하였고, 이는 본 발명에 따라 제조된 HERV 펩타이드에 대해 CD8+ T 세포의 특이적 활성화를 보여준다. 추가로, HERV-발현 종양 세포주에 대한 HERV-특이적 CD8+ T 세포의 세포독성은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적인 CD8+ T 세포를 사용하여 입증되었고 이는 이들 펩타이드에 의해 생성된 T 세포의 기능성 항종양 성질을 확인시켜준다.

[0079] 종양 세포에서 증진된 HERV 발현 및 수득된 결과를 고려하여, 다음과 같이 결론내릴 수 있다:

[0080] - HERV는 우선적으로 종양에서 발현되고 19 HERV 서브타입은 3중 음성 유방암 (TNBC)을 특징화하고, 이들의 대부분은 HERV-K 계열에 속한다.

[0081] - T 세포 에피토프를 함유하는 통상의 서열은 이들 19개 HERV 서브타입 간에 발견될 수 있다.

[0082] - 7개의 9량체 펩타이드는 강한 HLA-A2 결합제로서 동정되었고, 동족체 펩타이드로 펄싱된 T2 세포에 대해 또는 HERV 발현 종양 세포주에 대한 특이적 세포독성 반응과 함께 특이적 CD8+ T 세포 반응을 유발할 수 있다: FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6), SMDDQLNQL (서열번호 7).

[0083] - HERV 생성물은 따라서 기능적 T 세포 반응을 유도할 수 있는 공유된 종양 항원을 나타낸다. HERV-유래된 종양 항원은 암 백신을 개발하고 후천적 면역 반응을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다.

[0084] 정의

[0085] 용어 "단리된", "정제된", 또는 "생물학적으로 순수한"은 이것이 고유 상태(native state)로 발견되는 바와 같은 재료에 정상적으로 수반하는 성분들이 실질적으로 또는 필수적으로 부재(不在)인 재료를 언급한다. 따라서, 본 발명에 따른 단리된 펩타이드는 바람직하게 이들의 동일계 환경에서 펩타이드와 정상적으로 연합된 재료를

함유하지 않는다.

- [0086] "주요 조직적합성 복합체(Major histocompatibility complex)" 또는 "MHC"는 생리학적 면역 반응에 관여하는 세포 상호작용의 제어에서 역할을 수행하는 유전자 클러스터이다. 인간에서, MHC 복합체는 또한 HLA 복합체로서 공지되어 있다.
- [0087] MHC 및 HLA 복합체의 상세한 설명을 위해 "인간 백혈구 항원(Human leukocyte antigen)" 또는 "HLA"는 인간 부류 I 또는 부류 II 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 단백질이다.
- [0088] 용어 "약제학적으로 허용되는" 또는 "약리학적으로 허용되는"은 인간에게 투여되는 경우 알레르기 또는 유사한 원치않는 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 언급한다. 활성 성분으로서 단백질을 함유하는 수성 조성물의 제조는 당업계에서 널리 이해되고 있다. 전형적으로, 그러한 조성물은 약제학적으로 허용되는 통상적인 비히클 또는 부형제, 또는 액체 용액 또는 현탁액으로서 담체와 함께 주사 가능한 것으로서 제조되고; 주사 전에 액체의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다.
- [0089] 본원에 사용된 바와 같은 "비히클, 부형제, 담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅, 희석제, 항생균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 그러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0090] "면역원성 펩타이드"는 환자에서 면역계에 일단 제공되는 펩타이드가 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 유도할 수 있고, 이러한 반응은 면역원성이지만 필연적으로 보호성이 아님을 의미한다. 이것은 "면역원성 조성물"에 적용한다.
- [0091] "면역원성 반응"은 감염성 제제 또는 종양 항원으로부터 유래된 항원에 대한 CTL 및/또는 HTL 반응을 언급한다. 면역 반응은 또한 헬퍼 T 세포의 자극에 의해 촉진된 항체 반응을 포함할 수 있다.
- [0092] 특히, 면역원성 조성물은 조성물에 존재하는 HERV 펩타이드에 대한 및/또는 종양 세포에서 발현하는 유사한 에피토프를 포함하는 HERV 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 대한 CD8+ T 세포의 생체내 활성화를 유도할 수 있다.
- [0093] "백신 조성물" 또는 "백신 펩타이드"는 일단 환자에게 투여되고 환자의 면역계에 각각 제공되면, 조성물 또는 펩타이드가 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 유도할 수 있고, 이러한 면역 반응이 보호성임을 의미한다.
- [0094] "보호성 면역 반응"은 질환 증상 또는 진행을 예방하거나 적어도 부분적으로 정지시키는 감염성 제제 또는 종양 항원으로부터 유래된 항원에 대한 CTL 및/또는 HTL 반응을 언급한다. 면역 반응은 또한 헬퍼 T 세포의 자극에 의해 촉진된 항체 반응을 포함할 수 있다.
- [0095] "면역원성"은 환자에, 특히 환자의 혈액, 조직 또는 기관에 존재하면 펩타이드 또는 에피토프가 체액성 및/또는 세포-매개된 면역 반응을 유도할 수 있음을 의미한다.
- [0096] 조성물 또는 벡터가 "발현을 유도한다"라는 것은 이것이 펩타이드(들)을 암호화하는 핵산, DNA 또는 RNA를 포함하는 발현 벡터 또는 발현 벡터들을 포함함을 의미한다. 상기 벡터는 특히 RNA 벡터, DNA 벡터 또는 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 세균 벡터일 수 있다. 발현 카세트의 숙주 세포 계승으로의 통합될 수 있거나 벡터의 특성에 의존하여 통합이 아닐 수 있고 이는 당업자에게 널리 공지되어 있다. 발현 벡터 또는 발현 카세트는 환자에서 핵산 (폴리뉴클레오타이드)의 생체내 발현을 위해 필요한 요소들을 추가로 포함할 수 있다. 최소 방식에서, 이것은 개시 코돈 (ATG), 정지 코돈 및 프로모터로 이루어지고, 플라스미드, 및 폭스바이러스 이외의 다른 바이러스 벡터와 같은 특정 벡터에 대한 폴리아데닐화 서열로 이루어진다. ATG는 판독 프레임의 5'에 위치하고 정지 코돈은 3'에 위치한다. 이것이 널리 공지된 바와 같이, 발현을 제어할 수 있게 하는 다른 요소들이 존재할 수 있고, 예를 들어, 인핸서 서열, 안정화 서열 및 펩타이드의 분비를 허용하는 신호 서열이 있다.
- [0097] 단백질 또는 펩타이드는 당업자에게 공지된 임의의 기술에 의해 제조될 수 있고, 이는 표준 분자 생물학적 기술을 통한 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 발현, 천연 공급원으로부터 단백질 또는 펩타이드의 단리 또는 단백질 또는 펩타이드의 화학적 합성을 포함한다. 합성 펩타이드는 일반적으로 약 최대 35개 잔기 길이일 것이고, 이는 제조원 (Applied Biosystems (Foster City, Calif.))으로부터 가용한 것들과 같이 자동화 펩타이드 합성 기기의 대략적인 상한치 길이이다. 보다 긴 펩타이드는 또한 예를 들어, 제조합 수단에 의해 제조될 수 있다.
- [0098] "펩타이드 에피토프" 또는 "에피토프"는 펩타이드가 HLA 분자에 결합하고 CTL 및/또는 HTL 반응을 유도하도록 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프를 포함하는 펩타이드이다. 따라서, 본 발명의 면역원성 또는 백신 펩

타이드는 적어도 하나의 "펩타이드 에피토프"를 포함하고 적절한 HLA 분자에 결합할 수 있고 이후 이로부터 면역원성 또는 백신 펩타이드가 유래된 항원에 대한 세포독성 T 세포 반응 또는 헬퍼 T 세포 반응을 유도할 수 있다.

[0099] 이것은 본 발명의 펩타이드가 치환, 삽입 또는 결실 변이체와 같은 아미노산 서열 변이체를 추가로 사용할 수 있는 것으로 고려된다. 결실 변이체는 본래의 단백질의 하나 이상의 잔기가 결여되어 있다. 삽입 돌연변이체는 전형적으로 폴리펩타이드 내 비-말단 지점에서 재료의 부가를 포함한다. 치환은 기존의 아미노산에 대한 변화이다. 이들 서열 변이체는 절단, 점 돌연변이 및 프레임시프트 돌연변이를 생성할 수 있다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 합성 펩타이드는 이들 돌연변이에 의해 생성될 수 있다.

[0100] 이것은 또한 아미노산 서열 변이체가 부가적 잔기, 예를 들어, 추가의 N- 또는 C-말단 아미노산을 포함할 수 있지만 여전히 필수적으로 서열이 생물학적 활성의 유지를 포함하는, 상기 제시된 기준을 충족하는 이상 본원에 개시된 서열 중 하나에 제시된 바와 같은 것으로 이해된다.

[0101] 하기에서는 돌연변이된, 절단된 또는 변형된 단백질을 생성하기 위해, 본 발명의 펩타이드 또는 단백질과 같은 단백질의 아미노산을 변화시키는 것을 토대로 논의된다. 예를 들어, 특정 아미노산은 중앙-연관된 펩타이드 또는 단백질에서 다른 아미노산으로 대체되어 보다 큰 CTL 면역 반응을 유도할 수 있다. 이것은 단백질의 생물학적 기능 활성을 한정하는 단백질의 상호작용 능력 및 성질이기에 때문에, 특정 아미노산 치환은 단백질 서열, 및 이의 기본 핵산 암호화 서열에서 만들어짐으로써 돌연변이된, 절단된 또는 변형된 단백질을 생성할 수 있다.

[0102] 그러한 변화를 만드는데 있어서, 아미노산의 수치 지수 (hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질에 대한 상호작용 생물학적 기능을 부여하는데 있어서 수치 아미노산 지수의 중요성은 일반적으로 당업계에서 이해된다. 이것은 아미노산의 상대적 수치적 특징이 수득한 단백질의 2차 구조에 기여하고, 이어서 다른 분자, 예를 들어, 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과 단백질의 상호작용을 한정하는 것으로 받아들여진다.

[0103] 이것은 또한 당업계에서 유사 아미노산의 치환이 친수성을 토대로 효과적으로 만들어질 수 있는 것으로 이해된다. 미국 특허 제4,554,101호는 본원에 참조로 포함되고 이의 인접한 아미노산의 친수성에 의해 지배되는 바와 같은 단백질의 최대 국소 평균 친수성이 단백질의 생물학적 성질과 상호관련됨을 기재한다. 하기의 친수성 값은 아미노산 잔기에 할당되었다: 염기성 아미노산: 아르기닌 (+3.0), 라이신 (+3.0), 및 히스티딘 (-0.5); 산성 아미노산: 아스파르트레이트 (+3.0±1), 글루탐레이트 (+3.0±1), 아스파라긴 (+0.2), 및 글루타민 (+0.2); 친수성 비이온 아미노산: 세린 (+0.3), 아스파라긴 (+0.2), 글루타민 (+0.2), 및 트레오닌 (-0.4), 황 함유 아미노산: 시스테인 (-1.0) 및 메티오닌 (-1.3); 소수성, 비방향족 아미노산: 발린 (-1.5), 류신 (-1.8), 이소류신 (-1.8), 프롤린 (-0.5±1), 알라닌 (-0.5), 및 글라이신 (0); 소수성의 방향족 아미노산: 트립토판 (-3.4), 페닐알라닌 (-2.5), 및 티로신 (-2.3).

[0104] 아미노산이 유사한 친수성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있고 생물학적으로 또는 면역학적으로 변형된 단백질을 생성할 수 있는 것으로 이해된다. 그러한 변화에서, 이의 친수성 값이 ±2 이내에 있는 아미노산의 치환은 바람직하고, ±1 이내에 있는 아미노산의 치환이 특히 바람직하고 ±0.5 이내에 있는 아미노산의 치환이 보다 더 특히 바람직하다.

[0105] 상기 명시된 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환의 상대적 유사성, 예를 들어, 이들의 소수성, 친수성, 하전, 크기 등을 기준으로 한다. 다양한 이전의 특징을 고려하는 예시적 치환은 당업자에게 널리 공지되어 있고 다음을 포함한다: 아르기닌과 라이신; 글루탐이트와 아스파르트이트; 세린과 트레오닌; 글루타민과 아스파라긴; 및 발린, 류신과 이소류신.

[0106] 다른 조성물 성분

[0107] 본 발명의 다른 구현예에서, 조성물은 추가의 면역자극 제제 및 또는 그러한 제제를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 면역자극 제제는 추가의 항원, 면역조절제 또는 항원 제공 세포 또는 보조제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 추가의 제제(들)는 공유적으로 펩타이드에 결합된다. 다른 면역 강화 화합물은 또한 키토산을 포함하는, 폴리사카라이드와 같은 본 발명의 조성물과 함께 사용하기 위해 고려된다. 다수의 (하나 초과) 에피토프 또는 펩타이드는 서로 가교결합될 수 있다 (예를 들어, 중합체화될 수 있다).

[0108] 면역화 또는 백신접종을 위한 작은 펩타이드의 사용은 또한 전형적으로 최종 생성물 또는 표적 펩타이드 또는 에피토프에 면역원성 또는 가장 강한 면역원성을 부여하는 담체 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질로의 펩타이드의 접합을 요구할 수 있다. 따라서, 본 발명의 구현예에서, FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호

2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6) 및 SMDDQLNQL (서열번호 7) 중에서 각각 선택된 펩타이드는 펩타이드 링크를 통해 본 발명의 접합된 생성물 또는 펩타이드에 면역원성 또는 가장 강한 면역원성을 부여하는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 (추가 아미노산 잔기)에 접합되거나 연결된다.

[0109] 하나의 구현예에서, 펩타이드 또는 에피토프 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6) 및/또는 SMDDQLNQL (서열번호 7)는 보다 긴 펩타이드 또는 폴리펩타이드, 특히 HERV-K 펩타이드 또는 폴리펩타이드로 존재하고 바람직하게 이것은 에피토프가 기원하는 HERV-K에서 에피토프를 포함하는 천연의 보다 긴 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다. 보다 긴 서열은 따라서 예를 들어, 서열번호 8 내지 14의 서열로 제공된다. 변이체에서, 여러 에피토프는 동일한 보다 긴 펩타이드의 일부이다. 보다 긴 펩타이드를 접합된 최종 생성물에 면역원성 또는 가장 강한 면역원성을 부여하는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질에 접합시키는 것은 또한 본 발명에 포괄된다.

[0110] 본 발명에 따른 면역원성 조성물 또는 백신에서, 거기에 함유되거나 백터(들)에 의해 발현되는 펩타이드는 면역원성이거나 보호 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0111] 조성물 또는 펩타이드 또는 에피토프가 면역 모니터링과 같은 진단 또는 검정 목적을 위해 사용되는 경우, 펩타이드 또는 에피토프는 항원성일 수 있다. 따라서, 조성물의 구현예에서, 펩타이드 또는 에피토프 FLQFKTWWI (서열번호 1), RLIPYDWEI (서열번호 2), KLIDCYTFL (서열번호 3), YLSFIKILL (서열번호 4), AMIPKDWPL (서열번호 5), YAMSNLFSI (서열번호 6) 및/또는 SMDDQLNQL (서열번호 7), 또는 상기 에피토프를 포함하는 펩타이드 또는 에피토프는 항원성이다. 항원성 펩타이드 또는 에피토프는 접합되지 않은 형태일 수 있거나 (이것은 서열번호 1 내지 7의 에피토프 서열로 이루어져 있다) 본원에 개시된 바와 같은 펩타이드 또는 폴리펩타이드 모이어티에 접합될 수 있다.

[0112] 당업자는 중앙 연관 펩타이드에 대한 면역 반응이 생성되는지를 결정하는 다양한 검정법을 알고 있다. 용어 "면역 반응"은 세포 및 체액성 면역 반응 둘 다를 포함한다. 다양한 B 림프구 및 T 림프구 검정, 예를 들어, ELISA, 세포독성 T 림프구 (CTL) 검정, 예를 들어, 크로뎀 방출 검정, 말초 혈액 림프구 (PBL)를 사용한 증식 검정, 사량체 검정 및 사이토킨 생성 검정은 널리 공지되어 있다. 본원에 참조로 포함되는 문헌 (Benjamini et al. (1991))을 참조한다.

[0113] 애주반트

[0114] 또한 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 특정 면역원 조성물의 면역원성은 애주반트로서 공지된, 면역 반응의 비-특이적 자극제의 사용에 의해 증진될 수 있다. 일부 애주반트는 항원이 제공되는 방식에 영향을 미친다. 예를 들어, 면역 반응은 단백질 항원이 알루미늄 (alum)에 의해 침전된 경우 증가된다. 항원의 유화는 또한 항원 제공의 지속기간을 연장한다. 적합한 분자 애주반트는 모든 허용되는 면역자극 화합물, 예를 들어, 사이토킨, 독소 또는 합성 조성물을 포함한다.

[0115] 예시적인 흔히 바람직한 애주반트는 완전한 프론트 애주반트(사멸된 마이코박테리움 결핵을 포함하는 면역 반응의 비특이적 자극제), 불완전 프론트 애주반트 및 수산화알루미늄 애주반트를 포함한다. 또한 사용될 수 있는 다른 애주반트는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, 인터페론, GM-CSF, BCG, 수산화알루미늄, MDP 화합물, 예를 들어, thur-MDP 및 nor-MDP, CGP (MTP-PE), 지질 A, 및 모노포스포릴 지질 A (MPL)를 포함한다. 2% 스퀴알렌/Tween 80 유제 중에, 세균으로부터 추출된 3개의 성분, MPL, 트레할로스 다미콜레이트 (TDM) 및 세포벽 골격 (CWS)을 함유하는 RIB가 또한 고려된다. MHO 항원도 사용될 수 있다.

[0116] 하나의 양상에서, 애주반트 효과는 포스페이트 완충 식염수에서 약 0.05 내지 약 0.1% 용액 중에 사용되는, 알룸과 같은 제제의 사용에 의해 성취된다. 대안적으로, 항원은 약 0.25% 용액으로서 사용되는 슈가의 합성 중합체 (Carbopol®)와의 혼합물로서 제조된다. 애주반트 효과는 또한 각각 30초 내지 2분 기간 동안 약 70°C 내지 약 101°C 범위의 온도를 사용한 열 처리에 의한 백신에서 항원의 my 응집으로 나타날 수 있다. 알루미늄에 대한 펩신 처리된 (Fab) 항체, 씨. 파르부름 (C. parvum)과 같은 세균 세포(들), 내독소 또는 그람-음성 세균의 리포폴리사카라이드 성분과의 혼합물, 생리학적으로 허용되는 오일 비히클 중의 유제, 예를 들어, 만니드 모노-올레에이트 (Aracel A) 또는 블록 대용물로서 사용되는 퍼플루오로카본 (Fluosol-DA®)의 20% 용액과의 유제와 반응시킴에 의한 응집이 또한 사용될 수 있다.

[0117] 일부 애주반트는 예를 들어, 세균으로부터 수득된 특정 유기 분자는 항원에 대해서 보다는 숙주에 작용한다. 하나의 예는 무라밀 디펩타이드 (N-아세틸무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민 [MDP]), 세균 펩티도글리칸이다.

MDP는 대식세포를 자극할 뿐만 아니라 직접 B 세포를 자극하는 것으로 보인다.

- [0118] 특정 구현예에서, 헤모시아닌 및 헤모에리트린은 또한 본 발명에 사용될 수 있다. 키홀 림프 (KLH)으로부터의 헤모시아닌의 사용은 특정 구현예에서 바람직하지만, 다른 연체동물 및 절지동물 헤모시아닌 및 호모에리트린이 사용될 수 있다.
- [0119] 다양한 폴리사카라이드 애주반트가 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 마우스의 항체 반응에 대한 다양한 페렴 폴리사카라이드 애주반트의 사용이 기재되었다. 폴리사카라이드의 폴리아민 변종, 예를 들어, 탈아세틸화된 키틴을 포함하는 키틴 및 키토산이 특히 바람직하다.
- [0120] 애주반트의 또 다른 그룹은 세균 펩티도글리칸의 무라밀 디펩타이드 (MDP, N-아세틸무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민) 그룹이다. 무라밀 디펩타이드의 유도체, 예를 들어, 아미노산 유도체 트레오닐-MDP, 및 지방산 유도체 MTPPE가 또한 고려된다. 미국 특허 제4,950,645호는 무라밀 디펩타이드의 친지성 디사카라이드-트리펩타이드 유도체를 기재하고 이는 포스파티딜 콜린 및 포스파티딜 글리세롤로부터 형성된 인공 리포솜에 사용하기 위해 기재된다.
- [0121] BCG (바실러스 칼멧트-구에린, 마이코박테리움의 약독화된 균주) 및 BCG 세포벽 골격 (CWS)은 또한 트레할로스 디미콜레이트의 존재 또는 부재하에 애주반트로서 사용될 수 있다. 트레할로스 디미콜레이트 자체가 사용될 수 있다. BCG는 이의 면역자극 성질 때문에 중요한 임상적 도구이다.
- [0122] 양친매성 및 표면 활성제, 예를 들어, 사포닌 및 유도체, 예를 들어, QS21 (Cambridge Biotech)은 본 발명의 면역원과의 사용을 위한 여전히 또 다른 그룹의 애주반트를 형성한다. 비이온성 블록 공중합체 계면활성제가 또한 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또 다른 유용한 그룹의 애주반트이다. Quil A 및 렌티넨은 본 발명의 특정 구현예에서 사용될 수 있는 다른 애주반트이다.
- [0123] 애주반트의 또 다른 그룹은 미국 특허 제4,866,034호의 정제된 탈독성화된 내독소와 같은 탈독성화된 내독소이다.
- [0124] 당업자는 본 발명에 따른 세포 백신에 접합될 수 있는 상이한 종류의 애주반트를 알고 있고 이들은 무엇보다 알킬 리소포스필리피드 (ALP); BCG; 및 비오틴 (비오틴화된 유도체를 포함하는)을 포함한다. 특히 사용을 위해 고려되는 특정 애주반트는 그람-세포 기원의 테이코산이다. 이들은 리포테이코산 (LTA), 리비톨 테이코산 (RTA) 및 글리세롤 테이코산 (GTA)을 포함한다. 이들의 합성 대응물의 활성 형태는 또한 본 발명과 연계하여 사용될 수 있다.
- [0125] 애주반트는 핵산 (예를 들어, DNA 또는 RNA)에 의해 암호화될 수 있다. 그러한 애주반트는 또한 항원을 암호화하는 핵산 (예를 들어, 발현 벡터)에 또는 별도의 벡터 또는 다른 작제물에 암호화될 수 있는 것으로 고려된다. 애주반트를 암호화하는 핵산은 예를 들어 지질 또는 리포솜과 함께 직접 전달될 수 있다. 그러한 애주반트의 예는 폴리-ICLC이다.
- [0126] 발현 벡터
- [0127] 본 발명에 따른 펩타이드는 환자의 신체에 생체내 생산될 수 있다.
- [0128] 면역원성 조성물 또는 백신은 상기된 바와 같은 하나 이상의 펩타이드를 암호화하는 RNA 또는 DNA를 함유하여 상기 펩타이드가 동일계 생성될 수 있도록 한다. RNA 또는 DNA는 핵산 발현 시스템 (누드 DNA 또는 플라스미드, RNA 벡터), 세균 또는 바이러스 발현 시스템을 포함하는, 당업자에게 공지된 임의의 다양한 전달 시스템 내에 존재할 수 있다. 적절한 핵산 발현 시스템은 환자에서 발현을 위해 필요한 RNA 또는 DNA 서열 (예를 들어, 적합한 프로모터 및 말단 신호)을 함유한다. 세균 전달 시스템은 세균 (예를 들어, 바실러스-칼멧트-구에린)의 투여를 포함하여 이는 이의 세포 표면 상에 폴리펩타이드의 면역원성 부분의 발현을 유도한다. 바람직한 구현예에서, RNA 또는 DNA는 비-병원성 (결손), 복제 적격 바이러스의 사용을 포함할 수 있는, 바이러스 발현 시스템 (예를 들어, 백시니아, 다른 폭스 바이러스, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스)을 사용하여 도입될 수 있다. 그러한 발현 시스템으로 RNA 또는 DNA를 도입하기 위한 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. DNA는 또한 예를 들어, 문헌 (참조: Ulmer et al., Science 259:1745-1749 (1993))에 기재되고 문헌 (참조: Cohen, Science 259:1691-1692 (1993))에 의해 검토된 바와 같이 "나출된" 것일 수 있다. 나출된 DNA의 취득은 DNA를 세포로 효율적으로 수송되는 생분해 가능한 비드 상에 코팅시킴에 의해 증가될 수 있다.
- [0129] 바람직한 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 바이러스 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연합 바이러스, 폭스바이러스, 예를 들어, 백시니아 바이러스 및 약독화된 폭스바이러스, 예를

들어, 안카라 (MVA), NYVAC, ALVAC, TROVAC, 다른 바이러스 벡터, 예를 들어, 신드비스 바이러스, 사이토메갈로 바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 세균 벡터를 포함한다.

[0130] 용어 "발현"은 이의 가장 일반적인 의미에서 본 발명에 따라 사용되고 예를 들어, 전사 및/또는 해독에 의해 RNA 및/또는 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 생산을 포함한다. RNA와 관련하여, 용어 "발현" 또는 "해독"은 특히 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 생산에 관한 것이다. 이것은 또한 핵산의 부분 발현을 포함한다. 더우기 발현은 일시적이거나 안정한 것일 수 있다.

[0131] 발현 벡터가 세포로 도입될 수 있는 다양한 방식이 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 발현 벡터는 바이러스 또는 바이러스 계놈으로부터 유래된 조작된 벡터를 포함한다. 특정 바이러스가 수용체-매개된 세포내이입을 통해 세포에 진입하여 숙주 세포 계놈과 통합되어 바이러스 유전자를 안정적으로 및 효율적으로 발현시키는 능력은 이들이 외래 유전자의 포유동물 세포로의 전달을 위해 매력적인 후보물이 되게하였다. 유전자 벡터로서 사용되는 첫번째 바이러스는 파코바바이러스 (시미안 바이러스 40, 소 파필로마 바이러스 및 폴리오마) 및 아데노 바이러스를 포함하는 DNA 바이러스이다.

[0132] 핵산의 전달을 위한 특정 방법은 아데노바이러스 발현 벡터의 사용을 포함한다. 아데노바이러스 벡터는 계놈 DNA로 통합하는 능력이 낮은 것으로 공지되어 있지만, 이러한 특성은 이들 벡터에 의해 부여되는 높은 유전자 전달 효율에 의해 균형일 이룬다. "아데노바이러스 발현 벡터"는 (a) 작제물의 패키징을 지원하고 (b) 본원에 클로닝된 조직 또는 세포-특이적 작제물을 궁극적으로 발현하기에 충분한 아데노바이러스 서열을 함유하는 작제물을 포함하는 것으로 의미된다. 유전학적 구성 또는 아데노바이러스, 36 kb, 선형 이중나선 DNA 바이러스에 관한 정보를 토대로 대형 조각의 아데노바이러스 DNA를 최대 7 kb의 외래 서열로 대체할 수 있다.

[0133] 핵산은 아데노바이러스 기반 형질감염을 사용하여 세포에 도입될 수 있다. 증가된 형질감염 효율은 아데노바이러스 커플링된 시스템을 사용한 세포 시스템에서 보고되었다 (참조: Kelleher and Vos, 1994; Cotten et al., 1992; Curiel, 1994). 아데노-연합된 바이러스 (AAV)는 본 발명의 백신에 사용하기 위해 매력적인 벡터 시스템이다. AAV는 감염을 위해 광범위한 숙주 범위를 갖는다. rAAV 벡터의 생성 및 사용에 관한 세부사항은 미국 특허 제5,139,941호 및 제4,797,368호에 기재되어 있고, 이의 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0134] 레트로바이러스는 이들의 유전자를 숙주 계놈으로 통합하고, 대량의 외래 유전학적 재료를 전달하고, 광범위한 종 및 세포 유형을 감염시키고 특수 세포주에 패키징되도록 하는 이의 능력으로 인해 백신에서 유전자 전달 벡터로서의 전망을 갖는다. 레트로바이러스 벡터를 작제하기 위해, 핵산 (예를 들어, 관심 대상의 항원을 암호화하는 핵산)은 특정 바이러스 서열 대신 바이러스 계놈에 삽입되어 복제 결손인 바이러스를 생성한다. 비리온을 생성하기 위해, gag, pol 및 env 유전자를 함유하지만 LTR 및 패키징 성분들이 없는 패키징 세포주가 작제된다. 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열과 함께 cDNA를 함유하는 재조합 플라스미드가 특수 세포주에 도입되는 경우 (예를 들어, 인간갈슘 침전에 의해), 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자에 패키징되어 이어서 배양 배지로 분비되도록 한다. 이어서, 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수거하고 임의로 농축시키고 유전자 전달을 위해 사용한다.

[0135] 렌티바이러스는 복합 레트로바이러스이고, 이는 통상의 레트로바이러스 유전자 gag, pol, 및 env에 추가로, 조절 또는 구조적 기능과 함께 다른 유전자를 함유한다. 렌티바이러스 벡터는 당업계에 널리 공지되어 있다 (참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,013,516호 및 제5,994,136호). 렌티바이러스의 일부 예는 인간 면역결핍 바이러스: HIV-1, HIV-2 및 시미안 면역결핍 바이러스:SIV를 포함한다. 렌티바이러스 벡터는 HIV 독성 유전자를 다중으로 약독화시킴에 의해 생성되었고, 예를 들어, 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef는 결실시켜 벡터가 생물학적으로 안전하게 한다.

[0136] 재조합 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있고 생체내 및 생체의 유전자 전달 및 핵산 서열의 발현 둘 다를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 숙주 세포가 rev 및 tat 뿐만 아니라 패키징 기능, 즉, gag, pol 및 env를 갖는 2개 이상의 벡터로 형질감염된 비-분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스는 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5,994,136호에 기재되어 있다. 당업자는 특정 세포 유형의 수용체에 표적화하기 위한 항체 또는 특정 리간드와 외피 단백질을 연결시킴에 의해 재조합 바이러스를 표적화할 수 있다. 특정 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드를 암호화하는 또 다른 유전자와 함께, 관심 대상의 서열 (조절 영역을 포함하는)을 바이러스 벡터에 삽입함에 의해, 예를 들어, 상기 벡터는 지금 표적-특이적이다.

[0137] 면역원성 조성물 또는 백신 투여

[0138] 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여, 세포를 사멸시키고, 세포 성장을 억제하고, 전이를 억제하고, 종양 또는

조직 크기를 감소시키고 다르게는 종양 세포의 악성 표현형을 역전시키거나 감소시키기 위해, 당업자는 일반적으로 본 발명의 펩타이드를 투여 (또는 발현되도록)하여 표적화된 암 세포를 인지하고 사멸시킬 수 있는 T 세포를 유도한다. 투여 경로는 천연적으로 병변의 부위 및 특성에 따라 다양하고, 예를 들어, 피내, 경피, 비경구, 정맥내, 근육내, 비강내, 피하, 피부경유, 기관내, 복막내, 종양내, 관류, 세척, 직접 주사, 및 경구 투여를 포함한다.

- [0139] 종양내 주사 또는 종양 혈관계로의 주사는 구체적으로 별개의 고형의 접근가능한 종양을 위해 고려된다. 국소, 국부 또는 전신 투여가 또한 적절할 수 있다. > 4 cm의 종양에 대해, 투여될 용적은 약 4-10 ml (바람직하게 10 ml)이고, < 4 cm의 종양에 대해, 약 1 - 3 ml의 용적 (바람직하게 3 ml)이다. 단일 용량으로서 전달된 다중 주사는 약 0.1 내지 약 0.5 ml 용적을 포함한다. 바이러스 입자는 유리하게 다중 주사를 대략 1 cm 간격으로 떨어진 종양에 투여함에 의해 접촉될 수 있다.
- [0140] 수술 중재의 경우에, 본 발명은 수술전에 사용하여 수술될 수 없는 종양이 절개될 수 있게 한다. 대안적으로, 본 발명은 수술 시에 사용될 수 있고/있거나 이후에 잔여 또는 전이성 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 절개된 종양 베드는 종양-관련 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 이를 암호화하는 작제물을 포함하는 제형으로 주사되거나 관류될 수 있다. 관류는, 예를 들어, 카테터를 수술 부위에 이식된 상태로 유지함에 의해 절개 후 계속될 수 있다. 주기적 수술 후 치료가 또한 고려된다.
- [0141] 연속 투여는 또한 경우에 따라 예를 들어, 종양이 절단되고 종양 베드가 잔여 미시적 질환을 제거하기 위해 처리되는 경우 적용될 수 있다.
- [0142] 시린지 또는 카테터를 통한 전달이 바람직하다. 그러한 연속 관류는 치료 개시 후 약 1-2 hr으로부터 약 2-6 hr 까지, 약 6-12 hr까지, 약 12-24 hr 까지, 약 1-2일 까지, 약 1-2주 이상까지의 기간 동안 수행할 수 있다. 일반적으로, 연속 관류를 통한 치료학적 조성물의 용량은 단일 또는 다중 주사에 의해 주어지는 용량과 동등하고 관류를 수행하는 동안의 일정 기간 동안 조정된다. 추가로, 사지 관류는 특히 흑색종 및 육종의 치료에서 본 발명의 치료학적 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0143] 치료 용법은 또한 다양할 수 있고 흔히 종양 유형, 종양 위치, 질환 진행 및 환자의 건강 및 연령에 의존한다. 명백하게, 특정 유형의 종양은 보다 공격적 치료를 요구하고 동시에 특정 환자는 보다 부담이 되는 프로토콜을 용인할 수 없다. 임상적인 치료 제형의 공지된 효능 및 독성 (있는 경우)을 기준으로 그러한 결정을 내리는데 가장 적합하다.
- [0144] 약제학적 면역원성 또는 백신 조성물의 유효량은 일반적으로 질환 또는 이의 병태 또는 증상의 정도를 검출가능하게 반복적으로 개선시키거나, 감소시키거나 최소화하거나 제한하기 위해 충분한 양으로서 정의된다. 보다 엄격한 정의는 질환의 제거, 박멸 또는 치유를 포함하는, 백신 조성물을 위해 적용될 수 있다.
- [0145] 특정 구현예에서, 치료 중인 종양은 적어도 초기에 절개될 수 없다. 치료학적 바이러스 작제물을 사용한 치료는 특정의 특히 침윤성 부분의 가장자리에서 수축 또는 이의 제거에 의해 종양의 절개능을 증가시킬 수 있다. 치료 후, 절개는 가능할 수 있다. 절개에 후속적인 추가의 치료는 종양 부위에서 미시적 잔여 질환을 제거하는 작용을 한다.
- [0146] 1차 종양 또는 절개 후 종양 베드를 위한 전형적인 치료 과정은 다중 용량을 포함한다. 펩타이드의 하루 치료학적 유효량 (본 발명에 따른 펩타이드 또는 펩타이드들의 종양)은 0.01 mg 내지 10 mg, 특히, 0.025 mg 내지 5.0 mg의 범위, 또는 0.025 mg 내지 1.0 mg의 범위일 수 있다.
- [0147] 치료는 다양한 "단위 용량"을 포함할 수 있다. 유닛 용량은 치료학적 조성물의 소정량을 함유하는 것으로서 정의된다. 투여되는 양 및 특정 경로 및 제형은 임상적 분야의 당업자의 기술 내에 있고 펩타이드 조성물 또는 발현 벡터 조성물로서 조성물의 특성에 의존하여 다양할 수 있다. 유닛 용량은 단일 주사로서 투여될 필요가 없지만 일정 세트의 시기 동안 연속 주입을 포함할 수 있다. 본 발명의 유닛 용량은 간편하게 바이러스 작제물에 대한 플라크 형성 유닛 (pfu)으로서 기재될 수 있다. 유닛 용량은 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} pfu 이상의 범위이다. 대안적으로, 벡터의 종류 및 달성될 수 있는 역가에 의존하여, 당업자는 1 내지 100, 10 내지 50, 100-1000, 또는 최대 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 또는 1×10^{15} 이상의 감염성 바이러스 입자 (vp)를 환자에게 또는 환자의 세포에 전달한다.

도면의 간단한 설명

[0148]

도 1: 도 1a. 항원 제공, 세포 독성 및 면역 조절 경로와의 상관관계를 보여주는, 면역 시그니처와 TNBC에서 과발현되는 19 HERV 서브타입의 발현의 상관관계; 양의 상관관계(positive correlation)는 각각의 점으로 나타나고 (열은 또는 짙은 회색); 도 1b. 하나의 예로서, T 세포 시그니처와 HERV-K 10 발현의 상관관계.

도 2: 도 2a. CMV pp65 펩타이드에 의한 자극의 존재 또는 부재 (각각, 상부 사분면) 및 HERV 펩타이드 P5 (서열번호 5)의 존재 또는 부재 (각각 하부 사분면)하에 CD8+ T 세포의 텍스트라머 염색의 대표적인 플롯. 도 2b. 여러 공여자의 PBMC에 대한 특이적 HERV 펩타이드 (P1 내지 P7 - 서열번호 1 내지 7) 또는 대조군을 사용한 자극의 존재 또는 부재하에 12일 째에 텍스트라머 양성 CD8+ T 세포의 백분율.

도 3: 도 3a. 음성 및 양성 대조군 (상부 사분면) 및 HERV 펩타이드 P1, P2, P3 (서열번호 1, 2 및 3) (하부 사분면)으로 펠싱된 T2 세포와의 접촉 후 CD8+ T 세포에 의한 IFN- γ 생성의 대표적인 플롯. 도 3b. 여러 공여자의 PBMC에 대한 특이적 HERV 펩타이드 (P1, P2 및 P3 (서열번호 1, 2 및 3) 또는 대조군을 사용한 자극의 부재 또는 존재하에 12일 째에 IFN- γ 양성 CD8+ T 세포의 백분율.

도 4: 도 4a. CMV pp65 펩타이드에 의한 자극의 존재 또는 부재 (각각, 상부 사분면) 및 HERV 펩타이드 P1 (서열번호 1)의 존재 또는 부재 (각각 하부 사분면)하에 CD8+ T 세포의 텍스트라머 염색의 대표적인 플롯.

b. 여러 공여자의 PBMC에 대한 12일 째에 펩타이드 자극된 조건 대 비자극된 (P1 내지 P7 - 서열번호 1 내지 7)에서 텍스트라머 양성 특이적 CD8+ T 세포의 백분율 간의 배수 변화 비율.

도 4c. 12일 자극 후 및 동족체 펩타이드로 펠싱된 T2 세포와의 접촉 24h 후 IFN- γ + 및 그랜자임- β + 스팟 수의 대표적인 히스토그램.

도 5: 도 5aa. 공여자 a에 대한 음성 및 양성 대조군(상부 사분면) 및 HERV 펩타이드 P1, P2, P3 (서열번호 1 내지 3) (하부 사분면)으로 펠싱된 T2 세포와 접촉 후 CD8+ T 세포에 의한 IFN- γ 생성의 대표적인 플롯;

도 5ab. (연속). 공여자 b에 대한 음성 및 양성 대조군 (상부 사분면) 및 HERV 펩타이드 P4, P5, P6 및 P7 (서열번호 4 내지 7) (하부 사분면)으로 펠싱된 T2 세포와 접촉 후 CD8+ T 세포에 의한 IFN- γ 생성의 대표적인 플롯;

도 5b. 여러 공여자의 PBMC에 대한 특이적 HERV 펩타이드 (P1 내지 P7 - 서열번호 1 내지 7) 또는 대조군을 사용한 자극의 존재 또는 부재하에 12일 째에 IFN- γ 양성 CD8+ T 세포의 백분율.

도 6: 도 6a. 특이적 P1 CD8+ T 세포 (우측 사분면) 및 이들의 음성 대응물 (좌측 대응물)의 분류 및 확장 후 P1 (서열번호 1)에 대한 텍스트라머 염색의 대표적인 플롯.

도 6b. P1 또는 음성 대조군 (하전된 펩타이드 부재)으로 펠싱된 T2 세포와 P1 (서열번호 1) 특이적 CD8+ T 세포의 배양 24시간 후 IFN- γ + 및 그랜자임- β + 스팟 수의 대표적인 히스토그램.

도 6c. P1 (서열번호 1) 특이적 CD8+ T 세포 또는 이들의 음성 대응물과 함께, MDA-MB-231 세포주 (관심 대상의 펩타이드로 펠싱되거나 펠싱되지 않음)의 공동 배양에서 실시간 세포사 정량의 대표적인 곡선.

도 6d. 관심 대상의 펩타이드로 펠싱되거나 펠싱되지 않은 MDA-MB-231 세포주와의 공동 배양 6시간 후 P1 (서열번호 1) 특이적 CD8+ T 세포(검정) 대 이들의 음성 대응물(비특이적 CD8+ T 세포, 백색)의 IFN- γ (PE)의 세포 내 염색(intracellular staining)의 백분율의 대표적 히스토그램. HLA-A2 차단 항체의 첨가는 대조군으로서 사용하였다.

도 7: 도 7a. TNBC 디아세레이트로부터 확장된 CD8 T 세포에서 발견된 텍스트라머 양성 종양 침윤된 림프구 (TIL) (검정 사분면)의 대표적 도식. P1 내지 P7 (서열번호 1 내지 7)은 펩타이드 1 내지 7에 대한 텍스트라머를 나타내고, TNBC 1 내지 4는 4개의 상이한 환자를 나타낸다. 도 7b. 난소 종양 디아세레이트로부터 확장된 CD8 T 세포에서 발견된 텍스트라머 양성 TIL (검정 사분면)의 대표적 도식. P1 내지 P7 (서열번호 1 내지 7)은 펩타이드 1 내지 7에 대한 텍스트라머를 나타내고, 난소 1 내지 3은 3개의 상이한 환자를 나타낸다.

본 발명은 현재 도면을 언급하면서 비제한적인 실시예를 사용하여 기재된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0149] **실시예:**
- [0150] HERV 서열의 동정
- [0151] 상이한 계열로부터 HERV DNA 서열 (HERV-K, HERV-H, HERV-W, HERV-E 및 ERV3을 포함하는)은 Genbank 데이터베이스로부터 추출하였다. BLAST를 사용하여 이들 서열을 인간 게놈 (GRCH37) 상에 위치시키고, 상기 위치가 제기된 서열의 적어도 85% 상에 적어도 98%의 유사성을 유지하도록 하고 어떠한 겹을 갖지 않도록 한다. 따라서, 66개의 기능성 HERV 서열이 동정되었다.
- [0152] TNBC에서 HERV 서열의 분석
- [0153] HERV 발현은 42 TNBC를 함유하는 84개 유방암 샘플의 기존의 데이터베이스에서 분석하였다. 56개의 정상 유방 샘플을 비교하였다 (중양주위 56개 및 포유동물 감소 샘플 5개). RNA는 DNase 처리 및 폴리 A 선택을 수행하는 새로운 중양 생검으로부터 추출하였다. 충분한 양 (RNA 통합 수 > 6.5)을 제공하는 경우, 기능성 HERV 서열은 RNAseq 데이터와 정렬시킨다.
- [0154] 66개 인간 내인성 레트로바이러스 (HERV) 서브타입의 다중 성분 분석을 수행하였다. 42개 HERV를 발현시킨다. 19개 HERV는 정상 조직 및 ER+ 서브타입에 비해 특이적으로 3중 음성 유방암 (TNBC)을 특징화한다: HERVK 10, 17, 22, 7, 6, 21, 25, 11, 20, 16, 23, 1, 5; HERVH 4, 7; 및 HERV3.
- [0155] 펩타이드 선택 및 합성
- [0156] 19개 과발현된 HERV 간에 공유된 Gag 및 Pol에서의 공통된 영역은 참조 게놈 상에서 관독값의 정렬 후 동정되었다. 상이한 에피토프 예측 도구 (NetMHC I & II)를 사용하여, 대부분의 흔한 MHC I 및 II 대립형질에 대해 잠재적인 강한 에피토프 결합체가 동정되었다. 이들 중에서, HLA-A*0201에 대해 7개 예측된 9량체의 강한 결합체가 선택되고 합성되었다: 4개 Gag 및 3개 Pol 펩타이드 (JPT peptide technology, Berlin, Germany). 펩타이드 동일성은 판매자에 의한 질량 분광측정에 의해 확인되었다. 순도 > 95%가 예상되었고 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 결정되었다. 동결건조된 펩타이드를 탈이온수 <5% DMSO에 용해시키고 분취하여 사용때까지 -20 °C에서 보존하였다.
- [0157] 부류 I MHC (서열번호 1 내지 7)에 대해 9량체 펩타이드의 강한 결합체 + 부류 II 모티프의 측면 서열 (서열번호 12의 펩타이드를 제외한 각각의 측면 상에 10량체, 여기서, 서열번호 5의 서열은 C-말단 상에 있다)을 함유하는 29량체 GMX 펩타이드 (서열번호 8-14)가 동정되었고 합성을 위해 분석되었다.
- [0158] HERV 발현과 T 세포 시그니처 간의 상관관계의 생물정보학적 분석
- [0159] 상이한 시그니처를 사용하여 종양의 면역 특징을 평가하였다: 대조군 분석에 대한 섬유아세포, 호중구 및 내피 세포 뿐만 아니라, T 세포, CD8 T 세포, NK 세포, 세포독성 림프구에 대한 MCP 계수기 시그니처 (ref <http://cit.ligue-cancer.net/?p=1338&lang=en>); 면역스코어, 간질스코어에 대한 평가 팩키지 (<http://bioinformatics.mdanderson.org/estimate/index.html>); 이펙터 세포에 대한 면역페노그램15, 면역조절제 (면역 관문), 서프러서 세포 (조절 T 세포 및 MDSC), EMT 시그니처 (SSGSEA 및 Jean-Paul Thierry signature) 및 종양 서브타입과 특이적으로 연관된 시그니처 뿐만 아니라 특이적 유전자가 또한 평가된다(OCT4, TRIM28, SETDB1과 같이). 이들 시그니처 및 HERV간의 상관관계는 고전적인 통계학적 방법을 사용하여 분석된다. 도 1a는 19개 HERV와 항원 제공-관련 세포독성 또는 면역조절 시그니처로서 특이적 면역 시그니처 간의 유의적 상관관계를 보여준다. 하나의 예로서, HERV-K 10 발현은 유방암에서 T 세포 시그니처와 강한 상관관계가 있다 (도 1b).
- [0160] 특이적 CD8+ HERV+ 자극에 대한 PBMC 배양
- [0161] HLA-A2 공여자로부터의 PBMC는 5% AB 인간 혈청 (EFS Lyon으로부터의 5개 공여자 풀, 여과된), 및 5 pg/mL의 R848 (InvivoGen, San Diego, USA) 및 10 pg/mL의 Poly-IC (InvivoGen) 및 관심 대상의 펩타이드 (10 mM)가 농축된 20 UI/mL IL-2 (PROLEUKIN aldesleukine, Prometheus, Vevey, Switzerland)가 보충된 AIM-V 배지(Thermo Fisher Scientific)에서 12일 동안 배양하였다. 배양은 96U-바닥 웰 플레이트, 웰당 1.5×10^5 세포로 수행하였고 20개 웰은 각각의 펩타이드 조건에 대해 수행하였다. 100 pL의 배지를 갈아주고 R848, 폴리-IC, IL-2 및 관심 대상의 펩타이드 (서열번호 1 내지 7의 서열의 펩타이드)를 농축시켜 3일 째에 동일한 최종 농도를 성취하였다. IL-2 및 관심 대상의 펩타이드는 6일 째에 첨가하고 10일 째에 IL-2만을 첨가하였다. 양성 대조군은 MHC 부류 I에 의해 제공되고 특이적으로 CD8+ T 세포를 자극하는 CMV 펩타이드인, 텍스트라머 실험에서 0.1 pg/mL의

PP65 (JPT peptide technology)으로 항온처리한다. IFN- γ 실험을 위해, 0.4 pg/mL CEF 펩타이드 (Mabtech)를 사용하였고, 이는 우선적으로 IFN- γ 를 합성하도록 CD8+ T 세포를 자극하는 인간 CMV, EBV 및 인플루엔자 바이러스로부터의 23개 MHC 부류 I 제한절단된 바이러스 펩타이드의 풀로 구성된다.

[0162] 텍스트라머 검정 및 분류

[0163] 12일 째에, 동일한 조건으로부터의 세포는 함께 폴리프로필렌 튜브 중에 풀링하고, 2 mL의 FACS 완충액으로 세척하고 FACS 완충액 중에 재현탁시켰다. 조건은 암실 중 실온에서 15분 동안 10 μ L의 상응하는 텍스트라머 (Immudex, Copenhagen, Denmark)로 염색하였다. 좀비 근적외선 (NIR) 고정될 수 있는 생존능 키트 (Zombie NIR, biolegend, Paris, France)는 1/400으로 사용하여 생존능을 평가하였다. 항 CD3 (BV421, Biolegend) 및 항 CD8 (FITC, Beckman coulter, Brea, USA) 항체는 이어서 각각의 조건 (도 2의 검정에서 1/10, 도 4에 대해 1/25)에 첨가하고 4°C에서 암실에 20분 동안 방치하였다. 이어서, 세포는 2 mL의 FACS 완충액으로 2회 세척하고 분석 때까지 350 μ L의 FACS 완충액 중에 재현탁시켰다. 분석은 FACS Fortessa (BD)상에서 수행하여 다량체 특이적 HERV CD8+ T 세포를 구별하였다.

[0164] 도 2a에서의 결과는 비특이적 (좌측 패널) 및 특이적 (우측 패널) 펩타이드 펠싱된 PBMC에서 텍스트라머에 의해 염색된 집단을 보여준다. 상부 패널에서, 최대 72%의 CD8+ T 세포는 비-자극된 PBMC에서 2.02%에 비해 CMV로부터 양성 대조군 pp65 펩타이드를 사용한 자극 후 양성 (이전의 감염으로 인한 메모리 T 세포의 가능한 존재를 지적하는)을 유도하였다. 흥미롭게도 HERV 펩타이드 (예를 들어, 하부 패널에서 서열번호 5)로 자극된 PBMC는 비-자극된 조건에서 0.04%에 비해 34.2%의 텍스트라머 양성 CD8+ T 세포를 유도하였다. 4개의 상이한 공여자에 대하여 수득된 결과는 도 2b에 요약한다.

[0165] 도 4a에서의 결과는 비특이적 (좌측 패널) 및 특이적 (우측 패널) 펩타이드 펠싱된 PBMC에서 텍스트라머에 의해 염색된 집단을 보여준다. 상부 패널에서, 최대 23.40%의 CD8+ T 세포는 비-자극된 PBMC에서 3.63%에 비해 CMV로부터 양성 대조군 pp65 펩타이드를 사용한 자극 후 양성 (이전의 감염으로 인한 메모리 T 세포의 가능한 존재를 지적하는)을 유도하였다. 흥미롭게도 HERV 펩타이드 (예를 들어, 하부 패널에서 서열번호 1)로 자극된 PBMC는 비-자극된 조건에서 0.091%에 비해 0.63%의 텍스트라머 양성 CD8+ T 세포를 유도하였다. 12개의 상이한 공여자에 대해 수득된 결과는 도 4b에 요약하고 이는 P1, P4 및 P6 (예를 들어, 서열번호 1, 4, 6)에 대해 텍스트라머 양성 CD8+ T 세포에서 유의적 증가 및 P2 및 P3 (예를 들어, 서열번호 2, 3)에 대해 약간의 증가를 보여준다.

[0166] 12일 배양 후 펩타이드 자극된 PBMC를 사용하여 IFN- γ 및 그랜자임- β 에 대한 ELISPOT 검정을 수행하였다 (도 2c). 웰 당 2.10^5 개 세포는 10:1 비율에서 관심 대상의 펩타이드에 특이적인 T2 세포와의 공동 배양물에 넣었다. ELISPOT는 24시간 후 P1 및 P6 (예를 들어, 서열번호 1, 6)에 대해 특이적 IFN- γ 및 그랜자임- β 스팟을 보여주는 것으로 밝혀졌다.

[0167] T2 세포 접촉과 함께 세포독성 검정

[0168] PBMC 배양의 12일 째에, T2 세포는 RPMI에서 세척하고 AIM-V 배지 (Thermo Fisher Scientific)에 재현탁시켰다. T2 (SD 세포주)는 항원 가공 (TAP) 단백질과 연합된 수송체가 결핍인 림프아구성 세포주이고, 따라서 부류 I MHC 상에 내인성 펩타이드를 제공할 수 없지만 비-경쟁 환경에서 관심 대상의 외인성 항원에 대한 CTL 반응을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. T2 세포는 먼저 10 pg/mL의 상응하는 펩타이드를 37°C에서 2시간 동안 2M T2 세포에 참가함에 의해 HERV 펩타이드로 펠싱하였다. PBMC는 풀링시키고 계수하고 새로운 96 U-웰 플레이트로 각각 1:5의 농도로 상응하는 T2 세포와의 공동 배양물에 넣었다.

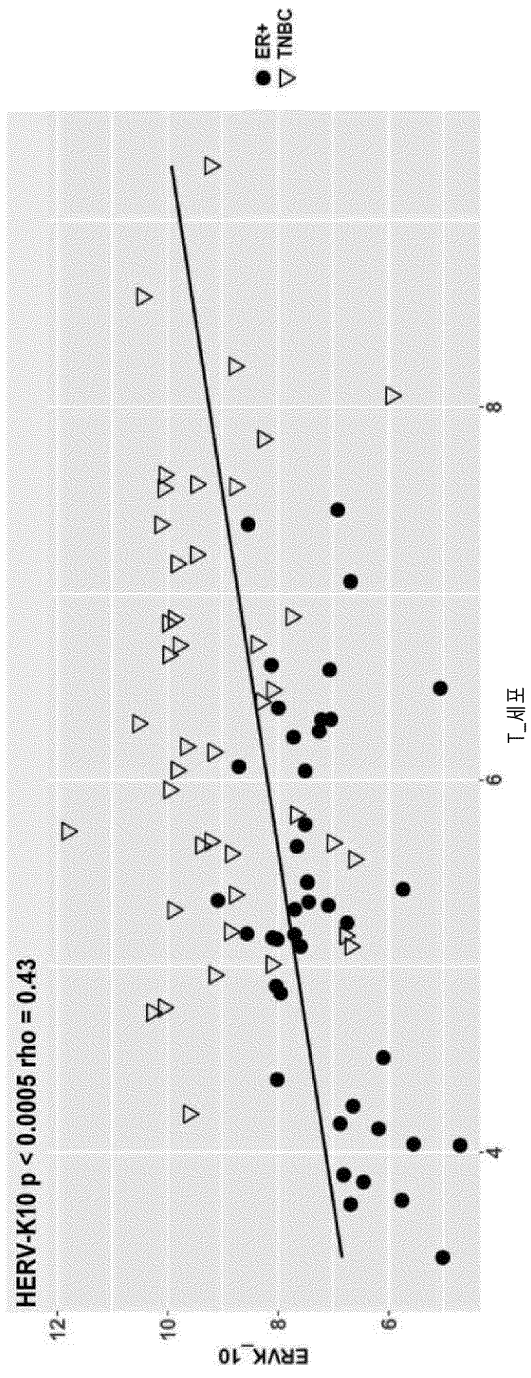
[0169] 37°C에서 4시간의 항온처리 후, 공동 배양물로부터의 세포를 세척하고 FACS 완충액 중에 이들의 염색 조건에 따라 V-웰 플레이트에 풀링하였다. 좀비 NIR (Biolegend)는 1/400으로 사용하여 생존능을 평가하였다. 항 CD3 (PercP, Biolegend) 및 항 CD8 (FITC, Beckman coulter) 항체는 조건 당 1/10으로 첨가하고 4°C에서 25분 동안 방치하였다. 세포는 다시 세척하고 이어서 실온에서 15분 동안 제조업자의 지침에 따라 고정/투과성화 용액 키트 (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 고정시켰다. 세포는 FACS 완충액 중에서 2회 세척하고 4°C에서 유지하였다.

[0170] 13일 째에, 세포는 실온에서 5분 동안 투과성화 용액 키트 (Invitrogen)를 사용하여 투과시키고 항 IFN- γ (PE, Biolegend) 항체를 1/20으로 4°C에서 추가로 25분 동안 용액에 첨가하였다. 세포는 2회 세척하고 FACS 분석 전에 350 μ L의 FACS 완충액 중에 재현탁시켰다. 분석은 FACS Fortessa (BD) 상에서 수행하여 HERV 서열을

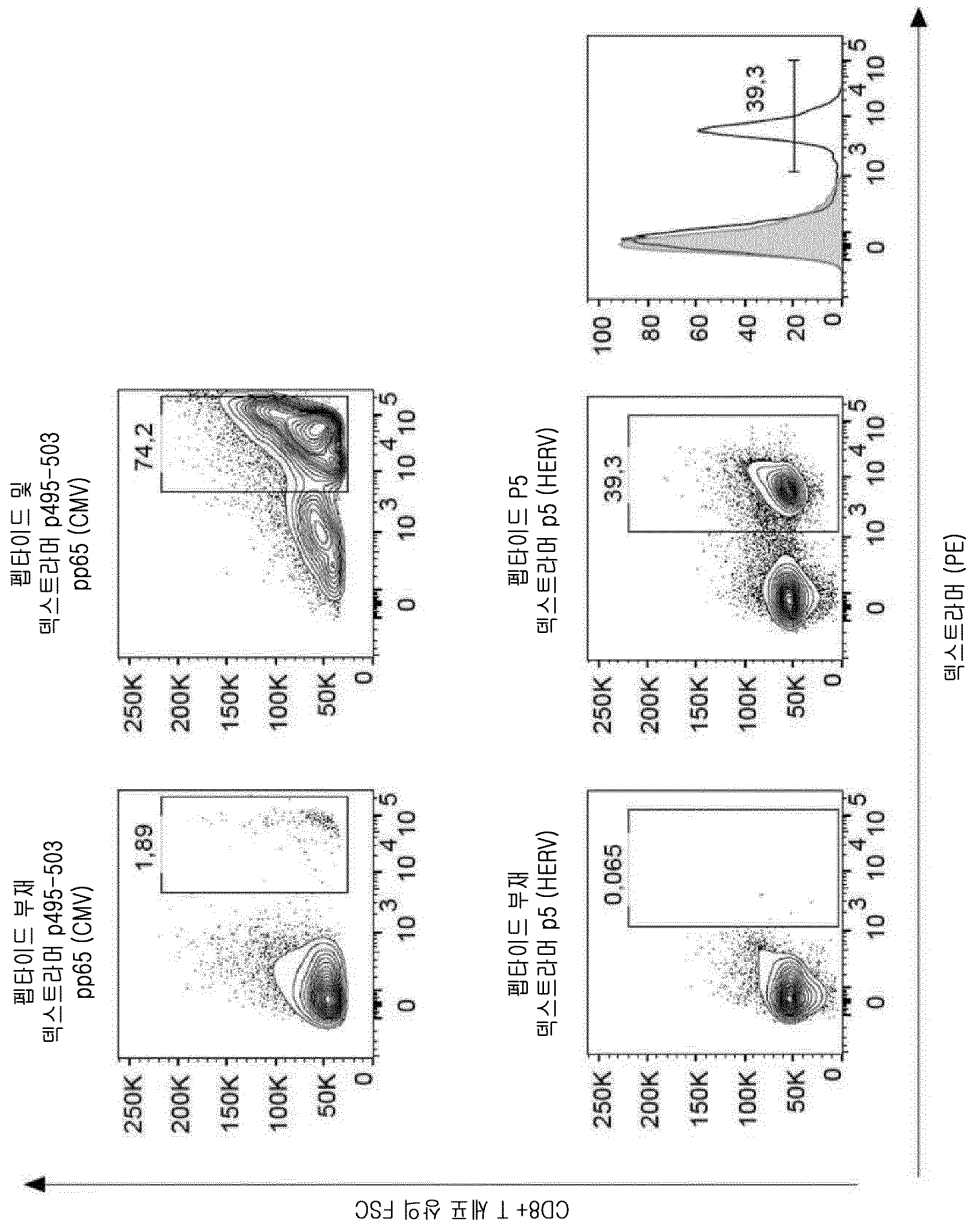
발현하는 T2 세포에 대해 특이적 세포독성 및 탈과립화를 조사하였다.

- [0171] 도 3a에서의 결과는 필싱되지 않거나 (P0: 상부-좌측 패널), 상이한 펩타이드로 필싱되거나 (Pneg: 상부-중앙 패널), 각각의 동족체 펩타이드 (양성 대조군 Ppos: 상부/우측 패널, 하부 패널에서 서열번호 1, 2 및 3의 HERV 펩타이드)로 필싱된 T2 세포에 대해 자극된 CD8+ T 세포의 IFN- γ 생성을 보여주고; 결과는 HERV 펩타이드를 발현하는 T2 세포에 대해 특이적 IFN- γ 생성을 보여준다. 5개 상이한 공여자의 결과는 도 3b에 요약하고, 이는 P1 (서열번호 1)로 자극된 CD8+ T 세포의 -10% (메디안에서)에서 및 P2 또는 P3 (서열번호 2 및 3)으로 자극된 CD8+ T 세포의 -5% (메디안에서)에서 IFN- γ 생성을 보여준다.
- [0172] 도 5aa 및 도 5ab에서의 결과는 필싱되지 않거나 (P0: 공여자 a 및 공여자 b 사분면 둘 다에서 상부-좌측 패널), 상이한 펩타이드로 필싱되거나 (Pneg: 공여자 a 및 공여자 b 둘 다에서 상부-중앙 패널), 각각의 동족체 펩타이드 (양성 대조군 Ppos: 상부/우측 패널, 공여자 a에 대한 하부 패널에서 서열번호 1 내지 3의 HERV 펩타이드 및 공여자 b에 대한 하부 패널에서 서열번호 4 내지 7의 HERV 펩타이드)로 필싱된 T2 세포에 대해 자극된 CD8+ T 세포의 IFN- γ 생성을 보여주고; 결과는 HERV 펩타이드를 발현하는 T2 세포에 대해 특이적 IFN- γ 생성을 보여준다. 12개의 상이한 공여자의 결과는 도 5b에 요약하고, 이는 P1 (서열번호 1), P2 및 P3 (서열번호 2 및 3)으로 자극된 유의적인 수의 CD8+ T 세포에서 및 P6 (서열번호 6)으로 자극된 적당한 수의 CD8+ T 세포에서 IFN- γ 생성을 보여준다.
- [0173] P1 특이적 CD8+ T 세포의 세포독성
- [0174] 텍스트라머-염색된 세포는 FACS Aria (BD)에 의해 분류하여 비특이적 대응물로부터 펩타이드-특이적 CD8+ T 세포를 분리하였다. 분획물 둘 다를 수거하고 14일 동안 96 라운드-웰 플레이트 상에서 피더 (feeder) 세포에 대해 별도로 확장시켰다. 비특이적 분획에 대한 특이적 분획의 순도는 14일에 평가하고 (도 6a) 음성 분획에서 <5%에 비해 양성 분획에서 >90%의 텍스트라머 양성 CD8+ T 세포를 유도한다. 이들 세포는 세포독성 실험을 위해 사용하였다.
- [0175] 분류되고 확장된 CD8+ T 세포는 ELISPOT 검정 (Cellular technology limited, CTL)에 의해 이들의 세포독성 잠재력에 대해 평가하였다. 4×10^4 의 P1 특이적 CD8+ T 세포는 이전에 펩타이드 P1으로 필싱된 T2 세포와 공동 배양하였다. 계수된 스팟의 수는 음성 대조군과 비교하여 동족체 펩타이드로 필싱된 표적 세포에 대해 P1 특이적 CD8+ T 세포에 의한 IFN- γ 및 그랜자임- β 의 생성 (사이토킨 둘 다에 대한 -800 스팟)을 지적한다 (도 6b). 이들 실험은 상기 세포가 특이적이고 기능적임을 지적한다.
- [0176] 세포주 HMEC (HLA-A2 인간 포유동물 상피 세포) 및 MDA-MB-231 (HLA-A2 3중 음성 유방암 세포주)에 대해 수행된 HERV 발현의 인 실리코 분석은 HMEC와 비교하여 MDA-MB-231 세포주에서 HERV의 과발현을 보여주었다.
- [0177] HLA-A2 TNBC 세포주 MDA-MB-231은 P1 특이적 CD8+ T 세포에 의해 유도된 세포사의 실시간 분석을 위한 표적으로서 사용하였다. 5.10^3 개의 MDA-MB-231 세포는 펩타이드 P1으로 필싱하거나 필싱하지 않고 96웰 플레이트에 점착되도록 하였다. 점착 후, P1 CD8+ T 세포 또는 이들의 음성 대응물 (대조군)은 웰에 부가하였다. 공동 배양은 세포질막 통합성이 감소하는 경우 세포에 진입하여 데옥시리보핵산 (DNA)에 결합시 형광성에서 100 내지 1000배 증가를 생성하는 Cytotox 녹색 염료 (Essenbioscience)의 존재하에 수행하였다. 동력학은 이들의 음성 대응물과 비교하여 MDA-MB-231이 P1-특이적 T 세포와 공동 배양되는 경우 세포사에서의 매우 유의적인 증가를 보여준다. 예상된 바와 같이, 세포사의 추가의 증가는 표적 MDA-MB-231 세포가 P1로 필싱되고 P1-특이적 T 세포와 공동 배양되는 경우 (아마도 표적 세포 상의 HLA-펩타이드 1 복합체의 수에서의 증가로 인해) (도 6c) 관찰되었다.
- [0178] 추가로, P1 특이적 CD8+ T 세포 또는 이들의 음성 대응물과 MDA-MB-231 HLA-A2 TNBC 세포주 간의 공동 배양 6 시간 후, IFN- γ 의 세포 내 염색은 FACS에 의해 수행하였다 (도 6d). 결과는 P1 특이적 세포가 음성 대응물과의 공동 배양과 비교하여 공동 배양물에 있는 경우 IFN- γ 생산 세포의 백분율의 증가를 보여준다. 상기 백분율은 MDA-MB-231이 이전에 P1으로 필싱되는 경우 약하게 증가된다. 항 HLA-A2 특이적 차단 항체의 사용은 상기 효과를 역전시켜 이의 특이성을 입증할 수 있다.
- [0179] 이와 함께, 이들 실험은 P1-특이적 CD8+ T 세포가 특이적으로 인지하고 동족체 펩타이드를 제공하는 표적 세포 (상기 실험에서 T2 세포)에 대해 기능하고 내인성으로 HERV-유래된 항원을 발현하는 종양 세포 (상기 실험에서 MDA-MB-231 TNBC 세포)를 특이적으로 인지하고 사멸시킴을 보여준다.
- [0180] TNBC 및 난소암으로부터 종양 침윤된 림프구 (TIL)의 텍스트라머 염색

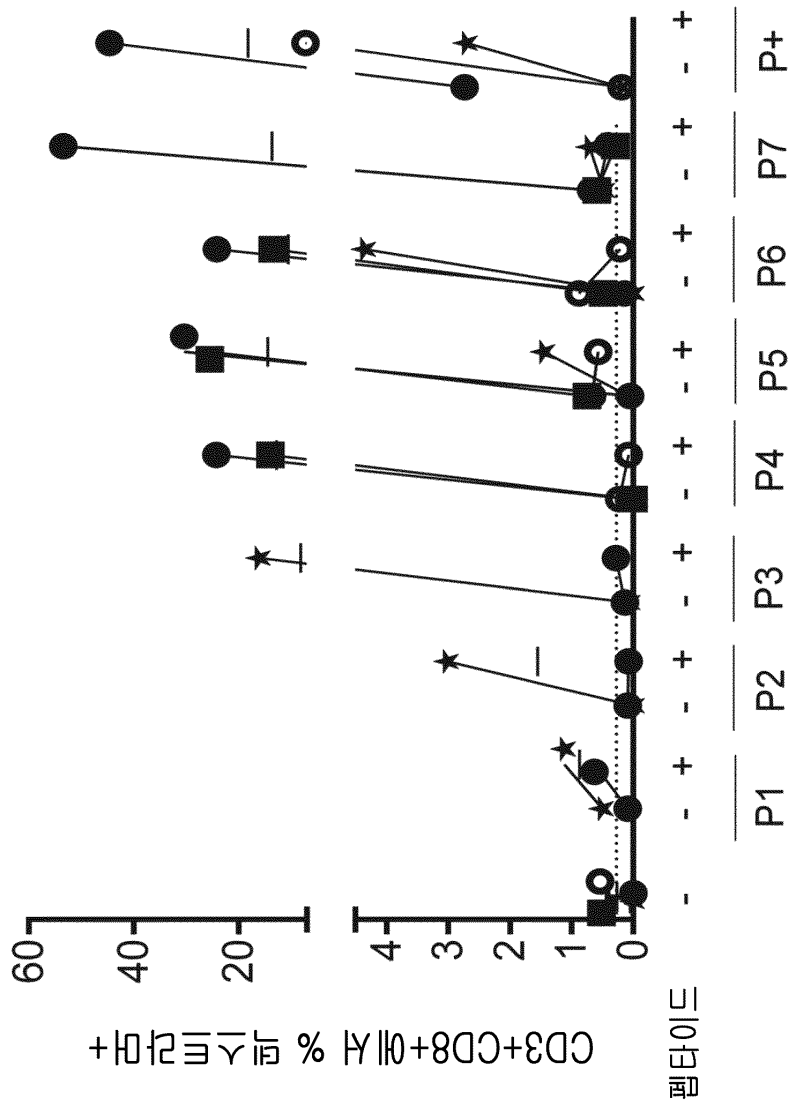
도면1b



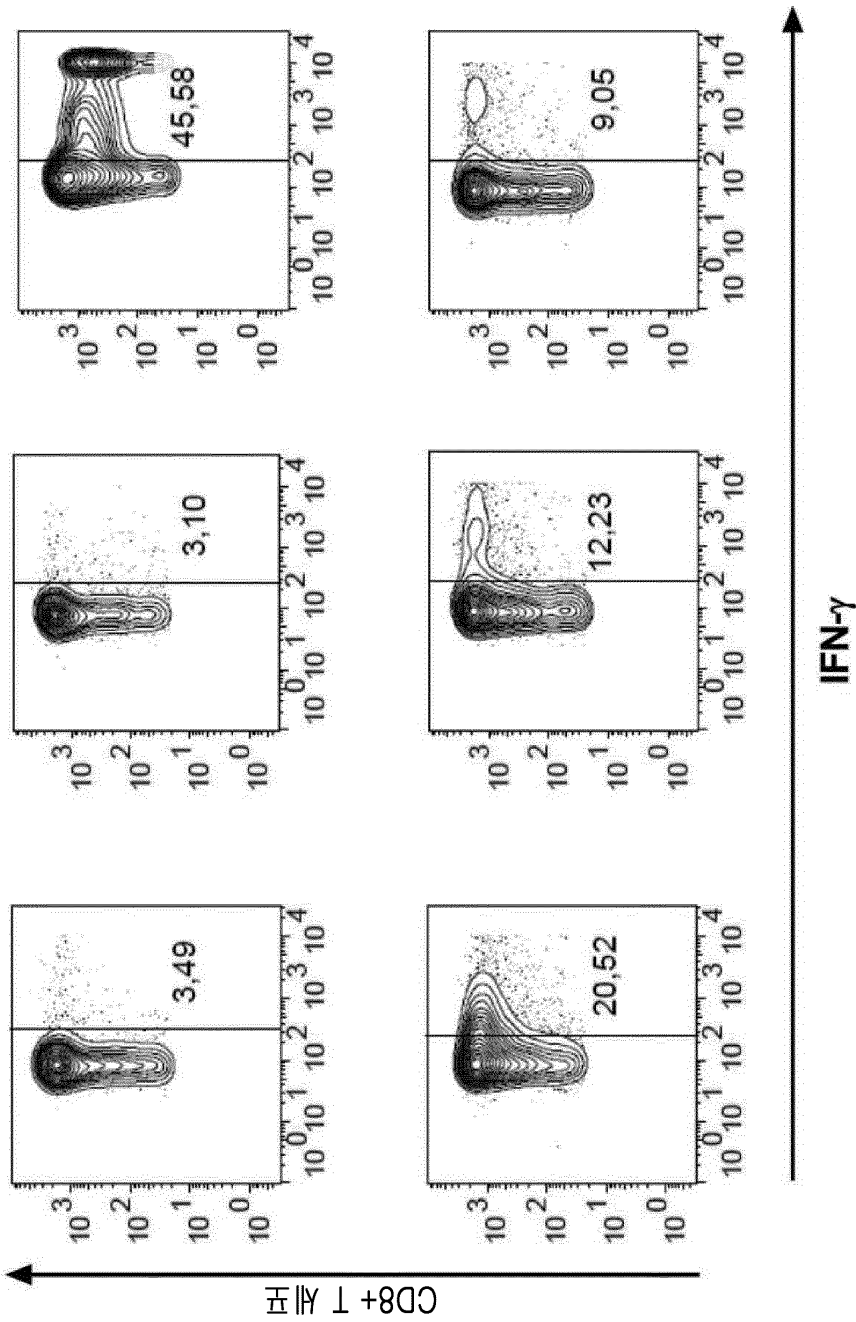
도면2a



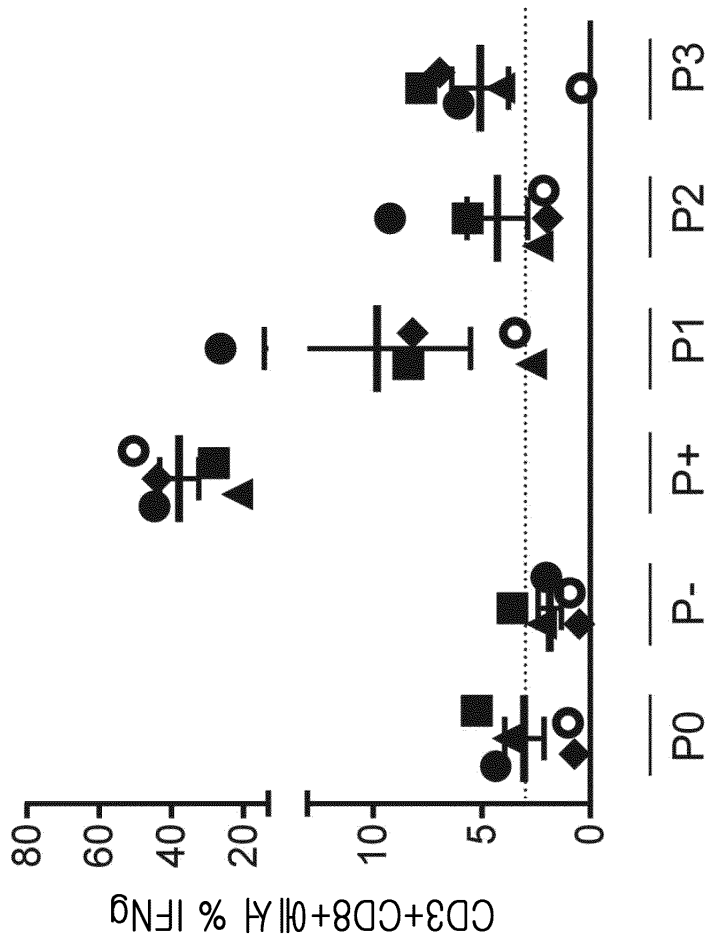
도면2b



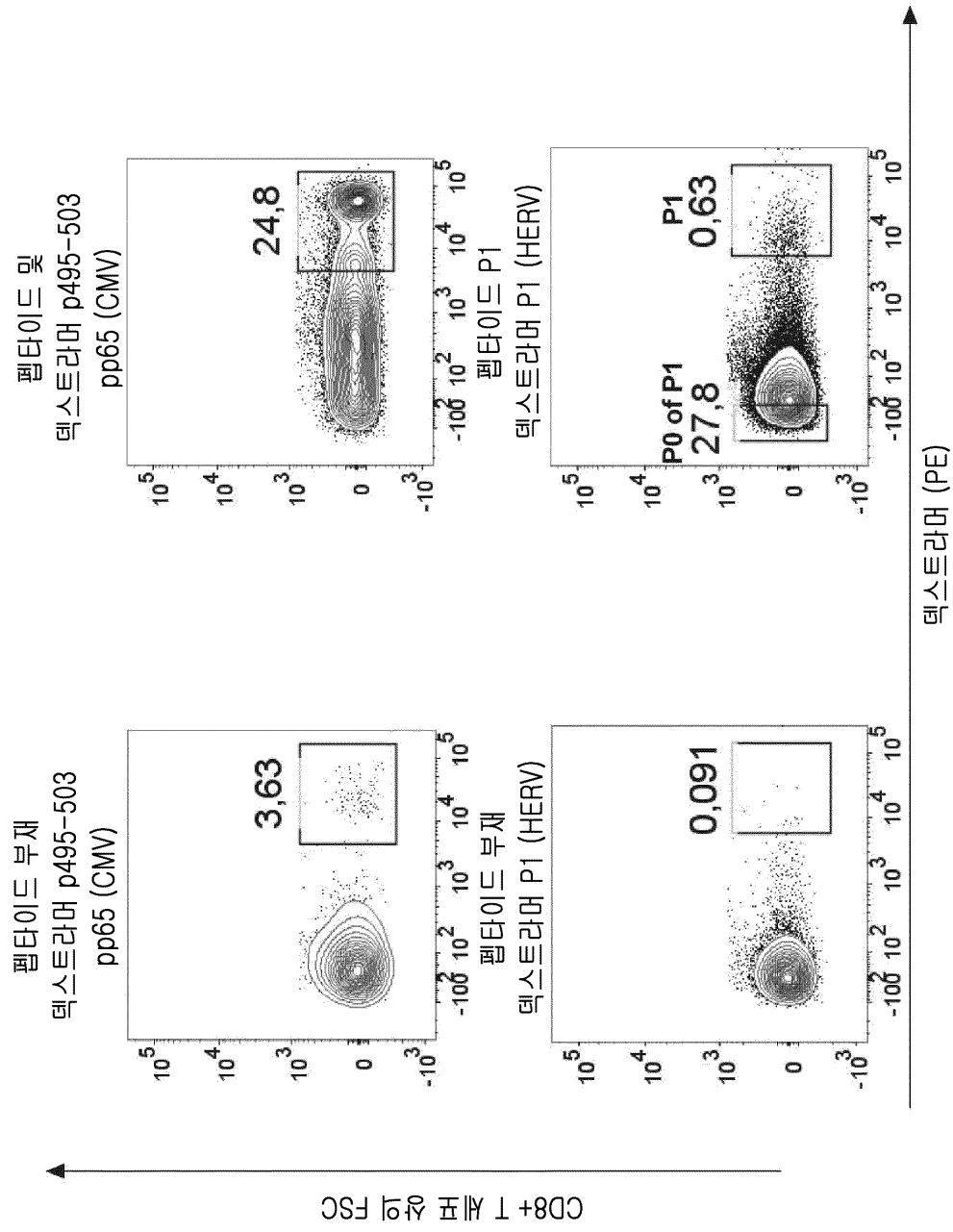
도면3a



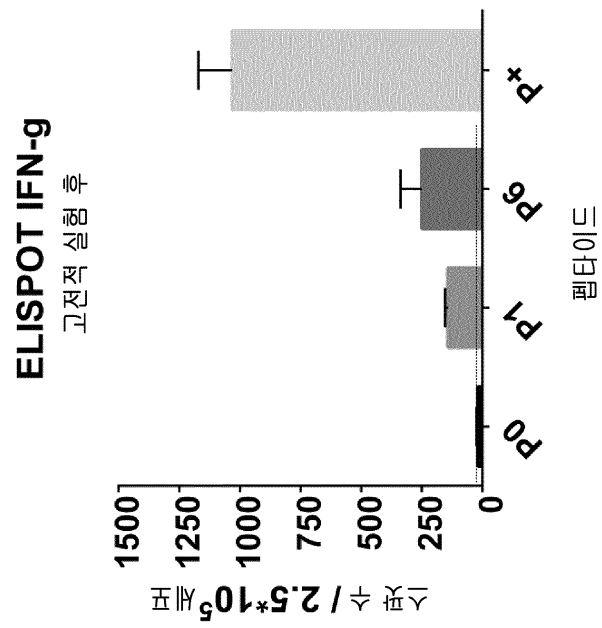
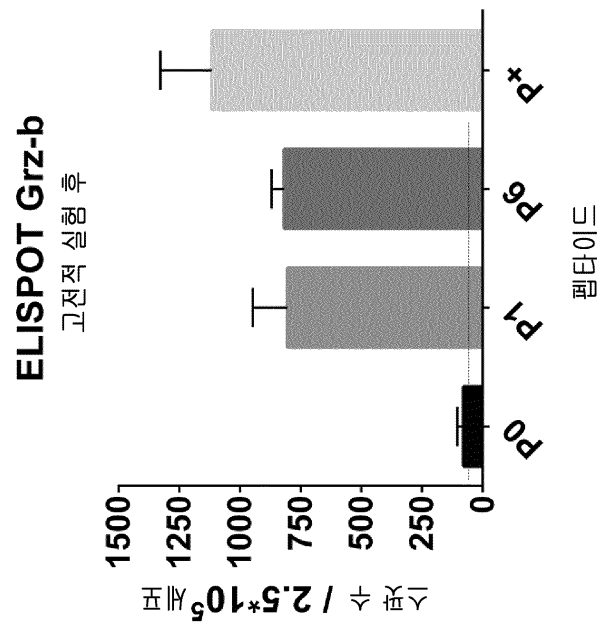
도면3b



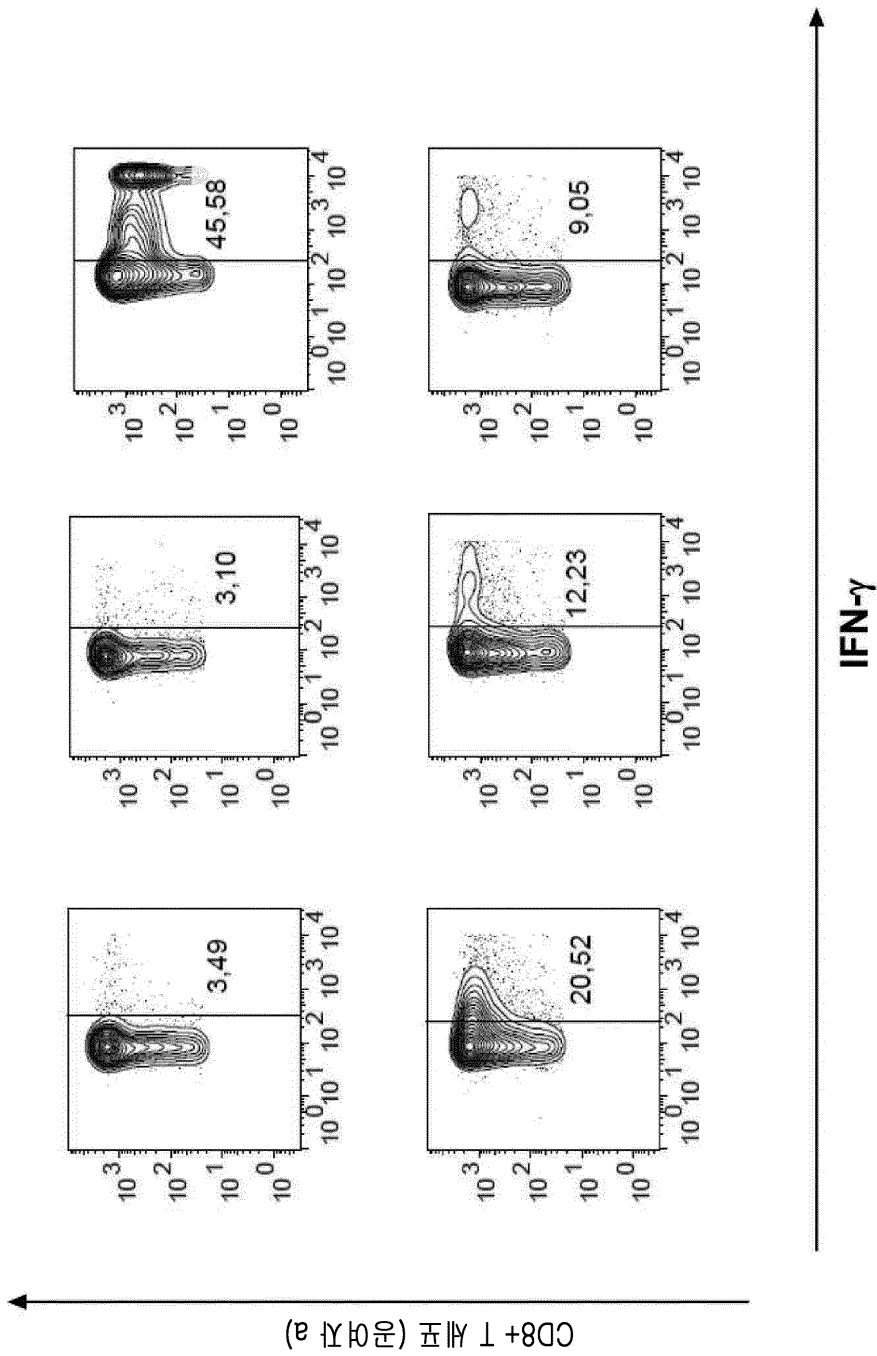
도면4a



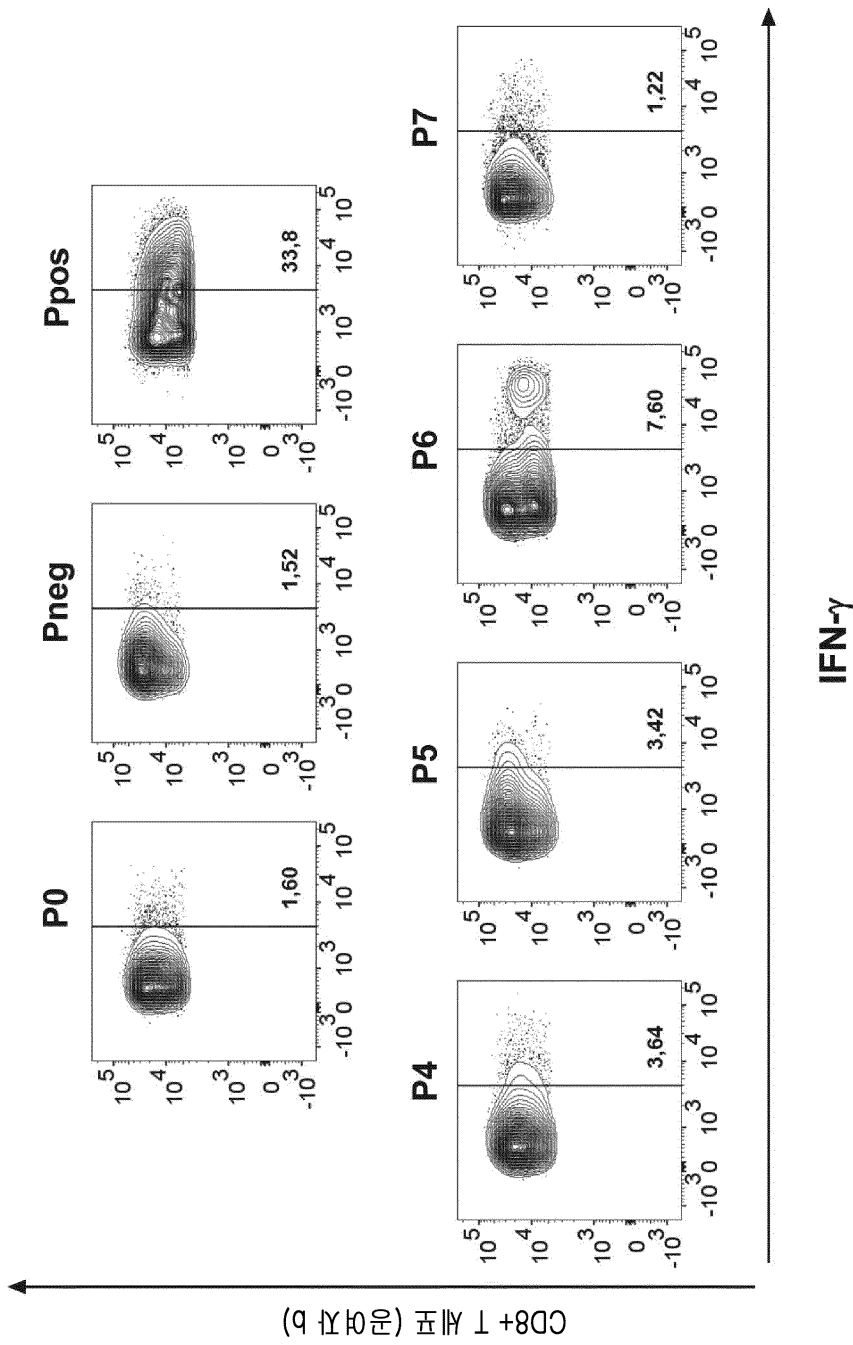
도면4c



도면5aa

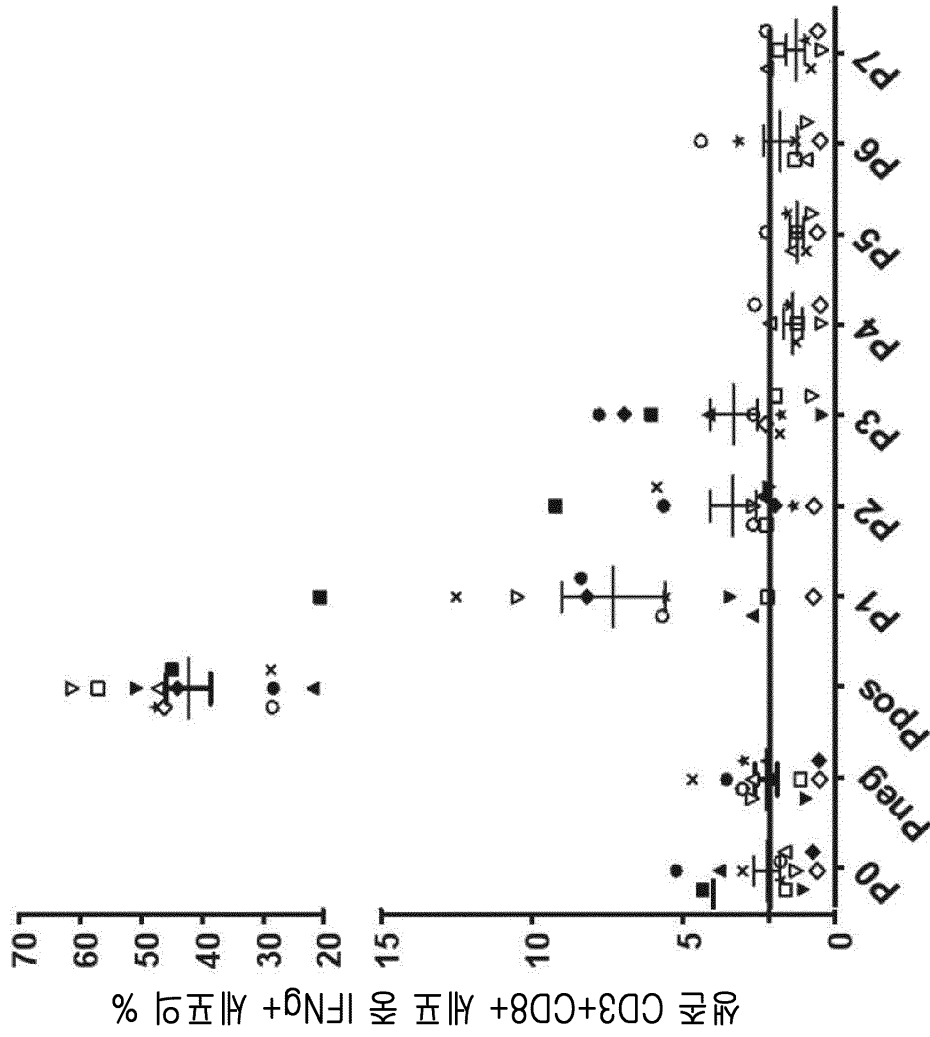


도면5ab

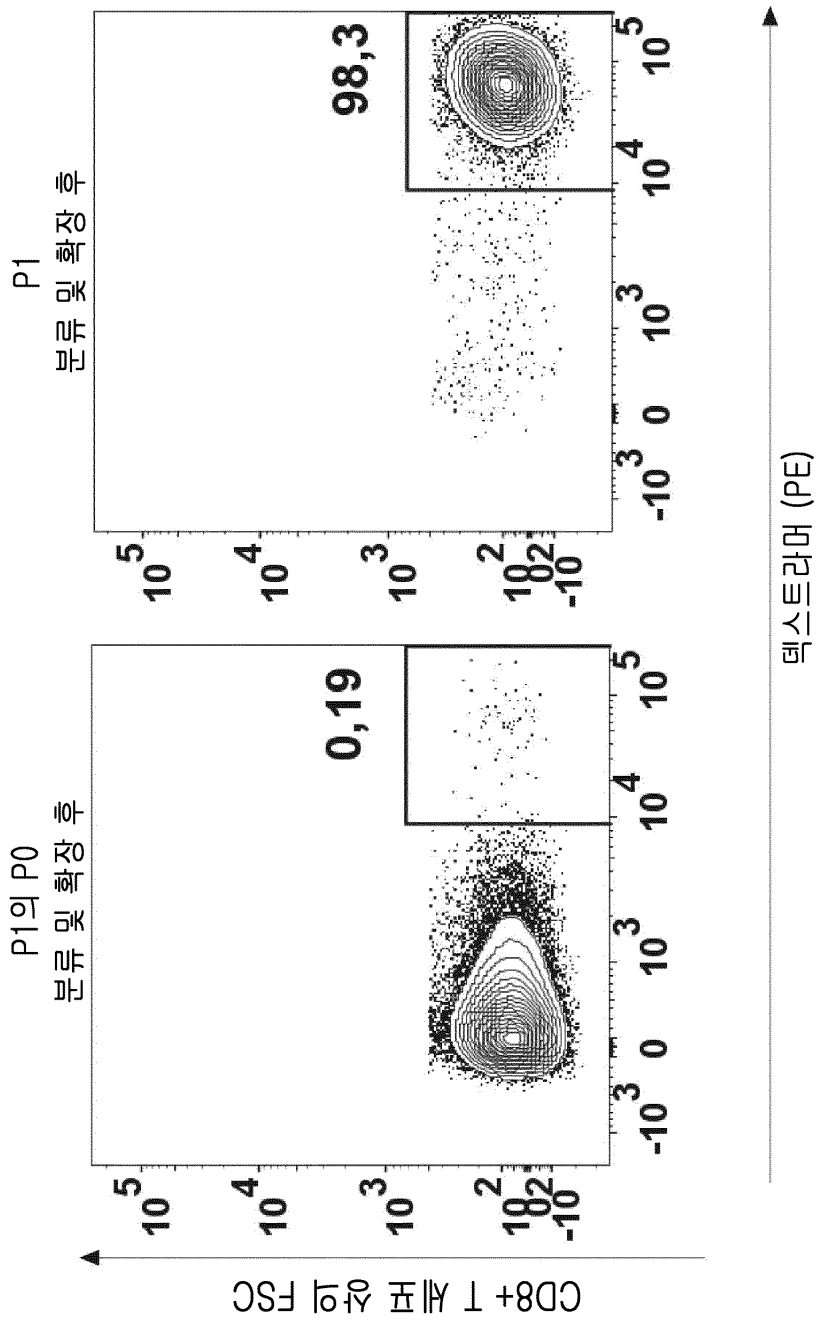


도면5b

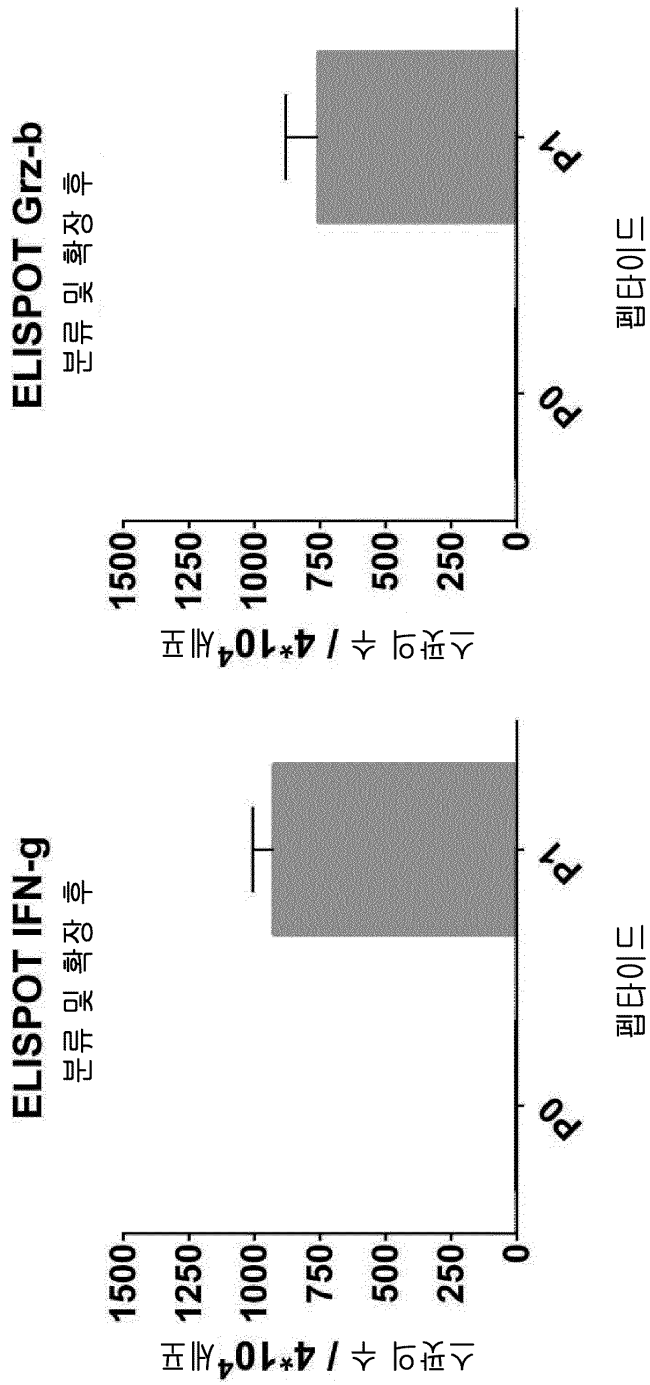
- HD1
- HD2
- HD3
- HD9
- HD14
- HD15
- HD18
- HD19
- HD20
- HD22
- HD25
- HD26



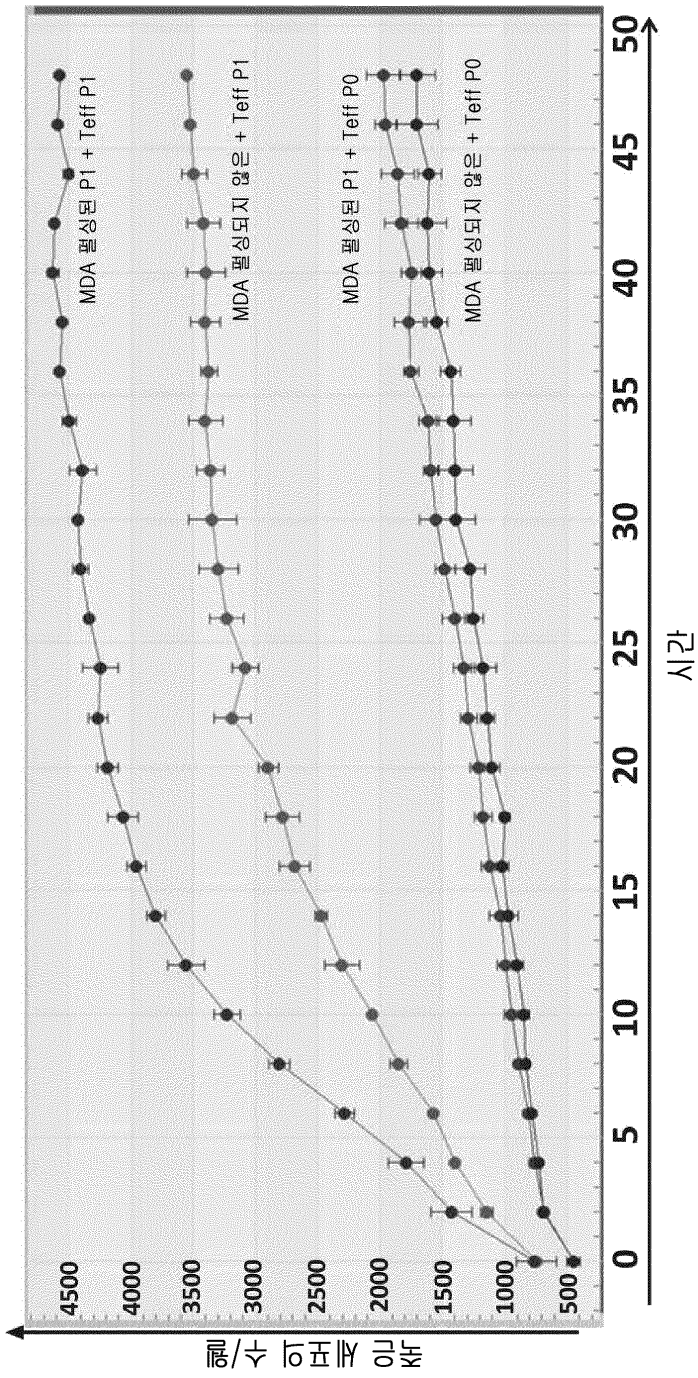
도면6a



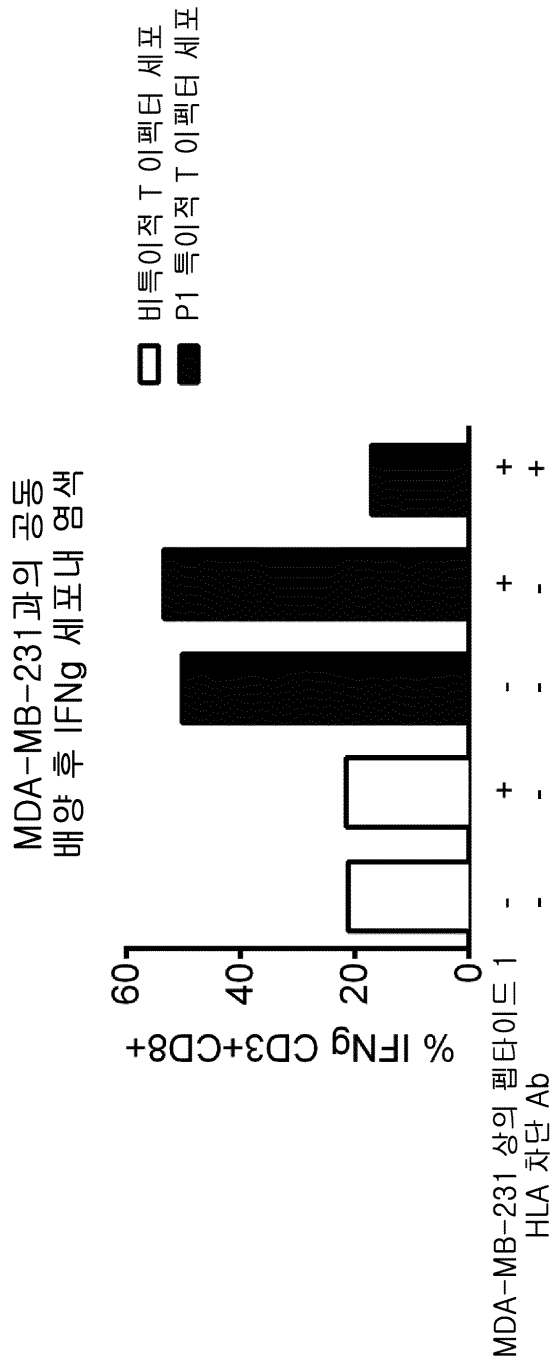
도면6b



도면6c



도면6d



도면7a

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
TNBC1							
TNBC2							
TNBC3							
TNBC4							시험되지 않음

도면7b

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
나소 1							
나소 2							시험되지 않음
나소 3							시험되지 않음

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Centre Leon-Berard

<120> HERV-K-derived antigens for cancer vaccine

<130> BET18L1817

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HERV epitope

<400> 1

Phe Leu Gln Phe Lys Thr Trp Trp Ile

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> epitope 2

<400> 2

Arg Leu Ile Pro Tyr Asp Trp Glu Ile

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> epitope 3

<400> 3

Lys Leu Ile Asp Cys Tyr Thr Phe Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HERV epitope 4

<400> 4

Tyr Leu Ser Phe Ile Lys Ile Leu Leu

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HERV epitope 5

<400> 5

Ala Met Ile Pro Lys Asp Trp Pro Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HERV epitope 6

<400> 6

Tyr Ala Met Ser Asn Leu Phe Ser Ile

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HERV epitope 7

<400> 7

Ser Met Asp Asp Gln Leu Asn Gln Leu

1 5

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> peptide 8

<400> 8

Lys Ser Lys Ile Lys Ser Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Ser Phe Ile Lys

1 5 10 15

Ile Leu Leu Lys Arg Gly Gly Val Lys Val Ser Thr Lys

 20 25

<210> 9

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> peptide 9
 <400> 9
 Thr Leu Leu Asp Ser Ile Ala His Gly His Arg Leu Ile Pro Tyr Asp
 1 5 10 15
 Trp Glu Ile Leu Ala Lys Ser Ser Leu Ser Pro Ser Gln
 20 25

<210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> peptide 10
 <400> 10
 Leu Ala Lys Ser Ser Leu Ser Pro Ser Gln Phe Leu Gln Phe Lys Thr
 1 5 10 15
 Trp Trp Ile Asp Gly Val Gln Glu Gln Val Arg Arg Asn
 20 25

<210> 11
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> peptide 11
 <400> 11
 Gly Pro Leu Gln Pro Gly Leu Pro Ser Pro Ala Met Ile Pro Lys Asp

 1 5 10 15
 Trp Pro Leu Leu Ile Ile Ile Asp Leu Lys Asp Cys Phe
 20 25

<210> 12
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> peptide 12

<400> 12

Lys Leu Ile Asp Cys Tyr Thr Phe Leu Gln Ala Glu Val Ala Asn Ala

1 5 10 15

Gly Leu Ala Ile Ala Ser Asp Lys Ile Gln Thr Ser Thr

 20 25

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> peptide 13

<400> 13

Trp Ile Arg Pro Thr Leu Gly Ile Pro Thr Tyr Ala Met Ser Asn Leu

1 5 10 15

Phe Ser Ile Leu Arg Gly Asp Ser Asp Leu Asn Ser Lys

 20 25

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> peptide 14

<400> 14

Arg Asp Val Glu Thr Ala Leu Ile Lys Tyr Ser Met Asp Asp Gln Leu

1 5 10 15

Asn Gln Leu Phe Asn Leu Leu Gln Gln Thr Val Arg Lys

 20 25

<210> 15

<211> 522

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> polypeptide (gag)

<400> 15

Met Gly Gln Thr Lys Ser Lys Ile Lys Ser Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu

1 5 10 15
 Ser Phe Ile Lys Ile Leu Leu Lys Arg Gly Gly Val Lys Val Ser Thr
 20 25 30

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

 Glu Thr Leu Lys Leu Glu Glu Ser Lys Pro Arg Gly Thr Ser Pro Leu
 100 105 110
 Pro Ala Gly Gln Val Pro Val Thr Leu Gln Pro Gln Lys Gln Val Lys
 115 120 125
 Glu Asn Lys Thr Gln Pro Pro Val Ala Tyr Gln Tyr Trp Pro Pro Ala
 130 135 140
 Glu Leu Gln Tyr Arg Pro Pro Pro Glu Ser Gln Tyr Gly Tyr Pro Gly
 145 150 155 160

 Met Pro Pro Ala Pro Gln Gly Arg Ala Pro Tyr Pro Gln Pro Pro Thr
 165 170 175
 Arg Arg Leu Asn Pro Thr Ala Pro Pro Ser Arg Gln Gly Ser Lys Leu
 180 185 190
 His Glu Ile Ala Gln Glu Gly Glu Pro Pro Thr Val Glu Ala Arg Tyr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Ser Ile Lys Lys Leu Lys Asp Met Lys Glu Gly Val Lys
 210 215 220

 Gln Tyr Gly Pro Asn Ser Pro Tyr Met Arg Thr Leu Leu Asp Ser Ile
 225 230 235 240
 Ala His Gly His Arg Leu Ile Pro Tyr Asp Trp Glu Ile Leu Ala Lys
 245 250 255

Ser Ser Leu Ser Pro Ser Gln Phe Leu Gln Phe Lys Thr Trp Trp Ile
 260 265 270
 Asp Gly Val Gln Glu Gln Val Arg Arg Asn Arg Ala Ala Asn Pro Pro
 275 280 285

 Val Asn Ile Asp Ala Asp Gln Leu Leu Gly Ile Gly Gln Asn Trp Ser
 290 295 300
 Thr Ile Ser Gln Gln Ala Leu Met Gln Asn Glu Ala Ile Glu Gln Val
 305 310 315 320
 Arg Ala Ile Cys Leu Arg Ala Trp Glu Lys Ile Gln Asp Pro Ser Lys
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Pro Asp Phe Val Ala Arg Leu Gln Asp Val Ala Gln Lys
 340 345 350

 Ser Ile Ala Asp Glu Lys Ala Arg Lys Val Ile Val Glu Leu Met Ala
 355 360 365
 Tyr Glu Asn Ala Asn Pro Glu Cys Gln Ser Ala Ile Lys Pro Leu Lys
 370 375 380
 Gly Lys Val Pro Ala Gly Ser Asp Val Ile Ser Glu Tyr Val Lys Ala
 385 390 395 400
 Cys Asp Gly Ile Gly Gly Ala Met His Lys Ala Met Leu Met Ala Gln
 405 410 415

 Ala Ile Thr Gly Val Val Leu Gly Gly Gln Val Arg Thr Phe Gly Arg
 420 425 430
 Lys Cys Tyr Asn Cys Gly Gln Ile Gly His Leu Lys Lys Asn Cys Pro
 435 440 445
 Val Leu Asn Lys Gln Asn Ile Thr Ile Gln Ala Thr Thr Thr Gly Arg
 450 455 460
 Glu Pro Pro Asp Leu Cys Asn Glu Gln Arg Gly Gln Pro Gln Ala Pro
 465 470 475 480

 Gln Gln Thr Gly Ala Phe Pro Ile Gln Pro Phe Val Pro Gln Gly Phe
 485 490 495
 Gln Gly Gln Gln Pro Pro Leu Ser Gln Val Phe Gln Gly Ile Ser Gln

180 185 190
 Ile His Cys Ile Asp Asp Ile Leu Cys Ala Ala Glu Thr Lys Asp Lys

195 200 205
 Leu Ile Asp Cys Tyr Thr Phe Leu Gln Ala Glu Val Ala Asn Ala Gly

210 215 220
 Leu Ala Ile Ala Ser Asp Lys Ile Gln Thr Ser Thr Pro Phe His Tyr

225 230 235 240
 Leu Gly Met Gln Ile Glu Asn Arg Lys Ile Lys Pro Gln Lys Ile Glu

245 250 255
 Ile Arg Lys Asp Thr Leu Lys Thr Leu Asn Asp Phe Gln Lys Leu Leu

260 265 270
 Gly Asp Ile Asn Trp Ile Arg Pro Thr Leu Gly Ile Pro Thr Tyr Ala

275 280 285
 Met Ser Asn Leu Phe Ser Ile Leu Arg Gly Asp Ser Asp Leu Asn Ser

290 295 300
 Lys Arg Met Leu Thr Pro Glu Ala Thr Lys Glu Ile Lys Leu Val Glu

305 310 315 320
 Glu Lys Ile Gln Ser Ala Gln Ile Asn Arg Ile Asp Pro Leu Ala Pro

325 330 335
 Leu Gln Leu Leu Ile Phe Ala Thr Ala His Ser Pro Thr Gly Ile Ile

340 345 350
 Ile Gln Asn Thr Asp Leu Val Glu Trp Ser Phe Leu Pro His Ser Thr

355 360 365
 Val Lys Thr Phe Thr Leu Tyr Leu Asp Gln Ile Ala Thr Leu Ile Gly

370 375 380
 Gln Thr Arg Leu Arg Ile Ile Lys Leu Cys Gly Asn Asp Pro Asp Lys

385 390 395 400
 Ile Val Val Leu Thr Lys Glu Gln Val Arg Gln Ala Phe Ile Asn Ser

405 410 415
 Gly Ala Trp Lys Ile Gly Leu Ala Asn Phe Val Gly Ile Ile Asp Asn

420 425 430

His Tyr Pro Lys Thr Lys Ile Phe Gln Phe Leu Lys Leu Thr Thr Trp
 435 440 445
 Ile Leu Pro Lys Ile Thr Arg Arg Glu Pro Leu Glu Asn Ala Leu Thr
 450 455 460
 Val Phe Thr Asp Gly Ser Ser Asn Gly Lys Ala Ala Tyr Thr Gly Pro
 465 470 475 480
 Lys Glu Arg Val Ile Lys Thr Pro Tyr Gln Ser Ala Gln Arg Ala Glu
 485 490 495
 Leu Val Ala Val Ile Thr Val Leu Gln Asp Phe Asp Gln Pro Ile Asn
 500 505 510
 Ile Ile Ser Asp Ser Ala Tyr Val Val Gln Ala Thr Arg Asp Val Glu
 515 520 525
 Thr Ala Leu Ile Lys Tyr Ser Met Asp Asp Gln Leu Asn Gln Leu Phe
 530 535 540
 Asn Leu Leu Gln Gln Thr Val Arg Lys Arg Asn Phe Pro Phe Tyr Ile
 545 550 555 560
 Thr His Ile Arg Ala His Thr Asn Leu Pro Gly Pro Leu Thr Lys Ala
 565 570 575
 Asn Glu Gln Ala Asp Leu Leu Val Ser Ser Ala Leu Ile Lys Ala Gln
 580 585 590
 Glu Leu His Ala Leu Thr His Val Asn Ala Ala Gly Leu Lys Asn Lys
 595 600 605
 Phe Asp Val Thr Trp Lys Gln Ala Lys Asp Ile Val Gln His Cys Thr
 610 615 620
 Gln Cys Gln Val Leu His Leu Pro Thr Gln Glu Ala Gly Val Asn Pro
 625 630 635 640
 Arg Gly Leu Cys Pro Asn Ala Leu Trp Gln Met Asp Val Thr His Val
 645 650 655
 Pro Ser Phe Gly Arg Leu Ser Tyr Val His Val Thr Val Asp Thr Tyr
 660 665 670
 Ser His Phe Ile Trp Ala Thr Cys Gln Ser Thr Ser His Val Lys Lys

