

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2009년 12월 10일 (10.12.2009)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2009/148229 A2

- (51) 국제특허분류:
C07K 7/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/002713
- (22) 국제출원일: 2009년 5월 22일 (22.05.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0051833 2008년 6월 2일 (02.06.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **바이오코아 주식회사 (BIOCORE CO., LTD.)** [KR/KR];
서울시 금천구 가산동 60-21, 153-023 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이정률 (LEE, Ky-oung-Ryul)** [KR/KR]; 서울시 서초구 서초3동 1494-4 번지 더미켄란 206 호, 137-073 Seoul (KR). **임종백 (LIM, Jong-Baeck)** [KR/KR]; 서울시 서초구 반포동 MV 아파트 1001 호, 137-040 Seoul (KR).
- (74) 대리인: **특허법인 신성 (SHINSUNG PATENT FIRM)**; 서울시 송파구 중대로 105 (가락동 99-7) ID 타워 601 호, 138-805 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

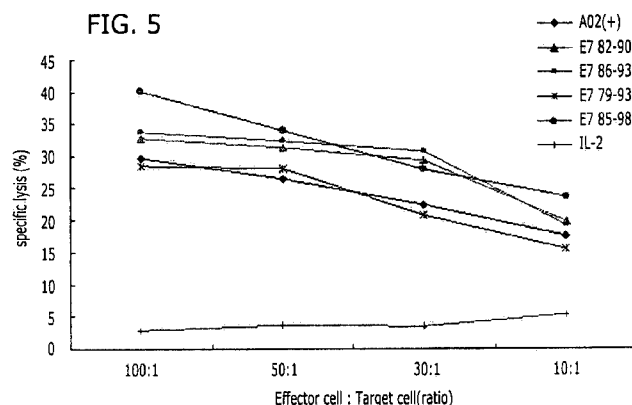
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: IMMUNOGENIC PEPTIDE AND COMPOSITION CONTAINING THE PEPTIDE FOR PREVENTING OR TREATING HPV-RELATED DISEASES

(54) 발명의 명칭: 면역성 펩타이드 및 그 펩타이드를 포함하는 HPV 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to an immunogenic peptide and a composition containing the peptide for preventing or treating HPV-related diseases, and more particularly, to an E7 immunogenic peptide derived from an HPV type 16 E7 protein and to a composition containing the peptide for preventing or treating HPV-related diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 면역성 펩타이드 및 그 펩타이드를 포함하는 HPV 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 HPV 타입 16의 E7 단백질 유래 E7 면역성 펩타이드 및 그 펩타이드를 포함하는 HPV 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.



WO 2009/148229 A2

명세서

면역성 펩타이드 및 그 펩타이드를 포함하는 HPV 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 면역성 펩타이드 및 그 펩타이드를 포함하는 HPV 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 HPV 타입 16의 E7 단백질 유래 E7 면역성 펩타이드 및 그 펩타이드를 포함하는 HPV 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자궁 경부암은 여성에게서 발생하는 악성 종양 가운데 두 번째로 발병 빈도가 높은 것으로, 매년 전세계적으로 35만 명 이상의 환자가 자궁 경부암으로 사망하고 있으며, 그 수가 계속 증가하고 있다(zur Hausen H., Nat Rev Cancer. 2002. 2(5):342-50). 자궁 경부암의 주원인은 인유두종 바이러스(human papillomavirus : HPV)로 알려져 있으며, 100여종이 넘는 HPV 중 40여종이 여성 생식기에 감염을 일으키는 것으로 밝혀 졌다 (de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004. 324: 17-27). 여러 종류의 HPV 중에서 특히 HPV 타입 16과 HPV 타입 18이 자궁 경부암 환자에게서 가장 흔하게 발견되어 종양발생에 중요하게 관여하고 있음이 알려져 있으며 그 중 HPV 타입 16은 가장 많은 자궁 경부암 환자에서 검출된다. (Munoz N, 외. N. Engl. J. Med. 2003. 348: 518-527).
- [3] HPV가 정상 세포에 감염되면 바이러스 oncoprotein이 숙주세포(host cell)의 유전자에 삽입되어 여러 바이러스 protein을 발현하게 되는 데, 그 중 E6와 E7은 강력한 oncoprotein으로서 tumor suppressor인 p53과 RB의 작용을 억제하여 암세포로의 진행과 지속적인 성장을 촉진하는 것으로 밝혀 졌다 (Werness BA, 외. Science. 1990. 248: 76-79;Dyson N, 외. Science. 1989. 243: 934-937). E7은 tumor suppressor 인 RB의 기능을 억제하며 (Kiyono T, 외. Nature. 1998. 396: 84-88), S-phase 유전자인 cyclin A 와 cyclin E의 활성을 촉진하고(Zerfass K, 외.J. Virol. 1995. 69: 6389-6399), 또한 cyclin-dependent kinase inhibitor인 CIP1(p21)과 KIP1(p27)의 기능을 억제하는 등(Jones DL, 외.Genes Dev. 1997. 11: 2101-2111;Funk JO, 외. Genes Dev. 1997. 11: 2090-2100;Zerfass-Thome K, 외. Oncogene. 1996. 13: 2323-2330)의 작용으로 감염된 세포의 apoptosis를 저해하고 종양으로의 전환을 유발하는 것으로 알려졌다. 이러한 바이러스 oncoprotein들은 정상 세포에서는 발견되지 않아 다양한 종류의 암을 대상으로 하는 면역치료에 있어서 아주 유력한 target이 되고, 또한 자궁 경부암의 치료를 위한 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte : CTL)를 생성하기 위해 HPV 에피토프를 규명하고자 하는 연구의 주요 대상이 되고 있다.

[4]

[5] 따라서, 본 발명에서는 높은 면역 반응을 나타내는 HLA-A*0201 특이 HPV 타입 16 E7 에피토프를 찾기 위해 E7 아미노산 서열을 이용하여 14개의 후보 펩타이드들을 합성한 후에 유체 세포측정법(flow cytometry)과 세포 독성(cytotoxicity) 실험을 수행하여 실제로 HLA-A*0201 타입을 가진 자궁 경부암 환자의 치료를 위한 세포 독성 T 림프구 생성을 유도할 수 있는 신규 HPV 타입 16 E7 에피토프를 규명하고자 하였으며 그 결과 E7₇₉₋₉₃ (LEDLLMGTLGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 에피토프를 밝혔다.

[6] HLA-A*0201 타입을 가진 자궁 경부암 환자의 치료가 가능한 세포 독성 T 림프구 생성을 유도하는 새로운 HPV 타입 16 E7 에피토프를 개발하고자 한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 HPV 관련 질환의 예방 또는 치료를 위한 펩타이드를 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

[8] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은

[9] 서열번호 13의 LEDLLMGTLGIVCPI 또는 서열번호 14의 GTLGIVCPICSQKP 아미노산 서열을 함유하는 펩타이드를 제공한다.본 발명의 펩타이드들은 상기 서열번호 13 또는 서열번호 14에 기재된 펩타이드들 뿐 아니라 이들 펩타이드에 하나 이상의 결손, 치환, 역위, 전좌 등의 돌연변이를 유발하여 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 돌연변이체 펩타이드들도 포함한다.

[10] 또한 본 발명은 본 발명의 서열번호 13의 펩타이드 또는 서열번호 14의 펩타이드 또는 이들의 상기 돌연변이체 펩타이드를 각각 코딩하는 핵산을 제공한다.

[11] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 서열은 서열번호 13의 펩타이드에 대해서는 서열번호 18(ttg gaa gac ctg tta atg ggc aca cta gga att gtg tgc ccc atc) 이고 서열번호 14의 펩타이드에 대해서는 서열번호 19인 것(ggc aca cta gga att gtg tgc ccc atc tgt tct cag aaa cca)이 바람직하나이에 한정되지 아니한다.

[12] 또 본 발명은 (a) 본 발명의 펩타이드 및 (b)약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 HPV 감염 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[13] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기의 HPV 감염 관련 질환은 보웬성 구진(bowenoid papulosis), 항문 이형성(anal dysplasia), 호흡기 또는 결막 유두종, 자궁 경부 이형성증, 자궁경부암, 외음암(vulval cancer), 또는 전립선암인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[14] 또한 본 발명은 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 미세입자, 리포솜, 또는 면역 자극 복합체(ISCOM)를 제공한다.

[15] 또 본 발명은 본 발명의 핵산을 유효성분으로 포함하는 미세입자, 리포솜, 또는

- 면역 자극 복합체(ISCOM)를 제공한다.
- [16] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 조성물은 HLA-A*3303 타입 환자 특이적인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [17] 또한 본 발명의 펩타이드 또는 핵산은 선택적으로 미세입자, 리포솜, 또는 면역 자극 복합체(ISCOM) 또는 본 발명의 펩타이드를 투여 대상에 공급하기에 적합한 다른 운반수단 속에 제제화될 수 있다. 미세입자를 사용하는 경우 그것은 바람직하게는 poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA)와 같은 공중합체인 중합체 매트릭스를 갖는다.
- [18] 포유류에서 면역반응(예를 들어 MHC class I-매개 또는 class II-매개 면역 반응을 포함하는 세포 면역 반응)은 면역원성 펩타이드가 결합하는 MHC 분자를 가지는 포유류, 즉 인간, 유인원, 개, 고양이, 토끼, 소, 쥐에 면역원성 펩타이드를 투여하여 촉발될 수 있다. 상기 본 발명의 펩타이드는 미세입자, 리포솜, 또는 ISCOM, 또는 용액의 일부로 투여될 수 있다.
- [19] 본 발명의 펩타이드를 투여하는 또 다른 방법은 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현벡터를 이용하는 것이다. 그 핵산 서열은 선택적으로 상기의 본 발명의 펩타이드에 연결된 신호 서열을 코딩할 수도 있다. 그 핵산이 신호 서열을 코딩할 때 바람직하게는 그것은 HLA-DR.alpha로부터 온 신호 서열 Met Ala Ile Ser Gly Val Pro Val Leu Gly Phe Phe Ile Ile Ala Val Leu Met Ser Ala Gln Glu Ser Trp Ala(서열번호 20)을 코딩한다. 그 경우에 본 발명의 서열은 예를 들어 서열번호 13 또는 14의 서열을 가질 수 있다. 바람직하게는 그 핵산은 핵산 감염을 일으키는 바이러스 유전자를 포함하지 아니하고 인텔트 E7 단백질을 코딩하지 아니한다.
- [20] 본 발명의 핵산은 프라즈미드 내에 포함될 수 있고, 선택적으로 중합체 매트릭스를 포함하는 미세입자 내에 제공될 수 있다. 바람직한 실시예에서 중합체 매트릭스는 필수적으로 PLGA의 공중합체로 구성된다. 바람직하게 그 미세입자는 예를 들어 0.02에서 20 마이크로론 또는 약 11 마이크로론 이하의 직경을 가진다. 바람직하게는 복수의 미세입자들이 0.02에서 20 마이크로론 또는 약 11 마이크로론 이하의 직경을 가진다.
- [21] 본 발명의 프라즈미드를 포함하는 세포도 본 발명의 범위 내이다. 그 세포는 예를 들어 B 세포 또는 다른 항원 제시 세포(APC)일 수 있다. 그 세포는 그것을 코딩하는 프라즈미드로부터 펩타이드 발현을 가능하게 하는 조건에서 배양되거나 유지된다.
- [22] 본 발명의 핵산 및 프라즈미드는 예를 들어 "naked DNA"로 포유류에 상기 언급한 프라즈미드를 투여하여 포유류 예를 들어 인간에서 면역 반응을 유도하는 방법에 유용하다. 그 포유류는 HPV 감염, 자궁경부 이형성증, 및/또는 자궁경부암의 위험이나 또는 질환을 가질 수 있다. 본 발명의 핵산 및 프라즈미드도 미세 입자, 리포솜, ISCOMS, 또는 상기에 기재된 것과 같은 다른 적당한 운반 수단에 삽입될 수 있다.

- [23] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [24] 본 발명에 개재된 펩타이드들과 그 펩타이드를 코딩하는 핵산은 HPV E7 단백질에 대한 면역 반응을 야기하는데 사용될 수 있다.
- [25] 본 발명의 펩타이드는 세포내 기관으로 그 펩타이드를 운반하는 수송(trafficking) 서열이 연결될 수 있다. 그 수송서열은 그것이 부착된 펩타이드의 세포내 수송(소기관에서 소기관으로 또는 세포 표면으로 이동을 지시)을 조절하는 기능을 하는 아미노산 사열이다. 그러한 수송 서열들은 ER, 리소좀 또는 엔도솜으로 그 폴리펩타이드들을 수송할 수 있고 시그널 펩타이드들(번역 동안 ER에 단백질을 지시하는 N-말단 서열), 예를 들어 KDEL과 같은 ER 체류 서열, 및 KFERQ, 또는 QREFK와 같은 와 같은 리소좀 타겟 서열을 포함할 수 있다.
- [26] 짧은 아미노산 서열들은 특정세포내 기관으로 단백질을 타겟하는 시그널로 작용할 수 있다. 예를 들어 ER로 가는 단백질의 아미노 말단에서 소수성 시그널 펩타이드가 발견된다.
- [27] 그러한 수송 서열은 HLA-DR,알파 리더 서열인 Met Ala Ile Ser Gly Val Pro Val Leu Gly Phe Phe Ile Ile Ala Val Leu Met Ser Ala Gln Glu Ser Trp Ala (서열번호 20)일 수 있다. 만약 그 부분이 본 발명의 폴리펩타이드를 ER로 수송하는데 충분하다면, 그 시그널 펩타이드의 상기 특정된 25개의 잔기 서열 중 일부분(예를 들어 적어도 10개의 아미노산 잔기)만을 포함할 수 있다.
- [28] 일부 경우에는 시그널 펩타이드에 의한 가공(즉 절단)을 가능하게 하기 위하여 본 발명의 HPV E7 항원성 펩타이드를 코딩하는 서열과 수송 서열을 연결하는 부분은 변형되는 것이 바람직하다. 시그널 펩타이드들에 대한 인식 서열들은 Von Heijne, NAR 14:4683, 1986에 기재된다.
- [29] 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 DNA를 구축하는데 표준 기술이 사용될 수 있다(예를 들어 WO 94/04171에 기재된 기술을 참고). 그 구축물은 인간 세포들에서 발현을 증가시키는 부가적인 서열들 예를 들어 적당한 프로모터, 코딩 서열의 RNA 안정 5' 과 3' 서열, 인트론(코딩되는 서열 내에 5' 또는 3' 어느 쪽에도 위치될 수 있음), 및 폴리(A) 부가 자리뿐만 아니라 그 구축물이 원핵 및/또는 진핵 숙주에 대한 선택 및 복제를 가능하게 하는 복제 오리진 및 선택 마커들을 포함할 수 있다.
- [30] 본 발명의 플라스미드 내에는 가나마이신 저항 유전자(519-1313 부위), SV40 얼리 프로모터(131-484 부위) 및 thymidine kinase (TK) 폴리아데닐레이션 자리(1314-1758 부위)를 가질 수 있다. 가나마이신 저항 유전자 및 관련 조절 서열은 단지 선택의 목적을 위한 것이고 만약 선택이 필요하지 않거나 바람직하지 않으면 플라스미드로부터 제거될 수 있다.
- [31] 본 발명의 펩타이드 및 핵산은 HPV에 의하여 감염된 것으로 알려졌거나,

HPV에 의하여 감염된 것이 의심스럽거나, HPV에 의하여 감염될 수 있는 대상에서 예방 또는 치료적인 백신으로 사용될 수 있다. 다른 적당한 대상들은 HPV-관련 질환의 증상을 나타내거나 질환이 발생할 것 같은 사람들을 포함한다. 본 발명의 펩타이드 및 백신은 HPV 군주 16의 감염과 관련된 질환들, 예를 들어 보웬성 구진(bowenoid papulosis), 항문 이형성(anal dysplasia), 호흡기 또는 결막 유두종, 자궁 경부 이형성증, 자궁경부암, 외음암(vulval cancer), 또는 전립선암을 치료하거나 예방하는 백신으로 사용될 수 있다.

- [32] 본 발명의 펩타이드 또는 핵산들은 HPV 감염 또는 HPV 감염과 관련된 질환들을 치료하기 위하여 단독 또는 당업계에 공지된 다른 치료법 예를 들어 화학요법제, 방사선 및 수술과 같이 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 펩타이드들 및 핵산들은 면역 반응을 증진하기 위하여 고안된 다른 치료, 예를 들어 당업계에 주지된 것과 같은 어쥬번트 또는 사이토카인(또는 사이토카인을 코딩하는 핵산)과 혼합하여 투여될 수 있다.
- [33] 본 발명의 펩타이드 또는 핵산들은 HPV 감염 또는 HPV 감염 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조에 사용될 수 있다.
- [34] 본 발명의 운반 시스템들은 HPV에 대한 면역 반응을 촉진시키려는 적당한 세포들에 펩타이드 또는 그 펩타이드를 발현하는 DNA 컨스트럭트를 운반하는데 사용될 수 있다.
- [35] 본 발명의 펩타이드 또는 그 펩타이드를 코딩하는 핵산들은 표준 방법, 예를 들어 Donnelly et al., J. Imm. Methods 176:145, 1994, 및 Vitiello et al., J. Clin. Invest. 95:341, 1995에 기재된 것과 같은 방법을 사용하여 투여될 수 있다.
- [36] 본 발명의 펩타이드 또는 핵산들은 대상에 당업계에 공지된 형태, 예를 들어 근육주사, 정맥주사, 동맥주사, 피내주사, 복강주사, 코의내부, 질내, 관장내, 피하내 주사될 수 있거나 그들은 예를 들어 미세입자를 포함하는 분말 또는 용액의 흡입에 의하여 위장관, 점막 또는 호흡기로 투여될 수 있다. 투여는 국소적(예를 들어 자궁경부 또는 다른 감염자리) 또는 전신성일 수 있다.
- [37] 본 발명의 펩타이드 또는 그 펩타이드를 코딩하는 핵산들은 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포솜, 미소구체(microspheres), 또는 나노구형입자와 같은 약학적으로 수용될 수 있는 담체에 운반될 수 있다. 그들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련되거나 또는 네이키드될 수 있고 지질, 리포솜, 미세입자, 금, 나노입자, 폴리머, 축하반응제, 다당류, 폴리아미노산, 덴드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 운반될 수 있다.
- [38] 약 0.1에서 100 마이크로몰의 펩타이드 용량 또는 약 1에서 200 마이크로그램의 DNA의 용량이 1회 체중 kg 당 투여되는 것이 바람직하다. 물론 당업계에 주지된 바와 같이 주어진 환자에 대한 용량은 환자의 키, 체표면적, 나이, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여 시간과 경로, 일반적 건강상태 및 동시에 투여되는 다른 약제를 포함하는 많은 인자들에 의존한다. 적정 투여량의 결정은 통상의 지식을

가진 약사들의 능력 범위내에서 능숙하다.

- [39] 바이오리스틱(biolistic) 전달 또는 생체 외(ex vivo) 처리와 같은 다른 표준 전달 방법들이 사용될 수도 있다. 생체 외 처리에서 예를 들어 항원제시 세포들(APCs), 수지상세포들, 말초혈액 단핵구 세포들, 또는 골수세포들을 환자 또는 적당한 공여자로부터 얻어서 본 면역 조성물로 생체 외에서 활성화된 후 그 환자에게 투여될 수 있다.
- [40] 미국 특허 제 5,783,567에 기재된 것을 포함하는 미세입자들이 세포 속으로 DNA, 또는 펩타이드와 같은 거대분자를 운반하기 위한 운송수단으로 사용될 수 있다. 그들은 폴리머의 쉼 내에 둘러 쌓여 있거나 폴리머 매트릭스에 들어간 거대분자들을 포함한다. 미세입자들은 예를 들어 들어있는 DNA를 분해되지 않은 상태로 유지하는 것과 같은 거대분자의 특성을 유지하는 작용을 한다. 미세입자들은 또 거대분자들의 펄스된 운반 및 특정 위치에 운반 또는 특정 세포 또는 타겟 세포군으로 운반에 사용될 수 있다.
- [41] 폴리머 매트릭스는 poly-lactic-co-glycolic acid, 전분, 젤라틴 또는 키틴과 같은 생분해성 공중합체일 수 있다. 미세입자들은 대상의 식세포로 DNA 분자들의 이동을 최대화하는데 특히 사용될 수 있다. 또는 그 미세입자들은 조직에 주사되거나 이식될 수 있다.
- [42] 본 발명의 펩타이드는 당업계에 주지된 지질, 덴드리머 또는 리포솜을 통하여 대상에 투여될 수 있다. 예를 들어 면역 펩타이드 또는 그 펩타이드를 코딩하는 핵산들을 운반하는 리포솜들은 인 비보에서 CTL 반응을 야기하는 것으로 알려졌다(Reddy et al., J. Immunol. 148:1585, 1992; Collins et al., J. Immunol. 148:3336-3341, 1992; Fries et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:358, 1992; Nabel et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 89:5157, 1992).
- [43] 본 발명의 펩타이드 및 핵산들은 사포닌 단독 또는 콜레스테롤 및 Quil A (사포닌)을 동시에 혼합하여 생성된 30-40 nm 크기의 (-) 차지된 케이지 유사 구조인 Immune Stimulating Complexes (ISCOMS)을 사용하여 투여될 수 있다. 본 발명의 펩타이드 및 핵산들은 ISCOMS와 동시 또는 별도로 투여될 수 있다.
- [44] 보조면역은 항원에 대한 운반 수단으로 ISCOMS을 사용한 독소플라스마증 및 Epstein-Barr 바이러스 유도된 종양들을 포함하는 감염의 여러 실험 모델에서 생성되어 왔다(Mowat et al., Immunology Today 12:383-385, 1991). ISCOMS에서 캡슐화된 1ug의 낮은 항원 용량이 클래스 I 매개된 CTL 반응을 생성하는 것이 발견되었다(Takahashi et al., Nature 344:873-875, 1990).
- [45] 면역 반응을 야기하는 본 발명의 펩타이드 및 핵산의 능력은 당업계에 주지된 면역 반응을 측정하는 방법들을 사용하여 분석할 수 있다. 예를 들어 세포 독성 T 세포들의 생성은 MHC 테트라머를 사용하거나 세포내 사이토카인 발현을 측정하거나 표준 ^{51}Cr release 분석에서 나타낼 수 있다. ELISA 또는 ELISPOT와 같은 표준 분석도 T 세포 활성화에 기여하는 사이토카인 프로파일을 측정하는데 사용될 수 있다. T 세포 증식은 또 당업계에 공지된 다른 분석들과 ^3H -thymidine

업테이크와 같은 분석을 사용하여 측정될 수 있다. B 세포 반응들은 ELISA와 같은 분석을 사용하여 측정될 수 있다.

[46] 디지털 이미징, 세포학적 질확대경 및 조직학적 검사와 같은 다른 방법들이 유두종 바이러스 관련 병소 또는 유두종 바이러스 레벨에 대한 본 발명의 펩타이드와 핵산의 효과를 측정하는데 사용될 수 있다.

[47] 이하, 본 발명을 설명한다.

[48] 자궁 경부암은 여성에게서 발생하는 악성 종양 가운데 두 번째로 발병 빈도가 매우 높아 그 위험성이 잘 알려져 있다. 인유두종 바이러스(HPV)가 자궁 경부암의 주원인으로 알려져 있으며, 그 중에서도 HPV 타입 16이 자궁 경부암 환자에서 가장 많이 검출됨이 밝혀져 있다. HPV 타입 16 E6와 E7은 viral oncoprotein으로서 HPV 감염된 자궁 경부세포를 암세포로의 진행을 야기 시키며 암세포의 지속적인 성장을 촉진하는 것으로 밝혀 졌다. HPV 타입 16 E7은 tumor suppressor 인 Rb의 기능을 억제하며 감염된 세포의 apoptosis를 저해하고 종양으로의 전환을 유발하는 데, 자궁 경부암 치료를 위한 세포독성 T 림프구를 이용한 면역세포 치료법 개발에 있어 유력한 표적항원 (target antigen)으로 지목되어 연구가 진행되어 가고 있다.

[49] HLA-A*0201 타입의 세포 독성 T 림프구의 생성을 유도하는 특정한 HPV 타입 16 E7 에피토프를 개발하기 위해 합성된 HPV 타입 16 E7 후보 펩타이드들을 이용하여 유체 세포측정법 (flow cytometry)을 실행한 결과 E7 후보 펩타이드 가운데 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTLGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 에피토프이 높은 수치의 세포 독성 T 세포의 분화 및 활성을 유도 하는 것을 알 수 있었으며, 또한 세포 독성 (cytotoxicity) 실험을 통해 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTLGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 에피토프이 기존 연구에서 잘 밝혀진 E7₈₂₋₉₀(LLMGTLGIV)과 E7₈₆₋₉₃(TLGIVCPI) peptide가 동일하거나 우수한 자궁 경부암 세포사멸 효과를 유발함을 알 수 있었다. 따라서, E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTLGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 에피토프이 자궁 경부암 환자의 치료 및 백신 개발에 효과적으로 적용될 수 있는 신규 HLA-A*0201 에피토프임을 규명하였다.

[50] 즉 본 발명에서는 기존에 밝혀진 E7 에피토프보다 높은 항암효과를 나타내는 펩타이드를 찾기 위해 정상 HLA-A*0201 타입 혈액 증여자에게서 PBMC를 공급받아 합성된 E7 펩타이드를 처리하여 1주 혹은 2주간 배양한 후 IFN- γ 의 발현 정도를 측정하여 CD8+ T 세포로의 분화를 유도하는 펩타이드의 후보를 선정하고, 세포 독성 실험인 ⁵¹Cr release assay 을 사용하여 실제적인 항암 효과를 확인해 보았다. 그림 1에서 볼 수 있었듯이, 합성된 14개의 펩타이드 중 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTLGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드가 다른 E7 펩타이드에 비해 높은 수치의 IFN- γ 의 생성을 나타냄으로써 효과적인 면역성(immunogenic)을 가지고 있음을 예상할 수 있었다.

[51] 유체 세포측정법을 사용하여 선별한 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTLGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 에피토프이 실제로 HLA-A*0201 타입의 자궁 경부암

세포에 대해 항암효과를 나타내는 지를 확인하기 위해 ^{51}Cr release assay 기법을 이용하여 세포 사멸효과를 측정해 본 결과, E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI) 펩타이드를 처리한 실험군에서 CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃(A02, NLVPMVATV) 펩타이드를 처리한 양성대조군보다 월등히 높은 세포 사멸효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(그림 3 및 4). 반면, 유체 세포측정법에서 IFN- γ 의 발현 정도가 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) epitope과 유사하게 나타난 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI) epitope은 세포 사멸 효과가 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) epitope에 비해 다소 낮게 나타났지만 기존의 보고된 양성대조군들과 비슷한 암세포 사멸효과를 보였다(그림 3 및 4). 이러한 결과는 두 E7 에피토프의 아미노산 서열 차이에서 기인하는 실제 자궁 경부암 세포에 대한 면역성 유발 정도가 다르기 때문에 나타난 것으로 예상된다. 또한, 선행된 연구에서 면역효과가 밝혀진 E7₈₂₋₉₀(LLMGTGIV)과 E7₈₆₋₉₃(TLGIVCPI) 펩타이드와 본 연구에서 면역효과가 나타난 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI)과 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드의 세포 사멸 효과를 비교해 본 결과, E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드가 가장 높은 항암효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(그림 5).

[52] 결론적으로, 유체 세포측정법과 세포 독성 실험을 통해 HPV 타입 16 E7 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드가 HLA-A*0201 타입 자궁 경부암의 백신 개발과 adoptive 면역세포치료에 필요한 세포 독성 T 림프구 생성에 효과적인 에피토프임을 규명할 수 있었다.

[53]

[54]

유리한 효과

[55] 본 발명에서 알 수 있는 바와 같이 HPV 타입 16 E7 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드가 HLA-A*0201 타입 자궁 경부암의 백신 개발과 adoptive 면역세포치료에 필요한 세포 독성 T 림프구 생성에 효과적인 에피토프임을 규명할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[56] 도 1과 2는 유체 세포측정법을 이용한 HPV type 16 E7 후보 에피토프에 의해 유도되는 HLA-A*0201 type 특이적인 CD8+ T 세포내의 IFN- γ 발현 정도의 측정.

[57] 도 1은 HLA-A*0201/2401 타입의 환자로부터 추출한 말초혈액 단핵구를 HPV type 16 E7 후보 펩타이드들과 음성 및 양성 대조군 펩타이드로 자극한 후 유도되는 HLA-A*0201 타입 특이적인 CD8+ T 세포내의 IFN- γ 발현 정도의 측정한 것임. IL-2(음성대조군), A02; CMVpp65₄₉₅₋₄₉₃ (HLA-A*0201, NLVPMVATV, 양성대조군), A24; CMVpp65₃₂₈₋₃₃₆(HLA-A*2402, QYDPVAALF, 양성대조군), A33; CMVpp65₉₁₋₁₀₀(HLA-A*3303, SVNVDHNPTGR, 음성대조군),

[58] 도 2는 HLA-A*0201/3303 타입의 환자로부터 추출한 말초혈액 단핵구를 HPV type 16 E7 후보 펩타이드들과 음성 및 양성 대조군 펩타이드로 자극한 후

- 유도되는 HLA-A*3303 타입 특이적인 CD8+ T 세포내의 IFN- γ 발현 정도의 측정된 것임. IL-2(음성대조군), A02; CMVpp65₄₉₅₋₄₉₃ (HLA-A*0201, NLVPMVATV, 양성대조군), A24; CMVpp65₃₂₈₋₃₃₆(HLA-A*2402, QYDPVAALF, 음성대조군), A33; CMVpp65₉₁₋₁₀₀(HLA-A*3303, SVNVHNPTGR, 양성대조군).
- [59] 도 3과 4는 ⁵¹Cr release assay 기법을 이용한 HPV type 16 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI)과 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 에피토프 특이 CD8+ 세포독성 T 림프구에 의한 HLA-A*0201 type 자궁 경부암 세포의 사멸 효과의 측정된 것임.
- [60] 도 3은 HLA-A*0201/3303 타입의 환자로부터 추출한 말초혈액 단핵구를 HPV type 16 E7 후보 펩타이드들과 음성 및 양성 대조군 펩타이드로 자극한 후 측정된 HLA-A*0201 타입 자궁 경부암 세포의 사멸 효과임. IL-2(음성대조군), A02; CMVpp65₄₉₅₋₄₉₃ (HLA-A*0201, NLVPMVATV, 양성대조군),
- [61] 도 4는 HLA-A*0201/2402 타입의 환자로부터 추출한 말초혈액 단핵구를 HPV type 16 E7 후보 펩타이드들과 음성 및 양성 대조군 펩타이드로 자극한 후 측정된 HLA-A*0201 타입 자궁 경부암 세포의 사멸 효과임. IL-2(음성대조군), A02; CMVpp65₄₉₅₋₄₉₃ (HLA-A*0201, NLVPMVATV, 양성대조군).
- [62] 도 5는 ⁵¹Cr release assay 기법을 이용한 기존에 밝혀진 HPV type 16 E7₈₂₋₉₀(LLMGTGIV), E7₈₆₋₉₃(TLGIVCPI) 에피토프와 신규 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI), E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 간의 HLA-A*0201 type 자궁 경부암 세포의 사멸 효과의 비교 측정.
- 발명의 실시를 위한 형태**
- [63] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [64] 실시예:1 펩타이드(peptide) 합성
- [65] HPV 타입 16 E7 단백질의 전체 아미노산 서열을 컴퓨터 알고리즘(computer algorithms)을 이용하여 각각 15mer의 크기로 중복(overlapping)되도록 나누어 합성한 후 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography : HPLC)기기를 이용하여 순도가 95% 이상 되는 펩타이드를 최종적으로 선택하여 총 14개를 합성하였다(표 1). 이런 식으로 합성된 펩타이드는 1% DMSO PBS에 녹인 후 -20°C에 냉동 보관한 후 사용 직전에 실온에서 해동하여 사용하였다.
- [66] 표 1

펩타이드 번호(서열번호)	아미노산 위치	아미노산 서열
1	1-15	MHGDTPTLHEYMLDL
2	7-21	TLHEYMLDLQPETTD
3	13-27	LDLQPETTDLYCYEQ
4	19-33	TTDLYCYEQLNDSSE
5	25-39	YEQLNDSSEEEDEID
6	31-45	SSEEEDEIDGPAGQA
7	37-51	EIDGPAGQAEPDRAH
8	43-57	GQAEPDRAHYNIVTF
9	49-63	RAHYNIVTFCCKCDS
10	61-75	CDSTLRRCVQSTHVD
11	67-81	LCVQSTHVDIRTLED
12	73-87	HVDIRTLEDLLMGTL
13	79-93	LEDLLMGTLGIVCPI
14	85-98	GTLGIVCPICSQKP

[67] 상기 표 1은 합성된 HPV 타입 16 E7 펩타이드를 나타낸다.

[68]

[69] 실시예 2:세포의 준비

[70] 연구 동의서에 서명한 HLA-A*0201 타입 혈액 공여자 (표 2)의 혈액을 원심분리(centrifugation)하여 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)를 분리한다. 간략히 설명하면, Ficoll-Hypaque 1.077를 사용하여 농도기울기(density-gradient)를 형성한 후 그 위에 증여자의 혈액을 조심스럽게 흘려 넣은 뒤 2000 rpm의 속도로 상온에서 15분간 원심분리를 실시한 후 백혈구 층(buffy coat)만을 채취하여 PBS로 2회 세척하여 실험에 사용하였다.

[71] 표 2

혈액 증여자(donor)	성별	HLA-A	HLA-B	HLA-C
1	남	A*0201/2402	13, 40	03, 03
2	남	A*0201/3303	44, 44	03, 14
3	남	A*0201/3303	44, 44	03, 14
4	남	A*0201/2402	40, 40	03, 04
5	남	A*0201/3001	13, 35	03, 06

- [72] 표 2는 HLA-A*0201 타입 혈액 증여자를 나타낸다.
- [73] 실시에 3: PBMC로부터 자가 수지상 세포(*autologous dendritic cell*)의 생성
- [74] 원심분리를 통해 얻어진 PBMC를 RPMI 배양액(10% FBS, 5% antibiotics)이 들어 있는 T75 플라스크에 넣어 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후, 부유된 세포들을 제거하고 플라스크에 고착된 단핵 세포(*monocyte*)에 Interleukin-4(IL-4, 1000U/ml)와 granulocyte-macrophage stimulating factor(GM-CSF, 800U/ml)를 첨가하였다. 배양 시작 후 2일, 4일째 되는 때에 IL-4(1000U/ml)와 GM-CSF(1600U/ml)을 각각 넣어 주었다. 세포의 성장에 맞춰 수시로 RPMI 배양액을 교체해 주었다. 배양 시작 후 5일째 되는 때에 tumor necrosis factor- α (TNF- α , 1000u/ml)를 첨가하였다.
- [75]
- [76] 실시에 4: 펩타이드에 특이적인 polyclonal 세포 독성 T 세포의 생성
- [77] 초저온 동결 되어 있는 HLA-A*0201 타입 혈액 증여자의 PBMC를 해동시켜 각 well당 2ml의 RPMI 배양액이 채워진 24 well 배양용기에 적정한 수의 세포를 넣어 주었다. 배양 시작 후 1일째 되는 때에 시험하고자 하는 펩타이드(10 μ g/ml)와 Interleukin-2(IL-2, 100U/ml)를 각 웰에 첨가해 주었다. 배양기간 중 이틀 간격으로 IL-2(1000U/ml)을 넣어주고 배양액을 교체해 주었다. 배양 시작 후 7일째 되는 때에 위에 언급한 방법으로 생성된 수지상 세포(세포 독성 T 세포수의 최소 10분의 1 이상의 세포수)와 펩타이드(20 μ g/ml)를 첨가해 주었다.
- [78] 실시에 5: 유체 세포측정법(*flow cytometry*)를 이용한 세포내 Interferon- γ (IFN- γ) 생성측정
- [79] 배양 시작 후 7일째 되는 때에 수지상 세포와 펩타이드가 첨가된 세포 독성 T 세포를 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이 때, 실험군 중 한 그룹에 phytohemagglutinin(PHA, 0.25 μ g/ml)을 넣어 주었다. 배양 후 10 μ g의 brefeldin A(BFA)를 각각 첨가해 준 뒤, 37°C에서 5시간 동안 배양하였다. 그 후, 각각의 well에서 세포를 채취하여 PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척해 주었다. 세척 후 1mM 농도의 EDTA가 들어 있는 PBS를 넣어 주고 37°C에서 10분간 배양하였다. 배양이 끝나면, 5% FBS가 포함된 PBS로 2회 세척해 주고, 형광표지된 항체인 peridin-chlorophyll-protien(PerCP)-conjugated mouse anti-human CD3+항체와 phycoerythrin(PE)-conjugated mouse anti-human CD8+항체를 각각 1:100의 비율로 넣어 준 뒤 4°C에서 15분간 dark상태로 배양하였다. 배양 후, lysing solution과 permeabilization solution을 각각 처리해 주고, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human IFN- γ 항체를 첨가해 준 뒤 4°C에서 30분간 dark상태로 배양하였다. 이 후, 5% FBS가 포함된 PBS로 2회 세척해 주고 1% formaldehyde로 고정시킨 뒤 FACS(fluorescence activated cell sorting)장비를 이용해 측정하여 분석하였다.
- [80] 실시에 6: 세포 독성 실험(*cytotoxicity assay*)

- [81] 자궁 경부암 세포주를 목표 세포(target cell)로 하여 ^{51}Cr release assay를 사용하여 세포 독성 실험을 실시하였다. 간략히 설명하면, RPMI 배양액에서 배양된 HLA-A*3303 타입의 자궁 경부암 세포주에 0.1 mCi의 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 를 첨가하여 37°C에서 45분간 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, 적정수의 목표 세포를 세포 독성 T 세포에 다양한 비율로 넣어 주고 37°C에서 5시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 1500 rpm으로 5분간 원심분리를 해주고 미리 준비한 γ -counter tube에 100 μl 씩 옮겨 넣었다. γ -ray counter를 이용해 측정하여 분석한다. 세포 독성 T 세포 특이적인 목표 세포 사멸의 정도는 $[(\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}) / (\text{maximum cpm} - \text{spontaneous cpm})] \times 100$ 의 공식을 이용하여 산정한다.
- [82] 상기의 실시예의 결과는 다음과 같다.
- [83] (1)유세포 분석법을 이용한 HPV 타입 16 E7 에피토프 특이적인 CD8+ 세포독성 T 림프구로부터 IFN- γ 의 생성확인
- [84] 합성된 14개의 HPV 타입 16 E7 펩타이드 가운데 HLA-A*0201 타입 환자 특이적으로 세포 독성 T 세포 생성을 유도하는 E7 에피토프의 후보를 선정하기 위해, 혈액 증여자의 PBMC에 각각의 펩타이드를 처리해 주고 1주일 후에 배양된 IL-2(음성대조군), CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV, HLA-A*0201, 양성대조군)을 각각 처리한 대조군을 비교하여 보았다. 그림 1 및 2에서 나타났듯이, 14개의 후보 펩타이드 대부분 IL-2만을 처리한 대조군 보다 높은 IFN- γ 의 생성을 유도하였고, 음성대조군(negative control)보다 높은 수치의 IFN- γ 의 생성을 보이는 펩타이드 중 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTLGIVCPI)과 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드를 처리한 실험군에서 양성대조군(positive control)과 동등하거나 더 높은 수준으로 IFN- γ 의 생성수치가 나타나는 것을 알 수 있었다. 따라서, E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTLGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드를 유력한 신규 HLA-A*0201 특이적 E7 에피토프으로 예측할 수 있었다.
- [85] (2) HPV 타입 16 E7 에피토프 특이적인 CD8+ 세포독성 T 림프구의 자궁 경부암 세포 독성 실험
- [86] 실제로 HLA-A*0201 타입 자궁 경부암 세포주에 작용하여 세포사멸을 시키는 지를 확인하기 위해 ^{51}Cr release assay 방법을 이용해 분석해 보았다. 혈액 공여자의 PBMC에 IL-2, CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV, HLA-A*0201, 양성대조군), E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTLGIVCPI) 그리고 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드를 각각 처리해 주고 1주일 후에 배양된 동일 환자의 수지상 세포와 함께 각각의 펩타이드를 다시 한번 처리해 준 뒤 다시 1주일간 배양 후, ^{51}Cr 이 표지된 HLA-A*0201 타입 자궁 경부암 세포주와 섞어 5시간 동안 배양하고 감마방사선 측정기를 이용하여 분석하였다. 분석한 결과를 살펴 보면, E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드를 처리한 실험군의 자궁경부암세포 사멸효과가 IL-2를 처리한 음성대조군은 물론, 양성대조군인 CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃

(NLVPMVATV)을 처리한 것보다도 월등히 높은 수치의 세포 사멸 효과를 보였다. E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI) 펩타이드를 처리한 실험군은 CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)을 처리한 양성대조군에 근접한 사멸 효과 수치를 나타내었으나 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드의 효과 효과 보다는 다소 낮음을 알 수 있었다. (그림 3 및 4)

[87] (3) 기존에 밝혀진 HPV 타입 16 E7 에피토프와 신규 에피토프인 E7₇₉₋

93(LEDLLMGTGIVCPI)과 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP)의 HLA-A*0201 타입 자궁 경부암 세포의 사멸 효과의 비교 측정

[88] 다른 HPV 타입 16 E7 에피토프인 E7₈₂₋₉₀(LLMGTGIV;서열번호: 15)와 E7₈₆₋

93(TLGIVCPI;서열번호: 16) 그리고 본 발명의 펩타이드인 E7₇₉₋₉₃

(LEDLLMGTGIVCPI)과 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP)의 자궁 경부암 세포에 대한

직접적인 사멸 효과를 ⁵¹Cr release assay 법을 이용해 비교 측정해 보았다. 혈액

증여자의 PBMC에 IL-2(음성대조군), CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV,

HLA-A*0201, 양성대조군;서열번호: 17), E7₈₂₋₉₀(LLMGTGIV, 양성대조군), E7

₈₆₋₉₃(TLGIVCPI, 양성대조군), E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI) 그리고 E7₈₅₋₉₈

(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드를 각각 처리해 주고 1주일 후에 배양된 동일

환자의 수지상 세포와 함께 각각의 펩타이드를 다시 한번 처리해 준 뒤 1주일간

다시 배양 후, ⁵¹Cr이 표지된 HLA-A*0201 타입 자궁 경부암 세포와 5시간 동안

함께 배양한 후 감마방사선 측정기를 이용하여 분석하였다. 측정된 결과를

분석해 보면, 본 연구에서 선별한 E7₇₉₋₉₃(LEDLLMGTGIVCPI)와 E7₈₅₋₉₈

(GTLGIVCPICSQKP) 펩타이드가 기존에 알려진 E7₈₂₋₉₀(LLMGTGIV)이나 E7₈₆₋₉₃

(TLGIVCPI) 에피토프 보다 동일하거나 높은 자궁 경부암 세포 사멸 효과를

보였다. 그 중에서도 특히 E7₈₅₋₉₈(GTLGIVCPICSQKP)가 가장 높은 암세포 사멸

효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. (그림 5)

청구범위

- [1] 서열번호 13의 LEDLLMGTLGIVCPI 및 서열번호 14의 GTLGIVCPICSQKP 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 펩타이드.
- [2] 제 1항의 서열번호 13의 펩타이드 및 서열번호 14의 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 펩타이드를 코딩하는 핵산.
- [3] 제 2항에 있어서, 상기 핵산 서열은 서열번호 13의 펩타이드에 대해서는 서열번호 18이고 서열번호 14의 펩타이드에 대해서는 서열번호 19인 것을 특징으로 하는 핵산.
- [4] (a)제1항의 펩타이드 및 (b)약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 HPV 감염 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [5] 제 4항에 있어서, 상기의 HPV 감염 관련 질환은 보웬성 구진(bowenoid papulosis), 항문 이형성(anal dysplasia), 호흡기 또는 결막 유두종, 자궁 경부 이형성증, 자궁경부암, 외음암(vulval cancer), 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [6] 제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 미세입자, 리포솜, 또는 면역 자극 복합체(ISCOM).
- [7] 제2항 또는 제3항 중 어느 한 항의 핵산을 유효성분으로 포함하는 미세입자, 리포솜, 또는 면역 자극 복합체(ISCOM).
- [8] 제 4항 또는 제5항에 있어서, 상기의 조성물은 HLA-A*0201 타입 환자 특이적인 것을 특징으로 하는 조성물.

FIG. 1

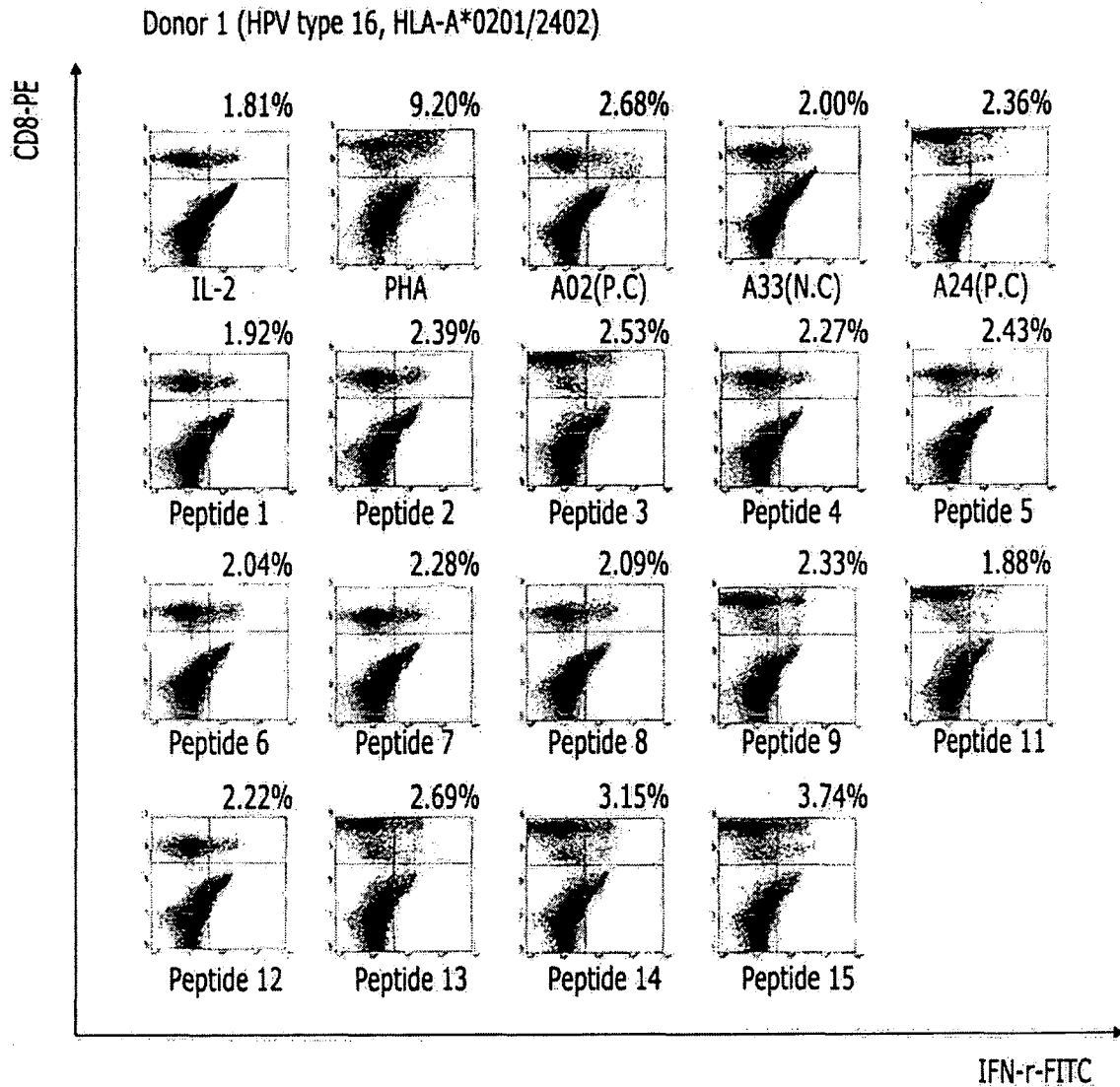


FIG. 2

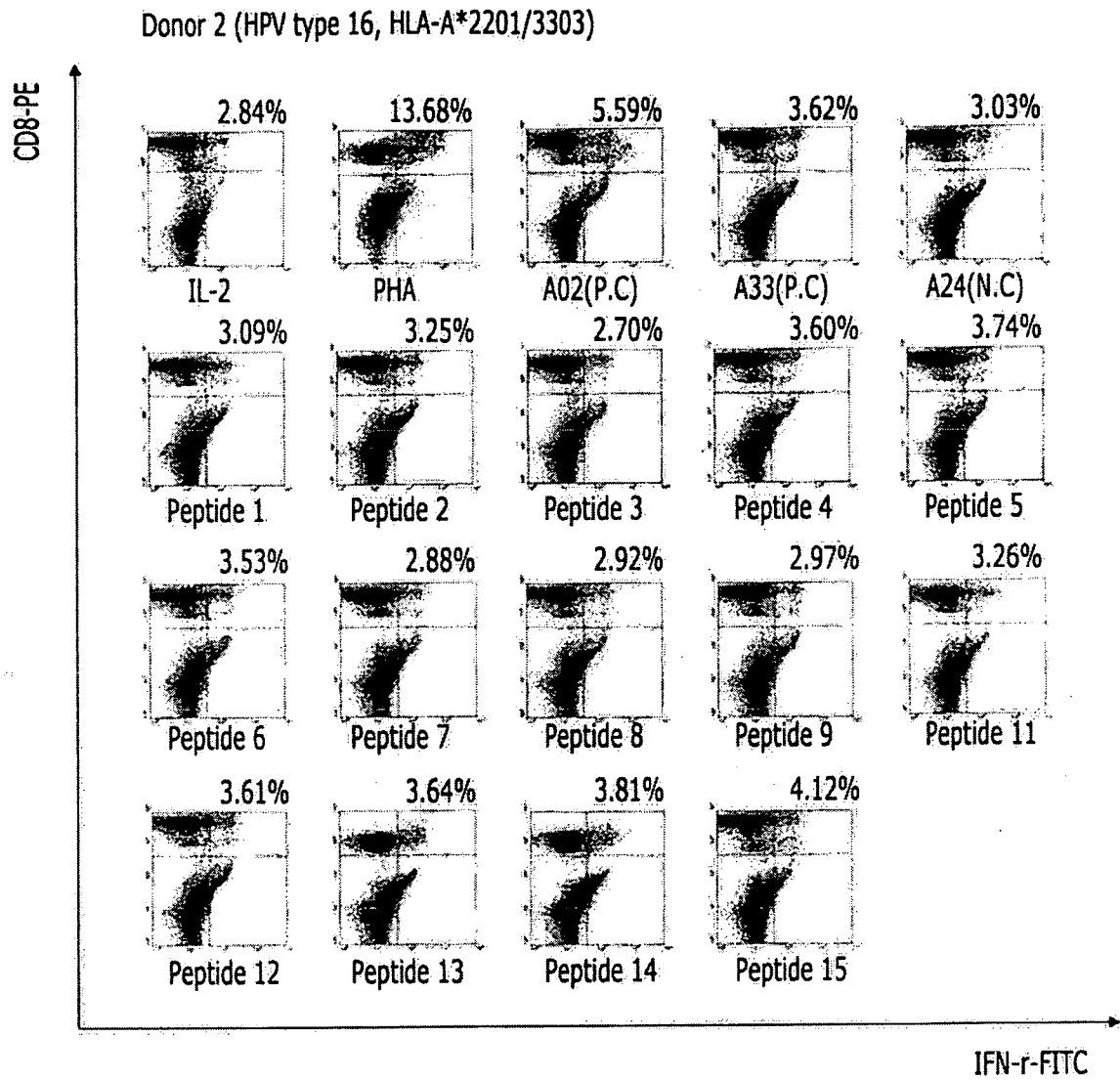


FIG. 3

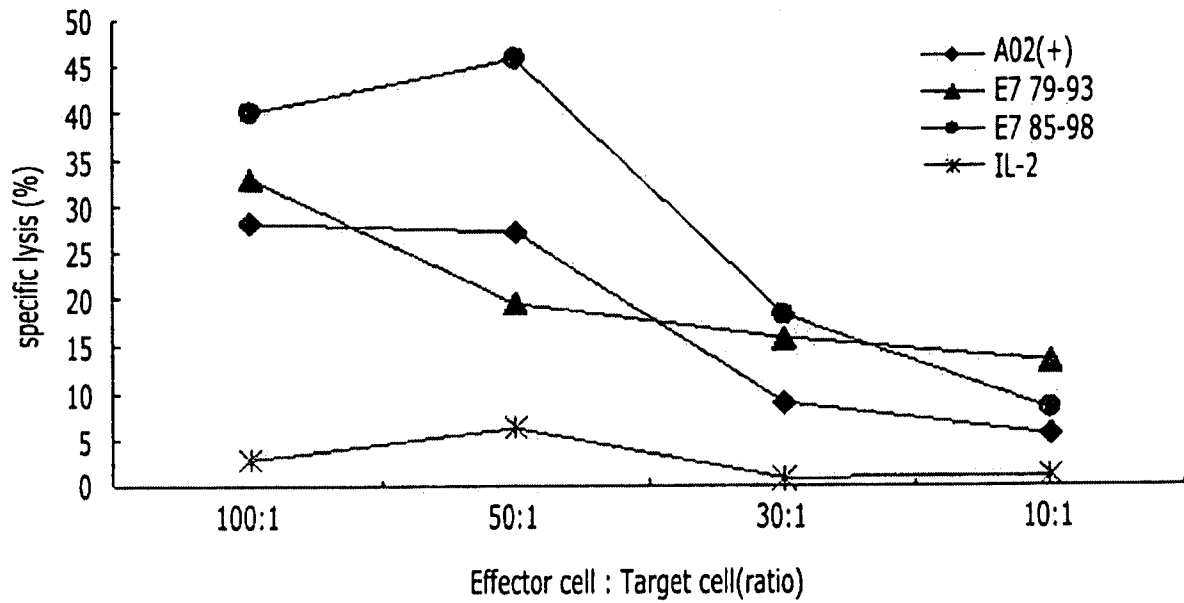


FIG. 4

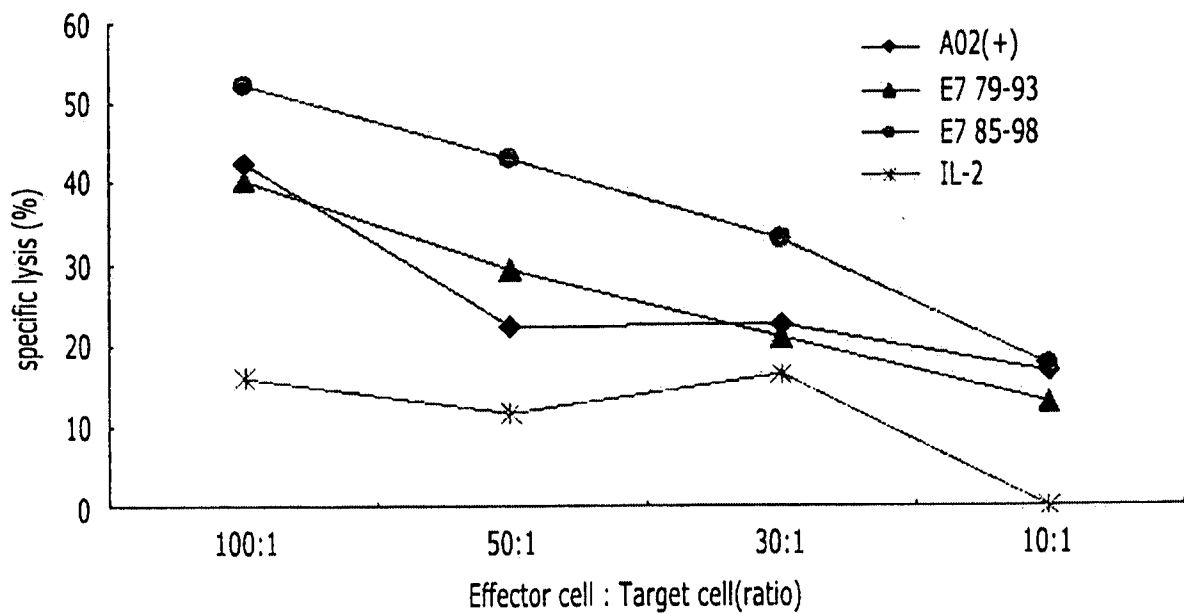


FIG. 5

