



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0137858
(43) 공개일자 2019년12월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 14/47 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
 A61K 38/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
 A61P 37/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
 C07K 14/74 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01)
 C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
 C07K 14/4748 (2013.01)
 A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7032832
- (22) 출원일자(국제) 2018년04월10일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년11월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/059114
- (87) 국제공개번호 WO 2018/189152
 국제공개일자 2018년10월18일
- (30) 우선권주장
 62/483,690 2017년04월10일 미국(US)
 10 2017 107 710.3 2017년04월10일 독일(DE)
- (71) 출원인
 이매티스 바이오테크놀로지스 게엠베하
 독일 72076 튀빙겐 파울-울리호-스트라체 15
- (72) 발명자
 발츠 올리아네 사라
 독일 72076 튀빙겐 가르텐스트라체 71
 코발레브스키 다니엘
 독일 72074 튀빙겐 텐첸베르크스트라체 29
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 제일특허법인(유)

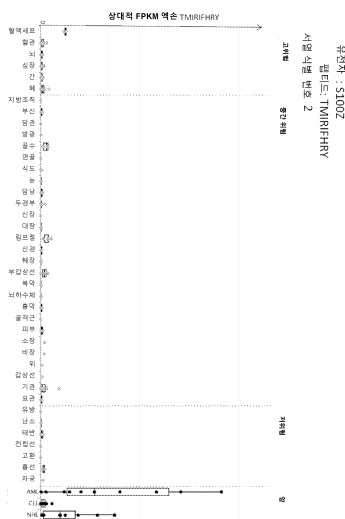
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 백혈병 및 다른 암에 대한 면역요법에 사용하기 위한 펩티드 및 펩티드의 조합

(57) 요약

본 발명은 면역요법 방법에 사용하기 위한 펩티드, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단독 또는, 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학 성분으로 역할가능한 기타 종양-연관 펩티드와 조합으로 항종양 면역 반응을 자극하거나 T 세포를 생체의 자극하여 환자로 이전하기 위한 종양-연관 T 세포 에피톱에 관한 것이다. 구조적적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 펩티드 자체는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적이 될 수도 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2310/16 (2013.01)

(72) 발명자

뢰플러 마르쿠스

독일 72119 암메르부흐 잔트크라벤스트라세 20

디 마르코 모레노

독일 72072 튀빙겐 메밍거스트라세 18/1

트라우트바인 니코

독일 70180 스투트가르트 펠라르구스스트라세 2

넬데 아니카

독일 72074 튀빙겐 픽토르-레너-스트라세 27

스테파노픽 스테판

독일 72074 튀빙겐 아우프 데어 부르크 3

람멘제 한스-게오르크

독일 72070 운테르예징겐 쑤메르할데 3

헨 제바스티안

독일 72070 튀빙겐 브롬베르크스트라세 15

명세서

청구범위

청구항 1

서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 대해 88% 이상의 상동성을 갖는 이의 변이체 서열을 포함하되, 상기 변이체가 구조적 적합 복합체(MHC) 분자에 결합하고/거나 상기 변이체 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는, 전장 폴리펩티드가 아닌 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 2

제1항에 있어서,

클래스 I 또는 II MHC 분자에 결합하는 능력을 갖고, MHC와 결합할 때 CD4 및/또는 CD8 T 세포에 의해 인식될 수 있는 펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

아미노산 서열이 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279 중 어느 하나에 따른 아미노산의 연속적인 신장을 포함하는, 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 더욱 바람직하게는 8 내지 16개의 아미노산의 전체 길이를 갖고, 가장 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 187 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되는 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함하는 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질의 일부, 특히 HLA-DR 항원-연관 불변 쇠(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질의 일부인 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 바람직하게는 MHC 분자에 결합할 때 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체를 특이적으로 인식하는 항체, 특히 가용성 또는 막-결합된 항체, 바람직하게는 단클론 항체 또는 이의 단편.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 바람직하게는 MHC 분자에 결합할 때 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체인 HLA 리간드와 반응성인 T 세포 수용체, 바람직하게는 가용성 또는 막-결합된 T 세포 수용체 또는 이의 단편.

청구항 9

제8항에 있어서,

리간드의 아미노산 서열이 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279 중 어느 하나에 대해 88% 이상의 동일성을 갖거나, 리간드의 아미노산 서열이 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279 중 어느 하나로 구성되는, T 세포 수용체.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

가용성 분자로서 제공되고, 임의적으로 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가 효과기 기능을 갖는 T 세포 수용체.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 바람직하게는 MHC 분자에 결합하는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체를 특이적으로 인식하는 압타머.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편을 인코딩하고, 임의적으로 이중 프로모터 서열에 연계된 핵산, 또는 상기 핵산을 발현하는 발현 벡터.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 또는 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포로서, 바람직하게는 수지상 세포, T 세포 또는 NK 세포와 같은 항원-제시 세포로부터 선택되는 재조합 숙주 세포.

청구항 14

T 세포를 적절한 항원-제시 세포 또는 항원-제시 세포를 모방하는 인공 구축물의 표면에 발현된 항원-로딩된 인간 클래스 I 또는 II MHC 분자와 상기 T 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화하기에 충분한 시간 동안 시험관 내에서 접촉시키는 단계

를 포함하되, 상기 항원이 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드인, 활성화된 T 림프구의 시험관내 생산 방법.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제14항에 따른 시험관내 생산 방법에 의해 생산되는 활성화된 T 림프구.

청구항 16

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 제11항에 따른 압타머, 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 제13항에 따른 숙주 세포, 및 제15항에 따른 활성화된 T 림프구로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성 성분, 또는 집합되거나 표지된 활성 성분, 및 약학적으로 허용가능한 담체, 및 임의적으로 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 안정화제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 또는 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편의 생산 방법으로서,

제13항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

상기 펩티드 또는 이의 변이체, 상기 항체 또는 이의 단편, 또는 상기 T 세포 수용체 또는 이의 단편을 상기 숙주 세포 및/또는 이의 배양 배지로부터 단리하는 단계

를 포함하는 생산 방법.

청구항 18

의약에 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 제11항에 따른 압타머, 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 제13항에 따른 숙주 세포, 또는 제15항에 따른 활성화된 T 림프구.

청구항 19

표적 세포가 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제시하는 환자에서 표적 세포를 괴사시키는 방법으로서,

효과적인 수의 제15항에 따른 활성화된 T 림프구를 상기 환자에게 투여함을 포함하는 방법.

청구항 20

암의 진단 및/또는 치료에 사용하기 위한 또는 암에 대한 약제의 제조에 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 제11항에 따른 압타머, 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 제13항에 따른 숙주 세포, 또는 제15항에 따른 활성화된 T 림프구.

청구항 21

암이 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 및 예를 들어 비호지킨 림프종, 이식후 림프증식성 질환(PTLD)과 같은 기타 림프구 종양, 및 원발성 골수섬유종, 본태성 혈소판감소증, 진성 적혈구증가증과 같은 기타 골수구 종양, 및 간세포 암종, 대장 암종, 아교모세포종, 위암, 식도암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 췌장암, 신세포 암종, 전립선암, 흑색종, 유방암, 담낭암 및 담관암종, 방광암, 자궁암, 두경부 편평세포 암종, 중피종, 및 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 따른 펩티드가 유래되는 단백질의 과발현을 나타내는 기타 종양으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 제20항에 정의된 용도.

청구항 22

(a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 제11항에 따른 압타머, 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 제13항에 따른 숙주 세포, 또는 제15항에 따른 활성화된 T 림프구를 용액 또는 동결건조된 형태로 함유하는 약학 조성물을 포함하는 용기;

(b) 임의적으로, 희석제, 또는 동결건조된 제형을 위한 재구성 용액을 함유하는 제2 용기;

(c) 임의적으로, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 펩티드; 및

(d) 임의적으로, (i) 용액의 사용, 또는 (ii) 동결건조된 제형의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서를 포함하는 키트.

청구항 23

제22항에 있어서,

(iii) 완충액, (iv) 희석제, (v) 필터, (vi) 주사바늘, 및 (vii) 주사기 중 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.

청구항 24

a) 개별 환자로부터의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드(TUMAP)를 동정하는 단계;

b) 단계 a)에서 동정된 펩티드를 정상 조직과 비교하여 종양에서 면역원성 및/또는 과다-제시에 대해 사전선별

된 펩티드의 창고(warehouse)와 비교하는 단계;

c) 개별 환자에서 동정된 TUMAP와 일치하는 하나 이상의 펩티드를 상기 창고로부터 선택하는 단계; 및

d) 단계 c)에 근거하여 개인화된 백신, 또는 화합물-기반 또는 세포 치료제를 생산하고/거나 제형화하는 단계를 포함하는, 개별 환자를 위한 개인화된 항암 백신, 또는 화합물-기반 및/또는 세포 치료제의 생산 방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

TUMAP가

a1) 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플로부터의 발현 데이터와 비교하여 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질을 동정하는 단계; 및

a2) 상기 발현 데이터와 종양 샘플에서 클래스 I 및/또는 클래스 II MHC 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열의 상관관계 결정에 의해 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래하는 MHC 리간드를 동정하는 단계에 의해 동정되는, 생산 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서,

MHC 리간드의 서열이 종양 샘플로부터 단리된 MHC 분자로부터 결합된 펩티드를 용출시키는 단계; 및 용출된 리간드를 서열결정(sequencing)하는 단계에 의해 동정되는, 생산 방법.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직이 동일한 환자로부터 수득되는, 생산 방법.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

창고에 포함된 펩티드가

aa) 정상 조직과 비교하여 악성 조직에서 과발현된 유전자의 동정을 포함하는, 마이크로어레이 또는 서열결정-기반의 발현 프로파일링(profiling)과 같은 고도의 병렬 방법(parallel method)에 의한 게놈-전체 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 수행하는 단계;

ab) 단계 aa)에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드를 선택하는 단계; 및

ac) 건강한 공여자 또는 환자로부터의 인간 T 세포를 사용하는 시험관내 면역원성 검정을 포함하는, 선택되는 펩티드에 의한 생체내 T 세포 반응의 유도를 결정하는 단계; 또는

ba) 질량 분광분석법을 사용하여 종양 샘플로부터 HLA 리간드를 동정하는 단계;

bb) 정상 조직과 비교하여 악성 조직에서 과발현된 유전자의 동정을 포함하는, 마이크로어레이 또는 서열결정-기반의 발현 프로파일링과 같은 고도의 병렬 방법에 의한 게놈-전체 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 수행하는 단계;

bc) 동정된 HLA 리간드를 유전자 발현 데이터와 비교하는 단계;

bd) 단계 bc)에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드를 선택하는 단계;

be) 종양 조직 상에 존재하고 건강한 조직에서 결여되거나 드물게 검출되는, 단계 bd)로부터 선택되는 TUMAP를 재검출하고, mRNA 수준에서 과발현의 관련성을 확인하는 단계; 및

bf) 건강한 공여자 또는 환자의 인간 T 세포를 사용하는 시험관내 면역원성 검정을 포함하는, 선택되는 펩티드에 의한 생체내 T 세포 반응의 유도를 결정하는 단계

에 따라 동정되는, 생산 방법.

청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

참고에 포함된 펩티드의 면역원성이 시험관내 면역원성 검정, 개별 HLA 결합에 대한 환자 면역모니터링, MHC 펩티드 염색, ELISPOT 검정 및/또는 세포내 시토카인 염색을 포함하는 방법에 의해 결정되는, 생산 방법.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

참고가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279로 구성되는 군으로부터 선택되는 복수의 펩티드를 포함하는, 생산 방법.

청구항 31

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

개별 환자로부터의 상응하는 정상 조직과 비교하여 종양 샘플에 고유한 하나 이상의 돌연변이를 동정하고, 상기 돌연변이와 상관관계가 있는 펩티드를 백신에 포함시키거나 세포 치료제를 생성하기 위해 선택하는 단계를 추가로 포함하는 생산 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

하나 이상의 돌연변이가 전체 게놈 서열결정에 의해 동정되는, 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역요법 방법에 사용하기 위한 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 예를 들어 항종양 면역 반응을 자극하거나 T 세포를 생체의 자극하여 환자로 이전시키는 백신 조성물의 활성 약학 성분으로 작용할 수 있는 종양 관련 T 세포 펩티드 에피토프 단독 또는 기타 종양 관련 펩티드와의 조합에 관한 것이다. 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 펩티드 자체는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적이 될 수도 있다.

[0002] 본 발명은 항종양 면역 반응을 이끌어내는 백신 조성물에서 또는 약학적/면역학적 활성 화합물 및 세포의 개발을 위한 표적으로 사용할 수 있는 인간 종양 세포의 HLA 클래스 I 분자로부터 유래하는 여러가지 신규 펩티드 서열 및 이들의 변이체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세계보건기구(WHO)에 따르면, 2012년 암은 세계적으로 4가지 주요 비전염성 질병에 속했다. 같은 해 동안, 고소득 국가들에서 대장암, 유방암 및 호흡관 암들이 10대 사망 원인에 포함되었다 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).

[0004] **역학**

[0005] 2012년, 세계적으로 1,410만 건의 신규 암, 암을 앓는 3,260만 명의 환자(진단 후 5년 이내) 및 820만 건의 암 사망이 추정되었다(Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

[0006] 백혈병 군에서, 본 발명은 구체적으로 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML) 및 급성 골수성 백혈병(AML)에 초점을 둔다.

[0007] CLL은 서구 세계에서 가장 흔한 백혈병이며 모든 백혈병의 약 3분의 1을 차지한다. 발생률은 미국과 유럽에서 유사하며 연간 신규 건수는 16,000건으로 추정된다. CLL은 아프리카인보다 백인에서 더 흔하며 히스패닉과 미국 인디언에서는 더 드물고 아시아인에서는 거의 없다. 아시아계의 경우 CLL 발생률은 백인보다 3배 더 낮다

(Gunawardana et al., 2008). CLL 환자의 5년 전체 생존율은 약 79%이다.

- [0008] AML은 성인과 아동 모두에서 진단되는 두 번째로 가장 흔한 유형의 백혈병이다. 미국에서 추정된 신규 사례는 1년에 약 21,000건이다. AML 환자의 5년 생존율은 약 25%이다.
- [0009] CML은 성인 백혈병의 15 내지 25%를 차지하며, 발생률은 유럽은 1.2/100,000명이고 미국은 1.75/100,000명이다 (Hoglund et al., 2015). 미국에서 신규 CML 추정치는 2016년이 8,220건이며, 사망 추정치는 1,070명이다(미국 암 협회, 2015). 2000년의 이마티닙 출시 이후, CML의 연간 사망률은 10 내지 20%로부터 1 내지 2%로 감소했다. 그 결과 미국에서 CML의 유병률의 추정치가 2000년의 25,000 내지 30,000건에서 2015년의 80,000 내지 100,000건으로 증가했다(Huang et al., 2012).
- [0010] 요법
- [0011] 만성 림프구성 백혈병 - CLL은 현재 치유가 불가능하지만, 다수의 환자가 느린 진행이나 증상의 악화만을 보인다. 환자는 치료의 조기 개시로부터 이익을 얻지 못하므로, 초기 접근방식은 "감시 및 대기"이다(Richards et al., 1999). 증상성이나 질병의 진행이 빠른 환자의 경우, 몇몇 치료 옵션이 가능하다. 여기에는 화학요법, 대상 요법, 단클론 항체와 같은 면역 기반 요법, 키메라 항체 수용체(CAR) 및 활성화 면역요법 및 줄기 요법 이식이 포함된다.
- [0012] CLL 치료에 사용되는 화학요법 약물은 대부분 클로람부실 및 시클로포스파미드와 같은 알킬화 제제 또는 플루다라빈과 같은 퓨린 유사체이다. 독일 CLL 시험군(GCLLSG)인 CCL4는 단일 플루다라빈 치료보다 플루다라빈/시클로포스파미드의 병용 요법이 더 우수함을 보여주었다(완전 관해(CR) 24% 대 7%)(Eichhorst et al., 2006).
- [0013] 이브루티닙과 이텔라리십은 B 세포 수용체 신호전달 캐스페이드의 분자를 표적으로 하는 키나제 억제제이다. 이브루티닙은 B 세포 성숙화에 중요한 src 관련 세포질 티로신 키나제인 브루들 티로신 키나제(BTK)를 억제하며 일선 또는 이선 요법에 사용된다(Byrd et al., 2013; O'Brien et al., 2014). 이텔라리십은 불응성 CLL에서 리투시맵과 병용으로 사용되는 PI3K- δ 억제제이다(Furman et al., 2014).
- [0014] 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)은, 예를 들어 염색체 17p(del 17p) 또는 p53 돌연변이가 있는 환자와 같은 예후가 불량한 환자를 위해 고려해 볼 수 있다. HSCT는 이식된 세포가 HLA 일치 개인으로부터 공여되는 동종이형 또는 환자 자신의 줄기 세포가 화학요법 이후 재주입되는 자가일 수 있다(Schetelig et al., 2008).
- [0015] 단클론성 항체는 혈액 악성 종양에서 널리 사용된다. 이는 면역세포 표면 분자의 양호한 특성화 및 혈액이나 골수에서 종양 세포의 접근성에 근거하는 적합한 항원의 지식에 기인한다. CLL 요법에서 사용되는 일반적인 단클론성 항체는 CD20 또는 CD52를 표적으로 한다. 원래 NHL의 치료를 위해 FDA가 승인한 최초의 단클론성 항-CD20 항체인 리투시맵은 현재 CLL 요법에 널리 사용된다. 리투시맵/플루다라빈/시클로포스파미드에 의한 병용 치료는 플루다라빈/시클로포스파미드의 공용에 비해 더 높은 CR 비율 및 개선된 전체 생존 기간(OS)을 초래하며 바람직한 치료 옵션이 되었다(Hallek et al., 2008). 오파투모맵은 CD20을 표적으로 하며 불응성 CLL 환자의 요법에 사용된다(Wierda et al., 2011). 오비누투주맵은 클로람부실과 병용하여 일선 치료에 사용되는 또 다른 단클론성 항-CD20 항체이다(Goede et al., 2014).
- [0016] 알렘투주맵은 화학요법 내성의 질병 환자 또는 del 17p이나 p53 돌연변이로 불량한 예후 인자를 가진 환자의 치료에 사용되는 항-CD52 항체이다(Parikh et al., 2011).
- [0017] 신규 단클론성 항체는 CD37(오틀레르투주맵, BI 836826, IMG529 및 (177)Lu-테틀로맵) 또는 CD40(다세투주맵 및 루카투무맵)을 표적으로 하며 임상전 환경에서 시험된다(Robak and Robak, 2014).
- [0018] 여러 완료되거나 지속중인 임상시험은 CD19 특이성을 가진 유전자조작된 자기 키메라 항원 수용체(CAR)가 변형된 T 세포에 기반한다(Maus et al., 2014). 지금까지 소수의 환자들만이 검출가능하거나 꾸준한 CAR을 보였다. 한 가지 부분 반응(PR) 및 두 가지 완전 반응(CR)이 Porter 등 및 Kalos 등에 의한 CAR T 세포 임상시험에서 검출되었다(Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011).
- [0019] 활성화 면역요법에는 다음 전략이 포함된다: 유전자 요법, 전체 변형 종양 세포 백신, DC 기반 백신 및 종양 관련 항원(TAA) 유래 펩티드 백신.
- [0020] 유전자 치료에서의 접근 방법은 자가 유전자 변형 종양 세포를 이용한다. 이러한 B-CLL 세포는 IL-2, IL-12, TNF- α , GM-CSF, CD80, CD40L, LFA-3 및 ICAM-1과 같은 면역공동자극 유전자로써 형질도입시켜 항원 제시 및 T 세포 활성화를 개선시킨다(Carballido et al., 2012). 종양 세포에서 특이적 T-세포 반응 및 감소는 쉽게 관찰

되는 반면, 면역 반응은 단지 일과성이다.

- [0021] 몇몇 연구에서는 자가 DC를 항원 제시 세포로서 사용하여 항종양 반응을 끌어냈다. DC는 종양 연관 펩티드, 전 종양 세포 용해물 및 종양 유래 RNA 또는 DNA와 함께 생체의 로딩되었다. 또 다른 전략에서는 DC와의 융합 및 DC-B-CLL-세포 잡종의 생성을 위해 전종양 세포를 사용한다. 형질도입된 DC는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 개시했다(Muller et al., 2004). 융합 잡종 및 종양 세포 용해물이나 세포자멸체로 장착된 DC는 종양 특이적 CD8+ T 세포 반응을 증가시켰다. 임상적 반응을 보인 환자는 IL-12 혈청 수준을 증가시키고 Treg 숫자를 감소시켰다 (Palma et al., 2008).
- [0022] 다른 접근방식은 변형된 종양 세포를 사용하여 CLL 특이적 면역 반응을 개시하거나 증가시킨다. 이 전략의 한 예는 트리오마 세포의 생성이다: B-CLL 세포가 항-APC 특이성을 가진 하이브리도마 세포를 발현하는 항-Fc 수용체와 융합된다. 트리오마 세포는 CLL 특이적 T 세포 반응을 시험관 내 유도했다(Kronenberger et al., 2008).
- [0023] 또 다른 전략은 보강제로서 칼메트-게렌 간균으로 조사된 자가 CLL 세포를 백신으로 사용한다. 몇몇 환자는 백혈구 수준의 감소 또는 안정한 질병을 나타냈다(Hus et al., 2008).
- [0024] 단리된 CLL 세포 외에도, CLL 환자의 전혈을 혈액 치료 단위에서의 제조 후 백신으로 사용했다. 이 백신은 몇몇 환자에서 CLL 특이적 T 세포 반응을 이끌어냈으며 부분적 임상 반응이나 안정된 질환을 초래했다(Spaner et al., 2005).
- [0025] 몇몇 TAA는 CLL에서 과발현되며 백신접종에 적합하다. 여기에는 피브로모듈린(Mayr et al., 2005), RHAMM/CD168(Giannopoulos et al., 2006), MDM2(Mayr et al., 2006), hTERT(Counter et al., 1995), 종양태아 항원-미숙 라미닌 수용체 단백질(OFAiLRP)(Siegel et al., 2003), 아디포필린(Schmidt et al., 2004), 서바이빈(Granziero et al., 2001), KW1 내지 KW14(Krackhardt et al., 2002) 및 종양 유래 IgVHCDR3 영역(Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012)이 포함된다. 제I상 임상시험을 RHAMM 유래 R3 펩티드를 백신으로 사용하여 수행했다. 6명의 환자 중 5명에서 검출가능한 R3 특이적 CD8+ T 세포 반응이 있었다(Giannopoulos et al., 2010).
- [0026] 만성 골수성 백혈병 - CML은 *BCR-ABL1* 유전자 융합을 초래하는 (9;22)(q34;q11.2) 염색체 전위에 의해 특징지어지는 골수증식성 종양이다. 초래되는 BCR-ABL1 융합 단백질은 이상조절된 티로신 키나제를 보이며 CML의 발병 및 유지에서 중심 역할을 한다(Lugo et al., 1990). 이러한 CML 백혈병 유발의 분자생물학적 기전의 발견은 BCR-ABL1 특이적 티로신 키나제 억제제(TKI)의 개발과 성공적인 임상적 적용을 초래했으며, 이러한 노력은 2002년에 새로 진단된 CML의 일차 치료를 위한 이마티닙의 승인에 의해 선봉에 서게 되었다(Johnson et al., 2003). TKI의 소개는 CML의 환자 관리 및 임상적 결과를 극적으로 변경시켰으며 CML 환자의 향상된 예상 수명을 가져왔다(Schmidt, 2016). 하지만 TKI 요법은 이차 저항의 발생 위험을 증가시키며(Khorashad et al., 2013) 상당한 비용이 필요한 평생 유지가 요구된다(Kantarjian et al., 2013). 더욱이 일반적으로 양호한 내성에도 불구하고, 뚜렷한 독성 프로파일이 동반이환이 있는 환자의 경우 특정한 TKI의 적용을 억제할 수 있으며 드물지만 중대한 이상반응을 유도할 수 있다(Jabbour and Kantarjian, 2016). 현재 CML의 유일한 초치적 요법은 동종줄기세포 이식이며, 이것은 상당한 이환율과 사망률로 인해 진행 병기에서 진단된 환자로 제약되거나 복수의 TKI가 실패한 환자의 구조 옵션으로 사용된다(Horowitz et al., 1996; Radich, 2010).
- [0027] CML은 혈액과 골수에 있는 CML 모세포의 빈도에 근거하여 만성 단계, 가속화 단계 및 모세포 위기의 세 단계로 구분된다. 환자의 약 90%는 초기의 만성 단계에서 진단되며, 모든 새로이 진단되는 환자의 약 50%는 무증상성이다(Jabbour and Kantarjian, 2016). TKI의 소개 전에는, CML 약물 요법이 화학요법과 알킬화 제제 부술판이나 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제인 히드록시우레아의 병용 또는 인터페론- α (IFN- α)의 치료와 같은 비특이적 제제로 제한되었다. 이러한 환경에서, 만성 단계는 3 내지 5년의 중간 기간과 이후의 3 내지 6개월에 달하는 가속화 단계로 이루어지며, 후자는 일반적으로 치명적으로 종료된다(Silver et al., 1999). 하위집합의 환자에서 IFN- α 는 질병 퇴행을 유도하고 생존기간을 향상시켰으나, 여기에는 상당한 독성과 유효성의 결여에 의한 장벽이 있었으며(Kujawski and Talpaz, 2007), 궁극적으로는 TKI 요법으로 대체되었다. TKI를 사용하는 CML용 표적 요법의 출현은 질병의 과정을 변경시켰으며 10년 생존율을 약 20%부터 80 내지 90%까지 증가시켰다(Jabbour and Kantarjian, 2016).
- [0028] 현재 미국에서 CML 환자의 치료를 위해 5가지 TKI가 승인되었다. 만성 단계의 CML의 표준 일차 요법은 대개 1세대 TKI 이마티닙(O'Brien et al., 2003) 또는 2세대 TKI 닐로티닙의 하나(Saglio et al., 2010) 또는 다사티닙(Kantarjian et al., 2010)을 사용한 치료로 구성된다. 보수니팁(Cortes et al., 2012) 및 포나티닙은 이전

TKI에 대한 불내성이나 저항이 있는 환자에게 적응된다.

- [0029] 높은 반응률과 깊은 반응에도 불구하고 TKI 요법에 대한 일차 및 이차 내성이 CML 환자에서 관찰되었다. 최상의 특성화된 내성 기전들은 *BCR-ABL1*의 게놈 증폭 또는 *BCR-ABL1* 키나제 영역에 대한 돌연변이이다(Khorashad et al., 2013). 돌연변이 분석은 대개 TKI 요법 하에서의 진행 이후 수행되었으며 추후 TKI들의 선택을 지도할 수 있다(Soverini et al., 2011). 2회 이상의 TKI에서 내성이나 불내성을 보인 환자에 있어서, 비특이적 단백질 번역 억제제인 오마세탁신이 미국에서 승인이 되었으나(Gandhi et al., 2014) TKI가 일반적으로 선호되는 옵션이다(Soverini et al., 2011). 오마세탁신은 *BCR-ABL1* 비의존 약물로서 원발성 CML 줄기 세포에서 항세포자멸성 *Mcl1-1* 단백질의 하향조절을 통해 세포자멸사를 유도하는 것으로 나타났다(Allan et al., 2011).
- [0030] 이마티닙 치료의 중단을 Stop 이마티닙(STIM) 임상시험에서 조사했으며, 이 시험에서는 2년 넘게 완전 분자생물학적 반응(CMR)을 나타내는 환자들이 등록되었다(Mahon et al., 2010). 최근의 업데이트에서, 환자의 61%가 분자적 재발을 경험했으며, 사건의 95%가 이마티닙 중단 후 7개월 이내에 발생했다. 주의할 것은 거의 모든 환자들이 이마티닙에 민감성을 유지했으며, 이마티닙의 재시작 후 CMR을 성취했다. TWISTER 임상시험에서 유사한 관찰이 이루어졌다(Ross et al., 2013). 하지만 이러한 임상시험에서 TKI 요법의 중단이 가능한 것이며 일부 환자가 치유될 수 있음을 잘 보여주는 반면, TKI 중단은 여전히 임상시험의 제약 하에서만 수행해야 하며 상당한 환자 모니터링을 요구한다(Jabbour and Kantarjian, 2016). TKI 요법의 중단 이후 분자 생물학적 재발에 대한 주요 이유는 미세 장류 암(MRD), 즉, 골수에 있는 잔류 CML 줄기 세포의 지속성이다(Bhatia et al., 2003). 이러한 CML 줄기 세포는 *BCR-ABL1* 활성화와는 비의존적으로 지속되는 것으로 나타났으며 TKI 요법에 의해 효과적으로 제거시킬 수 없다(Corbin et al., 2011).
- [0031] 종합하면 이것은 MRD의 박멸 성취를 위해 CML 줄기 세포의 *BCR-ABL1* 비의존적 풀을 표적으로 하는 신규 치료 전략을 요구한다. IFN- α 를 사용하는 동종이형 줄기 세포 이식 및 비특이적 면역요법이 환자의 하위집합에서 장기 관해를 유도할 수 있다는 사실은 CML의 면역학적 표적이 가능한 치료 옵션임을 나타낸다. 두 가지의 독립적 제 II상 백신접종 임상시험에서 상당한 환자의 경우 *BCR-ABL* 접합 펩티드를 표적으로 하는 항원-특이적 면역요법이 펩티드 특이적 T 세포 반응을 유도한 다음 항종양 효과가 나타남을 보여주었다(Bocchia et al., 2005; Cathcart et al., 2004). 하지만 이러한 CML-특이적 표적을 표적으로 하는 것은 적절한 HLA 동종이형을 집단적으로 발현하는 환자의 하위조합으로 제한된다. CML 면역요법의 다른 표적에는 아연 핑거 전사 인자 WT1과 같은 과발현된 항원이 포함되며, 이것은 골수성 악성 종양의 백신접종 임상시험에서 WT1⁺를 살해할 수 있는 세포독성 CD8 T 세포를 유도하는 것으로 나타났다(Rezvani et al., 2008; Keilholz et al., 2009). 더욱이 WT1 유도된 HLA-A*02 펩티드인 RMFPNAPYL에 특이적인 T 세포 수용체 유사 항체가 인간 백혈병 이종이식에서 항체 의존적인 세포의 세포독성을 매개하는 것으로 나타났다(Dao et al., 2013). CML에서 기술된 추가의 백혈병 관련 항원에는 다음이 포함된다: 히알우로난산 매개 기동성의 수용체(RHAMM)(Greiner et al., 2002), PPP2R5C(Zheng et al., 2011), PR1, PR3, PPP2R5C, ELA2, PRAME(Smahel, 2011) 및 M기 인단백질 11 단백질(MPP11)로부터 유래된 에피토프(Al et al., 2010). 이러한 시험에서 기술된 항원들은 대개 역 면역학 접근 방식과 예측을 사용하여 확인되었으며 HLA 분자에 의한 CML 관련 제시의 직접적인 증거는 결여되었다.
- [0032] CML의 면역조절 치료가 TKI 요법의 시대에서 다시 연구되고 있으며, 복수-TKI 내성 T315I 돌연변이를 가진 환자에서 IFN- α 및 TKI의 병용을 평가하는 시험이 한 예이다(Itonaga et al., 2012). 한 사례 보고에서 요법을 중단할 수 있는 한 명의 환자에서 깊은 분자생물학적 반응의 유지 유도가 발견되었다(Ilander et al., 2014). 더욱이 지속되는 임상시험에서 α -CTLA4(이필리무맙)와 α -PD1(니볼루맙)과 같은 면역 체크포인트 억제제의 유효성을 조사하고 있다. 그러므로 항원-특이적(병용) 요법은 CML에서 MRD의 박멸 및 복수-TKI 내성 클론의 치료를 위한 유망한 방향을 나타낸다.
- [0033] 급성 골수성 백혈병 - AML 치료는 두 단계로 나뉜다: 유도 요법 및 관해 후 "공고 요법". 유도 요법은 관해 유도를 위해 투여되며 병용 화학요법으로 구성된다. 공고 요법은 추가의 화학요법이나 조혈 세포 이식(HCT)으로 구성된다(Showell and Levis, 2014).
- [0034] AML 치료를 위해 가장 흔히 사용되는 화학요법 제제는 시타라빈, 다우노루비신, 이다루비신 및 미톡산트론, 그 다음에는 클라드리빈, 플루다라빈 및 광범위한 다른 제제들이 있다. 현재 MDS/AML의 치료에는 아자시티딘과 데시타빈(DNA 저메틸화제)이 사용된다. APL/AML M3의 치료에는 올-트랜스(all-trans) 레티노산(ATRA)과 삼산화 비소(ATO)가 포함된다(미국 암 협회, 2015).
- [0035] AML의 "표준 치료"는 "3+7"로 간주된다: 이다루비신이나 다우노루비신 3일 및 시타라빈 7일, 및 그 이후에 완전 관해(CR)에 도달하기 위한 여러 유사 과정(Estey, 2014). 표준 요법과 임상 시험 사이의 결정은 위험 층화에 근

거한다.

- [0036] 중간 위험 핵형이 있는 AML 사례는 어떠한 핵형 이상도 보이지 않거나 고위험 또는 저위험으로 분류되지 않는 하나 또는 두 가지 이상만 나타낸다.
- [0037] FLT3 돌연변이는 공격적 유형의 AML 및 불량한 예후와 연관이 있다. 이것은 흔히 NPM1 및 DNMT3a(DNA 메틸전이 효소 3A) 돌연변이와 함께 발생한다. NPM1(뉴클레오포스민) 돌연변이는 FLT3 돌연변이와 함께 발견되지 않는다 면 긍정적인 예후 지표이다. CEPBA(CCAAT-증진제 결합(enhancer-binding) 단백질 α /C/EBP α) 돌연변이는 야생형 발현 없는 이중 또는 동형접합 CEBPA 돌연변이의 경우 생존 기간상의 이점을 부여한다. 다양한 유전자에서 변형된 메틸화 패턴은 이소시트레이트 탈수소효소(IDH1 및 IDH2) 및 DNMT3A에서의 돌연변이에 의해 유발된다. 이러한 돌연변이는 불량한 생존기간과 연관이 있다.
- [0038] 긍정적인 위험 핵형이 있는 AML 사례는 APL(급성 범골수증 백혈병) 및 CBF(중심부 결합 인자) 백혈병으로 구성된다. APL 사례는 골수 전사 인자 PML과 레티노산 수용체 소단위 α (RARA)의 융합과 연관이 있다. PML/RARA 전위는 긍정적인 예후의 돌연변이이다. CBF 백혈병 사례는 CBF 소단위가 연관된 전위를 나타낸다. t(8;21)에서 CBF α 는 ETO 유전자에 융합한다. inv(16)에서 CBF β 는 평활근 미오신 중쇄에 융합한다. CBF 전위는 매우 긍정적인 예후의 돌연변이이다.
- [0039] 부정적인 위험 핵형이 있는 AML 사례는 전체 염색체의 전위, 불균형 재배열 및 전 염색체의 획득/상실과 같은 염색체 이상 등을 포함한 복합 핵형에 의해 특징지어진다. 이것은 불량한 예후와 연관이 있다.
- [0040] MDS/AML 사례는 골수형성 이상 증후군으로부터 진화하며 다른 AML 하위군보다 예후가 더 나쁘다(Showell and Levis, 2014).
- [0041] 위에 나열된 예후 인자들 외에도, 추가의 분자 표지자나 표지자 조합을 사용하여 특정 세포유전학적 하위군에서 예후를 판단할 수 있다.
- [0042] TP53 돌연변이는 AML에서 가장 부정적인 유전적 변형이다. IDH1 또는 IDH2에서의 돌연변이와 함께 돌연변이된 NPM1 및 FLT3 WT는 긍정적인 것으로 간주된다. 부정적인 인자에는 MLL 유전자에서의 부분 종열 중복, 돌연변이된 TET2 유전자, DNMT3a 및 CEBPA에서의 돌연변이와 함께 FLT3 ITD +, ASXL1 또는 PHF6에서의 돌연변이와 함께 FLT3 ITD, 및 CD25 발현(줄기세포유사 "시그니처(signature)" 및 더 불량한 결과)이 포함된다. CKIT 돌연변이의 존재는 긍정적인 inv(16) 또는 t(8;21)를 가진 환자의 예후를 보다 중간 범위로 변환시킨다. SPARC는 부정적인 유전자 발현 시그니처가 있는 NK(정상 핵형) 환자에서 상향조절되며 긍정적인 NPM1 돌연변이와 연관하여 하향조절된다. miR-155 과발현은 NK AML에서 불량한 예후를 전달한다. 차등적으로 메틸화된 영역들(DMR)은 여러 유전자(FLT3 돌연변이, NPM1 돌연변이)와 연관하여 발견될 때 예후적이다. 이 경우, 보다 낮은 발현은 보다 양호한 예후와 연관이 있다(Estey, 2014).
- [0043] 미세 잔존 질환(MRD)에 관한 치료 후 정보를 다음의 치료 결정에 포함시켜야 한다. 여기에는 유도 요법에 대한 반응, 융합 전사체의 PCR, MRD 검출을 위한 돌연변이된 유전자 및 과발현된 유전자, 및 표면 항원의 이상 발현 관찰을 위한 다매개변수 유세포분석이 포함된다.
- [0044] 부정적 및 중간-2 예후군에 속하는 환자에게는 임상시험이 권장된다. 치료 옵션에는 아자시티딘이나 데시타빈, CPX-351과 같은 저메틸화제(HMA), 다우노루비신과 시타라빈을 "최적의" 물 비율인 1:5로 배합한 리포솜 제제, 및 폴로 키나아제의 억제제인 볼라셀팁이 포함된다. 볼라셀팁은 LDAC(저용량 시타라빈)와 병용하여 투여된다. FLT3 돌연변이의 경우 상이한 여러 FLT3 억제제를 투여할 수 있다. 여기에는 3+7과 병용하여 투여하는 소라페닙, CKIT 또한 억제하는 FLT3 ITD의 보다 선택적인 억제제인 퀴자티닙, 크레놀티닙, 및 비선택적 FLT3 ITD 억제제인 미도스타우린이 포함된다. 또 다른 치료 옵션은 항체-약물 접합체(항-CD33 + 칼레키아미신, SGN-CD33a, 항-CD33 + 악티닙-225), 이중특이성 항체(CD33 + CD3(AMG 330) 또는 CD33 + CD16의 인식) 및 키메라 항체 수용체(CAR)를 사용하여 CD33을 표적화하는 것이다(Estey, 2014).
- [0045] 암 치료 관련 부작용 및 비용을 고려하면, 일반적으로 암, 특히 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 치료에 사용가능한 요인을 파악할 필요가 있다. 또한, 암의 보다 나은 진단, 예후의 평가 및 치료 성공의 예측을 유도하는 암 진단, 특히 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병을 위한 바이오마커를 표시하는 요인의 파악도 필요하다.
- [0046] 암의 면역요법은 부작용을 최소화시키는 반면 암 세포에 대한 특이적 표적화의 옵션을 나타낸다. 암 면역요법은 종양 관련 항원의 존재를 이용한다.

- [0047] 종양 관련 항원(TAA)의 현재 분류는 다음과 같은 주요 군을 포함한다:
- [0048] a) 암-고환 항원: 제일 처음으로 식별되었으며, T 세포에 의해 인식가능한 TAA가 이 종류에 속하며, 이는 그 구성원들의 발현이 조직학적으로 인간 종양과 다르며, 정상 조직 중, 고환의 정모 세포/정원 세포에서만 있고, 때로는 태반에서도 있기 때문에 원래 암-고환(CT) 항원이라고 불려졌다. 고환의 세포들이 클래스 I 또는 II HLA 분자를 발현하지 않기 때문에, 이 항원들은 정상 조직에 있는 T 세포에 의해 인식될 수 없으며 면역학적으로 종양 특이적이라고 간주될 수 있다. CT 항원의 잘 알려진 예로는 MAGE 계열 구성원들 및 NY_ESO_1이 있다.
- [0049] b) 분화 항원들: 이 TAA는 종양과 그 종양이 발생한 정상 조직 사이에 공유된다. 대부분의 알려진 분화 항원들은 흑색종과 정상 멜라닌 세포에서 발견된다. 이러한 멜라닌 세포 혈통 관련 단백질의 다수는 멜라닌의 생합성에 관련되어 있고, 따라서 종양 특이적이지 않지만 암 면역요법에 널리 사용된다. 예로는, 티로시나아제 및 흑색종을 위한 멜란-A/MART-1 또는 전립선암을 위한 PSA가 포함되지만 이로 국한되지 않는다.
- [0050] c) 과발현된 TAA: 일반적으로 낮은 발현 수준이 있는 많은 정상 조직뿐만 아니라 조직학적으로 다른 유형의 종양에서 유전자 인코딩에서 널리 발현된 TAA가 발견된다. 정상 조직에 의해 처리되고 잠재적으로 제시되는 많은 에피토프는 T 세포 인식의 임계치 수준보다 낮을 수 있고, T 세포의 종양 세포에서의 과발현은 이전에 확립된 내성을 중단시켜 항암 반응을 개시할 수 있다. 이 클래스 TAA의 두드러진 예로는 Her-2/neu, 서바이빈, 텔로머라제 또는 WT1가 있다.
- [0051] d) 종양 특이적 항원: 이러한 독특한 TAA는 정상 유전자의 변이로써 발생한다(β -카테닌, CDK4 등). 이러한 분자 변경의 일부는 종양 변이 및/또는 진행과 관련되어 있다. 종양 특이적 항원은 일반적으로 강한 면역 반응을 정상 조직에 대한 자기 면역 반응에 대한 위험성 없이 유도할 수 있다. 반면에, 대부분의 경우 TAA는 발견되어 일반적으로 많은 개별 종양에서 대개 공유되지 않은 해당 종양에만 적절하다. 종양 특이적(연관된) 아형을 갖는 단백질의 경우 펩티드가 종양(관련) 엑손으로부터 비롯된다면 펩티드의 종양 특이성(또는 연관성) 또한 발생할 수 있다.
- [0052] e) 비정상 번역 후 변형에서 발생하는 TAA: 이러한 TAA는 종양에서 특이적이지 않고 과발현되지도 않는 단백질에서 발생할 수 있지만 종양에서 주로 활동적인 번역 후 과정에 의해 종양과 관련된다. 이 클래스의 예는 종양 특이적일 수도 있고 아닐 수도 있는 분해 과정 동안 단백질 스플라이싱과 같은 이벤트 또는 MUC1의 경우 종양의 새로운 에피토프로 이끄는 변화된 당화 패턴에서 발생한다.
- [0053] f) 종양 바이러스 단백질: 이러한 TAA는 종양발생 과정에서 중요한 역할을 할 수 있는 바이러스 단백질이며, 그들이 이질적이기 때문에(인간 태생이 아닌), T 세포 반응을 일으킬 수 있다. 이런 단백질의 예로는 인간 유두종 타입 16 바이러스 단백질, 및 경부 암종에서 발현하는 E6와 E7이 있다.
- [0054] T 세포 기반의 면역요법은 종양 관련 또는 종양 특이 단백질로부터 유래된 펩티드 에피토프를 표적으로 하며, 이는 구조적 적합 복합체(MHC)의 분자에 의해 제시된다. 종양 특이적 세포 T 림프구에 의해 인식되는 항원, 즉 그들의 에피토프는, 발현되고, 같은 원조의 변형없는 세포들에 비해서, 각각의 종양의 세포에서 대개 상향조절된 효소, 수용체, 전사 인자 등과 같은 모든 단백질 클래스에서 유도된 분자일 수 있다.
- [0055] MHC 분자에는 두 클래스가 있고, MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II이다. MHC 클래스 I 분자는 α 중쇄와 β -2-마이크로글로불린으로 구성되어 있고, MHC 클래스 II 분자는 α 와 β 쇄로 구성되어 있다. 이들의 3차원 형태는 결합 홈을 형성하며, 이는 펩티드와의 비공유결합에 사용된다.
- [0056] MHC 클래스 I 분자는 대부분의 유핵 세포에서 찾을 수 있다. 이는 대부분 내인성 단백질, 결손 리보솜 생성물(DRIP)과 보다 큰 펩티드의 단백질분해성 절단으로 인해 생성된 펩티드를 제시한다. 하지만 엔도솜 구획이나 외생 출처로부터 유래된 펩티드 또한 MHC 클래스 I 분자에서 발견된다. 이러한 비고전적 방식의 클래스 I 제시를 문헌에서는 교차 제시라고 칭한다(Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). MHC 클래스 II 분자는 대부분 전문적인 항원-제시 세포(APC)에서 찾아볼 수 있고, 이들은 주로 APC에 의해 섭취된 외인성 또는 막형단 단백질의 펩티드를 제시하며(예컨대, 세포내 이입 동안), 이는 차후에 처리된다.
- [0057] 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합체는 적절한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8 양성 T 세포에 의해서 인식되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체는 적절한 TCR을 갖는 CD4 양성 조력 T 세포에 의해 인식된다. TCR, 펩티드 및 MHC가 이로써 1:1:1의 화학량론적 반응량으로 존재한다는 사실은 잘 알려져 있다.
- [0058] CD4-양성 보조 T 세포는 CD8-양성 세포 독성 T 세포에 의한 효과적인 반응을 유도하고 지속하는 데 중요한 역할을 한다. 종양 연관 항원(TAA)에서 유도된 CD4 양성 T 세포 에피토프의 동정은 항종양 면역 반응을 일으키기 위한

의약품의 개발에 아주 중요하다(Gnjatic et al., 2003). 종양 부위에서, 보조 T 세포는, 세포독성 T 세포(CTL) 친화적 시토카인 주위 환경을 지원하고(Mortara et al., 2006) 효과기 세포, 예를 들어 CTL, 자연 살해(NK) 세포, 대식 세포, 과립구를 유지한다(Hwang et al., 2007).

- [0059] 염증이 없는 경우, MHC 클래스 II 분자의 발현은 주로 면역계의 세포, 특히 전문적 항원-제시 세포(APC), 예를 들어, 단핵 세포, 단핵 세포로 유도된 세포, 대식 세포, 수지상 세포로 제한된다. 암 환자에서, 종양의 세포는 MHC 클래스 II를 발현하는 것으로 밝혀졌다(Dengjel et al., 2006).
- [0060] 본 발명의 연장된 펩티드는 MHC 클래스 II 활성 에피토프로 작용할 수 있다.
- [0061] MHC 클래스 II에 의해 활성화된 조력 T 세포는 항종양 면역에서 CTL 효과기 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. CD8 양성 킬러 T 세포의 TH1 유형 지원 효과기 기능의 조력 T 세포 반응을 일으키는 조력 T 세포 에피토프는, 세포 표면에 종양 관련 펩티드/MHC 복합체를 보이는 종양 세포에 대한 세포 독성 기능을 포함한다. 이런 식으로 종양 관련 조력 T 세포 펩티드 에피토프는, 따로 또는 다른 종양 관련 펩티드와 함께, 항종양 면역 반응을 자극하는 백신 조성의 활성 약학 원료로 사용될 수 있다.
- [0062] 예를 들어, 생쥐 같은 포유류 동물 모델에서는 심지어 CD8 양성 T 림프구의 부재하에서도, CD4 양성 T 세포가 인터페론- γ (IFN γ)의 분비에 의한 혈관신생의 저해를 통해 종양 발현을 억제하는 데 충분한 것으로 나타났다(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). CD4 T 세포가 직접적 항종양 효과기라는 증거가 있다(Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).
- [0063] 이전에는 HLA 클래스 II 분자의 구성적 발현이 일반적으로 면역 세포로 제한되기 때문에, 클래스 II 펩티드를 원발성 종양에서 직접 단리하는 것은 가능하지 않다고 간주되었다. 하지만, 텡젤(Dengjel) 등은 MHC 클래스 II 에피토프를 종양에서 직접적으로 식별하는 데 성공했다(WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).
- [0064] CD8 및 CD4에 의존하는 두 유형의 반응이 함께 상승작용에 의해 항종양 효과에 기여하므로, CD8+ T 세포(리간드:MHC 클래스 I 분자 + 펩티드 에피토프) 또는 CD4 양성 조력 T 세포(리간드:MHC 클래스 II 분자 + 펩티드 에피토프)에 의해 인식되는 종양 관련 항원의 식별 및 특성화가 종양 백신의 개발에 중요하다.
- [0065] MHC 클래스 I 펩티드가 세포 면역 반응을 촉발(유도)하려면 MHC 분자에도 결합해야 한다. 이 과정은 MHC 분자의 대립형질 및 그 펩티드의 아미노산 서열의 특정적 다형성에 의존한다. MHC 클래스 I 결합 펩티드는 대개 길이가 8 내지 12개의 아미노산 잔기이며 또한 대개 그 서열 내에 MHC 분자의 상응하는 결합 홈과 상호작용하는 2개의 유지되는 잔기("고정부")를 포함하고 있다. 이렇게 함으로써 각 MHC 대립형질은 어떤 펩티드가 결합 홈에 특정적으로 결합할 수 있는지 결정하는 "결합 모티프"를 갖는다.
- [0066] MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서, 펩티드는 종양 세포에 의해 발현되는 특정 MHC 클래스 I 분자와 결합할 수 있어야 하며 또한 후추 특정한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포에 의해 인식될 수 있어야 한다.
- [0067] 종양 특이 또는 연관 항원으로서 T 림프구에 의해 단백질이 인식되고, 치료에 사용되려면, 특정한 전체 조건이 충족되어야 한다. 항원은 주로 종양 세포에 의해 발현되어야 하며 비교적 소량일지라도 건강한 정상 조직에 의해서 발현되어서는 안 된다. 바람직한 구현에서, 펩티드는 건강한 정상 조직과 비교하여 종양 세포에 의해 과다 제시되어야 한다. 더욱이, 각각의 항원이 하나의 유형의 종양에서 뿐만 아니라 높은 농도로 나타나는 것이 바람직하다(즉, 세포마다 펩티드의 각각의 사본 번호). 종양 특이 및 종양 관련 항원은 흔히 기능(예컨대, 세포 주기 조절 또는 세포자멸사의 억제) 때문에 정상 세포를 종양 세포로 전환하는 것과 직접 관련된 단백질에서 유도된다. 또한, 변환을 직접적으로 일으키는 단백질의 하류 표적은 상향조절될 수 있고, 따라서 간접적으로 종양과 연관될 수 있다. 이러한 간접적 종양 관련 항원은 백신 접근법의 표적이 될 수도 있다(Singh-Jasuja et al., 2004). 종양 관련 항원에서 유도된 펩티드 자체("면역성 펩티드")가 시험관내 또는 생체내 T 세포 반응을 유도하도록 하기 위해서 에피토프가 항원의 아미노산 서열에 나타나는 것이 필수적이다.
- [0068] 기본적으로, MHC 분자에 결합할 수 있는 모든 펩티드는 T 세포 에피토프로서 기능할 수 있다. 시험관내 또는 생체내 T 세포 반응의 유도의 전체 조건은 상응하는 TCR이 있는 T 세포의 존재와 이 특정 에피토프에 대한 면역성 내성의 부재이다.
- [0069] 따라서, TAA는 종양 백신으로 제한되지 않지만 이를 포함하는 T 세포 기반 요법의 개발에 있어서 시작점이 된다. TAA의 식별과 특성화의 방법은 대개 환자 또는 건강한 대상에서 단리될 수 있는 T 세포의 사용에 기반하거나, 다른 전송 프로파일 또는 종양과 정상 조직 사이의 차등 전사 프로파일이나 차등 펩티드 발현 패턴의 생성에 기반한다. 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주에서 과발현되거나 그런 조직 또는 세포주에서 선택적으로

발현되는 유전자의 식별은 면역 요법에서 이런 유전자에서 전사된 항원의 이용에 대한 정밀한 정보를 제공하지 않는다. 이것은 상응하는 TCR이 있는 T 세포가 나타나야 하고 이 특정 에피토프에 대한 면역 내성이 없거나 최소화되어야 하므로 이러한 항원의 에피토프의 개개의 하위집단만이 그런 응용에 적합하기 때문이다. 따라서, 본원의 매우 바람직한 구현에서, 기능성 및/또는 증식성 T 세포가 발견될 수 있는, 과발현되거나 선택적으로 발현된 펩티드만 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능성 T 세포는 특정 항원에 의해 자극되었을 때 클론에 의해 확대되고 효과기 기능("효과기 T 세포")을 실행할 수 있는 T 세포로 정의된다.

[0070] 본 발명에 따른 특정 TCR(예컨대, 가용성 TCR) 및 항체 또는 다른 결합 분자(글릭)에 의해 펩티드-MHC를 표적화하는 경우, 기저 펩티드의 면역원성은 이차적인 것이다. 이러한 경우 그 제시가 결정 요인이다.

발명의 내용

[0071] 본 발명의 제1 양태에서, 본 발명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 관한 것으로서, 상기 변이체는 MHC에 결합하고/거나 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하며, 상기 펩티드는 기저의 전장 폴리펩티드가 아니다.

[0072] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드나 변이체가 갖는 전체 길이는 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개의 아미노산이다.

[0073] 다음 표에는 본 발명에 따른 펩티드들과 각각의 서열 식별 번호 및 이 펩티드들의 장래의 출처(기저) 유전자들이 나와 있다. 표 1에서 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 16의 펩티드가 HLA-A*01에 결합하고, 서열 식별 번호 17 내지 서열 식별 번호 27의 펩티드가 HLA-A*02에 결합하고, 서열 식별 번호 28 내지 서열 식별 번호 52의 펩티드가 HLA-A*03에 결합하고, 서열 식별 번호 53 내지 서열 식별 번호 76의 펩티드가 HLA-A*24에 결합하고, 서열 식별 번호 77 내지 서열 식별 번호 106의 펩티드가 HLA-B*07에 결합하고, 서열 식별 번호 107 내지 서열 식별 번호 121의 펩티드가 HLA-B*08에 결합하고, 서열 식별 번호 122 내지 서열 식별 번호 187의 펩티드가 HLA-B*44에 결합한다. 표 2의 펩티드는 고처리량의 스크리닝 및 높은 오류 비율의 결과로서 과거에 커다란 목록으로 공개되거나 알고리즘을 사용하여 계산되었지만, 과거에는 답과 연관된 점은 전혀 없었다. 표 2에서 서열 식별 번호 188 내지 서열 식별 번호 196의 펩티드가 HLA-A*01에 결합하고, 서열 식별 번호 197 내지 서열 식별 번호 207의 펩티드가 HLA-A*02에 결합하고, 서열 식별 번호 208 내지 서열 식별 번호 221의 펩티드가 HLA-A*03에 결합하고, 서열 식별 번호 222 내지 서열 식별 번호 224가 HLA-A*24에 결합하고, 서열 식별 번호 225 내지 서열 식별 번호 255의 펩티드가 HLA-B*07에 결합하고, 서열 식별 번호 256의 펩티드가 HLA-B*08에 결합하고, 서열 식별 번호 257 내지 서열 식별 번호 277의 펩티드가 HLA-B*44에 결합한다. 표 3의 펩티드는 본 발명에 따른 펩티드와의 병용에서 유용할 수 있는 추가의 펩티드이다. 표 3에서 서열 식별 번호 278의 펩티드가 HLA-A*02에 결합하고, 서열 식별 번호 279의 펩티드가 HLA-A*24에 결합한다.

[0074]

[표 1]

본 발명에 따른 펩티드

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
1	LTEGHSGNYY	FCRL5	A*01
2	TMIRIFHRY	S100Z	A*01/B*15
3	YINPAKLTPY	CARD11	A*01/A*03
4	ALDQNKMHY	CPA3	A*01
5	GTDVLSTRY	CPA3	A*01
6	VTEGVAQTSFY	HLA-DOA	A*01
7	FMDSESFYY	INPP5F	A*01
8	STDSAGSSY	PAX5	A*01
9	YSH PQYSSY	PAX5	A*01/B*15
10	YSDIGHLL	SESN3	A*01
11	AAADHHSLY	SOX4	A*01/A*32
12	ATDIVDSQY	T	A*01
13	ITDIHIKY	VPS13C	A*01
14	TFDLTVVSY	VPS13C	A*01
15	SVADIRNAY	WDFY4	A*01/A*32
16	WIGDKSFEY	ZNF121	A*01/A*29
17	KAYNRVIFV	MARCH1	A*02
18	YLLPSVLL	AGPAT5	A*02
19	SLFEGIYTI	FLT3	A*02
20	FSLEDLVRI	KIAA0226L	A*02
21	FLFDKLLLI	PLEKHG1	A*02
22	ILHAQTLKI	RALGPS2	A*02/B*13
23	FAFSGVLRA	RREB1	A*02
24	KLGPVAVSI	SIPA1L3	A*02/B*13
25	YLNEKSLQL	ST8SIA6	A*02
26	SLYVQQLKI	SYNE2	A*02/B*13
27	RLIAKEMNI	WDFY4	A*02/B*13
28	VILESIFLK	BTK	A*03/A*11
29	RIYDEILQSK	CD84	A*03
30	RTYGFVLTf	DENND5B	A*03/A*32
31	ATFNKLVSY	DNMT3B	A*03/A*32
32	KTSNIVKIK	FCRL2	A*03
33	SVFEGDSIVLK	FCRL2	A*03/A*11
34	SVYSETSNMDK	GSAP	A*03/A*11

[0075]

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
35	ATKSPAKPK	HIST1H1B	A*03
36	KAKAAAKPK	HIST1H1B	A*03
37	KAKKPAGAAK	HIST1H1E	A*03
38	KARKSAGAAK	HIST1H1E	A*03
39	IVIQLRAQK	HLA-DOB	A*03
40	RSKEYIRKK	KBTD8	A*03
41	SVAHLLSKY	MAP3K1	A*03/B*15
42	SVSSSTHFTR	MAP3K1	A*03/A*11
43	KLMETSMGF	MGA	A*03/A*32
44	KVYDPVSEY	MTMR1	A*03/B*15
45	VVFPFVNK	MYCN	A*03
46	RVFPSPMRI	PLCL2	A*03
47	SVLDLSVHK	PRDM2	A*03/A*11
48	RIKPPGPTAVPK	SCML2	A*03
49	GLLEEALFY	SMYD3	A*03/A*29
50	GVFNTLISY	TARBP1	A*03
51	ASTTVLALK	WDFY4	A*03/A*11
52	KAFNQSSTLTK	ZNF431, ZNF714, ZNF92, ZNF93	A*03
53	KYIEYYLVL	ADAM28	A*24
54	QQALNFTRF	AKAP13	A*24/B*15
55	IFVARLYYF	APOBEC3G	A*24
56	KYSSGFRNI	ATM	A*24
57	RFPPTPLF	BCL11A	A*24
58	KYLADLPTL	CEP85L	A*24
59	GLYEGTGRLF	DNMT3A, DNMT3B	A*24
60	TQDPHVNAFF	DOCK10	A*24/B*38
61	IFKEHNFSF	FLT3	A*24
62	YYLSHLERI	GNA15	A*24
63	IYFSNTHFF	GPR114	A*24
64	SFQSKATVF	HOXA9	A*24
65	AYLKQVLLF	INPP5F	A*24
66	SQPAVATSF	MYB	A*24/B*15
67	VFLPSEGFNF	N4BP2	A*24
68	LYQDRFDYL	NLRP3	A*24
69	EYNTIKDKF	PARP15	A*24
70	LYSDIGHLL	SESN3	A*24
71	RYLGKNWSF	SPNS3	A*24

[0076]

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
72	TYVENLRLL	SYNE2	A*24
73	TYPQLEGKFKF	WDFY4	A*24
74	SYADNILSF	WDR11	A*24
75	RFYLLTEHF	ZNF121	A*24
76	KAFSWSSAF	ZNF92	A*24/A*32
77	RPNGNSLFTSA	AFF3	B*07
78	RPRGLALVL	CASP2	B*07
79	SPVPSHWMVA	CD79B	B*07
80	KPLFKVSTF	DOCK10	B*07
81	SESPWLHAPSL	FAIM3	B*07/B*40
82	APFGFLGMQSL	FAM129C	B*07
83	IPVSRPIL	FCRL1	B*07
84	SPKLQIAAM	FCRL1	B*07
85	IPVSHPVL	FCRL3	B*07
86	IPASHPVL	FCRL5	B*07
87	FPAPILRAV	FCRLA	B*07
88	MPDPHLYHQM	FCRLA	B*07
89	FPETVNNLL	HEATR5B	B*07
90	KPKAAKPKA	HIST1H1B	B*07
91	KPKAAKPKAA	HIST1H1B	B*07
92	KAKKPAGAA	HIST1H1E	B*07
93	KARKSAGAA	HIST1H1E	B*07
94	KPKAAKPKKAA A	HIST1H1E	B*07
95	KPKAAKPKTA	HIST1H1E	B*07
96	KPKKAPKSPA	HIST1H1E	B*07
97	LPFGKIPIL	HPGDS	B*07/B*51
98	YPIALTRAEM	IKZF3	B*07/B*35
99	SPRAINNLVL	KLHL14	B*07
100	YPYQERVFL	PIK3R6	B*07/B*35
101	NPRYPNYMF	ROR1	B*07
102	LPLSMEAKI	RREB1	B*07/B*35
103	IPANTEKASF	SCIMP	B*07/B*50
104	RPMTPTQIGPSL	TCL1A	B*07
105	NPLTKLLAI	TFEC	B*07/B*08
106	KAFKWFSAL	ZNF736	B*07
107	QAAQRTAL	AFF3	B*08
108	ILAIRQNAL	AGPAT5	B*08

[0077]

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
109	LGHVRYVL	AGPAT5	B*08
110	FGLARIYSF	CDK6	B*08
111	VTLIKYQEL	CLEC17A	B*08/A*02
112	APLLRHWEL	HLA-DOA	B*08/B*07
113	DANSRTSQL	MAP3K1	B*08
114	HNALRILTF	NUP210	B*08
115	ELYQRIYAF	PIK3R6	B*08
116	TLKIRAEVL	RALGPS2	B*08
117	YIKTAKKL	RALGPS2	B*08
118	FEKEKESL	SESN3	B*08
119	DLRTKEVVF	SIPA1L3	B*08
120	VPPKKHLL	TRRAP	B*08
121	RPKKVNTL	ZBTB24	B*08
122	KELPGVKKY	ADAM28	B*44
123	EENPGKFLF	ARHGAP24	B*44
124	SESLPKEAF	ATF7IP	B*44
125	SESTFDRTF	ATF7IP	B*44
126	EENKPGIVY	BTLA	B*44
127	TEYPVFVY	CACNA2D4	B*44
128	GENDRLNHTY	CCDC88A	B*44
129	GEGAYGKVF	CDK6	B*44
130	EEEHGKGREY	CHD1	B*44
131	EEFETIERF	CHD1	B*44
132	GELPAVRDL	CIITA	B*44/B*40
133	AEHNFVAKA	CLEC17A	B*44/B*50
134	SEYADTHYF	CLNK	B*44
135	NEIKVYITF	CPA3	B*44
136	AEYKGRVTL	FAIM3	B*44/B*40/B*49
137	GELGGSVTI	FAIM3	B*44/B*49
138	SQAPAARAF	FAM129C	B*44/B*15
139	RENQVLGSGW	FCRL2	B*44
140	EYDLKWEF	FLT3	B*44/A*23
141	REYDYDLKWEF	FLT3	B*44
142	TEIFKEHNF	FLT3	B*44
143	YEYDLKWEF	FLT3	B*44
144	TEGKRYFTW	GANC	B*44
145	AEPLVGQRW	GDF7	B*44

[0078]

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
146	SESKTVVVTY	ICOSLG	B*44
147	KEVPRSYEL	IKZF3	B*44/B*40
148	REYNEYENI	IKZF3	B*44/B*49
149	SEKETVAYF	INPP5F	B*44
150	EEVTDRSQL	IRF8	B*44/B*40
151	EVDASIFKAW	IRF8	B*44
152	AELLAKELY	KIAA0226L	B*44
153	KEFEQVPGHL	KIAA0226L	B*44/B*40
154	AEPGPVITW	LILRA4	B*44
155	NEFPVIVRL	LRRK1	B*44
156	FEVESLFQKY	MAP3K1	B*44
157	VEIAEAIQL	MAP3K1	B*44/B*40
158	GENEDNRIGL	MCOLN2	B*44/B*40
159	GELLGRQSF	MDM4	B*44
160	EEETILHFF	NEK8	B*44
161	EEGDTLLHLF	NFKBID	B*44
162	DEAQARAAF	NLRP3	B*44
163	EEWMGLLEY	NLRP3	B*44
164	SEYSHLTRV	NPR3	B*44/B*49
165	VELDLQRSV	PIK3R6	B*44
166	NEVLASKY	PLCL2	B*44/B*18
167	KEIGAAVQAL	PLEKHA2	B*44/B*40
168	QEIQSLLTNW	PLEKHG1	B*44
169	EENGEVKEL	PRDM2	B*44
170	SENEQRRMF	PYHIN1	B*44
171	SEDLAVHLY	RALGPS2	B*44
172	VEDGLFHEF	RBM15	B*44
173	KEYDFGTQL	RNF220	B*44/B*49
174	TDKSFNPAY	RNGTT	B*44/B*47
175	HEIDGKALFL	SCML2	B*44
176	AENAVSNLSF	SLAMF6	B*44
177	QENMQIQSF	SPG11	B*44
178	REYEHYWTEL	STAP1	B*44/B*50
179	AEIKQTEEKY	VAV3	B*44
180	EPAFNVSY	VOPP1	B*44
181	GEIKEPLEI	VPS13C	B*44/B*40/B*49
182	AQNLSIIQY	WDFY4	B*44/B*15

[0079]

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
183	GESQDSTTAL	WDFY4	B*44/B*40
184	RMPPFTQAF	WDFY4	B*44/B*15
185	SEGDNVESW	ZCCHC7	B*44
186	NEQKIVRF	ZNF699	B*44/B*18
187	SDAQRPFSS	ZNF831	B*44/B*37

[0080]

[0081] [표 2]

이전에 알려진 암 관련이 없는 본 발명에 따른 펩티드.

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
188	YVDAGTPMY	AGPAT5	A*01
189	VTEEPQRLFY	BMF	A*01
190	HVDQDLTTY	CDK6	A*01
191	ISEAGKDLLY	CNTRL	A*01
192	RSDPGGGGLAY	MEX3B	A*01
193	LTDSEKGNSY	RALGPS2	A*01
194	YTDKKSIIY	STAP1	A*01
195	YSDKEFAGSY	TBC1D9	A*01
196	FTDIDGQVY	WDR11	A*01
197	SLADVHIEV	BTAF1	A*02
198	KLLGYDVHV	CASP2	A*02
199	AMPDSPAEV	CBFA2T3	A*02
200	VMLQINPKL	CCDC88A	A*02
201	ILAAVETRL	FBXO28	A*02
202	MVALPMVLV	ITGB7	A*02
203	FLLPKVQSI	KIAA0922	A*02
204	FLLPKVQSIQL	KIAA0922	A*02
205	FLINTNSEL	PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D	A*02
206	SLMDLQERL	STIM2	A*02
207	KLSDNILKL	SYNE2	A*02/B*13
208	KLNPQQAPLY	AKAP13	A*03
209	KTLPAMLGTGK	BTLA	A*03/A*11
210	RMYSQLKTLQK	DNMBP	A*03
211	ATYNKQPMYR	DNMT3A	A*03
212	LLWHWDTTQSLK	FCER2	A*03
213	RVYNIYIRR	GPR114	A*03/A*32
214	ATGAATPKK	HIST1H1E	A*03/A*11
215	KATGAATPK	HIST1H1E	A*03
216	RIKAPSRNTIQK	MAP3K1	A*03
217	TTVPHVFSK	MAP3K1	A*03/A*11
218	RVLTGVFTK	PARP15	A*03
219	HSYSSPSTK	RBM15	A*03
220	SISNLVFTY	SOX4	A*03/A*29

[0082]

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 등종이형
221	LLNRHILAH	ZNF669	A*03
222	RYLDEINLL	GNA15	A*24
223	RRMYPPPLI	VOPP1	A*24/B*27
224	VYEYVVERF	ZCCHC11	A*24
225	LPARFYQAL	AGPAT5	B*07
226	YLNRLHTW	BCL2	B*07/A*32
227	APINKAGSFL	BLK	B*07
228	SPRITFPSL	BLK	B*07
229	SPLGSLARSSL	CARD11	B*07
230	KPMKSVLVV	CCR7	B*07
231	MPLSTIREV	CDK6	B*07/B*51
232	APRPAGSYL	CIITA	B*07
233	SPRVYWLGL	CLEC17A	B*07
234	SPKESENAL	DEPDC5	B*07
235	SPSLPSRTL	DEPDC5	B*07
236	RPSNKAPLL	EHMT1	B*07
237	SPWLHAPSL	FAIM3	B*07
238	SPRSWIQVQI	FCRL5	B*07
239	APSKTSLIM	FOXP1	B*07
240	SPSLPNITL	HDAC4, HDAC9	B*07
241	APAPAEKTPV	HIST1H1E	B*07
242	SPFSFHHVL	ITGB7	B*07/B*35
243	LPKVQSIQL	KIAA0922	B*07
244	MPSSDTTVTF	MAP3K1	B*07/B*35
245	SPLSHHSQL	MAP3K1	B*07
246	YPGWHSTTI	MYB	B*07/B*51
247	QPSPARAPAEI	PMAIP1	B*07
248	LPYDSKHQI	PTPN22	B*07/B*51
249	SPADHRGYASL	SOX4	B*07
250	VPNLQTVSV	SP4	B*07/B*51
251	QPRLFTMDL	TRRAP	B*07
252	RPHIPISKL	UBASH3B	B*07
253	RPFADLLGTAF	WDFY4	B*07
254	SPRNLPQRAAL	WDFY4	B*07
255	YPGSDRIML	WDFY4	B*07
256	SPYKKLKEAL	TRAPPC10	B*08
257	KEFFFVKVF	AIM2	B*44
258	EELFRDGVNW	BCL2	B*44

[0083]

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
259	EENTLVQNY	BTAF1	B*44
260	AEIGEGAYGKVF	CDK6	B*44
261	NEIEHIPVW	CNTRL	B*44
262	QENQAETHAW	CXCR5	B*44
263	REAGFQVKAY	FCRLA	B*44
264	SEDHSGSYW	FCRLA	B*44
265	QEVDASIFKAW	IRF8	B*44
266	VDASIFKAW	IRF8	B*44
267	KEKFPINGW	MTMR1	B*44
268	NEDKGTKAW	MYSM1	B*44
269	KELEDLNKW	PDE4B	B*44
270	AESEDLAVHL	RALGPS2	B*44/B*40
271	AESEDLAVHLY	RALGPS2	B*44
272	KEFELRSSW	STIM2	B*44
273	AEIEIVKEEF	SYNE2	B*44
274	GEAVTDHPDRLW	TCL1A	B*44
275	TENPLTKLL	TFEC	B*44
276	EEEGNLLRSW	WDFY4	B*44
277	EEGNLLRSW	WDFY4	B*44

[0084]

[0085]

[표 3]

예를 들어, 개인화 암 요법에 유용한 펩티드.

서열 식별 번호	서열	공식 유전자 부호(들)	HLA 동종이형
278	YLDRKLLTL	SYK	A*02
279	LYIDRPLPYL	FAM21A, FAM21B, FAM21C	A*24

[0086]

[0087]

본 발명은 또한 일반적으로 예를 들어, 비호지킨 림프종, 이식후 림프증식성 질환(PTLD)과 같은 기타 림프구 종양, 및 원발성 골수섬유종, 본태성 혈소판감소증, 진성 적혈구증가증과 같은 기타 골수구 종양, 및 간세포 암종, 대장 암종, 아교모세포종, 위암, 식도암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 췌장암, 신세포 암종, 전립선암, 흑색종, 유방암, 담낭암 및 담관암종, 방광암, 자궁암, 두경부 편평세포 암종, 중피종과 같은 기타 암종과 같은 증식성 질병의 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.

[0088]

특히 바람직하게는, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279로 구성된 군으로부터 선택되는 본 발명에 따른 단일 또는 조합의 펩티드들이다. 더 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 187(표 1 참고)로 구성된 군으로부터 선택되는 단일 또는 조합의 펩티드들이며, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 및 예를 들어 비호지킨 림프종, 이식후 림프증식성 질환(PTLD)과 같은 기타 림프구 종양, 및 원발성 골수섬유종, 본태성 혈소판감소증, 진성 적혈구증가증과 같은 기타 골수구 종양, 및 간세포 암종, 대장 암종, 아교모세포종, 위암, 식도암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 췌장암, 신세포 암종, 전립선암, 흑색종, 유방암, 담낭암 및 담관암종, 방광암, 자궁암, 두경부 편평세포 암종, 중피종, 및 바람직하게는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 면역요법에서 이들의 사용이다.

[0089]

본 발명에 따른 특히 바람직한 펩티드의 조합에는 7개의 가장 흔한 HLA-A 및 -B 동종이형들(위의 표 참고)이 포함되며, 이것은 유럽 환자들의 92% 초과 (유전적) 범위를 제공하는 약품을 허용한다.

[0090]

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 및 예를 들어 비호지킨 림프종, 이식후 림프증식성 질환(PTLD)과 같은 기타 림프구 종양, 및 원발성 골수섬유종, 본태성 혈소판감소증, 진성 적혈구증가증과 같은 기타 골수구 종양, 및 간세포 암종, 대장 암종, 아교모세포종, 위암, 식도암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 췌장암, 신세포 암종, 전립선암, 흑색종, 유방암, 담낭암 및 담관암종, 방광암, 자궁암, 두경부 편평세포 암종, 중피종의 군으로부터 선택되는 증식성 질병의 바람직하게는 병용 치료를 위한 본 발명에 따른 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0091]

본 발명은 또한 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 길이 변이체와 같은 연장된 형태의 MHC 클래스 II

의 분자와 결합하는 능력을 가진 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.

- [0092] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드들에 관한 것으로서, 상기 펩티드들(각각)은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.
- [0093] 본 발명은 또한 본원에 따른 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0094] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 융합 단백질의 일부이며, 특히 HLA-DR 항원 연관된 불변 쇠(Ii)의 N-말단 아미노산에 융합되거나, 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 그 서열 안으로) 융합된다.
- [0095] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.
- [0096] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있고/거나 발현하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0097] 본 발명은 또한 질병의 치료 및 의약, 특히 암의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0098] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드 또는 본 발명에 따른 펩티드와 MHC의 복합체에 대해 특이적인 항체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0099] 본 발명은 또한 T 세포 수용체(TCR), 특히 가용성 TCR(sTCR) 및 자가조직 또는 동종이형 T 세포 안으로 조작된 클론된 TCR, 및 이들은 물론 NK 세포나 상기 TCR을 포함하거나 상기 TCR과 교차반응하는 다른 세포들을 만드는 방법에 관한 것이다.
- [0100] 항체 및 TCR은 현재 본 발명에 따른 펩티드의 면역요법 사용에 대한 추가적 양태이다.
- [0101] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 또는 상기 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항원-제시 세포, 바람직하게는 수지상 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0102] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양 및 상기 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터의 펩티드 단리를 포함한다.
- [0103] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 충분한 수량의 항원을 항원-제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원-제시 세포 또는 인공 항원-제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.
- [0104] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 그 항원-제시 세포가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279를 함유하는, 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 187을 함유하는 상기 펩티드 또는 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있고/거나 발현하는 발현 벡터를 포함한다.
- [0105] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 의해 생산된 활성화된 T 세포에 관한 것으로서, 상기 T 세포가 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.
- [0106] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 표적 세포가 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명에 따라 생산된 효과적인 수의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0107] 본 발명은 또한 약제로서 또는 약제의 제조에서 설명된 일체의 펩티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 본 발명에 따른 활성화된 T 림프구, T 세포 수용체 또는 기타 펩티드 및/또는 펩티드 MHC 결합 분자의 사용에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 약제가 암에 대해 활성이다.
- [0108] 바람직하게는 상기 약제가 세포 요법, 백신 또는 가용성 TCR 또는 항체에 근거한 단백질이다.
- [0109] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로서, 상기 암 세포는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 및 예를 들어 비호지킨 림프종, 이식후 림프증식성 질환(PTLD)과 같은 기타 림프구 종양, 및 원발성 골수섬유종, 본태성 혈소판감소증, 진성 적혈구증가증과 같은 기타 골수구 종양, 및 간세포 암종, 대장 암종, 아교모세포종, 위암, 식도암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 췌장암, 신세포 암종, 전립선암, 흑색종, 유방암, 담낭암 및 담관암종, 방광암, 자궁암, 두경부 편평세포 암종, 중피종, 및 바람직하게는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병이다.

- [0110] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 근거한 바이오마커에 관한 것으로서, 여기서는 암, 바람직하게는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 진단에 사용할 수 있는 "표적"이라고 부른다. 이 마커는 펩티드(들) 자체의 과다-제시 또는 상응하는 유전자(들)의 과발현일 수 있다. 이 마커는 또한 치료, 바람직하게는 면역요법, 가장 바람직하게는 바이오마커에 의해 확인된 동일한 표적을 표적화하는 면역요법의 성공의 확률을 예측하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 가용성 TCR은 관심 대상의 MHC와 복합체인 펩티드의 존재 검출을 위해 종양의 일부를 염색하는 데 사용할 수 있다.
- [0111] 임의적으로, 항체는 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가의 효과기 기능을 보유한다.
- [0112] 본 발명은 또한 암 치료의 문맥상 이러한 새로운 표적들의 사용에 관한 것이다.
- [0113] 발명의 상세한 설명
- [0114] 면역 반응 자극은 숙주 면역계가 외부 물질로 인식하는 항원의 존재에 의존한다. 종양 연관 항원의 발견은 숙주의 면역계를 종양 성장에 개입하는 데 사용할 가능성을 제기했다. 면역계의 체액성 및 세포성 지류를 이용하는 다양한 기전이 현재 암 면역 치료에서 탐색되고 있다.
- [0115] 세포 면역 반응의 특정 요소들은 종양 세포를 특이적으로 인식하고 파괴할 수 있다. T 세포의 종양 침투 세포 군락 또는 말초 혈액에서의 단리는 이러한 T 세포가 암에 대해 자연 면역 방어에서 중요한 역할을 함을 시사한다. 세포질에 자리잡은 단백질 또는 불완전 리보솜 생성물(DRIPS)에서 과생된 보통 8 내지 10개의 아미노산 잔기로 이루어진 주조직적합 복합체(MHC)를 가진 펩티드의 클래스 I 분자를 인식하는 CD8 양성 T 세포는 특히 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC 분자도 인간 백혈구-항원(HLA)으로 지정된다.
- [0116] "T 세포 반응"이란 용어는 특이적 증식과 시험관내 또는 생체 내에서 유도되는 효과기 기능의 활성화를 의미한다. MHC 클래스 I 제한 세포 독성 T 세포의 경우, 효과기 기능이 펩티드 펄스, 펩티드 전조 펄스 또는 자연적 펩티드 제시 표적 세포들의 용해, 시토키인의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 인터페론- γ , TNF- α , 또는 IL-2, 효과기 분자의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 그랜자임 또는 퍼로린 또는 탈과립일 수 있다.
- [0117] "펩티드"란 용어는 여기서 이웃 아미노산의 α 아미노와 카보닐기 사이에 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 일련의 아미노산 잔기를 지정하기 위해 사용한다. 펩티드는 아미노산 9개의 길이가 바람직하지만 짧게는 아미노산 8개일 수도 있고 길게는 10, 11 또는 12개일 수도 있고, MHC 클래스 II 펩티드의 경우(본 발명의 펩티드의 연장된 변이체) 그 길이가 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 이상의 아미노산일 수 있다.
- [0118] 더욱이 "펩티드"라는 용어는 α 아미노기와 이웃 아미노산의 카보닐기 사이의 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 아미노산 잔기의 서열에 의한 염을 포함한다. 바람직하게는 이 염은, 예를 들어 염화물 또는 아세트산염(트라이플루오로아세트레이트)과 같은 약학적으로 허용되는 펩티드의 염이다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 펩티드가 생체 내에서 염이 아니므로 생체내 상태의 펩티드와는 실질적으로 다르다는 점을 유의해야 한다.
- [0119] "펩티드"라는 용어는 "올리고펩티드"를 포함한다. 여기에서 "올리고펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 α 아미노기와 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 발명에서 올리고펩티드의 길이는 정확한 에피톱이 유지되는 이상 중요하지 않다. 올리고펩티드는 일반적으로 30개 아미노산보다 길이가 짧고, 15개 아미노산보다 길다.
- [0120] "폴리펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 α 아미노기와 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 일련의 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 발명에서 폴리펩티드의 길이는 정확한 에피톱들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 펩티드 또는 올리고 펩티드와 다르게, 폴리펩티드는 약 30개 초과 아미노산 잔기의 분자를 가지고 있는 것을 지칭한다.
- [0121] 이런 분자에 대한 펩티드, 올리고펩티드, 단백질, 또는 폴리뉴클레오티드 코딩은 면역 반응을 유도할 수 있으면 "면역원성"(따라서, 본 발명에서의 "면역원")이다. 본 발명의 경우, 면역원성은 T 세포 반응을 유도하는 능력으로 특정하게 정의된다. 그러므로, "면역원"은 면역 반응을 유도할 수 있는 분자이고, 본 발명의 경우, T 세포 반응을 유도할 수 있는 분자이다. 다른 양태에서, 면역원은 펩티드, 펩티드와 MHC의 복합체, 올리고펩티드 및/또는 특정 항체, 또는 항체에 대한 TCR을 높이는 데 사용되는 단백질일 수 있다.
- [0122] 클래스 I T 세포 "에피톱"은 적당한 친화도를 가진 MHC/펩티드 복합체에 결합하는 T 세포 수용체에 일치하는 T 세포에 의해 인식되는 삼성분(ternary) 복합체(MHC 클래스 I α 쇄, β -2-마이크로글로블린 및 펩티드)를 생성하는 클래스 I MHC 수용체에 결합하는 짧은 펩티드를 필요로 한다. MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드는 일

반적으로 길이가 8 내지 14개 아미노산이며, 가장 일반적으로 길이가 9개 아미노산이다.

[0123] 인간에는 MHC 클래스 I 분자를 인코딩하는 세 개의 유전자 좌가 있다(인간의 MHC 분자도 인간 백혈구 항원(HLA A)으로 지정된다): HLA-A, HLA-B 및 HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 및 HLA-A*07은 유전자 좌에서 발현할 수 있는 다른 MHC 클래스 I 대립형질의 예이다.

[0124] 표 4는 HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 및 HLA-B*44 혈청형의 발현 빈도 F이다. 일배체형 빈도 Gf는 미국에서 650만 명이 넘는 자원 공여자의 레지스트리로부터 얻은 HLA형 결정 데이터를 사용한 연구에서 유래한다(Gragert et al., 2013). 일배체형 빈도란 개별 염색체 상의 뚜렷한 대립유전자의 빈도를 말한다. 포유동물 세포 내의 이배수 염색체 조합으로 인해, 이 대립유전자의 유전형 발생 빈도가 더 높으며 하디-와인버그 원칙($F = 1 - (1-Gf)^2$)을 사용하여 계산할 수 있다.

[0125] [표 4]

대립유전자	집단	대립유전자 빈도로부터 계산된 표현형(F)
A*02	아프리카인(N=28557)	32.3%
	유럽 백인(N=1242890)	49.3%
	일본인(N=24582)	42.7%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	46.1%
	동남 아시아인 (N=27978)	30.4%
A*01	아프리카인(N=28557)	10.2%
	유럽 백인(N=1242890)	30.2%
	일본인(N=24582)	1.8%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	14.0%
	동남 아시아인 (N=27978)	21.0%
A*03	아프리카인(N=28557)	14.8%
	유럽 백인(N=1242890)	26.4%
	일본인(N=24582)	1.8%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	14.4%
	동남 아시아인 (N=27978)	10.6%
A*24	아프리카인(N=28557)	2.0%
	유럽 백인(N=1242890)	8.6%
	일본인(N=24582)	35.5%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	13.6%
	동남 아시아인 (N=27978)	16.9%
B*07	아프리카인(N=28557)	14.7%
	유럽 백인(N=1242890)	25.0%
	일본인(N=24582)	11.4%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	12.2%
	동남 아시아인 (N=27978)	10.4%
B*08	아프리카인(N=28557)	6.0%
	유럽 백인(N=1242890)	21.6%
	일본인(N=24582)	1.0%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	7.6%

[0126]

	동남 아시아인 (N=27978)	6.2%
B*44	아프리카인(N=28557)	10.6%
	유럽 백인(N=1242890)	26.9%
	일본인(N=24582)	13.0%
	히스패닉, 남미 + 중미 (N=146714)	18.2%
	동남 아시아인 (N=27978)	13.1%

[0127]

[0128]

본 발명의 펩티드는, 바람직하게는 본원에 기술된 본 발명의 백신에 포함되면, A*02, A*01, A*03, A*24, B*07, B*08 또는 B*44에 결합한다. 백신은 또한 범결합 MHC 클래스 II 펩티드를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 백신은 A*02, A*01, A*03, A*24, B*07, B*08 또는 B*44 양성인 환자에서 암의 치료에 사용할 수 있는 반면, 이러한 펩티드의 범결합 성격으로 인해 MHC 클래스 II 동종이형에 대한 선택이 필요하지 않다.

[0129]

본 발명의 A*02 펩티드가 다른 대립유전자, 예를 들어 A*24에 결합하는 펩티드와 합쳐지면, MHC 클래스 I 대립자만을 처리하는 것에 비해 더 높은 비율의 환자 모집단을 치료할 수 있다. 하나의 대립 유전자로는 대부분의 모집단에서 50% 미만의 환자를 치료할 수 있는 반면, HLA-A*24 및 HLA-A*02 에피토프를 포함하는 백신은 모든 관련된 모집단에서 60% 이상의 환자를 치료할 수 있다. 구체적으로 다양한 지역에서 이러한 대립유전자의 하나 이상에 양성인 환자의 비율은 다음과 같다: 미국 61%, 서유럽 62%, 중국 75%, 대한민국 77%, 일본 86%(www.allelefreqencies.net으로부터 계산했음).

[0130]

[표 5]

유럽 백인 인구에서 HLA 대립유전자의 범위(계산 출처: (Gragert et al., 2013)).

	범위(적어도 하나의 A-대립유전자)	B*07 와 조합	B*44 와 조합	B*07 및 B*44 와 조합
A*02 / A*01	70%	78%	78%	84%
A*02 / A*03	68%	76%	76%	83%
A*02 / A*24	61%	71%	71%	80%
A*01 / A*03	52%	64%	65%	75%
A*01 / A*24	44%	58%	59%	71%
A*03 / A*24	40%	55%	56%	69%
A*02 / A*01 / A*03	84%	88%	88%	91%
A*02 / A*01 / A*24	79%	84%	84%	89%
A*02 / A*03 / A*24	77%	82%	83%	88%
A*01 / A*03 / A*24	63%	72%	73%	81%
A*02 / A*01 / A*03 / A*24	90%	92%	93%	95%

[0131]

[0132]

한 바람직한 구현에서 "뉴클레오티드 서열"이란 용어는 데옥시리보뉴클레오티드의 이중중합체를 말한다.

[0133]

특정 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩은 자연적으로 발생하거나 합성 구축될 수도 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 인코딩하는 DNA 분절은 cDNA 단편들과 짧은 올리고뉴클레오티드 링커, 또는 일련의 올리고뉴클레오티드에서 미생물이나 바이러스 오페론에서 유도된 조절 요소를 구성하는 재조합 전사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공하기 위해서 조립된다.

[0134]

본원에 사용되는 용어 "펩티드를 코딩(또는 인코딩)하는 뉴클레오티드"는 예를 들어, 수지상 세포 또는 TCR 생산에 유용한 다른 세포계에 의해 서열이 발현되는 생물학적 체계와 호환가능한 인공(사람이 만든) 시작 및 정지 코돈을 포함하는 펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩을 지칭한다.

[0135]

본원에 사용되는 핵산 서열에 대한 언급에는 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산 모두가 포함된다. 그러므로, 예를 들

어 DNA의 경우 특정 서열이란 문맥에서 달리 나타내지 않는 한, 이러한 서열의 단일 가닥 DNA, 이 서열의 보체와의 두 가닥(이중 가닥 DNA) 및 이러한 서열의 보체를 가리킨다.

- [0136] 용어 "코딩 영역"은 자연적인 계놈 환경에서 유전자의 발현 생성물에 대해 자연스럽게 또는 정상적으로 코딩하는 유전자의 부분을 가리킨다(즉, 유전자의 자연(native) 발현 생성물에 대한 생체내 코딩 영역).
- [0137] 코딩 영역은 비돌연변이("정상")이거나 돌연변이 또는 개조된 유전자로부터 유래할 수 있거나, 심지어 DNA 서열, 또는 실험실에서 DNA 합성의 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용해서 실험실에서 전적으로 합성된 유전자로부터 유래할 수 있다.
- [0138] 용어 "발현 생성물"은 유전적 코드 퇴화로부터 유래하고, 이에 따라 동일 아미노산을 코딩하는 유전자 및 임의의 핵산 서열 코딩 등가물의 자연 번역 생성물인 폴리펩티드 또는 단백질을 의미한다.
- [0139] 코딩 서열을 말할 때, 용어 "단편"은 발현 제품이 완전한 코딩 영역의 발현 생성물과 같은 생물학적 기능이나 활성을 유지하는 완전한 코딩 영역보다 적은 부분의 DNA를 지칭한다.
- [0140] 용어 "DNA 분절"을 최소한 한번 이상의 상당히 순수한 형태로 단리된 DNA에서 유도된 단편의 형태, 또는 큰 DNA 구조의 구성 요소로서 DNA 중합체를 가리킨다. 여기서, 순수한 형태는 내인성 오염 물질이 없고, 표준 생화학 방법, 예를 들어, 클로닝 벡터를 사용하여 분절 및 그 구성 요소 뉴클레오티드 서열의 식별, 조작 및 복구를 가능하게 하는 양 또는 농도를 가리킨다. 이러한 분절은 일반적으로 진핵 생물 유전자에 존재하는 내부 비번역 서열, 또는 인트론에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공된다. 비번역 DNA 서열은 동일 서열이 코딩 영역의 조작 또는 발현을 방해하지 않는 오픈 리딩 프레임의 하단에 나타날 수 있다.
- [0141] 용어 "프라이머"는 한 가닥의 표준 DNA와 짝을 이룰 수 있는 짧은 핵산 서열을 의미하며 DNA 폴리머라아제가 테옥시리보뉴클레오티드 쇠 합성을 시작하는 유리 3'-OH 말단을 제공한다.
- [0142] 용어 "프로모터"는 전사를 시작하기 위한 RNA 폴리머라아제의 결합에 관여하는 DNA 영역을 뜻한다.
- [0143] 용어 "단리"는 그 물질이 원래의 환경(예를 들어, 자연적으로 발생하는 경우에는 자연 환경)에서 제거되는 것을 뜻한다. 예를 들어, 자연 발생하는 살아 있는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리되지 않지만, 자연계에서 공존하는 물질의 부분 또는 전체에서 단리되는 같은 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 벡터의 부분일 수 있고/거나 이러한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 구성의 일부일 수 있고, 이러한 벡터 또는 구성이 자연 환경의 일부가 아닐 때 여전히 단리될 수 있다.
- [0144] 본 발명에 따라 밝혀지는 폴리뉴클레오티드 및 재조합 또는 면역성의 폴리펩티드는 "정제" 형태일 수도 있다. 용어 "정제"는 절대적인 순도를 필요로 하지 않는다. 오히려, 그것은 상대적인 정의를 의도하며, 관련된 당업자들이 이해하는 용어로서 상당히 정제된 제제 또는 부분적으로 정제된 제제를 포함할 수 있다. 예를 들어, cDNA 라이브러리에서 단리된 각각의 클론은 전기 영동 동일성으로 통상적으로 정제된다. 시작 물질 또는 자연 물질의 최소한 10배 이상, 바람직하게는 100 또는 1000배, 더 바람직하게는 10000 또는 100000배로의 정제가 명시적으로 심사숙고된다. 또한, 바람직하게는, 99.999 중량%, 또는 최소한 99.99 중량% 또는 99.9 중량%, 심지어는 바람직하게 99 중량% 이상의 순도를 가진 특허청구범위에 기재된 폴리펩티드가 명시적으로 포함된다.
- [0145] 본 발명에서 따라 개시된 핵산과 폴리펩티드 발현 생성물, 및 이러한 핵산 및/또는 이러한 폴리펩티드를 가진 발현 벡터는 "강화된 형태"일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "강화"는 물질의 농도가 최소한 그것의 자연적 농도(예를 들어)의 최소한 2, 5, 10, 100 또는 1000배 정도이고, 유리하게는 0.01 중량%, 바람직하게는 약 0.1 중량% 이상임을 의미한다. 약 0.5 중량%, 1 중량%, 5 중량%, 10 중량% 및 20 중량% 강화된 제제도 고찰된다. 서열, 구성, 벡터, 클론 및 본 발명의 다른 물질들은 유리하게 강화된 또는 단리된 형태가 될 수 있다. 용어 "활성 단편"은, 예를 들어 토끼 또는 쥐 및 인간을 포함한 포유류와 같은 동물에게 따로 또는 임의적으로 적당한 보조제와 함께 또는 벡터 내에 투여했을 때 면역 반응(즉, 면역성 활성이 있는)을 생성하고 인간과 같은 수용 동물 내에서 T 세포 반응을 자극하는 형태로 면역 반응을 나타내는 펩티드, 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 단편을 의미한다. 그렇지 않으면, "활성 단편"은 또한 시험관 내 T 세포 반응을 유도하기 위해서 사용될 수도 있다.
- [0146] 본원에 사용된 "부분", "분절" 및 "단편"이라는 용어는, 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 서열이 더 큰 서열의 하위 집합을 형성하는 경우 아미노산 잔기와 같은 잔기의 지속적인 서열을 가리킨다. 예를 들어, 만약에 폴리펩티드가 트립신 또는 키모트립신과 같은 일반적인 엔도펩티다아제 치료를 받는다면, 그런 치료로 인해 생기는 올리고펩티드는 폴리펩티드의 시작 부분, 분절 또는 단편을 나타낼 것이다. 폴리뉴클레오티드와 관련해서 사용될 때, 이러한 용어들은 일반적인 엔도뉴클레아제 중 어떤 것과 함께 상기 폴리뉴클레오티드의 치료에 의해

생성된 생성물을 지칭한다.

- [0147] 본 발명에 따라, 서열을 언급할 때 용어 "백분율 동일성" 또는 "백분율 동일"은 설명되거나 명시된 서열("기준 서열")에 비교될 서열의 정렬 후("비교 서열") 서열이 명시된 또는 설명된 서열에 비교되는 것을 가리킨다. 백분율 동일성은 하기 공식에 따라서 결정된다:
- [0148] $\text{백분율 동일성} = 100 [1 - (C/R)]$
- [0149] 상기 식에서,
- [0150] C는 기준 서열과 비교 서열의 정렬의 길이에 비해 기준 서열과 비교 서열의 차이의 개수이되,
- [0151] (i) 비교 서열에서 상응하는 정렬된 염기 또는 아미노산이 없는 기준 서열내 각 염기 또는 아미노산,
- [0152] (ii) 기준 서열의 각 갭, 및
- [0153] (iii) 비교 서열의 정렬된 염기 또는 아미노산과 다른 기준 서열의 각 정렬된 염기 또는 아미노산은 차이를 구성하며,
- [0154] (iv) 정렬은 정렬된 서열의 위치 1에서 시작해야 하고,
- [0155] R은 비교 서열과의 정렬의 길이에 대한 기준 서열 염기 또는 아미노산의 수이고 기준 서열에 생긴 갭도 염기 또는 아미노산 개수로 계산된다.
- [0156] 만약에 위에서와 같이 계산된 비교 서열과 기준 서열 사이의 백분율 동일성이 특정 최소 백분율과 같거나 더 크면 위에서 계산된 백분율 동일성이 특정 백분율 동일성보다 작은 경우에 정렬이 있을 수 있더라도 비교 서열은 기준 서열에 대해 특정한 최소 백분율 동일성이 있다.
- [0157] 위에서 언급된 바와 같이, 본 발명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 대해 88% 상동성인 그 변이체 또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체를 제공한다. 본 발명의 펩티드는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I의 분자에 결합하는 능력 또는 연장된 버전의 상기 펩티드가 클래스 II에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0158] 본 발명에서, "상동"이라는 용어는 2개의 아미노산 서열, 즉, 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 일치 정도(위의 백분율 동일성 참조)를 일컫는다. 진술한 "상동"은 비교될 2개의 서열을 최적 상태에서 나란히 정렬하여 비교하여 결정된다. 이러한 서열 상동 관계는, 예를 들어 ClustalW 알고리즘을 이용하여 정렬을 만들어 계산할 수 있다. 일반적으로 사용가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 구체적으로 벡터 NTI, GENETYX 또는 다른 도구들은 공용 데이터베이스에서 제공된다.
- [0159] 이 분야의 당업자는 특정 펩티드의 변이체에 의해서 유도된 T 세포가 그 펩티드 자체와 교차 반응할 수 있을지를 평가할 수 있을 것이다(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).
- [0160] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"에 의해, 발명자들은, 예를 들어, 하나 또는 2개의 아미노산 잔기의 측쇄가 변경되어 그 펩티드가 여전히 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드와 실질적으로 같은 방법으로 HLA 분자와 결합할 수 있음을 의미한다(예를 들어, 그들을 자연적으로 발생하는 다른 아미노산 잔기 또는 다른 측쇄로 펩티드로 구성된다). 예를 들어, 펩티드 변형에 의해 HLA-A*02 또는 -DR과 같은 적합한 MHC 분자의 결합 흡과 상호 작용하여 결합하는 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지할 수 있고, 이에 따라 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 향상시키지 않더라도 적어도 유지한다.
- [0161] 이 T 세포는 그 결과로 본 발명의 한 양태에서 정의된 동족의 펩티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응하고 이러한 세포를 죽일 수 있다. 과학 문헌 및 데이터 베이스(Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)에서 얻을 수 있듯이, HLA 결합 펩티드의 특정 위치는 전형적으로 HLA 수용기의 결합 모티프에 일치하는 핵심 고정 잔기이며 이는 결합 흡을 이루고 있는 폴리펩티드 쇄의 극성, 전기 물리성, 소수성 및 공간적 특성에 의해 정의된다. 따라서, 이 분야의 당업자는 알려진 고정 잔기를 유지함으로써 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 정해진 아미노산을 변형할 수 있을 것이며 이러한 변이체들이 MHC 클래스 I 또는 II 분자와 결합할 수 있는 능력을 유지할 수 있는지를 결정할 수 있어야 한다. 본 발명의 변이체는 이어서 본 발명의 양태에 정의된 동족 펩티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포

와 교차 반응하고 이 세포를 죽일 수 있는 활성화된 T 세포의 TCR에 결합하는 능력을 유지한다.

- [0162] 본원에 개시된 본래(변형되지 않은) 펩티드는 달리 언급되지 않는 이상 아마도 선택적인 다른 부위에서 펩티드 쇄의 부위의 하나 이상의 잔기의 치환에 의해 변형될 수 있다. 바람직하게, 이러한 치환은 아미노산 쇄의 말단에 위치한다. 그런 치환은, 예를 들어, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 한 아미노산이 구조 및 특성이 유사한 아미노산에 의해 치환됨으로써 그 성격이 보존적일 수 있다. 심지어 더 보존적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것 같이, 같거나 비슷한 크기와 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종속에서의 서열 변화의 연구에서, 특정 아미노산의 치환은 다른 것들보다 더 자주 용인되고 있고, 이들은 본래의 아미노산과 치환 사이에서 크기, 전하, 극성 및 소수성이 비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보존적 치환"을 정의하는 데 기본이 된다.
- [0163] 여기서 보존적 치환은 아래의 다섯 개 군 중 하나의 교환으로 정의된다: 군 1- 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성의 잔기(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 군 2- 극성, 음전하를 가진 잔기와 그 아미드(Asp, Asn, Glu, Gln); 군 3- 극성, 양전하를 가진 잔기(His, Arg, Lys); 군 4- 큰, 지방족, 비극성 잔기(Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 군 5- 큰, 방향족 잔기(Phe, Tyr, Trp).
- [0164] 덜 보존적 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 비슷한 성질이지만 크기가 어느 정도 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 아주 비보존적인 치환은 산성 아미노산을 극성, 또는 심지어 염기성 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수도 있다. 그러나 이러한 "급진적" 치환은 화학적 작용이 완전히 예측 불가능하고 급진적 치환은 단순한 화학 원리에서 예측가능하지 않은 뜻밖의 발생이 있을 수 있기 때문에 효과가 없다고 기각할 수는 없다.
- [0165] 물론, 이런 치환은 일반적인 L-아미노산과 다른 구조를 포함할 수 있다. 그러므로, D-아미노산을 본 발명의 항원 펩티드에서 흔히 발견되는 L-아미노산으로 치환할 수 있고 본원에서 계속 포함될 수 있다. 또한, 비표준 아미노산(즉, 흔히 자연적으로 발생하는 단백질 생성 아미노산이 아닌) 역시 본 발명에 따라 면역원과 면역원성 폴리펩티드를 생산하기 위해서 치환될 수 있다.
- [0166] 아래에서 정의된 것과 상당히 동일하거나 더 큰 항원 활성이 있는 펩티드를 야기하는 하나 이상의 위치에서 치환이 발견되면, 이러한 치환의 조합은 조합된 치환이 펩티드의 항원성에 추가적 효과 또는 시너지 효과의 결과를 내는지 결정하기 위해 시험된다. 최대한으로, 펩티드에서 네 곳 이하의 위치에서 동시에 치환될 것이다.
- [0167] 본원에 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드는, 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향받지 않고, 1 또는 2개의 비앵커 아미노산(앵커 모티프에 대해서는 아래 참조)이 교환될 수 있다. 또 다른 구현에서는, 본 문서에서 명시된 바와 같이 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드에 있어서, 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향받지 않고 하나 또는 2개의 아미노산이 그에 대한 보존적 교환 파트너(다음을 참조)와 교환될 수 있다.
- [0168] T 세포 수용체와 상호작용하는 데 상당히 기여를 하지 않는 아미노산 잔기들은 이와 결합됨으로써 T 세포의 반응성에 상당한 영향을 주지 않고 관련된 MHC와의 결합을 제거하지 않는 다른 아미노산과의 교체에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 주어진 조건 외에도, 본 발명의 펩티드는 아미노산 서열 또는 그 한 부분 또는 주어진 변이체를 포함하는(발명자들이 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다고 일컫는) 어떠한 펩티드가 될 수도 있다.

[0169] [표 6]

다음 서열 식별 번호에 따른 펩티드의 변이체 및 모티프: 1, 193, 17, 27, 33, 210, 64, 73, 99, 238, 116, 118, 134 및 148.

위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
서열 식별 번호 1	L	T	E	G	H	S	G	N	Y	Y	
변이체		S	D								
		S	D							A	
		S									
		S								A	
			D								
			D							A	
										A	
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
서열 식별 번호 193	L	T	D	S	E	K	G	N	S	Y	
변이체		S									
		S								A	
		S	E								
		S	E							A	
										A	
			E								
			E							A	
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 17	K	A	Y	N	R	V	I	F	V		
변이체		L									
		L							I		
		L							L		
		L							A		
		M									
		M							I		
		M							L		
		M							A		
									I		
									L		
									A		

[0170]

		V										
		V							I			
		V							L			
		V							A			
		T										
		T							I			
		T							L			
		T							A			
		Q										
		Q							I			
		Q							L			
		Q							A			
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
서열 식별 번호 27	R	L	I	A	K	E	M	N	I			
변이체									V			
									L			
									A			
		M							V			
		M										
		M							L			
		M							A			
		A							V			
		A										
		A							L			
		A							A			
		V							V			
		V										
		V							L			
		V							A			
		T							V			
		T										
		T							L			
		T							A			
		Q							V			
		Q										
		Q							L			
		Q							A			
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
서열 식별	S	V	F	E	G	D	S	I	V	L	K	

[0171]

번호 33												
변이체		L										
		L										Y
		L										R
		L										F
		I										
		I										Y
		I										R
		I										F
		M										
		M										Y
		M										R
		M										F
												Y
												R
												F
		T										
		T										Y
		T										R
		T										F
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
서열 식별 번호 210	R	M	Y	S	Q	L	K	T	L	Q	K	
변이체		L										
		L										Y
		L										R
		L										F
		I										
		I										Y
		I										R
		I										F
												Y
												R
												F
		V										
		V										Y
		V										R
		V										F
		T										
		T										Y

[0172]

		T									R
		T									F
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 64	S	F	Q	S	K	A	T	V	F		
변이체		Y							I		
		Y							L		
		Y									
									I		
									L		
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
서열 식별 번호 73	T	Y	P	Q	L	E	G	F	K	F	
변이체										I	
										L	
		F								I	
		F								L	
		F									
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
서열 식별 번호 99	S	P	R	A	I	N	N	L	V	L	
변이체										F	
										V	
										M	
										A	
										I	
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
서열 식별 번호 238	S	P	R	S	W	I	Q	V	Q	I	
변이체										L	
										F	
										V	
										M	
										A	
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 116	T	L	K	I	R	A	E	V	L		
변이체					K						
					K				V		
					K				I		

[0173]

				K				M		
				K				F		
								V		
								I		
								M		
								F		
				H						
				H				V		
				H				I		
				H				M		
				H				F		
			R	K						
			R	K				V		
			R	K				I		
			R	K				M		
			R	K				F		
			R							
			R					V		
			R					I		
			R					M		
			R					F		
			R	H						
			R	H				V		
			R	H				I		
			R	H				M		
			R	H				F		
			L	K						
			L	K				V		
			L	K				I		
			L	K				M		
			L	K				F		
			L							
			L					V		
			L					I		
			L					M		
			L					F		
			L	H						
			L	H				V		
			L	H				I		
			L	H				M		

[0174]

			L		H				F		
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 118	F	E	K	E	K	K	E	S	L		
변이체									V		
									I		
									M		
									F		
					R						
					R				V		
					R				I		
					R				M		
					R				F		
					H						
					H				V		
					H				I		
					H				M		
					H				F		
			R								
			R						V		
			R						I		
			R						M		
			R						F		
			R								
			R	R							
			R	R					V		
			R	R					I		
			R	R					M		
			R	R					F		
			R	H							
			R	H					V		
			R	H					I		
			R	H					M		
			R	H					F		
			L								
			L						V		
			L						I		
			L						M		
			L						F		
			L		R						
			L		R				V		

[0175]

			L		R				I		
			L		R				M		
			L		R				F		
			L		H						
			L		H				V		
			L		H				I		
			L		H				M		
			L		H				F		
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 134	S	E	Y	A	D	T	H	Y	F		
변이체									W		
									Y		
									L		
		D									
		D							W		
		D							Y		
		D							L		
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 148	R	E	Y	N	E	Y	E	N	I		
변이체									F		
									W		
									Y		
									L		
		D							F		
		D							W		
		D							Y		
		D							L		

[0176]

[0177]

더 긴(연장된) 펩티드도 적합할 수 있다. 또한 대개 길이가 8 내지 11개의 아미노산이지만, MHC 클래스 I 에피토프가 더 긴 펩티드로부터 처리되는 펩티드 또는 실제 에피토프를 포함하는 단백질에 의해 생성될 가능성도 있다. 실제 에피토프가 양측에 있는 장기는 처리 동안 실제 에피토프를 노출하는 데 필요한 단백질 분해에 의한 분할에 상당한 영향을 주지 못하는 잔기이다.

[0178]

본 발명의 펩티드는 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산이 4:0 내지 0:4의 임의의 조합으로 양쪽 어디로든 추가될 수 있는 4개 이하의 아미노산만큼 연장될 수 있다. 본원에 따른 연장의 조합은 표 7에서 찾아볼 수 있다.

[0179]

[표 7]

본 발명의 펩티드 연장의 조합

C-말단	N-말단
4	0
3	0 또는 1
2	0 또는 1 또는 2
1	0 또는 1 또는 2 또는 3
0	0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4
N-말단	C-말단
4	0
3	0 또는 1
2	0 또는 1 또는 2
1	0 또는 1 또는 2 또는 3
0	0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4

[0180]

[0181]

연장/신장을 위한 아미노산은 해당 단백질의 원래 서열의 펩티드 또는 기타 모든 아미노산일 수 있다. 연장은

펩티드의 안정성 또는 용해도 강화를 위해 사용될 수 있다.

- [0182] 따라서, 본 발명의 에피토프는 자연적으로 발생하는 중앙 관련 또는 중앙 특이 에피토프와 동일할 수 있거나 실질상 동등한 항원 활성을 가지고 있는 한, 참조 펩티드와 비교 시 4개 이하의 다른 잔기를 가지고 있는 에피토프를 포함할 수 있다.
- [0183] 대체의 구현에서, 펩티드는 한쪽 또는 양쪽으로 4개 초과와 4개 이하의 아미노산, 바람직하게는 총 30개 이하의 아미노산 길이만큼 연장된다. 이는 MHC 클래스 II 결합 펩티드로 이어질 수 있다. MHC 클래스 II에 대한 결합은 당업계에서 알려진 방법으로 시험할 수 있다.
- [0184] 따라서, 본 발명은 MHC 클래스 I 에피토프의 펩티드와 변이체를 제공하며 여기서 펩티드 또는 변이체는 전체 길이가 8 내지 100이며, 바람직하게는 8 내지 30이며, 가장 바람직하게는 8 내지 14이며, 이는 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개의 아미노산이다. 연장된 클래스 II 결합 펩티드의 경우 그 길이는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 아미노산일 수도 있다.
- [0185] 물론, 본 발명에 따른 펩티드 또는 변이체는 인간 구조적 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖게 된다. 펩티드 또는 변이체의 MHC 복합체에 대한 결합은 당업계의 방법에 의해 시험할 수 있다.
- [0186] 바람직하게는, 본 발명에 따른 펩티드에 특이적인 T 세포가 치환 펩티드에 대해 시험될 때, 치환 펩티드가 배경에 상대적으로 세포 용해의 최대 증가의 절반을 달성할 때의 펩티드 농도는 약 1 mM 이하, 바람직하게 약 1 μM 이하, 더 바람직하게 약 1 nM 이하, 여전히 더 바람직하게 약 100 pM 이하, 가장 바람직하게는 약 10 pM 이하이다. 치환 펩티드가 하나 이상, 최소 2개, 보다 바람직하게는 3개의 개별 T 세포에 의해 인식되는 것 또한 바람직하다.
- [0187] 본 발명의 특히 바람직한 구현에서 그 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.
- [0188] "본질적으로 구성되는"이란 본 발명에 따른 펩티드가, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279 중 어느 하나에 따른 서열 또는 이의 변이체 이외에, MHC 분자 에피토프에 대한 에피토프로서 기능하는 펩티드의 부분을 필수적으로 형성하지 않는 추가적인 아미노산의 N- 및/또는 C-말단 위치의 신장을 포함함을 의미한다.
- [0189] 그럼에도 불구하고, 이러한 신장은 본 발명에 따른 펩티드의 세포 안으로의 효율적인 도입에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현에서, 펩티드는, 예를 들어 NCBI, GenBank Accession-number X00497에서 유도된 것처럼 HLA-DR 항원-결합 불변 쇄(p33, 다음의 "Ii")의 80개 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질의 일부이다. 다른 융합에서는, 본 발명의 펩티드는 항체에 의해 특이적으로 표적이 될 수 있도록 본원에 기술된 상기 항체 또는 그 기능적 일부, 특히 항체의 서열에 대해, 또는, 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체에 대해 또는 그 안으로 융합될 수 있다.
- [0190] 추가적으로, 펩티드 또는 변이체는 안정성 및/또는 MHC 분자와의 결합성을 높여 더 강한 면역 반응을 일으킬 수 있도록 변형될 수 있다. 펩티드 서열의 최적화를 위한 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있고, 예를 들어 반대 펩티드 결합 또는 비-펩티드 결합을 도입하는 것이 있다.
- [0191] 반대 펩티드 결합에서는 아미노산 잔기가 펩티드(-CO-NH-) 연결로 결합되어 있지 않으나 펩티드 결합이 반대로 되어 있다. 이러한 역-인버스 펩티드 모방형 물질은 이 분야에서 잘 알려진 방법으로 생성될 수 있고, 이 방법의 예는 이 문헌의 참조문헌으로 포함된 메지레 등(1997)의 문헌(Meziere et al., 1997)이다. 이 방법은 백본의 변경을 포함하지만, 측쇄의 방향을 바꾸지 않는 유사펩티드를 만드는 것을 포함한다. 메지레 등(Meziere et al., 1997)은 MHC 결합과 T 조력 세포 반응에서 이 유사 펩티드가 유용하다는 것을 나타낸다. CO-NH 펩티드 결합 대신에 NH-CO 결합을 포함하는 역-인버스 펩티드는 단백질 가수분해에 대한 저항력이 훨씬 높다.
- [0192] 비-펩티드 결합의 예는 -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, 및 -CH₂SO-이다. 미국 특허 공보 제4,897,445호는 기본 과정을 거쳐 합성된 폴리펩티드와 아미노 알데히드와 아미노산을 NaCNBH₃ 존재 하에 반응시켜 생성된 비-펩티드 결합을 포함한 폴리펩티드 쇄의 비-펩티드 결합(-CH₂-NH) 고체상 합성의 방법을 제공한다.
- [0193] 상기 기술된 서열을 가지고 있는 펩티드는 안정성, 생물가용성 및/또는 펩티드의 친화도를 증가시키기 위해 아미노 및/또는 카복시 말단에 존재하는 추가적인 화학기에 의해 합성될 수도 있다. 예를 들어, 카보벤족실, 단실 또는 t-부틸옥시카보닐 기 등의 소수성기가 펩티드의 아미노 말단에 추가될 수 있다. 비슷하게, 아세틸 기

또는 9-플루오레닐메톡시-카보닐-기가 펩티드의 아미노 말단에 위치할 수도 있다. 또한, 소수성 기, t-부틸옥시 카보닐, 또는 아미도 기 또한 펩티드의 카복시 말단에 추가될 수 있다.

- [0194] 또한, 본 발명의 펩티드는 그들의 입체 배열을 변화시키기 위해 생성될 수도 있다. 예를 들어, 펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기의 D-이성질체가 보통의 L-이성질체 대신에 사용될 수도 있다. 더 나아가서, 본 발명의 펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기가 비-자연적으로 일어나는 아미노산 잔기에 의해 치환될 수도 있다. 이와 같은 변화는 안정성, 생물가용성, 및/또는 본 발명의 펩티드의 결합 작용을 증가시킬 수 있다.
- [0195] 유사하게, 본 발명의 펩티드 또는 변이체는 특정한 아미노산을 펩티드 생성 전 또는 후에 반응시킴으로써 화학적으로 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예는 이 분야에서 잘 알려져 있고, 예를 들어 본원에 참조로 혼입된 문헌(R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2004)(Lundblad, 2004)에 잘 기술되어 있다. 아미노산의 화학 변형은 아실화, 아미딘화, 리신의 피리독실화, 환원성 알킬화 반응, 아미노산의 2,4,6-트라이니트로벤젠 설포화(TNBS)에 의한 트라이니트로벤질화, 카복실 기의 아미드 변형 및 퍼포름산에 의한 설피드릴 변형, 시스틴의 시스테릭산으로의 산화, 머큐리얼 유도체 생성, 다른 티올 화합물에 의한 혼합 다이설피드 생성, 말레이미드와의 반응, 요오드화 아세트산 또는 요오드 아세트아미드에 의한 카복시메틸화 및 알칼리성 pH에서의 사이안산 염에 의한 카바밀화를 포함하지만 이에 국한되지 않은 변형을 말한다. 이에 관해서, 당업자는 더 광대한 단백질의 화학 변형에 대한 방법론에 대해서는 문헌(*Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000))(Coligan et al., 1995)의 15장을 참조하길 바란다.
- [0196] 간단히 말하면, 예를 들어 단백질의 아르기닌 잔기는 흔히 페닐글리옥산, 2,3-부탄디온 및 1,2-사이클로헥산디온과 같은 근접한 디카보닐 화합물과의 반응에 근거하여 부가물을 형성한다. 다른 예는 메틸글로옥산과 아르기닌 잔기와의 반응이다. 시스테인은 리신 및 히스티딘과 같은 다른 친핵성 부위의 동시 변형 없이 변형시킬 수 있다. 그 결과, 다수의 시약들이 시스테인 변형에 사용가능하다. Sigma-Aldrich(<http://www.sigma-aldrich.com>)와 같은 회사들의 웹사이트에서는 특정한 시약에 관한 정보를 제공하고 있다.
- [0197] 단백질에서 이황화 결합의 선택적 환원 또한 흔하다. 단백질에서 이황화 결합은 생물약제의 열 처리 동안 형성되어 산화될 수 있다. 우드워드 시약 K는 특정 글루탐산 잔기의 변형에 사용될 수 있다. N-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N'-에틸카보디이미드를 사용하여 리신 잔기와 글루탐산 잔기 사이의 분자내 가교를 형성할 수 있다. 예를 들어, 다이에틸피로카보네이트는 단백질에서 히스티딘 잔기의 변형을 위한 시약이다. 히스티딘은 4-히드록시-2-노네날을 사용하여 변형시킬 수 있다. 리신 잔기와 다른 α-아미노기의 반응은, 예를 들어, 펩티드의 표형 결합 또는 단백질/펩티드들의 가교에 유용하다. 리신은 폴리(에틸렌)글리콜의 부착의 부위이며 단백질의 당화에서 중요 변형 부위이다. 단백질에서 메티오닌 잔기는, 예를 들어 요오도아세트아미드, 브로모에틸아민 및 클로르아민 T를 사용하여 변형시킬 수 있다.
- [0198] 테트라니트로메탄 및 N-아세틸이미다졸은 티로신 잔기의 변형에 사용할 수 있다. 디티로신의 형성을 통한 가교 형성은 과산화 수소/구리 이온으로써 성취할 수 있다.
- [0199] 트립토판의 변형에 대한 최근의 연구에서는 N-브로모숙신이미드, 브롬화 2-히드록시-5-니트로벤질 또는 3-브로모-3-메틸-2-(2-니트로페닐메르캅토)-3H-인돌(BPNS-스카톨)이 사용된 바 있다.
- [0200] PEG를 이용한 치료용 단백질과 펩티드의 성공적인 변형은 흔히 동시 순환 반감기를 증가시키는 것과 연관되어 있는 반면, 단백질과 글루타르알데히드, 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트 및 포름알데히드와 교차 결합이 히드로겔의 제조에 사용된다. 면역 치료를 위한 알레르겐의 화학적 변형은 종종 칼륨 시안산염의 카바밀화와 관련이 있다.
- [0201] 펩티드가 변환되거나 비-펩티드 결합을 포함하는 펩티드 또는 변이체가 본 발명의 구현에서 바람직하다.
- [0202] 본 발명의 또 다른 구현은 비자연적으로 발생하는 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되며 약학적으로 허용가능한 염으로 합성적으로 생산되었다(예컨대, 합성되었다). 펩티드를 합성적으로 생성하는 방법들은 당업계에서 잘 알려져 있다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 생체내 상태(들)에서의 펩티드와 실질적으로 다르며, 이는 생체 내에서 생성된 펩티드는 염이 아니기 때문이다. 펩티드의 비자연적 염 형태는 특히, 예를 들어 여기서 공개된 펩티드 백신과 같이 펩티드를 포함하는 약학 조성물의 맥락에서 상기 펩티드의 용해도를 매개한다. 치료할 시험 대상자에게 펩티드를 효율적으로 제공하기 위해서는 충분하며 적어도 실질적인 펩티드(들)의 용해도가 요구된다. 바람직하

계, 상기 염은 펩티드의 약학적으로 허용되는 염이다. 본 발명에 따른 이러한 염에는 음이온으로 PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- , 및 양이온으로 NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} 및 Ba^{2+} 를 포함하는 계열의 염과 같은 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 염이 포함된다. 특히 염은 $(NH_4)_3PO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4CH_3COO , NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , Rb_4CH_3COO , Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , $KClO_4$, KI , $KSCN$, Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , $NaCH_3COO$, $NaCl$, $NaBr$, $NaNO_3$, $NaClO_4$, NaI , $NaSCN$, $ZnCl_2$, Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , $CsCH_3COO$, $CsCl$, $CsBr$, $CsNO_3$, $CsClO_4$, CsI , $CsSCN$, Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , $LiCH_3COO$, $LiCl$, $LiBr$, $LiNO_3$, $LiClO_4$, LiI , $LiSCN$, Cu_2SO_4 , $Mg_3(PO_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $Mg(H_2PO_4)_2$, Mg_2SO_4 , $Mg(CH_3COO)_2$, $MgCl_2$, $MgBr_2$, $Mg(NO_3)_2$, $Mg(ClO_4)_2$, MgI_2 , $Mg(SCN)_2$, $MnCl_2$, $Ca_3(PO_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $Ca(H_2PO_4)_2$, $CaSO_4$, $Ca(CH_3COO)_2$, $CaCl_2$, $CaBr_2$, $Ca(NO_3)_2$, $Ca(ClO_4)_2$, CaI_2 , $Ca(SCN)_2$, $Ba_3(PO_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $Ba(H_2PO_4)_2$, $BaSO_4$, $Ba(CH_3COO)_2$, $BaCl_2$, $BaBr_2$, $Ba(NO_3)_2$, $Ba(ClO_4)_2$, BaI_2 및 $Ba(SCN)_2$ 으로부터 선택된다. 특히 바람직하게는, 예를 들어 염화물 또는 아세트산염(트라이플루오로아세트산)과 같은 NH 아세테이트, $MgCl_2$, KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , $NaCl$ 및 $CaCl_2$ 이다.

[0203] 보통, 펩티드와 변이체(적어도 펩티드 연결기를 아미노산 잔기 사이에 포함하는 것들)는 본원에 참조로 혼입된 루카스(Lukas) 등의 문헌(Lukas et al., 1981) 및 이에 인용된 문헌에 개시된 고체상 펩티드 합성의 Fmoc-폴리아미드 모드에 의해 합성될 수 있다. 일시적인 N-말단기 보호는 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(Fmoc)에 의해 제공된다. 이렇게 염기 불안정한 보호기의 반복적인 절단은 N,N-다이메틸포름아미드의 20% 피페리딘을 이용하여 이루어진다. 측쇄 작용기는 부틸 에터(세린, 트레오닌 및 티로신의 경우), 부틸 에스터(글루탐산 및 아스파르트산의 경우), 부틸옥시카보닐 유도체(리신과 히스티딘의 경우), 트라이틸 유도체(시스테인의 경우) 및 4-메톡시-2,3,6-트라이메틸벤젠술폰닐 유도체(아르기닌의 경우)로서 보호될 수 있다. 글루타민 또는 아스파라긴이 C-말단의 잔기인 경우, 4,4'-디메톡시벤즈히드릴이 사용되어 측쇄 아미도 작용기를 보호한다. 고체상 지지체 다이메틸아크릴아미드(백본-단량체), 비스아크릴로일에틸렌 디아민(가교 결합) 및 아크릴로일사르코신 메틸 에스터(작용제)의 3개의 단량체로 만들어진 폴리다이메틸-아크릴아미드 중합체에 기반을 둔다. 펩티드-대-레진 절단가능 연결 작용제로 사용되는 것은 산-불안정 4-히드록시메틸-페녹시아세트산 유도체이다. 모든 아미노산 유도체는 역 N,N-디사이클로헥실-카보다이미드/1-히드록시벤조트라이아졸에 의한 커플링 과정에 의해 추가되는 아스파라긴과 글루타민을 제외하여 미리 생성된 대칭의 무수물 유도체로서 추가된다. 모든 커플링과 탈보호 반응은 닌히드린, 트라이니트로벤젠 술폰산 또는 이소틴 실험 과정에 의해 모니터링된다. 합성 완성 시에, 펩티드는 50% 스캐빈저 믹스를 포함한 95% 트라이플루오로아세트산에 의한 측쇄 보호기 제거와 동시에 레진 지지체로부터 절단된다. 일반적으로 사용되는 스캐빈저는 에탄디올, 페놀, 아니솔 및 물을 포함하고, 정확한 선택은 합성되는 펩티드를 구성하는 아미노산에 따라 달라진다. 또한, 펩티드의 합성에서 고체상 및 용액상의 조합 방식도 가능하다(예를 들어, 문헌(Bruckdorfer et al., 2004) 및 이에 인용된 참조문헌 참고).

[0204] 트라이플루오로아세트산은 진공하 증발에 의해 제거되고 그 이후 다이에틸 에터에 의한 분쇄로 조 펩티드를 얻는다. 존재하는 일체의 스캐빈저는 수성상의 냉동건조로써 스캐빈저가 없는 조 펩티드를 생성하는 간단한 추출 과정에 의해 제거된다. 펩티드 합성 시약들은 일반적으로, 예를 들어 Calbiochem-Novabiochem(영국 노팅햄)으로부터 얻을 수 있다.

[0205] 정제는 재결정화, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 예를 들어 아세트니트릴/물 구배 분리를 사용하는 (대개) 액상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 기법의 하나 또는 그 조합에 의해 수행할 수 있다.

[0206] 펩티드의 분석은 박막 크로마토그래피, 전기 이동, 특히 모세관 전기 이동, 고체상 추출(CSPE), 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 산 가수분해 후 아미노산 분석 및 고속 원자 폭격(FAB) 질량 분광분석, 및 MALDI와 ESI-QTOF 질량 분광분석 등에 의해 이루어진다.

[0207] 질량 분석에 의한 HLA 리간드의 동정 및 상대적 정량화를 위해, 충격동결된 조직 샘플에서 얻어진 HLA를 정제하고 HLA-연관 펩티드를 단리했다. 단리된 펩티드는 분리하여 그 서열을 온라인 나노-전기분무-이온화(nanoESI) 액체 크로마토그래피-질량 분석(LC-MS) 실험에 의해 식별했다. 만성 림프구성 백혈병(N = 35개 샘플), 만성 골

수성 백혈병(N = 16개 샘플) 및 급성 골수성 백혈병(N = 32개 샘플)으로부터 기록된 자연적 종양 관련 펩티드 (TUMAP)의 단편 패턴을 동등한 서열을 가진 상응하는 합성 참조 펩티드의 과편 패턴과 비교하여, 얻어진 펩티드 서열을 확인했다. 펩티드는 원발성 종양의 HLA 분자의 리간드로서 직접 식별되었기 때문에, 그 결과는 83명의 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 환자에서 얻어진 원발 종양 조직에 대해 식별된 펩티드의 자연적 처리와 제시에 대한 직접적 증거를 제공한다(실시예 1 참조).

- [0208] 발견 파이프라인 XPRESIDENT(등록상표) v2.1(예를 들어, 전체내용이 본원에 혼입되는 US 2013/0096016을 참고)은 몇 가지 다른 비암성 조직 및 기관에 비해 암 조직에 대한 HLA-제한 펩티드 수준의 직접적인 상대적 정량화를 기준으로 관련 있는 과다-제시된 펩티드 백신 후보의 식별과 선택을 허용한다. 이는 서열 식별, 스펙트럼 집락화, 이온 계수화, 정제 시간 정렬, 전하 상태 디컨볼루션 및 정상화에 필요한 알고리즘을 조합시킨 독점 데이터 분석 파이프라인에 의해 처리하여 획득한 LC-MS 데이터를 사용한 표지-부재 차등 정량화의 개발에 의해 성취되었다.
- [0209] 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 조직 샘플에서 얻은 HLA-펩티드 복합체를 정제하고 HLA-연관 펩티드를 LC-MS로 분리하여 분석했다(실시예 1 참조). 원발성 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 샘플에 대한 이러한 접근 방식을 통해 본원에 포함된 모든 TUMAP를 식별했으며, 원발성 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병에 대한 제시가 확인되었다.
- [0210] 펩티드의 제시 이외에, 기저 유전자의 mRNA 발현을 시험했다. 정상 조직 및 암 조직의 RNASeq 분석을 통해 mRNA 데이터를 획득했다(실시예 2, 도 1 참조). 코딩 mRNA가 암 조직에서 고도로 발현되지만 필수 정상 조직에서는 매우 낮거나 부재하는 단백질들로부터 유래된 펩티드는 본 발명에 바람직하게 포함되었다.
- [0211] 본 발명은 본 발명의 펩티드를 과다 또는 배타적으로 제시하는 암/종양, 바람직하게는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 치료에 유용한 펩티드를 제공한다. 이 펩티드는 질량 분석법에 의해 원발성 인간 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 샘플 상에서 HLA 분자에 의해 자연적으로 제시되는 것으로 나타났다.
- [0212] 이 펩티드들이 유래된 다수의 출처 유전자/단백질("전장 단백질" 또는 "기저 단백질"로도 지정됨)을 정상 조직에 비해 암에서 고도로 과발현되는 것으로 나타났다(본 발명과 관련하여 "정상 조직"은 출처 유전자의 종양 연관 정도가 높은 것을 나타내는 건강한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 기타 정상 조직 세포를 의미한다)(실시예 2 참조). 더욱이 펩티드 자체는 종양 조직(본 발명과 관련하여 "종양 조직"이란 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병을 앓는 환자의 샘플을 의미한다) 상에서 제시되지만 정상 조직 상에서는 그렇지 않다.
- [0213] HLA-결합된 펩티드는 면역계, 특히 T 림프구에 의해서 인식될 수 있다. T 세포는 인식되는 HLA/펩티드 복합체를 제시하는 세포, 예를 들어, 유도된 펩티드를 제시하는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 세포를 파괴할 수 있다.
- [0214] 본 발명의 펩티드는 T 세포 반응을 자극할 수 있고/거나 과다-제시되는 것으로 나타났으므로, 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR, 예컨대 sTCR의 생산에 사용될 수 있다(실시예 3 및 4 참조). 더욱이, 해당되는 MHC와 결합된 펩티드는 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR, 예컨대 sTCR의 생산에도 사용될 수 있다. 해당 방법들은 당업자에게 잘 알려져 있고 해당 문헌에서도 찾을 수 있다(또한 하기 참조). 따라서, 본 발명의 펩티드는 환자의 종양 세포를 파괴할 수 있는 면역 반응을 생성하는 데 유용하다. 환자의 면역 반응은 설명된 펩티드의 직접적인 투여 또는 면역원성을 강화할 수 있는 제제(즉, 보조제)와 조합으로 적당한 전구체 물질(예를 들어, 연장된 펩티드, 단백질, 또는 이러한 펩티드를 인코딩하는 핵산)을 환자에게 투여하는 것으로 유도될 수 있다. 이런 치료적 백신접종에서 생길 면역 반응은 본 발명의 목적 펩티드가 비교가능한 복사수로 정상 조직에서는 나타나지 않고, 환자의 정상 세포에 대한 기피되는 자기 면역 반응의 위험을 배제하기 때문에 종양 세포에 아주 특이적일 수 있다.
- [0215] 본 발명은 α 쇄 및 β 쇄(" α/β TCR")를 포함하는 T 세포 수용체(TCR)에 관한 것이다. 또한 MHC 분자에 의해 제시되는 경우 TCR 및 항체에 결합할 수 있는 본 발명에 따른 펩티드가 제공된다.
- [0216] 본 설명은 또한 HLA 분자에 의해 제시될 때 본 발명에 따른 펩티드 항원에 결합할 수 있는 본 발명에 따른 TCR의 단편들에 관한 것이다. 이 용어는 특히 예를 들어 막형단 부분 및/또는 불변 부위가 누락된 TCR과 같은 가용성 TCR 단편, 단쇄 TCR 및 예를 들어 Ig와 같은 이에 대한 융합에 관한 것이다.
- [0217] 본 설명은 또한 본 설명의 TCR 및 펩티드를 발현하는 핵산, 벡터 및 숙주 세포; 그리고 이를 사용하는 방법에

관한 것이다.

- [0218] 용어 "T 세포 수용체"(약자로 TCR)는 α 폴리펩티드 쇠(α 쇠) 및 β 폴리펩티드 쇠(β 쇠)를 포함하는 이질이 합체 분자를 지칭하며, 여기서 이질이합체 수용체는 HLA 분자에 의해 제시된 펩티드 항원에 결합하는 능력이 있다. 이 용어는 소위 γ/δ TCR 또한 포함한다.
- [0219] 한 구현에서, 본 발명은 본원에 기술된 대로 TCR의 생산 방법을 제공하며, 이 방법은 TCR의 발현 촉진에 적합한 조건 하에서 TCR을 발현할 수 있는 숙주 세포의 배양을 포함한다.
- [0220] 본 발명은 다른 양태에서, 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 충분한 수량의 항원을 항원-제시 세포와 접촉 시킴으로써 그 항원이 적합한 항원-제시 세포 또는 인공 항원-제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩되거나 항원/클래스 I 또는 II MHC 복합체 단량체의 사랑체화에 의해 그 항원이 클래스 I 또는 II MHC 사합체 위에 로딩된다.
- [0221] α/β TCR의 α 및 β 쇠 및 γ/δ TCR의 γ 및 δ 쇠는 일반적으로 각각 2개의 "도메인", 즉, 가변 및 불변 도메인을 갖는 것으로 간주된다. 가변 도메인은 가변 영역(V) 및 결합 영역(J)의 연계로 구성된다. 가변 도메인은 리더 영역(L) 또한 포함할 수 있다. β 및 δ 쇠 또한 다양성 영역(D)을 포함할 수 있다. α 및 β 불변 도메인은 또한 α 및 β 쇠를 세포막에 고정시키는 C-말단 막횡단(TM) 도메인을 포함할 수 있다.
- [0222] γ/δ TCR에 대하여, 본원에 사용된 용어 "TCR γ 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR γ V(TRGV) 영역과 TCR γ J(TRGJ) 영역의 연계를 지칭하며, 또한 용어 TCR γ 불변 도메인은 세포의 TRGC 영역 또는 C-말단 절두된 TRGC 서열을 지칭한다. 마찬가지로 용어 "TCR δ 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR δ V(TRDV) 영역과 TCR δ D/J(TRDD/TRDJ) 영역의 연계를 지칭하며, 용어 "TCR δ 불변 도메인"은 세포의 TRDC 영역 또는 C-말단 절두된 TRDC 서열을 지칭한다.
- [0223] 본 발명의 TCR은 바람직하게는 결합 친화도(KD)가 약 100 μ M 이하, 약 50 μ M 이하, 약 25 μ M 이하 또는 약 10 μ M 이하인 펩티드-HLA 분자 복합체에 결합한다. 더욱 바람직하게는, 결합 친화도가 약 1 μ M 이하, 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하를 갖는 고친화도 TCR이다. 본 발명의 TCR에 대한 바람직한 결합 친화도 범위의 비제한적인 예는 약 1 nM 내지 약 10 nM, 약 10 nM 내지 약 20 nM, 약 20 nM 내지 약 30 nM, 약 30 nM 내지 약 40 nM, 약 40 nM 내지 약 50 nM, 약 50 nM 내지 약 60 nM, 약 60 nM 내지 약 70 nM, 약 70 nM 내지 약 80 nM, 약 80 nM 내지 약 90 nM 및 약 90 nM 내지 약 100 nM을 포함한다.
- [0224] 본 발명의 TCR와 관련하여 본원에 사용되는 "특이적 결합" 및 그 문법적 변형어는 100 μ M 이하의 펩티드-HLA 분자 복합체에 대한 결합 친화도(KD)를 갖는 TCR을 의미하는 것으로 사용된다.
- [0225] 본 발명의 α/β 이질이합체 TCR은 그 불변 도메인 사이에 도입된 이황화 결합을 가질 수 있다. 이러한 유형의 바람직한 TCR에는 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 서열을 갖는 것들이 포함되는 데, TRAC의 Thr 48 및 TRBC1 또는 TRBC2의 Ser 57이 시스테인 잔기로 교체는 경우는 예외로, 상기 시스테인은 TCR의 TRAC 불변 도메인 서열과 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 사이에 이황화 결합을 형성한다.
- [0226] 위에서 언급한 도입된 쇠간 결합의 유무에 관계 없이, 본 발명의 α/β 이질이합체 TCR은 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 서열을 가질 수 있고, TCR의 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 서열은 TRAC의 엑손 2의 Cys4와 TRBC1 또는 TRBC2의 엑손 2의 Cys2 사이에 있는 자연 이황화 결합에 의해 연계될 수 있다.
- [0227] 본 발명의 TCR은 방사성핵종, 형광단 및 비오틴으로 구성되는 군으로부터 선택되는 검출가능한 라벨을 포함할 수 있다. 본 발명의 TCR은 방사성핵종, 화학요법제, 독소와 같은 활성 치료제에 접합될 수 있다.
- [0228] 한 구현에서, α 쇠에 1개 이상의 돌연변이를 갖고/갖거나 β 쇠에 1개 이상의 돌연변이를 갖는 본 발명의 TCR은 돌연변이되지 않은 TCR에 비해 변형된 당화를 갖는다.
- [0229] 한 구현에서, TCR α 쇠에 1개 이상의 돌연변이를 갖고/갖거나 TCR β 쇠에 1개 이상의 돌연변이를 갖는 TCR은 펩티드-HLA 분자 복합체에 대해 결합 친화도 및/또는 결합 반감기를 갖고, 이는 비돌연변이 TCR α 쇠 및/또는 비돌연변이 TCR β 쇠를 포함하는 TCR의 그것에 대해 2배 이상이다. 종양 특이적 TCR의 친화도 강화 및 그 이용은 최적의 TCR 친화도에 대한 범위의 존재에 의존한다. 그러한 범위의 존재는, HLA-A2 제한 병원체에 특이적인 TCR의 KD 값이 HLA-A2 제한 종양 관련 자가 항원에 특이적인 TCR에 대해 일반적으로 약 10배 낮다는 관찰에 근거한다. 현재 종양은 개인 자체의 세포로부터 발생하기 때문에 종양 항원이 면역성일 수 있음에도 불구하고, 돌연변이된 단백질, 또는 변형된 번역 처리를 가진 단백질질이 면역계에 의해 이물질로 보이게 된다. 상향조절되

거나 과발현되는 항원(소위 자가 항원)이 반드시 종양에 대한 기능적 면역 반응을 유도하지는 않을 것이고, 이러한 항원에 고도로 반응성인 TCR을 발현하는 T 세포는 중추 관용이라고 알려진 과정에서 흉선 내부로부터 음으로 선택되었을 것이며, 이것은 자가 항원에 대해 낮은 친화도 TCR을 가진 T 세포만 남는다는 것을 의미한다. 따라서, 본원의 TCR 또는 변이체의 펩티드에 대한 친화도는 당업계에서 잘 알려진 방법들로 강화되어 왔다.

- [0230] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCR의 식별 및 단리 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 HLA-A*02 음성의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 A2/펩티드 단량체와 함께 배양하는 단계, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양하는 단계, 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의해 고결합성 T 세포를 단리하는 단계를 포함한다.
- [0231] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCR의 식별 및 단리 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 레퍼토리를 발현하는 전체 인간 TCR α β 유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자이식 마우스의 획득, 펩티드에 의한 마우스의 면역접종, 유전자이식 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)으로의 배양, 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 단리를 포함한다.
- [0232] 한 양태에서, 본 발명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 본 발명의 TCR- α 및/또는 TCR- β 쇄를 인코딩하는 핵산을 γ 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 발현 벡터로 클로닝한다. 재조합 바이러스를 생성한 다음 항원 특이성 및 기능적 결합성과 같은 기능성에 대해 시험했다. 다음에는 최종 생성물의 분취물을 사용하여 표적 T 세포 모집단(일반적으로 환자 PBMC로부터 정제된)을 형질도입하며, 모집단은 환자에 주입하기 전에 팽창된다.
- [0233] 또 다른 양태에서, 본 발명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 당업계에서 알려진 기법(예컨대, 시험관내 전사 시스템)으로 TCR RNA를 합성한다. 다음에는 시험관 내에서 합성된 TCR RNA를 종양 특이적 TCR- α 및/또는 TCR- β 쇄의 재발현을 위하여, 전기천공에 의해 건강한 공여자로부터 얻은 일차 CD8+ T 세포 내로 도입시킨다.
- [0234] 이러한 발현을 증가시키려면, 본 발명의 TCR을 인코딩하는 핵산을 레트로바이러스 긴 말단 반복(LTR), 거대세포 바이러스(CMV), 쥐 줄기세포 바이러스(MSCV) U3, 포스포글리세레이트 키나제(PGK), β -액틴, 유비퀴틴 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)/CD43 복합 프로모터, 연장 인자 (EF)-1a, 비장 포커스-형성 바이러스(SFFV) 프로모터와 같은 강력한 프로모터에 작동하도록 연계시킬 수 있다. 바람직한 한 구현에서, 이 프로모터는 발현되고 있는 핵산에 대해 이중이다.
- [0235] 강력한 프로모터 외에도, 본 발명의 TCR 발현 카세트가 도입 유전자 발현을 강화시킬 수 있는 추가의 요소를 포함할 수 있고, 여기에는 렌티바이러스 구성(Follenzi et al., 2000)의 핵 전위를 촉진시키는 중추 폴리퓨린 관(cPPT), 및 RNA 안정성의 증가로 도입 유전자 발현을 증가시키는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절요소(wPRE)(Zufferey et al., 1999)가 포함된다.
- [0236] 본 발명의 TCR의 α 및 β 쇄는 별개의 벡터에 위치한 핵산에 의해 인코딩될 수 있거나 동일한 벡터에 위치한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0237] 높은 수준의 TCR 표면 발현을 성취하려면 도입된 TCR의 TCR- α 및 TCR- β 쇄가 높은 수준으로 전사되는 것이 요구된다. 이를 위해서, 본 발명의 TCR- α 및 TCR- β 쇄를 단일 벡터에서 바이시스트로닉(bicistronic) 구성으로 클로닝할 수 있고, 이는 이러한 장애를 극복할 수 있는 것으로 나타났다. TCR- α 및 TCR- β 쇄 사이의 바이러스성 내재 리보솜 진입 부위(IRES)의 사용은 두 쇄의 조율된 발현을 초래하며, 이는 TCR- α 및 TCR- β 쇄가 번역 도중 2개의 단백질로 파괴되는 단일 전사체로부터 생성되어 TCR- α 및 TCR- β 쇄의 동등한 몰비의 생산을 보장하기 때문이다(Schmitt et al., 2009).
- [0238] 본 발명의 TCR을 인코딩하는 핵산은 코돈 최적화에 의해 숙주 세균으로부터의 발현을 증가시킬 수 있다. 유전자 코드의 반복성은 하나를 초과하는 코돈에 의해 일부의 아미노산 인코딩을 허용하지만, 일부 코돈은 다른 코돈에 비해 "최적" 미만이며 이것은 일치하는 tRNA 및 다른 요인들의 상대적 가용성 때문이다(Gustafsson et al., 2004). 각 아미노산이 포유류 유전자 발현을 위한 최적의 코돈에 의해 인코딩되도록 TCR- α 및 TCR- β 유전자 서열의 변경 및 mRNA 불안정성 또는 잠재 스플라이스 부위의 제거는 TCR- α 및 TCR- β 유전자 발현을 유의하게 강화시키는 것으로 나타났다(Scholten et al., 2006).
- [0239] 더욱이, 도입된 TCR 및 내생 TCR 사이의 틀린 짝짓기는 자가면역성에 대해 유의한 위험을 제기하는 특이성의 획득을 초래할 수 있다. 예를 들어, 혼합된 TCR 이합체의 형성은 적절하게 짝지어진 TCR 복합체의 형성에 이용할 수 있는 CD3 분자의 수를 감소시킬 수 있으므로, 도입된 TCR을 발현하는 세포의 기능적 결합성을 유의하게 감소

시킬 수 있다(Kuball et al., 2007).

- [0240] 틀린 짝짓기를 감소하기 위해 도입된 쇠의 내생 TCR과의 짝짓기 능력은 감소시키면서 쇠간 친화도를 촉진시키기 위해 본 발명의 도입된 TCR 쇠의 C-말단 도메인을 변형시킬 수 있다. 이러한 전략에는 인간 TCR- α 및 TCR- β C-말단 도메인을 이의 쥐 상대물로 교체(쥐 C-말단 도메인), 제2 시스틴 잔기를 도입된 TCR의 TCR- α 및 TCR- β 쇠로 도입하여 C-말단 도메인의 제2 쇠간 이황화 결합의 생성(시스틴 변형), TCR- α 및 TCR- β 쇠의 C-말단 도메인에서 상호작용하는 잔기의 교환("늑-인-홀(knob-in-hole)"), 및 TCR- α 및 TCR- β 쇠의 가변 도메인을 CD3 ζ 에 직접 융합(CD3 ζ 융합) 등이 포함될 수 있다(Schmitt et al., 2009).
- [0241] 한 구현에서, 숙주 세포는 본 발명의 TCR을 발현하도록 유전자조작된다. 바람직한 한 구현에서, 숙주 세포는 인간 T 세포나 T 세포 전구세포이다. 일부 구현에서, 이 T 세포나 T 세포 전구세포는 암 환자로부터 얻는다. 다른 구현에서, 이 T 세포나 T 세포 전구세포는 건강한 공여자로부터 얻는다. 본 발명의 숙주 세포는 치료할 환자에 대해 동종 또는 자가 세포이다. 한 구현에서, 숙주는 α/β TCR을 발현하도록 형질전환된 γ/δ T 세포이다.
- [0242] "약학 조성물"이란 의학적 환경에서 인간에서 투여하기에 적합한 조성물이다. 바람직하게, 약학 조성물은 무균 상태이며 GMP 지침에 따라 생산된다.
- [0243] 약학 조성물은 유리 형태 또는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 된 펩티드를 포함한다(위의 내용 참조). 본원에 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 염"은 펩티드가 체액의 산 또는 염기 염을 만들며 변형되는 공개된 펩티드의 유도체를 말한다. 예를 들어, 산성 염은 적당한 산과의 반응을 가진 자유 염기(일반적으로 중성 NH_2 기가 있는 약물의 중성 형태)로부터 제조된다. 산성 염을 제조할 때 적당한 산은, 예를 들어, 염산, 브롬화 수소산, 황산, 질산, 인산과 같은 무기산뿐만 아니라 초산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 수산, 말산, 말론산, 호박산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 벤조산, 계피산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산과 같은 유기산을 포함한다. 반대로, 펩티드에서 나타날 수 있는 산성 모이어티의 염기 염의 제조는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 트라이메틸아민과 같은 약학적으로 허용가능한 염기를 사용한다.
- [0244] 특별히 바람직한 구현에서, 약학 조성물은 아세트산(아세테이트), 트라이플루오로아세테이트 또는 염산(염화물)의 염으로 펩티드를 포함한다.
- [0245] 바람직하게는, 본 발명의 약제는 백신과 같은 면역치료제이다. 이는 환자의 영향을 받은 기관에 직접적으로 투여될 수 있거나 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.로서 전신에 투여되거나 환자에게서 또는 나중에 환자에게 투여될 인간 세포주에 생체의 적용될 수도 있거나 나중에 환자에게 다시 투여될 환자로부터 유래하는 면역 세포의 부분 집단의 선별에 시험관내 사용될 수도 있다. 만약 핵산이 시험관 내에서 세포에 투여되면, 인터루킨-2와 같은 면역 유도 시토카인과 함께 발현되도록 세포가 형질감염되는 것이 유용할 수도 있다. 펩티드는 상당히 순도가 높을 수도 있거나, 면역-자극 보조제(아래 참조)와 조합되어 있거나 면역-자극 시토카인과 조합으로 사용되거나, 리포솜과 같은 적당한 전달 체계와 함께 투여될 수도 있다. 펩티드는 또한 키흐 림펫 헤모시아닌(KLH) 또는 만난(WO 95/18145 및 문헌(Longenecker et al(1993)) 참조)과 같은 적당한 담체와 함께 복합될 수도 있다. 펩티드는 또한 꼬리표를 달거나 융합 단백질이거나 혼성 분자일 수도 있다. 본 발명에 서열이 주어진 이 펩티드들은 CD4 또는 CD8 T 세포를 자극할 것으로 기대한다. 하지만, CD8 T 세포의 자극은 CD4 T 조력 세포에 의해 제공되는 조력의 존재에 더 효율적이다. 따라서, CD8 CTL을 자극하는 MHC 클래스 I 에피토프의 경우, 융합 짝 또는 하이브리드 분자의 선택은 CD4-양성 T 세포를 자극하는 에피토프를 적절히 제공한다. CD4- 및 CD8-자극 에피토프는 이 분야에서 잘 알려졌고 본 발명에서 식별된 것들을 포함한다.
- [0246] 한 양태에서, 이 백신은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 펩티드 및 하나 이상의 추가적인 펩티드, 바람직하게는 2개 내지 50개, 더 바람직하게는 2개 내지 25개, 보다 더 바람직하게는 2개 내지 20개, 가장 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개의 펩티드를 포함한다. 펩티드(들)는 하나 이상의 특이적 TAA에서 유도되었고 이는 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합할 수 있다.
- [0247] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 펩티드 또는 펩티드 변이체를 인코딩하는 핵산(예를 들어, 폴리뉴클레오티드)을 제공한다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있고, 단일 가닥 및/또는 이중 가닥으로 되어 있을 수 있고, 또는 폴리뉴클레오티드의 자연(native) 또는 안정화 형태(예를 들어, 포스포로티오에이트 주골격을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드)일 수 있고, 펩티드를 코딩하는 한, 인트론을 포함할 수도 또는 그렇지 않을 수도 있다. 물론, 자연적으로 발생하는 펩티드 결합에 의해 결합된 자연적으

로 발생하는 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해서 인코딩될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 제공한다.

- [0248] 특히, DNA와 같은 폴리뉴클레오티드를, 예를 들어 상보적인 응집성 말단을 이용하여 연결하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들어, 상보적인 동중중합체 트래크가 벡터 DNA에 삽입될 DNA 분절에 추가될 수 있다. 벡터와 DNA 분절은 이후 상보적인 동중중합체 꼬리와 함께 수소 결합을 이용하여 결합되어 재조합 DNA 분자를 형성할 수 있다.
- [0249] 하나 이상의 제한 부위를 포함하는 합성 링커는 DNA 분절과 벡터를 결합하는 다른 방법을 제시한다. 여러 가지의 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는 합성 링커는 상업적으로 인터내셔널 바이오테크놀로지스 인코포레이티드(International Biotechnologies Inc, 미국 코네티컷주 뉴 헤이븐 소재)를 비롯한 곳에서 구입이 가능하다.
- [0250] 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA를 변형시키는 바람직한 방법은 사이키(Saiki) 등에 의해 공개된 바 있는 폴리머라아제 연쇄 반응을 이용한다(Saiki et al., 1988). 이 방법은, 예를 들어 적당한 제한 부위를 만들어 적당한 벡터로의 DNA 도입 또는 이 분야에서 알려져 있는 DNA를 다른 용도를 위해 변환하는 데 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용된다면, 수두- 또는 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.
- [0251] DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우 RNA)는 그 후 적당한 숙주에서 발현되어 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 DNA는 여기에 포함된 배울 수 있는 내용에 따라 적절히 수정된 알려진 기법에 의거하여 사용할 수 있고, 이는 본 발명의 폴리펩티드의 발현과 생성을 위해 적절한 숙주 세포를 형질전환시키는 데 사용된다. 이러한 기법은, 예를 들어 다음에 공개되어 있다: 미국 특허공보 제4,440,859호, 제4,530,901호, 제4,582,800호, 제4,677,063호, 제4,678,751호, 제4,704,362호, 제4,710,463호, 제4,757,006호, 제4,766,075호 및 제4,810,648호.
- [0252] 본 발명의 화합물을 구성하는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우, RNA)는 많은 종류의 다른 DNA 서열과 결합되어, 적당한 숙주로의 도입을 유도할 수 있다. 동반 DNA는 숙주의 특성, DNA를 숙주로 도입하는 방법, 및 에피소말 유지 또는 통합이 필요한 지에 따라 결정될 것이다.
- [0253] 보통, DNA는 발현을 위한 올바른 방향 및 올바른 리딩 프레임에 맞추어 플라스미드와 같은 발현 벡터로 삽입된다. 필요할 경우, DNA는 바람직한 숙주에 의해 인식되는 적당한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오티드 서열(하지만, 이 제어는 대부분의 경우 발현 벡터 내에 이미 존재한다)에 연결될 수도 있다. 벡터는 그 후 숙주로 기본적인 기술을 통해 도입된다. 보통, 모든 숙주가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포를 선택하는 것이 필요할 것이다. 하나의 선택 기술은 형질전환된 세포에서 선택가능한 특성(예컨대, 항생제 내성)을 코딩하는 DNA 서열을 필요한 제어 요소와 함께 발현 벡터에 통합시키는 것이다.
- [0254] 다른 방법으로는, 이러한 선택가능한 특성을 위한 유전자가 다른 벡터에 있을 수도 있고, 이는 바람직한 숙주 세포를 동시-형질전환하는 데 사용된다.
- [0255] 본 발명의 재조합 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본원에서 기술된 내용을 고려하여 당업자가 이미 알고 있는 적절한 상태에서 충분한 시간 동안 배양되어 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하며, 이는 후에 회복된다.
- [0256] 박테리아(예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*)과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류(예를 들어, 아스페르길스 스피시스(*Aspergillus species*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포 등의 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직하게는, 그 체계는 ATCC 셀 바이올로지 콜렉션(Cell Biology Collection)에서 구할 수 있는 CHO 세포 등의 포유류 세포일 수 있다.
- [0257] 구조성 발현을 위한 전형적인 포유류 세포 벡터 플라스미드는 CMV 또는 SV40 촉진제와 적당한 폴리 A 꼬리 및 네오마이신과 같은 저항 마커를 포함한다. 하나의 예는, 파마시아(Pharmacia, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)에서 구할 수 있는 pSVL이다. 유도가능 포유류 발현 벡터의 예는 pMSG이며 이 또한 파마시아에서 구할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 벡터는 pRS403-406과 pRS413-416이며 이는 대부분 스트라타젠 클로닝 시스템즈(Stratagene Cloning Systems, 미국 캘리포니아주 92037 라 줄라 소재)에서 구할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효소 통합 플라스미드(YIps)이며 이는 효소 선택 마커 HIS3, TRP1, LEU2와 URA3을 통합한다. 플라스미드 pRS413-416은 효소 동원체 플라스미드(Ycps)이다. (예를 들어, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 입수한) CMV 프로모터 기반 벡터는 일시적인 또는 안정된 발현, 세포질 발현 또는 분비, 및 FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT 등의 다양한 조합으로 N-말단 또는 C-말단 태깅 등을 제공한다. 이러한 융합 단

백질은 제조합 단백질의 감지, 정제와 분석을 가능하게 한다. 이중 태깅된 융합은 감지 시 유연성을 제공한다.

- [0258] 강한 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 조절 영역은 구성 단백질 발현 수준을 높이는 COS 세포에서 1mg/L까지 유도한다. 좀 더 효능이 약한 세포주에서는, 단백질 수준이 전형적으로 약 0.1mg/L이다. SV40 복제 원점이 있음으로써 SV40 복제가능 COS 세포에서 DNA 복제의 수준이 높은 결과를 낳는다. CMV 벡터는, 예를 들어 박테리아 세포에서의 복제를 위한 pMB1(pBR322의 유도체) 원점, 박테리아에서 압피실린 저항 선택을 위한 b-락타마아제 유전자, hGH poly A, 및 f1 원점을 포함할 수 있다. 프리-프로-트립신 리더(PPT) 서열을 포함하는 벡터는 FLAG 융합 단백질을 ANTI-FLAG 항체, 수지 및 플레이트를 사용하여 정제하기 위한 배양 배지로 분비하도록 방향을 정할 수가 있다. 다른 벡터와 발현 체계는 여러 가지의 숙주 세포 사용에 대해 널리 알려져 있다.
- [0259] 다른 구현에서는 본 발명의 2개 이상 펩티드 또는 펩티드 변이체가 인코딩됨으로써 연속적인 순서로 발현된다 ("염주 모양" 구조와 유사). 그렇게 함으로써 펩티드 또는 펩티드 변이체는, 예를 들어 LLLLLL과 같은 링커 아미노산의 퍼짐에 의해 함께 연결 또는 융합될 수 있거나, 그 사이에 추가의 펩티드 없이 연결될 수 있다. 이러한 구조들은 암 요법에서도 사용할 수 있고 MHC I 및 MHC II 모두가 연관되는 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0260] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 벡터 구성에 의해 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 박테리아 세포가 일부 상황에서 바람직한 원핵 숙주 세포일 수 있고, 보통 예를 들어 베테스다 리서치 래보러토리스 인코포레이티드(Bethesda Research Laboratories Inc., 미국 메릴랜드주 베테스다 소재)에서 구할 수 있는 대장균 균주 DH5, 및 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, ATCC)(미국 메릴랜드주 록빌 소재)에서 구할 수 있는 RR1(ATCC 31343)과 같은 대장균의 균주이다. 바람직한 진핵 숙주 세포는 효모, 곤충, 포유류 세포를 포함하고, 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유아세포와 대장 세포주 등의 척추동물 세포가 바람직하다. 효모 숙주 세포는 YPH499, YPH500 및 YPH501을 포함하며, 이는 대부분 스트라타젠 클로닝 시스템즈(미국 캘리포니아주 92037 라 줄라 소재)에서 구입가능하다. 바람직한 포유류 숙주 세포는 ATCC에서 구입가능한 CCL61로 알려져 있는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, CRL 1658로 알려져 있는 스위스 생쥐 배아 세포 NIH/3T3, ATCC에서 시판 중인 CRL 1650 세포로 알려져 있는 원숭이 신장 유도 COS-1 세포와 293 세포로 알려져 있는 인간 배아 신장 세포를 들 수 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이며 이는 배칼로바이러스 발현 벡터에 의해 형질감염될 수 있다. 발현을 위한 적당한 숙주 세포의 선택에 대한 개관은 예를 들어 문헌[Paulina Balbas and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9] 및 당업자에게 알려진 다른 문헌에서 찾을 수 있다.
- [0261] 적당한 세포 숙주를 본 발명의 DNA 구성으로 형질전환하는 것은 보통 사용되는 벡터의 유형이 따라 결정되는 잘 알려진 방법으로 완성된다. 원핵 숙주 세포의 형질전환에 대해서는, 예를 들어 코헨(Cohen) 등(Cohen et al., 1972) 및 문헌[Green and Sambrook, 2012]을 참고한다. 효모 세포의 형질전환은 셔만(Sherman) 등에 기술되어 있다(Sherman et al., 1986). 벅스(Beggs)의 방법 또한 유용하다(Beggs, 1978). 척추동물 세포와 관련하여 이러한 세포를 형질감염시키는 시약, 예를 들어 칼슘 인산염과 DEAE-덱스트란 또는 리포솜 제제는 스트라타젠 클로닝 시스템즈 또는 라이프 테크놀로지스 인코포레이티드(Life Technologies Inc., 미국 메릴랜드주 20877 게이 터스버그 소재)에서 입수할 수 있다. 전기 천공법 역시 세포를 형질전환 및/또는 형질감염시키는 데 유용하며 이는 효모 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포 및 척추동물 세포의 형질전환에 대해 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0262] 성공적으로 형질전환된 세포, 즉 본 발명의 DNA 구조를 가지고 있는 세포는 잘 알려진 PCR과 같은 기술로 식별된다. 다른 방법으로는, 상층액에 존재하는 단백질은 항생제를 사용함으로써 감지될 수 있다.
- [0263] 본 발명의 특정한 숙주 세포, 예를 들어 박테리아, 효모 및 곤충 세포와 같은 세포는 본 발명의 펩티드의 제조에 유용하다는 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다른 숙주 세포 또한 특정한 치료 방법에 유용할 수도 있다. 예를 들어, 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포는 적당한 MHC 분자에 로딩되도록 하는 본 발명의 펩티드를 발현하는 데 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0264] 바람직한 구현에서, 숙주 세포는 항원-제시 세포이며, 특히 수지상 세포 또는 항원-제시 세포이다. 전립선암 인산효소(PAP)를 함유하는 제조합 융합 단백질로 로딩된 APC는 무증상 또는 최소한의 증상성인 전이성 HRPC(Sipuleucel-T)의 치료에 대해 미국 식품안전청(FDA)에서 2010년 4월 29일에 승인되었다(Small EJ, et al.(Rini et al., 2006; Small et al., 2006).
- [0265] 본 발명의 다른 양태는 숙주 세포를 배양하고 펩티드를 숙주 세포 또는 배지에서 단리하는 것을 포함하는, 펩티

드 또는 이의 변이체를 생산하는 방법을 제공한다.

[0266] 펩티드의 다른 구현에 있어서, 본 발명의 핵산 또는 발현 벡터는 의약에서 사용된다. 예를 들어, 펩티드 또는 이의 변이체는 정맥내(i.v.) 주사, 피하(s.c.) 주사, 피내(i.d.) 주사, 복강내(i.p.) 주사, 근육내(i.m.) 주사 용으로 제조될 수 있다. 펩티드 주사의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m. 및 i.v. 투여를 포함한다. DNA 주사의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v. 투여를 포함한다. 예를 들어, 50 µg 내지 1.5 mg, 바람직하게는 125 µg 내지 500 µg의 용량의 펩티드 또는 DNA는 각각의 펩티드 또는 DNA에 따라서 투여될 수 있다. 이러한 범위의 용량이 이전의 임상시험에서 성공적으로 사용된 바 있다(Walter et al., 2012).

[0267] 활성 백신접종에 사용된 폴리뉴클레오티드는 상당히 순도가 높거나 적당한 벡터 또는 전달 체계에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 핵산을 설계하고 도입하는 방법은 이 업계에 잘 알려져 있다. 개요는, 예를 들어 투펠(Teufel) 등에 제공되어 있다(Teufel et al., 2005). 폴리뉴클레오티드 백신은 만들기가 쉽지만, 이들 벡터의 면역 반응을 유도하는 동작 모드는 완전히 이해가 되지 않았다. 적당한 벡터와 전달 체계는 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노 연관 바이러스 또는 하나 초과 바이러스 요소를 포함하는 혼성체 등의 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 체계는 양이온 지질과 양이온 중합체를 포함하고 있고 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자 총(gene-gun)"을 통한 것과 같은 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 핵산에 의해 인코딩된 펩티드는 용합 단백질이 될 수도 있고, 예로서는 위에서 언급한 각각의 반대 CDR을 위한 T 세포를 자극하는 에피톱을 들 수 있다.

[0268] 본 발명의 약제는 하나 이상의 보조제를 포함할 수도 있다. 보조제는 면역 반응을 비특이적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질이다(예컨대, 항원에 대한 CD8 양성 T 세포 및 조력 T(TH) 세포에 의해서 중재된 면역 반응). 따라서, 본 발명의 약제에서 보조제는 유용한 것으로 간주할 수 있다. 적당한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스(등록상표), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 플라젤린 또는 플라젤린에서 유도된 TLR5 리간드, FLT3 리간드, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(ALDARA, 등록상표), 레스퀴미드, ImuFact IMP321, IL-2, IL-13, IL-21과 같은 인터루킨, 인터페론 α 또는 β, 또는 이들의 폐결화된 유도체, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, 주브이문(JuvImmune), LipoVac, MALP2, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, 유중수형과 수중유형 에멀전, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, PepTel(등록상표) 벡터 시스템, 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLG)와 텍스트란 극미립자, 탈락토페린, SRL172, 비로솜(Virosomes) 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, β-글루칸, Pam3Cys, 사포닌에서 유도된 아퀼라스 QS21 스틸물론, 마이크로박테리아 추출물과 합성 세균의 세포 벽 모방제, 및 다른 리비의 데톡스(Ribi's Detox), 쿠일(Quil), 또는 슈퍼포스(Superfos)와 같은 독점 보조제 등이 있다. 프로인트(Freund's) 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 수지상 세포에 특이적인 여러 면역적 보조제(예컨대, MF59), 및 그 제조 방법은 이전에 설명된 바 있다(Allison and Krummel, 1995). 또한, 시토카인도 사용될 수 있다. 여러 시토카인은 수지상 세포의 림프 조직으로의 이동에 영향을 주는 데 직접적으로 연관된 바 있고(예컨대, TNF-), 이는 수지상 세포의 더 효율적인 T 림프구에 대한 항원-제시 세포로의 성장을 가속시키고(예컨대, GM-CSF, IL-1 및 IL-4)(US 5,849,589, 여기에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨) 면역보조제의 역할을 한다(예컨대, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-α, IFN-β)(Gabrilovitch et al., 1996).

[0269] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 백신 환경에서 보조제의 효율성을 높이는 것으로 나타났다. 이 이론에 국한하지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 톨-유사 수용체(TLR), 특히 TLR9를 통해 친성(비-적응) 면역 체계를 활성화시킴으로써 작동한다. CpG에 의해 유도된 TLR9의 활성화는 펩티드 또는 단백질 항원, 살아 있거나 죽은 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포 백신 및 예방적 및 치료적 백신의 다당류 접합체를 포함한 넓은 종류의 항원에 대한 항원 특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게, 이는 수지상 세포의 성숙 및 분화를 향상시키고 이는 TH1 세포의 활성화를 향상시키며 강한 세포독성 T 림프구(CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움이 없을 때에도 향상시킨다. TLR9 자극에 의해 일어난 TH1 바이어스는 보통 TH2 바이어스를 촉진시키는 명반 또는 비완성된 프로인트 보조제(IFA)와 같은 백신 보조제가 존재할 때 유지된다. CpG 올리고뉴클레오티드는 다른 보조제와 함께 제조되거나 함께 투여될 시 또는 특히 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 얻어 내기 위해 필요한 미세입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 비슷한 제형과 같은 제형에서 더 큰 보조제 활동을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 몇몇의 연구에서 보여진 바 있듯이 CpG가 없을 때 백신 전체 용량이 일으키는 항체 반응 수준으로 항원의 용량을 약 100배 정도 줄일 수 있도록 한다(Krieg, 2006). US 6,406,705 B1은 CpG 올리고뉴클레오티드, 비핵산 보조제 및 항원 특이적 면역 반응을 일으키는 항원의 병용에 대해 설명한다. CpG

TLR9 길항제는 몰로젠(Mologen, 독일 베를린 소재)에 의해 만들어진 dSLIM(이중 줄기 루프 번역조절제)이며 이는 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 성분이다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9 등의 다른 TLR 결합 분자 또한 사용이 가능하다.

[0270] 다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 화학적으로 변형된 CpG(예컨대, CpR, Idera), Poly(I:C)와 같은 dsRNA 유사체 및 그 유도체(예컨대, 앰프리젠(AmpliGen, 등록상표), 힐토놀(Hiltonol, 등록상표), poly-(ICLC), poly(IC-R), poly(I:C12U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 및 사이클로포스아미드, 수니티닙, 베바시주맙(Bevacizumab, 등록상표), 셀레브렉스, NCX-4016, 실테나필, 타달라필, 바르데나필, 소라페닙, 테모졸로마이드, 템시롤리무스, XL-999, CP-547632, 파조파닙, VEGF 트랩, ZD2171, AZD2171, 안티-CTLA4와 같은 면역활성인 소분자 및 항체, 면역계의 주요 구조를 표적화하는 다른 항체(예컨대, 항-CD-40, 항-TGF β , 항-TNF α 수용체) 및 SC58175(이는 치료적으로 및/또는 보조제의 역할을 할 수 있다). 본 발명에서 사용되는 보조제와 첨가제의 양과 농도는 특별히 다른 실험할 필요 없이 숙련된 기술자에 의해서 쉽게 결정될 수 있다.

[0271] 바람직한 보조제들은 항-CD40, 이미퀴모드, 레시퀴모드, GM-CSF, 사이클로포스파마이드, 수리티닙, 베바시주맙, 인터페론- α , CpG, 올리고뉴클레오티드 및 유도체, poly-(I:C) 및 유도체, RNA, 실테나필, 및 PLG 또는 비로숨미립자 제제이다.

[0272] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF, 사르가라모스틴), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드, 레시퀴모드 및 인터페론 α 와 같은 집락 자극 인자로 구성되는 군에서 선택된다.

[0273] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF, 사르가라모스틴), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 및 레시퀴모드와 같은 집락-자극 인자로 구성되는 군에서 선택된다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 또는 레시퀴모드이다. 훨씬 더 바람직한 보조제는 몬타나이드(Montanide) IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, poly-ICLC(힐토놀(등록상표)) 및 항-CD40 mAb 또는 이들의 조합들이다.

[0274] 이 조성물은 피하, 피부내, 근육내와 같은 비경구 투약 또는 경구 투약에 사용된다. 이를 위해, 펩티드 및 임의적으로 다른 분자들을 약학적으로 허용되는 담체, 바람직하게는 수용성 담체에 용해 또는 현탁한다. 추가로, 이 조성물은 완충액, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등의 부형제를 함유할 수 있다. 또한 펩티드는 시토카인과 같은 면역 자극 물질과 함께 투여될 수 있다. 이러한 조성물에 사용될 수 있는 방대한 부형제 목록은, 예를 들어 문헌[A. Kibbe, 약학적 부형제 핸드북](Kibbe, 2000)에서 확인할 수 있다. 이러한 조성물은 선종성 또는 암성 질병의 방지, 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예시적 제제는, 예를 들어 EP 2112253에서 찾아볼 수 있다.

[0275] 본 발명에 따른 백신에 의해 일어나는 면역 반응이 다른 세포 단계 및 다른 개발 단계에서는 암을 공격한다는 것을 인지하는 것이 중요하다. 더욱이, 암과 연관된 다른 신호전달 경로가 공격을 받는다. 이것은 단 하나 또는 몇몇 표적만을 다루는 백신에 비해 이점이며, 이로 인해 종양이 공격에 쉽게 적응(종양 탈출)하도록 유발할 수 있다. 더욱이, 모든 개별 종양들이 같은 패턴의 항원을 발현하는 것은 아니다. 따라서, 종양-연관된 여러 펩티드들의 조합은 모든 개별 종양이 적어도 표적의 일부를 갖도록 보장한다. 이 조성물은 각 종양이 여러 항원을 발현하도록 예상되며, 또한 종양 성장 및 유지에 필요한 여러 독립적 경로를 다루도록 설계되었다. 이에 따라, 백신은 보다 큰 환자 모집단을 위해 "기성품으로" 쉽게 사용이 가능하다. 이는 백신으로 치료할 환자의 사전 선택을 HLA 형질정도로 제한할 수 있고, 항원 발현을 위해 어떠한 추가의 바이오마커 평가를 요구하지 않음을 의미하지만, 효능에 중요한 여러 표적들이 유도된 면역 반응에 의해 동시에 공격됨을 여전히 보장한다 (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

[0276] 본원에 사용된 "골격"이란 용어는(예컨대, 항원성) 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 말한다. 한 구현에서, 골격은 그것이 부착되는 객체(예컨대, (제2) 항원 결합 모이어티)를 표적 부위, 예를 들어 특정 유형의 종양 세포 또는 항원성 결정인자를 갖는 종양 기질(예컨대, 본원에 따른 MHC와 펩티드의 복합체)로 향하도록 할 수 있다. 또 다른 구현에서, 골격은 그 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원을 통해 신호전달을 활성화할 수 있다. 골격은 항체 및 그 단편, 항체 중쇄 가변 영역 및 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 도메인에 결합하는 항원, 하나 이상의 안키린 반복 모티프 및 단일 도메인 항원 결합(SDAB) 분자를 포함하는 결합 단백질, 압타머, (가용성) TCR 및 동종 또는 자가 T 세포와 같은 (변형된) 세포를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 어떤 분자가 표적에 결합하는 골격인지 평가하기 위해, 결합 분석을 수행할 수 있다.

- [0277] "특이적" 결합이란 그 골격이 다른 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC 복합체보다 관심 대상의 펩티드-MHC 복합체에 더 잘 결합하며, 그 정도는 특이적 표적이 포함된 세포를 줄일 수 있는 활성 분자로 무장한 골격이 특이적 표적이 없는 다른 세포는 죽일 수 없지만 다른 펩티드-MHC 복합체를 제시하는 것을 의미한다. 교차반응성 펩티드-MHC의 펩티드가 자연적으로 발생하지 않는다면, 즉, 인간 HLA-펩티드으로부터 유래되지 않는다면, 다른 펩티드-MHC 복합체에 대한 결합은 관련이 없다. 표적 세포 괴사를 평가하는 검사는 당업계에 잘 알려져 있다. 이 검사는 변경되지 않는 펩티드-MHC 제시를 가진 표적 세포(일차 세포 또는 세포주) 또는 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC 수준이 도달되는 정도로 펩티드가 로딩된 세포를 사용하여 수행해야 한다.
- [0278] 각 골격은 라벨이 제공하는 신호의 존재 또는 부재를 판단함으로써 결합된 골격이 검출가능하도록 제공하는 라벨링을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 골격은 형광 염료 또는 임의의 다른 해당되는 세포 마커 분자를 사용하여 라벨링이 가능하다. 그러한 마커 분자는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 형광 라벨링(예를 들어, 형광 염료에 의해 제공되는)은 형광 또는 레이저 스캐닝 현미경 또는 유세포 분석에 의해 결합된 압타머의 가시화를 제공할 수 있다.
- [0279] 각 골격은 IL-21, 항-CD3, 항-CD28과 같은 제2 활성 분자와 접합될 수 있다.
- [0280] 폴리펩티드 골격에 대한 추가 정보는, 예를 들어 WO 2014/071978A1의 배경기술 부분과 거기에 인용된 참조문헌을 참고한다.
- [0281] 본 발명은 또한 압타머에 관한 것이다. 압타머(예는 WO 2014/191359 및 거기에 인용된 문헌을 참조)는 정의된 삼차원적 구조로 접힐 수 있고 특정 표적 구조를 인식할 수 있는 짧은 단일 가닥 핵산 분자이다. 이것은 표적 요법의 개발에 필요한 적합한 대안인 것으로 보여진 바 있다. 압타머는 높은 친화도 및 특이성으로 다양한 복합체 표적에 선택적으로 결합하는 것으로 나타난 바 있다.
- [0282] 세포 표면에 위치한 분자를 인식하는 압타머들이 지난 십 년 동안 식별되었으며 진단 및 치료 접근 방식을 개발하기 위한 수단을 제공한다. 압타머가 독성 및 면역원성을 거의 보유하지 않는 것으로 나타났으므로, 생의학 적용을 위한 유력한 후보이다. 정말로 압타머, 예를 들어 전립선 특이적 막-항원을 인식하는 압타머는 표적 대상의 요법을 위해 성공적으로 사용되어 왔으며, 또한 생체내 모델에서의 이중이식에 기능적인 것으로 나타난 바 있다. 더욱이, 특이적 종양 세포주를 인식하는 압타머가 식별된 바 있다.
- [0283] DNA 압타머는 다양한 암 세포, 특히 고형 종양으로부터 유래하는 것들을 위한 광범위 인식 성질을 밝히기 위해 선택가능한 반면에, 비종양형성 및 원발성의 건강한 세포는 인식되지 않는다. 식별된 압타머가 특이적 종양 아형을 인식할 뿐만 아니라 일련의 종양과 상호작용한다면, 이로 인해 압타머는 소위 광범위 진단 및 치료에 적용될 수 있다.
- [0284] 더욱이, 유세포 분석을 사용한 세포 결합 거동의 조사에 의하면 압타머는 나노몰 범위에서 매우 양호하고 뚜렷한 친화성을 드러내는 것으로 나타났다.
- [0285] 압타머는 진단 및 치료 목적으로 유용하다. 또한, 일부 압타머가 종양 세포에 의해 취해지며, 이에 따라 종양 세포 안으로의 siRNA와 같은 항암제의 표적 인도를 위한 분자 비히클로서 기능할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0286] 압타머는 세포 및 조직과 같은 복합체 표적 및 MHC를 사용한 현재 본 발명에 따른 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279 중 어느 한 서열을 포함하거나, 바람직하게는 이러한 서열로 구성되는 펩티드의 복합체에 대하여, 세포-SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment, 지수적 증식에 의한 리간드의 체계적 진화) 기법을 사용하여 선택가능하다.
- [0287] 본 발명의 펩티드는 MHC/펩티드 복합체에 대한 특이적 항체를 생성하고 개발하는 데 사용될 수 있다. 이들은 병변 조직에 치료, 표적화 독성 물질 또는 방사능 물질로 사용될 수 있다. 이런 항체의 또 다른 사용은 PET 같은 이미지 목적을 위해 병변 조직의 방사성 핵종을 표적화할 수도 있다. 이 사용은 작은 전이를 감지하거나 병변 조직의 크기와 정확한 위치를 결정하는 데 도움이 될 수 있다.
- [0288] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 HLA 제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II와 특이적으로 결합하는 제조합 항체의 생산 방법을 제공하는 것으로서, 이 방법은 상기 HLA 제한 항원(바람직하게는 본 발명에 따른 폴리펩티드)과 복합되는 가용성 형태의 MHC 클래스 I 또는 II 분자로서 상기 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II를 발현하는 세포를 포함하는 유전자 조작된 비인간 포유동물의 면역화; 상기 비인간 포유동물의 세포를 생산하는 항체로부터 mRNA 분자의 단리; 상기 mRNA 분자에 의해 인코딩된 단백질 분자를 표시하는 파지 디스플레이 라이브러리의 생산; 및 상기 파지 디스플레이 라이브러리로부터 하나 이상의 파지

의 단리를 포함하며, 상기 하나 이상의 파지는 상기 HLA 제한 항원과 복합되는 상기 인간 구조적 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II와 특이적으로 결합하는 상기 항체를 나타낸다.

- [0289] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 HLA 제한 항원과 복합되는 인간 구조적 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 것으로서, 이 항체는 바람직하게는 다클론 항체, 단클론 항체, 이중특이적 항체 및/또는 키메라 항체이다.
- [0290] 그러한 항체 및 단일쇄 클래스 I 구조적 적합 복합체의 생산을 위한 해당 방법들 및 이러한 항체의 생산을 위한 다른 도구들은 WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 및 출판물(Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003)에 공개되어 있고, 이들은 본 발명의 목적을 위해 그 전문이 참조문헌에 명백히 포함되어 있다.
- [0291] 바람직하게, 항체는 20 나노몰 미만, 바람직하게는 10 나노몰 미만의 결합 친화도로 복합체와 결합하는 데, 이는 본 발명의 문맥상 "특이적"으로 간주된다.
- [0292] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 대해 88% 이상의 상동성을 갖는(바람직하게는 동등한) 이의 변이체 또는 상기 펩티드와 T 세포 교차반응을 유도하는 이의 변이체에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 기저 전장 폴리펩티드가 아니다.
- [0293] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 대해 88% 이상의 상동성을 갖는(바람직하게는 동등한) 이의 변이체에 관한 것으로서, 상기 펩티드 또는 변이체가 갖는 전체 길이는 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개의 아미노산이다.
- [0294] 본 발명은 또한 인간 구조적 적합 복합체(MHC) 클래스-I 또는 -II의 분자에 결합하는 능력을 갖는 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.
- [0295] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 따른 아미노산으로 구성되거나 본질적으로 구성된다.
- [0296] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 (화학적으로) 변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0297] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 특히 HLA-DR 항원-연관된 불변 쇄(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질의 일부이거나, 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 안으로) 융합된다.
- [0298] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것으로서, 펩티드는 완전한(전체) 인간 단백질이 아니다.
- [0299] 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.
- [0300] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0301] 본 발명은 또한 특히 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 치료에 사용하기 위한 의약에 사용하기 위한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0302] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 또는 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0303] 본 발명은 또한 항원-제시 세포, 바람직하게는 수지상 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0304] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드를 생산하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양 및 상기 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터 펩티드의 단리를 포함한다.
- [0305] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 충분한 수량의 항원을 항원-제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원-제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.
- [0306] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 항원-제시 세포가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279를 포함하는 상기 펩티드 또는 상기 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.

- [0307] 본 발명은 또한 T 세포가 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 본 발명에 따른 방법에 의해 생산된 활성화된 T 세포에 관한 것이다.
- [0308] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 표적 세포가 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 괴사하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명에 따른 효과적인 수의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0309] 본 발명은 또한 설명한 일체의 펩티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 또는 본 발명에 따른 활성화된 세포 독성 T 림프구의 약제로서 또는 약제의 제조에서의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로서, 상기 약제는 암에 대해 활성을 갖는다.
- [0310] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로서, 상기 약제는 백신이다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로서, 상기 약제는 암에 대해 활성을 갖는다.
- [0311] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로서, 상기 암 세포는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 또는 예를 들어 비호지킨 림프종, 이식후 림프증식성 질환(PTLD)과 같은 기타 림프구 종양과 같은 기타 고형 또는 혈액학적 종양 세포, 그리고 원발성 골수섬유종, 본태성 혈소판감소증, 진성 적혈구증가증과 같은 기타 골수구 종양, 그리고 간세포 암종, 대장 암종, 아교모세포종, 위암, 식도암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 췌장암, 신세포 암종, 전립선암, 흑색종, 유방암, 담낭암 및 담관암종, 방광암, 자궁암, 두경부 편평세포 암종, 중피종이다.
- [0312] 본 발명은 또한 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 진단 및/또는 예후에 사용될 수 있는, 본 발명에서 "표적"이라 부르는, 본원에 따른 펩티드에 근거하는 특정 표지자 단백질 및 바이오마커에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암 치료를 위한 이러한 새로운 표적의 용도에 관한 것이다.
- [0313] 용어 "항체"는 본원에서 광범위한 의미로 사용되며, 다클론 및 단클론 항체를 둘 다 포함한다. 무손상 또는 "온전한" 면역글로불린 항체 분자뿐만 아니라, 용어 "항체"에 포함되어 있는 것은 그런 면역글로불린 분자와 인간화된 버전의 면역글로불린 버전의 단편(예컨대, CDR, Fv, Fab 및 Fc 단편) 또는 중합체이며, 이 단편은 본 발명에 따른 바람직한 특성(예를 들어, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 마커 (폴리)펩티드의 특이적 결합, 높아진 수준의 암 마커 유전자를 발현하는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 세포에 독소 전달, 및/또는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 마커 폴리펩티드의 활성 억제)을 나타낸다.
- [0314] 가능한 한, 본 발명의 항체는 상용 공급원으로부터 구입할 수 있다. 본 발명의 항체는 잘 알려진 방법을 통해서 생성될 수도 있다. 이 분야의 기술자는 전장 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 마커 폴리펩티드 또는 그 단편이 본 발명의 항체를 만드는 데 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 발명의 항체를 생성하는 데 사용될 폴리펩티드는 자연적인 원천에서 부분적으로 또는 완전히 정제될 수 있거나, 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성될 수도 있다.
- [0315] 예를 들어, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279에 따른 펩티드 또는 이의 변이체 또는 단편에 따른 펩티드와 같은 본 발명에 따른 펩티드를 인코딩하는 cDNA는 원핵 세포(예컨대, 세균) 또는 진핵 세포(예컨대, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포)에서 발현될 수 있고, 그 다음 그 재조합 단백질을 정제시켜, 본 발명에 따른 항체의 생성에 사용되는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 마커 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론성 또는 다클론성 항체 제제를 생성하는 데 사용할 수 있다.
- [0316] 당업자는 2개 이상의 다른 단클론 또는 다클론 항체의 조합의 생성이 의도하는 사용(예컨대, ELISA, 면역조직화학, 생체내 이미징, 면역독소 요법)에 요구되는 특이성 및 친화도를 갖는 항체의 획득가능성을 최대화함을 인식할 것이다. 이 항체들은 그 항체들이 사용되는 목적에 의거하여 알려진 방법에 의해 바람직한 활성도에 대해 시험된다(예컨대, ELISA, 면역조직화학, 면역요법 등; 항체의 생성과 시험에 관한 추가 지침은, 예를 들어 문헌 [Greenfield, 2014]을 참고한다). 예를 들어, 항체는 포르말린 고정 폐암 또는 동결된 조직 절편의 ELISA 분석법, 웨스턴 블롯, 면역조직화학 염색으로 시험할 수 있다. 치료 또는 생체내 진단을 위한 항체는 초기의 시험관내 특성화 이후, 알려진 임상 시험 방법에 따라 시험된다.
- [0317] "단클론 항체"라는 용어는 본원에서 치환으로 균등질 항체 개체군에서 획득된 항체를 가리킨다. 즉, 이 개체군이 포함하는 각각의 항체는 자연적으로 일어날 수 있는 소수의 돌연변이체를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 본원에서, 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 특정한 종으로부터 유도되거나 특정한 항체 클래스 또는 서

브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇠의 나머지 부분은 다른 종으로부터 유도되거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체, 및 이러한 항체의 단편의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 희망하는 길항 활성을 나타내는 "키메라(chimeric)" 항체를 포함한다(US 4,816,567, 여기에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨).

- [0318] 본 발명의 단클론 항체는 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 생쥐 또는 다른 적당한 숙주 동물이 보통 면역성을 주는 작용제에 의해 면역되어, 면역성을 주는 작용제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 이를 생산할 수 있는 능력을 가지고 있는 림프구를 유도해 낸다. 다른 방법으로는, 림프구는 시험관 내에서 면역될 수도 있다.
- [0319] 단클론 항체는 또한 US 4,816,567에서 설명된 바와 같은 제조법 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 인코딩하는 DNA는 손쉽게 단리되고 전통적인 방법을 사용하여 염기 서열 분석이 가능하다(예컨대, 마우스 유래 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용).
- [0320] 시험관내 방법 또한 1가(monovalent)의 항체를 제조하는 데 적당하다. 이 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 항체를 분해하여 항체의 단편, 특히 본원에서는 Fab 단편을 생산할 수 있다. 예를 들어, 파파인을 사용하여 분해가 이루어질 수 있다. 파파인 분해의 예는 WO 94/29348 및 US 4,342,566에 설명되어 있다. 항체의 파파인 분해는 보통 각각 하나의 항원 결합 위치 및 남은 Fe 단편을 포함한 Fab 단편이라 부르는 동등한 2개의 항원 결합 단편을 생산한다. 펩신 처리는 하나의 F(ab')₂ 단편과 하나의 pFc' 단편을 제공한다.
- [0321] 항체 단편(다른 서열과 붙어 있는 그렇지 않은 간에)은, 이 단편의 활동력이 변경되지 않은 항체 또는 항체 단편에 비교할 시, 현저하게 바뀌거나 손상이 되지 않는 한, 삽입, 삭제, 치환, 또는 특정한 영역 또는 특이적 아미노산 잔기의 다른 선택되는 변경을 포함할 수 있다. 이러한 변경은 이항화물 결합의 능력이 있는 아미노산의 제거/추가, 생체물 수명의 증가, 분비 특징의 변화 등의 추가적인 특성을 제공할 수 있다. 어떤 경우에도, 항체 단편은 결합 활성, 결합 도메인에서의 결합 조절 등의 생활성 성질을 소유하고 있어야 한다. 항체의 기능 또는 활동 영역은 단백질의 특정한 영역의 돌연변이 생성, 이어서 발현 및 발현된 폴리펩티드의 실험에 의해 확인될 수 있다. 이러한 방법은 이 분야의 기술자가 손쉽게 알 수 있는 기술이며 이는 항체 단편을 인코딩하는 핵산의 부위 특이적 돌연변이 생성을 포함할 수 있다.
- [0322] 본 발명의 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체를 추가로 포함할 수 있다. 인간화된 형태의 비인간(예, 쥐과 동물) 항체는 최소의 비인간 면역글로불린에서 유도된 서열을 포함하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇠 또는 이들의 단편(Fv, Fab, Fab' 또는 다른 항체의 항원 결합 하위서열)이다. 인간화된 항체는 수용자의 상보성 결정 영역(complementary determining region(CDR))의 잔기가 요구되는 특이성, 친화도 및 수용력을 가진 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 비인간 종(공여 항체)의 CDR의 잔유물로 바뀐 인간 면역글로불린(수용 항체)이다. 몇몇의 예에서는, 인간 면역글로불린의 Fv 구조(FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 교체된다. 인간화된 항체는 수용 항체 또는 수입된 CDR 또는 프레임워크 서열의 어디에서도 찾을 수 없는 잔기를 포함하기도 한다. 보통, 인간화된 항체는 가변 도메인을 하나 이상 또는 거의 대부분 2개를 포함하며, 모든 또는 실질상 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린에 상응하고, 모든 또는 실질상 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 일치 서열이다. 인간화된 항체는 이상적으로 적어도 보통 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 한 부분 또한 포함할 것이다.
- [0323] 이 분야에서 비인간 항체를 인간화하는 방법은 잘 알려져 있다. 보통, 인간화된 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 비인간 근원에서 이에 도입된다. 이 비인간 아미노산 잔기는 종종 "수입" 잔기라고 일컬어지며, 이는 대개 "수입" 가변 도메인에서 출처한다. 인간화는 본질적으로 설치류의 CDR 또는 CDR 서열로 상응하는 인간 항체 서열을 교체하는 것으로 실행될 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 키메라 항체(US 4,816,567)이며, 이 때 상당히 온전하지 않은 인간 가변 도메인이 비인간 종의 해당 서열로 치환되었다. 실제적으로, 인간화된 항체는 보통 몇몇의 CDR 잔기 및 가능하게는 몇몇의 FR 잔기가 이 설치류 항체의 유사한 부위의 잔기로 치환된 인간 항체이다.
- [0324] 면역되었을 때, 내생의 면역글로불린 생성이 없는 중에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 유전자가식 동물(예, 생쥐)이 사용될 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이 생쥐의 항체의 중쇄 결합 영역 유전자 동형 삭제가 내생 항체 생산의 완전한 억제 결과를 가져오는 것으로 기술되었다. 이러한 생식계열 돌연변이 생쥐로의 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 정렬 이입은 항원 챌린지가 존재할 때 인간 항체 생산의 결과를 낳을 것이다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리에서도 생산될 수 있다.

- [0325] 본 발명의 항체는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체에 의해서 대상에게 투여된다. 보통, 적당한 양의 약학적으로 허용가능한 염이 제형을 등장 상태로 만들기 위해 제형에 사용된다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는, 염수, 링거 용액(Ringer's solution) 및 포도당 용액을 포함한다. 이 용액의 pH는 바람직하게는 약 5 내지 약 8이며, 더 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5이다. 더 많은 담체는 세포간질액, 예를 들어 막, 리포솜 또는 미세입자와 같은 형태로 되어 있는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투성의 세포간질과 같은 지속적인 방출 제제를 포함한다. 예를 들어, 투여 경로 및 투여되는 항체의 농도에 따라 어떤 담체가 더 바람직한지는 이 분야의 당업자에게는 명백할 것이다.
- [0326] 항체는 대상, 환자 또는 세포에 주사(예, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내), 또는 주입과 같은 혈액으로의 전달이 효율적으로 이루어질 수 있는 다른 방법으로 투여될 수 있다. 항체는 국소뿐만이 아니라 전신의 치료 효과를 얻기 위해 종양내 또는 종양 주위 경로로도 투여될 수도 있다. 국소 또는 정맥내 주사가 바람직하다.
- [0327] 항체 투여의 효율적인 용량과 일정은 경험적으로 결정될 수 있고, 이러한 결정을 내리는 것은 이 분야의 기술 중의 하나이다. 이 분야의 당업자는 투여되는 항체의 용량이, 예를 들어 항체를 받는 대상, 투여 경로, 사용되는 특정한 항체의 종류 및 투여되는 다른 약들에 따라 달라진다는 것을 이해할 것이다. 단독으로 사용될 시 전형적인 항체의 일일 용량은 위에 언급된 요인을 고려할 때, 1일에 1 µg/kg 체중 내지 100 mg/kg 체중 이상으로 변할 수 있다. 바람직하게는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 치료를 위한 항체의 투여 후, 이 분야의 기술자들에게 알려진 다양한 방법으로 이 항체의 치료적 효율성을 평가할 수 있다. 예를 들어, 치료를 받고 있는 대상에서 암의 크기, 수, 및/또는 분포 등이 표준 종양 영상 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 항체의 투여가 없을 경우 발생할 질병 경과와 비교하여, 종양의 성장의 정지, 종양 수축의 야기 및/또는 새로운 종양 발생의 예방을 야기하는 치료의 목적으로 투여된 항체는 암의 치료에 효과있는 항체이다.
- [0328] 본 발명의 다른 양태는 특이적 펩티드-MHC 복합체를 인식하는 가용성 T 세포 수용체(sTCR)의 생산 방법을 제공하는 것이다. 이러한 가용성 T 세포 수용체는 특이적 T 세포 클론으로부터 생성가능하며, 그 친화도는 상보성 결정 영역을 표적으로 하는 돌연변이생성에 의해 증가될 수 있다. T 세포 수용체 선택을 위하여, 파지 디스플레이를 사용할 수 있다(US 2010/0113300, 문헌[Liddy et al., 2012]). 파지 디스플레이 동안 T 세포 수용체의 안정화 및 약물로서의 실용적인 사용을 위하여, α 및 β 쇄가 연결될 수 있고, 예를 들어 비자연적(non-native) 이황화 결합, 기타 공유 결합(단일 쇄 T 세포 수용체) 또는 이합체화 도메인에 의해 연결된다(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). T 세포 수용체는 표적 세포에 대한 특정 기능의 실행을 목적으로 독소, 약물, 시토카인(예를 들어, US 2013/0115191 참고), 및 항-CD3 도메인 등과 같은 효과기 세포를 모집하는 도메인과 연결될 수 있다. 더욱이, 이것은 입양 전달에 사용되는 T 세포에서 발견될 수 있다. 추가 정보는 WO 2004/033685A1 및 WO 2004/074322A1에서 찾을 수 있다. sTCR의 조합은 WO 2012/056407A1에 설명되어 있다. 이 생산에 관한 추가 방법들은 WO 2013/057586A1에 공개되어 있다.
- [0329] 그 밖에, 본 발명의 펩티드 및/또는 TCR 또는 항체 또는 다른 결합하는 분자는 생검 샘플에 근거한 병리학자의 암 진단을 확인하는 데 사용이 가능하다.
- [0330] 항체 또는 TCR은 생체 내의 진단 분석에 사용될 수도 있다. 일반적으로, 항체는 방사성핵종(예, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ³H, ³²P 또는 ³⁵S)으로 라벨링되고 면역섬광계수법(immunoscintigraphy)을 사용하여 종양의 위치가 결정될 수 있다. 하나의 구현에서는, 항체 또는 그 단편은 상기 언급된 단백질로 구성되는 군으로부터 선택한 2개 이상의 표적의 세포의 도메인에 결합을 하고 친화도 값(Kd)은 1x10 µM 미만이다.
- [0331] 진단의 용도로 사용되는 항체는 여러 가지 영상 방법으로 감지될 수 있는 적당한 프로브로 라벨링될 수 있다. 프로브의 감지 방법은 형광, 광학, 공초점 및 전자 현미경, 자기 공명 단층 촬영 영상 및 분광법, 형광 투시법, 전산화 단층 촬영과 양전자 방사 단층 촬영을 포함하지만 이에 국한되지 않는 방법을 들 수 있다. 적당한 프로브는 플루오레세인, 로다민, 에오신과 다른 형광체, 방사성 동위 원소, 금, 가돌리늄과 다른 란타넘계열 원소, 상자성체의 이온, 플루오르-18 및 다른 양전자 방출 방사성 핵종 등을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 것을 들 수 있다. 또한, 프로브는 2개 이상의 기능을 가지고 있을 수 있고, 본원에 나열된 하나 이상의 방법으로 감지될 수 있다. 이러한 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 본원에 나열된 프로브로 라벨링될 수 있다. 이렇게 항체와 프로브를 연결하는 것으로는 이 분야에서 잘 알려진 것들 중에 프로브의 공유원자 연결, 프로브의 항체로의 편입, 및 프로브의 결합을 위한 킬레이트 화합물의 공유원자 연결 등을 들 수 있다. 면역조직 화학을 위해서, 질병 조직 샘플은 신선하거나 냉동되었거나 파라핀에 포매되어 포르말린과 같은 방부제로 고정되어 있을 수 있다.

고정되었거나 포매되어 있는 샘플을 포함하고 있는 조직 절편은 라벨링된 1차 항체 및 2차 항체와 접촉되며, 이때 제자리 단백질 발현 감지를 위한 항체가 사용된다.

- [0332] 본 발명의 다른 양태는 T 세포를 적절한 항원-제시 세포의 표면에 발현된 항원-로딩된 인간 MHC 분자와 상기 T 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화하기에 충분한 시간 동안 시험관 내에서 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 항원이 본 발명에 따른 펩티드인, 활성화된 T 세포의 시험관내 생산 방법을 포함한다. 바람직하게는, 충분한 양의 항원이 항원-제시 세포와 함께 사용된다.
- [0333] 바람직하게는, 포유류 세포는 TAP 펩티드 트랜스포터가 결핍되어 있거나, 감소된 수준 또는 기능을 가지고 있다. TAP 펩티드 트랜스포터가 결핍되어 있는 적당한 세포로는 T2, RMA-S 및 초파리 세포를 들 수 있다. TAP는 항원 처리에 관련된 트랜스포터이다.
- [0334] 인간 펩티드 로딩 결핍 세포주 T2는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(미국 메릴랜드주 20852 록빌 파크론 드라이브 12301 소재, 카탈로그 번호 CRL 1992)에서 구입가능하고, 초파리 세포주 Schneider 2는 ATCC의 카탈로그 번호 CRL 19863으로 구입가능하며, 생쥐 RMA-S 세포주는 룡그렌 등의 문헌(Ljunggren and Karre, 1985)에서 기술된 바 있다.
- [0335] 바람직하게는, 숙주 세포는 형질감염전에 대부분 MHC 클래스 I 분자를 발현하지 않는다. 또한, 자가자 세포가 B7.1, B7.2, ICAM-1 및 LFA 3과 같은 T 세포에 대한 공동자극 신호를 제공하는 데 중요한 분자를 발현하는 것이 바람직하다. 다수의 MHC 클래스 I 분자의 핵산 서열 및 동시자가자 분자의 서열은 GenBank와 EMBL 데이터베이스에서 공개적으로 제공된다.
- [0336] MHC 클래스 I 에피토프이 항원으로 사용되는 경우, T 세포는 CD8-양성 T 세포이다.
- [0337] 만약 항원-제시 세포가 형질감염되어 그러한 에피토프를 발현한다면, 바람직하게는 그 세포는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279를 포함하는 펩티드 또는 이의 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.
- [0338] T 세포를 시험관 내에서 생성하는 몇몇의 다른 방법도 사용될 수 있다. 예를 들어, 자가조직 종양-침윤 림프구는 CTL의 생성에 사용가능하다. 플레반스키 등의 문헌(Plebanski et al., 1995)은 자가조직 말초의 혈액 림프구(PLB)를 T 세포의 제조 시 사용한다. 더욱이, 수지상 세포를 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄스화시키거나, 재조합 바이러스에 의한 감염에 의해 자가조직 T 세포의 생산도 가능하다. 또한, 자가조직 T 세포의 생산에서 B 세포도 사용할 수 있다. 또한, 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄스화된 또는 재조합된 바이러스에 의해 감염된 대식세포가 자가조직 T 세포의 제조 시 사용될 수 있다. 왈터 등의 문헌(Walter et al., 2003)은 인공 항원-제시 세포(aAPC)를 사용하는 시험관내 T 세포의 프라이밍을 기술하며, 이는 역시 선택되는 펩티드에 대해 T 세포를 생성하는 데 사용될 수 있다. 본 발명에서, aAPC는 미리 생성된 MHC:펩티드 복합체를 바이오틴-스트렙타비딘 생화학을 이용함으로써 포리스티렌 입자(마이크로 비드)의 표면과 커플링시킴으로써 생성되었다. 이 체계는 aAPC 상의 MHC 밀도를 정확히 제어할 수 있도록 허용하며, 이는 항원-특이적 T 세포 반응을 혈액 샘플로부터 높은 효율성으로 고- 또는 저-결합도로 선택적으로 유도해낼 수 있게 한다. MHC:펩티드 복합체를 제외하고, aAPC는 그들의 표면에 커플링된 항-CD28 항원과 같은 동시-자극 활성을 가지고 다른 단백질을 운반해야 한다. 더욱이, 이러한 aAPC-기반 체계는 종종, 예를 들어, 인터루킨-12와 같은 시토카인 등 적당한 가용성 요소의 추가를 요구한다.
- [0339] 동종이계 세포는 T 세포의 제조에 역시 사용될 수 있고, 방법은 WO 97/26328에 더 자세하게 기술되어 있고, 여기에 참조문헌으로 포함되어 있다. 예를 들어, 초파리 세포와 T2 세포에 추가적으로, CHO 세포, 배큘로바이러스-감염 곤충 세포, 박테리아, 효소, 백시니아-감염된 표적 세포 등과 같은 다른 세포들도 항원을 제시하는 데 사용될 수 있다. 또한, 식물성 바이러스를 사용할 수 있다(예를 들어, 포르타 등의 문헌(Porta et al., 1994) 참조). 이는 외부 펩티드의 제시를 위한 카우피 모자이크 바이러스의 높은 수확 체계로서의 개발을 기술한다.
- [0340] 본 발명의 펩티드에 대해 활성화된 T 세포는 치료에서 유용하다. 따라서, 본 발명의 더 나아간 양태는 본 발명의 상기 방법으로 획득할 수 있는 활성화된 T 세포를 제공한다.
- [0341] 상기 방법으로 생성된 활성화된 T 세포는, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 279의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.
- [0342] 바람직하게는, T 세포는 그의 TCR을 HLA/펩티드-복합체와 상호작용(예컨대, 결합)함으로써 이런 세포를 인식한다. 이 T 세포는 효율적인 수의 활성화된 T 세포가 투여되었을 때, 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩

티드를 비정상적으로 발현하는 환자의 표적 세포를 피사시키는 방법에 유용하다. 환자에게 투여된 T 세포는 상기 기술된 바와 같이 환자로부터 유도되고 활성화된다(즉, 이는 자가조직 T 세포이다). 다른 방법으로는, T 세포는 환자로부터 유도가 안 되고, 다른 개인에서 유도된다. 물론, 이 개인이 건강한 개인인 것이 바람직하다. 발명자들이 말하는 "건강한 개인"이라고 함은 개인이 전체적으로 좋은 건강을 가지고 있고, 바람직하게는 충분한 면역 체계를 가지고 있고, 더 바람직하게는, 손쉽게 실험되고 감지될 수 있는 어떤 질병도 겪고 있지 않다는 것이다.

- [0343] 생체 내에서, 본 발명에 따른 CD8-양성 T 세포에 대한 표적 세포는 종양 세포(이들은 가끔 MHC 클래스 II를 발현하기도 한다)이거나 종양을 감싸고 있는 간질성 세포(종양 세포)(이는 가끔 MHC 클래스 II를 또한 발현하기도 한다(Dengjel et al., 2006))일 수 있다.
- [0344] 본 발명의 T 세포는 치료 조성물의 성분으로 사용될 수도 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자의 표적 세포를 죽이는 방법으로서, 환자에게 위에 정의된 바와 같이 효율적인 수의 T 세포를 투여하는 방법을 제공한다.
- [0345] 본 발명자는 "비정상적으로 발현되는"이라는 구절에 의해, 폴리펩티드가 정상 조직의 발현 수준에 비교했을 때 과발현되거나 유전자가 종양이 유도된 조직에서는 침묵하지만(silent) 종양에서는 발현되는 것 또한 의미한다. 본 발명자들은 "과발현"이라는 구절에 의해, 폴리펩티드가 정상 조직에서 존재하는 수준의 1.2배 이상으로 존재하는 것을 말하고, 바람직하게는 2배 이상, 더 바람직하게는 5배 또는 10배 이상으로 존재하는 것을 의미한다.
- [0346] T 세포는, 예를 들어 상기 기술된 바와 같은 방법으로 얻어질 수 있다.
- [0347] 흔히 T 세포의 입양 전송이라고 불리는 것에 대한 프로토콜은 이 업계에서 잘 알려져 있다. 그 리뷰는 다음에서 찾을 수 있다: 가티오니 등 및 모르간 등의 문헌(Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).
- [0348] 본 발명의 다른 양태는 핵산이 클로닝되고 숙주 세포, 바람직하게는 T 세포에 개입되는 T 세포 수용체를 생성하는 데 있어서, MHC와 복합된 펩티드의 용도이다. 이어서, 이러한 유전자조작된 T 세포는 암의 요법을 위해 환자로 전달될 수 있다.
- [0349] 본 발명의 모든 분자(즉, 펩티드, 핵산, 항체, 발현 벡터, 세포, 활성화된 T 세포, T 세포, T 세포 수용체 또는 이를 인코딩하는 핵산)가 면역 반응을 피할 수 있는 성질을 가진 세포를 특징으로 하는 질환의 치료에 유용하다. 따라서, 본 발명의 임의의 분자는 약제로 사용되거나 약제를 만드는 데 사용될 수 있다. 이 분자는 단독으로 사용될 수도 있고, 본 발명에 따른 분자 또는 알려진 분자와 함께 결합하여 사용될 수도 있다.
- [0350] 본 발명은 다음을 포함한 키트(kit)를 포함한다:
- [0351] (a) 상기 기술된 약학 조성물을 용액 또는 동결건조된 형태로 포함하는 용기;
- [0352] (b) 임의적으로, 동결건조된 제형을 위한 희석제 또는 재구성 용액을 포함하는 제2 용기; 및
- [0353] (c) 임의적으로, (i) 용액의 사용, 또는 (ii) 동결건조된 제형의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서.
- [0354] 상기 키트는 (iii) 완충액, (iv) 희석제, (v) 필터, (vi) 주사바늘 또는 (vii) 주사기 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 용기는 바람직하게는 병, 바이알, 주사기 또는 시험관이며 또한 반복사용 용기일 수 있다. 약학 조성물은 바람직하게는 동결건조된다.
- [0355] 본 발명에 사용되는 키트는 바람직하게는 적당한 용기 중 본 발명의 동결건조된 제형, 및 이들의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서를 포함한다. 적당한 용기는, 예를 들어, 병, 바이알(예컨대, 듀얼 챔버 바이알), 주사기(듀얼 챔버 주사기 등) 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 바람직하게는, 키트 및/또는 용기에는 재구성 및/또는 사용을 위한 지시사항을 나타내는 설명서가 포함된다. 예를 들어, 라벨은 동결건조된 제형을 상기 펩티드 농도로 재구성해야 한다고 지시할 수 있다. 라벨은 또한 제형이 피하투여가 가능한지 아니면 유용한지를 보여줄 수도 있다.
- [0356] 제형을 포함한 용기는 재구성되는 제형의 반복된 투여(예컨대, 약 2 내지 6회의 투여)를 가능하게 하는 다용도 바이알일 수 있다. 키트는 또한 적당한 희석제(예컨대, 중탄산 용액)를 포함하는 제2 용기를 포함할 수도 있다.
- [0357] 희석제와 동결건조된 제형을 섞을 때는, 재구성되는 제형의 최종 펩티드 농도가 바람직하게는 0.15 mg/mL/펩티드(=75 μg) 이상이고, 바람직하게는 3 mg/mL/펩티드(=1500 μg) 이하이어야 한다. 키트는 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입 및 사용 설명서 등의 상업적 및 사용자 입장에서 필요한 다른 물

질을 더 추가로 포함할 수도 있다.

- [0358] 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 약학 조성물의 제형을 포함하는 하나의 용기를 다른 성분(예컨대, 다른 화합물들 또는 이 다른 화합물들의 약학 조성물)과 함께 또는 단독으로 포함하거나, 각각의 성분을 각자 다른 용기에 포함할 수 있다.
- [0359] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 다음과 같은 제2 화합물 또는 그들의 제형과 함께 투여될 수 있도록 포장된 본 발명의 제형을 포함한다: 보조제(예컨대, GM-CSF), 화학요법제, 자연 생산품, 호르몬 또는 길항제, 항-혈관신생제제 또는 억제제, 세포자멸-유도제 또는 킬레이터. 키트의 성분은 환자로의 투여 전에 미리 혼합되어 있을 수도 있거나, 각각의 성분이 각각 따로 용기에 담겨 있을 수도 있다. 키트의 성분은 하나 이상의 액체 용액으로 제공될 수도 있고, 바람직하게는 수용액, 더욱 바람직하게는 무균 수용액으로 제공된다. 키트의 성분은 적당한 용매를 첨가함으로써, 액체로 바뀔 수 있는 고체로 제공될 수도 있고, 바람직하게는 이는 다른 용기에 담겨 제공된다.
- [0360] 치료 키트의 용기는 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 고체나 액체를 담을 수 있는 임의의 다른 수단일 수 있다. 보통, 하나 초과와 성분이 있을 경우, 키트는 제2 바이알 또는 다른 용기를 포함하고, 이는 각각의 복용을 가능하게 한다. 키트는 약학적으로 허용가능한 액체를 포함하는 용기를 포함할 수도 있다. 바람직하게는, 치료 키트는 본 발명의 키트의 조성물인 본 발명의 제제를 투여할 수 있는 기구(예컨대, 하나 이상의 바늘, 주사기, 안약 투입제, 피펫 등)를 포함한다.
- [0361] 본 발명의 제형은 구강(경구), 비강, 안구, 피하, 피내, 근육내, 혈관내 또는 경피 등 어떠한 경로로든 펩티드 투여에 적당한 제형이다. 바람직하게는, 투여는 피하(s.c.)이며, 가장 바람직하게는 주입 펌프에 의한 피내(i.d.) 투여일 수 있다.
- [0362] 본 발명의 펩티드가 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병으로부터 단리되었기 때문에, 본 발명의 약제는 바람직하게는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 치료에 사용된다.
- [0363] 본 발명은 또한 사전선별된 TUMAP의 창고로부터 선택되는 하나 이상의 펩티드가 포함된 약학 조성물의 제조를 포함하는 개별 환자의 개인화된 약제의 생산 방법을 포함하며, 여기서 약학 조성물에 사용되는 하나 이상의 펩티드는 개별 환자의 적합성을 위해 선택된다. 한 구현에서, 약학 성분은 백신이다. 이 방법은 TCR 단리 또는 가용성 항체 및 다른 치료 옵션과 같은 하류 용도를 위해 T 세포 클론의 생산에도 적용시킬 수 있다.
- [0364] "개인화된 약학"이란, 활성적으로 개인화된 암 백신 및 자가 환자 조직을 사용하는 적응적 세포 세포 요법을 포함하는 한 명의 개별 환자의 치료를 위해서만 사용되는 그러한 개별 환자를 위해 구체적으로 맞춤형된 요법을 의미해야 한다.
- [0365] 본원에 사용되는 용어 "창고"란 특정한 종양 유형에서 면역원성 및/또는 과다-제시에 대해 사전선별된 펩티드의 군 또는 집합을 지칭해야 한다. "창고"란 용어는 백신에 포함된 특정한 펩티드가 물리적 시설에서 사전제조되어 보관되는 백신에 포함된다는 것을 내포함을 의도하지 않지만 그 가능성은 심사숙고된다. 이 펩티드는 생산된 개인화 백신마다 새로 제조될 수 있거나 사전제조되어 보관될 수 있음이 명시적으로 심사숙고된다. 창고(예컨대, 데이터베이스의 형태)는 다양한 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 대립유전자를 가진 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 환자의 종양 조직에서 고도로 과발현된 종양-연관 펩티드들로 구성된다. 창고는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 펩티드 또는 연장된 MHC 클래스 I 펩티드를 함유할 수 있다. 창고는 몇몇 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 조직들로부터 수집된 종양-연관 펩티드 외에도, HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 및 HLA-B*44 마커 펩티드를 포함할 수 있다. 이 펩티드들은 TUMAPS에 의해 유도된 T 세포 면역성의 양적 크기 비교를 허용하며 그에 따라 항종양 반응을 유발하는 백신의 용량에 대해 중요한 결정을 내리도록 허용한다. 둘째로, 이들은 환자에서 "자가" 항원으로부터 유래된 TUMAP에 대한 일체의 백신 유도된 T 세포 반응이 관찰되지 않는 경우 "비자가" 항원으로부터 유래된 중요한 양성 대조군 펩티드로 기능한다. 그리고, 셋째로, 환자의 면역적격의 상태에 대한 결론을 내리도록 허용할 수 있다.
- [0366] 창고용 TUMAP는 유전자 발현 분석, 질량 분석 및 T 세포 면역학(XPresident (등록상표))이 조합된 통합 기능적 계층 접근방식을 사용하여 동정된다. 이 접근 방식은 정상 조직에서는 발현되지 않거나 최소한으로만 발현되지만 고비율의 종양에서는 진정하게 존재하는 TUMAP만을 추가 분석을 위해 선택하도록 보증한다. 초기 펩티드 선택을 위하여, 환자 및 건강한 공여자의 혈액으로부터의 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골

수성 백혈병 샘플을 단계적 접근 방식으로 분석했다:

- [0367] 1. 악성 종양 물질로부터의 HLA 리간드는 질량 분석에 의해 동정되었다
- [0368] 2. 게놈-전체의 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 사용하여, 정상 기관과 조직들의 범위와 비교하여 악성 조직 (만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병)에서 과발현된 유전자들을 동정했다.
- [0369] 3. 동정된 HLA 리간드를 유전자 발현 데이터와 비교했다. 종양 조직 상에서 과다-제시되거나 선택적으로 제시된 펩티드들, 바람직하게는 2단계에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드들은 다중-펩티드 백신용으로 적절한 TUMAP 후보로 간주했다.
- [0370] 4. TUMAP로서 동정된 펩티드의 관련성을 지지하는 추가의 증거를 파악하기 위해 문헌 연구를 수행했다.
- [0371] 5. mRNA 수준에서의 과발현의 타당성은 3단계에서 종양 조직으로부터 선택되는 TUMAP의 재검출 및 건강한 조직에 대한 검출의 부재(또는 낮은 빈도)에 의해 확인되었다.
- [0372] 6. 선택되는 펩티드에 의한 생체내 T 세포 반응의 유도가 가능한지 여부를 평가하기 위해, 건강한 공여자는 물론 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 환자의 인간 T 세포를 사용하여 시험관내 면역원성 검사를 수행했다.
- [0373] 한 양태에서, 펩티드를 참고에 포함시키기 전에 면역원성에 대해 사전 스크리닝이 수행된다. 제한이 아니라 한 예로서, 펩티드/MHC 복합체와 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원-제시 세포를 가진 건강한 공여자의 CD8+ T 세포를 반복적으로 자극하는 시험관내 T 세포 초기 감작을 포함하는 방법을 사용하여 참고에 포함된 펩티드의 면역원성을 결정한다.
- [0374] 이 방법은 희귀한 암과 드문 발현 프로필을 가진 환자에서 바람직하다. 현재 개발되고 있는 고정 조성을 가진 다중펩티드 각테일과는 대조적으로, 참고는 백신과 종양의 항원의 실제 발현과 유의하게 더 높은 일치율 허용한다. 다중표적 접근 방식에서는 선택되는 단일 펩티드 또는 "재고" 펩티드들의 조합을 각 환자에 대해 사용한다. 이론상으로, 예를 들어 50개 라이브러리로부터 선택되는 5개의 다른 항원 펩티드에 근거한 접근방법은 이미 약 17백만 가지의 가능한 약품(DP) 조성을 초래할 것이다.
- [0375] 한 양태에서, 본원에 기술되거나 다음과 같은 본 발명에 따른 방법에 근거하여, 이 펩티드들은 개별 환자를 위한 적합성에 근거하여 백신에 포함되도록 선택된다.
- [0376] HLA 표현형, 전사체학 및 펩티도믹스 데이터는 환자의 종양 물질과 혈액 샘플로부터 수집하여 "참고"와 환자 고유의(즉, 돌연변이된) TUMAP를 포함하는 각 환자에 대해 가장 적절한 펩티드를 동정한다. 환자 종양에서 선택적으로 발현되거나 과발현되는 펩티드를 선택하게 되고, 이는 가능한 경우 환자의 개별 PBMC로써 시험했을 때 강한 시험관내 면역원성을 나타냈다.
- [0377] 바람직하게는, 백신에 포함되는 펩티드는 다음을 포함하는 방법에 의해 확인된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드들(TUMAP)의 동정; (b) (a)에서 동정된 펩티드를 위에 설명된 펩티드들의 참고(데이터베이스)와 비교; 및 (c) 그 환자에서 동정된 종양-연관 펩티드와 상관관계가 있는 참고(데이터베이스)로부터 하나 이상의 펩티드의 선택을 포함하는 방법에 의해 확인된다. 예를 들어, 종양 샘플에 의해 제시되는 TUMAP는 다음에 의해 확인된다: (a1) 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질의 동정을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 및 (a2) 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 동정하기 위해, 발현 데이터를 종양 샘플의 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계 결정. 바람직하게는, MHC 리간드의 서열은 종양 샘플로부터 단리된 MHC 분자로부터 결합된 펩티드를 용출시키고 용출된 리간드의 서열결정에 의해 동정된다. 바람직하게는, 종양 샘플과 정상 조직을 같은 환자로부터 얻는다.
- [0378] 참고(데이터베이스) 모델을 사용한 펩티드의 선택 외에도 또는 이에 대한 대안으로, TUMAP가 환자에서 새로 확인된 다음 백신에 포함될 수 있다. 한 예로서, 후보 TUMAP는 환자에서, (a1) 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질의 동정을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 및 (a2) 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 동정하기 위해, 발현 데이터를 종양 샘플의 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계의 결정에 의해 동정할 수 있다. 다른 예로서, 개별 환자로부터의 정상 상응하는 조직과 비교해서 종양 샘플에 대해 고유한 돌연변이를 포함하는 단백질을 확인할 수 있고, 그 돌연변이를 특이적으로 표적화하는 TUMAP를 동정가능하다. 예를 들어, 종양 및 상응하는 정상 조직의 게놈은 전체 게놈의 서열결정에 의해

서열을 결정할 수 있다. 유전자의 단백질 코딩 영역에서 비동의 돌연변이 발견을 위해, 종양 조직으로부터 게놈의 DNA 및 RNA를 추출하고, 정상적인 비돌연변이 게놈 생식계열 DNA는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 추출한다. 응용 NGS 접근방식은 단백질 코딩 영역의 재-서열결정으로 제약된다(엑솜 재-서열결정). 이 목적을 위해, 인간 샘플로부터 엑손 DNA를 업체가 공급한 표적 강화 키트를 사용하여 포획한 다음, 예를 들어 HiSeq2000(Illumina)으로 서열을 결정한다. 추가적으로, 유전자 발현의 직접적 정량화 및 돌연변이된 유전자가 환자의 종양에서 발현된다는 검증을 위해 종양 mRNA의 서열을 결정한다. 그에 따른 수백만의 서열 리드는 소프트웨어 알고리즘을 통해 처리된다. 출력 목록에는 돌연변이와 유전자 발현이 포함된다. 종양 특이적 체세포 돌연변이는 PBMC 유래된 생식계열 변이와 비교하여 결정된 다음 우선순위화한다. 다음에는 새로 동정된 펩티드를 상기 창고의 면역원성에 대해 시험할 수 있고, 적절한 면역원성을 소유하는 후보 TMAP를 선택하여 백신에 포함시킨다.

- [0379] 한 예시적 구현에서, 백신에 포함된 펩티드는 다음에 의해 확인된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드들(TUMAP)을 위에 설명한 방법으로 동정하는 단계; (b) 상응하는 정상 조직과 비교하여 종양에서 면역원성과 과다-제시에 대해 사전선별된 펩티드들의 창고를 이용하여 (a)에서 동정된 펩티드와 비교하는 단계; (c) 환자에서 동정된 종양-연관 펩티드와 상관관계가 있는 하나 이상의 펩티드를 창고에서 선택하는 단계; 및 (d) 임의적으로, (a)에서 새로 동정된 하나 이상의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인하는 단계.
- [0380] 한 예시적 구현에서, 백신에 포함된 펩티드는 다음에 의해 확인된다: (a) 개인 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드(TUMAP)를 동정하는 단계; 및 (b) (a)에서 새로 동정된 하나 이상의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인하는 단계.
- [0381] 개인화 펩티드 기반 백신에 대한 펩티드를 선택하면, 백신이 생산된다. 백신은 바람직하게는 20 내지 40% DMSO, 바람직하게는 약 30 내지 35% DMSO(약 33% DMSO 등)에 용해된 개별 펩티드들로 구성되는 액체 제형이다.
- [0382] 제품에 포함되어야 할 펩티드를 각각 DMSO에 용해한다. 단일 펩티드 용액의 농도는 제품에 포함시킬 펩티드의 수에 의존하여 선택해야 한다. 단일 펩티드-DMSO 용액은 동등하게 혼합하여 제품에 포함되는 모든 펩티드를 포함하는 용액이 펩티드 당 약 2.5 mg/mL의 농도를 갖도록 한다. 다음 혼합된 용액을 주사용 수와 1:3의 비율로 희석하여 33% DMSO에서 펩티드 당 0.826 mg/mL의 농도를 달성한다. 희석된 용액을 0.22 μ m 무균 필터를 통해 여과시킨다. 최종 벌크 용액을 얻는다.
- [0383] 최종 벌크 용액을 바이알에 채운 다음 사용 때까지 -20°C 에서 보관한다. 바이알 하나에는 700 μ L의 용액을 함유하고 각 펩티드를 0.578 mg씩 함유한다. 이 가운데 500 μ L(펩티드 당 약 400 μ g)는 피내 주사에 응용한다.
- [0384] 암 치료에 유용함에 덧붙여, 본 발명의 펩티드는 진단제로도 유용하다. 펩티드가 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 세포에서 생성되고 이런 펩티드가 정상 조직에서는 나타나지 않거나 적은 수준으로 나타난다는 것이 결정되었기 때문에, 이런 펩티드는 암의 존재의 진단에 사용될 수 있다.
- [0385] 혈액 세포에서 청구된 펩티드의 조직 생체 검사에서의 존재는 암의 진단 시 병리학자를 도울 수 있다. 항체, 질량 분석, 또는 이 분야에 알려진 다른 방법을 통한 특정 펩티드의 탐지는 그 조직 샘플이 악성 또는 염증이 있는지 또는 일반적으로 병들어 있는지 또는 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병의 바이오마커로서 사용가능한지 병리학자에게 알려줄 수 있다. 펩티드의 균의 존재는 병든 조직의 분류 또는 하위 분류를 가능하게 한다.
- [0386] 병든 조직 표본의 펩티드의 탐지는 특히 만약 T 림프구가 작용 기전에 참여하는 것으로 알려져 있거나 기대할 때, 면역계를 포함한 치료의 이익에 대한 결정을 내릴 수 있게 한다. MHC 발현의 손실은 감염된 악성 세포가 면역 감시를 탈출하는 데서 잘 설명되는 기전이다. 펩티드의 존재는 이 기전이 분석된 세포에서 이용되지 않는 것을 나타낸다.
- [0387] 본 발명의 펩티드는 펩티드 또는 MHC 분자에 복합된 펩티드에 대한 T 세포 반응 또는 항체 반응 같은 펩티드에 대한 림프구 반응을 분석하는 데 사용될 수 있다. 이런 림프구 반응은 추가 치료 단계에서 결정을 내릴 때 전조 표지자로 사용될 수 있다. 이런 반응은 또한 림프구 반응을 여러 수단으로, 예를 들어, 단백질 백신, 핵산, 자가조직 물질, 림프구의 양자 전송에 의해 유도하는 것을 목표로 하는 면역치료 접근방식의 대리 반응 표지자로 사용될 수 있다. 유전자 치료 설정에서, 펩티드에 대한 림프구 반응은 부작용의 평가에서 고려할 수 있다. 림프구 반응의 모니터링은 이식 요법의 후속 시험을 위한 중요한 도구가 될 수도 있다(예를 들어, 이식편 대 숙주 및 숙주 대 이식편 질병의 검출).
- [0388] 본 발명을 이의 바람직한 구현을 기술하는 하기 실시예에 첨부된 도면을 참조하여 기술되지만, 이로 제한되지

않는다. 본 발명의 목적을 위하여, 본원에 인용된 모든 참조문헌은 그 전문이 참조로 혼입된다.

도면의 간단한 설명

[0389]

도 1a 내지 도 1w는 여러 암 샘플에서 고도로 발현된 본 발명의 근원 유전자에 대한 예시적 발현 프로파일을 보여준다. 종양(검은 색 점)과 정상(회색 점) 샘플은 원발 장기에 따라 그룹화되고, 상자 수염 도표는 중간값, 25 번째 및 75 번째 백분위수(상자) 및 최소치 및 최대치(수염) RPKM 값을 나타낸다. 정상 기관은 위험 범주에 따라 순서대로 나와 있다. RPKM = 킬로베이스당 및 매핑된 리드 백만 개 당 리드. 정상 샘플: 혈액 세포; 혈관; 뇌; 심장; 간; 폐; adipose: 지방 조직; adren.gl.: 부신; 담관; 방광; BM: 골수; 연골; esoph: 식도; 눈; gallb: 담낭; 두경부; 신장; large_int: 대장; LN: 림프절; 신경; 췌장; parathyr: 부갑상선; perit: 복막; pituit: 뇌하수체; skel.mus: 골격근; 피부; small_int: 소장; 비장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁. 종양 샘플: AML: 만성 골수성 백혈병; CLL: 만성 림프구성 백혈병; NHL: 비호지킨 림프종. 도 1a) 유전자 부호: S100Z, 펩티드: TMIRIFHRY(서열 식별 번호 2); 도 1b) 유전자 부호: PAX5, 펩티드: YSHPQYSSY(서열 식별 번호 9), 도 1c) 유전자 부호: FLT3, 펩티드: SLFEGIYTI(서열 식별 번호 19), 도 1d) 유전자 부호: RALGPS2, 펩티드: ILHAQTLKI(서열 식별 번호 22), 도 1e) 유전자 부호: FCRL2, 펩티드: KTSNIVKIK(서열 식별 번호 32), 도 1f) 유전자 부호: KBTBD8, 펩티드: RSKEYIRKK(서열 식별 번호 40), 도 1g) 유전자 부호: ZNF92, 펩티드: KAFNQSSSTLTK(서열 식별 번호 52), 도 1h) 유전자 부호: ADAM28, 펩티드: KYIEYLV(서열 식별 번호 53), 도 1i) 유전자 부호: FLT3, 펩티드: IFKEHNFSF(서열 식별 번호 61), 도 1j) 유전자 부호: ZNF92, 펩티드: KAFSWSSAF(서열 식별 번호 76), 도 1k) 유전자 부호: FCRL3, 펩티드: IPVSHPLV(서열 식별 번호 85), 도 1l) 유전자 부호: CDK6, 펩티드: FGLARIYSF(서열 식별 번호 110), 도 1m) 유전자 부호: CLEC17A, 펩티드: VTLIKYQEL(서열 식별 번호 111), 도 1n) 유전자 부호: RALGPS2, 펩티드: YIKTAKKL(서열 식별 번호 117), 도 1o) 유전자 부호: CDK6, 펩티드: GEGAYGKVF(서열 식별 번호 129), 도 1p) 유전자 부호: FCRL2, 펩티드: RENQVLGSGW(서열 식별 번호 139), 도 1q) 유전자 부호: FLT3, 펩티드: REYEYDLKWEF(서열 식별 번호 141), 도 1r) 유전자 부호: BMF, 펩티드: VTEEPQRLFY(서열 식별 번호 189), 도 1s) 유전자 부호: FCER2, 펩티드: LLWHWDTTQSLK(서열 식별 번호 212), 도 1t) 유전자 부호: CDK6, 펩티드: MPLSTIREV(서열 식별 번호 231), 도 1u) 유전자 부호: CLEC17A, 펩티드: SPRVYWLGL(서열 식별 번호 233), 도 1v) 유전자 부호: PMAIP1, 펩티드: QPSPARAPAE(서열 식별 번호 247), 도 1w) 유전자 부호: CDK6, 펩티드: AEIGEGAYGKVF(서열 식별 번호 260).

도 2는 건강한 HLA-A*02+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 278 펩티드(YLDRKLLTL, 서열 식별 번호 278)(A, 왼쪽 패널)와의 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*02로 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 3주기의 자극 후, A*02/서열 식별 번호 278(A)로 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널(B)은 관련이 없는 A*02/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리(singlet) 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 불리언 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

도 3은 건강한 HLA-A*24+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 279 펩티드와의 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*24로 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다(A, 왼쪽 패널). 3주기의 자극 후, A*24/서열 식별 번호 279(LYIDRPLPYL, 서열 식별 번호 279)(A)로 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널(B)은 관련이 없는 A*24/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 불리언 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

도 4는 건강한 HLA-A*01+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 12 펩티드(ATDIVDSQY, 서열 식별 번호 12; A, 왼쪽 패널) 및 서열 식별 번호 192 펩티드(RSDPGGGGLAY, 서열 식별 번호 192; B, 왼쪽 패널)와의 각 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*01로 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 3주기의 자극 후, A*01/서열 식별 번호 12(A) 또는 A*01/서열 식별 번호 192(B)로 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널들(A 및 B)은 관련이 없는 A*01/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 불리언 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

도 5는 건강한 HLA-A*02+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서

열 식별 번호 19 펩티드(SLFEGIYTI, 서열 식별 번호 19; A, 왼쪽 패널) 및 서열 식별 번호 26 펩티드 (LYVQQLKI, 서열 식별 번호 26; B, 왼쪽 패널)와의 각 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*02로 코팅된 인공 APC 를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 3주기의 자극 후, A*02/서열 식별 번호 19(A) 또는 A*02/서열 식별 번호 26(B)로 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널들(A 및 B)은 관련이 없는 A*02/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 불리언 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

도 6은 건강한 HLA-A*03+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 45 펩티드(VVFPFVNK, 서열 식별 번호 45; A, 왼쪽 패널) 및 서열 식별 번호 215 펩티드 (KATGAATPK, 서열 식별 번호 215; B, 왼쪽 패널)와의 각 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*03으로 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 3주기의 자극 후, A*03/서열 식별 번호 45(A) 또는 A*03/서열 식별 번호 215(B)로 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널들(A 및 B)은 관련이 없는 A*03/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 불리언 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

도 7은 건강한 HLA-A*24+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 53 펩티드(KYIEYYLVL, 서열 식별 번호 53; A, 왼쪽 패널), 서열 식별 번호 68 펩티드(LYQDRFDYL, 서열 식별 번호 68; B, 왼쪽 패널)와의 각 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*24로 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 3주기의 자극 후, A*02/서열 식별 번호 53(A) 또는 A*24/서열 식별 번호 68(B)로 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널들(A 및 B)은 관련이 없는 A*24/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 불리언 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

도 8은 건강한 HLA-A*07+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 233(SPRVYWLGL, 서열 식별 번호 233, A, 왼쪽 패널) 및 서열 식별 번호 84 펩티드(SPKLQIAAM, 서열 식별 번호 84; B, 왼쪽 패널)와의 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-B*07로 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 3주기의 자극 후, B*07/서열 식별 번호 233(A) 또는 B*07/서열 식별 번호 84(B)로 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널들(A 및 B)은 관련이 없는 B*07/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 불리언 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

도 9는 건강한 HLA-B*44+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관 내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 145 펩티드(AEPLVGQRW, 서열 식별 번호 145; A, 왼쪽 패널) 및 서열 식별 번호 171 펩티드 (SEDLAVHLY, 서열 식별 번호 171; B, 왼쪽 패널)와의 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-B*44로 코팅된 인공 APC 를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 3주기의 자극 후, B*44/서열 식별 번호 145(A) 또는 B*44/서열 식별 번호 171(B)로 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널들(A 및 B)은 관련이 없는 B*44/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 불리언 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0390]

실시예

[0391]

실시예 1

[0392]

세포 표면에 제시된 종양 연관 펩티드의 동정

[0393]

조직 샘플

[0394]

환자의 종양 샘플과 정상 조직은 University Hospital Tuebingen(독일 튀빙겐 소재)으로부터 얻었다. 모든 환자의 고지에 의한 동의서가 채혈 전에 제출되었다. PBMC의 혈액 샘플에서의 단리는 채혈 후 즉시 피콜-하이파크

밀도 구배 원심분리를 사용하여 실행했다. PBMC 펠릿은 정제 후 즉시 충격-동결한 다음 TUMAP의 단리까지 -70℃ 이하에서 보관했다.

- [0395] 조직 샘플에서 HLA 펩티드의 단리
- [0396] 약간 변형된 프로토콜(Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999)에 따르면, 충격-동결된 조직 샘플의 HLA 펩티드 풀은 단단한 조직의 면역 촉진에 의해 HLA-A*02-특이 항체 BB7.2 또는 HLA-A, -B, -C-특이적 항체 W6/32, CNBr-활성화된 세파로오스, 산성 처리와 한외 여과를 이용해 취득되었다.
- [0397] 질량 분광 분석
- [0398] 얻어진 HLA 펩티드 풀은 그들의 소수성에 의해 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리되었고(Ultimate 3000 RSLC Nano UHPLC System, Dionex) 용출되는 펩티드는 ESI 소스를 갖춘 LTQ-Orbitrap 및 융합 하이브리드 질량 분석기(ThermoElectron)에 의해 분석되었다. 펩티드 샘플은 2cm PepMap 100 C18 Nanotrap 컬럼(Dionex)에 3%의 용매 B(20% H₂O, 80% 아세토니트릴 및 0.04% 포름산)를 사용하여 4 μL/분의 유속 및 10분의 조건하에서 로딩했다. 50℃에서 작동하는 컬럼 오븐에 장착된 입자 크기 2 μm인 25cm 또는 50cm PepMap C18 컬럼(Dionex)에서 분리를 수행했다. 적용된 기울기 범위는 300nL/분의 유속에서(25cm 컬럼 사용) 90분 동안 또는 175nL/분의 유속에서(50cm 컬럼 사용) 140분 동안 용매 B 3% 내지 40%였다. (용매 A: 99% H₂O, 1% ACN 및 0.1% 포름산; 용매 B: 20% H₂O, 80% ACN 및 0.1% 포름산).
- [0399] 질량 분석은 top five 방법(즉, 각 조사 스캔 동안 가장 풍부한 전구체 이온 5개를 단편화에 선택)을 사용하여 데이터 의존 획득 방식으로 수행했다. 대안으로는 Fusion Lumos 기기에서의 분석을 위해 TopSpeed 방법이 채택되었다.
- [0400] 조사 스캔은 60,000의 분해능으로(Orbitrap XL 사용) 또는 120,000의 분해능으로(Orbitrap Fusion Lumos 사용) Orbitrap에 기록했다. MS/MS 분석은 충돌 유도 해리(CID, 정규화 충돌 에너지 35%, 활성화 시간 30ms, 단리 너비 1.3 m/z)에 의해 수행했으며, 추후 분석은 선형 트랩 사중극자형(LTQ)에서 수행했다. HLA 클래스 I 리간드의 질량 범위는 400 내지 650m/z로 제한되었으며 단편화에 가능한 전하 상태는 2+ 및 3+를 선택했다. HLA 클래스 II는 질량 범위를 300 내지 1,500m/z로 설정하며 모든 양전하 상태 ≥ 2로써 단편화를 허용했다.
- [0401] 탄뎀 질량 스펙트럼은 고정된 Percolator 위발견율($q \leq 0.05$) 및 추가의 수동 제어로 MASCOT 또는 SEQUEST에 의해 해석했다. 동정된 펩티드 서열이 불확실한 경우, 그것은 서열이 동일한 합성 표준 펩티드의 단편화 패턴과 생성된 천연 펩티드의 단편화 패턴과 비교하여 이를 추가로 검증하였다.
- [0402] 표 8a 및 8b는 선택되는 펩티드에 대한 다양한 암 객체의 제시 및 지적된 암들의 진단 및/또는 치료에 대해 언급된 특정 관련성을 보여준다(예컨대, AML, CML(표 8a) 및 GBC, MEL, NHL, NSCLC 및 UBC(표 8b)에 대해 펩티드 서열 식별 번호 3, CLL(표 8a) 및 BRCA, CCC, CRC, GBC, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLCadeno, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC(표 8b)에 대해 펩티드 서열 식별 번호 4).
- [0403] 표 8a는 객체에 걸쳐 본 발명의 선택되는 종양-연관 펩티드 제시의 개요이다(CLL = 만성 림프구성 백혈병, AML = 급성 골수성 백혈병, CML = 만성 골수성 백혈병).

[0404] [표 8a]

서열 식별 번호	서열	암 객체상의 펩티드 제시
1	LTEGHSGNYY	CLL
2	TMIRIFHRY	AML
3	YINPAKLTPY	CLL
4	ALDQNKMHY	AML
5	GTDVLSTRY	AML, CML
6	VTEGVAQTSFY	CLL
7	FMDSESFYY	CLL
8	STDSAGSSY	CLL
9	YSHQPQYSSY	CLL
10	YSDIGHLL	CLL
11	AAADHHSLY	AML
12	ATDIVDSQY	CLL
13	ITDIHIKY	CLL
14	TFDLTVVSY	CLL
15	SVADIRNAY	CLL
16	WIGDKSFY	AML
17	KAYNRVIFV	CLL
18	YLLPSVLL	CLL
19	SLFEGIYTI	AML
20	FSLEDLVRI	CLL
21	FLFDKLLLI	CLL
22	ILHAQTLKI	CLL
23	FAFSGVLRA	AML
24	KLGPVAVSI	CLL
25	YLNEKSLQL	AML, CML
26	SLYVQQLKI	CLL
27	RLIAKEMNI	CLL
28	VILESIFLK	CLL
29	RIYDEILQSK	AML
30	RTYGFVLTf	CLL
31	ATFNKLVSY	AML
32	KTSNIVKIK	CLL
33	SVFEGDSIVLK	CLL
34	SVYSETSNMDK	CLL

[0405]

서열 식별 번호	서열	암 객체상의 펩티드 제시
35	ATKSPAKPK	CLL
36	KAKAAAKPK	CLL
37	KAKKPAGAAK	CLL
38	KARKSAGAAK	CLL
39	IVIQLRAQK	CLL
40	RSKEYIRKK	CLL
41	SVAHLLSKY	CLL
42	SVSSSTHFTR	CLL
43	KLMETSMGF	CLL
44	KVYDPVSEY	CLL
45	VVFPFPVNK	AML, CML
46	RVFPSPMRI	CLL
47	SVLDLSVHK	CLL
48	RIKPPGPTAVPK	AML
49	GLLEEALFY	AML
50	GVFNTLISY	AML
51	ASTTVLALK	CLL
52	KAFNQSSTLTK	CLL
53	KYIEYYLVL	CLL
54	QQALNFTRF	CLL
55	IFVARLYYF	CLL
56	KYSSGFRNI	CLL
57	RFPPTPPLF	CLL
58	KYLADLPTL	CLL
59	GLYEGTGRLF	AML
60	TQDPHVNAFF	CLL
61	IFKEHNFSF	AML
62	YYLSHLERI	AML
63	IYFSNTHFF	AML
64	SFQSKATVF	AML
65	AYLKQVLLF	CLL
66	SQPAVATSF	AML
67	VFLPSEGFNF	AML
68	LYQDRFDYL	AML
69	EYNTIKDKF	CLL
70	LYSDIGHLL	CLL
71	RYLGKNWSF	AML

[0406]

서열 식별 번호	서열	암 객체상의 펩티드 제시
72	TYVENLRLL	CLL
73	TYPQLEGFKF	CLL
74	SYADNILSF	CLL
75	RFYLLTEHF	AML
76	KAFSWSSAF	CLL
77	RPNGNSLFTSA	CLL
78	RPRGLALVL	AML, CML
79	SPVPSHWMVA	CLL
80	KPLFKVSTF	CLL
81	SESPWLHAPSL	CLL
82	APFGFLGMQSL	CLL
83	IPVSRPIL	CLL
84	SPKLQIAAM	CLL
85	IPVSHPVL	CLL
86	IPASHPVL	CLL
87	FPAPILRAV	CLL
88	MPDPHLYHQM	CLL
89	FPETVNNLL	CLL
90	KPKAAKPKA	CLL
91	KPKAAKPKAA	CLL
92	KAKKPAGAA	CLL
93	KARKSAGAA	CLL
94	KPKAAKPKKAAA	CLL
95	KPKAAKPKTA	CLL
96	KPKKAPKSPA	CLL
97	LPFGKIPIL	AML, CML
98	YPIALTRAEM	CLL
99	SPRAINNLVL	CLL
100	YPYQERVFL	CML
101	NPRYPNYMF	CLL
102	LPLSMEAKI	CML
103	IPANTEKASF	CLL
104	RPMTPTQIGPSL	CLL
105	NPLTKLLAI	AML
106	KAFKWFSAL	CLL
107	QAAQRTAL	CLL
108	ILAIRQNAL	CLL

[0407]

서열 식별 번호	서열	암 객체상의 펩티드 제시
109	LGHVRYVL	CLL
110	FGLARIYSF	AML, CML
111	VTLIKYQEL	CLL
112	APLLRHWEL	CLL
113	DANSRTSQL	CLL
114	HNALRILTF	AML
115	ELYQRIYAF	AML
116	TLKIRAEVL	CLL
117	YIKTAKKL	CLL
118	FEKEKKESL	CLL
119	DLRTKEVVF	CLL
120	VPPKKHLL	CLL
121	RPKKVNTL	CLL
122	KELPGVKKY	CLL
123	EENPGKFLF	CLL
124	SESLPKEAF	CLL
125	SESTFDRTF	CLL
126	EENKPGIVY	CLL
127	TEYPVYVY	AML
128	GENDRLNHTY	CLL
129	GEGAYGKVF	AML
130	EEEHGKGREY	CLL
131	EEFETIERF	CLL
132	GELPAVRDL	CLL
133	AEHNFVAKA	CLL
134	SEYADTHYF	CLL
135	NEIKVYITF	AML, CML
136	AEYKGRVTL	CLL
137	GELGGSVTI	CLL
138	SQAPAARAF	CLL
139	RENQVLGSGW	CLL
140	EYDLKWEF	AML
141	REYDYDLKWEF	AML
142	TEIFKEHNF	AML
143	YEYDLKWEF	AML
144	TEGKRYFTW	CLL
145	AEPLVGQRW	CLL

[0408]

서열 식별 번호	서열	암 객체상의 펩티드 제시
146	SESKTVVVTY	CLL
147	KEVPRSYEL	CLL
148	REYNEYENI	CLL
149	SEKETVAYF	CLL
150	EEVTDRSQL	CLL
151	EVDASIFKAW	CLL
152	AELLAKELY	CLL
153	KEFEQVPGHL	CLL
154	AEPGPVITW	CLL
155	NEFPVIVRL	CLL
156	FEVESLFQKY	CLL
157	VEIAEAIQL	CLL
158	GENEDNRIGL	CLL
159	GELLGRQSF	CLL
160	EEETILHFF	CLL
161	EEGDTLLHLF	CLL
162	DEAQARAAF	AML
163	EEWMGLLEY	AML
164	SEYSHLTRV	AML
165	VELDLQRSV	AML
166	NEVLASKY	CLL
167	KEIGAAVQAL	CLL
168	QEIQSLLTNW	CLL
169	EENGEVKEL	CLL
170	SENEQRRMF	CLL
171	SEDLAVHLY	CLL
172	VEDGLFHEF	CLL
173	KEYDFGTQL	AML
174	TDKSFPNAY	CLL
175	HEIDGKALFL	AML
176	AENAVSNLSF	CLL
177	QENMQIQSF	CLL
178	REYEHYWTEL	CLL
179	AEIKQTEEKY	AML
180	EEPAFNVSY	CLL
181	GEIKEPLEI	CLL
182	AQNLSIIQY	CLL

[0409]

서열 식별 번호	서열	암 객체상의 펩티드 제시
183	GESQDSTTAL	CLL
184	RMPPFTQAF	CLL
185	SEGDNVESW	CLL
186	NEQKIVRF	CLL
187	SDAQRPSF	CLL
188	YVDAGTPMY	CLL
189	VTEEPQRLFY	CLL
190	HVDQDLTTY	AML
191	ISEAGKDLLY	AML, CML, CLL
192	RSDPGGGGLAY	AML
193	LTDSEKGNYSY	CLL
194	YTDKKSIIY	CLL
195	YSDKEFAGSY	CLL
196	FTDIDGQVY	CLL
197	SLADVHIEV	CLL
198	KLLGYDVHV	AML
199	AMPDSPAEV	AML
200	VMLQINPKL	CLL
201	ILAAVETRL	CLL
202	MVALPMVLV	CLL
203	FLLPKVQSI	CLL
204	FLLPKVQSIQL	CLL
205	FLINTNSEL	CLL
206	SLMDLQERL	CLL
207	KLSDNILKL	CLL
208	KLNPQQAPLY	CLL
209	KTLPAMLGTGK	CLL
210	RMYSQLKTLQK	CLL
211	ATYNKQPMYR	CML
212	LLWHWDTTQSLK	CLL
213	RVYNIYIRR	AML
214	ATGAATPKK	CLL
215	KATGAATPK	CLL
216	RIKAPSRNTIQK	CLL
217	TTVPHVFSK	CLL
218	RVLTGVFTK	CLL
219	HSYSSPSTK	CLL

[0410]

서열 식별 번호	서열	암 객체상의 펩티드 제시
220	SISNLVFTY	AML
221	LLNRHILAH	CLL
222	RYLDEINLL	AML
223	RRMYPPPLI	CLL
224	VYEYVVERF	CLL
225	LPARFYQAL	CLL
226	YLNRLHHTW	CLL
227	APINKAGSFL	CLL
228	SPRITFPSL	CLL
229	SPLGSLARSSL	CLL
230	KPMKSVLVV	CLL
231	MPLSTIREV	AML, CML
232	APRPAGSYL	CLL
233	SPRVYWLGL	CLL
234	SPKESENAL	CLL
235	SPSLPSRTL	CLL
236	RPSNKAPLL	CLL
237	SPWLHAPSL	CLL
238	SPRSWIQVQI	CLL
239	APSKTSLIM	CLL
240	SPSLPNITL	CLL
241	APAPAEKTPV	CLL
242	SPFSFHHLV	CLL
243	LPKVQSIQL	CLL
244	MPSSDTTVTF	CLL
245	SPLSHHSQL	CLL
246	YPGWHSTTI	AML
247	QPSPARAPAE	CLL
248	LPYDSKHQI	CLL
249	SPADHRGYASL	AML
250	VPNLQTVSV	CLL
251	QPRLFTMDL	CLL
252	RPHIPISKL	CLL
253	RPFADLLGTAF	CLL
254	SPRNLQPQRAAL	CLL
255	YPGSDRIML	CLL
256	SPYKKLKEAL	CLL

[0411]

서열 식별 번호	서열	암 객체상의 펩티드 제시
257	KEFFFVKVF	CLL
258	EELFRDGVNW	CLL
259	EENTLVQNY	CLL
260	AEIGEGAYGKVF	AML
261	NEIEHIPVW	CLL
262	QENQAETHAW	CLL
263	REAGFQVKAY	CLL
264	SEDHSGSYW	CLL
265	QEVDAIFKAW	CLL
266	VDASIFKAW	CLL
267	KEKFPINGW	CLL
268	NEDKGTKAW	CLL
269	KELEDLNKW	CLL
270	AESEDLAVHL	CLL
271	AESEDLAVHLY	CLL
272	KEFELRSSW	CLL
273	AEIEIVKEEF	CLL
274	GEAVTDHPDRLW	CLL
275	TENPLTKLL	AML
276	EEEGNLLRSW	CLL
277	EEGNLLRSW	CLL

[0412]

[0413]

표 8b는 객체에 걸쳐 본 발명의 선택되는 종양-연관 펩티드 제시의 개요이다(BRCA = 유방암, CCC = 담관암, GBM = 뇌암, CRC = 대장 암종, OSCAR = 식도암, GBC = 담낭 선암종, GC = 위암, HNSCC = 두경부 편평세포 암종, HCC = 간세포 암종, MEL = 흑색종, NHL = 비호지킨 림프종, NSCLCadeno = 비소세포 폐암 선암종, NSCLCother = NSCLCadeno 또는 NSCLCsquam에 확실히 지정될 수 없는 NSCLC 샘플, NSCLCsquam = 편평세포 비소세포 폐암, OC = 난소암, PACA = 췌장암, PRCA = 전립선암 및 양성 전립선 비대증, RCC = 신세포 암종, SCLC = 소세포 폐암, UBC = 방광암, UEC = 자궁암).

[0414] [표 8b]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
1	LTEGHSGNYY	NHL
3	YINPAKLTPY	GBC, MEL, NHL, NSCLCother, UBC
4	ALDQNKMHY	BRCA, CCC, CRC, GBC, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
5	GTDVLSTRY	BRCA, CRC, GBC, GC, GEJC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
6	VTEGVAQTSFY	BRCA, CCC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UEC
7	FMDSESFYY	BRCA, GBC, GC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam
8	STDSAGSSY	NHL
10	YSDIGHLL	BRCA, CCC, GC, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, PACA, RCC, UEC
11	AAADHHSLY	GC, SCLC
13	ITDIHIKY	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC
14	TFDLTVVSY	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
15	SVADIRNAY	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
16	WIGDKSFY	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, MEL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, RCC
17	KAYNRVIFV	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GEJC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UBC, UEC
18	YLLPSVLL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
20	FSLEDLVRI	NHL
21	FLFDKLLLI	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC,

[0415]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
		MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
22	ILHAQTLKI	HCC, NHL, NSCLCsquam, PRCA
23	FAFSGVLRA	BRCA, CRC, GBC, GEJC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PRCA, SCLC, UBC, UEC
24	KLGPVAVSI	HCC, HNSCC, NHL, NSCLCsquam, OSCAR, PRCA
25	YLNEKSLQL	BRCA, CCC, CRC, GEJC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
26	SLYVQQLKI	HNSCC, NHL, OC, PRCA
27	RLIAKEMNI	HCC, NHL
28	VILESIFLK	GBC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PRCA, UEC
29	RIYDEILQSK	RCC
31	ATFNKLVSY	CRC, SCLC, UBC
33	SVFEGDSIVLK	NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, OC
34	SVYSETSNMD K	BRCA, MEL, NHL, NSCLCsquam, OC, OSCAR, RCC, UEC
41	SVAHLLSKY	UEC
42	SVSSSTHFTR	GC, HNSCC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, UEC
43	KLMETSMGF	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
44	KVYDPVSEY	BRCA, CCC, GBC, GBM, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, RCC, SCLC, UBC, UEC
45	VVFPPVNVK	GBM, NHL, NSCLCother, OC, SCLC, UEC
46	RVFPSPMRI	MEL, NHL, NSCLCsquam, OSCAR, SCLC
47	SVLDLSVHK	CCC, HCC, NHL, OSCAR, PRCA, SCLC, UEC
48	RIKPPGPTAVP K	BRCA, MEL
49	GLLEEALFY	BRCA, CRC, GBC, GC, HCC, MEL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, RCC
50	GVFNTLISY	MEL, PRCA
51	ASTTVLALK	NHL
53	KYIEYYLVL	GC, NSCLCadenos, NSCLCsquam, UEC

[0416]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
54	QQALNFTRF	GBC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, RCC, SCLC
55	IFVARLYYF	BRCA, CRC, GBC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
56	KYSSGFRNI	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UEC
57	RFPPTPLF	HNSCC, NHL, NSCLCsquam, OSCAR, UEC
58	KYLADLPTL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PRCA, RCC, SCLC, UEC
60	TQDPHVNAFF	BRCA, CRC, GBC, GEJC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
62	YYLSHLERI	GBC, HNSCC, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, UBC
65	AYLKQVLLF	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
66	SQPAVATSF	CRC, SCLC
67	VFLPSEGFNF	MEL, NSCLCadenos, SCLC
68	LYQDRFDYL	GC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, PRCA, SCLC, UEC
69	EYNTIKDKF	GBC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, SCLC, UEC
70	LYSDIGHLL	CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PRCA, RCC, UBC, UEC
71	RYLGKNWSF	GBC, OC, RCC
72	TYVENLRLI	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
73	TYPQLEGFKF	BRCA, CRC, GBC, GC, GEJC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
74	SYADNILSF	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL,

[0417]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
		NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
75	RFYLLTEHF	CRC, GBC, HCC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, SCLC
76	KAFSWSSAF	BRCA, GBM, NHL, NSCLCsquam, PRCA, SCLC, UBC
77	RPNGNSLFTSA	HCC, MEL, NHL, PRCA, SCLC, UEC
78	RPRGLALVL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
79	SPVPSHWMVA	CCC, MEL, NHL, PRCA, SCLC, UBC
80	KPLFKVSTF	NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, RCC, UEC
84	SPKLQIAAM	NHL, OC
85	IPVSHPVL	NHL
86	IPASHPVL	GBC, MEL, NHL, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, SCLC
87	FPAPILRAV	GBC, GC, MEL, NHL, NSCLCother, UBC
88	MPDPHLYHQM	MEL, NHL, NSCLCsquam
89	FPETVNNLL	NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, PACA
97	LPFGKIPIL	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
98	YPIALTRAEM	BRCA, CCC, GBC, GC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UEC
99	SPRAINNLVL	NHL
100	YPYQERVFL	NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam
101	NPRYPNYMF	NHL
104	RPMTPTQIGPS L	NHL
105	NPLTKLLAI	CCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC
106	KAFKWFSAL	NHL
108	ILAIRQNAL	CCC, NHL, OC
109	LGHVRYVL	CCC, GBM, NHL, UBC
110	FGLARIYSF	BRCA, CCC, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC

[0418]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
112	APLLRHWEL	BRCA, CCC, CRC, GBC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, SCLC
113	DANSRTSQL	MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, UEC
114	HNALRILTF	BRCA, NHL, NSCLCother, NSCLCsquam
115	ELYQRIYAF	HNSCC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, PRCA, SCLC
116	TLKIRAEVL	CCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PRCA, SCLC
118	FEKEKKESL	OC
119	DLRTKEVVF	GC, NHL
122	KELPGVKKY	CCC, CRC, GC, HCC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, RCC, UEC
123	EENPGKFLF	HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, PRCA
124	SESLPKEAF	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
126	EENKPGIVY	CRC, HCC, NHL
128	GENDRLNHTY	NHL
129	GEGAYGKVF	HCC, HNSCC, NSCLCadenos, OC, OSCAR, RCC
131	EEFETIERF	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
132	GELPAVRDL	CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA
133	AEHNFVAKA	BRCA, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, OC, OSCAR
134	SEYADTHYF	NHL
135	NEIKVYITF	BRCA, CRC, HNSCC, NSCLCadenos, NSCLCsquam, PRCA, RCC
136	AEYKGRVTL	NHL, OSCAR
138	SQAPAARAF	NHL, NSCLCadenos
139	RENQVLGSGW	NHL
143	YEYDLKWEF	NHL
144	TEGKRYFTW	MEL, NHL
145	AEPLVGQRW	NHL, PRCA, UBC

[0419]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
146	SESKTVVVTY	CRC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
147	KEVPRSYEL	HNSCC, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, OSCAR, RCC
148	REYNEYENI	NHL, NSCLCadenoc, OSCAR
149	SEKETVAYF	MEL, NHL
150	EEVTDRSQL	GBC, GC, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC
151	EVDASIFKAW	BRCA, CCC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, NHL, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
152	AELLAKELY	CCC, CRC, NHL, NSCLCsquam, UEC
154	AEPGPVITW	NHL
155	NEFPVIVRL	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
156	FEVESLFQKY	BRCA, CRC, GBC, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UEC
157	VEIAEAIQL	CCC, CRC, HNSCC, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC
159	GELLGRQSF	BRCA, CCC, CRC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, OC, PACA, RCC, UEC
160	EEETILHFF	NHL
161	EEGDTLLHLF	CRC, HNSCC, NHL, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, UBC, UEC
164	SEYSHLTRV	RCC
166	NEVLASKY	BRCA, CCC, CRC, GBC, GC, HCC, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PRCA, SCLC, UBC, UEC
167	KEIGAAVQAL	NSCLCadenoc, NSCLCother, OC
168	QEIQSLLTNW	CCC, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, RCC, SCLC, UEC
169	EENGEVKEL	NHL
171	SEDLAVHLY	BRCA, CRC, GC, HCC, HNSCC, NHL, OSCAR, PACA, PRCA, UBC

[0420]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
172	VEDGLFHEF	BRCA, CRC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, UBC, UEC
174	TDKSFPNAY	PRCA, SCLC
176	AENAVSNLSF	NHL
177	QENMQIQSF	BRCA, CCC, CRC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UBC, UEC
178	REYEHYWTEL	MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, OSCAR
179	AEIKQTEEKY	HCC
180	EPPAFNVSY	BRCA, CCC, GBC, NHL, NSCLCadenoc, OC, OSCAR
181	GEIKEPLEI	BRCA, CCC, CRC, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, RCC, UEC
182	AQNLSIIQY	BRCA, GBC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PRCA
183	GESQDSTTAL	CCC, HNSCC, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC
184	RMPPFTQAF	BRCA, GBC, GC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, PACA, PRCA, RCC, SCLC
185	SEGDNVESW	NHL
187	SDAQRPFSSF	NSCLCother, RCC
188	YVDAGTPMY	GBC, GBM, GC, NSCLCadenoc, NSCLCsquam
189	VTEEPQRLFY	BRCA, CCC, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
190	HVDQDLTTY	GBM, GC, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, PACA, PRCA
191	ISEAGKDLLY	BRCA, CCC, GEJC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UEC
192	RSDPGGGGLAY	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
193	LTDSEKGNYSY	GBC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, PRCA
195	YSDKEFAGSY	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR,

[0421]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
		PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
196	FTDIDGQVY	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
197	SLADVHIEV	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
198	KLLGYDVHV	BRCA, CRC, NHL, NSCLCother, OC, RCC, UEC
199	AMPDSPAEV	HNSCC, NHL, NSCLCadenos
200	VMLQINPKL	BRCA, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, RCC, SCLC, UEC
201	ILAAVETRL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
203	FLLPKVQSI	BRCA, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR
204	FLLPKVQSIQL	MEL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam
205	FLINTNSEL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
206	SLMDLQERL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UEC
207	KLSDNILKL	CRC, GBC, MEL, NHL, PRCA
208	KLNPQQAPLY	MEL, NHL, OSCAR, UEC
209	KTLPAMLGTG K	NHL, OC
210	RMYSQLKTLQ K	MEL, NHL
211	ATYNKQPMYR	CCC, CRC, GBC, GC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, OSCAR, RCC, SCLC, UEC
213	RVYNIYIRR	NHL, NSCLCadenos, OC
215	KATGAATPK	NSCLCsquam
216	RIKAPSRNTIQK	NHL
217	TTVPHVFSK	BRCA, CCC, CRC, GBC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR,

[0422]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
		PACA, PRCA, RCC, SCLC, UEC
218	RVLTGVFTK	NHL
220	SISNLVFTY	BRCA, CRC, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
221	LLNRHILAH	MEL, UEC
222	RYLDEINLL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
223	RRMYPPPLI	HCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, SCLC, UEC
224	VYEVVVERF	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, GEJC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
225	LPARFYQAL	BRCA, OSCAR
226	YLNRLHTW	NHL, NSCLCsquam
227	APINKAGSFL	MEL, NHL, OC
229	SPLGSLARSSL	GBC, NHL, OC, OSCAR
230	KPMKSVLVV	BRCA, GC, NHL, NSCLCadenoc, OC, OSCAR, UBC
231	MPLSTIREV	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
232	APRPAGSYL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
233	SPRVYWLGL	NHL
234	SPKESENAL	NHL, NSCLCsquam
237	SPWLHAPSL	GBC, NHL, NSCLCadenoc, OC
238	SPRSWIQVQI	BRCA, CRC, GBC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, RCC, SCLC, UEC
239	APSKTSLIM	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
240	SPSLPNITL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenoc, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC

[0423]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
241	APAPAEKTPV	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
242	SPFSFHHL	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
243	LPKVQSIQL	CCC, HCC, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, OSCAR, RCC
244	MPSSDTTVTF	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
245	SPLSHHSQL	GC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR
246	YPGWHSTTI	CRC, HNSCC, NHL
247	QPSPARAPAEI	GBC, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, SCLC
248	LPYDSKHQI	BRCA, CRC, GBC, GBM, GC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
249	SPADHRGYASL	BRCA, CRC, GBC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, RCC, SCLC, UBC, UEC
250	VPNLQTVSV	BRCA, CCC, CRC, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
251	QPRLFTMDL	BRCA, CRC, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, RCC, SCLC, UEC
252	RPHIPISKL	BRCA, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, RCC, SCLC, UBC, UEC
253	RPFADLLGTAF	BRCA, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UBC, UEC
254	SPRNLPQRAAL	CRC, GBC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, RCC, SCLC, UBC
255	YPGSDRIML	MEL, NHL, NSCLCadenos
256	SPYKKLKEAL	BRCA, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PRCA, RCC, SCLC, UBC

[0424]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
257	KEFFFVKVF	BRCA, CRC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, RCC, SCLC, UBC, UEC
258	EELFRDGVNW	CCC, CRC, HCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, PACA, PRCA, UEC
259	EENTLVQNY	BRCA, CRC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
260	AEIGEGAYGKV F	BRCA, CCC, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, UBC, UEC
261	NEIEHIPVW	NHL, OSCAR
262	QENQAETHAW	NHL
263	REAGFQVKAY	MEL, NHL
264	SEDHSGSYW	CRC, GC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam
265	QEVDASIFKAW	BRCA, CCC, CRC, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
266	VDASIFKAW	BRCA, CRC, GBC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, RCC, SCLC, UBC, UEC
267	KEKFPINGW	CRC, HNSCC, NHL, PACA
269	KELEDLNKW	BRCA, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, UEC
270	AESEDLAVHL	MEL, NSCLCsquam
271	AESEDLAVHLY	CRC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, PACA
272	KEFELRSSW	BRCA, CRC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, UEC
273	AEIEIVKEEF	BRCA, CCC, CRC, GBC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCsquam, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
274	GEAVTDHPDR LW	NHL
275	TENPLTKLL	BRCA, CRC, HCC, NHL
276	EEEGNLLRSW	BRCA, CCC, CRC, GBC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OC, OSCAR,

[0425]

서열 식별 번호	서열	종양 유형에서의 펩티드 제시
		PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
277	EEGNLLRSW	BRCA, CRC, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLCadenos, NSCLCother, NSCLCsquam, OSCAR, PACA, RCC, UBC, UEC

[0426]

[0427] 실시예 2

[0428] 본 발명의 펩티드를 인코딩하는 유전자의 발현 프로파일

[0429] 정상 세포와 비교한 종양 세포 상의 펩티드의 과다 제시 또는 특이적 제시는 면역요법에서의 그 유용성에 대해 충분하며 일부 펩티드는 정상 조직에서도 발생하는 그 근원 단백질에도 불구하고 종양 특이적이다. 여전히 mRNA

발현 양상 분석은 면역요법을 위한 펩티드 표적의 선택에서 추가적 안정성 수준을 추가한다. 특히 친화도 성숙 TCR과 같은 안정성 위험이 높은 치료적 옵션의 경우에는, 이상적 표적 펩티드는 종양에 고유하며 정상 조직에는 없는 단백질로부터 유래될 것이다.

[0430] RNA 원천 및 제조

[0431] 수술로 제거된 조직 검체는 위에서 나타낸 바와 같이(실시에 1 참조), 각각의 환자로부터 동의서를 얻은 다음 제공되었다. 종양 조직 검체는 수술 직후 스냅-냉동되었고 절구와 유봉을 이용하여 액체 질소 대기 하에 균질화되었다. 총 RNA는 TRI 시약(Ambion, 독일 다름스타트 소재)을 이용하여 샘플로부터 만들었으며, 이는 RNeasy(QIAGEN, 독일 힐텐 소재)에 의해 청소되었고; 이 두 가지 방법은 모두 제조업체의 설명서에 따라 실행되었다.

[0432] RNASeq 실험을 위한 건강한 인체 조직의 총 RNA는 다음으로부터 얻었다: Asterand(미국 미시간주 디트로이트 소재, 및 영국 헤르츠 로이스톤 소재); Bio-Options Inc.(미국 캘리포니아주 브레아 소재); Geneticist Inc.(미국 캘리포니아주 글렌데일 소재); ProteoGenex Inc.(미국 캘리포니아주 컬버 시티 소재); Tissue Solutions Ltd(영국 글라스고우 소재). RNASeq 실험을 위한 종양 조직의 총 RNA는 다음으로부터 얻었다: Asterand(미국 미시간주 디트로이트 소재, 및 영국 헤르츠 로이스톤 소재); BioCat GmbH(독일 하이델베르크 소재); BioServe(미국 메릴랜드주 벨츠빌 소재); Geneticist Inc.(미국 캘리포니아주 글렌데일 소재); Istituto Nazionale Tumori "Pascale"(이탈리아 나폴리 소재); ProteoGenex Inc.(미국 캘리포니아주 컬버 시티 소재); 및 University Hospital Heidelberg(독일 하이델베르크 소재). RNA 샘플의 양과 질은 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent, 독일 발트브론 소재) 상에서 RNA 6000 Pico LabChip Kit(Agilent)를 사용하여 분석되었다.

[0433] RNAseq 실험

[0434] 종양 및 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 CeGaT(독일 튀빙겐 소재)의 차세대 서열결정(RNAseq)으로 수행하였다. 간단히 말하면, 서열결정 라이브러리는 제공사의 프로토콜(Illumina Inc., 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)에 따라 Illumina HiSeq v4 시약 키트를 사용하여 제조하며, 여기에는 RNA 단편화, cDNA 변환 및 서열결정 어댑터의 첨가가 포함된다. 복수의 샘플에서 유래한 라이브러리들은 동일한 몰로 혼합한 다음, Illumina HiSeq 2500 시퀀서에서 그 제조사의 설명에 따라 서열을 결정함으로써 50 bp의 싱글 엔드 리드(single end read)를 생성한다. 처리된 리드는 STAR 소프트웨어를 사용하여 인간 게놈(GRCh38)에 대해 매핑한다. 발현 데이터는 RPKM(백만개 매핑된 리드당 킬로베이스당 리드, Cufflinks 소프트웨어에 의해 생성)으로 전사물 수준 상 및 엑손 수준 상(총 리드, Bedtools 소프트웨어에 의해 생성)에서 제공되고, 앙상블 서열 데이터베이스(Ensembl77)의 주석에 기반한다. 엑손 리드는 엑손 길이 및 정렬 크기에 대해 정규화하여 RPKM 수치를 얻는다.

[0435] 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병에서 고도로 과발현 또는 배타적으로 발현되는 본 발명의 출처 유전자의 예시적 발현 프로파일도 도 2에 도시된다. 추가의 예시적 유전자의 발현 점수가 표 9에 제시된다.

[0436] 표 9는 발현 점수를 나타낸다. 이 표는 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 매우 고도로 과발현된 유전자로부터의 펩티드들(+++), 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 고도로 과발현된 유전자로부터의 펩티드들(++) 또는 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 과발현된 유전자로부터의 펩티드들(+)을 나열한다. 이 점수의 베이스라인은 다음의 관련성 있는 정상 조직의 측정치로부터 계산했다: 혈액 세포, 혈관, 뇌, 심장, 간, 폐, 지방조직, 부신, 담관, 방광, 골수, 연골, 식도, 눈, 담낭, 두경부, 신장, 대장, 림프절, 복막, 뇌하수체, 골격근, 피부, 소장, 비장, 위, 갑상선, 기관, 요관(동일한 조직 유형에 대해 여러 샘플의 발현 데이터가 있는 경우, 모든 해당 샘플의 산술 평균을 그 계산에 사용했다).

[0437] [표 9]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현	
		AML	CLL
1	LTEGHSGNYY		+++
2	TMIRIFHRY	+++	
3	YINPAKLTPY		+
4	ALDQNKMHY	+	
5	GTDVLSTRY	+	
6	VTEGVAQTSFY		+
7	FMDSESFYY		++
8	STDSAGSSY		++
9	YSH PQYSSY		+++
10	YSDIGHLL		+
11	AAADHHSLY	+	
12	ATDIVDSQY		++
13	ITDIHIKY		+
14	TFDLTVVSY		+
15	SVADIRNAY		+
16	WIGDKSFY	+	
17	KAYNRVIFV		+
18	YLLPSVLL		+
19	SLFEGIYTI	+++	
20	FSLEDLVRI		+
21	FLFDKLLLI		+
22	ILHAQTLKI		++
23	FAFSGVLRA	+	
24	KLGPVAVSI		+
25	YLNEKSLQL	+	
26	SLYVQQLKI		+
27	RLIAKEMNI		+
28	VILESIFLK		+
29	RIYDEILQSK	+	+
30	RTYGFVLTf		+
31	ATFNKLVSy	+	
32	KTSNIVKIK		++
33	SVFEGDSIVLK		++
34	SVYSETSNMDK		+
35	ATKSPAKPK		++

[0438]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현	
		AML	CLL
36	KAKAAAKPK		++
37	KAKKPAGAAK		+
38	KARKSAGAAK		+
39	IVIQLRAQK		+
40	RSKEYIRKK		++
41	SVAHLLSKY		+
42	SVSSSTHFTR		+
43	KLMETSMGF		+
44	KVYDPVSEY		+
45	VVFPFPVNK	++	
46	RVFPSPMRI		+
47	SVLDLSVHK		+
48	RIKPPGPTAVPK	+	
49	GLLEEALFY	+	
50	GVFNTLISY	+	
51	ASTTVLALK		+
52	KAFNQSSTLTK		+++
53	KYIEYYLVL		++
54	QQALNFTRF		+
55	IFVARLYYF		+
56	KYSSGFRNI		+
57	RFPTPPLF		+
58	KYLADLPTL		+
59	GLYEGTGRLF	+	
60	TQDPHVNAFF		+
61	IFKEHNFSF	+++	
62	YYLSHLERI	+	
63	IYFSNTHFF	+	
64	SFQSKATVF	+++	
65	AYLKQVLLF		++
66	SQPAVATSF	+	
67	VFLPSEGFNF	+	+
68	LYQDRFDYL	++	
69	EYNTIKDKF		+
70	LYSDIGHLL		+
71	RYLGKNWSF	++	
72	TYVENLRLL		+

[0439]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현	
		AML	CLL
73	TYPQLEGFKF		++
74	SYADNILSF		+
75	RFYLLTEHF	+	
76	KAFSWSSAF		+++
77	RPNGNSLFTSA		+
78	RPRGLALVL	+	
79	SPVPSHWMVA		+
80	KPLFKVSTF		+
81	SESPWLHAPSL		+
82	APFGFLGMQSL		+
83	IPVSRPIL		++
84	SPKLQIAAM		++
85	IPVSHPVL		+++
86	IPASHPVL		+++
87	FPAPILRAV		+
88	MPDPHLYHQM		+
89	FPETVNNLL	+	+
90	KPKAAKPKA		++
91	KPKAAKPKAA		++
92	KAKKPAGAA		+
93	KARKSAGAA		+
94	KPKAAKPKKAAA		+
95	KPKAAKPKTA		+
96	KPKKAPKSPA		+
97	LPFGKIPIL	+	
98	YPIALTRAEM		+
99	SPRAINNLVL		++
100	YPYQERVFL	+	
101	NPRYPNYMF		+
102	LPLSMEAKI	+	
103	IPANTEKASF		+
104	RPMTPTQIGPSL		++
105	NPLTKLLAI	++	+
106	KAFKWFSAL		+
107	QAAQRTAL		+
108	ILAIRQNAL		+
109	LGHVRYVL		+

[0440]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현	
		AML	CLL
110	FGLARIYSF	++	
111	VTLIKYQEL		++
112	APLLRHWEL		+
113	DANSRTSQL		+
114	HNALRILTF	+	
115	ELYQRIYAF	+	
116	TLKIRAEVL		++
117	YIKTAKKL		++
118	FEKEKKESL		+
119	DLRTKEVVF		+
120	VPPKKHLL		+
121	RPKKVNTL		+
122	KELPGVKKY		++
123	EENPGKFLF		++
124	SESLPKEAF		+
125	SESTFDRTF		+
126	EENKPGIVY		+
127	TEYPVVFVY	+	
128	GENDRLNHTY		+
129	GEGAYGKVF	+++	
130	EEEHGKGREY		+
131	EEFETIERF		+
132	GELPAVRDL		+
133	AEHNFVAKA		++
134	SEYADTHYF		+++
135	NEIKVYITF	+	
136	AEYKGRVTL		++
137	GELGGSVTI		++
138	SQAPAARAF		+
139	RENQVLGSGW		++
140	EYDLKWEF	+++	
141	REYEYDLKWEF	+++	
142	TEIFKEHNF	+++	
143	YEYDLKWEF	+++	
144	TEGKRYFTW		+
145	AEPLVGQRW		++
146	SESKTVVITY		++

[0441]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현	
		AML	CLL
147	KEVPRSYEL		+
148	REYNEYENI		+++
149	SEKETVAYF		++
150	EEVTDRSQL		+
151	EVDASIFKAW		+
152	AELLAKELY		++
153	KEFEQVPGHL		+
154	AEPGPVITW		++
155	NEFPVIVRL		+
156	FEVESLFQKY		+
157	VEIAEAIQL		+
158	GENEDNRIGL		++
159	GELLGRQSF		+
160	EEETILHFF		+
161	EEGDTLLHLF	+	+
162	DEAQARAAF	++	
163	EEWMGLLEY	++	
164	SEYSHLTRV	+	
165	VELDLQRSV	+	
166	NEVLASKY		+
167	KEIGAAVQAL		+
168	QEIQSLLTNW		+
169	EENGEVKEL		+
170	SENEQRRMF		+
171	SEDLAVHLY		++
172	VEDGLFHEF		+
173	KEYDFGTQL	+	
174	TDKSFPNAY		+
175	HEIDGKALFL	+	
176	AENAVSNLSF		++
177	QENMQIQSF		+
178	REYEHYWTEL		+
179	AEIKQTEEKY	+	
180	EPAFNVSY		+
181	GEIKEPLEI		+
182	AQNLSIIQY		++
183	GESQDSTTAL		++

[0442]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현	
		AML	CLL
184	RMPPFTQAF		+
185	SEGDNVESW		+
186	NEQKIVRF		+
187	SDAQRPSF		+
188	YVDAGTPMY		+
189	VTEEPQRLFY		+++
190	HVDQDLTTY	++	
191	ISEAGKDILY	+	+
192	RSDPGGGGLAY	++	
193	LTDSEKGNSY		++
194	YTDKKSIIY		+
195	YSDKEFAGSY		+
196	FTDIDGQVY		+
197	SLADVHIEV		+
198	KLLGYDVHV	+	
199	AMPDSPAEV	+	+
200	VMLQINPKL		+
201	ILAAVETRL		+
202	MVALPMVLV		+
203	FLLPKVQSI		+
204	FLLPKVQSIQL		+
205	FLINTNSEL		+
206	SLMDLQERL		+
207	KLSDNILKL		+
208	KLNPQQAPLY		+
209	KTLPAMLGTGK		++
210	RMYSQLKTLQK		++
211	ATYNKQPMYR	+	
212	LLWHWDTTQSLK		++
213	RVYNIYIRR	+	
214	ATGAATPKK		+
215	KATGAATPK		+
216	RIKAPSRNTIQK		+
217	TTVPHVFSK		+
218	RVLTGVFTK		+
219	HSYSSPSTK		+
220	SISNLVFTY	+	

[0443]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현	
		AML	CLL
221	LLNRHILAH		+
222	RYLDEINLL	+	
223	RRMYPPPLI		+
224	VYEVVVERF		+
225	LPARFYQAL		+
226	YLNRLHHTW		++
227	APINKAGSFL		+
228	SPRITFPSL		+
229	SPLGSLARSSL		+
230	KPMKSVLVV		+
231	MPLSTIREV	+++	
232	APRPAGSYL		+
233	SPRVYWLGL		++
234	SPKESENAL		+
235	SPSLPSRTL		+
236	RPSNKAPLL		+
237	SPWLHAPSL		+
238	SPRSWIQVQI		+++
239	APSKTSLIM		+
240	SPSLPNITL		+
241	APAPAEKTPV		+
242	SPFSFHHVL		+
243	LPKVQSIQL		+
244	MPSSD'TTVTF		+
245	SPLSHHSQL		+
246	YPGWHSTTI	+	
247	QPSPARAPAEI	+	+++
248	LPYDSKHQI		+
249	SPADHRGYASL	+	
250	VPNLQTVSV		+
251	QPRLFTMDL		+
252	RPHIPISKL	+	+
253	RPFADLLGTAF		++
254	SPRNLPQRAAL		++
255	YPGSDRIML		+
256	SPYKKLKEAL		+
257	KEFFFVKVF		+

[0444]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현	
		AML	CLL
258	EELFRDGVNW		++
259	EENTLVQNY		+
260	AEIGEGAYGKVF	+++	
261	NEIEHIPVW		+
262	QENQAETHAW		+
263	REAGFQVKAY		+
264	SEDHSGSYW		+
265	QEVDAIFKAW		+
266	VDASIFKAW		+
267	KEKFPINGW		+
268	NEDKGTKAW		+
269	KELEDLNKW		+
270	AESEDLAVHL		++
271	AESEDLAVHLY		++
272	KEFELRSSW		+
273	AEIEIVKEEF		+
274	GEAVTDHPDRLW		++
275	TENPLTKLL	++	+
276	EEEGNLLRSW		++
277	EEGNLLRSW		++

[0445]

[0446]

실시예 3

[0447]

MHC 클래스 I 제시 펩티드의 시험관내 면역원성

[0448]

본 발명의 TUMAP의 면역원성에 대한 정보를 얻기 위해, 본 발명자는 펩티드/MHC 복합체 및 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원-제시 세포(aAPC)를 갖는 CD8+ T 세포의 반복된 자극을 근거로 시험관내 T 세포 초회 감작을 사용하여 조사를 수행했다. 이 방법으로 본 발명자들은 본 발명의 HLA-A*02:01, HLA-A*24:02, HLA-A*01:01, HLA-A*03:01, HLA-B*07:02 및 HLA-B*44:02 제한된 TUMAP의 면역원성을 보여줄 수 있었으며, 이것은 이 펩티드들이 인간에 존재하는 CD8+ 전구체 T 세포에 대한 T 세포 에피토프이라는 것을 보여주었다(표 10a 및 표 10b).

[0449]

CD8+ T 세포의 시험관내 프라이밍

[0450]

펩티드-MHC 복합체(pMHC) 및 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원-제시 세포에 의한 시험관내 자극을 수행하기 위해, 본 발명자는 독일 소재 University clinics Mannheim에서 동의서를 받은 건강한 공여자로부터의 CD8 마이크로로비드(Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬-글라트바크 소재)를 사용한 양성 선택을 통해 신선한 HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-B*07 또는 HLA-B*44 백혈구 성분 채집 산물로부터 CD8+ T 세포를 먼저 단리했다.

[0451]

PBMC 및 단리된 CD8+ 림프구는 10% 열 비활성화된 인간 AB 혈청(PAN-Biotech, 독일 아이텐바크 소재), 100 U/mL 페니실린/100 µg/mL 스트렙토마이신(Cambrex, 독일 쾰른 소재), 1 mM 피루브산 나트륨(CC Pro, 독일 오베르도를라 소재), 20 µg/mL 젠타마이신(Cambrex)으로 보충된 RPMI-Glutamax(Invitrogen, 독일 칼스루에 소재)를 포함하는 T 세포 배지(TCM)에서 사용할 때까지 배양했다. 이 단계에서 2.5 ng/mL IL-7(PromoCell, 독일 하이델베르크 소재) 및 10 U/mL IL-2(Novartis Pharma, 독일 뉘른베르크 소재) 또한 TCM에 추가했다.

[0452]

pMHC/항-CD28 코팅된 비드의 생성, T 세포 자극 및 관독은 고도로 정의된 시험관내 체계에서 수행했으며, 자극 조건 당 4가지 다른 pMHC 분자 및 관독 조건 당 8가지 다른 pMHC 분자를 각각 사용했다.

[0453]

정제된 공동-자극 쥐 IgG2a 항인간 CD28 Ab 9.3(Jung et al., 1987)은 제조사가 권장하는 술포-N-히드록시숙신 이미도비오틴을 사용하여 화학적으로 비오틴닐화했다(Perbio, 독일 본 소재). 사용된 비드는 스트렙티비딘으로 코팅된 직경 5.6 µm의 폴리스티렌 입자였다(Bangs Laboratories, 미국 일리노이주 소재).

[0454]

양성과 음성 대조군 자극으로 사용되는 pMHC는 각각 A*0201/MLA-001(변형된 Melan-A/MART-1로부터의 펩티드

ELAGIGILTV(서열 식별 번호 280))과 A*0201/DDX5-001(DDX5로부터의 YLLPAIVHI, 서열 식별 번호 281)였다.

[0455] 800.000 비드/200 μ L는 4 x 12.5ng 상이한 비오틴-pMHC 존재 하에 96-웰 플레이트에서 코팅하고 세척한 다음 600 ng 비오틴 항-CD28을 첨가하여 200 μ L의 부피로 만들었다. 자극은 1×10^6 CD8+ T 세포를 5 ng/mL IL-12(PromoCell)로 보충된 200 μ L TCM에서 37°C 및 3일 동안 세척하고 코팅된 2×10^5 비드와 함께 96-웰 플레이트에서 공동배양함으로써 개시했다. 매질의 반은 80 U/mL IL-2로 보충된 새로운 TCM에 의해 교환되고 배양은 37°C에서 4일간 계속되었다. 이 자극 주기는 총 세 번 수행되었다. 조건 당 8가지 다른 pMHC 분자를 사용하는 pMHC 멀티머의 관독을 위해, 이미 설명된 바와 같이(Andersen et al., 2012) 2차원 조합대수적 코딩 접근 방식을 사용했으며, 5가지 다른 형광색소와의 결합을 허용하는 약간의 변형이 있었다. 마지막으로, 다합체 분석은 Live/dead 근 IR 염료(Invitrogen, 독일 칼스루에 소재), CD8-FITC 항체 클론 SK1(BD, 독일 하이델베르크 소재) 및 형광 pMHC 다합체로써 세포를 염색하여 수행했다. 분석에는 적절한 레이저 및 필터가 장착된 BD LSRII SORP 세포측정기를 사용했다. 펩티드 특이 세포는 총 CD8+ T 세포의 백분율로 계산되었다. 다합체 분석의 평가는 FlowJo 소프트웨어(Tree Star, 미국 오레곤주 소재)를 사용하여 수행되었다. 특정 다합체+ CD8+ 림프구의 시험관내 초기 감작은 음성 대조군 자극과 비교함으로써 감지되었다. 제공된 항원의 면역원성은 1명의 건강한 공여자의 하나 이상의 시험관내 자극된 평가가능한 웰이 시험관내 자극 후 특이적인 CD8+ T 세포주를 함유하는 것으로 밝혀졌다(즉, 이러한 웰은 CD8+ T 세포 중 1% 이상의 특이적인 다합체+를 함유하였고, 특이적인 다합체+ 세포의 백분율은 음성 대조군 자극의 중간값의 10배 이상이었다).

[0456] 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병 펩티드의 시험관내 면역원성

[0457] 시험된 HLA 클래스 I 펩티드에서, 시험관내 면역원성은 펩티드 특이적 T 세포주의 형성에 의해 입증될 수 있었다. 도 2 내지 9는 본 발명의 14개 펩티드에 대한 TUMAP 특이적 다합체 염색 후 얻은 예시적 유세포 측정 결과 및 반응하는 음성 대조군을 도시한다. 본 발명의 63개의 펩티드에 대한 결과는 표 10a 및 표 10b에 요약되어 있다.

[0458] 표 10a는 본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 *시험관 내* 면역원성을 나타낸다(본 발명의 펩티드 출원자 실행한 *시험관 내* 면역원성 실험의 예시적 결과. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++).

[0459] [표 10a]

서열 식별 번호	서열	웰 양성[%]
278	YLDRKLLTL	++++
279	LYIDRPLPYL	++++

[0460] 표 10b는 본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 *시험관 내* 면역원성을 나타낸다(본 발명의 펩티드 출원자 실행한 *시험관 내* 면역원성 실험의 예시적 결과. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++).

[0462] [표 10b]

서열 식별 번호	서열	웰 양성[%]	HLA
1	LTEGHSGNYY	" + "	A*01
12	ATDIVDSQY	" + + "	A*01
19	SLFEGIYTI	" + + + + "	A*02
22	ILHAQTLKI	" + "	A*02
24	KLGPVAVSI	" + + + "	A*02
25	YLNEKSLQL	" + "	A*02
26	SLYVQQLKI	" + + "	A*02
27	RLIAKEMNI	" + "	A*02
29	RIYDEILQSK	" + "	A*03
45	VVFPFPVNK	" + "	A*03
47	SVLDLSVHK	" + "	A*03
51	ASTTVLALK	" + "	A*03
53	KYIEYYLVL	" + + + "	A*24
55	IFVARLYYF	" + "	A*24
57	RFPPTPPLF	" + "	A*24
68	LYQDRFDYL	" + "	A*24
73	TYPQLEGFKF	" + "	A*24
83	IPVSRPIL	" + "	B*07
84	SPKLQIAAM	" + + "	B*07
87	FPAPILRAV	" + "	B*07
89	FPETVNNLL	" + "	B*07
96	KPKKAPKSPA	" + "	B*07
99	SPRAINNLVL	" + "	B*07
104	RPMTPTQIGPSL	" + "	B*07
122	KELPGVKKY	" + + + + "	B*44
123	EENPGKFLF	" + + "	B*44
129	GEGAYGKVF	" + + + "	B*44
133	AEHNFVAKA	" + "	B*44
134	SEYADTHYF	" + + + "	B*44
136	AEYKGRVTL	" + "	B*44
137	GELGGSVTI	" + + + + "	B*44
139	RENQVLGSGW	" + + + "	B*44
140	EYDLKWEF	" + + + + "	B*44
142	TEIFKEHNF	" + + "	B*44
143	YEYDLKWEF	" + "	B*44

[0463]

서열 식별 번호	서열	웰 양성 [%]	HLA
145	AEPLVGQRW	"++++"	B*44
146	SESKTVVVTY	"+++ "	B*44
149	SEKETVAYF	"+ "	B*44
154	AEPGPVITW	"+++ "	B*44
158	GENEDNRIGL	"++ "	B*44
162	DEAQARA AF	"+ "	B*44
171	SEDLAVHLY	"++++ "	B*44
176	AENAVSNLSF	"++ "	B*44
182	AQNLSIIQY	"++++ "	B*44
192	RSDPGGGGLAY	"+ "	A*01
197	SLADVHIEV	"++ "	A*02
207	KLSDNILKL	"++ "	A*02
210	RMYSQLKTLQK	"+ "	A*03
215	KATGAATPK	"++ "	A*03
233	SPRVYWLGL	"++++ "	B*07
238	SPRSWIQVQI	"+ "	B*07
247	QPSPARAP AEL	"++ "	B*07
253	RPFADLLGTAF	"++++ "	B*07
254	SPRNLPQRAAL	"+ "	B*07
258	EELFRDGVNW	"+ "	B*44
260	AEIGEGAYGKVF	"++ "	B*44
270	AESEDLAVHL	"+ "	B*44
271	AESEDLAVHLY	"+ "	B*44
275	TENPLTKLL	"+ "	B*44
276	EEGNLLRSW	"++ "	B*44
277	EEGNLLRSW	"++ "	B*44

[0464]

[0465] **실시예 4**

[0466] 펩티드의 합성

[0467] 모든 펩티드는 Fmoc-전략을 사용하여 표준 및 확립된 고체상 펩티드 합성으로써 합성되었다. 각 개별 펩티드의 정제와 순도는 질량 분석법과 분석 RP-HPLC에 의해 결정했다. 펩티드는 순도가 50% 초과인 흰색에서 회백색의 동결건조물(삼불화 초산염)로 얻어졌다. 모든 TUMAP는 바람직하게는 삼불화아세트산 염 또는 아세트산 염으로 투여되지만, 다른 염의 형태 또한 가능하다.

[0468] **실시예 5**

[0469] MHC 결합 검정

[0470] 본 발명에 따른 T 세포 기반 요법의 후보 펩티드를 MHC 결합 능력(친화도)에 대해 더 실험했다. 개별 펩티드-MHC 복합체는 UV-리간드 교환에 의해 만들었으며, UV에 민감한 펩티드가 UV 조사 후 분할된 다음 분석된 관심 대상의 펩티드로 교환되었다. 펩티드 수용성 MHC 분자를 효과적으로 결합하고 안정화시킬 수 있는 펩티드 후보만이 MHC 복합체의 해리를 막는다. 이 교환작용의 수율을 결정하기 위해, 안정화된 MHC 복합체의 경쇄($\beta 2m$) 검출에 근거하여 ELISA를 수행했다. 이 검정은 Rodenko 등에서 일반적으로 설명된대로 수행했다(Rodenko et al., 2006).

[0471] 96 웰 MAXISorp 플레이트(NUNC)를 실온 및 PBS에서 2 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙타비딘으로 밤새 코팅하고 4회 세척한 다음 블로킹 완충액을 함유하는 2% BSA와 37°C에서 1시간 동안 블로킹을 진행했다. 퇴점기된 HLA-A*02:01/MLA-001 단량체가 표준의 역할을 했으며, 그 범위는 15 내지 500ng/mL였다. UV-교환 반응을 위한 펩티드-MHC 단량체는 블로킹 완충액으로 100배 희석되었다. 샘플은 37°C에서 1시간 배양 후 4회 세척하고 2 $\mu\text{g/mL}$ HRP 접합된 항- $\beta 2m$ 으로 37°C에서 1시간 배양한 다음 NH_2SO_4 로 정지시킨 TMB 용액으로 검출했다. 흡광은 450nm에서 측정했다. 높은 교환 수율(바람직하게는 50% 초과, 가장 바람직하게는 75% 초과)을 나타내는 후보 펩티드가 일반적으로 항체나 그 조각 및/또는 T 세포 수용체나 그 조각의 생성 및 생산을 위해 선호되는 데, 이는 MHC 분자에 대한 충분한

결합성을 보이며 MHC 복합체의 해리를 막기 때문이다.

[0472] 표 11은 MHC 클래스 I 결합 점수이다. HLA 클래스 I 제한 펩티드의 HLA-A*01:01에 대한 결합 범위는 펩티드 교환 수율에 의해 정해졌다: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

[0473] [표 11]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
1	LTEGHSGNYY	"+++ "
3	YINPAKLTPY	"++ "
4	ALDQNKMHY	"+++ "
5	GTDVLSTRY	"+++ "
6	VTEGVAQTSFY	"++++ "
7	FMDSESFYY	"+ "
8	STDSAGSSY	"++++ "
9	YSHPLYSSY	"++ "
10	YSDIGHLL	"++ "
11	AAADHHSLY	"+++ "
12	ATDIVDSQY	"+++ "
13	ITDIHIKY	"++++ "
14	TFDLTVVSY	"++ "
15	SVADIRNAY	"++ "
16	WIGDKSFEY	"++ "
188	YVDAGTPMY	"+++ "
189	VTEEPQRLFY	"++++ "
190	HVDQDLTTY	"++ "
191	ISEAGKDLLY	"+++ "
192	RSDPGGGGLAY	"+++ "
193	LTDSEKGNSY	"+++ "
194	YTDKKSIIY	"+++ "
195	YSDKEFAGSY	"++++ "
196	FTDIDGQVY	"+++ "

[0474]

[0475] 표 12는 MHC 클래스 I 결합 점수이다. HLA 클래스 I 제한 펩티드의 HLA-A*02:01에 대한 결합 범위는 펩티드 교환 수율에 의해 정해졌다: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

[0476] [표 12]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
17	KAYNRVIFV	"+++"
18	YLLPSVLL	"++++"
19	SLFEGIYTI	"++++"
20	FSLEDLVRI	""
21	FLFDKLLLI	"++++"
22	ILHAQTLKI	""
23	FAFSGVLRA	""
24	KLGPVAVSI	"++++"
25	YLNEKSLQL	"++++"
26	SLYVQQLKI	"++++"
27	RLIAKEMNI	"++++"
197	SLADVHIEV	"++++"
198	KLLGYDVHV	""
199	AMPDSPAEV	"++++"
200	VMLQINPKL	"++++"
201	ILAAVETRL	"++++"
203	FLLPKVQSI	"++++"
204	FLLPKVQSIQL	""
205	FLINTNSEL	"++++"
206	SLMDLQERL	""
207	KLSDNILKL	"++++"

[0477]

[0478] 표 13은 MHC 클래스 I 결합 점수이다. HLA 클래스 I 제한 펩티드의 HLA-A*03:01에 대한 결합 범위는 펩티드 교환 수율에 의해 정해졌다: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

[0479] [표 13]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
28	VILESIFLK	"++"
29	RIYDEILQSK	"++"
30	RTYGFVLTf	"++"
32	KTSNIVKIK	"++"
33	SVFEGDSIVLK	"++"
34	SVYSETSNMDK	"+++ "
35	ATKSPAKPK	"+++ "
36	KAKAAAKPK	"++"
37	KAKKPAGAAK	"+++ "
38	KARKSAGAAK	"+++ "
40	RSKEYIRKK	"+"
41	SVAHLLSKY	"++"
42	SVSSSTHFTR	"++"
43	KLMETSMGF	"++"
44	KVYDPVSEY	"++"
45	VVFPFPVNK	"+++ "
46	RVFPSPMRI	"++"
47	SVLDLSVHK	"++"
48	RIKPPGPTAVPK	"+++ "
49	GLLEEALFY	"++"
51	ASTTVLALK	"++"
52	KAFNQSSTLTK	"+++ "
208	KLNPQQAPLY	"++"
209	KTLPAMLGTGK	"++"
210	RMYSQLKTLQK	"+++ "
211	ATYNKQPMYR	"+++ "
212	LLWHWDTTQSLK	"+"
213	RVYNIYIRR	"++"
214	ATGAATPKK	"+++ "
215	KATGAATPK	"++"
216	RIKAPSRNTIQK	"++"
217	TTVPHVFSK	"++"
218	RVLTGVFTK	"++"
219	HSYSSPSTK	"+++ "
220	SISNLVFTY	"++"

[0480]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
221	LLNRHILAH	"+++ "

[0481]

[0482]

표 14는 MHC 클래스 I 결합 점수이다. HLA 클래스 I 제한 펩티드의 HLA-A*24:02에 대한 결합 범위는 펩티드 교환 수율에 의해 정해졌다: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

[0483] [표 14]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
53	KYIEYYLVL	"++++"
55	IFVARLYYF	"++++"
56	KYSSGFRNI	"+++"
57	RFPPTPPLF	"++++"
58	KYLADLPTL	"++++"
61	IFKEHNFSF	"++++"
62	YYLSHLERI	"++++"
63	IYFSNTHFF	"+++"
64	SFQSKATVF	"++"
67	VFLPSEGFNF	"+++"
68	LYQDRFDYL	"++++"
69	EYNTIKDKF	"+++"
70	LYSDIGHLL	"+++"
71	RYLGKNWSF	"++++"
72	TYVENLRLL	"+++"
73	TYPQLEGFKF	"++++"
74	SYADNLSF	"++++"
75	RFYLLTEHF	"+++"
222	RYLDEINLL	"+++"

[0484]

[0485] 표 15는 MHC 클래스 I 결합 점수이다. HLA 클래스 I 제한 펩티드의 HLA-B*07:02에 대한 결합 범위는 펩티드 교환 수율에 의해 정해졌다: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

[0486]

[표 15]

서열 식별 번호	서열	웹티드 교환
77	RPNGNSLFTSA	"+++ "
78	RPRGLALVL	"+++ "
79	SPVPSHWMVA	"+++ "
80	KPLFKVSTF	"++ "
81	SESPWLHAPSL	"+++ "
82	APFGFLGMQSL	"+++ "
83	IPVSRPIL	"+++ "
84	SPKLQIAAM	"+++ "
85	IPVSHPVL	"++ "
86	IPASHPVL	"++ "
87	FPAPILRAV	"+++ "
88	MPDPHLYHQM	"++ "
89	FPETVNNLL	"++ "
90	KPKAAKPKA	"++ "
91	KPKAAKPKAA	"++ "
92	KAKKPAGAA	"++ "
93	KARKSAGAA	"+++ "
94	KPKAAKPKKAAA	"++ "
95	KPKAAKPKTA	"++ "
96	KPKKAPKSPA	"+++ "
97	LPIFGKIPIL	"++ "
98	YPIALTRAEM	"+++ "
99	SPRAINNLVL	"++++ "
100	YPYQERVFL	"++ "
101	NPRYPNYMF	"+++ "
102	LPLSMEAKI	"++ "
103	IPANTEKASF	"++ "
104	RPMTPPTQIGPSL	"+++ "
105	NPLTKLLAI	"+++ "
106	KAFKWFSAL	"++ "
225	LPARFYQAL	"++++ "
226	YLNRLHHTW	"++ "
227	APINKAGSFL	"++++ "
228	SPRITFPSL	"++++ "
229	SPLGSLARSSL	"++++ "
230	KPMKSVLVV	"+++ "

[0487]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
231	MPLSTIREV	"++"
232	APRPAGSYL	"++++"
233	SPRVYWLGL	"++++"
234	SPKESENAL	"++"
235	SPSLPSRTL	"++"
236	RPSNKAPLL	"++++"
237	SPWLHAPSL	"++"
238	SPRSWIQVQI	"++++"
239	APSKTSLIM	"++"
240	SPSLPNITL	"++++"
241	APAPAEKTPV	"++++"
242	SPFSFHHVL	"++"
243	LPKVQSIQL	"++"
244	MPSSDTTVTF	"++++"
245	SPLSHHSQL	"++"
246	YPGWHSTTI	"++"
247	QPSPARAPAEI	"++"
248	LPYDSKHQI	"++"
249	SPADHRGYASL	"++"
250	VPNLQTVSV	"++"
251	QPRLFTMDL	"++++"
252	RPHIPISKL	"++"
253	RPFADLLGTAF	"++++"
254	SPRNLPQRAAL	"++++"
255	YPGSDRIML	"++"

[0488]

[0489]

표 16은 MHC 클래스 I 결합 점수이다. HLA 클래스 I 제한 펩티드의 HLA-B*44:02에 대한 결합 범위는 펩티드 교환 수율에 의해 정해졌다: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

[0490] [표 16]

서열 식별 번호	서열	웹티드 교환
122	KELPGVKKY	"++"
123	EENPGKFLF	"+++ "
124	SESLPKEAF	"++ "
125	SESTFDRTF	"+++ "
126	EENKPGIVY	"++ "
127	TEYPVYVY	"+"
128	GENDRLNHTY	"++ "
129	GEGAYGKVF	"++++ "
130	EEEHGKGREY	"++ "
131	EEFETIERF	"++ "
132	GELPAVRDL	"++ "
133	AEHNFVAKA	"+++ "
134	SEYADTHYF	"+++ "
135	NEIKVYITF	"+++ "
136	AEYKGRVTL	"++++ "
137	GELGGSVTI	"+++ "
138	SQAPAARAF	"++ "
139	RENQVLGSGW	"+++ "
140	EYDLKWEF	"++ "
141	REYDYDLKWEF	"+++ "
142	TEIFKEHNF	"++ "
143	YEYDLKWEF	"+++ "
144	TEGKRYFTW	"+++ "
145	AEPLVGQRW	"+++ "
146	SESKTVVYTY	"+++ "
147	KEVPRSYEL	"++ "
148	REYNEYENI	"++ "
149	SEKETVAYF	"+++ "
150	EEVTDRSQL	"++ "
151	EVDASIFKAW	"++ "
152	AELLAKELY	"++ "
153	KEFEQVPGHL	"++ "
154	AEPGPVITW	"+++ "
155	NEFPVIVRL	"+++ "

[0491]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
156	FEVESLFQKY	" + + + "
157	VEIAEAIQL	" + + + "
158	GENEDNRIGL	" + + "
159	GELLGRQSF	" + + + "
160	EEETILHFF	" + + "
161	EEGDTLLHLF	" + + + "
162	DEAQARAAF	" + + "
163	EEWMGLLEY	" + + + + "
164	SEYSHLTRV	" + + "
165	VELDLQRSV	" + + "
166	NEVLASKY	" + "
167	KEIGAAVQAL	" + + + "
168	QEIQSLLTNW	" + + + "
169	EENGEVKEL	" + + "
170	SENEQR RMF	" + + + "
171	SEDLAVHLY	" + + "
172	VEDGLFHEF	" + + + "
173	KEYDFGTQL	" + + "
174	TDKSFPNAY	" + "
175	HEIDGKALFL	" + + "
176	AENAVSNLSF	" + + "
177	QENMQIQSF	" + + + "
178	REYEHYWTEL	" + + + "
179	AEIKQTEEKY	" + + "
180	EPPAFNVSY	" + + "
181	GEIKEPLEI	" + + "
182	AQNLSIIQY	" + + "
183	GESQDSTTAL	" + + "
184	RMPPFTQAF	" + + "
185	SEGDNVESW	" + + + "
186	NEQKIVRF	" + "
187	SDAQRPSSF	" + "
257	KEFFFVKVF	" + + + "
258	EELFRDGVNW	" + + + "
259	EENTLVQNY	" + + "
260	AEIGEGAYGKVF	" + + + "
261	NEIEHIPVW	" + + + "

[0492]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
262	QENQAETHAW	"+++ "
263	REAGFQVKAY	"+++ "
264	SEDHSGSYW	"+++ "
265	QEVDAIFKAW	"+++ "
266	VDASIFKAW	"++ "
267	KEKFPINGW	"+++ "
268	NEDKGTKAW	"++ "
269	KELEDLNKW	"+++ "
270	AESEDLAVHL	"++ "
271	AESEDLAVHLY	"++ "
272	KEFELRSSW	"+++ "
273	AEIEIVKEEF	"++ "
274	GEAVTDHPDRLW	"+++ "
275	TENPLTKLL	"++++ "
276	EEEGNLLRSW	"+++ "
277	EEGNLLRSW	"+++ "

[0493]

[0494]

실시예 6

[0495]

펩티드-MHC 클래스 I의 안정성

[0496]

HLA-B*08:01 펩티드에 대한 펩티드-MHC 안정성을 ImmunAware(덴마크 코펜하겐 소재)에 의해 수행했다. HLA 클래스 I 분자로부터 펩티드의 해리를 측정하기 위해 유사성 기반의 동질성 실시간 분석을 사용하여 데이터를 획득했다. 첫째, 인간 재조합 HLA-B*08:01 및 $\beta 2m$ 이 대장균에서 발현되었으며, 일련의 액체 크로마토그래피 기반의 단계를 통해 정제되었다(Ferre et al., 2003; Ostergaard et al., 2001). 그 다음 37°C에서 MHC 중쇄와 연관되는 $\beta 2m$ 의 수량을 시간에 따라 측정하여 펩티드-MHC 복합체(pMHC)의 안정성을 결정할 수 있다(Harndahl et al., 2012). 각 pMHC의 안정성은 각 중쇄와 연관되는 $\beta 2m$ 의 반감기로서 표현되며, 데이터를 단상 해리 공식에 맞추어 계산했다.

[0497]

pMHC 안정성은 독립적 실험으로 측정했으며, HLA-B*08:01에 대한 해당 펩티드의 범위는 약한 결합제(+)부터 매우 안정된 결합제(++++)까지 이르는 것으로 나타났다. 평균 반감기(T1/2)가 표 17에 나와있다.

[0498]

표 17은 3개의 개별 측정치에 근거한 평균 반감기(T1/2)이다: T1/2 > 2 h = +; T1/2 > 4 h = ++; T1/2 > 6 h = +++; T1/2 > 10 h = ++++.

[0499] [표 17]

서열 식별 번호	서열	평균 반감기(T1/2)
107	QAAQRTAL	++
108	ILAIRQNAL	++
109	LGHVRYVL	+
110	FGLARIYSF	+
112	APLLRHWEL	+
113	DANSRTSQL	+++
114	HNALRILTF	++
115	ELYQRIYAF	++
116	TLKIRAEVL	+++
117	YIKTAKKL	++
118	FEKEKKESL	+++
119	DLRTKEVVF	++
120	VPPKKHLL	+
121	RPKKVNTL	+

[0500]

[0501] 참조문헌

- Al, Qudaihi G. et al., *Hematol.Oncol Stem Cell Ther.* **3** (2010): 24-33
- Allan, E. K. et al., *Leukemia* **25** (2011): 985-994
- Allison, J. P. et al., *Science* **270** (1995): 932-933
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012): 891-902
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006): 1805-1814
- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Bhatia, R. et al., *Blood* **101** (2003): 4701-4707
- Bocchia, M. et al., *Lancet* **365** (2005): 657-662
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* **132** (2013): 1133-1145
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Byrd, J. C. et al., *N.Engl.J Med.* **369** (2013): 32-42
- Carballido, E. et al., *Cancer Control* **19** (2012): 54-67
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Cathcart, K. et al., *Blood* **103** (2004): 1037-1042
- Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol* **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- Colombetti, S. et al., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738

[0502]

- Corbin, A. S. et al., *J Clin Invest* **121** (2011): 396-409
- Cortes, J. E. et al., *J Clin Oncol* **30** (2012): 3486-3492
- Counter, C. M. et al., *Blood* **85** (1995): 2315-2320
- Dao, T. et al., *Sci.Transl.Med* **5** (2013): 176ra33
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003): 2197-2207
- Eichhorst, B. F. et al., *Blood* **107** (2006): 885-891
- Estey, E. H., *Am.J Hematol.* **89** (2014): 1063-1081
- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Ferre, H. et al., *Protein Sci.* **12** (2003): 551-559
- Follenzi, A. et al., *Nat Genet.* **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- Furman, R. R. et al., *N.Engl.J Med.* **370** (2014): 997-1007
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
- Gandhi, V. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 1735-1740
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
- Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* **24** (2010): 798-805
- Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 95-103
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
- Goede, V. et al., *N.Engl.J Med.* **370** (2014): 1101-1110
- Gragert, L. et al., *Hum.Immunol.* **74** (2013): 1313-1320
- Granziero, L. et al., *Blood* **97** (2001): 2777-2783
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)

[0503]

- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Greiner, J. et al., *Exp.Hematol.* **30** (2002): 1029-1035
- Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008): 606-609
- Gustafsson, C. et al., *Trends Biotechnol.* **22** (2004): 346-353
- Hallek, Michael et al., *ASH Annual Meeting Abstracts* **112** (2008): 325
- Harig, S. et al., *Blood* **98** (2001): 2999-3005
- Harndahl, M. et al., *Eur.J Immunol.* **42** (2012): 1405-1416
- Hoglund, M. et al., *Ann.Hematol.* **94 Suppl 2** (2015): S241-S247
- Horowitz, M. M. et al., *Bone Marrow Transplant.* **17 Suppl 3** (1996): S5-S6
- Huang, X. et al., *Cancer* **118** (2012): 3123-3127
- Hus, I. et al., *Oncol Rep.* **20** (2008): 443-451
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Ilander, M. et al., *Leuk.Lymphoma* **55** (2014): 934-937
- Itonaga, H. et al., *Int.J Hematol.* **95** (2012): 209-213
- Jabbour, E. et al., *Am.J Hematol.* **91** (2016): 252-265
- Johnson, J. R. et al., *Clin Cancer Res* **9** (2003): 1972-1979
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
- Kalos, M. et al., *Sci.Transl.Med.* **3** (2011): 95ra73
- Kantarjian, H. et al., *N.Engl.J Med* **362** (2010): 2260-2270
- Kantarjian, H. M. et al., *J Clin Oncol* **31** (2013): 3600-3604
- Keilholz, U. et al., *Blood* **113** (2009): 6541-6548
- Khorashad, J. S. et al., *Blood* **121** (2013): 489-498
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* **rd** (2000)
- Krackhardt, A. M. et al., *Blood* **100** (2002): 2123-2131
- Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* **5** (2006): 471-484

[0504]

- Kronenberger, K. et al., *J Immunother.* **31** (2008): 723-730
- Kuball, J. et al., *Blood* **109** (2007): 2331-2338
- Kujawski, L. A. et al., *Cytokine Growth Factor Rev* **18** (2007): 459-471
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **690** (1993): 276-291
- Lugo, T. G. et al., *Science* **247** (1990): 1079-1082
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* **3rd** (2004)
- Mahon, F. X. et al., *Lancet Oncol* **11** (2010): 1029-1035
- Maus, M. V. et al., *Blood* **123** (2014): 2625-2635
- Mayr, C. et al., *Exp.Hematol.* **34** (2006): 44-53
- Mayr, C. et al., *Blood* **105** (2005): 1566-1573
- Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- Muller, M. R. et al., *Blood* **103** (2004): 1763-1769
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
- National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
- O'Brien, S. et al., *Lancet Oncol* **15** (2014): 48-58
- O'Brien, S. G. et al., *N.Engl.J Med* **348** (2003): 994-1004
- Ostergaard, Pedersen L. et al., *Eur.J Immunol.* **31** (2001): 2986-2996
- Palma, M. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **57** (2008): 1705-1710
- Parikh, S. A. et al., *Blood* **118** (2011): 2062-2068
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787

[0505]

- Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* **365** (2011): 725-733
- Radich, J., *Semin.Hematol.* **47** (2010): 354-361
- Rammensee, H. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- Rezvani, K. et al., *Blood* **111** (2008): 236-242
- Richards, S. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **91** (1999): 861-868
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Robak, T. et al., *Expert.Opin.Biol.Ther* **14** (2014): 651-661
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* **1** (2006): 1120-1132
- Ross, D. M. et al., *Blood* **122** (2013): 515-522
- Saglio, G. et al., *N.Engl.J Med* **362** (2010): 2251-2259
- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Schetelig, J. et al., *J Clin Oncol* **26** (2008): 5094-5100
- Schmidt, S., *Memo.* **9** (2016): 157-162
- Schmidt, S. M. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 1164-1170
- Schmitt, T. M. et al., *Hum.Gene Ther.* **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., *Clin Immunol.* **119** (2006): 135-145
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Showel, M. M. et al., *F1000Prime.Rep.* **6** (2014): 96
- Siegel, S. et al., *Blood* **102** (2003): 4416-4423
- Silver, R. T. et al., *Blood* **94** (1999): 1517-1536
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 187-195
- Smahel, M., *Cancer Immunol.Immunother.* **60** (2011): 1655-1668

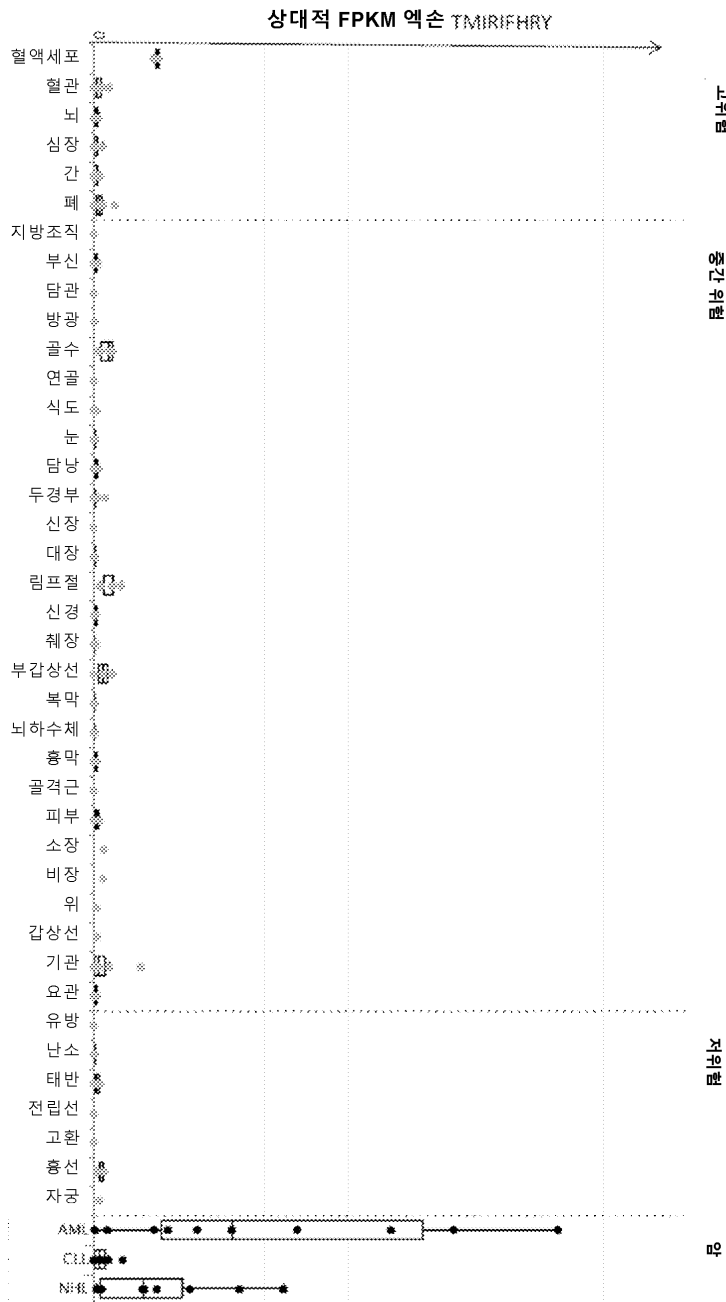
[0506]

- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094
- Soverini, S. et al., *Blood* **118** (2011): 1208-1215
- Spaner, D. E. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **54** (2005): 635-646
- Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wierda, W. G. et al., *Blood* **118** (2011): 5126-5129
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- Zheng, Y. et al., *Clin Biochem.* **44** (2011): 1405-1411
- Zufferey, R. et al., *J Virol.* **73** (1999): 2886-2892

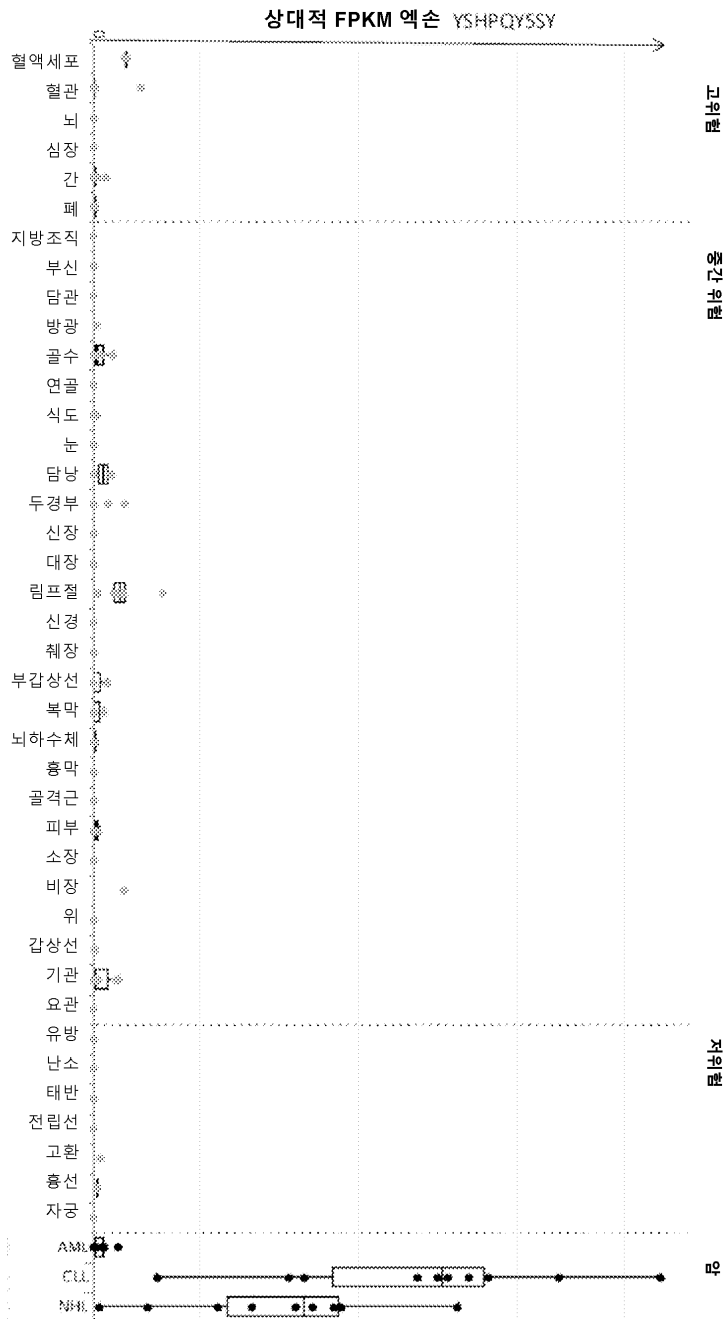
[0507]

도면

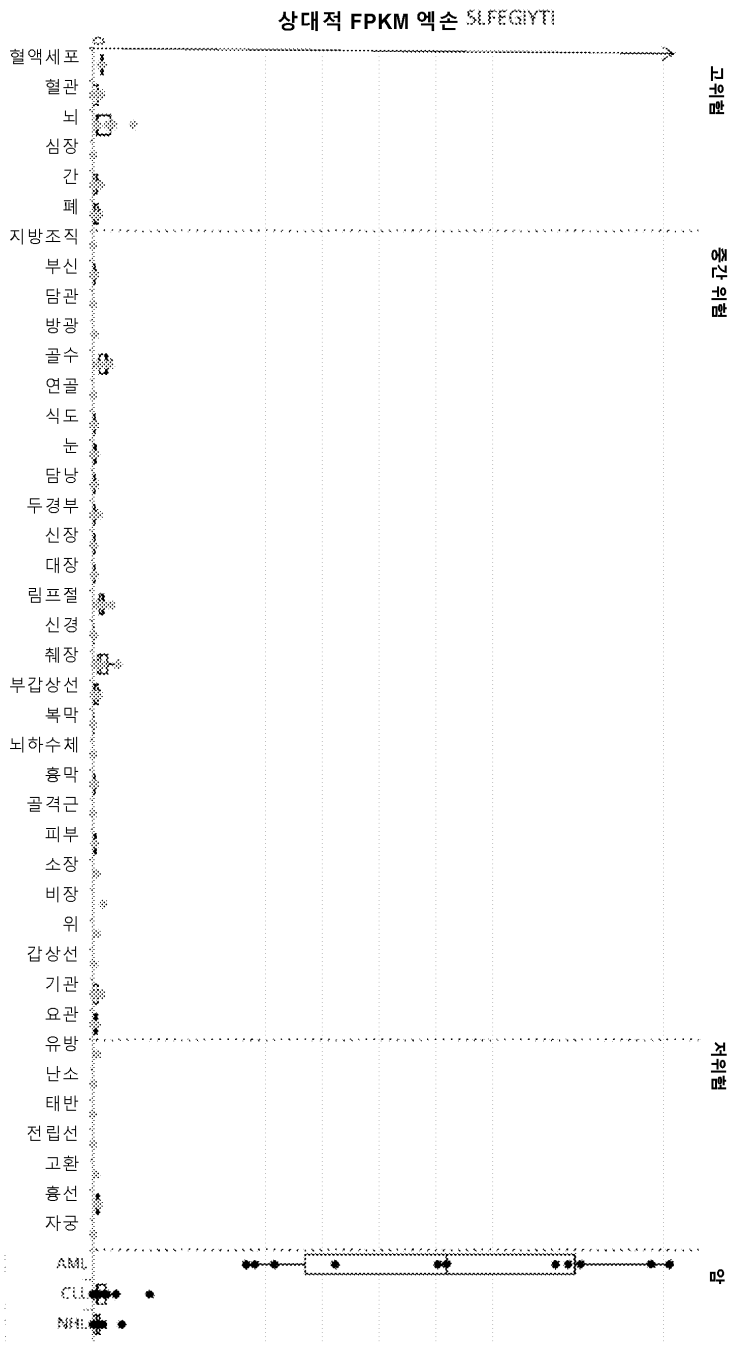
도면1a



도면1b

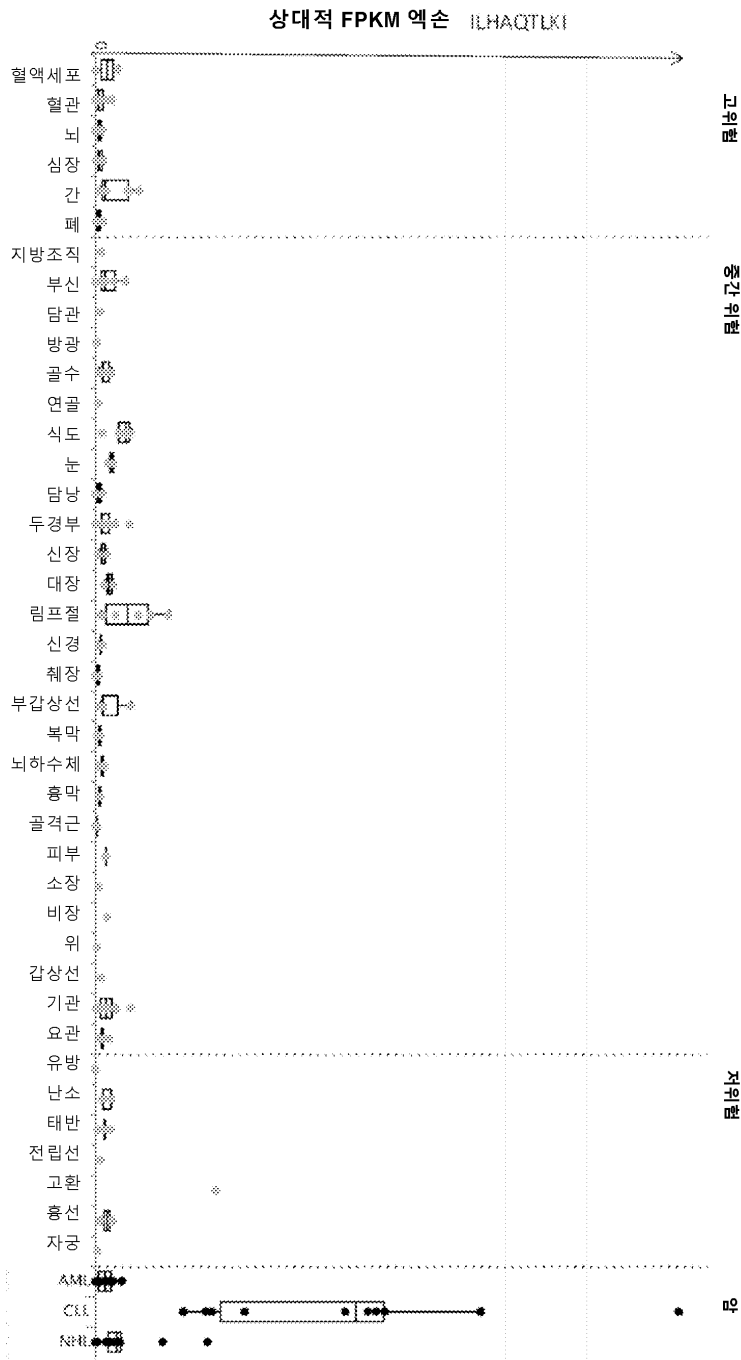


도면1c



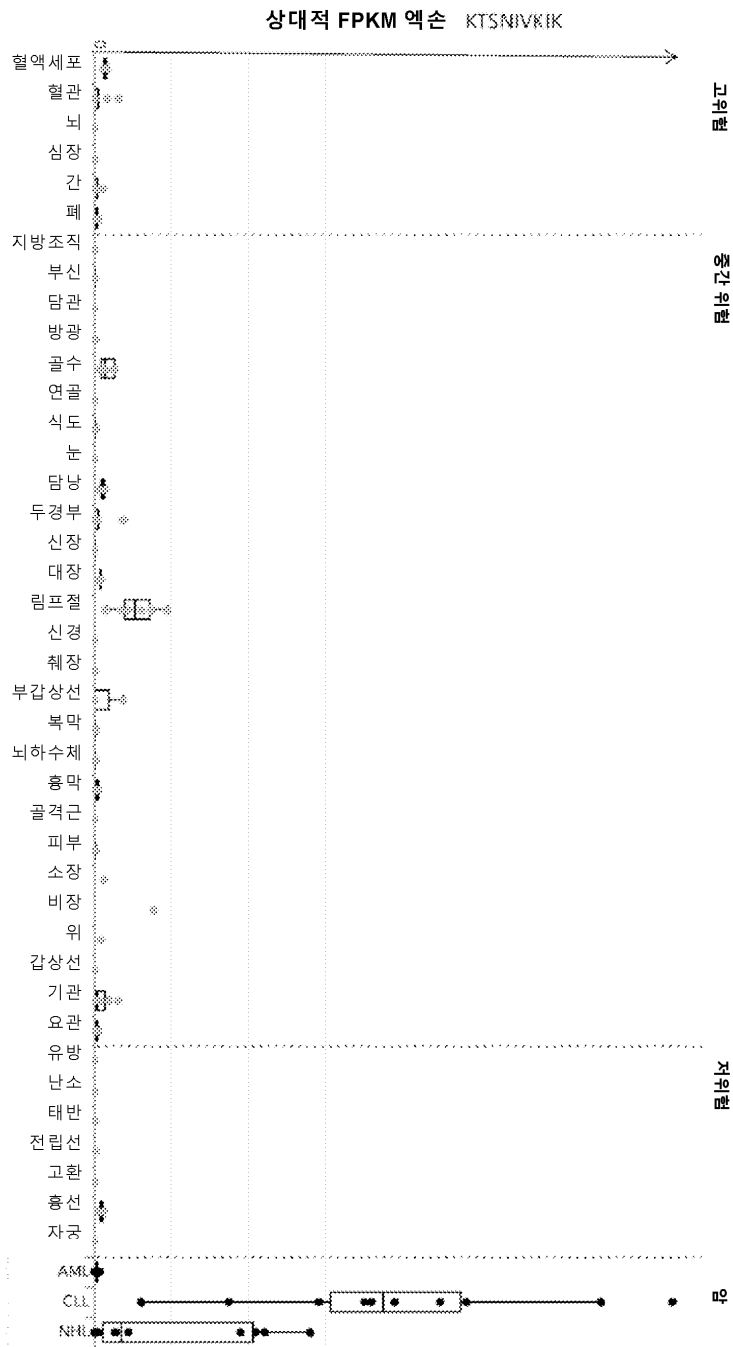
유전자 : FLT3
 펩티드 : SLEFGIYTI
 시퀀스 번호 : 31

도면1d



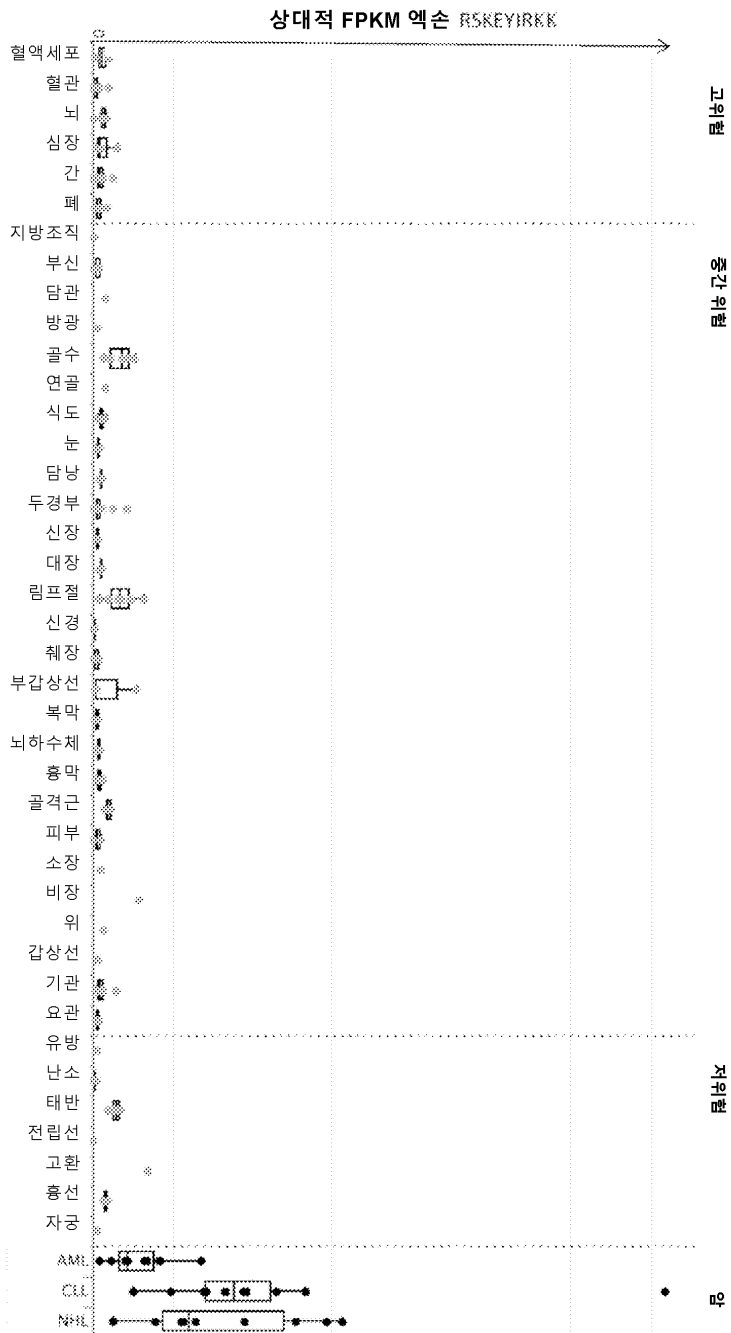
유전자 : RALGPS2
 펩티드 : ILHAQTLKI
 시연 식별 번호 22

도면1e



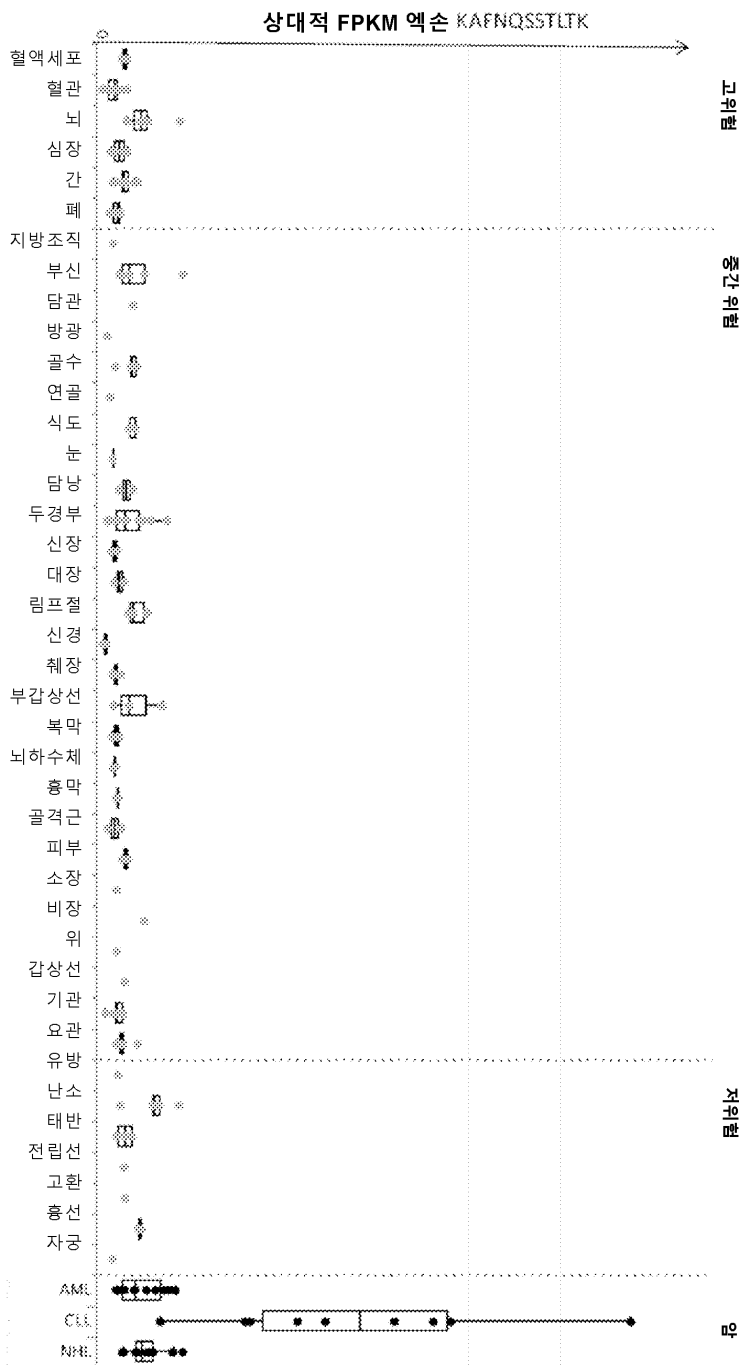
유전자 : FCRL2
 펩티드 : KTSNIVKIK
 서열 식별 번호 32

도면1f



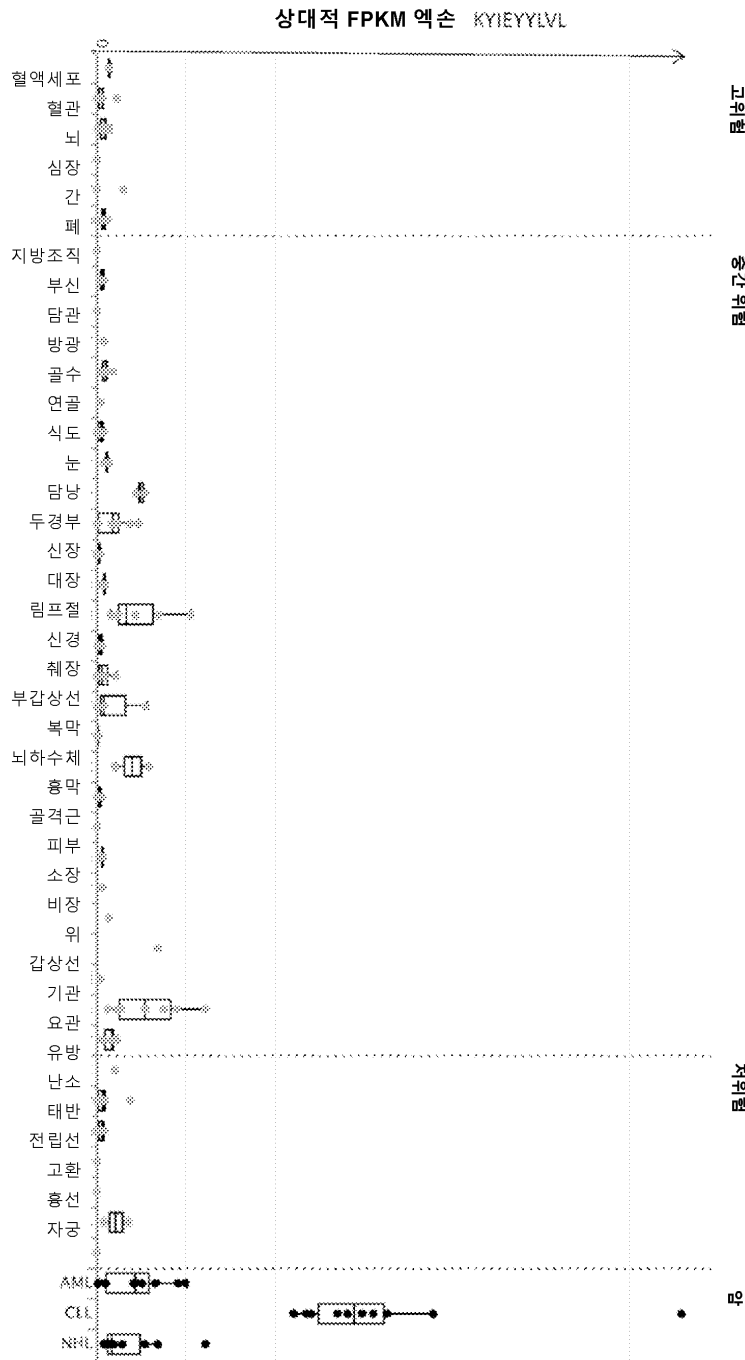
우전자 : KBTBD8
 펩티드 : RSKEYIRKK
 시열 식별 번호 40

도면1g



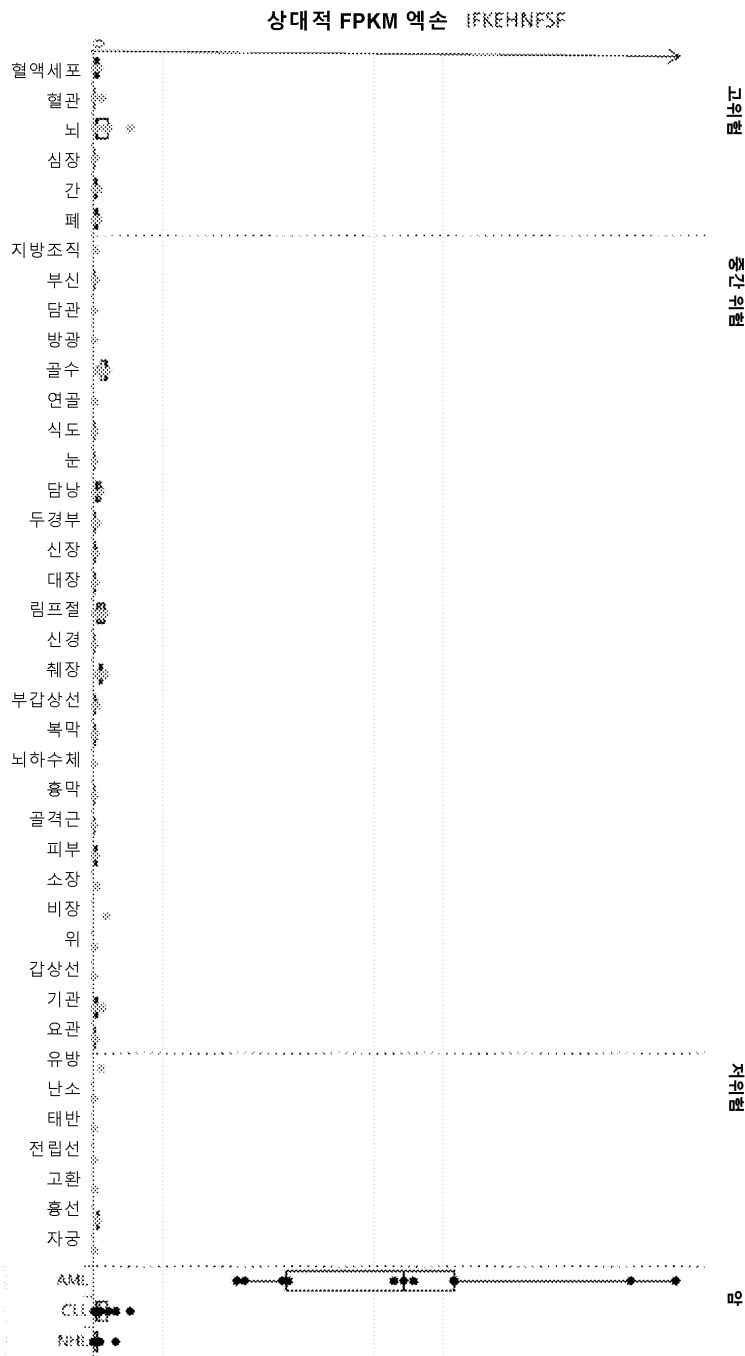
유전자 : ZNF92
 핀티드 : KAFNQSSSTLTK
 시퀀스 번호 52

도면1h

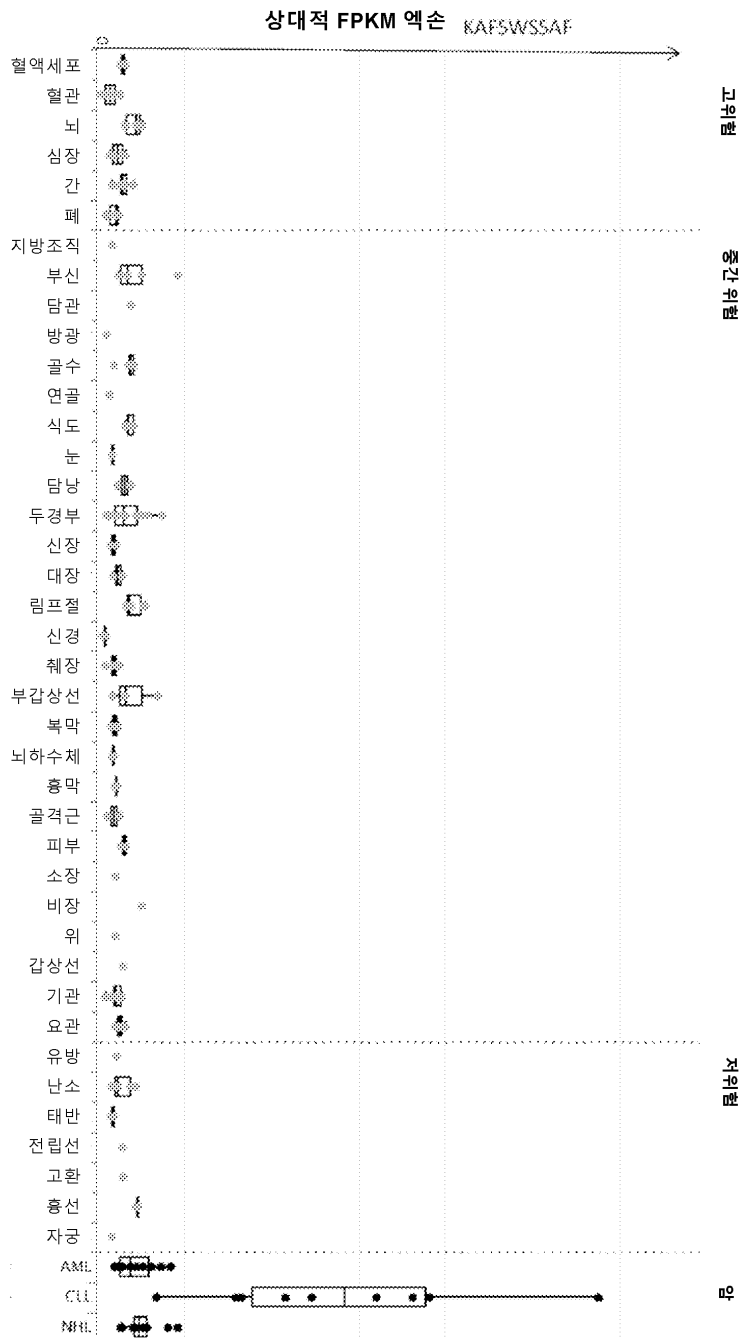


유전자 : ADAM28
 펩티드 : KYIEYYLVL
 시열 식별 번호 53

도면1i

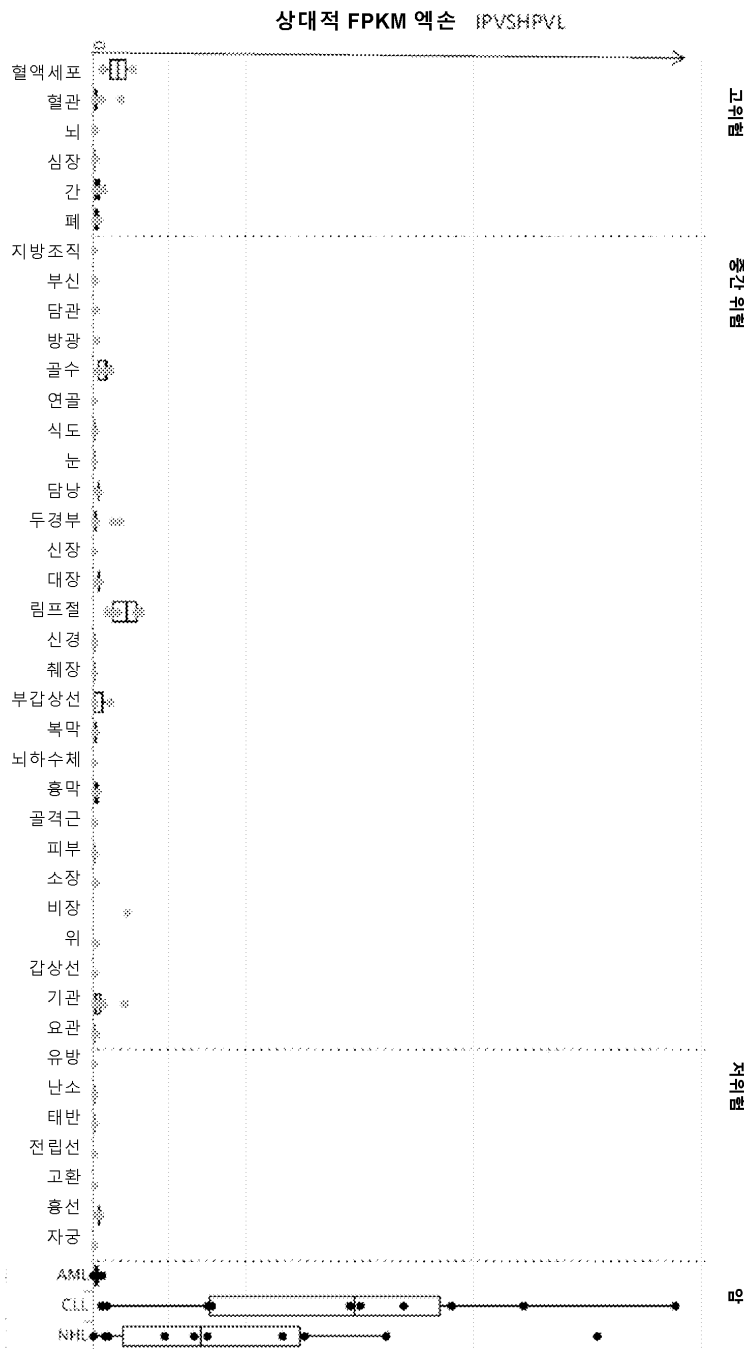


도면1j

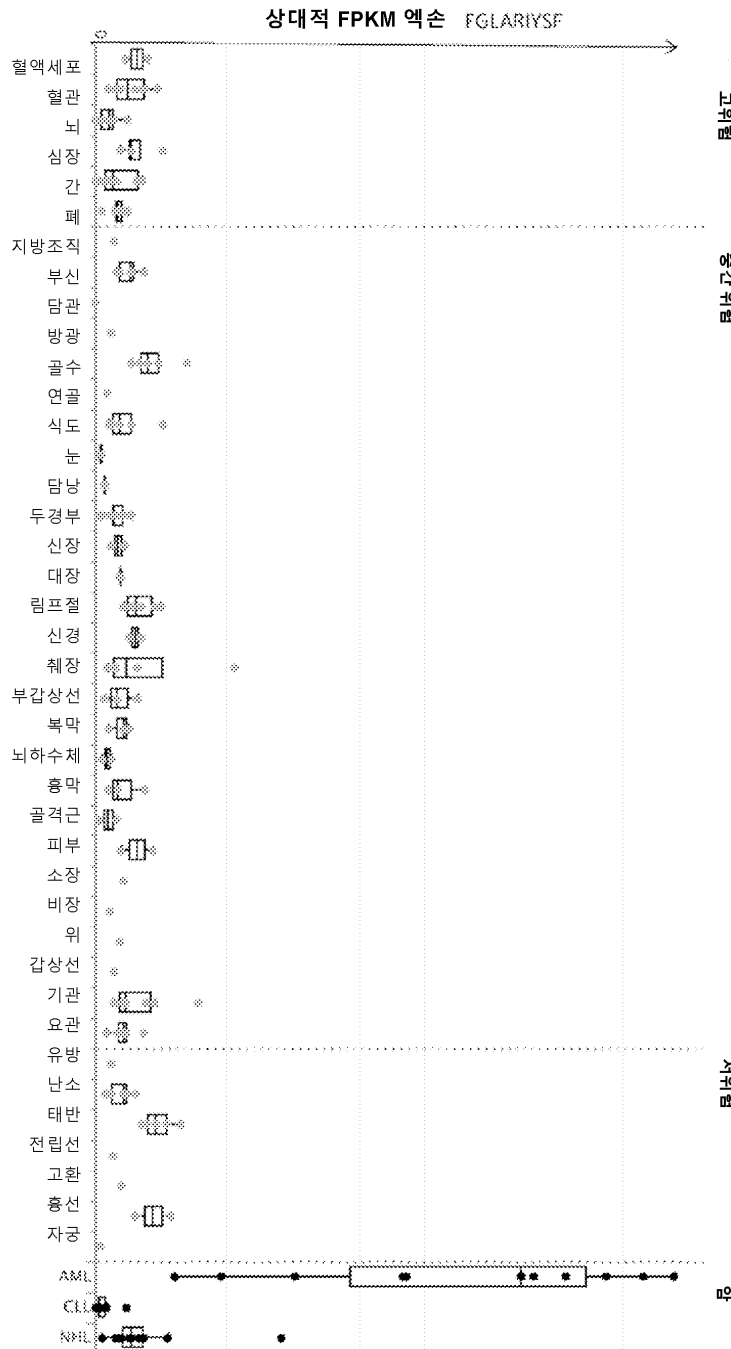


유전자 : ZNF92
 펩티드 : KAFSWSSAF
 서열 식별 번호 76

도면1k

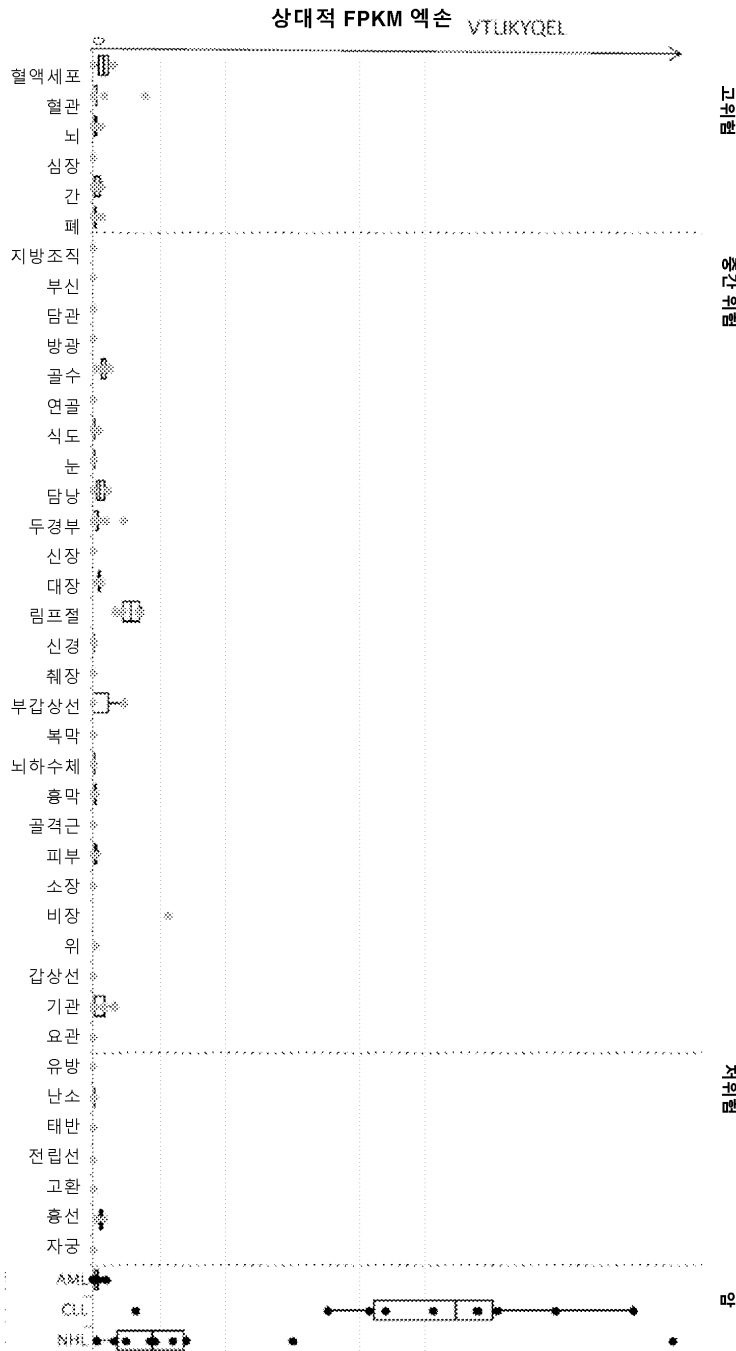


도면11



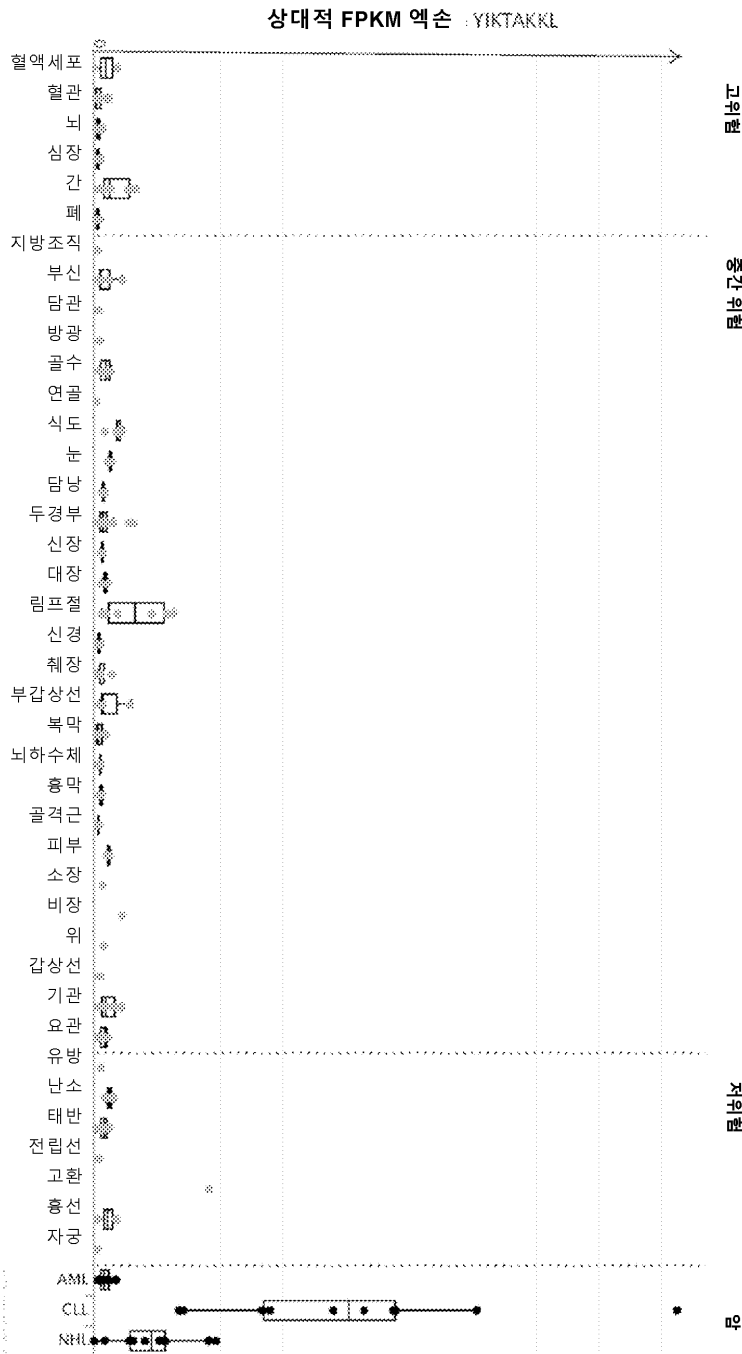
유전자 : CDK6
 펩티드 : FGLARIYSF
 시퀀스 번호 : 110

도면 1m



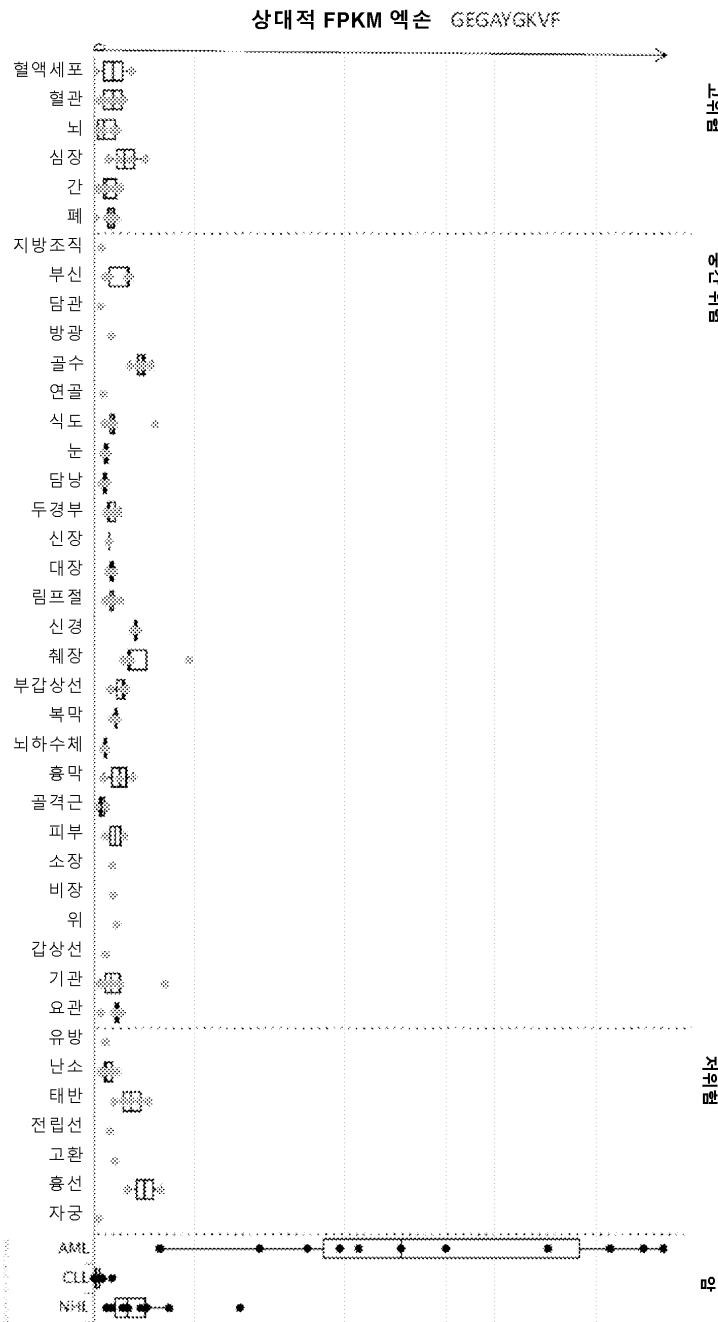
유전자 : CLEC17A
 궤티드 : VTLIKYQEL
 서열 식별 번호 111

도면1n



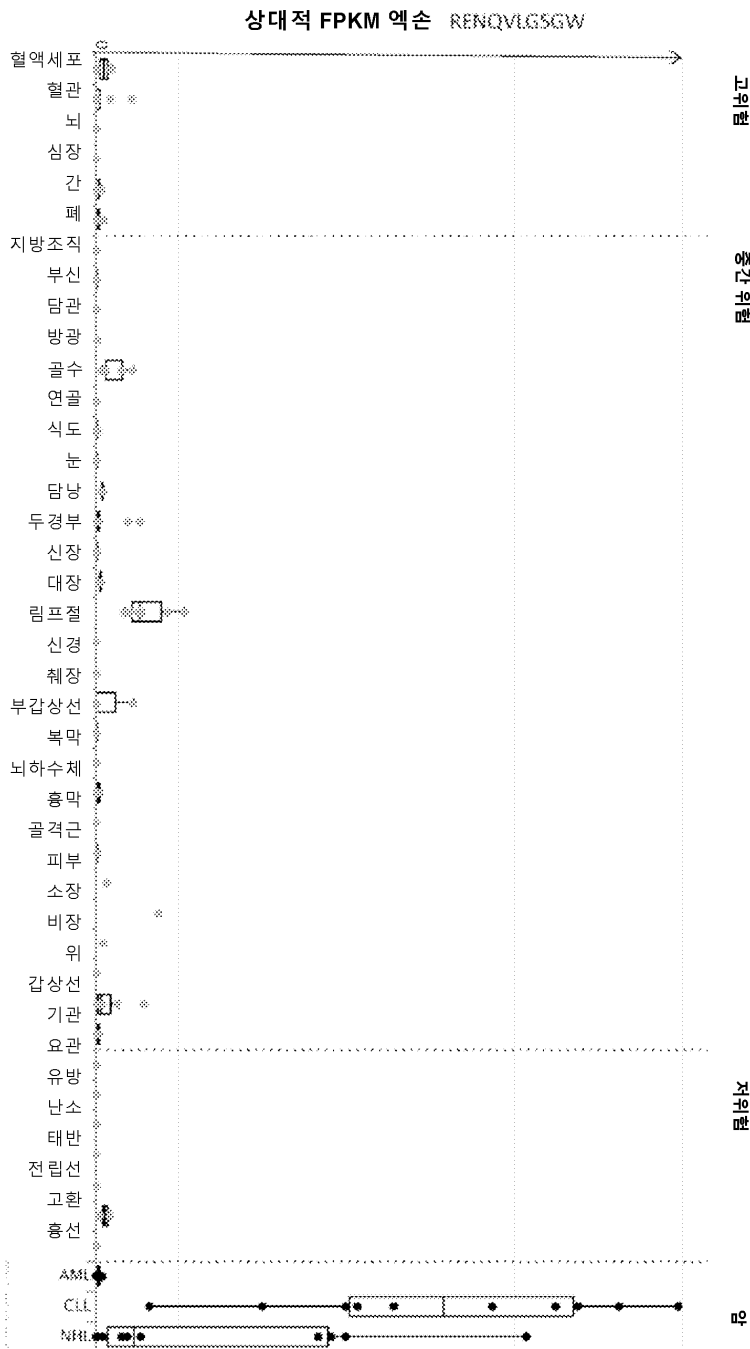
유전자 : RALGPS2
 펩티드 : YIKTAKKL
 시열 식별 번호 117

도면10



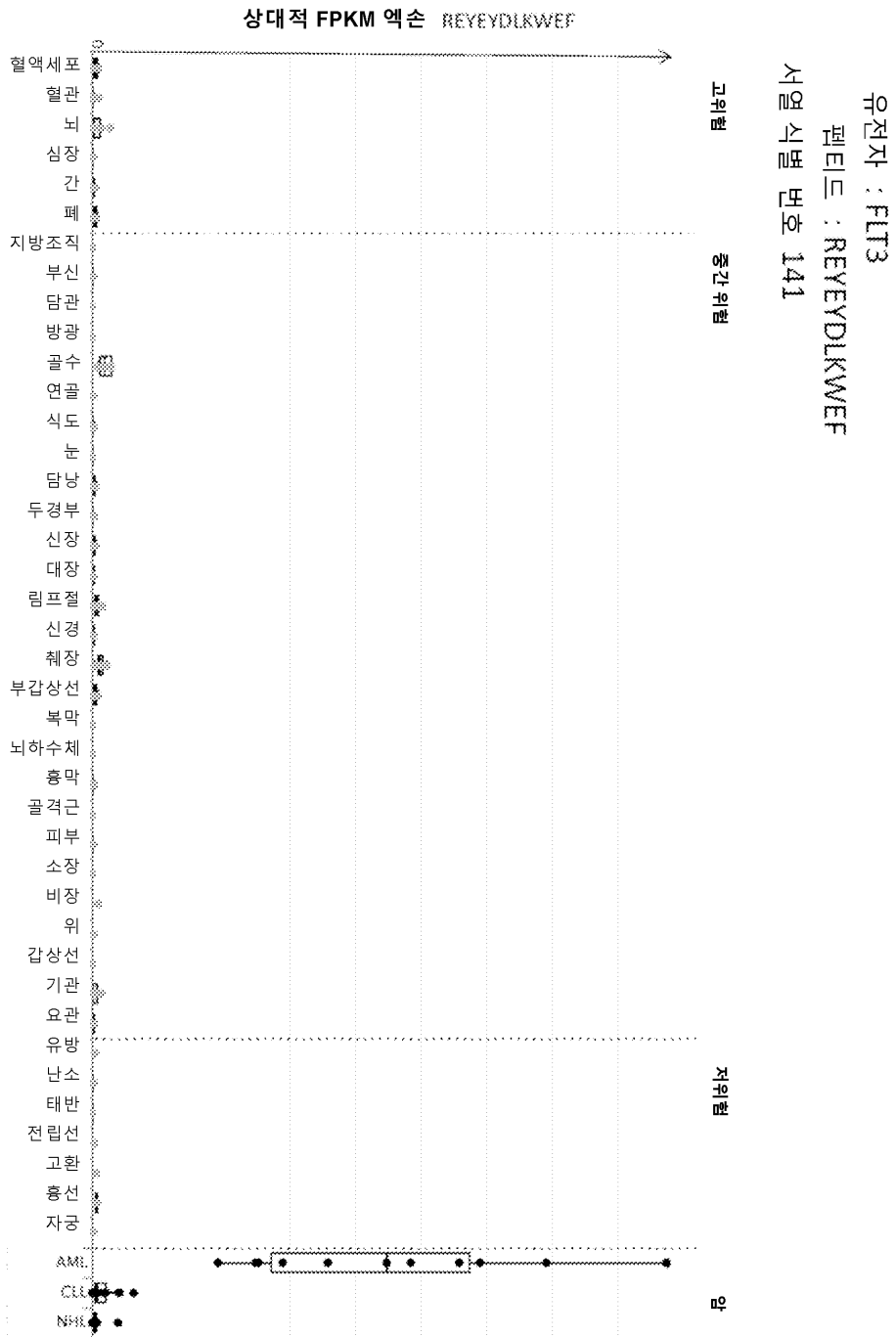
유전자 : CDK6
 펩티드 : GEGAYGKVF
 시퀀스 번호 129

도면1p

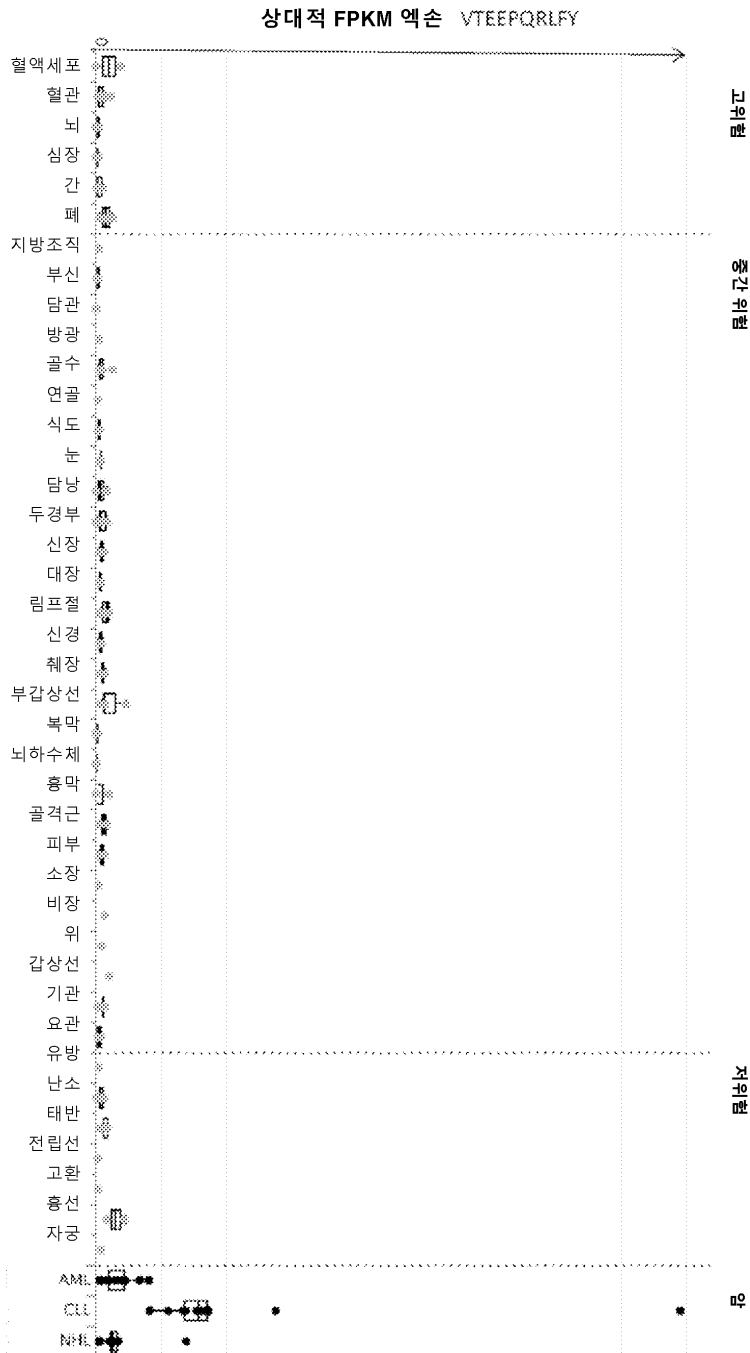


유전자 : FCRL2
 폼티드 : RENQVLSGSW
 서열 식별 번호 139

도면1q

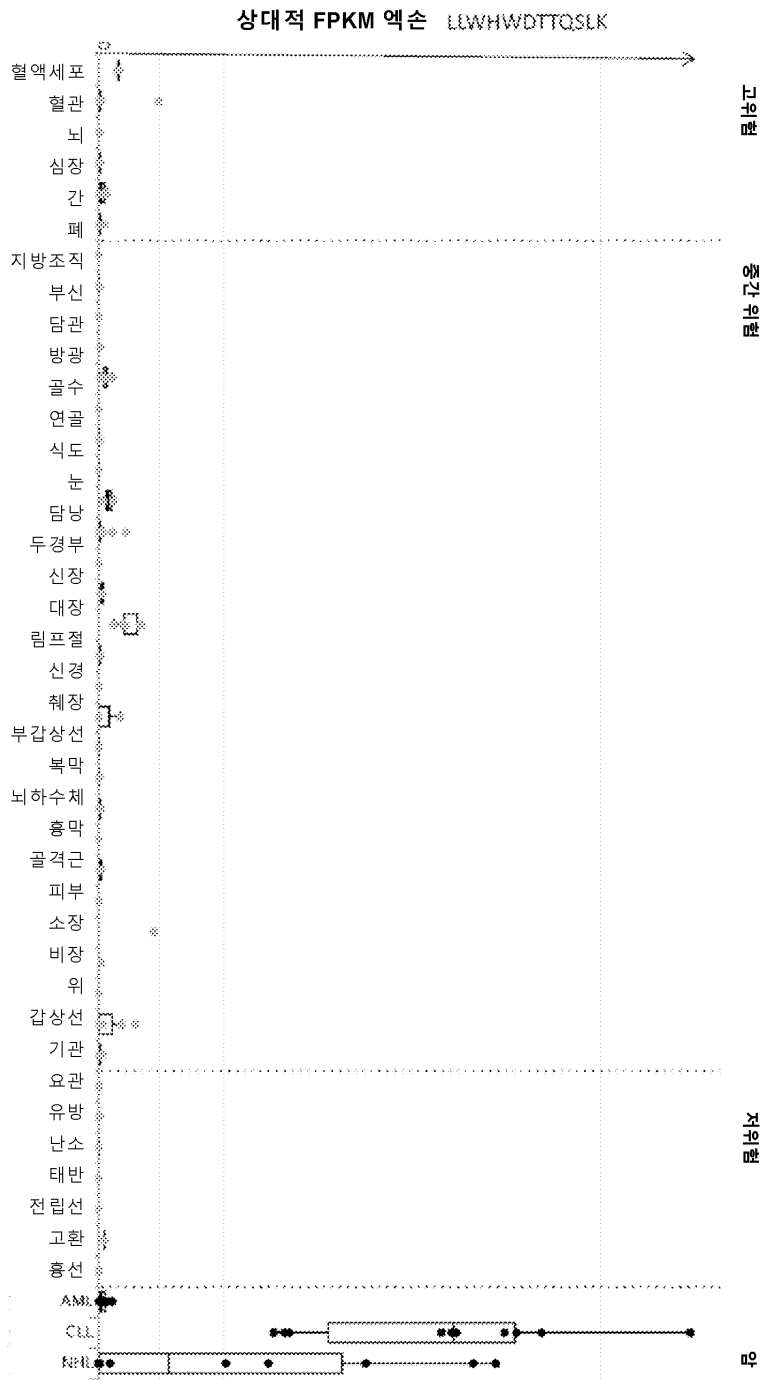


도면1r

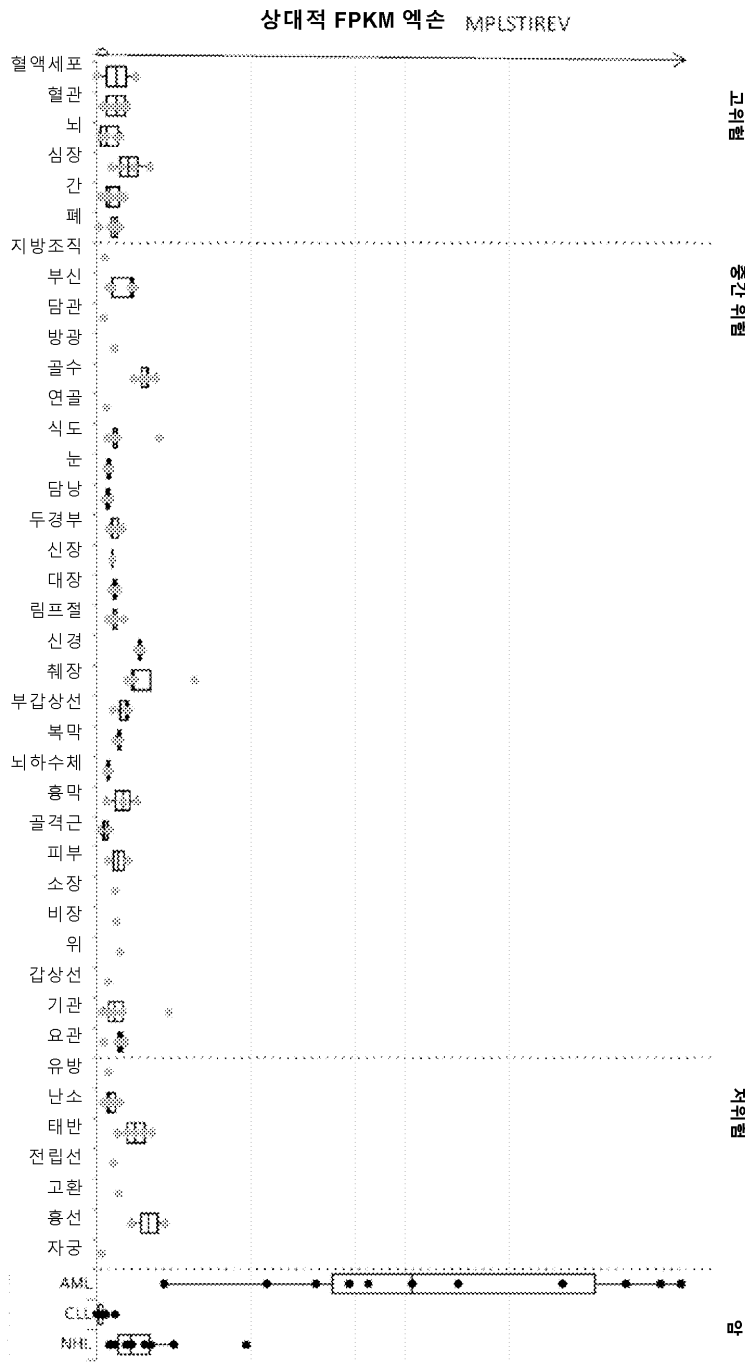


유전자 : BMF
 펩티드 : VTEEPQRLFY
 서열 식별 번호 189

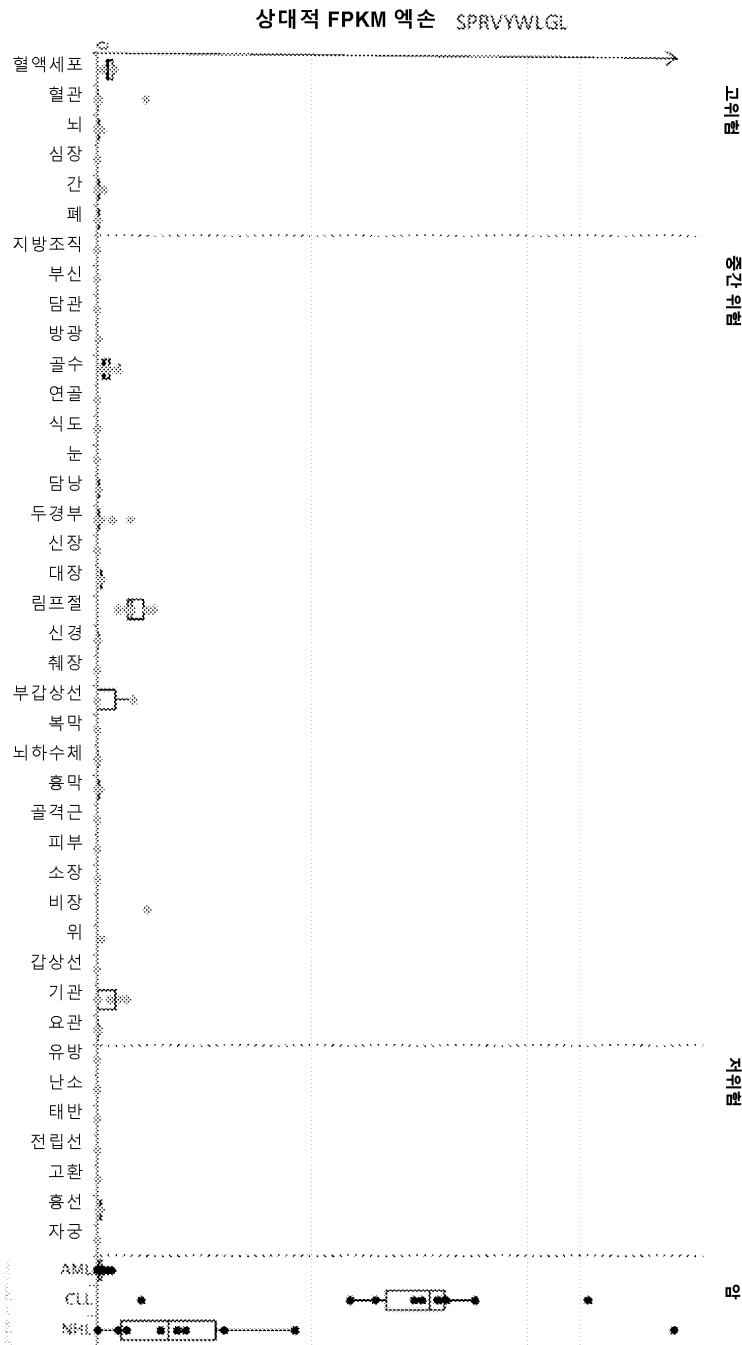
도면1s



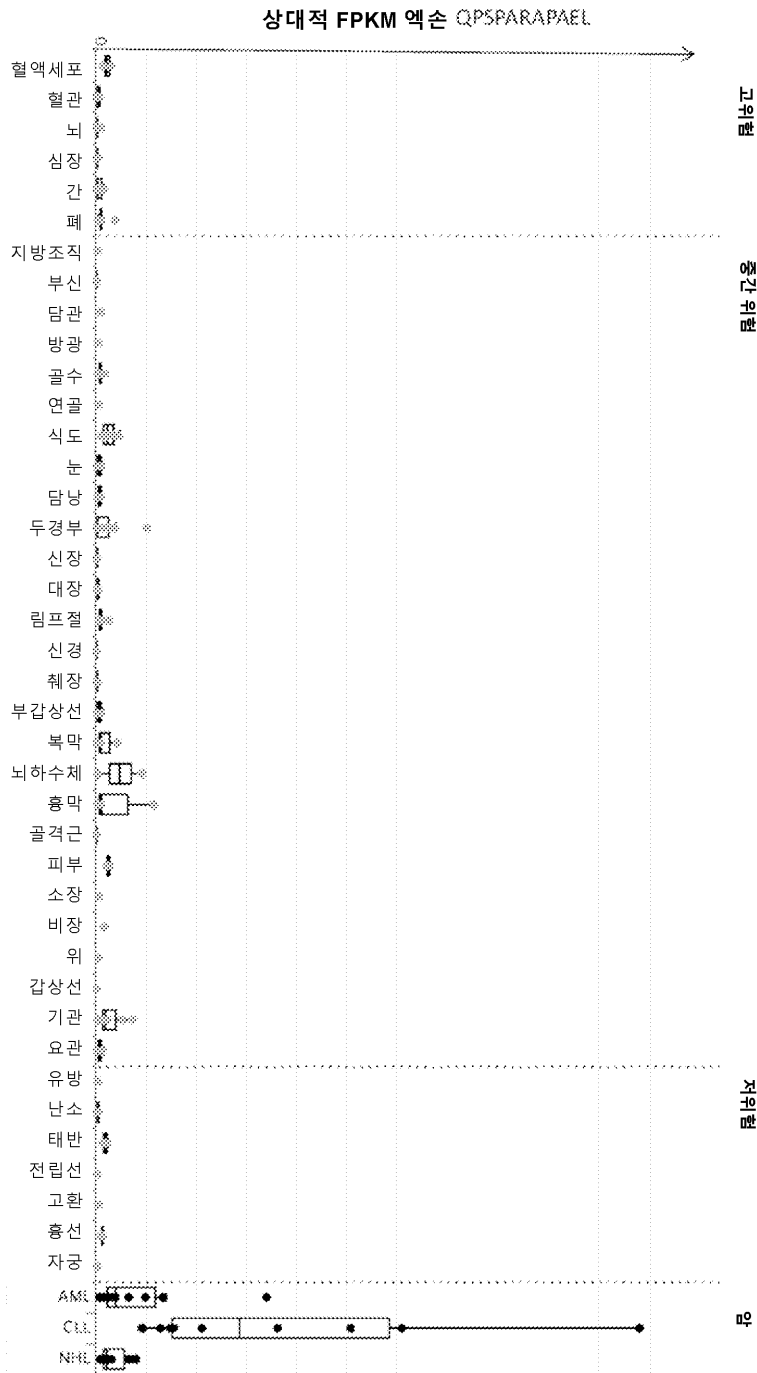
도면1t



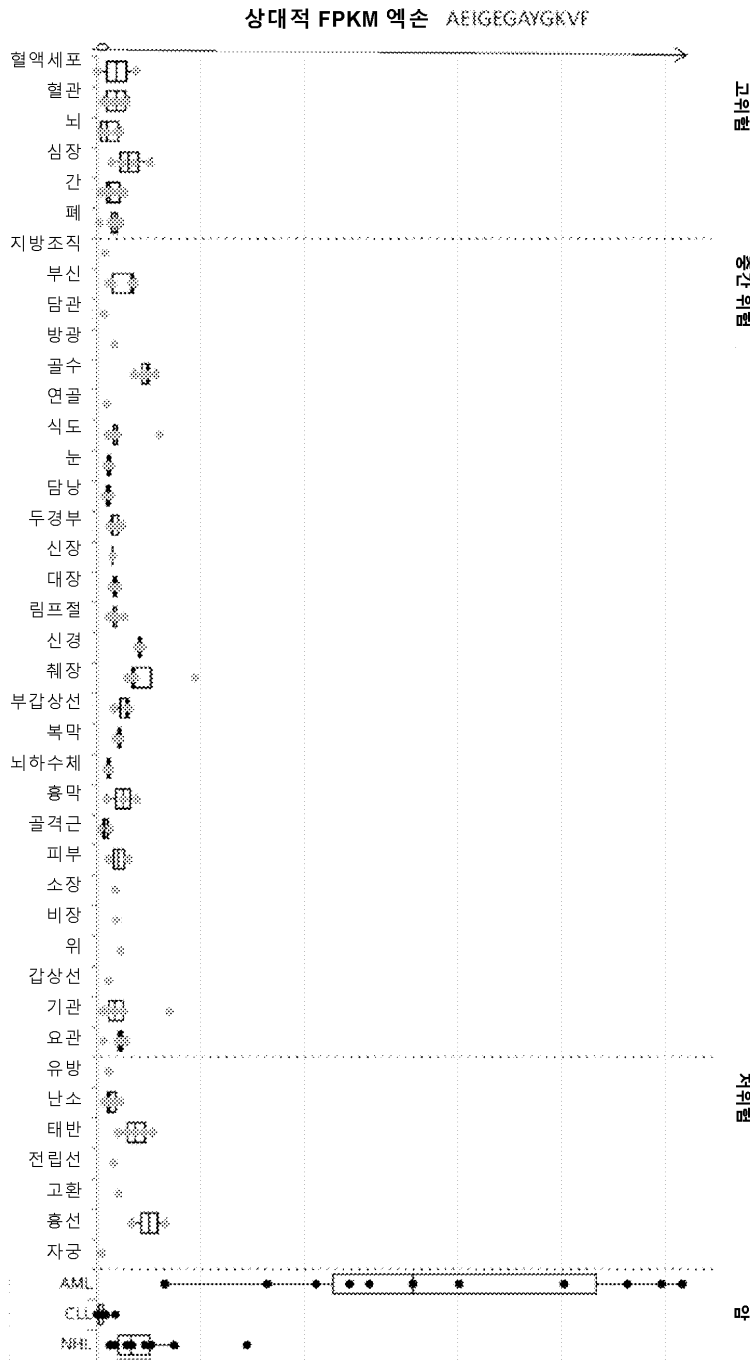
도면1u



도면1v

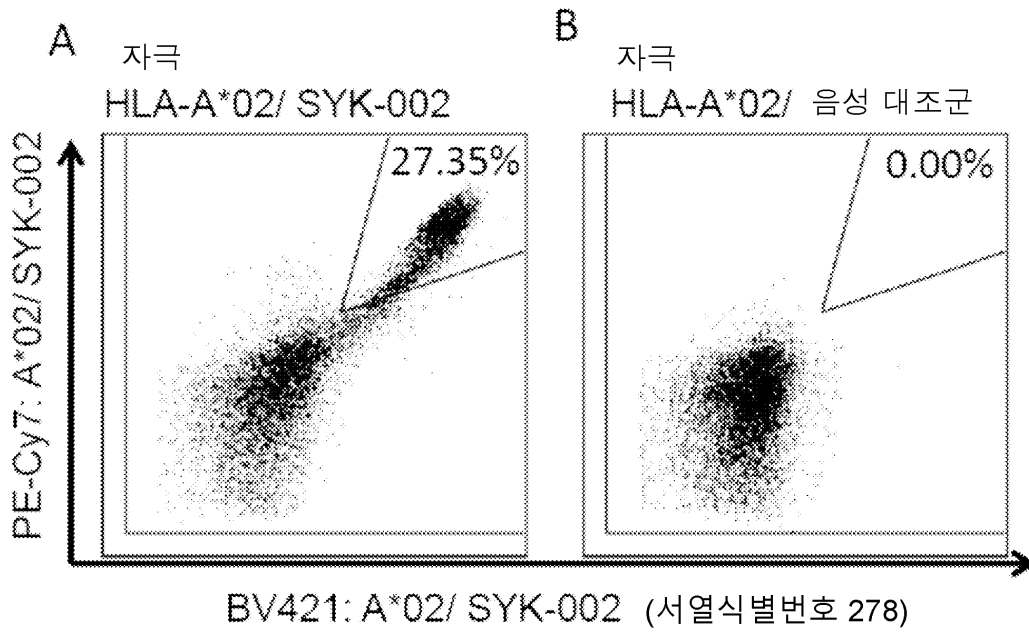


도면1w

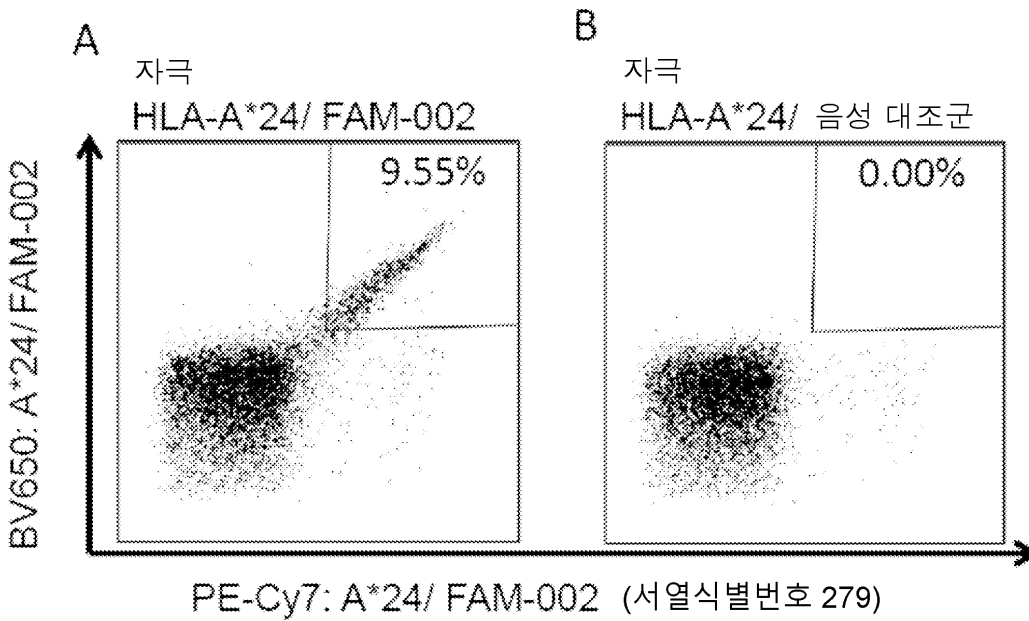


유전자 : CDK6
 펩티드 : AEIGEGAYGKVF
 서열 식별 번호 260

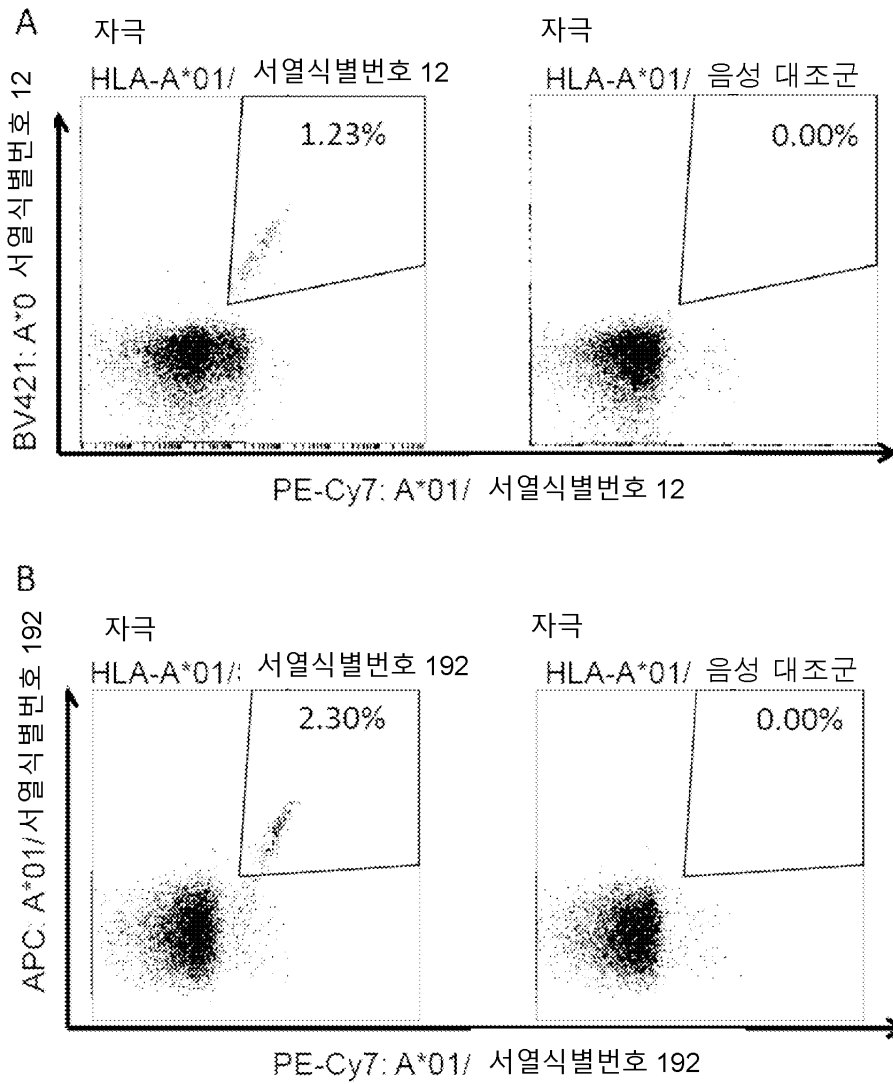
도면2



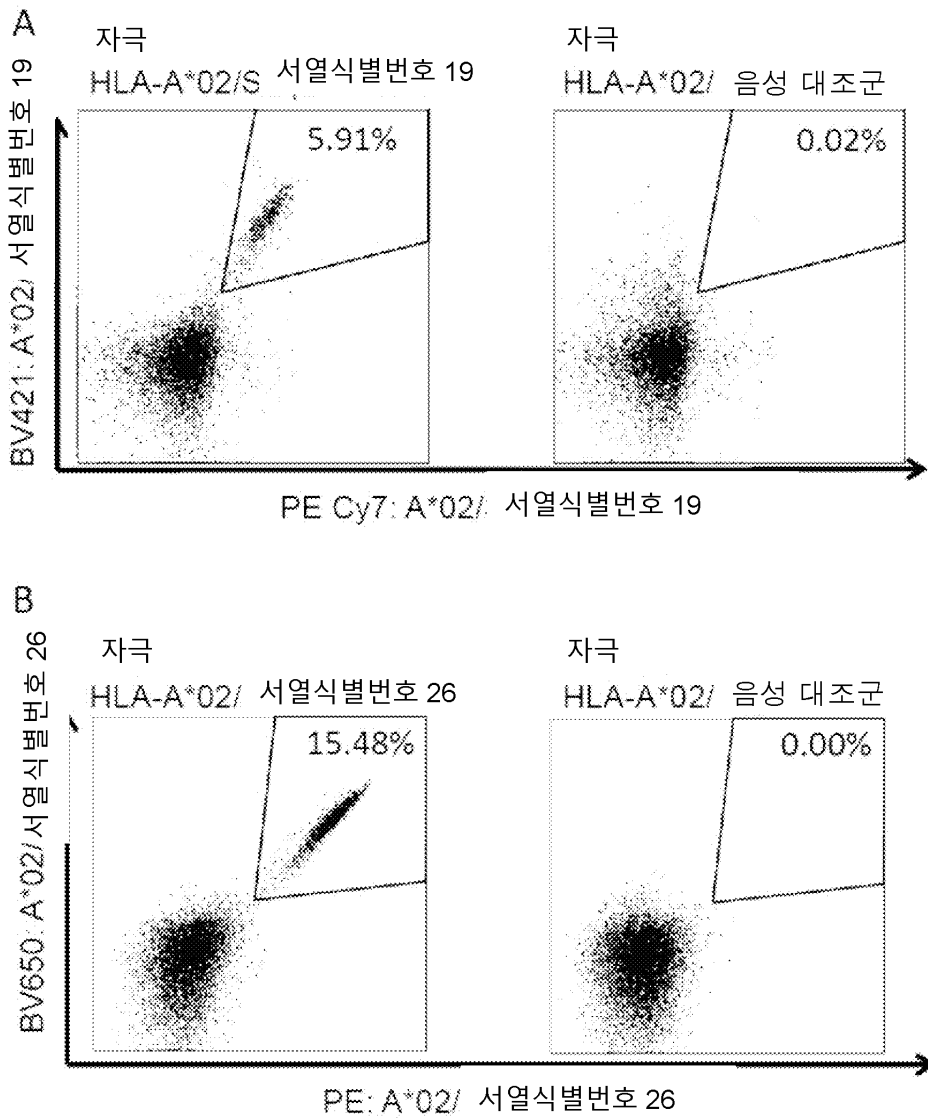
도면3



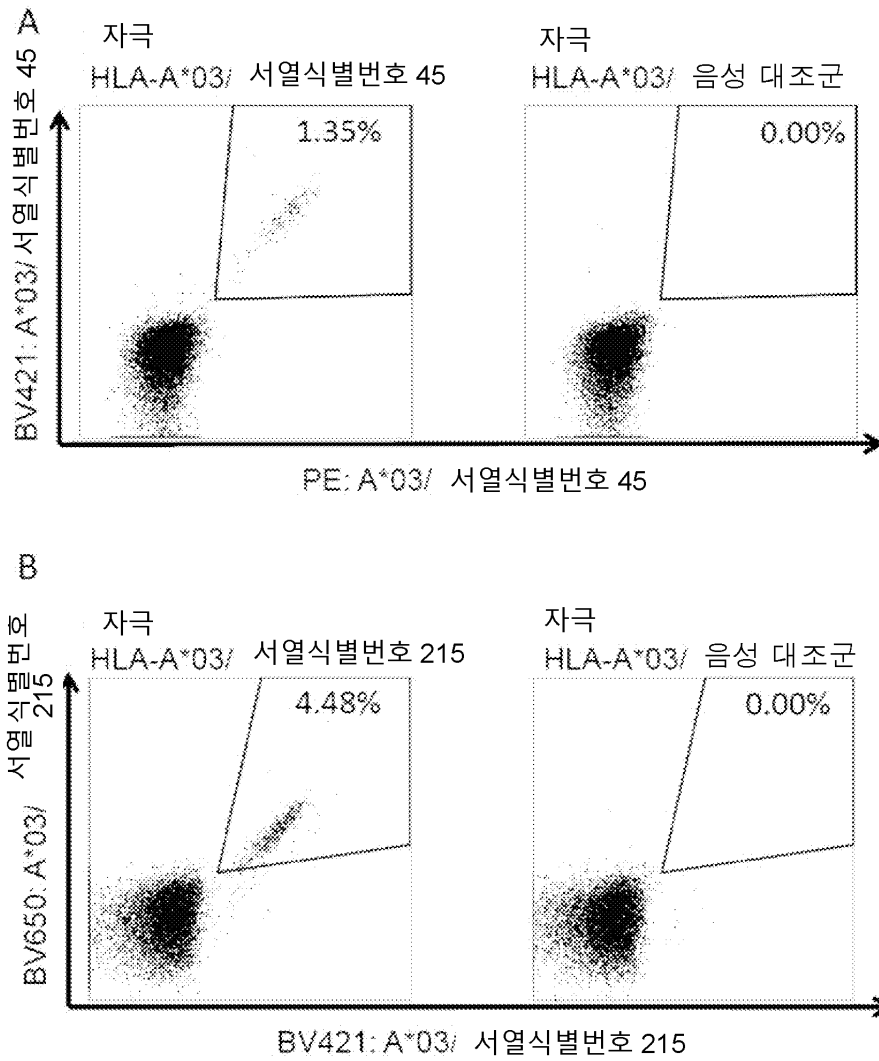
도면4



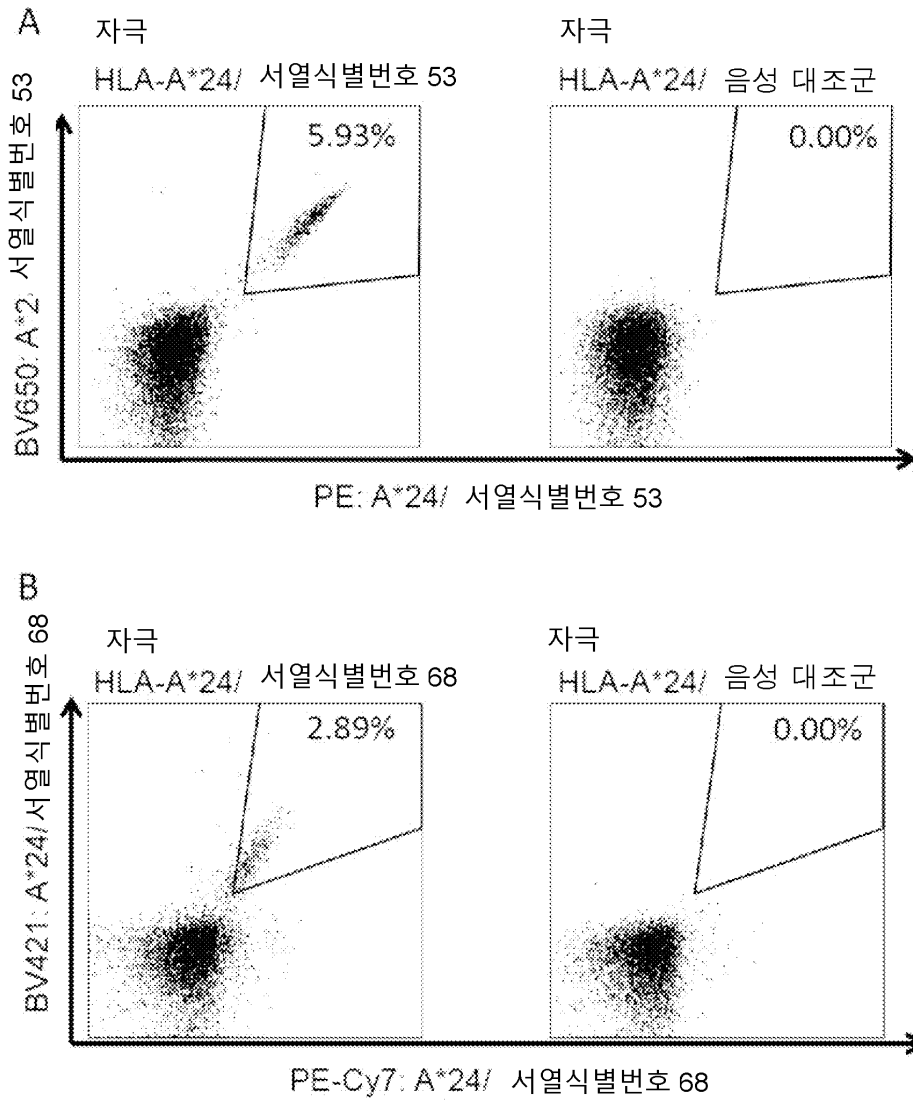
도면5



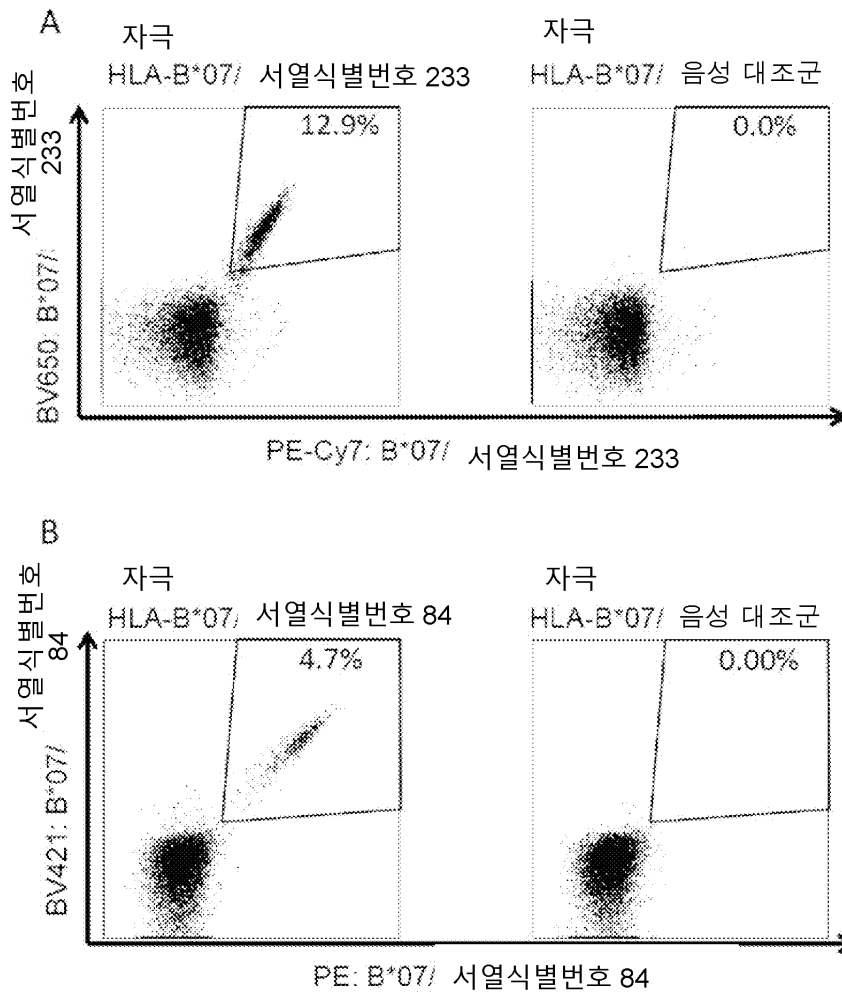
도면6



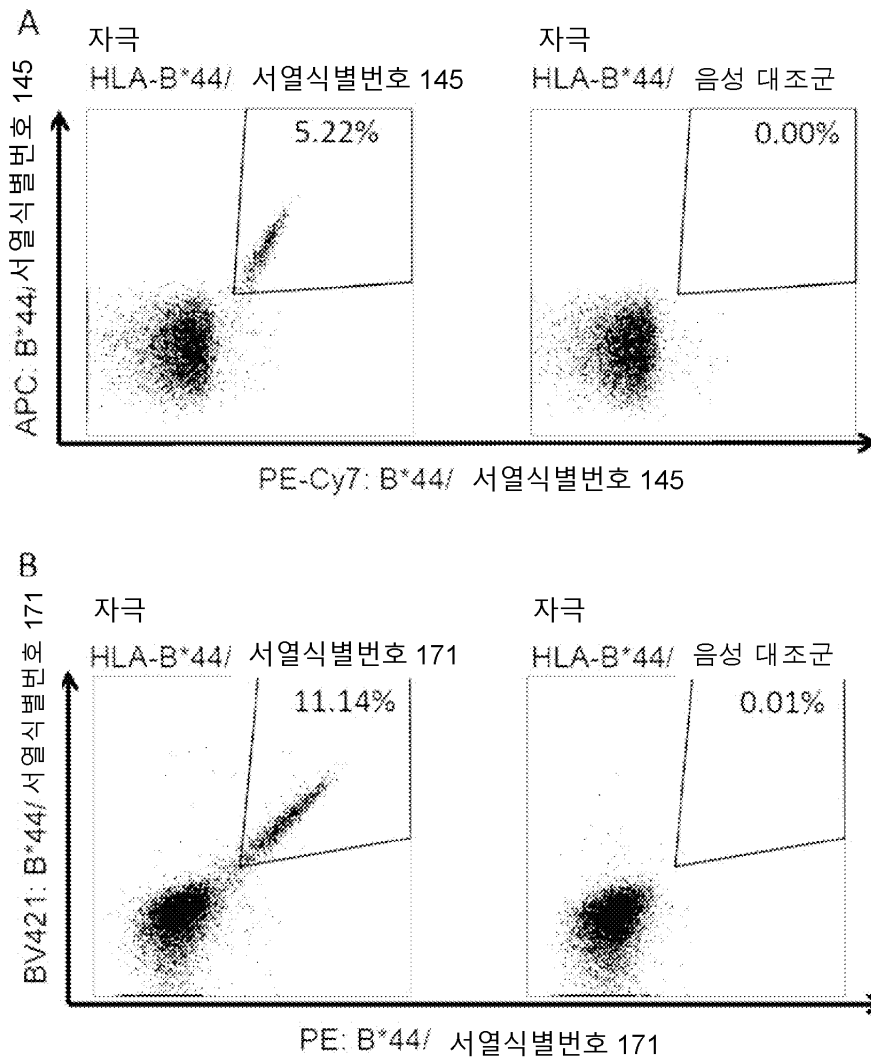
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Immatics Biotechnologies GmbH
- <120> Peptides and combination of peptides for use in immunotherapy against leukemias and other cancers
- <130> I33030WO
- <140> PCT/EP2018/059114
- <141> 2018-04-10
- <150> US 62/483,690
- <151> 2017-04-10
- <150> DE 10 2017 107 710.3
- <151> 2017-04-10

<160> 281

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Thr Glu Gly His Ser Gly Asn Tyr Tyr

1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Met Ile Arg Ile Phe His Arg Tyr

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Tyr Ile Asn Pro Ala Lys Leu Thr Pro Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Leu Asp Gln Asn Lys Met His Tyr

1 5

<210> 5

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Thr Asp Val Leu Ser Thr Arg Tyr

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Thr Glu Gly Val Ala Gln Thr Ser Phe Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Phe Met Asp Ser Glu Ser Phe Tyr Tyr

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Thr Asp Ser Ala Gly Ser Ser Tyr

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Tyr Ser His Pro Gln Tyr Ser Ser Tyr

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Ser Asp Ile Gly His Leu Leu

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Ala Ala Asp His His Ser Leu Tyr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Thr Asp Ile Val Asp Ser Gln Tyr

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ile Thr Asp Ile His Ile Lys Tyr

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Phe Asp Leu Thr Val Val Ser Tyr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Val Ala Asp Ile Arg Asn Ala Tyr

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Trp Ile Gly Asp Lys Ser Phe Glu Tyr

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Ala Tyr Asn Arg Val Ile Phe Val

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Leu Leu Pro Ser Val Val Leu Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Leu Phe Glu Gly Ile Tyr Thr Ile

1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20
Phe Ser Leu Glu Asp Leu Val Arg Ile

1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Phe Leu Phe Asp Lys Leu Leu Leu Ile

1 5
<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22
Ile Leu His Ala Gln Thr Leu Lys Ile

1 5
<210> 23
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 23
Phe Ala Phe Ser Gly Val Leu Arg Ala

1 5
<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24

Lys Leu Gly Pro Val Ala Val Ser Ile

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Tyr Leu Asn Glu Lys Ser Leu Gln Leu

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Leu Tyr Val Gln Gln Leu Lys Ile

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Leu Ile Ala Lys Glu Met Asn Ile

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Ile Tyr Asp Glu Ile Leu Gln Ser Lys

1 5 10

<210> 30

<211> 9

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Arg Thr Tyr Gly Phe Val Leu Thr Phe

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ala Thr Phe Asn Lys Leu Val Ser Tyr

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Lys Thr Ser Asn Ile Val Lys Ile Lys

1 5

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Val Phe Glu Gly Asp Ser Ile Val Leu Lys

1 5 10

<210> 34

<211> 11

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Ser Val Tyr Ser Glu Thr Ser Asn Met Asp Lys
 1 5 10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ala Thr Lys Ser Pro Ala Lys Pro Lys

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Lys Ala Lys Ala Ala Ala Lys Pro Lys

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Lys Ala Lys Lys Pro Ala Gly Ala Ala Lys

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Lys Ala Arg Lys Ser Ala Gly Ala Ala Lys

1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ile Val Ile Gln Leu Arg Ala Gln Lys

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Ser Lys Glu Tyr Ile Arg Lys Lys

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ser Val Ala His Leu Leu Ser Lys Tyr

1 5

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ser Val Ser Ser Ser Thr His Phe Thr Arg

1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Lys Leu Met Glu Thr Ser Met Gly Phe

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Lys Val Tyr Asp Pro Val Ser Glu Tyr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Val Val Phe Pro Phe Pro Val Asn Lys

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Arg Val Phe Pro Ser Pro Met Arg Ile

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ser Val Leu Asp Leu Ser Val His Lys

1 5

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Arg Ile Lys Pro Pro Gly Pro Thr Ala Val Pro Lys

1 5 10

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gly Leu Leu Glu Glu Ala Leu Phe Tyr

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Val Phe Asn Thr Leu Ile Ser Tyr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Ala Ser Thr Thr Val Leu Ala Leu Lys

1 5

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Lys Ala Phe Asn Gln Ser Ser Thr Leu Thr Lys

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Lys Tyr Ile Glu Tyr Tyr Leu Val Leu

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Gln Ala Leu Asn Phe Thr Arg Phe

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ile Phe Val Ala Arg Leu Tyr Tyr Phe

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Lys Tyr Ser Ser Gly Phe Arg Asn Ile

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Arg Phe Pro Pro Thr Pro Pro Leu Phe

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Lys Tyr Leu Ala Asp Leu Pro Thr Leu

1 5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Gly Leu Tyr Glu Gly Thr Gly Arg Leu Phe

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Thr Gln Asp Pro His Val Asn Ala Phe Phe

1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ile Phe Lys Glu His Asn Phe Ser Phe

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ile Tyr Phe Ser Asn Thr His Phe Phe

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ser Phe Gln Ser Lys Ala Thr Val Phe

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ala Tyr Leu Lys Gln Val Leu Leu Phe

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Ser Gln Pro Ala Val Ala Thr Ser Phe

1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Val Phe Leu Pro Ser Glu Gly Phe Asn Phe

1 5 10

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

68

Leu Tyr Gln Asp Arg Phe Asp Tyr Leu

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Glu Tyr Asn Thr Ile Lys Asp Lys Phe

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Leu Tyr Ser Asp Ile Gly His Leu Leu

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Arg Tyr Leu Gly Lys Asn Trp Ser Phe

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Thr Tyr Val Glu Asn Leu Arg Leu Leu

1 5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Thr Tyr Pro Gln Leu Glu Gly Phe Lys Phe

1 5 10

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Leu Ser Phe

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

75

Arg Phe Tyr Leu Leu Thr Glu His Phe

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Lys Ala Phe Ser Trp Ser Ser Ala Phe

1 5

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Arg Pro Asn Gly Asn Ser Leu Phe Thr Ser Ala

1 5 10

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Arg Pro Arg Gly Leu Ala Leu Val Leu

1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala

1 5 10

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Lys Pro Leu Phe Lys Val Ser Thr Phe

1 5

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Ser Glu Ser Pro Trp Leu His Ala Pro Ser Leu

1 5 10

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Ala Pro Phe Gly Phe Leu Gly Met Gln Ser Leu

1 5 10

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Ile Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Ser Pro Lys Leu Gln Ile Ala Ala Met

1 5

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Ile Pro Val Ser His Pro Val Leu

1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ile Pro Ala Ser His Pro Val Leu

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Phe Pro Ala Pro Ile Leu Arg Ala Val

1 5

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Pro Asp Pro His Leu Tyr His Gln Met

1 5 10

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Phe Pro Glu Thr Val Asn Asn Leu Leu

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Lys Pro Lys Ala Ala Lys Pro Lys Ala

1 5

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Lys Pro Lys Ala Ala Lys Pro Lys Ala Ala

1 5 10

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Lys Ala Lys Lys Pro Ala Gly Ala Ala

1 5

<210> 93

<211> 9

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Lys Ala Arg Lys Ser Ala Gly Ala Ala

1 5

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Lys Pro Lys Ala Ala Lys Pro Lys Lys Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Lys Pro Lys Ala Ala Lys Pro Lys Thr Ala

1 5 10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 96

Lys Pro Lys Lys Ala Pro Lys Ser Pro Ala

1 5 10

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Leu Pro Phe Gly Lys Ile Pro Ile Leu

1 5

<210> 98

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Tyr Pro Ile Ala Leu Thr Arg Ala Glu Met

1 5 10

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Ser Pro Arg Ala Ile Asn Asn Leu Val Leu

1 5 10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Tyr Pro Tyr Gln Glu Arg Val Phe Leu

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Asn Pro Arg Tyr Pro Asn Tyr Met Phe

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Leu Pro Leu Ser Met Glu Ala Lys Ile

1 5

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Ile Pro Ala Asn Thr Glu Lys Ala Ser Phe

1 5 10

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Arg Pro Met Thr Pro Thr Gln Ile Gly Pro Ser Leu

1 5 10

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Asn Pro Leu Thr Lys Leu Leu Ala Ile

1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Lys Ala Phe Lys Trp Phe Ser Ala Leu

1 5

<210> 107

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Gln Ala Ala Gln Arg Thr Ala Leu

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Ile Leu Ala Ile Arg Gln Asn Ala Leu

1 5

<210> 109

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Leu Gly His Val Arg Tyr Val Leu

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Phe Gly Leu Ala Arg Ile Tyr Ser Phe

1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Val Thr Leu Ile Lys Tyr Gln Glu Leu

1 5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Ala Pro Leu Leu Arg His Trp Glu Leu

1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Asp Ala Asn Ser Arg Thr Ser Gln Leu

1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

His Asn Ala Leu Arg Ile Leu Thr Phe

1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Glu Leu Tyr Gln Arg Ile Tyr Ala Phe

1 5
<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 116
Thr Leu Lys Ile Arg Ala Glu Val Leu

1 5
<210> 117
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 117

Tyr Ile Lys Thr Ala Lys Lys Leu

1 5
<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 118

Phe Glu Lys Glu Lys Lys Glu Ser Leu

1 5
<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 119

Asp Leu Arg Thr Lys Glu Val Val Phe

1 5
<210> 120
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 120

Val Pro Pro Lys Lys His Leu Leu

1 5

<210>

121

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Arg Pro Lys Lys Val Asn Thr Leu

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Lys Glu Leu Pro Gly Val Lys Lys Tyr

1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Glu Glu Asn Pro Gly Lys Phe Leu Phe

1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Ser Glu Ser Leu Pro Lys Glu Ala Phe

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Ser Glu Ser Thr Phe Asp Arg Thr Phe

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val Tyr

1 5

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Thr Glu Tyr Pro Val Phe Val Tyr

1 5

<210> 128

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Gly Glu Asn Asp Arg Leu Asn His Thr Tyr

1 5 10

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Lys Val Phe

1 5

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Glu Glu Glu His Gly Lys Gly Arg Glu Tyr

1 5 10

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Glu Glu Phe Glu Thr Ile Glu Arg Phe

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Gly Glu Leu Pro Ala Val Arg Asp Leu

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Ala Glu His Asn Phe Val Ala Lys Ala

1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Ser Glu Tyr Ala Asp Thr His Tyr Phe

1 5

<210> 135

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Asn Glu Ile Lys Val Tyr Ile Thr Phe

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Ala Glu Tyr Lys Gly Arg Val Thr Leu

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Gly Glu Leu Gly Gly Ser Val Thr Ile

1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Ser Gln Ala Pro Ala Ala Arg Ala Phe

1 5

<210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Arg Glu Asn Gln Val Leu Gly Ser Gly Trp

1 5 10

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe

1 5

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe

1 5 10

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Thr Glu Ile Phe Lys Glu His Asn Phe

1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe

1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Thr Glu Gly Lys Arg Tyr Phe Thr Trp

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Ala Glu Pro Leu Val Gly Gln Arg Trp

1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr

1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Lys Glu Val Pro Arg Ser Tyr Glu Leu

1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Arg Glu Tyr Asn Glu Tyr Glu Asn Ile

1 5

<210> 149

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Ser Glu Lys Glu Thr Val Ala Tyr Phe

1 5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Glu Glu Val Thr Asp Arg Ser Gln Leu

1 5

<210> 151

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Glu Val Asp Ala Ser Ile Phe Lys Ala Trp

1 5 10

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Ala Glu Leu Leu Ala Lys Glu Leu Tyr

1 5

<210> 153

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Lys Glu Phe Glu Gln Val Pro Gly His Leu

1 5 10

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp

1 5

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Asn Glu Phe Pro Val Ile Val Arg Leu

1 5

<210> 156

<211>

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Phe Glu Val Glu Ser Leu Phe Gln Lys Tyr

1 5 10

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Val Glu Ile Ala Glu Ala Ile Gln Leu

1 5

<210> 158

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Gly Glu Asn Glu Asp Asn Arg Ile Gly Leu

1 5 10

<210> 159

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 159

Gly Glu Leu Leu Gly Arg Gln Ser Phe

1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 160

Glu Glu Glu Thr Ile Leu His Phe Phe

1 5

<210> 161
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 161

Glu Glu Gly Asp Thr Leu Leu His Leu Phe

1 5 10

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 162

Asp Glu Ala Gln Ala Arg Ala Ala Phe

1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 163

Glu Glu Trp Met Gly Leu Leu Glu Tyr

1 5
<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 164
Ser Glu Tyr Ser His Leu Thr Arg Val

1 5
<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 165
Val Glu Leu Asp Leu Gln Arg Ser Val

1 5
<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 166

Asn Glu Val Leu Ala Ser Lys Tyr
1 5
<210> 167
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 167

Lys Glu Ile Gly Ala Ala Val Gln Ala Leu
1 5 10
<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 168

Gln Glu Ile Gln Ser Leu Leu Thr Asn Trp

1 5 10

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

Glu Glu Asn Gly Glu Val Lys Glu Leu

1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 170

Ser Glu Asn Glu Gln Arg Arg Met Phe

1 5

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 171

Ser Glu Asp Leu Ala Val His Leu Tyr

1 5

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 172

Val Glu Asp Gly Leu Phe His Glu Phe

1 5

<210> 173

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 173

Lys Glu Tyr Asp Phe Gly Thr Gln Leu

1 5

<210> 174

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Thr Asp Lys Ser Phe Pro Asn Ala Tyr

1 5

<210> 175

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 175

His Glu Ile Asp Gly Lys Ala Leu Phe Leu

1 5 10

<210> 176

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 176

Ala Glu Asn Ala Val Ser Asn Leu Ser Phe

1 5 10

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177

Gln Glu Asn Met Gln Ile Gln Ser Phe

1 5

<210> 178

<211> 10

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 178
Arg Glu Tyr Glu His Tyr Trp Thr Glu Leu
1 5 10

<210> 179

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 179

Ala Glu Ile Lys Gln Thr Glu Glu Lys Tyr
1 5 10

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

Glu Glu Pro Ala Phe Asn Val Ser Tyr
1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

Gly Glu Ile Lys Glu Pro Leu Glu Ile
1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Ala Gln Asn Leu Ser Ile Ile Gln Tyr
1 5

<210> 183

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 183
 Gly Glu Ser Gln Asp Ser Thr Thr Ala Leu
 1 5 10

<210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 184
 Arg Met Pro Pro Phe Thr Gln Ala Phe
 1 5

<210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 185
 Ser Glu Gly Asp Asn Val Glu Ser Trp
 1 5

<210> 186
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 186
 Asn Glu Gln Lys Ile Val Arg Phe
 1 5

<210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 187
 Ser Asp Ala Gln Arg Pro Ser Ser Phe

1 5
 <210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 188
 Tyr Val Asp Ala Gly Thr Pro Met Tyr

1 5
 <210> 189
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 189

Val Thr Glu Glu Pro Gln Arg Leu Phe Tyr
 1 5 10
 <210> 190
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 190

His Val Asp Gln Asp Leu Thr Thr Tyr
 1 5
 <210> 191
 <211>
 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 191

Ile Ser Glu Ala Gly Lys Asp Leu Leu Tyr
 1 5 10
 <210> 192
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 192

Arg Ser Asp Pro Gly Gly Gly Gly Leu Ala Tyr

1 5 10

<210> 193

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Leu Thr Asp Ser Glu Lys Gly Asn Ser Tyr

1 5 10

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Tyr Thr Asp Lys Lys Ser Ile Ile Tyr

1 5

<210> 195

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

Tyr Ser Asp Lys Glu Phe Ala Gly Ser Tyr

1 5 10

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

Phe Thr Asp Ile Asp Gly Gln Val Tyr

1 5

<210> 197

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

Ser Leu Ala Asp Val His Ile Glu Val

1 5

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Lys Leu Leu Gly Tyr Asp Val His Val

1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 199

Ala Met Pro Asp Ser Pro Ala Glu Val

1 5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Val Met Leu Gln Ile Asn Pro Lys Leu

1 5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Ile Leu Ala Ala Val Glu Thr Arg Leu

1 5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Met Val Ala Leu Pro Met Val Leu Val

1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

Phe Leu Leu Pro Lys Val Gln Ser Ile

1 5

<210> 204

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

Phe Leu Leu Pro Lys Val Gln Ser Ile Gln Leu

1 5 10

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu Leu

1 5

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

Ser Leu Met Asp Leu Gln Glu Arg Leu

1 5

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

Lys Leu Ser Asp Asn Ile Leu Lys Leu

1 5

<210> 208

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 208

Lys Leu Asn Pro Gln Gln Ala Pro Leu Tyr

1 5 10

<210> 209

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys

1 5 10

<210> 210

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 210

Arg Met Tyr Ser Gln Leu Lys Thr Leu Gln Lys

1 5 10

<210> 211

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 211

Ala Thr Tyr Asn Lys Gln Pro Met Tyr Arg

1 5 10

<210> 212

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 212

Leu Leu Trp His Trp Asp Thr Thr Gln Ser Leu Lys

1 5 10

<210> 213

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 213

Arg Val Tyr Asn Ile Tyr Ile Arg Arg

1 5

<210> 214

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 214

Ala Thr Gly Ala Ala Thr Pro Lys Lys

1 5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 215

Lys Ala Thr Gly Ala Ala Thr Pro Lys

1 5

<210> 216

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 216

Arg Ile Lys Ala Pro Ser Arg Asn Thr Ile Gln Lys

1 5 10

<210> 217

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 217

Thr Thr Val Pro His Val Phe Ser Lys

1 5

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 218

Arg Val Leu Thr Gly Val Phe Thr Lys

1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 219

His Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr Lys

1 5

<210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

Ser Ile Ser Asn Leu Val Phe Thr Tyr

1 5

<210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 221

Leu Leu Asn Arg His Ile Leu Ala His

1 5

<210> 222

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 222

Arg Tyr Leu Asp Glu Ile Asn Leu Leu

1 5

<210> 223

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 223

Arg Arg Met Tyr Pro Pro Pro Leu Ile

1 5

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 224

Val Tyr Glu Tyr Val Val Glu Arg Phe

1 5

<210> 225

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 225

Leu Pro Ala Arg Phe Tyr Gln Ala Leu

1 5

<210> 226

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 226

Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp

1 5

<210> 227

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 227

Ala Pro Ile Asn Lys Ala Gly Ser Phe Leu

1 5 10

<210> 228

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 228

Ser Pro Arg Ile Thr Phe Pro Ser Leu

1 5

<210> 229

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 229

Ser Pro Leu Gly Ser Leu Ala Arg Ser Ser Leu

1 5 10

<210> 230

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 230

Lys Pro Met Lys Ser Val Leu Val Val

1 5

<210> 231

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 231
Met Pro Leu Ser Thr Ile Arg Glu Val
1 5
<210> 232

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 232
Ala Pro Arg Pro Ala Gly Ser Tyr Leu
1 5
<210> 233

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 233
Ser Pro Arg Val Tyr Trp Leu Gly Leu
1 5
<210> 234

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 234
Ser Pro Lys Glu Ser Glu Asn Ala Leu
1 5
<210> 235

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 235
Ser Pro Ser Leu Pro Ser Arg Thr Leu

1 5
 <210> 236
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 236
 Arg Pro Ser Asn Lys Ala Pro Leu Leu

1 5
 <210> 237
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 237
 Ser Pro Trp Leu His Ala Pro Ser Leu

1 5
 <210> 238
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 238
 Ser Pro Arg Ser Trp Ile Gln Val Gln Ile

1 5 10
 <210> 239
 <211>
 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 239
 Ala Pro Ser Lys Thr Ser Leu Ile Met

1 5
 <210> 240
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 240

Ser Pro Ser Leu Pro Asn Ile Thr Leu

1 5

<210> 241

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 241

Ala Pro Ala Pro Ala Glu Lys Thr Pro Val

1 5 10

<210> 242

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 242

Ser Pro Phe Ser Phe His His Val Leu

1 5

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 243

Leu Pro Lys Val Gln Ser Ile Gln Leu

1 5

<210> 244

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 244

Met Pro Ser Ser Asp Thr Thr Val Thr Phe

1 5 10

<210> 245

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 245

Ser Pro Leu Ser His His Ser Gln Leu

1 5

<210> 246

<211>

9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 246

Tyr Pro Gly Trp His Ser Thr Thr Ile

1 5

<210> 247

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 247

Gln Pro Ser Pro Ala Arg Ala Pro Ala Glu Leu

1 5 10

<210> 248

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 248

Leu Pro Tyr Asp Ser Lys His Gln Ile

1 5

<210> 249

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 249

Ser Pro Ala Asp His Arg Gly Tyr Ala Ser Leu

1 5 10

<210> 250

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 250

Val Pro Asn Leu Gln Thr Val Ser Val

1 5

<210> 251

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 251

Gln Pro Arg Leu Phe Thr Met Asp Leu

1 5

<210> 252

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 252

Arg Pro His Ile Pro Ile Ser Lys Leu

1 5

<210> 253

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 253

Arg Pro Phe Ala Asp Leu Leu Gly Thr Ala Phe

1 5 10

<210> 254

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 254

Ser Pro Arg Asn Leu Gln Pro Gln Arg Ala Ala Leu

1 5 10

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 255

Tyr Pro Gly Ser Asp Arg Ile Met Leu

1 5

<210> 256

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 256

Ser Pro Tyr Lys Lys Leu Lys Glu Ala Leu

1 5 10

<210> 257

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 257

Lys Glu Phe Phe Phe Val Lys Val Phe

1 5

<210> 258

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 258

Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp

1 5 10

<210> 259

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 259

Glu Glu Asn Thr Leu Val Gln Asn Tyr

1 5
 <210> 260
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 260
 Ala Glu Ile Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Lys Val Phe

1 5 10
 <210> 261
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 261

Asn Glu Ile Glu His Ile Pro Val Trp

1 5
 <210> 262
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 262

Gln Glu Asn Gln Ala Glu Thr His Ala Trp

1 5 10
 <210> 263
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 263

Arg Glu Ala Gly Phe Gln Val Lys Ala Tyr

1 5 10
 <210> 264
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 264

Ser Glu Asp His Ser Gly Ser Tyr Trp

1 5

<210> 265

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 265

Gln Glu Val Asp Ala Ser Ile Phe Lys Ala Trp

1 5 10

<210> 266

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 266

Val Asp Ala Ser Ile Phe Lys Ala Trp

1 5

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 267

Lys Glu Lys Phe Pro Ile Asn Gly Trp

1 5

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 268

Asn Glu Asp Lys Gly Thr Lys Ala Trp

1 5

<210> 269

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 269

Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp

1 5

<210> 270

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 270

Ala Glu Ser Glu Asp Leu Ala Val His Leu

1 5 10

<210> 271

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 271

Ala Glu Ser Glu Asp Leu Ala Val His Leu Tyr

1 5 10

<210> 272

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 272

Lys Glu Phe Glu Leu Arg Ser Ser Trp

1 5

<

210> 273

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 273

Ala Glu Ile Glu Ile Val Lys Glu Glu Phe

1 5 10

<210> 274

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 274

Gly Glu Ala Val Thr Asp His Pro Asp Arg Leu Trp

1 5 10

<210> 275

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 275

Thr Glu Asn Pro Leu Thr Lys Leu Leu

1 5

<210> 276

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 276

Glu Glu Glu Gly Asn Leu Leu Arg Ser Trp

1 5 10

<210> 277

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 277

Glu Glu Gly Asn Leu Leu Arg Ser Trp

1 5

<210> 278

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 278

Tyr Leu Asp Arg Lys Leu Leu Thr Leu

1 5

<210> 279

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 279

Leu Tyr Ile Asp Arg Pro Leu Pro Tyr Leu

1 5 10

<210> 280

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 280

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 281

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1 5