(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월31일
(11) 등록번호 10-2095670
(24) 등록일자 2020년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *A61K 39/395* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
A61K 39/39558 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7026866(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년05월16일
심사청구일자 2018년10월17일
(85) 번역문제출일자 2018년09월17일
(65) 공개번호 10-2018-0105743
(43) 공개일자 2018년09월28일
(62) 원출원 특허 10-2012-7032745
원출원일자(국제) 2011년05월16일
심사청구일자 2016년02월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/036665
(87) 국제공개번호 WO 2011/143656
국제공개일자 2011년11월17일
(30) 우선권주장
61/334,866 2010년05월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Cancer Res. Vol. 67, No. 11, 페이지 5300-5307 (2007.06.01.)

(73) 특허권자
더 제너럴 하스피톨 코포레이션
미합중국 메사추세츠 02114 보스톤 후루츠 스트리트 55
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴 450
(72) 발명자
하코헨 니르
미국 02446 메사추세츠주 브루클린 메이슨 테라스 117
우 캐서린
미국 02446 메사추세츠주 브루클린 메이슨 테라스 117
(74) 대리인
김진희

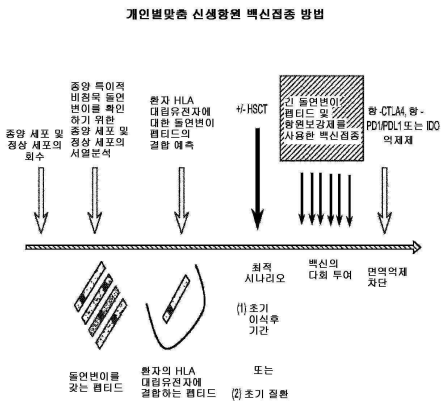
전체 청구항 수 : 총 36 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **종양 특이적 신생항원을 확인하는 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 면역요법 펩티드, 및 면역요법, 특히 암의 면역요법에서 상기 펩티드의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 단독으로 또는 다른 종양 관련 펩티드와 조합되어 항-종양 반응을 자극하는 백신 조성물의 활성 약학 성분으로서 사용되는 종양 특이적 신생항원(neoantigen)을 확인하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/5308 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
G01N 33/6854 (2013.01)
G01N 33/6878 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상체 특이적 펩티드를 확인하고, 투여시 대상체의 면역계에 상기 대상체 특이적 펩티드를 제시(present)하는 상기 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 대상체 특이적 면역원성 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 대상체는 종양을 가지고, 상기 대상체 특이적 펩티드는 대상체 및 대상체의 종양에 특이적이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 것인 방법:

대상체의 종양 및 대상체의 비종양 샘플의 핵산 샘플을 서열분석하는 단계;

비종양 샘플 내에 존재하지 않는 종양 특이적 비침묵(non-silent) 돌연변이를 포함하는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 서열을 확인하는 단계;

상기 비종양 샘플 내에 존재하지 않는 종양 특이적 비침묵 돌연변이를 포함하는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 서열에 의해 코딩되는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 대상체 특이적 펩티드를 생성하는 단계;

상기 대상체 특이적 펩티드의 상기 대상체의 HLA 단백질에 대한 결합을 측정 또는 예측하는 단계로서,

상기 대상체 특이적 펩티드 각각은 종양 특이적 돌연변이에서 확인된 네오에피토프(neo-epitope)와는 상이한, 대상체의 종양에 특이적인 에피토프인 종양 네오에피토프를 가지고,

각각의 네오에피토프는 비종양 샘플 내에 존재하지 않는 종양 특이적 비침묵 돌연변이의 발현 생성물이고, 각각의 네오에피토프는 대상체의 HLA 단백질에 결합하고,

상기 대상체 특이적 펩티드는 점 돌연변이를 가지고, 대상체의 HLA 단백질에 500 nM 미만의 IC_{50}으로 결합하고,

상기 대상체 특이적 펩티드 각각은 8 내지 50개 길이의 천연적으로 발생하는 아미노산을 가지는 것인 단계;

투여시 상기 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 대상체 특이적 펩티드가 대상체의 면역계에 제시될 수 있도록 대상체 특이적 면역원성 조성물을 대상체에의 투여를 위해 제제화하는 단계로서,

상기 면역원성 조성물은 하기 (1) 또는 (2) 또는 (3) 또는 (4) 또는 (5)를 포함하는, 상기 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 것인 단계;

(1) 비종양 샘플의 단백질과 비교하여 상이한 아미노산을 유발하는 비동질(non-synonymous) 돌연변이를 가지는 핵산 서열에 의해 코딩된 펩티드; 또는

(2) 정지 코돈이 변형되거나 결실되어, C 말단에서 신규 종양 특이적 서열을 갖는, 비종양 샘플의 단백질과 비교하여 보다 긴 단백질의 번역을 유발하는 리드쓰루(read-through) 돌연변이를 가지는 핵산 서열에 의해 코딩된 펩티드; 또는

(3) 성숙한 mRNA에 인트론의 포함을 유발하는 스플라이스 부위 돌연변이를 가지는 핵산 서열에 의해 코딩된 펩티드; 또는

(4) 비종양 샘플의 2개의 단백질의 연접부(junction)에서 종양 특이적 서열을 갖는 키메라 단백질을 코딩하고 유전자 융합을 나타내는 염색체 재배열을 나타내는 핵산 서열에 의해 코딩된 펩티드; 또는

(5) 비종양 샘플의 단백질과 비교하여 신규 종양 특이적 단백질 서열을 코딩하고 신규 개방 판독 프레임을 유발하는 프레임시프트 돌연변이 또는 결실을 가지는 핵산 서열에 의해 코딩된 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 대상체 특이적 면역원성 조성물이 15개 초과의 아미노산 길이의 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 대상체 특이적 면역원성 조성물이 24 내지 40개의 아미노산 길이의 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 대상체 특이적 면역원성 조성물이 항-종양 $CD8^+$ T 세포를 활성화하는 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 대상체 특이적 면역원성 조성물이 대상체의 HLA 단백질에 250 nM 미만의 IC_{50}으로 결합하거나 결합할 것으로 예측되는 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 대상체 특이적 면역원성 조성물이 대상체의 HLA 단백질에 100 nM 미만의 IC_{50}으로 결합하거나 결합할 것으로 예측되는 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 대상체 특이적 면역원성 조성물이 대상체의 HLA 단백질에 50 nM 미만의 IC_{50}으로 결합하거나 결합할 것으로 예측되는 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체 특이적 펩티드의 HLA 단백질에 대한 결합을 측정 또는 예측하는 단계는 대상체 특이적 펩티드가 대상체의 클래스 I HLA 단백질에 결합하는지를 측정 또는 예측하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 하나 이상의 항원보강제(adjuvant)와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 하나 이상의 항원보강제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하고, 항원보강제는 별도로 투여되는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 하나 이상의 항원보강제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하고, 제조는 대상체 특이적 면역원성 조성물 내에 항원보강제를 함유시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 하나 이상의 담체와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하고, 제조는 대상체 특이적 면역원성 조성물 내에 담체를 함유시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 다른 항암 치료제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 항-면역억제제 또는 면역자극제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1 차단을 제공하는 항-면역억제제 또는 면역자극제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체를 포함하는 항-면역억제제 또는 면역자극제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제제화하는 단계는 하나 이상의 항원보강제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제제화하는 단계는 하나 이상의 항원보강제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하고, 항원보강제는 별도로 투여되는 것인 방법.

청구항 19

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제제화하는 단계는 하나 이상의 항원보강제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하고, 제조는 대상체 특이적 면역원성 조성물 내에 항원보강제를 함유시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제제화하는 단계는 다른 항암 치료제와 함께 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 확인된 신규 개방 판독 프레임의 발현 생성물을 함유시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 대상체의 HLA 단백질에 500 nM 미만의 IC_{50}으로 결합하는, 확인된 점 돌연변이의 발현 생성물을 함유시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 대상체 특이적 펩티드의 HLA 단백질에 대한 결합을 측정 또는 예측하는 단계는 HLA 단백질에 결합하는 펩티드의 시험관내 조사를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 대상체 특이적 펩티드를 확인하거나 또는 제제화하는 단계는, 대상체의 암 조직 내에 하나 이상의 대상체 특이적 펩티드의 발현 수준을 결정하는 것, 및 대상체의 암 조직 내에서 상대적으로 많은 양으로 발현될 때 해당 대상체 특이적 펩티드를 대상체 특이적 조성물 내에 함유시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 제제화하는 단계는 대상체 특이적 펩티드를 대상체의 면역계에 투여하기 위한 조성물을 제조

하는 것을 포함하고, 대상체 특이적 펩티드는 벡터에 의한 생체내 발현으로 제공되는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 벡터는 플라스미드인 것인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 벡터는 바이러스 벡터인 것인 방법.

청구항 28

제1항에 있어서, 제제화하는 단계는 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 면역원성 조성물을 통해 대상체 특이적 펩티드를 대상체의 면역계에 투여하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제1항에 있어서, 대상체의 면역계에 제시하는 것은 대상체의 HLA와 대상체 특이적 펩티드의 복합체에 대해 특이적인 T 세포를 발생시키는 대상체 특이적 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 대상체로부터 T 세포를 분리하는 것을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 분리된 T 세포를 증폭시키는 것을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제1항에 있어서, 종양이 고형 종양인 것인 방법.

청구항 33

제1항에 있어서, 종양이 혈액 종양인 것인 방법.

청구항 34

제1항에 있어서, 종양이 유방 종양, 난소 종양, 전립선 종양, 폐 종양, 신장 종양, 위 종양, 결장 종양, 고환 종양, 두경부 종양, 췌장 종양, 뇌 종양, 흑색종, 림프종 또는 백혈병인 것인 방법.

청구항 35

제1항에 있어서, 종양이 흑색종인 것인 방법.

청구항 36

제1항에 있어서, 종양이 백혈병인 것인 방법.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] [관련 출원]

[0002] 본원은 2010년 5월 14일자로 출원된 미국 가출원 제61/334,866호(전체적으로 본원에 참고로 도입됨)의 이익을 주장한다.

[0003] [발명의 분야]

[0004] 본 발명은 일반적으로 종양 특이적 신생항원의 확인 및 암 백신의 제조를 위한 이들 신생항원의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 종양 백신은 전형적으로 종양 세포를 인식하여 용해시키는 항원 특이적 세포독성 T 세포(CTL)를 유도하기 위해 함께 작용하는 종양 항원 및 면역자극 분자(예를 들면, 사이토카인 또는 톨(Toll) 유사 수용체(TLR) 리간드)로 구성된다. 현재, 거의 모든 백신들이 공유된 종양 항원 또는 전체 종양 세포 제제를 포함한다(Gilboa, 1999). 공유된 종양 항원은 많은 개체들 전체에 걸쳐 종양에서 선택적으로 발현되는 면역원성 단백질이고 통상적으로 합성 펩티드 또는 재조합 단백질로서 환자에게 전달된다(Boon et al., 2006). 대조적으로, 전체 종양 세포 제제는 자가 방사선조사된 세포, 세포 용해물, 세포 융합체, 열 충격(heat-shock) 단백질 제제 또는 총 mRNA로서 환

자에게 전달된다(Parmiani et al., 2007). 전체 종양 세포가 자가 환자로부터 단리되기 때문에, 상기 세포는 환자 특이적 종양 항원뿐만 아니라 공유된 종양 항원도 발현한다. 마지막으로, 종양 항원의 확인에 있어서의 기술적 어려움으로 인해 백신에서 거의 사용되지 않고 있는 제3 클래스의 종양 항원이 있다(Sensi et al. 2006). 이 클래스는 아미노산 서열을 변경시키는 종양 특이적 돌연변이를 갖는 단백질들로 구성된다. 이러한 돌연변이된 단백질은 (a) 면역계에 의한 인식 및 파괴를 위해 (비종양 세포에 비해 상대적으로) 종양을 독특하게 표시할 수 있는 잠재력(Lennerz et al., 2005); 및 (b) 중추 및 종종 말초 T 세포 내성을 피함으로써 보다 효과적인 고 결합력(avidity) T 세포 수용체에 의해 인식될 수 있는 잠재력(Gotter et al., 2004)을 갖는다.

[0006] 따라서, 종양 백신으로서 유용한 네오에피토프를 확인하는 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 부분적으로, 종양 특이적 T 세포 반응을 이끌어낼 수 있는 펩티드를 확인하는 방법의 발견에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 한 양태에서, 본 발명은 암을 갖는 대상체의 발현된 유전자에서 종양 특이적 돌연변이를 확인함으로써 신생항원을 확인하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 상기 돌연변이가 점 돌연변이인 경우, 상기 방법은 상기 돌연변이를 갖는 돌연변이 펩티드를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 돌연변이 펩티드는 야생형 펩티드보다 더 높은 친화성으로 클래스 I HLA 단백질에 결합하고 500 nM 미만의 IC_{50}을 나타내고, 다른 양태에서, 상기 돌연변이가 스플라이스 부위(splice-site), 프레임시프트(frameshift), 리드쓰루(read-through) 또는 유전자 융합(gene-fusion) 돌연변이인 경우, 상기 방법은 상기 돌연변이에 의해 코딩된 돌연변이 폴리펩티드를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 돌연변이 폴리펩티드는 클래스 I HLA 단백질에 결합한다.

[0009] 임의적으로, 상기 방법은 항-종양 CD8 T 세포를 활성화시키는 펩티드 또는 폴리펩티드를 선택하는 단계를 추가로 포함한다.

[0010] 상기 돌연변이 펩티드 또는 폴리펩티드는 바람직하게는 야생형 펩티드보다 더 높은 친화성으로 클래스 I HLA 단백질에 결합하고 500 nM 미만의 IC_{50}을 나타낸다. 바람직하게는, 상기 펩티드 또는 폴리펩티드는 250 nM 미만의 IC_{50}을 나타낸다. 보다 바람직하게는, 상기 펩티드 또는 폴리펩티드는 100 nM 미만의 IC_{50}을 나타낸다. 가장 바람직하게는, 상기 펩티드 또는 폴리펩티드는 50 nM 미만의 IC_{50}을 나타낸다.

[0011] 상기 돌연변이 펩티드는 약 8개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는다. 또 다른 양태에서, 상기 돌연변이 펩티드는 약 8개 내지 50개 아미노산의 길이를 갖는다. 예를 들면, 상기 돌연변이 펩티드는 10개 초과의 아미노산, 15개 초과의 아미노산, 20개 초과의 아미노산 또는 30개 초과의 아미노산의 길이를 갖는다. 바람직하게는, 상기 돌연변이 펩티드는 약 24개 내지 40개 아미노산의 길이를 갖는다.

[0012] 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 확인된 하나 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드 및 항원보강제(adjuvant)를 투여함으로써 대상체에서 종양 특이적 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 상기 항원보강제는 예를 들면, TLR에 기초한 항원보강제 또는 광유(mineral oil)에 기초한 항원보강제이다. 몇몇 양태에서, 상기 펩티드 또는 폴리펩티드 및 TLR에 기초한 항원보강제는 광유에 기초한 항원보강제에 의해 유화된다. 임의적으로, 상기 방법은 항-면역억제제, 예컨대, 항-CTLA-4 항체, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CD25 항체 또는 인돌아민-피롤 2,3-디옥시제나제(IDO)의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 확인된 하나 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄싱된(pulsed) 자가 수지상세포 또는 항원제시세포를 대상체에게 투여함으로써 상기 대상체에서 종양 특이적 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 임의적으로, 상기 방법은 항원보강제, 예를 들면, TLR에 기초한 보강제 또는 광유에 기초한 보강제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 펩티드 또는 폴리펩티드 및 TLR에 기초한 항원보강제는 광유에 기초한 항원보강제에 의해 유화된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 방법은 항-면역억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 항-면역억제제는 예를 들면, 항-CTLA-4 항체, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CD25 항체 또는 IDO의 억제제를 포함한다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체의 발현된 유전자에서 다수의 종양 특이적 돌연변이를 확인하고, 확인된 종양 특이적 돌연변이를 갖는 돌연변이 펩티드 또는 폴리펩티드를 확인하고, 바람직하게는 야생형 펩티드보다 높은 친화성으로 클래스 I HLA 단백질에 결합하고 항-종양 CD8 T 세포를 활성화시킬 수 있는 하나 이상의 상기 확인된 돌연변이 펩티드 또는 폴리펩티드를 선택하고, 상기 하나 이상의 선택된 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 상기 하나 이상의 확인된 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄싱된 자가 수지상세포 또는 항원제시세포를 상기 대상체에게 투여함으로써 암에 대해 상기 대상체를 백신접종하거나 치료하는 방법을 제공한다. 상기 돌연변이 펩티드는 약 8개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는다. 또 다른 양태에서, 상기 돌연변이 펩티드는 약 8개 내지 50개 아미노산의 길이를 갖는다. 예를 들면, 상기 돌연변이 펩티드는 10개 초과의 아미노산, 15개 초과의 아미노산, 20개 초과의 아미노산 또는 30개 초과의 아미노산의 길이를 갖는다. 바람직하게는, 상기 돌연변이 펩티드는 약 24개 내지 40개 아미노산의 길이를 갖는다.

[0015] 임의적으로, 상기 방법은 항원보강제, 예를 들면, TLR에 기초한 보강제 또는 광유에 기초한 보강제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 펩티드 또는 폴리펩티드 및 TLR에 기초한 항원보강제는 광유에 기초한 항원보강제에 의해 유화된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 방법은 항-면역억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 항-면역억제제는 예를 들면, 항-CTLA-4 항체, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CD25 항체 또는 IDO의 억제제를 포함한다.

[0016] 제22항의 방법에 있어서, 상기 대상체는 조혈모세포 이식을 받았다.

[0017] 상기 대상체는 인간, 개, 고양이 또는 말이다. 상기 암은 유방암, 난소암, 전립선암, 폐암, 신장암, 위암, 결장암, 고환암, 두경부암, 췌장암, 뇌암, 흑색종, 림프종, 예컨대, B 세포 림프종 또는 백혈병, 예컨대, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 또는 T 세포 림프구성 백혈병이다.

[0018] 본 발명의 방법에 따라 확인된 펩티드 또는 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물도 본 발명에 포함된다.

[0019] 예를 들면, 본 발명은 2종 이상의 상이한 SF3B1 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하고, 이때 각각의 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 SF3B1에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 625에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 626에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 700에서 글루탐산을 포함하거나, 아미노산 위치 742에서 아스파르트산을 포함하거나, 아미노산 위치 903에서 아르기닌을 포함한다.

[0020] 또한, 본 발명은 2종 이상의 상이한 MYD88 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하고, 이때 각각의 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 MYD88에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 232에서 트레오닌을 포함하거나, 아미노산 위치 258에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 265에서 프롤린을 포함한다.

[0021] 추가로, 본 발명은 2종 이상의 상이한 TP53 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하고, 이때 각각의 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 TP53에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 111에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 215에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 238에서 세린을 포함하거나, 아미노산 위치 248에서 글루타민을 포함하거나, 아미노산 위치 255에서 페닐알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 273에서 시스테인을 포함하거나, 아미노산 위치 281에서 아스파라긴을 포함한다.

[0022] 추가로, 본 발명은 2종 이상의 상이한 ATM 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하고, 이때 각각의 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 ATM에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 1252에서 페닐알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 2038에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 2522에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 2954에서 시스테인을 포함한다.

[0023] 추가로, 본 발명은 2종 이상의 상이한 ABL 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하고, 이때 각각의 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 ABL에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 244에서 발린을 포함하거나, 아미노산 위치 248에서 발린을 포함하거나, 아미노산 위치 250에서 글루탐산을 포함하거나, 아미노산 위치 250에서 알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 252에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 252에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 253에서 페닐알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 253에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 255에서 라이신을 포함하거나, 아미노산 위치 255에서 발린을 포함하거나, 아미노산 위치 276에서 글리신을 포함하거나, 아미노산 위치 315에서 이소루신을 포함하거나, 아미노산 위치 315에서 아스파라긴을 포함하거나, 아미노산 위치 317에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 343에서 트레오닌을 포함하거나, 아미노산 위치 351에서 트레오닌을 포함하거나, 아미노산 위치 355에서 글리신을 포함하거나, 아미노산 위치 359에서 발린을 포함하거나, 아미노산 위치 359에서 알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 379에서 이소루신을 포함하거나,

아미노산 위치 382에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 387에서 메티오닌을 포함하거나, 아미노산 위치 396에서 프롤린을 포함하거나, 아미노산 위치 396에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 417에서 티로신을 포함하거나, 아미노산 위치 486에서 세린을 포함한다.

[0024] 2종 이상의 상이한 FBXW7 펩티드를 포함하는 조성물도 본 발명에 포함되고, 이때 각각의 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 FBXW7에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 280에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 465에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 505에서 시스테인을 포함하거나, 아미노산 위치 597에서 글루탐산을 포함한다.

[0025] 추가 양태에서, 본 발명은 2종 이상의 상이한 MAPK1 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하고, 이때 각각의 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 MAPK1에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 162에서 아스파라긴을 포함하거나, 아미노산 위치 291에서 글리신을 포함하거나, 아미노산 위치 316에서 페닐알라닌을 포함한다.

[0026] 또한, 본 발명은 2종 이상의 상이한 GNB1 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하고, 이때 각각의 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 GNB1에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 180에서 트레오닌을 포함한다.

[0027] 또한, 본 발명은 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 야생형 BCR-ABL에 따라 넘버링될 때 위치 255에서 라이신을 포함하는 BCR-ABL 펩티드의 조성물을 HLA-A3 양성 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 이마티닙(imatinib) 내성 종양을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0028] 추가로, 본 발명은 BCR-ABL 돌연변이를 포함하는 하나 이상의 펩티드를 이마티닙 내성 종양을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 이마티닙 내성 종양을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 펩티드는 50개 이하의 아미노산의 길이를 갖고 500 nM 미만의 IC_{50}으로 클래스 I HLA 단백질에 결합한다.

[0029] 달리 정의되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어들 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 방법 및 물질과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 하기에 기재된다. 본원에서 언급된 모든 공개문헌들, 특허출원들, 특허들 및 다른 참고문헌들은 전체적으로 명백히 참고로 도입된다. 불일치가 있는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선한다. 또한, 본원에 기재된 물질, 방법 및 예는 단지 설명을 위한 것이고 한정하기 위한 것이 아니다.

[0030] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 명확해질 것이고 하기 상세한 설명 및 특허청구범위에 의해 포괄된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 종양 백신을 위해 3개 클래스의 항원을 사용한 경우 특이성과 자가면역 독성의 균형을 보여준다. 종양 세포에서 발현된 전체 단백질 항원 셋(set)이 신체 내의 다른 세포에도 존재하는 수천 개의 단백질을 포함하기 때문에 전체 종양 세포는 종양 백신을 위한 최소 특이적 항원 제제일 수 있다. 과발현된 종양 항원은 신체 내의 다른 세포에 비해 종양에서 훨씬 더 높고 더 선택적인 발현에 대해 선택되었기 때문에 다소 더 특이적이다. 그럼에도 불구하고, 이들 항원의 발현에 대해 신체 내의 모든 세포들을 테스트하는 것은 불가능하고 다른 세포들이 이들을 발현할 상당한 위험이 존재한다. 마지막으로, 돌연변이된 단백질은 종양 세포에만 존재하는 네오에피토프를 발생시키고 최고 수준의 특이성을 제공한다.

도 2는 임의의 암의 치료에 적용될 수 있는 개인별맞춤 신생항원 백신접종 방법에 대한 개략도이다. 본 발명자들은 2개의 독특한 시나리오에서 이 방법을 적용할 가능성도 강조한다. 첫 번째 경우, 환자는 조혈모세포 이식(HSCT)(예를 들면, CLL, CML 및 다른 백혈병에 대해 수행됨) 후 초기 기간에서 백신접종된다. 면역계가 HSCT에 의한 재구성으로 인해 전능한 상태가 되어 종양 또는 치료에 의해 유도된 숙주 면역 결함을 극복하기 때문에, 초기 HSCT 후 기간은 독특한 치료 셋팅(setting)이다. 더욱이, 림프구감소증 환경, 예컨대, 초기 HSCT 후 셋팅에서 항상성 사이토카인의 풍부함은 T 세포의 신속한 증폭에 기여할 수 있다. 두 번째 경우, 환자는 (예를 들면, 고형 종양 또는 조혈 종양의 경우) 화학요법에의 노출에 의한 손상 전에 면역 기능이 질환의 초기 단계에서 보다 더 온전할 수 있을 때 질환 경과의 초기에 백신접종된다. 면역계가 이들 2가지 특정 상황에서 가장 높은 활성을 나타낼 것이기 때문에, 본 발명자들은 이들 상황이 종양 백신접종 방법을 적용할 이상적인 상황이라고 제안한다.

도 3은 하기 3개의 단계로 기재된 종양 네오에피토프의 확인 방법을 보여준다: (1) 서열분석 기술을 이용하여 단일 환자의 종양에 존재하되 생식세포계 DNA에는 존재하는 않는 유전자 돌연변이를 검출하는 단계; (2) 예측

알고리즘을 이용하여 돌연변이된 펩티드가 개인별 HLA 대립유전자에 결합할 잠재력을 갖는지를 예측하는 단계(이들 예측된 펩티드는 임의적으로 적절한 HLA 단백질과의 결합에 대해 실험적으로 테스트될 수 있다. 또한, 이들 유전자도 종양 세포에서 발현되어야 한다.); 및 (3) 생체외에서 T 세포를 발생시키고 이 T 세포가 돌연변이된 단백질을 발현하는 세포를 인식할 수 있는지를 테스트하는 단계(대안적으로, 질량 분광계를 이용하여 종양 세포 표면 HLA 단백질로부터 용출된 단백질을 검출할 수 있음). 만성 림프구성 백혈병에 대해, 현재까지 본 발명자들의 연구는 환자당 평균 23개의 단백질 변경 돌연변이, 46개의 예측된 결합 돌연변이 펩티드 및 15개 내지 25개의 검증된 결합 돌연변이 펩티드가 존재한다는 것을 입증하였다. 본 발명자들은 이들 중 약 7개 내지 12개의 펩티드가 종양 세포에서 발현되고 프로세싱된다고 예상한다(물론 이것은 종양 및 환자마다 상이할 수 있음).

도 4는 잠재적 종양 네오에피토프를 발생시키는 5개 클래스의 돌연변이를 보여준다. 신규 종양 특이적 에피토프는 미스센스(missense), 스플라이스 부위, 프레임시프트 또는 리드쓰루 점 돌연변이(적색 별표)의 결과로서 발생될 수 있거나, 2개의 유전자(또는 동일 유전자 내에서)의 융합으로부터 발생될 수 있다. 구체적으로, 스플라이스 부위, 프레임시프트 및 리드쓰루 돌연변이, 및 유전자 융합은 정상적으로 번역되지 않으나 돌연변이의 결과로서 발현되고 번역되는 신규 아미노산 스트레치(stretch)(자홍색으로 표시됨)를 각각 발생시킬 수 있다. 미스센스 돌연변이는 단일 아미노산 변화를 갖는 펩티드를 발생시킨다.

도 5는 CLL 환자에서 클래스당 돌연변이의 빈도를 보여준다. 차세대 서열분석을 일련의 7개 CLL 종양에 적용하는 본 발명자들의 연구는 CLL 세포가 가능한 돌연변이된 펩티드의 풍부한 공급원을 제공하는 많은 돌연변이를 보유한다는 것을 보여준다. 본 발명자들은 CLL에서 비침묵(nonsilent) 유전자 변경의 총 수가 개체당 17개 내지 155개이고, 이들 중 대다수가 체세포에서 변경된 점 돌연변이(미스센스)라는 것을 관찰하였다. 4명의 환자의 종양은 스플라이스 부위 돌연변이도 보유하였고, 3명의 환자의 경우 신규 유전자 융합체가 RNA 서열분석에 의해 확인되었다.

도 6은 환자의 6개 HLA(MHC 클래스 I) 대립유전자 각각에 대한 펩티드(특정 미스센스 돌연변이를 보유하는 펩티드) 결합의 자동화된 예측(도 3에서 방법의 단계 2A)으로부터 수득된 데이터를 보여준다(자홍색 = 강한 결합제; 녹색 = 중간 결합제).

도 7은 돌연변이된 유전자의 RNA 발현을 확인하는 방법(도 3에서 방법의 단계 2B)을 보여준다. A. CLL 환자 7의 경우, 본 발명자들은 예측된 HLA 결합 펩티드를 발생시키는 돌연변이된 유전자의 절반 이상이 RNA 수준에서 발현되었다는 것을 발견하였다. B. 본 발명자들은 DNA에서 발견된 특정 돌연변이를 보유하는 발현된 RNA를 검출하기 위해 RNA 실시간서열분석(pyrosequencing)도 이용하였다. C. 본 발명자들은 절단점 영역의 PCR-TOPO 클로닝을 이용한 DNA 서열분석에 의해 관찰된 신규 유전자 융합체(환자 2에 대해 발견된 융합체가 도시되어 있음)를 검증할 수 있다.

도 8은 HLA-펩티드 결합의 실험적 검증을 위한 방법 및 데이터(도 3에서 방법의 단계 2C)를 보여준다. A. 특정 HLA 대립유전자에 결합하는 펩티드의 실험적 검증을 위한 개략도. B. 환자 1 및 2에서 확인된 후보 돌연변이된 펩티드의 요약. 음영으로 표시된 칸은 분석이 진행되고 있음을 표시한다. C. 환자 2에 대한 유전자 변경(미스센스 돌연변이 또는 유전자 융합)으로부터 발생된 펩티드의 예측된 결합 친화성 대 실험적으로 검증된 결합 친화성에 대한 데이터. 120 nM 미만의 IC_{50}의 예측 컷오프(좌측에 있는 수직 직선)는 클래스 I HLA와의 실험적 결합을 보이는 모든 펩티드들을 제공하였다.

도 9는 HLA 대립유전자와의 결합에 있어서 돌연변이된 펩티드 대 생식세포계 펩티드(즉, 모 펩티드, 야생형 펩티드 또는 정상 펩티드로도 지칭됨)의 예측된 차이를 보여준다. 환자 2의 25개의 예측된 HLA 결합 돌연변이된 펩티드들 중 12개의 돌연변이된 펩티드들이 모 펩티드보다 2배 초과의 더 높은 결합(컷오프 = 적색 점선)을 갖는다. 이것은 돌연변이된 펩티드의 특이성을 추가로 증가시킨다. 돌연변이된 펩티드는 하기 2가지 이유로 특이적 펩티드이다: 첫째, 돌연변이된 펩티드를 인식하는 T 세포 수용체의 대다수가 야생형 모 펩티드를 검출하지 않을 것이고; 둘째, 돌연변이된 펩티드들 중 몇몇 펩티드들은 모 펩티드보다 더 높은 친화성으로 HLA에 결합할 수 있다. 첫 번째 성질은 컴퓨터에 의해 예측될 수 없기 때문에, 본 발명자들은 두 번째 성질을 예측하고 야생형 펩티드에 비해 상대적으로 더 높은 HLA와의 결합을 보이는 돌연변이된 펩티드만을 백신에 포함시키기 위해 선택하는 것에 초점을 맞출 것이다.

도 10은 후보 개별 CLL 네오에피토프에 대한 T 세포 반응성을 보여준다(도 3에서 방법의 단계 3). 본 발명자들은 (엘리스폿(Elispot) 분석을 이용하였을 때) 치료 1일 후 환자로부터 단리된 T 세포가 특이적 돌연변이된 TLK2 펩티드(펩티드 #7)를 검출할 수 있다는 것을 관찰하였다.

도 11은 BCR-ABL 돌연변이가 HLA-A 및 HLA-B 대립유전자에 결합할 것으로 예측된 많은 펩티드를 발생시킨다는 것을 보여준다. 본 발명자들은 NetMHC 예측 알고리즘(Nielsen et al. PLoS One. 2007, 2(8):e796)을 적용함으로써 8개의 공통된 HLA-A 및 HLA-B 대립유전자에 결합할 잠재력을 갖는, BCR-ABL 돌연변이로부터 발생된 펩티드를 예측하였다. 가장 공통된 BCR-ABL 돌연변이들이 감소하는 빈도에 따라 (좌측에서 우측으로) 정렬되어 있고, 다양한 클래스 I MHC 결합 펩티드의 예측된 IC_{50}이 표시되어 있다. 전체적으로, 본 발명자들은 광범위한 HLA 대립유전자들 전체에 걸쳐 1000 nM 미만의 IC_{50}으로서 정의된 우수한 친화성으로 결합할 84개의 펩티드들을 예측하였다. 예측된 84개의 모든 펩티드들 중 24개(29%)의 펩티드들이 50 nM 미만의 IC_{50}을 나타내는 강한 결합제인 것으로 예측되었다. 42개(50%)의 펩티드들은 50 nM 내지 500 nM의 IC_{50}으로서 정의된 친화성을 나타내는 중간 결합제이었다. 18개(21%)의 펩티드들은 500 nM 내지 1000 nM의 IC_{50}으로서 정의된 친화성을 나타내는 약한 결합제이었다.

도 12는 E255K 돌연변이를 보유하는 BCR-ABL 펩티드가 HLA 단백질에 결합하고 CML 환자에 존재하는 특정 다기능성 T 세포와 관련되어 있다는 것을 보여준다. A. E255K-B(및 모 펩티드)와 HLA A3 및 수퍼타입(supertype) 구성원의 실험적으로 유도된 결합 점수. B. 본 발명자들은 HSCT 후 HLAA3+ E255K+ 환자로부터 증폭된 CD8+ T 세포에서 E255K-B(MUT) 펩티드, 및 E255K 미니유전자(minigene)(MG)를 발현하는 A3+ 발현 APC에 대한 IFNɣ 분비를 검출하였다. 이 반응은 클래스 I 차단 항체(w6/32)의 존재 하에서 제거되었다. C. IFNɣ 분비 세포는 돌연변이된 펩티드에 대해 사량체+ 반응도 보였고, (루미넥스(Luminex) 분석에 기초할 때) IP10, TNFα 및 GM-CSF를 분비하는 다기능성 세포이었다(D).

도 13은 환자로부터 유래된 T 세포 클론이 종양 특이적 에피토프를 인식할 수 있고 이들 에피토프를 제시하는 세포를 사멸시킬 수 있다는 것을 보여준다. A. CML66의 CD8+ T 세포 에피토프(펩티드 66-72C)에 대한 반응성이 HLA B-4403에 의해 제한된다. B. CML66 mRNA는 CD40L 증폭된 B 세포 내로 효율적으로 핵감염될 수 있다. C. CML66 특이적 CD8+ T 세포는 RNA 핵감염 또는 펩티드 펄스에 의해 CML66을 발현하는 CD40L B 세포에 대한 세포독성을 나타내지만 대조군 표적에 대해서는 세포독성을 나타내지 않는다.

도 14는 CLL에서 유의하게 돌연변이된 유전자를 보여준다. A. 64개의 CLL 샘플들에서 9개의 가장 유의하게 돌연변이된 유전자들. N - 64개의 서열분석된 샘플들 전체에 걸쳐 총 포함된 영역(염기쌍으로 표시됨), p 값 및 q 값은 관찰된 돌연변이 군을 볼 확률을 데이터셋 전체에 걸쳐 계산된 배경 돌연변이 비율과 비교함으로써 계산되었다. 적색 막대 - CLL에서 돌연변이되는 것으로 종래 공지되어 있지 않은 유전자; 회색 막대 - CLL에서의 돌연변이가 종래 보고되어 있는 유전자. B. 문헌 또는 COSMIC 데이터베이스에서 종래 보고된 돌연변이와 비교된, 64개의 CLL 샘플들(CLL 샘플들에서 위치 및 돌연변이가 유전자 위에 표시되어 있음) 사이에서 발견된 ATM, SF3B1, TP53, MYD88, FBXW7, DDX3X, MAPK1 및 GNB1에서의 돌연변이의 유형(미스센스, 스플라이스 부위, 넌센스) 및 위치(유전자 아래의 선은 돌연변이의 위치를 보여줌).

도 15는 SF3B1이 CLL 샘플에서 발현되고(그래프에서 7번째 칸) PBMC, M(단핵구) 및 CC(암세포주)(K562, Jurkat, IM9, MCF-7, Hela, Ovcar, RPMI, OTM, MCF-CAR, KM12BM 및 MM1S를 포함함)를 포함하는 많은 대조군 세포에서의 발현보다 더 높은 발현을 보인다는 것을 보여준다.

도 16은 SF3B1 돌연변이가 환자 특이적 HLA 대립유전자에 결합할 것으로 예측되는 펩티드를 발생시킨다는 것을 보여준다. 예를 들면, 공통된 SF3B1 K700E 돌연변이를 포함하는 펩티드는 HLA에 강하게 결합할 것으로 예측된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 치유적 및 종양 특이적 면역요법을 개발하는 데 있어서 핵심적인 장벽 중 하나는 자가면역을 피하는 고도로 제한된 종양 항원의 확인 및 선택이다. 악성 세포 내에서의 유전적 변화의 결과로서 발생하는 종양 신생항원은 가장 종양 특이적인 클래스의 항원을 대표한다. 신생항원은 이의 확인에 있어서의 기술적 어려움으로 인해 백신에서 거의 사용되지 않는다. 종양 특이적 네오에피토프를 확인하는 본 발명자들의 방법은 3개의 단계를 포함한다. (1) 각각의 환자로부터의 종양 샘플 대 매칭된 생식세포계 샘플의 전체 게놈 또는 전체 엑솜(exome)(즉, 포획된 엑손만), 또는 RNA 서열분석을 이용하여 DNA 돌연변이를 확인하는 단계; (2) 검증된 펩티드-MHC 결합 예측 알고리즘을 적용하여 환자 HLA 대립유전자에 결합할 수 있고 종양에 존재하는 비침묵 돌연변이에 기초한 후보 T 세포 에피토프 셋을 발생시키는 단계; 및 (3) 임의적으로, 돌연변이된 펩티드에 대한 항원 특이적 T 세포를 입증하거나 후보 펩티드가 종양 표면 상의 HLA 단백질에 결합한다는 것을 입증하는 단계.

[0033] 따라서, 본 발명은 항원의 T 세포 에피토프를 확인하고/하거나 검출하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 대상체에서 종양 특이적 면역 반응을 유도하는 데에 유용한 종양 특이적 신생항원을 확인하고/하거나 검출하는 방법을 제공한다.

[0034] 구체적으로, 본 발명은 대상체의 게놈에서 다수의 종양 특이적 돌연변이를 확인함으로써 대상체를 백신접종하거나 치료하는 방법을 제공한다. 확인된 돌연변이를 갖고 클래스 I HLA 단백질에 결합하는 돌연변이 펩티드 및 폴리펩티드가 선택된다. 임의적으로, 이들 펩티드 및 폴리펩티드는 야생형 펩티드보다 더 높은 친화성으로 클래스 I HLA 단백질에 결합하고/하거나 항-종양 CD8 T 세포를 활성화시킬 수 있다. 이들 펩티드는 대상체에게 투여된다. 대안적으로, 상기 펩티드로 펄싱된 자가 항원제시세포가 투여된다.

[0035] 종양의 면역 조절에 있어서 돌연변이된 항원 또는 네오에피토프의 중요성은 하기 (a) 내지 (d)를 보여주는 중대한 연구에서 인식되었다: (a) 마우스 및 인간은 종종 돌연변이된 항원에 대한 T 세포 반응을 개시하고(Parmiani et al., 2007; Sensi and Anichini, 2006); (b) 마우스는 종양에 존재하는 단일 돌연변이된 펩티드를 사용한 면역화에 의해 종양으로부터 보호될 수 있고((Mandelboim et al., 1995); (c) 자연발생적 또는 백신 매개 장기간 흑색종 생존자는 돌연변이된 항원에 대한 강한 기억 세포독성 T 세포(CTL) 반응을 개시하고(Huang et al., 2004; Lennerz et al., 2005; Zhou et al., 2005a); (d) 마지막으로, 소포성 림프종 환자는 자가 종양 세포에 존재하는 환자 특이적 돌연변이된 면역글로불린 단백질에 의해 면역화된 경우 분자 관해(molecular remission)를 보인다(Baskar et al., 2004). 나아가, 이들 환자에서 CTL 반응은 상기 면역글로불린 단백질의 공유된 영역보다 돌연변이된 영역으로 편향된다. 또한, 이러한 돌연변이된 펩티드는 (a) 면역계에 의한 인식 및 파괴를 위해 종양을 독특하게 표시하여 자가면역에 대한 위험을 감소시킬 수 있는 잠재력; 및 (b) 중추 및 말초 T 세포 내성을 피하여 상기 항원이 보다 효과적인 고 결합력 T 세포 수용체에 의해 인식될 수 있게 하는 잠재력을 갖는다(도 1).

[0036] 임의의 특정 유전자에서의 동일한 돌연변이는 종양 전체에 걸쳐 거의 발견되지 않는다(가장 공통된 발암(driver) 돌연변이의 경우조차도 낮은 빈도로 존재함). 따라서, 본 발명의 방법은 환자 특이적 종양 돌연변이를 포괄적으로 확인할 것이다. 본 발명의 방법은 고도 병렬(highly parallel) 서열분석 기술, HLA-펩티드 결합 예측 수단 및 생화학적 분석을 이용함으로써 하기 (1) 내지 (3)을 가능하게 할 것이다: (1) 발현되어 환자의 종양에 존재하는 HLA 단백질에 결합하는 돌연변이된 펩티드의 포괄적인 확인; (2) 이들 확인된 네오에피토프에 대한 암 환자의 천연 면역 반응의 모니터링; 및 (3) 환자의 HLA 단백질과 관련된 이들 펩티드를 인식하는 세포독성 T 세포가 생체외에서 자가 종양 세포를 선택적으로 용해시킬 수 있는지의 확인. 이 방법은 암 환자의 면역계가 종양 네오에피토프와 어떻게 상호작용하는지에 대한 여러 기본적인 의문을 해결한다. 이들 의문은 하기 의문을 포함한다: 어떤 종양 네오에피토프가 어느 정도의 분율로 T 세포에 의해 검출되는지, 얼마나 많은 T 세포 전구체가 네오에피토프에 반응할 수 있는지, 순환계 및 종양에서 네오에피토프 특이적 기억 및 이펙터 T 세포가 어느 정도의 빈도로 존재하는지, T 세포가 이들 에피토프에 대해 얼마나 높은 결합력을 나타내는지, 및 네오에피토프 특이적 T 세포가 작용하는지. 이들 의문에 대한 해답은 인간 백신에서의 종양 네오에피토프의 사용에 대한 근거 및 방법 둘 다를 제공한다.

[0037] 인간의 면역계는 2개의 기능적 서브시스템, 즉 선천성 면역계 및 후천성 면역계으로 분류될 수 있다. 선천성 면역계는 감염에 대한 방어의 제1선이고, 대다수의 잠재적 병원체들이 예를 들면, 인식가능한 감염을 야기할 수 있기 전에 신속히 중화된다. 후천성 면역계는 침입 유기체의 분자 구조체(항원으로 지칭됨)에 반응한다. 2가지 유형의 후천성 면역 반응, 즉 체액성 면역 반응 및 세포 매개 면역 반응이 존재한다. 체액성 면역 반응에서, B 세포에 의해 체액 내로 분비되는 항체는 병원체로부터 유래된 항원에 결합하여 다양한 기작, 예를 들면, 보체 매개 용해를 통해 상기 병원체를 제거한다. 세포 매개 면역 반응에서, 다른 세포를 파괴할 수 있는 T 세포가 활성화된다. 예를 들면, 질환과 관련된 단백질이 세포에 존재하는 경우, 이 단백질은 세포 내에서 단백질분해에 의해 펩티드로 단편화된다. 그 다음, 특정 세포 단백질이 그 자신을 이러한 방식으로 형성된 항원 또는 펩티드에 부착시켜 이 항원 또는 펩티드를 세포의 표면으로 수송하고, 이 표면에서 상기 항원 또는 펩티드가 신체 내의 분자 방어 기작, 특히 T 세포에 제시된다. 세포독성 T 세포는 이들 항원을 인식하여 상기 항원을 보유하는 세포를 사멸시킨다.

[0038] 펩티드를 세포 표면 상으로 수송하여 상기 세포 표면 상에 제시하는 분자는 주조직적합성 복합체(MHC)의 단백질로서 지칭된다. MHC 단백질은 클래스 I의 MHC 단백질과 클래스 II의 MHC 단백질로 분류된다. 2개의 MHC 클래스의 단백질들의 구조는 매우 유사하나, 이들은 이들의 기능에 있어서 매우 상당히 상이하다. MHC 클래스 I의 단백질은 대다수의 종양 세포를 포함하는 신체 내의 거의 모든 세포들의 표면 상에서 존재한다. MHC 클래스 I의 단백질들은 통상적으로 내인성 단백질로부터 유래되거나 세포 내부에 존재하는 병원체로부터 유래된 항원으로

로딩된 후 세포독성 T 림프구(CTL)로 제시된다. 클래스 II의 MHC 단백질은 수지상세포, B 림프구, 대식세포 및 다른 항원제시세포 상에만 존재한다. 이들은 주로 외부 항원 공급원, 즉 세포의 외부에 있는 항원 공급원으로부터 프로세싱된 펩티드를 T 헬퍼(Th) 세포에 제시한다. 클래스 I의 MHC 단백질에 의해 결합된 펩티드의 대다수가 건강한 숙주 유기체 자체에서 생성된 세포질 단백질로부터 유래되고 정상적으로 면역 반응을 자극하지 않는다. 따라서, 클래스 I의 이러한 자가 펩티드 제시 MHC 분자를 인식하는 세포독성 T 림프구는 흉선에서 결실되거나 흉선으로부터 방출된 후 결실되거나 불활성화된다(즉, 내성화된다(tolerized)). MHC 분자는 이 분자가 펩티드를 비내성화된 세포독성 T 림프구에 제시한 경우 면역 반응을 자극할 수 있을 뿐이다. 세포독성 T 림프구는 그의 표면 상에서 T 세포 수용체(TCR) 및 CD8 분자 둘 다를 갖는다. T 세포 수용체는 MHC 클래스 I의 분자와 함께 복합체를 형성한 펩티드를 인식하고 이 펩티드에 결합할 수 있다. 각각의 세포독성 T 림프구는 특정 MHC/펩티드 복합체에 결합할 수 있는 독특한 T 세포 수용체를 발현한다.

[0039] 펩티드는 세포 표면 상으로 제시되기 전에 소포체(endoplasmic reticulum) 내에서 경쟁적 친화성 결합을 통해 그 자신을 MHC 클래스 I의 분자에 부착시킨다. 여기서, 개별 펩티드의 친화성은 그의 아미노산 서열, 및 이 아미노산 서열 내의 한정된 위치에서 특이적 결합 모티프의 존재와 직접적으로 관련되어 있다. 예를 들면, 이러한 펩티드의 서열이 공지되어 있는 경우, 예를 들면, 펩티드 백신을 사용하여 병든 세포에 대한 면역계를 조작할 수 있다.

[0040] 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 잠재적 T 세포 에피토프, 즉 펩티드 제시 결합체의 형태로 클래스 I 또는 클래스 II의 MHC 분자에 의해 결합된 후 이 형태로 T 림프구의 T 세포 수용체에 의해 인식되는 펩티드 서열을 예측할 수 있다. 현재, 특히 2개의 프로그램, 즉 SYFPEITHI(Rammensee et al., Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) 및 HLA_BIND(Parker et al., J. Immunol., 152 (1994), 163-175)가 이용된다. 그 다음, 이 방식으로 확인된 펩티드 서열로서, 클래스 I의 MHC 분자에 잠재적으로 결합할 수 있는 펩티드 서열은 그의 실제 결합 능력에 대해 시험관내에서 조사되어야 한다.

[0041] 본 발명의 기술적 목적은 종양 세포에 존재하는 잠재적 T 세포 에피토프를 확인하고 스크리닝하는 개선된 방법을 제공하는 것이고, 이 방법은 많은 수의 펩티드 서열들을 특정 MHC 분자에 결합하는 그들의 능력에 대해 동시적으로 신속하게 조사할 수 있게 한다.

[0042] 본 발명에서, 본 발명의 기초가 되는 상기 기술적 목적은 종양에 존재하나 정상 조직에는 존재하지 않는 돌연변이된 항원을 확인하고/하거나 검출하는 방법을 제공함으로써 달성된다. 상기 방법은 암 환자 게놈의 전체 코딩 부분의 대규모 병렬 게놈 서열분석을 이용하여 종양에서 특정 돌연변이된 유전자를 확인한다. 돌연변이 펩티드를 야생형 펩티드보다 HLA에 더 강하게 결합하여 종양 특이성을 부여할 잠재력을 갖는 돌연변이 펩티드로 좁히기 위해, 잘 확립된 알고리즘이 각각의 환자의 6개의 독특한 클래스 I HLA 대립유전자들 중 임의의 HLA 대립유전자에 결합하는 펩티드를 예측하는 데에 이용될 것이고, 종양 특이적 돌연변이 잔기를 갖는 모든 9머 또는 10머 펩티드들 대 생식세포계 잔기를 갖는 모든 9머 또는 10머 펩티드들에 대한 예측된 IC_{50}이 계산될 것이다. 전형적으로, 50 nM 미만의 예측된 IC_{50}을 나타내는 펩티드는 일반적으로 중간 친화성 내지 고 친화성 결합 펩티드로서 간주되고 HLA 결합의 생화학적 분석을 이용하여 그들의 친화성을 실험적으로 테스트하기 위해 선택될 것이다. 마지막으로, 인간 면역계가 이들 돌연변이된 종양 항원에 대한 효과적인 면역 반응을 개시하여 정상 세포를 사멸시키지 않으면서 종양 세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는지가 확인될 것이다.

[0043] 정의

[0044] "T 세포 에피토프"는 펩티드 제시 MHC 분자 또는 MHC 복합체의 형태로 클래스 I 또는 II의 MHC 분자에 의해 결합된 후 이 형태로 각각 세포독성 T 림프구 또는 T 헬퍼 세포에 의해 인식되고 결합될 수 있는 펩티드 서열을 의미하는 것으로서 이해되어야 한다.

[0045] "수용체"는 리간드에 결합할 수 있는 생물학적 분자 또는 분자 기를 의미하는 것으로서 이해되어야 한다. 수용체는 세포, 세포 형성 또는 유기체에서 정보를 전달하는 데에 기여할 수 있다. 수용체는 하나 이상의 수용체 유닛, 바람직하게는 2개의 수용체 유닛을 포함하고, 이때 각각의 수용체 유닛은 단백질 분자, 특히 당단백질 분자로 구성될 수 있다. 수용체는 리간드의 구조에 상보적인 구조를 갖고 결합 파트너로서 리간드와 함께 복합체를 형성할 수 있다. 정보는 특히 세포 표면 상에서의 리간드의 복합체 형성 후 수용체의 입체구조적 변화에 의해 전달된다. 본 발명에 따르면, 수용체는 특히 리간드, 특히 적합한 길이의 펩티드 또는 펩티드 단편과 함께 수용체/리간드 복합체를 형성할 수 있는 MHC 클래스 I 및 II의 단백질을 의미하는 것으로서 이해되어야 한다.

[0046] "리간드"는 수용체의 구조에 상보적인 구조를 갖고 이 수용체와 함께 복합체를 형성할 수 있는 분자를 의미하는

것으로서 이해되어야 한다. 본 발명에 따르면, 리간드는 특히 그의 아미노산 서열에 있어서 적합한 길이 및 적합한 결합 모티프를 가짐으로써 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II의 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 펩티드 또는 펩티드 단편을 의미하는 것으로서 이해되어야 한다.

[0047] 또한, "수용체/리간드 복합체"는 "수용체/펩티드 복합체" 또는 "수용체/펩티드 단편 복합체", 특히 클래스 I 또는 클래스 II의 펩티드 또는 펩티드 단편 제시 MHC 분자를 의미하는 것으로서 이해되어야 한다.

[0048] "주조직적합성 복합체(MHC)의 단백질 또는 분자", "MHC 분자", "MHC 단백질" 또는 "HLA 단백질"은 특히 단백질 항원의 단백질분해 절단으로부터 발생되어 잠재적 T 세포 에피토프를 나타내는 펩티드에 결합하여 이 펩티드를 세포 표면으로 수송하고 세포 표면에서 상기 펩티드를 특정 세포, 특히 세포독성 T 림프구 또는 T 헬퍼 세포에 제시할 수 있는 단백질을 의미하는 것으로서 이해되어야 한다. 게놈에서 주조직적합성 복합체는 세포 표면 상에서 발현되어 내인성 항원 및/또는 외래 항원에 결합하고 이 항원을 제시함으로써 면역학적 과정을 조절하는 데 있어서 중요한 유전자 생성물을 코딩하는 유전적 영역을 포함한다. 주조직적합성 복합체는 상이한 단백질, 즉 MHC 클래스 I의 분자 및 MHC 클래스 II의 분자를 코딩하는 2개의 유전자 군으로 분류된다. 상기 2개의 MHC 클래스의 분자들은 상이한 항원 공급원에 대해 전문화되어 있다. MHC 클래스 I의 분자는 내인적으로 합성된 항원, 예를 들면, 바이러스 단백질 및 종양 항원을 제시한다. MHC 클래스 II의 분자는 외인성 공급원, 예를 들면, 박테리아 생성물로부터 유래된 단백질 항원을 제시한다. 상기 2개의 MHC 클래스의 세포생물학 및 발현 패턴은 이들의 상이한 역할에 맞게 조절된다.

[0049] 클래스 I의 MHC 분자는 중쇄 및 경쇄로 구성되고 약 8개 내지 11개의 아미노산, 통상적으로 9개 또는 10개의 아미노산으로 구성된 펩티드(이 펩티드가 적합한 결합 모티프를 갖는 경우)에 결합하여 이 펩티드를 세포독성 T 림프구에 제시할 수 있다. 클래스 I의 MHC 분자에 의해 결합된 펩티드는 내인성 단백질 항원으로부터 유래된다. 클래스 I의 MHC 분자의 중쇄는 바람직하게는 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 단량체이고, 경쇄는 β-2-마이크로글로불린이다.

[0050] 클래스 II의 MHC 분자는 α 쇄 및 β 쇄로 구성되어 있고 약 15개 내지 24개의 아미노산으로 구성된 펩티드(이 펩티드가 적합한 결합 모티프를 갖는 경우)에 결합하여 이 펩티드를 T 헬퍼 세포에 제시할 수 있다. 클래스 II의 MHC 분자에 의해 결합된 펩티드는 통상적으로 외인성 단백질 항원의 세포외 부분으로부터 유래된다. α 쇄 및 β 쇄는 특히 HLA-DR, HLA-DQ 및 HLA-DP 단량체이다.

[0051] "백신"은 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 면역을 발생시키는 조성물을 의미하는 것으로서 이해되어야 한다. 따라서, 백신은 항원을 포함하는 약제이고 백신접종을 통해 특이적 방어 및 보호 물질을 발생시키기 위해 인간 또는 동물에서 사용된다.

[0052] "단리된"은 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체가 이것과 천연적으로 회합되어 있는 다른 생물학적 물질로부터 본질적으로 제거되어 있거나, 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드를 발현하도록 유전적으로 조작된 재조합 숙주 세포로부터 유래된 다른 생물학적 물질을 본질적으로 포함하지 않는다는 것을 의미한다.

[0053] "신생항원"은 발현된 단백질 내의 종양 특이적 돌연변이로부터 발생된 한 클래스의 종양 항원을 의미한다.

[0054] "정제된"은 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체가 이것과 천연적으로 회합되어 있는 다른 생물학적 물질을 실질적으로 포함하지 않거나, 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드를 발현하도록 유전적으로 조작된 재조합 숙주 세포로부터 유래된 다른 생물학적 물질을 실질적으로 포함하지 않는다는 것을 의미한다. 즉, 예를 들면, 본 발명의 정제된 폴리펩티드는 약 70% 내지 100% 이상의 순도를 갖는 폴리펩티드이다(즉, 상기 폴리펩티드는 조성물에 존재하고, 이때 이 폴리펩티드가 총 조성물의 약 70 중량% 내지 100 중량%를 차지한다). 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 정제된 폴리펩티드는 약 75 중량% 내지 99 중량%의 순도, 약 80 중량% 내지 99 중량%의 순도, 약 90 중량% 내지 99 중량%의 순도 또는 약 95 중량% 내지 99 중량%의 순도를 갖는다.

[0055] 종양 특이적 돌연변이의 확인

[0056] 본 발명은 일부 돌연변이(예를 들면, 암세포에 존재하는 변이체 또는 대립유전자)의 확인에 기초한다. 구체적으로, 이들 돌연변이는 암을 갖는 대상체의 암세포의 게놈에 존재하나 상기 대상체의 정상 조직에는 존재하지 않는다.

[0057] 종양 내의 유전적 돌연변이는 이들 돌연변이가 종양에서만 단백질의 아미노산 서열의 변화를 유발하는 경우 종

양의 면역학적 표적화에 유용한 것으로 간주될 것이다. 유용한 돌연변이는 하기 (1) 내지 (5)의 돌연변이를 포함한다: (1) 단백질에서 상이한 아미노산을 유발하는 비동질(nonsynonymous) 돌연변이; (2) 정지 코돈이 변형되거나 결실되어 C 말단에서 신규 종양 특이적 서열을 갖는 보다 긴 단백질의 번역을 유발하는 리드쓰루 돌연변이; (3) 인트론을 성숙 mRNA 내에 포함시켜 독특한 종양 특이적 단백질 서열을 유발하는 스플라이스 부위 돌연변이; (4) 2개의 단백질의 연접부(junction)에서 종양 특이적 서열을 갖는 키메라 단백질을 발생시키는 염색체 재배열(즉, 유전자 융합); 및 (5) 신규 종양 특이적 단백질 서열을 갖는 신규 개방 판독 프레임을 유발하는 프레임시프트 돌연변이 또는 결실.

[0058] 종양 세포에서 예를 들면, 스플라이스 부위, 프레임시프트, 리드쓰루 또는 유전자 융합 돌연변이로부터 발생된 돌연변이된 펩티드 또는 돌연변이된 폴리펩티드는 종양 세포 대 정상 세포에서 DNA, RNA 또는 단백질을 서열분석함으로써 확인될 수 있다.

[0059] 종래 확인된 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 펩티드도 본 발명의 범위 내에 있다. 공지된 종양 돌연변이는 웹사이트(http://www.sanger.ac.uk/cosmic)에서 발견될 수 있다.

[0060] 다양한 방법들을 이용하여 개체의 DNA 또는 RNA에서 특정 돌연변이 또는 대립유전자의 존재를 검출할 수 있다. 이 분야에서의 진보는 정확하고 용이하고 저렴한 대규모 SNP 유전형분석(genotyping)을 제공하였다. 가장 최근에, 예를 들면, 동적 대립유전자 특이적 혼성화(DASH), 마이크로플레이트 어레이 대각선 겔 전기영동(MADGE), 실시간서열분석, 올리고뉴클레오티드 특이적 결찰(ligation), 택만(TaqMan) 시스템 및 다양한 DNA "칩" 기술, 예컨대, 아피메트릭스(Affymetrix) SNP 칩을 포함하는 여러 신규 기법들이 기재되어 있다. 이들 방법은 전형적으로 PCR에 의한 표적 유전적 영역의 증폭을 필요로 한다. 침윤성 절단에 의한 신호 소분자의 발생 후 질량 분광측정 또는 고정된 자물쇠(padloc) 프로브 및 회전 환(rolling-circle) 증폭에 기초한 다른 새로 개발된 방법들이 궁극적으로 PCR에 대한 필요성을 제거할 것이다. 특정 단일 뉴클레오티드 다형성을 검출하는, 당업계에서 공지된 여러 방법들이 하기에 요약되어 있다. 본 발명의 방법은 모든 이용가능한 방법들을 포함하는 것으로 이해된다.

[0061] PCR에 기초한 검출 수단은 다수의 마커의 동시적인 다중 증폭을 포함할 수 있다. 예를 들면, 크기에서 중첩되지 않고 동시적으로 분석될 수 있는 PCR 생성물들을 발생시키기 위해 PCR 프라이머를 선택하는 것은 당업계에서 잘 공지되어 있다. 대안적으로, 차등적으로 표지되어 있어 차등적으로 검출될 수 있는 프라이머들을 사용하여 상이한 마커들을 증폭시킬 수 있다. 물론, 혼성화에 기초한 검출 수단은 한 샘플에서 다수의 PCR 생성물들의 차등적 검출을 가능하게 한다. 다수의 마커의 다중 분석을 가능하게 하는 다른 기법들은 당업계에서 공지되어 있다.

[0062] 게놈 DNA 또는 세포 RNA 내의 단일 뉴클레오티드 다형성의 분석을 용이하게 하는 여러 방법들이 개발되었다. 한 실시양태에서, 단일 염기 다형성을 예를 들면, 문디 씨 알(Mundy, C. R.)(미국 특허 제4,656,127호)에 개시된 바와 같이 전문화된엑소뉴클레아제(exonuclease) 내성 뉴클레오티드를 사용하여 검출할 수 있다. 상기 방법에 따르면, 다형성 부위의 3' 말단에 바로 인접한 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머를 특정 동물 또는 인간으로부터 수득된 표적 분자에 혼성화시킨다. 표적 분자 상의 상기 다형성 부위가 존재하는 특정 엑소뉴클레아제 내성 뉴클레오티드 유도체에 상보적인 뉴클레오티드를 포함하는 경우, 상기 유도체는 혼성화된 프라이머의 말단에 도입될 것이다. 이러한 도입은 상기 프라이머가 엑소뉴클레아제에 대한 내성을 나타내게 함으로써 그의 검출을 허용한다. 샘플의 엑소뉴클레아제 내성 유도체의 본질(identity)이 공지되어 있기 때문에, 상기 프라이머가 엑소뉴클레아제에 대한 내성을 나타내게 된다는 발견은 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드가 반응에 사용된 뉴클레오티드 유도체에 상보적이었다는 것을 암시한다. 이 방법은 다량의 외래 서열 데이터의 확인을 필요로 하지 않는다는 이점을 갖는다.

[0063] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 용액에 기초한 방법을 이용하여 다형성 부위의 뉴클레오티드의 본질을 확인한다(코헨 디 등(Cohen, D. et al.)의 프랑스 특허 제2,650,840호 및 PCT 출원 공보 제WO 91/02087호). 미국 특허 제4,656,127호의 문디 방법에서와 같이, 다형성 부위의 3' 말단에 바로 인접한 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머를 사용한다. 상기 방법은 다형성 부위의 뉴클레오티드에 상보적인 경우 상기 프라이머의 말단에 도입되게 될 표지된 디데옥시뉴클레오티드 유도체를 사용하여 상기 부위의 뉴클레오티드의 본질을 확인한다.

[0064] 유전적 비트(Bit) 분석 또는 GBA®로서 공지된 대안적 방법이 고엘렛 피 등(Goelet, P. et al.)(PCT 출원 공보 제WO 92/15712호)에 의해 기재되어 있다. 상기 고엘렛 피 등의 방법은 표지된 종결자(terminator)와, 다형성 부위의 3' 말단에 인접한 서열에 상보적인 프라이머의 혼합물을 사용한다. 따라서, 도입되는 표지된 종결자는 평가될 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드에 의해 확인되고 이 뉴클레오티드에 상보적이다. 코헨 등(Cohen et al.)(프랑스 특허 제2,650,840호 및 PCT 출원 공보 제WO 91/02087호)의 방법과 대조적으로, 고엘

렛 피 등의 방법은 바람직하게는 프라이머 또는 표적 분자가 고체상에 고정되어 있는 이종상 분석이다.

[0065] 최근에, DNA 내의 다형성 부위를 분석하기 위해 여러 프라이머에 의해 안내된(guided) 뉴클레오티드 도입 절차가 기재되었다(Komher, J. S. et al., Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990); Syvanen, A.-C, et al., Genomics 8:684-692 (1990); Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 1143-1147 (1991); Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1: 159-164 (1992); Ugozzoli, L. et al., GATA 9: 107-112 (1992); Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208: 171-175 (1993)). 이들 방법은 이들 모두 다형성 부위에 존재하는 염기를 구별하기 위한 표지된 데옥시뉴클레오티드의 도입에 의존한다는 점에서 GBA®와 상이하다. 이러한 형식에서, 신호는 도입된 데옥시뉴클레오티드의 수에 비례하기 때문에, 동일한 뉴클레오티드의 연속부(runs)에서 일어나는 다형성은 상기 연속부의 길이에 비례하는 신호를 발생시킬 수 있다(Syvanen, A.-C, et al., Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59 (1993)).

[0066] 수백만 개의 개별 DNA 또는 RNA 분자들로부터 직접적으로 서열 정보를 동시에 수득하기 위해 다수의 시도가 현재 진행되고 있다. 실시간 단일 분자 합성에 의한 서열분석(Real-time single molecule sequencing-by-synthesis) 기술은 형광 뉴클레오티드가 서열분석될 주형에 상보적인 DNA의 발생중인 가닥 내로 도입될 때 상기 형광 뉴클레오티드를 검출하는 것에 의존한다. 한 방법에서, 30개 내지 50개 염기의 길이를 갖는 올리고뉴클레오티드가 5' 말단에서 유리 커버 슬립에 공유적으로 고착된다. 이들 고착된 가닥은 2종의 기능을 수행한다. 첫째, 이들은 주형이 표면에 결합된 올리고뉴클레오티드에 상보적인 포획 꼬리를 갖도록 구성된 경우 표적 주형 가닥에 대한 포획 부위로서 작용한다. 또한, 이들은 서열 판독의 기초를 형성하는 주형 지정된 프라이머 연장을 위한 프라이머로서 작용한다. 포획 프라이머는 합성, 검출, 및 염료의 제거를 위한 염료-링커의 화학적 절단으로 구성된 다수의 주기를 이용한 서열 결정을 위한 고정된 위치 부위로서 작용한다. 각각의 주기는 중합효소/표지된 뉴클레오티드 혼합물의 첨가, 세정, 이미지화 및 염료의 절단으로 구성된다. 대안적 방법에서, 중합효소는 형광 공여자 분자에 의해 변형되고 유리 슬라이드 상에 고정되는 반면, 각각의 뉴클레오티드는 감마 포스페이트에 부착된 수용자 형광 부분(moiety)에 의해 색채 코딩된다. 이 시스템은 뉴클레오티드가 드 노보(de nove) 쇄 내로 도입될 때 형광 태깅된(tagged) 중합효소와 형광 변형된 뉴클레오티드 사이의 상호작용을 검출한다. 다른 합성에 의한 서열분석 기술도 존재한다.

[0067] 바람직하게는, 임의의 적합한 합성에 의한 서열분석 플랫폼을 이용하여 돌연변이를 확인할 수 있다. 전술된 바와 같이, 4종의 주요 합성에 의한 서열분석 플랫폼이 현재 이용가능하다: 로슈/454 라이프 사이언시스(Roche/454 Life Sciences)로부터의 게놈 시퀀서(Genome Sequencer), 일루미나/솔렉사(Illumina/Solexa)로부터의 1G 어날라이저(Analyzer), 어플라이드 바이오시스템스(Applied BioSystems)로부터의 SOLiD 시스템 및 헬리코스 바이오사이언시스(Helicos Biosciences)로부터의 헬리스코프(Heliscope) 시스템. 합성에 의한 서열분석은 파시픽 바이오사이언시스(Pacific BioSciences) 및 비지젠 바이오테크놀로지스(visiGen Biotechnologies)에 의해서도 기재되었다. 이들 플랫폼 각각이 본 발명의 방법에서 이용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 서열분석될 다수의 핵산 분자들이 지지체(예를 들면, 고체 지지체)에 결합된다. 핵산을 지지체 상에 고정시키기 위해, 포획 서열/보편적인 프라이밍 부위가 주형의 3' 및/또는 5' 말단에 부가될 수 있다. 핵산은 포획 서열을 지지체에 공유적으로 부착된 상보적인 서열에 혼성화시킴으로써 상기 지지체에 결합될 수 있다. 포획 서열(보편적인 포획 서열로도 지칭됨)은 보편적인 프라이머로서 이중으로 작용할 수 있는 지지체에 부착된 서열에 상보적인 핵산 서열이다.

[0068] 포획 서열에 대한 대체물로서, 커플링 쌍(예를 들면, 미국 특허출원 공보 제2006/0252077호에 기재된 바와 같은 항체/항원, 수용체/리간드 또는 아비딘-바이오틴 쌍)의 한 구성원이 상기 커플링 쌍의 각각의 제2 구성원으로 코팅된 표면 상에 포획될 각각의 단편에 연결될 수 있다.

[0069] 포획 후, 서열은 예를 들면, 실시예 및 미국 특허 제7,283,337호에 기재된 바와 같이 합성에 의한 주형 의존적 서열분석을 포함하는 단일 분자 검출/서열분석에 의해 분석될 수 있다. 합성에 의한 서열분석에서, 표면에 결합된 분자는 중합효소의 존재 하에서 다수의 표지된 뉴클레오티드 트리포스페이트에 노출된다. 주형의 서열은 성장하는 쇄의 3' 말단에 도입된 표지된 뉴클레오티드의 순서에 의해 결정된다. 이것은 실시간으로 수행될 수 있거나 단계 및 반복 방식으로 수행될 수 있다. 실시간 분석을 위해, 각각의 뉴클레오티드에 대한 상이한 광학 표지를 도입할 수 있고, 다중 레이저를 이용하여 도입된 뉴클레오티드를 자극할 수 있다.

[0070] 임의의 유형의 세포 또는 조직을 사용하여 본원에 기재된 진단에서 사용될 핵산 샘플을 수득할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, DNA 또는 RNA 샘플을 종양 또는 체액, 예를 들면, 공지된 기법(예를 들면, 정맥채혈)에 의해 수득된 혈액 또는 타액으로부터 수득한다. 대안적으로, 무수 샘플(예를 들면, 모발 또는 피부)에 대한 핵산 테

스트를 수행할 수 있다.

[0071] 대안적으로, 단백질 질량 분광측정을 이용하여 종양 세포 상의 MHC 단백질에 결합된 돌연변이된 펩티드의 존재를 확인하거나 검증할 수 있다. 산을 사용하여 펩티드를 종양 세포로부터 용출하거나 종양으로부터 면역침전된 HLA 분자로부터 용출한 후 질량 분광측정을 이용하여 확인할 수 있다.

[0072] 신생항원성 펩티드

[0073] 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 확인된 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 단리된 펩티드, 공지된 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 펩티드, 및 본 발명의 방법에 의해 확인된 돌연변이 폴리펩티드 또는 이의 단편을 추가로 포함한다. 이들 펩티드 및 폴리펩티드는 본원에서 "신생항원성 펩티드" 또는 "신생항원성 폴리펩티드"로서 지칭된다. 용어 "펩티드"는 전형적으로 인접 아미노산의 α-아미노 기와 카르복실 기 사이의 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 일련의 잔기, 전형적으로 L-아미노산을 지칭하기 위해 본 명세서에서 "돌연변이 펩티드" 및 "신생항원성 펩티드"와 상호교환적으로 사용된다. 유사하게, 용어 "폴리펩티드"는 전형적으로 인접 아미노산의 α-아미노 기와 카르복실 기 사이의 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 일련의 잔기, 전형적으로 L-아미노산을 지칭하기 위해 본 명세서에서 "돌연변이 폴리펩티드" 및 "신생항원성 폴리펩티드"와 상호교환적으로 사용된다. 상기 폴리펩티드 또는 펩티드는 다양한 길이를 가질 수 있고, 그들의 중성(비하전된) 형태 또는 염 형태로 존재할 수 있고, 변형, 예컨대, 글리코실화, 측쇄 산화 또는 인산화를 포함하지 않을 수 있거나 상기 변형이 본원에 기재된 바와 같은 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 조건 하에서 이들 변형을 포함할 수 있다.

[0074] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 신생항원성 펩티드 분자의 크기는 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 11개, 약 12개, 약 13개, 약 14개, 약 15개, 약 16개, 약 17개, 약 18개, 약 19개, 약 20개, 약 21개, 약 22개, 약 23개, 약 24개, 약 25개, 약 26개, 약 27개, 약 28개, 약 29개, 약 30개, 약 31개, 약 32개, 약 33개, 약 34개, 약 35개, 약 36개, 약 37개, 약 38개, 약 39개, 약 40개, 약 41개, 약 42개, 약 43개, 약 44개, 약 45개, 약 46개, 약 47개, 약 48개, 약 49개, 약 50개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개, 약 110개, 약 120개 또는 이보다 많은 수의 아미노산 분자 잔기, 및 이 범위 내에서 유도가능한 임의의 범위를 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 신생항원성 펩티드 분자는 50개 이하의 아미노산을 갖는다.

[0075] 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 특정 신생항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 길이에 있어서 MHC 클래스 I의 경우 13개 이하의 잔기를 갖고 통상적으로 약 8개 내지 약 11개, 특히 9개 또는 10개의 잔기로 구성되고, MHC 클래스 II의 경우 15개 내지 24개의 잔기를 갖는다.

[0076] 보다 긴 펩티드는 여러 방식으로 디자인될 수 있다. 한 경우, HLA 결합 펩티드가 예측되거나 공지되어 있는 경우, 보다 긴 펩티드는 (1) 각각의 상응하는 유전자 생성물의 N 말단 및 C 말단 쪽으로 2개 내지 5개의 아미노산 연장을 갖는 개별 결합 펩티드; 또는 (2) 각각에 대해 연장된 서열을 갖는 결합 펩티드들 중 일부 또는 전부의 연쇄연결(concatenatation)로 구성될 수 있다. 또 다른 경우, 서열분석이 (신규 펩티드 서열을 유발하는 프레임시프트, 리드쓰루 또는 인트론 포함으로 인해) 종양에 존재하는 긴(10개 초과의 잔기) 네오에피토프 서열을 보여주는 경우, 보다 긴 펩티드는 (3) 신규 종양 특이적 아미노산의 전체 스트레치로 구성되어 컴퓨터 예측 또는 펩티드와 HLA 단백질의 시험관내 결합 테스트의 필요성을 없앨 것이다. 두 경우에서, 보다 긴 펩티드의 사용은 환자 세포에 의한 내인성 프로세싱을 가능하게 하고 보다 효과적인 항원 제시 및 T 세포 반응의 유도를 유발할 수 있다.

[0077] 상기 신생항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 HLA 단백질에 결합한다. 몇몇 양태에서, 상기 신생항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 야생형 펩티드보다 더 높은 친화성으로 HLA 단백질에 결합한다. 신생항원성 펩티드 또는 폴리펩티드는 적어도 5000 nM 미만, 적어도 500 nM 미만, 적어도 250 nM 미만, 적어도 200 nM 미만, 적어도 150 nM 미만, 적어도 100 nM 미만 또는 적어도 50 nM 미만의 IC_{50}을 나타낸다.

[0078] 상기 신생항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 대상체에게 투여된 경우 자가면역 반응을 유도하지 않고/않거나 면역학적 내성을 유발하지 않는다.

[0079] 본 발명은 적어도 2개 이상의 신생항원성 펩티드를 포함하는 조성물도 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조성물은 2종 이상의 상이한 펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 2종 이상의 상이한 펩티드는 동일한 폴리펩티드로부터 유래된다. 상이한 폴리펩티드는 펩티드가 길이, 아미노산 서열 또는 이들 둘 다에서 상이하다는 것을 의미한다. 상기 펩티드는 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 것으로 공지되어 있거나 본 발명의 방법에 의해 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 것으로 발견된 임의의 폴리펩티드로부터 유래된다. 신생항원성 펩티드가 유래될

수 있는 적합한 폴리펩티드는 예를 들면, COSMIC 데이터베이스(http://www.sanger.ac.uk/cosmic)에서 발견될 수 있다. COSMIC는 인간 암에서의 체세포 돌연변이에 대한 포괄적인 정보를 관리한다. 상기 펩티드는 종양 특이적 돌연변이를 포함한다. 몇몇 양태에서, 종양 특이적 돌연변이는 특정 유형의 암에 대한 발암 돌연변이이다. 몇몇 양태에서, 상기 펩티드는 SF3B1 폴리펩티드, MYD88 폴리펩티드, TP53 폴리펩티드, ATM 폴리펩티드, ABL 폴리펩티드, FBXW7 폴리펩티드, DDX3X 폴리펩티드, MAPK1 폴리펩티드 또는 GNB1 폴리펩티드로부터 유래된다.

[0080] SF3B1 펩티드는 이 펩티드가 SF3B1 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, SF3B1 펩티드는 야생형 SF3B1에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 625에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 626에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 700에서 글루탐산을 포함하거나, 아미노산 위치 742에서 아스파르트산을 포함하거나, 아미노산 위치 903에서 아르기닌을 포함한다. 야생형 SF3B1은 표 A(서열 번호 1)에 나타나 있다.

표 A: 야생형 SF3B1 (서열 번호 1)

```
makiakthedieaqireiqgkkaaldeaqgvgldstgyydqeiyggsdsr
fagyvtsiaateledddddyssstsllgqkkpgyhapvallndipqsteq
ydpfaehrppkiadredeykkhrrtmiisperldpfadggktpdpkmnar
tymdvmreqhltkeereirqqlaekakagelkvvngaaasqppskrkrrw
dqtadqtpgatpkklsswdqaetpghtpslrwdetpgrakgsetpgatpg
skiwdptpshtpagaatpgrgdtpghatpghggatssarknrwdetpkte
rdtpghgsgwaetprtdrggdsigetptpgaskrksrwdetpasqmggst
pvltpgktpigtpamnmatptpghimsmtpeqlqawrwereidernrpls
deeldamfpegykvlpppagyvpirtparkltatptplggmtgfhmqted
rtmksvndqpsgnlpflkpddiqyfdkllvdvdestlspeeqkerkimkl
llkikngtppmrkaalrqitdkarefgagplfnqilpllmsptledqerh
llvkvidrilyklddlvrpyvhkilvviepllidedyyarvegreiisnl
akaaglatmistmrpdidnmdeyvrnttarafavvasalgipsllpflka
vckskkswqarhtgikivqqiailmgcailphlrslveiiehglvdeqqk
vrtisalaiaalaeaatpygiesfdsvlkplwkgirqhrgkglaaflkai
gyliplmdaeyanyytrevmlilirefqspdeemkkivlkvvkqccgtdg
veanyikteilppffkhfwqhrmaldrrnyrqlvdttvelankvgaaeii
srivddlkdeaeqyrkmvmetiekimgnlgaadidhkleeqlidgilyaf
qeqttedsvmlngfgtvvnalgkrvkpylpqicgtvlwrlnnksakvrqq
aadlisrtavvmktcqeeklmghlgvvlyeylgeeypevlgsilgalkai
vnvigmhkmtppikdllprltpilknrhekvqencidlvgriadrgaeyv
sarewmricfellellkahkkairratvntfgyiakaigphdvlatllnn
lkvqerqnrvcttvaiaivaetcspftvlpalmneyrvpelnvqngvlks
lsflfeyigemgkdyiyavtplledalmdrdlvhrqtasavvqhmslgvy
gfgcedslnhllnyvwpnvfetsphviqavmgaleglrvaigpcrmlqyc
lqglfhparkvrdvywkiynsiyigsqdaliahypriynddkntyiryel
dyil
```

[0081]

[0082] MYD88 펩티드는 이 펩티드가 MYD88 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게는 MYD88 펩티드는 야생형 MYD88에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 232에서 트레오닌을 포함하거나, 아미노산 위치 258에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 265에서 프롤린을 포함한다. 야생형 MYD88은 표 B(서열 번호 2)에 나타나 있다.

표 B: 야생형 MYD88 (서열 번호 2)

```
mrpdraeapgppamaaggpgagsaapvsstsslplaalnmrvrrrlslfl
nvrtqvaadwtalaeemdfeyleirqletqadptgrlldawqgrpgasvg
rllelltklgrddvllelgpsieedcqkyilkqqqeeaekplqvaavdss
vprtaelagittlddplghmperfdaficycpsdiqfvqemirqleqtny
rlklcvsdrdvlpgtcvwsiaseliekrcrrmvvvvsddylqskecdfqt
kfalslspgahqkrlipikykamkkefpsilrfitvcdytnpctkswfwt
rlakalslp
```

[0083]

[0084] TP53 펩티드는 이 펩티드가 TP53 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, TP53 펩티드는 야생형 TP53에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 111에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 215에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 238에서 세린을 포함하거나, 아미노산 위치 248에서 글루타민을 포함하거나, 아미노산 위치 255에서 페닐알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 273에서 시스테인을 포함하거나, 아미노산 위치 281에서 아스파라긴을 포함한다. 야생형 TP53은 표 C(서열 번호 3)에 나타나 있다.

표 C: 야생형 TP53 (서열 번호 3)

meepqsdpsvepplsqetfsdlwkllpennvlsplpsqamddlmlspddi
eqwftedpgpdeaprmpeaappvapapaaptpaapapapswplsssvpsq
ktyqgsygfrlgflhsgtaksvtctyspalnkmfcqlaktcpvqlwvdst
pppgtrvramaiykqsqhmtevvrrcphhercsdsdglappqhlirvegn
lrveylddrntfrhsvvvpyeppevgsdcttihynymcnsscmggmnrrp
iltiitledssgnllgrnsfevrvcacpgrdrrteeenlrkkgephhelp
pgstkralpnntssspqpkkkpldgeyftlqirgrerfemfrelnealel
kdaqagkepggsrahsshlkskkgqstsrhkklmfktegpdsd

[0085]

[0086] ATM 펩티드는 이 펩티드가 ATM 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, ATM 펩티드는 야생형 ATM에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 1252에서 페닐알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 2038에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 2522에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 2954에서 시스테인을 포함한다.

[0087] 야생형 ATM은 표 D(서열 번호 4)에 나타나 있다.

표 D: 야생형 ATM (서열 번호 4)

mslvlndlliccrqlehdraterkkevekfkrlirdpetikhldrhsdsk
qgkylnwdavfrflqkyiqketeclriakpnvsastqasrqkkmqeissl
vkyfikcanrraprlkcqellnyimdtvkdssngaiygadcsnillkdil
svrkywceisqqqwlelfsvyfrlylkpsqdvhrvlvariihavtkgccs
qtdglnskfldffskaiqcarqekssslnhilaaltiflktlavnfrir
vcelgdeilptllyiwtqhrlndslkeviielfqlqiyihhpkgaktqek
gayestkwrsilynlydllvneishigsrgkyssgfrniavkenlielma
dichqvfnedtrsleisqsytttqressdysvpckrkkielgwevikdhl
qksqndfdlvpwlqiatqliskypaslpncelspllmilsqllpqqrhge
rtpyvlrcltevalcqdkrsnlessqksdllklwnkiwcitfrgisseqi
qaenfgllgaiiqgslvevdrefwklftgsacrpscpavccltlalttsi
vpgtvkmgieqnmcevnrsfslkesimkwllfyqlegdlenstevppilh
snfphlvlekilvsltmknckaamnffqsvpecehhqkdkeelsfsevee
lflqttfdkmdfltivrecgiekhqssigfsvhqnlkesldrcllglseq
llnnysseitnsetlvrcsrllvgvlgcycymgviaeeeaykselfqkak
slmqcagesitlfknktneefrigslrnmmqlctrclsnctkkspnkias
gfflrlltsklmndiadickslasfikkpfdrgevesmeddtngnlmeve
dqssmnlfndypdssvsdanepgesqstigainplaeeylskqdllfldm
lkflclcvttaqtntvsfraadirrkllmlidsstleptkslhlhmylml
lkelpgeeyplpmedvlellkplsnvcslyrrdqdvcktilnhvlhvvkn
lgqsnmdsentrdaqgqfltvigafwhltkerkyifsvrmalvnclktll
eadpyskwailnvmgkdfpvnevftqfladnhhqvrmlaaesinrlfqdt
kgdssrllkalplklqqtafenaylkaqegmremshsaenpetldeiynr
ksvlltliavvlscspicekqalfalcksvkenglephlvkkvlekvset
fgyrrledfmashldylvlewlnlqdteynlssfpfillnytniedfyrs
cykvliphlvirshfdevksianqiqedwkslltdcfpkilvnilpyfay
egtrdsgmaqqretatkvydmlksenllgkqidhlfisnlpeivvellmt
lhepanssasqstdlcdfsgdldpapnpphfpshvikatfayisnchktk
lksileilskspdsyqkillaiceqaaetnnvykkhrilkiyhlfvslll
kdiksglggawafvlrdviytlihyinqrpscimdvslrsfslccdllsq
vcqtavtyckdalenhlhvivgtliplvyeqvevqkqvldllkylvidnk
dnenlyitiklldpfpdhvvfkdlritqqkikysrgpfslleeinhflsv
svydalpltrleglkdlrrqlelhkdqmvdimrasqdnpqdgimvklvvn
llqlskmainhtgekevleavgsclgevgpidfstiaiqhskdasytkal
klfedkelqwtfimltylnntlvedcvkvrsaavtclknilatktghsfw
eiykmttdpmlaylqpfrtsrkkflevprfdkenpfegllddinlwiplse
nhdiwiktltcafldsggtkceilqllkpmcevktdfcqtvlpylihdil
lqdtneswrnllsthvqgfftsclrhfsqtsrsttpanldsesehffrcc
ldkksqrtmlavvdymrrqkrpssgtifndafwldlnylevakvaqscaa
hftallyaeiyadkksmddqekrslafeegsqsttisslsekskeetgis
lqdllleiyrsigepdslygcgggkmlqpitrlrtyeheamwgkalvtyd
letaipsstrqagiiqalqnlglchilsvylkgldyenkdwcpeleelhy
qaawrnmqwdhctsvskevegtsyheslynalqslrdrefstfyeslkya
rvkeveemckrslesvyslyptlsrlqaigelesigelfsrsvthrqlse
vyikwqkhsqllkdsdfsfqepimalrtvileilmekemdnsqrecikdi
ltkhlvelsilartfkntqlperaifqikqynsvscgvsewqleeaqvfw
akkeqslalsilkqmikkldascaannpslkltyteclrvcgnwlaetcl
enpavimqtylekavevagnydgessdelrngkmkaflslarfsdtqyqr
ienymkssefenkqallkrakeevgllrehkiqtnrytvkvqreleldel
alralkedrkrflckavenyinc llsgeehdmwvfrlcslwlensgvsev
ngmmkrdgmkiptykflplmyqlaarmgtkmmgglgfhevlnnlisrism
dhphhtlfiilalananrdefltkpevarrsritknvpkqssqldedrte
aanriictirsrrpqmvrsvealcdayiilanldatqwktqrkginipad
qpitklknledvvvptmeikvdhtgeygnlvtiqsfkaefrlaggvnlpk
iidcvgsdgkerrqlvkgrddlrqdavmqqvfqmcntllqrntetrkrkl
tictykvvplsqrsgvlewctgtvpigeflvnnedgahkryrpndfsafq
cqkkmmevqkksfeekyevfmdvcqnfqpvfryfcmekfldpaiwfekrl
aytrsvatssivgyilglgdrhvqnilineqsaelvhidlgvafeqgkil
ptpetvpfrltrdivdgmgitgvegvfrrccektmevmrnsqetlltive
vllydplfdwtmnplkalylqqrpedetelhptlnaddqeckrnlsdidq
sfnkvaervlmrlqeklkgveegtvlsvggqvnlliqqaidpknlsrlfp
gwkawv

[0088]

[0089] ABL 펩티드는 이 펩티드가 ABL 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, BCR-ABL 펩티드는 야생형 ABL에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 244에서 발린을 포함하거나, 아미노산 위치 248에서 발린을 포함하거나, 아미노산 위치 250에서 글루탐산을 포함하거나, 아미노산 위치 250에서 알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 252에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 252에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 253에서 페닐알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 253에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 255에서 라이신을 포함하거나, 아미노산 위치 255에서 발린을 포함하거나, 아미노산 위치 276에서 글리신을 포함하거나, 아미노산 위치 315에서 이소루신을 포함하거나, 아미노산 위치 315에서 아스파라긴을 포함하거나, 아미노산 위치 317에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 343에서 트레오닌을 포함하거나, 아미노산 위치 351에서 트레오닌을 포함하거나, 아미노산 위치 355에서 글리신을 포함하거나, 아미노산 위치 359에서 발린을 포함하거나, 아미노산 위치 359에서 알라닌을 포함하거나, 아미노산 위치 379에서 이소루신을 포함하거나, 아미노산 위치 382에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 387에서 메티오닌을 포함하거나, 아미노산 위치 396에서 프롤린을 포함하거나, 아미노산 위치 396에서 아르기닌을 포함하거나, 아미노산 위치 417에서 티로신을 포함하거나, 아미노산 위치 486에서 세린을 포함한다. 야생형 ABL은 표 E(서열 번호 5)에 나타나 있다.

표 E: 야생형 Abl (서열 번호 5)

```
MLEICLKLVGCKSKKGLSSSSSCYLEEALQRPVASDFEPQGLSEAARWNSKENLLAGPSENDPNLFVALY
DFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPVSRNAAEYL
LSSGINGSFLVRESESSPGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSESRFNTLAELVHHHSTVADGLI
TTLHYPAPKRNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEV
EEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVVLLYMATQISSA
MEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKS
DVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEGCPEKVYELMRACWQWNPSDRPSFAEIH
QAFETMFQESSISDEVEKELGKQGVRGAVSTLLQAPELPTKTRTSRRAAEHRDTTDVPEMPHSKGQGESD
PLDHEPAVSPLLPRKERGPPEGGLNEDERLLPKDKKTNLFSALIKKKKKTAPTPPKRSSSFREMDGQPER
RGAGEEEGRDISNGALAFTPLDTADPAKSPKPSNGAGVPNGALRESGGSGFRSPHLWKKSSTLTSSRLAT
GEEEGGGSSSKRFLRSCSASCVPHGAKDTEWRSVTLPRDLQSTGRQFDSSTFGGHKSEKPALPRKRAGEN
RSDQVTRGTVTPPPRLVKKNEEAADEVFKDIMESSPGSSPPNLTPKPLRRQVTVAPASGLPHKEEAGKGS
ALGTPAAAEPVTPTSKAGSGAPGGTSKGPAEESRVRRHKHSSESPGRDKGKLSRLKPAPPPPPAASAGKA
GGKPSQSPSQEAAGEAVLGAKTKATSLVDAVNSDAAKPSQPGEGLKKPVLPATPKPQSAKPSGTPISPAP
VPSTLPSASSALAGDQPSSTAFIPLISTRVSLRKTRQPPERIASGAITKGVVLDSTEALCLAISRNSEQM
ASHSAVLEAGKNLYTFCVSYVDSIQQMRNKFAFREAINKLENNLRELQICPATAGSGPAATQDFSKLLSS
VKEISDIVQR
```

[0090]

[0091] FBXW7 펩티드는 이 펩티드가 FBXW7 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, FBXW7 펩티드는 야생형 FBXW7에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 280에서 루신을 포함하거나, 아미노산 위치 465에서 히스티딘을 포함하거나, 아미노산 위치 505에서 시스테인을 포함하거나, 아미노산 위치 597에서 글루탐산을 포함한다. 야생형 FBXW7은 표 F(서열 번호 6)에 나타나 있다.

표 F: 야생형 FBXW7 (서열 번호 6)

```
mnqellsvgskrrrtggslrgnpsssqvdeeqmnrvveeeqqqqlrqqee
ehtarngevvgveprpggqndsqqgqleennnrfisvdedssgnqeeqee
deehageqdeedeeeeemdqesddfdqsddssredehthtnsvtnsssiv
dlpvhqlsspfytkttkmkrkldhgsevrsfslgkkpckvseytsttglv
pcsatpttfgdlraangqgqqrrritsvqpptglqewlkmfqswsgpekl
laldelidsceptqvkhmmqviepqfqrdfisllpkelalyvlsflepkd
llqaaqtcrywrilaednllwrekckeegideplhikrrkvikpgfihsp
wksayirqhridtnwrrgelkspkvlkghddhvitclqfcgnrivsgsdd
ntlkvwsavtgkclrtlvghtggvwssqmrdniiisgstdrtlkvwnaet
gecihtlyghtstvrcmhlhekrvvsgsrdatlrvwdietgqclhvlmgh
vaavrcvqydgrrvvsgaydfmvkvwdpetetclhtlqghtnrvyslqfd
gihvvsgsldtsirvwdvetgncihtltghqsltsgmelkdnilvsgnad
stvkiwdiktgqclqtlqgpnkhqsavtclqfnknfvitssddgtvklwd
lktgefirnlvtlesggsggvvwrirasntklvcavgsrngteetkllvl
dfdvdmk
```

[0092]

[0093] DDX3X 펩티드는 이 펩티드가 DDX3X 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. DDX3X 펩티드는 야생형 DDX3X에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 24에서의 미스센스 돌연변이, 아미노산 위치 342에서의 스플라이스 부위 돌연변이 또는 아미노산 위치 410에서의 프레임시프트으로부터 발생된 펩티드이다. 야생형 DDX3X는 표 G(서열 번호 7)에 나타나 있다.

표 G: 야생형 DDX3X (서열 번호 7)
mshvavenalgldqqfagldlnssdnqsggstaskgryipphlrnreatk gfydkdssgwssskdkdayssfgsrsdsrgkssffsdrgsgsrgrfddrg rsdydgigsrgdrsgfgkferggnsrwcdksdeddwskplppserleqel fsggntginfekyddipveatgnncpphiesfsdvemgeiimgnieltry trptpvqkhaipiikekrdlmacaqtgsgktaafllpilsqiysdgpgea lramkengrygrrkqypislvlaptrelavqiyeearkfsyrsrvrpcvv yggadigqqirdlergchllvatpgrlvdmmergkigldfckylvldead rmldmgfepqirriveqdtmppkgvrhtmmfsatfpkeiqmlardfldey iflavgrvgstsenitqkvvwveesdkrsflldllnatgkdsltlvfvet kkgadsledflyhegyactsihgdrsqrdreealhqfrsgkspilvatav aargldisnvkhvinfdlpsdieeyvhrigrtgrvgnlglatsffnerni nitkdlldllveakqevpswlenmayehhykgssrgrskssrfsggfgar dyrqssgassssfsssrasssrsgggghgssrgfggggyggfynsdgygg nynsqgvdwwgn

[0094]

[0095] MAPK1 펩티드는 이 펩티드가 MAPK1 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, MAPK1 펩티드는 야생형 MAPK1에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 162에서 아스파라긴을 포함하거나, 아미노산 위치 291에서 글리신을 포함하거나, 아미노산 위치 316에서 페닐알라닌을 포함한다. 야생형 MAPK1은 표 H(서열 번호 8)에 나타나 있다.

표 H: 야생형 MAPK1 (서열 번호 8)
maaaaaagagpemvrgqvfdvgprytnlsyigegaygmvcsaydnvnkvr vaikkispfehqtycqrtlreikillrfrheniigindiiraptieqmkd vyivqdlmetdlykllktqhlsndhicyflyqilrglkyihsanvlhrdl kpsnlllnttcdlkicdfglarvadpdhdhtgflteyvatrwyrapeiml nskgytksidiwsvgcilaemlsnrpifpgkhyldqlnhilgilgspsqe dlnciinlkarnyllslphknkvpwnrlfpnadskaldlldkmltfnphk rieveqalahpyleqyydpsdepiaeapfkfdmelddlpkeklkelifee tarfqpgyrs

[0096]

[0097] GNB1 펩티드는 이 펩티드가 GNB1 폴리펩티드의 일부를 포함한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, GNB1 펩티드는 야생형 GNB1에 따라 넘버링될 때 아미노산 위치 180에서 트레오닌을 포함한다. 야생형 GNB1은 표 I(서열 번호 9)에 나타나 있다.

표 I: 야생형 GNB1 (서열 번호 9)
mseldqlrqeaeqlknqirdarkacadatlsqitnnidpvgriqmrtrrt lrghlakiyamhwgtdsrllvsasqdgkliiwdsyttnkvhaiplrsswv mtcayapsgnyvacggldnicsiynlktregnvrvsrelaghtgylsccr flddnqivtssgdttcalwdietgqqtttftghtgdvmslslapdtrlfv sgacdasaklwdvregmcrqtftghesdinaicffpngnafatgsddatc rlfdlradqelmtyshdniicgitsvsfsksgrlllagyddfncnvwdal kadragvlaghdnrvsclgvtddgmavatgswdsflkiwn

[0098]

[0099] 원하는 활성을 나타내는 신생항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 원하는 MHC 분자에 결합하고 적절한 T 세포를 활성화시키는 비변형된 펩티드의 생물학적 활성의 전부를 실질적으로 증가시키거나 적어도 보유하면서 원하는 성질, 예를 들면, 개선된 약리학적 특성을 제공하도록 필요에 따라 변형될 수 있다. 예를 들면, 신생항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 다양한 변화, 예컨대, 보존적 또는 비보존적 치환을 가질 수 있고, 이때 이러한 변화는 그들의 용도에 있어서 일부 이점, 예컨대, 개선된 MHC 결합을 제공할 것이다. 보존적 치환은 아미노산 잔기를 생물학적으로 및/또는 화학적으로 유사한 또 다른 아미노산 잔기로 치환시키는 것, 예를 들면, 소수성 잔기를 또 다른 소수성 잔기로 치환시키거나 극성 잔기를 또 다른 극성 잔기로 치환시키는 것을 의미한다. 치환은 조합, 예컨대, Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; 및 Phe, Tyr을 포함한다. 또한, 단일 아미노산 치환의 효과를 D-아미노산을 사용하여 입증할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들면, 문헌(Merrifield, Science 232:341-347 (1986), Barany & Merrifield, The Peptides, Gross & Meienhofer, eds. (N.Y., Academic Press), pp. 1-284 (1979)), 및 문헌(Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (Rockford, III., Pierce), 2d Ed. (1984))에 기재된 바와 같이 잘 공지되어 있는 펩티드 합성 절차의 이용을 통해 만들어질 수 있다.

[0100] 신생항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 예를 들면, 아미노산의 부가 또는 결실을 통해 화합물의 아미노산 서열을

연장시키거나 감소시킴으로써 변형될 수도 있다. 상기 펩티드, 폴리펩티드 또는 유사체는 일부 잔기의 순서 또는 조성을 변경시킴으로써 변형될 수도 있고, 생물학적 활성에 필수적인 일부 아미노산 잔기, 예를 들면, 핵심적인 접촉 부위에 존재하는 일부 아미노산 잔기 또는 보존된 잔기는 일반적으로 생물학적 활성에 대한 불리한 영향을 미치지 않으면서 변경될 수 없다는 것이 용이하게 인식될 것이다. 비핵심적인 아미노산은 단백질에서 천연적으로 발생하는 아미노산, 예컨대, L-α-아미노산 또는 이들의 D-이성질체로 한정될 필요가 없고 비천연 아미노산, 예컨대, β-γ-δ-아미노산뿐만 아니라 L-α-아미노산의 많은 유도체들도 포함할 수 있다.

[0101] 전형적으로, 단일 아미노산 치환을 갖는 일련의 펩티드들을 사용하여 결합에 대한 정전하, 소수성 등의 효과를 측정할 수 있다. 예를 들면, 다양한 MHC 분자 및 T 세포 수용체에 대해 상이한 민감성 패턴을 나타내는 일련의 양으로 하전된 아미노산(예를 들면, Lys 또는 Arg) 또는 음으로 하전된 아미노산(예를 들면, Glu) 치환을 펩티드의 길이를 따라 만든다. 또한, 상대적으로 중성을 띤 작은 부분, 예컨대, Ala, Gly, Pro 또는 유사한 잔기를 사용한 다중 치환을 이용할 수 있다. 상기 치환은 동종올리고머 또는 이종올리고머일 수 있다. 치환되거나 부가된 잔기의 수 및 유형은 필수 접촉점 사이의 필요한 공간 및 추구되는 일부 기능적 성질(예를 들면, 소수성 대 친수성)에 의해 좌우된다. 모 펩티드의 친화성에 비해 증가한 MHC 분자 또는 T 세포 수용체에 대한 결합 친화성은 이러한 치환에 의해 달성될 수도 있다. 임의의 경우, 이러한 치환은 예를 들면, 결합을 파괴할 입체적 간섭 및 전하 간섭을 피하도록 선택된 아미노산 잔기 또는 다른 분자 단편을 사용해야 한다.

[0102] 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기의 치환이다. 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 임의의 조합을 조합하여 최종 펩티드에 도달할 수 있다. 치환 변이체는 펩티드의 하나 이상의 잔기가 제거되고 상이한 잔기가 그 위치에 삽입되어 있는 변이체이다. 이러한 치환은 펩티드의 특성을 정교하게 조절하기를 원하는 경우 일반적으로 하기 표에 따라 만들어진다.

원래의 잔기	예시적 치환
Ala	Ser
Arg	Lys, His
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Lys; Arg
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; His
Met	Leu; Ile
Phe	Tyr; Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr; Phe
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu
Pro	Gly

[0103]

[0104] 기능(예를 들면, MHC 분자 또는 T 세포 수용체에 대한 친화성)의 실질적인 변화는 상기 표에 기재된 치환보다 덜 보존적인 치환을 선택함으로써, 즉 (a) 치환 영역에서의 펩티드 골격의 구조, 예를 들면, 쉬트(sheet) 또는 나선 입체구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 용적을 유지하는 것에 대한 잔기의 효과에 있어서 보다 유의하게 상이한 잔기를 선택함으로써 만들어진다. 일반적으로 펩티드 성질에서의 최대 변화를 생성하는 것으로 예측되는 치환은 (a) 친수성 잔기, 예를 들면, 세릴이 소수성 잔기, 예를 들면, 류실, 이소류실, 페닐알라닐, 발릴 또는 알라닐을 치환시키거나 이 소수성 잔기로 치환되는 치환; (b) 양전성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들면, 라이실, 아르기닐 또는 히스티딜이 음전성 잔기, 예를 들면, 글루타밀 또는 아스파르틸을 치환시키거나 이 음전성 잔기로 치환되는 치환; 또는 (c) 용적이 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌이 측쇄를 갖지 않는 잔기, 예를 들면, 글리신을 치환시키거나 이 잔기로 치환되는 치환일 것이다.

[0105] 상기 펩티드 및 폴리펩티드는 신생항원성 펩티드 또는 폴리펩티드 내의 2개 이상의 잔기의 등배전자체(isostere)도 포함할 수 있다. 본원에서 정의된 등배전자체는 제1 서열의 입체구조가 제2 서열에 대한 특이성을 나타내는 결합 부위에 꼭 맞기 때문에 제2 서열을 치환시킬 수 있는, 2개 이상의 잔기로 구성된 서열이다. 상기

용어는 구체적으로 당업자에게 잘 공지되어 있는 펩티드 골격 변형을 포함한다. 이러한 변형은 아미드 질소, α-탄소 또는 아미드 카르보닐의 변형, 아미드 결합의 완전한 치환, 연장, 결실 또는 골격 가교결합을 포함한다. 일반적으로 문헌(Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. VII (Weinstein ed., 1983))을 참조한다.

[0106] 다양한 아미노산 모방체(mimetics) 또는 비천연 아미노산을 사용한 펩티드 및 폴리펩티드의 변형은 상기 펩티드 및 폴리펩티드의 생체내 안정성을 증가시키는 데에 특히 유용하다. 안정성은 다수의 방식으로 분석될 수 있다. 예를 들면, 펩티다제 및 다양한 생물학적 매질, 예컨대, 인간 혈장 및 혈청이 안정성의 테스트에 사용되어 왔다. 예를 들면, 문헌(Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab Pharmacokin. 11:291-302 (1986))을 참조한다. 본 발명의 펩티드의 반감기를 25% 인간 혈청(부피/부피) 분석을 이용하여 편리하게 측정한다. 프로토콜은 일반적으로 다음과 같다. 풀링된 인간 혈청(AB형, 비가열 불활성화됨)을 사용 전에 원심분리로 탈지한다. 그 다음, 상기 혈청을 RPMI 조직 배양 배지를 사용하여 25%까지 희석하고 펩티드 안정성의 테스트에 사용한다. 예정된 시간 간격을 두고, 소량의 반응 용액을 제거하고 6% 수성 트리클로르아세트산 또는 에탄올에 첨가한다. 흐린 반응 샘플을 15분 동안 냉각시킨(4℃) 후 회전시켜 침전된 혈청 단백질을 펠렛화한다. 그 다음, 안정성 특이적 크로마토그래피 조건을 이용하는 역상 HPLC로 상기 펩티드의 존재를 확인한다.

[0107] 상기 펩티드 및 폴리펩티드는 개선된 혈청 반감기 이외의 원하는 성질을 제공하도록 변형될 수 있다. 예를 들면, CTL 활성을 유도하는 상기 펩티드의 능력은 T 헬퍼 세포 반응을 유도할 수 있는 하나 이상의 에피토프를 포함하는 서열과의 연결에 의해 증강될 수 있다. 특히 바람직한 면역원성 펩티드/T 헬퍼 접합체는 스페이서 분자에 의해 연결된다. 상기 스페이서는 전형적으로 생리학적 조건 하에서 실질적으로 하전되지 않는 상대적으로 작은 중성 분자, 예컨대, 아미노산 또는 아미노산 모방체로 구성된다. 상기 스페이서는 전형적으로, 예를 들면, Ala, Gly, 및 비극성 아미노산 또는 중성 극성 아미노산의 다른 중성 스페이서로부터 선택된다. 임의적으로 존재하는 스페이서는 동일한 잔기로 구성될 필요가 없으므로 이종올리고머 또는 동종올리고머일 수 있다는 것이 이해될 것이다. 존재하는 경우, 스페이서는 통상적으로 1개 또는 2개 이상의 잔기, 보다 통상적으로 3개 내지 6개의 잔기로 구성될 것이다. 대안적으로, 상기 펩티드는 스페이서 없이 T 헬퍼 펩티드에 연결될 수 있다.

[0108] 신생항원성 펩티드는 펩티드의 아미노 또는 카르복시 말단에서 직접적으로 또는 스페이서를 통해 T 헬퍼 펩티드에 연결될 수 있다. 신생항원성 펩티드 또는 T 헬퍼 펩티드의 아미노 말단은 아실화될 수 있다. 예시적 T 헬퍼 펩티드는 파상풍 변독소(toxoid) 830-843, 인플루엔자 307-319, 및 말라리아 환상포자소체 82-398 및 378-389를 포함한다.

[0109] 단백질 또는 펩티드는 표준 분자생물학적 기법을 통한 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 발현, 천연 공급원으로부터의 단백질 또는 펩티드의 단리, 또는 단백질 또는 펩티드의 화학적 합성을 포함하는, 당업자에게 공지되어 있는 임의의 기법에 의해 제조될 수 있다. 다양한 유전자에 상응하는 뉴클레오티드 및 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 서열은 이미 개시되어 있고 당업자에게 공지되어 있는 전산화된 데이터베이스에서 발견될 수 있다. 이러한 데이터베이스 중 하나는 국립보건원의 웹사이트에 위치하는 국립생물공학정보센터 유전자은행(National Center for Biotechnology Information's Genbank) 및 진펩트(GenPept) 데이터베이스이다. 공지된 유전자에 대한 코딩 영역은 본원에 개시된 기법을 이용함으로써 증폭될 수 있고/있거나 발현될 수 있거나, 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 대안적으로, 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드의 다양한 상업적 제제가 당업자에게 공지되어 있다.

[0110] 본 발명의 추가 양태는 본 발명의 신생항원성 펩티드를 코딩하는 핵산(예를 들면, 폴리뉴클레오티드)을 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 단일 가닥 및/또는 이중 가닥의 DNA, cDNA, PNA, CNA 또는 RNA; 천연 또는 안정화된 형태의 폴리뉴클레오티드, 예컨대, 포스포로티오에이트 골격을 갖는 폴리뉴클레오티드; 또는 이들의 조합물일 수 있고, 상기 폴리뉴클레오티드는, 상기 펩티드를 코딩하는 한, 인트론을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 물론, 천연 발생 펩티드 결합에 의해 연결된 천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 본 발명의 추가 양태는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 제공한다. 상이한 유형의 세포에 대한 발현 벡터가 당업계에서 잘 공지되어 있고 과도한 실험 없이 선택될 수 있다. 일반적으로, DNA는 발현을 위해 적절한 배향 및 정확한 판독 프레임으로 발현 벡터, 예컨대, 플라스미드 내로 삽입된다. 필요한 경우, DNA는 원하는 숙주에 의해 인식되는 적절한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오티드 서열에 연결될 수 있지만, 이러한 제어는 일반적으로 발현 벡터에서 이용될 수 있다. 그 다음, 상기 벡터는 표준 기법을 통해 숙주 내로 도입된다. 지침은 예를 들면, 문헌(Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y)에서 발

견될 수 있다.

[0111] 백신 조성물

[0112] 본 발명은 면역원성 조성물, 예를 들면, 특이적 T 세포 반응을 일으킬 수 있는 백신 조성물에 관한 것이다. 상기 백신 조성물은 본원에 기재된 방법에 의해 확인된 종양 특이적 신생항원에 상응하는 돌연변이 펩티드 및 돌연변이 폴리펩티드를 포함한다.

[0113] 당업자는 예를 들면, T 세포에 의한 IFNɣ 생성 또는 종양 사멸을 분석하여 T 세포의 시험관내 발생뿐만 아니라 그의 효능 및 총 존재도, 일부 펩티드에 대한 일부 T 세포의 증식, 친화성 및 증폭, 및 T 세포의 기능성을 테스트함으로써 바람직한 펩티드, 폴리펩티드 또는 이들의 조합물을 선택할 수 있을 것이다. 그 다음, 통상적으로, 가장 효율적인 펩티드들이 백신으로서 조합된다.

[0114] 적합한 백신은 바람직하게는 1개 내지 20개의 펩티드, 보다 바람직하게는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개의 상이한 펩티드, 더 바람직하게는 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개 또는 14개의 상이한 펩티드, 가장 바람직하게는 12개, 13개 또는 14개의 상이한 펩티드를 포함할 것이다.

[0115] 본 발명의 한 실시양태에서, 상이한 펩티드 및/또는 폴리펩티드는 1개의 백신 조성물이 상이한 MHC 분자, 예컨대, 상이한 MHC 클래스 I 분자와 회합할 수 있는 펩티드 및/또는 폴리펩티드를 포함하도록 선택된다. 바람직하게는, 1개의 백신 조성물은 가장 빈번하게 발생하는 MHC 클래스 I 분자와 회합할 수 있는 펩티드 및/또는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 백신 조성물은 2개 이상의 바람직한 MHC 클래스 I 분자, 보다 바람직하게는 3개 이상의 바람직한 MHC 클래스 I 분자, 보다 더 바람직하게는 4개 이상의 바람직한 MHC 클래스 I 분자와 회합할 수 있는 상이한 단편을 포함한다.

[0116] 상기 백신 조성물은 특이적 세포독성 T 세포 반응 및/또는 특이적 헬퍼 T 세포 반응을 일으킬 수 있다.

[0117] 상기 백신 조성물은 항원보강제 및/또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 유용한 항원보강제 및 담체의 예는 본원에서 하기에 제공되어 있다. 상기 조성물 중의 펩티드 및/또는 폴리펩티드는 담체, 예컨대, 단백질 또는 항원 제시세포, 예컨대, 펩티드를 T 세포에 제시할 수 있는 수지상세포(DC)와 회합될 수 있다.

[0118] 항원보강제는 백신 조성물 내로 혼합되어 돌연변이 펩티드에 대한 면역 반응을 증가시키거나 달리 변형시키는 임의의 물질이다. 담체는 신생항원성 펩티드와 회합될 수 있는 스카폴드 구조체, 예를 들면, 폴리펩티드 또는 다당류이다. 임의적으로, 항원보강제는 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드에 공유적으로 또는 비공유적으로 접합된다.

[0119] 항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 항원보강제의 능력은 전형적으로 면역 매개 반응의 유의한 증가 또는 질환 증상의 감소에 의해 표시된다. 예를 들면, 체액성 면역의 증가는 전형적으로 항원에 대해 발생된 항체의 역가의 유의한 증가에 의해 표시되고, T 세포 활성의 증가는 전형적으로 증가된 세포 증식, 세포 매개 세포독성 또는 사이토카인 분비에 의해 표시된다. 항원보강제는 예를 들면, 일차 체액성 또는 Th 반응을 일차 세포성 또는 Th 반응으로 변화시킴으로써 면역 반응을 변경시킬 수도 있다.

[0120] 적합한 항원보강제는 1018 ISS; 알루미늄 염; 앰플리백스(Amplivax); AS15, BCG; CP-870,893; CpG7909; CyaA; dSLIM; GM-CSF; IC30; IC31; 이미퀴모드(Imiquimod); 이뮤팩트(ImuFact) IMP321; IS 패취(Patch); ISS; 이스코매트릭스(ISCOMATRIX); 주브이뮨(JuvImmune); 리포백(LipoVac); MF59; 모노포스포릴 지질 A; 몬타니드(Montanide) IMS 1312; 몬타니드 ISA 206; 몬타니드 ISA 50V; 몬타니드 ISA-51; OK-432; OM-174; OM-197-MP-EC; 온택(ONTAK); 펩텔(PepTel).RTM. 벡터 시스템; PLG 미세입자; 레스퀴모드(resiquimod); SRL172; 비로좀(Virosome) 및 다른 바이러스 유사 입자; YF-17D; VEGF 트랩(trap); R848; β-글루칸; Pam3Cys; 사포닌, 마이코박테리아 추출물 및 합성 박테리아 세포벽 모방체로부터 유래된 아퀼라(Aquila's) QS21 스티뮬론(stimulon)(아퀼라 바이오텍(Aquila Biotech), 미국 매사추세츠주 우스터 소재); 및 다른 전매특허 항원보강제, 예컨대, 리비 데톡스(Ribi's Detox), 퀼(Quil) 또는 수퍼포스(Superfos)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 항원보강제, 예컨대, 불완전 프로인트 항원보강제 또는 GM-CSF가 바람직하다. 수지상세포 및 이의 제제에 대한 특이성을 나타내는 여러 면역학적 항원보강제(예를 들면, MF59)가 종래에 기재되어 있다(Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186(1): 18-27; Allison A C; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11). 사이토카인도 사용될 수 있다. 여러 사이토카인들이 림프 조직으로의 수지상세포 이동에 대한 영향(예를 들면, TNF-α), T 림프구를 위한 효율적인 항원제시세포로의 수지상세포의 성숙의 가속화(예를 들면, GM-CSF, IL-1 및 IL-4)(전체적으로 본원에 참고로 구체적으로 도입되는 미국 특허 제5,849,589호) 및 면역보강제로서의 작용(예를 들면, IL-12)(Gabrilovich D

I, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418)과 직접적으로 연관되어 있다.

[0121] 백신 셋팅에서 항원보강제의 효과를 증강시키는 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드도 보고되었다. 이론에 구속받고자 하는 것은 아니지만, CpG 올리고뉴클레오티드는 톨 유사 수용체(TLR), 주로 TLR9를 통해 선천성(비적응) 면역계를 활성화시킴으로써 작용한다. CpG에 의해 유발된 TLR9 활성화는 예방 백신 및 치료 백신 둘 다에서 펩티드 또는 단백질 항원, 살아있는 또는 사멸된 바이러스, 수지상세포 백신, 자가 세포 백신 및 다당류 접합체를 포함하는 매우 다양한 항원들에 대한 항원 특이적 체액성 반응 및 세포성 반응을 증강시킨다. 보다 중요하게는, 상기 활성화는 CD4 T 세포 도움의 부재 하에서 조차도 수지상세포 성숙 및 분화를 증강시켜 TH1 세포의 활성화를 증강시키고 강한 세포독성 T 림프구(CTL)를 발생시킨다. TLR9 자극에 의해 유도된 TH1 편향은 정상적으로 TH2 편향을 촉진하는 명반 또는 불완전 프로인트 항원보강제(IFA)의 존재 하에서 조차도 유지된다. CpG 올리고뉴클레오티드는 다른 항원보강제와 함께, 또는 제제, 예컨대, 미세입자, 나노입자, 지질 유화액 또는 유사한 제제로 제제화되거나 동시투여된 경우 훨씬 더 높은 항원보강제 활성을 보이는데, 이러한 활성은 특히 항원이 상대적으로 약한 경우 강한 반응을 유도하기 위해 필요하다. 또한, 상기 CpG 올리고뉴클레오티드는 면역 반응을 가속화시키고 몇몇 실험에서 CpG를 갖지 않는 전체 투여량의 백신에 필적할만한 항체 반응을 나타내면서 항원 투여량을 대략 2자릿수 크기만큼 감소시킬 수 있다(Arthur M. Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, Jun. 2006, 471-484). 미국 특허 제6,406,705 B1호는 항원 특이적 면역 반응을 유도하기 위한 CpG 올리고뉴클레오티드, 비핵산 항원보강제 및 항원의 조합된 사용을 기술한다. 상업적으로 입수가능한 CpG TLR9 길항제는 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 성분인 dSLIM(이중 줄기 루프 면역조절제)(몰로겐(Mologen)(독일 베를린 소재))이다. 다른 TLR 결합 분자, 예컨대, RNA 결합 TLR7, TLR8 및/또는 TLR9도 사용될 수 있다.

[0122] 유용한 항원보강제의 다른 예로는 치료제 및/또는 항원보강제로서 작용할 수 있는 화학적으로 변형된 CpG(예를 들면, CpR, 이데라(Idera)), 폴리(I:C)(예를 들면, 폴리I:CI2U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA뿐만 아니라 면역활성 소분자 및 항체, 예컨대, 사이클로포스프아미드, 수니티닙(sunitinib), 베바시주맙(bevacizumab), 셀레브렉스(celebrex), NCX-4016, 실데나필(sildenafil), 타달라필(tadalafil), 바르데나필(vardenafil), 소라피닙(sorafinib), XL-999, CP-547632, 파조파닙(pazopanib), ZD2171, AZD2171, 이필리무맙(ipilimumab), 트레멜리무맙(tremelimumab) 및 SC58175가 있으나 이들로 한정되지 않는다. 본 발명의 내용에서 유용한 항원보강제 및 첨가제의 양 및 농도는 과도한 실험 없이 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 추가 항원보강제는 콜로니 자극 인자, 예컨대, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF, 사르그라모스팀(sargramostim))를 포함한다.

[0123] 본 발명에 따른 백신 조성물은 하나 초과의 상이한 항원보강제를 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명은 전술된 물질들 중 임의의 물질 또는 이들의 조합물을 포함하는 임의의 항원보강제 물질을 포함하는 치료 조성물을 포괄한다. 펩티드 또는 폴리펩티드 및 항원보강제는 임의의 적절한 순서로 별도로 투여될 수 있다는 것도 고려된다.

[0124] 담체는 항원보강제와 독립적으로 존재할 수 있다. 담체의 기능은 예를 들면, 돌연변이체의 활성 또는 면역원성을 증가시키기 위해, 안정성을 부여하기 위해, 생물학적 활성을 증가시키기 위해 또는 혈청 반감기를 증가시키기 위해 특히 돌연변이체의 분자량을 증가시키는 것일 수 있다. 나아가, 담체는 펩티드를 T 세포에 제시하는 것을 보조할 수 있다. 담체는 당업자에게 공지되어 있는 임의의 적합한 담체, 예를 들면, 단백질 또는 항원제시세포일 수 있다. 담체 단백질은 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 단백질, 예컨대, 트랜스페린, 소 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, 티로글로불린 또는 오브알부민, 면역글로불린 또는 호르몬, 예컨대, 인슐린 또는 팔미트산일 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 인간의 면역화를 위해, 담체는 인간에서 허용가능하고 안전한 생리학적으로 허용되는 담체이어야 한다. 그러나, 본 발명의 한 실시양태에서 파상풍 변독소 및/또는 디프테리아 변독소가 적합한 담체이다. 대안적으로, 담체는 덱스트란, 예를 들면, 세파로스일 수 있다.

[0125] 세포독성 T 세포(CTL)는 온전한 외래 항원 자체보다는 MHC 분자에 결합된 펩티드의 형태로 항원을 인식한다. MHC 분자 자체는 항원제시세포의 세포 표면에 위한다. 따라서, CTL의 활성화는 펩티드 항원, MHC 분자 및 APC로 구성된 삼량체 복합체가 존재하는 경우에만 가능하다. 상응하게, 상기 활성화는 펩티드가 CTL의 활성화를 위해 사용되는 경우뿐만 아니라 각각의 MHC 분자를 갖는 APC가 추가로 첨가되는 경우에도 면역 반응을 증강시킬 수 있다. 따라서, 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 백신 조성물은 하나 이상의 항원제시세포를 추가로 포함한다.

[0126] 항원제시세포(또는 자극제 세포)는 전형적으로 그의 표면 상에 MHC 클래스 I 또는 II 분자를 갖고, 한 실시양태에서 실질적으로 그 자체가 MHC 클래스 I 또는 II 분자를 선택된 항원으로 로딩할 수 없다. 하기에 보다 상세히 기재되어 있는 바와 같이, MHC 클래스 I 또는 II 분자는 시험관내에서 선택된 항원으로 용이하게 로딩될 수 있다.

[0127] 바람직하게는, 항원제시세포는 수지상세포이다. 적합하게는, 수지상세포는 신생항원성 펩티드로 펄싱된 자가 수지상세포이다. 상기 펩티드는 적절한 T 세포 반응을 일으키는 임의의 적합한 펩티드일 수 있다. 종양 관련 항원으로부터 유래된 펩티드로 펄싱된 자가 수지상세포를 사용하는 T 세포 요법은 문헌(Murphy et al. (1996) The Prostate 29, 371-380 and Tjua et al. (1997) The Prostate 32, 272-278)에 개시되어 있다.

[0128] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 하나 이상의 항원제시세포를 포함하는 백신 조성물이 하나 이상의 본 발명의 펩티드로 펄스처리되거나 로딩된다. 대안적으로, 환자로부터 단리된 말초 혈액 단핵세포(PBMC)가 생체외에서 펩티드로 로딩된 후 환자 내로 다시 주입될 수 있다.

[0129] 대안으로서, 항원제시세포는 본 발명의 펩티드를 코딩하는 발현 구축물을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드일 수 있고 수지상세포를 형질도입시켜 펩티드의 제시 및 면역의 유도를 일으킬 수 있는 것이 바람직하다.

[0130] 치료 방법

[0131] 본 발명은 본 발명의 신생항원성 펩티드 또는 백신 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 종양 특이적 면역 반응을 유도하거나, 종양에 대해 백신접종하거나, 상기 대상체에서 암의 증상을 치료하고/하거나 완화시키는 방법을 추가로 제공한다.

[0132] 상기 대상체는 암으로 진단받았거나 암을 발생시킬 위험이 있다. 상기 대상체는 이마티닙 내성 종양을 갖는다. 상기 대상체는 종양 특이적 면역 반응이 요구되는 인간, 개, 고양이, 말 또는 임의의 동물이다. 상기 종양은 임의의 고형 종양, 예컨대, 유방암, 난소암, 전립선암, 폐암, 신장암, 위암, 결장암, 고환암, 두경부암, 췌장암, 뇌암, 흑색종, 및 조직 기관의 다른 종양 및 혈액 종양, 예컨대, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, T 세포 림프구성 백혈병 및 B 세포 림프종을 포함하는 림프종 및 백혈병이다.

[0133] 본 발명의 펩티드 또는 조성물은 CTL 반응을 유도하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0134] 특정 실시양태에서, 본 발명은 BCR-ABL 돌연변이를 포함하는 하나 이상의 신생항원성 펩티드를 대상체에게 투여함으로써 이마티닙 내성 종양을 치료하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 대상체는 HLA-A3이다. BCR-ABL 돌연변이는 예를 들면, T315I, E255K, M351T, Y253H, Q252H, F317L, F359V, G250E, Y253F, E355G, E255V, M244V, L248V, G250A, Q252R, D276G, T315N, M343T, F359A, V379I, F382L, L387M, H396P, H396R, S417Y 및 F486S를 포함한다.

[0135] 본 발명의 신생항원성 펩티드, 폴리펩티드 또는 백신 조성물은 단독으로 또는 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 상기 치료제는 예를 들면, 화학요법제, 방사선 또는 면역요법이다. 특정 암에 대한 임의의 적합한 치료제가 투여될 수 있다. 화학요법제의 예로는 알데스류킨(aldesleukin), 알트레타민(altretamine), 아미포스틴(amifostine), 아스파라기나제(asparaginase), 블레오마이신(bleomycin), 카페시타빈(capecitabine), 카르보플라틴(carboplatin), 카르무스틴(carmustine), 클라드리빈(cladribine), 시사프리드(cisapride), 시스플라틴(cisplatin), 사이클로포스프아미드(cyclophosphamide), 사이타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine)(DTIC)), 닥티노마이신(dactinomycin), 독세타셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 드로나비놀(dronabinol), 에포에틴 알파(epoetin alpha), 에토포시드(etoposide), 필그라스팀(filgrastim), 플루다라빈(fludarabine), 플루오로우라실(fluorouracil), 젬시타빈(gemcitabine), 그라니세트론(granisetron), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이다루비신(idarubicin), 이포스아미드(ifosfamide), 인터페론 알파, 이리노테칸(irinotecan), 란소프라졸(lansoprazole), 레바미솔(levamisole), 류코보린(leucovorin), 메게스트롤(megestrol), 메스나(mesna), 메토트렉세이트(methotrexate), 메토클로프라미드(metoclopramide), 미토마이신(mitomycin), 미토탄(mitotane), 미톡산트론(mitoxantrone), 오메프라졸(omeprazole), 온단세트론(ondansetron), 파클리탁셀(paclitaxel)(탁솔(Taxol)®), 필로카르핀(pilocarpine), 프로클로로페라진(prochloroperazine), 리툭시마브(rituximab), 타목시펜(tamoxifen), 탁솔, 토포테칸 하이드로클로라이드(topotecan hydrochloride), 트라스투주마브(trastuzumab), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine) 및 비노렐빈 타르트레이트(vinorelbine tartrate)가 있으나 이들로 한정되지 않는다. 전립선암 치료의 경우, 항-CTLA-4와 조합될 수 있는 바람직한 화학요법제는 파클리탁셀(탁솔®)이다.

[0136] 추가로, 대상체는 항-면역억제제/면역조절제를 추가로 투여받을 수 있다. 예를 들면, 대상체는 항-CTLA 항체, 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체를 추가로 투여받는다. 항체에 의한 CTLA-4 또는 PD-L1의 차단은 환자에서 암 세포에 대한 면역 반응을 증강시킬 수 있다. 특히, CTLA-4 차단은 백신접종 프로토콜 후 수행된 경우 효과적인

것으로 밝혀졌다.

[0137] 백신 조성물에 포함될 각각의 펩티드의 최적 양 및 최적 투약 섭생법은 과도한 실험 없이 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 펩티드 또는 그의 변이체는 정맥내(i.v.) 주사, 피하(s.c.) 주사, 피내(i.d.) 주사, 복강내(i.p.) 주사 또는 근육내(i.m.) 주사용으로 제조될 수 있다. 바람직한 펩티드 주사 방법은 피하, 피내, 복강내, 근육내 및 정맥내 주사를 포함한다. 바람직한 DNA 주사 방법은 피내, 근육내, 피하, 복강내 및 정맥내 주사를 포함한다. 예를 들면, 1 mg 내지 500 mg, 50 ㎍ 내지 1.5 mg, 바람직하게는 125 ㎍ 내지 500 ㎍의 투여량의 펩티드 또는 DNA가 제공될 수 있고 상기 투여량은 각각의 펩티드 또는 DNA에 의해 좌우될 것이다. 이 범위의 투여량은 종래 테스트에서 성공적으로 사용되었다(Brunsvig P F, et al., Cancer Immunol Immunother. 2006; 55(12): 1553-1564; M. Staehler, et al., ASCO meeting 2007; Abstract No 3017). 백신 조성물의 다른 투여 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0138] 본 발명의 약학 조성물은 이 조성물에 존재하는 펩티드의 선택, 수 및/또는 양이 조직, 암 및/또는 환자에 대해 특이적인 선택, 수 및/또는 양이 되도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 펩티드의 정확한 선택은 부작용을 피하기 위해 소정의 조직에서의 모 단백질의 발현 패턴에 의해 좌우될 수 있다. 상기 선택은 암의 구체적 유형, 질환의 상태, 선행 치료 섭생법, 환자의 면역 상태, 및 물론 환자의 HLA-일배체형(haplotype)에 의해 좌우될 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 백신은 특정 환자의 개별 요건에 따라 개별화된 성분들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 환자에서 관련된 신생항원의 발현, 개별 알레르기 또는 다른 치료로 인한 원치 않는 부작용, 및 치료의 제 1 라운드 또는 일정 후 이차 치료에 대한 조정에 따라 펩티드의 양을 변경시킬 수 있다.

[0139] 암을 위한 백신으로서 사용될 조성물의 경우, 정상 조직에서 다량으로 발현되는 내인성 모 단백질의 펩티드는 본 발명의 조성물에서 사용되지 않거나 소량으로 존재할 것이다. 다른 한편으로, 환자의 종양이 다량의 특정 단백질을 발현한다는 것이 공지되어 있는 경우, 이 암의 치료를 위한 각각의 약학 조성물에는 이 특정 단백질 또는 이 단백질의 경로에 대한 특이성을 나타내는 펩티드가 다량으로 및/또는 1개 초과의 수로 존재할 수 있거나 포함될 수 있다.

[0140] 본 발명의 펩티드를 포함하는 약학 조성물은 이미 암을 앓는 개체에게 투여될 수 있다. 치료 적용에 있어서, 조성물은 종양 항원에 대한 효과적인 CTL 반응을 이끌어내어 증상 및/또는 합병증을 치유하거나 적어도 부분적으로 정지시키기에 충분한 양으로 환자에게 투여된다. 이를 달성하기에 적합한 양은 "치료 유효량"으로서 정의된다. 이 용도에 효과적인 양은 예를 들면, 펩티드 조성, 투여 방식, 치료될 질환의 단계 및 중증도, 환자의 체중 및 일반적인 건강 상태, 및 처방 의사의 판단에 의해 좌우될 것이지만, 초기 면역화를 위한(즉, 치료 또는 예방 투여를 위한) 상기 효과적인 양은 일반적으로 70 kg 환자의 경우 약 1.0 ㎍ 내지 약 50,000 ㎍의 펩티드이고, 그 후 환자의 혈액에서 특이적 CTL 활성을 측정함으로써 환자의 반응 및 상태에 따라 수 주 내지 수 개월 동안 부스팅(boosting) 섭생법에 따라 부스팅 투여량 또는 약 1.0 ㎍ 내지 약 10,000 ㎍의 펩티드가 투여된다. 본 발명의 펩티드 및 조성물은 일반적으로 심각한 질환 상태, 즉 특히 암이 전이된 경우 생명을 위협하는 또는 잠재적으로 생명을 위협하는 상황에서 사용될 수 있다는 것을 명심해야 한다. 이러한 경우, 외래 물질의 최소화 및 펩티드의 상대적인 무독성 성질에 비추어 볼 때, 이들 펩티드 조성물을 상당한 과량으로 투여하는 것이 가능하고 치료 의사에 의해 바람직하다고 판단될 수 있다.

[0141] 치료 용도의 경우, 투여는 종양의 검출 시점 또는 종양의 수술적 제거 시점에서 시작되어야 한다. 이 시작 후, 적어도 증상이 실질적으로 경감될 때까지 및 그 후 일정 기간 동안 부스팅 투여량이 투여된다.

[0142] 치유적 치료를 위한 약학 조성물(예를 들면, 백신 조성물)은 비경구, 국소, 비강, 경구 또는 국부 투여를 위한 것이다. 바람직하게는, 약학 조성물은 비경구, 예를 들면, 정맥내, 피하, 피내 또는 근육내로 투여된다. 상기 조성물은 종양에 대한 국부 면역 반응을 유도하기 위해 수술적 절개 부위에 투여될 수 있다. 본 발명은 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체에 용해되어 있거나 현탁되어 있는 펩티드의 용액 및 백신 조성물을 포함하는 비경구 투여용 조성물을 제공한다. 다양한 수성 담체, 예를 들면, 물, 완충된 물, 0.9% 식염수, 0.3% 글리신, 히알루론산 등이 사용될 수 있다. 이들 조성물은 잘 공지되어 있는 통상적인 멸균 기법에 의해 멸균될 수 있거나 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 사용을 위해 그 자체로서 포장될 수 있거나 동결건조될 수 있고, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 용액과 조합된다. 상기 조성물은 생리학적 조건에 가깝게 만드는 약학적으로 허용되는 보조 물질, 예컨대, pH 조절제 및 완충제, 긴장성 조절제, 습윤화제 등, 예를 들면, 아세트산나트륨, 젖산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 모노라우르산소르비탄, 올레산트리에탄올아민 등을 필요에 따라 포함할 수 있다.

[0143] 약학 제제 중의 본 발명의 펩티드의 농도는 광범위하게, 즉 약 0.1 중량% 미만, 통상적으로 약 2 중량% 이상부

터 20 중량% 내지 50 중량% 이상만큼 높은 농도까지 변경될 수 있고 선택된 구체적 투여 방식에 따라 주로 유체 부피, 점도 등에 의해 선택될 것이다.

[0144] 본 발명의 펩티드는 펩티드를 특정 세포 조직, 예컨대, 림프 조직으로 표적화하는 리포좀을 통해 투여될 수도 있다. 리포좀은 펩티드의 반감기를 증가시키는 데에도 유용하다. 리포좀은 유화액, 발포체(foams), 교질입자(micelles), 불용성 단일층, 액체 결정, 인지질 분산액, 판형 층 등을 포함한다. 이들 제제에서, 전달될 펩티드는 리포좀의 일부로서 도입되거나, 단독으로 도입되거나, 예를 들면, 림프 세포들 사이에서 우세한 수용체에 결합하는 분자, 예컨대, CD45 항원에 결합하는 단일클론 항체, 또는 다른 치료 조성물 또는 면역원성 조성물과 함께 도입된다. 따라서, 본 발명의 원하는 펩티드로 충전된 리포좀은 림프 세포 부위로 향할 수 있고, 그 후 이 부위에서 리포좀은 선택된 치료/면역원성 펩티드 조성물을 전달한다. 본 발명에서 사용될 리포좀은 일반적으로 중성 인지질 및 음으로 하전된 인지질, 및 스테롤, 예컨대, 콜레스테롤을 포함하는 표준 소포 형성 지질로부터 형성된다. 지질의 선택은 일반적으로 예를 들면, 리포좀 크기, 혈류 중의 리포좀의 산 불안정성 및 안정성의 고려에 의해 좌우된다. 예를 들면, 문헌(Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9;467 (1980), USA), 미국 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호, 제4,837,028호 및 제5,019,369호에 기재된 바와 같이, 다양한 방법이 리포좀의 제조에 이용될 수 있다.

[0145] 면역 세포로의 표적화를 위해, 리포좀 내로 도입될 리간드는 예를 들면, 원하는 면역계 세포의 세포 표면 결정 인자에 대한 특이성을 나타내는 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 펩티드를 포함하는 리포좀 현탁액은 특히 투여 방식, 전달될 펩티드 및 치료될 질환의 단계에 따라 달라지는 투여량으로 정맥내, 국부, 국소 등으로 투여될 수 있다.

[0146] 고체 조성물의 경우, 예를 들면, 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로스, 글루코스, 수크로스, 탄산마그네슘 등을 포함하는 통상적인 또는 나노입자 무독성 고체 담체가 사용될 수 있다. 경구 투여의 경우, 통상적으로 사용되는 부형제, 예컨대, 상기 나열된 담체들 중 임의의 담체 및 일반적으로 10% 내지 95%, 보다 바람직하게는 25% 내지 75% 농도의 활성 성분, 즉 하나 이상의 본 발명의 펩티드를 도입함으로써 약학적으로 허용되는 무독성 조성물을 형성한다.

[0147] 에어로졸 투여의 경우, 면역원성 펩티드는 바람직하게는 계면활성제 및 추진제와 함께 미분된 형태로 제공된다. 펩티드의 전형적인 백분율은 0.01 중량% 내지 20 중량%, 바람직하게는 1 중량% 내지 10 중량%이다. 물론, 계면활성제는 무독성을 나타내어야 하고 바람직하게는 추진제에서 가용성을 나타내어야 한다. 이러한 물질의 대표적인 예는 6개 내지 22개의 탄소 원자를 포함하는 지방산, 예컨대, 카프로산, 옥탄산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레스테르산 및 올레산과 지방족 다가 알코올 또는 이의 환형 무수물의 에스테르 또는 부분적 에스테르이다. 혼합된 에스테르, 예컨대, 혼합된 또는 천연 글리세리드가 사용될 수 있다. 계면활성제는 조성물의 0.1 중량% 내지 20 중량%, 바람직하게는 0.25 중량% 내지 5 중량%를 차지할 수 있다. 조성물은 나머지는 통상적으로 추진제이다. 예를 들면, 비강내 전달을 위한 레시틴의 사용과 마찬가지로 원하는 경우 담체도 포함될 수 있다.

[0148] 치료 또는 면역화를 위해, 본 발명의 펩티드 및 임의적으로 본원에 기재된 하나 이상의 펩티드를 코딩하는 핵산을 환자에게 투여할 수도 있다. 다수의 방법이 핵산을 환자에게 전달하는 데에 편리하게 이용된다. 예를 들면, 핵산을 "네이키드(naked) DNA"로서 직접적으로 전달할 수 있다. 이 방법은 예를 들면, 문헌(Wolff et al., Science 247: 1465-1468 (1990))뿐만 아니라 미국 특허 제5,580,859호 및 제5,589,466호에도 기재되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,204,253호에 기재된 바와 같이 탄도(ballistic) 전달을 이용하여 핵산을 투여할 수도 있다. DNA로만 구성된 입자를 투여할 수 있다. 대안적으로, DNA를 입자, 예컨대, 금 입자에 부착시킬 수 있다.

[0149] 또한, 핵산을 양이온성 화합물, 예컨대, 양이온성 지질과의 복합체 형태로 전달할 수도 있다. 지질 매개 유전자 전달 방법은 예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO 96/18372호, 국제 특허출원 공보 제WO 93/24640호, 문헌(Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7): 682-691 (1988)), 미국 특허 제5,279,833호, 국제 특허출원 공보 제WO 91/06309호 및 문헌(Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414 (1987))에 기재되어 있다.

[0150] 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 약독화된 바이러스 숙주, 예컨대, 백시니아 또는 계두 바이러스에 의해 발현될 수도 있다. 이 방법은 본 발명의 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 발현시키기 위한 벡터로서 백시니아 바이러스의 사용을 포함한다. 재조합 백시니아 바이러스는 급성적으로 또는 만성적으로 감염된 숙주 또는 비감염된 숙주 내로 도입되었을 때 면역원성 펩티드를 발현하여 숙주 CTL 반응을 이끌어낸다. 면역화 프로토콜에 유용한 백시니아 벡터 및 방법은 예를 들면, 미국 특허 제4,722,848호에 기재되어 있다. 또 다른 벡터는 BCG(칼

메트-게랭간균(Bacille Calmette Guerin))이다. BCG 벡터는 문헌(Stover et al., Nature 351:456-460 (1991))에 기재되어 있다. 본 발명의 펩티드의 치료 투여 또는 면역화에 유용한 매우 다양한 다른 벡터들, 예를 들면, 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*) 벡터 등이 본원의 설명으로부터 당업자에게 자명해질 것이다.

[0151] 본 발명의 펩티드를 코딩하는 핵산을 투여하는 바람직한 수단은 다수의 에피토프를 코딩하는 미니유전자 구축물을 사용한다. 인간 세포에서의 발현을 위해 선택된 CTL 에피토프(미니유전자)를 코딩하는 DNA 서열을 생성하기 위해, 상기 에피토프의 아미노산 서열을 역으로 번역한다. 인간 코돈 사용 표가 각각의 아미노산에 대한 코돈 선택에 대한 지침으로서 사용된다. 이들 에피토프 코딩 DNA 서열을 직접적으로 연결하여 연속 폴리펩티드 서열을 생성한다. 발현 및/또는 면역원성을 최적화하기 위해, 추가 요소를 미니유전자 디자인 내로 도입할 수 있다. 역 번역될 수 있고 미니유전자 서열 내에 포함될 수 있는 아미노산 서열의 예로는 헬퍼 T 림프구, 에피토프, 리더 (신호) 서열 및 소포체 체류 신호가 있다. 추가로, CTL 에피토프에 인접한 합성(예를 들면, 폴리-알라닌) 또는 천연 발생 플랭킹 서열을 포함시킴으로써 CTL 에피토프의 MHC 제시를 개선할 수 있다.

[0152] 미니유전자의 플러스 가닥 및 마이너스 가닥을 코딩하는 올리고뉴클레오티들을 조립함으로써 미니유전자 서열을 DNA로 전환시킨다. 잘 공지된 기법을 이용하여 중첩 올리고뉴클레오티드들(30개 내지 100개 염기 길이)을 적절한 조건 하에서 합성하고 인산화하고 정제하고 어닐링한다. 올리고뉴클레오티드들의 말단을 T4 DNA 리가제(ligase)를 사용하여 연결한다. 그 다음, CTL 에피토프 폴리펩티드를 코딩하는 이 합성 미니유전자를 원하는 발현 벡터 내로 클로닝할 수 있다.

[0153] 당업자에게 잘 공지되어 있는 표준 조절 서열을 벡터에 포함시켜 표적 세포에서의 발현을 보장한다. 여러 벡터 요소들이 요구된다: 미니유전자 삽입을 위한 다운스트림 클로닝 부위를 갖는 프로모터; 효율적인 전사 종결을 위한 폴리아데닐화 신호; 이. 콜라이의 복제 기점; 및 이. 콜라이 선택 마커(예를 들면, 앰피실린 또는 가나마이신 내성). 이 목적을 위해 다수의 프로모터, 예를 들면, 인간 사이토메갈로바이러스(hCMV) 프로모터를 사용할 수 있다. 다른 적합한 프로모터 서열에 대해서는 예를 들면, 미국 특허 제5,580,859호 및 제5,589,466호를 참조한다.

[0154] 미니유전자 발현 및 면역원성을 최적화하기 위해 추가 벡터 변형이 요구될 수 있다. 몇몇 경우, 효율적인 유전자 발현을 위해 인트론이 요구되고, 하나 이상의 합성 또는 천연 발생 인트론을 미니유전자의 전사된 영역 내로 도입할 수 있다. mRNA 안정화 서열의 포함도 미니유전자의 발현 증가를 위해 고려할 수 있다. 최근에, 면역조절 서열(ISS 또는 CpG)이 DNA 백신의 면역원성에 있어서 일정한 역할을 수행한다고 제안되었다. 면역원성을 증강시키는 것으로 밝혀진 경우 이들 서열을 미니유전자 코딩 서열의 외부에서 벡터 내에 포함시킬 수 있다.

[0155] 몇몇 실시양태에서, 미니유전자에 의해 코딩된 에피토프, 및 면역원성을 증강시키거나 감소시키기 위해 포함된 제2 단백질의 생성을 가능하게 하는 이시스트론성(bicistronic) 발현 벡터를 사용할 수 있다. 동시발현된 경우 면역반응을 유리하게 증강시킬 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드의 예로는 사이토카인(예를 들면, IL2, IL12, GM-CSF), 사이토카인 유도 분자(예를 들면, LeIF) 또는 보조자극 분자가 있다. 헬퍼(HTL) 에피토프를 세포내 표적화 신호에 연결할 수 있고 CTL 에피토프와 별도로 발현시킬 수 있다. 이것은 HTL 에피토프가 CTL 에피토프와 상이한 세포 구획으로 향하게 할 것이다. 요구되는 경우, 이것은 MHC 클래스 II 경로 내로의 HTL 에피토프의 보다 효율적인 도입을 용이하게 하여 CTL 유도를 개선할 수 있다. CTL 유도와 대조적으로, 면역억제 분자(예를 들면, TGF-β)의 동시발현에 의한 면역 반응의 특이적 감소가 일부 질환에서 유리할 수 있다.

[0156] 일단 발현 벡터가 선택되면, 미니유전자를 프로모터의 다운스트림에 위치한 폴리링커 영역 내로 클로닝한다. 이 플라스미드를 적절한 이. 콜라이 균주 내로 형질전환시키고, DNA를 표준 기법을 이용하여 제조한다. 미니유전자의 배향 및 DNA 서열뿐만 아니라 벡터에 포함된 모든 다른 요소들을 제한 맵핑(mapping) 및 DNA 서열분석을 이용하여 확인한다. 정확한 플라스미드를 보유하는 박테리아 세포를 마스터(master) 세포 뱅크 및 작업 세포 뱅크로서 저장할 수 있다.

[0157] 정제된 플라스미드 DNA를 다양한 제제를 사용하여 주사용으로 제조할 수 있다. 이들 중 가장 단순한 것은 동결건조된 DNA를 멸균 인산염 완충제 식염수(PBS)에서 재구성하는 것이다. 다양한 방법이 기재되어 있고, 신규 기법이 이용가능해질 수 있다. 전술된 바와 같이, 핵산을 양이온성 지질을 사용하여 편리하게 제제화한다. 추가로, 당지질, 융합유도성(fusogenic) 리포좀, 펩티드, 및 보호 상호작용 비축합(PINC) 화합물로서 총칭되는 화합물도 정제된 플라스미드 DNA와 함께 복합체를 형성하여 안정성, 근육내 분산, 또는 특정 유형의 기관 또는 세포로의 수송과 같은 변수에 영향을 미칠 수 있다.

[0158] 표적 세포 감작이 미니유전자에 의해 코딩된 CTL 에피토프의 발현 및 MHC 클래스 I 제시에 대한 기능적 분석으

로서 이용될 수 있다. 플라스미드 DNA를, 표준 CTL 크로뮴 방출 분석을 위한 표적으로서 적합한 포유동물 세포주 내로 도입한다. 이용되는 형질감염 방법은 최종 제제에 의해 좌우될 것이다. "네이키드" DNA의 경우 전기천공이 이용될 수 있는 반면, 양이온성 지질은 직접적인 시험관내 형질감염을 가능하게 한다. 형광 활성화된 세포 분류(FACS)를 이용하여 형질감염된 세포를 풍부하게 하기 위해 녹색 형광 단백질(GFP)을 발현하는 플라스미드를 동시형질감염시킬 수 있다. 그 다음, 이들 세포를 크로뮴-51로 표지하고 에피토프 특이적 CTL 세포주에 대한 표적 세포로서 사용한다. ^{51}Cr 방출에 의해 검출된 세포용해는 미니유전자에 의해 코딩된 CTL 에피토프의 MHC 제시의 달성을 표시한다.

[0159] 생체내 면역원성은 미니유전자 DNA 제제의 기능적 테스트를 위한 두 번째 방법이다. 적절한 인간 MHC 분자를 발현하는 형질전환 마우스를 DNA 생성물로 면역화시킨다. 투여량 및 투여 경로는 제제에 의해 좌우된다(예를 들면, PBS 중의 DNA의 경우 근육내 투여, 지질과 복합체를 형성한 DNA의 경우 복강내 투여). 면역화로부터 21일 후, 비장세포를 회수하고 테스트될 각각의 에피토프를 코딩하는 펩티드의 존재 하에서 1주 동안 재자극한다. 표준 기법을 이용하여 이들 이펙터 세포(CTL)를 펩티드로 로딩되고 크로뮴-51로 표지된 표적 세포의 세포용해에 대해 분석한다. 미니유전자에 의해 코딩된 에피토프에 상응하는 펩티드의 MHC 로딩에 의해 감작된 표적 세포의 용해는 CTL의 생체내 유도에 대한 DNA 백신 기능을 입증한다.

[0160] 펩티드는 생체외에서 CTL을 이끌어내는 데에도 사용될 수 있다. 발생된 CTL은 다른 통상적인 형태의 요법에 반응하지 않거나 펩티드 백신 요법에 반응하지 않을 환자에서 만성 종양을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 조직배양물에서 환자의 CTL 전구체 세포(CTLp)를 항원제시세포(APC)의 공급원 및 적절한 펩티드와 함께 항온처리함으로써 특정 종양 항원에 대한 생체외 CTL 반응을 유도한다. CTLp가 활성화되고 이펙터 CTL로 성숙되고 증폭되는 적절한 항온처리 시간(전형적으로 1주 내지 4주) 후, 상기 세포를 환자 내로 다시 주입하는데, 이때 상기 세포는 상기 환자 내에서 그의 특이적 표적 세포(즉, 종양 세포)를 파괴할 것이다. 특이적 세포독성 T 세포의 발생을 위한 시험관내 조건을 최적화하기 위해, 자극제 세포의 배양을 적절한 혈청 무함유 배지에서 유지한다.

[0161] 자극제 세포를 활성화하고자 하는 세포, 예를 들면, 전구체 CD8+ 세포와 함께 항온처리하기 전, 자극제 세포의 표면 상에서 발현되는 인간 클래스 I 분자 상으로 로딩되기에 충분한 양의 항원성 펩티드를 자극제 세포 배양물에 첨가한다. 본 발명에서, 펩티드의 충분한 양은 각각의 자극제 세포의 표면 상에서 발현되는 약 200개, 바람직하게는 200개 이상의 인간 클래스 MHC 분자가 펩티드로 로딩되게 하는 양이다. 바람직하게는, 자극제 세포를 2 ㎍/㎖ 초과의 펩티드와 함께 항온처리한다. 예를 들면, 자극제 세포를 3 ㎍/㎖, 4 ㎍/㎖, 5 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 15 ㎍/㎖ 또는 이보다 많은 펩티드와 함께 항온처리한다.

[0162] 그 다음, 휴면 또는 전구체 CD8+ 세포를 활성화시키기에 충분한 시간 동안 상기 CD8+ 세포를 배양물에서 적절한 자극제 세포와 함께 항온처리한다. 바람직하게는, 상기 CD8+ 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화시킨다. 휴면 또는 전구체 CD8+(이펙터) 세포 대 자극제 세포의 비는 개체마다 다를 수 있고, 또한 개체의 림프구가 배양 조건에 적응하는 능력, 및 본원에 기재된 치료 방법이 이용되는 질환 상태 또는 다른 상태의 성질 및 중증도와 같은 변수에 의해 좌우될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 림프구 대 자극제 세포 비는 약 30:1 내지 300:1의 범위 내에 있다. 치료적으로 사용가능한 또는 유효한 수의 CD8+ 세포를 자극하기 위해 필요한 시간만큼 오랫동안 이펙터/자극제 배양물을 유지할 수 있다.

[0163] 시험관내 CTL의 유도는 APC 상의 대립유전자 특이적 MHC 클래스 I 분자에 결합되는 펩티드의 특이적 인식을 필요로 한다. APC당 특이적 MHC/펩티드 복합체의 수는 특히 일차 면역 반응에서 CTL의 자극을 위해 매우 중요하다. 세포당 소량의 펩티드/MHC 복합체가 세포를 CTL에 의한 용해에 민감하게 만들기에 충분하거나 이차 CTL 반응을 자극하기에 충분하지만, 일차 반응 동안 CTL 전구체(pCTL)의 성공적인 활성화는 유의하게 더 많은 수의 MHC/펩티드 복합체를 필요로 한다. 세포 상의 빈 주조직적합성 복합체 분자의 펩티드 로딩은 일차 세포독성 T 림프구 반응의 유도를 가능하게 한다. 세포 상의 빈 주조직적합성 복합체 분자의 펩티드 로딩은 일차 세포독성 T 림프구 반응의 유도를 가능하게 한다.

[0164] 모든 인간 MHC 대립유전자들에 대해 돌연변이 세포주가 존재하지는 않기 때문에, MHC와 회합된 내인성 펩티드를 APC의 표면으로부터 제거한 후 발생된 빈 MHC 분자를 관심있는 면역원성 펩티드로 로딩하는 기법을 이용하는 것이 유리하다. 비형질전환된(비종양발생성) 비감염된 세포 및 바람직하게는 환자의 자가 세포를 APC로서 사용하는 것이 생체외 CTL 요법의 개발을 향한 CTL 유도 프로토콜의 디자인을 위해 바람직할 수 있다. 본원은 MHC와 회합된 내인성 펩티드를 APC의 표면으로부터 스트립핑(stripping)한 후 원하는 펩티드를 로딩하는 방법을 개시한다.

[0165] 안정한 MHC 클래스 I 분자는 하기 요소들로 형성된 삼량체 복합체이다: 1) 통상적으로 8개 내지 10개의 잔기로

구성된 펩티드, 2) 그의 α1 도메인 및 α2 도메인 내에 펩티드 결합 부위를 보유하는 경막 다형성 단백질 중쇄, 및 3) 비공유적으로 회합된 비다형성 경쇄인 β2마이크로글로불린. 상기 복합체로부터 결합된 펩티드를 제거하고/하거나 β2마이크로글로불린을 해리시키는 것은 MHC 클래스 I 분자를 비기능적인 불안정한 상태로 만들어 신속한 분해를 초래한다. PBMC로부터 단리된 모든 MHC 클래스 I 분자들이 그들에 결합된 내인성 펩티드를 갖는다. 따라서, 제1 단계는 외인성 펩티드가 MHC 클래스 I 분자에 첨가될 수 있기 전에 MHC 클래스 I 분자의 분해를 야기하지 않으면서 APC 상의 MHC 클래스 I 분자에 결합된 모든 내인성 펩티드들을 제거하는 것이다.

[0166] 결합된 펩티드의 MHC 클래스 I 분자를 자유롭게 하는 2종의 가능한 방법은 배양 온도를 밤새 37℃에서 26℃까지 낮추어 β2마이크로글로불린을 탈안정화시키는 단계 및 약산 처리를 이용하여 내인성 펩티드를 세포로부터 스트립핑하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 이미 결합된 펩티드를 세포외 환경으로 방출시켜 새로운 외인성 펩티드가 빈 클래스 I 분자에 결합되게 한다. 냉온 항온처리 방법은 외인성 펩티드가 MHC 복합체에 효율적으로 결합할 수 있게 하지만 세포의 대사 속도를 늦출 수 있는 26℃에서의 밤샘 항온처리를 필요로 한다. 또한, MHC 분자를 활발히 합성하지 않는 세포(예를 들면, 휴면 PBMC)는 냉온 절차에 의해 다량의 빈 표면 MHC 분자를 생성하지 않을 가능성이 있다.

[0167] 강산 스트립핑은 pH 2의 트리플루오로아세트산을 사용한 펩티드의 추출, 또는 면역친화성 정제에 의해 정제된 클래스 I-펩티드 복합체의 산 변성을 포함한다. 이들 방법은 APC의 생존력, 및 항원 제시에 있어서 핵심적인 최적 대사 상태를 보존하면서 내인성 펩티드를 제거하는 것이 중요하기 때문에 CTL 유도에 적합하지 않다. pH 3의 약산 용액, 예컨대, 글리신 또는 시트르산염-인산염 완충제가 내인성 펩티드를 확인하고 종양과 회합된 T 세포 에피토프를 확인하는 데에 이용되어 왔다. 이 처리는 MHC 클래스 II 분자를 포함하는 다른 표면 항원들이 온전한 상태로 남아있는 동안 MHC 클래스 I 분자만이 탈안정화된다(그리고 회합된 펩티드가 방출된다)는 점에서 특히 효과적이다. 가장 중요하게는, 약산 용액을 사용한 세포의 처리는 세포의 생존력 또는 대사 상태에 영향을 미치지 않는다. 약산 처리는 내인성 펩티드의 스트립핑이 4℃에서 2분 이내에 일어나기 때문에 신속하고 APC는 적절한 펩티드가 로딩된 후 그의 기능을 수행할 준비가 되어 있다. 이 기법은 본원에서 일차 항원 특이적 CTL의 발생을 위해 펩티드 특이적 APC를 만드는 데에 이용된다. 생성된 APC는 펩티드 특이적 CD8+ CTL의 유도에 있어서 효율적이다.

[0168] 공지되어 있는 다양한 방법들 중 한 방법을 이용하여 자극제 세포로부터 활성화된 CD8+ 세포를 효과적으로 분리할 수 있다. 예를 들면, 자극제 세포, 자극제 세포 상에 로딩된 펩티드, 또는 CD8+ 세포(또는 이의 절편)에 대한 특이성을 나타내는 단일클론 항체를 사용하여 이들 세포를 이들의 적절한 상보적인 리간드에 결합시킬 수 있다. 그 다음, 항체로 태깅된 분자를 적절한 수단, 예를 들면, 잘 공지되어 있는 면역침전 또는 면역분석 방법을 통해 자극제-이펙터 세포 혼합물로부터 추출할 수 있다.

[0169] 활성화된 CD8+ 세포의 효과적인 세포독성 양뿐만 아니라 이들 살해(killer) 세포의 궁극적인 표적이 되는 세포의 양 및 유형도 시험관내 사용과 생체내 사용 사이에 상이할 수 있다. 또한, 상기 양은 환자의 상태에 따라 상이할 것이고 모든 적절한 인자들의 고려를 통해 실시자에 의해 결정될 것이다. 그러나, 마우스에서 사용되는 약 5×10^{6}개 내지 5×10^{7}개의 세포에 비해 바람직하게는 약 1×10^{6}개 내지 약 1×10^{12}개, 보다 바람직하게는 약 1×10^{8}개 내지 약 1×10^{11}개, 보다 더 바람직하게는 약 1×10^{9}개 내지 약 1×10^{10}개의 활성화된 CD8+ 세포가 성인을 위해 사용된다.

[0170] 바람직하게는, 전술된 바와 같이, 활성화된 CD8+ 세포를 치료될 개체에게 투여하기 전에 상기 CD8+ 세포를 세포 배양물로부터 회수한다. 그러나, 다른 현재 치료 방법 및 제안된 치료 방법과 달리, 본 방법은 종양발생성을 나타내지 않는 세포 배양 시스템을 이용한다는 것을 주목하는 것이 중요하다. 따라서, 자극제 세포와 활성화된 CD8+ 세포의 완전한 분리가 달성되지 않은 경우, 소수의 자극제 세포의 투여와 관련되어 있는 것으로 공지된 내재적인 위험은 존재하지 않는 반면, 포유동물 종양 촉진 세포의 투여는 매우 위험할 수 있다.

[0171] 세포 성분을 재도입하는 방법은 당업계에서 공지되어 있고 미국 특허 제4,844,893호(Honsik, et al.) 및 미국 특허 제4,690,915호(Rosenberg)에서 예시된 절차와 같은 절차를 포함한다. 예를 들면, 정맥내 관주를 통한 활성화된 CD8+ 세포의 투여가 적절하다.

[0172] 본 발명은 특허청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 한정하지 않는 하기 실시예에서 추가로 기재될 것이다.

[0173] **실시예**

[0174] **실시예 1: 백신접종을 위한 네오에피토프를 확인하는 방법**

[0175] 종양 특이적 네오에피토프를 확인하기 위한 본 발명자들의 방법은 3개의 단계를 포함한다. (1) 각각의 환자로부터의 종양 샘플 대 매칭된 생식세포계 샘플의 전체 게놈 또는 전체 엑솜(즉, 포획된 엑손만) 서열분석을 이용하여 DNA 돌연변이를 확인하는 단계. 본 발명자들의 예비 연구는 CLL 세포가 아미노산 서열을 변경시키고 잠재적 신규 T 세포 에피토프를 발생시킬 수 있는 많은 상이한 유전적 변화를 포함한다는 것을 입증한다. (2) 고도로 검증된 펩티드-MHC 결합 예측 알고리즘을 적용하여 종양에 존재하는 비침묵 돌연변이에 기초한 후보 T 세포 에피토프 셋을 발생시키는 단계. 본 발명자들은 CLL 샘플에서 돌연변이된 유전자의 발현을 RNA로서 확인한 후 실험적 방법을 이용하여 펩티드-HLA 결합 예측을 확인함으로써 후보 펩티드와 HLA 대립유전자의 결합을 정량할 것이다. (3) 돌연변이된 펩티드에 대한 항원 특이적 T 세포를 발생시키는 단계.

[0176] **실시예 2: 만성 림프구성 백혈병을 갖는 환자의 종양에서 돌연변이된 유전자를 확인하기 위한 종양 게놈 및 정상 게놈 서열분석(단계 1)**

[0177] (정상 조직에 존재하지 않는) 종양 특이적 돌연변이를 검출하기 위해, 각각의 환자의 종양 및 정상 조직으로부터 샘플을 수집하였다. 백혈병의 경우, 종양 세포, 예를 들면, CD5 및 CD19 표면 마커를 발현하는 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 갖는 환자의 종양 세포에 대한 특이성을 나타내는 항체를 사용하는 자기 비드 단리 또는 형광 활성화된 세포 분류를 이용하여 종양을 정제하였다. 피부 섬유모세포를 정상 조직 대조군으로서 사용하였다. 서열분석을 위한 DNA 또는 RNA를 단리된 종양 또는 정상 조직 세포로부터 정제하였다. 흑색종, 난소 종양 및 다른 고형 종양의 경우(이때, 비종양 세포에 의한 오염이 존재함), 종양 세포의 상대적으로 균질한 단기간 배양물 또는 레이저에 의해 포획된 종양으로부터 DNA 및 RNA를 단리하였다. PBMC를 정상 대조군 세포로서 사용하였다. 모든 샘플들에 대해, 돌연변이된 펩티드 특이적 T 세포의 증폭을 위해 필요할 때까지 PBMC를 냉동보존하였다. 최종적으로, 종양 세포의 단기간 배양물도 증폭된 T 세포의 표적으로서 추후에 사용하기 위해 냉동보존하였다. 서열분석 전, 단리된 게놈 DNA 또는 RNA를 핵산 무결성 및 순도에 대해 테스트하였다.

[0178] 각각의 DNA 샘플에 대해, 전체 게놈 DNA를 전단하고 서열분석하였거나, 혼성체 선택을 이용하여 코딩 엑손을 상보적인 올리고뉴클레오티드로 포획한 후 서열분석하였다(Gnirke et al., Nat Biotechnol. 2009, 27(2):182-9). DNA 라이브러리 및 RNA 라이브러리를 발생시켰고 일루미나 차세대 서열분석 기구를 이용하여 서열분석하였다.

[0179] 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 갖는 64명의 환자들의 서열분석은 생식세포계 DNA 서열에 비해 상대적으로 종양에서 단백질 아미노산 서열을 변경시키는 평균 23개의 비침묵 돌연변이를 제공하였다(도 3). 네오에피토프를 발생시킬 잠재력을 갖는 이들 비침묵 돌연변이는 5개의 상이한 클래스로 분류되었다: 미스센스, 스플라이스 부위, 프레임시프트(삽입결실, 삽입 및 결실), 리드쓰루 및 유전자 융합(도 4). 이들 돌연변이의 빈도는 개별 환자마다 상이하다(도 5). 모든 이들 돌연변이들이 면역화를 위한 잠재적 네오에피토프를 제공하고, 이때 프레임시프트, 리드쓰루 및 스플라이스 부위(예를 들면, 보유된 인트론을 사용함) 돌연변이는 보다 긴 신규 펩티드 스트레치를 발생시키고, 미스센스 돌연변이는 단일 아미노산 변화를 갖는 짧은 펩티드를 발생시키고, 마지막으로 융합 유전자는 신규 연접 서열을 갖는 혼성체 펩티드를 발생시킨다.

[0180] **실시예 3: 종양 특이적 돌연변이를 보유하는 발현된 단백질로부터 유래된 HLA 결합 펩티드의 확인(단계 2)**

[0181] 다음 의문은 돌연변이된 유전자가 환자 MHC/HLA 단백질에 의해 제시될 수 있는 펩티드를 발생시킬 수 있는지이다. 먼저, 여러 알고리즘을 이용하여 환자 1의 10개 미스센스 돌연변이로부터 500 nM 미만의 IC_{50} 점수를 보이는 30개의 HLA 결합 펩티드, 및 환자 2의 53개 미스센스, 1개 삽입결실 및 2개 유전자 융합으로부터 500 nM 미만의 IC_{50} 점수를 보이는 137개의 HLA 결합 펩티드를 예측하였다. 6개의 특이적 HLA 대립유전자를 갖는 환자에서 1개의 미스센스 돌연변이에 대한 한 예가 도시되어 있고, 이때 9머 펩티드와 HLA 대립유전자의 54개 조합으로부터 2개의 결합 펩티드가 예측되었다(도 6). 이들 유전자가 종양에서 발현되는지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 (돌연변이 클래스에 의해 좌우되는 여러 방법을 이용하여(도 7)) 돌연변이된 유전자들에 대한 RNA 수준을 측정하였고 HLA 결합 펩티드를 발생시키는 돌연변이된 유전자의 98%가 발현되었다는 것을 발견하였다.

[0182] 그 다음, HLA 대립유전자에 결합하는 것으로 공지된 기준 펩티드 및 테스트 펩티드를 사용한 경쟁 결합 분석을 수행함으로써, RNA 발현 검증을 통과한 모든 예측된 펩티드들의 HLA 결합 능력을 실험적으로 검증하였다(Sidney et al., Curr Protoc Immunol. 2001, Chapter 18:Unit 18.3)(도 8a). 본 발명자들이 HLA 결합의 실험적 확인을 위해 제출한 서브셋 중에서, 환자 1의 미스센스 돌연변이로부터 발생된 17개의 예측된 펩티드들 중 8개(47%)의 예측된 펩티드들이 HLA 대립유전자에 대한 높은 결합 친화성(IC_{50} <500 nM)을 나타낸다는 것이 확인되었다(도 8b). 환자 2의 경우, 49개의 예측된 펩티드들 중 25개의 예측된 펩티드들이 HLA 결합을 나타내는 것으로서 실험적으로 확인되었다. 이들 결과는 예측된 IC_{50}이 150 nM 미만인 모든 펩티드들이 실험적으로 HLA 결합을 보이지만

500 nM 미만의 컷오프가 그 당시에 40% 내지 50%의 진정한 결합 펩티드를 발생시킨다는 것을 암시한다(도 8c). 주목할 만한 것은 환자 2의 25개의 확인된 돌연변이된 펩티드가 생식세포계 펩티드보다 2배 이상 더 우수한 결합 친화성을 나타낸다는 것이다(도 9). 이러한 펩티드를 종양 백신 내에 도입하여 T 세포가 생식세포계 펩티드와 교차반응할 기회를 감소시키는 것이 바람직할 수 있지만, 차등적 결합을 보이지 않는 펩티드들은 T 세포 수용체에 의한 돌연변이 펩티드 대 생식세포계 펩티드의 차등적 인식으로 인해 종양 특이적 반응을 여전히 제공할 수 있다.

[0183] **실시예 4: CLL 환자 샘플의 서열분석에 의해 확인된 돌연변이된 펩티드에 대한 CD8+ T 세포 반응(단계 3)**

[0184] 지금부터, 본 발명자들은 예측된 또는 실험적으로 검증된 HLA 결합 돌연변이된 펩티드에 기초하여 이들 종양 특이적 돌연변이된 펩티드를 인식하는 T 세포가 발생될 수 있는지를 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 종양 세포에서 발현되는 것으로 검증된 유전자로부터 유래된 펩티드(결합 점수가 1000 nM 미만인 펩티드)를 합성하였다. 원하는 특이성을 나타내는 T 세포를 발생시키기 위해, 본 발명자들은 서열분석된 환자의 T 세포를 IL-2 및 IL-7의 존재 하에서 (개별 펩티드 또는 펩티드 풀의 사용을 통해) 펩티드로 펄싱된 자가 APC(수지상세포 및 CD40L 증폭된 자가 B 세포)를 사용하여 매주 자극하였다. 3회 또는 4회의 자극 후, 상기 펩티드에 대한 반응성을 입증하기 위해 증폭된 CD8+ 세포를 INFγ 분비에 기초한 엘리스폿(ELISpot) 상에서 테스트하였다. 본 발명자들은 환자 1의 17개 후보 펩티드들 중에서 TLK2 유전자로부터의 돌연변이된 펩티드로 펄싱된 자가 DC에 대한 T 세포의 INFγ 분비를 검출하였다(도 10).

[0185] **실시예 5: 돌연변이된 BCR-ABL 유전자는 환자 MHC/HLA 단백질에 결합하고 돌연변이 펩티드 특이적 CD8+ T 세포를 이끌어낼 수 있다.**

[0186] 본 발명자들은 또 다른 유형의 백혈병인 만성 골수성 백혈병(CML)을 갖는 환자에서 종양 특이적 돌연변이 펩티드에 대한 T 세포 반응의 보다 완전한 연구를 수행하였다. CML은 BCR-ABL 유전자 융합의 생성물인 종양 특이적 전위 단백질의 발현에 의해 정의된다. BCR-ABL의 돌연변이는 BCR-ABL을 표적화하는 이마티닙 메실레이트를 사용한 제1선 약리요법에 대한 약물 내성을 발생시키는 CML 환자에서 발생된다. 잠재적으로, 이들 돌연변이는 숙주 또는 이식된 정상 공여자로부터의 T 세포가 MHC 단백질에 결합될 때 인식할 수 있는 네오에피토프를 발생시킬 수 있고, 이들 T 세포는 최소한으로 내성화될 것이다.

[0187] 본 발명자들은 이마티닙에 대한 내성을 나타내는 환자에서 발생되는 20개의 가장 공통된 돌연변이를 고려하였고 각각의 돌연변이 주위에서 조합된 9머 펩티드 및 10머 펩티드의 결합을 예측하였다. 본 발명자들은 NetMHC(Nielsen et al., PLoS One. 2007, 2(8):e796) 또는 IEDB(Vita R et al., Nucleic Acids Res. 2010, 38:D854-62) 예측 알고리즘을 이용하여, 20개의 공통된 돌연변이로부터 유래된 84개의 펩티드와 하나 이상의 8개 공통 HLA 대립유전자의 결합(IC_{50}<1000 nM)을 예측하였고, 이때 많은 펩티드들이 3개의 가장 공통된 돌연변이로부터 유래되었다. 84개의 펩티드들 중 24개의 펩티드들이 강한 결합제인 것으로 예측되었고(IC_{50}<50 nM)(도 14), 42개의 펩티드들이 중간 결합제인 것으로 예측되었고(50 nM<IC_{50}<500 nM), 18개의 펩티드들이 약한 결합제로서 예측되었다(500 nM<IC_{50}<1000 nM).

[0188] 본 발명자들은 높은 친화성으로 HLA-A3에 결합할 것으로 예측되는, E255K(E255K-$B_{255-263}$) 돌연변이(KVYEGVWKK)(서열 번호 10)로부터 발생된 돌연변이 펩티드에 대해 관심을 집중시켰다(IC_{50}=33.1 nM). 본 발명자들은 경쟁 MHC 결합 분석(도 8a)을 이용하여, HLA-A3에 대한 E255K-B의 높은 결합 친화성(IC_{50}=17 nM)을 실험적으로 확인하였는데, 이때 돌연변이 펩티드의 HLA 결합은 모(야생형) 펩티드에 비해 약 10배 더 강하였다(도 15a). E255K-B는 다른 A3 수퍼타입 패밀리 구성원인 HLA-A*1101 및 HLA-A*68에도 결합하는 것으로 실험적으로 검증되었다. 그 다음, 본 발명자들은 1명의 정상 HLA-A3+ 공여자 및 2명의 E255K+/HLA-A3+ CML 환자로부터의 E255K-B에 대한 T 세포주로서, 모 펩티드보다 돌연변이된 펩티드에 대해 더 높은 특이성을 각각 나타내는 T 세포주를 발생시켰다(도 15b 및 15c). E255K-B에 대한 반응성을 나타내는 T 세포는 E255K 돌연변이를 둘러싼 227개의 염기쌍을 포함하는 미니유전자에 의해 형질감염된 HLA-A3+ APC에도 반응하였기 때문에 E255K-B는 내인적으로 프로세싱되어 제시되는 것으로 보인다. 마지막으로, 1명의 환자에서의 E255K 반응성은 치유 동종-HSCT 후에만 발생되었다(도 15d). 이들 연구는 백혈병에 의해 유도된 유전적 변경이 생체내에서 임상 반응과 관련된 신규 면역원성 종양 특이적 항원 표적을 제공할 수 있다는 것을 입증한다. 따라서, 돌연변이된 BCR-ABL의 면역원성 T 세포 에피토프를 확인하기 위한 본 발명자들의 방법은 생물정보학적 수단을 적용하여 돌연변이된 유전자로부터의 T 세포 에피토프를 발견하는 효과적인 방법을 나타낸다.

[0189] **실시예 6: 종양 에피토프를 인식하는 환자의 T 세포 클론은 돌연변이된 에피토프를 제시하는 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다.**

[0190] T 세포의 표적 특이성의 확인은 개별 T 세포 클론의 특징규명에 의해 가장 잘 해결된다. 따라서, 본 발명자들은 전형적으로 반응성 T 세포주의 희석을 한정한 후, 돌연변이된 펩티드로 펄싱된 자가 APC 대 생식세포계 펩티드로 펄싱된 자가 APC의 차등적 사멸을 나타내는 T 세포 클론을 표준 크롬 방출 분석을 이용하여 스크리닝함으로써 돌연변이된 펩티드 특이적 T 세포 클론을 단리한다. 본 발명자들은 각각의 펩티드에 대한 일련의 표준 희석을 이용하여 50% 사멸에 필요한 펩티드의 농도를 측정한다. 50% 사멸에 필요한 야생형 펩티드 대 돌연변이 펩티드의 비가 10배를 초과하는 경우, 본 발명자들은 돌연변이된 종양 항원에 대해 이미 관찰된 바와 같이 T 세포에 의한 이들 펩티드의 차등적 인식이 존재한다는 결론을 내린다. 본 발명자들은 CML 종양 항원인 CML66에 대해 이 절차를 수행하였다. CML66 펩티드 특이적 T 세포가 프로세싱되어 제시된 에피토프를 인식하는지를 확인하기 위해, CML66 펩티드 반응성 T 세포를 전체 CML66 단백질을 발현하도록 형질도입된 자가 APC와 함께 항온처리하였다. 본 발명자들은 (DC, CD40L 증폭된 B 세포 또는 조작된 HLA 분자를 갖는 K562 세포에서) 플라스미드 DNA 또는 시험관내 전사된 RNA를 핵감염시킴으로써 CML66을 발현시켰다. 도 12a에 나타낸 바와 같이, 자극된 T 세포는 HLA-B4403에 결합된 CML66 유래의 펩티드 에피토프(펩티드 66-72C)에 대한 특이성을 나타내었다. CD40L 증폭된 B 세포가 CML66 mRNA에 의해 핵감염되었을 때 전체 CML66 단백질이 효율적으로 발현되었기 때문에(도 12b), 본 발명자들은 이들 세포(또는 펩티드로 펄싱된 세포)를 표준 크롬 방출 분석에서 표적으로서 사용할 수 있었고 T 세포가 이들 표적 세포를 효과적으로 용해시켰다는 것을 발견하였다(도 12c). 환자 매칭된 종양 세포의 용해를 포함하는 필적할만한 분석을 각각의 암 환자로부터 발생된, 돌연변이된 펩티드 특이적 T 세포주 각각(예를 들면, 실시예 6 및 7에 기재된 T 세포를 사용함)에 대해 수행한다.

[0191] **실시예 7: 잠재적 종양 항원으로서 돌연변이된 종양 유발자**

[0192] 본 발명자들은 64명의 환자들 전체에 걸쳐 존재하는 1188개의 비침묵 돌연변이들 중에서 SF3B1(CLL 환자의 16%), TP53(12.5%), MYD88(9%), ATM(9%), FBXW7(6%), MAPK1(5%), GNB1(3%) 및 M6PR(3%)을 포함하는 8개의 재발성 돌연변이를 확인하였다(도 11). 이들 돌연변이(특히 가장 빈번한 돌연변이: SF3B1, TP53, MYD88 및 ATM)는 종양 발생 또는 진행에 필수적인 발암 돌연변이인 것으로 예측된다. 이들 발암 유전자는 백신에 포함될 것으로 기대되는 종양 특이적 항원을 대표한다.

[0193] SF3B1은 CLL에서 가장 빈번하게 돌연변이된 유전자이고 보존된 부위에서 돌연변이되고 CLL 환자에서 고도로 발현되고(도 12) 종래에 기재되지 않았다. 가장 공통된 SF3B1 돌연변이는 K700E(SF3B1 돌연변이의 40%)이었고, 추가 89명의 독립적인 CLL 환자들의 유전형분석은 이 돌연변이를 보유하는 6개의 추가 환자 종양을 포함하지 못하였다. 본 발명자들은 펩티드-HLA 결합 알고리즘을 SF3B1 돌연변이에 적용함으로써 돌연변이된 펩티드와 가장 공통된 HLA-A2 대립유전자의 결합을 예측하였다(도 13). CLL에서 가장 공통된 돌연변이(SF3B1 K700E)를 보유하는 펩티드가 가장 공통된 클래스 I HLA 대립유전자(HLA-A2)에 결합하는 경우, 이 펩티드는 많은 CLL 환자를 위한 CLL 백신에 포함될 훌륭한 후보물질이다.

참고문헌

Albert, T. J., Molla, M. N., Muzny, D. M., Nazareth, L., Wheeler, D., Song, X., Richmond, T. A., Middle, C. M., Rodesch, M. J., Packard, C. J., et al. (2007). Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. Nat Methods 4, 903-905.

Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Canning, C., Neuberg, D., Schlossman, R., Pickett, C., Collins, H., Wang, Y., Anderson, K. C., and Ritz, J. (1998). Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. Blood 91, 3671-3680.

Annunziata, C. M., Davis, R. E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., et al. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. Cancer Cell 12, 115-130.

Attia, P., Phan, G. Q., Maker, A. V., Robinson, M. R., Quezado, M. M., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., et al. (2005). Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. J Clin Oncol 23, 6043-6053.

Austen, B., Powell, J. E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A. M., Fegan, C., Moss, P., and Stankovic, T. (2005). Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. Blood 106, 3175-3182.

Balakrishnan, A., Bleeker, F. E., Lamba, S., Rodolfo, M., Daniotti, M., Scarpa, A., van Tilborg, A. A., Leenstra, S., Zanon, C., and Bardelli, A. (2007). Novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. Cancer Res 67, 3545-3550.

Baskar, S., Kobrin, C. B., and Kwak, L. W. (2004). Autologous lymphoma vaccines induce human T cell responses against multiple, unique epitopes. J Clin Invest 113, 1498-1510.

Baurain, J. F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T., and Coulie, P. G. (2000). High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. J Immunol 164, 6057-6066.

[0194]

Beck, K. E., Blansfield, J. A., Tran, K. Q., Feldman, A. L., Hughes, M. S., Royal, R. E., Kammula, U. S., Topalian, S. L., Sherry, R. M., Kleiner, D., et al. (2006). Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. J Clin Oncol 24, 2283-2289.

Bellucci, R., Wu, C. J., Chiaretti, S., Weller, E., Davies, F. E., Alyea, E. P., Dranoff, G., Anderson, K. C., Munshi, N. C., and Ritz, J. (2004). Complete response to donor lymphocyte infusion in multiple myeloma is associated with antibody responses to highly expressed antigens. Blood 103, 656-663.

Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. Annu Rev Immunol 24, 175-208.

Brandle, D., Brasseur, F., Weynants, P., Boon, T., and Van den Eynde, B. (1996). A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. J Exp Med 183, 2501-2508.

Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., et al. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. Nature 448, 439-444.

Chiari, R., Foury, F., De Plaen, E., Baurain, J. F., Thonnard, J., and Coulie, P. G. (1999). Two antigens recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a melanoma result from a single point mutation in an essential housekeeping gene. Cancer Res 59, 5785-5792.

De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J. P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T. (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 2274-2278.

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., et al. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 298, 850-854.

Estep, A. L., Palmer, C., McCormick, F., and Rauen, K. A. (2007). Mutation Analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 Ovarian Cancer Cell Lines: Implications for Therapy. PLoS ONE 2, e1279.

[0195]

Garcia-Marco, J. A., Caldas, C., Price, C. M., Wiedemann, L. M., Ashworth, A., and Catovsky, D. (1996). Frequent somatic deletion of the 13q12.3 locus encompassing BRCA2 in chronic lymphocytic leukemia. Blood 88, 1568-1575.

Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. Immunity 11, 263-270.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature 446, 153- 158.

Gueguen, M., Patard, J. J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renauld, J. C., Van Cangh, P. J., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (1998). An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. J Immunol 160, 6188-6194.

Herman, J., Jongeneel, V., Kuznetsov, D., and Coulie, P. G. (1999). Differences in the recognition by CTL of peptides presented by the HLA-B*4402 and the HLA-B*4403 molecules which differ by a single amino acid. Tissue Antigens 53, 111-121.

Hocker, T., and Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. Hum Mutat 28, 578-588.

Hodi, F. S., Butler, M., Oble, D. A., Seiden, M. V., Haluska, F. G., Kruse, A., Macrae, S., Nelson, M., Canning, C., Lowy, I., et al. (2008). Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 3005- 3010.

Hodi, F. S., Mihm, M. C., Soiffer, R. J., Haluska, F. G., Butler, M., Seiden, M. V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., et al. (2003). Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 4712-4717.

Huang, J., El-Gamil, M., Dudley, M. E., Li, Y. F., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F. (2004). T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. J Immunol 172, 6057-6064.

Jocham, D., Richter, A., Hoffmann, L., Iwig, K., Fahlenkamp, D., Zakrzewski, G., Schmitt, E., Dannenberg, T., Lehmacher, W., von Wietersheim, J., and Doehn, C. (2004). Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. Lancet 363, 594-599.

Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., and Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. Nat Med 13, 552-559.

[0196]

Keats, J. J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W. J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C. X., Sebag, M., et al. (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. Cancer Cell 12, 131-144.

Ladetto, M., Omede, P., Sametti, S., Donovan, J. W., Astolfi, M., Drandi, D., Volpato, F., Giaccone, L., Giaretta, F., Palumbo, A., et al. (2002). Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. Exp Hematol 30, 529-536.

Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R. A., Lifke, A., Ferel, D., Wolfel, C., Huber, C., and Wolfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 16013-16018.

Lin, H. H., Ray, S., Tongchusak, S., Reinherz, E., and Brusic, V. (2008). Evaulation of MHC class I peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. BMC Bioinformatics (in press).

Maker, A. V., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., Hughes, M., Yellin, M. J., Haworth, L. R., Levy, C., et al. (2006). Intrapatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. J Immunother (1997) 29, 455-463.

Mandelboim, O., Vadai, E., Fridkin, M., Katz-Hillel, A., Feldman, M., Berke, G., and Eisenbach, L. (1995). Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. Nat Med 1, 1179-1183.

Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., and van der Bruggen, P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. J Exp Med 186, 785-793.

Marijt, W. A., Heemskerk, M. H., Kloosterboer, F. M., Goulmy, E., Kester, M. G., van der Hoorn, M. A., van Luxemburg-Heys, S. A., Hoogeboom, M., Mutis, T., Drijfhout, J. W., et al. (2003). Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 2742-2747.

Marina O, Hainz U, Biernacki MA, et al. (2010) Serologic markers of effective tumor immunity against chronic lymphocytic leukemia include nonmutated B-cell antigens. Cancer Res. 70, 1344-1355.

Mullally, A., and Ritz, J. (2007). Beyond HLA: the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood 109, 1355-1362.

[0197]

Ofran, Y., Brusic, V., Soiffer, R., Antin, J. H., and Ritz, J. (2008). Identification of human minor histocompatibility antigens (mHa) by combining bioinformatic prediction of peptide epitopes with validation of T cell reactivity in patient blood samples after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Bone Marrow Transplant 14, 1.

Parmiani, G., De Filippo, A., Novellino, L., and Castelli, C. (2007). Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. J Immunol 178, 1975-1979.

Pasmant, E., Laurendeau, I., Heron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., and Bieche, I. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family;identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. Cancer Res 67, 3963-3969.

Peters, B., Sidney, J., Bourne, P., Bui, H. H., Buus, S., Doh, G., Fleri, W., Kronenberg, M., Kubo, R., Lund, O., et al. (2005). The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. PLoS Biol 3, e91.

Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., et al. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 8372-8377.

Provan, D., Bartlett-Pandite, L., Zwicky, C., Neuberg, D., Maddocks, A., Corradini, P., Soiffer, R., Ritz, J., Nadler, L. M., and Gribben, J. G. (1996). Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. Blood 88, 2228-2235.

Reifenberger, J., Knobbe, C. B., Sterzinger, A. A., Blaschke, B., Schulte, K. W., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2004). Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. Int J Cancer 109, 377-384.

Ribas, A., Camacho, L. H., Lopez-Berestein, G., Pavlov, D., Bulanhagui, C. A., Millham, R., Comin-Anduix, B., Reuben, J. M., Seja, E., Parker, C. A., et al. (2005). Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. J Clin Oncol 23, 8968-8977.

Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. J Exp Med 183, 1185-1192.

[0198]

Rondon, G., Giralt, S., Huh, Y., Khouri, I., Andersson, B., Andreeff, M., and Champlin, R. (1996). Graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. Bone Marrow Transplant 18, 669-672.

Rosenberg, S. A., Yang, J. C., and Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat Med 10, 909-915.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. Science 275, 1790-1792.

Sanderson, K., Scotland, R., Lee, P., Liu, D., Groshen, S., Snively, J., Sian, S., Nichol, G., Davis, T., Keler, T., et al. (2005). Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. J Clin Oncol 23, 741-750.

Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., et al. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 18538- 18543.

Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G. A., Dohner, H., and Lichter, P. (1999). Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 94, 748-753.

Segal, N. H., Parsons, D. W., Peggs, K. S., Velculescu, V., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Allison, J. P. (2008). Epitope landscape in breast and colorectal cancer. Cancer Res 68, 889-892.

Sensi, M., and Anichini, A. (2006). Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy. Clin Cancer Res 12, 5023-5032.

Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., et al. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science 314, 268-274.

Soiffer, R., Hodi, F. S., Haluska, F., Jung, K., Gillessen, S., Singer, S., Tanabe, K., Duda, R., Mentzer, S., Jaklitsch, M., et al. (2003). Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol 21, 3343-3350.

[0199]

Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., et al. (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 13141-13146.

Srivastava, P. K. (2006). Therapeutic cancer vaccines. Curr Opin Immunol 18, 201-205.

Stankovic, T., Hubank, M., Cronin, D., Stewart, G. S., Fletcher, D., Bignell, C. R., Alvi, A. J., Austen, B., Weston, V. J., Fegan, C., et al. (2004). Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. Blood 103, 291-300.

Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. Cancer Res 63, 2127-2133.

Thomas, R. K., Baker, A. C., Debiasi, R. M., Winckler, W., Laframboise, T., Lin, W. M., Wang, M., Feng, W., Zander, T., MacConaill, L., et al. (2007). High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. Nat Genet 39, 347-351.

Thompson, A. A., Talley, J. A., Do, H. N., Kagan, H. L., Kunkel, L., Berenson, J., Cooper, M. D., Saxon, A., and Wall, R. (1997). Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia. Blood 90, 1387-1394.

Thornton, P. D., Gruszka-Westwood, A. M., Hamoudi, R. A., Atkinson, S., Kaczmarek, P., Morilla, R. M., Hilditch, B. L., A'Hern, R., Matutes, E., and Catovsky, D. (2004). Characterisation of TP53 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. Hematol J 5, 47-54.

Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C. B., Okada, C. Y., et al. (2002). Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. Blood 99, 1517-1526.

Toze, C. L., Galal, A., Barnett, M. J., Shepherd, J. D., Conneally, E. A., Hogge, D. E., Nantel, S. H., Nevill, T. J., Sutherland, H. J., Connors, J. M., et al. (2005). Myeloablative allografting for chronic lymphocytic leukemia: evidence for a potent graft-versus-leukemia effect associated with graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant 36, 825-830.

[0200]

Ueda, M., Toji, E., and Noda, S. (2007). Germ line and somatic mutations of BRAF V599E in ovarian carcinoma. Int J Gynecol Cancer 17, 794-797.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254, 1643-1647.

Van Pel, A., Georlette, M., and Boon, T. (1979). Tumor cell variants obtained by mutagenesis of a Lewis lung carcinoma cell line: immune rejection by syngeneic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 76, 5282-5285.

Van Trappen, P. O., Cullup, T., Troke, R., Swann, D., Shepherd, J. H., Jacobs, I. J., Gayther, S. A., and Mein, C. A. (2007). Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer. Gynecol Oncol 104, 129-133.

Willmore-Payne, C., Holden, J. A., Tripp, S., and Layfield, L. J. (2005). Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. Hum Pathol 36, 486-493.

Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. Science 269, 1281-1284.

Wu, C. J., Biernacki, M., Kutok, J. L., Rogers, S., Chen, L., Yang, X. F., Soiffer, R. J., and Ritz, J. (2005). Graft-versus-leukemia target antigens in chronic myelogenous leukemia are expressed on myeloid progenitor cells. Clin Cancer Res 11, 4504-4511.

Wu, C. J., Chillemi, A., Alyea, E. P., Orsini, E., Neuberg, D., Soiffer, R. J., and Ritz, J. (2000a). Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. Blood 95, 352-359.

Wu, C. J., and Ritz, J. (2006). Induction of tumor immunity following allogeneic stem cell transplantation. Adv Immunol 90, 133-173.

Wu, C. J., Yang, X. F., McLaughlin, S., Neuberg, D., Canning, C., Stein, B., Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Dranoff, G., and Ritz, J. (2000b). Detection of a potent humoral response associated with immune-induced remission of chronic myelogenous leukemia. J Clin Invest 106, 705-714.

Wu, R., Hendrix-Lucas, N., Kuick, R., Zhai, Y., Schwartz, D. R., Akyol, A., Hanash, S., Misek, D. E., Katabuchi, H., Williams, B. O., et al. (2007). Mouse model of human ovarian

[0201]

endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. Cancer Cell 11, 321-333.

Yang, X. F., Wu, C. J., McLaughlin, S., Chillemi, A., Wang, K. S., Canning, C., Alyea, E. P., Kantoff, P., Soiffer, R. J., Dranoff, G., and Ritz, J. (2001). CML66, a broadly immunogenic tumor antigen, elicits a humoral immune response associated with remission of chronic myelogenous leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 7492-7497.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., et al. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. N Engl J Med 348, 203-213.

Zhang W, Choi J, Zeng W, et al. (2010) Graft-versus-Leukemia Antigen CML66 Elicits Coordinated B-Cell and T-Cell Immunity after Donor Lymphocyte Infusion. Clin Cancer Res. 16, 2729-2739.

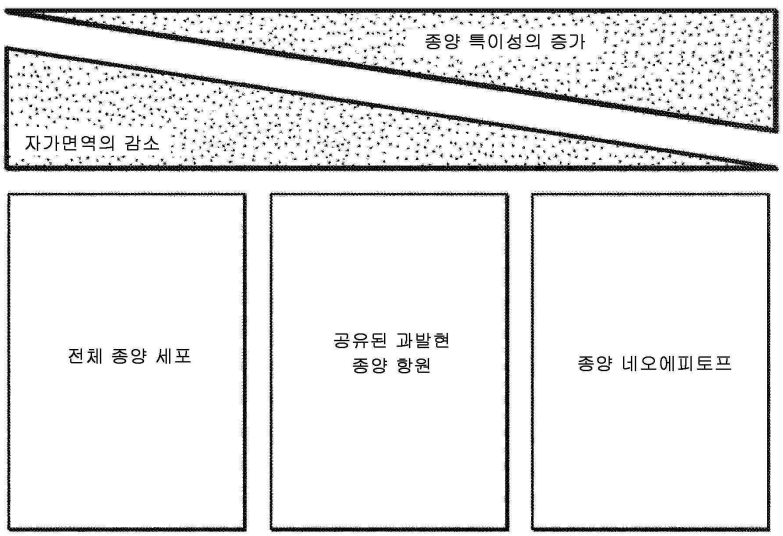
Zhou, J., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F. (2005a). Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy. J Immunother (1997) 28, 53-62.

Zhou, X., Jun, D. Y., Thomas, A. M., Huang, X., Huang, L. Q., Mautner, J., Mo, W., Robbins, P. F., Pardoll, D. M., and Jaffee, E. M. (2005b). Diverse CD8+ T-cell responses to renal cell carcinoma antigens in patients treated with an autologous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transduced renal tumor cell vaccine. Cancer Res 65, 1079-1088.

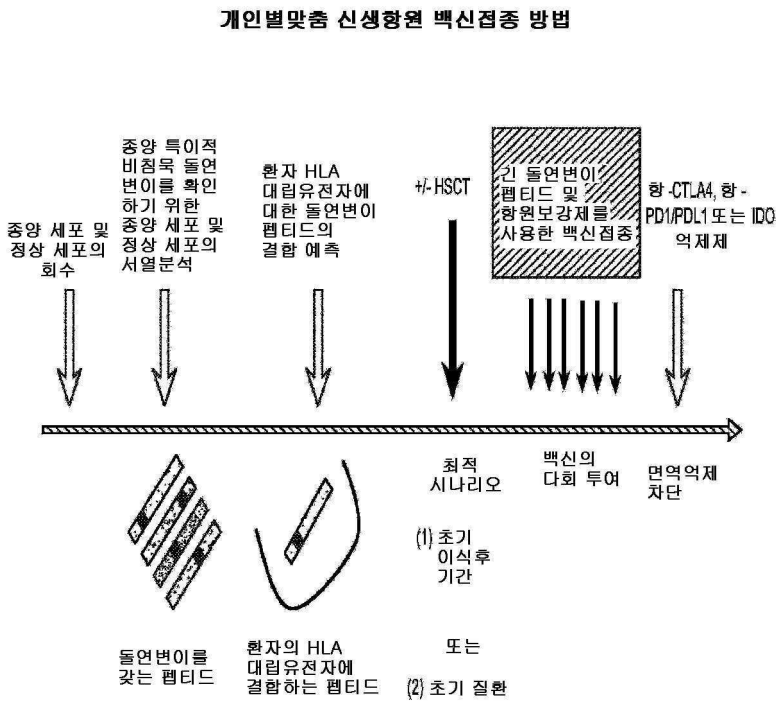
[0202]

도면

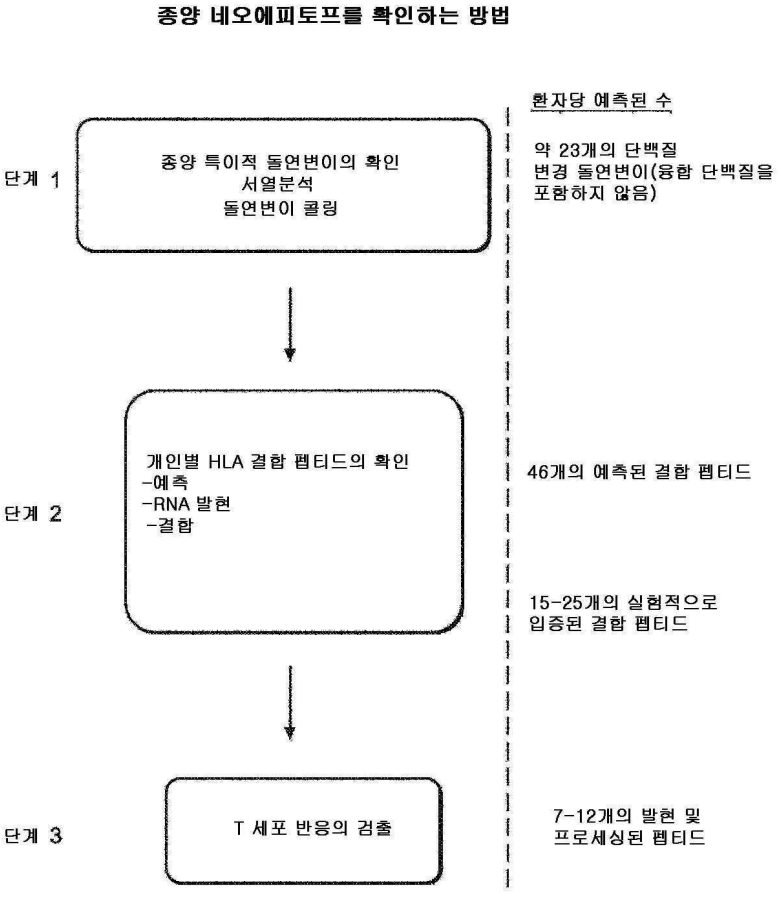
도면1



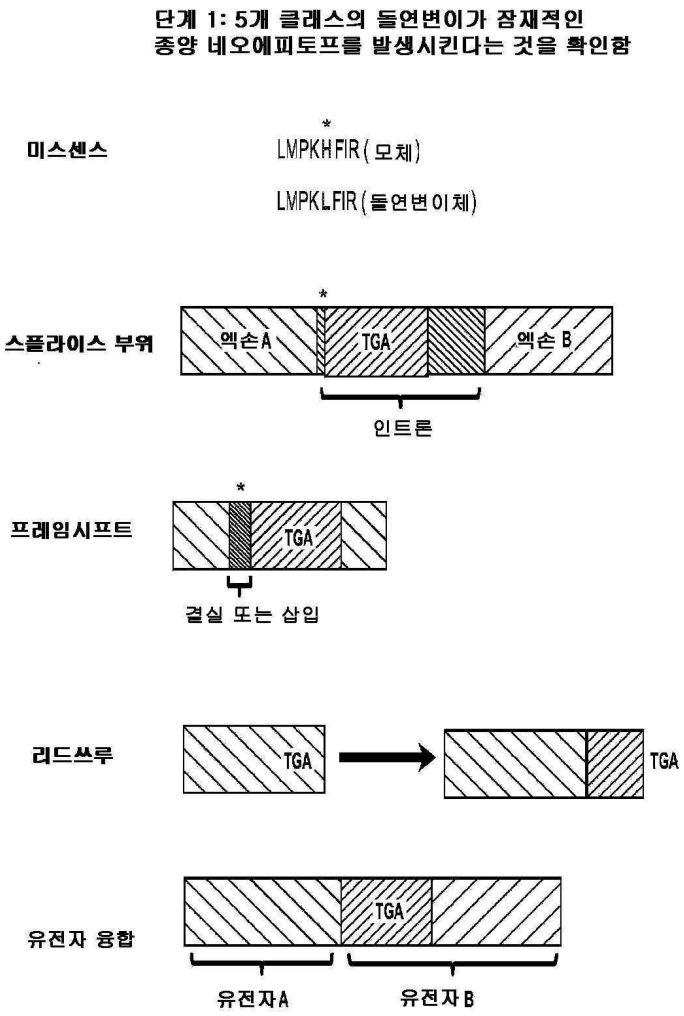
도면2


개인별맞춤 신생항원 백신접종 방법
종양 세포 및 정상 세포의 회수
종양 특이적 비침묵 돌연변이를 확인하기 위한 종양 세포 및 정상 세포의 서열분석
환자 HLA 대립유전자에 대한 돌연변이 펩티드의 결합 예측
+/- HSCT
긴 돌연변이 펩티드 및 항원보강제를 사용한 백신접종
항-CTLA4, 항-PD1/PDL1 또는 IDO 억제제
최적 시나리오
(1) 초기 이식후 기간
또는
(2) 초기 질환
백신의 다회 투여
면역억제 차단
돌연변이를 갖는 펩티드
환자의 HLA 대립유전자에 결합하는 펩티드

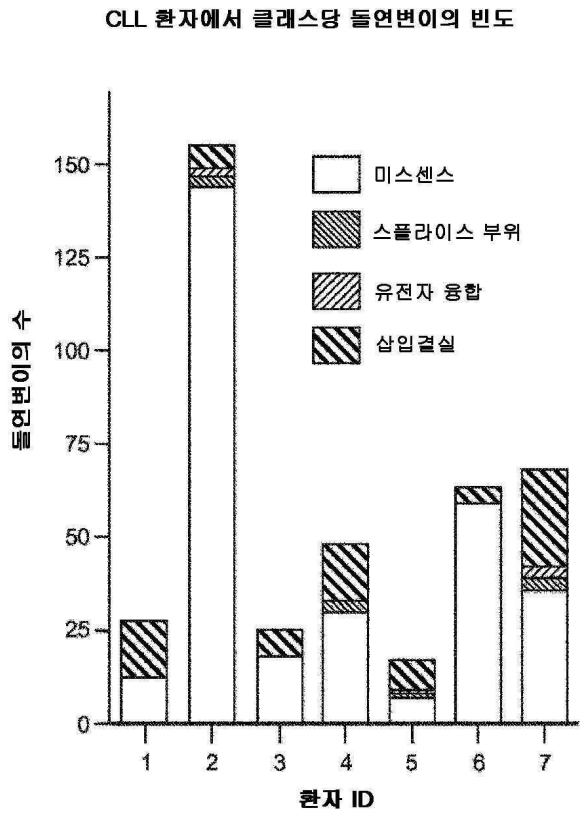
도면3


종양 네오에피토프를 확인하는 방법
환자당 예측된 수
단계 1
종양 특이적 돌연변이의 확인
서열분석
돌연변이 콜링
약 23개의 단백질 변경 돌연변이(융합 단백질을 포함하지 않음)
단계 2
개인별 HLA 결합 펩티드의 확인
-예측
-RNA 발현
-결합
46개의 예측된 결합 펩티드
15-25개의 실험적으로 입증된 결합 펩티드
단계 3
T 세포 반응의 검출
7-12개의 발현 및 프로세싱된 펩티드

도면4


단계 1: 5개 클래스의 돌연변이가 잠재적인
종양 네오에피토프를 발생시킨다는 것을 확인함
미스센스
LMPKHFIR(모체)
LMPKLFIR(돌연변이체)
스플라이스 부위
엑손A
TGA
엑손B
인트론
프레임시프트
TGA
결실 또는 삽입
리드쓰루
TGA
TGA
유전자 융합
TGA
유전자A
유전자B

도면5


CLL 환자에서 클래스당 돌연변이의 빈도
돌연변이의 수
150
125
100
75
50
25
0
1
2
3
4
5
6
7
환자 ID
미스센스
스플라이스 부위
유전자 융합
삽입결실

도면9

단계 2A: 환자의 HLA 대립유전자 각각에 대한 자동화된 펩티드 예측

강한 결합 친화성 IC_{50}<50nm

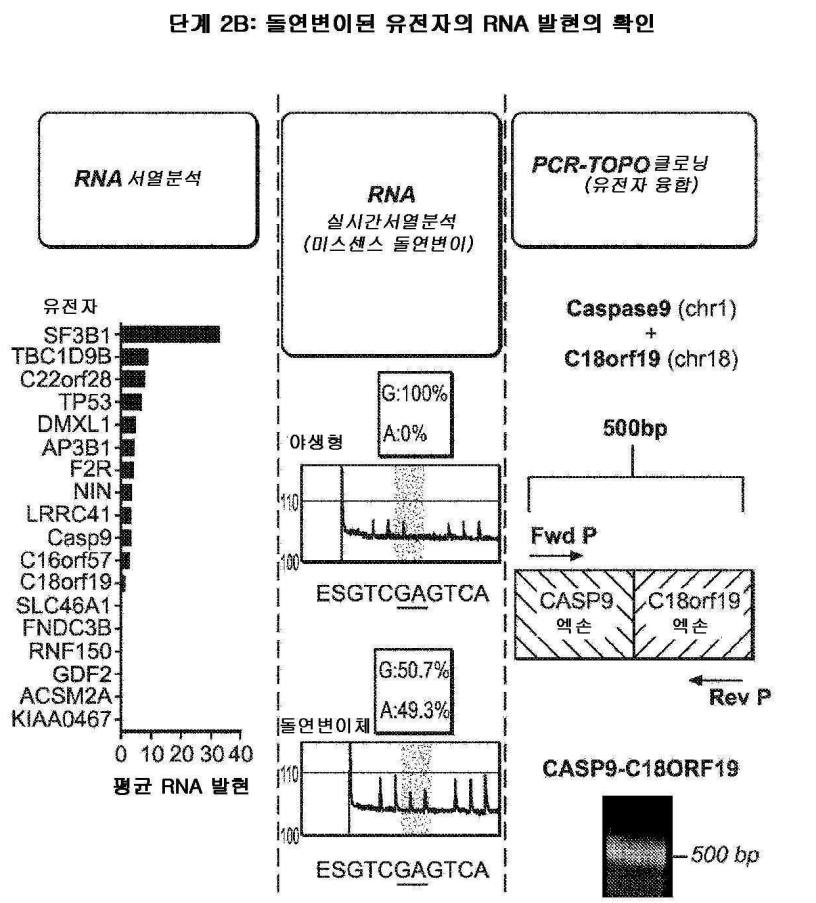
중간 결합 IC_{50}<500nm

비돌연변이된 ASILLMTVI

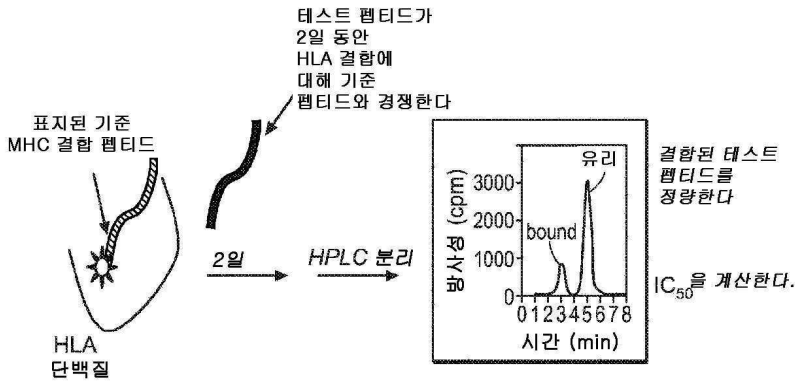
돌연변이된 ASILLMTVT

위치	F2R/NM_001992 T@196	HLA-A*0101	HLA-A*0201	HLA-B*0702	HLA-B*0801	HLA-C*0701	HLA-C*0702
188-196	ASILLMTVT	23671.85	19359.42	29705.82	33914.47	30813.86	29921.85
189-197	SILLMTVTS	33864.61	8502.78	32065.73	14437.61	35076.88	31257.98
190-198	ILLMTVTSI	28921.10	41.91	11185.03	921.87	18346.73	13844.36
191-199	LLMTVTSID	32446.28	6105.16	31413.94	19157.37	42419.53	41446.55
192-200	LMTVTSIDR	30402.31	33262.16	41747.34	39837.33	37470.89	35512.98
193-201	MTVTSIDRF	5066.20	17874.71	16830.38	27827.56	7827.33	6665.52
194-202	TVTSIDRFL	25673.87	10165.34	17459.35	29667.50	19864.06	20854.32
195-203	VTSIDRFLA	4397.21	7438.75	27799.40	34937.23	34058.25	28879.51
196-204	TSIDRFLAV	5703.43	527.45	9124.17	245.43	11255.57	9553.74

도면7


단계 2B: 돌연변이된 유전자의 RNA 발현의 확인
RNA 서열분석
RNA
실시간서열분석
(미스센스 돌연변이)
PCR-TOPO 클로닝
(유전자 융합)
유전자
SF3B1
TBC1D9B
C22orf28
TP53
DMXL1
AP3B1
F2R
NIN
LRRC41
Casp9
C16orf57
C18orf19
SLC46A1
FNDC3B
RNF150
GDF2
ACSM2A
KIAA0467
0 10 20 30 40
평균 RNA 발현
야생형
G:100%
A:0%
ESGTCGAGTCA
돌연변이체
G:50.7%
A:49.3%
ESGTCGAGTCA
Caspase9 (chr1)
+
C18orf19 (chr18)
500bp
Fwd P
CASP9
엑손
C18orf19
엑손
Rev P
CASP9-C18ORF19
500 bp

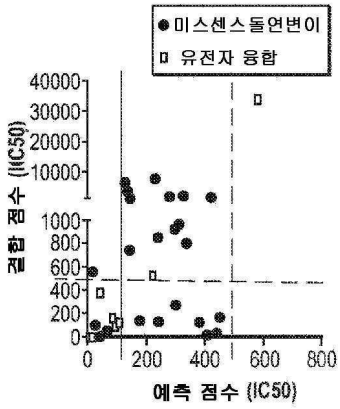
도면8a


단계 2C: HLA-펩티드 결합의 실험적 입증
테스트 펩티드가
2일 동안
HLA 결합에
대해 기준
펩티드와 경쟁한다
표지된 기준
MHC 결합 펩티드
HLA
단백질
2일
HPLC 분리
유리
bound
방사성 (cpm)
3000
2000
1000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
시간 (min)
결합된 테스트
펩티드를
정량한다
IC50을 계산한다.

도면8b

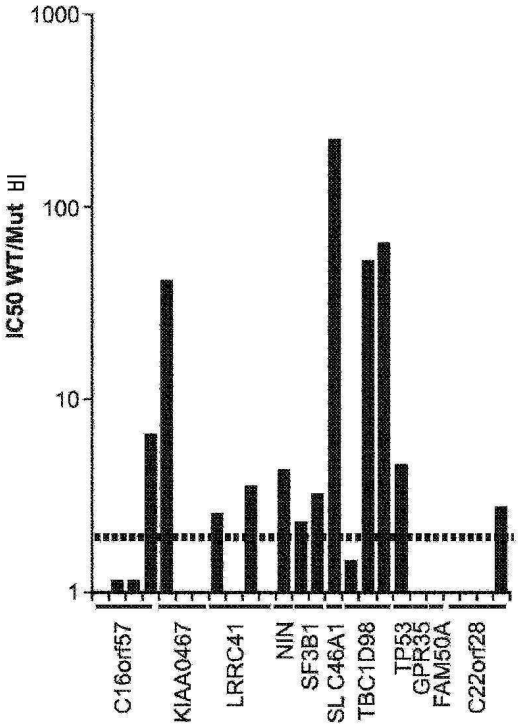
Pt	유전적 변경의 클래스	돌연변이된 유전자 수	HLA 결합 펩티드를 발생시킬 것으로 예측된 돌연변이된 유전자 수	예측된 펩티드 수	실험적으로 확인된 펩티드/테스트된 총 펩티드
1	미스센스	12	10	30	8/17 (47%)
	스플라이스 부위	0	0	0	0
	삽입결실	16	0	0	0
	유전자 융합				
2	미스센스	144	53	116	18/29 (46%)
	스플라이스 부위	3	0	0	0
	삽입결실	6	1	11	
	유전자 융합	2	2	10	7/10 (70%)

도면8c



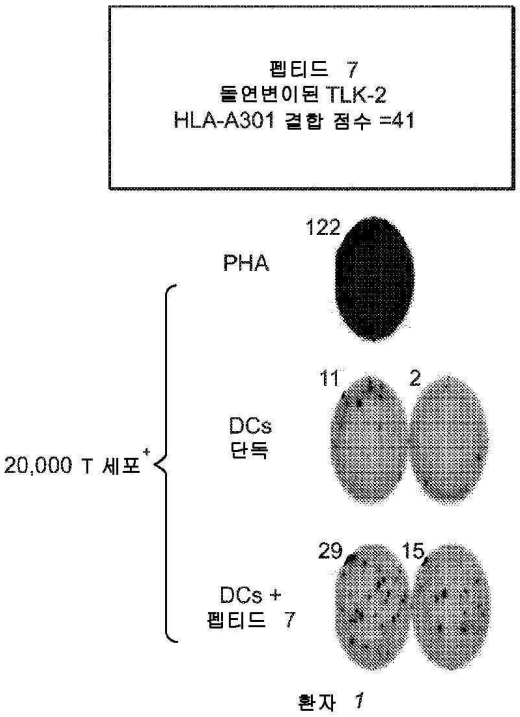
도면9

HLA 대립유전자에의 결합에 대한 돌연변이된
펩티드 대 생식세포계 펩티드의 예측된 결합 차이

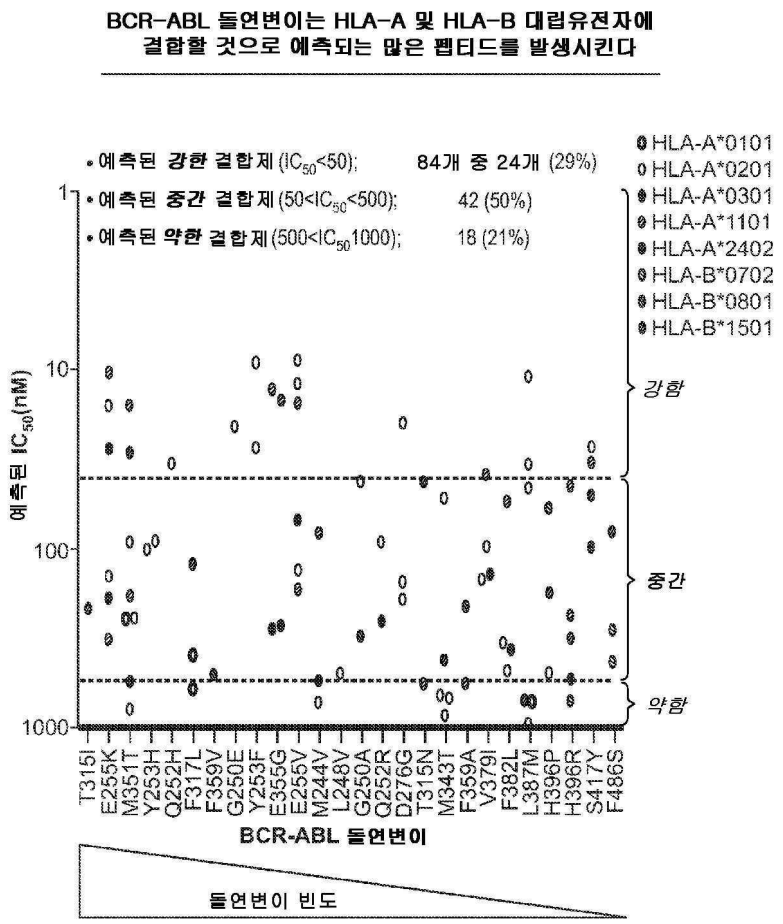


도면10

단계 3: 후보 개인별 CLL 네오에피토프에 대한 T 세포 반응성



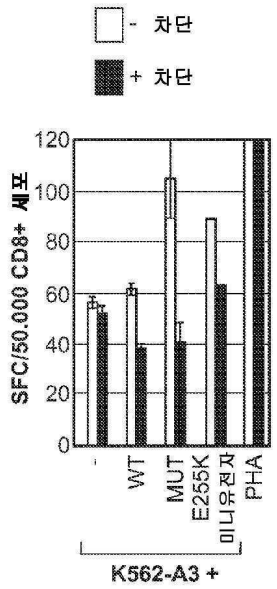
도면11



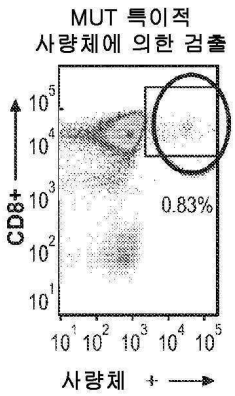
도면12a

펩티드	서열	HLA A03 수퍼타입 결합능 (IC50 nM)					
		*A*0301*	*A*1101*	*A*3001*	*A*3101*	*A*3301*	*A*6801*
E255K-모체	EVYEGVWKK	1074	63	·	·	60	10
E255K-B	KVYEGVWKK	17	39	603	202	42860	45

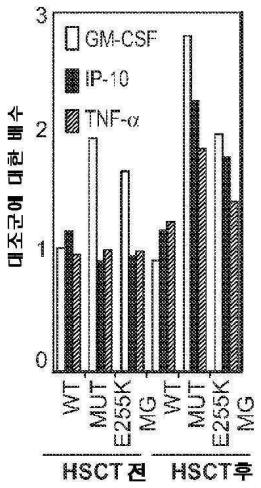
도면12b



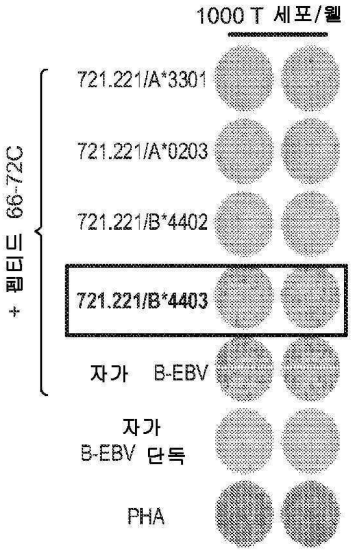
도면12c



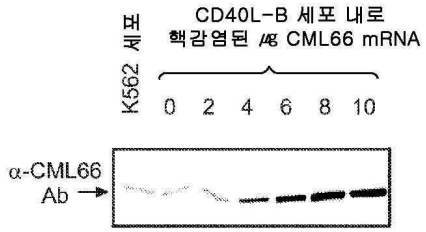
도면12d



도면13a



도면13b



도면13c

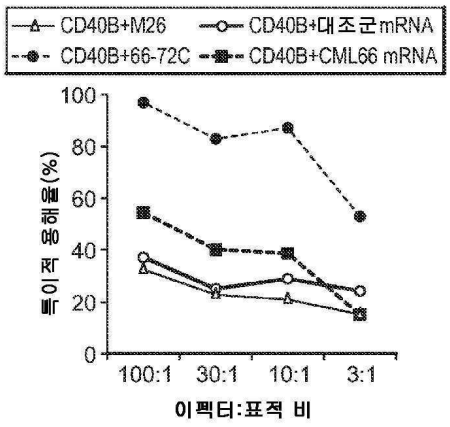
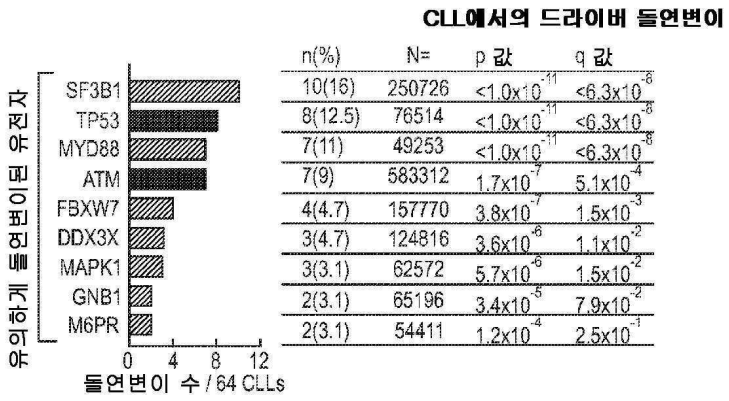


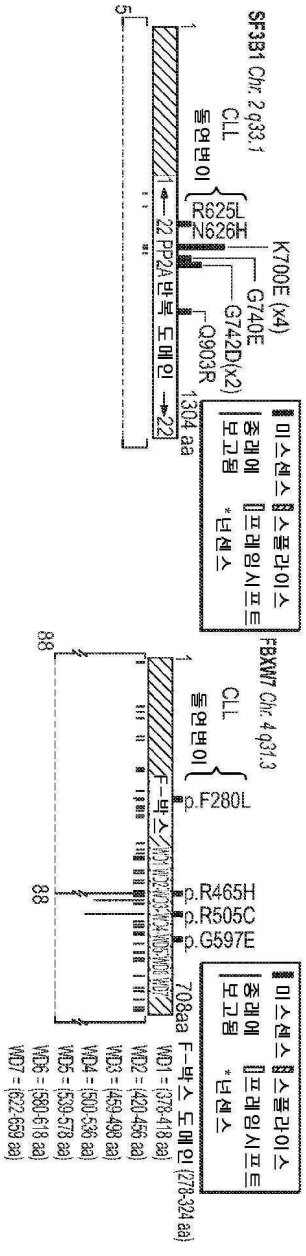
FIG. 13C

도면14a

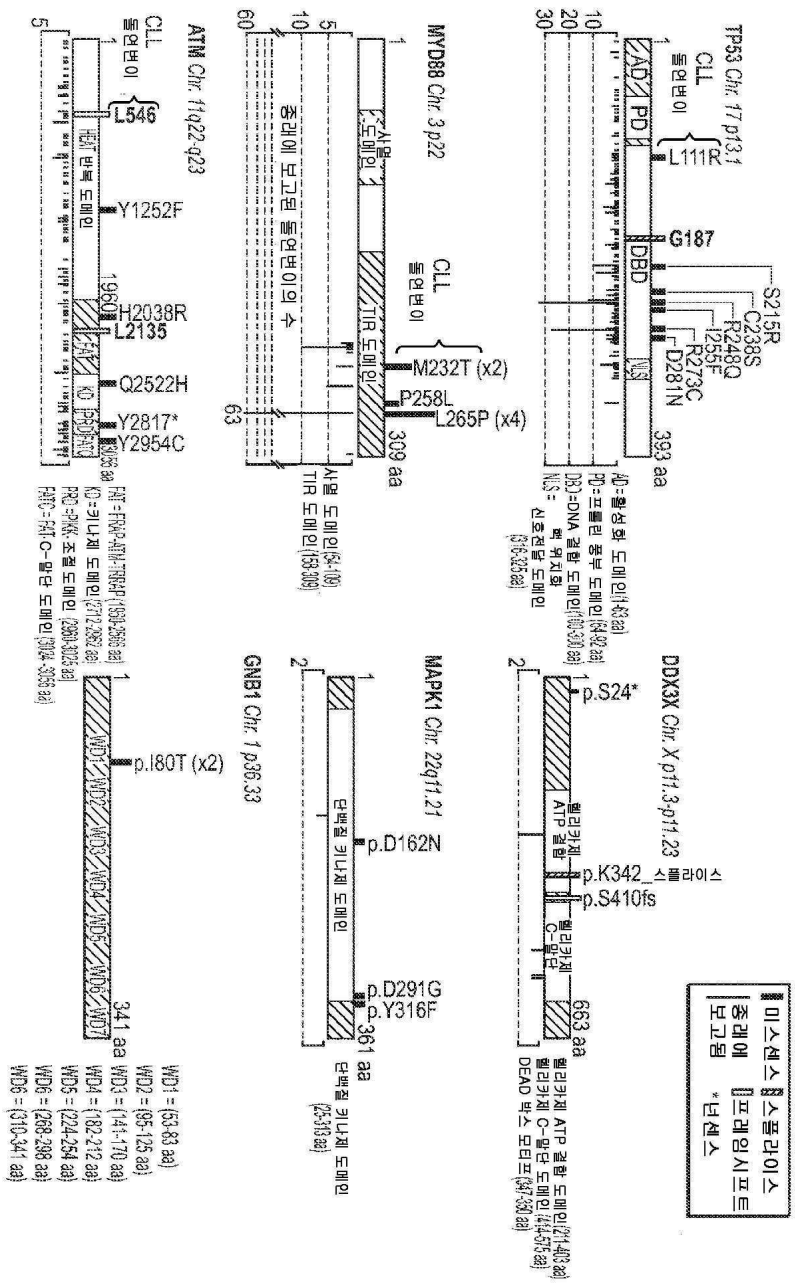


n(%)	N=	p 값	q 값
10(16)	250726	$<1.0\times10^{-11}$	$<6.3\times10^{-8}$
8(12.5)	76514	$<1.0\times10^{-11}$	$<6.3\times10^{-8}$
7(11)	49253	$<1.0\times10^{-11}$	$<6.3\times10^{-8}$
7(9)	583312	1.7×10^{-7}	5.1×10^{-4}
4(4.7)	157770	3.8×10^{-7}	1.5×10^{-3}
3(4.7)	124816	3.6×10^{-6}	1.1×10^{-2}
3(3.1)	62572	5.7×10^{-6}	1.5×10^{-2}
2(3.1)	65196	3.4×10^{-5}	7.9×10^{-2}
2(3.1)	54411	1.2×10^{-4}	2.5×10^{-1}

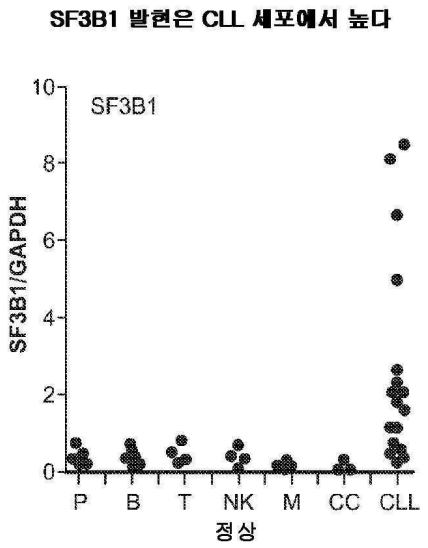
도면14b



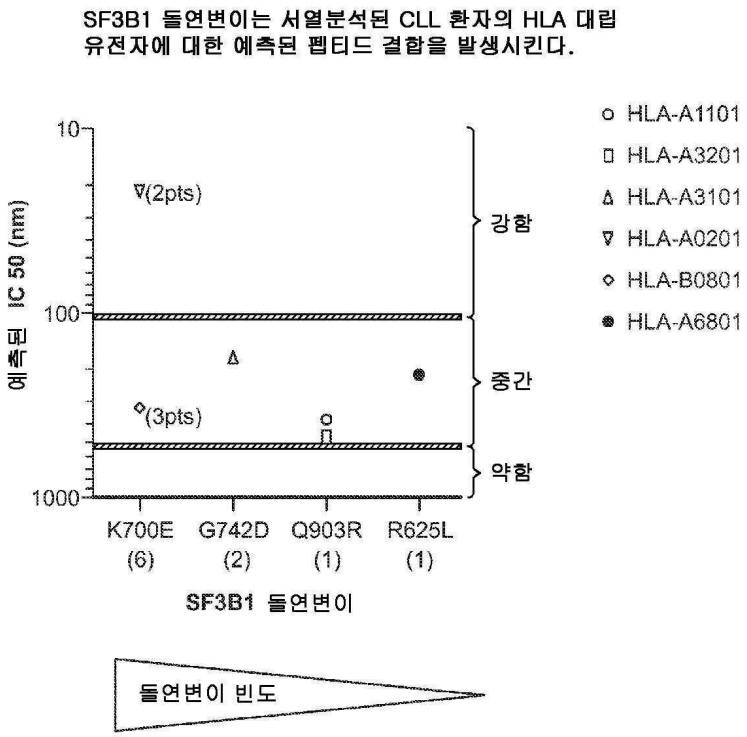
도면14c


TP53 Chr. 17 p13.1
CLL 돌연변이
AD
PD
DBD
NLS
L111R
G187
S215R
C238S
R248Q
I255F
R273C
D281N
393 aa
AD=활성화 도메인(1-43 aa)
PD=프롤린 풍부 도메인(64-92 aa)
DBD=DNA 결합 도메인(100-300 aa)
NLS= 핵 위치화 신호전달 도메인 (316-325 aa)
MYD88 Chr. 3 p22
사멸 도메인
TIR 도메인
CLL 돌연변이
M232T (x2)
P258L
L265P (x4)
309 aa
사멸 도메인(54-109)
TIR 도메인(158-309)
ATM Chr. 11q22-q23
CLL 돌연변이
L546
HEAT 반복 도메인
Y1252F
1960
H2038R
L2135
FAT
KD
PRD
FATC
Q2522H
Y2817*
Y2954C
FAT=FRAP-ATM-TRRAP(1950-2566 aa)
KD=키나제 도메인(2712-2962 aa)
PRD=PRK 조절 도메인 (2960-3025 aa)
FATC=FAT-C-말단 도메인(3024-3056 aa)
DDX3X Chr. X p11.3-p11.23
p.S24*
헬리카제 ATP 결합
p.K342_스플라이스
p.S410fs
헬리카제 C-말단
663 aa
헬리카제 ATP 결합 도메인(211-403 aa)
헬리카제 C-말단 도메인(414-575 aa)
DEAD 박스 모티프(347-350 aa)
MAPK1 Chr. 22q11.21
단백질 키나제 도메인
p.D162N
p.D291G
p.Y316F
361 aa
단백질 키나제 도메인 (25-313 aa)
GNB1 Chr. 1 p36.33
p.I80T (x2)
WD1
WD2
WD3
WD4
WD5
WD6
WD7
341 aa
WD1 = (53-83 aa)
WD2 = (95-125 aa)
WD3 = (141-170 aa)
WD4 = (182-212 aa)
WD5 = (224-254 aa)
WD6 = (268-298 aa)
WD6 = (310-341 aa)
미스센스
스플라이스
종래에 보고됨
프레임시프트
*넌센스

도면15



도면16



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The General Hospital Corporation

Dana-Farber Cancer Institute,Inc.

<120> Compositions and Methods of Identifying Tumor Specific Neoantigens

<130> 39564-502001WO

<140> PCT/US2011/036665

<141> 2011-05-16

<150> 61/334866

<151> 2010-05-14

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1304

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Lys Ile Ala Lys Thr His Glu Asp Ile Glu Ala Gln Ile Arg
1 5 10 15

Glu Ile Gln Gly Lys Lys Ala Ala Leu Asp Glu Ala Gln Gly Val Gly
20 25 30

Leu Asp Ser Thr Gly Tyr Tyr Asp Gln Glu Ile Tyr Gly Gly Ser Asp
35 40 45

Ser Arg Phe Ala Gly Tyr Val Thr Ser Ile Ala Ala Thr Glu Leu Glu
50 55 60

Asp Asp Asp Asp Asp Tyr Ser Ser Ser Thr Ser Leu Leu Gly Gln Lys
65 70 75 80

Lys Pro Gly Tyr His Ala Pro Val Ala Leu Leu Asn Asp Ile Pro Gln
85 90 95

Ser Thr Glu Gln Tyr Asp Pro Phe Ala Glu His Arg Pro Pro Lys Ile
100 105 110

Ala Asp Arg Glu Asp Glu Tyr Lys Lys His Arg Arg Thr Met Ile Ile
115 120 125

Ser Pro Glu Arg Leu Asp Pro Phe Ala Asp Gly Gly Lys Thr Pro Asp
130 135 140

Pro Lys Met Asn Ala Arg Thr Tyr Met Asp Val Met Arg Glu Gln His
145 150 155 160

Leu Thr Lys Glu Glu Arg Glu Ile Arg Gln Gln Leu Ala Glu Lys Ala
165 170 175
Lys Ala Gly Glu Leu Lys Val Val Asn Gly Ala Ala Ala Ser Gln Pro
180 185 190
Pro Ser Lys Arg Lys Arg Arg Trp Asp Gln Thr Ala Asp Gln Thr Pro
195 200 205

Gly Ala Thr Pro Lys Lys Leu Ser Ser Trp Asp Gln Ala Glu Thr Pro
210 215 220
Gly His Thr Pro Ser Leu Arg Trp Asp Glu Thr Pro Gly Arg Ala Lys
225 230 235 240
Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ala Thr Pro Gly Ser Lys Ile Trp Asp Pro
245 250 255
Thr Pro Ser His Thr Pro Ala Gly Ala Ala Thr Pro Gly Arg Gly Asp
260 265 270

Thr Pro Gly His Ala Thr Pro Gly His Gly Gly Ala Thr Ser Ser Ala
275 280 285
Arg Lys Asn Arg Trp Asp Glu Thr Pro Lys Thr Glu Arg Asp Thr Pro
290 295 300
Gly His Gly Ser Gly Trp Ala Glu Thr Pro Arg Thr Asp Arg Gly Gly
305 310 315 320
Asp Ser Ile Gly Glu Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Lys Arg Lys Ser
325 330 335

Arg Trp Asp Glu Thr Pro Ala Ser Gln Met Gly Gly Ser Thr Pro Val
340 345 350
Leu Thr Pro Gly Lys Thr Pro Ile Gly Thr Pro Ala Met Asn Met Ala
355 360 365
Thr Pro Thr Pro Gly His Ile Met Ser Met Thr Pro Glu Gln Leu Gln
370 375 380
Ala Trp Arg Trp Glu Arg Glu Ile Asp Glu Arg Asn Arg Pro Leu Ser
385 390 395 400

Asp Glu Glu Leu Asp Ala Met Phe Pro Glu Gly Tyr Lys Val Leu Pro

405 410 415

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

420 425 430

Ala Thr Pro Thr Pro Leu Gly Gly Met Thr Gly Phe His Met Gln Thr

435 440 445

Glu Asp Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Asp Gln Pro Ser Gly Asn Leu

450 455 460

Pro Phe Leu Lys Pro Asp Asp Ile Gln Tyr Phe Asp Lys Leu Leu Val

465 470 475 480

Asp Val Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys

485 490 495

Ile Met Lys Leu Leu Leu Lys Ile Lys Asn Gly Thr Pro Pro Met Arg

500 505 510

Lys Ala Ala Leu Arg Gln Ile Thr Asp Lys Ala Arg Glu Phe Gly Ala

515 520 525

Gly Pro Leu Phe Asn Gln Ile Leu Pro Leu Leu Met Ser Pro Thr Leu

530 535 540

Glu Asp Gln Glu Arg His Leu Leu Val Lys Val Ile Asp Arg Ile Leu

545 550 555 560

Tyr Lys Leu Asp Asp Leu Val Arg Pro Tyr Val His Lys Ile Leu Val

565 570 575

Val Ile Glu Pro Leu Leu Ile Asp Glu Asp Tyr Tyr Ala Arg Val Glu

580 585 590

Gly Arg Glu Ile Ile Ser Asn Leu Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr

595 600 605

Met Ile Ser Thr Met Arg Pro Asp Ile Asp Asn Met Asp Glu Tyr Val

610 615 620

Arg Asn Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Val Val Ala Ser Ala Leu Gly

625 630 635 640

Ile Pro Ser Leu Leu Pro Phe Leu Lys Ala Val Cys Lys Ser Lys Lys

645 650 655

Ser Trp Gln Ala Arg His Thr Gly Ile Lys Ile Val Gln Gln Ile Ala
660 665 670

Ile Leu Met Gly Cys Ala Ile Leu Pro His Leu Arg Ser Leu Val Glu
675 680 685

Ile Ile Glu His Gly Leu Val Asp Glu Gln Gln Lys Val Arg Thr Ile
690 695 700

Ser Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Ala Glu Ala Ala Thr Pro Tyr Gly
705 710 715 720

Ile Glu Ser Phe Asp Ser Val Leu Lys Pro Leu Trp Lys Gly Ile Arg
725 730 735

Gln His Arg Gly Lys Gly Leu Ala Ala Phe Leu Lys Ala Ile Gly Tyr
740 745 750

Leu Ile Pro Leu Met Asp Ala Glu Tyr Ala Asn Tyr Tyr Thr Arg Glu
755 760 765

Val Met Leu Ile Leu Ile Arg Glu Phe Gln Ser Pro Asp Glu Glu Met
770 775 780

Lys Lys Ile Val Leu Lys Val Val Lys Gln Cys Cys Gly Thr Asp Gly
785 790 795 800

Val Glu Ala Asn Tyr Ile Lys Thr Glu Ile Leu Pro Pro Phe Phe Lys
805 810 815

His Phe Trp Gln His Arg Met Ala Leu Asp Arg Arg Asn Tyr Arg Gln
820 825 830

Leu Val Asp Thr Thr Val Glu Leu Ala Asn Lys Val Gly Ala Ala Glu
835 840 845

Ile Ile Ser Arg Ile Val Asp Asp Leu Lys Asp Glu Ala Glu Gln Tyr
850 855 860

Arg Lys Met Val Met Glu Thr Ile Glu Lys Ile Met Gly Asn Leu Gly
865 870 875 880

Ala Ala Asp Ile Asp His Lys Leu Glu Glu Gln Leu Ile Asp Gly Ile
885 890 895

Leu Tyr Ala Phe Gln Glu Gln Thr Thr Glu Asp Ser Val Met Leu Asn

900 905 910

Gly Phe Gly Thr Val Val Asn Ala Leu Gly Lys Arg Val Lys Pro Tyr
915 920 925
Leu Pro Gln Ile Cys Gly Thr Val Leu Trp Arg Leu Asn Asn Lys Ser
930 935 940
Ala Lys Val Arg Gln Gln Ala Ala Asp Leu Ile Ser Arg Thr Ala Val
945 950 955 960
Val Met Lys Thr Cys Gln Glu Glu Lys Leu Met Gly His Leu Gly Val
965 970 975

Val Leu Tyr Glu Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu Val Leu Gly Ser
980 985 990
Ile Leu Gly Ala Leu Lys Ala Ile Val Asn Val Ile Gly Met His Lys
995 1000 1005
Met Thr Pro Pro Ile Lys Asp Leu Leu Pro Arg Leu Thr Pro Ile
1010 1015 1020
Leu Lys Asn Arg His Glu Lys Val Gln Glu Asn Cys Ile Asp Leu
1025 1030 1035

Val Gly Arg Ile Ala Asp Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ser Ala Arg
1040 1045 1050
Glu Trp Met Arg Ile Cys Phe Glu Leu Leu Glu Leu Leu Lys Ala
1055 1060 1065
His Lys Lys Ala Ile Arg Arg Ala Thr Val Asn Thr Phe Gly Tyr
1070 1075 1080
Ile Ala Lys Ala Ile Gly Pro His Asp Val Leu Ala Thr Leu Leu
1085 1090 1095

Asn Asn Leu Lys Val Gln Glu Arg Gln Asn Arg Val Cys Thr Thr
1100 1105 1110
Val Ala Ile Ala Ile Val Ala Glu Thr Cys Ser Pro Phe Thr Val
1115 1120 1125
Leu Pro Ala Leu Met Asn Glu Tyr Arg Val Pro Glu Leu Asn Val
1130 1135 1140

Gln Asn Gly Val Leu Lys Ser Leu Ser Phe Leu Phe Glu Tyr Ile
1145 1150 1155

Gly Glu Met Gly Lys Asp Tyr Ile Tyr Ala Val Thr Pro Leu Leu
1160 1165 1170
Glu Asp Ala Leu Met Asp Arg Asp Leu Val His Arg Gln Thr Ala
1175 1180 1185
Ser Ala Val Val Gln His Met Ser Leu Gly Val Tyr Gly Phe Gly
1190 1195 1200
Cys Glu Asp Ser Leu Asn His Leu Leu Asn Tyr Val Trp Pro Asn
1205 1210 1215

Val Phe Glu Thr Ser Pro His Val Ile Gln Ala Val Met Gly Ala
1220 1225 1230
Leu Glu Gly Leu Arg Val Ala Ile Gly Pro Cys Arg Met Leu Gln
1235 1240 1245
Tyr Cys Leu Gln Gly Leu Phe His Pro Ala Arg Lys Val Arg Asp
1250 1255 1260
Val Tyr Trp Lys Ile Tyr Asn Ser Ile Tyr Ile Gly Ser Gln Asp
1265 1270 1275

Ala Leu Ile Ala His Tyr Pro Arg Ile Tyr Asn Asp Asp Lys Asn
1280 1285 1290
Thr Tyr Ile Arg Tyr Glu Leu Asp Tyr Ile Leu
1295 1300
<210> 2
<211> 309
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Arg Pro Asp Arg Ala Glu Ala Pro Gly Pro Pro Ala Met Ala Ala
1 5 10 15
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Ile Glu Lys Arg Cys Arg Arg Met Val Val Val Val Ser Asp Asp Tyr
225 230 235 240
Leu Gln Ser Lys Glu Cys Asp Phe Gln Thr Lys Phe Ala Leu Ser Leu
245 250 255
Ser Pro Gly Ala His Gln Lys Arg Leu Ile Pro Ile Lys Tyr Lys Ala
260 265 270
Met Lys Lys Glu Phe Pro Ser Ile Leu Arg Phe Ile Thr Val Cys Asp

275 280 285

Tyr Thr Asn Pro Cys Thr Lys Ser Trp Phe Trp Thr Arg Leu Ala Lys
290 295 300

Ala Leu Ser Leu Pro
305

<210> 3

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys

165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln

180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp

195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu

210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser

225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr

245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val

260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn

275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu

325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp

340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His

355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met

370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp

385 390

<210> 4

<211> 3056

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Leu Val Leu Asn Asp Leu Leu Ile Cys Cys Arg Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Asp Arg Ala Thr Glu Arg Lys Lys Glu Val Glu Lys Phe Lys Arg
20 25 30

Leu Ile Arg Asp Pro Glu Thr Ile Lys His Leu Asp Arg His Ser Asp
35 40 45

Ser Lys Gln Gly Lys Tyr Leu Asn Trp Asp Ala Val Phe Arg Phe Leu
50 55 60

Gln Lys Tyr Ile Gln Lys Glu Thr Glu Cys Leu Arg Ile Ala Lys Pro
65 70 75 80

Asn Val Ser Ala Ser Thr Gln Ala Ser Arg Gln Lys Lys Met Gln Glu
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Val Lys Tyr Phe Ile Lys Cys Ala Asn Arg Arg Ala
100 105 110

Pro Arg Leu Lys Cys Gln Glu Leu Leu Asn Tyr Ile Met Asp Thr Val
115 120 125

Lys Asp Ser Ser Asn Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Asp Cys Ser Asn Ile
130 135 140

Leu Leu Lys Asp Ile Leu Ser Val Arg Lys Tyr Trp Cys Glu Ile Ser
145 150 155 160

Gln Gln Gln Trp Leu Glu Leu Phe Ser Val Tyr Phe Arg Leu Tyr Leu
165 170 175

Lys Pro Ser Gln Asp Val His Arg Val Leu Val Ala Arg Ile Ile His
180 185 190

Ala Val Thr Lys Gly Cys Cys Ser Gln Thr Asp Gly Leu Asn Ser Lys
195 200 205

Phe Leu Asp Phe Phe Ser Lys Ala Ile Gln Cys Ala Arg Gln Glu Lys
210 215 220

Ser Ser Ser Gly Leu Asn His Ile Leu Ala Ala Leu Thr Ile Phe Leu

225 230 235 240

Lys Thr Leu Ala Val Asn Phe Arg Ile Arg Val Cys Glu Leu Gly Asp

245 250 255

Glu Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Ile Trp Thr Gln His Arg Leu Asn

260 265 270

Asp Ser Leu Lys Glu Val Ile Ile Glu Leu Phe Gln Leu Gln Ile Tyr

275 280 285

Ile His His Pro Lys Gly Ala Lys Thr Gln Glu Lys Gly Ala Tyr Glu

290 295 300

Ser Thr Lys Trp Arg Ser Ile Leu Tyr Asn Leu Tyr Asp Leu Leu Val

305 310 315 320

Asn Glu Ile Ser His Ile Gly Ser Arg Gly Lys Tyr Ser Ser Gly Phe

325 330 335

Arg Asn Ile Ala Val Lys Glu Asn Leu Ile Glu Leu Met Ala Asp Ile

340 345 350

Cys His Gln Val Phe Asn Glu Asp Thr Arg Ser Leu Glu Ile Ser Gln

355 360 365

Ser Tyr Thr Thr Thr Gln Arg Glu Ser Ser Asp Tyr Ser Val Pro Cys

370 375 380

Lys Arg Lys Lys Ile Glu Leu Gly Trp Glu Val Ile Lys Asp His Leu

385 390 395 400

Gln Lys Ser Gln Asn Asp Phe Asp Leu Val Pro Trp Leu Gln Ile Ala

405 410 415

Thr Gln Leu Ile Ser Lys Tyr Pro Ala Ser Leu Pro Asn Cys Glu Leu

420 425 430

Ser Pro Leu Leu Met Ile Leu Ser Gln Leu Leu Pro Gln Gln Arg His

435 440 445

Gly Glu Arg Thr Pro Tyr Val Leu Arg Cys Leu Thr Glu Val Ala Leu

450 455 460

Cys Gln Asp Lys Arg Ser Asn Leu Glu Ser Ser Gln Lys Ser Asp Leu

465 470 475 480

Leu Lys Leu Trp Asn Lys Ile Trp Cys Ile Thr Phe Arg Gly Ile Ser
485 490 495
Ser Glu Gln Ile Gln Ala Glu Asn Phe Gly Leu Leu Gly Ala Ile Ile
500 505 510
Gln Gly Ser Leu Val Glu Val Asp Arg Glu Phe Trp Lys Leu Phe Thr
515 520 525

Gly Ser Ala Cys Arg Pro Ser Cys Pro Ala Val Cys Cys Leu Thr Leu
530 535 540
Ala Leu Thr Thr Ser Ile Val Pro Gly Thr Val Lys Met Gly Ile Glu
545 550 555 560
Gln Asn Met Cys Glu Val Asn Arg Ser Phe Ser Leu Lys Glu Ser Ile
565 570 575
Met Lys Trp Leu Leu Phe Tyr Gln Leu Glu Gly Asp Leu Glu Asn Ser
580 585 590

Thr Glu Val Pro Pro Ile Leu His Ser Asn Phe Pro His Leu Val Leu
595 600 605
Glu Lys Ile Leu Val Ser Leu Thr Met Lys Asn Cys Lys Ala Ala Met
610 615 620
Asn Phe Phe Gln Ser Val Pro Glu Cys Glu His His Gln Lys Asp Lys
625 630 635 640
Glu Glu Leu Ser Phe Ser Glu Val Glu Glu Leu Phe Leu Gln Thr Thr
645 650 655

Phe Asp Lys Met Asp Phe Leu Thr Ile Val Arg Glu Cys Gly Ile Glu
660 665 670
Lys His Gln Ser Ser Ile Gly Phe Ser Val His Gln Asn Leu Lys Glu
675 680 685
Ser Leu Asp Arg Cys Leu Leu Gly Leu Ser Glu Gln Leu Leu Asn Asn
690 695 700
Tyr Ser Ser Glu Ile Thr Asn Ser Glu Thr Leu Val Arg Cys Ser Arg
705 710 715 720

Leu Leu Val Gly Val Leu Gly Cys Tyr Cys Tyr Met Gly Val Ile Ala

725 730 735

Glu Glu Glu Ala Tyr Lys Ser Glu Leu Phe Gln Lys Ala Lys Ser Leu

740 745 750

Met Gln Cys Ala Gly Glu Ser Ile Thr Leu Phe Lys Asn Lys Thr Asn

755 760 765

Glu Glu Phe Arg Ile Gly Ser Leu Arg Asn Met Met Gln Leu Cys Thr

770 775 780

Arg Cys Leu Ser Asn Cys Thr Lys Lys Ser Pro Asn Lys Ile Ala Ser

785 790 795 800

Gly Phe Phe Leu Arg Leu Leu Thr Ser Lys Leu Met Asn Asp Ile Ala

805 810 815

Asp Ile Cys Lys Ser Leu Ala Ser Phe Ile Lys Lys Pro Phe Asp Arg

820 825 830

Gly Glu Val Glu Ser Met Glu Asp Asp Thr Asn Gly Asn Leu Met Glu

835 840 845

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

850 855 860

Ser Val Ser Asp Ala Asn Glu Pro Gly Glu Ser Gln Ser Thr Ile Gly

865 870 875 880

Ala Ile Asn Pro Leu Ala Glu Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Asp Leu Leu

885 890 895

Phe Leu Asp Met Leu Lys Phe Leu Cys Leu Cys Val Thr Thr Ala Gln

900 905 910

Thr Asn Thr Val Ser Phe Arg Ala Ala Asp Ile Arg Arg Lys Leu Leu

915 920 925

Met Leu Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu Pro Thr Lys Ser Leu His Leu

930 935 940

His Met Tyr Leu Met Leu Leu Lys Glu Leu Pro Gly Glu Glu Tyr Pro

945 950 955 960

Leu Pro Met Glu Asp Val Leu Glu Leu Leu Lys Pro Leu Ser Asn Val

965 970 975

Cys Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Gln Asp Val Cys Lys Thr Ile Leu Asn
980 985 990

His Val Leu His Val Val Lys Asn Leu Gly Gln Ser Asn Met Asp Ser
995 1000 1005

Glu Asn Thr Arg Asp Ala Gln Gly Gln Phe Leu Thr Val Ile Gly
1010 1015 1020

Ala Phe Trp His Leu Thr Lys Glu Arg Lys Tyr Ile Phe Ser Val
1025 1030 1035

Arg Met Ala Leu Val Asn Cys Leu Lys Thr Leu Leu Glu Ala Asp
1040 1045 1050

Pro Tyr Ser Lys Trp Ala Ile Leu Asn Val Met Gly Lys Asp Phe
1055 1060 1065

Pro Val Asn Glu Val Phe Thr Gln Phe Leu Ala Asp Asn His His
1070 1075 1080

Gln Val Arg Met Leu Ala Ala Glu Ser Ile Asn Arg Leu Phe Gln
1085 1090 1095

Asp Thr Lys Gly Asp Ser Ser Arg Leu Leu Lys Ala Leu Pro Leu
1100 1105 1110

Lys Leu Gln Gln Thr Ala Phe Glu Asn Ala Tyr Leu Lys Ala Gln
1115 1120 1125

Glu Gly Met Arg Glu Met Ser His Ser Ala Glu Asn Pro Glu Thr
1130 1135 1140

Leu Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Lys Ser Val Leu Leu Thr Leu Ile
1145 1150 1155

Ala Val Val Leu Ser Cys Ser Pro Ile Cys Glu Lys Gln Ala Leu
1160 1165 1170

Phe Ala Leu Cys Lys Ser Val Lys Glu Asn Gly Leu Glu Pro His
1175 1180 1185

Leu Val Lys Lys Val Leu Glu Lys Val Ser Glu Thr Phe Gly Tyr
1190 1195 1200

Arg Arg Leu Glu Asp Phe Met Ala Ser His Leu Asp Tyr Leu Val

1205 1210 1215

Leu Glu Trp Leu Asn Leu Gln Asp Thr Glu Tyr Asn Leu Ser Ser
1220 1225 1230
Phe Pro Phe Ile Leu Leu Asn Tyr Thr Asn Ile Glu Asp Phe Tyr
1235 1240 1245
Arg Ser Cys Tyr Lys Val Leu Ile Pro His Leu Val Ile Arg Ser
1250 1255 1260
His Phe Asp Glu Val Lys Ser Ile Ala Asn Gln Ile Gln Glu Asp
1265 1270 1275

Trp Lys Ser Leu Leu Thr Asp Cys Phe Pro Lys Ile Leu Val Asn
1280 1285 1290
Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Tyr Glu Gly Thr Arg Asp Ser Gly Met
1295 1300 1305
Ala Gln Gln Arg Glu Thr Ala Thr Lys Val Tyr Asp Met Leu Lys
1310 1315 1320
Ser Glu Asn Leu Leu Gly Lys Gln Ile Asp His Leu Phe Ile Ser
1325 1330 1335

Asn Leu Pro Glu Ile Val Val Glu Leu Leu Met Thr Leu His Glu
1340 1345 1350
Pro Ala Asn Ser Ser Ala Ser Gln Ser Thr Asp Leu Cys Asp Phe
1355 1360 1365
Ser Gly Asp Leu Asp Pro Ala Pro Asn Pro Pro His Phe Pro Ser
1370 1375 1380
His Val Ile Lys Ala Thr Phe Ala Tyr Ile Ser Asn Cys His Lys
1385 1390 1395

Thr Lys Leu Lys Ser Ile Leu Glu Ile Leu Ser Lys Ser Pro Asp
1400 1405 1410
Ser Tyr Gln Lys Ile Leu Leu Ala Ile Cys Glu Gln Ala Ala Glu
1415 1420 1425
Thr Asn Asn Val Tyr Lys Lys His Arg Ile Leu Lys Ile Tyr His
1430 1435 1440

```
Leu Phe  Val Ser Leu Leu Leu  Lys Asp Ile Lys Ser  Gly Leu Gly
    1445                1450                1455

Gly Ala  Trp Ala Phe Val Leu  Arg Asp Val Ile Tyr  Thr Leu Ile
    1460                1465                1470
His Tyr  Ile Asn Gln Arg Pro  Ser Cys Ile Met Asp  Val Ser Leu
    1475                1480                1485
Arg Ser  Phe Ser Leu Cys Cys  Asp Leu Leu Ser Gln  Val Cys Gln
    1490                1495                1500
Thr Ala  Val Thr Tyr Cys Lys  Asp Ala Leu Glu Asn  His Leu His
    1505                1510                1515

Val Ile  Val Gly Thr Leu Ile  Pro Leu Val Tyr Glu  Gln Val Glu
    1520                1525                1530
Val Gln  Lys Gln Val Leu Asp  Leu Leu Lys Tyr Leu  Val Ile Asp
    1535                1540                1545
Asn Lys  Asp Asn Glu Asn Leu  Tyr Ile Thr Ile Lys  Leu Leu Asp
    1550                1555                1560
Pro Phe  Pro Asp His Val Val  Phe Lys Asp Leu Arg  Ile Thr Gln
    1565                1570                1575

Gln Lys  Ile Lys Tyr Ser Arg  Gly Pro Phe Ser Leu  Leu Glu Glu
    1580                1585                1590
Ile Asn  His Phe Leu Ser Val  Ser Val Tyr Asp Ala  Leu Pro Leu
    1595                1600                1605
Thr Arg  Leu Glu Gly Leu Lys  Asp Leu Arg Arg Gln  Leu Glu Leu
    1610                1615                1620
His Lys  Asp Gln Met Val Asp  Ile Met Arg Ala Ser  Gln Asp Asn
    1625                1630                1635

Pro Gln  Asp Gly Ile Met Val  Lys Leu Val Val Asn  Leu Leu Gln
    1640                1645                1650
Leu Ser  Lys Met Ala Ile Asn  His Thr Gly Glu Lys  Glu Val Leu
    1655                1660                1665
Glu Ala  Val Gly Ser Cys Leu  Gly Glu Val Gly Pro  Ile Asp Phe
```

1670 1675 1680

Ser Thr Ile Ala Ile Gln His Ser Lys Asp Ala Ser Tyr Thr Lys

1685 1690 1695

Ala Leu Lys Leu Phe Glu Asp Lys Glu Leu Gln Trp Thr Phe Ile

1700 1705 1710

Met Leu Thr Tyr Leu Asn Asn Thr Leu Val Glu Asp Cys Val Lys

1715 1720 1725

Val Arg Ser Ala Ala Val Thr Cys Leu Lys Asn Ile Leu Ala Thr

1730 1735 1740

Lys Thr Gly His Ser Phe Trp Glu Ile Tyr Lys Met Thr Thr Asp

1745 1750 1755

Pro Met Leu Ala Tyr Leu Gln Pro Phe Arg Thr Ser Arg Lys Lys

1760 1765 1770

Phe Leu Glu Val Pro Arg Phe Asp Lys Glu Asn Pro Phe Glu Gly

1775 1780 1785

Leu Asp Asp Ile Asn Leu Trp Ile Pro Leu Ser Glu Asn His Asp

1790 1795 1800

Ile Trp Ile Lys Thr Leu Thr Cys Ala Phe Leu Asp Ser Gly Gly

1805 1810 1815

Thr Lys Cys Glu Ile Leu Gln Leu Leu Lys Pro Met Cys Glu Val

1820 1825 1830

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

1835 1840 1845

Ile Leu Leu Gln Asp Thr Asn Glu Ser Trp Arg Asn Leu Leu Ser

1850 1855 1860

Thr His Val Gln Gly Phe Phe Thr Ser Cys Leu Arg His Phe Ser

1865 1870 1875

Gln Thr Ser Arg Ser Thr Thr Pro Ala Asn Leu Asp Ser Glu Ser

1880 1885 1890

Glu His Phe Phe Arg Cys Cys Leu Asp Lys Lys Ser Gln Arg Thr

1895 1900 1905

Met Leu Ala Val Val Asp Tyr Met Arg Arg Gln Lys Arg Pro Ser
1910 1915 1920
Ser Gly Thr Ile Phe Asn Asp Ala Phe Trp Leu Asp Leu Asn Tyr
1925 1930 1935

Leu Glu Val Ala Lys Val Ala Gln Ser Cys Ala Ala His Phe Thr
1940 1945 1950
Ala Leu Leu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Lys Ser Met Asp
1955 1960 1965
Asp Gln Glu Lys Arg Ser Leu Ala Phe Glu Glu Gly Ser Gln Ser
1970 1975 1980
Thr Thr Ile Ser Ser Leu Ser Glu Lys Ser Lys Glu Glu Thr Gly
1985 1990 1995

Ile Ser Leu Gln Asp Leu Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Ser Ile Gly
2000 2005 2010
Glu Pro Asp Ser Leu Tyr Gly Cys Gly Gly Gly Lys Met Leu Gln
2015 2020 2025
Pro Ile Thr Arg Leu Arg Thr Tyr Glu His Glu Ala Met Trp Gly
2030 2035 2040
Lys Ala Leu Val Thr Tyr Asp Leu Glu Thr Ala Ile Pro Ser Ser
2045 2050 2055

Thr Arg Gln Ala Gly Ile Ile Gln Ala Leu Gln Asn Leu Gly Leu
2060 2065 2070
Cys His Ile Leu Ser Val Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Tyr Glu Asn
2075 2080 2085
Lys Asp Trp Cys Pro Glu Leu Glu Glu Leu His Tyr Gln Ala Ala
2090 2095 2100
Trp Arg Asn Met Gln Trp Asp His Cys Thr Ser Val Ser Lys Glu
2105 2110 2115

Val Glu Gly Thr Ser Tyr His Glu Ser Leu Tyr Asn Ala Leu Gln
2120 2125 2130
Ser Leu Arg Asp Arg Glu Phe Ser Thr Phe Tyr Glu Ser Leu Lys

2135 2140 2145

Tyr Ala Arg Val Lys Glu Val Glu Glu Met Cys Lys Arg Ser Leu

2150 2155 2160

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

2165 2170 2175

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Ile Gly Glu Leu Phe Ser Arg Ser Val

2180 2185 2190

Thr His Arg Gln Leu Ser Glu Val Tyr Ile Lys Trp Gln Lys His

2195 2200 2205

Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ser Asp Phe Ser Phe Gln Glu Pro Ile

2210 2215 2220

Met Ala Leu Arg Thr Val Ile Leu Glu Ile Leu Met Glu Lys Glu

2225 2230 2235

Met Asp Asn Ser Gln Arg Glu Cys Ile Lys Asp Ile Leu Thr Lys

2240 2245 2250

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

2255 2260 2265

Gln Leu Pro Glu Arg Ala Ile Phe Gln Ile Lys Gln Tyr Asn Ser

2270 2275 2280

Val Ser Cys Gly Val Ser Glu Trp Gln Leu Glu Glu Ala Gln Val

2285 2290 2295

Phe Trp Ala Lys Lys Glu Gln Ser Leu Ala Leu Ser Ile Leu Lys

2300 2305 2310

Gln Met Ile Lys Lys Leu Asp Ala Ser Cys Ala Ala Asn Asn Pro

2315 2320 2325

Ser Leu Lys Leu Thr Tyr Thr Glu Cys Leu Arg Val Cys Gly Asn

2330 2335 2340

Trp Leu Ala Glu Thr Cys Leu Glu Asn Pro Ala Val Ile Met Gln

2345 2350 2355

Thr Tyr Leu Glu Lys Ala Val Glu Val Ala Gly Asn Tyr Asp Gly

2360 2365 2370

```
Glu Ser  Ser Asp Glu Leu Arg  Asn Gly Lys Met Lys  Ala Phe Leu
    2375                 2380                 2385
Ser Leu  Ala Arg Phe Ser Asp  Thr Gln Tyr Gln Arg  Ile Glu Asn
    2390                 2395                 2400
Tyr Met  Lys Ser Ser Glu Phe  Glu Asn Lys Gln Ala  Leu Leu Lys
    2405                 2410                 2415

Arg Ala  Lys Glu Glu Val Gly  Leu Leu Arg Glu His  Lys Ile Gln
    2420                 2425                 2430
Thr Asn  Arg Tyr Thr Val Lys  Val Gln Arg Glu Leu  Glu Leu Asp
    2435                 2440                 2445
Glu Leu  Ala Leu Arg Ala Leu  Lys Glu Asp Arg Lys  Arg Phe Leu
    2450                 2455                 2460
Cys Lys  Ala Val Glu Asn Tyr  Ile Asn Cys Leu Leu  Ser Gly Glu
    2465                 2470                 2475

Glu His  Asp Met Trp Val Phe  Arg Leu Cys Ser Leu  Trp Leu Glu
    2480                 2485                 2490
Asn Ser  Gly Val Ser Glu Val  Asn Gly Met Met Lys  Arg Asp Gly
    2495                 2500                 2505
Met Lys  Ile Pro Thr Tyr Lys  Phe Leu Pro Leu Met  Tyr Gln Leu
    2510                 2515                 2520
Ala Ala  Arg Met Gly Thr Lys  Met Met Gly Gly Leu  Gly Phe His
    2525                 2530                 2535

Glu Val  Leu Asn Asn Leu Ile  Ser Arg Ile Ser Met  Asp His Pro
    2540                 2545                 2550
His His  Thr Leu Phe Ile Ile  Leu Ala Leu Ala Asn  Ala Asn Arg
    2555                 2560                 2565
Asp Glu  Phe Leu Thr Lys Pro  Glu Val Ala Arg Arg  Ser Arg Ile
    2570                 2575                 2580
Thr Lys  Asn Val Pro Lys Gln  Ser Ser Gln Leu Asp  Glu Asp Arg
    2585                 2590                 2595

Thr Glu  Ala Ala Asn Arg Ile  Ile Cys Thr Ile Arg  Ser Arg Arg
```

2600 2605 2610

Pro Gln Met Val Arg Ser Val Glu Ala Leu Cys Asp Ala Tyr Ile

2615 2620 2625

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

2630 2635 2640

Gly Ile Asn Ile Pro Ala Asp Gln Pro Ile Thr Lys Leu Lys Asn

2645 2650 2655

Leu Glu Asp Val Val Val Pro Thr Met Glu Ile Lys Val Asp His

2660 2665 2670

Thr Gly Glu Tyr Gly Asn Leu Val Thr Ile Gln Ser Phe Lys Ala

2675 2680 2685

Glu Phe Arg Leu Ala Gly Gly Val Asn Leu Pro Lys Ile Ile Asp

2690 2695 2700

Cys Val Gly Ser Asp Gly Lys Glu Arg Arg Gln Leu Val Lys Gly

2705 2710 2715

Arg Asp Asp Leu Arg Gln Asp Ala Val Met Gln Gln Val Phe Gln

2720 2725 2730

Met Cys Asn Thr Leu Leu Gln Arg Asn Thr Glu Thr Arg Lys Arg

2735 2740 2745

Lys Leu Thr Ile Cys Thr Tyr Lys Val Val Pro Leu Ser Gln Arg

2750 2755 2760

Ser Gly Val Leu Glu Trp Cys Thr Gly Thr Val Pro Ile Gly Glu

2765 2770 2775

Phe Leu Val Asn Asn Glu Asp Gly Ala His Lys Arg Tyr Arg Pro

2780 2785 2790

Asn Asp Phe Ser Ala Phe Gln Cys Gln Lys Lys Met Met Glu Val

2795 2800 2805

Gln Lys Lys Ser Phe Glu Glu Lys Tyr Glu Val Phe Met Asp Val

2810 2815 2820

Cys Gln Asn Phe Gln Pro Val Phe Arg Tyr Phe Cys Met Glu Lys

2825 2830 2835

Phe Leu Asp Pro Ala Ile Trp Phe Glu Lys Arg Leu Ala Tyr Thr
2840 2845 2850
Arg Ser Val Ala Thr Ser Ser Ile Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu
2855 2860 2865
Gly Asp Arg His Val Gln Asn Ile Leu Ile Asn Glu Gln Ser Ala
2870 2875 2880
Glu Leu Val His Ile Asp Leu Gly Val Ala Phe Glu Gln Gly Lys
2885 2890 2895

Ile Leu Pro Thr Pro Glu Thr Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Asp
2900 2905 2910
Ile Val Asp Gly Met Gly Ile Thr Gly Val Glu Gly Val Phe Arg
2915 2920 2925
Arg Cys Cys Glu Lys Thr Met Glu Val Met Arg Asn Ser Gln Glu
2930 2935 2940
Thr Leu Leu Thr Ile Val Glu Val Leu Leu Tyr Asp Pro Leu Phe
2945 2950 2955

Asp Trp Thr Met Asn Pro Leu Lys Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Arg
2960 2965 2970
Pro Glu Asp Glu Thr Glu Leu His Pro Thr Leu Asn Ala Asp Asp
2975 2980 2985
Gln Glu Cys Lys Arg Asn Leu Ser Asp Ile Asp Gln Ser Phe Asn
2990 2995 3000
Lys Val Ala Glu Arg Val Leu Met Arg Leu Gln Glu Lys Leu Lys
3005 3010 3015

Gly Val Glu Glu Gly Thr Val Leu Ser Val Gly Gly Gln Val Asn
3020 3025 3030
Leu Leu Ile Gln Gln Ala Ile Asp Pro Lys Asn Leu Ser Arg Leu
3035 3040 3045
Phe Pro Gly Trp Lys Ala Trp Val
3050 3055
<210> 5
<211> 1130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Leu Glu Ile Cys Leu Lys Leu Val Gly Cys Lys Ser Lys Lys Gly
1 5 10 15

Leu Ser Ser Ser Ser Ser Cys Tyr Leu Glu Glu Ala Leu Gln Arg Pro
20 25 30

Val Ala Ser Asp Phe Glu Pro Gln Gly Leu Ser Glu Ala Ala Arg Trp
35 40 45

Asn Ser Lys Glu Asn Leu Leu Ala Gly Pro Ser Glu Asn Asp Pro Asn
50 55 60

Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Phe Val Ala Ser Gly Asp Asn Thr Leu
65 70 75 80

Ser Ile Thr Lys Gly Glu Lys Leu Arg Val Leu Gly Tyr Asn His Asn
85 90 95

Gly Glu Trp Cys Glu Ala Gln Thr Lys Asn Gly Gln Gly Trp Val Pro
100 105 110

Ser Asn Tyr Ile Thr Pro Val Asn Ser Leu Glu Lys His Ser Trp Tyr
115 120 125

His Gly Pro Val Ser Arg Asn Ala Ala Glu Tyr Leu Leu Ser Ser Gly
130 135 140

Ile Asn Gly Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Glu Ser Ser Pro Gly Gln
145 150 155 160

Arg Ser Ile Ser Leu Arg Tyr Glu Gly Arg Val Tyr His Tyr Arg Ile
165 170 175

Asn Thr Ala Ser Asp Gly Lys Leu Tyr Val Ser Ser Glu Ser Arg Phe
180 185 190

Asn Thr Leu Ala Glu Leu Val His His His Ser Thr Val Ala Asp Gly
195 200 205

Leu Ile Thr Thr Leu His Tyr Pro Ala Pro Lys Arg Asn Lys Pro Thr
210 215 220

Val Tyr Gly Val Ser Pro Asn Tyr Asp Lys Trp Glu Met Glu Arg Thr
225 230 235 240
Asp Ile Thr Met Lys His Lys Leu Gly Gly Gly Gln Tyr Gly Glu Val
245 250 255
Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys Tyr Ser Leu Thr Val Ala Val Lys Thr
260 265 270

Leu Lys Glu Asp Thr Met Glu Val Glu Glu Phe Leu Lys Glu Ala Ala
275 280 285
Val Met Lys Glu Ile Lys His Pro Asn Leu Val Gln Leu Leu Gly Val
290 295 300
Cys Thr Arg Glu Pro Pro Phe Tyr Ile Ile Thr Glu Phe Met Thr Tyr
305 310 315 320
Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu Arg Glu Cys Asn Arg Gln Glu Val Asn
325 330 335

Ala Val Val Leu Leu Tyr Met Ala Thr Gln Ile Ser Ser Ala Met Glu
340 345 350
Tyr Leu Glu Lys Lys Asn Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
355 360 365
Cys Leu Val Gly Glu Asn His Leu Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu
370 375 380
Ser Arg Leu Met Thr Gly Asp Thr Tyr Thr Ala His Ala Gly Ala Lys
385 390 395 400

Phe Pro Ile Lys Trp Thr Ala Pro Glu Ser Leu Ala Tyr Asn Lys Phe
405 410 415
Ser Ile Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
420 425 430
Ala Thr Tyr Gly Met Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Asp Leu Ser Gln Val
435 440 445
Tyr Glu Leu Leu Glu Lys Asp Tyr Arg Met Glu Arg Pro Glu Gly Cys
450 455 460

Pro Glu Lys Val Tyr Glu Leu Met Arg Ala Cys Trp Gln Trp Asn Pro

465 470 475 480

Ser Asp Arg Pro Ser Phe Ala Glu Ile His Gln Ala Phe Glu Thr Met

485 490 495

Phe Gln Glu Ser Ser Ile Ser Asp Glu Val Glu Lys Glu Leu Gly Lys

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Thr Asp Val Pro Glu Met Pro His Ser Lys Gly Gln Gly Glu Ser Asp

545 550 555 560

Pro Leu Asp His Glu Pro Ala Val Ser Pro Leu Leu Pro Arg Lys Glu

565 570 575

Arg Gly Pro Pro Glu Gly Gly Leu Asn Glu Asp Glu Arg Leu Leu Pro

580 585 590

Lys Asp Lys Lys Thr Asn Leu Phe Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys

595 600 605

Lys Thr Ala Pro Thr Pro Pro Lys Arg Ser Ser Ser Phe Arg Glu Met

610 615 620

Asp Gly Gln Pro Glu Arg Arg Gly Ala Gly Glu Glu Glu Gly Arg Asp

625 630 635 640

Ile Ser Asn Gly Ala Leu Ala Phe Thr Pro Leu Asp Thr Ala Asp Pro

645 650 655

Ala Lys Ser Pro Lys Pro Ser Asn Gly Ala Gly Val Pro Asn Gly Ala

660 665 670

Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ser Gly Phe Arg Ser Pro His Leu Trp Lys

675 680 685

Lys Ser Ser Thr Leu Thr Ser Ser Arg Leu Ala Thr Gly Glu Glu Glu

690 695 700

Gly Gly Gly Ser Ser Ser Lys Arg Phe Leu Arg Ser Cys Ser Ala Ser

705 710 715 720

Cys Val Pro His Gly Ala Lys Asp Thr Glu Trp Arg Ser Val Thr Leu
725 730 735
Pro Arg Asp Leu Gln Ser Thr Gly Arg Gln Phe Asp Ser Ser Thr Phe
740 745 750
Gly Gly His Lys Ser Glu Lys Pro Ala Leu Pro Arg Lys Arg Ala Gly
755 760 765
Glu Asn Arg Ser Asp Gln Val Thr Arg Gly Thr Val Thr Pro Pro Pro
770 775 780

Arg Leu Val Lys Lys Asn Glu Glu Ala Ala Asp Glu Val Phe Lys Asp
785 790 795 800
Ile Met Glu Ser Ser Pro Gly Ser Ser Pro Pro Asn Leu Thr Pro Lys
805 810 815
Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ala Pro Ala Ser Gly Leu Pro His
820 825 830
Lys Glu Glu Ala Gly Lys Gly Ser Ala Leu Gly Thr Pro Ala Ala Ala
835 840 845

Glu Pro Val Thr Pro Thr Ser Lys Ala Gly Ser Gly Ala Pro Gly Gly
850 855 860
Thr Ser Lys Gly Pro Ala Glu Glu Ser Arg Val Arg Arg His Lys His
865 870 875 880
Ser Ser Glu Ser Pro Gly Arg Asp Lys Gly Lys Leu Ser Arg Leu Lys
885 890 895
Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ser Ala Gly Lys Ala Gly Gly
900 905 910

Lys Pro Ser Gln Ser Pro Ser Gln Glu Ala Ala Gly Glu Ala Val Leu
915 920 925
Gly Ala Lys Thr Lys Ala Thr Ser Leu Val Asp Ala Val Asn Ser Asp
930 935 940
Ala Ala Lys Pro Ser Gln Pro Gly Glu Gly Leu Lys Lys Pro Val Leu
945 950 955 960
Pro Ala Thr Pro Lys Pro Gln Ser Ala Lys Pro Ser Gly Thr Pro Ile

965 970 975

Ser Pro Ala Pro Val Pro Ser Thr Leu Pro Ser Ala Ser Ser Ala Leu
980 985 990
Ala Gly Asp Gln Pro Ser Ser Thr Ala Phe Ile Pro Leu Ile Ser Thr
995 1000 1005
Arg Val Ser Leu Arg Lys Thr Arg Gln Pro Pro Glu Arg Ile Ala
1010 1015 1020
Ser Gly Ala Ile Thr Lys Gly Val Val Leu Asp Ser Thr Glu Ala
1025 1030 1035

Leu Cys Leu Ala Ile Ser Arg Asn Ser Glu Gln Met Ala Ser His
1040 1045 1050
Ser Ala Val Leu Glu Ala Gly Lys Asn Leu Tyr Thr Phe Cys Val
1055 1060 1065
Ser Tyr Val Asp Ser Ile Gln Gln Met Arg Asn Lys Phe Ala Phe
1070 1075 1080
Arg Glu Ala Ile Asn Lys Leu Glu Asn Asn Leu Arg Glu Leu Gln
1085 1090 1095

Ile Cys Pro Ala Thr Ala Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Gln Asp
1100 1105 1110
Phe Ser Lys Leu Leu Ser Ser Val Lys Glu Ile Ser Asp Ile Val
1115 1120 1125
Gln Arg
1130
<210> 6
<211> 707
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Met Asn Gln Glu Leu Leu Ser Val Gly Ser Lys Arg Arg Arg Thr Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Gly Asn Pro Ser Ser Ser Gln Val Asp Glu Glu Gln

20 25 30

Met Asn Arg Val Val Glu Glu Glu Gln Gln Gln Gln Leu Arg Gln Gln

35 40 45

Glu Glu Glu His Thr Ala Arg Asn Gly Glu Val Val Gly Val Glu Pro

50 55 60

Arg Pro Gly Gly Gln Asn Asp Ser Gln Gln Gly Gln Leu Glu Glu Asn

65 70 75 80

Asn Asn Arg Phe Ile Ser Val Asp Glu Asp Ser Ser Gly Asn Gln Glu

85 90 95

Glu Gln Glu Glu Asp Glu Glu His Ala Gly Glu Gln Asp Glu Glu Asp

100 105 110

Glu Glu Glu Glu Glu Met Asp Gln Glu Ser Asp Asp Phe Asp Gln Ser

115 120 125

Asp Asp Ser Ser Arg Glu Asp Glu His Thr His Thr Asn Ser Val Thr

130 135 140

Asn Ser Ser Ser Ile Val Asp Leu Pro Val His Gln Leu Ser Ser Pro

145 150 155 160

Phe Tyr Thr Lys Thr Thr Lys Met Lys Arg Lys Leu Asp His Gly Ser

165 170 175

Glu Val Arg Ser Phe Ser Leu Gly Lys Lys Pro Cys Lys Val Ser Glu

180 185 190

Tyr Thr Ser Thr Thr Gly Leu Val Pro Cys Ser Ala Thr Pro Thr Thr

195 200 205

Phe Gly Asp Leu Arg Ala Ala Asn Gly Gln Gly Gln Gln Arg Arg Arg

210 215 220

Ile Thr Ser Val Gln Pro Pro Thr Gly Leu Gln Glu Trp Leu Lys Met

225 230 235 240

Phe Gln Ser Trp Ser Gly Pro Glu Lys Leu Leu Ala Leu Asp Glu Leu

245 250 255

Ile Asp Ser Cys Glu Pro Thr Gln Val Lys His Met Met Gln Val Ile

260 265 270

Glu Pro Gln Phe Gln Arg Asp Phe Ile Ser Leu Leu Pro Lys Glu Leu

275 280 285

Ala Leu Tyr Val Leu Ser Phe Leu Glu Pro Lys Asp Leu Leu Gln Ala

290 295 300

Ala Gln Thr Cys Arg Tyr Trp Arg Ile Leu Ala Glu Asp Asn Leu Leu

305 310 315 320

Trp Arg Glu Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ile Asp Glu Pro Leu His Ile

325 330 335

Lys Arg Arg Lys Val Ile Lys Pro Gly Phe Ile His Ser Pro Trp Lys

340 345 350

Ser Ala Tyr Ile Arg Gln His Arg Ile Asp Thr Asn Trp Arg Arg Gly

355 360 365

Glu Leu Lys Ser Pro Lys Val Leu Lys Gly His Asp Asp His Val Ile

370 375 380

Thr Cys Leu Gln Phe Cys Gly Asn Arg Ile Val Ser Gly Ser Asp Asp

385 390 395 400

Asn Thr Leu Lys Val Trp Ser Ala Val Thr Gly Lys Cys Leu Arg Thr

405 410 415

Leu Val Gly His Thr Gly Gly Val Trp Ser Ser Gln Met Arg Asp Asn

420 425 430

Ile Ile Ile Ser Gly Ser Thr Asp Arg Thr Leu Lys Val Trp Asn Ala

435 440 445

Glu Thr Gly Glu Cys Ile His Thr Leu Tyr Gly His Thr Ser Thr Val

450 455 460

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

465 470 475 480

Ala Thr Leu Arg Val Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Cys Leu His Val

485 490 495

Leu Met Gly His Val Ala Ala Val Arg Cys Val Gln Tyr Asp Gly Arg

500 505 510

Arg Val Val Ser Gly Ala Tyr Asp Phe Met Val Lys Val Trp Asp Pro

515 520 525

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

530 535 540

Tyr Ser Leu Gln Phe Asp Gly Ile His Val Val Ser Gly Ser Leu Asp

545 550 555 560

Thr Ser Ile Arg Val Trp Asp Val Glu Thr Gly Asn Cys Ile His Thr

565 570 575

Leu Thr Gly His Gln Ser Leu Thr Ser Gly Met Glu Leu Lys Asp Asn

580 585 590

Ile Leu Val Ser Gly Asn Ala Asp Ser Thr Val Lys Ile Trp Asp Ile

595 600 605

Lys Thr Gly Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln Gly Pro Asn Lys His Gln

610 615 620

Ser Ala Val Thr Cys Leu Gln Phe Asn Lys Asn Phe Val Ile Thr Ser

625 630 635 640

Ser Asp Asp Gly Thr Val Lys Leu Trp Asp Leu Lys Thr Gly Glu Phe

645 650 655

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

660 665 670

Trp Arg Ile Arg Ala Ser Asn Thr Lys Leu Val Cys Ala Val Gly Ser

675 680 685

Arg Asn Gly Thr Glu Glu Thr Lys Leu Leu Val Leu Asp Phe Asp Val

690 695 700

Asp Met Lys

705

<210> 7

<211> 662

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Ser His Val Ala Val Glu Asn Ala Leu Gly Leu Asp Gln Gln Phe

1 5 10 15

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

Lys Ser Ser Phe Phe Ser Asp Arg Gly Ser Gly Ser Arg Gly Arg Phe
85 90 95
Asp Asp Arg Gly Arg Ser Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Arg Gly Asp
100 105 110
Arg Ser Gly Phe Gly Lys Phe Glu Arg Gly Gly Asn Ser Arg Trp Cys
115 120 125
Asp Lys Ser Asp Glu Asp Asp Trp Ser Lys Pro Leu Pro Pro Ser Glu
130 135 140

Arg Leu Glu Gln Glu Leu Phe Ser Gly Gly Asn Thr Gly Ile Asn Phe
145 150 155 160
Glu Lys Tyr Asp Asp Ile Pro Val Glu Ala Thr Gly Asn Asn Cys Pro
165 170 175
Pro His Ile Glu Ser Phe Ser Asp Val Glu Met Gly Glu Ile Ile Met
180 185 190
Gly Asn Ile Glu Leu Thr Arg Tyr Thr Arg Pro Thr Pro Val Gln Lys
195 200 205

His Ala Ile Pro Ile Ile Lys Glu Lys Arg Asp Leu Met Ala Cys Ala
210 215 220
Gln Thr Gly Ser Gly Lys Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser
225 230 235 240
Gln Ile Tyr Ser Asp Gly Pro Gly Glu Ala Leu Arg Ala Met Lys Glu
245 250 255

Asn Gly Arg Tyr Gly Arg Arg Lys Gln Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu
260 265 270

Ala Pro Thr Arg Glu Leu Ala Val Gln Ile Tyr Glu Glu Ala Arg Lys
275 280 285
Phe Ser Tyr Arg Ser Arg Val Arg Pro Cys Val Val Tyr Gly Gly Ala
290 295 300
Asp Ile Gly Gln Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Cys His Leu Leu
305 310 315 320
Val Ala Thr Pro Gly Arg Leu Val Asp Met Met Glu Arg Gly Lys Ile
325 330 335

Gly Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met
340 345 350
Leu Asp Met Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Arg Ile Val Glu Gln Asp
355 360 365
Thr Met Pro Pro Lys Gly Val Arg His Thr Met Met Phe Ser Ala Thr
370 375 380
Phe Pro Lys Glu Ile Gln Met Leu Ala Arg Asp Phe Leu Asp Glu Tyr
385 390 395 400

Ile Phe Leu Ala Val Gly Arg Val Gly Ser Thr Ser Glu Asn Ile Thr
405 410 415
Gln Lys Val Val Trp Val Glu Glu Ser Asp Lys Arg Ser Phe Leu Leu
420 425 430
Asp Leu Leu Asn Ala Thr Gly Lys Asp Ser Leu Thr Leu Val Phe Val
435 440 445
Glu Thr Lys Lys Gly Ala Asp Ser Leu Glu Asp Phe Leu Tyr His Glu
450 455 460

Gly Tyr Ala Cys Thr Ser Ile His Gly Asp Arg Ser Gln Arg Asp Arg
465 470 475 480
Glu Glu Ala Leu His Gln Phe Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ile Leu Val
485 490 495
Ala Thr Ala Val Ala Ala Arg Gly Leu Asp Ile Ser Asn Val Lys His

500 505 510

Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Ser Asp Ile Glu Glu Tyr Val His Arg

515 520 525

Ile Gly Arg Thr Gly Arg Val Gly Asn Leu Gly Leu Ala Thr Ser Phe

530 535 540

Phe Asn Glu Arg Asn Ile Asn Ile Thr Lys Asp Leu Leu Asp Leu Leu

545 550 555 560

Val Glu Ala Lys Gln Glu Val Pro Ser Trp Leu Glu Asn Met Ala Tyr

565 570 575

Glu His His Tyr Lys Gly Ser Ser Arg Gly Arg Ser Lys Ser Ser Arg

580 585 590

Phe Ser Gly Gly Phe Gly Ala Arg Asp Tyr Arg Gln Ser Ser Gly Ala

595 600 605

Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Ser Arg Ala Ser Ser Ser Arg Ser Gly

610 615 620

Gly Gly Gly His Gly Ser Ser Arg Gly Phe Gly Gly Gly Gly Tyr Gly

625 630 635 640

Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Asn Tyr Asn Ser Gln Gly

645 650 655

Val Asp Trp Trp Gly Asn

660

<210> 8

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Pro Glu Met Val Arg Gly

1 5 10 15

Gln Val Phe Asp Val Gly Pro Arg Tyr Thr Asn Leu Ser Tyr Ile Gly

20 25 30

Glu Gly Ala Tyr Gly Met Val Cys Ser Ala Tyr Asp Asn Val Asn Lys

35 40 45

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

Tyr Lys Leu Leu Lys Thr Gln His Leu Ser Asn Asp His Ile Cys Tyr
115 120 125
Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn
130 135 140
Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Leu Asn Thr Thr
145 150 155 160
Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Ala Asp Pro
165 170 175

Asp His Asp His Thr Gly Phe Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp
180 185 190
Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Ser
195 200 205
Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser Asn
210 215 220
Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His Ile
225 230 235 240

Leu Gly Ile Leu Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile Ile
245 250 255
Asn Leu Lys Ala Arg Asn Tyr Leu Leu Ser Leu Pro His Lys Asn Lys
260 265 270
Val Pro Trp Asn Arg Leu Phe Pro Asn Ala Asp Ser Lys Ala Leu Asp
275 280 285

Leu Leu Asp Lys Met Leu Thr Phe Asn Pro His Lys Arg Ile Glu Val
290 295 300

Glu Gln Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro Ser
305 310 315 320
Asp Glu Pro Ile Ala Glu Ala Pro Phe Lys Phe Asp Met Glu Leu Asp
325 330 335
Asp Leu Pro Lys Glu Lys Leu Lys Glu Leu Ile Phe Glu Glu Thr Ala
340 345 350
Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser
355 360

<210> 9
<211> 340
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Ser Glu Leu Asp Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Asn
1 5 10 15
Gln Ile Arg Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Ala Thr Leu Ser Gln
20 25 30
Ile Thr Asn Asn Ile Asp Pro Val Gly Arg Ile Gln Met Arg Thr Arg
35 40 45
Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Gly
50 55 60

Thr Asp Ser Arg Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile
65 70 75 80
Ile Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg
85 90 95
Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val
100 105 110
Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr
115 120 125

Arg Glu Gly Asn Val Arg Val Ser Arg Glu Leu Ala Gly His Thr Gly
130 135 140
Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Asn Gln Ile Val Thr Ser
145 150 155 160
Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln
165 170 175
Thr Thr Thr Phe Thr Gly His Thr Gly Asp Val Met Ser Leu Ser Leu
180 185 190

Ala Pro Asp Thr Arg Leu Phe Val Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ala
195 200 205
Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Met Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly
210 215 220
His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Pro Asn Gly Asn Ala
225 230 235 240
Phe Ala Thr Gly Ser Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg
245 250 255

Ala Asp Gln Glu Leu Met Thr Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly
260 265 270
Ile Thr Ser Val Ser Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly
275 280 285
Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ala Leu Lys Ala Asp Arg
290 295 300
Ala Gly Val Leu Ala Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val
305 310 315 320

Thr Asp Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu
325 330 335
Lys Ile Trp Asn
340

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 10

Lys Val Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Parental peptide

<400> 11

Leu Met Pro Lys His Phe Ile Arg

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Missense mutant peptide

<400> 12

Leu Met Pro Lys Leu Phe Ile Arg

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 13

Ala Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Ile

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 14

Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Thr Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 15

Ile Leu Leu Met Thr Val Thr Ser Ile

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 16

Leu Leu Met Thr Val Thr Ser Ile Asp

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 17

Leu Met Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 18

Met Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 19

Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 20

Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ala

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 21

Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ala Val

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 22

Ala Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Thr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized peptide

<400> 23

Glu Val Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys

1 5