



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월09일
(11) 등록번호 10-1284237
(24) 등록일자 2013년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7016885(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년11월18일
심사청구일자 2012년07월27일
(85) 번역문제출일자 2012년06월28일
(65) 공개번호 10-2013-0026527
(43) 공개일자 2013년03월13일
(62) 원출원 특허 10-2006-7012186
원출원일자(국제) 2004년11월18일
심사청구일자 2009년11월18일
(86) 국제출원번호 PCT/DK2004/000799
(87) 국제공개번호 WO 2005/049073
국제공개일자 2005년06월02일
(30) 우선권주장
60/523,119 2003년11월19일 미국(US)
PA 2003 01716 2003년11월19일 덴마크(DK)
(56) 선행기술조사문헌
W01998058541 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
수르백 에이피에스
덴마크 디케이-1826 프레데릭스베르그 씨. 알함브라바이 3
(72) 발명자
스탈텐 에이빈드 펠 토르
덴마크 디케이-2650 히비도브레 캐서린 부스 베주 17
앤더슨 매즈 할드
덴마크 디케이-2900 헬레럼 에스티.티브. 에스텔스베주 27
(74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 38 항

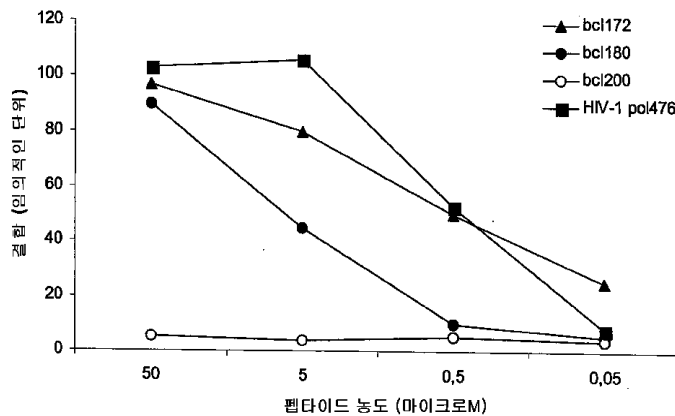
심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 B c 1-2 패밀리에 속한 단백질들, 그들의 단편들 및 암 환자에 대한 그들의 용도

(57) 요약

본 발명은 약학적 조성물에 있어서의 용도를 위한 Bcl-2 패밀리에 속하는 단백질 및 그들의 펩타이드 단편들에 관한 것이다. 본 발명에서 개시된 단백질 및 펩타이드 단편들은 특히 암의 치료를 위한 백신 조성물에서 유용하다. 또한 본 발명은 상기 조성물을 이용한 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 측면은 개시된 단백질 및 펩타이드 단편들을 특이적으로 인식하는 T-세포들 및 T-세포 수용체를 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

Bcl-X_L(B-cell leukemia/lymphoma X_L) 단백질로부터 유래한, 의약으로 사용되기 위한 면역학적으로 활성화된 분리된 펩타이드로서,

YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO:45), VLVSRIAAWM (SEQ ID NO: 48) 및 VAFSFGGAL (SEQ ID NO: 49)로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 의약으로 사용되기 위한 것으로서, MHC(Major histocompatibility complex) 클래스 I 제한된 펩타이드이며, 하기의 특성 중 적어도 하나를 갖는 것인 펩타이드:

(i) 어셈블리 결합 분석에 의해 측정된 것으로서 최고 50 μM에서 클래스 I HLA(Human leukocyte antigen) 분자의 최고 회복력의 반(C₅₀ 값)이 가능한 펩타이드의 양에 의해 측정될 때 친화력에서 제한되는 클래스 I HLA 분자에 결합가능하고,

(ii) ELISPOT(Enzyme-linked immunosorbent spot) 분석에 의해 측정될 때 10⁴ PBL(peripheral blood lymphocytes)당 적어도 1의 빈도에서 암 환자의 PBL 집단에서 INF-γ-생산 세포(Interferon-gamma producing cell)를 유도할 수 있거나

(iii) 에피토프 펩타이드에 반응하는 CTL(cytotoxic T lymphocytes)의 종양 조직에서 인 시투(*in situ*) 측정이 가능한 것.

청구항 3

제2항에 있어서, C₅₀ 값을 최고 30 μM에서 갖는 펩타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, C₅₀ 값을 최고 20 μM에서 갖는 펩타이드.

청구항 5

제4항에 있어서, C₅₀ 값을 최고 10 μM에서 갖는 펩타이드.

청구항 6

제1항에 있어서, 암 환자에 있어서 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 것인 펩타이드.

청구항 7

제1항에 있어서, MHC 클래스 I HLA-A 분자 또는 MHC 클래스 I HLA-B 분자에 의해 제한되는 펩타이드.

청구항 8

제7항에 있어서, HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 및 HLA-A24로 구성되는 군에서 선택되는 MHC 클래스 I HLA 종에 의하여 제한되는 펩타이드.

청구항 9

제8항에 있어서, HLA-A2로 제한되는 펩타이드.

청구항 10

제7항에 있어서, HLA-B7, HLA -B35, HLA -B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 및 HLA-B51로 구성되는 군으로부터

선택되는 MHC 클래스 I HLA-B에 의해 제한되는 펩타이드.

청구항 11

제1항에 있어서, 데카펩타이드(decapeptide)인 펩타이드.

청구항 12

제6항에 있어서, 적어도 10^4 PBL 당 10의 빈도에서 암 환자의 PBL 집단에서 INF- γ -생산하는 세포를 유도할 수 있는 펩타이드.

청구항 13

제6항에 있어서, Bcl- χ_L 단백질이 발현하는 암 질환을 갖는 환자의 PBL 집단에서 INF- γ -생산하는 세포를 유도할 수 있는 펩타이드.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암 질환은 만성 림프성 백혈병 및 만성 골수성 백혈병을 포함하는 조혈 악성 종양, 흑색종, 유방암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 결장암, 췌장암 및 전립선암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 펩타이드.

청구항 15

제1항에 따른 Bcl- χ_L 로부터 유래한 면역학적으로 활성화된 분리된 펩타이드 또는 상기 펩타이드를 인코딩하는 핵산을 포함하는, 암 질환에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 의약으로서 사용되기 위한 백신 조성물로서,

상기 펩타이드는 하기의 특성 중 적어도 하나를 갖는 MHC 클래스 I-제한된 펩타이드인 것인 백신 조성물:

(i) 어셈블리 결합 분석에 의해 측정된 것으로서 최고 50 μ M에서 클래스 I HLA 분자의 최고 회복력의 반 (C_{50}) 값이 가능한 펩타이드의 양에 의해 측정될 때 친화력에서 제한되는 클래스 I HLA 분자에 결합가능하고,

(ii) ELISPOT 분석에 의해 측정될 때 10^4 PBL당 적어도 1의 빈도에서 암 환자의 PBL 집단에서 INF- γ -생산 세포를 유도할 수 있거나

(iii) 에피토프 펩타이드에 반응하는 CTL의 종양 조직에서 인 시투(*in situ*) 측정이 가능한 것.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 백신은 백신주사를 맞은 환자에 있어서 암 질환에 대한 세포 독성 효과를 갖는 이펙터 T-세포(effector T cells)의 생산을 유도하는 것인 백신 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 조성물은 어쥬번트를 함유하는 것인 백신 조성물.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 조성물은 MHC 클래스 I HLA-B 분자에 의하여 제한되는 펩타이드와의 조합으로 MHC 클래스 I HLA-A 분자에 의하여 제한되는 펩타이드를 함유하는 것인 백신 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 어쥬번트는 박테리아 DNA 기초 어쥬번트, 오일/계면활성제 기초 어쥬번트, 바이러스성 dsRNA 기초한 어쥬번트 및 이미다조치닐린(imidazochinilines)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 백신 조성물.

청구항 20

제15항에 따른 백신 조성물을 포함하고, 항암제를 더 포함하는 키트-오브-파트(kit-of-parts).

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 항암제는 항체인 것인 키트-오브-파트.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 항암제는 사이토카인인 것인 키트-오브-파트.

청구항 23

암 환자에 있어서 PBL(peripheral blood lymphocytes) 또는 종양 조직에서 Bcl-X_L(B-cell leukemia/lymphoma X_L)와 반응하는 T 세포 존재의 엑스 비보(ex vivo) 또는 인 시투(in situ) 진단을 위한 조성물로서, 청구항 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드 또는 제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 백신 조성물로부터 제조된 암 질환의 치료 또는 예방용 의약.

청구항 25

제24항에 있어서, 치료되기 위한 질환은 Bcl-X_L 단백질 패밀리 멤버가 발현되는 암 질환인 것인 의약.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 암 질환은 만성 림프성 백혈병 및 만성 골수성 백혈병을 포함하는 조혈 악성 종양, 흑색종, 유방암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 결장암, 췌장암 및 전립선암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 의약.

청구항 27

제24항에 있어서, 추가적인 암 치료법과 조합되는 것인 의약.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 추가적인 치료법은 화학치료, 방사선 치료, 면역자극물질로 치료, 유전자 치료, 항체로 치료 및 수지상 세포를 이용한 치료로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 의약.

청구항 29

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드는 암 질환의 치료 또는 예방에 사용되기 위한 것인 펩타이드.

청구항 30

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백신 조성물은 암 질환의 치료 또는 예방에 사용되기 위한 것인 백신 조성물.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 치료 대상 질병은 Bcl-X_L 단백질 패밀리 멤버가 발현하는 암 질환인 것인, 제29항에 따라 사용되기 위한 펩타이드.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 치료 대상 질병은 Bcl-X_L 단백질 패밀리 멤버가 발현하는 암 질환인 것인, 제30항에 따라 사용되기 위한 백신 조성물.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 암 질환은 만성 림프성 백혈병 및 만성 골수성 백혈병을 포함하는 조혈 악성 종양, 흑색 종, 유방암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 결장암, 췌장암 및 전립선암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, 제29항에 따라 사용되기 위한 펩타이드.

청구항 34

제30항에 있어서, 상기 암 질환은 만성 림프성 백혈병 및 만성 골수성 백혈병을 포함하는 조혈 악성 종양, 흑색 종, 유방암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 결장암, 췌장암 및 전립선암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, 제30항에 따라 사용되기 위한 백신 조성물.

청구항 35

제29항에 있어서, 추가적인 암 치료법과 조합되는 것인, 제29항에 따라 사용되기 위한 펩타이드.

청구항 36

제30항에 있어서, 추가적인 암 치료법과 조합되는 것인, 제30항에 따라 사용되기 위한 백신 조성물.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 추가적인 치료법은 화학치료, 방사선 치료, 면역자극물질로 치료, 유전자 치료, 항체로 치료 및 수지상 세포를 이용한 치료로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, 제35항에 따라 사용되기 위한 펩타이드.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 추가적인 치료법은 화학치료, 방사선 치료, 면역자극물질로 치료, 유전자 치료, 항체로 치료 및 수지상 세포를 이용한 치료로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, 제36항에 따라 사용되기 위한 백신 조성물.

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 암 예방 및 치료 분야와 관련이 있다. 특히 항암 면역 반응을 유도해 낼 수 있는 분리된 세포자살(apoptosis) 조절 단백질들 또는 그들의 펩타이드 단편들을 제공하고 있다. 특히, 암 치료, 진단 및 예 후에 있어서 Bcl-2 단백질 패밀리에 속한 그러한 단백질들 및 그들의 면역성 펩타이드 단편들의 용도를 제공한다.

배경기술

[0002] 화학치료제의 폭넓은 다양성에 대한 암 세포들의 내성의 발전은 암의 성공적인 치료에 있어서 주요한 방해가 된다. 약제내성(drug resistance)은 넓은 범위의 암 세포 타입들에 있어서 관찰된다. 많은 메카니즘들이 약 불활성화, 세포막 펌프에 의한 약 방출, 약제 표적들의 돌연변이 및 세포자살 개시의 실패를 포함하는 약제내성에 공헌하고 있다. 세포자살의 저지는 미토콘드리아 세포막 전위의 보유 및 사이토카인 자극을 포함하는 갖가지 상

황을 초래할 수 있다.

- [0003] 약제내성 표현형에 대한 책임을 갖고 있는 단백질들의 검색은 항세포자살 분자 Bcl-2와 관련이 있다. Bcl-2의 과발현은 백혈병, 다른 세포자살-관련 종양들에 있어서 약제내성의 발전에서 역할을 하고 있고, 그 결과로서, 다양한 인간 암들에 있어서 약한 예후를 가진다. Bcl-2는 Bcl-2 패밀리에 속하고, 그들의 멤버들은 세포자살을 조절한다. 그 패밀리는 프로아포프토틱(proapoptotic) 및 항세포자살(antiapoptotic) 멤버 모두를 포함하고 있다. 비록 어떻게 Bcl-2가 항 세포자살 효과에 작용하는지에 대한 정확한 이해는 여전히 불분명하지만, 백혈병 및 임파종에서만 아니라 폐, 결장, 전립선 및 유방암을 포함하는 수많은 암에서 과발현되고 있는 것이 알려졌다.
- [0004] 그러므로, Bcl-2는 결정적인 세포 인자로서, 그 단백질의 증가된 발현 수준이 세포자살 자극에 대한 저항성을 부여하고, 그것에 의해 암의 발병 및 진행에 기여하기 때문이다.
- [0005] 포유류의 면역 시스템이 외래 또는 이질적인 물질에 대해 인식하고 반응하는 과정은 복잡하다. 그 시스템의 중요한 측면은 T-세포 반응이다. 이 반응은 T 세포가 MHC(인간 주요 조직적합성 복합체)를 HLA(인간 백혈구 항원)으로서 일컬어지는 세포 표면 분자들의 복합체들 및 펩타이드들을 인식하고 상호작용하는 것을 요구한다. 그 펩타이드들은 좀더 큰 분자들로부터 유래되고, 이는 세포들에 의해 진행되어 차례로 HLA/MHC 분자를 제시한다. T 세포들과 HLA/펩타이드 복합체들의 상호작용은 제한적인데, 이는 T 세포가 HLA 분자 및 펩타이드의 특정한 조합에 대해서 특이적임을 요구하기 때문이다. 만약 특이 T 세포가 존재하지 않는다면 그것의 파트너 복합체가 존재한다 하더라도 T-세포 반응은 일어나지 않는다. 마찬가지로 특정 복합체가 존재하지 않는다면 T 세포가 존재한다 하더라도 반응이 일어나지 않는 것이다.
- [0006] T 세포들이 세포 이상을 인식하는 것에 의한 메카니즘은 또한 암에서도 연관되어 있으며, 그 예로 WO 92/ 0356 에서는, 차례로 세포 표면에서 발현되는 펩타이드로 진행되는 유전자들의 패밀리가 개시되어 있고, 이들은 특이적 CTLs에 의해 종양세포의 용해를 이끌 수 있다. 이들 유전자들은 MAGE 패밀리로 언급되고, "종양 제한 항원 전구체들(tumour rejection antigen precursors)" 또는 "TRAP" 분자들을 위한 코드로 불리워지기도 하며, 그러므로 그들로부터 유래된 펩타이드들은 "종양 제한 항원들(tumour rejection antigens)" 또는 "TRAs"로서 언급된다.
- [0007] WO 94/05304에서는, 노나펩타이드들(nonapeptides)이 HLA-A1 분자에 결합하는 것이 개시되었다. 이 자료는 특정한 HLA 분자들을 위한 특정한 펩타이드들의 알려진 특이성이 주어진다면 다른 것이 아닌 하나의 HLA 분자에 결합하는 특정한 펩타이드를 기대할 수 있음을 개시하고 있다. 이는 서로 다른 개체가 다른 HLA 표현형을 소유하는 것처럼 의미있다. 결론적으로, 특정 HLA 분자를 위한 파트너가 되는 것으로서 특정한 펩타이드의 동정이 진단적 및 치료적인 세분화(ramifications)을 가지지만, 이들은 오직 그 특정한 HLA 표현형을 가진 개체와 관련이 있다.
- [0008] *그러므로, 종양 관련 항원들(TAAs)로부터 유래된 펩타이드는 MHC 분자들과의 관계에서 CTLs(cytotoxic T lymphocytes)에 의해 항원으로서 인식되어 질 수 있게 된다. 그러나, 비록 전부가 아닌 대부분의 종양들이 항원성이라 하더라도, 오직 몇몇만이 종양 진행이 면역 시스템에 의하여 점차적으로 조절되는 어떤 의미에서의 진정한 면역원성인 것이다.
- [0009] 이러한 한계를 극복하기 위하여, 몇몇 면역 치료학적인 연구들이 개시되었는데, 예를 들면 TAA-유래 펩타이드들의 백신화이다. 흑색종의 경우, CTL-확인된 TAAs의 가장 많은 수가 종양으로서 특정되어졌고, 항원에 대항한 강력한 CTL 반응이 백신에 의해 유도되며, 어떤 환자들은 그들 병의 완전한 치료를 경험하였다. 그러나 이들 백신 시도에서 사용된 펩타이드 에피토프들의 대부분은 멜라노사이트 특이적이며, 이들 펩타이드들은 비-멜라노사이트 기원의 종양에는 적용될 수 없다. 게다가 이들 TAAs의 발현은 서로 다른 환자들의 종양들 사이에서 혼성(heterogeneous)이며, 한 환자로부터 수득된 전이에서도조차 다양할 수 있다. 그러나 지난 2년동안, 수많은 다양한 암들에서 발현되어지는 많은 수의 종양 특이적 펩타이드 항원들, 예를 들어 HER-2, Muc-1 및 텔로머라아제 등이 동정되어져 왔다.
- [0010] 세포자살(Apoptosis)은 세포 자살의 유전적 프로그램으로서 세포자살의 억제제 돌연변이 형성의 축적을 선호하는 세포들의 수명 기간을 연장시킴으로써 암 형성에 관련된 중요한 메카니즘으로 제안되어져 왔다. 설비빈(Survivin)은 최근에 동정된 세포자살 단백질의 억제제(Inhibitors of apoptosis proteins, IAPs) 패밀리의 멤버이다. 약 4백만 전사체의 전체적인 유전자 발현 분석에서, 설비빈은 정상조직이 아닌 많은 종류의 암에서 변

함없이 상향-조절된 상위 유전자 중의 하나로서 동정되었다. 조혈 악성 종양에서뿐만 아니라 폐, 결장, 유방, 췌장 및 전립선암을 포함한 고형암(solid malignancies)에서 설비빈은 과발현시킨다. 추가로, 일련의 흑색종(melanoma) 또는 비-흑색종 피부 암들은 변함없이 설비빈 양성으로 보고되었다. 대부분 인간의 암에 있어서 설비빈의 과발현은 종양 진행에 있어서 세포자살 억제제의 일반적인 규칙을 제한하는데, 이 개념은 신경아세포종(neuroblastoma) 뿐만 아니라 결장 및 방광암의 경우에 있어서 설비빈의 발현이 나쁜 예후와 관련되어 있다는 관찰에 의해 입증되었다. 반대로, 설비빈은 정상적인 성인 조직에서는 관찰되지 않는다. 이러한 특성은 진단 및 치료 목적을 위한 적당한 TAA로서의 설비빈에 자격을 준다.

[0011] 그러므로, 지난 10년 동안, MHC-제한된 형태로서 CTLs에 의해 인식되어지는 많은 수의 TAAs 가 동정되었다. 설비빈이 대부분 인간의 암에서 과발현되고 그것의 기능 억제가 세포자살을 증가시키는 결과를 가지기 때문에, 이 단백질은 치료적 CTL 반응을 위한 표적으로서 제공되어 질 것이다. 설비빈 단백질 및 이것의 가능한 진단 및 치료적인 용도가 Altieri et al(Altieri, D. C., Marchisio, P. C., and Marchisio, C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest*, 79: 1327-1333, 1999) 및 참고자료로서 제출된 US 6,245,523에 개시되었다. 설비빈은 단일 BIR 및 RING 핑거 대신 고도로 충전된 카르복시-말단의 감겨진 코일 지역(highly charged carboxy-terminal coiled coil region)을 함유하는 16.5 kDa 세포질 단백질이며, 이는 B 세포 전구체로 전달될 때 성장 인자(IL-3) 철회에 의해 유도되는 세포자살을 억제한다. 설비빈을 코딩하는 유전자는 EPR-1(Effector Cell Protease Receptor-1)의 서열과 거의 동일하지만 반대방향에서 기원된 것이어서 헤드-투-헤드 구성에서 복제된 두개의 분리된 유전자가 존재하게 된다. 따라서, 설비빈은 안티센스 EPR-1 산물로서 묘사될 수 있다. 기능적으로, 그것의 자연적인 안티센스 EPR-1 전사의 상향-조절에 의한 설비빈 발현의 억제는 광범위한 세포자살 및 감소된 세포성장을 초래한다.

[0012] US 6.245.523는 정제된 설비빈의 분리를 개시하고, 그것은 설비빈 단백질을 코딩하는 핵산 분자와 설비빈 결합하는 항체 및 다른 분자들을 제공한다. US 6.245.523 는 또한 설비빈 단백질의 항 세포자살적으로 활성화된 단편들 및 그것의 변형체를 개시하고, 여기에서 아미노산 잔기는 공개된 설비빈 서열의 N- 또는 C- 말단에, 또는 내부에 삽입된다. 그러한 펩타이드들이 세포자살을 위해 요구되는 핵심 기능적인 잔기들, 예로 67 위치에 Trp, 73 위치에 Pro 및 84 위치에 Cys 을 함유하고 있어야 함을 특별히 개시하고 있다.

[0013] 지난 10년 동안, 다수의 임상적인 시도가 암 환자들에 있어 항 종양 T-세포 반응을 유도하기 위하여 특정 펩타이드 백신의 가능성을 보여주고 있다. 그러나, 환자들의 임상 과정이 대부분의 경우에 개선되지 못했다. 이러한 모순은 많은 경우에 있어서 종양 세포들의 면역 탈출 메카니즘에 의해 설명된다. 암 성장에 있어 중요한 역할을 하지 않는 항원을 목표로 하는 치료 전략을 위해 불충분한 암 세포 항원의 선별이 잘 인식되어야 하는 한계가 있다.

[0014] 그러나, 유방암 환자의 경우에, Bcl-2 단백질의 모순된 역할이 관찰되었다. 초기 유방 종양에 있어서, Bcl-2 음성이 더욱 나쁜 임상 결과와 연관되어 있다. 추가로, Bcl-2 단백질의 과발현은 Bcl-2 유전자의 프로모터 영역에서 에스트로겐 수용체 반응 요소에 의해 매개되는 에스트로겐-양성 종양과 상호 관련이 있음이 보고되었다. 에스트로겐-양성 종양의 예후는 에스트로겐 수용체-음성 종양의 그것보다 좀 더 좋다. 이러한 의미있는 모순된 결과를 위한 몇몇 가능한 설명들이 제안되었는데, 예를 들어 세포 증식에 대한 Bcl-2의 억제 효과, 에스트로겐에 의한 Bcl-2 발현의 조절, 및/또는 그것의 세포보호적(cytoprotective) 기능을 억제하는 Bcl-2 길항제의 존재이다.

[0015] 여전히, 상기 연구들은 또한 유방암에서 Bcl-2의 과발현이 억제내성과 상호연과되어있음을 보여주고, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 Bcl-2의 하향조절이 세포자살과 연관된 억제 민감도를 조절하는 것을 보여주고 있다. 게다가, 유방암 세포주로의 Bcl-2의 유전자 전달감염(gene transfection)이 일관되게 세포자살에 대한 증대된 저항성을 초래한다. 추가로, 세포자살의 또다른 억제제의 존재가 기술되었는데, 유방암에서 단백질 설비빈은 Bcl-2의 발현 및 감소된 아포프토 지수(Apoptotic index, AI) 및 약한 전반적인 생존과 강하게 관련되어 있다. 설비빈과 Bcl-2사이의 유사한 관련이 신경아세포종(neuroblastoma), 위암(gastric cancer), 결장암(colorectal cancer) 및 하이 그라이드 비 호지킨 림프종(high-grade non-Hodgkin's lymphoma)에서도 발견된다. 그러므로 대부분의 다른 인간의 암에서와 마찬가지로 유방암에 있어서도, 세포자살의 억제가 일반적인 주안점으로서, 항-세포자살 유전자, 예를 들어 설비빈 및/또는 Bcl-2 유전자들의 발현은 감소된 아포프토 지수(AI)에서 반영된 것과 같이, 좀더 명백한 항세포자살 효과를 유발할 수 있다. 최근들어 설비빈은 다양한 암을 가진 환자들에 있어 자발적인 T-세포 반응성을 위한 표적이 되는 것이 보여진다. 이러한 초기 발견들은 우리들 자신 또는 다른 사람들에 의해 확인되고 강화되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 발명의 요약

[0017] 본 발명은 MHC 클래스 I 제한된 펩타이드들이 설비빈보다 단백질을 조절하는 세포자살의 다른 클래스, 예를 들어 Bcl-2 단백질 패밀리로부터 유래될 수 있다는 발견에 기초한다. 상기 Bcl-2 단백질 패밀리는 MHC 클래스 I HLA 분자들과 결합이 가능하며 이로 인하여 암 질환을 앓고 있는 환자들에 있어서 CTL 면역반응을 유도한다. 이러한 발견은 Bcl-2 단백질 패밀리에 속한 단백질들이 TRAP 분자로서 행동하여, 세포들에 의해 *in vivo*에서 TRA 기능성을 가진 펩타이드들로 진행되는 것이 증명되었다. 이러한 발견들이 암 질환의 제어에 있어 일반적으로 적용가능할 수 있는 신규한 치료 및 진단적 접근을 위한 방법을 열었다.

[0018] 본 발명은 Bcl-2가 암 질환에 대한 면역 치료를 위한 적절한 표적이 됨을 개시하고 있다. Bcl-2는 중요한 세포 내 인자이며 그것의 발현은 종양 세포들의 생존을 위해 중요하다. 그러므로, Bcl-2는 백신을 위한 매력적인 표적이 되는데, 이 단백질의 발현의 하향조절 및 손실에 의한 면역 탈출이 유지된 종양 성장에 손상을 주기 때문이다. 게다가, 본 발명을 이끄는 연구에서, 본 발명자들은 ELISPOT 분석을 사용하여 유방암 환자들에게서 Bcl-2 유래된 펩타이드들에 대한 PBL(peripheral blood lymphocytes)에서 자발적인 T-세포 반응성을 검색하고 발견하였다.

[0019] 따라서, 본 발명은 암의 예방 또는 치료에 있어서 의약으로서의 용도를 위한 Bcl-2 단백질 패밀리에 속한 분리된 단백질, 또는 이것들의 면역학적으로 활성화된 펩타이드 단편과 관련되어 있다. 특히, 본 발명은 암의 예방 또는 치료에 있어서 의약의 용도를 위하여, Bcl-2 단백질 패밀리에 속한 단백질으로부터 유래된 면역학적으로 활성화된 분리된 펩타이드 단편들과 관련있다.

[0020] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 상기 단백질 및/또는 펩타이드 단편을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한, Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 분리된 단백질 또는 그것의 면역학적으로 활성화된 펩타이드 단편 또는 상기 단백질 또는 상기 펩타이드를 코딩하는 핵산을 함유하는 백신 조성물을 암의 예방 또는 치료에 있어서 의약의 용도로서 제공한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 측면은 Bcl-2 단백질 패밀리 멤버와 반응하는 암 환자에 있어서 PBLs 또는 종양 조직에서 T 세포들의 존재의 *ex vivo* 또는 *in situ* 진단을 위한 진단 키트 및 상기에서 정의된 본 발명의 펩타이드 단편을 포함하는 키트; 본 발명의 펩타이드 단편과 클래스 I HLA 분자 또는 그 분자의 단편의 복합체와 관련있다.

[0023] 또한, 본 발명의 목적은 암 환자에 있어서 T 세포에 반응적인 Bcl-2 단백질 패밀리 멤버의 존재를 측정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기에서 정의된 본 발명의 복합체를 종양 조직 또는 혈액 샘플에 접촉, 그 조직 또는 혈구에 그 복합체의 결합을 측정하는 것을 포함한다.

[0024] 추가로, 특이적으로 본 발명의 펩타이드 단편에 특이적으로 결합가능한 분자 및 상기 결합을 차단할 수 있는 분자를 제공한다.

[0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암 질환을 치료하는 방법과 관련이 있다. 이 방법은 본 발명의 약학적 조성물, 본 발명의 펩타이드 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 본 발명의 분자 및/또는 그러한 결합을 차단할 수 있는 분자의 효과적인 양을 질환을 앓고 있는 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암 질환의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 여기에서 정의된 단백질 또는 펩타이드 단편의 용도를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0027] 발명의 상세한 설명

[0028] 본 발명의 주요 목적은 암의 예방 또는 치료에 있어 의약으로서의 용도로 Bcl-2 단백질 패밀리에 속한 분리된 단백질 또는 그것의 면역학적으로 활성을 갖는 분리된 펩타이드 단편들을 제공하는 것이다.

- [0029] Bcl-2 단백질 패밀리는 세포자살을 조절하는 몇몇 단백질들을 포함하고 있다. 이 패밀리는 프로아포프토틱 및 항세포자살 멤버들을 포함하고 있다. 본 발명의 명세서에서, 암에 있어서 약학적으로 또는 진단학적으로 활성화된 물질들로서 상기 단백질 패밀리의 가능성이 Bcl-2 단백질과 관련하여 상세하게 연구되었다. 추가로, 약학적 및 진학적으로 활성화된 물질로서 Bcl-X_L 및 Mcl-1의 가능성이 상세하게 개시되었다. 그러나, Bcl-2 단백질 또는 그것의 단편들에 대한 그런 관찰들과 유사한 면역 반응이 존재하거나 암 환자에 있어서 Bcl-2 단백질 패밀리의 다른 멤버, 예를 들어 암에 있어서 억제내성 및 과발현과 관련되어 있는 Mcl-1 또는 Bcl-X_L과 같은 다른 항세포자살 단백질에 대항하여 도입될 수 있다. 따라서, 본 발명은 Bcl-2 단백질 패밀리의 어떠한 멤버, 바람직하게는 암 환자에서 면역 반응을 유도할 수 있는 항세포자살 멤버로서, 예를 들어 Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-b, Bcl2-L-10 및 Bcl-X_L로 구성된 그룹에서 선택된 단백질, 바람직하게는 Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w 및 Bcl-X_L로 구성된 그룹에서 선택된 단백질, 더 바람직하게는 Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-X_L로 구성된 그룹에서 선택된 단백질에 관한 것이다.
- [0030] Bcl-2 항-세포자살 패밀리의 멤버들은 정상적으로 죽음으로 예정된 세포에서 세포자살을 억제함으로써 그들의 발암효과에 영향을 미쳐서, *in vivo*에서 세포들의 축적을 촉진시킨다.
- [0031] Bcl-2 단백질 패밀리의 모든 멤버들은 Bcl-2 상동성(BH) 도메인(BH1, BH2, BH3, 및 BH4)으로 알려진 4개의 보존된 모티프들 중에서 적어도 하나를 함유하고 있다. BH 도메인의 존재에 추가하여, 바람직한 항세포자살 분자들은 카르복실-말단 멤브레인-앵커링 도메인(TM)을 가지고 있다. Bcl-2 및 Bcl-X_L과 같은 항세포자살 멤버들은 트랜스멤브레인 도메인을 따라서 모두 4개의 BH 도메인을 함유하고 있다. Bax 및 Bak와 같은 다중도메인 프로아포프토틱 단백질들은 거의 BH4 도메인을 함유하고 있다. '오직 BH3-도메인'(예 Bad 및 Bid)으로 알려진 프로아포프토틱 단백질의 두번째 하위그룹은 오직 BH3 도메인을 가지고 있으며 다른 BH 도메인은 결실된 분자로 구성되어 있다. bcl-x 및 mcl-1 유전자의 얼터네티브리 스플라이스드 폼(alternatively spliced forms)을 대표하는 Bcl-X_S 및 Mcl-1S와 같은 프로아포프토틱 단백질들은 각각 BH1 및 BH2 도메인이 결핍되어 있다. 추가로, Mcl-1S는 트랜스멤브레인 도메인이 결핍되어 있다. Bcl-2 단백질 패밀리에 속한 단백질들은 예로서 Shangary S et al (Shangary S and Johnson DE (2003) Recent advances in the development of anticancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protein family. *Leukemia* 17:1470-1482) 에 개시되어 있다.
- [0032] 비록 Bcl-2 단백질 패밀리에 속한 단백질이 항세포자살 성질을 가지고 있는 것이 바람직하다고 할지라도, Bcl-2 패밀리에 속한 단백질이 예를 들어 Bax, Bok/Mtd, Bad, Bik/Nbk, Bid, Hrk/DP5, Bim, Noxa, Bmf 및 PUMA/bbc3로 구성되는 그룹에서 선택되는 프로아포프토틱 단백질일 수 있다고 보는 본 발명에서와는 비교된다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 실시형태에 있어서, Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질은 Bcl-2, 바람직하게는 인간 Bcl-2, 더욱 바람직하게는 SwissProt 데이터베이스에서 제1 접속 번호 P10415를 갖는 서열의 Bcl-2이다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시 형태에 있어서, Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질은 Bcl-X_L이고, 바람직하게는 인간 Bcl-X_L이며, 더욱 바람직하게는 SwissProt 데이터베이스에서 제1 접속 번호 Q07817를 갖는 서열의 Bcl-X_L이다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시 형태에 있어서, Bcl-2 패밀리에 속하는 단백질은 Mcl-1, 바람직하게는 인간 Mcl-1, 더욱 바람직하게는 SwissProt 데이터베이스에서 제1 접속 번호 Q07820을 갖는 서열의 Mcl-1이다.
- [0036] 수많은 인간 암들이 Bcl-2 및 Bcl-2 패밀리의 다른 멤버들을 높은 수준으로 발현시키기 때문에, 이들 항원들을 목적으로 하는 면역치료학적 전략은 넓은 임상 적용을 가질 수 있다. 그러한 접근의 주요한 관점은 자동-반응 면역 반응을 유도하는 것이다. 그러므로, 이 단백질 패밀리에 속한 멤버들에 기초한 백신의 미래는 치료 효능 및 면역접종(immunisation)이 따를지도 모르는 부작용의 종류에 의존하게 될 것이다. 멜라토사이트에서 분화된 항원으로부터 유래된 펩타이드들이 IV 단계 흑색종을 가진 환자들을 치료하기 위해 처음 사용되었을 때, 차례로 그자체로 임상적으로 백반증(vitiligo) 또는 망막염(retinitis)으로서 명백하게 되었다. 그러나 임상적인 경험은 백신을 맞은 환자들에게서 백반증의 발병이 다른 형태의 치료를 받은 환자들에게서 저색소침착증(hypopigmentation)과 관련된 멜라노마의 발명보다 현저하게 높지 않음을 증명하였다. 추가로 자가 항원에 대한

다양한 백신의 시도에 대한 심각한 부작용은 아직 보고되지 않았다.

[0037] 하나의 유용한 실시 형태에 있어서, 몇몇 형태 중 적어도 하나에 의해 특징되어지는 신규한 MHC 클래스 I-제한 펩타이드 단편들(이하 "펩타이드"로서 언급되기도 한다)을 제공한다. 이는 여기에서 개시된 것 처럼 어셈블리 결합 분석에 의해 측정된 최고 50 μM에서 클래스 I HLA 분자의 최고 회복력의 반(C₅₀ 값)을 갖는 펩타이드의 양에 의해 측정되는 것같은 친화력에서 제한되는 클래스 I HLA 분자에 결합할 수 있는 것의 하나로 특징되어질 수 있다. 이 어셈블리 분석은 앞서 개시된 Andersen et al.(Andersen, M. H., L. Tan, I. Sondergaard, J. Zeuthen, T. Elliott, and J. S. Haurum. 2000. Poor correspondence between predicted and experimental binding of peptides to class I MHC molecules. *Tissue Antigens* 55:519)에서와 같이 수행되고, 이는 펩타이드 수송체 결합 세포주 T2로 펩타이드를 로딩한 후 HLA 분자의 안정화에 기초한다. 그 결과, 정확하게 접혀진 안정한 HLA 헤비 체인이 의존적인 항체를 확인함으로써 면역침강되고, 펩타이드 결합은 정량된다.

[0038] 이 분석은 상기의 친화력에서 주어진 HLA 대립 유전자 분자에 결합하는 그들의 능력을 위한 후보 펩타이드들을 스크리닝하는 단순한 수단을 제공한다. 바람직한 실시 형태에 있어서, 본 발명의 펩타이드 단편은 C₅₀ 값이 최고 30 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 및 2 μM 인 것 중에서 하나를 가진다.

[0039] 그러나, 본 발명에 다른 더욱 바람직한 펩타이드들은 ELISPOT 분석, 예를 들어 하기의 실시예 1, 섹션 4에서 개시된 ELISPOT 분석에 의해 측정된 것으로서 특이적 T-세포 반응을 일으킬 수 있는 펩타이드들이다. 높은 친화력으로 MHC에 결합하지 않는 몇몇 펩타이드들이라도 여전히 ELISPOT에 의해 결정된 것처럼 T-세포 반응을 일으킬 수도 있다. 높은 친화력으로 MHC에 결합가능한 다른 펩타이드들은 ELISPOT에 의해 결정된 것처럼 T-세포 반응을 또한 일으킬 수 있다. 양 종류의 펩타이드들은 본 발명에 따른 바람직한 펩타이드들이다.

[0040] 그러므로, 본 발명에 따른 바람직한 펩타이드들은 ELISPOT 분석에 의해 측정된 것처럼 특이적인 T-세포 반응을 야기시키는 것이 가능하고, 10⁸ 세포 당 50 펩타이드 특정 스팟보다 더 많이, 더욱 바람직하게는 10⁷ 세포당, 좀더 바람직하게는 10⁶, 좀더 바람직하게는 10⁵, 더욱더 바람직하게는 10⁴ 세포당 측정되었다.

[0041] 상기에서 언급한 바와 같이, HLA 시스템은 인간의 주요한 조직적합성(MHC) 시스템을 대표한다. 일반적으로서, MHC 시스템은 이식 항원(transplantation antigens), 흉선 의존 면역 반응, 일정한 보체 인자들 및 일정한 질환에 대한 소질과 같은 특성의 범위를 제어한다. 좀더 상세하게는, 세가지의 다른 타입의 분자들, 예를 들어 클래스 I, II 및 III 분자들을 코드하고, 좀더 일반적인 MHC의 특성을 결정한다. 이러한 분자들의, 클래스 I 분자들은 소위 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 분자로 불리워지고, 이들은 대부분 유핵세포들 및 혈소판의 표면에 존재한다.

[0042] 본 발명의 펩타이드들은 특정 MHC 클래스 I HLA 분자에 대한 결합능력(에 의해 제한되는) 특징된다. 그러므로, 하나의 실시 형태에서 펩타이드는 HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A9, HLA-A10, HLA-A11, HLA-Aw19, HLA-A23(9), HLA-A24(9), HLA-A25(10), HLA-A26(10), HLA-A28, HLA-A29(w19), HLA-A30(w19), HLA-A31(w19), HLA-A32(w19), HLA-Aw33(w19), HLA-Aw34(10), HLA-Aw36, HLA-Aw43, HLA-Aw66(10), HLA-Aw68(28), HLA-A69(28)을 포함하는 MHC 클래스 I HLA-A 분자에 의해 제한되는 하나를 의미한다. 좀더 명료한 지정은 또한 논문을 통해 또한 사용된 것으로서, 예를 들어 A-Aw19 및 HLA-A24(49) 대신에 HLA-A19 또는 HLA-A24와 같이, 오직 제1의 숫자 지정이 이용되어졌다. 특정 실시 형태에서는, 본 발명의 펩타이드는 HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 및 HLA-A24로 구성된 그룹으로부터 선택된 MHC 클래스 I HLA 종류로 제한된다.

[0043] 본 발명의 펩타이드들은 Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버의 공지의 서열(Reed, J. C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17:3225)로부터 유래될 수도 있다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 펩타이드는 최고 200, 바람직하게는 최고 100, 더욱 바람직하게는 최고 50, 더더욱 바람직하게는 최고 25, 더더욱더욱 바람직하게는 최고 20, 더더더욱더욱 바람직하게는 최고 15, 최고 10을 함유한다(좀더 바람직하게는 구성된다). 예를 들어 Bcl-2 단백질 패밀리의 상기에서 언급한 멤버들 중의 하나의 9 내지 10 연속 아미노산의 범위에서, 바람직하게는 SwissProt 데이터베이스에서 제1 접속 번호 P10415를 갖는 Bcl-2로부터, 제1 접속 번호 Q07820을 갖는 Mcl-1로부터 또는 제1 접속 번호 Q0787을 갖는 Bcl-X_L로부터를 들 수 있다.

[0044] 특정 HLA 분자에 결합 능력을 갖는 펩타이드들의 선별은 펩타이드들에서 특정 위치의 소수의 연관된 아미노산의 지배가 나타나는 주어진 특정 HLA 분자에 결합하는 공지 서열들의 조정에 의해서 만들어질 수 있다. 그런 지배적인 아미노산 잔기들은 또한 "앵커 잔기들(anchor residues)" 또는 "앵커 잔기 모티프"로서 또한 인용될 수 있

다. 접근가능한 데이터베이스에서 발견될 수 있는 공지의 서열에 기초한 상대적으로 단순한 과정을 수행함으로써, 펩타이드들은 Bc1-2 단백질 패밀리를 분자로부터 유래될 수 있으며, 이들은 특정 HLA 분자에 결합할 것이다. HLA 분자들의 범위를 위한 그러한 분석들을 위한 대표적인 예시는 하기 표에 주어졌다:

표 1

[0045]

HLA 대립유전자	위치 1	위치 2	위치 3	위치 5	위치 6	위치 7	C-말단
HLA-A1		T,S	D,E			L	Y
HLA-A2		L,M			V		L,V
HLA-A3		L,V,M	F,Y				K,Y,F
HLA-A11		V,I,F,Y	M,L,F,Y,I				K,R
HLA-A23		I,Y					W,I
HLA-A24		Y		I,V	F		I,L,F
HLA-A25		M,A,T	I				W
HLA-A26	E,D	V,T,I,L,F			I,L,V		Y,F
HLA-A28	E,D	V,A,L					A,R
HLA-A29		E					Y,L
HLA-A30		Y,L,F,V					Y
HLA-A31			L,M,F,Y				R
HLA-A32		I,L					W
HLA-A33		Y,I,L,V					R
HLA-A34		V,L					R
HLA-A66	E,D	T,V					R,K
HLA-A68	E,D	T,V					R,K
HLA-A69		V,T,A					V,L
HLA-A74		T					V,L
HLA-B5		A,P	F,Y				I,L
HLA-B7	*	P					L,F
HLA-B8			K	K,R			L
HLA-B14		R,K					L,V
HLA-B15 (B62)		Q,L,K,P,H, V,I,M,S,T					F,Y,W
HLA-B17							L,V
HLA-B27		R					Y,K,F,L
HLA-B35		P					I,L,M,Y
HLA-B37		D,E					I,L,M
HLA-B38		H	D,E				F,L
HLA-B39		R,H					L,F
HLA-B40 (B60, 61)		E	F,I,V				L,V,A,W,M, T,R
HLA-B42		L,P					Y,L
HLA-B44		E					F,Y,W
HLA-B46		M,I,L,V					Y,F
HLA-B48		Q,K					L
HLA-B51		A,P,G					F,Y,I,V
HLA-B52		Q	F,Y				I,V
HLA-B53		P					W,F,L
HLA-B54		P					
HLA-B55		P					A,V
HLA-B56		P					A,V
HLA-B57		A,T,S					F,W,Y
HLA-B58		A,T,S					F,W,Y
HLA-B67		P					L
HLA-B73		R					P
HLA-Cw1		A,L					L
HLA-Cw2		A,L					F,Y

HLA-Cw3		A,L					L,M
HLA-Cw4		Y,P,F					L,M,F,Y
HLA-Cw6							L,I,V,Y
HLA-Cw6		Y					L,Y,F
HLA-Cw8		Y					L,I
HLA-Cw16		A,L					L,V

- [0046] * 하나의 실시 형태에서 이 위치를 위한 특정한 앵커 잔기는 없으나, 바람직한 실시형태에서는 앵커 잔기는 R 또는 A이다.
- [0047] 그러므로, 예시로서, 잠재적으로 HLA-A1에 결합 능력을 가지는 노나펩타이드들은 다음의 서열들 중의 하나를 가진다: Xaa-T-D-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y, Xaa-T-E-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y; Xaa-S-D-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y 또는 Xaa-S-E-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y (Xaa는 어느 아미노산 잔기를 지시함). 유사한 방법으로, 또 다른 HLA 분자에 결합 능력을 가지는 가능한 서열들이 지정될 수 있다.
- [0048] 당업자는 주어진 HLA 분자에 대한 "앵커 잔기 모티프"를 더 동정할 수 있을 것이다.
- [0049] 그러므로, 유용한 실시 형태에서, 본 발명의 펩타이드들은 펩타이드들, 상기 표에서 작성된 특정 HLA 대립유전자들의 각각을 위한, 상기 표에서 나타난 것과 같은 아미노산 잔기들의 어느 하나를 함유하는 염기서열을 포함한다.
- [0050] 그러므로, 본 발명이 펩타이드들은 Bc1-2 단백질 패밀리의 멤버들로부터 연속적인 서열을 함유하는 상기에서 언급된 펩타이드들 중의 어느 하나일 것이며, 그 범위는 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 5의 범위, 더욱 바람직하게는 1 내지 3, 더더욱 바람직하게는 1 내지 2, 좀더 바람직하게는 1 아미노산의 범위에서 다른 아미노산으로 교환되거나, 바람직하게 말하자면 펩타이드는 하나 또는 그 이상의, 바람직하게는 상기 표에서 나타난 주어진 HLA-A 특이적 펩타이드의 모든 앵커 잔기들을 함유한다.
- [0051] 주어진 HLA-A 특정 펩타이드의 앵커 잔기를 함유하고 있는 Bc1-2 단백질 패밀리의 멤버들의 펩타이드들의 준비방법에 대한 무제한적인 예가 실시예 3의 섹션 "변형된 펩타이드 반응"에서 개시되고 있다. 그러므로, 본 발명 펩타이드의 하나의 실시형태에서, 펩타이드는 최고 200, 바람직하게는 최고 100, 더욱 바람직하게는 최고 50, 더더욱 바람직하게는 최고 25, 좀더 바람직하게는 최고 20, 좀더 더욱 바람직하게는 15, 좀더 더더욱 바람직하게는 10 아미노산을 함유하는 어느 펩타이드일 것이며, RLKRDWLVK (SEQ ID NO:62), QSDEIISRY (SEQ ID NO:63) 및 QSEEIISRY (SEQ ID NO:64)으로 구성된 그룹에서 선택되는 서열, 좀더 바람직하게는 RLKRDWLVK (SEQ ID NO:62)으로 구성된 그룹에서 선택된 서열을 함유하는(또는 좀더 바람직하게는 구성되는) 어느 펩타이드일 것이다.
- [0052] 그러므로, 본 발명의 펩타이드들을 동정하기 위한 간단한 접근은 다음 단계를 포함한다: 특정한 HLA 분자의 선별, 예로서 주어진 집단에서 높은 비율로 발생하는 어느 것을 선별하고, Bc1-2 단백질 패밀리의 단백질에서 "앵커 잔기 모티프"를 동정하기 위해 상기에서 개시된 것처럼 정렬(alignment) 분석을 수행하고, 동정된 앵커 잔기들 중의 하나 또는 그 이상을 함유하는 적당한 사이즈의 펩타이드들을 분리 또는 구성하고, 및 그 결과로서 발생된 펩타이드의 다음 항목을 테스트하는 것을 포함한다: (i) 여기에서 개시된 것처럼 어셈블리 분석을 이용하여 특정 HLA 분자에 대한 결합 능력, (ii) 여기에서 개시된 것처럼 ELISPOT 분석에 의해 결정된 적어도 1/10⁴ PBLs의 빈도에서 암 환자의 PBL 집단에서 INF- γ -생산하는 세포를 유도하는 펩타이드의 능력, 및/또는 (iii) 테스트된 에피토프 펩타이드들과 반응하는 종양 조직 CTLs에서 *in situ* 측정되는 펩타이드들의 능력.
- [0053] 특정 실시 형태에서, 본 발명의 펩타이드는 다음으로부터 선택된 서열을 갖는 HLA-A2 제한된 Bc1-2 유래 펩타이드들이다: ALVGACITL (SEQ ID NO:1), ALSPVPPVV (SEQ ID NO:2), SLALVGACI (SEQ ID NO:3), KTLTSLALV (SEQ ID NO:4), LLSLALVGA (SEQ ID NO:5), WLSLKTLLSL (SEQ ID NO:6), AAAGPALSPV (SEQ ID NO:7), PLFDFSWLSL (SEQ ID NO:8), FTARGRFATV (SEQ ID NO:9), YLNRHLHTWI (SEQ ID NO:10), NIALWMTEYL (SEQ ID NO:11).
- [0054] 바람직한 실시 형태에서, 펩타이드는 최고 200, 바람직하게는 최고 100, 더욱 바람직하게는 최고 50, 더더욱 바람직하게는 최고 25, 더더더욱 바람직하게는 최고 20, 더더더더욱 바람직하게는 최고 15, 더더더더더욱 바람직하게는 최고 10 아미노산을 함유하는(또는 좀더 바람직하게는 구성되는) 어느 펩타이드일 것이며, ALVGACITL (SEQ ID NO:1), ALSPVPPVV (SEQ ID NO:2), SLALVGACI (SEQ ID NO:3), KTLTSLALV (SEQ ID NO:4), LLSLALVGA (SEQ ID NO:5), WLSLKTLLSL (SEQ ID NO:6), AAAGPALSPV (SEQ ID NO:7), PLFDFSWLSL (SEQ ID NO:8), FTARGRFATV (SEQ ID NO:9), YLNRHLHTWI (SEQ ID NO:10), NIALWMTEYL (SEQ ID NO:11)로 구성된 그룹으로부터 선

택된 서열, 바람직하게는 NIALWMTEYL (SEQ ID NO:11), YLNRHLHTWI (SEQ ID NO:10), PLFDFSWSLSL (SEQ ID NO:8) 및 WLSLKTLLSL (SEQ ID NO:6)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열, 더욱 바람직하게는 PLFDFSWSLSL (SEQ ID NO:8) 및 WLSLKTLLSL (SEQ ID NO:6)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 어느 펩타이드일 것이다.

[0055] 또 다른 바람직한 실시 형태에서, 펩타이드는 최고 200, 바람직하게는 최고 100, 더욱 바람직하게는 최고 50, 더더욱 바람직하게는 최고 25, 더더더욱 바람직하게는 최고 20, 더더더더욱 바람직하게는 최고 15, 더더더더더욱 바람직하게는 최고 10 아미노산을 함유하는(또는 좀더 바람직하게는 구성되는) 어느 펩타이드일 것이며, EMQVLVSRI (SEQ ID NO: 44), TAYQSFEQV (SEQ ID NO:43), YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO:45), WMATYLNDHL (SEQ ID NO:46), VLVSRIAAM (SEQ ID NO: 48) 및 VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49)으로 구성된 그룹에서 선택되는 서열, 바람직하게는 TAYQSFEQV (SEQ ID NO:43), YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO:45), WMATYLNDHL (SEQ ID NO:46), VLVSRIAAM (SEQ ID NO: 48) 및 VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49)으로 구성된 그룹에서 선택되는 서열, 더욱 바람직하게는 TAYQSFEQV (SEQ ID NO: 43), VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49), VLVSRIAAM (SEQ ID NO: 48) 및 RIAAWMATYL (SEQ ID NO:45)으로 구성된 그룹에서 선택되는 서열, 또는 TAYQSFEQV (SEQ ID NO:43) 및 WMATYLNDHL (SEQ ID NO:46)로 구성되는 그룹에서 선택되는 서열 또는 YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42)으로 구성되는 그룹에서 선택되는 서열로 구성되는 어느 펩타이드일 것이다.

[0056] 또 다른 바람직한 실시 형태에서, 펩타이드는 최고 200, 바람직하게는 최고 100, 더욱 바람직하게는 최고 50, 더더욱 바람직하게는 최고 25, 더더더욱 바람직하게는 최고 20, 더더더더욱 바람직하게는 최고 15, 더더더더더욱 바람직하게는 최고 10 아미노산을 함유하는(또는 좀더 바람직하게는 구성되는) 어느 펩타이드일 것이며, RIAAWMATY (SEQ ID NO:50) 및 ALCVESVDK (SEQ ID NO:51)으로 구성된 그룹에서 선택되는 서열, 바람직하게는 RIAAWMATY (SEQ ID NO:50)으로 구성되는 그룹에서 선택되는 서열을 함유하는 어느 펩타이드일 것이다.

[0057] 또 다른 바람직한 실시 형태에서, 펩타이드는 최고 200, 바람직하게는 최고 100, 더욱 바람직하게는 최고 50, 더더욱 바람직하게는 최고 25, 더더더욱 바람직하게는 최고 20, 더더더더욱 바람직하게는 최고 15, 더더더더더욱 바람직하게는 최고 10 아미노산을 함유하는(또는 좀더 바람직하게는 구성되는) 어느 펩타이드일 것이며, YLREQATGAK (SEQ ID NO:52), SITDVLVRTK (SEQ ID NO 53), LISFGAFVAK (SEQ ID NO 54), RLLFFAPTR (SEQ ID NO:55), RTKRDWLK (SEQ ID NO:56) 및 DIKNEDDVK (SEQ ID NO:57)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 서열, 바람직하게는 RLLFFAPTR (SEQ ID NO:55) 및 RTKRDWLK (SEQ ID NO:56)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 서열을 함유하는 어느 펩타이드일 것이다.

[0058] 또 다른 바람직한 실시 형태에서, 펩타이드는 최고 200, 바람직하게는 최고 100, 더욱 바람직하게는 최고 50, 더더욱 바람직하게는 최고 25, 더더더욱 바람직하게는 최고 20, 더더더더욱 바람직하게는 최고 15, 더더더더더욱 바람직하게는 최고 10 아미노산을 함유하는(또는 좀더 바람직하게는 구성되는) 어느 펩타이드일 것이며, PAEEEEEDLY (SEQ ID NO:58), SPEEELDGY (SEQ ID NO:59), QSLEIISRY (SEQ ID NO:60) 및 AGVGAGLAY (SEQ ID NO:61)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 서열, 바람직하게는 PAEEEEEDLY (SEQ ID NO:58) 및 QSLEIISRY (SEQ ID NO:60)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 서열을 함유하는 어느 펩타이드일 것이다.

[0059] 좀더 유용한 실시 형태에서, 본 발명의 펩타이드는 다음 중 어느 것을 포함하는 MHC 클래스 I HLA-B 분자에 의해 제한되는 펩타이드이다: HLA-B5, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B12, HLA-B13, HLA-B14, HLA-B15, HLA-B16, HLA-B17, HLA-B18, HLA-B21, HLA-Bw22, HLA-B27, HLA-B35, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B39, HLA-B40, HLA-Bw41, HLA-Bw42, HLA-B44, HLA-B45, HLA-Bw46 및 HLA-Bw47. 특정 실시 형태에서, 본 발명의 펩타이드가 결합할 수 있는 특정한 MHC 클래스 I HLA-B는 HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 및 HLA-B51로부터 선택된다.

[0060] 또 다른 유용한 실시 형태에서, 본 발명의 펩타이드는 다음의 어느 것을 포함하는 MHC 클래스 I HLA-C 분자에 의해 제한된다: HLA-Cw1, HLA-Cw2, HLA-Cw3, HLA-Cw4, HLA-Cw5, HLA-Cw6, HLA-Cw7 및 HLA-Cw1.

[0061] 바람직하게, 본 발명의 펩타이드 단편은 50 아미노산 잔기 보다 적은 수를 함유하고, 좀더 바람직하게는 최고 20 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는 10 아미노산 잔기를 함유하고 있다. 특정 실시 형태에서, 펩타이드는 헵타펩타이드(heptapeptide), 옥토펙타이드(octopeptide), 노나펩타이드(nonapeptide), 데카펩타이드(decapeptide) 또는 언데카펩타이드(undecapeptide)이다.

[0062] 본 발명의 펩타이드는 상기에서 언급한 바와 같이, Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버 또는 그것의 단편으로부터 유래된 것이다. 단백질로부터 유래된 펩타이드는 그 단백질이 발현되는 어떤 동물 종으로부터도 어떤 Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버가 될 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 출발 단백질은 설치 동물(rodent species), 토끼 및 인간과

같은 영장류를 포함한 포유동물로부터이다. 선별된 단백질의 서열에 기초하여, 본 발명의 펩타이드는 상기에서 지시한 것같이 적절한 크기의 펩타이드를 초래하는 단백질 출발 물질에 어떤 적절한 화학적 또는 효소적 처리에 의해 유래되거나, 당업자에게 익숙한 어떤 전통적인 펩타이드 합성 과정에 의해 합성될 수 있다.

- [0063] 본 발명의 펩타이드는 그 유도체는 Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버의 선천적인 서열을 가지고 있을 것이다. 그러나, 어느 주어진 HLA 분자에 더 높은 친화력을 갖는 펩타이드는 예를 들어 상기의 주어진 HLA 분자와 관련되는 앵커 잔기 모티프가 동정된 과정에 기초하여 적어도 하나의 아미노산 잔기를 치환, 결실 또는 첨가함으로써 서열을 변형시킴으로써 그러한 선천적인 서열로부터 유래될 것이다.
- [0064] 본 발명의 펩타이드의 중요한 특색은 INF- γ 생산하는 반응체 T 세포, 즉 암 환자의 PBL 집단 또는 종양 세포들 (표적 세포들)에 있어서 특정한 펩타이드를 특이적으로 인식하는 세포독성 T 세포(CTLs)을 인식하거나 유도하는 능력이다. 이 활성은 환자로부터의 PBLs 또는 종양세포를 Andersen et al(Andersen, M. H., L. O. Pedersen, J. C. Becker, and P. thor Straten. 2001. Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptose Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients. *Cancer Res.* 61:869) 및 뒤의 실험예에서 개시된 ELISPOT 분석을 수행함으로써 손쉽게 결정되었다. 앞의 분석에서, 테스트된 펩타이드로 세포들을 접촉시킴으로써 분석된 PBL 조직 또는 종양 세포들을 자극하는 것이 유리할 것이다. 바람직하게는, 펩타이드는 여기에 사용된 것처럼 ELISPOT 분석에 의해 결정된 것과 같이 여기에서 사용된 ELISPOT 분석에 의해 결정된 것처럼 10^4 PBLs 당 적어도 1의 빈도에서 INF- γ 생산하는 T 세포들을 유도하거나 인식하는 것이 가능하다. 좀더 바람직하게는 그 빈도는 10^4 PBLs 당 적어도 5, 가장 바람직하게는 10^4 PBLs 당 적어도 10, 10^4 PBLs 당 적어도 50 또는 100이다.
- [0065] ELISPOT 분석은 Bcl-2 패밀리의 유래 펩타이드 특이적 T 세포 반응을 모니터링하는 강력한 수단을 대표한다. 그러나, 비록 대부분의 경우에 있어서 ELISPOT 반응성이 표적 세포들을 용해시키는 CTLs의 능력과 상호 관련되어 있음이 보여졌다 하더라도, 이 개념에 대한 결정적인 증거가 오직 직접적으로 주어질 수 있다. 그러므로, 여기에서 발견들의 주요 의미는 본 발명의 펩타이드들이 발현되어 암 세포에서 HLA 분자들과 복합체를 형성할 것이라는 것이다. 이는 암 세포들이 CTLs에 의해 파괴되기 쉽게 하고, 신생물(neoplasmas)의 성장을 제어하는 Bcl-2 패밀리의 단백질 면역의 가능한 유용성을 강조한다. 유방암 환자의 PBLs에서 HLA 제한된 Bcl-2-유래 펩타이드에 대한 자발적인 CTL-반응의 존재는 유방암 환자에 있어서 뿐만 아니라 Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버가 폐, 결장, 전립선암을 포함하는 많은 암 및 백혈병 및 임파종에서, 암 질환의 넓은 범위에서 과발현되기 때문에, 이러한 종양 항원의 면역치료적인 가능성을 입증하였다.
- [0066] 따라서, 또 다른 바람직한 실시형태에서 본 발명의 펩타이드는 Bcl-2 단백질 패밀리가 과발현되는 만성 림프성 백혈병(chronic lymphatic leukaemia) 및 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukaemia)과 같은 조혈 악성 종양, 흑색종(melanoma), 유방암, 자궁경부암(cervix cancer), 난소암(ovary cancer), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer), 췌장암(pancreas cancer) 및 전립선암(prostate cancer)을 포함하는 암 질환을 가지는 환자의 PBL 집단에서 INF- γ 를 생산하는 세포들을 유도하는 것이 가능하다.
- [0067] PBL 집단에서 면역 반응을 유도하는 능력에 추가하여, 본 발명의 펩타이드들은 *in situ*에서, 즉 고형암 조직에서 세포용해적 면역 반응을 유도하는 것 또한 가능할 것으로 고려된다. 이는 HLA-펩타이드 복합체를 제공함으로써 증명되어 질 수 있다. 예컨대, 다중결합됨으로써, 측정가능한 수준으로 제공됨으로써, 본 발명의 에피토프 펩타이드와 반응가능한 종양 조직 CTLs에서 측정되는 면역조직화학 염색을 위한 그러한 복합체들을 사용함으로써 증명되어 질 수 있다.
- [0068] 따라서, 본 발명 펩타이드의 더욱 중요한 특징은 에피토프 펩타이드와 반응하는 CTLs의 종양 조직에서 *in situ* 측정이 가능하다는 것이다.
- [0069] 세포표면에서 HLA 및 펩타이드들의 복합체의 제시를 초래하는 HLA 분자에 결합하는 그들의 능력에 추가하여, 차례로 그 복합체는 에피토프로서 또는 세포독성 T 세포의 표적으로 행동하고, 본 발명의 펩타이드는 복합체 및/또는 DTH(Delayed Type Hypersensitivity)에 대한 항체의 생산을 초래하는 B-세포 반응과 같은 다른 타입의 면역 반응을 유도할 것으로 고려된다. 후자 형태의 면역반응은 본 발명 펩타이드의 주사 자리에서 홍반 및 촉진성 경결(palpable induration)로서 정의된다.
- [0070] 본 발명에 따른 백신 조성물은 Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질 또는 그들의 펩타이드 단편을 코딩하는 핵산을 함유한다. 상기 핵산은 상기에서 언급된 단백질들 및 펩타이드 단편들 중의 어느 것을 코딩한다. 핵산은 예시로서 DNA, RNA, LNA, HNA, PNA 일 수 있으며, 바람직하게는 DNA 또는 RNA이다.

- [0071] 본 발명의 핵산은 발현 벡터와 같은 어느 적절한 벡터내에 포함될 수 있다. 다수의 벡터들이 이용가능하고 기술자들은 특정 목적에 따라 유용한 벡터를 선택할 수 있다. 그 벡터는 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 인공적인 크로모솜의 형태가 될 수 있다. 적절한 핵산 서열이 다양한 과정에 의하여 벡터내로 삽입되어 질 수 있는데, 예를 들면, DNA는 이 분야에서 잘 알려진 기술들을 이용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 자리로 삽입될 수 있다. 본 발명에 따른 핵산 서열과는 별개로, 벡터는 하나 또는 그 이상의 시그널 서열, 복제 기점, 하나 또는 그 이상의 마커 유전자들, 인핸서(enhancer) 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열을 함유하고 있다. 그 벡터는 또한 추가적 서열도 포함한다. 하나 또는 그 이상의 이러한 성분들을 함유하는 적절한 벡터의 구축은 이 분야에서 기술자들에게 알려진 표준 라이게이션 기술들을 사용한다. 그 벡터는 바람직하게는 발현 벡터로서, 적절한 세포에서 발현을 지시하는 레귤레이토리 핵산 서열(regulatory nucleic acid)에 연결되어 작동가능한 핵산을 포함한다. 본 발명의 범위 내에서 상기 레귤레이토리 핵산 서열은 일반적으로 포유류 세포에서, 바람직하게는 인간 세포에서, 더욱 바람직하게는 항원제시세포에서 발현을 지시할 수 있다.
- [0072] 바람직한 실시 형태에서, 벡터는 바이러스 벡터(viral vector)이다. 상기 바이러스 벡터는 Bcl-2 단백질 패밀리를 포함하는 벡터 또는 그들의 펩타이드 단편을 코딩하는 핵산에 추가로 T-세포 자극 폴리펩타이드를 코딩하는 두번째 핵산 서열을 함유한다. 그 T-세포 자극 폴리펩타이드는 바람직하게는 B7.1, ICAM-1 및 LFA-3로 구성되는 그룹에서 선택된다.
- [0073] 벡터는 또한 약독화된(attenuated) 박테리아 벡터가 될 수도 있다. 약독화된 박테리아 벡터는 감염 및 유지 부위에서 지속적인 점막 면역 반응(mucosal immune response)을 유도하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 재조합 박테리아가 벡터가 사용될 수 있는데, 예를 들어 박테리아 벡터는 살모넬라(Salmonella), 락토코커스(Lactococcus), 및 리스테리아(Listeria)로 구성되는 그룹에서 선택될 수 있다. 일반적으로, 비상동성 항원 HPV16 L1 또는 E7에 면역의 유도가 마우스에서 강한 CTL 유도 및 종양 퇴화와 함께 보여질 수 있다.
- [0074] 본 발명은 또한 다음을 함유하는 키트-오브-파트(kit-of-parts)와 관련있다.
- [0075] i) 여기에 기재된 백신 조성물 중 어느 것 및/또는
- [0076] ii) 여기에 기재된 Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질들 중의 어느 것 및/또는
- [0077] iii) 여기에 기재된 ii)의 단백질의 펩타이드 단편들 중의 어느 것 및/또는
- [0078] iv) ii)의 단백질 또는 iii)의 펩타이드들을 코딩하는 핵산들 중의 어느 것
- [0079] 및 더 나아가 항암제를 포함하는 키트-오브-파트에 관한 것이다.
- [0080] 키트-오브-파트(the kit-of-parts)의 구성성분은 바람직하게는 개별적인 조성물로 포함되고, 그러나 모든 키트-오브-파트의 성분들은 동일한 조성물내에 포함되어 있는 본 발명의 범위내에서 포함된다. 그러므로 키트-오브-파트의 성분은 다른 것과 함께 동시에 또는 순차적으로 투여된다.
- [0081] 항암제는 화학요법 또는 유전자 치료, 면역자극 물질 또는 항체로서 사용되는 제제가 될 수 있다. 면역자극 물질은 GM-CSF, 타입 I IFN, 인터루킨 12 및 인터루킨 15로 구성되는 그룹에서 선택되는 사이토카인을 예로 들 수 있다. 항체는 항-CD40 또는 항-CTLA-4 항체와 같은 면역 자극 항체가 바람직하다. 면역 자극 물질은 면역 억제 세포들 (예: 레귤레이토리 T-세포) 또는 인자들의 고갈이 가능한 물질이며, 상기 물질은 E3 유비퀴틴 리가아제를 예로 들 수 있다. E3 유비퀴틴 리가아제 (HECT, RING 및 U-박스 단백질들)는 면역 세포 기능의 핵심 분자 조절자로서 알려져 있고, 이들은 각각 단백질 가수분해 파괴 동안 특정 억제제 분자들을 표적화하여 감염동안 면역 반응을 조절하는 것과 관련있다. 몇몇 HECT 및 RING E3 단백질들은 또한 자가 면역 관용의 유도 및 유지와 연관되어 있다: c-Cbl, Cbl-b, GRAIL, Itch 및 Nedd4 각각은 T 세포 성장 인자의 생산 및 증식을 음성적으로 조절한다.
- [0082] 본 발명의 발견들이 본 발명의 단백질 또는 펩타이드 단편의 진단적인 적용으로서 뿐만 아니라 치료적 적용을 위한 기초를 제공하는 것은 분명하다.
- [0083] 따라서, 더 나아가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 단백질 또는 펩타이드 단편을 포함하는 약학적 조성물을 제공하고, 특히 암 환자에게 투여될 경우 백신이 투여된 환자에 있어 암 세포에 대한 세포독성 효과를 가지는 이펙터 T 세포(effector T cells)의 생산을 유도하는 것을 포함하여 암 질환에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0084] 알려진대로, 다양한 HLA 분자들은 대부분의 인간에서 다양하게 보급되어 있고, 본 발명의 방법에 따라서 치료될

수 있는 환자 집단을 확장하기 위한 몇몇 HLA 클래스 I 분자들로 제한되는 펩타이드 에피토프를 동정할 수 있는 필수조건이 있다.

[0085] 다양한 HLA 제한 요소를 가지는 다중 Bcl-2 에피토프들의 특성은 두가지 중요한 방법으로 이 표적 항원의 임상적인 가능성을 넓힐 수 있다: (i) Bcl-2 유래 펩타이드에 기초한 면역 치료를 위해 적합한 환자들의 수를 증가시키는 것이다. HLA-A2 항원은 카프카스인(백인) 또는 아시아인들의 약 50%에서 나타나고, HLA-A1 및 HLA-A3 항원은 약 25%의 카프카스인 및 5% 아시아인에서 모두 나타나며, 반면에 HLA-A11 항원은 카프카스인의 약 15% 및 아시아인의 약 30%에서 나타난다. 비록 이러한 수가 상호발현에 의해 증가될 수 없다고 하더라도, 이들의 다중성에 의해 제한된 펩타이드들의 조합은 확실히 대부분의 암 환자들을 포함할 것이다. (ii) 각 환자에 있어서 몇몇 제한 요소들의 수집된 표적은 HLA-대립유전자 결실에 의해 면역 탈출의 위험을 감소시킬 것이다. 클래스 I 발현의 전체적인 결실이 오히려 희귀한 일임에 반하여, 단일 HLA 대립유전자의 결실은 암 세포에서 나타나는 MHC 변형의 중요한 요소가 된다. 그러므로, 다양한 HLA 대립유전자들로 제한된 Bcl-2 에피토프들의 동정으로, 중복된 대립유전자를 갖는 환자에 있어서 하나 이상의 HLA 분자를 동시에 표적화시키는 것이 가능하게 될 것이다.

[0086] 따라서, 고도의 면역 다가-에피토프 백신의 개발이 가능하게 될 것이다. 바람직하게는, 그러한 백신들은 다른 적절한 펩타이드들 및/또는 하기에서 소개될 어쥬번트들의 조합에서 임의적으로 최적의 Bcl-2-유래 펩타이드들의 동시적인 배달이 가능하도록 제작되어야만 한다. 본 발명은 Bcl-2 단백질 패밀에 속하지 않거나 또는 유래된 단백질들 또는 펩타이드 단편들 및/또는 하기에서 개시되는 어쥬번트들 및/또는 하기에서 개시될 클래스 II-MHC 제한 에피토프들의 조합에서 임의적으로 Bcl-2-유래 펩타이드들을 포함하는 그러한 다가에피토프 백신을 포함한다.

[0087] 종양들이 일반적으로 클래스 II MHC를 나타내지 않는 사실에도 불구하고 클래스 II-MHC 제한된 에피토프를 이용한 백신과 같은 종양-특이적 T 세포 세포 면역을 유도하는데 좀더 중점을 두고 있다. 이는 많은 경우에 있어서 백신-유도된 항-종양 반응의 유도 및 효능은 종양-특이적 CD4 양성 T_H 세포들의 상호작용을 요구한다는 최근의 발견에 기초로 하는 것이다. 그러므로, 좀더 복잡한 조성을 갖는 백신의 개발을 위한 중요한 요소는 예를 들어 조심스럽게 선택된 CTL 및 T_H 세포 에피토프들의 콜렉션을 포함하거나 코딩하는 백신을 제작하는 것과 같이 다중 종양 항원을 표적으로 하여 제작하는 것이다.

[0088] 분명히, 다가-에피토프 백신들은 온코프로테인(oncoprotein)과 같은 잠재적으로 위험한 단백질(이들을 코딩하는 유전자)의 도입과 같은 필요없이 몇몇 다른 항원으로부터 유래된 에피토프에 대한 면역을 일으키는 효과적인 방법을 확립한다. 그런 백신은 또한 하부의(subdominant) 및 애매한(cryptic) T 세포 에피토프에 대한 면역의 선별적인 유도를 허용하는데, 이는 정상 조직에서 현저하게 존재하는 에피토프들을 위해 존재할지도 모르는 관용에 대해 종양-관련 자가항원의 경우에 있어서 특히 중요할 수 있다.

[0089] 게다가, 항원-제시 세포들은 항원-제시 세포들의 면역프로테아솜(immunoproteasomes) 및 대부분의 종양 세포에 존재하는 '구조적인' 프로테아솜(proteasomes) 사이에서의 기능적인 차이 때문에 종양 세포에서 발현하는 확실한 에피토프의 제시에 실패할 수도 있다. 펩타이드-기초한 백신의 경우에 있어서, 그러한 에피토프들은 'MHC-준비' 형태로 투여될 수 있는데, 이는 항원 업테이크의 독립적인 외인성의 로딩 및 숙주 항원-제시 세포에 의한 제시를 통하여 제시가 가능하다.

[0090] 본 발명의 펩타이드가 상대적으로 작은 분자이기에, 백신, 면역원적 조성물 등을 생산하기 위해서, 어쥬번트와 같은 다양한 물질을 갖는 펩타이드를 결합하는 것이 필요될 수 있다. 어쥬번트, 넓게 정의하면, 면역 반응을 촉진시키는 물질이다. 빈번하게, 어쥬번트의 선택은 Freund's 완전 또는 불완전 어쥬번트 또는 알루미늄 침강된 항원(alum precipitated antigen)과 조합하여 사용되는 사멸된 B. 페르투스시스(*B. pertussis*) 미생물이다.

[0091] 어쥬번트에 대한 일반적인 논의는 Goding, 모노클로날 항체: 원리 및 실제 (2nd edition, 1986)의 pp61-63에서 제공되어 있다. 그러나 Goding은 관심 항원이 저분자량 또는 약한 면역원성일 때 면역원적 담체의 결합이 추천된다고 하였다. 그러한 담체 분자의 예는 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet haemocyanin), 소태아 혈청(bovine serum albumin), 오브알부민(ovalbumin) 및 조류 면역글로블린(fowl immunoglobulin)을 들 수 있다. 다양한 사포닌 추출물이 면역원적 조성물에서 어쥬번트로서 유용하다고 제안되고 있다. 최근, 사이토카인으로 잘 알려진 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)을 어쥬번트로서 사용하는 것이 제안되고 있다.(WO 97/28816)

[0092] 본 발명에 따른 백신 조성물은 바람직하게는 어쥬번트 및/또는 담체를 포함한다. 유용한 어쥬번트 및 담체들의

예로는 하기에서 주어진다. 그러므로 조성물에서 존재하는 Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질 또는 그들의 펩타이드 단편은 담체와 관련될 수 있는데, 단백질 또는 T-세포에 그것의 펩타이드 단편 또는 Bcl-2 단백질 패밀리에 제시가능한 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포와 같은 담체와 관련될 수 있다.

[0093] 어쥬번트는 백신 조성물에 혼합되어 Bcl-2 단백질 패밀리 또는 그들의 펩타이드 단편에 대한 면역 반응을 증가시키거나 만약 그렇지 않으면 변형시키는 어떤 물질을 의미한다. 담체들은 폴리펩타이드 또는 폴리사카라이드와 같은 스캐폴드(scaffold) 구조로서 Bcl-2 단백질 패밀리 또는 그들의 펩타이드 단편은 관련될 가능성이 있다.

[0094] 어쥬번트는 다음으로 구성된 그룹에서 선택될 수 있다: $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, 이산화규소(silica), 명반(alum), $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, 카올린(Kaolin), 탄소(carbon), 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide), 머라밀 디펩타이드(muramyl dipeptides), N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine, thr-DMP), N-아세틸-놀누라밀-L-알라닐-D-이소글루타민(N-acetyl-nornuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, CGP 11687, 또한 nor-MDP로 언급됨), N-아세틸뮤라미울-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'2'-디팔미톨-스-글리세로-3-하이트록시포스포릴록시)-에틸아민 (N-acetylmuramyul-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine, CGP 19835A, 또한 MTP-PE로 언급됨), 2% 스쿠알렌/트윈-80.RTM. 에멀전에서 RIBI (MPL+TDM+CWS), 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharides) 및 지질 A, Freund's 완전한 어쥬번트(FAC), Freund's 불완전한 어쥬번트, 머크 어쥬번트 65, 폴리뉴클레오타이드 (예를 들면, 폴리 IC 및 폴리 AU 산), 마이코박테리움으로부터 왁스 D, 결핵(tuberculosis), 코리네박테리움 파르븀(Corynebacterium parvum), 보테텔라 펠투스시스(Bordetella pertussis) 및 브루셀라(Brucella) 속의 멤버에서 발견되는 물질, 리포솜 또는 다른 지질 에멀전, 티터맥스, ISCOMS, 퀴일(Quil A), ALUN (US 58767 및 5,554,372 참고), 지질 A 유도체들, 콜레라톡신 유도체들, HSP 유도체들, LPS 유도체, 합성 펩타이드 매트릭스 또는 GMDP, 인터루킨 1, 인터루킨 2, 몬타나이드 ISA-51(Montanide ISA-51) 및 QS-21을 포함하는 다양한 유도체들.

[0095] 또 다른 바람직한 어쥬번트들은 CpG 올리고뉴클레오타이드 서열을 유도하는 어쥬번트와 같은 박테리아 DNA 기초한 어쥬번트이다. 좀더 다른 바람직한 어쥬번트들은 폴리 I:C와 같은 바이러스 dsRNA 기본 어쥬번트이다. 이미다조치닐린(Imidazochinilines)은 바람직한 어쥬번트들 중에서 또 다른 예이다. 추가로, 바람직한 어쥬번트는 리포솜이다. 가장 바람직한 어쥬번트는 사람에게 이용하는데 적합한 어쥬번트들이다.

[0096] 몬타나이드 어쥬번트(벨기에의 Seppic사에서 모두 입수할 수 있는)는 Montanide ISA-51, Montanide ISA-50, Montanide ISA-70, Montanide ISA-206, Montanide ISA-25, Montanide ISA-720, Montanide ISA-708, Montanide ISA-763A, Montanide ISA-207, Montanide ISA-264, Montanide ISA-27, Montanide ISA-35, Montanide ISA 51F, Montanide ISA 016D 및 Montanide IMS으로 구성된 그룹에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 Montanide ISA-51, Montanide IMS 및 Montanide ISA-720으로 구성된 그룹에서 선택될 수 있고, 좀더 바람직하게는 Montanide ISA-51으로 구성된 그룹에서 선택될 수 있다. Montanide ISA-51 (Seppic, Inc.)는 비-물질대사적 미네랄 오일, 물질대사적 오일 또는 이 두가지의 혼합물들이 조합된 다양한 계면활성제에서 오일/계면활성제에 기초한 어쥬번트이다. 그것들은 Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질 또는 그들의 펩타이드 단편을 함유하는 수용액으로 에멀전으로서의 용도로 준비된다. 계면활성제는 만나이드 올리에이트(mannide oleate)이다. QS-21(Antigenics; Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA)는 고도로 정제된, 수용액으로서 다루어진 수용성 사포닌이다. QS-21 및 몬타나이드 ISA-51 어쥬번트는 무균, 단일 용도 유리병으로 제공될 수 있다.

[0097] 어쥬번트에 대한 일반적인 논의는 Goding, 모노클로날 항체: 원리 및 실제 (2nd edition, 1986)의 pp61-63에서 제공되어 있다. 그러나 Goding은 관심 항원이 저분자량 또는 약한 면역원성일 때 면역원적 담체의 결합이 추천된다고 하였다. 그러한 담체 분자의 예는 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet haemocyanin), 소태아 혈청(bovine serum albumin), 오브알부민(ovalbumin) 및 조류 면역글로블린(fowl immunoglobulin)을 들 수 있다. 다양한 사포닌 추출물이 면역원적 조성물에서 어쥬번트로서 유용하다고 제안되고 있다. 최근, 사이토카인으로 잘 알려진 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)을 어쥬번트로서 사용하는 것이 제안되고 있다.(WO 97/28816)

[0098] 본 발명과 관련하여 사용 가능한 어쥬번트들의 바람직한 기능성들(어쥬번트 행동의 형태들)이 하기 표 2에서 제시되었다.

표 2

[0099]

행동	어쥬번트 타입	이점
1. 면역조절	사이토카인 네트워크를 변형할 수 있는 일반적으로 작은 분자 또는 단백질	면역반응의 상향조절. Th1 및 Th2의 선택
2. 제시	원래 구조에서 면역원과 상호작용하는 일반적으로 양친매성 분자	항체 반응 무력화의 증진. 반응기간을 증가시킴
3. CTL 유도	· 면역원과 결합 또는 포위시킬 수 있는 입자 및 세포막과 혼합 또는 분열시킬 수 있는 입자 · 세포표면 MHC-1에 펩타이드의 직접적인 접합을 위한 w/o 에멀전	클래스 I 제한된 펩타이드를 배출하는 단백질의 세포질의 과정 난교잡성 펩타이드가 알려졌다면, 간단한 과정
4. 표적	· 면역원에 결합하는 미립자 어쥬번트. 쿠퍼세포를 포화시키는 어쥬번트 · 대식세포 및 DCs의 렉틴 수용체들을 표적으로 하는 탄수화물 어쥬번트	어쥬번트 및 면역원의 효과적인 용도 상기에서처럼, 표적을 선택한다면 반응의 종류를 결정할 수도 있다.
5. 디팟 발생 (Depot generation)	· 단기간을 위한 w/o 에멀전 장기간을 위한 마이크로스피어 또는 나노스피어	효율성 단일-도즈 백신을 위한 가능성

[0100] 소스: Cox et al.(Cox, J.C., and Coulter, A.R. (1997). Vaccine 15, 248-56)

[0101] 본 발명에 따른 백신 조성물은 하나 이상의 다른 어쥬번트를 함유할 수 있다. 게다가, 본 발명은 상기 어느 것을 포함하는 어떤 어쥬번트 물질 또는 그들의 조합을 함유하는 치료적 조성물을 포함한다. Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질 또는 그들의 펩타이드 단편들 및 어쥬번트는 적절한 순서로 개별적으로 투여될 수 있는 것 또한 고려된다.

[0102] 담체는 어쥬번트와는 독립적으로 존재할 수 있다. 담체의 기능은 그들의 활성 또는 면역성을 증가시키기 위해 특히 펩타이드 단편들의 분자량을 증가시키거나, 생물학적 활성을 증가시키거나, 또는 세럼 반감기를 증가시키는 것이다. 게다가, 담체는 Bcl-2 패밀리에 속하는 단백질 또는 그들의 펩타이드 단편들을 T-세포에 제시를 원조할 수 있다. 담체는 단백질 또는 항원제시세포와 같이 이 분야에서 숙련된 사람에게 알려진 어떤 적절한 담체일 수 있다. 담체는 단백질일 수 있으며, 키흐 림팻 헤모시아닌, 트랜스페린과 같은 혈청 단백질, 소 태아 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, 티로글루블린 또는 오보알부민, 면역글루블린, 인슐린 또는 팔마산과 같은 호르몬에 한정되지 않는다. 사람의 면역조치를 위하여, 담체는 사람에게 생리적으로 수용가능한 담체여야만 하고 안전해야 한다. 그러나, 과상풍 독소(tetanus toxoid) 및/또는 디프테리아 독소는 본 발명의 하나의 실시형태에서 적절한 담체가 된다. 대신에 담체는 세파로스(sepharose)와 같은 텍스트란일 수도 있다.

[0103] 따라서, 본 발명은 상기의 어느 것을 포함하는 어쥬번트 물질 또는 그들의 조합을 함유하는 치료적 조성물을 포함한다. 항원, 즉 본 발명의 펩티드 및 어쥬번트는 어느 적절한 순서로 동시에 또는 개별적으로 투여될 수 있음이 고려된다.

[0104] 본 발명의 약학적 조성물에서 항원의 선택은 이 분야의 기술을 가진 사람에게 의해 결정될 수 있는 변수에 의존될 것이다. 언급한 것과 같이, 본 발명의 각각의 다양한 펩타이드는 특정 HLA 분자에 의해 세포표면에 제시된다. 그 처럼, 만약 처리된 제출이 HLA 표현형에 연관된 타입이라면, 펩타이드/펩타이드들은 특정 HLA 분자에 결합하는 것으로 알려진 것으로 선택된다.

[0105] 그 대신에, 관심 항원은 주어진 집단에서 다양한 HLA 표현형의 보급에 기초하여 선택된다. 예를 들어, HLA-A2는 백인 집단에서 가장 보급이 높은 표현형이고, 그러므로, HLA-A2에 결합하는 펩타이드 유래 설비빈을 함유하는 조성물은 그 집단의 큰 부분에서 활성을 가질 것이다. 그러나, 본 발명의 조성물은 또한 표적 집단의 좀더 큰 부분을 커버하도록 다양한 HLA 분자와 특이적으로 상호작용할 수 있는, 펩타이드에서 유래된 두개 또는 그 이상의 설비빈의 조합을 함유할 수 있다. 그러므로, 예로서, 약학적 조성물은 HLA-A에 의해 제한되는 펩타이드 및 HLA-B 분자에 의해 제한되는 펩타이드의 조합을 함유하는데, 예를 들어 HLA-A2 및 HLA-B35와 같이 표적 집단에서 HLA 표현형의 발현에 대응하는 그러한 HLA-A 및 HLA-B를 포함하는 것이다. 추가로, 그 조성물은 HLA-C 분자

에 의해 제한되는 펩타이드를 포함할 수 있다.

- [0106] 본 발명의 유용한 면역원성 조성물은 여기에서 정의된 Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버 유래 펩타이드에 추가하여 여기에서 정의된 것과 같은 Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버 또는 여기의 면역원적 단편의 면역학적으로 유효한 양을 함유한다.
- [0107] 약학적 조성물에서 본 발명의 면역원적 펩타이드의 양은 특정한 적용에 의존하여 다양할 수 있다. 그러나 면역원의 일회분량은 약 10 μ g 에서 약 5000 μ g, 바람직하게는 약 50 μ g에서 약 2500 μ g, 더욱 바람직하게는 약 100 μ g에서 약 1000 μ g 사이 정도가 바람직하다. 투여 방법은 피내(intradermal), 피하(subcutaneous) 및 정맥내(intravenous) 투여를 포함하여, 시간 유리 형성의 형태로 피하주입(implantation) 등이 포함된다. 이 분야에 알려진 투여의 모든 형태들이 여기에 포함된다. 공식적으로 주사가 가능한 면역원적 펩타이드 조성물에 적합한 이 분야에서 알려진 어떤 및 모든 전통적인 투여 형태가 포함되는데, 리포필라이스드(lyophilised) 형태 및 용액, 현탁액 또는 필요하다면 일반적으로 약학적으로 허용가능한 담체, 희석액, 방부제, 어쥬번트, 완충제 성분, 등이 함유되는 에멀전 형태이다.
- [0108] 약학적 조성물은 이 분야에서 기술을 가진 사람에 의해 알려진 어떤 전통적인 프로토콜을 사용하여 제조되고 투여될 수 있다. 실시예 5에서, 백신의 투여에 있어 제한되지 않는 예뿐만 아니라 본 발명에 따른 백신 조성물의 제조의 제한되지 않는 예가 주어졌다. 그 프로토콜은 여기에 기재된 백신 조성물의 어느 것에도 쉽게 적용될 수 있는 것으로 이 분야의 당업자에 의해 인식될 수 있다.
- [0109] 본 발명의 더 나아간 실시 형태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 암 환자를 치료하는데 유용하고, 그 환자의 암 진행 동안 암 세포는 화학치료적으로 활성화된 항암제 및/또는 방사선치료에 대한 민감도가 감소된다.
- [0110] 본 발명의 약학적 조성물은 세포사멸 조절에 관련되는 단백질 또는 그것으로부터 유래된 펩타이드 단편을 포함하여, Bcl-2 단백질 패밀리에 속하지 않거나 또는 유래되지 않은 단백질 또는 펩타이드 단편으로부터 선택되는 적어도 하나의 면역원적 단백질 또는 그것의 펩타이드 단편을 함유할 수 있다. 하나의 예로서, 그런 단백질 또는 펩타이드는 상기에서 정의된 설비빈, 또는 그것의 펩타이드 단편이다. 특정 실시형태에서, 면역원적 설비빈-유래 펩타이드는 다음으로부터 선택되는 서열을 가지는 HLA-A2 제한 펩타이드이다: FLKLDLDRERA (설비빈₁₀₁₋₁₀₉) (SEQ ID NO:12), TLPPAWQPFL (설비빈₅₋₁₄) (SEQ ID NO:13), ELTLGFEFLK (설비빈₉₅₋₁₀₄) (SEQ ID NO:14), LLLGFEFLK (SEQ ID NO:15) 및 LMLGFEFLK (SEQ ID NO:16).(괄호 안의 지정은 US 6.245.523에서 개시된 설비빈 단백질에서 잔기의 위치를 나타내고 있다.)
- [0111] LLLGFEFLK (SEQ ID NO:15)는 펩타이드의 2 위치에서 "T"를 "L"로 치환함으로써 설비빈 96-104로부터 유래된 서열이고, LMLGFEFLK (SEQ ID NO:16)은 2 위치에서 "T"를 "M"으로 치환함으로써 설비빈 96-104로부터 유래된 것이다. 좀더 특정한 실시형태에 있어서, 면역원성 설비빈-유래 펩타이드는 다음으로부터 선택된 서열을 갖는 HLA-B35-제한된 설비빈-유래 펩타이드이다: CPTENEPDL (설비빈₄₆₋₅₄) (SEQ ID NO:17), EPDLAQCF (설비빈₅₁₋₅₉) (SEQ ID NO:18), CPTENEPDY (SEQ ID NO:19) 및 EPDLAQCFY (SEQ ID NO:20).(괄호 안의 지정은 US 6.245.523에서 개시된 설비빈 단백질에서 잔기의 위치를 나타내고 있다.)
- [0112] CPTENEPDY (SEQ ID NO:19)는 펩타이드의 C 말단에 있는 "L"을 "Y"으로 치환하여 얻어진 설비빈₄₆₋₅₄로부터 유래된 서열이고, EPDLAQCFY (SEQ ID NO:20)은 C 말단 2의 "F" 잔기를 "Y"로 치환함으로써 얻은 설비빈₅₁₋₅₉로부터 유래된 것이다.
- [0113] 실시 형태에 있어서, 펩타이드는 다음에서 선택되는 서열을 가지는 HLA-A1 제한된 펩타이드이다: 설비빈₃₈₋₄₆ (Sur38Y9) (MAEAGFIHY (SEQ ID NO:21)의 9 위치에서 C가 Y로 변환), 설비빈₄₇₋₅₆ (Sur47Y10) (PTENEPDLAY(SEQ ID NO:22)의 10 위치에서 Q가 Y로 변환), 설비빈₉₂₋₁₀₁ (Sur92-101) (QFEELTLGEF) (SEQ ID NO:23), 및 설비빈₉₃₋₁₀₁ (Sur93T2) (FTEELTLGEF (SEQ ID NO:24)의 2 위치에서 E가 T로 변환).
- [0114] 본 발명의 펩타이드는 또한 설비빈₁₈₋₂₄ (Sur18K10) (RISTFKNWPK (SEQ ID NO:25)의 10 위치에서 F가 K로 변환)과 같은 HLA-A3 제한 펩타이드 및/또는 설비빈₅₃₋₆₂ (Sur53-62) (DLAQCFDFK)(SEQ ID NO:26)과 같은 HLA-A11 제한 펩타이드 및/또는 설비빈₁₈₋₂₈ (Sur18-28) (RISTFKNWPFL)(SEQ ID NO:27)과 같은 HLA-A2 제한 펩타이드일 수도 있다.

- [0115] 그러나, 본 발명의 바람직한 실시 형태에서 백신 조성물은 살아있거나 그것의 단편들은 포함하지 않는다.
- [0116] 다른 유용한 펩타이드는 오히려 선택적으로 발현되고, 흑색종에서 발견되는 공지의 세포자살 억제제 폴리펩타이드 ML-IAP을 포함한다. 그러므로, 특이 T- 세포 반응, 즉 세포독성 T- 세포 반응 또는 헬퍼 T-세포반응을 유도할 수 있는 ML-IAP의 단편들이 임의적으로 본 발명의 조성물에 포함될 수 있다.
- [0117] ML-IAP의 유용한 펩타이드 단편들은 특허 출원 WO 2004/089980에서 개시된 ML-IAP 단편들의 어느 것을 포함하고, 온전히 그대로 여기에 참고자료로서 편입되어 있으며, 바람직하게는 ML-IAP₂₄₅ (RLQEERTCKV)(SEQ ID NO:28), ML-IAP₂₈₀ (QLCPICRAPV)(SEQ ID NO:29), ML-IAP₉₀ (RLASFYDWPL)(SEQ ID NO:30), ML-IAP₁₅₄ (LLRSKGRDFV)(SEQ ID NO:31), ML-IAP₂₃₀ (VLEPPGARDV)(SEQ ID NO:32), ML-IAP₉₈ (PLTAEVPPPEL)(SEQ ID NO:33), ML-IAP₃₄ (SLGSPVLGL)(SEQ ID NO:34), ML-IAP₅₄ (QILGQLRPL)(SEQ ID NO:35), ML-IAP₉₉ (LTAEVPPPEL)(SEQ ID NO:36), ML-IAP₈₃ (GMGSEELRL)(SEQ ID NO:37) 및 ML-IAP₂₀₀ (ELPTPRREV)(SEQ ID NO:38) 이다.
- [0118] 다른 유용한 펩타이드들은 TRAG-3 및 그들의 펩타이드 단편들을 포함한다. TRAG-3는 적어도 두개의 얼터네이티브 리 스플라이스드 폼으로 존재하고 모든 TRAG-3 스플라이스 형태의 펩타이드들은 그 펩타이드 만큼 유용하다. 특히, 어떤 TRAG-3 스플라이스 형태의 단편들, 여기에서 상기 단편들은 특이 T-세포 반응, 즉 세포독성 T-세포 반응 또는 헬퍼 T-세포 반응을 유도할 수 있는 것으로서, 본 발명의 조성물내에 임의적으로 포함되어 진다.
- [0119] 추가로, 본 발명에 따른 조성물은 앞서 정의된 클래스 I 제한된 에피토프 및 클래스 II 제한된 에피토프를 포함하는 다가에피토프(multiepitope) 백신을 제공할 수도 있다.
- [0120] 본 발명 조성물의 면역보호적 효과는 몇몇의 접근, 예를 들어 앞서 WO 97/28816에서 개시된 것과 같은 접근을 사용하여 측정될 수 있다. 성공적인 면역 반응은 예방접종(immunisation) 후의 DTH 반응의 발생 및/또는 백신 조성물의 펩타이드(들)을 특이적으로 인식하는 항체들의 측정에 의해 결정될 수도 있다.
- [0121] 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 백신 조성물이다. 약학적 조성물은 그러므로 면역원성 조성물 또는 암 질환에 대하여 면역 반응을 유도할 수 있는 백신일 것이다. 여기에서 사용된 것처럼, "면역원성 조성물 또는 백신"이라는 표현은 암 세포들에 대하여 지시된 면역 반응의 적어도 하나의 타입을 유도하는 조성물을 일컫는다. 그러므로, 그러한 면역 반응은 상기에서 언급한 타입들 중의 어느 하나일 것이다. 세포 표면에 제시된 HLA/펩타이드 복합체를 인식가능항 CTLs이 발생하여 세포 용해를 초래하는 CTL 반응, 즉 백신은 접종된 개체에서 암 세포에 대항하여 세포독성 효과를 갖는 이펙터 T-세포의 생산을 유도한다; 항-암 항체들의 생산을 일으키는 B-세포 반응; 및/또는 면역반응의 DTH(Delayed-type hypersensitivity) 타입.
- [0122] 유용한 실시 형태에서, 암 질환에 대항하여 지시된 면역 반응은 본 발명의 펩타이드를 투여함으로써, 또한 환자로부터의 항원 제시 세포(APCs) 상에 MHC 클래스 I 분자들을 로딩함으로써, 환자로부터 PBLs를 분리하고, 환자에게 세포 back을 주사하기 전에 펩타이드로 세포들을 배양함으로써, 또는 환자로부터의 전구체 APCs를 분리하고 환자에게 세포 back을 주입하기 전에 사이토카인 및 항원을 사용하여 프로페셔널 APCs내로 세포들을 분화시킴으로써 유도된다.
- [0123] 그러므로, Bcl-2 패밀리에 속하는 단백질 또는 그들의 펩타이드 단편 또는 상기 단백질 또는 상기 펩타이드 단편을 코딩하는 핵산을 함유하는 항원 제시 세포를 함유하는 백신 조성물을 제공하는 것이 본 발명의 한 측면이 된다. 항원 제시 세포는 T-세포에 대한 항원을 제시하는 것이 가능한 어떤 세포가 된다. 바람직한 항원 제시 세포는 수지상 세포(dendritic cells)이다. 수지상 세포(DC)는 하기에서 설명될 예제와 같이 어떤 적절한 프로토콜에 따른 치료 과정에서 준비되어 사용된다. 그 프로토콜은 다양한 HLA 타입 및 다양한 질환을 가진 환자들에게에 사용이 적합한 것으로서 이 분야의 기술을 가진 사람에 의해 인식되어 질 것이다.
- [0124] 수지상 세포(DC)는 37°C 에서 1시간동안 50µg/ml HLA-제한된 펩타이드(GMP 퀄리티에서 합성된)으로 주입되고, 5×10⁶ 세포들이 1일 및 14일째에 피하에 투여되고, 그 후에 매 4주마다, 추가적으로 5번의 백신 후에 백혈구 성분채집술(leukapheresis)이 수행된다. 임상적인 사용 및 품질 제어를 위한 DC의 발생은 Thurner et al.(Thurner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A., and Schuler, G. (1999) Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application *J.Immunol.Methods* 223, 1)에서 개시된 것처럼 필수적으로 수행될 수 있다.
- [0125] 그러므로, 본 발명의 하나의 실시형태에서, 암을 치료하는 방법은 펩타이드가 *ex vivo* 에서 환자의 항원제시체

포(APCs)로 펩타이드를 제시함으로써 투여되고, 그러므로 환자에게 처리된 APCs를 주사함으로써 투여되는 것이다.

- [0126] 이를 수행하는 적어도 두가지의 대체가능한 방법들이 있다. 하나는 암 환자로부터 APCs를 분리하고 펩타이드를 가진 MHC 클래스 I 분자들을 배양하는 것이다. MHC 클래스 I 분자들을 로딩시키는 것은 펩타이드를 가진 APCs를 배양하는 것을 의미하고, 그 펩타이드에 특이적인 MHC 클래스 I 분자를 가진 APCs는 펩타이드와 결합할 것이고, 그러면 그것이 T 세포에 제시될 것이다. 그 결과로서, APCs는 환자에게 재주사될 것이다. 다른 대체는 수지상 세포 생물학의 분야에서 만들어진 최근의 발견에 의존한다. 이 경우에, (수지상 세포 전구체가 되는) 모노사이트들을 환자로부터 분리하여 사이토카인 및 항원을 사용하여 프로페셔널 APC (또는 수지상 세포)로 *in vitro*에서 분화시킨다. 그 결과, *in vitro*에서 발생된 DCs는 펩타이드를 배출하여 환자에게 주입된다.
- [0127] Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버들이 암 형태의 범주에서 발견되어 나타나는 사실때문에, 본 발명의 백신이 그러한 펩타이드들이 발현되는 어떤 타입의 암 질환도 제어가능할 것이다. 그러므로, 예를 들어, 본 발명의 백신 조성물은 만성 림프성 백혈병 및 만성 골수성 백혈병을 포함하는 조혈 악성종양, 흑색종, 유방암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 결장암, 췌장암 및 전립선암에 대하여 면역학적으로 활성을 가진다.
- [0128] 상기 개시로부터, 기술자들은 본 발명의 단백질들 및/또는 펩타이드들을 암 진단 도구로서 유용함을 깨닫게 될 것이다. 그러므로, 본 발명의 펩타이드들은 암 질환의 측면에서 널리 적용가능한 진단적 및 예후적 과정을 발전시키는 기초를 제공한다. 그러므로, 또 다른 유용한 실시 형태에서 본 발명의 조성물은 암 환자에서 PBLs 사이에서 또는 종양 조직에서 Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버에 반응하는 T세포의 측정에 기반한 것과 같이, *ex vivo* 또는 *in situ* 진단을 위한 조성물이 된다.
- [0129] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 펩타이드를 함유하는 PBLs 사이에서 또는 종양 조직에서 Bcl-2 단백질 멤버에 반응하는 T 세포의 존재를 암 환자에서 *ex vivo* 또는 *in situ* 진단을 위한 진단키트를 제공하고, 암 환자에 있어서 그러한 반응 T 세포의 존재를 측정하는 방법, 본 발명의 펩타이드와 클래스 I HLA 분자 또는 그 분자의 단편의 복합체를 종양 조직 또는 혈액 샘플에 접촉시키고, 조직 또는 혈구에 그 복합체를 결합시켜 측정하는 방법을 제공한다.
- [0130] 또 다른 유용한 진단적 또는 예후적 접근은 상동성이 있는 동물에서 항체를 발생시키는데 기초를 둔다. 예를 들어, 본 발명의 인간 Bcl-2 단백질 패밀리의 멤버-유래 펩타이드에 대하여 지시된 무관 항체로서, 펩타이드를 제시하는 암 세포의 존재를 진단하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 바람직한 투여량은 약 1 μ g에서 약 750 μ g의 범위가 될 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 가진 예방접종에 기초를 둔 모노클로날 항체를 생산하는 것 또한 가능하다. 따라서 본 발명은 또한 분자, 특히 그것의 단편을 포함하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체로서, 본 발명의 펩타이드에 특이적으로 결합가능한 분자 및 본 발명의 펩타이드에 대하여 지시된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체에 대하여 발생된 항체와의 결합을 차단할 수 있는 분자에 관한 것이다. 게다가 본 발명은 본 발명의 펩타이드 또는 단백질 뿐만 아니라 이를 코딩하는 분리된 핵산에 특이적으로 결합가능한 분리된 T-세포 수용체에 관한 것이다. 그러한 T-세포 수용체는 기술자에게 잘 알려진 표준 기술들을 사용하여 단백질 또는 펩타이드 특이적 T-세포로부터 클론될 수 있다.
- [0131] 한 측면에서, 본 발명은 또한 여기에서 개시된 Bcl-2 패밀리에 속하는 단백질 및/또는 그들의 펩타이드 단편들의 어느 것에 특이적으로 결합 가능한 T-세포 수용체를 포함하는 분리된 T-세포에 고나한 것이다. 분리된 T-세포는 바람직하게는 *in vitro*에서 확장된 T-세포이다. *in vitro*에서의 T-세포의 확장 방법은 숙련된 사람들에게 잘 알려져 있다. 그러한 T-세포는 특히 적응 전이 또는 자가 세포 전이에 의해 암의 치료에 유용하다.
- [0132] 그러므로, 본 발명은 또한 Bcl-2 패밀리에 속하는 단백질 또는 그들의 펩타이드 단편에 특이적으로 결합 가능한 T-세포 수용체를 가진 T-세포를 암으로 고통받는 인간과 같은 개체에 투여함을 포함하는 치료 방법에 관한 것이다. 게다가 본 발명은 암의 치료를 위한 의약의 준비를 위한 Bcl-2 패밀리에 속하는 단백질 또는 그들의 펩타이드 단편에 특이적으로 결합 가능한 T-세포 수용체를 가진 T-세포의 용도에 관한 것이다. 자가 세포 전이는 Rosenberg SA et al. (Rosenberg SA and Dudley ME (2004) Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *PNAS* 101:14639-14645)에서 개시된 것처럼 필수적으로 수행될 수 있다.
- [0133] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 앞에서 개시한 것과 같이 진단 시약으로서 유용한 펩타이드와 클래스 I HLA 분자 또는 그 분자의 단편의 복합체를 제공한다. 그러한 복합체는 단량체 또는 다량체일 것이다.
- [0134] 본 발명은 암 질환의 완화 또는 치료를 위한 수단을 제공한다. 따라서, 본 발명의 한 측면은 Bcl-2 단백질 패밀

리 멤버와 관련된 암 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 암 질환은 만성 림프성 백혈병 및 만성 골수성 백혈병을 포함하는 조혈 종양, 흑색종, 유방암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 결장암, 췌장암 및 전립선암을 포함한다. 상기 치료 방법은 병으로 고생하는 환자에게 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량, 본 발명의 펩타이드에 특이적으로 결합 가능한 분자 및/또는 그러한 분자의 결합을 차단할 수 있는 분자를 투여하는 것이 포함된다.

- [0135] 어떤 경우에는 본 발명의 치료방법에 화학치료, 방사선치료, 면역 자극 물질의 치료, 유전자 치료, 항체의 치료 및 수지상 세포를 이용한 치료와 같은 일반적인 암 치료를 조합하는 것이 바람직할 것이다. 종양 세포에 있어서 Bcl-2 단백질 패밀리의 증가된 발현때문에, 본 발명에 의해 개시된 것처럼 Bcl-2-기초한 면역치료의 세포독성 화학치료와의 조합이 암을 치료하는 효과적인 접근이 될 것이다.
- [0136] 본 발명의 한 측면은 면역화(immunisation) 모니터 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 i) 개체로부터 혈액 샘플을 제공하고,
- [0137] ii) Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질 또는 그것의 펩타이드 단편을 제공하고, 상기 단백질 또는 펩타이드는 여기에 개시된 단백질 또는 펩타이드의 어느 하나를 의미하며,
- [0138] iii) 상기 혈액 샘플이 항체 또는 그 단백질 또는 펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 T-세포 수용체를 가진 T-세포를 가지고 있는지 여부를 측정하고,
- [0139] iv) 그에 따라 상기 단백질 또는 펩타이드에 따른 면역 반응이 상기 개체에서 일어나는지를 측정하는 단계로 구성된다.
- [0140] 그 개체는 바람직하게는 인간, 예를 들면 Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 단백질 또는 그것의 펩타이드 단편 또는 상기 단백질 또는 펩타이드를 코딩하는 핵산으로 면역반응이 발생한 인간이다.
- [0141] 본 발명은 지금부터 하기에서 기술될 것이며, 여기의 실시예 및 도면에 한정되지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0142] 도 1은 Bcl-2로부터의 펩타이드들에 결합하는 HLA-A2의 동정을 보여준다. 클래스 I MHC 헤비 체인 밴드는 포스포이미저(Phosphor imager)를 사용하여 정량하였다. 안정화된 HLA-A2 헤비 체인의 양은 추가된 펩타이드의 결합 친화력과 직접적으로 관련이 있다. HLA-A2 제한 양성 제어 펩타이드 HIV Po1₄₇₆(검은색 정사각형)의 결합은 펩타이드 Bcl₁₇₂ (검은색 삼각형), Bcl₁₈₀ (검은색 원), 및 Bcl₂₀₀ (흰색 원)과 비교된다.

도 2는 15명의 유방암 환자들로부터 펩타이드 Bcl₁₇₂, Bcl₁₈₀, Bcl₂₀₈ 및 Bcl₂₁₄. PBL에 대한 T- 세포 반응을 분석한 것을 나타내고 있다. T-임과구는 펩타이드로 또는 펩타이드 없이 3회, 웰 당 10⁵ 세포에 평판되기 전에 펩타이드로 한번에 자극된다. 펩타이드 특이 스팟들의 평균 수는 (첨가된 펩타이드 없는 스팟을 제외시킨 후) 각 환자에게 ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 사용하여 계산되었다.

도 3은 INF- γ ELISPOT에 의해 측정된 Bcl-2에 대한 T-세포 반응을 나타내고 있다. 열명의 HLA-A2 양성 CLL 환자들, 세명의 HLA-A2 양성 AML 환자들 및 두명의 췌장암(PC) 환자로부터의 PBL을 분석하였다. 펩타이드 Bcl₂₀₈ (A) 및 Bcl₂₁₄ (B)를 실험하였다. T- 임과구는 펩타이드로 또는 펩타이드 부재시 모두에서 3회 반복하여 웰당 10⁵ 세포가 도달되기 전에 펩타이드로 한번 자극되었다.

펩타이드 특이 스팟들의 평균 수는 각 환자에게 ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 사용하여 계산하였다. 반응기(항원 특이적 스팟들의 평균 \pm 1/2 표준편차 > 10⁵ 임과구 당 25로서 정의된) 는 검은색 정사각형으로 표시되고, 반면에 비 반응 개체들은 흰색 정사각형으로 표시되었다.

도 4는 그랜자임 B(granzyme B) ELISPOT에 의해 Bcl-2 특이적 CTL의 측정을 나타낸다. 4 명의 서로 다른 후기 유방암 환자들의 T-림프구(b19, b20, b22, b16) 및 건강한 대조구(h1)는 펩타이드 Bcl₂₀₈ (A) 또는 Bcl₂₁₄(B)의 존재 또는 부재시에 3회 반복하여 웰당 10⁵ 세포로 도달되기 전에 펩타이드로 한번 자극되었다.

펩타이드 특이적 그랜자임 B 스팟들의 평균수(첨가된 펩타이드가 없는 스팟들을 제거한 후)는 각 환자들에서

ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 사용하여 계산하였다.

반응기(항원 특이적 스팟들의 평균 \pm 1/2 표준편차 $> 10^5$ 임파구 당 25로서 정의된) 는 검은색 정사각형으로 표시되고, 반면에 비 반응 개체들은 흰색 정사각형으로 표시되었다.

도 5는 Bcl-2 특이적 CTL의 세포독성 능력을 나타낸다. bcl₂₀₈ 반응하는 CTL는 HLA-A2/bcl₂₀₈ 코팅된 자기 비즈를 사용하여 유방암 환자의 PBL로부터 분리하였다. A) 분리된 대부분의 컬처는 bcl₂₀₈의 존재(검은 색 정사각형) 또는 부존재(흰색 정사각형)시 T2 세포의 특이적 용해를 분석하였다. B) HLA-A2 양성 유방암 세포주 MDA-MB-231(검은색 원) 및 HLA-A2 음성 유방암 세포주 ZR75-1(흰색 원)의 bcl₂₀₈-분리 T 세포에 의한 용해.

도 6은 INF- γ EILSPOT에 의해 측정된 Bcl-X_L에 대한 HLA-A2 제한된 T-세포반응을 나타낸다. 12명의 건강한 개체, 유방암을 가진 18명의 환자들(BC 환자들), 6명의 흑색종 환자들 및 2명의 췌장암 환자들(PC 환자들)의 PBL을 분석하였다. 모든 개체들은 HLA-A2 양성이다. 펩타이드 Bcl-X_{L173-182} (YLNDHLEPWI)(SEQ ID NO:48) (A), Bcl-X_{L141-150} (VAFFSFGGAL)(SEQ ID NO:49) (B), Bcl-X_{L161-170} (VLVSRIAAMW)(SEQ ID NO:48) (C), 및 Bcl-X_{L165-174} (RIAAWMATYL)(SEQ ID NO:45) (D)를 실험하였다. T-임파구는 관련 펩타이드의 존재 또는 부존재시에 삼회 반복하여 웰당 10^5 세포로 도달되기 전에 펩타이드로 한번 자극되었다.

펩타이드 특이적 스팟들의 평균 수(첨가된 펩타이드는 스팟들의 제거 후)는 각 환자들에서 ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 사용하여 계산하였다.

반응기(항원 특이적 스팟들의 평균 \pm 1/2 표준편차 $> 10^5$ 임파구 당 25로서 정의된) 는 검은색 정사각형으로 표시되고, 반면에 비 반응 개체들은 흰색 정사각형으로 표시되었다.

도 7은 그랜자임 B ELISPOT 에 의해 Bcl-X_L 특이적 CTL의 측정을 나타낸다. 3명의 서로 다른 유방암 환자들(BC35, BC36 및 BC17)들로부터의 T-임파구는 Bcl-X_{L173-182} (YLNDHLEPWI) 존재 또는 부재시에 삼회 반복하여 웰당 3×10^5 세포로 도달되기 전에 펩타이드로 한번 자극되었다.

펩타이드 특이적 그랜자임 B 스팟들의 평균수(첨가된 펩타이드가 없는 스팟들을 제거한 후)는 ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 사용하여 각 환자들에게서 계산하였다. 반응기(항원 특이적 스팟들의 평균 \pm 1/2 표준편차 $> 10^5$ 임파구 당 25로서 정의된) 는 검은색 정사각형으로 표시되고, 반면에 비 반응 개체들은 흰색 정사각형으로 표시되었다.

도 8은 유방암 환자의 PBL에서 Bcl-X_L 특이적, CD8 양성 세포의 분석을 나타낸다. 환자 BC36의 PBL은 *in vitro* 에서 Bcl-X_{L173-182}로 한번 자극되고, CD8+ 세포들이 분석전에 분리되었다.

항-CD8 항체 및 오중체(pentamer) 복합체 HLA-A2/Bcl-X_{L173-182}를 이용한 컬처의 FACS 염색은 세포의 95.5%가 CD8 양성이며, 이들의 0.24%가 오중체 양성 (A)임을 보여준다. HLA-A2/HIV 오중체는 음성 대조군 (B)로서 사용되었다. 세포 컬처는 추가적으로 ELISPOT 수단으로 분석하였다. (C)

도 9는 INF- EILSPOT에 의해 측정된 Bcl-X_L에 대한 HLA-A2 제한된 T-세포 반응을 나타낸다. 12명의 건강한 개체, 18명의 유방암 환자들(BC 환자들), 6명의 흑색종 환자들 및 2명의 췌장암 환자들(PC 환자들)로부터의 PBL을 분석하였다. 모든 개체들은 HLA-A2 양성이다. 펩타이드 Bcl-X_{L118-126} (TAYQSFEQV)(SEQ ID NO:43) (A) 및 Bcl-X_{L169-178} (WMATYLNDHL)(SEQ ID NO:46) (B)을 시험하였다. T-임파구는 관련 펩타이드의 존재 또는 부재시에 삼회 반복하여 웰 당 10^5 세포로 도달되기 전에 펩타이드로 한번 자극되었다. 펩타이드 특이 스팟들의 평균수(첨가된 펩타이드가 없는 스팟들의 제거후)는 각 환자들에게서 ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 사용하여 계산하였다. 반응기(항원 특이적 스팟들의 평균 \pm 1/2 표준편차 $> 10^5$ 임파구 당 25로서 정의된) 는 검은색 정사각형으로 표시되고, 반면에 비 반응 개체들은 흰색 정사각형으로 표시되었다.

도 10은 INF- γ ELISPOT에 의해 측정된 Bcl-X_L에 대한 HLA-A3 제한된 T-세포 반응을 나타낸다. T-임파구는 Bcl-X_{L165-173} (RIAAWMATY)(SEQ ID NO:50)의 존재 또는 부재시에 삼회 반복하여 웰 당 10^5 세포로 도달되기 전에

펩타이드로 한번 자극되었다.

7명의 건강한 개체들, 5명의 유방암 환자들, 4명의 흑색종 환자들, 2명의 췌장암 환자들, 및 5명의 다발 골수종 (myeloma) 환자들로부터의 PBL을 분석하였다.

모든 개체들은 HLA-A3 양성이다. 펩타이드 특이적 스팟들의 평균 수는 (첨가된 펩타이드가 없는 스팟들을 제거한 후) ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기(CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 이용하여 각 환자들에게서 계산하였다.

도 11은 INF- γ ELISPOT에 의해 Mc1-1에 대한 HLA-A3 제한된 T-세포 반응을 나타낸다. T-임파구는 펩타이드의 존재 또는 부재시에 삼회 반복하여 웰 당 3×10^5 세포로 도달되기 전에 펩타이드로 한번 자극되었다. 10명의 건강한 개체, 6명의 유방암 환자들(BC), 2명의 췌장암 환자들(PC), 6명의 CLL 환자들의 PBL을 분석하였다. 모든 개체들은 HLA-A3 양성이다. 펩타이드 특이적 스팟들의 평균 수는 (첨가된 펩타이드가 없는 스팟들을 제거한 후) ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 이용하여 각 환자들에게서 계산하였다. 반응기(항원 특이적 스팟들의 평균 \pm 1/2 표준편차 $> 10^5$ 임파구 당 25로서 정의된) 는 검은색 정사각형으로 표시되고, 반면에 비 반응 개체들은 흰색 정사각형으로 표시되었다.

도 12는 INF- γ ELISPOT에 의해 측정된 Mc1-1에 대한 HLA-A1 제한된 T-세포 반응을 나타낸다. T-임파구는 Mc1-1₁₆₆₋₁₇₅ 또는 Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅의 존재 또는 부재시에 삼회 반복하여 웰 당 3×10^5 세포로 도달되기 전에 펩타이드로 한번 자극되었다. 6명의 건강한 개체들, 4명의 유방암 환자들(BC), 및 7명의 흑색종 환자들의 PBL을 Mc1-1₁₉₅₋₁₀₃ 펩타이드(좌) 및 Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈(우)에 대해 실험하였다. 모든 개체들은 HLA-A1 양성이다. 펩타이드 특이적 스팟들의 평균 수는 (첨가된 펩타이드가 없는 스팟들을 제거한 후) ImmunoSpot® 시리즈 2.0 분석기 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 이용하여 각 환자들에게서 계산하였다. 반응기(항원 특이적 스팟들의 평균 \pm 1/2 표준편차 $> 10^5$ 임파구 당 25로서 정의된) 는 검은색 정사각형으로 표시되고, 반면에 비 반응 개체들은 흰색 정사각형으로 표시되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0143] 실시예 1

[0144] 유방암 환자들에 있어서 Bcl-2에 대한 면역 반응

[0145] 재료 및 방법들

[0146] 1. 환자들

[0147] PBL(Peripheral blood lymphocytes, 말초 혈액 임파구)은 유방암 환자들로부터 수집하였다. PBL은 림포프렙 분리(Lymphoprep separation), HLA-타입드 (Department of Clinical Immunology, University Hospital, Copenhagen, Denmark) 및 10% DMSO로 FCS에서 냉동을 이용하여 분리하였다. 혈액 샘플링을 하기 전에는 어떤 환자도 면역치료를 받지 않았다.

[0148] 2. MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩타이드의 어셈블리 분석

[0149] 물질대사적으로 [³⁵S]-메티오닌으로 라벨링된 HLA-A2 분자들에 대한 합성 펩타이드(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 결합 친화력은 앞에서 설명한대로 어셈블리 분석으로 측정하였다. 그 분석은 TAP-결합 세포주 T2로부터, 세포 용해로 유리된 앵프티 HLA 분자들의 펩타이드-매개 안정화(stabilisation)에 기초를 두고 있다.

[0150] 안정하게 포개진 HLA-분자들은 HLA-클래스 I 특이적, 확인-의존 mAb W6/32를 이용하여 면역-침강되고, IEF(isoelectric focusing) 겔 전기영동에 의해 분리된다. MHC 헤비 체인 밴드는 ImageGauge Phosphorimager program (FUJI photo film Co., Carrollton, TX, USA)를 사용하여 정량된다. 그 밴드의 집중(intensity)는 분석동안 회복된 펩타이드 결합된 클래스 I MHC 복합체의 양과 직접적으로 관련있다. 그 결과, HLA-A2 안정화(stabilisation)의 정도는 첨가된 펩타이드의 결합 친화력과 직접적으로 관계가 있다. HLA-A2의 회복은 관련된

펩타이드의 50, 5, 0.5, 0.05 μM 의 존재하에서 측정되었다. C_{50} 값은 최고의 안정화의 반을 충족시키는 펩타이드 농도로서 각 펩타이드에 대하여 계산하였다.

[0151] 3. PBL의 항원 자극

[0152] ELISPOT 분석의 민감도를 높이기 위하여, PBL는 분석에 앞서 *in vitro* 에서 한번 자극시켰다. 0일째에, PBL 또는 부서진 림프절(crushed lymph nodes)을 녹이고(thawed), X- 비보 미디움(X-vivo medium, Bio Whittaker, Walkersville, Maryland), 5% 열-불활성화된 인간 혈청, 및 10 μM 펩타이드의 존재하에서 L-글루타민 2mM에서 24-웰 플레이트(Nunc, 덴마크)에서 2×10^6 세포 농도에서 2 ml/웰으로 도말하였다. 2일 경과 후, 20 IU/ml 재조합 인터루킨-2(IL-2) (Chiron, Ratingen, Germany)이 상기 컬처에 첨가되었다. 배양된 세포는 12일째에 ELISPOT으로 반응성을 테스트하였다.

[0153] 4. ELISPOT 분석

[0154] ELISPOT 분석은 앞에서 개시한 것(Andersen, M. H., L. O. Pedersen, J. C. Becker, and P. thor Stratén. 2001. Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptose Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients. *Cancer Res.* 61:869)과 같이 이펙터 세포들을 유리시키는 펩타이드 에피토프-특이 인터페론- γ 를 정량하기 위하여 실시하였다. 간단히 말하면, 니트로셀룰로오스가 깔린 96-웰 플레이트 (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Hedehusene, Denmark)는 항-INF- γ 항체(1-D1K, Mabtech, Nacka, Sweden)로 코팅되었다. 상기 웰을 세척하고, X-비보 메디움 및 다양한 세포 농도에서 두번씩 첨가된 세포들에 의해 차단되었다. 펩타이드들은 그때 각 웰이 첨가되고, 밤새도록 배양되었다. 그 다음날, 미디어는 폐기되고, 그 웰은 바이오티닐레이티드(biotinylated) 두번째 항체(7-B6-1-Biotin, Mabtech)가 첨가되기 전에 세척하였다. 그 플레이트는 2 시간 동안 배양되고, 세척 및 아비딘-효소 컨주게이트(Avidin-enzyme conjugate, AP-Avidin, Calbiochem, Life Technologies)가 각 웰에 첨가되었다. 플레이트는 실온에서 1시간동안 배양되었고, 효소 기질 NBT/BCIP(Gibco, Life Technologies)가 각 웰에 첨가되고, 실온에서 5 - 10분동안 배양되었다. 반응은 짙은 자주색 스팟들이 나타날때 수돗물로 세척함으로써 종결되었다. 그 스팟들은 ImmunoSpot® Series 2.0 Analyzer (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US)을 이용하여 그 수를 세고, 펩타이드 특이적 CTL 빈도는 스팟-형성 세포들의 수로부터 계산되었다. 모든 분석은 각 펩타이드 항원마다 삼회 반복 수행하였다.

[0155] 5. 결과

[0156] Bcl-2 유래 펩타이드의 HLA-A2에의 결합

[0157] Bcl-2 단백질의 아미노산 서열은 주요 HLA-A2 특이 앵커 잔기들을 이용하여 가장 적당한 HLA-A2 노나- 및 데카머- 펩타이드 에피토프들로 스크리닝하였다(Andersen, M. H., L. Tan, I. Sondergaard, J. Zeuthen, T. Elliott, and J. S. Haurum. 2000. Poor correspondence between predicted and experimental binding of peptides to class I MHC molecules. *Tissue Antigens* 55:519). 13개의 Bcl-2 유래 펩타이드들이 합성되었고 어셈블리 분석을 수행하여 HIV-1 pol₄₇₆₋₄₈₄(ILKEPVHGV) (SEQ ID NO:39)로부터 HLA-A2 고친화 양성 대조군 에피토프와 비교함으로써 HLA-A2 결합을 실험하였다. 그 어셈블리 분석은 TAP-결합 세포주 T2에 다양한 농도의 펩타이드를 로딩시킨 후 클래스 I 분자의 안정화에 기초를 둔다. 그 결과, 정확하게 폴드된 안정한 MHC 헤비 체인은 확인-의존 항체들을 이용하여 면역침강된다. 클래스 I MHC 분자들의 안정화의 범위는 도 1에서 증명된 것처럼 첨가된 펩타이드의 결합 친화력과 직접적으로 관련이 있다.

[0158] 클래스 I MHC 분자들의 최고 회복력의 반(C_{50} 값)에 요구되는 펩타이드의 농도는 HIV-1 pol₄₇₆₋₄₈₄의 경우에는 0.7 μM 이다. (표 3) 8개의 Bcl-2 유래 펩타이드들은 양성 대조군으로서 거의 유사한 고친화력으로 결합하였다; Bcl₂₂₄, Bcl₁₈₅, Bcl₂₂₂, Bcl₂₁₈, Bcl₂₂₀, Bcl₂₁₄, Bcl₁₂₄ 및 Bcl₁₇₂ (C_{50} = 0.7, 1, 1, 2, 1, 3, 1, 및 2 μM , 각각) (Table 1)

[0159] 펩타이드 Bcl₈₀, Bcl₂₀₈ 및 Bcl₁₈₀은 오직 중간 또는 약한 친화력으로 결합하였다. (C_{50} = 36, 7 및 20 μM , 각각) 실험된 펩타이드의 두개는 (Bcl₂₁₆, Bcl₂₀₀)는 전혀 HLA-A2에 결합하지 않았다. 이번 주제에서 실험된 펩타이드들

의 리스트는 표 3에서 보여주고 있다.

표 3

[0160]

단백질 ^a	서열	SEQ ID NO	C ₅₀ 값(μM) ^b
HIV-1 pol ₄₇₆	ILKEPVHGV	39	0.7
Bcl ₂₂₄	A L V G A C I T L	1	0.7
Bcl ₈₅	A L S P V P P V V	2	1
bcl ₂₂₂	S L A L V G A C I	3	1
bcl ₂₁₈	K T L L S L A L V	4	2
bcl ₂₂₀	L L S L A L V G A	5	1
bcl ₂₁₄	W L S L K T L L S L	6	3
bcl ₈₀	A A A G P A L S P V	7	36
bcl ₂₁₆	S L K T L L S L A L	40	결합하지 않음
bcl ₂₀₈	P L F D F S W L S L	8	7
bcl ₁₂₄	F T A R G R F A T V	9	1
bcl ₁₈₀	Y L N R H L H T W I	10	15
bcl ₁₇₂	N I A L W M T E Y L	11	2
bcl ₂₀₀	E L Y G P S M R P L	41	결합하지 않음

[0161] ^a 아래 첨자에 입력된 값의 범위는 서열에서 첫번째 아미노산의 위치를 지시하고 있다.

[0162] ^b C₅₀ 값은 HLA-A2에 최고 결합력의 1/2를 위해 요구되는 펩타이드의 농도를 의미한다.

[0163] 화학 치료를 받은 유방암 환자들에 있어서 BCL-2 유래 펩타이드에 대한 CTL 반응

[0164] ELISPOT IFN-γ 분비 분석을 이용하여, 우리는 유방암 환자들의 말초 혈액 T 세포에서 Bcl-2 유래 펩타이드에 대한 특이 T-세포 반응의 존재를 실험하였다. 이 방법은 암 환자들에서 중앙 특이적 CTL를 동정하였을 때 최고로 효과적이었다.

[0165] 15명의 HLA-A2 양성 유방암 환자들의 PBL은 ELISPOT에서 실험하기 전에 *in vitro*에서 한번 자극되었다. 이 과정은 Andersen et al.(Andersen, M. H., L. O. Pedersen, J. C. Becker, and P. thor Straten. 2001. Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptose Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients. *Cancer Res.* 61:869)에서 설명하였듯이 ELSPOT의 민감도의 범위로 선택된다. 많은 CTL 에피토프들이 사실은 낮은 친화성 펩타이드들이기 때문에 우리는 실험의 첫번째 라인에서 모든 13개의 Bcl-2 추론 펩타이드들을 포함하였다. 반응은 Bcl₁₇₂, Bcl₁₈₀, Bcl₂₀₈, 및 Bcl₂₁₄에 대해 측정되었고, 이들 펩타이드로부터 데이터는 오직 도 2에서 주어졌다. 자발적인 CTL 반응은 환자들 중 8명 (50%)으로부터의 PBL에서 Bcl₁₇₂에 대해 측정되었고, 환자들 중 4명(약 25%)에서 Bcl180에 대해 측정되었다. (도 2) 그러나, 가장 빈번한 반응은 Bcl₂₀₈ 및 Bcl₂₁₄에 대해 측정되었고, 환자들 중 12명 (약 80%)이 Bcl₂₀₈에 대해 측정가능한 CTL 반응을 보였고, 환자들 중 11명(약 75%)이 Bcl₂₁₄-반응을 보였다. (도 2)

[0166] 실시예 2

[0167] 암 환자들에 있어서 Bcl-2의 면역원성

[0168] 요약

[0169] 여기에서, 우리는 관련없는 중앙 종류, 즉 체장암, AML 및 CLL로 고생하는 환자들로부터의 말초혈액에서 Bcl-2에 대한 자발적인 T-세포 반응성을 설명한다. 추가로 우리는 이들 Bcl-2 반응적 T 세포들이 실제로 펩타이드 특이적이며, 세포독성 effector 세포들임을 보여준다. 그러므로, Bcl-2는 예를 들어 전통적인 방사선- 및 화학 치료의 조합에 있어서 항-암 면역 치료 전략을 위한 중요하고 널리 적용할 수 있는 표적으로서 제공될 것이다.

[0170] 서론

[0171] Bcl-2 패밀리는 세포자살 조절에 있어서 몇몇 핵심 역할을 포함하고, 항세포자살 분자들 뿐만 아니라 프로아포프토틱 모두를 포함한다. Bcl-2는 암의 발병 및 진행에 공헌하는 결정적인 세포 인자이다. 본 연구에서, 우리는 암 환자들에 있어서 Bcl-2의 선천적 세포 면역원성을 실험하였다.

[0172] 방법들

[0173] 환자들

[0174] PBL은 림포프랩 분리(Lymphoprep separation)를 이용해 분리하고, HLA-타입드 (Department of Clinical Immunology, University Hospital, Copenhagen, Denmark) 되고, 10% DMSO를 가진 FCS에서 냉동되었다. 혈액 샘플링 전에 면역 치료를 받은 환자들은 아무도 없다. 환자들로부터의 동의는 이들 측정들에 앞서 획득하였다.

[0175] 말초 혈액 임파구(Peripheral blood lymphocytes, PBL)은 단계 IV로 정의되는 전이를 가진 진행중인 질환을 갖는 13명의 HLA-A2 양성 유방암 환자들로부터 수집하였다.; 환자들의 대부분은 한 중앙 위치이상을 가지고 있었다.(8/13 환자들) 사전 치료는 화학치료, 호르몬 치료, 및 방사선 치료를 포함한다. 8명의 환자들 사전에 화학 치료를 받았고, 반면 5명의 환자들은 실험에 합류되기 전에 오직 호르몬 치료만 받았으며 화학치료는 받지 않았다. 게다가, 수술가능한 유방암을 가진 12명의 HLA-A2 양성 환자들 포함되었고, 혈액 샘플은 수술 및 화학 치료전에 수집하였다. 추가로 PBL은 단계 IV로 정의되는 전이를 가진 진행 중인 두명의 HLA-A2 양성 체장암 환자들로부터 수집하였다. 마지막으로 10명의 HLA-A2양성의 CLL로 새로이 진단받은 환자들 및 3명의 AML 환자들로부터 치료전에 획득하였다. 12명의 HLA-A2 양성인 개체로부터 획득한 PBL은 대조군으로서 사용되었다.

[0176] 그랜자임 B ELISPOT(Granzyme B ELISPOT)

[0177] 그랜자임 B (GrB) ELISPOT 분석은 앞서 설명하였듯이 항원 특이적 CTL 세포독성을 측정하기 위하여 사용하였다. 간단히 설명하면, 니트로세룰로오스가 깔린 96 웰 플레이트들 (MultiScreen MAIP N45, Millipore)은 GrB 캡처 항체 (BD Biosciences, Brondby, Denmark)로 코팅되었다. 그 웰은 세척되고, 5% 인간 혈청을 가진 X-비보 메디움에 의해 차단되었다. 세포들은 다양한 세포 농도에서 첨가되었다. T2 세포들 및 펩타이드들은 그때 각 웰이 첨가되고, 플레이트는 4시간동안 배양하였고, 메디움은 제거되고, 웰은 GrB 측정 항체(BD Biosciences)의 첨가 전에 세척되었다. 플레이트는 2시간동안 배양되었고, 세척하고 아비딘 홀스래디쉬 페록시다아제(Avidin horseradish peroxidase, BD Biosciences)는 각 웰에 첨가되었다. 플레이트는 실온에서 1 시간동안 배양되었다. AEC 기질 시약 (BD Biosciences)이 각 웰에 첨가되고 실온에서 5-10분동안 배양되었다. 반응은 적색 스팟들이 출현했을때 수돗물로 세척함으로써 종결되었다. 그 스팟들은 세어지고, 펩타이드 특이적 CTL 빈도는 INF- γ ELISPOT과 유사하게 계산되었다. 모든 분석은 각 펩타이드 항원에 대해 두번 또는 세번 실시하였다.

[0178] 펩타이드 특이적 T 세포들의 분리

[0179] 항원 특이적 세포들은 앞에서 설명한대로 자기 비즈가 코팅된 Bcl₂₀₈/HLA-A2의 수단에 의해 분리되었다. 바이오 터닐레이티드(Biotinylated) 모노머(ProImmune, Oxford, UK)는 실온에서 20분동안, 40 μ l PBS에서 5 \times 10⁶ 비즈로 2.5 μ g 모노머를 배양함으로써 자기 비즈로 코팅된 스트렙타빈(streptavin)과 짝을 이룬다. 상기 자기 복합체는 자기장(Dynal A/S, Oslo, Norway)에서 PBS에서 3시간 동안 세척되었고, 그 결과 5% BSA를 가진 PBS에서 1:10의 비율로 PBLs와 혼합되고, 1시간 동안 매우 서서히 회전시켰다. 자기 복합체와 관련있는 항원특이적 CD8+ T 세포들은 3 시간동안 세척되었다. 분리된 세포들은 5% HS를 가진 X-비보에서 충분한 시간동안 재부유시켰고, 세포

현탁액으로부터 자기 비즈가 유리 및 제거되기 전까지 3시간동안 배양하였다. 분리된 세포는 48-웰 플레이트에서, X-비보, 5% HS 및 10^6 항-CD28에서 배양되었고, 항-CD3는 4-1BB 리간드(4-1BBL)을 발현하는 인위적인 세포-기초 항원 제시 세포(K32/41BBL)(펜실바니아 대학, 병리 및 의약 실험 분과, Dr. Carl H. June 으로부터 제공받음)를 코팅하였다. 분리 하루 후에, 20 유닛/ml IL-2를첨가하였고, 5일째에 표적 세포를 죽이는 이들 세포들의 능력을 표준 ^{51}Cr 유리 분석으로 실험하였다.

[0180] **희석 제한에 의한 클로닝**

[0181] CTL 클론들은 96-웰 플레이트에서 5% HS를 가진 X-비보에서 40 IU/ml IL-2 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA의 존재하에서 방사선 조사된 PBMC를 이용하여 희석을 제한함으로써 분리된 컬처들로부터 확립되었다. 신선한 매디우 및 IL-2가 3-4일 간격으로 클론들에 첨가되었다.

[0182] **세포독성 분석(Cytotoxicity assay)**

[0183] CTL-매개 세포독성을 위한 전통적인 [^{51}CR]-유리 분석을 수행하였다. 표적 세포들은 관련 펩타이드를 가지거나 가지고 있지 않은 T2-세포들, HLA-A2-양성 유방암 세포주 MDA-MB-231, 및 HLA-A2-음성 유방암 세포주 ZR75-1이다. 양 유방암 세포주는 역전사-PCR에 의해 실험된 것처럼 Bcl-2를 발현하였다.(데이터 없음)

[0184] **결과**

[0185] Bcl-2 유래 펩타이드들에 대한 CTL 반응

[0186] Bcl-2 특이적 T 세포들이 백혈병 환자들로부터의 PBL 에서도 역시 존재하는지 여부를 실험하기 위하여, 우리는 10명의 HLA-A2 양성 CLL 환자들 및 3명의 AML 환자들로부터의 PBL을 두개의 펩타이드 bcl₂₀₈ 및 bcl₂₁₄에 대한 반응성을 실험하였다. Bcl-2 반응은 CLL 환자들 중 5명, AML 환자들 중에서 2명에게서 발견되었다. (도 3) 게다가, 우리는 두명의 체장암 환자로부터의 PBL을 실험하여 양 환자들이 bcl₂₀₈ 및 bcl₂₁₄ 펩타이드에 대한 CTL 반응을 가지고 있음을 확인하였다. (도 3) 유사하게, 12명의 건강한 HLA-A2 양성 개체들로부터의 PBL을 실험하였다. 놀랍게도 약한 CTL 반응이 건강한 개체들 중의 한명에게서 bcl₂₀₈ 펩타이드에 대해 측정되었다.(데이터 없음)

[0187] PBL에서 Bcl-2 특이적 그랜자임 B 유리

[0188] GrB ELISPOT을 이용하여, 우리는 PBL에서 발견된 bcl-2 특이적 T 세포가 세포독성 기능을 나타내는지 평가하였다. 그러므로, bcl-2에 반응하는 유방암 환자들(환자번호: 19, 20 및 22) 중 3명의 PBL을 두개의 에피토프 bcl₂₀₈ 및 bcl₂₁₄에 대한 반응성을 분석하였다. (도 4) 세명의 환자 모두에게서, 양 펩타이드에 대한 반응이 10^5 PBL 당 약 50-140 펩타이드 특이적 CTL의 빈도로 발견되었다. 대조구로서 우리는 한명의 환자(환자번호: 16)를 포함시켰으며, 오직 bcl₁₇₂에 대한 반응성만 발견할 수 있었고 INF- γ ELISPOT 및 건강한 대조구(h1)에서 bcl₂₀₈ 및 bcl₂₁₄에 대해서는 반응성을 발견할 수 없었다. 예상한 것처럼, 유방암 환자 번호 16 및 건강한 대조구에서 bcl₂₀₈ 또는 bcl₂₁₄에 대한 GrB의 유리는 없었다.

[0189]

[0190] Bcl-2-반응적인 CTL의 기능적 역량

[0191] Bcl-2-반응적인 CTL의 기능적인 역량을 특성화하기 위하여, 이들 세포들은 설명한대로 HLA-A2/bcl₂₀₈ 복합체로 뒤덮인 자기 비즈의 수단으로 풍부하게(enriched)하였다. 세포들은 분리되기 전에 *in vitro*에서 펩타이드로 한 번 자극되었다. 분리된 세포들의 작은 분획이 희석을 제한함으로써 클론되었다. 확장된 컬처들은 GrB ELISPOT에서 펩타이드가 부재이거나 bcl₂₀₈로 펄스된 T2 세포들의 인지를 실험하였다. 이들 클론들의 몇몇은 bcl₂₀₈-펄스된

T2 세포들의 특이적 인식을 보였다.(데이터 없음) 그러나, 불행하게도 우리는 그 이상의 분석을 위해 이들 클론들을 확장시킬 수 없었다.

[0192] 분리 하루 후에, IL-2가 잔여 세포에 첨가되고, 5일째에 펩타이드가 로딩된 T2 세포들을 죽이는 세포들의 능력을 표준 ⁵¹Cr 유리 분석으로 테스트하였다. 이를위하여 로딩되지 않은 T2 세포들 또는 bcl₂₀₈로 로딩된 T2 세포들이 표적으로서 제공되었다. 이 분석은 오직 bcl₂₀₈로 펠스된 T2 세포들이 죽었음을 나타냈다. (도 5a) 이 강화된, *in vitro*에서 자극된 bcl₂₀₈ 반응적인 T 세포들은 HLA-A2 양성, Bcl-2 발현하는 유방암 세포주 MDA-MB-231을 죽이는 능력을 테스트하였다. 풍부하게 된 T 세포들은 효과적으로 MDA-MB-231 세포들을 용해시켰으며, 반대로 Bcl-2 발현 및 HLA-A2 음성 유방암 세포주 ZR75-1 에 대한 세포독성은 관찰되지 않았다. (도 5b)

[0193] **실시예 3**

[0194] 암 환자에 있어서 Bcl-X(L)의 면역원성

[0195] **요약**

[0196] 여기에서, 우리는 Bcl-X_L이 암 환자들이 있어서 T-세포 인식을 위한 표적임을 증명한다. 그러므로, 우리는 ELISPOT 및 플로우 사이토메트리 염색(flow cytometry stainings)의 수단에 의해 Bcl-X_L로부터 유래된 펩타이드 에피토프들에 대한 자발적인 HLA-A2- 및 HLA-A3-제한된 세포독성 T-세포 반응을 기술한다. 그러므로 Bcl-2 패밀리 단백질과 같은 세포자살 억제제들에 대한 세포성 면역 반응이 암에서 일반적인 현상으로 나타나며, 그 결과로서, 이 단백질 그룹은 항-암 면역치료를 위한 매력적인 보편적인 표적 단백질을 대표한다. 추가로, 세포에서 이들 단백질의 증가된 발현이 약 저항성과 상호관련이 있기때문에, 세포독성 화학치료 및 면역치료의 조합이 암의 치료를 위한 매우 매력적인 방법이 된다.

[0197] **서론**

[0198] 항세포자살 단백질 Bcl-X_L은 bcl-x 유전자의 긴 얼터네이티브리 스플라이스드 폼(alternatively spliced form)으로부터 생산되고, 반면에 프로아포프토틱 Bcl-X_S은 동일한 유전자의 짧은 얼터네이티브리 스플라이스드 폼(alternatively spliced form)으로부터 유래된다. Bcl-X_L은 치료 및 약한 예후의 일반적인 형태에 대한 저항과 직접적으로 관련있기 때문에 암에 있어서 중요한 역할을 한다. Bcl-X_L의 기능적인 억제제인 세포자살 과정을 복구하고 화학적 및 방사선 치료에 민감한 네오플라ستيك 세포(neoplastic cells)가 되게 한다. 반면에 Bcl-X_L의 높은 수위로 발현하는 암세포주의 축진이 다양한 약 저항성 표현형을 초래한다. Bcl-X_L의 증가된 발현은 AML 및 방광암, 유방암, 췌장암 및 흑색종과 같은 고형암뿐만 아니라 다발골수종을 포함한 다양한 악성 종양의 다양성에서 보고된다.

[0199] 면역 치료를 위한 이상적인 표적은 정상조직에서 침묵하고, 암세포에서는 과발현되고, 직접적으로 종양세포 생존 및 진행에 관련이 있는 유전자 산물이다.

[0200] **물질 및 방법**

[0201] 환자들

[0202] 말초 혈액 임파구(PBL)은 다양한 기원의 암으로 고생하는 환자 및 건강한 대조군으로부터 수집하여 림포프랩 분리를 이용하여 분리하고, HLA-타입드 (Department of Clinical Immunology, University Hospital, Copenhagen, Denmark) 및 10% DMSO를 가진 FCS에서 냉동시켰다. 혈액 샘플링 전에 면역치료를 받은 환자는 아무도 없다. 이들 측정예 앞서 환자들로부터 동의를 구하였다.

[0203] 플로우 사이토메트리 (FACS)

[0204] 유방암 환자로부터의 PBL은 관련 펩타이드로 *in vitro*에서 한번 자극되었고, 하루에 7개의 CD8+ 세포들이 다이날 CD8 음성 분리 키트(Dynal CD8 negative isolation kit, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway)을 이용하여 PBL에서 분리되었다. 그 결과 CD8 양성 T 세포 컬처가 PE 쿠프렛 Pro5™ MHC 오중체 (ProImmune, Oxford, UK)로 염색되고, 플로우로크롬(flouochrome) 연결된 mAbs: CD8-APC 및 CD3-FITC (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA)으로 염색된 항체에 의해 뒤따랐다. 양 염색은 암실에서 4°C, 30분 동안 PBS+2% FCS에서 수행되었다. 사용된 Pro5™ MHC 오중체 복합체는 : HLA-A2/ Bcl-X_{L173-182} (YLNDHLEPWI)(SEQ ID NO:42) 및 HLA-A2/ HIV-1 pol₄₇₆₋₄₈₄ (ILKEPVHGV)(SEQ ID NO:39)이다. 샘플은 BD FACS 지역에서 DIVA 소프트웨어(BD, San Jose, CA)를 이용하여 분석되었다.

[0205] **결과**

[0206] **Bcl-XL 유래 펩타이드에 대한 자발적인 CTL 반응**

[0207] bcl-x 유전자는 얼터네이티브 스플라이싱을 통해 두개의 mRNAs로 전사된다. 항세포자살 단백질 Bcl-X_L은 긴 얼터네이티브 스플라이싱(long alternative splice)로부터 생산된다. 반면에 프로아포프토틱 Bcl-X_S는 동일한 유전자의 짧은 얼터네이티브 스플라이싱(short alternative splice)로부터 유래된다. 좀더 큰 BCL-X_L의 단백질 산물은 삼입지역(아미노산 126-188)에 의해 Bcl-X_S 단백질과 차별된다. 그러므로, 만약 Bcl-X_L이 암환자들에 있어서 T-세포를 위한 선천적인 표적이되는지를 조사하기 위하여, 우리는 이 삼입지역(각 말단의 9개의 아미노산을 포함하는)을 주요 HLA-A2 특이적 앵커 잔기들을 이용하여 추정적인 HLA-A2 에피토프를 위해 세밀히 조사하였다. 그 결과, 우리는 7개의 Bcl-XL 추정 펩타이드들 (Bcl-X_{L158-166} (EMQVLVSRI)(SEQ ID NO:44), Bcl-X_{L118-126} (TAYQSFEQV)(SEQ ID NO:43), Bcl-X_{L173-182} (YLNDHLEPWI)(SEQ ID NO:42), Bcl-X_{L165-174} (RIAAWMATYL)(SEQ ID NO:45), Bcl-X_{L169-178} (WMATYLNDHL)(SEQ ID NO:46), Bcl-X_{L161-170} (VLVSRIAAMW)(SEQ ID NO:48), Bcl-X_{L141-150} (VAFFSFGGAL)(SEQ ID NO:49))을 합성하였고, 이들 펩타이드에 대한 ELISPOT의 수단에 의해 다른 기원의 HLA-A2+ 암 환자들의 PBL을 세밀히 조사하였다. 이 방법은 암 환자들에 있어 중앙 특이적 CTL을 확인하는데 아주 효과적임을 앞서 보았다. 진실로, 강한 그리고 빈번한 CTL 반응이 다른 기원의 암 환자들에서 실험된 펩타이드들 (Bcl-X_{L173-182}, Bcl-X_{L141-150}, Bcl-X_{L161-170}, 및 Bcl-X_{L165-174}) 중의 4개에 대하여 발견되었다. (도 6) 전반적으로, 18명의 HLA-A2+ 유방암 환자들에서 15명이 이들 4개의 Bcl-X_L 펩타이드들 중의 적어도 하나에 대해서 면역 반응을 가졌다.(반응자들은 항원 특이적 세포들의 평균수 ± 1/2 표준 편차> 10⁵ 세포들 당 25로서 정의된다.)

[0208] 마찬가지로, 실험한 흑색종 환자들 6명 중의 4명 및 췌장암 환자들 4명 중 1명은 이들 4개의 펩타이드들의 적어도 하나에 대하여 면역반응을 가졌다. 그러므로, 실험한 유방암 환자들 18명 중의 9명이 Bcl-X_{L173-182}에 대하여 면역 반응을 가졌으며, 반면에 실험된 HLA-A2+ 흑색종 환자들의 6명 중 2명이 이 펩타이드에 대하여 면역반응을 나타내었다.(도 6a) 18명의 실험된 유방암 환자들 중 4명이 Bcl-X_{L141-150}에 대하여 면역반응을 가졌으며, 반면에 우리는 실험된 2명의 췌장암 환자들 중 한명의 PBL에서 반응을 발견하였다. 우리는 이 펩타이드에 대하여 실험된 5명의 흑색종 환자들 중 누구의 PBL에서도 이 반응을 발견할 수 없었다. (도 6b) 마찬가지로, 우리는 6명의 유방암 환자들, 한명의 실험된 췌장암 환자의 PBL에서 Bcl-X_{L161-170}에 대한 반응을 발견하였다.(도 6c) 마지막으로, 4명의 유방암 환자들, 2명의 흑색종 환자들 및 한명의 췌장암 환자가 Bcl-X_{L165-174}에 대한 반응을 가졌다. (도 6d) 대조구로서 12명의 건강한 HLA-A2+ 개체들의 PBL을 실험하였다. 중요하게도, 건강한 개체에서는 Bcl-X_{L173-182}, Bcl-X_{L141-150}, Bcl-X_{L161-170}, 또는 Bcl-X_{L165-174} 펩타이드 어느 것에 대하여 반응을 발견할 수 없었다. (도 6)

[0209] **PBL에서 Bcl-XL 특이적 그랜자임 B 유리**

[0210] GrB ELISPOT을 사용하여, 우리는 PBL에서 발견된 Bcl-X_L 특이적 T 세포가 세포독성 기능을 나타내는지 여부를 평가하였다. 그러므로, Bcl-X_L에 반응하는 유방암 환자들 중 2명(환자번호: 35 및 36)으로부터의 PBL을 Bcl-X_{L173-182}에 대하여 반응지를 분석하였다.(도 7) 두 환자 모두에게서 Bcl-X_{L173-182}에 대한 반응이 3×10⁵ 세포당 약

50-100 펩타이드 특이적 CTL의 빈도에서 발견될 수 있었다. 대조구로서, 우리는 한명의 환자(환자번호: 17)를 포함하였으며, Bc1-X_{L141-150}에 대한 반응만을 발견할 수 있었고, INF- γ ELISPOT에서는 Bc1-X_{L173-182}에 대한 반응을 발견할 수 없었다. 예상했던대로, 유방암 환자 번호 17에서는 Bc1-X_{L173-182}에 대하여는 어떠한 GrB 유리도 발견되지 않았다.

[0211]

[0212] **Bc1-XL 특이적 T 세포의 FACS 분석**

[0213] 유방암 환자들로부터의 PBL에서 Bc1-X_{L173-182} 특이적 CTL의 자발적인 발생이 FACS 분석 및 Pro5TM MHC 오중체 염색을 사용하여 분석되었다. 유방암 환자 번호 36으로부터의 PBL은 펩타이드로 *in vitro*에서 한번 자극되었고, CD8 양성 세포는 분리되었다. 이 걸치는 HLA-A2/BCL-X 오중체 복합체로 염색되었다. FACS 분석은 CD8+ T 세포의 0.24%를 함유하는 오중체 양성 T 세포들을 쉽게 발견할 수 있는 집단을 드러냈다.(도 8a) 비교로서, 동일한 CD8+ T-세포가 ELISPOT의 수단에 의해 분석하였을 때, 약 1.4% Bc1-X_{L173-182} 특이적, CD8+ T 세포를 분비하는 IFN- γ 을 보였다.(도 8c)

[0214] **Bc1-X(L)에 대한 추가적인 HLA-A2 제한된 에피토프들**

[0215] 우리는 양 펩타이드에 대한 다른 기원의 암환자들에 있어서 약한 자발적인 CTL 반응을 확인하기 위하여 Bc1-X_{L118-126} (TAYQSFEQV)(SEQ ID NO:43)(도 9a) 및 Bc1-X_{L169-178} (WMATYLNDHL)(SEQ ID NO:46) (figure 9b)에 대해서 ELISPOT 수단에 의해 다른 기원의 HLA-A2+ 암 환자들의 PBL을 세밀히 분석하였다.

[0216] **Bc1-X(L)에 대한 HLA-A3 제한된 반응들**

[0217] 추가로, 우리는 주요 HLA-A3 특이적 앵커 잔기들을 이용하여 추정되는 HLA-A3 에피토프들을 위하여 삽입된 지역(각 말단에서 9개의 아미노산을 포함하는)을 세밀히 분석하였다. 그 결과, 우리는 두개의 펩타이드들을 합성하였다: Bc1-X_{L165-173} (RIAAWMATY)(SEQ ID NO:50) 및 Bc1-X_{L149-157} (ALCVESVDK)(SEQ ID NO 51) 그 다음으로, 우리는 Bc1-X_{L165-173} (RIAAWMATY)(SEQ ID NO: 50) 및 Bc1-X_{L149-157} (ALCVESVDK)(SEQ ID NO:51) 펩타이드에 대하여 ELISPOT를 이용하여 다른 기원의 HLA-A3+ 암 환자들의 PBL을 세밀히 분석하였다. 이 방법은 암 환자들에 있어서 종양 특이적 CTL을 확인하는데 아주 효과적임은 앞에서 보여줬다. 진실로, 강하고 빈번한 CTL 반응이 다른 기원의 암 환자들에서 Bc1-X_{L165-173} (RIAAWMATY)(SEQ ID NO:50)에 대해 발견하였다. 5명의 실험된 유방암 환자들 중 4명에서 HLA-A3+ PBL에서 Bc1-X_{L165-173}에 대한 반응을 발견할 수 있었고(반응자들은 항원 특이적 세포의 평균수 $\pm 1/2$ 표준편차 $> 10^5$ 세포 당 25로서 정의됨), 4명의 실험된 흑색종 환자들 중 4명, 4명의 실험된 다발 골수종 환자들 중의 1명뿐만 아니라 2 명의 실험된 췌장암 환자들 중 2명에서도 발견되었다. (도 10) 중요하게도, 우리는 대조군으로 실험한 7명의 HLA-A3+ 건강한 개체 중 어느 누구한테서도 상기 반응을 발견할 수 없었다. (도 10)

[0218] **실시예 4**

[0219] **암 환자에 있어서 Mcl-1의 면역원성**

[0220] **요약**

[0221] 여기에서, 우리는 Mcl-1이 암 환자에 있어서 T-세포 인식을 위한 표적임을 증명한다. 그러므로, 우리는 ELISPOT의 수단에 의해 Mcl-1로부터 유래된 펩타이드 에피토프에 대한 자발적인 HLA-A1- 및 HLA-A3-제한된 세포독성 T-세포 반응에 대하여 기술한다.

[0222] **서론**

[0223] 골수 세포 인자-1(Myeloid cell factor-1, Mcl-1)는 초기 모노사이트 분화에서 발현되는 Bcl-2 패밀리의 죽음-

억제 멤버이며, 미성숙 골수 세포로의 트랜스펙션(transfection)에서 생존력을 증진시킬 수 있다. 트랜스제닉 마우스에서 Mc1-1은 조혈 세포 타입의 스펙트럼 및 골수 세포의 불멸화(immortalization)에서 생존을 증진시킨다. Mc1-1의 증가된 수치는 전립선암, 췌장암, 흑색종, 유방암, 난소암 환자 및 자궁경부암을 포함하는 수많은 인간 암들, 뿐만 아니라 B-세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL) 및 AML 및 ALL 재발에서 많이 보고되고 있다. B-CLL 환자들에서 Mc1-1의 높아진 수치는 단일-약제 치료 후에 완전한 완화를 성취하는데 실패하는 것과 강하게 상호연관되어 있다. 다발 골수종에서, Mc1-1은 악성 세포의 생존에서 중요한 역할을 한다. 이와 관련하여, 그 자신의 프로모터의 제어아래에서 mc1-1 트랜스진(transgene)을 발현하는 마우스가 소포 림프종(follicular lymphoma)에서 큰 세포 임파종으로 확산시키는 범위에서 높은 빈도로 B-세포 종양형성(neoplasias)을 발전시킨다는 것이 증명되었다.

[0224]

[0225] Mc1-1에 대한 HLA-A3-제한된 반응

[0226] 암 환자에 있어서 Mc1-1이 T-세포를 위한 선천적인 표적인지 여부를 조사하기 위하여, 우리는 주요 HLA-A3 특이적 앵커 잔기들을 사용하여 가장 가능한 HLA-A3 노나- 및 데카-머 펩타이드 에피토프들을 위한 단백질 서열을 실험하였다. 그 결과, 우리는 6개의 Mc1-1 추론된 펩타이드들을 합성하였고(Mc1-1₁₈₅₋₁₉₄ (YLREQATGAK)(SEQ ID NO:52), Mc1-1₂₉₃₋₃₀₂ (SITDVLVRTK)(SEQ ID NO:53), Mc1-1₂₆₇₋₂₇₆ (LISFGAFVAK)(SEQ ID NO:54), Mc1-1₉₅₋₁₀₃ (RLFFAPTR)(SEQ ID NO:55), Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈ (RTKRDWLVK)(SEQ ID NO:56), Mc1-1₂₃₆₋₂₄₄ (DIKNEDDVK)(SEQ ID NO:57)), 이들 펩타이드에 대한 반응성을 ELISPOT 분석의 잇점을 이용하여 다른 기원의 HLA-A3+ 암 환자들로부터의 PBL을 세밀히 분석하였다. 이 방법은 암 환자에 있어서 종양 특이적 CTL의 확인을 위한 최고로 효과적인 방법임이 앞서 소개되었다. 진실로, 강하고 빈번한 CTL 반응이 다른 기원의 암 환자들의 2개의 Mc1-1 유래된 펩타이드(Mc1-1₉₅₋₁₀₃ 및 Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈)에 대해 측정되었다.(도 11) 전체적으로, 6명의 실험된 HLA-A3+ 유방암 환자들 중 5명이 이들 두개의 Mc1-1 펩타이드 중 하나에 대하여 면역반응을 보였다. 그러므로, 5명의 유방암 환자들은 Mc1-1₉₅₋₁₀₃에 대해 반응을 나타낸 것이고 (반응자들은 항원 특이적 세포의 평균수 \pm 1/2 표준편차 $> 10^5$ 세포당 25로서 정의됨), 세명의 환자들 이 Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈에 대해 반응을 보였다.(도 11) 추가로, 두명의 실험된 HLA-A3+ 췌장암 환자들 중 2명이 Mc1-1₉₅₋₁₀₃에 대해 면역반응을 보였고, 반면에 이들 중 한명은 Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈에 대해 또한 반응하였다. 추가로 우리는 B-CLL을 앓고 있는 6 명의 환자들로부터의 PBL을 실험하였고 이들 환자들 중 두명에 있어서 Mc1-1₉₅₋₁₀₃에 대하여 반응을 확인하였다. 대조구로서, 10명의 건강한 HLA-A3+ 개체들로부터의 PBL을 실험하였다. 중요하게도, 건강한 도너들에서는 Mc1-1₉₅₋₁₀₃ 또는 Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈ 펩타이드에 대해서 어떠한 반응도 발견할 수 없었다. (도 11) 유사하게, 암 환자들 또는 건강한 대조구들 중 어디에서도 추가적인 4개의 Mc1-1 유래된 펩타이드 중 어느 하나에 대해서도 반응을 발견할 수 없었다. (데이터 부재)

[0227] Mc1-1에 대한 HLA-A1-제한된 반응

[0228] Mc1-1이 암 환자에 있어서 T-세포를 위한 선천적인 표적인지 여부를 조사하기 위하여, 우리는 주요 HLA-A1 특이적 앵커 잔기들을 이용하여, 가장 가능한 HLA-A1 노나- 및 데카-머 펩타이드 에피토프들을 위한 단백질 서열을 실험하였다. 그 결과로서, 우리는 4개의 Mc1-1 추론된 펩타이드들을 합성하였고 (Mc1-1₁₆₆₋₁₇₅ (PAEEEEEDLY)(SEQ ID NO:58), Mc1-1₁₂₁₋₁₂₉ (SPEEELDGY)(SEQ ID NO:59), Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅ (QSLEIISRY)(SEQ ID NO:60), Mc1-1₃₃₉₋₃₄₇ (AGVGAGLAY)(SEQ ID NO:61)), ELISPOT 분석의 잇점을 이용하여 이들 펩타이드에 대한 반응성을 기원이 다른 HLA-A1+ 암 환자들의 PBL을 세밀히 분석하였다. 진실로, CTL 반응은 다른 기원의 암 환자에서 두개의 Mc1-1 유래된 펩타이드(Mc1-1₁₆₆₋₁₇₅ 및 Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅)에 대해 관찰되었다.(도 12) 전체적으로, 4명의 실험된 HLA-A1+ 유방암 환자들 중에서 3명이 Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅에 대해 면역 반응을 보였으며, 추가로 이들 중 한명이 Mc1-1₁₆₆₋₁₇₅에 대해 반응을 보였다. (도 12) 추가로, 7명의 흑색종 환자들 중 한명이 Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅ 펩타이드에 대하여 면역 반응을 보였으며, Mc1-1₁₆₆₋₁₇₅에 대해서도 면역반응을 보였다. 대조구로서, 6명의 건강한 HLA-A1+ 개체들로부터의 PBL을 실험하였다. 중요한 것은, 건강한 도너들의 어디에서도 Mc1-1₁₆₆₋₁₇₅ 또는 Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅ 펩타이드에 대한 반응을 관찰할 수 없었다.(도 12)

[0229]

[0230] 변형된 펩타이드 반응

[0231] HLA-A3 제한된 펩타이드 Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈의 면역원성은 위치 2에서 트레오닌을 더 나은 HLA-A3 앵커 잔기, 즉 루이신 (Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈L2 (RLKRDWLVK)(SEQ ID NO:62))으로 대체함으로써 증가되었다. 자발적인 면역 반응은 Mc1-1₃₀₀₋₃₀₈L2에 대해 두명의 유방암 환자에서 관찰되었다.(데이터 부재) 마찬가지로, 좀더 많은 면역원성 에피토프를 발생시키기 위하여 우리는 HLA-A1 제한된 펩타이드 Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅를 위치 3에서 두개의 펩타이드 Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅D3 (QSDEIISRY)(SEQ ID NO:63) 및 Mc1-1₁₇₇₋₁₈₅E3 (QSEEIISRY)(SEQ ID NO:64)이 생기게 변형하였다.

[0232] 논의

[0233] 거의 모든 악성 종양은 세포자살 신호의 결실에 의해 특징지어진다. 이는 악성 종양 세포들이 내인적인 세포자살 자극뿐만 아니라, 화학치료제 및 방사선과 같은 외인성의 자극에도 저항을 갖도록 한다. 이런 인간 암에서 발견되는 불완전한 세포자살은 종종 Bcl-단백질 패밀리, 즉, Bcl-2, Bcl-X_L, 및 Mc1-1, Bcl-w, Bfl-1~1-A1, Bcl-b, 및 Bcl2-L-10에서 항세포자살 단백질의 과발현에서 초래된다.

[0234] 세포자살의 그러한 억제체를 이용하여, 백신 용도를 위한 단백질은 유리하다. 면역 탈출의 몇가지 형태로서 이들 단백질의 하향조절 또는 발현의 상실이 유지된 종양 성장이 감소하기 때문이며, 이는 종양세포들의 생존은 Bcl-2 패밀리의 기능적으로 활성화된 멤버들을 요구하기 때문이다. 치료 전략을 위하여, 종양 세포 성장 및 생존과 관련하여 중요하지 않은 역할을 하는 항원의 표적화에 있어서, 항원 결합 종양의 선별이 잘 알려진 한계이다. 추가로, 세포에서의 Bcl-2 패밀리 단백질의 증가된 발현이 약 저항성과 상호 관련이 있으며, Bcl-2 패밀리-기초 면역치료와 세포독성 화학치료와의 조합이 암 치료를 위한 매우 흥미로운 새로운 방법이다.

[0235] 우리는 모티프를 결합하는 펩타이드의 존재를 위하여 Bcl-2, bcl-X(L) 및 Mc1-1 단백질을 스캔하였고, 암 환자들에 있어서 특이적인 T-세포 반응을 찾기 위하여 이들을 사용하였다. 그 때문에, 자발적인 T-세포 반응성이 관련없는 종양 타입들, 즉, 췌장암, 유방암, 흑색종 AML 및 CLL 로 고생하는 환자들에 있어서 ELSIPOT에 의해 Bcl-2 패밀리의 모든 멤버들에 대해 발견되었다. 암 환자들로부터의 PBL에서 Bcl-X_L 특이적 CD8+ 세포들의 존재는 CD8/펜타머 FACS 염색에 의해 확인되었다. 함께 취합하면, 이들 데이터들은 이들 환자들로부터 에피토프를 확인하는 CTL이 암에 대한 치료적 백신에 있어서 널리 적용될 수 있으며, 그러므로 실질적인 면역 치료적인 가치를 지님을 보여준다.

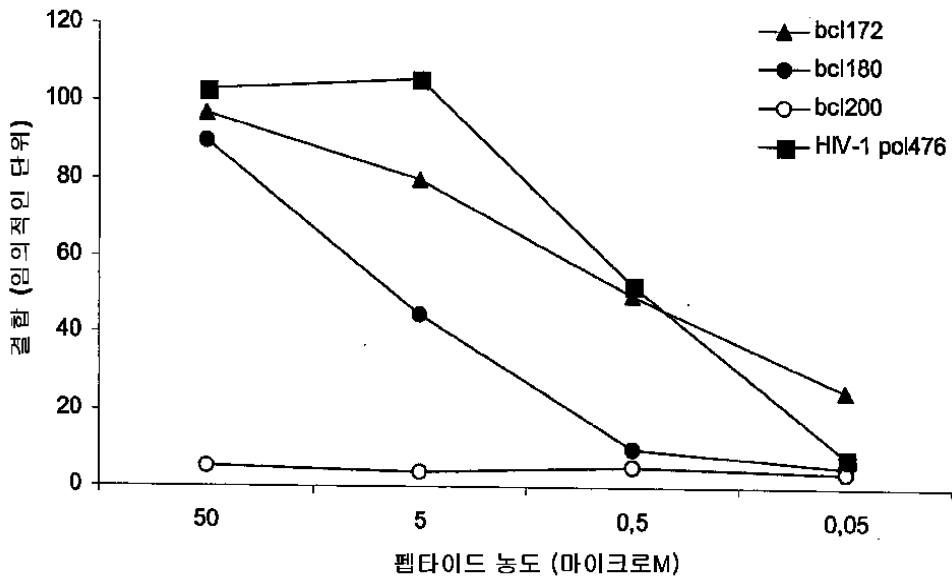
[0236] 추라고, 유방암 환자들의 11명이 Bcl-2 특이적 CTLs를 가졌으며, 이들 환자들 중 8명이 사전에 화학치료의 적어도 한가지를 치료받았다. 두명의 환자(환자번호: 14 및 17)에 있어서, 4개의 다른 Bcl-2 펩타이드에 대하여 어떠한 CTL 반응이 발견되지 않았다. 두 환자는 미리 항-호르몬 치료는 받았지만 화학치료는 받지 않았다. 유사하게, 우리는 사전에 화학치료를 받은 국소적인 유방암을 가진 환자들에 있어서 어떠한 반응도 발견할 수 없었다. 그러므로, 유방암 환자들에 있어서 Bcl-2 반응은 화학치료를 받은 환자들에 있어서만 오직 발견되었다. 비록 종양 로드가 중요할지라도, 이는 면역 반응은 Bcl-2 발현의 증가를 유도하는 치료의 결과로서 도입되거나 증가되어진다는 점을 지시한다. 그것은 세포독성 화학치료로 면역치료가 기본이된 Bcl-2 패밀리의 조합이 시너지작용이 되어 현저히 반응 비율을 개선시키는 것이다. Bcl-X(L) 및 Mc1-1 반응을 위한 실험된 환자들의 치료 상태는 이용할 수 없다.

[0237] 본 연구에서, 우리는 환자들의 PBL에서 Bcl-2 또는 Bcl-X(L) 특이적 CTL이 실질적으로 세포독성 이펙터 세포들임을 증명하기 위하여 GrB ELISPOT 분석을 이용하였다. 상기 개념을 더 증명하기 위하여, 우리는 환자 PBL로부터 Bcl-2 반응적인 T 세포를 풍부히 하고(enriched), 결과적인 T-세포주는 전통적인 ⁵¹Cr-유리 분석에서 펩타이드-펄스된 T2-세포를 용해시키는 것이 가능함을 보였다. 게다가, 이 Bcl-2 반응적인 T-세포주는 HLA-매치되는 유방암 세포주를 죽이는 것이 가능하고, 반면에 HLA-A2 음성 표적 세포들은 죽이지 못한다. 이러한 발견들은 진실로 암 세포가 HLA-A2 부분자와의 관계에서 Bcl-2 펩타이드를 진행시키고 나타내는 것을 보여준다. 마지막으로, 우리는 이들 분리된 세포들을 클론할 수 있으며, 그것들이 Bcl-2 펩타이드 에피토프에 대하여 매우 특이적으로 반응함을 보였다.

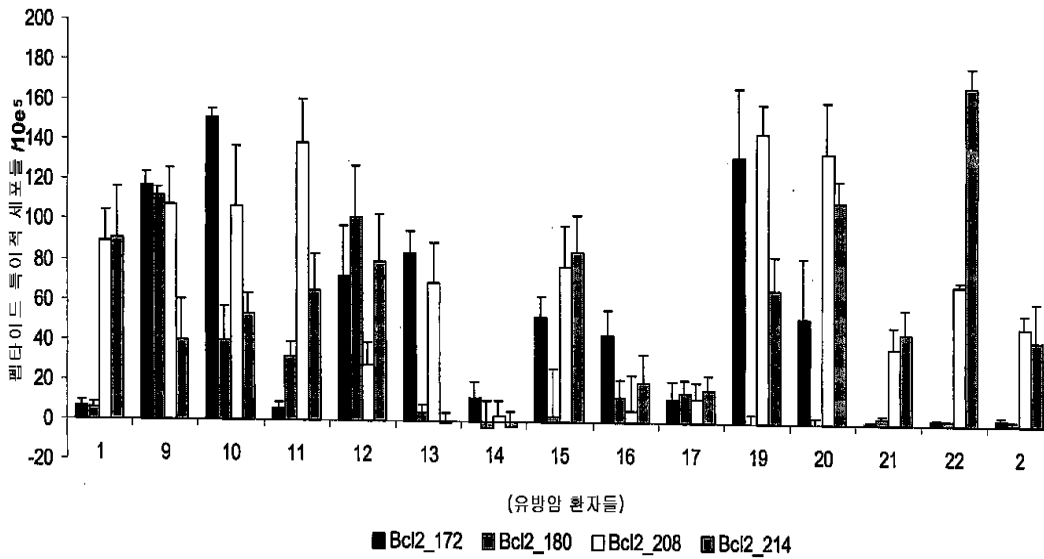
- [0238] 멜라노사이트 분화 항원으로부터 유래된 펩타이드가 처음으로 단계 IV 흑색종을 가진 환자를 치료하기 위하여 사용되었을 때, 이것이 흑색종의 명백한 파괴를 유도할 것이라고 계획되고, 차례로 임상적으로 백반증 (vitiligo) 또는 망막염(retinitis)을 명백히 하였다. 그러나 임상적인 경험이 백신을 맞은 환자에서 백반증의 발생이 다른 형태의 치료를 받은 환자에서의 색소침착저하증(hypopigmentation)과 관련된 멜라노마의 발병보다 현저하게 높지 않았다.
- [0239] 추가로, 자가-항원에 대한 다양한 백신에 있어서 심각한 부작용은 보고되지 않았다.
- [0240] 함께 취합된 우리의 데이터는 Bcl-2 패밀리의 단백질의 그룹에 대한 세포성 면역 반응은 암에 있어서는 일반적인 특성임을 증명하였다. 면역치료의 충격을 최대화하기 위한 시도로, 흥분 전략은 발현 프로파일 및 특정 질환 또는 질환 단계에서 선택된 표적의 예후적인 중요성이 되는 것으로 고려되어진다.
- [0241] 그러므로, Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl- χ_2 의 상호발현이 몇몇 암에서 또는 질환의 특정 단계에서 보여지는 동안, 다른 암들은 하나 또는 다른 단백질의 배타적인 발현을 나타낸다. 그러므로, 난소암과 같은 몇몇 질환에서, Bcl-2가 아닌 Mcl-1의 발현은 Mcl-1이 기본적인 항원이기 때문에 높은 단계 및 낮은 생존력과 관련이 있으며, 반면에 CLL과 같은 질환에서 Bcl-2 및 Mcl-2은 상호 과 발현되고, 동시에 양 단백질을 표적화하는 것은 각 분자 하나를 표적화하는 것보다 좀더 효과적인 전략으로 대표된다. 유사하게, Tanaka et al 은 유방 종양에서 세포자살 단백질 설비빈의 다른 억제제의 존재는 강하게 Bcl-2의 발현과 관련되어 있으며, 감소된 아포프토틱 지수(AI)와 관련이 있으며, 전체적으로 약한 생존력과 관련이 있음을 개시하였다. 설비빈과 Bcl-2 사이의 유사한 관련성은 신경모세포종(neuroblastoma), 위암, 결장암, 및 하이-그레이드 비-호지킨 임파종에서 나타난다. 암에 대한 치료적 백신에서 펩타이드 유래 설비빈의 안정성 및 가능한 효능은 일반적으로 단계 I/II 임상적 시도에서 조사되고 있다(J. Becker, personal communication). 그러므로, 흥미로운 면역 치료적인 전략은 Bcl-2 단백질 패밀리의 및 특히 설비빈 모두를 표적화할 것인데, 이는 다른 세포 경로를 통해 그들의 항-세포자살 기능을 수행할 것이기 때문이다.
- [0242] **실시예 5**
- [0243] 펩타이드 백신
- [0244] Bcl-2 단백질 패밀리의 펩타이드들은 유리 아마이드 NH₂ 말단 및 유리 산 COOH 말단으로 UVA Biomolecular Core Facility에서 합성될 수 있다. 각각은 동결 건조된 펩타이드로서 제공되고, 그 후 멸균수에서 재구성되고, 물에서 67-80% 락테이트 링거스(Lactated Ringer's)의 마지막 농도로 완충용액으로서 락테이트 링거스 용액(Lactated Ringer's solution, LR, Baxter Healthcare, Deerfield, IL)으로 희석된다. 이 용액은 그 후 멸균-여과되고, 붕규산 유리병에 담아서, IND 6453으로 정의되는 FDA 가이드라인과의 합치에 있어서 동일성, 무효, 일반적인 안정성 및 순도의 확인을 포함하는 품질 보증 실험의 시리즈를 위해 제출된다. 이들 펩타이드 용액이 3년동안 -20°C에서 저장되었을 때, 펩타이드 안정성 테스트는 순도에 있어서 또는 펩타이드 농도에 있어서 감소가 없음을 증명하였다.
- [0245] 특정한 환경에서, 환자들이 클래스 II HLA-제한된 헬퍼 펩타이드를 가지거나 가지고 있지 않은 클래스 I HLA-제한된 펩타이드의 약 100 μ g 을 함유하는 백신을 받을 것이다. 환자들은 어쥬번트 단독 존재하에서 클래스 I HLA 펩타이드의 약 100 μ g 을 백신주사를 맞거나, 클래스 II-제한된 헬퍼 펩타이드의 190 μ g이 포함된 HLA 클래스 I-제한된 펩타이드의 약 100 μ g 을 백신주사 맞을 것이다.
- [0246] 헬퍼 펩타이드의 좀더 많은 투여량은 헬퍼 및 세포독성 에피토프의 동량 제공하기 위해 계산된다. 추가로, 환자들은 양 펩타이드의 아마노산 서열을 함유하는 좀더 긴 펩타이드로 백신주사를 맞을 수 있다.
- [0247] 상기 펩타이드들은, 1-ml 수용액에서, QS-21의 약 100 μ g 을 가진 용액/현탁액으로서 또는 몬타나이드 ISA-51 어쥬번트의 약 1ml 를 가진 에멀전으로서 모두 투여될 수 있다.
- [0248] 환자들은 0일째에 면역화되고, 어쥬번트 함유된 펩타이드로 1, 2, 3, 6, 9, 및 12달에, 총 7번 면역화된다. 희귀한 예외로, 백신은 각 백신이 동일한 팔에 투여될 수 있다. 펩타이드들은 바람직하게 s.c. 로 투여된다.

도면

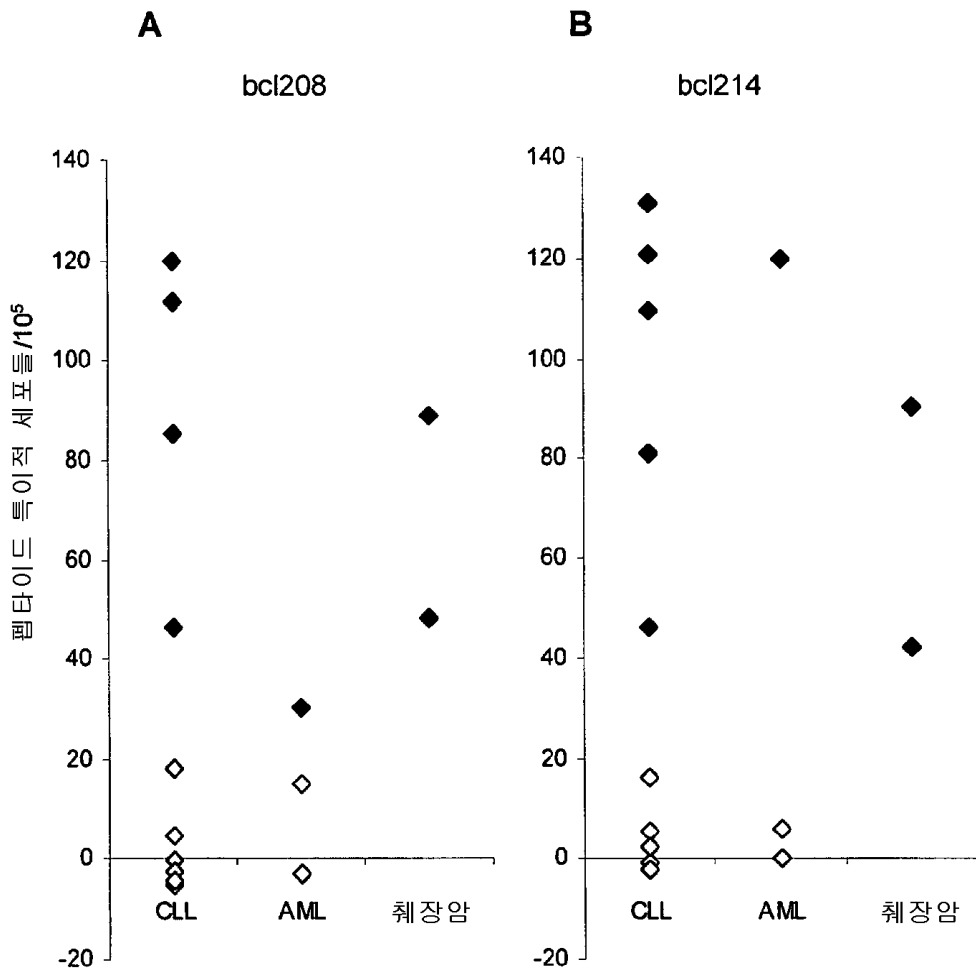
도면1



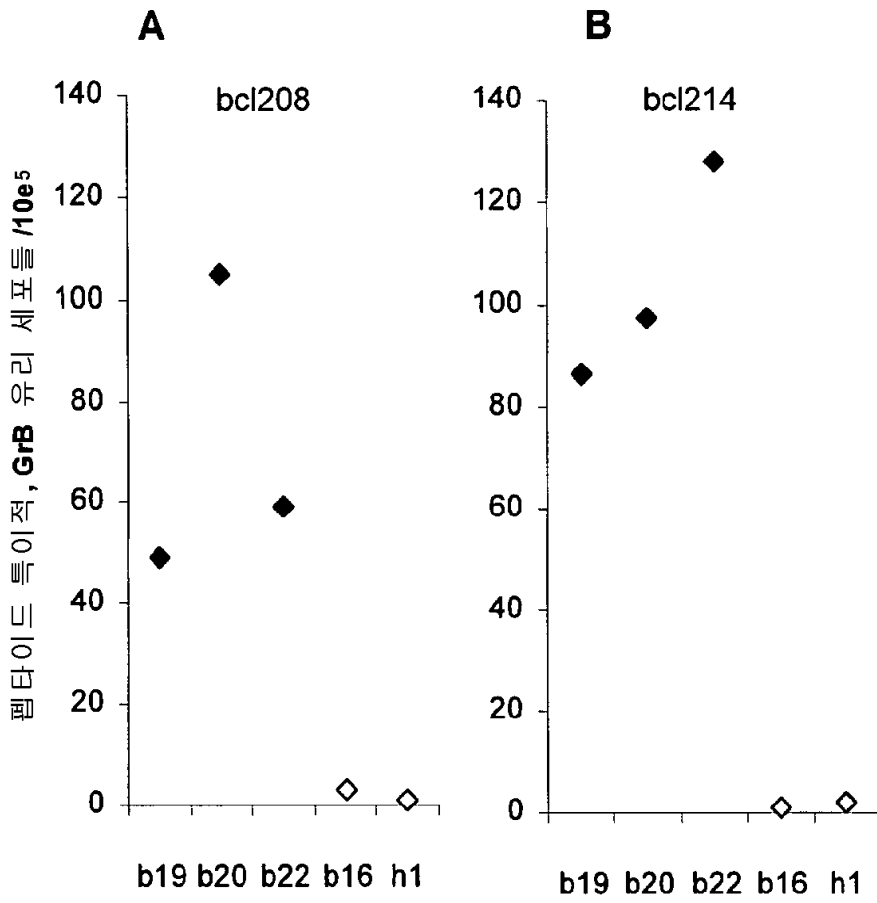
도면2



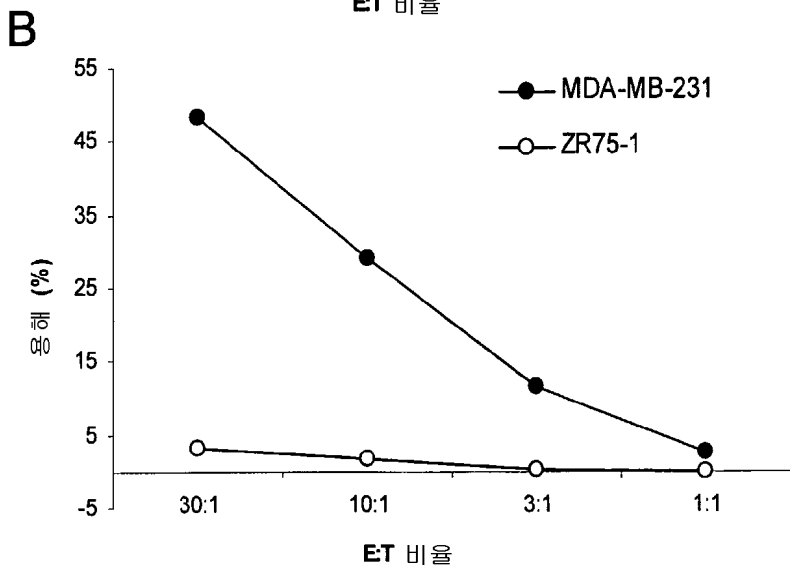
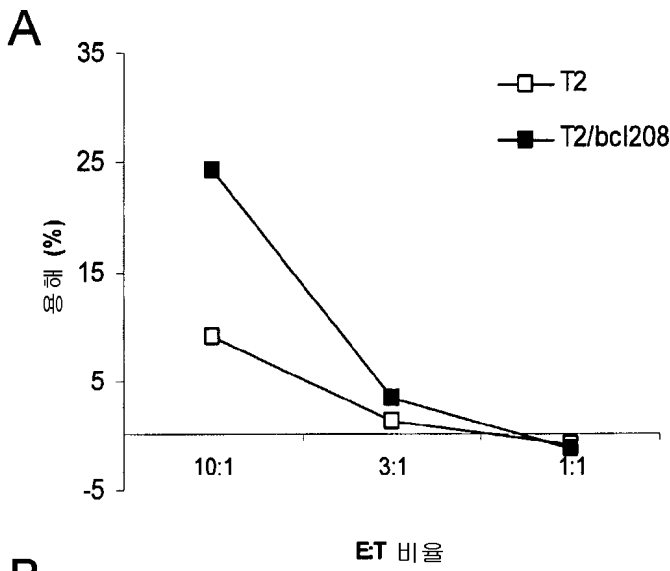
도면3



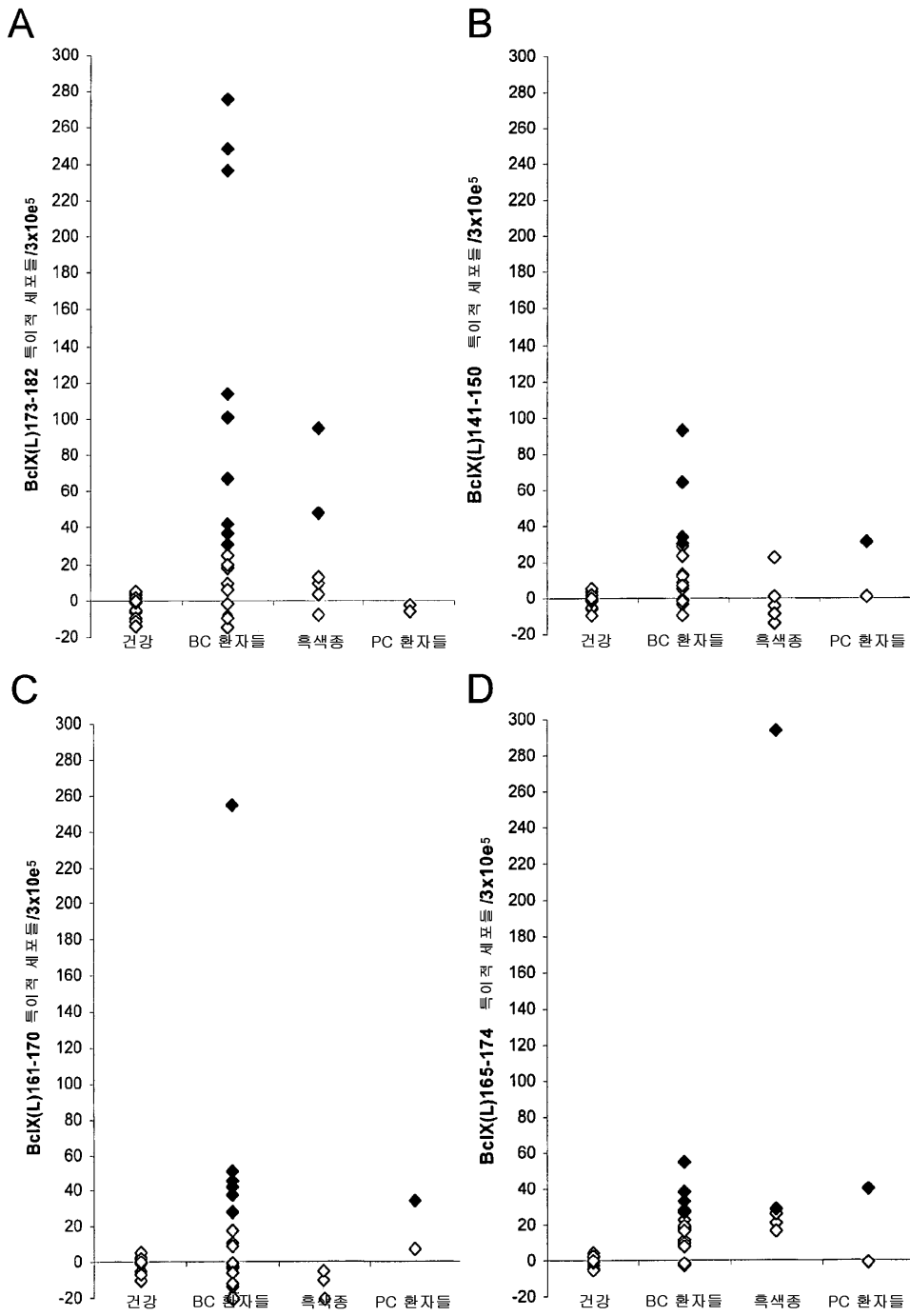
도면4



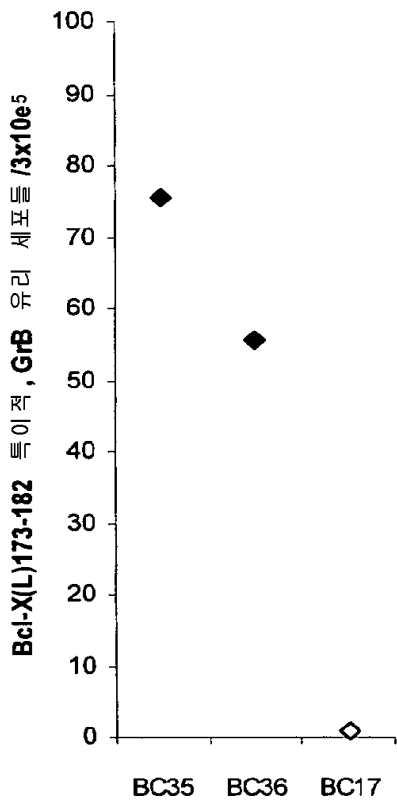
도면5



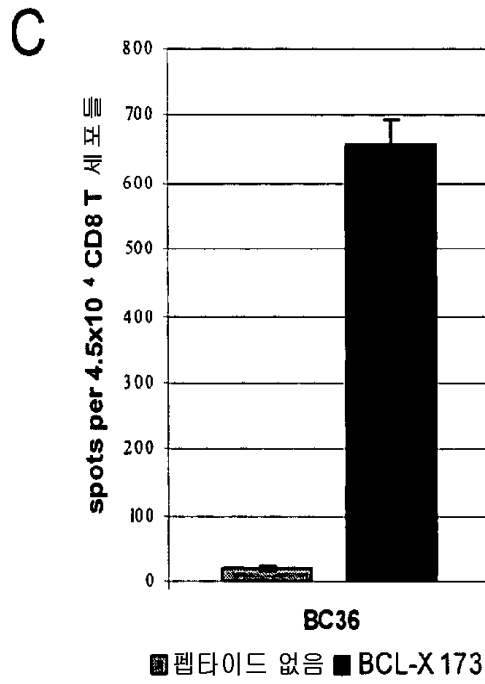
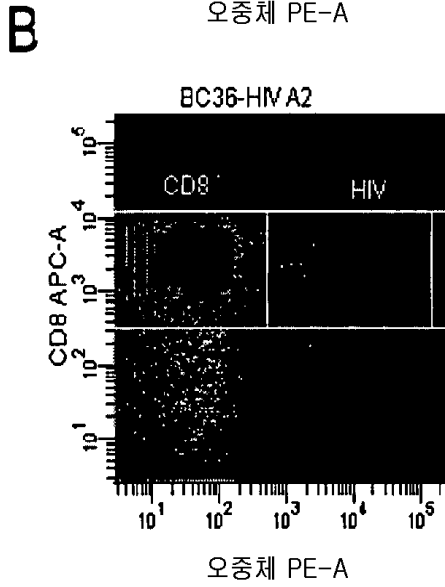
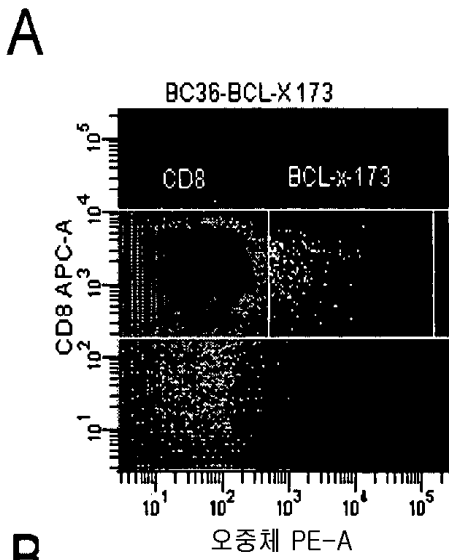
도면6



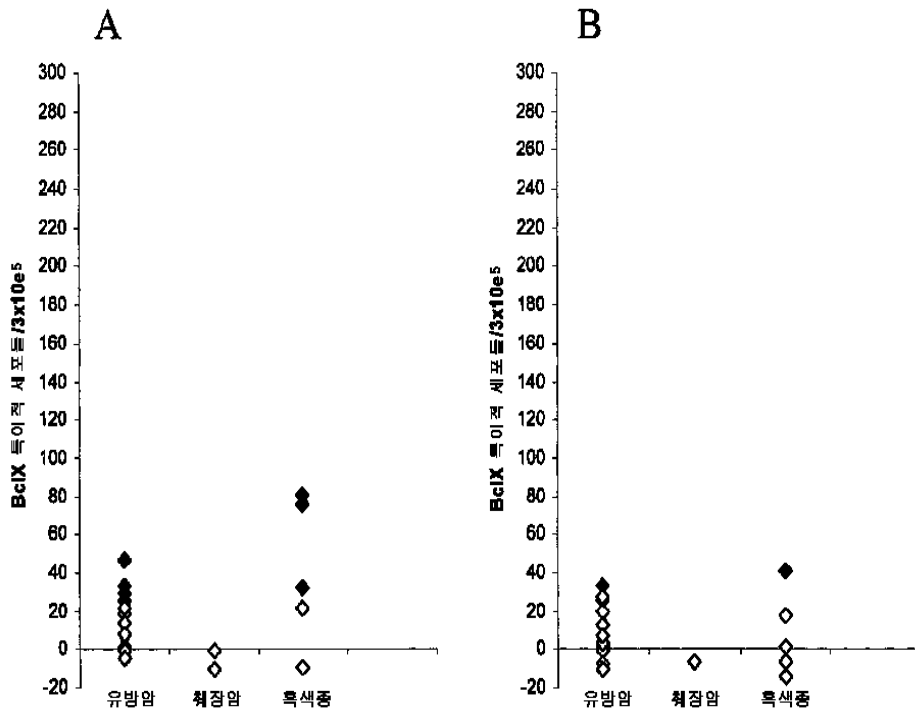
도면7



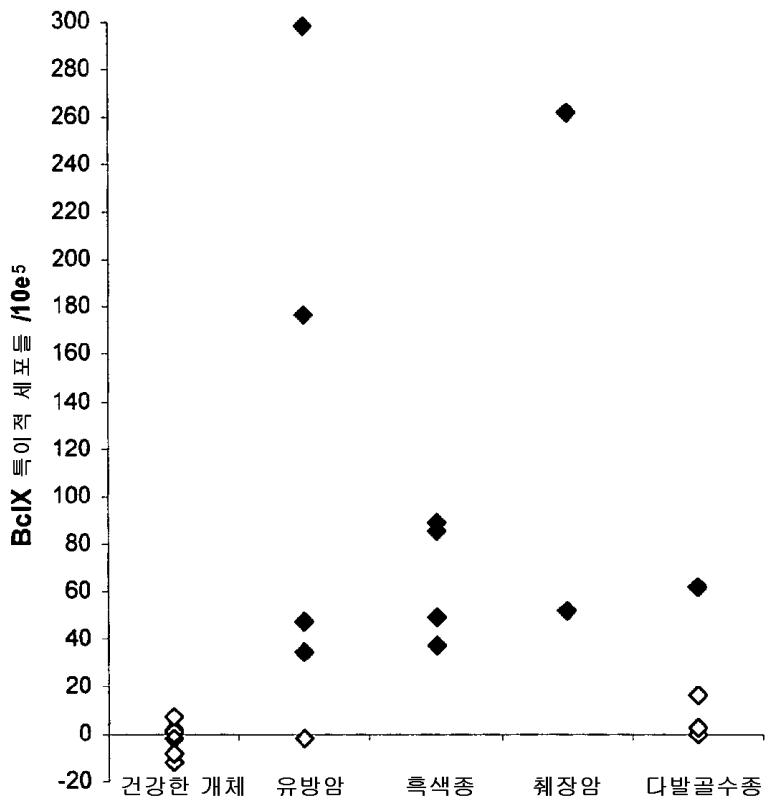
도면8



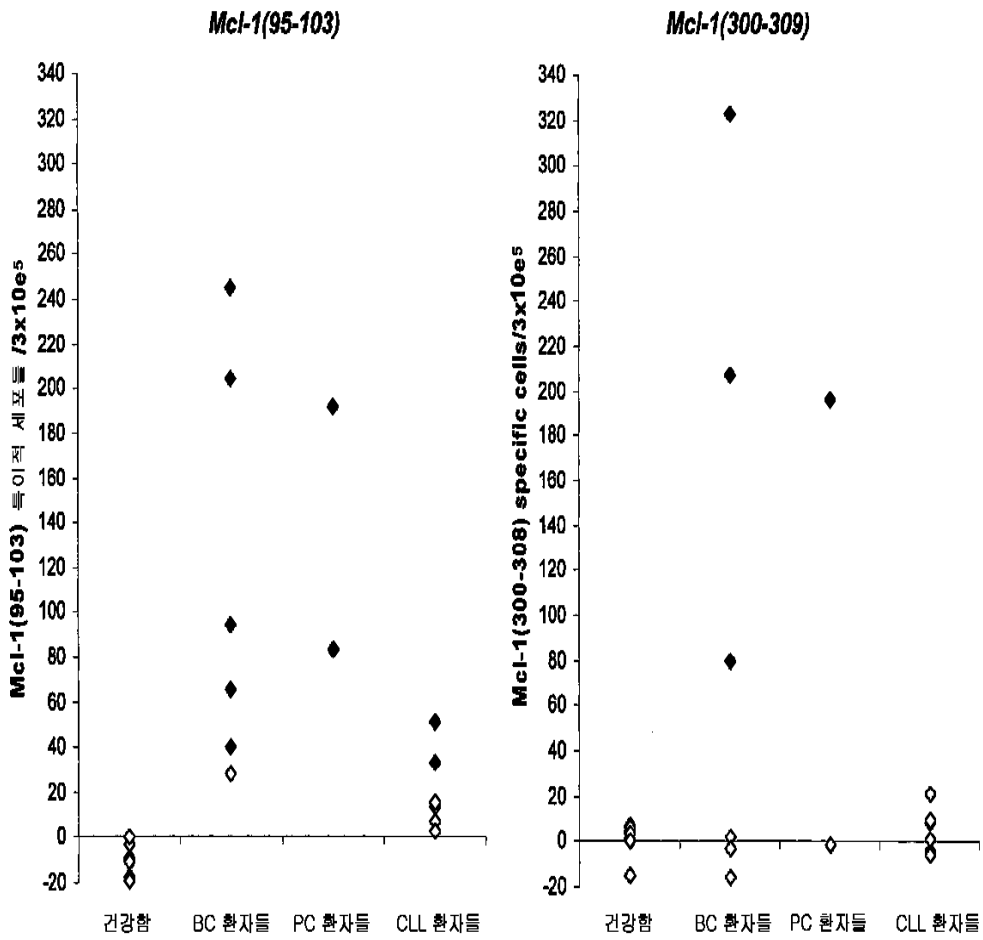
도면9



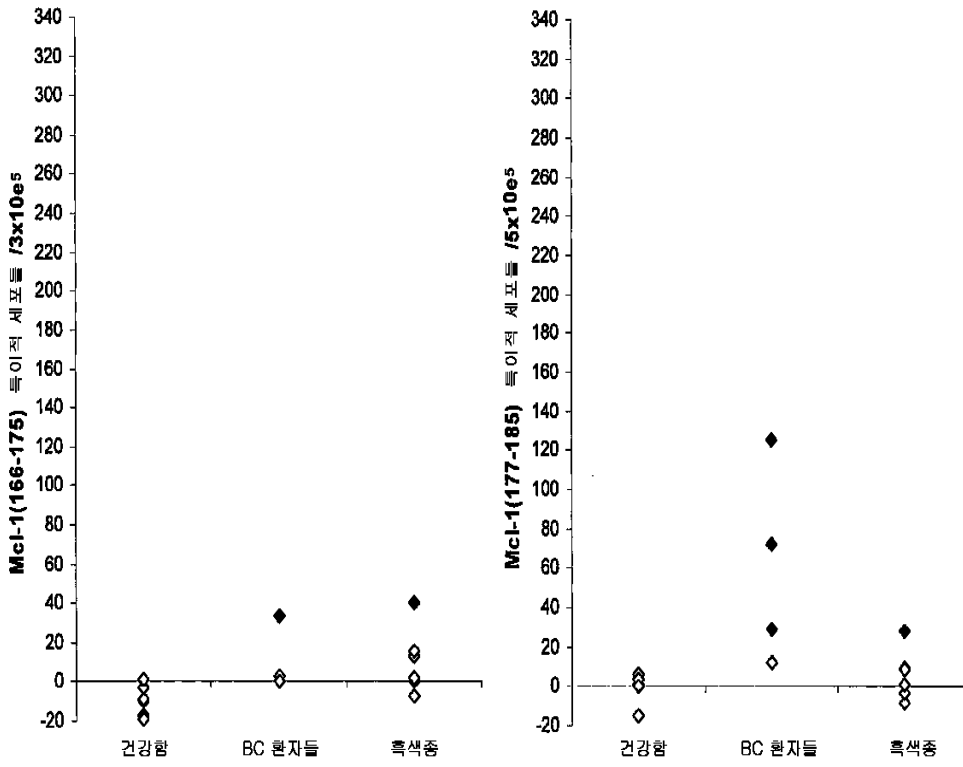
도면10



도면11



도면12



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)