



등록특허 10-2251606



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월12일
(11) 등록번호 10-2251606
(24) 등록일자 2021년05월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) **A61K 35/17** (2014.01)
A61K 38/00 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) **C07K 16/30** (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) **C12N 15/115** (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01) **G01N 33/569** (2017.01)

(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2018-7023154**(분할)

(22) 출원일자(국제) **2016년03월24일**
 심사청구일자 **2018년08월10일**

(85) 번역문제출일자 **2018년08월10일**

(65) 공개번호 **10-2018-0093124**

(43) 공개일자 **2018년08월20일**

(62) 원출원 **특허 10-2017-7027189**
 원출원일자(국제) **2016년03월24일**

(86) 국제출원번호 **PCT/EP2016/056557**

(87) 국제공개번호 **WO 2016/156202**
 국제공개일자 **2016년10월06일**

(30) 우선권주장
 62/139,189 2015년03월27일 미국(US)
 1505305.1 2015년03월27일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌
 US20120039811 A1*
 US04772557 A*
 US20070248628 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이메티스 바이오테크놀로지스 케엠베하
독일 72076 투빈겐 파울-울리흐-스트라쎄 15

(72) 발명자
마르 안드레아
독일 72076 튀빙겐 키르شن베크 22
스테베르만 레아
독일 72070 튀빙겐 히르쉬가쎄 7
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
제일특허법인(유)

(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 노은주

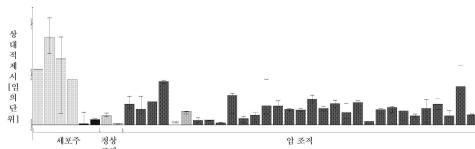
(54) 별명의 명칭 다양한 종양에 대한 면역요법에서의 사용을 위한 펩티드 및 펩티드의 조합

(57) 요약

본 발명은 면역요법 방법에서의 사용을 위한 웨티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단독, 또는, 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 역할가능한 기타 종양-연관 웨티드들과 병용하여 항종양 면역 반응을 촉진하거나 세포를 생체외 촉진하여 환자로 이전(뒷면에 계속)

대 표 도

챕터 3: KLQEKIQEL (A^02:01)



펩티드 김을 내용
4개 베일러 암 세포주, 1개 혜창암 세포주, 1개 흑색종 세포주, 2개 정상 조직 샘플(1개 무신, 1개 미장), 31개 원발성 유조직 샘플(1개 뇌암, 4개 경관암, 1개 서도암, 1개 신장암, 2개 간암, 16개 폐암, 4개 난소암, 1개 직장암, 1개 위암)
(총 89개 샘플로 구성)

하기 위한 종양-연관 T 세포 에피톱에 관한 것이다. 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드, 또는 펩티드 자체는 항체, 용해성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적일 수도 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)
A61K 39/0011 (2018.08)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
G01N 33/56977 (2013.01)
C12N 2501/998 (2013.01)

(72) 발명자

바인셍크 토니

독일 73773 아이호발트 임 모르겐라인 15

슈르 올리버

독일 72074 튜빙겐 아이흐할덴스트라쎄 19

프리체 엔스

독일 72144 뉴클링겐 래르헨베크 11

싱 하르프레트

미국 텍사스주 77005 휴스턴 모닝사이드 드라이브
5122 아파트먼트 525

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 14에 따른 아미노산 서열로 구성된 웨티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 따른 웨티드를 코딩하는 핵산.

청구항 10

제9항의 핵산을 발현하는 발현 벡터.

청구항 11

제1항에 따른 웨티드;

제1항에 따른 웨티드를 코딩하는 핵산; 또는

상기 핵산을 발현하는 발현 벡터

를 포함하는 재조합 숙주 세포.

청구항 12

제1항에 따른 웨티드를 생산하는 방법으로서,

상기 방법은

제1항에 따른 웨티드, 제1항에 따른 웨티드를 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 발현하는 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 제1항에 따른 웨티드를 제시하거나, 제1항에 따른 웨티드를 코딩하는 핵산을 발현하거나, 또는 상기 핵산을 발현하는 발현 벡터를 발현하는 것인 단계; 및

상기 펩티드를 상기 숙주 세포 또는 이의 배양 배지로부터 단리하는 단계
를 포함하는, 방법.

청구항 13

활성화된 T 림프구를 생산하는 시험관내 방법으로서,

항원-특이적 방식으로 T 세포를 활성화하기 위하여, 항원-제시 세포의 표면 또는 항원-제시 세포를 모방하는 인공 구축물의 표면에 발현된 항원-로딩된 인간 클래스 I MHC 분자와 T 세포를 시험관내에서 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 항원이 제1항의 펩티드인, 활성화된 T 림프구를 생산하는 시험관내 방법.

청구항 14

항원-특이적 방식으로 T 세포를 활성화하기 위하여, 항원-제시 세포의 표면 또는 항원-제시 세포를 모방하는 인공 구축물의 표면에 발현된 항원-로딩된 인간 클래스 I MHC 분자와 T 세포를 시험관내에서 접촉시키는 단계를 포함하는 활성화된 T 림프구를 생산하기 위한 시험관내 방법에 의해 생산된 활성화된 T 림프구로서,

상기 항원이 제1항에 따른 펩티드인,

제1항에 따른 펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하는 활성화된 T 림프구.

청구항 15

제1항에 따른 펩티드;

제1항에 따른 펩티드를 코딩하는 핵산;

상기 핵산을 발현하는 발현 벡터;

상기 펩티드, 상기 핵산, 또는 상기 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포; 및

제14항에 따른 활성화된 T 림프구

로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 활성 성분 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 암의 진단, 암의 치료 또는 암의 진단 및 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서,

암의 진단, 암의 치료 또는 암의 진단 및 치료를 위한 의약, 또는 암에 대한 약제의 제조에 사용하기 위한 펩티드.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

제9항에 있어서,

암의 진단, 암의 치료 또는 암의 진단 및 치료, 또는 암에 대한 약제의 제조에 사용하기 위한 핵산.

청구항 20

제10항에 있어서,

암의 진단, 암의 치료 또는 암의 진단 및 치료를 위한 의약, 또는 암에 대한 약제의 제조에 사용하기 위한 발현 벡터.

청구항 21

제11항에 있어서,

암의 진단, 암의 치료 또는 암의 진단 및 치료를 위한 의약, 또는 암에 대한 약제의 제조에 사용하기 위한 재조합 숙주 세포.

청구항 22

제14항에 있어서,

암의 진단, 암의 치료 또는 암의 진단 및 치료를 위한 의약, 또는 암에 대한 약제의 제조에 사용하기 위한, 활성화된 T 림프구.

청구항 23

제16항에 있어서,

암이 간세포 암종(HCC), 대장암(CRC), 아교모세포종(GB), 위암(GC), 식도암, 비소세포 폐암(NSCLC), 췌장암(PC), 신장 세포 암종(RCC), 양성 전립선 비대증(BPH), 전립선암(PCA), 난소암(OC), 흑색종, 유방암, 만성 림프성 백혈병(CL), 메르켈 세포 암종(MCC), 소세포 폐암(SCLC), 비호지킨 림프종(NHL), 급성 골수성 백혈병(AML), 담낭암 및 담관 암종(GBC, CCC), 방광암(UBC), 자궁암(UEC), 및 서열번호 14의 웹티드가 유래하는 단백질의 과발현을 나타내는 기타 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는, 웹티드.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

제19항에 있어서,

암이 간세포 암종(HCC), 대장암(CRC), 아교모세포종(GB), 위암(GC), 식도암, 비소세포 폐암(NSCLC), 췌장암(PC), 신장 세포 암종(RCC), 양성 전립선 비대증(BPH), 전립선암(PCA), 난소암(OC), 흑색종, 유방암, 만성 림프성 백혈병(CL), 메르켈 세포 암종(MCC), 소세포 폐암(SCLC), 비호지킨 림프종(NHL), 급성 골수성 백혈병(AML), 담낭암 및 담관 암종(GBC, CCC), 방광암(UBC), 자궁암(UEC), 및 서열번호 14의 웹티드가 유래하는 단백질의 과발현을 나타내는 기타 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는, 핵산.

청구항 27

제20항에 있어서,

암이 간세포 암종(HCC), 대장암(CRC), 아교모세포종(GB), 위암(GC), 식도암, 비소세포 폐암(NSCLC), 췌장암(PC), 신장 세포 암종(RCC), 양성 전립선 비대증(BPH), 전립선암(PCA), 난소암(OC), 흑색종, 유방암, 만성 림프성 백혈병(CL), 메르켈 세포 암종(MCC), 소세포 폐암(SCLC), 비호지킨 림프종(NHL), 급성 골수성 백혈병(AML), 담낭암 및 담관 암종(GBC, CCC), 방광암(UBC), 자궁암(UEC), 및 서열번호 14의 웹티드가 유래하는 단백질의 과발현을 나타내는 기타 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는, 발현 벡터.

청구항 28

제21항에 있어서,

암이 간세포 암종(HCC), 대장암(CRC), 아교모세포종(GB), 위암(GC), 식도암, 비소세포 폐암(NSCLC), 췌장암(PC), 신장 세포 암종(RCC), 양성 전립선 비대증(BPH), 전립선암(PCA), 난소암(OC), 흑색종, 유방암, 만성 림프성 백혈병(CL), 메르켈 세포 암종(MCC), 소세포 폐암(SCLC), 비호지킨 림프종(NHL), 급성 골수성 백혈병(AML), 담낭암 및 담관 암종(GBC, CCC), 방광암(UBC), 자궁암(UEC), 및 서열번호 14의 웹티드가 유래하는 단백질의 과발현을 나타내는 기타 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는, 단백질.

발현을 나타내는 기타 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는, 재조합 숙주 세포.

청구항 29

제22항에 있어서,

암이 간세포 암종(HCC), 대장암(CRC), 아교모세포종(GB), 위암(GC), 식도암, 비소세포 폐암(NSCLC), 췌장암(PC), 신장 세포 암종(RCC), 양성 전립선 비대증(BPH), 전립선암(PCA), 난소암(OC), 흑색종, 유방암, 만성 림프성 백혈병(CLL), 메르켈 세포 암종(MCC), 소세포 폐암(SCLC), 비호지킨 림프종(NHL), 급성 골수성 백혈병(AML), 담낭암 및 담관 암종(GBC, CCC), 방광암(UBC), 자궁암(UEC), 및 서열번호 14의 웹티드가 유래하는 단백질의 과 발현을 나타내는 기타 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는, 활성화된 T 림프구.

청구항 30

(a) 제1항에 따른 웹티드; 제1항에 따른 웹티드를 코딩하는 핵산; 상기 핵산을 발현하는 발현 벡터; 상기 웹티드, 상기 핵산, 또는 상기 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포; 또는 제14항에 따른 활성화된 T 림프구를, 용액 또는 동결건조된 형태로 함유하는 약학 조성물을 포함하는 용기;

(b) 추가로 (i) 완충제, (ii) 회석제, (iii) 필터, (iv) 주사바늘, 및 (v) 주사기 중 하나 이상을 포함하는, 암의 진단, 암의 치료 또는 암의 진단 및 치료를 위한 키트.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역요법에 사용되는 웹티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 종양-연관 T 세포 에피톱을 단독으로, 또는, 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 역할가능한 기타 종양-연관 웹티드들과 병용하여 항종양 면역 반응을 촉진하거나 T 세포를 생

체외 자극하여 환자에게 이전하는 것과 관련된다. 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드, 또는 펩티드 자체는 항체, 용해성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적일 수도 있다.

[0002] 본 발명은 항종양 면역 반응을 이끌어내는데 필요한 백신 조성물 또는 약학적/면역학적 활성 화합물 및 세포의 개발에 필요한 표적으로서 사용할 수 있는 인간 종양 세포의 HLA 클래스 I 분자로부터 유래하는 몇몇 신규 펩티드 서열들 및 이들의 변이체들에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세계보건기구(WHO)에 따르면, 암은 2012년에 세계적인 4대 비전염성 치명적 질병에 속한다. 같은 해에 직장암, 유방암 및 호흡관암들은 고소득 국가들에서 10대 사망 원인에 올랐다 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).

역학

[0005] 2012년에는, 1410만 건의 신규 암 사례, 암으로 고생하는 3260만의 환자(진단 후 5년 이내) 및 820만 건의 암에 의한 사망이 세계적으로 추정되었다(Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

[0006] 뇌암, 백혈병 및 폐암의 군에서, 본 발명은 구체적으로 아교모세포종(GB), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 급성 골수성 백혈병(AML), 비소세포 및 소세포 폐암(NSCLC 및 SCLC)에 각각 초점을 둔다.

[0007] GB는 가장 흔한 중추 신경계 악성 종양으로 미국에서의 연령 조절된 발병률은 100,000명당 3.19명이다. GB는 예후가 매우 불량하며 1년 생존율은 35%이고 5년 생존율은 5% 미만이다. 남성, 고령의 나이 및 민족이 GB의 위험 요인으로 보인다(Thakkar et al., 2014).

[0008] CLL은 모든 백혈병의 약 3분의 일을 차지하는 서방 세계에서 가장 흔한 백혈병이다. 발생률은 미국과 유럽이 유사하며 추정된 신규 사례는 1년에 약 16,000건이다. CLL은 아프리카인보다 백인에서 더 흔하며, 히스패닉과 미국 인디언에서 더 희귀하고 아시아인에서는 거의 발생하지 않는다. 아시아 출신의 경우, CLL 발병률은 백인보다 3배 적다(Gunawardana et al., 2008). CLL 환자의 5년 전체 생존율은 약 79%이다 (<http://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/statistics>).

[0009] 폐암은 세계적으로 가장 흔한 유형의 암이며, 여러 국가에서 암에 의한 사망의 주요 원인이다. 폐암은 소세포 폐암과 비소세포 폐암으로 세분화된다. NSCLC에는 선암종, 편평세포 암종 및 대세포 암종의 조직학적 유형이 포함되며 미국에서 모든 폐암의 85%를 차지한다. NSCLC의 발병률은 현재와 과거 흡연자를 포함하는 흡연 유병률과 밀접한 상호 관계가 있으며 5년 생존율은 15%로 보고된 바 있다(World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008).

요법

유방암

[0012] 유방암 환자의 표준 치료는 여러 매개변수에 의존한다: 종양 단계, 호르몬 수용체 상태 및 HER2 발현 양상. 표준 치료법에는 완전 외과적 절제와 그 이후의 방사능 요법이 포함된다. 주로 안트라사이클린과 탁산을 사용하는 화학요법을 절제 전에 또는 후에 시작할 수 있다. HER2-양성 종양의 환자는 화학치료제 외에도 항-HER2 항체 트라스주맙을 투여받는다(S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2012). 유방암은 면역원성 암 단위이며, 원발성 종양에서 다른 유형들의 침윤 면역세포들은 뚜렷한 예후 및 예후의 유의성을 표출한다. 유방암 환자를 대상으로 다수의 조기 면역요법 시험이 실행된 바 있다. 유방암에서 이필리무맙 및 다른 T 세포-활성화 항체에 의한 면역 체크포인트 억제의 영향에 관한 임상 데이터가 나오고 있다(Emens, 2012).

만성 림프구성 백혈병

[0014] CLL은 현재 치유가 가능하지 않지만, 다수의 환자들은 질병의 느린 진행이나 증상의 악화만을 보인다. 증상성 또는 급속히 진행하는 질병을 가진 환자의 경우, 몇몇 치료 옵션을 사용할 수 있다. 여기에는 화학요법, 표적요법, 단클론성 항체와 같은 면역 기반 요법, 키메라 항원 수용체(CAR) 및 활성 면역요법 및 줄기 세포 이식이 포함된다.

[0015] 몇몇 완료되거나 진행 중인 임상 시험은 CD19 특이성을 가진 공학적 자가 키메라 항원 수용체(CAR) 변형 T 세포에 기반한다(Maus et al., 2014). 지금까지 소수의 환자들만 검출가능하거나 지속적인 CAR을 보였다. Porter 등 및 Kalos 등에 의한 CAR T세포 시험에서 1회의 부분 반응(PR) 및 2회의 완전 반응(CR)이 검출된 바 있다(Kalos

et al., 2011; Porter et al., 2011).

[0016] 활성 면역요법에는 다음의 전략이 포함된다: 유전자 요법, 전체 변형 종양 세포 백신, DC 기반 백신 및 종양 관련 항원(TAA) 유래 펩티드 백신.

[0017] 몇몇 TAA는 CLL에서 과발현되며 예방접종에 적절하다. 여기에는 피브로모듈린(Mayr et al., 2005), RHAMM/CD168(Giannopoulos et al., 2006), MDM2(Mayr et al., 2006), hTERT(Counter et al., 1995), 종양태아성 항원-미숙 라미닌수용체 단백질(OFAiLRP)(Siegel et al., 2003), 아디포필린(Schmidt et al., 2004), 서바이빈(Granziero et al., 2001), KW1에서 KW14(Krackhardt et al., 2002) 및 종양 유래 IgVHCDR3 영역(Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012)이 포함된다. 제I상 임상 시험은 RHAMM-유래 R3 펩티드를 백신으로 사용하여 수행했다. 6명 환자 가운데 5명에게 검출가능한 R3 특이적 CD8+ T 세포 반응이 나타났다(Giannopoulos et al., 2010).

대장암

[0018] 대장암(CRC)의 병기에 따라, 결장 및 직장 암에 사용가능한 다른 표준 요법이 있다. 표준 치치에는 수술, 방사능 요법, 화학요법 및 CRC 표적 요법이 포함된다(Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b).

[0019] 가장 최근의 임상 시험에서는 CRC에 대한 치료 옵션으로서 활성 면역요법을 분석한다. 그러한 전략에는 종양 관련 항원(TAA), 전종양 세포, 수지상 세포(DC) 백신 및 바이러스 벡터로부터의 펩티드를 사용한 예방접종이 포함된다(Koido et al., 2013).

[0020] 지금까지 펩티드 백신은 암배아 항원(CEA), 뮤신 1, EGFR, T 세포 3에 의해 인식되는 편평세포 암종 항원(SART3), 베타-사람 용모성 성선자극호르몬(베타-hCG), 월름즈 종양 항원 1(WT1), 서바이빈-2B, MAGE3, p53, 링 평거 단백질 43 및 미토콘드리아 외막 34 트랜스로케이스(TOMM34), 또는 변이 KRAS에 대한 것이었다. 몇몇 제I상 및 제II상 임상 시험에서 환자들은 항원-특이적 CTL 반응 또는 항체 생성을 보여주었다. 면역학적 반응과 대조적으로, 다수의 환자들은 임상적 수준에서 펩티드 백신에 의한 혜택을 얻지 못했다(Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

[0021] 수지상 세포 백신은 TAA-유래 펩티드, 종양 세포 용해질, 세포자멸사 종양 세포 또는 종양 RNA 또는 DC-종양 세포 융합 생성물로써 맥동시킨 DC들로 구성된다. 제I/II상 시험에서 많은 환자들이 구체적인 면역학적 반응을 보인 반면, 소수만이 임상적 혜택을 얻었다(Koido et al., 2013).

식도암

[0022] 식도암의 일차 치료 전략은 종양 병기와 위치, 조직학적 유형 및 환자의 의학적 상태에 따른다. 화학치료 요법에는 옥살리플라타민과 플루오로우라실, 카보플라타민과 파클리탁셀, 시스플라타민과 플루오로우나실, FOLFOX 및 시스플라타민과 이리노테칸이 포함된다. 식도암에서의 표적 요법에 대한 무작위 배정 데이터는 매우 제한되어 있으므로, HER2-양성 종양 환자는 위암의 지침에 따라 치료해야 한다(Stahl et al., 2013).

[0023] 매우 제한된 수의 조기 임상 시험만이 수행되었으므로 식도암에서의 면역요법적 접근 방법에 관한 데이터는 매우 드물다. 세 가지 다른 암-고환 항원들(TTK 단백질 키나제, 림프구 항원 6 콤플렉스 로커스 K 및 인슐린-유사 성장 요인(IGF)-II mRNA 결합 단백질 3)로부터 유래된 세 가지 펩티드로 구성된 백신을 제I상 시험에서 식도암이 진행된 환자에게 투여한 결과 중간 정도의 결과가 나타났다. 자가 급성 세포의 시험관내 투여 이후 활성화된 T 세포의 종양내 주사는 제I/II상 임상연구에서 11명의 환자 가운데 4명으로부터 완전 또는 부분 반응을 초래했다(Toomey et al., 2013).

위암

[0024] 위암(GC)은 세포 라이닝의 점막층에서 시작하여 성장함에 따라 외층을 통해 퍼진다. 네 가지 유형의 표준 치료가 사용된다. 위암 치료에는 내시경 또는 외과적 절제, 화학요법, 방사선 요법 또는 화학 방사선 조사가 사용될 수 있다(Leitlinie Magenkarzinom, 2012).

[0025] 진행 GC를 위한 현재의 치료 요법 효능은 불량하며 이는 낮은 5년 생존율을 초래한다. 면역요법은 GC 환자의 생존을 개선시키는 대체 접근 방법일 수 있다. 종양 관련 림프구 및 시토카인 유도 살해 세포, HER2/neu를 표적하는 펩티드 기반 백신, MAGE-3 또는 혈관의 내피 성장 인자 수용체 1 및 2, 및 HER2/neu를 표적화하는 수지상 세포 기반 백신의 양자 전이는 GC 임상 시험에서 촉망되는 결과를 보여주었다. 면역 체크포인트 억제 및 인공 T 세포는 추가의 치료 옵션을 나타낼 수 있으며, 이는 전임상 및 임상 연구에서 현재 평가되고 있다(Matsueda and

Graham, 2014).

[0029] 아교모세포종

아교모세포종(WHO 등급 IV)의 치료 옵션은 매우 제한되어 있다. GB의 치료를 위해 여러 면역치료 접근방식을 조사하고 있으며, 면역 체크포인트 억제, 백신접종 및 인공 T 세포의 양자 전이가 포함된다.

[0031] GB 환자를 위한 여러 백신접종의 접근방식이 현재 조사 중이며, 웨티드 기반 백신, 열충격 단백질 백신, 자가 종양 세포 백신, 수지상 세포 기반 백신 및 바이러스 단백질 기반 백신이 포함된다. 이러한 접근방식에서는 상피 성장 인자 수용체 변이체 III(EGFRvIII) 또는 열출력 단백질 자가 종양 세포 용해질 또는 거대세포 바이러스 성분으로 맥동화된 수지상 세포로부터 유래한 웨티드를 GB 환자에 적용하여 항종양 면역 반응을 유도한다. 이러한 연구들의 몇몇은 양호한 안정성 및 내약성 프로파일은 물론 촉망되는 효능 데이터를 드러낸다.

[0032] 유전자이식 T 세포의 양자 전이는 GB의 치료를 위한 추가적 면역치료 접근방식이다. 현재 여러 임상 시험을 통해 HER2, IL-13 수용체 알파 2 및 EGFRvIII에 대한 T 세포가 포함된 키메라 항원 수용체의 안정성 및 효능이 평가 중이다(Ampie et al., 2015).

[0033] 간암

[0034] 질병 관리는 진단 시 종양 병기 및 간의 전반적 상태에 의존한다. HCC에 대한 화학요법에는 전신 요법의 경우 독소루비신, 5-플루오로우라실 및 시스플라틴의 병용이 포함되고, 간동맥 주입에는 독수루비신, 플록수리딘 및 미토마이신 C의 병용이 포함된다. 하지만 대부분의 HCC는 화학치료에 대한 높은 내성을 보인다(Enguita-German and Fortes, 2014).

[0035] 진행성 절제불가능한 HCC에서 치료 옵션은 멀티-티로신 키나제 억제제인 소라페닙으로 제한된다(Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). 소라페닙은 생존을 약 3개월 증가시키는 것으로 확인된 유일한 전신 약물이며 현재 그러한 환자를 위한 유일한 실험적 치료 옵션이다(Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008).

[0036] 최근에 제한된 수의 HC를 위한 면역요법 시험이 실행된 바 있다. 시토카인은 면역 세포의 하위 조합의 활성화 및/또는 종양 면역원성의 증가에 사용되고 있다(Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). 다른 시험에서는 종양-침윤 림프구 또는 활성화 말초 혈액 림프구의 주입에 초점을 맞추었다(Shi et al., 2004; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

[0037] 지금까지, 적은 수의 치료 예방 접종 시험이 실행되었다. Butterfield 등은 백신으로 알파-태아단백(AFP)에서 유래된 웨티드 또는 AFP 웨티드가 로딩된 DC를 사용한 생체외 시험 두 가지를 수행했다(Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). 두 가지 다른 연구에서는, 자가 수지 세포(DC)를 자가 종양 용해물 (Lee et al., 2005) 또는 간모세포종 세포주 HepG2의 용해물(Palmer et al., 2009)로써 생체외 필스를 가했다. 지금까지 예방접종 시험에서는 제한된 임상적 결과의 개선만을 보여주었다.

[0038] 흑색종

[0039] 흑색종에서 표준 요법은 주위의 조직이 건강한 상태에서 완전한 외과적 절제이다. 치료 옵션에는 단일 화학요법, 복합 화학요법 및 특이적 억제제를 사용하는 표적 요법이 통합된다(S3-Leitlinie Melanom, 2013).

[0040] 몇몇 다른 백신접종 접근방식이 진행성 흑색종 환자를 대상으로 이미 평가된 바 있다. 지금까지 제3상 시험은 비교적 실망스러운 결과를 보였으며 백신접종 전략은 분명히 개선되어야 할 필요가 있다. 따라서, OncoVEX GM-CSF 시험이나 DERMA 시험과 같은 새로운 임상 시험은 내약성의 감소없이 임상적 효능의 개선을 목표로 한다 (<http://www.cancerresearchuk.org>).

[0041] T 세포의 양자 전이는 진행 단계 흑색종의 치료에 대한 커다란 전망을 보여준다. 시험관내 화장 자가 종양 침윤 림프구는 물론 암-고환 항원 NY-ESO-1에 대한 고친화도 T 세포 수용체를 은닉하는 T 세포는 흑색종 환자에게 이전시 상당히 유익하며 특성이 낮은 효과가 있었다. 불행하게도 멜라닌 세포 특이적 항원 MART1 및 gp100에 대해 고친화도 T 세포 수용체를 가진 T 세포 및 암 고환 항원 MAGEA3은 임상 시험에서 상당한 특성 효과를 유도했다. 이와 같이 T 세포 양자 전이는 높은 치료 잠재성이 있지만, 이러한 치료의 모험성과 내성을 더욱 증가시킬 필요가 있다(Phan and Rosenberg, 2013; Hinrichs and Restifo, 2013).

[0042] 비소세포 폐암

[0043] 치료 옵션은 암의 유형(소세포 또는 비소세포) 및 단계에 따라 결정되고 수술, 방사선 요법, 화학요법, 및 베바

시주맙 또는 엘로티닙 및 제피티닙과 같은 표적 생물학적 요법 등을 포함한다(S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

[0044] NSCLC를 위한 치료 옵션의 확대를 위해 여러 면역치료 접근방식들을 연구했으며 아직 조사 중에 있다. NSCLC 환자에서 L-BLP25 또는 MAGEA3에 의한 백신접종은 백신 매개에 의한 생존율을 이점을 보여주는데 실패했지만, 동종 이행 세포주에서 유래한 백신은 임상 연구에서 촉망되는 결과를 보여주었다. 그 밖에 갠글리오사이드, 표피 성장 인자 수용체 및 몇몇 다른 항원을 표적으로 하는 추가의 백신접종 시험이 현재 진행 중이다. 환자의 항종양 T 세포 반응을 강화시키는 대체 전략은 차단 억제 T 세포 수용체 또는 특정 항체와 이의 리간드로 구성된다. NSCLC에서의 이필리루맙, 니볼루맙, 펜브롤리주맙, MPDL3280A 및 MEDI-4736 등에서 몇몇 항체의 치료 가능성이 현재 임상 시험에서 평가 중이다(Reinmuth et al., 2015).

[0045] 난소암

[0046] 조기는 물론 진행기의 난소 암종에서는 외과적 절제가 일차 요법이다(S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 2013).

[0047] 특히 CD8-양성 T 세포와 같은 전염증성 종양 침윤 림프구의 존재는 양호한 예후와 상관관계가 있으며 종양 관련 항원에 특이적인 T 세포는 암 조직으로부터 분리될 수 있으므로, 면역요법은 난소암 환자의 치료를 개선시키는 유망한 전략인 것처럼 보인다.

[0048] 따라서, 난소암에서 여러 면역요법의 조사를 위해 상당한 과학적 노력이 이루어지고 있다. 상당한 수의 전임상 및 임상 연구가 이미 수행되었으며 추가 연구가 현재 진행 중이다. 시토카인 요법, 백신접종, 단클로닝 항체 치료, 양자 세포 전이 및 면역조절에 대해 사용가능한 임상적 데이터가 있다.

[0049] 몇몇 종양 관련 단백질(Her2/neu, NY-ESO-1, p53, 월름 종양-1)로부터 유래한 단일 또는 복수 웨티드 또는 자가 종양 세포로부터 유래한 전체 종양 항원을 사용한 제I상 및 제II상 백신접종 연구에서 양호한 안전성과 내성 프로파일이 밝혀졌으나 그 임상적 효과는 낮음 내지 중간으로 그쳤다.

[0050] 임상 시험에서 면역 세포의 양자 전이에서는 이질성 결과를 얻었다. 시험관내 확장 자가 종양 침윤 T 세포의 양자 전이는 파일럿 시험에서 유망한 접근방식으로 나타났다. 이와 반대로 염산 수용체 알파에 특이적인 키메라 항원 수용체를 은닉하는 T 세포의 이전은 제I상 시험에서 유의한 임상적 반응을 유도하지 못했다. 시험관내에서 종양 세포 용해질 또는 종양 관련 단백질로 맥동화된 수지상 세포는 이전시 항종양 T 세포를 강화시키는 것으로 나타났지만, T 세포 활성화의 정도는 임상적 효과와 상관관계를 나타내지 않았다. 자연 살해 세포의 이전은 제II상 임상 연구에서 유의한 독성을 유발했다.

[0051] 내인성 항종양 면역성은 물론 면역요법은 면역억제 종양 미세환경에 의해 방해를 받는다. 이러한 장애가 되는 면역조절 약물(예: 사이클로포스타마이드)을 극복하기 위해, 항-CD25 항체 및 폐길화 리포좀 독소루비신을 면역요법과 병용하여 시험한다. 현재 가장 신뢰할 수 있는 데이터는 항-CTLA4 항체인 이필리루맙에 대해 사용가능하며, 이는 T 세포 활성을 강화시킨다. 이필리루맙은 난소암 환자에서 상당한 항종양 효과를 미치는 것으로 나타났다(Mantia-Smaldone et al., 2012).

[0052] 췌장암

[0053] 췌장암 환자에 대한 치료 옵션은 매우 제한되어 있다. 효과적인 치료에 대한 하나의 주요 문제는 진단 시 전형적으로 진행된 종양 단계이다.

[0054] 백신접종 전략은 췌장암의 치료에 대한 더욱 혁신적이고 유망한 대안으로서 조사되고 있다. KRAS 변이를 표적하는 웨티드 기반 백신, 반응성 텔로머라제, 가스트린, 서바이빈, CEA 및 MUC1은 임상 시험에서 이미 평가된 바 있으며, 부분적으로 유망한 결과를 나타냈다. 더욱이 췌장암 환자에서 수지상 세포 기반 백신, 동종이형 GM-CSF-분비 백신 및 알젠판투셀-L에 대한 임상 시험은 또 면역요법의 유익한 효과를 드러냈다. 여러 백신 임상 시험 계획서의 효율성을 조사하는 추가 임상 시험이 현재 진행 중이다(Salman et al., 2013).

[0055] 전립선암

[0056] 전립선암의 치료 전략은 주로 암 병기에 의존한다. 국소적으로 제한된 비전이성 전립선암의 경우, 치료 옵션에는 능동적 감시(대기 및 주시), 전립선의 완전 외과적 절제 및 근접치료를 사용하거나 사용하지 않는 국소적 고용량 방사선 요법이 포함된다(S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2014).

[0057] 수지상 세포 기반의 백신 시플루셀-T는 FDA가 승인한 최초의 항암 백신이다. CRPC 환자의 생존에 대한 긍정적인

효과로 인해, 이 면역요법의 개발에 많은 노력이 계속되고 있다. 백신접종 전략에 대하여, 웨티드 백신 전립선-특이적 항원(PSA)-TRICOM, 개인화된 웨티드 백신 PPV, DNA 백신 pTGV-HP 및 GM-CSF GVAX를 발현하는 전세포 백신은 여러 임상 시험에서 유망한 결과를 나타냈다. 더욱이 시풀루셀-T 이외의 수지상 세포 기반 백신, 즉, BPX-101 및 DCVAC/Pa는 전립선암 환자로부터 임상적 반응을 유도하는 것으로 나타났다. 이필리무맙과 니볼루맙과 같은 면역 체크포인트 억제제는 임상 연구를 통해 단일요법은 물론 안드로겐 박탈 요법, 국소 방사선 요법, PSA-TRICOM 및 GVAX 등의 다른 치료와의 병용으로서 평가 중에 있다. 면역조절 물질인 타스퀴니모드는 제II상 시험에서 진행을 상당히 지연시키고 무진행 생존율을 증가시켰으며 현재 제III상 시험에서 추가로 조사 중에 있다. 또 다른 면역조절제인 레날리도마이드는 초기 임상 연구에서는 유망한 효과를 유도했지만 제III상 시험에서는 생존율을 개선시키지 못했다. 이러한 실망스러운 결과에도 불구하고 레날리도마이드에 대한 추가 시험이 지속되고 있다(Quinn et al., 2015).

[0058] 신장 세포 암종

초기 치료는 가장 흔하게는 영향받은 신장의 일부 또는 전부 제거하는 방법이며 근치 치료의 중심이 되는 치료법이다(Rini et al., 2008). 예후 점수가 불량한 환자의 일차 치료를 위해, 몇몇 암 조직 및 협회에 의해 정교하게 만들어진 지침은 수용체인 티로신 키나제 억제제(TKI) 수니티닙과 파조파닙, 단클론성 항체인 베바시주밥과 인터페론-알파(IFN- α)의 병용 및 mTOR 억제제인 템시룰리무스를 추천한다. 미국의 NCCN은 물론 유럽의 EAU 및 ESMO에 의해 정교하게 만들어진 지침에 따르면, 이전의 시토카인(IFN- α , IL-2) 요법이 실패한 RCC 환자에서 TKI인 소라페닙, 파조파닙 또는 최근의 악시티닙을 이전 요법으로 추천하고 있다. NCCN 지침은 또한 이러한 환경에서 수니티닙을 조언한다(NCCN 카테고리 I에 따르면 높은 수준의 증거).

RCC의 알려진 면역원성은 진행성 RCC에서 면역요법과 암 백신의 사용을 지지하는 기반을 제시한 바 있다. 런프 구 PD-1 발현 및 RCC 진행 단계, 등급 및 예후 사이의 흥미로운 상관관계는 물론 RCC 종양 세포에 의한 선택적 PD-L1 발현 및 이의 악화된 임상적 결과와의 관련 가능성 모두 RCC의 치료를 위해 새로운 항 PD-1/PD-L1 제제의 단일 사용 또는 항혈관형성 약물이나 다른 면역요법 접근방식과의 병용 요법 개발로 이끌었다(Massari et al., 2015). TRIST라고 부르는 진행 RCC의 제III상 암 백신 시험에서는, 치유 요법의 일선 표준에 추가된 TroVax(종양 관련 항원인, 5T4 및 마마 바이러스 백터)가 국소적으로 진행된 또는 mRCC 환자의 생존율을 연장시키는지 평가한다. 이 연구에 남아있는 399명(54%)의 환자군에서 중간 생존율에 도달하지 않았으나, 그 데이터의 분석은 TroVax가 면역학적으로 활성이 있으며 또한 5T4-특이적 항체 반응의 강도와 생존율 개선 사이의 상관관계가 존재함을 보여주는 이전의 임상적 결과를 확인한다. 또한 RCC에서 과발현된 에피톱을 사용하는 웨티드 백신을 찾는 몇몇 연구가 있다.

[0061] 종양 백신의 다양한 접근방식에 대한 조사가 이루어진 바 있다. 종양 백신의 다양한 접근방식에 대한 조사가 이루어진 바 있다. RCC 환자를 대상으로 종양 세포 용해질, 수지상 세포와 종양 세포의 융합 또는 전체 종양 RNA를 포함하는 전체 종양 접근방식을 사용하는 연구가 수행되었으며, 이러한 시험의 일부에서 종양 병변의 완화가 보고되었다(Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001).

[0062] 소세포 폐암

[0063] SCLC의 치료 및 예후는 진단된 암의 병기에 강력하게 의존한다. 임상 결과에 근거하는 SCLC의 병기 결정은 병리학적 병기 결정보다 더욱 흔하다. 임상적 병기 결정에서는 신체 검사와 다양한 영상 시험 및 생검의 결과를 사용한다. SCLC의 표준 화학요법 치료에서는 에토포사이드나 이리노테칸과 시스플라틴이나 카보플라틴을 병용한다(American Cancer Society, 2015; S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

[0064] 면역요법은 암 요법의 과도하게 조사된 분야를 제시한다. SCLC의 치료에서 다양한 접근방식이 연구되고 있다. 그러한 접근방식의 하나는 자연적 인간 면역 억제제인 CTLA-4의 차단을 표적으로 한다. CTLA-4의 억제는 면역계를 복잡하게 만드는 것을 의도한다. 최근에 SCLC의 치료에서 촉망되는 면역 체크 포인트 억제제의 개발이 시작된 바 있다. 또 다른 접근방식은 항암 백신에 근거하며 이는 현재 임상 연구에서 SCLC의 치료에 사용 가능하다(American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute, 2015).

[0065] 급성 골수성 백혈병

[0066] AML 치료는 두 단계로 나뉘어진다: 유도 요법 및 완화 후/"강화 요법". 유도 요법은 완화의 유도를 위해 시행하며 병용 화학요법으로 구성된다. 강화 요법은 추가의 화학요법이나 조혈 세포 이식(HCT)으로 구성된다(Showell and Levis, 2014).

- [0067] 불량 및 중등도-2의 예후군에 속하는 환자에게는 임상 시험이 추천된다. 치료 옵션에는 아자시티딘이나 테시타빈, CPX-351과 같은 저메틸화 제제(HMA), 다우노루비신과 시타라빈의 1:5 "최적" 몰 비율에 의한 리포솜 배합 및 폴로 키나제 억제제인 블라세르팁이 포함된다. 블라세르팁은 LDAC(저용량 시타라빈)와 병용으로 투여된다. FLT3 변이의 경우 몇몇 다른 FLT3 억제제를 투여할 수 있다. 여기에는 3+7로 병용 투여하는 소라페닙, FLT3 ITD의 보다 선택적 억제제이며 CKIT 억제하는 퀴자르티닙, 크레놀라닙 및 비선택적 FLT3 ITD 억제제인 미도스타우린이 포함된다. 또 다른 치료 옵션은 항체-약물 접합체(항 CD33 + 칼레치아미신, SGN-CD33a, 항-CD33 + 악티니움-225), 양특이성 항체(CD33 + CD3(AMG 330) 또는 CD33 + CD16의 인지) 및 키메라 항원 수용체(CAR)를 사용하여 CD33을 표적으로 한다(Estey, 2014).
- [0068] 비호지킨 림프종
- [0069] NHL에는 60개 초과의 아형이 있다. 가장 흔한 아형 3개는 미만성 큰 B-세포 림프종(DLBCL, 가장 흔한 아형), 소포성 림프종(FL, 두 번째로 가장 흔한 아형) 및 소림프구성 림프종/만성 림프구성 림프종(SLL/CLL, 세 번째로 가장 흔한 아형)이다. DLBCL, FL 및 SLL/CLL은 NHL의 약 85%를 차지한다. NHL의 치료는 조직학적 유형과 병기에 의존한다.
- [0070] 림프종 환자에서는 자발적 종양 퇴행을 관찰할 수 있다. 따라서, 활성 면역요법은 요법 옵션이다(Palomba, 2012).
- [0071] 중요한 백신접종 옵션에는 Id 백신이 포함된다. B 림프구는 세포 클론마다 독특한(= 이디오타입, Id) 중쇄 및 경쇄의 가변 부위에 특이적 아미노산 서열이 있는 면역글로불린을 발현한다. 이디오타입은 종양 관련 항원의 기능을 한다.
- [0072] 능동적 백신접종에는 보조제(KLH)와 접합된 재조합 단백질(Id)의 주사가 포함되며 면역 보조제로서 GM-CSF와 함께 투여한다. 종양-특이적 Id는 하이브리도마 배양에 의해 생산되거나 박테리아, 곤충 또는 포유류 세포 배양에 의한 재조합 DNA 기술(플라스미드)로써 생산된다.
- [0073] 자궁암
- [0074] 자궁내막암의 80% 이상은 자궁내막 선암종(제I형)으로 발생하며, 이것은 에스트로겐 노출과 관련되며 또한 양호 내지 중간 정도로 분화된 형태이다. 자궁내막 암종 및 자궁경부암의 치료는 병기에 의존한다(World Cancer Report, 2014).
- [0075] 현재 시험 중인 면역치료 접근방식도 일부 있다. 제I/II상 임상 시험에서 자궁암을 앓는 환자들에게 월름 종양 유전자 1(WT1) mRNA로써 전기천공된 자가 수지상 세포(DC)를 접종하였다. 보조제에 대한 국소적 알레르기 반응 1건 외에도, 부작용이 관찰되지 않았으며, 6명 가운데 3명의 환자가 면역 반응을 보였다(Coosemans et al., 2013).
- [0076] 담낭 선암종 및 담관암종
- [0077] 담관암종(CC)은 치료가 어려우며 대개 치명적이다. 유일한 치료적 치료 옵션은 완전 절제(R0)이다. 담관암에서 생물학적 요법의 효능은 복합적인 것이었다. 소라페닙, 베바시주맙, 파조파닙 및 레고라페닙과 같은 혈관 성장을 표적화하는 약물을 현재 CCC 치료에 관해 연구 중이다. 추가적으로 세툭시맙과 파니투무맙과 같은 EGFR를 표적하는 약물은 화학요법과 병용하여 임상 연구에서 사용되고 있다(American Cancer Society, 2015). 지금까지 시험한 대부분의 약물들은 질병 통제와 전체 생존율을 유의하게 개선시키지 못했으며 추가 임상 시험들이 진행 중이다.
- [0078] 담낭암(GBC)은 세계적으로 가장 흔하며 공격적인 담관의 악성 암이다. 일반적으로 담관의 암종에 대한 희귀성으로 인해 소수의 GBC 또는 CCC 특이적 연구만이 있으며, 그 대부분에 모든 담관암이 포함된다. 이것이 지난 10년 동안 치료가 개선되지 않은 이유이며 R0 절제가 여전히 유일한 완치 치료 옵션이다.
- [0079] 방광암
- [0080] 방광암의 표준 치료에는 수술, 방사선 요법, 화학요법 및 면역요법이 포함된다(National Cancer Institute, 2015).
- [0081] 공격적 비근 침윤성 방광암(NMIBC)의 치료에 있어서 효과적인 면역치료 접근방식이 확립되어 있다. 따라서, 박테리아의 약화 형태인 소결핵균(*Bacillus Calmette-Guerin* = BCG)이 방광내 해결안으로 적용된다. BCG 치료의 주요 효과는 암 재발로부터의 상당한 장기적(최대 10년) 보호 및 감소된 진행률이다. 원칙적으로 BCG에 의한 치

료는 세포 면역 반응을 자극하는 국소적 염증성 반응을 유도한다. BCG에 대한 면역 반응은 다음의 주요 단계들에 근거한다: BCG에 의한 요로상피 및 방광암 세포의 감염과 그에 따른 항원-제시 분자의 증가된 발현, 시토카인 방출을 통해 매개되는 면역 반응의 유도, 다양한 면역 세포들(세포 독성 T 림프구, 호중구, 자연 살해 세포 및 대식세포)의 관여를 통한 항종양 활성도의 유도(Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013).

- [0082] 암 치료와 연관된 종증의 부작용과 비용을 비교하면, 일반적인 암 및 특히 간세포 암종(HCC), 대장암(CRC), 아교모세포종(GB), 위암(GC), 식도암, 비소세포 폐암(NSCLC), 췌장암(PC), 신장 세포 암종(RCC), 전립선 비대증(BPH), 전립선암(PCA), 난소암(OC), 흑색종, 유방암, 만성 림프성 백혈병(CL), 메르켈 세포 암종(MCC), 소세포 폐암(SCLC), 비호지킨 림프종(NHL), 급성 골수성 백혈병(AML), 담낭암 및 담관 암종(GBC, CCC), 방광암(UBC), 자궁암(UEC)의 치료에서 사용가능한 요인들을 파악할 필요가 있다. 또한 일반적인 암 및 상기 언급된 암의 유형에 대한 바이오마커를 나타내는 요인들 특히 암의 보다 나은 진찰과 예후의 평가 및 치료 성공의 예측을 초래하는 요인들을 파악할 필요도 있다.
- [0083] 암의 면역요법이란 부작용은 최소화하면서 암 세포에 특이적으로 표적화하는 옵션을 나타낸다. 암 면역요법에서는 종양-연관 항원을 이용한다. 종양 관련 항원(TAA)의 현재 분류는 다음과 같은 주요 그룹을 포함한다:
- [0084] a) 암-고환 항원: 이미 확인되어 T 세포에 의해 인식된 첫 번째 TAA는 이 종류에 속하며, 이는 그 멤버들의 발현이 조직학적으로 인간 종양과 다르며, 정상 조직 중, 고환의 정도 세포/정원 세포에만 있으며, 때로는 태반에 있기 때문에 최초에 암-고환(CT) 항원이라고 불렸다. 고환 세포가 클래스 I 또는 II HLA 분자를 발현하지 않기 때문에, 이 항원들은 정상 세포에 있는 T 세포에 의해 인식될 수 없으며 면역학적으로 종양-특이적이라고 간주될 수 있다. CT 항원의 잘 알려진 예로는 MAGE 구성원 및 NY-ESO-1이 있다.
- [0085] b) 분화 항원: 이러한 TAA는 종양과 종양이 발생한 정상 세포 사이에 공유된다. 대부분의 알려진 분화 항원은 흑색종과 정상 멜라닌 세포에서 발견된다. 이러한 많은 멜라닌 세포 계통-관련 단백질은 멜라닌의 생합성과 관련되어 있으며, 이에 따라 종양-특이적은 아니지만 암 면역치료에 널리 사용된다. 예로는, 흑색종을 위한 티로시나아제 및 Melan-A/MART-1 또는 전립선암을 위한 PSA가 있고 이에 국한되지 않는다.
- [0086] c) 과발현된 TAA: 일반적으로 낮은 발현 수준이 있는 많은 정상 조직뿐만 아니라 조직학적으로 다른 유형의 종양에서 유전자 인코딩에서 널리 발현된 TAA가 발견된다. 정상 조직에 의해 처리되고 잠재적으로 제시되는 많은 에피톱이 T 세포 인식의 임계치 수준보다 낮을 수 있고, T 세포의 종양 세포에서의 과발현은 이전에 확립된 내성을 중단시켜 항암 반응을 개시할 수 있다. 이 클래스 TAA의 유력한 예로는 Her-2/neu, 서바이빈, 텔로미라제 또는 WT1가 있다.
- [0087] d) 종양-특이적 항원: 이러한 독특한 TAA는 정상 유전자의 변이로써 발생한다(β -카테닌, CDK4 등). 이러한 분자 변경의 일부는 종양 변이 및/또는 진행과 관련되어 있다. 종양-특이적 항원은 일반적으로 강한 면역 반응을 정상 조직에 대한 자가 면역 반응 위험성 없이 유도할 수 있다. 반면에, 대부분의 경우 TAA는 발견되어 일반적으로 많은 개별 종양에서 대개 공유되지 않은 해당 종양에만 적절하다. 종양-특이적(연관된) 아형을 갖는 단백질의 경우 펩티드가 종양(관련) 엑손으로부터 비롯된다면 펩티드의 종양-특이성(또는 연관성) 또한 발생할 수 있다.
- [0088] e) 비정상 변역 후 변형에서 발생하는 TAA: 이러한 TAA는 특이적이 아니고 과발현되지도 않는 단백질에서 발생할 수 있지만 종양에서 주로 활동적인 변역 후 과정에 의해 종양과 관련된다. 이 클래스의 예는 종양-특이적일 수도 있고 아닐 수도 있는 분해 과정 동안 단백질 스플라이싱과 같은 이벤트 또는 MUC1의 경우 종양의 새로운 에피톱으로 이끄는 변화된 당화 패턴에서 발생한다.
- [0089] f) 종양 바이러스 단백질: 이러한 TAA는 종양발생 과정에서 중요한 역할을 할 수 있는 바이러스 단백질이며, 그들이 이질적이기 때문에(인간 태생이 아닌), T 세포 반응을 일으킬 수 있다. 이런 단백질의 예로는 인간 유두종 타입 16 바이러스 단백질, 및 경부 암종에서 발현하는 E6와 E7이 있다.
- [0090] T 세포 기반의 면역요법은 종양-연관 또는 종양-특이적 단백질로부터 유래된 펩티드 에피톱을 표적으로 하며, 이는 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 의해 제시된다. 종양-특이적 세포 독성 T 림프구에 의해 인식되는 항원, 즉 그들의 에피톱은, 발현되고, 같은 원조의 변형없는 세포들에 비해서, 각각의 종양의 대개 상향조절된 세포인 효소, 수용체, 전사 인자 등과 같은 모든 단백질 클래스에서 유도된 분자일 수 있다.
- [0091] MHC-분자에는 두 클래스가 있으며, MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II이다. MHC 클래스 I 알파 중쇄와 베타-2-저분자글로불린, 알파와 베타 쇄의 MHC 클래스 II 분자로 구성되어 있다. 이들의 3차원 형태는 결합 홈을 형성하며,

이는 웨티드와의 비공유결합에 사용된다.

- [0092] MHC 클래스 I 분자는 대부분의 유핵 세포에서 찾을 수 있다. 이는 대부분 내인 단백질, 결손 리보솜 생성물(DRIP)과 큰 웨티드의 단백질분해성 절단으로 인해 생성된 웨티드를 제시한다. 하지만 엔도솜 구획이나 외생 출처로부터 유래된 웨티드 또한 MHC 클래스 I 분자에서 발견된다. 이러한 비교전적 방식의 클래스 I 제시를 문헌에서는 교차-제시라고 칭한다(Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). MHC 클래스-II 분자는 대부분 전문적인 항원-제시 세포(APC)에서 찾아 볼 수 있으며, 이들은 주로 APC에 의해 섭취된 외인 또는 막횡단 단백질의 웨티드를 제시하며(예: 세포내이입 동안), 이는 후에 처리된다.
- [0093] 웨티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합체는 적당한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8-양성 T 세포에 의해서 인식이 되는 반면, 웨티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체는 적당한 TCR을 갖는 CD4-양성 조력 T 세포에 의해 인식이 된다. TCR, 웨티드 및 MHC가 이로써 1:1:1의 화학양론적 반응량으로 존재한다는 사실은 잘 알려져 있다.
- [0094] CD4-양성 보조 T 세포는 CD8-양성 세포 독성 T 세포에 의한 효과적인 반응을 유도하고 지속하는데 중요한 역할을 한다. 종양-연관 항원(TAA)에서 유도된 CD4-양성 T 세포 에피톱의 동정은 항-종양 면역 반응을 일으키기 위한 의약품의 개발에 아주 중요하다(Gnjatic et al., 2003). 종양 부위에서, 보조 T 세포는, 세포독성 T 세포(CTL) 친화적 시토카인 주위 환경을 지원하고(Mortara et al., 2006) 효과기 세포, 예를 들어 CTL, 자연 살해(NK) 세포, 대식 세포, 과립구를 유치한다(Hwang et al., 2007).
- [0095] 염증이 없는 경우, MHC 클래스 II 분자의 발현은 주로 면역계의 세포, 특히 전문적 항원-제시 세포(APC), 예를 들어, 단핵 세포, 단핵 세포-유도된 세포, 대식 세포, 수지상 세포로 제한된다. 암 환자에서, 종양의 세포는 MHC 클래스 II 분자를 발현하는 것으로 밝혀졌다(Dengjel J, et al.).
- [0096] 본 발명의 신장 웨티드는 HLA 클래스 II 활성 에피톱으로 작용할 수 있다.
- [0097] MHC 클래스 II에 의해 활성화된 조력 T 세포는 항-종양 면역에서 CTL 효과기 기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다. CD8-양성 킬러 T 세포의 TH1 유형 지원 효과기 기능의 조력 T 세포 반응을 일으키는 조력 T 세포 에피톱은, 세포 표면에 종양-연관 웨티드/MHC 복합체를 보이는 종양 세포에 대한 세포 독성 기능을 포함한다. 이런 식으로 종양-연관 조력 T 세포 웨티드 에피톱은, 따로 또는 다른 종양-연관 웨티드와 함께, 항-종양 면역 반응을 자극하는 백신 조성의 활성 약학 원료로 사용될 수 있다.
- [0098] 예를 들어, 생쥐 같은 포유류 동물 모델에서는 심지어 CD8-양성 T 림프구의 부재 하에서도, CD4-양성 T 세포가 인터페론-감마(IFN γ)의 분비에 의한 혈관신생의 저해를 통한 종양의 억제 징후에 충분하다는 것이 보여졌다(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). CD4 T 세포가 직접적 항종양 작용기라는 증거가 있다(Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).
- [0099] 이전에는 HLA 클래스 II 분자의 구성적 발현이 일반적으로 면역 세포로 제한되기 때문에, 클래스 II 웨티드를 원발성 종양에서 직접 격리하는 것은 가능하지 않다고 간주되었다. 그러나, Dengjel 등은 MHC 클래스 II 에피톱을 종양에서 직접적으로 식별하는데 성공했다(WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).
- [0100] CD8 및 CD4에 의존하는 두 유형의 반응이 함께 상승작용에 의해 항종양 효과에 기여함으로써, CD8+ T 세포(리간드: MHC 클래스 I 분자 + 웨티드 에피톱) 또는 CD4-양성 조력 T 세포(리간드: MHC 클래스 II 분자 + 웨티드 에피톱)에 의해 인식되는 종양-연관 항원의 식별 및 특성화가 종양 백신의 개발에 중요하다.
- [0101] MHC 클래스 I 웨티드 세포 면역 반응을 촉발(유도)하려면 MHC-분자에도 결합해야 한다. 이 프로세스는 MHC-분자의 대립형질 및 그 웨티드의 아미노산 서열의 특정한 다형성에 의존한다. MHC-클래스-I-결합 웨티드는 대개 길이가 8 내지 12개의 아미노산 잔기이며 대개 그 서열 내에 MHC-분자와 상응하는 결합 홈과 상호작용하는 2개의 보존 잔기("고정")를 포함하고 있다. 이렇게 함으로써 각 MHC 대립형질은 어떤 웨티드가 결합 홈에 특이적으로 결합할 수 있는가를 결정하는 "결합 모티프"를 갖는다.
- [0102] MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서, 웨티드는 종양 세포에 의해 발현되는 특정 MHC 클래스 I 분자와 결합할 수 있어야 하며 또한 추후 특정한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포에 의해 인식될 수 있어야 한다.
- [0103] 종양-특이적 또는 종양-연관 항원으로서 T 림프구에 의해 단백질이 인식되고, 치료에 사용되려면, 특정한 전제 조건이 충족되어야 한다. 항원은 주로 종양 세포에 의해 발현되어야 하며 비교적 소량일지라도 건강한 정상 조직에 의해서는 발현되어서는 안 된다. 바람직한 구현에서, 웨티드는 건강한 정상 조직과 비교하여 종양 세포에 의해 과다제시되어야 한다. 더욱이 각각의 항원이 하나의 유형의 종양에서 뿐만 아니라 높은 농도로 나타나는 것이 바람직하다(즉 세포마다 웨티드의 각각의 사본 번호). 종양-특이적 및 종양-연관 항원은 흔히 기능 때문에

(예: 세포 주기 관리 또는 아폽토시스의 억제) 정상 세포를 종양 세포로 전환하는 것과 직접 관련된 단백질에서 유도된다. 또한, 변환을 직접적으로 일으키는 단백질의 하류 표적은 상향조절될 수 있으며, 이에 따라 간접적으로 종양과 연관될 수 있다. 이러한 간접적 종양-연관 항원은 백신 접근법의 표적이 될 수도 있다(Singh-Jasuja et al., 2004). 에피톱이 항원의 아미노산 서열에 나타나는 것이 중요하며, 종양-연관 항원에서 유도된 그러한 웨티드("면역성 웨티드")는 시험관내 또는 생체내 T 세포반응을 유도해야 한다.

[0104] 기본적으로, MHC 분자에 결합할 수 있는 모든 웨티드는 T 세포 에피톱으로서 기능할 수 있다. 시험관내 또는 생체내 T 세포 반응을 유도하는 전제 조건은 상응하는 TCR이 있는 T 세포의 존재와 이 특정 에피톱에 대한 면역 내성의 부재이다.

[0105] 따라서, TAA는 종양 백신으로 제한되지 않지만 이를 포함하는 T 세포 기반 요법의 개발에 있어서 시작점이 된다. TAA의 식별과 특성화의 방법은 대개 환자 또는 건강한 대상에서 격리될 수 있는 CTL의 사용에 기반되거나, 다른 전송 프로파일 또는 종양과 정상 조직 사이의 차등 전사 프로파일이나 차등 웨티드 발현 패턴의 생성에 기반한다. 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주에서 과발현되거나 그런 조직 또는 세포주에서 선택적으로 발현되는 유전자의 식별은 면역 치료에서 이런 유전자에서 전사된 항원의 이용에 대한 정밀한 정보를 제공하지 않는다. 이것은 상응하는 TCR이 있는 T 세포가 나타나야 하고 이 특정 에피톱에 대한 면역 내성이 없거나 최소화되어야 하므로 이러한 항원의 에피톱의 개개의 소집단만이 그런 응용에 적합하기 때문이다. 따라서 본 발명의 매우 바람직한 구현에서, 기능성 및/또는 증식성 T 세포가 발견될 수 있는 MHC 분자와 관련이 있게 나타나는 과발현된 또는 선택적으로 발현된 웨티드만 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능성 T 세포는 특정 항원에 의해 자극되었을 때 클론에 의해 확대되고 효과기 기능("효과기 T 세포")을 실행할 수 있는 T 세포로 정의된다.

[0106] 본 발명에 따른 특정 TCR(예: 용해성 TCR) 및 항체 또는 다른 결합 분자(골격)에 의해 웨티드-MHC를 표적화하는 경우, 기저 웨티드의 면역원성은 이차적인 것이다. 이러한 경우, 제시가 결정요인이다.

발명의 내용

[0107] 본 발명의 제1 양태에서, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 288 또는 서열번호 1 내지 서열번호 288에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 웨티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것으로, 상기 변이체는 MHC에 결합하며/거나 상기 웨티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하며, 상기 웨티드는 기저의 전장 폴리웨티드가 아니다.

[0108] 웨티드가 암 요법 표적으로 기능하는데 가장 중요한 기준은 정상 조직에 비해 원발성 종양 조직에 대한 과다제시인 반면, 상응하는 유전자의 RNA 발현 프로파일 또한 적절한 웨티드의 선택에 도움을 줄 수 있다. 특히, 일부 웨티드는 그 화학적 물성으로 인해 세포에 대한 낮은 복제수로 인하여 질량 분광법에 의한 검출이 어려우며, 웨티드 제시의 검출에 집중하는 스크리닝 접근방식은 이러한 표적의 파악에 실패할 수 있다. 하지만 이러한 표적은 정상 조직에서 유전자 발현의 분석으로 시작하며 이차적으로 종양에서의 웨티드 제시 및 유전자 발현을 평가하는 대체 접근방식으로 검출할 수 있다. 이 접근방식은 추가적인 유전자 발현 데이터(종양 샘플 포함)와 합쳐진 공개 데이터베이스(Lonsdale, 2013), 및 웨티드 제시 데이터로부터 mRNA 데이터를 사용하여 본 발명에서 실현되었다. 유전자의 mRNA가 정상 조직, 특히 필수 기관계에 거의 부재한다면, 심지어 효능이 강한 전략(양특이성 친화도-최적화 항체 또는 T 세포 수용체와 같은)에 의해 상응하는 웨티드를 표적화하는 것이 더 안전할 수 있다. 그러한 웨티드는 작은 비율의 종양 조직에서만 동정되더라도 흥미로운 표적을 나타낸다. 일상적 질량 분광 분석은 웨티드 수준에 대한 표적 범위를 평가하기에 충분히 민감하지 않다. 이와 달리 종양 mRNA 발현은 범위 평가에 사용할 수 있다. 웨티드 자체의 검출을 위해서는, 일상적 스크리닝보다 민감도가 더 높은 표적 질량 분석의 접근방식이 필요할 수 있으며 이는 웨티드 제시 수준에 대한 범위의 더 나은 추정이 가능하다.

[0109] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 서열번호 288 또는 서열번호 1 내지 서열번호 288에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 본 발명의 웨티드에 관한 것으로, 상기 웨티드 또는 이의 변이체가 갖는 전체 길이는 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개의 아미노산이다.

[0110] 다음 표에는 본 발명에 따른 웨티드와 각각의 서열번호 및 이 웨티드의 유망한 근원(기저) 유전자가 제시된다. 표 1A의 모든 웨티드는 HLA-A*02에 결합한다. 표 1A에 나와있는 모든 웨티드는 오류 비율이 높은 고처리량 선별의 결과로서 대규모 목록으로 이전에 공개되었거나 다른 알고리즘을 사용하여 계산된 바 있으나 이전에는 전혀

암과 연관된 적은 없다.

[표 1A]

본 발명에 따른 웹티드

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
1	KLQEKIQEL	1062	CENPE
2	SVLEKEIYSI	127602	DNAH14
3	RVIDDSLWVGV	2187	FANCB
4	VLFGELPAL	8701	DNAH11
5	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
6	FLNIAETAL	8701	DNAH11
7	ALLQALMEL	51236, 728071	FAM203A, FAM203B
8	ALSSSQAEV	3833	KIFC1
9	SLITGQDLSV	51804	SIX4
10	QLIEKNWLL	56992	KIF15
11	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	26762	HAVCR1
13	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
14	YTFSGDVQL	4312	MMP1
15	GLPSATTTV	94025	MUC16
16	SLADLSLLL	134391	GPR151
17	GLLPSAESIKL	132989	C4orf36
18	KTASINQN	81930	KIF18A
19	KVFELDLVTL	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	1063	CENPF
21	YLMDDFSSL	1293	COL6A3
22	LMYPYIYHV	54954	FAM120C
23	ALLSPLSLA	4017, 9583	LOXL2, ENTPD4
24	KVWSDVTP	4320, 4322	MMP11, MMP13
25	LLWGHPRVALA	25878	MXRA5
26	VLJDKVAVV	6660	SOX5
27	GLLGKVTSV	51297	BPIFA1
28	IKVTDPQLREL	51297	BPIFA1
29	KMISAIPTL	94025	MUC16
30	IITEVITRL	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	94025	MUC16
32	VVMVLVML	94025	MUC16
33	TLDRNNSLYV	94025	MUC16
34	TLNTLD1NL	94025	MUC16
35	VLIKGLEE1	3832	KIF11

[0112]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
36	TVLQELINV	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	3832	KIF11
38	VLQQESNFL	63967	CLSPN
39	YLEDGFAYV	5558	PRIM2
40	KIWEELSLEV	4102, 4105	MAGEA3, MAGEA6
41	IVTEIISEI	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	64151	NCAPG
43	LLIPFTIFM	1237	CCR8
44	AVFNLVHV	56923	NMUR2
45	FLPVSVVYV	56923	NMUR2
46	IISLDEVAVSL	144455	E2F7
47	GLNGFNVLL	144455	E2F7
48	KISDFGLATV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	8532	CPZ
51	LDSEALLTL	84467	FBN3
52	TIGIPFPNV	83990	BRIP1
53	AQHLSTLLL	1469	CST1
54	YLVPGLVAA	64180	DPEP3
55	HLFDKIIKI	654463	FER1L6
56	VLQENSSDYQSNL	3188	HNRNPH2
57	TLYPGRFDYV	338322	NLRP10
58	HLLGEGAFAQV	699	BUB1
59	ALADGIKSFL	5296	PIK3R2
60	YLFSQGLQGL	2491	CENPI
61	ALYPKEITL	203102	ADAM32
62	SIVENIHVI	675	BRCA2
63	KLLPMVIQL	246	ALOX15
64	SLYAGSNNQV	246	ALOX15
65	SLSEKSPEV	158511, 728461	CSAG1, CSAG2
66	AMFPDTIPRV	285220	EPHA6
67	FLIENLLAA	3166	HMX1
68	QLMNLIRSV	51124	IER3IP1
69	LKVLKADVVL	259307	IL4I1
70	GLTEKTVLV	24137, 285643	KIF4A, KIF4B
71	HMSGKLTNV	55771	PRR11
72	VLSTRVTNV	55771	PRR11
73	SVPKTLGV	11280	SCN11A

[0113]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
74	GLAFLPASV	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	6570	SLC18A1
76	FTAEFLEKV	79801	SHCBP1
77	ALYGNVQQV	91646	TDRD12
78	LFQSRIAGV	7579	ZSCAN20
79	TVLEE1GNRV	9133	CCNB2
80	VLTGQVHEL	10715	CERS1
81	ILAEPIYI	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	55655	NLRP2
83	GLLENSPHL	25788	RAD54B
84	FLLEREQLL	165055	CCDC138
85	KLLDKPEQFL	342184	FMN1
86	SLFSNIESV	54848	ARHGEF38
87	KLLSLLEEA	54848	ARHGEF38
88	LLLPLELSLA	374946	DRAXIN
89	SLAETIFIV	3359	HTR3A
90	A1LNVDENQV	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	3359	HTR3A
92	RLFEEVLGV	9816	URB2
93	RLYGYFHDA	6790	AURKA
94	YLDEVAFM.	1238	CCBP2
95	KLIDEDEPLFL	1767	DNAH5
96	ALDTTTRHEL	93323	HAUS8
97	KLFEKSTGL	23421	ITGB3BP
98	FVQEKİPEL	84944	MAEL
99	TLFGIQLTEA	84944	MAEL
100	ALQSFEFRV	56130	PCDHB6
101	SLLEVNEASSV	149628	PYHIN1
102	GLYPVTLVGV	83696	TRAPP9
103	YLADTVQKL	100526761, 549 37	CCDC169-SOHLH2, SOHLH2
104	DLPTQEPAALGTT	354	KLK3
105	AMLASQTEA	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	4477	MSMB
107	RVLPGQAVTGV	55247	NEIL3
108	FIANLPPELKA	6013	RLN1
109	ILGSFELQL	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	7047	TGM4

[0114]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
111	AQLEGKLVSI	3161	HMMR
112	ILAQDVAQL	24137	KIF4A
113	FLFLKEVKV	54596	L1TD1
114	LLFPSDVQTL	23397	NCAPH
115	ILHGEVNKV	54830	NUP62CL
116	ALLSSVAEA	9048	ARTN
117	TLLEGISRA	26256	CABYR
118	IAYNPNGNAL	3824	KLRD1
119	SLIEESEL	284217	LAMA1
120	LQLJPLKGSL	6241	RRM2
121	ALYVQAPTV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	150737, 92104	TTC30B, TTC30A
124	ALLRLFTI	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	11130	ZWINT
127	IMKATGLGIQL	154664	ABCA13
128	SILTNISEV	24	ABCA4
129	KMASKVTQV	132612	ADAD1
130	QLYGSAITL	158067	AK8
131	SLYPHFTLL	440138	ALG11
132	ALLNNVIEW	57101	AN02
133	FLDGRPLTL	83734	ATG10
134	SLYKSFLQL	527	ATP6VOC
135	HLDTVKIEV	135152	B3GAT2
136	LLWDAPAKC	192134	B3GNT6
137	KLIYKDLVSV	85016	C11orf70
138	GIINKLTV	440087	C12orf69
139	IILENIQSL	55732	C1orf112
140	FLDSQITTV	255119	C4orf22
141	NIDINNNEL	57082	CASC5
142	LLDAAHASI	284992	CCDC150
143	MLWESIMRV	166979	CDC20B
144	FLISQTPLL	60437	CDH26
145	ALEEKLENV	79172	CENPO
146	VVA AHLAGA	148113	CILP2
147	GLLSALENV	1269	CNR2
148	YLILSSHQL	1269	CNR2

[0115]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
149	NMADGQLHQV	728577.79937	CNTNAP3B,CNTNAP3
150	VLLDMVHSL	100507170,255 313,653282,72 8036,728042,7 28049,728062, 728072,728075 ,728082,72809 0,728096	CT47A12,CT47A11,CT47A 7,CT47A10,CT47A9,CT47 A8,CT47A6,CT47A5,CT47 A4,CT47A3,CT47A2,CT47 A1
151	DISKRIQSL	100128553,220 429,341689,42 53,64693	CTAGE4,CTAGE10P,CTAGE 16P,CTAGE5,CTAGE1
152	ILVTSIFFL	643	CXCR5
153	KLVELEHTL	203413	CXorf61
154	AIIKEIQTV	1588	CYP19A1
155	TLD SYLKAV	163720,199974	CYP4Z2P,CYP4Z1
156	VILTSSPFL	10800	CYSLTR1
157	ILQDGQFLV	138009	DCAF4L2
158	YLDPLWHQL	2072	ERCC4
159	QLGPVPVTI	285966	FAM115C
160	TLQEWLTEV	167555	FAM151B
161	NLLDENVCL	26290	GALNT8
162	GLLGNNLLTSL	51608	GET4
163	GLEERLYTA	29933	GPR132
164	MLIIRVPSV	80000	GREB1L
165	SLLDYEVSI	116444	GRIN3B
166	LLGDSSFFL	283254	HARB11
167	LVVDEGSLVSV	92797	HELB
168	VIFEGERPYL	84072	HORMAD1
169	ALADLSVAV	3363	HTR7
170	FIAAVVEKV	203100	HTRA4
171	LLLLDVPTA	10437	IFI30
172	SLYLQMNSLRTE	28426	IGHV3-43
173	RLIDIYKNV	338567	KCNK18
174	ALYSGDLHAA	157855	KCNU1
175	SLLDLVQSL	57536	KIAA1328
176	VQSGLRILL	57650	KIAA1524
177	ALINVNLAL	146909	KIF18B
178	SLVSWQLLL	3814	KISS1

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
179	TLGEIIKGV	402569	KPNA7
180	RLYEEEIRI	3887, 3889	KRT81, KRT83
181	LLWAPTAQA	389812	LCN15
182	GLQDGFIITV	284194, 654346	LGALS9B, LGALS9C
183	ALSYILPYL	147172	LRRC37BP1
184	ALDSTIAHL	149499	LRRC71
185	TLYQGLPAEV	80131	LRRC8E
186	SLLSLESRL	57408	LRTM1
187	SILKEDPFL	346389	MACC1
188	VLGEEQEJV	4108, 728269	MAGEA9, MAGEA9B
189	MAVSDLLIL	2862	MLNR
190	SLSTELFKV	4622, 4626	MYH4, MYH8
191	AAIEIFEKV	55728	N4BP2
192	TLLPSSGLVTL	344148	NCKAP5
193	ALFHMNILL	126206	NLRP5
194	KLLEEVQLL	126206	NLRP5
195	VIIQNLPAL	387129	NPSR1
196	TLHQWIYYL	120406	NXPE2
197	LGGPTSLLHV	390038	OR51D1
198	ILTNKVVSV	119678	OR52E2
199	SVADLAHV	27334	P2RY10
200	IMPTFDLTKV	203569, 389860	PAGE2, PAGE2B
201	LLFSSLCEA	51050	PI15
202	ALAKDELSL	120379	PIH1D2
203	FLFVDPELV	146850	PIK3R6
204	SEWGSPHAAP	5539	PPY
205	LAFGYDDEL	391004, 654348	PRAMEF17, PRAMEF16
206	GLDAFRIFL	431704	RGS21
207	KLFETVEEL	6121	RPE65
208	HLNNDRNPL	6406	SEMG1
209	VLQTEELVAN	6406	SEMG1
210	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
211	LLTTVLINA	6582	SLC22A2
212	MTLSEIIHAV	9153	SLC28A2
213	ILAVDGVLGV	169026	SLC30A8
214	ALFETLIQL	139420	SMEK3P
215	QIADIVTSV	139420	SMEK3P
216	ALSTVTPRI	166378	SPATA5

[0117]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
217	LLWPSSVPA	246777,79400	SPESP1,NOX5
218	SLTGANITV	83932	SPRTN
219	GVVPTIQKV	64220	STRA6
220	ALSELERVL	51298	THEG
221	IMLNSVEE1	387357	THEMIS
222	LLTGVFAQL	388564	TMEM238
223	ALHPVQFYI	93587	TRMT10A
224	LLFDWSGTGRADA	79465	ULBP3
225	FLPQPVPLSV	57695	USP37
226	SLAGNLQEL	11023	VAX1
227	SEMEELPSV	26609,425054, 51481	VCX,VCX3B,VCX3A
228	SLLELDGINRL	221806	VWDE
229	YLYELEHAL	80217	WDR96
230	KLLNMIFSI	2829	XCR1
231	LLDDIFIRL	143570	XRRA1
232	LVVGGIATV	84614	ZBTB37
233	SLFESLEYL	132625	ZFP42

[0118]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
234	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
235	SLLNQPKAV	63967	CLSPN
236	KMSELQTYV	1063	CENPF
237	ALLEQTGDSL	1063	CENPF
238	HLQEKLQLS	1063	CENPF
239	VIIKGLEEITV	3832	KIF11
240	SVQENIQQQK	3832	KIF11
241	KQFEGTVETI	675	BRCA2
242	KLQEEIPVL	1062	CENPE
243	GLAEFQENV	57405	SPC25
244	NVAEIVIHI	83540	NUF2
245	ALLEEEEGV	4103	MAGEA4
246	ALAGIVTNV	11077	HSF2BP
247	NLLIDDKGTIKL	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	983	CDK1
249	YLYQILQGI	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	983	CDK1
251	LLWGNLPEI	653820,729533	FAM72B,FAM72A
252	SLMEKNQSL	24137,285643	KIF4A,KIF4B
253	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
254	ALGDKFLLRV	4608	MYBPH
255	FLMKNSDLYGA	79801	SHCBP1
256	FLNDIFERI	337873,337874	HIST2H2BC,HIST2H2BD
257	KLIDHQGLYL	7579	ZSCAN20
258	QLVQRVASV	5683	PSMA2
259	GPGIFPPPPPQP	10879	SMR3B
260	ALNESLVEC	55165	CEP55
261	GLAALAVHL	2175	FANCA
262	LLLEAVWHL	2175	FANCA
263	SIIIEYLPTL	79915	ATAD5
264	TLHDQVHLL	2099	ESR1
265	FLLDKPQDLSI	346389	MACC1
266	FLLDKPQDL	346389	MACC1
267	YLLDMPLWYL	7153	TOP2A
268	SLDKDIVAL	7153	TOP2A
269	GLLDCTPFL	2177	FANCD2

[0119]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
270	TLLTFFHEL	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	55215	FANCI
272	FVMEGEPPKL	348654	GEN1
273	SLNKQIETV	57650	KIAA1524
274	TLYNPERTITV	10642, 10643	IGF2BP1, IGF2BP3
275	AVPPPPSSV	10642	IGF2BP1
276	RMPTVILQCV	9622	KLK4
277	KLQEELNKV	3161	HMMR
278	VLEDKVLSV	128239	IQGAP3
279	VLMDEGAVLTL	54596	L1TD1
280	HLWGHALFL	89866	SEC16B
281	LLLESDPKVYSL	6491	STIL
282	SLYALHVKA	79001	VKORC1
283	ALSELLQQV	9816	URB2
284	KLMDPGSLPPL	2118	ETV4
285	MLLDTVQKV	54892	NCAPG2
286	FLTEMVHFI	93517	SDR4E1
287	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
288	SLYKGLLSV	25788	RAD54B

J = 포스포세린

[0120]

[0121] 특히 바람직한 것은 서열번호 1 내지 288로 구성된 군으로부터 선택된 본 발명에 따른 단일 또는 조합의 웨티드이다. 보다 바람직한 것은 서열번호 1 내지 서열번호 126으로 구성된 군으로부터 선택된 단일 또는 조합의 웨티드이고(표 1), 간세포 암종(HCC), 대장암(CRC), 아교모세포종(GB), 위암(GC), 식도암, 비소세포 폐암(NSCLC), 췌장암(PC), 신장 세포 암종(RCC), 전립선 비대증(BPH), 전립선암(PCA), 난소암(OC), 흑색종, 유방암, 만성 림프성 백혈병(CL), 메르켈 세포 암종(MCC), 소세포 폐암(SCLC), 비호지킨 림프종(NHL), 급성 골수성 백혈병(AML), 담낭암 및 담관 암종(GBC, CCC), 방광암(UBC), 자궁암(UEC)의 면역요법에서 이러한 웨티드의 사용이다.

[0122]

[0122] 가장 바람직한 것은 서열번호 274, 14, 21, 23, 25, 157, 168, 11, 253, 85, 89, 40, 264, 155, 233 및 245로 구성된 군으로부터 선택된 단일 또는 조합의 웨티드이며(표 1, 2 및 10), HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 및 CLL에서 이러한 웨티드의 사용이다.

[0123]

[0123] 본 발명은 또한 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I 또는 길이 변이체와 같은 긴 형태의 MHC 클래스-II의 분자와 결합하는 능력을 가진 본 발명에 따른 웨티드에 관한 것이다.

[0124]

[0124] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 웨티드에 관한 것으로, 상기 웨티드는 (각각) 서열번호 1 내지 서열번호 288에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.

[0125]

[0125] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 웨티드에 관한 것으로, 상기 웨티드는 변형되며/거나 비웨티드 결합을 포함한다.

[0126]

[0126] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 웨티드에 관한 것으로, 상기 웨티드는 융합 단백질의 일부이며, 특히 HLA-DR 항원-결합 항원-연관된 불변쇄(Ii)에 융합되거나, 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 그 서열 안으로) 융합된다.

[0127]

[0127] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 웨티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.

[0128]

[0128] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있거나 발현하는 벡터에 관한 것이다.

[0129]

[0129] 본 발명은 또한 질병의 치료와 의학, 특히 암의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 웨티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.

[0130]

[0130] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 웨티드에 대해 특이적인 항체 또는 본 발명에 따른 상기 웨티드와 MHC와의 복합

체 및 이들을 만드는 방법에 관한 것이다.

- [0131] 본 발명은 또한 T 세포 수용체(TCR), 특히 용해성 TCR(sTCR) 및 상동성 또는 동종이형 T 세포로 조작된 복제된 TCR 및 이러한 수용체를 만드는 방법은 물론 상기 TCR을 함유하거나 상기 TCR과 교차반응하는 NK 세포 또는 기타 세포들에 관한 것이다.
- [0132] 항체 및 TCR은 즉시 가용한 본 발명에 따른 웨티드의 면역치료적 사용의 추가 구현이다.
- [0133] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 또는 전에 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항원-제시 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0134] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 웨티드의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 발명에 따른 숙주 세포의 배양과 상기 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터 웨티드의 단리를 포함한다.
- [0135] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 상기 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원-제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원-제시 세포 또는 인공 항원-제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.
- [0136] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 항원-제시 세포는 서열번호 1 내지 서열번호 288, 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 126 또는 변이체 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨티드를 포함하는 상기 웨티드를 발현할 수 있거나 발현하는 발현 벡터를 포함한다.
- [0137] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 의해 제공된 활성화된 T 세포에 관한 것으로, 상기 T 세포는 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨티드를 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.
- [0138] 본 발명은 또한 표적 세포가 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨티드를 비정상적으로 발현하는 환자에서 그 표적 세포를 죽이는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 본 발명에 따라 생산된 효과적인 수의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0139] 본 발명은 또한 설명한 일체의 웨티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 활성화된 T 림프구, T 세포 수용체 또는 항체, 또는 본 발명에 따른 다른 웨티드 및/또는 웨티드-MHC-결합 분자의 약제로서 또는 약제의 제조에서의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 약제는 암에 대해 활성이다.
- [0140] 바람직하게는 상기 약제는 세포 요법, 백신 또는 용해성 TCR 또는 항체에 근거한 단백질에 대해 적합하며 이를 위해 사용된다.
- [0141] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로, 상기 암 세포는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 세포이다.
- [0142] 본 발명은 또한 본원에서 "표적"이라 칭하며 바람직하게는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 및 CLL의 진단에 사용할 수 있는 본 발명에 따른 웨티드에 근거하는 바이오마커에 관한 것이다. 마커는 웨티드 자체의 과다제시 또는 상용하는 유전자의 과발현일 수 있다. 또한 마커는 치료, 바람직하게는 면역요법, 가장 바람직하게는 바이오마커에 의해 파악된 동일한 표적을 대상으로 하는 면역요법의 성공 확률을 예측하는데 사용할 수도 있다. 예를 들어, 항체 또는 용해성 TCR은 MHC와의 복합체에서 관심 있는 웨티드의 존재를 검출하기 위해 종양의 부분을 염색에 사용할 수 있다.
- [0143] 임의적으로 그 항체는 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가의 효과기 기능을 갖는다.
- [0144] 본 발명은 또 암 치료의 맥락에서 이러한 신규 표적들의 사용에 관한 것이다.
- [0145] CABYR은 수정능 획득 과정 동안 인산화되면 섬유집과 연관하여 정자 편모의 주요 조각에 국소화되며 칼슘 결합을 나타내는 단백질을 인코딩한다(RefSeq, 2002). 비소세포 폐암 세포주인 NCI-H460과 A549에서 CABYR 동종형인 CABYR-a 및 CABYR-b의 해체는 증식의 억제, 및 구성적으로 활성인 Akt 경로의 하류 구성요소에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Qian et al., 2014). CABYR 발현의 억제는 phospho-GSK-3베타 및 p53와 p27 단백질과 같은 Akt 경로의 하류 구성요소에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Qian et al., 2014). 더욱이 CABYR 녹-다운(knock-down)은 시험관내 및 생체내 모두에서 화학요법 약물에 대한 반응의 화학민감성 및 약물 유도 세포자멸사를 상당히 증가시키는 것으로 나타났으며, 이에 따라 폐암에서 세포자멸사 반응 및 화학민감성을 개선시키는 신규 방법일 수 있다(Qian et al., 2014). CABYR은 결과적으로 뇌 종양, 췌장암 및 폐암에 존재하는 것으로 나

타나는, 초기에는 고환 특이적인 단백질로서 묘사되었다(Hsu et al., 2005; Luo et al., 2007; Li et al., 2012). CABYR은 결과적으로 뇌 종양, 췌장암 및 폐암에서 존재하는 것으로 나타나는, 초기에는 고환 특이적인 단백질로서 묘사되었다(Li et al., 2012).

[0146] COL6A3은 대부분의 연결 조직에서 발견되며 기질 구성요소들을 조직하는데 중요한 염주 미세섬유인 제VI형 콜라겐의 세 알파쇄 가운데 하나인 제VI형 알파 3 콜라겐을 인코딩한다(RefSeq, 2002). COL6A3은 대부분의 연결 조직에서 발견되며 기질 구성요소들을 조직하는데 중요한 염주 미세섬유인 제VI형 콜라겐의 알파-3 쇄를 인코딩한다(RefSeq, 2002). COL6A3은 결장, 방광 및 전립선 암에서 교대로 스플라이싱된다. COL6A3의 긴 동종형은 암 샘플에서 거의 독점적으로 발현되며 새로운 암 마커로서 가능할 가능성이 있다(Thorsen et al., 2008). COL6A3은 췌장관 선암종 조직에서 고도로 발현되며 종양-특이적 교대 스플라이싱된다(Kang et al., 2014). COL6A3은 고등급 난소암과 상관관계가 있는 것으로 입증되었으며 시스플라틴 내성에 기여한다. COL6A3은 위암 조직에서 빈번히 과발현되는 것으로 관찰되었다(Xie et al., 2014). COL6A3 돌연변이는 종양 분화 및 TNM 병기 결정과 독립적으로 대장 암종의 환자에서 더 나은 전체 생존율을 유의하게 예측했다(Yu et al., 2015). COL6A3 발현은 췌장암, 결장암, 위암, 점막표피양 암종 및 난소암에서 증가한 것으로 보고되었다. 엑손 3, 4 및 6 등 암 관련 전사 변이체가 결장암, 방광암, 전립선암 및 췌장암에서 검출되었다(Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008). 난소암에서는 COL6A3 수준이 더 높은 종양 등급과 상관관계가 있었으며 췌장암에서는 COL6A3이 적절한 진단 혈청 바이오마커를 대표하는 것으로 나타났다(Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014).

[0147] CXorf61은 CT83으로도 알려져 있으며, 암/고환 항원 83을 인코딩하며 염색체 Xq23에 위치한다(RefSeq, 2002). CXorf61의 발현은 유방암과 폐암 등 여러 암 유형에서 묘사된 바 있다(Yao et al., 2014; Hanagiri et al., 2013; Baba et al., 2013). CXorf61은 폐암에서 면역원성 암-고환 항원으로 나타났다. 따라서, 이는 항암 면역 요법의 유망한 후보자를 대표할 수 있다(Fukuyama et al., 2006).

[0148] CYP4Z1은 시토크롬 P450 효소 상과의 구성원을 인코딩한다. 시토크롬 P450 단백질은 약물 대사 및 콜레스테롤, 스테로이드 및 기타 지질의 합성에 연관된 다수의 반응을 촉매하는 단일산화효소이다(RefSeq, 2002). 유방암에서 CYP4Z1 과발현은 높은 종양 등급과 불량한 예후와 연관이 있다. 기능 상으로 CYP4Z1은 유방암에서 부분적으로 PI3/Akt 및 ERK1/2 신호전달을 통해 종양의 혈관형성 및 성장을 촉진시킨다(Yu et al., 2012; Murray et al., 2010). 그 밖에 CYP4Z1은 비소세포 폐암 진행에서 역할을 하는 것으로 묘사되었다(Bankovic et al., 2010). 전립선암과 난소암에서, CYP4Z1은 독립적인 예측 마커로서 파악된 바 있다(Tradonsky et al., 2012; Downie et al., 2005). CYP4Z2P는 염색체 1p33에 위치한 위유전자이다(RefSeq, 2002).

[0149] DCAF4L2는 DDB1 및 CUL4 연관 인자 4-유사 2를 인코딩한다. 이 단백질의 구체적인 기능은 해명이 필요한 것으로 남아 있다. 그렇지만 DCAF4L2 유전자는 시신경 유두 형태학 및 구순열 발육과 연관된 것으로 나타났다(Springelkamp et al., 2015; Beaty et al., 2013).

[0150] ESR1은 호르몬 결합, DNA 결합 및 전사의 활성화에 중요한 리간드-활성 전사 인자인 에스트로겐 수용체를 인코딩하며, 이는 성적 발육과 생식 기능에 필수적이다(RefSeq, 2002). ESR1의 돌연변이 및 단일 뉴클레오티드 다형태는 간, 전립선, 쓸개 및 유방암 등 여러 암 유형에 대한 위험과 연관되어 있다. ESR1 발현의 상향조절은 세포 증식과 종양 성장과 관련이 있지만, ESR1 양성 종양 환자의 전체 생존율은 선택적 에스트로겐 수용체 조절인자에 의한 성공적인 요법으로 인해 더 낫다(Sun et al., 2015; Hayashi et al., 2003; Bogush et al., 2009; Miyoshi et al., 2010; Xu et al., 2011; Yakimchuk et al., 2013; Fuqua et al., 2014). ESR1 신호전달은 세포 변형, 성장 및 생존의 책임이 있는 여러 경로를 방해하며 EGFR/IGFR, PI3K/Akt/mTOR, p53, HER2, NFκB 및 TGF-베타 경로들이 포함된다(Frasor et al., 2015; Band and Laiho, 2011; Berger et al., 2013; Skandalis et al., 2014; Mehta and Tripathy, 2014; Ciruelos Gil, 2014).

[0151] FMN1은 부착 이음의 형성 및 선형 액틴 케이블의 중합에서 역할을 하는 단백질인 formin1을 인코딩한다(RefSeq, 2002). FMN1에서 단일 뉴클레오티드 다형성은 전립선암의 위험 증가와 연관이 있다(Lisitskaia et al., 2010).

[0152] HAVCR1은 A형 간염 바이러스 세포 수용체 1 또는 KIM-1로도 알려져 있으며, 인간 A형 간염 바이러스와 TIMD4 모두에 대한 막 수용체 단백질을 인코딩하며 천식과 알레르기성 질병의 완화에 관여할 수 있다(RefSeq, 2002). HAVCR1은 난소 투명 세포 암종 및 간세포 암종과 연관된 신규 바이오마커 후보로서 묘사되었다(Bonventre, 2014; Kobayashi et al., 2015). HAVCR1은 투명 세포 신장 세포 암종-유래 세포주에서 IL-6/STAT-3/HIF-1A 촉을 활성화하며 종양 진행 및 환자 결과를 결정하는 것으로 나타났다(Cuadros et al., 2014). 신장에서 HAVCR1의

구성 발현은 투명 세포 신장 세포 암종 발육에 대한 잠재적 감수성 소질로서 묘사되었다(Cuadros et al., 2013). 더욱이, 강화된 HAVCR1 엑토-도메인 박리는 시험관내의 침습적 표현형 및 생체내에서 보다 공격적인 종양을 촉진시키는 것으로 나타났다(Cuadros et al., 2013). HAVCR1은 신장 세포 및 난소 투명 세포 암종 및 대장암에서 상향조절되는 것으로 묘사되었다(Wang et al., 2013b). HAVCR1 상향조절은 대장암에서 잠재적인 진단 바이오마커 및 수술 후 보다 긴 무질병 기간의 예후 마커로서 묘사되었으며, 이는 또한 대장암에서 전이 케스케이드에도 연루될 수 있다(Wang et al., 2013b). HAVCR1은 T 세포 거대 과립 림프구성 백혈병과 연관된 것으로 나타났다(Wlodarski et al., 2008).

[0153] HORMAD1(CT46으로도 불림)은 감수 분열에서 역할을 수행할 수 있는 HORMA 도메인 함유 단백질을 인코딩한다. HORMA 도메인은 염색질 결합 및 세포 주기 조절에 관여한다(RefSeq, 2002). HORMAD1은 유방, 위 및 난소 암 등 여러 암 유형에서 과발현되는 암/고환 항원으로써 잠재적 바이오마커 및 면역요법의 표적이 된다(Yao et al., 2014; Shahzad et al., 2013; Chen et al., 2005; Aung et al., 2006; Adelaide et al., 2007). HORMAD1 하향조절은 침습, 이동 및 종양 무게의 감소 및 감소된 VEGF 단백질 수준을 초래한다(Shahzad et al., 2013).

[0154] HSF2BP는 HSF2와 연관되는 HSF2 결합 단백질을 인코딩하며 HSF2 활성화 조절에 관여할 수 있다(RefSeq, 2002).

[0155] HSF4는 열-충격 전사 인자 4를 인코딩하며, 이는 열이나 기타 응력의 조건 하에서 열-충격 반응 유전자를 활성화시킨다(RefSeq, 2002). HSF4는 아교모세포종에서 하향조절되는 것으로 나타났다(Mustafa et al., 2010).

[0156] HTR3A는 활성화 이후 신경세포에서 신속한 탈분극 반응을 유발하는 리간드 판문 이온 채널 수용체 초과에 속하는 5-하이드록시트립타민(세로토닌) 수용체를 인코딩한다(RefSeq, 2002). HTR3A(5-HT3으로도 불림)는 몇몇 암 유형에서 조절 완화되며, 예를 들어 외투 세포 림프종에서의 하향조절, 광범위한 B 세포 종양의 차등 발현, 유방암 세포주에서 감소된 발현이다(Pai et al., 2009; Rinaldi et al., 2010; Ek et al., 2002).

[0157] IGF2BP1은 CRD-BP로도 알려져 있으며, 특정 유전자의 mRNA와의 결합하에 그 번역을 조절함으로써 기능하는 인슐린-유사 성장 인자 2 mRNA 결합 단백질 군의 구성원을 인코딩한다(RefSeq, 2002). IGF2BP1을 포함하는 IGF2 mRNA 결합 단백질 군의 두 구성원은, 다양한 인간 암에서 신생 합성되며 종양 성장, 약물 내성 및 전이를 향상시키는 강력한 전사후 종양유전자일 수 있는 진짜 종양태아 단백질로서 묘사되었다(Lederer et al., 2014). IGF2BP1의 발현은 다양한 전반적인 불량한 예후 및 전이와 상관관계가 있는 것으로 보고되었다(Lederer et al., 2014). 이리하여 IGF2BP1은 암 요법을 위한 강력한 바이오마커 및 후보 표적으로 제안되었다(Lederer et al., 2014). IGF2BP 군 구성원들은 암 전이와 KRAS, MYC, MDR1과 같은 종양유전자 인자들의 발현과 크게 연관된 것으로 묘사되었다(Bell et al., 2013). IGF2BP1은 C-MYC와 상호 작용하는 것으로 나타났으며 또한 광범위한 대다수의 결장 및 유방암 및 육종은 물론 유방 섬유선종 및 수막종과 같은 양성 종양에서 발현되는 것으로 발견되었다(Ioannidis et al., 2003). IGF2BP1은 간세포 암종과 기저 세포 암종에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Noubissi et al., 2014; Zhang et al., 2015a). IGF2BP1 및 다른 유전자들의 상향조절은 간세포 암종에서 불량한 수술 후 예후와 유의하게 연관되는 것으로 나타났다(Zhang et al., 2015a). IGF2BP1은 간세포 암종과 신장세포 암종에서 각각 종양 억제인자인 miR-9 및 miR-372의 표적으로 나타났다(Huang et al., 2015; Zhang et al., 2015a). 기질 IGF2BP1의 손실은 결장에서 종양발생의 미세환경을 촉진하는 것으로 나타났으며, 이는 IGF2BP1이 결장 기질 세포에서 종양-억제 역할을 수행하는 것을 나타낸다(Hamilton et al., 2015). IGF2BP1은 신경모세포종에서 4기 종양, 감소된 환자 생존율 및 MYCN 유전자 증폭과 연관있는 것으로 나타났으며, 이에 따라 신경모세포종에서 잠재적 종양유전자이며 독립적인 부정적 예후 인자일 수 있다(Bell et al., 2015). IGF2BP1은 기저 세포 암종의 발육에 있어서 GLI1 발현 및 활동을 조절하는 WNT/β-카테닌 신호전달의 직접적 표적으로 묘사되었다(Noubissi et al., 2014).

[0158] IGF2BP3은 인슐린 유사 성장 인자 II의 번역을 억제하는 종양 태아 단백질인 인슐린 유사 성장 인자 II mRNA 결합 단백질 3을 인코딩한다(RefSeq, 2002). 몇몇 연구에 의하면 IGF2BP3은 세포 분극 이동, 형태학, 대사, 종식 및 분화 등 세포 기능의 다양한 주요 양상에서 활동하는 것으로 나타났다. 시험관내 연구에서는 IGF2BP3이 종양세포 증식, 유착 및 침습을 촉진하는 것으로 나타났다. 더욱이 IGF2BP3은 공격적이고 진행성인 암과 연관이 있는 것으로 나타났다(Bell et al., 2013; Gong et al., 2014). IGF2BP3 과발현은 다수의 종양 유형, 예를 들어 신경 모세포종, 대장 암종, 간내 담관암종, 간세포 암종, 전립선암 및 신장세포 암종에서 묘사되고 불량한 예후, 진행된 종양 병기 및 전이와 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013; Yuan et al., 2009).

[0159] MAGEA3은 흑색종 연관 항원군 구성원 A3을 인코딩한다. MAGEA3은 암 고환 항원으로서 널리 알려져 있다(RefSeq,

2002; Pineda et al., 2015; De et al., 1994). MAGEA3은 전이성 흑색종 암의 요법 백신접종에 사용되는 것으로 오랫동안 알려져 왔다. 진행 악성 흑색종 환자에서 현재 수행하는 MAGEA3 및 4개의 다른 항원을 사용하는 경피 웨티드 백신접종은 불완전 반응자에 비해 완전 반응자에 의한 더 긴 전체 생존율에 유의하게 기여하는 것으로 나타났다(Coulie et al., 2002; Fujiyama et al., 2014). NSCLC에서, MAGEA3은 빈번히 발현되는 것으로 나타났다. NSCLC 조직 샘플에서 MAGEA3의 발현은 더 큰 수의 종양 괴사와 상관관계가 있었으며 폐암 세포주에서 증식과 침습을 억제하고 세포자멸사를 촉진하는 것으로 나타났다. 선암종 환자에 있어서, MAGEA3의 발현은 더 나은 생존율과 연관이 있었다. NSCLC 치료를 위한 유망한 제3상 임상 시험에서 전세포 항MAGEA3 백신이 현재 조사되고 있다(Perez et al., 2011; Reck, 2012; Hall et al., 2013; Grah et al., 2014; Liu et al., 2015). MAGEA3 및 다른 4개의 유전자가 합쳐지는 경우 HCC에서 빈번히 발현되는 것으로 나타났다. HCC 환자에서 이러한 유전자들의 발현은 순환되는 종양 세포 수, 높은 종양 등급 및 진행 병기와 상관관계가 있었다. MAGE3을 발현하는 종양 샘플에서는 이 유전자를 발현하지 않는 샘플보다 간 전이의 빈도가 훨씬 더 높았다(Bahnassy et al., 2014; Hasegawa et al., 1998). 방광암 세포주는 물론 폐, 결장 또는 유방암의 세포주로부터 분리된 암 줄기 세포 유사 측면 군락은 다른 암 고환 항원 가운데 MAGEA3의 발현을 보여주었다. 일방적으로 암 줄기 세포는 현재의 암 요법에 내성이이며 또한 치료 후 암 재발 및 진행을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이리하여 MAGEA3은 특히 방광암에서 면역요법 치료를 위한 신규 표적으로 사용될 수 있다(Yamada et al., 2013; Yin et al., 2014). 둔부 및 경부 편평세포 암종에서 MAGEA3의 발현은 더 나은 무질병 생존율과 연관이 있는 것으로 나타났다(Zamuner et al., 2015). 더욱이 MAGEA3은 난소암의 예후 마커로서 사용이 가능하다(Szajnik et al., 2013).

[0160]

MAGEA4는 MAGE4로도 알려져 있으며, MAGEA 유전자 군의 구성원을 인코딩하고 염색체 Xq28에 위치한다(RefSeq, 2002). MAGEA4는 비정상피종 고환 생식 세포 종양은 아니지만 작은 비율의 전형적 정상피종, 유방암종, 호지킨 텁프종의 앰스타인바 바이러스 음성 사례, 식도 암종, 폐 암종, 방관 암종, 두경부 암종, 대장암, 구강 편평세포 암종, 간세포 암종에서 발현된 것으로 밝혀진 암 고환 항원으로 묘사되었다(Ries et al., 2005; Bode et al., 2014; Li et al., 2005; Ottaviani et al., 2006; Hennard et al., 2006; Chen et al., 2003). MAGEA4는 두경부의 원발성 점막 흑색종에서 빈번히 발현되는 것으로 밝혀졌으며, 이에 따라 암 고환 항원-기반 면역요법의 잠재적 표적일 수 있다(Prasad et al., 2004). MAGEA4는 LHK2 폐 선암종 세포, SW480 결장 선암종 세포 및 MCF7 유방 선암종 세포로부터 오래된 유사 줄기 암세포에서 우선적으로 발현되는 것으로 나타났다(Yamada et al., 2013). 자발적으로 변환된 정상 구강 각질세포에서 MAGEA4의 과발현은 세포 주기 억제의 방지, 및 P53 전사 표적 BAX 및 CDKN1A에 의해 매개되는 세포자멸사의 억제에 의해 성장을 촉진시키는 것으로 나타났다(Bhan et al., 2012). MAGEA4는 이른 병기의 간세포 암종 환자에 비해 간경변이 있는 C형 간염 바이러스 감염 환자와 늦은 병기의 간 세포 암종 환자에서 더 빈번히 발현되는 것으로 나타났으므로, MAGEA4 전사물의 검출은 예후 예측에 도움이 될 수 있다(Hussein et al., 2012). MAGEA4는 폐암에서 발현되는 몇몇 암/고환 항원 가운데 하나로 나타났으며 이는 폐암 환자에서 다가 면역요법의 가능한 후보로서 기능할 수 있다(Kim et al., 2012). MAGEA4는 식도 암종과 간세포 암종에서 상향조절되는 것으로 묘사되었다(Zhao et al., 2002; Wu et al., 2011). p286-1Y2L9L이라 불리는 MAGEA4 유래 신규 웨티드 유사체는 식도암에 대한 웨티드 백신의 개발에 적합한 신규 후보 에피톱으로 묘사되었다(Wu et al., 2011). MAGEA4를 포함하는 MAGE 유전자 군의 몇몇 구성원은 흑색종에서 빈번히 변이되는 것으로 나타났다(Caballero et al., 2010).

[0161]

MAGEA6은 흑색종 관련 항원 A6을 인코딩한다. MAGEA3은 암 고환 항원으로서 널리 알려져 있다(RefSeq, 2002; Pineda et al., 2015; De et al., 1994). MAGEA6은 흑색종, 진행성 골수종, 소아 횡문근육종, 육종, 폐, 방광, 전립선, 유방 및 대장 암, 두경부 편평세포, 식도 편평세포 및 구강 편평세포 암종에서 빈번히 발현되는 것으로 나타났다(Ries et al., 2005; Hasegawa et al., 1998; Gibbs et al., 2000; Dalerba et al., 2001; Otte et al., 2001; van der Bruggen et al., 2002; Lin et al., 2004; Tanaka et al., 1997). MAGEA6 발현은 다발성 골수증 환자에서 더 짧은 무질병 생존율과 관련된 바 있다. 대조적으로 두경부 편평세포 암종에서, MAGEA6의 발현은 더 나은 무질병 생존율과 연관이 있는 것으로 나타났다(van et al., 2011; Zamuner et al., 2015). MAGEA6은 파클리탁셀 내성의 난소암 세포주에서 과발현된 유전자 조합에 속했다. 더욱이 MAGEA6의 전달 감염은 파클리탁셀 민감성 세포에 대한 약물 내성 증가에 기여했다(Duan et al., 2003). MAGEA6은 난소암의 예후 마커로서 사용이 가능하다(Szajnik et al., 2013). 폐암, 결장암 또는 유방암 세포주로부터 분리된 암 줄기 세포 유사 측면 군락은 다른 암 고환 항원들 가운데 MAGEA6의 발현을 보여주었다(Yamada et al., 2013).

[0162]

MAGEA9 또는 MAGE9 또는 MAGE-A9로도 알려져 있으며, MAGEA 유전자 군의 구성원을 인코딩하며 염색체 Xq28에 위치한다(RefSeq, 2002). 비소세포 폐암의 종양 및 기질 세포에서의 MAGEA9의 높은 발현은 불량한 생존율과 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Zhang et al., 2015b). MAGEA9 발현은 비소세포 폐암에서 5년의 전체 생존율에 대한 독자적 예후 인자로서 묘사되었다(Zhang et al., 2015b). 새로 진단된 다발 골수종에서의 MAGEA9의 존재는

더 짧은 전체 생존율과 연관이 있는 것으로 나타났다(van et al., 2011). MAGEA9는 BALB/c 마우스에서 수지상 세포 백신접종의 용도가 저용량 RENCA-MAGEA9 신장 세포 암종 이식의 거부를 초래하는 것으로 나타난, 신장 세포 암종 항원으로 묘사되었다(Herbert et al., 2010). MAGEA9는 웨티드 특이적 세포독성 세포주는 웨티드-함유 T2 세포 및 MAGEA9 발현 신장 세포 암종 세포주에 대해 높은 세포독성 활동도를 표시하는 것으로 나타났으며, 이것은 MAGEA9가 신장 세포 암종의 면역요법에 적합한 표적일 수 있음을 의미한다(Oehlrich et al., 2005). MAGEA9는 자궁암에서 가장 흔하게 발현되는 암 고환 항원의 하나로 나타났다(Risinger et al., 2007). MAGEA9는 MAGE 군의 구성원으로 묘사되었으며, 이는 고환 암에서 발현된다(Zhan et al., 2015). MAGEA9의 높은 발현은 대장암에서 정맥 침습 및 럼프절 전이와 연관이 있는 것으로 나타났다(Zhan et al., 2015). MAGEA9 발현은 대장암에서 더 낮은 생존율과 연관 있는 것으로 나타났으며, MAGEA9의 높은 발현은 대장암 환자에서 불량한 예후 인자로 묘사되었다(Zhan et al., 2015). 이리하여 MAGEA9는 대장암 치료에서 새로운 표적이 될 것으로 기대된다 (Zhan et al., 2015). MAGEA9 과발현은 상피 난소암, 침윤성 관성 유방암, 후두 편평세포 암종 및 간세포 암종에서 불량한 예후를 예측하는 것으로 나타났다(Gu et al., 2014; Han et al., 2014; Xu et al., 2014; Xu et al., 2015). MAGEA9는 후두 편평세포 암종, 침윤성 관상 유방암, 상피 난소암, 대장암 및 간세포 암종에서 상향 조절되는 것으로 나타났다(Gu et al., 2014; Han et al., 2014; Xu et al., 2014; Xu et al., 2015; Zhan et al., 2015).

[0163] MAGEA9B는 X 염색체 상에서 MAGEA9 단백질의 복제를 인코딩한다(RefSeq, 2002). 종양 제Ib기의 비소세포 폐암에서 MAGEA9B 발현은 환자 생존과 상관관계가 있다(Urgard et al., 2011).

[0164] MMP1은 기질 금속함유 단백분해효소(MMP)의 웨티드분해효소 M10군의 구성원을 인코딩한다. 이 군의 단백질은 배아 발육, 생식, 조직 리모델링과 같은 정상 생리적 과정은 물론 관절염과 전이와 같은 질병 과정에서 세포의 기질의 파괴에 관여한다(RefSeq, 2002). 다수의 저자들이 MMP 발현의 양상과 종양의 침윤 및 전이 가능성 사이의 양적 상관관계를 잘 보여준 바 있으며 다음이 포함된다: 직장암 및 위암, 폐 암종, 유방암, 난소암, 전립선암, 갑상선암 및 뇌종(Velinov et al., 2010). MMP1은 후두 편평세포 암종에서 종양 병기 의존 발현을 나타내는 바 이오마커로서 파악되었다(Hui et al., 2015). 말초 혈액에 상피 간엽 전환(CTC_EMT)이 있는 순환하는 종양 세포가 있는 유방암 환자의 경우, 종양 세포($p = 0.02$) 및 종양-연관 간질($p = 0.05$)에서의 MMP1의 발현은 CTC_EMT 가 없는 환자의 경우보다 유의하게 증가했다(Cierna et al., 2014). 마우스 모델에서는 MMP1 발현 및 분비가 종양 진행을 실질적으로 차단시키는 특이적 항-FGFR3 단클론성 항체에 의해 차단되었다(Du et al., 2014).

[0165] 기질 금속함유 단백분해효소(MMP) 군의 단백질들은 배아 발육, 생식, 조직 리모델링과 같은 정상 생리적 과정은 물론 관절염과 전이와 같은 질병 과정에서 세포의 기질의 파괴에 연루된다. 하지만 이 유전자에 의해 인코딩되는 효소는 본질적 분비 경로 내에서 퓨린에 의해 세포간 활성화된다. 또한 다른 MMP들에 반해, 이 효소는 알파 1-단백질 분해효소 억제제를 절단하며 세포의 기질의 구조 단백질을 약하게 열화시킨다(RefSeq, 2002). MMP-11은 스트로멜리신-3으로도 불려지며 MMP 초파에 속하는 스트로멜리신 하위 그룹의 구성원이고, 이는 암 세포, 기질 세포 및 주기의 미세환경에서 검출된 바 있다. MMP-11이 종양에 대해 이중 효과를 미치는 방식은 다르다. 한편으로는 MMP-11은 세포자멸사의 억제 및 암 세포의 이동 및 침윤을 강화함으로써 암 발육을 촉진시키는 반면 또 다른 면에서는 동물 모델에서 전이의 억제를 통해 암 발육에 대해 부정적 역할을 수행한다. 정상 대조군과 비교하여 암 환자의 혈청 및 위암, 유방암, 췌장암과 같은 복수의 종양 조직 검체에서 MMP-11의 과발현이 발견되었다(Zhang et al., 2016). MMP-11은 짹진 정상 점막보다 CRC 조직에서 mRNA 수준 및 단백질 수준으로 과발현되는 것이 잘 나타났다. 더욱이 MMP-11 발현은 CRC 럼프절 전이, 원격 전이 및 TNM 병기와 상관관계가 있었다(Tian et al., 2015). MMP-11 과발현은 상부 요로 상피암(UTUC) 및 요로 방광 요로상피세포 암종(UBUC)에서 공격적 종양 표현형과 불리한 임상적 결과와 연관되어 있으며, 이는 신규 예후 및 치료 표적이 될 수 있음을 시사한다(Li et al., 2016).

[0166] MXRA5는 기질 리모델링과 연관된 단백질 중 하나를 인코딩하며, 이는 7개의 류신이 풍부한 반복서열 및 폐를레 칸과 관련된 12개의 면역글로불린 유사 C2-유형 도메인을 함유한다(RefSeq, 2002). 중국에서의 연구에 의하면 비소세포 폐암에서 MXRA5가 두 번째로 가장 빈번히 변이되는 유전자로서 확인되었다(Xiong et al., 2012). 결장암에서, MXRA5는 과발현되는 것으로 나타났으며 조기 진단 및 그물막 전이에 대한 바이오마커로서 사용될 수 있다(Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

[0167] RAD54는 DEAD-유사 헬리케이스 상과에 속하는 단백질을 인코딩한다. 이것은 사카로미세스 세레비시아 RAD54 및 RDH54가 유사성을 공유하며, 이 두 가지 모두는 DNA의 상동성 재조합 및 수리에 관여한다. 이 단백질은 두 가닥 DNA에 결합하여 DNA 존재 하에서 ATPase 활성도를 나타낸다. 이 유전자는 고환과 비장에서 고도로 발현되는데, 이는 유사분열 및 감수분열 재조합에서 능동적 역할을 시사한다(RefSeq, 2002). RAD54B의 동종접합 돌연변이는

원발성 림프종과 결장암에서 관찰되었다(Hiramoto et al., 1999). RAD54B는 인간 종양 세포에서 RAD51의 dsDNA에 대한 직접적 결합의 계획 불안정화 영향을 상쇄시킨다(Mason et al., 2015).

[0168] ZFP42(DEX1로도 불림)는 줄기 세포 마커로서 사용되며 다능성 및 재프로그래밍에 필수적인 아연, 평거 단백질을 인코딩한다(Son et al., 2013; Mongan et al., 2006). ZFP42의 발현은 전립선암 세포와 신장 세포 암종에서 하향조절되지만 이와 반대로 편평세포 암종에서는 상향조절된다(Raman et al., 2006; Lee et al., 2010; Reinisch et al., 2011). ZFP42는 SOCS3 발현의 조절을 통해 JAK/STAT 신호전달 경로를 억제하며, 이는 세포 분화를 조절한다(Xu et al., 2008).

[0169] 면역 반응 자극은 숙주 면역계가 외부 물질로 인식하는 항원의 존재에 의존한다. 종양-연관 항원의 발견은 숙주의 면역계를 종양 성장에 개입하는데 사용할 가능성을 제기했다. 면역계의 체액성 및 세포성 지류를 이용하는 다양한 기전이 현재 암 면역 치료에서 탐색되고 있다.

[0170] 세포 면역 반응의 특정 요소들은 종양 세포를 특이적으로 인식하고 파괴할 수 있다. T 세포의 종양 침투 세포 군락 또는 말초 혈액에서의 분리는 이러한 T 세포가 암에 대해 자연 면역 방어로써의 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다. 시토졸에 자리잡은 단백질 또는 불완전 리보솜 생성물(DRIPS)에서 파생된 보통 8 내지 10개의 아미노산 잔기로 구성된 주조직적합 복합체(MHC)를 가진 웨티드의 클래스 I 분자를 인식하는 CD8 양성 T 세포는 특히, 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC-분자도 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지정된다.

[0171] "T-세포 반응"이란 특이적 증식과 시험관내 또는 생체내에서 유도되는 효과기 기능의 활성화를 의미한다. MHC 클래스 I 제한 세포 독성 T 세포의 경우, 효과기 기능이 웨티드 펠스, 웨티드 전조 펠스 또는 자연적 웨티드 제시 표적 세포들의 용해, 시토카인의 분비, 바람직하게는 웨티드에서 유도되는 인터페론 감마, TNF 알파, 또는 IL-2, 효과기 분자의 분비, 바람직하게는 웨티드에서 유도되는 그랜자임 또는 퍼로린 또는 탈과립일 수 있다.

[0172] "웨티드"란 용어는 여기서 이웃 아미노산의 알파 아미노와 카보닐 기 사이에 웨티드 결합으로 보통 서로 연결되는 일련의 아미노산 잔기를 지정하기 위해 사용한다. 웨티드는 아미노산 9개의 길이가 바람직하지만 아미노산 8개까지 짧을 수도 있고 10, 11, 12 또는 13개의 아미노산까지 길 수도 있으며, MHC 클래스 II 웨티드의 경우(본 발명의 웨티드의 연장된 변이) 그 길이가 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산일 수 있다.

[0173] 더욱이 "웨티드"라는 용어는 알파 아미노 기와 이웃 아미노산의 카보닐 기 사이의 웨티드 결합으로 보통 서로 연결되는 아미노산 잔기의 서열에 의한 염을 포함한다. 바람직하게는 이 염은, 예를 들어 염화물 또는 아세트산 염(삼분화 아세트산염)과 같은 약학적으로 허용되는 웨티드의 염이다. 본 발명에 따른 웨티드의 염은 웨티드가 생체내에서 염이 아니므로 생체내 상태의 웨티드와는 실질적으로 다르다는 점을 유의해야 한다.

[0174] "웨티드"라는 용어는 "올리고웨티드"도 포함한다. 본원에서 "올리고웨티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노 기와 카보닐 기 사이에서 일반적으로 웨티드 결합으로 연결되는, 아미노산 잔기를 지정하는데 사용된다. 본 발명에서 올리고웨티드의 길이는 올바른 에피톱이 유지되는 이상 중요하지 않다. 올리고웨티드는 일반적으로 30개 아미노산 보다 길이가 짧고, 15개 아미노산 보다 길다.

[0175] "폴리웨티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노 기와 카보닐 기 사이에서 일반적으로 웨티드 결합으로 연결되는, 일련의 아미노산 잔기를 지정하는데 사용된다. 본 발명에서 폴리웨티드의 길이는 정확한 에피톱들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 웨티드 또는 올리고웨티드와 다르게, 폴리웨티드는 약 30개 아미노산 잔기 이상의 문자를 가지고 있는 것을 언급한다.

[0176] 이런 문자의 웨티드, 올리고웨티드, 단백질, 또는 폴리뉴클레오티드 코딩은 면역 반응을 유도할 수 있으면 "면역성"(따라서 본 발명에서의 "면역원")이다. 본 발명의 경우, 면역성은 T 세포 반응을 유도하는 능력으로 특정하게 정의된다. 따라서, "면역원"은 면역 반응을 유도할 수 있는 문자이고, 본 발명의 경우, T 세포 반응을 유도할 수 있는 문자이다. 다른 양태에서, 면역원은 웨티드, 웨티드와 MHC의 복합체, 올리고웨티드 및/또는 특정 항체나 항체에 대한 TCR을 높이는데 사용되는 단백질일 수 있다.

[0177] 클래스 I T 세포 "에피톱"은 적당한 친화력을 가진 MHC/웨티드 혼합물에 결합하는 T 세포 수용체에 일치하는 T 세포에 의해 인식되는 삼항 혼합물(MHC 클래스 I 알파 쇄, 베타-2-미세글로불린 및 웨티드)을 생성하는 클래스 I 또는 II MHC 수용체에 결합하는 짧은 웨티드를 필요로 한다. MHC 클래스 I 문자에 결합하는 웨티드는 일반적으로 길이가 8 내지 14개 아미노산이며, 대개 일반적으로 길이가 9개 아미노산이다.

[0178] 인간에는 MHC 클래스 I 문자를 인코딩하는 3개의 유전자 부위가 있다(인간의 MHC 문자도 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지정된다(HLA)): HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, 및 HLA-A*07은 유전자 부위에서 발현할

수 있는 다른 MHC 클래스 I 대립형질의 예이다.

[0179] 표 1B는 HLA-A*02, HLA-A*24 및 가장 빈번한 HLA-DR 혈청형의 발현 빈도이다. 빈도는 Mori 등(Mori et al., 1997)으로부터 조정된 미국 인구 내에서의 일배체형 빈도 Gf로부터 유추되며, 하디-와인버그 공식 $F=1-(1-G_f)^2$ 를 사용한다. A*02 또는 A*24와 일부 HLA-DR 대립형질의 조합은 강화되거나 연관 불평형으로 인해 단일 빈도보다 덜 빈번할 수 있다. 자세한 내용은 Chanock 등을 참조한다(Chanock et al., 2004).

[표 1B]

대립형질	모집단	대립형질 빈도로부터 계산된 표현형
A*02	백인계(북미)	49.1%
A*02	미국 흑인(북미)	34.1%
A*02	아시아계 미국인(북미)	43.2%
A*02	중남미계(북미)	48.3%
DR1	백인계(북미)	19.4%
DR2	백인계(북미)	28.2%
DR3	백인계(북미)	20.6%
DR4	백인계(북미)	30.7%
DR5	백인계(북미)	23.3%
DR6	백인계(북미)	26.7%
DR7	백인계(북미)	24.8%
DR8	백인계(북미)	5.7%
DR9	백인계(북미)	2.1%
DR1	미국 흑인 (북미)	13.20%
DR2	미국 흑인 (북미)	29.80%
DR3	미국 흑인 (북미)	24.80%
DR4	미국 흑인 (북미)	11.10%
DR5	미국 흑인 (북미)	31.10%
DR6	미국 흑인 (북미)	33.70%
DR7	미국 흑인 (북미)	19.20%
DR8	미국 흑인 (북미)	12.10%
DR9	미국 흑인 (북미)	5.80%
DR1	아시아계 미국인 (북미)	6.80%
DR2	아시아계 미국인 (북미)	33.80%
DR3	아시아계 미국인 (북미)	9.20%
DR4	아시아계 미국인 (북미)	28.60%
DR5	아시아계 미국인 (북미)	30.00%
DR6	아시아계 미국인 (북미)	25.10%
DR7	아시아계 미국인 (북미)	13.40%
DR8	아시아계 미국인 (북미)	12.70%
DR9	아시아계 미국인 (북미)	18.60%
DR1	중남미계 미국인 (북미)	15.30%
DR2	중남미계 미국인 (북미)	21.20%
DR3	중남미계 미국인 (북미)	15.20%
DR4	중남미계 미국인 (북미)	36.80%
DR5	중남미계 미국인 (북미)	20.00%

[0181]

대립형질	모집단	대립형질 빈도로부터 계산된 표현형
DR6	중남미계 미국인 (북미)	31.10%
DR7	중남미계 미국인 (북미)	20.20%
DR8	중남미계 미국인 (북미)	18.60%
DR9	중남미계 미국인 (북미)	2.10%
A*24	필리핀	65%
A*24	러시아 네네츠인	61%
A*24:02	일본	59%
A*24	말레이시아	58%
A*24:02	필리핀	54%
A*24	인도	47%
A*24	대한민국	40%
A*24	스리랑카	37%
A*24	중국	32%
A*24:02	인도	29%
A*24	호주 서부	22%
A*24	미국	22%
A*24	러시아 사마라인	20%
A*24	남미	20%
A*24	유럽	18%

[0182]

[0183] 본 발명의 펩티드는 바람직하게는 본원에 설명한 바와 같이 본 발명의 백신에 포함되는 경우 A*02에 결합한다. 백신은 범-결합 MHC 클래스 II 펩티드를 포함할 수도 있다. 따라서, 본 발명의 백신은 A*02 양성인 환자의 암을 치료하는데 사용할 수 있는 반면, MHC 클래스 II 동종형에 대한 선택은 이 펩티드의 범-결합 성격으로 인해 필요하지 않다.

[0184]

본 발명의 A*02 펩티드가 다른 대립형질, 예를 들어 A*24와 결합하는 펩티드와 조합되는 경우, 모든 환자 모집단에서 MHC 클래스 I 대립형질 하나만을 취급하는 것에 비해 더 높은 비율의 치료가 가능하다. 대부분의 모집단에서 하나의 대립형질만으로는 환자의 50% 미만을 해결할 수 있는 반면, HLA-A*24 및 HLA-A*02로 구성된 백신은 일체의 관련있는 모집단에서 적어도 환자의 60% 치료가 가능하다. 구체적으로 환자의 다음 백분율은 다양한 지역에서 하나 이상의 이러한 대립형질에 대해 양성이 된다: 미국 61%, 서부 유럽 62%, 중국 75%, 한국 77%, 일본 86%(www.allelefrequencies.net의 자료로부터 계산됨).

[0185]

한 바람직한 구현에서 용어 "뉴클레오티드 서열"은 데옥시리보뉴클레오티드의 이성중합체를 언급한다.

[0186]

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

[0187]

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

[0188]

본원에 사용된 핵산 서열에 대한 언급에는 한 가닥 및 두 가닥 핵산 모두가 포함된다. 따라서, 예를 들어 DNA의 경우 특정 서열이란 문맥에서 달리 나타내지 않는 한, 이러한 서열의 단일 가닥 DNA, 보완이 있는 이러한 서열의 중복(이중 가닥 DNA) 및 이러한 서열의 보완을 언급한다.

[0189]

용어 "코딩 영역"은 자연적인 게놈 환경에서 유전자의 발현 생성물에 대해 자연스럽게 또는 정상적으로 코딩하는 유전자의 부분을 언급한다(즉, 유전자 본래의 발현 생성물에 대한 생체내 영역 코딩).

[0190]

코딩 영역은 비변이("정상적")이거나 변이 또는 개조된 유전자에서 찾을 수 있거나, 심지어는 DNA 서열, 또는 DNA 합성 기술을 보유한 제조업자에게 잘 알려진 방법을 사용해서 실험실에서 전적으로 합성된 유전자에서 찾을 수 있다.

- [0191] 용어 "발현 생성물"은 유전자의 자연 번역 생성물인 폴리펩티드 또는 단백질, 및 유전적 코딩 퇴화 및 이에 따른 동일 아미노산 코딩으로 인해 초래된 어떤 핵산 서열 코딩 생성물을 의미한다.
- [0192] 코딩 서열을 말할 때, 용어 "단편"은 발현 제품이 완전한 코딩 영역의 발현 생성물과 같은 생물학적 기능이나 활동을 유지하는 완전한 코딩 영역보다 적은 부분의 DNA를 언급한다.
- [0193] 용어 "DNA 분절"은 최소한 한번 이상의 상당히 순수한 형태로 분리된 DNA에서 유도된 단편의 형태, 또는 큰 DNA 구조의 구성 요소로서 DNA 중합체를 언급한다. 이때, 순수한 형태는 내인성 오염 물질이 없고 분절 및 표준 생화학 방법, 예를 들어, 복제 벡터에 따른 그 구성 요소 뉴클레오티드 서열의 식별, 조작 및 복구를 가능하게 하는 양 또는 농도를 언급한다. 이러한 분절은 일반적으로 전핵 생물 유전자에 존재하는 내부 비번역 서열, 또는 인트론에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공된다. 비번역 DNA 서열은 동일 서열이 코딩 영역의 조작이나 발현을 방해하지 않는 오픈 리딩 프레임의 하단에 나타날 수 있다.
- [0194] 용어 "프라이머"는 하나의 표준 DNA와 짹을 이를 수 있는 짹은 핵산 서열을 의미하며 DNA 폴리머라제가 데옥시리보뉴클레오티드 쇄 합성을 시작하는 자유 3'-OH 말단을 제공한다.
- [0195] 용어 "프로모터"는 모사를 시작하기 위한 RNA 폴리머라제의 결합에 관여하는 DNA 영역을 뜻한다.
- [0196] 용어 "단리"는 그 물질이 원래의 환경(예를 들어, 자연적으로 발생하는 경우에는 자연 환경)에서 제거되는 것을 뜻한다. 예를 들어, 자연 발생하는 살아있는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 분리되지 않지만, 자연계에서 공존하는 물질의 부분 또는 전체에서 분리되는 같은 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 제거된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 운송체 및/또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 부분이거나 폴리펩티드는 구성의 일부일 수 있으며, 이러한 벡터 또는 구성이 자연 환경의 일부가 아닐 때 여전히 분리될 수 있다.
- [0197] 본 발명에서 밝혀지는 폴리뉴클레오티드 및 재조합 또는 면역성의 폴리펩티드는 "순수한" 형태일 수도 있다. 용어 "정제"는 절대적인 순도를 필요로 하지 않는다. 오히려, 그것은 상대적인 정의를 의도하며, 관련된 당업자들이 이해하는 용어로써 상당히 정제된 제조 또는 부분적으로 정제된 제조를 포함할 수 있다. 예를 들어, cDNA 라이브러리에서 분리된 각각의 클론은 전기 영동 동일성으로 통상적으로 정제된다. 시작 물질 또는 자연 물질의 최소한 하나 이상의 순서, 바람직하게 2 내지 3개 순서, 더 바람직하게는 4 내지 5개 순서의 크기로 정제가 명시적으로 심사숙고된다. 또한 바람직하게는 중량 단위로 99.999%, 또는 최소한 99.99% 또는 99.9%; 심지어 바람직하게 99%보다 큰 순도를 가진 청구범위에 기재된 폴리펩티드는 명시적으로 심사숙고된다.
- [0198] 본 발명에서 밝혀진 핵산과 폴리펩티드 발현 생성물은, 이러한 핵산 및/또는 이러한 폴리펩티드를 가진 발현 벡터뿐만 아니라, "강화된 형태"일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "강화"는 물질의 농도가 최소한 그것의 자연적 농도(예를 들어)의 최소한 2, 5, 10, 100, 또는 1000배 정도이고, 유리하게는 0.01 중량%, 바람직하게는 최소한 약 0.1 중량% 정도임을 의미한다. 중량 단위로 약 0.5%, 1%, 5%, 10%, 및 20% 강화된 제조도 심사숙고된다. 서열, 구성, 벡터, 클론, 및 본 발명의 다른 물질들은 유리하게 강화된 또는 격리된 형태가 될 수 있다. 용어 "활성 단편"은, 예를 들어 토끼 또는 쥐 및 인간을 포함한 포유류 같은 동물에게 따로 또는 임의적으로 적당한 보조제와 함께 또는 매개체로서 투여했을 때 면역 반응(즉, 면역성 활동이 있는)을 생성하고 인간과 같은 수용 동물 내에서 T 세포 반응을 자극하는 형태로 면역 반응을 나타내는 웨피드, 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 단편을 의미한다. 그렇지 않으면, "활성 단편"은 또한 시험관내 T 세포 반응을 유도하기 위해서 사용될 수도 있다.
- [0199] 본원에 사용된 "부분", "분절" 및 "단편"이라는 용어는, 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 서열이 더 큰 서열의 하위 집합을 형성하는 경우 아미노산 잔기와 같은 잔기의 지속적인 서열을 언급한다. 예를 들어, 만약에 폴리펩티드가 트립신이나 키모트립신 같은 일반적인 엔도펩티다아제 치료를 받는다면, 그런 치료로 인해 생기는 올리고펩티드는 폴리펩티드의 시작 부분, 분절 또는 단편을 나타낼 것이다. 폴리뉴클레오티드와 관련해서 사용될 때, 이러한 용어들은 일반적인 엔도뉴클레아제 중 어떤 것과 함께 상기 폴리뉴클레오티드의 치료에 의해 생성된 생성물을 언급한다.
- [0200] 본 발명에 따라, 서열을 언급할 때 용어 "백분율 동일성" 또는 "백분율 동일한"은 설명되거나 명시된 서열("기준 서열")에 비교될 서열의 정렬 후("비교 서열") 서열이 명시된 또는 설명된 서열에 비교되는 것을 언급한다. 백분율 동일성은 하기 공식에 따라서 결정된다:
- [0201] 백분율 동일성 = $100 [1 - (C/R)]$
- [0202] 이때, C는 기준 서열과 비교 서열의 정렬의 길이에 비해 기준 서열과 비교 서열의 차이의 개수이되,

- [0203] (i) 비교 서열에서 상응하는 정렬된 염기 또는 아미노산이 없는 기준 서열에 각 염기 또는 아미노산,
- [0204] (ii) 기준 서열의 각 차이, 및
- [0205] (iii) 비교 서열의 정렬된 염기 또는 아미노산과 다른 기준 서열의 각 정렬된 염기 또는 아미노산이 차이를 구성하며,
- [0206] (iv) 정렬은 정렬된 서열의 위치 1에서 시작해야 한다.
- [0207] 그리고 R은 비교 서열과의 정렬의 길이에 대한 기준 서열 염기 또는 아미노산의 수이고 기준 서열에 생긴 공백도 염기 또는 아미노산 개수로 계산된다.
- [0208] 만약에 위에서와 같이 계산된 비교 서열과 기준 서열 사이의 백분율 동일성이 특정 최소 백분율과 같거나 더 크면 위에서 계산된 백분율 동일성이 특정 백분율 동일성보다 작은 경우에 정렬이 있더라도 비교 서열은 기준 서열에 대해 특정한 최소 백분율 동일성이 있다.
- [0209] 위에서 언급된 바와 같이, 본 발명은 서열번호 1 내지 288로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 펩티드, 또는 서열번호 1 내지 288에 대해 88% 상동성인 그 변이체, 또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체를 제공한다. 본 발명의 펩티드는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I의 분자에 결합하는 능력 또는 신장된 벼전의 상기 펩티드가 클래스 II에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0210] 본 발명에서, "상동"이라는 용어는 2개의 아미노산 서열, 즉, 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 일치 정도(위의 백분율 동일성 참조)를 일컫는다. 전술한 "상동"은 비교될 2개의 서열을 최적 상태에서 나란히 정렬하고 비교하여 결정된다. 이러한 서열 상동 관계는, 예를 들어 ClustalW 알고리즘을 이용하여 정렬을 만들어 계산할 수 있다. 일반적으로 사용이 가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 구체적으로 벡터 NTI, GENETYX 또는 다른 도구들은 공용 데이터베이스에서 제공된다.
- [0211] 이 분야의 당업자는 특정 펩티드의 변이체에 의해서 유도된 T 세포가 그 펩티드 자체와 교차 반응할 수 있을지를 평가할 수 있을 것이다(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).
- [0212] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"에 의해, 발명자들은 예를 들어, 1 또는 2개의 아미노산 잔기의 측쇄가 변경되어 그 펩티드가 여전히 서열번호 1 내지 서열번호 288의 아미노산 서열로 구성된 펩티드와 실질적으로 같은 방법으로 HLA 분자와 결합할 수 있음을 의미한다(예를 들어, 그들을 자연적으로 발생하는 다른 아미노산 잔기 또는 다른 측쇄로 서열번호 1 내지 서열번호 288로 구성된 군으로부터 선택된 본 발명에 따른 단일 또는 조합의 펩티드이다. 예를 들어, 펩티드 변형에 의해 HLA-A*02 또는 DR과 같은 적합한 MHC 분자의 결합 홈과 상호 작용하여 결합하는 능력이 향상되지 않으면 적어도 유지하고 마찬가지로 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력이 향상되지 않으면 적어도 유지할 수 있다.
- [0213] 이 T 세포는 그 결과로 본 발명의 한 양태에서 정의된 바 있는 동족의 펩티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응하고 이러한 세포를 죽일 수 있다. 과학 문헌 및 데이터베이스 (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)에서 얻을 수 있듯이, HLA 결합 펩티드의 특정한 위치는 전형적으로 HLA 수용기의 결합 모티프에 일치하는 핵심 고정 잔기이며, 이는 결합 홈을 이루고 있는 폴리펩티드의 극성, 전기 물리성, 소수성 및 공간적 특성에 의해 정의된다. 따라서, 이 분야의 당업자는 알려진 고정 잔기를 유지함으로써 서열번호 1 내지 서열번호 288에 정해진 아미노산 서열을 변형할 수 있고 이러한 변이체들이 MHC 클래스 I 또는 II 분자와 결합할 수 있는 능력을 유지할 수 있는지를 결정할 수 있어야 한다. 이 본 발명의 변이체는 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 유지하고, 이는 그 결과로 본 발명의 양태에서 동족의 펩티드라고 정의된 자연 아미노산 서열을 포함하고 있는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응을 하고 이 세포를 죽일 수 있다.
- [0214] 본원에서 밝혀진 본래 (변형되지 않은) 펩티드는 달리 언급되지 않는 이상 아마도 선택적인 다른 부위에서 펩티드 쇄의 부위의 하나 이상의 잔기의 치환에 의해 변형될 수 있다. 바람직하게, 이러한 치환은 아미노산 쇄의 말단에 위치한다. 그런 치환은, 예를 들어, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 보수적일 수 있다. 심지어 더 보수적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것 같이, 같거나 비슷한 크기와 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종족에서의 서열 변화의 연구에서, 특정 아미노산의 치환은 다른 것들보다 더 자주 용인되고 있으며, 이들은 본래의 아미노산과 치환 사이에서 크기, 전하, 극성, 및 소수성이 비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보존적 치환"을 정의하는데 기본이

된다.

- [0215] 본원에서 보존적 치환은 아래의 다섯 개 그룹 중 하나의 교환으로 정의된다: 그룹 1- 작은 지방성, 무극성 또는 약간 극성의 잔기(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 그룹 2- 극성, 음성 하전된 잔기와 그 아미드(Asp, Asn, Glu, Gln); 그룹 3- 극성, 양성 하전된 잔기(His, Arg, Lys); 그룹 4- 큰, 지방성, 무극성 잔기(Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 그룹 5- 큰, 방향족 잔기(Phe, Tyr, Trp).
- [0216] 몇 보존적 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 비슷한 성질이지만 크기가 어느 정도 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 아주 비보수적인 치환은 산성 아미노산을 극성, 또는 심지어 염기성 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수도 있다. 그러나, 이러한 "급진적" 치환은 화학적 작용이 완전히 예측 불가능하고, 급진적 치환은 단순한 화학 원리에서 예측 가능하지 않은 뜻밖의 발생이 있을 수 있기 때문에 효과가 없다고 기각할 수는 없다.
- [0217] 물론, 이런 치환은 일반적인 L-아미노산 외 다른 구조를 포함할 수 있다. 따라서, D-아미노산을 본 발명의 항원 펩티드에서 흔히 발견되는 L-아미노산으로 교체할 수 있고 여기에서 공개를 통해 계속 포함시킬 수 있다. 또한, 비표준 아미노산(즉, 흔히 자연적으로 발생하는 단백질성 아미노산이 아닌) 역시 본 발명에 따라 면역성과 면역성 폴리펩티드를 생산하기 위해서 치환될 수 있다.
- [0218] 아래에서 정의된 것과 상당히 동일하거나 더 큰 항원 활성이 있는 펩티드의 하나 이상의 위치에서 치환이 발견되면, 이러한 치환의 조합은 조합된 치환이 펩티드의 항원성에 추가적 효과 또는 시너지 효과의 결과를 내는지 결정하기 위해 시험된다. 최대, 펩티드에서 네 곳 이상의 위치에서 동시에 치환될 수 없을 것이다.
- [0219] 본 문서에서 명시한 바와 같이, 아미노산 서열로 필수적으로 구성된 펩티드는, 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I 또는 클래스-II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향 받음 없이 1 또는 2개의 비앵커 아미노산(앵커 모티프에 대해서는 아래 참조)이 교환되도록 할 수 있다. 또 다른 구현에서는, 본 문서에서 명시된 바와 같이 아미노산 서열로 필수적으로 구성된 펩티드에 있어서, 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I 또는 클래스-II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향받음 없이 1 또는 2개의 아미노산이 그에 대한 보존적 교환 파트너(다음을 참조)와 교환될 수 있다.
- [0220] T 세포 수용체와 상호작용하는데 상당히 기여를 하지 않는 아미노산 잔기들은 이와 결합됨으로써 T 세포의 반응성에 상당한 영향을 주지 않고 관련된 MHC와의 결합을 제거하지 않는 다른 아미노산과의 교체에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 주어진 조건 외에도, 본 발명의 펩티드는 아미노산 서열 또는 그 한 부분 또는 주어진 변이체를 포함하는(발명자들이 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다고 일컫는) 어떠한 펩티드가 될 수도 있다.

[0221]

[표 2]

서열번호 4, 13 및 15에 따른 웹티드의 변이체 및 모티프

위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
서열번호 4	V	L	F	G	E	L	P	A	L
변이체								V	
								I	
								A	
	M							V	
	M							I	
	M								
	M							A	
	A							V	
	A							I	
	A								
	A							A	
	V							V	
	V							I	
	V								
	V							A	
	T							V	
	T							I	
	T								
	T							A	
	Q							V	
	Q							I	
	Q								
	Q							A	
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
서열번호 15	G	L	P	S	A	T	T	T	V
변이체		I						L	
	I							I	
	I								
	I							A	
	M							L	
	M							I	
	M								
	M							A	
	A							L	
	A							I	

[0222]

	A							
	A						A	
	V						L	
	V						I	
	V							
	V						A	
	T						L	
	T						I	
	T							
	T						A	
	Q						L	
	Q						I	
	Q							
	Q						A	
위치	1	2	3	4	5	6	7	8 9
서열번호 13	R	L	H	D	E	N	I	L L
변이체							V	
							I	
							A	
	M						V	
	M						I	
	M							
	M						A	
	A						V	
	A						I	
	A							
	A						A	
	V						V	
	V						I	
	V							
	V						A	
	T						V	
	T						I	
	T							
	T						A	
	Q						V	
	Q						I	
	Q							
	Q						A	

[0223]

[0224] 더 긴 웨티드도 적합할 수 있다. 대개 길이가 8 내지 11개의 아미노산이지만, MHC 클래스 I 에피톱이 더 긴 웨티드로부터 처리되는 웨티드 또는 실제 에피톱을 포함하는 단백질에 의해 생성될 가능성이 있다. 실제 에피톱이 양측에 있는 장기는 처리 동안 실제 에피톱을 노출하는데 필요한 단백질 분해에 의한 분할에 상당한 영향을 주지 못하는 잔기이다.

[0225]

본 발명의 웨티드는 아미노산을 최대 4개까지 연장할 수 있는데 즉, 1, 2, 3 및 4개의 아미노산이 4:0과 0:4 사이에서 일체의 조합으로 양쪽 어디로든 추가될 수 있다. 본 발명에 따른 신장의 조합은 표 3에서 찾을 수 있다.

[0226]

[표 3]

본 발명의 펩티드들의 신장에 대한 조합

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

[0227]

[0228] 연장/신장을 위한 아미노산은 해당 단백질의 원래 서열의 펩티드나 기타 모든 아미노산일 수 있다. 연장은 펩티드의 안정성이나 용해성 강화를 위해 사용될 수 있다.

[0229]

따라서, 본 발명의 에피톱은 자연적으로 발생하는 종양-연관 또는 종양-특이적 에피톱과 동일하거나 실질상 동일한 항원적 활동력을 가지고 있는 한, 참조 펩티드와 비교 시 4개 이하의 다른 잔기를 가지고 있는 에피톱을 포함할 수 있다.

[0230]

대체의 구현에서, 펩티드는 한쪽 또는 양쪽으로 4개 이상의 아미노산, 바람직하게는 총 30개의 아미노산 길이만큼 연장된다. 이는 MHC 클래스 II 결합 펩티드를 초래할 수 있다. MHC 클래스 II에 대한 결합은 당업계에서 알려진 방법으로 시험할 수 있다.

[0231]

따라서, 본 발명은 MHC 클래스 I 에피톱의 펩티드와 변이체를 제공하며, 이때 펩티드 또는 변이체는 전체 길이가 8 내지 100개이며, 바람직하게는 8 내지 30개이며, 가장 바람직하게는 8 내지 14개이며, 이는 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개의 아미노산이다. 신장된 클래스 II 결합 펩티드의 경우 그 길이는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 아미노산일 수도 있다.

[0232]

물론, 본 발명에 따른 펩티드 또는 변이체는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖게 된다. 펩티드 또는 변이체의 MHC 복합체에 대한 결합은 당업계의 방법에 의해 시험할 수 있다.

[0233]

바람직하게는, 본 발명에 따른 특이적 펩티드의 T 세포가 치환 펩티드에 대해 시험될 때, 치환 펩티드가 배경에 상대적으로 세포 용해의 최대 증가의 절반을 달성할 때의 펩티드 농도는 약 1 mM 이하, 바람직하게 약 1 μ M 이하, 더 바람직하게 약 1 nM 이하, 여전히 더 바람직하게 약 100 pM 이하, 가장 바람직하게는 약 10 pM 이하이다. 치환 펩티드가 하나 이상, 최소 2개, 보다 바람직하게 3개의 개별 T 세포에 의해 인식되는 것 또한 바람직하다.

[0234]

본 발명의 특히 바람직한 구현에서, 펩티드는 서열번호 1 내지 서열번호 288에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 서열번호 1 내지 서열번호 288에 따른 아미노산 서열로 본질적으로 구성된다.

[0235]

"본질적으로 구성된"이란, 서열번호 1 내지 서열번호 288에 따른 서열 또는 변이체 외에도, 본 발명에 따른 펩티드가, MHC 분자 에피톱에 대한 에피톱으로 기능하는 펩티드의 한 부분을 반드시 형성하지 않는 아미노산의 추가적인 N- 및/또는 C-말단 위치 신장을 함유하는 것을 의미해야 한다.

[0236]

그럼에도 불구하고, 이러한 신장은 본 발명에 따른 펩티드의 세포 내로의 효율적인 도입에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현에서, 펩티드는 예를 들어 NCBI, GenBank 수탁번호 X00497에서 유도된 것처럼 HLA-DR 항원 결합 불변쇄(p33, 다음의 "Ii")의 80개 N-말단 아미노산을 포함하고 있는 융합 단백질의 일부이다. 다른 융합에서는, 본 발명의 펩티드는 항체에 의해 특이적으로 표적화될 수 있도록 본원에 설명된 상기 항체나 그 기능적 일부, 특히 항체의 서열에 대해 또는, 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체에 대해 또는 그 안으로 융합될 수 있다.

[0237]

추가적으로, 펩티드 또는 변이체는 안정성 및/또는 MHC 분자와의 결합성을 높여 더 강한 면역 반응을 일으킬 수 있도록 변형될 수 있다. 펩티드 서열의 최적화를 위한 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어 반대

펩티드 결합 또는 비-펩티드 결합을 도입하는 것이 있다.

[0238] 반대 펩티드 결합에서는 아미노산 잔기가 펩티드(-CO-NH-) 연결로 결합되어 있지 않으나 펩티드 결합이 반대로 되어있다. 이러한 역-인버스 펩티드 모방형 물질은 이 분야에서 잘 알려진 방법으로 생성될 수 있으며, 이 방법의 예는 이 문헌의 참조문헌으로 포함된 Meziere 등(1997)(Meziere et al., 1997)에 설명되어 있다. 이 방법은 백본의 변경을 포함하지만, 측쇄의 방향을 바꾸지 않는 유사펩티드를 만드는 것을 포함한다. Meziere 등(Meziere et al., 1997)은 MHC 결합과 T 조력 세포 반응에서 이 유사 펩티드가 유용하다는 것을 보여준다. CO-NH 대신에 NH-CO 결합을 포함하고 있는 레트로 역위 펩티드는 단백질 가수 분해에 대한 저항력이 훨씬 높다.

[0239] 비-펩티드 결합의 예는 -CH₂-NH, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, 및 -CH₂SO-이다. 미국 특허 4,897,445는 기본 과정을 거쳐 합성된 폴리펩티드와 아미노 알데히드와 아미노산을 NaCNBH₃ 존재 하에 반응시켜 생성된 비-펩티드 결합을 포함한 폴리펩티드 쇄의 비-펩티드 결합(-CH₂-NH)을 위한 고체상 합성의 방법을 제공한다.

[0240] 위에서 묘사된 서열로 구성된 펩티드는 안정성, 생물가용성, 및/또는 펩티드의 결합을 증가시키기 위해 추가적인 화학 기를 아미노 및 또는 카복시 말단에 결합할 수도 있다. 예를 들어, 카보벤족실, 단실, 또는 t-부틸옥시카보닐 기 등 소수성 기가 펩티드의 아미노 말단에 추가될 수 있다. 마찬가지로, 아세틸 기 또는 9-플루오레닐 메톡시-카보닐 기가 펩티드의 아미노 말단에 위치할 수도 있다. 또한, 소수성 기, t-부틸옥시카보닐, 또는 아미도 기 또한 펩티드의 카르복시 말단에 추가될 수 있다.

[0241] 또한, 본 발명의 펩티드는 입체적 배치를 변화시키기 위해 생성될 수도 있다. 예를 들어, 펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기의 D-이성질체가 보통의 L-이성질체 대신에 사용될 수도 있다. 더 나아가서, 본 발명의 펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기가 비자연적으로 발생하는 아미노산 잔기와 치환될 수도 있다. 이와 같은 변화는 안정성, 생물가용성, 및/또는 본 발명의 펩티드의 결합을 증가시킬 수 있다.

[0242] 유사하게, 본 발명의 펩티드 또는 변이체는 특정한 아미노산을 펩티드 생성 전 또는 후에 반응시킴으로써 화학적으로 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예는 이 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 이 문헌의 참조문헌에 포함되어 있는 문헌[R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004(Lundblad, 2004)]에 잘 묘사되어 있다. 아미노산의 화학 변형은 아실화, 아미딘화, 리신의 피리독실화, 환원성 알킬화 반응, 아미노산의 2,4,6-트라이니트로벤젠 살포화(TNBS)에 의한 트라이니트로벤질화, 카르복실 기의 아미드 변형 및 퍼포민산에 의한 살피드릴 변형, 시스틴의 시스테릭산으로의 산화, 머큐리얼 유도체 생성, 다른 티올 화합물과 다이설피드 생성, 말레이미드와의 반응, 요오드화 아세트산 또는 요오드 아세트아미드에 의한 카르복시메틸화, 및 알칼리성 pH에서 시안산 염에 의한 카르바모일화를 포함하지만 이에 국한되지 않은 변형을 언급한다. 이에 관해서, 더 광대한 단백질의 화학 변형에 대한 방법론에 대해서는 당업자는 (Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan 등 (John Wiley & Sons NY 1995-2000))(Coligan et al., 1995)의 15장을 참조하길 바란다.

[0243] 간단히 말하면, 예를 들어 단백질의 아르기닌 잔기는 흔히 페닐글리옥산, 2,3-부탄다이온 및 1,2-사이클로헥산다이온과 같은 이웃자리 디아카르보닐 화합물과의 반응에 근거하여 부가물을 형성한다. 다른 예는 메틸글로옥산과 아르기닌 잔기와의 반응이다. 시스테인은 리신과 히스티딘과 같은 다른 친핵성 부위의 동시 변형 없이 변형시킬 수 있다. 그 결과 다수의 시약들이 시스테인 변형에 사용 가능하다. Sigma-Aldrich(<http://www.sigma-aldrich.com>)와 같은 회사들의 웹사이트에서는 특정 시약에 관한 정보를 제공하고 있다.

[0244] 단백질에서 이황화 결합의 선택적 환원 또한 흔하게 나타난다. 단백질에서 이황화 결합은 생물약제의 열 처리 동안 형성되어 산화될 수 있다. 우드워드의 시약 K는 특정 글루탐산 잔기의 변형에 사용될 수 있다. N-(3-다이메틸아미노)프로필1)-N'-에틸카르보다이이미드를 사용하여 리신 잔기와 글루탐산 잔기 사이의 분자 내 가교를 형성할 수 있다. 예를 들어, 다이메틸파로카보네이트는 단백질에서 히스티딘 잔기의 변형을 위한 시약이다. 히스티딘은 4-하이드록시-2-노네날을 사용하여 변형시킬 수 있다. 리신 잔기와 다른 α -아미노 기의 작용은, 예를 들어, 펩티드의 표면 결합 또는 단백질/펩티드들의 가교에 유용하다. 리신은 폴리(에틸렌)글리콜의 부착 부위이며 단백질의 당화에서 중요 변형 부위이다. 단백질에서 메티오닌 잔기는, 예를 들어 요오도아세트아미드, 브로모에틸아민 및 클로르아민 T를 사용하여 변형시킬 수 있다.

[0245] 테트라나이트로메탄 및 N-아세틸이미다졸은 티로신 잔기의 변형에 사용할 수 있다. 다이티로신의 형성을 통한 가교 형성은 과산화 수소/구리 이온으로써 성취할 수 있다.

- [0246] 트립토판의 변형에 대한 최근의 연구에서는 N-브로모숙신이미드, 브롬화 2-하이드록시-5-니트로벤질 또는 3-브로모-3-메틸-2-(2-니트로페닐메르캅토)-3H-인돌(BPNS-스카톨)이 사용된 바 있다.
- [0247] PEG를 이용한 치료 단백질과 웨პ티드의 성공적인 변환은 하이드로겔 준비시 사용되는 단백질을 글루타르알데히드, 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트 및 포름알데히드와 교차 결합하는 동시 순환 반감기를 증가시키는 것과 흔히 관련되어 있다. 면역 치료를 위한 알레르겐의 화학적 변형은 종종 칼륨 시안산염의 카바밀화와 관련이 있다.
- [0248] 웨პ티드 또는 변이체, 이때 웨პ티드는 변환되었거나 비-웨პ티드 결합을 포함하는 것이 본 발명 구현에서 바람직하다. 일반적으로 웨პ티드와 변이체(적어도 웨პ티드 링크를 아미노산 잔기 사이에 포함하는 것들)는 고체상 웨პ티드 합성의 Fmoc-폴리아미드 모드에 의해 합성될 수 있으며, 이는 Lukas 등(Lukas et al., 1981) 및 여기에 인용된 참조문헌에 공개되어 있다. 일시적인 N-말단 기 보호는 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(Fmoc)에 의해 제공된다. 이렇게 염기 불안정한 보호기의 반복적인 절단은 N,N-다이메틸포름아미드의 20% 피페리딘을 이용하여 구성된다. 측쇄 기능은 부틸 에테르(세린, 트레오닌 및 티로신의 경우), 부틸 에스테르(글루탐산 및 아스파르트산의 경우), 부틸옥시카보닐 변이체(리신과 히스티딘의 경우), 트라이틸 변이체(아르기닌의 경우) 및 4-메톡시-2,3,6-트라이메틸벤젠술포닐 유도체(아르기닌의 경우)로서 보호될 수 있다. 글루타민 또는 아스파라긴이 C-말단의 잔기인 경우, 4,4'-다이메톡시벤즈하이드릴이 사용되어 측쇄 아미도 기능을 보호한다. 고체형 보조는 다이메틸아크릴아미드(백본-모노머), 비스아크릴로일에틸렌 다이아민(가교 결합) 및 아크릴로일사르코신 메틸 에스테르(기능 작용제)의 3개의 모노머로 만들어진 폴리다이메틸-아크릴아미드 중합체에 기반을 둔다. 웨პ티드 대 레진 절단가능 연결 작용제로 사용되는 것은 산-불안정 4-하이드록시메틸-페녹시아세트산 유도체이다. 모든 아미노산 유도체는 역 N,N-다이사이클로헥실-카보다이이미드/1-하이드록시벤조트라이아졸에 의한 커플링 과정에 의해 추가되는 아스파라진과 글루타민을 제외하고 미리 생성된 대칭의 무수물 유도체로서 추가된다. 모든 커플링과 탈보호 반응은 닌히드린, 트라이니트로벤젠 술폰산 또는 이소틴 실험 과정에 의해 모니터링된다. 합성 완료 시에, 웨პ티드는 레진 기반에서 50% 스캐빈저 믹스를 포함한 95% 트라이플루오로아세트산에 의한 측쇄 보호기 제거와 동시에 절단된다. 일반적으로 사용되는 스캐빈저로는 에탄다이티올, 페놀, 아니솔 및 물을 포함하고, 정확한 선택은 합성되는 웨პ티드에 포함되어 있는 아미노산에 따라 결정된다. 웨პ티드의 합성에 있어서 고체상과 액체상 방법의 결합 또한 가능하다(예를 들어, 문헌[Bruckdorfer et al., 2004] 및 이 문헌에 인용된 참고문헌 참조).
- [0249] 트라이플루오로아세트산은 진공 상태에서 증발된 후 다이에틸에테르에 의한 분쇄에 의해 제거되어 조(crude) 웨პ티드를 생성한다. 존재하는 일체의 스캐빈저는 수용액 상태에서 냉동건조에 의한 간단한 추출 과정에 의해 제거되어 스캐빈저가 없는 조 웨პ티드를 생성한다. 웨პ티드 합성의 시약은 일반적으로, 예를 들어 칼바이오켐-노바바이오켐(노팅힐)(Calbiochem-Novabiochem(Nottingham))으로부터 입수할 수 있다.
- [0250] 정제는 재결정화, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피 및 (보통) 예를 들어 아세토니트릴/물 구배 분리를 사용하는 역상 고성능 액체 크로마토그래피 등의 단일 방법 또는 이의 결합 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0251] 웨პ티드의 분석은 박막 크로마토그래피, 전기 영동법, 특히 모세관 전기 영동법, 고체상 추출법(CSPE), 고성능 역단계 액체 크로마토그래피, 산성 가수분해 후 아미노산 분석 및 고속 원자 폭격 질량 분석법 및 MALDI와 ESI-QTOF 질량 분석법 등에 의해 이루어질 수 있다.
- [0252] 본 발명의 웨პ티드의 동정을 위해, 약 3000개의 정상(건강한) 조직 샘플로부터 얻은 RNA 발현 데이터의 데이터베이스(Lonsdale, 2013)를 선별하여 생명유지 기관계에서 거의 발현이 부재하며 다른 중요 기관계에서는 발현이 낮은 유전자를 찾았다. 이어서, 이러한 유전자의 단백질 생성물로부터 유래된 암 관련 웨პ티드들을 여기서 설명된 XPRESIDENT™ 플랫폼을 사용한 질량분석법에 의해 동정했다.
- [0253] 과다제시된 웨პ티드를 선택하기 위해, 중간 샘플 제시는 물론 복제 변이를 보여주는 제시 프로파일이 계산된다. 이 프로파일은 관심 대상의 중양 개체 샘플을 정상 조직 샘플의 베이스라인에 병치된다. 그런 다음, 이 프로파일 각각에 대해 선형 혼합효과 모형의 p-값을 계산하고(Pinheiro et al., 2015) 오류 발견율(Benjamini and Hochberg, 1995)에 대한 복수의 검사를 조절함으로써 과다제시 점수에 통합될 수 있다(실시예 1 참고).
- [0254] 질량 분석에 의한 HLA 리간드의 동정 및 상대적 정량화를 위해, 충격동결된 조직 샘플에서 얻은 HLA를 정제하고 HLA-연관 웨პ티드를 확인했다. 확인된 웨პ티드는 분리하여 그 서열을 온라인 나노-전기분무-이온화(nanoESI) 액체 크로마토그래피-질량 분석(LC-MS) 실험에 의해 식별했다. 암 샘플(370명 기증자로부터의 N = 377 A*02-양성 샘플, N = 204 A*02-양성 샘플)로부터 기록된 자연적 중양-연관 웨პ티드(TUMAP)의 단편화 패턴을 동일한 서열을 가

진 상응하는 합성 참조 펩티드의 단편화 패턴과 비교하여, 얻어진 펩티드 서열을 확인했다. 이 펩티드는 원발성 종양의 HLA 분자의 리간드로서 직접 식별되기 때문에, 그 결과는 574명 암 환자로부터 수득된 원발성 암 조직에 대해 식별된 펩티드의 자연적 처리와 제시에 대한 직접적 증거를 제공한다.

- [0255] 발견 파이프라인 XPRESIDENT® v2.1(예를 들어, 전체가 여기에 포함되는 US 2013-0096016을 참고)은 몇 가지 다른 비암성 조직 및 기관에 비해 암 조직에 대한 HLA-제한 펩티드 수준의 직접적인 상대적 정량화를 기준으로 관련된 과다제시된 펩티드 백신 후보의 식별과 선택을 허용한다. 이는 서열 식별, 스펙트럼 집약화, 전화 이온 계수화, 정체 시간 정렬, 상태 디컨볼루션 및 정상화에 필요한 알고리즘을 조합시킨 독점 데이터 분석 파이프라인에 의해 처리하여 획득한 LC-MS 데이터를 사용한 비표지 차등 정량화의 개발에 의해 성취되었다.
- [0256] 펩티드와 샘플 각각에 대한 오류 측정치 등 제시 수준이 확립되었다. 종양 조직에 배타적으로 제시된 펩티드 및 종양에서 과다제시된 펩티드 대비 비암성 조직 및 기관이 식별된 바 있다.
- [0257] 원발성 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 및 CLL 샘플로의 HLA-펩티드 복합체를 정제했으며, HLA-관련 펩티드를 분리하여 LC-MS에 의해 분석했다(실시예 참조). 본 출원에 포함된 모든 TUMAP는 이러한 접근방식으로써 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, 및/또는 CLL 샘플 상에서 식별하여 이러한 종양 유형에 대한 제시를 확인했다.
- [0258] 복수의 종양 및 정상 조직에 대해 식별된 TUMAP를 비표지 LC-MS 데이터에 대한 이온-계수화를 사용하여 정량화했다. 이 방법은 펩티드의 LC-MS 신호 영역이 샘플에 과다한 존재와 상관관계가 있음을 가정한다. 다양한 LC-MS 실험에서 펩티드의 모든 정량적 신호들을 LS-MS 실험을 중심 경향에 근거하여 정상화하고 샘플 당 평균화하여 제시 프로파일이라 부르는 막대 도표에 통합시켰다. 이 제시 프로파일은 단백질 데이터베이스 검색, 스펙트럼 군락화, 충전 상태 디컨벌루션(방전) 및 시간 성격 및 정체 정상화와 같은 다른 분석 방법들을 통합시킨다.
- [0259] 더욱이, 발견 파이프라인 XPRESIDENT® v2.x를 사용하면 암 또는 다른 감염된 조직에서 MHC-, 바람직하게는 HLA-제약된 펩티드 수준의 직접 절대 정량화가 가능하다. 간단히 말하면 총 세포 수는 분석된 조직 샘플의 총 DNA 함량으로부터 계산되었다. 조직 샘플에서 TUMAP의 펩티드 총량은 자연 TUMAP에 대한 비율 및 소위 내부 표준으로 부르는 TUMAP의 동위원소 버전의 알려진 양으로서 나노 LC MS/MS에 의해 측정했다. TUMAP 분리의 효율은 TUMAP 분리 절차에서 가능한 가장 이른 시점에 모든 선택된 펩티드:MHC 복합체를 조직 용해물에 스파이킹하고, 펩티드 단리 절차의 완료 후 나노 LC-MS/MS에 의한 검출을 이용하여 결정했다. 총 세포수와 펩티드의 총량은 조직 샘플당 3회 측정으로부터 계산했다. 펩티드 특이적 분리 효율은 10회의 스파이킹 실험을 진행하고 매회마다 3회 측정을 통해 평균을 내어 계산했다(실시예 6 및 표 11 참조).
- [0260] 이러한 RNA 발현 및 질량 분석 데이터의 분석 조합을 통해 본 발명의 288개 펩티드가 밝혀졌다. 많은 경우 펩티드를 적은 수의 종양에서 식별되었다. 하지만 일상적 질량 분광 분석의 제한된 민감도로 인하여, RNA 데이터가 범위 추정에 대한 훨씬 나은 기반을 제공한다.
- [0261] 본 발명은 암/종양, 바람직하게는 본 발명의 펩티드를 과도하게 또는 배타적으로 제시하는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 및 CLL의 치료에 유용한 펩티드를 제공한다. 이 펩티드들은 원발성 인간 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, CLL 샘플 및/또는 PC 샘플의 HLA 분자에 의해 자연적으로 제시되는 것으로 질량 분석법에 의해 나타났다.
- [0262] 펩티드가 유래하는 근원 유전자/단백질("전장 단백질" 또는 "기저 단백질"로도 지정됨)의 다수는 근원 유전자에 대한 고도의 종양-연관을 표출하는 정상 조직과 비교해서 암에서 고도로 과발현되는 것으로 나타났다. 본 발명과 관련하여 "정상 조직"은 근원 유전자와의 높은 정도의 종양-연관성을 발휘하는 종양-상응 유형의 건강한 조직(간, 결장/직장, 뇌, 위, 식도, 폐, 췌장, 신장, 전립선, 난소, 피부, 유방 및 백혈구) 또는 기타 정상 조직 세포를 의미한다(실시예 2 참조). 게다가 펩티드 자체는 종양 조직에서 강력히 과다제시된다. 본 발명과 관련하여 "종양 조직"은 정상 조직상의 것이 아니라 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL을 앓는 환자의 샘플을 의미한다(실시예 1 참조).
- [0263] HLA-결합된 펩티드는 면역계 특히 T 립프구에 의해서 인식된다. T 세포는 인식된 HLA/펩티드 복합체를 제시하는 세포, 예를 들어 유도된 펩티드를 제시하는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, PC, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL의 세포를 파괴할 수 있다.

- [0264] 본 발명의 펩티드는 T 세포 반응을 자극할 수 있으며/거나 과다제시되는 것으로 나타났으므로, 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR, 예를 들어 용해성 TCR의 생산에 사용될 수 있다(실시예 3, 실시예 4 참조). 더욱이 해당되는 MHC와 복합된 펩티드는 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR 특히 sTCR의 생산에도 사용될 수 있다. 해당 방법들은 당업자에게 잘 알려져 있으며 해당 문헌에서도 찾을 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩티드는 환자의 종양 세포를 파괴할 수 있는 면역 반응을 생성하는데 유용하다. 환자의 면역 반응은 설명된 펩티드의 직접적인 투여 또는 면역성을 강화할 수 있는 제제(즉, 보조제)와 섞인 적당한 전조 물질(예를 들어, 연장된 펩티드, 단백질, 또는 이러한 펩티드를 인코딩하는 핵산)을 환자에게 투여하는 것으로 유도될 수 있다. 이런 치료 백신에서 생긴 면역 반응은 본 발명의 표적 펩티드가 비교가능한 복사 수로 정상 조직에서는 나타나지 않고, 환자의 정상 세포에 대한 기피되는 자기 면역 반응의 위험을 배제하기 때문에 종양 세포에 아주 특이적일 수 있다.
- [0265] 본 설명은 또한 알파 쇄 및 베타 쇄("알파/베타 TCR")를 구성하는 T 세포 수용체(TCR)에 관한 것이다. 또한 MHC 분자에 의해 제시될 경우 TCR 및 항체에 결합할 수 있는 펩티드가 제공된다. 본 설명은 또한 본 설명의 TCR 및 펩티드의 발현을 위한 핵산, 벡터 및 숙주 세포 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.
- [0266] "T 세포 수용체"(약자로 TCR)란 용어는 알파 폴리펩티드 쇄(알파 쇄) 및 베타 폴리펩티드 쇄(베타 쇄)로 구성된 이종이합체 분자를 칭하며 이종이합체 수용체는 HLA 분자에 의해 제시되는 펩티드 항원에 결합할 수 있다. 이 용어는 또한 소위 감마/델타 TCR도 포함한다.
- [0267] 한 구현에서 이 설명은 여기서 설명한 TCR 생산 방법을 제공하며 이 방법은 TCR의 발현 측진에 적합한 조건 하에서 TCR을 발현시킬 수 있는 숙주 세포의 배양으로 구성된다.
- [0268] 다른 양상에서 본 발명은 본 설명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원-제시 세포와 접촉시킴으로써 상기 항원이 적절한 항원-제시 세포 또는 인공 항원-제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자에 로딩되거나 항원/클래스 I 또는 II MHC 복합체 단량체를 사합체화함으로써 상기 항원이 클래스 I 또는 II MHC 사합체에 로딩된다.
- [0269] 알파/베타 TCR의 알파 및 베타 쇄, 및 감마/델타 TCR의 감마 및 베타 쇄는 일반적으로 각각 2개의 "도메인", 즉, 가변 및 불변 도메인을 갖는 것으로 간주된다. 가변 도메인은 가변 영역(V) 및 결합 영역(J)의 연속으로 구성된다. 가변 도메인은 선도 구역(L)도 포함할 수 있다. 베타 및 델타 쇄도 다양성 구역(D)을 포함할 수 있다. 알파 및 베타 불변 도메인은 알파 및 베타 쇄를 세포막에 고정시키는 C-말단 막횡단(TM) 도메인도 포함할 수 있다.
- [0270] 감마/델타 TCR에 대하여, 본원에 사용된 "TCR 감마 가변 도메인"이란 용어는 선도 영역(L) 없는 TCR 감마 V(TRGV) 구역의 연속을 지칭하며, TCR 감마 불변 도메인이란 용어는 세포의 TRGC 구역이나 C-말단 절두된 TRGC 서열을 지칭한다. 마찬가지로 "TCR 델타 가변 도메인"이란 용어는 선도 영역(L)이 없는 TCR 델타 V(TRDV) 영역 및 TCR 델타 D/J(TRDD/TRDJ) 영역의 연속을 지칭하며 "TCR 델타 불변 도메인"이란 용어는 세포의 TRDC 영역 또는 C-말단 절단 TRDC 서열을 지칭한다.
- [0271] 본 설명의 TCR은 바람직하게는 결합 친화성(KD)이 약 100 μM 이하, 약 50 μM 이하, 약 25 μM 이하, 또는 약 10 μM 이하로서 펩티드-HLA 분자 복합체에 결합한다. 더욱 바람직하게는 약 1 μM 이하, 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하의 결합 친화성을 갖는 고친화성 TCR이다. 본 발명의 TCR에 대한 바람직한 결합 친화성 범위의 비제한적 실례에는 약 1 nM 내지 약 10 nM; 약 10 nM 내지 약 20 nM; 약 20 nM 내지 약 30 nM; 약 30 nM 내지 약 40 nM; 약 40 nM 내지 약 50 nM; 약 50 nM 내지 약 60 nM; 약 60 nM 내지 약 70 nM; 약 70 nM 내지 약 80 nM; 약 80 nM 내지 약 90 nM; 및 약 90 nM 내지 약 100 nM이 포함된다.
- [0272] 본 설명의 TCR과 관련하여 본원에 사용된, "특이적 결합" 및 이의 문법적 변형들은 펩티드-HLA 분자 복합체의 결합 친화성(KD)이 100 μM 이하인 TCR을 의미한다.
- [0273] 본 발명의 알파/베타 이종이합체는 그 불변 도메인 사이에 개입된 이황화 결합이 있을 수 있다. 이 유형의 바람직한 TCR에는 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 서열이 있는 것들을 포함하지만, TRAC의 Thr 48 및 TRBC1 또는 TRBC2의 Ser 57은 시스테인 잔기에 의해 교체되고, 상기 시스테인은 TRAC 불변 도메인 서열과 TCR의 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 서열 사이에 이황화 결합을 형성한다.
- [0274] 위에서 언급된 도입된 쇄간 결합의 유무와 무관하게, 본 설명의 알파/베타 이종이량체 TCR은 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 서열을 가질 수 있으며, TCR의 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 서열은 TRAC의 엑손 2의 Cys4와 TRBC1 또는 TRBC2의 엑손 2의 Cys2 사이의 기본 이황화 결

함에 의해 연결될 수 있다.

[0275] 본 설명의 TCR은 방사선핵종, 형광단 및 비오틴으로 구성된 군으로부터 선택된 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 본 설명의 TCR은 방사성핵종과 같은 치료적으로 활성인 제제, 화학요법 제제 또는 독소에 결합할 수 있다.

[0276] 한 구현에서, 알파 쇄에서 하나 이상의 돌연변이를 갖고/거나 베타 쇄에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 본 발명의 TCR이 돌연변이되지 않은 TCR에 비해 변형된 글리코실화를 갖는다.

[0277] 한 구현에서, TCR 알파 쇄 및/또는 TCR 베타 쇄에서 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 TCR의 웨티드-HLA 분자 복합체에 대한 결합 친화성 및/또는 결합 반감기가 돌연변이되지 않은 TCR 알파 쇄 및/또는 돌연변이되지 않은 TCR 베타 쇄을 포함하는 TCR의 그것보다 적어도 2배이다. 종양-특이적 TCR의 친화성-강화 및 이의 이용은 최적의 TCR 친화성에 대한 윈도우의 존재에 의존한다. 그러한 윈도우의 존재는 HLA-A2-제약된 병원체의 KD 값이 HLA-A2-제약된 종양 관련 자가-항원에 비해 일반적으로 약 10배라는 관찰에 근거한다. 종양 항원이 면역원성의 잠재성을 갖더라도, 종양이 개인 자신의 세포로부터 발생하기 때문에, 돌연변이된 단백질이나 변형된 면역 처리를 갖는 단백질만이 면역계에 의해 이물질로 보여지는 것으로 현재 알려져 있다. 상향조절되거나 과발현된 항원(소위 자가-항원)이 종양에 대해 기능적 면역 반응을 반드시 유도하지는 않을 것이다. 이러한 항원에 대해 반응성이 높은 TCR을 발현하는 T 세포는 자가-항원에 대해 낮은 친화성의 TCR을 가진 T 세포만 남는다는 의미로 알려진 중추 내성의 과정에서 흥선 내에서 부정적으로 선택되었을 것이다. 따라서, 본 발명의 TCR 또는 변이체의 본 발명에 따른 웨티드에 대한 친화성은 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 강화시킬 수 있다.

[0278] 본 설명은 또한 본 발명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 HLA-A*02-음성의 건강한 공여자로부터 PBMC를 A2/웨티드 단량체로써 배양하는 단계, PBMC를 사합체-파이코에리스린(PE)으로써 배양하는 단계, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포를 단리하는 단계를 포함한다.

[0279] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 단리에 관한 것으로, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 수집물을 발현하는 전체 인간 TCR $\alpha\beta$ 유전자 자리들(1.1 및 0.7 Mb)로써 유전자이식 마우스의 획득, 관심 대상의 웨티드에 의한 마우스의 백신접종, 유전자이식 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-홍조(PE)에 의한 배양, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 단리를 포함한다.

[0280] 한 양태에 있어서, 본 설명의 TCR을 발현하는 T 세포를 취득하기 위해, 본 발명의 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇄를 인코딩하는 핵산을 감마 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 발현 벡터로 클로닝한다. 이 재조합 바이러스를 생성한 다음 항원 특이성 및 기능적 결합성과 같은 기능성에 대해 검사한다. 다음 최종 생성물의 일정 부분을 사용하여 표적 T 세포 군락(일반적으로 환자 PBMC로부터 정제됨)을 형질도입하며, 이는 확장된 다음 환자에게 주입한다.

[0281] 다른 양태에 있어서, 본 설명의 TCR을 발현하는 T 세포를 취득하기 위해, TCR RNA는 당업계에서 알려진 기법으로, 예를 들어 시험관내 전사 시스템에서 합성한다. 다음, 시험관내에서 합성된 TCR RNA를 건강한 공여자로부터 얻은 원발성 CD8+ T 세포에 전기천공에 의해 도입함으로써 종양-특이적 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇄를 재발현 시킨다.

[0282] 발현의 증가를 위해, 본 설명의 TCR을 인코딩하는 핵산은 강력한 프로모터에 작동가능하게 연관시킬 수 있으며, 이는 레트로바이러스 긴 말단 반복(LTR), 거대세포 바이러스(CMV), 마우스 줄기세포 바이러스(MSCV) U3, 포스포글리세르산 인산화효소(PGK), β -액틴, 유비퀴틴 및 원숭이 바이러스 40(SV40)/CD43 복합 프로모터, 연장 인자(EF)-1a 및 비장 병소 형성 바이러스(SFFV) 프로모터 등이다. 바람직한 구현에서, 이 프로모터는 발현 중인 핵산에 대해 이종이다.

[0283] 강력한 프로모터 외에도, 본 설명의 TCR 발현 카세트에는 이식 유전자 발현을 강화시킬 수 있는 추가의 요소들이 포함될 수 있으며, 이는 렌티바이러스성 구성의 핵 전위를 촉진하는 중앙 폴리퓨린 트랙(cPPT)(Follenzi et al., 2000), 및 RNA 안정성의 증가를 통해 이식 유전자 발현의 수준을 증가시키는 wPRE(우드체 간염 바이러스 전사 후 조절 요소)(Zufferey et al., 1999) 등을 포함한다.

[0284] 본 발명의 TCR의 알파 및 베타 쇄는 별개의 벡터에 위치한 핵산에 의해 인코딩할 수 있거나 동일한 벡터에 의한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩 할 수 있다.

[0285] 고수준의 TCR 표면 발현의 성취는 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄가 고수준으로 전사되는 것을 요구한다. 이를 위해서는, 본 설명의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄가 단일 벡터에서 비시스템트로닉 구성으로 클로닝 될 수 있으며, 이는 이러한 장애물을 극복할 수 있는 것으로 나타난 바 있다. TCR-알파 및 TCR-베타 쇄 사이에

있는 바이러스성 내부 리보좀 엔트리 부위(IRES)를 사용하는 경우 두 쇄의 발현 조정을 초래하는데, 이는 번역 동안 2개의 단백질로 분해되는 단일 전사물로부터 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄가 생성됨으로써 동일한 몰 비율의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄가 생성되도록 보장하기 때문이다(Schmitt et al., 2009).

[0286] 본 설명의 TCR을 인코딩하는 핵산은 코돈의 최적화를 통해 숙주 세포의 발현을 증가시킬 수 있다. 유전 부호의 중복성으로 인해 일부 아미노산은 하나보다 많은 코돈에 의해 인코딩이 가능하지만, 특정 코돈은 다른 것보다 덜 "최적"인데 이는 tRNA는 물론 다른 인자의 짹짓기에 대한 상대적 가용도 때문이다(Gustafsson et al., 2004). 각 핵산이 포유류 유전자 발현을 위해 최적의 코돈에 의해 인코딩되도록 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 서열의 변형은 물론 mRNA 불안정성 모티프 또는 잠적 스플라이스 부위의 제거는 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 발현을 유의하게 강화시키는 것으로 나타났다(Scholten et al., 2006).

[0287] 더욱이 도입된 TCR 쇄에 따라 내인성 TCR 쇄 사이의 틀린 짹짓기는 자가 면역에 대해 상당한 위험을 제기하는 특이성의 획득을 초래할 수 있다. 예를 들어, 혼합 TCR 이합체의 형성은 제대로 짹짓기된 TCR 복합체의 형성에 가용한 CD3 분자의 수를 감소시킬 수 있으며, 이에 따라, 도입된 TCR을 발현하는 세포의 기능적 결합성을 유의하게 감소시킬 수 있다(Kuball et al., 2007).

[0288] 잘못된 짹짓기를 감소시키려면, 본 설명의 도입된 TCR 쇄의 C-말단 도메인을 변형하여 쇄간 친화성을 촉진시킬 수 있는 반면, 내인 TCR과 도입된 쇄의 짹짓기 능력을 감소시킬 수 있다. 이러한 전략에는 인간 TCR-알파 및 TCR-베타 C-말단 도메인의 상응하는 마우스 도메인에 의한 교체(마우스 C-말단 도메인); 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄 모두에 두 번째 시스테인 잔기를 도입하여 C-말단 도메인에서 두 번째 쇄간 이황 결합의 생성(시스테인 변형); TCR-알파 및 TCR-베타 쇄 C-말단 도메인에서 상호작용하는 잔기들의 교환("눕-인-홀(knob-in-hole)"); 및 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄의 가변 도메인의 CD3 ζ 에 대한 직접 융합(CD3 ζ 융합)이 포함될 수 있다(Schmitt et al., 2009).

[0289] 한 구현에서는, 숙주 세포를 본 설명의 TCR을 발현하도록 공학적으로 조작한다. 바람직한 구현에서는, 이 숙주 세포가 인간 T 세포 또는 T 전구세포이다. 일부 구현에서는 T 세포 또는 T 전구 세포를 암 환자로부터 얻는다. 다른 구현에서는 T 세포 또는 T 전구 세포를 건강한 공여자로부터 얻는다. 본 설명의 숙주 세포는 치료하려는 환자에 대해 동종이거나 자가일 수 있다. 한 구현에서, 이 숙주는 감마/델타 T 세포 변형을 통해 알파/베타 TCR을 발현한다.

[0290] "약학 조성물"이란 의학적 환경에서 인간에게 투여하는데 적합한 조성물이다. 바람직하게는, 약학 조성물은 무균이며 GMP 지침에 따라 생산된다.

[0291] 약학 조성물은 유리 형태 또는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 된 웨티드를 포함한다(상기 내용도 참조). 본원에 사용된 "약학적으로 허용가능한 염"은 웨티드가 산 또는 제제의 염기 염을 만들며 변형되는 공개된 웨티드의 유도체를 언급한다. 예를 들어, 산성 염은 적당한 산과의 반응을 가진 자유 염기(일반적으로 중성 NH₂ 기가 있는 약물의 중성 형태)로부터 제조된다. 산성 염을 준비할 때 적당한 산은, 예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산과 같은 같은 무기산뿐만 아니라 초산, 프로피온산, 클리콜산, 피루브산, 수산, 말산, 말론산, 호박산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 벤조산, 계피산, 맨델릭산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산과 같은 유기산을 포함한다. 반대로, 웨티드에서 나타날 수 있는 산성 잔기의 염기 염의 제조는 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 암모늄, 수산화 칼슘, 트라이메틸아민과 같은 약학적으로 허용가능한 염기를 사용한다.

[0292] 특별히 바람직한 약학 조성물의 구현은 초산(아세트산염), 삼불화 초산 또는 염산(염화물)의 염으로서 웨티드를 포함한다.

[0293] 바람직하게는, 이 본 발명의 약제는 백신과 같은 면역요법제이다. 이는 환자의 영향을 받은 기관에 직접적으로 투여될 수 있거나 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.로서 전체적으로 투여되거나 환자에게서 또는 나중에 환자에게 투여될 인간 세포주에 생체외로 적용될 수도 있거나 나중에 환자에게 다시 투여될 선택된 면역 세포의 부분 집단에 시험관내로 사용될 수도 있다. 만약 핵산이 시험관내에서 세포에 투여되면, 인터루킨-2와 같은 면역 유도 시토카인과 함께 발현되는 것이 유용할 수도 있다. 웨티드는 상당히 순도가 높을 수도 있고, 또는 면역 유도 보조제(아래 참조)와 결합되어 있거나 면역-유도 시토카인과 함께 합성체로 사용되거나, 리포좀과 같은 적당한 전달 체계와 함께 투여될 수도 있다. 웨티드는 또한 키홀 임펫 해모시아닌(KLH) 또는 만난과 같은 적절한 담체와 접합시킬 수도 있다(WO 95/18145 및 문헌[Longenecker et al., 1993] 참고). 웨티드는 표지를 붙일 수도 있으며 융합 단백질일 수 있고 하이브리드 분자일 수도 있다. 본 발명에서 그 서열이 제공된 웨티드는 CD4 또는

CD8 T 세포를 자극할 것으로 기대된다. 하지만 CD8 세포의 자극은 CD4 보조 T 세포에 의해 제공되는 도움이 존재할 때 더 효율적이다. 따라서, CD8 T 세포를 자극하는 MHC 클래스 I 에피톱의 경우, 융합 파트너 또는 하이브리드 분자의 섹션은 CD4-양성 T 세포를 자극하는 에피톱을 적절하게 제공한다. CD4-와 CD8-자극 에피톱은 이 분야에서 잘 알려졌고 본 발명에서 식별된 것들을 포함한다.

[0294] 한 양태에서, 이 백신은 서열번호 1 내지 서열번호 288을 명시하는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 펩티드 및 하나 이상의 추가적인 펩티드, 바람직하게는 2개 내지 50개이고, 더 바람직하게는 2 내지 25개이며, 보다 더 바람직하게는 2개 내지 20개이고, 가장 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개의 펩티드를 포함한다. 펩티드는 하나 이상의 특정한 TAA에서 유도되었고 이는 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합할 수 있다.

[0295] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 펩티드 또는 펩티드 변이체를 인코딩하는 핵산(예를 들어, 폴리뉴클레오티드)에 대한 정보를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이의 결합일 수 있으며, 한 가닥 및/또는 이중 쇄로 되어 있을 수 있고, 또는 본래의 형태일 수도 있거나, 예를 들어 포스포로 티오에이트 백본을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드의 안정화된 형태로 되어 있을 수도 있으며, 펩티드를 코딩하는 한 인트론을 포함할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 물론, 단지 자연적으로 일어나는 아미노산 잔기로 구성된, 및 자연적으로 일어나는 펩티드 결합에 의해 결합된 펩티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해서 인코딩될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터에 대한 설명을 제공한다.

[0296] 특히 DNA와 같은 폴리뉴클레오티드를, 벡터, 예를 들어 보완 응집성 말단을 이용하여 연결하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들어, 보완 동종종합체 트랙트가 DNA 조각에 추가되어 이를 벡터 DNA에 삽입할 수 있다. 벡터와 DNA 조각은 이후 보완 동종종합체 꼬리와 함께 수소 결합을 이용하여 재조합 DNA 분자를 생성할 수 있다.

[0297] 하나 이상의 제한 부위를 포함하는 합성된 연결부위는 DNA 분절과 벡터를 결합하는 다른 방법을 제시한다. 여러 가지의 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는 합성 연결부위는 상업적으로 International Biotechnologies Inc(New Haven, CN, USA)를 비롯한 곳에서 구입이 가능하다.

[0298] 본 발명에서 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA를 변형하는 바람직한 방법은 다음의 Saiki RK 등에 의하여 공개된 폴리미라제 연쇄 반응을 이용한다(Saiki et al., 1988). 이 방법은, 예를 들어 적당한 제한 부위를 만들어 적당한 벡터로 DNA를 도입하는데 사용하거나 당업계에서 알려져 있는 DNA를 다른 유용한 용도를 위해 변형하는데 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용된다면, 수두 벡터 또는 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.

[0299] DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우, RNA)는 그 후 적당한 숙주에서 발현되며 이는 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 가지고 있는 폴리펩티드를 생성한다. 따라서, 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 DNA는 알려진 기술과 여기에서 배울 수 있는 것을 고려하여 적절히 수정하여 적절한 숙주 세포를 본 발명의 폴리펩티드를 발현하고 생성하도록 형질전환시키는 데 사용된다. 이러한 기법은, 예를 들어 다음에 공개되어 있다: 미국 특허 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075 및 4,810,648.

[0300] 본 발명의 화합물을 만드는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우, RNA)는 많은 종류의 다른 DNA 서열과 결합되어, 적절한 숙주로의 도입을 유도할 수 있다. 동반 DNA는 숙주의 특성, DNA를 숙주로 도입하는 방법 및 에피솜 유지 또는 통합이 필요한지에 따라 결정될 것이다.

[0301] 보통, DNA는 발현을 위한 올바른 방향 및 올바른 리딩 프레임에 맞추어 플라스미드와 같은 발현 벡터로 삽입된다. 필요할 경우, DNA는 바람직한 숙주에 의해 인식되는 적당한 전사 조절 제어 뉴클레오티드 서열(하지만, 이제어는 대부분의 경우 발현 벡터 내에 이미 존재한다)에 연결될 수도 있다. 벡터는 그 후 숙주로 기본적인 기술을 통해 도입된다. 보통, 모든 숙주가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 세포를 선택하는 것이 필요할 것이다. 하나의 선택 기술은 형질전환된 세포에서 선택이 가능한 특성(예: 항생제 내성)을 코딩하는 DNA 서열을 필요한 제어 요소와 함께 발현 벡터에 통합시키는 것이다.

[0302] 다른 방법으로는, 이러한 선택이 가능한 특성이 다른 벡터에 있을 수도 있으며, 이는 바람직한 숙주 세포를 동시-형질전환하는데 사용된다.

[0303] 발명의 재조합 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 문서에서 기술된 내용을 고려하여 당업자가 이미 알고 있

는 적절한 상태에서 충분한 시간 동안 배양되어 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하며, 이는 후에 회복된다.

[0304] 박테리아(예를 들어, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)와 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류(예를 들어, 아스페길러스 스피시즈(*Aspergillus spec.*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포 등의 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직하게는, 그 체계는 ATCC Cell Biology Collection에서 구할 수 있는 CHO 세포 등의 포유류 세포로 구성될 수 있다.

[0305] 구조성 발현을 위한 전형적인 포유류 세포 벡터 플라스미드는 CMV 또는 SV40 촉진제와 적당한 폴리 A 꼬리 및 네오마이신과 같은 저항성 마커를 포함한다. 하나의 예는, Pharmacia(Piscataway, NJ, USA)에서 구할 수 있는 pSVL이다. 유도가능 포유류 발현 벡터의 예는 pMSG이며 이 또한 Pharmacia에서 구할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 벡터는 pRS403-406과 pRS413-416이며 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems(La Jolla, CA 92037, USA)에서 구할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효소 통합 플라스미드(YIps)이며 이는 효소 선택 마커 HIS3, TRP1, LEU2와 URA3을 통합한다. 플라스미드 pRS413-416은 효소 동원체 플라스미드(Ycps)이다. (예를 들어, Sigma-Aldrich로부터 입수한) CMV 프로모터 기반 벡터는 일시적인 또는 안정된 발현, 세포질 발현 또는 분비, 및 FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT 등의 다양한 조합으로 N-말단 또는 C-말단 표지 등을 제공한다. 이러한 융합 단백질은 재조합 단백질의 검출, 정제와 분석을 가능하게 한다. 이중 표지 융합은 검출 시 유연성을 제공한다.

[0306] 강한 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 조절 영역은 구성 단백질 발현 수준을 높기는 COS 세포에서 1 mg/L까지 작동한다. 좀 더 효능이 약한 세포주에서는, 단백질 수준이 전형적으로 약 0.1 mg/L 정도이다. SV40 복제 원점의 존재는 SV40 복제를 가능하게 하는 COS 세포에서 높은 수준의 DNA 복제를 야기한다. CMV 벡터는, 예를 들어 박테리아 세포에서의 복제를 위한 pMB1 원점, 박테리아에서 암피실린 저항 선택을 위한 b-락타마제 유전자, hGH poly A, 및 f1 원점을 포함할 수 있다. 프리프로트립신 리더(PPT) 서열을 포함하는 벡터는 FLAG 융합 단백질을 ANTI-FLAG 항원, 레진, 및 플레이트를 사용하여 정제하기 위한 배양 배지로 분비하도록 방향을 정할 수가 있다. 다른 벡터와 발현 체계는 여러 가지의 숙주 세포 사용에 대해 널리 알려져 있다.

[0307] 다른 구현에서는 본 발명의 2개 이상의 펩티드나 펩티드 변이체가 인코딩됨으로써 연속적인 순서로 발현된다("염주 모양" 구조와 유사). 그렇게 함으로써 펩티드나 펩티드 변이체는, 예를 들어 LLLLLL과 같은 링커 아미노산의 껴짐에 의해 함께 연결 또는 융합될 수 있으며 또한 그 사이에 추가의 펩티드 없이 연결될 수 있다. 이러한 구성들은 암 요법에서도 사용할 수 있으며 MHC I 및 MHC II 모두가 연관되는 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0308] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 벡터 구성에 의해 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵 세포이거나 진핵 세포일 수 있다. 박테리아 세포가 몇몇의 상황에서 바람직한 원핵 숙주 세포일 수 있으며, 보통 Bethesda Research Laboratories Inc.(Bethesda, MD, USA)에서 구할 수 있는 에스케리치아 콜라이균주 DH5, 그리고 American Type Culture Collection(ATCC)(Rockville, MD, USA)(No ATCC 31343)에서 RR1이 입수가능하다. 바람직한 진핵 숙주 세포는 효소, 곤충, 포유류 세포를 포함하고, 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유아세포와 대장 세포주 등의 척추 동물이 바람직하다. 효모 숙주 세포는 YPH499, YPH500 및 YPH501을 포함하며, 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems(La Jolla, CA 92037, USA)에서 구입이 가능하다. 바람직한 포유류 숙주 세포는 ATCC에서 구입이 가능한 CCL61로 알려져 있는 중국 햄스터 난소 세포, CRL 1658로 알려져 있는 스위스 생쥐 배아 세포 NIH/3T3, CRL 1650 세포로 알려져 있는 원숭이 신장-유도 COS-1 세포와 293 세포로 알려져 있는 인간 배아 신장 세포를 들 수 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이며 이는 배클로바이러스 발현 벡터에 의해 세포로 감염될 수 있다. 발현을 위한 적당한 숙주 세포의 선택에 대한 개관은 예를 들어 문헌 [Paulina Balbas and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9] 및 당해 분야의 숙련자에게 알려진 다른 문헌에서 찾을 수 있다.

[0309] 적당한 세포 숙주를 본 발명의 DNA 구성으로 형질전환하는 것은 보통 사용되는 벡터의 유형이 따라 결정되는 잘 알려진 방법으로 완성된다. 원핵 숙주 세포의 형질전환에 대해서는, 예를 들어 Cohen 등(Cohen et al., 1972) 및 문헌[Green and Sambrook, 2012]을 참조한다. 효모 세포의 형질전환은 Sherman 등에 설명되어 있다(Sherman et al., 1986). Beggs의 방법(Beggs, 1978) 또한 유용하다. 척추 동물 세포와 관련하여 이러한 세포를 감염시키는 시약, 예를 들어 칼슘 인산염과 DEAE-덱스트란 또는 리포좀 제제는 Stratagene Cloning Systems 또는 Life Technologies Inc.(Gaithersburg, MD 20877, USA)에서 입수할 수 있다. 전기 천공법 역시 형질전환 및/또는 세포를 감염시키는데 유용하며 이는 효소 세포, 박테리아 세포, 곤충세포 및 척추동물 세포 형질전환에 잘 알려져

있다.

- [0310] 성공적으로 형질전환된 세포, 즉 본 발명의 DNA 구조를 가지고 있는 세포는 잘 알려진 PCR과 같은 기술로 식별된다. 다른 방법으로는, 상청액에 존재하는 단백질은 항생제를 사용함으로써 검출될 수 있다.
- [0311] 본 발명의 특정한 숙주 세포, 예를 들어 박테리아, 효소 및 곤충 세포와 같은 세포는 본 발명의 웨티드의 준비에 유용하다는 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다른 숙주 세포 또한 특정한 치료 방법에 유용할 수도 있다. 예를 들어, 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포는 적당한 MHC 분자에 로딩이 되도록 하는 본 발명의 웨티드를 발현하는데 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0312] 바람직한 구현에서, 숙주 세포는 항원-제시 세포이며, 특히 수지상 세포 또는 항원-제시 세포이다. 전립선산 인 산효소(PAP)를 함유하는 재조합 융합 단백질로 로딩된 APC는 무증상 또는 최소한의 증상 전이성 HRPC(Sipuleucel-T)의 치료에 대해 미국 식품안전청(FDA)에서 2010년 4월 29일에 승인된 바 있다(Rini et al., 2006; Small et al., 2006).
- [0313] 본 발명의 다른 양태는 웨티드 또는 그 변이체를 생산하는 방법, 숙주 세포를 배양하고 웨티드를 숙주 세포 또는 배지에서 단리하는 것을 포함한 생산 방법을 제공한다.
- [0314] 다른 구현에서는 본 발명의 웨티드, 핵산 또는 벡터 발현이 의학에서 사용된다. 예를 들어, 웨티드 또는 그의 변이체는 정맥내(i.v.) 투여, 피부하(s.c.) 투여, 피부내(i.d.) 투여, 복강내(i.p.) 투여, 근육내(i.m.) 투여를 포함한다. 웨티드 투여의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m., 및 i.v. 투여를 포함한다. DNA 투여의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v. 투여를 포함한다. 웨티드 또는 DNA의 50 µg 및 1.5 mg, 바람직하게는 125 µg 내지 500 µg의 용량이 각각의 웨티드 또는 DNA에 따라서 투여될 수 있다. 이러한 범위의 용량이 이전의 임상실험에서 성공적으로 사용된 바 있다(Walter et al., 2012).
- [0315] 능동적 백신접종에 사용된 폴리뉴클레오티드는 상당히 순도가 높거나 적당한 벡터 또는 전달 체계에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 핵산을 설계하고 도입하는 방법은 이 업계에 잘 알려져 있다. 개요는, 예를 들어 Teufel 등(Teufel et al., 2005)이 제공하고 있다. 폴리뉴클레오티드 백신은 만들기가 쉽지만, 이들 벡터의 면역 반응을 유도하는 동작 모드는 완전히 이해가 되지 않았다. 적당한 벡터와 전달 체계는 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노-연관 바이러스 또는 하나 이상의 바이러스를 포함하는 혼성체 등의 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 체계는 양이온 지질과 양이온 중합체를 포함하고 있으며 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자-총(gene-gun)"을 통한 것과 같은 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 웨티드 또는 핵산에 의해 인코딩된 웨티드는 융합 단백질이 될 수도 있고, 예로서는 위에서 언급한 각각의 반대 CDR을 위한 T 세포를 유도하는 에피톱을 들 수 있다.
- [0316] 본 발명의 약제는 하나 이상의 보조제를 포함할 수 있다. 보조제는 면역 반응을 비특이적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질을 언급한다(예: 항원에 대한 CD80-양성 T 세포 및 조력 T(TH) 세포에 의해서 중재된 면역 반응). 따라서, 본 발명에서 보조제는 유용한 약제 구성이라고 할 수 있다. 적당한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 플라젤린 또는 플라젤린에서 유도된 TLR5 리간드, FLT3 리간드, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(ALDARA®), 레스퀴미드, ImuFact IMP321, IL-2, IL-13, IL-21과 같은 인터루킨, 인터페론 알파 또는 베타, 또는 이들의 폐 길화된 유도체, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, 주브이뮨(JuvImmune), LipoVac, MALP2, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, 유중수형과 수중유형 에멀젼, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, PepTel® 벡터 시스템, PLG와 텍스트란 극미립자, 탈락토페린, SRL172, 비로솜(Virosome) 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타글루칸, Pam3Cys, 사포닌에서 유도된 아킬라스 QS21 스틸물론, 마이코박테리아 추출물과 합성 세균의 세포 벽 모방체, 및 다른 리비의 데톡스(Ribi's Detox), 쿠일(Qui1), 또는 수퍼포스(Superfos)와 같은 독점 보조제 등이 있다. 프로인트 보조제(Freund's adjuvant) 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 몇몇 면역적 보조제(예: MF59)는 수지상 세포에 특이적이고, 그 제조 방법은 이전에 묘사된 바 있다(Allison and Krummel, 1995). 또한, 시토카인도 사용될 수 있다. 몇몇 시토카인은 수지상 세포의 림포이드 조직으로의 이동에 영향을 주는 것에 직접적으로 연관된 바 있으며(예: TNF-α), 이는 수지상 세포의 더 효율적인 T 림프구에 대한 항원-제시 세포로의 성장을 가속시키고(예: GM-CSF, IL-1 및 IL-4)(미국 특허 5,849,589, 본원에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨) 면역보조제의 역할을 한다(예: IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-알파, IFN-베타)(Gabrilovich et al.

1996).

[0317] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 백신 세팅에서 보조제의 효율성을 높이는 것으로 나타났다. 이 이론에 국한하지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 틀-유사 수용체(TLR), 특히 TLR9를 통해 선천(비적응) 면역 반응을 활성화시킨다. CpG에 의해 유도된 TLR9의 활성화는 펩티드 또는 단백질 항원, 살아 있거나 죽은 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포 백신 및 예방적 및 치료적 백신의 다당류 접합체를 포함한 넓은 종류의 항원에 대한 항원-특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게 이는 수지상 세포의 성숙 및 차별화를 향상시키고 이는 TH1 세포의 활성화를 향상시키며 강한 세포독성 T 럼프구(CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움이 없을 때에도 향상시킨다. TLR9 자극에 의해 일어난 TH1 바이러스는 보통 TH2 바이러스를 촉진시키는 명반 또는 비완성된 프로인트 보조제(IFA)와 같은 백신 보조제가 존재할 때도 유지된다. CpG 올리고뉴클레오티드는 다른 보조제와 함께 제조되거나 함께 투여될 시 또는 특히 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 얻어내기 위해 필요한 미세입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 비슷한 제약으로 되어 있을 경우 더 큰 보조제 활동을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 몇몇의 연구에서 보여진 바 있듯이 CpG가 없을 때 백신 전체 용량이 일으키는 항체 반응 수준으로 항원의 용량을 약 2배 정도 줄일 수 있도록 한다(Krieg, 2006). 미국 특히 6,406,705 B1은 CpG 올리고뉴클레오티드, 비핵산 보조제 및 항원 특이 면역 반응을 일으키는 항원의 결합 사용에 대해 묘사한다. CpG TLR9 길항제는 Mologen(Berlin, Germany)에 의해 만들어진 dSLIM(double Stem Loop Immunomodulator)이며 이는 본 발명의 제약 조성의 바람직한 성분이다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9 등의 다른 TLR 결합 분자 또한 사용이 가능하다.

[0318] 다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 화학적으로 변형된 CpGs(예: CpR, Idera), Poly(I:C)와 같은 dsRNA 유사체 및 그 유도체, 예컨대 앰프리젠(AmpliGen), 힐토놀(Hiltonol), poly-(ICLC), poly(IC-R), poly(I:C12U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 및 사이클로포스아미드, 수니티닙, 베바시주맙(Bevacizumab), 셀레브렉스, NCX-4016, 실테나필, 타달라필, 바르데나필, 소라페닙, 테모졸로마이드, 템시롤리무스, XL-999, CP-547632, 파조파닙, VEGF 트랩, ZD2171, AZD2171, 항-CTLA4와 같은 면역활성적인 작은 분자 및 항체 및 면역계의 주요 구조를 표적화하는 다른 항체(예: 항-CD-40, 항-TGF베타, 항-TNF알파 수용체) 및 SC58175가 있으며 이는 치료적으로 또는 보조제의 역할을 할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 보조제와 첨가제의 양과 농도는 과도한 실험 없이 숙련된 기술자에 의해서 쉽게 결정될 수 있다.

[0319] 바람직한 보조제들은 이미퀴모드, 레시퀴모드, GM-CSF, 사이클로포스파마이드, 수리티닙, 베바시주맙, 인터페론-알파, CpG, 올리고뉴클레오티드 및 유도체 폴리-(I:C) 및 유도체, RNA, 실테나필, 및 PLG 또는 비로솜 미립자제제이다.

[0320] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 그래뉼로사이트 마크로파지 콜로니-자극 인자(GMCSF, 사르가라모스팀), 사이클로포스파마이드, 이미퀴모드, 레시퀴모드 및 인테페론 알파와 같은 콜로니 자극 인자로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0321] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 그래뉼로사이트 마크로파지 콜로니 자극 인자(GMCSF, 사르가라모스팀), 사이클로포스파마이드, 이미퀴모드 및 레시퀴모드로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 사이클로포스파마이드, 이미퀴모드 또는 레시퀴모드이다. 훨씬 더 바람직한 보조제는 Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC(Hiltonol®) 및 anti-CD40 mAB 또는 이들의 조합들이다.

[0322] 이 조성물은 피하, 피부내, 근육내 비경구 투약 또는 경구 투약에 사용된다. 이를 위해, 펩티드 및 임의적으로 다른 분자들을 약학적으로 허용되는, 바람직하게는 수용성 담체에 용해하거나 혼탁한다. 추가로, 이 조성물은 완충제, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 또한 펩티드는 시토카인 같은 면역 자극 물질과 같이 투여될 수도 있다. 이러한 성분에 사용될 수 있는 방대한 부형제 목록은, 예를 들어 다음에서 확인할 수 있다: A. Kibbe, 약학적 부형제 핸드북(Kibbe, 2000). 이러한 조성물은 선종성 또는 암성 질병의 예방, 방지 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예시적 제제는 예를 들어 EP2113253에서 찾을 수 있다.

[0323] 본 발명에 따른 백신에 의해 일어나는 면역 반응이 다른 세포 단계 및 다른 개별 단계에서 암을 공격한다는 것을 인지하는 것이 중요하다. 더욱이, 암과 연관된 다른 신호전달 경로가 공격을 받는다. 이것은 단 하나 또는 몇몇 표적만을 다루며 종양으로 하여금 공격에 쉽게 적응하도록 유발할 수 있는(종양 탈출) 백신에 비해 이점으로 작용한다. 더욱이, 모든 개별 종양들이 같은 항원의 패턴을 발현하는 것은 아니다. 따라서, 몇몇 종양-연관 펩티드들의 조합은 모든 개별 종양이 적어도 표적의 일부를 갖도록 한다. 이 조성물은 각 종양이 몇 개의 항원을 발현할 것으로 기대되며 종양 성장 및 유지에 필요한 몇 개의 독립적 경로를 다루도록 설계되었다. 따라서,

백신은 보다 큰 환자 모집단을 위해 "기성품"으로 쉽게 사용이 가능하다. 이는 백신으로 치료할 환자의 사전 선택을 HLA 유형결정으로 제약될 수 있고, 항원 발현을 위해 어떠한 추가의 바이오마커 평가를 요구하지 않음을 의미하지만, 효능에 중요한 몇몇 표적들이 유도된 면역 반응에 의해 동시적으로 공격되도록 계속 보장한다 (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

[0324] 본원에 사용된 "골격(scaffold)"이란 용어는 (예: 항원성) 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 언급한다. 한 구현에서, 골격은 그것이 부착되는 객체(예: (제2) 항원 결합 모이어티)를 표적 부위, 예를 들어 특이한 유형의 종양 세포 또는 항원성 결정인자를 갖는 종양 간질(예: 당장의 용도에 따른 펩티드와 MHC의 복합체)로 향하도록 지시할 수 있다. 또 다른 구현에서, 골격은 그 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원을 통해 신호전달을 활성화할 수 있다. 골격은 항체 및 그 단편, 항체 중쇄 변수 영역 및 항체 연쇄 변수 영역을 포함하는 항체의 도메인에 결합하는 항원, 하나 이상의 앙키린 반복 모티프 및 단일 도메인 항원 결합(SDAB) 분자를 포함하는 결합 단백질, 암타머, (용해성) TCR 및 동종 또는 자가 T 세포와 같은 (변형된) 세포를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 어떤 문자가 표적에 결합하는 골격인지 평가하기 위해, 결합 검정을 수행할 수 있다.

[0325] "특이적" 결합이란 그 골격이 다른 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC-복합체보다 관심 대상의 펩티드-MHC-복합체에 더 잘 결합하며, 그 정도는 특정 표적이 포함된 세포를 줄일 수 있는 활성 문자로 무장한 골격이 특정 표적이 없는 다른 세포는 죽일 수 없으며 다른 펩티드-MHC 복합체를 제시하는 것을 의미한다. 교차-반응성 펩티드-MHC의 펩티드가 자연적으로 발생하지 않는다면, 즉 인간 HLA-펩티돌로부터 유래되지 않는다면, 다른 펩티드-MHC 복합체에 대한 결합은 관련이 없다. 표적 세포 살해의 평가 검사는 당업계에 잘 알려져 있다. 이 검사는 변경되지 않는 펩티드-MHC 제시를 가진 표적 세포(일차 세포 또는 세포주) 또는 자연적으로 발생되는 펩티드-MHC 수준이 도달되는 정도로 펩티드가 포함된 세포를 사용하여 수행해야 한다.

[0326] 각 골격은 표지가 제공하는 신호의 존재나 부재를 판단함으로써 결합된 골격이 검출가능하도록 제공하는 표지를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 골격은 형광 염료나 일체의 다른 해당되는 세포 마커 문자를 사용하여 표지가 가능하다. 그러한 마커 문자는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 형광 표지(예를 들어, 형광 염료에 의해 제공되는)는 형광이나 레이저 스캐닝 현미경 또는 유세포 분석에 의해 결합된 암타머의 가시화를 제공할 수 있다.

[0327] 각 골격은 IL-21, 항CD3, 항CD28과 같은 두 번째 활성 문자와 접합될 수 있다.

[0328] 폴리펩티드 골격에 대한 추가 정보는, 예를 들어 WO 2014/071978A1의 배경기술 부분과 거기에 인용된 참조문헌을 참조한다.

[0329] 본 발명은 또한 암타머에 관한 것이다. 암타머(예를 들어, WO 2014/191359 및 여기에 인용된 문헌을 참조)는 정의된 삼차원적 구조로 접힐 수 있으며 특정 표적 구조를 인지할 수 있는 짧은 단일 가닥 핵산 문자이다. 이것은 표적 요법의 개발에 필요한 적합한 대안인 것으로 보여진 바 있다. 암타머는 높은 친화성 및 특이성으로써 다양한 복합체 표적에 임의적으로 결합하는 것으로 나타난 바 있다.

[0330] 세포 표면에 위치한 문자를 인지하는 암타머가 지난 십 년 동안 동정된 바 있으며 진단 및 치료 접근방식을 개발하기 위한 수단을 제공한다. 암타머가 독성 및 면역원성을 거의 소유하지 않는 것으로 나타난 바가 있으므로, 생존의학적 용도를 위한 유력한 후보이다. 정말로 암타머, 예를 들어 전립선 특이적 막-항원을 인지하는 암타머는 표적 대상의 요법을 위해 성공적으로 사용되어 왔으며 또한 생체 모델에서의 이종이식에 기능적인 것으로 나타난 바 있다. 더욱이 특이적 종양 세포주를 인지하는 암타머가 동정된 바 있다.

[0331] DNA 암타머는 다양한 암 세포 및 특히 고형 종양으로부터 유래하는 것들을 위한 광범위 인지 성질을 밝히기 위해 선택가능한 반면에, 비종양형성 및 원발성의 건강한 세포는 인지되지 않는다. 동정된 암타머가 특이적 종양 아형을 인지할 뿐만 아니라 일련의 종양과 상호작용한다면, 이로 인해 암타머는 소위 광범위 진단 및 치료에 적용될 수 있다.

[0332] 더욱이, 유세포 분석을 사용한 세포 결합 거동의 조사에 의하면 암타머는 나노몰 범위에서 매우 양호하고 뚜렷한 친화성을 드러내는 것으로 나타났다.

[0333] 암타머는 진단 및 치료 목적으로 유용하다. 더욱이 일부 암타머는 종양 세포에 의해 섭취되어 종양 세포 안으로의 siRNA와 같은 항암제의 표적화된 전달을 위한 문자 부형체로서 기능할 수 있음을 보여줄 수 있다.

[0334] 암타머는 세포와 조직과 같은 복합체 표적 및 서열번호 1 내지 서열번호 288 중 어느 하나에 따른 서열을 포함하는(바람직하게는 이들로 구성된) 본 발명에 따른 펩티드와 MHC 문자와의 복합체에 대하여, 세포-SELEX(지수적

증식에 의한 리간드의 체계적 진화) 기법을 사용하여 선택될 수 있다.

- [0335] 본 발명의 펩티드는 MHC/펩티드 복합체에 대한 특정 항체를 생성하고 개발하는데 사용될 수 있다. 이들은 병변 조직에 치료, 독성 물질 표적화 또는 방사능 물질로 사용될 수 있다. 이런 항체의 또 다른 사용은 PET 같은 이미지 목적을 위해 병변 조직의 방사성 핵종을 표적화할 수도 있다. 이 사용은 작은 전이를 검출하거나 병변 조직의 크기와 정확한 위치를 결정하는데 도움이 될 수 있다.
- [0336] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 HLA-제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II와 특이적으로 결합하는 재조합 항체의 생산 방법을 제공하는 것으로, 이 방법은 상기 HLA 제한 항원과 복합체를 형성하는 용해성 형태의 MHC 클래스 I 또는 II 분자로써 상기 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II를 발현하는 세포를 포함하는 유전자 조작된 비인간 포유동물의 면역화; 상기 비인간 포유동물의 세포를 생산하는 항체로부터 mRNA 분자의 단리; 상기 mRNA 분자에 의해 인코딩된 단백질 분자를 표시하는 파지 디스플레이 라이브러리의 생산; 및 상기 파지 디스플레이 라이브러리로부터 하나 이상의 파지의 단리를 포함하며, 상기 하나 이상의 파지는 상기 HLA-제한 항원과 복합되는 상기 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II와 특이적으로 결합하는 상기 항체를 나타낸다.
- [0337] 본 발명의 다른 양태는 HLA 제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 것으로 이 항체는 바람직하게는 다클론 항체, 단클론 항체, 양특이성 항체 및/또는 키메라 항체이다.
- [0338] 그러한 항체 및 단일 쇄 클래스 I 주조직적합 복합체의 생산을 위한 해당 방법들은 물론 이러한 항체의 생산을 위한 다른 도구들은 WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 및 문헌[Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003]에 공개되어 있으며, 이들은 본 발명의 목적을 위해 그 전문이 참조문헌에 명백히 포함되어 있다.
- [0339] 바람직하게는 항체는 20 nM 미만, 복합체에 대해서 바람직하게는 10 nM 미만의 결합 친화성으로써 복합체와 결합하는데, 이는 또한 본 발명의 맥락에서 "특이적"으로 간주된다.
- [0340] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 288로 구성된 군으로부터의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 또는 서열 번호 1 내지 서열번호 288에 대해 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 동일한) 그 변이체 또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체에 관한 것으로, 상기 펩티드는 기저 전장 폴리펩티드가 아니다.
- [0341] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 서열번호 288로 구성된 군으로부터의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 또는 서열번호 1 내지 서열번호 288에 대해 적어도 90% 상동성인(바람직하게는 동일한) 그 변이체에 관한 것으로, 상기 펩티드 또는 변이체는 전체 길이가 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14 개의 아미노산이다.
- [0342] 본 발명은 또한 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖는 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.
- [0343] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 서열번호 1 내지 288에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.
- [0344] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 (화학적으로) 변형되거나/며 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0345] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로, 펩티드는 융합 단백질의 일부이며, 특히 HLA-DR 항원 연관 불변체(Ii)에 융합되거나, 펩티드는, 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 안으로) 융합된다.
- [0346] 본 발명은 또한 본 발명이 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것으로, 펩티드는 완전한 (전부) 인간 단백질이 아니다.
- [0347] 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.
- [0348] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0349] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 의학에서의 특히 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL의 치료에

서의 사용을 위한 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.

[0350] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 또는 전에 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0351] 본 발명은 또한 항원-제시 세포, 바람직하게는 수지상 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.

[0352] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양과 상기 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터 펩티드의 단리를 포함한다.

[0353] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원-제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원-제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.

[0354] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 항원-제시 세포가 서열번호 1 내지 서열번호 288을 포함하는 상기 펩티드 또는 상기 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있는 펩티드를 포함한다.

[0355] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 의해 제조된 활성화된 T 세포에 관한 것으로, 상기 T 세포는 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.

[0356] 본 발명은 또한 표적 세포가 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자에서 그 표적 세포를 죽이는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 본 발명에 따른 효과적인 수의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0357] 본 발명은 또한 설명한 일체의 펩티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 또는 본 발명에 따른 활성화된 세포 독성 T 림프구의 약제로서 또는 약제의 제조를 위한 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로, 상기 약제는 암에 대해 활성을 갖는다.

[0358] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로, 상기 약제는 백신이다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로, 상기 약제는 암에 대해 활성을 갖는다.

[0359] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로, 상기 암세포는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 세포이다.

[0360] 본 발명은 또한 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL의 진단 및/또는 예후에 사용할 수 있는 본원에서 "표적"으로 부르는, 본 발명에 따른 펩티드에 근거한 특정 마커 단백질 및 바이오마커에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 암 치료를 위한 이러한 신규 표적들의 용도에 관한 것이다.

[0361] 용어 "항체"는 본원에서 광범위한 의미로 사용되며, 다클론 및 단클론 항체를 둘 다 포함한다. 무손상 또는 "온전한" 면역글로불린 분자 외에도, "항체"란 용어에는 그러한 면역글로불린 분자들의 단편(예: CDRs, Fv, Fab 및 Fc 단편) 또는 중합체 및 면역글로불린 분자의 인간화 버전이 포함되는데, 이들은 본 발명에 따른 임의의 바람직한 특성(예: HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 마커 (폴리) 펩티드의 특이적 결합, 암 마커 유전자를 증가된 수준으로 발현하는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 세포로의 독소 전달 및/또는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 마커 폴리펩티드의 활성도 억제)을 나타낸다.

[0362] 가능한 한, 본 발명의 항체는 상용 공급원에서 구입해야 한다. 본 발명의 항체는 잘 알려진 방법을 통해서 만들어질 수도 있다. 당업자는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 마커 폴리펩티드 또는 이들의 단편이 본 발명의 항체 생성에 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 항체를 생성하는데 사용될 폴리펩티드는 자연적인 원천에서 부분적으로 또는 완전히 정제될 수 있으며, 또는 재조합 DNA 기술을 이용하여 만들어질 수도 있다.

[0363] 예를 들어, 서열번호 1 내지 서열번호 288에 따른 본 발명에 따른 펩티드 또는 그 변이체 또는 단편을 인코딩하는 cDNA는 원핵 세포(예, 박테리아) 또는 진핵 세포(예, 효모, 곤충 또는 포유류 세포)에서 발현될 수 있으며, 재조합 단백질은 그 후 정제되고 본 발명에 따른 항체 생성에 사용되는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 마커 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론 또는 다클론 항체 제조에 사용될 수 있다.

- [0364] 당업자는 2개 이상의 다른 단클론 또는 다클론 항체의 조합의 생성이 의도하는 용도(예: ELISA, 면역조직화학, 생체내 이미징, 면역 독소 요법)에 요구되는 특이성 및 친화성을 갖는 항체의 획득가능성을 최대화시킴을 인식할 것이다. 이 항체들은 그 항체들이 사용되는 목적에 의거하여 알려진 방법에 의해 목적하는 활성에 대해 시험된다(예: ELISA, 면역조직화학, 면역요법 등; 항체의 생성과 시험에 관한 추가 지침은, 예컨대 문헌 [Greenfield, 2014]을 참고한다). 예를 들어, 항체는 ELISA 검정, 웨스턴 블로트, 포르말린 고정 암 면역조직화학 염색 또는 동결 조직 절개에서 시험할 수 있다. 치료 또는 생체내 진단을 위한 항체는 초기의 시험관내 특성화 이후, 알려진 임상 시험 방법에 따라 시험한다.
- [0365] "단클론 항체"라는 용어는 본원에서 실질적으로 균질한 항체 집단에서 획득된 것을 언급한다. 즉, 이 집단이 포함하는 각각의 항체는 자연적으로 일어날 수 있는 소수의 변이체를 제외하고는 동일하다. 본원에서 단클론 항체는 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 특정한 종 또는 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체의 서열과 상응하거나 일치하고, 쇄의 나머지 부분은 다른 종 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체 및 이러한 항체의 단편의 서열과 상응하거나 일치하고, 희망하는 상반되는 활동성을 보여주는 "키메라" 항체를 포함한다(미국 특히 4,816,567, 전문이 여기에 포함됨).
- [0366] 본 발명의 단클론 항체는 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 생쥐 또는 다른 적당한 숙주 동물이 보통 면역성을 주는 작용제에 의해 면역되어, 면역성을 주는 작용제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 이를 생산할 수 있는 능력을 가지고 있는 램프구를 유도한다. 다른 방법으로는, 램프구는 시험관내에서 면역될 수도 있다.
- [0367] 단클론 항체는 미국 특히 4,816,567에 설명된 것과 같은 재조합 DNA 방법들에 의해서도 만들어질 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 인코딩하는 DNA는 손쉽게 격리되고 전통적인 방법을 사용하여 염기 서열 분석이 가능하다(예, 마우스 유래 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특정하게 결합할 수 있는 능력이 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써).
- [0368] 시험관내 방법 또한 1가(monovalent) 항체를 제조하는 데에 적당하다. 이 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 항체를 절편화시켜 항체의 단편을 특히 여기서는 Fab 단편을 생산할 수 있다. 예를 들어, 파파인을 사용하여 절편화가 이루어질 수 있다. 파파인 절편화의 예는 WO 94/29348 및 미국 특히 4,342,566에 설명되어 있다. 항체의 파파인 절편화는 보통 각각 하나의 항원 결합 위치 및 남은 Fe 단편을 포함한 Fab 단편의 동일한 2개의 항원 결합 단편을 생산한다. 펩신 처리는 F(ab')₂ 단편 및 pFc' 단편을 생산한다.
- [0369] 항체 단편(다른 서열과 붙어 있든 그렇지 않은 간에)은 또한 단편의 활동력이 변경되지 않은 항체 또는 항체 단편에 비교할 시, 현저하게 바뀌거나 손상이 되지 않는 한, 삽입, 삭제, 치환, 또는 특정한 위치 또는 특정한 아미노산 잔기의 다른 선택된 변경을 포함할 수 있다. 이러한 변경은 이황화물 결합의 능력이 있는 아미노산의 제거/추가, 생물적 생명의 증가, 분비 특징의 변화 등의 추가적인 특성을 제공할 수 있다. 어떤 경우에도, 항체 단편은 결합성, 결합 도메인에서의 결합 조정 등의 생물작용 성질을 소유하고 있어야 한다. 항체의 기능적인 또는 활동적인 범위는 단백질의 특정한 지역의 돌연변이 생성, 발현 및 이 발현된 폴리펩티드의 실험에 의해 확인될 수 있다. 이러한 방법은 이 분야의 기술자가 손쉽게 알 수 있는 기술이며 이는 항체 단편을 인코딩하는 핵산의 위치-특정 돌연변이 생성을 포함할 수 있다.
- [0370] 본 발명의 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체를 추가로 포함할 수 있다. 인간화된 형태의 비-인간(예, 쥐파동물) 항체는 최소의 비-인간 면역글로불린 항체에서 유도된 서열을 포함하는 키메라 면역글로불린 항체, 면역글로불린 쇄 또는 이들의 단편(Fv, Fab, Fab' 또는 다른 항체의 항원 결합의 결과)이다. 인간화된 항체는 상보성 결정 영역(complementary determining region(CDR))의 잔기가 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 비-인간 종(공여 항체)의 CDR의 잔기로 바뀐 요구되는 특이성, 친화력 및 수용력을 가진 인간 면역글로불린(수용 항체)이다. 몇몇의 예에서는, 인간 면역글로불린의 Fv 구조(FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 교체된다. 인간화된 항체는 수용 항체 또는 수입된 CDR 또는 구조 서열의 어디에서도 찾을 수 없는 서열을 포함하기도 한다. 보통, 인간 항체는 변이성 도메인을 적어도 하나 또는 거의 대부분 2개를 포함하며, 모든 또는 실질상 모든 CDR 범위는 비-인간 면역글로불린에 상응하고 모든 또는 실질상 모든 구조 범위는 인간 면역글로불린 일치 서열이다. 인간화된 항체는 이상적으로 적어도 보통 인간 면역 글로불린의 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 한 부분 또한 포함할 것이다.
- [0371] 이 분야에서 비인간 항체를 인간화하는 방법은 잘 알려져 있다. 보통, 인간화된 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 비-인간 근원에서 이에 도입된다. 이 비-인간 아미노산 잔류들은 종종 "수입" 잔기이라고 일컬어지며, 이는 대개 "수입" 변수 도메인에서 취한다. 인간화는 본질적으로 설치류의 CDR 또는 상응하는 인간 항체 서열의

CDR 서열을 인간의 것으로 교체하는 것으로 실행될 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화된" 항체는 키메라 항체이며(US 4,816,567), 온전한 인간 변수 도메인보다 훨씬 적게 비인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 대체된다. 실제적으로, 인간화된 항체는 보통 몇몇의 CDR 잔기 및 가능하게는 몇몇의 구조 잔기가 이 설치류의 유사한 영역의 잔기와 치환된 인간 항체이다.

[0372] 면역되었을 때, 내생의 면역글로불린 생성이 없는 중에 전체 인간 항체를 생산할 수 있는 유전자이식 동물(예, 생쥐)이 사용될 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포계열 돌연변이 생쥐의 항체 중쇄 결합 영역 유전자의 동형 삭제는 내생 항체 생산의 완전한 억제 결과를 가져온다. 이러한 생식세포계열 돌연변이 생쥐로의 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자 정렬의 이입은 항원이 존재할 때 인간 항체 생산의 결과를 낳을 것이다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리에서도 생산될 수 있다.

[0373] 본 발명의 항체는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체에 의해서 피험자에게 투여된다. 보통, 적당한 약학적으로 허용가능한 염이 제형을 등장 상태로 만들기 위해 제형에 사용된다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는, 링거 용액(Ringer's solution) 및 포도당 용액이 있다. 이 용액의 pH 값은 바람직하게는 약 5 내지 약 8이며, 더 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5이다. 더 많은 담체는 항체를 포함하는 세포간질이 막, 리포좀 또는 미세 입자와 같은 형태로 되어 있는 고체 소수성 중합체 반투성의 세포간질과 같은 지속적인 방출 준비를 포함한다. 예를 들어, 투여 방법 및 투여되는 항체의 농도에 따라 어떤 담체가 더 바람직한지는 이 분야의 당업자에게는 명백할 것이다.

[0374] 항체는 피험자, 환자 또는 세포에 주사(예, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내), 또는 효과적인 형태로 혈류로의 전달을 보장하는 주입과 같은 다른 방법으로 투여될 수 있다. 항체는 국소 및 전신 치료 효과를 얻기 위해 종양내 또는 종양 주위 경로 투여될 수도 있다. 국소 또는 정맥내 주사가 바람직하다.

[0375] 항체 투여의 효율적인 용량과 스케줄은 경험적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정을 내리는 것은 이 분야의 기술 중의 하나이다. 이 분야의 당업자는 투여되는 항체의 용량이, 예를 들어 항체를 받는 대상, 투여 방법, 사용되는 특정한 항체의 종류 및 투여되는 다른 약들에 따라 달라진다는 것을 이해할 것이다. 단독으로 사용될 때 전형적인 항체의 일일 용량은 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 의 범위일 수 있으며, 위에 언급된 요인을 고려할 때 이보다 더 높을 수도 있다. 바람직하게는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL의 치료를 위한 항체의 투여 후, 이 분야의 당업자들에게 알려진 다양한 방법으로 이 치료 항체의 효능을 평가할 수 있다. 예를 들어, 크기, 수, 및/또는 치료를 받고 있는 대상의 암의 분포 등이 표준 종양 영상 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 항체의 투여가 없을 경우 일어날 수 있는 종양의 성장을 정지시켜, 종양을 오그라들게 하거나 새로운 종양의 성장을 예방하는 치료의 목적으로 투여된 항체는 효과있는 폐암의 치료라고 할 수 있다.

[0376] 본 발명의 다른 양태는 특이적 웹티드-MHC 복합체를 인식하는 용해성 T 세포 수용체(sTCR)의 생산 방법을 제공하는 것이다. 이러한 용해성 T 세포 수용체는 특이적 T 세포 클론으로부터 생성가능하며, 그 친화력은 상보결정 부위를 표적으로 하는 돌연변이유발성에 의해 증가될 수 있다. T 세포 수용체 선택을 위하여, 파지 디스플레이를 사용할 수 있다(US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). 파지 디스플레이 동안 T 세포 수용체의 안정화를 위하여, 및 약물로서의 실용적인 용도의 경우, 알파 및 베타 쇄는, 예를 들어 비정상적 이황화 결합, 기타 공유 결합(단일-쇄 T 세포 수용체) 또는 이합체화 도메인에 의해 연결될 수 있다(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). T 세포 수용체는 표적 세포에 대한 특정 기능의 실행을 목적으로 독소, 약물, 시토카인(예를 들어, US 2013/0115191 참고), 및 항-CD3 도메인과 같은 효과기 세포를 모집하는 도메인 등과 연결될 수 있다. 더욱이, 이것은 양자 전이에 사용되는 T 세포에서 발견될 수 있다. 추가 정보는 WO 2004/033685A1 및 WO 2004/074322A1에서 찾을 수 있다. sTCR의 조합은 WO 2012/056407A1에 설명되어 있다. 이 생산에 관한 추가 방법들은 WO 2013/057586A1에 공개되어 있다.

[0377] 그 밖에, 본 발명의 웹티드 및/또는 TCR 또는 항체 또는 다른 결합하는 분자는 병리학자에 의한 생검 샘플에 근거하는 암의 진단을 확인하는데 사용가능하다.

[0378] 항체 또는 TCR은 생체내의 진단 분석에 사용될 수도 있다. 보통, 항체는 방사성핵종으로 표지되고(예컨대, ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P 또는 ^{35}S), 면역 섬광 조형술을 사용하여 그 종양이 국소화될 수 있다. 하나의 구현에서는, 항체 또는 그 단편은 상기 언급된 단백질들로 구성된 군으로부터 선택된 단백질에 대한 2개 이상의 표적의 세포외 도메인에 결합을 하고 친화성 값(Kd)은 $1\times 10 \mu\text{M}$ 보다 낮다.

[0379] 진단의 용도로 사용되는 항체는 여러 가지의 영상 방법으로 검출될 수 있는 적당한 프로브로 표지될 수 있다.

프로브의 검출 방법은 형광, 광학, 공초점 및 전자 현미경, 자기 공명 단층 촬영 영상 및 분광기 형광 투시법, 전산화 단층 촬영과 양전자 방사 단층 촬영기를 포함하지만 이에 국한되지 않는 방법을 들 수 있다. 적당한 프로브는 플루오레세인, 로다민, 에오신, 및 다른 형광체, 방사성 동위 원소, 금, 가돌리늄 및 다른 란탄계열 원소, 상자성체의 이온, 플루오르-18 및 다른 양전자 방출 방사성 핵종 등을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 것을 들 수 있다. 또한, 프로브는 2개 이상의 기능을 가지고 있을 수 있으며, 본원에 나열된 하나 이상의 방법으로 검출될 수 있다. 이러한 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 본원에 나열된 프로브로 표지될 수 있다. 이렇게 항체와 프로브를 연결하는 것으로는 이 분야에서 잘 알려진 것들 중에 프로브의 공유원자 연결, 프로브의 항체로의 편입, 및 프로브의 결합을 위한 퀼레이트 화합물의 공유원자 연결 등을 들 수 있다. 면역조직 화학을 위해서, 질병 조직 샘플은 신선하거나 냉동되었거나 파라핀에 포매되어 포르말린과 같은 방부제로 고정되어 있을 수 있다. 고정되었거나 포매되어 있는 샘플을 포함하고 있는 조직 절편은 표지된 1차 항체와 2차 항체와 접촉되며, 이때 그 항체는 동일 반응계 단백질 발현의 검출을 위해 사용된다.

[0380] 본 발명의 다른 양태는 활성화된 T 세포와 항원 적재된 적당한 항원-제시 세포의 표면에서 T 세포를 항원이 본 발명의 웨პ티드라고 할 때 항원 특정 방식으로서 활성화시키는데 충분한 시간 동안에 발현되는 인간 클래스 I 또는 II MHC 분자의 접촉을 포함하는 시험관내 방법으로 생성하는 방법을 포함한다. 바람직하게는, 충분한 양의 항원이 항원-제시 세포와 함께 사용된다.

[0381] 바람직하게는, 포유류 세포는 TAP 웨პ티드 트랜스포터가 결핍되어 있거나, 감소된 수준 또는 기능을 가지고 있다. TAP 웨პ티드 트랜스포터가 결핍되어 있는 적당한 세포로는 T2, RMA-S 및 초파리 세포를 들 수 있다. TAP란 항원 처리에 관련된 트랜스포터를 일컫는다.

[0382] 인간 웨პ티드 적재 결핍 세포주 T2는 American Type Culture Collection(12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA)의 카탈로그 번호 CRL 1992로 구입이 가능하고, 초파리 세포주 Schneider 2는 ATCC의 카탈로그 번호 CRL 19863으로 구입이 가능하며, 생쥐 RMA-S 세포주는 Ljunggren 등에서 묘사가 된 바 있다 (Ljunggren and Karre, 1985).

[0383] 바람직하게는, 숙주 세포는 감염 전에 실질적으로 MHC 클래스 I 분자를 발현하지 않는다. 자극기 세포는 B7.1, B7.2, ICAM-1 및 LFA 3과 같은 T 세포를 위한 공동-자극 신호의 제공에 중요한 분자를 발현하는 것 또한 바람직하다. 다수의 MHC 클래스 II 분자의 핵산 서열 및 동시자극 분자의 서열은 GenBank와 EMBL 데이터베이스에서 공개적으로 제공된다.

[0384] MHC 클래스 I 애피톱이 항원으로 사용되는 경우, T 세포는 CD8-양성 CTL이다.

[0385] 항원-제시 세포가 이러한 애피톱을 발현하도록 감염되는 경우, 바람직하게는 그 세포는 서열번호 1 내지 서열번호 288 또는 이의 변이체 아미노산 서열을 포함하는 상기 웨პ티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.

[0386] T 세포를 시험관내에서 생성하는 몇몇의 다른 방법도 사용될 수 있다. 예를 들어, 자가 중양-침윤 림프구를 CTL 생성에 사용할 수 있다. Plebanski 등(Plebanski et al., 1995)은 T 세포의 제조에 자기 말초 혈액(PLB) 림프 구를 사용했다. 수지상 세포를 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드로 펠스화시키거나, 제조합 바이러스에 의한 감염에 의해 자가 조직 T 세포의 생산이 가능하다. 또한, B 세포는 자가 조직 T 세포의 생산에서 사용할 수 있다. 또한, 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드로 펠스화된 또는 재조합된 바이러스에 의해 감염된 대식 세포가 자가 조직 T 세포의 제조 시 사용될 수 있다. S. Walter 등(Walter et al., 2003)은 인공 항원-제시 세포(aAPC)를 사용하는 시험관내 T 세포의 프라이밍을 묘사하며, 이는 역시 선택된 웨პ티드에 대해 T 세포를 생성하는 적절한 방법일 수 있다. 본 발명에서, aAPC는 미리 생성된 MHC:웨პ티드 복합체를 폴리스티렌 입자(마이크로 비드)의 표면과 커플링시키고 바이오틴-스트렙트아비딘 생화학을 이용함으로써 생성되었다. 이 체계는 aAPC의 정확한 MHC 밀도를 제어할 수 있도록 허용하며, 이는 항원-특이적 T 세포 반응을 혈액 샘플에서 높은 효율성으로 고- 또는 저-결합력을 임의적으로 유도해낼 수 있게 한다. MHC:웨პ티드 합성체를 제외하고, aAPC는 그들의 표면에 커플된 항-CD28 항원과 같은 동시-자극 활동을 가지고 다른 단백질을 운반해야 한다. 더욱이 이러한 aAPC-기반 체계는 종종, 예를 들어, 인터루킨-12와 같은 시토카인 등 적당한 용해 요소의 첨가를 요구한다.

[0387] 동종이계 세포는 T 세포의 제조에 역시 사용될 수 있으며 방법은 WO 97/26328에 더 자세하게 묘사되어 있으며, 여기에 참조문헌으로 포함되어 있다. 예를 들어, 초파리 세포와 T2 세포에 추가적으로, CHO 세포, 배콜로바이러스-감염 곤충 세포, 박테리아, 효모, 백시니아-감염된 표적 세포 등과 같은 다른 세포들도 항원을 제시하는데 사용될 수 있다. 추가적으로 식물 바이러스가 사용될 수도 있으며(예를 들어, Porta 등(Porta et al., 1994)), 이는 외부 웨პ티드의 제시를 위한 카우피 모자이크바이러스의 높은 수확 체계로서 개발에 대해 묘사한다.

- [0388] 이 실험의 펩티드에 대해 활성화된 T 세포는 치료에서 유용하다. 따라서, 본 발명의 더 나아간 양태는 앞서 말한 발명의 방법으로 획득할 수 있는 활성화된 T 세포에 대한 내용을 제공한다.
- [0389] 위에서 말한 방법으로 생성된 활성화된 T 세포는 서열번호 1 내지 서열번호 288의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.
- [0390] 바람직하게는, T 세포는 그의 TCR을 HLA/펩티드-합성체(예, 결합)와 상호작용함으로써 이런 세포를 인식한다. 이 T 세포는 효율적인 활성화된 T 세포의 수가 투여되었을 시, 본 발명의 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자에서 표적 세포를 괴사시키는데 유용하다. 환자에게 투여된 T 세포는 위에서 묘사된 바와 같이 환자에게 유도되고 활성화된다(즉, 이는 자가 조작 T 세포이다). 다른 방법으로는, T 세포는 환자에게 유도되지 않고, 다른 개인에서 유도된다. 물론, 이 개인이 건강한 개인인 것이 바람직하다. 본 발명자들이 말하는 "건강한 개인"이라고 함은 개인이 전체적으로 좋은 건강을 가지고 있으며, 바람직하게는 충분한 면역 체계를 가지고 있으며, 더 바람직하게는, 손쉽게 실험되고 검출될 수 있는 어떤 질병도 겪고 있지 않다는 것이다.
- [0391] 생체내에서, 본 발명에 따른 CD4-양성 T 세포는 종양 세포(이들은 가끔 MHC 클래스 II를 발현하기도 한다)이나 종양(종양 세포)을 감싸고 있는 간질성 세포(이는 가끔 MHC 클래스 II를 또한 발현하기도 한다(Dengjel et al., 2006))일 수 있다.
- [0392] 본 발명의 T 세포는 활성적인 치료 구성의 성분으로 사용될 수도 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자에서 표적 세포를 괴사시키고 환자에게 위에 정의된 바와 같이 효율적인 T 세포의 수를 투여하는 방법을 제공한다.
- [0393] 본 발명자들은 "비정상적으로 발현되는"이라는 구절에 의해, 폴리펩티드가 정상 수준에 비교했을 때 과발현되거나 유전자가 종양이 유도된 조직에서는 침묵적이지만(silent) 종양에서는 발현되는 것도 의미한다. 본 발명자들은 "과발현"이라는 구절에 의해, 폴리펩티드가 정상 조직에서 존재하는 수준의 적어도 1.2배 이상으로 존재하는 것을 말하고, 바람직하게는 적어도 2배, 더 바람직하게는 적어도 5배 또는 10배로 존재하는 것을 의미한다.
- [0394] T 세포는, 예를 들어 위에서 묘사된 바와 같은 방법으로 얻어질 수 있다.
- [0395] 흔히 T 세포의 양자 전이라고 불리는 것에 대한 프로토콜은 이 업계에서 잘 알려져 있다. 리뷰는 다음에서 찾을 수 있다: Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006.
- [0396] 본 발명의 다른 양태에는 그 핵산이 클로닝되어 숙주 세포, 바람직하게는 T 세포로 도입되는 T 세포 수용체를 생성하기 위해 MHC와 복합체가 되는 펩티드의 사용이 포함된다. 이러한 조작된 T 세포는 따라서, 암 치료를 위해 환자로 이전할 수 있다.
- [0397] 본 발명의 모든 문자, 즉, 펩티드, 핵산, 항체, 발현 벡터, 세포, 활성화된 T 세포, T 세포 수용체 또는 이를 인코딩하는 핵산은 면역 반응을 피할 수 있는 성질을 가진 세포에 의해 특징지어지는 질병의 치료에 유용하다. 따라서 본 발명에 포함되어 있는 어떤 문자든지 약제로 사용되거나 약제를 만드는데 사용될 수 있다. 이 문자는 단독으로 사용될 수도 있고, 어떤 알려진 문자와 함께 결합하여 사용될 수도 있다.
- [0398] 본 발명은 또한 암, 특히 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 및 다른 악성 종양의 치료에 유용한 약제를 제공한다.
- [0399] 본 발명은 다음을 포함한 키트(kit)를 포함한다:
- [0400] (a) 위에 묘사된 바와 같은 약학 조성물을 용액 또는 동결건조된 형태로 포함하고 있는 용기;
 - [0401] (b) 임의적으로 희석제 또는 동결건조된 제형을 위한 재구성 용액을 포함하는 제2 용기; 및
 - [0402] (c) 임의적으로 (i) 용액의 사용 또는 (ii) 동결건조된 배합의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서.
- [0403] 이 키트는 (iii) 완충제, (iv) 희석제, (v) 필터, (vi) 주사바늘, 및 (vii) 주사기 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 그 용기는, 바람직하게 병, 바이알, 주사기 또는 시험관이며; 다용도 용기일 수 있다. 약학 조성물은 바람직하게는 동결건조된다.
- [0404] 본 발명에 사용되는 키트는 바람직하게는 동결건조되어 있는 약제를 적당한 용기와 이들의 재구성 및/또는 사용에 관한 설명서를 함께 포함한다. 적당한 용기는, 예를 들어, 병, 바이알(예: 듀얼 챔버 바이알), 주사기(듀얼 챔버 주사기 등) 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재질로서 형성할 수 있다.

바람직하게는 키트 및/또는 용기는 재구성 및/또는 사용에 대한 사용법을 표시하는 지시 내용을 그 용기 상에 또는 그와 연관하여 포함한다. 예를 들어, 라벨 상에서 동결건조된 제형을 상기 웨პ티드 농도로 재구성해야 한다고 지시할 수 있다. 라벨은 또한 약제가 피하투여가 가능한지 아니면 유용한지를 보여줄 수도 있다.

- [0405] 제형을 포함한 용기는 재구성된 약제의 반복된 투여를 가능하게 하는 다용도 바이알일 수 있다(예: 2 내지 6회의 투여). 키트는 또한 적당한 희석제(예: 중탄산 용액)를 포함하는 제2 용기를 포함할 수도 있다.
- [0406] 희석제와 동결건조된 약제를 섞었을 때, 재구성된 배합의 최종 웨პ티드 농도가 바람직하게는 적어도 0.15 mg/mL/웨პ티드($=75 \mu\text{g}$)이며 바람직하게는 3 mg/mL/웨პ티드($=1500 \mu\text{g}$)를 넘지 않아야 한다. 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입 및 사용 설명서 등의 사용자의 입장에서 필요한 것을 추가로 포함할 수도 있다.
- [0407] 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 약학 조성물을 포함하는 하나의 용기를 다른 제품과 함께 또는 단독으로 포함하거나(예: 다른 화합물들 또는 이 다른 화합물들의 약학 조성물) 각각의 조성물을 각자 다른 용기에 포함할 수 있다.
- [0408] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 다음과 같은 제2 화합물 또는 그들의 약학 조성물과 함께 투여될 수 있는 약학 조성물을 포함한다: 보조제(예: GM-CSF), 화학요법제, 자연 생성물, 호르몬 또는 길항제, 항혈관신생 제제 또는 억제제, 피사유도제 또는 퀼레이터. 키트의 조성물은 미리 혼합되어 있을 수도 있거나, 각각의 조성물이 각각 따로 용기에 담겨 있을 수도 있다. 키트의 조성물은 하나 이상의 액체 용액에 제공될 수도 있고, 바람직하게는 수용액, 더욱 바람직하게는 무균 수용액에 제공된다. 키트의 조성물은 적당한 용해제를 첨가함으로써 액체로 바꿀 수 있는 고체로 제공될 수도 있고, 바람직하게는 이는 다른 용기에 담겨 제공된다.
- [0409] 치료 키트의 용기는 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 고체나 액체를 담을 수 있는 다른 어떤 용기일 수 있다. 보통, 하나 이상의 구성물이 있을 경우, 키트는 제2 물약병 또는 다른 용기를 포함하고, 이는 각각의 복용을 가능하게 한다. 키트는 약학적으로 허용가능한 액체를 포함하고 있는 용기를 포함할 수도 있다. 바람직하게는, 치료 키트는 본 발명 키트의 성분인 본 발명의 제제를 투여할 수 있는 기구를 포함한다(예: 하나 이상의 바늘, 주사기, 안약 투입제, 피펫 등).
- [0410] 본 제형은 구강(경구), 비강, 안약 형태, 피하, 피내, 근육내, 혈관내 또는 경피 등 어떠한 투여 형태로든 웨პ티드 투여에 적당한 약제이다. 바람직하게는, 그 투여는 s.c.이며, 가장 바람직하게 i.d. 투여는 주입 펌프에 의 할 수 있다.
- [0411] 본 발명의 웨პ티드는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL로부터 단리되었으므로, 본 발명의 약제는 바람직하게는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL의 치료에 사용된다.
- [0412] 본 발명은 또한 사전선별된 TUMAP의 창고에서 선택된 하나 이상의 웨პ티드로 구성된 약학 조성물의 제조를 포함하는 개별 환자를 위한 개인화된 약학 조성물의 생산 방법에 관한 것으로, 그 약학 조성물에 사용되는 상기 하나 이상의 웨პ티드는 개별 환자의 적합성을 위해 선택된다. 한 구현에서, 이 약학 조성물은 백신이다. 이 방법은 TCR 분리와 같은 하류 용도를 위한 T 세포 클론의 생산 또는 용해성 항체 및 다른 치료 옵션에도 적용할 수 있다.
- [0413] "개인화된 약학"이란, 활성적으로 개인화된 암 백신 및 자가 환자 조직을 사용하는 적응적 세포 요법을 포함하는 한 명의 개별 환자의 치료를 위해서만 사용되는 그러한 개별 환자를 위해 구체적으로 맞춤화된 요법을 의미해야 한다.
- [0414] 본원에 사용된 용어 "창고"란 특정한 종양 유형에서 면역원성 및/또는 과다제시에 대해 사전선별된 웨პ티드의 군 또는 조합을 지칭해야 한다. 용어 "창고"는 백신에 포함된 특정 웨პ티드가 사전 제조되어 물리적 시설에 보관되었음을 함축하는 의도가 아니다(하지만 그러한 가능성은 고려된다). 생산된 각 개인화된 백신을 위해 웨პ티드들이 새로 제조될 수 있거나 사전 제조되어 저장될 수 있음이 명백히 고려된다. 창고(예: 데이터베이스의 형태로서)는 다양한 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 대립형질을 갖는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 환자들의 종양 조직에서 고도로 과발현된 종양-연관된 웨პ티드들로 구성된다. 이는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 웨პ티드 또는 신장된 MHC 클래스 I 웨პ티드를 포함할 수 있다. 창고는 몇몇 종양 조직들로부터 수집된 종양-연관 웨პ티드 외에도, HLA-A*02 및 HLA-A*24 마커 웨პ티드를 포함할 수 있다. 이 웨პ티드들은 TUMAP에 의해 유도된 T 세포 면역성의 크기에 대한 정량적

인 비교를 허용하므로 백신의 항종양 반응을 이끌어내는 용량에 관한 중요한 결론을 도출할 수 있다. 둘째로, 어떤 환자에서 "자가" 항원으로 유래한 TUMAP에 대한 인체의 백신-유도 T 세포 반응이 관찰되지 않는 경우, 이것은 "비-자가" 항원으로부터 유래한 중요한 양성 대조 웨티드로서 기능한다. 그리고,셋째로, 이것은 환자의 면역능력 상태에 대한 결론의 도출을 가능케 한다.

[0415] 본 발명과 창고의 TUMAP는 유전자 발현 분석, 질량 분석 및 T 세포 면역학(XPresident®)이 조합된 통합 기능적 유전체 접근방식을 사용하여 동정된다. 이 접근방식은 정상 조직에서 발현되지 않거나 최소한으로만 발현되는 것이 아닌 고비율의 종양에서 실제로 존재하는 TUMAP만을 추가 분석을 위해 선택한다는 것을 보증한다. 초기 웨티드 선택을 위해, 환자의 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 샘플 및 건강한 공여자의 샘플들을 단계적 접근방식으로 분석했다:

[0416] 1. 전장 유전체 전령 리보핵산(mRNA)의 발현 분석을 사용하여 중요한 정상(비암성) 조직에서 매우 낮은 수준으로 발현되는 유전자들을 동정했다. 이 유전자들이 다양한 정상 기관 및 조직과 비교하여 암성 조직(HCC, CRC, GB, GC, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC)에서 과발현되는지 평가했다.

[0417] 2. 암성 물질(HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, CLL)로부터 HLA 리간드를 질량 분석법으로 동정했다.

[0418] 3. 동정된 HLA 리간드들을 유전자 발현 데이터와 비교했다. 단계 2에서 검출된 종양 조직 상에 과다제시되거나 임의적으로 제시된 바람직하게는 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자들에 의해 인코딩된 웨티드들은 멀티-웨티드 백신의 적절한 TUMAP 후보로서 간주되었다.

[0419] 4. TUMAP로서 동정된 웨티드의 관련성을 지지하는 추가 증거를 파악하기 위해 문헌 연구를 수행했다.

[0420] 5. mRNA 수준에서의 과발현의 타당성은 단계 3에서 종양 조직으로부터 선택된 TUMAP의 재검출 및 건강한 조직에 대한 검출의 결여(낮은 빈도)에 의해 확인되었다.

[0421] 6. 선택된 웨티드에 의한 생체내 T 세포 반응의 유도가 가능한지 여부를 평가하기 위해, 건강한 공여자는 물론 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL 환자의 인간 T 세포를 사용하여 시험관내 면역원성 검사를 수행했다.

[0422] 한 측면에서는, 웨티드들이 창고에 포함되기 전에 면역원성에 대해 사전선별된다. 제한이 아니라 한 예로서, 웨티드/MHC 복합체 및 항-CD28 항체가 로딩된 인공 항원-제시 세포를 가진 건강한 공여자의 CD8+ T 세포를 반복적으로 자극하는 시험관내 T 세포 초회감작을 포함하는 방법을 사용하여 창고에 포함된 웨티드의 면역원성을 결정한다.

[0423] 이 방법은 희귀한 암과 드문 발현 프로파일을 갖는 환자에 대해 선호된다. 현재 개발되고 있는 고정된 성분을 갖는 멀티-웨티드 칵테일과 대비할 때, 창고는 종양에서 항원의 실제 발현과 백신과의 훨씬 더 높은 정합을 허용한다. 선택된 하나의 또는 몇몇 "재고(off-the-shelf)" 웨티드들의 조합을 다중표적 접근방식으로 각 환자에 대해 사용한다. 이론상으로, 예를 들어 50개 라이브러리로부터 선택된 5개의 다른 항원 웨티드 선택에 근거한 접근방법은 이미 약 1700만 가지의 가능한 약품(DP) 성분을 초래할 것이다.

[0424] 한 양태에서, 이 웨티드는 여기서 또는 다음에 설명된 본 발명에 따른 방법에 근거하여 백신의 포함 여부가 선택된다.

[0425] HLA 표현형, 전사체학 및 웨티드믹스 데이터는 환자의 종양 물질과 혈액 샘플로부터 수집하여 "창고"와 환자 고유의(즉, 돌연변이된) TUMAP를 포함하는 각 환자에 대해 가장 적절한 웨티드를 동정한다. 환자 종양에서 선택적으로 발현되거나 과발현되는 웨티드를 선택하게 되며, 이는 가능한 경우 환자의 개별 PBMC로써 시험했을 때 강한 시험관내 면역원성을 나타낸다.

[0426] 바람직하게는 백신에 포함된 웨티드는, (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 웨티드들(TUMAP)의 동정; (b) (a)에서 동정된 웨티드를 위에 설명된 웨티드들의 창고(데이터베이스)와 비교; 및 (c) 그 환자에서 동정된 종양-연관 웨티드와 상관관계가 있는 창고(데이터베이스)로부터 하나 이상의 웨티드 선택을 포함하는 방법에 의해 동정된다. 예를 들어, 종양 샘플에 의해 제시된 TUMAP는 다음에 의해 동정된다: (a1) 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질의 파악을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 및 (a2) 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 파악하기 위해, 발현 데이터를 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드

의 서열과 상관관계 결정. 바람직하게는 종양 샘플로부터 단리된 MHC 분자의 결합된 펩티드를 용출시키고 용출된 리간드의 서열결정에 의해 MHC 리간드의 서열을 파악한다. 바람직하게는 종양 샘플과 정상 조직은 같은 환자로부터 얻는다.

[0427] 참고(데이터베이스) 모델을 사용하는 펩티드의 선택 외에 또는 그 대안으로서, TUMAP를 새 환자에서 동정한 다음 백신에 포함시킬 수 있다. 한 예로서, 후보 TUMAP 환자에서, (a1) 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질의 파악을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 및 (a2) 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 파악하기 위해, 발현 데이터를 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계의 결정에 의해 동정할 수 있다. 다른 예로서, 개별 환자의 조직에 상응하는 정상 샘플에 대해 종양 샘플에서 고유한 돌연변이를 포함하는 단백질을 동정할 수 있으며, 돌연변이를 특이적으로 표적하는 TUMAP를 동정할 수 있다. 예를 들어, 종양 및 상응하는 정상 조직의 유전체에 대한 염기서열은 전체 유전체의 염기서열 결정에 의해 결정할 수 있다. 유전자의 단백질-코딩 영역에서 비동의 돌연변이의 발견을 위해, 유전체 DNA 및 RNA를 종양 조직으로부터 추출하고, 정상의 돌연변이되지 않은 유전체의 종자계 DNA는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 추출한다. 이러한 응용 NGS 접근방법은 단백질 코딩 영역의 염기서열 재결정으로 제약된다(신유전체 염기서열 재결정). 이 목적을 위해, 업체가 공급하는 표적 강화 키트를 사용한 다음, 예를 들어 HiSeq2000(Illumina)에 의해 염기서열 결정에 의해 인간 샘플의 엑손 DNA를 포착한다. 그 밖에, 유전자 발현의 직접 정량화 및 돌연변이된 유전자가 환자의 종양에서 발현된다는 검증을 위해 종양 mRNA에 대한 염기 서열을 결정한다. 그에 따른 수백만의 서열 판독값은 소프트웨어 알고리즘을 통해 처리된다. 그 출력 목록에는 돌연변이와 유전자 발현이 포함된다. 종양-특이적 체세포 돌연변이는 PBMC-유래 생식세포의 변종과 비교하여 결정한 다음 우선순위화된다. 다음에는 새로 동정된 펩티드를 위에 설명한 참고의 면역원성에 대해 시험할 수 있으며, 적절한 면역원성을 소유하는 후보 TUMAP를 선택하여 백신에 포함시킨다.

[0428] 하나의 예시적 구현에서, 백신에 포함되는 펩티드는 다음에 의해 동정된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드(TUMAP)를 위에 설명한 방법으로 동정하는 단계; (b) 상응하는 정상 조직과 비교하여 종양에서 면역원성과 과다제시에 대해 사전선별된 펩티드들의 참고를 이용하여 (a)에서 동정된 펩티드와 비교하는 단계; (c) 환자에서 동정된 종양-연관 펩티드와 상관관계가 있는 하나 이상의 펩티드를 참고에서 선택하는 단계; 및 (d) 임의적으로 (a)에서 새로 동정된 하나 이상의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인하는 단계.

[0429] 하나의 예시적 구현에서, 백신에 포함되는 펩티드는 다음에 의해 동정된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드들(TUMAP)을 위에 설명한 방법으로 동정하는 단계; 및 (b) (a)에서 새로 동정된 하나 이상의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인하는 단계.

[0430] 개인화된 펩티드 기반 백신을 위한 펩티드들이 선택되면, 백신이 생산된다. 백신은 20 내지 40% DMSO, 바람직하게는 약 33% DMSO와 같은 약 30 내지 35% DMSO에 용해된 개별 펩티드들로 구성된 액체 배합이다.

[0431] 제품에 포함되는 펩티드는 각각 DMSO에 용해한다. 단일 펩티드 용액의 농도는 제품에 포함시킬 펩티드의 수에 따라 선택해야 한다. 단일 펩티드-DMSO 용액들을 동등한 비율로 혼합하여 제품에 포함시킬 모든 펩티드가 포함된 용액을 만드는데 그 농도는 펩티드 당 약 2.5 mg/mL이다. 그런 다음, 주사제용으로 33% DMSO에서 펩티드 당 0.826 mg/mL의 농도를 얻기 위해 혼합된 용액을 1:3의 비율로 물로 희석한다. 희석시킨 용액을 0.22 μL 멀균 필터를 통해 여과시킨다. 최종 벌크 용액을 얻는다.

[0432] 최종 벌크 용액을 바이알에 채워 사용 시까지 -20°C에서 보관한다. 1개의 바이알에는 각 펩티드를 0.578 mg씩 포함하는 700 μL의 용액이 들어있다. 여기서 500 μL(펩티드 당 약 400 μg)를 피내 주사로 투여하게 된다.

[0433] 암 치료에 유용함에 덧붙여, 본 발명의 펩티드는 진단제로도 유용하다. 펩티드가 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 및 CLL 세포에서 생성되고 이런 펩티드가 정상 조직에서는 존재하지 않거나 더 낮은 수준으로 존재한다는 것이 결정되었기 때문에, 이런 펩티드는 암의 존재의 진단에 사용될 수 있다.

[0434] 청구되는 펩티드의 혈액 샘플 내 조직 생체 검사에서의 존재는 암의 진단 시 병리학자를 도울 수 있다. 항체, 질량 분석, 또는 이 분야에 다른 알려진 방법의 수단을 통한 특정 펩티드의 검출은 조직 샘플이 악성 또는 염증이 있는지 또는 일반적으로 병들어 있는지 또는 HCC, CRC, GB, GC, 식도암, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, 흑색종, 유방암, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC 또는 CLL의 바이오마커로서 사용가능한지 병리학자에게 알려줄 수 있다. 펩티드의 그룹의 존재는 병변 조직의 분류 또는 하위 분류를 가능하게 한다.

[0435] 병변 조직 샘플의 펩티드의 검출은 특히 만약 T 램프구가 작용 기전에 참여하는 것으로 알려져 있거나 기대할 때, 면역계를 포함한 치료의 이익에 대한 결정을 내릴 수 있게 한다. MHC 발현의 손실은 감염된 악성 세포가 면역 감시를 탈출하는 과정에서 잘 설명되는 기전이다. 펩티드의 존재는 이 기전이 분석된 세포에서 악용되지 않는 것을 보여준다.

[0436] 본 발명의 펩티드는 펩티드 또는 MHC 분자에 합성된 펩티드에 대한 T 세포 반응 또는 항체 반응과 같은 펩티드에 대한 램프구 반응을 분석하는데 사용될 수 있다. 이런 램프구 반응은 추가 치료 단계에서 결정을 내릴 때 전조 마커로 사용될 수 있다. 이런 반응은 또한 램프구 반응을 여러 방법으로, 예를 들어, 단백질 백신, 핵산, 자가 조직 물질, 램프구의 양자 면역 전송을 유도하는 것을 목표로 하는 면역치료의 접근방식에서 대리 마커로 사용될 수 있다. 유전자 치료 설정에서, 펩티드에 대한 램프구 반응은 부작용의 평가에서 고려할 수 있다. 램프구 반응의 모니터링은 이식 요법의 후속 시험을 위한 중요한 도구가 될 수도 있다(예를 들어, 이식편대숙주 및 숙주대이식편병의 검출).

[0437] 이제 본 발명은 그 바람직한 구현을 설명하는 하기 실시예 및 동반되는 도면을 참조하여 묘사될 것이나, 이에 국한되지 않는다. 본 발명의 목적상, 여기에 인용된 모든 참조문헌들은 그 전문이 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0438] 도 1은 정상 조직과 비교하여 여러 암 조직에서 다양한 펩티드의 과다제시를 보여준다. 그 분석에는 170개가 넘는 정상 조직 샘플 및 376개의 암 샘플에 의한 데이터가 포함되었다. 펩티드가 제시된 샘플만이 도면에 제시된다: 도 1a) 유전자: CENPE, 펩티드: KLQEKIQEL(서열번호 1), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 4개 백혈구 암 세포주, 1개 체장암 세포주, 1개 흑색종 세포주, 2개 정상 조직 샘플(1개 부신, 1개 비장), 31개 원발성 암 조직 샘플(1개 뇌암, 4개 결장암, 1개 식도암, 1개 신장암, 2개 간암, 16개 폐암, 4개 난소암, 1개 직장암, 1개 위암), 도 1b) 유전자: KIF15, 펩티드: QLIEKNWLL(서열번호 10), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 5개 백혈구 암 세포주, 1개 체장암 세포주, 1개 골수성 백혈병 세포주, 및 1개 정상 조직 샘플(1개 부신), 29개 암 조직 샘플(4개 결장암, 2개 식도암, 1개 백혈구 암, 1개 간암, 10개 폐암, 11개 난소암), 도 1c) 유전자: HAVCR1, 펩티드: LLDPKTIFL(서열번호 11), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 신장암 세포주, 13개 암 조직 샘플(8개 신장암, 1개 간암, 2개 폐암, 2개 직장암), 도 1d) 유전자: RPGRIP1L, 펩티드: RLHDENILL(서열번호 13), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 신장암 세포주, 1개 전립선암 세포주, 1개 흑색종 세포주, 50개 암 조직 샘플(4개 뇌암, 1개 결장암, 2개 식도암, 3개 신장암, 2개 간암, 23개 폐암, 7개 난소암, 2개 체장암, 2개 전립선암, 3개 직장암, 1개 위암), 도 1e) 내지 도 1j)는 정상 조직과 비교하여 여러 암 조직에서 다양한 펩티드의 과다제시를 보여준다. 그 분석에는 320개가 넘는 정상 조직 샘플 및 462개의 암 샘플로 얻은 데이터가 포함되었다. 펩티드가 제시된 샘플만이 도면에 제시된다: 도 1e) 유전자: DNAH14, 펩티드: SVLEKEIYSI(서열번호 2), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 4개 세포주(3개 혈액 세포, 1개 체장), 2개 정상 세포(1개 램프 절, 1개 기관), 52개 암 조직(2개 담관암, 1개 골수 세포암, 3개 백혈구성 백혈병 암, 5개 유방암, 1개 식도암, 1개 식도 및 위암, 1개 담낭암, 4개 결장암, 7개 폐암, 6개 램프절암, 7개 난소암, 4개 전립선암, 4개 피부암, 2개 방광암, 4개 자궁암), 도 1f) 유전자: MAGEA3, MAGEA6, 펩티드: KIWEELSLEV(서열번호 40), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 8개 암 조직(1개 간암, 3개 폐암, 2개 피부암, 1개 위암, 1개 방광암), 도 1g) 유전자: HMX1, 펩티드: FLIENLLAA(서열번호 67), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 7개 암 조직(4개 뇌암, 2개 폐암, 1개 자궁암), 도 1h) 유전자: CCDC138, 펩티드: FLLEREQLL(서열번호 84), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 3개 세포주(2개 혈액 세포, 1개 피부), 24개 암 조직(1개 골수 세포암, 3개 백혈구성 백혈병, 1개 골수암, 1개 유방암, 1개 신장암, 2개 결장암, 3개 직장암, 1개 폐암, 7개 램프절 암, 3개 방광암, 1개 자궁암), 도 1i) 유전자: CLSPN, 펩티드: SLLNQPKAV(서열번호 235), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 13개 세포주(3개 혈액 세포, 2개 신장, 8개 체장), 30개 암 조직(1개 골수 세포암, 1개 백혈구성 백혈병, 2개 뇌암, 2개 유방암, 2개 식도암, 1개 담낭암, 1개 직장암, 2개 간암, 4개 폐암, 5개 램프절암, 2개 난소암, 2개 피부암, 4개 방광암, 1개 자궁암), 도 1j) 유전자: SPC25, 펩티드: GLAEFQENV(서열번호 243), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 3개 세포주(1개 혈액 세포, 1개 신장, 1개 체장), 67개 암 조직(1개 담관암, 4개 백혈구성 백혈병, 1개 골수 세포암, 2개 뇌암, 3개 유방암, 4개 식도암, 2개 담낭암, 2개 결장암, 1개 직장암, 2개 간암, 15개 폐암, 8개 램프절암, 9개 난소암, 3개 피부암, 4개 방광암, 6개 자궁암).

도 2는 정상 조직 패널과 비교하여 여러 암에서 고도로 과발현되거나 배타적으로 발현된 본 발명의 근원 유전자들의 예시적 발현 프로파일(정상 신장에 비교되는 상대적 발현)을 보여준다. 도 2a) PRIM2 - 왼쪽에서 오른쪽으로 조직들: 부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(세겹), 백혈구, 간, 폐, 램프절, 난소, 체장, 태반, 전립선, 침샘, 골격 근육, 피부, 신장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁, 정

맥(각 정상 샘플은 몇몇 공여자의 풀을 나타냄), 22개 개인 전립선암 샘플, 도 2b) CHEK1 - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(세겹), 백혈구, 간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 침샘, 골격 근육, 피부, 신장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁, 정맥(각 정상 샘플은 몇몇 공여자의 풀을 나타냄), 3개 개인 정상 결장 샘플, 10개 개인 대장암 샘플, 도 2c) TTC30A - 왼쪽에서 오른쪽으로 조직들: 부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(세겹), 백혈구, 간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 침샘, 골격 근육, 피부, 신장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁, 정맥(각 정상 샘플은 몇몇 공여자의 풀을 나타냄), 30개 개인 뇌암 샘플, 도 2d) TRIP13 - 왼쪽에서 오른쪽으로 조직들: 부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(세겹), 백혈구, 간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 침샘, 골격 근육, 피부, 신장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁, 정맥(각 정상 샘플은 몇몇 공여자의 풀을 나타냄), 1개 개인 정상 폐 샘플, 38개 개인 폐암 샘플, 도 2e) MXRA5 - 왼쪽에서 오른쪽으로 조직들: 부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(세겹), 백혈구, 간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 침샘, 골격 근육, 피부, 신장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁, 정맥(각 정상 샘플은 몇몇 공여자의 풀을 나타냄), 9개 개인 췌장암 샘플. 도 2f 내지 도 2h는 정상 조직(흰색 막대) 및 여러 암 샘플(검정색 막대) 패널에서 암으로 고도 파발현되거나 배타적으로 발현된 본 발명의 근원 유전자들의 예시적 발현 프로파일을 보여준다. 도 2f) MMP11, MMP13(서열번호 24) - 왼쪽에서 오른쪽으로 조직들: 80개 정상 조직 샘플(6개 동맥, 2개 혈액 세포, 2개 뇌, 1개 심장, 2개 간, 3개 폐, 2개 정맥, 1개 지방 조직, 1개 부신, 5개 골수, 1개 연골, 1개 결장, 1개 식도, 2개 눈, 2개 담낭, 1개 신장, 6개 림프절, 4개 췌장, 2개 말초 신경, 2개 뇌하수체, 1개 직장, 2개 침샘, 2개 골격 근육, 1개 피부, 1개 소장, 1개 췌장, 1개 위, 1개 갑상선, 7개 기관, 1개 방광, 1개 유방, 5개 난소, 5개 태반, 1개 전립선, 1개 고환, 1개 흉선, 1개 자궁), 50개 암 샘플(10개 유방암, 4개 담관암, 6개 담낭암, 11개 식도암, 10개 방광암, 10개 자궁암), 도 2g) HORMAD1(서열번호 168) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 80개 정상 조직 샘플(6개 동맥, 2개 혈액 세포, 2개 뇌, 1개 심장, 2개 간, 3개 폐, 2개 정맥, 1개 지방 조직, 1개 부신, 5개 골수, 1개 연골, 1개 결장, 1개 식도, 2개 눈, 2개 담낭, 1개 신장, 6개 림프절, 4개 췌장, 2개 말초 신경, 2개 뇌하수체, 1개 직장, 2개 침샘, 2개 골격 근육, 1개 피부, 1개 소장, 1개 췌장, 1개 위, 1개 갑상선, 7개 기관, 1개 방광, 1개 유방, 5개 난소, 5개 태반, 1개 전립선, 1개 고환, 1개 흉선, 1개 자궁), 41개 암 샘플(10개 유방암, 10개 피부암, 11개 비소세포 폐암, 10개 소세포 폐암), 도 2h) IGF2BP1, IGF2BP3(서열번호 274) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 80개 정상 조직 샘플(6개 동맥, 2개 혈액 세포, 2개 뇌, 1개 심장, 2개 간, 3개 폐, 2개 정맥, 1개 지방 조직, 1개 부신, 5개 골수, 1개 연골, 1개 결장, 1개 식도, 2개 눈, 2개 담낭, 1개 신장, 6개 림프절, 4개 췌장, 2개 말초 신경, 2개 뇌하수체, 1개 직장, 2개 침샘, 2개 골격 근육, 1개 피부, 1개 소장, 1개 췌장, 1개 위, 1개 갑상선, 7개 기관, 1개 방광, 1개 유방, 5개 난소, 5개 태반, 1개 전립선, 1개 고환, 1개 흉선, 1개 자궁), 53개 암 샘플(4개 담관암, 6개 방광암, 10개 림프절암, 12개 난소암, 11개 식도암, 10개 폐암).

도 3은 예시적 면역원성 데이터: 펩티드-특이적 다합체 염색 이후 유세포 측정 결과를 보여준다.

도 4a 내지 도 4r은 다음을 상부에 보여준다: 기술적 중복 측정에 따른 중간 MS 신호 강도를 색깔있는 점으로 도표에 나타냈다: 펩티드가 검출된 단일 HLA-A*02 양성 정상 샘플(녹색 또는 회색 점) 및 종양 샘플(적색 점). 종양 및 정상 샘플은 근원 기관에 따라 그룹화되었으며, 상자수염도는 복수 샘플에 대한 정규화 신호 강도의 중앙값, 25번째 및 75번째 백분위수(상자) 및 최소값 및 최대값(수염)을 나타낸다. 정상 기관은 위험 범주에 따라 순서가 정해진다(혈액 세포, 심혈관계, 뇌, 간, 폐; 고위험, 진한 녹색 점; 생식 기관, 유방, 전립선: 저위험, 회색 점; 모든 다른 기관들: 중간 위험; 연한 녹색 점). 하부: 각 기관에서 상대적 펩티드 검출 빈도를 축 플롯으로 보여준다. 패널 아래 수는 각 기관에 대해 분석한 총 샘플 수 가운데 펩티드가 검출된 샘플의 수를 가리킨다(정상 샘플의 N = 298, 종양 샘플의 N = 461). 만약 어떤 상황에서 펩티드가 검출되었지만 기술적 이유로 정량화할 수 없었다면, 해당 샘플은 이러한 검출 빈도의 표시에는 포함되지만 이 도면의 상부에는 점으로 나타내지 않는다. 조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; adipose: 지방 조직; adren.g1.: 부신; BM: 골수; colorect: 대장; 십이지장; esoph: 식도; gallb: 담낭; LN: 림프절; panc: 췌장; parathyrr: 부갑상선; perit: 복막; pituit: 뇌하수체; sal.gland: 침샘; skel.mus: 골격 근육; 피부; sm.int: 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁. 종양 샘플: AML: 급성 골수성 백혈병; PCA: 전립선암; BRCA: 유방암; CLL: 만성 림프구성 백혈병; CRC: 대장암; GALB: 담낭암; HCC: 간세포 암종; MEL: 흑색종; NHL: 비호지킨 림프종; OC: 난소암; OSCAR: 식도암; OSC_GC: 식도/위암; PC: 췌장암; GB: 아교모세포종; GC: 위암; NSCLC: 비소세포 폐암; RCC: 신장 세포 암종; SCLC: 소세포 폐암; UBC: 방광 암종; UEC: 자궁 및 자궁내막암.

도 5a 내지 도 5r은 여러 암 샘플에서 과발현된 본 발명의 근원 유전자의 예시적 발현 프로파일을 보여준다. 종양(적색 점) 및 정상(녹색 또는 회색 점)은 근원 기관에 따라 그룹화되었으며, 상자수염도는 복수 샘플에 대한 정규화 신호 강도의 중앙값, 25번째 및 75번째 백분위수(상자) 및 최소값 및 최대값(수염) RPKM 값을 나타낸다. 정상 기관은 위험 범주에 따라 순서가 정해진다. RPKM = 킬로베이스 당 백만 매핑 리드 당 리드 수. 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; adipose: 지방 조직; adren.gl.: 부신; BM: 골수; colorect: 대장; 십이지장; esoph: 식도; gallb: 쓸개; LN: 림프절; panc: 췌장; parathy: 부갑상선; perit: 복막; pituit: 뇌하수체; sal.gland: 침샘; ske1.mus: 골격 근육; 피부; sm.int: 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁. 종양 샘플: AML: 급성 골수성 백혈병; PCA: 전립선암; BRCA: 유방암; CLL: 만성 림프구성 백혈병; CRC: 대장암; GALB: 담낭암; HCC: 간세포 암종; MEL: 흑색종; NHL: 비호지킨 림프종; OC: 난소암; OSCAR: 식도암; OSC_GC: 식도/위암; PC: 췌장암; GB: 아교모세포종; GC: 위암; NSCLC: 비소세포 폐암; RCC: 신장 세포 암종; SCLC: 소세포 폐암; UBC: 방광 암종; UEC: 자궁 및 자궁내막암.

도 6a 내지 도 6m은 건강한 HLA-A*02+공여자에서 펩티드 특이적 시험관내 CD8+ T세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 예를 들어, 서열번호 11 펩티드(6a, 왼쪽 패널) 또는 서열번호 14 펩티드(6b, 왼쪽 패널)와 각각 복합된 항-CD28 mAb 및 HLA-A*02로 코팅한 인공 APC를 사용하여, CD8+ T 세포를 프라이밍했다(서열번호 157 (6c), 233 (6d), 85 (6e), 89 (6f), 155 (6g), 153 (6h), 264 (6i), 117 (6j), 253 (6k), 39 (6l) 및 203 (6m)). 3주기의 자극 후, 펩티드-반응성 세포의 검출은, 예를 들어 A*02/SeqID No 11 (6a) 또는 A*02/SeqID No 14 (6b)와 같은 관련 다합체를 사용한 2D 다합체 염색에 의해 수행했다. 왼쪽 패널들(예: 6a 및 6b)은 관련이 없는 A*02/펩티드 복합체로써 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 본 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로써 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시된다.

도 7a 내지 도 7c는 정상 조직과 비교하여 여러 암 조직에서의 다양한 펩티드의 과다제시를 보여준다. 그 분석에는 320개가 넘는 정상 조직 샘플 및 462개의 암 샘플로 얻은 데이터가 포함되었다. 펩티드가 제시된 샘플만이 도면에 제시된다: 도 7a) 유전자: CCR8, 펩티드: LLIPFTIFM(서열번호 43), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 16개 암 조직(1개 담관암, 1개 유방암, 1개 결장암, 7개 폐암, 2개 림프절암, 3개 난소암, 1개 피부암); 도 7b) 유전자: CXCR5, 펩티드: ILVTSIFFL(서열번호 152), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 6개 정상 조직(1개 림프절, 5개 췌장), 16개 암 조직(8개 백혈구성 백혈병, 8개 림프절암); 도 7c) 유전자: CYSLTR1, 펩티드: VILTSSPFL(서열번호 156), 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 3개 정상 조직(1개 폐, 1개 림프절, 1개 췌장), 11개 암 조직(2개 유방암, 5개 백혈구성 백혈병), 3개 림프절암, 1개 골수성 세포암).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0439]

실시예

[0440]

실시예 1

[0441]

세포 표면에 제시한 종양-연관 펩티드의 동정 및 정량화

[0442]

조직 샘플

[0443]

환자의 종양 조직은 다음을 통해 제공되었다: Asterand(Detroit, USA and Royston, Herts, UK); Val d'Hebron University Hospital(Barcelona); BioServe(Beltsville, MD, USA); Center for cancer immune therapy(CCIT), Herlev Hospital(Herlev); Geneticist Inc.(Glendale, CA, USA); University Hospital of Geneva; University Hospital of Heidelberg; University Hospital of Munich; Kyoto Prefectural University of Medicine(KPUM); Osaka City University(OCU); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, USA); University Hospital of Tübingen. 정상 조직은 다음을 통해 제공되었다: Bio-Options Inc.(CA, USA); BioServe(Beltsville, MD, USA); Capital BioScience Inc.(Rockville, MD, USA); Geneticist Inc.(Glendale, CA, USA); University Hospital of Geneva; University Hospital of Heidelberg; University Hospital Munich; ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, USA); University Hospital of Tübingen. 모든 환자의 고지에 의한 동의서가 수술 전 또는 부검 전에 제출되었다. 조직은 절제 직후 충격 동결되었으며 TUMAP의 분리까지 -70°C 이하에서 보관되었다.

[0444]

조직 샘플에서 HLA 펩티드의 단리

[0445]

약간 변형된 프로토콜에 따라, 충격 동결된 조직 샘플의 HLA 펩티드 풀은 고형 조직의 면역 침전에 의해 HLA-A*02-특이 항체 BB7.2 또는 HLA-A, -B, -C-특이적 항체 W6/32, CNBr-활성화 세파로오스, 산성 처리와 한의 여

과를 이용해 획득되었다(Falk, et al 1991; Seeger, et al. T 1999).

[0446] 질량 분광분석법의 분석

얻어진 HLA 웨티드 풀은 그들의 소수성에 의해 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리되었고(nanoAcuity UPLC system, Waters) 용출된 웨티드는 ESI 공급원을 갖춘 LTQ-velos 및 융합 하이브리드 질량분광분석기(ThermoElectron)에 의해 분석되었다. 웨티드 풀은 분당 400 nL의 유량을 적용하여 1.7 μm C18 역상 물질(Waters)로 충전된 용융-실리카 마이크로모세관 컬럼(75 μm i.d. x 250 mm)에 바로 로딩된다. 이어서, 웨티드는 2-단계 180분-10% 내지 33%의 2개 용매 구배를 이용하여 분리되고, 여기서 유량은 분당 300 nL이다. 구배는 용매 A(물의 0.1% 포름산)와 용매 B(아세토니트릴의 0.1% 포름산)로 이루어진다. 구배는 용매 A(물의 0.1% 포름산)와 용매 B(아세토니트릴의 0.1% 포름산)로 이루어진다. 금이 입혀진 유리 모세관(PicoTip, New Objective)이 미세-ESI 공급원으로의 도입에 사용되었다. LTQ-Orbitrap 분광분석기가 TOP5 전략을 이용한 데이터-의존 모드에서 작동되었다. 간략하게, 스캔 사이클은 오비트랩(orbitrap)의 높은 질량 정확도($R = 30,000$)의 전스캔으로 시작되고, 이후 5개의 가장 많은 이전에 선택한 이온의 동적 배제에 의한 전조 이온에 대한 오비트랩($R = 7,500$)의 MS/MS 스캔이 이어졌다. 텐덤 질량 스펙트럼은 SEQUEST와 추가적인 수동 컨트롤에 의해 해석된다. 동정된 웨티드 서열은 생성된 자연 웨티드 단편화 패턴과 합성을 서열-일치 참고 웨티드와의 비교를 통해 보증되었다.

[0448] 비표지 상대적 LC-MS 정량화는 이온 계측, 즉, LC-MS 특징의 추출 및 분석에 의해 수행했다(Mueller et al., 2007). 이 방법은 웨티드의 LC-MS 신호 영역이 샘플 내의 풍부함과 상관관계가 있음을 가정한다. 추출된 특징은 전하 상태 디컨볼루션 및 정체 시간 정렬에 의해 더욱 처리되었다(Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). 마지막으로 모든 LC-MS 특징은 서열 확인 결과와 상호 참조하여 다른 샘플과 조직의 정량 데이터를 웨티드 제시 프로파일에 합쳤다. 이 정량 데이터를 중심 경향성에 따라 2단 형태로 정상화함으로써 기술적인 생물학적 복제 내에서의 변동을 고려했다. 따라서, 동정된 웨티드는 하나씩 정량 데이터와 연관시키며 샘플과 조직 사이의 상대적 정량화를 허용할 수 있다. 그 밖에 웨티드 후보로부터 얻어진 모든 정량 데이터를 수동으로 검사하여 데이터 일관성을 보증하고 자동화 분석의 정확성을 확인했다. 웨티드마다 평균 샘플 제시는 물론 복사 변이를 보여주는 제시 프로파일을 계산했다. 이 프로파일은 암 샘플을 정상 조직 샘플의 기준선에 병치한다. 예시적인 과다제시된 웨티드의 제시 프로파일이 도 1에 제시된다. 객체들에 대한 웨티드 제시의 개요가 선택된 웨티드는 표 4A에 제시된다.

[0449] 표 4A에서 객체들에서 선택된 웨티드의 제시 개요. 정상 조직과 비교하여 해당 객체의 암 세포에서 임의의 웨티드가 과다제시 되었다면 그 웨티드는 흥미로운 것으로 간주했다. MEL = 흑색종, BRCA = 유방암, OSCAR = 식도암. BPH에는 양성 전립선 비대증은 물론 췌장암이 포함된다.

[0450]

[표 4A]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 객체
1	KLQEKIQEL	GB,GC,NSCLC,HCC,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR
2	SVLEKEIYSI	NSCLC,HCC,BPH,OC,CRC,PC
3	RVIDDSLVVGV	NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC, OSCAR
4	VLFGEALPAL	GB,NSCLC,BRCA,RCC,PC, OC, PC
5	GLVDIMVHL	NSCLC,RCC, OC
7	ALLQALMEL	GC,NSCLC,RCC,CRC,PC
8	ALSSSQAEV	GB,NSCLC,OC,CRC,PC
9	SLITGQDLLSV	NSCLC,BPH,OC,MEL,PC, OSCAR
10	QLIEKNWLL	NSCLC,OC,CRC,PC, HCC, CLL, OSCAR
11	LLDPKTIFL	NSCLC,HCC,RCC,CRC
12	RLLDPKTIFL	NSCLC,RCC
13	RLHDENILL	GB,GC,NSCLC,HCC,BPH,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR
14	YTFSGDVQL	GC,NSCLC,CRC,PC, OSCAR
15	GLPSATTTV	GC, NSCLC, OC, PC
16	SLADLSLLL	NSCLC,HCC,PC
17	GLLPSAESIKL	NSCLC,BPH,OC, OSCAR
18	KTASINQNV	NSCLC,CRC,PC, OSCAR, OC
19	KVFELDLVTL	GC,NSCLC,CRC, OSCAR
21	YLMDDDFSSL	PC, NSCLC
22	LMYPYIYHV	GB, NSCLC, OC, OSCAR
23	ALLSPLSLA	PC
24	KVWSDVTPL	PC, NSCLC
25	LLWGHPRVALA	CRC, PC, NSCLC
26	VLDGKVAVV	HCC, MEL, OC, GB, GC, NSCLC
27	GLLGKVTSV	NSCLC,BRCA
29	KMISAIPTL	NSCLC,OC
34	TLNTLDINL	OC, PC
35	VIIKGLEEI	GC,NSCLC, OSCAR
36	TVLQELINV	NSCLC,PC, OSCAR
37	QIVELIEKI	GC,NSCLC, OSCAR
39	YLEDGFAYV	GB,NSCLC,HCC,PC
40	KIWEELSLEV	GC,NSCLC,HCC,MEL
43	LLIPFTIFM	NSCLC,MEL,CRC, OC
44	AVFNLVHV	GC,NSCLC,PC
46	ISLDEVAVSL	GB,NSCLC,HICC, OC
47	GLNGFNVLL	PC, OSCAR

[0451]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 객체
48	KISDFGLATV	GB, NSCLC, PC, OSCAR
49	KLIGNIHGNEV	GB, NSCLC, OC
50	ILLSVLHQL	NSCLC, CRC
51	LDSEALLTL	GB, NSCLC, HCC
52	TIGIPFPNV	NSCLC, PC, OC
53	AQHLSTLLL	GC, NSCLC
54	YLVPGLVAA	NSCLC, OC
55	HILFDKIJKI	GC, CRC
56	VLQENSSDYQSNL	NSCLC, HCC
57	TLYPGRFDYV	NSCLC, PC
58	HLLGEGAFAQV	NSCLC, PC
59	ALADGIKSFL	NSCLC, PC
60	YLFSQGLQGL	NSCLC, PC
61	ALYPKEITL	NSCLC, CRC
63	KLLPMVIQL	NSCLC, PC
65	SLSEKSPEV	NSCLC, OC, OSCAR, MEL
66	AMFPDTIPRV	NSCLC, OC
67	FLIENLLAA	GB, NSCLC
68	QLMNLIRSV	HCC, PC
69	LKVLKADWVL	GC, NSCLC
70	GLTEKTVLV	NSCLC, PC
71	HMSGKLTNV	NSCLC, PC
73	SVPKTLGV	GB, RCC
74	GLAFLPASV	GC, CRC
76	FTAEFLEKV	NSCLC, PC, GB, OSCAR
77	ALYGNVQQV	NSCLC, OC
82	ILAEEPITYIRV	NSCLC, PC, OSCAR, OC
83	GLLENSPHL	NSCLC, OC
84	FLLEREQLL	NSCLC, MEL, RCC, CRC, PC
85	KLLDKPEQFL	NSCLC, OC, MEL, CRC
86	SLFSNIESV	NSCLC, BPH, CRC
88	LLLPLELSA	GB, NSCLC, PC
89	SLAETIFIV	GC, NSCLC, OC
92	RLFEEVLGV	NSCLC, HCC, OC, OC
93	RLYGYFHDA	NSCLC, PC
94	YLDEVAFML	NSCLC, HCC, OC
95	KLIDEDEPFL	NSCLC, OC
96	ALDTTRHEL	NSCLC, PC

[0452]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 객체
97	KLFEKSTGL	NSCLC, CRC
98	FVQEKİPEL	GC, CRC
100	ALQSFEFRV	OC, RCC
101	SLLEVNEASSV	GC, CLL
102	GLYPVTLVGV	BPH, OC
114	LLF PSDVQZL	PC, OSCAR
116	ALLSSVAEA	NSCLC, OSCAR, OC
117	TLLEGISRA	NSCLC, OC
134	SLYKSFLQL	NSCLC, OSCAR, OC
137	KLIYKDLVSV	NSCLC, OC, PC
146	VVA AHLAGA	NSCLC, OSCAR, OC
158	YLDPLWHQL	PC, OC
165	SLLDYEVSI	NSCLC, OSCAR, OC
166	LLGDSSFFL	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, PC
170	FIAAVVEKV	NSCLC, OC
175	SLLDLVQSL	PC, OC
176	VQSGLRILL	NSCLC, OSCAR
184	ALDSTIAHL	NSCLC, OC
191	AAIEIFEKV	NSCLC, OSCAR, OC
203	FLFVDPELV	NSCLC, GC, OC
229	YLYELEIHAL	NSCLC, OC
233	SLFESLEYL	NSCLC, OSCAR, OC
234	VLLNEILEQV	GC, NSCLC, HCC, OC, MEL, RCC, CRC, PC, OSCAR
235	SLLNQPKAV	GB, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC, OSCAR
236	KMSELQTYV	GB, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC
237	ALLEQTGDMSL	NSCLC, OC, MEL, CRC
239	VI IKGLEEITV	GC, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC
241	KQFEGTVEI	NSCLC, MCC, OC, CRC, PC, OSCAR
242	KLQEEIPVL	GB, NSCLC, CRC
243	GLAEFQENV	GB, NSCLC, HCC, OC, CRC, PC, OSCAR
244	NVAEIVIHI	GC, NSCLC
246	LAGIVTNV	NSCLC, HCC, OC, MEL, RCC
247	NLLIDDKGTIKL	NSCLC, HCC, MEL, CRC, PC
248	VLMQDSRLYL	NSCLC, CRC, PC
251	LLWGNLPEI	NSCLC, MEL, CRC, PC, OC
252	SLMEKNQSL	NSCLC, OC, CRC, OSCAR, RCC
253	KLLAVIHEL	NSCLC, RCC, CRC, PC, OSCAR, OC
254	ALGDKFLRV	NSCLC, HCC, MEL, OC

[0453]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 객체
255	FLMKNSDLYGA	NSCLC, HCC, MEL, PC, OSCAR
256	FLNDIFERI	NSCLC, HCC, CLL, OC
257	KLIDHQGLYL	NSCLC, OC, CRC, OSCAR
258	QLVQRVASV	NSCLC, OC
259	GPGIFPPPPPQP	NSCLC, BPH, OSCAR, OC
260	ALNESLVEC	NSCLC, MEL, OSCAR, OC
261	GLAALAVHL	NSCLC, OC, MEL, CRC, PC, OSCAR
262	LLLEAVWHL	NSCLC, CRC
263	SIIEYLPTL	NSCLC, MEL, PC
264	TLHDQVHLL	NSCLC, BPH, OC
265	FLLDKPQDLSI	NSCLC, OC, RCC
266	FLLDKPQDL	RCC, OC
267	YLLDMPLWYL	NSCLC, RCC, CRC, OC, MEL
269	GLLDCPIFL	NSCLC, CRC, OSCAR, OC
270	TLLTFFHEL	GB, PC
271	VLIEYNFSI	NSCLC, OC
272	FVMEGEPPKL	NSCLC, OC
273	SLNKQIETV	NSCLC, OC
274	TLYNPERTITV	NSCLC, PC, HCC
277	KLQEELNKV	HCC, OC
281	LLLESDPKVYSL	PC, OC
284	KLMDPGSLPPL	NSCLC, OC
287	KIQEILTQV	GB, GC, NSCLC, HCC, CLL, OC, MEL, RCC, CRC, PC, OSCAR
288	SLYKGLLSV	GB, NSCLC, HCC, BPH, OC, RCC, CRC, PC, OSCAR

[0454]

[0455] 표 4B는 객체들에서 선택된 웹티드의 제시 개요이다. GB = 아교모세포종, BRCA = 유방암, CRC = 대장암, RCC = 신장 세포 암종, CLL = 만성 백혈구성 백혈병, HCC = 간세포 암종, NSCLC = 비소세포 폐암, SCLC = 소세포 폐암, NHL = 비호치킨 림프종, AML = 급성 골수성 백혈병, OC = 난소암, PC = 췌장암, BPH = 전립선암 및 양성 전립선 비대증, OSCAR = 식도암, 위식도 접합부의 암 포함, GBC_CCC = 담낭선암종 및 담관암종, MEL = 흑색종, GC = 위암, UBC = 방광암, UTC = 자궁암.

[0456]

[표 4B]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 추가 객체
1	KLQEKIQEL	MEL, AML, NHL
2	SVLEKEIYSI	GC, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
3	RVIIIDDSLVVGV	UBC
4	VLFGELPAL	SCLC, UBC, UTC
5	GLVDIMVIL	SCLC, UBC, BRCA, MEL, PC
6	FLNAIETAL	RCC
7	ALLQALMEL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
8	ALSSSQAEV	BPH, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
9	SLITGQDLLSV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC
10	QLIEKNWLL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
11	LLDPKTIFL	GBC_CCC
13	RLJIDENILL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, MEL, AML, NHL
14	YTFSGDVQL	SCLC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL
15	GLPSATTIV	UBC, UTC, MEL
16	SLADLSLLL	GB, GC, BPH, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, RCC, CRC, AML, NHL
17	GLLPSAESIKL	UBC
18	KTASINQNV	SCLC, UBC, UTC, MEL
19	KVFELDLVTL	AML, NHL
21	YLMDDFSSL	OSCAR, OC, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
22	LMYPYIYHV	HCC, CLL, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, CRC, NHL
24	KVWSDVTPL	BRCA
26	VLDGKVAVV	CLL, UTC, NHL
27	GLLGKVTsv	SCLC, UBC
28	IKVTDPQLLEL	NSCLC, MEL
29	KM1SAIPTL	UTC
30	IITEVITRL	OC, UTC
31	GLLETTGLLAT	OC
33	TLDRNSLYV	OC, UTC
34	TLNTLDINL	UTC
35	VIIKGLEEI	OC
36	TVLQELINV	UBC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
38	VLQQESNFL	AML
39	YLEDGFAYV	CLL, UBC, UTC, MEL, NHL
40	KIWEELSLEV	SCLC, UBC

[0457]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 추가 객체
41	IVTEIISEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
43	LLIPFTIFM	SCLC, GBC_CCC, NHL
46	ISLDEVAVSL	BRCA
47	GLNGFNVLL	SCLC, UTC, GBC_CCC, MEL, CRC, AML, NHL
48	KISDFGLATV	OC, MEL
51	LDSEALLTL	BRCA
52	TIGIPFPNV	MEL, NHL
53	AQHLSTLLL	SCLC, GBC_CCC
56	VLQENSSDYQSNL	UTC
57	TLYPGRFDYV	OSCAR, UBC
59	ALADGIKSFLL	BRCA, MEL
64	SLYAGSNNQV	NSCLC
65	SLSEKSPEV	HCC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, NHL
67	FJENIJAA	UTC
68	QLMNLIRSV	UBC, AML
70	GLTEKTVLV	CRC, AML, NHL
75	AIJDGAIQL	GC, CRC
76	FTADEFLEKV	UBC, MEL, AML, NHL
77	ALYGNVQQV	BRCA, NHL
78	LFQSRAGV	BPH
80	VLTGQVHEL	GB
83	GLLENSPHL	BRCA, MEL, AML, NHL
84	FLLEREQLL	CLL, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
85	KLLDKPEQFLL	NHL
86	SLFSNIESV	SCLC, BRCA, GBC_CCC
87	KLLSLLEEA	NSCLC, BPH
89	SLAETIFIV	SCLC, GBC_CCC, RCC, NHL
90	AILNVDEKNQV	OC
91	LLPSIFLMV	OC
92	RLFEEVLGV	OSCAR, SCLC, UBC, BRCA, AML
94	YLDEVAFML	UBC, BRCA, GBC_CCC
95	KLIIDEDEPLFL	SCLC, UTC, GBC_CCC
96	AIIDTTRHEL	OSCAR, UBC, UTC
98	FVQEKİPEL	GBC_CCC
99	TLFGIQLTEA	GC, GBC_CCC
101	SIJ.EVNNEASSV	NHL
102	GLYPVTLVGV	SCLC, BRCA, AML
103	YLADTVQKL	NSCLC
104	DLPTQEPAALGTT	BPH

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 추가 객체
106	VLLGSVVIFA	BPH
108	FIANLPPELKA	BPH
109	ILGSFELQL	BPII
110	QIQQQVSEV	BPH
112	ILAQDVAQL	MEL, AML, NHL
113	FLFLKEVKV	CRC
116	ALLSSVAEA	SCLC, BRCA, CRC
117	TLLEGISRA	BRCA
118	IAYNPNGNAL	NSCLC, CLL, AML
119	SLIEESEEL	OC, UTC
121	ALYVQAPTV	NSCLC, UTC, NHL
122	SIIDTELKV	AML
124	ALLRLFTI	NSCLC
128	SILTNISEV	NSCLC
129	KMASKVTQV	HCC
130	QLYGSAITL	HCC
132	ALLNNVIEV	HCC, BRCA
133	FLDGRPLTL	UTC, MEL
135	HLDTVKIEV	GB
136	LLWDAPAKC	CRC
139	IILENIQSL	UBC, BRCA, AML
140	FLDSQITTV	MEL
142	LLDAAIASI	NSCLC
143	MLWESIMRV	NSCLC, UTC
144	FLISQTPLL	NSCLC, SCLC, UBC
145	ALEEKLENV	NSCLC
146	VVA AHLAGA	GC, MEL
147	GLLSALENV	CLL, NHL
148	YLILSSHQL	CLL, NHL
150	VLLDMVHSL	HCC, UTC
151	DISKRIQSL	NSCLC
152	ILVTSIFFL	CLL, NHL
153	KLVELEHTL	GC, NSCLC, OSCAR
154	AIIKEIQTIV	GB, NSCLC, HCC, UBC, MEL
155	TLDSYLKAV	OC, BRCA
156	VILTSSPFL	CLL, BRCA, AML, NHL
157	ILQDGQFLV	HCC, UBC
158	YLDPLWHQL	CLL, MEL, NHL
159	QLGPVPVTI	UBC, RCC, NHL

[0459]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 추가 객체
160	TLQEWLTEV	NSCLC, GBC_CCC
161	NLLDENVCL	CRC
162	GLLGNNLLTSL	NSCLC
163	GLEERLYTA	NSCLC, CLL, AML, NHL
164	MLIIRPVSV	NSCLC
165	SLLDYEVSI	GBC_CCC
166	LLGDSSFFL	CLL, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML
167	LVVDEGSLVSV	OC, SCLC
168	VIFEGERPYL	NSCLC, BRCA, NHL
169	ALADLSAV	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL, AML
170	FIAAVVEKV	SCLC, NHL
171	LLLLDVPTA	NSCLC, UTC, BRCA, CRC, NHL
172	SLYLQMNSLRTE	NSCLC
173	RLIDIYKNV	OC
174	ALYSGDLHAA	HCC
175	SLLDLVQSL	BRCA, AML, NHL
177	ALINVLNAL	AML
179	TLGEIIKGV	NSCLC
180	RLYEEEIRI	NSCLC
181	LLWAPTAQA	GB, NSCLC, RCC, CRC
182	GLQDGFBQITV	GC
183	ALSYILPYL	NSCLC, SCLC, UTC, BRCA, CRC, AML, NHL
184	ALDSTIAHL	UTC, MEL
185	TLYQGLPAEV	GC, NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, BRCA, RCC, CRC
186	SLLSLESRL	GC
187	SILKEDPFL	NSCLC
188	VLGEEQEJV	NSCLC
189	MAVSDLLIL	GB
190	SLSTELFKV	HCC
192	TLLPSSGLVTL	BRCA
193	ALFHMNILL	NSCLC
194	KLLEEVQLL	NSCLC
195	VIIQNLPAI	CRC
196	TIHQWIYYL	CRC
198	ILTNKVVSV	OC
199	SVADLAIVL	GC
200	IMPTFDLTKV	HCC
201	LLFSLLCEA	BPH
203	FLFVDPELV	CRC, AML, NHL

[0460]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 추가 객체
204	SEWGSPHAAVP	PC
205	LAFGYDDEL	HCC
206	GLDAFRIFL	CRC
207	KLFETVEEL	GB
208	HLNNDRNPL	BPH
210	GLAGDNIYL	RCC
211	LLTTLINA	RCC
212	MTLSEIHAV	CRC
213	ILAVDGVLGV	NSCLC, BRCA, MEL
214	AI.FETLIQL	HCC
215	QIADIVTSV	HCC
216	ALSTVTPRI	HCC
217	LLWPSSVPA	GB, MEL, AML
220	AI.SELERVL	BPH, UTC
221	IMLNSVEEI	BPH, NHL
222	LLTGVFAQL	CLL, UTC, BRCA, CRC, NHL
223	ALHPVQFYL	OC, CRC
224	LLFDWSGTGRADA	GBC_CCC
225	FLPQPVPLSV	CLL, MEL, NHL
226	SLAGNLQEL	GB
227	SEMEELPSV	HCC
228	SLLELDGINRL	NSCLC
230	KLLNMIFSII	BPH
231	LLDDIFIRL	MEL
233	SLFESLEYL	UTC, RCC
234	VLLNEILEQV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
235	SIJNQPKAV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
236	KMSELQTYV	GC, BPH, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, RCC, AML, NIL
237	ALLEQTGDMISL	SCLC, UBC, BRCA, AML, NHL
238	HLQEKLQSL	HCC
239	VIIKGLEEITV	CLL, SCLC, UBC, UTC, AML, NHL
240	SVQENIQQQK	RCC, NHL
241	KQFEGTVIEI	CLL, NHL
242	KLQEEIPVLI	BRCA, MEL, NHL
243	GLAEFQENV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
244	NVAEIVIHI	GB
245	ALLEEEEGV	NSCLC, UBC, GBC_CCC
246	ALAGIVTNV	GB, CLL, SCLC, BRCA, GBC_CCC, AML

[0461]

서열번호	서열	특별한 관심 대상의 추가 색체
248	VLMQDSRLYL	CLL, UBC, UTC, AML, NHL
251	LLWGNLPEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
252	SLMEKNQSL	AML
253	KLLAVIHEL	UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
254	ALGDKFLLRV	NHL
255	FLMKNSDLYGA	UBC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
256	FLNDIFERI	UTC, MEL, AML, NHL
258	QLVQRVASV	UBC, NHL
260	ALNESLVEC	SCLC, UBC, UTC, CRC, AML, NHL
261	GLAALAVHI	GC, CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
262	LLLEAVWIL	BRCA, NHL
263	SI LEYLP TL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, GBC_CCC, AML, NHL
264	TLHDQVHLL	UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL
265	FLLDKPQDLSI	GBC_CCC
267	YLLDMPLWYL	AML, NHL
269	GLLD CPIFL	CLL, UTC, AML, NHL
270	TLLTFFHEL	UTC, GBC_CCC, AML, NHL
271	VLIEYNFSI	CLL, SCLC, MEL, AML, NHL
272	FVMEGEPPKL	CLL, UTC
273	SLNKQIETV	AML
275	AVPPP PSSV	NSCLC, HCC
276	RMPTVLQCV	BPII
277	KI.QEEELNKV	NSCLC, OSCAR, UBC, BRCA, NHL
279	VLMDEGAVLTL	CLL, CRC, NHL
280	HLWGHALFL	HCC
281	LLLES DPKVYSL	OSCAR, SCLC
282	SLYALHVKA	OC, SCLC
283	ALSELLQQV	NSCLC, HCC, OC, SCLC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
285	MLLDTVQKV	NSCLC
286	FLTEMVHF I	NSCLC, CLL, SCLC, UBC, NHL

[0462]

실시예 2**본 발명의 펩티드를 인코딩하는 유전자의 발현 프로파일**

[0465]

정상 세포와 비교한 종양 세포 상의 펩티드의 과다제시 또는 특이적 제시는 면역요법에서의 그 유용성에 충분하며 일부 펩티드는 정상 조직에서도 발생하는 그 근원 단백질에도 불구하고 종양-특이적이다. 여전히 mRNA 발현 프로파일의 결정은 면역요법을 위한 펩티드 표적의 선택에서 추가적 안정성 수준을 추가한다. 특히 친화성-성숙된 TCR과 같은 안정성 위험이 높은 치료적 옵션의 경우에는, 이상적 표적 펩티드는 종양에 고유하며 정상 조직에서는 없는 단백질로부터 유래될 것이다. 본 발명에서, 위에서 묘사한 약 3000개의 정상 조직 샘플에 달하는 RNA 발현 데이터의 데이터베이스에 근거하여 모든 근원 유전자의 정상 조직 발현은 최소인 것으로 나타났다. 또한 일부 암 개체의 경우(HCC, CRC, GB, GC, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA), 해당되는 암을 가진 환자 모집단에서 표적 범위를 추정하기 위해 정상 및 종양 조직에 대한 RNA 분석이 추가되었다.

[0466]

RNA 공급원 및 준비

[0467]

외과적으로 제거된 조직 샘플은 위에서 지적한 바와 같이 각 환자로부터 서면 동의서를 받은 후 제공되었다(실시예 1 참조). 종양 조직 샘플은 수술 직후 스냅-냉동되었고 절구와 유봉을 이용하여 액체 질소 환경 아래에서 균질화되었다. 총 RNA는 TRIzol(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)을 이용하여 샘플로부터 제조되었고 이는 RNeasy(QIAGEN, Hilden, Germany)에 의해 청소되었다; 이 2개의 모든 방법은 제조업체의 설명서에 따라 실행되었다.

[0468]

건강한 인간 조직의 총 RNA는 상업적으로 얻어졌다(Ambion, Huntingdon, UK; Clontech, Heidelberg, Germany; Stratagene, Amsterdam, Netherlands; BioChain, Hayward, CA, USA). 여러 개인에서 얻어진 RNA(2에서 123명의 개인)는 각각의 개인에게 균등 가중치를 두어 섞어졌다. RNA 샘플의 양과 질은 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent, Waldbronn, Germany)에 의해 RNA 6000 Pico LabChip Kit(Agilent)를 사용하여 분석되었

다.

[0469] RNASeq 실험을 위한 건강한 인간 조직의 모든 RNA는 다음을 통해 제공되었다: Asterand(Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK), BioCat GmbH(Heidelberg, Germany), BioServe(Beltsville, MD, USA), Capital BioScience Inc.(Rockville, MD, USA), Geneticist Inc.(Glendale, CA, USA), Istituto Nazionale Tumori "Pascale"(Naples, Italy), ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, USA), University Hospital Heidelberg(Heidelberg, Germany).

[0470] RNASeq 실험을 위한 종양 조직의 모든 RNA는 다음을 통해 제공되었다: Asterand(Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK), Bio-Options Inc.(Brea, CA, USA), BioServe(Beltsville, MD, USA), Geneticist Inc.(Glendale, CA, USA), ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, USA), Tissue Solutions Ltd(Glasgow, UK), University Hospital Bonn(Bonn, Germany), University Hospital Heidelberg(Heidelberg, Germany), University Hospital Tubingen(Tubingen, Germany).

마이크로어레이 실험

[0472] 범위는 30개 GB, 16개 CRC, 56개 RCC, 12개 HCC, 38개 NSCLC, 11개 PC, 34개 GC 및 20개 전립선암 샘플의 RNA 발현 프로파일의 분석에 의해 추정했다(어피메트릭스 마이크로어레이).

[0473] 모든 암과 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 Affymetrix Human Genome(HG) U133A 또는 HG-U133 Plus 2.0 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)에 의해 실행되었다. 모든 단계는 Affymetrix의 사용설명서에 따라 실행되었다. 간단히, 이중가닥 cDNA는 SuperScript RTII(Invitrogen)와 올리고-dT-T7 프라이머(MWG Biotech, Ebersberg, Germany)를 사용하여 사용설명서에 따라 총 RNA 5 내지 8 μ g으로부터 합성되었다. 시험관내 전사는 U133A 어레이를 위한 BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit(ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, USA) 또는 U133 Plus 2.0 어레이를 위한 GeneChip IVT Labelling Kit(Affymetrix)를 사용하여 실행되었다. 이는 cRNA 단편화, 교배 및 스트렙트아비딘-피코에리트리틴 및 비오티닐화된 항-스트렙트아비딘 항체로의 염색으로 이어졌다(Molecular Probes, Leiden, Netherlands). 이미지는 Agilent 2500A GeneArray Scanner(U133A) 또는 Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000(U133 Plus 2.0)을 이용하여 스캔되었고, 데이터는 기본 세팅을 이용하여 GCOS 소프트웨어(Affymetrix)를 통해 분석되었다. 정상화를 위해, Affymetrix에 의해 제공된 100개의 하우스키핑(housekeeping) 유전자가 사용되었다. 상대적인 발현 값은 시그널 로그 비율을 통해 계산되었고 정상 샘플의 값은 임의로 1.0으로 정해졌다. 본 발명의 HCC, CRC, GB, GC, NSCLC, PC, RCC, 또는 BPH/PCA에서 고도로 과발현되거나 배타적으로 발현되는 근원 유전자의 예시적 발현 프로파일이 도 2에 제시된다. 선택된 유전자의 범위 개요는 하기 표에 제시된다.

[0474] 표 5A는 선택된 웨티드에서 근원 유전자의 표적 범위이다. 과발현이란 해당 유전자에 대해 가장 높은 발현을 보여 관련있는 정상 조직과 비교하여 종양 조직의 발현이 1.5배를 초과하는 것으로 정의했다. 19% 미만 과발현 = I, 20 내지 49% = II, 50 내지 69% = III, 70% 초과 = IV. 웨티드가 몇몇 근원 유전자로부터 유래할 수 있다면, 최소 범위를 가진 유전자로 결정되었다.

[0475]

[표 5A]

서열 번호	서열	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH / PCA (%)	GC (%)	유전자- ID	공식적 유전자- 부호
116	ALLSSVAEA	I	II	I	I	II	I	I	I	9048	ARTN
263	SIIEYLPTL	I	II	I	I	I	I	I	I	79915	ATAD5
93	RLYGYFHDA	II	III	I	II	II	II	I	III	6790	AURKA
27	GLLGKVTSV	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
28	IKVTDPQLLEL	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
62	SLVENIHVL	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
241	KQFEGTVEI	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
52	TIGIPFPNV	III	I	I	II	II	I	I	II	83990	BRIP1
58	IILLGEGAFFAQV	III	III	I	I	III	II	I	III	699	BUB1
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	II	II	I	I	26256	CABYR
94	YLDEVAFML	I	I	I	I	I	II	I	I	1238	CCBP2
103	YLADTVQKL	II	I	I	I	I	I	I	I	10052676 1, 54937	CCDC169- SOHLH2, SO HLH2
79	TVLEEIGNRV	II	IV	I	I	II	I	I	II	9133	CCNB2
247	NLLIDDKGTIKL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
249	YLYQILQGI	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
250	LMQQDSRQLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
1	KLQEKIQEL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
242	KLQEEIPVL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
19	KVFELDLVTL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
236	KMSELQTYV	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMMSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
238	HLQEKLQSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
60	YLFQSGLQGL	III	IV	I	III	III	II	I	III	2491	CENP1
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	I	II	55165	CEP55
48	KISDFGLATV	IV	IV	II	II	IV	II	I	IV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ

[0476]

서열 번호	서열	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH / PCA (%)	GC (%)	유전자 ID	공식적 유전자 번호
284	KLMDPGSLPPL	I	IV	I	I	II	I	I	II	2118	ETV4
261	GLAALAVHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA
262	LLLEAVWIL	I	III	I	I	II	I	I	I	2175	FANCA
270	TLLTFFHEL	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
11	LLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
111	AQLEGKLVSI	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
277	KLQEELNKV	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
67	FLIENLLAA	I	I	I	II	I	I	I	I	3166	HMX1
56	VLQENSSDYQSNL	II	III	I	I	I	I	I	I	3188	HNRNPH2
89	SLAETIFIV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
91	LLPSIIFLMV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
287	KIQEILTQV	IV	II	II	III	IV	IV	I	II	10643	IGF2BP3
97	KLFEKSTGL	IV	IV	II	II	I	II	III	II	23421	ITGB3BP
35	VIIKGLEEI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
36	TVLQELINV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
239	VIIKGLEEITV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
240	SVQENIQQK	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
10	QLIEKNWLL	IV	IV	I	II	III	II	I	IV	56992	KIF15
112	ILAQDVAQL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24137	KIF4A
70	GLTEKTVLV	III	IV	I	I	II	II	I	III	24, 137, 2 85, 643	KIF4A, KIF4B
252	SLMEKNQSL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24, 137, 2 85, 643	KIF4A, KIF4B
104	DLPTQEPALGTT	I	I	I	I	I	I	IV	I	354	KLK3
118	IAYNPNGNAL	I	I	I	I	I	II	I	I	3824	KLRD1
113	FLFLKEVKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
279	VLMDEGAVLTL	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
119	SLIEESEEL	I	II	I	I	I	I	I	I	284217	LAMA1
105	AMLASQTEA	II	I	I	II	I	IV	I	I	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	I	I	I	I	I	I	IV	II	4477	MSMB

[0477]

서열 번호	서열	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH / PCA (%)	GC (%)	유전자 ID	공식적 유전자 부호
29	KMISAIPTL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
30	IIITEVITRL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
32	VVMVLVML	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
41	IVTEI ISE I	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
234	VLLNEILEQV	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
285	MLLDTVQKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54892	NCAPG2
114	LLFPSDVQTL	II	III	I	I	III	I	I	III	23397	NCAPH
107	RVLPGQAVTGV	I	III	I	I	I	I	I	I	55247	NEIL3
81	ILAEEPIYI	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
82	ILAEEPIYIRV	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
115	ILHGEVNKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54830	NUP62CL
39	YLEDGFAYV	II	IV	I	I	III	II	IV	IV	5558	PRIM2
83	GLLENSPHL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
253	KLLAVIHEL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
288	SLYKGLLSV	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
108	FIANLPPELKA	I	II	I	I	I	I	IV	I	6013	RLN1
13	RLHDENILL	III	II	II	I	I	I	I	I	23322	RPGRIPL
120	LQLJPLKGLSL	II	IV	I	II	III	II	I	III	6241	RRM2
76	FTAEFLEKV	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
255	FLMKNSDLYGA	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
74	GLAFLPASV	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
243	GLAEFQENV	II	I	I	I	II	II	I	II	57405	SPC25
281	LLLESDPKVYSL	I	III	I	I	I	I	I	I	6491	STIL
109	ILGSFELQL	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
110	Q1QQGVSEV	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
267	YLLDMPLWYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A
268	SLDKDIVAL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A
121	ALYVQAPTV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13

[0478]

서열 번호	서열	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH / PCA (%)	GC (%)	유전자 ID	공식적 유전자 부호
123	QTAPEEAFIKL	IV	II	III	III	III	II	IV	III	15,073,7 92,104	TTC30B, TTC30A
124	ALLRLFTI	III	IV	II	II	IV	IV	I	IV	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT

[0479]

RNaseq 실현

종양 및 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 CeGaT(독일 뷔빙겐)의 차세대 시퀀싱(RNaseq)에 의해 수행했다. 요약하면, RNA 단편화, cDNA 변환 및 시퀀싱 어댑터의 추가를 포함하는 제공자의 프로토콜(Illumina Inc., 미국 캘리포니아 샌디에고)에 따라 Illumina HiSeq v4 시약 키트를 사용하여 시퀀싱 라이브러리를 준비했다. 복

수의 샘플로부터 유래한 라이브러리들을 동일 몰 비율로 혼합한 다음 제조사의 지침에 따라 Illumina HiSeq 2500 시퀀서에서 시퀀싱을 수행하여 50 bp 단일 말단 리드를 생성했다. 처리된 리드를 STAR 소프트웨어를 사용하여 인간 게놈(GRCh38)에 대해 매핑한다. 발현 데이터는 양상을 시퀀스 데이터베이스(Ensembl77)의 주석에 근거하여, 전사물 수준에서 RPKM(Reads Per Kilobase per Million 매핑 리드, Cufflinks 소프트웨어로 생성)으로서 엑손 수준(총 리드, Bedtools 소프트웨어로 생성)에서 제공된다. 엑손 리드들 엑손 길이 및 정렬 크기로서 정규화하여 RPKM 값을 얻는다.

[0482] 본 발명의 NHL, BRCA, GBC, CCC, MEL, OC, OSCAR, SCLC, UBC, UEC에서 고도로 과발현되거나 배타적으로 발현되는 근원 유전자의 예시적 발현 프로파일이 도 2f 내지 도 2h에 제시된다. 추가의 예시적 유전자에 대한 발현 점수는 표 5B에 제시된다.

[0483] 표 5B는 선택된 웨티드에서 근원 유전자의 표적 범위이다. 과발현이란 해당 유전자에 대해 가장 높은 발현을 보여 관련있는 정상 조직과 비교하여 종양 조직의 발현이 1.5배를 초과하는 것으로 정의했다. 19% 미만 과발현 = I, 20 내지 49% = II, 50 내지 69% = III, 70% 초과 = IV. 웨티드가 몇몇 근원 유전자로부터 유래할 수 있다면, 최소 범위를 가진 유전자로 결정되었다. 베이스라인에는 다음의 관련있는 정상 조직들이 포함되었다: 지방 조직, 부신, 동맥, 골수, 뇌, 연골, 결장, 식도, 담낭, 심장, 신장, 간, 폐, 림프절, 췌장, 뇌하수체, 직장, 골격 근육, 피부, 소장, 비장, 위, 흉선, 갑상선, 기관, 방광 및 정맥. 동일한 조직 유형의 여러 샘플에 대한 발현 데이터가 있는 경우, 모든 해당 샘플의 산술 평균을 계산에 사용했다. AML = 급성 골수성 백혈병, NHL = 비호지킨 림프종, BRCA = 유방암, CLL = 만성 백혈구성 백혈병, GBC_CCC = 담낭 선암종 및 담관 암종, MEL = 흑색종, OC = 난소암, OSCAR = 식도암(위식도 접합 부위의 암 포함), SCLC = 소세포 폐암, UBC = 방광암, UTC = 자궁암.

[0484]

[표 5B]

서열 번호	서열	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
1	KLQEKIQEL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
2	SVLEKEIYSI	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
3	RVIDDSLVVGV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
4	VLFGEPLPAL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
5	GLVDIMVHL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
7	ALLQALMEL	I	II	II	I	II	III	II	II	I	II	I
8	ALSSSQAEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
9	SLITGQDLSV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
10	QLIEKNWLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
11	LLDPKTIPL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I
13	RLHDENILL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
14	YTFSGDVQL	I	I	I	I	I	II	I	IV	I	III	I
17	GLLPSAESIKL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
18	KTASINQNV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
21	YLMDDFSSL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
22	LMYPYIYHV	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I
24	KVWSDVTPL	I	I	IV	I	IV	II	II	IV	II	IV	IV
39	YLEDGFAYV	I	II	II	I	II	II	III	I	III	I	I
40	KIWEELSLEV	I	I	II	I	III	IV	I	III	IV	III	II
41	IVTEIISEI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
43	LLIPFTIFM	I	II	II	I	II	II	I	IV	I	II	I
46	ISLDEVAVSL	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
47	GLNGFNVLL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	II
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
67	FLIENLLAA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
76	FTAEFLEKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
83	GLLENSPHL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
84	FLLEREQLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	II
85	KLLDKPEQFL	I	I	I	I	I	IV	I	I	I	I	I
86	SLFSNIESV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
88	LLLPLESLA	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
89	SLAETIFIV	I	III	I	I	I	I	II	I	II	I	I
92	RLFEEVLGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
95	KLIDEDEPLFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
96	ALDTTRHEL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I

[0485]

서열 번호	서열	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
102	GLYPVTLVGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
116	ALLSSVAEA	I	I	II	I	I	I	I	IV	I	II	I
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
147	GLLSALEENV	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
148	YLILSSHQL	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
152	ILVTSIFFL	I	II	I	II	I	I	I	I	I	I	I
153	KLVELEHTL	I	I	II	I	II	I	I	II	I	II	I
155	TLD SYLKAV	I	I	III	I	I	I	I	I	I	I	I
156	VILTSSPFL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
157	ILQDGQFLV	I	I	I	II	I	III	I	I	II	I	I
158	YLDPLWHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
166	LLGDSSFFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
169	ALADLSVAV	I	I	I	I	I	I	I	II	I	III	I
170	FIAAVVEKV	I	I	I	I	I	II	II	I	I	I	I
181	LLWAPTAQA	I	I	I	I	II	I	I	I	II	I	I
185	TLYQGLPAEV	I	I	II	I	I	I	III	IV	I	II	IV
203	FLFVDPPELV	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
220	ALSELERVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
222	LLTGVFAQL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	II	I
233	SLFESLEYL	I	I	II	I	II	II	II	II	I	I	I
234	VLLNEILEQV	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
235	SLLNQPKAV	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
236	KMSELQTYV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
237	ALLEQTGDMMSL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
241	KQFEGTVEI	I	II	II	I	I	I	I	I	II	I	I
242	KLQEEIPVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
243	GLAEFQENV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
245	ALLEEEEGV	I	I	I	I	I	II	I	II	II	II	I
246	ALAGIVTNV	I	I	II	I	II	I	III	I	I	II	I
248	VLMQDSRLYL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
251	LLWGNLPEI	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
252	SLMEKNQSL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
253	KLLAVIHEL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
255	FLMKNSDLYGA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
257	KLIDHQGLYL	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
260	ALNESI.VEC	I	III	I	I	II	I	II	IV	II	II	II
261	GLAALAVHL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I

서열 번호	서열	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
263	SIIEYLPTL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
264	TLHDQVHLL	I	I	IV	I	I	I	IV	I	I	I	IV
265	FLLDKPQDLSI	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	I
267	YLLDMPLWYL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
269	GLLDCPIFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
270	TLLTFPHEL	I	I	I	I	I	II	I	II	II	I	I
271	VLIEYNFSTI	I	I	I	I	I	II	I	III	II	I	I
274	TLYNPERTITV	II	IV	II	III	IV	IV	IV	IV	IV	II	II
277	KLQEELNKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
279	VLMDEGAVLTL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
283	ALSELLQQV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
286	FLTEMVHFI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	II	I

[0487]

실시예 3

MHC 클래스 I 제시 웨티드의 시험관내 면역원성

[0489] 본 발명의 TUMAP의 면역원성에 대한 정보를 얻기 위해, 웨티드/MHC 복합체 및 항-CD28 항체가 로딩된 인공 항원-제시 세포(aAPC)를 갖는 CD8+ T 세포의 반복된 자극을 근거로 시험관내 초회감작 검사를 사용하여 조사할 수 행했다. 이 방법으로 본 발명자들은 지금까지 47개의 HLA-A*0201 제한된 본 발명의 TUMAP의 면역원성을 보여줄 수 있었으며, 이것은 이 웨티드들이 인간에 존재하는 CD8+ 전구 T 세포에 대한 T 세포 에피톱이라는 것을 보여주었다(표 6A 및 6B).

CD8+ T 세포의 시험관내 초회감작

[0492] 웨티드-MHC 복합체(pMHC) 및 항-CD28 항체가 로딩된 인공 항원-제시 세포에 의한 시험관내 자극을 수행하기 위해, 독일 소재 University clinics Mannheim에서 동의서를 받은 건강한 공여자로부터의 CD8 마이크로비드 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)를 사용한 양성 선택을 통해 신선한 HLA-A*02 백혈구 성분 채집 산물로부터 CD8+ T 세포를 먼저 분리했다. PBMC 및 분리된 CD8+ 림프구는 10% 열 비활성화된 인간 AB 혈청 (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany), 100 U/mL 페니실린/100 µg/mL 스트렙토마이신(Cambrex, Cologne, Germany), 1 mM 페루브산 나트륨(CC Pro, Oberdorla, Germany), 20 µg/mL 젠타마이신(Cambrex)으로 보충된 RPMI-Glutamax(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)로 구성된 T 세포 배지(TCM)에서 사용할 때까지 배양했다. 이 단계에서 2.5 ng/mL IL-7(PromoCell, Heidelberg, Germany) 및 10 U/mL IL-2(Novartis Pharma, Nürnberg, Germany) 또한 TCM에 추가했다. pMHC/항-CD28 코팅된 비드의 생성, T 세포 자극 및 관독은 고도로 정의된 시험 관내 체계에서 수행했으며, 자극 조건 당 4가지 다른 pMHC 문자 및 관독 조건 당 8가지 다른 pMHC 문자를 각각 사용했다.

[0493] 정제된 공동-자극 쥐 IgG2a 항인체 CD28 Ab 9.3(Jung et al., 1987)은 제조사가 권장하는 술폰-N-하이드록시숙신이미도비오틴을 사용하여 화학적으로 비오틴화했다(Perbio, Bonn, Germany). 사용된 비드는 스트렙티비드으로 코팅된 직경 5.6 µm의 폴리스티렌 입자였다(Bangs Laboratories, Illinois, USA).

[0494] 양성 및 음성 대조군 자극에 사용된 pMHC는 각각 A*0201/MLA-001(변형된 Melan-A/MART-1에서 얻은 웨티드 ELAGIGILTV(서열번호 289) 및 A*0201/DDX5-001/DDX5에서 얻은 YLLPAIVHI, 서열번호 290)였다.

[0495] 800,000 비드/200 µL는 4 x 12.5 ng 비오틴-pMHC 존재 하에 96-웰 플레이트에서 코팅하고 세척한 다음 600 ng 비오틴 항CD28을 첨가하여 200 µL의 부피로 만들었다. 1×10^6 CD8+ T 세포와 2×10^5 의 세척하고 코팅한 비드를 5 ng/mL IL-12 (PromoCell)로 보충한 200 µL TCM에서 37°C에서 3일 동안 배양함으로써 96-웰 플레이트에서의 자극을 개시했다. 배지의 반은 80 U/mL IL-2로 추가된 새로운 TCM에 의해 교환되고 배양은 37°C에서 4 일간 계속되었다. 이 자극 주기는 총 세 번 수행되었다. 조건 당 8가지 다른 pMHC 문자를 사용하는 pMHC 멀티머의 관독을 위해, 이미 설명된 바와 같이(Andersen et al., 2012) 2차원 조합대수적 코팅 접근방식을 사용했으며, 5가지 다른 형광색소와의 결합을 허용하는 약간의 변형이 있었다. 마지막으로 멀티머 분석은 살아있는/죽은 세포를 근적 외선(near IR) 염료(Invitrogen, Karlsruhe, Germany), CD8-FITC 항체 클론 SK1(BD, Heidelberg, Germany) 및 형광 pMHC 멀티머로써 세포를 염색하여 수행했다. 분석에는 적절한 레이저 및 필터가 장착된 BD LSRII SORP 세

포측정기를 사용했다. 펩티드 특이적 세포는 총 CD8+ T 세포의 백분율로 계산되었다. 멀티머 분석의 평가는 FCS Express 소프트웨어(De Novo Software)를 사용하여 수행되었다. 특정 멀티머+ CD8+ 림프구의 시험관내 프라이밍은 음성 대조군 자극과 비교함으로써 검출했다. 주어진 항원의 면역성은 건강한 기증자의 최소한 하나의 시험관내 자극된 평가가능한 웰에 시험관내 자극 후 CD8+ T 세포주가 포함되는 것으로 확인될 때 나타났다(예를 들어, 이 웰은 CD8+ T 세포 중 최소한 1%의 특정 테트라머+를 가졌으며 특정 테트라머+ 세포의 백분율은 최소한 음성 대조군 자극의 매체보다 10배여야 한다).

[0496] HCC 펩티드의 시험관내 면역원성

[0497] 시험된 HLA 클래스 I 펩티드에서, 시험관내 면역원성은 펩티드 특정 T 세포주의 형성에 의해 입증될 수 있었다. 본 발명의 15개의 펩티드에 대한 TUMAP-특이적 다합체 염색 이후 예시적 유세포 측정 결과 및 상응하는 음성 대조군이 도 3 및 도 6에 제시된다. 본 발명의 2개의 펩티드에 대한 결과는 표 6A 및 6B에 요약되어 있다.

[0498] [표 6A]

본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 시험관 내 면역원성

본 발명의 출원자가 실행한 펩티드에 대한 시험관 내 면역원성 실험의 예시적 결과.

[0499] <20 % = +; 21 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

서열 번호	서열	웰	공여자
288	SLYKGLLSV	++	++++
287	KIQEILTQV	+	+++

[0500]

표 6B는 본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 시험관내 면역원성이다. 본 발명의 출원자가 HLA-A*02 제한된 펩티드에 대해 실행한 시험관내 면역원성 실험의 예시적 결과이다. 시험관내 면역원성 실험의 결과가 표시된다. 양성 웰 및 공여자의 (평가 가능한 합계)에 대한 백분율이 다음과 같이 요약된다: 20% 미만 = +; 20% 내지 49% = ++; 50% 내지 69% = +++; 70% 이상 = ++++.

[0502]

[표 6B]

서열번호	서열	웰 양성 [%]
4	VLFGELPAL	+
7	ALLQALMEL	++
9	SLITGQQDLLSV	+
11	LLDPKTIFL	++
14	YTFSGDVQL	+
17	GLLPSAESIKL	+
18	KTASINQNV	+++
27	GLLGKVTSV	+
29	KMISAIPTL	+
34	TLNTLDINL	++++
35	VIIKGLEEI	+
39	YLEDGFAYV	++++
48	K1SDFGLATV	++
50	ILLSVLHQL	+
66	AMFPDTIPRV	+
77	ALYGNVQQV	+
82	ILAEPIYIRV	+++
89	SLAETIFIV	+
92	RLFEEVLGV	++
97	KLFEKSTGL	+
101	SLLEVNEASSV	+
102	GLYPVTLVGV	+
117	TLLEGISRA	++
121	ALYVQAPTV	+
157	ILQDGQFLV	+
166	LLGDSSFFL	++
183	ALSYILPYL	+++
203	FLFVDPVELV	+++
233	SLFESILEYL	+
234	VLLNEILEQV	++
236	KMSELQTYV	+
242	KLQEEIPVL	+
246	ALAGIVTNV	+
248	VLMQDSRLYL	++
251	LLWGNLPEI	++

[0503]

서열번호	서열	웰 양성 [%]
253	KLLAVIHEL	++
254	ALGDKFLLRV	+
255	FLMKNSDLYGA	+
257	KLIDHQGLYL	+
260	ALNESLVEC	+
261	GLAALAVHL	++
263	SIIIEYPLTL	+
264	TLHDQVHLL	+
267	YLLDMPLWYL	+
275	AVPPPSSV	++

[0504]

실시예 4

[0506] 펩티드의 합성

[0507] 모든 펩티드는 Fmoc-전략을 사용하여 표준 및 잘 확립된 고체상 펩티드 합성으로써 합성되었다.

[0508] 각 개별 펩티드의 정체와 순도는 질량 분석법과 분석 RP-HPLC에 의해 결정되었다. 펩티드는 백색 내지 황백색 동결건조 배양물(삼불화아세트산 염) 및 50% 초과의 순도로서 얻어졌다.

[0509] 모든 TUMAP는 바람직하게는 삼불화아세트산 염 또는 아세트산 염으로 투여되지만, 다른 염의 형태 또한 가능하다.

[0510] **실시예 5**

[0511] MHC 결합 검정

[0512] 본 발명에 따른 T 세포 기반 요법의 후보 펩티드를 그 MHC 결합 능력(친화성)에 대해 추가로 시험했다. 개별 펩티드-MHC 복합체는 UV-리간드 교환에 의해 만들었으며, UV에 민감한 펩티드가 UV 조사 후 분할된 다음 분석된 관심 대상의 펩티드로 교환되었다. 펩티드 수용성 MHC 분자를 효과적으로 결합하고 안정화시킬 수 있는 펩티드 후보만이 MHC 복합체의 해리를 막는다. 이 교환작용의 수율을 결정하기 위해, 안정화된 MHC 복합체의 경쇄(β 2m) 검출에 근거하여 ELISA를 수행했다. 이 검정은 Rodenko 등에서 일반적으로 설명된 대로 수행했다(Rodenko et al., 2006).

[0513] 96-웰 MAXISorp 플레이트(NUNC)를 PBS에서 2 μ g/mL 스트렙타비딘으로 밤새 코팅하고 4회 세척한 다음 블로킹 완충제를 함유하는 2% BSA에서 37°C 및 30분 동안 블로킹을 진행했다. 되접기된 HLA-A*02:01/MLA-001 단량체가 표준의 역할을 했으며, 그 범위는 15 내지 500 ng/mL였다. UV-교환 반응을 위한 펩티드-MHC 단량체는 블로킹 완충제로 100배 희석되었다. 샘플은 37°C에서 1시간 배양 후 4회 세척하고 2 μ g/mL HRP 접합된 항- β 2m으로 37°C에서 1시간 배양한 다음 NH₂SO₄로 정지시킨 TMB 용액으로 검출했다. 흡광은 450 nm에서 측정했다. 높은 교환 수율(바람직하게는 50% 초과, 가장 바람직하게는 75% 초과)을 보이는 후보 펩티드가 일반적으로 항체 또는 그 단편 및/또는 T 세포 수용체 또는 그 단편의 생성 및 생성을 위해 선호되는데, 이는 MHC 분자에 대한 충분한 결합성을 보이며 MHC 복합체의 해리를 막기 때문이다.

[0514] 표 7은 MHC 클래스 I 결합 점수이다. HLA-A*02:01에 대한 HLA-클래스 I 제한된 펩티드의 결합을 펩티드 교환 수율에 의해 평가했다: 10% 이상 = +; 20% 이상 = ++; 50% 이상 = +++; 75% 이상 = ++++.

[0515]

[표 7]

서열번호	서열	펩티드 교환
1	KLQEKIQEL	++++
3	RVIDDSLVVGV	+++
4	VLFGELPAL	+++
5	GLVDIMVHL	+++
6	FLNAIETAL	++++
7	ALLQALMEL	+++
9	SLITGQDLSV	+++
10	QLIEKNWLL	+++
11	LLDPKTIFL	+++
12	RLLDPKTIFL	+++
13	RLHDENILL	+++
14	YTFSGDVQL	+++
16	SLADLSLLL	+++
17	GLLPSAESIKL	++++
18	KTASINQNV	++
19	KVFELDLVTI	++
20	ALVEKGEFAL	++
21	YLMDDFSSL	+++
22	LMYPV IYHV	+++
23	ALLSPLSLA	+++
24	KVWSDVTP	+++
25	LLWGHPRVALA	+++
26	VLDGKVAVV	+++
27	GLLGKVTSV	+++
28	IKVTDPQLLE	++
29	KMISAIPTL	++
30	IITEVITRL	+++
31	GLLETTGLLAT	+++
33	TLDRNSLYV	++
34	TLNTILDINL	+++
35	VIIGLEEI	++
36	TVLQELINV	+++
37	QIVELIEKI	++
38	VLQQESNFL	++
39	YLEDGFAYV	+++
40	KIWEELSLEV	+++
41	IVTEIISEI	+++

[0516]

서열번호	서열	펩티드 교환
42	KQMSISTGL	++
44	AVFNLVHVV	+++
45	FLPVSVVYV	+++
47	GLNGFNVLL	+++
48	KISDFGLATV	+++
49	KLIGNIHGNEV	++
50	ILLSVLIHQQL	+++
51	LDSEALLTL	++
52	TIGIPFPNV	++
53	AQHLSTLLL	+
54	YLVPGLVAA	+++
55	HLFDKIIIKI	+++
57	TLYPGRFDYV	++
58	HLLGEGAFFAQV	+++
59	ALADGIKSFL	+++
60	YLFSQGLQGL	+++
61	ALYPKEITL	+++
62	SLVENIHVL	+++
63	KLLPMV1QL	+++
64	SLYAGSNNQV	++
65	SLSEKSPEV	++
66	AMFPDTIPRV	++
67	FLIENLLAA	+++
68	QLMNLIRSV	+++
69	LKVLKADVVL	++
70	GLTEKTVLV	++
71	HMSGKLTNV	++
72	VLSTRVTNV	++
74	GLAFLPASV	++
75	ALLDGALQL	+++
76	FTAEFLEKV	+++
77	ALYGNVQQV	+++
79	TVLEEIGNRV	++
80	VLTGQVHEL	+++
81	ILAEEPIYI	++
82	ILAEEPIYIRV	+++
83	GLLENSPHL	++
84	FLLEREQLL	++++
85	KLLDKPEQFL	++

서열번호	서열	펩티드 교환
86	SLFSNIESV	+++
87	KLLSLLEEA	+++
88	LLLPLELSLA	+++
89	SLAETIFIV	+++
90	AILNVDEKNQV	++
91	LLPSIFLMV	++
92	RLFEEVLGV	++++
93	RLYGYFHDA	++
94	YLDEVAFML	+++
95	KLIDEDEPLFL	+++
96	ALDTTRHEL	++
97	KLFEKSTGL	+++
98	FVQEKFPEL	+++
99	TLFGIQLTEA	+++
100	ALQSFEFRV	+++
101	SLLEVNEASSV	+++
102	GLYPVTLVGV	+++
103	YLADTVQKL	++
105	AMLASQTEA	++
106	VLLGSVVIFA	++
107	RVLPGQQAVTGV	++
108	FIANLPPELKA	+++
109	ILGSFELQL	+++
110	QIQGQVSEV	++
111	AQLEGKLVSI	+++
112	ILAQDVQL	+++
113	FLFLKEVKV	++
114	LLFPSDVQTL	++
115	ILHGEVNKV	++
116	ALLSSVAEA	++
117	TLLEGISRA	++
119	SLIEESEL	++
121	ALYVQAPTV	++
122	SIIDTELKV	+++
123	QTAPEEAFIKL	+
124	ALLRLFTI	++
125	AALEVLAEV	+++
126	QLREAFEQL	+++
128	SILTNISEV	++

[0518]

서열번호	서열	펩티드 교환
129	KMASKVTQV	++
130	QLYGSAITL	+++
131	SLYPHFTLL	+++
132	ALLNNVIEV	+++
133	FLDGRPLTL	++
134	SLYKSFLQL	++
136	LLWDAPAKC	+++
137	KLIYKDLVSV	++
138	GIINKLVTV	++
139	IILENIQSL	+++
140	FLDSQITTV	+++
141	NIDINNNEL	++
142	LLDAAHASI	++
143	MLWESIMRV	+++
144	FLISQTPLL	+++
145	ALEEKLENV	+++
146	VVA AHLAGA	++
147	GLLSALENV	+++
148	YLILSSHQL	+++
149	NMADGQLHQV	++
150	VLLDMVHSL	+++
151	DISKR IQSL	++
153	KLVELEHTL	+++
154	AI IKE IQTV	++
155	TLD SYLKAV	++
157	ILQDGQFLV	++
158	YLDPLWHQL	+++
159	QLGPVPVTI	+++
160	TLQEWLTEV	+++
161	NLLDENWCL	++++
162	GLLGNL LTSL	+++
163	GLEERLYTA	++
164	MLIIRVPSV	+++
165	SLLDYEVSI	+++
166	LLGDSSFFL	+++
167	LVVDEGSLVSV	+++
168	VIFEGERPMYL	+++
169	ALADLSVAV	+++
170	FIAAVVEKV	++

[0519]

서열번호	서열	펩티드 교환
171	LLLLDVPTA	++
173	RLIDIYKNV	+++
174	ALYSGDLHAA	++
175	SLLDLVQSL	+++
176	VQSGLRILL	++
177	ALINVLNAL	+++
178	SLVSWQLLL	++++
179	TLGEI IKGV	+++
180	RLYEEEIRI	+++
181	LLWAPTAQA	+++
182	GLQDGFBITV	+++
183	ALSYILPYL	+++
184	ALDSTIAHL	++
185	TLYQGLPAEV	++
187	SILKEDPFL	++
188	VLGEEQEGV	++
190	SLSTELFKV	+++
191	AAIEIFEKV	+++
192	TLLPSSGLVTL	++
193	ALFHMNILL	+++
194	KLLEEVQLL	++
195	VIIQNLPAL	+++
198	ILTNKVVSV	++
199	SVADLAHVW	++
200	IMPTFDLTKV	+++
203	FLFVDPELV	++
204	SEWGSPHAAP	+++
206	GLDAFRIFL	++++
207	KLFETVEEL	+++
208	HLNNDRNPL	++
210	GLAGDNIYL	+++
211	LLTTVLIINA	+++
212	MTLSEIHAV	++
213	ILAVDGVLGV	+++
214	ALFETLIQL	+++
215	QIADIVTSV	++
216	ALSTVTPRI	++
217	LIWPSSVPA	+++
218	SLTGANITV	+++

[0520]

서열번호	서열	펩티드 교환
219	GVVPTIQKV	++
220	ALSELERVL	+++
221	IMLNSVEEI	++
222	LIJTGIVFAQI	++
223	ALHPVQFYI	+++
224	LLFDWSGTGRADA	+++
225	FLPQPVPLSV	+++
226	SLAGNLQEL	+++
227	SEMEELPSV	+
228	SLLELDGINRL	+++
229	YLYELEHAL	++
230	KLLNMIFSI	+++
231	LLDDIFIRL	+++
233	SLFESLEYL	+++
234	VLLNEILEQV	++++
235	SLLNQPKAV	++
236	KMSELQTYV	+++
237	ALLEQTGDMGL	+++
238	HLQEKLQSL	++
239	VIIKGLEEVTV	+++
241	KQFEGTVETI	+++
242	KLQEEIPVLL	+++
243	GLAEFQENV	++
244	NVAEIVIHI	+++
245	ALLEEEEGV	++
246	ALAGIVTNV	+++
247	NLLIDDKGTIKL	++
248	VLMQDSRLYL	+++
249	YLYQILQGI	+++
250	LMQDSRLYL	+++
251	LLWGNLPEI	+++
252	SLMEKNQSL	++
253	KLLAVIHEL	+++
254	ALGDKFLLRV	++
255	FLMKNSDLYGA	+++
256	FLNDIFERI	+++
257	KLIDHQGLYL	+++
258	QLVQRVASV	++
259	GPGIFPPPPPQP	+

[0521]

서열번호	서열	펩티드 교환
260	ALNESLVEC	+++
261	GLAALAVHL	+++
262	LLLEAVWHL	+++
263	SIIEYLPTL	+++
264	TLHDQVHLL	++
265	FLLDKPQDLSI	+++
266	FLLDKPQDL	++
267	YLLDMPLWYL	+++
268	SLDKDIVAL	++
269	GLLDCCPIFL	++++
270	TLLTFFHEL	+++
271	VLIEYNFSI	+++
272	FVMEGEPPKL	++
273	SLNKQIETV	++
274	TLYNPERTITV	+++
275	AVPPPPSSV	++
276	RMPTVLCV	+++
277	KLQEELNKV	+++
278	VLEDKVLSV	+++
279	VLMDEGAVLTL	++
280	HLWGHALFL	+++
281	LLLESDPKVYSL	++
282	SLYALIHVKA	++
283	ALSELLQQV	+++
284	KLMDPGSLPPL	++
285	MLLDLTVQKV	+++
286	FLTEMVHF1	+++

[0522]

실시예 6

[0523]

[표 8]

본 발명에 따른 바람직한 펩티드

서열번호	서열	펩티드 코드
11	LLDPKTIFL	HAVCR1-001
14	YTFSGDVQL	MMP1-003
21	YLMDDFSSL	COL6A3-015
24	KVWSDDVTPL	MMP-002
25	LLWGHPRVALA	MXRA5-003
40	KIWEELSLEV	MAGEA3-003
85	KLLDKPEQFL	FMN1-001
89	SLAETIFIV	IITR3A-001
117	TLLEGISRA	CABY-001
153	KLVELEHTL	CT83-001
155	TLD SYLKAV	CYP4Z-001
157	ILQDGQFLV	DCAF4L2-001
168	VIFEGERPMYL	HORMAD1-001
233	SLFESLEYL	ZFP42-001
245	ALLEEEEGV	MAGEA4-003
253	KLLAVIHEL	RAD54B-002
264	TLHDQVHLL	ESR1-001
274	TLYNPERTITV	IGF-004

[0525]

[0526] 세포 표면에 제시된 종양-연관 펩티드의 절대 정량화

[0527] 항체 및/또는 TCR과 같은 결합체의 생성은 시간이 많이 걸리는 과정이며, 일부의 선택된 표적에 대해서만 수행 할 수 있다. 종양-연관 및 종양-특이적 펩티드의 경우, 선택 기준은 제시의 배타성 및 세포 표면 상에 제시된 펩티드의 밀도를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 여기서 설명되는 펩티드의 단리 및 상대적 정량화 외에도, 본 발명자는 설명된 바와 같이 세포 당 절대 펩티드 복제 수를 분석했다. 고형 종양 샘플에서 세포당 TUMAP 복제수의 정량화는 분리된 TUMAP의 절대 정량화, TUMAP 분리의 효율 및 분석된 조직 샘플의 세포 수를 요구한다.

[0528] nanLC-MS/MS에 의한 펩티드 정량

[0529] 질량 분석법에 의한 펩티드의 정확한 정량화를 위해, 내부 표준법을 사용하여 각 펩티드의 검정 곡선을 생성했다. 내부 표준이란 각 펩티드의 2중-동위원소-표지 변이체이며, 즉 동위원소-표지 아미노산 2개를 TUMAP 합성에 포함시켰다. 이는 질량에서만 종양-연관 펩티드와 다른 다른 물리화학적 성질은 차이를 보이지 않는다 (Anderson et al., 2012). 각 MS 샘플에 대해 내부 표준을 스파이킹하며, 모든 MS 신호는 내부 표준의 MS 신호에 대해 정규화하여 MS 실험 간 가능한 기술적 편차를 없앴다.

[0530] 검정 곡선은 적어도 3가지 다른 매트릭스에서 작성했다. 즉, HLA 펩티드는 일상적 MS 샘플과 유사한 자연 샘플로부터 용출되며 각 제제는 이중 MS 실행을 통해 측정했다. 평가에서는, MS 신호를 내부 표준의 신호에 대해 정규화하고 검정 곡선은 로지스틱 회귀에 의해 계산했다.

[0531] 조직 샘플에서 얻는 종양-연관 펩티드의 정량화에서는, 각 샘플을 내부 표준으로 스파이킹하고; MS 신호는 내부 표준에 대해 정규화한 다음 펩티드 검정 곡선을 사용하여 정량화했다.

[0532] 펩티드/MHC 단리의 효율

[0533] 모든 단백질 정제 공정과 마찬가지로, 조직 샘플로부터의 단백질 단리는 관심 대상의 단백질에 대한 일정 손실과 연관된다. TUMAP 단리의 효율 결정을 위해, 절대 정량을 위해 선택된 모든 TUMAP에 대한 펩티드/MHC 복합체를 생성했다. 자연 펩티드/MHC 복합체로부터 스파이킹된 것을 구별할 수 있기 위해, TUMAP의 단일-동위원소-표지 버전을 사용했다. 즉, 하나의 동위원소-표지 아미노산을 TUMAP 합성에 포함시켰다. 이 복합체들을 신선하게 준비된 조직 용해물에 즉, TUMAP 단리 절차에서 가능한 가장 이른 시점에 스파이킹한 다음 추후 친화성 정제에서 자연 펩티드/MHC 복합체와 같이 포획했다. 따라서, 단일-표지 TUMAP의 회수 측정은 개별 자연 TUMAP의 단리 효율에 대한 결론을 허용한다.

[0534] 단리의 효율은 적은 수의 샘플에서 분석했으며 이러한 조직 샘플들 사이에 유사했다. 이와 반대로 개별 펩티드 간의 단리 효율은 차이가 있다. 이것은 단리 효율은 그것이 제한된 수의 조직 샘플만을 통해 결정되는 것이라도 다른 조직의 제제로 외삽할 수 있음을 시사한다. 하지만 각 TUMAP는 개별적으로 분석하는 것이 필요한데 이는 단리 효율을 한 펩티드에서 다른 것으로 외삽할 수 없기 때문이다.

[0535] 고체 동결 조직에서의 세포 수 결정

[0536] 본 발명자는 절대 펩티드 정량화를 거친 조직 샘플의 세포 수 결정을 위해, DNA 함량 분석을 적용했다. 이 방법은 광범위한 다른 출처의 샘플들, 가장 중요하게는 동결 샘플에 적용된다(Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). 펩티드 분리 프로토콜 동안, 조직 샘플을 동질의 용해물로 처리하며 이로부터 소량의 용해물 일정 부분을 취한다. 이 일정 부분을 세 부분으로 나누며, 이로부터 DNA가 분리된다 (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). 각 DNA 분리물로부터 총 DNA 함량을 형광-기반 DNA 정량화 검정(Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germany)을 사용하여 정량화하는데 이때 최소 2회 반복 측정한다.

[0537] 세포수의 계산을 위해, 1개의 건강한 혈액 샘플의 일정 부분들로부터 얻어진 DNA 표준 곡선(정의된 세포 수 범위 포함)을 생성한다. 이 표준 곡선을 사용하여, 각 DNA 단리물로부터 얻은 총 DNA 함량에서 총 세포 수를 계산 한다. 펩티드 분리에 사용된 조직 샘플의 평균 총 세포수를 외삽하며, 이때 용해 분별액의 알려진 용적과 총 용해물 용적을 고려한다.

[0538] 세포 당 펩티드 복제수

[0539] 본 발명자는 상기 언급된 실험에서 얻는 데이터를 통해, 샘플의 펩티드 총량을 해당 샘플의 총 세포수로 나눈 다음 다시 단리 효율에 따른 나누기를 하여 세포당 TUMAP 복제수를 계산했다. 선택된 펩티드의 복제수는 표 9에

제시된다.

[0540] 표 9는 절대 복제수이다. 이 표는 종양 샘플에 대한 절대 펩티드 정량화 결과를 나열하고 있다. 각 펩티드에 대한 세포당 복제수 중간값이 표시되어 있다: 100 미만 = +; 100 이상 = ++; 1,000 이상 = +++; 10,000 이상 = ++++. 평가가능한 고품질 MS 데이터를 사용할 수 있는 샘플 수가 표시되어 있다.

[표 9]

서열번호	펩티드 코드	세포 당 복제수 (중앙값)	샘플 수
11	HAVCR1-001	+	22
14	MMP1-003	++	10
21	COL6A3-015	+	35
24	MMP-002	+	33
85	FMN1-001	+	18
89	HTR3A-001	+++	17
117	CABY-001	+	17
155	CYP4Z-001	++	18
157	DCAF4L2-001	++	16
245	MAGEA4-003	+	33
253	RAD54B-002	+++	6
264	ESR1-001	+	16
274	IGF-004	+	6

[0542]

참조문헌

- [0544] Adelaide, J. et al., Cancer Res **67** (2007): 11565-11575
- [0545] Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124
- [0546] Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933
- [0547] American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
- [0548] Ampie, L. et al., Front Oncol. **5** (2015): 12
- [0549] Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902
- [0550] Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res **11** (2012): 1868-1878
- [0551] Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814
- [0552] Arafat, H. et al., Surgery **150** (2011): 306-315
- [0553] Aung, P. P. et al., Oncogene **25** (2006): 2546-2557
- [0554] Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708
- [0555] Baba, T. et al., Eur.J Cardiothorac.Surg. **43** (2013): 759-764
- [0556] Bahnassy, A. A. et al., World J Gastroenterol. **20** (2014): 18240-18248
- [0557] Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274
- [0558] Band, A. M. et al., J Mammary.Gland.Biol Neoplasia. **16** (2011): 109-115
- [0559] Bankovic, J. et al., Lung Cancer **67** (2010): 151-159
- [0560] Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282
- [0561] Beatty, T. H. et al., Hum.Genet. **132** (2013): 771-781
- [0562] Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109
- [0563] Bell, J. L. et al., J Clin Oncol **33** (2015): 1285-1293

- [0564] Bell, J. L. et al., *Cell Mol Life Sci.* **70** (2013): 2657-2675
- [0565] Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, **57** (1995): 289-300
- [0566] Berger, C. et al., *Curr.Mol.Med.* **13** (2013): 1229-1240
- [0567] Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
- [0568] Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)
- [0569] Bhan, S. et al., *Oncol Rep.* **28** (2012): 1498-1502
- [0570] Bode, P. K. et al., *Mod.Pathol.* **27** (2014): 899-905
- [0571] Bogush, T. A. et al., *Antibiot.Khimoter.* **54** (2009): 41-49
- [0572] Bonventre, J. V., *Trans.Am.Clin Climatol.Assoc.* **125** (2014): 293-299
- [0573] Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- [0574] Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- [0575] Bray, F. et al., *Int J Cancer* **132** (2013): 1133-1145
- [0576] Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- [0577] Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- [0578] Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 2817-2825
- [0579] Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **9** (2003): 5902-5908
- [0580] Caballero, O. L. et al., *PLoS.One.* **5** (2010)
- [0581] Carballido, E. et al., *Cancer Control* **19** (2012): 54-67
- [0582] Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
- [0583] Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **59** (2007): 561-574
- [0584] Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- [0585] Chapiro, J. et al., *Radiol.Med.* **119** (2014): 476-482
- [0586] Chen, H. S. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* **11** (2003): 145-148
- [0587] Chen, S. T. et al., *Cancer Sci.* **102** (2011b): 2191-2198
- [0588] Chen, Y. L. et al., *Int J Surg.* **11** (2013c): 85-91
- [0589] Chen, Y. T. et al., *Cancer Immun.* **5** (2005): 9
- [0590] Cierna, Z. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014): 472
- [0591] Ciruelos Gil, E. M., *Cancer Treat.Rev* **40** (2014): 862-871
- [0592] Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* **16** (2003a): 324-332
- [0593] Cohen, C. J. et al., *J Immunol* **170** (2003b): 4349-4361
- [0594] Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69** (1972): 2110-2114
- [0595] Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- [0596] Colombetti, S. et al., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738
- [0597] Coosemans, A. et al., *Anticancer Res* **33** (2013): 5495-5500
- [0598] Coulie, P. G. et al., *Immunol.Rev* **188** (2002): 33-42

- [0599] Counter, C. M. et al., *Blood* **85** (1995): 2315-2320
- [0600] Cuadros, T. et al., *Cancer Res* **74** (2014): 1416-1428
- [0601] Cuadros, T. et al., *Eur.J Cancer* **49** (2013): 2034-2047
- [0602] Dalerba, P. et al., *Int.J Cancer* **93** (2001): 85-90
- [0603] De, Plaen E. et al., *Immunogenetics* **40** (1994): 360-369
- [0604] Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
- [0605] Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003): 2197-2207
- [0606] Downie, D. et al., *Clin Cancer Res.* **11** (2005): 7369-7375
- [0607] Du, X. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 6324-6335
- [0608] Duan, Z. et al., *Clin Cancer Res* **9** (2003): 2778-2785
- [0609] Ek, S. et al., *Cancer Res* **62** (2002): 4398-4405
- [0610] Emens, L. A., *Expert.Rev.Anticancer Ther.* **12** (2012): 1597-1611
- [0611] Enguita-German, M. et al., *World J Hepatol.* **6** (2014): 716-737
- [0612] Estey, E. H., *Am.J Hematol.* **89** (2014): 1063-1081
- [0613] Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- [0614] Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- [0615] Findeis-Hosey, J. J. et al., *Biotech.Histochem.* **87** (2012): 24-29
- [0616] Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- [0617] Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* **31** (2009): 819-823
- [0618] Frasor, J. et al., *Mol.Cell Endocrinol.* **418 Pt 3** (2015): 235-239
- [0619] Fuge, O. et al., *Res Rep.Urol.* **7** (2015): 65-79
- [0620] Fujiyama, T. et al., *J Dermatol.Sci.* **75** (2014): 43-48
- [0621] Fukuyama, T. et al., *Cancer Res.* **66** (2006): 4922-4928
- [0622] Fuqua, S. A. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **144** (2014): 11-19
- [0623] Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
- [0624] Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013): S636-S643
- [0625] Gardina, P. J. et al., *BMC.Genomics* **7** (2006): 325
- [0626] Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
- [0627] Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* **24** (2010): 798-805
- [0628] Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 95-103
- [0629] Gibbs, P. et al., *Melanoma Res* **10** (2000): 259-264
- [0630] Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003): 8862-8867
- [0631] Godkin, A. et al., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
- [0632] Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* **21** (2014): 191-200
- [0633] Grah, J. J. et al., *Tumori* **100** (2014): 60-68

- [0634] Granziero, L. et al., Blood **97** (2001): 2777-2783
- [0635] Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual **4th** (2012)
- [0636] Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual **2nd** (2014)
- [0637] Gu, X. et al., Sci.Rep. **4** (2014): 6625
- [0638] Gunawardana, C. et al., Br.J Haematol. **142** (2008): 606-609
- [0639] Hall, R. D. et al., Cancer Control **20** (2013): 22-31
- [0640] Hamilton, K. E. et al., Mol.Cancer Res **13** (2015): 1478-1486
- [0641] Han, L. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014): 6734-6742
- [0642] Hanagiri, T. et al., Anticancer Res. **33** (2013): 2123-2128
- [0643] Harig, S. et al., Blood **98** (2001): 2999-3005
- [0644] Hasegawa, H. et al., Arch.Pathol.Lab Med. **122** (1998): 551-554
- [0645] Hayashi, S. I. et al., Endocr.Relat Cancer **10** (2003): 193-202
- [0646] Hennard, C. et al., J Pathol. **209** (2006): 430-435
- [0647] Herbert, N. et al., J Immunol. **185** (2010): 902-916
- [0648] Hinrichs, C. S. et al., Nat.Biotechnol. **31** (2013): 999-1008
- [0649] Hiramoto, T. et al., Oncogene **18** (1999): 3422-3426
- [0650] Hoffmann, N. E. et al., Cancer **112** (2008): 1471-1479
- [0651] Holtl, L. et al., Clin.Cancer Res. **8** (2002): 3369-3376
- [0652] Hsu, H. C. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **329** (2005): 1108-1117
- [0653] Hu, S. et al., J Cancer Res Clin Oncol **140** (2014): 883-893
- [0654] Huang, X. et al., Cell Prolif. **48** (2015b): 593-599
- [0655] Hui, L. et al., Oncol Rep. **34** (2015): 2627-2635
- [0656] Hussein, Y. M. et al., Med.Oncol **29** (2012): 3055-3062
- [0657] Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- [0658] Ioannidis, P. et al., Anticancer Res **23** (2003): 2179-2183
- [0659] Jeng, Y. M. et al., Br.J Surg. **96** (2009): 66-73
- [0660] Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- [0661] Kalos, M. et al., Sci.Transl.Med. **3** (2011): 95ra73
- [0662] Kang, C. Y. et al., J Gastrointest.Surg. **18** (2014): 7-15
- [0663] Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- [0664] Kim, Y. D. et al., Int.J Mol.Med. **29** (2012): 656-662
- [0665] Kobayashi, H. et al., Oncol Lett. **10** (2015): 612-618
- [0666] Koido, S. et al., World J Gastroenterol. **19** (2013): 8531-8542
- [0667] Krackhardt, A. M. et al., Blood **100** (2002): 2123-2131
- [0668] Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- [0669] Lederer, M. et al., Semin.Cancer Biol **29** (2014): 3-12

- [0670] Lee, M. Y. et al., *J Cell Physiol* **224** (2010): 17-27
- [0671] Lee, W. C. et al., *J Immunother.* **28** (2005): 496-504
- [0672] Leitlinien f \ddot{u} r Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)
- [0673] Leivo, I. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* **156** (2005): 104-113
- [0674] Leonetti, M. D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **109** (2012): 19274-19279
- [0675] Li, H. et al., *Bull.Cancer* **99** (2012): E26-E33
- [0676] Li, M. et al., *Clin Cancer Res* **11** (2005): 1809-1814
- [0677] Li, W. M. et al., *J Surg.Oncol* (2016)
- [0678] Li, Y. et al., *Cancer Epidemiol.* **39** (2015): 8-13
- [0679] Liddy, N. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 980-987
- [0680] Lin, J. et al., *Clin Cancer Res* **10** (2004): 5708-5716
- [0681] Lin, L. et al., *Oncol Lett.* **6** (2013): 740-744
- [0682] Lisitskaia, K. V. et al., *Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol.* (2010): 34-37
- [0683] Liu, X. et al., *Int.Immunopharmacol.* **25** (2015): 416-424
- [0684] Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* **162** (1985): 1745-1759
- [0685] Llovet, J. M. et al., *N Engl.J Med.* **359** (2008): 378-390
- [0686] Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **690** (1993): 276-291
- [0687] Lonsdale, J., *Nat.Genet.* **45** (2013): 580-585
- [0688] Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78** (1981): 2791-2795
- [0689] Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification 3rd* (2004)
- [0690] Luo, C. et al., *Clin Cancer Res* **13** (2007): 1288-1297
- [0691] Mantia-Smaldone, G. M. et al., *Hum.Vaccin.Immunother.* **8** (2012): 1179-1191
- [0692] Marten, A. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **51** (2002): 637-644
- [0693] Mason, J. M. et al., *Nucleic Acids Res.* **43** (2015): 3180-3196
- [0694] Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* **41** (2015): 114-121
- [0695] Matsueda, S. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 1657-1666
- [0696] Maus, M. V. et al., *Blood* **123** (2014): 2625-2635
- [0697] Mayr, C. et al., *Exp.Hematol.* **34** (2006): 44-53
- [0698] Mayr, C. et al., *Blood* **105** (2005): 1566-1573
- [0699] Mehta, A. et al., *Breast* **23** (2014): 2-9
- [0700] Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- [0701] Miyagi, Y. et al., *Clin Cancer Res* **7** (2001): 3950-3962
- [0702] Miyoshi, Y. et al., *Med.Mol.Morphol.* **43** (2010): 193-196
- [0703] Molina, J. R. et al., *Mayo Clin Proc.* **83** (2008): 584-594
- [0704] Mongan, N. P. et al., *Mol.Carcinog* **45** (2006): 887-900
- [0705] Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129

- [0706] Mori, M. et al., *Transplantation* **64** (1997): 1017-1027
- [0707] Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- [0708] Moulton, H. M. et al., *Clin Cancer Res.* **8** (2002): 2044-2051
- [0709] Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res.* **7** (2008): 51-61
- [0710] Mueller, L. N. et al., *Proteomics*. **7** (2007): 3470-3480
- [0711] Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
- [0712] Murray, G. I. et al., *Histopathology* **57** (2010): 202-211
- [0713] National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
- [0714] Noubissi, F. K. et al., *J Invest Dermatol.* **134** (2014): 1718-1724
- [0715] Oehlrich, N. et al., *Int.J Cancer* **117** (2005): 256-264
- [0716] Okuno, K. et al., *Exp.Ther Med.* **2** (2011): 73-79
- [0717] Ottaviani, S. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **55** (2006): 867-872
- [0718] Otte, M. et al., *Cancer Res* **61** (2001): 6682-6687
- [0719] Ozeki, N. et al., *Int.J Mol.Sci.* **17** (2016)
- [0720] Pai, V. P. et al., *Breast Cancer Res* **11** (2009): R81
- [0721] Palmer, D. H. et al., *Hepatology* **49** (2009): 124-132
- [0722] Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* **14** (2012): 433-440
- [0723] Perez, C. A. et al., *Expert.Rev Anticancer Ther.* **11** (2011): 1599-1605
- [0724] Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 289-297
- [0725] Pineda, C. T. et al., *Cell* **160** (2015): 715-728
- [0726] Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- [0727] Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- [0728] Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- [0729] Porter, D. L. et al., *N Engl.J Med.* **365** (2011): 725-733
- [0730] Prasad, M. L. et al., *Head Neck* **26** (2004): 1053-1057
- [0731] Qian, Z. et al., *Mol.Cancer Res* **12** (2014): 335-347
- [0732] Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol.* (2015)
- [0733] Raman, J. D. et al., *Carcinogenesis* **27** (2006): 499-507
- [0734] Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- [0735] Reck, M., *Ann.Oncol* **23 Suppl 8** (2012): viii28-viii34
- [0736] RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- [0737] Reinisch, C. M. et al., *Int.J Exp.Pathol.* **92** (2011): 326-332
- [0738] Reinisch, W. et al., *J Immunother.* **25** (2002): 489-499
- [0739] Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* **140** (2015): 329-333
- [0740] Ries, J. et al., *Int.J Oncol* **26** (2005): 817-824

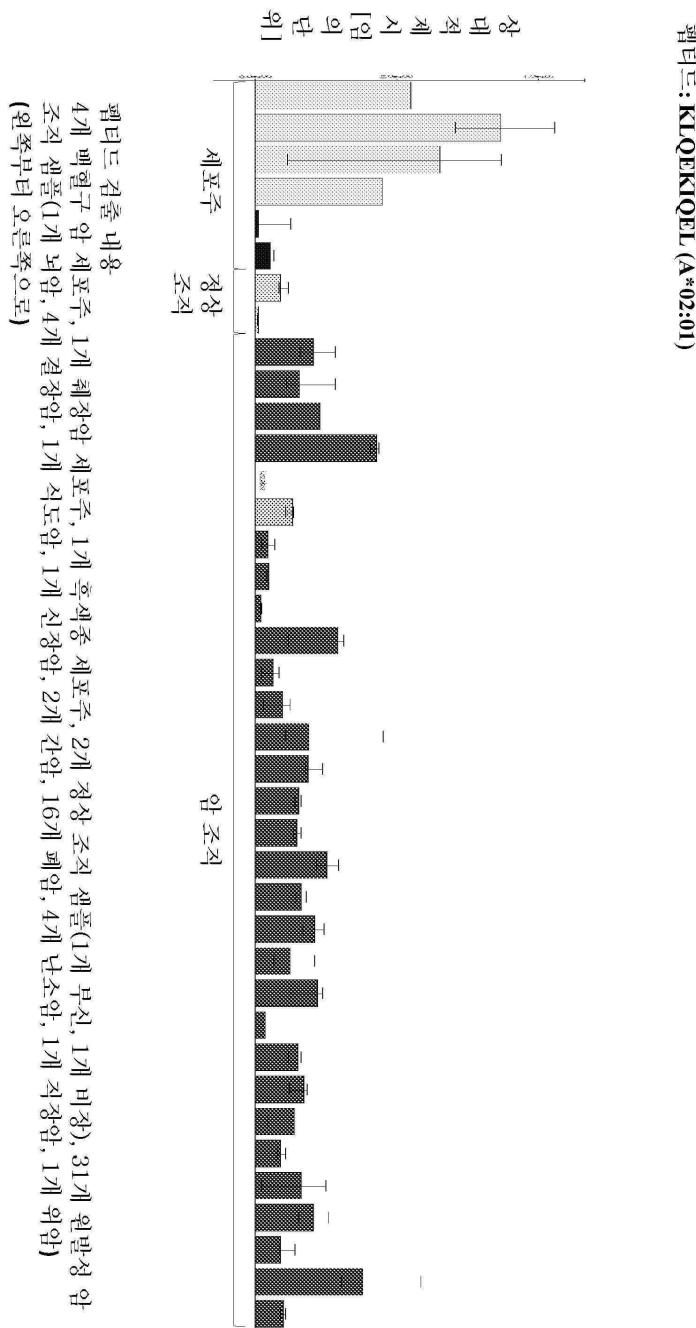
- [0741] Rinaldi, A. et al., Pathobiology **77** (2010): 129-135
- [0742] Rini, B. I. et al., Curr.Opin.Oncol. **20** (2008): 300-306
- [0743] Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006): 67-74
- [0744] Risinger, J. I. et al., Clin Cancer Res **13** (2007): 1713-1719
- [0745] Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921
- [0746] Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132
- [0747] S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, **032-0100L**, (2013)
- [0748] S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011)
- [0749] S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, **032-0350L**, (2013)
- [0750] S3-Leitlinie Mammakarzinom, **032-0450L**, (2012)
- [0751] S3-Leitlinie Melanom, **032-0240L**, (2013)
- [0752] S3-Leitlinie Prostatakarzinom, **043/0220L**, (2014)
- [0753] Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491
- [0754] Salman, B. et al., Oncoimmunology. **2** (2013): e26662
- [0755] Sangro, B. et al., J Clin Oncol **22** (2004): 1389-1397
- [0756] Schmidt, S. M. et al., Cancer Res **64** (2004): 1164-1170
- [0757] Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- [0758] Shahzad, M. M. et al., Cancer Lett. **330** (2013): 123-129
- [0759] Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- [0760] Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell **3** (2003): 377-386
- [0761] Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004): 1146-1151
- [0762] Showel, M. M. et al., F1000Prime.Rep. **6** (2014): 96
- [0763] Siegel, S. et al., Blood **102** (2003): 4416-4423
- [0764] Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542
- [0765] Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- [0766] Skandalis, S. S. et al., Matrix Biol **35** (2014): 182-193
- [0767] Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- [0768] Smith, M. J. et al., Br.J Cancer **100** (2009): 1452-1464
- [0769] Son, M. Y. et al., Stem Cells **31** (2013): 2374-2387
- [0770] Springelkamp, H. et al., Genet.Epidemiol. **39** (2015): 207-216
- [0771] Stahl, M. et al., Ann.Oncol. **24 Suppl 6** (2013): vi51-vi56
- [0772] Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- [0773] Su, Z. et al., Cancer Res. **63** (2003): 2127-2133
- [0774] Sun, H. et al., J BUON. **20** (2015): 296-308
- [0775] Szajnik, M. et al., Gynecol.Obstet.(Sunnyvale.) **Suppl 4** (2013): 3
- [0776] Szarvas, T. et al., Int J Cancer **135** (2014): 1596-1604

- [0777] Takayama, T. et al., *Cancer* **68** (1991): 2391-2396
- [0778] Takayama, T. et al., *Lancet* **356** (2000): 802-807
- [0779] Tanaka, F. et al., *Int.J Oncol* **10** (1997): 1113-1117
- [0780] Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- [0781] Thakkar, J. P. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **23** (2014): 1985-1996
- [0782] Thorsen, K. et al., *Mol Cell Proteomics.* **7** (2008): 1214-1224
- [0783] Tian, X. et al., *J Transl.Med.* **13** (2015): 337
- [0784] Toomey, P. G. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 32-42
- [0785] Tradonsky, A. et al., *Am.J Clin Pathol.* **137** (2012): 918-930
- [0786] Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- [0787] Urgard, E. et al., *Cancer Inform.* **10** (2011): 175-183
- [0788] van der Bruggen, P. et al., *Immunol.Rev* **188** (2002): 51-64
- [0789] van, Duin M. et al., *Haematologica* **96** (2011): 1662-1669
- [0790] Velinov, N. et al., *Khirurgiia (Sofiiia)* (2010): 44-49
- [0791] Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- [0792] Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- [0793] Wang, G. H. et al., *Oncol Lett.* **5** (2013): 544-548
- [0794] Wang, Y. et al., *Anticancer Res* **33** (2013): 207-214
- [0795] Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 7099-7109
- [0796] Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- [0797] Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- [0798] Włodarski, M. W. et al., *J Leukoc.Biol* **83** (2008): 589-601
- [0799] World Cancer Report, (2014)
- [0800] Wu, Z. Y. et al., *Scand.J Immunol.* **74** (2011): 561-567
- [0801] Xie, X. et al., *Oncol Lett.* **7** (2014): 1537-1543
- [0802] Xiong, D. et al., *Carcinogenesis* **33** (2012): 1797-1805
- [0803] Xu, J. et al., *J Mol.Biol* **377** (2008): 28-46
- [0804] Xu, L. et al., *Zhongguo Fei.Ai.Za Zhi.* **14** (2011): 727-732
- [0805] Xu, X. et al., *Exp.Mol.Pathol.* **97** (2014): 579-584
- [0806] Xu, Y. et al., *Sci.Rep.* **5** (2015): 12104
- [0807] Yakimchuk, K. et al., *Mol.Cell Endocrinol.* **375** (2013): 121-129
- [0808] Yamada, R. et al., *Tissue Antigens* **81** (2013): 428-434
- [0809] Yang, S. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1772** (2007): 1033-1040
- [0810] Yao, J. et al., *Cancer Immunol.Res.* **2** (2014): 371-379
- [0811] Yin, B. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014a): 2934-2941
- [0812] Yu, J. et al., *Gut* **64** (2015): 636-645

- [0813] Yu, W. et al., *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **264** (2012): 73–83
- [0814] Yuan, R. H. et al., *Ann Surg.Oncol.* **16** (2009): 1711–1719
- [0815] Zamuner, F. T. et al., *Mol.Cancer Ther.* **14** (2015): 828–834
- [0816] Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570–4577
- [0817] Zhan, W. et al., *Clin Res Hepatol.Gastroenterol.* (2015)
- [0818] Zhang, H. et al., *Carcinogenesis* **35** (2014): 1863–1871
- [0819] Zhang, J. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 42040–42052
- [0820] Zhang, S. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **8** (2015): 541–550
- [0821] Zhang, X. et al., *Int.J Oncol* (2016)
- [0822] Zhao, H. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* **10** (2002): 100–102
- [0823] Zou, T. T. et al., *Oncogene* **21** (2002): 4855–4862
- [0824] Follenzi A, et al. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):217–22
- [0825] Zufferey R, et al. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2886–92
- [0826] Scholten KB, et al. *Clin Immunol.* 2006 May;119(2):135–45.
- [0827] Gustafsson C, et al. *Trends Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):346–53. Review
- [0828] Kuball, J., et al. (2007). *Blood* **109**, 2331–2338
- [0829] Schmitt, T. M., et al. (2009). *Hum. Gene Ther.* **20**, 1240–1248

도면

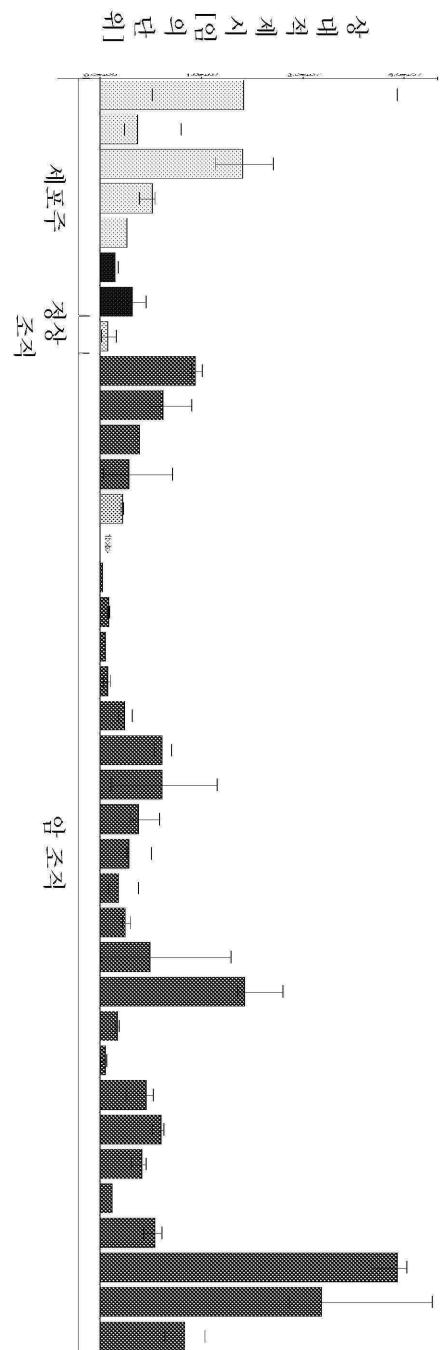
도면 1a



펩타드 검출 내용
4개 벡렐구 암 세포주, 1개 츄장암 세포주, 1개 흑색종 세포주, 2개 정상 조직 샘플(1개 부신, 1개 비장), 31개 원발성 암 (원쪽부터 오른쪽으로)

도면 1b

체티드: QLIEKNWLL (A*02:01)

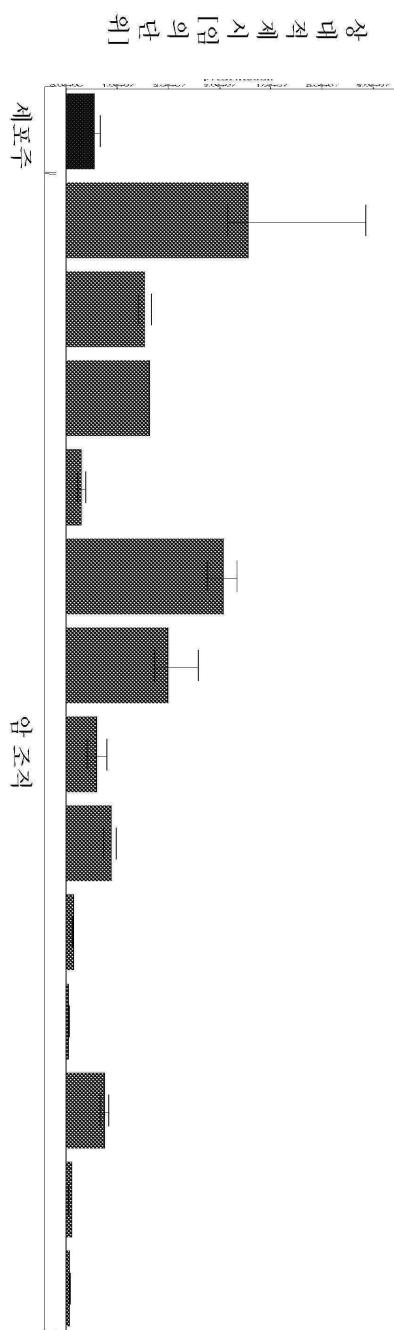


체티드 검출 내용

5개 베혈구암 세포주, 1개 혈장암 세포주, 1개 굴수성 베혈병 세포주, 그리고 1개 정상조직 샘플(1기 부신), 29개 암조직 샘플(4개 질경암, 2개 식도암, 1개 베혈구암, 1개 간암, 10개 폐암, 11개 난소암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

도면 1c

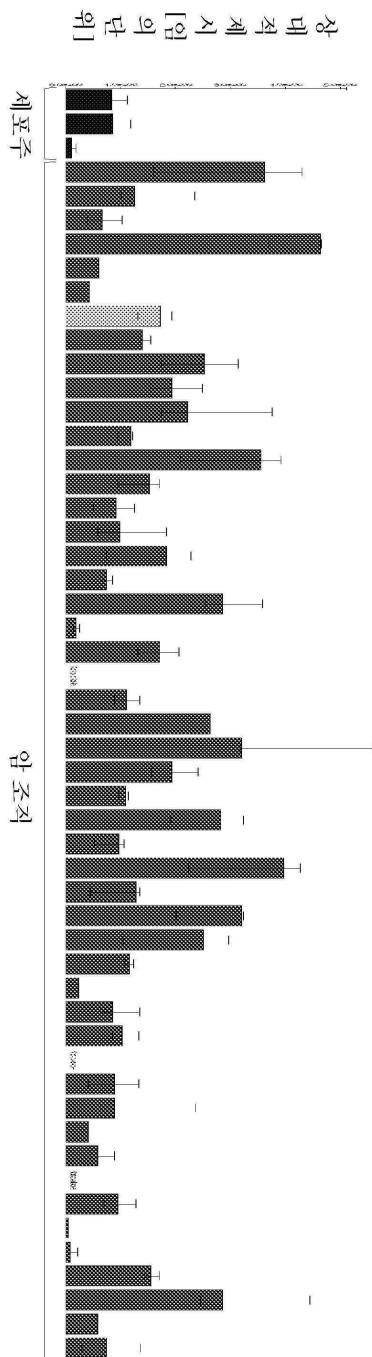
제작자: LLDPKTIFL (A*02:01)



제작자: 김충내용
1기 신장암 세포층, **13기** 암조직 샘플(8개 신장암, **1기** 간암, **2기** 폐암, **2기** 쥐장암)(왼쪽부터 오른쪽으로)

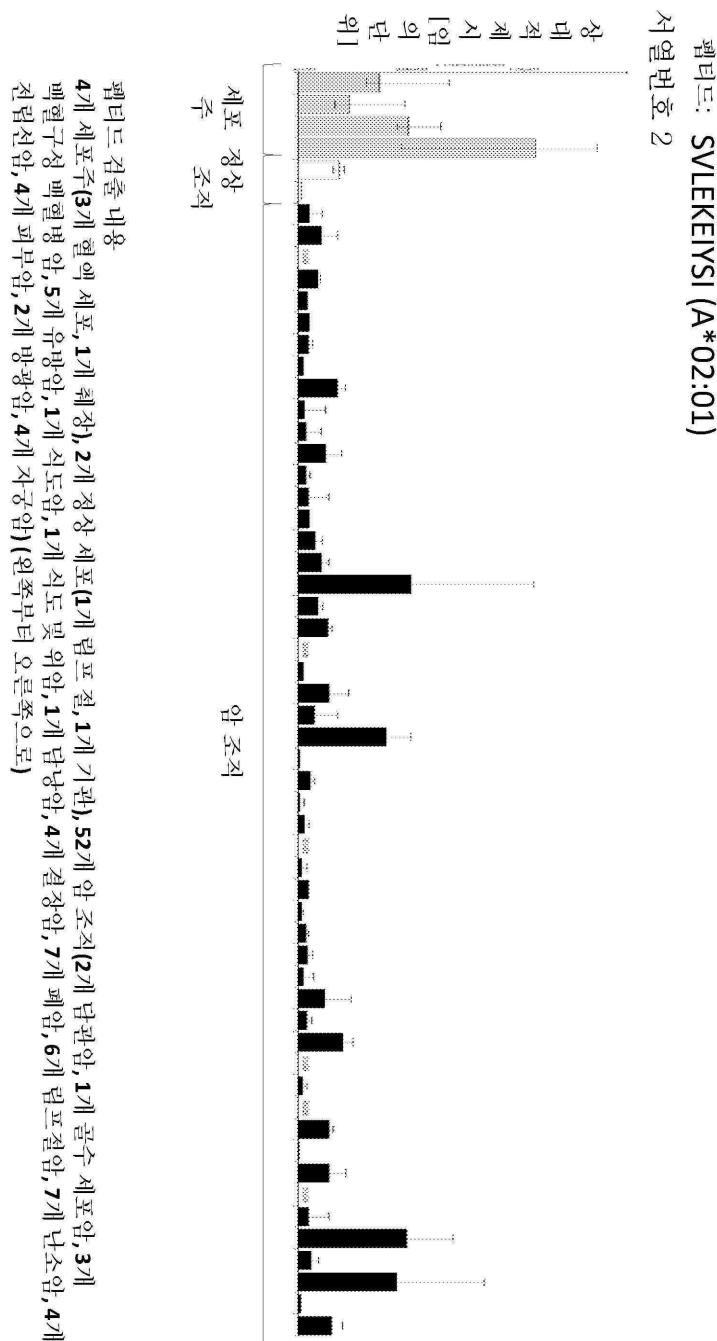
도면 1d

펩티드: RLHDENILL (A*02:01)

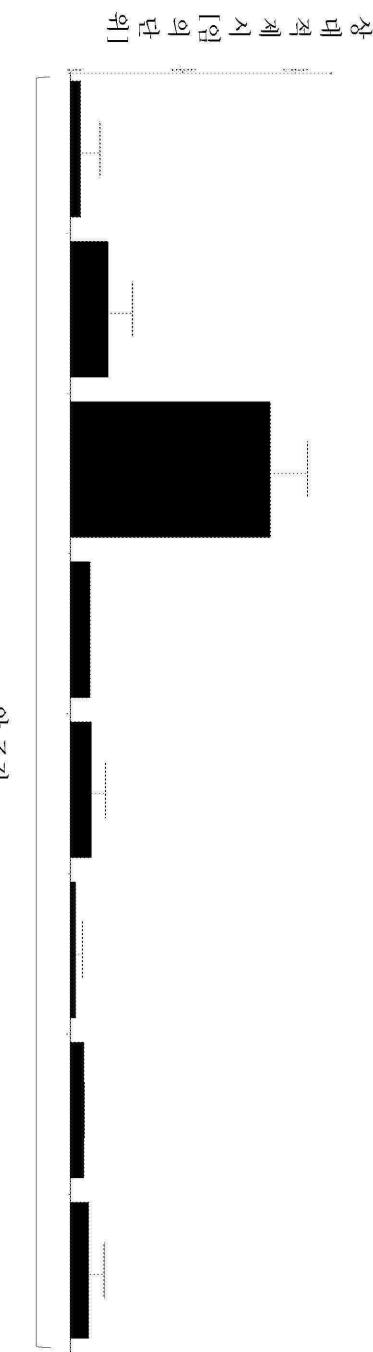


펩티드 검출 내용
1개 신장암 세포주, **1개** 전립선암 세포주, **1개** 혈액중 세포주, **50개** 암 조직 샘플(**4개** 난암, **1개** 경장암, **2개** 식도암, **3개** 신장암,
2개 간암, **23개** 폐암, **7개** 난소암, **2개** 췌장암, **2개** 전립선암, **3개** 직장암, **1개** 위암)(원쪽부터 오른쪽으로)

도면 1e



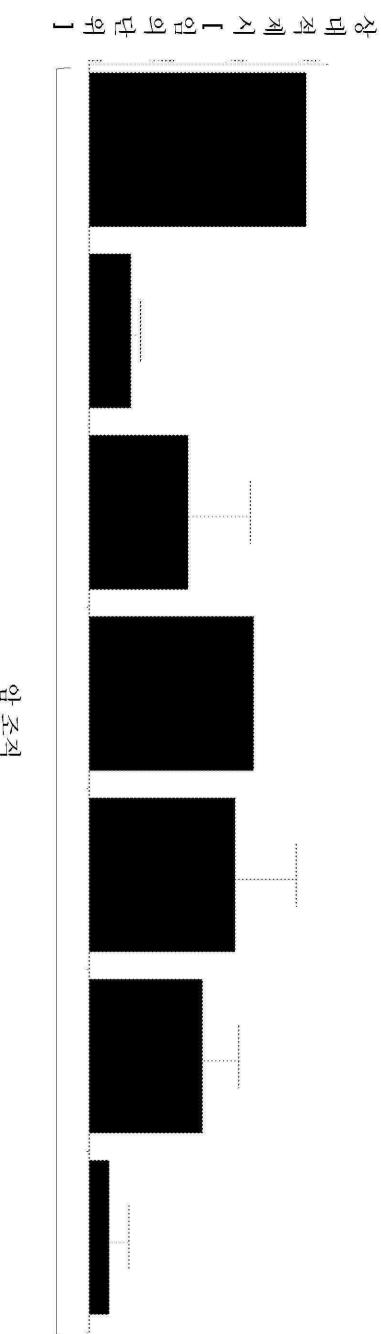
도면 1f



필터드 검출 내용
8개 압조직(1개 간암, 3개 폐암, 그리고 2개 폴부암, 1개 위암, 1개 망광)(왼쪽부터 오른쪽으로)

도면 1g

제작자: FLIENLLAA (A*02:01)
서열번호 67

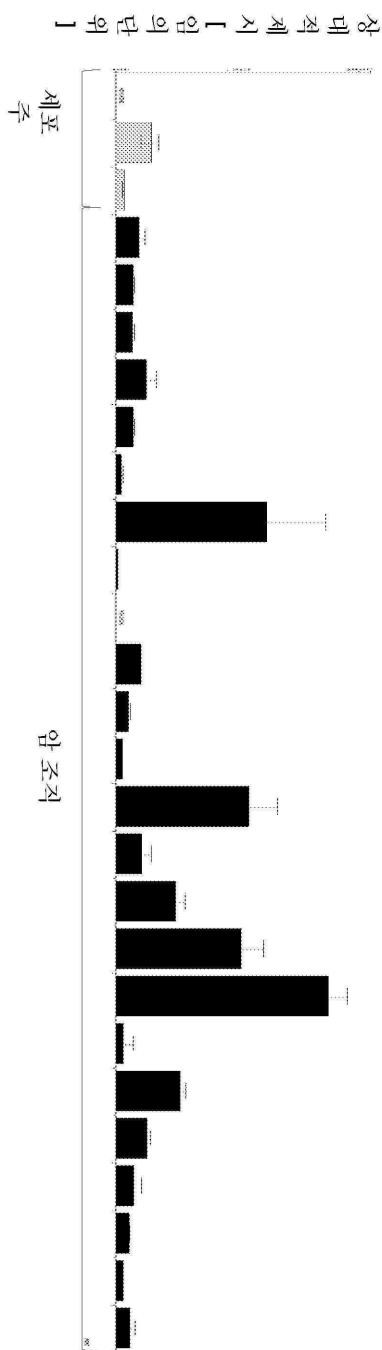


제작자: FLIENLLAA (A*02:01)
서열번호 67

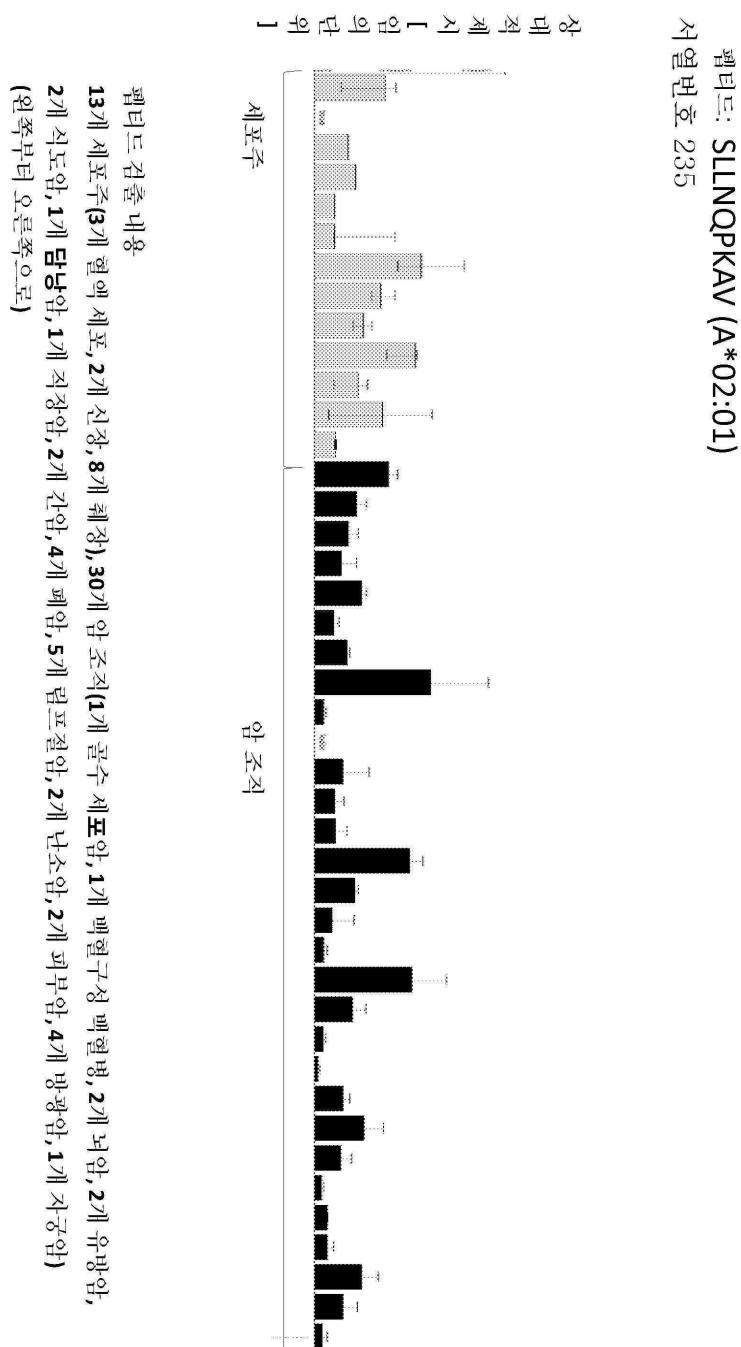
7개 암조직[4개] 뇌암, 2개 폐암, 1개 자궁암)(왼쪽부터 오른쪽으로)
암조직 내용
7개 암조직[4개] 뇌암, 2개 폐암, 1개 자궁암)(왼쪽부터 오른쪽으로)

도면 1h

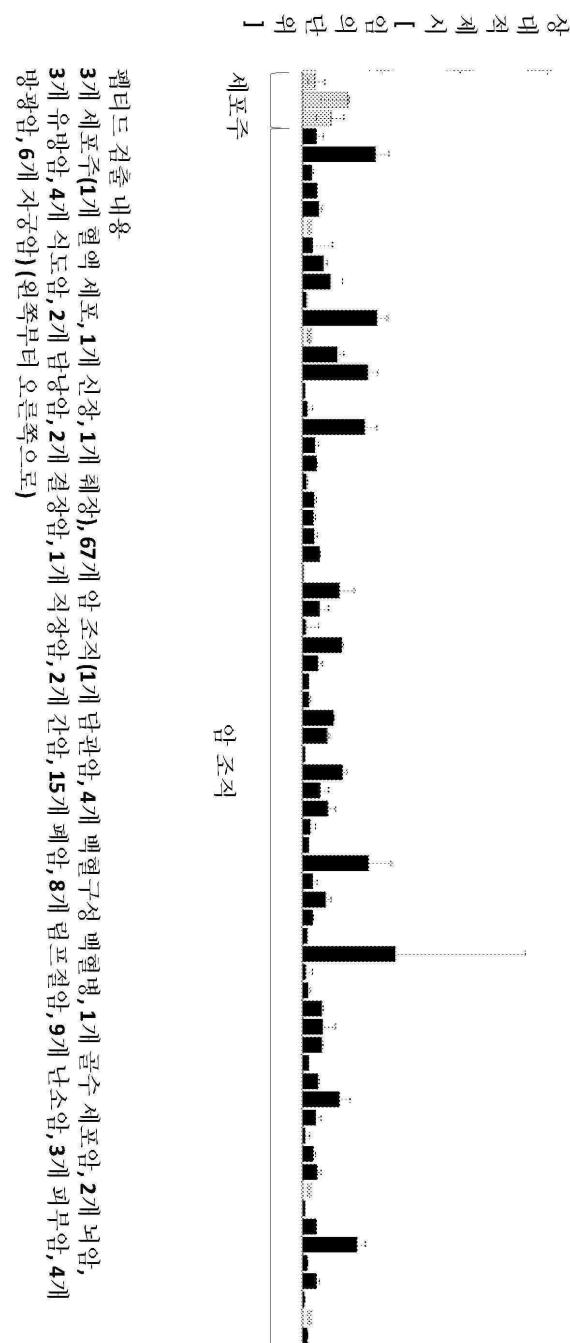
扶贫工作號: FLLEREQQLL (A*02:01)
서열번호 84



扶贫工作號 내용
3개 세포주 **12개** 혈액 세포, **1개** 피부, **24개** 암 조직(**1개** 콜수 세포암, **3개** 백혈구암, **3개** 맥혈구암, **1개** 혈액암, **1개** 유방암, **1개** 신장암, **2개** 결장암, **3개** 직장암, **1개** 폐암, **7개** 림프절 암, **3개** 방광암, **1개** 자궁암)(원쪽부터 오른쪽으로)

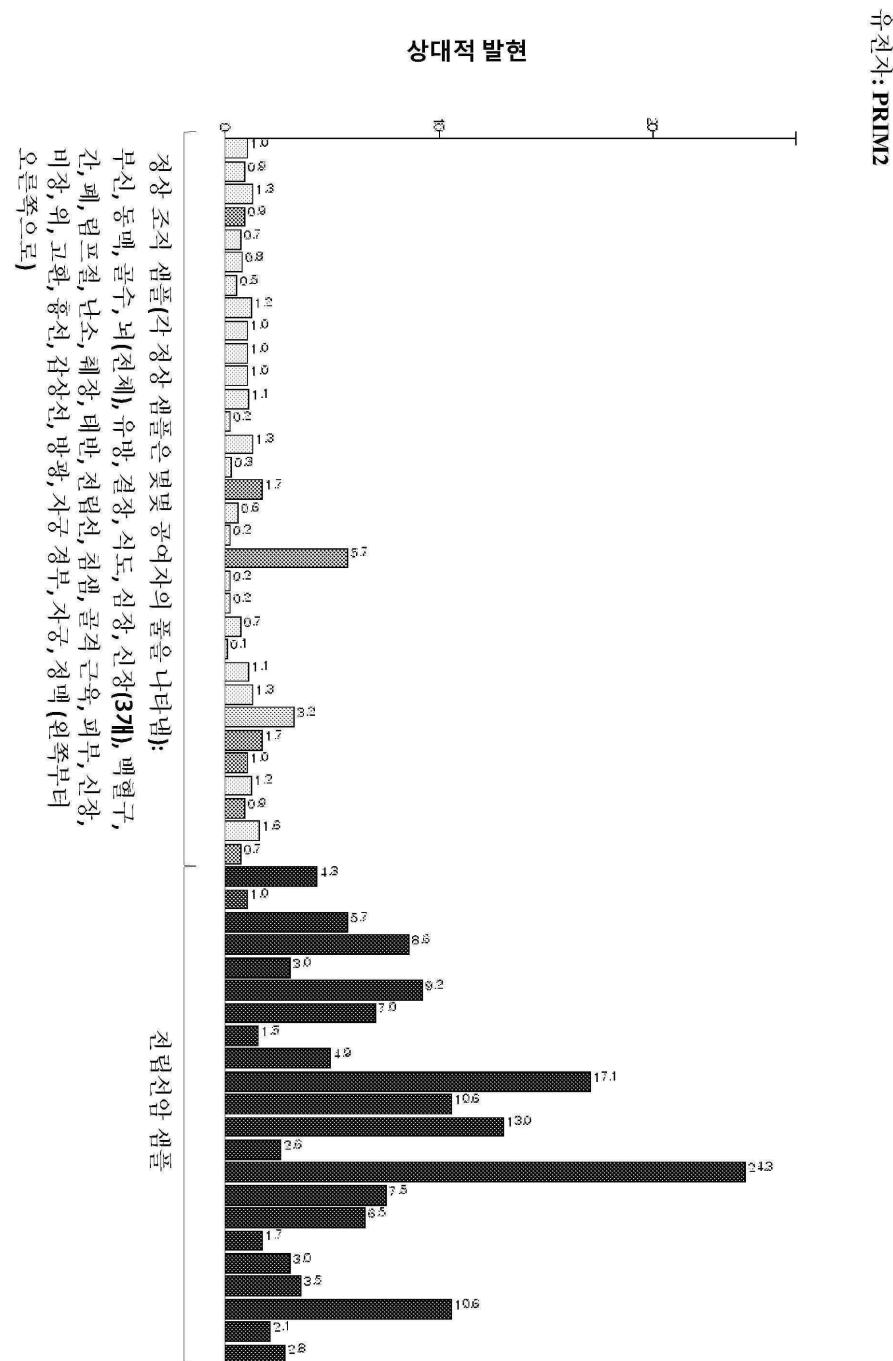
도면 1*i*

도면 1j



펩티드: GLAEFQENV (A*02:01)
서열번호 243

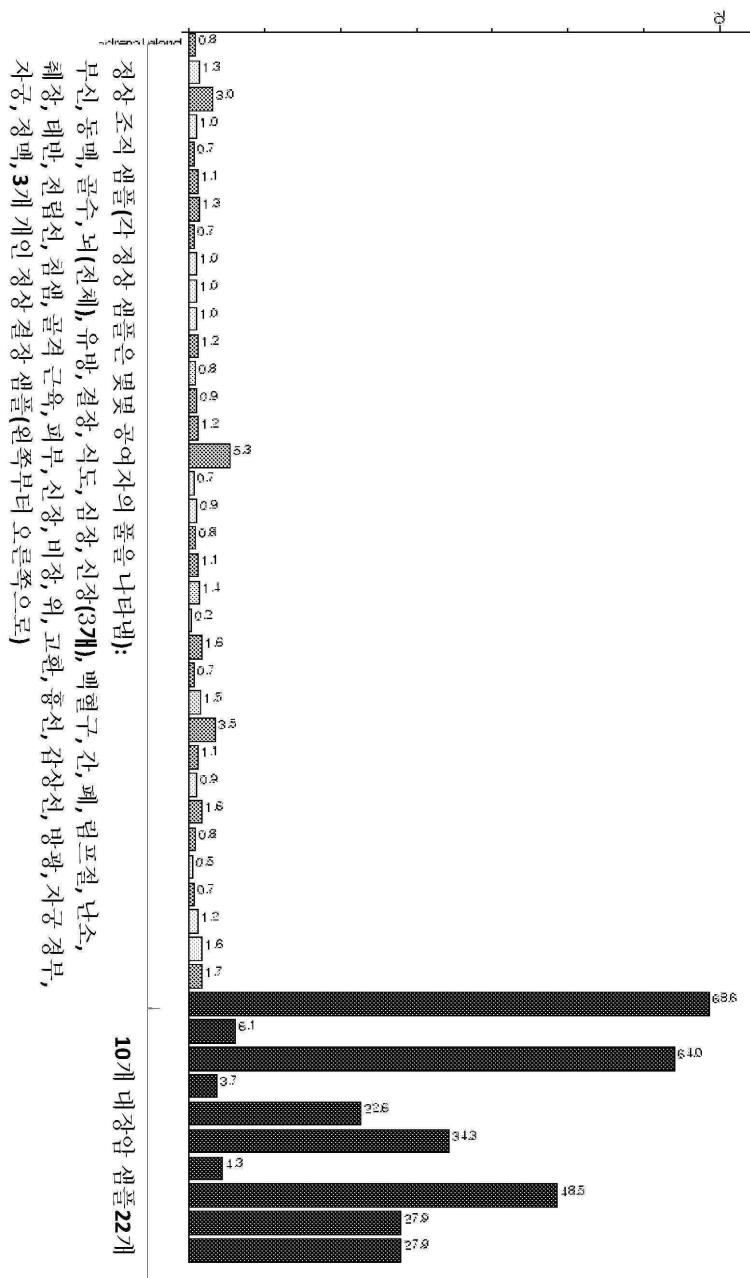
도면2a



도면2b

상대적 발현

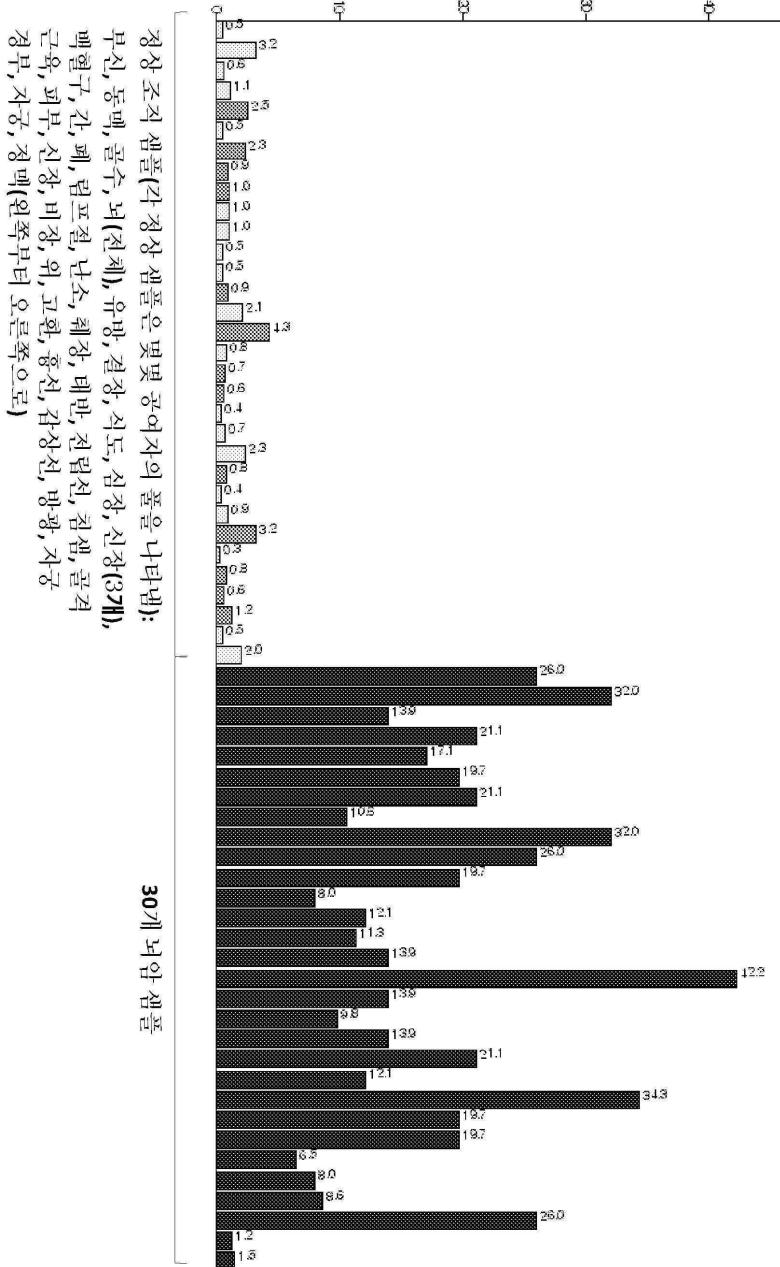
유전자: CHEK1



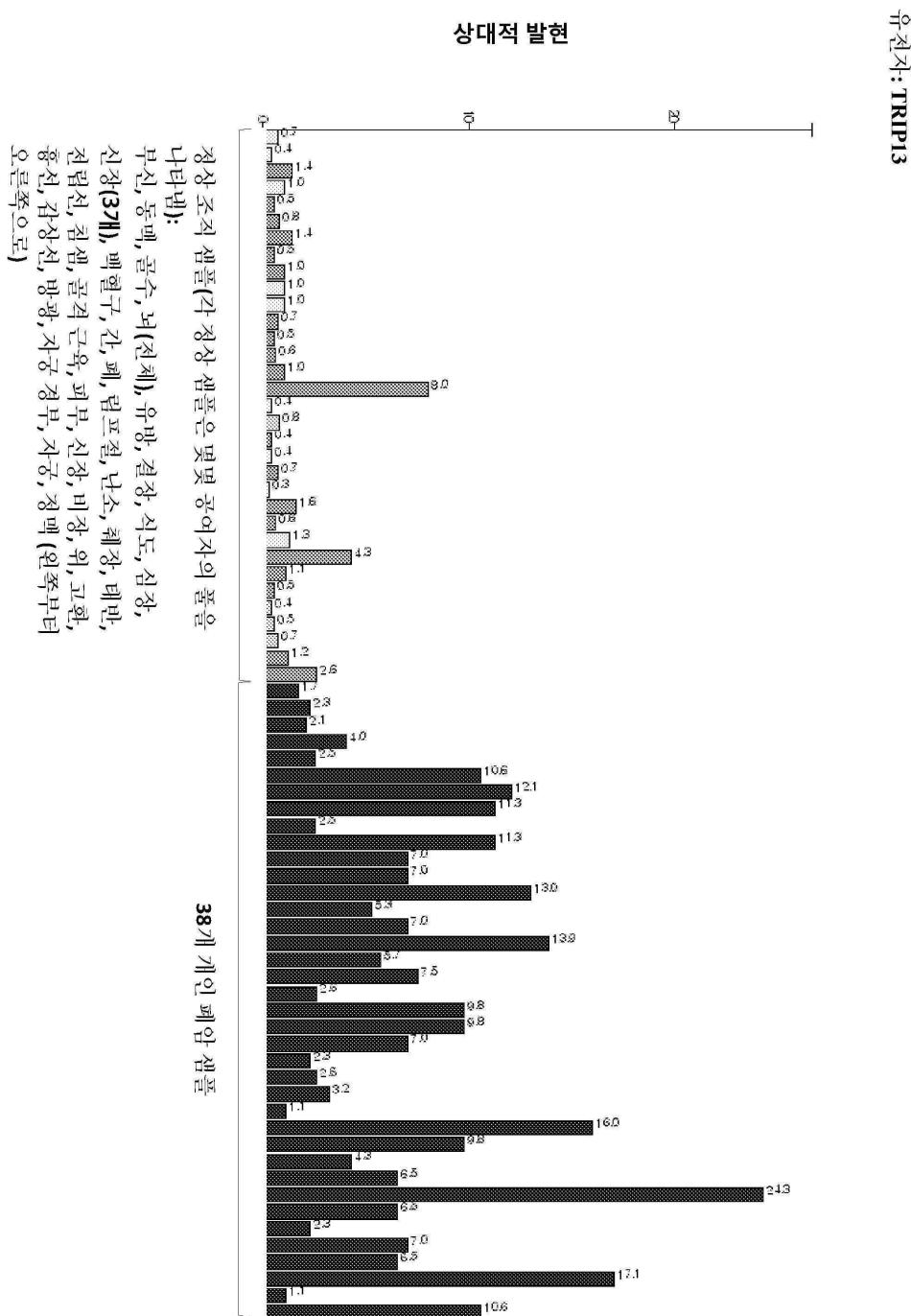
도면2c

유적지: TTC30A

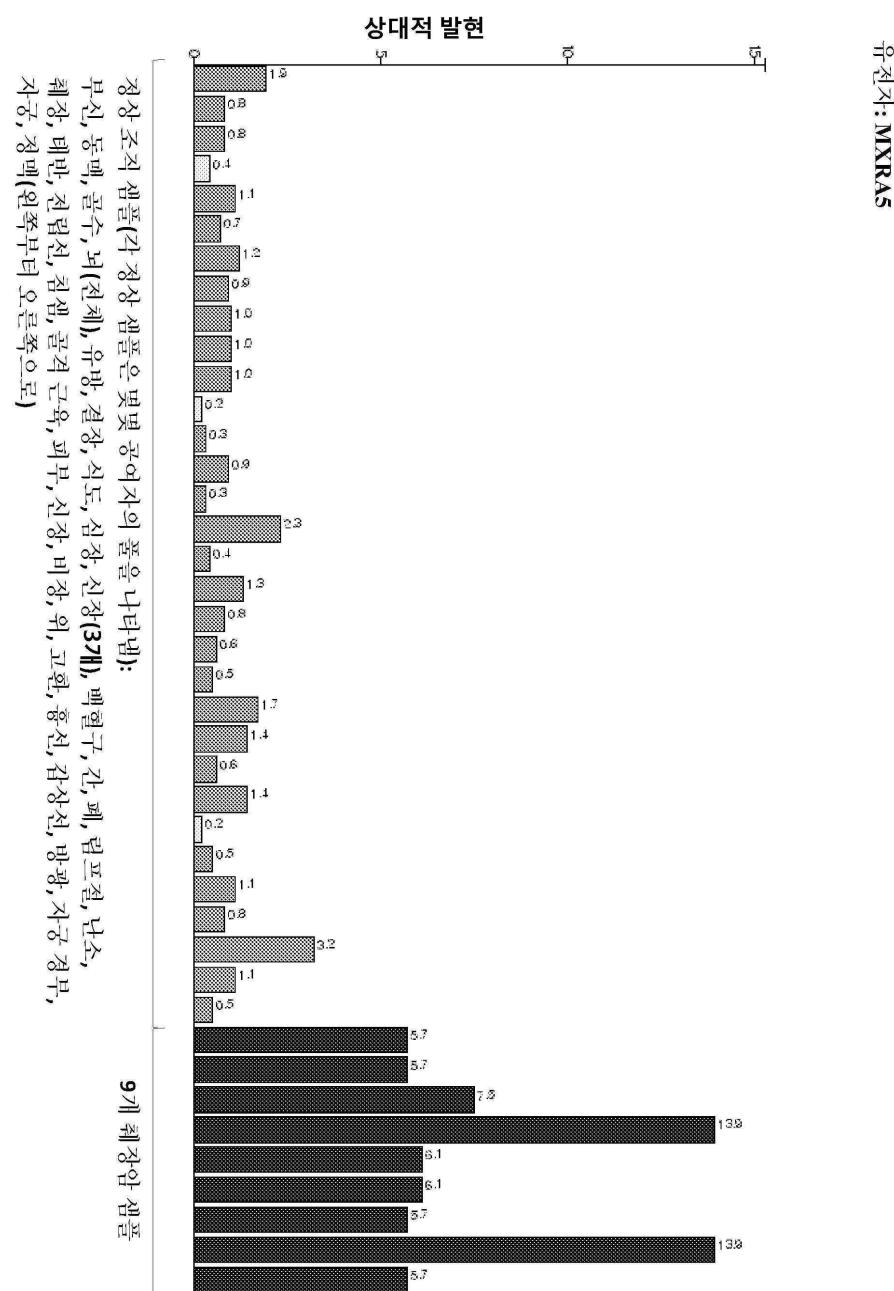
상대적 발현



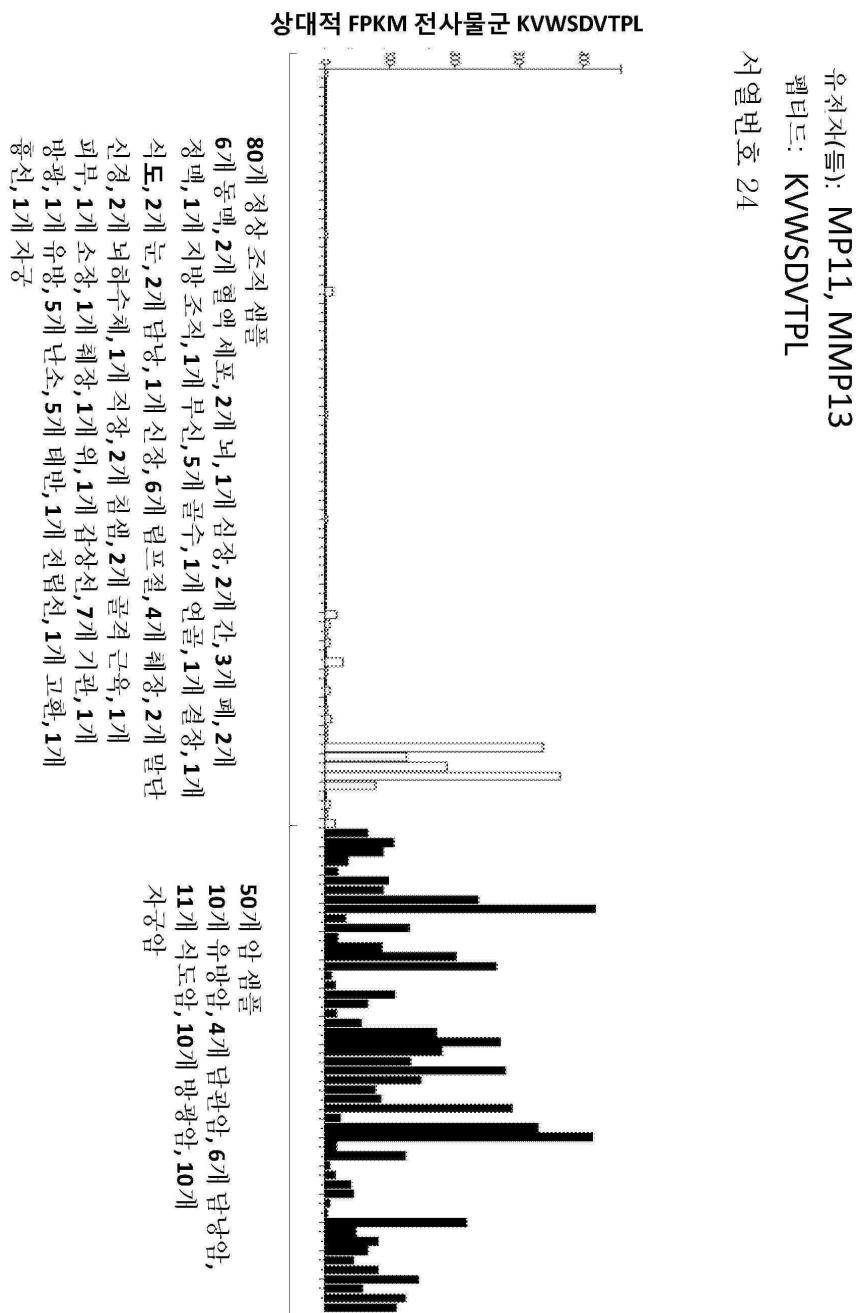
도면2d



도면2e



도면2f



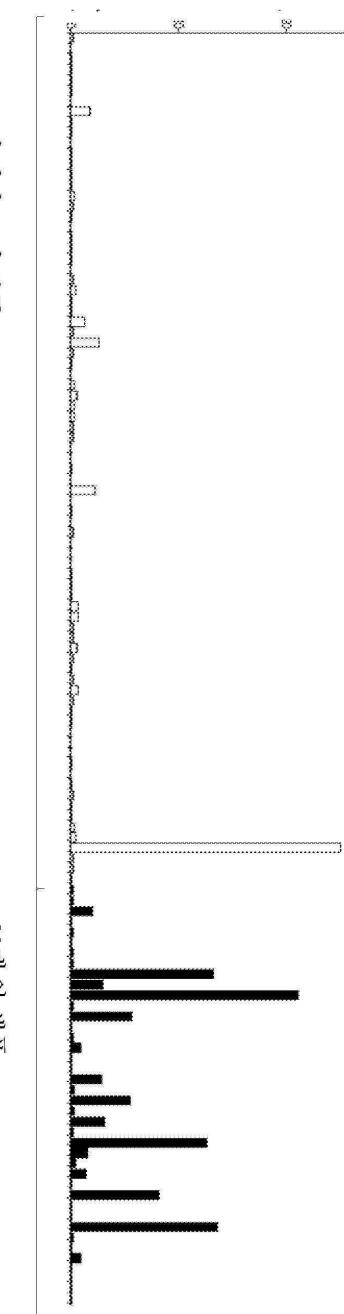
도면2g

상대적 FPKM 전사물군 VIFEGEPMYL

유전자(들): HORMAD1

펩타이드: VIFEGEPMYL

서열번호 168



80개 정장 조직 샘플
6개 동맥, **2개** 혈액 세포, **2개** 뇌, **1개** 심장, **2개** 간, **3개** 폐, **2개** 정맥, **1개** 지방조직, **1개** 부신, **5개** 골수, **1개** 연골, **1개** 질장, **1개** 식도, **2개** 눈, **2개** 담낭, **1개** 신장, **6개** 림프절, **4개** 췌장, **2개** 말단신경, **2개** 뇌하수체, **1개** 직장, **2개** 침샘, **2개** 골격근육, **1개** 피부, **1개** 소장, **1개** 췌장, **1개** 위, **1개** 감상선, **7개** 기관, **1개** 방광, **1개** 유방암, **5개** 난소, **5개** 대변, **1개** 천립선, **1개** 고환, **1개** 흉선, **1개** 자궁

41개 암 샘플
10개 유방암, **10개** 피부암, **11개** 비소세포 폐암, **10개** 소세포 폐암

도면2h

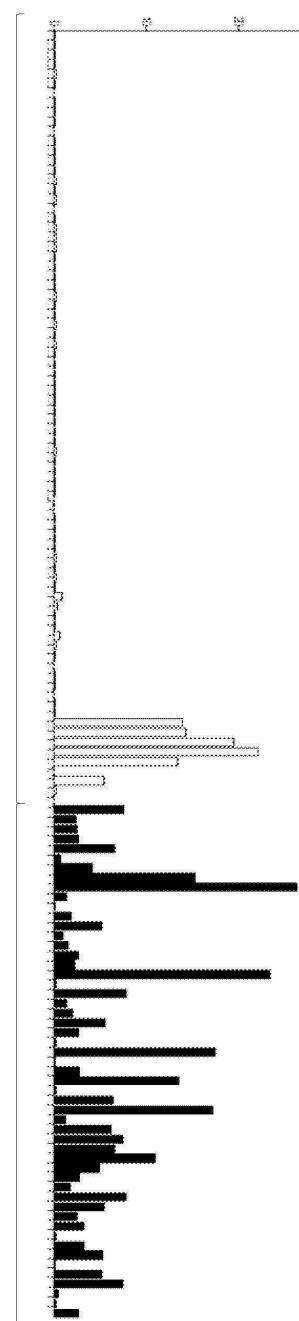
상대적 FPKM 전사물군 TLYNPERTITV

유전자(들): GF2BP1, IGF2BP3

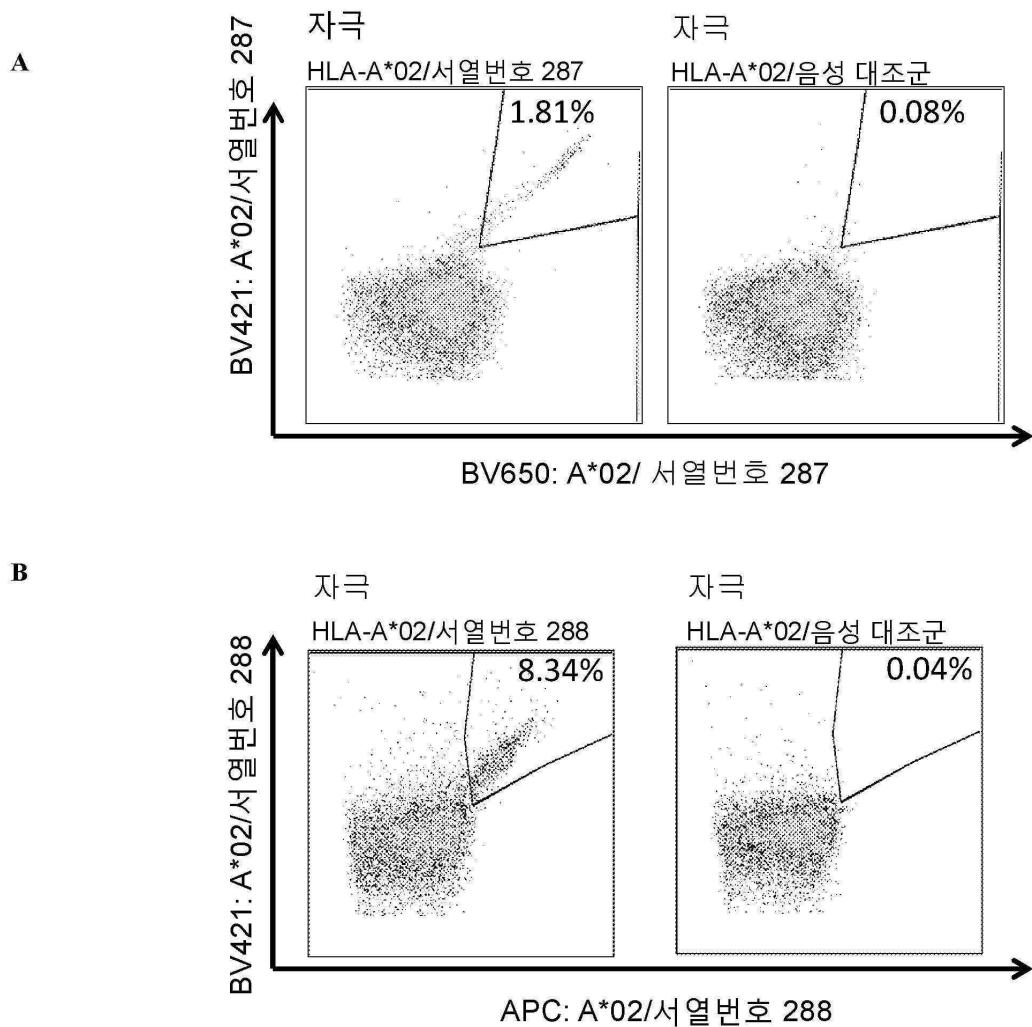
폐티드: TLYNPERTITV

서열번호 274

80개 정상 조직 샘플
6개 동맥, 2개 혈액 세포, 2개 뇌, 1개 심장, 2개 간, 3개 폐, 2개
정맥, 1개 지방 조직, 1개 무신, 5개 골수, 1개 연골, 1개 결장, 1개
식도, 2개 눈, 2개 담낭, 1개 직장, 2개 신장, 5개 림프절, 4개 췌장, 2개 말단
신경, 2개 뇌수지, 1개 직장, 2개 침샘, 2개 끝격 근육, 1개
피부, 1개 소장, 1개 쥐장, 1개 위, 1개 감상선, 7개 기관, 1개
방광, 1개 유방, 5개 난소, 5개 태반, 1개 전립선, 1개 고환, 1개
홍선, 1개 자궁

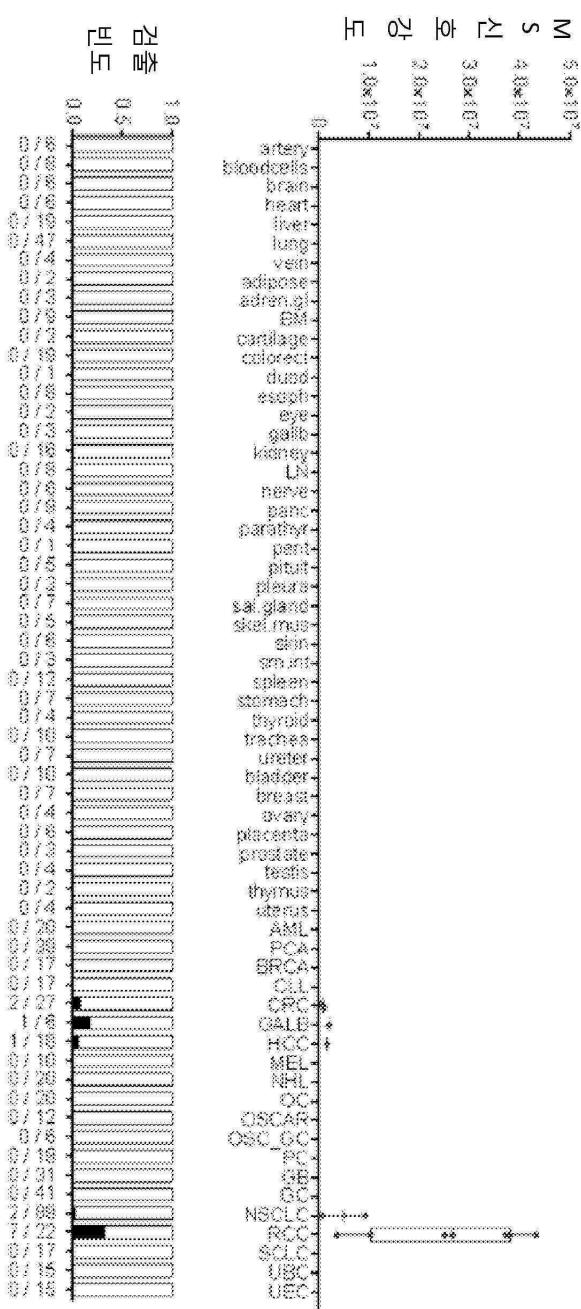


도면3



도면4a

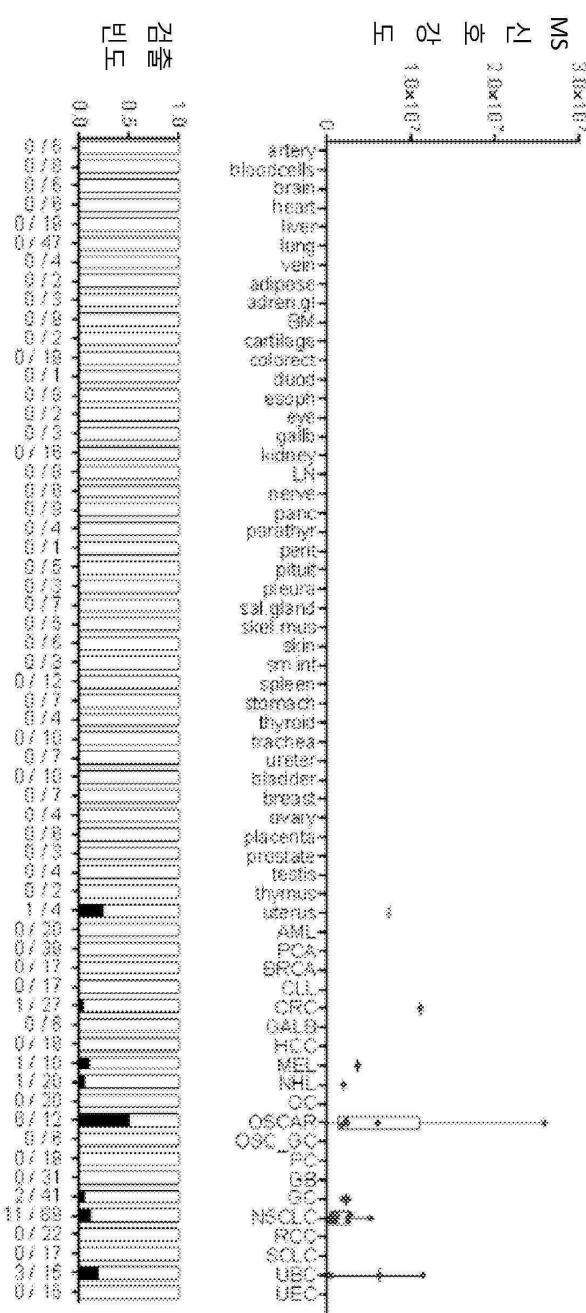
서열번호 11: HAVCR1-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방조직; 부신; 콜수; 절장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무감성선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 간장선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁 종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면4b

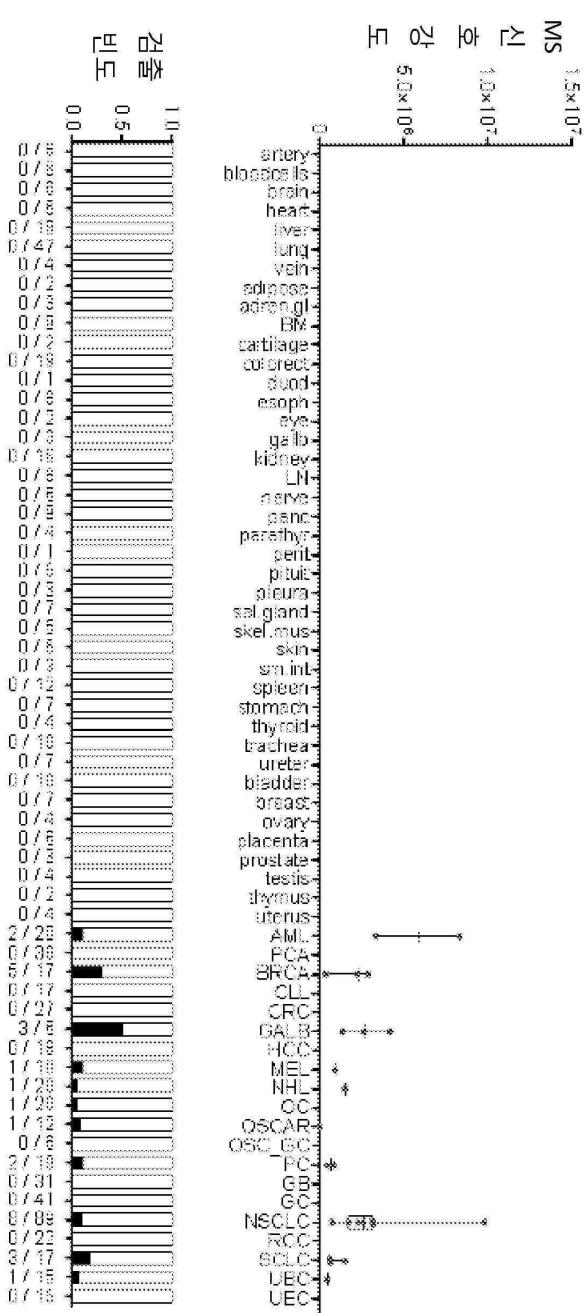
서열번호 14: MMP1-003



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 뚱苣; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 글수; 결장직장; 십이지장; 씩도; 담낭; 림프절; 췌장; 부-김상천; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 간선신; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁 종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

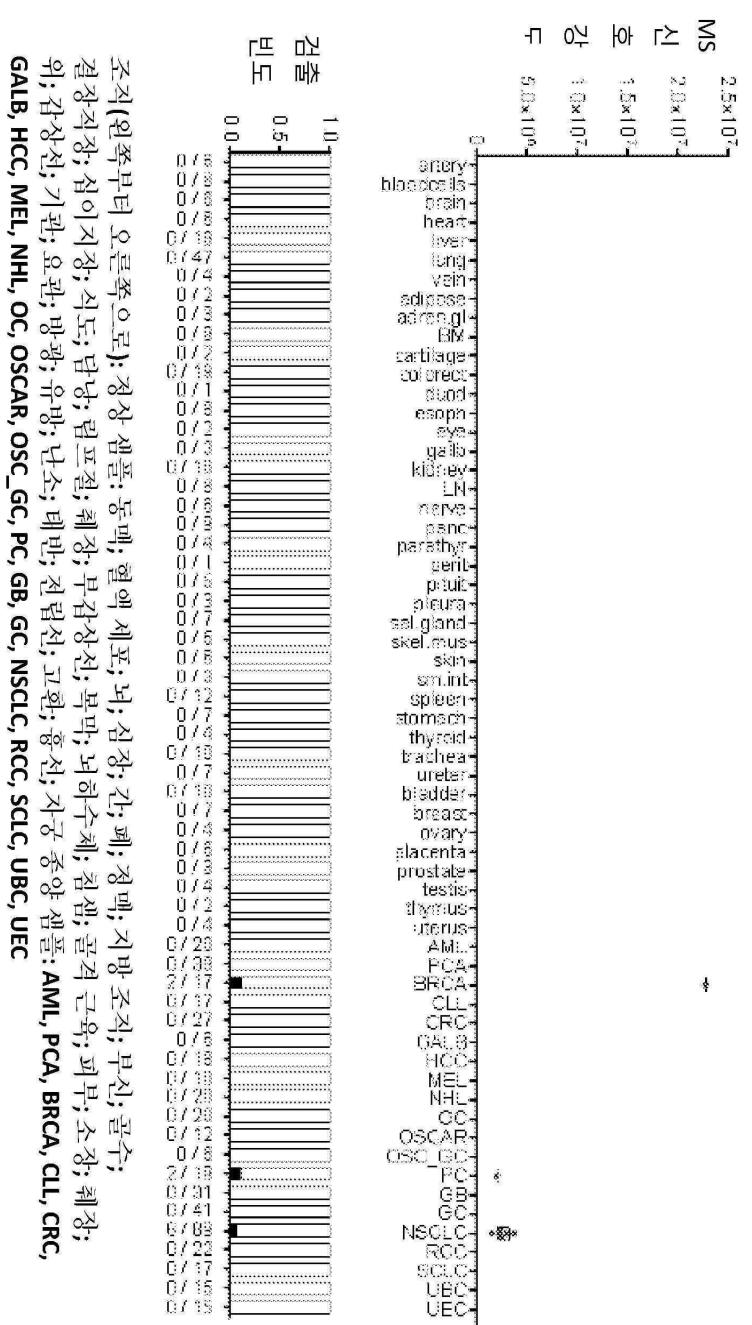
도면4c

서열번호 21: COL6A3-015



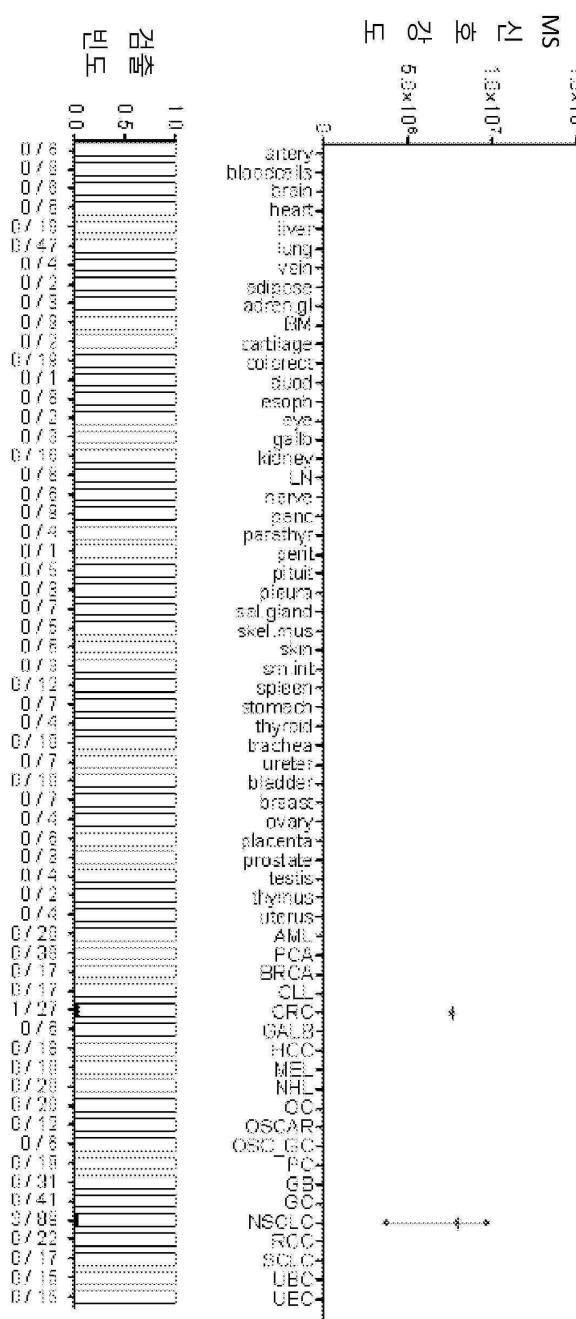
조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상샘: 둉매; 혈액 세포: 혈액; 심장: 간; 폐: 경매; 지방조직: 부신; 골수;
질장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 대하수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 췌장; 위;
췌장선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC,
GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면4d



GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC
조직(원쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플; 동맥, 혈액 세포, 뇌, 심장, 간, 폐, 정맥; 지방 조직, 부신, 골주, 결장직장; 심이지장; 식도, 담낭, 림프절; 췌장; 무갑상선; 목막; 낙하수체; 침샘; 글락 균육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선, 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁; 종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC,

도면4e

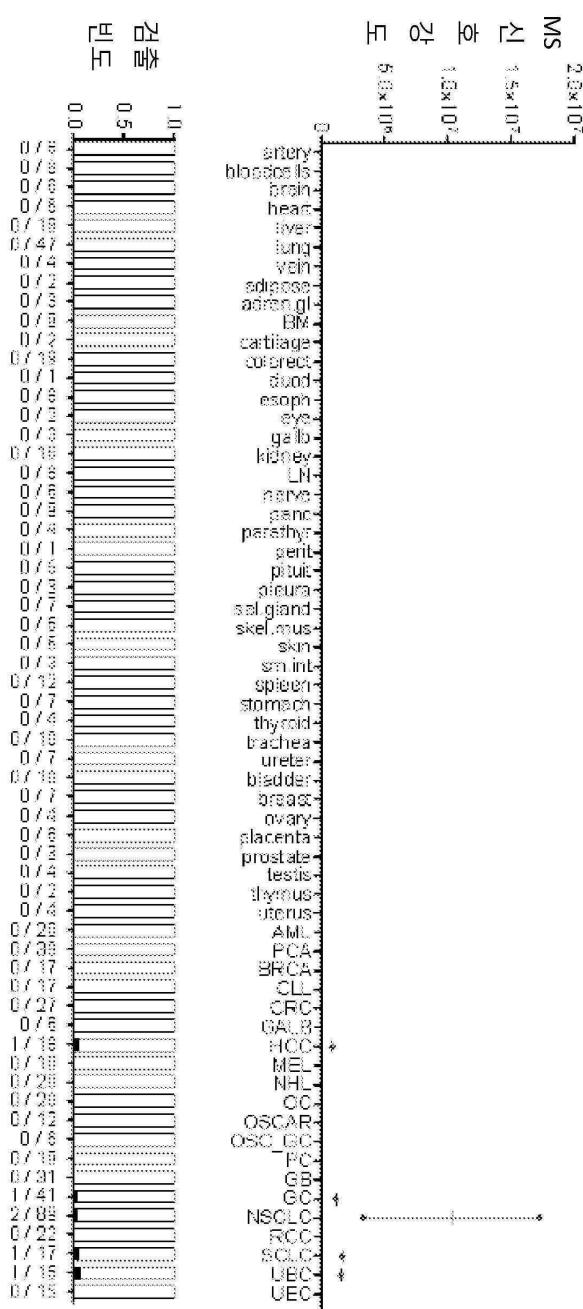


서열번호 25: MXRA5-003

조직(일쪽부터 오른쪽으로): 정상샘플; 동매; 혈액 세포; 뇌; 신장; 간; 폐; 정맥; 지방조직; 부신; 굴수; 결장직장; 심이지장; 씩도; 담낭; 램프절; 췌장; 부갑상선; 목막; 뇌하수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

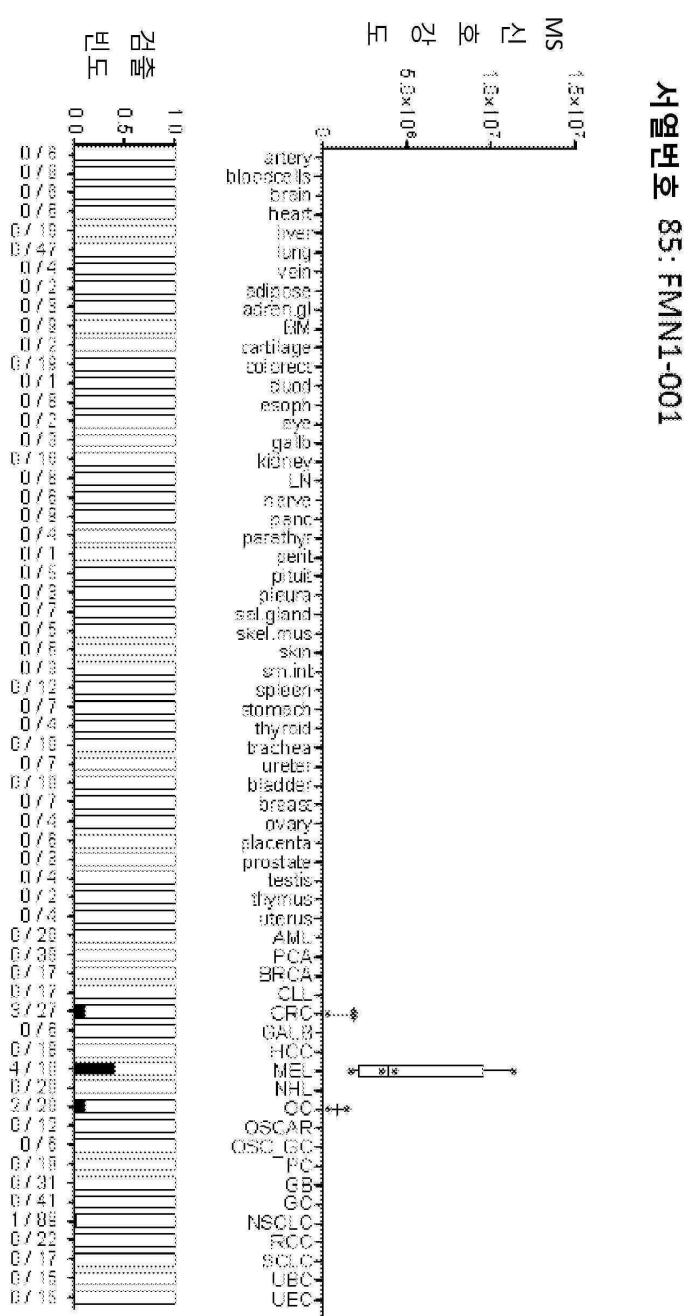
도면4f

서열번호 40: MAGEA3-003



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 뚱메; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 무신; 글수; 절장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘, 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 간선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁 종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

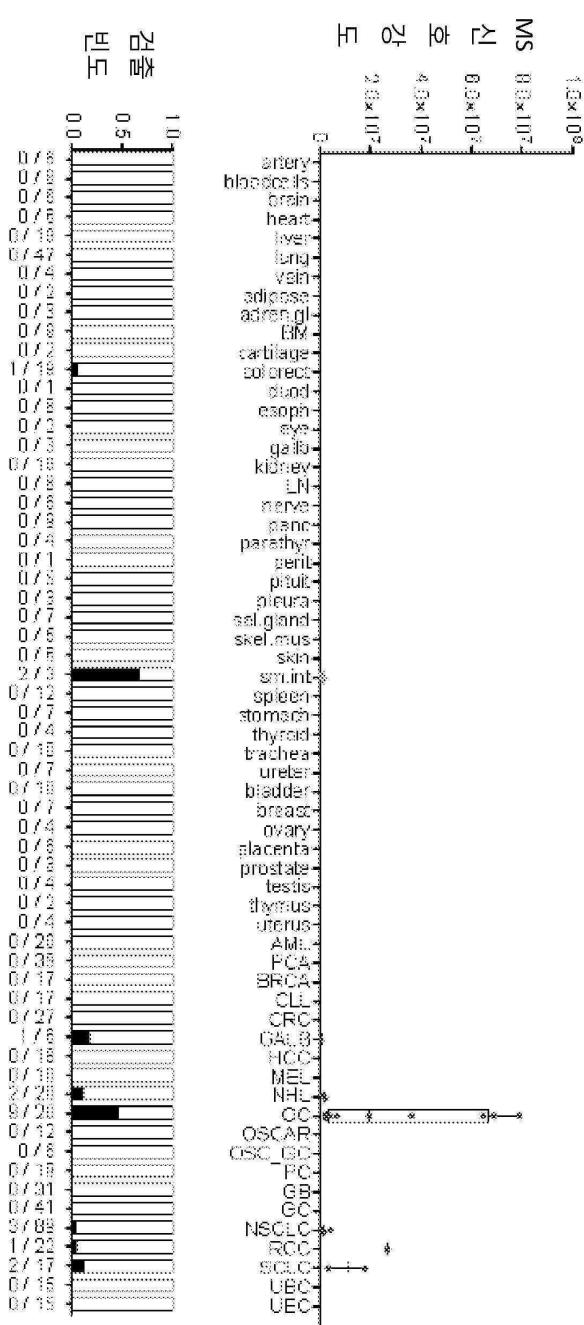
도면4g



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 콜수; 철장(직장); 심이지장; 신도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 오관; 방광; 유방; 난소; 배·반·전립선; 고환; 흉선; 자궁·중앙·샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSCC, GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면4h

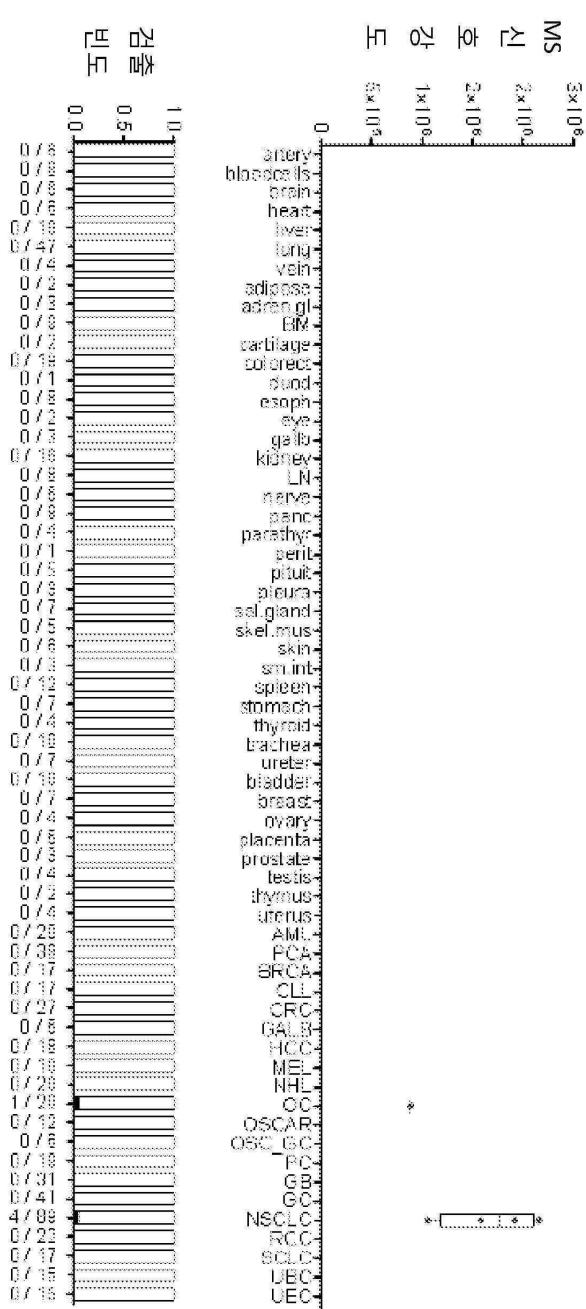
서열번호 89: HTR3A-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동백; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수;
결장(직장); 심(이)지(장); 췌(도); 담(낭); 림프(절); 췌(장); 부(감)상(선); 복(막); 뇌(하)수(체); 침(샘); 골(격)근(육); 피(부); 소(장); 췌(장);
위; 간(장)신; 기(관); 요(관); 망(관); 유(방); 난(소); 태(반); 전(립)신; 고(화); 흉(선); 자(궁)종(양) 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC,
GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면4i

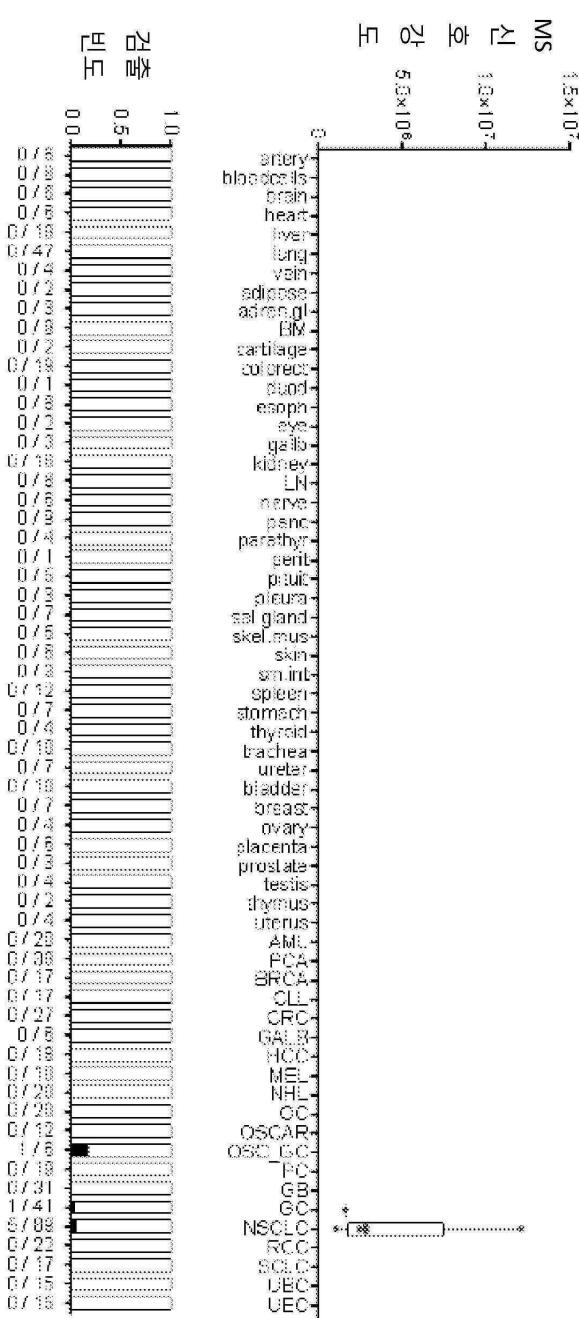
서열번호 117: CABY-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상샘플: 동백; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방조직; 부신; 골수;
결장직장; 심이지장; 썩도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 췌장;
위; 간상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 테민; 전립선; 고환; 흉선; 자궁 종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CL, CRC,
GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면4j

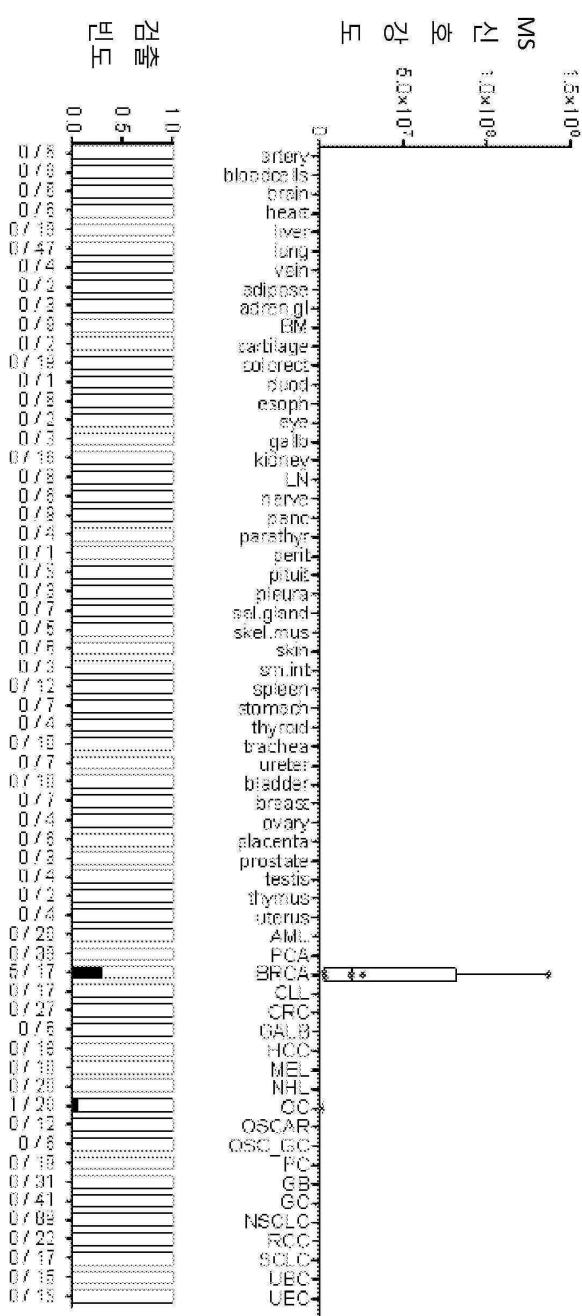
서열번호 153: CT83-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 끌수; 결장 직장; 심이지장; 식도; 담낭; 캄프질; 췌장; 무감상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 간장선; 기관; 오관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁 종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면4k

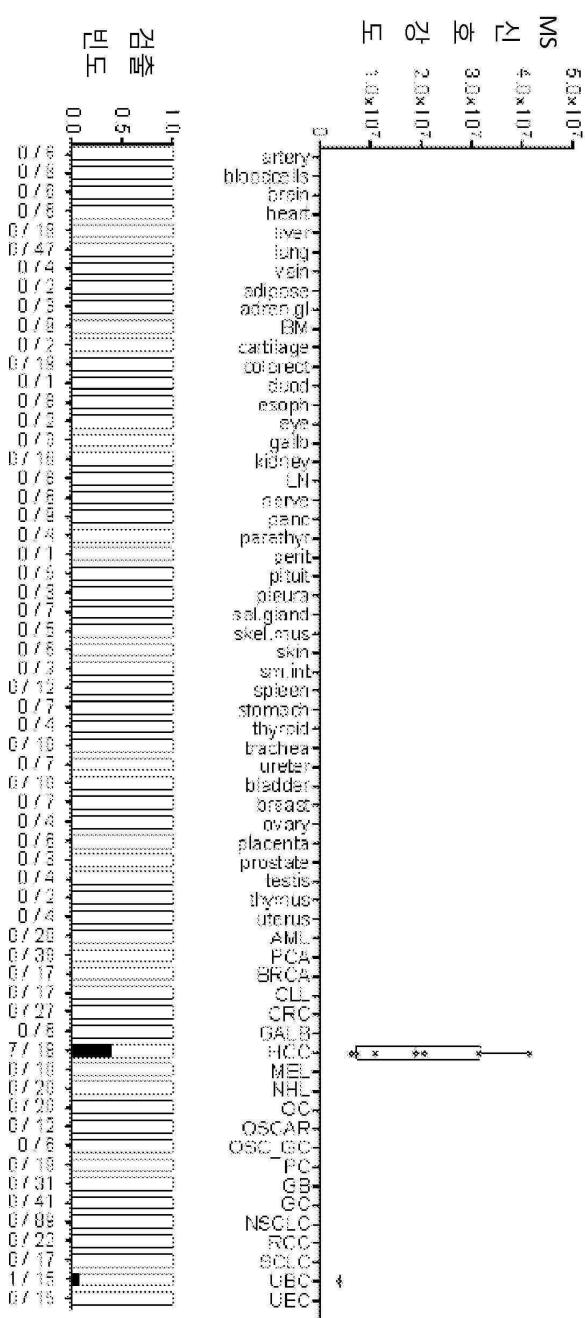
서열번호 155: CYP4Z-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉액; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 끌수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 캄프질; 췌장; 무갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 간장선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁 중앙 샘플. AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

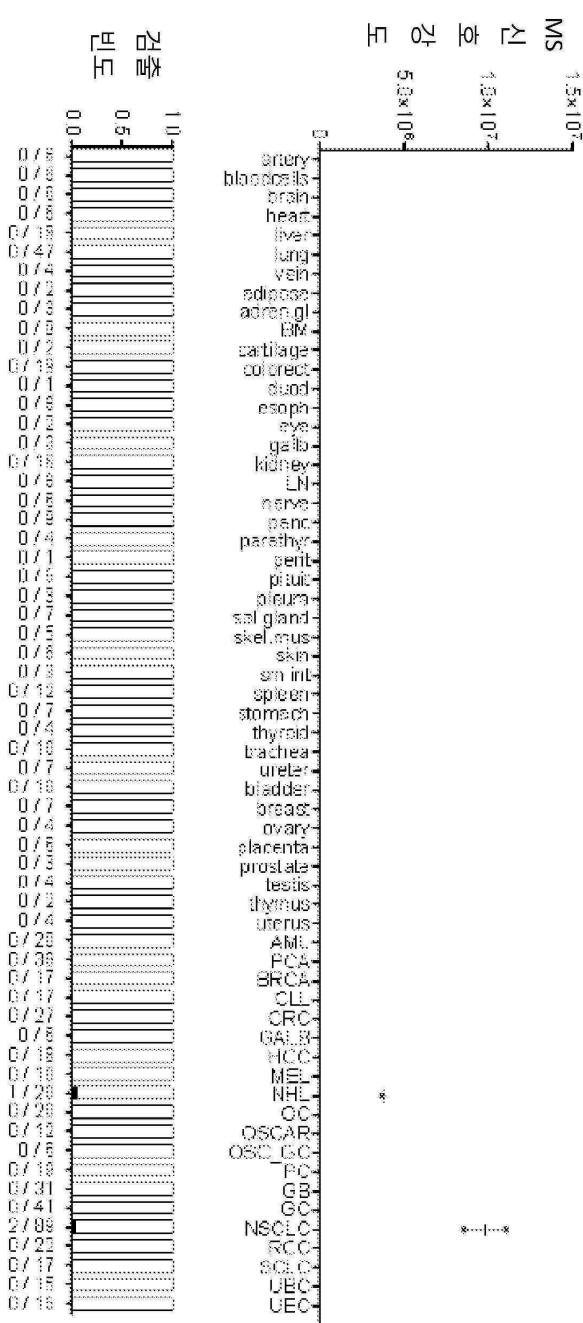
도면41

서열번호 157: DCAF4L2-001



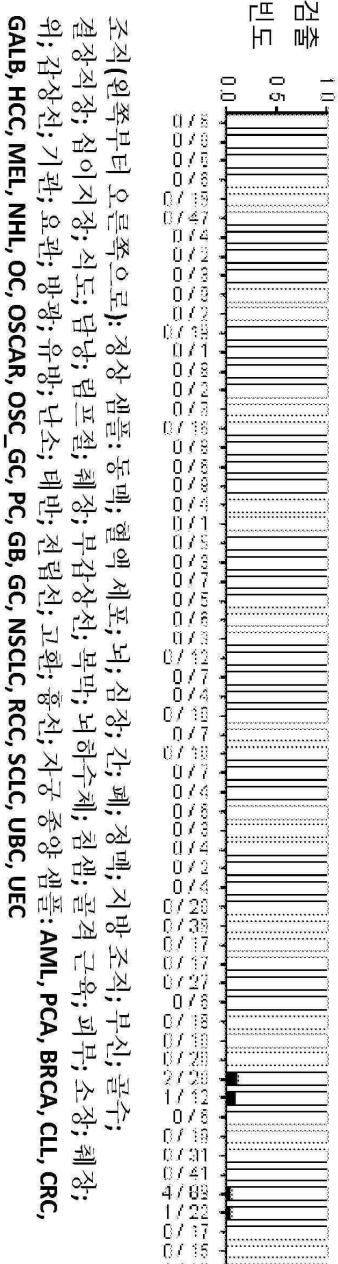
도면4m

서열번호 168: HORMAD1-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플; 동백; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 무신; 골수; 질장(장; 심이지 장; 식도; 담낭; 텁포질; 췌장; 무감상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 간선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁 종양 샘플; AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면4n

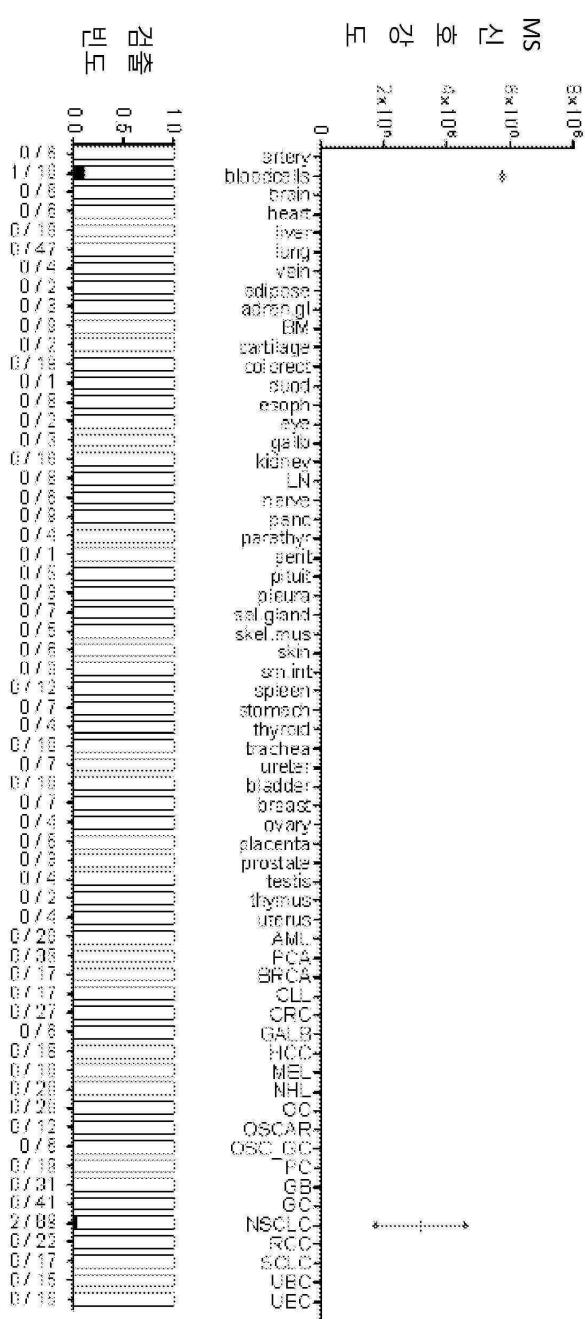


조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수;
결장 직장; 심이지장; 쇠도; 담낭; 램프질; 쥐장; 무감상선; 폭막; 대하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 쥐장;
위; 감상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁; 중앙 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC,
GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

서열번호 233: ZFP42-001

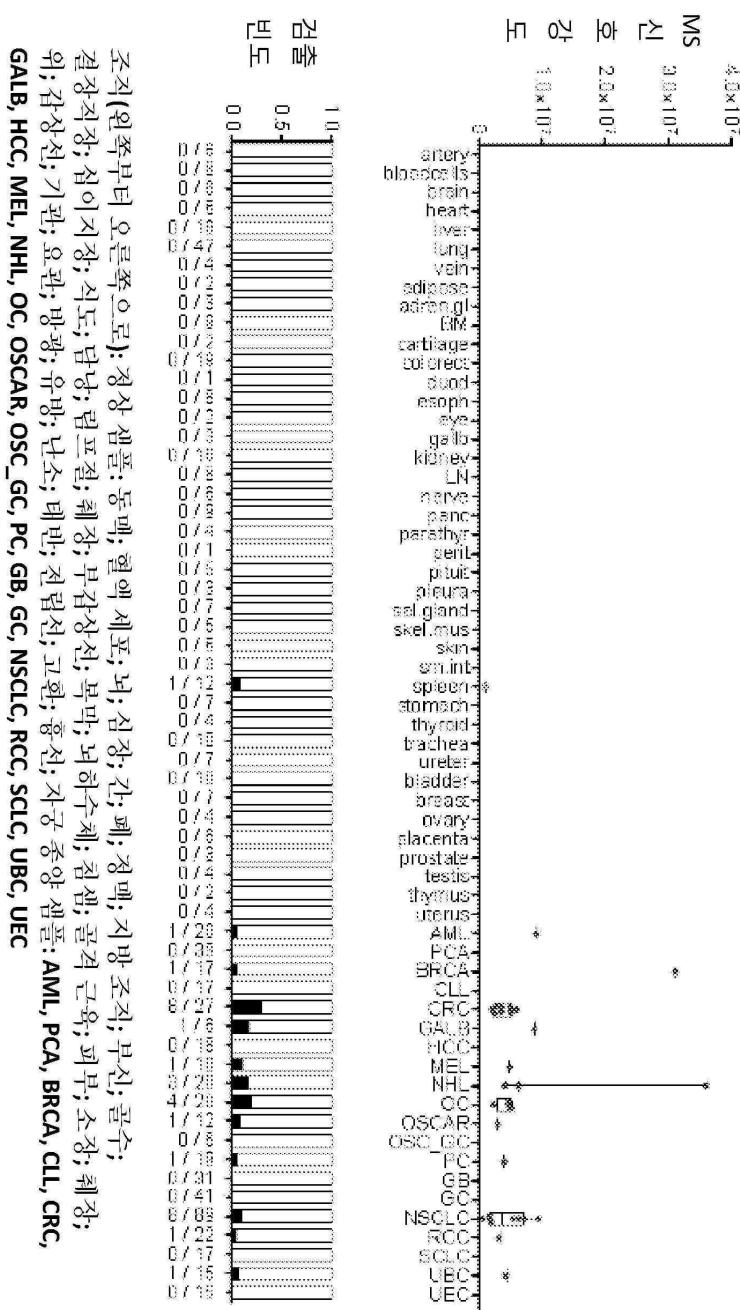
도면40

서열번호 245: MAGEA4-003



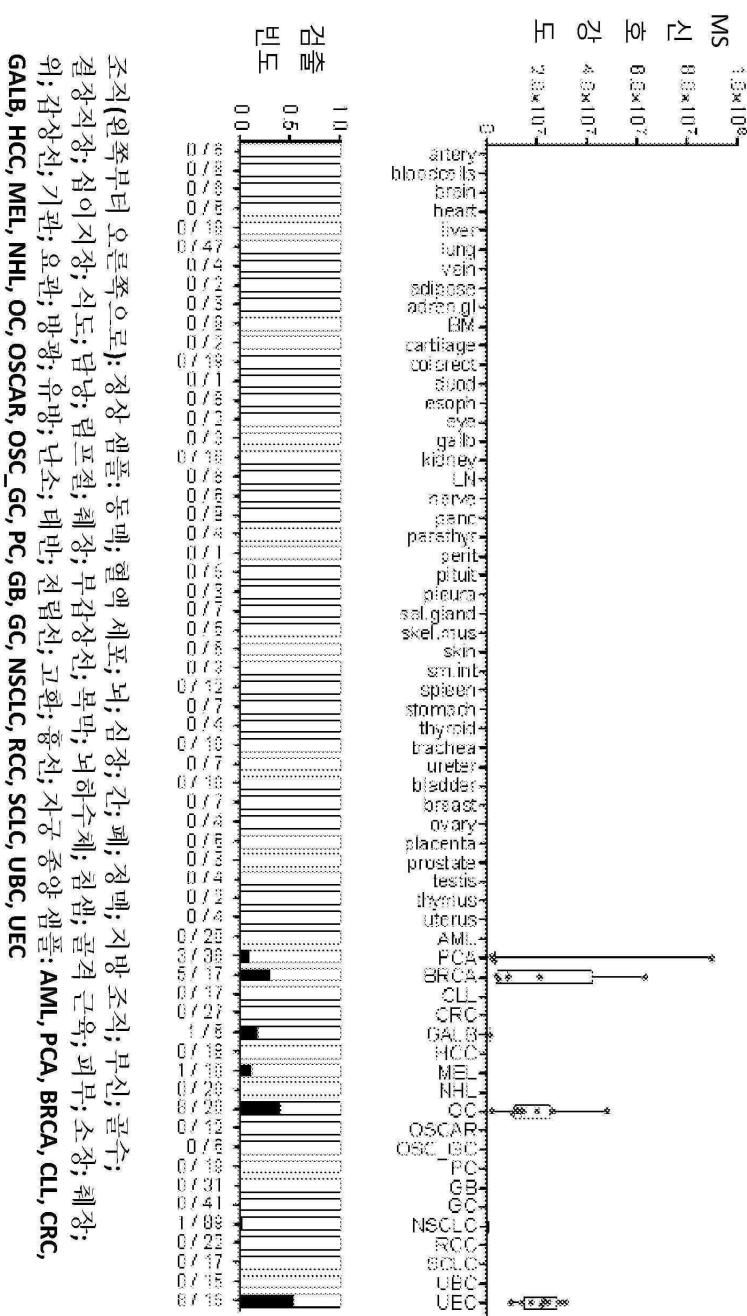
조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방조직; 부신; 콜수;
 질장조직; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 부막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장;
 위; 간장; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁 중앙 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC,
 GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면4p



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상샘플; 둉매; 혈액 세포; 노; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방조직; **부신**; 끌수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무갑상선; 목막; 뇌하수체; 침샘; 풀격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 테반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁; 중앙샘플; **AML**, **PCA**, **BRCA**, **CLL**, **CRC**, **GALB**, **HCC**, **MEL**, **NHL**, **OC**, **OSCAR**, **OSC_GC**, **PC**, **GB**, **GC**, **NSCLC**, **RCC**, **SCIC**, **UBC**, **UEC**

도면4q



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수;

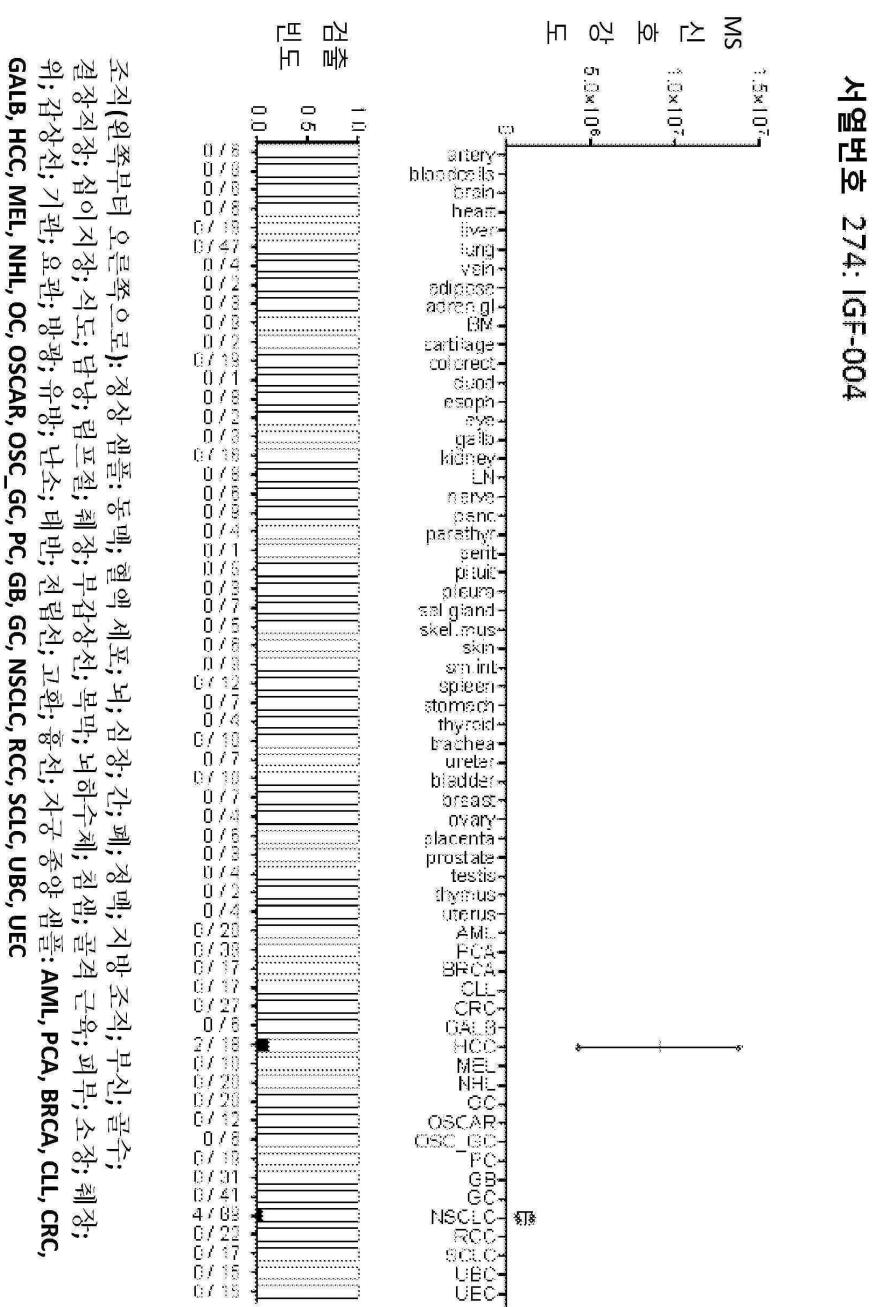
결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장;

유; 간선지; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁; 종양: 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC,

GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

서열번호 264: ESR1-001

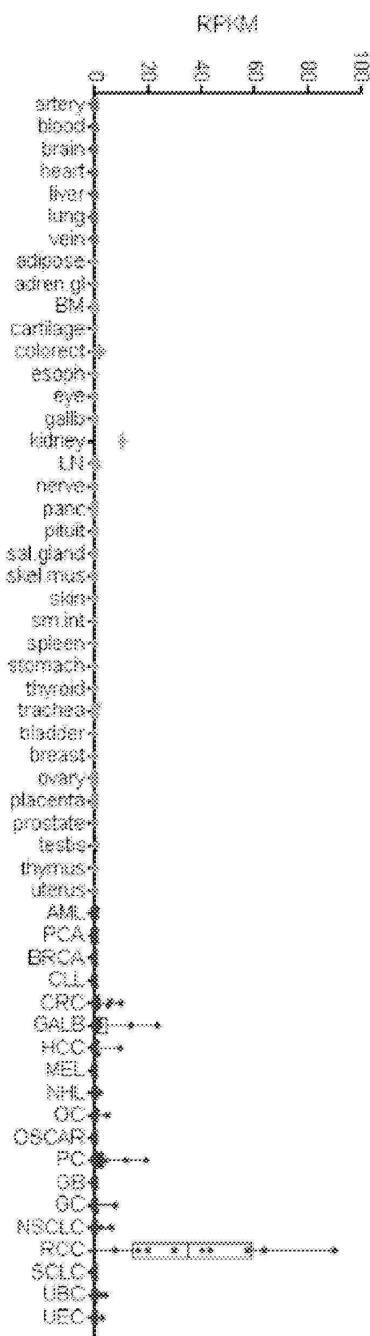
도면4r



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 신장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 램프질; 쥐장; 무갑상선; 목막; 뇌하수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 쥐장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 테반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁종양샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5a

서열번호 11: HAVCR1-001

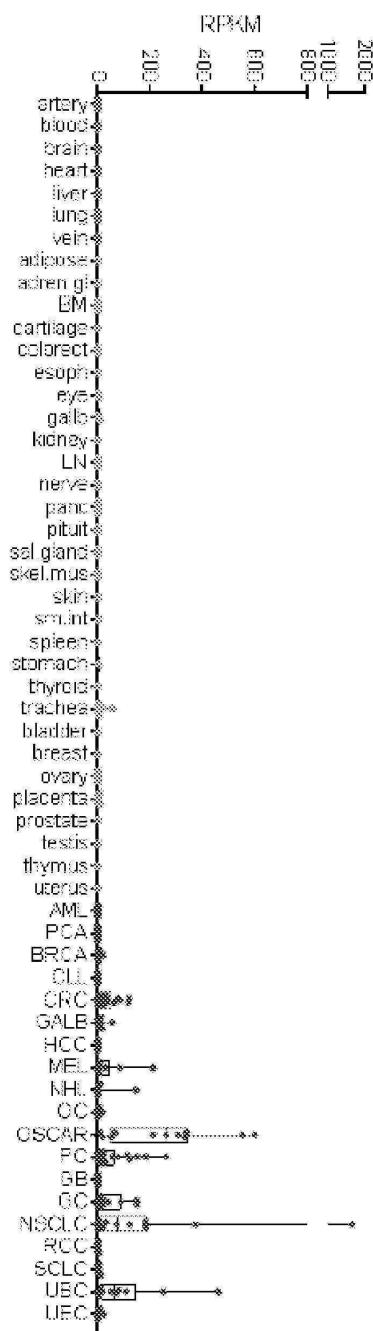


조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 콜수; 결장直장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무감상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 감상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.

종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5b

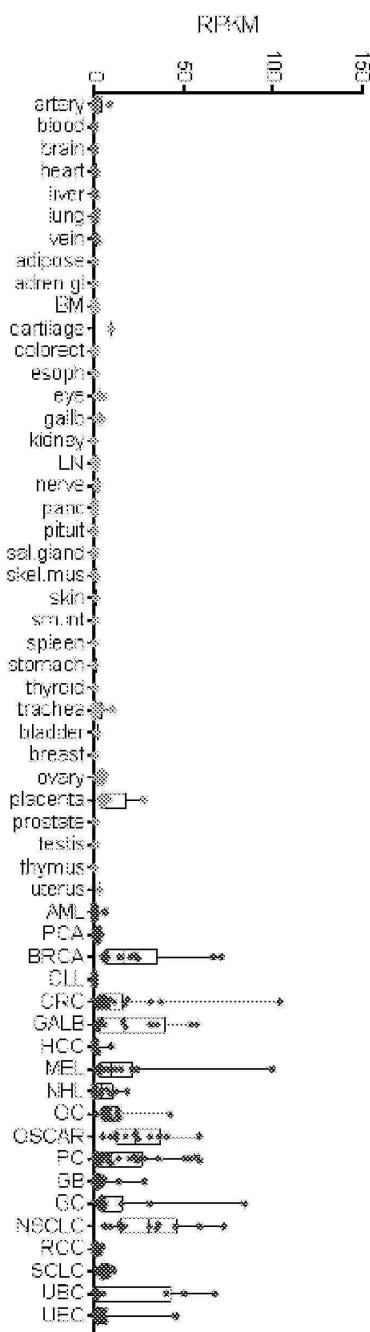
서열번호 14: MMP1-003



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무감상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 감상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 혼선; 자궁.
중앙 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALE, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5c

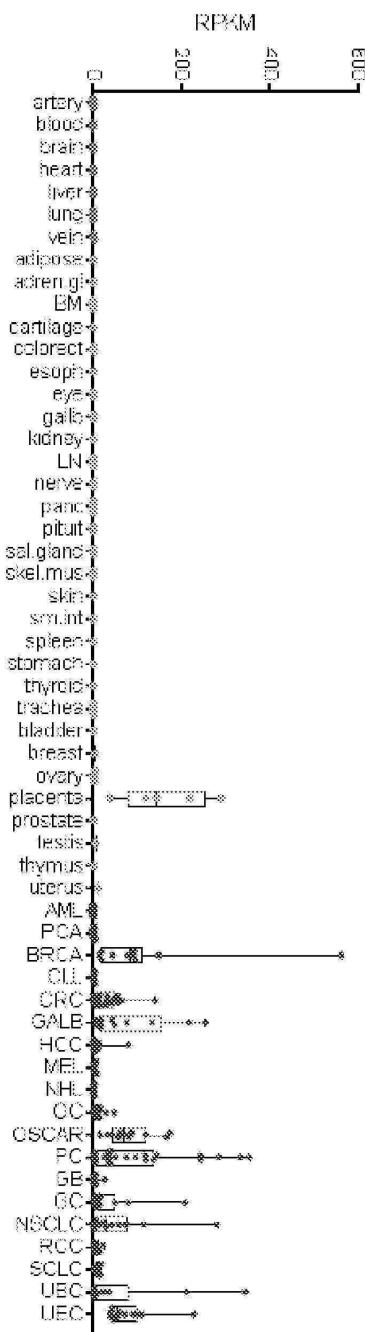
서열번호 21: COL6A3-015



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상샘플; 둉매; 혈액세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 쟁폐; 지방조직; 무신; 골수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무갑상선; 복막; 보호수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.
종양샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5d

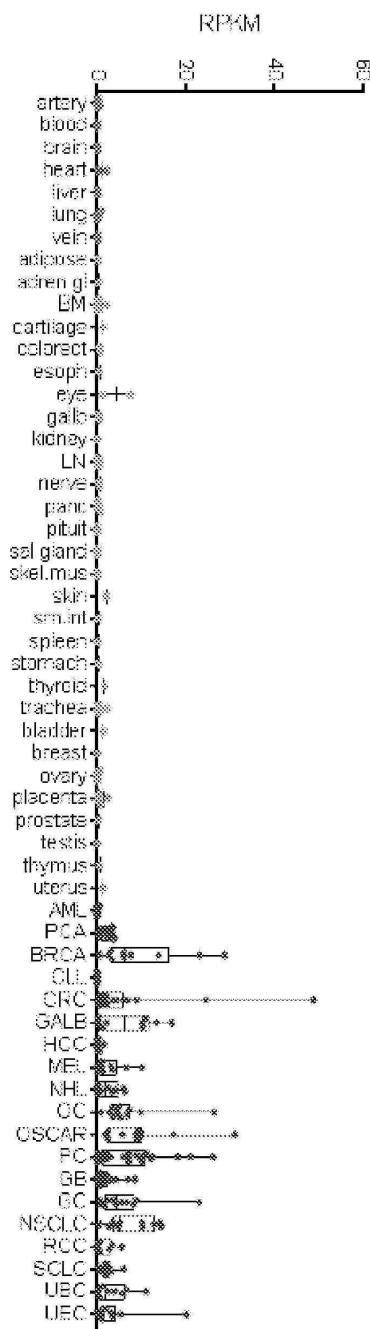
서열번호 24: MMIP-002



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방조직; 부신; 골수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무감상선; 목박; 뇌하수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 감상선; 기관: 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.
증양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5e

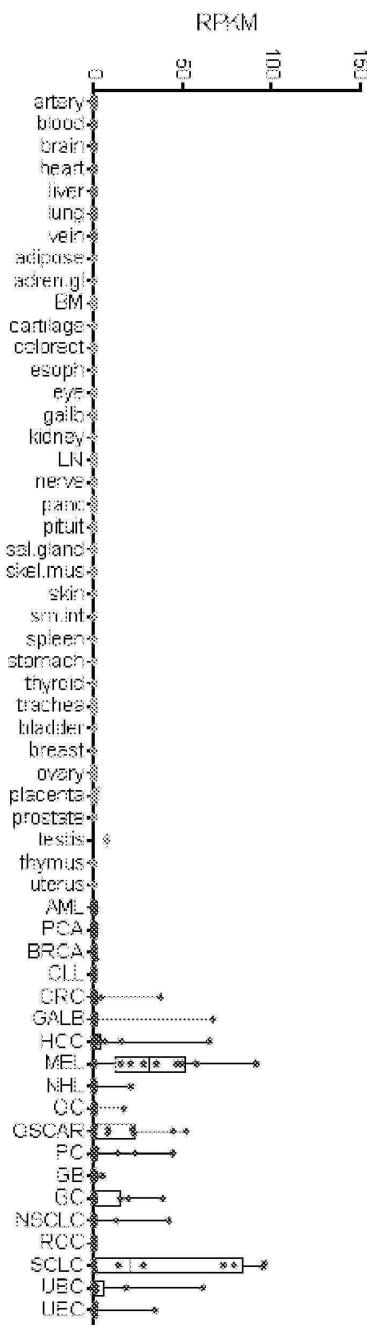
서열번호 25: MXRAS-003



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉매; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 무신; 골수; 결장 직장;
심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선;
기관: 요관; 망강; 유방; 난소; 테반; 전립선; 고환; 혼선; 자궁.
중앙 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5f

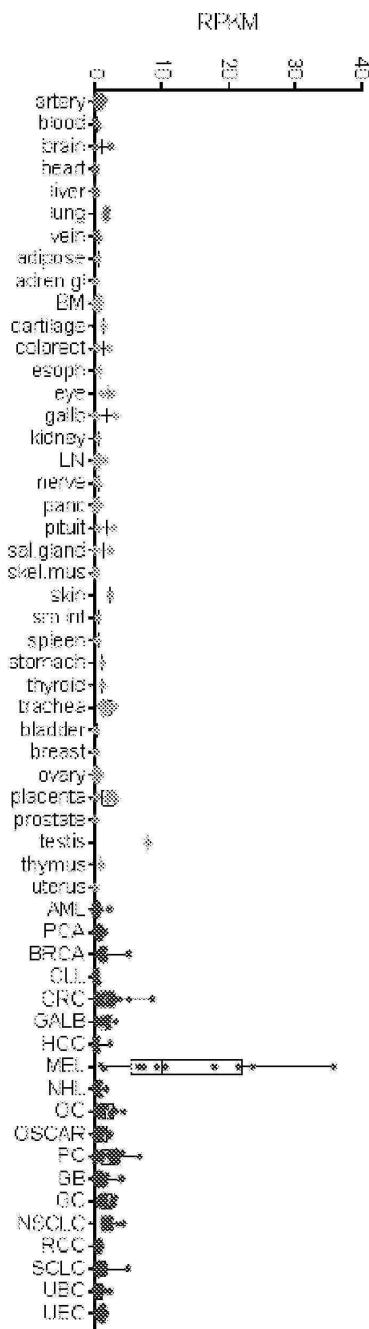
서열번호 40: MAGEA3-003



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉맥; 혈액 세포, 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방조직; 부신; 골수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 유관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 지근.
 중앙 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5g

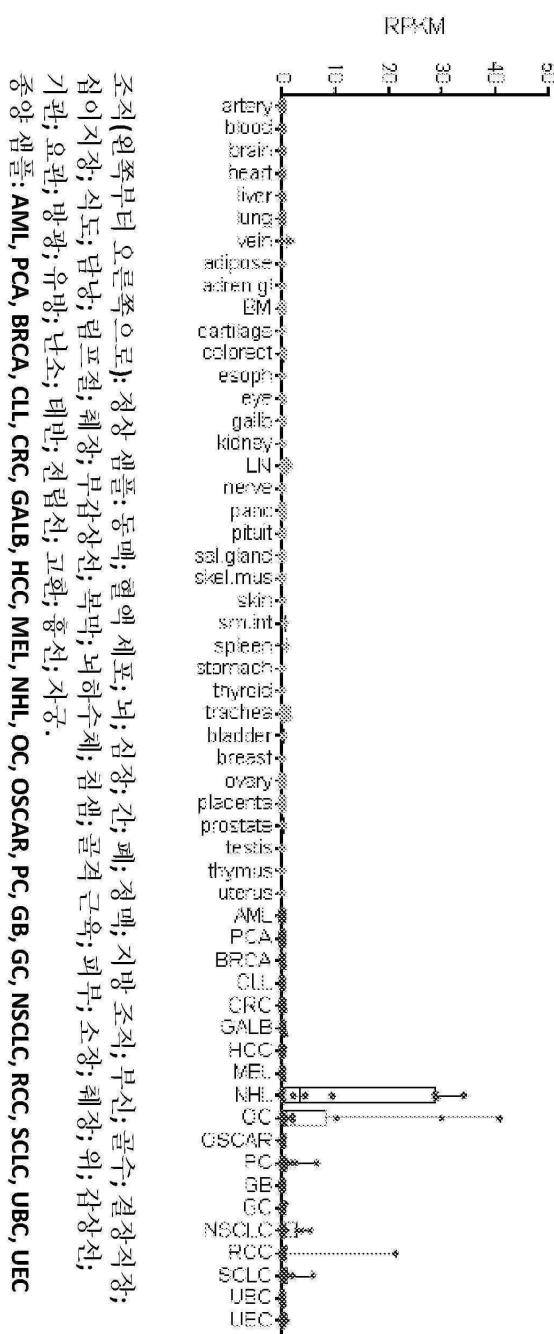
서열번호 85: FMN1-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥, 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 청맥; 지방조직, 부신; 골수; 결장직장;
심이지장; 썩도; 담낭; 림프절, 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선;
기관: 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 침범선; 고환; 흉선; 자궁.
증양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5h

서열번호 89: HTR3A-001

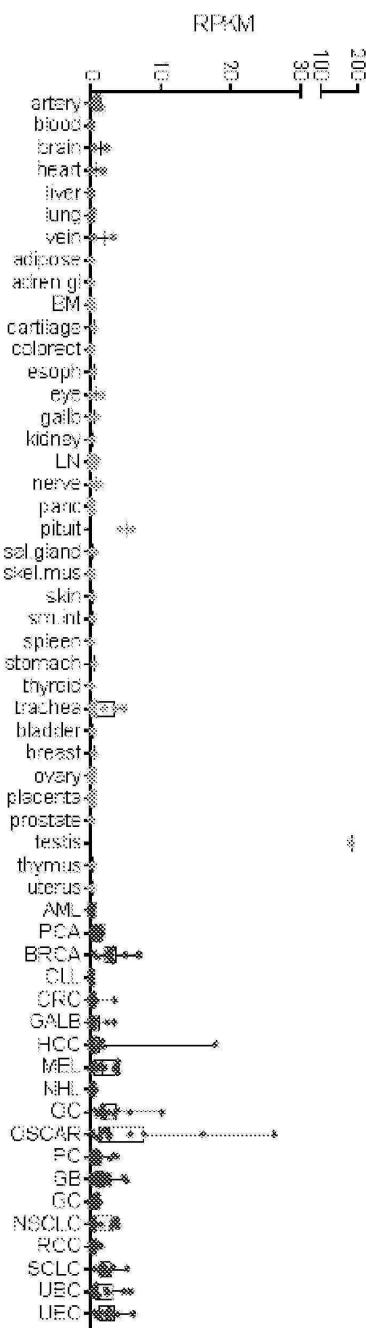


조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정장 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무갑상선; 복막; 벼하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관: 요관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.

종양 샘플: AML, PCA, BRC, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5i

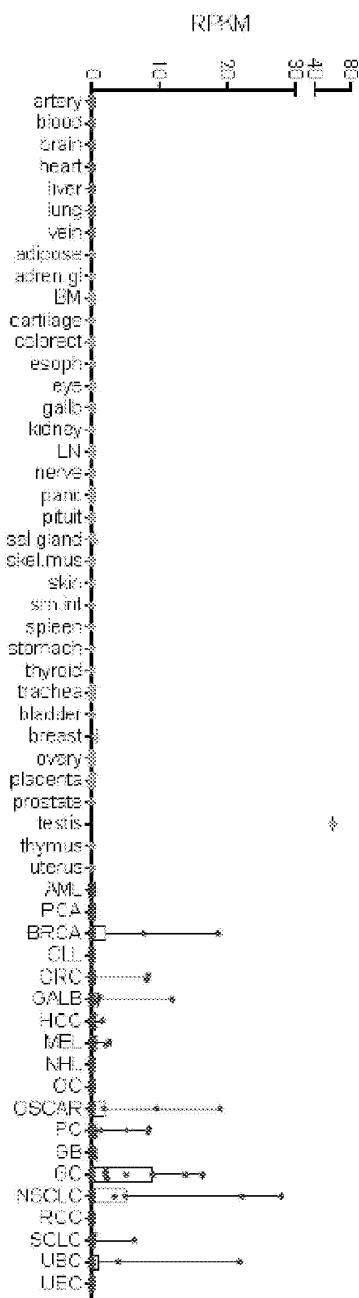
서열번호 117: CABY-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 청백; 지방조직; 부신; 골수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.
증양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5j

서열번호 153: CT83-001

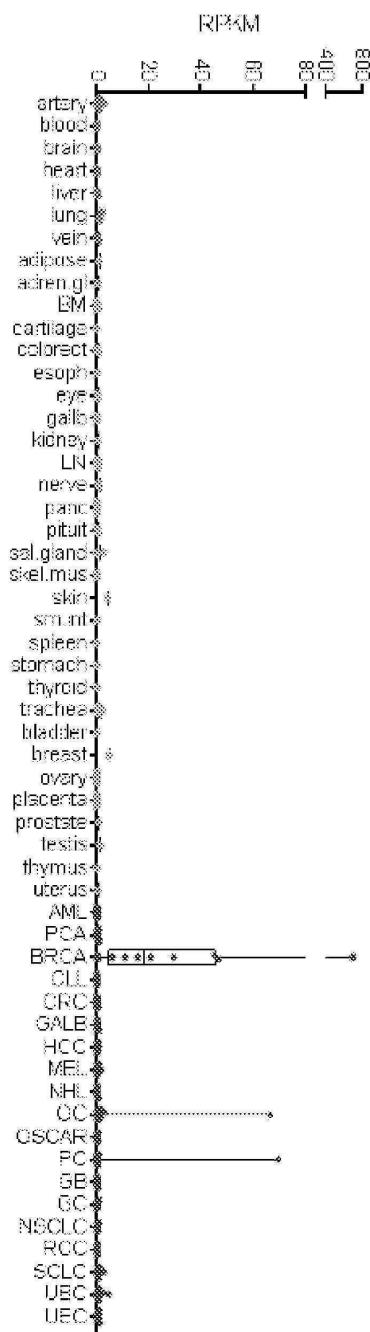


조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉폐; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 청백; 지방조직; 부신; 골수; 결장직장; 심이지장; 썩도; 담낭; 림프절; 췌장; 무감성선; 폭막; 뇌하수체; 침샘; 골격근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 감성선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.

종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

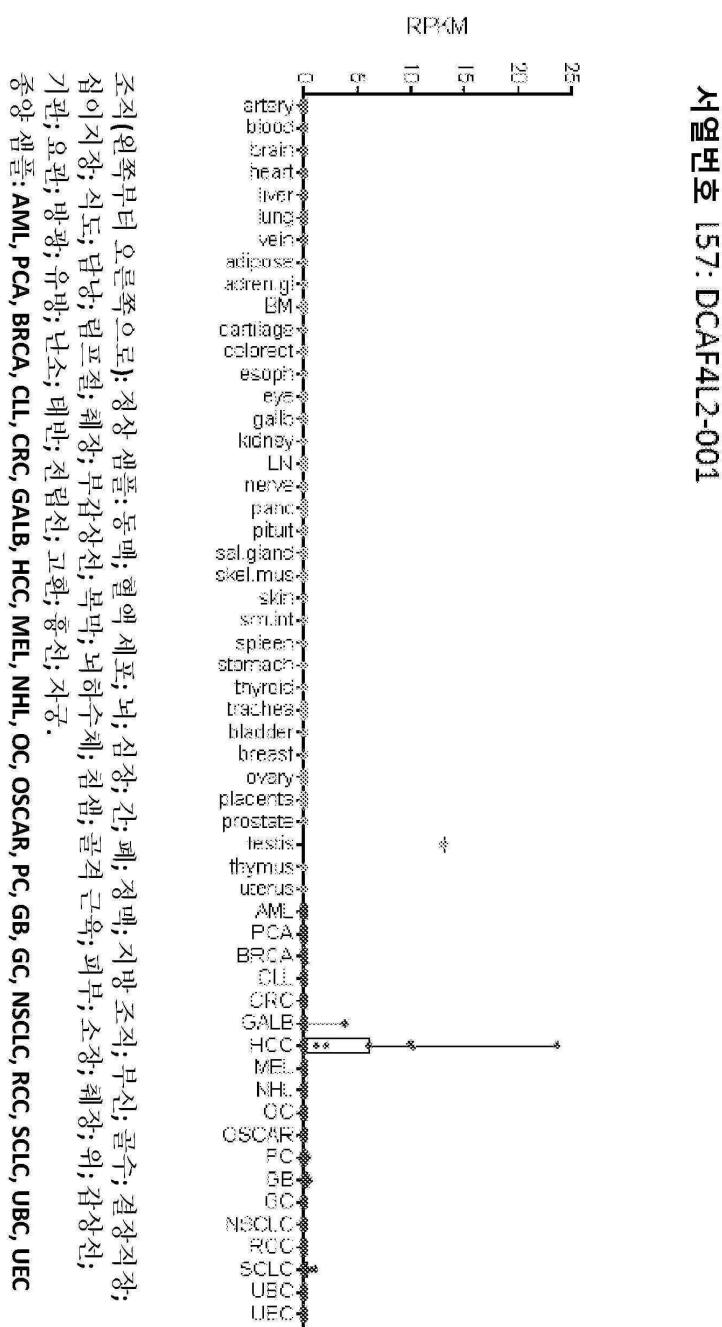
도면5k

서열번호 155: CYP4Z-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉폐; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 끌수; 결장직장; 심이지장; 쇠도; 담낭; 림프절; 췌장; 무감상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 글각근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 감상선; 기관, 오관; 방광; 유방; 난소; 대변; 전립선; 고환; 혈전; 자궁.
종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면51

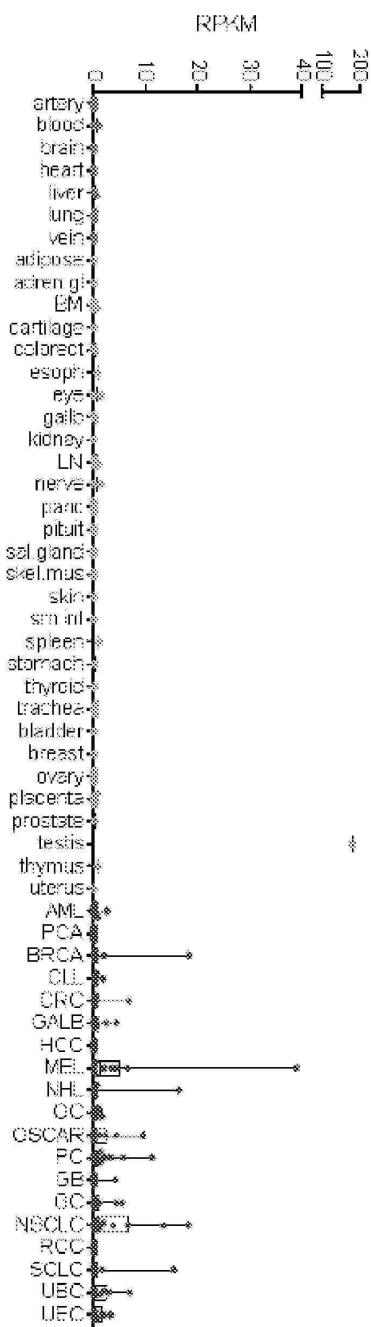


조직(원쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플; 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방조직; 부신; 굴수; 결장직장; 신식기자-식도-기관지-리 호흡. 체지-Ⅱ 가시식 부인-나트륨-코카이니드-코제-Ⅲ 가스-체지-Ⅳ. 가시식

증양 세포群: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5m

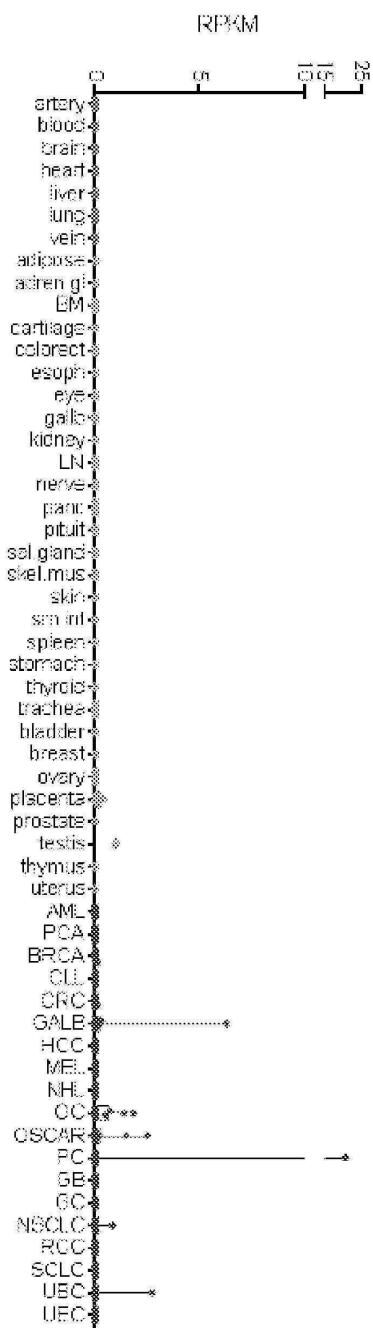
서열번호 168: HORMAD1-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.
종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면5n

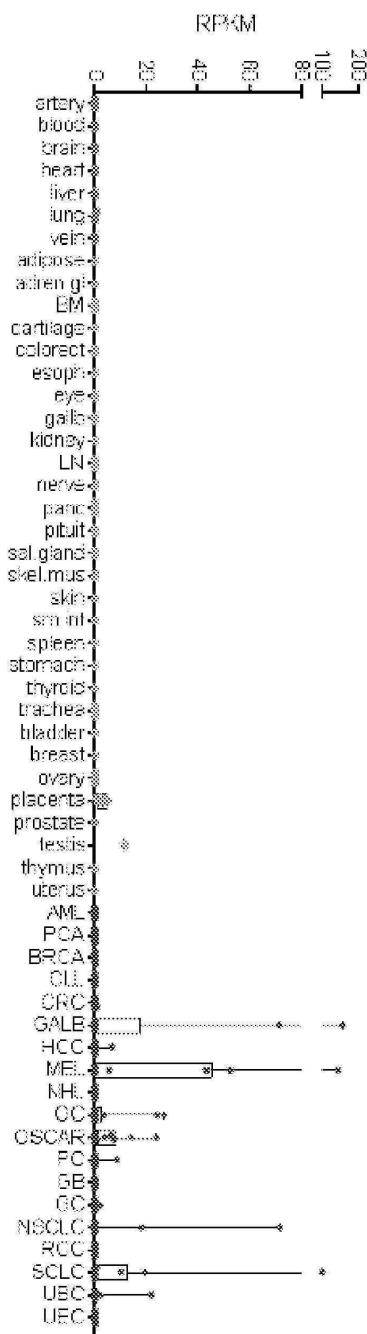
서열번호 233: ZFP42-001



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 둉맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 갈수; 결장직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무감상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 감상선; 가관; 요관; 방광; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.
종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

도면50

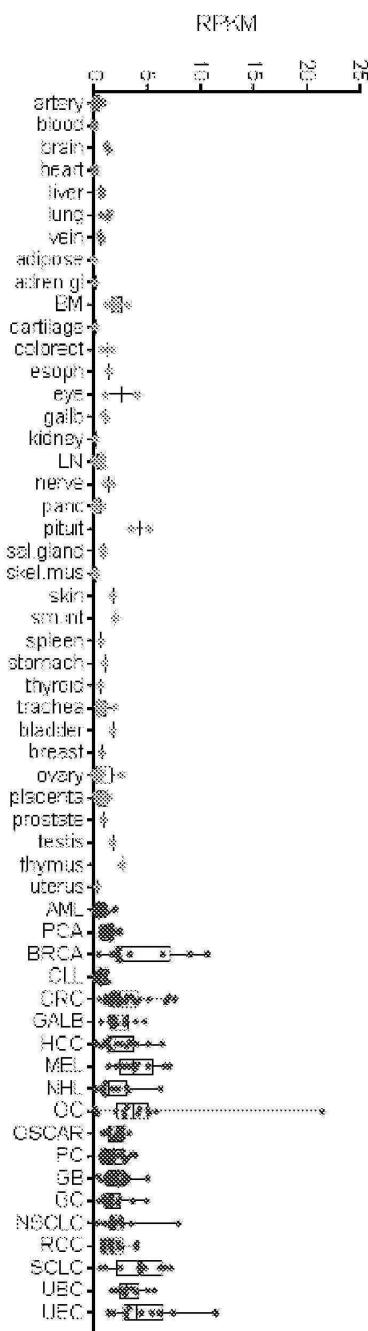
서열번호 245: MAGEA4-003



조직(원쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수, 결장-직장; 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무감상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 감상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 테란; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.
종양 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALE, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UEC, UBC, UEC

도면5p

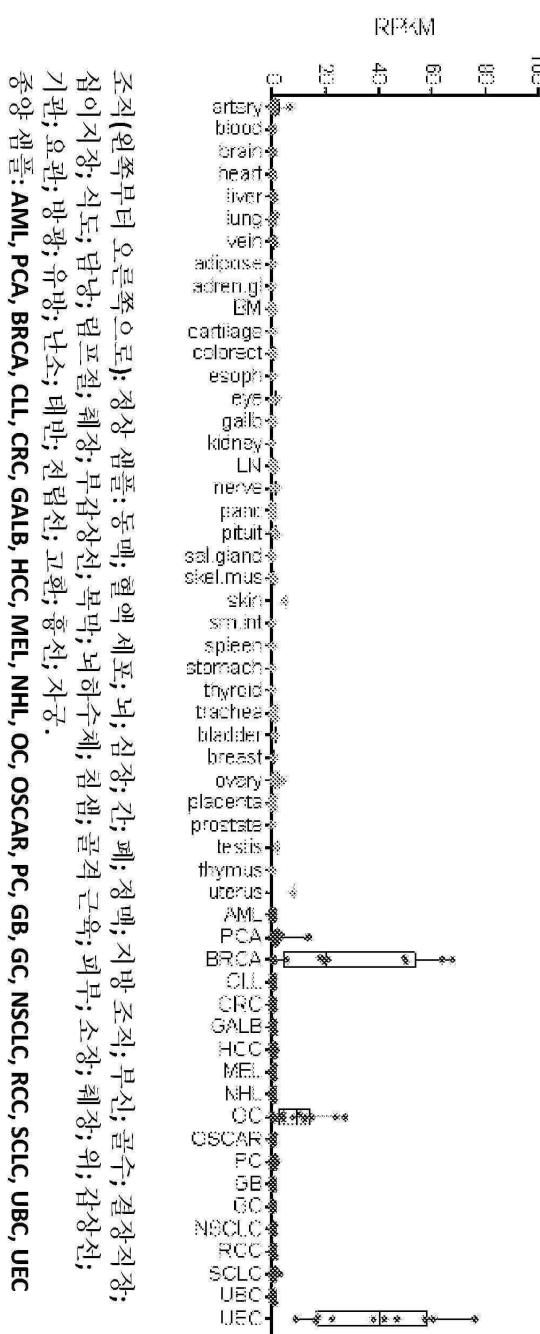
서열번호 253: RAD54B-002



조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 뚉백; 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수; 결장 직장;
심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 글омерular; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선;
기관: 요관; 방광; 유방; 난소; 배변; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.
중앙 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

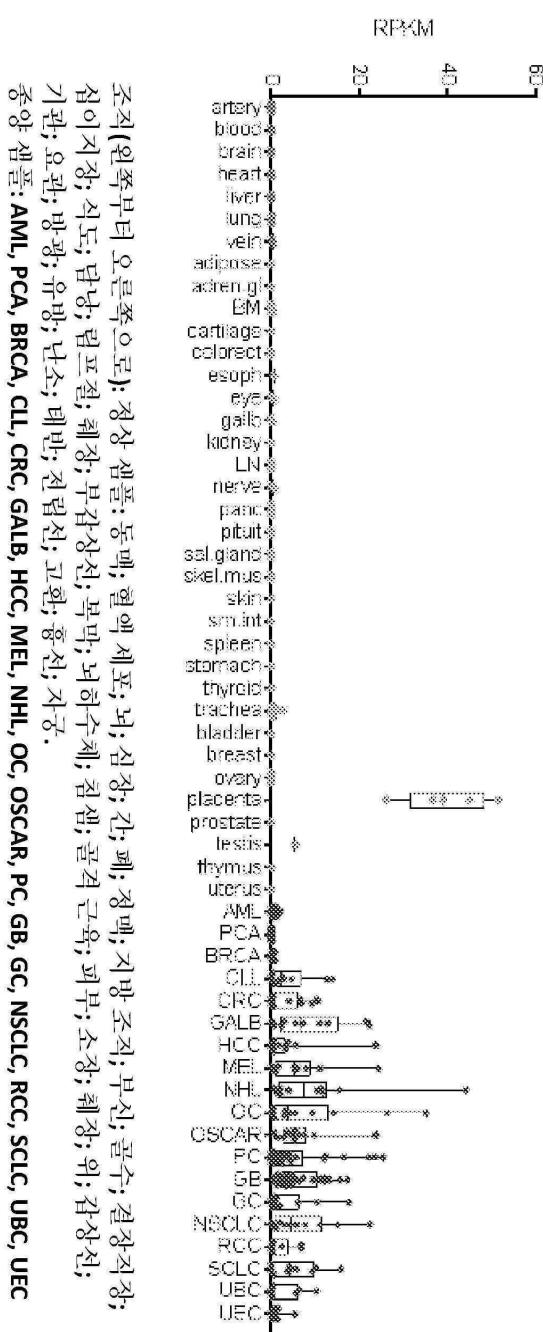
도면5q

서열번호 264: ESR1-001



도면5r

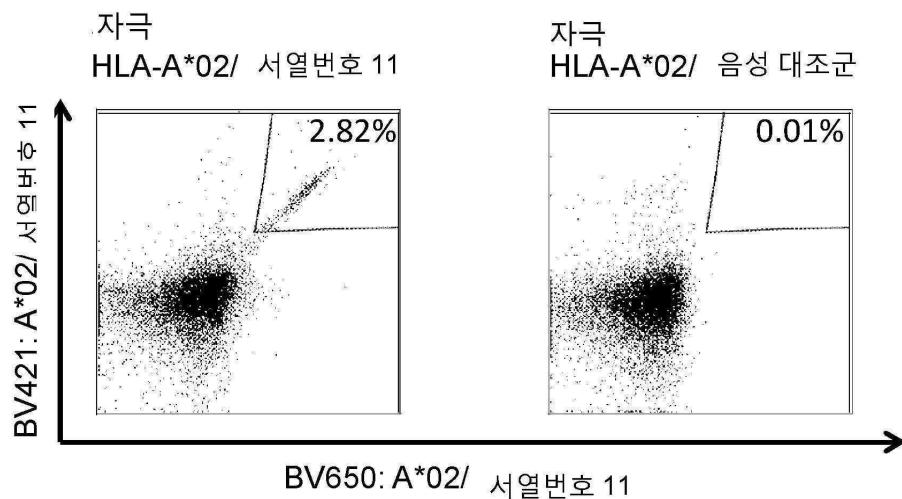
서열번호 274: IGF-004



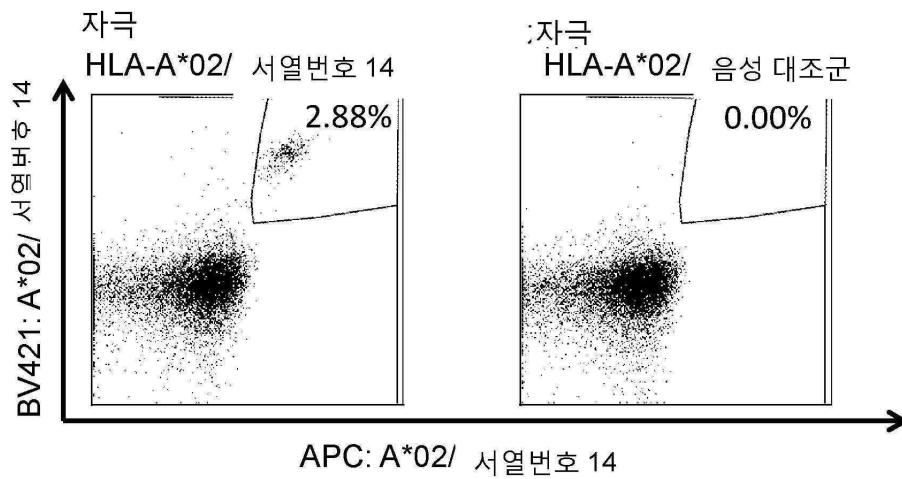
조직(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 동맥, 혈액 세포; 뇌; 심장; 간; 폐; 정맥; 지방 조직; 부신; 골수, 결장직장, 심이지장; 식도; 담낭; 림프절; 췌장; 무갑상선; 복막; 뇌하수체; 침샘; 골격 근육; 피부; 소장; 췌장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 방광; 유방; 난소; 테민; 전립선; 고환; 흉선; 자궁.

중앙 샘플: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALE, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

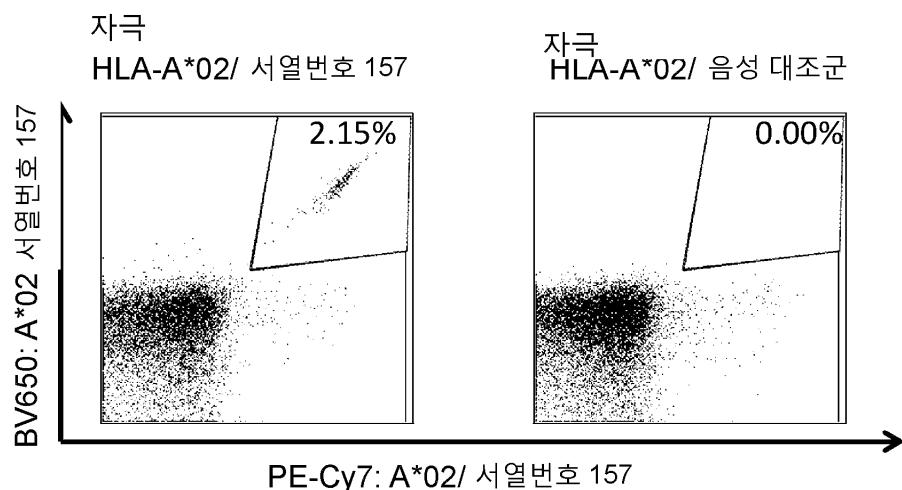
도면6a



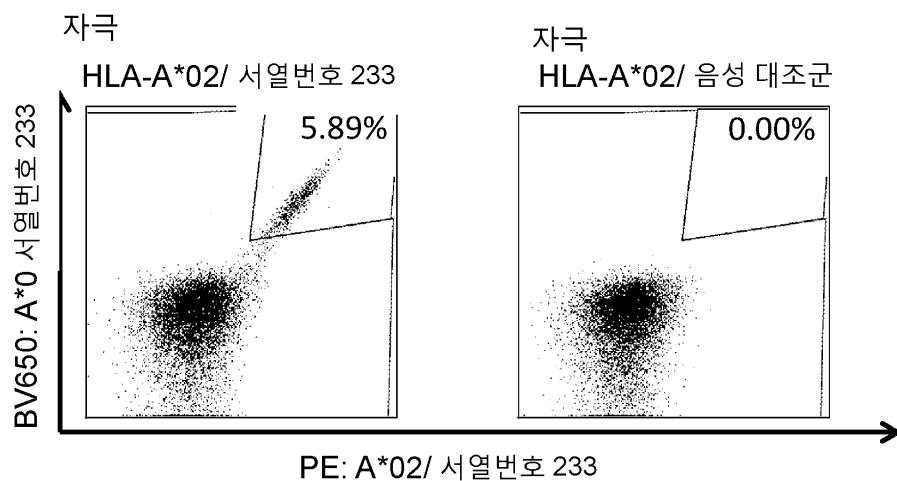
도면6b



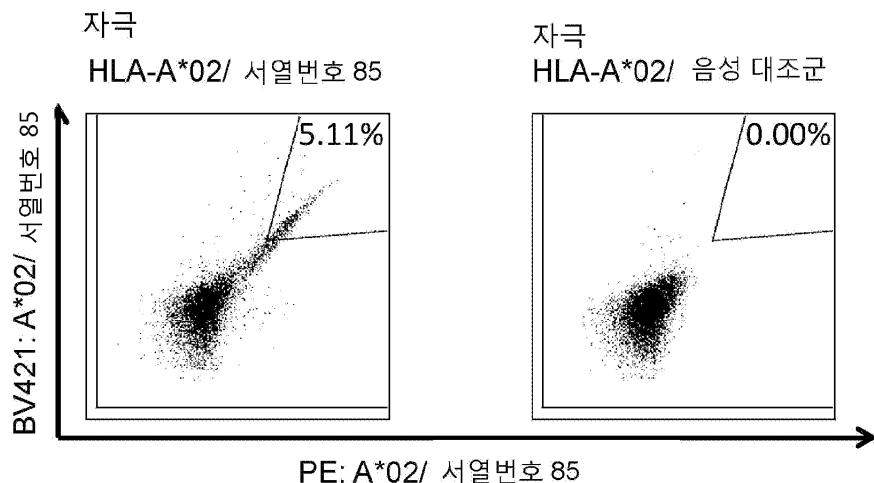
도면6c



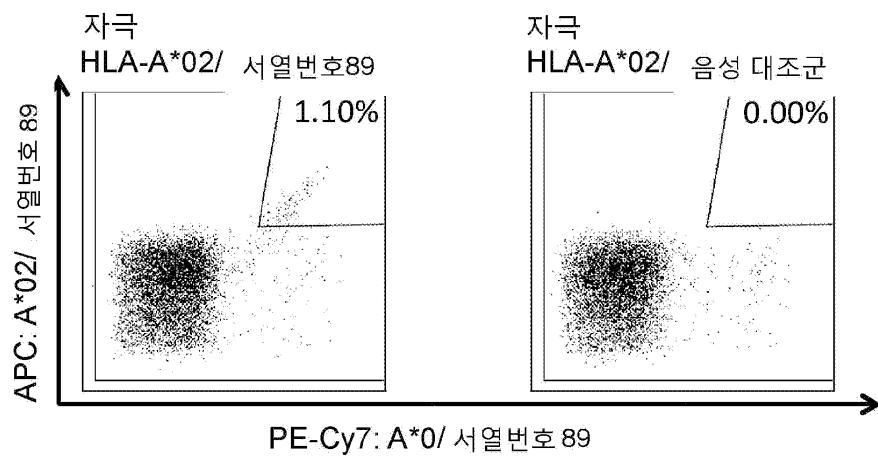
도면6d



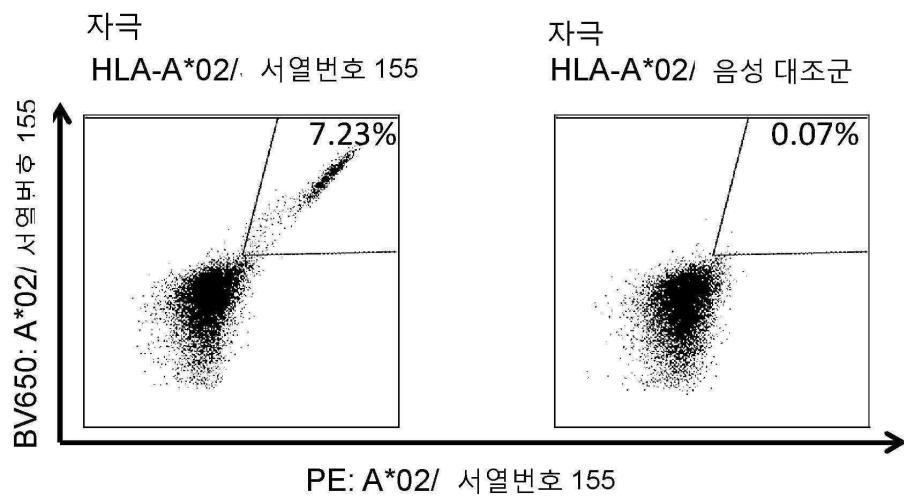
도면6e



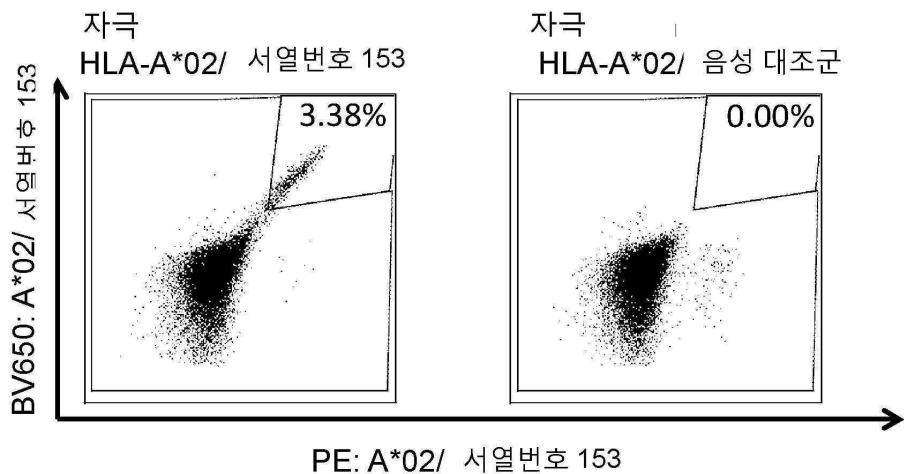
도면6f



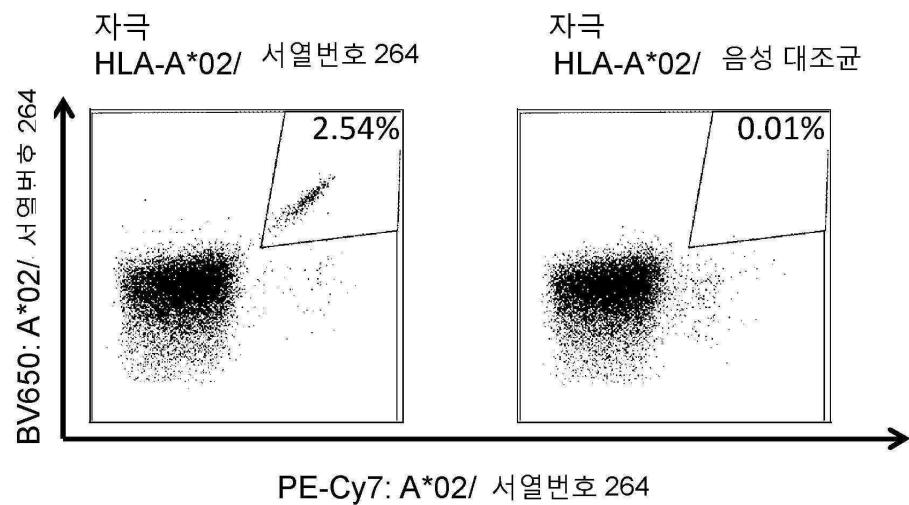
도면6g



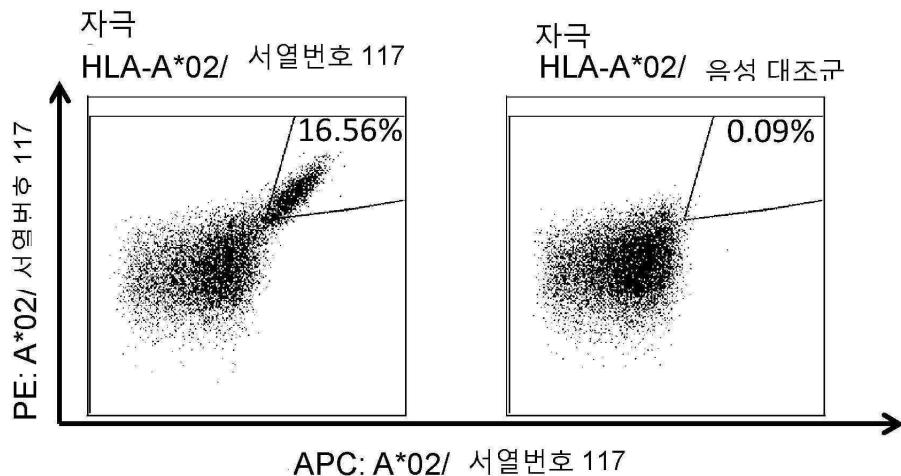
도면6h



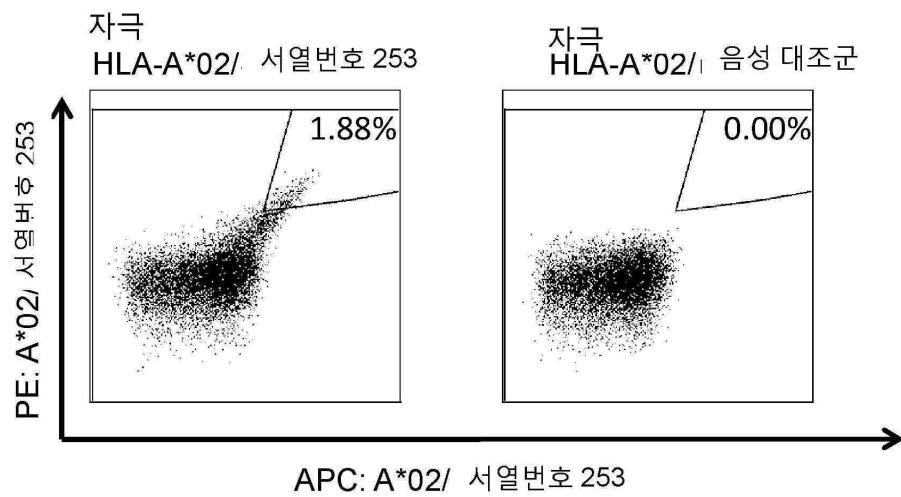
도면6i



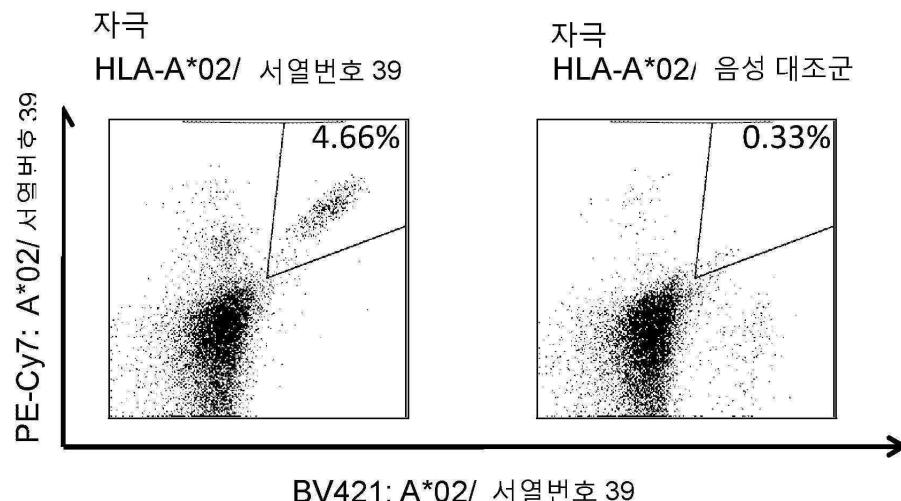
도면6j



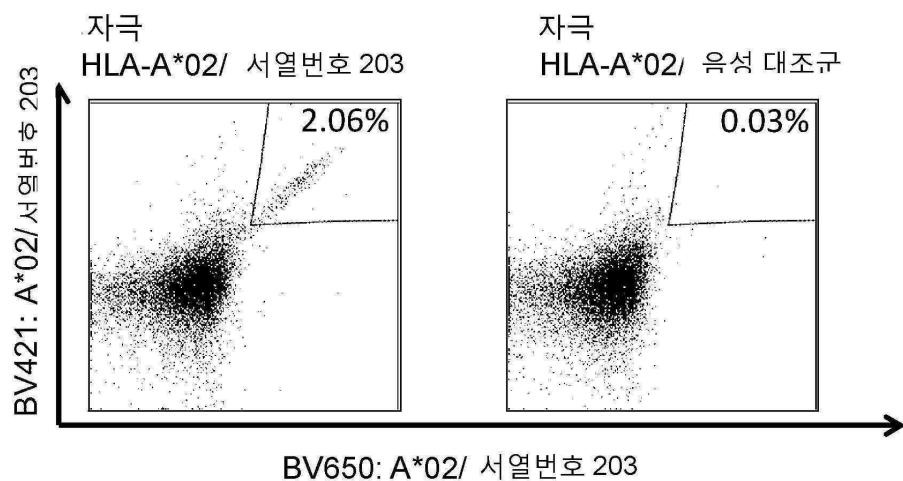
도면6k



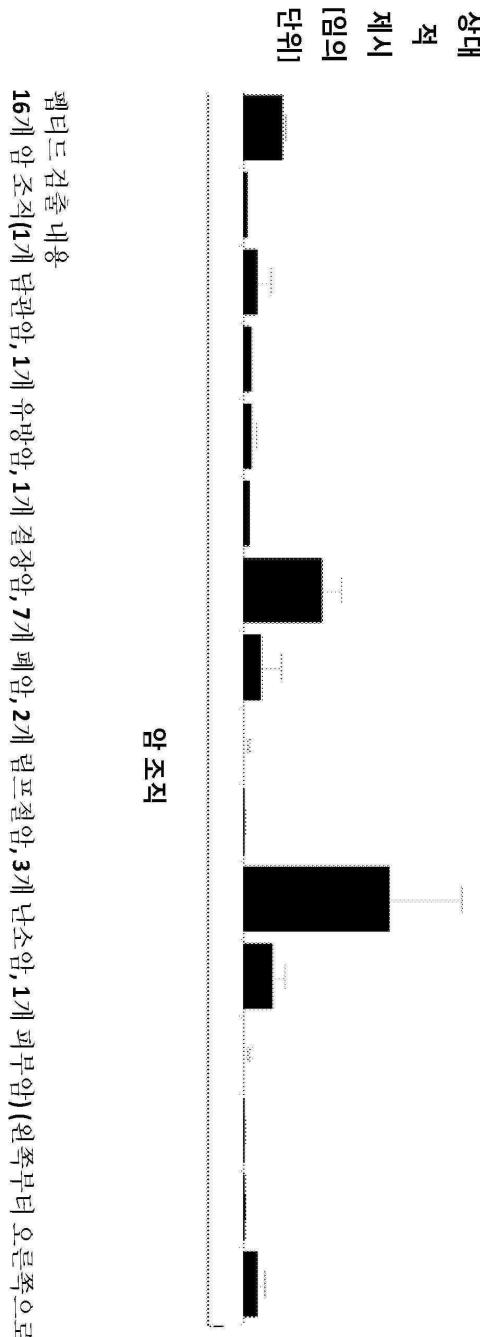
도면6l



도면6m

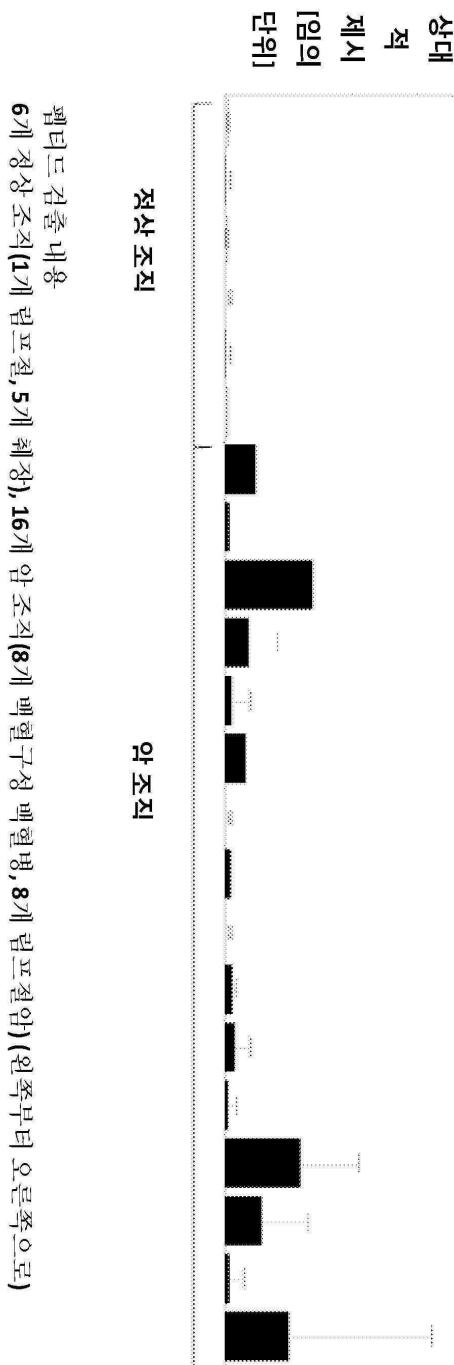


도면7a



페티드: LIPIFTIFM (A*02)
서열번호 43

도면7b

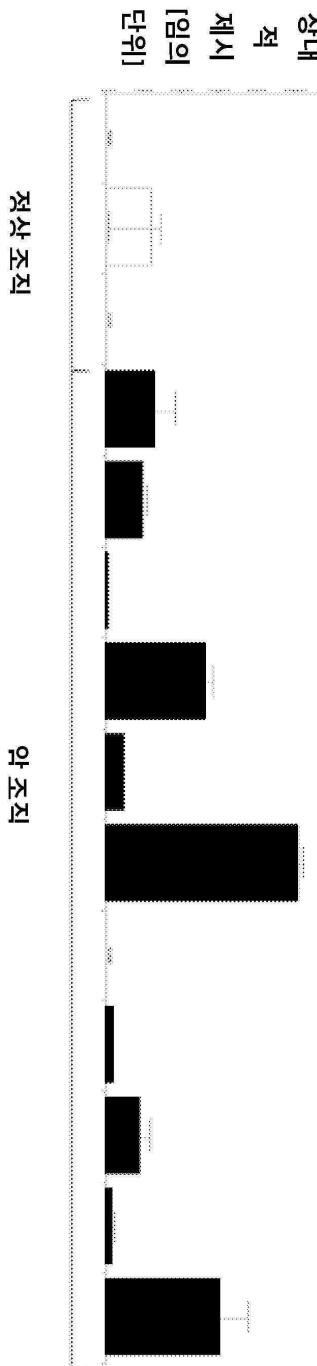


웨이드 검출 내용
6개 정상 조작(1개 램프절, 5개 채장), 16개 암 조작(8개 백열구성 백열방, 8개 램프절암)(왼쪽부터 오른쪽으로)

펜타드: LVTSIFFL (A*02)
서열번호 152

도면 7c

펩티드: VILTSSPFL (A*02)
 서열번호 156



펩티드 검출 내용
3 개 정상 조직(1 개 폐, 1 개 럼프절, 1 개 췌장), 11 개 암 조직(2 개 유방암, 5 개 베릴구성 베릴병), 3 개 림프절암, 1 개 글수성 세포암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Novel peptides and combination of peptides for use in immunotherapy against various tumors

<130> I32799WO

<140> PCT/EP2016/056557

<141> 2016-03-24

<150> US 62/139,189

<151> 2015-03-27

<150> GB 1505305.1

<151> 2015-03-27

<160> 290

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu

1 5

<

210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile

1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Val Val Gly Val

1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Leu Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Leu Ser Ser Ser Gln Ala Glu Val

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Leu Ile Thr Gly Gln Asp Leu Leu Ser Val

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Leu Pro Ser Ala Thr Thr Thr Val

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ser Leu Ala Asp Leu Ser Leu Leu Leu

1 5

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Thr Ala Ser Ile Asn Gln Asn Val

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Val Phe Glu Leu Asp Leu Val Thr Leu

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Leu Val Glu Lys Gly Glu Phe Ala Leu

1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Leu Met Tyr Pro Tyr Ile Tyr His Val

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu

1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Val Leu Asp Gly Lys Val Ala Val Val

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr Ser Val

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ile Lys Val Thr Asp Pro Gln Leu Leu Glu Leu

1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu

1 5

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala Thr

1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Val Val Met Val Leu Val Leu Met Leu

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Thr Leu Asn Thr Leu Asp Ile Asn Leu

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Thr Val Leu Gln Glu Leu Ile Asn Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Ile Val Glu Leu Ile Glu Lys Ile

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Val Leu Gln Gln Glu Ser Asn Phe Leu

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Tyr Leu Glu Asp Gly Phe Ala Tyr Val

1 5

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val

1 5 10

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ile Val Thr Glu Ile Ile Ser Glu Ile

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Lys Gln Met Ser Ile Ser Thr Gly Leu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met

1 5

<210> 44

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Val Phe Asn Leu Val His Val Val

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Phe Leu Pro Val Ser Val Val Tyr Val

1 5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ile Ser Leu Asp Glu Val Ala Val Ser Leu

1 5 10

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Leu Asn Gly Phe Asn Val Leu Leu

1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val

1 5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Lys Leu Ile Gly Asn Ile His Gly Asn Glu Val

1 5 10

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ile Leu Leu Ser Val Leu His Gln Leu

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Leu Asp Ser Glu Ala Leu Leu Thr Leu

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Thr Ile Gly Ile Pro Phe Pro Asn Val

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Ala Gln His Leu Ser Thr Leu Leu Leu

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Tyr Leu Val Pro Gly Leu Val Ala Ala

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

His Leu Phe Asp Lys Ile Ile Lys Ile

1 5

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Val Leu Gln Glu Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Asn Leu

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Phe Asp Tyr Val

1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

His Leu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Ala Gln Val

1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ala Leu Ala Asp Gly Ile Lys Ser Phe Leu Leu

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Tyr Leu Phe Ser Gln Gly Leu Gln Gly Leu

1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Leu Tyr Pro Lys Glu Ile Thr Leu

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser Leu Val Glu Asn Ile His Val Leu

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Lys Leu Leu Pro Met Val Ile Gln Leu

1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ser Leu Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Gln Val

1 5 10

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ser Leu Ser Glu Lys Ser Pro Glu Val

1 5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Ala Met Phe Pro Asp Thr Ile Pro Arg Val

1 5 10

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gln Leu Met Asn Leu Ile Arg Ser Val

1 5

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Leu Lys Val Leu Lys Ala Asp Val Val Leu

1 5 10

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gly Leu Thr Glu Lys Thr Val Leu Val

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

His Met Ser Gly Lys Leu Thr Asn Val

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Val Leu Ser Thr Arg Val Thr Asn Val

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Ser Val Pro Lys Thr Leu Gly Val

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Leu Ala Phe Leu Pro Ala Ser Val

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213>

Homo sapiens

<400> 75

Ala Leu Leu Asp Gly Ala Leu Gln Leu

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Phe Thr Ala Glu Phe Leu Glu Lys Val

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Leu Tyr Gly Asn Val Gln Gln Val

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Leu Phe Gln Ser Arg Ile Ala Gly Val

1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Thr Val Leu Glu Glu Ile Gly Asn Arg Val

1 5 10

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Val Leu Thr Gly Gln Val His Glu Leu

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile

1 5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 82

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val

1 5 10

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Leu Leu Glu Asn Ser Pro His Leu

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu

1 5

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Lys Leu Leu Asp Lys Pro Glu Gln Phe Leu

1 5 10

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Leu Phe Ser Asn Ile Glu Ser Val

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Lys Leu Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ala

1 5

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Leu Leu Leu Pro Leu Glu Leu Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

89

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val

1 5

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Ala Ile Leu Asn Val Asp Glu Lys Asn Gln Val

1 5 10

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Leu Leu Pro Ser Ile Phe Leu Met Val

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Arg Leu Tyr Gly Tyr Phe His Asp Ala

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe Met Leu

1 5

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Lys Leu Ile Asp Glu Asp Glu Pro Leu Phe Leu

1 5 10

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Ala Leu Asp Thr Thr Arg His Glu Leu

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Lys Leu Phe Glu Lys Ser Thr Gly Leu

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Phe Val Gln Glu Lys Ile Pro Glu Leu

1 5

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Thr Leu Phe Gly Ile Gln Leu Thr Glu Ala

1 5 10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Ala Leu Gln Ser Phe Glu Phe Arg Val

1 5

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Ser Leu Leu Glu Val Asn Glu Ala Ser Ser Val

1 5 10

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Gly Leu Tyr Pro Val Thr Leu Val Gly Val

1 5 10

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 103

Tyr Leu Ala Asp Thr Val Gln Lys Leu

1 5

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr

1 5 10

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Met Leu Ala Ser Gln Thr Glu Ala

1 5

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Val Leu Leu Gly Ser Val Val Ile Phe Ala

1 5 10

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Arg Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val

1 5 10

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Phe Ile Ala Asn Leu Pro Pro Glu Leu Lys Ala

1 5 10

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Ile Leu Gly Ser Phe Glu Leu Gln Leu

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Gln Ile Gln Gly Gln Val Ser Glu Val

1 5

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Ala Gln Leu Glu Gly Lys Leu Val Ser Ile

1 5 10

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Ile Leu Ala Gln Asp Val Ala Gln Leu

1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Phe Leu Phe Leu Lys Glu Val Lys Val

1 5

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Leu Leu Phe Pro Ser Asp Val Gln Thr Leu

1 5 10

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Ile Leu His Gly Glu Val Asn Lys Val

1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala

1 5

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Ile Ala Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu

1 5 10

<210> 119

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Glu Glu Leu

1 5

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Leu Gln Leu Ser Pro Leu Lys Gly Leu Ser Leu

1 5 10

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Ala Leu Tyr Val Gln Ala Pro Thr Val

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Ser Ile Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val

1 5

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Gln Thr Ala Pro Glu Glu Ala Phe Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Ala Leu Leu Leu Arg Leu Phe Thr Ile

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Ala Ala Leu Glu Val Leu Ala Glu Val

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Gln Leu Arg Glu Ala Phe Glu Gln Leu

1 5

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Ile Met Lys Ala Thr Gly Leu Gly Ile Gln Leu

1 5 10

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Ser Ile Leu Thr Asn Ile Ser Glu Val

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Lys Met Ala Ser Lys Val Thr Gln Val

1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Gln Leu Tyr Gly Ser Ala Ile Thr Leu

1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Ser Leu Tyr Pro His Phe Thr Leu Leu

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Ala Leu Leu Asn Asn Val Ile Glu Val

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Phe Leu Asp Gly Arg Pro Leu Thr Leu

1 5

<210> 134

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Ser Leu Tyr Lys Ser Phe Leu Gln Leu

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

His Leu Asp Thr Val Lys Ile Glu Val

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Leu Leu Trp Asp Ala Pro Ala Lys Cys

1 5

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Lys Leu Ile Tyr Lys Asp Leu Val Ser Val

1 5 10

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Gly Ile Ile Asn Lys Leu Val Thr Val

1 5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Ile Ile Leu Glu Asn Ile Gln Ser Leu

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Phe Leu Asp Ser Gln Ile Thr Thr Val

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Asn Ile Asp Ile Asn Asn Asn Glu Leu

1 5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Leu Leu Asp Ala Ala His Ala Ser Ile

1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Met Leu Trp Glu Ser Ile Met Arg Val

1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Phe Leu Ile Ser Gln Thr Pro Leu Leu

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Ala Leu Glu Glu Lys Leu Glu Asn Val

1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Val Val Ala Ala His Leu Ala Gly Ala

1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Gly Leu Leu Ser Ala Leu Glu Asn Val

1 5

<210> 148

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Tyr Leu Ile Leu Ser Ser His Gln Leu

1 5

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Asn Met Ala Asp Gly Gln Leu His Gln Val

1 5 10

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Val Leu Leu Asp Met Val His Ser Leu

1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Asp Ile Ser Lys Arg Ile Gln Ser Leu

1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu

1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Lys Leu Val Glu Leu Glu His Thr Leu

1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Ala Ile Ile Lys Glu Ile Gln Thr Val

1 5

<210> 155

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Thr Leu Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Val

1 5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Val Ile Leu Thr Ser Ser Pro Phe Leu

1 5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val

1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Tyr Leu Asp Pro Leu Trp His Gln Leu

1 5

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 159

Gln Leu Gly Pro Val Pro Val Thr Ile

1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

Thr Leu Gln Glu Trp Leu Thr Glu Val

1 5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 161

Asn Leu Leu Asp Glu Asn Val Cys Leu

1 5

<210> 162

<211> 10

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

Gly Leu Leu Gly Asn Leu Leu Thr Ser Leu

1 5 10

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

Gly Leu Glu Glu Arg Leu Tyr Thr Ala

1 5

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 164

Met Leu Ile Ile Arg Val Pro Ser Val

1 5

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

Ser Leu Leu Asp Tyr Glu Val Ser Ile

1 5

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

Leu Leu Gly Asp Ser Ser Phe Phe Leu

1 5

<210> 167

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 167

Leu Val Val Asp Glu Gly Ser Leu Val Ser Val

1 5 10

<210> 168

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu

1 5 10

<

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

Ala Leu Ala Asp Leu Ser Val Ala Val

1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 170

Phe Ile Ala Ala Val Val Glu Lys Val

1 5

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 171

Leu Leu Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala

1 5

<210> 172

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 172

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu

1 5 10

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 173

Arg Leu Ile Asp Ile Tyr Lys Asn Val
1 5

<210> 174
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 174

Ala Leu Tyr Ser Gly Asp Leu His Ala Ala
1 5 10

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 175

Ser Leu Leu Asp Leu Val Gln Ser Leu

1 5
<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 176

Val Gln Ser Gly Leu Arg Ile Leu Leu

1 5
<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 177

Ala Leu Ile Asn Val Leu Asn Ala Leu

1 5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 178

Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu

1 5

<210> 179

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 179

Thr Leu Gly Glu Ile Ile Lys Gly Val

1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

Arg Leu Tyr Glu Glu Glu Ile Arg Ile

1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

Leu Leu Trp Ala Pro Thr Ala Gln Ala

1 5

<210> 182

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Gly Leu Gln Asp Gly Phe Gln Ile Thr Val

1 5 10

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Pro Tyr Leu

1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

Ala Leu Asp Ser Thr Ile Ala His Leu

1 5

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 185

Thr Leu Tyr Gln Gly Leu Pro Ala Glu Val

1 5 10

<210> 186

<

211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Ser Leu Leu Ser Leu Glu Ser Arg Leu

1 5

<210> 187

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 187

Ser Ile Leu Lys Glu Asp Pro Phe Leu

1 5

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

Val Leu Gly Glu Glu Gln Glu Gly Val

1 5

<210> 189

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

Met Ala Val Ser Asp Leu Leu Ile Leu

1 5

<210> 190

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 190

Ser Leu Ser Thr Glu Leu Phe Lys Val

1 5

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

Ala Ala Ile Glu Ile Phe Glu Lys Val

1 5

<210> 192

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

Thr Leu Leu Pro Ser Ser Gly Leu Val Thr Leu

1 5 10

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Ala Leu Phe His Met Asn Ile Leu Leu

1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Lys Leu Leu Glu Glu Val Gln Leu Leu

1 5

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala Leu

1 5

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

Thr Leu His Gln Trp Ile Tyr Tyr Leu

1 5

<210> 197

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

Leu Gly Gly Pro Thr Ser Leu Leu His Val

1 5 10

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Ile Leu Thr Asn Lys Val Val Ser Val

1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 199

Ser Val Ala Asp Leu Ala His Val Leu

1 5

<210> 200

<211>

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Ile Met Pro Thr Phe Asp Leu Thr Lys Val

1 5 10

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Leu Leu Phe Ser Leu Leu Cys Glu Ala

1 5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Ala Leu Ala Lys Asp Glu Leu Ser Leu

1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

Phe Leu Phe Val Asp Pro Glu Leu Val

1 5

<210> 204

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

Ser Glu Trp Gly Ser Pro His Ala Ala Val Pro

1 5 10

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

Leu Ala Phe Gly Tyr Asp Asp Glu Leu

1 5

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

Gly Leu Asp Ala Phe Arg Ile Phe Leu

1 5

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

Lys Leu Phe Glu Thr Val Glu Glu Leu

1 5

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 208

His Leu Asn Asn Asp Arg Asn Pro Leu

1 5

<210> 209

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

Val Leu Gln Thr Glu Glu Leu Val Ala Asn

1 5 10

<210> 210

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 210

Gly Leu Ala Gly Asp Asn Ile Tyr Leu

1 5

<210> 211

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 211

Leu Leu Thr Thr Val Leu Ile Asn Ala

1 5

<210> 212

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 212

Met Thr Leu Ser Glu Ile His Ala Val

1 5

<210> 213

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 213

Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val

1 5 10

<210> 214

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 214

Ala Leu Phe Glu Thr Leu Ile Gln Leu

1 5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 215

Gln Ile Ala Asp Ile Val Thr Ser Val

1 5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 216

Ala Leu Ser Thr Val Thr Pro Arg Ile

1 5

<210> 217

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 217

Leu Leu Trp Pro Ser Ser Val Pro Ala

1 5

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 218

Ser Leu Thr Gly Ala Asn Ile Thr Val

1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 219

Gly Val Val Pro Thr Ile Gln Lys Val

1 5

<210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

Ala Leu Ser Glu Leu Glu Arg Val Leu

1 5

<210> 221
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 221

Ile Met Leu Asn Ser Val Glu Glu Ile
1 5

<210> 222
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 222

Leu Leu Thr Gly Val Phe Ala Gln Leu
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 223

Ala Leu His Pro Val Gln Phe Tyr Leu
1 5

<210> 224
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 224

Leu Leu Phe Asp Trp Ser Gly Thr Gly Arg Ala Asp Ala
1 5 10

<210> 225
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 225

Phe Leu Pro Gln Pro Val Pro Leu Ser Val

1 5 10

<210> 226

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 226

Ser Leu Ala Gly Asn Leu Gln Glu Leu

1 5

<210> 227

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 227

Ser Glu Met Glu Glu Leu Pro Ser Val

1 5

<210> 228

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 228

Ser Leu Leu Glu Leu Asp Gly Ile Asn Leu Arg Leu

1 5 10

<210> 229

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 229

Tyr Leu Tyr Glu Leu Glu His Ala Leu

1 5

<210> 230

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 230

Lys Leu Leu Asn Met Ile Phe Ser Ile

1 5

<210>

> 231

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 231

Leu Leu Asp Asp Ile Phe Ile Arg Leu

1 5

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 232

Leu Val Val Gly Gly Ile Ala Thr Val

1 5

<210> 233

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 233

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu

1 5

<210> 234

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 234

Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val

1 5 10

<210> 235

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 235

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val

1 5

<210> 236

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 236

Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val

1 5

<210> 237

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 237

Ala Leu Leu Glu Gln Thr Gly Asp Met Ser Leu

1 5 10

<210> 238

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 238

His Leu Gln Glu Lys Leu Gln Ser Leu

1 5

<210> 239

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 239

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile Thr Val

1 5 10

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 240

Ser Val Gln Glu Asn Ile Gln Gln Lys

1 5

<210> 241

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 241

Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile

1 5

<210> 242

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 242

Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu

1 5

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 243

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val

1 5

<210> 244

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 244

Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile

1 5

<210> 245

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 245

Ala Leu Leu Glu Glu Glu Gly Val

1 5

<210> 246

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 246

Ala Leu Ala Gly Ile Val Thr Asn Val

1 5

<210> 247

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 247

Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 248

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 248

Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu

1 5 10

<210> 249

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 249

Tyr Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile

1 5

<210> 250

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 250

Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu

1 5

<210> 251

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 251

Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile

1 5

<210> 252

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 252

Ser Leu Met Glu Lys Asn Gln Ser Leu

1 5

<210> 253

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 253

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu

1 5

<210> 254

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 254

Ala Leu Gly Asp Lys Phe Leu Leu Arg Val

1 5 10

<210> 255

<211>

11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 255

Phe Leu Met Lys Asn Ser Asp Leu Tyr Gly Ala

1 5 10

<210> 256

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 256

Phe Leu Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile

1 5

<210> 257

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 257

Lys Leu Ile Asp His Gln Gly Leu Tyr Leu

1 5 10

<210> 258

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 258

Gln Leu Val Gln Arg Val Ala Ser Val

1 5

<210> 259

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 259

Gly Pro Gly Ile Phe Pro Pro Pro Pro Gln Pro

1 5 10

<210> 260

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 260

Ala Leu Asn Glu Ser Leu Val Glu Cys

1 5

<210> 261

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 261

Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu

1 5

<210> 262

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 262

Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu

1 5

<210> 263

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 263

Ser Ile Ile Glu Tyr Leu Pro Thr Leu

1 5

<210> 264

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 264

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu

1 5

<210> 265

<211> 11

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 265

Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu Ser Ile

1 5 10

<210> 266

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 266

Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu

1 5

<210> 267

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 267

Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu

1 5 10

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 268

Ser Leu Asp Lys Asp Ile Val Ala Leu

1 5

<210> 269

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 269

Gly Leu Leu Asp Cys Pro Ile Phe Leu

1 5

<210> 270

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 270

Thr Leu Leu Thr Phe Phe His Glu Leu

1 5

<210> 271

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 271

Val Leu Ile Glu Tyr Asn Phe Ser Ile

1 5

<210> 272

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 272

Phe Val Met Glu Gly Glu Pro Pro Lys Leu

1 5 10

<210> 273

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 273

Ser Leu Asn Lys Gln Ile Glu Thr Val

1 5

<210> 274

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 274

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val

1 5 10

<210> 275

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 275

Ala Val Pro Pro Pro Ser Ser Val

1 5

<210> 276

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 276

Arg Met Pro Thr Val Leu Gln Cys Val

1 5

<210> 277

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 277

Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asn Lys Val

1 5

<210> 278

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 278

Val Leu Glu Asp Lys Val Leu Ser Val

1 5

<210> 279

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 279

Val Leu Met Asp Glu Gly Ala Val Leu Thr Leu

1 5 10

<210> 280

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 280

His Leu Trp Gly His Ala Leu Phe Leu

1 5

<210> 281

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

Leu Leu Leu Glu Ser Asp Pro Lys Val Tyr Ser Leu

1 5 10

<210> 282

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 282

Ser Leu Tyr Ala Leu His Val Lys Ala

1 5

<210> 283

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 283

Ala Leu Ser Glu Leu Leu Gln Gln Val

1 5

<210> 284

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 284

Lys Leu Met Asp Pro Gly Ser Leu Pro Pro Leu

1 5 10

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 285

Met Leu Leu Asp Thr Val Gln Lys Val

1 5

<210> 286

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 286

Phe Leu Thr Glu Met Val His Phe Ile

1 5

<210> 287

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 287

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 288

Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val

1 5

<210> 289

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 289

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 290

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 290

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1 5