



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0016531
(43) 공개일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7000589
(22) 출원일자(국제) 2016년06월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/036605
(87) 국제공개번호 WO 2016/201049
국제공개일자 2016년12월15일
(30) 우선권주장
62/172,890 2015년06월09일 미국(US)

(71) 출원인
더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드
미국 02142 매사추세츠주 캠프리지 메인 스트리트 415
(72) 발명자
프리치 에드워드 에프
미국 01742 매사추세츠주 콩코드 마이넷 로드 74
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 103 항

(54) 발명의 명칭 신생물 백신을 위한 제형 및 그의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 대상체에서의 신생물의 치료 또는 예방을 위한 신생물 백신 또는 면역원성 조성물 제형, 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2039/60 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염;

(b) pH 조절제; 및

(c) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로서,

상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO, 또는 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 백신 조성물인 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 적어도 2가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 적어도 3가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 적어도 4가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 적어도 5가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 최대 40가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드가 가용성인 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 신생항원 펩티드가 약 5 내지 약 50개의 아미노산 길이의 범위인 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 신생항원 펩티드가 약 15 내지 약 35개의 아미노산 길이의 범위인 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 신생항원 펩티드가 약 15개 이하의 아미노산 길

이, 약 8 내지 약 11개의 아미노산 길이, 또는 9 또는 10개의 아미노산 길이인 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 신생항원 펩티드가 약 30개 이하의 아미노산 길이, 약 6 내지 약 25개의 아미노산 길이, 약 15 내지 약 24개의 아미노산 길이, 또는 약 9 내지 약 15개의 아미노산 길이인 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH 조절제가 염기인 약제학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH 조절제가 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염인 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH 조절제가 석신산염인 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH 조절제가 시트르산염인 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 석신산나트륨을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제15항 및 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 석신산염이 상기 제형에 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 존재하는 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제15항, 제17항 및 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 석신산염이 상기 제형에 약 2 mM 내지 약 5 mM의 농도로 존재하는 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 텍스트로스를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 트레할로스를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 수크로스를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 디메틸설폭시드를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 25

제20항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 동결건조 가능한 약제학적 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 면역조절제 또는 애주번트(Adjuvant)를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 면역조절제 또는 애주번트가 폴리-ICLC, 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스(Amplivax), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(Imiquimod), ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴지질 A, 몬타나이드(Montanide) IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PepTel®, 벡터 시스템, PLGA 마이크로입자, 레시퀴모드(resiquimod), SRL172, 비로솜(Virosome) 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys 및 아퀼라스(Aquila's) QS21 스티물론(stimulon)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 면역조절제 또는 애주번트가 폴리-ICLC를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29

다음을 포함하는 신생물 백신인 약제학적 조성물:

1 내지 5가지의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염,

1 내지 3%의 디메틸설폭시드;

3.6 내지 3.7%의 수 중 텍스트로스;

3.6 내지 3.7 mM의 석신산 또는 그의 염;

0.5 mg/ml의 폴리 I: 폴리 C;

0.375 mg/ml의 폴리-L-라이신;

1.25 mg/ml의 나트륨 카르복시메틸셀룰로스; 및

0.225%의 염화나트륨.

청구항 30

제29항에 있어서, 각각의 1 내지 5가지의 신생항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 각각 약 300 µg/ml의 농도로 존재하는 약제학적 조성물.

청구항 31

신생물 백신을 위한 신생-항원 펩티드 용액의 제조 방법으로서, 상기 방법이

(a) 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액을 제조하는 단계로서, 상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO, 또는 7 초과와 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 단계; 및

(b) 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액을 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액과 조합하여, 그에 의해, 신생물 백신을 위한 펩티드 용액을 제조하

는 단계를 포함하는 신생물 백신을 위한 신생-항원 펩티드 용액의 제조 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액이 적어도 2가지, 적어도 3가지 또는 4가지 또는 5가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 신생물 백신을 위한 펩티드 용액이 물, 텍스트로스, 석신산염 및 디메틸설폭시드를 포함하는 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 조합 단계 후에, 상기 신생물 백신을 위한 펩티드 용액을 여과하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 신생물 백신을 위한 펩티드 용액이 동결건조 가능한 방법.

청구항 36

신생물 백신의 제조 방법으로서, 상기 방법이

(a) 펩티드 용액을 제조하는 단계; 및

(b) 상기 펩티드 용액을 면역조절제 또는 애쥬번트의 용액과 조합하여, 그에 의해, 신생물 백신을 제조하는 단계를 포함하는 신생물 백신의 제조 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 면역조절제 또는 애쥬번트가 폴리-ICLC, 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MPEC, ONTAK, PepTel®, 벡터 시스템, PLGA 마이크로입자, 레시퀴모드, SRL172, 비로좁 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys 및 아퀼라스 QS21 스티뮬론으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 면역조절제 또는 애쥬번트가 폴리-ICLC인 방법.

청구항 39

신생물을 갖는 것으로 진단받은 대상체의 치료 방법으로서, 상기 방법이 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 신생물을 치료하는 단계를 포함하는 신생물을 갖는 것으로 진단받은 대상체의 치료 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 제2 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 제3 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 제4 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를

추가로 포함하는 방법.

청구항 43

제31항 내지 제36항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되는 신생물 백신.

청구항 44

(a) 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO, 또는 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 및

(b) 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 신생물 백신을 위한 신생-항원 펩티드 용액.

청구항 45

(a) 적어도 하나의 신생항원에 대한 면역 반응을 유도하도록 구성된 개별 패키징된 동결-건조 면역원성 조성물; 및

(b) 상기 동결-건조 백신의 재구성을 위한 용액을 포함하는 백신접종 또는 면역화 키트로서,

상기 면역원성 조성물이 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO, 또는 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 백신접종 또는 면역화 키트.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 용액이 애뉴먼트를 포함하는 백신접종 또는 면역화 키트.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 면역원성 조성물이 항원인 백신접종 또는 면역화 키트.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 면역원성 조성물이 바이러스 벡터인 백신접종 또는 면역화 키트.

청구항 49

(a) 적어도 하나의 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계; 및

(b) 상기 펩티드의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우, 선택적으로, 상기 펩티드의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 상기 펩티드를 선택하는 단계를 포함하는 펩티드의 선택 방법.

청구항 50

(a) 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계를 포함하는 수용액 중 펩티드의 가용성의 평가 방법으로서,

상기 펩티드의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우, 선택적으로, 상기 펩티드의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에, 상기 펩티드가 수용액에서 가용성인, 수용액 중 펩티드의 가용성의 평가 방법.

청구항 51

(a) 적어도 하나의 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계;

(b) 상기 펩티드의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 및 9 이상의 Pi 또는 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우, 선택적으로, 상기 펩티드의 Pi 및 HYDRO가 7 초과와 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에, 상기 펩티드를 선택하는 단계; 및

(c) 상기 펩티드를 포함하는 수용액을 제조하는 단계를 포함하는 펩티드 수용액의 제조 방법.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드가 신생-항원 펩티드인 방법.

청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드가 약 5 내지 약 50개의 아미노산 길이, 약 15 내지 약 35개의 아미노산 길이, 약 15개 이하의 아미노산 길이, 약 8 내지 약 11개의 아미노산 길이, 또는 9 또는 10개의 아미노산 길이인 방법.

청구항 54

제49항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드가 약 30개 이하의 아미노산 길이, 약 6 내지 약 25개의 아미노산 길이, 약 15 내지 약 24개의 아미노산 길이, 또는 약 9 내지 약 15개의 아미노산 길이인 방법.

청구항 55

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용액이 pH 조절제를 포함하는 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 pH 조절제가 염기인 방법.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, 상기 pH 조절제가 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염인 방법.

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH 조절제가 시트르산염인 방법.

청구항 59

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH 조절제가 석신산염인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 석신산염이 석신산나트륨을 포함하는 방법.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 석신산염이 상기 수용액에 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 62

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 석신산염이 상기 수용액에 약 2 mM 내지 약 5 mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 63

제50항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용액이 텍스트로스, 트레할로스 또는 수크로스를 추가로 포함하는 방법.

청구항 64

제50항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용액이 디메틸설폭시드를 추가로 포함하는 방법.

청구항 65

제50항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용액이 면역조절제 또는 애쥘번트를 추가로 포함하는 방법.

청구항 66

제50항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용액이 약제학적 조성물인 방법.

청구항 67

제50항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용액이 면역원성 조성물인 방법.

청구항 68

제50항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용액이 백신 조성물인 방법.

청구항 69

제50항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용액이 동결건조 가능한 방법.

청구항 70

신생-항원 펩티드 수용액의 제조 방법으로서, 상기 방법이

(a) 적어도 하나의 신생-항원 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계;

(b) 상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한된다면, 선택적으로, 상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에, 상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드를 선택하는 단계;

(c) 상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액을 제조하는 단계; 및

(d) 상기 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액을 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액과 조합하여, 그에 의해, 신생-항원 펩티드 수용액을 제조하는 단계를 포함하는 신생-항원 펩티드 수용액의 제조 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 단계 (c) 및/또는 (d)의 용액을 여과하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액을 동결건조시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40가지의 신생-항원 펩티드를 포함하며, 이의 각각은 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로, Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 방법.

청구항 74

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로, Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 적어도 2가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 75

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 청구항의 상기 신생-항원 펩티드 용액이 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로, Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 적어도 3가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 76

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로, Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 적어도 4가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 77

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로, Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 적어도 5가지의 신생-항원 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 78

제70항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 신생항원 펩티드가 약 5 내지 약 50개의 아미노산 길이, 약 15 내지 약 35개의 아미노산 길이, 약 15개 이하의 아미노산 길이, 약 8 내지 약 11개의 아미노산 길이, 또는 9 또는 10개의 아미노산 길이인 방법.

청구항 79

제70항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 신생항원 펩티드가 약 30개 이하의 아미노산 길이, 약 6 내지 약 25개의 아미노산 길이, 약 15 내지 약 24개의 아미노산 길이, 또는 약 9 내지 약 15개의 아미노산 길이인 방법.

청구항 80

제70항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 pH 조절제를 포함하는 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 pH 조절제가 염기인 방법.

청구항 82

제80항 또는 제81항에 있어서, 상기 pH 조절제가 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염인 방법.

청구항 83

제80항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH 조절제가 시트르산염인 방법.

청구항 84

제80항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH 조절제가 석신산염인 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 석신산염이 석신산나트륨을 포함하는 방법.

청구항 86

제84항 또는 제85항에 있어서, 석신산염이 상기 제형에 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 87

제84항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 석신산염이 상기 제형에 약 2 mM 내지 약 5 mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 88

제84항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 텍스트로스를 포함하는 방법.

청구항 90

제88항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 트레할로스를 포함하는 방법.

청구항 91

제88항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 수크로스를 포함하는 방법.

청구항 92

제88항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 디메틸설폭시드를 추가로 포함하는 방법.

청구항 93

제70항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 동결건조 가능한 방법.

청구항 94

제70항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 면역조절제 또는 애주번트를 추가로 포함하는 방법.

청구항 95

제17항 또는 제94항에 있어서, 상기 면역조절제 또는 애주번트가 폴리-ICLC, 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PepTel®, 벡터 시스템, PLGA 마이크로입자, 레시퀴모드, SRL172, 비로좁 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys 및 아퀼라스 QS21 스티물론으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 96

제94항에 있어서, 상기 면역조절제 또는 애주번트가 폴리-ICLC를 포함하는 방법.

청구항 97

제70항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이

1 내지 5가지의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 각각의 신생-항원 펩티드가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 및 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로, Pi 및 HYDRO가 7 초과

Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 1 내지 5가지의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염;

1 내지 3%의 디메틸설폭시드;

3.6 내지 3.7%의 텍스트로스;

3.6 내지 3.7 mM의 석신산 또는 그의 염;

0.5 mg/ml의 폴리 I:폴리 C;

0.375 mg/ml의 폴리-L-라이신;

1.25 mg/ml의 나트륨 카르복시메틸셀룰로스; 및

0.225%의 염화나트륨을 포함하는 방법.

청구항 98

제70항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액이 신생-항원 펩티드의 각각을 약 300 µg/ml의 농도로 포함하는 방법.

청구항 99

제70항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 약제학적 조성물인 방법.

청구항 100

제70항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 면역원성 조성물인 방법.

청구항 101

제70항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액이 백신 조성물인 방법.

청구항 102

제70항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생-항원 펩티드 용액을 신생물을 갖는 것으로 진단받은 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 신생물을 치료하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 103

제70항 내지 제98항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되는 신생물 백신.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원 및 참조에 의한 포함

[0002] 본 출원은 2015년 6월 9일자 출원된 미국 가출원 제62/172,890호의 우선권 및 이익을 주장한다.

[0003] 2014년 12월 5일자 출원된 국제 특허 출원 제PCT/US2014/068893호를 참조한하며, 2013년 12월 6일자 출원된 미국 가특허 출원 제61/913,172호에 대한 우선권을 주장한다.

[0004] 전술한 출원, 및 상기 출원에 또는 상기 출원의 절차 중에 인용된 모든 문헌("출원 인용 문헌") 및 상기 출원 인용 문헌에 인용되거나 참조된 모든 문헌, 및 본원에서 인용되거나 참조된 모든 문헌("본원 인용 문헌") 및 본원 인용 문헌에 인용되거나 참조된 모든 문헌은, 본원에 언급되거나 본원에 참고로 포함된 임의의 문헌에 언급된 임의의 제품에 대한 임의의 제조사의 지침서, 설명서, 제품 명세서 및 제품 시이트(sheet)와 함께, 본원에 참고로 포함되어 있으며, 그리고 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 모든 참조된 문헌은 마치 각각의 개별 문헌을 참고로 포함하는 것으로 특정적으로 그리고 개별적으로 나타내는 것과 동일한 정도로 참고로 포함된다.

[0005] 연방 정부 후원 설명

[0006] 본 발명은 미국 국립보건원에 의해 지급된 승인 번호 CA155010 및 HL103532 하에 정부 지원으로 수행되었다. 정부는 본 발명에 소정의 권리를 갖는다.

[0007] 기술분야

[0008] 본 발명은 신생물의 치료용 제형 및 그의 제조 방법에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 대상체에서의 신생물의 치료용 종양 백신을 위한 제형 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0009] 대략 160만 명의 미국인들이 매년 신생물이 있는 것으로 진단받고, 2013년에 미국에서 대략 580,000명의 사람들이 상기 질병으로 인해 사망하는 것으로 예상된다. 과거 수십 년에 걸쳐, 신생물의 검출, 진단 및 치료에 상당한 개선이 있었으며, 이는 많은 유형의 신생물에 대하여 생존율을 유의미하게 증가시켰다. 그러나 신생물이 있는 것으로 진단받은 사람들 중 오직 약 60%만이 치료의 개시 5년 후에 여전히 살아 있으며, 이는 미국에서 신생물이 사망의 두 번째의 주된 원인이 되게 만든다.

[0010] 현재, 제거 기술(예를 들어, 수술적 절차, 초저온/열 처리, 초음파, 고주파 및 방사선) 및 화학적 기술(예를 들어, 약제학적 제제, 세포독성/화학치료제, 모노클로날 항체 및 그들의 다양한 조합)을 포함하는 수많은 상이한 기존의 암 치료법이 존재한다. 불행히도, 그러한 치료법은 빈번하게 심각한 위험, 독성 부작용 및 매우 높은 비용 및 불확실한 효과와 관련이 있다.

[0011] 환자 자신의 면역계를 사용하여 암 세포를 표적화하려는 암 치료법(예를 들어, 암 백신)에 관심이 증가하고 있는데, 그 이유는, 그러한 치료법이 본원에 기술된 단점의 일부를 완화/제거할 수 있기 때문이다. 암 백신은 전형적으로 종양 항원 및 면역자극 분자(예를 들어, 사이토카인 또는 TLR 리간드)로 이루어져 있으며, 그들은 함께 작용하여, 종양 세포를 표적화하고 그를 파괴하는 항원-특이적 세포독성 T 세포를 유도한다. 현재의 암 백신은 전형적으로 공유 종양 항원을 함유하며, 이는 많은 개체에서 관찰되는 종양에서 선택적으로 발현되거나 과-발현되는 고유 단백질(즉, - 개체 내의 모든 정상 세포의 DNA에 의해 인코딩되는 단백질)이다. 그러한 공유 종양 항원이 특정 유형의 종양을 확인하는데 유용하지만, 그들은 특정 종양 유형에 대해 T-세포 반응을 표적화하기 위한 면역원으로서 이상적이지 않은데, 그 이유는 그들이 자기-관용의 면역 약화 효과를 겪기 때문이다. 종양-특이적 및 환자-특이적 신생항원을 함유하는 백신은 공유 종양 항원을 함유하는 백신의 단점 중 일부를 극복할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 일반적으로, 임의의 백신은 백신이 사용 전에 분해되거나 손상되지 않을 것을 보장하기에 충분히 긴 저장 기간을 가져야 한다. 또한, 저장 안정성은 백신의 성분이 저장 동안 용액으로부터 침전되지 않아야 하는 것을 요구한다. 그러나 적당한 저장 안정성을 달성하는 것이 어려울 수 있다. 따라서, 백신을 위한 신규한 제형이 필요하다.

[0013] 본 출원에서 임의의 문헌의 인용 또는 확인은 그러한 문헌이 본 발명에 대한 선행 기술로서 이용 가능하다는 인정이 아니다.

과제의 해결 수단

[0014] 요약

[0015] 본 발명은 신생물의 치료용 신생물 백신 또는 면역원성 조성물, 더욱 특히, 대상체에서 종양의 치료를 위한 종양-특이적 및 환자-특이적 신생-항원의 풀을 포함하는 백신 제형에 관한 것이다.

[0016] 일 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계; 및 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우, 선택적으로, 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 펩티드를 선택하는 단계를 포함하는 펩티드의 선택 방법을 제공한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 방법은 적어도 2개의 펩티드의 Pi 및 HYDRO를 결정하는 단계, 및 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi

및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되거나, 그에 가장 근접한 경우에 펩티드를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 관련 실시형태에 있어서, 선택된 펩티드는 본원에 기재된 방법(예를 들어, 수용액, 약제학적 조성물, 면역원성 조성물, 백신 조성물 등의 제조 방법)에 사용된다.

[0017] 일 양태에서, 본 발명은 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계로서, 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우, 선택적으로, 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 펩티드가 수용액에서 가용성인 단계를 포함하는 수용액 중 펩티드의 가용성의 평가 방법을 제공한다.

[0018] 일 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계; 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우, 선택적으로, 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 펩티드를 선택하는 단계; 및 펩티드를 함유하는 수용액을 제조하는 단계를 포함하는 펩티드 수용액의 제조 방법을 제공한다.

[0019] 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 신생-항원 펩티드이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 5 내지 약 50개의 아미노산 길이의 범위이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 15 내지 약 35개의 아미노산 길이의 범위이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 15개 이하의 아미노산 길이이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 8 내지 약 11개의 아미노산 길이이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 9 또는 10개의 아미노산 길이이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 30개 이하의 아미노산 길이이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 6 내지 약 25개의 아미노산 길이이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 15 내지 약 24개의 아미노산 길이이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 9 내지 약 15개의 아미노산 길이이다.

[0020] 일 실시형태에 있어서, 수용액은 pH 조절제를 함유한다. 일 실시형태에 있어서, pH 조절제는 염기이다. 일 실시형태에 있어서, pH 조절제는 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염이다. 일 실시형태에 있어서, pH 조절제는 시트르산염이다. 또 다른 실시형태에 있어서, pH 조절제는 석신산염이다. 일 실시형태에 있어서, 석신산염은 석신산나트륨을 함유한다. 일 실시형태에서, 일 실시형태에 있어서, 석신산염은 수용액에 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 존재한다. 일 실시형태에 있어서, 석신산염은 수용액에 약 2 mM 내지 약 5 mM의 농도로 존재한다.

[0021] 일 실시형태에 있어서, 수용액은 텍스트로스, 트레할로스 또는 수크로스를 추가로 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 수용액은 디메틸설폭시드를 추가로 함유한다.

[0022] 일 실시형태에 있어서, 수용액은 면역조절제 또는 애쥬번트를 추가로 함유한다.

[0023] 일 실시형태에 있어서, 수용액은 약제학적 조성물이다. 일 실시형태에 있어서, 수용액은 면역원성 조성물이다. 일 실시형태에 있어서, 수용액은 백신 조성물이다.

[0024] 일 실시형태에 있어서, 수용액은 동결건조 가능하다.

[0025] 일 양태에서, 본 발명은 신생-항원 펩티드 수용액의 제조 방법을 제공하며, 당해 방법은 적어도 하나의 신생-항원 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계; 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한된다면, 선택적으로, 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 적어도 하나의 신생-항원 펩티드를 선택하는 단계; 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 함유하는 용액을 제조하는 단계; 및 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 함유하는 용액을 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 함유하는 용액과 조합하여, 그에 의해, 신생물 백신을 위한 펩티드 용액을 제조하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 상기 방법은 용액을 여과하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 상기 방법은 여과된 신생-항원 펩티드 용액을 동결건조시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0026] 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40가지

의 신생-항원 펩티드를 함유하며, 이의 각각은 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택된다. 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 적어도 2가지의 신생-항원 펩티드를 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 청구범위의 신생-항원 펩티드 용액은 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 적어도 3가지의 신생-항원 펩티드를 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 적어도 4가지의 신생-항원 펩티드를 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 기반하여 선택되는 적어도 5가지의 신생-항원 펩티드를 함유한다.

[0027] 일 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 신생항원 펩티드는 약 5 내지 약 50개의 아미노산 길이의 범위이다. 일 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 신생항원 펩티드는 약 15 내지 약 35개의 아미노산 길이의 범위이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 15개 이하의 아미노산 길이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 8 내지 약 11개의 아미노산 길이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 9 또는 10개의 아미노산 길이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 30개 이하의 아미노산 길이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 6 내지 약 25개의 아미노산 길이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 15 내지 약 24개의 아미노산 길이다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드 또는 적어도 하나의 펩티드는 약 9 내지 약 15개의 아미노산 길이다.

[0028] 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 pH 조절제를 함유한다. 일 실시형태에 있어서, pH 조절제는 염기이다. 일 실시형태에 있어서, pH 조절제는 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염이다. 일 실시형태에 있어서, pH 조절제는 시트르산염이다. 일 실시형태에 있어서, pH 조절제는 석신산염이다. 일 실시형태에 있어서, 석신산염은 석신산나트륨을 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 석신산염은 제형에 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 존재한다. 일 실시형태에 있어서, 석신산염은 제형에 약 2 mM 내지 약 5 mM의 농도로 존재한다.

[0029] 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 텍스트로스를 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 트레할로스를 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 수크로스를 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 디메틸설폭시드를 추가로 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 동결건조 가능하다.

[0030] 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 면역조절제 또는 애쥬번트를 추가로 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 면역조절제 또는 애쥬번트는 폴리-ICLC, 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스(Amplivax), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(Imiquimod), ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴지질 A, 몬타나이드(Montanide) IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PepTel®, 벡터 시스템, PLGA 마이크로입자, 레시퀴모드(resiquimod), SRL172, 비로솜(Virosome) 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys 및 아퀼라스(Aquila's) QS21 스티물론(stimulon)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시형태에 있어서, 면역조절제 또는 애쥬번트는 폴리-ICLC를 함유한다.

[0031] 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 1 내지 5가지의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 각각의 신생-항원 펩티드가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 Pi 및 HYDRO를 갖는 것, 선택적으로 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 Pi 및 -5.5 이상의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우

에 기반하여 선택되는 1 내지 5가지의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 1 내지 3%의 디메틸설폭사이드; 3.6 내지 3.7%의 텍스트로스; 3.6 내지 3.7 mM의 석신산 또는 그의 염; 0.5 mg/ml의 폴리 I:폴리 C; 0.375 mg/ml의 폴리-L-라이신; 1.25 mg/ml의 나트륨 카르복시메틸셀룰로스; 및 0.225%의 염화나트륨을 함유한다.

- [0032] 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 신생-항원 펩티드의 각각을 약 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 함유한다.
- [0033] 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 약제학적 조성물이다. 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 면역원성 조성물이다. 일 실시형태에 있어서, 신생-항원 펩티드 용액은 백신 조성물이다.
- [0034] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 신생-항원 펩티드 용액을 신생물을 갖는 것으로 진단받은 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 신생물을 치료하는 단계를 포함하는 본원에 기재된 방법을 제공한다.
- [0035] 일 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계; 및 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 또는 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우, 선택적으로 그의 Pi 및 HYDRO가 7 초과 및 9 이하의 Pi 및 -5.5 이하의 HYDRO 값에 의해 제한되는 경우에 펩티드를 선택하는 단계를 포함하는 본원에 기재된 방법에 의해 제조되는 신생물 백신을 제공한다.
- [0036] 일 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; pH 조절제; 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0037] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 가용성인 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 가용성 펩티드는 실험적으로 확인될 수 있다. 가용성 펩티드는 각각의 펩티드의 아미노산 서열에 기반하여 확인될 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 특정 등전점(Pi)을 갖는 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 특정 소수성을 갖는 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 소수성은 HYDRO 값으로 표현될 수 있다. HYDRO 값은 각각의 아미노산 측쇄의 알려져 있는 소수성 또는 친수성의 값을 사용하여 결정될 수 있다. HYDRO 값은 펩티드 내의 소수성 아미노산의 비단속 스트레치를 확인함으로써 결정될 수 있다. HYDRO 값은 소수성 아미노산의 비단속 스트레치 내의 각각의 아미노산의 소수성을 합산하여 결정될 수 있다. HYDRO 값은 가장 높은 소수성의 정도를 갖는 소수성 아미노산의 비단속 스트레치에서의 값의 합일 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드는 Pi 및 HYDRO 값의 조합에 기반하여 가용성이다. 펩티드는 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이하의 HYDRO, 및 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한될 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, 펩티드는 이들 값의 범위 중 임의의 것 이내이다.
- [0038] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 백신 조성물이다.
- [0039] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 적어도 2가지의 신생항원 펩티드를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 적어도 3가지의 신생-항원 펩티드를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 적어도 4가지의 신생-항원 펩티드를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 적어도 5가지의 신생-항원 펩티드를 포함한다. 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 유리하게는 적어도 4가지의 상이한 신생항원을 포함하며(상이한 항원이란, 각각의 항원이 상이한 신생에피토프를 갖는 것으로 의도됨), 예를 들어, 적어도 4 또는 5 또는 6 또는 7 또는 8 또는 9 또는 10 또는 11 또는 12 또는 13 또는 14 또는 15 또는 16 또는 17 또는 18 또는 19 또는 20 또는 21 또는 22 또는 23 또는 24 또는 25 또는 26 또는 27 또는 28 또는 29 또는 30 또는 31 또는 32 또는 33 또는 34 또는 35 또는 36 또는 37 또는 38 또는 39 또는 40가지 이상의 상이한 신생항원이 신생물 백신 또는 면역원성 조성물에 존재할 수 있다.
- [0040] 특정 실시형태에 있어서, 신생항원 펩티드는 약 5 내지 약 50개의 아미노산 길이의 범위이다. 또 다른 관련 실시형태에 있어서, 신생항원 펩티드는 약 15 내지 약 35개의 아미노산 길이의 범위이다. 전형적으로, 길이는 약 15 또는 20개 초과인 아미노산, 예를 들어, 15 내지 50개 또는 약 75개의 아미노산이다.
- [0041] 일 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 pH 조절제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.
- [0042] 특정 실시형태에 있어서, pH 조절제는 염기이다. 특정 실시형태에 있어서, pH 조절제는 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염이다. 특정 실시형태에 있어서, pH 조절제는 석신산염이다. 특정 실시형태에 있어서, pH

조절제는 시트르산염이다.

- [0043] 특정 실시형태에 있어서, 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 석신산이나트륨을 포함한다.
- [0044] 특정 실시형태에 있어서, 석신산염은 제형에 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 존재한다. 특정 실시형태에 있어서, 석신산염은 제형에 약 2 mM 내지 약 5 mM의 농도로 존재한다.
- [0045] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 물을 포함한다.
- [0046] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 텍스트로스를 추가로 포함한다.
- [0047] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 트레할로스를 추가로 포함한다.
- [0048] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 수크로스를 추가로 포함한다.
- [0049] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 디메틸설폭시드를 추가로 포함한다.
- [0050] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 면역조절제 또는 애쥬번트를 추가로 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 상기 방법은 면역조절제 또는 애쥬번트의 투여를 추가로 포함한다. 또 다른 관련 실시형태에 있어서, 면역조절제 또는 애쥬번트는 폴리-ICLC, 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PEPTEL, 벡터 시스템, PLGA 마이크로입자, 레시퀴모드, SRL172, 비로즘 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys 및 아퀼라스 QS21 스티물론으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가의 실시형태에 있어서, 면역조절제 또는 애쥬번트는 폴리-ICLC이다.
- [0051] 이들 폴리머의 수 중 용해는 산 용액을 야기하며, 이를 바람직하게는 생리학적 pH로 중화시켜, 백신 또는 면역원성 조성물 또는 그의 항원(들) 또는 벡터(들)가 혼입되는 애쥬번트 용액을 제공한다. 그 다음, 폴리머의 카르복실기는 부분적으로 COO⁻로 존재한다.
- [0052] 바람직하게는, 본 발명에 따른 애쥬번트의, 특히 카보머의 용액을 바람직하게는 염화나트륨의 존재하에 증류수에서 제조하며, 수득되는 용액은 산성 pH로 존재한다. 이러한 원액은 그것을 필요한 양(요망되는 최종 농도를 수득하기 위해), 또는 그의 상당한 부분의 염, 예를 들어, NaCl이 채워진 물, 바람직하게는 생리학적 식염수(NaCl 9 g/l)에, 바람직하게는 염기, 예를 들어, NaOH를 사용한 동시의 또는 이후의 중화(pH 7.3 내지 7.4)와 함께, 한꺼번에 또는 수회 분량으로 첨가하여 희석한다. 생리학적 pH의 이러한 용액을 그대로 사용하여, 특히 동결-건조된 또는 동결건조 형태로 저장되는 백신을 재구성한다.
- [0053] 최종 백신 조성물 중 폴리머 농도는 0.01% 내지 2% w/v, 더욱 특별히 0.06 내지 1% w/v, 바람직하게는 0.1 내지 0.6% w/v이다.
- [0054] 또 다른 양태에서, 본 발명은 1 내지 5가지의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 1 내지 3%의 디메틸설폭시드; 수 중 3.6 내지 3.7%의 텍스트로스; 3.6 내지 3.7 mM의 석신산 또는 그의 염; 0.5 mg/ml의 폴리 I: 폴리 C; 0.375 mg/ml의 폴리-L-라이신; 1.25 mg/ml의 나트륨 카르복시메틸셀룰로스; 및 0.225%의 염화나트륨을 포함하는 신생물 백신인 약제학적 조성물을 제공한다. 특정 실시형태에 있어서, 1 내지 5가지의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 각각은 각각 약 300 µg/ml의 농도로 존재한다.
- [0055] 또 다른 양태에서, 본 발명은 신생물 백신을 위한 신생-항원 펩티드 용액의 제조 방법을 제공하며, 당해 방법은 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액을 제공하는 단계; 및 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액을 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액과 조합하여, 그에 의해, 신생물 백신을 위한 펩티드 용액을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0056] 특정 실시형태에 있어서, 상기 방법은 가용성인 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 제조하는 단계를 포함한다. 가용성 펩티드는 실험적으로 결정될 수 있다. 펩티드는 각각의 펩티드의 아미노산 서열에 기반하여 결정될 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 특정 등전점(P_i)을 갖는 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 특정 소수성을 갖는 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포

함한다. 소수성은 HYDRO 값으로 표현될 수 있다. HYDRO 값은 각각의 아미노산 측쇄의 알려져 있는 소수성 또는 친수성의 값을 사용함으로써 결정될 수 있다. HYDRO 값은 펩티드 내의 소수성 아미노산의 비단속 스트레치를 확인함으로써 결정될 수 있다. HYDRO 값은 소수성 아미노산의 비단속 스트레치 내의 각각의 아미노산의 소수성을 합산하여 결정될 수 있다. HYDRO 값은 가장 높은 소수성의 정도를 갖는 소수성 아미노산의 비단속 스트레치에서의 값의 합일 수 있다. 펩티드는 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 및 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한될 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, 펩티드는 이들 값의 범위 중 임의의 것 이내이다.

[0057] 특정 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액은 적어도 2가지(또는 3 또는 4 또는 5가지)의 신생-항원 펩티드를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 신생물 백신을 위한 펩티드 용액은 물, 텍스트로스 또는 트레할로스 또는 수크로스, 석신산염 및 디메틸설폭시드를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 상기 방법은 조합하는 단계 후에, 신생물 백신을 위한 펩티드 용액을 여과하는 단계를 추가로 포함한다.

[0058] 또 다른 양태에서, 본 발명은 신생물 백신의 제조 방법을 제공하며, 당해 방법은 신생물 백신을 위한 펩티드 용액을 제공하는 단계; 및 펩티드 용액을 면역조절제 또는 애주번트의 용액과 조합하여, 그에 의해 신생물 백신을 제조하는 단계를 포함한다.

[0059] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 방법(예를 들어, 상기 기재된 방법)에 의해 제조되는 신생물 백신을 제공한다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 및 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 신생물 백신을 위한 신생-항원 펩티드 용액을 제공한다.

[0061] 또 다른 양태에서, 본 발명은 신생물을 갖는 것으로 진단받은 대상체의 치료 방법을 제공하며, 당해 방법은 본 발명의 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 약제학적 조성물)을 대상체에게 투여하여, 그에 의해, 신생물을 치료하는 단계를 포함한다.

[0062] 특정 실시형태에 있어서, 상기 방법은 본 발명의 제2 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 약제학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0063] 특정 실시형태에 있어서, 상기 방법은 본 발명의 제3 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 약제학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0064] 특정 실시형태에 있어서, 상기 방법은 본 발명의 제4 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 약제학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0065] 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 예를 들어, 하나의 시간 일정, 예를 들어, 1주마다, 2주마다, 3주마다, 1개월마다, 2개월마다, 분기마다(3개월마다), 1년의 1/3마다(4개월마다), 5개월마다, 년 2회(6개월마다), 7개월마다, 8개월마다, 9개월마다, 10개월마다, 11개월마다, 매년 등으로 이루어질 수 있다.

[0066] 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 각각이 신생항원의 일부를 함유하는 하위조성물을 통해 투여될 수 있으며, 하위-조성물은 대상체 또는 환자 상의 상이한 위치에 투여될 수 있으며; 예를 들어, 20가지의 상이한 신생항원을 포함하는 조성물은 각각이 20가지의 상이한 신생항원 중 5가지를 함유하는 네(4)개의 하위조성물로 투여될 수 있으며, 네(4)개의 하위조성물은 환자의 배액 림프절에 또는 그 근처에, 예를 들어, 팔 및 다리 각각(예를 들어, 환자의 각 측의 허벅지 또는 상부 허벅지 또는 엉덩이 가까이 또는 등 아래쪽)에 각각의 하위조성물을 전달하기 위한 시도로, 환자 또는 대상체의 배액 림프절에 또는 그 근처에 각 하위조성물을 전달하기 위한 시도로 투여될 수 있다. 물론, 위치의 수 및 그에 따라 하위조성물의 수는 달라질 수 있으며, 예를 들어, 숙련자는 비강에서의 또는 그 근처에서의 투여를 고려하여, 5번째 투여점을 가질 수 있으며, 숙련자는 오직 1가지, 2가지 또는 3가지가 사용되도록 위치를 달라지게 할 수 있다(예를 들어, 각 팔과 한 다리, 각 다리와 한 팔, 팔 사용하지 않고 각 다리 또는 오직 양팔만).

[0067] 전술된 다양한 간격으로 투여되는 백신 또는 면역원성 조성물은 상이한 제형일 수 있으며, 단일의 투여 동안 대상체 또는 환자에서 상이한 위치에 투여되는 하위조성물은 상이한 조성물일 수 있다. 예를 들어, 처음의 투여는 전체 항원 백신 또는 면역원성 조성물의 투여일 수 있으며, 다음의 또는 이후의 투여는 생체내에서 항원(들)의 발현을 갖는 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터 또는 플라스미드)의 투여일 수 있다. 마찬가지로, 환자 또는 대상체에서 상이한 위치로의 상이한 하위조성물의 투여에서, 하위조성물의 일부는 전체 항원을 포함할 수 있으며,

하위조성물의 일부는 생체내에서 항원(들)의 발현을 갖는 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터 또는 플라스미드)를 포함할 수 있다. 그리고 일부 조성물 및 하위조성물은 생체내에서 항원(들)의 발현을 갖는 벡터(들)(예를 들어, 바이러스 벡터 또는 플라스미드) 및 전체 항원 둘 모두를 포함할 수 있다. 생체내에서 항원(들)의 발현을 갖는 일부 벡터(예를 들어, 폭스바이러스)는 면역자극 또는 보조 효과를 가질 수 있으며, 이에 따라, 그러한 벡터를 함유하는 조성물 또는 하위조성물은 자가-보조될 수 있다. 또한, 항원이 면역계에 제시되는 방법의 성질을 변화 시킴으로써, 투여는 면역계를 "프라이밍"시킨 다음, "부스트"시킬 수 있다. 그리고 이러한 맥락에서, "백신"이 언급되는 경우, 본 발명이 면역원성 조성물을 이해하는 것으로 의도되며, 환자 또는 대상체가 언급되는 경우, 그러한 개체가 본원에 개시된 치료, 투여, 조성물 및 일반적으로 대상 발명을 필요로 하는 환자 또는 대상체인 것으로 의도된다.

[0068] 더욱이, 본 발명은 임의의 유형의 발현 벡터, 예를 들어, 바이러스 발현 벡터, 예를 들어, 폭스바이러스(예를 들어, 오소폭스바이러스 또는 조류폭스바이러스, 예를 들어, 변형된 백신니아 안카라(Modified Vaccinia Ankara) 또는 MVA, MVA-BN을 포함하는 백신니아 바이러스, WO-A-92/15672호에 따른 NYVAC, 계두, 예를 들어, TROVAX, 카나리아두, 예를 들어, ALVAC(WO-A-95/27780호 및 WO-A-92/15672호) 구두, 돈두 등), 아데노바이러스, AAV 헤르페스바이러스 및 렌티바이러스; 또는 플라스미드 또는 DNA 또는 핵산 분자 벡터의 이용에 적용된다. 세포질성인 일부 벡터, 예를 들어, 폭스바이러스 벡터가 유리할 수 있다. 그러나 아데노바이러스, AAV 및 렌티바이러스도 또한 본 발명의 실시예 사용하기에 유리할 수 있다.

[0069] 즉시 사용 가능한, 특히, 재구성된 백신 또는 면역원성 조성물에서, 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터는 이러한 개시내용 및 해당 분야(예를 들어, 본원에 언급된 특허 및 과학 문헌에서)의 지식으로부터 숙련자의 범위 내의 양으로 존재한다.

[0070] 전체 항원 또는 벡터, 예를 들어, 재조합 생 백신은 일반적으로 동결-건조 형태로 존재하여, 그들의 저장을 가능하게 하며, 사용 직전에 본원에 논의된 바와 같은 애쥬번트를 포함할 수 있는 용매 또는 부형제 중에 재구성된다.

[0071] 따라서, 본 발명의 대상은 또한, 개별적으로 패키징되는 동결-건조 백신 및 유리하게는 동결-건조 백신의 재구성을 위한 본원에 논의된 바와 같은 애쥬번트 화합물을 포함하는 용액을 포함하는 백신접종 또는 면역화 세트 또는 키트이다.

[0072] 본 발명의 대상은 또한, 예를 들어, 비경구, 바람직하게는 피하, 근육내 또는 피내 경로에 의하여 또는 점막 경로에 의하여 본 발명에 따른 백신 또는 면역원성 조성물을 하나 이상의 투여 속도로 투여하는 단계를 포함하거나, 또는 본질적으로 그로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지는 백신접종 또는 면역화 방법이다. 선택적으로, 이러한 방법은 (예를 들어, 동결건조된 전체 항원 또는 벡터이면) 동결-건조 백신 또는 면역원성 조성물을 유리하게는 애쥬번트도 또한 포함하는 용액 중에 재구성하는 예비 단계를 포함한다.

[0073] 일 실시형태에 있어서, 대상체는 비호지킨 림프종(NHL), 투명 세포 신장 세포 암종(ccRCC), 흑색종, 육종, 백혈병 또는 방광, 결장, 뇌, 유방, 두경부, 자궁내막, 폐, 난소, 췌장 또는 전립선의 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 신생물을 앓고 있다. 또 다른 실시형태에 있어서, 신생물은 전이성이다. 추가의 실시형태에 있어서, 대상체는 검출 가능한 신생물을 갖지 않지만, 질병 재발 위험이 높다. 추가의 관련 실시형태에 있어서, 대상체는 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식(AHSCT)을 겪은 적이 있다.

[0074] 일 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 프라이밍/부스트 투여 섭생법으로 이루어진다. 또 다른 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 프라이밍으로서 제1주, 제2주, 제3주 또는 제4주에 이루어진다. 또 다른 추가의 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 부스트로서 제2개월, 제3개월, 제4개월 또는 제5개월에 이루어진다.

[0075] 일 실시형태에 있어서, 백신 또는 면역원성 조성물은 각각의 신생항원 펩티드에 관하여 70 kg 개체마다 약 10 μ g 내지 1 mg의 용량으로 투여된다. 또 다른 실시형태에 있어서, 백신 또는 면역원성 조성물은 각각의 신생항원 펩티드에 관하여 70 kg 개체마다 약 10 μ g 내지 2000 μ g의 평균 주별 용량 수준으로 투여된다.

[0076] 일 실시형태에 있어서, 백신 또는 면역원성 조성물은 정맥내 또는 피하 투여된다.

[0077] 또 다른 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 및 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 신생물 백신을 위한 신생-항원 펩티드 용액을 제공한다.

[0078] 본 발명은 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 제20110293637호에서와 같은 방법, 예를 들어,

- [0079] (i) 대상체의 종양의 시료의 핵산 시퀀싱, 및
- [0080] 대상체의 비-종양 시료의 핵산 시퀀싱을 통한 것을 포함하여,
- [0081] 비-종양 시료에 존재하지 않는 복수의 적어도 4개의 종양-특이적 비-침묵 돌연변이를 확인하는 단계; 및
- [0082] (ii) 확인된 비-침묵 돌연변이로부터 복수의 적어도 4개의 대상체-특이적 펩티드를 선택하는 단계로서, 각각이 확인된 복수의 종양 특이적 돌연변이로부터 대상체의 종양에 특이적인 에피토프인 상이한 종양 신생-에피토프를 갖고,
- [0083] 각각의 신생-에피토프는 비-종양 시료에 존재하지 않는 종양-특이적 비-침묵 돌연변이의 발현 산물이며, 각각의 신생-에피토프는 대상체의 HLA 단백질에 결합하고, 선택하는 단계가 HLA 단백질로의 대상체-특이적 펩티드의 결합을 결정하는 것을 포함하는 단계, 및
- [0084] (iii) 대상체로의 투여를 위한 대상체-특이적 면역원성 조성물을 제형화하여, 투여시에 복수의 적어도 4개의 대상체-특이적 펩티드가 대상체의 면역계에 제시되게 하는 단계를 포함하고,
- [0085] 선택하는 단계 또는 제형화하는 단계가
- [0086] 대상체-특이적 면역원성 조성물에, 확인된 신생-ORF의 발현 산물을 포함하고, 신생-ORF가 신규한 오픈 리딩 프레임 생성하는 비-종양 시료에 존재하지 않는 종양-특이적 비-침묵 돌연변이인 대상체-특이적 펩티드를 포함하는 것, 및
- [0087] 대상체-특이적 면역원성 조성물에, 확인된 점 돌연변이의 발현 산물을 포함하고, 500 nM 미만의 IC₅₀을 갖는 대상체의 HLA 단백질로의 결합이 결정된 대상체-특이적 펩티드를 포함하는 것 중 적어도 하나를 포함하고,
- [0088] 그에 의해, 복수의 적어도 4개의 대상체-특이적 펩티드가 확인되고, 투여 시에 복수의 적어도 4개의 대상체-특이적 펩티드를 대상체의 면역계에 제시하며, 대상체-특이적 펩티드가 대상체 및 대상체의 종양에 특이적인 대상체-특이적 면역원성 조성물이 제조되는, 복수의 적어도 4개의 대상체-특이적 펩티드를 확인하고, 투여 시에 복수의 적어도 4개의 대상체-특이적 펩티드를 대상체의 면역계에 제시하는 대상체-특이적 면역원성 조성물의 제조 방법으로서, 대상체가 종양을 갖고, 대상체-특이적 펩티드는 대상체 및 대상체의 종양에 특이적인 방법; 또는
- [0089] a. 암을 갖는 대상체의 발현된 유전자에서 종양 특이적 돌연변이를 확인하는 단계;
- [0090] b. 단계 (a)에서 확인된 상기 돌연변이가 점 돌연변이인 경우,
- [0091] i. 단계 (a)에서 확인된 돌연변이를 갖는 돌연변이 펩티드를 확인하는 단계로서, 상기 돌연변이 펩티드가 야생형 펩티드보다 더 큰 친화성으로 클래스 I HLA 단백질에 결합하고; 500 nm 미만의 IC₅₀을 갖는 단계;
- [0092] c. 단계 (a)에서 확인된 상기 돌연변이가 스플라이스-부위, 프레임쉬프트, 리드-쓰루(read-through) 또는 유전자-융합 돌연변이인 경우,
- [0093] i. 단계 (a)에서 확인된 돌연변이에 의해 인코딩되는 돌연변이 폴리펩티드를 확인하는 단계로서, 상기 돌연변이 폴리펩티드가 클래스 I HLA 단백질에 결합하는 단계를 포함하는 신생항원의 확인 방법; 또는
- [0094] 확인된 하나 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드 및 애쥬번트를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서의 종양 특이적 면역 반응의 유도 방법; 또는
- [0095] a. 대상체의 발현된 유전자 내의 복수의 종양 특이적 돌연변이를 확인하는 단계로서, 상기 확인된 돌연변이가
- [0096] i. 점 돌연변이를 갖는 돌연변이 펩티드를 추가로 확인하는 점 돌연변이; 및/또는
- [0097] ii. 돌연변이에 의해 인코딩되는 돌연변이 폴리펩티드를 추가로 확인하는 스플라이스-부위, 프레임쉬프트, 리드-쓰루 또는 유전자-융합 돌연변이인 단계;
- [0098] b. 클래스 I HLA 단백질에 결합하는 단계 (a)에서 확인된 하나 이상의 돌연변이 펩티드 또는 폴리펩티드를 선택하는 단계;
- [0099] c. 항-종양 CD8 T-세포를 활성화시킬 수 있는 단계 (b)에서 확인된 하나 이상의 돌연변이 펩티드 또는 폴리펩티드를 선택하는 단계; 및
- [0100] d. 대상체에게, 하나 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드, 단계 (c)에서 선택된 하나 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드로 펠싱된 자가 수지상 세포 또는 항원 제시 세포를 투여하는 단계; 또는 하나의 확인된 펩티드(들)를 포함하

는 약제학적 조성물을 제조하는 단계 및 본원에 논의된 바와 같은 방법(들)을 수행하는 단계를 포함하는 암을 위한 대상체의 백신접종 또는 치료 방법의 수행을 이해한다. 따라서, 본원의 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 미국 특허 출원 제20110293637호에서와 같을 수 있다.

[0101] 따라서, 임의의 이전에 공지된 제품, 제품의 제조 방법 또는 제품의 사용 방법을 본 발명 내에 포함하지 않는 것이 본 발명의 목적이므로, 본 출원인은 권리를 보존하며, 이로써 임의의 이전에 공지된 제품, 공정 또는 방법에 대한 권리 포기를 드러낸다. 본 발명은 USPTO(35 U.S.C. § 112, 제1항) 또는 EPO(EPC의 83조)의 기재된 설명 및 실시 가능 요건을 충족하지 않는 임의의 제품, 공정 또는 제품의 제조 또는 제품의 사용 방법을 본 발명의 범위 내에 포함하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 추가로 언급되므로 출원인은 권리를 보존하고 이로써 임의의 이전에 기재된 제품, 제품의 제조 방법 또는 제품의 사용 방법에 대한 권리 포기를 드러낸다.

[0102] 본 명세서 및 특히 청구범위 및/또는 단락에서, "함유한다", "함유된", "함유하는" 등과 같은 용어가 미국 특허법에 귀속되는 의미를 가질 수 있고; 예를 들어, 그들은 "포함한다", "포함된", "포함하는" 등을 의미할 수 있으며; "본질적으로 이루어지는" 및 "본질적으로 이루어진다"와 같은 용어가 미국 특허법에 귀속되는 의미를 갖고, 예를 들어, 그들은 명백하게 열거되지 않는 요소를 허용하지만, 선행 기술에서 발견되거나 본 발명의 기본적인 또는 새로운 특징에 영향을 미치는 요소를 배제함이 주목된다.

[0103] 이들 및 다른 실시형태가 개시되거나 하기의 상세한 설명으로부터 명백하고 그에 의해 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0104] 본 특허 또는 출원 파일은 유색으로 작성된 도면을 적어도 하나 포함하고 있다. 유색 도면(들)이 첨부된 본 특허 또는 특허 출원의 카피는 사무국에 신청서와 필요 비용을 납부함으로써 제공된다.

예시로 제공되지만, 단지 기재된 특정 실시형태에만 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는 하기의 상세한 설명은 본원에 참조로 포함되는 첨부된 도면과 함께 최적으로 이해될 수 있으며, 여기서,

도 1은 개인맞춤화 암 백신 또는 면역원성 조성물의 제조를 위한 흐름도를 보여준다.

도 2는 암 환자를 위한 암 백신 또는 면역원성 조성물을 생성하기 위한 전-처리 단계를 위한 흐름도를 보여준다.

도 3은 본 발명의 예시적인 실시형태에 따른 프라임 부스트 전략에 기초한 면역화 일정을 예시한 것이다. 다중의 면역화는 처음 -3주에 걸쳐 발생하여, 면역 반응의 프라이밍 단계 동안 조기의 높은 항원 노출을 유지할 수 있다. 이어서, 환자는 8주 동안 휴식하여, 기억 T 세포가 발생되게 할 수 있으며, 이어서, 이들 T 세포를 부스팅시켜, 강력한 진행 중인 반응을 유지할 수 있다.

도 4는 본 발명의 예시적인 양태에 따른 일차 면역학적 중점을 나타내는 시간선을 보여준다.

도 5는 본 발명의 예시적인 실시형태에 따른 4개의 하위군의 폴로의 개별 신생항원 펩티드의 약물 제품 처리를 도시한 개략도를 보여준다.

도 6은 신생항원 제형을 사용한 마우스 수지상 세포의 자극 후의 다수의 주요 면역 마커의 유도 수준을 평가하기 위한 정량적 PCR의 결과를 보여준다.

도 7은 5% 텍스트로스 및 0.8% DMSO의 MDSC 분석을 보여준다.

도 8은 10% 트레할로스 및 0.8% DMSO의 MDSC 분석을 보여준다.

도 9는 10% 수크로스 및 0.8% DMSO의 MDSC 분석을 보여준다.

도 10은 예시적인 동결건조의 압력 프로파일을 보여준다.

도 11은 예시적인 동결건조의 온도 프로파일을 보여준다.

도 12는 본 발명의 예시적인 제형을 사용한 동결건조된 케이이크의 물리적 외양을 보여준다.

도 13은 아미노산 서열 KYNDFDSEPMFLFIVFSHGILVNHMLIVVM(SEQ ID NO:1)을 갖는 주어진 펩티드에 대하여 HYDRO 값이 결정되는 방법의 일 예를 보여준다.

도 14는 펩티드의 세트에 대한 HYDRO 대 P_i 를 플롯팅한 차트를 보여준다.

도 15는 도 14에서의 펩티드를 포함하는 더 큰 펩티드의 세트에 대한 HYDRO 대 P_i 를 플롯팅한 차트를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 발명의 이해를 용이하게 하기 위하여, 다수의 용어 및 어구가 본원에 정의된다:

특별히 언급하거나 문맥에서 명백하지 않은 한, 본원에 사용되는 "약"이라는 용어는 당업계에서 정상적인 허용 범위 내로서, 예를 들어 평균의 2 표준 편차 이내로서 이해된다. 약은 언급된 값의 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01% 내로 이해될 수 있다. 문맥에서 달리 명백하지 않은 한, 본원에 제공되는 모든 수치는 약이라는 용어로 수식된다.

특별히 언급하거나 문맥에서 명백하지 않은 한, 본원에 사용되는 "또는"이라는 용어는 포괄적인 것으로 이해된다. 특별히 언급하거나 문맥에서 명백하지 않은 한, 본원에 사용되는 "하나의(a, an)" 및 "상기(the)"이라는 용어는 단수 또는 복수인 것으로 이해된다.

"작용제"는 임의의 소 분자 화합물, 항체, 핵산 분자 또는 폴리펩티드, 또는 그들의 단편을 의미한다.

"개선한다"는 질병(예를 들어, 신생물, 종양 등)의 발생 또는 진행을 감소시키거나, 억제하거나, 약화시키거나, 줄이거나, 저지하거나, 안정화시키는 것을 의미한다.

"변경"은 당업계에 알려져 있는 표준 방법, 예를 들어, 본원에 기술된 것들에 의해 검출시의 유전자 또는 폴리펩티드의 발현 수준 또는 활성의 변화(증가 또는 감소)를 의미한다. 본원에 사용되는 변경은 발현 수준의 10% 변화, 바람직하게는 발현 수준의 25% 변화, 더욱 바람직하게는 40% 변화, 가장 바람직하게는 50% 이상의 변화를 포함한다.

"유사체"는 동일하지 않지만, 유사한 기능적 또는 구조적 특징을 갖는 분자를 의미한다. 예를 들어, 종양 특이적 신생-항원 폴리펩티드 유사체는 천연-발생 폴리펩티드에 비하여 유사체의 기능을 향상시키는 소정의 생화학적 변형을 갖지만, 상응하는 천연-발생 종양 특이적 신생-항원 폴리펩티드의 생물학적 활성을 유지한다. 그러한 생화학적 변형은 예를 들어, 리간드 결합을 변경시키지 않고, 유사체의 프로테아제 내성, 막 투과성 또는 반감기를 증가시킬 수 있다. 유사체는 비천연 아미노산을 포함할 수 있다.

용어 "신생항원" 또는 "신생항원성"은 게놈 인코딩된 단백질의 아미노산 서열을 변경시키는 종양-특이적 돌연변이(들)로부터 야기되는 종양 항원의 부류를 의미한다.

"신생물"이란, 부적절하게 높은 수준의 세포 분열, 부적절하게 낮은 수준의 아포토시스(apoptosis) 또는 둘 모두에 의해 야기되거나 그로 이어지는 임의의 질병을 의미한다. 예를 들어, 암은 신생물의 일 예이다. 암의 예에는 제한 없이, 백혈병(예를 들어, 급성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수모구성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병), 진성 적혈구증가증, 림프종(예를 들어, 호지킨병, 비-호지킨병), 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄병 및 고형 종양, 예를 들어 육종 및 암종(예를 들어, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장 세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막암종, 고환종, 배아 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 정소암, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 슈반세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 및 망막모세포종)이 포함된다. 림프구증식 장애도 또한 증식성 질병인 것으로 여겨진다.

용어 "신생물 백신"은 신생물/종양 특이적 신생항원, 예를 들어, 적어도 2가지, 적어도 3가지, 적어도 4가지, 적어도 5가지 이상의 신생항원 펩티드의 풀링된 시료를 지칭하는 의미이다. "백신"은 질병(예를 들어, 신생물/종양)의 예방 및/또는 치료를 위한 면역성의 생성을 위한 조성물을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 백신은 항원을 포함하는 약제이며, 백신접종에 의해 특이적 방어 및 보호 물질을 생성하기 위해 인간 또는 동물에서 사용되고자 한다. "신생물 백신 조성물"은 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다.

용어 "약제학적으로 허용되는"은 미국 연방 또는 주정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 승인 가능하거나, 인간

을 포함하는 동물에서의 사용에 대해 미국 약전 또는 일반적으로 인정되는 기타 약전에 열거됨을 의미한다.

- [0117] "약제학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제"는 작용제와 함께 대상체에게 투여될 수 있고, 그의 약리학적 활성을 파괴하지 않으며, 치료량의 작용제를 전달하기에 충분한 용량으로 투여되는 경우에 비독성인 부형제, 담체 또는 희석제를 말한다.
- [0118] 본원에 열거된 바와 같은 풀링된 중앙 특이적 신생항원의 "약제학적으로 허용되는 염"은 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 또는 동물의 조직과의 접촉에 사용하기에 적합한 것으로 당업계에 일반적으로 고려되는 산 또는 염기 염일 수 있다. 그러한 염은 염기성 잔기, 예를 들어, 아민의 무기 및 유기산 염, 및 산성 잔기, 예를 들어, 카르복실산의 알칼리 또는 유기 염을 포함한다. 구체적인 약제학적 염에는 산, 예를 들어, 염산, 인산, 브롬화수소산, 말산, 글리콜산, 푸마르산, 황산, 설��파산, 설��파닐산, 포름산, 톨루엔설택산, 메탄설택산, 벤젠 설택산, 에탄 디설택산, 2-하이드록시에틸설택산, 질산, 벤조산, 2-아세톡시벤조산, 시트르산, 타르타르산, 락트산, 스테아르산, 살리실산, 글루탐산, 아스코르브산, 파모산, 석신산, 푸마르산, 말레산, 프로피온산, 하이드록시말레산, 하이드로요오드산, 페닐아세트산, 알칸산, 예를 들어, 아세트산, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ (여기서, n 은 0 내지 4임) 등의 염이 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 유사하게, 약제학적으로 허용되는 양이온은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 알루미늄, 리튬 및 암모늄을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 당업자는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985)]에 열거된 것들을 포함하는 본원에 제공된 풀링된 중앙 특이적 신생항원을 위한 추가의 약제학적으로 허용되는 염을 본 명세서 및 해당 분야의 지식으로부터 알 것이다. 일반적으로, 약제학적으로 허용되는 산 또는 염기 염은 임의의 통상의 화학 방법에 의해 염기성 또는 산성 모이어티를 함유하는 모체 화합물로부터 합성될 수 있다. 약술하면, 그러한 염은 이들 화합물의 유리 산 또는 염기 형태를 적절한 용매 중에서 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0119] "폴리펩티드" 또는 "펩티드"는 천연적으로 그를 동반하는 성분으로부터 분리된 폴리펩티드를 의미한다. 전형적으로, 폴리펩티드는 그것이 천연적으로 회합되어 있는 단백질 및 천연-발생 유기 분자가 적어도 60 중량% 없는 경우 분리된 것이다. 바람직하게는, 제제는 중량 기준으로 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 99%의 폴리펩티드이다. 분리된 폴리펩티드는 예를 들어, 천연 공급원으로부터의 추출에 의해, 그러한 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 핵산의 발현에 의해; 또는 단백질을 화학적으로 합성함으로써 수득될 수 있다. 순도는 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 컬럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해, 또는 HPLC 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0120] 본원에 사용되는 용어 "예방하다", "예방하는", "예방", "예방적 처치" 등은 질병 또는 질환을 갖지 않으나, 질병 또는 질환이 발생할 위험이 있거나, 질병 또는 질환이 발생하기 쉬운 대상체에서 질병 또는 질환의 발생 가능성을 감소시키는 것을 말한다.
- [0121] 용어 "프라이밍/부스트" 또는 "프라이밍/부스트 투여 섭생법"은 백신 또는 면역원성 또는 면역학적 조성물의 연속적인 투여를 지칭하는 의미이다. 프라이밍 투여(프라이밍)는 제1 백신 또는 면역원성 또는 면역학적 조성물 유형의 투여이며, 1회, 2회 이상의 투여를 포함할 수 있다. 부스트 투여는 백신 또는 면역원성 또는 면역학적 조성물 유형의 제2 투여이며, 1회, 2회 이상의 투여를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 연간 투여를 포함하거나 본질적으로 그로 이루어질 수 있다. 특정 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 프라이밍/부스트 투여 섭생법에서 이루어진다.
- [0122] 본원에 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50으로 이루어진 군으로부터의 임의의 수, 수의 조합 또는 하위-범위, 및 상기 언급된 정수 사이에 개재되는 모든 소수의 값, 예를 들어, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 및 1.9를 포함하는 것으로 이해된다. 하위-범위에 관하여, 범위의 어느 하나의 종점으로부터 연장되는 "내재(nested) 하위-범위"가 특별히 고려된다. 예를 들어, 예시적인 범위 1 내지 50의 내재 하위-범위는 하나의 방향으로 1 내지 10, 1 내지 20, 1 내지 30 및 1 내지 40, 또는 다른 방향으로 50 내지 40, 50 내지 30, 50 내지 20 및 50 내지 10을 포함할 수 있다.
- [0123] "수용체"는 리간드에 결합할 수 있는 생물학적 분자 또는 분자 그룹핑(grouping)을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 수용체는 세포, 세포 형성 또는 유기체에서 정보를 전달하는데 기여할 수 있다. 수용체는 적어도 하나의 수용체 유닛을 포함하고, 빈번하게 2개 이상의 수용체 유닛을 포함하고, 각각의 수용체 유닛은 단백질 분자, 특히 당단백질 분자로 이루어질 수 있다. 수용체는 리간드의 구조에 상보적인 구조를 갖고 결합 파트너로서 리간

드와 함께 복합체를 형성할 수 있다. 신호전달 정보는 세포 표면 상의 리간드와의 결합 후에 수용체의 입체형태 변화에 의해 전달될 수 있다. 본 발명에 따르면, 수용체는 리간드, 특히 적합한 길이의 펩티드 또는 펩티드 단편과 함께 수용체/리간드 복합체를 형성할 수 있는 MHC 클래스 I 및 II의 특정 단백질을 말할 수 있다.

[0124] 또한, "수용체/리간드 복합체"는 "수용체/펩티드 복합체" 또는 "수용체/펩티드 단편 복합체", 특히 클래스 I 또는 클래스 II의 펩티드- 또는 펩티드 단편-제시 MHC 분자를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0125] "감소한다"는 적어도 10%, 25%, 50%, 75% 또는 100%의 음의 변경을 의미한다.

[0126] "참조"는 표준 또는 대조군 조건을 의미한다.

[0127] "참조 서열"은 서열 비교를 위한 기준으로 사용되는 정의된 서열이다. 참조 서열은 특정 서열의 서브셋 또는 전체; 예를 들어, 전장 cDNA 또는 게놈 서열의 세그먼트 또는 완전한 cDNA 또는 게놈 서열일 수 있다. 폴리펩티드에 있어서, 참조 폴리펩티드 서열의 길이는 일반적으로, 적어도 약 10 내지 2,000개 아미노산, 10 내지 1,500개, 10 내지 1,000개, 10 내지 500개 또는 10 내지 100개일 것이다. 바람직하게는 참조 폴리펩티드 서열의 길이는 적어도 약 10 내지 50개 아미노산, 더욱 바람직하게는 적어도 약 10 내지 40개 아미노산, 더더욱 바람직하게는 약 10 내지 30개 아미노산, 약 10 내지 20개 아미노산, 약 15 내지 25개 아미노산 또는 약 20개 아미노산일 수 있다. 핵산에 있어서, 참조 핵산 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 약 60개 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 적어도 약 75개 뉴클레오타이드, 더더욱 바람직하게는 약 100개 뉴클레오타이드 또는 약 300개 뉴클레오타이드, 또는 그 근처 또는 그 사이의 임의의 정수일 것이다.

[0128] "특이적으로 결합한다"란, 폴리펩티드를 인식하고 이에 결합하지만, 실질적으로 시료, 예를 들어, 생물학적 시료 중 다른 분자를 인식하고 이에 결합하지 않는 화합물 또는 항체를 의미한다.

[0129] 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 단편을 인코딩하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 그러한 핵산 분자는 내인성 핵산 서열과 100% 동일할 필요가 없지만, 전형적으로 상당한 동일성을 나타낼 것이다. 내인성 서열과 "상당한 동일성"을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 이중-가닥 핵산 분자의 적어도 하나의 가닥과 혼성화할 수 있다. "혼성화한다"란, 다양한 엄격성 조건 하에 상보적 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 본원에 기재된 유전자), 또는 그의 부분 사이에 이중-가닥 분자를 형성하기 위해 쌍을 이루는 것을 의미한다(예를 들어, 문헌[Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399]; 문헌[Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507] 참조).

[0130] 예를 들어, 엄격한 염 농도는 대개 약 750 mM NaCl 및 75 mM 시트르산삼나트륨 미만, 바람직하게는 약 500 mM NaCl 및 50 mM 시트르산삼나트륨 미만, 더욱 바람직하게는 약 250 mM NaCl 및 25 mM 시트르산삼나트륨 미만일 것이다. 저 엄격성 혼성화는 유기 용매, 예를 들어 포름아미드의 부재 하에 수득될 수 있는 한편, 고 엄격성 혼성화는 적어도 약 35%의 포름아미드, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50%의 포름아미드 존재 하에 수득될 수 있다. 엄격한 온도 조건은 대개 적어도 약 30°C, 더욱 바람직하게는 적어도 약 37°C, 가장 바람직하게는 적어도 약 42°C의 온도를 포함할 것이다. 추가의 파라미터, 예를 들어, 혼성화 시간, 세제, 예를 들어 황산도데실나트륨(SDS)의 농도, 및 캐리어 DNA의 포함 또는 배제를 변화시키는 것은 당업자에게 널리 알려져 있다. 다양한 수준의 엄격성이 이들 다양한 조건을 필요에 따라 조합함으로써 달성된다. 바람직한 실시형태에 있어서, 혼성화는 30°C에서, 750 mM NaCl, 75 mM 시트르산삼나트륨, 및 1% SDS 중에서 발생할 것이다. 더욱 바람직한 실시형태에 있어서, 혼성화는 37°C에서, 500 mM NaCl, 50 mM 시트르산삼나트륨, 1% SDS, 35% 포름아미드, 및 100 µg/ml의 변성 연어 정자 DNA(ssDNA) 중에서 발생할 것이다. 가장 바람직한 실시형태에 있어서, 혼성화는 42°C에서, 250 mM NaCl, 25 mM 시트르산삼나트륨, 1% SDS, 50% 포름아미드, 및 200 µg/ml의 ssDNA 중에서 발생할 것이다. 이들 조건의 유용한 변화는 당업자에게 쉽게 이해될 것이다.

[0131] 대부분의 응용에 있어서, 혼성화 후의 세척 단계 또한 엄격성이 달라질 것이다. 세척 엄격성 조건은 염 농도 및 온도에 의해 정의될 수 있다. 상기와 같이, 세척 엄격성은 염 농도를 감소시킴으로써 또는 온도를 상승시킴으로써 증가할 수 있다. 예를 들어, 세척 단계를 위한 엄격한 염 농도는, 바람직하게는 약 30 mM NaCl 및 3 mM 시트르산삼나트륨 미만, 가장 바람직하게는 약 15 mM NaCl 및 1.5 mM 시트르산삼나트륨 미만일 것이다. 세척 단계를 위한 엄격한 온도 조건은 대개, 적어도 약 25°C, 더욱 바람직하게는 적어도 약 42°C, 더더욱 바람직하게는 적어도 약 68°C의 온도를 포함할 것이다. 바람직한 실시형태에 있어서, 세척 단계는 25°C에서, 30 mM NaCl, 3 mM 시트르산삼나트륨, 및 0.1% SDS 중에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 실시형태에 있어서, 세척 단계는 42°C에서, 15 mM NaCl, 1.5 mM 시트르산삼나트륨, 및 0.1% SDS 중에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 실시형태에 있어서, 세척 단계는 68°C에서, 15 mM NaCl, 1.5 mM 시트르산삼나트륨, 및 0.1% SDS 중에서 일어날 것이다. 이들 조건의

추가적 변화도 당업자에게 쉽게 이해될 것이다. 혼성화 기술은 당업자에게 널리 알려져 있고, 예를 들어 문헌[Benton and Davis (Science 196:180, 1977)]; 문헌[Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975)]; 문헌[Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001)]; 문헌[Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York)]; 및 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York]에 기재되어 있다.

[0132] 용어 "대상체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 동물을 말한다. 오직 예시로서, 대상체는 인간 또는 비-인간 포유동물, 예를 들어, 비-인간 영장류, 소, 말, 개, 양 또는 고양이를 포함하나 이들에 한정되지 않는 포유동물을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

[0133] "상당히 동일한"은 참조 아미노산 서열(예를 들어, 본원에 기재된 아미노산 서열 중 임의의 것) 또는 핵산 서열(예를 들어, 본원에 기재된 핵산 서열 중 임의의 것)과 적어도 50% 동일성을 나타내는 폴리펩티드 또는 핵산 분자를 의미한다. 바람직하게는, 그러한 서열은 아미노산 또는 핵산 수준에서, 비교를 위해 사용되는 서열과 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 80% 또는 85%, 더욱 바람직하게는 90%, 95% 또는 심지어 99% 동일하다.

[0134] 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어(예를 들어, 위스콘신 생명공학 센터 대학, 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)(1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)의 서열 분석 소프트웨어 패키지, BLAST, BESTFIT, GAP 또는 PILEUP/PRETTYBOX 프로그램)를 사용하여 측정된다. 그러한 소프트웨어는 상동성의 정도를 다양한 치환, 결실 및/또는 기타 변형으로 지정함으로써 동일하거나 유사한 서열을 매치시킨다. 보존적 치환은 전형적으로 하기의 군 내의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 라이신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 동일성의 정도를 결정하기 위한 예시적인 방법에서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있으며, e^{-3} 내지 e^{-100} 의 확률 점수는 밀접하게 관련된 서열을 나타낸다.

[0135] "T-세포 에피토프"는 펩티드-제시 MHC 분자 또는 MHC 복합체의 형태로 클래스 I 또는 II의 MHC 분자에 의해 결합된 다음, 이러한 형태에서 나이브 T-세포, 세포독성 T-림프구 또는 T-헬퍼 세포에 의해 인식되고 그에 의해 결합될 수 있는 펩티드 서열을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0136] 용어 "치료한다", "치료되는", "치료하는", "치료" 등은 장애 및/또는 그와 관련된 증상(예를 들어, 신생물 또는 종양)을 감소시키거나 개선하는 것을 지칭하는 의미이다. "치료하는"은 "완화"의 개념을 포함하며, 이는 암과 관련된 임의의 증상 또는 다른 악영향 및/또는 암 치료법과 관련된 부작용의 발생 또는 재발의 빈도 또는 그의 중증도의 감소를 말한다. 또한, 용어 "치료하는"은 "관리하는"의 개념을 포함하며, 이는 환자에서 특정 질병 또는 장애의 중증도의 감소 또는 그의 재발의 지연, 예를 들어, 질병을 앓은 적이 있는 환자에서 관해의 기간의 연장을 말한다. 배제하는 것은 아니지만, 장애 또는 질환의 치료는 장애, 질환, 또는 이와 관련된 증상이 완전히 제거될 것을 요하지 않는 것이 인식된다.

[0137] "치료 효과"라는 용어는 장애(예를 들어, 신생물 또는 종양)의 증상 또는 그의 관련 병증 중 하나 이상의 어느 정도의 경감을 말한다. 본원에 사용되는 "치료적 유효량"은 세포 또는 대상체로의 단일 또는 다중 용량 투여시에, 그러한 장애를 갖는 환자의 생존력의 연장, 장애의 하나 이상의 증후 또는 증상의 감소, 예방 또는 지연 등에 있어서, 그러한 치료의 부재 하에 예상되는 것을 능가하는 효과적인 작용제의 양을 말한다. "치료적 유효량"은 치료 효과를 달성하는데 필요한 양을 정량화하는 것으로 의도된다. 당업계의 통상의 기술을 갖는 의사 또는 수의사는 필요한 약제학적 조성물의 "치료적 유효량"(예를 들어, ED50)을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 요망되는 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 것보다 더 낮은 수준으로 약제학적 조성물에 사용되는 본 발명의 화합물의 투여를 시작하고, 요망되는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증가시킬 수 있다.

[0138] 약제학적 조성물은 전형적으로 1일 체중 킬로그램당 약 0.0001 mg 내지 약 200 mg의 화합물의 투여량을 제공해야 한다. 예를 들어, 인간 환자로의 전신 투여를 위한 투여량은 0.01 내지 10 $\mu\text{g/kg}$, 20 내지 80 $\mu\text{g/kg}$, 5 내지 50 $\mu\text{g/kg}$, 75 내지 150 $\mu\text{g/kg}$, 100 내지 500 $\mu\text{g/kg}$, 250 내지 750 $\mu\text{g/kg}$, 500 내지 1000 $\mu\text{g/kg}$, 1 내지 10 mg/kg, 5 내지 50 mg/kg, 25 내지 75 mg/kg, 50 내지 100 mg/kg, 100 내지 250 mg/kg, 50 내지 100 mg/kg, 250 내지 500 mg/kg, 500 내지 750 mg/kg, 750 내지 1000 mg/kg, 1000 내지 1500 mg/kg, 1500 내지 2000 mg/kg, 5 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg 또는 200 mg/kg 범위일 수 있다. 약제학적 단위 투여 형태는 단위 투여형마다 약 0.001 mg 내지 약 5000 mg, 예를 들어, 약 100 내지 약 2500 mg의 화합물 또는 필수 성분의 조합을 제

공하도록 제조된다.

- [0139] "백신"은 질병(예를 들어, 신생물/종양)의 예방 및/또는 치료를 위해 면역성을 생성하는 조성물을 의미하는 것으로서 이해되어야 한다. 따라서, 백신은 항원을 포함하는 약제이고, 백신접종에 의해 특이적 방어 및 보호 물질을 생성하기 위해 인간 또는 동물에서 사용되는 것으로 의도된다.
- [0140] 본원에서 변수의 임의의 정의에서 화학기의 목록의 언급은 임의의 단일기 또는 열거된 기의 조합으로서의 변수의 정의를 포함한다. 본원의 변수 또는 양태에 대한 실시형태의 언급은 임의의 단일의 실시형태 또는 임의의 다른 실시형태 또는 그의 부분과의 조합으로서의 실시형태를 포함한다.
- [0141] 본원에 제공된 임의의 조성물 또는 방법은 본원에 제공된 임의의 다른 조성물 및 방법 중 하나 이상과 조합될 수 있다.
- [0142] 본 발명은 복수의 신생물/종양 특이적 신생-항원을 포함하는, 치료적 유효량의 약제학적 조성물(예를 들어, 암 백신)을 대상체(예를 들어, 포유류, 예를 들어, 인간)에게 투여함에 의한 신생물, 더욱 특별히는 종양의 치료를 위한 백신 및 방법에 관한 것이다. 본원에 더욱 상세히 기재된 바와 같이, 전체 게놈/엑솜 시퀀싱을 사용하여 개별 환자의 신생물/종양에 독특하게 존재하는 모든 또는 거의 모든 돌연변이된 신생항원을 확인할 수 있으며, 이러한 돌연변이된 신생항원의 집합을 분석하여, 환자의 신생물/종양의 치료를 위한 개인맞춤화 암 백신 또는 면역원성 조성물로 사용하기 위한 신생항원의 특정한 최적화된 서브셋을 확인할 수 있다. 예를 들어, 신생물/종양 특이적 신생항원의 집단은 각 환자의 신생물/종양 및 정상 DNA를 시퀀싱하여, 종양-특이적 돌연변이를 확인함으로써 확인될 수 있으며, 환자의 HLA 알로타입(allotype)이 확인될 수 있다. 그 다음, 신생물/종양 특이적 신생항원 및 그들의 동족 고유 항원의 집단은 어떤 종양-특이적 돌연변이가 환자의 HLA 알로타입에 결합할 수 있는 에피토프를 생성하는지를 예측하기 위한 입증된 알고리즘을 사용한 생물정보 분석으로 처리될 수 있다. 이러한 분석에 기초하여, 이들 돌연변이의 서브셋에 상응하는 복수의 펩티드를 각 환자에 대하여 설계하고 합성할 수 있으며, 환자의 면역화에서 암 백신 또는 면역원성 조성물로 사용하기 위해 함께 폴링할 수 있다. 신생-항원 펩티드는 애췌번트(예를 들어, 폴리-ICLC) 또는 또 다른 항-신생물제와 병용될 수 있다. 이론에 결부되지 않고, 이들 신생-항원은 중심 흥선 반응을 우회하는 한편(이에 따라 보다 강력한 항-종양 T 세포 반응을 가능하게 함), 자가면역성 가능성을 감소시키는 것으로 예상된다(예를 들어, 정상의 자가-항원의 표적화를 회피함으로써).
- [0143] 면역계는 2가지 기능적 하위계로 분류될 수 있다: 선천성 및 후천성 면역계. 선천성 면역계는 감염에 대한 제1선의 방어이며, 대부분의 잠재적인 병원체는 그들이 예를 들어, 뚜렷한 감염을 유발할 수 있기 전에 이러한 계에 의해 신속히 중화된다. 후천성 면역계는 항원으로 지칭되는, 침입하는 유기체의 분자 구조에 반응한다. 2가지 유형의 후천성 면역 반응이 존재하는데, 이는 체액성 면역 반응 및 세포-매개의 면역 반응을 포함한다. 체액성 면역 반응에서, B 세포에 의해 체액으로 분비되는 항체는 병원체-유래의 항원에 결합하여, 다양한 메카니즘, 예를 들어, 보체-매개의 용해를 통해 병원체의 제거를 야기한다. 세포-매개의 면역 반응에서, 다른 세포를 파괴할 수 있는 T-세포가 활성화된다. 예를 들어, 질병과 관련된 단백질이 세포에 존재한다면, 그들은 단백질 가수분해에 의해 세포 내에서 펩티드로 단편화된다. 그 다음, 특정 세포 단백질은 그들 자체가 이러한 방식으로 형성된 항원 또는 펩티드에 부착하고, 그들을 세포의 표면으로 수송하며, 여기서, 그들은 신체의 분자적 방어 메카니즘, 특히, T-세포에 제시된다. 세포독성 T 세포는 이들 항원을 인식하고, 항원을 지니는 세포를 사멸시킨다.
- [0144] 세포 표면 상에 펩티드를 수송하고, 제시하는 분자는 주 조직적합성 복합체(MHC)의 단백질로 지칭된다. MHC 단백질은 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II로 지칭되는 2가지 유형으로 분류된다. 2가지 MHC 클래스의 단백질의 구조는 매우 유사하나; 그들은 매우 상이한 기능을 갖는다. MHC 클래스 I의 단백질은 대부분의 종양 세포를 비롯하여 신체의 거의 모든 세포의 표면 상에 존재한다. MHC 클래스 I 단백질에, 보통 내인성 단백질로부터 또는 세포 내측에 존재하는 병원체로부터 기원하는 항원이 로딩된 다음, 나이브 또는 세포독성 T-림프구(CTL)에 제시된다. MHC 클래스 II 단백질은 수지상 세포, B-림프구, 대식구 및 기타 항원-제시 세포 상에 존재한다. 그들은 주로 외부의 항원 공급원, 즉, 세포의 외측으로부터 처리된 펩티드를 T-헬퍼(Th) 세포에 제시한다. MHC 클래스 I 단백질에 의해 결합되는 펩티드의 대부분은 유기체 그 자신의 건강한 숙주 세포에서 생성된 세포질 단백질로부터 기원하며, 보통 면역 반응을 자극하지 않는다. 따라서, 그러한 클래스 I의 자가-펩티드-제시 MHC 분자를 인식하는 세포독성 T-림프구는 흥선(중심 반응)에서 제거되거나, 그들이 흥선으로부터 방출된 후에 제거되거나 불활성화, 즉, 관용화된다(말초 관용). MHC 분자는 그들이 펩티드를 비-관용화 T-림프구에 제시하는 경우 면역 반응을 자극할 수 있다. 세포독성 T-림프구는 그들의 표면 상에 T-세포 수용체(TCR) 및 CD8 분자 둘 모두를 갖는

다. T-세포 수용체는 MHC 클래스 I의 분자와 복합체화된 펩티드를 인식하고 이와 결합할 수 있다. 각각의 세포 독성 T-림프구는 특유한 T-세포 수용체를 발현하는데, 이는 특정 MHC/펩티드 복합체에 결합할 수 있다.

[0145] 펩티드 항원은 그들이 세포 표면 상에 제시되기 이전에, 소포체 내에서의 경쟁적 친화성 결합에 의해 그들 자체가 MHC 클래스 I의 분자에 부착한다. 여기서, 개별 펩티드 항원의 친화성은 그의 아미노산 서열 및 아미노산 서열 내의 정의된 위치에서의 특이적 결합 모티프의 존재와 직접적으로 관련되어 있다. 그러한 펩티드의 서열이 알려져 있다면, 예를 들어, 펩티드 백신을 사용하여 질병 세포에 대하여 면역계를 조작할 수 있다.

[0146] 치유적 및 종양-특이적 면역요법을 개발하는데 결정적인 장애물 중 하나는 자가면역을 회피하기 위한 고도로 특이적이며 제한된 종양 항원을 확인하고 선택하는 것이다. 악성종양 세포 내의 유전자 변화(예를 들어, 역위, 전좌, 결실, 미스센스 돌연변이, 스플라이스 부위 돌연변이 등)의 결과로 생기는 종양 신생항원은 가장 종양-특이적인 항원의 부류를 나타낸다. 신생항원은 그들을 확인하고, 최적화된 신생항원을 선택하고, 백신 또는 면역원성 조성물에 사용하기 위하여 신생항원을 생성함에 있어서의 기술적 어려움 때문에, 암 백신 또는 면역원성 조성물에서 드물게 사용되어 왔다. 이들 문제는 다음에 의해 다루어질 수 있다:

[0147] ● 각 환자로부터의 종양 대 일치되는 생식계열 시료의 전체 게놈, 전체 엑솜(예를 들어, 오직 포착된 엑손만) 또는 RNA 시퀀싱을 사용하여 DNA 수준에서 신생물/종양 내의 모든 또는 거의 모든 돌연변이를 확인하는 것;

[0148] ● 확인된 돌연변이를 하나 이상의 펩티드-MHC 결합 예측 알고리즘을 사용하여 분석하여, 신생물/종양 내에서 발현되고, 환자 HLA 대립형질에 결합할 수 있는 복수의 후보 신생항원 T 세포 에피토프를 생성하는 것; 및

[0149] ● 암 백신 또는 면역원성 조성물에 사용하기 위하여, 모든 neoORF 펩티드 및 예측된 결합 펩티드의 세트로부터 선택되는 복수의 후보 신생항원 펩티드를 합성하는 것.

[0150] 예를 들어, 시퀀싱 정보를 치료 백신으로 전달하는 것은 다음을 포함할 수 있다:

[0151] (1) **개체의 HLA 분자에 결합할 수 있는 개인의 돌연변이된 펩티드의 예측.** 어떤 특정 돌연변이가 면역원으로 사용될 지를 효율적으로 선택하는 것은 환자 HLA 유형의 확인, 및 어떤 돌연변이된 펩티드가 환자의 HLA 대립형질에 효율적으로 결합할 지를 예측하는 능력을 필요로 한다. 최근에, 입증된 결합 및 비-결합 펩티드를 사용한 신경망 기반의 학습 접근법에 의해, 주요 HLA-A 및 -B 대립형질에 대한 예측 알고리즘의 정확성이 진전되었다.

[0152] (2) **긴 펩티드의 다중-에피토프 백신으로서 약물의 제형화.** 실제로 가능한 많은 돌연변이된 에피토프를 표적화하는 것은 면역계의 막대한 능력을 이용하며, 특정 면역 표적화된 유전자 산물의 하향-조절에 의해 면역학적 회피 기회를 방지하고, 알려져 있는 에피토프 예측 방법의 부정확성을 보완한다. 합성 펩티드는 다중의 면역원을 효율적으로 제조하고, 돌연변이 에피토프의 확인을 효율적인 백신으로 신속하게 전달하기에 특히 유용한 수단을 제공한다. 펩티드는 오염 박테리아 또는 동물 물질이 없는 시약을 사용하여 화학적으로 손쉽게 합성되고 용이하게 정제될 수 있다. 작은 크기는 단백질의 돌연변이된 영역에 대한 분명한 집중을 가능하게 하고, 또한 다른 성분(비돌연변이된 단백질 또는 바이러스 벡터 항원)과의 관련없는 항원 경쟁을 감소시킨다.

[0153] (3) **강력한 백신 애쥬번트와의 병용.** 효율적인 백신은 면역 반응을 개시하기 위하여 강력한 애쥬번트를 필요로 한다. 하기 기재된 바와 같이, 폴리-ICLC, TLR3의 효능제 및 RNA 헬리카제(helicase) - MDA5 및 RIG3의 도메인은 백신 애쥬번트에 바람직한 몇몇 특성을 나타내었다. 이들 특성은 생체내에서의 면역 세포의 국소 및 전신 활성화의 유도, 자극성 케모카인 및 사이토카인의 생성 및 DC에 의한 항원-제시의 자극을 포함한다. 추가로, 폴리-ICLC는 인간에서 지속적인 CD4+ 및 CD8+ 반응을 유도할 수 있다. 중요한 것은 폴리-ICLC로 백신접종된 대상체에서, 그리고 매우 효율적인 복제-가능(replication-competent) 황열 백신을 제공받은 자원자에서 전사 및 신호 전달 경로의 상향조절에서 두드러진 유사성이 관찰되었다는 점이다. 추가로, 최근 단계 1 연구에서, NY-ESO-1 펩티드 백신(몬타나이드에 더하여)과 병용하여 폴리-ICLC로 면역화된 난소 암종 환자의 90% 초과에서, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 유도 및 펩티드에 대한 항체 반응이 나타났다. 동시에, 폴리-ICLC를 현재까지 25가지 초과의 임상 시험에서 광범위하게 시험하였으며, 비교적 양성의 독성 프로파일을 나타내었다. 본 발명의 이점은 본원에 추가로 기재된다.

[0154] 본원에 기재된 바와 같이, 동물 및 인간 둘 모두에서, 돌연변이된 에피토프가 면역 반응의 유도에 효율적이며, 자발적 종양 퇴행 또는 장기간 생존의 경우가 돌연변이된 에피토프에 대한 CD8+ T-세포 반응과 상호관련이 있으며(문헌[Buckwalter and Srivastava PK. "It is the antigen(s), stupid" and other lessons from over a decade of vaccitherapy of human cancer. Seminars in immunology 20:296-300 (2008)]; 문헌[Karanikas et al, High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. Cancer Res.

61:3718-3724 (2001)]; 문헌[Lennerz et al, The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neo-antigens. Proc Natl Acad Sci U S A.102:16013 (2005)], "면역편집"이 마우스 및 인간에서 돌연변이된 우성 항원의 발현의 변경까지 추적될 수 있다는 대규모의 증거가 있다(문헌[Matsushita et al, Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting Nature 482:400 (2012)]; 문헌[DuPage et al, Expression of tumor-specific antigens underlies cancer immunoediting Nature 482:405 (2012)]; 및 문헌[Sampson et al, Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma J Clin Oncol. 28:4722-4729 (2010)]). 일 실시형태에 있어서, 암 환자의 돌연변이된 에피토프가 결정된다.

[0155] 일 실시형태에 있어서, 돌연변이된 에피토프는 차세대 시퀀싱 기술을 사용한 암 환자로부터의 건강한 조직 및 종양 조직의 게놈 및/또는 엑솜의 시퀀싱에 의해 결정된다. 또 다른 실시형태에 있어서, 그들의 돌연변이 빈도 및 신생항원으로 작용하는 능력에 기초하여 선택되는 유전자를 차세대 시퀀싱 기술을 사용하여 시퀀싱한다. 차세대 시퀀싱을 게놈 시퀀싱, 게놈 리시퀀싱, 전사체 프로파일링(RNA-Seq), DNA-단백질 상호작용(ChIP-시퀀싱) 및 에피게놈 특성화에 적용한다(문헌[de Magalhaes JP, Finch CE, Janssens G (2010). "Next-generation sequencing in aging research: emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions". Ageing Research Reviews 9 (3): 315-323]; 문헌[Hall N (May 2007). "Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology". J. Exp. Biol. 209 (Pt 9): 1518-1525]; 문헌[Church GM (January 2006). "Genomes for all". Sci. Am. 294 (1): 46-54]; 문헌[ten Bosch JR, Grody WW (2008). "Keeping Up with the Next Generation". The Journal of Molecular Diagnostics 10 (6): 484-492]; 문헌[Tucker T, Marra M, Friedman JM (2009). "Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine". The American Journal of Human Genetics 85 (2): 142-154]). 차세대 시퀀싱에 의해, 이제 별개의 돌연변이, 예를 들어, 개별 종양 내의 코딩 돌연변이, 가장 흔하게 단일의 아미노산 변화(예를 들어, 미스센스 돌연변이) 및 덜 빈번하게 프레임-쉬프트 삽입/결실/유전자 융합, 정지 코돈 내의 리드-쓰루 돌연변이 및 부적절하게 스플라이싱된 인트론의 번역에 의해 생성되는 신규한 스트레치의 아미노산(예를 들어, neoORF)의 존재를 신속하게 나타낼 수 있다. neoORF는 그들의 서열의 전체가 면역계에 대하여 완전히 신규하고, 바이러스 또는 박테리아 외래 항원과 유사하기 때문에, 특히 면역원으로서 가치가 있다. 따라서, neoORF는 (1) 종양에 매우 특이적이며(즉, 임의의 정상 세포에서 발현이 존재하지 않음); (2) 중심 관용을 우회하여, 그에 의해, 신생항원-특이적 CTL의 전구체 빈도를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 치료적 항암 백신 또는 면역원성 조성물에서 유사한 외래 서열을 사용하는 능력은 인간 파필로마 바이러스(HPV)로부터 유래된 펩티드를 사용하여 최근에 입증되었다. 바이러스 암유전자 E6 및 E7로부터 유래된 HPV 펩티드의 믹스의 3 내지 4회의 백신접종을 제공받은 예비-신생물, 바이러스-유도 질병이 있는 19명의 환자의 약 50%는 24개월 이상 동안 완전한 반응을 유지하였다(문헌[Kenter et al, Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia NEJM 361:1838 (2009)]).

[0156] 시퀀싱 기술에 의해, 각 종양이 유전자의 단백질 코딩 내용을 변경시키는 다중의 환자-특이적인 돌연변이를 함유하는 것으로 드러났다. 그러한 돌연변이는 변경된 단백질을 생성하며, 이는 단일의 아미노산 변화(미스센스 돌연변이에 의해 야기)에서, 프레임 쉬프트, 종결 코돈의 리드-쓰루 또는 인트론 영역의 번역(신규한 오픈 리딩 프레임 돌연변이; neoORF)으로 인한 긴 영역의 신규한 아미노산 서열의 부가까지의 범위이다. 이들 돌연변이된 단백질은 고유 단백질과 달리, 그들이 자기-관용의 면역-약화 영향을 겪지 않기 때문에, 종양에 대한 숙주의 면역 반응에 대한 가치있는 표적이다. 따라서, 돌연변이된 단백질은 면역원성일 가능성이 더 크며, 또한, 환자의 정상 세포에 비하여 종양 세포에 대하여 더욱 특이적이다.

[0157] 종양 특이적 신생항원을 확인하기 위한 대안적인 방법은 직접적인 단백질 시퀀싱이다. 이중질량분석법(MS/MS)을 포함하는 다차원 MS 기술(MSn)을 사용한 효소에 의한 분해의 단백질 시퀀싱도 또한 사용하여 본 발명의 신생항원을 확인할 수 있다. 그러한 프로테وم 접근법은 신속하고 고도로 자동화된 분석을 가능하게 한다(예를 들어, 문헌[K. Gevaert and J. Vandekerckhove, Electrophoresis 21:1145-1154 (2000)] 참조). 본 발명의 범주 내에서, 미지의 단백질의 드노보(de novo) 시퀀싱을 위한 고효율 방법을 사용하여 환자의 종양의 프로테오믹스를 분석하여, 발현된 신생항원을 확인할 수 있음이 추가로 고려된다. 예를 들어, 메타 샷건 단백질 시퀀싱을 사용하여, 발현된 신생항원을 확인할 수 있다(예를 들어, 문헌[Guthals et al. (2012) Shotgun Protein Sequencing with Meta-contig Assembly, Molecular and Cellular Proteomics 11(10):1084-96] 참조).

[0158] 또한, 종양 특이적 신생항원을 MHC 멀티머를 사용하여 확인하여, 신생항원-특이적 T-세포 반응을 확인할 수 있다. 예를 들어, 환자 시료에서 신생항원-특이적 T-세포 반응의 고효율 분석을 MHC 테트라머-기반의 스크리닝 기

술을 사용하여 수행할 수 있다(예를 들어, 문헌[Hombrink et al. (2011) High-Throughput Identification of Potential Minor Histocompatibility Antigens by MHC Tetramer-Based Screening: Feasibility and Limitations 6(8):1-11]; 문헌[Hadrup et al. (2009) Parallel detection of antigen-specific T-cell responses by multidimensional encoding of MHC multimers, Nature Methods, 6(7):520-26]; 문헌[van Rooij et al. (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an Ipilimumab-responsive melanoma, Journal of Clinical Oncology, 31:1-4]; 및 문헌[Heemskerk et al. (2013) The cancer antigenome, EMBO Journal, 32(2):194-203] 참조). 그러한 테트라머-기반의 스크리닝 기술을 종양 특이적 신생항원의 초기 확인을 위해 또는 대안적으로 환자가 이미 노출되어 있는 신생항원이 무엇인지를 평가하기 위한 2차 스크리닝 프로토콜로서 사용하여, 그에 의해, 본 발명을 위한 후보 신생항원의 선택을 용이하게 할 수 있다.

[0159] 일 실시형태에 있어서, 암 환자에서의 돌연변이의 존재의 결정으로부터 유래되는 시퀀싱 데이터를 분석하여, 개인의 HLA 분자에 결합할 수 있는 개인의 돌연변이된 펩티드를 예측한다. 일 실시형태에 있어서, 데이터를 컴퓨터를 사용하여 분석한다. 또 다른 실시형태에 있어서, 서열 데이터를 신생항원의 존재에 대하여 분석한다. 일 실시형태에 있어서, 신생항원을 MHC 분자에 대한 그들의 친화성에 의해 결정한다. 어떤 특정 돌연변이가 면역원으로 사용될 지를 효율적으로 선택하는 것은 환자 HLA 유형의 확인, 및 어떤 돌연변이된 펩티드가 환자의 HLA 대립형질에 효율적으로 결합할 지를 예측하는 능력을 필요로 한다. 최근에, 입증된 결합 및 비-결합 펩티드를 사용한 신경망 기반의 학습 접근법에 의해, 주요 HLA-A 및 -B 대립형질에 대한 예측 알고리즘의 정확성이 진전되었다. 어떤 미스센스 돌연변이가 환자의 동족 MHC 분자에 대하여 강력한 결합 펩티드를 생성하는지 예측하기 위하여 최근에 개선된 알고리즘을 사용하여, 각 환자에 대한 최적으로 돌연변이된 에피토프(neoORF 및 미스센스 둘 모두)의 대표적인 펩티드의 세트를 확인하고 우선순위를 정할 수 있다(문헌[Zhang et al, Machine learning competition in immunology - Prediction of HLA class I binding peptides J Immunol Methods 374: 1 (2011)]; 문헌[Lundegaard et al Prediction of epitopes using neural network based methods J Immunol Methods 374:26 (2011)]).

[0160] 실제로 가능한 많은 돌연변이된 에피토프를 표적화하는 것은 면역계의 막대한 능력을 이용하며, 특정 면역 표적화된 유전자 산물의 하향-조절에 의해 면역학적 회피 기회를 방지하고, 알려져 있는 에피토프 예측 방법의 부정확성을 보완한다. 합성 펩티드는 다중의 면역원을 효율적으로 제조하고, 돌연변이 에피토프의 확인을 효율적인 백신 또는 면역원성 조성물로 신속하게 전달하기에 특히 유용한 수단을 제공한다. 펩티드는 오염 박테리아 또는 동물 물질이 없는 시약을 사용하여 화학적으로 손쉽게 합성되고 용이하게 정제될 수 있다. 작은 크기는 단 백질의 돌연변이된 영역에 대한 분명한 집중을 가능하게 하고, 또한 다른 성분(비돌연변이된 단백질 또는 바이러스 벡터 항원)과의 관련없는 항원 경쟁을 감소시킨다.

[0161] 일 실시형태에 있어서, 약물 제형은 긴 펩티드의 다중-에피토프 백신 또는 면역원성 조성물이다. 그러한 "긴" 펩티드는 전문 항원-제시 세포, 예를 들어, 수지상 세포에서 효율적인 내재화, 가공 및 교차-제시를 겪으며, 인간에서 CTL을 유도하는 것으로 보인다(문헌[Melief and van der Burg, Immunotherapy of established (pre) malignant disease by synthetic long peptide vaccines Nature Rev Cancer 8:351 (2008)]). 일 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 펩티드를 면역화를 위해 제조한다. 바람직한 실시형태에 있어서, 20가지 이상의 펩티드를 면역화를 위해 제조한다. 일 실시형태에 있어서, 신생항원 펩티드는 약 5 내지 약 50개의 아미노산 길이의 범위이다. 또 다른 실시형태에 있어서, 약 15 내지 약 35개의 아미노산 길이의 펩티드가 합성된다. 바람직한 실시형태에 있어서, 신생항원 펩티드는 약 20 내지 약 35개의 아미노산 길이의 범위이다.

[0162] 종양 특이적 신생항원의 생성

[0163] 본 발명은 적어도 부분적으로 환자의 면역계에 종양 특이적 신생항원의 풀을 제시하는 능력에 기초한다. 당업자는 본 명세서 및 해당 분야의 지식으로부터 그러한 종양 특이적 신생항원을 생성하기 위한 다양한 방식이 존재함을 알 것이다. 일반적으로, 그러한 종양 특이적 신생항원은 시험관내 또는 생체내에서 생성될 수 있다. 종양 특이적 신생항원은 펩티드 또는 폴리펩티드로서 시험관내에서 생성될 수 있으며, 이는 이어서 개인맞춤화 신생물 백신 또는 면역원성 조성물로 제형화되고, 대상체에게 투여될 수 있다. 하기에 추가로 상세히 기재된 바와 같이, 그러한 시험관내 생성은 당업자에게 알려져 있는 다양한 방법, 예를 들어, 펩티드 합성, 또는 다양한 박테리아, 진핵 또는 바이러스 재조합 발현 시스템 중 임의의 것에서의 DNA 또는 RNA 분자로부터의 펩티드/폴리펩티드의 발현에 이어서 발현된 펩티드/폴리펩티드의 정제에 의해 발생할 수 있다. 대안적으로, 종양 특이적 신생항원은 종양 특이적 신생항원을 인코딩하는 분자(예를 들어, DNA, RNA, 바이러스 발현 시스템 등)를 대상체 내로 도입하여, 인코딩된 종양 특이적 신생항원이 발현됨으로써 생체내에서 생성될 수 있다. 또한, 신생항원의 시험관내 및 생체내 생성 방법은 그것이 약제학적 조성물 및 전달 방법에 관한 것이므로, 본원에 추가로

기재된다.

[0164] **수용액에서 가용성인 펩티드의 선택**

[0165] 본원에 개시된 방법은 적어도 부분적으로 수용액에서 가용성인 펩티드의 선택 능력에 기반한다. 펩티드의 가용성은 실험적으로 결정될 수 있다. 수용액에서의 펩티드의 가용성은 또한 각각의 펩티드의 아미노산 서열에 기반하여 결정될 수도 있다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드의 가용성은 펩티드의 소수성 및 등전점(Pi)에 관한 2가지의 계산 가능한 파라미터를 사용하여 결정된다. 등전점 및 소수성은 숙련자에게 알려져 있는 방법 중 임의의 것, 예를 들어, 실시예 14에 기재된 방법을 사용하여 추정될 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 펩티드의 소수성은 연속 소수성 아미노산으로 이루어진 펩티드 내의 영역을 확인하고, 연속 소수성 아미노산의 각각의 영역의 소수성의 정도에 대한 지수를 계산하고, 가장 높은 소수성의 정도를 갖는 영역을 확인함으로써 추정된다. 이러한 파라미터는 HYDRO로 표기될 수 있다. 이러한 계산은 각각의 아미노산 측쇄에 대한 공개된 소수성(또는 친수성)의 값을 사용하고, 펩티드 내의 소수성 아미노산의 비단속 스트레치를 확인하고, 각각의 영역 내의 각각의 아미노산의 소수성을 합산함으로써 용이하게 달성될 수 있다. 펩티드의 소수성을 추정하기 위한 일 예는 실시예 14에 기재되어 있다.

[0166] 일 실시형태에 있어서, 본원에 기재된 가용성 펩티드의 선택 방법은 펩티드의 Pi 및 HYDRO 값을 결정하는 단계 및 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 및 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우에 펩티드를 선택하는 단계를 포함한다.

[0167] 일 실시형태에 있어서, 본원에 기재된 수용액에서의 펩티드의 가용성의 평가 방법은 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계로서, 펩티드는 그의 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 및 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우에 수용액에서 가용성인 단계를 포함한다.

[0168] 일 실시형태에 있어서, 본원에 기재된 펩티드 수용액의 제조 방법은 적어도 하나의 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계, 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 및 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한되는 경우에 펩티드를 선택하는 단계 및 펩티드를 포함하는 수용액을 제조하는 단계를 포함한다.

[0169] 일 실시형태에 있어서, 본원에 기재된 신생-항원 펩티드 수용액의 제조 방법은 적어도 하나의 신생-항원 펩티드의 등전점(Pi) 및 소수성(HYDRO)을 결정하는 단계, 그의 Pi 및 HYDRO가 5 이상의 Pi 및 -6.0 이상의 HYDRO, 8 이상의 Pi 및 -8.0 이상의 HYDRO, 5 이하의 Pi 및 -5 이상의 HYDRO, 및 9 이상의 Pi 및 -8.0 이하의 HYDRO에 의해 제한된다면, 적어도 하나의 신생-항원 펩티드를 선택하는 단계, 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액을 제조하는 단계 및 적어도 하나의 신생-항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액을 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 용액과 조합하여, 그에 의해, 신생물 백신을 위한 펩티드 용액을 제조하는 단계를 포함한다.

[0170] **시험관내 펩티드/폴리펩티드 합성**

[0171] 단백질 또는 펩티드는 표준 분자생물학적 기술을 통한 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 발현, 천연 공급원으로부터의 단백질 또는 펩티드의 단리, 단백질 또는 펩티드의 시험관내 번역 또는 화학적 합성을 포함하는, 당업자에게 공지되어 있는 임의의 기술에 의해 제조될 수 있다. 다양한 유전자에 상응하는 뉴클레오타이드 및 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 서열은 이미 개시되어 있고 당업자에게 공지되어 있는 전산화된 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 그러한 데이터베이스 중 하나는 미국 국립보건원의 웹사이트에 위치하는 미국 국립생물공학정보센터 유전자은행(National Center for Biotechnology Information's Genbank) 및 진펩트(GenPept) 데이터베이스이다. 알려져 있는 유전자에 대한 코딩 영역은 본원에 개시된 기술을 이용함으로써 또는 당업자에게 공지되어 있을 바와 같이 증폭 및/또는 발현될 수 있다. 대안적으로, 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드의 다양한 상업적 제제가 당업자에게 공지되어 있다.

[0172] 펩티드는 오염 박테리아 또는 동물 물질이 없는 시약을 사용하여 화학적으로 용이하게 합성될 수 있다(문헌 [Merrifield RB: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85:2149-54, 1963]). 특정 실시형태에 있어서, 신생항원 펩티드는 (1) 균일한 합성 및 절단 조건을 사용한 멀티-채널 기기에서의 병행 고체상 합성; (2) 컬럼 스트리핑과 함께 RP-HPLC 컬럼에서의 정제; 및 펩티드 간의 대체가 아닌 재세척; 이후의 (3) 제한된 세트의 가장 유익한 검정을 사용한 분석에 의해 제조된다. 우수 제조 관리

기준(GMP) 풋프린트(footprint)는 개별 환자에 대한 펩티드의 세트에 관하여 정의될 수 있으며, 이에 따라 상이한 환자에 대한 펩티드의 합성 간에 모음 전환 절차만을 필요로 한다.

- [0173] 대안적으로, 본 발명의 신생항원 펩티드를 인코딩하는 핵산(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드)을 사용하여 시험관내에서 신생항원 펩티드를 생성할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 단일- 및/또는 이중-가닥의 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA, 또는 고유 또는 안정화 형태의 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 포스포로티오에이트 백본이 있는 폴리뉴클레오타이드 또는 그들의 조합일 수 있으며, 그것이 펩티드를 코딩하는 한 인트론을 함유하거나 그를 함유하지 않을 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 시험관내 번역을 사용하여 펩티드를 생성한다. 당업자가 사용할 수 있는 많은 예시적인 시스템이 존재한다(예를 들어, Retic Lysate IVT 키트, 라이프 테크놀로지즈(Life Technologies)(Waltham, MA)).
- [0174] 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터도 또한 제조될 수 있다. 상이한 세포 유형에 대한 발현 벡터가 당업계에 널리 알려져 있고 과도한 실험 없이 선택될 수 있다. 일반적으로, DNA는 발현을 위해 적절한 배향 및 정확한 리딩 프레임으로 발현 벡터, 예컨대, 플라스미드 내로 삽입된다. 필요한 경우, DNA는 요망되는 숙주(예를 들어, 박테리아)에 의해 인식되는 적절한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오타이드 서열에 연결될 수 있지만, 그러한 제어는 일반적으로 발현 벡터에서 이용 가능하다. 그 다음, 벡터는 표준 기술을 사용하여 클로닝을 위한 숙주 박테리아 내로 도입된다(예를 들면, 문헌[Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.] 참조).
- [0175] 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포도 또한 고려된다. 신생항원 펩티드는 요망되는 신생항원 펩티드를 인코딩하는 RNA 또는 cDNA 분자의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 신생항원 펩티드는 단일의 발현 벡터에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0176] "폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드"라는 용어는 오직 폴리펩티드에 대한 코딩 서열만을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 및 추가의 코딩 및/또는 비-코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 RNA의 형태 또는 DNA의 형태로 존재할 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하며; 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있고, 단일 가닥이면, 코딩 가닥 또는 비-코딩(안티-센스) 가닥일 수 있다.
- [0177] 실시형태들에 있어서, 폴리뉴클레오타이드는 동일한 리딩 프레임에서, 예를 들어 숙주 세포로부터의 폴리펩티드의 발현 및/또는 분비를 돕는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 세포로부터의 폴리펩티드의 수송을 제어하는 분비 서열로서 기능하는 리더 서열)에 융합된 종양 특이적 신생항원 펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 리더 서열을 갖는 폴리펩티드는 프레단백질(preprotein)이며, 숙주 세포에 의해 절단되는 리더 서열을 가져, 성숙 형태의 폴리펩티드를 형성할 수 있다.
- [0178] 실시형태들에 있어서, 폴리뉴클레오타이드는 동일한 리딩 프레임에서, 예를 들어, 이어서 개인맞춤화 신생물 백신 또는 면역원성 조성물로 혼입될 수 있는 인코딩된 폴리펩티드의 정제를 가능하게 하는 마커 서열에 융합된 종양 특이적 신생항원 펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 마커 서열은 박테리아 숙주의 경우에 마커에 융합된 성숙 폴리펩티드의 정제를 제공하기 위해 pQE-9 벡터에 의해 공급된 헥사-히스티딘 태그일 수 있거나, 또는 마커 서열은 포유동물 숙주(예를 들어, COS-7 세포)를 사용하는 경우에 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 헤마글루티닌(HA) 태그일 수 있다. 추가의 태그는 칼모듈린(Calmodulin) 태그, FLAG 태그, Myc 태그, S 태그, SBP 태그, 소프태그(Softag) 1, 소프태그 3, V5 태그, 엑스프레스(Xpress) 태그, 아이소펩 태그(Isopeptag), 스파이태그(SpyTag), 비오틴 카르복실 운반 단백질(BCCP) 태그, GST 태그, 형광 단백질 태그(예를 들어, 녹색 형광 단백질 태그), 말토스 결합 단백질 태그, 누스(Nus) 태그, 스트렙(Strep)-태그, 티오레독신 태그, TC 태그, Ty 태그 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0179] 실시형태들에 있어서, 폴리뉴클레오타이드는 동일한 리딩 프레임에서 융합된 종양 특이적 신생항원 펩티드 중 하나 이상에 대한 코딩 서열을 포함하여, 다중의 신생항원 펩티드를 생성할 수 있는 단일의 연쇄체화된(concatamerized) 신생항원 펩티드 작제물을 생성할 수 있다.
- [0180] 특정 실시형태들에 있어서, 본 발명의 종양 특이적 신생항원 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오타이드와 적어도 60% 동일한, 적어도 65% 동일한, 적어도 70% 동일한, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한 또는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단리된 핵산 분자가 제공될 수 있다.
- [0181] 참조 뉴클레오타이드 서열과 적어도 예를 들어, 95% "동일한" 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 뉴클레오타이드 서열의 각각의 100개 뉴클레오타이드마다 최대 5개의 점 돌연변이를 포함

할 수 있는 것을 제외하고, 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열이 참조 서열과 동일한 것으로 의도된다. 다시 말하면, 참조 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 수득하기 위하여, 참조 서열의 뉴클레오타이드의 최대 5%가 결실되거나 다른 뉴클레오타이드로 치환될 수 있거나, 참조 뉴클레오타이드 내의 총 뉴클레오타이드의 최대 5%의 뉴클레오타이드 개수가 참조 서열 내로 삽입될 수 있다. 이들 참조 서열의 돌연변이는 참조 뉴클레오타이드 서열의 아미노- 또는 카르복시-말단 위치, 또는 그들 말단 위치 사이의 임의의 곳에, 참조 서열 내의 뉴클레오타이드 중에 개별적으로 또는 참조 서열 내 하나 이상의 연속 그룹에 산재되어 일어날 수 있다.

[0182] 실제적인 문제로서, 임의의 특정 핵산 분자가 참조 서열에 대하여 적어도 80% 동일한지, 적어도 85% 동일한지, 적어도 90% 동일한지, 일부 실시형태에 있어서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한지 여부는 알려져 있는 컴퓨터 프로그램, 예를 들어, 베스트핏(Bestfit) 프로그램(위스콘신 서열 분석 패키지, 유닉스(Unix)용 버전 8, 제네텍스 컴퓨터 그룹(University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711))을 사용하여 관례적으로 결정할 수 있다. 베스트핏은 문헌[Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘을 이용하여 두 서열 간의 최적의 상동성 세그먼트를 찾는다. 특정 서열이 예를 들어 본 발명에 따른 참조 서열과 95% 동일한지 여부를 결정하기 위해서 베스트핏 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 사용하는 경우, 파라미터는, 동일성 백분율이 참조 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 계산되고 참조 서열 내 뉴클레오타이드의 총 개수의 최대 5%의 상동성의 값이 허용되도록 설정된다.

[0183] 본원에 기재된 단리된 종양 특이적 신생항원 펩티드는 당업계에 알려져 있는 임의의 적합한 방법에 의해 시험관 내(예를 들어, 실험실 내)에서 생성될 수 있다. 그러한 방법은 직접적인 단백질 합성 방법에서부터 단리된 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 DNA 서열을 작제하고 그들 서열을 적합한 형질전환된 숙주에서 발현시키는 것까지 다양하다. 일부 실시형태에 있어서, 재조합 기술을 이용하여 관심 야생형 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 단리하거나 합성하여 DNA 서열을 작제한다. 선택적으로, 서열은 위치-특이적 돌연변이유발에 의해 돌연변이유발되어, 그의 기능적 유사체를 제공할 수 있다. 예를 들어 문헌[Zoeller et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81:5662-5066 (1984)] 및 미국 특허 제4,588,585호를 참조한다.

[0184] 실시형태들에 있어서, 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기를 이용하여 화학적 합성에 의해 작제될 것이다. 그러한 올리고뉴클레오타이드는 요망되는 폴리펩티드의 아미노산 서열과, 관심 재조합 폴리펩티드가 생성되는 숙주 세포에서 선호되는 코돈의 선택에 기초하여 설계될 수 있다. 단리된 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 서열을 합성하기 위해서 표준 방법을 적용할 수 있다. 예를 들어, 완전한 아미노산 서열을 사용하여 역번역된 유전자를 작제할 수 있다. 추가로, 특정 단리된 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 DNA 올리고머를 합성할 수 있다. 예를 들어, 요망되는 폴리펩티드의 부분을 코딩하는 몇몇의 작은 올리고뉴클레오타이드를 합성한 다음 라이게이션시킬 수 있다. 개별 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 상보적 조립을 위한 5' 또는 3' 오버행(overhang)을 함유한다.

[0185] 일단 (합성, 위치-지정 돌연변이유발 또는 다른 방법에 의해) 조립되면, 관심있는 특정 단리된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 발현 벡터에 삽입되고, 선택적으로 요망되는 숙주에서의 단백질의 발현에 적절한 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다. 적절한 조립은, 뉴클레오타이드 시퀀싱, 제한 맵핑 및 적합한 숙주에서의 생물학적 활성 폴리펩티드의 발현에 의해 확인될 수 있다. 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 숙주에서 트랜스펙션된 유전자의 높은 발현 수준을 수득하기 위하여, 유전자를 선택된 발현 숙주에서 기능성인 전사 및 번역 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결할 수 있다.

[0186] 재조합 발현 벡터를 사용하여 종양 특이적 신생항원 펩티드를 인코딩하는 DNA를 증폭 및 발현시킬 수 있다. 재조합 발현 벡터는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 종양 특이적 신생항원 펩티드 또는 생물학적 등가 유사체를 인코딩하는 합성 또는 cDNA-유래 DNA 단편을 갖는 복제 가능한 DNA 작제물이다. 전사 단위는 일반적으로 본원에 상세히 기재되는 바와 같이, (1) 유전자 발현에서 조절 역할을 갖는 유전자 요소 또는 요소들, 예를 들어 전사 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조적 또는 코딩 서열, 및 (3) 적절한 전사 및 번역 개시 및 종결 서열의 조립을 포함한다. 그러한 조절 요소에는 전사를 제어하는 오퍼레이터 서열이 포함될 수 있다. 보통 복제 원점에 의해 수여되는 숙주에서의 복제 능력, 및 형질전환체의 인식을 용이하게 하기 위한 선택 유전자가 추가로 혼입될 수 있다. DNA 영역은 그들이 서로에 대해 기능적으로 관련되는 경우, 작동 가능하게 연결된 것이다. 예를 들어, 신호 펩티드에 대한 DNA(분비 리더)가 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전구체로 발현되는 경우 그것은 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동 가능하게 연결된 것이거나; 프로모터가 서열의 전사를 제어하는 경우, 프로모터는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 것이거나; 또는 리보솜 결합 부위가 번역이 이루어지도록 위치된 경우,

리보솜 결합 부위가 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, 작동 가능한 연결은 인접한 것을 의미하며, 분비 리더의 경우, 이는 리딩 프레임 내에서 인접한 것을 의미한다. 효모 발현 시스템에서 사용하도록 의도된 구조적 요소에는 숙주 세포에 의한 번역된 단백질의 세포외 분비를 가능하게 하는 리더 서열이 포함된다. 대안적으로, 재조합 단백질이 리더 또는 수송 서열 없이 발현되는 경우, 그것은 N-말단 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 이 잔기는 선택적으로 이후에 발현되는 재조합 단백질로부터 절단되어 최종 산물을 제공할 수 있다.

[0187] 진핵 숙주, 특히 포유동물 또는 인간을 위한 유용한 발현 벡터로는, 예를 들어, SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 거대세포바이러스 유래의 발현 제어 서열을 포함하는 벡터가 포함된다. 박테리아 숙주용으로 유용한 발현 벡터로는, 알려져 있는 박테리아 플라스미드, 예컨대, pCR1, pBR322, pMB9 및 그들의 유도체를 비롯한 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 유래의 플라스미드, 보다 넓은 숙주 범위의 플라스미드, 예컨대 M13 및 섬유상 단일-가닥 DNA 파지가 포함된다.

[0188] 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포로는 적절한 프로모터의 조절하의 원핵생물, 효모, 곤충 또는 보다 고등한 진핵 세포가 포함된다. 원핵생물로는, 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 에스케리키아 콜라이 또는 바실러스(*bacilli*)가 포함된다. 보다 고등한 진핵 세포로는 포유동물 기원의 확립된 세포주가 포함된다. 또한, 무세포 번역 시스템이 이용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모, 및 포유동물 세포 숙주에서 사용하기에 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 당업계에 널리 알려져 있다(문헌[Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985] 참조).

[0189] 또한, 다양한 포유동물 또는 곤충 세포 배양 시스템이 재조합 단백질의 발현에 유리하게 이용된다. 포유동물 세포에서의 재조합 단백질의 발현이 수행될 수 있는데, 그 이유는, 그러한 단백질이 일반적으로 올바르게 폴딩되고, 적절히 변형되고, 완전히 기능성이기 때문이다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예로는, 문헌[Gluzman (*Cell* 23:175, 1981)]에 기재된 COS-7 계통의 원숭이 신장 세포 및, 예를 들어, L 세포, C127, 3T3, 중국 햄스터 난소(CHO), 293, HeLa 및 BHK 세포주를 비롯한, 적절한 벡터를 발현시킬 수 있는 기타 세포주가 포함된다. 포유동물 발현 벡터는 발현시킬 유전자에 연결된 비-전사 요소, 예컨대 복제 원점, 적합한 프로모터 및 인핸서, 및 기타 5' 또는 3' 플랜킹 비-전사 서열, 및 5' 또는 3' 비-번역 서열, 예컨대 필수적인 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여자 및 수용자 부위, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서 이종 단백질을 생성하기 위한 배큘로바이러스 시스템은 문헌[Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988)]에 개관되어 있다.

[0190] 형질전환된 숙주에 의해 생성된 단백질을 임의의 적합한 방법에 따라 정제할 수 있다. 그러한 표준 방법에는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도 및 사이징(*sizing*) 컬럼 크로마토그래피 등), 원심분리, 차별적 용해도, 또는 단백질 정제에 대한 임의의 다른 표준 기술이 포함된다. 친화성 태그, 예컨대 헥사히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 코트(*coat*) 서열 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제 등을 단백질에 부착하여, 적절한 친화성 컬럼을 통과시킴으로써 정제를 용이하게 할 수도 있다. 단리된 단백질은 또한 단백질분해, 핵 자기 공명 및 x-선 결정학과 같은 기술을 이용하여 물리적으로 특성화될 수도 있다.

[0191] 예를 들어, 배양 배지 내로 재조합 단백질을 분비하는 시스템 유래의 상층액을 먼저 상업적으로 입수 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어(Millipore) 펠리콘(Pellicon) 한외여과 유닛을 이용하여, 농축할 수 있다. 농축 단계 후, 농축물을 적합한 정제 매트릭스에 적용할 수 있다. 대안적으로, 음이온 교환 수지, 예를 들어, 펜던트 디에틸아미노에틸 (DEAE) 기를 갖는 매트릭스 또는 기판을 이용할 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로스 또는 단백질 정제에 통상 이용되는 다른 유형일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 단계를 이용할 수 있다. 적합한 양이온 교환제로는 술포프로필 또는 카르복시메틸기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스가 포함된다. 마지막으로, 소수성 RP-HPLC 매질, 예를 들어, 펜던트 메틸 또는 기타 지방족 기를 갖는 실리카 겔을 이용하는 하나 이상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 단계를 이용하여 압 줄기 세포 단백질-Fc 조성물을 추가로 정제할 수 있다. 또한, 균질한 재조합 단백질을 제공하기 위해 상기한 정제 단계의 일부 또는 전부를 다양한 조합으로 이용할 수도 있다.

[0192] 박테리아 배양물에서 생성된 재조합 단백질은 예를 들어, 세포 펠렛으로부터의 최초 추출에 이어서 하나 이상의 농축, 염석, 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 단리될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 최종 정제 단계에 이용될 수 있다. 재조합 단백질의 발현에 이용되는 미생물 세포는, 동결-해동 사이클링, 초음파처리, 기계적 파괴, 또는 세포 용해제 이용을 비롯한 임의의 편리한 방법으로 파괴할 수 있다.

[0193] **생체내 펩티드/폴리펩티드 합성**

[0194] 또한, 본 발명은 예를 들어, DNA/RNA 백신의 형태로 신생항원 펩티드/폴리펩티드를 생체내에서 그를 필요로 하는 대상체에게 전달하기 위한 비히클로서의 핵산 분자의 이용을 고려한다(예를 들어, 본원에 전문이 참조로 포함되는 WO2012/159643호 및 WO2012/159754호 참조).

[0195] 일 실시형태에 있어서, 신생항원은 플라스미드의 이용에 의해 그를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다. 이들은 보통 관심 유전자(또는 상보성 DNA)의 생체내 전사 및 번역을 유도하는 강력한 바이러스 프로모터로 이루어진 플라스미드이다(문헌[Mor, et al., (1995). The Journal of Immunology 155 (4): 2039-2046]). 인트론 A를 때때로 포함시켜, mRNA 안정성을 개선시키고, 이에 따라 단백질 발현을 증가시킬 수 있다(문헌[Leitner et al. (1997). The Journal of Immunology 159 (12): 6112-6119]). 또한, 플라스미드는 강력한 폴리아데닐화/전사 종결 신호, 예를 들어, 소 성장 호르몬 또는 토기 베타-글로불린 폴리아데닐화 서열을 포함한다(문헌[Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410]; 문헌[Robinson et al., (2000). Adv. Virus Res. Advances in Virus Research 55:1-74]; 문헌[Bohmet al., (1996). Journal of Immunological Methods 193 (1): 29-40]). 멀티시스트로닉 벡터는 때때로 1가지 초과면역원을 발현하거나 면역원 및 면역 자극 단백질을 발현하도록 작제된다(문헌[Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54:129-88]).

[0196] 플라스미드는 면역원이 발현되는 "비히클"이기 때문에, 최대의 단백질 발현을 위한 벡터 설계의 최적화가 필수적이다(문헌[Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54:129-88]). 단백질 발현을 증진시키는 하나의 방법은 진핵 세포를 위해 병원성 mRNA의 코돈 사용을 최적화시킴으로써 이루어진다. 다른 고려사항은 프로모터의 선택이다. 그러한 프로모터는 SV40 프로모터 또는 라우스 육종 바이러스(RSV)일 수 있다.

[0197] 플라스미드는 수많은 상이한 방법에 의해 동물 조직으로 도입될 수 있다. 가장 일반적인 2가지 접근법은 표준 피하 주사바늘을 사용한 염수 중 DNA의 주사 및 유전자 총 전달이다. DNA 백신 플라스미드의 작제 및 이들 2가지 방법에 의한 숙주로의 그의 이후의 전달의 개략적 요약은 사이언티픽 어메리칸(Scientific American)에 예시되어 있다(문헌[Weiner et al., (1999) Scientific American 281 (1): 34-41]). 염수에서의 주사는 보통 골격근에서 근육내로(IM) 또는 피내로(ID) 행해지며, DNA는 세포의 공간으로 전달된다. 이는 일시적으로 근육 섬유를 마이오톡신, 예를 들어, 부피바카인을 사용하여 손상시킴으로써 전기천공법에 의해; 또는 염수 또는 수크로스의 고장성 용액을 사용함으로써 보조될 수 있다(문헌[Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410]). 이러한 전달 방법에 대한 면역 반응은 주사바늘 유형, 주사바늘 정렬, 주사 속도, 주사 부피, 근육 유형 및 주사되는 동물의 연령, 성별 및 생리학적 조건을 포함하는 많은 인자에 의해 영향을 받을 수 있다(문헌[Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410]).

[0198] 유전자 총 전달, 다른 통상적으로 사용되는 전달 방법은 추진제로서 압축된 헬륨을 사용하여 금 또는 텅스텐 마이크로입자 상에 흡수된 플라스미드 DNA(pDNA)를 표적 세포 내로 탄도적으로 가속화시킨다(문헌[Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42:343-410]; 문헌[Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88]).

[0199] 대안적인 전달 방법은 점막 표면, 예를 들어, 비강 및 폐 점막 상의 네이키드 DNA의 에어로졸 적하(문헌[Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88]) 및 눈 및 질 점막으로의 pDNA의 국소 투여(문헌[Lewis et al., (1999) Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88])를 포함할 수 있다. 또한, 점막 표면 전달은 양이온성 리포솜-DNA 제제, 생분해성 미소구체, 장 점막으로의 경구 투여를 위한 약독화 시겔라 또는 리스테리아 벡터 및 재조합 아데노바이러스 벡터를 사용하여 달성된다.

[0200] 전달 방법은 효율적인 면역 반응을 야기하는데 필요한 DNA의 용량을 결정한다. 염수 주입은 10 μ g 내지 1 mg의 가변량의 DNA를 필요로 하는 한편, 유전자 총 전달은 효율적인 면역 반응을 야기하는데 근육내 염수 주입보다 100 내지 1000배 더 적은 DNA를 필요로 한다. 일반적으로, 0.2 μ g 내지 20 μ g이 필요하지만, 16 ng만큼 적은 양이 보고되었다. 이들 양은 종마다 달라지며, 예를 들어, 마우스는 영장류보다 대략 10배 더 적은 DNA를 필요로 한다. 염수 주사는 더 많은 DNA를 필요로 하는데, 이는 DNA가 표적 조직(보통 근육)의 세포의 공간으로 전달되며, 여기서, 그것은 세포에 의해 흡수되기 전에 물리적 장벽(예를 들어, 몇몇을 언급하면, 기저판 및 다량의 연결 조직)을 극복해야 하는 한편, 유전자 총 전달은 DNA를 세포 내로 직접 퍼부어, 더 적은 "낭비"를 초래한다(예를 들어, 문헌[Sedegah et al., (1994). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91 (21): 9866-9870]; 문헌[Daheshia et al., (1997). The Journal of Immunology

159 (4): 1945-1952]; 문헌[Chen et al., (1998). The Journal of Immunology 160 (5): 2425-2432]; 문헌[Sizemore (1995) Science 270 (5234): 299-302]; 문헌[Fynan et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (24): 11478-82] 참조).

[0201] 일 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 예를 들어, 본 발명에 따라 확인된 바와 같은 하나 이상의 신생항원 펩티드/폴리펩티드를 인코딩하는 개별 DNA 플라스미드를 포함할 수 있다. 본원에 논의된 바와 같이 발현 벡터의 정확한 선택은 발현될 펩티드/폴리펩티드에 따라 달라질 수 있으며, 당업자의 기술 내에 있다. (예를 들어, 근육 세포 내의 에피솅, 비-복제, 비-통합 형태에서) 예상되는 DNA 작제물의 지속성은 증가된 보호 기간을 제공하는 것으로 예상된다.

[0202] 본 발명의 하나 이상의 신생항원 펩티드는 바이러스 기반의 시스템(예를 들어, 아데노바이러스 시스템, 아데노연관 바이러스(AAV) 벡터, 폭스바이러스 또는 렌티바이러스)을 사용하여 인코딩되고, 생체 내에서 발현될 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 그를 필요로 하는 인간 환자에서 사용하기 위한 바이러스 기반의 벡터, 예를 들어, 아데노바이러스(예를 들어, 본원에 그 전문이 참조로 포함되는 문헌[Baden et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). J Infect Dis. 2013 Jan 15;207(2):240-7] 참조)를 포함할 수 있다. 아데노 연관 바이러스, 아데노바이러스 및 렌티바이러스 전달을 위해 사용될 수 있는 플라스미드는 이전에 기재되어 있다(예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,955,808호 및 제6,943,019호 및 미국 특허 출원 제20080254008호 참조).

[0203] 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는 벡터 중에, 세포의 숙주 게놈 내의 통합은 레트로바이러스 유전자 전달 방법을 사용하여 가능하여, 삽입된 트랜스유전자의 장기간 발현을 초래한다. 바람직한 실시형태에 있어서, 레트로바이러스는 렌티바이러스이다. 또한, 높은 형질도입 효율이 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다. 레트로바이러스의 형성은 외래 외피 단백질을 혼입시키고, 잠재적 표적 집단의 표적 세포를 증식시킴으로써 변경될 수 있다. 레트로바이러스는 오직 특성의 세포 유형만이 렌티바이러스에 의해 감염되도록 삽입된 트랜스유전자의 조건적 발현이 가능하도록 조작될 수 있다. 세포 유형 특이적 프로모터를 사용하여 특정 세포 유형에서의 발현을 표적화할 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다(그리고 그에 따라, 렌티바이러스 및 레트로바이러스 벡터 둘 모두가 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다). 더욱이, 렌티바이러스 벡터는 그들이 비-분열 세포를 형질도입할 수 있거나, 그를 감염시킬 수 있으며, 전형적으로 높은 바이러스 역가를 생성할 수 있기 때문에 바람직하다. 따라서, 레트로바이러스 유전자 운반 시스템의 선택은 표적 조직에 따라 달라질 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 최대 6 내지 10 kb의 외래 서열에 대하여 패키징 능력을 갖는 시스-작용성 긴 말단 반복부로 이루어진다. 최소 시스-작용성 LTR은 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 이는 이어서, 요망되는 핵산을 표적 세포로 통합시켜, 영구적인 발현을 제공하는데 사용된다. 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 쥐과 백혈병 바이러스(MuLV), 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스(GaLV), 원숭이 면역 결핍 바이러스(SIV), 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 및 그들의 조합에 기초한 것들을 포함한다(예를 들어, 문헌[Buchscher et al., (1992) J. Virol. 66:2731-2739]; 문헌[Johann et al., (1992) J. Virol. 66:1635-1640]; 문헌[Sommerfelt et al., (1990) Virol. 176:58-59]; 문헌[Wilson et al., (1998) J. Virol. 63:2374-2378]; 문헌[Miller et al., (1991) J. Virol. 65:2220-2224]; PCT/US94/05700호 참조). Zou 등은 1×10^9 형질도입 단위(TU)/ml의 역가를 갖는 재조합 렌티바이러스 약 10 μ l를 척추강내 카테터에 의해 투여하였다. 이들 부류의 투여량은 본 발명에서 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터의 이용에 적합하게 되거나 추론될 수 있다.

[0204] 또한, 최소 비영양류 렌티바이러스 벡터, 예를 들어, 말 감염성 빈혈 바이러스(equine infectious anemia virus: EIAV)에 기반한 렌티바이러스 벡터가 본 발명의 실시예에 유용하다(예를 들어, 문헌[Balagaan, (2006) J Gene Med; 8: 275 - 285, Published online 21 November 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jgm.845] 참조). 벡터는 표적 유전자의 발현을 유도하는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터를 가질 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 실시예에 유용한 벡터(들) 중에 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 벡터를 고려한다.

[0205] 또한, 아데노바이러스 벡터가 본 발명의 실시예에 유용하다. 하나의 이점은 시험관내 및 생체내 다양한 포유류 세포 및 조직에서 재조합 유전자를 효율적으로 전달하고 발현하여, 전달된 핵산의 높은 발현을 초래하는 재조합 아데노바이러스의 능력이다. 추가로, 휴지 세포를 생산적으로 감염시키는 능력은 재조합 아데노바이러스 벡터의 유용성을 확대시킨다. 또한, 높은 발현 수준은 핵산의 산물이 충분한 수준으로 발현되어, 면역 반응을 생성할

것을 보장한다(예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제7,029,848호 참조).

[0206] 본원의 일 실시형태에 있어서, 전달은 아데노바이러스를 통해 이루어지며, 이는 적어도 1×10^5 개 입자(입자 단위, pu로도 지칭)의 아데노바이러스 벡터를 함유하는 단일의 부스터 용량일 수 있다. 본원의 일 실시형태에 있어서, 용량은 바람직하게는 적어도 약 1×10^6 개 입자(예를 들어, 약 1×10^6 개 내지 1×10^{12} 개 입자), 더욱 바람직하게는 적어도 약 1×10^7 개 입자, 더욱 바람직하게는 적어도 약 1×10^8 개 입자(예를 들어, 약 1×10^8 개 내지 1×10^{11} 개 입자 또는 약 1×10^8 개 내지 1×10^{12} 개 입자), 가장 바람직하게는, 적어도 약 1×10^9 개 입자(예를 들어, 약 1×10^9 개 내지 1×10^{10} 개 입자 또는 약 1×10^9 개 내지 1×10^{12} 개 입자), 또는 심지어 적어도 약 1×10^{10} 개 입자(예를 들어, 약 1×10^{10} 개 내지 1×10^{12} 개 입자)의 아데노바이러스 벡터이다. 대안적으로, 용량은 약 1×10^{14} 개 이하의 입자, 바람직하게는 약 1×10^{13} 개 이하의 입자, 더더욱 바람직하게는 약 1×10^{12} 개 이하의 입자, 더더욱 바람직하게는 약 1×10^{11} 개 이하의 입자, 가장 바람직하게는 약 1×10^{10} 개 이하의 입자(예를 들어, 약 1×10^9 개 이하의 입자)를 포함한다. 따라서, 용량은 예를 들어, 약 1×10^6 입자 단위(pu), 약 2×10^6 pu, 약 4×10^6 pu, 약 1×10^7 pu, 약 2×10^7 pu, 약 4×10^7 pu, 약 1×10^8 pu, 약 2×10^8 pu, 약 4×10^8 pu, 약 1×10^9 pu, 약 2×10^9 pu, 약 4×10^9 pu, 약 1×10^{10} pu, 약 2×10^{10} pu, 약 4×10^{10} pu, 약 1×10^{11} pu, 약 2×10^{11} pu, 약 4×10^{11} pu, 약 1×10^{12} pu, 약 2×10^{12} pu 또는 약 4×10^{12} pu의 아데노바이러스 벡터를 갖는 단일 용량의 아데노바이러스 벡터를 함유할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 2013년 6월 4일에 승인된 Nabel 등의 미국 특허 제8,454,972 B2호의 아데노바이러스 벡터, 그의 29열, 36 내지 58줄의 투여량을 참조한다. 본원의 일 실시형태에 있어서, 아데노바이러스는 다중의 용량을 통해 전달된다.

[0207] 생체내 전달에 관하여, AAV는 그것이 숙주 게놈 내로 통합되지 않기 때문에 삽입 돌연변이유발을 야기할 가능성이 낮고, 독성이 낮기 때문에, 다른 바이러스 벡터에 비하여 유리하다. AAV는 4.5 또는 4.75 Kb의 패키징 제한을 갖는다. 4.5 또는 4.75 Kb보다 더 큰 작제물은 상당히 감소된 바이러스 생성을 야기한다. 핵산 분자 발현을 유도하기 위해 사용될 수 있는 많은 프로모터가 존재한다. AAV ITR은 프로모터로 소용될 수 있으며, 추가의 프로모터 요소의 요구를 없애는데 유리하다. 편재성 발현을 위하여, 하기의 프로모터가 사용될 수 있다: CMV, CAG, CBh, PGK, SV40, 페리틴 중쇄 또는 경쇄 등. 뇌 발현을 위하여, 하기의 프로모터가 사용될 수 있다: 모든 뉴런을 위한 시냅신(Synapsin)I, 흥분성 뉴런을 위한 CaMKII알파, GABAergic 뉴런을 위한 GAD67 또는 GAD65 또는 VGAT 등. RNA 합성을 유도하기 위해 사용되는 프로모터는 Pol III 프로모터, 예를 들어, U6 또는 H1을 포함할 수 있다. Pol II 프로모터 및 인트론 카세트를 사용하여 가이드 RNA(grNA)를 발현할 수 있다.

[0208] AAV에 관하여, AAV는 AAV1, AAV2, AAV5 또는 그들의 임의의 조합일 수 있다. 표적화될 세포에 관하여 AAV를 선택할 수 있으며; 예를 들어, 뇌 또는 뉴런 세포를 표적화하기 위하여 AAV 혈청형 1, 2, 5 또는 하이브리드 캡시드 AAV1, AAV2, AAV5 또는 그들의 임의의 조합을 선택할 수 있고; 심장 조직을 표적화하기 위하여 AAV4를 선택할 수 있다. AAV8은 간으로의 전달을 위해 유용하다. 상기 프로모터 및 벡터가 개별적으로 바람직하다.

[0209] 본원의 일 실시형태에 있어서, 전달은 AAV를 통해 이루어진다. 인간으로의 AAV의 생체내 전달을 위한 치료적 유효 용량은 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{50} 개의 작용성 AAV/ml(용액)을 함유하는 약 20 내지 약 50 ml 범위의 염수 용액인 것으로 여겨진다. 투여량은 임의의 부작용에 대하여 치료적 이익의 균형을 이루도록 조정될 수 있다. 본원의 일 실시형태에 있어서, AAV 용량은 일반적으로 1×10^5 내지 약 1×10^{50} 개의 게놈 AAV, 1×10^8 내지 약 1×10^{20} 개의 게놈 AAV, 1×10^{10} 내지 약 1×10^{16} 개의 게놈 AAV 또는 1×10^{11} 내지 약 1×10^{16} 개의 게놈 AAV의 농도의 범위이다. 인간 투여량은 약 1×10^{13} 개의 게놈 AAV일 수 있다. 그러한 농도는 약 0.001 ml 내지 약 100 ml, 약 0.05 내지 약 50 ml 또는 약 10 내지 약 25 ml의 담체 용액으로 전달될 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, AAV는 약 2×10^{13} 개의 바이러스 게놈/밀리리터의 역가로 사용되며, 마우스의 선조 반구의 각각은 1회의 500 나노리터 주사를 제공받는다. 다른 유효 투여량은 용량 반응 곡선을 확립하는 통상의 시험을 통해 당업자에 의해 용이하게 확립될 수 있다. 예를 들어, 2013년 3월 26일에 등록된 Hajjar 등의 미국 특허 제8,404,658 B2호, 27열, 45 내지 60줄을 참조한다.

[0210] 또 다른 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물에 대한 세포 면역 반응을 효율적으로 활성화시키는 것은 비-병원성 미생물에서 백신 또는 면역원성 조성물 내의 관련 신생항원을 발현시킴으로써 달성될 수

있다. 그러한 미생물의 잘 알려져 있는 예에는 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) BCG, 살모넬라(*Salmonella*) 및 슈도모나(*Pseudomona*)가 있다(본원에 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 제6,991,797호 참조).

[0211] 또 다른 실시형태에 있어서, 포스바이러스는 신생물 백신 또는 면역원성 조성물에 사용된다. 이들은 오소포스바이러스, 조류포스, 백신시아, MVA, NYVAC, 카나리아두, ALVAC, 계두, TROVAC 등을 포함한다(예를 들어, 문헌[Verardiet al., Hum Vaccin Immunother. 2012 Jul;8(7):961-70]; 및 문헌[Moss, Vaccine. 2013; 31(39):4220-4222] 참조). 포스바이러스 발현 벡터는 1982년에 설명되었으며, 수많은 분야에서 신속하게 백신 개발 및 연구를 위하여 광범위하게 사용되었다. 벡터의 이점에는 간단한 작제, 다량의 외래 DNA를 수용하는 능력 및 높은 발현 수준이 포함된다.

[0212] 또 다른 실시형태에 있어서, 백신시아 바이러스는 신생항원을 발현하도록 신생물 백신 또는 면역원성 조성물에 사용된다(문헌[Rolph et al., Recombinant viruses as vaccines and immunological tools. Curr Opin Immunol 9:517-524, 1997]). 재조합 백신시아 바이러스는 감염된 숙주 세포의 세포질 내에서 복제할 수 있으며, 이에 따라, 관심 폴리펩티드는 면역 반응을 유도할 수 있다. 더욱이, 포스바이러스는 면역 세포, 특히 항원-제시 세포를 직접 감염시킴으로써 구조적적합성 복합체 클래스 I 경로에 의한 가공을 위해 인코딩된 항원을 표적화하는 그들의 능력 때문만 아니라, 자가-보조하는 그들의 능력 때문에, 백신 또는 면역원성 조성물 벡터로서 광범위하게 사용되어 왔다.

[0213] 또 다른 실시형태에 있어서, ALVAC는 신생물 백신 또는 면역원성 조성물에서 벡터로 사용된다. ALVAC는 외래 트랜스유전자를 발현하도록 변형될 수 있는 카나리아두 바이러스이며, 원핵 및 진핵 항원 둘 모두에 대한 백신접종 방법으로 사용되어 왔다(문헌[Horig H, Lee DS, Conkright W, et al. Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. Cancer Immunol Immunother 2000;49:504-14]; 문헌[von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, et al. Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA.) and B7.1 transgenes in patients with, recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. Clin Cancer Res 2000;6:2219-28]; 문헌[Musey L, Ding Y, Elizaga M, et al. HIV-1 vaccination administered intramuscularly can induce both, systemic and mucosal T cell immunity in HIV-1-uninfected individuals. J Immunol 2003;171:1094-101]; 문헌[Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93: 11349-53]; 미국 특허 제7,255,862호). 단계 I 임상 시험에서, 중앙 항원 CEA를 발현하는 ALVAC 바이러스는 뛰어난 안전성 프로파일을 보였으며, 선택된 환자에서 증가된 CEA-특이적 T-세포 반응을 초래하였지만; 객관적 임상 반응이 관찰되지 않았다(문헌[Marshall JL, Hawkins MJ, Tsang KY, et al. Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant, vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen. J Clin Oncol 1999;17:332-7]).

[0214] 또 다른 실시형태에 있어서, 변형된 백신시아 안카라(MVA) 바이러스는 신생항원 백신 또는 면역원성 조성물을 위한 바이러스 벡터로 사용될 수 있다. MVA는 오소포스바이러스 과의 구성원이며, 백신시아 바이러스의 안카라 균주의 닭 배아 섬유아세포(CVA)에서 약 570회의 연속 계대에 의해 생성되었다(검토를 위하여, 문헌[Mayr, A., et al., Infection 3, 6-14, 1975] 참조). 이들 계대의 결과로서, 생성된 MVA 바이러스는 CVA에 비하여 3.1 킬로베이스 더 적은 게놈 정보를 함유하며, 고도로 숙주-세포가 제한된다(문헌[Meyer, H. et al., J. Gen. Virol. 72, 1031-1038, 1991]). MVA는 그의 극도의 약화, 즉, 감소된 발병력 또는 감염 능력을 특징으로 하지만, 여전히 뛰어난 면역원성을 유지한다. 다양한 동물 모델에서 시험하는 경우, MVA는 심지어 면역-억제 개체에서도 약독성인 것으로 입증되었다. 더욱이, MVA-BN®-HER2는 HER-2-양성 유방암의 치료를 위하여 설계된 후보 면역요법이며, 현재 임상 시험 중이다(문헌[Mandl et al., Cancer Immunol Immunother. Jan 2012; 61(1): 19-29]). 재조합 MVA를 제조하고 이용하는 방법이 설명되어 있다(예를 들어, 전문이 본원에 포함되는 미국 특허 제8,309,098호 및 제5,185,146호 참조).

[0215] 또 다른 실시형태에 있어서, 백신시아 바이러스의 변형된 코펜하겐 균주, NYVAC 및 NYVAC 변종이 벡터로 사용된다(전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제7,255,862호; PCT WO 95/30018호; 미국 특허 제5,364,773호 및 제5,494,807호 참조).

[0216] 일 실시형태에 있어서, 백신 또는 면역원성 조성물의 재조합 바이러스 입자는 그를 필요로 하는 환자에게 투여된다. 발현된 신생항원의 투여량은 수 마이크로그램 내지 수백 마이크로그램, 예를 들어, 5 내지 500 μ g의 범위일 수 있다. 백신 또는 면역원성 조성물은 이들 투여량 수준에서 발현을 달성하기 위해 임의의 적합한 양으로

투여될 수 있다. 바이러스 입자는 적어도 약 $10^{3.5}$ pfu의 양으로 그를 필요로 하는 환자에게 투여되거나 세포 내로 트랜스펙션될 수 있으며; 이에 따라, 바이러스 입자는 바람직하게는 적어도 약 10^4 pfu 내지 약 10^6 pfu로 그를 필요로 하는 환자에게 투여되거나 세포 내로 감염 또는 트랜스펙션될 수 있지만; 그를 필요로 하는 환자에는 적어도 약 10^8 pfu가 투여될 수 있으며, 더욱 바람직한 투여량이 적어도 약 10^7 pfu 내지 약 10^9 pfu일 수 있게 한다. NYVAC에 대한 용량은 ALVAC, MVA, MVA-BN 및 조류폭스, 예를 들어, 카나리아두 및 계두에 적용 가능하다.

[0217] **백신 또는 면역원성 조성물 애주번트**

[0218] 효율적인 백신 또는 면역원성 조성물은 유리하게는 면역 반응을 개시하기 위한 강력한 애주번트를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 폴리-ICLC, TLR3의 효능제 및 RNA 헬리카제-MDA5 및 RIG3의 도메인은 백신 또는 면역원성 조성물 애주번트에 바람직한 몇몇 특성을 보였다. 이들 특성은 생체 내에서의 면역 세포의 국소 및 전신 활성화의 유도, 자극성 케모카인 및 사이토카인의 생성, 및 DC에 의한 항원-제시의 자극을 포함한다. 추가로, 폴리-ICLC는 인간에서 지속적인 CD4+ 및 CD8+ 반응을 유도할 수 있다. 중요한 것은, 폴리-ICLC로 백신접종된 대상체에서, 그리고 매우 효율적인 복제-가능 황열 백신을 제공받은 자원자에서 전사 및 신호 전달 경로의 상향조절에서 두드러진 유사성이 관찰되었다는 점이다. 추가로, 최근 단계 1 연구에서, NY-ESO-1 펩티드 백신(몬타나이드에 더하여)과 병용하여 폴리-ICLC로 면역화된 난소 암종 환자의 90% 초과에서, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 유도 및 펩티드에 대한 항체 반응이 나타났다. 동시에, 폴리-ICLC를 현재까지 25회 초과 임상 시험에서 광범위하게 시험하였으며, 비교적 양성의 독성 프로파일을 나타내었다. 강력하고 특이적인 면역원에 더하여, 신생항원 펩티드는 애주번트(예를 들어, 폴리-ICLC) 또는 다른 항-신생물제와 조합될 수 있다. 이론에 결부되지 않고, 이들 신생항원은 중심 흡수 반응을 우회하는 한편(이에 따라 보다 강력한 항-종양 T 세포 반응을 가능하게 함), 자가 면역성에 대한 가능성을 감소시키는 것으로 예상된다(예를 들어, 정상의 자가-항원의 표적화를 회피함으로써). 효율적인 면역 반응은 유리하게는 면역계를 활성화시키기 위한 강력한 애주번트를 포함한다(문헌[Speiser and Romero, Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity Seminars in Immunol 22:144 (2010)]). 예를 들어, 톨-유사 수용체(TLR)는 선천성 면역계와 차례로 후천성 면역계를 효율적으로 유도하는 미생물 및 바이러스 병원체 "위험 신호"의 강력한 센서로 드러났다(문헌[Bhardwaj and Gnajatic, TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants? Cancer J. 16:382-391 (2010)]). TLR 효능제 중에, 폴리-ICLC(합성 이중-가닥 RNA 모방체)는 골수-유래 수지상 세포의 가장 강력한 활성화제 중 하나이다. 인간 자원자 연구에서, 폴리-ICLC는 안전하며, 가장 강력한 약독화된 생 바이러스 백신 중 하나, 황열 백신 YF-17D에 의해 유도되는 것과 유사한, 말초 혈액 세포 내의 유전자 발현 프로파일을 유도하는 것으로 나타났다(문헌[Caskey et al, Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans J Exp Med 208:2357 (2011)]). 바람직한 실시형태에 있어서, 힐토놀(Hiltonol)®, 온코비르, 인코포레이티드(Oncovir, Inc)에 의해 제조되는 폴리-ICLC의 GMP 제제가 애주번트로 이용된다. 다른 실시형태에 있어서, 본원에 기재된 다른 애주번트가 예상된다. 예를 들어, 수중유, 유중수 또는 다중상 W/O/W; 예를 들어, 미국 특허 제7,608,279호 및 문헌[Aucouturier et al, Vaccine 19 (2001), 2666-2672] 및 거기에 인용된 문헌을 참조한다.

[0219] **적응증**

[0220] 이러한 문헌의 면역원성 조성물 또는 백신으로 치료될 수 있는 암 및 암 질환의 예는 암을 갖는 것으로 진단받거나, 암이 발생할 위험이 있는 그를 필요로 하는 환자를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 대상체는 고형 종양, 예를 들어, 유방, 난소, 전립선, 폐, 신장, 위, 결장, 고환, 두경부, 췌장, 뇌, 흑색종 및 다른 조직 기관의 종양 및 혈액 종양, 예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, T 세포 림프성 백혈병 및 B 세포 림프종을 포함하는 림프종 및 백혈병, 뇌 종양 및 중추 신경계 종양(예를 들어, 수막, 뇌, 척수, 뇌신경 및 CNS의 다른 부분의 종양, 예를 들어 교아세포종 또는 수모세포종); 두경부암, 유방 종양, 순환계 종양(예를 들어, 심장, 종격 및 가슴막, 및 기타 흉내 장기, 혈관 종양 및 혈관 조직 관련 종양); 혈액 및 림프계 종양(예를 들어, 호지킨 질병, 비-호지킨 질병 림프종, 버키트 림프종, AIDS-관련 림프종, 악성 면역중식성 질병, 다발성 골수종, 및 악성 형질세포 신생물, 림프성 백혈병, 골수성 백혈병, 급성 또는 만성 림프성 백혈병, 단핵구 백혈병, 특정 세포 유형의 기타 백혈병, 특정되지 않은 세포 유형의 백혈병, 특정되지 않은 림프, 조혈 및 관련 조직의 악성 신생물, 예컨대 미만성 거대 세포 림프종, T-세포 림프종 또는 피부 T-세포 림프종); 배설계 종양(예를 들어, 콩팥, 신장 갈매기, 요관, 방광, 및 기타 비뇨기); 위장관 종양(예를 들어, 식도, 위, 소장, 결장, 결장직장, 직장구불결장 이행부, 직장, 항문 및 항문관); 간 및 간내 쓸개관, 쓸개, 및 기타 담도 부분, 췌장, 및 기타 소화 기관을 포함하는 종양; 구강 종양(예를 들어, 입술, 혀, 잇몸, 입바닥, 입천장,

귀밀샘, 침샘, 편도, 입인두, 코인두, 조롱박굴, 하인두, 및 기타 구강 부분); 생식계 종양(예를 들어, 외음, 질, 자궁목, 자궁, 난소, 및 여성 생식기관과 연관된 기타 부위, 태반, 음경, 전립선, 고환, 및 남성 생식 기관과 연관된 기타 부위); 기도 종양(예를 들어, 비강, 중이, 부비동, 후두, 기관, 기관지 및 폐, 예컨대 소세포 폐암 및 비-소세포 폐암); 골격계 종양(예를 들어, 사지의 뼈 및 관절연골, 뼈관절연골 및 기타 부위); 피부 종양(예를 들어, 피부의 악성 흑색종, 비-흑색종 피부 암, 피부의 기저 세포 암종, 피부의 편평 세포 암종, 중피종, 카포시 육종); 및 말초 신경계 및 자율 신경계, 결합 및 연 조직, 후복막 및 복막, 눈, 갑상선, 부신, 및 기타 내분비샘 및 관련 구조물, 림프절의 속발성 및 상세포형의 악성 신생물, 호흡계 및 소화계의 속발성 악성 신생물 및 기타 부위의 속발성 악성 신생물을 가질 수 있다.

[0221] 비호지킨 림프종(NHL), 투명 세포 신장 세포 암종(ccRCC), 전이성 흑색종, 육종, 백혈병 또는 방광, 결장, 뇌, 유방, 두경부, 자궁내막, 폐, 난소, 췌장 또는 전립선의 암의 치료가 특히 관심이 있는 것이다. 특정 실시형태에 있어서, 흑색종은 고위험 흑색종이다.

[0222] 이러한 면역원성 조성물 또는 백신을 사용하여 치료될 수 있는 암은 다른 것들 중 다른 화학요법제를 사용한 치료에 불응성인 경우를 포함할 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "불응성"은, 다른 화학치료제를 사용한 치료 후에 항증식 반응을 보이지 않거나, 오직 약한 항증식 반응만을 보이는(예를 들어, 종양 성장의 억제력을 보이지 않거나, 오직 약한 억제만을 보이는) 암(및/또는 그의 전이)을 말한다. 이들은 다른 화학치료제로 충분히 치료될 수 없는 암이다. 불응성 암은 (i) 환자의 치료 중에 하나 이상의 화학요법제가 이미 실패하였던 암뿐만 아니라 (ii) 다른 수단, 예를 들어, 생검 및 화학요법제의 존재하의 배양에 의해 불응성을 나타낼 수 있는 암도 포함한다.

[0223] 본원에 기재된 면역원성 조성물 또는 백신은 또한 이전에 치료된 적이 없는 치료를 필요로 하는 환자의 치료에 적용 가능하다.

[0224] 본원에 기재된 면역원성 조성물 또는 백신은 또한, 대상체가 검출 가능한 신생물을 갖지 않으나, 질병 재발 위험이 높은 경우에 적용 가능하다.

[0225] 자가 조혈 줄기 세포 이식(AHSCT)을 겪은 치료를 필요로 하는 환자, 특히, AHSCT를 겪은 후에 잔류 질병이 입증된 환자의 치료도 또한, 특히 관심있는 것이다. AHSCT 후 환경은 작은 부피의 잔류 질병, 항상성의 확대의 상황으로의 면역 세포의 주입 및 임의의 표준 재발-지연 치료법의 부재를 특징으로 한다. 이들 특징은 질병 재발을 지연시키기 위해 기재된 신생물 백신 또는 면역원성 조성물을 사용할 독특한 기회를 제공한다.

[0226] 약제학적 조성물/전달 방법

[0227] 또한, 본 발명은 선택적으로, 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 첨가제와 병용한 본 발명에 따른, 유효량의 하나 이상의 화합물(그의 약제학적으로 허용되는 염 포함)을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0228] 종양 특이적 신생항원 펩티드가 단독의 활성 약제로서 투여될 수 있지만, 그들은 하나 이상의 다른 작용제 및/또는 애드juv언트와 병용하여 사용될 수도 있다. 병용으로 투여되는 경우, 치료제는 동일한 시간에 또는 상이한 시간에 제공되는 개별 조성물로서 제형화될 수 있거나, 치료제는 단일의 조성물로 제공될 수 있다.

[0229] 조성물을 1일 1회, 1일 2회, 2일마다 1회, 3일마다 1회, 4일마다 1회, 5일마다 1회, 6일마다 1회, 7일마다 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 2개월마다 1회, 6개월마다 1회 또는 1년에 1회 투여할 수 있다. 투여 간격을 개별 환자의 요구에 따라 조정할 수 있다. 보다 긴 투여 간격을 위하여, 연장 방출형 또는 데포(depot) 제형을 사용할 수 있다.

[0230] 본 발명의 조성물을 급성인 질병 및 질병 증상을 치료하기 위해 사용할 수 있으며, 또한 만성 질환의 치료를 위해 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 신생물을 치료하거나 예방하기 위한 방법에 사용된다. 특정 실시형태에 있어서, 본 발명의 화합물은 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년 또는 5년, 10년 또는 15년을 초과하는 기간; 또는 예를 들어, 범위의 하한이 14일 내지 15년의 임의의 기간이며, 범위의 상한이 15일 내지 20년(예를 들어, 4주 내지 15년, 6개월 내지 20년)인 수 일, 수 개월 또는 수 년의 임의의 기간 범위 동안 투여한다. 일부 경우에, 본 발명의 화합물을 환자의 나머지 생 동안 투여하는 것이 유리할 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, 환자를 질병 또는 장애의 진행을 점검하기 위해 모니터링하며, 이에 따라 용량을 조정한다. 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명에 따른 치료는 적어도 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년 또는 5년, 10년, 15년, 20년 동안 또는 대상체의 나머지 생 동안 효율적이다.

- [0231] 종양 특이적 신생항원 펩티드는 통상적인 약제학적으로 허용되는 담체, 애쥬번트 및 비히클을 함유하는 단위 용량 제형으로, 주사에 의해, 경구, 비경구, 흡입 스프레이에 의해, 직장, 질 또는 국소로 투여될 수 있다. 본원에 사용되는 비경구라는 용어는 림프절(들)내, 피하, 정맥내, 근육내, 흉골내, 주입 기술, 복강내, 눈 또는 안구내, 유리체내, 협측, 경피, 비강내, 두개내 및 경막내를 포함하여 뇌 내, 발목, 무릎, 엉덩이, 어깨, 팔꿈치, 손목을 포함하여 관절 내, 종양 내로 직접 등 및 좌제 형태를 포함한다.
- [0232] 외과적 절제는 수술을 사용하여, 암, 예를 들어, 종격, 신경 또는 생식 세포 종양 또는 흉선종에서 비정상 조직을 제거한다. 특정 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 종양 절제 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15주 이상에 개시된다. 바람직하게는 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 종양 절제 후 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12주에 개시된다.
- [0233] 프라임/부스트 섭생법은 백신 또는 면역원성 또는 면역학적 조성물의 연속 투여를 말한다. 특정 실시형태에 있어서, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 프라임/부스트 투여 섭생법에서 이루어지며, 예를 들어, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 프라임으로서 제1주, 제2주, 제3주 또는 제4주에, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 부스트로서 제2개월, 제3개월 또는 제4개월에 이루어진다. 다른 실시형태에 있어서, 이중 프라임-부스트 전략을 사용하여, 더 큰 세포독성 T-세포 반응을 유도한다(문헌[Schneider et al., Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies, Immunological Reviews Volume 170, Issue 1, pages 29-38, August 1999] 참조). 다른 실시형태에 있어서, 신생항원을 인코딩하는 DNA를 사용하여 프라임 후에 단백질 부스트로 이어진다. 다른 실시형태에 있어서, 단백질을 사용하여 신생항원을 인코딩하는 바이러스로 프라임에 이어서 부스팅시킨다. 다른 실시형태에 있어서, 신생항원을 인코딩하는 바이러스를 사용하여, 프라임시키고, 다른 바이러스를 사용하여 부스팅시킨다. 다른 실시형태에 있어서, 단백질을 사용하여, 프라임시키고, DNA를 사용하여 부스팅시킨다. 바람직한 실시형태에 있어서, DNA 백신 또는 면역원성 조성물을 사용하여 T-세포 반응을 프라임시키고, 재조합 바이러스 백신 또는 면역원성 조성물을 사용하여 반응을 부스팅시킨다. 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 바이러스 백신 또는 면역원성 조성물은 단백질 또는 DNA 백신 또는 면역원성 조성물과 동시 투여되어, 단백질 또는 DNA 백신 또는 면역원성 조성물을 위한 애쥬번트로 작용한다. 이어서, 환자는 바이러스 백신 또는 면역원성 조성물, 단백질, 또는 DNA 백신 또는 면역원성 조성물 중 어느 하나로 부스팅될 수 있다(문헌[Hutchings et al., Combination of protein and viral vaccines induces potent cellular and humoral immune responses and enhanced protection from murine malaria challenge. Infect Immun. 2007 Dec;75(12):5819-26. Epub 2007 Oct 1] 참조).
- [0234] 약제학적 조성물을 통상의 약학적 방법에 따라 처리하여, 인간 및 기타 포유류를 포함하는 그를 필요로 하는 환자로의 투여를 위한 약제를 생성할 수 있다.
- [0235] 신생항원 펩티드의 변형은 펩티드의 용해도, 생체이용성 및 대사 속도에 영향을 미쳐, 이에 따라 활성 종의 전달에 대한 조절을 제공할 수 있다. 용해도는 신생항원 펩티드를 제조하고, 당업자의 기술 내의 알려져 있는 방법에 따라 시험함으로써 평가될 수 있다.
- [0236] 예상치 않게, 석신산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염(석신산염)을 포함하는 약제학적 조성물이 신생항원 펩티드에 대하여 개선된 용해도를 제공할 수 있는 것이 관찰되었다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 신생항원 펩티드 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; pH 조절제(예를 들어, 염기, 예를 들어, 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염, 예를 들어, 석신산 또는 시트르산의 약제학적으로 허용되는 염); 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 그러한 약제학적 조성물은 적어도 하나의 신생항원 펩티드를 포함하는 용액을 염기, 예를 들어, 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염, 예를 들어, 석신산 또는 시트르산의 약제학적으로 허용되는 염(예를 들어, 석신산나트륨)을 조합하거나, 또는 적어도 하나의 신생항원 펩티드를 포함하는 용액을 염기, 예를 들어, 디카르복실레이트 또는 트리카르복실레이트 염, 예를 들어, 석신산 또는 시트르산의 약제학적으로 허용되는 염(예를 들어, 석신산염 완충제 용액 포함)과 조합함으로써 제조될 수 있다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 석신산나트륨을 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, pH 조절제(예를 들어, 시트르산염 또는 석신산염)는 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로, 특정 실시형태에 있어서, 약 1.5 mM 내지 약 7.5 mM, 또는 약 2.0 내지 약 6.0 mM, 또는 약 3.75 내지 약 5.0 mM의 농도로 조성물에 존재한다.
- [0237] 약제학적 조성물의 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 물을 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 텍스트로스를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 디메틸설폭시드를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 면역조절제 또

는 애쥬번트를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 면역조절제 또는 애쥬번트는 폴리-ICLC, 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PEPTTEL, 벡터 시스템, PLGA 마이크로입자, 레시퀴모드, SRL172, 비로즘 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys 및 아퀼라스 QS21 스티물론으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시형태에 있어서, 면역조절제 또는 애쥬번트는 폴리-ICLC를 포함한다.

[0238] 잔테논 유도체, 예를 들어, 바디메잔(Vadimezan) 또는 AsA404(5,6-디메틸아잔테논-4-아세트산(DMXAA)으로도 알려져 있음)는 또한 본 발명의 실시형태에 따른 애쥬번트로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 그러한 유도체는 또한 예를 들어, 전신 또는 중앙내 전달을 통해 본 발명의 백신 또는 면역원성 조성물과 동시에 투여되어, 중앙 부위에서 면역성을 자극할 수 있다. 이론에 결부되지 않고, 그러한 잔테논 유도체는 IFN 유전자 ISTING) 수용체의 자극제를 통해 인터페론(IFN) 생성을 자극함으로써 작용하는 것으로 여겨진다(예를 들어, 문헌[Conlon et al. (2013) Mouse, but not Human STING, Binds and Signals in Response to the Vascular Disrupting Agent 5,6-Dimethylxanthene-4-Acetic Acid, Journal of Immunology, 190:5216-25] 및 문헌[Kim et al. (2013) Anticancer Flavonoids are Mouse-Selective STING Agonists, 8:1396-1401] 참조).

[0239] 백신 또는 면역원성 조성물은 또한, 아크릴계 또는 메타크릴계 폴리머 및 말레산 무수물 및 알케닐 유도체의 코폴리머로부터 선택되는 애쥬번트 화합물을 포함할 수 있다. 그것은 특히, 당 또는 폴리알코올(카보머)의 폴리알케닐 에테르와 가교된, 특히, 알릴 수크로스 또는 알릴펜타에리트리톨과 가교된 아크릴산 또는 메타크릴산의 폴리머이다. 그것은 또한, 예를 들어, 디 비닐 에테르와 가교된 말레산 무수물 및 에틸렌의 코폴리머일 수 있다 (전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,713,068호 참조).

[0240] 특정 실시형태에 있어서, pH 조절제는 본원에 기재된 바와 같이 애쥬번트 또는 면역조절제를 안정화시킬 수 있다.

[0241] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 1 내지 5개의 펩티드, 디메틸 설펍사이드(DMSO), 텍스트로스(또는 트레할로스 또는 수크로스), 물, 석신산염, 폴리 I: 폴리 C, 폴리-L-라이신, 카르복시메틸셀룰로스 및 염화물을 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 1 내지 5개의 펩티드 각각은 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 3 부피% 이하의 DMSO를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 3.6 내지 3.7%의 수 중 텍스트로스를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 3.6 내지 3.7 mM의 석신산염(예를 들어, 석신산이나트륨으로서) 또는 그의 염을 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 0.5 mg/ml 의 폴리 I: 폴리 C를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 0.375 mg/ml 의 폴리-L-라이신을 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 1.25 mg/ml 의 나트륨 카르복시메틸셀룰로스를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 0.225%의 염화나트륨을 포함한다.

[0242] 약제학적 조성물은 선택적으로, 약제학적으로 허용되는 첨가제, 담체 및/또는 부형제와 병용하여, 본원에 기재된 질병 및 질환(예를 들어, 신생물/종양)을 치료하기 위한 치료적 유효량으로 본원에 기재된 중앙 특이적 신생항원 펩티드를 포함한다. 본 개시내용 및 해당 분야의 지식으로부터 당업자는 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물의 치료적 유효량이 치료될 질환, 그의 중증도, 사용될 치료 섭생, 사용되는 작용제의 약동학 및 치료되는 환자(동물 또는 인간)에 따라 달라질 수 있음을 인식할 것이다.

[0243] 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 제조하기 위하여, 치료적 유효량의 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물은 바람직하게는 용량을 생성하기 위한 통상의 약제 배합 기술에 따라 약제학적으로 허용되는 담체와 친밀히 배합된다. 담체는 수많은 다른 것들 중, 겔, 크림, 연고, 로션 및 시간 지연된 이식 가능한 제제를 포함하여, 투여, 예를 들어, 안구, 경구, 국소 또는 비경구를 위해 요망되는 제제의 형태에 따라 매우 다양한 형태를 취할 수 있다. 경구 투여형의 약제학적 조성물의 제조에 있어서, 통상의 약제학적 매질 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 이에 따라, 액체 경구 제제, 예를 들어, 현탁액, 엘릭시르(elixir) 및 용액을 위하여, 물, 글리콜, 오일, 알코올, 향미제, 보존제, 착색제 등을 포함하는 적합한 담체 및 첨가제가 사용될 수 있다. 고체 경구 제제, 예를 들어, 분말, 정제, 캡슐을 위해, 그리고 고체 제제, 예를 들어, 좌제를 위해, 진분, 당 담체, 예를 들어, 텍스트로스, 만니톨, 락토스 및 관련 담체, 희석제, 과립화제, 윤활제, 결합제, 붕해제 등을 포함하는 적합한 담체 및 첨가제가 사용될 수 있다. 요망되는 경우, 정제 또는 캡슐은 장용-코팅되거나 표준 기술에 의한 지속 방출형일 수 있다.

[0244] 활성 화합물은 치료되는 환자에서 심각한 독성 효과를 야기하지 않고, 요망되는 적응증을 위해, 치료적 유효량

을 환자에게 전달하기에 충분한 양으로 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제에 포함된다.

- [0245] 경구 조성물은 일반적으로 비활성 희석제 또는 식용 가능한 담체를 포함한다. 그들은 젤라틴 캡슐에 둘러싸이거나, 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료 투여의 목적을 위해, 활성 화합물 또는 그의 전구약물 유도체에는 부형제가 혼입될 수 있으며, 정제, 트로키제(troch) 또는 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 약제학적 혼화성 결합제 및/또는 애썬트 물질은 조성물의 부분으로 포함될 수 있다.
- [0246] 정제, 환제, 캡슐제, 트로키제 등은 임의의 하기 성분 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 미세결정 셀룰로스, 검 트래거캔트 또는 젤라틴과 같은 결합제; 전분 또는 락토스와 같은 부형제, 알긴산 또는 옥수수 전분과 같은 분산제; 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제; 콜로이드 이산화규소와 같은 활택제(glidant); 수크로스 또는 사카린과 같은 감미제; 또는 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향미제와 같은 향미제. 단위 투여형이 캡슐제인 경우, 그것은 본원에 논의된 물질에 더하여, 지방 오일과 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 또한, 단위 투여형은 물리적 투여 단위형을 변형시키는 다양한 다른 물질, 예를 들면, 당 피복제, 셀락(shellac) 또는 장용제를 함유할 수 있다.
- [0247] 경구 투여에 적합한 본 발명의 제형은 각각 소정량의 활성 성분을 함유하는 분리된 단위, 예를 들어, 캡슐제, 카세제(cachet) 또는 정제로서; 분말 또는 과립으로서; 수성 액체 또는 비수성 액체 중 용액 또는 현탁액으로서; 또는 수중유 액체 에멀전 또는 유중수 에멀전으로서 및 볼루스로서 등으로 제시될 수 있다.
- [0248] 정제는 선택적으로 하나 이상의 보조 성분을 사용한 압축 또는 몰딩에 의해 제조될 수 있다. 압축된 정제는 선택적으로 결합제, 윤활제, 비활성 희석제, 보존제, 표면-활성 또는 분산제와 혼합된 자유 유동 형태, 예를 들어, 분말 또는 과립의 활성 성분을 적합한 기계에서 압축시킴으로써 제조될 수 있다. 몰딩된 정제는 비활성 액체 희석제로 적셔진 분말형 화합물의 혼합물을 적합한 기계에서 몰딩시킴으로써 제조될 수 있다. 정제는 선택적으로, 코팅되거나 스코어링(scored)될 수 있으며, 그 안의 활성 성분의 서방 또는 조절 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다.
- [0249] 약제학적 활성 성분의 그러한 서방형 또는 조절 방출형 조성물의 제형화 방법은 당업계에 알려져 있으며, 일부가 개시내용의 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제3,870,790호; 제4,226,859호; 제4,369,172호; 제4,842,866호 및 제5,705,190호를 포함하나 이들에 한정되지 않는 몇몇 교부된 미국 특허에 기재되어 있다. 코팅은 장으로의 화합물의 전달을 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,638,534호, 제5,541,171호, 제5,217,720호 및 제6,569,457호 및 거기에 인용된 참고문헌 참조).
- [0250] 또한, 활성 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼, 씹임 검(chewing gum) 등의 성분으로서 투여될 수 있다. 시럽은 활성 화합물에 더하여, 감미제로서 수크로스 또는 프룩토스, 및 특정 보존제, 염료 및 착색제 및 향미제를 함유할 수 있다.
- [0251] 안구, 비경구, 피내, 피하 또는 국소 적용을 위해 사용되는 용액 또는 현탁액은 하기의 성분을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예를 들어, 주사용 물, 염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 항박테리아제, 예를 들어, 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 산화방지제, 예를 들어, 아스코르브산 또는 소듐 비설피트; 킬레이트제, 예를 들어, 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예를 들어, 아세테이트, 시트르산염 또는 인산염 및 등장성 조절제, 예를 들어, 염화나트륨 또는 텍스트로스.
- [0252] 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 수성 용매, 즉, 선택적으로 추가의 공용매와 함께 물을 포함하는 용매이다. 예시적인 약제학적으로 허용되는 담체는 물, 수 중 완충 용액(예를 들어, 인산염-완충 염수(PBS) 및 수 중 5% 텍스트로스(D5W) 또는 10% 트레할로스 또는 10% 수크로스)를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 수성 용매는 예를 들어, 약 1 내지 4% 또는 1 내지 3%의 양으로 디메틸 설폭시드(DMSO)를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체는 (즉, 실질적으로 체액, 예를 들어, 혈장과 동일한 삼투압을 갖는) 등장성이다.
- [0253] 일 실시형태에 있어서, 활성 화합물은 이식물 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 조절 방출형 제형과 같이, 신체로부터의 신속한 제거에 대하여 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조된다. 생분해성 생체적합성 폴리머, 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락틱-코-글리콜산(PLGA)이 사용될 수 있다. 그러한 제형의 제조 방법은 개시내용 및 해당 분야의 지식을 고려하여 당업자의 영역 내이다.
- [0254] 당업자는 본 개시내용 및 해당 분야의 지식으로부터 정제에 더하여, 다른 투여형이 서방형 또는 조절 방출형의 활성 성분을 제공하도록 제형화될 수 있음을 인식한다. 그러한 투여형은 캡슐제, 과립 및 겔-캡(gel-cap)을 포

함하나 이들에 한정되지 않는다.

- [0255] 또한, 리포솜 현탁액은 약제학적으로 허용되는 담체일 수 있다. 이들은 당업자에게 알려져 있는 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 리포솜 제형은 적절한 지질(들)을 무기 용매 중에 용해시키고, 기화되면, 용기 표면에 건조된 지질의 막막이 남게 되어 제조될 수 있다. 그 다음, 활성 화합물의 수용액을 용기 내로 도입한다. 그 다음 용기를 용기 벽에 지질 물질이 없도록 그리고 지질 응집체를 분산시키기 위하여 수동으로 와류시켜, 리포솜 현탁액을 형성한다. 당업자에게 잘 알려져 있는 다른 제조 방법도 본 발명의 이러한 양태에서 사용될 수 있다.
- [0256] 제형은 편리하게 단위 투여형으로 제시되고 통상의 약제 기술에 의해 제조될 수 있다. 그러한 기술은 활성 성분 및 약제학적 담체(들) 또는 부형제(들)가 회합되게 하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분이 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 모두와 균일하게 그리고 친밀하게 회합되게 한 다음, 필요에 따라, 산물을 성형하여 제조된다.
- [0257] 입으로의 국소 투여에 적합한 제형 및 조성물은 향미 베이스, 통상적으로, 수크로스 및 아카시아 또는 트래저캔트 중에 성분을 포함하는 로젠지(lozenge); 비활성 베이스, 예를 들어 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아 중에 활성 성분을 포함하는 향정(pastille); 및 적합한 액체 담체 중에 투여될 성분을 포함하는 구강 세척제를 포함한다.
- [0258] 피부로의 국소 투여에 적합한 제형은 약제학적으로 허용되는 담체 중에 투여될 성분을 포함하는 연고, 크림, 젤 및 페이스트로서 제시될 수 있다. 바람직한 국소 전달 시스템은 투여될 성분을 함유하는 경피 패치이다.
- [0259] 직장 투여용 제형은 예를 들어, 코코아 버터 또는 살리실레이트를 포함하는 적합한 베이스를 사용하여 좌제로 제시될 수 있다.
- [0260] 담체가 고체인 비강 투여에 적합한 제형은 코담배(snuff)가 투여되는 방식, 즉, 코에 근접하게 유지된 분말의 용기로부터 비강 경로를 통한 빠른 흡입으로 투여되는 예컨대, 20 내지 500 마이크로 범위의 입자 크기를 갖는 조분(coarse powder)을 포함한다. 비강 스프레이 또는 비강 점적액으로의 투여를 위한, 담체가 액체인 적합한 제형은 활성 성분의 수성 또는 유성 용액을 포함한다.
- [0261] 질 투여에 적합한 제형은 활성 성분에 더하여 당업계에 적절한 것으로 알려져 있는 그러한 담체를 함유하는 페서리(pessary), 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 폼(foam) 또는 스프레이 제형으로 제시될 수 있다.
- [0262] 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플(ampoule), 일회용 주사기 또는 다중 용량 바이알에 봉입될 수 있다. 정맥내 투여된다면, 바람직한 담체는 예를 들어, 생리 식염수 또는 인산염 완충 염수(PBS)를 포함한다.
- [0263] 비경구 제형을 위하여, 담체는 분산을 보조하는 것들을 포함하는 다른 성분이 포함될 수 있지만, 통상 멸균수 또는 염화나트륨 수용액을 포함한다. 물론, 멸균수가 사용되고 멸균으로 유지되는 경우, 조성물 및 담체는 또한 멸균된다. 또한, 주사 가능한 현탁액이 제조될 수 있으며, 이 경우 적절한 액체 담체, 현탁화제 등이 사용될 수 있다.
- [0264] 비경구 투여에 적합한 제형은 산화방지제, 완충제, 세균발육저지제(bacteriostat) 및 제형이 의도되는 수여자의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용액; 및 현탁화제 및 농후제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제형은 단위-용량 또는 다중-용량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알에 제시될 수 있으며, 냉동-건조(동결건조) 조건에 보관될 수 있으며, 이는 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어, 주사용 물의 첨가만을 필요로 한다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0265] 활성 화합물의 투여는 연속적으로(정맥내 점적)부터 1일 수회의 경구 투여(예를 들어, Q.I.D.)까지의 범위일 수 있으며, 눈 또는 안구 경로를 통한 것을 포함하여, 다른 투여 경로 중에, 경구, 국소, 눈 또는 안구, 비경구, 근육내, 정맥내, 피하, 경피(투과 증진제를 포함할 수 있음), 협측 및 좌제 투여를 포함할 수 있다.
- [0266] 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 통상적인 약제학적으로 허용되는 담체, 애쥬번트 및 비히클을 함유하는 투여 단위 제형으로 주사에 의해, 경구로, 비경구로, 흡입 스프레이에 의해, 직장내로, 질내로 또는 국소로 투여될 수 있다. 본원에 사용되는 용어 비경구는 림프절(들)내, 피하, 정맥내, 근육내, 흉골내, 주입 기술, 복강내, 눈 또는 안구내, 유리체내, 협측, 경피, 비강내, 두개내 및 경막내를 포함하여 뇌 내, 발목, 무릎, 엉덩이, 어

개, 팔꿈치, 손목을 포함하여 관절 내, 종양 내로 직접 등 및 좌제 형태를 포함한다.

- [0267] 주사, 카테터, 투관침, 프로젝틸, 플루론 겔, 스텐트, 지연 약물 방출 폴리머 또는 내부 접근을 제공하는 다른 장치와 같은 다양한 기술이 관심 부위에 조성물을 대상체에게 제공하는데 사용될 수 있다. 환자로부터 제거됨으로 인해 기관 또는 조직이 접근 가능한 경우, 그러한 기관 또는 조직을 대상 조성물을 함유하는 매질 중에 담그거나, 대상 조성물을 기관에 칠하거나 또는 임의의 편리한 방법으로 적용할 수 있다.
- [0268] 종양 특이적 신생항원 펩티드는 요망되는 국소 또는 전신 생리학적 또는 약리학적 효과를 얻는데 효과적인 조성물의 조절 및 지속 방출에 적합한 장치를 통해 투여할 수 있다. 상기 방법은 지속 방출형 약물 전달 시스템을 작용제의 방출이 요망되는 영역에 배치하고, 작용제가 장치를 통과하여 요망되는 치료 영역으로 이동하게 하는 것을 포함한다.
- [0269] 종양 특이적 신생항원 펩티드는 적어도 하나의 알려져 있는 다른 치료제 또는 상기 작용제의 약제학적으로 허용되는 염과 병용하여 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 알려져 있는 치료제의 예는 코르티코스테로이드(예를 들어, 코르티손, 프레드니손, 텍사메타손), 비-스테로이드성 항염증 약물(NSAID)(예를 들어, 이부프로펜, 셀레콕시, 아스피린, 인도메타신, 나프록센), 알킬화제, 예를 들어, 부설판, 시스-플라틴, 미토마이신 C, 및 카보플라틴; 항유사분열제(antimitotic agent), 예를 들어, 콜히친, 빈블라스틴, 파클리탁셀 및 도세탁셀; 토포 I 억제제, 예를 들어, 캄토테신 및 토포테칸; 토포 II 억제제, 예를 들어, 독소루비신 및 에토포시드; 및/또는 RNA/DNA 항대사물질, 예를 들어, 5-아자시티딘, 5-플루오로우라실 및 메토타렉세이트; DNA 항대사물질, 예를 들어, 5-플루오로-2'-데옥시-우리딘, ara-C, 하이드록시우레아 및 티오구아닌; 항체, 예를 들어, 헤르셉틴(HERCEPTIN) 및 리투산(RITUXAN)을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0270] 본원에 특별히 언급된 성분에 더하여, 본 발명의 제형이 당해 제형 유형을 고려하여 당업계에서 통상적인 다른 작용제를 포함할 수 있고, 예를 들어, 경구 투여에 적합한 것들이 향미제를 포함할 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0271] 약제학적으로 허용되는 염 형태는 본 발명에 따른 약제학적 조성물 중의 포함을 위한 바람직한 본 발명에 따른 화합물의 화학적 형태일 수 있다.
- [0272] 이들 작용제의 전구약물 형태를 포함하는 본 발명의 화합물 또는 그들의 유도체는 약제학적으로 허용되는 염의 형태로 제공될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, 약제학적으로 허용되는 염 또는 복합체라는 용어는 모체 화합물의 요망되는 생물학적 활성을 유지하고, 정상 세포에 대하여 제한된 독성 효과를 나타내는 본 발명에 따른 활성 화합물의 적절한 염 또는 복합체를 말한다. 그러한 염의 비제한적인 예에는 (a) 무기산(예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산 등)으로 형성된 산 부가염 및 유기산, 예를 들어, 다른 것들 중 특히, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 석신산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 탄닌산, 파모산, 알긴산 및 폴리글루탐산으로 형성된 염; (b) 금속 양이온, 예를 들어, 다른 수많은 것들 중 특히 아연, 칼슘, 나트륨, 칼륨 등으로 형성된 염기 부가염이 있다.
- [0273] 본원에서 화합물은 상업적으로 이용 가능하거나 합성될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, 본원의 화학식의 화합물의 추가의 합성 방법이 당업자에게 명백하다. 또한, 다양한 합성 단계는 교대 순서 또는 순으로 수행되어, 요망되는 화합물을 제공할 수 있다. 본원에 기재된 화합물의 합성에 유용한 합성 화학 변환 및 보호기 방법(보호 및 탈보호)이 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, 2nd. Ed., Wiley-VCH Publishers (1999)]; 문헌[T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd. Ed., John Wiley and Sons (1999)]; 문헌[L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1999)]; 및 문헌[L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)] 및 그의 이후의 판에 기재된 것과 같은 것들을 포함한다.
- [0274] 본 발명의 종양 특이적 신생항원 펩티드와 함께 포함될 수 있는 추가의 작용제는 하나 이상의 비대칭 중심을 함유할 수 있으므로 라세미체 및 라세미 혼합물, 단일 거울상이성체, 개별 부분입체이성체 및 부분입체이성체 혼합물로서 존재할 수 있다. 이들 화합물의 모든 그러한 이성체 형태는 본 발명에 명시적으로 포함된다. 본 발명의 화합물은 또한, 다수의 호변체 형태로 제시될 수 있으며, 그러한 예에서, 본 발명이 본원에 기재된 화합물의 모든 호변체 형태를 명시적으로 포함한다(예를 들면, 고리 시스템의 알킬화는 다중의 위치에서 알킬화를 야기할 수 있고, 본 발명은 모든 그러한 반응 산물을 명시적으로 포함한다). 그러한 화합물의 모든 그러한 이성체 형태가 본 발명에 명시적으로 포함된다. 본원에 기재된 화합물의 모든 결정 형태는 본 발명에 명시적으로 포함된다.
- [0275] **투여량**

- [0276] 본원에 기재된 작용제가 약제로서 인간 또는 동물에게 투여되는 경우, 그들은 그 자체로 또는 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제와 병용되는 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물로서 제공될 수 있다.
- [0277] 본 발명의 약제학적 조성물 중 활성 성분의 실제 투여 수준 및 투여의 시간 경과에 환자에게 독성 없이, 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 요망되는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위하여 달라질 수 있다. 일반적으로 본 발명의 작용제 또는 약제학적 조성물은 바이러스 감염 및/또는 자가면역 질병과 관련된 증상을 감소시키거나 제거하기에 충분한 양으로 투여된다.
- [0278] 작용제의 바람직한 용량은 환자가 용인할 수 있고, 심각한 또는 허용 가능하지 않은 부작용이 발생하지 않을 최대치이다. 예시적인 용량 범위는 0.01 mg 내지 250 mg/일, 0.01 mg 내지 100 mg/일, 1 mg 내지 100 mg/일, 10 mg 내지 100 mg/일, 1 mg 내지 10 mg/일 및 0.01 mg 내지 10 mg/일을 포함한다. 작용제의 바람직한 용량은 환자가 용인할 수 있고, 심각한 또는 허용 가능하지 않은 부작용을 발생하지 않는 최대치이다. 실시형태들에 있어서, 작용제는 약 10 μ g 내지 약 100 mg/kg(체중)/일, 약 0.1 내지 약 10 mg/kg/일 또는 약 1.0 mg 내지 약 10 mg/kg(체중)/일의 농도로 투여된다.
- [0279] 실시형태들에 있어서, 약제학적 조성물은 1 내지 10 mg, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mg 범위의 양의 작용제를 포함한다.
- [0280] 실시형태들에 있어서, 치료적 유효 용량은 약 0.1 ng/ml 내지 약 50 내지 100 mg/ml의 작용제의 혈청 농도를 생성한다. 약제학적 조성물 5는 전형적으로 약 0.001 mg 내지 약 2000 mg의 화합물/kg(체중)/일의 투여량을 제공해야 한다. 예를 들어, 인간 환자로의 전신 투여를 위한 투여량은 1 내지 10 mg/kg, 20 내지 80 mg/kg, 5 내지 50 mg/kg, 75 내지 150 mg/kg, 100 내지 500 mg/kg, 250 내지 750 mg/kg, 500 내지 1000 mg/kg, 1 내지 10 mg/kg, 5 내지 50 mg/kg, 25 내지 75 mg/kg, 50 내지 100 mg/kg, 100 내지 250 mg/kg, 50 내지 100 mg/kg, 250 내지 500 mg/kg, 500 내지 750 mg/kg, 750 내지 1000 mg/kg, 1000 내지 1500 mg/kg, 10 1500 내지 2000 mg/kg, 5 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg 또는 2000 mg/kg의 범위일 수 있다. 약제학적 단위 투여형은 단위 투여형당 약 1 mg 내지 약 5000 mg, 예를 들어, 약 100 내지 약 2500 mg의 화합물 또는 또는 필수 성분의 조합을 제공하도록 제조된다.
- [0281] 실시형태들에 있어서, 약 50 nM 내지 약 1 μ M의 작용제가 대상체에게 투여된다. 관련 실시형태들에 있어서, 약 50 내지 100 nM, 50 내지 250 nM, 100 내지 500 nM, 250 내지 500 nM, 250 내지 750 nM, 500 내지 750 nM, 500 nM 내지 1 μ M 또는 750 nM 내지 1 μ M의 작용제가 대상체에게 투여된다.
- [0282] 유효량의 결정은 특히 본원에 제공된 상세한 개시내용의 견지에서 충분히 당업자의 능력 내에 있다. 일반적으로, 작용제의 효과적인 또는 유효한 양은 먼저 낮은 용량의 작용제(들)를 투여한 다음, 요망되는 효과(예를 들어, 바이러스 감염 또는 자가면역 질병과 관련된 증상의 감소 또는 제거)가 최소의 또는 허용되는 독성 부작용과 함께, 치료되는 대상체에서 관찰될 때까지 투여된 용량 또는 투여량을 증분식으로 증가시킴으로써 결정된다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여에 적절한 용량 및 투여 일정을 결정하기 위해 적용 가능한 방법은 예를 들어, 각각이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman et al., eds., 11th Edition, McGraw-Hill 2005] 및 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th and 21st Editions, Gennaro and University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippencott Williams & Wilkins (2003 and 2005)]에 기재되어 있다.
- [0283] 바람직한 단위 용량 제형은 본원에 논의된 바와 같이 1일 용량 또는 단위, 1일 하위-용량 또는 그의 적절한 분율의 투여되는 성분을 함유하는 것들이다.
- [0284] 본 발명의 중앙 특이적 신생-항원 펩티드 및/또는 본 발명의 조성물을 사용한 장애 또는 질병의 치료를 위한 투여 섭생법은 질병의 유형, 환자의 연령, 체중, 성별, 의학적 조건, 질환의 중증도, 투여 경로 및 사용되는 특정 화합물을 포함하는 다수의 요인에 기초한다. 이에 따라, 투여 섭생법은 광범위하게 달라질 수 있으나, 표준 방법을 사용하여 통상적으로 결정될 수 있다.
- [0285] 대상체에게 투여되는 양 및 투여 섭생법은 다수의 요인, 예를 들어, 투여 방식, 치료되는 질환의 성질, 치료되는 대상체의 체중 및 처방하는 의사의 판단에 따라 달라질 수 있으며; 그러한 모든 요인은 본 개시내용 및 해당 분야 내의 지식으로부터 당업자의 범위 내에 있다.
- [0286] 본 발명에 따른 치료적 활성 제형에 포함되는 화합물의 양은 질병 또는 질환을 치료하기 위한 유효량이다. 일반적으로, 투여형 중의 본 발명의 바람직한 화합물의 치료적 유효량은 사용되는 화합물, 치료되는 질환 또는 감염

및 투여 경로에 따라, 약 0.025 mg/kg/일 보다 약간 적은 양 내지 약 2.5 g/kg/일, 바람직하게는 약 0.1 mg/kg/일 내지 약 100 mg/kg/일의 환자 또는 그보다 상당히 더 많은 양의 범위이지만, 이러한 용량 범위에 대한 예외가 본 발명에 의해 고려될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물은 그의 가장 바람직한 형태에서, 약 1 mg/kg/일 내지 약 100 mg/kg/일의 범위의 양으로 투여된다. 화합물의 용량은 치료되는 질환, 특정 화합물 및 기타 임상적 요인, 예를 들어, 환자의 체중 및 질환 및 화합물의 투여 경로에 좌우될 수 있다. 본 발명이 인간 및 수의학적 용도 둘 모두를 위한 응용을 갖는 것이 이해되어야 한다.

- [0287] 인간으로의 경구 투여를 위하여, 대략 0.1 내지 100 mg/kg/일, 바람직하게는 대략 1 내지 100 mg/kg/일의 용량이 일반적으로 충분하다.
- [0288] 약물 전달이 국소라기보다는 전신인 경우, 이러한 용량 범위는 일반적으로 약 0.04 미만 내지 약 400 $\mu\text{g}/\text{cc}$ (환자의 혈액) 이상 범위의 활성 화합물의 효율적인 혈중 수준 농도를 생성한다. 화합물은 단위 투여형당 0.001 내지 3000 mg, 바람직하게는 0.05 내지 500 mg의 활성 성분을 함유하는 것을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 적합한 단위 투여형으로 편리하게 투여된다. 10 내지 250 mg의 경구 용량이 보통 편리하다.
- [0289] 특정 예시적인 실시형태에 따르면, 백신 또는 면역원성 조성물은 신생항원 펩티드당 약 10 μg 내지 1 mg의 용량으로 투여된다. 특정 예시적인 실시형태에 따르면, 백신 또는 면역원성 조성물은 신생항원 펩티드당 약 10 μg 내지 2000 μg 의 평균 주마다의 용량 수준으로 투여된다.
- [0290] 약물 조성물 중 활성 화합물의 농도는 약물의 흡수, 분포, 불활성화 및 배출 속도 및 당업자에게 알려져 있는 기타 요인에 좌우될 것이다. 또한, 용량 값이 완화될 질환의 중증도에 따라 달라질 것임을 주목해야 한다. 임의의 특정 대상체에 있어서, 특정 용량 섭생법을 개체 요구 및 조성물을 투여하고 조성물의 투여를 감독하는 개인의 전문적인 판단에 따라 시간이 지남에 따라 조정해야 하며, 본원에 기재된 농도 범위가 단지 예시적인 것이고, 청구된 조성물의 범주 또는 실시를 제한하려는 의도가 아님이 또한 이해되어야 한다. 활성 성분을 한꺼번에 투여하거나, 수많은 보다 작은 용량으로 분할하여, 다양한 시간 간격으로 투여할 수 있다.
- [0291] 본 발명은 본원에 기재된 적어도 하나의 종양 특이적 신생항원을 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다. 실시형태들에 있어서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 함유하며, 이는 그 자체가 조성물을 제공받은 대상체에게 유해한 면역 반응의 생성을 유도하지 않는 임의의 약제를 포함하고, 과도한 독성 없이 투여될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "약제학적으로 허용되는"이라는 용어는 연방 정부 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되고, 척추동물 및 더욱 구체적으로 포유동물, 더욱 특별히는 인간에 사용하기 위한 것으로 미국 약전, 유럽 약전 또는 다른 일반적으로 인식된 약전에 나열된 것을 의미한다. 이런 조성물은 바이러스 감염 및/또는 자가면역 질병을 치료 및/또는 예방하는데 유용할 수 있다.
- [0292] 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 기타 부형제의 전체적인 논의는 본원에 참조로 포함되는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (17th ed., Mack Publishing Company)] 및 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st ed., Lippincott Williams & Wilkins)]에 제시되어 있다. 약제학적 조성물의 제형은 투여 방식에 적합해야 한다. 실시형태들에 있어서, 약제학적 조성물은 인간으로의 투여에 적합하며, 멸균, 비-미립자 및/또는 비-발열성일 수 있다.
- [0293] 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제는 염수, 완충 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 멸균 등장 수성 완충제 및 그들의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0294] 습윤제, 유화제 및 윤활제, 예를 들어, 소듐 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트, 및 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 방향제, 보존제 및 산화방지제도 또한 조성물에 존재할 수 있다.
- [0295] 약제학적으로 허용되는 산화방지제의 예는 다음을 포함하나 이들에 한정되지 않는다: (1) 수용성 산화방지제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 소듐 비설페이트, 소듐 메타비설페이트, 소듐 설페이트 등; (2) 유용성 산화방지제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트화제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.
- [0296] 실시형태들에 있어서, 약제학적 조성물은 고체 형태, 예를 들어, 재구성에 적합한 동결건조 분말, 액체 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐제, 지속 방출형 제형 또는 분말로 제공된다.
- [0297] 실시형태들에 있어서, 약제학적 조성물은 예를 들어, 약제학적 조성물 중의 활성 성분의 양과 농도를 표기하는 밀봉 용기에 액체 형태로 공급된다. 관련 실시형태에 있어서, 액체 형태의 약제학적 조성물은 기밀 밀봉 용기에

공급된다.

- [0298] 본 발명의 약제학적 조성물의 제형화 방법은 통상적이며, 당업계에 널리 알려져 있다(문헌[Remington and Remington's] 참조). 당업자는 요망되는 특징(예를 들어, 투여 경로, 생체안전성 및 방출 프로파일)을 갖는 약제학적 조성물을 용이하게 제형화할 수 있다.
- [0299] 약제학적 조성물의 제조 방법은 활성 성분이 약제학적으로 허용되는 담체 및 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 회합되게 하는 단계를 포함한다. 약제학적 조성물은 활성 성분이 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 모두와 균일하고 친밀하게 회합되게 한 다음, 필요에 따라, 산물을 성형함으로써 제조될 수 있다. 다층 투여형의 제조를 포함하는 약제학적 조성물의 추가의 제조 방법은 본원에 참조로 포함되는 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (9th ed., Lippincott Williams & Wilkins)]에 기재되어 있다.
- [0300] 경구 투여에 적합한 약제학적 조성물은 캡슐제, 카세제, 환제, 정제, 로젠지(항미 베이스, 통상적으로는 수크로스 및 아카시아 또는 트래거캔트 사용), 분말, 과립 형태로, 또는 수성 또는 비수성 액체의 용액 또는 현탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전으로서, 또는 엘릭시르 또는 시럽으로서, 또는 향정(비활성 베이스, 예컨대 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아 사용)으로서, 및/또는 구강 세척제 등으로서 존재할 수 있으며, 이들 각각은 활성 성분(들)으로서 소정량의 본원에 기재된 화합물(들), 그의 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 또는 전구약물을 함유한다. 활성 성분은 또한 볼루스, 연약 또는 페이스트로서 투여될 수 있다.
- [0301] 경구 투여를 위한 고체 투여형(예를 들어, 캡슐제, 정제, 환제, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 활성 성분은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제, 예컨대 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘, 및/또는 다음 중 임의의 것과 혼합된다: (1) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산; (2) 결합제, 예컨대 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 보습제(humectant), 예컨대 글리세롤; (4) 붕해제, 예컨대 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트 및 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예컨대 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예컨대 4급 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 예컨대 아세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트 및 그의 혼합물; (10) 착색제. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우에, 약제학적 조성물은 완충제도 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한, 연질 및 경질-충진 젤라틴 캡슐제에서 충전제, 및 락토스 또는 유당과 같은 부형제, 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하여 제조될 수도 있다.
- [0302] 정제는 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 몰딩에 의해 제조될 수 있다. 압축된 정제는 결합제(예를 들어, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 비활성 희석제, 보존제, 붕해제(예를 들어, 전분글리콜산나트륨 또는 교차-결합된 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스), 표면-활성 및/또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 몰딩된 정제는 비활성 액체 희석제로 적서진 분말 활성 성분의 혼합물을 적합한 기계에서 몰딩시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0303] 정제 및 기타 고체 투여형, 예를 들어, 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립은 선택적으로, 스코어링되거나 코팅 및 셀, 예를 들어, 장용 코팅 및 당업계에 잘 알려져 있는 기타 코팅과 함께 제조될 수 있다.
- [0304] 일부 실시형태에 있어서, 활성 성분의 효과를 연장시키기 위하여, 피하 또는 근육내 주사로부터 화합물의 흡수를 늦추는 것이 바람직하다. 이는 불량한 수 용해도를 갖는 결정질 또는 무정형 물질의 액체 현탁액의 사용에 의해 달성될 수 있다. 이어서, 활성 성분의 흡수율은 그의 용해율에 따라 달라지며, 용해율은 차례로 결정 크기 및 결정질 형태에 따라 달라질 수 있다. 대안적으로, 비경구-투여된 활성 성분의 지연된 흡수는 화합물을 오일 비히클 중에 용해시키거나 현탁화시킴으로써 달성된다. 또한, 주사 가능한 약제학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 포함에 의해 야기될 수 있다.
- [0305] 조절 방출형 비경구 조성물은 수성 현탁액, 미소구체, 마이크로캡슐, 자성 미소구체, 오일 용액, 오일 현탁액, 에멀전의 형태일 수 있거나, 활성 성분은 생체적합성 담체(들), 리포솜, 나노입자, 이식물 또는 주입 장치에 혼입될 수 있다.
- [0306] 미소구체 및/또는 마이크로캡슐의 제조에 사용하기 위한 물질은 생분해성/생침식성 폴리머, 예를 들어, 폴리글락틴, 폴리-(아이소부틸 시아노아크릴레이트), 폴리(2-하이드록시에틸-L-글루타민) 및 폴리(락트산)을 포함한다.

- [0307] 조절 방출형 비경구 제형을 제형화하는 경우 사용될 수 있는 생체적합성 담체는 탄수화물, 예를 들어, 텍스트란, 단백질, 예를 들어, 알부민, 리포단백질 또는 항체를 포함한다.
- [0308] 이식물에 사용하기 위한 물질은 비-생분해성, 예를 들어, 폴리디메틸실록산 또는 생분해성, 예를 들어, 폴리(카프로락톤), 폴리(락트산), 폴리(글리콜산) 또는 폴리(오르토 에스테르)일 수 있다.
- [0309] 실시형태들에 있어서, 활성 성분(들)은 에어로졸에 의해 투여된다. 이는 화합물을 함유하는 수성 에어로졸, 리포솜 제제 또는 고체 입자를 제조함으로써 달성된다. 비수성(예를 들어, 플루오로카본 추진제) 현탁액이 사용될 수 있다. 또한, 약제학적 조성물은 초음파 네블라이저를 사용하여 투여될 수 있으며, 이는 화합물의 분해를 야기할 수 있는 전단으로의 작용제의 노출을 최소화시킬 것이다.
- [0310] 대개는, 수성 에어로졸은 통상의 약제학적으로 허용되는 담체 및 안정화제와 함께 활성 성분(들)의 수용액 또는 현탁액을 제형화시킴으로써 제조된다. 담체 및 안정화제는 특정 화합물의 요건에 따라 달라지나, 전형적으로, 비이온성 계면활성제(Tween, Pluronic 또는 폴리에틸렌 글리콜), 혈청 알부민과 같은 무해한 단백질, 소르비탄 에스테르, 올레산, 레시틴, 아미노산, 예를 들어, 글리신, 완충제, 염, 당 또는 당 알코올을 포함한다. 에어로졸은 일반적으로 등장성 용액으로부터 제조된다.
- [0311] 활성 성분(들)의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여형은 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 성분(들)은 멸균 조건하에 약제학적으로 허용되는 담체, 및 적절한 경우 임의의 보존제, 완충제 또는 추진제와 혼합될 수 있다.
- [0312] 본 발명에 사용하기에 적합한 경피 패치는 본원에 참조로 포함되는 문헌[Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives (Marcel Dekker Inc., 1989)] 및 미국 특허 제4,743,249호, 제4,906,169호, 제5,198,223호, 제4,816,540호, 제5,422,119호, 제5,023,084호에 개시되어 있다. 또한, 경피 패치는 경음낭 패치를 포함하는 당업계에 널리 알려져 있는 임의의 경피 패치일 수 있다. 그러한 경피 패치 내의 약제학적 조성물은 당업계에 잘 알려져 있는 하나 이상의 흡수 증진제 또는 피부 투과 증진제를 함유할 수 있다(예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제4,379,454호 및 제4,973,468호 참조). 본 발명에 사용하기 위한 경피 치료 시스템은 이온도입법(iontophoresis), 확산 또는 이들 2개 효과의 병용에 기초할 수 있다.
- [0313] 경피 패치는 신체로의 활성 성분(들)의 조절된 전달을 제공하는 이점이 부가된다. 그러한 투여형은 활성 성분(들)을 적절한 매질에 용해시키거나 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 또한, 흡수 증진제를 사용하여, 피부를 가로지르는 활성 성분의 유동을 증가시킬 수 있다. 그러한 유동 속도는 속도 조절 막을 제공하거나 활성 성분(들)을 폴리머 매트릭스 또는 겔에 분산시킴으로써 조절될 수 있다.
- [0314] 그러한 약제학적 조성물은 크림, 연고, 로션, 도포제, 젤, 하이드로젤, 용액, 현탁액, 스틱(stick), 스프레이, 페이스트, 플라스터(plaster) 및 기타 종류의 경피 약물 전달 시스템의 형태일 수 있다. 또한, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제, 예를 들어, 유화제, 산화방지제, 완충제, 보존제, 보습제, 투과 증진제, 킬레이트화제, 겔-형성제, 연고 베이스, 향료 및 피부 보호제를 포함할 수 있다.
- [0315] 유화제의 예는 천연 발생 검(gum), 예를 들어, 아카시아 검 또는 트래거캔트 검, 천연 발생 포스파티드, 예를 들어, 대두 레시틴 및 소르비탄 모노올레이트 유도체를 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0316] 산화방지제의 예는 부틸화 하이드록시 아니솔(BHA), 아스코르브산 및 그의 유도체, 토코페롤 및 그의 유도체 및 시스테인을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0317] 보존제의 예는 파라벤, 예를 들어, 메틸 또는 프로필 p-하이드록시벤조에이트 및 벤즈알코늄 클로라이드를 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0318] 보습제의 예는 글리세린, 프로필렌 글리콜, 소르비톨 및 우레아를 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0319] 투과 증진제의 예는 프로필렌 글리콜, DMSO, 트리에탄올아민, N,N-디메틸아세트아미드, N,N-디메틸포름아미드, 2-피롤리돈 및 그들의 유도체, 테트라하이드로프루피릴 알코올, 프로필렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 모노라우레이트 또는 메틸 라우레이트를 갖는 디에틸렌 글리콜 모노에틸 또는 모노메틸 에테르, 유칼립투스, 레시틴, 트란스쿠톨(TRANSCUTOL) 및 아존(AZONE)을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0320] 킬레이트화제의 예는 나트륨 EDTA, 시트르산 및 인산을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0321] 겔 형성제의 예는 카보폴(Carbopol), 셀룰로스 유도체, 벤토나이트, 알기네이트, 젤라틴 및 폴리비닐피롤리돈을

포함하나 이들에 한정되지 않는다.

- [0322] 활성 성분(들)에 더하여, 본 발명의 연고, 페이스트, 크림 및 겔은 부형제, 예를 들어, 동물 및 식물 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트래거캔트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 활석 및 산화아연 또는 그들의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0323] 분말 및 스프레이는 부형제, 예를 들어, 락토스, 활석, 규산, 수산화알루미늄, 규산칼슘 및 폴리아미드 분말 또는 이들 물질의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이는 추가로 관례적 추진제, 예를 들어, 클로로플루오로하이드로카본 및 휘발성 비치환된 탄화수소, 예를 들어, 부탄 및 프로판을 함유할 수 있다.
- [0324] 주사 가능한 데포 형태는 생분해성 폴리머, 예를 들어, 폴리락티드-폴리글리콜리드 중 본 발명의 화합물(들)의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 화합물 대 폴리머의 비, 및 사용되는 특정 폴리머의 성질에 따라, 화합물 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생분해성 폴리머의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 또한, 주사 가능한 데포 제형은 신체 조직과 상용성인 리포솜 또는 마이크로에멀전에 약물을 포획함으로써 제조된다.
- [0325] 피하 이식물은 당업계에 널리 알려져 있으며, 본 발명에 사용하기에 적합하다. 피하 이식 방법은 바람직하게는 비-자극성이며 기계적으로 탄성이다. 이식물은 매트릭스 유형, 저장소 유형 또는 그의 혼성물일 수 있다. 매트릭스 유형 장치에서, 담체 물질은 다공성 또는 비다공성, 고체 또는 반고체일 수 있으며, 활성 화합물 또는 화합물들에 대하여 투과 가능하거나 투과 불가능하다. 담체 물질은 생분해성일 수 있거나, 투여 후에 천천히 침식할 수 있다. 일부 예에서, 매트릭스는 비-분해성이나, 대신에, 담체 물질이 분해되기 위하여, 매트릭스를 통한 활성 화합물의 확산에 의존한다. 대안적인 피하 이식 방법은 저장소 장치를 사용하며, 여기서, 활성 화합물 또는 화합물들은 속도 조절 막, 예를 들어, 성분 농도와 독립적인(0차 동역학을 갖는) 막으로 둘러싸인다. 또한, 속도 조절 막으로 둘러싸인 매트릭스로 이루어진 장치도 사용하기에 적합하다.
- [0326] 저장소 및 매트릭스 유형 장치 둘 모두는 폴리디메틸실록산, 예를 들어, 실라스틱(SILASTIC) 또는 기타 실리콘 고무와 같은 물질을 함유할 수 있다. 매트릭스 물질은 불용성 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리비닐 클로라이드, 에틸비닐 아세테이트, 폴리스티렌 및 폴리메타크릴레이트, 및 글리세롤 팔미토스테아레이트, 글리세롤 스테아레이트 및 글리세롤 베헤네이트 유형의 글리세롤 에스테르일 수 있다. 물질은 소수성 또는 친수성 폴리머일 수 있으며, 선택적으로, 가용화제를 함유한다.
- [0327] 피하 이식 장치는 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5,035,891호 및 제4,210,644호에 기재된 바와 같이 임의의 적합한 폴리머로 제조된 서방형 캡슐일 수 있다.
- [0328] 일반적으로, 약물 화합물의 방출 및 경피 투과에 대한 속도 조절을 제공하기 위하여 적어도 4개의 상이한 접근법이 적용 가능하다. 이들 접근법은 막-조절 시스템(membrane-moderated system), 점착 분산-조절 시스템(adhesive diffusion-controlled system), 매트릭스 분산형 시스템 및 마이크로저장소 시스템이다. 조절 방출형 경피 및/또는 국소 조성물이 이들 접근법의 적합한 혼합을 사용하여 수득될 수 있는 것이 인식된다.
- [0329] 막-조절 시스템에서, 활성 성분은 금속 플라스틱 라미네이트와 같은 약물 비투과성 라미네이트 및 마이크로다공성 또는 비다공성 폴리머 막, 예를 들면, 에틸렌-비닐 아세테이트 코폴리머와 같은 속도-조절 폴리머 막으로부터 몰딩된 얇은 구획 내에서 전체가 캡슐화되어 있는 저장소 안에 존재한다. 활성 성분은 속도-조절 폴리머 막을 통과하여 방출된다. 약물 저장소에서, 활성 성분은 고체 폴리머 매트릭스에 분산되거나 또는 실리콘 유체와 같은 여과 불가능한 점성 액체 매질 내에 현탁화될 수도 있다. 폴리머 막의 외부 표면에서, 경피 시스템과 피부 표면의 친밀한 접촉을 달성하기 위해 점착성 폴리머의 박막이 적용된다. 점착성 폴리머는 바람직하게는 활성 약물 물질과 혼화성인 저알러지성 폴리머이다.
- [0330] 점착성 분산-조절 시스템에서, 활성 성분의 저장소는 활성 성분을 점착성 폴리머 내에 직접 분산시킨 후, 예를 들어, 용매 캐스팅에 의해, 활성 성분을 포함하는 점착제를 실질적으로 약물-비투과성인 금속 플라스틱 백킹(backing)의 평평한 시트에 도포하여 얇은 약물 저장소 층을 형성함으로써 형성된다.
- [0331] 매트릭스 분산형 시스템은 활성 성분의 저장소가 친수성 또는 친유성 폴리머 매트릭스 내에 활성 성분을 실질적으로 균질하게 분산시킴으로써 형성되는 것을 특징으로 한다. 그 다음, 약물-함유 폴리머를 실질적으로 잘 정의된 표면적 및 조절된 두께를 갖는 디스크에 몰딩한다. 점착성 폴리머를 주변을 따라 도포하여, 디스크 주위의 점착제 스트립(strip)을 형성한다.
- [0332] 마이크로저장소 시스템은 저장소 및 매트릭스 분산형 시스템의 조합으로 여겨질 수 있다. 이러한 경우에, 활성

물질의 저장소는 먼저 약물 고체를 수용성 폴리머의 수용액에 현탁화시킨 다음, 약물 현탁액을 친유성 폴리머에 분산시켜 약물 저장소의 다수의 여과 불가능한 미세한 미소구체를 형성함으로써 형성된다.

[0333] 본원에 기재된 조절 방출형, 연장 방출형 및 지속 방출형 조성물 중 임의의 것을 제형화하여, 약 30분 내지 약 1주 내에, 약 30분 내지 약 72시간 내에, 약 30분 내지 24시간 내에, 약 30분 내지 12시간 내에, 약 30분 내지 6시간 내에, 약 30분 내지 4시간 내에 그리고 약 3시간 내지 10시간 내에 활성 성분을 방출시킬 수 있다. 실시 형태들에 있어서, 유효 농도의 활성 성분(들)은 대상체로의 약제학적 조성물의 투여 후에 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 16시간, 24시간, 48시간, 72시간 이상 동안 대상체에서 유지된다.

[0334] 백신 또는 면역원성 조성물

[0335] 본 발명은 특이적 T-세포 반응을 야기할 수 있는 면역원성 조성물, 예를 들어, 신생물 백신 또는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 본원에 개시된 방법에 의해 확인되는 종양 특이적 신생항원에 상응하는 신생항원 펩티드 및/또는 신생항원 폴리펩티드를 포함한다.

[0336] 적합한 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 바람직하게는 복수의 종양 특이적 신생항원 펩티드를 함유할 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 백신 또는 면역원성 조성물은 1 내지 100가지의 펩티드의 세트, 더욱 바람직하게는 1 내지 50가지의 펩티드의 세트, 더더욱 바람직하게는 10 내지 30가지의 펩티드의 세트, 더더욱 바람직하게는 15 내지 25가지의 펩티드의 세트를 포함할 수 있다. 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 백신 또는 면역원성 조성물은 적어도 하나의 펩티드, 더욱 바람직하게는 2, 3, 4 또는 5가지의 펩티드를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에 있어서, 백신 또는 면역원성 조성물은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30가지의 상이한 펩티드를 포함할 수 있다.

[0337] 백신 또는 면역원성 조성물에 포함될 각 펩티드의 최적량 및 최적의 투여 섭생법은 과도한 실험 없이, 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 펩티드 또는 그의 변이체는 정맥내(i.v.) 주사, 피하(s.c.) 주사, 피내(i.d.) 주사, 복강내(i.p.) 주사, 근육내(i.m.) 주사를 위해 제조될 수 있다. 바람직한 펩티드 주사 방법은 s.c, i.d., i.p., i.m. 및 i.v.를 포함한다. 바람직한 DNA 주사 방법은 i.d., i.m., s.c, i.p. 및 i.v.를 포함한다. 예를 들어, 1 내지 500 mg, 50 μ g 및 1.5 mg, 바람직하게는 10 μ g 내지 500 μ g의 용량의 펩티드 또는 DNA가 제공될 수 있으며, 각각의 펩티드 또는 DNA에 좌우될 수 있다. 이러한 범위의 용량을 이전의 시험에서 연속하여 사용하였다(문헌[Brunsvig P F, et al., Cancer Immunol Immunother. 2006; 55(12): 1553-1564]; 문헌[M. Stachler, et al., ASCO meeting 2007; Abstract No 3017]). 다른 백신 또는 면역원성 조성물의 투여 방법이 당업자에게 알려져 있다.

[0338] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상이한 종양 특이적 신생항원 펩티드 및/또는 폴리펩티드는 신생물 백신 또는 면역원성 조성물에 사용하여, 환자의 신생물/종양에 대한 면역 공격을 생성할 우도를 최대화시키도록 선택된다. 이론에 의해 결부되지 않고, 종양 특이적 신생항원 펩티드의 다양성의 포함은 신생물/종양에 대한 넓은 범위의 면역 공격을 생성할 수 있는 것으로 여겨진다. 일 실시형태에 있어서, 선택된 종양 특이적 신생항원 펩티드/폴리펩티드는 미스센스 돌연변이에 의해 인코딩된다. 제2 실시형태에 있어서, 선택된 종양 특이적 신생항원 펩티드/폴리펩티드는 미스센스 돌연변이 및 neoORF 돌연변이의 조합에 의해 인코딩된다. 제3 실시형태에 있어서, 선택된 종양 특이적 신생항원 펩티드/폴리펩티드는 neoORF 돌연변이에 의해 인코딩된다.

[0339] 선택된 종양 특이적 신생항원 펩티드/폴리펩티드가 미스센스 돌연변이에 의해 인코딩되는 일 실시형태에 있어서, 펩티드 및/또는 폴리펩티드는 환자의 특정 MHC 분자와 회합하는 그들의 능력에 기초하여 선택된다. 또한, neoORF 돌연변이로부터 유래된 펩티드/폴리펩티드는 환자의 특정 MHC 분자와 회합하는 그들의 능력에 기초하여 선택될 수 있을 뿐 아니라, 환자의 특정 MHC 분자와 회합하는 것으로 예측되지 않더라도 선택될 수도 있다.

[0340] 백신 또는 면역원성 조성물은 특이적인 세포독성 T 세포 반응 및/또는 특이적인 헬퍼 T 세포 반응을 야기할 수 있다.

[0341] 백신 또는 면역원성 조성물은 애주번트 및/또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 유용한 애주번트 및 담체의 예는 본원에서 제공되어 있다. 조성물 중의 펩티드 및/또는 폴리펩티드는 담체, 예컨대, 단백질 또는 항원 제시 세포, 예컨대, 펩티드를 T-세포에 제시할 수 있는 수지상 세포(DC)와 회합될 수 있다.

[0342] 애주번트는 백신 또는 면역원성 조성물 내로 혼합되어 돌연변이 펩티드에 대한 면역 반응을 증가시키거나 달리 변형시키는 임의의 물질이다. 담체는 신생항원 펩티드와 회합될 수 있는 스카폴드 구조체, 예를 들면, 폴리펩티드 또는 다당류이다. 선택적으로, 애주번트는 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드에 공유적으로 또는 비공유적으로

로 컨쥬게이트된다.

- [0343] 항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 애쥬번트의 능력은 전형적으로 면역 매개 반응의 유의한 증가 또는 질병 증상의 감소에 의해 표시된다. 예를 들면, 체액성 면역의 증가는 전형적으로 항원에 대해 유도된 항체의 역가의 유의한 증가에 의해 표시되고, T-세포 활성의 증가는 전형적으로 증가된 세포 증식, 세포 독성 또는 사이토카인 분비에 의해 표시된다. 애쥬번트는 예를 들면, 일차 체액성 또는 Th2 반응을 일차 세포성 또는 Th1 반응으로 변화시킴으로써 면역 반응을 변경시킬 수도 있다.
- [0344] 적합한 애쥬번트는 1018 ISS, 알루미늄 염, 암폴리박스, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PEPTEL. 벡터 시스템, PLG 마이크로입자, 레시퀴모드, SRL172, 비로솜 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys, 사포닌, 마이코박테리아 추출물 및 합성 박테리아 세포벽 모방체로부터 유래된 아퀼라스 QS21 스티물론(아퀼라 바이오텍(Aquila Biotech)(Worcester, Mass., USA)) 및 다른 전매특허 애쥬번트, 예컨대, 리비스 데톡스(Ribi's Detox). 퀴ل(Quil) 또는 슈퍼포스(Superfos)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 수지상 세포에 특이적인 몇몇의 면역학적 애쥬번트(예를 들면, MF59) 및 그들의 제제가 종래에 기재되어 있다(문헌[Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186(1): 18-27]; 문헌[Allison A C; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11]). 사이토카인도 사용될 수 있다. 몇몇의 사이토카인이 림프 조직으로의 수지상 세포 이동에 대한 영향(예를 들면, TNF- α), T 림프구를 위한 효율적인 항원 제시 세포로의 수지상 세포의 성숙의 가속화(예를 들면, GM-CSF, IL-1 및 IL-4)(전문이 본원에 참고로 구체적으로 포함되는 미국 특허 제5,849,589호) 및 면역애쥬번트로서의 작용(예를 들면, IL-12)(문헌[Gabrilovich DI, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418])과 직접적으로 연관되어 있다.
- [0345] 톨 유사 수용체(TLR)도 애쥬번트로 사용될 수 있으며, "병원체-관련 분자 패턴"(PAMPS)으로 지칭되는 많은 미세 유기체에 의해 공유되는 보존된 모티프를 인식하는 패턴 인식 수용체(PRR)의 과의 중요한 구성원이다. 이들 "위험 신호"의 인식은 선천성 및 후천성 면역계의 다중의 요소를 활성화시킨다. TLR은 선천성 및 후천성 면역계의 세포, 예를 들어, 수지상 세포(DC), 대식구, T 및 B 세포, 비만 세포 및 과립구에 의해 발현되며, 상이한 세포 구획, 예를 들어, 원형질막, 리소솜, 엔도솜 및 엔도리소솜에 국소화된다. 상이한 TLR은 별개의 PAMPS를 인식한다. 예를 들어, TLR4는 박테리아 세포벽에 함유된 LPS에 의해 활성화되며, TLR9는 비메틸화 박테리아 또는 바이러스 CpG DNA에 의해 활성화되고, TLR3은 이중 가닥 RNA에 의해 활성화된다. TLR 리간드 결합은 하나 이상의 세포내 신호전달 경로의 활성화를 야기하여, 궁극적으로 염증 및 면역성과 관련된 많은 주요 분자(특히, 전사 인자 NF- κ B 및 I형 인터페론)의 생성을 야기한다. TLR 매개의 DC 활성화는 증진된 DC 활성화, 식세포작용, 활성화 및 동시-자극 마커, 예를 들어, CD80, CD83 및 CD86의 상향조절, DC가 배출 림프절로 이동하게 하고, T 세포로의 항원 제시를 용이하게 하는 CCR7의 발현 및 사이토카인, 예를 들어, I형 인터페론, IL-12 및 IL-6의 증가된 분비를 야기한다. 이들 다운스트림 사건의 전부는 후천성 면역 반응의 유도에 결정적이다.
- [0346] 현재 임상 개발 중인 가장 유망한 암 백신 또는 면역원성 조성물 애쥬번트 중 하나는 TLR9 효능제 CpG 및 합성 이중 가닥 RNA(dsRNA) TLR3 리간드 폴리-ICLC이다. 예비임상 연구에서, 폴리-ICLC는 그의 염증유발성 사이토카인의 유도 및 IL-10의 자극의 결여 및, DC에서의 높은 수준의 동시-자극 분자의 유지로 인하여, LPS 및 CpG와 비교하여 가장 강력한 TLR 애쥬번트인 것으로 보인다. 추가로, 폴리-ICLC는 최근에, 인간 파필로마바이러스(HPV)16 캡소머로 이루어진 단백질 백신 또는 면역원성 조성물을 위한 애쥬번트로서 비-인간 영장류(레서스 원숭이)에서 CpG와 직접 비교되었다(문헌[Stahl-Hennig C, Eisenblatter M, Jasny E, et al. Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. PLoS pathogens. Apr 2009;5(4)]).
- [0347] CpG 면역 자극 올리고뉴클레오티드도 또한 백신 또는 면역원성 조성물 환경에서 애쥬번트의 효과를 증진시키는 것으로 나타났다. 이론에 결부되지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 톨-유사 수용체(TLR), 주로 TLR9를 통해 선천성(비-적응) 면역계를 활성화시킴으로써 작용한다. CpG 촉발된 TLR9 활성화는 펩티드 또는 단백질 항원, 생 또는 사멸 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포 백신 및 예방적 및 치료적 백신 둘 모두의 다당류 컨쥬게이트를 포함한 매우 다양한 항원에 대한 항원-특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게 이는 수지상 세포 성숙 및 분화를 향상시켜, Th1 세포의 활성화를 향상시키며 강한 세포독성 T-림프구(CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움의 부재하에서도 향상시킨다. TLR9 자극에 의해 유도된 Th1 편향은 보통 Th2 편향을 촉진시키는 알루미늄(alum) 또는 불완전 프레온트 애쥬번트(IFA)와 같은 백신 애쥬번트의 존재하에서도 유지된다. CpG 올리고뉴

클리오티드는 다른 애주번트와 제형화되거나 동시-투여되는 경우 또는 특히 항원이 상대적으로 약한 경우 강한 반응을 유도하는데 필요한 제형, 예를 들어, 마이크로입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 유사한 제형에서 훨씬 더 큰 애주번트 활성을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 몇몇의 연구에서 항원 용량이 대략 수십 배 감소되게 하여, CpG가 없는 전체-용량 백신에 대한 유사한 항체 반응을 갖게 할 수 있다(문헌[Arthur M. Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, Jun. 2006, 471-484]). 미국 특허 제6,406,705 B1호는 항원-특이적 면역 반응을 유도하기 위한, CpG 올리고뉴클레오타이드, 비-핵산 애주번트 및 항원의 병용을 기재한다. 상업적으로 입수 가능한 CpG TLR9 길항제는 몰로젠(Mologen)(Berlin, GERMANY)에 의한 dSLIM(double Stem Loop Immunomodulator)이며 이는 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 성분이다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9와 같은 다른 TLR 결합 분자도 또한 이용될 수 있다.

[0348] 유용한 애주번트의 다른 예는 화학적으로 변형된 CpG(예를 들어, CpR, Idera), 폴리(I:C)(예를 들어, 폴리:CI2U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA, 및 면역활성 소분자 및 항체, 예를 들어, 사이클로포스파미드, 수니티닙(sunitinib), 베바시주맙(bevacizumab), 셀레브렉스(celebrex), NCX-4016, 실테나필(sildenafil), 타달라필(tadalafil), 바르테나필(vardenafil), 소라피닙(sorafenib), XL-999, CP-547632, 파조파닙(pazopanib), ZD2171, AZD2171, 이필리무맙(ipilimumab), 트레멜리무맙(tremelimumab) 및 SC58175를 포함하나 이들에 한정되지 않으며, 이는 치료적으로 및/또는 애주번트로서 작용할 수 있다. 본 발명의 맥락에서 유용한 애주번트 및 첨가제의 양 및 농도는 과도한 실험 없이 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 추가의 애주번트는 콜로니-자극 인자, 예를 들어, 과립구 대식구 콜로니 자극 인자(GM-CSF, 사그라모스팀(sargramostim))를 포함한다.

[0349] 폴리-ICLC는 약 5000개 뉴클레오타이드의 평균 길이의 폴리I 및 폴리C 가닥으로 이루어진 합성에 의해 제조된 이중-가닥 RNA이며, 이는 폴리라이신 및 카르복시메틸셀룰로스의 첨가에 의해 열 변성 및 혈청 뉴클레아제에 의한 가수분해에 안정화된다. 화합물은 TLR3 및 MDA5의 RNA 헬리카제-도메인(둘 모두 PAMP 과의 구성원임)을 활성화시켜, DC 및 자연 살해(NK) 세포 활성화 및 I형 인터페론, 사이토카인 및 케모카인의 "천연 믹스(mix)"의 생성을 야기한다. 추가로, 폴리-ICLC는 2개의 IFN-유도성 핵 효소 시스템, 2'5'-OAS 및 PKR(4-6)로도 알려져 있는 P1/eIF2a 키나제, 및 RIG-I 헬리카제 및 MDA5에 의해 매개되는 더욱 직접적이고 광범위한 숙주-표적화된 항-감염성 및 아마도 항종양 효과를 가한다.

[0350] 설치류 및 비-인간 영장류에서, 폴리-ICLC는 바이러스 항원에 대한 T 세포 반응, 교차-프라이밍, 및 종양-, 바이러스- 및 자가항원-특이적 CD8+ T-세포의 유도를 증진시키는 것으로 보였다. 비-인간 영장류에서의 최근의 연구에서, 폴리-ICLC는 DC 표적화된 또는 비-표적화된 HIV Gag p24 단백질에 대한 항원 반응 및 T-세포 면역성의 생성에 필수적인 것으로 관찰되어, 백신 애주번트로서의 그의 유효성을 강조한다.

[0351] 인간 대상체에서, 연속 전혈 시료의 전사 분석에 의해, 1회의 단일의 폴리-ICLC의 피하 투여를 제공받은 8명의 건강한 인간 공여자 간에 유사한 유전자 발현 프로파일, 및 이들 8명의 대상체 대 위약을 제공받은 4명의 대상체 간에 최대 212개의 유전자의 차별적인 발현이 드러났다. 현저하게, 매우 효율적인 황열 백신 YF17D로 면역화된 자원자로부터의 이전의 데이터에 대한 폴리-ICLC 유전자 발현 데이터의 비교에 의해, 선천성 면역계의 경로를 포함하는 다수의 전사 및 신호 전달 정규 경로가 피크 시점에서 유사하게 상향조절되었음이 나타났다.

[0352] 더욱 최근에, 단독의 고환암 항원 NY-ESO-1 유래의 긴 합성 중첩 펩티드(OLP), 또는 몬타나이드-ISA-51, 또는 1.4 mg의 폴리-ICLC 및 몬타나이드를 사용한 피하 백신접종의 단계 1 연구로 처리된, 제2 또는 제3 완전 임상 관해의 난소, 나팔관 및 원발성 복막암이 있는 환자에 대하여 면역학적 분석이 보고되었다. NY-ESO-1-특이적 CD4+ 및 CD8+ T-세포 및 항체 반응의 생성은 단독의 OLP 또는 OLP 및 몬타나이드에 비하여, 폴리-ICLC 및 몬타나이드의 첨가로 현저하게 향상되었다.

[0353] 본 발명에 따른 백신 또는 면역원성 조성물은 1가지 초과와 상이한 애주번트를 포함할 수 있다. 추가로, 본 발명은 본원에 논의된 것 중 임의의 것을 포함하는 임의의 애주번트 물질을 포함하는 치료적 조성물을 포함한다. 또한, 펩티드 또는 폴리펩티드, 및 애주번트가 임의의 적절한 순서로 따로 투여될 수 있는 것이 고려된다.

[0354] 담체는 애주번트와 독립적으로 존재할 수 있다. 담체는 항원에 공유 결합될 수 있다. 담체는 또한, 항원을 인코딩하는 DNA와 프레임 내로 담체를 인코딩하는 DNA를 삽입함으로써 항원에 부가될 수 있다. 담체의 기능은 예를 들어, 안정성을 부여하거나, 생물학적 활성을 증가시키거나, 혈청 반감기를 증가시키는 것일 수 있다. 반감기의 연장은 적용 횟수를 줄이고 용량을 낮추는데 도움을 줄 수 있으며, 이에 따라, 치료적 이유뿐 아니라 경제적 이유로 유리하다. 추가로, 담체는 T-세포로의 펩티드의 제시를 보조할 수 있다. 담체는 당업자에게 알려져 있는 임의의 적합한 담체, 예를 들어, 단백질 또는 항원 제시 세포일 수 있다. 담체 단백질은 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 단백질, 예를 들어, 트랜스페린, 소 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, 티로

글로불린 또는 오브알부민, 면역글로불린 또는 호르몬, 예를 들어, 인슐린 또는 팔미트산일 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 인간의 면역화를 위하여, 담체는 인간에게 허용 가능하고 안전한, 생리학적으로 허용되는 담체일 수 있다. 그러나, 과상풍 독소이드 및/또는 디프테리아 독소이드는 본 발명의 일 실시형태에 있어서 적합한 담체이다. 대안적으로, 담체는 텍스트란, 예를 들어, 세파로스일 수 있다.

[0355] 세포독성 T-세포(CTL)는 무손상 외래 항원 그 자체보다는 MHC 분자에 결합된 펩티드의 형태의 항원을 인식한다. MHC 분자 그 자체는 항원 제시 세포의 세포 표면에 위치한다. 따라서, CTL의 활성화는 오직 펩티드 항원, MHC 분자 및 APC의 삼량체 복합체가 존재하는 경우에만 가능하다. 상응하여, 그것은 펩티드가 CTL의 활성화를 위해 사용되는 경우뿐 아니라, 추가적으로 각각의 MHC 분자를 갖는 APC가 첨가되는 경우에 면역 반응을 증진시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 따른 백신 또는 면역원성 조성물은 추가로 적어도 하나의 항원 제시 세포를 함유한다.

[0356] 항원-제시 세포(또는 자극인자 세포)는 전형적으로 그의 표면 상에 MHC 클래스 I 또는 II 분자를 가지며, 일 실시형태에 있어서, 실질적으로 그 자체가 MHC 클래스 I 또는 II 분자에 선택된 항원을 로딩할 수 없다. 본원에 더욱 상세히 기재되어 있는 바와 같이, MHC 클래스 I 또는 II 분자에는 시험관내에서 선택된 항원이 용이하게 로딩될 수 있다.

[0357] CD8+ 세포 활성화는 CD4+ 세포의 사용을 통해 증강될 수 있다. 종양 항원에 대한 CD4 T+ 세포 에피토프의 확인은 관심이 고쳐지는데, 그 이유는 암에 대한 많은 면역 기반의 치료법이 CD8+ 및 CD4+ T 림프구 둘 모두가 환자의 종양을 표적화하기 위해 사용된다면 더욱 효율적일 수 있기 때문이다. CD4+ 세포는 CD8 T 세포 반응을 증진시킬 수 있다. 동물 모델에서의 많은 연구에 의해, CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 모두가 항-종양 반응에 참여하는 경우 보다 나은 결과가 명백하게 입증되었다(예를 들어, 문헌[Nishimura et al. (1999) Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (TH1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. J Ex Med 190:617-27] 참조). 상이한 유형의 암에 대한 치료법의 개발에 적용 가능한 보편적 CD4+ T 세포 에피토프가 확인되었다(예를 들어, 문헌[Kobayashi et al. (2008) Current Opinion in Immunology 20:221-27] 참조). 예를 들어, 과상풍 독소이드 유래의 HLA-DR 제한 헬퍼 펩티드를 흑색종 백신에 사용하여, CD4+ T 세포를 비특이적으로 활성화시켰다(예를 들어, 문헌[Slingluff et al. (2007) Immunologic and Clinical Outcomes of a Randomized Phase II Trial of Two Multi-peptide Vaccines for Melanoma in the Adjuvant Setting, Clinical Cancer Research 13(21):6386-95] 참조). 그러한 CD4+ 세포가 그들의 종양 특이성을 달라지게 하는 3가지 수준으로 적용 가능할 수 있는 것이 본 발명의 범주 내인 것으로 고려된다: 1) 보편적 CD4+ 에피토프(예를 들어, 과상풍 독소이드)를 사용하여 CD8+ 세포를 보강할 수 있는 광범위한 수준; 2) 종양-관련 고유 CD4+ 에피토프를 사용하여 CD8+ 세포를 보강할 수 있는 중간 수준; 및 3) 신생항원 CD4+ 에피토프를 사용하여 환자 특이적 방식으로 CD8+ 세포를 보강할 수 있는 환자 특이적 수준.

[0358] 또한, CD8+ 세포 면역성은 신생항원 로딩된 수지상 세포(DC) 백신으로 생성될 수 있다. DC는 T 세포 면역성을 개시하는 강력한 항원-제시 세포이며, 예를 들어, 직접 펩티드 주사에 의해 하나 이상의 관심 펩티드가 로딩되는 경우, 암 백신으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 전이성 흑색종으로 새로이 진단받은 환자는 IL-12p70-생성 환자 DC 백신을 통하여 자가 펩티드 펄싱된 CD40L/IFN- γ -활성화 성숙 DC와 함께 3개의 HLA-A*0201-제한 gp100 흑색종 항원-유래 펩티드에 대하여 면역화된 것으로 나타났다(예를 들어, 문헌[Carreno et al (2013) L-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity, Journal of Clinical Investigation, 123(8):3383-94] 및 문헌[Ali et al. (2009) In situ regulation of DC subsets and T cells mediates tumor regression in mice, Cancer Immunotherapy, 1(8):1-10] 참조). 신생항원 로딩된 DC가 합성 TLR 3 효능제 폴리이노신-폴리시티딜산-폴리-L-라이신 카르복시메틸셀룰로스(폴리-ICLC)를 사용하여 DC를 자극하여 제조될 수 있는 것이 본 발명의 범주 내인 것으로 고려된다. 폴리-ICLC는 CD83 및 CD86의 상향조절, 인터류킨-12(IL-12), 종양 괴사 인자(TNF), 인터페론 감마-유도 단백질 10(IP-10), 인터류킨 1(IL-1) 및 I형 인터페론(IFN)의 유도 및 최소 인터류킨 10(IL-10) 생성에 의해 평가시, 인간 DC에 대한 강력한 개별 성숙 자극제이다. DC를 백혈구분리 반출술에 의해 수득되는 동결된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 분화시킬 수 있는 한편, PBMC를 피콜(Ficoll) 기울기 원심분리에 의해 분리하고, 분취물로 동결시킬 수 있다.

[0359] 예시적으로, 하기의 7일 활성화 프로토콜을 사용할 수 있다. 1일 - PBMC를 해동시키고, 조직 배양 플라스크에 플레이팅하여, 조직 배양 인큐베이터에서 37°C에서 1 내지 2시간 인큐베이션시킨 후에 플라스틱 표면에 부착된 단핵구를 선택한다. 인큐베이션 후에, 림프구를 세척해내고, 부착 단핵구를 인터류킨-4(IL-4) 및 과립구 대식구-콜로니 자극 인자(GM-CSF)의 존재하에 5일 동안 배양하여, 미성숙 DC로 분화시킨다. 제6일에, 미성숙 DC를 백신의 품질에 대한 조절의 역할을 하는 키홀 림프 헤모시아닌(KLH) 단백질로 펄싱시키고, 백신의 면역원성을 부

스팅시킬 수 있다. DC를 자극하여 성숙시키고, 펩티드 항원을 로딩하고, 하룻밤 인큐베이션시킨다. 제7일에, 세포를 세척하고, 속도 조절 동결기를 사용하여 4 내지 20×10^6 개 세포를 함유하는 1 ml 분취액에서 동결시켰다. DC의 뱃치에 대한 로트 출하(Lot release) 시험을 수행하여, DC를 환자에게 주사하기 전에 최소 사양을 만족시킬 수 있다(예를 들어, 문헌[Sabado et al. (2013) Preparation of tumor antigen-loaded mature dendritic cells for immunotherapy, J. Vis Exp. Aug 1;(78). doi: 10.3791/50085] 참조).

[0360] DC 백신은 환자로의 전달을 용이하게 하기 위해 스캐폴드 시스템으로 혼입될 수 있다. DC 백신을 사용한 환자 신생물의 치료적 처치는 숙주 수지상 세포를 동원하는 인자를 장치에 방출시키고, 항원을 방출하면서 애췌번트(예를 들어, 위험 신호)를 국소 제시함으로써 잔류 미성숙 DC를 분화시키며, DC가 T 세포와 상호작용하여 암 신생항원에 대한 강력한 세포독성 T 림프구 반응을 생성할 수 있는 림프절(또는 요망되는 작용 부위)로의 활성화된, 항원 로딩된 DC의 방출을 촉진시키는 생체물질 시스템을 사용할 수 있다. 이식 가능한 생체물질을 사용하여 환자 특이적 방식으로 신생물에 대한 강력한 세포독성 T 림프구 반응을 생성할 수 있다. 그 다음, 생체물질로부터의 항원의 방출과 협력하여 감염을 모방하는 위험 신호에 그들을 노출시킴으로써 생체물질-잔류 수지상 세포를 활성화시킬 수 있다. 그 다음, 활성화된 수지상 세포를 생체물질로부터 림프절로 이동시켜, 세포독성 T 이펙터 반응을 유도한다. 이러한 접근법은 종양 생검으로부터 제조된 용해물을 사용한 예비임상 연구에서, 확립된 흑색종의 퇴행을 야기하는 것으로 이전에 입증되어 있으며(예를 들어, 문헌[Ali et al. (2009) In situ regulation of DC subsets and T cells mediates tumor regression in mice, Cancer Immunotherapy 1(8):1-10]; 문헌[Ali et al. (2009) Infection-mimicking materials to program dendritic cells in situ. Nat Mater 8:151-8] 참조), 그러한 백신은 현재 대나-파버 암연구소(Dana-Farber Cancer Institute)에서 최근에 개시된 단계 I 임상 시험에서 시험 중이다. 또한, 이러한 접근법은 현 제안에서, C6 랫트 신경교종 모델.24를 사용하여 교모세포종의 퇴행, 및 강력한 기억 반응의 유도를 야기하여, 재발을 방지하는 것으로 나타났다. 종양 특이적 수지상 세포 활성화를 증폭시키고 유지하기 위한 그러한 이식 가능한 바이오매트릭스 백신 전달 스캐폴드의 능력은 종래의 피하 또는 림프절 내 백신 투여에 의해 달성될 수 있는 것보다 더욱 강력한 항-종양 면역감작을 야기할 수 있다.

[0361] 바람직하게는, 항원 제시 세포는 수지상 세포이다. 적합하게는, 수지상 세포는 신생항원 펩티드가 펄싱된 자가 수지상 세포이다. 펩티드는 적절한 T-세포 반응을 야기하는 임의의 적합한 펩티드일 수 있다. 종양 관련 항원 유래의 펩티드로 펄싱된 자가 수지상 세포를 사용한 T-세포 치료법은 문헌[Murphy et al. (1996) The Prostate 29, 371-380] 및 문헌[Tjua et al. (1997) The Prostate 32, 272-278]에 개시되어 있다.

[0362] 따라서, 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 항원 제시 세포를 함유하는 백신 또는 면역원성 조성물에는 본 발명의 하나 이상의 펩티드가 펄싱되거나 로딩된다. 대안적으로, 환자로부터 단리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에는 생체외에서 펩티드가 로딩되고, 환자로 다시 주사될 수 있다. 대안적으로, 항원 제시 세포는 본 발명의 펩티드를 인코딩하는 발현 작제물을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 그것이 수지상 세포를 형질도입시켜, 펩티드의 제시 및 면역성의 유도를 야기할 수 있는 것이 바람직하다.

[0363] 본 발명의 약제학적 조성물은 조성물에 존재하는 펩티드의 선택, 수 및/또는 양이 조직, 암 및/또는 환자-특이적이라도 컴파일링(compiled)된다. 예를 들어, 펩티드의 정확한 선택은 주어진 조직에서의 모체 단백질의 발현 패턴에 의해 안내되어, 부작용을 피할 수 있다. 선택은 특정 유형의 암, 질병의 상태, 보다 조기의 치료 섭생, 환자의 면역 상태 및 물론 환자의 HLA-단상형에 좌우될 수 있다. 추가로, 본 발명에 따른 백신 또는 면역원성 조성물은 특정 환자의 개인적 요구에 따라, 개별화된 성분을 함유할 수 있다. 예는 특정 환자에서의 관련 신생항원의 발현에 따른 펩티드의 양의 변화, 개인적 알러지 또는 다른 처치로 인한 원치않는 부작용, 및 치료 계획 또는 제1차 치료 후의 제2 치료에 대한 조정을 포함한다.

[0364] 본 발명의 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물은 이미 암을 앓고 있는 개체에게 투여될 수 있다. 치료적 응용에서, 조성물은 종양 항원에 대하여 유효한 CTL 반응을 유도하고, 증상 및/또는 합병증을 치유하거나 적어도 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로 환자에게 투여된다. 이를 달성하기에 적당한 양은 "치료적 유효 용량"으로 정의된다. 이러한 이용에 유효한 양은 펩티드 조성, 투여 방식, 치료 중인 질병의 병기 및 중증도, 환자의 체중 및 일반적 건강 상태 및 처방하는 의사의 판단에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로, 초기 면역화(치료적 또는 예방적 투여를 위함)를 위해서 70 kg 환자에 대하여 약 1.0 μ g 내지 약 50,000 μ g의 펩티드 범위이며, 부스팅 용량, 또는 아마도 환자의 혈액 중 특이적 CTL 활성을 측정함으로써 그리고 환자의 반응 및 질환에 따라 수주 내지 수개월에 걸친 부스팅 섭생에 따른 약 1.0 μ g 내지 약 10,000 μ g의 펩티드 범위이다. 본 발명의 펩티드 및

조성물은 일반적으로 특히 암이 전이되는 경우에, 생명을 위협하거나 잠재적으로 생명을 위협하는 상황인 중증의 질병 상태에 사용될 수 있음을 유념해야 한다. 치료적 이용을 위하여, 투여는 종양의 검출 또는 수술적 제거 후 가능한 빨리 시작해야 한다. 이는 적어도 증상이 실질적으로 악화될 때까지 그리고 그 후 소정의 기간 동안 부스팅 용량으로 이어진다.

[0365] 치료적 처치를 위한 약제학적 조성물(예를 들어, 백신 조성물)은 비경구, 국소, 비강, 경구 또는 국소 투여용으로 의도된다. 바람직하게는 약제학적 조성물은 비경구, 예를 들어, 정맥내, 피하, 피내 또는 근육내 투여된다. 조성물은 수술 절제 부위에 투여되어, 종양에 대한 국소 면역 반응을 유도할 수 있다. 본 발명은 펩티드의 용액을 포함하는 비경구 투여를 위한 조성물을 제공하며, 백신 또는 면역원성 조성물은 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체 중에 용해되거나 현탁화된다. 다양한 수성 담체, 예를 들어, 물, 완충수, 0.9% 염수, 0.3% 글리신, 히알루론산 등이 사용될 수 있다. 이들 조성물은 통상의 잘 알려져 있는 멸균 기술에 의해 멸균되거나 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액을 그대로의 사용을 위해 포장하거나, 동결건조시킬 수 있으며, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 용액과 배합된다. 조성물은 생리학적 조건에 근접되기 위해 필요한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들어, pH 조절제 및 완충제, 장성 조절제, 습윤제 등, 예를 들어, 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 등을 함유할 수 있다.

[0366] 펩티드를 함유하는 리포솜 현탁액은 특히, 투여 방식, 전달되는 펩티드 및 치료되는 질병의 병기에 따라 달라지는 용량으로, 정맥내, 국소, 국부 등으로 투여될 수 있다. 면역 세포로의 표적화를 위하여, 리간드, 예를 들어, 요망되는 면역계 세포의 세포 표면 결정기에 특이적인 항체 또는 그의 단편이 리포솜에 혼입될 수 있다.

[0367] 고체 조성물에 있어서, 예를 들어, 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 사카린나트륨, 활석, 셀룰로스, 글루코스, 수크로스, 탄산마그네슘 등을 포함하는 종래의 또는 나노입자 비독성 고체 담체가 사용될 수 있다. 경구 투여를 위하여, 약제학적으로 허용되는 비독성 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제 중 임의의 것, 예를 들어, 이전에 열거된 담체 및 일반적으로, 본 발명의 하나 이상의 펩티드인, 10 내지 95%, 더욱 바람직하게는 25% 내지 75%의 농도의 활성 성분을 혼입시킴으로써 형성된다.

[0368] 에어로졸 투여를 위하여, 면역원성 펩티드는 바람직하게는 계면활성제 및 추진제와 함께 미분된 형태로 공급된다. 펩티드의 전형적인 백분율은 중량 기준으로, 0.01% 내지 20%, 바람직하게는 1% 내지 10%이다. 계면활성제는 물론 비독성이며, 바람직하게는 추진제 중에 가용성일 수 있다. 그러한 작용제를 대표하는 것은 6 내지 22개의 탄소 원자를 함유하는 지방산의 에스테르 또는 부분 에스테르, 에컨대 지방족 다가 알콜 또는 그의 환형 무수물을 갖는 카프로산, 옥탄산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레스테르산 및 올레산이다. 혼합된 에스테르, 에컨대 혼합 또는 천연 글리세리드가 사용될 수 있다. 계면활성제는 조성물의 0.1 중량% 내지 20 중량%, 바람직하게는 0.25 중량% 내지 5 중량%를 구성할 수 있다. 조성의 평형은 일반적인 추진제이다. 담체, 예를 들어, 비강내 전달용 레시틴도 또한 필요에 따라 포함될 수 있다.

[0369] 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 오염 박테리아 또는 동물 물질이 없는 시약을 사용하여 화학적으로 용이하게 합성될 수 있다(문헌[Merrifield RB: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85:2149-54, 1963]).

[0370] 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 또한 벡터, 예를 들어, 본원에 논의된 바와 같은 핵산 분자, 예를 들어, RNA 또는 DNA 플라스미드, 바이러스 벡터, 예를 들어, 폭스바이러스, 예를 들어, 오소폭스바이러스, 조류폭스 바이러스 또는 아데노바이러스, AAV 또는 렌티 바이러스에 의해 발현될 수 있다. 이러한 접근법은 본 발명의 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현하기 위한 벡터의 이용을 포함한다. 급성 또는 만성 감염된 숙주로의 또는 비감염된 숙주로의 도입시에, 벡터는 면역원성 펩티드를 발현하며, 이에 의해, 숙주 CTL 반응을 유도한다.

[0371] 치료 목적 또는 면역화 목적을 위하여, 본 발명의 펩티드를 인코딩하는 핵산 및 본원에 기재된 펩티드 중 하나 이상도 또한 환자에게 투여될 수 있다. 수많은 방법이 핵산을 환자에 전달하기 위해 알맞게 사용된다. 예를 들어, 핵산은 "네이키드 DNA"로서 직접 전달될 수 있다. 이러한 접근법은 예를 들어, 문헌[Wolff et al., Science 247: 1465-1468 (1990)] 및 미국 특허 제5,580,859호 및 제5,589,466호에 기재되어 있다. 또한, 핵산은 예를 들어, 미국 특허 제5,204,253호에 기재된 바와 같이 볼리스틱(ballistic) 전달을 사용하여 투여될 수 있다. 단지 DNA만으로 이루어진 입자가 투여될 수 있다. 대안적으로, DNA는 입자, 예를 들어, 금 입자에 부착될 수 있다. 일반적으로, 백신 또는 면역원성 조성물을 위한 플라스미드는 숙주 세포, 예를 들어, 포유류 세포로부터 항원의 발현 또는 발현 및 분비를 조절하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 항원(예를 들어, 하나 이상의 신생항원)을 인코딩하는 DNA; 예를 들어, 업스트림에서 다운스트림으로, 프로모터, 예를 들어, 포유류 바이러스

프로모터(예를 들어, CMV 프로모터, 예를 들어, hCMV 또는 mCMV 프로모터, 예를 들어, 조기-중간 프로모터 또는 SV40 프로모터 -- 유용한 프로모터에 대해서는 본원에 인용되거나 포함된 문헌 참조)에 대한 DNA, 분비를 위한 진핵 리더 펩티드(예를 들어, 조직 플라스미노겐 활성화제)에 대한 DNA, 신생항원(들)에 대한 DNA 및 종결자(예를 들어, 소 성장 호르몬 또는 bGH polyA를 인코딩하는 유전자로부터의 3' UTR 전사 종결자)를 인코딩하는 DNA를 포함할 수 있다. 조성물은 1가지 초과 플라스미드 또는 벡터를 함유할 수 있으며, 이에 의해, 각 벡터는 상이한 신생항원을 함유하고 발현한다. 또한, Wasmoen의 미국 특허 제5,849,303호 및 Dale의 미국 특허 제5,811,104호가 언급되며, 그 본문이 유용할 수 있다. DNA 또는 DNA 플라스미드 제형은 양이온성 지질과 함께 또는 그 내에서 제형화될 수 있으며; 양이온성 지질 및 애쥬번트에 관하여, Loosmore의 미국 특허 출원 제2003/0104008호도 또한 언급된다. 또한, 생체 내에서 함유하고 발현하는 DNA 플라스미드의 작제 및 사용에 사용될 수 있는 DNA 플라스미드 교시를 위하여, Audonnet의 미국 특허 제6,228,846호 및 제6,159,477호의 교시에 의존될 수 있다.

[0372] 또한, 핵산은 양이온 화합물, 예를 들어, 양이온 지질로 복합체화되어 전달될 수 있다. 지질-매개의 유전자 전달 방법은 예를 들어, WO1996/18372호; WO 1993/24640호; 문헌[Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7): 682-691 (1988)]; 미국 특허 제5,279,833호; WO 1991/06309호; 및 문헌[Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414 (1987)]에 기재되어 있다.

[0373] 관심 펩티드를 인코딩하는 RNA(예를 들어, mRNA)도 또한 전달을 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kiken et al, 2011]; 문헌[Su et al, 2011] 참조; 또한, US 8278036호; 문헌[Halabi et al. J Clin Oncol (2003) 21:1232-1237]; 문헌[Petsch et al, Nature Biotechnology 2012 Dec 7;30(12): 1210-6] 참조).

[0374] 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는 폭스바이러스, 예를 들어, 코르도폭스바이러스(*Chordopoxvirinae*) 상과 폭스바이러스(척추동물의 폭스바이러스), 예를 들어, 오소폭스바이러스 및 조류폭스 바이러스, 예를 들어, 백시니아 바이러스(예를 들어, Wyeth 균주, WR 균주(예를 들어, ATCC® VR-1354), 코펜하겐 균주, NYVAC, NYVAC.1, NYVAC.2, MVA, MVA-BN), 카나리아두 바이러스(예를 들어, Wheatley C93 균주, ALVAC), 계두 바이러스(예를 들어, FP9 균주, Webster 균주, TROVAC), 도브폭스(dovepox), 구두(pigeonpox), 메추리두(quailpox) 및 라쿤 폭스(raccoon pox), 특허 그의 합성 또는 비천연 발생 재조합체, 그의 용도 및 그러한 재조합체의 제조 및 이용 방법에 관한 정보는 각각이 본원에 참조로 포함되는 하기와 같은 과학 및 특허 문헌에서 찾을 수 있다:

[0375] 미국 특허 제4,603,112호, 제4,769,330호, 제5,110,587호, 제5,174,993호, 제5,364,773호, 제5,762,938호, 제5,494,807호, 제5,766,597호, 제7,767,449호, 제6,780,407호, 제6,537,594호, 제6,265,189호, 제6,214,353호, 제6,130,066호, 제6,004,777호, 제5,990,091호, 제5,942,235호, 제5,833,975호, 제5,766,597호, 제5,756,101호, 제7,045,313호, 제6,780,417호, 제8,470,598호, 제8,372,622호, 제8,268,329호, 제8,268,325호, 제8,236,560호, 제8,163,293호, 제7,964,398호, 제7,964,396호, 제7,964,395호, 제7,939,086호, 제7,923,017호, 제7,897,156호, 제7,892,533호, 제7,628,980호, 제7,459,270호, 제7,445,924호, 제7,384,644호, 제7,335,364호, 제7,189,536호, 제7,097,842호, 제6,913,752호, 제6,761,893호, 제6,682,743호, 제5,770,212호, 제5,766,882호 및 제5,989,562호, 및

[0376] 문헌[Panicali, D. Proc. Natl. Acad. Sci. 1982; 79: 4927-493], 문헌[Panicali D. Proc. Natl. Acad. Sci. 1983; 80(17): 5364-8], 문헌[Mackett, M. Proc. Natl. Acad. Sci. 1982; 79: 7415-7419], 문헌[Smith GL. Proc. Natl. Acad. Sci. 1983; 80(23): 7155-9], 문헌[Smith GL. Nature 1983; 302: 490-5], 문헌[Sullivan VJ. Gen. Vir. 1987; 68: 2587-98], 문헌[Perkus M Journal of Leukocyte Biology 1995; 58: 1-13], 문헌[Yilma TD. Vaccine 1989; 7: 484-485], 문헌[Brochier B. Nature 1991; 354: 520-22], 문헌[Wiktor, TJ. Proc. Natl. Acad. Sci. 1984; 81:7194-8], 문헌[Rupprecht, CE. Proc. Natl. Acad. Sci. 1986; 83: 7947-50], 문헌[Poulet, H Vaccine 2007; 25(Jul): 5606-12], 문헌[Weyer J. Vaccine 2009; 27(Nov): 7198-201], 문헌[Buller, RM Nature 1985; 317(6040): 813-5], 문헌[Buller RM. J. Virol. 1988; 62(3):866-74], 문헌[Flexner, C. Nature 1987; 330(6145): 259-62], 문헌[Shida, H. J. Virol. 1988; 62(12): 4474-80], 문헌[Kotwal, GJ. J. Virol. 1989; 63(2): 600-6], 문헌[Child, SJ. Virology 1990; 174(2): 625-9], 문헌[Mayr A. Zentralbl Bakteriell 1978; 167(5,6): 375-9], 문헌[Antoine G. Virology. 1998; 244(2): 365-96], 문헌[Wyatt, LS. Virology 1998; 251 (2): 334-42], 문헌[Sancho, MC. J. Virol 2002; 76(16): 8313-34], 문헌[Gallego-Gomez, JC. J. Virol. 2003; 77(19): 10606-22], 문헌[Goebel SJ. Virology 1990; (a,b) 179: 247-66], 문헌[Tartaglia, J. Virol. 1992; 188(1): 217-32], 문헌[Najera JL. J. Virol 2006; 80(12): 6033-47],

문헌[Najera, JL. J. Virol. 2006; 80: 6033-6047], 문헌[Gomez, CE. J. Gen. Virol 2007; 88: 2473-78], 문헌[Mooij, P. Jour. Of Virol 2008; 82: 2975-2988], 문헌[Gomez, CE. Curr. Gene Ther. 2011; 11:189-217], 문헌[Cox, W. Virology 1993; 195: 845-50], 문헌[Perkus, M. Jour. Of Leukocyte Biology 1995; 58: 1-13], 문헌[Blanchard TJ. J Gen Virology 1998; 79(5): 1159-67], 문헌[Amara R. Science 2001 ; 292: 69-74], 문헌[Hel, Z., J. Immunol 2001; 167: 7180-9], 문헌[Gherardi MM. J. Virol. 2003; 77: 7048-57], 문헌[Didierlaurent, A. Vaccine 2004; 22: 3395-3403], 문헌[Bissh H. Proc. Nat. Aca. Sci. 2004; 101 : 6641-46], 문헌[McCurdy LH. Clin. Inf. Dis 2004; 38: 1749-53], 문헌[Earl PL. Nature 2004; 428: 182-85], 문헌[Chen Z. J. Virol 2005; 79: 2678-2688], 문헌[Najera JL. J. Virol. 2006; 80(12): 6033-47], 문헌[Nam JH. Acta. Virol 2007; 51 : 125-30], 문헌[Antonis AF. Vaccine 2007; 25: 4818-4827], 문헌[B Weyer J. Vaccine 2007; 25: 4213-22], 문헌[Ferrier-Rembert A. Vaccine 2008; 26(14): 1794-804], 문헌[Corbett M. Proc. Natl. Acad. Sci. 2008; 105(6): 2046-51], 문헌[Kaufman HL., J. Clin. Oncol. 2004; 22: 2122-32], 문헌[Amato, RJ. Clin. Cancer Res. 2008; 14(22): 7504-10], 문헌[Dreicer R. Invest New Drugs 2009; 27(4): 379-86], 문헌[Kantoff PW. J. Clin. Oncol. 2010, 28, 1099-1105], 문헌[Amato RJ. J. Clin. Can. Res. 2010; 16(22): 5539-47], 문헌[Kim, DW. Hum. Vaccine. 2010; 6: 784-791], 문헌[Oudard, S. Cancer Immunol. Immunother. 2011; 60: 261-71], 문헌[Wyatt, LS. Aids Res. Hum. Retroviruses. 2004; 20: 645-53], 문헌[Gomez, CE. Virus Research 2004; 105: 11-22], 문헌[Webster, DP. Proc. Natl Acad, Sci, 2005; 102: 4836-4], 문헌[Huang, X. Vaccine 2007; 25: 8874-84], 문헌[Gomez, CE. Vaccine 2007a; 25: 2863-85], 문헌[Esteban M. Hum. Vaccine 2009; 5: 867-871], 문헌[Gomez, CE. Curr. Gene therapy 2008; 8(2): 97-120], 문헌[Whelan, K.T. Plos one 2009; 4(6): 5934], 문헌[Scriba, TJ. Eur. Jour. Immuno. 2010; 40(1): 279-90], 문헌[Corbett, M. Proc. Natl. Acad. Sci. 2008; 105: 2046-2051], 문헌[Midgley, CM. J. Gen. Virol. 2008; 89: 2992-97], 문헌[Von Krempelhuber, A. Vaccine 2010; 28: 1209-16], 문헌[Perreau, M. J. Of Virol. 2011; Oct: 9854-62], 문헌[Pantaleo, G. Curr Opin HIV-AIDS. 2010; 5: 391-396].

[0377] 본 발명의 실시예에 유용한 아데노바이러스 벡터에 관하여, 미국 특허 제6,955,808호가 언급된다. 사용되는 아데노바이러스 벡터는 Ad5, Ad35, Ad11, C6 및 C7 벡터로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 아데노바이러스 5("Ad5") 계통의 서열이 공개되어 있다(그의 내용이 본원에 참조로 포함되어 있는 문헌[Chroboczek, J., Bieber, F., and Jacrot, B. (1992) The Sequence of the Genome of Adenovirus Type 5 and Its Comparison with the Genome of Adenovirus Type 2, Virology 186, 280-285]). Ad35 벡터는 미국 특허 제6,974,695호, 제6,913,922호 및 제6,869,794호에 기재되어 있다. Ad11 벡터는 미국 특허 제6,913,922호에 기재되어 있다. C6 아데노바이러스 벡터는 미국 특허 제6,780,407호; 제6,537,594호; 제6,309,647호; 제6,265,189호; 제6,156,567호; 제6,090,393호; 제5,942,235호 및 제5,833,975호에 기재되어 있다. C7 벡터는 미국 특허 제6,277,558호에 기재되어 있다. E1-결합 또는 결실, E3-결합 또는 결실 및/또는 E4-결합 또는 결실인 아데노바이러스 벡터도 또한 사용될 수 있다. E1 영역에 돌연변이를 갖는 특정 아데노바이러스는 E1-결합 아데노바이러스 돌연변이체가 비-허용 세포에서 복제-결합이 있거나 적어도 고도로-약독화되기 때문에, 개선된 안전성 여유를 갖는다. E3 영역에 돌연변이를 갖는 아데노바이러스는 아데노바이러스가 MHC 클래스 I 분자를 하향-조절하는 메커니즘을 파괴함으로써 면역원성이 향상될 수 있다. E4 돌연변이를 갖는 아데노바이러스는 후기 유전자 발현의 억제 때문에, 아데노바이러스 벡터의 면역원성이 감소될 수 있다. 그러한 벡터는 동일한 벡터를 사용한 반복된 재-백신접종이 요망되는 경우, 특히 유용할 수 있다. E1, E3, E4, E1 및 E3, 및 E1 및 E4에서 결실되거나 돌연변이된 아데노바이러스 벡터가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 추가로, 모든 바이러스 유전자가 결실된 "무기력(gutless)" 아데노바이러스 벡터도 또한 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 그러한 벡터는 그들의 복제를 위해 헬퍼 바이러스를 필요로 하며, 천연 환경에 존재하지 않는 조건, E1a 및 Cre 둘 모두를 발현하는 특수 인간 293 세포주를 필요로 한다. 그러한 "무기력" 벡터는 비-면역원성이며, 이에 따라, 벡터는 재백신접종을 위해 다수회 접종될 수 있다. "무기력" 아데노바이러스 벡터는 이중 삽입물/유전자, 예를 들어, 본 발명의 트랜스유전자의 삽입을 위해 사용될 수 있으며, 심지어 다수의 이중 삽입물/유전자의 동시-전달을 위해 사용될 수 있다.

[0378] 본 발명의 실시예에 유용한 렌티바이러스 벡터 시스템에 관하여, 미국 특허 제6428953호, 제6165782호, 제6013516호, 제5994136호, 제6312682호 및 제7,198,784호 및 거기에 인용된 문헌이 언급된다.

[0379] 본 발명의 실시예에서 유용한 AAV 벡터에 관하여, 미국 특허 제5658785호, 제7115391호, 제7172893호, 제6953690호, 제6936466호, 제6924128호, 제6893865호, 제6793926호, 제6537540호, 제6475769호 및 제6258595호, 및 거기에 인용된 문헌이 언급된다.

[0380] 또 다른 벡터는 BCG(Bacille Calmette Guerin)이다. BCG 벡터는 문헌[Stover et al. (Nature 351:456-460

(1991))]에 기재되어 있다. 본 발명의 펩티드의 치료적 투여 또는 면역화에 유용한 매우 다양한 다른 벡터, 예를 들어, 살모넬라 타이피(Salmonella typhi) 벡터 등이 본원의 설명으로부터 당업자에게 명백하다.

- [0381] 벡터는 항원 투여에 의해 유도되는 용량 및/또는 반응에 유사한 생체내 발현 및 반응을 갖도록 투여될 수 있다.
- [0382] 본 발명의 펩티드를 인코딩하는 핵산의 바람직한 투여 방식은 다수의 에피토프를 인코딩하는 미니유전자 작제물을 사용한다. 인간 세포에서의 발현을 위하여, 선택된 CTL 에피토프를 인코딩하는 DNA 서열(미니유전자)을 생성하기 위하여, 에피토프의 아미노산 서열은 역 번역된다. 인간 코돈 사용 표를 사용하여 각 아미노산에 대한 코돈 선택을 안내한다. 이들 에피토프-인코딩 DNA 서열은 직접 연결되어, 연속 폴리펩티드 서열을 생성한다. 발현 및/또는 면역원성을 최적화시키기 위하여, 추가의 요소가 미니유전자 설계에 혼입될 수 있다. 역 번역될 수 있으며, 미니유전자 서열에 포함될 수 있는 아미노산 서열의 예에는 헬퍼 T 림프구, 에피토프, 리더(신호) 서열 및 소포체 잔류 신호가 포함된다. 또한, CTL 에피토프의 MHC 제시는 합성(예를 들어, 폴리-알라닌) 또는 천연 발생 플랭킹 서열을 CTL 에피토프에 인접하게 포함함으로써 향상될 수 있다.
- [0383] 미니유전자 서열은 미니유전자의 플러스 및 마이너스 가닥을 인코딩하는 올리고뉴클레오티드를 조립함으로써 DNA로 전환된다. 중첩 올리고뉴클레오티드(30 내지 100개 염기 길이)는 잘 알려져 있는 기술을 사용하여 적절한 조건하에 합성, 인산화, 정제 및 어닐링된다. 올리고뉴클레오티드의 말단은 T4 DNA 리가제(ligase)를 사용하여 연결된다. 그 다음, CTL 에피토프 폴리펩티드를 인코딩하는 이러한 합성 미니유전자는 요망되는 발현 벡터로 클로닝될 수 있다.
- [0384] 당업자에게 널리 알려져 있는 표준 조절 서열을 벡터에 포함시켜, 표적 세포에서의 발현을 보장한다. 몇몇 벡터 요소가 필요하다: 미니유전자 삽입을 위한 다운스트림 클로닝 부위가 있는 프로모터; 효율적인 전사 종결을 위한 폴리아데닐화 신호; 에스케리키아 콜라이 복제 원점; 및 에스케리키아 콜라이 선택 마커(예를 들어, 앰피실린 또는 카나마이신 내성). 많은 프로모터, 예를 들어, 인간 거대세포바이러스(hCMV) 프로모터가 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. 다른 적합한 프로모터 서열에 대하여 미국 특허 제5,580,859호 및 제5,589,466호를 참조한다.
- [0385] 미니유전자 발현 및 면역원성을 최적화하기 위하여, 추가의 벡터 변형이 요망될 수 있다. 일부 경우에, 효율적인 유전자 발현을 위해 인트론이 필요하며, 하나 이상의 합성 또는 천연-발생 인트론이 전사되는 미니유전자의 영역 내로 혼입될 수 있다. 또한, mRNA 안정화 서열의 포함은 미니유전자 발현을 증가시키는 것으로 여겨질 수 있다. 면역 자극 서열(ISS 또는 CpG)이 DNA 백신의 면역원성에서 역할을 수행하는 것이 최근에 제안되었다. 이들 서열은 면역원성을 증진시키는 것으로 관찰된다면, 미니유전자 코딩 서열 외측에 벡터 내에 포함될 수 있다.
- [0386] 일부 실시형태에 있어서, 미니유전자-인코딩된 에피토프, 및 면역원성을 증가시키거나 감소시키기 위해 포함되는 제2 단백질의 생성을 가능하게 하기 위하여, 비시스트론(bicistronic) 발현 벡터가 사용될 수 있다. 동시-발현되는 경우 면역 반응을 유리하게 증가시킬 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드의 예는 사이토카인(예를 들어, IL2, IL12, GM-CSF), 사이토카인-유도 분자(예를 들어, LeIF) 또는 동시자극 분자를 포함한다. 헬퍼(HTL) 에피토프는 세포내 표적화 신호에 연결될 수 있으며, CTL 에피토프와 따로 발현될 수 있다. 이는 CTL 에피토프와 상이한 세포 구획으로의 HTL 에피토프의 지향을 가능하게 할 것이다. 필요에 따라, 이는 MHC 클래스 II 경로로의 HTL 에피토프의 더욱 효율적인 유입을 용이하게 하여, CTL 유도를 향상시킬 수 있다. CTL 유도와 대조적으로, 면역억제 분자(예를 들어, TGF- β)의 동시-발현에 의해 면역 반응을 특이적으로 감소시키는 것은 특정 질병에서 유리할 수 있다.
- [0387] 일단 발현 벡터를 선택하면, 미니유전자를 프로모터의 다운스트림 폴리링커 영역으로 클로닝한다. 이러한 플라스미드를 적절한 에스케리키아 콜라이 균주로 형질전환시키고, DNA를 표준 기술을 사용하여 제조한다. 벡터에 포함되는 미니유전자, 및 모든 다른 요소의 배향 및 DNA 서열을 제한 맵핑 및 DNA 서열 분석을 사용하여 확인한다. 올바른 플라스미드를 지니는 박테리아 세포를 마스터(master) 세포 은행 및 작업용 세포 은행으로 보관할 수 있다.
- [0388] 정제된 플라스미드 DNA를 다양한 제형을 사용한 주사용으로 제조할 수 있다. 이들 중 가장 간단한 것은 멸균 인산염-완충 염수(PBS) 중 동결건조된 DNA의 재구성이다. 다양한 방법이 설명되어 있으며, 신규 기술이 이용 가능하게 될 수 있다. 본원에 언급된 바와 같이, 핵산을 양이온 지질과 편리하게 제형화시킨다. 또한, 보호성, 상호작용성, 비-축합성(PINC)으로서 총칭되는, 당지질, 융합유도성 리포솜, 펩티드 및 화합물이 또한 정제된 플라스미드 DNA로 복합체화되어, 안정성, 근육내 분산, 또는 특정 기관 또는 세포 유형으로의 트래픽킹(trafficking)과 같은 변수에 영향을 미칠 수 있다.

- [0389] 미니유전자-인코딩된 CTL 에피토프의 발현 및 MHC 클래스 I 제시에 대한 기능적 검증으로서 표적 세포 감작화를 사용할 수 있다. 플라스미드 DNA를, 표준 CTL 크로뮬 방출 분석법에 대한 표적으로서 적합한 포유류 세포주 내로 도입한다. 사용된 트랜스펙션 방법은 최종 제형에 좌우된다. "네이키드" DNA에 대해서는 전기천공법이 사용될 수 있는 반면, 양이온 지질은 직접적인 시험관내 트랜스펙션을 가능하게 한다. 녹색 형광 단백질(GFP)을 발현하는 플라스미드를 동시-트랜스펙션시켜, 형광 활성화된 세포 분류(FACS)를 이용하여 트랜스펙션된 세포를 농축시킬 수 있다. 이어서, 이들 세포를 크로뮬-51 표지시키고, 이를 에피토프-특이적 CTL 주에 대한 표적 세포로서 사용한다. ^{51}Cr 방출에 의해 검출된 세포용해는 미니유전자-인코딩된 CTL 에피토프의 MHC 제시의 생성을 나타낸다.
- [0390] 생체내 면역원성은 미니유전자 DNA 제형을 기능적으로 시험하기 위한 제2의 접근법이다. 적절한 인간 MHC 분자를 발현하는 트랜스제닉(transgenic) 마우스를 DNA 산물로 면역화시킨다. 용량 및 투여 경로는 제형 의존적이다(예를 들면, PBS 중의 DNA의 경우에는 근육내이고, 지질-복합체화된 DNA의 경우에는 복강내이다). 면역화 21일 후, 비장 세포를 수집하고, 시험되는 각각의 에피토프를 인코딩하는 펩티드의 존재하에 1주 동안 재자극시킨다. 이들 이펙터 세포(CTL)를 표준 기술을 사용하여, 펩티드-로딩되고 크로뮬-51 표지된 표적 세포의 세포용해에 대해 분석한다. 미니유전자-인코딩된 에피토프에 상응하는 펩티드의 MHC 로딩에 의해 감작화된 표적 세포의 용해는 생체내 CTL 유도를 위한 DNA 백신 기능을 입증해준다.
- [0391] 펩티드를 사용하여, 또한 생체외에서 CTL을 유도할 수 있다. 생성된 CTL을 사용하여, 기타 종래의 형태의 치료법에 반응하지 않거나 또는 펩티드 백신 치료 접근법에 반응하지 않는 만성 종양의 치료를 필요로 하는 환자에서 만성 종양을 치료할 수 있다. 특정 종양 항원에 대한 생체외 CTL 반응은, 환자의 CTL 전구체 세포(CTLp)를 항원-제시 세포(APC)의 공급원 및 적절한 펩티드와 함께 조직 배양에서 인큐베이션시킴으로써 유도된다. CTLp를 활성화시키고, 이를 성숙시키고, 이펙터 CTL로 증량시키는 적절한 인큐베이션 시간(전형적으로, 1 내지 4주) 후에, 세포를 환자에게 다시 주입하고, 여기서, 그들은 그들의 특이적 표적 세포(즉, 종양 세포)를 파괴시킨다. 특이적 세포독성 T 세포의 생성을 위한 시험관내 조건을 최적화시키기 위하여, 자극인자 세포의 배양을 적절한 무혈청 배지에서 유지한다.
- [0392] 활성화된 세포, 예를 들어, 전구체 CD8^+ 세포와 자극인자 세포의 인큐베이션 전에, 자극인자 세포의 표면상에서 발현된 인간 클래스 I 분자에 로딩되기에 충분한 양의 항원 펩티드의 양을 자극인자 세포 배양에 첨가한다. 본 발명에서, 펩티드의 충분한 양은 약 200개, 바람직하게는 200개 이상의, 펩티드가 로딩된 인간 클래스 I MHC 분자가 각각의 자극인자 세포의 표면상에 발현되게 하는 양이다. 바람직하게는, 자극인자 세포를 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 초과인 펩티드와 함께 인큐베이션시킨다. 예를 들어, 자극인자 세포를 3, 4, 5, 10, $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 펩티드와 인큐베이션시킨다.
- [0393] 이어서, 휴지 또는 전구체 CD8^+ 세포를, CD8^+ 세포를 활성화시키기 위해 충분한 기간 동안 적절한 자극인자 세포와 함께 배양에서 인큐베이션시킨다. 바람직하게는, CD8^+ 세포를 항원-특이적 방식으로 활성화시킨다. 휴지 또는 전구체 CD8^+ (이펙터) 세포 대 자극인자 세포의 비는 개체마다 달라질 수 있고, 이는 추가로, 배양 조건에 대한 개체의 림프구의 순응(amenability), 및 기존의 치료 양상이 이용되는 질병 증상 또는 기타 증상의 성질 및 중증도와 같은 변수에 좌우될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 림프구:자극인자 세포 비는 약 30:1 내지 300:1의 범위이다. 이펙터/자극인자 배양은, 치료학적으로 이용 가능하거나 유효한 수의 CD8^+ 세포를 자극하는데 필요한 만큼 장시간 동안 유지시킬 수 있다.
- [0394] CTL을 시험관내에서 유도하기 위해서는, APC 상의 대립형질 특이적 MHC 클래스 I 분자와 결합되는 펩티드를 특이적으로 인식해야 한다. APC당 특이적 MHC/펩티드 복합체의 수는 CTL을 자극하는데, 특히 1차 면역 반응에 있어 결정적이다. 세포당 소량의 펩티드/MHC 복합체는, 세포가 CTL에 의한 용해에 감수성 있게 하거나 2차 CTL 반응을 자극하는데 충분하지만, 1차 반응 동안에 CTL 전구체(pCTL)를 성공적으로 활성화시키기 위해서는, 상당히 더 많은 수의 MHC/펩티드 복합체가 필요하다. 세포 상에 빈(empty) 주 조직적합성 복합체 분자의 펩티드 로딩은 1차 세포독성 T 림프구 반응의 유도를 가능하게 한다.
- [0395] 돌연변이 세포주가 모든 인간 MHC 대립형질에 대하여 존재하지 않기 때문에, APC 표면으로부터 내인성 MHC-회합된 펩티드를 제거하는 기술을 사용한 다음, 생성된 빈 MHC 분자에 관심 면역원성 펩티드를 로딩하는 것이 유리하다. APC로서의, 환자의 비-형질전환되고(비-종양형성), 비-감염된 세포, 바람직하게는 자가 세포의 이용이, 생체외 CTL 치료법 개발에 지향된 CTL 유도 프로토콜의 설계에 바람직하다. 본 출원에는 APC의 표면으로부터 내인성 MHC-회합된 펩티드를 스트리핑(striping)한 다음, 요망되는 펩티드를 로딩하는 방법이 개시되어 있다.
- [0396] 안정한 MHC 클래스 I 분자는 다음 요소로 형성된 삼량체 복합체이다: 1) 통상 8 내지 10개 잔기의 펩티드, 2)

그의 $\alpha 1$ 및 $\alpha 2$ 도메인 내에 펩티드-결합 부위를 보유하고 있는 막형단 다형성 단백질 중쇄, 및 3) 비-공유적으로 회합된 비-다형성 경쇄, p2마이크로글로불린. 결합된 펩티드를 제거하고/하거나 복합체로부터 p2마이크로글로불린을 해리시켜, MHC 클래스 I 분자를 비기능성이고 불안정하게 만들어, 신속한 분해를 야기한다. PBMC로부터 단리된 모든 MHC 클래스 I 분자는 그들에 결합된 내인성 펩티드를 갖는다. 따라서, 제1 단계는 그들의 분해를 야기하지 않고, APC 상의 MHC 클래스 I 분자에 결합된 모든 내인성 펩티드를 제거한 후, 외인성 펩티드를 그들에 첨가하는 것이다.

[0397] MHC 클래스 I 분자에 결합된 펩티드가 없게 하기 위한 가능한 2가지 방법에는, 배양 온도를 밤새 37°C에서 26°C로 낮추어 p2마이크로글로불린을 불안정화시키는 방법, 및 온건한 산 처리를 이용하여 세포로부터 내인성 펩티드를 스트리핑하는 방법이 포함된다. 상기 방법은 이전에 결합된 펩티드를 세포외 환경으로 방출시켜, 신규한 외인성 펩티드가 빈 클래스 I 분자에 결합하도록 한다. 냉온 인큐베이션 방법은 외인성 펩티드가 MHC 복합체에 효율적으로 결합되게 할 수 있으나, 26°C에서의 밤샘 인큐베이션을 필요로 하는데, 이는 세포의 대사 속도를 늦출 수 있다. 또한, MHC 분자를 활발히 합성하지 않는 세포(예를 들어, 휴지 PBMC)는 아마도 냉온 과정에 의해 다량의 빈 표면 MHC 분자를 생성하지 않을 것이다.

[0398] 가혹한 산 스트리핑은 트리플루오로아세트산, pH 2를 사용한 단백질의 추출 또는 면역친화성 정제된 클래스 I-펩티드 복합체의 산 변성을 포함한다. 이들 방법으로는 CTL을 유도할 수 없는데, 이는 항원 제시에 있어 결정적인 최적의 대사 상태와 APC 생존력을 보존하면서 내인성 펩티드를 제거하는 것이 중요하기 때문이다. pH 3의 온건한 산 용액, 예를 들면, 글리신 또는 시트르산염-인산염 완충액을 사용하여 내인성 펩티드를 확인하고 종양 관련 T 세포 에피토프를 확인하였다. 상기 처리는, MHC 클래스 II 분자를 포함한 다른 표면 항원은 무손상으로 유지되는 반면, MHC 클래스 I 분자만이 불안정화(및 회합 펩티드 방출)된다는 점에서 특히 유효하다. 가장 중요하게는, 세포를 온건한 산 용액으로 처리하는 것은 세포 생존력 또는 대사 상태에 영향을 미치지 않는다. 온건한 산 처리는 신속한데, 이는 내인성 펩티드의 스트리핑이 4°C에서 2분 내에 일어나고, 적당한 펩티드가 로딩된 후에 APC가 그의 기능을 수행할 준비가 되기 때문이다. 상기 기술을 본원에 활용하여, 1차 항원-특이적 CTL의 생성을 위해 펩티드-특이적 APC를 제조한다. 생성된 APC는 펩티드-특이적 CD8+ CTL을 유도하는데 효율적이다.

[0399] 활성화된 CD8+ 세포는, 공지된 각종 방법 중의 한 방법을 사용하여 자극인자 세포로부터 효과적으로 분리될 수 있다. 예를 들면, 자극인자 세포, 자극인자 세포에 로딩된 펩티드 또는 CD8+ 세포(또는 그의 세그먼트)에 특이적인 모노클로날 항체를 이용하여, 그들의 적절한 상보적 리간드를 결합시킬 수 있다. 이어서, 항체-태그된 분자를, 적절한 수단, 예를 들면, 널리 알려져 있는 면역침전법 또는 면역분석법을 통하여 자극인자-이펙터 세포 혼합물로부터 추출할 수 있다.

[0400] 활성화된 CD8+ 세포의 유효한 세포독성 양은 시험관내 용도 및 생체내 용도 간에 달라질 수 있을 뿐만 아니라 이들 킬러 세포의 궁극적인 표적인 세포의 유형과 양에 따라 달라질 수 있다. 상기 양은 또한, 환자의 상태에 따라서 달라질 수 있으며, 이는 전문가가 모든 적절한 요인들을 고려하여 결정해야 한다. 그러나, 마우스에서 약 5×10^6 내지 약 5×10^7 개 세포를 사용하는 것에 비해, 성인 인간의 경우, 바람직하게는 약 1×10^6 내지 약 1×10^{12} 개, 보다 바람직하게는 약 1×10^8 내지 약 1×10^{11} 개, 더더욱 바람직하게는 약 1×10^9 내지 약 1×10^{10} 개의 활성화된 CD8+ 세포를 사용한다.

[0401] 바람직하게는, 본원에 논의된 바와 같이, 활성화된 CD8+ 세포를 세포 배양으로부터 수집한 후에, CD8+ 세포를 치료될 개체에게 투여한다. 그러나 다른 존재하는 및 제안된 치료 양상과는 달리, 본 발명의 방법이 종양형성성이 아닌 세포 배양 시스템을 이용하는 것을 주목하는 것이 중요하다. 따라서, 자극인자 세포와 활성화된 CD8+ 세포의 완전한 분리가 달성되지 않는 경우, 소수의 자극인자 세포 투여와 연관되는 것으로 공지된 내재 위험이 없는 반면, 포유동물 종양-증진성 세포의 투여가 극도로 위험할 수 있다.

[0402] 세포 성분을 재도입하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 이에는 미국 특허 제4,844,893호(Honsik et al.) 및 미국 특허 제4,690,915호(Rosenberg)에 예시된 바와 같은 과정이 포함된다. 예를 들면, 활성화된 CD8+ 세포를 정맥내 주입을 통하여 투여하는 것이 적절하다.

[0403] 본 발명의 실시는 다르게 나타내지 않는 한, 충분히 당업자의 이해 범위 내에 있는 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상의 기술을 사용한다. 그러한 기술은 문헌, 예를 들어, 문헌["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989)]; 문헌["Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984)]; 문헌["Animal Cell Culture" (Freshney, 1987)]; 문헌["Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Wei, 1996)]; 문헌["Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells"

(Miller and Calos, 1987)]; 문헌["Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987)]; 문헌["PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994)]; 문헌["Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)]에 완전히 설명되어 있다. 이들 기술은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 생성에 적용 가능하며, 그와 같이, 본 발명의 제조 및 실시에서 고려될 수 있다. 특정 실시형태에 특히 유용한 기술이 하기의 섹션에 논의된다.

[0404] **치료 방법**

[0405] 본 발명은 본 발명의 신생물 백신 또는 신생항원 펩티드 또는 조성물을 대상체에게 투여함에 의한 대상체에서의 신생물/종양 특이적 면역 반응의 유도, 신생물/종양에 대한 백신접종, 대상체에서의 암의 증상의 치료 및/또는 완화 방법을 제공한다.

[0406] 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 신생물 백신 또는 면역원성 조성물은 암을 갖는 것으로 진단받거나 암이 발생할 위험이 있는 환자를 위해 사용될 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 환자는 고형 종양, 예를 들어, 유방, 난소, 전립선, 폐, 신장, 위, 결장, 정소, 두경부, 췌장, 뇌, 흑색종 및 다른 조직 기관의 종양 및 조혈 종양, 예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, T 세포 림프성 백혈병 및 B 세포 림프종을 포함하는 림프종 및 백혈병을 가질 수 있다.

[0407] 본 발명의 펩티드 또는 조성물은 CTL 반응을 유도하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0408] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 도 2에 나타난 일반 흐름도에 따라 임의의 암이 있는 그를 필요로 하는 환자에서 사용될 수 있다. 그를 필요로 하는 환자는 개인맞춤화 종양-특이적 펩티드의 혼합물을 사용한 일련의 프라이밍 백신접종을 제공받을 수 있다. 추가로, 4주 기간에 걸쳐, 프라이밍은 유지 단계 동안 2회의 부스트로 이어질 수 있다. 모든 백신접종은 피하 전달된다. 백신 또는 면역원성 조성물은 환자에서 안전성, 용인성, 면역 반응 및 임상 효과에 대하여, 그리고 백신 또는 면역원성 조성물의 생성의 실행 가능성 및 적절한 시간 내의 연속적인 백신접종의 개시에 대하여 평가된다. 제1 코호트는 5명의 환자로 이루어질 수 있으며, 안전성이 적당하게 입증된 후에, 추가의 10명의 환자의 코호트가 등록될 수 있다. 말초 혈액을 펩티드-특이적 T-세포 반응에 대하여 광범위하게 모니터링하고, 환자를 질병 재발을 평가하기 위하여 최대 2년 동안 추적한다.

[0409] **백신 또는 면역원성 조성물 키트 및 동시-패키징**

[0410] 일 양태에서, 본 발명은 면역원성 조성물 또는 백신의 투여를 가능하게 하는 본원에 논의된 요소 중 임의의 하나 이상을 함유하는 키트를 제공한다. 요소는 개별적으로 또는 병용하여 제공될 수 있으며, 임의의 적합한 용기, 예를 들어, 바이얼, 병 또는 튜브에 제공될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 키트는 1가지 이상의 언어로 된, 예를 들어, 1가지 초과 언어로 된 설명서를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 키트는 본원에 기재된 요소 중 하나 이상을 사용하는 과정에 사용하기 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 시약은 임의의 적합한 용기에서 제공될 수 있다. 예를 들어, 키트는 하나 이상의 전달 또는 저장 완충제를 제공할 수 있다. 시약은 특정 과정에서 사용 가능한 형태 또는 사용 전에 하나 이상의 다른 성분의 첨가를 필요로 하는 형태로(예를 들어, 농축물 또는 동결건조 형태로) 제공될 수 있다. 완충제는 탄산나트륨 완충제, 중탄산나트륨 완충제, 붕산염 완충제, 트리스(Tris) 완충제, MOPS 완충제, HEPES 완충제 및 그들의 조합을 포함하나 이들에 제한되지 않는 임의의 완충제일 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 완충제는 알칼리성이다. 일부 실시형태에 있어서, 완충제는 약 7 내지 약 10의 pH를 갖는다. 일부 실시형태에 있어서, 키트는 벡터 중 하나 이상, 단백질 및/또는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함한다. 키트는 유리하게는 본 발명의 시스템의 모든 요소의 제공을 가능하게 할 수 있다. 키트는 동물, 포유류, 영장류, 설치류 등으로 투여될 1 내지 50개 이상의 신생항원 돌연변이에 대한 RNA를 함유하거나 그를 인코딩하는 벡터(들) 및/또는 입자(들) 및/또는 나노입자(들)를 포함할 수 있으며, 키트는 진핵생물로 투여하기 위한 설명서 및 본 발명의 방법 중 임의의 것과 함께 사용하기 위한 설명서를 포함한다.

[0411] 일 실시형태에 있어서, 키트는 면역원성 조성물 또는 백신이 있는 적어도 하나의 바이얼을 함유한다. 일 실시형태에 있어서, 키트는 혼합되고, 즉시 사용되는 즉시 사용 가능한 성분을 포함할 수 있다. 즉시 사용 가능한 면역원성 또는 백신 조성물은 상이한 폴의 면역원성 조성물을 함유하는 개별 바이얼을 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 바이러스 벡터 또는 DNA 플라스미드를 함유하는 하나의 바이얼을 포함할 수 있으며, 다른 바이얼은 면역원성 단백질을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 키트는 재구성된 형태가 될 준비가 된 면역원성 조성물 또는 백신을 함유할 수 있다. 면역원성 또는 백신 조성물은 동결 건조되거나 동결건조될 수 있다. 키트는 그것이 투여할 준비가 되도록 동결건조된 조성물에 첨가될 수 있는 재구성 완충제가 있는 개별 바이얼을 포함할

수 있다. 완충제는 유리하게는 본 발명에 따른 애쥬번트 또는 에멀전을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 키트는 1회 용량의 면역원성 조성물을 함유하는 단일의 바이얼을 포함할 수 있다. 다른 양태에 있어서, 하나의 바이얼이 치료 시각표에 따라 투여되도록 다수의 바이얼이 포함된다. 추가의 실시형태에 있어서, 바이얼은 그를 필요로 하는 환자로의 그들의 적절한 투여를 위해 표지된다. 면역원은 동결건조 형태, 건조 형태로 또는 본원에 기재된 바와 같은 수용액에 존재할 수 있다. 면역원은 본원에 기재된 바와 같은 생 약독화 바이러스, 단백질 또는 핵산일 수 있다.

[0412] 또 다른 실시형태에 있어서, 키트는 면역 반응의 프라이밍에 사용하기 위한 면역원성 조성물 및 부스팅을 위해 사용될 다른 면역원성 조성물을 위한 개별 바이얼을 포함할 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 프라이밍 면역원성 조성물은 DNA 또는 바이러스 핵터일 수 있으며, 부스팅 면역원성 조성물은 단백질일 수 있다. 어느 하나의 조성물은 동결건조되거나, 즉시 투여될 수 있다.

[0413] 본 발명 및 그의 이점이 상세히 기재되어 있지만, 첨부된 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 목적과 범주로부터 벗어남 없이, 다양한 변화, 대체 및 변경이 본원에서 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다.

[0414] 본 발명은 단지 예시의 목적을 위해 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는 하기의 실시예에 추가로 예시되어 있다.

[0415] 실시예

[0416] 실시예 1

[0417] 암 백신 시험 프로토콜

[0418] 본원에 기재된 조성물 및 방법을 도 2에 나타난 일반 흐름도에 따라 고위험 흑색종(완전 절제된 병기 IIIB, IIIC 및 IVM1a,b)이 있는 15명의 환자에서 시험할 수 있다. 환자는 4주 기간에 걸친 개인맞춤화 중앙-특이적 펩티드 및 폴리-ICLC의 혼합물을 사용한 일련의 프라이밍 백신접종에 이어서, 유지 단계 동안 2회의 부스트를 제공할 수 있다. 모든 백신접종은 피하 전달된다. 백신 또는 면역원성 조성물을 환자에서 안전성, 용인성, 면역 반응 및 임상 효과에 대하여, 그리고 백신 또는 면역원성 조성물의 생성의 실행 가능성 및 적절한 시간 내의 성공적인 백신접종의 개시에 대하여 평가한다. 제1 코호트는 5명의 환자로 이루어질 수 있으며, 안전성이 적당하게 입증된 후에, 추가의 10명의 환자의 코호트가 등록될 수 있다. 말초 혈액을 펩티드-특이적 T-세포 반응에 대하여 광범위하게 모니터링하며, 환자를 질병 재발을 평가하기 위하여 최대 2년 동안 추적한다.

[0419] 본원에 기재된 바와 같이, 동물 및 인간 둘 모두에서, 돌연변이된 에피토프가 면역 반응의 유도에 효율적이며, 자발적 중앙 퇴행 또는 장기간 생존의 경우가 돌연변이된 에피토프에 대한 CD8+ T-세포 반응과 상호관련이 있으며(문헌[Buckwalter and Srivastava PK. "It is the antigen(s), stupid" and other lessons from over a decade of vaccitherapy of human cancer. Seminars in immunology 20:296-300 (2008)]; 문헌[Karanikas et al, High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. Cancer Res. 61:3718-3724 (2001)]; 문헌[Lennerz et al, The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neo-antigens. Proc Natl Acad Sci U S A.102:16013 (2005)]), "면역편집"이 마우스 및 인간에서 돌연변이된 우성 항원의 발현의 변경까지 추적될 수 있다는 대규모의 증거가 있다(문헌[Matsushita et al, Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting Nature 482:400 (2012)]; 문헌[DuPage et al, Expression of tumor-specific antigens underlies cancer immunoediting Nature 482:405 (2012)]; 및 문헌[Sampson et al, Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma J Clin Oncol. 28:4722-4729 (2010)]).

[0420] 차세대 시퀀싱에 의해, 이제 별개의 돌연변이, 예를 들어, 개별 중앙 내의 코딩 돌연변이, 가장 흔하게 단일의 아미노산 변화(예를 들어, 미스센스 돌연변이) 및 덜 빈번하게 프레임-쉬프트 삽입/결실/유전자 융합, 정지 코돈 내의 리드-쓰루 돌연변이 및 부적절하게 스플라이싱된 인트론의 번역에 의해 생성되는 신규한 스트레치의 아미노산(예를 들어, neoORF)의 존재를 신속하게 나타낼 수 있다. NeoORF는 그들의 서열의 전체가 면역계에 대하여 완전히 신규하고, 바이러스 또는 박테리아 외래 항원과 유사하기 때문에, 특히 면역원으로서 가치가 있다. 따라서, neoORF는 (1) 중앙에 매우 특이적이며(즉, 임의의 정상 세포에서 발현이 존재하지 않음); (2) 중심 관용을 우회하여, 그에 의해, 신생항원-특이적 CTL의 전구체 빈도를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 치료적 항암 백신에서 유사한 외래 서열을 사용하는 능력은 인간 파필로마 바이러스(HPV)로부터 유래된 펩티드를 사용하여

최근에 입증되었다. 바이러스 암유전자 E6 및 E7로부터 유래된 HPV 펩티드의 믹스의 3 내지 4회의 백신접종을 제공받은 예비-신생물, 바이러스-유도 질병이 있는 19명의 환자의 약 50%는 24개월 이상 동안 완전한 반응을 유지하였다(문헌[Kenter et al, Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia NEJM 361:1838 (2009)]).

[0421] 시퀀싱 기술에 의해, 각 종양이 유전자의 단백질 코딩 내용을 변경시키는 다중의 환자-특이적인 돌연변이를 함유하는 것으로 드러났다. 그러한 돌연변이는 변경된 단백질을 생성하며, 이는 단일의 아미노산 변화(미스센스 돌연변이에 의해 야기)에서, 프레임 쉬프트, 종결 코돈의 리드-쓰루 또는 인트론 영역의 번역(신규한 오픈 리딩 프레임 돌연변이; neoORF)으로 인한 긴 영역의 신규한 아미노산 서열의 부가까지의 범위이다. 이들 돌연변이된 단백질은 고유 단백질과 달리, 그들이 자기-관용의 면역-약화 영향을 겪지 않기 때문에, 종양에 대한 숙주의 면역 반응에 대한 가치있는 표적이다. 따라서, 돌연변이된 단백질은 면역원성일 확률이 더 크며, 또한, 환자의 정상 세포에 비하여 종양 세포에 대하여 더욱 특이적이다.

[0422] 어떤 미스센스 돌연변이가 환자의 동족 MHC 분자에 대하여 강력한 결합 펩티드를 생성하는지 예측하기 위하여 최근에 개선된 알고리즘을 사용하여, 각 환자에 대한 최적으로 돌연변이된 에피토프(neoORF 및 미스센스 둘 모두)의 대표적인 펩티드의 세트를 확인하고 우선순위를 정하고, 최대 20개 이상의 펩티드를 면역화를 위해 제조한다(문헌[Zhang et al, Machine learning competition in immunology - Prediction of HLA class I binding peptides J Immunol Methods 374:1 (2011)]; 문헌[Lundegaard et al Prediction of epitopes using neural network based methods J Immunol Methods 374:26 (2011)]). 길이가 약 20 내지 35개 아미노산인 펩티드는 그러한 "긴" 펩티드가 효율적인 내재화, 처리 및 전문 항원-제시 세포, 예를 들어, 수지상 세포에서 교차-제시를 겪고, 인간에서 CTL을 유도하는 것으로 보이기 때문에, 합성한다(문헌[Melief and van der Burg, Immunotherapy of established (pre) malignant disease by synthetic long peptide vaccines Nature Rev Cancer 8:351 (2008)]).

[0423] 강력하고 특이적인 면역원에 더하여, 효율적인 면역 반응은 유리하게는 면역계를 활성화시키기 위한 강력한 애드juv언트를 포함한다(문헌[Speiser and Romero, Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity Seminars in Immunol 22:144 (2010)]). 예를 들어, 톨-유사 수용체(TLR)는 선천성 면역계와 차례로 후천성 면역계를 효율적으로 유도하는 미생물 및 바이러스 병원체 "위험 신호"의 강력한 센서로 드러났다(문헌[Bhardwaj and Gnjatic, TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants? Cancer J. 16:382-391 (2010)]). TLR 효능제 중에, 폴리-ICLC(합성 이중-가닥 RNA 모방체)는 골수-유래 수지상 세포의 가장 강력한 활성화제 중 하나이다. 인간 자원자 연구에서, 폴리-ICLC는 안전하며, 가장 강력한 약독화된 생 바이러스 백신 중 하나, 황열 백신 YF-17D에 의해 유도되는 것과 유사한, 말초 혈액 세포 내의 유전자 발현 프로파일을 유도하는 것으로 나타났다(문헌[Caskey et al, Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans J Exp Med 208:2357 (2011)]). 힐토놀®, 온코비르, 인코포레이티드(Oncovir, Inc)에 의해 제조되는 폴리-ICLC의 GMP 제제가 애드juv언트로 이용된다.

[0424] 실시예 2

[0425] 표적 환자 집단

[0426] 병기 IIIB, IIIC 및 IVM1a,b, 흑색종이 있는 환자는 심지어 질병의 완전한 수술적 절제에도, 상당한 질병 재발 및 사망의 위험을 갖는다(문헌[Balch et al, Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification J Clin Oncol 27:6199 - 6206 (2009)]). 이러한 환자 집단에 대한 이용 가능한 전신 애드juv언트 요법은 인터페론-α(IFNα)이며, 이는 측정 가능하나 미미한 이익을 제공하며, 상당한, 빈번하게 용량을 제한하는 독성과 관련이 있다(문헌[Kirkwood et al, Interferon alfa-2b Adjuvant Therapy of High-Risk Resected Cutaneous Melanoma: The Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684 J Clin Oncol 14:7-17 (1996)]; 문헌[Kirkwood et al, High- and Low-dose Interferon Alpha-2b in High-Risk Melanoma: First Analysis of Intergroup Trial E1690/S9111/C9190 J Clin Oncol 18:2444 - 2458 (2000)]). 이들 환자는 이전의 암-지향 치료법에 의해 또는 활성 암에 의해 면역-약화되지 않으며, 이에 따라, 백신의 안전성 및 면역학적 영향을 평가하기 위한 뛰어난 환자 집단을 나타낸다. 마지막으로, 이들 환자에 대한 현재의 표준의 치유는 수술 후에 어떠한 치료도 지시하지 않아서, 백신 제제에 대한 8 내지 10주 창을 가능하게 한다.

[0427] 표적 집단은 임상적으로 검출 가능한, 조직학적으로 확인된 림프절(국소 또는 원위)이 있거나, 또는 완전히 절제되고 질병이 없는 전이 중인 피부 흑색종 환자이다(병기 IIIB의 대부분(시퀀싱 및 세포주 발생에 적당한 종양 조직을 가져야 하기 때문에, 켈양형 원발성 종양과 미세전이 림프절(T1-4b, N1a 또는 N2a)이 있는 환자는 배제

됨), 모든 병기 IIIC 및 병기 IVm1a, b). 이들은 처음의 진단시의 또는 보다 조기의 단계의 흑색종을 이전에 진단받은 후의 질병 재발시의 환자일 수 있다.

[0428] 종양 수집: 환자는 그들에 흑색종이 없게 하려는 의도로, 그들의 원발성 흑색종(이미 제거되지 않았다면) 및 모든 영역 전이 질병의 완전한 절제를 겪을 수 있다. 병리학적 평가를 위해 적당한 종양을 수집한 후에, 잔류 종양 조직을 멸균 용기에서 멸균 매질에 두고, 분해를 위해 준비한다. 종양 조직의 부분을 전체-엑스 및 전사체 시퀀싱 및 세포주 생성을 위해 사용하며, 임의의 잔여 종양을 동결시킨다.

[0429] 정상 조직 수집: 정상 조직 시료(혈액 또는 객담 시료)를 전체 엑스 시퀀싱을 위해 취한다.

[0430] 임상적으로 분명한 국소영역 전이 질병 또는 완전히 절제 가능한 원위의 림프절, 피부 또는 폐 전이 질병이 있는 환자(절제 가능하지 않은 원위 또는 내장 전이 질병의 부재)를 확인하고 연구에 참가시킨다. 수술 전의 환자의 유입은 흑색종 세포주 개발을 위하여 신선한 종양 조직을 획득하는데 필요하다(면역 모니터링 계획의 부분으로서의 시험관내 세포독성 분석법을 위해 표적 세포를 생성하기 위함).

[0431] 실시예 3

[0432] 용량 및 일정

[0433] 예비-치료 기준을 만족하는 환자에 있어서, 백신 투여를 가능한 연구 약물이 도착하고, 인커밍(incoming) 사양이 만족된 후에 가능한 빨리 시작할 수 있다. 각 환자에 있어서, 4개의 개별 연구 약물이 존재하며, 각각은 20개의 환자-특이적 펩티드 중 5개를 함유한다. 면역화는 일반적으로 도 3에 나타난 일정에 따라 처리될 수 있다.

[0434] 환자는 외래 진료소에서 처치된다. 각 처치일의 면역화는 각각이 개별 사지로의 4회의 1 ml 이하 주사로 이루어져, 상이한 영역의 림프계를 표적화하여, 항원 경쟁을 줄일 수 있다. 환자가 완전한 액와 또는 서혜부 림프절 절제를 겪는다면, 백신은 대안으로서 우측 또는 좌측 횡격막으로 투여된다. 각각의 주사는 그 환자에 대한 4개의 연구 약물 중 1개로 이루어질 수 있으며, 동일한 연구 약물이 각 사이클 동안 동일한 사지로 주사된다. 각각 1 ml 주사의 조성은

[0435] 5가지의 환자-특이적 펩티드 각각 300 µg를 함유하는 연구 약물 0.75 ml

[0436] 2 mg/ml의 폴리-ICLC(힐토늘®) 0.25 ml(0.5 mg).

[0437] 유도/프라이밍 단계 동안, 환자는 제1일, 제4일, 제8일, 제15일 및 제22일에 면역화된다. 유지 단계에서, 환자는 제12주 및 제24주에 부스터 용량을 제공받을 수 있다.

[0438] 혈액 시료는 다수의 시점: 예비-(기준선; 상이한 날에 2개의 시료); 프라이밍 백신접종 동안 15일; 유도/프라이밍 백신접종 후 4주(제8주); 예비-제1 부스트(제12주) 및 제1 부스트 이후(제16주); 예비-제2 부스트(제24주) 및 제2 부스트 이후(제28주)에 수득될 수 있으며, 50 내지 150 ml 혈액을 각 시료에 대하여 수집한다(제16주 제외). 1차 면역학적 종점은 제16주이며, 이에 따라, 환자는 백혈구분리반출술을 겪을 수 있다(다르게 나타내지 않는 한, 환자 및 의사 평가에 기초함).

[0439] 실시예 4

[0440] 면역 모니터링

[0441] 면역화 전략은 일련의 초기의 근접 배치된 면역화를 수반하여, 면역 반응을 유도하며, 휴지 기간으로 이어져, 기억 T-세포가 확립되게 하는 "프라이밍-부스트" 접근법이다. 이것은 부스터 면역화로 이어지며, 이러한 부스트 4주 후의 T-세포 반응은 강력한 반응을 생성하는 것으로 예상되며, 1차 면역학적 종점이다. 전반적 면역학적 반응을 먼저, 모든 면역화 에피토프를 포함하는 중첩 15 mer 펩티드(11개 아미노산 중첩)의 풀로 자극하는 생체의 ELISPOT 분석법에서 18시간 내의 이러한 시점으로부터의 말초 혈액 단핵 세포를 사용하여 모니터링한다. 예비-백신접종 시료를 평가하여, 이러한 펩티드 풀에 대한 기준선 반응을 확립한다. 보장된 바와 같이, 추가의 PBMC 시료를 평가하여, 전체 펩티드 믹스에 대한 면역 반응의 동역학을 시험한다. 기준선을 상당히 초과하는 반응을 나타내는 환자에 있어서, 모든 15 mer의 풀을 디콘볼루션시켜 특정 면역화 펩티드(들)가 면역원성이었는지를 결정한다. 또한, 다수의 추가의 분석법을 적절한 시료를 위해 개별적으로 행한다:

[0442] ● 전체 15 mer 풀 또는 하위-풀을 세포내 사이토카인 염색 분석법을 위한 자극 펩티드로서 사용하여, 항원-특이적 CD4+, CD8+, 중심 기억 및 이펙터 기억 집단을 확인하고 정량화한다.

[0443] ● 유사하게, 이들 풀을 사용하여, 이들 세포에 의해 분비되는 사이토카인의 패턴을 평가하여, TH1 대 TH2 표현

형을 결정한다.

- [0444] ● 세포외 사이토카인 염색 및 비자극 세포의 유세포계수를 사용하여 Treg 및 골수-유래의 억제자 세포(MDSC)를 정량화시킨다.
- [0445] ● 흑색종 세포주가 반응하는 환자로부터 성공적으로 확립되고, 활성화 에피토프가 확인될 수 있다면, 돌연변이 및 상응하는 야생형 펩티드를 사용하여 T-세포 독성 분석법을 행한다.
- [0446] ● 1차 면역학적 종점으로부터의 PBMC를 도 4에 나타낸 바와 같이, 자극제로서 알려져 있는 흑색종 종양 관련 항원을 사용함으로써 그리고 면역원 중 하나인 것으로 선택되지 않았던 몇몇의 추가의 확인된 돌연변이 에피토프를 사용함으로써 "에피토프 스프레딩"에 대하여 평가한다.
- [0447] 종양 시료의 면역-조직화학을 행하여, CD4+, CD8+, MDSC 및 Treg 침윤 집단을 정량화한다.
- [0448] 실시예 5
- [0449] 신생항원 제제
- [0450] 종양의 수술적 절제 후에, 종양 조직의 일부 및 혈액 시료를 시설로 즉시 전달하고, 여기서, 그것에 추가의 추적을 위해 독특한 식별 코드를 할당한다. 종양 조직을 콜라게나제를 사용하여 분해하고, 개별 부분을 핵산(DNA 및 RNA) 추출을 위해 동결시킨다. 혈액 시료를 즉시 핵산 추출을 위한 시설로 전달한다. 종양 조직으로부터 추출된 DNA 및/또는 RNA를 전체-엑스 시퀀싱(예를 들어, Illumina HiSeq 플랫폼의 사용에 의함)을 위해 그리고 HLA 타이핑 정보를 결정하기 위해 사용한다. 미스센스 또는 neoORF 신생항원 펩티드가 단백질-기반의 기술(예를 들어, 질량 분광법)에 의해 직접 확인될 수 있는 것이 본 발명의 범주 내인 것으로 고려된다.
- [0451] 생물정보학 분석을 다음과 같이 행한다. 엑스 및 RNA의 서열 분석 - SEQ 패스트(fast) Q 파일은 대규모 프로젝트, 예를 들어, 많은 환자 시료에 대한 TCGA에서 광범위하게 사용되고 입증된 기존의 생물정보학 파이프라인을 활용한다(예를 들어, 문헌[Chapman et al, 2011], 문헌[Stransky et al, 2011], 문헌[Berger et al, 2012]). 2개의 순차적인 카테고리의 분석이 존재한다: 데이터 처리 및 암 게놈 분석.
- [0452] 데이터 처리 파이프라인: 피카드(Picard) 데이터 처리 파이프라인(picard.sourceforge.net/)을 시퀀싱 플랫폼에 의해 개발하였다. 각각의 종양 및 정상 시료에 대한 (예를 들어, 일루미나(Illumina)) 시퀀서(sequencer)로부터 추출된 미가공 데이터를 피카드 파이프라인에서 다양한 모듈을 사용하여 하기의 과정으로 처리한다:
- [0453] (i) 데이터 전환: 미가공 일루미나 데이터를 표준 BAM 형식으로 전환시키고, 상이한 품질 역치를 초과하는 염기의 분포에 관한 기본 QC 매트릭스를 생성한다.
- [0454] (ii) 정렬: BWA(Burrows-Wheeler Alignment) 툴을 사용하여 판독물 쌍을 인간 게놈(hg19)에 대하여 정렬한다.
- [0455] (iii) 중복 표시: PCR 및 광학적 중복을 판독물 쌍 맵핑 위치에 기초하여 확인하고 최종 BAM 파일에 표시한다.
- [0456] (iv) 삽입-결실 재정렬: 게놈 내의 알려져 있는 삽입 및 결실 다형성 부위에 대하여 정렬된 판독물을 시험하고, 재정렬시에 개선에 대한 로그 오즈(LOD) 점수가 적어도 0.4인 부위를 교정한다.
- [0457] (v) 품질 재보정: 일루미나 파이프라인에 의해 보고된 원래의 염기 품질 점수를 판독-사이클, 레인(lane), 유세포 타일(tile), 의문 염기 및 이전의 염기에 기초하여 재보정한다. 재보정은 비-dbSNP 위치 내의 모든 미스매치가 오류 때문임을 가정하며, 이는 총 관찰 횟수 중의 미스매치의 비율로서 각 관심 범주에서 오류의 확률의 재보정을 가능하게 한다.
- [0458] (vi) 품질 조절: 최종 BAM 파일을 처리하여 사이클에 의한 판독물 품질, 품질 점수의 분포, 정렬의 요약 및 삽입물 크기 분포를 포함하는 광범위 QC 매트릭스를 생성한다. 품질 QC를 실패한 데이터는 블랙리스트에 올린다.
- [0459] (vii) 아이덴티티 확인: 약 100개의 알려져 있는 SNP 위치에서 직교하여 수집된 시료 유전형 데이터를 서열 데이터에 대하여 점검하여, 시료의 아이덴티티를 확인한다. 10 이상의 LOD 점수를 아이덴티티의 확인을 위한 역치로 사용한다. 아이덴티티 QC를 실패한 데이터는 블랙리스트에 올린다.
- [0460] (viii) 데이터 수집: 동일한 시료로부터의 모든 데이터를 합치고, 중복 표시 단계를 반복한다. 추정된 짧은 삽입 및 결실 영역을 함유하는 신규한 표적 영역을 확인하고, 삽입-결실 재정렬 단계를 이들 유전자좌에서 수행한다.
- [0461] (ix) 수집된 데이터에서 추정의 삽입-결실 주위의 국소 재정렬: 추정의 짧은 삽입 및 결실을 함유하는 신규한

표적 영역을 확인하고, 국소 재정렬 단계를 이들 유전자좌에서 수행하여(예를 들어, GATK, RealignerTargetCreator 및 IndelRealigner 모듈을 사용하여), 삽입-결실 호출의 일관성 및 정확성을 보장한다.

- [0462] (x) 수집된 데이터에서의 품질 조절: QC 매트릭스, 예를 들어, 정렬 요약 및 삽입물 크기 분포를 재계산한다. 또한, 추출 과정으로부터 반응성 오염물질의 존재하에 DNA의 음향 진단에 의해 야기되는 라이브러리 작제 과정의 초기 단계에서의 산화적 손상비를 평가하는 일련의 매트릭스를 생성한다.
- [0463] 피카드의 출력물은 주어진 시료에 대한 염기 서열, 품질 점수 및 모든 판독물의 정렬 상세사항을 저장하는 bam 파일(예를 들어, <http://samtools.sourceforge.net/SAM1.pdf> 참조)이다.
- [0464] 암 돌연변이 검출 파이프라인: 피카드 파이프라인 유래의 종양 및 매치되는 정상 bam 파일을 본원에 기재된 바와 같이 분석한다:
- [0465] 1. 품질 조절
- [0466] (i). Capseg 프로그램을 종양 및 일치되는 정상 엑솔 시료에 적용하여, 카피수 프로파일을 얻는다. 이어서, CopyNumberQC 툴을 사용하여, 생성된 프로파일을 수동으로 조사하고, 종양/정상 시료 믹스-업을 평가할 수 있다. 노이즈가 있는 프로파일을 갖는 정상의 시료 및 종양 시료가 상응하는 정상보다 더 낮은 카피수 변이를 갖는 경우를 데이터 생성 및 분석 파이프라인을 통해 표시하고, 추적하여, 믹스-업을 점검한다.
- [0467] (ii). 종양 순도 및 배수성을 Capseg-생성된 카피수 프로파일에 기초하여 ABSOLUTE 툴 15에 의해 추정한다. 노이즈가 많은 프로파일은 고도로 분해된 시료의 시퀀싱으로부터 초래될 것이다. 그러한 경우에 종양 순도 및 배수성 추정치는 가능하지 않을 것이며, 상응하는 시료가 표시된다.
- [0468] (iii). ContEst(문헌[Cibulskis et al, 2011])를 사용하여 시료 중 교차-시료 오염 수준을 결정한다. 4% 초과 오염이 있는 시료를 폐기한다.
- [0469] 2. 체세포 단일 뉴클레오티드 변이(SSNV)의 확인
- [0470] 체세포 염기 쌍 치환은 뮤텍트(muTect)(문헌[Cibulskis et al, 2013])로 지칭되는 베이지안(Bayesian) 통계 프레임워크를 사용하여 환자로부터의 종양 및 일치되는 정상 bam을 분석함으로써 확인된다. 예비처리 단계에서, 우세한 저 품질 염기 또는 게놈에 대한 미스매치가 있는 판독물을 필터링한다. 이어서, 뮤텍트는 2개의 로그-오즈(LOD) 점수를 산출하며, 이는 각각 종양 및 정상 시료에서의 변이체의 존재 및 부재하의 신뢰성을 표현한다. 처리후 단계에서, 후보 돌연변이를 포획 아티팩트(artifact), 시퀀싱 및 정렬을 고려하여 6개의 필터에 의해 필터링한다:
- [0471] (i) 근위 갭: 사건의 부근에 오정렬 삽입-결실의 존재로 인하여 야기되는 위양성을 제거한다. 후보 돌연변이 주위의 11-bp 창 내에 삽입 또는 결실이 있는 3개 이상의 판독이 있는 시료를 거부한다.
- [0472] (ii) 불량한 맵핑: 게놈 내의 판독물의 모호한 배치 때문에 야기되는 위양성을 폐기한다. 종양 및 정상 시료에서 50% 이상의 판독물이 맵핑 품질 0을 갖거나, 20 이상의 맵핑 품질을 갖는 돌연변이 대립형질을 지니는 판독물이 없다면, 후보물질들을 거부한다.
- [0473] (iii) 3 대립형질 부위: 정상에서 이형접합성인 부위를 폐기하는데, 그 이유는 이들이 많은 위양성을 생성하는 경향을 갖기 때문이다.
- [0474] (iv) 가닥 편향: 돌연변이를 지니는 판독물의 큰 분율이 동일한 배향을 갖는 컨텍스트(context)-특이적 시퀀싱 오류에 의해 야기되는 위양성을 제거한다. 역치를 통과하기 위한 감수성이 90% 이상인, 가닥-특이적 LOD가 2 미만인 후보물질들을 거부한다.
- [0475] (v) 클러스터링된 위치: 판독물 정렬의 시작으로부터 끝까지 고정된 위치에서 발생하는 대체 대립형질을 특징으로 하는 정렬 오류로 인한 위양성을 거부한다. 판독물의 시작 및 끝으로부터 거리 중간값이, 돌연변이가 정렬의 시작 또는 끝에 존재하는 것을 암시하는 10 이하이면 또는 거리의 절대 편차 중간값이, 돌연변이가 클러스터링되어 있음을 암시하는 3 이하이면, 거부한다.
- [0476] (vi) 대조군에서 관찰: 무작위 시퀀싱 오류에 의해 예상되는 것을 넘어서는 정상의 시료에서의 대체 대립형질의 발생의 증거가 존재하는 종양에서 위양성을 폐기한다. 정상의 시료에서 대체 대립형질을 함유하는 2개 이상의 판독물이 존재하거나, 그들이 판독물의 3% 이상에 있고, 그들의 품질 점수의 합이 20 초과이면, 거부한다.

- [0477] 이들 6개의 필터에 더하여, 후보물질들 중 정상의 시료의 패널에 대해 비교하고, 2개 이상의 정상 시료에서 생식계 열 변이체로 존재하는 것으로 관찰되는 것들을 거부한다. 이어서, 최종 돌연변이 세트에 온코테이터(Oncotator) 툴을 사용하여 게놈 영역, 코돈, cDNA 및 단백질 변화를 포함하는 몇몇 필드에 의해 주석을 달 수 있다.
- [0478] 3. 체세포 작은 삽입 및 결실의 확인
- [0479] 본원에 기재된 국소 재정렬 출력물(상기 "수집된 데이터에서 추정된 삽입-결실 주위의 국소 재정렬" 참조)을 사용하여, 베타적으로 종양에서 또는 각각 종양 및 정상 bam 둘 모두에서의 변이체를 뒷받침하는 판독물의 평가에 기초하여 후보 체세포 및 생식계 삽입-결실을 예측한다. 미스매치의 개수 및 분포, 및 염기 품질 점수에 기초한 추가의 필터링을 행한다(문헌[McKenna et al, 2010], 문헌[DePristo et al, 2011]). 모든 삽입-결실을 인테그레이티드 게노믹스 뷰어(Integrated Genomics Viewer)(문헌[Robinson et al, 2011])(www.broadinstitute.org/igv)를 사용하여 수동으로 조사하여, 고충실도 호출을 보장한다.
- [0480] 4. 유전자 융합 검출
- [0481] 유전자 융합 검출 파이프라인에서의 제1 단계는 종양 RNA-Seq 판독물을 유전자 서열이 알려져 있는 라이브러리에 대하여 정렬한 다음, 게놈 좌표에 대하여 이러한 정렬의 맵핑을 행하는 것이다. 게놈 맵핑은 공통의 게놈 위치에 엑손을 공유하는 상이한 전사물 변이체로 맵핑되는 다수의 판독물 쌍의 붕괴에 도움을 준다. DNA 정렬된 bam 파일을 2개의 짝이 상이한 염색체 상의 또는 동일한 염색체 상이라면 적어도 1 MB 떨어져 있는 2개의 상이한 코딩 영역에 대해 맵핑되는 판독물 쌍에 대하여 질의한다. 또한, 이들 각각의 유전자에서 정렬된 쌍 말단이(추정의) 융합 mRNA 전사물의 코딩-->코딩 5'-> 3' 방향과 일치하는 방향으로 존재하는 것이 필요할 수 있다. 적어도 2개의 그러한 '키메라' 판독물 쌍이 존재하는 유전자 쌍의 목록은 추가의 정제로 처리되는 초기 추정 사건 목록으로 열거된다. 다음으로, 모든 정렬되지 않은 판독물을 원래 bam 파일로부터 추출하는데, 그들의 짝이 원래 정렬되고, 본원에 기재된 바와 같이 수득된 유전자 쌍 내의 유전자 중 하나로 맵핑되는 추가의 제한이 있다. 그 다음, 모든 그러한 원래 정렬되지 않은 판독물을 발견된 유전자 쌍 간의 모든 가능한 엑손-엑손 접합부(전장, 경계-대-경계, 코딩 5'-> 3' 방향)의 맞춤 "참조" 빌트에 정렬하기 위한 시도가 이루어질 수 있다. 그러한 하나의 원래 정렬되지 않은 판독물이 유전자 X의 엑손 및 유전자 Y의 엑손 간의 접합부로(독특하게) 맵핑되고, 그의 짝이 실제로 유전자 X 또는 Y 중 하나로 맵핑된다면, 그러한 판독물은 "융합" 판독물로 표시된다. 유전자 융합 사건은 엑손:엑손 접합부 주위의 과도한 수의 미스매치 없이, 그리고 어느 하나의 유전자에서 적어도 10 bp의 커버리지(coverage)와 함께, 그의 짝에 대한 올바른 상대적 배향으로 적어도 하나의 융합 판독물이 존재하는 경우에, 호출된다. 매우 상동성인 유전자(예를 들어, HLA 과) 간의 유전자 융합은 아마도 허위이며, 필터링된다.
- [0482] 5. 클론성의 추정
- [0483] 생물정보 분석을 사용하여 돌연변이의 클론성을 추정할 수 있다. 예를 들어, ABSOLUTE 알고리즘(문헌[Carter et al, 2012], 문헌[Landau et al, 2013])을 사용하여 종양 순도, 배수성, 절대 카피수 및 돌연변이의 클론성을 추정할 수 있다. 각각의 돌연변이의 대립형질 분획의 밀도 분포 확률을 생성한 다음 돌연변이의 암 세포 분율(CCF)로의 전환이 행해진다. 돌연변이는 그들의 CCF의 사후 확률이 각각 0.95 이상인지 0.5 미만인지에 기초하여, 클론 또는 서브클론으로 분류된다.
- [0484] 6. 발현의 정량화
- [0485] TopHat 모듈(문헌[Langmead et al, 2009])을 사용하여 종양에 대한 RNA-Seq 판독물 및 일치되는 정상 bam을 hg19 게놈에 대해 정렬한다. RNA-Seq 데이터의 품질을 RNA-SeQC(문헌[DeLuca et al, 2012]) 패키지에 의해 평가한다. 그 다음, RSEM 툴(문헌[Li et al, 2011])을 사용하여 유전자 및 아이소형 발현 수준을 추정할 수 있다. 백만당 킬로베이스당 생성된 판독물 및 tau 추정을 사용하여 다른 곳에 기재된 바와 같이 각 환자에서 확인된 신생항원을 개인맞춤화시킨다.
- [0486] 7. RNA-Seq에서의 돌연변이의 확인
- [0487] 8. 본원에 기재된 바와 같은 전체 엑솔 데이터(단일 뉴클레오타이드 변이, 작은 삽입 및 결실 및 유전자 융합 포함)의 분석에 의해 확인되는 체세포 돌연변이의 확인을 환자의 상응하는 RNA-Seq 종양 BAM 파일을 시험함으로써 평가한다. 각 변이체 유전자좌에 있어서, 베타-이항 분포에 기초한 능력 계산을 수행하여, RNA-Seq 데이터에서 그것을 검출하기 위한 적어도 95% 능력이 존재하는 것을 보장한다. 포획으로 확인된 돌연변이는, 적당한 능력의 부위에 대한 돌연변이를 지니는 적어도 2개의 판독물이 존재한다면 입증되는 것으로 여겨진다.

- [0488] 종양-특이적 돌연변이-함유 에피토프의 선택: 모든 미스센스 돌연변이 및 neoORF를 네덜란드 소재의 덴마크 기술 대학, 생물 서열 분석 센터에 의해 제공되고 유지되는 신경망 기반의 알고리즘 netMHC를 사용하여 돌연변이-함유 에피토프의 존재에 대하여 분석한다. 이러한 과의 알고리즘을 일련의 관련 접근법(ref) 중에 최근에 완료된 경쟁에 기초하여 상위 에피토프 예측 알고리즘의 순위를 정하였다. 알고리즘을 국소 지역에서 표적 환자 집단 내의 주요 민족인 백인(Caucasian) 집단에서 관찰되는 HLA-A 대립형질의 99% 및 HLA-B 대립형질의 87%를 커버하는 69개의 상이한 인간 HLA A 및 B 대립형질에서 인공의 신경망 기반의 접근법을 사용하여 트레이닝하였다. 가장 최신의 버전을 사용한다(v2.4).
- [0489] HLA 알로타입이 알려져 있는 CLL 환자에서 관찰되는 돌연변이로부터 예측을 행함으로써 알고리즘의 정확성을 평가하였다. 포함된 알로타입은 A0101, A0201, A0310, A1101, A2402, A6801, B0702, B0801, B1501이었다. mid-2011에서 netMHCpan을 사용하여 각 돌연변이에 걸쳐 있는 모든 9 mer 및 10 mer 펩티드에 대하여 예측이 이루어졌다. 이들 예측에 기초하여, 예측된 친화성의 대부분이 500 nM 미만인 칠십사(74)개의 9 mer 펩티드 및 육십삼(63)개의 10 mer 펩티드를 합성하고, 결합 친화성을 경쟁적 결합 분석법(Sette)을 사용하여 측정하였다.
- [0490] 이들 펩티드에 대한 예측을 가장 최신의 버전의 각각의 MHC 서버(netMHCpan, netMHC 및 netMHCcons)를 사용하여 2013년 3월에 반복하였다. 이들 3개의 알고리즘은 2012년(Zhang 등)에 경쟁에 사용되는 20개의 그룹 중 상위 평가된 알고리즘이었다. 그 다음, 신규한 예측의 각각에 대하여 관찰된 결합 친화성을 평가하였다. 예측된 및 관찰된 각 세트의 값에 대하여, 각 범위에 대한 올바른 예측의 % 및 시료의 개수가 제공되어 있다. 각 범위에 대한 정의는 하기와 같다:
- [0491] 0-150: 150 nM 이하의 친화성을 갖는 것으로 예측되고 150 nM 이하의 친화성을 갖는 것으로 측정.
- [0492] 0-150*: 150 nM 이하의 친화성을 갖는 것으로 예측되고, 500 nM 이하의 친화성을 갖는 것으로 측정.
- [0493] 151-500 nM: 150 nM 초과이나 500 nM 이하의 친화성을 갖는 것으로 예측되고, 500 nM 이하의 친화성을 갖는 것으로 측정.
- [0494] FN(>500 nM): 위음성 - 500 nM 초과인 친화성을 갖는 것으로 예측되거나 500 nM 이하의 친화성을 갖는 것으로 측정.
- [0495] 9 mer 펩티드(표 1)에 있어서, 알고리즘 간에 차이가 거의 없었으며, netMHC cons에 대한 151 내지 500 nM 범위에 대한 약간 더 큰 값은 적은 개수의 시료로 인해 유의미한 것으로 판단되지 않는다.

표 1

범위 (nM)	9mer PAN	9mer netMHC	9mer CONS
0-150	76% (33)	78% (37)	76% (34)
0-150*	91% (33)	89% (37)	88% (34)
151-500	50% (28)	50% (14)	62% (13)
FN (>500)	38% (13)	39% (23)	41% (27)

- [0496]
- [0497] 10 mer 펩티드(표 2)에 대하여, 다시 netMHCpan 또는 netMHCcons보다 상당히 더 위양성을 생성한 netMHC를 제외하고, 알고리즘 간에 차이가 거의 존재하지 않았다. 그러나, 10 mer 예측의 정확성은 9 mer에 비하여, 0 내지 150 nM 및 0 내지 150* nM 범위에서 약간 더 낮고, 151 내지 500 nM 범위에서 상당히 더 낮다.

표 2

범위 (nM)	10mer PAN	10mer netMHC	10mer CONS
0-150	53% (19)	50% (16)	59% (17)
0-150*	68% (19)	69% (16)	76% (17)
151-500	35% (26)	42% (12)	35% (23)
FN (>500)	11% (18)	23% (35)	13% (23)

[0498]

[0499]

10 mer에 있어서, 151 내지 500 nM 범위에서 결합제에 대한 50% 미만의 정확성으로 인하여, 0 내지 150 nM 범위에서의 예측만을 사용한다.

[0500]

임의의 개별 HLA 대립형질에 대한 시료의 개수는 상이한 대립형질에 대한 예측 알고리즘의 정확성에 관한 어떠한 결론을 도출하기에 너무 적었다. 가장 큰 이용 가능한 서브셋(0 내지 150* nM; 9 mer) 유래의 데이터는 일 예로서 표 3에 나타나 있다.

표 3

대립형질	정확한 분율
A0101	2/2
A0201	9/11
A0301	5/5
A1101	4/4
A2402	0/0
A6801	3/4
B0702	4/4
B0801	1/2
B1501	2/2

[0501]

[0502]

HLA C 대립형질에 대한 예측의 정확성을 판단하기 위하여 이용 가능한 데이터가 거의 없기 때문에, HLA A 및 B 대립형질에 대한 예측만을 사용할 것이다(Zhang 등).

[0503]

흑색종 서열 정보 및 펩티드 결합 예측의 평가를 TCGA 데이터베이스로부터의 정보를 사용하여 행하였다. 상이한 환자 유래의 220개 흑색종에 대한 정보에 의해, 환자마다 평균하여 대략 450개의 미스센스 및 5개의 neoORF가 존재하였음이 드러났다. 20명의 환자를 무작위로 선택하고, netMHC를 사용하여 예측된 결합 친화성을 모든 미스센스 및 neoORF 돌연변이에 대하여 계산하였다(문헌[Lundegaard et al Prediction of epitopes using neural network based methods J Immunol Methods 374:26 (2011)]). HLA 알로타입이 이들 환자에 대하여 알려져 있지 않지만, 알로타입마다 예측된 결합 펩티드의 개수를 알로타입의 빈도에 기초하여 조정하여(지리적 영역[흑색종에 대한 백인]에서의 예측된 발병 우성 집단에 대한 골수 등록 데이터세트), 환자마다 예측된 개수의 실행 가능한 돌연변이 에피토프를 생성하였다. 각각의 이들 돌연변이 에피토프(MUT)에 대하여, 또한 상응하는 고유(NAT) 에피토프 결합을 예측하였다.

[0504]

본원에 기재된 우선순위결정의 사용:

- [0505] ● 환자의 90%(20명 중 18명)는 백신접종에 적절한 적어도 20개의 펩티드를 갖는 것으로 예측되었으며;
- [0506] ● 환자의 거의 1/4에 대하여, neoORF 펩티드는 20개 펩티드의 절반 내지 전부를 구성할 수 있으며;
- [0507] ● 절반을 조금 초과하는 환자에 대하여, 범주 1 및 2 내의 펩티드만을 사용할 것이며;
- [0508] ● 환자의 80%에 대하여, 범주 1, 2 및 3 내의 펩티드만을 사용할 것이다.
- [0509] 따라서, 높은 비율의 환자가 적당한 수의 면역원성 펩티드를 생성하는 것으로 예상하게 하는 충분한 수의 돌연변이가 흑색종에 존재한다.
- [0510] 실시예 6
- [0511] 펩티드 생성 및 제형
- [0512] 면역화를 위한 GMP 신생항원 펩티드를 FDA 규정에 따라 화학적 합성(문헌[Merrifield RB: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85:2149-54, 1963])에 의해 제조한다. 각각 20개의 약 20 내지 30 mer 펩티드로 3회의 개발 시행을 행하였다. 각 시행을 동일한 시설에서 행하고, 드래프트(draft) GMP 배치 기록을 사용하여 GMP 시행에 사용된 것과 동일한 장비를 사용하였다. 각 시행에 의해, 각각 50 mg 초과 펩티드가 성공적으로 생성되었으며, 이를 모든 현재 계획된 출하 시험(예를 들어, 외양, MS에 의한 확인, RP-HPLC에 의한 순도, 질소 원소에 의한 함량 및 RP-HPLC에 의한 TFA 함량)에 의해 시험하고, 적절한 경우 표적화된 사양을 충족시킨다. 또한, 산물을 이러한 과정의 부분에 대하여 예상되는 기간(대략 4주) 내에 생성하였다. 동결건조된 벌크 펩티드를 장기간 안정성 연구에 두고, 최대 12개월의 다양한 시점에 평가한다.
- [0513] 이들 시행으로부터의 물질을 사용하여 계획된 용해 및 혼합 접근법을 시험하였다. 약술하면, 각 펩티드를 100% DMSO 중에 고농도(50 mg/ml)로 용해시키고, 수성 용매 중에 2 mg/ml로 희석한다. 먼저, PBS가 희석제로 사용될 것이지만, 소수의 펩티드의 염색이 가시적인 혼탁을 야기하는 것으로 예상되었다. D5W(수 중 5% 텍스트로스)가 훨씬 더 효율적인 것으로 나타났으며; 40개의 펩티드 중 37개가 투명한 용액으로 성공적으로 희석되었다. 수 중 10% 수크로스 또는 10% 트레할로스도 또한 효과적이다. 10% 수크로스 또는 10% 트레할로스를 함유하는 제형은 5% 텍스트로스를 함유하는 제형과 달리 동결건조 가능하다. 유일하게 문제가 있는 펩티드는 매우 소수성인 펩티드이다.
- [0514] 표 4는 소수성 아미노산의 계산된 분율에 기초하여 분류된 60개의 유력한 신생항원 펩티드의 용해도 평가의 결과를 보여준다. 나타난 바와 같이, 0.4 미만의 소수성 분율을 갖는 거의 모든 펩티드는 DMSO/D5W 중에서 가용성이지만, 0.4 이상의 소수성 분율을 갖는 다수의 펩티드가 DMSO/D5W 중에서 가용성이 아니었다("DMSO/D5W 중 가용성"으로 표지된 열에 빨간색으로 강조되어 나타냄). 이들 중 다수는 석신산염의 첨가에 의해 용해될 수 있다("DMSO/D5W/석신산염 중 가용성"의 열에 녹색으로 강조되어 나타냄). 이들 펩티드 4개 중 3개는 0.4 내지 0.43의 소수성 분율을 가졌다. 4개의 펩티드가 석신산염의 첨가시에 용해도가 더 낮아지며; 이들 펩티드 4개 중 3개는 0.45 이상의 소수성 분율을 가졌다.

표 4

ID	시열	DMSO 증 가용성	DMSO/D 5W 증 가용성	DMSO/D5 W 중 펩 티드의 pH	DMSO/D5W /석신산 염 중 가용성	DMSO/D5W /5 mM 석 신염 스 파이크 중 펩티 드의 pH	DMSO/D5 W/5 mM 석신산 염 및 힐토놀 (Hilton ol) 중 펩티드 의 pH	소수성	친수성	대략적 등전점
CS671 5	PPYPYSSPSLVLP T EPHTPKSLQQPGL PS		Y	4.11				0.17	0.10	7.86
CS672 2	NPEKYKAKSRSPG SPVVEGTGSPPK WQIGEQEF							0.18	0.27	9.45
CS672 5	GTVLQGTASALSQ SQRPPSVNRVPP SSPSSQE		Y	3.95				0.18	0.12	7.03
CS741 6	AESAQRQGPNGG GEQSANEF		Y	3.91	Y	6.31	6.54	0.20	0.20	3.73
CS671 0	EPDQEAQVSSTYK DCNTLHLPTERFS PVR		Y	3.65				0.21	0.31	4.71
CS671 2	LKDSNSWPPSNK RGFDTEDAHKS N ATPVP							0.21	0.31	7.95
CS678 1	GASRRSSASQGA GSLGLSEEKTLRSG GGP		Y					0.21	0.21	11.26
CS671 8	KKEKAEKLEKERQ RHISKPLGGPFS L TTHTGE		Y					0.21	0.45	10.31
CS672 0	SPTEPSTKLPGFDS CGNTEIAERKIKRI YGGFK		Y					0.21	0.30	9.48

[0515]

CS672 3	ECGKAFTRGSQLT QHQQIHSEKSFY KECGID		Y	3.68				0.21	0.33	6.14
CS670 8	SHVEKAHITAESA QRQGPNGGGEQ SANEF		Y					0.24	0.28	5.25
CS672 1	PIERVKKNLLKEY NVSDDSMKLGGN NTSEKAD		Y					0.24	0.39	9.33
CS691 6	HKSIGQPKLSTHP FLCPKPQKMNTSL GQHLLT		Y					0.25	0.22	10.64
CS741 7	AESAQRQGPLGG GEQSANEF		Y	3.82	Y	6.28	6.5	0.25	0.20	3.73
CS671 7	KPKKVAGAAPKK SIKRTPKKVKPAT AAGTKK		Y	4.65				0.27	0.39	12.18
CS671 9	SKLPYPVAKSGKR ALARGPAPTEKTP HSGAQLG		Y	3.94				0.27	0.24	11.1
CS692 5	EQGPWQSEGQT WRAAGGRVPVPC PAAGPG		Y					0.28	0.14	6.14
CS691 5	SGARIGAPPHAT ATSSSFMPGTW GREDL		Y					0.30	0.17	8.02
CS691 9	KLAWRGRISSSGC PSMTSPSPMFG MTLHT		Y	4.38	Y	6.74	6.99	0.30	0.13	11.38
CS672 6	DSAVDKGHPNRS ALSITPGLRIGPSG IPQAGLG		Y					0.30	0.18	10.26
CS740 9	LLDRNTSGTTFTL LGVSDYPELQVP		Y	3.86	Y	6.32	6.62	0.31	0.15	3.59

[0516]

CS6709	LTDLPGRIRVAPQ QNDLDSPPQISIS NAE	X			NT			0.31	0.21	3.91
CS7414	KGASLDAGWGSP RWHTTRMTSASA GRSTRA		Y	3.81	Y	6.71	6.99	0.31	0.21	12.5
CS6917	FRLIWRSVKNGKS SREQELSWNCSH QVPSLGA		Y					0.31	0.25	10.67
CS6938	GKSRGQQAQDR ARHAAGAAPARP LGALREQ		Y					0.33	0.30	12.31
CS7408	LLTDRNTSGTFTL LGVSYPQLQVPI PQAGLG		Y	3.89	Y	6.31	6.75	0.33	0.12	3.59
CS6711	RGLHSQGLGRGRI AMAQTAGVLRSL EQEE		Y	3.82				0.34	0.28	10.92
CS6716	PQLAGGGGSGAP GEHPLLPGGAPLP AGLF		Y					0.34	0.07	5.08
CS6926	TWAGHVTALAR PLGAPWAEPGSC GPGTN		Y					0.34	0.10	7.05
CS7431	KKNITNLSRLVVR PDTDAVY		Y	3.8	Y	6.45	6.69	0.35	0.30	10.29
CS7432	WDGPPENDMLL KEICGSUP		Y	3.72	Y	6.22	6.45	0.35	0.25	3.43
CS6930	LAASGLHGSABL VPGEQPVSGPHH GKQPAGV		Y					0.35	0.16	8.17
CS6729	PIQVFYTKQPQND YLHVALVSFQIH QEAPSSQ		Y	3.87				0.36	0.15	6.15

[0517]

CS693 1	VAGLAASGLHGS AWLVPGEQPVSG PHHGKQ		Y	3.80	Y	6.42	6.66	0.37	0.17	8.17
CS693 4	SKRGVGAKTLLP DPFLFWPCLEGTR RSL		Y	3.86	Y	6.57	6.79	0.38	0.24	10.67
CS693 6	SYKLLPLLIFPSHR RAPLLSATGDRGF SV		Y					0.38	0.24	11.48
CS691 4	GLLSDGSGLGQIT WASAEHLQRPGA GAELA		Y					0.40	0.17	4.4
CS693 2	DLCICPRSHRGAF QLLPSALLVRVLE GSDS		Y					0.40	0.23	6.9
CS693 5	DASDFLPDTQLFP HFTELLPLDPLEG SSV		N		Y			0.40	0.23	3.2
CS694 3	DMAWRRNSRLY WLIKMEQWQE QHLPSSLSS		Y					0.40	0.27	9.79
CS742 8	LSVPFTCGVNFGE SIEDLEI		N	n/a	Y	n/a	n/a	0.40	0.20	2.75
CS743 0	PLMQTELHQLVP EADPEEMA		Y	3.95	Y	6.23	6.37	0.40	0.30	3.35
CS691 8	EDLHLLSVPCPSYK KLPLLIFPSHRRAP LLSA		Y					0.41	0.25	9.67
CS694 1	AHRQGEKQHLLP VFSRLALRLPWRH SVQL		Y	3.92	Y	6.49	6.78	0.41	0.31	12.5
CS741 0	ALSLTPGLRIGPSG LFLVFLAESAVDK GHPNRS		Y	3.99	Y	6.46	6.88	0.42	0.18	10.26

[0518]

CS7411	DSAVDKGHPNRS ALSLTPGLRIGPSG LFLVFLA		Y	3.87	Y	6.53	6.94	0.42	0.18	10.26
CS7412	LRVFIGNIAVNHA PVSRLRPGGLPPG APPGTV		Y	4.24	N	6.61	6.96	0.42	0.09	12.49
CS7438	LPVFIGNIAVNHA PVSRLRPGGLPPG APPGTV		Y	4.24	Y	6.78	6.96	0.42	0.06	11.18
CS6942	VSWGKKVQPIDSI LADWNEDIEAFE MMEKD		N		Y			0.43	0.37	3.68
CS7415	GTKALQLHSIAGR WPRMEPWVVES MSLGVP		Y	3.91	Y	6.61	6.81	0.43	0.20	10.26
CS6937	SGQPAPEETVLFL GLLHGLLLRLRLR GG		Y	3.87	N	6.51	6.76	0.45	0.21	10.98
CS7418	YLLPKTAVVLRCP ALRVKRP		Y	3.98	Y	6.76	6.96	0.45	0.25	11.48
CS7420	IGALNPKRAAFFA EHYESWE		Y	3.84	N	6.38	6.56	0.45	0.30	5.38
CS7425	SYDSVIRELLQKPN VRVVVL	X	Y	3.78	N	6.44	6.65	0.45	0.25	9.79
CS7427	VEQGHVRVGPDPV VTHPAFLV		Y	3.72	Y	6.34	6.52	0.45	0.25	6.15
CS6927	APALGPGAASVAS RCGLDPALAPGGS HMLRA		Y					0.45	0.13	8.99
CS6783	LLTDRNTSGTFTL LGVSYPQLQVPL FLVFLA		N	3.96	Y			0.45	0.12	3.59

[0519]

CS6933	EEGLPEVFGA GVPLALCPAVP SAAKPHRPRVL		Y					0.45	0.21	7.05
CS7413	VQLSIQDVIRRA RLSTVPTAQRV ALRSGWI		Y	3.9	Y	6.73	7.02	0.47	0.20	12.68
CS6730	LPVFIGNIAVNHA APVSLRPGGLGL PPGAPPLVVP		Y	4.20				0.48	0.06	11.18

[0520]

[0521]

계획된 면역화 펩티드의 예측된 생화학적 특성을 평가하고, 이에 따라 합성 계획을 변경시켜(보다 짧은 펩티드 사용, 예측된 에피토프 주위의 N- 또는 C-말단 방향의 합성될 영역의 이동 또는 잠재적으로 대안적 펩티드의 사용) 높은 소수성 분해를 갖는 펩티드의 수를 제한할 수 있다.

[0522]

DMSO/D5W 중 10개의 개별 펩티드를 2회의 동결/해동 사이클을 겪게 하였으며, 완전한 복구를 보였다. 2개의 개별 펩티드를 DMSO/D5W 중에 용해시키고, 2가지 온도(-20℃ 및 -80℃)에 안정하게 두었다. 이들 펩티드를 최대 24주 동안 평가하였다(RP-HPLC 및 pH 및 육안의 검사). 둘 모두의 펩티드는 최대 24주 동안 안정적이며; RP-HPLC 검정에 의해 검출되는 불순물 백분율은 -20℃ 또는 -80℃ 중 어느 하나에서 보관되는 경우, 어느 하나의 펩티드에 대하여 유의미하게 변경되지 않았다. 평가할 경향이 언급되지 않았기 때문에, 임의의 작은 변화는 검정 가변성으로 인한 것으로 보인다.

[0523]

도 5에 나타난 바와 같이, 투여형 과정의 설계는 각각 5개의 펩티드로 이루어진 환자-특이적 펩티드의 4개의 풀

을 제조하는 것이다. RP-HPLC 검정법을 준비하고, 정량화하여, 이들 펩티드 믹스를 평가하였다. 이러한 검정법으로 단일의 믹스 내의 다수의 펩티드의 우수한 용해가 달성되며, 이를 사용하여 개별 펩티드를 정량화할 수 있다.

[0524] 막 여과(0.2 μm 포어 크기)를 사용하여 바이오버든(bioburden)을 감소시키고, 최종 여과 멸균을 행한다. 4가지의 상이한 적절하게 사이징된(sized) 필터 유형을 먼저 평가하고, 폴(Pall), PES 필터(# 4612)를 선택하였다. 현재까지, 각각 5개의 상이한 펩티드로 된 4개의 상이한 혼합물을 제조하고, 개별적으로 2개의 PES 필터를 통해 순차적으로 여과하였다. RP-HPLC 분석법을 사용하여 각 개별 펩티드의 회수를 평가하였다. 20개의 펩티드 중 18개에 있어서, 2회의 여과 후의 회수는 90% 초과였다. 2개의 고도의 소수성 펩티드에 대하여, 회수는 소규모로 평가되는 경우 60% 미만이었으나, 소정의 규모에서 거의 완전히 회수되었다(87 및 97%). 본원에 언급된 바와 같이, 선택된 서열의 소수성 성질을 제한하기 위한 접근법을 착수한다.

[0525] 5가지의 펩티드로 이루어진 펩티드 풀(풀 4)을 DMSO 중에서의 용해, D5W/석신산염(5 mM)을 사용한 2 mg/ml로의 희석 및 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 펩티드 농도 및 4%의 최종 DMSO 농도로의 풀링에 의해 제조하였다. 제조 후에, 펩티드를 25 mm 폴 PES 필터(카탈로그 번호 4612)를 사용하여 여과하고, 닌크 크라이오(Nunc Cryo) 바이얼(# 375418) 내로 1 ml 분취물로 분배하였다. 시료를 지금까지 제0시간 및 제2주 및 제4주에 분석하였다. 추가의 시료를 제8주 및 제24주에 분석한다. -80°C 에서, 펩티드 풀 4의 HPLC 프로파일 또는 불순물 프로파일의 유의미한 변화가 제4주 시점에 관찰되지 않았다. 제4주 시점까지, 펩티드 풀에 대한 육안의 관찰 및 pH가 변하지 않았다.

[0526] 실시예 7

[0527] 펩티드 합성

[0528] GMP 펩티드를 표준 고체상 합성 펩티드 화학에 의해 합성하고(예를 들어, CS 536 XT 펩티드 합성기 사용), RP-HPLC에 의해 정제한다. 각 개별 펩티드를 다양한 정량화된 분석법에 의해 분석하여 외양(육안), 순도(RP-HPLC), 아이덴티티(질량 분광법에 의한), 양(질소 원소) 및 트리플루오로아세테이트 반대이온(RP-HPLC)을 평가하고, 출하시킨다.

[0529] 개인맞춤화 신생항원 펩티드는 각 환자에 특유한 최대 20개의 별개의 펩티드로 이루어질 수 있다. 각 펩티드는 표준 펩티드 결합에 의해 연결된 약 20 내지 약 30개의 L-아미노산의 선형 폴리머일 수 있다. 아미노 말단은 일차 아민(NH_2 -)일 수 있으며, 카복시 말단은 카르보닐기($-\text{COOH}$)이다. 포유류 세포에서 통상 관찰되는 표준 20개 아미노산이 사용된다(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 발린). 각 펩티드의 분자량은 그의 길이 및 서열에 기초하여 달라지며, 각 펩티드에 대하여 계산한다.

[0530] Fmoc (9-플루오레닐메토일옥시카르보닐)-N-말단 보호 아미노산을 모든 합성 반응을 위해 사용한다. 아미노산의 측쇄를 적절한 대로 2,2,4,6,7-펜타메틸-디하이드로벤조푸란-5-설폰닐(Pbf), 트리페닐메틸(Trt), t-부틸옥시카르보닐(Boc) 또는 t-부틸 에테르(tBu) 기로 보호한다. 모든 벌크 아미노산을 디메틸포름아미드(DMF) 중에 용해시킨다. 측합은 개별 반응에서 하기의 2개의 측매 조합을 사용한다:

[0531] 디이소필카르보디이미드/1-하이드록시벤조트리아졸(DIC/HOBT)

[0532] 디이소프로필에틸아민/2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(DIEA/HBTU)

[0533] 각 아미노산을 2회 커플링시켜, 높은 수준의 혼입을 보장한다. 처음의 커플링은 2 내지 6시간 동안 DIC/HOBT를 사용하고, 제2 커플링은 1 내지 2시간 동안 DIEA/HBTU를 사용한다. 2개의 커플링의 각각을 UV 흡광도에 의해 모니터링하고, 커플링 사이클 사이에 수지를 DMF를 사용하여 광범위하게 세척하여, 효율을 개선시킨다. 2 사이클의 커플링 후에, 다음 사이클로 계속하기 위하여, 계산된 커플링 효율은 적어도 95%여야 한다. 최소 커플링 효율을 만족시키지 않는 임의의 펩티드의 추가의 합성을 중단시킨다.

[0534] 모든 아미노산을 커플링시킨 후에, 수지를 DMF로 2회 세척한 후에 메탄올로 3회 세척한다. 이어서, 수지를 여전히 반응 용기에 있는 동안 간단히 진공 건조시킨 다음, 그것이 자유롭게 유동할 때까지 진공 건조(12시간 초과)를 위하여 신규한 테어드(tared) 용기로 옮긴다. 건조된 수지를 함유하는 용기를 칭량하고, 테어드 용기의 질량을 감하고, 수지 질량에 대하여 조정함으로써 합성된 미정제 펩티드의 질량을 결정한다. 예상된 질량 수율은 60% 내지 90% 범위이다. 적어도 200 mg의 미정제 펩티드를 생성하지 못한 임의의 합성을 종결시킨다. 건조된 수지를 절단의 개시 전 최대 28일 동안 4°C 에서 보관할 수 있다.

[0535] 절단 반응을 단일의 룸(room)에서 행한다. 합성 룸에서 절단 룸으로 환자-특이적 건조된 수지의 세트를 전달하

기 전에, 절단 룸은 신규한 GMP 제품의 합성을 위해 QA에 의해 완전히 자격을 얻는다. 자격은 라인 클리어런스(line clearance) 검사, GMP 모음 세정의 입증, 모든 필요한 물질 및 글라스웨어(glassware)의 스테이징(staging), 장비 적합성 및 표지의 입증, 및 모든 필요한 인원이 연구를 행하도록 적절하게 훈련되고 자격이 있고, 적절하게 가운을 입고, 분명한 병이 없음의 입증을 포함한다.

[0536] 룸 준비 운영을 사용될 장비(회전식 증발기, 진공 펌프, 밸런스(balance))의 확인 및 장비가 적절하게 세정되고 보정됨(적절한 경우)을 나타내는 기록의 조사와 함께 개시한다. 필요한 모든 미가공 물질(TFA, 트리아소프로필실란(TIS) 및 1,2-에탄디티올)의 완전한 목록을 QA가 발부하고, 제조에서는 사용될 롯트 번호, 재시험 또는 만료일 및 각 날의 반응을 위해 분배된 물질의 양을 확인한다.

[0537] 수지로부터의 펩티드 쇄의 절단 및 측쇄 보호기의 절단은 실온에서 3 내지 4시간 동안 산-생성된 유리-라디칼의 스캐빈저(scavenger)로서 2% 트리아소프로필실란(TIS) 및 1% 1,2-에탄디티올의 존재하에 산성 조건(95% TFA)하에 달성된다.

[0538] 수지는 여과에 의해 유리 미정제 펩티드로부터 분리된다. 방출된 및 탈보호된 펩티드의 최종 용액은 에테르를 사용하여 침전을 겪고, 침전물을 12시간 동안 동결-건조시킨다. 방출된 미정제 펩티드의 수율은 동결-건조된 분말을 칭량하고, 방출된 미정제 펩티드/수지-결합된 펩티드의 비를 계산함으로써 결정된다. 미정제 펩티드의 예상되는 수율은 200 mg 내지 1000 mg이다. 적어도 200 mg의 미정제 펩티드를 제공하지 못한 임의의 절단 반응을 종결시킨다. 이어서, 미정제 펩티드를 정제 모음으로 전달한다.

[0539] 정제를 단일의 룸에서 행한다. 절단 룸으로부터 정제 룸으로의 건조된 미정제 펩티드의 세트의 전달 이전에, 정제 룸은 신규 GMP 제품의 합성을 위한 품질 보증에 의해 완전히 자격을 얻는다. 자격은 라인 클리어런스 검사, GMP 모음 세정의 입증, 모든 필요한 물질 및 글라스웨어의 스테이징, 장비 적합성 및 표지의 입증, 및 모든 필요한 인원이 연구를 행하도록 적절하게 훈련되고 자격이 있고, 적절하게 가운을 입고, 분명한 병이 없음의 입증을 포함한다.

[0540] 룸 준비 운영을 사용될 장비(분취용 역상 고성능 액체 크로마토그래피[RP-HPLC], 밸런스, 분석 액체 크로마토그래피/질량 분광광도계(LC/MS), 동결건조기, 밸런스)의 확인 및 장비가 적절하게 세정되고 보정됨(적절한 경우)을 나타내는 기록의 조사와 함께 개시한다. 필요한 모든 미가공 물질(트리플루오로아세트산[TFA], 아세토니트릴[ACN], 물)의 완전한 목록을 QA가 발부하고, 제조에서는 사용될 롯트 번호, 재시험 또는 만료일 및 각 날의 반응을 위해 분배된 물질의 양을 확인한다.

[0541] 200 mg 이하의 동결-건조된 방출된 펩티드를 ACN 중에 용해시킴으로써 정제를 개시한다. 그 다음, 시료를 물을 사용하여 5% 내지 10% ACN으로 추가로 희석한다. TFA를 0.1%의 최종 농도로 첨가한다. 하나의 C-18 RP-HPLC 컬럼(10 cm × 250 cm)을 환자 특이적 펩티드의 각 세트의 개시 이전에 신선하게 팩킹한다. 컬럼을 환자 펩티드를 로딩하기 전에 0.1% TFA를 함유하는 5% 아세토니트릴로 광범위하게 세척한다. 단일의 컬럼으로 로딩되는 펩티드의 최대량은 200 mg이다. 컬럼을 220 nm에서의 UV 흡광도에 의해 모니터링한다. 단일의 펩티드의 로딩 후에, 시료가 컬럼에 유입되게 하고, 컬럼을 5% 아세토니트릴/0.1% TFA로 세척한다. 0.1% TFA와 함께 10% 내지 50% 기울기의 아세토니트릴을 사용하여 펩티드를 용리시킨다. UV 흡광도가 기준선 위 20%인 점에서 시작하여, 분획을 수집한다(각각 50 ml). 추가의 UV 흡광 물질이 컬럼으로부터 용리되지 않거나, 기울기가 완료될 때까지 분획을 계속 수집한다. 전형적으로, 주요 용리 피크를 4 내지 8개 분획으로 분리한다.

[0542] 각각의 개별 분획을 분석 LC/MS에 의해 평가한다. 선택된 분석 조건은 피크 용리 산물과 관련된 아세토니트릴 백분율에 기초한다. 95% 이상의 순도 및 예상되는 질량을 갖는 분획을 펩티드 산물로서 폴링한다. 전형적으로 2 내지 4개의 분획이 이러한 폴링 요건을 만족시킨다. 폴링된 펩티드를 동결-건조를 위해 테어드 자(jar)에 두고, 24 내지 72시간 동안 동결-건조시킨다. 동결-건조된 펩티드를 함유하는 자의 질량을 결정하고, 테어드 자의 질량을 감함으로써 동결건조된 펩티드의 질량을 결정한다.

[0543] 동결-건조된 펩티드의 부분을 분석 및 배치를 위해 품질 조절로 옮긴다. 나머지를 추가의 처리 이전에 -20℃에 보관한다.

[0544] 분획의 어느 것도 95% 순도의 요건을 만족시키지 않는 임의의 펩티드를 폐기한다. RP-HPLC 분획의 재처리가 일어나지 않을 수 있다. 충분한 미정제된 동결-건조 및 절단 펩티드가 이용 가능하다면, 펩티드의 제2 시료를 컬럼에서 정제하여, 기울기 조건을 조정하여, 용리된 펩티드의 순도를 개선시킬 수 있다.

[0545] 그 다음, 컬럼을 4 컬럼 부피의 100% ACN/0.1% TFA를 사용하여 광범위하게 세척함으로써 임의의 잔류 펩티드를

스트립핑시킨 다음, 다음의 펩티드를 로딩하기 전에 5% ACN/0.1% TFA로 재평형화시킬 수 있다.

- [0546] 개별 환자에 대한 펩티드를 동일한 컬럼에서 순차적으로 처리한다. 25개 이하의 펩티드를 단일의 컬럼에서 처리한다.
- [0547] 이에 따라 약물 물질 제조를 위한 유닛 조작은 다음으로 구성된다:
- [0548] 합성:
- [0549] 각 아미노산에 대한 축합, 세척 및 재축합
- [0550] 수지 세척 및 진공 건조
- [0551] 절단 모음으로의 전달
- [0552] 절단:
- [0553] 수지로부터의 산 절단
- [0554] 수지로부터 방출된 펩티드의 분리 및 펩티드 침전
- [0555] 정제 모음으로의 전달
- [0556] 정제:
- [0557] 아세토니트릴 중 용해 및 RP-HPLC 정제
- [0558] 24 내지 72시간 동안 피크 분획의 동결-건조
- [0559] QC 시험을 위한 분취물의 제거 및 남아 있는 동결건조 산물의 보관.
- [0560] 개인맞춤화 신생항원 펩티드는 색상-코딩 캡이 있는 2 ml 넉크 크라이오 바이얼을 함유하는 박스로 공급될 수 있으며, 각 바이얼은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 최대 5개의 펩티드를 함유하는 대략 1.5 ml의 동결된 DMSO/D5W 용액을 함유한다. 4개 그룹의 펩티드 각각에 대하여 10 내지 15개 바이얼이 존재할 수 있다. 바이얼은 사용 전에 -80°C 에 보관해야 한다. 진행 중인 안정성 연구는 저장 온도 및 시간을 뒷받침한다.
- [0561] 저장 및 안정성: 개인맞춤화 신생항원 펩티드는 -80°C 에서 동결 보관한다. 해동된, 멸균 여과된, 개인맞춤화 신생항원 펩티드 및 폴리-ICLC의 공정 중 중간체 및 최종 혼합물은 실온에서 유지하나 4시간 내에 사용해야 한다.
- [0562] 상용성: 개인맞춤화 신생항원 펩티드를 사용 직전에 1/3 부피의 폴리-ICLC와 혼합한다.
- [0563] 실시예 8
- [0564] 제형 시험
- [0565] 일부 조건 하에 펩티드 풀 용액에서 특정 펩티드를 사용하여 혼탁 또는 침전이 관찰되었다. 이에 따라, 펩티드 용해도 및 안정성에 대한 약한 완충제의 효과를 평가하였다.
- [0566] 폴리-ICLC 및 펩티드 풀(DMSO가 있는 D5W 중)의 혼합이 특히 소수성 펩티드에 대하여, 아마도, 폴리-ICLC 용액의 낮은 pH로 인하여, 때때로 혼탁 또는 침전을 야기하는 것이 관찰되었다. 펩티드 용액의 pH를 상승시키기 위하여, 완충제를 시험하고, 펩티드 용해도에 대한 효과를 평가하였다. 초기 시험에 기초하여, 시트르산염 및 석신산염 완충제를 시험하였다.
- [0567] 단독의 D5W에서 용해도 문제를 갖는 4개의 펩티드 중 3개에 대하여 개선된 용해도가 관찰되었다. 이러한 초기의 관찰에 기초하여, 19개의 추가의 펩티드를 시트르산염 또는 석신산염을 사용하여 평가하고 4개의 추가의 펩티드를 단독의 석신산염을 사용하여 평가하였다. 완충제로서 시트르산나트륨(시험되는 경우) 또는 석신산나트륨 중 어느 하나를 사용하는 경우 19개의 시험된 펩티드 중 18개의 용액이 투명한 것이 관찰되었다(단독의 석신산염에서 평가된 4개의 펩티드 중 어느 것도 혼탁을 나타내지 않음).
- [0568] 2 mM 내지 5 mM 농도의 석신산염이 효과적인 것으로 관찰되었다. 석신산염 완충제에서 하나의 펩티드에 대하여 펩티드의 회수가 개선되었으나 시트르산염 완충제에서는 그렇지 않았다. 사용되는 펩티드 풀 및 석신산염 완충제의 농도에 따라, D5W/석신산염 중 펩티드 용액에 대한 pH는 약 4.64 내지 약 6.96 범위였다.
- [0569] 총 27개의 펩티드(가용화시키기 어려운 초기의 4개의 펩티드의 그룹 포함)의 평가 후에, 하나의 펩티드가 모든 조건에서 재현 가능하게 혼탁을 보이며, 하나의 추가의 펩티드가 약간의 혼탁을 보이지만, 여과시에 완전히 회

복 가능하였던 것이 관찰되었다. 이들 2개의 펩티드 둘 모두는 높은 소수성을 가졌다.

[0570] 일반적으로, 석신산염 완충제와 함께 D5W 중 2 mg/ml로의 희석시에 투명한 펩티드가 다른 펩티드와의 혼합시에 투명도를 유지하는 것이 관찰되었다(이것은 일반적으로 단독의 D5W 중 펩티드에 대하여 사실임).

[0571] 대표적인 절차에서, 펩티드를 칭량하고, 펩티드 함량%에 대하여 보정한 다음, 50 mg/ml의 농도로 DMSO 중에 용해시켰다. 그 다음, DMSO/펩티드 용액을 D5W 중 5 mM 석신산나트륨을 사용하여 2 mg/ml의 펩티드 농도로 희석시켰다.

[0572] 추가의 펩티드 용해도 조건을 시험하였다. 펩티드 CS6709, CS6712, CS6720, CS6726 및 CS6783을 각각 대략 10 mg으로 칭량하였다. 그 다음, 펩티드를 대략 200 μ l USP 등급 DMSO에 용해시켜, 각 펩티드에 대하여 50 mg/ml 농도를 수득하였다. 본 발명자들은 50 mg/ml을 제공하도록 계산한 10.02 mg의 펩티드 CS6709는 200 μ l 양의 DMSO에 완전히 용해되지 않았음을 관찰하였다. 시료는 혼탁한 것으로 보였다. 총 600 μ l의 DMSO에 대하여 추가의 50 μ l 증분의 DMSO를 400 μ l까지 펩티드 CS6709에 첨가하였다. DMSO의 양이 600 μ l에 도달하는 경우, CS6709는 용액(투명)이 되었으며, 농도는 16.67 mg/ml였다.

[0573] 펩티드를 400 μ g로 희석하기 위하여, 칼륨이 없는 PBS pH 7.4 용액을 제조하였다. 모든 5개의 DMSO 펩티드 시료(50 mg/ml)를 400 μ g/ml로의 희석을 위해 단일의 바이알에 두었다. 각각의 DMSO 펩티드를 40 μ l로 바이알에 첨가하였으며, 16.67 mg/ml의 농도였던 CS6709를 제외한다. 단일의 바이알에 첨가되는 CS6709의 부피는 120 μ l였다. 4.72 ml PBS pH 7.4를 첨가함으로써 시료를 400 μ g으로 희석하였다. PBS pH 7.4의 첨가 시에, 펩티드 중 하나 이상이 침전되는 것이 관찰되었다.

[0574] 어떤 펩티드가 침전되는지를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 매우 소량(10 내지 20 μ l)의 DMSO 용해된 펩티드를 사용하고, 이들 펩티드를 다양한 액체로 첨가하여, 하기 표 5의 매트릭스를 따랐다.

표 5

펩티드 희석제 매트릭스

펩티드	리포솜	PBS pH 7.4	물	10% 수크로스	D5W(5% 텍스트로스 USP급 주사)
CS6709	NP	NP	NP	NP	NP
CS6712	NP	NP	NP	NP	NP
CS6720	NP	NP	NP	NP	NP
CS6726	NP	NP	NP	NP	NP
CS6783	P	P	NP	NP	NP

P=침전; NP=침전 부재

[0575]

[0576] CS6783은 PBS pH 7.4가 펩티드 혼합물에 대한 희석제로 사용되는 경우 침전하는 것으로 관찰되었다. 주사 가능한 USP급 D5W는 PBS pH 7.4에 대한 희석제 대체물이다.

[0577] 또한, 본 발명자들은 소량의 각 펩티드(1 mg 미만)를 시험하여, 5개의 펩티드 중 임의의 것이 DMSO를 사용하지 않고, D5W 중에 용해될 수 있었는지를 알아내었다. 펩티드 CS6709, CS6712, CS6720 및 CS6726은 D5W 중에 직접 용해될 수 있었다. CS6783은 D5W를 사용하여 용해될 수 없었다.

[0578] 실시예 9

[0579] 제형

[0580] 각 환자에 대한 제형은 면역원으로서 개별적으로 생성되는 최대 20가지의 펩티드를 포함한다. 백신접종을 위하여, 4개의 풀(각각 최대 5가지의 펩티드)을 본원에 논의된 바와 같은 림프계의 별개의 부분을 표적으로 하는 개별 부분으로의 주사를 위해 제조한다. 개별 펩티드를 칭량하고, 높은 농도에서 DMSO 중에 용해시키고, 수 중 5% 텍스트로스(D5W) 및 석신산나트륨(4.8 내지 5 mM)을 사용하여 희석시키고, 4개의 풀에서 혼합하였다. 개별 풀을 0.2 μ m 필터를 통해 여과하여 바이오버든(bioburden)을 감소시키고, 바이알에 분취하고, 동결시킨다. 동결된 바이알을 사용할 때까지 동결 보관한다.

[0581] 본원에 기재된 바와 같이, 약물 물질을 구성하는 환자-특이적 펩티드의 세트를 개별적으로 제조하고, 동결건조시키고, 시험하고, 출하시키고, 제조 후에 보관한다. 주사를 위해 이들 펩티드를 제조하기 위하여, 각각 최대 5

가지의 상이한 펩티드로 구성된 4개의 그룹을 풀링을 위해 확인한다.

[0582] 실시예 10

[0583] 백신의 제조

[0584] **칭량 및 용해:** 총중량 및 펩티드 함량에 기초하여, 15 mg(순중량) 또는 약간 더 많은 각 개별 펩티드를 칭량하고, 100% USP급 DMSO(2:250 μ l)를 첨가하여, 50 mg/ml의 최종 펩티드 농도를 달성한다. 개발 연구에 기초하여, 95% 초과 용해된 펩티드는 이 때 투명도를 보인다.

[0585] **희석 및 혼합:** 5 mM 석신산나트륨(D5W/Succ)을 함유하는 USP급 D5W를 희석제로 사용하기 위해 제조하고 여과한다(0.2 J..tm). 250 μ l의 각각의 용해된 펩티드를 D5W/Succ로 희석하여, 펩티드 농도를 2 mg의 펩티드/ml로 감소시키고, pH를 대략 약 6.0으로 조정한다. 투명한 용액을 보이지 않는 임의의 펩티드를 다른 펩티드(또는 추가의 펩티드가 이용 가능하지 않은 경우에만 D5W/석신산염 용액)로 대체한다. 그 다음, 5.5 ml의 각각의 희석된 펩티드 용액을 400 μ g의 펩티드/ml의 농도로 각 펩티드가 있는 단일의 5-펩티드 함유 풀로 조합한다. 그 다음, 2회의 0.2 μ m 막 여과 단계 중 제1 단계를 수행한다. 각 풀을 루어 락 팁(luer lock tip) 및 18 게이지 블런트(blunt) 주사바늘이 핏팅된 60 ml 벡톤 디슨(Becton Dickinson)(또는 등가물) 주사기로 빼낸다. 주사바늘을 제거하고, 25 mm 폴 PES(폴리에테르 설펜) 0.2 μ m 막 필터(폴 카탈로그 HP1002)로 대체한다. 주사기의 내용물을 필터를 통해 50 ml 멸균 폴리프로필렌 튜브(팔콘(Falcon)# 352070 또는 등가물) 내로 옮긴다. 각 풀의 분취물을 시험을 위해 제거하고, 나머지를 -80℃에서 동결시킨다. 각 개별 희석된 펩티드의 나머지를 모든 분석이 완료될 때까지 -20℃에 보관한다.

[0586] **배송:** 동결된 펩티드 풀을 입증된 배송 용기 및 당일 속달 항공(overnight air)을 사용하여 배송한다.

[0587] **여과 및 보관:** 동결된 풀을 해동시키고, 생물안전성 캐비넷으로 옮긴다. 해동된 풀로부터 2 ml 시료를 멸균 및 내독소 시험을 위해 시험한다. 나머지 벌크 용액을 2회의 0.2 μ m 막 여과의 제2 단계를 위해 처리한다. 벌크 풀링된 펩티드를 루어-락 팁 및 18 게이지 블런트 주사바늘이 핏팅된 벡톤 디슨(또는 등가물) 60 ml 주사기로 빼낸다. 주사바늘을 제거하고, 25 mm 폴 PES(폴리에테르 설펜) 0.2 μ m 막 필터(폴 카탈로그 HP1002)로 대체한다. 주사기의 내용물을 필터를 통해 50 ml 멸균 폴리프로필렌 튜브(팔콘# 352070 또는 등가물) 내로 옮긴다. 그 다음, 펩티드 용액의 1.5 ml 분취물을 15개의 사전-표지된 멸균 1.8 ml 넉크 크라이오 바이얼(카탈로그 번호 375418)로 무균적으로 옮긴다. 바이얼을 4색-코딩된 캡 중 하나로 캡핑한다. 상이한 색-코딩된 캡을 단일의 환자에 대한 4개 풀의 펩티드 각각에 대하여 사용하여, 확인을 돕는다. 바이얼을 환자의 성명, 의료 기록 번호, 연구 번호, 원래 제품/시료 영문 숫자 식별자 및 독특한 영문 숫자 식별자(A 내지 D)로 표시한다. 모든 바이얼을 -80℃에서 동결시킨다. 나머지 동결된 바이얼을 모든 출하 시험이 허용 기준을 통과할 때까지 보관한다. 환자는 모든 출하 시험이 완료되고 제품이 약국으로 출하될 때까지 면역화가 예정되지 않는다.

[0588] 대안적으로, 각 면역화 일에, 본원에 기재된 바와 같은 생물안전성 캐비넷 내에서, 아직 멸균 여과로 처리되지 않은 한 세트(4개)의 바이얼을 해동시키고, 생물안전성 캐비넷으로 옮긴다. 각 바이얼의 내용물을 개별 주사기로 빼낸다. 0.2 μ m 멸균 필터를 부착하고, 내용물을 필터를 통해 멸균 바이얼로 옮긴다. 필터를 제거하고, 무균성에 대하여 점검한 다음, 0.75 ml의 펩티드 혼합물을 멸균 주사기를 사용하여 빼내고, 주사기-대-주사기 전달에 의해 0.25 ml 폴리-ICLC(힐토놀®)와 혼합한다.

[0589] **분석:** 3가지 시험(외양, 아이덴티티 및 잔류 용매)을 풀링된 펩티드의 분취물에서 공정-중 시험으로 행한다. 내독소를 최종 여과 이전에 해동된 펩티드 풀의 분취물에서 시험한다. 무균성을 최종 산물의 2개의 바이얼로부터 조합된 시료에서 분석한다. 이러한 접근법을 취하여, 주요 생화학적 정보(펩티드 용해도, 각 풀 내의 각 피크의 아이덴티티 및 임의의 잔류 용매의 수준)가 최종 여과를 행하기 이전에 이용 가능한 것을 보장한다. 풀링되고 여과된 벌크 펩티드 풀을 받는 즉시, 내독소 시험 및 미생물에 대한 배양을 수행하여, 미생물 순도를 평가한다. 내독소 사양을 만족시키는 것이 제품 사용에 요구된다. 미생물 배양 시험에서의 임의의 양성 결과를 제품 사용에 대한 영향에 대하여 조사한다. 주요 안전성 시험, 무균성을 최종 여과 및 바이얼 보관 후에 바이얼 보관된 시료, 환자 사용에 가장 가까운 시료에서 행한다.

[0590] 실시예 11

[0591] 투여

[0592] 개인맞춤형 신생-항원 펩티드/폴리펩티드와의 혼합 후에, 백신(예를 들어, 펩티드 + 폴리-ICLC)은 피하 투여되어야 한다.

[0593] **개인맞춤화 신생항원 펩티드/폴리펩티드 풀의 제조:** 펩티드를 각각 최대 5개의 펩티드로 된 4개의 풀에서 함께 혼합한다. 각 풀에 대한 선택 기준은 펩티드가 결합하는 것으로 예측되는 특정 MHC 대립형질에 기초한다.

[0594] **풀 조성:** 풀의 조성은 각 펩티드가 결합하는 것으로 예측되는 특정 HLA 대립형질에 기초하여 선택된다. 4가지 풀을 개별 림프절 베이진(lymph node basin)으로 배액되는 해부학적 부위에 주사한다. 이러한 접근법을 동일한 HLA 대립형질로 펩티드 결합 간의 항원 경쟁을 가능한 많이 잠재적으로 감소시키고, 면역 반응의 발생에서 환자의 면역계의 넓은 서브셋을 관련시키기 위해 선택하였다. 각 환자에 있어서, 최대 4개의 상이한 HLA A 및 B 대립형질에 결합하는 것으로 예측되는 펩티드가 확인된다. 일부 neoORF 유래의 펩티드는 임의의 특정 HLA 대립형질과 회합되지 않는다. 펩티드를 상이한 풀에 분배하는 접근법은 특정 HLA 대립형질과 회합되는 각 세트의 펩티드를 가능한 4개의 풀만큼 많은 풀에 분산시키는 것이다. 주어진 대립형질에 대하여 4개 초과 예측된 펩티드가 존재하는 상황이 있을 가능성이 높으며, 이들 경우에, 특정 대립형질과 회합되는 1가지 초과 펩티드를 동일한 풀에 할당하는 것이 필요하다. 임의의 특정 대립형질과 회합되지 않는 이들 neoORF 펩티드를 잔여 슬롯(slot)에 무작위로 할당한다. 예는 하기에 나타나 있다:

A1	HLAA0101	3개 펩티드
A2	HLA A1101	5개 펩티드
B1	HLA B0702	2개 펩티드
B2	HLA B6801	7개 펩티드
X	부제 (neoORF)	3개 펩티드

[0595]

풀 번호	1	2	3	4
	B2	B2	B2	B2
	B2	B2	B2	A2
	A2	A2	A2	A2
	A1	A1	A1	B1
	B1	X	X	X

[0596]

[0597] 동일한 MHC 대립형질에 결합하는 것으로 예측된 펩티드는 가능한 때마다 개별 풀로 배치된다. neoORF 펩티드의 일부는 환자의 임의의 MHC 대립형질에 결합하는 것으로 예측되지 않을 수 있다. 그러나 이들 펩티드는 주로 그들이 완전히 신규하고 이에 따라 중심 관용의 면역-약화 효과를 겪지 않고, 이에 따라, 높은 확률의 면역원성을 갖기 때문에 여전히 사용된다. 또한, neoORF 펩티드는 임의의 정상 세포에서 등가의 분자가 존재하지 않기 때문에, 현저하게 감소된 자가면역 가능성을 지닌다. 또한, 예측 알고리즘으로부터 야기되는 위 음성이 존재할 수 있으며, 펩티드가 HLA 클래스 II 에피토프를 함유할 가능성이 있다(HLA 클래스 II 에피토프는 현재의 알고리즘에 기초하여 신뢰성있게 예측되지 않음). 특정 HLA 대립형질로 확인되지 않은 모든 펩티드는 개별 풀로 무작위로 할당된다. 주사마다 300 μ g의 각 펩티드의 최종 용량으로 각 펩티드의 양이 예측된다.

[0598] 각 환자에 있어서, 각각 5개의 합성 펩티드의 4가지 상이한 풀("A", "B", "C" 및 "D"로 표지)은 제조처에 의해 제조되며, -80°C에 보관된다. 면역화 일에, 펩티드 성분(들) 및 폴리-ICLC로 이루어진 완전한 백신을 연구 약제 부에서 제조한다. 각각 하나의 바이알(A, B, C 및 D)을 실온에서 해동시키고, 나머지 단계를 위해 생물안전성 캐비닛으로 이동시킨다. 0.75 ml의 각 펩티드 풀을 바이알로부터 개별 주사기로 빼낸다. 개별적으로, 폴리-ICLC의 4개의 0.25 ml(0.5 mg) 분취물을 개별 주사기로 빼낸다. 그 다음, 각 펩티드 풀 함유 주사기의 내용물을 주사기-대-주사기 전달에 의해 폴리-ICLC의 0.25 ml 분취물과 온건하게 혼합한다. 전체 1 ml의 혼합물을 주사를 위해 사용한다. 이들 4개의 제제를 "연구 약물 A", "연구 약물 B", "연구 약물 C" 및 "연구 약물 D"로 표지한다.

[0599] 각 면역화 일에, 환자에 폴리-ICLC(힐토놀®)와 혼합된 개인맞춤화 신생항원 펩티드의 최대 4개의 풀을 피하 주사한다.

[0600] 펩티드 및 힐토놀®의 각 혼합물에 대한 주사 부피는 1 ml이다.

[0601] 각 펩티드의 풀은 최대 5가지의 펩티드로 이루어지며, 각각은 400 μ g/ml의 농도이다.

[0602] 펩티드 풀의 조성은:

[0603] 각각 400 μ g/ml의 농도의 최대 5가지의 펩티드

- [0604] 4%의 DMSO
- [0605] 4.8 내지 5%의 수 중 텍스트로스
- [0606] 4.8 내지 5 mM의 석신산나트륨이다.
- [0607] 힐토놀®은:
- [0608] 2 mg/ml의 폴리 I: 폴리 C
- [0609] 1.5 mg/ml의 폴리-L-라이신
- [0610] 5 mg/ml의 나트륨 카르복시메틸셀룰로스
- [0611] 0.9%의 염화나트륨으로 이루어진다.
- [0612] 각 1 ml의 주사 부피는 0.25 ml의 힐토놀®과 혼합된 4개의 펩티드 풀 중 하나 0.75 ml로 이루어진다. 혼합 후에, 조성은:
- [0613] 각각 300 µg/ml의 농도의 최대 5개의 펩티드
- [0614] 3% 이하의 DMSO
- [0615] 3.6 내지 3.7%의 수 중 텍스트로스
- [0616] 3.6 내지 3.7 mM의 석신산나트륨
- [0617] 0.5 mg/ml의 폴리 I: 폴리 C
- [0618] 0.375 mg/ml의 폴리-L-라이신
- [0619] 1.25 mg/ml의 나트륨 카르복시메틸셀룰로스
- [0620] 0.225%의 염화나트륨이다.
- [0621] **주사:** 각 면역화 시에, 4가지 연구 약물의 각각을 하나의 사지로 피하 주사한다. 전체 치료 기간(즉, 연구 약물 A를 제1일, 제4일, 제8일 등에 좌측 팔에 주사하고, 연구 약물 B를 제1일, 제4일, 제8일 등에 우측 팔에 주사할 것임) 동안 각 면역화 시에 각 개별 연구 약물을 동일한 사지에 투여한다. 완전한 액와 또는 서혜부 림프절 절제 후의 상태인 환자에 대한 대안적인 해부학적 위치는 각각 좌측 및 우측 횡격막이다.
- [0622] 백신은 프라임/부스트 일정에 따라 투여된다. 백신의 프라임 용량은 본원에 나타난 바와 같이 제1일, 제4일, 제8일, 제15일 및 22일에 투여된다. 부스트 단계에서, 백신은 제85일(제13주) 및 제169일(제25주)에 투여된다.
- [0623] 적어도 하나의 용량의 백신을 제공받은 모든 환자를 독성에 대하여 평가한다. 환자가 유도 단계 동안 모든 백신 접종 및 유지 단계 동안 제1 백신접종(부스트)을 제공받는다면, 환자를 면역학적 활성에 대하여 평가한다.
- [0624] 실시예 12
- [0625] 최종 투여형의 단기간 실온 안정성
- [0626] **펩티드 안정성.** 하기 표 6에 나타난 5가지의 펩티드로 이루어진 펩티드 풀(풀 3)을 DMSO 중에서의 용해 및 D5W/석신산염(2 mM)을 사용한 2 mg/ml로의 희석 및 400 µg/ml의 최종 펩티드 농도 및 4%의 최종 DMSO 농도로의 폴링에 의해 제조하였다. 제조 후에, 펩티드를 25 mm 폴 PES 필터(카탈로그 번호 4612)를 사용하여 여과하고, 넌크 크라이오 바이얼(# 375418) 내로 1 ml 분취물로 분배하였다.

표 6

표 3의 펩티드 및 서열

펩티드	서열	펩티드 내용물%	총 아미노산	소수성	소수성 비율
1	CS6919	KLAWRGRISSSGCPMTSPSPMFGMTLHT	30	9	0.30
2	CS6931	VAGLAASGLHGS AWLVPGEQPVSGPHHGKQ	30	11	0.37
3	CS6934	SKRGVGAKTLLLPDPFLFWPCLEGTRSL	29	11	0.38
4	CS6941	AHRQGEKQHLLPVFSRLALRLPWRHSVQL	29	12	0.41
5	CS7416	AESAQRQGPNGGGEQSANEF	20	4	0.20

[0627]

[0628] 투여형 제조를 위해 계획된 바와 같이 0.75 ml의 풀 3을 0.25 ml의 힐토놀®과 혼합함으로써 3개의 시료를 제조하였다. 그 다음, 시료를 0, 4 및 6시간 동안 실온에 두고, RP-HPLC에 의해 분석하였다(표 7). 5개의 펩티드 중 4개에 대하여 변화가 주목되지 않았다. 각각 제4시간 및 제6시간에 14%에서 17% 및 18%로 증가하는 펩티드 CS6919와 관련된 제2 피크의 약간의 증가가 주목되었다. -20℃ 안정성 연구에서 주목된 바와 같이, 펩티드 CS6919 및 CS6934(둘 모두 풀4에 나타남)는 이러한 불순물의 위치에서 용리하는 헤테로다이머를 형성할 수 있다(질량 분석에 의해 나타난 바와 같음). 모든 펩티드의 회수는 90% 초과였으며, 이는 6시간 실온 인큐베이션 후에 최종 투여형에서 임의의 펩티드의 파괴 및 소실이 없음을 나타낸다.

표 7

힐토놀®과의 혼합 및 실온 인큐베이션 후의 풀 3의 안정성 요약

T0 풀 3+ 힐토놀	주요 피크	총 불순물	총 피크	순도%	불순물%
CS6919	7786.28	1256.72	9043	86.1	13.9
CS6931	9014.82	198.6	9213.42	97.84	2.16
CS6934	6147.14	244.49	6391.63	96.17	3.83
CS7416	5988.42	143.98	6132.4	97.65	2.35
CS6941	7140.91	0	7140.91	100	0
풀 3 + 힐토놀	주요 피크	총 불순물	총 피크	순도%	불순물%
4시간 실온					
CS6919	7238.56	1492.4	8730.96	82.91	17.09
CS6931	8523.53	265.54	8789.07	96.98	3.02
CS6934	5842.22	184.46	6026.68	96.94	3.06
CS7416	5669.85	148.82	5818.67	97.44	2.56
CS6941	6676.54	0	6676.54	100	0
풀 3 + 힐토놀	주요 피크	총 불순물	총 피크	순도%	불순물%
6시간 실온					
CS6919	7688.89	1703.9	9392.79	81.86	18.14
CS6931	9387.81	311.37	9699.18	96.79	3.21
CS6934	6268.16	221.46	6489.62	96.59	3.41
CS7416	6197.48	132.83	6330.31	97.9	2.1
CS6941	7158.29	0	7158.29	100	0

회수	
주요 피크	총 AUP
93%	97%
95%	95%
95%	94%
95%	95%
93%	93%
회수	
주요 피크	총 AUP
106%	108%
110%	110%
107%	108%
109%	109%
107%	107%

[0629]

[0630] **폴리-ICLC 안정성.** 제2 연구에서, 다른 펩티드 풀(풀 4)을 사용하고, 힐토놀®과 혼합하고(0.75 ml 펩티드 풀 + 0.25 ml 힐토놀®), 실온에서 6시간 동안 보관하였다. 그 다음, 실온 인큐베이션된 펩티드 + 힐토놀® 믹스 및 단독의 힐토놀®(4℃에서 계속 보관)을 20 µg/ml 폴리-ICLC로 희석하고, 공개된 방법에 따라 마우스 수지상 세포를 사용하여 TLR 자극에 대하여 검정하였다. 24시간 자극 후에, 정량적 PCR을 사용하여, 도 6에 나타난 바와 같이 다수의 주요 면역 마커의 유도 수준을 평가하였다. 최종 제형에서 펩티드 풀과 함께 6시간 실온 후의 폴리-ICLC의 자극 능력에 차이가 없었으며, 이는 힐토놀®이 임의의 제형 성분(DMSO[4%], D5W, 5 mM 석신산염, 펩티드)에 의해 영향을 받지 않았으며, 실온에서 최대 6시간 동안 최종 투여형에서 안정하였음을 나타낸다.

[0631] 실시예 13

[0632] 최종 제형 형태의 동결건조

[0633] 펩티드를 위한 제형은 하기와 같다: 펩티드의 각 풀은 각각 400 µg/ml의 농도의 최대 5가지의 펩티드로 이루어진다. 펩티드 풀의 조성은:

[0634] 각각 400 µg/ml의 농도의 최대 5가지의 펩티드

- [0635] 4 내지 8%의 DMSO
- [0636] 4.6 내지 4.8%의 수 중 텍스트로스
- [0637] 5 mM의 석신산나트륨이다.
- [0638] 안정화를 위해 사용되는 증량제(bulking agent)는 수 중 텍스트로스(D5W)이다. 최종 제형은 제형 매트릭스의 열 특성에 기초한다. 조절형 시차 주사 열량계(Modulated differential scanning calorimetry, MDSC) 데이터는 각각 -24℃ 및 -56℃에서 2개의 열 전이 온도(T_g')의 존재 및 DMSO의 용융으로 인한 -67℃에서의 발열 반응을 시사한다. 문헌에 기초하여, D5W의 유리 전이는 -43℃이다. MDSC 데이터는 DMSO의 존재가 유리 전이 온도를 더욱 감소시키는 것을 시사한다. 이러한 정보에 기초하여, 펩티드의 동결건조 실행 가능성을 2가지 추가의 증량제, 수크로스 및 트레할로스를 사용하여 점검하였다. 하기의 제형을 MDSC 분석을 사용하여 평가하였다(도 7 내지 도 9):
- [0639] 1. 5% D5W 및 0.8% DMSO
- [0640] 2. 10% 수크로스 및 0.8% DMSO
- [0641] 3. 10% 트레할로스 및 0.8% DMSO
- [0642] 상기 제형을 -50℃에서 3시간 동안 동결시키고, -35℃에서 75 mtorr에서 30시간 동안 일차 건조시키고, -30℃에서 30시간 동안 건조시킴으로써 보존성 동결건조 사이클을 사용하여 동결건조시켰다(도 10 및 11). 부분적인 케이크가 단독의 D5W를 함유하는 제형에 대하여 관찰되지만, D5W-DMSO를 함유하는 제형은 완전히 방해된다. 동결건조 결과는 0.8% DMSO의 존재하에, 트레할로스 또는 수크로스를 함유하는 제형이 텍스트로스를 함유하는 제형보다 동결건조에 있어서 더욱 양립 가능한 것을 시사한다(도 12).
- [0643] 시료(25 μ l)를 하기의 프로그램을 사용하여 MDSC에 의해 분석하였다. 하기의 파라미터를 사용하여, 열 사건을 모니터링하였다:
- [0644] 1. 20.00℃에서 평형화
- [0645] 2. 5.00분 동안 등온
- [0646] 3. 60초마다 +/- 1.00℃ 조절
- [0647] 4. 데이터 저장: ON
- [0648] 5. -70℃까지 1.00℃/분의 온도변화(ramp)
- [0649] 6. -70℃에서 평형화
- [0650] 7. 5.00분 동안 등온
- [0651] 8. 20.00℃까지 1.00℃/분의 온도변화
- [0652] 9. 20.00℃에서 평형화
- [0653] 10. 데이터 저장: OFF
- [0654] 11. 5분 동안 등온
- [0655] 12. 방법의 종료
- [0656] **동결건조.** MDSC를 사용하여 유리 전이 온도(T_g)를 결정하였으며, 이를 사용하여, 제품의 일차 건조 및 동결 온도를 선택한다(표 8 및 도 7 내지 도 9). 데이터는 DMSO의 용융이 모든 제형에서 -68℃ 근처에 발생하는 것을 나타낸다. 모든 3개의 제형에서 2개의 유리 전이가 존재하였다. 텍스트로스, 트레할로스 또는 수크로스를 함유하는 제형은 각각 -59℃, -42℃ 및 -50℃의 가장 낮은 열류 유리 전이를 가지며, 이는 붕괴/용융 없이 D5W-DMSO를 함유하는 제형을 동결건조하기 어려움을 시사한다.

표 8

10% 수크로스 및 0.8% DMSO의 MDSC 분석

제형	동결 온도(°C)	용융(°C)	DMSO 용융(°C)	Tg'1(°C)	Tg'2(°C)
5% D5W-0.8% DMSO 열류	-18.2	-0.38	-67.86	-24.27	-59.17
5% D5W-0.8% DMSO 역열류	N/A	N/A	NA	-33.31	-62.86
10% 트레할로스-0.8% DMSO 열류	-12.64	-1.25	-68.06	-24.4	-42.55
10% 트레할로스-0.8% DMSO 역열류	N/A	N/A	NA	-24.4	-39.2
10% 수크로스-0.8% DMSO 열류	-11.36	-0.26	-67.87	-23.53	-50.31
10% 수크로스-0.8% DMSO 역열류	N/A	N/A	NA	-31.21	N/A

[0657]

[0658]

동결건조를 초기에 넉크 바이얼을 사용하여 시도하였으며, 넉크 바이얼의 형태가 제형 매트릭스를 동결건조시기에 적당하지 않았음이 관찰되었다. 4개의 1.8 ml 멸균 넉크 바이얼(써모 사이언티픽(Thermo Scientific)) 내의 5% D5W 및 0.8% DMSO 제형 1 ml을 동결건조 사이클을 사용하여 동결건조시켰다(-50°C로 동결 및 2시간 동안 유지, -15°C에서 20시간 동안 75 mtorr에서 일차 건조 및 75 mtorr 압력과 함께 20°C에서 8시간의 이차 건조). 바이얼 내에 케이크가 존재하지 않는 것이 관찰되었으며, 넉크 바이얼의 바닥에서 작은 액적의 형태의 액체 잔류 DMSO 및 D5W가 인지되었다.

[0659]

동결건조에 적합한 플린트(flint) 바이얼을 선택하여, 선도 제형의 동결건조의 실행 가능성을 결정하였다. 1.5 ml의 각 제형을 함유하는 5개의 바이얼을 3 ml 13 mm 플린트 바이얼에 채우고, 13 mm 동결건조 스톱퍼(stopper)를 사용하여 부분적으로 폐쇄하고, 동결건조를 위해 라이오스타(Lyostar) II의 중간 선반에 보관하였다.

[0660]

-50°C 미만의 유리 전이를 갖는 제형을 동결건조시키기 어렵다. 유리 전이 온도에 기초하여, 하기의 보존성 동결건조 파라미터를 동결건조를 위해 설정하였다(표 9). 압력 프로파일 및 온도 프로파일에 대하여 획득된 결과는 각각 도 10 및 도 11에 제시되어 있다. 피라니(pirani) 압력은 일차 및 이차 건조 동안 선반 설정 압력 아래로 유지되었으며, 이는 챔버 내에 수분이 존재하지 않고(도 10), 동결건조 사이클이 완료됨을 시사한다.

표 9

DMSO 및 트레할로스, 수크로스 또는 D5W를 함유하는 캡티드의 위약 제형의 동결건조 파라미터

단계	온도	압력	유지 시간(분)	온도변화 속도	온도변화/유지 시간(분 또는 시간)
로드	20°C	대기압	N/A	N/A	
동결	-50°C	N/A	N/A	1°C/분	70(온도변화)
동결	-50°C	N/A	120	N/A	180(유지)
일차 건조	-35°C	75 m torr	1800	1°C/분	15(온도변화)
일차 건조	-30°C	75 m torr	피라니가 75 mtorr에 도달할 때까지(1800분)	1°C/분	5 온도변화
이차 건조	20°C	75 m torr	N/A	1°C/분	50(온도변화)
이차 건조	20°C	75 m torr	피라니가 75 mtorr에 도달할 때까지(1800분)	NA	피라니가 75 mtorr에 도달할 때까지(220분)
겉소 및 스톱퍼 하에 600 Torr로 백필링시키고, 760(대기압)이 되게 하고, 크립핑하고, 밀봉함					

[0661]

[0662]

케이크의 물리적 외양. D5W 및 DMSO를 함유하는 제형은 완전히 봉해되고 용융되는 한편, 트레할로스-DMSO 또는

수크로스-DMSO를 함유하는 제형은 약간의 방해가 있는 백색 무정형 케이크를 갖는다(도 12).

실시예 14

D5W/석신산염 또는 다른 수성 완충제 중 가용성 펩티드의 생성을 위한 알고리즘

본 발명자들은 다양한 수용액 중 펩티드의 가용성의 정확한 예측을 위한 알고리즘을 개발하였다. 일반적으로, 수용액 중 임의의 주어진 펩티드의 가용성이 단독의 서열 정보에 기반하여 예측하기 어려우며, 종종 실험적 결정을 필요로 하는 것이 이해된다. 소수성 및 등전점과 관련된 2가지의 계산 가능한 파라미터를 사용하여, 본 발명자들은 이들 파라미터의 특정 계산 가능한 조합을 갖는 펩티드가 높은 또는 낮은 가용성을 나타내는 것을 확인하여, 이에 따라, 펩티드 가용성의 예측의 문제에 대한 해결책을 제공하였다.

등전점(P_i)은 인터넷(예를 들어, www.geneinfinity.org/sms/sms_proteiniep.html 참조)에서 용이하게 이용 가능한 계산기를 사용하여 추정되거나, 모든 가능한 하전된 아미노산에 대한 알려져 있는 pH/전하 식을 사용하여 용이하게 계산될 수 있다. 하전된 아미노산(H,R,K,D,E,C,Y)의 측쇄 및 펩티드 아미노 및 카르복시 말단의 pKa가 알려져 있다(표 10).

표 10

(NH ₂ -)	9.69	(-COOH)	2.34
K (라이신)	10.5	D (아스파르트산)	3.86
R (아르기닌)	12.4	E (글루탐산)	4.25
H (히스티딘)	6.00	C (시스테인)	8.33
		Y (티로신)	10.0

레닌자, 생화학

각각의 아미노산의 실제 전하는 하기 화학식에 따라 용액의 pH에 좌우될 것이다:

$$\text{NH}_2, \text{K}, \text{R}, \text{H} \text{에 있어서} \quad Z(\text{전하}) = \frac{10^{\text{pKa}}}{(10^{\text{pH}} + 10^{\text{pKa}})}$$

$$-\text{COOH}, \text{D}, \text{E}, \text{C}, \text{Y} \text{에 있어서} \quad Z(\text{전하}) = \frac{10^{\text{pH}}}{(10^{\text{pH}} + 10^{\text{pKa}})}$$

임의의 주어진 pH에서의 펩티드 상의 순전하는 각각의 개별 아미노산 또는 말단 상의 전하의 합이다. 등전점은 순전하가 0인 pH이다.

소수성은 다양한 방식으로 계산될 수 있다. 소수성을 계산하기 위한 1가지 방식은 소수성인 각 펩티드의 영역을 찾고, 각각의 영역의 소수성의 정도에 대한 지수를 계산하고, 가장 높은 소수성의 정도를 갖는 영역을 찾는 것이다. 이러한 파라미터는 HYDRO로 표기될 수 있다. 이러한 계산은 각 아미노산 측쇄에 대한 공개된 소수성(또는 친수성)의 값을 사용하고, 펩티드 내의 소수성 아미노산의 비단속 스트레치를 확인하고, 각각의 영역 내의 각각의 아미노산의 소수성을 합산함으로써 용이하게 달성될 수 있다. 일 예로서, 각각의 아미노산에 대한 하기의 친수성의 표가 제공되어 있다(표 11):

표 11

알라닌	-0.5
시스테인	-1
아스파르트산	3
글루탐산	3
페닐알라닌	-2.5
글리신	0
히스티딘	-0.5
이소류신	-1.8
라이신	3
류신	-1.8
메티오닌	-1.3
아스파라긴	0.2
프롤린	0
글루타민	0.2
아르기닌	3
세린	0.3
트레오닌	-0.4
발린	-1.5
트립토판	-3.4
티로신	-2.3

[0672]

[0673]

소수성 아미노산은 음의 값을 갖는다.

[0674]

각각의 아미노산은 그의 친수성 값이 부여되며, 모두가 0 미만의 값을 갖는 아미노산의 각각의 연속 스트레치에 있어서, 이들 값을 함께 합산하며, 이러한 합은 주어진 연속 스트레치에 대한 소수성 지수이다. 가장 소수성인 스트레치는 가장 음의 값을 갖는 것이다. 이러한 값은 파라미터 HYDRO를 정의한다. 예시적인 펩티드에 대한 이들 값의 예가 나타나 있다(도 13). 청색의 값은 각 아미노산에 대한 친수성 값을 나타내며(이에 따라, 음의 값은 소수성 잔기를 나타냄), 적색의 값은 소수성 스트레치에 걸친 소수성 값의 합을 나타낸다.

[0675]

이들 2가지 파라미터(P_i 및 HYDRO)를 함께 시험하는 경우, 특정의 조합된 특징을 갖는 펩티드가 더욱 흔하게 가용성인 한편, 다른 조합된 특징을 갖는 펩티드는 불용성이다. 이에 따라, 이들 조합된 특징을 합성을 위한 펩티드의 설계 과정 동안 사용하여, 합성 후에, 펩티드가 제형 완충제에서 가용성일 가능성이 증가되게 할 수 있다.

[0676]

표 12는 221가지의 펩티드에 대한 계산된 P_i 및 HYDRO 값과, 어떤 펩티드가 본원에 기재된 수 중 5% 텍스트로스(D5W)/5 mM 석신산염 제형 중에서 가용성인지 불용성인지 여부를 나타낸다.

표 12

펩티드 시열	PI	가용성(S)/ 분용성(I)	HYDRO	펩티드 시열	PI	가용성(S)/ 분용성(I)	HYDRO
TSGSSTALPGSNPSTMDSGSGD	2.925	1	-2.7	LLTDRNTSGTFTLLGVSDYP ELQVPLFLVFLA	3.705	5	-12.4
DGVSEEFWLVDLLPSTHY T	3.585	1	-9.2	DSAVDKGHPNRSALSLTPGL RIGPSGLFLVFLA	10.085	5	-12.4
DVTYDGHFVLGSPYVEA SL	3.695	1	-4.2	ALSLTPGLRIGPSGLFLVFLAE SAVDKGHPNRS	10.085	5	-12.4
EYWKVLDGELEVAPEYPQ STARDWL	3.815	1	-5.7	PIDTSKTDPTVLLFMESQYS QLGQD	3.505	5	-9.3
GLEQLSHINFEKLEWTSS SERYIGTEGGGMDQSILFL AEEGTAK	3.795	1	-3.8	NNSKKKWFLFQDSKKIQVE QPQ	10.385	5	-10.2
TTTSVKKEELVSEEDFQGI ITPGAQ	4.005	1	-8.4	SKRGVGAKTLLLPDPFLFWP CLEGTRRS	10.565	5	-10.2
EEFNRRVRENPDWTQL WMAFVAFQDE	4.005	1	-5.1	SLPKSKRKFVVSATKGVPA GNSD	10.985	5	-7.3
EDSKYQNLPPFFVGHNMI LLVSEE	4.125	1	-14	DNHLRRNRLLVDFLHGQL	10.795	5	-6.6
TTSGDERLYPSPTFYIHEN YLQLE	4.155	1	-6.5	TKRQVILLHTELEFLYPLR F	9.715	5	-7.8
ESKLFQDPDEFSLAHLLEP FRQYYL	4.155	1	-7.5	TKORDLLVAHDLIWKMS RTGDAKPS	9.755	5	-7.6
TISLLIFYNTKEIARTEEH QE	4.275	1	-6.4	HRPRPFSPGKQVSSAPLFML DLYN	10.385	5	-7.4
ETYSRSFYPEHSIKEWLI G	4.705	1	-12	PENDDLMMPRIVDVTSLA TEGG	3.425	5	-6.9
TLDDIKEWLEDEGQVLNI QMRRTLHK	4.705	1	-7.3	RPAGRTQLLWTPAAPTAM AEVPGHTP	10.885	5	-7.4
NHSAKFLKELTLAMDELE ENFRG	4.755	1	-5.2	DPNKYPVPENWLYKEAHQ L	4.625	5	-7.5
KAHVEGDGVVEEIRYHPF LYDRET	4.765	1	-5.8	SHTQTTLFHTFYELLIQKN K	10.045	5	-10.8
EAAFSVGATGIITDYP TAL	4.785	1	-6.6	DGGGRQHSRPRHSGAGPK PSSSEWAVCWAP	10.095	5	-10.3
RHYLDNHG	5.115	1	-4.6	STLPVISDSTTKRRWSALV IG	11.325	5	-5.6
IGALNPKRAAFFAEHYES WE	5.395	1	-6.5	GSYLVALGAHTGEES	4.245	5	-7.9
ERLSIQNFSKLLNDNIFYM S	6.935	1	-7.9	RARQILIASHLPFYELRHNQ V	9.835	5	-5.9
LDVLQRPLSPGNSEFLTAT ANYSK	6.935	1	-6.1	LPVFIGNIAVNHAPVSLRPG LGLPPGAPGTVP	11.045	5	-5.8
SAVSAASIPAMHINQATN GGGS	7.845	1	-4.1	VAGLAASGLHGSALVLPGE QPVSQPHHGKQ	8.055	5	-7.2
ISSLFVSYFLYRVVFHFE	7.695	1	-8.9	DASDFLPDTQLFPHTTELLP LDPLEGSSV	3.315	5	-5.4

[0677]

펩티드 시열	PI	가용성(S)/ 분용성(I)	HYDRO	펩티드 시열	PI	가용성(S)/ 분용성(I)	HYDRO
LVDQWRWGVFSGHTPP SRYNFDWWY	7.695	1	-9.1	DRSVLAKKLKFTLVFRHGD RSPID	10.805	5	-10.2
DHAPEFPAREMLLKQKLL LCQERYFL	7.155	1	-6.6	VEQGHVVRVGPVVTHPAFL V	6.025	5	-6.3
SVLREDLGQLEYKYQYAY FRMGIKHPD	7.595	1	-7.6	SQSSTPAMLFAPAHRILT YLSQ	9.845	5	-6.7
ADRRRQRSTFRVLFHVE GGESEE	7.855	1	-8.3	GTKALQLHSIAGRWPMEP WVVESMSLGV	10.085	5	-6.4
AIYHKYYHYLYSYLPASLK NMVD	9.075	1	-11.5	TIKNSDKNVVLEHFG	7.795	5	-4.8
KQGWTTTEGIWKDVYIHL	9.555	1	-7.4	RLVLGKFGDLTNFSSPHAR	11.325	5	-5.1
AISSSLFVSFLYR	9.585	1	-8.9	YLLPKTAVVLRCPALVRKP LENNANHDETSFLPRKESN IVD	11.405	5	-5.9
SGQPAPEETVFLGLLHGL LLILRLRGG	10.795	1	-9		4.275	5	-6.1
KQYLDHSGNLSMSHNIK IFMFQLRG	10.175	1	-8.1	KKNITNLSRLVVRPDTDAVY	10.175	5	-4.8
SMWKGELYRQNRFASSK ESAKLYGS	10.195	1	-4.7	GQSFFVRNKKVTRAPLSEGP HSLG	11.465	5	-6.5
LRVFIGNIAVNHAPVSLRP GLGLPPGAPPGTV	12.405	1	-5.8	KMQRRNDDKSILMHGLVSL RESSRG	11.305	5	-5.4
DVGVNSLQYYLSPDLHF SLIQKENLD	3.965	1	-6.4	HKSIGQPKLSTHPFLCPKPQ KMNTSLGQHLTL	10.555	5	-5.3
DHVSIIISATIPNALEFAD WIG	3.695	1	-7.2	NTDKGNPKGYLPSHYKRV QMLLSDRFL	10.195	5	-4.9
DPDVGVNSLQYYLSPDL HFSLI	3.595	1	-6.4	WDGPPENDMLLKEICGLIP PRVDLQGAELWKRLEHIGTE MIITK	3.585	5	-4.9
LHFIMPEKFSFWEDFEE	3.995	1	-7.9		7.795	5	-5.3
DPLMTCSEPERLTELFRQ AELE	3.885	1	-6.1	DHAPEFPAREMLLKQKLLS QER	7.725	5	-4.9
TLKEEVNELQYRQKQLELL ITNLMRQVD	4.795	1	-5.8	SSELTAVNFPSFHVTSKLIM VSPTS	7.815	5	-4.9
LKEMNEKVSFIKNSLLSD SQVGHQLD	5.385	1	-4.3	EVVGGYTWPSPGNIYQGYW AQGKR	9.395	5	-6.2
YFDVVERSTEKIVDTSIFN I	4.065	1	-6.1	GSTLSPVPWLPSEEFTLWSS LSPPG	3.125	5	-8.1
VARNYLREAVSHNASLEV AILRD	7.765	1	-5.6	GSGALGAVGATKVPRNQD WL	10.085	5	-5.2
AAAFPSQRTSWEFLQSLV SIKQEKPA	9.885	1	-4.3	GDQYKATDFVADWAGTFK MVFTPKDGSG	4.345	5	-5.7
NNGPVTILQRIHHMAAS HVNITS	11.045	1	-5.5	LSPREEFLRLCKKIMMRSIQ	10.565	5	-4.4
LMSNLAFADFCMRMYL	6.085	1	-5.4	GALGAVGATKVPRNQDWL GVSRLRTKA	12.135	5	-5.2
YRMYQKGQETSTNLIASIF A	9.525	1	-4.8	VQLSIQDVIRRARLSTVPTA QRVALRSGWI	12.575	5	-5.2
PAAGDFIRFFQLRLRLR FF	11.925	1	-5	AVGATKVPRNQDWLGVSR QL	11.325	5	-5.2
LNYLRTAKFLEMVGVDLH PVYG	7.635	1	-4.3	GAVGATKVPRNQDWL	10.085	5	-5.2
FKMDRQGVTVQLSCLSYI SALGMIMT	8.875	1	-4.1	EGPMHQWVSQGRIPYPR PGMCPSKT	9.555	5	-4.9
LTKLKFSLKSNFFDEYF	9.955	1	-5	AHRQGEKQHLLPVFSRLALR LPWRHVSQVL	12.405	5	-4.1

[0678]

펩티드 시열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO	펩티드 시열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO
				KLAWRGRISSSGCPSMTSP SPMFGMTLHT	11.325	5	-5.7
				SLTEESGGAVAFFPGNLSTSS SA	3.125	5	-7.5
				AQRKLYQDVMHENFTNLLS VGHQP	7.885	5	-4.1
				DDSLHIQATYISGPVLAGSG D	3.595	5	-5
				SRNTGHLHPTPRFPLLRWT QEPQPLE	10.795	5	-3.8
				SHNELADSGIPENSFNVS LVE	3.685	5	-3.3
				VPRIAEELMNKKLPSTFG PYLE	9.625	5	-4.1
				KHLPGVNFPGNQWNPVEG ILPS	7.815	5	-3.6
				GRMSPSQFARVPGYVGS PLAAMNPK	11.385	5	-4.1
				LPDEVSGLEQLESIINFE KLTWTSSNVME	3.435	5	-3.8
				DATFSDGSLGQLVKNTS ATYALS	3.885	5	-5.5
				DEQGREAEELARSGPSA AGPVRLLKPLVPLGL	7.205	5	-3.3
				RRGGALFASRPFRFTPL	12.875	5	-5.3
				SAAEALLENLDEESIKPV HSSILGQE	3.885	5	-3.6
				PGGDSGELITDAHELGV AHPPGY	4.055	5	-4
				PETGEIQVKTFDLREQRE SYELKV	4.495	5	-4.7
				VSGLEQLESIINFEKL	3.965	5	-3.6
				GLEQLESIINFEKL	3.965	5	-3.6
				LPDEVSGLEQLESIINFE KL	3.585	5	-3.6
				TTVTHERKQAKVVNPPIQ EVGKGARK	10.965	5	-3.2
				RYNSTAATNEVSEVTVFS KSPVT	7.015	5	-5.9
				KGEKNGMTFSSTKDYVNN VVSWGKKVQPIDSLADWNE	9.555	5	-4.2
				DIEAFEMMEKD	3.825	5	-4.1
				GHQKLPKGIHLFEAFTQ VAKKEPDG	7.895	5	-6.6
				TSRRLTGLLDHEVQAGRQ	10.795	5	-3.6
				SPIKLVQKVASKIPFPDR ITEESV	9.755	5	-3.3
				RGQIKLADFRLARLYSSE SR	10.375	5	-4.1
				PLMQTELHQLVPEADPEE MA	3.585	5	-3.3
				TFPKKIQMLARDFLDEY	6.975	5	-4.3
				LLDILDAGREYSAMRDQY MRT	4.205	5	-3.6

[0679]

펩티드 시열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO	펩티드 시열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO
				NILHQEELIAQKKWEIAKM EQK	5.525	5	-4.1
				VPDINMEKKLRKIRAQTQK HLDLYARDG	10.285	5	-4.6
				HPEFANPDSMEYISDVVDE VIQN	3.375	5	-4.1
				SEIDFPMARSKLLKKLP SKD L	10.385	5	-3.6
				EDSDKLFESKAELADHQKF	4.365	5	-4.3
				MPPPGALMGLAKKK SIPQ PTN	10.845	5	-4.1
				SGARIGAPPHATATSSSF MPGTWGREDL	7.845	5	-3.8
				LGETMGQVTEKLQPTYMEE T	3.795	5	-4
				TWAGHVSTALARPLGAPW AEPGSCGPGTN	7.155	5	-4.3
				WTPAAPTAMAEVGP GHTP AHPSQGAVPP	6.015	5	-3.8
				EQGPWQSEGQTWRAAGG RVVPVCPAAGPG	6.435	5	-3.8
				LARDIPPAVTGKWKLSDLRR YGAVPSG	10.685	5	-3.4
				KGASLDAGWGSRWTTTR MTSASAGRSTRA	12.405	5	-4.6
				LSVPFTCGVNF GDSIEDLEI	2.835	5	-3.9
				VTSPKASPVTFPAAAFPTAS PANKD	9.885	5	-4.4
				DSPAGPRRKECTMALAPNF TANNR	10.095	5	-5.5
				PSTANYNSFSSAPMPQIPVA SVTPT	5.925	5	-2.5
				SAVSAASIPAEHINQATNGG GS	5.125	5	-2.3
				NNQTNSPTTNPFGSSGSFN LPNSGD	3.095	5	-2.5
				GTEPEPAFQDDAVNAPLEF KMAAGSSG	3.505	5	-3
				TNGPEKNSSFPSSVDYAAS GPRKL	9.625	5	-3.3
				PAPPPAVPKEHPAPPAPPPA SAPTP	7.815	5	-2
				MSQDIKKADEQIESMTYTE RKT	4.725	5	-4
				PAHPSQGA VPPSRAAAEPH LKPSPELQTA	7.965	5	-2.3
				SGSPPLRVSVGDFSQEFSPI QEAQQD	3.585	5	-2.5
				RQRRGRGLPGEAGLEGFEP SDALGPD	4.725	5	-2.5
				AESAQRQGPNGGGEQSAN EF	3.965	5	-2.5
				AAVRPEQRPAARGSRV	12.405	5	-2.5

[0680]

펩티드 서열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO	펩티드 서열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO
				FYSNSTVSETQWKVTVTPR	9.715	5	-4.8
				LMGRLQHTFKQKMTGVGA	11.565	5	-3.4
				SLEKR			
				VDKNGRRRLVYLVENPGG	10.385	5	-8.9
				VDKNGRRRLVYLVENPGGY			
				VAYS	9.835	5	-8.9
				FLQVPGSPVSPSA	6.015	5	-6.1
				FVGKLRHPVAVDVLL	10.085	5	-5.1
				YPEPQNKEAFVHSQMYSTD			
				YDQI	4.055	5	-5
				DDNGNILDPKTSTIALFKA			
				HEV	4.115	5	-7
				LVGQLKRVPRTRVYRNQ			
				RPESVS	12.235	5	-3.8
				PASRALEKKGNVYVTDHG			
				SCV	7.155	5	-5.7
				LCPASRALEKKGNVYVDH			
				GS	7.155	5	-5.7
				ALEKKGNVYVTDHGSCV	5.345	5	-5.7
				IAMGFPQKDLKAYTGIL	9.625	5	-4
				AAVDSVTIPPAQCYSLLHL			
				QQRMMQSA	8.895	5	-5.9
				PAAVDSVTIPPAQCYSLLHL	4.935	5	-5.9
				DLSYVSDQNGGVPDQILLHL			
				RPTED	3.765	5	-7.7
				AVRSPGSPILLEVSGSGAIS	6.975	5	-5.4
				LEEVAQRSHAVRSPGSPILLEV			
				VG	5.395	5	-5.4
				LAALCPASRALEKKGNVYV			
				TDHGS	7.155	5	-5.7
				LAALCPASRALEKKGNVYV			
				TDH	7.155	5	-5.7
				ASRALEKKGNVYVTDHGS			
				CVRA	8.845	5	-5.7
				ALCPASRALEKKGNVYV	8.845	5	-5.3
				AALCPASRALEKKGNVYV	8.845	5	-3.8
				SHHTHSYQRYSHPLFLPGHR			
				LDPPH	9.585	5	-6.1
				SHQIHSYQLYTHPLHPWD			
				HRD	6.605	5	-5
				DKGHQFHVHPLHSGDDLDP			
				P	5.565	5	-5
				KLRTIPLSDNTIFRRICTIAKH			
				LE	10.565	5	-5.5
				ASATEPANDSLFSPGAANLF			
				STYLAR	4.075	5	-5
				FPVQSTEDVFPQGLPNEY			
				AFVT	2.945	5	-7.2
				AASAAAFPSQRTSWEFLQSL			
				VSIKQEK	9.885	5	-4.3

[0681]

펩티드 서열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO	펩티드 서열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO
				GSVLQFMPFTTVSELMKVS AMSSPKV	9.885	5	-4.8
				NQVLASRYGIRGFSTIKIFQK GESPV	10.695	5	-4.3
				ARLQSKYEPVIFKSIMRQLI SPQL	11.405	5	-5.8
				DVTGPHLYSIYHGSTDKLPY VTMGS	6.015	5	-6.4
				SHLASLKNVSPVLRSHSFS DPSPKFA	10.585	5	-3.3
				TAQFAPSPGQPPALSPSPYG HRLPLQQG	9.845	5	-3
				pASAKSRREFDKIELAYRR	10.675	5	-4.6
				MAGPKGFQYRALYPFRRER	11.265	5	-4.6
				SDAFSGLTALPQSILLFGP	3.095	5	-7.9
				STQHADLTIIDNIKEMNFLR RYK	9.625	5	-5.8
				LHTHYDYVSALHPVSTPSKE YTSA	6.305	5	-5.5
				SSPLGRANGRRFANPRDSFS AMGFQR	12.575	5	-3
				EIHGKCNMTITSRGTTVTP TKETVSLG	7.165	5	-3.9
				LNTGLFRIKFKEPLENLI	9.885	5	-4.3
				SPQSGGAATLAAQARLQPV HLDVWGEHERG	6.035	5	-4.9
				GSGSQMPAWRTRGAISASS TQKTPTTRL	12.705	5	-3.9
				GLTRISIQRAQPLPPCLPSFR PPTALQGLS	12.105	5	-2.8
				SRLQTRKNKKLALSSTPSNIA PSD	11.565	5	-4.1
				WCTEMKRVFGFPVHYTDVS NMS	7.155	5	-4.8
				GPLQLPVTRKNMPLPGVVK LPPLPGS	11.635	5	-3
				ALLQNVELRRNVLSPTPLA N	10.885	5	-4.8
				VNGISSQPQVPFYPNLQKS QYYSTV	9.395	5	-4.8
				YLSHTLGAASSFMRPTVPPP QF	9.845	5	-4.1
				SLRNNMFEISDRFIGYKTYN ITK	9.935	5	-4.3
				VTLNDMKARQKALVRERER QLA	11.305	5	-3.8
				VKQLERGEASVDFKKNLEY AAT	7.095	5	-3.7
				TKLKSAPHWTNCILHEYKN LSTS	9.965	5	-5.1
				FAKGFRESDLNSWPVAPRP LLSV	10.085	5	-3.6
				HLLQKQTSIQSPSLYGNSSPP	10.175	5	-4.1

펩티드 서열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO	펩티드 서열	PI	가용성(S)/ 불용성(I)	HYDRO
				LNK			
				STEVEPKESPHLARHRHLMK TLVKSLS	10.315	5	-3.7
				DGAWPVLLDKFVEWYKDK QMS	4.455	5	-5.7
				SHKLESIKEITNFKDAKQLL	9.665	5	-3.6
				TGKPEMDFVRLAQLFARAR PMGLF	11.225	5	-4.8

도 15는 이러한 세트의 펩티드에 대한 그들 파라미터를 $x(P_i)$ 및 $y(\text{HYDRO})$ 축 상에 플롯팅한 것이다. 관찰된 바와 같이, 불용성 펩티드는 x - y 공간의 도처에 분포되어 있는 한편, 가용성 펩티드는 더욱 분리된 영역에서 관찰된다. 따라서, 가용성은 순전하와 소수성의 균형에 의해 결정되며, 아미노산 서열에 기반하여 예측 가능할 수 있다.

가용성인 펩티드의 %는 영역 별로 상이하다. 도 15에서, 영역 A는 5 이상의 P_i 및 -6.0 이상의 HYDRO , 및 8 이상의 P_i 및 -8.0 이상의 HYDRO 에 의해 제한되며, 영역 B는 5 이하의 P_i 및 -5 이상의 HYDRO 에 의해 제한되며, 영역 C는 9 이상의 P_i 및 -8.0 이하의 HYDRO 에 의해 제한된다. 바람직한 영역(A, B 및 C)에서, 가용성이었던 시험된 펩티드의 %는 도 13에 특정되어 있으며, 64% 내지 89%의 범위이다. 바람직하지 않은 영역("기타")에서, 펩티드의 오직 약 42.5%만이 가용성이었다.

표 13

	A	B	C	기타
용해성 수	115	25	9	17
불용성 수	15	3	4	23
용해성%	88%	89%	64%	42.5%

[0686]

[0687]

펩티드 영역의 길이 또는 특정 서열에 대한 변경 및 선택된 펩티드에 대한 이들 값의 즉각적인 재-계산을 가능하게 하는 엑셀 스프레드시트(Excel spreadsheet)를 구축할 수 있다. 이러한 방법은 더 높은 예측된 가용성을 갖는 펩티드의 설계 또는 가용성일 것 같지 않은 가능한 펩티드의 거부를 용이하게 할 수 있다. 이러한 방법은 가용성 펩티드를 생성하고자 하는 펩티드 제조업체에 상당하게 이익을 줄 수 있다.

[0688]

이러한 방법은 특정 수성 제형(D5W/5 mM 석신산염)을 사용하여 개발하였지만, 임의의 다른 수성 제형에 대하여 용이하게 조정하여, P_i 및 소수성의 적절한 조합을 확인할 수 있다.

[0689]

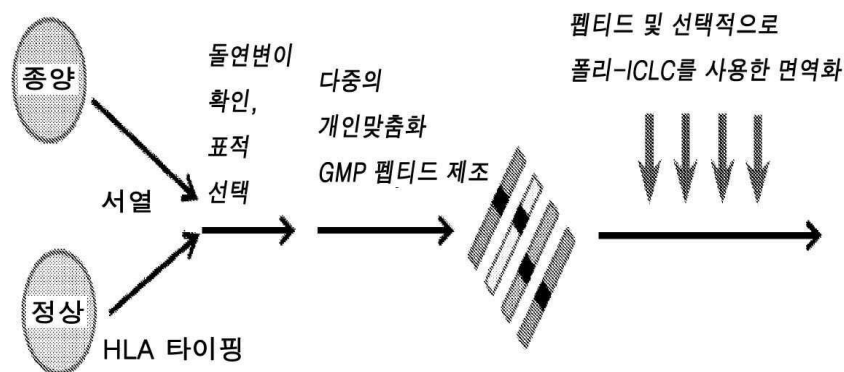
* * *

[0690]

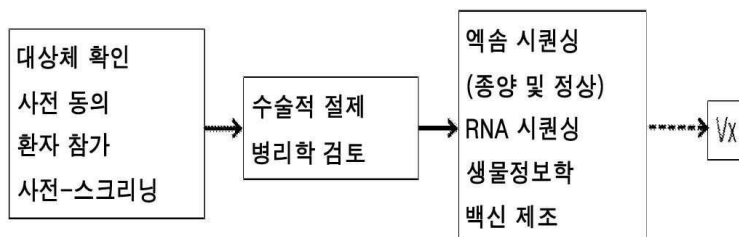
따라서, 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 기재했지만, 상기 단락에 의해 정의되는 발명은 상기 상세한 설명에 제시된 특정 세부사항에 제한되지 않고, 본 발명의 목적 또는 범주에서 벗어나지 않으면서 그것의 많은 명백한 변화가 가능하다고 이해되어야 한다.

도면

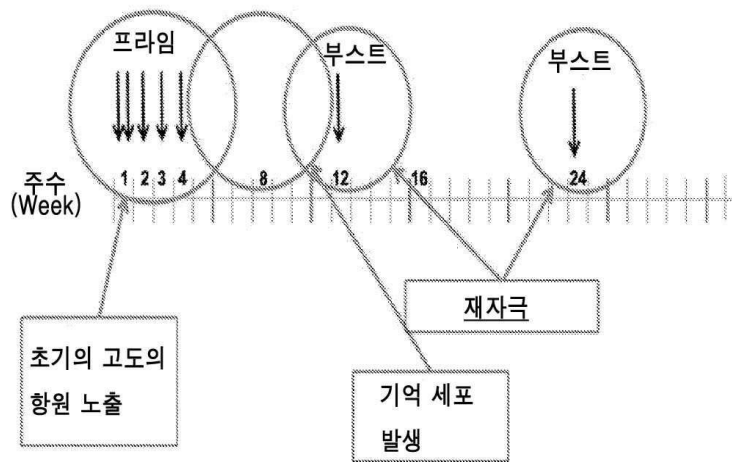
도면1



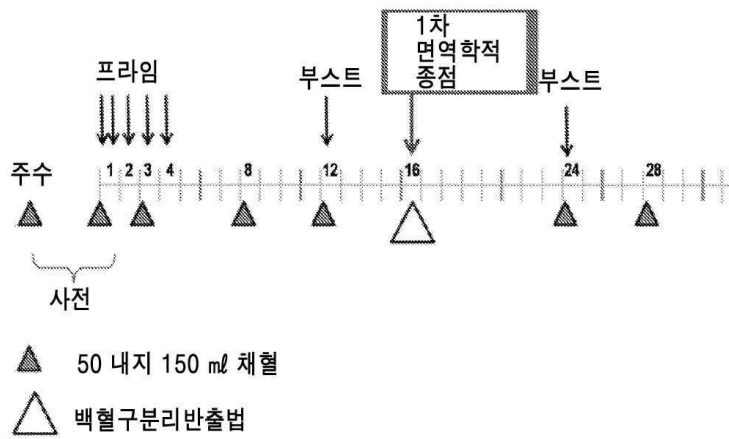
도면2



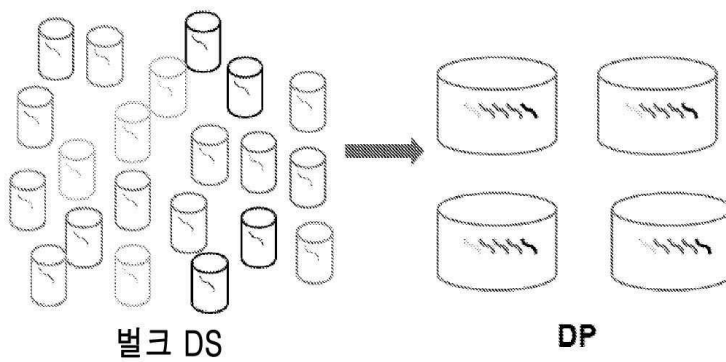
도면3



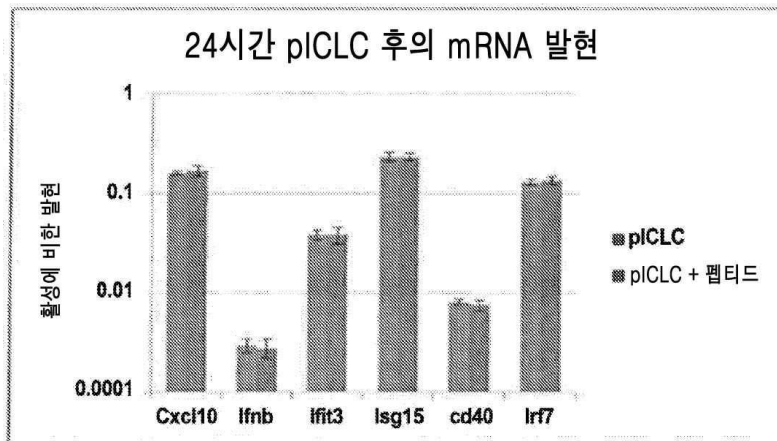
도면4



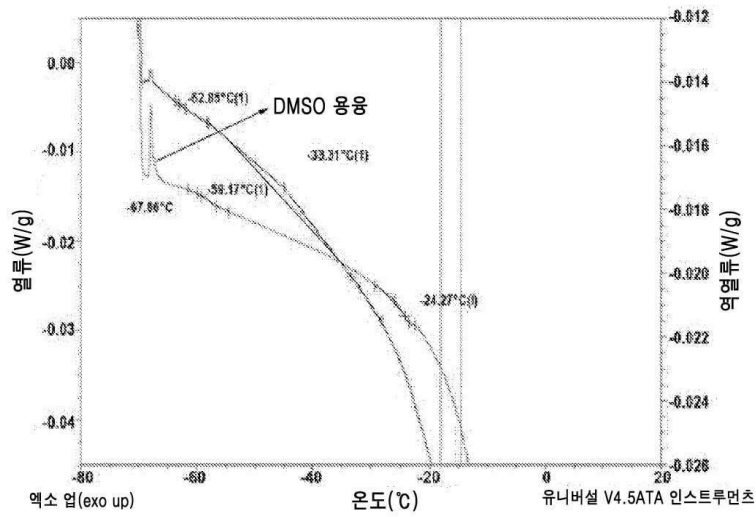
도면5



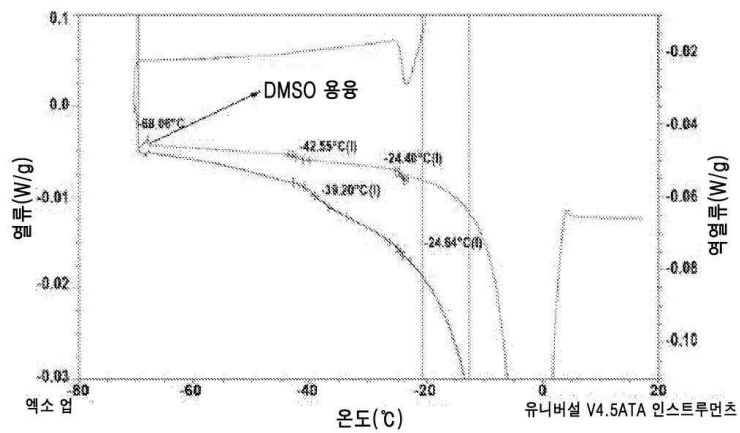
도면6



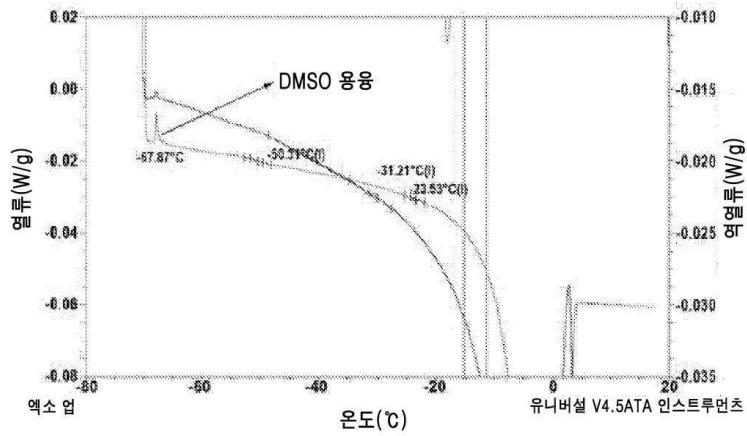
도면7



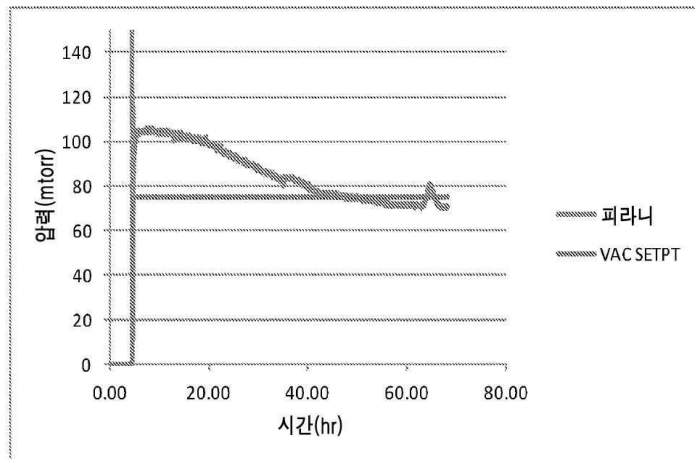
도면8



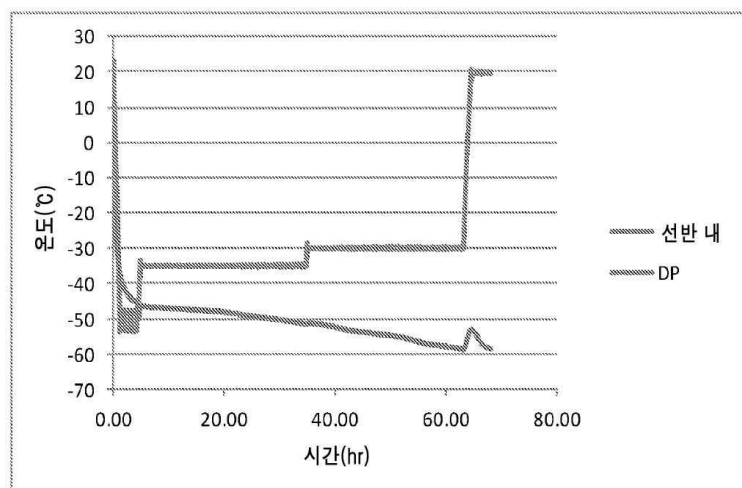
도면9



도면10



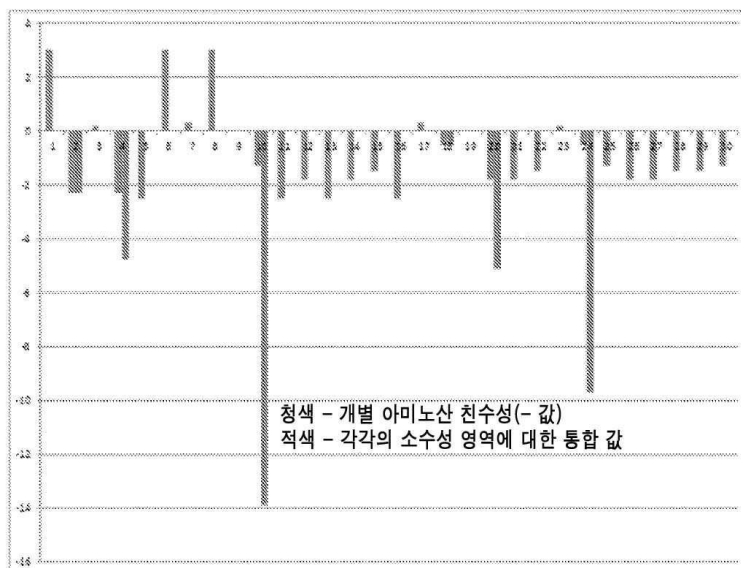
도면11



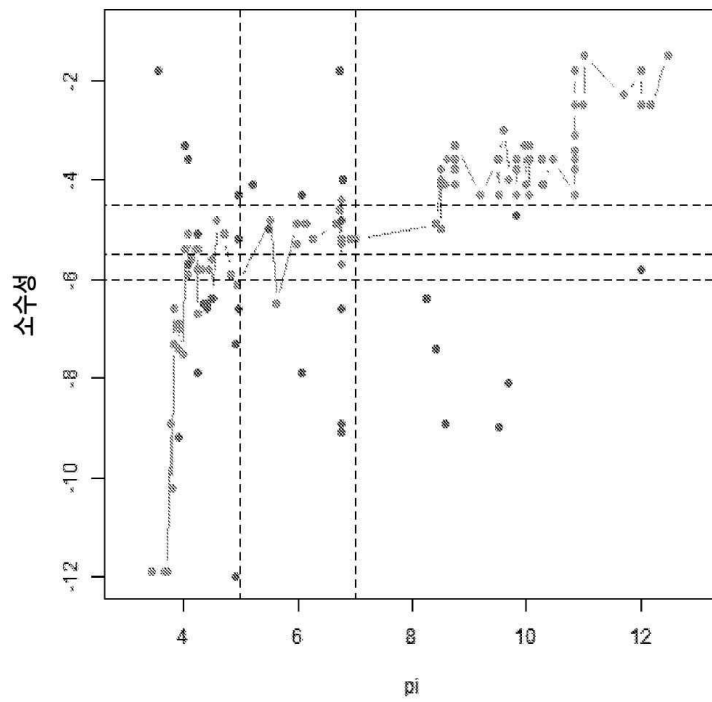
도면12



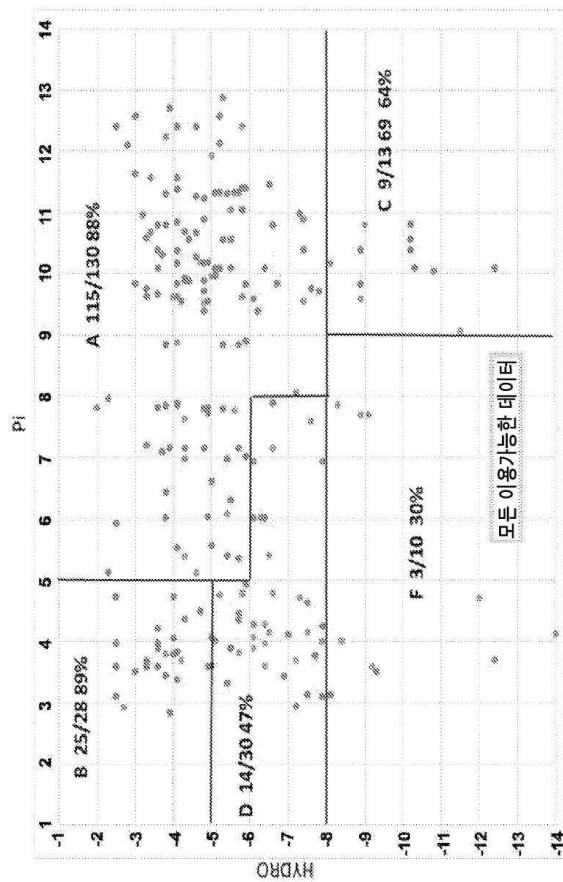
도면13



도면14



도면15



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE BROAD INSTITUTE INC.

<120> FORMULATIONS FOR NEOPLASIA VACCINES AND METHODS OF PREPARING
THEREOF

<130> 47608.99.2011

<140> PCT/US2016/036605

<141> 2016-06-09

<150> 62/172,890

<151> 2015-06-09

<160> 287

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 1

Lys Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Glu Pro Met Phe Leu Phe Ile Val Phe

1 5 10 15

Ser His Gly Ile Leu Val Asn His Met Leu Ile Val Val Met

20 25 30

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 2

Pro Pro Tyr Pro Tyr Ser Ser Pro Ser Leu Val Leu Pro Thr Glu Pro

1 5 10 15

His Thr Pro Lys Ser Leu Gln Gln Pro Gly Leu Pro Ser

20 25

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 3

Asn Pro Glu Lys Tyr Lys Ala Lys Ser Arg Ser Pro Gly Ser Pro Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 4

Gly Thr Tyr Leu Gln Gly Thr Ala Ser Ala Leu Ser Gln Ser Gln Glu

1 5 10 15

Arg Pro Pro Ser Val Asn Arg Val Pro Pro Ser Ser Pro Ser Ser Gln

20 25 30

Glu

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 5

Ala Glu Ser Ala Gln Arg Gln Gly Pro Asn Gly Gly Gly Glu Gln Ser

1 5 10 15

Ala Asn Glu Phe

20

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 6

Glu Pro Asp Gln Glu Ala Val Gln Ser Ser Thr Tyr Lys Asp Cys Asn

1 5 10 15

Thr Leu His Leu Pro Thr Glu Arg Phe Ser Pro Val Arg

20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 7

Leu Lys Asp Ser Asn Ser Trp Pro Pro Ser Asn Lys Arg Gly Phe Asp

1 5 10 15

Thr Glu Asp Ala His Lys Ser Asn Ala Thr Pro Val Pro

20 25

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 8

Gly Ala Ser Arg Arg Ser Ser Ala Ser Gln Gly Ala Gly Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25

<210> 9

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 9

Lys Lys Glu Lys Ala Glu Lys Leu Glu Lys Glu Arg Gln Arg His Ile

1 5 10 15

Ser Lys Pro Leu Leu Gly Gly Pro Phe Ser Leu Thr Thr His Thr Gly

20 25 30

Glu

<210> 10

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 10

Ser Pro Thr Glu Pro Ser Thr Lys Leu Pro Gly Phe Asp Ser Cys Gly
 1 5 10 15
 Asn Thr Glu Ile Ala Glu Arg Lys Ile Lys Arg Ile Tyr Gly Gly Phe
 20 25 30
 Lys

<210> 11

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 11

Glu Cys Gly Lys Ala Phe Thr Arg Gly Ser Gln Leu Thr Gln His Gln
 1 5 10 15
 Gly Ile His Ile Ser Glu Lys Ser Phe Glu Tyr Lys Glu Cys Gly Ile
 20 25 30
 Asp

<210> 12

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 12

Ser His Val Glu Lys Ala His Ile Thr Ala Glu Ser Ala Gln Arg Gln
 1 5 10 15
 Gly Pro Asn Gly Gly Gly Glu Gln Ser Ala Asn Glu Phe
 20 25

<210> 13

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 13

Pro Ile Glu Arg Val Lys Lys Asn Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Asn Val

1 5 10 15

Ser Asp Asp Ser Met Lys Leu Gly Gly Asn Asn Thr Ser Glu Lys Ala

20 25 30

Asp

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 14

His Lys Ser Ile Gly Gln Pro Lys Leu Ser Thr His Pro Phe Leu Cys

1 5 10 15

Pro Lys Pro Gln Lys Met Asn Thr Ser Leu Gly Gln His Leu Thr Leu

20 25 30

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 15

Ala Glu Ser Ala Gln Arg Gln Gly Pro Leu Gly Gly Gly Glu Gln Ser
1 5 10 15

Ala Asn Glu Phe
20

<210> 16

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 16

Lys Pro Lys Lys Val Ala Gly Ala Ala Thr Pro Lys Lys Ser Ile Lys
1 5 10 15

Arg Thr Pro Lys Lys Val Lys Lys Pro Ala Thr Ala Ala Gly Thr Lys
20 25 30

Lys

<210> 17

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 17

Ser Lys Leu Pro Tyr Pro Val Ala Lys Ser Gly Lys Arg Ala Leu Ala

1 5 10 15
Arg Gly Pro Ala Pro Thr Glu Lys Thr Pro His Ser Gly Ala Gln Leu

20 25 30

Gly

<210> 18

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 18

Glu Gln Gly Pro Trp Gln Ser Glu Gly Gln Thr Trp Arg Ala Ala Gly

1 5 10 15

Gly Arg Val Pro Val Pro Cys Pro Ala Ala Gly Pro Gly

20 25

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 19

Ser Gly Ala Arg Ile Gly Ala Pro Pro Pro His Ala Thr Ala Thr Ser

1 5 10 15

Ser Ser Ser Phe Met Pro Gly Thr Trp Gly Arg Glu Asp Leu

20 25 30

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 20

Lys Leu Ala Trp Arg Gly Arg Ile Ser Ser Ser Gly Cys Pro Ser Met

1 5 10 15

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Met Phe Gly Met Thr Leu His Thr
20 25 30

<210> 21

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 21

Asp Ser Ala Val Asp Lys Gly His Pro Asn Arg Ser Ala Leu Ser Leu
1 5 10 15
Thr Pro Gly Leu Arg Ile Gly Pro Ser Gly Ile Pro Gln Ala Gly Leu
20 25 30

Gly

<210> 22

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 22

Leu Leu Thr Asp Arg Asn Thr Ser Gly Thr Thr Phe Thr Leu Leu Gly
1 5 10 15
Val Ser Asp Tyr Pro Glu Leu Gln Val Pro
20 25

<210> 23

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 23

Leu Thr Asp Leu Pro Gly Arg Ile Arg Val Ala Pro Gln Gln Asn Asp

1 5 10 15

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

20 25

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 24

Lys Gly Ala Ser Leu Asp Ala Gly Trp Gly Ser Pro Arg Trp Thr Thr

1 5 10 15

Thr Arg Met Thr Ser Ala Ser Ala Gly Arg Ser Thr Arg Ala

20 25 30

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 25

Phe Arg Leu Ile Trp Arg Ser Val Lys Asn Gly Lys Ser Ser Arg Glu

1 5 10 15

Gln Glu Leu Ser Trp Asn Cys Ser His Gln Val Pro Ser Leu Gly Ala

20 25 30

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 26

Gly Lys Ser Arg Gly Gln Gln Ala Gln Asp Arg Ala Arg His Ala Ala

1 5 10 15

Gly Ala Ala Pro Ala Arg Pro Leu Gly Ala Leu Arg Glu Gln

20 25 30

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 27

Leu Leu Thr Asp Arg Asn Thr Ser Gly Thr Thr Phe Thr Leu Leu Gly

1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Pro Glu Leu Gln Val Pro Ile Pro Gln Ala Gly Leu

20 25 30

Gly

<210> 28

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 28

Arg Gly Leu His Ser Gln Gly Leu Gly Arg Gly Arg Ile Ala Met Ala

1 5 10 15

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

20 25

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 29

Pro Gln Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Gly Glu His Pro

1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Gly Ala Pro Leu Pro Ala Gly Leu Phe

20 25

<210> 30

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 30

Thr Trp Ala Gly His Val Ser Thr Ala Leu Ala Arg Pro Leu Gly Ala

1 5 10 15

Pro Trp Ala Glu Pro Gly Ser Cys Gly Pro Gly Thr Asn

20 25

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 31

Lys Lys Asn Ile Thr Asn Leu Ser Arg Leu Val Val Arg Pro Asp Thr

1 5 10 15

Asp Ala Val Tyr

20

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 32

Trp Asp Gly Pro Pro Glu Asn Asp Met Leu Leu Lys Glu Ile Cys Gly

1 5 10 15

Ser Leu Ile Pro

20

<210> 33

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 33

Leu Ala Ala Ser Gly Leu His Gly Ser Ala Trp Leu Val Pro Gly Glu

1 5 10 15

Gln Pro Val Ser Gly Pro His His Gly Lys Gln Pro Ala Gly Val

20 25 30

<210> 34

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 34

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

1 5 10 15

Val Ala Leu Val Ser Val Phe Gln Ile His Gln Glu Ala Pro Ser Ser

20 25 30

Gln

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 35

Val Ala Gly Leu Ala Ala Ser Gly Leu His Gly Ser Ala Trp Leu Val

1 5 10 15

Pro Gly Glu Gln Pro Val Ser Gly Pro His His Gly Lys Gln

20 25 30

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 36

Ser Lys Arg Gly Val Gly Ala Lys Thr Leu Leu Leu Pro Asp Pro Phe

1 5 10 15

Leu Phe Trp Pro Cys Leu Glu Gly Thr Arg Arg Ser Leu

20 25

<210> 37

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 37

Ser Tyr Lys Lys Leu Pro Leu Leu Ile Phe Pro Ser His Arg Arg Ala

1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Ala Thr Gly Asp Arg Gly Phe Ser Val

20 25

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 38

Gly Leu Leu Ser Asp Gly Ser Gly Leu Gly Gln Ile Thr Trp Ala Ser

1 5 10 15

Ala Glu His Leu Gln Arg Pro Gly Ala Gly Ala Glu Leu Ala

20 25 30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 39

Asp Leu Cys Ile Cys Pro Arg Ser His Arg Gly Ala Phe Gln Leu Leu

1 5 10 15

Pro Ser Ala Leu Leu Val Arg Val Leu Glu Gly Ser Asp Ser

20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 40

Asp Ala Ser Asp Phe Leu Pro Asp Thr Gln Leu Phe Pro His Phe Thr

1 5 10 15

Glu Leu Leu Leu Pro Leu Asp Pro Leu Glu Gly Ser Ser Val

20 25 30

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 41

Asp Met Ala Trp Arg Arg Asn Ser Arg Leu Tyr Trp Leu Ile Lys Met

1 5 10 15

Val Glu Gln Trp Gln Glu Gln His Leu Pro Ser Leu Ser Ser

20 25 30

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 42

Leu Ser Val Pro Phe Thr Cys Gly Val Asn Phe Gly Asp Ser Ile Glu

1 5 10 15

Asp Leu Glu Ile

20

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 43

Pro Leu Met Gln Thr Glu Leu His Gln Leu Val Pro Glu Ala Asp Pro

1 5 10 15

Glu Glu Met Ala

20

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 44

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

1 5 10 15

Pro Leu Leu Ile Phe Pro Ser His Arg Arg Ala Pro Leu Leu Ser Ala

20

25

30

<210> 45

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 45

Ala His Arg Gln Gly Glu Lys Gln His Leu Leu Pro Val Phe Ser Arg

1 5 10 15

Leu Ala Leu Arg Leu Pro Trp Arg His Ser Val Gln Leu

20 25

<210> 46

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 46

Ala Leu Ser Leu Thr Pro Gly Leu Arg Ile Gly Pro Ser Gly Leu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser

<210> 47

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 47

Asp Ser Ala Val Asp Lys Gly His Pro Asn Arg Ser Ala Leu Ser Leu

1	5	10	15
Thr	Pro	Gly	Leu
Arg	Ile	Gly	Pro
Ser	Gly	Leu	Phe
Leu	Val	Phe	Leu
20	25	30	
Ala			

<210> 48

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 48

Leu Arg Val Phe Ile Gly Asn Ile Ala Val Asn His Ala Pro Val Ser

1	5	10	15
Leu	Arg	Pro	Gly
Leu	Gly	Leu	Pro
Pro	Gly	Ala	Pro
Pro	Gly	Thr	Val
20	25	30	
Pro			

<210> 49

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 49

Leu Pro Val Phe Ile Gly Asn Ile Ala Val Asn His Ala Pro Val Ser

1	5	10	15
Leu	Arg	Pro	Gly
Leu	Gly	Leu	Pro
Pro	Gly	Ala	Pro
Pro	Gly	Thr	Val

20 25 30

Pro

<210> 50

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 50

Val Ser Trp Gly Lys Lys Val Gln Pro Ile Asp Ser Ile Leu Ala Asp

1 5 10 15

Trp Asn Glu Asp Ile Glu Ala Phe Glu Met Met Glu Lys Asp

20 25 30

<210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 51

Gly Thr Lys Ala Leu Gln Leu His Ser Ile Ala Gly Arg Trp Pro Arg

1 5 10 15

Met Glu Pro Trp Val Val Glu Ser Met Ser Leu Gly Val Pro

20 25 30

<210> 52

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 52

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

1 5 10 15

His Gly Leu Leu Leu Ile Leu Arg Arg Leu Arg Gly Gly

20 25

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 53

Tyr Leu Leu Pro Lys Thr Ala Val Val Leu Arg Cys Pro Ala Leu Arg

1 5 10 15

Val Arg Lys Pro

20

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 54

Ile Gly Ala Leu Asn Pro Lys Arg Ala Ala Phe Phe Ala Glu His Tyr

1 5 10 15

Glu Ser Trp Glu

20

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 55

Ser Tyr Asp Ser Val Ile Arg Glu Leu Leu Gln Lys Pro Asn Val Arg

1 5 10 15

Val Val Val Leu

20

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 56

Val Glu Gln Gly His Val Arg Val Gly Pro Asp Val Val Thr His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Val

20

<210> 57

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 57

Ala Pro Ala Leu Gly Pro Gly Ala Ala Ser Val Ala Ser Arg Cys Gly

1 5 10 15

Leu Asp Pro Ala Leu Ala Pro Gly Gly Ser His Met Leu Arg Ala

20 25 30

<210> 58

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 58

Leu Leu Thr Asp Arg Asn Thr Ser Gly Thr Thr Phe Thr Leu Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala

<210> 59

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 59

Glu Glu Gly Leu Leu Pro Glu Val Phe Gly Ala Gly Val Pro Leu Ala

1 5 10 15

Leu Cys Pro Ala Val Pro Ser Ala Ala Lys Pro His Arg Pro Arg Val

20 25 30

Leu

<210> 60

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 60

Val Gln Leu Ser Ile Gln Asp Val Ile Arg Arg Ala Arg Leu Ser Thr

1 5 10 15

Val Pro Thr Ala Gln Arg Val Ala Leu Arg Ser Gly Trp Ile

20 25 30

<210> 61

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 61

Leu Pro Val Phe Ile Gly Asn Ile Ala Val Asn His Ala Pro Val Ser

1 5 10 15

Leu Arg Pro Gly Leu Gly Leu Pro Pro Gly Ala Pro Pro Leu Val Val

20 25 30

Pro

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 62

Lys Leu Ala Trp Arg Gly Arg Ile Ser Ser Ser Gly Cys Pro Ser Met

1 5 10 15

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Met Phe Gly Met Thr Leu His Thr

20 25 30

<210> 63

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 63

Val Ala Gly Leu Ala Ala Ser Gly Leu His Gly Ser Ala Trp Leu Val

1 5 10 15

Pro Gly Glu Gln Pro Val Ser Gly Pro His His Gly Lys Gln

20 25 30

<210> 64

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 64

Ser Lys Arg Gly Val Gly Ala Lys Thr Leu Leu Leu Pro Asp Pro Phe

1 5 10 15

Leu Phe Trp Pro Cys Leu Glu Gly Thr Arg Arg Ser Leu

20 25

<210> 65

<211> 29

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 65

Ala His Arg Gln Gly Glu Lys Gln His Leu Leu Pro Val Phe Ser Arg

1 5 10 15

Leu Ala Leu Arg Leu Pro Trp Arg His Ser Val Gln Leu

20 25

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 66

Ala Glu Ser Ala Gln Arg Gln Gly Pro Asn Gly Gly Gly Glu Gln Ser

1 5 10 15

Ala Asn Glu Phe

20

<210> 67

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 67

Thr Ser Gly Ser Ser Thr Ala Leu Pro Gly Ser Asn Pro Ser Thr Met

1 5 10 15

Asp Ser Gly Ser Gly Asp

20

<210> 68

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 68

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

1 5 10 15

His Tyr Thr

<210> 69

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 69

Asp Val Thr Tyr Asp Gly His Pro Val Leu Gly Ser Pro Tyr Thr Val

1 5 10 15

Glu Ala Ser Leu

20

<210> 70

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 70

Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro Glu Tyr

1 5 10 15

Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu

20

25

<210> 71

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 71

Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu

1 5 10 15

Trp Thr Ser Ser

20

<210> 72

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 72

Ser Glu Arg Tyr Ile Gly Thr Glu Gly Gly Gly Met Asp Gln Ser Ile

1 5 10 15

Leu Phe Leu Ala Glu Glu Gly Thr Ala Lys

20

25

<210> 73

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 73

Thr Thr Thr Ser Val Lys Lys Glu Glu Leu Val Leu Ser Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Gln Gly Ile Thr Pro Gly Ala Gln

20

25

<210> 74

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 74

Glu Glu Phe Asn Arg Arg Val Arg Glu Asn Pro Trp Asp Thr Gln Leu

1 5 10 15

Trp Met Ala Phe Val Ala Phe Gln Asp Glu

20 25

<210> 75

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 75

Glu Asp Ser Lys Tyr Gln Asn Leu Leu Pro Phe Phe Val Gly His Asn

1 5 10 15

Met Leu Leu Val Ser Glu Glu

20

<210> 76

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 76

Thr Thr Ser Gly Asp Glu Arg Leu Tyr Pro Ser Pro Thr Phe Tyr Ile

1 5 10 15

His Glu Asn Tyr Leu Gln Leu Phe Glu

20 25

<210> 77

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 77

Glu Ser Lys Leu Phe Gly Asp Pro Asp Glu Phe Ser Leu Ala His Leu

1 5 10 15

Leu Glu Pro Phe Arg Gln Tyr Tyr Leu

20 25

<210> 78

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 78

Thr Ile Ser Leu Leu Leu Ile Phe Tyr Asn Thr Lys Glu Ile Ala Arg

1 5 10 15

Thr Glu Glu His Gln Glu

20

<210> 79

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 79

Glu Thr Tyr Ser Arg Ser Phe Tyr Pro Glu His Ser Ile Lys Glu Trp

1 5 10 15

Leu Ile Gly Met Glu Leu Val Phe Val

20 25

<210> 80

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 80

Thr Leu Asp Asp Ile Lys Glu Trp Leu Glu Asp Glu Gly Gln Val Leu

1 5 10 15

Asn Ile Gln Met Arg Arg Thr Leu His Lys

20 25

<210> 81

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 81

Asn His Ser Ala Lys Phe Leu Lys Glu Leu Thr Leu Ala Met Asp Glu

1 5 10 15

Leu Glu Glu Asn Phe Arg Gly

20

<210> 82

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 82

Lys Ala His Val Glu Gly Asp Gly Val Val Glu Glu Ile Ile Arg Tyr

1 5 10 15

His Pro Phe Leu Tyr Asp Arg Glu Thr

20 25

<210> 83

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 83

Glu Ala Ala Phe Ser Val Gly Ala Thr Gly Ile Ile Thr Asp Tyr Pro

1 5 10 15

Thr Ala Leu Arg His Tyr Leu Asp Asn His Gly

20 25

<210> 84

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 84

Ile Gly Ala Leu Asn Pro Lys Arg Ala Ala Phe Phe Ala Glu His Tyr

1 5 10 15

Glu Ser Trp Glu

20

<210> 85
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 85
 Glu Arg Leu Ser Ile Gln Asn Phe Ser Lys Leu Leu Asn Asp Asn Ile
 1 5 10 15
 Phe Tyr Met Ser

20
 <210> 86
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 86
 Leu Asp Val Leu Gln Arg Pro Leu Ser Pro Gly Asn Ser Glu Phe Leu
 1 5 10 15
 Thr Ala Thr Ala Asn Tyr Ser Lys
 20

<210> 87
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 87
 Ser Ala Val Ser Ala Ala Ser Ile Pro Ala Met His Ile Asn Gln Ala

1 5 10 15

Thr Asn Gly Gly Gly Ser

20

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 88

Ile Ser Ser Leu Phe Val Ser Tyr Phe Leu Tyr Arg Val Val Phe His

1 5 10 15

Phe Glu

<210> 89

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 89

Leu Val Asp Gln Trp Arg Trp Gly Val Phe Ser Gly His Thr Pro Pro

1 5 10 15

Ser Arg Tyr Asn Phe Asp Trp Trp Tyr

20

25

<210> 90

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 90

Asp His Ala Pro Glu Phe Pro Ala Arg Glu Met Leu Leu Lys Tyr Gln

1 5 10 15

Lys Leu Leu Cys Gln Glu Arg Tyr Phe Leu

20 25

<210> 91

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 91

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

1 5 10 15

Ala Tyr Phe Arg Met Gly Ile Lys His Pro Asp

20 25

<210> 92

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 92

Ala Asp Arg Arg Arg Gln Arg Ser Thr Phe Arg Ala Val Leu His Phe

1 5 10 15

Val Glu Gly Gly Glu Ser Glu Glu

20

<210> 93

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 93

Ala Ile Tyr His Lys Tyr Tyr His Tyr Leu Tyr Ser Tyr Tyr Leu Pro

1 5 10 15

Ala Ser Leu Lys Asn Met Val Asp

20

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 94

Lys Gln Gly Trp Thr Thr Glu Gly Ile Trp Lys Asp Val Tyr Ile Ile

1 5 10 15

Lys Leu

<210> 95

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 95

Ala Ile Ile Ser Ser Leu Phe Val Ser Tyr Phe Leu Tyr Arg

1 5 10

<210> 96

<211> 29

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 96
 Ser Gly Gln Pro Ala Pro Glu Glu Thr Val Leu Phe Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 His Gly Leu Leu Leu Ile Leu Arg Arg Leu Arg Gly Gly
 20 25

<210> 97
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"

<400> 97
 Lys Gln Tyr Leu Asp His Ser Gly Asn Leu Met Ser Met His Asn Ile
 1 5 10 15
 Lys Ile Phe Met Phe Gln Leu Leu Arg Gly
 20 25

<210> 98
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 98
 Ser Met Trp Lys Gly Glu Leu Tyr Arg Gln Asn Arg Phe Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Lys Glu Ser Ala Lys Leu Tyr Gly Ser

20 25

<210> 99

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 99

Leu Arg Val Phe Ile Gly Asn Ile Ala Val Asn His Ala Pro Val Ser

1 5 10 15

Leu Arg Pro Gly Leu Gly Leu Pro Pro Gly Ala Pro Pro Gly Thr Val

20 25 30

Pro

<210> 100

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 100

Asp Val Gly Val Asn Ser Leu Gln Gln Tyr Tyr Leu Ser Pro Asp Leu

1 5 10 15

His Phe Ser Leu Ile Gln Lys Glu Asn Leu Asp

20 25

<210> 101

<211>

23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 101

Asp His Val Ser Ile Ile Leu Leu Ser Ala Thr Ile Pro Asn Ala Leu

1 5 10 15

Glu Phe Ala Asp Trp Ile Gly

20

<210> 102

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 102

Asp Pro Asp Val Gly Val Asn Ser Leu Gln Gln Tyr Tyr Leu Ser Pro

1 5 10 15

Asp Leu His Phe Ser Leu Ile

20

<210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 103

Leu His Phe Ile Met Pro Glu Lys Phe Ser Phe Trp Glu Asp Phe Glu

1 5 10 15

Glu

<210> 104

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 104

Asp Pro Leu Met Thr Cys Ser Glu Pro Glu Arg Leu Thr Glu Ile Leu

1 5 10 15

Phe Gln Arg Ala Glu Leu Glu

20

<210> 105

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 105

Thr Leu Lys Glu Glu Val Asn Glu Leu Gln Tyr Arg Gln Lys Gln Leu

1 5 10 15

Glu Leu Leu Ile Thr Asn Leu Met Arg Gln Val Asp

20

25

<210> 106

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 106

Leu Lys Glu Met Asn Glu Lys Val Ser Phe Ile Lys Asn Ser Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Asp Ser Gln Val Gly His Leu Gln Asp

20

25

<210> 107

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 107

Tyr Phe Asp Val Val Glu Arg Ser Thr Glu Lys Ile Val Asp Thr Ser

1 5 10 15

Leu Ile Phe Asn Ile

20

<210> 108

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 108

Val Ala Arg Asn Tyr Leu Arg Glu Ala Val Ser His Asn Ala Ser Leu

1 5 10 15

Glu Val Ala Ile Leu Arg Asp

20

<210> 109

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 109

Ala Ala Ala Phe Pro Ser Gln Arg Thr Ser Trp Glu Phe Leu Gln Ser

1 5 10 15

Leu Val Ser Ile Lys Gln Glu Lys Pro Ala

20 25

<210> 110

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 110

Asn Asn Gly Pro Val Thr Ile Leu Gln Arg Ile His His Met Ala Ala

1 5 10 15

Ser His Val Asn Ile Thr Ser

20

<210> 111

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 111

Leu Met Ser Asn Leu Ala Phe Ala Asp Phe Cys Met Arg Met Tyr Leu

1 5 10 15

<210> 112

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 112

Tyr Arg Met Tyr Gln Lys Gly Gln Glu Thr Ser Thr Asn Leu Ile Ala

1 5 10 15

Ser Ile Phe Ala

20

<210> 113

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 113

Pro Ala Ala Gly Asp Phe Ile Arg Phe Arg Phe Phe Gln Leu Leu Arg

1 5 10 15

Leu Glu Arg Phe Phe

20

<210> 114

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 114

Leu Asn Tyr Leu Arg Thr Ala Lys Phe Leu Glu Met Tyr Gly Val Asp

1 5 10 15

Leu His Pro Val Tyr Gly

20

<210> 115

<211> 25

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 115

Phe Lys Met Asp Arg Gln Gly Val Thr Gln Val Leu Ser Cys Leu Ser

1 5 10 15

Tyr Ile Ser Ala Leu Gly Met Met Thr

20 25

<210> 116

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 116

Leu Thr Lys Leu Lys Phe Ser Leu Lys Lys Ser Phe Asn Phe Phe Asp

1 5 10 15

Glu Tyr Phe

<210> 117

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 117

Leu Leu Thr Asp Arg Asn Thr Ser Gly Thr Thr Phe Thr Leu Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala

<210> 118
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 118
 Asp Ser Ala Val Asp Lys Gly His Pro Asn Arg Ser Ala Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Thr Pro Gly Leu Arg Ile Gly Pro Ser Gly Leu Phe Leu Val Phe Leu
 20 25 30
 Ala

<210> 119
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 119
 Ala Leu Ser Leu Thr Pro Gly Leu Arg Ile Gly Pro Ser Gly Leu Phe
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Leu Ala Glu Ser Ala Val Asp Lys Gly His Pro Asn Arg
 20 25 30
 Ser

<210> 120
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 120

Pro Ile Asp Thr Ser Lys Thr Asp Pro Thr Val Leu Leu Phe Met Glu

1 5 10 15

Ser Gln Tyr Ser Gln Leu Gly Gln Asp

20 25

<210> 121

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 121

Asn Asn Ser Lys Lys Lys Trp Phe Leu Phe Gln Asp Ser Lys Lys Ile

1 5 10 15

Gln Val Glu Gln Pro Gln

20

<210> 122

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 122

Ser Lys Arg Gly Val Gly Ala Lys Thr Leu Leu Leu Pro Asp Pro Phe

1 5 10 15

Leu Phe Trp Pro Cys Leu Glu Gly Thr Arg Arg Ser Leu

20 25

<210> 123

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 123

Ser Leu Pro Lys Ser Phe Lys Arg Lys Ile Phe Val Val Ser Ala Thr

1 5 10 15

Lys Gly Val Pro Ala Gly Asn Ser Asp

20 25

<210

> 124

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 124

Asp Asn His Leu Arg Arg Asn Arg Leu Ile Val Val Asp Leu Phe His

1 5 10 15

Gly Gln Leu

<210> 125

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 125

Thr Lys Arg Gln Val Ile Leu Leu His Thr Glu Leu Glu Arg Phe Leu

1 5 10 15

Glu Tyr Leu Pro Leu Arg Phe

20

<210> 126

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 126

Thr Lys Asp Arg Asp Leu Leu Val Val Ala His Asp Leu Ile Trp Lys

1 5 10 15

Met Ser Pro Arg Thr Gly Asp Ala Lys Pro Ser

20 25

<210> 127

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 127

His Arg Pro Arg Pro Phe Ser Pro Gly Lys Gln Val Ser Ser Ala Pro

1 5 10 15

Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn

20

<210> 128

<211> 23

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 128

Pro Glu Asn Asp Asp Leu Phe Met Met Pro Arg Ile Val Asp Val Thr
1 5 10 15

Ser Leu Ala Thr Glu Gly Gly
20

<210> 129

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 129

Arg Pro Ala Gly Arg Thr Gln Leu Leu Trp Thr Pro Ala Ala Pro Thr
1 5 10 15

Ala Met Ala Glu Val Gly Pro Gly His Thr Pro
20 25

<210> 130

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 130

Asp Pro Asn Lys Tyr Pro Val Pro Glu Asn Trp Leu Tyr Lys Glu Ala
1 5 10 15

His Gln Leu Phe Leu Glu
20

<210> 131

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 131

Ser His Thr Gln Thr Thr Leu Phe His Thr Phe Tyr Glu Leu Leu Ile

1 5 10 15

Gln Lys Asn Lys His Lys

20

<210> 132

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<

223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 132

Asp Gly Gly Arg Gln His Ser Gly Pro Arg Arg His Ser Gly Ala Gly

1 5 10 15

Pro Lys Pro Ser Ser Ser Glu Trp Ala Val Cys Trp Ala Pro

20 25 30

<210> 133

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 133

Ser Thr Leu Pro Val Ile Ser Asp Ser Thr Thr Lys Arg Arg Trp Ser

1 5 10 15

Ala Leu Val Ile Gly Leu

20

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 134

Gly Ser Tyr Leu Val Ala Leu Gly Ala His Thr Gly Glu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 135

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 135

Arg Ala Arg Gln Ile Leu Ile Ala Ser His Leu Pro Phe Tyr Glu Leu
1 5 10 15
Arg His Asn Gln Val Glu Ser
20

<210> 136

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 136

Leu Pro Val Phe Ile Gly Asn Ile Ala Val Asn His Ala Pro Val Ser
1 5 10 15
Leu Arg Pro Gly Leu Gly Leu Pro Pro Gly Ala Pro Pro Gly Thr Val
20 25 30
Pro

<210> 137
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 137

Val Ala Gly Leu Ala Ala Ser Gly Leu His Gly Ser Ala Trp Leu Val
 1 5 10 15
 Pro Gly Glu Gln Pro Val Ser Gly Pro His His Gly Lys Gln
 20 25 30

<210> 138
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 138

Asp Ala Ser Asp Phe Leu Pro Asp Thr Gln Leu Phe Pro His Phe Thr
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Leu Pro Leu Asp Pro Leu Glu Gly Ser Ser Val
 20 25 30

<210> 139
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 139

Asp Arg Ser Val Leu Ala Lys Lys Leu Lys Phe Val Thr Leu Val Phe
1 5 10 15

Arg His Gly Asp Arg Ser Pro Ile Asp
20 25

<210> 140

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 140

Val Glu Gln Gly His Val Arg Val Gly Pro Asp Val Val Thr His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Val
20

<210> 141

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 141

Ser Gln Ser Ser Thr Pro Ala Met Leu Phe Pro Ala Pro Ala Ala His
1 5 10 15

Arg Thr Leu Thr Tyr Leu Ser Gln
20

<210> 142

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 142

Gly Thr Lys Ala Leu Gln Leu His Ser Ile Ala Gly Arg Trp Pro Arg

1 5 10 15

Met Glu Pro Trp Val Val Glu Ser Met Ser Leu Gly Val Pro

20 25 30

<210> 143

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 143

Thr Ile Lys Asn Ser Asp Lys Asn Val Val Leu Glu His Phe Gly

1 5 10 15

<210> 144

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 144

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

1 5 10 15

Pro His Ala Arg

20

<210> 145

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 145

Tyr Leu Leu Pro Lys Thr Ala Val Val Leu Arg Cys Pro Ala Leu Arg

1 5 10 15

Val Arg Lys Pro

20

<210> 146

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 146

Leu Glu Asn Asn Ala Asn His Asp Glu Thr Ser Phe Leu Leu Pro Arg

1 5 10 15

Lys Glu Ser Asn Ile Val Asp

20

<210> 147

<211> 20

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 147

Lys Lys Asn Ile Thr Asn Leu Ser Arg Leu Val Val Arg Pro Asp Thr

1 5 10 15

Asp Ala Val Tyr

20

<210> 148

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide antigen sequence"

<400

> 148

Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys Val Arg Thr Ala Pro Leu

1 5 10 15

Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly

20

<210> 149

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide antigen sequence"

<400> 149

Lys Met Gln Arg Arg Asn Asp Asp Lys Ser Ile Leu Met His Gly Leu

1 5 10 15

Val Ser Leu Arg Glu Ser Ser Arg Gly

20 25

<210> 150

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide antigen sequence"

<400> 150

His Lys Ser Ile Gly Gln Pro Lys Leu Ser Thr His Pro Phe Leu Cys

1 5 10 15

Pro Lys Pro Gln Lys Met Asn Thr Ser Leu Gly Gln His Leu Thr Leu
20 25 30

<210> 151

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 151

Asn Thr Asp Lys Gly Asn Asn Pro Lys Gly Tyr Leu Pro Ser His Tyr

1 5 10 15

Lys Arg Val Gln Met Leu Leu Ser Asp Arg Phe Leu

20 25

<210> 152

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 152

Trp Asp Gly Pro Pro Glu Asn Asp Met Leu Leu Lys Glu Ile Cys Gly

1 5 10 15

Ser Leu Ile Pro

20

<210> 153

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 153

Pro Arg Val Asp Leu Gln Gly Ala Glu Leu Trp Lys Arg Leu His Glu

1 5 10 15

Ile Gly Thr Glu Met Ile Ile Thr Lys

20 25

<210> 154

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 154

Asp His Ala Pro Glu Phe Pro Ala Arg Glu Met Leu Leu Lys Tyr Gln

1 5 10 15

Lys Leu Leu Ser Gln Glu Arg

20

<210> 155

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 155

Ser Ser Glu Leu Thr Ala Val Asn Phe Pro Ser Phe His Val Thr Ser

1 5 10 15

Leu Lys Leu Met Val Ser Pro Thr Ser

20 25

<210> 156

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 156

Glu Val Val Gly Gly Tyr Thr Trp Pro Ser Gly Asn Ile Tyr Gln Gly

1 5 10 15

Tyr Trp Ala Gln Gly Lys Arg

20

<210> 157

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 157

Gly Ser Thr Leu Ser Pro Val Pro Trp Leu Pro Ser Glu Glu Phe Thr

1 5 10 15

Leu Trp Ser Ser Leu Ser Pro Pro Gly

20 25

<210> 158

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 158

Gly Ser Gly Ala Leu Gly Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn

1 5 10 15

Gln Asp Trp Leu

20

<210> 159

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 159

Gly Asp Gln Tyr Lys Ala Thr Asp Phe Val Ala Asp Trp Ala Gly Thr

1 5 10 15

Phe Lys Met Val Phe Thr Pro Lys Asp Gly Ser Gly

20 25

<210> 160

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 160

Leu Ser Pro Arg Glu Glu Phe Leu Arg Leu Cys Lys Lys Ile Met Met

1 5 10 15

Arg Ser Ile Gln

20

<210> 161

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 161

Gly Ala Leu Gly Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp

1 5 10 15

Trp Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala

20 25

<210> 162

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 162

Val Gln Leu Ser Ile Gln Asp Val Ile Arg Arg Ala Arg Leu Ser Thr

1 5 10 15

Val Pro Thr Ala Gln Arg Val Ala Leu Arg Ser Gly Trp Ile

20 25 30

<210> 163

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 163

Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val

1 5 10 15

Ser Arg Gln Leu

20

<210> 164

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 164

Gly Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu

1 5 10 15

<210> 165

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 165

Glu Gly Pro Met His Gln Trp Val Ser Tyr Gln Gly Arg Ile Pro Tyr

1 5 10 15

Pro Arg Pro Gly Met Cys Pro Ser Lys Thr

20 25

<210> 166

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 166

Ala His Arg Gln Gly Glu Lys Gln His Leu Leu Pro Val Phe Ser Arg

1 5 10 15

Leu Ala Leu Arg Leu Pro Trp Arg His Ser Val Gln Leu

20 25

<210> 167

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 167

Lys Leu Ala Trp Arg Gly Arg Ile Ser Ser Ser Gly Cys Pro Ser Met

1 5 10 15

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Met Phe Gly Met Thr Leu His Thr

20 25 30

<210> 168

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 168

Ser Leu Thr Glu Glu Ser Gly Gly Ala Val Ala Phe Phe Pro Gly Asn

1 5 10 15

Leu Ser Thr Ser Ser Ser Ala

20

<210> 169

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 169

Ala Gln Arg Lys Leu Tyr Gln Asp Val Met His Glu Asn Phe Thr Asn

1 5 10 15

Leu Leu Ser Val Gly His Gln Pro

20

<210> 170

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 170

Asp Asp Ser Leu His Ile Gln Ala Thr Tyr Ile Ser Gly Pro Val Leu

1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Asp

20

<210> 171

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 171

Ser Arg Asn Thr Gly His Leu His Pro Thr Pro Arg Phe Pro Leu Leu

1 5 10 15

Arg Trp Thr Gln Glu Pro Gln Pro Leu Glu

20

25

<210> 172

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 172

Ser His Asn Glu Leu Ala Asp Ser Gly Ile Pro Glu Asn Ser Phe Asn

1 5 10 15

Val Ser Ser Leu Val Glu

20

<210> 173

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 173

Val Pro Arg Ile Ala Glu Leu Met Asn Lys Lys Leu Pro Ser Phe Gly

1 5 10 15

Pro Tyr Leu Glu

20

<210> 174

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 174

Lys His Leu Pro Gly Val Asn Phe Pro Gly Asn Gln Trp Asn Pro Val

1 5 10 15

Glu Gly Ile Leu Pro Ser

20

<210> 175

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 175

Gly Arg Met Ser Pro Ser Gln Phe Ala Arg Val Pro Gly Tyr Val Gly

1 5 10 15

Ser Pro Leu Ala Ala Met Asn Pro Lys

 20 25

<210> 176

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

 peptide antigen sequence"

<400> 176

Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn

1 5 10 15

Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Ser Ser Asn Val Met Glu

 20 25 30

<210> 177

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

 peptide antigen sequence"

<400> 177

Asp Ala Thr Phe Ser Asp Gly Ser Leu Gly Gln Leu Val Lys Asn Thr

1 5 10 15

Ser Ala Thr Tyr Ala Leu Ser

 20

<210> 178

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 178

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

1 5 10 15

Ala Gly Pro Val Arg Leu Lys Pro Gly Leu Val Pro Gly Leu

20 25 30

<210> 179

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 179

Arg Arg Gly Gly Ala Leu Phe Ala Ser Arg Pro Arg Phe Thr Pro Leu

1 5 10 15

<210> 180

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 180

Ser Ala Ala Glu Ala Leu Glu Leu Asn Leu Asp Glu Glu Ser Ile Ile

1 5 10 15

Lys Pro Val His Ser Ser Ile Leu Gly Gln Glu

20 25

<210> 181

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 181

Pro Gly Gly Asp Ser Gly Glu Leu Ile Thr Asp Ala His Glu Leu Gly

1 5 10 15

Val Ala His Pro Pro Gly Tyr

20

<210> 182

<211> 24

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 182

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

1 5 10 15

Arg Glu Ser Tyr Glu Leu Lys Val

20

<210> 183

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 183

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

1 5 10 15

<210> 184

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"

<400> 184
 Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5 10

<210> 185

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"

<400> 185
 Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn
 1 5 10 15
 Phe Glu Lys Leu
 20

<210> 186

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"

<400> 186
 Thr Thr Val Thr His Glu Arg Lys Gln Ala Lys Val Val Asn Pro Pro
 1 5 10 15
 Ile Gln Glu Val Gly Lys Gly Ala Arg Lys
 20 25

<210> 187

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 187

Arg Tyr Asn Ser Thr Ala Ala Thr Asn Glu Val Ser Glu Val Thr Val

1 5 10 15

Phe Ser Lys Ser Pro Val Thr

20

<210> 188

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 188

Lys Gly Glu Lys Asn Gly Met Thr Phe Ser Ser Thr Lys Asp Tyr Val

1 5 10 15

Asn Asn Val

<210> 189

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 189

Val Ser Trp Gly Lys Lys Val Gln Pro Ile Asp Ser Ile Leu Ala Asp

1 5 10 15

Trp Asn Glu Asp Ile Glu Ala Phe Glu Met Met Glu Lys Asp

20 25 30

<210> 190

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 190

Gly His Gln Lys Leu Pro Gly Lys Ile His Leu Phe Glu Ala Glu Phe

1 5 10 15

Thr Gln Val Ala Lys Lys Glu Pro Asp Gly

20 25

<210> 191

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 191

Thr Ser Arg Arg Leu Thr Gly Leu Leu Asp His Glu Val Gln Ala Gly

1 5 10 15

Arg Gln

<210> 192

<211>

24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 192

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

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Glu Glu Ser Val

20

<210> 193

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 193

Arg Gly Gln Ile Lys Leu Ala Asp Phe Arg Leu Ala Arg Leu Tyr Ser

1 5 10 15

Ser Glu Glu Ser Arg

20

<210> 194

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 194

Pro Leu Met Gln Thr Glu Leu His Gln Leu Val Pro Glu Ala Asp Pro

1 5 10 15

Glu Glu Met Ala

20

<210> 195

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 195

Thr Phe Pro Lys Lys Ile Gln Met Leu Ala Arg Asp Phe Leu Asp Glu
1 5 10 15
Tyr

<210> 196

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 196

Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met
1 5 10 15
Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr
20

<210> 197

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 197

Asn Ile Leu His Gln Glu Glu Leu Ile Ala Gln Lys Lys Trp Glu Ile
1 5 10 15

Glu Ala Lys Met Glu Gln Lys
20

<210> 198

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 198

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

1 5 10 15

Thr Gln Lys His Leu Asp Leu Tyr Ala Arg Asp Gly

20 25

<210> 199

<211> 23

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 199

His Pro Glu Phe Ala Asn Pro Asp Ser Met Glu Tyr Ile Ser Asp Val

1 5 10 15

Val Asp Glu Val Ile Gln Asn

20

<210> 200

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 200

Ser Glu Ile Asp Phe Pro Met Ala Arg Ser Lys Leu Leu Lys Lys Lys

1 5 10 15

Leu Pro Ser Lys Asp Leu

20

<210> 201

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 201

Glu Asp Ser Asp Lys Leu Phe Glu Ser Lys Ala Glu Leu Ala Asp His

1 5 10 15

Gln Lys Phe

<210> 202

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 202

Met Pro Pro Pro Gly Ala Leu Met Gly Leu Ala Leu Lys Lys Lys Ser

1 5 10 15

Ile Pro Gln Pro Thr Asn

20

<210> 203

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 203

Ser Gly Ala Arg Ile Gly Ala Pro Pro Pro His Ala Thr Ala Thr Ser

1 5 10 15

Ser Ser Ser Phe Met Pro Gly Thr Trp Gly Arg Glu Asp Leu

20 25 30

<210> 204

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 204

Leu Gly Glu Thr Met Gly Gln Val Thr Glu Lys Leu Gln Pro Thr Tyr

1 5 10 15

Met Glu Glu Thr

20

<210> 205

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 205

Thr Trp Ala Gly His Val Ser Thr Ala Leu Ala Arg Pro Leu Gly Ala

1 5 10 15

Pro Trp Ala Glu Pro Gly Ser Cys Gly Pro Gly Thr Asn

20 25

<210> 206

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 206

Trp Thr Pro Ala Ala Pro Thr Ala Met Ala Glu Val Gly Pro Gly His

1 5 10 15

Thr Pro Ala His Pro Ser Gln Gly Ala Val Pro Pro

20 25

<210> 207

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 207

Glu Gln Gly Pro Trp Gln Ser Glu Gly Gln Thr Trp Arg Ala Ala Gly

1 5 10 15

Gly Arg Val Pro Val Pro Cys Pro Ala Ala Gly Pro Gly

20 25

<210> 208

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 208

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Tyr Gly Ala Val Pro Ser Gly

20 25

<210> 209

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 209

Lys Gly Ala Ser Leu Asp Ala Gly Trp Gly Ser Pro Arg Trp Thr Thr

1 5 10 15

Thr Arg Met Thr Ser Ala Ser Ala Gly Arg Ser Thr Arg Ala

20 25 30

<210> 210

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 210

Leu Ser Val Pro Phe Thr Cys Gly Val Asn Phe Gly Asp Ser Ile Glu

1 5 10 15

Asp Leu Glu Ile

20

<210> 211

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 211

Val Thr Ser Pro Lys Ala Ser Pro Val Thr Phe Pro Ala Ala Ala Phe

1 5 10 15

Pro Thr Ala Ser Pro Ala Asn Lys Asp

20 25

<210> 212

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 212

Asp Ser Pro Ala Gly Pro Arg Arg Lys Glu Cys Thr Met Ala Leu Ala

1 5 10 15

Pro Asn Phe Thr Ala Asn Asn Arg

20

<210> 213

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 213

Pro Ser Thr Ala Asn Tyr Asn Ser Phe Ser Ser Ala Pro Met Pro Gln

1 5 10 15

Ile Pro Val Ala Ser Val Thr Pro Thr

20 25

<210> 214

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 214

Ser Ala Val Ser Ala Ala Ser Ile Pro Ala Glu His Ile Asn Gln Ala

1 5 10 15

Thr Asn Gly Gly Gly Ser

20

<210> 215

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 215

Asn Asn Gln Thr Asn Ser Pro Thr Thr Pro Asn Phe Gly Ser Ser Gly

1 5 10 15

Ser Phe Asn Leu Pro Asn Ser Gly Asp

20 25

<210> 216

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 216

Gly Thr Glu Pro Glu Pro Ala Phe Gln Asp Asp Ala Val Asn Ala Pro

1 5 10 15

Leu Glu Phe Lys Met Ala Ala Gly Ser Ser Gly

20 25

<210> 217

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 217

Thr Asn Gly Pro Glu Lys Asn Ser Ser Ser Phe Pro Ser Ser Val Asp

1 5 10 15

Tyr Ala Ala Ser Gly Pro Arg Lys Leu

20 25

<210> 218

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 218

Pro Ala Pro Pro Pro Ala Val Pro Lys Glu His Pro Ala Pro Pro Ala

1 5 10 15

Pro Pro Pro Ala Ser Ala Pro Thr Pro

20 25

<210> 219

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400>

> 219

Met Ser Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Glu Gln Ile Glu Ser Met Thr

1 5 10 15

Tyr Ser Thr Glu Arg Lys Thr

20

<210> 220

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 220

Pro Ala His Pro Ser Gln Gly Ala Val Pro Pro Ser Arg Ala Ala Ala

1 5 10 15

Glu Pro His Leu Lys Pro Ser Pro Ser Glu Leu Gln Thr Ala

20 25 30

<210> 221

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 221

Ser Gly Ser Pro Pro Leu Arg Val Ser Val Gly Asp Phe Ser Gln Glu

1 5 10 15

Phe Ser Pro Ile Gln Glu Ala Gln Gln Asp

20 25

<210> 222

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 222

Arg Gln Arg Arg Gly Arg Leu Gly Leu Pro Gly Glu Ala Gly Leu Glu

1 5 10 15

Gly Phe Glu Pro Ser Asp Ala Leu Gly Pro Asp

20 25

<210> 223

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 223

Ala Glu Ser Ala Gln Arg Gln Gly Pro Asn Gly Gly Gly Glu Gln Ser

1 5 10 15

Ala Asn Glu Phe

20

<210> 224

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 224

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

1 5 10 15

<210> 225

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 225

Phe Tyr Ser Asn Ser Thr Val Ser Glu Thr Gln Trp Lys Val Thr Val
 1 5 10 15
 Thr Pro Arg

<210> 226

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"

<400> 226

Leu Met Gly Arg Leu Gln His Thr Phe Lys Gln Lys Met Thr Gly Val
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Leu Glu Lys Arg
 20

<210> 227

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"

<400> 227

Val Asp Lys Asn Gly Arg Arg Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro
 1 5 10 15

Gly Gly

<210> 228

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 228

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

1 5 10 15

Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser

20

<210> 229

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 229

Phe Leu Leu Gln Val Pro Gly Ser Pro Val Val Ser Pro Ser Ala

1 5 10 15

<210> 230

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 230

Phe Val Gly Lys Leu Gln Arg His Pro Val Ala Val Asp Val Leu Leu

1 5 10 15

<210> 231

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 231

Tyr Pro Glu Pro Gln Asn Lys Glu Ala Phe Val His Ser Gln Met Tyr

1 5 10 15

Ser Thr Asp Tyr Asp Gln Ile

20

<210> 232

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide antigen sequence"

<400> 232

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

1 5 10 15

Leu Phe Lys Ala His Glu Val

20

<210> 233

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide antigen sequence"

<400> 233

Leu Val Gly Gln Leu Lys Arg Val Pro Arg Thr Gly Arg Val Tyr Arg

1 5 10 15

Asn Val Gln Arg Pro Glu Ser Val Ser

20 25

<210> 234

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 234

Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr

1 5 10 15

Asp His Gly Ser Cys Val

20

<210> 235

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 235

Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val

1 5 10 15

Val Thr Asp His Gly Ser

20

<210> 236

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 236

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

1 5 10 15

Cys Val

<210> 237

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 237

Ile Ala Met Gly Phe Pro Gln Lys Asp Leu Lys Ala Tyr Thr Gly Thr

1 5 10 15

Ile Leu

<210> 238

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 238

Ala Ala Val Asp Ser Val Thr Ile Pro Pro Ala Gln Cys Tyr Leu Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Leu Gln Gln Arg Arg Met Gln Ser Ala

20 25

<210> 239

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 239

Pro Ala Ala Val Asp Ser Val Thr Ile Pro Pro Ala Gln Cys Tyr Leu

1 5 10 15

Ser Leu Leu His Leu

20

<210> 240

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 240

Asp Leu Ser Tyr Val Ser Asp Gln Asn Gly Gly Val Pro Asp Gln Ile

1 5 10 15

Leu Leu His Leu Arg Pro Thr Glu Asp

20

25

<210> 241

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 241

Ala Val Arg Ser Pro Gly Ser Pro Leu Ile Leu Glu Val Gly Ser Gly

1 5 10 15

Ser Gly Ala Ile Ser

20

<210> 242

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 242

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

1 5 10 15

Pro Leu Ile Leu Glu Val Gly

20

<210> 243

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 243

Leu Ala Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly

1 5 10 15

Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser

20 25

<210> 244

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 244

Leu Ala Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly

1 5 10 15

Asn Tyr Val Val Thr Asp His

20

<210> 245

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 245

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

1 5 10 15

His Gly Ser Cys Val Arg Ala

20

<210> 246

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 246

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr

1 5 10 15

Val Val

<210> 247

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 247

Ala Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn

1 5 10 15

Tyr Val

<210> 248

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 248

Ser His His Thr His Ser Tyr Gln Arg Tyr Ser His Pro Leu Phe Leu

1 5 10 15

Pro Gly His Arg Leu Asp Pro Pro Ile

20 25

<210> 249

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 249

Ser His Gln Ile His Ser Tyr Gln Leu Tyr Thr His Pro Leu Leu His

1 5 10 15

Pro Trp Asp His Arg Asp

20

<210> 250

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 250

Asp Lys Gly His Gln Phe His Val His Pro Leu Leu His Ser Gly Asp

1 5 10 15

Asp Leu Asp Pro

20

<210> 251

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 251

Lys Leu Arg Thr Ile Pro Leu Ser Asp Asn Thr Ile Phe Arg Arg Ile

1 5 10 15

Cys Thr Ile Ala Lys His Leu Glu

20

<210> 252

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<

223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 252

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

1 5 10 15

Ala Asn Leu Phe Ser Thr Tyr Leu Ala Arg

20

25

<210> 253

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 253

Phe Pro Val Val Gln Ser Thr Glu Asp Val Phe Pro Gln Gly Leu Pro

1 5 10 15

Asn Glu Tyr Ala Phe Val Thr

20

<210> 254

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 254

Ala Ala Ser Ala Ala Ala Phe Pro Ser Gln Arg Thr Ser Trp Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gln Ser Leu Val Ser Ile Lys Gln Glu Lys

20

25

<210> 255

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 255

Gly Ser Val Leu Gln Phe Met Pro Phe Thr Thr Val Ser Glu Leu Met

1 5 10 15

Lys Val Ser Ala Met Ser Ser Pro Lys Val

20

25

<210> 256

<211> 26

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 256
 Asn Gln Val Leu Ala Ser Arg Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ser Thr Ile
 1 5 10 15
 Lys Ile Phe Gln Lys Gly Glu Ser Pro Val
 20 25

<210> 257
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 257
 Ala Arg Leu Gln Ser Lys Glu Tyr Pro Val Ile Phe Lys Ser Ile Met
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Leu Ile Ser Pro Gln Leu
 20 25

<210> 258
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide antigen sequence"
 <400> 258
 Asp Val Thr Gly Pro His Leu Tyr Ser Ile Tyr Leu His Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Asp Lys Leu Pro Tyr Val Thr Met Gly Ser

20 25

<210> 259

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 259

Ser His Leu Ala Ser Leu Lys Asn Asn Val Ser Pro Val Leu Arg Ser

1 5 10 15

His Ser Phe Ser Asp Pro Ser Pro Lys Phe Ala

20 25

<210> 260

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 260

Thr Ala Gln Phe Ala Pro Ser Pro Gly Gln Pro Pro Ala Leu Ser Pro

1 5 10 15

Ser Tyr Pro Gly His Arg Leu Pro Leu Gln Gln Gly

20 25

<210> 261

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 261

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

1 5 10 15

Tyr Arg Arg

<210> 262

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 262

Met Ala Gly Pro Lys Gly Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro Phe Arg

1 5 10 15

Arg Glu Arg

<210> 263

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 263

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

1 5 10 15

Phe Gly Pro

<210> 264

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 264

Ser Thr Gln His Ala Asp Leu Thr Ile Ile Asp Asn Ile Lys Glu Met

1 5 10 15

Asn Phe Leu Arg Arg Tyr Lys

20

<210> 265

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 265

Leu His Thr His Tyr Asp Tyr Val Ser Ala Leu His Pro Val Ser Thr

1 5 10 15

Pro Ser Lys Glu Tyr Thr Ser Ala

20

<210> 266

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 266

Ser Ser Pro Leu Gly Arg Ala Asn Gly Arg Arg Phe Ala Asn Pro Arg

1 5 10 15

Asp Ser Phe Ser Ala Met Gly Phe Gln Arg

20

25

<210> 267

<211> 28

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 267

Glu Ile His Gly Lys Cys Glu Asn Met Thr Ile Thr Ser Arg Gly Thr

1 5 10 15

Thr Val Thr Pro Thr Lys Glu Thr Val Ser Leu Gly

20 25

<210> 268

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 268

Leu Asn Thr Gly Leu Phe Arg Ile Lys Phe Lys Glu Pro Leu Glu Asn

1 5 10 15

Leu Ile

<210> 269

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 269

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

1 5 10 15

Gln Pro Val His Leu Asp Val Trp Gly Glu His Glu Arg Gly

20 25 30

<210> 270

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 270

Gly Ser Gly Ser Gln Met Pro Ala Trp Arg Thr Arg Gly Ala Ile Ser

1 5 10 15

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

20 25

<210> 271

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 271

Gly Leu Thr Arg Ile Ser Ile Gln Arg Ala Gln Pro Leu Pro Pro Cys

1 5 10 15

Leu Pro Ser Phe Arg Pro Pro Thr Ala Leu Gln Gly Leu Ser

20 25 30

<210> 272

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 272

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

1 5 10 15

Pro Ser Asn Ile Ala Pro Ser Asp

20

<210> 273

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 273

Trp Cys Thr Glu Met Lys Arg Val Phe Gly Phe Pro Val His Tyr Thr

1 5 10 15

Asp Val Ser Asn Met Ser

20

<210> 274

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 274

Gly Pro Leu Gln Leu Pro Val Thr Arg Lys Asn Met Pro Leu Pro Gly

1 5 10 15

Val Val Lys Leu Pro Pro Leu Pro Gly Ser

20

25

<210> 275

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 275

Ala Leu Leu Gln Asn Val Glu Leu Arg Arg Asn Val Leu Val Ser Pro

1 5 10 15

Thr Pro Leu Ala Asn

20

<210> 276

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 276

Val Asn Gly Ile Ser Ser Gln Pro Gln Val Pro Phe Tyr Pro Asn Leu

1 5 10 15

Gln Lys Ser Gln Tyr Tyr Ser Thr Val

20

25

<210> 277

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 277

Tyr Leu Ser His Thr Leu Gly Ala Ala Ser Ser Phe Met Arg Pro Thr

1 5 10 15

Val Pro Pro Pro Gln Phe

20

<210> 278

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 278

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

1 5 10 15

Tyr Lys Thr Tyr Asn Ile Thr Lys

20

<210> 279

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 279

Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala Arg Gln Lys Ala Leu Val Arg Glu

1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Leu Ala

20

<210> 280

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 280

Val Lys Gln Leu Glu Arg Gly Glu Ala Ser Val Val Asp Phe Lys Lys

1 5 10 15

Asn Leu Glu Tyr Ala Ala Thr

20

<210> 281

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 281

Thr Lys Leu Lys Ser Lys Ala Pro His Trp Thr Asn Cys Ile Leu His

1 5 10 15

Glu Tyr Lys Asn Leu Ser Thr Ser

20

<210> 282

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 282

Phe Ala Lys Gly Phe Arg Glu Ser Asp Leu Asn Ser Trp Pro Val Ala

1 5 10 15

Pro Arg Pro Leu Leu Ser Val

20

<210> 283

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide antigen sequence"

<400> 283

His Leu Leu Gln Lys Gln Thr Ser Ile Gln Ser Pro Ser Leu Tyr Gly

1 5 10 15

Asn Ser Ser Pro Pro Leu Asn Lys

20

<210> 284

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 284

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

1 5 10 15

His Leu Met Lys Thr Leu Val Lys Ser Leu Ser Thr

20

25

<210> 285

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 285

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

1 5 10 15

Asp Lys Gln Met Ser

20

<210> 286

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 286

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

1 5 10 15

Lys Gln Leu Leu

20

<210> 287

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide antigen sequence"

<400> 287

Thr Gly Lys Pro Glu Met Asp Phe Val Arg Leu Ala Gln Leu Phe Ala

1 5 10 15

Arg Ala Arg Pro Met Gly Leu Phe Asn Glu Trp Tyr Arg Lys

20 25 30