(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C07K 16/26

(11) 공개번호 특2002-0007416
(43) 공개일자 2002년01월26일

(21) 출원번호 10-2001-7014692
(22) 출원일자 2001년11월17일
번역문 제출일자 2001년11월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/13392
(86) 국제출원출원일자 2000년05월15일
(87) 국제공개번호 WO 2000/69915
(87) 국제공개일자 2000년11월23일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 일본, 대한민국,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

(30) 우선권주장 60/134,419 1999년05월17일 미국(US)
60/134,432 1999년05월17일 미국(US)

(71) 출원인 에이브이아이 바이오파마 인코포레이티드
추후보정
미국 오리건주 97258 포틀랜드 사우스웨스트 콜롬비아 원 스위트 1105

(72) 발명자 이버슨패트릭엘.
미국오리건주97330코발리스노스웨스트페어옥스플레이스5902

(74) 대리인 정진상
박종혁
이기석

심사청구 : 없음

(54) hCG백신으로 암을 치료하는 조합 접근법

요약

본 발명은 대상에 사람의 항-hCG 단일클론 항체 및/또는 hCG 면역원성 펩티드 백신을 투여하고 이어서, hCG-CTP16, hCG-CTP21 및 hCG-CTP37 각각에 대한 환자의 면역반응을 모니터하고, hCG 면역원성 펩티드에 대한 검출가능한 면역 반응에 따른 백신접종 섭생법을 조정함으로써 암의 면역요법에 대한 개선된 방법에 관한 것이다. 본 발명은 더욱이 hCG 면역원성 펩티드의 면역요법에 대한 방법 및 키트에 관한 것이다.

색인어
hCG 면역원성 펩티드, 면역요법

명세서

기술분야

본 발명은 사람의 항-hCG 단일클론 항체 및/또는 hCG 면역원성 펩티드 백신을 투여함으로써 사람의 융모막 성선자극호르몬(CG)의 생산과 결합된 암의 생체내 면역요법을 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명은 더욱이 hCG의 37량체 C-말단 단편 (hCG-CTP37) 및 그것의 면역원성 단편에 대한 면역 반응의 평가에 기초하여 환자의 치료 섭생법을 모니터하고 조절하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

참고문헌

Abbas, AK, et al., Eds., Cellular and Molecular Immunology, 3rd edition, WB Saunders Co., 394-405 (1997)

Acevedo, et al., Cancer 69: 1829-1842 (1992)

Acevedo, etal., CancerDetect. Prev. 1 (Suppl.): 447-287 (1987)

Braunstein, GD, In: IMMUNODAIGNOSIS OF CANCER, Herberman, RB and Mercer, DW, Eds, Marcel Dekker, Inc., New York, pages 673-701 (1990)

Dirnhofer, et al., Hum Pathol Apr; 29 (4): 377-82 (1998)

Fiddes, J. C. and Goodman, H. M. Nature, 281: 351-356 (1979)

Fiddes, J. C. and Goodman, H. M., Nature, 286: 684-687 (1980)

Fife, K and Bower, M, Br. J. Cancer 73 : 1317-1322 (1996)

Hudson, D., J. Org. Chem. 53: 617-624, (1988)

Lee, A. C. J., et al., Mol. Immunol., 17: 749 (1980)

Lee, et al., Mol. Immunol. 17: 749-756, (1980)

Triozzi PL and Stevens VC, Oncol Rep 6 (1): 7-17,1999.

Triozzi PL, et al., Clin Cancer Res 3 (12 Pt 1): 2355-62,1997.

배경기술

백신접종은 질병 징후의 감소, 감염 인자의 수평적 전달의 방지 및 질환 사망율을 감소시키기 위한 면역 시스템의 준비 수단이다. 대상의 면역 시스템은 외부 항원에 대해 면역 반응을 일으킬 것이라는 것이 잘 알려진다. 다른곳에서 형성된 항체를 투여하는 것에 의해 동물에 면역성을 부여하는 것이 또한 알려진다(즉, 수동 면역화).

표준 백신은 원하는 면역 반응에 대한 카르보히드레이트, 펩티드, 폴리펩티드, 및 글리코실화 폴리펩티드의 투여를 포함한다(능동 면역화). 백신 투여에 대한 대안은 하나 이상의 펩티드 폴리펩티드에 대한 미리 형성된 항체의 투여를 포함한다(수동 면역화). 다클론 또는 단일클론 항체가 통상의 기법으로 쉽게 생산될 수 있지만, 현재까지는 안전한 항체 조성물의 생산 및 정제는 상대적으로 고비용이고 시간 소모적이다.

연혁적으로, 사람의 치료요법에 수동 면역화 과정을 사용하는 것은 심각한 제한이 있었다. 이러한 제한은 항체 생산의 비용 및 이러한 항체의 지연된 투여에 대한 요구때문에 암과 같은 만성 질환의 치료에서 가장 분명하다. 추가적인 어려움은 면역원이 대상의 면역 시스템에서 일반적으로 인식되지 않는 가용성 단백질 또는 내인성 단백질인 경우에 직면한다.

어떤 암은 이론상으로는 숙주는 암에 대한 면역 반응을 개시하여야 할 지라도 숙주의 면역 시스템에 의한 공격에 상당한 내성이 있다. 이러한 내성은 암 세포에 대한 정상적인 면역 반응을 방해하는 암의 능력에 의해서 그들의 성장 및 증식을 허용하기 때문인 것으로 여겨진다.

일반적으로, 융모막 성선자극호르몬(CG), 예를 들어, 사람의 융모막 성선자극호르몬(hCG)은 사람의 태반 및 배반포 세포에서 분비된다. 그러나, 많은 사람의 암은 발암과정의 어떤 시점에서 hCG 를 생산 및 보유 및/또는 분비한다. hCG 는 다양한 사람 암세포계의 막(Acevedo, et al., 1992), 및 암 환자의 혈청(Braunstein)에서 검출되었다. 사실, hCG β 서브유닛 C-말단 펩티드(CTP)는 다양한 암에서 발현되고, 이 구조체로의 면역화는 예비임상 연구에서 항종양 활성을 증명하였다 Acevedo, et al., 1992; Acevedo, et al., 1987).

예를 들어, hCG 및/또는 그것의 서브유닛은 사람의 폐 암 세포에 의해서 만들어지고, hCG 폴리펩티드 또는 그것의 부분은 종양세포에 대한 자가분비 성장 프로모터로 작용한다는 것을 증명했다(예를 들어, Rivera et al., 1989 참조). 추가적인 참고문헌은 종양-함유 동물에서 항-hCG 항체의 능동 생산은 hCG 백신의 투여에 기인할 수 있다는 것을 개시한다(예를 들어, U.S. 특허번호 5,762,931 및 U.S. 특허번호 4,780,312 참조).

암세포의 증식 능력과 결합된 몇 개의 생물학적 활성은 (1) 종양 아네르기에의 연결(종양에 대한 면역반응의 부족), (2) 종양 혈액 공급의 향상, 및 (3) hCG 가 많은 암 세포에서 성장 자극 인자로 작용한다는 관찰을 포함하는 hCG 에 기인했다.

역학조사는 사람 폐암은 종종 호르몬, 우세하게는 사람 융모막 성선자극호르몬(hCG)의 합성의 결합을 나타낸다. hCG 및 그것의 서브유닛의 증가된 순환 수준은 종종 악성종양에 대한 생화학적 마커로서 사용되고, hCG 의 감소된 수준은 사람 폐 종양에서 성공적인 수술에 대한 마커로서 사용한다. 유리 및/또는 종양 결합 β-hCG 는 방광, 췌장, 경부, 결장직장, 폐, 췌장, 식도, 유방, 위, 전립선, 난소, 자궁, 경부, 및 자궁내막 암 뿐만 아니라 생식 세포 암을 가진 대다수의 환자에서 검출되었다(예를 들어, Dirnhofer, et al., 1998; Triozzi PL 및 Stevens VC, 1999). hCG 및 다른 성선자극호르몬은 또한 Kaposi 의 육종과 결합되었다(KS, Fife, K and Bower, M, 1996).

결장직장암은 최초 진단의 5 년내에 감염된 자의 거의 반을 죽이는 질병이고, 17 명의 미국인 중에서 약 1 명이 평생동안 결장직장암을 발병한다. 외과술 개입은 개선된 전이성 결장직장암을 가지는 대부분의 환자를 위한 선택이 아니다. 플루오로우라실(5-FU) 및 류코보린으로의 초기 화학요법은 단계 III 결장 암을 가진 환자를 위한 표준이 되었다(NIH Consensus Conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 264:1444-1450, 1990;Goldberg RM and Erlichman C.Oncology 12:59-63, 1998). 5-FU-불응의 향상된 결장직장암을 가지는 환자에 대한 요법은 일반적으로 이리노테칸(irinotecan)이다(Van Custem E and Blijham GH. Semin Oncol26:13-20, 1999 및 Cunningham D et al. Lancet 352:1413-1418, 1998). 향상된 결장직장 암의 치료에 대한 복합적 새로운 접근법은 (a) 옥사프라틴, 카펙시타빈, 우라실/테가푸르(UFT)와 같은 새로운 약제(Punt CJ., Cancer 1998; 15:679-689, 1998);(b) 단일클론 항체, 17-1A(Punt CJ., 1998)을 사용하는 수동 면역요법; 및 (c) 하나 이상의 암-결합 항원과의 특이적 능동 면역요법에 대한 몇 가지 접근법(ASI)을 포함한다(Goydos JS et al., J Sur Res 1996;63:298-304 및 Vermorken, JB et al.Lancet 1999; 353:345-350).

숙주에 의한 hCG 에 대한 항체 생산에 기초하여 항-암 전략과 같은 β-hCG/파상풍 톡소이드의 사용을 개시하는, 예컨대, U.S. 특허번호 4,767,842, 4,885,285, 5,817,713 및 5, 698,201와 같은 Stevens 에게 허여된 몇몇의 오하이오 주 특허는 본원에 참고문헌으로 특별히 수록된다.

다양한 연구 노력은 hCG-발현 암의 치료에 대한 개선된 방향에 관한 것이지만, CG-발현 종양을 가진 암환자에서 순환성 CG 및 세포-결합 CG의 수준의 감소 또는 제거에 효과적이고 안전한 방법에 대한 요구는 여전하다.

(발명의 개요)

그러므로, 사람의 융모막 성선자극호르몬(hCG), 또는 그것의 면역원성 에피토프를 발현하는 암의 면역요법을 위한 방법을 제공하는 것이 본 발명의 일반적인 목적이다.

본 발명은 암의 감소, 확산 및/또는 진행의 예방 수단으로서 대상 특히, 사람 암환자에 hCG 면역원성 펩티드 백신 조성물을 투여함으로써 hCG 에 대한 면역 반응을 유발하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한 hCG-CTP37의 21량체 N-말단 단편(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4)단독으로, 또는 hCG-CTP37의 16량체 C-말단 단편(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합하여 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체 조성물에 관한 것이다.

이러한 사람의 단일클론 항체 조성물은 사람 환자에의 주입에 적합한 용액으로 준비될 수 있고, 수동 면역요법, 특히 암의 면역요법에서 유용성이 발견된다.

한 양태에서, 본 발명은 약 25 내지 500 mg 의 투여량으로 적어도 4 내지 6 주의 기간동안 주마다 1 내지 2 회, 사람의 단일클론 항체 조성물을 투여함으로써 암의 면역요법을 위한 방법을 제공한다.

관련 양태에서, 사람의 단일클론 항체 조성물은 적당한 담체 단백질로 유도된 hCG 면역원성 펩티드 백신과 함께 또는 연속적으로 투여된다.

한 양태에서, 펩티드 백신은 단독으로 hCG " 루프" 펩티드(SEQ ID NO:9)와 조 합한 hCG-CTP(SEQ ID NO:2)이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 hCG-CTP16(SEQ ID NO:6), hCG-CTP21(SEQ ID NO:4), 및 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 각각에 특이적인 환자 항-hCG 항체 수준을 측정하는 단계, 및 환자를 관련 항체 수준에 따라서 하기의 4 군 중 하나로 분류하는 단계에 의해서 환자에서 hCG 에 대한 면역반응을 분류하는 방법을 제공한다. (1) 항-CTP16 또는 항-CTP21 항체 또는 총 항-hCG-CTP37 항체의 어떤 것도 검출되지 않는 환자(항체 비반응자); (2) 제1 또는 제2항체의 어떤 것도 검출되지 않는 반면에 총 항-hCG-CTP37 항체가 검출되는 환자(약한 항체 반응자); (3) 제1항체의 검출가능한 수준을 가지지만, 제2항체의 검출가능하지 않은 수준을 가지는 환자(CTP16에 대해서만 항체 반응자); 및 (4) 제1 및 제2항체의 검출가능한 수준을 가지는 환자(CTP16 및 CTP21 항체 반응자).

본 발명은 더욱이 환자 상태의 무시할 수 있는 정도의 향상으로 증명된 바와 같이, 적어도 1mg 펩티드/투여의 hCG-CTP37 백신 투여량에 대하여 반응하지 못하는암환자 군을 치료하는 개선된 방법을 제공한다. 본 분석법은 전형적으로 최초 투여 후 9-15 주사이에서 수행되고, 환자에서 항-hCG-CTP21 항체의 측정된 수준이 검출가능하지 않거나, 항-hCG-CTP21 의 수준보다 실질적으로 낮은 경우에 (i) 최초 투여로 제공된 것보다 더 많은 투여량으로 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여; (ii) 1.0mg 미만의 CTP37 펩티드/환자/투여에 해당하는 투여량으로 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여; (iii) hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신과 조합하여 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여; (iv) 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여에 이어서, 1mg 미만의 hCG-CTP37 펩티드/환자/투여에 해당하는 백신 투여량으로 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여; (v) 적당한 담체 단백질로 유

도된 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)로 구성되는 CTP37 N-말단 펩티드 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여; (vi) 1 내지 2 주마다 적어도 1 회 투여량으로 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람 단일클론 항체의 연속적인, 간격을 둔 투여; (vii) 1 내지 2 주마다 적어도 1 회 투여량으로 hCG-CTP16(SEQ ID NO:6)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 함께 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체의 연속적인, 간격을 둔 투여; 및 (viii) hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합하여 hCG-CTP37 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여로 구성되는 군으로부터 선택된 백신접종 섭생법으로 환자를 더 치료한다.

본 발명의 관련 양태에서, 본 발명은 펩티드 및 검출가능한 리포터와 면역반응하는 사람 항체를 표지하는 시약 수단과 함께 hCG-CTP16 펩티드, hCG-CTP21 펩티드, 및 hCG-CTP37 을 포함하는, hCG에 대한 면역반응을 모니터하는 장치 및 방법을 제공한다.

본 발명의 이러한 목적은 하기의 본 발명의 상세한 설명을 수록된 도면과 함께 결부하여 읽을 때 더욱 분명하게 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 SEQ ID NO:1 으로 표시된 유전자은행 기탁 번호 180437 로 제공되는사람의 융모막 성선자극호르몬(hCG)의 β 서브유닛의 아미노산 서열을 도시한다.

도 2a 는 hCG의 β 서브유닛의 잔기 109-145 의 잔기를 도시한다(C-말단 펩티드, CTP, SEQ ID NO:2).

도 2b 는 첨가된 N-말단 메티오닌을 가지는 hCG 의 C-말단 펩티드를 도시한다(CTP, SEQ ID NO:3).

도 2c 는 hCG 의 β 서브유닛의 아미노산 서열의 잔기 110-130 을 도시한다(C-말단 에피토프, CTP-21, SEQ ID NO:4).

도 2d 는 hCG 의 β 서브유닛의 아미노산 서열의 잔기 111-118 을 도시한다(CTP21내의 에피토프, SEQ ID NO:5).

도 2e 는 hCG 의 β 서브유닛의 아미노산 서열의 잔기 130-145 를 도시한다(N-말단 에피토프, CTP-16, SEQ ID NO:6).

도 2f는 hCG 의 β 서브유닛의 아미노산 서열의 잔기 130-145 를 도시한다(첨가된 N-말단 C 를 가지는 N-말단 에피토프, CTP17, SEQ ID NO:7).

도 2g 는 hCG 의 β 서브유닛의 아미노산 서열의 잔기 133-145 를 도시한다(CTP-16내의 에피토프, SEQ ID NO:8).

도 2h 는 hCG의 β 서브유닛의 아미노산 38-57, 루프 펩티드를 도시한다(SEQ ID NO:9).

도 3 은 hCG 의 C-말단 펩티드로 백신접종 개시 후에 0 내지 24 주동안 단계 II 임상 실험에서 결장직장 암의 혈청에서 검출된 항 β-hCG 항체의 평균 수준을 나타낸다. 환자는 hCG 의 " 고" 또는 " 저" 투여량을 복용하였다. 고투여량 군은(칠해지지 않은 원) 3 또는 4 주에서 CTP37-DT 의 1.0mg 추가 주입 후에, 그로부터 매 3 월마다 CTP37-DT 의 1.0 mg 추가 주입과 함께 2.0mg CTP37-DT 의 초기 주입을 복용했고, 저투여량 군은(검게 칠한 원) 3 또는 4 주에서 CTP37-DT 의 0.5mg 추가 주입 을 받은 후에, 그로부터 매 3 월마다 CTP37-DT 를 추가했다.

도 4 는 상기의 도 3 에 도시된 것과 같은 단계 II 임상 실험의 저 투여량 군(검게 칠한 원) 및 고 투여량 군(칠해지지 않은 원)에서 결장직장 암 환자에 대한 CTP37 로의 초기 백신접종 후에 0 내지 24 주에 걸친 가장 최대의 종양 면적(cm^2)을 도시한다.

도 5 는 도 3 에 도시된 것과 같은 CTP37 로 초기 백신접종 후에 0 내지 24 주동안 단계 II 임상 실험에서 결장직장 암 환자에 대한 혈청 항-CTP37 항체 수준 및 종양 면적(cm^2)간의 관계를 도시한다.

도 6 은 (상기에 도시된 도 3 에 개시된 단계 II 임상 실험의 확장된 프로토콜에서)정상의 비면역화 대상에 비하여 CTP 로 면역화된 2 명의 결장직장 암 환자의 세포-매개 면역 반응을 나타낸다.

도 7 은 (상기의 도3 에 도시된 단계 II 임상 실험의 확장된 프로토콜에서) CTP37로 면역화된 결장직장 암 환자에 대한 생존 환자 대 생존 시간의 비율을 나타내고, 하기의 것을 특징으로 한다: (1) 플라스마에서 항-CTP37 항체를 검출할 수 없는 환자(검게 칠한 다이아몬드); (2) 플라스마에서 검출가능한 저수준의 항-CTP37 항체를 가짐으로써 CTP16 대 CTP21 에 대한 항체의 상대적인 수준이 검출될 수 없는 환자(칠해지지 않은 삼각형);(3) 플라스마에서 항-CTP37 항체 및 항-CTP16 항체를 가지지만, 검출가능한 항-CTP21 항체를 가지지 않는 환자(검게 칠한 사각형); 및 (4) 플라스마에서 검출가능한 항-CTP37, 항-CTP16 및 항-CTP21 항체를 가지는 환자(칠해지지 않은 원).

발명의 상세한 설명

I.정의

용어 "hCG 펩티드", "hCG 면역원성 펩티드" 또는 "hCG 에피토프" 는 완전한 hCG 단백질의 아미노산서열의 전체는 아니지만 부분적으로 같은 아미노산 서열을 가지고 예를 들어, 총 hCG 단백질의 면역학적 활성을 보유하는 단편과 같은 완전한 hCG 단백질의 적어도 하나의 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 hCG 펩티드를 의미한다.

본원에 사용될 때, 용어 "hCG 면역원성 펩티드" 또는 "hCG 면역원성 β 서브유닛 펩티드" 또는 그것의 단편은 대상에 투여되는 경우에 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 유발할 수 있는, 각각 hCG 또는 hCG 의 β 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열을 말한다.

본원에 사용될 때, hCG 면역원성 펩티드에 관한 용어 "항원성 전구체" 또는 "전구체" 는 대상에 의해서 hCG 면역원성 펩티드로 프로세싱될 수 있는 hCG 펩티드를 말한다.

본원에 사용될 때, 용어 "hCG C 말단 펩티드" 또는 "hCG CTP37" 은 천연 서열로 제시된 hCG 의 β 서브유닛의 C-말단 37 아미노산("CTP37량체", 도2a, SEQ ID NO:2), 등가의 생물학적 활성을 가지는 변이체 또는 그것의 유사체를 말한다.

어떤 경우에, hCG CTP 는 N-말단("CTP 38량체" 로 명명, 도2b, SEQ ID NO:3)에서 첨가된 메티오닌을 가진다.

hCG 에 관하여 본원에 사용될 때, 용어 "루프" 펩티드는 hCG β 서브유닛의 아미노산 38 내지 57 을 의미하고(도2h, SEQ ID NO:9), 여기에서 아미노산 38 및 57 은 천연서열의 형태로, 또는 등가의 생물학적 활성을 가지는 변이체 또는 그것의 유사체 형태로 이황화결합에 의해 연결된다.

hCG 에 대한 기준으로 본원에 사용될 때, 용어 "16량체" 또는 "C-말단 에피토프" 는 천연 서열로 제시된 hCG 의 β 서브유닛의 아미노산 130-145, 또는 등가의 생물학적 활성을 가지는 변이체 또는 그것의 유사체를 의미한다.

hCG 에 대한 기준으로 본원에 사용될 때, 용어 "17량체" 는 담체 단백질로의 유도 목적으로 첨가된 C-말단 시스테인을 가지는 hCG 의 β 서브유닛의 아미노산 130-145 를 의미한다(도 2f, SEQ ID NO:7).

hCG 에 대한 기준으로 본원에 사용될 때, 용어 " 21량체" 또는 " N-말단 에피토프" 는 천연서열로 제시된 hCG 의 β 서브유닛의 아미노산 110-130, 또는 등가의 생물학적 활성을 가지는 변이체 또는 그것의 유사체를 의미한다(도 2c, SEQ ID NO:4).

hCG 면역원성 펩티드 또는 에피토프에 대한 기준으로 본원에 사용될 때, 용어 " 비천연" 은 천연에서 발견된 것과 같은 hCG 에피토프의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산이 다른 에피토프의 아미노산 서열을 의미한다.

" 비천연" 아미노산 서열은 하나 이상의 " 보존성" 또는 " 비보존성" 아미노산 치환, 아미노산 삽입 또는 결실을 포함하는 변이체 아미노산 서열을 가지는 hCG 면역원성 에피토프를 포함할 수 있거나, 어떤 경우에 펩티드의 N-또는 C-말단에 추가적인 아미노산을 가질 수 있다. 이러한 " 비천연" hCG 면역원성 펩티드는 그것이 유도된 천연 펩티드의 생물학적 활성(면역원성)을 보유한다.

용어 " 펩티드 담체 단백질 접합체" 는 용어 " 담체 단백질로 유도된 펩티드" 와 상호교환적으로 사용되고, 면역원성을 향상시키기 위해서 담체 단백질에 연결된 hCG 면역원성 펩티드를 말한다.

본원에 사용될 때, 용어 " hCG 면역원성 펩티드 백신" 또는 " hCG 펩티드 백신" 은 본원에서 hCG-CTP16(SEQ ID NO:6) 및 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)로 예증된대로, 적당한 담체 분자로 유도된 hCG 면역원성 펩티드를 말한다.

본원에 사용될 때, 용어 " hCG 백신" 또는 " 백신" 은 적당한 담체 분자, hCG-CTP37(SEQ ID NO:2)로 유도된 hCG 면역원성 펩티드 및/또는 더욱 수동적으로 투여된 항-hCG 사람 단일클론 항체를 말한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 면역반응" 은 hCG 면역원성 에피토프에 대한 항체의 생산과 같은 체액성 면역반응 또는 세포독성 T 세포 반응과 같은 세포성 면역반응을 말한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 면역적격 대상" 은 면역원성 에피토프에 대하여 세포성 및/또는 체액성 면역반응을 모니터할 수 있는 면역원성 에피토프에 대한 노출에 기초한 면역반응 세포를 가지는 대상을 말한다.

본원에 사용될 때, hCG 펩티드에 관한 용어 면역원성 " 에피토프" 또는 " 항원성 결정자" 는 hCG 에 대하여 B-및/또는 T-세포 매개 면역반응을 일으킬 수 있는 hCG 아미노산 서열의 부분을 말한다. 에피토프는 유일한 것;즉 다른 항원과 상호반응성이 없거나 거의 보이지 않는 특이적인 hCG 에피토프에 대하여 발생된 면역반응인 것이 바람직하다.

" 기능적 등가" 는 본원에 개시되고, SEQ ID NO:2, 4, 6 및 9 로 제시된 천연 서열 hCG 면역원성 펩티드에 대한 등가의 생물학적 활성을 가지는 hCG 면역원성 펩티드에 대한 아미노산 서열을 의미한다. 관련 생물학적 활성은 면역학적 활성, 즉 hCG 면역원성 펩티드 백신이 투여된 대상에서 면역반응을 유발하는 능력이다.

본원에서 아미노산 잔기는 그것의 표준 단일 문자 표시로 말한다: A, 알라닌; C,시스테인; D,아스파르트산; E,글루타민산; F,페닐알라닌; G,글리신; H,히스티딘; I,이소루신; K,리신; L,류신; M,메티오닌; N,아스파라긴; P,프롤린; Q,글루타민; R,아르기닌; S,세린; T,트레오닌; V,발린; W,트립토판; Y,티로신.

본원에 사용될 때, 용어 " 능동 면역화" 는 대상의 면역반응 세포에 의해서 면역반응을 유발하는 hCG 펩티드 백신의 사용을 의미한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 투여" 는 hCG 면역원성 펩티드 백신과 접촉하도록 대상의 면역반응 세포를 가져오는 것을 의미한다. 대부분의 경우에, 이러한 " 투여" 는 대상에 hCG 면역원성 펩티드 백신 조성물의 피하 또는 근육내 주입에 의해서 발생한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 수동 면역화" 는 면역화 접근법으로 대상에 항체의 직접 투여를 의미한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 애쥬번트" 는 즉, 비특이적 면역자극제로 작용함으로써 백신이 투여된 대상의 총 면역 반응을 상승시킬 수 있는 물질을 말한다. 애쥬번트는 또한 더욱 빠른 면역반응 유발에 사용될 수 있다.

본원에 사용될 때, 용어 " 연속적인, 간격을 둔 투여" 는 초기 투여 다음에, 초기 투여에 이어서 다양한 시간 간격으로 하나 이상의 " 추가" 투여을 포함하는 hCG 면역원성 펩티드 백신의 치료 섭생법을 말하도록 사용된다. " 추가" 투여는 정규적인 간격으로 허여되거나 허여되지 않을 수 있다.

본원에 사용될 때, 용어 " 사람 환자에 적합한 용액" " 사람 환자에의 주입에 적한한 형태로" 및 " 제약학적으로 허용가능한" 은 상호교환적으로 사용될 수 있고,생리적 역효과를 초래하지 않고 사람 대상에 투여될 수 있는 담체, 희석제 및 시약을 포함하는 조성물을 말한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 치료하는 것" , " 치료" 및 " 요법" 은 치료적 요법, 예방 요법, 및 방지 요법을 말한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 투여" 는 환자에게 투여된 항 hCG 사람의 단일클론 항체 또는 hCG 면역원성 펩티드 백신의 양을 말한다. 양은 대상, 면역원 및 애쥬번트의 존재에 따라 하기에 기술된 바와 같이 다양하다.

본원에 사용될 때, 암치료에 관한 용어 " 잠재적인 치료 효율성" 은 hCG 면역원성 펩티드에 대한 면역 반응, 종양 크기 및 환자 생존 시간을 포함하는 다양한 임상 종결점의 평가에 의해서 결정된 허여된 치료 전략의 잠재적인 효율성을 말한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 백신에 대한 반응 실패" 는 일반적으로 hCG CTP37 또는 그것의 면역원성 에피토프에 대한 검출된 면역 반응이 없는 환자를 의미한다.

본원에 사용될 때, 용어 " 체액" 은 뇨, 타액, 플라스마, 혈액, 척수액, 및 생물학적 기원의 다른 샘플을 포함하는 대상에서 얻어진 다양한 샘플 형태를 말한다.

본원에 사용될 때, hCG 면역원성 펩티드에 대한 면역 반응의 면역분석에 관한 용어 " 분석" 은 정성(양성/음성) 또는 정량적인 평가일 수 있다.

II.암 및 hCG

악성 종양은 대상에 의해 외래인자로서 인지되는 단백질 항원을 발현할 수 있고, 면역감시체계는 어떤 형태의 종양의 성장 및 확산성을 제한할 수 있지만, 면역 시스템은 치명적인 사람 암으로부터 대상을 효과적으로 보호하지 못한다.

이러한 암은 빠른 성장 및 확산성때문에 면역 시스템을 극복할 수 있고/또는 종양 세포는 면역 파괴를 피할 수 있다. 이러한 회피에 대한 제안된 메카니즘은 (1)세포 독성 T 림프구(CTL)에 의한 인지의 필요성으로 유형 I MHC 와 프로세싱된 종양 펩티드 항원의 복합화를 거의 또는 전혀 초래하지 않는 종양 세포 표면상의 유형 I MHC 항원의 하향-조절, (2) 종양 세포에 의한 유형 II MHC 분자의 발현이 거의 또는 전혀 없어서 종양 특이적 CD4+ 보조 T 세포(CTL 활성에 필요한 것으로 추정되는 신호 생산)를 직접적으로 활성화시킬 수 없도록 하는 CTL 의 활성화 부족 (3) CD4+ 보조 T 세포의 활성화에 필요한 2 차 신호를 제공하는 공-자극 세포 마커의 부재, 및 (4) 패스(fas)-리간드와 같은 항-종양 반응을 억제하는 종양 세포에 의해 생산된 인자를 제한없이 포함한다(Abbas, AK, et al., 1997).

발명자들은 어떤 폴리펩티드가 사람 및 다른 포유동물 모두에서 종양세포에 대한 지지 인자이고/또는 이에서 분비된다는 것을 또한 밝혀냈다. 이러한 지지 인자는 호르몬, 구체적으로는 융모막 성선자극 호르몬(CG)에 생화학적, 생물학적 및 면역학적 유사성을 가진다. 어떤 암종은 그들의 표면적으로는 대상에 내인성 물질로 형성된 것으로 나타나고, 따라서 상대적으로 비면역원성인 표면을 대상의 면역시스템에 제공함으로써, CG 또는 면역학적으로 유사한 물질을 유출한다.

유리 β-hCG(100 μg/ml 이상)가 방광(47%), 췌장(32%) 및 경부 암 환자(30%)뿐만 아니라 생식세포 종양을 가지는 대다수의 환자에서 검출되었다. 종양-결합 β-hCG 는 결장직장(52%), 폐(34%), 췌장(31%), 식도(28%), 및 유방(24%), 방광(21%) 암(Braunstein, 1990)에서 검출되었다. 게다가, 면역조직화학 검출은 위, 전립선, 난소, 자궁, 경부, 및 자궁내막 암의 약 8 내지 19 % 로 보고되었다(Braunstein, 1990).

악성 암의 효과적인 치료는 종양 세포의 더이상의 확산을 예방하고, 치사율 을 감소 즉, 질병을 가지는 환자의 경우 생존 시간을 증가시켜야만 한다. 통상의 치료 방법은 면역시스템의 비특이적 자극, 수동 면역요법, 및 죽은 종양 세포 또는 종양 세포 항원, 그것의 폴리펩티드 또는 단편 단독으로 또는 화학요법 및/또는 방사선 요법과 조합하여

능동 면역화 연구는 β-hCG/파상풍 톡소이드 변형 폴리펩티드가 CG-유사 물질과 결합된 독성 래트 유방 아데노암종 R 3230 AC 의 종양 세포의 주입에 대한 래트 보호를 부여한다는 것을 나타낸다. 수동 면역화는 또한 마우스에서 루이스(Lewis) 폐 암종 종양, 바이러스-유발 백혈병 및 육종 종양에 대한 보호를 초래했다(예를 들어, U.S. 특허번호 5,698,201 참조).

hCG 의 C-말단 펩티드 단독으로 또는 애쥬번트로서 CRL 1005(Optivax;Vaxcel Inc., Norcross, GA)와 함께 근육내로 주입된 hCG "루프" 펩티드와 조합한 hCG 의 C-말단 펩티드는 전이성 암을 가지는 환자에서 초기 단계 임상 실험에서 평가되었다.

측정가능한 항-hCG 항체 생산은 연구를 초래했으나, 항-암 활성의 평가는 연구에 포함되지 않았다[예를 들어, Triozzi PL 및 Stevens VC, Oncol Rep 6(1):7-17,1999;Triozzi PL et al., Clin Cancer Res 3(12Pt1):2355-62,1997].

III.수동 면역요법용 사람의 단일클론 항체

A. 사람의 단일클론 항체의 생산

생체내 요법에 대한 항체의 가치 및 가능성이 당업계에서 오랫동안 인식되어왔다. 접근법은 항-항체 면역 반응을 피하기 위해서 환자에게 외래성으로 쉽게 "인식" 되지 않는 사람 또는 "사람화" 단일클론 항체를 발전시켰다. 어떤 경우에, 사람의 B 세포-하이브리도마-생산 단일클론 항체의 사용은 다양한 질환 상태의 치료 가능성을 가진다. 그러나, 많은 천연 사람의 종양제는 사람에서 면역원성이 아니므로 사람 항원에 대한 항체를 생산하는 사람의 B 세포를 분리하는 것이 어려울 수 있다.

키메라 또는 "사람화" 항체는 유전적으로 조작되고 마우스 및 사람의 항체 유전자 단편 부분으로부터 조립된다. 이러한 키메라 및 사람화 항체는 여전히 다양한 양의 마우스 항체 단백질 서열을 보유할 것이고, 따라서 환자에게 투여되는 경우에 사람 항-마우스 면역 반응을 유발 할 수 있다.

재조합 DNA 접근법은 사람의 C[H] 영역 및 사람외(예를 들어, 뮤린) 항원 결합(변동) 영역을 가지는 키메라 항체의 생산에 대해 집중했다. 이러한 키메라 항체는 일반적으로 원하는 항체 가변 영역 및/또는 항상 영역을 클로닝하고, 원하는 가변 및 항상 영역을 가지는 기능적 키메라 항체의 모든 또는 부분을 코딩하는 단일 구조체에 클론된 서열을 결합시키고, 항체를 발현할 수 있는 세포에 구조체를 도입하고, 안정하게 키메라 항체를 발현하는 세포를 선택함으로써 생산된다.

사람외(예를 들어, 뮤린) 항체의 사람화 형태는 키메라 면역글로블린, 면역글로블린 사슬 또는 그것의 단편(Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ 또는 다른 항원-결합 서열 영역)이다. 사람화 항체는 사람 항체의 상보성 결정 영역(CDR)의 잔기가 마우스, 래트 또는 래빗과 같은 사람외 종의 CDR 잔기로 대체된 사람의 항체를 포함한다. 대부분의 경우에, 사람화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 사람외 기원인 가변성 영역 도메인을 포함한다. 어떤 경우에, 사람의 면역글로블린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 사람외 잔기로 대체된다. 사람외 항체를 사람화하는 방법은 당업계에 주지된다(예를 들어, Jones, et al., 1986;Riechmann, et al., 1988; Verhoeyen, et al., 1988). 본 발명의 방법의 실용성을 발견하기 위해서, 사람화 항체는 펩티드 항원 및 다른 유리한 생물학적 성질을 보유해야만 한다.

사람화 항체는 파지 전개 라이브러리를 사용하여 생산 할 수 있다(Hoogenboom and Winter,1991; Marks, et al., 1991).

사상균 파지 전개 벡터 또는 " 파지미드" 는 반복적으로 다양하고 신규한 면역학적 특성을 가지는 단일클론 항체의 거대한 라이브러리의 유용한 준비를 허용할 것으로 보였다. 사상균 파지 코팅 단백질 막 정착 도메인은 파지 복제의 조립 단계동안 유전자-생산 및 유전자의 연결에 기여하고, 조합 라이브러리로부터 항체의 클로닝 및 발현에 사용되었다(예를 들어, Kang, et al., 1991 참조). 이 기법은 사람화 항체에서 발견된 것과 같은 설치류 기원의 프레임워크 또는 CDR 잔기를 가지지 않는다.

사람의 단일클론 항체를 생산하는 방법은 일반적으로 (1) 플레임내의 항체 V 도메인 유전자를 사상균 박테리오파지의 메이저 또는 마이너 코팅 단백질 유전자 중 하나에 클로닝하는 단계, (2) 조립된 헤테로다이머 항체 분자를 발현시킴으로써기능적 항체 단편이 파지 입자의 표면상에 전개되는 단계, (3) 면역친화성 기법을 사용하여 표면 발현 파지 입자를 분리함으로써 이러한 성질을 발현하는 항체를 코딩하는 유전자를 선택하는 단계를 포함한다(예를 들어, Hoogenboom, HR, et al., 1998;U.S. 특허번호 5,804,440 참조).

비면역화 사람 공여체의 V 유전자의 레퍼토리가 제조될 수 있고, 다양한 배열에 대한 항체(자가-항원을 포함)가 파지 전개를 사용하여 분리될 수 있다.

파지 전개에 의해 얻은 사람 항체의 친화성은 더욱 친화성 항체를 선택하기 위해서 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자를 연속적으로 비면역 공여체로부터 얻은 V 도메인 유전자의 자연 발생 변이체의 레퍼토리로 치환함으로써 향상될 수 있다. 파지 전개에 의해서 얻은 사람 항체의 다양성은 중쇄 및 경쇄 유전자의 셔플링(Kang, et al., 1991), 클론된 중쇄 유전자의 CDR3 영역을 변형(Barbas, et al., 1992), 및 폴리머라제 사슬 반응에 의해 라이브러리로 무작위 돌연변이의 도입(Gram, et al., 1992)에 의해서 얻을 수 있다.

택일적으로, 현재 면역화에 기초하여 내인성 면역글로블린 생산의 부존재에서 사람 항체의 전체 레파토리를 생산할 수 있는 트랜스젠(transgenic) 동물(예를 들어, xenmmice) 을 생산하는 것이 가능하다. 이 접근법에서, 사람의 중쇄 및 경쇄 Ig 유전자 모두의 거대한 단편은 광범위한 레파토리의 항원-특이적, 완전한 사람 항체를 생산할 수 있는 마우스 균주를 생산하도록 마우스 생식계에 삽입되었다.

제노마우스는 사람의 중쇄(h mu) 및 사람의 K 경쇄(h K), 또는 h mu 및 마우스 람다(m 람다) 경쇄를 발현하는 B 세포를 생산한다. 이러한 마우스는 현저하게 다양한 성인유사 레파토리를 가진 완전한 사람 항체 수준을 생산하고, 항원과의 면역화에 기초하여 항원-특이적 완전한 사람의 단일클론 항체를 생산한다(예를 들어, Jakobovits, et al., 1995; Jakobovits, 1995).

이러한 제노게놈 마우스-유도 사람 단일클론 항체는 사람에서 IgG1 과 같은 보체 고정을 위한 올바른 Ig 중쇄를 가질 수 없다. 이러한 경우에, 제노게놈 마우스 하이브리도마로부터의 mRNA 를 코딩하는 항체는 IgG1 중쇄에 삽입된 cDNA 를 얻기 위해서 사용될 수 있다. 그 다음, 이 카세트는 당업자가 통상 사용하는 과정을 사용하여 발현벡터에 삽입될 수 있고, 연이어서 트랜스젠 고우트의 생산에 사용될 수 있다. 유도가능한 프로모터가 그 안에 코딩된 단백질의 발현을 유발하여 고우트의 밀크로 분비될 수 있도록 트랜스젠 고우트가 개발되었다. 이 과정은 사람의 단일클론 항체의 많은 양을 상대적으로 저 비용으로 생산하도록 한다.

바람직한 접근법에서, 본 발명의 항-hCG 면역원성 펩티드 항체는 상기에 개시된 대로 제노젠성 마우스 기법에 이어서, IgG 중쇄 대체로 생산되고, 트랜스젠 고우트에서 클론되고 발현된 사람의 항체를 포함한다.

B.사람의 단일클론 항체를 포함하는 치료요법 조성물

그러므로 본 발명은 암의 면역요법을 수행에 유용한 치료요법 조성물이 기대된다.

hCG CTP37 에피토프와 특이적으로 면역반응하는 하나 이상의 서로 다른 사람의 단일클론 항체를 포함하는 치료적 조성물 및 본 발명의 면역요법에서 그것의 사용이 본원에 개시된다. 바람직한 사람의 단일클론 항체는 항-hCG-CTP16 (SEQ ID NO:6) 및 항 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)을 포함한다.

사람 단일클론 항체의 치료적 유효량은 바람직한 효과 즉, 혈청내 또는 환자의 종양 세포에 존재하는 hCG 를 중성화시킴으로써 환자의 혈청 또는 종양세포에서 검출가능한 hCG 또는 해리 hCG 의 양을 감소시킬 것으로 기대되는 양이다. 이러한 감소는 환자의 증가된 생존 시간과 상관관계가 있다.

본 발명의 치료적 조성물은 종래의 방법에 따라서 조제된 그안에 활성 성분으로 그 안에 용해 또는 분산된 hCG CTP37 의 에피토프와 특이적으로 면역반응하는 적어도 한 종의 사람 단일클론 항체와 함께 생리적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함한다.

주사 또는 주입의 치료적 조성물은 오일 또는 수성 운반체에서 항체의 현탁액, 용액 또는 에멀젼과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁제, 안정제 및/또는 분산제와 같은 성분을 포함할 수 있다. 택일적으로, 조성물은 적당한 무균 액체와의 사용 전에 재구성을 위한 건조 형태일 수 있다.

본 발명의 사람 단일클론 항체는 주입 또는 시간의 경과에 따른 점진적 주입에 의해 비경구적으로 투여될 수 있다. 대부분의 경우에, 본 발명의 사람 단일클론 항체를 포함하는 치료적 조성물은 정맥내로 투여되나, 다른 송달 수단이 기대된다. 예를 들어, 본 발명의 사람 단일클론 항체는 정맥내, 복강내, 근육내, 피하내, 종양내로 주입될 수 있거나; 또는 피내로 또는 연동적인 수단으로 투여될 수 있다.

항체 투여의 적당한 섭생법은 다양화될 수 있으나, 초기 투여 다음에 연속적인 투여에 의해서 한 번 이상의 간격으로 반복되어 투여되는 것에 의해 특징화된다. 본 발명의 치료 방법에서, 항-hCG 항체는 hCG 면역원성 펩티드 백신과 함께 또는 연속적으로 투여될 수 있다.

본 발명의 방법에 사용된 항체의 치료적 유효량은 환자에서 검출가능한 hCG 의 양을 감소시키기에 충분한 제약학적으로 허용가능한 조성물에서의 전형적인 항체 양이다.

투여량은 매 투여마다 매 환자에서 약 25 mg 내지 약 50 mg 으로 다양화될 수 있고, 여기에서 평균 환자는 70 kg 이다. 일반적으로, 항-hCG 항체는 4 내지 6 주의 기간동안 주마다 1 내지 2 회 투여된다. 그러나, 어떤 경우에, 이러한 항체 투여는 영구적으로 계속될 수 있다. 하기에 더 개시된 바와 같이 항체 치료 기간은 hCG-CTP16, hCG-CTP21 및 hCG-CTP37 에 대한 환자의 면역반응에 기초하여 hCG 면역원성 펩티드 백신과 조합하여 평가된다.

본 발명의 면역요법이 hCG 면역원성 펩티드 백신과 함께 hCG 와 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체의 투여를 포함하는 경우에, 사람의 단일클론 항체의 투여량은 초기 hCG 백신 투여량 후 약 9 내지 15 주에 시작하여 수행된 hCG 면역원성 펩티드에 대한 면역분석법의 결과에 기초하여 조절될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

더욱 구체적으로는, hCG-CTP37의 16량체 C-말단 단편(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6), hCG-CTP37의 21량체 N-말단 단편(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4) 및 전체 hCG-CTP37 펩티드(SEQ ID NO:2)에 대한 환자 항체의 수준은 다양한 시간에서 모니터된다. 수동 hCG-CTP37 사람의 단일클론 항체의 투여량 섭생법은 필요한 경우에 환자의 체액에서 hCG-CTP16(SEQ ID NO:6) 및 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4) 모두에 대해 검출된 항체를 초래하도록 hCG 펩티드 백신 투여량 섭생법과 조합하여 조절된다.

바람직하게는, hCG 백신의 투여는 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2), hCG-CTP16(SEQ ID NO:6) 및 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)에 대해 검출된 항체의 수준을 초래한다. 더욱 바람직하게는, hCG 펩티드 백신 투여는 hCG-CTP16(SEQ ID NO:6) 및 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4) 모두에 대해 검출된 항체의 수준을 초래하고, 양 펩티드에 대한 면역반응은 비슷한 범위이다.

IV.백신으로서의 hCG 면역원성 펩티드

A.hCG 면역원성 에피토프

" hCG 면역원성 에피토프" 또는 " hCG 항원성 에피토프" 는 hCG 에 대한 면역 반응을 유발하는 어떤 아미노산 서열 또는 아미노산 서열의 조합이다.

바람직한 구체예에서, hCG 백신은 단독으로 또는 하나 이상의 추가적인 면역원성 hCG 펩티드와 조합하여 및/또는 하나 이상의 항-hCG 항체의 수동적 투여와 함께 대상에 투여되는 hCG β 서브유닛의 C-말단 펩티드(CTP37, SEQ ID NO:2)를 포함한다.

본 발명의 방법에 사용된 바람직한 면역원성 에피토프는 단독으로, 또는 hCG β 서브유닛의 아미노산 38 내지 57 (" 루프" 펩티드)과 조합된 hCG의 β 서브유닛(CTP37)의 C-말단 37 아미노산, 그로부터 유도된 펩티드이다.

hCG β 서브유닛의 " 루프" 펩티드는 실질적으로 사람의 황체화 호르몬 (LH), 여포 자극 호르몬(FSH) 및 갑상선 자극호르몬(TSH)의 해당 영역에 유사하다. 따라서, " 루프" 펩티드 또는 그것의 유사체는 그것의 CTP37 펩티드 및 그것의 유사체, 또는 그것으로부터 유도된 펩티드와 조합하여 투여된다.

" 루프" 및 CTP37 펩티드의 조합된 투여는 하기와 같이 수행될 수 있다:(1) 적당한 담체 단백질로의 유도전에 2 펩티드가 화학적으로 연결되거나 일렬로 합성될 수 있다; (2) 2 펩티드는 서로 화학적으로 연결되지 않고 같은 담체에 화학적으로 유도될 수 있다;(3) 2 펩티드는 별개의 담체로 유도될 수 있고 2 개의 결과적인 접합체의 혼합물은 치료될 대상에 투여될 수 있다;또는 (4) 2 개의 펩티드는 별개의 담체로 유도될 수 있고 2 개의 결과적인 접합체의 혼합물은 치료될 대상에 각각 투여될 수 있다.

본원에 개시된 hCG 백신은 hCG-CTP37의 2 이상의 에피토프에 대한 면역반응을 유발하기 위해 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 대표적인 형태의 hCG 백신이다. 일반적으로, 펩티드 항원의 크기는 hCG 의 적어도 하나 이상의 면역원성 에피토프를 포함할 만큼 커야만 한다. 본원의 개시에 의해서 예상되는 가장 작은 유용한 면역원성 에피토프 또는 단편은 일반적으로 기대대는 약 8 내지 40 이상의 아미노산과 유사한 서열을 가지는 길이면에서 약 8 개의 인접한 아미노산 잔기일 것이다.

hCG 카르복시 말단 37 아미노산내의 2 개의 주요한 에피토프, N-말단 21 아미노산 에피토프(CTP21) 및 C-말단 16 아미노산 에피토프가 있다(CTP16;Berger P et al., Mol and Cell Endocrinol 126:33-43, 1996). 도 2a, 2c 및 2e 는 각각 CTP37, CTP21 및 CTP16의 아미노산 서열을 도시한다. hCG 백신접종 전략은 하나 이상의 CTP37, CTP21 및 CTP16의 투여를 포함할 수 있다. 그러나, 연구는 CTP16 에피토프에 대한 면역 반응이 면역지배적이어서, CTP37 단독 또는 CTP21의 조합 투여가 바람직하다는 것을 보여주었다.

일반적으로, hCG 면역원성 펩티드 백신의 초기 투여는 적어도 1 mg 의 hCG-CTP37 로 구성된다. hCG 면역원성 펩티드 백신의 추적 및 " 추가" 투여 또는 수동적으로 투여된 항-hCG 항체는 일반적으로 하기 중 하나 이상의 연속적인, 간격을 둔 투여로 암환자에게 제공된다:(i) 최초 투여로 제공된 것보다 더 많은 CTP37 백신(SEQ ID NO:2) 투여량; (ii) 투여당 환자마다 1.0mg 미만의 CTP37 에 해당하는 백신 투여량; (iii) hCG-CTP37 백신과 조합되어 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)으로 구성되는 프로모터 백신; (iv) 투여당 환자마다 1.0mg 미만의 CTP37 에 해당하는 백신 투여량으로 적당한 담체에 유도되고 hCG-CTP37 백신의 연속적인 간격을 두고 투여된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신;(v) 적당한 담체 단백질로 유도된 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)

로 구성되는 펩티드 백신;(vi) hCG-CTP37(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4)의 21량체 N-말단 단편과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체를 1 내지 2 주마다 적어도 1 투여량으로 수동 투여; (vii) hCG-CTP16(SEQ ID NO:6)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합하여 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체를 1 내지 2 주마다 적어도 1 투여량으로 수동 투여; (viii) hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합하여 hCG-CTP37백신(SEQ ID NO:2)의 연속적인, 간격을 둔 투여.

한 양태에서, hCG 백신의 CTP37의 양은 1.0mg, 바람직하게는 0.5mg 이다. 관련 양태에서, CTP37 백신이 " 루프" 백신과 함께 환자에게 투여되는 경우에, hCG 백신의 CTP37 성분의 양은 1.0mg 미만, 바람직하게는 0.5 mg이고, " 루프" 백신의 양은 CTP37 펩티드의 양 이상이다.

모든 경우에, hCG 면역원성 펩티드는 예를 들어, 단백질과 같은 담체 분자에 접합된다. 일반적으로, 각 hCG 면역원성 펩티드는 담체 단백질에 각각 접합된다. 하나 이상의 접합된 hCG 면역원성 펩티드는 해당 환자의 치료 섭생법에 포함되고, hCG 펩티드 백신은 동시, 또는 이시에 환자에게 투여될 수 있다. 대부분의 경우에, 접합된 hCG 면역원성 펩티드는 연속적인, 간격을 둔 투여로 함께 투여된다.

B.hCG 펩티드 백신의 제조

다양한 hCG 폴리펩티드 사슬은 박테리아, 효모, 및 배양된 포유동물 세포와 같은 숙주 세포에서 재조합 DNA 기법에 의해 발현되었다(예를 들어, 각각 사람의 융모막성 성선호르몬(hCG) 의 α 및 β 서브유닛의 클로닝을 개시하는 Fiddes, J. C. and Goodman, H.M., 1979 및 Fiddes, J.C. 및 Goodman, H.M. , 1980 참조).

유전자은행 기탁번호 180437 로 이용가능하고, 본원에 SEQ ID NO:1 으로 제시된 hCG β 서브유닛의 아미노산 서열을 본 발명의 방법에 사용하기 위한 펩티드 선택에 사용했다.

hCG 면역원성 펩티드는 본질적으로 D.Hudson, 1988에 개시된 것과 같은 Fmoc(9-플루오레닐메틸옥시카르보닐)화학, 또는 Boc(4차 부틸옥시카르보닐)화학을 사용하여 화학적으로 합성되었다. 통상적으로 이용가능한 실험 기법(예를 들어, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)을 사용하는 아미노산 합성 기법이 당업자에게 채용된다. 합성에 이어서, 펩티드는 일반적으로, HPLC 로 정제되고, 펩티드의 완전한 상태 및 진정성은 Edman 분해에 이어서 예를 들어, 온전한 펩티드의 NMR 분석과 같은 전통적인 서열결정 또는 질량-분광광도분석으로 결정된다. 각 합성 펩티드의 면역원성은 항-hCG CTP37항체를 가진 것으로 알려진 대상에서 취한, 혈청 또는 플라스마와 같은 체액의 항체와의 면역반응성을 결정하기 위한 다양한 체외 면역분석법을 통해 각각 결정된다.

C.변이체 또는 변형된 hCG 면역원성 펩티드

대부분의 경우에, 본발명의 방법에서 사용된 hCG 면역원성 펩티드는 천연 hCG 면역원성 펩티드와 같은 서열을 가진다. 그러나, 어떤 경우에, hCG 면역원성 펩티드는 변이체 hCG 펩티드이다.

아미노산의 어떤 치환은 단편의 면역원성 특징에 영향을 미치지 않고도 가능하다.

표준 치환 부류는 공통적인 측쇄 성질 및 예를 들어, 표준 Dayhoff 빈도 교환 기질(Dayhoff)에 의해 결정될 때, 상동성 단백질에서 가장 높은 빈도의 치환에 기초한 6 개의 부류이다. 이러한 부류는 부류 I:Cys; 작은 지방족 측쇄 및 OH-기 측쇄를 나타내는 부류 II: Ser, Thr, Pro, Hyp, Ala, 및 Gly; 수소결합을 형성할 수 있는 중성 및 음으로 하전된 측쇄를 나타내는 부류 III:Asn, Asp, Glu, 및 Gln; 염기 극 측쇄를 나태내는 부류 IV:His, Arg, 및 Lys; 분지 지방족 측쇄를 나타내는 부류 V:Ile, Val, 및 Leu, 및 Met; 및 방향족 측쇄를 나타내는 부류 VI:Phe, Tyr, 및 Trp 이다. 게다가, 각 군은 부류 IV 의 오르니틴, 호모아르기닌, N-메틸 리신, 디메틸 리신, 또는 트리메틸-리신과 같은 관련 아미노

산 유사체, 및 군 VI 의 할로겐화 티로신을 포함할 수 있다. 더욱이, 부류는 L-아미노산은 치환에 바람직하지는 않지만, L 및 D 입체이성질체 모두를 포함할 수 있다.

일단 아미노산 치환 또는 변형이 이루어진다면, 변이체 hCG 면역원성 펩티드는 체외 면역분석법으로 면역원성이 선별된다.

본원에 개시된 hCG 면역원성 펩티드의 아미노산 서열은 추가적인 N-또는 C-말단 아미노산과 같은 추가적인 잔기를 포함할 수 있으나, 펩티드 또는 폴리펩티드가 면역원성과 같은 적당한 생물학적 활성을 유지하는 한 본질적으로 본원에 개시된 서열의 하나와 같았다.

hCG 면역원성 펩티드의 아미노산은 등가의 또는 훨씬 개선된 분자를 생산하는 방식으로 변형될 수 있다. 생물학적 활성을 한정하는 것은 hCG 펩티드의 면역원성이다. 어떤 아미노산 서열 치환은 아미노산 서열 및 그것을 코딩하는 핵산 서열에서 만들어질 수 있고, 더 큰 생물학적 유용성 또는 활성(면역원성)을 가지는 hCG 펩티드의 발현을 초래한다. 어떤 경우에, 이러한 변형은 안정성 또는 등가의 생물학적 유용성 및 활성의 유지와 함께 더욱 바람직한 약학적 성질과 같은 다른 잇점을 제공할 수 있다.

이러한 변형을 하는 경우에, 아미노산의 수치료 지수가 고려될 수 있다. 어떤 아미노산은 유사한 수치료 지수 또는 점수를 가지는 다른 아미노산으로 치환될 수 있고, 생물학적으로 기능적인 등가의 단백질을 얻을 수 있다(Kyte and Doolittle, 1982). 이러한 변형을 하는 경우에, 수치료 지표가 +/-2 인 아미노산의 치환이 바람직하고, +/-1 인 아미노산의 치환이 특히 바람직하고, +/-0.5 인 것이 더욱 더 바람직하다. 유사 아미노산의 치환이 U.S. 특허번호 4,554,101 친수성에 기초하여 효과적으로 이루어질 수 있다는 것이 또한 이해된다. 이러한 변형에서, 친수성값이 +/-2 인 아미노산의 치환이 바람직하고, +/-1 인 것이 특히 바람직하고, +/-0.5 인 것이 더욱더 바람직하다.

본 발명의 방법에 사용된 변이체 hCG 면역원성 펩티드는 환자에의 투여에 개선된 성질을 가질 수 있으나, 이러한 펩티드는 본원에 개시된 천연 서열 hCG 면역원성 펩티드의 면역원성을 보유한다.

V.항-hCG 면역 반응을 유발하는 치료 섭생법

A.체내 투여

hCG 백신의 체내 투여는 접종 부위에 면역 시스템 세포를 동원할 수 있는 능력을 가지는 애쥬번트 또는 물질의 존재하에서 접종시킴으로써 얻을 수 있다. hCG 면역원성 펩티드 백신은 단독으로 또는 예를 들어, hCG-CTP16, SEQ ID NO:6 및/또는 hCG-CTP21, SEQ ID NO:4와 같은 hCG-CTP37의 16량체 C-말단 단편과 특이적으로 면역반응하는 수동적으로 투여된 사람의 단일클론 항체와 조합하여 투여될 수 있다.

본 발명의 방법에서, 보호 면역화가 바람직한 대상의 면역 반응 세포는 단독 으로 또는 hCG CTP37 의 에피토프와 특이적으로 면역반응하는 하나 이상의 사람의 단일클론 항체와 조합하여 hCG 면역원성 펩티드 백신에 노출된다. 보호 면역화는 이러한 노출에 이어서 대상에서 순환 hCG 또는 종양-결합 hCG의 양 감소를 실행함으로써 얻을 수 있다. 항체 및 세포 매개 면역 반응은 hCG 백신의 항암 작용에 기여할 수 있다.

본 발명의 방법에서, hCG 면역원성 펩티드 백신 및/또는 사람의 단일클론 항체는 투여량 조성물과 양립가능한 방식으로 투여되고, 그 양은 면역원성 및 치료적 유효량이다. 투여되는 양은 예를 들어, 펩티드 백신에 반응하는 개인의 면역 시스템의 능력을 포함하여 치료될 대상에 의존한다.

일반적으로, 본 발명의 면역치료적 방법은 이미 암을 가진 대상에 적용할 수 있다. 이것은 관련 형태의 암을 진단하기 위해서 당업자에 의해 사용가능한 하나 이상의 기준에 의해 대상이 암을 가지는 지를 진단할 수 있었다는 것을 의미한다. 이러한 기준은 암은 암 표면상에서 hCG 의 발현을 특징으로하고, 어떤 경우에는 환자의 플라스마 및/또는 다른 체액에서 순환하는 hCG 의 존재를 더 이상의 특징으로 한다는 것이다. 대표적인 형태의 암은 결장직장암, 췌장암, 유방암, 폐암, 및 시스플레틴으로의 치료가 어려운 고환암을 포함한다.

어떤 경우에, 본 발명의 면역치료적 방법은 발전성 암으로의 높은 위험성을 가지는 대상, 또는 하나 이상의 진단적 기준이 암이 발전성일 수 있는 것을 나타내는 대상에 적용할 수 있다.

수술, 방사선요법, 및 화학요법은 현재 암치료에 대한 1차적 방법이다. 항-hCG CTP37 사람의 단일클론 항체 및/또는 hCG 펩티드 백신 기초 치료와 함께 수동 면역은 이러한 다른 암요법과 조합될 수 있다는 것이 기대된다. 본원에 개시된 방법은 더욱 훨씬 큰 치료적 효과를 초래하면서 수술, 방사선 요법, 및 화학요법의 어떤 하나와 함께 상승 또는 추가적인 방식으로 상호작용할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 어떤 경우에, 암을 치료하는 개선된 방법은 항-hCG CTP37 사람의 단일클론 항체의 투여 및/또는 hCG 펩티드 백신의 투여에 의한 수동 면역화와 함께 예를 들어, 화학요법 또는 방사선요법과 같은 종래의 암 치료와 조합할 것이다.

B.hCG 펩티드 백신 조성물

본 발명은 hCG 의 β 서브유닛의 C-말단 펩티드, 그 자체로 실질적으로 비면역원성인 펩티드에 대하여 면역 반응을 유발하는 방법을 제공한다. 이것은 대상에 투여하기 전에 담체 분자와 펩트드를 접합시킴으로써 이루어질 수 있다.

본 발명의 방법에서, 단백질과 같은 적당한 담체로 유도된 하나 이상의 hCG 면역원성 펩티드의 면역학적 유효량은 hCG 면역원성 펩티드 또는 환자 상태의 개선을 초래하는 효과적인 방식으로 담체 분자에 접합된 펩티드로 구성되는 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여에 의해 암 환자에게 투여된다.

바람직한 구체예에서, hCG 면역원성 펩티드는 당업자에게 알려진 많은 담체 분자의 하나에 직접 결합된다. 담체 단백질은 그것의 외인성 성질을 인식하고 그것에 대한 항체를 발생시킬 수 있도록 투여될 대상의 면역 시스템에 대해 충분한 크기여야만 한다.

어떤 경우에, 담체 분자는 hCG 면역원성 펩티드에 직접 결합한다. 다른 경우에, 담체 분자 및 hCG 면역원성 펩티드간의 삽입된 링커 분자가 있다.

하나의 대표적인 구체예에서, 결합 반응은 펩티드상의 유리 술프히드릴기를 요구한다. 이러한 경우에, N-말단 시스테인 잔기는 펩티드가 합성되는 경우에 펩티드에 첨가된다. 예를 들어, CTP17(SEQ ID NO:7)은 hCG β 서브유닛 펩티드, CTP16(SEQ ID NO:6) + 담체 분자에 CTP16 의 결합을 초래하는 첨가된 N-말단 시스테인 잔기와 같은 서열을 가진다. 하나의 대표적인 구체예에서, 종래의 숙신이미드 화학은 담체 분자와 펩티드 연결에 사용된다. 이러한 펩티드:담체 단백질을 제조하는 방법은 일반적으로 당업자에게 알려지고, 이러한 방법을 위한 시약은 상업적으로 이용할 수 있다(예를 들어, Sigma Chemical Co.로부터 구입). 일반적으로 약 5-30 펩티드 분자는 담체 단백질 분자마다 접합된다.

대표적인 담체 분자는 키홀림펫헤모시아닌(KLH), 소 혈청알부민(BSA), 플라겔린, 인플루엔자 서브유닛 단백질, 파상풍 톡소이드(TT), 디프테리아 톡소이드 (DT), 콜레라 톡소이드(CT), 다양한 박테리아 열쇼크 단백질, 글루타티온 환원효소 (GST)와 같은 단백질, 또는 티로글로블린등과 같은 천연 단백질을 포함한다. 당업자는 적당한 담체 분자를 쉽게 선택할 수 있다.

바람직한 구체예에서, hCG 면역원성 펩티드는 디프테리아 독소(DT)에 접합된다.

어떤 경우에, 담체 분자는 Ficoll70 또는 Ficoll 400 (수크로스 및 에피클로로히드린의 합성 코폴리머)와 같은 비단백질, Dextran T70 과 같은 폴리글루코스이다.

접합의 정도는 환자의 상태와 결합된 hCG 효과의 부분 또는 전체를 중성화하기에 충분한 수준으로 암 환자에서 면역반응 유발에 적합해야만 한다. 이것은 펩티드, 담체 분자 및 환자상에 의존하여 다양화될 것이라는 것이 이해될 것이다.

본 발명은 상기에 개시된 hCG 백신 조성물을 제공하고, 여기에서 각 hCG 면역원성 펩티드는 같은 또는 서로 다른 담체 분자에 결합된다.

hCG 백신 조성물은 선택된 담체 분자에 결합된 같은 또는 서로 다른 hCG 면역원성 펩티드의 단일 또는 다중 카피를 포함할 수 있다. 본 구체예의 한 양태에서, hCG 백신 조성물은 폴리펩티드에 서열적으로 조합되고 같은 담체에 결합된 양쪽 인접성 서열이 존재 또는 부재하는 서로 다른 hCG 면역원성 펩티드를 포함할 수 있다. 택일적으로, hCG 면역원성 펩티드는 같은 또는 서로 다른 담체에 펩티드로서 각각 결합될 수 있고, 결과적인 hCG 면역원성 펩티드-담체 접합체는 단일 조성물을 형성하도록 함께 혼합될 수 있거나, 동시 또는 이시에 각각 투여될 수 있다.

예를 들어, hCG 면역원성 펩티드는 디프테리아 톡소이드(DT)의 분자마다 약 15-20 펩티드 분자를 사용하는 Lee A. C.J., et al., 1980 의 방법에 의해서 시스테인일 측쇄에 의해서 디프테리아 톡소이드(DT) 담체 단백질에 공유결합될 수 있다.

일반적으로, 유도된 hCG 펩티드 백신 조성물은 운반체와 함께 투여된다. 운반체의 목적은 백신 제조물을 에멀션화하는 것이다. 다양한 운반체는 당업자에게 알려지고, 효과적인 에멀션화제로서 기능하는 어떤 운반체가 본 발명의 방법에서 유용성이 발견된다. 투여의 바람직한 운반체는 스쿠알란 및/또는 스쿠알렌과 함께 만나이드 모노올레이트의 혼합물을 포함한다. 스쿠알렌은 본 발명의 백신에 사용하는 스쿠알란에 바람직하고, 바람직하게는 스쿠알렌 및/또는 스쿠알란의 비율이 만나이드 모노올레이트의 부피당 중량부마다 약 4:1 내지 약 20:1 이다.

hCG 백신의 투여로부터 초래된 면역 반응의 규모를 더욱 향상시키기 위해서, 면역학적 애쥬번트는 백신 조성물에 포함된다. 당업자에게 알려진 대표적인 애쥬번트는 물/오일 에멀젼, 예를 들어, CRL 1005 (Optivax; Vaxcel Inc., Norcross, GA) , 인산 알루미늄, 수산화 알루미늄, 수산화 알루미늄 및 수산화 마그네슘의 수성 현탁액, 박테리아 엔도톡신, 폴리뉴클레오티드, 폴리일렉트로리트, 친지질 애쥬번트 및 합성 무라밀 디펩티드(norMDP)유사체와 같은 비이온 코폴리머 애쥬번트를 포함한다. 환자에게 투여되는 hCG 백신 조성물에 포함되는 바람직한 애쥬번트는 N-아세틸-노르-무라닐-L-알라닐-D-이소글루타민, N-아세틸-무라닐-(6-0-스테아로일)-L-알라닐-D-이소클루타민, 및 N-글리콜-무라닐-L-α Abu-D-이소클루타민(Ciba-Geigy Ltd.) 와 같은 norMDP 유사체이다. 대부분의 경우에, 펩티드 접합체에 대한 애쥬번트의 질량 비율은 약 1:2 내지 1:20 이다. 바람직한 구체예에서, 펩티드 접합체에 대한 애쥬번트의 질량 비율은 약 1:10이다. hCG 백신의 애쥬번트 성분은 hCG 면역원성 에피토프에 면역 반응을 최대화하기 위해 그 안에서 다양화될 수 있다.

투여의 바로 직전에, hCG 면역원성 펩티드 담체 단백질 접합체 및 애쥬번트는 적당한 용매에 용해되고, 에멀젼화제 또는 운반체가 첨가된다. 예를 들어, hCG 면역원성 펩티드 담체 단백질 접합체 조성물은 norMDP와 함께 포스페이트 완충 식염수(PBS)에 용해된 DT에 접합되고, 더욱이 스쿠알렌/만나이드 모노올레이트 에멀션화제를 포함하는 CTP37 펩티드를 포함할 수 있다.

본 발명의 면역원성 단백질성 조성물에 사용하기 위한 제약학적으로 허용가능한 적당한 담체는 당업자에게 알려진다. 이러한 담체는 대상에 hCG 백신 도입에 적합한 예를 들어, 포스페이트 완충 식염수, 또는 어떤 생리적으로 양립가능한 배지를 포함한다.

당업자에게 알려진 다양한 약제 송달 메카니즘은 본 발명의 hCG 면역원성 펩티드를 투여하기 위해서 사용될 수 있다. 조절된 해리 조제물은 본 발명의 방법에서 펩티드 또는 항체를 복합하거나 흡수하기 위해서 폴리머를 사용함으로써 얻을 수 있다. 조절된 송달은 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌비닐아세테이트, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 또는 프로타민 술페이트와 같은 거대분자를 사용하여 이루어질 수 있고, 그것의 농도는 펩티드 백신의 해리 율을 변화시킬 수 있다.

어떤 경우에, hCG 펩티드는 예를 들어, 폴리에스테르, 폴리아미노산, 히드로겔, 폴리락트산, 또는 에틸렌 비닐아세테이트 코폴리머로 구성된 폴리머 입자로 통합될 수 있다. 택일적으로, 당업계에 일반적으로 알려진 방법을 사용하여 hCG 펩티드 백신이 미세캡슐, 리포좀, 알부민 중심체, 미세에멀젼, 나노입자, 나노캡슐, 또는 거대에멀젼으로 트랩화된다.

C.치료 섭생법

본 발명의 hCG 백신은 진피(ID) 주입, 근육내(IM) 주입, 피하(SC) 주입, 정맥내(IV) 주입, 복강내(IP) 주입, 및 종양 근처 주입을 제한없이 포함하는 경로에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여 경로는 피하(SC) 주입이다.

본 발명의 암 치료 방법에서, 환자는 최초에 제약학적으로 허용가능한 조성물로 적당한 담체 분자로 유도된 2.0mg 미만의 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 및 바람직하게는 1.0 mg 미만의 hCG-CTP37를 복용한다. 어떤 경우에, 최초 백신은 2.0 mg 미만의 hCG-" 루프" 펩티드(SEQ ID NO:9)와 함께 2.0 mg 미만의 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2)의 조합을 포함하고, 여기에서 각 hCG 면역원성 펩티드는 적당한 담체 분자에 개별적으로 유도된다. 바람직한 구체예에서, 환자는 0.5 mg hCG " 루프" 펩티드(SEQ ID NO:9)와 함께 0.5 mg hCG-CTP37(SEQ ID NO:2)의 조합으로 구성되는 최초 복용을 한다.

최초 백신접종 후 9 내지 15 주사이의 기간 후에, hCG-CTP37의 16량체 C-말단, hCG-CTP37의 21량체 N 말단 단편 및 hCG-CTP37에 대한 환자 항체의 수준을 면역분석법으로 평가한다. 면역분석법은 항암 치료 전, 그 동안 및 그 후에 정기적인 간격을 두고 반복될 수 있다.

면역분석 결과에 기초하여, hCG 백신 치료 섭생법은 hCG 에 대한 면역 반응을 최적화하기 위해서 조절될 수 있다. 바람직한 투여량 섭생법은 최초 백신 투여후 9주 초기 내지 15주에 검출가능한 hCG-CTP37의 16량체 C-말단 펩티드 단편 및 21량체 N-말단 펩티드 단편 모두에 대해 유사한 범위의 면역반응으로 환자의 면역 반응을 유발한다.

CTP21(SEQ ID NO:4)에 대한 면역반응이 검출될 수 있는 것이 바람직하고, CTP21에 대해 검출된 면역 반응은 CTP16(SEQ ID NO:6)에 대한 면역 반응에 유사한 범위인 것이 더욱 바람직하다. " 유사한 범위" 는 CTP21 및 CTP16 에 대한 검출된 면역 반응이 50% 이상이 아니고, 바람직하게는 단지 20% 이다. 즉, CTP21(SEQ ID NO:4)에 대한 면역반응은 실질적으로 CTP16(SEQ ID NO:6)에 대한 면역반응보다 낮지 않다.

hCG 에 대한 환자의 면역 반응은 하기와 같은 군으로 될 수 있다.

(1) 플라스마에서 어떤 항-CTP37 항체도 검출되지 않은 환자(항체 비반응자);(2) 항-CTP16 또는 항-CTP21 항체가 검출되지 않은 동안 총 항-hCG-CTP37 항체가 검출된 환자(약한 항체 반응자); (3) 플라스마에서 항-CTP37 항체 및 항-CTP16 항체가 검출되었으나 항-CTP21 항체가 검출되지 않은 환자(CTP16 에 대해서만 항체 반응자); 및 (4) 플라스마에서 항-CTP37, 항-CTP16 및 항 CTP21 항체가 검출된 환자(CTP16 및 CTP21 항체 반응자).

면역분석법 후에, CTP21 N-말단 단편에 특이적인 항체의 수준은 hCG-CTP37 의 CTP16 C-말단 단편에 특이적인 항체의 수준보다 실질적으로 더 낮은 군 (1), (2), (3) 의 환자 및 그룹(4)의 환자는 하기 중 하나 이상으로부터 선택된 백신접종 섭생법으로 치료될 수 있다: (i) 최초 투여에서 제공된 것 이상의 투여량으로 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;(ii) 1mg 미만의 CTP37 펩티드/환자/투여에 해당하는 투여량으로 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;(iii) hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신과 조합하여 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;(iv) 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여에 이어서, 1mg 미만의 CTP37 펩티드/환자/투여의 후자 백신의 투여량으로 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여; (v) 적당한 담체 단백질로 유도된 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)로 구성되는 CTP37 N-말단 펩티드 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;(vi) 적어도 1 주 내지 2 주 마다 한번씩 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체의 연속적인, 간격을 둔 투여;(vii) 적어도 1 내지 2 주마다 한번씩 hCG-CPT16(SEQ ID NO:6)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 함께 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체의 연속적인, 간격을 둔 투여; 및 (viii) hCG-CTP21 (SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합하여 hCG-CTP37 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여.

면역분석법 후에, CTP21 N-말단 단편에 특이적인 항체의 수준이 hCG-CTP37 의 CTP16 C-말단 단편에 특이적인 항체 수준에 유사한 범위인 군 (4) 의 환자는 또한 상기에 개시된 (i) 내지 (viii) 중 하나 이상으로부터 선택된 백신접종 섭생법으로 치료될 수 있다.

바람직하게는, hCG 백신의 투여는 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2), hCG-CTP16(SEQ ID NO:6) 및 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)에 대해 검출된 항체 수준을 초래한다. 더욱더 바람직하게는, hCG 펩티드 백신 투여는 hCG-CTP16(SEQ ID NO:6) 및 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4) 모두에 대하여 검출된 항체 수준을 초래하고, 여기에서 양 펩티드에 대한 면역 반응의 범위는 유사하다.

상기에 개시된 치료 섭생법은 예시 목적으로 제시되고, 치료 섭생법은 상기에 개시된 바와 같이 hCG 에 대한 환자의 면역반응에 기초하여 필요에 따라 조정될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 본 발명의 한 양태는 hCG-CTP37, hCG-CTP21 및 hCG-CTP16 에 대한 면역반응의 중간 모니터에 관한 것이고, 치료 섭생법에서 상응하는 조정은 이러한 모니터 결과에 기초한다.

D.투여량 범위

본 발명에 앞서, 암 치료를 위한 hCG 면역원성 펩티드 접합체의 최초 투여는 일반적으로 적당한 담체 단백질로 유도된 적어도 1.0 mg 의 hCG 면역원성 펩티드를 포함했다. 실시예 1에 제시된 연구 결과는 이러한 투여량이 치료되는 대다수의 환자에서 hCG-CTP37 의 C-말단 에피토프(CTP16, SEQ ID NO:6) 및 N-말단 에피토프(CTP21, SEQ ID NO:4) 모두에 면역반응을 유발하지 않아서, 결장직장암의 효과적인 치료 섭생법일 수 없다는 것을 제안한다.

실시예 1 의 더이상의 예시에서, hCG-CTP37의 C-말단 에피토프(CTP16, SEQ ID NO:6) 및 N-말단 에피토프(CTP21, SEQ ID NO:4) 모두에 대한 면역 반응을 증명한 단계 II 임상 실험의 환자는 생존 시간이 상당히 증가했다.

본 발명은 CTP37 의 C-말단 에피토프(CTP16, SEQ ID NO:6) 및 N-말단 에피토프(CTP21, SEQ ID NO:4) 모두에 면역반응을 초래하는 암의 치료 방법에 관한 것이다. 이것은 (1) 단독으로 또는 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)의 양과 조합하여 각각 적당한 담체 분자에 유도된 1.0 mg 미만의 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 펩티드/환자/투여; (2) 적당한 담체에 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:2)에 의어서 펩티드/환자/투여 후에 1.0 mg 이하의 hCG CTP37(SEQ ID NO:2) 펩티드/환자/투여의 투여 (3) 적당한 담체 분자에 유도된 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)펩티드 백신; (4) 1 내지 2주마다 적어도 1 회 투여된 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)와 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체; (5) 1 내지 2 주마다 적어도 1 회 투여된 hCG-CTP16(SEQ ID NO:6)와 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 함께 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)와 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체; 및 (5) hCG-C

TP21(SEQ ID NO:4)와 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합하는 hCG-CTP37 백신(SEQ ID NO:2) 중 하나 이상의 투여에 의해 수행될 수 있다.

다른 바람직한 구체예에서, 단독으로, 또는 " 루프" 펩티드(SEQ ID NO:9)의 양과 조합하여 적당한 담체 분자로 유도된 0.5 mg 의 CTP37(SEQ ID NO:2)이 투여된다. 전형적으로, 환자에 투여된 " 루프" 펩티드(SEQ ID NO:9)의 양은 CTP37(SEQ ID NO:2)의 양 이상이다. 예를 들어, CTP37 백신이 " 루프" 백신과 함께 투여되는 경우에, 백신의 CTP37 성분의 양은 일반적으로 1.0 mg 미만, 바람직하게는 0.5 mg이고, " 루프" 백신의 양은 CTP37(SEQ ID NO:2)의 양 이상이다. 본 구체예의 더이상의 양태에서, 또한 항-hCG CTP21 및/또는 항-hCG CTP16 사람 단일클론 항체의 25 내지 500 mg 이 바람직하게는 환자에게 주마다 약 1 내지 2 회 투여된다.

치료 섭생법 및/또는 항-hCG CTP21 의 양 및/또는 항-hCG CTP16 사람의 단일클론 항체에서 CTP37(SEQ ID NO:2) + 또는 - 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)의 양은 치료되는 환자의 체액에서 항-CTP37, 항-CTP16 및 항-CTP21 항체에 대한 면역분석법에 기초하여 연속적인 투여전에 변형될 수 있다.

바람직한 치료 섭생법은 실시예 1 에 더욱 개시된 것과 같이 결장직장 암 환자에서 증가된 생존 시간과 상관관계를 가지는 CTP37, CTP16 및 CTP21 에 대한 검출가능한 면역 반응을 초래한다.

VI.hCG 에 대한 면역 반응의 평가

hCG 백신 투여의 효율성 결정에 사용되는 임상 종결점은 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2), hCG-CTP16(SEQ ID NO:6), hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)에 대한 면역반응의 평가 및 종양 크기의 결정 및 환자 생존 시간을 포함한다(예를 들어, 주단위로).

한 양태에서, 발명은 hCG 백신의 투여 후에 9 내지 15 주에서, CTP37의 C-말단 단편, hCG-CTP16(SEQ ID NO:6), CTP37의 N-말단 단편, hCG-CTP21(SEQ ID NO:4), 및 CTP37에 대한 항체의 수준을 측정하고 이어서, hCG-CTP16, hCG-CTP21 및 hCG-CTP37에 대한 면역반응에 기초하여 다음의 4 군 중 하나로 환자를 분류함으로써 암 환자에서 hCG 에 대한 면역 반응을 분류하는 수단을 제공한다: (1) 플라스마에서 검출되지 않은 항-CTP37 항체를 가지는 환자(항체 비반응자);(2) 항-CTP16 또는 항-CTP21 항체의 어떤 것도 검출되지 않는 동안 총 항-hCG CTP37 항체가 검출되는 환자(약한 항체 반응자);(3) 플라스마에서 항-CTP21 항체가 검출되지 않으나 항-CTP37 항체 및 항-CTP16 항체를 가지는 환자 (CTP16 에 대해서만 항체 반응자); 및 (4) 플라스마에서 검출되는 항-CTP37, 항-CTP16 및 항-CTP21 항체를 가지는 환자(CTP16 및 CTP21 항체 반응자).

본 발명은 hCG 에 대한 면역 반응을 모니터할 수 있는 진단적 장치를 포함한다. 장치는 hCG-CTP37의 C-말단 단편의 아미노산 서열(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6)을 가지는 펩티드, hCG-CTP37의 N-말단 단편의 아미노산 서열(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4)을 가지는 펩티드 및 펩티드를 가진 면역반응성인 사람의 항체를 검출하기 위한 리포터-표지 항-사람의 면역글로블린 항체와 같이 사람 항체를 표지하기에 효과적인 시약을 포함한다.

이러한 진단적 장치는 면역학의 당업자에게 일반적으로 공지되고 다양한 대상의 항체 분석에 통상적으로 사용된다.

어떤 경우에, 장치는 hCG 펩티드가 부착하는 고체상 기질을 포함한다.

본 발명은 더욱이 (1) hCG-CTP37의 C-말단 단편(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6), (2) hCG-CTP37의 N-말단 단편(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4), 및(3) hCG-CTP37(SEQ ID NO:6)의 아미노산 서열을 가지는 펩티드와 체액 샘플을 반응시키고, 각 펩티드와 면역반응성인 샘플에서 항체를 검출하는 단계를 수행함으로써 hCG 에 대한 면역 반응을

모니터하는 방법을 포함한다. 분석법은 정량적이어서 각 펩티드에 대한 면역반응의 상대적인 범위를 결정하기 위한 각 항체의 수준을 비교하는데 사용되는 것이 바람직하다.

본 발명의 방법은 일반적으로, 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA), 방사면역분석법(RIA), 면역침전법, 웨스턴 블럿, 도트 블럿, FACS 분석 및 당업계에 알려진 다른 방법과 같은 면역분석법에 이용가능하다.

바람직한 구체예에서, 면역분석법은 예를 들어, ELISA 분석법과 같은 고체 지지체에 고정된 hCG 펩티드 항원을 포함한다.

면역분석법은 (A)(1) hCG-CTP37의 C-말단 단편(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6);(2) hCG-CTP37의 N-말단 단편(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4); 및 (3) 고체 지지체에 결합된 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2)의 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 펩티드 ; (B) 대상으로부터 샘플을 수거하는 수단; 및 (C) 분석을 수행하는 반응 용기를 포함하는 키트에 의해서 예증된 키트 포맷에 쉽게 적용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 키트는 또한 표지 수단, 지시자 반응 효소 및 기질, 및 다른 용액, 면역분석법에 필요한 완충액 또는 다른 성분을 포함할 수 있다.

본 명세서에 언급된 모든 공개문헌 및 특허 출원은 각 공개 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고문헌으로 포함된 것으로 나타나지 않는다면, 본원에 참고문헌으로 수록된다.

전술한 발명은 이해의 완전성을 위해서 예시의 방식으로 어떤 상세한 설명 및 실시예에 개시되었지만, 이것은 당업자에게 쉽게 이해될 것이고, 수록된 청구범위의 취지 및 범위에서 벗어나지 않고 어떤 변형이 이루어질 수 있다.

하기에 실시예가 예시되지만, 본 발명을 제한하려는 어떤 의도도 없다.

실시예 1실시예 1

무작위 단계 II 임상실험에서, 77 환자는 저 또는 고 투여량 백신 섭생을 할당받았다. 적임의 환자는 원발종양의 치료적 절제술을 받았고, 어떤 인종, 어떤 성, 18 세 이상이었으며 전이성 결장 또는 직장의 아데노암종의 조직 진단을 했다. 실험 계획은 동시적인 화학요법을 배제했다. 프로토콜은 피내 피부 시험에 의해 측정될 때, 하나 이상의 일반적인 회상 항원(파상풍 톡소이드, 디프테리아 톡소이드, 스트렙토키나제 투베르쿨린, 칸디다, 트리코피톤)에 지연형과민증에 대한 양성 시험을 필요로 했다. 모든 환자는 백신접종전에 피내 피부 시험에 의해서 디프테리아 톡소이드 회상 항원에 즉시형과민증에 대하여 음성을 나타냈다. 모든 환자는 SWOG(Sothwest Oncology Group)성능 점수 0,1 또는 2를 가졌다.

백신을 무균 식염수에서 20:1(w:w)의 비율로 용해된 노르뮤라밀 디펩티드 애쥬번트에 대한 CTP-디프테리아 톡소이드 접합체(25분자 합성 CTP37 펩티드/DT 의 10^5 Da)와 함께 조제된 4:1 의 비율로 스쿠알렌:만나이드 올레이트의 수제작 에멀젼으로 제조했다. 접종 부피는(접합체량에 기초하여) 0.5 mg 투여량당 0.4 ml, 1.0 mg 투여량당 0.8 mg 및 2.0 투여량당 1.6 ml 였다. 36 명의 환자가 0, 28 일, 70 일 및 16 주에서 0.5 mg 백신으로 구성된 저 투여량 섭생법에 참여했다. 41 명의 환자가 0 일에 2.0 mg 의 백신을 복용하고, 28일, 70 일 및 16 주에 1.0 mg을 복용하는 고 투여량 섭생법에 참여했다. 백신을 근육내 투여했다.

hCG-CTP37(SEQ ID NO:2, 도2a)는 에피토프(SEQ ID NO:5, 도 2d) 및 C-말단 영역(CTP16, SEQ ID NO:6, 도 2e), 에피토프(SEQ ID NO:8, 도2g)를 포함하는 적어도 2 개의 에피토프, N-말단 영역(CTP21, SEQ ID NO:4, 도 2c)를 포함하는 것으로 알려진다.

평가된 임상 종결점은 hCT-CTP37, hCG-CTP21의 N-말단 단편(SEQ ID NO:4), hCG-CTP37, hCG-CTP16의 C-말단 단편(SEQ ID NO:6), 및 총 CTP37 펩티드(SEQ ID NO:2)에 대한 면역 반응, 종양 크기 및 환자의 생존 시간의 결정을 포함했다.

항-hCG 항체 수준은 이미 공지된 대로(Jones W et al., Lancet 1:1295-1298,1998), 면역화한 후에 간격을 두고 수거된 혈청의 다양한 희석에 대하여^{125} I-표지 hCG 의 결합을 결정함으로써 측정했다. 결과는 비희석 혈청의 리터당 n몰로 결합된 β-hCG 의 양으로 보고된다.

표준 고체상, 간접 효소-결합 면역흡착분석법(ELISA)는 항-DT 항체에 대한 환자 항혈청의 분석에 사용되었다. 요약하면, 96 웰 마이크로티터 플레이트를 포스페이트-완충 식염수(PBS)에서 1 μg/ml 의 농도로 정제된 DT(Pasteur Merieux Connaught, Toronto, Ontario, Canada)로 코팅했다. 환자 항혈청의 일련의 2 배 희석물을 PBS/1% 소 혈청 알부민(BSA) 및 0.1% 트윈-20 으로 웰에 첨가했고, 실내온도에서 1 시간동안 인큐베이션했다. 웰을 PBS/0.1% 트윈-20 으로 세척한 다음에 45 분동안 고우트 항-사람 IgA, IgG, IgM-허스래디시페록시다제 접합체(HRP conjugate, Kierkegaard and Perry Laboratories, Gaethersburg, MD)를 첨가했다.웰을 PBS/0.1% 트윈-20(2회) 및 희석된 물(2배)로 세척한 다음에, 플레이트를 발색균(ABTS, Kierkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)을 15 분동안 첨가함으로써 현상했고, 연이어서 405 nm에서 흡광도를 분석했다. 모든 환자 샘플에 대한 결과는 선형 적정 범위내의 선택된 희석(1/32000)에서 광밀도로 보고된다.

hCG-CTP(SEQ ID NO:6) 및 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)를 합성했고, >95% 순도 로 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 정제했다(Peptide Express, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA). hCG-CTP37을 GMP 생산으로 얻었다(Peninsula Laboratories, Inc. Belmont, CA, USA). 충분한 항-hCG 항체 적정을 가지는 환자 항혈청을 경쟁 ELISA를 사용하여 CTP37, CTP21 및 CTP16 와의 결합에 대해 분석했다. 경쟁 ELISA 전에, 경쟁 ELISA 에 대한 최적의 항원 코팅 농도 및 최적의 항혈청 희석을 간접 ELISA에 의해서 각 항혈청에 대해 결정했다. 1.0, 0.50, 0.25 및 0.10 μg/ml 로 CTP37 로 코팅된 ELISA 플레이트를 PBS에서 1% BSA 로 차단했다. 1/1000 내지 1/60,000 의 범위의 몇 개의 항혈청 희석을 플레이트에 첨가했다. 결합 항체를 항-사람 HRP 접합체로 검출했다. 항혈청 농도에 대한 광밀도의 선형반응을 나타낸 항원 코팅 농도를 경쟁 ELISA 에 사용했다. 경쟁 ELISA를 변형(Chang SP et al., J Immunol. 128: 702-705, 1982)외에 개시된 방법에 따라서 수행했다. 요약하면, 플레이트를 각 항혈청에 대한 예비-결정된 농도로 PBS에서 하룻밤동안 CTP37 과 함께 인큐베이션했고, 그 다음 1 % BSA/PBS 로 차단했다. 그 다음, 예비-결정 희석에서 항혈청을 다양한 농도의 CTP37, CTP21 또는 CTP16의 다양한 농도로 예비인큐베이션한 다음, 60 μℓ의 각 항혈청-펩티드 혼합물을 CTP37-코팅된 플레이트에 첨가했다. HRP-접합 사람의 면역글로블린을 플레이트에 결합된 무(완전히 제거되지는 않음)항체의 양을 결정하는 데 사용했다. 결합 비율을 같은 플레이트상이 항혈청 표준 시리즈(경쟁 펩티드는 없음)에 대해 405 nm 에서 샘플 광밀도를 비교함으로써 계산했다. 각 펩티드 농도에 대한 2 개의 레플리케이트 값을 평균화했고, % 결합 대 Log_{10} [펩티드 경쟁자]으로 플롯한 다음에, GraphPad PRISM™ 소프트웨어(GraphPad Software, Inc. San Diego, CA)를 사용하여 1 부위 경쟁 방정식과 일치시켰다. Microsoft Excel 및 GraphPad PRISM ™ 소프트웨어를 생존을 비교하기 이한 생존 및 로그 랭크 시험을 개시하기 위한 Kaplan-Meier 커브를 포함하는 통계학적 분석에 사용했다. 0.05 이하의 P-값이 중요하게 여겨졌다.

hCG 에 대한 면역반응을 백신접종의 개시후 0 내지 24 주에서 환자의 혈청에서 측정했다. 상당한 hCG 항체 생산을 백신접종 프로토콜의 12 주에서 관찰했다(도 3).

항-hCG CTP37 항체 적정은 0.5 mg 투여량 섭생보다 더 많은 항체 적정을 초래한 백신의 2.0 mg 최초 투여량으로서 투여량 의존적이었다(도 3). 저 투여량을 복용한 환자에서 가장 큰 종양 면적이 상당한 증가를 보이지는 않았지만, 종양 성장은 고투여량 섭생에서 관찰되었고, 가장 큰 종양 면적의 평균은 2 투여량 섭생($p<0.05$, 도4)간에 큰 차이가 있었다. 그러므로, CTP37 에 대한 면역 반응은 평균적인 거대 종양 면적과 상관관계가 없었다. 게다가, 환자 생존 시간의 평균은 저 투여량 군의 경우에 39.9 주였고, 고 투여량 군의 경우에 32.4 주였다. 항체/가장 거대한 종양 면적 비율은 시간에 따라 지수적으로 증가하였다(도 5).

백신은 또한 다양한 항원(PHA, CTP37, CTP-37-KI, DT 및 β hCG) 에 대한 PBMC 증식 반응으로 결정된 때, 세포-매개 면역 반응을 초래한 것으로 보여졌다. 미토겐을 1, 0.1, 또는 0.01 μg/웰로 첨가했다(도 6 에 제시된 데이타

는 1 μg/ml 농도이다). PHA 자극 지표가 4 보다 크므로, 도 6 은 데이타 포인트의 그것에 대해 부정확하다. PHA 에 대한 정확한 값은 정상의 경우에 79 였고; 환자 1 의 경우에 147; 및 환자 2 의 경우에 2819 이다. 더 이상의 방법은 Triozzi et al., 1997 에 개시된다.

CTP37 에 대한 항체 반응은 환자 생존과 상관관계를 가지지만, DT 항체 적정은 고 또는 저투여량군에 대한 환자 생존과 상관관계가 없었다.

발견에 기초한 메카니즘은 본 발명이 보호받고자 하는 범위가 아니지만, 결과는 특정 hCG β 서브유닛 에피토프에 대한 항체 반응은 약물동태학(hCG 의 명확한 개선) 및/또는 약역학(수용체에 대한 hCG 결합의 방해)에 의해 작용할 수 있다는 것을 제안한다. CTP37 의 CTP16 또는 CTP21 펩티드를 가지는 경쟁 분석에서 CTP37 로 면역화된 환자에서 채취된 혈청 샘플의 평가는 CTP16 이 사람에서 면역지배적이라는 것을 제안하면서, CTP21에 대한 면역 반응과 비교하여 CTP16 에 대한 더 활발한 면역 반응을 나타냈다.

4 군으로 분리되어 CTP37-DT 의 근육내 주사를 투여받은 환자의 면역반응은 하기와 같았다:(1) 제1 또는 제2항체, 또는 총 항-hCG-CTP37 항체의 어떤 것도 검출되지 않은 환자(항체 비반응자); (2) 제1 또는 제2항체는 검출되지 않은 반면에 총 항-hCG CTP37 항체가 검출되는 환자(약한 항체 반응자); (3) 제1항체의 검출가능한 수준을 가지지만, 제2항체의 검출가능하지 않은 수준을 가지는 환자(CTP16 항체에 대해서만 반응자); 및 (4) 제1 및 제2항체의 검출가능한 수준을 가지는 환자(CTP16 및 CTP21 항체 반응자)(표1).

표 1. 4개의 항체 반응 부분 모집단의 환자 특성

군	환자	검출된 항-CTP37 항체	검출된 항-CTP16 항체	검출된 항-CTP21 항체	혈청 CG	hCG 항체 (nM)
1	21	NO	NO	NO	3.5 ± 2.9	0 ± 0
2	20	YES	NO	NO	5.3 ± 3.4	2.4 ± 1.4
3	20	YES	YES	NO	7.5±15.7	36.6± 51.5
4	15	YES	YES	YES	3.6 ± 3.5	30.0± 23.6

4 항체 반응군의 각각에서 환자에 대한 생존 곡선은 도7에 도시된다. 이러한 생존 곡선은 서로 상당히 다르다는 것이 발견되었다(p=0.0019). 하기의 표 2 에서 요약된 것과 같이, 평균 생존 시간은 항-hCG 항체가 없는 21 환자의 경우에 16.4 주, 항체 적정 반응근을 포함하는 20 환자에서 29.6 주, CTP16 에피토프 인식만을 가지는 20 환자에서 34.8 주, 및 CTP16 및 CTP21 모두에 대한 반응을 개시하는 15 환자에서 64.6 주였다.

표 2. 단계 II 임상 실험에서 CTP에 대한 면역 반응

군	군내 환자	생존시간(주)
1	21/73	16.4
2	20/73	29.6
3	20/73	34.8
4	15/73	64.6

게다가, CTP16 및 CTP21 모두에 대하여 검출된 면역 반응을 가지는 환자에 대한 증가된 생존 시간은 고 및 저 투여량 치료군에 대한 증가된 생존 시간을 예상케했다.

CTP37 백신에서 CTP16 및 CTP21 에피토프 모두의 항체 인식을 가지는 환자의 경우에 생존의 잇점은 환자 전체의 면역 상태의 일반적인 측정과 관련이 없었다. 도 1 에 보여진 대로, 평균 혈청 IgG 수준에서 4 군 사이의 중요한 차이가 없었다. 게다가, CTP37 펩티드 백신의 투여전에 피부 시험에서 그것에 반응한 많은 회상 항원, 또는 대다수의 회상 항원 반응 범위간의 차이는 없었다. 더욱이, CTP16만에 대한 반응자군, CTP16 및 CTP21 반응자 군의 비교에서 평균 항-hCG 항체 적정에 어떤 차이도 없었다.

본원에 제시된 결과는 생존 시간은 환자가 2 중 에피토프 반응을 나타냄에 따라서 증가되었음을 증명했다. 2 중 에피토프 반응자의 평균 생존 시간은 65 주였고, 이것은 이리노테칸으로 치료된 환자와 비교하여 더 긴 생존 시간을 나타냈다. 양 CTP37 에피토프에 대한 항체를 전개할 수 있는 환자에서 전체 평균 항-hCG 적정은 CTP16 에피토프에 대한 반응만을 전개할 수 있는 환자의 그것과 비교하여 중요한 차이는 없었다(표 1). 그러나, 평균 생존 시간은 단일 에피토프 군에 비교된 2 중 에피토프 반응자 군에서 거의 2 배 길었다. 이 결과는 β hCG 에 대한 면역반응의 정성적 성질은 백신 효험 결정에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 나타낼 뿐만 아니라, 결과는 β 에 대한 항체 반응이 환자 생존과 직접 연관된다는 가설을 뒷받침한다.

실시예 2실시예 2

CTP37 로 면역화된 래빗 및 CTP16 및 CTP21 에 대한 면역 반응을 측정했다. 비교면역분석법은 사람의 경우와 유사하게, CTP16 이 래빗에서 면역지배적이라는 것을 나타내면서 CPT21 에 대한 면역 반응에 비하여 CTP16 에 대한 더욱 활발한 면역반응을 검출했다.

래빗을 hCG " 루프" 펩티드 단독으로 면역화하는 경우, 경쟁분석법에서 CTP21 에 대한 어떤 반응도 검출되지 않은 반면에, CTP16 에 대한 면역반응이 검출되었고, 래빗을 CTP37 및 루프 펩티드로 면역화하는 경우에, CTP16 및 CTP21 모두에 대한 면역반응이 경쟁 분석법에서 검출했다. 하기의 CTP37 및 hCG " 루프" 펩티드 백신의 조합 투여의 경우에, CTP16 에 대한 면역 반응은 면역지배적임을 나타내지 않았다.

표 3. 에피트프 맵핑 및 생물학적 중성화[1]

~에 대한 항혈청	래빗 #	펩티드 경쟁자		생물학적 중성화	
		CTP21	CTP16	MUT	주용체
CTP37	4162	+	++	+++	-
	4164	++	+	++	+
	77 M	-	+	-	-
	63 H	-	++	-	N.D.[3]
	3989	-	+++	유리한 효과[2]	N.D.
루프	4157	-	++	+++	++
	4160	-	+++	+++	++
조합 루프+ CTP37	4165	++	+	+	N.D.
	4166	++	+	+++	N.D.
	4169	+	++	++	N.D.
	4173	++	+	++	N.D.

[1] + = ED 50 > 1000 ng; + + = ED 50 < 250 ng; + + + = ED 50 < 10 ng
[2] 유리한 효과 = 무 항혈청 대조군보다 더 큰 hCG 반응
[3] N.D.= 무작용

CTP37 펩티드 백신 및 hCG " 루프" 백신의 조합 투여에 대한 이러한 면역화 연구의 결과는 CTP37 및 " 루프" 펩티드의 공동투여는 " 루프" 펩티드가 CTP37 단독 투여보다 hCG - CPT16 및 hCG - CTP21 에 대한 더욱 균형잡힌 면역반응을 초래하는 추가 백신으로 효과적이라는 것을 제안하면서, CTP21 에 대한 개선된 면역반응 및 CTP16 및 CTP21 모두에 대한 유사한 정도의 면역반응을 초래한다는 것을 제시한다.

표 4. 서열 목록

개시	SEQ ID NO	도
유전자 은행 기탁번호 180437로 얻은 hCG β 서브유닛	1	1
hCG-CTP37 펩티드: TCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (hCG β 서브유닛의 잔기 109-145)	2	2A
hCG-CTP38 펩티드: MTCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (hCG β 서브유닛의 잔기 109-145+N-말단 met)	3	2B
N-말단 에피토프, CTP21: CDDPRFQDSSSSKAPPPSLPS (hCG β 서브유닛 CTP의 잔기 110-130)	4	2C
CTP21을 가진 에피토프: DDPRFQDS (hCG β 서브유닛의 잔기 111-118에 해당하는 8량체 펩티드)	5	2D
C-말단 에피토프, CTP16: SPSRLPGPSDTPILPQ (hCG β 서브유닛 CTP의 잔기 130-145)	6	2E
첨가된 N-말단 C를 가지는 C-말단 에피토프, CTP-17: CSPSRLPGPSDTPILP	7	2F
CTP16/CTP17내의 에피토프: RLPGPSDTPILP (hCG β 서브유닛의 잔기 133-145에 해당)	8	2G
hCG β 서브유닛 루프 펩티드 CTP MTR VLQ GVL PAL PQV VC (잔기 38과 57사이에 S-S 결합을 가지는 β 서브유닛의 잔기 38-57)	9	2H

(57) 청구의 범위

청구항 1.

hCG-CTP37의 21량체 N-말단 단편(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 사람 환자에의 주입에 적합한 형태로 용액에 포함된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, hCG-CTP37의 16량체 C-말단 단편(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합되고, 사람 환자에의 주입에 적합한 용액에 포함된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 정맥내로 투여되는 경우에 충실성 종양에서 리포좀의 격리를 허용하도록 리포좀의 혈류 순환 시간을 충분히 연장하기에 효과적인 폴리에틸렌글리콜로 코팅된 리포좀에 트랩된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 5.

대상에 제 1 항의 항체의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 대상에서 암을 치료하는 방법.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 16량체 C-말단 단편(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 5 항에 있어서, 상기 투여단계는 적어도 4 내지 6 주의 기간동안 주마다 1 내지 2 회 반복되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 5 항에 있어서, 상기 투여단계는 약 25 내지 500 mg 의 항체 투여량을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 5 항에 있어서, 적당한 담체 단백질로 유도된 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2)로 구성된 백신을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 9 항에 있어서, 적당한 담체 단백질로 유도된 hCG "루프" 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성된 백신을 대상에 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

(a) 최초 백신접종 후 9-15 주 사이의 기간 후에, hCG-CTP16(SEQ ID NO:6), 및 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4) 각각에 대한 환자의 제1 및 제2항체의 수준을 측정하는 단계

(b) 환자의 측정된 제2항체의 수준이 검출가능하지 않거나 실질적으로 제1 항체의 수준보다 낮은 경우에,

(i) 최초 투여로 제공된 것보다 더 많은 투여량으로 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(ii) 1mg 미만의 CTP37 펩티드/환자/투여에 해당하는 투여량으로 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(iii) hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신과 조합하여 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(iv) 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여에 이어서, 1mg 미만의 CTP37 펩티드/환자/투여에 해당하는 백신 투여량으로 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(v) 적당한 담체 단백질로 유도된 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)로 구성되는 CTP37 N-말단 펩티드 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(vi) 1 내지 2 주마다 적어도 1 회 투여량으로 제 1 항의 항체의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(vii) 1 내지 2 주마다 적어도 1 회 투여량으로 제 3 항의 항체의 연속적인, 간격을 둔 투여; 및

(viii) hCG-CTP37의 21량체 N-말단 단편(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합하여 hCG-CTP37 백신(SEQ ID NO:2)의 연속적인, 간격을 둔 투여로 구성되는 군에서 선택된 하나 이상의 백신접종 섭생법에 의해 환자를 더 치료하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 적어도 1mg hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 펩티드/투여의 투여량으로 적당한 담체 분자로 유도된 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2)로 구성되는 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여에 의해 환자의 상태가 무시할 수 있는 정도의 개선으로 증명된 경우와 같이 백신에 반응하지 못하는 환자군에 특이적인 개선을 가지는 암 환자를 치료하는 방법.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 더이상의 백신접종은 섭생법(i)에 따르는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제 11 항에 있어서, 더이상의 백신접종은 섭생법(ii)에 따르는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제 11 항에 있어서, 더이상의 백신접종은 섭생법(iii)에 따르는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 11 항에 있어서, 더이상의 백신접종은 섭생법(iv)에 따르는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 11 항에 있어서, 더이상의 백신접종은 섭생법(v)에 따르는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 11 항에 있어서, 더이상의 백신접종은 섭생법(vi)에 따르는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 11 항에 있어서, 더이상의 백신접종은 섭생법(vii)에 따르는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제 11 항에 있어서, 더이상의 백신접종은 섭생법(viii)에 따르는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

(a) hCG-CTP16(SEQ ID NO:6), hCG-CTP21(SEQ ID NO:4), 및 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2)각각에 대하여 제1, 제2 및 총 환자 hCG 항체의 수준을 측정하는 단계, 및

(b) 제1 및 제2항체의 측정된 수준에 기초하여

(i) 제1 또는 제2항체, 또는 총 항-hCG-CTP37 항체의 어떤 것도 검출되지 않은 환자(항체 비반응자);

(ii) 제1 또는 제2항체가 검출되지 않은 반면에 총 항-hCG-CTP37 항체가 검출된 환자(약한 항체 반응자);

(iii) 제1항체의 검출가능한 수준을 가지지만, 제2 항체의 비검출가능한 수준을 가지는 환자(CTP16 항체에 대해서만 반응자); 및

(iv) 제1 및 제2항체 모두의 검출가능한 수준을 가지는 환자(CTP16 및 CTP21 항체 반응자)의 군 중 하나로 환자를 분류하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는

hCG 에 대한 면역 반응을 분류하는 방법.

청구항 21.

제 20 항에 있어서, 상기 측정을 hCG 면역원성 펩티드 또는 항-hCG 단일클론 항체와 함께 백신접종 후에 9-15 주 사이의 기간 후에 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제 20 항에 있어서,

(i) 최초 투여로 제공된 것보다 더 많은 투여량으로 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(ii) 1.0mg 미만의 CTP37 펩티드/환자/투여에 해당하는 투여량으로 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(iii) hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신과 조합하여 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(iv) 적당한 담체로 유도된 hCG 루프 펩티드(SEQ ID NO:9)로 구성되는 프로모터 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여에 이어서, 1mg 미만의 hCG-CTP37 펩티드/환자/투여에 해당하는 백신 투여량으로 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2) 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(v) 적당한 담체 단백질로 유도된 hCG-CTP21(SEQ ID NO:4)로 구성되는 CTP37 N-말단 펩티드 백신의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(vi) 1 내지 2 주마다 적어도 1 회 투여량으로 제 1 항의 항체의 연속적인, 간격을 둔 투여;

(vii) 1 내지 2 주마다 적어도 1 회 투여량으로 제 3 항의 항체의 연속적인, 간격을 둔 투여; 및

(viii) hCG-CTP37의 21량체 N-말단 단편(SEQ ID NO:4)과 특이적으로 면역반응하는 사람의 단일클론 항체와 조합하여 hCG-CTP37 백신(SEQ ID NO:2)의 연속적인, 간격을 둔 투여로 구성되는 군으로부터 선택된 백신접종 섭생법으로 환자를 더 치료함으로써 군(i)-(iii) 환자의 치료 효험 가능성 향상에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

(a) hCG-CTP37의 16량체 C-말단 단편(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6);

(b) hCG-CTP37의 21량체 N-말단 단편(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4);

(c) hCG-CTP37 펩티드(SEQ ID NO:2); 및

(d) 검출가능한 리포터를 가진 단편 (a), (b), (c)와 면역반응하는 사람 항체를 표지하는 시약 수단을 포함하는 것을 특징으로 하는 hCG 에 대한 면역 반응을 모니터하는 진단 장치.

청구항 24.

제 23 항에 있어서, 단편 (a), (b) 및 (c)가 부착된 고체상 기질을 더 포함하고, 상기 시약 수단은 리포터-표지 항-사람 면역글로블린 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 25.

(a) 체액 샘플을 그것에 결합된 고체상 시약, hCG-CTP37의 16량체 C-말단 단편(hCG-CTP16, SEQ ID NO:6), 21량체 N-말단 단편(hCG-CTP21, SEQ ID NO:4), 및 hCG-CTP37(SEQ ID NO:2)과, 상기의 3 펩티드와 특이적으로 면역반응하는 리포터 표지된 항체의 존재하에서, 반응시키는 단계; 및

(b) 고체 지지체에 결합된 리포터-표지 항체의 양으로부터 3 개의 체액 항체의 수준을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 hCG 에 대한 면역 반응을 모니터하는 방법.

도면

도면 1

```
1   MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT
61  MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC
121 GGPKDHPLTC DDPRFQDSSS SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ
```

도면 2

TCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

도 2a

MTCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

도 2b

CDDPRFQDSSSSKAPPPSLPS

도 2c

DDPRFQDS

도 2d

SPSRLPGPSDTPILPQ

도 2e

CSPSRLPGPSDTPILP

도 2f

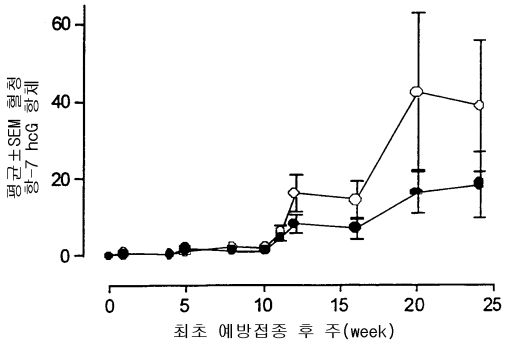
RLPGPSDTPILP

도 2g

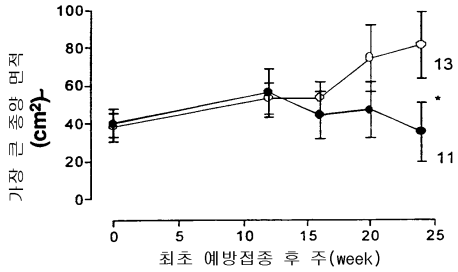
CTPMTRVLQGVLPALPQVVC

도 2h

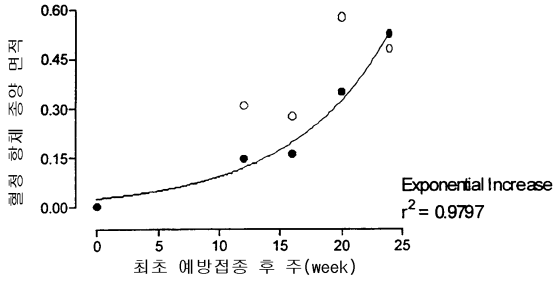
도면 3



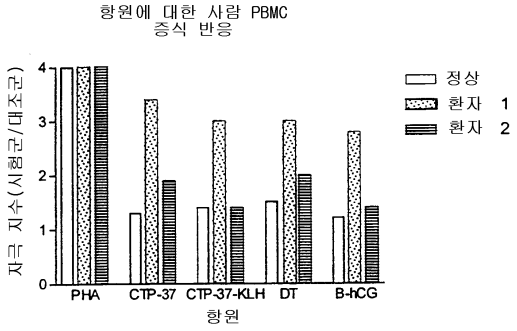
도면 4



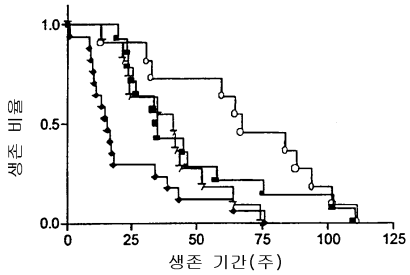
도면 5



도면 6



도면 7



<110> AVI BioPharma, Inc.
<120> Combined Approach to Treatment of Cancer with hCG Vaccines
<130> 0450-0027.41
<140> PCT/US00/13392
<141> 2000-05-15
<150> US 60/134,419
<151> 1999-05-17
<150> US 60/134,432
<151> 1999-05-17
<160> 9
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 165
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

```
Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
  1               5                  10                  15
Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile
             20                  25                  30
Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
         35                  40                  45
Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val
     50                  55                  60
Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg
 65                  70                  75                  80
Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val
                 85                  90                  95
Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu
            100                 105                 110
Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
        115                 120                 125
Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
    130                 135                 140
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
145                 150                 155                 160
Pro Ile Leu Pro Gln
                165
```

<210> 2

<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
1 5 10 15
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
20 25 30
Pro Ile Leu Pro Gln
35
<210> 3
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-terminal peptide of hCG with N-terminal methionine
<400> 3
Met Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala
1 5 10 15
Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
20 25 30
Thr Pro Ile Leu Pro Gln
35
<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro
1 5 10 15
Pro Ser Leu Pro Ser
20
<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser
1 5
<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
1 5 10 15
<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> residues 150-165 of beta subunit of hCG with added N-terminal C
<400> 7
Cys Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 1   5   10   15
Gln
<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 1   5   10
<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9
Cys Pro Thr Met Thr Arg Val Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro
 1   5   10   15
Gln Val Val Cys
            20