(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0070328
(43) 공개일자 2022년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 14/74* (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7015914(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년03월24일
심사청구일자 2022년05월11일
(62) 원출원 특허 10-2017-7027590
원출원일자(국제) 2016년03월24일
심사청구일자 2021년03월22일
(85) 번역문제출일자 2022년05월11일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/056601
(87) 국제공개번호 WO 2016/156230
국제공개일자 2016년10월06일
(30) 우선권주장
1505585.8 2015년03월31일 영국(GB)
62/140,767 2015년03월31일 미국(US)

(71) 출원인
이매틱스 바이오테크놀로지스 게엠베하
독일 72076 투빈겐 파울-울리흐-스트라쎄 15
(72) 발명자
마르 안드레아
독일 72076 튀빙겐 키르쉔베크 22
바인셍크 토니
독일 아이흐발트 73773 임 모르겐라인 15
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

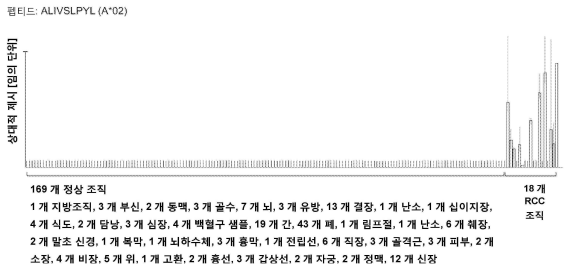
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **신세포암종(RCC) 및 기타 암에 대한 면역요법에 사용하기 위한 펩티드 및 펩티드와 골격의 조합**

(57) 요 약

본 발명은 면역요법 방법에서의 사용을 위한 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단독 또는 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 역할 가능한 기타 종양 연관 펩티드들과 병용하여 항종양 면역 반응을 촉진하거나 세포를 생체외 촉진하여 환자로 이전하기 위한 종양 연관 T 세포 에피토프에 관한 것이다. 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 그러한 펩티드는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적일 수도 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A61K 39/0011 (2021.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/4748 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
C12N 5/0638 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
(72) 발명자
슈르 올리버
독일 72074 튀빙겐 아이호할덴스트라쎄 19
프리췌 옌스
독일 72144 듀쓸링겐 래르헨베크 11
싱 하르프레트
미국 텍사스주 77005 휴스턴 모닝사이드 드라이브 5122 아파트먼트 525
송 콜레테
독일 73760 오스트필데른 빌리-바우마이스터-베크 21

명 세 서

청구범위

청구항 1

최대 16개의 아미노산 길이를 갖고 서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩티드가 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II 분자에 결합하는 능력을 갖고, 상기 펩티드가 상기 MHC에 결합될 때 CD4 및/또는 CD8 T 세포에 의해 인식될 수 있는, 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 펩티드가 서열번호 38, 1 내지 37 및 39 내지 114 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열로 구성되는, 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 펩티드가 변형되고/되거나 비-펩티드 결합을 포함하는, 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 및 HLA-DR 항원-연관 불변쇄(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 펩티드 또는 펩티드-MHC 복합체 내에 포함된 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 펩티드를 특이적으로 인식하는 결합 분자.

청구항 7

제6항에 있어서, 결합 분자가:

(i) 가용성 또는 막-결합된, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이거나;

(ii) HLA 리간드와 반응성인, 가용성 또는 막-결합된, T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 항원 결합 단편이고,

여기서 상기 리간드가 상기 펩티드 또는 펩티드-MHC 복합체 내에 포함된 상기 펩티드인, 결합 분자.

청구항 8

제7항에 있어서, 결합 분자가:

(i) 단클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 이중특이성 항체 및/또는 키메라 항체, 또는 이들의 항원 결합 단편이고/이거나;

(ii) 추가의 효과기 기능, 면역 자극 도메인 또는 면역 자극 독소를 갖는 항체 또는 가용성 TCR인, 결합 분자.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 상기 펩티드를 특이적으로 인식하는 결합 분자를 인코딩하는 핵산.

청구항 10

제9항에 있어서, 이종 프로모터 서열에 연계된, 핵산.

청구항 11

제9항에 따른 핵산 또는 이종 프로모터 서열에 연계된 제9항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 상기 펩티드를 특이적으로 인식하는 결합 분자, 상기 펩티드를 인코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 숙주 세포가 (i) 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포, (ii) T 세포, 또는 (iii) NK 세포로부터 선택되는, 재조합 숙주 세포.

청구항 14

활성화 T 림프구를 생성하기 위한 시험관 내 방법으로서, T 세포를 적합한 항원-제시 세포 또는 항원-제시 세포를 모방하는 인공 구축물의 표면에서 발현된 항원-로딩된 인간 MHC 클래스 I 또는 II 분자와, 상기 T 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화하는데 충분한 시간 동안 시험관 내에서 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 항원이 하기 i) 내지 iii)중 어느 하나인 펩티드인, 방법:

i) 최대 16개의 아미노산 길이를 갖고 서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 펩티드;

ii) i)에 따른 펩티드로서, 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II 분자에 결합하는 능력을 갖고, MHC에 결합될 때 CD4 및/또는 CD8 T 세포에 의해 인식될 수 있는 펩티드; 및

iii) i)에 따른 펩티드로서, 변형되고/되거나 비-펩티드 결합을 포함하는 펩티드.

청구항 15

서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제14항에 따른 방법에 의해 수득가능한, 활성화 T 림프구.

청구항 16

서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제14항에 따른 방법에 의해 수득가능한, 활성화 세포독성 T 림프구(CTL).

청구항 17

제15항 또는 제16항에 따른 활성화 T 림프구를 포함하는 치료적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 보조제(adjuvant)를 추가로 포함하는, 치료적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 보조제가 IL-2 및 IL-15 중 적어도 하나인 인터류킨인, 치료적 조성물.

청구항 20

환자의 표적 세포를 사멸시키는 활성화 T 림프구의 집단을 포함하는, 암에 걸린 환자를 치료하거나 또는 환자가 암으로 고통받는 것을 예방하기 위한 조성물로서, 상기 표적 세포가 하기 i) 내지 iii)중 어느 하나인 펩티드 펩티드를 제시하는, 조성물:

i) 최대 16개의 아미노산 길이를 갖고 서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로

부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 펩티드;

ii) i)에 따른 펩티드로서, 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II 분자에 결합하는 능력을 갖고, MHC에 결합될 때 CD4 및/또는 CD8 T 세포에 의해 인식될 수 있는 펩티드; 및

iii) i)에 따른 펩티드로서, 변형되고/되거나 비-펩티드 결합을 포함하는 펩티드.

청구항 21

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 활성화 T 림프구가:

(a) 환자의 자가 조직이거나;

(b) 건강한 공여자로부터 수득되거나;

(c) 자가 종양 침윤 림프구로부터 유래하거나; 또는

(d) 말초 혈액 단핵 세포로부터 유래하는, 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 활성화 T 세포가 시험관 내에서 확장된 것인, 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염; 상기 펩티드 및 HLA-DR 항원-연관 불변쇄(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질; 상기 펩티드를 특이적으로 인식하는 결합 분자; 상기 펩티드 또는 상기 결합 분자를 인코딩하는 핵산; 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터; 상기 펩티드, 상기 결합 분자, 상기 핵산 또는 상기 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포; 서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제14항에 따른 방법에 의해 수득가능한 활성화 T 림프구; 및 서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제14항에 따른 방법에 의해 수득가능한 활성화 CTL로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 활성 성분을 포함하는, 암의 치료, 예방 및/또는 진단을 위한 약학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 암이 폐암, 뇌암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 흑색종, 난소암, 식도암, 및 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드의 과다-제시(over-presentation)를 나타내는 기타 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 25

다음 단계를 포함하는, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 상기 펩티드를 특이적으로 인식하는 결합 분자를 생산하기 위한 방법:

(i) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 상기 펩티드를 특이적으로 인식하는 결합 분자, 또는 상기 펩티드 또는 상기 결합 분자를 인코딩하는 핵산을 포함하거나, 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터를 보유하는, 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

(ii) 상기 숙주 세포 및/또는 이의 배양 배지로부터 상기 펩티드 또는 결합 분자를 단리하는 단계.

청구항 26

a) 서열번호 38, 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염;

b) a)에 따른 펩티드 및/또는 펩티드-MHC 복합체와 반응성인 T 세포 수용체;

c) a)에 따른 펩티드, 및 HLA-DR 항원-연관 불변쇄(Ii)의 N-말단 아미노산 1 내지 80을 포함하는 융합 단백질;

d) a) 내지 c) 중 어느 하나를 인코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터;

e) d)의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포;

f) T 세포를 적합한 항원-제시 세포의 표면에 발현된 a)에 따른 펩티드와, 상기 T 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화하는데 충분한 시간 동안 시험관 내에서 접촉시키는 것을 포함하는 방법, 및 이러한 활성화 T 세포를 자가 조직 또는 다른 환자에게 이전하는 방법에 의해 수득되는, 활성화 T-림프구;

g) a)에 따른 펩티드 및/또는 펩티드-MHC 복합체, 및/또는 a)에 따른 펩티드를 제시하는 세포에 대해 반응성이고, 예를 들어 면역-활성화 도메인 또는 독소와의 융합에 의해 잠재적으로 변형되는, 항체 또는 가용성 T 세포 수용체; 및

h) a) 내지 g) 중 어느 하나에 따른 접합된 또는 표지된 펩티드 또는 골격으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성 성분, 및

약학적으로 허용가능한 담체 및 약학적으로 허용가능한 부형제 중 적어도 하나를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 약학적 조성물이:

(i) 보조제를 추가로 포함하고/하거나;

(ii) 백신 또는 세포 치료적 조성물인, 약학적 조성물.

청구항 28

용액 또는 동결건조 형태로, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염; 상기 펩티드 및 HLA-DR 항원-연관 불변쇄(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질; 상기 펩티드를 특이적으로 인식하는 결합 분자; 상기 펩티드 또는 상기 결합 분자를 인코딩하는 핵산; 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터; 상기 펩티드, 상기 결합 분자, 상기 핵산 또는 상기 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포; 서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제14항에 따른 방법에 의해 수득가능한 활성화 T 림프구; 및 서열번호 38, 및 서열번호 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제14항에 따른 방법에 의해 수득가능한 활성화 CTL로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 활성 성분을 포함하는 약학적 조성물을 포함하는 용기를 포함하는 키트.

청구항 29

제28항에 있어서, 다음 중 적어도 하나를 추가로 포함하는, 키트:

(i) 희석제 또는 동결건조 제형을 위한 재구성 용액을 함유하는 제2 용기;

(ii) 서열번호 1 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 펩티드; 및

(iii) 완충제, 희석제, 필터, 주사바늘, 주사기, 또는 보조제 중 하나 이상.

청구항 30

개별 환자를 위한 개인화 항암 백신 또는 화합물-기반 또는 세포 치료제를 생산하는 방법으로서,

a) 상기 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양 연관 펩티드(TUMAP)를 동정하는 단계;

b) a)에서 동정된 펩티드를 정상 조직과 비교하여 종양에서의 면역원성 및/또는 과다-제시에 대해 사전-선별된 펩티드의 창고(warehouse)와 비교하는 단계;

c) 환자의 샘플에서 동정된 TUMAP와 일치하는 펩티드를 상기 창고로부터 선택하는 단계; 및

d) 단계 c)에 근거하여 개인화 백신 또는 화합물-기반 또는 세포 치료제를 제형화하는 단계를 포함하고,

여기서 상기 창고가 서열번호 38, 1 내지 37 및 39 내지 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 가지는 펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, (1) 내지 (4)로 이루어진 다음 군으로부터 선택되는 하나 이상의 수단을 포함하는, 방법:

(1) 상기 TUMAP가:

(a1) 종양 샘플로부터의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플로부터의 발현 데이터와 비교하여 종양 샘플에서 과다-발현되거나 이상 발현된 단백질을 동정하고;

(a2) 발현 데이터와 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과의 상관관계를 결정하여 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 동정함으로써 식별됨;

(2) MHC 리간드의 서열이 종양 샘플로부터 단리된 MHC 분자로부터 결합된 펩티드를 용출시키고, 용출된 리간드를 서열결정함으로써 동정됨;

(3) 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직이 동일한 환자의 조직으로부터 수득됨; 및

(4) 창고에 포함된 펩티드의 면역원성이 시험관 내 면역원성 검정, 개별 HLA 결합에 대한 환자 면역모니터링, MHC 멀티머 염색, ELISPOT 검정 및/또는 세포내 시토카인 염색을 포함하는 방법에 의해 결정됨.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 개별 환자로부터의 정상의 상응하는 조직에 대해, 종양 샘플에 고유한 적어도 하나의 돌연변이를 동정하고, 상기 돌연변이와 상관관계가 있는 펩티드를 백신에 포함시키거나 세포 요법의 생성을 위해 선택하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 적어도 하나의 돌연변이가 전체 게놈 서열결정에 의해 동정되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 면역요법에 사용되는 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 종양 연관 T 세포 에피토프를 단독으로 또는 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 역할 가능한 기타 종양 연관 펩티드들과 병용하여 항종양 면역 반응을 촉진하거나 T 세포를 생체외 자극하여 환자에게 이전하는 것과 관련된다. 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 그러한 펩티드는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적일 수도 있다.

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

배 경 기 술

[0003] 신장암은 여성보다 남성에서 더 흔하며 2012년 기준 세계적으로 남성에서는 9번째(214,000건), 여성에서는 14번째(124,000건)로 가장 흔한 암이다. 신규 건수의 70%는 인간 개발 수준이 높거나 매우 높은 국가에서 발생했으며, 이 중 34%의 신규 건수는 유럽에서, 19%는 북미에서 각각 발생한 것으로 추정된다. 2012년에 신장암에 의한 사망은 143,000건으로 추정되며(남성 91,000건, 여성 52,000건), 신장암은 세계적으로 16번째로 가장 높은 암의 사망 원인이다.

[0004] 가장 높은 발생률은 체코공화국에서 나타났다. 높은 발생률은 동부 유럽, 북미 및 호주에서도 나타났다. 아프리카와 동부 아시아의 대부분에서는 발생률이 낮은 것으로 추정된다. 치사율은 개발도가 아주 낮거나 중간 정도인 국가(전체 사망률 대 발생률 비율, 0.5)에서보다 개발도가 높은 국가(0.4)에서 더 낮다. 사례의 3.1%만이 아프리카에서 진단되었으며 사망의 5.7%가 이 지역에서 발생했다. 발생률과 사망률은 인간 개발의 여러 수준에 걸쳐 많은 국가에서 증가하고 있다(World Cancer Report, 2014).

[0005] 대부분의 신장암은 신세포 암종(RCC)이며, 이것은 신장 실질 내부의 상이한 세포 유형으로부터 발생한 이질성 종양 등급이다. 대부분은 투명 세포 신장 암종이며(신장암 사례의 약 70%), 그 다음으로 유두형(10 내지 15%),

혐색소형(약 5%) 그리고 집합관(<1%) 신세포 암종의 순서이다. 이러한 신세포 종양 아형마다 뚜렷한 유전적 특성이 있다(Moch, 2013; 세계 보건기구 종양의 분류, 2004).

[0006] 신세포 암종(RCC)의 특징은 조기 경고 징후의 결여, 다양한 임상적 소견 및 방사선과 화학요법에 대한 내성이다. RCC 환자의 총 25 내지 30%에서 초기에 현성 전이가 나타난다(Hofmann et al., 2005). RCC 환자의 약 3분의 1은 시간에 따라 전이성 질병으로 발전한다. 그리하여 모든 RCC 환자의 거의 50 내지 60%는 결국 전이성 질병을 제시하게 된다(Bleumer et al., 2003; Hofmann et al., 2005). 전이성 질병 환자 가운데, 약 75%는 폐 전이, 36%는 림프절 및/또는 연조직 침윤, 20%는 골 침윤 그리고 18%는 간 침윤을 경험한다(Sachdeva et al., 2010).

[0007] 전이성 질병이 있으며 사이토카인 기반 일차 전신 요법을 받는 RCC 환자는 5가지 예후 인자를 근거로 생존 예측의 위험군으로 분류할 수 있다(Motzer et al., 2004). 보다 짧은 생존 기간과 연관된 치료 전 특징은 낮은 카르노프스키 수행 상태(<80%), 높은 혈청 유산 탈수소효소(>1.5 ULN), 낮은 헤모글로빈(<LLN), 높은 보정 혈청 칼슘(>10 mg/dL), 그리고 진단 후 치료까지의 시간(<1년)이었다. 이러한 위험 요인에 근거하여, 환자를 3가지 위험군으로 분류했다. 위험 인자가 0(호의적인 위험)인 환자의 18%에서 사망까지의 시간의 중간값은 36개월이었다. 환자의 62%에서는 1가지 또는 2가지의 위험 요인(중간 위험)이 있었으며 이 군의 중간 생존 시간은 14개월이었다. 3가지 이상의 요인(불량한 위험)을 가진 환자는 환자의 20%를 구성했으며 생존 시간의 중간값은 5개월이었다. 이러한 MSKCC 위험군 분류의 적용은 진행성 RCC에 대한 임상 시험에서 널리 적용되고 있다. 위험 분류는 임상 시험의 결과 및 요법 지시에 대한 계획과 해석을 위해 사용할 수 있다.

[0008] RCC의 위험 인자는 흡연과 비만이다. 여러 메타 분석을 통해 일체의 흡연은 절대 흡연한 적이 없음과 비교해서 신장암의 위험을 증가시키는 것이 확인되었다(Cho et al., 2011; Hunt et al., 2005). 또한 1일 담배 개비 수와 관련된 용량 의존 위험 증가도 있다. 위험은 흡연 중단 후 5년의 기간이 지나면 감소된다. 과체중, 특히 비만은 남녀 모두에서 신장암의 위험 인자이다(Ljungberg et al., 2011). 과체중과 비만으로부터 기인하는 모든 신장암 사례의 비율은 미국에서 약 40% 그리고 유럽 국가에서 최대 40%로 추정되었다(Renehan et al., 2008; Renehan et al., 2010). 비만이 신장암 발생에 영향을 미치는 기전은 분명하지 않다. 성 스테로이드 호르몬은 직접적인 내분비 수용체 매개 영향에 의해 신세포 증식에 영향을 미칠 수 있다. 성 호르몬 결합 글로불린 및 프로게스테론의 감소된 수준, 인슐린 내성 그리고 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 같은 성장 인자의 증가된 수준 등의 내분비 질환과 합쳐진 비만이 신장암 발생에 기여할 수 있다. 최근에 환자 대조군 시험을 통해 투명 세포 암종과 비만과의 더 강력한 연관성이 보고되었다(World Cancer Report, 2014).

[0009] 초기 치료는 가장 흔하게는 영향받은 신장의 일부 또는 전부를 제거하는 방법이며 근치 치료의 중심이 되는 치료법이다(Rini et al., 2008). 예후 점수가 불량한 환자의 일차 치료를 위해, 몇몇 암 조직 및 협회에 의해 정교하게 만들어진 지침은 수용체인 티로신 키나제 억제제(TKI) 수니티닙(Sutent®)과 파조파닙(Votrient®), 단클로성 항체인 베바시주밥(Avastin®)과 인터페론-알파(IFN-α)의 병용 그리고 mTOR 억제제인 템시롤리무스(Torisel®)를 추천한다. 미국의 NCCN은 물론 유럽의 EAU 및 ESMO에 의해 정교하게 만들어진 지침에 따르면, 이전의 시토카인(IFN-α, IL-2) 요법이 실패한 RCC 환자에서 TKI인 소라페닙, 파조파닙 또는 최근의 악시티닙을 이전 요법으로 추천하고 있다. NCCN 지침은 또한 이러한 환경에서 수니티닙을 조언한다(NCCN 카테고리 I에 따르면 높은 수준의 증거).

[0010] 에베롤리무스 및 엑시티닙은 확립된 지침에 따라 VEGF 표적 요법 및 TKI로부터 혜택을 받지 못한 환자를 위한 2차 요법으로 권장된다.

[0011] RCC의 알려진 면역원성은 진행성 RCC에서 면역요법과 암 백신의 사용을 지지하는 기반을 제시한 바 있다.

[0012] 림프구 PD-1 발현 및 RCC 진행 단계, 등급 및 예후 사이의 흥미로운 상관관계는 물론 RCC 종양 세포에 의한 선택적 PD-L1 발현 및 이의 악화된 임상적 결과와의 관련 가능성 모두 RCC의 치료를 위해 새로운 항 PD-1/PD-L1 제제의 단일 사용 또는 항혈관형성 약물이나 다른 면역요법 접근 방식과의 병용 요법 개발로 이끌었다(Massari et al., 2015).

[0013] TRIST라고 부르는 진행 RCC의 제III상 암 백신 시험에서는, 치유 요법의 일선 표준에 추가된 TroVax(종양 관련 항원인, 5T4 및 마마 바이러스 벡터)가 국소적으로 진행된 또는 mRCC 환자의 생존율을 연장시키는지 평가한다. 이 연구에 남아있는 399명(54%)의 환자군에서 중간 생존율에 도달하지 않았으나, 그 데이터의 분석은 TroVax가 면역학적으로 활성이 있으며 또한 5T4-특이적 항체 반응의 강도와 생존율 개선 사이의 상관관계가 존재함을 보여주는 이전의 임상적 결과를 확인한다. 또한 RCC에서 과발현된 에피토프를 사용하는 펩티드 백신을 찾는 몇몇

연구가 있다.

[0014] 종양 백신의 다양한 접근 방식에 대한 조사가 이루어진 바 있다. RCC 환자를 대상으로 종양 세포 용해질, 수지상 세포와 종양 세포의 융합 또는 전체 종양 RNA를 포함하는 전체 종양 접근 방식을 사용하는 연구가 수행되었으며, 이러한 시험의 일부에서 종양 병변의 완화가 보고되었다(Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001).

[0015] 지난 수년 동안 RCC에서 발현되고 항원 특이적 CTL에 의해 인식된 몇몇 인간 TAA가 발현 클로닝, 역면역학 접근 방식 또는 DNA 마이크로어레이 기술의 적용에 의해 정의되고 규명되었다(Dannenmann et al., 2013; Michael and Pandha, 2003; Minami et al., 2014; Renkvist et al., 2001; Wierecky et al., 2006).

[0016] 암 치료와 연관된 중증의 부작용과 비용을 비교하면, 일반적인 암 그리고 특히 RCC의 치료에서 사용가능한 요인들을 파악할 필요가 있다. 또한 일반적인 암 그리고 특히 RCC에 대한 암의 보다 나은 진찰과 예후의 평가 및 치료 성공의 예측을 초래하는 바이오마커를 나타내는 요인들을 파악할 필요도 있다.

[0017] 암의 면역요법이란 부작용은 최소화하면서 암 세포에 특이적으로 표적화하는 옵션을 나타낸다. 암 면역요법에서는 종양 연관 항원을 이용한다.

[0018] 종양 관련 항원(TAA)의 현재 분류는 다음과 같은 주요 그룹을 포함한다:

[0019] a) 암-고환 항원: 이미 확인되어 T 세포에 의해 인식된 첫 번째 TAA는 이 종류에 속하며, 이는 그 멤버들의 발현이 조직학적으로 인간 종양과 다르며, 정상 조직 중, 고환의 정모 세포/정원 세포에만 있으며, 때로는 태반에 있기 때문에 최초에 암-고환(CT) 항원이라고 불렸다. 고환 세포가 클래스 I 또는 II HLA 분자를 발현하지 않기 때문에, 이 항원들은 정상 세포에 있는 T 세포에 의해 인식될 수 없으며 면역학적으로 종양-특이적이라고 간주될 수 있다. CT 항원의 잘 알려진 예로는 MAGE 구성원 및 NY-ESO-1이 있다.

[0020] b) 분화 항원: 이러한 TAA는 종양 그리고 종양이 발생한 정상 세포 사이에 공유된다. 대부분의 알려진 분화 항원은 흑색종과 정상 멜라닌 세포에서 발견된다. 이러한 많은 멜라닌 세포 계통-관련 단백질은 멜라닌의 생합성과 관련되어 있으며 그러므로 종양 특이적은 아니지만 암 면역치료에 널리 사용된다. 예로는, 흑색종을 위한 티로시나아제 및 Melan-A/MART-1 또는 전립선암을 위한 PSA가 있고 이에 국한되지 않는다.

[0021] c) 과발현된 TAA: 일반적으로 낮은 발현 수준이 있는 많은 정상 조직뿐만 아니라 조직학적으로 다른 유형의 종양에서 유전자 인코딩에서 널리 발현된 TAA가 발견된다. 정상 조직에 의해 처리되고 잠재적으로 제시되는 많은 에피토프가 T 세포 인식의 임계치 수준보다 낮을 수 있고, T 세포의 종양 세포에서의 과발현은 이전에 확립된 내성을 중단시켜 항암 반응을 개시할 수 있다. 이 클래스 TAA의 유력한 예로는 Her-2/neu, 서바이빈, 텔로머라제 또는 WT1가 있다

[0022] d) 종양 특이적 항원: 이러한 독특한 TAA는 정상 유전자의 변이로써 발생한다(β-카테닌, CDK4 등). 이러한 분자 변경의 일부는 종양 변이 및/또는 진행과 관련되어 있다. 종양 특이적 항원은 일반적으로 강한 면역 반응을 정상 조직에 대한 자가 면역 반응 위험성 없이 유도할 수 있다. 반면에, 대부분의 경우 TAA는 발견되어 일반적으로 많은 개별 종양에서 대개 공유되지 않은 해당 종양에만 적절하다. 종양 특이적(연관된) 아형을 갖는 단백질의 경우 펩티드가 종양(관련) 엑손으로부터 비롯된다면 펩티드의 종양-특이성(또는 연관성) 또한 발생할 수 있다.

[0023] e) 비정상 번역 후 변형에서 발생하는 TAA: 이러한 TAA는 특이적이 아니고 과발현되지도 않는 단백질에서 발생할 수 있지만 종양에서 주로 활동적인 번역 후 과정에 의해 종양과 관련된다. 이 클래스의 예는 종양 특이적일 수도 있고 아닐 수도 있는 분해 과정 동안 단백질 스플라이싱과 같은 이벤트 또는 MUC1의 경우 종양의 새로운 에피토프으로 이끄는 변화된 당화 패턴에서 발생한다.

[0024] f) 종양 바이러스 단백질: 이러한 TAA는 종양발생 과정에서 중요한 역할을 할 수 있는 바이러스 단백질이며, 그들이 이질적이기 때문에(인간 태생이 아닌), T 세포 반응을 일으킬 수 있다. 이런 단백질의 예로는 인간 유두종 타입 16 바이러스 단백질, 및 경부 암종에서 발현하는 E6와 E7이 있다.

[0025] T 세포 기반의 면역요법은 종양-연관 또는 종양-특이적 단백질로부터 유래된 펩티드 에피토프를 표적으로 하며, 이는 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 의해 제시된다. 종양 특정 세포 독성 T 림프구에 의해 인식되는 항원, 즉 그들의 에피토프는, 발현되고, 같은 원조의 변형없는 세포들에 비해서, 각각의 종양의 대개 상향조절된 세포인 효소, 수용체, 전사 인자 등과 같은 모든 단백질 클래스에서 유도된 분자일 수 있다.

[0026] MHC-분자에는 두 클래스가 있으며, MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II이다. MHC 클래스 I 알파 중쇄와 베타-2-저분자글로불린, 알파와 베타 쇄의 MHC 클래스 II 분자로 구성되어 있다. 이들의 3차원 형태는 결합 홈을 형성하며, 이는 펩티드와의 비공유결합에 사용된다.

[0027] MHC 클래스 I 분자는 대부분의 유핵 세포에서 찾을 수 있다. 이는 대부분 내인 단백질, 결손 리보솜 생성물(DRIP)과 큰 펩티드의 단백질분해성 절단으로 인해 생성된 펩티드를 제시한다. 하지만 엔도솜 구획이나 외생 출처로부터 유래된 펩티드 또한 MHC 클래스 I 분자에서 발견된다. 이러한 비고전적 방식의 클래스 I 제시를 문헌에서는 교차-제시라고 칭한다(Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). MHC 클래스-II 분자는 대부분 전문적인 항원 제시 세포(APC)에서 찾아 볼 수 있으며, 이들은 주로 APC에 의해 섭취된 외인 또는 막횡단 단백질의 펩티드를 제시하며(예: 세포내이입 동안), 이는 후에 처리된다.

[0028] 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합물은 적당한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8-양성 T 세포에 의해서 인식되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합물은 적당한 TCR을 갖는 CD4-양성 조력 T 세포에 의해 인식된다. TCR, 펩티드 및 MHC가 이로써 1:1:1의 화학양론적 반응량으로 존재한다는 사실은 잘 알려져 있다.

[0029] CD4-양성 보조 T 세포는 CD8-양성 세포 독성 T 세포에 의한 효과적인 반응을 유도하고 지속하는데 중요한 역할을 한다. 종양 연관 항원(TAA)에서 유도된 CD4-양성 T 세포 에피토프의 동정은 항-종양 면역 반응을 일으키기 위한 의약품의 개발에 아주 중요하다(Gnjatic et al., 2003). 종양 부위에서, 보조 T 세포는, 세포독성 T 세포(CTL) 친화적 시토카인 주위 환경을 지원하고(Mortara et al., 2006) 효과기 세포, 예를 들면 CTL, 자연 살해(NK) 세포, 대식 세포, 과립구를 유치한다(Hwang et al., 2007).

[0030] 염증이 없는 경우, MHC 클래스 II 분자의 발현은 주로 면역계의 세포, 특히 전문적 항원-제시 세포(APC), 예를 들면, 단핵 세포, 단핵 세포-유도된 세포, 대식 세포, 수지상 세포로 제한된다. 암 환자에서, 종양의 세포는 MHC 클래스 II 분자를 발현하는 것으로 밝혀졌다(Dengjel J, et al.).

[0031] 본 발명의 신장(더 기다란) 펩티드는 MHC 클래스 II 활성 에피토프으로 작용할 수 있다.

[0032] MHC 클래스 II에 의해 활성화된 조력 T 세포는 항-종양 면역에서 CTL 효과기 기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다. CD8-양성 킬러 T 세포의 TH1 유형 지원 효과기 기능의 조력 T 세포 반응을 일으키는 조력 T 세포 에피토프는, 세포 표면에 종양-연관 펩티드/MHC 복합체를 보이는 종양 세포에 대한 세포 독성 기능을 포함한다. 이런 식으로 종양-연관 조력 T 세포 펩티드 에피토프는, 따로 또는 다른 종양-연관 펩티드와 함께, 항-종양 면역 반응을 자극하는 백신 조성의 활성 약학 원료로 사용될 수 있다.

[0033] 예를 들면, 생쥐 같은 포유류 동물 모델에서는 심지어 CD8-양성 T 림프구의 부재 하에서도, CD4-양성 T 세포가 인터페론-감마(IFNɣ)의 분비에 의한 혈관신생의 저해를 통한 종양의 억제 징후에 충분하다는 것이 보여졌다(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). CD4 T 세포가 직접적 항종양 작용기라는 증거가 있다(Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014a).

[0034] 이전에는 HLA 클래스 II 분자의 구성적 발현이 일반적으로 면역 세포로 제한되기 때문에, 클래스 II 펩티드를 원발성 종양에서 직접 단리하는 것은 가능하지 않다고 간주되었다. 그러나, Dengjel 등은 MHC 클래스 II 에피토프를 종양에서 직접적으로 식별하는데 성공했다(WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

[0035] CD8 및 CD4에 의존하는 두 유형의 반응이 함께 상승작용에 의해 항종양 효과에 기여함으로써, CD8+ T 세포(리간드: MHC 클래스 I 분자 + 펩티드 에피토프) 또는 CD4-양성 조력 T 세포(리간드: MHC 클래스 II 분자 + 펩티드 에피토프)에 의해 인식되는 종양-연관 항원의 식별 및 특성화가 종양 백신의 개발에 중요하다.

[0036] MHC 클래스 I 펩티드가 세포 면역 반응을 촉발(유도)하려면 MHC-분자에도 결합해야 한다. 이 프로세스는 MHC-분자의 대립형질 그리고 그 펩티드의 아미노산 서열의 특정한 다형성에 의존한다. MHC-클래스-I-결합 펩티드는 대개 길이가 8 내지 12개의 아미노산 잔기이며 대개 그 서열 내에 MHC-분자와 상응하는 결합 홈과 상호작용하는 두 개의 보존 잔기("고정")를 포함하고 있다. 이렇게 함으로써 각 MHC 대립형질은 어떤 펩티드가 결합 홈에 특이적으로 결합할 수 있는가를 결정하는 "결합 모티프"를 갖는다.

[0037] MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서, 펩티드는 종양 세포에 의해 발현되는 어떤 MHC 클래스 I 분자와 결합할 수 있어야 하며 또한 추후 특정한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포에 의해 인식될 수 있어야 한다.

[0038] 종양-특이 또는 연관 항원으로서 T 림프구에 의해 단백질이 인식되고, 치료에 사용되려면, 특정한 전제 조건이 충족되어야 한다. 항원은 주로 종양 세포에 의해 발현되어야 하며 비교적 소량일지라도 건강한 정상 조직에 의해서는 발현되어서는 안 된다. 바람직한 구현에서, 펩티드는 건강한 정상 조직과 비교하여 종양 세포에 의해 과

다제시되어야 한다. 더욱이 각각의 항원이 하나의 유형의 종양에서뿐만 아니라 높은 농도로 나타나는 것이 바람직하다(즉 세포마다 펩티드의 각각의 카피 수). 종양-특이적 및 종양-연관 항원은 흔히 기능 때문에(예: 세포 주기 관리 또는 아폽토시스의 억제) 정상 세포를 종양 세포로 전환하는 것과 직접 관련된 단백질에서 유도된다. 또한, 변환을 직접적으로 일으키는 단백질의 하류 표적은 상향조절될 수 있으며 따라서 간접적으로 종양과 연관될 수 있다. 이러한 간접적 종양-연관 항원은 백신 접근법의 표적이 될 수도 있다(Singh-Jasuja et al., 2004). 에피토프가 항원의 아미노산 서열에 나타나는 것이 중요하며, 종양 관련 항원에서 유도된 그러한 펩티드("면역성 펩티드")는 시험관 내 또는 생체 내 T 세포반응을 유도해야 한다.

[0039] 기본적으로, MHC 분자에 결합할 수 있는 모든 펩티드는 T 세포 에피토프으로서 기능할 수 있다. 시험관 내 또는 생체 내 T 세포 반응을 유도하는 전제 조건은 상응하는 TCR이 있는 T 세포의 존재와 이 특정 에피토프에 대한 면역 내성의 부재이다.

[0040] 그러므로, TAA는 종양 백신으로 제한되지 않지만 이를 포함하는 T 세포 기반 요법의 개발에 있어서 시작점이 된다. TAA의 식별과 특성화의 방법은 대개 환자 또는 건강한 대상에서 단리될 수 있는 CTL의 사용에 기반되거나, 다른 전송 프로파일 또는 종양과 정상 조직 사이의 차등 전사 프로파일이나 차등 펩티드 발현 패턴의 생성에 기반한다. 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주에서 과발현되거나 그런 조직 또는 세포주에서 선택적으로 발현되는 유전자의 식별은 면역 치료에서 이런 유전자에서 전사된 항원의 이용에 대한 정밀한 정보를 제공하지 않는다. 이것은 상응하는 TCR이 있는 T 세포가 나타나야 하고 이 특정 에피토프에 대한 면역 내성이 없거나 최소화되어야 하므로 이러한 항원의 에피토프의 개개의 소집단만이 그런 응용에 적합하기 때문이다. 따라서 본 발명의 매우 바람직한 구현에서, 기능성 및/또는 증식성 T 세포가 발견될 수 있는 MHC 분자와 관련이 있게 나타나는 과발현된 또는 선택적으로 발현된 펩티드만 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능성 T 세포는 특정 항원에 의해 자극되었을 때 클론에 의해 확대되고 효과기 기능("효과기 T 세포")을 실행할 수 있는 T 세포로 정의된다.

[0041] 본 발명에 따른 특정 TCR(예: 가용성 TCR) 및 항체 또는 다른 결합 분자(골격)에 의해 펩티드-MHC를 표적화하는 경우, 기저 펩티드의 면역원성은 이차적인 것이다. 이러한 경우, 제시가 결정요인이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0042] 본 발명의 제 1 양태에서, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 114 또는 서열번호 1 내지 서열번호 114에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88%, 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것으로, 상기 변이체는 MHC에 결합하였거나 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하며, 상기 펩티드는 기저의 전장 폴리펩티드가 아니다.

[0043] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 서열번호 114 또는 서열번호 1 내지 서열번호 114에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 본 발명의 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드 또는 이의 변이체가 갖는 전장은 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개의 아미노산이다.

[0044] 다음 표에는 본 발명에 따른 펩티드와 각각의 서열번호 그리고 이 펩티드의 유망한 소스(기저) 유전자가 나와 있다. 표 1 및 표 2의 모든 펩티드는 HLA-A*02에 결합한다. 표 2에 나와 있는 모든 펩티드는 오류 비율이 높은 고처리량 선별의 결과로서 대규모 목록으로 이전에 공개되었거나 다른 알고리즘을 사용하여 계산된 바 있으나 이전에는 전혀 암과 연관된 적은 없다. 표 3의 펩티드는 본 발명에 따른 펩티드와의 병용에서 유용할 수 있는 추가의 펩티드이다. 표 4A 및 표 4B의 펩티드는 또한 해당되는 기저 폴리펩티드의 과발현이나 과다제시에 관여하는 다양한 기타 악성종양의 진단 및/또는 치료에 유용하다.

[0045] [표 1]

본 발명에 따른 펩티드

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
1	ALIVSLPYL	10786	SLC17A3
2	ILWREVVTL	3299	HSF4
3	RLLGEVQAL	3299	HSF4
4	FLSQDIITV	5972	REN
5	YLYPNLTRL	6540	SLC6A13
6	VLFELSKTV	23250	ATP11A
7	FLLSLIDRL	112399	EGLN3
8	GLASFKSFL	8490	RGS5
9	ILLQKPDSV	8490	RGS5
10	KLLQNNYGL	8490	RGS5
11	FIQTEAPKEV	8490	RGS5
12	ALDPSGNQLI	54437	SEMA5B
13	KIMAQILTV	120892	LRRK2
14	ALLTETIFL	120892	LRRK2
15	ILIKHLVKV	143872	ARHGAP42
16	FMPEELPQL	55258	THNSL2
17	ILAQQVHAL	113220	KIF12
18	YVLDLAAKV	47	ACLY
19	LLDPGSLQL	646658	SYNDIG1L
20	AVANTTFTV	80270	HSD3B7
21	RLIQGDQILSV	10207	INADL
22	FLSPPLPSV	593, 641649	BCKDHA, TMEM91
23	YIQEVVQYI	23236	PLCB1
24	FTLGTTVFL	4717	NDUFC1

[0046]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
25	LLVPAHLVAA	11082	ESM1
26	SLMEILYTL	91949	COG7
27	SLSDLLVSL	23596	OPN3
28	FIADLVVGL	2023, 2026, 2027	ENO1, ENO2, ENO3
29	ILLDLEQAL	9820	CUL7
30	QLFYTKIFL	5351	PLOD1
31	VLFGLDPAVIKV	259217	HSPA12A
32	FLAGGIRGSGA	113730	KLHDC7B
33	FIADVVEKI	5654, 94031	HTRA1, HTRA3
34	ELNNQNFYL	11113	CIT
35	VLHSLQTQL	51129	ANGPTL4
36	SLFGKKYIL	2274	FHL2
37	VLAPVILML	8714	ABCC3
38	VLLDTILQL	11077	HSF2BP
39	YLLNLNHLGL	23471	TRAM1
40	YIQEHLLQI	10625	IVNS1ABP
41	GLLKTLQKL	25932	CLIC4
42	VILDTGTIQL	9027	NAT8
43	YLKDELDEL	23255	SOGA2
44	ALFSFVTAL	80727	TTYH3
45	ALLGIPLTL	3777, 60598	KCNK3, KCNK15
46	GLSEVLVQI	57553	MICAL3
47	TLAEVRAVQEI	56950	SMYD2
48	VVASNIMEV	5209	PFKFB3
49	VLIVEVPGV	111	ADCY5
50	SLSDHIVLL	3675	ITGA3

[0047]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
51	NLWPMILTL	3675	ITGA3
52	SILDAVQRV	137902	PXDNL
53	FLLEIRQTL	23161	SNX13
54	ALVAKGLVQA	10327	AKR1A1
55	YLALILPVL	9122	SLC16A4
56	ILMDFSNSM	3691	ITGB4
57	SLQKEILYL	55102	ATG2B
58	FLVDFEQSHL	1573	CYP2J2
59	SLKNNVVSV	7045	TGFBI
60	ILWKDIEYV	143425	SYT9
61	SLMGILLRI	22900	CARD8
62	VLAGPAFLVQL	55244	SLC47A1
63	GLIEDHFDVTV	51752	ERAP1
64	LLAASVALA	4885	NPTX2
65	IIYGGSVTGA	7167, 729708	TPI1, TPI1P1
66	TLLKTIIKV	57545	CC2D2A
67	LLDVLAPLV	80781	COL18A1
68	YVLTQPPSV	28796, 28815, 28831, 3537, 3538	IGLV3-21, IGLV2-14, IGLJ3, IGLC1, IGLC2
69	ILADLLPSL	25979	DHRS7B
70	SLTALRLLL	9920	KBTBD11
71	ALDGHLYAV	9920	KBTBD11
72	YSLEKVFGI	10916	MAGED2
73	GLDGIPFTV	7205	TRIP6
74	GLFHKQVTV	23037	PDZD2

[0048]

[0049]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
75	FLIKSINLV	143879	KBTBD3
76	VLADDHLIEV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2, PDZK1, PDZK1P1
77	SLIKHKIML	523	ATP6V1A
78	ALLDTVVQA	8911, 8912	CACNA1I, CACNA1H
79	ALADIVWRA	84182	FAM188B
80	KLASMLETL	112464	PRKCDBP
81	SLLPALPKL	4036	LRP2
82	SLLQATDFMSL	7070	THY1
83	lQWSlVPEV	23151	GRAMD4
84	YLMDEGAHL	7358	UGDH
85	FVMSEIRTV	114991	ZNF618
86	GLLQGKLALL	4835	NQO2
87	LADGVQKV	8542	APOL1
88	TLAELHISL	84166	NLRC5
89	SLLLAVTEV	3714	JAG2
90	FTLEKNFVI	1292	COL6A2
91	MLLSSLVSL	79001	VKORC1
92	FLFRDILEL	29102	DROSHA

[0050] [표 2]

이전에 알려진 암 연관이 없는 본 발명에 따른 추가 펩티드

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
93	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
94	ILHHKVYDL	1528	CYB5A
95	KLTDVGIATL	115701	ALPK2
96	TLAETLVNL	283372, 283373	ANKRD52
97	TLISELVQA	9820	CUL7
98	KIPPVSPSI	57561	ARRDC3
99	GLAPHLEQI	79711	IPO4
100	KLNVAPLAV	653784, 80097	MZT2A, MZT2B
101	HIYDKAFITV	2321	FLT1
102	LLFDVHTTL	65250	C5orf42
103	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
104	ALFEGVVRQI	6236	RRAD
105	ALADLDELLIRA	3339	HSPG2
106	VLMDLKALL	51428	DDX41
107	VLMDLKALLL	51428	DDX41
108	VLISVLQAI	26999	CYFIP2
109	YLWSRVEKL	120892	LRRK2
110	LLDLHSYLL	10299	MARCH6
111	TLLETEMLL	80817	CEP44
112	LLFDHLEPIEL	25780	RASGRP3
113	SLFDWNVKL	134111	UBE2QL1
114	ALAVNISAA	908	CCT6A

[0051]

[0052] [표 3]

예를 들어, 개인화 암 요법에 유용한 펩티드

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
115	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
116	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
117	VLFGELPAL	8701	DNAH11
118	FLNAIETAL	8701	DNAH11
119	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
120	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
121	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
122	SLDPSSPQV	9514	GAL3ST1
123	YVDPVITSI	4233	MET
124	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
125	KLDPTKTTL	10397	NDRG1
126	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
127	VLAPLFVYL	2535, 8321, 8324	FZD2, FZD1, FZD7
128	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
129	VLAPRVLRA	5954	RCN1
130	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
131	VMAGDIYSV	123	PLIN2
132	SVASTITGV	123	PLIN2
133	QLIDYERQL	11072	DUSP14
134	VADKIHSV	11072	DUSP14
135	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
136	YQDPHSTAV	1956	EGFR
137	TLVAIVVGV	60681	FKBP10
138	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y

[0053]

서열번호	서열	유전자 ID	공식적 유전자 부호
139	ILNVDGLIGV	47	ACLY
140	SLANNVTSV	131566	DCBLD2
141	LLVDDSFLHTV	253982	ASPHD1
142	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
143	ALFVRLLALA	7045	TGFBI
144	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
145	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
146	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1
147	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
148	KLLTEVHAA	101	ADAM8
149	SILTIEDGIFEV	100287551, 3306, 3312	HSPA8P8, HSPA2, HSPA8
150	TLMPNINKL	5169	ENPP3
151	YMYEGPAPRI	5169	ENPP3

[0054]

[0055] 본 발명은 또한 예를 들어, 폐암, 뇌암, 위암, 결장암 또는 직장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 흑색종, 난소암 및 식도암과 같은 증식성 질병의 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 펩티드와 일반적으로 관련이 있다.

[0056] 특히 바람직한 것은 서열번호 1 내지 서열번호 114로 이루어진 군으로부터 선택된 본 발명에 따른 단일 또는 조합의 펩티드이다. 보다 바람직한 것은 서열번호 1 내지 서열번호 63으로 이루어진 군으로부터 선택된 단일 또는 조합의 펩티드이다(표 1 참조), 그리고 RCC, 폐암, 뇌암, 위암, 결장암 또는 직장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 흑색종, 난소암 및 식도암, 그리고 바람직하기로는 RCC의 면역요법에서의 사용이다.

[0057] 다음 표 4A에 나와 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 많은 펩티드는 다른 종양 유형에서도 발견되며 따라서 다른 적응증의 면역요법에도 사용될 수 있다. 또한 도 1e와 실시예 1도 참조한다.

[0058] 표 4A는 본 발명에 따른 펩티드 및 다른 증식성 질병에서 특히 다른 암 질병에서의 구체적인 사용을 나타낸다. 이 표는 펩티드가 발견된 추가의 종양 유형에서의 선택된 펩티드로서 측정된 종양 샘플에서 5% 넘게 과다제시되거나 정상 조직 대 종양의 기하학적 평균 비율이 3보다 큰 측정된 종양 샘플에서 5% 넘게 제시된 펩티드를 나타낸다. 과다제시란 가장 높은 제시의 정상 샘플에 비해 종양 샘플에서의 더 높은 제시로서 정의된다.

[0059] [표 4A]

서열번호	서열	다른 관련 기관/질병
1	ALIVSLPYL	간
2	ILWREVVTL	난소
5	YLYPNLTRL	간
8	GLASFKSFL	췌장
12	ALDPSGNQLI	난소
14	ALLTETIFL	백혈구
15	ILIKHLVKV	간
16	FMPEELPQL	췌장, 유방, 난소
21	RLIQGDQILSV	폐, 결장, 직장, 간, 난소
23	YIQEVVQYI	간
24	FTLGTTVFL	폐, 전립선, 백혈구, 식도
26	SLMEILYTL	결장, 직장, 췌장, 전립선, 난소
27	SLSDLLVSL	폐, 간, 췌장, 백혈구
28	FIADLVVGL	흑색종
29	ILLDLEQAL	폐, 췌장, 전립선, 유방, 난소
30	QLFYTKIFL	폐, 결장, 직장, 난소
31	VLFGLDPAVIKV	뇌, 난소
32	FLAGGIRGSGA	위
33	FIADVVEKI	폐, 백혈구, 난소
34	ELNNQNFYL	흑색종, 식도
36	SLFGKKYIL	결장, 직장
37	VLAPVILML	폐, 결장, 직장, 췌장, 난소
38	VLLDTILQL	뇌, 간, 췌장, 흑색종, 난소
39	YLLNLNHLGL	폐, 간, 백혈구
44	ALFSFVTAL	폐, 흑색종, 난소

[0060]

서열번호	서열	다른 관련 기관/질병
45	ALLGIPLTL	전립선, 난소, 식도
46	GLSEVLVQI	결장, 직장
47	TLAEVRAVQEI	간, 흑색종
49	VLIVEVPGV	난소
50	SLSDHIVLL	폐
51	NLWPMILTL	폐, 췌장, 식도
52	SILDAVQRV	폐, 뇌, 췌장, 난소
54	ALVAKGLVQA	흑색종, 난소
55	YLALILPVL	흑색종
56	ILMDFSNSM	췌장
59	SLKNNVVSV	췌장, 난소, 식도
61	SLMGILLRI	백혈구
63	GLIEDHFDVTV	폐, 결장, 직장, 전립선, 백혈구, 흑색종, 난소
65	IIYGGSVTGA	유방
66	TLLKTIIKV	뇌
67	LLDVLAPLV	폐, 위, 간, 췌장, 유방, 식도
68	YVLTQPPSV	폐, 췌장, 백혈구, 식도
69	ILADLLPSL	폐, 뇌, 췌장, 유방, 난소
72	YSLEKVFGI	간
73	GLDGIPFTV	뇌, 췌장, 유방, 흑색종
78	ALLDTVVQA	간, 전립선
79	ALADIVWRA	폐, 뇌, 결장, 직장, 간, 췌장, 전립선, 난소, 식도
82	SLLQATDFMSL	결장, 직장, 췌장, 식도
84	YLMDEGAHL	간
85	FVMSEIRTV	간

[0061]

서열번호	서열	다른 관련 기관/질병
86	GLLQGKLALL	간, 흑색종
87	LADGVQKV	유방, 흑색종
88	TLAELHISL	난소
90	FTLEKNFVI	전립선
91	MLLSSLVSL	폐, 간
93	GVMAGDIYSV	폐, 결장, 직장, 간, 식도
94	ILHHKVYDL	간
96	TLAETLVNL	폐, 위, 결장, 직장, 췌장, 전립선, 유방, 난소, 식도
97	TLISELVQA	폐, 결장, 직장, 췌장, 전립선, 유방, 흑색종, 난소, 식도
98	KIPPVSPSI	폐, 간, 유방
99	GLAPHLEQI	간, 난소
100	KLNVAPLAV	폐, 뇌, 결장, 직장, 간, 췌장, 흑색종, 난소
101	HIYDKAFITV	간, 난소
102	LLFDVHTTL	폐, 뇌
103	KLQDGLLHI	뇌, 결장, 직장, 간
104	ALFEGVVRQI	간, 흑색종, 식도
105	ALADLDELLIRA	췌장, 흑색종
107	VLMDLKALLL	전립선, 백혈구, 난소
108	VLISVLQAI	백혈구
109	YLWSRVEKL	췌장, 난소
110	LLDLHSYLL	위, 백혈구
111	TLLETEMLL	췌장, 유방
112	LLFDHLEPIEL	백혈구

[0062]

서열번호	서열	다른 관련 기관/질병
113	SLFDWNVKL	간, 전립선
114	ALAVNISAA	폐, 뇌, 간, 췌장, 식도
115	LLDPKTIFL	결장, 직장, 간
116	GLVDIMVHL	난소
117	VLFGELPAL	폐, 췌장, 유방, 난소
119	RLHDENILL	폐, 뇌, 결장, 직장, 간, 췌장, 전립선, 난소, 식도
121	ALLRTVVSV	폐, 간, 췌장, 유방, 난소
122	SLDPSSPQV	간
123	YVDPVITSI	폐
124	ILSPLSVAL	간, 췌장
125	KLDPTKTTL	전립선
126	KIQEILTQV	폐, 뇌, 위, 결장, 직장, 간, 췌장, 백혈구, 난소, 식도
127	VLAPLFVYL	폐, 췌장, 유방, 흑색종
128	YLEEDVYQL	폐, 췌장
129	VLAPRVLRA	폐, 뇌, 결장, 직장, 간, 췌장, 난소
130	ALPTVLVGV	폐, 뇌, 위, 결장, 직장, 간, 흑색종, 식도
131	VMAGDIYSV	폐, 간, 췌장, 식도
132	SVASTITGV	간, 유방
133	QLIDYERQL	폐, 결장, 직장, 간, 췌장, 식도
134	VADKIHSV	위, 췌장, 식도
135	VVDEGPTGV	폐, 뇌, 위, 간, 췌장, 백혈구, 유방, 난소, 식도
136	YQDPHSTAV	뇌, 간
137	TLVAIVVGV	폐, 뇌, 위, 결장, 직장, 간, 췌장, 전립선, 유방, 난소

[0063]

서열번호	서열	다른 관련 기관/질병
138	SLDTLMTYV	폐, 뇌, 결장, 직장, 췌장, 전립선, 백혈구, 식도
139	ILNVDGLIGV	뇌, 결장, 직장, 간, 전립선
140	SLANNVTSV	폐, 뇌, 췌장, 흑색종, 난소, 식도
141	LLVDDSFLHTV	뇌, 간, 췌장, 흑색종, 난소, 식도
142	SVDVSPPKV	폐, 췌장, 흑색종, 식도
143	ALFVRLLALA	폐, 뇌, 위, 결장, 직장, 간, 흑색종, 식도
144	RLLDVLAPLV	간
145	SLHFLILYV	폐, 뇌, 결장, 직장, 간, 흑색종, 난소
146	KLIDLSQVMYL	폐, 결장, 직장, 췌장, 난소
147	ALADKELLPSV	폐, 결장, 직장, 간, 췌장, 흑색종, 난소
148	KLLTEVHAA	폐, 위, 결장, 직장, 간, 췌장, 유방, 난소, 식도
149	SILTIEDGIFEV	폐, 뇌, 결장, 직장, 간, 췌장, 전립선, 백혈구, 유방, 흑색종, 난소
150	TLMPNINKL	간

[0064]

[0065] 표 4B는 본 발명에 따른 펩티드 및 다른 증식성 질병에서 특히 다른 암 질병에서의 구체적인 사용을 나타낸다. 이 표는 표 4A와 같이 측정된 종양 샘플에서 5%가 넘게 과다 제시(특이적 제시 포함) 또는 정상 조직 대 종양의 기하학적 평균의 비율이 3보다 큰 측정된 샘플에서 5%가 넘게 제시를 보여주는 추가의 종양 유형에서 발견된 선택된 펩티드를 나타낸다. 과다제시란 가장 높은 제시의 정상 샘플에 비해 종양 샘플에서의 더 높은 제시로서 정의된다. 과다제시를 시험한 대상의 정상 조직은 다음과 같다: 지방 조직, 부신, 혈액 세포, 혈관, 골수, 뇌, 연골, 식도, 눈, 담낭, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 신경, 췌장, 부갑상선, 복막, 뇌하수체, 흉막, 타액선, 골격근, 피부, 소장, 비장, 위, 흉선, 갑상선, 기관, 요관, 방광.

[0066] [표 4B]

서열번호	서열	추가 객체
2	ILWREVVTL	흑색종, NHL
4	FLSQDIITV	자궁암
6	VLFELSKTV	AML
8	GLASFKSFL	흑색종, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암
10	KLLQNNYGL	BRCA, 담낭암, 담관암
12	ALDPSGNQLI	뇌암
13	KIMAQILTV	CLL, NHL
14	ALLTETIFL	NHL
15	ILIKHLVKV	자궁암, NHL
17	ILAQQVHAL	자궁암
18	YVLDLAAKV	SCLC, CLL, BRCA, 흑색종, 자궁암, NHL
20	AVANTTFTV	식도암, 방광암, 자궁암
21	RLIQGDQILSV	SCLC, BRCA, 식도암, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암, OC
24	FTLGTTVFL	흑색종, 자궁암, NHL
26	SLMEILYTL	흑색종, 담낭암, 담관암, AML, OC, SCLC
27	SLSDLLVSL	CRC, 흑색종, 자궁암, AML, NHL
28	FIADLVVGL	SCLC, CLL, AML, NHL
29	ILLDLEQAL	흑색종, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암, AML, NHL, OC
30	QLFYTKIFL	흑색종, 식도암, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암
33	FIADVVEKI	SCLC, BRCA, 식도암
34	ELNNQNFYL	CRC, 방광암, AML, NHL
36	SLFGKKYIL	방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암

[0067]

38	VLLDTILQL	NSCLC, SCLC, CLL, BRCA, 식도암, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암, AML, NHL, OC
39	YLLNLNHLGL	NHL
40	YIQEHLLQI	흑색종
43	YLKDELDEL	식도암, 담낭암, 담관암, NHL
45	ALLGIPLTL	BRCA, 흑색종, 방광암, 자궁암, OC
46	GLSEVLVQI	SCLC, HCC, 흑색종, 방광암, 담낭암, 담관암, NHL
48	VVASNIMEV	BRCA, 흑색종
49	VLIVEVPGV	담낭암, 담관암, OC
50	SLSDHIVLL	PC, 흑색종, 식도암, 방광암, 담낭암, 담관암
51	NLWPMILTL	흑색종, 자궁암, 담낭암, 담관암, 식도암
52	SILDAVQRV	SCLC, BRCA, 흑색종, 자궁암
54	ALVAKGLVQA	NHL
55	YLALILPVL	CLL
56	ILMDFSNSM	방광암, 담낭암, 담관암
57	SLQKEILYL	흑색종
59	SLKNNVVSV	흑색종, 자궁암, 담낭암, 담관암
61	SLMGILLRI	BRCA
62	VLAGPAFLVQL	자궁암
63	GLIEDHFDVTV	SCLC
64	LLAASVALA	뇌암, AML
65	IIYGGSVTGA	CLL, 흑색종, 방광암, 자궁암
66	TLLKTIIKV	흑색종, 방광암
67	LLDVLAPLV	CRC, 흑색종, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암
68	YVLTQPPSV	BRCA
69	ILADLLPSL	SCLC, 흑색종, 식도암, 자궁암, AML, NHL
72	YSLEKVFGI	뇌암, GC, CRC, PrC, BRCA, 흑색종, OC, 방광암, AML,

[0068]

		PC
73	GLDGIPFTV	GC, 방광암, 자궁암, AML
75	FLIKSINLV	CLL, 흑색종, AML
76	VLADDHLIEV	HCC, 담낭암, 담관암
77	SLIKHKIML	CRC, 흑색종, 자궁암
78	ALLDTVVQA	BRCA
79	ALADIVWRA	SCLC, BRCA, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암, 식도암, OC
80	KLASMLETL	흑색종
81	SLLPALPKL	BRCA
82	SLLQATDFMSL	NSCLC, 뇌암, BRCA, 흑색종, 자궁암, NHL, PC
83	IQWSIVPEV	CLL, 흑색종, 담낭암, 담관암, AML, NHL
84	YLMDEGAHL	담낭암, 담관암
85	FVMSEIRTV	자궁암, 담낭암, 담관암
86	GLLQGKLALL	자궁암, NHL
88	TLAELHISL	CLL, 식도암
89	SLLLAVTEV	SCLC, BRCA, 흑색종, 방광암
90	FTLEKNFVI	CRC, BRCA, PC
91	MLLSSLVSL	SCLC, 흑색종, 방광암, 담낭암, 담관암
92	FLFRDILEL	흑색종, AML
93	GVMAGDIYSV	담낭암, 담관암, PC
95	KLTDVGIATL	흑색종, NHL
96	TLAETLVNL	SCLC, HCC, CLL, 흑색종, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암, AML, NHL
97	TLISELVQA	SCLC, GC, HCC, CLL, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암, NHL
98	KIPPVSPSI	자궁암, NHL

[0069]

99	GLAPHLEQI	BRCA, 흑색종, AML, NHL
100	KLNVAPLAV	CLL, BRCA, 자궁암, AML, NHL, OC
101	HIYDKAFITV	SCLC, BRCA
102	LLFDVHTTL	SCLC, 흑색종, 방광암, 자궁암, AML
103	KLQDGLLHI	SCLC, PC, 흑색종, OC, NHL
104	ALFEGVVRQI	방광암
105	ALADLDELLIR A	BRCA
106	VLMDLKALL	AML
107	VLMDLKALLL	AML
108	VLISVLQAI	BRCA, AML, NHL
109	YLWSRVEKL	CLL, NHL
110	LLDLHSYLL	자궁암
111	TLLETEMLL	방광암
112	LLFDHLEPIEL	BRCA, NHL
113	SLFDWNVKL	SCLC, BRCA, 식도암, 담낭암, 담관암, AML, NHL
114	ALAVNISAA	GC, CRC, CLL, BRCA, 흑색종, 방광암, 자궁암, 담낭암, 담관암, AML, NHL, PC

[0070]

[0071] NSCLC= 비소세포 폐암, SCLC= 소세포 폐암, RCC= 신장암, CRC= 결장암 또는 직장암, GC= 위암, HCC= 간암, PC= 췌장암, PrC= 전립선암, BRCA=유방암, MCC= 메르켈 세포 암종, OC= 난소암, NHL= 비호지킨 림프종, AML= 급성 골수성 백혈병, CLL= 만성 림프구성 백혈병.

[0072] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 폐암의 치료를 위한 서열번호 21, 27, 29, 30, 33, 37, 39, 44, 50, 51, 52, 63, 67, 68, 69, 79, 91, 93, 96, 97, 98, 100, 102, 114, 117, 119, 121 ,123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 165, 137, 138, 140, 142, 143, 145, 146, 147, 148 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0073] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 뇌암의 치료를 위한 서열번호 31, 38, 52, 66, 69, 73, 79, 100, 102, 103, 114, 119, 126, 129, 130, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 145 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0074] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 위암의 치료를 위한 서열번호 32, 67, 96, 110, 126, 130, 134, 135, 137, 143 및 148의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0075] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 대장암의 치료를 위한 서열번호 21, 26, 30, 36, 37, 46, 63, 79, 82, 93, 96, 97, 100, 103, 115, 119, 126, 129, 130, 133, 137, 138, 139, 143, 145, 146, 147, 148 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0076] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 간암의 치료를 위한 서열번호 1, 5, 15, 21, 23, 24, 27, 38, 39, 47, 67, 72, 78, 79, 84, 85, 86, 91, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 113, 114, 115, 119, 121, 122, 124, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 139, 141, 143, 144, 145, 147, 148, 149 및 150의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0077] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 췌장암의 치료를 위한 서열번호 8, 16, 26, 27, 29, 37, 38, 51, 52, 56, 59, 67, 68, 69, 73, 79, 82, 96, 97, 100, 105, 109, 111, 114, 117, 119,

121, 124, 126, 127, 128, 129, 131, 133, 134, 135, 137, 138, 140, 141, 142, 146, 147, 148 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0078] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 전립선암의 치료를 위한 서열번호 24, 26, 29, 45, 63, 78, 79, 90, 96, 97, 107, 113, 119, 125, 137, 138, 139 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0079] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 백혈병의 치료를 위한 서열번호 14, 24, 27, 33, 39, 61, 63, 68, 107, 108, 110, 112, 126, 135, 138 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0080] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 유방암의 치료를 위한 서열번호 16, 29, 65, 67, 69, 73, 87, 96, 97, 98, 111, 117, 121, 127, 132, 135, 137, 148 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0081] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 흑색종의 치료를 위한 서열번호 28, 34, 38, 44, 47, 54, 55, 63, 73, 86, 87, 97, 100, 104, 105, 127, 130, 140, 141, 142, 143, 145, 147 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0082] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 난소암의 치료를 위한 서열번호 2, 12, 16, 21, 26, 29, 30, 31, 33, 37, 38, 44, 45, 49, 52, 54, 59, 63, 69, 79, 88, 96, 97, 99, 100, 101, 107, 109, 116, 117, 119, 121, 126, 129, 135, 137, 140, 141, 145, 146, 147, 148 및 149의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0083] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 하나의 합쳐진 바람직한 구현에서 식도암의 치료를 위한 서열번호 24, 34, 45, 51, 59, 67, 68, 79, 82, 93, 96, 97, 104, 114, 119, 126, 130, 131, 133, 134, 135, 138, 140, 141, 142, 143 및 148의 어느 하나에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0084] 그리하여 본 발명의 또 다른 양태는 RCC, 폐암, 뇌암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 흑색종, 난소암 및 식도암의 군으로부터 선택된 증식성 질병, 그리고 바람직하게는 RCC의 바람직하게는 병용 치료를 위한 본 발명에 따른 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0085] 바람직하게는, 본 발명은 RCC, 폐암, 뇌암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 흑색종, 난소암 및 식도암의 군으로부터 선택된 증식성 질병, 그리고 바람직하게는 RCC의 바람직하게는 병용 치료를 위한, 서열번호 1 및/또는 15에 따른 본 발명에 따른 펩티드의 사용에 관한 것이다.

[0086] 본 발명은 또한 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I 또는 길이 변이체와 같은 긴 형태의 MHC 클래스-II의 분자와 결합하는 능력을 가진 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.

[0087] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 (각각) 서열번호 1 내지 서열번호 114에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 이루어진다.

[0088] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 변형되며/거나 비펩티드 결합을 포함한다.

[0089] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 융합 단백질의 일부이며 특히 HLA-DR 항원-결합 항원-연관된 불변쇄(Ii)에 융합되거나 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 그 서열 안으로) 융합된다.

[0090] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.

[0091] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있거나 발현하는 벡터에 관한 것이다.

[0092] 본 발명은 또한 질병의 치료와 의학 특히 암의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.

[0093] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 대해 특이적인 항체 또는 본 발명에 따른 상기 펩티드와 MHC와의 복합체 그리고 이들을 만드는 방법에 관한 것이다.

[0094] 본 발명은 또한 T 세포 수용체(TCR), 특히 가용성 TCR(sTCR) 및 상동성 또는 동종이형 T 세포로 조작된 복제된 TCR 그리고 이러한 수용체를 만드는 방법은 물론 상기 TCR을 함유하거나 상기 TCR과 교차반응하는 NK 세포 또는

기타 세포들에 관한 것이다.

[0095] 항체 및 TCR은 즉시 가용한 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 151에 따른 펩티드의 면역치료적 사용의 추가 구현이다.

[0096] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 또는 전에 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항원 제시 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.

[0097] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 발명에 따른 숙주 세포의 배양과 상기 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터 펩티드의 단리를 포함한다.

[0098] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 상기 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.

[0099] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 항원 제시 세포는 서열번호 1 내지 서열번호 114, 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 63 또는 변이체 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 상기 펩티드를 발현할 수 있거나 발현하는 발현 벡터를 포함한다.

[0100] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 의해 제공된 활성화된 T 세포에 관한 것으로, 상기 T 세포는 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.

[0101] 본 발명은 또한 표적 세포가 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 환자에서 그 표적 세포를 죽이는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 본 발명에 따라 생산된 효과적인 수의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0102] 본 발명은 또한 설명한 일체의 펩티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 활성화 T 림프구, T 세포 수용체 또는 항체, 또는 본 발명에 따른 다른 펩티드 및/또는 펩티드-MHC-결합 분자를 약제로서 또는 약제의 제조에서의 사용에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 약제는 암에 대해 활성이다. 바람직하게는 상기 약제는 암에 대해 활성이다.

[0103] 바람직하게는 상기 약제는 세포 요법, 백신 또는 가용성 TCR 또는 항체에 근거한 단백질을 위한 것이다.

[0104] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로, 상기 암 세포는 RCC, 폐암, 뇌암, 위암, 결장암 또는 직장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 흑색종, 난소암 및 식도암, 그리고 바람직하기로는 RCC 세포이다.

[0105] 본 발명은 또한 여기서 "표적"이라 칭하며 암 바람직하게는 RCC의 진단에 사용할 수 있는 본 발명에 따른 펩티드에 근거하는 바이오마커에 관한 것이다. 마커는 펩티드 자체의 과다 제시 또는 상응하는 유전자의 과발현일 수 있다. 또한 마커는 치료, 바람직하게는 면역요법 그리고 가장 바람직하게는 바이오마커에 의해 파악된 동일한 표적을 대상으로 하는 면역요법의 성공 확률을 예측하는데 사용할 수도 있다. 예를 들어, 항체 또는 가용성 TCR은 MHC와의 복합체에서 관심 있는 펩티드의 존재를 검출하기 위해 종양의 부분의 염색에 사용할 수 있다.

[0106] 임의적으로, 그 항체는 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가의 효과기 기능을 갖는다.

[0107] 본 발명은 또 암 치료의 맥락에서 이러한 신규 표적들의 사용에 관한 것이다.

[0108] ABCC3은 간세포 암종, 난소암, 직장암, 골육종, 유방암, 비소세포 폐암, 다형성 아교모세포종 및 췌관 선암종과 연관이 있다(Mohelnikova-Duchonova et al., 2013; Molina-Pinelo et al., 2014; Goode et al., 2014; Liu et al., 2014c; Yu et al., 2014; Sedlakova et al., 2015; Zuniga-Garcia et al., 2015; Wang et al., 2014c).

[0109] ACLY는 유방암, 간암, 결장암, 폐암 및 전립선 암과 같은 다양한 종양에서 이상 발현되거나 종양 병기 및 분화와 역으로 상관관계가 있다(Zu et al., 2012).

[0110] 췌장암에서 ADAM8 과발현은 췌관 선암종 세포의 이동 및 침입성 증가와 연관이 있다(Schlomann et al., 2015). ADAM8은 폐암, 신세포 암종 및 뇌암에서 종양 세포의 이동 및 침입에 관여한다.

[0111] ADCY5 유전자 과메틸화 및 감소된 mRNA 발현은 급성 림프모구 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 폐 선암종에서 발생한다(Kuang et al., 2008; Tong et al., 2010; Sato et al., 2013a).

[0112] AHNAK2는 종양 성장 및 침입에 관여하는 인자인 섬유모세포 성장 인자 1(FGF1)의 비고전적 분비 경로에서 중요

한 요소이다(Kirov et al., 2015).

[0113] AIFM2의 발현은 대다수의 인간 종양에서 하향조절되는 것으로 나타났다(Wu et al., 2004; Mei et al., 2006). AIFM2는 난소암 세포주에서 종양원성의 기능적 억제와 연관된 9개 유전자 중의 하나로 확인되었다(Notaridou et al., 2011).

[0114] AKR1A1은 유방암에서 상향조절되는 것으로 나타났으며 폐암 및 후두암과 연관되어 있다(Penning, 2014; Hlavac et al., 2014; Kim et al., 2012).

[0115] ALPK2 발현은 대장암에서 하향조절되며 정상적인 결장 음와(colonic crypt)의 선종으로의 전이에서 가능한 역할을 수행한다(Yoshida et al., 2012). ALPK2는 위암에서 복제 수의 손실과 과소발현 사이의 강력한 연관을 나타낸다(Junnila et al., 2010).

[0117] ANGPTL4는 유방암과 장액성 난소암에서 상향조절되는 것으로 나타났으며, 아교모세포종, 간세포 암종, 구강 편평 세포 암종 및 폐암과 연관이 있다(Ferguson et al., 2013; Tanaka et al., 2015; Ng et al., 2014; Garner et al., 2015; Schumann et al., 2015; Johnson et al., 2015).

[0118] APOL1 발현은 신세포 암종 조직과 세포주에서 하향조절된다(Hu et al., 2012).

[0119] ARRDC3은 유방암 및 췌장암과 연관된다(Wang et al., 2014a; Huang et al., 2012a).

[0120] ATG2B 틀이동 돌연변이(frameshift mutation)는 미세위상 및 불안정성이 높은 위암 및 대장 암종에서 흔하다(Kang et al., 2009).

[0121] ATP11A는 대장암에서 상향조절되는 것으로 나타났으며 림프모구 백혈병과 연관이 있고 또한 대장암에서 전이의 바이오마커로서 제안된다(Miyoshi et al., 2010; Zhang et al., 2005).

[0122] ATP2A1은 암 악액질에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Fontes-Oliveira et al., 2013).

[0123] ATP2A2는 피부암, 결장암 및 폐암과 연관되어 있다(Korosec et al., 2006; Hovnanian, 2007).

[0124] CACNA1H는 알도스테론 생성 선종, 전립선암 및 유방암과 연관되어 있다(Felizola et al., 2014; Asaga et al., 2006; Gackiere et al., 2013).

[0125] CACNA1I는 결장암, 유방암 및 전립선암과 연관되어 있다(Basson et al., 2015).

[0126] CARD8은 난소암, 유방암 및 폐암과 같은 여러 암의 세포주 그리고 대장암, 위암 또는 유방암 환자로부터 유래된 조직에서 고도로 발현된다(Pathan et al., 2001; Yamamoto et al., 2005).

[0127] CCT6A는 고환 생식세포 종양 및 악성 흑색종과 연관되어 있다(Tanic et al., 2006; Alagaratnam et al., 2011).

[0128] CIT는 인접한 비종양 조직에 비해 간세포 암종(HCC)에서 빈번히 상향조절된다. RNAi에 의한 CIT 녹다운(knock-down)은 생체 내에서 HCC 세포의 종양원성을 억제한다(Fu et al., 2011).

[0129] 종양 세포에서의 CLIC4의 하향조절 그리고 종양 기질에서 상향조절은 신장암, 난소암, 유방암, 폐암 및 피부암 등 다수의 인간 암에서 공통되며 악성 진행을 표시한다(Suh et al., 2007a; Okudela et al., 2014; Suh et al., 2007b).

[0130] COL18A1의 차등 발현이 방광암, 횡문근양 종양 및 난소 암종에서 보고되었으며, 이 유전자 내부의 특이적 다형성은 산발성 유방암에 대한 위험을 증가시키는 것으로 나타났다(Fang et al., 2013; Gadd et al., 2010; Lourenco et al., 2006; Peters et al., 2005).

[0131] COL6A2는 자궁경부암, 고등급 장액성 난소암에서의 불량한 전체 생존율, B-전구체 급성 림프모구 백혈병, 간세포 암종, 원발성 및 전이성 뇌종양, 폐의 편평세포 암종, 두경부 편평세포 암종과 연관이 있으며, 자궁경부암에서 잠재적 DNA 메틸화로 설명되었다(Cheon et al., 2014; Chen et al., 2014c; Vachani et al., 2007; Liu et al., 2010b; Seong et al., 2012; Hogan et al., 2011).

[0132] CUL7은 췌장암 및 간세포 암종과 연관이 있다(Wang et al., 2014b; Paradis et al., 2013).

[0133] CYB5A 발현은 간세포 암종에서 하향조절된다(Khan et al., 2013a). CYB5A는 자가포식(autophagy) 유도 및

TRAF6 조절을 통한 종양 억제제 기능을 나타내는 췌관 선암종의 예후 인자이다(Giovannetti et al., 2014). CYB5A는 발암성 분자를 해독하는 효소를 인코딩하며 췌장암의 예후 인자이다(Blanke et al., 2014; Giovannetti et al., 2014).

[0134] CYFIP2 발현은 유방암에서 새로 형성된 림프절에서 증가된다(Gantsev et al., 2013). CYFIP2 발현은 대조 조직에 비해 인간의 위 종양 샘플에서 감소된다(Cheng et al., 2013). CYFIP2는 만성 림프구성 백혈병에서 여러 세포자멸사 관련 유전자 중 하나이다(Halldorsdottir et al., 2012).

[0135] CYP2J2는 식도암, 폐암, 유방암, 위암, 간암 및 결장암 등 다양한 인간 암에서 과발현되는 것으로 나타난 효소이다. CYP2J2는 EGFR 인산화의 촉진 그리고 PI3K 및 MAPK 신호전달의 활성화에 의해 암종 세포의 증식을 증가시키고 세포자멸사를 억제하며 또한 티로신 키나제 억제제를 추가로 대사함으로써 항암 제제에 대해 내성을 부여한다(Jiang et al., 2005; Narjoz et al., 2014).

[0136] DCBLD2는 아교모세포종과 두경부암(HNC)에서 상향조절되며 EGFR 자극에 의한 종양생성에 요구된다(Feng et al., 2014). 더욱이, DCBLD2는 고도의 전이성 폐암 하위주(subline)와 조직 샘플에서 상향조절된다. 이와 반대로 위암에서 DCBLD2의 발현은 그 프로모터의 과메틸화에 의해 침묵된다.

[0137] DDX41은 급성 골수성 백혈병과 연관되어 있다(Antony-Debre and Steidl, 2015).

[0138] DROSHA는 마이크로 RNA 생합성에서 중대한 2개의 효소 중 하나이며, 위장 종양, 유방암 및 자궁경부암 등 다수의 암에서 과발현되고, 종양 세포의 증식, 군락 형성 및 이동을 강화시키는 것으로 보인다(Avery-Kiejda et al., 2014; Havens et al., 2014; Zhou et al., 2013).

[0139] DUSP14 유전자의 단일 뉴클레오티드 다형성은 변형된 흑색종의 위험과 연관이 있다(Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013b).

[0140] EGFR은 유방암 및 타액선 아데노이드 암종에서 상향 조절되는 것으로 나타났으며, 비소세포 폐암, 간세포 암종 및 대장암과 연관이 있다(Dienstmann et al., 2015; Wang et al., 2015b; Steinway et al., 2015; Xiao et al., 2015; Inoue et al., 2015).

[0141] EGLN3 발현은 비소세포 폐암 및 신세포 암종에서 상향조절되는 것으로 나타났다. 더욱이 EGLN3은 투명 세포 신세포 암종 및 대장암과 연관이 있다(Tanaka et al., 2014; Yang et al., 2014d; Toth et al., 2014; Chu et al., 2014).

[0142] ENO1 발현은 비소세포 폐암에서 상향조절되는 것으로 나타났다. 더욱이 ENO1은 자궁내막 암종, 췌관 선암종, 아교모세포종 및 비인두 암종과 연관이 있다(Yang et al., 2014b; Naryzhnyi et al., 2014; Principe et al., 2015; Fu et al., 2015; Zhao et al., 2015a).

[0143] ENO2는 폐암, 고형 신경내분비 암종, 과립세포 종양 및 췌장암과 연관이 있다(Sigari et al., 2014; Zizi-Sermpetzoglou et al., 2014; Liu et al., 2014a; Bedir et al., 2015; Wang et al., 2013b).

[0144] ENO3은 B 세포 림프종, 포상 연부 육종, 횡문근육종 및 신경모세포종과 연관이 있다(Oka et al., 1989; Mukai et al., 1986; Royds et al., 1985; Ishiguro et al., 1984).

[0145] ENPP3은 신경모세포종, II기 대장암, 두경부 편평 세포 암종, 급성 호염구성 백혈병 및 담관 암종과 연관이 있다(Agesen et al., 2012; Staal-Viliare et al., 2007; Gomez-Villafuertes et al., 2014; Yano et al., 2004; Thiel et al., 2011).

[0146] ERAP1은 자궁경부 암종, 신세포 암종, 식도 편평 세포 암종, 흑색종, 난소 암종 및 신경모세포종과 연관이 있다(Mehta et al., 2015; Forloni et al., 2010; Liu et al., 2010a; Kamphausen et al., 2010; Ayshamgul et al., 2011; Stoehr et al., 2013).

[0147] ESM1 발현은 위암에서 상승되는 것으로 나타났으며, 간모세포종, 비인두 암종 및 난소암과 연관이 있고 또한 위암에 대한 잠재적 바이오마커일 수 있다(Yu et al., 2013; Dong et al., 2014; Lv et al., 2014; El Behery et al., 2013).

[0148] FHL2는 급성 골수성 백혈병, 난소암, 폐암, 결장 암종, 유방암, 췌관 선암종 및 인간 악성 흑색종에서 상향조절되는 것으로 나타났으며 전립선암 및 횡문근육종에서는 하향조절되는 것으로 나타났다(Kleiber et al., 2007; Westphal et al., 2015; Qian et al., 2010; Zienert et al., 2015).

[0149] FKBP10은 백혈병 세포에서 아드리아마이신 내성 표현형의 획득 및 유지에 참여하는 신규 유전자로서 확인되었다(Sun et al., 2014). FKBP10은 이의 상향조절을 통한 대장암과 관련된 바 있다. 이와 반대로 FKBP10의 과소발현은 상피 난소 암종의 특징이었다.

[0150] FLT1은 결장암, 전립선암, 비소세포 폐암 및 췌장암과 연관이 있다(Awasthi et al., 2015; Heist et al., 2015; Tsourlakis et al., 2015; Zhang et al., 2015).

[0151] FZD1은 식도암, 갑상선 암종, 자궁 육종, 전립선암, 편평세포/선편평세포 암종 및 담낭의 선암종, 결장암 및 유방암과 연관이 있다(Goksel et al., 2014; Hung et al., 2014; Davidov et al., 2014; Su et al., 2015; Zhang et al., 2012a; Planutis et al., 2013; Devaney et al., 2013; Li et al., 2014a).

[0152] FZD2는 식도암에서 상향조절된 것으로 나타났으며, 위장 기질 종양, 타액선 선양 낭성 암종 및 대장암과 연관이 있다(Wang and Zheng, 2014; Ding et al., 2015; Prakash et al., 2005; Liu et al., 2014b).

[0153] FZD7은 난소암에서 상향조절된 것으로 나타났으며, 자궁경부암, 간세포 암종, 대장암, 흑색종, 유방암, 위암 및 중심성 신경세포종과 연관이 있다(Anastas et al., 2014; Li et al., 2014c; Gonzalez et al., 2014; Song et al., 2014; Deng et al., 2015; Asad et al., 2014; Vasiljevic et al., 2013; Rocken and Warneke, 2012; Dey et al., 2013).

[0154] GAL3ST1 활성도는 신세포 암종(RCC) 조직 및 RCC 세포주 SMKT-R3에서 증가된다(Honke et al., 1996). GAL3ST1 발현은 정상 난소의 기질 조직 및 정상 표면의 난소 상피 세포 대비 난소의 상피 암종 세포에서 상향조절된다(Liu et al., 2010c).

[0155] GALNT2는 N-아세틸갈락토사미닐전이효소 2이며, 위암 세포에서는 MMP-2 및 TGF-β1의 감소를 통해, 그리고 간세포 암종(여기서는 빈번히 하향조절됨)에서는 EGF 수용체 활성도의 억제를 통해 항증식성 및 항전이성 활성도를 나타내는 것으로 나타났다. 이와 반대로 편평 세포 암종에서 GALNT2의 과발현은 O-글리코실화 및 EGFR 활성도의 변형에 의해 종양 세포의 침습 가능성을 강화시키는 것으로 보고되었다(Hua et al., 2012; Lin et al., 2014; Wu et al., 2011).

[0156] GRAMD4는 간세포 암종(HCC) 세포주 및 HCC 조직에서 상향조절되며, 증가된 발현은 HCC의 임상병리학적 특성과 상관관계가 있다(Zhang et al., 2013).

[0157] HAVCR1은 A형 간염 바이러스 세포 수용체 1 또는 KIM-1로도 알려져 있으며, 인간 A형 간염 바이러스와 TIMD4 모두에 대한 막 수용체 단백질을 인코딩하며 천식과 알레르기성 질병의 완화에 관여할 수 있다(RefSeq, 2002). HAVCR1은 난소 투명 세포 암종 및 간세포 암종과 연관된 신규 바이오마커 후보로서 묘사되었다(Bonventre, 2014; Kobayashi et al., 2015). HAVCR1은 투명 세포 신장 세포 암종-유래 세포주에서 IL-6/STAT-3/HIF-1A 축을 활성화하며 종양 진행 및 환자 결과를 결정하는 것으로 나타났다(Cuadros et al., 2014). 신장에서 HAVCR1의 구성 발현은 투명 세포 신장 세포 암종 발육에 대한 잠재적 감수성 소질로서 묘사되었다(Cuadros et al., 2013). HAVCR1은 신장 세포 및 난소 투명 세포 암종 그리고 대장암에서 상향조절되는 것으로 묘사되었다(Wang et al., 2013b). HAVCR1 상향조절은 대장암에서 잠재적인 진단 바이오마커 그리고 수술 후 보다 긴 무질병 기간의 예후 마커로서 묘사되었으며, 이는 또한 대장암에서 전이 케스케이드에도 연루될 수 있다(Wang et al., 2013b). HAVCR1은 T 세포 거대 과립 림프구성 백혈병과 연관된 것으로 나타났다(Wlodarski et al., 2008).

[0158] HSF2BP는 HSF2와 연관되는 HSF2 결합 단백질을 인코딩하며 HSF2 활성화 조절에 관여할 수 있다(RefSeq, 2002).

[0159] HSF4는 열-충격 전사 인자 4를 인코딩하며, 이는 열이나 기타 응력의 조건 하에서 열-충격 반응 유전자를 활성화시킨다(RefSeq, 2002). HSF4는 아교모세포종에서 하향조절되는 것으로 나타났다(Mustafa et al., 2010).

[0160] 여러 연구들은 자궁경부암, 신세포 암종 및 방광암의 질병 진행에서 HSPA2의 중요한 역할을 시사한다. 유전자 내부의 다형성은 위암의 발생과 연관이 있다(Ferrer-Ferrer et al., 2013; Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b; Singh and Suri, 2014).

[0161] HSPA8은 식도의 편평세포 암종에서 과발현되는 것으로 나타났으며, 실험관 내 식도암 세포에서의 HSPA8의 높은 발현 수준은 이러한 세포에 대한 산화성 스트레스 유도 세포자멸사에 대해 길항작용을 했다. 더욱이 HSPA8은 다발골수종 및 대장성 암종에서 과발현되며 HSPA8의 BCR-ABL1 유도 발현은 만성 골수성 백혈병에서 세포 생존을 촉진한다(Chatterjee et al., 2013; Dadkhah et al., 2013; Jose-Eneriz et al., 2008; Kubota et al., 2010; Wang et al., 2013a).

[0162] HSPG2는 흑색종, 구강 편평 세포 암종, 투명 세포 신세포 암종 및 전립선 종양과 연관이 있으며 그 하향조절은 간세포 암종 및 결장 종양에서 나타났다(Nikitovic et al., 2014; Warren et al., 2014; Gbormittah et al., 2014; Zaghloul et al., 2015; Kawahara et al., 2014; Suhovskih et al., 2015; 2015; Elewa et al., 2015; Lai et al., 2011).

[0163] HTRA1은 간세포 암종, 비장 변연부 림프종, 편평 세포 암종 및 신경모세포종과 연관이 있으며, 위암, 유방암, 담낭암 및 폐 선암종에서 하향조절된 것으로 나타났다(Xu et al., 2014; D'Angelo et al., 2014; Fujinaga et al., 2014; Sahasrabuddhe et al., 2014; Franco et al., 2015; Arribas et al., 2015; Zhao et al., 2015b; Bao et al., 2015).

[0164] HTRA3은 구강 편평 세포 암종과 갑상선 암종에서 상향조절되고, 난소암, 유방암, 자궁내막 암 및 폐암에서 하향조절되는 것으로 나타났으며, 대장암과 연관이 있고 구강암의 잠재적 예후 바이오마커일 수 있다(Karagiannis et al., 2014; Zhao et al., 2014; Moriya et al., 2015; Narkiewicz et al., 2009; Beleford et al., 2010; Zurawa-Janicka et al., 2012; Yin et al., 2013).

[0165] IGF2BP3은 인슐린 유사 성장 인자 II의 번역을 억제하는 종양 태아 단백질인 인슐린 유사 성장 인자 II mRNA 결합 단백질 3을 인코딩한다(RefSeq, 2002). 시험관내 연구에서는 IGF2BP3이 종양 세포 증식, 유착 및 침습을 촉진하는 것으로 나타났다. 더욱이 IGF2BP3은 공격적이고 진행성인 암과 연관이 있는 것으로 나타났다(Bell et al., 2013; Gong et al., 2014). IGF2BP3 과발현은 다수의 종양 유형, 예를 들어 신경 모세포종, 대장암, 간내 담관암종, 간세포 암종, 전립선암 및 신장세포 암종에서 묘사되고 불량한 예후, 진행된 종양 병기 및 전이와 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013; Yuan et al., 2009).

[0166] 새로 획득된 IGLC1과 재발 결실은 만성 골수성 백혈병(CML)에서 티로신 키나제 억제제(TKI) 내성을 보였던 45명의 환자 중 3명에서 검출되었다(Nowak et al., 2010).

[0167] IGLC2의 이형접합성 손실은 두개내 수막종의 의존하는 경우(informative case) 중 50%에서 나타난 바 있다(Kim et al., 1993).

[0168] IGLJ3은 털세포 백혈병에서 바람직한 경쇄 IG 람다의 성분에 범용으로 사용되는 연결 유전자이다(Forconi et al., 2008).

[0169] IGLV2-14는 정상적, 자가반응성 및 종양성 세포의 관련 목록에 비해 만성 림프구성 백혈병(CLL)에서 세 번째로 가장 빈번한 IGLV 유전자이다(Stamatopoulos et al., 2005).

[0170] IGLV3-21은 정상적, 자가반응성 및 종양성 세포의 관련 목록에 비해 만성 림프구성 백혈병(CLL)에서 가장 빈번한 IGLV 유전자이다(Stamatopoulos et al., 2005).

[0171] INADL은 비소세포 폐암에서 시스플라틴-젬사타빈 병용 화학요법에 반응하여 하향조절된다(Ma et al., 2015).

[0172] ITGA3은 대장암에서 상향조절되는 것으로 나타났으며, 전립선암, 표피양 암종, 조기 위 암종 및 골육종과 연관이 있다(Yang et al., 2014c; Chong et al., 2014; Lustosa et al., 2014; Ren et al., 2014; Bauer et al., 2014; Mertens-Walker et al., 2015).

[0173] ITGB4는 전립선암, 위암, 유방암, 구강 편평 세포 암종 및 난소암과 연관이 있으며 췌관 선암종에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Chen et al., 2014b; Xin et al., 2014; Zubor et al., 2015; Masugi et al., 2015; Gao et al., 2015b; Kawakami et al., 2015). ITGB4(CD104라고도 함)는 알파 6 아단위와 연관되는 경향이 있으며, 식도 편평 세포 암종, 방광암 및 난소암과 같은 여러 침습성 암종의 생물학에서 결정적 역할을 할 가능성이 높다(Kwon et al., 2013; Pereira et al., 2014; Chen et al., 2014b). ITGB4에서 단일 뉴클레오티드 다형성은 종양의 공격성과 생존에 영향을 주는 것으로 보이며 유방암 환자에서 예후적 가치가 있을 수 있다(Brendle et al., 2008).

[0174] IVNS1ABP는 BCL1/JH 양성 다발 골수종과 연관이 있으며 다발 골수종의 잠재적 예후 표지자일 수 있다(Ni et al., 2012).

[0175] JAG2는 췌관 선암종, 간세포 암종 및 망막모세포종에서 상향조절된 것으로 나타났으며, 다발 골수종, 자궁내막암, 전립선암, 골육종, 두경부암 및 방광 요로상피 암종과 연관이 있다(Sun et al., 2014a; Li et al., 2014b;

Carvalho et al., 2014; Xiao et al., 2014; Zhang et al., 2014a; Sasnauskiene et al., 2014; Lu et al., 2014; Hu et al., 2015; Li et al., 2013).

[0176] KCNK15 유전자의 과메틸화는 결장암, 백혈병 및 방광암 등 여러 세포주에서 발견되었다(Shu et al., 2006).

[0177] KIF12는 유방암에서 과발현되는 것으로 나타났으며, 신장 종양, 자궁암 및 췌장암과 연관이 있다(Katoh and Katoh, 2005; Tan et al., 2012).

[0178] KLHDC7B는 자궁경부 편평 세포 암종과 연관이 있으며, 자궁경부 편평 세포 암종의 잠재적 바이오마커이다(Guo et al., 2015).

[0179] LRP2는 간세포 암종, 췌장암, 악성 흑색종, 원발성 중추신경계 림프종 및 투명 세포 신세포 암종과 연관이 있다(Fernandez-Banet et al., 2014; Andersen et al., 2015; Pedersen et al., 2010; Schuetz et al., 2005; Anderson et al., 2013).

[0180] LRRK2는 호르몬 관련 암, 유방암 및 파킨슨병 환자에서 수반하는 비피부 암과 연관이 있으며, 파킨슨병 환자에서 혈액암과 연관이 있을 수 있다(Ruiz-Martinez et al., 2014; Agalliu et al., 2015; Inzelberg et al., 2012).

[0181] MACC1은 위암, 대장암 및 유방암 등 다수의 암 객체에서 과발현되며, 환자의 암 진행, 전이 및 불량한 생존율과 연관이 있다(Huang et al., 2013; Ma et al., 2013; Stein, 2013; Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015c; Ilm et al., 2015). MACC1은 베타-카테닌 표적화 및 PI3K/AKT 신호전달 경로를 통하여 발암을 촉진시키며, 이는 c-Met 및 베타-카테닌 그리고 c-Myc, cyclin D1, caspase9, BAD 및 MMP9 등 이들의 하류 표적 유전자의 증가로 이어진다(Zhen et al., 2014; Yao et al., 2015).

[0182] MAGED2 과발현은 흑색종, 유방암 및 결장암과 연관이 있다(Li et al., 2004; Strekalova et al., 2015).

[0183] MET는 역분화 지방육종에서 상향조절된 것으로 나타났으며, 멜라닌세포성 종양, 간세포 암종, 비소세포 폐암, 유전성 유두상 신장암 및 위 선암종과 연관이 있다(Petrini, 2015; Finocchiaro et al., 2015; Steinway et al., 2015; Bill et al., 2015; Yeh et al., 2015).

[0184] NAT8은 림프모구 백혈병과 연관이 있다(Mak et al., 2014).

[0185] NDRG1은 췌장암과 같은 암에서 전이 억제제이며, 전립선암과 결장암에서는 하향조절되는 것으로 나타난 반면 간세포 암종과 자궁경부 선암종에서는 상향조절되는 것으로 나타났다(Nishio et al., 2008; Cheng et al., 2011; Bae et al., 2013; Richardson et al., 2013).

[0186] NLRC5는 림프양 유래 종양 세포주에서 하향조절되는 것으로 나타났다(Staehli et al., 2012).

[0187] NPTX2는 췌장암, 유잉(Ewing) 육종 및 아교모세포종에서 촉진제 과메틸화에 의해 하향조절된다(Zhang et al., 2012b; Alholle et al., 2013; Shukla et al., 2013).

[0188] NQO2는 자궁내막암, 유두상 갑상선 미소암종 및 식도암과 연관이 있다(Hevir-Kene and Rizner, 2015; Malik et al., 2012; Lee et al., 2013).

[0189] OPN3 발현은 5-플루오로우라실에 민감한 Bel7402 및 HepG2 세포에 비해 5-플루오로우라실 내성의 간세포 암종 세포주에서 감소된다(Jiao et al., 2012).

[0190] PDZD2는 소장 신경내분비 종양 및 전립선암과 연관이 있다(Tam et al., 2006; Rehfeld et al., 2014).

[0191] PDZK1의 과발현은 다발 골수종의 약물 내성에서 역할을 할 수 있다(RefSeq, 2002).

[0192] PFKFB3은 위암, 결장암, 폐암, 유방암에서 상향조절되는 것으로 나타났으며, 췌장암, 전립선암 및 아교모세포종과 연관이 있다(Minchenko et al., 2014; Fleischer et al., 2011; Ragnum et al., 2013).

[0193] PLCB1은 원발성 두경부 편평 세포 암종, 골수성 백혈병 및 다형 아교모세포종과 연관이 있다(Guerrero-Preston et al., 2014; Waugh, 2014; Ramazzotti et al., 2011).

[0194] PLIN2는 지질 저장 및 조기 대장암의 검출을 위한 혈장 바이오마커에 관여한다(Matsubara et al., 2011). PLIN2는 투명 세포 및 유두상 신세포 암종 환자에서 대조군에 비해 유의하게 증가한다. PLIN2의 수술전 요중 농도는 종양 크기와 병기를 반영한다(Morrissey et al., 2014). PLIN2 발현은 정상 조직과 폐의 편평 세포 암종보다 폐 선암종의 표본에서 유의하게 더 높다(Zhang et al., 2014b).

[0195] PLOD1 발현은 인간 유방암 진행과 연관이 있다(Gilkes et al., 2013).

[0196] PRKCDBP는 유방암의 뇌 전이 및 원발성 유방암에서 하향조절되는 것으로 나타났다. 추가적으로 PRKCDBP는 유방암, 대장암, 자궁내막암, 폐암 및 위암과 연관이 있다(Bai et al., 2012; Moutinho et al., 2014; Li et al., 2015; Tong et al., 2012; Wikman et al., 2012).

[0197] RASGRP3은 아교모세포종, 유방암 및 인간 흑색종에서 상향조절되는 것으로 나타났으며, 전립선암, 간세포 암종 및 구강암과 연관이 있다(Nagy et al., 2014; Sowalsky et al., 2015; Lee et al., 2015; Yang et al., 2011; Bhatnagar et al., 2012; Martinez-Lopez et al., 2012).

[0198] RCN1은 인간의 내피 및 전립선암 세포주에 있는 형질막에 국소화된다(RefSeq, 2002). RCN1은 유방암에서 과발현된다.

[0199] REN은 신세포 암종, 췌장암, 결합조직형성 소원형 세포 종양 및 사구체 옆 세포 종양과 연관이 있다(Elouazzani et al., 2014; Lee et al., 2014; Nakai et al., 2015; Araujo et al., 2015).

[0200] RGS5는 폐암에서 하향조절되고 투명 세포 신세포 암종, 간세포 암종, 여러 림프종 아형 및 부갑상선 선종에서 상향조절되는 것으로 나타났으며, 대장암, 신경모세포종, 난소암, 비소세포 폐암 및 위암과 연관이 있다(Volz et al., 2015; Xu et al., 2015; Wang et al., 2010a; Dannenmann et al., 2013; Koh et al., 2011; Huang et al., 2012b; Altman et al., 2012; Kumps et al., 2013; Sethakorn and Dulin, 2013; Hu et al., 2013).

[0201] RPGRIP1L은 유사분열 체크포인트 단백질 Mad2를 통해 부분적으로 고정-독립 성장을 억제하며, 인간 간세포 암종에서 후보 종양 억제제 유전자이다(Lin et al., 2009).

[0202] RRAD는 폐암, 난소암 및 비인두 암종에서 하향조절되는 것으로 나타났으며, 다형 아교모세포종, 식도 편평 세포 암종 및 간세포 암종과 연관이 있다(Wang et al., 2014d; Yeom et al., 2014; Liu et al., 2015; Mo et al., 2012; Lin and Chuang, 2012; Jin et al., 2013).

[0203] SEMA5B는 신세포 암종에서 상향조절되지만, 지금까지 그 발현은 다른 암 유형이나 정상 조직에서는 발견된 바 없다(Hirota et al., 2006).

[0204] 플라스민-알파 2-플라스민 억제제 복합체의 혈장 수준은 비소세포 폐 암종에서 생존율의 예측자인 것으로 나타났으며, 알파 2-항플라스민의 낮은 활성도가 전립선 암종 환자의 혈액에서 관찰된 바 있다(Taguchi et al., 1996; Zietek et al., 1996).

[0205] SLC16A3 발현은 간세포 암 환자에서의 불량한 예후 그리고 세포주 실험에서 세포 증식, 이동 및 침입의 증가와 연관되었다(Gao et al., 2014a). 종양 생성에서 SLC16A3의 기능적 관여가 췌장암의 아집단에서 나타났다.

[0206] SLC16A4는 비소세포 폐암, 선양 암종, 췌관 암종, 구강 편평 세포 암종 및 위암에서 상향조절되는 것으로 나타났으며, 유방암 및 간세포 암종과 연관이 있다(Baek et al., 2014; Gao et al., 2015a; Yan et al., 2014; Jensen et al., 2014; Koo and Yoon, 2015; Granja et al., 2015; Baenke et al., 2015).

[0207] 유기 음이온 수송체 2 및 유기 양이온 수송체 2의 높은 발현은 FOLFOX 기반 화학요법으로 치료받는 전이성 대장암 환자에서의 양호한 결과에 대한 독립적 예측자이다(Tashiro et al., 2014). SLC22A2, SLC22A11, SLC28A1, SLC28A3 및 SLC29A1의 mRNA 발현은 비종양성 췌장 조직과 비교 시 췌장 종양에서 하향조절되었다(Mohelnikova-Duchonova et al., 2013a). SLC22A2(OCT2라고도 알려진)는 근위 세뇨관에서 시스플라틴의 흡수를 조절하며, OCT2의 억제는 중증의 시스플라틴 유도 신장독성에 대해 보호한다(Sprowl et al., 2013).

[0208] SLC47A1은 전립선암과 연관이 있다(Joerger et al., 2015).

[0209] SLC6A13 발현은 결장암에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Tran et al., 2014b).

[0210] SMYD2는 식도 편평 원발성 암종, 유방암, 간암, 위암 및 급성 림프모구 백혈병에서 상향조절되는 것으로 나타났다(Sakamoto et al., 2014; Komatsu et al., 2015; Nguyen et al., 2015).

[0211] SYT9는 자궁경부암 및 전립선암과 연관이 있으며 자궁경부암에 대한 잠재적 바이오마커를 제시할 수 있다(Chen et al., 2014c; Bao et al., 2011).

[0212] TGFBI 발현은 담관암종, 간 암종, 위 암종, 식도 편평 세포 암종 및 투명 세포 신세포 암종에서 상승된 것으로 나타났다. 더욱이 TGFBI는 대장암과 연관이 있는 것으로 나타났다(Lebdai et al., 2015; Ozawa et al., 2014;

Zhu et al., 2015; Han et al., 2015).

[0213] THY1은 항침습성 활성을 지닌 비인두 암종에서 종양 억제 유전자 후보이다(Lung et al., 2010).

[0214] TIMP1 단백질 발현은 전이성 간 질환 환자, 아동 급성 림프모구 백혈병 및 유방암에서 불량한 예후와 연관이 있다(Bunatova et al., 2012; Scrideli et al., 2010; Sieuwerts et al., 2007). TIMP1은 췌장암의 검출에 대한 잠재적 혈청 표지자이다(Slater et al., 2013). TIMP1은 잘 알려진 갑상선암 표지자이다(Griffith et al., 2006).

[0215] TPI1은 골육종에서 하향조절되는 것으로 나타났으며, 유방암, 식도 편평 세포 암종, 아교모세포종, 자궁내막암 및 난소암과 연관이 있다(Zamani-Ahmadmahmudi et al., 2014; Chen et al., 2014a; Yoshida et al., 2013; Khan et al., 2013b; Gao et al., 2014).

[0216] TRIP6은 유잉(Ewing) 육종, 비인두 암종 및 아교모세포종에서 상향조절되는 것으로 나타났으며, 유방암과 연관이 있다(Pavlikova et al., 2015; Lai et al., 2010; Fei et al., 2013; Grunewald et al., 2013).

[0217] UBE2QL1 전사는 신세포 암종에서 하향조절되는 것으로 나타났다(Wake et al., 2013).

[0218] UGDH는 대장암, 전립선암, 난소 장액성 선암종, 유방암 및 간세포 암종과 연관이 있다(Lapointe and Labrie, 1999; Konno, 2001; Fan et al., 2009; Wei et al., 2009; Wang et al., 2010b).

[0219] VKORC1 다형태는 전립선암의 발생 위험과 연관이 있을 수 있다(Nimptsch et al., 2009). VKORC1은 PIVKAII(비타민 K의 부재에 의해 유도되는 단백질)의 농도에 영향을 미치며, 이는 간세포 암종의 스크리닝에 사용된다(Wang et al., 2010c).

[0220] 이제 본 발명은 그 바람직한 구현을 설명하는 다음의 실시예에서 그리고 동반되는 도면을 참조하여 묘사될 것이나, 이에 국한되지 않는다. 본 발명의 목적상, 여기에 인용된 모든 참조 문헌들은 그 전문이 포함된다.

과제의 해결 수단

[0221] 면역 반응 자극은 숙주 면역계가 외부 물질로 인식하는 항원의 존재에 의존한다. 종양 연관 항원의 발견은 숙주의 면역계를 종양 성장에 개입하는 데 사용할 가능성을 제기했다. 면역계의 체액성 그리고 세포성 지류를 이용하는 다양한 기전이 현재 암 면역 치료에서 탐색되고 있다.

[0222] 세포 면역 반응의 특정 요소들은 종양 세포를 특이적으로 인식하고 파괴할 수 있다. T 세포의 종양 침투 세포 군락 또는 말초 혈액에서의 단리는 이러한 T 세포가 암에 대해 자연 면역 방어로써의 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다. 시토졸에 자리잡은 단백질 또는 불완전 리보솜 생성물(DRIPS)에서 파생된 보통 8 내지 10의 아미노산 잔기로 이루어진 주조직적합 복합체(MHC)를 가진 펩티드의 클래스 I 분자를 인식하는 CD8 양성 T 세포는 특히, 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC-분자도 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지정된다.

[0223] "T-세포 반응"이란 특이적 증식과 시험관 내 또는 생체 내에서 유도되는 효과기 기능의 활성화를 의미한다. MHC 클래스 I 제한 세포 독성 T 세포의 경우, 효과기 기능이 펩티드 펄스, 펩티드 전조 펄스 또는 자연적 펩티드 제시 표적 세포들의 용해, 시토카인의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 인터페론 감마, TNF 알파, 또는 IL-2, 효과기 분자의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 그랜자임 또는 퍼로린 또는 탈과립일 수 있다.

[0224] "펩티드"란 용어는 여기서 이웃 아미노산의 알파 아미노와 카보닐 기 사이에 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 일련의 아미노산 잔기를 지정하기 위해 사용한다. 펩티드는 아미노산 9개의 길이가 바람직하지만 아미노산 8개까지 짧을 수도 있고 아미노산 10, 11 또는 12개까지 길 수도 있으며, MHC 클래스 II 펩티드의 경우(본 발명의 펩티드의 연장된 변이) 그 길이가 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산일 수 있다.

[0225] 더욱이 "펩티드"라는 용어는 알파 아미노 기와 이웃 아미노산의 카보닐 기 사이의 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 아미노산 잔기의 서열에 의한 염을 포함한다. 바람직하게는 이 염은 예를 들어 염화물 또는 아세트산염(삼분화 아세트산염)과 같은 약학적으로 허용되는 펩티드의 염이다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 펩티드가 *생체 내*에서 염이 아니므로 *생체 내* 상태의 펩티드와는 실질적으로 다르다는 점을 유의해야 한다.

[0226] "펩티드"라는 용어는 "올리고펩티드"도 포함한다. 여기에서 "올리고펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노 기 및 카보닐 기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 발명에서 올리고펩티드의 길이는 올바른 에피토프가 유지되는 이상 중요하지 않다. 올리고펩티드는 일반적으로 30개 아미노산 보다 길이가 짧고, 15개 아미노산 보다 길다.

[0227] "폴리펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노 기 및 카보닐 기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 일련의 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 발명에서 폴리펩티드의 길이는 정확한 에피토프들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 펩티드 또는 올리고 펩티드와 다르게, 폴리펩티드는 약 30개 아미노산 잔기 이상의 분자를 가지고 있는 것을 언급한다.

[0228] 이런 분자의 펩티드, 올리고펩티드, 단백질, 또는 폴리뉴클레오티드 인코딩은 면역 반응을 유도할 수 있으면 "면역성"(따라서 본 발명에서의 "면역원")이다. 본 발명의 경우, 면역성은 T 세포 반응을 유도하는 능력으로 특정하게 정의된다. 그러므로, "면역원"은 면역 반응을 유도할 수 있는 분자이고, 본 발명의 경우, T 세포 반응을 유도할 수 있는 분자이다. 다른 양태에서, 면역원은 펩티드, 펩티드와 MHC의 복합체, 올리고펩티드 및/또는 특정 항체나 항체에 대한 TCR을 높이는데 사용되는 단백질일 수 있다.

[0229] 클래스 I T 세포 "에피토프"은 적당한 친화력을 가진 MHC/펩티드 혼합물에 결합하는 T 세포 수용체에 일치하는 T 세포에 의해 인식되는 삼항 혼합물(MHC 클래스 I 알파 쇄, 베타-2-미세글로블린 및 펩티드)을 생성하는 클래스 I 또는 II MHC 수용체에 결합하는 짧은 펩티드를 필요로 한다. MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드는 일반적으로 길이가 8 내지 14개 아미노산이며, 대개 일반적으로 길이가 9개 아미노산이다.

[0230] 인간에는 MHC 클래스 I 분자를 인코딩하는 세 개의 유전자 부위가 있다(인간의 MHC 분자도 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지정된다(HLA)): HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, 및 HLA-A*07은 유전자 부위에서 발현할 수 있는 다른 MHC 클래스 I 대립형질의 예이다.

[0231] 표 5는 HLA-A*02, HLA-A*24 및 가장 빈번한 HLA-DR 혈청형의 발현 빈도를 나타낸다. 빈도는 Mori 등(Mori et al., 1997)으로부터 조정된 미국 인구 내에서의 일배체형 빈도 Gf로부터 유추되며, 하디-와인버그 공식 $F = 1-(1-Gf)^2$를 사용한다. A*02 또는 A*24와 일부 HLA-DR 대립형질의 조합은 강화되거나 연관 불평형으로 인해 단일 빈도보다 덜 빈번할 수 있다. 자세한 내용은 Chanock et al 등을 참조한다 (Chanock et al., 2004).

[0232] [표 5]

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

[0233]

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

[0234]

[0235] 본 발명의 펩티드는 바람직하게는 여기서 설명한 바와 같이 본 발명의 백신에 포함되는 경우 A*02에 결합한다. 백신은 범-결합 MHC 클래스 II 펩티드를 포함할 수도 있다. 그러므로 본 발명의 백신은 A*02 양성인 환자의 암을 치료하는데 사용할 수 있는 반면, MHC 클래스 II 동종형에 대한 선택은 이 펩티드의 범-결합 성격으로 인해 필요하지 않다.

[0236] 본 발명의 A*02 펩티드가 다른 대립형질, 예를 들어 A*24와 결합하는 펩티드와 조합되는 경우, 모든 환자 모집단에서 MHC 클래스 I 대립형질 하나만을 취급하는 것에 비해 더 높은 비율의 치료가 가능하다. 대부분의 모집단에서 하나의 대립형질만으로는 환자의 50% 미만을 해결할 수 있는 반면, HLA-A*24 및 HLA-A*02로 구성되는 백신은 일체의 관련있는 모집단에서 적어도 환자의 60% 치료가 가능하다. 구체적으로 환자의 다음 백분율은 다양한 지역에서 적어도 하나의 이러한 대립형질에 대해 양성이 된다: 미국 61%, 서부 유럽 62%, 중국 75%, 한국 77%, 일본 86%(www.allelefrequencies.net의 자료로부터 계산됨).

[0237] 한 바람직한 구현에서 용어 "뉴클레오티드 서열"은 디옥시리보뉴클레오티드의 이성중합체를 언급한다.

[0238] 특정 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 인코딩은 자연적으로 발생하거나 합성 구축될 수도 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 인코딩하는 DNA 절편은 cDNA 조각들과 짧은 올리고뉴클레오티드 링커, 또는 일련의 올리고뉴클레오티드에서 미생물이나 바이러스 오페론에서 유도된 조절 요소를 구성하는 재조합 전사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공하기 위해서 조립된다.

[0239] 여기서 사용되는 용어 "펩티드를 인코딩(또는 인코딩)하는 뉴클레오티드"는 예를 들어, 수지상 세포 또는 TCR 제조에 유용한 다른 세포계에 의해 서열이 발현되는 생물학적 체계와 호환가능한 인공(사람이 만든) 시작 및 정지 코돈을 포함하는 펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 인코딩을 지칭한다.

[0240] 여기서 사용되는 핵산 서열에 대한 언급에는 한 가닥 및 두 가닥 핵산 모두가 포함된다. 그러므로, 예를 들어 DNA의 경우 특정 서열이란 문맥에서 달리 나타내지 않는 한, 이러한 서열의 단일 가닥 DNA, 보완이 있는 이러한 서열의 중복(이중 가닥 DNA) 및 이러한 서열의 보완을 언급한다.

[0241] 용어 "코딩 영역"은 자연적인 게놈 환경에서 유전자의 발현 생성물에 대해 자연스럽게 또는 정상적으로 인코딩하는 유전자의 부분을 언급한다(즉, 유전자 본래의 발현 생성물에 대한 *생체 내* 영역 인코딩).

[0242] 코딩 영역은 비변이("정상적")이거나 변이 또는 개조된 유전자에서 찾을 수 있거나, 심지어는 DNA 서열, 또는 DNA 합성 기술을 보유한 제조업자에게 잘 알려진 방법을 사용해서 실험실에서 전적으로 합성된 유전자에서 찾을 수 있다.

[0243] 용어 "발현 생성물"은 유전자의 자연 번역 생성물인 폴리펩티드 또는 단백질, 그리고 유전적 인코딩 퇴화 및 이

에 따른 동일 아미노산 인코딩으로 인해 초래된 어떤 핵산 서열 인코딩 생성물을 의미한다.

[0244] 코딩 서열을 말할 때, 용어 "단편"은 발현 제품이 완전한 인코딩 영역의 발현 생성물과 같은 생물학적 기능이나 활동을 유지하는 완전한 인코딩 영역보다 적은 부분의 DNA를 언급한다.

[0245] 용어 "DNA 세그먼트"는 최소한 한번 이상의 상당히 순수한 형태로 분리된 DNA에서 유도된 단편의 형태, 또는 큰 DNA 구조의 구성 요소로서 DNA 중합체를 언급한다. 여기서 순수한 형태는 내인성 오염 물질이 없고 세그먼트 및 표준 생화학 방법, 예를 들면, 복제 벡터에 따른 그 구성 요소 뉴클레오티드 서열의 식별, 조작 및 복구를 가능하게 하는 양 또는 농도를 언급한다. 이러한 세그먼트는 일반적으로 진핵 생물 유전자에 존재하는 내부 비번역 서열, 또는 인트론에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공된다. 비번역 DNA 서열은 동일 서열이 인코딩 영역의 조작이나 발현을 방해하지 않는 오픈 리딩 프레임의 하단에 나타날 수 있다.

[0246] 용어 "프라이머"는 하나의 표준 DNA와 짝을 이룰 수 있는 짧은 핵산 서열을 의미하며 DNA 폴리머라아제가 디옥시리보 뉴클레오티드 쇄 합성을 시작하는 자유 3'-OH 말단을 제공한다.

[0247] 용어 "프로모터"는 모사를 시작하기 위한 RNA 폴리머라아제의 결합에 관여하는 DNA 영역을 뜻한다.

[0248] 용어 "단리"는 그 물질이 원래의 환경(예를 들면, 자연적으로 발생하는 경우에는 자연 환경)에서 제거되는 것을 뜻한다. 예를 들면, 자연 발생하는 살아 있는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리되지 않지만, 자연계에서 공존하는 물질의 부분 또는 전체에서 단리되는 같은 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 제거된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 벡터의 부분이고/거나 이러한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 구성의 일부일 수 있으며, 이러한 벡터 또는 구성이 자연 환경의 일부가 아닐 때 여전히 단리될 수 있다.

[0249] 본 발명에서 밝혀지는 폴리뉴클레오티드 및 재조합 또는 면역성의 폴리펩티드는 "정제" 형태일 수도 있다. 용어 "정제"는 절대적인 순도를 필요로 하지 않는다. 오히려, 그것은 상대적인 정의를 의도하며, 관련된 당업자들이 이해하는 용어로써 상당히 정제된 제조 또는 부분적으로 정제된 제조를 포함할 수 있다. 예를 들면, cDNA 라이브러리에서 단리된 각각의 클론은 전기 영동 동일성으로 통상적으로 정제된다. 한자리 수 이상, 바람직하게 두 자리 또는 세자리 수, 더 바람직하게는 네자리 또는 다섯자리 수의 출발 물질 또는 자연 물질의 정제가 명시적으로 심사숙고된다. 또한 바람직하게는 중량으로 99.999%, 또는 최소한 99.99% 또는 99.9%; 및 심지어는 바람직하게 99%보다 큰 순도를 가진 특허청구범위에 기재된 폴리펩티드는 명시적으로 심사숙고된다.

[0250] 본 발명에서 밝혀진 핵산과 폴리펩티드 발현 생성물뿐만 아니라, 이러한 핵산 및/또는 이러한 폴리펩티드를 가진 발현 벡터는 "강화된 형태"일 수 있다. 여기에서 사용되는 것처럼, 용어 "강화"는 물질의 농도가 최소한 그것의 자연적 농도(예를 들면)의 최소한 2, 5, 10, 100, 또는 1000배 정도이고, 유리하게는 0.01 중량%, 바람직하게는 최소한 약 0.1 중량% 정도임을 의미한다. 중량으로 약 0.5%, 1%, 5%, 10%, 및 20% 강화된 제조도 심사숙고된다. 서열, 구성, 벡터, 클론, 및 본 발명의 다른 물질들은 유리하게 강화된 또는 단리된 형태가 될 수 있다. 용어 "활성 단편"은 예를 들면 토끼 또는 쥐 및 인간을 포함한 포유류 같은 동물에게 따로 또는 임의적으로 적당한 보조제와 함께 또는 매개체로서 투여했을 때 면역 반응(즉, 면역성 활동이 있는)을 생성하고 인간과 같은 받는 동물 내에서 T 세포 반응을 자극하는 형태로 면역 반응을 나타내는 펩티드, 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 단편을 의미한다. 그렇지 않으면, "활성 단편"은 또한 시험관 내 T 세포 반응을 유도하기 위해서 사용될 수도 있다.

[0251] 여기에서 사용되는, "부분", "분절" 및 "단편" 이라는 용어는, 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 서열이 더 큰 서열의 하위 집합을 형성하는 경우 아미노산 잔기와 같은 잔기의 지속적인 서열을 언급한다. 예를 들면, 만약에 폴리펩티드가 트립신이나 키모트립신 같은 일반적인 엔도펩티다아제 치료를 받는다면, 그런 치료로 인해 생기는 올리고펩티드는 폴리펩티드의 시작 부분, 분절 또는 단편을 나타낼 것이다. 폴리뉴클레오티드와 관련해서 사용될 때, 이러한 용어들은 일반적인 엔도뉴클레아제 중 어떤 것과 함께 상기 폴리뉴클레오티드의 치료에 의해 생성된 생성물을 언급한다.

[0252] 본 발명에 따라, 서열을 언급할 때 용어 "백분율 동일성" 또는 "백분율 동일한"은 설명되거나 명시된 서열("기준 서열")에 비교될 서열의 정렬 후("비교 서열") 서열이 명시된 또는 설명된 서열에 비교되는 것을 언급한다. 백분율 동일성은 하기 공식에 따라서 결정된다:

[0253] 백분율 동일성 = 100 [1 -(C/R)]

[0254] 여기서 C는 기준 서열과 비교 서열의 정렬의 길이에 비해 기준 서열과 비교 서열의 차이의 개수이다. 또한,

[0255] (i) 비교 서열에서 상응하는 정렬된 염기 또는 아미노산이 없는 기준 서열에 각 염기 또는 아미노산,

[0256] (ii) 기준 서열의 각 차이, 및

[0257] (iii) 비교 서열의 정렬된 염기 또는 아미노산과 다른 기준 서열의 각 정렬된 염기 또는 아미노산은 차이를 구성하며,

[0258] (iv) 정렬은 정렬된 서열의 위치 1에서 시작해야 한다.

[0259] 그리고 R은 비교 서열과의 정렬의 길이에 대한 기준 서열 염기 또는 아미노산의 수이고 기준 서열에 생긴 공백도 염기 또는 아미노산 개수로 계산된다.

[0260] 만약에 위에서와 같이 계산된 비교 서열과 기준 서열 사이의 백분율 동일성이 특정 최소 백분율과 같거나 더 크면 위에서 계산된 백분율 동일성이 특정 백분율 동일성보다 작은 경우에 정렬이 있더라도 비교 서열은 기준 서열에 대해 특정한 최소 백분율 동일성이 있다.

[0261] 위에서 언급된 바와 같이, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열번호 1 내지 서열번호 114에 대해 88% 상동성인 그 변이체 또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체를 제공한다. 본 발명의 펩티드는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I의 분자에 결합하는 능력 또는 신장된 버전의 상기 펩티드가 클래스 II에 결합하는 능력을 갖는다.

[0262] 본 발명에서, "상동"이라는 용어는 두 개의 아미노산 서열, 즉, 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 일치 정도(위의 백분율 동일성 참조)를 일컫는다. 전술한 "상동"은 비교될 두 개의 서열을 최적 상태에서 나란히 정렬하여 비교하여 결정된다. 이러한 서열 상동 관계는 예를 들면 ClustalW 알고리즘을 이용하여 정렬을 만들어 계산할 수 있다. 일반적으로 사용이 가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 구체적으로 벡터 NTI, GENETYX 또는 다른 도구들은 공용 데이터베이스에서 제공된다.

[0263] 이 분야의 당업자는 특정 펩티드의 변이체에 의해서 유도된 T 세포가 그 펩티드 자체와 교차 반응할 수 있을지를 평가할 수 있을 것이다(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

[0264] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"에 의해, 발명자들은 예를 들면, 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기의 측쇄가 변경되어 그 펩티드가 여전히 서열번호 1 내지 서열번호 114의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드와 실질적으로 같은 방법으로 HLA 분자와 결합할 수 있음을 의미한다(예를 들면 그들을 자연적으로 발생하는 다른 아미노산 잔기 또는 다른 측쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 본 발명에 따른 단일 또는 조합의 펩티드이다). 예를 들면, 펩티드 변형에 의해 HLA-A*02 또는 DR과 같은 적합한 MHC 분자의 결합 홈과 상호 작용하여 결합하는 능력이 향상되지 않으면 적어도 유지하고 마찬가지로 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력이 향상되지 않으면 적어도 유지할 수 있다.

[0265] 이 T 세포는 그 결과로 본 발명의 한 양태에서 정의가 된 바 있는 동족의 펩티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응을 하고 이러한 세포를 죽일 수 있다. 과학 문헌 및 데이터베이스(Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)에서 얻을 수 있듯이, HLA 결합 펩티드의 특정한 위치는 전형적으로 HLA 수용기의 결합 모티프에 일치하는 핵심 고정 잔기이며 이는 결합 홈을 이루고 있는 폴리펩티드의 극성, 전기 물리성, 소수성 및 공간적 특성에 의해 정의된다. 따라서 이 분야의 당업자는 알려진 고정 잔기를 유지함으로써 서열번호 1 내지 서열번호 114에 정해진 아미노산 서열을 변형할 수 있고 이러한 변이체들이 MHC 클래스 I 또는 II 분자와 결합할 수 있는 능력을 유지할 수 있는지를 결정할 수 있어야 한다. 이 본 발명의 변이체는 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 유지하고, 이는 그 결과로 본 발명의 양태에서 동족의 펩티드라고 정의된 자연 아미노산 서열을 포함하고 있는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응을 하고 이 세포를 죽일 수 있다.

[0266] 여기에서 밝혀진 본래 (변형되지 않은) 펩티드는 달리 언급되지 않는 이상 아마도 선택적인 다른 부위에서 펩티드 쇄의 부위의 하나 이상의 잔기의 치환에 의해 변형될 수 있다. 바람직하게 이러한 치환은 아미노산 쇄의 말단에 위치한다. 그런 치환은, 예를 들면, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 보존적일 수 있다. 심지어 더 보존적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것 같이, 같거나 비슷한 크기와 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종족에서의 서열 변화의 연구에서, 특정 아미노산의 치환은 다른 것들보다 더 자주 용인되고 있으며, 이들은 본래의 아미노산과 치환 사이에서 크기, 전하, 극성, 및 소수성이 비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보존적 치환"을 정의하는데 기본이

된다.

[0267] 여기서 보존적 치환은 아래의 다섯 개 그룹 중 하나의 교환으로 정의된다: 그룹 1- 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성의 잔기(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 그룹 2- 극성, 음성 하전된 잔기와 그 아미드(Asp, Asn, Glu, Gln); 그룹 3- 극성, 양성 하전된 잔기(His, Arg, Lys); 그룹 4- 큰, 지방족, 비극성 잔기(Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 그룹 5- 큰, 방향족 잔기(Phe, Tyr, Trp).

[0268] 덜 보존적 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 비슷한 성질이지만 크기가 어느 정도 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 아주 비보존적인 치환은 산성 아미노산을 극성, 또는 심지어 염기성 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수도 있다. 그러나 이러한 "급진적" 치환은 화학적 작용이 완전히 예측 불가능하고 급진적 치환은 단순한 화학 원리에서 예측 가능하지 않은 뜻밖의 발생이 있을 수 있기 때문에 효과가 없다고 기각할 수는 없다.

[0269] 물론, 이런 치환은 일반적인 L-아미노산 외 다른 구조를 포함할 수 있다. 그러므로, D-아미노산을 본 발명의 항원 펩티드에서 흔히 발견되는 L-아미노산으로 교체할 수 있고 여기에서 공개를 통해 계속 포함시킬 수 있다. 또한, 비표준 아미노산(즉, 흔히 자연적으로 발생하는 단백질성 아미노산이 아닌) 역시 본 발명에 따라 면역원과 면역원성 폴리펩티드를 생산하기 위해서 치환될 수 있다.

[0270] 아래에서 정의된 것과 상당히 동일하거나 더 큰 항원 활성이 있는 펩티드의 하나 이상의 위치에서 치환이 발견되면, 이러한 치환의 조합은 조합된 치환이 펩티드의 항원성에 추가적 효과 또는 상승적 효과의 결과를 내는지 결정하기 위해 시험된다. 최대, 펩티드에서 4 곳 이상의 위치에서 동시에 치환될 수 없을 것이다.

[0271] 본 문서에서 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진 펩티드는, 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I 또는 클래스-II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향받음 없이 하나 또는 두 개의 비앵커 아미노산(앵커 모티프에 대해서는 아래 참조)이 교환되도록 할 수 있다. 또 다른 구현에서는, 본 문서에서 명시된 바와 같이 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진 펩티드에 있어서, 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I 또는 클래스-II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향받음 없이 하나 또는 두 개의 아미노산이 그에 대한 보존적 교환 파트너(다음을 참조)와 교환될 수 있다.

[0272] T 세포 수용체와 상호작용하는 데에 상당히 기여를 하지 않는 아미노산 잔기들은 이와 결합됨으로써 T 세포의 반응성에 상당한 영향을 주지 않고 관련된 MHC와의 결합을 제거하지 않는 다른 아미노산과의 교체에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 주어진 조건 외에도, 본 발명의 펩티드는 아미노산 서열 또는 그 한 부분 또는 주어진 변이체를 포함하는(발명자들이 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다고 일컫는) 어떠한 펩티드가 될 수도 있다.

[0273] [표 6]

서열번호 1, 4 및 5에 따른 펩티드의 변이체 및 모티프

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

[0274]

		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
서열번호 5	Y	L	Y	P	N	L	T	R	L
변이체									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

[0275]

[0276] 더 긴 펩티드도 적합할 수 있다. 대개 길이가 8 내지 11개의 아미노산이지만, MHC 클래스 I 에피토프가 더 긴 펩티드로부터 처리되는 펩티드 또는 실제 에피토프를 포함하는 단백질에 의해 생성될 가능성이 있다. 실제 에피토프가 양측에 있는 잔기는 처리 동안 실제 에피토프를 노출하는데 필요한 단백질 분해에 의한 분할에 상당한 영향을 주지 못하는 잔기이다.

[0277] 본 발명의 펩티드는 아미노산을 최대 4개까지 연장할 수 있는데 즉, 1, 2, 3 및 4개의 아미노산이 4:0과 0:4 사이에서 일체의 조합으로 양쪽 어디로든 추가될 수 있다. 본 발명에 따른 신장의 조합은 표 7에서 찾을 수 있다:

[0278] [표 7]

본 발명의 펩티드들의 신장에 대한 조합

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

[0279]

[0280] 연장/신장을 위한 아미노산은 해당 단백질의 원래 서열의 펩티드나 기타 모든 아미노산일 수 있다. 연장은 펩티드의 안정성이나 가용성 강화를 위해 사용될 수 있다.

[0281] 따라서, 본 발명의 에피토프는 자연적으로 발생하는 종양 관련 또는 종양 특정 에피토프과 동일하거나 실질상 동일한 항원적 활동력을 가지고 있는 한, 참조 펩티드와 비교 시 4개 이하의 다른 잔기를 가지고 있는 에피토프를 포함할 수 있다.

[0282] 대체의 구현에서, 펩티드는 한쪽 또는 양쪽으로 4개 이상의 아미노산, 바람직하게는 총 30개의 아미노산 길이만큼 연장된다. 이는 MHC 클래스 II 결합 펩티드를 초래할 수 있다. MHC 클래스 II에 대한 결합은 당업계에서 알려진 방법으로 시험할 수 있다.

[0283] 따라서, 본 발명은 MHC 클래스 I 에피토프의 펩티드와 변이체를 제공하며 여기서 펩티드 또는 변이체는 전장이 8 내지 100개이며, 바람직하게는 8 내지 30개이며, 가장 바람직하게는 8 내지 14개이며, 이는 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개의 아미노산이다. 신장된 클래스 II 결합 펩티드의 경우 그 길이는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 아미노산일 수도 있다.

[0284] 물론, 본 발명에 따른 펩티드 또는 변이체는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖게 된다. 펩티드 또는 변이체의 MHC 복합체에 대한 결합은 당업계의 방법에 의해 시험할 수 있다.

[0285] 바람직하게는, 본 발명에 따른 특이적 펩티드의 T 세포가 치환 펩티드에 대해 시험될 때, 치환 펩티드가 배경에 상대적으로 세포 용해의 최대 증가의 절반을 달성할 때의 펩티드 농도는 약 1 mM 이하, 바람직하게 약 1 μM 이하, 더 바람직하게 약 1 nM 이하, 여전히 더 바람직하게 약 100 pM 이하, 가장 바람직하게는 약 10 pM 이하이다. 치환 펩티드가 1명 이상, 2명 이상, 보다 바람직하게 3명의 개인으로부터의 T 세포에 의해 인식되는 것 또한 바람직하다.

[0286] 본 발명의 특히 바람직한 구현에서 펩티드는 서열번호 1 내지 서열번호 114에 따라 이루어진 군으로부터 선택된 본 발명에 따른 단일 또는 조합의 펩티드이다.

[0287] "본질적으로 구성되는"이란 서열번호 1 내지 서열번호 114에 따른 서열 또는 변이체 외에도 본 발명에 따른 펩티드는 N- 및/또는 C-말단에 추가적으로 위치하고 있는 아미노산이 MHC 분자 에피토프에 대한 에피토프으로 기능하는 펩티드의 한 부분을 반드시 형성하지 않는 아미노산들을 포함하는 것을 의미해야 한다.

[0288] 그럼에도 불구하고, 이러한 추가된 아미노산은 본 발명에 따르면 세포 내로 효율적인 펩티드의 도입에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현에서, 펩티드는 예를 들면 NCBI, GenBank Accession-number X00497에서 유도된 것처럼 HLA-DR 항원 결합 불변쇄(p33, 다음의 "Ii")의 80개 N-말단 아미노산을 포함하고 있는 융합 단백질의 일부이다. 다른 융합에서는, 본 발명의 펩티드는 항체에 의해 특이적으로 표적화될 수 있도록 여기서 설명된 상기 항체나 그 기능적 일부 특히 항체의 서열에 대해 또는 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체에 대해 또는 그 안으로 융합될 수 있다.

[0289] 추가적으로, 펩티드 또는 변이체는 안정성 및/또는 MHC 분자와의 결합성을 높여 더 강한 면역 반응을 일으킬 수 있도록 변형될 수 있다. 펩티드 서열의 최적화를 위한 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들면 반대

펩티드 결합 또는 비-펩티드 결합을 도입하는 것이 있다.

[0290] 반대 펩티드 결합에서는 아미노산 잔기가 펩티드(-CO-NH-) 연결로 결합되어 있지 않으나 펩티드 결합이 반대로 되어있다. 이러한 역-인버스 펩티드 모방형 물질은 이 분야에서 잘 알려진 방법으로 생성될 수 있으며, 이 방법의 예는 이 문헌의 참조 문헌으로 포함된 Meziere 등(1997)(Meziere et al., 1997)에 설명되어 있다. 이 방법은 백본의 변경을 포함하지만, 측쇄의 방향을 바꾸지 않는 유사펩티드를 만드는 것을 포함한다. Meziere 등(Meziere et al., 1997)은 MHC 결합과 T 조력 세포 반응에서 이 유사 펩티드가 유용하다는 것을 보여준다. CO-NH 대신에 NH-CO 결합을 포함하고 있는 레트로 역위 펩티드는 단백질 가수 분해에 대한 저항력이 훨씬 높다.

[0291] 비-펩티드 결합의 예는 $-CH_2-NH$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, 및 $-CH_2SO-$이다. 미국 특허 번호 4,897,445는 기본 과정을 거쳐 합성된 폴리펩티드와 아미노 알데히드와 아미노산을 $NaCNBH_3$ 존재 하에 반응을 시켜 생성된 비-펩티드 결합을 포함한 폴리펩티드 쇄의 비펩티드 결합($-CH_2-NH$)을 위한 고체상 합성의 방법을 제공한다.

[0292] 위에서 묘사된 서열로 이루어진 펩티드는 안정성, 생물가용성, 및/또는 펩티드의 결합을 증가시키기 위해 추가적인 화학 기를 아미노 및 또는 카복시 말단에 결합할 수도 있다. 예를 들면, 카보벤족실, 단실, 또는 t-부틸옥시카보닐 기 등 소수성 기가 펩티드의 아미노 말단에 추가될 수 있다. 마찬가지로, 아세틸 기 또는 9-플루오레닐메톡시-카보닐-기가 펩티드의 아미노 말단에 위치할 수도 있다. 또한, 소수성 기, t-부틸옥시카보닐, 또는 아미도 기 또한 펩티드의 카르복시 말단에 추가될 수 있다.

[0293] 또한, 본 발명의 펩티드는 입체적 배치를 변화시키기 위해 생성될 수도 있다. 예를 들면, 펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기의 D-이성질체가 보통의 L-이성질체 대신에 사용될 수도 있다. 더 나아가서, 본 발명의 펩티드의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 비자연적으로 발생하는 아미노산 잔기와 치환될 수도 있다. 이와 같은 변화는 안정성, 생물가용성, 및/또는 본 발명의 펩티드의 결합을 증가시킬 수 있다.

[0294] 유사하게, 본 발명의 펩티드 또는 변이체는 특정한 아미노산을 펩티드 생성 전 또는 후에 반응시킴으로써 화학적으로 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예는 이 분야에서 잘 알려져 있으며 예를 들어, 이 문헌의 참조 문헌에 포함되어 있는 R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004(Lundblad, 2004)에 잘 묘사되어 있다. 아미노산의 화학 변형은 아실화, 아미딘화, 리신의 피리독실화, 환원성 알킬화 반응, 아미노산의 2,4,6-트리니트로벤젠 설폰화(TNBS)에 의한 트라이니트로벤질화, 카르복실 기의 아미드 변형 및 퍼포민산에 의한 설피드릴 변형, 시스틴의 시스테릭산으로의 산화, 머큐리얼 유도체 생성, 다른 티올 화합물과 다이설피드 생성, 말레이미드와의 반응, 요오드화 아세트산 또는 요오드 아세트아미드에 의한 카르복시메틸화 및 알칼리성 산도에서의 시안산 염에 의한 카르바밀화를 포함하지만 이에 국한되지 않은 변형을 언급한다. 이에 관해서, 더 광대한 단백질의 화학 변형에 대한 방법론에 대해서는 당업자는 Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan 등 (John Wiley & Sons NY 1995-2000)(Coligan et al., 1995)의 15장을 참조하길 바란다.

[0295] 간단히 말하면, 예를 들어 단백질의 아르기닌 잔기는 흔히 페닐글리옥산, 2,3-부탄디온 및 1,2-사이클로헥산디온과 같은 이웃자리 디카르보닐 화합물과의 반응에 근거하여 부가물을 형성한다. 다른 예는 메틸글로옥살과 아르기닌 잔기와의 반응이다. 시스테인은 리신과 히스티딘과 같은 다른 친핵성 부위의 동시 변형 없이 변형시킬 수 있다. 그 결과 다수의 시약들이 시스테인 변형에 사용 가능하다. Sigma-Aldrich(http://www.sigma-aldrich.com)와 같은 회사들의 웹사이트에서는 특정 시약에 관한 정보를 제공하고 있다.

[0296] 단백질에서 이황화 결합의 선택적 환원 또한 흔하게 나타난다. 단백질에서 이황화 결합은 생물약제의 열 처리 동안 형성되어 산화될 수 있다. 우드워드의 시약 K는 특정 글루탐산 잔기의 변형에 사용될 수 있다. N-(3-디메틸아미노)프로필l)-N'-에틸카르보디이미드를 사용하여 리신 잔기와 글루탐산 잔기 사이의 분자 내 가교를 형성할 수 있다. 예를 들어, 디메틸피로카보네이트는 단백질에서 히스티딘 잔기의 변형을 위한 시약이다. 히스티딘은 4-히드록시-2-노네날을 사용하여 변형시킬 수 있다. 리신 잔기와 다른 α-아미노기의 작용은, 예를 들어, 펩티드의 표면 결합 또는 단백질/펩티드들의 가교에 유용하다. 리신은 폴리(에틸렌)글리콜의 부착 부위이며 단백질의 당화에서 중요 변형 부위이다. 단백질에서 메티오닌 잔기는 예를 들어 요오도아세트아미드, 브로모에틸아민 및 클로르아민 T를 사용하여 변형시킬 수 있다.

[0297] 테트라니트로메탄 및 N-아세틸이미다졸은 티로신 잔기의 변형에 사용할 수 있다. 디티로신의 형성을 통한 가교 형성은 과산화 수소/구리 이온으로써 성취할 수 있다.

[0298] 트립토판의 변형에 대한 최근의 연구에서는 N-브로모숙신이미드, 브롬화 2-히드록시-5-니트로벤질 또는 3-브로모-3-메틸-2-(2-니트로페닐메르캅토)-3H-인돌(BPNS-스카톨)이 사용된 바 있다.

[0299] PEG를 이용한 치료 단백질과 펩티드의 성공적인 변환은 히드로겔 준비시 사용되는 단백질을 글루타르알데히드, 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트 및 포름알데히드와 교차 결합하는 동시 순환 반감기를 증가시키는 것과 흔히 관련되어 있다. 면역 치료를 위한 알레르겐의 화학적 변형은 종종 칼륨 시안산염의 카바밀화와 관련이 있다.

[0300] 펩티드 또는 변이체, 여기에서 펩티드는 변환되었거나 비-펩티드 결합을 포함하는 것이 본 발명 구현에서 바람직하다. 일반적으로 펩티드와 변이체(적어도 펩티드 링크를 아미노산 잔기 사이에 포함하는 것들)는 고체상 펩티드 합성의 Fmoc-폴리아미드 모드에 의해 합성될 수 있으며, 이는 Lukas 등(Lukas et al., 1981) 그리고 여기에 인용된 참조문헌에 공개되어 있다. 일시적인 N-말단 기 보호는 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(Fmoc)에 의해 제공된다. 이렇게 염기 불안정한 보호기의 반복적인 절단은 N,N-디메틸포름아미드의 20% 피페리딘를 이용하여 이루어진다. 측쇄 기능은 부틸 에테르(세린, 트레오닌 및 티로신의 경우), 부틸 에스테르(글루탐산 및 아스파르트산의 경우), 부틸옥시카보닐 변이체(리신과 히스티딘의 경우), 트라이틸 변이체(아르기닌의 경우) 그리고 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤젠술포닐 유도체(아르기닌의 경우)로서 보호될 수 있다. 글루타민 또는 아스파라긴이 C-말단의 잔기인 경우, 4,4'-디메톡시벤즈히드릴이 사용되어 측쇄 아미도 기능을 보호한다. 고체형 보조제는 디메틸아크릴아미드(백본-모노머), 비스아크릴로일에틸렌 디아민(가교 결합) 및 아크릴로일사르코신 메틸 에스테르(기능 작용제)의 3개의 모노머로 만들어진 폴리디메틸-아크릴아미드 중합체에 기반을 둔다. 펩티드 대 레진 절단 가능 연결 작용제로 사용되는 것은 산-불안정 4-히드록시메틸-페녹시아세트산 유도체이다. 모든 아미노산 유도체는 역 N,N-디사이클로헥실-카보다이이미드/1-히드록시벤조트리아졸에 의한 커플링 과정에 의해 추가되는 아스파라진과 글루타민을 제외하고 미리 생성된 대칭의 무수물 유도체로서 추가된다. 모든 커플링과 탈보호 반응은 닌히드린, 트리니트로벤젠 술폰산 또는 이소틴 실험 과정에 의해 모니터링된다. 합성 완료 시에, 펩티드는 레진 기반에서 50% 스캐빈저 믹스를 포함한 95% 트리플루오로아세트산에 의한 측쇄 보호기 제거와 동시에 절단된다. 일반적으로 사용되는 스캐빈저로는 에탄디티올, 페놀, 아니솔 및 물을 포함하고, 정확한 선택은 합성되는 펩티드에 포함되어 있는 아미노산에 따라 결정된다. 펩티드의 합성에 있어서 고체상과 액체상 방법의 결합 또한 가능하다(예를 들면, (Bruckdorfer et al., 2004) 및 이 문헌에 인용된 참고문헌 참조).

[0301] 트리플루오로아세트산은 진공 상태에서 증발된 후 디에틸에테르에 의한 분쇄에 의해 제거되어 조펩티드를 생성한다. 존재하는 일체의 스캐빈저는 수용액 상태에서 냉동건조에 의한 간단한 추출 과정에 의해 제거되어 스캐빈저가 없는 조펩티드를 생성한다. 펩티드 합성의 시약은 일반적으로 예를 들면 칼바이오켐-노바바이오켐(노팅햄)(Calbiochem-Novabiochem(Nottingham))으로부터 입수할 수 있다.

[0302] 정제는 재 결정화, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피 및 (보통) 예를 들면 아세토니트릴/물 구배 분리를 사용하는 역상 고성능 액체 크로마토그래피 등의 단일 방법 또는 이의 결합 방법에 의해 수행할 수 있다.

[0303] 펩티드의 분석은 박막 크로마토그래피, 전기 영동법, 특히 모세관 전기 영동법, 고체상 추출법(CSPE), 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 산성 가수분해 후 아미노산 분석 및 고속 원자 폭격(FAB) 질량 분석법 및 MALDI와 ESI-QTOF 질량 분석법 등에 의해 이루어질 수 있다.

[0304] 과다 제시된 펩티드를 선택하기 위해, 중간 샘플 제시는 물론 복제 변이를 보여주는 제시 프로필이 계산된다. 이 프로필은 관심 대상의 종양 개체 샘플을 정상 조직 샘플의 베이스라인에 병치된다. 그런 다음, 이 프로필 각각에 대해 선형 혼합효과 모형의 p-값을 계산하고(Pinheiro et al., 2015) 오류 발견율(Benjamini and Hochberg, 1995)에 대한 복수의 검사를 조절함으로써 과다 제시 점수에 통합될 수 있다.

[0305] 질량 분석에 의한 HLA 리간드의 동정 및 상대적 정량화를 위해, 충격동결된 조직 샘플에서 얻은 HLA를 정제하고 HLA-연관 펩티드를 확인했다. 확인된 펩티드는 분리하여 그 서열을 온라인 나노-전기분무-이온화(nanoESI) 액체 크로마토그래피-질량 분석(LC-MS) 실험에 의해 식별했다. RCC 샘플(N=18*02-양성 샘플)로부터 기록된 자연적 TUMAP의 분절 패턴을 동일한 서열을 가진 상응하는 합성 참조 펩티드의 분절 패턴과 비교하여, 얻어진 펩티드 서열을 확인했다. 이 펩티드는 원발성 종양의 HLA 분자의 리간드로서 직접 식별되기 때문에, 그 결과는 18명의 RCC 환자로부터 얻은 원발성 암 조직에 대해 식별된 펩티드의 자연적 처리와 제시에 대한 직접적 증거를 제공한다.

[0306] 발견 파이프라인 XPRESIDENT® v2.1(예를 들어 전체가 여기에 포함되는 US 2013-0096016을 참고)은 몇 가지 다른 비암성 조직 및 기관에 비해 암 조직에 대한 HLA-제한 펩티드 수준의 직접적인 상대적 정량화를 기준으로 관

련된 과다 제시된 펩티드 백신 후보의 식별과 선택을 허용한다. 이는 서열 식별, 스펙트럼 집락화, 전화 이온 계수화, 정체 시간 정렬, 상태 디컨볼루션 및 정상화에 필요한 알고리즘을 조합시킨 독점 데이터 분석 파이프라인에 의해 처리하여 획득한 LC-MS 데이터를 사용한 비표지 차등 정량화의 개발에 의해 성취되었다.

[0307] 펩티드와 샘플 각각에 대한 오류 측정치 등 제시 수준이 확립되었다. 종양 조직에 배타적으로 제시된 펩티드 그리고 종양에서 과다제시된 펩티드 대비 비암성 조직 및 기관이 식별된 바 있다.

[0308] RCC 조직 샘플로의 HLA-펩티드 복합체를 정제했으며, HLA-관련 펩티드를 분리하여 LC-MS에 의해 분석했다(실시예 참조). 본 출원에 포함된 모든 TUMAP는 이러한 접근 방식으로써 원발성 RCC 샘플 상에서 식별하여 원발성 RCC에 대한 제시를 확인했다.

[0309] 복수의 RCC 및 정상 조직에 대해 식별된 TUMAP를 비표지 LC-MS 데이터에 대한 이온-계수화를 사용하여 정량화했다. 이 방법은 펩티드의 LC-MS 신호 영역이 샘플에 과다한 존재와 상관관계가 있음을 가정한다. 다양한 LC-MS 실험에서 펩티드의 모든 정량적 신호들을 LS-MS 실험을 중심 경향에 근거하여 정상화하고 샘플 당 평균화하여 제시 프로필이라 부르는 막대 도표에 통합시켰다. 이 제시 프로필은 단백질 데이터베이스 검색, 스펙트럼 군락화, 충전 상태 디컨벌루션(방전) 및 시간 성격 및 정체 정상화와 같은 다른 분석 방법들을 통합시킨다.

[0310] 더욱이, 발견 파이프라인 XPRESIDENT® v2.1을 사용하면 암 또는 다른 감염된 조직에서 MHC-, 바람직하게는 HLA-제약된 펩티드 수준의 직접 절대 정량화가 가능하다. 간단히 말하면 총 세포 수는 분석된 조직 샘플의 총 DNA 함량으로부터 계산되었다. 조직 샘플에서 TUMAP의 펩티드 총량은 자연 TUMAP에 대한 비율 그리고 소위 내부 표준으로 부르는 TUMAP의 동위원소 버전의 알려진 양으로서 나노 LC MS/MS에 의해 측정했다. TUMAP 분리의 효율은 TUMAP 분리 절차에서 가능한 가장 이른 시점에 모든 선택된 펩티드:MHC 복합체를 조직 용해물에 스파이킹 그리고 펩티드 분리 절차의 완료 후 나노LC-MS/MS에 의한 검출을 이용하여 결정했다. 총 세포수와 펩티드의 총량은 조직 샘플당 3회 측정으로부터 계산했다. 펩티드 특이적 분리 효율은 10회의 스파이킹 실험을 진행하고 매회마다 3회 측정을 통해 평균을 내어 계산했다(실시예 6 및 표 12의 참조).

[0311] 본 발명은 암/종양, 바람직하게는 본 발명의 펩티드를 과도하게 또는 배타적으로 제시하는 RCC의 치료에 유용한 펩티드를 제공한다. 이 펩티드들은 원발성 인간 RCC 샘플 및/또는 PC 샘플의 HLA 분자에 의해 자연적으로 제시되는 것으로 질량 분석법에 의해 나타났다.

[0312] 펩티드가 유래하는 소스 유전자/단백질("전장 단백질" 또는 "기저 단백질"로도 지정됨)의 다수는 소스 유전자에 대한 고도의 종양 연관을 표출하는 정상 조직과 비교해서 암에서 고도로 과발현되는 것으로 나타났다 - 본 발명과 관련하여 "정상 조직"은 소스 유전자와의 높은 정도의 종양 연관성을 발휘하는 종양-상응 유형의 건강한 신장 세포 또는 기타 정상 조직 세포를 의미한다(실시예 2 참조). 게다가 펩티드 자체는 종양 조직에서 강력히 과다제시된다 - 본 발명과 관련하여 "종양 조직"은 정상 조직상의 것이 아니라 RCC를 앓는 환자의 샘플을 의미한다(실시예 1 참조).

[0313] HLA-결합된 펩티드는 면역계 특히 T 림프구에 의해서 인식된다. T 세포는 인식된 HLA/펩티드 복합체를 제시하는 세포, 예를 들어 유도된 펩티드를 제시하는 RCC의 세포를 파괴할 수 있다.

[0314] 본 발명의 펩티드는 T 세포 반응을 자극할 수 있으며/거나 과다 제시되는 것으로 나타났으므로, 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR, 예를 들어 가용성 TCR의 생산에 사용될 수 있다(실시예 3, 실시예 4 참조). 더욱이 해당되는 MHC와 복합된 펩티드는 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR 특히 sTCR의 생산에도 사용될 수 있다. 해당 방법들은 당업자에게 잘 알려져 있으며 해당 문헌에서도 찾을 수 있다. 그러므로, 본 발명의 펩티드는 환자의 종양 세포를 파괴할 수 있는 면역 반응을 생성하는데 유용하다. 환자의 면역 반응은 설명된 펩티드의 직접적인 투여 또는 면역성을 강화할 수 있는 제제(즉, 보조제)와 섞인 적당한 전조 물질(예를 들면, 연장된 펩티드, 단백질, 또는 이러한 펩티드를 인코딩하는 핵산)을 환자에게 투여하는 것으로 유도될 수 있다. 이런 치료 백신에서 생긴 면역 반응은 본 발명의 표적 펩티드가 비교가능한 카피 수로 정상 조직에서는 나타나지 않고, 환자의 정상 세포에 대한 기피되는 자기 면역 반응의 위험을 배제하기 때문에 종양 세포에 아주 특이적일 수 있다.

[0315] 본 발명은 또한 알파 쇄 및 베타 쇄("알파/베타 TCR")를 구성하는 T 세포 수용체(TCR)에 관한 것이다. 또한 MHC 분자에 의해 제시될 경우 TCR 및 항체에 결합할 수 있는 펩티드가 제공된다. 본 발명은 또 본 발명의 TCR 및 펩티드의 발현을 위한 핵산, 벡터 및 숙주 세포 그리고 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0316] "T 세포 수용체"(약자로 TCR)란 용어는 알파 폴리펩티드 쇄(알파 쇄) 및 베타 폴리펩티드 쇄(베타 쇄)로 구성되는 이종이합체 분자를 칭하며 이종이합체 수용체는 HLA 분자에 의해 제시되는 펩티드 항원에 결합할 수 있다.

이 용어는 또한 소위 감마/델타 TCR도 포함한다.

[0317] 한 구현에서 이 설명은 여기서 설명한 TCR 생산 방법을 제공하며 이 방법은 TCR의 발현 촉진에 적합한 조건 하에서 TCR을 발현시킬 수 있는 숙주 세포의 배양으로 이루어진다.

[0318] 다른 양상에서 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원-제시 세포와 접촉시킴으로써 상기 항원이 적절한 항원-제시 세포 또는 인공 항원-제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자에 로딩되거나 항원/클래스 I 또는 II MHC 복합체 단량체를 사합체화함으로써 상기 항원이 클래스 I 또는 II MHC 사합체에 로딩된다.

[0319] 알파/베타 TCR의 알파 및 베타 쇄 그리고 감마/델타 TCR의 감마 및 베타 쇄는 일반적으로 각각 2개의 "도메인" 즉, 가변 및 불변 도메인을 갖는 것으로 간주된다. 가변 도메인은 가변 영역(V) 및 결합 영역(J)의 연속으로 이루어진다. 가변 도메인은 선도 구역(L)도 포함할 수 있다. 베타 및 델타 쇄도 다양성 구역(D)을 포함할 수 있다. 알파 및 베타 불변 도메인은 알파 및 베타 쇄를 세포막에 고정시키는 C-말단 막횡단(TM) 도메인도 포함할 수 있다.

[0320] 감마/델타 TCR에 대하여, 여기서 사용된 "TCR 감마 가변 도메인"이란 용어는 선도 영역(L) 없는 TCR 감마 V(TRGV) 구역의 연속을 지칭하며, TCR 감마 불변 도메인이란 용어는 세포의 TRGC 구역이나 C-말단 각추 TRGC 서열을 지칭한다. 마찬가지로 "TCR 델타 가변 도메인"이란 용어는 선도 영역(L)이 없는 TCR 델타 V(TRDV) 영역 및 TCR 델타 D/J(TRDD/TRDJ) 영역의 연속을 지칭하며 "TCR 델타 불변 도메인"이란 용어는 세포의 TRDC 영역 또는 C-말단 절단 TRDC 서열을 지칭한다.

[0321] 본 발명의 TCR은 바람직하게는 결합 친화성(KD)이 약 100 μM 이하, 약 50 μM 이하, 약 25 μM 이하, 또는 약 10 μM 이하로서 펩티드-HLA 분자 복합체에 결합한다. 더욱 바람직하기로는 약 1 μM 이하, 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하의 결합 친화성을 갖는 고친화성 TCR이다. 본 발명의 TCR에 대한 바람직한 결합 친화성 범위의 비제한적 실례에는 약 1 nM 내지 약 10 nM; 약 10 nM 내지 약 20 nM; 약 20 nM 내지 약 30 nM; 약 30 nM 내지 약 40 nM; 약 40 nM 내지 약 50 nM; 약 50 nM 내지 약 60 nM; 약 60 nM 내지 약 70 nM; 약 70 nM 내지 약 80 nM; 약 80 nM 내지 약 90 nM; 그리고 약 90 nM 내지 약 100 nM이 포함된다.

[0322] 본 발명의 TCR과 관련하여 여기서 사용되는, "특이적 결합" 및 이의 문법적 변형들은 펩티드-HLA 분자 복합체의 결합 친화성(KD)이 100 μM 이하인 TCR을 의미한다.

[0323] 본 발명의 알파/베타 이종이합체는 그 불변 도메인 사이에 개입된 이황화 결합이 있을 수 있다. 이 유형의 바람직한 TCR에는 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1 또는 TRBC2 불변 도메인 서열이 있는 것들을 포함하지만, TRAC의 Thr 48을 TRBC1이나 TRBC2의 Ser 57은 시스테인 잔기에 의해 교체되고, 상기 시스테인은 TRAC 불변 도메인 서열과 TCR의 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열 사이에 이황화 결합을 형성한다.

[0324] 위에서 언급된 도입된 쇄간 결합의 유무와 무관하게, 본 발명의 알파/베타 이종이량체 TCR은 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열을 가질 수 있으며, TCR의 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열은 TRAC의 엑손 2의 Cys4와 TRBC1이나 TRBC2의 엑손 2의 Cys2 사이의 기본 이황화 결합에 의해 연결될 수 있다.

[0325] 본 발명의 TCR은 방사선핵종, 형광단 및 비오틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 검출가능한 라벨을 포함할 수 있다. 본 발명의 TCR은 방사성핵종과 같은 치료적으로 활성인 제제, 화학요법 제제 또는 독소에 결합할 수 있다.

[0326] 한 구현에서, 알파 쇄에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖고/거나 베타 쇄에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 본 발명의 TCR이 돌연변이되지 않은 TCR에 비해 변형된 글리코실화를 갖는다.

[0327] 한 구현에서, TCR 알파 쇄 및/또는 TCR 베타 쇄에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 TCR의 펩티드-HLA 분자 복합체에 대한 결합 친화성 및/또는 결합 반감기가 돌연변이되지 않은 TCR 알파 쇄 및/또는 돌연변이되지 않은 TCR 베타 쇄를 포함하는 TCR의 그것보다 적어도 2배이다. 종양 특이적 TCR의 친화성-강화 및 그 착취는 최적의 TCR 친화성에 대한 창의 존재에 의존한다. 그러한 창의 존재는 HLA-A2-제약된 병원체는, HLA-A2-제약된 종양 관련 자가-항원에 비해 KD 값이 일반적으로 약 10배라는 관찰에 근거한다. 종양 항원이 면역원성의 잠재성을 갖더라도, 종양이 개인 자신의 세포로부터 발생하기 때문에, 돌연변이된 단백질이나 변형된 번역 처리를 갖는 단백질만이 면역계에 의해 이물질로 보여지는 것으로 현재 알려져 있다. 상향조절되거나 과발현된 항원(소위 자가-항원)이 종양에 대해 기능적 면역 반응을 반드시 유도하지는 않을 것이다. 이러한 항원에 대해 반응성이 높은

TCR을 발현하는 T 세포는 자가-항원에 대해 낮은 친화성의 TCR을 가진 T 세포만 남는다는 의미로 알려진 중추 관용의 과정에서 흉선 내에서 부정적으로 선택되었을 것이다. 그러므로 본 발명의 TCR 또는 변이체의 본 발명에 따른 펩티드에 대한 친화성은 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 강화시킬 수 있다.

[0328] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCR의 식별 및 단리 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 HLA-A*02-음성의 건강한 공여자로부터 PBMC를 A2/펩티드 단량체로써 배양하는 단계, PBMC를 사합체-파이코에리스린(PE)으로써 배양하는 단계, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포를 단리하는 단계를 포함한다.

[0329] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCR의 식별 및 단리 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 수집물을 발현하는 전체 인간 TCRαβ 유전자 자리들(1.1 및 0.7 Mb)로써 유전자이전 마우스를 획득하는 단계, 관심 대상의 펩티드에 의해 마우스를 면역접종하는 단계, 유전자전이 마우스로부터 얻어진 PBMC를 사합체-홍조(PE)에 의해 배양하는 단계, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의해 고결합성 T 세포를 단리하는 단계를 포함한다.

[0330] 한 양태에 있어서, 본 발명의 TCR을 발현하는 T 세포를 취득하기 위해, 본 발명의 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇄를 인코딩하는 핵산을 감마 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 발현 벡터로 클로닝한다. 이 재조합 바이러스를 생성한 다음 항원 특이성 및 기능적 결합성과 같은 기능성에 대해 검사한다. 다음 최종 생성물의 일정 부분을 사용하여 표적 T 세포 군락(일반적으로 환자 PBMC로부터 정화됨)을 형질도입하며, 이는 확장된 다음 환자에게 주입한다. 다른 양태에 있어서, 본 발명의 TCR을 발현하는 T 세포를 취득하기 위해, TCR RNA는 당업계에서 알려진 기법으로 예를 들어 시험관 내 전사 시스템에서 합성한다. 다음, 시험관 내에서 합성된 TCR RNA를 건강한 공여자로부터 얻은 원발성 CD8+ T 세포에 전기천공에 의해 도입함으로써 종양 특이적 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇄를 재발현시킨다.

[0331] 발현의 증가를 위해, 본 발명의 TCR을 인코딩하는 핵산은 강력한 프로모터에 작동가능하게 연관시킬 수 있으며, 이는 레트로바이러스 긴 말단 반복(LTR), 거대세포 바이러스(CMV), 마우스 줄기세포 바이러스(MSCV) U3, 포스포글리세르산 인산화효소(PGK), β-액틴, 유비퀴틴 그리고 원숭이 바이러스 40(SV40)/CD43 복합 프로모터, 연장 인자(EF)-1a 및 비장 병소 형성 바이러스(SFFV) 프로모터 등이다. 바람직한 구현에서, 이 프로모터는 발현 중인 핵산에 대해 이종이다. 강력한 프로모터 외에도, 본 발명의 TCR 발현 카세트에는 이식 유전자 발현을 강화시킬 수 있는 추가의 요소들이 포함될 수 있으며, 이는 렌티바이러스성 구성의 핵 전위를 촉진하는 중앙 폴리퓨린 트랙(cPPT) (Follenzi et al., 2000), 그리고 RNA 안정성의 증가를 통해 이식 유전자 발현의 수준을 증가시키는 wPRE(우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 요소)(Zufferey et al., 1999) 등을 포함한다.

[0332] 본 발명의 TCR의 알파 및 베타 쇄는 별개의 벡터에 위치한 핵산에 의해 인코딩할 수 있거나 동일한 벡터에 의한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩할 수 있다.

[0333] 고수준의 TCR 표면 발현의 성취는 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄가 고수준으로 전사되는 것을 요구한다. 이를 위해서는, 본 발명의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄가 단일 벡터에서 비시스트로닉 구성으로 클로닝될 수 있으며, 이는 이러한 장애물을 극복할 수 있는 것으로 나타난 바 있다. TCR-알파 및 TCR-베타 쇄 사이에 있는 바이러스성 내부 리보좀 엔트리 부위(IRES)를 사용하는 경우 두 쇄의 발현 조정을 초래하는데, 이는 번역 동안 2개의 단백질로 분해되는 단일 전사물로부터 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄가 생성됨으로써 동일한 몰 비율의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄가 생성되도록 보장하기 때문이다(Schmitt et al. 2009).

[0334] 본 발명의 TCR을 인코딩하는 핵산은 코돈의 최적화를 통해 숙주 세포의 발현을 증가시킬 수 있다. 유전 부호의 중복성으로 인해 일부 아미노산은 하나보다 많은 코돈에 의해 인코딩이 가능하지만, 특정 코돈은 다른 것보다 덜 "최적"인데 이는 tRNA는 물론 다른 인자의 짝짓기에 대한 상대적 가용도 때문이다(Gustafsson et al., 2004). 각 핵산이 포유류 유전자 발현을 위해 최적의 코돈에 의해 인코딩되도록 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 서열의 변형은 물론 mRNA 불안정성 모티프 또는 잠적 스플라이스 부위의 제거는 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 발현을 유의하게 강화시키는 것으로 나타났다(Scholten et al., 2006).

[0335] 더욱이 도입된 TCR 쇄에 따라 내인성 TCR 쇄 사이의 틀린 짝짓기는 자가 면역에 대해 상당한 위험을 제기하는 특이성의 획득을 초래할 수 있다. 예를 들어, 혼합 TCR 이합체의 형성은 제대로 짝짓기된 TCR 복합체의 형성에 가용한 CD3 분자의 수를 감소시킬 수 있으며, 그리하여 도입된 TCR을 발현하는 세포의 기능적 결합성을 유의하게 감소시킬 수 있다(Kuball et al., 2007).

[0336] 잘못된 짝짓기를 감소시키려면, 본 발명의 도입된 TCR 쇄의 C-말단 도메인을 변형하여 쇄간 친화성을 촉진시킬 수 있는 반면, 내인 TCR과 도입된 쇄의 짝짓기 능력을 감소시킬 수 있다. 이러한 전략에는 인간 TCR-알파 및

TCR-베타 C-말단 도메인의 상응하는 마우스 도메인에 의한 교체(마우스 C-말단 도메인); 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄 모두에 두 번째 시스테인 잔기를 도입하여 C-말단 도메인에서 두 번째 쇄간 이황 결합의 생성(시스테인 변형); TCR-알파 및 TCR-베타 쇄 C-말단 도메인에서 상호작용하는 장기들의 교환("knob-in-hole"); 그리고 TCR-알파 및 TCR-베타 쇄의 가변 도메인을 CD3ζ에 대한 직접 융합(CD3ζ 융합)이 포함될 수 있다(Schmitt et al. 2009).

[0337] 한 구현에서는, 숙주 세포를 본 발명의 TCR을 발현하도록 공학적으로 조작한다. 바람직한 구현에서는, 이 숙주 세포가 인간 T 세포 또는 T 전구세포이다. 일부 구현에서는 T 세포 또는 T 전구 세포를 암 환자로부터 얻는다. 다른 구현에서는 T 세포 또는 T 전구 세포를 건강한 공여자로부터 얻는다. 본 발명의 숙주 세포는 치료하려는 환자에 대해 동종이거나 자가일 수 있다. 한 구현에서, 이 숙주는 감마/델타 T 세포 변형을 통해 알파/베타 TCR을 발현한다.

[0338] "약학적 조성물"이란 의학적 환경에서 인간에게 투여하는데 적합한 성분이다. 바람직하게는, 약학적 조성물은 무균이며 GMP 지침에 따라 생산된다.

[0339] 약학적 조성물은 유리 형태 또는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 된 펩티드를 포함한다(상기 내용도 참조). 여기서 사용되는 것처럼, "약학적으로 허용가능한 염"은 펩티드가 산 또는 제제의 염기 염을 만들며 변형되는 공개된 펩티드의 유도체를 언급한다. 예를 들면, 산성 염은 적당한 산과의 반응을 가진 자유 염기(일반적으로 중성 NH_2 기가 있는 약물의 중성 형태)로부터 제조된다. 산성 염을 준비할 때 적당한 산은 예를 들면, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산과 같은 같은 무기산뿐만 아니라 초산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 수산, 말산, 말론산, 호박산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 벤조산, 계피산, 만델릭산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산같은 유기산을 포함한다. 반대로, 펩티드에서 나타날 수 있는 산성 잔기의 염기 염의 준비는 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 암모늄, 수산화 칼슘, 트리메틸아민과 같은 약학적으로 허용가능한 염기를 사용한다.

[0340] 특별히 바람직한 약학적 조성물의 구현은 초산(아세트산염), 삼불화 초산 또는 염산(염화물)의 염으로의 펩티드를 가진다.

[0341] 바람직하게는, 이 본 발명의 약제는 백신과 같은 면역요법제이다. 이는 환자의 영향을 받은 기관에 직접적으로 투여될 수 있거나 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.로서 전체적으로 투여되거나 환자에게서 또는 나중에 환자에게 투여될 인간 세포주에 생체 외로 적용될 수도 있거나 나중에 환자에게 다시 투여될 선택된 면역 세포의 부분집단에 시험관 내로 사용될 수도 있다. 만약 핵산이 시험관 내에서 세포에 투여되면, 인터루킨-2와 같은 면역유도 시토카인과 함께 발현되는 것이 유용할 수도 있다. 펩티드는 상당히 순도가 높을 수도 있거나, 면역 유도 보조제(아래 참조)와 결합되어 있거나 면역-유도 시토카인과 함께 합성체로 사용되거나, 리포좀과 같은 적당한 전달 체계와 함께 투여될 수도 있다. 펩티드는 또한 키홀 임펫 헤모시아닌(KLH) 또는 만난과 같은 적절한 담체와 접합시킬 수도 있다(WO 95/18145 및 문헌 (Longenecker et al., 1993) 참고). 펩티드는 표지를 붙일 수도 있으며 융합 단백질일 수 있고 하이브리드 분자일 수도 있다. 본 발명에서 그 서열이 제공된 펩티드는 CD4 또는 CD8 T 세포를 자극할 것으로 기대된다. 하지만 CD8 세포의 자극은 CD4 보조 T 세포에 의해 제공되는 도움이 존재할 때 더 효율적이다. 그러므로 CD8 T 세포를 자극하는 MHC 클래스 I 에피토프의 경우, 융합 파트너 또는 하이브리드 분자의 섹션은 CD4-양성 T 세포를 자극하는 에피토프를 적절하게 제공한다. CD4-와 CD8-자극 에피토프는 이 분야에서 잘 알려졌고 본 발명에서 식별된 것들을 포함한다.

[0342] 한 양태에서, 이 백신은 서열번호 1 내지 서열번호 114를 명시하는 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 펩티드 그리고 적어도 하나의 추가적인 펩티드, 바람직하게는 2개 내지 50개이고, 더 바람직하게는 2개 내지 25개이며, 보다 더 바람직하게는 2개 내지 20개이고 가장 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개의 펩티드를 포함한다. 펩티드는 하나 이상의 특정한 TAA에서 유도되었고 이는 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합할 수 있다.

[0343] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 펩티드 또는 펩티드 변이체를 인코딩하는 핵산(예를 들면 폴리뉴클레오티드)에 대한 정보를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이의 조합일 수 있으며, 한 가닥 및/또는 이중 쇄로 되어 있을 수 있거나, 본래의 형태일 수도 있거나, 예를 들면 포스포로티오에이트 백본을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드의 안정화된 형으로 되어 있을 수도 있으며, 펩티드를 인코딩하는 한 인트론을 포함할 수도 있고, 그렇지 않을 수도 있다. 물론, 단지 자연적으로 일어나는 아미노산 잔기로 이루어진 그리고 자연적으로 일어나는 펩티드 결합에 의해 결합이 된 펩티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해서 인코딩될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터에 대한 설명을 제

공한다.

[0344] 특히 DNA와 같은 폴리뉴클레오티드를 벡터, 예를 들면 보완 응집성 말단을 이용하여 연결하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들면, 보완 동종중합체 트랙트가 DNA 조각에 추가되어 이를 벡터 DNA에 삽입할 수 있다. 벡터와 DNA 조각은 이후 보완 동종중합체 꼬리와 함께 수소 결합을 이용하여 재조합 DNA 분자를 생성할 수 있다.

[0345] 하나 이상의 제한 부위를 포함하는 합성된 연결부위는 DNA 분절과 벡터를 결합하는 다른 방법을 제시한다. 여러 가지의 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는 합성 연결부위는 상업적으로 International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, USA를 비롯한 곳에서 구입이 가능하다.

[0346] 본 발명에서 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA를 변형하는 바람직한 방법은 다음의 Saiki RK 등에 의하여 공개된 폴리머라아제 연쇄 반응을 이용한다(Saiki et al., 1988). 이 방법은 예를 들면 적당한 제한 부위를 만들어 적당한 벡터로 DNA를 도입하는데 사용하거나 당업계에서 알려져 있는 DNA를 다른 유용한 용도를 위해 변형하는 데에 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용된다면, 수두 벡터 또는 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.

[0347] DNA(또는 레트로 바이러스 벡터일 경우, RNA)는 그 후 적당한 숙주에서 발현되며 이는 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 가지고 있는 폴리펩티드를 생성한다. 따라서, 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 DNA는 알려진 기술과 여기에서 배울 수 있는 것을 고려하여 적절히 수정하여 적절한 숙주 세포를 본 발명의 폴리펩티드를 발현하고 생성하도록 형질전환시키는 데 사용된다. 이러한 기법은 예를 들어 다음에 공개되어 있다: 미국 특허 번호 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075 및 4,810,648.

[0348] 본 발명의 화합물을 만드는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우, RNA)는 많은 종류의 다른 DNA 서열과 결합되어, 적절한 숙주로의 도입을 유도할 수 있다. 동반 DNA는 숙주의 특성, DNA를 숙주로 도입하는 방법 및 에피솜 유지 또는 통합이 필요한 지에 따라 결정될 것이다.

[0349] 보통, DNA는 발현을 위한 올바른 방향 및 올바른 리딩 프레임에 맞추어 플라스미드와 같은 발현 벡터로 삽입된다. 필요할 경우, DNA는 바람직한 숙주에 의해 인식되는 적당한 전사 조절 제어 뉴클레오티드 서열(하지만, 이 제어는 대부분의 경우 발현 벡터 내에 이미 존재한다)에 연결될 수도 있다. 벡터는 그 후 숙주로 기본적인 기술을 통해 도입된다. 보통, 모든 숙주가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 세포를 선택하는 것이 필요할 것이다. 하나의 선택 기술은 형질전환된 세포에서 선택이 가능한 특성(예: 항생제 내성)을 인코딩하는 DNA 서열을 필요한 제어 요소와 함께 발현 벡터에 통합시키는 것이다.

[0350] 다른 방법으로는, 이러한 선택이 가능한 특성이 다른 벡터에 있을 수도 있으며, 이는 바람직한 숙주 세포를 동시-형질전환하는 데에 사용된다.

[0351] 발명의 재조합 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 문서에서 기술된 내용을 고려하여 당업자가 이미 알고 있는 적절한 상태에서 충분한 시간 동안 배양되어 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하며, 이는 후에 회복된다.

[0352] 박테리아(예를 들면, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)와 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들면 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류(예를 들면 아스퍼길러스 스피시즈(*Aspergillus spec.*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포 등의 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직하게는, 그 체계는 ATCC Cell Biology Collection에서 구할 수 있는 CHO 세포 등의 포유류 세포로 구성될 수 있다.

[0353] 구조성 발현을 위한 전형적인 포유류 세포 벡터 플라스미드는 CMV 또는 SV40 촉진제와 적당한 폴리 A 꼬리 및 네오마이신과 같은 저항성 마커를 포함한다. 하나의 예는, Pharmacia, Piscataway, NJ, USA에서 구할 수 있는 pSVL이다. 유도가능 포유류 발현 벡터의 예는 pMSG이며 이 또한 Pharmacia에서 구할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 벡터는 pRS403-406과 pRS413-416이며 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA에서 구할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효소 통합 플라스미드(YIps)이며 이는 효소 선택 마커 HIS3, TRP1, LEU2와 URA3을 통합한다. 플라스미드 pRS413-416은 효소 동원체 플라스미드(Ycps)이다. (예를 들면 Sigma-Aldrich로부터 입수한) CMV 프로모터 기반 벡터는 일시적인 또는 안정된 발현, 세포질 발현 또는 분비, 및 FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT 등의 다양한 조합으로 N-말단 또는 C-말단 표지 등을 제공한다. 이러한 융합 단백질은 재조합 단백질의 검출, 정제와 분석을 가능하게 한다. 이중 표지 융합은 검출 시 유연성을 제공한다.

[0354] 강한 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 조절 영역은 구성 단백질 발현 수준을 높게는 COS 세포에서

1mg/L까지 작동한다. 좀 더 효능이 약한 세포주에서는, 단백질 수준이 전형적으로 약 0.1mg/L 정도이다. SV40 복제 원점이 있음으로써 SV40, 복제를 가능하게 하는 COS 세포에서 DNA 복제의 수준이 높은 결과를 낳는다. CMV 벡터는 예를 들면 박테리아 세포에서의 복제를 위한 pMB1 원점, 박테리아에서 암피실린 저항 선택을 위한 b-락타마아제 유전자, hGH poly A, 및 f1 원점을 포함할 수 있다. 프리프로트립신 리더(PPT) 서열을 포함하는 벡터는 FLAG 융합 단백질을 ANTI-FLAG 항원, 레진, 및 플레이트를 사용하여 정제하기 위한 배양 배지로 분비하도록 방향을 정할 수가 있다. 다른 벡터와 발현 체계는 여러 가지의 숙주 세포 사용에 대해 널리 알려져 있다.

[0355] 다른 구현에서는 본 발명의 2개 이상 펩티드나 펩티드 변이체가 인코딩됨으로써 연속적인 순서로 발현된다("염주 모양" 구조와 유사). 그렇게 함으로써 펩티드나 펩티드 변이체는 예를 들어 LLLLLL과 같은 링커 아미노산의 퍼짐에 의해 함께 연결 또는 융합될 수 있으며 또한 그 사이에 추가의 펩티드 없이 연결될 수 있다. 이러한 구성들은 암 요법에서도 사용할 수 있으며 MHC I 및 MHC II 모두가 연관되는 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0356] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 벡터 구성에 의해 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.. 숙주 세포는 원핵 세포이거나 진핵 세포일 수 있다. 박테리아 세포가 몇몇의 상황에서 바람직한 원핵 숙주 세포일 수 있으며, 보통 Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA에서 구할 수 있는 에스케리치아 콜라이 균주 DH5, 그리고 American Type Culture Collection(ATCC), Rockville, MD, USA(No ATCC 31343)에서 RR1이 입수가능하다. 바람직한 진핵 숙주 세포는 효모, 곤충, 포유류 세포를 포함하고, 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유아세포와 대장 세포주 등의 척추 동물 세포가 바람직하다. 효모 숙주 세포는 YPH499, YPH500 및 YPH501을 포함하며, 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA에서 구입이 가능하다. 바람직한 포유류 숙주 세포는 ATCC에서 구입이 가능한 CCL61로 알려져 있는 중국 햄스터 난소 세포, CRL 1658로 알려져 있는 스위스 생쥐 배아 세포 NIH/3T3, CRL 1650 세포로 알려져 있는 원숭이 신장-유도 COS-1 세포와 293 세포로 알려져 있는 인간 배아 신장 세포를 들 수 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이며 이는 배큘로바이러스 발현 벡터에 의해 세포로 감염될 수 있다. 발현을 위한 적당한 숙주 세포의 선택에 대한 개관은 예를 들면 Paulina Balbas and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1- 58829-262-9 및 당해 분야의 숙련자에게 알려진 다른 문헌에서 찾을 수 있다.

[0357] 적당한 세포 숙주를 본 발명의 DNA 구성으로 형질전환하는 것은 보통 사용되는 벡터의 유형에 따라 결정되는 잘 알려진 방법으로 완성된다. 원핵 숙주 세포의 형질전환에 대해서는 예를 들면 Cohen 등(Cohen et al., 1972) 그리고 (Green and Sambrook, 2012)를 참조한다. 효모 세포의 형질전환은 Sherman 등에 설명되어 있다(Sherman et al., 1986). Beggs의 방법(Beggs, 1978) 또한 유용하다. 척추 동물 세포와 관련하여 이러한 세포를 감염시키는 시약, 예를 들면 칼슘 인산염과 DEAE-덱스트란 또는 리포좀 제제는 Stratagene Cloning Systems 또는 Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USA에서 입수할 수 있다. 전기 천공법 역시 형질전환 및/또는 세포를 감염시키는 데에 유용하며 이는 효소 세포, 박테리아 세포, 곤충세포 및 척추동물 세포 형질전환에 잘 알려져 있다.

[0358] 성공적으로 형질전환이 된 세포, 즉 본 발명의 DNA 구조를 가지고 있는 세포는 잘 알려진 PCR과 같은 기술로 식별된다. 다른 방법으로는, 상청액에 존재하는 단백질은 항생제를 사용함으로써 검출될 수 있다.

[0359] 본 발명의 특정한 숙주 세포, 예를 들면 박테리아, 효소 및 곤충 세포와 같은 세포는 본 발명의 펩티드의 준비에 유용하다는 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다른 숙주 세포 또한 특정한 치료 방법에 유용할 수도 있다. 예를 들면, 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포는 적당한 MHC 분자에 로딩이 되도록 하는 본 발명의 펩티드를 발현하는 데 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0360] 바람직한 구현에서, 숙주 세포는 항원 제시 세포이며, 특히 수지상 세포 또는 항원 제시 세포이다. 전립선산 인산효소(PAP)를 함유하는 재조합 융합 단백질로 로딩된 APC는 무증상 또는 최소한의 증상 전이성 HRPC(Sipuleucel-T)의 치료에 대해 미국 식품안전청(FDA)에서 2010년 4월 29일에 승인된 바 있다(Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

[0361] 본 발명의 다른 양태는 펩티드 또는 그 변이체를 생산하는 방법, 숙주 세포를 배양하고 펩티드를 숙주 세포 또는 배지에서 단리하는 것을 포함한 생산 방법을 제공한다.

[0362] 다른 구현에서는 본 발명의 펩티드, 핵산 또는 벡터 발현이 의학에서 사용된다. 예를 들면, 펩티드 또는 그의 변이체는 정맥 내(i.v.) 투여, 피부 하(s.c.) 투여, 피부 내(i.d.) 투여, 복강 내(i.p.) 투여, 근육 내(i.m.)

투여를 포함한다. 펩티드 투여의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m., 및 i.v. 투여를 포함한다. DNA 투여의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v. 투여를 포함한다. 펩티드 또는 DNA의 50 μg 및 1.5 mg, 바람직하게는 125 μg 내지 500 μg 사이의 용량이 각각의 펩티드 또는 DNA에 따라서 투여될 수 있다. 이러한 범위의 용량이 이전의 임상실험에서 성공적으로 사용된 바 있다(Walter et al., 2012).

[0363] 면역 접종에 사용된 폴리뉴클레오티드는 상당히 순도가 높거나 적당한 벡터 또는 전달 체계에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 핵산을 설계하고 도입하는 방법은 이 업계에 잘 알려져 있다. 개요는 예를 들어 Teufel 등(Teufel et al., 2005)이 제공하고 있다. 폴리뉴클레오티드 백신은 만들기가 쉽지만, 이들 벡터의 면역 반응을 유도하는 동작 모드는 완전히 이해가 되지 않았다. 적당한 벡터와 전달 체계는 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노 연관 바이러스 또는 한 개 이상의 바이러스를 포함하는 혼성체 등의 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 체계는 양이온 지질과 양이온 중합체를 포함하고 있으며 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자-총(gene-gun)"을 통한 것과 같은 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 펩티드 또는 핵산에 의해 인코딩된 펩티드는 융합 단백질이 될 수도 있고, 예로서는 위에서 언급한 각각의 반대 CDR을 위한 T 세포를 유도하는 에피토프를 들 수 있다.

[0364] 본 발명의 약제는 하나 이상의 보조제를 포함할 수 있다. 보조제는 면역 반응을 비특이적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질을 언급한다(예: 항원에 대한 CD8-양성 T 세포 및 조력 T(TH) 세포에 의해서 중재된 면역 반응). 따라서 본 발명에서 보조제는 유용한 약제 구성이라고 할 수 있다. 적당한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 플라젤린 또는 플라젤린에서 유도된 TLR5 리간드, FLT3 리간드, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(ALDARA®), 레스퀴미드, ImuFact IMP321, IL-2, IL-13, IL-21과 같은 인터루킨, 인터페론 알파 또는 베타, 또는 이들의 페길화된 유도체, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, 주브이뮨(JuvImmune), LipoVac, MALP2, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, 유중수형과 수중유형 에멀전, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, PepTel® 벡터 시스템, PLG와 덱스트란 극미립자, 탈락토페린, SRL172, 비로솜(Virosome) 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타글루칸, Pam3Cys, 사포닌에서 유도된 아퀼라스 QS21 스틸물론, 마이코박테리아 추출물과 합성 세균의 세포 벽 모방제, 및 다른 리비의 데톡스(Ribi's Detox), 쿠일(Quil), 또는 수퍼포스(Superfos)와 같은 독점 보조제 등이 있다. Freund's 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 몇몇 면역적 보조제(예: MF59)는 수지상 세포에 특이적이고, 그 제조 방법은 이전에 묘사된 바 있다(Allison and Krummel, 1995). 또한, 시토카인도 사용될 수 있다. 몇몇 시토카인은 수지상 세포의 림포이드 조직으로의 이동에 영향을 주는 것에 직접적으로 연관된 바 있으며(예: TNF-α), 이는 수지상 세포의 더 효율적인 T 림프구에 대한 항원 제시 세포로의 성장을 가속시키고(예: GM-CSF, IL-1 및 IL-4)(미국 특허 번호 5,849,589, 여기에 그 전문이 참조 문헌으로 포함됨) 면역보조제의 역할을 한다(예: IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-알파, IFN-베타)(Gabrilovich et al 1996).

[0365] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 백신 세팅에서 보조제의 효율성을 높이는 것으로 나타났다. 이 이론에 국한하지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 톨-유사 수용체(TLR), 특히 TLR9를 통해 선천(비적응) 면역 반응을 활성화시킨다. CpG에 의해 유도된 TLR9의 활성화는 펩티드 또는 단백질 항원, 살아있거나 죽은 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포 백신 및 예방적 및 치료적 백신의 다당류 접합체를 포함한 넓은 종류의 항원에 대한 항원 특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게 이는 수지상 세포의 성숙 및 차별화를 향상시키고 이는 TH1 세포의 활성화를 향상시키며 강한 세포독성 T 림프구(CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움이 없을 때에도 향상시킨다. TLR9 자극에 의해 일어난 TH1 바이러스는 보통 TH2 바이러스를 촉진시키는 alum 또는 비완성된 프로인트 보조제(Freund's adjuvant(IFA))와 같은 백신 보조제가 존재할 때도 유지된다. CpG 올리고뉴클레오티드는 다른 보조제와 함께 제조되거나 함께 투여될 시 또는 특히 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 얻어내기 위해 필요한 미세입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 비슷한 제약으로 되어 있을 경우 더 큰 보조제 활동을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 몇몇의 연구에서 보여진 바 있듯이 CpG가 없을 때 백신 전체 용량이 일으키는 항체 반응 수준으로 항원의 용량을 약 두 배 정도 줄일 수 있도록 한다(Krieg, 2006). 미국 특허 번호 6,406,705 B1은 CpG 올리고뉴클레오티드, 비핵산 보조제 및 항원 특이 면역 반응을 일으키는 항원의 결합 사용에 대해 묘사한다. CpG TLR9 길항제는 Mologen(Berlin, Germany)에 의해 만들어진 dSLIM(double Stem Loop Immunomodulator)이며 이는 본 발명의 제약 조성의 바람직한 성분이다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9 등의 다른 TLR 결합 분자 또한 사용이 가능하다.

[0366] 다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 화학적으로 변형된 CpG(예: CpR, Idera),

Poly(I:C)와 같은 dsRNA 유사체 및 그 유도체(예: 앰프리젠(AmpliGen), 힐토놀(Hiltonol), poly-(ICLC), poly(IC-R), poly(I:C12U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 및 사이클로포스아미드, 수니티닙, 베바시주맙(Bevacizumab), 셀레브렉스, NCX-4016, 실데나필, 타달라필, 바르데나필, 소라페닙, 테모졸로마이드, 템시롤리무스, XL-999, CP-547632, 파조파닙, VEGF 트랩, ZD2171, AZD2171, 안티-CTLA4와 같은 면역활성적인 작은 분자 및 항체 및 면역계의 주요 구조를 표적화하는 다른 항체(예: anti-CD-40, anti-TGFbeta, anti-TNFalpha 수용체) 및 SC58175가 있으며 이는 치료적으로 또는 보조제의 역할을 할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 보조제와 첨가제의 양과 농도는 특별히 다른 실험할 필요 없이 숙련된 기술자에 의해서 쉽게 결정될 수 있다.

[0367] 바람직한 보조제들은 이미퀴모드, 레시퀴모드, GM-CSF, 사이클로포스파마이드, 수리티닙, 베바시주맙, 인터페론-알파, CpG, 올리고뉴클레오티드 및 유도체 폴리-(I:C) 및 유도체, RNA, 실데나필, 그리고 PLG 또는 비로솜 미립자 제제이다.

[0368] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 그래뉼로사이트 마크로파지 콜로니-자극 인자(GMCSF, 사르가라모스팀), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드, 레시퀴모드 및 인테페론 알파와 같은 콜로니 자극 인자로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0369] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 그래뉼로사이트 마크로파지 콜로니 자극 인자(GMCSF, 사르가라모스팀), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 및 레시퀴모드로 구성되는 군으로부터 선택된다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 또는 레시퀴모드이다. 훨씬 더 바람직한 보조제는 Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC(Hiltonol®) 및 anti-CD40 mAB 또는 이들의 조합들이다.

[0370] 이 조성물은 피하, 피부내, 근육내 비경구 투약 또는 경구 투약에 사용된다. 이를 위해, 펩티드, 및 임의적으로 다른 분자들을 약학적으로 허용되는, 바람직하게는 수용성 담체에 용해 또는 현탁한다. 추가로, 이 조성물은 완충액, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 또한 펩티드는 시토카인 같은 면역 자극 물질과 같이 투여될 수도 있다. 이러한 성분에 사용될 수 있는 방대한 부형제 목록은 예를 들어 다음에서 확인할 수 있다: A. Kibbe, 약학적 부형제 핸드북(Kibbe, 2000). 이러한 조성물은 선종성 또는 암성 질병의 예방, 방지 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예시적 제제는 예를 들어 EP2113253에서 찾을 수 있다.

[0371] 본 발명에 따른 백신에 의해 일어나는 면역 반응이 다른 세포 단계 및 다른 개발 단계에서 암을 공격한다는 것을 인지하는 것이 중요하다. 더욱이 암과 연관된 다른 신호전달 경로가 공격을 받는다. 이것은 단 하나 또는 몇몇 표적만을 다루며 종양으로 하여금 공격에 쉽게 적응하도록 유발할 수 있는(종양 탈출) 백신에 비해 이점으로 작용한다. 더욱이, 모든 개별 종양들이 같은 항원의 패턴을 발현하는 것은 아니다. 그러므로 몇몇 종양 연관 펩티드들의 조합은 모든 개별 종양이 적어도 표적의 일부를 갖도록 한다. 이 조성물은 각 종양이 몇 개의 항원을 발현할 것으로 기대되며 종양 성장 및 유지에 필요한 몇 개의 독립적 경로를 다루도록 설계되었다. 그리하여 백신은 보다 큰 환자 모집단을 위해 "기성품"으로 쉽게 사용이 가능하다. 이는 백신으로 치료할 환자의 사전 선택을 HLA 형결정으로 제약될 수 있고, 항원 발현을 위해 어떠한 추가의 바이오마커 평가를 요구하지 않음을 의미하지만, 효능에 중요한 몇몇 표적들이 유도된 면역 반응에 의해 동시적으로 공격되도록 계속 보장한다(Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

[0372] 여기서 사용된 "골격(scaffold)"이란 용어는 (예: 항원성) 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 언급한다. 한 구현에서, 골격은 그것이 부착되는 객체(예: (두 번째) 항원 결합 모이어티)를 표적 부위, 예를 들어 특이한 유형의 종양 세포 또는 항원성 결정인자를 갖는 종양 간질(예: 당장의 용도에 따른 펩티드와 MHC의 복합체)로 향하도록 지시할 수 있다. 또 다른 구현에서 골격은 그 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원을 통해 신호전달을 활성화할 수 있다. 골격은 항체 및 그 단편, 항체 중쇄 변수 영역 및 항체 경쇄 변수 영역을 포함하는 항체의 도메인에 결합하는 항원, 적어도 하나의 안키린 반복 모티프 및 단일 도메인 항원 결합(SDAB) 분자를 포함하는 결합 단백질, 압타머, (가용성) TCR 그리고 동종 또는 자가 T 세포와 같은 (변형된) 세포를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 어떤 분자가 표적에 결합하는 골격인지 평가하기 위해, 결합 검정을 수행할 수 있다.

[0373] "특이적" 결합이란 그 골격이 다른 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC-복합체보다 관심 대상의 펩티드-MHC-복합체에 더 잘 결합하며, 그 정도는 특정 표적이 포함된 세포를 줄일 수 있는 활성 분자로 무장한 골격이 특정 표적이 없는 다른 세포는 죽일 수 없으며 다른 펩티드-MHC 복합체를 제시하는 것을 의미한다. 교차-반응성 펩티드-MHC의 펩티드가 자연적으로 발생하지 않는다면, 즉 인간 HLA-펩티돔으로부터 유래되지 않는다면, 다른 펩티드-MHC 복합체에 대한 결합은 관련이 없다. 표적 세포 살해의 평가 검사는 당업계에 잘 알려져 있다. 이 검사는 변

경되지 않는 펩티드-MHC 제시를 가진 표적 세포(일차 세포 또는 세포주) 또는 자연적으로 발생되는 펩티드-MHC 수준이 도달되는 정도로 펩티드가 포함된 세포를 사용하여 수행해야 한다.

[0374] 각 골격은 라벨이 제공하는 신호의 존재나 부재를 판단함으로써 결합된 골격이 검출 가능하도록 제공하는 라벨링을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 골격은 형광 염료나 일체의 다른 해당되는 세포 마커 분자를 사용하여 라벨링이 가능하다. 그러한 마커 분자는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 형광 라벨링은 (예를 들어 형광 염료에 의해 제공되는) 형광이나 레이저 스캐닝 현미경 또는 유세포 분석에 의해 결합된 압타머의 가시화를 제공할 수 있다.

[0375] 각 골격은 IL-21, 항CD3, 항CD28과 같은 두 번째 활성 분자와 접합될 수 있다.

[0376] 폴리펩티드 골격에 대한 추가 정보는 예를 들어 WO 2014/071978A1의 배경 부분과 거기에 인용된 참조 문헌을 참조한다.

[0377] 본 발명은 또한 압타머에 관한 것이다. 압타머란(예를 들어 WO 2014/191359 및 여기에 인용된 문헌을 참조) 정의된 삼차원적 구조로 접힐 수 있으며 특정 표적 구조를 인지할 수 있는 짧은 단일 가닥 핵산 분자이다. 이것은 표적 요법의 개발에 필요한 적합한 대안인 것으로 보여진 바 있다. 압타머는 높은 친화성 및 특이성으로써 다양한 복합체 표적에 선택적으로 결합하는 것으로 나타난 바 있다.

[0378] 세포 표면에 위치한 분자를 인지하는 압타머가 지난 십 년 동안 동정된 바 있으며 진단 및 치료 접근 방식을 개발하기 위한 수단을 제공한다. 압타머가 독성 및 면역원성을 거의 소유하지 않는 것으로 나타난 바가 있으므로, 생존의학적 용도를 위한 유력한 후보이다. 정말로 압타머, 예를 들어 전립선 특이적 막-항원을 인지하는 압타머는 표적 대상의 요법을 위해 성공적으로 사용되어 왔으며 또한 생체 모델에서의 이종이식에 기능적인 것으로 나타난 바 있다. 더욱이 특이적 종양 세포주를 인지하는 압타머가 동정된 바 있다.

[0379] DNA 압타머는 다양한 암 세포 그리고 특히 고형 종양으로부터 유래하는 것들을 위한 광범위 인지 성질을 밝히기 위해 선택가능한 반면에, 비종양형성의 그리고 원발성의 건강한 세포는 인지되지 않는다. 동정된 압타머가 특이적 종양 아형을 인지할 뿐만 아니라 일련의 종양과 상호작용한다면, 이로 인해 압타머는 소위 광범위 진단 및 치료에 적용될 수 있다.

[0380] 더욱이 유세포 분석을 사용한 세포 결합 거동의 조사에 의하면 압타머는 나노몰 범위에서 매우 양호하고 뚜렷한 친화성을 드러내는 것으로 나타났다.

[0381] 압타머는 진단 및 치료 목적으로 유용하다. 더욱이 일부 압타머는 종양 세포에 의해 섭취되며 그리하여 종양 세포 안으로의 siRNA와 같은 항암제의 표적 인도를 위한 분자 부형제로서 기능이 가능함을 보여줄 수 있다.

[0382] 압타머는 세포와 조직과 같은 복합체 표적 그리고 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 114 사이의 어느 것에 따른 서열로 구성되며 본 발명에 따른 펩티드와 MHC 분자와의 복합체에 대하여, cell-SELEX(지수적 증식에 의한 리간드의 체계적 진화) 기법을 사용하여 선택이 가능하다.

[0383] 본 발명의 펩티드는 MHC/펩티드 복합체에 대한 특정 항체를 생성하고 개발하는데 사용될 수 있다. 이들은 병변 조직에 치료, 독성 물질 표적화 또는 방사능 물질로 사용될 수 있다. 이런 항체의 또 다른 사용은 PET 같은 이미지 목적을 위해 병변 조직의 방사성 핵종을 표적화할 수도 있다. 이 사용은 작은 전이를 검출하거나 병변 조직의 크기와 정확한 위치를 결정하는데 도움이 될 수 있다.

[0384] 그러므로 본 발명의 다른 양태는 HLA-제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II와 특이적으로 결합하는 재조합 항체의 생산 방법을 제공하는 것으로, 이 방법은 상기 HLA 제한 항원과 복합체를 형성하는 가용성 형태의 MHC 클래스 I 또는 II 분자로써 상기 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II를 발현하는 세포를 포함하는 유전자 조작된 비인간 포유동물의 면역화; 상기 비인간 포유동물의 세포를 생산하는 항체로부터 mRNA 분자의 단리; 상기 mRNA 분자에 의해 인코딩된 단백질 분자를 표시하는 파지 디스플레이 라이브러리의 생산; 및 상기 파지 디스플레이 라이브러리로부터 적어도 하나의 파지의 단리를 포함하며 상기 적어도 하나의 파지는 상기 HLA-제한 항원과 복합되는 상기 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II와 특이적으로 결합하는 상기 항체를 나타낸다.

[0385] 본 발명의 다른 양태는 HLA 제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 것으로 이 항체는 바람직하게는 다클론 항체, 단클론 항체, 이중특이성 항체 및/또는 키메라 항체이다.

[0386] 그러한 항체 및 단일 쇄 클래스 I 주조직적합 복합체의 생산을 위한 해당 방법들은 물론 이러한 항체의 생산을 위한 다른 도구들은 WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 및 출판물(Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003)에 공개되어 있으며, 이들은 본 발명의 목적을 위해 그 전문이 참조문헌에 명백히 포함되어 있다.

[0387] 바람직하게는 항체는 20 나노몰 미만, 복합체에 대해서 바람직하게는 10 나노몰 미만의 결합 친화력으로써 복합체와 결합하는데, 이는 또한 본 발명의 맥락에서 "특이적"으로 간주된다.

[0388] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 114로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열번호 1 내지 서열번호 114에 대해 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 동일한) 그 변이체 또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체에 관한 것으로, 상기 펩티드는 기저 전장 폴리펩티드가 아니다.

[0389] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 서열번호 114로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열번호 1 내지 서열번호 114에 대해 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 동일한) 그 변이체에 관한 것으로, 상기 펩티드 또는 변이체는 전장이 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개인 아미노산이다.

[0390] 본 발명은 또한 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖는 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.

[0391] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 서열번호 1 내지 서열번호 114에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 이루어진다.

[0392] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 (화학적으로) 변형되거나/며 비펩티드 결합을 포함한다.

[0393] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 펩티드는 융합 단백질의 일부이며 특히 HLA-DR 항원 연관 불변쇄(Ii)에 융합되거나 펩티드는 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 안으로) 융합된다.

[0394] 본 발명은 또한 본 발명이 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것으로, 단 펩티드가 완전한 (전부) 인간 단백질은 아니다.

[0395] 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.

[0396] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터에 관한 것이다.

[0397] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 의학에서의 특히 RCC의 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.

[0398] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 또는 전에 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0399] 본 발명은 또한 항원 제시 세포 그리고 바람직하게는 수지상 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.

[0400] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양과 상기 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터 펩티드의 단리를 포함한다.

[0401] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.

[0402] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 항원 제시 세포가 서열번호 1 내지 서열번호 114를 포함하는 상기 펩티드 또는 상기 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있는 펩티드를 포함한다.

[0403] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 의해 제조된 활성화된 T 세포에 관한 것으로, 상기 T 세포는 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.

[0404] 본 발명은 또한 표적 세포가 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 환자에서 그 표적 세포를 죽이는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 본 발명에 따른 효과적인 수의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0405] 본 발명은 또한 설명한 일체의 펩티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 또는 본 발명에 따른 활성화된 세포 독성 T 림프구를 약제로서 또는 약제의 제조시 사용에 관한 것이다. 본 발

명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로 상기 약제가 암에 대해 활성을 갖는다.

[0406] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로 상기 약제가 백신이다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로 상기 약제가 암에 대해 활성을 갖는다.

[0407] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 사용에 관한 것으로, 상기 암세포는 RCC 세포 또는 폐암, 뇌암, 위암, 결장 또는 직장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 흑색종, 난소암, 및 식도암과 같은 기타 고형이나 혈액 종양의 세포이다.

[0408] 본 발명은 또한 RCC의 진단 및/또는 예후에 사용할 수 있는 여기서 "표적"으로 부르는, 본 발명에 따른 펩티드에 근거한 특정 마커 단백질 및 바이오마커에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 암 치료를 위해 이러한 신규 표적들의 사용에 관한 것이다.

[0409] 용어 "항체" 또는 "항체들"은 여기에서 광범위한 의미로 사용되며, 다클론 및 단클론 항체를 둘 다 포함한다. 무손상 또는 "온전한" 면역글로불린 분자 외에도, "항체"란 용어에는 그러한 면역글로불린 분자들의 단편(예: CDRs, Fv, Fab 및 Fc 단편) 또는 중합체 그리고 면역글로불린 분자의 인간화 버전이 포함되는데, 단 이들은 본 발명에 따른 바람직한 물성들(예: RCC 마커 (폴리) 펩티드의 특이적 결합, 암 마커 유전자를 발현하는 RCC 세포로 증가된 수준의 독소 인도 및/또는 RCC 마커 폴리펩티드의 활성도 억제)의 어느 것이라도 발현한다.

[0410] 가능한 한, 본 발명의 항체는 상용 소스에서 구입해야 한다. 본 발명의 항체는 잘 알려진 방법을 통해서 만들어질 수도 있다. 당업자는 RCC 마커 폴리펩티드 또는 이들의 단편이 본 발명의 항체 생성에 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 항체를 생성하는 데에 사용될 폴리펩티드는 자연적인 원천에서 부분적으로 또는 완전히 정화될 수 있거나, 재조합 DNA 기술을 이용하여 만들어질 수도 있다.

[0411] 예를 들어, 서열번호 1 내지 서열번호 114에 따른 본 발명에 따른 펩티드 또는 그 변이체나 단편을 인코딩하는 cDNA는 원핵 세포(예, 박테리아) 또는 진핵 세포(예, 효모, 곤충 또는 포유류 세포)에서 발현될 수 있으며, 재조합 단백질은 그 후 정화되고 본 발명에 따른 항체 생성에 사용되는 RCC 마커 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론 또는 다클론 항체 제조에 사용될 수 있다.

[0412] 당업자는 두 개 이상의 다른 단클론 또는 다클론 항체의 조합의 생성을 의도하는 사용(예: ELISA, 면역조직화학, *생체 내* 이미징, 면역 독소 요법)에 요구되는 특이성 및 친화성을 갖는 항체의 획득 가능성을 최대화함을 인식할 것이다. 이 항체들은 그 항체들이 사용되는 목적에 의거하여 알려진 방법에 의해 바라는 활성도에 대해 시험된다(예: ELISA, 면역조직화학, 면역요법 등; 항체의 생성과 시험에 관한 추가 지침은 다음을 참고한다(예: Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). 예를 들어, 항체는 ELISA 검정, 웨스턴 블롯, 포르말린 고정 암 면역조직화학 염색 또는 동결 조직 절개에서 시험할 수 있다. 치료 또는 *생체 내* 진단용을 위한 항체는 초기의 *시험관 내* 특성화 이후, 알려진 임상 시험 방법에 따라 시험한다.

[0413] "단클론 항체"라는 용어는 여기서 실질적으로 균등질 항체 개체군에서 획득이 된 것을 언급한다. 즉, 이 개체군이 포함하는 각각의 항체는 자연적으로 일어날 수 있는 소수의 변이체를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 여기서 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 특정한 종 또는 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체의 서열과 상응하거나 일치하고, 쇄의 나머지 부분은 다른 종 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체, 및 이러한 항체의 단편의 서열과 상응하거나 일치하고, 희망하는 상반되는 활동성을 보여주는 "키메릭(chimeric)" 항체를 포함한다(미국 특허 번호 4,816,567, 전문이 여기에 포함됨).

[0414] 본 발명의 단클론 항체는 하이브리도마 방법을 사용하여 준비될 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 생쥐 또는 다른 적당한 숙주 동물이 보통 면역성을 주는 작용제에 의해 면역되어, 면역성을 주는 작용제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 이를 생산할 수 있는 능력을 가지고 있는 림프구를 유도해 낸다. 다른 방법으로는, 림프구는 시험관 내에서 면역될 수도 있다.

[0415] 단클론 항체는 미국 특허번호 4,816,567에 설명된 것과 같은 재조합 DNA 방법들에 의해서도 만들어질 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 인코딩하는 DNA는 손쉽게 단리되고 전통적인 방법을 사용하여 염기 서열 분석이 가능하다(예, 마우스 유래 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써).

[0416] *시험관 내* 방법 또한 1가의(monovalent) 항체를 준비하는 데에 적당하다. 이 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 항체를 절편화시켜 항체의 단편을 특히 여기서는 Fab 단편을 생산할 수 있다. 예를 들면, 파파인을 사용하여 절편화가 이루어질 수 있다. 파파인 소화의 예는 WO 94/29348 및 미국 특허 번호 4,342,566에 설명되어 있다.

항체의 파파인 소화는 보통 각각 하나의 항원 결합 위치 및 남은 Fe 단편을 포함한 Fab 단편의 동일한 두 개의 항원 결합 단편을 생산한다. 펩신 처리는 F(ab')2 단편 및 pFc' 단편을 생산한다.

[0417] 항체 단편도, 이가 다른 서열과 붙어 있든 그렇지 않든 간에, 이 단편의 활동력이 변경되지 않은 항체 또는 항체 단편에 비교할 시, 현저하게 바뀌거나 손상이 되지 않는 한, 삽입, 삭제, 치환, 또는 특정한 위치의 또는 특정한 아미노산 잔기의 다른 선택된 변경을 포함할 수 있다. 이러한 변경은 이황화물 결합의 능력이 있는 아미노산의 제거/추가, 생물적 생명의 증가, 분비 특징의 변화 등의 추가적인 특성을 제공할 수 있다. 어떤 경우에도, 항체 단편은 결합성, 결합 도메인에서의 결합 조정 등의 생물작용 성질을 소유하고 있어야 한다. 항체의 기능적인 또는 활동적인 범위는 단백질의 특정한 지역의 돌연변이 생성, 발현 및 이 발현된 폴리펩티드의 실험에 의해 확인될 수 있다. 이러한 방법은 이 분야의 기술자가 손쉽게 알 수 있는 기술이며 이는 항체 단편을 인코딩하는 핵산의 위치-특정 돌연변이 생성을 포함할 수 있다.

[0418] 본 발명의 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체를 더욱 포함할 수 있다. 인간화된 형태의 비-인간(예, 쥐과 동물) 항체는 최소의 비-인간 면역글로불린 항체에서 유도된 서열을 포함하는 키메릭 면역글로불린 항체, 면역글로불린 쇄 또는 이들의 단편(Fv, Fab, Fab' 또는 다른 항체의 항원 결합의 결과)이다. 인간화된 항체는 상보성 결정 영역(complementary determining region(CDR))의 잔기가 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 비-인간 종(공여 항체)의 CDR의 잔기로 바뀐 요구되는 특이성, 친화력 및 수용력을 가진 인간 면역글로불린(수납 항체)이다. 몇몇의 예에서는, 인간 면역글로불린의 Fv 구조(FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 교체된다. 인간화된 항체는 수납 항체 또는 수입된 CDR 또는 구조 서열의 어디에서도 찾을 수 없는 서열을 포함하기도 한다. 보통, 인간 항체는 변이성 도메인을 적어도 하나 또는 거의 대부분 두 개를 포함하며, 모든 또는 실질상 모든 CDR 범위는 비-인간 면역글로불린에 상응하고 모든 또는 실질상 모든 구조 범위는 인간 면역글로불린 일치 서열이다. 인간화된 항체는 이상적으로 적어도 보통 인간 면역 글로불린의 면역글로불린 불변 범위(Fc)의 한 부분 또한 포함할 것이다.

[0419] 이 분야에서 비인간 항체를 인간화하는 방법은 잘 알려져 있다. 보통, 인간화된 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 비-인간 근원에서 이에 도입된다. 이 비-인간 아미노산 잔기들은 종종 "수입" 잔기라고 일컬어지며, 이는 대개 "수입" 변수 도메인에서 출처한다. 인간화는 본질적으로 설치류의 CDR 또는 상응하는 인간 항체 서열의 CDR 서열을 인간의 것으로 교체하는 것으로 실행될 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화된" 항체는 키메릭 항체이며(US 4,816,567), 온전한 인간 변수 도메인보다 훨씬 적게 비인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 대체된다. 실제적으로, 인간화된 항체는 보통 몇몇의 CDR 잔기 및 가능하게는 몇몇의 구조 잔기가 이 설치류의 유사한 영역의 잔기와 치환된 인간 항체이다.

[0420] 면역되었을 때, 내생의 면역글로불린 생성이 없는 중에 전체 인간 항체를 생산할 수 있는 유전자이식 동물(예, 생쥐)이 사용될 수 있다. 예를 들면, 키메릭 배선 돌연변이 생쥐의 항체의 중쇄 결합 영역 유전자 동형 삭제는 내생 항체 생산의 완전한 억제 결과를 가져온다. 이러한 배선 돌연변이 생쥐로의 인간 배선 면역글로불린 유전자 정렬 이입은 항원이 존재할 때 인간 항체 생산의 결과를 낳을 것이다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리에서도 생산될 수 있다.

[0421] 발명의 항체는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체에 의해서 피험자에게 투여된다. 보통, 적당한 약학적으로 허용가능한 염이 제형을 등장 상태로 만들기 위해 제형에 사용된다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는, 링거 용액(Ringer's solution) 및 포도당 용액이 있다. 이 용액의 pH 값은 바람직하게는 약 5 내지 약 8 사이이며, 더 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5 사이이다. 더 많은 담체는 항체를 포함하는 세포간질이 막, 리포좀 또는 미세입자와 같은 형태로 되어 있는 고체 소수성 중합체 반투성의 세포간질과 같은 지속적인 방출 준비를 포함한다. 예를 들어, 투여 방법 및 투여되는 항체의 농도에 따라 어떤 담체가 더 바람직한지는 이 분야의 당업자에게는 명백할 것이다.

[0422] 항체는 피험자, 환자 또는 세포에 주사(예, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내), 또는 주입과 같은 혈액으로서의 전달이 효율적으로 이루어질 수 있는 다른 방법으로 투여될 수 있다. 항체는 국소뿐만이 아니라 전신의 치료 효과를 얻기 위해 종양 내 또는 종괴 주위의 방법으로도 투여될 수도 있다. 국소 또는 정맥내 주사가 바람직하다.

[0423] 항체 투여의 효율적인 용량과 스케줄은 경험적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정을 내리는 것은 이 분야의 기술 중의 하나이다. 이 분야의 당업자는 투여되는 항체의 용량은 예를 들어 이 항체를 받는 대상, 투여 방법, 사용되는 특정한 항체의 종류 및 투여되는 다른 약들에 따라 달라진 다는 것을 이해할 것이다. 단독으로 사용될 시 전형적인 항체의 일일 용량은 1 μg/kg 내지 100 mg/kg로 다를 수 있으며, 위에 언급된 요인을 고려할 때 이보다 더 높을 수도 있다. 바람직하게는 RCC의 치료를 위한 항체의 투여 후, 이 분야의 당업자들에게 알려진 다

양한 방법으로 이 치료 항체의 효능을 평가할 수 있다. 예를 들면, 크기, 수, 및/또는 치료를 받고 있는 대상의 암의 분포 등이 표준 종양 영상 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 항체의 투여가 없을 경우 일어날 수 있는 종양의 성장을 정지시켜, 종양을 오그라들게 하거나, 새로운 종양의 성장을 예방하는 치료의 목적으로 투여된 항체는 효과있는 폐암의 치료라고 할 수 있다.

[0424] 본 발명의 다른 양태는 특이적 펩티드-MHC 복합체를 인식하는 가용성 T 세포 수용체(sTCR)의 생산 방법을 제공하는 것이다. 이러한 가용성 T 세포 수용체는 특이적 T 세포 클론으로부터 생성 가능하며, 그 친화력은 상보결정 부위를 표적으로 하는 돌연변이유발성에 의해 증가시킬 수 있다. T 세포 수용체 선택의 목적 상, 파지 디스플레이를 사용할 수 있다(US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). 파지 디스플레이 동안 T 세포 수용체의 안정화 목적 상 그리고 약물로서의 실용적인 용도의 경우, 알파 및 베타 쇄는, 예를 들어 비정상적 이황화 결합, 기타 공유 결합(단일-쇄 T 세포 수용체) 또는 이합체화 도메인에 의해 연결될 수 있다(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). T 세포 수용체는 표적 세포에 대한 특정 기능의 실행을 목적으로 독소, 약물, 시토카인(예를 들어, US 2013/0115191 참고), 그리고 항-CD3 도메인과 같은 효과기 세포를 모집하는 도메인 등과 연결될 수 있다. 더욱이 이것은 입양 전달에 사용되는 T 세포에서 발견될 수 있다. 추가 정보는 WO 2004/033685A1 및 WO 2004/074322A1에서 찾을 수 있다. sTCR의 조합은 WO 2012/056407A1에 설명되어 있다. 이 생산에 관한 추가 방법들은 WO 2013/057586A1에 공개되어 있다.

[0425] TCR, 예를 들어 여기에 공개된 특이적 펩티드-MHC 복합체를 인식하는 가용성 T-세포 수용체(sTCR)를 제공하는 것도 본 발명의 추가적 양상이다.

[0426] 그 밖에, 본 발명의 펩티드 및/또는 TCR 또는 항체 또는 다른 결합하는 분자는 병리학자에 의한 생검 샘플에 근거하는 암의 진단을 확인하는데 사용이 가능하다.

[0427] 항체 또는 TCR은 생체 내의 진단 분석에 사용될 수도 있다. 보통, 항체는 방사성핵종으로 라벨이 되고(예, 111 In, 99 Tc, 14 C, 131 I, 3 H, 32 P 또는 35 S) 면역 섬광 조형술을 사용하여 그 종양이 국소화될 수 있다. 하나의 구현에서는, 항체 또는 그 단편은 상기 언급된 단백질들로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질에 대한 두 개 또는 그 이상의 표적의 세포외 도메인에 결합을 하고 친화성 값(Kd)은 1x10㎛M 보다 낮다.

[0428] 진단의 용도로 사용되는 항체는 여러 가지의 영상 방법으로 검출될 수 있는 적당한 프로브로 라벨이 될 수 있다. 프로브의 검출 방법은 형광, 광학, 공초점 및 전자 현미경, 자기 공명 단층 촬영 영상 및 분광기 형광 투시법, 전산화 단층 촬영과 양전자 방사 단층 촬영기를 포함하지만 이에 국한되지 않는 방법을 들 수 있다. 적당한 프로브는 플루오레세인, 로다민, 에오신과 다른 형광체, 방사성 동위 원소, 금, 가돌리늄과 다른 란탄계열 원소, 상자성체의 이온, 플루오르-18 및 다른 양전자 방출 방사성 핵종 등을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 것을 들 수 있다. 또한, 프로브는 두 개의 또는 그 이상의 기능을 가지고 있을 수 있으며, 여기에 나열된 하나 이상의 방법으로 검출될 수 있다. 이러한 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 여기에 나열된 프로브로 라벨이 될 수 있다. 이렇게 항체와 프로브를 연결하는 것으로는 이 분야에서 잘 알려진 것들 중에 프로브의 공유원자 연결, 프로브의 항체로의 편입, 및 프로브의 결합을 위한 킬레이트 화합물의 공유원자 연결 등을 들 수 있다. 면역조직 화학을 위해서, 질병 조직 샘플은 신선하거나 냉동되었거나 파라핀에 포매되어 포르말린과 같은 방부제로 고정되어 있을 수 있다. 고정되었거나 포매되어 있는 샘플을 포함하고 있는 조직 절편은 라벨링된 1차 항체와 2차 항체와 접촉되며 여기서 그 항체는 원위치 단백질 발현의 검출을 위해 사용된다.

[0429] 본 발명의 다른 양태는 활성화된 T 세포와 항원 적재된 적당한 항원-제시 세포의 표면에서 T 세포를 항원이 본 발명의 펩티드라고 할 때 항원 특정 방식으로서 활성화시키는 데 충분한 시간 동안에 발현되는 인간 클래스 I 또는 II MHC 분자의 접촉을 포함하는 시험관 내의 방법으로 생성하는 방법을 포함한다. 바람직하게는, 충분한 양의 항원이 항원-제시 세포와 함께 사용된다.

[0430] 바람직하게는, 포유류 세포는 TAP 펩티드 트랜스포터가 결핍되어 있거나, 감소된 수준 또는 기능을 가지고 있다. TAP 펩티드 트랜스포터가 결핍되어 있는 적당한 세포로는 T2, RMA-S 및 초파리 세포를 들 수 있다. TAP란 항원 처리에 관련된 트랜스포터를 일컷는다.

[0431] 인간 펩티드 적재 결핍 세포주 T2는 Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA의 카탈로그 번호 CRL 1992에서 구입이 가능하고, 초파리 세포주 Schneider 2는 ATCC의 카탈로그 번호 CRL 19863에서 구입이 가능하며, 생쥐 RMA-S 세포주는 Ljunggren 등에서 묘사가 된 바 있다 (Ljunggren and Karre, 1985).

[0432] 바람직하게는, 숙주 세포는 감염전에 실질적으로 MHC 클래스 I 분자를 발현하지 않는다. 프로모터 세포는 B7.1,

B7.2, ICAM-1 및 LFA 3과 같은 T 세포를 위한 공동-자극 신호의 제공에 중요한 분자를 발현하는 것 또한 바람직하다. 다수의 MHC 클래스 II 분자의 핵산 서열 및 동시자극 분자의 서열은 GenBank와 EMBL 데이터베이스에서 공개적으로 제공된다.

[0433] MHC 클래스 I 에피토프가 항원으로 사용되는 경우, T 세포는 CD8-양성 T 세포이다.

[0434] 만약 항원 제시 세포가 이러한 에피토프를 발현하도록 감염되었다면, 바람직하게는 그 세포는 서열번호 1 내지 서열번호 114 및/또는 서열번호 115 내지 서열번호 151 또는 이의 변이체 아미노산 서열을 포함하는 상기 펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.

[0435] T 세포를 시험관 내에서 생성하는 몇몇의 다른 방법도 사용될 수 있다. 예를 들어, 자가 종양-침윤 림프구를 CTL 생성에 사용할 수 있다. Plebanski 등(Plebanski et al., 1995)은 T 세포의 준비에 자기 말초 혈액(PLB) 림프구를 사용했다. 수지상 세포를 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄스시키거나, 재조합 바이러스에 의한 감염에 의해 자가 조직 T 세포의 생산이 가능하다. 또한, B 세포는 자가 조직 T 세포의 생산에서 사용할 수 있다. 또한, 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄스된 또는 재조합된 바이러스에 의해 감염된 대식 세포가 자가 조직 T 세포의 준비시 사용될 수 있다. S. Walter 등(Walter et al., 2003)은 인공 항원 제시 세포(aAPC)를 사용하는 시험관 내 T 세포의 프라이밍을 묘사하며, 이는 역시 선택된 펩티드에 대해 T 세포를 생성하는 적절한 방법일 수 있다. 본 발명에서, aAPC는 미리 생성된 MHC:펩티드 복합체를 폴리스티렌 입자(마이크로 비드)의 표면과 커플링을 시키고 바이오틴-스트렙트아비딘 생화학을 이용함으로써 생성되었다. 이 체계는 aAPC의 정확한 MHC 밀도를 제어할 수 있도록 허용하며, 이는 항원-특정 T 세포 반응을 혈액 샘플에서 높은 효율성으로 고- 또는 저-결합력을 선택적으로 유도해낼 수 있게 한다. MHC:펩티드 합성체를 제외하고, aAPC는 그들의 표면에 커플된 항-CD28 항원과 같은 동시-자극 활동을 가지고 다른 단백질을 운반해야 한다. 더욱이 이러한 aAPC-기반 체계는 종종 예를 들면, 인터루킨-12와 같은 시토카인 등 적당한 용해 요소의 첨가를 요구한다.

[0436] 동종이계 세포는 T 세포의 준비에 역시 사용될 수 있으며 방법은 WO 97/26328에 더 자세하게 묘사되어 있으며, 여기에 참조 문헌으로 포함되어 있다. 예를 들어, 초파리 세포와 T2 세포에 추가적으로, CHO 세포, 배큘로바이러스-감염 곤충 세포, 박테리아, 효모, 백시니아-감염된 표적 세포 등과 같은 다른 세포들도 항원을 제시하는 데에 사용될 수 있다. 추가적으로 식물 바이러스가 사용될 수도 있으며(예를 들면, Porta 등 (Porta et al., 1994)), 이는 외부 펩티드의 제시를 위한 카우피 모자이크바이러스의 높은 수확 체계로서 개발에 대해 묘사한다.

[0437] 이 실험의 펩티드에 대해 활성화된 T 세포는 치료에서 유용하다. 따라서, 본 발명의 더 나아간 양태는 앞서 말한 발명의 방법으로 획득할 수 있는 활성화된 T 세포에 대한 내용을 제공한다.

[0438] 위에서 말한 방법으로 생성된 활성화된 T 세포는 서열번호 1 내지 서열번호 114의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.

[0439] 바람직하게는, T 세포는 그의 TCR을 HLA/펩티드-합성체(예, 결합)와 상호작용을 함으로써 이런 세포를 인식한다. 이 T 세포는 효율적인 활성화된 T 세포의 수가 투여되었을 시 발명의 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 이상 발현하는 환자의 표적 세포를 죽이는 데 유용하다. 환자에게 투여된 T 세포는 위에서 묘사된 바와 같이 환자에게 유도되고 활성화된다(즉, 이는 자가 조직 T 세포이다). 다른 방법으로는, T 세포는 환자에게 유도가 안 되고, 다른 개인에서 유도된다. 물론, 이 개인이 건강한 개인인 것이 바람직하다. 발명자들이 말하는 "건강한 개인"이라고 함은 개인이 전체적으로 좋은 건강을 가지고 있으며, 바람직하게는 충분한 면역 체계를 가지고 있으며, 더 바람직하게는, 손쉽게 실험되고 검출될 수 있는 어떤 질병도 겪고 있지 않다는 것이다.

[0440] *생체 내*에서, 본 발명에 따른 CD4-양성 T 세포는 종양 세포(이들은 가끔 MHC 클래스 II를 발현하기도 한다)이거나 종양을 감싸고 있는 간질성 세포(종양 세포)(이는 가끔 MHC 클래스 II를 또한 발현하기도 한다(Dengjel et al., 2006))일 수 있다.

[0441] 본 발명의 T 세포는 활성적인 치료 구성의 성분으로 사용될 수도 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 이상 발현하는 환자의 표적 세포를 죽이고 환자에게 위에 정의된 바처럼 효율적인 T 세포의 수를 투여하는 방법을 제공한다.

[0442] 본 발명자들은 "이상 발현되는"이라는 구절에 의해, 폴리펩티드가 정상 수준에 비교했을 때 과발현되거나 유전자가 종양이 유도된 조직에서는 침묵적이지만(silent) 종양에서는 발현되는 것도 의미한다. 본 발명자들은 "과발현"이라는 구절에 의해, 폴리펩티드가 정상 조직에서 존재하는 수준의 적어도 1.2배 이상으로 존재하는 것을

말하고, 바람직하게는 적어도 2배, 더 바람직하게는 적어도 5배 또는 10배로 존재하는 것을 의미한다.

[0443] T 세포는 예를 들면 위에서 묘사된 바와 같은 방법으로 얻어질 수 있다. 흔히 T 세포의 입양 전송이라고 불리는 것에 대한 프로토콜 역시 이 업계에서 잘 알려져 있다. 리뷰는 다음에서 찾을 수 있다: Gattioni 등 및 Morgan 등(Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

[0444] 본 발명의 다른 양태에는 그 핵산이 클로닝되어 숙주 세포 바람직하게는 T 세포로 도입되는 T 세포 수용체를 생성하기 위해 MHC와 복합체가 되는 펩티드의 사용이 포함된다. 이러한 조작된 T 세포는 그리하여 암 치료를 위해 환자로 이전할 수 있다.

[0445] 본 발명의 모든 분자 즉, 펩티드, 핵산, 항체, 발현 벡터, 세포, 활성화된 T 세포, T 세포 수용체 또는 이를 인코딩하는 핵산은 면역 반응을 피할 수 있는 성질을 가진 세포에 의해 특징지어지는 질병의 치료에 유용하다. 따라서 본 발명에 포함되어 있는 어떤 분자든지 약제로 사용되거나 약제를 만드는 데에 사용될 수 있다. 이 분자는 단독으로 사용될 수도 있고, 어떤 알려진 분자와 함께 결합하여 사용될 수도 있다.

[0446] 본 발명은 다음을 포함한 키트(kit)를 포함한다:

[0447] (a) 위에 묘사된 바와 같은 약학적 조성물을 용액 또는 동결건조된 형태로 포함하고 있는 용기;

[0448] (b) 임의적으로 희석제 또는 동결건조된 제형을 위한 재구성 용액을 포함하는 제2 용기; 및

[0449] (c) 임의적으로 (i) 용액의 사용, 또는 (ii) 동결건조된 제형의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서.

[0450] 이 키트는 (iii) 완충액, (iv) 희석제, (v) 필터, (vi) 주사바늘, 및 (vii) 주사기 중 1종 이상을 더욱 포함할 수 있다. 그 용기는 바람직하게 병, 바이알, 주사기 또는 시험관이며; 다용도 용기일 수 있다. 약학적 조성물은 바람직하게는 동결건조된다.

[0451] 본 발명에 사용되는 키트는 바람직하게는 동결건조되어 있는 약제를 적당한 용기와 이들의 재구성 및/또는 사용에 관한 설명서를 함께 포함한다. 적당한 용기는 예를 들면, 병, 바이알(예: 듀얼 챔버 바이알), 주사기(듀얼 챔버 주사기 등) 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리나 플라스틱과 같은 다양한 재질로서 형성할 수 있다. 바람직하게는 키트 및/또는 용기는 재구성 및/또는 사용에 대한 사용법을 표시하는 지시 내용을 그 용기 상에 또는 그와 연관하여 포함한다. 예를 들어, 라벨 상에서 동결건조된 제형을 상기 펩티드 농도로 재구성해야 한다고 지시할 수 있다. 라벨은 또한 약제가 피하투여가 가능한지 아니면 유용한지를 보여줄 수도 있다.

[0452] 제형을 포함한 용기는 재이루어진 약제의 반복된 투여를 가능하게 하는 다용도 바이알일 수 있다(예: 2 내지 6회의 투여). 키트는 또한 적당한 희석제(예: 중탄산 용액)를 포함하는 두 번째의 용기를 포함할 수도 있다.

[0453] 희석제와 동결건조된 약제를 섞었을 때, 재이루어진 제형의 최종 펩티드 농도가 바람직하게는 적어도 0.15 mg/mL/펩티드(=75㎍)이며 바람직하게는 3 mg/mL/펩티드(=1500㎍)를 넘지 않아야 한다. 키트는 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입 및 사용 설명서 등의 사용자의 입장에서 필요한 것을 더 추가로 포함할 수도 있다.

[0454] 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 약학적 조성물을 포함하는 하나의 용기를 다른 제품과 함께 또는 단독으로 포함하거나(예: 다른 화합물들 또는 이 다른 화합물들의 약학적 조성물) 각각의 조성물을 각자 다른 용기에 포함할 수 있다.

[0455] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 다음과 같은 두 번째의 화합물 또는 그들의 약학적 조성물과 함께 투여될 수 있는 약학적 조성물을 포함한다: 보조제(예: GM-CSF), 화학요법제, 자연 생성물, 호르몬 또는 길항제, 항혈관신생 제제 또는 억제제, 괴사유도제 또는 킬레이터. 키트의 조성물은 미리 혼합되어 있을 수도 있거나, 각각의 조성물이 각각 따로 용기에 담겨 있을 수도 있다. 키트의 조성물은 하나 이상의 액체 용액에 제공될 수도 있고, 바람직하게는 수용액, 더욱 바람직하게는 무균 수용액에 제공된다. 키트의 조성물은 적당한 용해제를 첨가함으로써 액체로 바뀔 수 있는 고체로 제공될 수도 있고, 바람직하게는 이는 다른 용기에 담겨 제공된다.

[0456] 치료 키트의 용기는 바이알, 실험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 고체나 액체를 담을 수 있는 다른 어떤 용기일 수 있다. 보통, 하나 이상의 구성물이 있을 경우, 키트는 두 번째의 물약병 또는 다른 용기를 포함하고, 이는 각각의 복용을 가능하게 한다. 키트는 약학적으로 허용가능한 액체를 포함하고 있는 용기를 포함할 수도 있다. 바람직하게는, 치료 키트는 현재 키트의 조성물인 발명의 제제를 투여할 수 있는 기구를 포함한다(예: 하나 이상의 바늘, 주사기, 안약 투입제, 피펫 등).

[0457] 본 제형은 구강(경구), 비강, 안약 형태의, 피하의, 피내, 근육내, 혈관내 또는 경피 등 어떠한 투여 형태로든 펩티드 투여에 적당한 약제이다. 바람직하게는, 그 투여는 s.c.이며, 가장 바람직하게 i.d. 투여는 주입 펌프에 의할 수 있다.

[0458] 본 발명의 펩티드는 RCC로부터 분리되었으므로, 본 발명의 약제는 바람직하게는 RCC의 치료에 사용된다.

[0459] 본 발명은 또한 사전선별된 TUMAP의 창고에서 선택된 적어도 하나의 펩티드로 이루어진 약학적 조성물의 제조를 포함하는 개별 환자를 위한 개인화 약학적 조성물의 생산 방법에 관한 것으로, 그 약학적 조성물에 사용되는 상기 적어도 하나의 펩티드는 개별 환자의 적합성을 위해 선택된다. 한 구현에서 이 약학적 조성물은 백신이다. 이 방법은 TCR 분리와 같은 하류 용도를 위한 T 세포 클론의 생산 또는 가용성 항체 및 다른 치료 옵션에도 적응할 수 있다.

[0460] "개인화 약학"이란, 활성적으로 개인화된 암 백신 및 자가 환자 조직을 사용하는 적응적 세포 요법을 포함하는 한 명의 개별 환자의 치료를 위해서만 사용되는 그러한 개별 환자를 위해 구체적으로 맞춤화된 요법을 의미해야 한다.

[0461] 여기에서 사용되는 용어 "창고"란 특정한 종양 유형에서 면역원성 및/또는 과다 제시에 대해 사전선별된 펩티드의 군 또는 조합을 지칭해야 한다. 용어 "창고"는 백신에 포함된 특정 펩티드가 사전 제조되어 물리적 시설에 보관되었음을 함축하는 의도가 아니다(하지만 그러한 가능성은 고려된다). 생산된 각 개인화된 백신을 위해 펩티드들이 새로 제조될 수 있거나 사전 제조되어 저장될 수 있음이 명백히 고려된다. 창고(예: 데이터베이스의 형태로서)는 다양한 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 대립형질을 갖는 RCC 환자들의 종양 조직에서 고도로 과발현된 종양 연관된 펩티드들로 이루어진다. 이는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 펩티드 또는 신장된 MHC 클래스 I 펩티드를 포함할 수 있다. 창고는 몇몇 RCC 조직들로부터 수집된 종양 연관 펩티드 외에도, HLA-A*02 및 HLA-A*24 마커 펩티드를 포함할 수 있다. 이 펩티드들은 TUMAP에 의해 유도된 T 세포 면역성의 크기에 대한 정량적인 비교를 허용하므로 백신의 항종양 반응을 이끌어내는 용량에 관한 중요한 결론을 도출할 수 있다. 두 번째, 어떤 환자에서 "자가" 항원으로 유래한 TUMAP에 대한 인체의 백신-유도 T 세포 반응이 관찰되지 않는 경우, 이것은 "비-자가" 항원으로부터 유래한 중요한 양성 대조군 펩티드로서 기능한다. 그리고 세 번째로, 이것은 환자의 면역 능력 상태에 대한 결론의 도출을 가능케 한다.

[0462] 창고의 TUMAP는 유전자 발현 분석, 질량 분석 및 T 세포 면역학(XPresident ®)이 조합된 통합 기능적 유전체 접근방식을 사용하여 동정된다. 이 접근 방식은 정상 조직에서 발현되지 않거나 최소한으로만 발현되는 것이 아닌 고비율의 종양에서 실제로 존재하는 TUMAP만을 추가 분석을 위해 선택한다는 것을 보증한다. 초기 펩티드 선택을 위해, 환자의 RCC 샘플 그리고 건강한 공여자의 샘플들을 단계적 접근 방식으로 분석했다:

[0463] 1. 악성 물질로부터의 HLA 리간드를 질량 분석법으로 동정했다.

[0464] 2. 전장 유전체 전령 리보핵산(mRNA)의 발현 분석을 사용하여 다양한 정상 기관 및 조직과 비교하여 악성 조직(RCC)에서 과발현되는지 평가했다.

[0465] 3. 동정된 HLA 리간드들을 유전자 발현 데이터와 비교했다. 2 단계에서 검출된 종양 조직 상에 과다 제시되거나 선택적으로 제시된 바람직하게는 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자들에 의해 인코딩된 펩티드들은 멀티-펩티드 백신의 적절한 TUMAP 후보로서 간주되었다.

[0466] 4. TUMAP로서 동정된 펩티드의 관련성을 지지하는 추가 증거를 파악하기 위해 문헌 연구를 수행했다.

[0467] 5. mRNA 수준에서의 과발현의 타당성은 3단계에서 종양 조직으로부터 선택된 TUMAP의 재검출 그리고 건강한 조직에 대한 검출의 결여(낮은 빈도)에 의해 확인되었다.

[0468] 6. 선택된 펩티드에 의한 생체 내 T 세포 반응의 유도가 가능한지 여부를 평가하기 위해, 건강한 공여자는 물론 RCC 환자의 인간 T 세포를 사용하여 시험관 내 면역원성 검사를 수행했다.

[0469] 한 측면에서는, 펩티드들이 창고에 포함되기 전에 면역원성에 대해 사전선별된다. 제한이 아니라 한 예로서, 펩티드/MHC 복합체 및 항-CD28 항체가 로딩된 인공 항원 제시 세포를 가진 건강한 공여자의 CD8+ T 세포를 반복적으로 자극하는 시험관 내 T 세포 초회감작을 포함하는 방법을 사용하여 창고에 포함된 펩티드의 면역원성을 결정한다.

[0470] 이 방법은 희귀한 암과 드문 발현 프로필을 갖는 환자에 대해 선호된다. 현재 개발되고 있는 고정된 성분을 갖는 멀티-펩티드 칵테일과 대비할 때, 창고는 종양에서 항원의 실제 발현과 백신과의 훨씬 더 높은 정합을 허용

한다. 선택된 하나의 또는 몇몇 "재고(off-the-shelf)" 펩티드들의 조합을 다중표적 접근 방식으로 각 환자에 대해 사용한다. 이론상으로, 예를 들어 50개 라이브러리로부터 선택된 5개의 다른 항원 펩티드 선택에 근거한 접근방법은 이미 약 1700만 가지의 가능한 약품(DP) 성분을 초래할 것이다.

[0471] 한 양태에서, 이 펩티드는 여기서 또는 다음에 설명된 본 발명에 따른 방법에 근거하여 백신의 포함 여부가 선택된다.

[0472] HLA 표현형, 전사체학 및 펩티도믹스 데이터는 환자의 종양 물질과 혈액 샘플로부터 수집하여 "창고"와 환자 고유의(즉 돌연변이된) TUMAP를 포함하는 각 환자에 대해 가장 적절한 펩티드를 동정한다. 환자 종양에서 선택적으로 발현되거나 과발현되는 펩티드를 선택하게 되며, 이는 가능한 경우 환자의 개별 PBMC로써 시험했을 때 강한 시험관 내 면역원성을 나타낸다.

[0473] 바람직하게는 백신에 포함된 펩티드는, (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드들(TUMAP)의 동정; (b) (a)에서 동정된 펩티드를 위에 설명된 펩티드들의 창고(데이터베이스)와 비교; 및 (c) 그 환자에서 동정된 종양 연관 펩티드와 상관관계가 있는 창고(데이터베이스)로부터 적어도 하나의 펩티드 선택을 포함하는 방법에 의해 동정된다. 예를 들어, 종양 샘플에 의해 제시된 TUMAP는 다음에 의해 동정된다: (a1) 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질의 파악을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 및 (a2) 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 파악하기 위해, 발현 데이터를 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계 결정. 바람직하게는 종양 샘플로부터 단리된 MHC 분자의 결합된 펩티드를 용출시키고 용출된 리간드의 서열결정에 의해 MHC 리간드의 서열을 파악한다. 바람직하게는 종양 샘플과 정상 조직은 같은 환자로부터 얻는다.

[0474] 창고(데이터베이스) 모델을 사용하는 펩티드의 선택 외에 또는 그 대안으로서, TUMAP를 새 환자에서 동정한 다음 백신에 포함시킬 수 있다. 한 예로서, 후보 TUMAP 환자에서, (a1) 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질의 파악을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 및 (a2) 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 파악하기 위해, 발현 데이터를 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계의 결정에 의해 동정할 수 있다. 다른 예로서, 개별 환자의 조직에 상응하는 정상 샘플에 대해 종양 샘플에서 고유한 돌연변이를 포함하는 단백질을 동정할 수 있으며, 돌연변이를 특이적으로 표적하는 TUMAP를 동정할 수 있다. 예를 들어, 종양 및 상응하는 정상 조직의 유전체에 대한 염기서열은 전체 유전체의 염기서열 결정에 의해 결정할 수 있다. 유전자의 단백질-코딩 영역에서 비동의 돌연변이의 발견을 위해, 유전체 DNA 및 RNA를 종양 조직으로부터 추출하고, 정상의 돌연변이되지 않은 유전체의 종자계 DNA는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 추출한다. 이러한 응용 NGS 접근방법은 단백질 인코딩 영역의 염기서열 재결정으로 제약된다(신유전체 염기서열 재결정). 이 목적을 위해, 업체가 공급하는 표적 강화 키트를 사용한 다음 예를 들어 HiSeq2000(Illumina)에 의해 염기서열 결정에 의해 인간 샘플의 엑손 DNA를 포착한다. 그 밖에, 유전자 발현의 직접 정량화 그리고 돌연변이된 유전자가 환자의 종양에서 발현된다는 검증을 위해 종양 mRNA에 대한 염기 서열을 결정한다. 그에 따른 수백만의 서열 판독값은 소프트웨어 알고리즘을 통해 처리된다. 그 출력 목록에는 돌연변이와 유전자 발현이 포함된다. 종양-특이적 체세포 돌연변이는 PBMC-유래 생식세포의 변종과 비교하여 결정한 다음 우선순위화된다. 다음에는 새로 동정된 펩티드를 위에 설명한 창고의 면역원성에 대해 시험할 수 있으며, 적절한 면역원성을 소유하는 후보 TUMAP를 선택하여 백신에 포함시킨다.

[0475] 하나의 예시적 구현에서, 백신에 포함되는 펩티드는 다음에 의해 동정된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양 연관 펩티드(TUMAP)를 위에 설명한 방법으로 동정하고; (b) 상응하는 정상 조직과 비교하여 종양에서 면역원성과 과다제시에 대해 사전선별된 펩티드들의 창고를 이용하여 (a)에서 동정된 펩티드와 비교하고; (c) 환자에서 동정된 종양 연관 펩티드와 상관관계가 있는 적어도 하나의 펩티드를 창고에서 선택하고; (d) 임의적으로 (a)에서 새로 동정된 적어도 하나의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인한다.

[0476] 하나의 예시적 구현에서, 백신에 포함되는 펩티드는 다음에 의해 동정된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양 연관 펩티드들(TUMAP)을 위에 설명하는 방법으로 동정하고; (b) (a)에서 새로 동정된 적어도 하나의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인한다.

[0477] 개인화된 펩티드 기반 백신을 위한 펩티드들이 선택되면, 백신이 생산된다. 백신은 20 내지 40% DMSO, 바람직하게는 약 33% DMSO와 같은 약 30 내지 35% DMSO에 용해된 개별 펩티드들로 이루어진 액체 제형이다.

[0478] 제품에 포함되는 펩티드는 각각 DMSO에 용해한다. 단일 펩티드 용액의 농도는 제품에 포함시킬 펩티드의 수에 따라 선택해야 한다. 단일 펩티드-DMSO 용액들을 동등한 비율로 혼합하여 제품에 포함시킬 모든 펩티드가 포함된 용액을 만드는데 그 농도는 펩티드 당 약 2.5mg/ml이다. 그런 다음, 주사제용으로 33% DMSO에서 펩티드 당 0.826mg/ml의 농도를 얻기 위해 혼합된 용액을 1:3의 비율로 물로 희석한다. 희석시킨 용액을 0.22㎛ 멸균 필터를 통해 여과시킨다. 최종 벌크 용액을 얻는다.

[0479] 최종 벌크 용액을 바이알에 채워 사용 시까지 -20℃에서 보관한다. 1개의 바이알에는 각 펩티드를 0.578mg씩 포함하는 700㎕의 용액이 들어 있다. 여기서 500㎕(펩티드 당 약 400 ㎍)를 피내 주사로 투여하게 된다.

[0480] 암 치료에 유용함에 덧붙여, 본 발명의 펩티드는 진단으로도 유용하다. 펩티드가 RCC 세포에서 생성되고 이런 펩티드가 정상 조직에서는 존재하지 않거나 더 낮은 수준으로 존재한다는 것이 결정되었기 때문에, 이런 펩티드는 암의 존재의 진단에 사용될 수 있다.

[0481] 주장되는 펩티드의 혈액 샘플 내 조직 생체 검사에서의 존재는 암의 진단 시 병리학자를 도울 수 있다. 항체, 질량 분석, 또는 이 분야에 다른 알려진 방법의 수단을 통한 특정 펩티드의 탐지는 조직 샘플이 악성 또는 염증이 있는지 또는 일반적으로 병들어 있는지 또는 RCC의 바이오마커로서 사용가능한지 병리학자에게 알려줄 수 있다. 펩티드의 기의 존재는 병변 조직의 분류 또는 하위 분류를 가능하게 한다.

[0482] 병변 조직 샘플의 펩티드의 탐지는 특히 만약 T 림프구가 작용 기전에 참여하는 것으로 알려져 있거나 기대할 때, 면역계를 포함한 치료의 이익에 대한 결정을 내릴 수 있게 한다. MHC 발현의 손실은 감염된 악성 세포가 면역 감시를 탈출하는 과정에서 잘 설명되는 기전이다. 펩티드의 존재는 이 기전이 분석된 세포에서 악용되지 않는 것을 보여준다.

[0483] 본 발명의 펩티드는 펩티드 또는 MHC 분자에 합성된 펩티드에 대한 T 세포 반응 또는 항체 반응 같은 펩티드에 대한 림프구 반응을 분석하는데 사용될 수 있다. 이런 림프구 반응은 추가 치료 단계에서 결정을 내릴 때 전조 마커로 사용될 수 있다. 이런 반응은 또한 림프구 반응을 여러 방법으로, 예를 들면, 단백질 백신, 핵산, 자가 조직 물질, 림프구의 양자 면역 전송을 유도하는 것을 목표로 하는 면역치료의 접근 방식에서 대리 마커로 사용될 수 있다. 유전자 치료 설정에서, 펩티드에 대한 림프구 반응은 부작용의 평가에서 고려할 수 있다. 림프구 반응의 모니터링은 이식 요법의 후속 시험을 위한 중요한 도구가 될 수도 있다(예를 들면, 이식편대숙주 및 숙주대이식편병의 검출).

발명의 효과

[0484] 본 발명은 면역요법, 특히 암의 면역요법에서의 사용을 위한 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 단독 또는 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 역할 가능한 기타 종양 연관 펩티드들과 병용하여 항종양 면역 반응을 촉진하거나 세포를 생체외 촉진하여 환자로 이전하기 위한 종양 연관 T 세포 에피토프를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0485] 도 1a 내지 도 1n은 정상 조직 및 RCC에서 다양한 펩티드의 과다 제시를 보여준다. 도 1a) 유전자: SLC17A3, 펩티드: ALIVSLPYL(서열번호 1) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 지방조직, 3개 부신, 2개 동맥, 3개 골수, 7개 뇌, 3개 유방, 13개 결장, 1개 난소, 1개 십이지장, 4개 식도, 2개 담낭, 3개 심장, 4개 백혈구 샘플, 19개 간, 43개 폐, 1개 림프절, 1개 난소, 6개 췌장, 2개 말초 신경, 1개 복막, 1개 뇌하수체, 3개 흉막, 1개 전립선, 6개 직장, 3개 골격근, 3개 피부, 2개 소장, 4개 비장, 5개 위, 1개 고환, 2개 흉선, 3개 갑상선, 2개 자궁, 2개 정맥, 12개 신장, 18개 RCC. 이 펩티드는 간암에서도 발견되었다(도면에는 나와 있지 않음). 도 1b) 유전자: SOGA2, 펩티드: YLEEDVYQL(서열번호 128) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 지방조직, 3개 부신, 2개 동맥, 3개 골수, 7개 뇌, 3개 유방, 13개 결장, 1개 난소, 1개 십이지장, 4개 식도, 2개 담낭, 3개 심장, 4개 백혈구 샘플, 19개 간, 43개 폐, 1개 림프절, 1개 난소, 6개 췌장, 2개 말초 신경, 1개 복막, 1개 뇌하수체, 3개 흉막, 1개 전립선, 6개 직장, 3개 골격근, 3개 피부, 2개 소장, 4개 비장, 5개 위, 1개 고환, 2개 흉선, 3개 갑상선, 2개 자궁, 2개 정맥, 12개 신장, 18개 RCC. 이 펩티드는 췌장암, 난소암, 위암 및 폐암에서도 발견되었다(도면에는 나와 있지 않음). 도 1c) 유전자: SEMA5B, 펩티드: ALDPSGNQLI(서열번호 12) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 지방조직, 3개 부신, 2개 동맥, 3개 골수, 7개 뇌, 3개 유방, 13개 결장, 1개 난소, 1개 십이지장, 4개 식도, 2개 담낭, 3개 심장, 4개 백혈구 샘플, 19개 간, 43개 폐, 1개 림프절, 1개 난소, 6개 췌장, 2개 말초 신경, 1개 복막, 1개 뇌하수체, 3개 흉막, 1개 전립선, 6개 직장, 3개 골격근, 3개 피부, 2개 소장, 4개

비장, 5개 위, 1개 고환, 2개 흉선, 3개 갑상선, 2개 자궁, 2개 정맥, 12개 신장, 18개 RCC. 이 펩티드는 난소암, 뇌암 및 폐암에서도 발견되었다(도면에는 나와 있지 않음). 도 1d) 유전자: RGS5, 펩티드: GLASFKSFL(서열번호 8) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 지방조직, 3개 부신, 2개 동맥, 3개 골수, 7개 뇌, 3개 유방, 13개 결장, 1개 난소, 1개 십이지장, 4개 식도, 2개 담낭, 3개 심장, 4개 백혈구 샘플, 19개 간, 43개 폐, 1개 림프절, 1개 난소, 6개 췌장, 2개 말초 신경, 1개 복막, 1개 뇌하수체, 3개 흉막, 1개 전립선, 6개 직장, 3개 골격근, 3개 피부, 2개 소장, 4개 비장, 5개 위, 1개 고환, 2개 흉선, 3개 갑상선, 2개 자궁, 2개 정맥, 12개 신장, 18개 RCC. 이 펩티드는 전립선암, 유방암, 결장암, 간암, 흑색종, 난소암, 식도암, 췌장암, 뇌암, 위암 및 폐암에서도 발견되었다(도면에는 나와 있지 않음). 도 1e) 유전자: SLC16A3, 펩티드: VVDEGPTGV(서열번호 135) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 백혈구 세포주, 5개 정상 조직(3개 폐, 1개 림프절, 1개 비장), 77개 암 조직(2개 뇌암, 1개 유방암, 1개 결장암, 1개 식도암, 10개 신장암, 1개 백혈병, 1개 간암, 35개 폐암, 12개 난소암, 8개 췌장암, 5개 위암). 펩티드 제시가 없는 샘플은 도면에 나와있지 않다. 검사한 정상(건강한) 조직 패널은 도 1a 내지 도 1d에서와 같았다. 도 1f) 유전자: ESM1, 펩티드: LLVPAHLVAA(서열번호 25) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 지방조직, 3개 부신, 2개 동맥, 3개 골수, 7개 뇌, 3개 유방, 13개 결장, 1개 십이지장, 4개 식도, 2개 담낭, 3개 심장, 4개 백혈구, 19개 간, 43개 폐, 1개 림프절, 6개 췌장, 2개 말초 신경, 1개 복막, 1개 뇌하수체, 3개 흉막, 1개 전립선, 6개 직장, 3개 골격근, 3개 피부, 2개 소장, 4개 비장, 5개 위, 1개 고환, 2개 흉선, 3개 갑상선, 2개 자궁, 2개 정맥, 12개 신장, 18개 RCC. 이 펩티드는 췌장암, 식도암, 뇌암, 폐암 및 자궁암에서도 발견되었다(도면에는 나와 있지 않음). 도 1g) 유전자: ARHGAP42, 펩티드: ILIKHLVKV(서열번호 15) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 세포주(1개 흑색종), 17개 암 조직(1개 결장암, 5개 신장암, 1개 간암, 3개 폐암, 4개 림프절암, 1개 고환암, 2개 자궁암). 도 1h) 유전자: HTR, 펩티드: FIADVVEKI(서열번호 33) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 16개 암 조직(1개 뇌암, 1개 유방암, 1개 식도암, 3개 신장암, 1개 백혈구성 백혈병 암, 5개 폐암, 1개 림프절암, 2개 난소암, 1개 췌장암). 도 1i) 유전자: HSF2B, 펩티드: VLLDTILQL(서열번호 38) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 양성(신장암), 3개 세포주(1개 췌장, 1개 흉막, 1개 전립선), 1개 기타 질병(1개 피부), 9개 정상 조직(1개 폐, 1개 림프절, 2개 태반, 1개 소장, 3개 비장, 1개 갑상선), 67개 암 조직(1개 담관암, 5개 뇌암, 2개 유방암, 2개 식도암, 2개 담낭암, 4개 신장암, 7개 백혈구성 백혈병 암, 3개 간암, 16개 폐암, 5개 림프절암, 1개 골수성 세포암, 9개 난소암, 1개 췌장암, 1개 직장암, 5개 피부암, 2개 방광암, 1개 자궁암). 도 1j) 유전자: TRAM1, 펩티드: YLLNLNHLGL(서열번호 39) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 2개 세포주(1개 신장, 1개 췌장), 1개 정상 조직(1개 폐), 19개 암 조직(1개 유방암, 2개 신장암, 3개 백혈구성 백혈병 암, 2개 간암, 7개 폐암, 1개 림프절암, 1개 난소암, 1개 직장암, 1개 방광암). 도 1k) 유전자: PXDNL, 펩티드: SILDAVQRV(서열번호 52) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 23개 암 조직(3개 뇌암, 4개 유방암, 3개 신장암, 8개 폐암, 2개 난소암, 1개 췌장암, 1개 피부암, 1개 자궁암). 도 1l) 유전자: THY1, 펩티드: SLLQATDFMSL(서열번호 82) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 11개 세포주(11개 췌장 세포주), 4개 정상 조직(1개 신장, 1개 림프절, 1개 태반, 1개 기관), 36개 암조직(1개 담관암, 5개 뇌암, 3개 유방암, 4개 결장암, 1개 식도암, 3개 신장암, 1개 간암, 9개 폐암, 1개 림프절암, 1개 난소암, 2개 췌장암, 1개 직장암, 2개 피부암, 1개 방광암, 1개 자궁암). 도 1m) 유전자: ARRDC3, 펩티드: KIPPVSPSI(서열번호 98) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 2개 세포주(2개 신장), 4개 정상 조직(1개 부신, 1개 폐, 1개 림프절, 1개 태반), 27개 암 조직(4개 뇌암, 1개 유방암, 1개 식도암, 1개 담낭암, 5개 신장암, 1개 백혈구성 백혈병 암, 5개 간암, 12개 폐암, 2개 림프절암, 4개 난소암, 3개 전립선암, 2개 피부암, 6개 자궁암). 도 1n) 유전자: TIMP1, 펩티드: KLQDGLLHI(서열번호 103) - 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 1개 세포주(1개 혈액 세포), 29개 암 조직(2개 뇌암, 5개 결장암, 3개 신장암, 1개 간암, 4개 폐암, 2개 림프절암, 3개 난소암, 1개 췌장암, 1개 직장암, 6개 피부암, 1개 고환암).

도 2a 내지 도 2d는 정상 조직 및 35개 RCC 샘플의 패널에서 췌장암에서 고도로 과발현되거나 배타적으로 발현된 본 발명의 근원 유전자들의 예시적 발현 프로파일(정상 신장에 비한 상대적 발현)을 보여준다. 왼쪽부터 오른쪽으로 조직들: 부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(3중), 백혈구, 간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 타액선, 골격근, 피부, 소장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁, 정맥, 23개 정상 신장 샘플, 35개 RCC 샘플, 도 2a GAL3ST1; 도 2b EGLN3; 도 2c APOL1; 및 도 2d MET.

도 3a 내지 도 3f는 예시적 면역원성 데이터(건강한 HLA-A*02+공여자의 *시험관내* 펩티드 특이적 CD8+ T 세포 반응의 결과로서 펩티드-특이적 다항체 염색 후 유세포 측정 결과)를 보여준다. 서열번호 20 펩티드(3c, 왼쪽 패널), 서열번호 34 펩티드(3d, 왼쪽 패널), 서열번호 1 펩티드(3e, 왼쪽 패널) 또는 서열번호 15 펩티드(3f, 왼쪽 패널)와의 각 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*24로써 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T세포를 초회감작시켰다. 세 주기의 자극 후, A*02/서열번호 20(3c), A*02/서열번호 34(3d), A*02/서열번호 1(3e) 또는 A*02/서열번호 15(3f)로써 염색되는 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 실행했다. 오른쪽 패널(3c,

3d, 3e 및 3f)은 관련이 없는 A*02/펩티드 복합체로써 자극한 세포의 대조군 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 부울(Boolean) 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로써 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 중 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0486] **실시예**

[0487] **실시예 1: 세포 표면에 제시한 종양 연관 펩티드의 동정 및 정량화**

[0488] 조직 샘플

[0489] 환자의 종양 조직은 다음을 통해 제공되었다: BioServe (Beltsville, MD, USA); University Hospital of Munich; University Hospital of Tubingen.

[0490] 정상(건강한) 조직은 다음을 통해 제공되었다: Bio-Options Inc., CA, USA; BioServe, Beltsville, MD, USA; Capital BioScience Inc., Rockville, MD, USA; Geneticist Inc., Glendale, CA, USA; University Hospital of Geneva; University Hospital of Heidelberg; Kyoto Prefectural University of Medicine (KPUM); University Hospital Munich; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, USA; University Hospital of Tubingen.

[0491] 모든 환자의 고지에 의한 동의서가 수술 전 또는 부검 전에 제출되었다. 조직은 절제 직후 충격 동결되었으며 TUMAP의 분리까지 -70℃ 이하에서 보관되었다.

[0492] 조직 샘플에서 HLA 펩티드의 단리

[0493] 약간 변형된 프로토콜에 따라, 충격 동결된 조직 샘플의 HLA 펩티드 풀은 고형 조직의 면역 침전에 의해 HLA-A*02-특이 항체 BB7.2 또는 HLA-A, -B, -C-특이적 항체 W6/32, CNBr-활성화 세파로오스, 산성 처리와 한외 여과를 이용해 획득되었다(Falk, et al 1991; Seeger, et al. T 1999).

[0494] 질량 분광분석법의 분석

[0495] 얻어진 HLA 펩티드 풀은 그들의 소수성에 의해 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리되었고(nanoAcquity UPLC system, Waters) 용출된 펩티드는 ESI 소스를 갖춘 LTQ- velos 및 융합 하이브리드 질량분광분석기(ThermoElectron)에 의해 분석되었다. 펩티드 풀은 분당 400nL의 유량을 적용하여 1.7 μm C18 역상 물질(Waters)로 충전된 용융-실리카 마이크로모세관 컬럼(75 μm i.d. x 250 mm)에 바로 로딩된다. 이어서, 펩티드는 두-단계 180분-10% 내지 33%의 2개 용매 구배를 이용하여 분리되고, 여기서 유량은 분당 300nL이다. 구배는 용매 A(물의 0.1% 포름산)와 용매 B(아세토니트릴의 0.1% 포름산)로 이루어져 있다. 구배는 용매 A(물의 0.1% 포름산)와 용매 B(아세토니트릴의 0.1% 포름산)로 이루어져 있다. 금이 입혀진 유리 모세관(PicoTip, New Objective)이 미세-ESI 소스로의 도입에 사용되었다. LTQ-Orbitrap 분광분석기가 TOP5 전략을 이용한 데이터-의존 모드에서 작동되었다. 간략하게, 스캔 사이클은 오비트랩(orbitrap)의 높은 질량 정확도(R = 30 00 0)의 전 스캔으로 시작되고, 이후 5개의 가장 많은 이전에 선택한 이온의 동적 배제에 의한 전조 이온에 대한 오비트랩(R = 7500)의 MS/MS 스캔이 이어졌다. 탠덤 질량 스펙트럼은 SEQUEST와 추가적인 수동 컨트롤에 의해 해석된다. 동정된 펩티드 서열은 생성된 자연 펩티드 분절 패턴과 합성을 서열-일치 참고 펩티드와의 비교를 통해 보증되었다.

[0496] 비표지 상대적 LC-MS 정량화는 이온 계측 즉, LC-MS 특징의 추출 및 분석에 의해 수행했다(Mueller et al., 2007). 이 방법은 펩티드의 LC-MS 신호 영역이 샘플 내의 풍부함과 상관관계가 있음을 가정한다. 추출된 특징은 전하 상태 디컨블루션 및 정체 시간 정렬에 의해 더욱 처리되었다(Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). 마지막으로 모든 LC-MS 특징은 서열 확인 결과와 상호 참조하여 다른 샘플과 조직의 정량 데이터를 펩티드 제시 프로필에 합쳤다. 이 정량 데이터를 중심 경향성에 따라 2단 형태로 정상화함으로써 기술적인 생물학적 복제 내에서의 변동을 고려했다. 그리하여 동정된 펩티드는 하나씩 정량 데이터와 연관시키며 샘플과 조직 사이의 상대적 정량화를 허용할 수 있다. 그 밖에 펩티드 후보로부터 얻어진 모든 정량 데이터를 수동으로 검사하여 데이터 일관성을 보증하고 자동화 분석의 정확성을 확인했다. 펩티드마다 평균 샘플 제시는 물론 복사 변이를 보여주는 제시 프로필을 계산했다. 이 프로필은 암 샘플을 정상 조직 샘플의 기준선에 병치한다. 예시적인 과다제시된 펩티드의 제시 프로필이 도 1에 나와 있다. 예시적 펩티드의 제시 점수는 표 8에 나와 있다.

[0497] 표 8은 제시 점수를 나타낸다. 이 표는 정상 조직의 패널과 비교하여 종양에서 매우 고도로 과다제시된(+++), 정상 조직의 패널과 비교하여 종양에서 고도로 과다제시된(++) 또는 정상 조직의 패널과 비교하여 종양에서 과

다제시된(+) 펩티드를 나열한다.

[0498] [표 8]

서열번호	서열	펩티드 제시
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	+++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	+++
6	VLFELSKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	+++
9	ILLQKPDSV	+++
10	KLLQNNYGL	+
11	FIQTEAPKEV	+++
12	ALDPSGNQLI	+++
13	KIMAQILTV	+
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	+++
16	FMPEELPQL	+++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	+
20	AVANTTFTV	+++
21	RLIQGDQILSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	++
26	SLMEILYTL	+++
27	SLSDLLVSL	++

[0499]

28	FIADLVVGL	++
29	ILLDLEQAL	+
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+
32	FLAGGIRGSGA	+++
33	FIADVVEKI	+++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	+++
36	SLFGKKYIL	+++
37	VLAPVILML	+++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLQI	++
41	GLLKTLQKL	+
42	VILDTGTIQL	+++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+
45	ALLGIPLTL	++
47	TLAEVRAVQEI	+
48	VVASNIMEV	+++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	+
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	+++
55	YLALILPVL	+++
56	ILMDFSNSM	+
57	SLQKEILYL	+++

[0500]

58	FLVDFEQSHL	+ +
60	ILWKDIEYV	+ + +
61	SLMGILLRI	+ + +
62	VLAGPAFLVQL	+ + +
66	TLLKTIIKV	+ +
67	LLDVLAPLV	+
68	YVLTQPPSV	+ + +
69	ILADLLPSL	+ +
70	SLTALRLLL	+
72	YSLEKVFGI	+
73	GLDGIPFTV	+ +
74	GLFHKQVTV	+
75	FLIKSINLV	+ +
77	SLIKHKIML	+ +
78	ALLDTVVQA	+
79	ALADIVWRA	+
80	KLASMLETL	+
83	IQWSIVPEV	+ +
86	GLLQGKLALL	+
88	TLAELHISL	+
89	SLLLAVTEV	+
90	FTLEKNFVI	+ +
91	MLLSSLVSL	+
92	FLFRDILEL	+ + +
93	GVMAGDIYSV	+ +
94	ILHHKVYDL	+
96	TLAETLVNL	+

[0501]

97	TLISELVQA	+
98	KIPPVSPSI	+ + +
99	GLAPHLEQI	+
100	KLNVAPLAV	+
101	HIYDKAFITV	+ +
102	LLFDVHTTL	+
103	KLQDGLLHI	+ + +
104	ALFEGVVRQI	+ + +
105	ALADLDELLIRA	+ +
106	VLMDLKALL	+
107	VLMDLKALLL	+ +
108	VLISVLQAI	+ +
109	YLWSRVEKL	+
110	LLDLHSYLL	+
111	TLLETEMLL	+ + +
112	LLFDHLEPIEL	+
113	SLFDWNVKL	+ +
114	ALAVNISAA	+ +
115	LLDPKTIFL	+ + +
116	GLVDIMVHL	+ + +
117	VLFGELPAL	+ + +
118	FLNAIETAL	+ + +
119	RLHDENILL	+ + +
120	GLAGDNIYL	+ + +
121	ALLRTVVSV	+ +
122	SLDPSSPQV	+ +
123	YVDPVITSI	+ +

[0502]

124	ILSPLSVAL	+
125	KLDPTKTTL	+++
126	KIQEILTQV	+++
127	VLAPLFVYL	++
128	YLEEDVYQL	+++
129	VLAPRVLRA	++
130	ALPTVLVGV	++
131	VMAGDIYSV	++
132	SVASTITGV	++
133	QLIDYERQL	++
134	VADKIHSV	+++
135	VVDEGPTGV	+++
136	YQDPHSTAV	++
137	TLVAIVVGV	++
138	SLDTLMTYV	++
139	ILNVDGLIGV	++
140	SLANNVTSV	++
141	LLVDDSFLHTV	+++
143	ALFVRLLALA	++
145	SLHFLILYV	+
150	TLMPNINKL	+++
151	YMYEGPAPRI	+++

[0503]

[0505] **실시예 2: 본 발명의 펩티드를 인코딩하는 유전자의 발현 프로필**

[0506] 정상 세포와 비교한 종양 세포 상의 펩티드의 과다 제시 또는 특이적 제시는 면역요법에서의 그 유용성에 충분하며 일부 펩티드는 정상 조직에서도 발생하는 그 소스 단백질에도 불구하고 종양-특이적이다. 여전히 mRNA 발현 프로필의 결정은 면역요법을 위한 펩티드 표적의 선택에서 추가적 안정성 수준을 추가한다. 특히 친화성-성숙된 TCR과 같은 안정성 위험이 높은 치료적 옵션의 경우에는, 이상적 표적 펩티드는 종양에 고유하며 정상 조직에서는 없는 단백질로부터 유래될 것이다.

[0507] RNA 소스 및 준비

[0508] 외과적으로 제거된 조직 샘플은 위에서 지적한 바와 같이 각 환자로부터 서면 동의서를 받은 후 제공되었다(실시예 1 참조). 종양 조직 샘플은 수술 직후 스냅-냉동되었고 절구와 유봉을 이용하여 액체 질소 환경 아래에서 균질화되었다. 총 RNA는 TRIzol(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)을 이용하여 샘플로부터 준비되었고 이는 RNeasy(QIAGEN, Hilden, Germany)에 의해 청소되었다; 이 두 개의 모든 방법은 제조업체의 설명서에 따라 실행되었다.

[0509] 건강한 인간 조직의 총 RNA는 상업적으로 얻어졌다(Ambion, Huntingdon, UK; Clontech, Heidelberg, Germany; Stratagene, Amsterdam, Netherlands; BioChain, Hayward, CA, USA). 여러 개인에서 얻어진 RNA(2 내지 123명의 개인)는 각각의 개인에게 균등 가중치를 두어 섞어졌다.

[0510] RNA 샘플의 양과 질은 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent, Waldbronn, Germany)에 의해 RNA 6000 Pico

LabChip Kit(Agilent)를 사용하여 분석되었다.

[0511] 마이크로어레이 실험

[0512] 모든 암과 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 Affymetrix Human Genome(HG) U133A 또는 HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide microarrays(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)에 의해 실행되었다. 모든 단계는 Affymetrix의 사용설명서에 따라 실행되었다. 간단히, 이중가닥 cDNA는 SuperScript RTII(Invitrogen)와 올리고-dT-T7 프라이머(MWG Biotech, Ebersberg, Germany)를 사용하여 사용설명서에 따라 총 RNA 5 내지 8 μg으로부터 합성되었다. *시험관 내* 전사는 U133A arrays를 위한 BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit(ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, USA) 또는 U133 Plus 2.0 arrays를 위한 GeneChip IVT Labelling Kit(Affymetrix)를 사용하여 실행되었다. 이는 cRNA 단편화, 교배 및 스트렙트아비딘-피코에리트리틴 및 비오티닐화된 항-스트렙트아비딘 항체로의 염색으로 이어졌다(Molecular Probes, Leiden, Netherlands). 이미지는 Agilent 2500A GeneArray Scanner(U133A) 또는 Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000(U133 Plus 2.0)을 이용하여 스캔되었고, 데이터는 기본 세팅을 이용하여 GCOS software(Affymetrix)를 통해 분석되었다. 정상화를 위해, Affymetrix에 의해 제공된 100개의 하우스키핑 유전자(housekeeping)가 사용되었다. 상대적인 발현 값은 시그널 로그 비율을 통해 계산되었고 정상 샘플의 값은 임의로 1.0으로 정해졌다. 본 발명의 RCC에서 고도로 과발현되는 또는 배타적으로 발현되는 근원 유전자의 예시적 발현 프로필이 도 2에 나와 있다. 추가의 예시적 유전자의 발현 점수는 표 9에 제시된다.

[0513] 표 9는 발현 점수를 나타낸다. 이 표는 정상 조직의 패널과 비교하여 종양에서 매우 고도로 과다제시된(+++), 정상 조직의 패널과 비교하여 종양에서 고도로 과다제시된(++) 또는 정상 조직의 패널과 비교하여 종양에서 과다제시된(+) 펩티드를 나열한다.

[0514] [표 9]

서열번호	유전자 명칭	서열	유전자 발현
1	SLC17A3	ALIVSLPYL	++
2	HSF4	ILWREVVTL	++
3	HSF4	RLLGEVQAL	++
6	ATP11A	VLFELSKTV	+
7	EGLN3	FLLSLIDRL	++
18	ACLY	YVLDLAAKV	+
28	ENO1,ENO2,ENO3	FIADLVVGL	+
35	ANGPTL4	VLHSLQTQL	++
37	ABCC3	VLAPVILML	+
40	IVNS1ABP	YIQEHLLQI	+
50	ITGA3	SLSDHIVLL	+
51	ITGA3	NLWPMILTL	+
55	SLC16A4	YLALILPVL	+
59	TGFBI	SLKNNVVSV	+
62	SLC47A1	VLAGPAFLVQL	+
63	ERAP1	GLIEDHFDVTV	+
65	TPI1,TPI1P1	IIYGGSVTGA	+
76	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1	VLADDHLIEV	++
81	LRP2	SLLPALPKL	+
87	APOL1	LADGVQKV	++
93	PLIN2	GVMAGDIYSV	+
94	CYB5A	ILHHKVYDL	+
101	FLT1	HIYDKAFITV	++
105	HSPG2	ALADLDELLIRA	+
115	HAVCR1	LLDPKTIFL	+
120	SLC22A2	GLAGDNIYL	+
122	GAL3ST1	SLDPSSPQV	+++
123	MET	YVDPVITSI	++

[0515]

서열번호	유전자 명칭	서열	유전자 발현
125	NDRG1	KLDPTKTTL	+
127	FZD2,FZD1,FZD7	VLAPLFVYL	+
131	PLIN2	VMAGDIYSV	+
132	PLIN2	SVASTITGV	+
137	FKBP10	TLVAIVVGV	+
139	ACLY	ILNVDGLIGV	+
143	TGFBI	ALFVRLLALA	+

[0516]

[0518] **실시예 3: 클래스 I 제시 펩티드의 *시험관 내* 면역원성**

[0519] 본 발명의 TUMAP의 면역원성에 대한 정보를 얻기 위해, 펩티드/MHC 복합체 및 항-CD28 항체가 로딩된 인공 항원 제시 세포(aAPC)를 갖는 CD8+ T 세포의 반복된 자극을 근거로 *시험관 내* 초회감작 검사를 사용하여 조사를 수행했다. 이 방법으로 본 발명자들은 지금까지 22개의 HLA-A*0201 제한된 본 발명의 TUMAP의 면역원성을 보여줄 수 있었으며, 이것은 이 펩티드들이 인간에 존재하는 CD8+ 전구 T 세포에 대한 T 세포 에피토프가라는 것을 보여주었다(표 10).

[0520] *CD8+ T 세포의 시험관 내 초회감작*

[0521] 펩티드-MHC 복합체(pMHC) 및 항-CD28 항체가 로딩된 인공 항원 제시 세포에 의한 *시험관 내* 자극을 수행하기 위해, 독일 소재 University clinics Mannheim에서 동의서를 받은 건강한 공여자로부터의 CD8 마이크로비드(Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)를 사용한 양성 선택을 통해 신선한 HLA-A*02 백혈구 성분 채집 산물로부터 CD8+ T 세포를 먼저 단리했다.

[0522] PBMC 및 단리된 CD8+ 림프구는 10% 열 비활성화된 인간 AB 혈청(PAN-Biotech, Aidenbach, Germany), 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신(Cambrex, Cologne, Germany), 1 mM 피루브산 나트륨(CC Pro, Oberdorla, Germany), 20 μg/ml 젠타마이신(Cambrex)으로 보충된 RPMI-Glutamax(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)로 이루어진 T 세포 배지(TCM)에서 사용할 때까지 배양했다. 이 단계에서 2.5 ng/ml IL-7(PromoCell, Heidelberg, Germany) 및 10 U/ml IL-2(Novartis Pharma, Nurnberg, Germany) 또한 TCM에 추가했다.

[0523] pMHC/항-CD28 코팅된 비드의 생성, T 세포 자극 및 판독은 고도로 정의된 *시험관 내* 체계에서 수행했으며, 자극 조건 당 4가지 다른 pMHC 분자 그리고 판독 조건 당 8가지 다른 pMHC 분자를 각각 사용했다.

[0524] 정제된 공동-자극 쥐 IgG2a 항인체 CD28 Ab 9.3(Jung et al., 1987)은 제조사가 권장하는 술폰-N-히드록시숙신이미도비오틴을 사용하여 화학적으로 비오틴닐화했다(Perbio, Bonn, Germany). 사용된 비드는 스트렙티비딘으로 코팅된 직경 5.6 μm의 폴리스티렌 입자였다(Bangs Laboratories, Illinois, USA).

[0525] 양성 및 음성 대조군 자극에 사용된 pMHC는 각각 A*0201/MLA-001(변형된 Melan-A/MART-1에서 얻은 펩티드 ELAGIGILTV(서열번호 152)) 그리고 A*0201/DDX5-001(DDX5에서 얻은 YLLPAIVHI, 서열번호 153)였다.

[0526] 800.000 비드/200 μl는 4 x 12.5 ng 비오틴-pMHC 존재 하에 96-웰 플레이트에서 코팅하고 세척한 다음 600 ng 비오틴 항CD28을 첨가하여 200 μl의 부피로 만들었다. $1x10^6$ CD8+ T 세포와 $2x10^5$의 세척하고 코팅한 비드를 5 ng/ml IL-12 (PromoCell)로 보충한 200 μl TCM에서 그리고 37℃에서 3일 동안 배양함으로써 96-웰 플레이트에서의 자극을 개시했다. 배지의 반은 80 U/ml IL-2로 추가된 새로운 TCM에 의해 교환되고 배양은 37℃에서 4 일간 계속되었다. 이 자극 주기는 총 세 번 수행되었다. 조건 당 8가지 다른 pMHC 분자를 사용하는 pMHC 멀티머의 판독을 위해, 이미 설명된 바와 같이(Andersen et al., 2012) 2차원 조합대수적 코팅 접근 방식을 사용했으며, 5가지 다른 형광색소와의 결합을 허용하는 약간의 변형이 있었다. 마지막으로 멀티머 분석은 살아있는/죽은 세포를 근적외선(near IR) 염료(Invitrogen, Karlsruhe, Germany), CD8-FITC 항체 클론 SK1(BD, Heidelberg, Germany) 및 형광 pMHC 멀티머로써 세포를 염색하여 수행했다. 분석에는 적절한 레이저 및 필터가 장착된 BD LSRII SORP 세포측정기를 사용했다. 펩티드 특이 세포는 총 CD8+ T 세포의 백분율로 계산되었다. 멀티머 분석의 평가는 FCS Express 소프트웨어(De Novo Software)를 사용하여 수행되었다. 특정 멀티머+ CD8+ 림프구의 *시험관 내* 프라이밍은 음성 대조군 자극과 비교함으로써 검출했다. 주어진 항원의 면역성은 건강한 기증자의 최소한 하나의 시험관 내 자극된 평가 가능한 웰에 시험관 내 자극 후 CD8+ T 세포주가 포함되는 것으로 확인될 때 나타났다(예를 들면, 이 웰은 CD8+ T 세포 중 최소한 1%의 특정 테트라머+를 가졌으며 특정 테트라머+ 세포의 백분율은 최소한 음성 대조군 자극의 매체보다 10배여야 한다).

[0527] RCC 펩티드의 *시험관 내* 면역원성

[0528] 실험된 HLA 클래스 I 펩티드에서, 시험관 내 면역원성은 펩티드 특정 T 세포주의 형성에 의해 입증될 수 있었다. 본 발명의 2개의 펩티드에 대한 TUMAP-특이적 다합체 염색 이후 예시적 유세포 측정 결과 및 상응하는 음성 대조군이 도 3에 나와 있다. 본 발명의 3개의 펩티드에 대한 결과는 표 10A 및 10B에 요약되어 있다.

[0529] 표 10A는 본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 시험관 내 면역원성을 나타낸다. 본 발명의 출원자가 실행한 펩티드에 대한 *시험관 내* 면역원성 실험의 예시적 결과이다. <20 % = +; 21 % - 49 % = ++; 50 % - 69 %= +++; >= 70 % = ++++.

[0530] [표 10A]

서열 식별	펩티드식별	웰	공여자
123	YVDPVITSI	+	++++
127	VLAPLFVYL	++	++++
143	ALFVRLLALA	+	+++

[0531]

[0532] 표 10B는 본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 시험관 내 면역원성을 나타낸다. 본 발명자들이 본 발명의 펩티드에 대해 실행한 *시험관 내* 면역원성 실험의 예시적 결과를 나타낸다. *시험관 내* 면역원성 실험의 결과가 표시된다. 양성 웰 및 공여자(평가 가능한 합계)에 대한 백분율이 다음과 같이 요약된다: <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 %= +++; >= 70 %= +++.

[0533] [표 10B]

서열번호	서열	웹 양성 [%]
1	ALIVSLPYL	+
2	ILWREVVTL	+
3	RLLGEVQAL	+
6	VLFELSKTV	+
7	FLLSLIDRL	+
9	ILLQKPDSV	+
15	ILIKHLVKV	+
16	FMPEELPQL	+
18	YVLDLAAKV	++
20	AVANTTFTV	+
22	FLSPPLPSV	++
29	ILLDLEQAL	+
34	ELNNQNFYL	++
36	SLFGKKYIL	++
94	ILHHKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++++
98	KIPPVSPSI	++++

[0534]

[0536] **실시예 4: 펩티드의 합성**

[0537] 모든 펩티드는 Fmoc-전략을 사용하여 표준 및 잘 확립된 고체상 펩티드 합성으로써 합성되었다. 각 개별 펩티드의 정체와 순도로 질량 분석법과 분석 RP-HPLC에 의해 결정했다. 펩티드는 백색 내지 황백색 동결건조 배양물(삼불화아세트산 염) 그리고 >50%의 순도로서 얻어졌다. 모든 TUMAP는 바람직하게는 삼불화아세트산 염 또는 아세트산 염으로 투여되지만, 다른 염의 형태 또한 가능하다.

[0539] **실시예 5: MHC 결합 검정**

[0540] 본 발명에 따른 T 세포 기반 요법의 후보 펩티드를 그 MHC 결합 능력(친화성)에 대해 추가로 시험했다. 개별 펩티드-MHC 복합체는 UV-리간드 교환에 의해 만들었으며, UV에 민감한 펩티드가 UV 조사 후 분할된 다음 분석된 관심 대상의 펩티드로 교환되었다. 펩티드 수용성 MHC 분자를 효과적으로 결합하고 안정화시킬 수 있는 펩티드 후보만이 MHC 복합체의 해리를 막는다. 이 교환작용의 수율을 결정하기 위해, 안정화된 MHC 복합체의 경쇄(β2m) 검출에 근거하여 ELISA를 수행했다. 이 검정은 Rodenko 등에서 일반적으로 설명된 대로 수행했다(Rodenko et al., 2006).

[0541] 96 웰 MAXISorp 플레이트(NUNC)를 PBS에서 2ug/ml 스트렙타비딘으로 밤새 코팅하고 4회 세척한 다음 블로킹 완충액을 함유하는 2% BSA에서 37℃ 및 30분 동안 블로킹을 진행했다. 되접기된 HLA-A*02:01/MLA-001 단량체가 표준의 역할을 했으며, 그 범위는 15 내지 500ng/ml였다. UV-교환 반응을 위한 펩티드-MHC 단량체는 블로킹 완충액으로 100배 희석되었다. 샘플은 37℃에서 1시간 배양 후 4회 세척하고 2㎍/ml HRP 접합된 항-β2m으로 37℃에서 1시간 배양한 다음 NH_2SO_4로 정지시킨 TMB 용액으로 검출했다. 흡광은 450nm에서 측정했다. 높은 교환 수율(바람직하게는 50% 초과, 가장 바람직하게는 75% 초과)을 보이는 후보 펩티드가 일반적으로 항체나 그 단편 및/또는 T 세포 수용체나 그 단편의 생성 및 생산을 위해 선호되는데, 이는 MHC 분자에 대한 충분한 결합성을 보이며 MHC 복합체의 해리를 막기 때문이다.

[0542] 표 11은 MHC 클래스 I 결합 점수를 나타낸다. HLA-A*02:01에 대한 HLA-클래스 I 제한된 펩티드의 결합을 펩티드 교환 수율에 의해 범위를 정했다: ≥10% = +; ≥20% = ++; ≥50 = +++; ≥ 75% = ++++.

[0543] [표 11]

서열번호	서열	펩티드 교환
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	++
6	VLFELSKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	++
9	ILLQKPDSV	++
10	KLLQNNYGL	++
11	FIQTEAPKEV	++
12	ALDPSGNQLI	++
13	KIMAQILTV	+++
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	++
16	FMPEELPQL	++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	++
20	AVANTTFTV	++
21	RLIQGDQILSV	++
22	FLSPPLPSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	+++
25	LLVPAHLVAA	++

[0544]

서열번호	서열	펩티드 교환
27	SLSDLLVSL	+++
28	FIADLVVGL	++
29	ILLDLEQAL	+++
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+++
33	FIADVVEKI	++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	++
36	SLFGKKYIL	++
37	VLAPVILML	++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLQI	+++
41	GLLKTLQKL	++
42	VILDTGTIQL	++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+++
45	ALLGIPLTL	+++
46	GLSEVLVQI	+++
47	TLAEVRAVQEI	+++
48	VVASNIMEV	++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	++
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	++
53	FLLEIRQTL	++

[0545]

서열번호	서열	펩티드 교환
54	ALVAKGLVQA	++
55	YLALILPVL	++
56	ILMDFSNSM	+++
57	SLQKEILYL	++
58	FLVDFEQSHL	++++
59	SLKNNVVSV	+++
60	ILWKDIEYV	+++
61	SLMGILLRI	++
62	VLAGPAFLVQL	+++
63	GLIEDHFDVTV	++
64	LLAASVALA	++
65	IIYGGSVTGA	++
66	TLLKTIIKV	++
67	LLDVLAPLV	++
68	YVLTQPPSV	++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	++
71	ALDGHLYAV	+++
72	YSLEKVFGI	++
73	GLDGIPFTV	+++
74	GLFHKQVTV	+++
75	FLIKSINLV	+++
76	VLADDHLIEV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	++
79	ALADIVWRA	+++

[0546]

서열번호	서열	펩티드 교환
80	KLASMLETL	+++
81	SLLPALPKL	++
82	SLLQATDFMSL	+++
83	IQWSIVPEV	+++
84	YLMDEGAHL	++
85	FVMSEIRTV	+++
86	GLLQGKLALL	++
88	TLAELHISL	++
89	SLLLAVTEV	++
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	++
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++++
94	ILHHKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++
96	TLAETLVNL	+++
97	TLISELVQA	++
98	KIPPVSPSI	++
99	GLAPHLEQI	++
100	KLNVAPLAV	++
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+++
103	KLQDGLLHI	++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	+++
106	VLMDLKALL	+++

[0547]

서열번호	서열	펩티드 교환
107	VLMDLKALLL	+++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	++++
110	LLDLHSYLL	++
111	TLLETEMLL	++
112	LLFDHLEPIEL	+++
113	SLFDWNVKL	+++
114	ALAVNISAA	+++

[0548]

[0550] **실시예 6: 세포 표면에 제시된 종양 연관 펩티드의 절대 정량화**

[0551] 항체 및/또는 TCR과 같은 결합제의 생성은 시간이 많이 걸리는 과정이며, 일부의 선택된 표적에 대해서만 수행할 수 있다. 종양-연관 및 종양-특이적 펩티드의 경우, 선택 기준은 제시의 배타성 그리고 세포 표면 상에 제시된 펩티드의 밀도를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 고형 종양 샘플에서 세포당 TUMAP 복제수의 정량화는 분리된 TUMAP의 절대 정량화, TUMAP 분리의 효율 그리고 분석된 조직 샘플의 세포 수를 요구한다.

[0552] nanoLC-MS/MS에 의한 펩티드 정량

[0553] 질량 분석법에 의한 펩티드의 정확한 정량화를 위해, 내부 표준법을 사용하여 각 펩티드의 검정 곡선을 생성했다. 내부 표준이란 각 펩티드의 2중-동위원소-표지 변이체이며, 즉 동위원소-표지 아미노산 2개를 TUMAP 합성에 포함시켰다. 이는 질량에서만 종양-연관 펩티드와 다를 뿐 다른 물리화학적 성질은 차이를 보이지 않는다(Anderson et al., 2012). 각 MS 샘플에 대해 내부 표준을 스파이킹하며, 모든 MS 신호는 내부 표준의 MS 신호에 대해 정규화하여 MS 실험 간 가능한 기술적 편차를 없앴다.

[0554] 검정 곡선은 적어도 3가지 다른 매트릭스에서 작성했다. 즉, HLA 펩티드는 일상적 MS 샘플과 유사한 자연 샘플로부터 용출되며 각 제제는 이중 MS 실행을 통해 측정했다. 평가에서는, MS 신호를 내부 표준의 신호에 대해 정규화하고 검정 곡선은 로지스틱 회귀에 의해 계산했다.

[0555] 조직 샘플에서 얻는 종양 연관 펩티드의 정량화에서는, 각 샘플을 내부 표준으로 스파이킹했다; MS 신호는 내부 표준에 대해 정규화한 다음 펩티드 검정 곡선을 사용하여 정량화했다.

[0556] 펩티드/MHC 단리의 효율

[0557] 모든 단백질 정제 공정과 마찬가지로, 조직 샘플로부터의 단백질 단리는 관심 대상의 단백질에 대한 일정 손실과 연관된다. TUMAP 단리의 효율 결정을 위해, 절대 정량을 위해 선택된 모든 TUMAP에 대한 펩티드/MHC 복합체를 생성했다. 자연 펩티드/MHC 복합체로부터 스파이킹된 것을 구별할 수 있기 위해, TUMAP의 단일-동위원소-표지 버전을 사용했다. 즉, 하나의 동위원소-표지 아미노산을 TUMAP 합성에 포함시켰다. 이 복합체들을 신선하게 준비된 조직 용해물에 즉, TUMAP 단리 절차에서 가능한 가장 이른 시점에 스파이킹한 다음 추후 친화성 정제에서 자연 펩티드/MHC 복합체와 같이 포획했다. 그러므로 단일-표지 TUMAP의 회수 측정은 개별 자연 TUMAP의 단리 효율에 대한 결론을 허용한다.

[0558] 단리의 효율은 적은 수의 샘플에서 분석했으며 이러한 조직 샘플들 사이에 유사했다. 이와 반대로 개별 펩티드 간의 단리 효율은 차이가 있다. 이것은 단리 효율은 그것이 제한된 수의 조직 샘플만을 통해 결정되는 것이라도 다른 조직의 제제로 외삽할 수 있음을 시사한다. 하지만 각 TUMAP는 개별적으로 분석하는 것이 필요한데 이는 단리 효율을 한 펩티드에서 다른 것으로 외삽할 수 없기 때문이다.

[0559] 고체 동결 조직에서의 세포 수 결정

[0560] 본 발명자는 절대 펩티드 정량화를 거친 조직 샘플의 세포 수 결정을 위해, DNA 함량 분석을 적용했다. 이 방법은 광범위한 다른 출처의 샘플들 그리고 가장 중요하게는 동결 샘플에 적용된다(Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). 펩티드 단리 프로토콜 동안, 조직 샘플을 동질의 용해물로 처리하며 이로부터 소량의 용해물 일정 부분을 취한다. 이 일정 부분을 세 부분으로 나누며, 이로부터 DNA가 단리된다(QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). 각 DNA 단리물로부터 총 DNA 함량을 형광-기반 DNA 정량화 검정(Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germany)을 사용하여 정량화하는데 이때 최소 2회 반복 측정한다.

[0561] 세포수의 계산을 위해, 1개의 건강한 혈액 샘플의 일정 부분들로부터 얻어진 DNA 표준 곡선(정의된 세포 수 범위 포함)을 생성한다. 이 표준 곡선을 사용하여, 각 DNA 단리물로부터 얻은 총 DNA 함량에서 총 세포 수를 계산한다. 펩티드 분리에 사용된 조직 샘플의 평균 총 세포수를 외삽하며, 이때 용해 분별액의 알려진 용적과 총 용해물 용적을 고려한다.

[0562] 세포 당 펩티드 복제수

[0563] 본 발명자는 상기 언급된 실험에서 얻는 데이터를 통해, 샘플의 펩티드 총량을 해당 샘플의 총 세포수로 나눈 다음 다시 단리 효율에 따른 나누기를 하여 세포당 TUMAP 복제수를 계산했다. 선택된 펩티드의 복제수는 표 12

에 나와 있다.

[0564] 표 12는 절대 복제수를 나타낸다. 이 표는 NSCLC 종양 샘플에 대한 절대 펩티드 정량화 결과를 나열하고 있다. 각 펩티드에 대한 세포당 복제수 중간값이 표시되어 있다: <100 = +; >=100 = ++; >=1,000 +++; >=10,000 = ++++. 평가 가능한 고품질 MS 데이터를 사용할 수 있는 샘플 수가 표시되어 있다.

[0565] [표 12]

[0566]

서열번호	펩티드 코드	세포 당 복제수(중앙값)	샘플 수
1	SLC17A3-001	++	18

[0568] **[참조문헌]**

[0569] PLoS.One. **10** (2015): e0119247

[0570] Agalliu, I. et al., JAMA Neurol. **72** (2015): 58-65

[0571] Agesen, T. H. et al., Gut **61** (2012): 1560-1567

[0572] Alagaratnam, S. et al., Int.J Androl **34** (2011): e133-e150

[0573] Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124

[0574] Alholle, A. et al., Epigenetics. **8** (2013): 1198-1204

[0575] Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933

[0576] Altman, M. K. et al., Biochem.Res.Int. **2012** (2012): 518437

[0577] Amatschek, S. et al., Cancer Res **64** (2004): 844-856

[0578] Anastas, J. N. et al., J Clin Invest **124** (2014): 2877-2890

[0579] Andersen, R. K. et al., Pigment Cell Melanoma Res. **28** (2015): 267-280

[0580] Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902

[0581] Anderson, L. N. et al., PLoS.One. **8** (2013): e66768

[0582] Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res **11** (2012): 1868-1878

[0583] Antony-Debre, I. et al., Cancer Cell **27** (2015): 609-611

[0584] Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814

[0585] Araujo, W. F. et al., Urol.Oncol (2015)

[0586] Arribas, A. J. et al., Blood **125** (2015): 1922-1931

[0587] Asad, M. et al., Cell Death.Dis. **5** (2014): e1346

[0588] Asaga, S. et al., Anticancer Res. **26** (2006): 35-42

[0589] Avery-Kiejda, K. A. et al., BMC.Cancer **14** (2014): 253

[0590] Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708

[0591] Awasthi, N. et al., Cancer Lett. **358** (2015): 59-66

[0592] Ayshamgul, H. et al., Chin Med.J (Engl.) **124** (2011): 341-346

[0593] Bae, D. H. et al., J Clin Pathol. **66** (2013): 911-917

[0594] Baek, G. et al., Cell Rep. **9** (2014): 2233-2249

[0595] Baenke, F. et al., J Pathol. (2015)

[0596] Bai, L. et al., J Cell Biochem. **113** (2012): 322-328

[0597] Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274

[0598] Bao, B. Y. et al., Clin Cancer Res. **17** (2011): 928-936

[0599] Bao, W. et al., Biomed.Pharmacother. **70** (2015): 97-102

[0600] Basson, M. D. et al., Mol.Oncol **9** (2015): 513-526

[0601] Bauer, K. M. et al., J Proteome.Res. **13** (2014): 4910-4918

[0602] Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282

[0603] Bedir, R. et al., Iran J Otorhinolaryngol. **27** (2015): 69-74

[0604] Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109

[0605] Beleford, D. et al., Clin Cancer Res. **16** (2010): 398-409

[0606] Bell, J. L. et al., Cell Mol Life Sci. **70** (2013): 2657-2675

[0607] Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300

[0608] Bhatnagar, R. et al., Oral Oncol **48** (2012): 831-835

[0609] Bill, K. L. et al., Lab Invest (2015)

[0610] Blanke, K. L. et al., Cancer Causes Control **25** (2014): 1513-1521

[0611] Bleumer, I. et al., Eur.Urol. **44** (2003): 65-75

[0612] Bonventre, J. V., Trans.Am.Clin Climatol.Assoc. **125** (2014): 293-299

[0613] Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003): 707-711

[0614] Braumuller, H. et al., Nature (2013)

[0615] Brendle, A. et al., Carcinogenesis **29** (2008): 1394-1399

[0616] Brossart, P. et al., Blood **90** (1997): 1594-1599

[0617] Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004): 29-43

[0618] Bunatova, K. et al., Anticancer Res. **32** (2012): 4601-4606

[0619] Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 345-357

[0620] Carvalho, F. L. et al., Prostate **74** (2014): 933-945

[0621] Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. **65** (2004): 1211-1223

[0622] Chatterjee, M. et al., Haematologica **98** (2013): 1132-1141

[0623] Chen, K. et al., J Cancer Res.Clin Oncol **140** (2014a): 1715-1721

[0624] Chen, Q. et al., PLoS.One. **9** (2014b): e88386

[0625] Chen, S. T. et al., Cancer Sci. **102** (2011): 2191-2198

[0626] Chen, Y. C. et al., Int.J Cancer **135** (2014c): 117-127

[0627] Chen, Y. L. et al., Int J Surg. **11** (2013): 85-91

[0628] Cheng, A. S. et al., Gastroenterology **144** (2013): 122-133

[0629] Cheng, J. et al., Cancer Lett. **310** (2011): 35-45

[0630] Cheon, D. J. et al., Clin Cancer Res **20** (2014): 711-723

[0631] Cho, E. et al., Hematol.Oncol.Clin.North Am. **25** (2011): 651-665

[0632] Chong, Y. et al., Oncol Rep. **31** (2014): 2535-2544

[0633] Chu, X. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **15** (2014): 5819-5823

[0634] Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. **16** (2003a): 324-332

[0635] Cohen, C. J. et al., J Immunol **170** (2003b): 4349-4361

[0636] Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114

[0637] Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)

[0638] Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738

[0639] Cuadros, T. et al., Cancer Res **74** (2014): 1416-1428

[0640] Cuadros, T. et al., Eur.J Cancer **49** (2013): 2034-2047

[0641] D'Angelo, V. et al., J Neurooncol. **117** (2014): 287-294

[0642] Dadkhah, E. et al., Arch.Iran Med. **16** (2013): 463-470

[0643] Dannenmann, S. R. et al., Cancer Immunol.Res. **1** (2013): 288-295

[0644] Davidov, T. et al., J Surg.Res. **190** (2014): 565-574

[0645] Deng, B. et al., Tumour.Biol. (2015)

[0646] Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170

[0647] Denkberg, G. et al., J Immunol **171** (2003): 2197-2207

[0648] Devaney, J. M. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **16** (2013): 292-300

[0649] Dey, N. et al., PLoS.One. **8** (2013): e77425

[0650] Dienstmann, R. et al., Am.Soc.Clin Oncol Educ.Book. **35** (2015): e149-e156

[0651] Ding, L. C. et al., Oncol Rep. (2015)

[0652] Dong, R. et al., PLoS.One. **9** (2014): e85599

[0653] El Behery, M. M. et al., Arch.Gynecol.Obstet. **288** (2013): 1371-1376

[0654] Elewa, M. A. et al., Clin Exp.Metastasis (2015)

[0655] Elouazzani, H. et al., J Clin Imaging Sci. **4** (2014): 33

[0656] Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296

[0657] Fan, H. Z. et al., J Cancer Res.Clin Oncol **135** (2009): 591-602

[0658] Fang, Z. Q. et al., Genet.Mol Res **12** (2013): 1479-1489

[0659] Fei, J. et al., Tumour.Biol. **34** (2013): 2329-2335

[0660] Felizola, S. J. et al., J Steroid Biochem.Mol.Biol. **144 Pt B** (2014): 410-416

[0661] Feng, H. et al., J Clin Invest **124** (2014): 3741-3756

[0662] Ferguson, B. W. et al., BMC.Cancer **13** (2013): 593

[0663] Fernandez-Banet, J. et al., Genomics **103** (2014): 189-203

[0664] Ferrer-Ferrer, M. et al., Arch.Med.Res **44** (2013): 467-474

[0665] Findeis-Hosey, J. J. et al., Biotech.Histochem. **87** (2012): 24-29

[0666] Finocchiaro, G. et al., Ann.Transl.Med. **3** (2015): 83

[0667] Fleischer, M. et al., Genes Chromosomes.Cancer **50** (2011): 1010-1020

[0668] Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814

[0669] Fontes-Oliveira, C. C. et al., Biochim.Biophys.Acta **1830** (2013): 2770-2778

[0670] Forconi, F. et al., Haematologica **93** (2008): 697-705

[0671] Forloni, M. et al., Cancer Res. **70** (2010): 916-924

[0672] Forsey, R. W. et al., Biotechnol.Lett. **31** (2009): 819-823

[0673] Franco, R. et al., Histol.Histopathol. **30** (2015): 707-714

[0674] Fu, Q. F. et al., J Hematol.Oncol **8** (2015): 22

[0675] Fu, Y. et al., Mol.Biol.Rep. **38** (2011): 693-702

[0676] Fujinaga, T. et al., Int.J Oncol **44** (2014): 1614-1624

[0677] Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. **2** (1996): 1096-1103

[0678] Gackiere, F. et al., Biol.Open. **2** (2013): 941-951

[0679] Gadd, S. et al., Lab Invest **90** (2010): 724-738

[0680] Gantsev, S. K. et al., Biomed.Pharmacother. **67** (2013): 363-366

[0681] Gao, H. et al., Cancer Lett. **344** (2014): 54-61

[0682] Gao, H. J. et al., J Cancer Res.Clin Oncol **141** (2015a): 1151-1162

[0683] Gao, W. et al., BMC.Cancer **15** (2015b): 367

[0684] Garg, M. et al., Cancer **116** (2010a): 3785-3796

[0685] Garg, M. et al., Eur.J Cancer **46** (2010b): 207-215

[0686] Garner, J. M. et al., PLoS.One. **10** (2015): e0125838

[0687] Gattinoni, L. et al., Nat Rev.Immunol **6** (2006): 383-393

[0688] Gbormittah, F. O. et al., J Proteome.Res. **13** (2014): 4889-4900

[0689] Gilkes, D. M. et al., Mol Cancer Res **11** (2013): 456-466

[0690] Giovannetti, E. et al., J Natl.Cancer Inst. **106** (2014): djt346

[0691] Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867

[0692] Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997): 905-911

[0693] Goksel, G. et al., J BUON. **19** (2014): 207-214

[0694] Gomez-Villafuertes, R. et al., J Neurochem. **131** (2014): 290-302

[0695] Gong, Y. et al., Adv.Anat.Pathol. **21** (2014): 191-200

[0696] Gonzalez, J. E. et al., J Am.Acad.Audiol. **25** (2014): 253-260

[0697] Goode, G. et al., PLoS.One. **9** (2014): e100103

[0698] Granja, S. et al., Oncotarget. **6** (2015): 6708-6721

[0699] Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual **4th** (2012)

[0700] Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual **2nd** (2014)

[0701] Griffith, O. L. et al., J Clin.Oncol. **24** (2006): 5043-5051

[0702] Grunewald, T. G. et al., Biol.Cell **105** (2013): 535-547

[0703] Guerrero-Preston, R. et al., Epigenetics. **9** (2014): 1031-1046

[0704] Guo, P. et al., Onco.Targets.Ther. **8** (2015): 73-79

[0705] Halldorsdottir, A. M. et al., Am.J Hematol. **87** (2012): 361-367

[0706] Han, B. et al., Mol.Cancer **14** (2015): 64

[0707] Havens, M. A. et al., PLoS.Genet. **10** (2014): e1004312

[0708] Heist, R. S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **112** (2015): 1547-1552

[0709] Hevir-Kene, N. et al., Chem Biol.Interact. **234** (2015): 309-319

[0710] Hirota, E. et al., Int.J Oncol. **29** (2006): 799-827

[0711] Hlavac, V. et al., Medicine (Baltimore) **93** (2014): e255

[0712] Hoffmann, N. E. et al., Cancer **112** (2008): 1471-1479

[0713] Hofmann, H. S. et al., Eur.Urol. **48** (2005): 77-81

[0714] Hogan, L. E. et al., Blood **118** (2011): 5218-5226

[0715] Holtl, L. et al., Clin.Cancer Res. **8** (2002): 3369-3376

[0716] Honke, K. et al., J Biochem. **119** (1996): 421-427

[0717] Hovnanian, A., Subcell.Biochem. **45** (2007): 337-363

[0718] Hu, C. A. et al., FEBS Lett. **586** (2012): 947-955

[0719] Hu, M. et al., J Surg.Oncol **108** (2013): 192-196

[0720] Hu, S. et al., J Cancer Res Clin Oncol **140** (2014): 883-893

[0721] Hu, Y. et al., Mol.Cancer Ther. **14** (2015): 289-297

[0722] Hua, D. et al., Int.J Mol Med. **30** (2012): 1267-1274

[0723] Huang, C. N. et al., Ann.Oncol **23** (2012a): 707-713

[0724] Huang, G. et al., J Surg.Oncol **105** (2012b): 420-424

[0725] Huang, Y. et al., Cell Biosci. **3** (2013): 16

[0726] Hung, T. H. et al., Int.J Biochem.Cell Biol. **53** (2014): 55-65

[0727] Hunt, J. D. et al., Int.J Cancer **114** (2005): 101-108

[0728] Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838

[0729] Ilm, K. et al., Mol.Cancer **14** (2015): 38

[0730] Inoue, Y. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. (2015)

[0731] Inzelberg, R. et al., Neurology **78** (2012): 781-786

[0732] Ishiguro, Y. et al., Gan **75** (1984): 53-60

[0733] Jeng, Y. M. et al., Br.J Surg. **96** (2009): 66-73

[0734] Jensen, D. H. et al., J Oral Pathol.Med. (2014)

[0735] Jiang, J. G. et al., Cancer Res **65** (2005): 4707-4715

[0736] Jiao, J. et al., Cancer Lett. **320** (2012): 96-103

[0737] Jin, Z. et al., Anticancer Res. **33** (2013): 5199-5203

[0738] Joerger, M. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **18** (2015): 167-172

[0739] Johnson, R. H. et al., Oncotarget. (2015)

[0740] Jose-Eneriz, E. S. et al., Br.J Haematol. **142** (2008): 571-582

[0741] Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615

[0742] Junnila, S. et al., BMC.Cancer **10** (2010): 73

[0743] Kamphausen, E. et al., Cancer Immunol.Immunother. **59** (2010): 1273-1284

[0744] Kang, M. R. et al., J Pathol. **217** (2009): 702-706

[0745] Karagiannis, G. S. et al., Mol.Oncol **8** (2014): 1240-1252

[0746] Katoh, M. et al., Oncol Rep. **13** (2005): 367-370

[0747] Kawahara, R. et al., PLoS.One. **9** (2014): e115004

[0748] Kawakami, K. et al., Int.J Oncol (2015)

[0749] Khan, R. et al., Clin.Proteomics. **10** (2013a): 6

[0750] Khan, Z. et al., Cancer Invest **31** (2013b): 404-411

[0751] Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)

[0752] Kim, J. H. et al., J Korean Med.Sci. **8** (1993): 68-72

[0753] Kim, J. S. et al., Cancer Biol.Ther. **13** (2012): 638-646

[0754] Kim, M. et al., Mol Cancer Res **6** (2008): 222-230

[0755] Kirov, A. et al., J Cell Biochem. (2015)

[0756] Kleiber, K. et al., Anticancer Res. **27** (2007): 55-61

[0757] Kobayashi, H. et al., Oncol Lett. **10** (2015): 612-618

[0758] Koh, J. et al., Mol.Endocrinol. **25** (2011): 867-876

[0759] Komatsu, S. et al., Br.J Cancer **112** (2015): 357-364

[0760] Konno, R., Hum.Cell **14** (2001): 261-266

[0761] Koo, J. S. et al., Am.J Clin Pathol. **143** (2015): 584-592

[0762] Korosec, B. et al., Cancer Genet.Cytogenet. **171** (2006): 105-111

[0763] Koshikawa, K. et al., Oncogene **21** (2002): 2822-2828

[0764] Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484

[0765] Kuang, S. Q. et al., Leukemia **22** (2008): 1529-1538

[0766] Kubota, H. et al., Cell Stress.Chaperones. **15** (2010): 1003-1011

[0767] Kumps, C. et al., PLoS.One. **8** (2013): e52321

[0768] Kwon, J. et al., Int J Oncol **43** (2013): 1523-1530

[0769] Lai, K. K. et al., PLoS.Genet. **7** (2011): e1002147

[0770] Lai, Y. J. et al., Mol.Cell Biol. **30** (2010): 5582-5596

[0771] Lapointe, J. et al., Endocrinology **140** (1999): 4486-4493

[0772] Lebdai, S. et al., Urol.Oncol **33** (2015): 69-8

[0773] Lee, H. J. et al., Oncol Lett. **8** (2014): 1986-1992

[0774] Lee, H. K. et al., Oncotarget. **6** (2015): 1850-1864

[0775] Lee, J. et al., Yonsei Med.J **54** (2013): 1158-1167

[0776] Li, J. et al., J Mol.Histol. **45** (2014a): 47-57

[0777] Li, M. et al., Int.J Oncol. **24** (2004): 305-312

[0778] Li, R. et al., Curr.Cancer Drug Targets. **14** (2014b): 274-285

[0779] Li, W. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **6** (2013): 2430-2440

[0780] Li, X. X. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014c): 2729-2736

[0781] Li, Y. et al., BMC.Cancer **15** (2015): 417

[0782] Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987

[0783] Lin, L. et al., Oncol Lett. **6** (2013): 740-744

[0784] Lin, M. C. et al., Oral Oncol **50** (2014): 478-484

[0785] Lin, Y. W. et al., Eur.J Cancer **45** (2009): 2041-2049

[0786] Lin, Z. Y. et al., Biomed.Pharmacother. **66** (2012): 454-458

[0787] Liu, B. et al., Zhonghua Fu Chan Ke.Za Zhi. **45** (2010a): 41-44

[0788] Liu, F. et al., World J Surg.Oncol **12** (2014a): 333

[0789] Liu, H. et al., Carcinogenesis **34** (2013): 885-892

[0790] Liu, J. et al., Oncotarget. (2015)

[0791] Liu, K. et al., Tumour.Biol. **35** (2014b): 995-1002

[0792] Liu, S. et al., Tumour.Biol. **35** (2014c): 9897-9904

[0793] Liu, Y. et al., J Neurooncol. **99** (2010b): 13-24

[0794] Liu, Y. et al., Mol.Cancer **9** (2010c): 186

[0795] Ljungberg, B. et al., Eur.Urol. **60** (2011): 615-621

[0796] Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759

[0797] Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291

[0798] Lourenco, G. J. et al., Breast Cancer Res Treat. **100** (2006): 335-338

[0799] Lu, Y. Y. et al., Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi. **22** (2014): 1336-1340

[0800] Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795

[0801] Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)

[0802] Lung, H. L. et al., Int.J Cancer **127** (2010): 304-312

[0803] Lustosa, S. A. et al., ScientificWorldJournal. **2014** (2014): 102541

[0804] Lv, Z. et al., Tumour.Biol. **35** (2014): 10497-10502

[0805] Ma, G. F. et al., Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci. **19** (2015): 578-585

[0806] Ma, J. et al., Pathol.Oncol Res **19** (2013): 821-832

[0807] Mak, A. B. et al., J Mol.Biol. **426** (2014): 2175-2182

[0808] Malik, M. A. et al., Mol.Biol.Rep. **39** (2012): 9095-9104

[0809] Marten, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002): 637-644

[0810] Martinez-Lopez, N. et al., Gastroenterology **143** (2012): 787-798

[0811] Massari, F. et al., Cancer Treat.Rev. **41** (2015): 114-121

[0812] Masugi, Y. et al., Lab Invest **95** (2015): 308-319

[0813] Matsubara, J. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **20** (2011): 2195-2203

[0814] Mehta, A. M. et al., Immunogenetics **67** (2015): 267-275

[0815] Mei, J. et al., Oncogene **25** (2006): 849-856

[0816] Mertens-Walker, I. et al., BMC.Cancer **15** (2015): 164

[0817] Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237

[0818] Michael, A. et al., Lancet Oncol. **4** (2003): 215-223

[0819] Minami, T. et al., Int.Immunopharmacol. **20** (2014): 59-65

[0820] Minchenko, O. H. et al., World J Gastroenterol. **20** (2014): 13705-13717

[0821] Miyoshi, N. et al., Oncol Rep. **23** (2010): 505-510

[0822] Mo, Y. et al., Cancer Lett. **323** (2012): 147-154

[0823] Moch, H., Semin.Cancer Biol. **23** (2013): 3-9

[0824] Mochizuki, S. et al., Cancer Sci. **98** (2007): 621-628

[0825] Mohelnikova-Duchonova, B. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. **72** (2013a): 669-682

[0826] Mohelnikova-Duchonova, B. et al., Pancreas **42** (2013b): 707-716

[0827] Molina-Pinelo, S. et al., PLoS.One. **9** (2014): e90524

[0828] Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129

[0829] Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027

[0830] Moriya, Y. et al., Oral Oncol **51** (2015): 84-89

[0831] Morrissey, J. J. et al., Urology **83** (2014): 256-14

[0832] Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443

[0833] Motzer, R. J. et al., Clin.Cancer Res. **10** (2004): 6302S-6303S

[0834] Moutinho, C. et al., J Natl.Cancer Inst. **106** (2014): djt322

[0835] Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res **7** (2008): 51-61

[0836] Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480

[0837] Mukai, M. et al., Am.J Surg.Pathol. **10** (1986): 212-218

[0838] Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638

[0839] Mustafa, D. A. et al., Gene Regul.Syst.Bio **4** (2010): 103-107

[0840] Nagy, Z. et al., Mol.Cancer **13** (2014): 96

[0841] Nakai, Y. et al., J Cancer Res.Clin Oncol **141** (2015): 933-939

[0842] Narjoz, C. et al., PLoS.One. **9** (2014): e95532

[0843] Narkiewicz, J. et al., Oncol Rep. **21** (2009): 1529-1537

[0844] Naryzhnyi, S. N. et al., Biomed.Khim. **60** (2014): 308-321

[0845] Ng, K. T. et al., Mol.Cancer **13** (2014): 196

[0846] Nguyen, H. et al., J Biol.Chem **290** (2015): 13641-13653

[0847] Ni, I. B. et al., Hematol.Rep. **4** (2012): e19

[0848] Nikitovic, D. et al., Biochim.Biophys.Acta **1840** (2014): 2471-2481

[0849] Nimptsch, K. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **18** (2009): 49-56

[0850] Nishio, S. et al., Cancer Lett. **264** (2008): 36-43

[0851] Notaridou, M. et al., Int.J Cancer **128** (2011): 2063-2074

[0852] Nowak, D. et al., Blood **115** (2010): 1049-1053

[0853] Oka, K. et al., Lab Invest **60** (1989): 38-44

[0854] Okudela, K. et al., PLoS.One. **9** (2014): e87193

[0855] Olesen, S. H. et al., Mol Cell Proteomics. **4** (2005): 534-544

[0856] Ozawa, D. et al., Ann.Surg.Oncol (2014)

[0857] Paradis, V. et al., Gut **62** (2013): 911-919

[0858] Pathan, N. et al., J Biol.Chem **276** (2001): 32220-32229

[0859] Pavlikova, N. et al., Exp.Cell Res. **333** (2015): 1-10

[0860] Pedersen, M. O. et al., Leuk.Lymphoma **51** (2010): 314-328

[0861] Penning, T. M., Chem Res.Toxicol. **27** (2014): 1901-1917

[0862] Pereira, P. M. et al., Org.Biomol.Chem. **12** (2014): 1804-1811

[0863] Peters, D. G. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **14** (2005): 1717-1723

[0864] Petrini, I., Ann.Transl.Med. **3** (2015): 82

[0865] Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (http://CRAN.R-project.org/packe=nlme) (2015)

[0866] Planutis, K. et al., J Transl.Med. **11** (2013): 50

[0867] Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787

[0868] Porta, C. et al., Virology **202** (1994): 949-955

[0869] Prakash, S. et al., J Pediatr.Hematol.Oncol **27** (2005): 179-187

[0870] Principe, M. et al., Oncotarget. **6** (2015): 11098-11113

[0871] Qian, Z. et al., Chem Biol.Interact. **184** (2010): 50-57

[0872] Quinn, M. C. et al., Int J Oncol **42** (2013): 912-920

[0873] Ragnum, H. B. et al., Int.J Radiat.Oncol Biol.Phys. **87** (2013): 753-760

[0874] Ramazzotti, G. et al., Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr. **21** (2011): 291-301

[0875] Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219

[0876] RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/

[0877] Rehfeld, A. et al., Front Endocrinol.(Lausanne) **5** (2014): 46

[0878] Ren, Y. et al., Mol.Cell Proteomics. **13** (2014): 3126-3137

[0879] Renehan, A. G. et al., Int.J Cancer **126** (2010): 692-702

[0880] Renehan, A. G. et al., Lancet **371** (2008): 569-578

[0881] Renkvist, N. et al., Cancer Immunol.Immunother. **50** (2001): 3-15

[0882] Richardson, A. et al., Crit Rev.Oncog. **18** (2013): 409-434

[0883] Rini, B. I. et al., Curr.Opin.Oncol. **20** (2008): 300-306

[0884] Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006): 67-74

[0885] Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921

[0886] Rocken, C. et al., Pathologe **33 Suppl 2** (2012): 235-240

[0887] Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132

[0888] Royds, J. A. et al., J Clin Pathol. **38** (1985): 1258-1260

[0889] Ruiz-Martinez, J. et al., Mov Disord. **29** (2014): 750-755

[0890] Sachdeva K et al., http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview (2010)

[0891] Sahasrabuddhe, N. A. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **446** (2014): 863-869

[0892] Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491

[0893] Sakamoto, L. H. et al., Leuk.Res. **38** (2014): 496-502

[0894] Sasnauskiene, A. et al., Medicina (Kaunas.) **50** (2014): 14-18

[0895] Sato, T. et al., PLoS.One. **8** (2013): e59444

[0896] Schlomann, U. et al., Nat Commun. **6** (2015): 6175

[0897] Schuetz, A. N. et al., J Mol.Diagn. **7** (2005): 206-218

[0898] Schumann, T. et al., Oncotarget. (2015)

[0899] Scrideli, C. A. et al., Leuk.Res. **34** (2010): 32-37

[0900] Sedlakova, I. et al., Int.J Gynecol.Cancer **25** (2015): 236-243

[0901] Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576

[0902] Seong, J. et al., Mol.Biol.Rep. **39** (2012): 3597-3601

[0903] Sethakorn, N. et al., J Recept.Signal.Transduct.Res. **33** (2013): 166-171

[0904] Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)

[0905] Shu, J. et al., Cancer Res. **66** (2006): 5077-5084

[0906] Shukla, S. et al., Cancer Res. **73** (2013): 6563-6573

[0907] Sieuwerts, A. M. et al., Clin.Chem **53** (2007): 1280-1288

[0908] Sigari, N. et al., Clin Lab **60** (2014): 23-27

[0909] Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542

[0910] Singh, S. et al., Tumour.Biol. (2014)

[0911] Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195

[0912] Slater, E. P. et al., Transl.Oncol. **6** (2013): 99-103

[0913] Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094

[0914] Song, J. et al., PLoS.One. **9** (2014): e110074

[0915] Sowalsky, A. G. et al., Mol.Cancer Res. **13** (2015): 98-106

[0916] Sprowl, J. A. et al., Clin Pharmacol.Ther. **94** (2013): 585-592

[0917] Staal-Viliare, A. et al., Leuk.Lymphoma **48** (2007): 439-441

[0918] Staehli, F. et al., J Immunol. **188** (2012): 3820-3828

[0919] Stamatopoulos, K. et al., Blood **106** (2005): 3575-3583

[0920] Stein, U., Expert.Opin.Ther.Targets. **17** (2013): 1039-1052

[0921] Steinway, S. N. et al., PLoS.One. **10** (2015): e0128159

[0922] Stoehr, C. G. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **6** (2013): 998-1008

[0923] Strekalova, E. et al., Clin.Cancer Res. (2015)

[0924] Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163

[0925] Su, H. et al., J Transl.Med. **13** (2015): 104

[0926] Su, Z. et al., Cancer Res. **63** (2003): 2127-2133

[0927] Suh, K. S. et al., Clin.Cancer Res. **13** (2007a): 121-131

[0928] Suh, K. S. et al., Mol.Carcinog. **46** (2007b): 599-604

[0929] Suhovskih, A. V. et al., Cell Tissue Res. (2015)

[0930] Sun, W. et al., Cancer Res. **74** (2014a): 1091-1104

[0931] Sun, Z. et al., J Proteome.Res **13** (2014b): 1593-1601

[0932] Szarvas, T. et al., Int J Cancer **135** (2014): 1596-1604

[0933] Taguchi, O. et al., Clin Chim.Acta **244** (1996): 69-81

[0934] Tam, C. W. et al., Endocrinology **147** (2006): 5023-5033

[0935] Tan, M. H. et al., Breast Cancer Res.Treat. **131** (2012): 849-858

[0936] Tanaka, J. et al., J Oral Pathol.Med. **44** (2015): 126-133

[0937] Tanaka, T. et al., J Cancer Res.Clin Oncol **140** (2014): 503-513

[0938] Tanic, N. et al., Anticancer Res. **26** (2006): 2137-2142

[0939] Tashiro, A. et al., Am.J Cancer Res. **4** (2014): 528-536

[0940] Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762

[0941] Thiel, A. et al., Oncol Rep. **26** (2011): 615-620

[0942] Tong, S. Y. et al., Cancer Invest **30** (2012): 642-645

[0943] Tong, W. G. et al., Epigenetics. **5** (2010): 499-508

[0944] Toth, K. et al., Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. **22** (2014): 642-647

[0945] Tran, E. et al., Science **344** (2014a): 641-645

[0946] Tran, T. T. et al., Photochem.Photobiol. **90** (2014b): 1136-1143

[0947] Tsourlakis, M. C. et al., Int.J Mol.Sci. **16** (2015): 8591-8606

[0948] Vachani, A. et al., Clin Cancer Res. **13** (2007): 2905-2915

[0949] Vasiljevic, A. et al., Neuropathology. **33** (2013): 149-161

[0950] Volz, N. B. et al., Pharmacogenomics.J **15** (2015): 69-76

[0951] Wake, N. C. et al., Hum.Mutat. **34** (2013): 1650-1661

[0952] Walter, S. et al., J Immunol **171** (2003): 4974-4978

[0953] Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261

[0954] Wang, B. S. et al., Cell Stress.Chaperones. **18** (2013a): 359-366

[0955] Wang, D. et al., Mol.Cell Biochem. **396** (2014a): 67-77

[0956] Wang, G. et al., Tumour.Biol **36** (2015a): 1055-1065

[0957] Wang, H. et al., J Biol.Chem **289** (2014b): 4009-4017

[0958] Wang, J. H. et al., World J Gastroenterol. **16** (2010a): 5642-5646

[0959] Wang, L. H. et al., Tumour.Biol. **35** (2014c): 1157-1168

[0960] Wang, R. et al., Biomed.Res.Int. **2013** (2013b): 195692

[0961] Wang, T. P. et al., Exp.Cell Res. **316** (2010b): 2893-2902

[0962] Wang, W. M. et al., Mol.Med.Rep. (2015b)

[0963] Wang, Y. et al., J Biol.Chem **289** (2014d): 14225-14238

[0964] Wang, Y. et al., Clin.Chem Lab Med. **48** (2010c): 1475-1479

[0965] Wang, Y. et al., Anticancer Res **33** (2013c): 207-214

[0966] Wang, Y. et al., Pathol.Oncol Res. **20** (2014): 611-618

[0967] Wang, Z. et al., J Cancer Res Clin Oncol **141** (2015c): 1353-1361

[0968] Warren, C. R. et al., J Cell Biochem. **115** (2014): 1322-1333

[0969] Waugh, M. G., Mol.Neurobiol. (2014)

[0970] Wei, Q. et al., Cancer Res. **69** (2009): 2332-2339

[0971] Westphal, P. et al., Am.J Clin Pathol. **143** (2015): 248-256

[0972] Wierecky, J. et al., Cancer Res. **66** (2006): 5910-5918

[0973] Wikman, H. et al., PLoS.One. **7** (2012): e47537

[0974] Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423

[0975] Wittig, B. et al., Hum.Gene Ther. **12** (2001): 267-278

[0976] Wlodarski, M. W. et al., J Leukoc.Biol **83** (2008): 589-601

[0977] World Cancer Report, (2014)

[0978] World Health Organization Classification of Tumours, (2004)

[0979] Wu, M. et al., Oncogene **23** (2004): 6815-6819

[0980] Wu, Y. M. et al., Cancer Res **71** (2011): 7270-7279

[0981] Xiao, L. et al., Biochim.Biophys.Acta (2015)

[0982] Xiao, W. et al., Mol.Med.Rep. **10** (2014): 453-458

[0983] Xin, Z. et al., Virchows Arch. **465** (2014): 35-47

[0984] Xu, Y. et al., J Cell Biochem. **115** (2014): 1112-1121

[0985] Xu, Z. et al., Oncol Rep. **33** (2015): 2899-2907

[0986] Yamamoto, M. et al., Cancer Res. **65** (2005): 8706-8714

[0987] Yan, P. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **15** (2014): 8923-8929

[0988] Yang, C. Y. et al., J Immunol **192** (2014a): 1547-1557

[0989] Yang, D. et al., Oncogene **30** (2011): 4590-4600

[0990] Yang, J. et al., J Proteomics. **109** (2014b): 162-175

[0991] Yang, W. et al., Med.Oncol **31** (2014c): 826

[0992] Yang, W. et al., Tumour.Biol. **35** (2014d): 8267-8279

[0993] Yano, Y. et al., Cancer Lett. **207** (2004): 139-147

[0994] Yao, Y. et al., Cell Physiol Biochem. **35** (2015): 983-996

[0995] Yeh, I. et al., Nat.Commun. **6** (2015): 7174

[0996] Yeom, S. Y. et al., Mol.Cancer Ther. **13** (2014): 3049-3061

[0997] Yin, Y. et al., Tumour.Biol. **34** (2013): 3611-3617

[0998] Yoshida, A. et al., Hum.Cell **26** (2013): 56-66

[0999] Yoshida, Y. et al., Anticancer Res. **32** (2012): 2301-2308

[1000] Yu, P. H. et al., PLoS.One. **8** (2013): e82254

[1001] Yu, Z. et al., Cancer Lett. **353** (2014): 182-193

[1002] Yuan, R. H. et al., Ann Surg.Oncol **16** (2009): 1711-1719

[1003] Zaghloul, R. A. et al., Eur.J Pharmacol. **746** (2015): 353-362

[1004] Zamani-Ahmadmahmudi, M. et al., Electrophoresis **35** (2014): 901-910

[1005] Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577

[1006] Zhang, B. et al., Blood **106** (2005): 1355-1361

[1007] Zhang, H. et al., Cancer Lett. **323** (2012a): 106-113

[1008] Zhang, J. et al., Mol.Med.Rep. **10** (2014a): 749-754

[1009] Zhang, J. et al., Xi.Bao.Yu Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za Zhi. **29** (2013): 190-193

[1010] Zhang, L. et al., Dig.Dis.Sci. **57** (2012b): 2608-2614

[1011] Zhang, S. D. et al., Onco.Targets.Ther. **8** (2015): 835-843

[1012] Zhang, X. D. et al., Int.J Clin Exp.Med. **7** (2014b): 1190-1196

[1013] Zhao, M. et al., Cancer Invest **32** (2014): 464-469

[1014] Zhao, M. et al., Oncotarget. (2015a)

[1015] Zhao, Z. et al., Med.Oncol **32** (2015b): 112

[1016] Zhen, T. et al., Oncotarget. **5** (2014): 3756-3769

[1017] Zhou, J. et al., Oncol Rep. **30** (2013): 2229-2237

[1018] Zhu, J. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **8** (2015): 702-710

[1019] Zienert, E. et al., Cancer Lett. **364** (2015): 17-24

[1020] Zietek, Z. et al., Pol.Tyg.Lek. **51** (1996): 86-88

[1021] Zizi-Sermpetzoglou, A. et al., Eur.J Gynaecol.Oncol **35** (2014): 325-327

[1022] Zu, X. Y. et al., Recent Pat Anticancer Drug Discov. **7** (2012): 154-167

[1023] Zubor, P. et al., Mol.Biol.Rep. **42** (2015): 977-988

[1024] Zuniga-Garcia, V. et al., Dig.Dis.Sci. (2015)

[1025] Zurawa-Janicka, D. et al., Oncol Rep. **28** (2012): 1838-1844

[1026] Follenzi A,et al. Nat Genet. 2000 Jun;25(2):217-22.

[1027] Zufferey R, et al. J Virol. 1999 Apr;73(4):2886-92.

[1028] Scholten KB, et al. Clin Immunol. 2006 May;119(2):135-45.

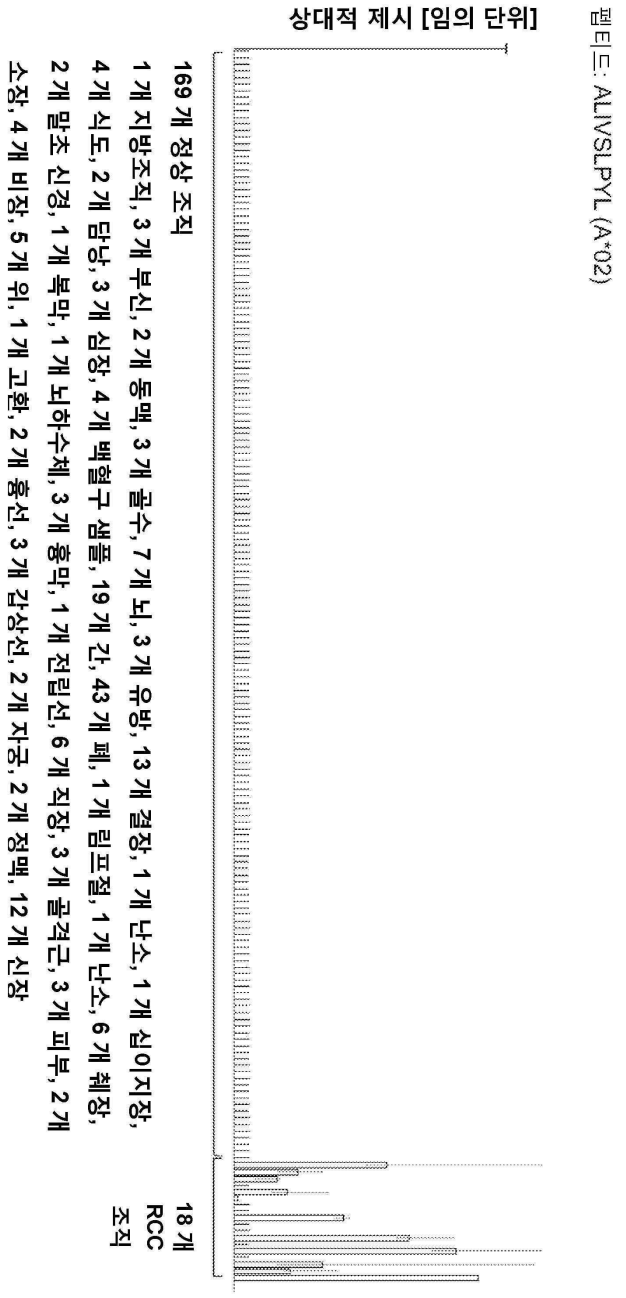
[1029] Gustafsson C, et al. Trends Biotechnol. 2004 Jul;22(7):346-53. Review.

[1030] Kuball, J., et al. *(2007). Blood 109, 2331-2338.*

[1031] Schmitt, T. M., et al. *(2009). Hum. Gene Ther. 20, 1240-1248*

도면

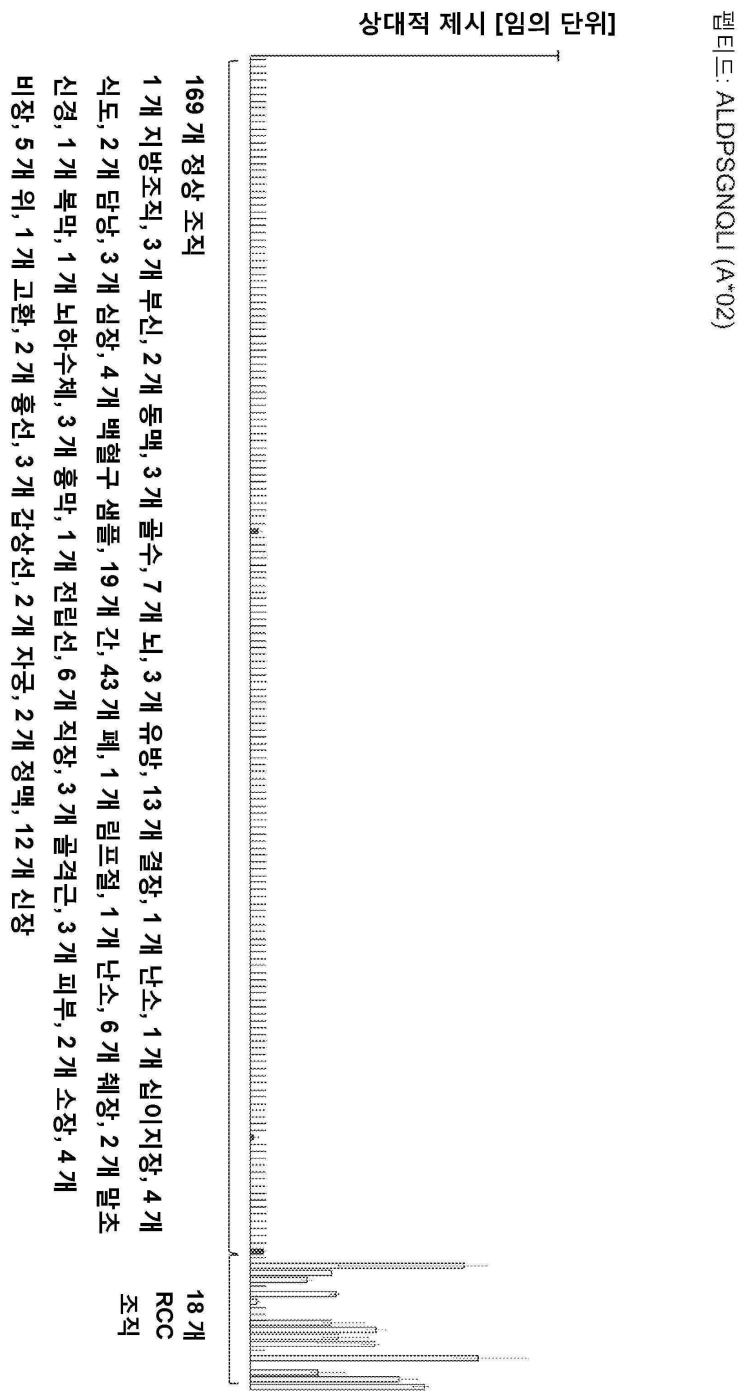
도면1a



도면1b

펩티드: YLEEDVYQL (A*02)
상대적 제시 [임의 단위]
169 개 정상 조직
18 개 RCC 조직
1 개 지방조직, 3 개 부신, 2 개 동맥, 3 개 골수, 7 개 뇌, 3 개 유방, 13 개 결장, 1 개 난소, 1 개 십이지장,
4 개 식도, 2 개 담낭, 3 개 심장, 4 개 백혈구 샘플, 19 개 간, 43 개 폐, 1 개 림프절, 1 개 난소, 6 개 췌장, 2 개
말초 신경, 1 개 복막, 1 개 뇌하수체, 3 개 흉막, 1 개 전립선, 6 개 직장, 3 개 골격근, 3 개 피부, 2 개 소장,
4 개 비장, 5 개 위, 1 개 고환, 2 개 흉선, 3 개 감상선, 2 개 자궁, 2 개 정맥, 12 개 신장

도면1c


펩티드: ALDPSGNQLI (A*02)
상대적 제시 [임의 단위]
169 개 정상 조직
18 개 RCC 조직
1 개 지방조직, 3 개 부신, 2 개 동맥, 3 개 골수, 7 개 뇌, 3 개 유방, 13 개 결장, 1 개 난소, 1 개 십이지장, 4 개 식도, 2 개 담낭, 3 개 심장, 4 개 백혈구 샘플, 19 개 간, 43 개 폐, 1 개 림프절, 1 개 난소, 6 개 췌장, 2 개 말초 신경, 1 개 복막, 1 개 뇌하수체, 3 개 흉막, 1 개 전립선, 6 개 직장, 3 개 골격근, 3 개 피부, 2 개 소장, 4 개 비장, 5 개 위, 1 개 고환, 2 개 흉선, 3 개 갑상선, 2 개 자궁, 2 개 정맥, 12 개 신장

도면1d

펩티드: GLA5FK5FL (A*02)
상대적 제시 [임의 단위]
169 개 정상 조직
1 개 지방조직, 3 개 부신, 2 개 동맥, 3 개 골수, 7 개 뇌, 3 개 유방, 13 개 결장, 1 개 난소, 1 개
십이지장, 4 개 식도, 2 개 담낭, 3 개 심장, 4 개 백혈구 샘플, 19 개 간, 43 개 폐, 1 개 림프절, 1 개
난소, 6 개 췌장, 2 개 말초 신경, 1 개 복막, 1 개 뇌하수체, 3 개 흉막, 1 개 전립선, 6 개 직장, 3 개
골격근, 3 개 피부, 2 개 소장, 4 개 비장, 5 개 위, 1 개 고환, 2 개 흉선, 3 개 갑상선, 2 개 자궁, 2 개
정맥, 12 개 신장
18 개
RCC 조직

도면1e

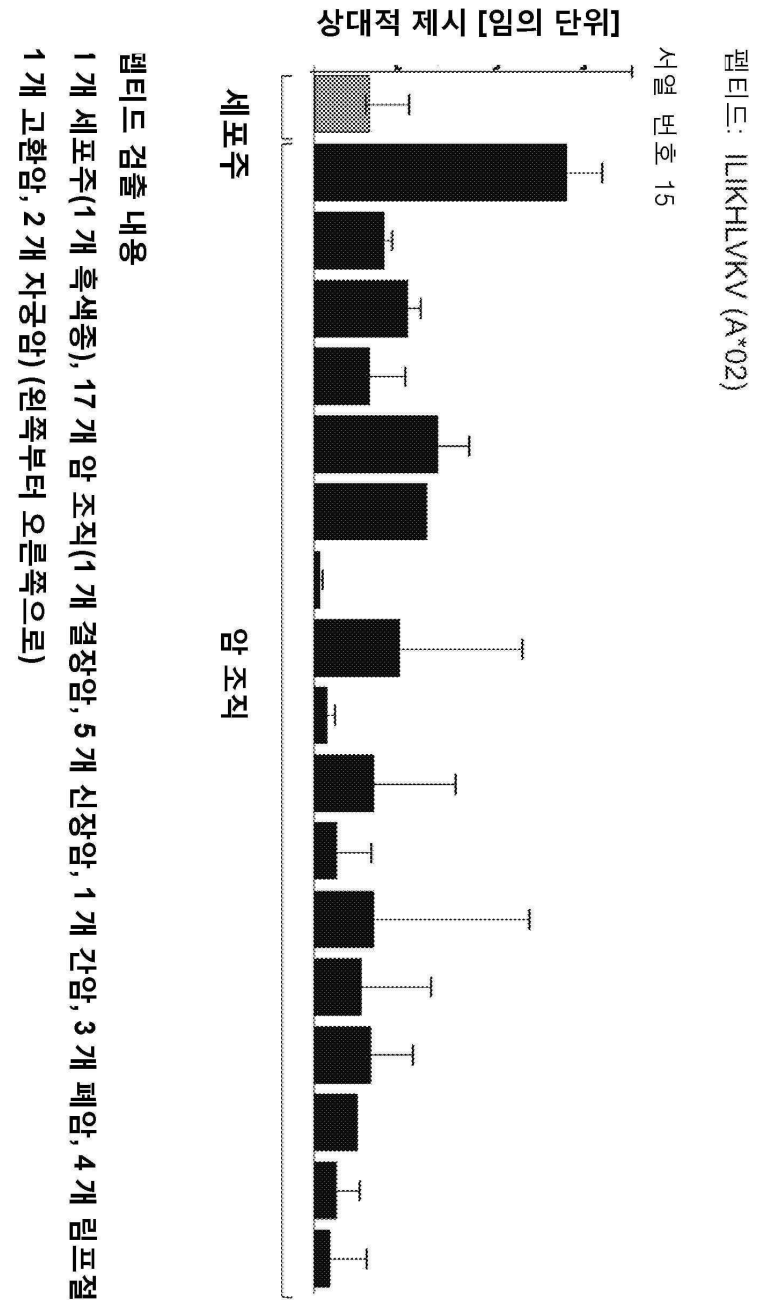
펩티드 검출 내용

1 개 백혈구 세포주, 5 개 정상 조직(3 개 폐, 1 개 림프절, 1 개 비장), 77 개 암 조직(2 개 뇌암, 1 개 유방암, 1 개 결장암, 1 개 식도암, 10 개 신장암, 1 개 백혈병, 1 개 간암, 35 개 폐암, 12 개 난소암, 8 개 췌장암, 5 개 위암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

도면1f

펩티드: LLVPAHLVAA (A*02)
상대적 제시 [임의 단위]
서열 번호 25
18 개 RCC 조직
169 개 정상 조직
1 개 지방조직, 3 개 부신, 2 개 동맥, 3 개 골수, 7 개 뇌, 3 개 유방, 13 개 결장, 1 개 십이지장, 4 개 식도, 2 개 담낭, 3 개 심장, 4 개 백혈구, 19 개 간, 43 개 폐, 1 개 림프절, 6 개 췌장, 2 개 말초 신경, 1 개 복막, 1 개 뇌하수체, 3 개 흉막, 1 개 전립선, 6 개 직장, 3 개 골격근, 3 개 피부, 2 개 소장, 4 개 비장, 5 개 위, 1 개 고환, 2 개 흉선, 3 개 갑상선, 2 개 자궁, 2 개 정맥, 12 개 신장

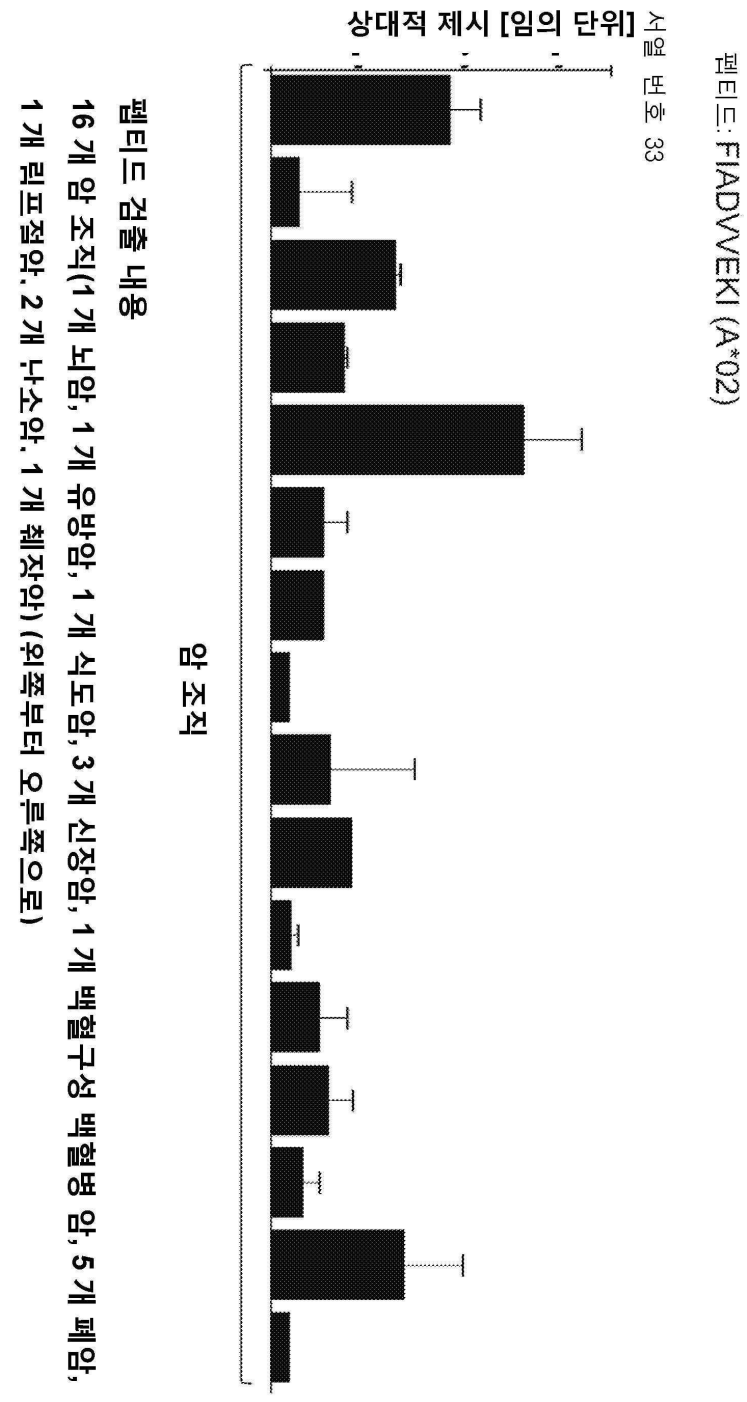
도면1g



펩티드 검출 내용

1 개 세포주(1 개 흑색종), 17 개 암 조직(1 개 결장암, 5 개 신장암, 1 개 간암, 3 개 폐암, 4 개 림프절암, 1 개 고환암, 2 개 자궁암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

도면1h

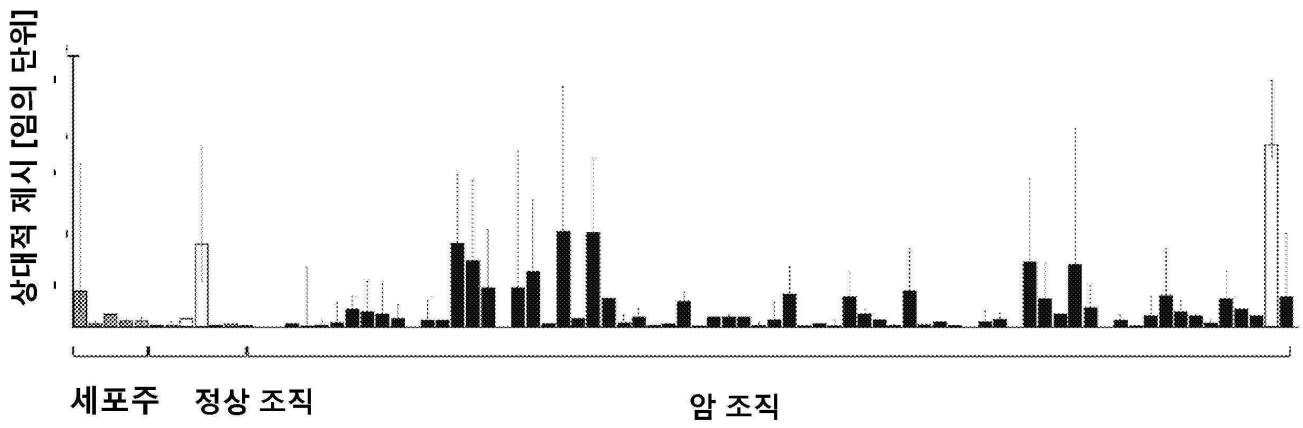


펩티드 검출 내용

16 개 암 조직(1 개 뇌암, 1 개 유방암, 1 개 식도암, 3 개 신장암, 1 개 백혈구성 백혈병 암, 5 개 폐암, 1 개 림프절암, 2 개 난소암, 1 개 췌장암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

펩티드: VLLDTILQL (A*02)

서열 번호 38

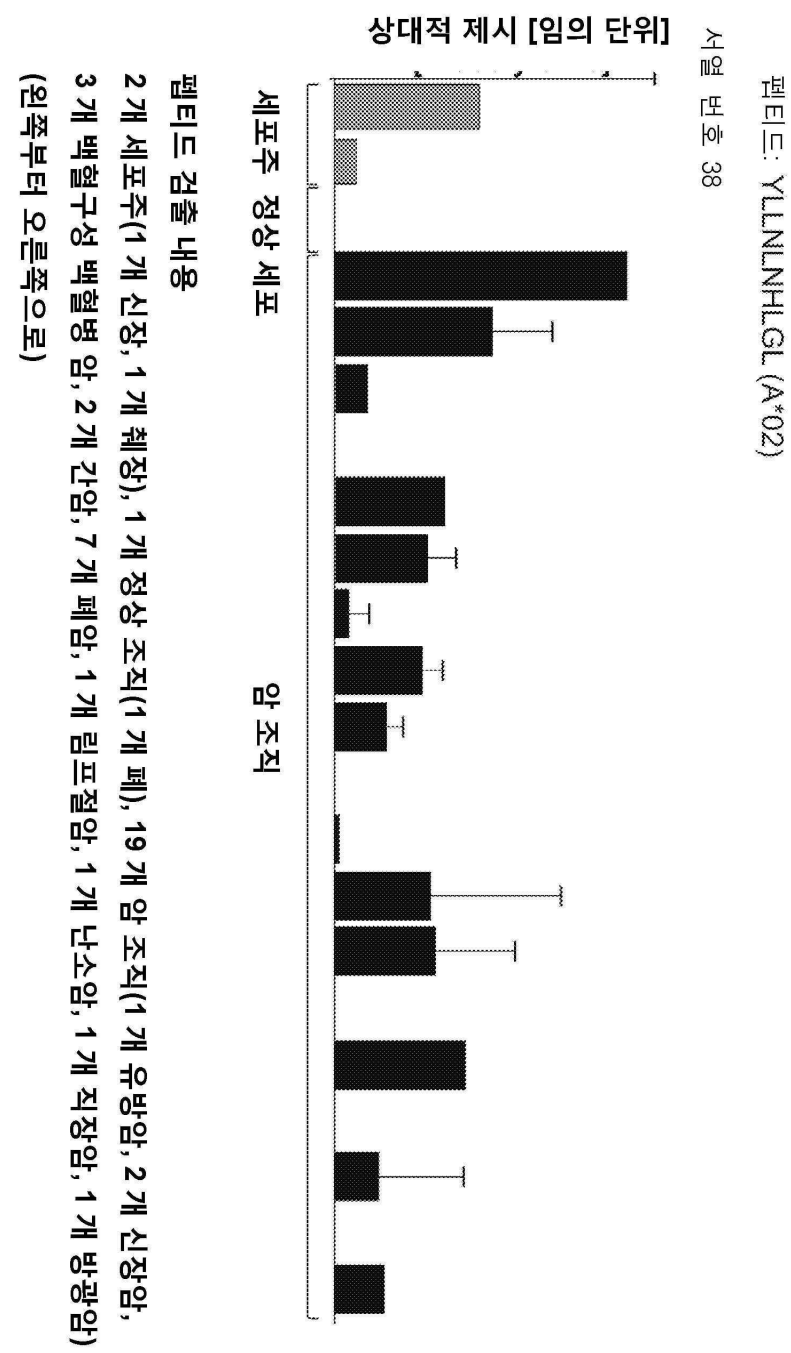


펩티드 검출 내용

1 개 양성(신장암), 3 개 세포주(1 개 췌장, 1 개 흉막, 1 개 전립선), 1 개 기타 질병(1 개 피부), 9 개 정상 조직(1 개 폐, 1 개 림프절, 2 개 태반, 1 개 소장, 3 개 비장, 1 개 갑상선), 67 개 암 조직(1 개 담관암, 5 개 뇌암, 2 개 유방암, 2 개 식도암, 2 개 담낭암, 4 개 신장암, 7 개 백혈구성 백혈병 암, 3 개 간암, 16 개 폐암, 5 개 림프절암, 1 개 골수성 세포암, 9 개 난소암, 1 개 췌장암, 1 개 직장암, 5 개 피부암, 2 개 방광암, 1 개 자궁암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

도면11

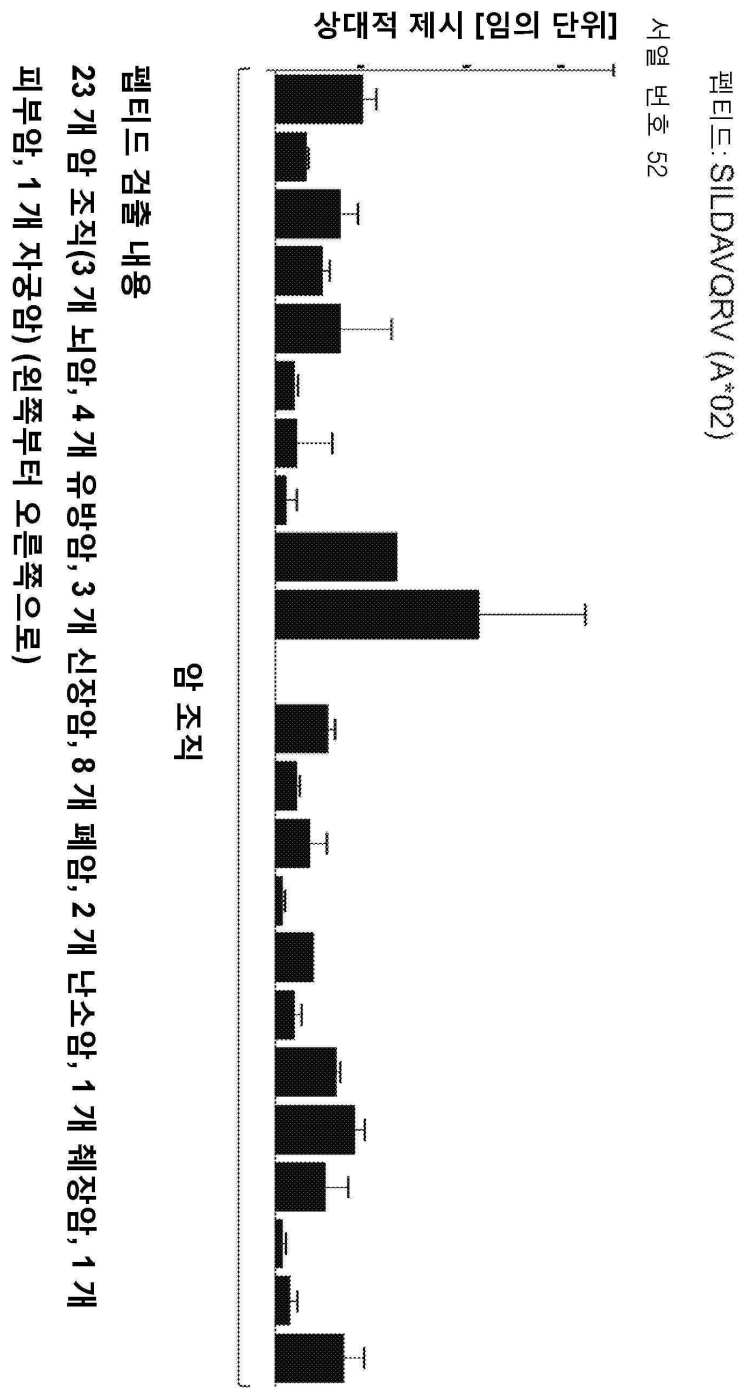
도면1j



펩티드 검출 내용

2 개 세포주(1 개 신장, 1 개 췌장), 1 개 정상 조직(1 개 폐), 19 개 암 조직(1 개 유방암, 2 개 신장암, 3 개 백혈구성 백혈병 암, 2 개 간암, 7 개 폐암, 1 개 림프절암, 1 개 난소암, 1 개 직장암, 1 개 방광암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

도면1k



펩티드 검출 내용

23 개 암 조직(3 개 뇌암, 4 개 유방암, 3 개 신장암, 8 개 폐암, 2 개 난소암, 1 개 췌장암, 1 개 피부암, 1 개 자궁암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

도면11

펩티드 검출 내용

11 개 세포주(11 개 췌장 세포주), 4 개 정상 조직(1 개 신장, 1 개 림프절, 1 개 태반, 1 개 기관), 36 개 암조직(1 개 담관암, 5 개 뇌암, 3 개 유방암, 4 개 결장암, 1 개 식도암, 3 개 신장암, 1 개 간암, 9 개 폐암, 1 개 림프절암, 1 개 난소암, 2 개 췌장암, 1 개 직장암, 2 개 피부암, 1 개 방광암, 1 개 자궁암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

도면1m

펩티드 검출 내용

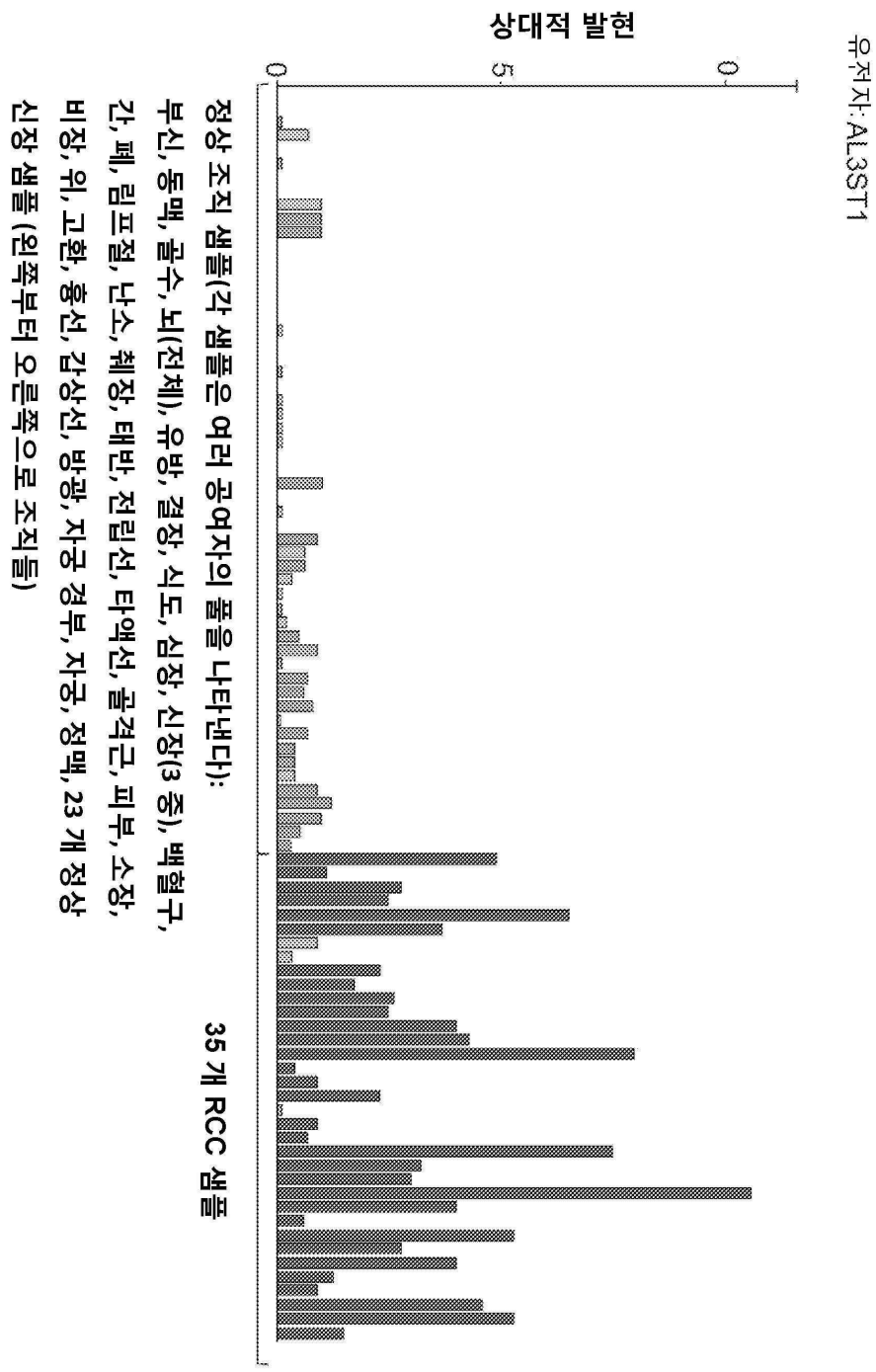
2 개 세포주(2 개 신장), 4 개 정상 조직(1 개 부신, 1 개 폐, 1 개 림프절, 1 개 태반), 27 개 암 조직(4 개 뇌암, 1 개 유방암, 1 개 식도암, 1 개 담낭암, 5 개 신장암, 1 개 백혈구성 백혈병 암, 5 개 간암, 12 개 폐암, 2 개 림프절암, 4 개 난소암, 3 개 전립선암, 2 개 피부암, 6 개 자궁암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

도면1n

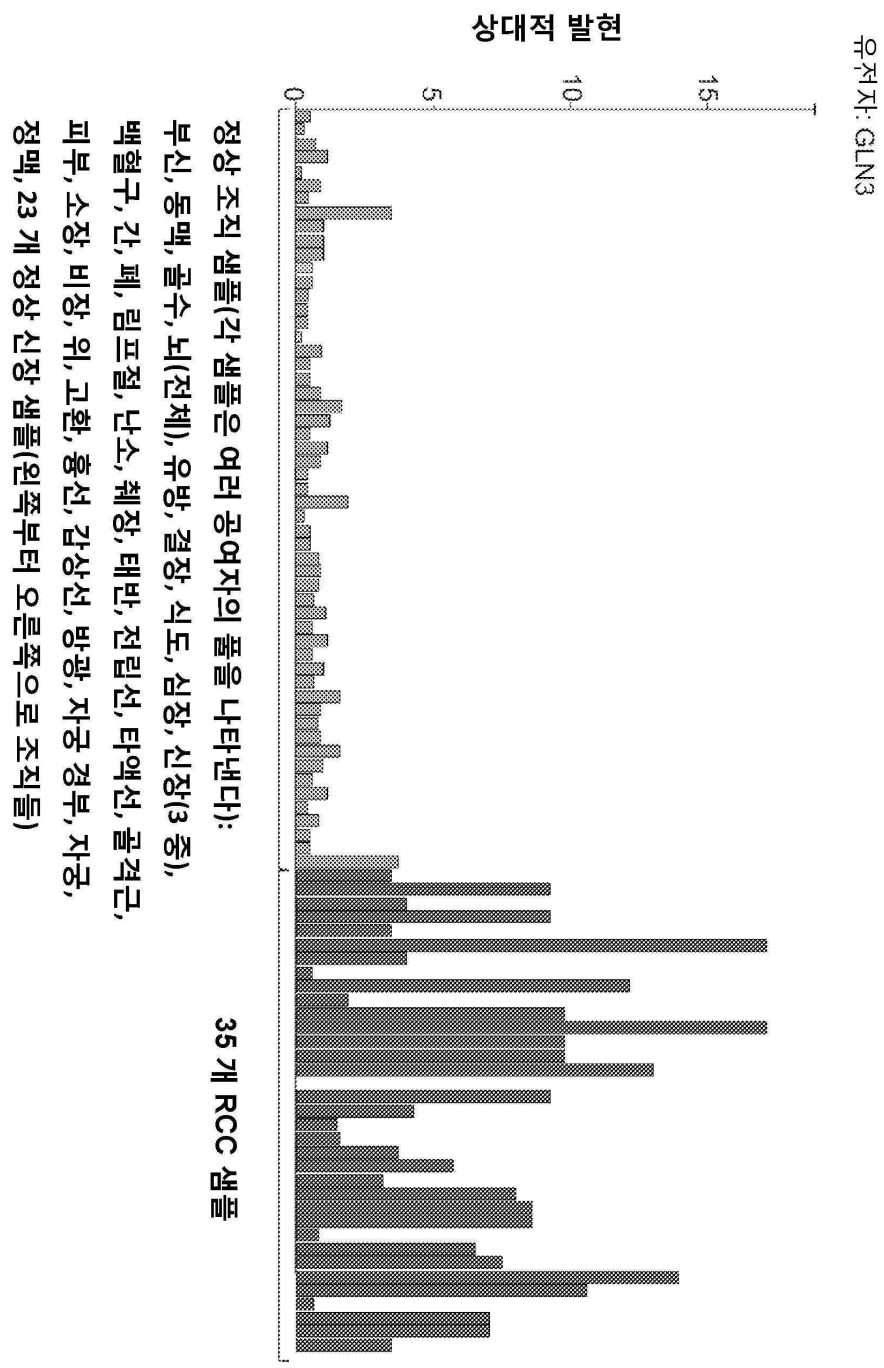
펩티드 검출 내용

1 개 세포주(1 개 혈액 세포), 29 개 암 조직(2 개 뇌암, 5 개 결장암, 3 개 신장암, 1 개 간암, 4 개 폐암, 2 개 림프절암, 3 개 난소암, 1 개 췌장암, 1 개 직장암, 6 개 피부암, 1 개 고환암) (왼쪽부터 오른쪽으로)

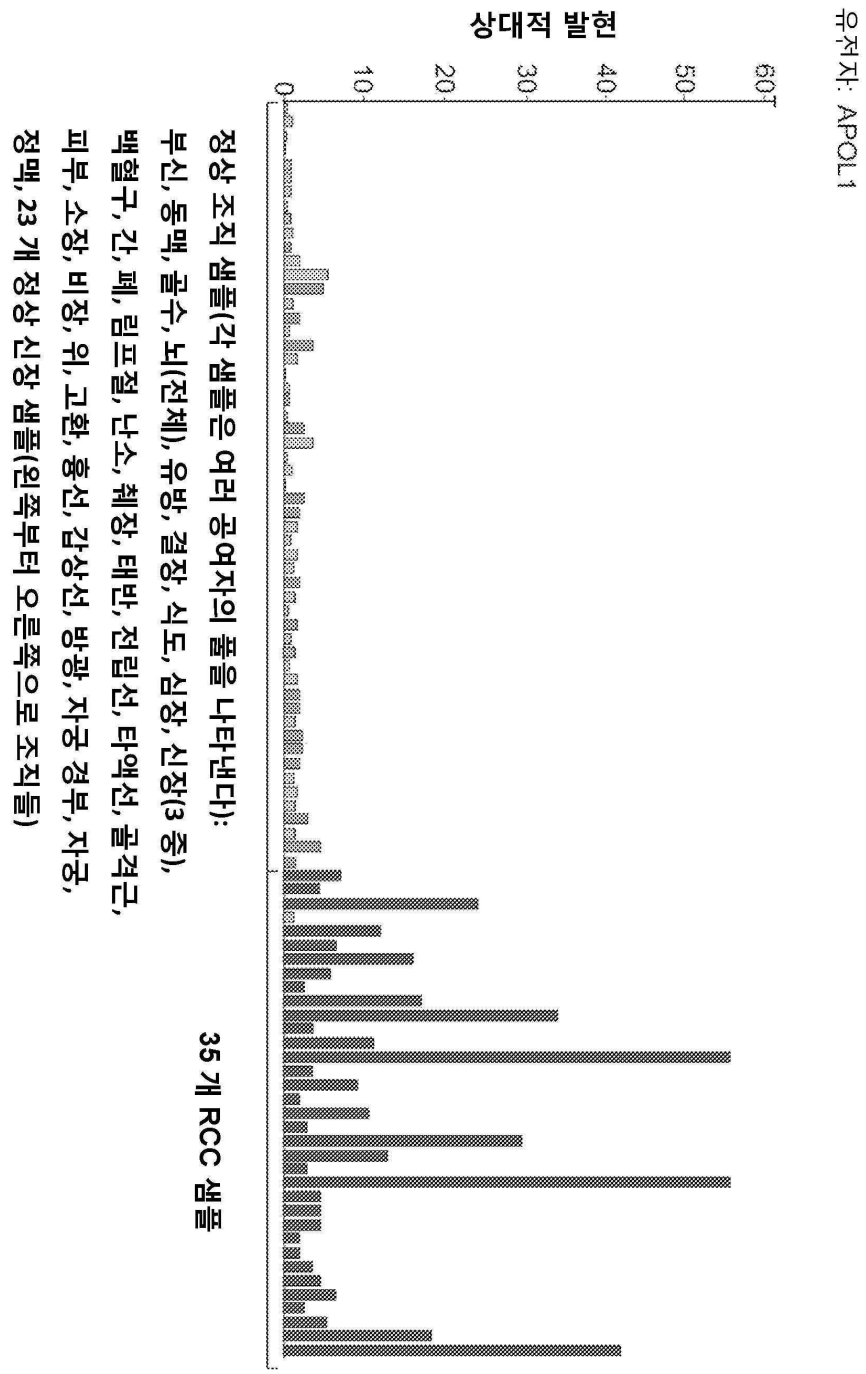
도면2a


유전자:AL3ST1
상대적 발현
0
5
0
35 개 RCC 샘플
정상 조직 샘플(각 샘플은 여러 공여자의 풀을 나타낸다):
부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(3 종), 백혈구,
간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 타액선, 골격근, 피부, 소장,
비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁, 정맥, 23 개 정상
신장 샘플 (왼쪽부터 오른쪽으로 조직들)

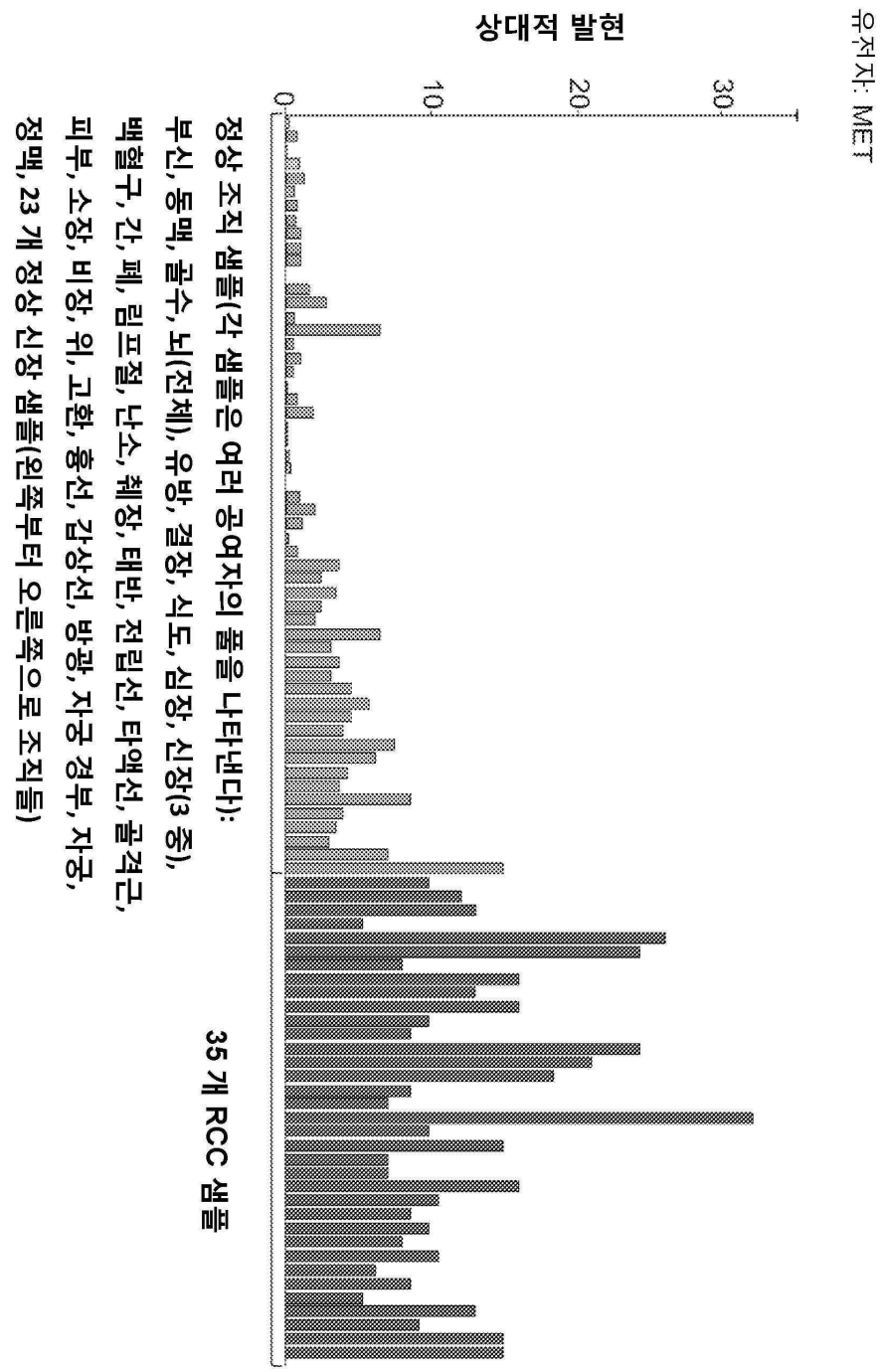
도면2b


유전자: GLN3
상대적 발현
0
5
10
15
35 개 RCC 샘플
정상 조직 샘플(각 샘플은 여러 공여자의 풀을 나타낸다):
부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(3 종),
백혈구, 간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 타액선, 골격근,
피부, 소장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁,
정맥, 23 개 정상 신장 샘플(왼쪽부터 오른쪽으로 조직들)

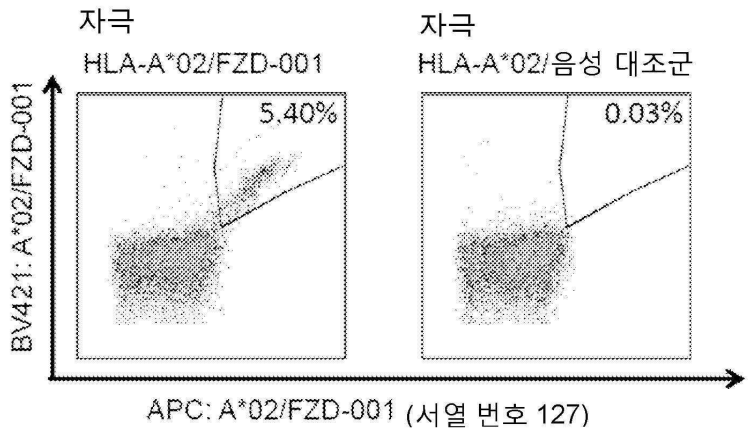
도면2c


유전자: APOL1
상대적 발현
0
10
20
30
40
50
60
35 개 RCC 샘플
정상 조직 샘플(각 샘플은 여러 공여자의 풀을 나타낸다):
부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(3 중),
백혈구, 간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 타액선, 골격근,
피부, 소장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁,
정맥, 23 개 정상 신장 샘플(왼쪽부터 오른쪽으로 조직들)

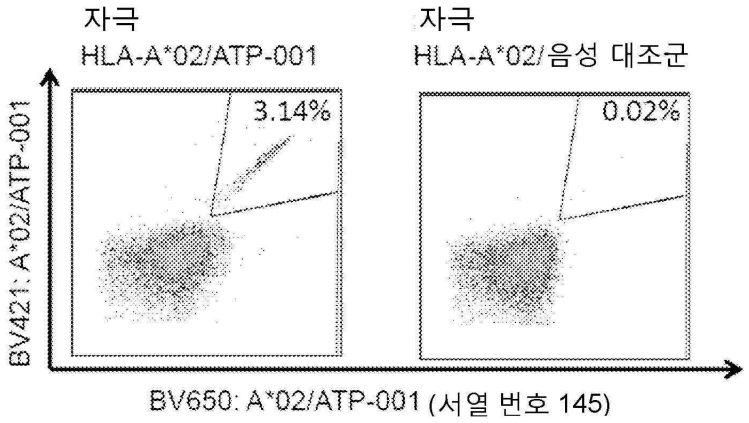
도면2d


유전자: MET
상대적 발현
0
10
20
30
35 개 RCC 샘플
정상 조직 샘플(각 샘플은 여러 공여자의 풀을 나타낸다):
부신, 동맥, 골수, 뇌(전체), 유방, 결장, 식도, 심장, 신장(3 종),
백혈구, 간, 폐, 림프절, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 타액선, 골격근,
피부, 소장, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 방광, 자궁 경부, 자궁,
정맥, 23 개 정상 신장 샘플(왼쪽부터 오른쪽으로 조직들)

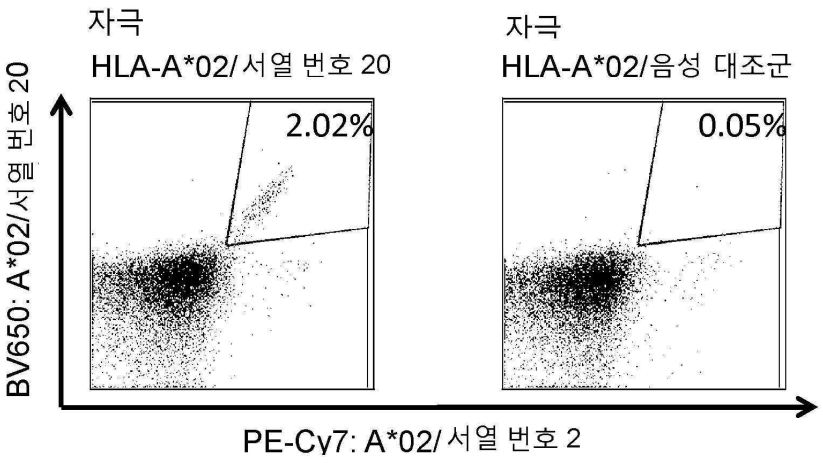
도면3a



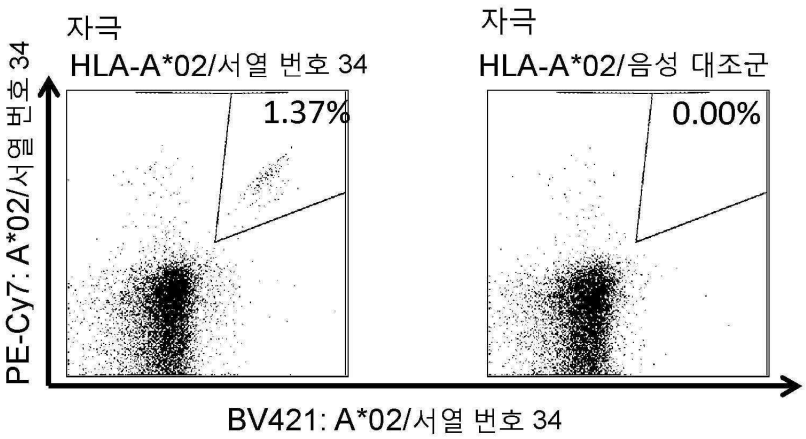
도면3b



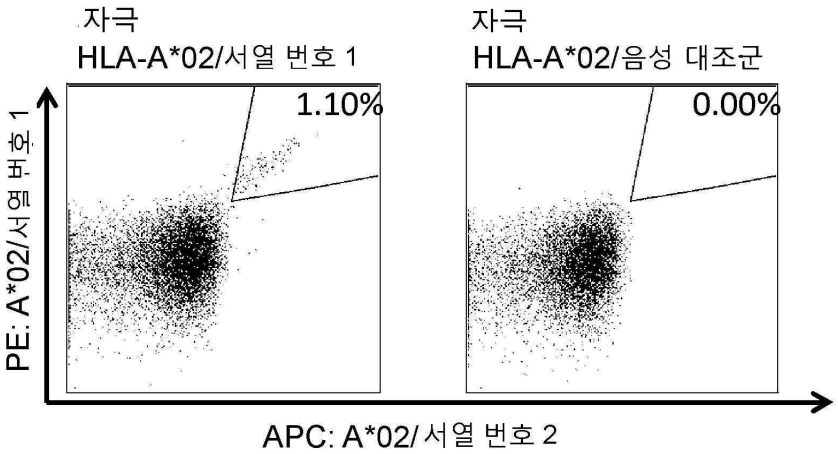
도면3c



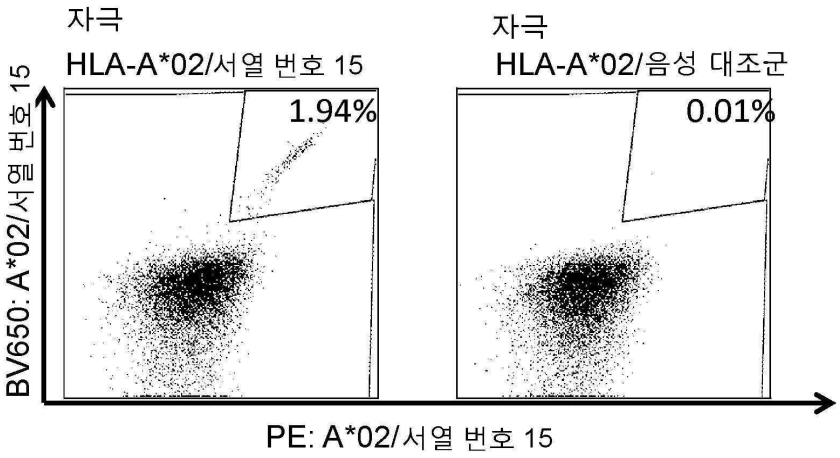
도면3d



도면3e



도면3f



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Immatics biotechnologies GmbH

<120> Novel peptides and combination of peptides and scaffolds for use in immunotherapy against Renal Cell Carcinoma (RCC) and other cancers

<130> IPA220560-DE

<140> PCT/EP2016/056601

<141> 2016-03-24

<150> GB 1505585.8

<151> 2015-03-31

<150> US 62/140,767

<151> 2015-03-31

<160> 153

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Leu Ile Val Ser Leu Pro Tyr Leu

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Leu Trp Arg Glu Val Val Thr Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Leu Leu Gly Glu Val Gln Ala Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Leu Ser Gln Asp Ile Ile Thr Val

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Leu Tyr Pro Asn Leu Thr Arg Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Leu Phe Glu Leu Ser Lys Thr Val

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Phe Leu Leu Ser Leu Ile Asp Arg Leu

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Leu Ala Ser Phe Lys Ser Phe Leu

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Leu Leu Gln Lys Pro Asp Ser Val

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Lys Leu Leu Gln Asn Asn Tyr Gly Leu

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Phe Ile Gln Thr Glu Ala Pro Lys Glu Val

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Ile Met Ala Gln Ile Leu Thr Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Leu Leu Thr Glu Thr Ile Phe Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Leu Ile Lys His Leu Val Lys Val

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Phe Met Pro Glu Glu Leu Pro Gln Leu

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ile Leu Ala Gln Gln Val His Ala Leu

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Val Leu Asp Leu Ala Ala Lys Val

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Leu Asp Pro Gly Ser Leu Gln Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Val Ala Asn Thr Thr Phe Thr Val

1 5

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Leu Ile Gln Gly Asp Gln Ile Leu Ser Val

1 5 10

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Phe Leu Ser Pro Pro Leu Pro Ser Val

1 5

<210> 23

<211

> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Ile Gln Glu Val Val Gln Tyr Ile

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Phe Thr Leu Gly Thr Thr Val Phe Leu

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Leu Val Pro Ala His Leu Val Ala Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Leu Met Glu Ile Leu Tyr Thr Leu

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ser Leu Ser Asp Leu Leu Val Ser Leu

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Phe Ile Ala Asp Leu Val Val Gly Leu

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ile Leu Leu Asp Leu Glu Gln Ala Leu

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Leu Phe Tyr Thr Lys Ile Phe Leu

1 5

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Leu Phe Gly Leu Asp Pro Ala Val Ile Lys Val

1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Phe Leu Ala Gly Gly Ile Arg Gly Ser Gly Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Ile

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Glu Leu Asn Asn Gln Asn Phe Tyr Leu

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Leu His Ser Leu Gln Thr Gln Leu

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Leu Phe Gly Lys Lys Tyr Ile Leu

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Val Leu Ala Pro Val Ile Leu Met Leu

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Val Leu Leu Asp Thr Ile Leu Gln Leu

1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Tyr Leu Leu Asn Leu Asn His Leu Gly Leu

1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

40

Tyr Ile Gln Glu His Leu Leu Gln Ile

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Leu Leu Lys Thr Leu Gln Lys Leu

1 5

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Val Ile Leu Asp Thr Gly Thr Ile Gln Leu

1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Tyr Leu Lys Asp Glu Leu Asp Glu Leu

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Leu Phe Ser Phe Val Thr Ala Leu

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Thr Leu

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Leu Ser Glu Val Leu Val Gln Ile

1 5

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Thr Leu Ala Glu Val Arg Ala Val Gln Glu Ile

1 5 10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Val Val Ala Ser Asn Ile Met Glu Val

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Val Leu Ile Val Glu Val Pro Gly Val

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Leu Ser Asp His Ile Val Leu Leu

1 5

<210> 51

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Asn Leu Trp Pro Met Ile Leu Thr Leu

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ser Ile Leu Asp Ala Val Gln Arg Val

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Phe Leu Leu Glu Ile Arg Gln Thr Leu

1 5

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Leu Val Ala Lys Gly Leu Val Gln Ala

1 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Tyr Leu Ala Leu Ile Leu Pro Val Leu

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ile Leu Met Asp Phe Ser Asn Ser Met

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ser Leu Gln Lys Glu Ile Leu Tyr Leu

1 5

<210> 58

<211> 10

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Phe Leu Val Asp Phe Glu Gln Ser His Leu

1 5 10

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ile Leu Trp Lys Asp Ile Glu Tyr Val

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ser Leu Met Gly Ile Leu Leu Arg Ile

1 5

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Val Leu Ala Gly Pro Ala Phe Leu Val Gln Leu

1 5 10

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Leu Ile Glu Asp His Phe Asp Val Thr Val

1 5 10

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Leu Ala Ala Ser Val Ala Leu Ala

1 5

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Val Thr Gly Ala

1 5 10

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Leu Leu Lys Thr Ile Ile Lys Val

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

68

Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ile Leu Ala Asp Leu Leu Pro Ser Leu

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Ser Leu Thr Ala Leu Arg Leu Leu Leu

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Ala Leu Asp Gly His Leu Tyr Ala Val

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Ser Leu Glu Lys Val Phe Gly Ile

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Gly Leu Asp Gly Ile Pro Phe Thr Val

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Leu Phe His Lys Gln Val Thr Val

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Phe Leu Ile Lys Ser Ile Asn Leu Val

1 5

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Val Leu Ala Asp Asp His Leu Ile Glu Val

1 5 10

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Leu Ile Lys His Lys Ile Met Leu

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Ala Leu Leu Asp Thr Val Val Gln Ala

1 5

<210> 79

<211> 9

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Leu Ala Asp Ile Val Trp Arg Ala

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Lys Leu Ala Ser Met Leu Glu Thr Leu

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Lys Leu

1 5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Ser Leu Leu Gln Ala Thr Asp Phe Met Ser Leu

1 5 10

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Ile Gln Trp Ser Ile Val Pro Glu Val

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Tyr Leu Met Asp Glu Gly Ala His Leu

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Phe Val Met Ser Glu Ile Arg Thr Val

1 5

<210> 86

<211> 10

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Gly Leu Leu Gln Gly Lys Leu Ala Leu Leu

1 5 10

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Thr Leu Ala Glu Leu His Ile Ser Leu

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Ser Leu Leu Leu Ala Val Thr Glu Val

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Thr Leu Glu Lys Asn Phe Val Ile

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Met Leu Leu Ser Ser Leu Val Ser Leu

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Phe Leu Phe Arg Asp Ile Leu Glu Leu

1 5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gly Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val

1 5 10

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Ile Leu His His Lys Val Tyr Asp Leu

1 5

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Lys Leu Thr Asp Val Gly Ile Ala Thr Leu

1 5 10

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Thr Leu Ala Glu Thr Leu Val Asn Leu

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Thr Leu Ile Ser Glu Leu Val Gln Ala

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Lys Ile Pro Pro Val Ser Pro Ser Ile

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Gly Leu Ala Pro His Leu Glu Gln Ile

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Lys Leu Asn Val Ala Pro Leu Ala Val

1 5

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val

1 5 10

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Leu Leu Phe Asp Val His Thr Thr Leu

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Lys Leu Gln Asp Gly Leu Leu His Ile

1 5

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Ala Leu Phe Glu Gly Val Val Arg Gln Ile

1 5 10

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Leu Ala Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala

1 5 10

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Val Leu Met Asp Leu Lys Ala Leu Leu

1 5

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Val Leu Met Asp Leu Lys Ala Leu Leu Leu

1 5 10

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Val Leu Ile Ser Val Leu Gln Ala Ile

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Tyr Leu Trp Ser Arg Val Glu Lys Leu

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Leu Leu Asp Leu His Ser Tyr Leu Leu

1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Thr Leu Leu Glu Thr Glu Met Leu Leu

1 5

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Leu Leu Phe Asp His Leu Glu Pro Ile Glu Leu

1 5 10

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Ser Leu Phe Asp Trp Asn Val Lys Leu

1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Ala Leu Ala Val Asn Ile Ser Ala Ala

1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu

1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu

1 5

<210> 117

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu

1 5

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu

1 5

<210> 119

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu

1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Gly Leu Ala Gly Asp Asn Ile Tyr Leu

1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Ser Leu Asp Pro Ser Ser Pro Gln Val

1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile

1 5

<210> 124

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Ile Leu Ser Pro Leu Ser Val Ala Leu

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Lys Leu Asp Pro Thr Lys Thr Thr Leu

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu

1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Tyr Leu Glu Glu Asp Val Tyr Gln Leu

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala

1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Ala Leu Pro Thr Val Leu Val Gly Val

1 5

<210> 131

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu

1 5

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Val Val Asp Glu Gly Pro Thr Gly Val

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val

1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Ser Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val

1 5

<210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Ile Leu Asn Val Asp Gly Leu Ile Gly Val

1 5 10

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser Val

1 5

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Leu Leu Val Asp Asp Ser Phe Leu His Thr Val

1 5 10

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val

1 5

<210> 143

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 144

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Arg Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val

1 5 10

<

210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val

1 5

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Lys Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu

1 5 10

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Ala Leu Ala Asp Lys Glu Leu Leu Pro Ser Val

1 5 10

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala

1 5

<210> 149

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Ser Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val

1 5 10

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Thr Leu Met Pro Asn Ile Asn Lys Leu

1 5

<210> 151

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Arg Ile

1 5 10

<210> 152

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1 5