(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0117112
(43) 공개일자 2011년10월26일

(51) Int. Cl.
C07K 7/06 (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7017449
(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년12월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2011년07월25일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/006944
(87) 국제공개번호 WO 2010/073551
국제공개일자 2010년07월01일
(30) 우선권주장
61/145,912 2009년01월20일 미국(US)
JP-P-2008-327358 2008년12월24일 일본(JP)

(71) 출원인
온코세라피 사이언스 가부시키가이샤
일본, 가나가와 213-0012, 가와사키시, 다카쯔구, 사카도 3쵸메 2-1
(72) 발명자
츠노다 타쿠야
일본국 213-0012 가나가와 가와사키시 다카쯔구 사카도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이샤 나이
오사와 류지
일본국 213-0012 가나가와 가와사키시 다카쯔구 사카도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) C10RF59 펩티드 및 이를 포함하는 백신

(57) 요 약

본 발명은 HLA항원에 결합하고 CTL(cytotoxic T lymphocyte , CTL)유도성을 가지는 서열번호 43의 아미노산 서열을 가진 분리된 펩티드 또는 그것의 면역학적 활성 단편을 제공한다. 또한 본 발명은 변경된 펩티드가 원래의 CTL 유도성을 유지하는 한, 한 개, 두 개 또는 복수의 앞서 언급한 아미노산이 삽입, 치환 또는 첨가된 펩티드 또는 단편을 포함한다. 또한, 이러한 상기 펩티드 중 어느 것을 암호화하는 핵산 및 상기 펩티드 및 핵산 중 어느 것을 포함하는 약학적 약제 및 조성물을 제공한다. 상기 펩티드, 핵산, 약학적 약제 및 조성물은 암 또는 종양을 치료하는데 쓰일 수 있다.

(72) 발명자

요시무라 사치코

일본국 213-0012 가나가와 가와사키시 다카쯔구 사카도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이샤 나이

와타나베 토모히사

일본국 213-0012 가나가와 가와사키시 다카쯔구 사카도 3쵸메 2-1 온코세라피 사이언스 가부시키가이샤 나이

특허청구의 범위

청구항 1

HLA항원에 결합하고 CTL 유도성을 가지며, 서열번호 43의 아미노산 서열로 구성되거나 또는 이의 면역학적 활성 단편인 분리된 펩티드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 HLA 항원이 HLA-A02인 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에서, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17 및 20으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 4

제 1항 내지 3항 중 어느 한 항에 있어서, 노나펩티드(nonapeptide) 또는 데카펩티드(decapeptide)인 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 5

제 4항에 있어서, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17 및 20으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열로 구성되며, 한 개, 두 개 또는 복수의 아미노산이 삽입, 치환, 결실 또는 첨가된 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 6

하기 특성 중 하나 또는 모두를 가지는 제 5항의 펩티드:

(a) N-말단으로부터 두번째 아미노산이 루신(leucine) 및 메티오닌(methionine)의 군으로부터 선택되는 것; 및

(b) C-말단으로부터 아미노산이 발린(valine) 및 루신(leucine)의 군으로부터 선택되는 것.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 HLA 항원이 HLA-A24인 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 8

제 1항 또는 제 7항에 있어서, 서열번호 26, 32, 34, 40 및 41로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항에 있어서, 노나펩티드 또는 데카펩티드인 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 10

제 9항에 있어서, 서열번호 26, 32, 34, 40 및 41로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하며, 한 개, 두 개 또는 복수의 아미노산이 삽입, 치환, 결실 또는 첨가된 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 11

하기 특성 중 하나 또는 두 개를 가지는 제 9항의 펩티드:

(a) N-말단에서 두번째 아미노산이 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 메티오닌 및 트립토판(tryptophan)의 군으로 부터 선택되는 것; 및

(b) C-말단 아미노산이 페닐알라닌, 루신, 이소루신(isoleucine), 트립토판, 및 메티오닌의 군으로 부터 선택되는 것.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 13

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 하나 또는 그 이상의 펩티드, 또는 제 12항의 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 CTL 유도용 조성물.

청구항 14

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 하나 또는 그 이상의 펩티드, 또는 제 12항의 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 암 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 암 재발 방지용 약학적 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서, HLA 항원이 HLA-A02 또는 A24인 개체에 투여하기 위해 조성된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 16

제 14항 또는 제 15항에 있어서, 암 치료를 위해 조성된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 17

하기 단계 중 하나를 포함하는, CTL 유도성을 가지는 APCs(an antigen-presenting cell, APC) 유도 방법:

(a) 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 펩티드와 APCs를 시험관 내, 체외, 생체 내에서 접촉하는 단계; 및

(b) 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APCs 내로 도입하는 단계.

청구항 18

하기 단계 중 적어도 하나를 포함하는 CTL 유도 방법:

(a) CD8-양성 T 세포를 HLA 항원과 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 펩티드의 복합체를 그것의 표면에 제시하는 APCs와 공배양하는 단계;

(b) CD8-양성 T 세포를 HLA 항원과 제 1항 내지 제 11항에 중 어느 한 항의 펩티드의 복합체를 그것의 표면에 제시하는 엑소솜과 공배양하는 단계; 및

(c) 제 1항 내지 제 11항에 중 어느 한 항의 펩티드에 결합하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 아단위(subunit) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 T세포로 도입하는 단계.

청구항 19

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 펩티드와 HLA 항원 복합체를 그것의 표면에 제시하는 APCs.

청구항 20

제 19항에 있어서, 제 17항의 방법으로 유도된 것을 특징으로 하는 APCs.

청구항 21

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 펩티드를 표적으로 하는 분리된 CTL.

청구항 22

제 21항에 있어서, 제 18항의 방법으로 유도된 것을 특징으로 하는 CTL.

청구항 23

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 펩티드, 이의 면역학적 활성 단편, 상기 펩티드 또는 상기 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암에 대한 면역 반응 유도 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2008년 12월 24일에 출원된 일본 특허출원 제 2008-327358호에 대한 우선권을 주장하고, 2009년 1월 20일에 출원된 미국 가출원 제 61/145,912호에 대한 우선권을 주장하며, 전체 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0002] 본 발명은 생물과학 분야, 보다 구체적으로 암 치료 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 암 백신, 및 종양의 치료 및 예방을 위한 약물로 매우 효과적인 신규한 펩티드에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] CD8 양성 세포독성 T 림프구(CD8 positive cytotoxic T lymphocytes, CTLs)는 주조직적합성복합체(major histocompatibility complex, MHC) 클래스 I 분자에 존재하는 종양관련 항원(tumor-associated antigens, TAA)에서 유래한 에피토프 펩티드(epitope peptide)를 인지한 후, 종양세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있다. TAA의 첫 번째 예로 흑색종 항원(melanoma antigen, MAGE) 패밀리의 발견 이후, 다른 많은 TAA가 면역학적 접근을 통해 발견되었다. (NPL 1: Boon T, *Int J Cancer* 1993 May 8, 54(2): 177-80; NPL 2: Boon T & van der Bruggen P, *J Exp Med* 1996 Mar 1, 183(3): 725-9), 상기 TAA 중 일부는 현재 면역치료의 표적으로서 임상 개발 과정에 있다.

[0004] 강력하고 특이적인 항종양 면역반응을 유도하는 새로운 TAA를 동정함으로써, 다양한 종류의 암에서 펩티드 백신 전략의 임상적인 응용의 무궁한 발전이 보장된다(NPL 3: Harris CC, *J Natl Cancer Inst* 1999 Oct 16, 88(20): 1442-55; NPL 4: Butterfield LH et al, *Cancer Res* 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; NPL 5: Vissers JL et al, *Cancer Res* 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; NPL 6: Van der Burg SH et al, *J Immunol* 1996 May 1, 156(9): 3308-14; NPL 7: Tanaka F et al, *Cancer Res* 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; NPL 8: Fujie T et al, *Int J Cancer* 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; NPL 9: Kikuchi M et al, *Int J Cancer* 1999 May 5, 81(3): 459-66; NPL 10: Oiso M et al, *Int J Cancer* 1999 May 5, 81(3): 387-94). 현재까지, 이러한 종양관련 항원 유래 펩티드를 이용한 몇몇의 임상 실험이 보고되고 있다(NPL 11: Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; NPL 12: Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; NPL 13: Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15).

[0005] Chromosome 1 open reading frame 59(C1orf59)는 Mammalian Gene Collection(MGC)의 cDNA 라이브러리 스크리닝(cDNA library screening)을 통해 확인되었다(NPL 14: MGC Program Team, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24; 99(26):16899-903). 그러나, C1orf59가 종양 환자에 대한 암 면역치료의 표적으로 쓰일 수 있는지 여부는 확인되지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) [NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80

(비특허문헌 0002) [NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

(비특허문헌 0003) [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55

(비특허문헌 0004) [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42

(비특허문헌 0005) [NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

(비특허문헌 0006) [NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14

(비특허문헌 0007) [NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8

(비특허문헌 0008) [NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72

(비특허문헌 0009) [NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66

(비특허문헌 0010) [NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94

(비특허문헌 0011) [NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80

(비특허문헌 0012) [NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42

(비특허문헌 0013) [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15

(비특허문헌 0014) [NPL 14] MGC Program Team, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24; 99(26):16899-903

도면의 간단한 설명

[0006] 본 발명의 다양한 측면 및 적용은 도면의 간단한 설명의 고려시 당업자에게 자명할 것이며, 본 발명의 상세한 설명과 하기의 그것의 바람직한 실시태양은 하기와 같다.

[도 1] 도 1은 C1orf59 유래 펩티드로 유도된 CTL에 대한 IFN-gamma ELISPOT 분석의 결과를 나타내는 일련의 사진 (a)-(j)를 포함한다. C1orf59-A02-9-261(서열번호 1)로 자극된 6번 웰의 CTL (a), C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3)로 자극된 2번 및 7번 웰의 CTL (b), C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4)로 자극된 4번 및 6번 웰의 CTL (c), C1orf59-A02-9-122 (서열번호 7)로 자극된 3번 웰의 CTL (d), C1orf59-A02-10-240(서열번호 9)로 자극된 5번 웰의 CTL (e), C1orf59-A02-10-90 (서열번호 13)로 자극된 5번 웰의 CTL (f), C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15) 로 자극된 7번 웰의 CTL (g), C1orf59-A02-10-122 (서열번호 17)로 자극된 4번 및 8번 웰의 CTL (h), 및 C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20)로 자극된 2번 웰의 CTL (i)은 각각 대조군에 비하여 강력한 IFN-gamma 생산을 보였다. 사각형 박스 안에 나타낸 웰의 세포는 CTL 세포주를 확립하기 위해 증식되었다. 반면, 음성 데이타의 전형적인 예로서, C1orf59-A02-10-261 (서열번호 8)로 자극한 CTL (j)에 대해 IFN-gamma 특이적 생산이 발견되지 않았다. 도면에서, "+"는 적절한 펩티드로 자극한 표적세포에 대한 IFN-gamma 생산을 나타내며, "-"는 어떠한 펩티드로도 자극하지 않은 표적세포에 대한 IFN-gamma 생산을 나타낸다.

[도 2] 도 2는 C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3) (a), C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4) (b), C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15) (c), C1orf59-A02-10-122 (서열번호 17) (d) 및 C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20) (e)로 자극한 CTL 세포주의 IFN- gamma 생산을 IFN-gamma ELISA로 분석하여 나타낸 선 그래프 (a)-(e)를 포함한다. 각 펩티드로 자극하여 확립된 CTL 세포주는 대조군에 비해 강력한 IFN-gamma 생산을 보였다. 도면에서, "+"는 적절한 펩티드로 자극한 표적 세포에 대한 IFN-gamma 생산을 나타내고, "-"는 어떠한 펩티드로 자극하지 않은 표적세포에 대한 IFN-gamma 생산을 나타낸다.

[도 3] 도 3은 C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4) (a), C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15) (b) 및 C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20) (c)로 자극한 CTL 세포주 유래 제한된 희석으로 수립한 CTL 클론(clones)의 IFN-gamma 생산을 나타낸다. 본 문서에 나타낸 결과는 각 펩티드로 자극하여 수립한 CTL 클론이 대조군에 비해 강력한 IFN-gamma 생산을 보이는 것을 증명한다. 도면에서, "+"는 적절한 펩티드로 자극한 표적 세포에 대한 IFN-gamma 생산을 나타낸다. "-"는 어떠한 펩티드로 자극하지 않은 표적세포에 대한 IFN-gamma 생산을 나타낸다.

[도 4] 도 4는 외생적으로 C1orf59 및 HLA-A*0201를 발현하는 표적 세포에 대해 특이적 CTL 활성을 나타내는 선 그래프 (a)-(c)를 포함한다. HLA-A*0201 또는 전장의 C1orf59 유전자로 형질전환된 COS7 세포는 대조군으로 제조되었다. C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3) (a), C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4) (b) 및 C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15) (c)로 수립된 CTL 세포주는 C1orf59 및 HLA-A*0201(검정 마름모꼴) 모두를 형질전환한 COS7 세포에 대해 특이적 CTL 활성을 보였다. 반면, HLA-A*0201 (삼각형) 또는 C1orf59 (원형) 중 어느 것인가를 발현하는 표적 세포에 대한 유의적인 특이적 CTL 활성은 확인되지 않았다.

[도 5] 도 5는 C1orf59 유래 펩티드로 유도된 CTL에 대한 분석에 대한 IFN-gamma ELISPOT 결과를 나타내는 그림이다. C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26)로 자극한 5번 웰의 CTL (a), C1orf59-A24-9-66 (서열번호 32)로 자극한 3번 웰의 CTL (b), C1orf59-A24-9-200 (서열번호 34) 로 자극한 4번 웰의 CTL (c), C1orf59-A24-10-124 (서열번호 40)로 자극한 5번 웰의 CTL (d) 및 C1orf59-A24-10-363 (서열번호 41)로 자극한 7번 웰의 CTL (e)은 각각 대조군에 비해 강력한 IFN-gamma 생산을 보였다. 이들 사진 중 사각형이 있는 웰은 CTL 세포주를 수립하기 위해 증식된 상응하는 웰 유래 세포를 나타낸다. 도면에서, "+"는 적절한 펩티드로 자극한 웰에 있는 세포를 나타내고, "-"는 어떠한 펩티드로 자극하지 않은 세포를 나타낸다.

[도 6] 도 6은 ELISA를 통해 C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26) (a), C1orf59-A24-9-66 (서열번호 32) (b), C1orf59-A24-9-200 (서열번호 34) (c), C1orf59-A24-10-124 (서열번호 40) (d) 및 C1orf59-A24-10-363 (서열번호 41) (e)로 자극된 CTL 세포주의 IFN-gamma 생산을 나타내는 선 그래프를 나타낸다. 각 펩티드의 자극에 의해 수립된 CTL 세포주가 대조군에 비해 강력한 IFN-gamma 생산을 보이는 것을 증명하였다. 도면에서, "+"는 적절한 펩티드로 자극한 세포를 나타내고, "-"는 어떠한 펩티드로도 자극되지 않은 세포를 나타낸다.

[도 7] 도 7은 C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26) (a 및 b), C1orf59-A24-9-66 (서열번호 32) (c), C1orf59-A24-9-200 (서열번호 34) (d), C1orf59-A24-10-124 (서열번호 40) (e) 및 C1orf59-A24-10-363 (서열번호 41) (f)로 자극한 CTL 세포주로 부터 제한 희석함으로써 수립된 CTL 클론의 IFN-gamma 생산을 나타낸다. 이러한 펩티드로 수립된 CTL 클론이 대조군에 비해 강력한 IFN-gamma 생산을 나타내는 것을 증명하였다. 도면에서, "+"는 서열번호 26 (a 및 b), 서열번호 32 (c), 서열번호 34 (d), 서열번호 40 (e) 및 서열번호 41 (f)로 자극된

세포들을 나타내며, "-"는 어떠한 펩티드로도 자극하지 않은 세포를 나타낸다.

[도 8] 도 8은 C1orf59 및 HLA-A*2402를 발현하는 표적세포에 대해 특이적 CTL 활성을 나타내는 선 그래프를 나타낸다. HLA-A*2402만 또는 전장의 C1orf59 유전자만 형질 전환된 COS7 세포가 대조군으로 제조되었다. C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26)로 수립된 CTL 클론은 C1orf59 및 HLA-A*2402(검정 마름모꼴) 둘다 형질전환된 COS7 세포에 대해 특이적 CTL활성을 보였다. 반면에, HLA-A*2402 (세모꼴) 또는 C1orf59 (원형) 어느 하나를 발현하는 표적세포에 대해 유의적인 특이적 CTL 활성이 발견되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007] **발명의 개요**

[0008] 본 발명은 면역치료의 적합한 표적의 발견에 대한 부분에 기초한다. TAA는 일반적으로 면역계에 대한 "자기"로 인지되어 종종 면역원성이 없기 때문에 적절한 표적의 발견은 중요하다. 상기 언급한 바와 같이 C1orf59(GenBank Accession No. NM_144584 (서열번호 42)의 유전자에 의해 암호화되는 서열번호 43)는 방광암(bladder cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 결장암(colorectal cancer), 식도암(esophagus cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer) 및 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)과 같은 암조직에서 과발현하는 것으로 확인되었다. 따라서 C1orf59는 면역치료의 후보 표적이다.

[0009] 본 발명은 C1orf59에 특이적인 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes, CTL)을 유도하는 능력을 가지는, C1orf59의 특이적 에피토프 단백질의 확인에 대한 최소한의 부분에 기초한다. 아래 기재한 것과 같이, 자극된 건강한 공여자로부터 수득된 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)는 C1orf59 유래 후보 단백질에 결합하는 HLA-A*0201 또는 HLA-A*2402로 자극되었다. 그런 다음, 각 후보 펩티드에 의해 자극된 HLA-A02 또는 A24 양성 표적 세포에 대해 특이적 세포독성을 갖는 CTL 세포주가 확립되었다. 이러한 결과는 이러한 펩티드가 C1orf59를 발현하는 세포에 대해 강력하고 특이적 면역반응을 유도할 수 있는 HLA-A02 또는 A24에 제한적인 에피토프 펩티드임을 증명한다. 이러한 결과는 C1orf59는 강한 면역성을 가지며 그것의 에피토프는 종양 면역치료에 효과적인 표적임을 증명한다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 C1orf59 (서열번호 43)에서 유래 분리된 펩티드또는 HLA 항원에 결합하는 이의 면역학적 활성 단편을 제공하는 것이다. 본 발명의 펩티드는 CTL 유도성을 갖는 것으로 예상된다. 그들은 체외에서 CTL을 유도하는데 사용하거나 또는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암과 같은 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 개체에 투여될 수 있다. 바람직하게는, 상기 펩티드들은 일반적으로 노나펩티드(nonapeptides) 또는 데카펩티드(decapeptides)이며, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17, 20, 26, 32, 34, 40 및 41의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되며, 강한 CTL 유도성을 보인다.

[0011] 본 발명은 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17, 20, 26, 32, 34, 40 및 41의 아미노산 서열을 가지는 변형된 펩티드에 관한것이고, 원래의 CTL 유도성을 유지하는 한 이 중, 한 개, 두 개 또는 복수의 아미노산이 치환 또는 첨가 될 수 있다.

[0012] 또한 본 발명은 본 발명의 펩티드 중 어느 것을 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드(polynucleotides)를 제공한다. 본 발명의 펩티드뿐만 아니라 이러한 폴리뉴클레오티드는 CTL 유도성이 있는 항원 제시 세포(antigen-expressing cells, APC)를 유도하기 위해 사용되거나 또는 암 및 본 발명의 펩티드에 대한 면역반응을 유도하기 위해, 개체에 투여될 수 있다.

[0013] 개체에 투여하였을 경우, 본 발명의 펩티드는 APCs의 표면에 제시되고, 그 후 각각의 펩티드를 표적으로 하는 CTL을 유도한다. 따라서, 본 발명의 하나의 측면은 CTL을 유도하는 본 발명의 임의의 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공하기 위한 것이다. 또한, 상기 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 중 어느 것을 포함하는 약제는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암과 같은 암의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발 예방에 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 또다른 목적은 암의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발을 예방하기 위한, 본 발명의 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 중 어느 것을 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다. 상기 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드에 대신 또는 추가하여, 상기 조성물 또는 약학적 조성물은 본 발명의 펩티드 중 어느 것을

제시하는 APCs 또는 엑소솜을, 유효 성분으로서 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 상기 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 HLA항원 및 본 발명의 펩티드의 복합체를 그것의 표면에 제시하는 APCs를 유도하는데, 예를 들면, 본 발명의 펩티드에 개체 유래 APCs를 접촉함으로써 또는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 APCs로 도입함으로써 사용될 수 있다. 이러한 APCs는 표적 펩티드에 대하여 높은 CTL 유도성을 가지며, 암 면역치료에 대해 유용하다. 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 수득된 APCs 뿐만 아니라 CTL유도성으로 APCs를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 CD8 양성 세포와 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜을 공배양하는 단계 또는 본 발명의 펩티드에 결합하는 T 세포 수용체 아단위(subunit)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 CTL을 유도하는 방법을 제공하는 것이다. 또한, 본 방법에 의해 획득할 수 있는 CTL은 C1orf59이 과발현하는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암와 같은 암의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 그러므로, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 획득가능한 CTL을 제공하는 것이다.

[0016] 또한, 본 발명의 다른 목적은 C1orf59 또는 이의 면역학적 활성 단편, 또는 C1orf59 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 C1orf59 또는 이의 단편을 발현하는 엑소솜 또는 APCs를 포함하는 약제 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 결장암, 전립선 암, 소세포폐암과 같은 암을 포함하는, C1orf59 과발현과 관련된 질환에 적용될 수 있다.

[0018] 상기 발명의 개요 및 하기의 상세한 설명은 모두 예시적인 실시태양이며, 본 발명 또는 본 발명의 다른 대체적인 실시태양에 한정하지 않는다.

[0019] 본 문서에 기재된 것들에 유사하거나 같은 어떤 방법 및 재료들이 본 발명의 실시태양의 수행 또는 시험에서 이용될 수 있지만, 바람직한 방법, 기구 및 재료를 하기에 기재하였다. 그러나, 본 재료 및 방법이 기재되기 이전에, 본 발명은 명세서에 기재된 특정 사이즈, 모양, 부피, 재료, 방법, 프로토콜 등에 한정되지 않으며, 이들은 통상적인 실험 및 최적화에 부합하여 변형될 수 있다. 또한 본 발명의 상세한 설명에서 사용되는 용어는 특정한 버전 또는 내용을 기술하기 위한 목적이나, 오직 첨부된 청구항으로 제한되는 본 발명의 범위로 제한하려는 의도는 아니다.

[0020] 본 명세서에서 언급된 공개, 특허 또는 특허 출원의 내용은 그 전체가 명세서에 참조로서 통합된다. 그러나, 본 명세서의 어느 것도 본 발명은 이전 발명으로 인하여 선행되는 문헌의 자격이 없다는 인정으로서, 만들어지지 않는다.

[0021] **I.정의**

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "a", "an", 및 "the"는 따로 명시되지 않는 한, "적어도 1개"를 의미한다.

[0023] 본 발명에서 호환적으로 사용되는 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 상기 용어는 1개 이상의 아미노산 잔기로 된 아미노산 중합체가 변형된 잔기, 또는 천연 아미노산 중합체뿐만 아니라 천연 아미노산에 대응하는 인공 화학 모방체와 같은 비천연 잔기에 적용된다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "아미노산"은 천연 아미노산과 합성 아미노산, 및 천연 아미노산과 마찬가지로 기능하는 아미노산 모방체(mimetic) 및 아미노산 유사체(analog)를 의미한다. 아미노산은 L-아미노산 또는 D-아미노산일 수 있다. 천연 아미노산은 유전 코드에 의해 암호화되는 아미노산 및 세포에서 번역 후 변형된 아미노산[예를 들면, 하이드록시프롤린(hydroxyproline), gamma-카복시글루탐산(ɣ-carboxyglutamate) 및 O-포스포세린(O-phosphoserine)]이다. 상기 용어 "아미노산 유사체"는 천연 아미노산과 같은 기본적인 화학 구조(수소, 카복실기, 아미노기 및 R기에 결합하는 α탄소)를 가지고 있지만, 변형된 R기 또는 변형된 골격을 가지는 화합물을 의미한다[예를 들면, 호모세린(homoserine), 노르루신(norleucine), 메티오닌(methionine), 설폭사이드(sulfoxide), 메티오닌 메틸 설포니움(methionine methyl sulfonium)]. 상기 용어 "아미노산 모방체"는 서로 다른 구조이지만, 일반적인 아미노산과 비슷한 기능이 있는 화학적 화합물을 의미한다.

[0025] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명위원회가 권장하는, 일반적으로 알려진 3문자 상징 또는 1문자 상징에 의해

불린다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어 "유전자", "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드" 및 "핵산"은 따로 명시되지 않는 한, 호환적으로 사용되며, 아미노산과 마찬가지로, 일반적으로 인정되는 1문자 코드에 의해 불린다.

[0027] 별도로 명시되지 않는 한, "암"은 C1orf59 유전자가 과발현하는 암을 나타내고, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암을 포함하나, 이에 한정하지 않는다.

[0028] 별도로 명시되지 않는 한, 상기 용어 "세포독성 T 림프구", "세포독성 T 세포" 및 "CTL"은 호환되어 쓰이며 따로 명시되지 않는 한, 비자기 세포(예를 들면 종양 세포, 바이러스에 감염된 세포)를 인식하고 이러한 세포의 사멸을 유도할 수 있는 T 림프구의 하위집단(sub-group)을 나타낸다.

[0029] 별도로 명시되지 않는 한, 상기 용어 "HLA-A02"는 HLA-A0201 또는 HLA-A0206와 같은 아형(subtype)을 포함하는 HLA-A2형을 나타낸다.

[0030] 별도로 명시되지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

[0031] **II. 펩티드**

[0032] C1orf59 유래 펩티드가 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)에 의해 인식되는 항원으로서 역할을 한다는 것을 증명하기 위하여, C1orf59(서열번호 43)유래 펩티드가 보통 HLA 대립유전자에 보여지는 HLA-A02 또는 HLA-A24에 의해 제한되는 항원 에피토프인가를 확인하기 위하여 C1orf59 유래 펩티드를 분석하였다(Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994). HLA-A02에 결합 C1orf59 유래 펩티드 후보를 HLA-A02에 대한 그들의 결합 친화성에 기초하여 동정하였다. 하기 펩티드들은 후보 펩티드들이다:

[0033] C1orf59-A02-9-261 (서열번호 1),

[0034] C1orf59-A02-9-333 (서열번호 2),

[0035] C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3),

[0036] C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4),

[0037] C1orf59-A02-9-271 (서열번호 5),

[0038] C1orf59-A02-9-63 (서열번호 6),

[0039] C1orf59-A02-9-122 (서열번호 7),

[0040] C1orf59-A02-10-240 (서열번호 9),

[0041] C1orf59-A02-10-260 (서열번호 10),

[0042] C1orf59-A02-10-270 (서열번호 11),

[0043] C1orf59-A02-10-346 (서열번호 12),

[0044] C1orf59-A02-10-90 (서열번호 13),

[0045] C1orf59-A02-10-334 (서열번호 14),

[0046] C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15),

[0047] C1orf59-A02-10-121 (서열번호 16),

[0048] C1orf59-A02-10-122 (서열번호 17),

[0049] C1orf59-A02-10-30 (서열번호 18),

[0050] C1orf59-A02-10-183 (서열번호 19),

[0051] Clorf59-A02-10-196 (서열번호 20),

[0052] Clorf59-A02-10-10 (서열번호 21),

[0053] Clorf59-A02-10-66 (서열번호 22),

[0054] Clorf59-A02-10-326 (서열번호 23), 및

[0055] Clorf59-A02-10-252 (서열번호 24).

[0056] 이러한 펩티드들을 적재한 수지상 세포(dendritic cells, DCs)에 의한 시험관 내 T 세포의 자극 후, 하기 각각의 펩티드를 이용하여 CTL을 성공적으로 수립하였다:

[0057] Clorf59-A02-9-261 (서열번호 1),

[0058] Clorf59-A02-9-152 (서열번호 3),

[0059] Clorf59-A02-9-121 (서열번호 4),

[0060] Clorf59-A02-9-122 (서열번호 7),

[0061] Clorf59-A02-10-240 (서열번호 9),

[0062] Clorf59-A02-10-90 (서열번호 13),

[0063] Clorf59-A02-10-188 (서열번호 15),

[0064] Clorf59-A02-10-122 (서열번호 17), 및

[0065] Clorf59-A02-10-196 (서열번호 20).

[0066] Clorf59 유래 HLA-A24 결합 펩티드 후보는 그들의 HLA-A24 결합친화성을 이용하여 동정하였다. 하기 펩티드들은 후보 펩티드들이다:

[0067] Clorf59-A24-9-385-25 (서열번호 25),

[0068] Clorf59-A24-9-221-26 (서열번호 26),

[0069] Clorf59-A24-9-338-27 (서열번호 27),

[0070] Clorf59-A24-9-339-28 (서열번호 28),

[0071] Clorf59-A24-9-182-29 (서열번호 29),

[0072] Clorf59-A24-9-35-30 (서열번호 30),

[0073] Clorf59-A24-9-253-31 (서열번호 31),

[0074] Clorf59-A24-9-66-32 (서열번호 32),

[0075] Clorf59-A24-9-145-33 (서열번호 33),

[0076] Clorf59-A24-9-200-34 (서열번호 34),

[0077] Clorf59-A24-9-257-35 (서열번호 35),

[0078] Clorf59-A24-9-144-36 (서열번호 36),

[0079] Clorf59-A24-9-151-37 (서열번호 37),

[0080] Clorf59-A24-9-첨가8-38 (서열번호 38),

[0081] Clorf59-A24-9-97-39 (서열번호 39),

[0082] Clorf59-A24-9-124-40 (서열번호 40), 및

[0083] Clorf59-A24-9-363-41 (서열번호 41).

[0084] 이러한 펩티드들을 적재한 수지상 세포(dendritic cells, DCs)에 의한 시험관 내 T 세포의 자극 후, 하기 각각

의 펩티드를 이용하여 CTL을 성공적으로 수립하였다:

[0085] C1orf59-A24-9-221-26 (서열번호 26),

[0086] C1orf59-A24-9-66-32 (서열번호 32),

[0087] C1orf59-A24-9-200-34 (서열번호 34),

[0088] C1orf59-A24-9-124-40 (서열번호 40), 및

[0089] C1orf59-A24-9-363-41 (서열번호 41).

[0090] 이러한 수립된 CTL은 각각의 펩티드에 의해 자극받은 표적 세포에 대해 강력한 특이적 CTL 활성을 보인다. 본 발명의 이러한 결과는 C1orf59가 CTL에 의해 인식되는 항원이며, 상기 펩티드들은 HLA-A02 또는 HLA-A24에 제한되는 C1orf59의 에피토프 펩티드임을 나타낸다.

[0091] C1orf59 유전자는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암과 같은 암에서 과발현하고 대부분의 정상 기관에서 발현하지 않기 때문에, 면역치료에 적절한 표적이다. 따라서, 본 발명은 C1orf59의 CTL-인식되는 에피토프에 대응하는 노나펩티드(nonapeptides)(아홉 개의 아미노산으로 구성된 펩티드)와 데카펩티드(decapeptides)(열 개의 아미노산으로 구성된 펩티드)를 제공한다. 본 발명의 노나펩티드 및 데카펩티드의 바람직한 예는 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17, 20, 26, 32, 34, 40 및 41에서 선택된 아미노산 서열로 구성된 이러한 펩티드를 포함한다.

[0092] 일반적으로, Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1,152(1):163-75에 기재되어 있는 것과 같이, 인터넷상에서 현재 사용가능한 소프트웨어 프로그램을 이용하여 컴퓨터 상(in silico)에서 다양한 펩티드와 HLA 항원 사이의 결합 친화성을 산출할 수 있다. 예를 들면, Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1):163-75; 및 Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6):1872-81에 기재되어 있는 것에 따라, HLA 항원과의 결합 친화성을 측정할 수 있다. 결합 친화성을 결정하는 방법은, 예를 들면, Journal of Immunological Methods, 1995, 185:181-190; Protein Science, 2000, 9:1838-1846에 기재되어 있다. 따라서, 이러한 소프트웨어 프로그램을 이용하여 HLA 항원과 높은 결합 친화성을 가진 C1orf59 유래 면역학적 활성 단편이 선택될 수 있다. 따라서, 본 발명은 이러한 공지된 프로그램을 이용해 동정된 HLA항원과 결합하는 C1orf59로 부터 유래하고 어떠한 면역학적 활성 단편으로 구성되는 펩티드를 포함한다. 본 발명의 펩티드는 C1orf59의 전장으로 구성된 펩티드일 수 있다.

[0093] 본 발명의 상기 펩티드는 상기 펩티드가 CTL 유도성을 유지하는 한, 부가적 아미노산 잔기를 인접시킬 수 있다. 본 발명의 펩티드에 인접되는 상기 아미노산 잔기는 원래 펩티드의 CTL 유도성을 손상시키지 않는 한, 어떤 유형의 아미노산으로 구성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 C1orf59 유래하고 HLA 항원에 결합 친화성을 갖는 펩티드를 포함한다. 이러한 펩티드들은 전형적으로 약 40 아미노산 미만, 흔히 20 아미노산 미만, 보통 약 15 아미노산 미만이다.

[0094] 일반적으로, 어떠한 펩티드 중의 한 개 또는 그 이상의 아미노산의 변형은 상기 단백질의 기능에 영향을 미치지 않으며, 어떠한 경우에는 원래 단백질의 원하는 기능을 촉진할 수 있다. 실제로, 변형된 펩티드(즉, 원래의 참조 서열에 대하여 한 개, 두 개 또는 복수의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 첨가 또는 삽입함으로써 변형된 아미노산 서열로 구성되는 펩티드)가 원래의 펩티드의 생물 활성을 유지한다는 것이 알려져 있다(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10:6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982,79:6409-13). 따라서, 하나의 실시태양에 있어서, 본 발명의 상기 펩티드는 CTL 유도성을 가지는 본 발명의 펩티드는 한 개, 두 개 또는 복수의 아미노산이 첨가, 삽입 및/또는 치환된, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17, 20, 26, 32, 34, 40 및 41에서 선택되는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0095] 당업자는 단일 아미노산 또는 적은 비율의 아미노산이 변한 아미노산 서열에 대한 개개의 첨가 또는 치환이 원래 아미노산 서열의 특성의 보존하는 결과를 야기하는 경향이 있는 것을 알고있다. 예컨대, 그들은 "보존적 치환(conservative substitution)" 또는 "보존적 변형(conservative modification)"이라고 나타내며, 단백질의 변화로 변형된 단백질은 원래 단백질과 유사 기능을 가지게 된다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환표는 당업계에 잘 알려져 있다. 아미노산 측쇄의 특성의 예로는 소수성 아미노산(A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), 및 하기 작용기 또는 공통적 특징을 가지는 측쇄가 있다: 지방족 측쇄(G, A, V, L, I, P); 수산기를 포함하는 측쇄(S, T, Y); 황 원자를 포함하는 측쇄(C,

M); 카복실산 및 아미드를 포함하는 측쇄(D, N, E, Q); 염기를 포함하는 측쇄(R, K, H); 및 방향족을 포함하는 측쇄(H, F, Y, W). 또한, 하기 8개 군은 서로 보존적 치환으로서 당업계에서 서로 허용될 수 있는 아미노산을 포함한다:

[0096] (1) 알라닌(A), 글리신(G);

[0097] (2) 아스파라긴산(D), 글루탐산(E);

[0098] (3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0099] (4) 아르기닌(R), 리신(K);

[0100] (5) 이소 류신(I), 루신(L), 메티오닌(M), 발린(V);

[0101] (6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);

[0102] (7) 세린(S), 트레오닌(T); 및

[0103] (8) 시스테인(C), 메티오닌(M)(예를 들면, Creighton, Proteins 1984 참조)

[0104] 이러한 보존적으로 변형된 펩티드 또한 본 발명의 펩티드로 간주한다. 그러나, 본 발명의 펩티드는 그들에 한정되지 않고, 상기 변형된 펩티드가 원래 펩티드의 CTL 유도성을 가지는 한, 비보존적인 변형도 포함할 수 있다. 또한, 변형된 펩티드는 C1orf59의 다형성 변종, 종간 상동체(homologue) 대립 유전자의 CTL 유도 가능한 펩티드를 제외하지 않는다. 또한, 변형된 펩티드는 다형성 변종, 종간 상동체(homologue) 및 C1orf59의 대립 유전자의 CTL 유도 가능한 펩티드를 제외하지 않아야 한다.

[0105] 필요한 CTL 유도성을 계속 유지하기 위하여 소수의(예를 들면, 한 개, 두 개 또는 복수) 또는 낮은 비율의 아미노산을 변형(삽입, 결실, 첨가 및/또는 치환)할 수 있다. 본 발명에서, 상기 용어 "복수"는 다섯 개 또는 그 이하, 예를 들면 네 개 또는 그 이하를 의미한다. 변형되는 아미노산의 비율은 바람직하게는 20% 또는 그 이하, 더욱 바람직하게는, 15% 또는 그 이하, 가장 바람직하게는 10% 또는 그 이하 또는 1 ~ 5%일 수 있다.

[0106] 또한, 더욱 높은 결합 친화성을 얻기 위해서 본 발명의 펩티드는 아미노산 잔기가 삽입, 치환 또는 첨가될 수 있고, 또는 아미노산 잔기가 결실될 수 있다. 면역치료에 사용했을 경우, 본 발명의 펩티드는 바람직하게는 HLA 항원과 복합체로서 세포 또는 엑소솜의 표면에 제시된다. 자연적으로 드러난 펩티드와 더불어, HLA 항원에 결합함으로써 드러난 펩티드 서열의 규칙성은 이미 공지되었으므로(J Immunol 1994, 152:3913; Immunogenetics 1995, 41:178; J Immunol 1994, 155:4307), 이와 같은 규칙성에 근거한 변형을 본 발명의 면역원성 펩티드에 도입될 수 있다. 예를 들면, HLA-A24 결합성을 높이기 위해 N-말단으로부터 2번째 아미노산이 페닐알라닌, 티로신, 메티오닌 또는 트립토판으로 치환 및/또는 C-말단 아미노산이 페닐알라닌, 루신, 이소 류신, 트립토판, 또는 메티오닌으로 치환하는 것이 바람직하다. 따라서, N-말단으로부터 2번째 아미노산이 페닐알라닌, 티로신, 메티오닌 또는 트립토판으로 치환, 및/또는 C-말단 아미노산이 페닐알라닌, 루신, 이소 류신, 트립토판, 또는 메티오닌으로 치환된 서열번호 26, 32, 34, 40 및 41의 아미노산 서열을 가진 펩티드는 본 발명에 포함된다. 한편, 높은 HLA-02 결합친화성을 갖는 펩티드는 N-말단으로부터 2번째 아미노산이 루신 또는 메티오닌으로 치환되고, C-말단의 아미노산이 발린 또는 루신으로 치환된다. 따라서, N-말단으로부터 2번째 아미노산이 루신 또는 메티오닌으로 치환, 및/또는 C-말단이 발린 혹은 루신으로 치환되는 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17 및 20의 아미노산 서열을 가지는 펩티드는 본 발명에 포함된다. 치환은 말단의 아미노산에서 뿐만 아니라 펩티드의 잠재적인 TCR 인식 부위에서도 실시할 수 있다. 몇 개의 연구에서, 예를 들면 CAP1, $p53_{(264-272)}$, $Her\text{-}2/neu_{(369-377)}$ 또는 $gp100_{(209-217)}$ 펩티드 중의 아미노산 치환이 원래의 것과 동일하거나 더욱 뛰어난 것일 수 있음을 증명하고 있다 (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1;168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 and S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

[0107] 또한, 본 발명은 상기 펩티드의 N 및/또는 C-말단에 한 개, 두 개 또는 복수의 아미노산을 첨가할 수도 있다. 높은 HLA 항원 결합 친화성을 가지며, CTL 유도성을 유지하고 있는 이러한 변형된 펩티드 또한 본 발명에 포함된다.

[0108] 그러나, 펩티드 서열이 서로 다른 기능을 가지는 내인성 또는 외인성 단백질의 아미노산 서열의 한 부분과 동일할 경우, 특이적 물질에 대한 자가면역장애 또는 특정 물질에 대한 알레르기 증상 등의 부작용이 유발될 가능성이 있다. 따라서 , 상기 펩티드 서열이 다른 단백질의 아미노산 서열과 일치하는 상황을 피하기 위해서, 사용

가능한 데이터베이스를 이용하여 상동성 검색을 실시하는 것이 바람직하다. 목표 펩티드와 한 개 또는 두 개의 아미노산 차이가 있는 펩티드마저도 존재하지 않는다는 것이 상동성 검색에서 드러날 경우, 어떠한 부작용의 위험 없이 HLA 항원과 결합 친화성, 및/또는 CTL 수송 능력을 증강시키기 위해, 상기 목표 펩티드를 변형시킬 수 있다.

[0109] 상기와 같이, HLA 항원에 대해 높은 결합 친화성을 가지는 펩티드는 매우 효과적일 것이라고 기대되지만, 높은 결합 친화성의 존재에 따라 지표로서 선택된 후보 펩티드는 CTL 유도성의 존재에 대해 한층 더 검토된다. 본 발명에서, 상기 용어 "CTL 유도성"은 APCs 상에 제시될 경우에 CTL을 유도하는 펩티드의 능력을 의미한다. 또한, "CTL 유도성"은 펩티드의 CTL 활성화, CTL 증식 유도, CTL에 의한 표적세포의 용해 촉진, 및 CTL의 IFN-gamma 생산을 증가시키는 능력을 포함한다.

[0110] CTL 유도성의 확인은 인간 MHC 항원을 보유하는 APCs{예를 들면, B-림프구, 마크로파지(macrophage) 및 수지상세포(dendritic cell, DC)}, 또는 더욱 구체적으로는 인간 말초 혈액 단핵 백혈구(human peripheral blood mononuclear leukocytes) 유래 수지상세포를 유도하고, 펩티드를 사용하여 자극, CD8 양성 세포와 혼합한 후, 그 후에 표적세포에 대한 CTL에 의해 생산 및 방출되는 IFN-gamma를 측정하여 수행할 수 있다. 반응계로서, 인간 HLA 항원을 발현하도록 제작된 형질전환 동물(예를 들면, BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8):764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T (H) response에 기재된 것)을 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 표적세포를 ^{51}Cr 등으로 방사 표지할 수 있고, 상기 표적세포로부터 방출된 방사능으로부터 세포독성 활성을 산출할 수 있다. 다른 방법으로, 고정화된 펩티드를 가진 항원제시세포(APCs)의 존재하에 CTL에 의해 생산 및 방출되는 IFN-gamma를 측정하고, 항-IFN-gamma 단일클론항체를 사용한 배지에서 저해 영역을 가시화함으로써, CTL 유도성을 측정할 수 있다.

[0111] 상기와 같이, 상기 펩티드의 CTL 유도성을 검사한 결과, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17, 20, 26, 32, 34, 40 및 41에 의해 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩티드로부터 선택되는 노나펩티드 또는 데카펩티드는, HLA 항원에 대한 높은 결합 친화성뿐만 아니라 특히 높은 CTL 유도성을 보였다. 따라서, 이러한 펩티드는 본 발명의 바람직한 실시태양로서 예시된다.

[0112] 또한, 상동성 분석의 결과는 이러한 펩티드들이 어떠한 다른 알려진 인간 유전자 산물 유래 펩티드와 현저한 상동성을 갖지 않음을 보인다. 이것은 면역치료에 사용하였을 때, 알려지지 않거나 또는 원하지 않은 면역반응의 가능성을 낮춘다. 따라서, 또한 측면으로부터 역시, 이러한 펩티드들은 C1orf59에 대한 암 환자의 면역성을 제거하는데 쓰인다. 따라서, 본 발명의 펩티드들은, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17, 20, 26, 32, 34, 40 및 41으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성된 펩티드가 바람직하다.

[0113] 상기와 같이, 펩티드의 변형과 함께, 본 발명의 펩티드는 그들이 CTL 유도성을 유지하고 있는 한, 다른 물질에 더 결합될 수 있다. 예시적인 물질에는 펩티드, 지질, 당 및 당 측쇄, 아세틸기, 천연 및 합성 폴리머등이 포함된다. 상기 펩티드는 원래 펩티드의 생물 활성이 손실되지 않는 한, 당화(glycosylation), 측쇄 산화, 및/또는 인산화 등의 변형을 포함한다. 이러한 종류의 변형은 추가적인 기능(예를 들어, 표적 기능 및 전달 기능)을 제공하거나 상기 펩티드를 안정시킬 수 있다.

[0114] 예를 들면, 폴리펩티드의 생체 내 안정성을 증대시키기 위해, D-아미노산, 아미노산 모방체, 또는 비천연 아미노산을 도입하는 것은 당업계에서 잘 알려져 있으며; 이 개념은 또한 본 발명의 폴리펩티드에 적용될 수 있다. 폴리펩티드의 안정성은 여러 가지 방법으로 분석할 수 있다. 예를 들면, 펩티다제(peptidases) 및 인간 혈장 및 혈청과 같은 다양한 생물학적 배지는 안정성 시험에 사용될 수 있다(예를 들면, Verhoef et al. , Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986,11:291-302 참조).

[0115] 또한, 본 발명에 있어서, 본 발명의 펩티드는 " C1orf59 펩티드(들)" 또는 " C1orf59 폴리펩티드(들)"로 기재될 수 있다.

[0116] **III. C1orf59 펩티드의 제조**

[0117] 본 발명의 펩티드는 잘 알려진 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드는 재조합형 DNA 기술 또는 화학 합성에 의해 합성적으로 제조할 수 있다. 본 발명의 펩티드는 개별적으로, 또는 두 개 또는 이상의

펩티드를 포함하는 더 긴 폴리펩티드로 합성할 수 있다. 상기 펩티드는 분리될 수 있는데, 즉, 자연에 존재하는 다른 숙주세포 단백질 및 이의 단편, 또는 다른 어떠한 화학물질을 실질적으로 포함하지 않도록 정제 또는 분리될 수 있다.

[0118] 본 발명의 펩티드는 선택된 아미노산 서열을 기반으로 화학 합성을 통해 얻을 수 있다. 합성에 적용될 수 있는 일반적인 펩티드 합성의 예는 하기를 포함하지만, 이에 한정하지 않는다:

[0119] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

[0120] (ii) The Preteins, Vol 2, Academic Press, New York, 1976;

[0121] (iii) Peptide Synthesis(일본어),Maruzen Co, 1975;

[0122] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis(일본어), Maruzen Co, 1985;

[0123] (v) Development of Pharmaceuticals(제 2판)(일본어), Vol. 14(peptide synthesis), Hirokawa, 1991 ;

[0124] (vi) WO99/67288; 및

[0125] (vii) Barany G. & Merrifield RB, Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis,"Academic Press, New York, 1980, 100-118

[0126] 또는, 본 발명의 펩티드는 펩티드를 제작하기 위한 임의의 잘 알려진 유전자 공학 방법을 사용해서 얻을 수 있다(예를 들면, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(Wu et al. 판) 1983, 101:347-62). 예를 들면, 우선, 목표 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현 가능한 형태(예를 들면, 프로모터 서열에 해당하는 조절 서열의 아래부분(downstream))로 포함하여 적절한 벡터를 제조하고 적절한 숙주 세포에 형질전환한다. 그 다음에, 상기 숙주 세포를 원하는 펩티드를 제작하기 위해 배양한다. 또한 상기 펩티드는 시험관 내(in vitro) 번역 시스템을 사용하여 시험관 내에서 제조될 수도 있다.

[0127] **Ⅳ. 폴리뉴클레오티드**

[0128] 본 발명은 본 발명의 상기 언급한 펩티드 중 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이들은 자연에 존재하는 C1orf59 유전자(GenBank Accession No. NM_144584 (서열번호 42))에서 유래한 폴리뉴클레오티드 및 이의 보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열로부터 유래한 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명에서, 상기 용어"보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열"은 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 서열을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴로 인하여, 많은 수의 기능적으로 동일한 핵산은 모든 주어진 단백질을 암호화한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCU및 GCG은 모두 알라닌 아미노산을 암호화한다. 따라서, 코돈에 의해 결정되는 알라닌의 모든 위치에서, 암호화되는 폴리펩티드의 변경없이, 상기 코돈은 상응하는 코돈 중 어느 하나로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이를 "침묵 변이(silent variations)"라 하고, 보존적으로 변형된 변종의 한 종류이다. 펩티드를 암호화하는 본 발명의 모든 핵산 서열은 상기 핵산의 모든 가능한 침묵 변종도 나타낸다. 당업자는 핵산의 각 코돈(보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG은 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 얻기 위해 변형될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 펩티드를 암호화하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 공개된 각 서열에서 암시적으로 기재되어 있다.

[0129] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA 및 이들의 유도체로 구성될 수 있다. DNA는 A, T, C 및 G 등의 염기로 적절하게 구성되고, T는 RNA에서는 U로 대체된다.

[0130] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 개재 아미노산 서열의 유무를 불문하고 본 발명의 다양한 펩티드를 암호화할 수 있다. 예를 들면, 상기 개재 아미노산 서열은 폴리뉴클레오티드 또는 번역된 펩티드의 절단 부위(예를 들면, 효소 인식 서열)를 제공할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 코딩 서열에 대한 어떠한 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 펩티드의 발현에 필요한 조절 서열을 포함하는 재조합형 폴리뉴클레오티드일 수 있고 또는 마커 유전자등을 가지는 발현 벡터(플라스미드)일 수도 있다. 일반적으로, 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드는, 예를 들면, 폴리머라제 (polymerase)및 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 이용한 종래의 재조합 기술을 통해 폴리뉴클레오티드를 조작하여 제조할 수 있다.

[0131] 재조합 기술 및 화학 합성 기술은 모두 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 제작하는 데 사용할 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드는 반응능(competent) 세포에 형질전환되어 발현하는 적절한 벡터 내에 삽입하여 제작할 수 있다. 또는, PCR 기술 또는 적절한 숙주에서의 발현을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시킬 수 있다(예를 들면, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). 또는, Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5에 기재되어 있는 것과 같이, 고체상 기술을 이용하여 폴리뉴클레오티드를 합성할 수 있다.

[0132] Ⅴ. 엑소솜(Exosomes)

[0133] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩티드와 HLA 항원 사이에 형성된 복합체를 그 표면에 제시하는 엑소솜이라는 세포 내 소낭을 제공한다. 엑소솜은 예를 들면, 일본 특허출원 제 11-510507호 및 WO99/03499에 설명된 방법을 사용하여 제조할 수 있고, 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 환자에게서 얻어진 APCs를 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 상기 엑소솜은 본 발명의 상기 펩티드와 마찬가지로 백신으로써 접종할 수 있다.

[0134] 복합체에 포함된 HLA 항원의 형태는 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 개체의 HLA 항원의 형태와 일치해야 한다. 예를 들면, 일본인에 대하여, HLA-A02(특히, A*0201 및 또한 A*0206)및 A24(특히, A*2402)가 대개 일반적이므로, 일본인 환자의 치료를 위해 적절할 것이다. 일본인과 백인에게서 높게 발현되는 A-02 또는 A-24 형태는 효과적인 결과를 얻기 위해 도움이 된다. 일반적으로, 임상에서는, 치료를 필요로 하는 환자의 HLA 항원의 형태는 미리 검사되고 있어, 특정 항원에 대해 높은 수준의 결합 친화성을 갖거나, 항원제시에 의한 세포독성 T 세포(CTL) 유도성을 가지는 펩티드를 적절하게 선택하는 것이 가능하게 된다. 또한, 높은 결합 친화성 및 CTL 유도성을 나타내는 펩티드를 얻기 위하여, 자연에 존재하는 C1orf59 부분적 펩티드의 아미노산 서열을 바탕으로 한 개, 두 개 또는 복수의 아미노산의 치환, 삽입 및/또는 첨가를 실시할 수 있다.

[0135] 본 발명의 상기 엑소솜에 대하여 A-02 형태의 HLA 항원을 사용할 경우, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17 및 20 중 어느 하나의 서열을 갖는 펩티드가 사용된다. 한편, A-24 형태의 HLA 항원을 사용할 경우, 서열번호 26, 32, 34, 40 및 41중 어느하나의 서열을 갖는 펩티드가 사용된다.

[0136] Ⅵ. 항원제시세포(antigen-presenting cells, APCs)

[0137] 또한, 본 발명은 HLA 항원과 본 발명의 펩티드 사이에 형성된 복합체를 그 표면에 제시하는 APCs를 제공한다. 본 발명의 펩티드를 접촉시키는 것에 의해, 또는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드를 발현 가능한 형태로 도입함으로써 얻을 수 있는 APCs는 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 환자에게서 유래할 수 있고, 그 자체로 또는 본 발명의 펩티드, 엑소솜 또는 세포독성 T 세포를 포함하는 다른 약물과 조합하여 투여할 수 있다.

[0138] 상기 APCs는 특정한 종류의 세포에 한정되지 않고, 림프구에 의해 인식되기 위하여, 세포 표면에 단백질성 항원을 제시하는 것이 알려져 있는 수지상세포(DC), 랑게르한스(Wrangel Hans) 세포, 마크로파지(macrophage), B세포 및 활성화 T 세포를 포함한다. 수지상세포는 강력한 CTL 유도성을 가지는 APCs 중 하나이므로, 수지상세포는 본 발명의 APCs로서 사용할 수 있다.

[0139] 예를 들면, 말초혈액단핵세포로부터 수지상세포를 유도하고, 그런 다음 그것들을 시험관 내, 생체 내 또는 체외에서 본 발명의 펩티드와 접촉(자극)시켜 APCs를 얻을 수 있다. 본 발명의 펩티드를 개체에 투여하면, 본 발명의 펩티드가 제시된 APCs가 개체의 체내에서 유도된다. 따라서 본 발명의 APCs는 본 발명의 펩티드를 개체에 주입한 후 개체에서 수집할 수 있다. 또는, 본 발명의 상기 APCs는 본 발명의 상기 펩티드가 주입된 개체로부터 수집한 APCs와 접촉함으로써 얻을 수 있다.

[0140] 본 발명의 상기 APCs는 단독 또는 본 발명의 상기 펩티드, 엑소솜 또는 본 발명의 CTL을 포함하는 다른 약품과의 조합으로 개체의 암에 대한 면역반응을 유도하기 위해 개체에 투여될 수 있다. 예를 들면, 체외 투여는 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0141] a: 첫번째 개체로부터 APCs 수집하는 단계,

[0142] b: 단계 a의 APCs와 상기 펩티드의 접촉하는 단계 및

[0143] c; 단계 b의 APCs를 두번째 개체에 투여하는 단계.

[0144] 첫번째 개체와 두번째 개체는 같은 개체일 수 있고, 또는 다른 개체일 수 있다. 단계 b에서 얻어진 상기 APCs는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 소세포폐암을 포함하는 암 치료 및/또는 예방을 위한 백신으로 투여될 수 있다.

[0145] 또한, 본 발명은 APCs를 유도하는 약학적 조성물 제조에 대한 방법 또는 과정을 제공하고, 상기 방법은 약학적으로 허용가능한 운반체와 함께 본 발명의 펩티드를 혼합 또는 제조하는 단계를 포함한다.

[0146] 본 발명의 하나의 측면에 따르면, APCs는 높은 수준의 CTL 유도성을 가지고 있다. "높은 수준의 CTL 유도성"이라는 용어에 있어서, 상기 높은 수준은 펩티드와 접촉시키지 않는 APCs 또는 CTL을 유도할 수 없는 펩티드와 접촉시킨 APCs의 CTL 유도성 수준과 비교한 CTL 유도성 수준이다. 높은 수준의 세포독성 T 세포 유도성을 가지는 이러한 APCs는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한 유전자를 시험관 내에서 APCs에 도입하는 단계를 포함하는 방법으로 제조할 수 있다. 상기 도입 유전자는 DNA 또는 RNA 형태일 수 있다. 도입 방법으로는, 특별한 제한 없이, 본 기술분야에서 일반적으로 실시되는 다양한 방법, 예를 들면, 리포펙션(lipofection), 전기천공법 (electroporation), 및 인산칼슘법 등을 사용할 수 있다. 더욱 구체적으로는, 이는 Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 특허공보 제2000-509281호에 기재된 것에 따라 실시할 수 있다. 유전자를 APCs로 도입함으로써, 상기 유전자는 세포 안에서 전사 및 번역을 겪고, 이렇게 얻어진 단백질은 MHC 클래스 I 또는 클래스 II에 의해 처리되고, 제시 경로를 거쳐 펩티드가 제시된다.

[0147] **Ⅶ. 세포독성 T 세포**

[0148] 본 발명의 임의의 펩티드에 대해 유도된 세포독성 T 세포는 생체 내에서 종양 관련 내피를 표적으로 하는 면역반응을 증강하고 그로 인하여 상기 펩티드와 같이 백신으로서 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 임의의 펩티드에 의해 특이적으로 유도 또는 활성화된 분리된 세포독성 T 세포를 제공한다. 이러한 CTL은 (1) 본 발명의 펩티드를 개체에 투여하고, 개체로부터 CTL을 수집; (2)개체 유래 APCs와 CD8 양성 T 세포, 또는 본 발명의 펩티드와 함께 시험관내에서 말초혈액단핵림프구 접촉(자극) 후 CTL 분리;(3) CD8 양성 T 세포 또는 말초혈액단핵림프구와 시험관내에서 그것의 표면에 HLA 항원과 본 발명의 펩티드 복합체를 제시하는 APCs 또는 엑소솜을 접촉하고 CTL 분리; 또는 (4) 상기 CTL에 본 발명의 펩티드에 결합하는 T 세포 수용체 아단위(subnit)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자의 도입으로 얻어질 수 있다. 상기 APCs 및 엑소솜은 상기 기재한 (4)의 방법으로 준비될 수 있으며, (4)의 방법은 아래 "VIII. T 세포 수용체 (TCR)" 부분에서 상세히 기재된다.

[0149] 본 발명의 CTL은 치료 및/또는 예방의 표적이 되는 개체로부터 유래할 수 있고, 그 자체, 또는 조절 효과의 목적을 위한 본 발명의 펩티드 또는 엑소솜을 포함하여 다른 약물과 조합하여 투여할 수 있다. 상기 얻어진 세포독성 T 세포는 본 발명의 펩티드, 예를 들어, 유도를 위해 사용한 것과 동일한 펩티드를 제시하는 표적 세포에 대해 특이적으로 작용한다. 상기 표적 세포는 암세포와 같은 C1orf59을 내생적으로 발현하는 세포, 또는 C1orf59 유전자가 형질전환된 세포이고; 본 발명의 펩티드에 의한 자극에 의해 세포 표면에 상기 펩티드를 제시하는 세포도 활성화된 CTL 공격의 표적이 될 수 있다.

[0150] **Ⅷ. T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)**

[0151] 또한, 본 발명은 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)의 아단위(subunit)를 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물 및 이를 이용한 방법을 제공한다. 상기 TCR 아단위(subunit)는 C1orf59을 제시하는 종양세포에 대한 특이성을 T 세포에 부여하는 TCR 형성 능력을 가진다. 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여, 본 발명의 한 개 또는 복수 펩티드로 유도된 CTL의 TCR 아단위로서의 α 측쇄 및 β 측쇄의 핵산을 동정할 수 있다(WO2007/032255 및 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288, 2003). 예를 들면, PCR 방법은 TCR 아단위를 암호화하는 핵산 서열을 분석하는데 바람직하다. 상기 분석을 위한 PCR 프라이머는, 예를 들어, 5' side 프라이머로서 5'-R 프라이머 (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (서열번호 44) 및 TCR 알파 사슬(alpha chain) C 부위에 특이적인 3-TRa-C 프라이머 (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (서열번호 45), TCR 베타 사슬(beta chain) C1 부위에 특이적인 3-TRb-C1 프라이머 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (서열번호 46) 또는 3' side 프

라이머로서 TCR 베타 사슬 C2 부위에 특이적인 3-TRbeta-C2 프라이머 (5'- ctagcctctggaatccttttctctt-3')(서열번호 47)일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. TCR 유도체는 C1orf59를 제시하는 표적세포에 높은 결합력으로 결합할 수 있고, 상기 C1orf59 펩티드를 제시하는 표적세포의 효과적인 사멸을 생체 내 또는 시험관 내에서 선택적으로 매개할 수 있다.

[0152] TCR 아단위를 암호화하는 핵산은 적절한 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터와 같은 적합한 벡터에 삽입할 수 있다. 이러한 벡터들은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 핵산 또는 이를 포함하는 벡터는 T 세포, 예를 들면, 환자 유래의 T 세포 내에 효율적으로 도입될 수 있다. 유용하게는, 본 발명은 환자 자신의 T 세포(또는 다른 포유 동물의 T 세포)의 빠른 변경에 의해, 뛰어난 암 세포 사멸 특성을 갖는 변경된 T 세포를 빠르고 쉽게 제작하는 것을 가능하게 하는 즉시 사용가능한(off-the-shelf) 조성물을 제공한다.

[0153] 본 발명의 펩티드로 유도된 CTL로부터 분리된 핵산에 의해 암호화된 TCR은 특이적으로 본 발명의 펩티드 및 HLA 분자의 복합체를 특이적으로 인지할 수 있으며, 상기 TCR이 상기 T 세포 표면에 있을 때, 상기 표적세포에 대한 T 세포 특이적 활성을 제공한다. 이러한 특이적 인식은 어떠한 알려진 방법에 의해 확인될 수 있으며, 바람직한 방법은, 예를들어, HLA분자 및 본 발명의 펩티드를 이용하는 테트라머(tetramer) 분석(e.g., Altman et al. Science. 274, 94-96 (1996); McMichael et al. J Exp Med. 187, 1367-1371 (1998))과 ELISPOT 분석을 포함한다. ELISPOT분석을 수행함으로써, 세포 표면에 TCR을 발현하는 상기 T 세포가 TCR로 세포를 인식하고, 상기 신호가 세포내부적으로 전환되며, 그 후에 T 세포에서 INF-gamma와 같은 사이토카인이 분비되는 것이 확인될 수 있다. 표적세포에 대한 T세포의 세포독성 활성은 당업계에 알려진 방법에 의해 측정될 수 있다. 바람직한 방법은, 예를 들어, 표적세포로서 C1orf59를 발현하는 HLA 양성 세포를 이용하는 크로미움(chromium) 분비 분석을 포함한다.

[0154] 또한, 본 발명은 예를 들어, HLA-A02 에 포함된 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17 및 20의 C1orf59 펩티드 및 또한 HLA-A24에 포함된 26, 32, 34, 40 및 41의 C1orf59 펩티드에 결합하는 TCR 아단위 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로 형질전환하여 제조한 CTL을 제공한다. 상기 형질전환된 CTL은 생체 내에서 암세포로 홈밍(homing)할 수 있으며, 잘 알려진 시험관내 배양 방법으로 증식시킬 수 있다(예를 들면, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). 본 발명의 상기 CTL은 치료나 보호를 필요로 하는 환자의 암의 치료 또는 예방에 유용한 면역학적 조성물을 구성하는데 쓰일 수 있다(WO2006/031221).

[0155] **IX. 약학적 약제 또는 조성물**

[0156] 예방 및 방지는 질병 유래의 사망률 또는 발병률의 부담을 감소하는 어떠한 활동을 포함한다. 예방 및 방지는 "1차, 2차 및 3차 예방 단계 " 를 일으킬 수 있다. 1차 예방 및 방지는 질환의 발달을 피하는 반면, 2차 및 3차 수준의 예방 및 방지는 질환의 진행 및 증상의 위험성의 예방과 방지 및 기능을 회복시키고 질환-관련 합병증을 감소시킴으로써 이미 발생한 질환의 부정적인 영향을 감소하는 활동을 포함한다. 또는, 예방 및 방지는 광범위한 특정한 질병의 고통을 완화를 위한 예방적 치료, 예를 들면 종양의 전이와 증식을 감소하는것, 혈관형성을 감소하는 것을 포함한다.

[0157] 암의 치료 및/또는 예방에 대하여, 및/또는 그것의 수술 후 재발의 방지는 다음 단계 중 어떤 것을, 예를 들어 암 세포의 수술적 제거, 암의 세포의 성장 저해, 종양의 퇴화 또는 회귀, 암의 발생의 차도 및 억제의 유도, 종양 회귀 및 전이의 저해 또는 감소를 포함한다. 효과적인 암의 치료 및/또는 예방은 사망자수를 감소시키며, 암을 가지고 있는 개개인의 예후를 향상시키고, 혈중 종양 마커의 수준을 감소시키고, 암과 수반되는 증상을 완화시킨다. 예를 들면, 증상의 개선 또는 감소는 효과적으로 치료된 것으로 여겨지며 및/또는 상기 방지는 10%, 20%, 30% 또는 그 이상의 감소, 또는 안정한 질환을 포함한다.

[0158] C1orf59 발현은 정상조직에 비해 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암을 포함하는 암에서 특이적으로 증가되어 있기 때문에, 본 발명의 펩티드 또는 이러한 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 종양 또는 암의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발에 대한 예방에 쓰일 수 있다. 따라서, 본 발명은 암의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발을 방지하는 약학적 약제 또는 조성물을 제공하며, 이는 하나 또는 다수의 본 발명의 펩티드, 또는 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효 성분으로 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 펩티드는 상기 엑소솜 또는 약학적 약제 또는 조성물로서 사용되는 APCs와 같은 세포의 임의의 표면에서 발현될 수 있다. 추가로, 상기 언급한 본 발명의 임의의 펩티드를 표적으로 하는 세포독성 T 세포는 또한 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물의 유

효 성분으로서 사용될 수 있다.

[0159] 다른 실시태양에서, 또한 본 발명은 암 또는 종양을 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 약제를 제조하는데 있어서, 하기 선택되는 유효 성분의 용도를 제공한다:

[0160] (a) 본 발명의 펩티드;

[0161] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0162] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜; 및

[0163] (d) 본 발명의 CTL.

[0164] 또는, 본 발명은 추가적으로 종양의 암 치료에 사용을 위한 하기로부터 선택되는 유효성분을 제공한다:

[0165] (a) 본 발명의 펩티드;

[0166] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0167] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜; 및

[0168] (d) 본 발명의 CTL.

[0169] 또는, 본 발명은 추가적으로 암 또는 종양을 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 약제를 제조하기 위한 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법 또는 과정은 유효성분으로서 하기로부터 선택되는 약학적으로 또는 생리활성적으로 허용가능한 유효 성분이 있는 운반체를 제형화하는 단계를 포함한다:

[0170] (a) 본 발명의 펩티드;

[0171] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 공개된 이러한 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0172] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜;및

[0173] (d) 본 발명의 CTL.

[0174] 다른 실시태양에서, 본 발명은 또한 종양 또는 암을 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 약제 제조 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법 또는 과정은 하기로부터 선택되는 유효성분이 있는 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 운반체를 혼합하는 단계를 포함한다:

[0175] (a) 본 발명의 펩티드;

[0176] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 공개된 이러한 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0177] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜;및

[0178] (d) 본 발명의 CTL.

[0179] 또는, 상기 약학적 조성물 또는 약제 본 발명은 따로 또는 같이 종양 또는 암의 방지 및 이의 수술 후 재발 예방에 쓰일 수 있다.

[0180] 상기 약학적 약제 또는 조성물은 백신으로 사용한다. 본 발명의 맥락에서, 상기 용어 “백신”(또한 “면역성의 조성물"로 불리우는)은 개체에 접종하였을 때, 항 종양 면역을 유도하는 기능을 가지는 물질을 나타낸다.

[0181] 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물은 사람 또는 이에 한정하지 않으나, 마우스(mouse), 랫(rat), 기니아-피그, 토끼, 고양이, 개, 양, 염소, 돼지, 소, 말, 원숭이, 개코원숭이 및 침팬지, 특이적으로 상업적으로 중요한 동물 또는 가축을 포함하는 어떠한 다른 포유동물을 포함하는 개체에서 암 또는 종양 및/또는 그것의 수술 후 재발 방지에 쓰일 수 있다.

[0182] 본 발명에 따르면, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17, 20, 26, 32, 34, 40 및 41 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩티드들은 HLA-A02 또는 A24 에 제한된 에피토프 펩티드인 것이 알려졌다. 따라서, 서열번호 1, 3, 4, 7, 9, 13, 15, 17 및 20 의 아미노산 서열을 갖는 이러한 펩티드들의 어느 것을 포함하는 상기 약학적 약제 또는 조성물은 특이적으로 HLA 항원이 HLA-A02인 개체에 투여에 대해 적합하며, 서열번호 26, 32, 34, 40 및 41의 아미노산 서열을 갖는 펩티드들은 특이적으로 HLA 항원이 HLA-A24인 개체에 투여에 적합하다. 마찬가지로 이러한 펩티드들 중 어떤 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 약제 및 조성물에 적용한

다(예를 들면, 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드).

[0183] 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물에 의해 치료된 암 또는 종양은 한정되지 않으나, C1orf59가 관련된, 포함된 예를 들어, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암과 같은 모든 종류의 암 또는 종양을 포함한다.

[0184] 상기 약학적 약제 또는 조성물은 상기 기재한 유효 성분에 더하여, 암 세포에 대해 CTL을 유도하는 능력이 있는 다른 펩티드, 상기 다른 펩티드를 암호화하는 다른 폴리뉴클레오티드, 상기 다른 펩티드들을 제시하는 다른 세포를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 암세포에 대해 CTL을 유도하는 능력을 가지는 다른 펩티드들도 암 특이적 항원(예를 들어, 확인된 TAA들)에 의해 증폭되나 이에 한정하지 않는다.

[0185] 상기 물질은, 예를 들면 본 발명의 펩티드들 중 어느 하나, 유효 성분의 항 종양 효과를 저해하지 않는 한, 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물은 유효 성분으로서 다른 치료적 물질을 선택적으로 포함할 수 있다. 예를 들면, 제제는 항염증 조성물, 진통효과, 화학요법제 및 기타 같은 종류의 것을 포함할 수 있다. 그것의 약물 안에 다른 치료적 물질을 포함하는 것에 더하여, 본 발명의 약물은 역시 하나 또는 그 이상의 다른 조성물과 단계적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 약물 및 약학적 약제의 양은, 예를 들면, 쓰이는 약학적 약제의 유형, 치료되는 질환, 투여의 일정과 방법에 달려있다.

[0186] 본 명세서에서 특히 언급한 성분에 더하여, 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물은 논의가 되고 있는 형태의 제형을 갖는 종래의 다른 약제 또는 조성물을 포함할 수 있다.

[0187] 본 발명의 한 실시태양에서, 상기 약학적 약제 또는 조성물은, 예를 들어 암과같은, 질환의 병리학 조건을 치료하는데, 유용한 물질을 포함하는 제품 및 키트에 포함될 수 있다. 상기 제품은 라벨이 있는 상기 약학적 약제 또는 조성물 중 어느 하나의 용기를 포함할 수 있다. 적합한 용기는 병, 바이알 및 테스트 튜브를 포함한다. 상기 용기는 병 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 만들어질 수 있다. 상기 용기의 라벨은 상기 질환의 한 개 또는 그 이상의 조건의 치료 또는 예방에 쓰이는 조성물인 것을 나타내야 한다. 또한 라벨은 투여 지시 및 기타의 것에 대해 나타낼 수 있다.

[0188] 상기 기재한 용기에 더하여, 또한 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물을 포함한 키트는 선택적으로 약학적으로 허용할 수 있는 희석액을 보관하는 두 번째 용기를 포함할 수 있다. 또한 이것은 상업적 및 사용자의 관점으로부터 바람직한 다른 물질, 다른 버퍼, 희석액, 필터, 니들, 주사기 및 사용설명서를 포함할 수 있다.

[0189] 상기 약학적 약제 또는 조성물은 유효 성분이 포함된 한 개 또는 그 이상의 구성 단위 제형을 포함할 수 있는 팩 또는 용기 장치에 존재할 수 있다. 상기 팩은, 예를 들어, 금속 또는 블리스터 포장같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서(dispenser) 장치는 투여에 대한 지시에 의해 동반될 수 있다.

[0190] (1)상기 펩티드를 유효성분으로 포함하는 약학적 약제 또는 조성물.

[0191] 본 발명의 펩티드들은 약학적 약제 또는 조성물로 직접적으로 투여될 수 있으며, 또는 필요하다면, 종래의 제조방법에 의해 제조되기도 한다. 후자의 경우, 본 발명의 펩티드들에 더하여, 운반체, 부형약 및 이러한 것이 특이적 제한 없이 포함될 수 있다. 이러한 운반체들은 멸균된 물, 생리학적 살린, 포스패이트 버퍼, 배양 유액 등이다. 또한, 상기 약학적 약제 또는 조성물은 필요하다면, 안정제, 현탁액, 보존료, 계면활성제등을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물은 항암 목적으로 사용될 수 있다.

[0192] 본 발명의 펩티드들은 생체 내에서 CTL을 유도하기 위해 본 발명의 펩티드들 중 두 개 또는 그 이상으로 구성된 조합으로 준비될 수 있다. 상기 펩티드 조합은 혼합제의 형태를 가질 수 있고, 또는 표준 기술을 이용하여 각각 다른 것이 접합될 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드들은 화학적으로 연결 또는 단독 융합 폴리펩티드 서열로서 발현될 수 있다. 상기 조합의 펩티드들은 같거나 다를 수 있다. 본 발명의 펩티드들을 투여함으로써, 펩티드들은 APCs에 HLA 항원에 의해 높은 밀도로 제시되며, 그 후에 제시된 펩티드 및 HLA 항원으로 구성된 복합체에 대해 특이적으로 반응하는 CTL은 유도된다. 또는, 본 발명의 임의의 펩티드를 그것의 세포 표면에 제시하는 APCs는 본 발명의 상기 펩티드로 개체로부터 유래된 APCs(예를 들면, 수지상 세포)를 자극함으로써 수득할 수 있고, 상기 개체에 투여되고, 그 결과, CTL은 상기 개체에서 유도되고 상기 암 세포에 대한 침해성이 증가할 수 있다.

[0193] 또한, 본 발명의 펩티드를 유효성분으로 포함하는 암 또는 종양의 치료 및/또는 예방에 대한 상기 약학적 약제 또는 조성물은 세포 면역을 효과적으로 유도하는 알려진 보조약을 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 약학적

약제 또는 조성물은 다른 유효 성분과 함께 또는 그래뉼 제형으로 투여될 수 있다. 보조약은 면역학적으로 활성이 있는 단백질과 함께 (또는 연속적으로)투여 하였을 때, 단백질에 대해 면역반응을 증가시키는 화합물을 나타낸다. 본 명세서에서 고려한 보조약은 문헌에 기재되어 있는 것들을 포함한다(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). 적합한 보조약의 예는 알루미늄 포스페이트(aluminum phosphate), 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide), 알럼(alum), 콜레라 톡신(cholera toxin), 살모넬라 톡신(salmonella toxin) 등등을 포함하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0194] 또한, 리포좀 제형, 미세한 마이크로미터 지름의 비드가 결합된 펩티드가 있는 그래뉼 제형 및 리피드가 결합되는 펩티드 제형이 편리하게 쓰일 수 있다.

[0195] 본 발명의 다른 실시태양에서, 또한 본 발명의 펩티드들은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 투여될 수 있다. 염의 바람직한 예는 알카리 메탈이 있는 염, 메탈이 있는 염, 유기 염기가 있는 염, 유기산이 있는 염 및 무기산이 있는 염을 포함한다.

[0196] 몇몇의 실시태양에서, 또한 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물은 CTL을 준비하는 구성요소를 포함할 수 있다. 지질은 바이러스 항원에 대해 생체 내에서 CTL을 준비시킬 수 있는 약제로 확인되었다. 예를 들면, 팔미트 산 잔기(palmitic acid residues)는 라이신 잔기의 엡실론-아미노(epsilon-amino) 및 알파-아미노(alpha-amino) 그룹에 붙여질 수 있으며, 그 후에 본 발명의 펩티드들과 연결될 수 있다. 지질화 펩티드들은 리포좀으로 도입 또는 보조약 안에 유화되어 마이셀 또는 입자 안에 직접적으로 투여될 수 있다. CTL 반응을 준비시키는 지질의 또 다른 예로, 적절한 펩티드들에 공유적으로 붙일 때, 트리팔미토일-S-글리세릴시스테인리세릴-세린(tripalmitoyl-S-glycerylcysteinlyseryl-serine, P3CSS)과 같은 E. coli 지단백질이 CTL을 준비하는 것에 사용될 수 있다(참조, 예를 들어, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

[0197] 투여 방법은 경구, 피내, 피하, 정맥 주사, 또는, 및 전신 투여 또는 표적하는 장소 부근에 국소적 투여일 수 있다. 상기 투여는 단독 투여로 수행될 수 있으며 또는 다수의 투여로 신장시킬 수 있다. 본 발명의 펩티드의 복용량은 치료되기 위한 질환, 환자의 연령, 몸무게, 투여 방법, 등등에 알맞게 적용될 수 있으며, 보통 0.001 mg 내지1000 mg, 예를 들면, 0.001 mg 내지 1000 mg, 예를 들면, 0.1 mg 내지 10 mg이며, 몇 일에서 몇 달에 한 번 투여될 수 있다.

[0198] (2)폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 약학적 약제 또는 조성물

[0199] 또한, 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물은 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에서 공개된 펩티드를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 본 명세서에서, 상기 용어 "발현할 수 있는 형태"는 세포 안으로 상기 폴리뉴클레오티드가 도입되었을 때, 생체내에서 폴리뉴클레오티드가 항 종양 면역을 유도하는 폴리펩티드로 발현될 것임을 의미한다. 예시된 실시태양에서, 관심있는 폴리뉴클레오티드의 핵산 서열은 폴리뉴클레오티드의 발현에 대해 필요한 조절 요소를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 표적세포의 유전체로 안정한 삽입을 향상시키기 위해 준비 될 수 있다(참조, 예를 들어, Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 for a description of homologous recombination cassette vectors)(예를 들어, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; U.S. Patent Nos. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 및 WO 98/04720)를 참조한다. DNA-기반의 전달 기술의 예로서 "네이키드 DNA(naked DNA)", 용이한 전달(부피바카인(bupivacaine), 폴리머, 펩티드-매개), 양이온 지질 복합체 및 입자-매개("유전자 총")또는 압력-매개 전달을 포함한다(참조, 예를 들어, U.S. Patent No. 5,922,687).

[0200] 또한, 본 발명의 펩티드는 바이러스 또는 세균 벡터로 발현될 수 있다. 발현 벡터의 예로 백시니아(vaccinia) 또는 계두(fowlpox)와 같은 강화된 바이러스 숙주를 포함한다. 이러한 접근은 백시니아 바이러스의 사용, 예를 들어, 상기 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 발현하는 벡터를 포함한다. 숙주에 도입하였을 때, 상기 재조합 백시니아 바이러스는 면역성 펩티드를 발현하고, 그렇게 함으로써 면역 반응을 유도한다. 면역법 프로토콜에서 유용한 백시니아 벡터 및 방법은, 예를 들어, U.S. Patent No. 4,722,848에 기재되어 있다. 다른 벡터는 BCG(Bacille Calmette Guerin)이다. BCG 벡터는 Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60에 기재되어 있다. 치료상의 투여 또는 면역법에 대한 유용한 다양한 다른 벡터들, 예를 들어, 아데노 및 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이럴 벡터, 살모넬라 타이피 벡터, 독성이 없는 탄저균 독소 벡터, 기타 같은 종류의 것이 분명할 것이다. (참조, 예를 들어, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85).

[0201] 개체에 폴리뉴클레오티드의 전달은 폴리뉴클레오티드를 운반하는 벡터에 개체가 직접적으로 노출되는 경우 또는

세포가 시험관내에서 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 첫 번째로 형질 전환된 후, 세포가 개체에 이식되는 경우 중 어느 것이 될 수 있다. 이 두 가지 방법이 각각 생체 내 및 체외 유전자 치료법으로 알려져 있다.

[0202] 유전자 치료의 상기 방법의 일반적인 리뷰는 (참조 Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215)를 참조한다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 재조합 DNA의 일반적으로 당업계에 알려진 방법은 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; and Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990에 기재되어 있다.

[0203] 투여 방법은 경구, 피내, 피하, 정맥 주사, 또는, 및 전신 투여 또는 표적하는 장소 부근에 국소적 투여일 수 있다. 상기 투여는 단독 투여로 수행될 수 있으며 또는 다수의 투여로 신장시킬 수 있다. 적절한 담체에 포함된 상기 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 상기 펩티드를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포의 용량은 치료되기 위한 질환, 환자의 연령, 몸무게, 투여 방법, 등등에 알맞게 적용될 수 있으며, 그리고 보통 0.001 mg 내지1000 mg, 예를 들면, 0.001 mg 내지 1000 mg, 예를 들면, 0.1 mg 내지 10 mg이며, 몇 일에서 몇 달에 한 번 투여될 수 있다. 당업자는 적합한 용량을 적절히 선택할 수 있다.

[0204] **X.펩티드, 엑소솜, APCs 및 CTL을 이용하는 방법**

[0205] 본 발명의 펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 APCs와 CTL을 유도하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 엑소솜 및 APCs는 CTL을 유도하는데 사용될 수 있다. 상기 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 엑소솜 및 APCs는 화합물이 그들의 CTL 유도성을 저해하지 않는 한 어떠한 다른 화합물의 조합으로 사용될 수 있다. 따라서, 상기에 언급한 본 발명의 약학적 약제 또는 조성물 중 어떤 것은 CTL을 유도하는데 사용될 수 있으며, 그것에 더하여, 또한 이러한 펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것은 아래 기재된 APCs를 유도하는데 사용될 수 있다.

[0206] (1) 항원제시세포(antigen-presenting cells, APCs) 유도 방법

[0207] 본 발명은 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드를 사용하여 높은 CTL유도성이 있는 APCs를 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 시험관 내, 체 외 또는 생체 내에서 본 발명의 펩티드를 APCs와 접촉하는 하기 단계를 포함한다. 예를 들어, 체외에서 펩티드와 APCs를 접촉하는 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0208] a: 개체로부터 APCs를 수집하는 단계; 및

[0209] b: 펩티드와 단계 a의 APCs를 접촉하는 단계.

[0210] APCs는 특정한 종류의 세포에 한정되지 않으며, 림프구에 의해 인식되기 위해서 단백질성의 항원을 그들의 세포 표면에 발현하는 것으로 알려져 있는 수지상세포, 랑게르한스 세포, 대식세포, B 세포 및 활성화된 T 세포를 포함한다. 바람직하게, 수지상세포는 APCs들 사이에서 그것의 제일 강한 CTL 유도성 때문에 쓰일 수 있다. 본 발명 중 어떠한 펩티드는 단독으로서 또는 본 발명의 다른 펩티드들의 조합으로 단계 b의 상기 펩티드로서 사용될 수 있다.

[0211] 또는 본 발명의 펩티드들은 생체 내에서 APCs에 펩티드를 접촉하기 위해 개체로 투여될 수 있다. 결과적으로, APCs는 개체의 몸에서 유도될 수 있다. 따라서, 또한 본 발명은 생체 내에서 본 발명의 펩티드를 개체로 투여하여 APCs를 유도하는 방법을 고려한다. 또한, 생체 내에서 본 발명의 펩티드들이 발현되고 APCs와 접촉하여, 결과적으로 높은 CTL 유도성을 가지는 APCs를 유도하도록, 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 개체에 표현할 수 있는 형태로 투여하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명은 또한 생체 내에서 APCs를 유도하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 개체로 투여하는 방법을 고려한다. 상기 용어 “발현할 수 있는 형태”는 상기 부분 "IX. 약학적 조성물 (2) 유효 성분으로 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 약제"에서 정의된다.

[0212] 또한, 본 발명은, CTL 유도성이 있는 APCs를 유도하기 위해 APCs 내로 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 포함한다. 예를 들면, 상기 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다.

[0213] a: 개체로부터 APCs의 수집; 및

[0214] b: 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 도입.

[0215] 단계 b는 상기 부분 "VI. 항원 제시 세포"에 기재한 것과 같이 수행될 수 있다.

[0216] (2) CTL을 유도하는 방법

[0217] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드, 또는 엑소솜 또는, APCs를 이용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공한다.

[0218] 또한, 본 발명은 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명의 펩티드와 HLA 항원 복합체를 인식하는 T 세포 수용체(TCR) 아단위(subunit)를 형성함으로써 가능하다. 바람직하게, CTL을 유도하기 위한 상기 방법은, 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 한 단계를 포함한다:

[0219] a) CD8 양성 T 세포를 그것의 표면에 HLA 항원 및 본 발명의 펩티드의 복합체를 제시하는 APCs 및/또는 엑소솜과 접촉시키는 단계; 및

[0220] b) 본 발명의 펩티드 및 HLA 항원폴리펩티드 복합체를 인식하는 TCR 아단위를 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 CD8 양성 세포로 도입하는 단계.

[0221] 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, APCs 또는 엑소솜이 개체로 투여될 때, CTL은 개체의 몸에서 유도되고, 표적하는 암세포에 대한 면역 반응의 강도는 향상된다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, APCs 또는 엑소솜을 CTL을 유도하기 위해 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 고려한다.

[0222] 또는, CTL은 체외에서도 유도될 수 있다. 이러한 경우에, CTL 유도 후에 활성화된 CTL은 개체에 되돌려 질 수 있다. 예를 들면, CTL을 유도하는 본 발명의 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0223] a) 개체로부터 APCs를 수집하는 단계;

[0224] b) 펩티드와 단계 a)의 APCs를 접촉하는 단계; 및

[0225] c) CD8-양성 세포와 단계 b)의 APCs와 공배양하는 단계.

[0226] 상기 단계 c)에서 CD8-양성 세포와 공배양된 APCs는 상기 "VI. APCs" 부분에서 기재한 것과 같이 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 APCs에 형질전환함으로써 준비될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 본 발명의 펩티드 및 HLA항원의 복합체를 그것의 표면에 효과적으로 제시하는 어떤 APCs는 즉각적인 방법을 위해 사용될 수 있다.

[0227] 이러한 APCs 대신에, 본 발명의 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 그것의 표면에 제시하는 엑소솜도 역시 사용될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명은 역시 그것의 표면에 본 발명의 펩티드와 HLA항원 복합체를 제시하는 엑소솜이 CD8-양성 세포와 공배양되는 것을 고려한다. 이러한 엑소솜은 상기 "V. 엑소솜" 부분에서 기재한 방법에 의해 준비될 수 있다.

[0228] 또한, CTL은 본 발명의 펩티드에 결합하는 TCR 아단위를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 CD8-양성 세포에 도입함으로써 유도될 수 있다. 이러한 형질 도입은 상기 "VIII. T세포 수용체 (TCR)" 부분에 기재된 것과 같이 수행될 수 있다.

[0229] 또한, 본 발명은 CTL을 유도하는 약학적 약제 또는 조성물은 제조하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용가능한 운반체를 혼합 또는 제조하는 단계를 포함한다.

[0230] (3)면역반응을 유도하는 방법

[0231] 또한, 본 발명은 C1orf59에 관련된 질환에 대해 면역반응을 유도하기 위한 방법을 제공한다. 적합한 질환은, 예를 들어 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암을 포함한다.

[0232] 상기 방법은 본 발명의 펩티드들 중 어느 것 또는 그들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약제 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법은 역시 본 발명의 펩티드들 중 어느 것을 제시하는 엑소솜 또는 APCs의 투여를 고려한다. 상세하게는, "IX. 약학적 약제 또는 조성물"의 항목을 참조하고, 특히 본 발명의 약학적 약제 및 조성물이 백신으로 사용된 것을 기재한 부분을 참조하라. 또한, 상기 엑소솜과 APCs는 "V. 엑소솜", "VI. APCs(APCs)" 및 "X. 펩티드, 엑소솜, APCs 및 CTL을 사용한 방법"의(1) 및 (2)의 항목 하에 세부항목에 기재된 면역 반응을 유도하는 방법에 대해 적용될 수 있다.

[0233] 또한 본 발명은 면역반응을 유도하는 약학적 약제 또는 조성물을 제조하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방

법은 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용가능한 운반체를 혼합 또는 제조하는 단계를 포함한다.

[0234] 또는, 본 발명의 방법은 하기를 포함하는, 백신 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0235] (a) 본 발명의 펩티드;

[0236] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 공개된 이러한 펩티드를 암호화하는 핵산;

[0237] (c) 본 발명의 펩티드를 그것의 표면에 제시하는 APCs 또는 엑소솜; 및

[0238] (d) 본 발명의 CTL.

[0239] 본 발명에서, C1orf59가 과발현하는 암은 이러한 유효 성분으로 치료될 수 있다. 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암을 포함하지만, 이에 한정하지 않는다. 따라서, 유효 성분으로 구성된 약학적 조성물 또는 백신의 투여에 앞서, 치료되기 위한 암세포 또는 조직에서 C1orf59 발현 수준이 같은 기관의 정상 세포에 비해 증가되었는지 확인하는 것이 바람직하다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 본 발명은 하기 단계를 포함할 수 있는 C1orf59을 (과)발현하는 암을 치료하는 방법을 제공한다:

[0240] i) 치료되기 위한 암이 있는 개체로부터 얻어지는 암 세포 또는 암 조직에서 C1orf59 의 발현 수준을 확인하는 단계;

[0241] ii) 정상 대조군과 상기 C1orf59 의 발현 수준을 비교하는 단계; 및

[0242] iii) (a) 내지 (d)로 구성된 상기 기재된 군으로부터 적어도 한 가지 선택되는 구성요소를 정상 대조군에 비해 C1orf59가 과발현하는 암이 있는 개체에 투여하는 단계.

[0243] 또는, 본 발명은 또한, C1orf59가 과발현하는 암이 있는 개체로 투여하는데 이용하기 위하여, 상기 기재된 (a) 내지 (d) 로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 한 가지 구성요소를 포함하는 백신 또는 약학적 조성물을 제공한다. 다시 말해서, 본 발명은 또한 본 발명의 C1orf59 폴리펩티드가 처리되는 개체를 확인하는 방법을 제공하며, 이 방법은 개체 유래 암 세포 또는 조직에서 C1orf59 발현 수준을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 정상 대조군에 비해 발현 수준의 증가는 개체가 가진 암이 본 발명의 C1orf59 폴리펩티드로 치료될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0244] 본 발명에 따르면, 개체로부터 얻어진 암세포 또는 조직에서 C1orf59의 발현 수준이 결정된다. 상기 발현 수준은 당업계에 알려진 방법을 이용하여 전사(핵산) 생산물 수준에서 결정될 수 있다. 예를 들면, C1orf59의 mRNA는 혼성화 방법으로 탐침을 이용하여 정량될 수 있다(예를 들어, Northern hybridization). 탐지는 칩 또는 어레이로 수행될 수 있다. 어레이의 사용이 C1orf59의 발현 수준을 탐지하는데 바람직하다. 당업자들은 이러한 C1orf59의 서열정보를 이용하여 탐침을 제조할 수 있다. 예를 들면, C1orf59의 cDNA는 탐침으로 사용될 수 있다. 만약 필요하다면, 상기 탐침은 염료, 형광 물질 및 동위원소와 같은, 적절한 표지로 표지될 수 있으며, 유전자의 발현 수준은 혼성화된 표지의 강도로 탐지될 수 있다.

[0245] 또한, C1orf59의 전사 생산물은 증폭-기반 탐지 방법에 의해 프라이머를 사용하여 정량될 수 있다(예를 들면, RT-PCR). 이러한 프라이머는 상기 유전자의 이용가능한 서열 정보를 기반으로 제조될 수 있다.

[0246] 특히, 상기 제시된 방법에 대해 사용된 탐침 또는 프라이머는 엄격한 상태, 적절하게 엄격한 상태 또는 낮게 엄격한 상태하에서 C1orf59의 mRNA와 혼성화된다. 본 명세서에 사용되었던, 상기 용어 “엄격한 (혼성화) 조건”은 탐침 또는 프라이머가 그것의 표적 서열에 혼성화하는 조건을 나타내지만, 다른 서열에는 혼성화되지 않는다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며, 다른 환경하에서 달라질 것이다. 더 긴 서열의 특이적 혼성화는 짧은 서열에 비해 높은 온도에서 관찰된다. 일반적으로, 엄격한 조건의 온도는 정의된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대해 열융해점(Thermal melting point, Tm)보다 약 5℃ 낮게 선택된다. 상기 Tm은 (정의된 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에) 50%의 상기 탐침이 상보적으로 상기 표적 서열에 동등하게 혼성화되는 온도이다. 상기 표적 서열이 일반적으로 과다하게 존재하므로, Tm에서 상기 탐침의 50%는 동등하게 점유된다. 일반적으로, 엄격한 조건은 염 약 1.0 M 소듐 이온 미만인 농도일 수 있으며, 일반적으로, pH 7.0 내지 8.3에서 약 0.01 내지 1.0 M 소듐 이온 (또는 다른 염들) 온도는 짧은 탐침 또는 프라이머에 대해 적어도 약 30℃이고, (예를 들면, 10 내지 50 뉴클레오티드) 긴 탐침 또는 프라이머에 대해서는 적어도 약 60℃이다. 엄격한 조건은 포름아마이드(formamide)와 같은 불안정하제의 첨가로 얻을 수 있다.

[0247] 또는, 번역 생산물은 C1orf59 발현 수준의 확인에 대해 탐지될 수 있다. 예를 들면, C1orf59 단백질의 양은 결

정될 수 있다. 번역 산물로서 단백질의 양을 결정하는 방법은 상기 단백질을 인식하는 특이적 항체를 사용한 면역분석 방법을 포함한다. 상기 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 또한, 상기 단편 또는 변형된 항체가 C1orf59 단백질에 결합하는 능력을 유지하는 한, 항체의 어떤 단편 또는 변형(예를 들어, 카이메릭 항체, scFv, Fab, F(ab')2, Fv, 등등)은 탐지를 위해 쓰일 수 있다. 단백질의 탐지를 위해 이러한 유형의 항체를 준비하는 방법는 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 방법은 본 발명에서 이러한 항체 및 그들의 등가물을 준비하는 것에 적용될 수 있다.

[0248] C1orf59 유전자 발현 수준을 탐지하기 위한 다른 방법은 그것의 번역 산물에 기초하기 때문에, 염색의 강도는 C1orf59 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직학적 분석을 통해 관찰될 수 있다. 다시 말해서, 이러한 측정에서, 강한 염색은 증가된 단백질의 존재 수준 및, 동시에, C1orf59 유전자의 높은 발현수준을 나타낸다.

[0249] 암세포에서의 C1orf59 유전자의 발현 수준은, 예를 들어, 10%, 25%, 또는 50% 또는 1.1배 이상, 1.5배 이상, 2.0배 이상, 5.0배 이상, 10.0배 이상 또는 그 이상과 같이, 상기 표적 유전자의 상기 대조군 수준으로부터 수준이 증가된 것에 따라 확인될 수 있다(예를 들면, 정상 세포의 상기 수준).

[0250] 상기 대조군 수준은 질환 상태(암성 또는 비암성)라고 알려진 개체로부터 이전에 수집되고 저장된 샘플을 이용함으로써 상기 암세포와 동시에 확인될 수 있다. 또한, 치료되기 위한 암을 가지는 조직의 암이 없는 부분에서 얻어진 정상 세포는 정상 대조군으로 사용될 수 있다. 또는, 상기 대조군 수준은 이전에 질환 상태에 있다고 알려진 개체 유래 샘플에서 확인된 C1orf59 유전자의 발현 수준을 분석함으로써 얻어진 상기 결과를 기반으로 하는 통계학적인 방법으로 확인될 수 있다. 또한, 이전에 시험된 세포의 발현 패턴 데이터베이스로부터 대조군 수준은 유래될 수 있다.

[0251] 또한, 본 발명의 측면에 따르면, 개체 유래 샘플 안의 C1orf59 유전자의 발현 수준은 대조군 수준과 복수로 비교될 수 있으며, 복수 표준시료로 부터 결정될 수 있다. 개체 유래 시료와 유사한 조직 형태로부터 유래된 참조 시료로 부터 대조군을 결정하는 것이 바람직하다. 또한, 질환 상태로 알려져 있는 군의 C1orf59 유전자의 발현 수준의 기준치를 이용하는 것이 바람직하다. 기준치는 당업계에 알려진 어떤 방법에 의해 얻을 수 있다. 예를 들면, 평균 +/- 2 S.D. 또는 평균 +/- 3 S.D. 의 범위는 기준치로 쓰일 수 있다.

[0252] 본 발명의 맥락에서, 암이 아닌 것으로 알려진 생물학적 시료 유래에 의해 확인된 대조군 수준은 “정상 대조군 수준”으로 나타낸다. 반면에, 만약 대조군 수준이 암의 생물학적 시료로부터 확인되면, “암 대조군 수준”으로 나타낸다.

[0253] C1orf59 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 수준에 비해 증가되었을 때, 또는 암 대조군 수준에 유사하거나/동등할 때, 바람직하게 개체는 본 발명의 백신 또는 약학적 조성물로 치료된다.

[0254] 더욱 구체적으로, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 (i) 치료되기 위한 암이 있는 개체를 진단, 및/또는 (ii) 암 치료에 대한 개체를 선택 방법을 제공한다:

[0255] a) 치료되기 위한 암을 가진 것으로 의심되는 개체로부터 얻어지는 암세포 또는 조직에서 C1orf59의 발현 수준을 확인하는 단계;

[0256] b) 정상 대조군 수준과 C1orf59 발현 수준의 비교하는 단계;

[0257] c) 만약 C1orf59의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 증가되었다면, 치료되기 위한 암을 가지는 개체로 진단하는 단계 ; 및

[0258] d) 만약 개체가 단계 c)에서 치료될 암을 가지고 있다고 진단되었다면, 암 치료에 대한 개체로 선택하는 단계.

[0259] 또는, 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0260] a) 치료되기 위한 암이 있다고 의심되는 개체로부터 얻어진 암 세포 또는 암 조직에서 C1orf59의 발현 수준을 확인하는 단계;

[0261] b) 암 대조군 수준과 C1orf59의 발현 수준 비교하는 단계;

[0262] c) 만약 C1orf59의 발현 수준이 암 대조군 수준과 유사하거나 또는 동등하다면, 치료되기 위한 암을 가진 개체로 진단하는 단계;및

[0263] d) 만약 단계 c)에서 치료될 암을 가진 것으로 진단되었다면, 암 치료에 대한 개체로 선택하는 단계.

[0264] 또한, 본 발명은 본 발명의 C1orf59 폴리펩티드로 치료될 수 있는 암으로부터 고통받는 개체를 확인하며, 암 면

역치료의 효율을 평가 및/또는 모니터링하는데 유용할 수 있는 키트를 제공한다. 바람직하게, 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암을 포함하지만 이에 한정하지 않는다. 더욱 특히, 상기 키트는 바람직하게 개체 유래 암 세포안의 C1orf59유전자의 발현을 탐지하기 위한 적어도 한 가지 시약을 포함하며, 이러한 시약은 하기의 군으로부터 선택될 수 있다:

[0265] (a) C1orf59 유전자의 mRNA 탐지를 위한 시약;

[0266] (b) C1orf59 단백질의 탐지를 위한 시약; 및

[0267] (c) C1orf59 단백질의 생물학적 활성을 탐지하기 위한 시약.

[0268] C1orf59유전자의 mRNA를 탐지하기 위한 적절한 시약은 특이적으로 결합 또는 C1orf59 mRNA를 확인하는 C1orf59 mRNA의 부분에 대한 상보적 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드와 같은 핵산을 포함한다. 이러한 유형의 올리고뉴클레오티드는 C1orf59 mRNA에 특이적인 프라이머 및 탐침으로 증폭될 수 있다. 이러한 유형의 올리고뉴클레오티드는 당업계에 잘 알려진 방법에 기초하여 준비될 수 있다. 만약 필요하다면, C1orf59 mRNA를 탐지하기 위한 시약은 고체 매트릭스에 고정화될 수 있다. 또한, C1orf59 mRNA를 탐지하기 위한 하나 이상의 시약은 키트안에 포함될 수 있다.

[0269] 반면에, C1orf59 단백질을 탐지하기 위한 적절한 시약은 C1orf59 단백질에 대한 항체를 포함한다. 상기 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 또한 단편 또는 변형된 항제가 C1orf59단백질에 결합하는 능력을 유지하는 한, 상기 항체의 어떤 단편 또는 변형 (예를 들어, 카이메릭 항체,scFv, Fab, F(ab')2, Fv 등등)은 시약으로 사용될 수 있다. 단백질 탐지를 위한 이러한 유형의 항체를 준비하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 방법은 이러한 항체 및 그것의 등가물을 준비하는 방법도 본 발명에서 적용될 수 있다. 또한, 항체는 직접적인 연결 또는 간접적인 표지 기술을 통해 신호 발생 분자로 표지될 수 있다. 표지 및 항체 표지에 대한 방법 및 그들의 표적으로 항체의 결합을 탐지하는 것은 당업계에 잘 알려져 있으며, 어떤 표지 및 방법은 본 발명에 적용될 수 있다. 또한, C1orf59 단백질을 탐지하기 위한 하나 이상의 시약은 키트안에 포함될 수 있다.

[0270] 상기 키트는 상기 언급한 시약의 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 암 또는 암으로 부터의 고통이 없는 개체로부터 얻어진 조직 샘플은 유용한 대조 시약으로 제공할 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 바람직한 상업적 및 사용자의 관점으로 부터, 버퍼, 희석액, 필터, 니들, 주사기 및 사용설명서(예를 들어, 문서, 테잎, CD-ROM)를 포함하는 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0271] 본 발명의 실시태양에서, C1orf59 mRNA에 대한 탐침이 시약일 때, 상기 시약은 탐지 부위가 적어도 한 개로 구성되는 다공성 스트립과 같은 고체 메트릭스에 고정화될 수 있다. 다공성 스트립의 측정 또는 탐지는 각각의 구성하는 핵산(탐침)부위의 많은 수를 포함할 수 있다. 시험 스트립은 또한 음성 및/또는 양성 대조군에 대한 부위를 포함할 수 있다. 또는, 대조군 부위는 시험 스트립으로부터 분리된 스트립에 위치할 수 있다. 선택적으로 다른 탐지 부위는 고정화된 핵산의 다른 양, 즉, 첫번째 탐지 부위의 높은 양 및 다음 부위 안의 적은 양을 포함할 수 있다. 시험 시료를 더했을 때, 탐지가능한 신호를 제시하는 부위의 수는 시료 안에 존재하는 C1orf59 mRNA의 양의 정량적 지표를 제공한다. 상기 탐지 부위는 어떠한 적절하게 탐지가능한 모양으로 구성될 수 있으며, 일반적으로 시험 스트립의 바 또는 닷 스패닝(dot spanning) 상기 너비 안에 있다.

[0272] 또한, 본 발명의 키트는 양성 대조군 시료 또는 C1orf59 표준 시료을 포함한다. 상기 본 발명의 양성 대조군 시료는 C1orf59 양성 시료를 수집하고, 그 후에 그들의 C1orf59 수준을 분석함으로써 준비될 수 있다. 그 대신에, 정제된 C1orf59 단백질 또는 폴리뉴클레오티드는 양성 시료 또는 C1orf59 표준 시료를 형성하기 위해 C1orf59을 발현하지 않는 세포에 더해질 수 있다. 본 발명에서, 정제된 C1orf59는 재조합 단백질일 수 있다. 상기 양성 대조군 샘플의 C1orf59 수준은, 예를 들면, 상기 컷 오프 수준(cut off value) 그 이상이다.

[0273] 하기의 실시예는 본 발명을 설명하고, 당업자가 상기 동일한 것을 제작하고 이용하는 일반적인 기술 중 하나를 돕기 위해 제시된다. 상기 실시예는 본 발명의 범위를 어느 방법으로든 제한하려는 것은 아니다.

[0274] **실시예**

[0275] **실시예1**

[0276] **재료 및 방법**

[0277] **세포주**

[0278] T2(HLA-A2), 인간 B-림프아구양 세포주 및 아프리칸 그린 원숭이 신장 세포주인 COS7를 ATCC에서 구입하였다.

[0279] **C1orf59 유래 펩티드의 후보 선택**

[0280] HLA-A*0201 분자에 결합하는 C1orf59 유래의 9-머 및 10-머 아미노산 펩티드를 Parker KC et al.(J Immunol 1994, 152(1):163-75) 및 Kuzushima K et al.(Blood 2001, 98(6):1872-81)에 의해 알고리즘이 기재되어 있는 결합 예측 소프트웨어 "BIMAS"(http://www-bimas. cit. nih. gov/molbio/hla_bind)를 사용하여 예측하였다. 이러한 펩티드는 표준적인 고체상 합성법에 따라 Biosynthesis(Lewisville, Texas)에서 합성하였고, 역상고속액체크로마토그래피(HPLC)로 정제하였다. 상기 펩티드의 순도(>90%) 및 동일성은 각각 분석용 HPLC 및 질량분석을 통하여 측정하였다. 펩티드를 디메틸설폭시드(dimethylsulfoxide, DMSO) 20 mg/mℓ에 용해하고, -80℃에서 저장하였다.

[0281] **시험관 내에서의 CTL 유도**

[0282] 단핵세포 유래 수지상세포(dendritic cell, DC)를 APCs(antigen-presenting cell, APC)로 사용하여 인간 백혈구 항체(human leukocyte antigen, HLA)에 제시된 펩티드에 대한 CTL 반응을 유도하였다. 참고 문헌(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)에 기재된 바와 같이, 수지상세포를 시험관 내에서 제작하였다. 구체적으로, Ficoll-Plaque(Pharmacia) 용액을 사용하여 정상적인 지원자(HLA-A*0201 양성)에서 분리한 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 단핵세포 비율을 높이기 위하여 플라스틱 조직배양 접시(Becton Dickinson)에 붙여서 분리하였다. 단핵세포가 많은 개체군을 1000 U/ml의 과립구 대식세포 콜로니 자극인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)(R&D System) 및 1000 U/ml 인터루킨-4(interleukin-4, IL-4)(R&D System)가 존재하고 2%의 열에 의해 비활성화된 자가혈청(autologous, AS)을 포함하는 AIM-V 배지(Invitrogen)에서 배양하였다. 배양 7일 후, 사이토카인으로 유도한 수지상세포에, AIM-V 배지에서 20 ℃에서 4시간 동안, 3 ㎍/ml의 β2-마이크로글로불린 존재하에서 20 ㎍/ml의 각각의 합성 펩티드를 적용하였다. 제조된 세포는 그 세포표면에, CD80, CD83, CD86 및 HLA 클래스 II 등의 DC 관련 분자를 발현하는 것으로 나타났다(결과는 나타내지 않음). 그런 다음, 펩티드 자극한 수지상세포를 마이토마이신 C(mitomycin C, MMC)로 불활성화(30 ㎍/ml로 30분간)하여, CD8 Positive Isolation Kit(Dynal)를 사용하여 양성 선택으로 얻은 자가 CD8 양성 T 세포와 1:20의 비율로 혼합하였다. 이들 배양물을 48-웰 플레이트(Corning)에 배양하여; 각 웰은 0.5 mℓ의 AIM-V/2% AS 배지에 1.5×10^4개의 수지상세포, 3×10^5개의 펩티드 자극한 CD8 양성 T 세포, 및 10 ng/ml의 IL-7(R&D System)을 포함하였다. 배양 3일 후, 상기 배양액에 최종 농도를 20 IU/ml가 되도록 하여 IL-2(CHIRON)를 첨가하였다. 7일 및 14일째에, 펩티드로 자극한 자가 수지상세포로 T 세포를 더 자극하였다. 상기와 같은 방법으로 상기 수지상세포를 매회 제조하였다. 21일 째에 3차 펩티드 자극 후, 펩티드를 자극한 T2 세포에 대하여 CTL 활성을 측정하였다. (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20,84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506).

[0283] **CTL 증식 과정**

[0284] Riddell 등에 의해 보고된 방법과 같은 방법을 사용하여 CTL을 배양하여 증식시켰다(Walter et al., N Engl J Med 1995, 333(16):1038-44; Riddell et al, Nat Med 1996 Feb, 2(2):216-23). 총 5×10^4 개의 CTL을 40 ng/ml의 항 CD3 단일 클론 항체(Pharmingen)의 존재 하에서, MMC에 의해 불활성화된 두 종류의 인간 B 림프아구양(lymphoblastoid) 세포주와 함께, 25 ml의 AIM-V/5% AS 배지에 현탁하였다. 배양 시작한 뒤 1일 후, 120 IU/ml의 IL-2를 상기 배양물에 첨가하였다. 5, 8 및 11일째에 30 IU/ml의 IL-2를 함유하는 신선한 AIM-V/5% AS 배지를 상기 배양물에 공급하였다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5,84(1):94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20,84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May ,97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506).

[0285] **CTL 클론(clone)의 수립**

[0286] 96 웰 둥근 바닥 마이크로 타이터 플레이트(round-bottomed micro titer plate, Nalge Nunc International)에 한 웰당 0.3, 1 및 3 CTL이 되도록 희석하였다. 한 웰당 5% AS를 함유하는 총 150 ㎕의 AIM-V 배지에서 한 웰

당 1×10^4 세포의 두 종류의 인간 B 림프아구양 세포주, 30 ng/ml의 항 CD3 항체, 및 125 U/ml의 IL-2와 함께 CTL을 배양하였다. 10일 후, IL-2의 최종농도가 125 U/ml이 되도록 상기 배지에 한 웰당 50 ml의 IL-2를 첨가하였다. 14일째에 CTL 활성을 시험하였고, 상기와 같은 방법을 이용하여 CTL 복제(clone)를 증식시켰다(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506).

[0287] **특이적인 CTL 활성**

[0288] 특이적인 CTL 활성을 조사하기 위하여, 인터페론-감마(interferon-γ, IFN-γ) 효소결합 이뮤노스팟(enzyme-linked immunospot, ELISPOT) 분석 및 IFN-gamma효소결합면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 실시하였다. 구체적으로, 펩티드 자극한 T2 (1×10^4개/웰)을 자극세포로서 제조하였다. 48 웰에 배양한 세포 또는 한계 희석 후의 CTL 클론(clone)을 반응 세포(responder cell)로서 사용하였다. IFN-gamma ELISPOT 분석 및 IFN-gamma ELISA 분석을 제작자의 과정에 따라서 수행하였다.

[0289] **외생적으로 표적 유전자 및 HLA-A02 모두 또는 따로 발현하는 세포의 준비**

[0290] 표적 유전자 또는 HLA-A02의 개방형 해독틀(open reading frame)을 암호화하는 cDNA(complementary DNA, cDNA)를 PCR로 증폭하였다. PCR-증폭 산물을 pCAGGS 벡터(vector)에 클로닝하였다. 플라스미드를 제작자의 권장된 절차에 따라 리포펙타민(lipofectamine) 2000(Invitrogen)을 이용하여 표적 유전자 및 HLA-A02가 없는 세포주 COS7로 형질전환되었다. 형질전환한 2주 후에, 형질전환된 세포는 버센(versene, Invitrogen)으로 수득하였고, CTL 활성 분석에 대한 표적세포 (5 X 10^4 세포/웰)로 이용하였다.

[0291] **결과**

[0292] **암에서 증가된 C1orf59 발현**

[0293] 전체 유전자 발현 분석 데이타는 다양한 암으로부터 C1orf59 (GenBank Accession No. NM_144584; 서열번호 42)발현이 증가한 것으로 나타나는 cDNA-마이크로어레이(cDNA-microarray)로부터 수득하였다. C1orf59 발현은 33례 방광암 중 31례에서, 70례 유방암 중 34례에서, 12례 자궁경부암 중 11례에서, 8례 직장암중 8례에서, 27례 식도암 중 25례에서, 10례 비소세포폐암 중 2례에서, 16례 골육종 중 8례에서, 1례 난소암 중 1례에서, 6례 췌장암 중 3례에서, 41례 전립선암 중20례에서, 13례 소세포폐암 중 7례에서, 34례 소프트 조직 종양(soft tissue tumors) 중 25례에서 이에 상응하는 정상 조직과 비교하여 유효하게 증가하였다(표 1).

표 1

[0294] 상응하는 정상조직과 비교하여 암 조직에서 C1orf59의 상향 조절이 나타난 사례의비율

암(cancers)	비율(Ratio)
방광암(bladder cancer)	31/33
유방암(breast cancer)	34/70
자궁경부암(cervical cancer)	11/12
결장암(colorectal cancer)	8/8
식도암(esophagus cancer)	25/57
비소세포폐암(NSCLC)	2/10
골육종(osteosarcoma)	8/16
난소암(ovarian cancer)	1/1
췌장암(pancreatic cancer)	3/6
전립선암(prostate cancer)	20/41
소세포폐암(SCLC)	7/13

[0295] **C1orf59 유래 HLA-A02에 결합하는 펩티드의 예측**

[0296] 표 2는 C1orf59 중 HLA-A02에 결합하는 펩티드를 결합 친화성이 높은 순서대로 나타낸다. 잠재적 HLA-A02 결합성을 가지는 총 24개의 펩티드를 선택하였고, 에피토프 펩티드를 결정하기 위해 시험하였다(표 2).

표 2

C1orf59 유래 HLA-A02에 결합하는 9-머 및 10-머 펩티드들

펩티드 명칭	순위	개시 부위	아미노산 서열	BIMAS 점수	서열 번호
C1orf59-9mer	1	261	LQQERFFKL	166.362	1
	2	333	FCVGDKFFV	66.623	2
	3	152	YLSPSMIVI	45.255	3
	4	121	RLLGFDLIT	42.958	4
	5	271	LVNEVSQQV	42.418	5
	6	63	RLLKVNPCI	38.601	6
	7	122	LLGFDLITC	19.425	7
C1orf59-10mer	1	261	LQQErFFKLV	354.871	8
	2	240	CLSEqHDQHV	285.163	9
	3	260	SLQQeRFFKL	235.414	10
	4	270	VLVNeVSQQV	118.238	11
	5	346	LLAYpKLNRL	83.527	12
	6	90	SLAPfLGDFL	57.572	13
	7	334	CVGDkFFVPL	55.332	14
	8	188	MEFQtWALYV	46.786	15
	9	121	RLLGfDLITC	42.278	16
	10	122	LLGFdLITCI	40.792	17
	11	30	PLYRqRYQFV	40.396	18
	12	183	FEWTrMEFQT	32.087	19
	13	196	YVANrYDYSV	27.995	20
	14	10	SVVDgNFEEV	23.23	21
	15	66	KVNPcIELLV	21.3	22
	16	326	IENSpTPFCV	13.335	23
	17	252	AVFTtSYPSL	10.374	24

[0297]

[0298] 개시 부위는 C1orf59의 N-말단으로부터 아미노산 잔기의 수를 나타낸다.

[0299] **HLA-A*0201에 제한적인 C1orf59 유래 예측된 펩티드로 CTL 유도**

[0300] C1orf59 유래 이러한 펩티드들에 대한 CTL은 "재료 및 방법"에 기재한 프로토콜에 따라 제작하였다. 펩티드 특이적 CTL 활성은 IFN-gamma ELISPOT 분석으로 결정되었다(도 1(a)-(i)). 도 1은 C1orf59-A02-9-261(서열번호 1)로 자극한 6번 웰(a), C1orf59-A02-9-152(서열번호 3)로 자극한 2번 및 7번 웰(b), C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4)로 자극한 4번 및 6번 웰 (c), C1orf59-A02-9-122 (서열번호 7)로 자극한 3번 웰 (d), C1orf59-A02-10-240 (서열번호 9)로 자극한 5번 웰 (e), C1orf59-A02-10-90 (서열번호 13)로 자극한 4번 웰 (f), C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15)로 자극한 7번 웰 (g), C1orf59-A02-10-122 (서열번호 17)로 자극한 4번 및 8번 웰 (h), 및 C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20)로 자극한 2번 웰 (i)은 대조군의 웰에 비해서 강력한 IFN-gamma 생산을 입증하는 것을 나타낸다. 반면, 이러한 펩티드들이 HLA-A*0201와 잠재적 결합 활성을 가짐에도 불구하고, 표 1에서와 같이 다른 펩티드에 의한 자극은 특이적 CTL 활성을 나타내지 않았다. 음성 데이타의 전형적인 예로서, C1orf59-A02-10-261 (서열번호 8)로 자극된 CTL에서 특이적 IFN-gamma 생산은 확인되지 않았다 (도. 1 (j)). 결과적으로, C1orf59 유래 9-머 펩티드들이 강력한 CTL들을 유도할 수 있는 펩티드들을 선별하였다.

[0301] **C1orf59 특이적 펩티드에 대한 CTL 세포주와 클론의 수립**

[0302] IFN-gamma ELISPOT 분석에 의해 확인된 펩티드 특이적 CTL 활성을 보이는 C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3)로 자극한 7번 웰, C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4)로 자극한 6번 웰, C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15)로 자극

한 7번 웰, C1orf59-A02-10-122 (서열번호 17)로 자극한 8번 웰 및 C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20)로 자극한 2번 웰의 세포는 증식되었고 CTL 세포주로 수립되었다. 이러한 CTL 세포주의 각각의 CTL 활성은 IFN-gamma ELISA 분석으로 확인되었다(도. 2 (a)-(e)). 모든 CTL 세포주는 펩티드 자극이 없는 표적세포에 비해서 상응하는 펩티드로 자극된 표적 세포에 대해 강력한 IFN-gamma 생산을 나타내는 것으로 보인다. 또한, CTL 클론을 "재료 및 방법"에 기재한 것에 따라 CTL세포주로부터 희석을 제한함으로써 수립하였으며, 펩티드로 자극된 표적세포에 대한 CTL 클론의 IFN-gamma 생산은 IFN-gamma ELISA 분석으로 확인하였다(도. 3 (a)-(c)). C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4), C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15) 및 C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20)로 자극된 CTL 클론으로부터 강력한 IFN-gamma 생산을 확인하였다.

[0303] **외생적으로 C1orf59 및 HLA-A*0201를 발현하는 표적 세포에 대한 특이적 CTL 활성**

[0304] 이러한 펩티드에 대해 수립된 상기의 CTL 세포주에 대하여 C1orf59 및 HLA-A*0201 분자를 외생적으로 발현하는 표적세포를 인식하는 그들의 능력을 시험하였다. C1orf59 및 HLA-A*0201 분자 유전자의 전장으로 형질전환된 COS7세포에 대한 특이적 CTL 활성(C1orf59 및 HLA-A*0201 유전자를 외생적으로 발현하는 표적 세포에 대한 특이적 모델)은 효과 세포로서 상응하는 펩티드에 의해 유도된 CTL 세포주를 이용하여 시험하였다. C1orf59 유전자 또는 HLA-A* 0201로 형질 전환한 COS7 세포는 대조군으로 준비되었다. 도 4에서, C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3) (a), C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4) (b) 및 C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15) (c)로 자극된 CTL은 C1orf59 및 HLA- A* 0201 둘 모두를 발현하는 COS7세포에 대해 강력한 활성을 보였다. 반면에, 대조군에 대해 특이적 CTL 활성은 나타나지 않았다. 따라서, 이러한 데이타는 C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3), C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4) 및 C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15)가 HLA-A*0201 분자와 함께 표적세포에 자연적으로 발현하면 CTL에 의해 인식된다는 것을 명백하게 증명한다. 이러한 결과는 C1orf59 유래 이러한 펩티드가 C1orf59을 발현하는 암이 있는 환자에 대한 암 백신에 적용될 수 있음을 나타낸다.

[0305] **항원 펩티드의 상동성 분석**

[0306] 하기 서열로 자극된 CTL은

[0307] C1orf59-A02-9-261 (서열번호 1),

[0308] C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3),

[0309] C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4),

[0310] C1orf59-A02-9-122 (서열번호 7),

[0311] C1orf59-A02-10-240 (서열번호 9),

[0312] C1orf59-A02-10-90 (서열번호 13),

[0313] C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15),

[0314] C1orf59-A02-10-122 (서열번호 17) 및

[0315] C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20)는 현저하고 특이적인 CTL 활성을 보인다. 이러한 결과는 C1orf59-A02-9-261 (서열번호 1), C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3), C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4), C1orf59-A02-9-122 (서열번호 7), C1orf59-A02-10-240 (서열번호 9), C1orf59-A02-10-90 (서열번호 13), C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15), C1orf59-A02-10-122 (서열번호 17) 및 C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20)의 서열이 사람의 면역 반응을 예민하게 하는 것으로 알려진 다른 분자 유래 펩티드에 대해 상동성이 있다는 사실로 인한 것일 것이다. 이러한 가능성을 차단하기 위해, 이러한 펩티드 서열에 대한 상동성 분석은 특이적 상동성이 없는 서열을 나타내는 BLAST 알고리즘 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)을 이용하여 수행된다. 하기의 서열의 상동성 분석 결과,

[0316] C1orf59-A02-9-261 (서열번호 1),

[0317] C1orf59-A02-9-152 (서열번호 3),

[0318] C1orf59-A02-9-121 (서열번호 4),

[0319] C1orf59-A02-9-122 (서열번호 7),

[0320] C1orf59-A02-10-240 (서열번호 9),

[0321] C1orf59-A02-10-90 (서열번호 13),

[0322] C1orf59-A02-10-188 (서열번호 15),

[0323] C1orf59-A02-10-122 (서열번호 17) 및

[0324] C1orf59-A02-10-196 (서열번호 20)은 유일하며 따라서, 본 출원인의 지식으로, 이러한 분자는 연관되지 않은 분자에 대한 의도되지 않은 면역 반응을 일으킬 가능성이 거의 없다.

[0325] 결론적으로, C1orf59 유래 신규한 HLA-A02 에피토프 펩티드는 확인되었으며, 암 면역치료에 대해 적용될 수 있음이 증명되었다.

[0326] **실시예2**

[0327] **재료와 방법**

[0328] **세포주**

[0329] A24 림프아구양 세포주 (A24LCL)는 HLA-A24 양성 사람 B-림프아구양 세포로 엡스테인-바 바이러스(Epstein-barr virus)로 형질전환되어 수립된다. 아프리칸 그린 원숭이 신장 세포주인 COS7는 ATCC에서 구입되었다.

[0330] **C1orf59유래 펩티드 후보 선택**

[0331] HLA-A*2402 분자에 결합하는 C1orf59 유래 9-머 또는 10-머 펩티드는 결합 예측 소프트웨어인 "BIMAS" (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al.(J Immunol 1994, 152(1): 163-75) Kuzushima et al.(Blood 2001, 98(6): 1872-81))에 의해 예측된다.

[0332] 이러한 펩티드는 표준 고체상 합성 방법에 따라 Sigma (Sapporo, Japan) 에서 합성되고 역전상 HPLC(high performance liquid chromatography)에 의해 정제된다. 펩티드의 순도(>90%)와 동질성은 분석적인 HPLC와 질량 분광법 분석에 의해 각각 결정된다. 펩티드는 DMSO(dimethylsulfoxide)에 의해 20 mg/ml로 희석되며, -80℃에서 보관된다.

[0333] **시험관내 CTL 유도**

[0334] 단핵구-유래 수지상 세포(Monocyte-derived dendritic cells, DC)는 HLA(human leukocyte antigen)에 제시된 펩티드에 대한 CTL(cytotoxic T lymphocyte) 반응을 유도하는 APCs(APC)로써 쓰인다. 수지상 세포는 기재한 바와 같이 시험관내에서 만들어진다(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). 특히, 피콜-플라그(Pharmacia) 용액에 의해 정상 지원자(HLA-A*2402 양성)로부터 분리된 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)는 단핵구 분획에 그들이 풍부하도록 하기 위해 플라스틱 배양 용기(Becton Dickinson)에 부착하여 분리되었다. 단핵구가 풍부한 개체군은 1000 U/ml GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, R&D System) 및1000 U/ml interleukin (IL)-4 (R&D System) 존재하에 2% 열-비활성화 자가 혈청(AS)을 포함하는AIM-V Medium (Invitrogen)에서 배양되었다. 배양 7일 후, 사이토카인이 도입된 수지상세포는 20 μg/ml의 합성된 각 펩티드로 자극하고, 3 ㎍/ml 베타 2-마이크로글로블린(beta 2-microglobulin) 존재하에 AIM-V 배지에서 37℃에서 3시간 동안 배양되었다. 만들어진 세포는 CD80, CD83, CD86 및 HLA class II와 같은 수지상세포 관련된 분자를 그들의 세포 표면에 발현하였다(데이터는 나타내지 않음). 이러한 펩티드-자극된 수지상세포는 X-irradiated (20 Gy)로 비활성화시키고, 자가유래 CD8 양성 T 세포와 1:20의 비율로 혼합하였으며, CD8 Positive Isolation Kit (Dynal)로 양성 선택물을 수득하였다. 이러한 배양은 48-웰 플레이트(Corning)에서 설정되었다; 각 웰은 펩티드-자극된 수지상세포 1.5 x 10^4, CD8 양성 T 세포 3 x 10^5 및 0.5 ml AIM-V/2% AS 배지 안에10 ng/ml IL-7 (R&D System)을 포함하였다. 3일이 지난 후, 이러한 배양에 최종농도가 20 IU/ml 인IL-2 (CHIRON)가 보충되었다. 7일과 14일에, T 세포는 또한 자가유래 펩티드-자극된 수지상세포에 의해 자극되었다. 수지상세포는 상기에 기재한 방식대로 각 시간에 준비되었다. 펩티드 자극 21일의 세번째 단계 후에, CTL은 펩티드-자극된 A24 LCL 또는 T2 세포에 대해 시험되었다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0335] **CTL 증식 절차**

[0336] Riddell et al에 의해 기재된 방법과 유사한 상기 방법을 이용하여 CTL은 증식되었다(Walter EA et al., N

Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23). 총 5 x 10^4 CTL이 AIM-V/5% AS배지 25 ml에 두 가지 유형의 사람 MMC로 비활성화된 B- 림프아구양세포 세포주와 함께 40 ng/ml anti-CD3 monoclonal antibody (Pharmingen) 존재하에 부유되었다. 배양을 시작한 후 1일, 120 IU/ml IL-2를 배양세포에 더해주었다. 5, 8, 11일에 배양세포에 30 IU/ml IL-2를 포함하는 신선한 AIM-V/5% AS 배지를 주었다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0337] **CTL클론의 수립**

[0338] 96 round-bottomed micro titer plate (Nalge Nunc International)안에 웰당 0.3, 1 및 3 CTL을 갖도록 희석액을 만들었다. CTL은 두 종류의 사람 B-림프아구양세포 세포주 1 X 10^4, 30 ng/ml anti-CD3 항체, 125 U/ml IL-2, 총 웰당 5% AS를 포함하는 AIM-V 배지 150 ㎕와 함께 배양되었다. 50 ㎕/웰 IL-2가 10일 후에 최종 농도가 125 U/ml IL-2에 도달하도록 더해졌다. CTL 활성은 14일에 시험되었으며, CTL 클론은 기재한 바와 같은 방법을 사용하여 증식되었다(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0339] **특이적 CTL 활성**

[0340] 특이적 CTL 활성을 확인하기 위해, IFN-gamma ELISPOT(enzyme-linked immunospot)분석 및 IFN-gamma ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)가 수행되었다. 특히, 펩티드-자극된 A24 LCL(1 x 10^4/웰)은 자극 세포로 준비되었다. 48웰에 배양된 세포는 반응 세포로 사용되었다. IFN-gamma ELISPOT 분석 및 IFN-gamma ELISA는 제작자의 절차에 따라 수행되었다.

[0341] **표적 유전자 및 HLA-A24의 따로 또는 모두 발현하는 세포의 수립**

[0342] 표적유전자 또는 HLA-A24의 개방형 해독틀(open reading frame)을 암호화하는 cDNA는 PCR에 의해 증폭된다. PCR-증폭된 산물은 pCAGGS 벡터로 클로닝된다. 플라스미드는 제작자가 권장하는 절차에 따라 lipofectamine 2000 (Invitrogen) 을 이용하여 표적 유전자와 HLA-A24가 없는 세포주인 COS7로 형질전환되었다. 형질전환 2일 후에, 형질전환된 세포는 versene (Invitrogen)로 수득되었으며 CTL 활성 분석에 대한 표적세포(5 X 10^4 세포/웰)로 사용되었다.

[0343] **결과**

[0344] **C1orf59유래 HLA-A24에 결합하는 펩티드의 예측**

[0345] 표 3은 C1orf59의 HLA-A24 결합 펩티드를 높은 결합 친화성 순으로 나타낸다. 잠재적인 HLA-A24 결합 능력이 있는 총 17개의 펩티드가 선택되었으며 에피토프 펩티드를 결정하는 것이 시험되었다(표 3).

표 3

C1orf59 유래 HLA-A24에 결합하는 9-머 및 10-머 펩티드들

펩티드 명칭	순위	개시 부위	아미노산 서열	결합 점수	서열 번호
C1orf59-A24-9mer	1	385	NYFDEQFEF	132	25
	2	221	GYCTQIGIF	100	26
	3	338	KFFVPLQRL	48	27
	4	339	FFVPLQRLL	43.2	28
	5	182	KFEWTRMEF	33	29
	6	35	RYQFVKNLV	25.2	30
	7	253	VFTTSYPSL	20	31
	8	66	KVNPCIELL	14.4	32
	9	145	FPEVVFGYL	10.08	33
	10	200	RYDYSVEFT	10	34
C1orf59-A24-10mer	1	257	SYPSLQQERF	150	35
	2	144	RFPEVVFGYL	120.96	36
	3	151	GYLFPSMIVI	75	37
	4	338	KFFVPLQRLL	48	38
	5	97	DFLKPRDLNL	30	39
	6	124	GFDLITCIEL	22	40
	7	363	RSVIADSIPL	12	41

[0346]

[0347] 개시부위는 C1orf59의 상기 N-말단으로부터의 수를 나타낸다. 결합 점수는 "BIMAS"로 부터 유래되었다.

[0348] **HLA-A*2402에 제한적인 C1orf59 유래 예측된 펩티드로 CTL 유도 및 C1orf59 유래 펩티드로 자극한 CTL 세포주에 대한 수립**

[0349] C1orf59 유래 이러한 펩티드에 대한 CTL은 "재료 및 방법"에 기재된 프로토콜에 따라 만들어진다. 펩티드 특이적 CTL 활성은 IFN-gamma ELISPOT 분석에 의해 결정된다(도 5a-e). C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26) 로 자극한 5번 웰 (a), C1orf59-A24-9-66 (서열번호 32)로 자극한 3번 웰 (b), C1orf59-A24-9-200 (서열번호 34) 로 자극한 4번 웰 (c), C1orf59-A24-10-124 (서열번호 40)로 자극한 5번 웰 (d) C1orf59-A24-10-363 (서열번호 41) 로 자극한 7번 웰 (e)은 대조군 웰에 비해 강력한 IFN-gamma 생산을 증명하였다. 또한, 양성 웰의 이러한 세포들은 증식되었고, CTL 세포주로 수립되었다. 이러한 CTL 세포주의 CTL활성은 IFN-gamma ELISA 분석에 의해 결정된다(도 6a-e). 모든 CTL 세포주는 펩티드 자극이 없는 표적세포에 비해 상응하는 펩티드로 자극된 표적세포에 대한 강력한 IFN-gamma 생산을 증명하였다. 반면에, 이러한 펩티드가 HLA-A*2402 에 결합하는 특성을 보임에도 불구하고, CTL세포주는 표3에 나타난 다른 펩티드의 자극으로 수립될 수 없었다(데이터는 나타내 않음). 결과적으로, C1orf59 유래 다섯 개의 펩티드가 강력한CTL세포주를 유도할 수 있는 펩티드로 선별되는 것을 나타냈다.

[0350] **C1orf59 특이적 펩티드에 대한CTL 클론의 수립**

[0351] CTL 클론은 "재료 및 방법"에 기재한 바와 같이 CTL 세포주로부터 희석을 제한함으로써 수립될 수 있으며, 펩티드로 자극된 표적세포에 대한 CTL클론으로부터 IFN-gamma 생산은 IFN-gamma ELISA 분석으로 확인될 수 있다. 강력한 IFN-gamma 생산은 C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26), C1orf59-A24-9-66 (서열번호 32), C1orf59-A24-9-200 (서열번호 34), C1orf59-A24-10-124 (서열번호 40) 및 C1orf59-A24-10-363 (서열번호 41) 로 자극된 CTL 클론으로부터 확인되었다.

[0352] **외생적으로 C1orf59 및 HLA-A*2402을 발현하는 표적세포에 대한 특이적 CTL활성**

[0353] 이러한 펩티드에 대해 형성되고 수립된 CTL 세포주는 C1orf59 및 HLA-A*2402을 발현하는 표적세포를 인식하는 그들의 능력에 대해 시험되었다. 전장의 C1orf59 및 HLA-A*2402 분자 유전자 둘 모두 형질 전환된 COS7 세포에 (C1orf59 및 HLA-A*2402유전자를 발현하는 표적세포에 대한 특이적 모델) 대한 특이적 CTL 활성은 효과 세포로서 상응하는 펩티드에 의해 형성된 CTL세포주를 이용하여 시험되었다. COS7는 전장의 C1orf59 유전자 또는 HLA-A* 2402로 형질전환되어 대조군으로 준비되었다. 도 8에서, 서열번호 26으로 자극된 CTL은 C1orf59 및 HLA- A* 2402 둘 모두를 발현하는 COS7세포에 대해 강력한 CTL활성을 나타내었다. 반면에, 대조군에 대해서는 상당한 특이적 CTL 활성이 발견되지 않았다. 따라서, 이러한 데이터는 C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26)가 자연적으로 분해되며, HLA-A*2402 분자와 표적세포에 발현되고, CTL에 의해 인식되는 복합체임을 명백하게 증명하였다. 이러한 결과는 C1orf59 유래 펩티드들이 C1orf59 발현하는 종양이 있는 환자에 대한 암 백신으로 적용 가능한 것을 나타낸다.

[0354] **항원 펩티드의 상동성 분석**

[0355] C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26), C1orf59-A24-9-66 (서열번호 32), C1orf59-A24-9-200 (서열번호 34), C1orf59-A24-10-124 (서열번호 40) 및 C1orf59-A24-10-363 (서열번호 41) 로 자극된 CTL은 현저하고 특이적 CTL활성을 보였다. 이러한 결과는 C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26), C1orf59-A24-9-66 (서열번호 32), C1orf59-A24-9-200 (서열번호 34), C1orf59-A24-10-124 (서열번호 40) 및 C1orf59-A24-10-363 (서열번호 41)의 서열이 사람 면역계를 민감하게 하는 것으로 알려진 다른 분자 유래 펩티드에 일치하는 것 때문일 것이다. 이러한 가능성을 차단하기 위해, 상동성 분석이 BLAST 알고리즘(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)을 이용하여 이러한 펩티드들에 대해 수행되었으며, 유의적인 상동성이 있는 서열이 없는 것으로 밝혀졌다. 이러한 상동성 분석 결과는 C1orf59-A24-9-221 (서열번호 26), C1orf59-A24-9-66 (서열번호 32), C1orf59-A24-9-200 (서열번호 34), C1orf59-A24-10-124 (서열번호 40) 및 C1orf59-A24-10-363 (서열번호 41)은 독특하며 따라서, 최선의 지식으로, 이러한 분자는 연관되지 않은 분자에 대한 의도되지 않은 면역 반응을 일으킬 가능성이 거의 없다.

[0356] 결과적으로, C1orf59 유래 신규한 HLA-A24 에피토프 펩티드가 확인되었다. 또한 C1orf59의 에피토프 펩티드가 암 면역치료에 적용될 수 있음이 증명되었다.

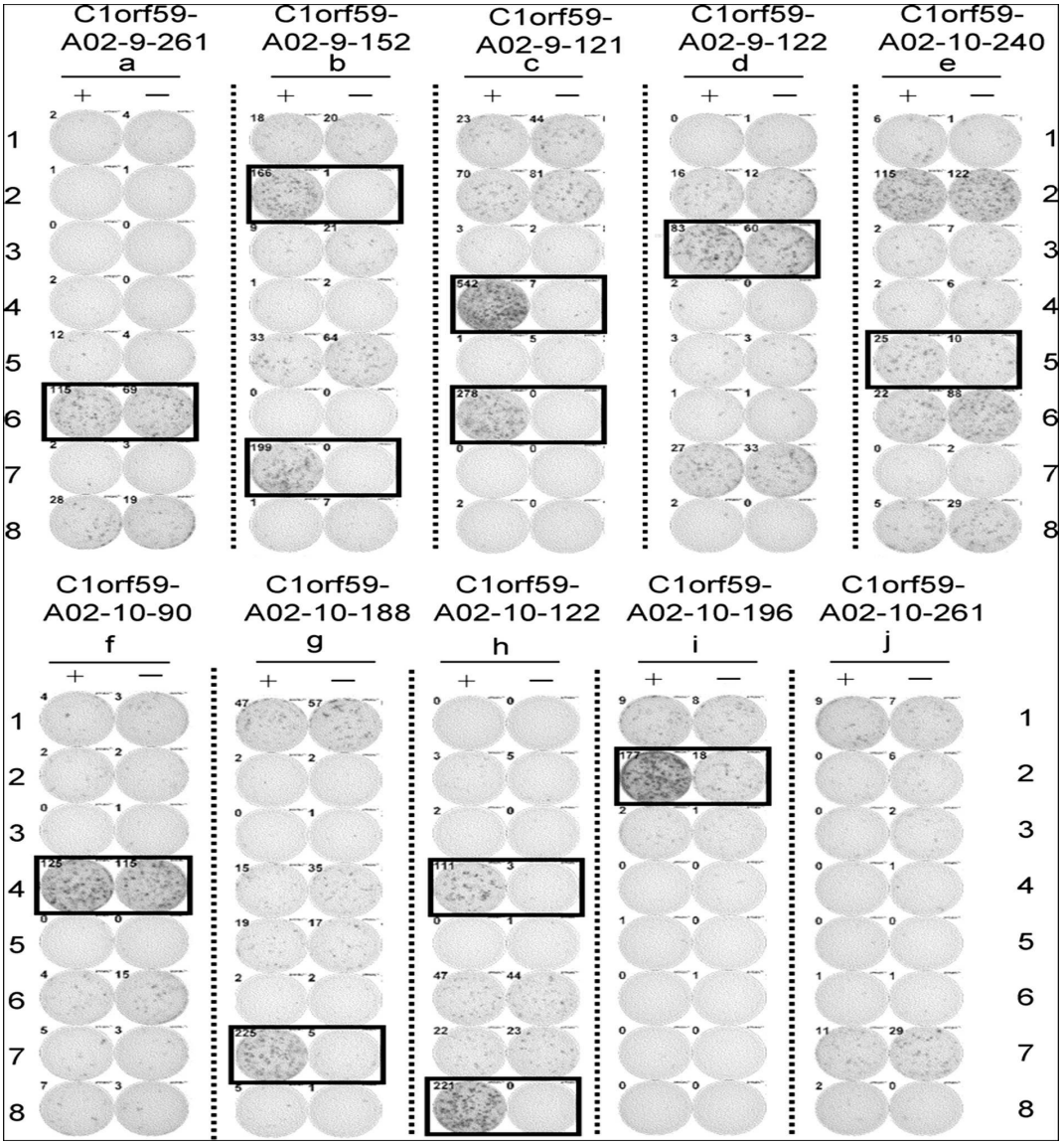
산업상 이용가능성

[0357] 본 발명은 신규한 TAA인, 강력하고 특이적인 항 종양 면역반응을 유도하고 다양한 유형의 암에 적용가능한, 특히 C1orf59 유래한 것을 기재한다. 이러한 TAA는 C1orf59 과발현에 관련된 질환, 예를 들어 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 비소세포폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암 및 소세포폐암에 대한 펩티드 백신으로 유용하다.

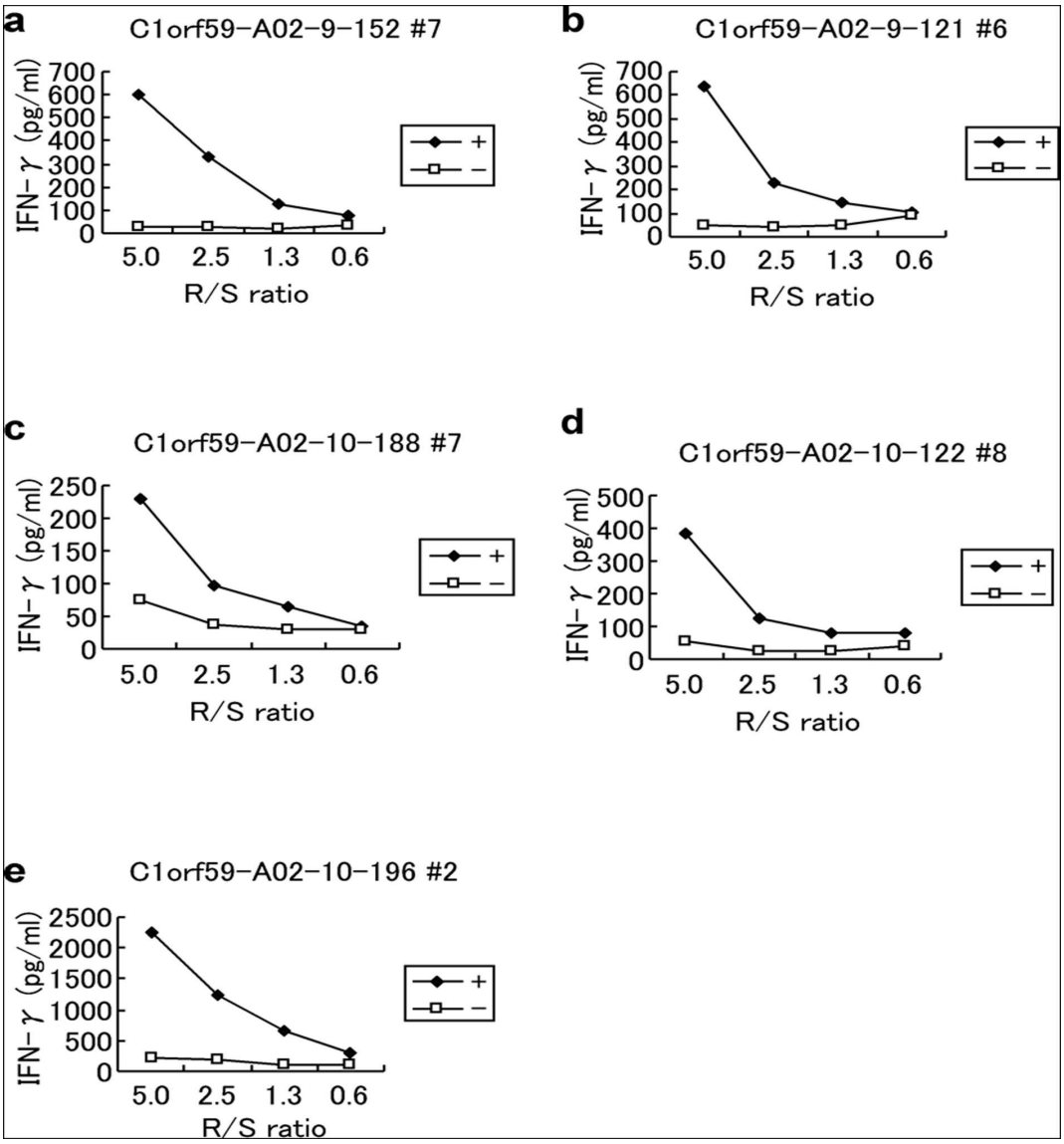
[0358] 본 발명은 본 명세서에 자세한 설명과 그것의 특정 실시태양에 대한 참고문헌이 기재되어 있지만, 앞서 언급된 설명이 본질적으로 예시 및 설명하기 위한 것이며, 본 발명 및 바람직한 실시태양을 설명하기 위한 것임으로 이해될 수 있다. 일반적인 실험을 통하여, 당업자들은 다양한 변화 및 변형이 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 만들어 질 수 있으며, 본 발명의 목적 및 한계는 첨부된 청구항에 의해서 정의된다는 것을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

도면

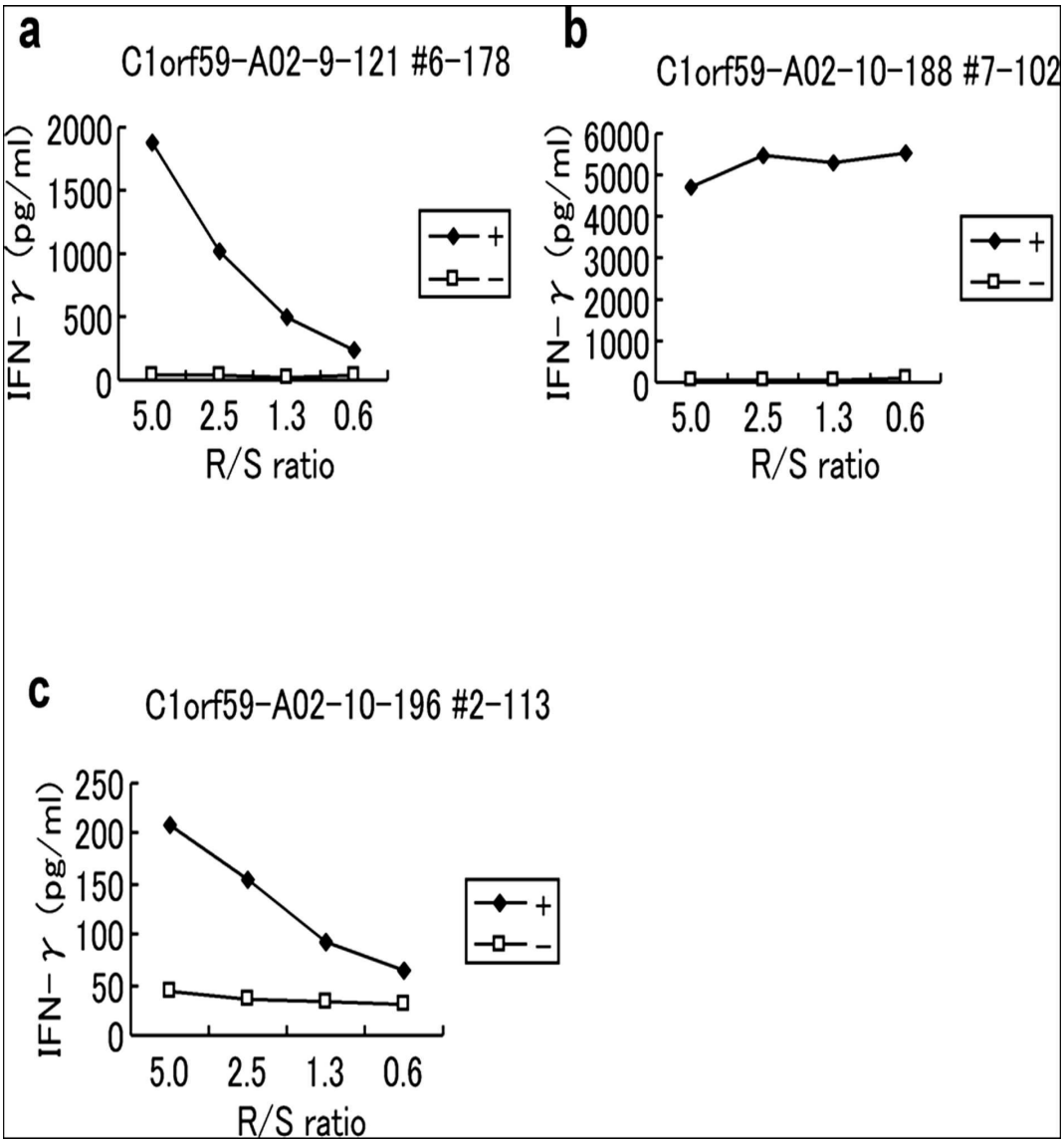
도면1


C1orf59-A02-9-261
a
C1orf59-A02-9-152
b
C1orf59-A02-9-121
c
C1orf59-A02-9-122
d
C1orf59-A02-10-240
e
C1orf59-A02-10-90
f
C1orf59-A02-10-188
g
C1orf59-A02-10-122
h
C1orf59-A02-10-196
i
C1orf59-A02-10-261
j
+
—
1
2
3
4
5
6
7
8

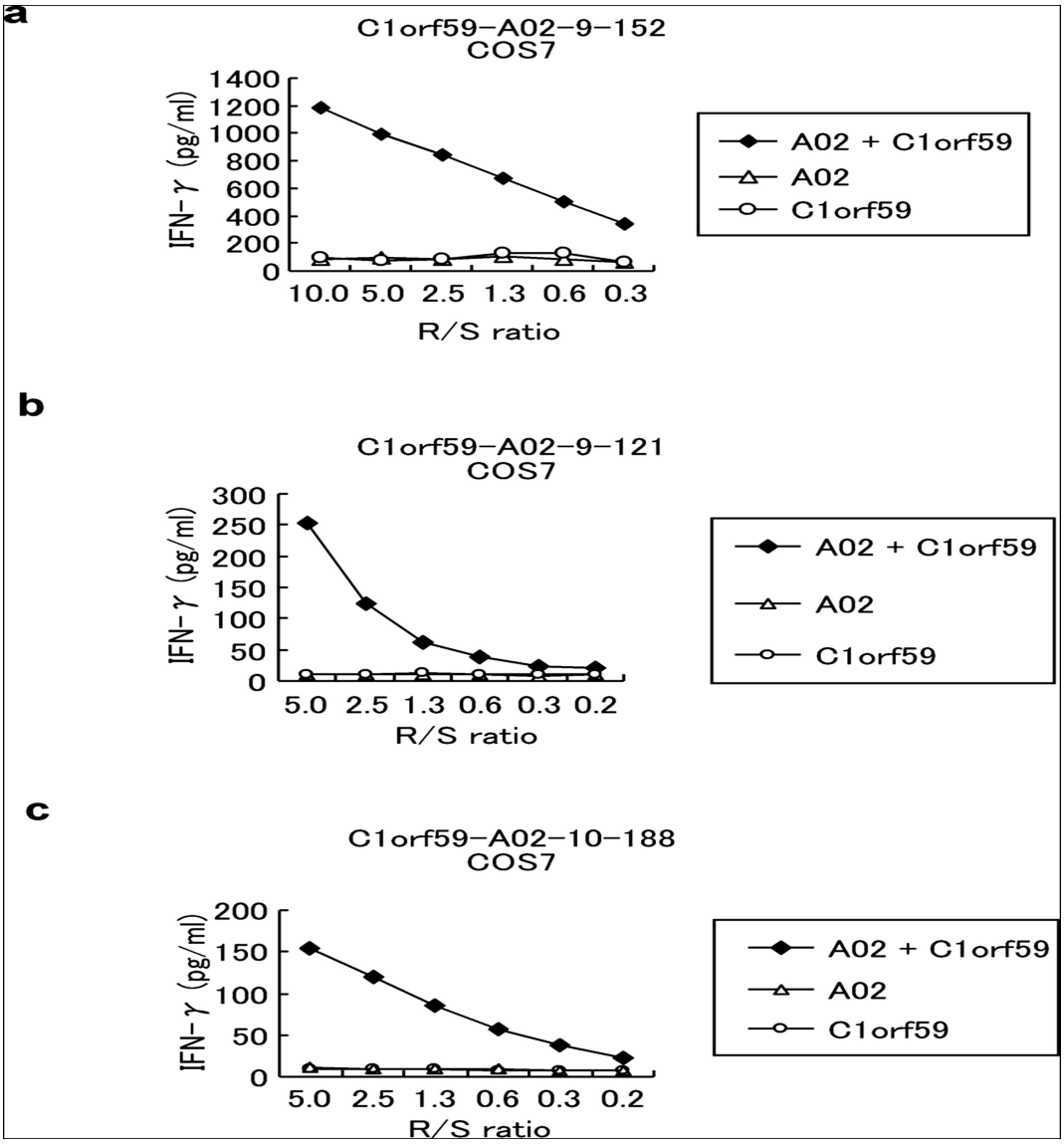
도면2


a
C1orf59-A02-9-152 #7
IFN-γ (pg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
+
−
b
C1orf59-A02-9-121 #6
IFN-γ (pg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
+
−
c
C1orf59-A02-10-188 #7
IFN-γ (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
+
−
d
C1orf59-A02-10-122 #8
IFN-γ (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
+
−
e
C1orf59-A02-10-196 #2
IFN-γ (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
+
−

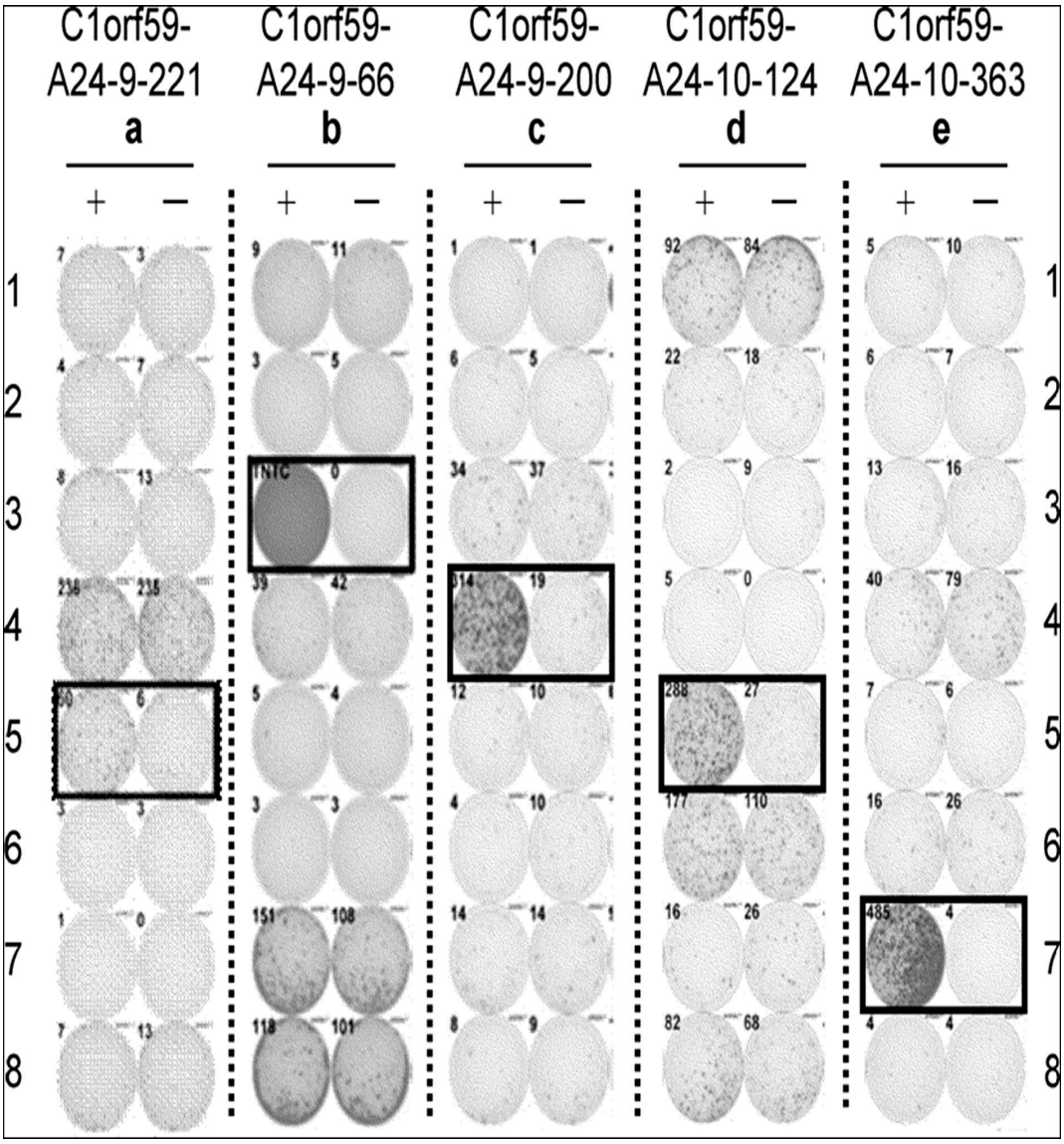
도면3


a
C1orf59-A02-9-121 #6-178
IFN-γ (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
+
−
b
C1orf59-A02-10-188 #7-102
IFN-γ (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
+
−
c
C1orf59-A02-10-196 #2-113
IFN-γ (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
5.0 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
+
−

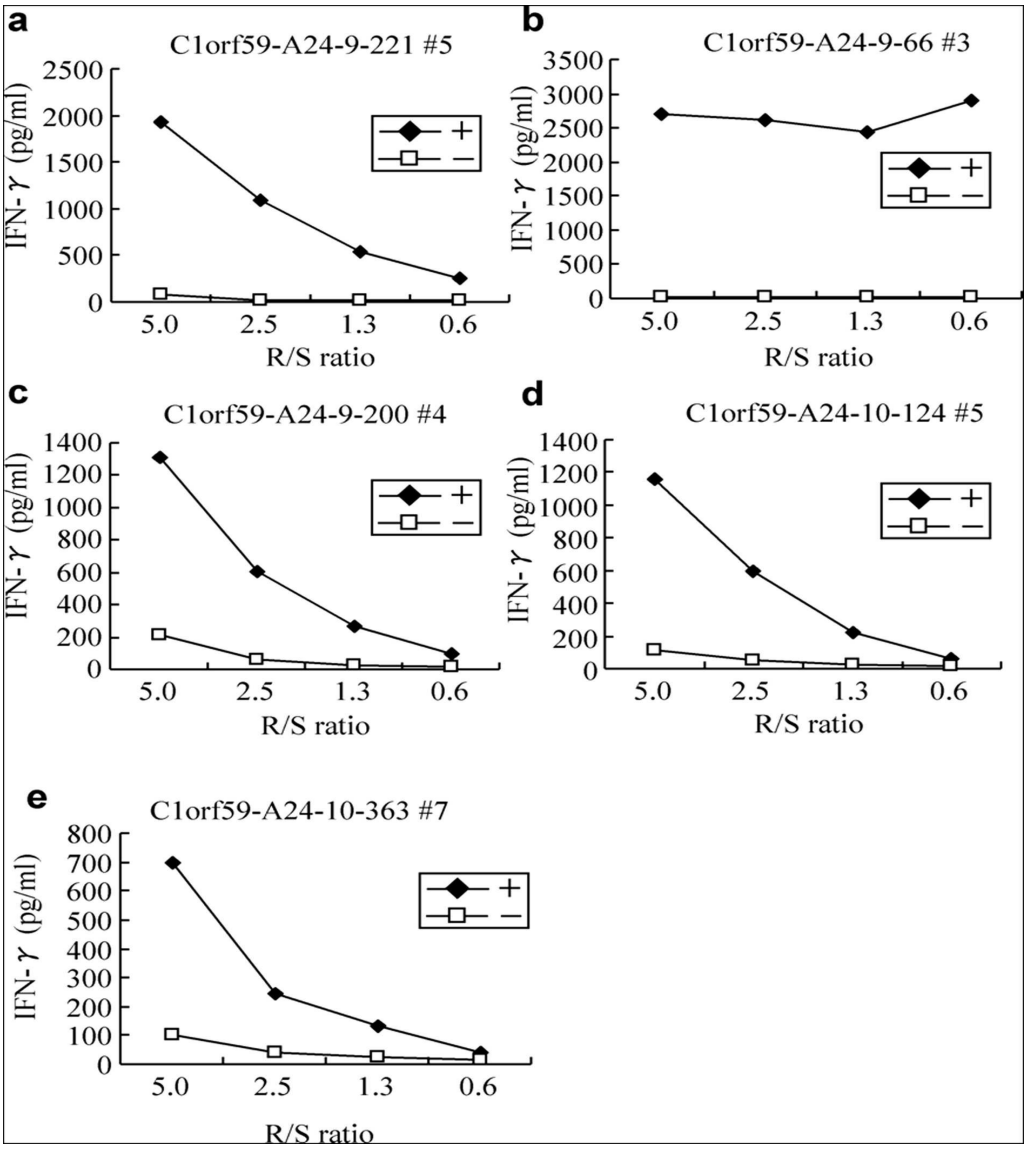
도면4


a
C1orf59-A02-9-152
COS7
IFN-γ (pg/ml)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10.0 5.0 2.5 1.3 0.6 0.3
R/S ratio
A02 + C1orf59
A02
C1orf59
b
C1orf59-A02-9-121
COS7
IFN-γ (pg/ml)
300
250
200
150
100
50
0
5.0 2.5 1.3 0.6 0.3 0.2
R/S ratio
A02 + C1orf59
A02
C1orf59
c
C1orf59-A02-10-188
COS7
IFN-γ (pg/ml)
200
150
100
50
0
5.0 2.5 1.3 0.6 0.3 0.2
R/S ratio
A02 + C1orf59
A02
C1orf59

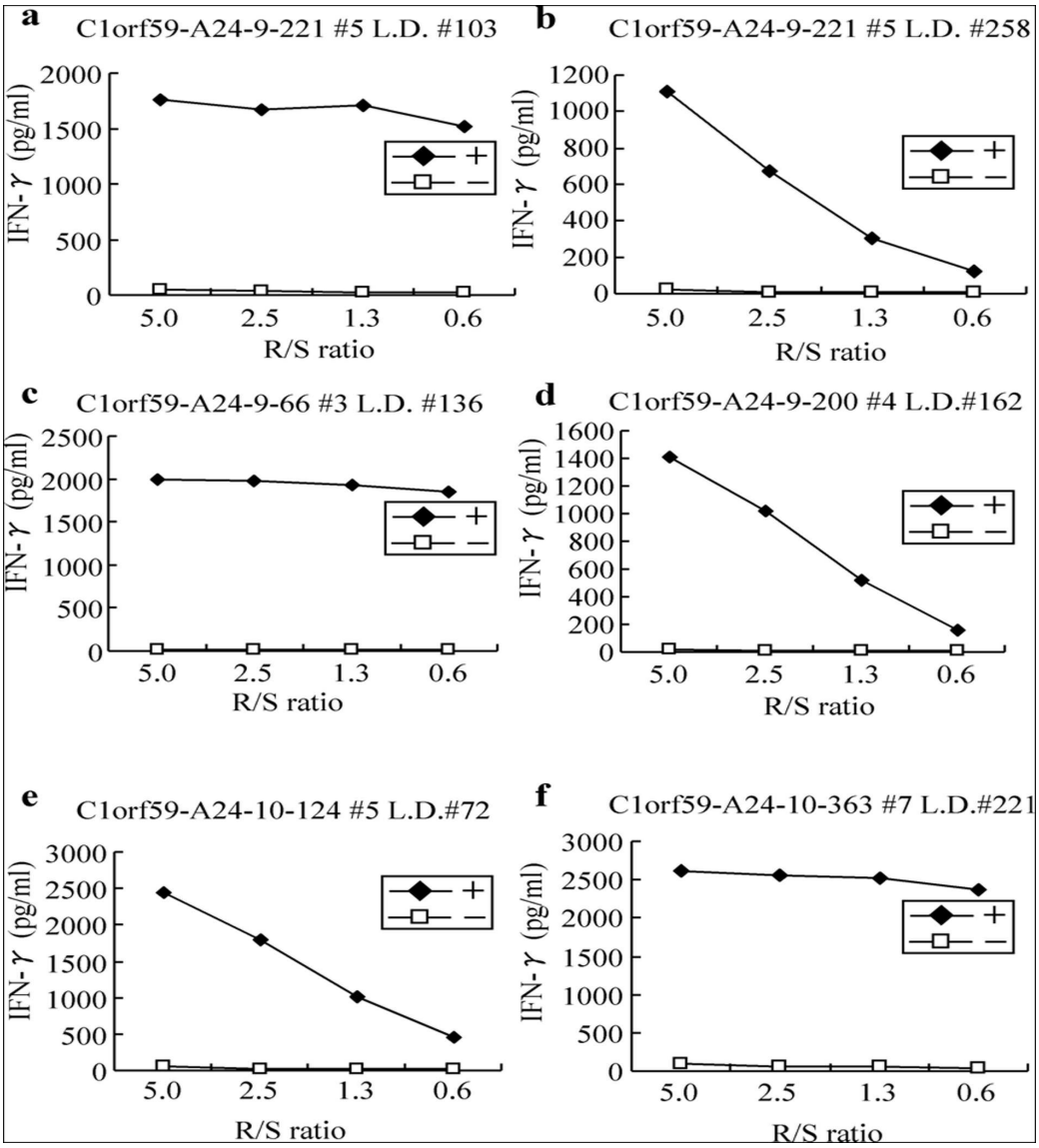
도면5


C1orf59-A24-9-221
a
C1orf59-A24-9-66
b
C1orf59-A24-9-200
c
C1orf59-A24-10-124
d
C1orf59-A24-10-363
e
+
−
1
2
3
4
5
6
7
8
TNTC

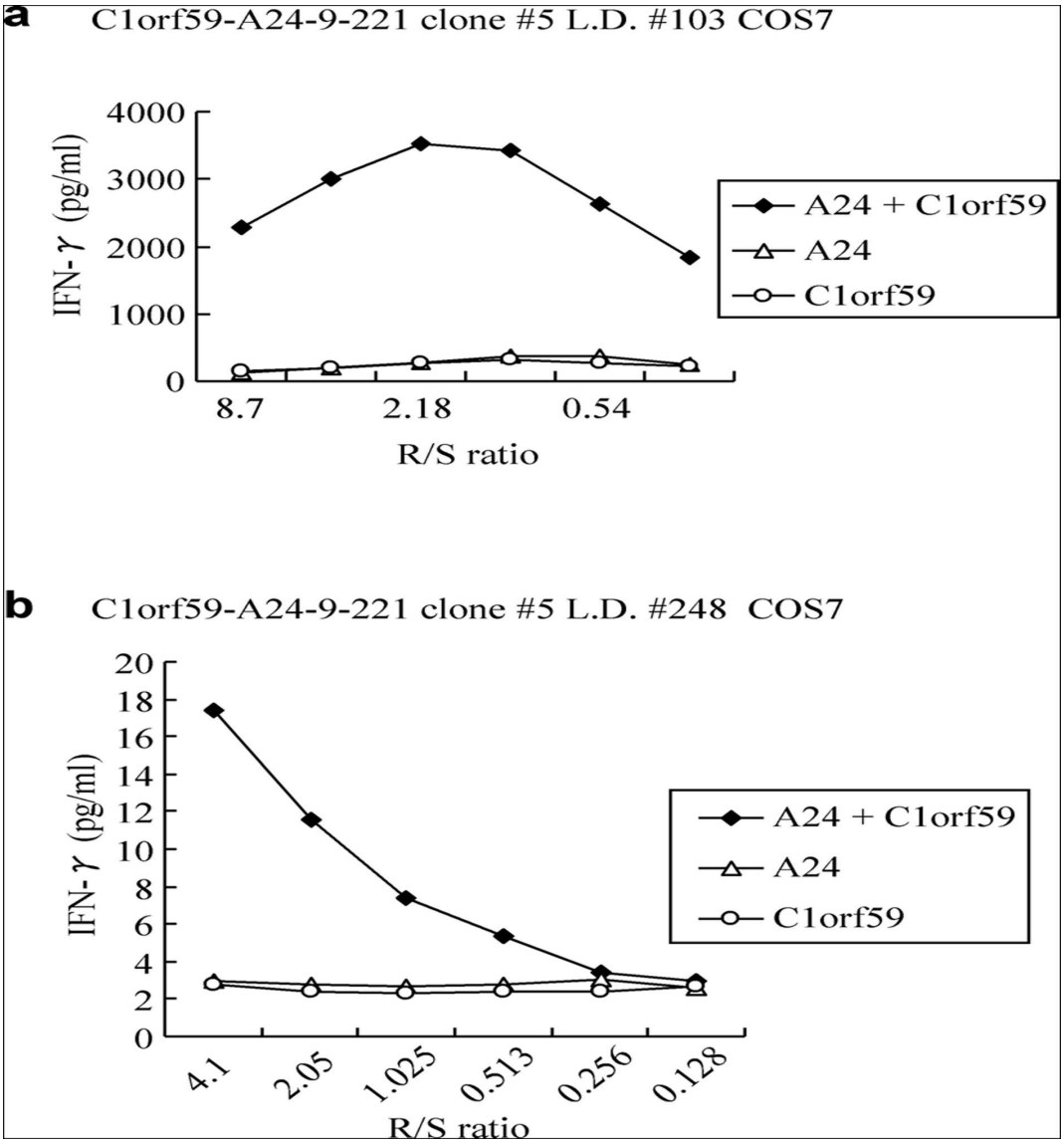
도면6


a
C1orf59-A24-9-221 #5
IFN-γ (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
b
C1orf59-A24-9-66 #3
IFN-γ (pg/ml)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
c
C1orf59-A24-9-200 #4
IFN-γ (pg/ml)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
d
C1orf59-A24-10-124 #5
IFN-γ (pg/ml)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
e
C1orf59-A24-10-363 #7
IFN-γ (pg/ml)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−

도면7


a
C1orf59-A24-9-221 #5 L.D. #103
IFN-γ (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
b
C1orf59-A24-9-221 #5 L.D. #258
IFN-γ (pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
c
C1orf59-A24-9-66 #3 L.D. #136
IFN-γ (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
d
C1orf59-A24-9-200 #4 L.D.#162
IFN-γ (pg/ml)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
e
C1orf59-A24-10-124 #5 L.D.#72
IFN-γ (pg/ml)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−
f
C1orf59-A24-10-363 #7 L.D.#221
IFN-γ (pg/ml)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
−

도면8



서 열 목 록

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> C1ORF59 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

<130> 11fpi-06-01

<150> JP 2008-327358

<151> 2008-12-24

<150> US 61/145,912

<151> 2009-01-20

<150> PCT/JP2009/006944

<151> 2009-12-17

<160> 47

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 1

Leu Gln Gln Glu Arg Phe Phe Lys Leu

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 2

Phe Cys Val Gly Asp Lys Phe Phe Val

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 3

Tyr Leu Ser Pro Ser Met Ile Val Ile

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 4

Arg Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile Thr

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 5

Leu Val Asn Glu Val Ser Gln Gln Val

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 6

Arg Leu Leu Lys Val Asn Pro Cys Ile

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 7

Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile Thr Cys

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Leu Gln Gln Glu Arg Phe Phe Lys Leu Val

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 9

Cys Leu Ser Glu Gln His Asp Gln His Val

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 10

Ser Leu Gln Gln Glu Arg Phe Phe Lys Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 11

Val Leu Val Asn Glu Val Ser Gln Gln Val

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 12

Leu Leu Ala Tyr Pro Lys Leu Asn Arg Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 13

Ser Leu Ala Pro Phe Leu Gly Asp Phe Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 14

Cys Val Gly Asp Lys Phe Phe Val Pro Leu

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 15

Met Glu Phe Gln Thr Trp Ala Leu Tyr Val

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 16

Arg Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile Thr Cys

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 17

Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile Thr Cys Ile

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 18

Pro Leu Tyr Arg Gln Arg Tyr Gln Phe Val

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 19

Phe Glu Trp Thr Arg Met Glu Phe Gln Thr

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 20

Tyr Val Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Ser Val

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 21

Ser Val Val Asp Gly Asn Phe Glu Glu Val

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 22

Lys Val Asn Pro Cys Ile Glu Leu Leu Val

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 23

Ile Glu Asn Ser Pro Thr Pro Phe Cys Val

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 24

Ala Val Phe Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Leu

1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 25

Asn Tyr Phe Asp Glu Gln Phe Glu Phe

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 26

Gly Tyr Cys Thr Gln Ile Gly Ile Phe

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 27

Lys Phe Phe Val Pro Leu Gln Arg Leu

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 28

Phe Phe Val Pro Leu Gln Arg Leu Leu

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 29

Lys Phe Glu Trp Thr Arg Met Glu Phe

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 30

Arg Tyr Gln Phe Val Lys Asn Leu Val

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 31

Val Phe Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Leu

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 32

Lys Val Asn Pro Cys Ile Glu Leu Leu

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 33

Phe Pro Glu Val Val Phe Gly Tyr Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 34

Arg Tyr Asp Tyr Ser Val Glu Phe Thr

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 35

Ser Tyr Pro Ser Leu Gln Gln Glu Arg Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 36

Arg Phe Pro Glu Val Val Phe Gly Tyr Leu

1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 37

Gly Tyr Leu Phe Pro Ser Met Ile Val Ile

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 38

Lys Phe Phe Val Pro Leu Gln Arg Leu Leu

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 39

Asp Phe Leu Lys Pro Arg Asp Leu Asn Leu

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 40

Gly Phe Asp Leu Ile Thr Cys Ile Glu Leu

1 5 10

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized peptide sequence

<400> 41

Arg Ser Val Ile Ala Asp Ser Ile Pro Leu

1 5 10

<210> 42

<211> 1890

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

gtttttaggc ctttgccacg cctcgggagc gccacgaact caacagccgc ccaagccgcc 60

ttccggctcg cggtctgcgg acgcgctcgg agttgggggc cttcgccaac agctgccgta 120

ccgtgccgcg tcgcagccgc acgctagcgg ggtcaacggc gcggcaggcg caggggtcct 180

cgccaaggtt cggaagagga ccttgaaaat ggcttctggg catgcgccac agcggccgtt 240

acgagacgca aaaccgacgc cttggaactg agagcctaga gggacggagc tcggcgcacc 300

atgaggctcc cggggcccaa ggccgaccgt gagagcgcac gagctgagtc agtgctgatt 360

ctctcaaata gagcttgaag gataaatctt cattttgtt tcaacaaaac ttcgaaacaa 420

aatggaagaa aataatctac agtgcagtag tgtggttgac ggtaattttg aagaagttcc 480

cagggagacg gcaattcagt ttaaacctcc actatacaga cagcggtacc agttcgttaa 540

aaatttagtg gatcaacatg agcctaagaa ggttgcagac ctgggatgtg gtgatacttc 600

actcttaagg ctgctaaaag tcaatccatg cattgaattg cttgttggag tagatattaa 660

tgaggataaa ttacgatgga gaggggattc gttagctcct ttcctggggg attttctgaa 720

acctcgggat ctgaatttga ccatcacatt gtatcatggc tccgttgtgg agagagactc 780

tcgtttgctt ggatttgact tgataacgtg tattgaatta atagaacatt tggattcagg 840

tgatctggcc agatttcctg aagtggtatt tgggtacctg tctccatcca tgattgtcat 900

cagcacacca aactctgaat tcaatcccct gtttccatca gtgaccttaa gagattcaga 960

tcataaattt gagtggacca gaatggagtt tcagacctgg gctttatatg tggcaaatcg 1020

ctatgattac tctgtggagt ttactggtgt cggggaacca ccagctggag ctgagaatgt 1080

tggatactgt acccagatag gaatcttccg gaaaaatgga ggaaaggcaa cagaatcatg 1140

tctttcagag cagcatgatc agcatgttta taaagctgtt tttaccacct catacccaag 1200

cttacagcag gaaaggttct ttaaacttgt gttggttaat gaggtgtccc aacaagtgga 1260

aagcttaaga gtgagccacc tgccaaggcg gaaagaacag gctggggaac ggggtgataa 1320

gcccaaagac attggtggct caaaggcccc tgtcccatgc tttggaccag tcttcacaga 1380

ggttgagaag gccaagatag agaactctcc cacacccttc tgtgttggag ataaattttt 1440

cgtacctctg cagagactcc ttgcgtatcc caagttgaac cgcttatgtg ctaatgaaga 1500

gatgatgaga tcagtcattg ctgactcaat tcctctgagc agtgatggtt ctgcagtggt 1560

ggctgacctg cgtaattatt ttgatgaaca gtttgagttt tgaaccatgt ttatttcctg 1620

aaatttcagg gtctcagcga tagttgtgct cacttagaat ttagtttttt ttgtgtaatc 1680

ctaattcaag taatgttttt aaagtttcac tgcaaaagtc tatgttccaa gccattggac 1740

agacctgctt gagatatggc cagactgcag tgagccctga gaaagatatg agggtttaaa 1800

acgggtgctt tcctttgatt ttggactttt ttgttttctc aagaataaag aagttggatg 1860

tggtaatatg ttaattttga aaaaaaaaaa 1890

<210> 43

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Glu Glu Asn Asn Leu Gln Cys Ser Ser Val Val Asp Gly Asn Phe
1 5 10 15

Glu Glu Val Pro Arg Glu Thr Ala Ile Gln Phe Lys Pro Pro Leu Tyr
20 25 30

Arg Gln Arg Tyr Gln Phe Val Lys Asn Leu Val Asp Gln His Glu Pro
35 40 45

Lys Lys Val Ala Asp Leu Gly Cys Gly Asp Thr Ser Leu Leu Arg Leu
50 55 60

Leu Lys Val Asn Pro Cys Ile Glu Leu Leu Val Gly Val Asp Ile Asn
65 70 75 80

Glu Asp Lys Leu Arg Trp Arg Gly Asp Ser Leu Ala Pro Phe Leu Gly

85 90 95

Asp Phe Leu Lys Pro Arg Asp Leu Asn Leu Thr Ile Thr Leu Tyr His
100 105 110

Gly Ser Val Val Glu Arg Asp Ser Arg Leu Leu Gly Phe Asp Leu Ile
115 120 125

Thr Cys Ile Glu Leu Ile Glu His Leu Asp Ser Gly Asp Leu Ala Arg
130 135 140

Phe Pro Glu Val Val Phe Gly Tyr Leu Ser Pro Ser Met Ile Val Ile
145 150 155 160

Ser Thr Pro Asn Ser Glu Phe Asn Pro Leu Phe Pro Ser Val Thr Leu

165 170 175

Arg Asp Ser Asp His Lys Phe Glu Trp Thr Arg Met Glu Phe Gln Thr

180 185 190

Trp Ala Leu Tyr Val Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Ser Val Glu Phe Thr

195 200 205

Gly Val Gly Glu Pro Pro Ala Gly Ala Glu Asn Val Gly Tyr Cys Thr

210 215 220

Gln Ile Gly Ile Phe Arg Lys Asn Gly Gly Lys Ala Thr Glu Ser Cys

225 230 235 240

Leu Ser Glu Gln His Asp Gln His Val Tyr Lys Ala Val Phe Thr Thr

245 250 255

Ser Tyr Pro Ser Leu Gln Gln Glu Arg Phe Phe Lys Leu Val Leu Val

260 265 270

Asn Glu Val Ser Gln Gln Val Glu Ser Leu Arg Val Ser His Leu Pro

275 280 285

Arg Arg Lys Glu Gln Ala Gly Glu Arg Gly Asp Lys Pro Lys Asp Ile

290 295 300

Gly Gly Ser Lys Ala Pro Val Pro Cys Phe Gly Pro Val Phe Thr Glu

305 310 315 320

Val Glu Lys Ala Lys Ile Glu Asn Ser Pro Thr Pro Phe Cys Val Gly

325 330 335

Asp Lys Phe Phe Val Pro Leu Gln Arg Leu Leu Ala Tyr Pro Lys Leu

340 345 350

Asn Arg Leu Cys Ala Asn Glu Glu Met Met Arg Ser Val Ile Ala Asp

355 360 365

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

370 375 380

Asn Tyr Phe Asp Glu Gln Phe Glu Phe

385 390

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence sequence

<400> 44

gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence sequence

<400> 45

tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3-TRbeta-C1

<400> 46

tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence sequence

<400> 47

ctagcctctg gaatcctttc tctt 24